

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7162895号

(P7162895)

(45)発行日 令和4年10月31日(2022.10.31)

(24)登録日 令和4年10月21日(2022.10.21)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 35/17 (2015.01)

A 6 1 K

35/17

Z Z N A

A 6 1 K 31/7105(2006.01)

A 6 1 K

31/7105

A 6 1 P 31/18 (2006.01)

A 6 1 P

31/18

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P

43/00

1 0 5

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N

5/10

請求項の数 34 (全126頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-500423(P2019-500423)

(86)(22)出願日 平成29年7月7日(2017.7.7)

(65)公表番号 特表2019-525914(P2019-525914 A)

(43)公表日 令和1年9月12日(2019.9.12)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/041168

(87)国際公開番号 WO2018/009847

(87)国際公開日 平成30年1月11日(2018.1.11)

審査請求日 令和2年5月20日(2020.5.20)

(31)優先権主張番号 62/385,864

(32)優先日 平成28年9月9日(2016.9.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/409,270

(32)優先日 平成28年10月17日(2016.10.17)

最終頁に続く

(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 20850, ロックビル, キー ウェスト アベニュー 9713, フィフス フロア

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 HIV予備免疫化および免疫療法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

HIVに感染した細胞を処置する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(PBMC)を含む組成物であって、前記形質導入されたPBMCは、

(a) HIVに感染した被験体からPBMCを得るステップであって、前記被験体が、治療有効量のHIV特異的CD4+T細胞の集団を濃縮する第1の刺激剤で過去に免疫化されている、ステップと、

(b) 前記PBMCを、治療有効量のHIV特異的CD4+T細胞の集団を濃縮する第2の刺激剤と接触させる、または接触させたステップであって、前記接触がex vivoで行われる、ステップと、

(c) ex vivoにおいて、前記PBMCからHIV特異的CD4+T細胞を陽性選択する、または陽性選択したステップと、

(d) ex vivoにおいて、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達系を用いて前記PBMCに形質導入する、または形質導入したステップであって、少なくとも1つのコードされる遺伝子エレメントが、

配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有する配列；あるいは

(i) 配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する配列、および、(ii) 配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有する配列と、配列番号111と少なくとも90%の配列同一性を有する配列；あるいは

以下、(iii) マイクロRNA骨格に組み込まれた配列番号97と少なくとも90%

の配列同一性を含む配列、(i v) マイクロRNA骨格に組み込まれた配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を含む配列、および(v) マイクロRNA骨格に組み込まれた配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を含む配列の全てを含む、ステップであって、

ここで、前記少なくとも1つの遺伝子エレメントは、発現した場合、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害すること、ならびに、HIV Vif配列およびHIV Tat配列をターゲティングすることができる、ステップと、

(e) 少なくとも1日間にわたって、前記形質導入されたPBMCを培養する、または培養したステップ

とを含む、方法によって産生される、組成物。

10

【請求項2】

前記HIV特異的CD4+T細胞が、前記PBMCから少なくとも1つの物理的選択方法を使用して陽性選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記形質導入されたPBMCが、約1～約35日間までにわたって培養される、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

被験体に注入される、または注入されたことを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

前記被験体がヒトである、請求項4に記載の組成物。

20

【請求項6】

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

【請求項7】

前記ペプチドがgagペプチドを含む、請求項6に記載の組成物。

【請求項8】

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

【請求項9】

前記ワクチンがHIVワクチンを含む、請求項8に記載の組成物。

30

【請求項10】

前記HIVワクチンが、MVA/HIV62Bワクチンまたはそのバリエーションを含む、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

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

【請求項12】

前記ウイルス送達系がレンチウイルス粒子を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項13】

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、発現した場合にHIV RNA配列をターゲティングすることができる、請求項1に記載の組成物。

40

【請求項14】

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、配列番号31、配列番号1または配列番号97のいずれか1つを含む場合、前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、発現した場合にケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができる、請求項13に記載の組成物。

【請求項15】

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

【請求項16】

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、マイクロRNAクラスターを含む、請求項

50

15 に記載の組成物。

【請求項17】

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1、配列番号2および配列番号111の少なくとも2つ；または
配列番号97、配列番号6および配列番号7の各々
を含む、請求項16に記載の組成物。

【請求項18】

被験体においてHIV感染を処置する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（PBMC）を含む組成物であって、前記形質導入されたPBMCが、

（a）前記被験体から白血球を取り出す、または取り出したステップであって、前記被験体が、治療有効量のHIV特異的CD4+T細胞の集団を濃縮する第1の刺激剤で過去に免疫化されているステップと、

（b）前記白血球からPBMCをex vivoで精製する、または精製したステップと、

（c）前記PBMCからHIV特異的CD4+T細胞を陽性選択する、または陽性選択したステップと、

（d）前記PBMCを治療有効量のHIV特異的CD4+T細胞の集団を濃縮する第2の刺激剤とex vivoで接触させる、または接触させたステップと、

（e）少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達系を用いて前記PBMCにex vivoで形質導入する、または形質導入したステップであって、前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、

配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有する配列；あるいは

（i）配列番号1と少なくとも90%の配列同一性を有する配列、および、（ii）配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を有する配列と、配列番号111と少なくとも90%の配列同一性を有する配列；あるいは

以下、（iii）マイクロRNA骨格に組み込まれた配列番号97と少なくとも90%の配列同一性を有する配列、（iv）マイクロRNA骨格に組み込まれた配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を有する配列、および（v）マイクロRNA骨格に組み込まれた配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を有する配列の全て

を含む、ステップであって、

ここで、前記少なくとも1つの遺伝子エレメントは、発現した場合、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害すること、ならびに、HIV Vif配列およびHIV Tat配列をターゲティングすることができる、ステップと、

（f）少なくとも1日間にわたって、形質導入された前記PBMCを培養する、または培養したステップ

とを含む、方法によって産生される、組成物。

【請求項19】

前記HIV特異的CD4+T細胞が、前記PBMCから少なくとも1つの物理的選択方法を使用して陽性選択される、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

前記形質導入されたPBMCが、約1～約35日間までにわたって培養される、請求項18に記載の組成物。

【請求項21】

前記被験体に注入される、または注入されたことを特徴とする、請求項18に記載の組成物。

【請求項22】

前記被験体がヒトである、請求項18～21のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項23】

前記第1の刺激剤および前記第2の刺激剤の少なくとも1つがペプチドを含む、請求項18に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 24】

前記ペプチドが g a g ペプチドを含む、請求項 23 に記載の組成物。

【請求項 25】

前記第 1 の刺激剤および前記第 2 の刺激剤の少なくとも 1 つが、ワクチンを含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記ワクチンが HIV ワクチンを含む、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

前記 HIV ワクチンが、MVA / HIV 62 B ワクチンまたはそのバリエーションを含む、請求項 26 に記載の組成物。

10

【請求項 28】

前記第 1 の刺激剤および前記第 2 の刺激剤が同じである、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 29】

前記ウイルス送達系がレンチウイルス粒子を含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 30】

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、HIV RNA 配列をターゲティングすることができる少なくとも 1 つの低分子 RNA を含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 31】

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、配列番号 31、配列番号 1 または配列番号 97 のいずれか 1 つを含む場合、前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体 CCR5 の産生を阻害することができる低分子 RNA も含む、請求項 30 に記載の組成物。

20

【請求項 32】

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、マイクロ RNA または shRNA を含む、請求項 30 または 31 に記載の組成物。

【請求項 33】

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、マイクロ RNA クラスターを含む、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 34】

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 1、配列番号 2 および配列番号 111 の少なくとも 2 つ；または
配列番号 97、配列番号 6 および配列番号 7 の各々
を含む、請求項 33 に記載の組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、「HIV PRE-IMMUNIZATION AND IMMUNOTHERAPY」との表題の 2016 年 7 月 8 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 360, 185 号、「HIV PRE-IMMUNIZATION AND IMMUNOTHERAPY」との表題の 2016 年 9 月 9 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 385, 864 号、「HIV PRE-IMMUNIZATION AND IMMUNOTHERAPY」との表題の 2016 年 10 月 17 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 409, 270 号および「HIV PRE-IMMUNIZATION AND IMMUNOTHERAPY」との表題の 2017 年 1 月 11 日に出願された PCT / US 17 / 13019 号（これらの開示は、参考として本明細書に援用される）に対する優先権を主張する。

40

【0002】

本発明は、概して、HIV の処置および防止のための免疫化および免疫療法の分野に関する。特に、開示されている方法は、機能的治癒を求める HIV + の個体から白血球を得

50

て処理し、そのようなHIV+の個体に注入するのに好適な細胞産物を調製することに関する。

【背景技術】

【0003】

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

10

【0004】

免疫系がHIV複製の制限において通常は不十分であるとはいえ主要な役割を果たすことを示すデータの出現により、HIV感染のための免疫療法には強い関心が寄せられている。細胞溶解性T細胞 (CTL) の機能の維持に重要であるウイルス特異的Tヘルパー細胞が一定の役割を果たしている可能性が高い。ウイルス血症も中和抗体に影響されるが、これらは概してHIV感染における重要性が低く、in vivoで進化するウイルスバリエーションに後れを取る。

【0005】

まとめると、これらのデータは、HIV特異的細胞性免疫応答の強度および幅の増加は、いわゆるHIV免疫療法による臨床的有用性を有し得ることを示す。いくつかの研究においてHIVに対するワクチンが試験されたが、今日まで十分な成功を収めていない。さらに、遺伝子療法技術を利用することによるHIV免疫療法の強化に関心が示されているが、他の免疫療法のアプローチと同じく、十分な成功を収めていない。

20

【0006】

ウイルスベクターは、特異的なウイルスと宿主細胞の相互作用および治療用遺伝子構築物の発現についての機構のために、標的細胞に遺伝子を形質導入するために使用され得る。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を含む多くの異なる細胞型、ならびに胚、受精卵、単離組織試料、in situの組織標的および培養細胞に遺伝子を移入するためのビヒクルとして使用されてきた。外来遺伝子または変更した遺伝子を細胞に導入し発現させる能力は、遺伝子療法、誘導多能性幹細胞の体細胞リプログラミング、および様々なタイプの免疫療法などの治療介入に有用である。

30

【0007】

遺伝子療法は、ウイルスベクターの使用を伴い得る新しい治療薬を作り出す可能性のある、生物医学研究の中で最も成熟した分野のうちの1つである。療法に利用可能な多種多様な可能性のある遺伝子を考慮すると、感染性および非感染性疾患を処置する手段としての遺伝子療法の期待に応えるためには、これらの遺伝子を送達する効率的な手段が必要である。マウスのレトロウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス (アデノ随伴ウイルス)、コクサッキーウイルス、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系が、治療用の遺伝子移入ベクターとして提唱されてきた。

40

【0008】

ウイルスベクターを開発する際には、組織向性、ウイルス調製物の安定性、発現の安定性および制御、ゲノムのパッケージング容量、構築物依存性ベクター安定性、ならびに所望の結果が宿主ゲノムへの安定な遺伝子組み込みを有するべきかどうかを含め、考慮しなければならない多くの要因がある。加えて、ウイルスベクターのin vivoでの適用は、ウイルス構造タンパク質および／または形質導入された遺伝子産物に対する宿主免疫応答によって限定されることが多い。

【0009】

このように、毒性および安全性が、被験体の処置のためにウイルスベクターをin vivoで使用するために克服しなければならない主なハードルである。ヒトにおける遺伝

50

子療法の適用においては、遺伝子送達ビヒクルまたは治療用遺伝子産物に対する宿主免疫応答に関連する問題に直面した歴史的な例が多数存在する。いくつかのウイルス遺伝子を1つまたは複数の治療用遺伝子と併せて共形質導入 (co-transduce) するウイルスベクター (例えば、アデノウイルス) には特に問題がある。

【0010】

レンチウイルスベクターは概して細胞傷害を誘導せず、強力な宿主免疫応答を誘発しないものの、いくつかの免疫刺激性遺伝子産物をコードするHIV-1などの一部のレンチウイルスベクターは、*in vivo*で細胞傷害をもたらす、強力な免疫応答を誘導する可能性を有する。しかしながら、形質導入後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関しては、これは懸念事項にならない場合がある。当然ながら、これは常に当てはまるとは限らない。というのも、場合により、ベクターの目的は、臨床的に有用な免疫応答を誘起するタンパク質をコードすることであるからである。

【0011】

レンチウイルスベクターの使用に関する別の重要な問題は、一部の細胞傷害性ウイルスタンパク質に曝露された際の細胞変性の可能性の問題である。ある特定のHIV-1タンパク質への曝露は、T細胞の細胞死または機能的無反応性を誘導し得る。同様に、多くの場合、組換えにより複製可能な毒性ウイルスが発生する可能性が懸念される。したがって、改善されたHIV処置が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

一態様では、HIVに感染した細胞を処置する方法が提供される。本方法は、*ex vivo*で行われる、HIVに感染した被験体から単離された末梢血単核細胞 (PBMC) を治療有効量の刺激剤と接触させるステップと、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達系をPBMCに*ex vivo*で形質導入するステップと、適度な形質導入を確実にするために十分な期間にわたって、形質導入されたPBMCを培養するステップとを様々に含む。諸実施形態では、形質導入されたPBMCは約1～約35日間培養される。諸実施形態では、本方法は、形質導入されたPBMCを被験体に注入するステップをさらに含む。諸実施形態では、本方法は、PBMCからHIV特異的CD4+T細胞を陽性選択する (*positively selecting*) ステップをさらに含む。さらなる実施形態では、HIV特異的CD4+T細胞は、少なくとも1つの物理的選択方法を使用して陽性選択される。諸実施形態では、被験体はヒトである。諸実施形態では、刺激剤は、被験体においてT細胞応答を刺激するのに好適な任意の薬剤を含む。諸実施形態では、刺激剤は、ペプチドまたはペプチドの混合物であり、また諸実施形態では、*gag* ペプチドを含む。さらなる実施形態では、刺激剤はワクチンである。諸実施形態では、ワクチンはHIVワクチンであり、諸実施形態では、HIVワクチンは、MVA/HIV62Bワクチンまたはそのバリエーションである。諸実施形態では、ウイルス送達系はレンチウイルス粒子を含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができる低分子RNA (*small RNA*) を含む。さらなる実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、HIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAを含む。さらなる実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができる低分子RNAと、HIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAとを含む。HIV RNA配列は、ウイルス送達系によるターゲティングに好適な任意のHIV配列を含む。諸実施形態では、HIV RNA配列は、HIV *Vif* 配列、HIV *Tat* 配列、またはそれらのバリエーションのうちの1つまたは複数を含む。少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ウイルス送達系により発現させることができる任意の遺伝子エレメントを含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロRNAまたは*shRNA*を含む。さらなる実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロRNAクラスターを含む。

10

20

30

40

50

【0013】

別の態様では、H I V + の個体から末梢血を得るステップと；血液を分画してP B M C 集団を得るステップと；P B M C 集団を精製された抗原提示細胞またはH I V の成分を代表するペプチドもしくはタンパク質と接触させるステップと；接触させたP B M C 集団を約1～約35日間培養して抗原特異的T細胞の数を増加させるステップと；ペプチド刺激に応答する細胞を陽性選択して、濃縮された細胞画分を生成するステップと；本明細書で詳述されるウイルス送達系を濃縮された細胞画分にe x v i v o で形質導入するステップと、適度な形質導入を確実にするために十分な期間にわたって、形質導入された細胞の画分を培養するステップとを含む方法が開示される。本明細書に開示される方法ステップの順序は変更してよい。非限定的な例として、細胞を陽性選択するステップおよび細胞に形質導入するステップを逆転させてもよく、形質導入効率を改善するためにポリクローナル刺激を追加してもよい。

10

【0014】

諸実施形態では、P B M C 集団をさらに精製して、P B M C の精製画分を生成する。諸実施形態では、P B M C のさらに精製した画分を、H I V の成分を代表するペプチドまたはタンパク質と接触させる。

【0015】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、
AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCA
CAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT
(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%のパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは配列番号1を含む。

【0016】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、
CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATC
TCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA (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%のパーセント同一性、または
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG
TCCCCCTCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC
G (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%のパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、
配列番号2；または配列番号3
を含む。

【0017】

40

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、
AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCA
CAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT
CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGT
TGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAG
CGTGGTCCCCCTCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCT
TCGTC (配列番号31)

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%のパーセント同一性を有する配列を含む。諸実施形態では、マイクロRNAク

50

ラスターは、配列番号 31 を含む。

【0018】

別の態様では、被験体において HIV 感染を処置する方法が開示される。本方法は、有効量の第 1 の刺激剤で被験体を免疫化するステップと、被験体から白血球を取り出し、末梢血単核細胞 (P B M C) を得るステップとを様々に含む。本方法は、P B M C を治療有効量の第 2 の刺激剤と *ex vivo* で接触させるステップと、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達系を P B M C に *ex vivo* で形質導入するステップと、適度な形質導入を確実にするために十分な期間にわたって、形質導入された P B M C を培養するステップとをさらに含む。諸実施形態では、形質導入された P B M C は約 1 ~ 約 35 日間培養され得る。諸実施形態では、本方法は、P B M C から HIV 特異的 C D 4 + T 細胞を陽性選択するステップをさらに含む。さらなる実施形態では、HIV 特異的 C D 4 + T 細胞は、少なくとも 1 つの物理的選択方法を使用して陽性選択される。諸実施形態では、本方法は、形質導入された P B M C を被験体に注入するステップをさらに伴う。被験体はヒトであり得る。第 1 および第 2 の刺激剤は、同じであっても異なってもよい。第 1 および第 2 の刺激剤は、ペプチドまたはペプチドの混合物のうちの 1 つまたは複数を含み得る。諸実施形態では、第 1 および第 2 の刺激剤のうちの少なくとも 1 つが、*g a g* ペプチドを含む。諸実施形態では、第 1 および第 2 の刺激剤のうちの少なくとも 1 つは、P B M C 中または P B M C の精製画分中に存在する免疫細胞によって認識される *g a g* ペプチドの混合物を含む。第 1 および第 2 の刺激剤のうちの少なくとも 1 つは、ワクチンを含み得る。諸実施形態では、ワクチンは HIV ワクチンであり、さらなる実施形態では、HIV ワクチンは、M V A / H I V 62 B ワクチンまたはそのバリエーションである。諸実施形態では、ウイルス送達系はレンチウイルス粒子を含む。諸実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができる低分子 RNA を含む。諸実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、H I V RNA 配列をターゲティングすることができる少なくとも 1 つの低分子 RNA を含む。諸実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができる低分子 RNA と、H I V RNA 配列をターゲティングすることができる少なくとも 1 つの低分子 RNA とを含む。H I V RNA 配列は、H I V V i f 配列、H I V T a t 配列、またはそれらのバリエーションを含み得る。少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、マイクロ RNA または s h RNA を含み得る。諸実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、単一の転写プロモーターの制御下におけるクラスター内のすべてのエレメントの同時発現のためにデザインされた合成マイクロ RNA クラスターを含む。諸実施形態では、P B M C 集団をさらに精製して、P B M C の精製画分を生成する。

【0019】

別の態様では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、
AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCA
CAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT
(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% のパーセント同一性を有するマイクロ RNA を含む。諸実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、配列番号 1 を含む。

【0020】

別の態様では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、
CATCTCCATGGCTGTACACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATC
TCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA (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% のパーセント同一性、または
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG

TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC
G (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% のパーセント同一性を有するマイクロ RNA を含む。諸実施形態では、
少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、配列番号 2; または配列番号 3 を含む。

【0021】

別の態様では、マイクロ RNA クラスターは、

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCA
CAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT
CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACACCTTGTGCGGGGGATGTGTACTTCTGAAGTTGTGT
TGAATCTCATGGAGTTTCAAGAAGACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAG
CGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCT
TCGTC (配列番号 31)

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% のパーセント同一性を有する配列を含む。諸実施形態では、マイクロ RNA ク
ラスターは、配列番号 31 を含む。

【0022】

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子エレメントを含み、少なくとも 1 つのコードされた遺
伝子エレメントは、ケモカイン受容体 CCR5 の産生を阻害することができる低分子 RNA
を含む。少なくとも 1 つのコードされた遺伝子エレメントは、HIV RNA 配列をター
ゲティングすることができる少なくとも 1 つの低分子 RNA を含んでもよい。別の態様
では、少なくとも 1 つのコードされた遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体 CCR5 の
産生を阻害することができる低分子 RNA と、HIV RNA 配列をターゲティングする
ことができる少なくとも 1 つの低分子 RNA とを含む。HIV RNA 配列は、HIV V
if 配列、HIV Tat 配列、またはそれらのバリエーションを含み得る。少なくとも 1 つ
のコードされた遺伝子エレメントは、マイクロ RNA または shRNA を含み得る。少な
くとも 1 つのコードされる遺伝子エレメントは、単一の転写プロモーターの制御下にお
けるクラスター内のすべてのエレメントの同時発現のためにデザインされた合成マイクロ R
NA クラスターを含み得る。

【0023】

別の態様では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCA
CAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT
(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% のパーセント同一性を有するマイクロ RNA を含む。諸実施形態では、少なく
とも 1 つの遺伝子エレメントは、配列番号 1 を含む。

【0024】

別の態様では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、

CATCTCCATGGCTGTACACCTTGTGCGGGGGATGTGTACTTCTGAAGTTGTGTTGAATC
TCATGGAGTTTCAAGAAGACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA (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% のパーセント同一性、または

GGGCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG
TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC
G (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%のパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号2;または配列番号3を含む。

【0025】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、
AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCA
CAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT
CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGCGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGT
TGAATCTCATGGAGTTTCAAGAAGACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAG
CGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCT
TCGTC (配列番号31)

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%のパーセント同一性を有する配列を含む。諸実施形態では、マイクロRNAクラスターは、配列番号31を含む。

【0026】

別の態様では、レンチウイルス粒子を発現させるためのレンチウイルスベクター系が開示される。この系は、本明細書に記載されるレンチウイルスベクターと、好ましくは細胞に感染するように最適化されたエンベロープタンパク質を発現させるためのエンベローププラスミドと、目的の遺伝子を発現させるための少なくとも1つのヘルパープラスミドとを含む。諸実施形態では、目的の遺伝子は、gag、pol、およびrev遺伝子のうちの1つまたは複数を含む。諸実施形態では、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って産生される。諸実施形態では、レンチウイルス粒子は、目的の標的の産生を調整することができる。諸実施形態では、目的の標的は、ケモカイン受容体CCR5またはHIV RNA配列のうちのいずれかである。この系は、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よい。諸実施形態では、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。

【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ように最適化されたエンベロープタンパク質と、本明細書に記載されるレンチウイルスベクターとを含む。諸実施形態では、エンベロープタンパク質は、T細胞に感染するように最適化されていてよい。諸実施形態では、エンベロープタンパク質は、CD4+T細胞に感染するように最適化されている。

【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系に感染することができる任意の細胞を含む。諸実施形態では、細胞は、レンチウイルス粒子に感染したCD4+T細胞である。諸実施形態では、CD4+T細胞はまた、HIV抗原を認識するように選択されたものである。諸実施形態では、HIV抗原は、gag抗原を含む。諸実施形態では、CD4+T細胞は、レンチウイルス粒子に感染した後に低下したレベルのCCR5を発現する。

【0029】

別の態様では、治療処置レジメンのための被験体を選択する方法が提供される。本方法は、有効量の第1の刺激剤で被験体を免疫化するステップと;被験体から白血球を取り出し、末梢血単核細胞(PBMC)を精製し、PBMCに関連する少なくとも1つの因子に関連付けられる第1の定量化可能な測定値を決定するステップと;PBMCを治療有効量の第2の刺激剤とex vivoで接触させ、PBMCに関連する少なくとも1つの因子に関連付けられる第2の測定値を決定するステップとを様々に含み、ここで、第2の定量

化可能な測定値が第1の定量化可能な測定値より高い場合、被験体が処置レジメンのために選択される。少なくとも1つの因子は、T細胞の増殖またはIFNガンマ産生に関連する任意の因子を含み得る。

【0030】

前出の全体的な説明、ならびに以下の図面の簡単な説明および詳細な説明は、例示的かつ説明的なものであり、特許請求され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、および新規の特徴は、以下の図面の簡単な説明および本発明の詳細な説明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* 処置方法のフロー図を示す。

【0032】

【図2】図2は、本開示に従うCD4+T細胞の変更および新しい感染の防止を示す。

【0033】

【図3】図3は、治療用ベクター、ヘルパープラスミド、およびエンベローププラスミドからなる、例示的なレンチウイルスベクター系を示す。ここで示されている治療用ベクターは、本明細書においてAGT103とも呼ばれる好ましい治療用ベクターであり、miR30CCR5-miR21Vif-miR185-Tatを含有する。

【0034】

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

【0035】

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

【0036】

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

【0037】

【図7】図7は、例示的なベクター配列を示す。CCR5向性HIV株の伝播を阻害するためのプロモーターおよびmiRクラスターのプラス（すなわち、ゲノム）鎖配列を開発した。下線のない配列は、このmiRクラスターに対して好ましいプロモーターとして選択された転写のEF-1アルファプロモーター（配列番号108）を含む。下線のある配列は、miR30CCR5（配列番号1）、miR21Vif（配列番号2）、およびmiR185Tat（配列番号111）（配列番号33に集合的に示されている）からなるmiRクラスターを示す。

【0038】

【図8】図8は、本開示の様々な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。

【0039】

【図9A】図9は、AGTc120細胞における実験的ベクターによるCCR5のノックダウン、および対応するR5向性HIV感染の防止を示す。（A）AGT103レンチウイルスベクターありまたはなしでのAGTc120細胞におけるCCR5の発現を示す。（B）HIVのNef遺伝子に融合した緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現していたHIVBaL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。

【図9B】同上

【0040】

【図10】図10は、本開示のレンチウイルスベクターにおける、shRNA阻害剤配列によるCCR5発現の調節を実証するデータを示す。（A）潜在的候補のスクリーニングデータが示されている。（B）CCR5shRNA-1（配列番号16）の形質導入後のCCR5ノックダウンデータが示されている。

【0041】

10

20

30

40

50

【図11】図11は、本開示のレンチウイルスベクターにおける、shRNA阻害剤配列によるHIV成分の調節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。

【0042】

【図12】図12は、本明細書に記載されるように、HIV発現プラスミドをトランスフェクトした細胞におけるTatタンパク質の発現をAGT103が低減させることを実証するデータを示す。

【0043】

【図13】図13は、本開示のレンチウイルスベクターにおける、合成マイクロRNA配列によるHIV成分の調節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。

10

【0044】

【図14】図14は、長鎖または短鎖のWPRE配列のいずれかを含有する本開示のレンチウイルスベクターにおける、合成マイクロRNA配列によるCCR5発現の調節を実証するデータを示す。

【0045】

【図15】図15は、長鎖または短鎖のWPRE配列のいずれかを含有する本開示のレンチウイルスベクターにおける、合成マイクロRNA配列によるCCR5発現の調節を実証するデータを示す。

20

【0046】

【図16】図16は、WPRE配列ありまたはなしの本開示のレンチウイルスベクターにおける、合成マイクロRNA配列によるCCR5発現の調節を実証するデータを示す。

【0047】

【図17】図17は、本開示のレンチウイルスベクターにおける、合成マイクロRNA配列を調節するCD4プロモーターによるCCR5発現の調節を実証するデータを示す。

【0048】

【図18】図18は、HIV Gag特異的CD4 T細胞の検出を実証するデータを示す。

【0049】

【図19-1】図19は、HIV特異的なCD4 T細胞の拡大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) 処置の例示的なスケジュールが示されている。(B) 本明細書に記載される、CD4でゲーティングしたT細胞におけるIFNガンマ産生が示されている。(C) 本明細書に記載される、CD4でゲーティングしたT細胞におけるIFNガンマ産生およびGFP発現が示されている。(D) 本明細書に記載されるHIV特異的CD4+T細胞の頻度が示されている。(E) 本明細書に記載されるワクチン接種後、かつex vivoペプチドおよび拡大増殖に続いてのPBMCからのIFNガンマ産生が示されている。

30

【図19-2】同上。

【図19-3】同上。

【図19-4】同上。

40

【図19-5】同上。

【図19-6】同上。

【0050】

同上。

【図20A】図20は、漸増するAGT103-GFPの用量応答およびCCR5発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) 漸増量のAGT103-GFPに関する用量応答データが示されている。(B) CCR5発現という点で正規分布した集団が示されており、集団平均の左へのシフトは、AGT103-GFPの形質導入に起因するCCR5発現の減少を示す。(C) 漸増用量のAGT103-GFPによるCCR5発現の阻害パーセンテージが示されている。

50

【図 20B】 同上。

【図 20C】 同上。

【0051】

【図 21A】 図 21 は、初代ヒト CD4 + T 細胞に対する AGT103 の形質導入効率を実証するデータを示す。(A) 本明細書に記載されるように、形質導入された細胞 (GFP 陽性) の頻度が FACS により示されている。(B) 本明細書に記載される細胞あたりのベクターコピー数が示されている。

【図 21B】 同上。

【0052】

【図 22】 図 22 は、本明細書に記載される、初代 CD4 + T 細胞における HIV 複製の AGT103 阻害を実証するデータを示す。

【0053】

【図 23】 図 23 は、HIV 誘導性枯渇からの初代ヒト CD4 + T 細胞の AGT103 保護を実証するデータを示す。

【0054】

【図 24A】 図 24 は、HIV 特異的な、AGT103 を形質導入した CD4 + T 細胞が高度に濃縮された CD4 + T 細胞集団の生成を実証するデータを示す。(A) 本明細書に記載される細胞集団に関する CD4 および CD8 の発現プロファイルを示す。(B) 本明細書に記載される細胞集団に関する CD4 および CD8 の発現プロファイルを示す。(C) 本明細書に記載される細胞集団に関する IFN ガンマおよび CD4 の発現プロファイルを示す。(D) 本明細書に記載される細胞集団に関する IFN ガンマおよび GFP の発現プロファイルを示す。

【図 24B】 同上。

【図 24C】 同上。

【図 24D】 同上。

【発明を実施するための形態】

【0055】

概説

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

【0056】

本明細書では、治療用ウイルスベクター (例えば、レンチウイルスベクター)、免疫療法、および HIV 感染を処置するためにそれらを使用する方法が開示される。諸実施形態では、HIV 感染の機能的治癒を達成するための方法および組成物が提供される。本明細書の図 1 に示されるように、様々な態様および実施形態は、第 1 の刺激事象、例えば、HIV 感染患者において、例えば HAART の毎日の投与によるウイルス血症の安定な抑制と共に、HIV に対する強力な免疫応答をもたらすことを意図するワクチンを用いた、第 1 の治療的免疫化を含む。諸実施形態では、第 1 の刺激事象により、HIV 特異的 CD4 T 細胞の画分が濃縮される。この後には、(1) 白血球除去または静脈血からの PBMC の精製もしくは PBMC の画分の精製による末梢白血球の単離、(2) 第 2 の刺激事象、例えば、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好適な刺激剤による CD4 + T 細胞の *ex vivo* での刺激、(3) ペプチド刺激への生物学的応答に基づく濃縮された細胞集団の選択、(4) 治療用レンチウイルス形質導入、*ex vivo* の T 細胞培養の実施、および (5) 元の患者への再注入が続く。

【0057】

CD4 + T 細胞などの新しい細胞が HIV に感染することを防止するには、様々な方法および組成物を使用することができる。例えば、図 2 に解説されているように、新しい細胞が感染するのを防止するためには、CCR5 発現をターゲティングしてウイルスの付着

10

20

30

40

50

を防止することができる。さらに、残存するあらゆる感染性ウイルスRNAの破壊をターゲティングすることもできる。前出のことに関し、また本明細書の図2を参照すると、HIVに既に感染している細胞におけるHIVウイルスのサイクルを止める組成物および方法が提供される。HIVウイルスのサイクルを止めるためには、潜伏感染CD4+T細胞などの潜伏感染細胞によって産生されるウイルスRNAをターゲティングする。

【0058】

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

【0059】

定義および解釈

本明細書で別途定義されない限り、本開示との関連で使用される科学および技術用語は、当業者により一般的に理解されている意味を有するものとする。さらに、文脈により別途必要とされない限り、単数形用語は複数形を含み、複数形用語は単数形を含むものとする。概して、本明細書に記載される、細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学ならびにタンパク質および核酸の化学、およびハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法、ならびにこれらの技術は、当技術分野で周知であり一般的に使用されているものである。特記なき限り、本開示の方法および技術は概して、当技術分野で周知であり、かつ本明細書随所で引用され、論じられる様々な一般的参考文献およびより具体的な参考文献に記載されている、従来の方から従って行われる。例えば、Sambrook J.およびRussell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y. (2000年)、Ausubelら、Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology、Wiley, John & Sons, Inc. (2002年)、HarlowおよびLane Using Antibodies: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y. (1998年)、およびColiganら、Short Protocols in Protein Science、Wiley, John & Sons, Inc. (2003年)を参照されたい。任意の酵素反応または精製技術は、製造元の仕様に従って、当技術分野で一般的に実行されるように、または本明細書に記載されるように行われる。本明細書に記載される、分析化学、合成有機化学、ならびに医薬品および製薬化学に関連して使用される命名法、ならびにこれらの検査手技および技術は、当技術分野で周知であり一般的に使用されているものである。

【0060】

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

【0061】

本明細書で使用される場合、活性剤「の投与」または「を投与すること」という用語は、処置を必要とする被験体に、この個体の身体に治療上有用な形態および治療有効量で導入され得る形態で、本発明の活性剤を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る、miR30-CCR5/miR21-Vif/miR185-TatマイクロRNAクラスター配列を含有するレンチウイルスベクターの特定の実施形態を指す。

【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有するレンチウイルスが形質導入された細胞を指す。

【0064】

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

【0065】

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

10

【0066】

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

【0067】

本明細書および特許請求の範囲の全体において、「comprise (含む)」という単語、または「comprises (含む)」もしくは「comprising (含む)」などの変形は、記載された整数または整数群の包含を暗示するが、いかなる他の整数または整数群の除外も暗示するものではないと理解される。さらに、本明細書で使用される場合、「includes (含む)」という用語は、限定することなく含むことを意味する。

20

【0068】

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

30

【0069】

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

【0070】

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

40

【0071】

「HIVワクチン」という用語は、HIV特異的免疫応答を誘発することを意図する、

50

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

【表1-1】

表1

IAVI臨床試験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)
ACTG 326; PACTG 326	ALVAC vCP1452

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

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

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

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

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

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

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

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

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

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

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

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

【0072】

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

【0073】

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

【0074】

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

【0075】

「P B M C」という用語は末梢血単核細胞を指す。

【0076】

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

10

【0077】

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

20

【0078】

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

30

【0079】

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

40

【0080】

本開示の核酸およびタンパク質配列は、公開データベースに対する検索を行うための「

50

クエリー配列」としてさらに使用して、例えば、関連する配列を特定することができる。このような検索は、Altschulら（1990年）、J. Mol. Biol.、215巻：403～104頁のNBLASTおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を使用して行うことができる。NBLASTプログラム、スコア＝100、ワード長＝12を用いてBLASTのヌクレオチド検索を行うと、本発明の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。XBLASTプログラム、スコア＝50、ワード長＝3を用いてBLASTのタンパク質検索を行うと、本発明のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためのギャップありアラインメントを得るためには、Altschulら（1997年）、Nucleic Acids Res.、25巻（17号）：3389～3402頁に記載されているGapped BLASTを利用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する際は、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用してよい。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。

10

【0081】

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

【0082】

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

20

【0083】

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

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。

30

【0084】

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

40

【0085】

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

【0086】

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

50

【0087】

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

【0088】

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

10

【0089】

本明細書で使用される場合、「治療用ベクター」という用語は、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。

【0090】

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

20

【0091】

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

【0092】

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

30

【0093】

本開示の諸態様の説明

本明細書で詳述されるように、一態様では、HIVに感染した細胞を処置する方法が提供される。本方法は、概して、ex vivoで行われる、HIVに感染した被験体から単離された末梢血単核細胞 (PBMC) を治療有効量の刺激剤と接触させるステップと、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達系をPBMCにex vivoで形質導入するステップと、そのような形質導入を達成するために十分な期間にわたって、形質導入されたPBMCを培養するステップとを含む。諸実施形態では、形質導入されたPBMCは約1～約35日間培養される。諸実施形態では、本方法は、形質導入されたPBMCを被験体に注入するステップをさらに含む。諸実施形態では、被験体はヒトである。諸実施形態では、刺激剤は、ペプチドまたはペプチドの混合物であり、また諸実施形態では、gagペプチドを含む。さらなる実施形態では、刺激剤はワクチンを含む。諸実施形態では、ワクチンはHIVワクチンであり、さらなる実施形態では、HIVワクチンは、MVA/HIV62Bワクチンまたはそのバリエーションである。諸実施形態では、ウイルス送達系はレンチウイルス粒子を含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができる低分子RNAを含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、HIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAを含む。他の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができる低分子RNAと、HIV RNA配列をターゲティングすることができる少な

40

50

くとも1つの低分子RNAとを含む。諸実施形態では、HIV RNA配列は、HIV Vif配列、HIV Tat配列、またはそれらのバリエーションを含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロRNAまたはshRNAのうちの少なくとも1つを含む。さらなる実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロRNAクラスターを含む。

【0094】

別の態様では、HIV+の個体から末梢血を得るステップと；血液を分画してPBMC集団を得るステップと；PBMC集団を精製された抗原提示細胞またはHIVの成分を代表するペプチドもしくはタンパク質と接触させるステップと；接触させたPBMC集団を約1～約12日間培養して抗原特異的集団を拡大増殖させるステップと；ペプチド刺激に
10 応答する細胞を陽性選択して、濃縮された細胞画分を生成するステップと；本明細書で詳述されるウイルス送達系を濃縮された細胞画分にex vivoで形質導入するステップと、適度な形質導入を確実にするために十分な期間にわたって、形質導入された細胞の画分を培養するステップとを含む方法が開示される。

【0095】

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

【0096】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号1と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高いパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは配列番号1を含む。
20

【0097】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号2と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、もしくはそれよりも高いパーセント同一性、または配列番号3と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、もしくはそれよりも高いパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号2または配列番号3を含む。
30

【0098】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、配列番号31と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高いパーセント同一性を有する配列を含む。諸実施形態では、マイクロRNAクラスターは、配列番号31を含む。
40

【0099】

別の態様では、被験体においてHIV感染を処置するための細胞産物を製造する方法が開示される。本方法は、概して、血中白血球を得るステップと、被験体から白血球を取り出すステップと、末梢血単核細胞(PBMC)またはPBMCの規定の画分を精製するステップとを含む。本方法は、PBMCまたはPBMCの精製画分を治療有効量の刺激剤と
50

*ex vivo*で接触させるステップと；刺激剤への応答に基づく陽性選択によって抗原特異的T細胞の割合を増やすステップと；少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達系をP B M CまたはP B M Cの精製画分に*ex vivo*で形質導入するステップと；改変細胞集団の形質導入および成長を達成するために十分な期間にわたって、形質導入されたP B M CまたはP B M Cの精製画分を培養するステップとをさらに含む。本方法は、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、またはサイトカイン発現に基づいて抗原特異的細胞を選択すること、または細胞の治療用画分を濃縮するための選択方法の組み合わせによる、P B M Cのさらなる濃縮をさらに含んでよい。諸実施形態では、形質導入されたP B M CまたはP B M Cの精製画分は、約1～約35日間培養される。本方法は、形質導入されたP B M CまたはP B M Cの精製画分を被験体に注入するステップをさらに伴い得る。被験体はヒトであり得る。第1の刺激剤のうちの少なくとも1つは、ペプチドまたはペプチドの混合物を含んでよく、H I Vゲノムによりコードされるタンパク質のうちの1つ、2つ、3つ、またはそれよりも多くを代表してよい。諸実施形態では、第1の刺激剤のうちの少なくとも1つは、g a gペプチドを含む。第1の刺激剤のうちの少なくとも1つは、ワクチンを含んでもよい。諸実施形態では、ワクチンはH I Vワクチンであり、さらなる実施形態では、H I Vワクチンは、M V A / H I V 6 2 Bワクチンまたはそのバリエーションである。諸実施形態では、第1の刺激剤は、g a gペプチドの混合物である。

【0100】

諸実施形態では、ウイルス送達系はレンチウイルス粒子を含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体C C R 5の産生を阻害することができる低分子R N Aを含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、H I V R N A配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子R N Aを含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体C C R 5の産生を阻害することができる低分子R N Aと、H I V R N A配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子R N Aとを含む。H I V R N A配列は、H I V V i f配列、H I V T a t配列、またはそれらのバリエーションを含み得る。少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロR N Aもしくはs h R N A、またはそれらのクラスターを含み得る。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、合成マイクロR N Aクラスターを含む。

【0101】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号1と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高いパーセント同一性を有するマイクロR N Aを含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号1を含む。

【0102】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号2と少なくとも80%、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%のパーセント同一性、または配列番号3と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、もしくはそれよりも高いパーセント同一性を有するマイクロR N Aを含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号2または配列番号3を含む。

【0103】

別の態様では、マイクロR N Aクラスターは、配列番号31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8

5 %、少なくとも86 %、少なくとも87 %、少なくとも88 %、少なくとも89 %、少なくとも90 %、少なくとも91 %、少なくとも92 %、少なくとも93 %、少なくとも94 %、少なくとも95 %、またはそれよりも高いパーセント同一性を有する配列を含む。諸実施形態では、マイクロRNAクラスターは、配列番号31を含む。

【0104】

別の態様では、レンチウイルスベクターが開示される。このレンチウイルスベクターは、少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントを含み、少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができる低分子RNA、またはHIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAを含む。別の態様では、少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができる低分子RNAと、HIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAとを含む、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、またはそれらのバリエーションを含み得る。少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントは、マイクロRNAまたはshRNAを含み得る。少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントは、マイクロRNAクラスターを含み得る。

【0105】

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

【0106】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号2と少なくとも80 %、少なくとも81 %、少なくとも82 %、少なくとも83 %、少なくとも84 %、少なくとも85 %、少なくとも86 %、少なくとも87 %、少なくとも88 %、少なくとも89 %、少なくとも90 %、少なくとも91 %、少なくとも92 %、少なくとも93 %、少なくとも94 %、少なくとも95 %、もしくはそれよりも高いパーセント同一性、または配列番号3と少なくとも80 %、少なくとも81 %、少なくとも82 %、少なくとも83 %、少なくとも84 %、少なくとも85 %、少なくとも86 %、少なくとも87 %、少なくとも88 %、少なくとも89 %、少なくとも90 %、少なくとも91 %、少なくとも92 %、少なくとも93 %、少なくとも94 %、少なくとも95 %、もしくはそれよりも高いパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号2または配列番号3を含む。

【0107】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、配列番号31と少なくとも80 %、少なくとも81 %、少なくとも82 %、少なくとも83 %、少なくとも84 %、少なくとも85 %、少なくとも86 %、少なくとも87 %、少なくとも88 %、少なくとも89 %、少なくとも90 %、少なくとも91 %、少なくとも92 %、少なくとも93 %、少なくとも94 %、少なくとも95 %、またはそれよりも高いパーセント同一性を有する配列を含む。諸実施形態では、マイクロRNAクラスターは、配列番号31を含む。

【0108】

別の態様では、レンチウイルス粒子を発現させるためのレンチウイルスベクター系が提供される。この系は、本明細書に記載されるレンチウイルスベクターと；好ましくは細胞に感染するように最適化されたエンベロープタンパク質を発現させるための少なくとも1つのエンベローププラスミドと；目的の遺伝子、例えばgag、pol、およびrev遺伝子のいずれかを発現させるための少なくとも1つのヘルパープラスミドとを含み、レン

チウイルスベクター、少なくとも1つのエンベローププラスミド、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、レンチウイルス粒子がパッケージング細胞によって産生され、このレンチウイルス粒子は、目的の標的配列の調整、例えばケモカイン受容体CCR5の産生の阻害、またはHIV RNA配列のターゲティングが可能である。

【0109】

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

10

【0110】

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

【0111】

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

20

【0112】

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)

一般的に「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とは、免疫系の進行性不全が、生命を脅かす日和見感染およびがんを蔓延させる状態である。処置しなければ、HIV感染後の平均生存期間は、HIVサブタイプおよび宿主集団の遺伝的特質に応じて9~11年と推定される。HIVによる感染は、血液、精液、膿液、尿道球腺液(*pre-ejaculate*)、唾液、涙、リンパ液もしくは脳脊髄液、または母乳を含むがこれらに限定されない体液の移入、あるいは汚染された血液または組織産物の使用によって起こる。HIVは、感染した個体において遊離ウイルス粒子として存在する場合もあれば、感染した免疫細胞内に存在する場合もある。

30

【0113】

HIVは、ヘルパーT細胞などのヒト免疫系に不可欠な細胞に感染するが、向性はHIVサブタイプ間で異なり得る。HIV感染に対して特に感受性であり得る免疫細胞としては、CD4+T細胞、マクロファージ、および樹状細胞が挙げられるが、これらに限定されない。HIV感染は、感染していないバイスタンダー細胞のアポトーシス、感染細胞の直接的なウイルスによる殺傷、および感染細胞を認識するCD8細胞傷害性リンパ球による感染CD4+T細胞の殺傷を含むがこれらに限定されないいくつかの機構により、低レベルのCD4+T細胞をもたらす。CD4+T細胞数が臨界レベル未満に低下すると、細胞媒介性免疫が失われ、日和見感染およびがんに対して身体が、次第により感受性になる。

40

【0114】

50

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

【0115】

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

【0116】

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

【0117】

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

【0118】

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

【0119】

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

【0120】

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

10

20

30

40

50

【0121】

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

【0122】

本発明の一実施形態では、処置は、被験体のHIV特異的CD4 T細胞を、約100%、約200%、約300%、約400%、約500%、約600%、約700%、約800%、約900%、または約1000%濃縮する。

10

【0123】

遺伝子療法

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

【0124】

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

20

【0125】

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

【0126】

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

30

【0127】

例えば、一部の既存の療法は、細胞をHIV感染に耐性にする試みにおいて、CCR5の一部分を欠失させるジンクフィンガーヌクレアーゼに依拠する。しかしながら、最適な処置の後でさえ、T細胞の30%しかヌクレアーゼによって改変されておらず、改変されたもののうち、HIV感染を防止するように改変されていたのは、CD4 T細胞集団全体の10%のみであった。対照的に、開示されている方法では、実質的にすべての細胞が、HIV感染を可能にするために必要なレベル未満にCCR5発現が低減しているレンチウイルス導入遺伝子を有することになる。

40

【0128】

開示されている方法の目的では、遺伝子療法は、親和性増強T細胞受容体、CD4 T細胞上（または代替的にはCD8 T細胞上）のキメラ抗原受容体、ウイルスタンパク質に起因する細胞死を回避するためのシグナル伝達経路の改変、TREX、SAMHD1、

50

M x A または M x B タンパク質、A P O B E C 複合体、T R I M 5 アルファ複合体、テザリン (B S T 2)、および哺乳動物細胞において H I V 複製を低減させることができると特定された同様のタンパク質を含む H I V 制限エレメントの発現増加を含み得るが、これらに限定されない。

【0129】

免疫療法

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

【0130】

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

【0131】

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

【0132】

方法

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

【0133】

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

【0134】

治療用ワクチンは、処置が行われている地理的領域の優勢なウイルス型を代表するタンパク質配列を有する 1 つまたは複数の H I V タンパク質を含み得る。治療用ワクチンは、精製タンパク質、不活化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質、細菌ベクター化タンパク質、ペプチドまたはペプチド断片、ウイルス様粒子 (V L P)、サイトカインおよび／またはケモカインを含む生物学的または化学的アジュバント、ビヒクル、ならびに免疫化の方法を含む。ワクチン接種は、当技術分野で公知の標準的方法に従って施してよく、H I V 患者は、免疫化とその後のレンチウイルス形質導入を含む e x v i v o でのリンパ球の培養との間の中間期 (i n t e r v a l) 中に抗レトロウイルス薬療法を継続して

よい。

【0135】

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

【0136】

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

【0137】

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

【0138】

単離されたCD4 T細胞は、過去の治療用ワクチン接種に存在した抗原を含み得るHIVワクチン抗原による再刺激の間中、適切な培地において培養され得る。長期のex vivo培養中のウイルスの再出現を防止するため、逆転写酵素、プロテアーゼ、またはインテグラーゼの阻害剤を含む抗レトロウイルス治療薬を添加してもよい。CD4 T細胞の再刺激は、培養物中のHIV特異的CD4 T細胞の割合を増やすために使用される。同じ手順は、精製により得られた末梢血単核細胞を含むより少ない血液量を使用してH

ＩＶ特異的Ｔ細胞を特定し、この亜集団の頻度を測定する、分析目的で使用することもできる。

【０１３９】

ＰＢＭＣ画分は、ＨＩＶ特異的ＣＤ４ Ｔ細胞について、*in vivo*免疫化のために過去に使用されたワクチンの成分と一致するかまたはこれを補完するＨＩＶタンパク質とこれらの細胞を接触させることによって濃縮することができる。*ex vivo*での再刺激は、ＨＩＶ特異的ＣＤ４ Ｔ細胞の相対的な頻度を約２、約５、約１０、約２５、約５０、約７５、約１００、約１２５、約１５０、約１７５、または約２００倍増加させ得る。さらなる濃縮は、ＨＩＶ抗原、ワクチン、またはペプチドに応答する細胞の陽性選択によって得られる。陽性選択は、例えば、CliniMACS Cytokine Capture System (Miltenyi Biotec製品番号１３０－０２８－７０１、San Diego、CA 92121) または、Miltenyi Prodigy System (Miltenyi Biotec製品番号２００－０７５－３０１、San Diego、CA 92121) を含め、二重特異性試薬により捕捉され、磁性カラムでの陽性選択ができるように磁性ビーズ抗体で標識された、サイトカイン（インターフェロンガンマまたは腫瘍壊死因子アルファを含むがこれらに限定されない）の発現に基づいた生存細胞の選択に適合する、同様の手動もしくは自動システムを用いて達成される。濃縮は、ＣＤ４５ＲＯ、ＭＨＣクラスⅡ、および当技術分野で公知の他のものを含む、活性化Ｔ細胞で優先的に発現される細胞表面マーカーを検出することができる抗体で、刺激した細胞を標識することによっても達成され得る。標識された細胞の精製は、蛍光活性化細胞ソーティング、磁性ビーズソーティング、または生存細胞を表現型の特徴に基づいて精製することができる他の物理的方法によるものであってよい。

【０１４０】

本方法は、ＣＤ４ Ｔ細胞の*in vivo*での治療的免疫化および*ex vivo*での再刺激を、*ex vivo*でのレンチウイルス形質導入および培養と組み合わせるステップをさらに含む。

【０１４１】

よって、一実施形態では、ＨＩＶ特異的ＣＤ４ Ｔ細胞が濃縮されている再刺激したＰＢＭＣまたはＰＢＭＣの画分は、上述のように陽性選択され、１、２、３、４、５、または最大１２、２０、もしくは３０日間培養した後、Miltenyi GMP Trans Act Ｔ細胞試薬 (Miltenyi Biotec製品番号１７０－０７６－１５６、San Diego、CA 92121)、または他の植物もしくは真菌ベースのアグルチニン、または、細胞表面ＣＤ３およびＣＤ２８を認識してこれらの分子を架橋し、ポリクローナルＴ細胞活性化を引き起こすことができる他の試薬などの、ポリクローナルマイトジェンを用いて、再度活性化させることができる。ポリクローナル刺激後、細胞は、治療用抗ＨＩＶレンチウイルスまたは他のベクターで形質導入され、そのような形質導入のために十分な期間、例えば約１～約２１日間、最大約３５日間などにわたって培養下に維持される。代替的に、これらの細胞は、約１～約１８日間、約１～約１５日間、約１～約１２日間、約１～約９日間、または約３～約７日間にわたって培養されてもよい。よって、形質導入された細胞は、約１、約２、約３、約４、約５、約６、約７、約８、約９、約１０、約１１、約１２、約１３、約１４、約１５、約１６、約１７、約１８、約１９、約２０、約２１、約２２、約２３、約２４、約２５、約２６、約２７、約２８、約２９、約３０、約３１、約３２、約３３、約３４、または約３５日間にわたって培養され得る。ポリクローナルマイトジェンを用いた活性化は、細胞産物製造プロセスに含まれる場合もあれば、含まれない場合もある。

【０１４２】

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

置が付随する場合がある。

【0143】

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

10

【0144】

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

【0145】

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

20

30

【0146】

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

40

【0147】

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

50

R TまたはH A A R Tを中止または低減することができる。

【0148】

有効度の目的上、形質導入されたH I V特異的C D 4 T細胞の頻度は、遺伝子療法の効果の新規の代替マーカーであり、本明細書においてより詳細に論じられるように決定することができる。

【0149】

組成物

様々な態様では、本開示は、感受性細胞へのH I Vの侵入を阻害する遺伝子構築物を送達することができるレンチウイルスベクターを提供する。例として、本明細書による1つの作用機構は、感受性細胞へのウイルス進入速度を低減させるため、C C R 5および／またはC X C R 4ケモカイン受容体に対するm R N Aレベルを低下させることである。

【0150】

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

【0151】

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

【0152】

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

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

10

20

30

40

50

をターゲティングするマイクロ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は、核のRNA輸送を促進するために使用され得るさらなるベクター成分である)、および

- ・ デルタU3 3'LTR (ベクターの安全性を改善するためにU3領域の一部分を欠失させた、HIVの3'末端反復配列の改変バージョン)。

【0153】

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

【0154】

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

【0155】

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

【0156】

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

【0157】

レンチウイルスベクター系

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

【0158】

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

10

20

30

40

50

【0159】

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

【0160】

別の実施形態では、エンベロープタンパク質は、レンチウイルスに由来しないが、異なるウイルスに由来する。結果として得られる粒子は、シュードタイプ化粒子と呼ばれる。エンベロープの適切な選択により、実質的に任意の細胞に「感染」することができる。例えば、インフルエンザウイルス、VSV-G、アルファウイルス（セムリキ森林ウイルス、シンドビスウイルス）、アレナウイルス（リンパ球性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（ムンプスまたは麻疹）、およびオルソミクソウイルス（インフルエンザウイルス）のものなどの細胞内区画をターゲティングするエンベロープタンパク質をコードするenv遺伝子を使用することができる。好ましくは使用することができる他のエンベロープとしては、MLV-E、MLV-A、およびGALVなどのモロニー白血病ウイルス由来のものが挙げられる。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に特に好ましい。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、脳への送達には、ドーパミン受容体などの特定の受容体のターゲティングを使用することができる。別の標的は血管内皮であり得る。これらの細胞は、フィロウイルスエンベロープを使用してターゲティングすることができる。例えば、転写後修飾によってGPになるエボラのGP、およびGP₂糖タンパク質である。別の実施形態では、シュードタイプ化エンベロープ（例えば、FIVまたはSHIV [米国特許第5,654,195号]）を有する異なるレンチウイルスカプシドを使用することができる。SHIVシュードタイプ化ベクターは、サルなどの動物モデルにおいて容易に使用することができる。

【0161】

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

【0162】

別の態様では、レンチウイルス粒子を発現させるためのレンチウイルスベクター系が開示される。この系は、本明細書に記載されるレンチウイルスベクターと；細胞に感染するように最適化されたエンベロープタンパク質を発現させるためのエンベローププラスミドと；gag、pol、およびrev遺伝子を発現させるための少なくとも1つのヘルパープラスミドとを含み、レンチウイルスベクター、エンベローププラスミド、および少なくとも1つのヘルパープラスミドがパッケージング細胞株にトランスフェクトされると、レ

ンチウイルス粒子がパッケージング細胞株によって産生され、このレンチウイルス粒子は、ケモカイン受容体CCR5の産生の阻害、またはHIV RNA配列のターゲティングが可能である。

【0163】

別の態様では、本明細書では治療用ベクターとも呼ばれるレンチウイルスベクターは、次のエレメント：ハイブリッド5'末端反復配列(RSV/5'LTR) (配列番号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-1α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ΔU3 3'LTR (配列番号39)を含む。別の態様では、置換、欠失、付加、または変異による配列変化を使用して、本明細書で参照される配列を改変することができる。

10

【0164】

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

20

【0165】

別の態様では、エンベローププラスミドは、次のエレメント：RNAポリメラーゼIIプロモーター(CMV) (配列番号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)を含む。別の態様では、置換、欠失、付加、または変異による配列変化を使用して、本明細書で参照される配列を改変することができる。

【0166】

様々な態様では、レンチウイルスパッケージングに使用されるプラスミドは、ベクターの機能を損失することなく、様々なエレメントの置換、付加、除去、または変異によって改変される。例えば、限定されるものではないが、次のエレメントは、パッケージング系を構成するプラスミドにおいて同様のエレメントに取って代わることができる：伸長因子1(EF-1)、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)、およびユビキチンC(UbC)プロモーターは、CMVまたはCAGプロモーターに取って代わることができる。SV40ポリAおよびbGHポリAは、ウサギベータグロビンポリAに取って代わることができる。ヘルパープラスミド中のHIV配列は、異なるHIV株またはクレードから構築されていてよい。VSV-G糖タンパク質は、ネコ内在性ウイルス(RD114)、テナガザル白血病ウイルス(GALV)、狂犬病(FUG)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、インフルエンザA家禽ペストウイルス(fowl plague virus)(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)の膜糖タンパク質で置換され得る。

30

【0167】

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

40

【0168】

バイオアッセイ

50

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

【0169】

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

【0170】

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

【0171】

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

【0172】

用量および剤形

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

【0173】

様々な実施形態では、初回のin vivo免疫化のためのHIV特異的なワクチンは、必要とする被験体に様々な用量で投与される。一般に、筋肉内注射により送達されるワクチンは、不活化ウイルス粒子から調製された全ウイルスタンパク質、ウイルス様粒子、または組換え系から精製されたウイルスタンパク質もしくはウイルス調製物から精製された

10

20

30

40

50

もののいずれかのHIVタンパク質を、約10 μ g～約300 μ g、約25 μ g～約275 μ g、約50 μ g～約250 μ g、約75 μ g～約225、または約100 μ g～約200 μ g含む。組換えウイルスベクターまたは細菌ベクターは、記載されるありとあらゆる経路によって投与されてもよい。筋肉内ワクチンは、約1 μ g～約100 μ g、約10 μ g～約90 μ g、約20 μ g～約80 μ g、約30 μ g～約70 μ g、約40 μ g～約60 μ g、または約50 μ gの好適なアジュバント分子を含み、注射1用量あたり0.1～5mlの体積の油、食塩水、緩衝液、または水に懸濁され、可溶性調製物であってもエマルジョン調製物であってもよい。一部のウイルスベクター化もしくは細菌ベクター化ワクチン、融合タンパク質、リポソーム製剤、または同様の調製物を含む、経口的、直腸、口腔、性器粘膜、または鼻腔内に送達されるワクチンは、より高い量のウイルスタンパク質およびアジュバントを含有してもよい。真皮、真皮下(subdermal)、または皮下のワクチンは、経口的、直腸、または鼻腔内に送達されるワクチンにより似ている量のタンパク質およびアジュバントを利用する。初回免疫化に対する応答に応じて、ワクチン接種は、同じかまたは代替の送達経路を使用して1～5回繰り返され得る。間隔は、免疫化の間で2～24週間であり得る。ワクチン接種に対する免疫応答は、ELISAまたは同様の方法論を使用して、血清、血漿、腔分泌物、直腸分泌物、唾液、または気管支肺胞洗浄液中のHIV特異的抗体を試験することによって測定される。細胞性免疫応答は、ワクチン抗原によるin vitro刺激に続いて、細胞内のサイトカインの蓄積について染色を行った後、フローサイトメトリーまたはリンパ球増殖、リン酸化シグナル伝達タンパク質の発現、もしくは細胞表面活性化マーカーの変化を含む同様の方法によって試験される。投薬の上限は個々の患者に基づいて決定してよく、各個々の製品または製品ロットに関する毒性/安全性プロファイルに依存する。

【0174】

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

【0175】

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

【0176】

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

【0177】

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

【0178】

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

【0179】

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

【0180】

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

【0181】

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

【0182】

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

【0183】

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

【0184】

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

【0185】

再刺激の目的では、概して、リンパ球、PBMC、および／またはCD4 T細胞を患者から取り出し、再刺激および培養のために単離する。単離した細胞は、免疫化に使用したものと同一HIVワクチンもしくは活性化剤と接触させても、または異なるHIVワクチンもしくは活性化剤と接触させてもよい。一実施形態では、単離した細胞は、培養物中の約 10^6 個の細胞あたり約10 ng～5 μ g（または任意の他の好適な量）のHIVワクチンまたは活性化剤と接触させる。より具体的には、単離した細胞は、培養物中の約 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 μ g、約1.5 μ g、約2 μ g、約2.5 μ g、約3 μ g、約3.5 μ g、約4 μ g、約4.5 μ g、または約5 μ gのHIVワクチンまたは活性化剤と接触させてもよい。

【0186】

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

10

20

30

40

50

は約35日目に行われ得る。

【0187】

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

【0188】

細胞の濃縮

様々な実施形態では、T細胞などの細胞がHIV感染患者から得られ、培養される。培養は、マルチウェルプレートにて馴化培地（「CM」）を含む培養培地中で行われ得る。上清p24gagのレベル（「p24」）およびウイルスRNAレベルが標準的手段によって評価され得る。CM培養細胞が1ng/ml未満の上清p24レベルのピークを有する患者は、さらなる抗ウイルス剤の使用ありまたはなしのCMにおける大規模なT細胞の拡大増殖に好適な患者であり得る。さらに、異なる薬物または目的の薬物の組み合わせを異なるウェルに加えてよく、試料中のウイルスレベルに対する影響を標準的手段によって評価することができる。適度なウイルス抑制をもたらす薬物の組み合わせは、治療上有用な組み合わせである。特定の被験体に関する適度なウイルス抑制を構成するものが何かを決定することは、適格な技師の能力の範囲内である。ウイルスの拡大増殖を制限することにおける目的の薬物の有効性を試験するために、抗CD3抗体などのさらなる因子を培養物に添加してウイルス産生を刺激してもよい。当技術分野で公知のHIV感染細胞試料の培養方法とは異なり、CMでは2か月超の期間にわたるT細胞の培養が可能であり、これにより、長期の薬物有効性をアッセイする有効な系がもたらされる。

【0189】

このアプローチにより、CMを含む培地中の細胞の培養による、細胞集団内の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が可能になる。CM4における培養は、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り、HIVLTRにより駆動される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は、AP-1、NFカッパB、NF-AT、IRF、LEF-1、およびSp1などの宿主細胞がコードするタンパク質、ならびにHIVがコードするタンパク質であるTatを含む。目的のHIV遺伝子発現調節エレメントは、AP-1、NFカッパB、NF-AT、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応答エレメント（「TAR」）を含む。

【0190】

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

【0191】

T細胞を濃縮する別の方法は、免疫親和性に基づく選択を利用する。この方法は、第1および第2の細胞集団、例えばCD4+およびCD8+細胞集団の同時の濃縮または選択を含む。初代ヒトT細胞を含有する細胞は、インキュベーション組成物中で、CD4に特異的に結合する第1の免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、これらの免疫親和性試薬が試料中の細胞表面でそれぞれCD4およびCD8分子に特異的に結合する条件下で接触される。第1および/または第2の免疫親和性試薬に結合した細胞が回収され、これにより、CD4+細胞およびCD8+細胞を含む濃縮された組成物が生成される。このアプローチは、最適以下の収量の濃度である第1および/または第2の免疫親和性試薬の濃度を用いた組成物のインキュベーションを含み得る。注目す

10

20

30

40

50

べきことに、一部の実施形態では、形質導入された細胞は、混合された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、混合されたT細胞集団ではない。

【0192】

一部の実施形態では、固体支持体が球体、例えばビーズ、例えばマイクロビーズまたはナノビーズである、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、ビーズは磁性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た結合試薬と可逆的結合を形成することができる1つまたは複数の結合パートナーを含有し、抗体は、固体表面に可逆的に動員される。一部の実施形態では、前記固体表面で抗体が結合した細胞表面マーカーを発現する細胞は、結合試薬と結合パートナーとの間の可逆的結合の破壊によりマトリクスから回収可能である。一部の実施形態では、結合試薬は、ストレプトアビジンであるか、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。一部の実施形態では、HIVタンパク質、ワクチン、またはペプチドに特異的に応答する細胞を、これらの細胞におけるサイトカインの発現に基づいて捕捉するために、免疫親和性に基づく選択が使用される。二重特異性捕捉試薬は、T細胞に結合し、また、その細胞から放出されるサイトカインを捕捉する。サイトカインは好ましくはインターフェロンガンマであるが、腫瘍壊死因子アルファ、またはT細胞により産生されることが公知の他のサイトカインを含み得る。固定化されたサイトカインは、磁性ビーズにより改変された第2の免疫親和性試薬によって認識される。第1の捕捉試薬-サイトカイン-第2の免疫親和性試薬および磁性ビーズと合わさった細胞は、磁性カラムに保持されるため、HIVタンパク質、ワクチン、またはペプチドによる刺激後にサイトカインを発現せず、生きた状態で維持されている細胞から精製除去される。磁場からマトリクスを取り出すと、標識された細胞の放出および高度に濃縮された集団としての捕捉が可能になる。一部の事例では、濃縮された細胞は、抗CD3/抗CD28マイクロビーズまたはレンチウイルス形質導入と適合する同様の刺激試薬などのポリクローナルマイトジェンで刺激される前に、数を増加させるため、1〜30日間にわたって培養され得る。

【0193】

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

【0194】

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

【0195】

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

【実施例】

【0196】

(実施例1：レンチウイルスベクター系の開発)

図3(直鎖形態)および図4(環状化形態)にまとめたようにレンチウイルスベクター系を開発した。まず図3の上部を参照すると、左から右に、次のエレメント：ハイブリッド5'末端反復配列(RSV/5'LTR)(配列番号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)を有する代表的な治療用ベクターをデザインし産生した。図3で詳述されている治療用ベクターは、本明細書ではAGT103とも呼ばれる。

10

【0197】

次に図3の中央部を参照すると、左から右に、次のエレメント：CAGプロモーター(配列番号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)を有するヘルパープラスミドをデザインし産生した。

【0198】

次に図3の下部を参照すると、左から右に、次のエレメント：RNAポリメラーゼIIプロモーター(CMV)(配列番号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)を有するエンベローププラスミドをデザインし産生した。

20

【0199】

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

30

【0200】

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

40

【0201】

より具体的に図4を参照すると、ヘルパー+Revプラスミドは、CAGエンハンサー(配列番号40)、CAGプロモーター(配列番号41)、ニワ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。

50

【0202】

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。

【0203】

代替のベクター系において、また図6に関して、本明細書においてベクター配列は配列番号105～107として提供される。

【0204】

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系の合成。

材料および方法：

ヘルパープラスミドの構築：Gag、Pol、およびインテグラーゼ遺伝子を含むpNL4-3 HIVプラスミド（NIH Aids Reagent Program）からのDNA断片の初回PCR増幅によってヘルパープラスミドを構築した。pCDNA3プラスミド（Invitrogen）の同じ部位に挿入するために使用され得る、EcoRIおよびNotI制限部位を有する断片を増幅するためのプライマーをデザインした。フォワードプライマーは（5'-TAAGCAGAAATTC ATGAATTTGCCAGGAAGAT-3'）（配列番号81）であり、リバースプライマーは（5'-CCATACAATGAATGGACACTAGGCGGCCGCAACGAAT-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次の通りであった。

```
GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAATGATAGGGGGAATTGGAGGTTT
TATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATAAAGCTATAG
GTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAG
ATTGGCTGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAGACTGTACCAGTAAATTAAG
GCCAGGAATGGATGGCCCAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAAATAAAG
CATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAGGAAGGAAGAAATTTCAAAATTTGGGCCT
GAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAG
AAAATTAGTAGATTTTCAAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAGTTCAAT
TAGGAATACCACATCCTGTCAGGGTTAAACAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTG
GGCGATGCATATTTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTAC
CATACCTAGTATAAACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCAC
AGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCT
TTTAGAAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGG
ATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGT
TGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTTGG
ATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCCAGAAAA
GGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATTAGTGGGAAATTTGAATTGGGCAAGTC
AGATTTATGCAGGGATTAAAGTAAGGCAATTATGTAACTTCTTAGGGGAACCAAGCA
CTAACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAGCAGAGCTAGAAGTGGCAGAAAACAGGG
AGATTCTAAAAGAACCGGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTTAATAGCA
GAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACATATCAATTTTATCAAGAGCCATTTAA
AAATCTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGAATGAAGGGTGCCCACTAATGATGTGAAAC
AATTAACAGAGGCAGTACAAAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACT
CCTAAATTTAAATTACCCATACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTG
GCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTAT
GGTACCAGTTAGAGAAAGAACCCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGGGGCA
GCCAATAGGGAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTAAGTACAGAGGAAGACAAA
AAGTTGTCCCCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCTA
GCTTTGCAGGATTTCGGGATTAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATTGGG
AATCATTCAAGCACAAACCAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGC
```

10

20

30

40

50

AGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTACCAGCACACAAAGGAATTGGA
GGAAATGAACAAGTAGATAAATTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTTAGA
TGGAAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGG
CTAGTGATTTTAACTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAA
TGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCCAGGAATATGGCA
GCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTG
GATATATAGAAGCAGAAGTAATTCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTC
TTAAAATTAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTT
CACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCCTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCA
TTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAGAAA
ATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGT
ATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAA
TAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAA
ATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGAAAGGACCAGC
AAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCGAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAG
TAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGAT
GATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAA (配列番号 8 3)

【 0 2 0 5 】

次に、Xba I および Xma I 隣接制限部位を有する、Rev、RRE、およびウサギ
ベータグロビンポリA配列を含有するDNA断片を、MWG Operonによって合成
した。次いでこのDNA断片を、Xba I および Xma I 制限部位においてプラスミドに
挿入した。DNA配列は次の通りであった。

TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTCAGACT
CATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCC
GAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGA
ACGGATCCTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCTACCAC
CGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACGCAGGGG
GTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGA
ATAGAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCG
TCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGACGAGCAGCAA
CAATTTGCTGAGGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCACTCACAGTCTGGGGCA
TCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTC
CTAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCT
GACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGT
GTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAACATCAGAATGAGTAT
TTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTAT
AAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCCATAGAAAA
GCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACA
TCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCTGACTACTC
CCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGG
CGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACAC
AACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACT
CACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGC
GGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGC
CCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTT
ATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTT
TTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTAC
AAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAG
TTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCAGCGGCCGCCCGGG (配列番号 8
4)

10

20

30

40

50

【0206】

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

```
ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGG
AGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCC
CGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCA
TTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT
ATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCAT
TATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT
CATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCC
CCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCGAGCGATGG
GGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCG
GGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCT
TTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCGGG
AGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCGCTCGCGCCGCCCCGCCCC
GGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCG
GGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAG
CCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCG
GTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGC GGCCCGCGCTGCCCGGCGGGCTGTGAGCGC
TGCGGGCGCGGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGGCCGGG
GGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTG
TGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGC
ACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGG
CGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGG
GGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCGGCCCGGAGCGC
CGGCGGCTGTGAGGCGCGGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGA
GGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAATCTGGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCC
GCACCCCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCG
GGGAGGGCCTTCGTGCGTGC CGCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGGGG
TGCCGCAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGG
CGTGTGACCGGCGGGAATTC (配列番号 85)
```

【0207】

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Indianaウイルス糖タンパク質(VSV-G)配列を、MWG Operonによって合成した。次いでこのDNA断片をEcoRI制限部位においてpCDNA3.1プラスミド(Invitrogen)に挿入し、CMV特異的なプライマーを使用したシーケンシングによって正しい方向を決定した。DNA配列は次の通りであった。

```
GAATTCATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTATTCATTGGGGTGAATTGCAAGTT
CACCATAGTTTTTCCACACAACCAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCTTCTAATTACC
ATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATTGGCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTA
CAAGTCAAAATGCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCATGC
TTCCAAATGGGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATATAACACATT
CCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAA
CAAGGAACCTTGGCTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGAC
GGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACA
```

CAGGAGAATGGGTTGATTACAGTTCATCAACGGAAAATGCAGCAATTACATATGCCCC
 ACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCT
 TAACCTCATTTCATGGACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGG
 GAAAGGAGGGCACAGGGTTCAGAAAGTAAGTAACTTTGCTTATGAACTGGAGGCAAGGCC
 TGCAAAATGCAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCTGGTTCTGA
 GATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTCAA
 GTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGACGTTGAGAGG
 ATCTTGGATTATTCCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCAAT
 CTCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTTTCA
 CCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCT
 GCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGGA
 GTGGGATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGA
 CCAGTTCAGGATATAAGTTTCTTTATACATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGAT
 CTTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTTGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTC
 GCAACTTCCTGATGATGAGAGTTTATTTTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAA
 TCGAGCTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTATTGCCTCTTTTTTTCTTT
 ATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTTGCATT
 AAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGACATAGAGATGAGAATTC (配
 列番号 86)

【0208】

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

【0209】

図5を部分的に参照すると、ヘルパープラスミドは、CAGエンハンサー（配列番号4
 9）、CAGプロモーター（配列番号50）、ニフ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
 Int（配列番号54）、HIV RRE（配列番号55）、およびウサギベータグロビ
 ンポリA（配列番号56）を含む。

【0210】

Revプラスミドは、RSVプロモーター（配列番号57）、HIV Rev（配列番
 号58）、およびウサギベータグロビンポリA（配列番号59）を含む。

【0211】

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。

【0212】

ヘルパー、Rev、およびエンベローププラスミドを含む3ベクターレンチウイルスパ
 ッケージング系の合成。

材料および方法：

Revを含まないヘルパープラスミドの構築：

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

TCTAGAAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAG

CGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAG
 AACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGG
 CATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGC
 TCCTAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCAT
 CTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTT
 GTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAACATCAGAATGAGT
 ATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCT
 ATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTTATTCCATAGAA
 AAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTTTATATTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAA
 CATCCCTAAAATTTTCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCTCTCTGACTAC
 TCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTT
 GGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCAC
 ACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAA
 CTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCA
 GCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCC
 GCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTTCTCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTAT
 TTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCT
 TTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTT
 ACAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCT
 AGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCACCCGGG (配列番号 8 7)

10

20

【0213】

Rev プラスミドの構築：

隣接する MfeI および XbaI 制限部位を有する RSV プロモーターおよび HIV
 Rev 配列を、MWG Operon により、単一の DNA 断片として合成した。次いで
 この DNA 断片を、CMV プロモーターが、RSV プロモーターに置き換えられている M
 feI および XbaI 制限部位において pCDNA3.1 プラスミド (Invitrogen)
 に挿入した。DNA 配列は次の通りであった。

CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTTAGGC
 GAAAAGCGGGGCTTCGGTTGTACGCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAGTAGTTTCGC
 TTTTGCATAGGGAGGGGAAATGTAGTCTTATGCAATACACTTGTAGTCTTGCAACATG
 GTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGATGCCGATT
 GGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACAGGTCTGACAT
 GGATTGGACGAACCACTGAATTCCGCATTGCAGAGATAATTGTATTAAAGTGCCTAGCT
 CGATACAATAAACGCCATTTGACCATTACACCATTTGGTGTGCACCTCCAAGCTCGAGC
 TCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATA
 GAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCCCTCGAAGCTAGCGATTAGGCATCTCCTATGG
 CAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTT
 CTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCCGAAGGAATAG
 AAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCCTTA
 GCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGA
 CTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCC
 TCAATATTGGTGGAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCTAGA
 (配列番号 8 8)

30

40

【0214】

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

【0215】

プロモーター：伸長因子 1 (EF-1) (配列番号 6 4)、ホスホグリセリン酸キナー

50

ゼ (P G K) (配列番号 65)、およびユビキチン C (U b C) (配列番号 66) は、C M V (配列番号 60) または C A G プロモーター (配列番号 100) に取って代わることができる。これらの配列は、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させることもできる。

【0216】

ポリ A 配列: S V 40 ポリ A (配列番号 67) および b G H ポリ A (配列番号 68) は、ウサギベータグロビンポリ A (配列番号 48) に取って代わることができる。これらの配列は、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させることもできる。

【0217】

H I V G a g、P o l、およびインテグラーゼ配列: ヘルパープラスミド中の H I V 配列は、異なる H I V 株またはクレードから構築されていてよい。例えば、B a l 株由来の H I V G a g (配列番号 69)、H I V P o l (配列番号 70)、および H I V I n t (配列番号 71) は、本明細書に概説されるヘルパー/ヘルパー+R e v プラスミドに含有される g a g、p o l、および i n t 配列と交換することができる。これらの配列は、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させることもできる。

【0218】

エンベロープ: V S V - G 糖タンパク質は、ネコ内在性ウイルス (R D 114) (配列番号 72)、テナガザル白血病ウイルス (G A L V) (配列番号 73)、狂犬病 (F U G) (配列番号 74)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (L C M V) (配列番号 75)、インフルエンザ A 家禽ペストウイルス (F P V) (配列番号 76)、ロスリバーアルファウイルス (R R V) (配列番号 77)、マウス白血病ウイルス 10A1 (M L V) (配列番号 78)、またはエボラウイルス (E b o V) (配列番号 79) 由来の膜糖タンパク質で置換され得る。これらのエンベロープの配列は、本明細書の配列の部分において特定される。さらに、これらの配列は、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させることもできる。

【0219】

まとめると、3ベクター系対4ベクター系は、部分的には次のように比較および対比することができる。3ベクターのレンチウイルスベクター系は、1. ヘルパープラスミド: H I V G a g、P o l、インテグラーゼ、および R e v / T a t; 2. エンベローププラスミド: V S V - G / F U G エンベロープ; ならびに 3. 治療用ベクター: R S V 5' L T R、P s i パッケージングシグナル、G a g 断片、R R E、E n v 断片、c P P T、W P R E、および 3' デルタ L T R を含有する。4ベクターのレンチウイルスベクター系は、1. ヘルパープラスミド: H I V G a g、P o l、およびインテグラーゼ; 2. R e v プラスミド: R e v; 3. エンベローププラスミド: V S V - G / F U G エンベロープ; ならびに 4. 治療用ベクター: R S V 5' L T R、P s i パッケージングシグナル、G a g 断片、R R E、E n v 断片、c P P T、W P R E、および 3' デルタ L T R を含有する。上記のエレメントに対応する配列は、本明細書の配列表の部分において特定される。

【0220】

(実施例 2: 抗 H I V レンチウイルスベクターの開発)

この実施例の目的は、抗 H I V レンチウイルスベクターを開発することであった。

【0221】

阻害性 RNA のデザイン。H o m o s a p i e n s ケモカイン C - C モチーフ受容体 5 (C C R 5) (G C 03 P 046377) の mRNA 配列を使用して、ヒト細胞において C C R 5 レベルをノックダウンする潜在的な s i RNA または s h RNA 候補を検索した。B r o a d I n s t i t u t e のプログラムまたは T h e r m o S c i e n t i f i c の B L O C K - i T R N A i D e s i g n e r などの s i RNA または s h RNA デザインプログラムによって選択された候補から、潜在的な RNA 干渉配列を選択した。選択された個々の s h RNA 配列を、レンチウイルスベクターの RNA ポリメラーゼ I I プロモーター、例えば H 1、U 6、または 7 S K のすぐ 3' 側に挿入して、s h RNA 発現を調節した。これらのレンチウイルス-s h RNA 構築物を使用して細胞の形質導入を

10

20

30

40

50

行い、特異的なmRNAレベルの変化を測定した。mRNAレベルを低下させるために最も強力なshRNAをマイクロRNA骨格内に個々に包埋して、CMVまたはEF-1アルファRNAポリメラーゼIIプロモーターのいずれかによる発現を可能にした。マイクロRNA骨格は、mirbase.orgから選択した。RNA配列を合成siRNAオリゴヌクレオチドとしても合成し、レンチウイルスベクターを使用せずに細胞に直接導入した。

【0222】

ヒト免疫不全ウイルス1型のBaL株(HIV-1 85US__BaL、受託番号AY713409)のゲノム配列を使用して、ヒト細胞におけるHIV複製レベルをノックダウンする潜在的なsiRNAまたはshRNA候補を検索した。配列相同性および経験に基づいて、この検索ではHIVのTatおよびVif遺伝子の領域に焦点を合わせたが、当業者には、これらの領域の使用は非限定的であり、他の潜在的な標的が選択され得ることは理解されよう。重要なことに、gagまたはpol遺伝子の高度に保存された領域は、ベクターの製造に必要なパッケージング系補完プラスミドにこれらと同じ配列が存在したため、shRNAによってターゲティングすることができなかった。CCR5(NM000579.3、NM001100168.1特異的)RNAと同様に、Broad Instituteが主催しているGene-ESoftware Suite(broadinstitute.org/mai/public)またはThermo ScientificのBLOCK-iT RNAi Designer(rnadesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=shrna&pid=6712627360706061801)などのsiRNAまたはshRNAデザインプログラムによって選択された候補から、潜在的なHIV特異的RNA干渉配列を選択した。選択された個々のshRNA配列を、レンチウイルスベクターのRNAポリメラーゼIIプロモーター、例えばH1、U6、または7SKのすぐ3'側に挿入して、shRNA発現を調節した。これらのレンチウイルス-shRNA構築物を使用して細胞の形質導入を行い、特異的なmRNAレベルの変化を測定した。mRNAレベルを低下させるために最も強力なshRNAをマイクロRNA骨格内に個々に包埋して、CMVまたはEF-1アルファRNAポリメラーゼIIプロモーターのいずれかによる発現を可能にした。

【0223】

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

【0224】

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る技術を使用して、本明細書の図8に示されるように、一連のレンチウイルスベクターを開発した。

【0225】

ベクター1を開発し、これは、左から右に、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）を含有する。

【0226】

ベクター2を開発し、これは、左から右に、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）を含有する。

10

【0227】

ベクター3を開発し、これは、左から右に、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）を含有する。

20

【0228】

ベクター4を開発し、これは、左から右に、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）を含有する。

【0229】

ベクター5を開発し、これは、左から右に、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）を含有する。

30

【0230】

ベクター6を開発し、これは、左から右に、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）を含有する。

【0231】

ベクター7を開発し、これは、左から右に、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）を含有する。

40

【0232】

ベクター8を開発し、これは、左から右に、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）を含有する。

【0233】

50

ベクター 9 を開発し、これは、左から右に、末端反復配列 (L T R) 部分 (配列番号 3 5) ; C D 4 エレメント (配列番号 3 0) ; m i R 3 0 C C R 5 (配列番号 1) ; m i R 2 1 V i f (配列番号 2) ; m i R 1 8 5 T a t (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 (W P R E) (配列番号 3 2、8 0) ; および末端反復配列部分 (配列番号 1 0 2) を含有する。

【 0 2 3 4 】

ベクターの開発

これらの実験のために開発したベクターのすべてが必ずしも予想され得た通りに機能したとは限らないことに留意されたい。より具体的には、H I V に対するレンチウイルスベクターは、1) 標的細胞表面上の H I V 結合タンパク質 (受容体) のレベルを低下させて初期のウイルスの付着および侵入を遮断する阻害性 R N A、2) ウイルス T a t 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、H I V T A R 配列の過剰発現、および 3) H I V ゲノム内の重要な保存配列を攻撃する阻害性 R N A という、3 つの主要な成分を含み得る。

【 0 2 3 5 】

上記の第 1 の点に関して、重要な細胞表面 H I V 結合タンパク質は、ケモカイン受容体 C C R 5 である。H I V 粒子は、C D 4 および C C R 5 細胞表面タンパク質に結合することにより、感受性 T 細胞に付着する。C D 4 は、T 細胞の免疫学的機能に重要な細胞表面上の必須の糖タンパク質であるため、その発現レベルを操作するための標的として、これは選択しなかった。しかしながら、C C R 5 遺伝子のヌル変異のホモ接合体として生まれ、受容体発現が完全に欠如している人々は、いくつかの感染性疾患に対する感受性の増強および稀な自己免疫が発生する可能性を除いては通常の生活を送る。よって、C C R 5 の調整は比較的安全なアプローチであると決定され、抗 H I V レンチウイルスベクターの開発における主要な標的であった。

【 0 2 3 6 】

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

【 0 2 3 7 】

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

【 0 2 3 8 】

ベクターの開発および試験のための様々な方法は、まず好適な標的 (本明細書に記載されている) を特定した後、細胞モデルで試験するための個々または複数の阻害性 R N A 種を発現するプラスミド D N A を構築し、最後に、抗 H I V 機能が証明された阻害性 R N A を含有するレンチウイルスベクターを構築することに依拠する。レンチウイルスベクター

は、毒性、*in vitro* 産生中の収量、および CCR5 発現レベルの低下またはウイルス遺伝子産物の低減によるウイルス複製の阻害という点での HIV に対する有効性について試験される。

【0239】

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

【0240】

以下の表 2 で詳述するプラスミド 1～4 は、HIV の Gag、Pol、および RT 遺伝子に対する shRNA 配列を試験した。各 shRNA は細胞モデルにおいてウイルスタンパク質発現を抑制するのに活性であったが、さらなる開発を妨げた 2 つの重要な問題があった。第 1 に、これらの配列は、北米および欧州で現在循環しているクレード B HIV 株を代表するものではない HIV の実験室単離物に対してターゲティングされた。第 2 に、これらの shRNA は、レンチウイルスベクターパッケージング系において重要な成分をターゲティングし、製造中のベクター収量を大きく低減させることになる。表 2 で詳述するプラスミド 5 は、CCR5 をターゲティングするために選択され、リード候補配列をもたらした。表 2 で詳述するプラスミド 6、7、8、9、10、および 11 は、TAR 配列を組み込んだものであり、レンチウイルスベクター製造に使用された細胞を含む哺乳動物細胞に対して許容されない毒性をもたらしたことが分かった。表 2 で詳述するプラスミド 2 は、Tat RNA 発現を低減させることができるリード shRNA 配列を特定した。表 2 で詳述するプラスミド 12 は、レンチウイルスベクターにおいてマイクロ RNA（miR）として発現される shCCR5 の有効性を実証し、これが最終産物に存在するはずであることを裏付けた。表 2 で詳述するプラスミド 13 は、レンチウイルスベクターにおいてマイクロ RNA（miR）として発現される shVif の有効性を実証し、これが最終産物に存在するはずであることを裏付けた。表 2 で詳述するプラスミド 14 は、レンチウイルスベクターにおいてマイクロ RNA（miR）として発現される shTat の有効性を実証し、これが最終産物に存在するはずであることを裏付けた。表 2 で詳述するプラスミド 15 は、単一のプロモーターから発現された miR クラスターの形態で、miR CCR5、miR Tat および miR Vif を含有した。これらの miR は、レンチウイルスベクターパッケージング系において重要な成分をターゲティングせず、哺乳動物細胞に対して無視できる毒性を有することが証明された。クラスター内の miR は、以前に試験された個々の miR に対して等しく有効であり、全体的な影響は、CCR5 向性 HIV BaL 株の複製の実質的な低減であった。

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2: HIV ベクターの開発

	内部コード	物質	説明	所見	決定
1	SIH-H1-shRT-1,3	レンチウイルスベクター	LAI 株の RT のための shRNA 構築物	誤った標的、実験室ウイルス、ウイルス試験なし	放棄
2	SIH-H1-shRT43 (Tat/Rev NL4-3)	レンチウイルスベクター	H1 プロモーター shRNA Tat/Rev 重複	Tat タンパク質ノックダウン>90%	リード
ベクターの構築:Rev/Tat(RT)shRNA について、BamHI および EcoRI 制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を、MWG Operon によって合成した。Tat mRNA 発現を減少させる能力について、2 つの異なる Rev/Tat 標的配列を試験した。RT1,3 標的配列は、(5'-ATGGCAGGAAGAAGCGGAG-3')(配列番号 89)であり、shRNA 配列は、(5'-ATGGCAGGAAGAAGCGGAGTTCAAGAGACTCCGCTTCTTCCTGCCATTTTTT-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。pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)にオリゴヌクレオチド配列を挿入した。 Rev/Tat に対する shRNA の機能試験:3'-UTR(mRNA の非翻訳領域)に挿入された Rev/Tat 標的配列を含有するルシフェラーゼレポータープラスミドを使用し、Tat 発現を低減させるベクターの能力を試験した。ルシフェラーゼおよび Rev/Tar 標的配列を含有するプラスミドを、shRT1,3 または shRT43 プラスミドのいずれかとともに共トランスフェクトした。shRT43 shRNA 配列の強力な機能を示す発光の 90%の低減があったが、shRT1,3 プラスミドでは 10%未満であった。 結論:ルシフェラーゼアッセイ系における mRNA レベルの低下という点で、SIH-H1-shRT43 は SIH-H1-shRT-1,3 よりも優れていた。これは shRT43 配列の強力な阻害活性を示し、さらなる開発のためのリード候補としてこれを選択した。					
3	SIH-H1-shGag-1	レンチウイルスベクター	LAI Gag のための shRNA 構築物	Gag 発現を阻害するがパッケージングを阻害する	放棄
ベクターの構築:Gag shRNA について、BamHI および EcoRI 制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を、MWG Operon によって合成した。Gag mRNA 発現を減少させる能力について、Gag 標的配列を試験した。Gag 標的配列は、(5'-GAAGAAATGATGACAGCAT-3')(配列番号 11)であり、shRNA 配列は、(5'-GAAGAAATGATGACAGCATTTCAAGAGAATGCTGTCATCATTTCTTCTTTTT-3')(配列番号 12)である。pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)にオリゴヌクレオチド配列を挿入した。 Gag に対する shRNA の機能試験:3'-UTR(mRNA の非翻訳領域)に挿入された Gag 標的配列を含有するルシフェラーゼレポータープラスミドを使用し、Gag 発現を低減させるベクターの能力を試験した。ルシフェラーゼおよび Gag 標的配列を含有するプラスミドを、Gag プラスミドに共トランスフェクトした。発光が約 90%低減し、shGag shRNA 配列の強力な効果が示された。 結論:この shRNA 配列は、HIV Gag 発現に対して強力であるが、放棄された。レンチウイルスパッケージング系は、ヘルパープラスミドからの Gag の産生を必要とし、Gag の shRNA による阻害は、レンチウイルスベクターの収量を低減させる。この shRNA 配列					

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

は、HIV のオリゴヌクレオチド阻害剤として使用してもよいし、または、異なるベクターゲノムを使用するか、もしくはこの shRNA による阻害に抵抗するように改変された、代替のウイルスベクターパッケージング系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 のための shRNA 構築物	Pol 発現を阻害するがパッケージングを阻害する	放棄
ベクターの構築:MWG Operon によって合成された BamHI および EcoRI 制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を有する Pol shRNA を構築した。Pol mRNA 発現を減少させる能力について、Pol 標的配列を試験した。Pol 標的配列は、(5'-CAGGAGCAGATGATACAG-3')(配列番号 13)であり、shRNA 配列は、(5'-CAGGAGATGATACAGTTCAAGAGACTGTATCATCTGCTCCTGTTTT-3')(配列番号 14)である。pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)にオリゴヌクレオチド配列を挿入した。 HIV Pol に対する shRNA の機能試験:3'-UTR(mRNA の非翻訳領域)に挿入された Pol 標的配列を含有するルシフェラーゼレポータープラスミドを使用し、Pol 発現を低減させるベクターの能力を試験した。ルシフェラーゼおよび Pol 標的配列を含有するプラスミドを、Pol プラスミドに共トランスフェクトした。発光が 60%低減し、shPol shRNA 配列の強力な効果が示された。 結論:この shRNA 配列は、HIV Pol 発現に対して強力であるが、放棄された。レンチウイルスパッケージング系は、ヘルパープラスミドからの Pol の産生を必要とし、Pol の shRNA による阻害は、レンチウイルスベクターの収量を低減させる。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してもよいし、または、異なるベクターゲノムを使用するか、もしくはこの shRNA による阻害に抵抗するように改変された、代替のウイルスベクターパッケージング系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 のための shRNA 構築物	5 つの候補の中で最良、細胞外 CCR5 タンパク質の低減>90%	リード
ベクターの構築:MWG Operon によって合成された BamHI および EcoRI 制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を有する CCR5 shRNA を構築した。pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)にオリゴヌクレオチド配列を挿入した。CCR5 遺伝子配列 1(配列番号 25)に焦点を合わせる CCR5 標的配列 1 番は、(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)に焦点を合わせる CCR5 標的配列 2 番は、(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)に焦点を合わせる CCR5 標的配列 3 番は、(5'-GTAGCTCTAACAGGTTGGA-3')(配列番号 19)であり、shRNA 配列は、(5'-GTAGCTCTAACAGGTTGATTCAAGAGATCCAACCTGTTAGAGCTACTTTTT-3')(配列番号 20)である。CCR5 遺伝子配列 4(配列番号 28)に焦点を合わせる CCR5 標的配列 4 番は、(5'-GTTTCAGAACTACCTCTTA-3')(配列番号 21)であり、shRNA 配列は、(5'-GTTTCAGAACTACCTCTTATCAAGAGATAAGAGGTAGTTTCTGAACCTTTTT-3')(配列番号 22)である。CCR5 遺伝子配列 5(配列番号 29)に焦点を合わせる CCR5 標的配列 5 番は、(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。					

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

CCR5 に対する shRNA の機能試験:最初に、各プラスミドに関する別々の実験で、5つの CCR5 標的配列のうちの 1つを含有するレンチウイルスプラスミドのそれぞれを、ヒト CCR5 遺伝子を発現するプラスミドと共にトランスフェクトすることにより、CCR5 RNA 発現をノックダウンする CCR5 shRNA 配列の能力を試験した。次いで、CCR5 特異的プライマーを使用した qPCR 分析により、CCR5 mRNA 発現を評価した。 結論:CCR5 mRNA レベルの低下に基づくと、shRNACCR5-1 が CCR5 遺伝子発現を低減させるの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 を抑制する、細胞に対して毒性、パッケージング不良	放棄
9	U6-TAR-7SK-shRT	レンチウイルスベクター	shRNA プロモーターを 7SK に変更する	毒性、パッケージング不良	放棄
10	U6-TAR-H1-shRT-H1-shCCR5	レンチウイルスベクター	U6 プロモーター-TAR-H1-RT-H1-shCCR5	毒性、パッケージング不良、H1 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 に変更する	毒性、パッケージング不良	放棄
ベクターの構築:隣接する KpnI 制限部位を含有する TAR デコイ配列を MWG operon によって合成し、pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)の KpnI 部位に挿入した。このベクターにおいて、TAR 発現は U6 プロモーターによって調節される。TAR デコイ配列は、(5'-CTTGCAATGATGTCGTAATTTGCGTCTTACCTCGTTCTCGACAGCGACCAGATCTGAGCC TGGGAGCTCTCTGGCTGTGTCAGTAAGCTGGTACAGAAGGTTGACGAAAATTCTTACTGAG CAAGAAA-3')(配列番号 8)である。TAR 配列に特異的なプライマーを使用した qPCR 分析によって TAR デコイ配列の発現を決定した。同じく TAR 配列を含有するさらなるベクターを構築した。このベクターの XhoI 部位に H1 プロモーターおよび shRT 配列を挿入した。H1 shRT 配列は、(5'-GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCAGTGTCAGTACTAGGCGGGA ACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCG CCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATCCGCGGAGACAGCGA CGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTTT-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、shRT 発現を調節するため、7SK プロモーターを、H1 プロモーターの代わりに使用した。U6 TAR、H1 shRT、および H1 shCCR5 を含有する別のベクターを構築した。U6 TAR および H1 shRT を含有するプラスミドの SpeI 部位に H1 shCCR5 配列を挿入した。H1 CCR5 配列は、(5'-GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCAGTGTCAGTACTAGGCGGGA ACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCG CCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATCCGTGTCAAGTCCAAT CTATGTTCAAGAGACATAGATTGGACTTGACACTTTTT-3')(配列番号 92)である。また、					

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

shRT 発現を調節するため、7SK プロモーターを、H1 プロモーターの代わりに使用した。 TAR デコイ活性の機能試験:本発明者らは、パッケージング効率に対する SIH-U6-TAR の効果を試験した。TAR 配列を含めたとき、SIH パッケージング系におけるベクターの収量は実質的に低減した。 結論:TAR デコイ配列を発現するレンチウイルスベクターは、ベクター収量が低いため、商業的開発に適さない。これらの構築物は放棄された。					
12	shCCR5	レンチウイルスベクター	マイクロ RNA 配列	細胞外 CCR5 タンパク質の低減>90%	リード
ベクターの構築:MWG Operon によって合成された BsrGI および NotI 制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を有する CCR5 マイクロ RNA を構築した。pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)にオリゴヌクレオチド配列を挿入した。プラスミド構築物試験物質 5 に使用した CMV プロモーターを EF-1 プロモーターで置換した。隣接する ClaI および BsrGI 制限部位を含有する EF-1 プロモーターを MWG Operon によって合成し、shCCR5-1 を含有する pCDH ベクターに挿入した。EF-1 プロモーター配列は、(5'-CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGGCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCGGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCAGAAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAAGGGCCTTCCGTCCTACGCCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCCTGAGCTTTTGGAGTACGTCTGTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCTTGGAATTTGCCCTTTTGGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTACAGGTGTCGTGA-3')(配列番号 4)である。 レンチウイルス CDH-shCCR5-1 の機能試験:CEM-CCR5 T 細胞に形質導入を行い、CCR5 に対する蛍光標識モノクローナル抗体で染色した後に細胞表面 CCR5 発現を測定し、細胞表面 CCR5 分子の数に正比例する染色の強度を分析的フローサイトメトリーによって測定することにより、CCR5 発現をノックダウンする miR CCR5 配列の能力を決定した。CCR5 をターゲティングするのに最も有効な shRNA 配列は、CCR5 shRNA 配列 1 番であった。しかしながら、合成マイクロ RNA 配列を構築するのに最も有効な CCR5 ターゲティング配列は、CCR5 配列 5 番と重複していた;この結論は、配列アラインメントおよび miRNA 構築の経験に基づいていた。最後に、miR30 ヘアピン配列を使用して、(5'-AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCAAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT-3')(配列番号 1)である合成 miR30 CCR5 配列を構築した。miR CCR5 標的配列は、(5'-GAGCAAGCTCAGTTTACA-3')(配列番号 5)である。細胞 1 個あたり平均で 1.25 個の組み込まれたレンチウイルスのゲノムコピーを生成する、5 に等しい感染多重度において、CCR5 発現レベルは$\geq 90\%$低下し、レンチウイルスベクターにおける miR30CCR5 マイクロ RNA					

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

構築物による CCR5 mRNA の強力な阻害を示した。					
結論:miR30CCR5 構築物は、CCR5 細胞表面発現を低減させるのに強力であり、HIV の治療用レンチウイルスのリード候補である。					
13	shVif	レンチウイルスベクター	マイクロ RNA 配列	Vif タンパク質の低減>80%	リード
ベクターの構築:MWG Operon によって合成された BsrGI および NotI 制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を有する Vif マイクロ RNA を構築した。EF-1 プロモーターを含有する pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)にオリゴヌクレオチド配列を挿入した。配列アラインメントおよび合成 miRNA の構築の経験に基づき、miR21 ヘアピン配列を使用して、(5'-CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA-3')(配列番号 2)である合成 miR21 Vif 配列を構築した。miR Vif 標的配列は、(5'-GGGATGTGTACTTCTGAACTT-3')(配列番号 6)である。 miR21Vif の効力に関する機能試験: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免疫ブロット分析によって Vif タンパク質発現を測定することにより、Vif 発現をノックダウンする miR Vif 配列の能力を決定した。 結論:免疫ブロットデータの定量的画像解析によって決定した場合、miR21Vif は、Vif タンパク質発現を≥ 10 倍低減させた。これは、miR21Vif が本発明者らの治療用レンチウイルスのリード候補として正当化することを証明するのに十分であった。					
14	shTat	レンチウイルスベクター	マイクロ RNA 配列	Tat RNA の低減 >80%	リード
ベクターの構築:MWG Operon によって合成された BsrGI および NotI 制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を有する Tat マイクロ RNA を構築した。EF-1 プロモーターを含有する pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)にマイクロ RNA クラスターを挿入した。配列アラインメントおよび合成 miRNA の構築の経験に基づき、(5'-GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCC TCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTCG-3')である合成 miR185 Tat 配列を構築するため、miR185 ヘアピン配列を選択した。miR Tat 標的配列は、(5'-TCCGCTTCTTCCTGCCATAG-3')(配列番号 7)である。 miR185Tat の効力に関する機能試験:Tat 特異的プライマーを使用した RT-PCR 分析によって Tat mRNA 発現を測定することにより、Tat 発現をノックダウンする miR Tat の能力を決定した。本発明者らは、Tat mRNA の相対レベルを低下させることに基づいて miR185Tat を同様の miR155Tat と比較した。 結論:miR185Tat は、miR155Tat と比較して Tat mRNA を低減させる効力がおよそ 2 倍高く、本発明者らの治療用レンチウイルスのリード候補として選択した。					
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 の低減 >90%、Vif タンパク質の低減>80%、Tat RNA の低減 >80%、HIV 複製の >95%の阻害	候補

10

20

30

40

50

【表 2 - 6】

ベクターの構築:MWG Operon によって合成された BsrGI および NotI 制限部位を含有する合成 DNA 断片を用い、miR30CCR5 miR21Vif miR185Tat マイクロ RNA クラスター配列を構築した。EF-1 プロモーターを含有する pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に DNA 断片を挿入した。miR クラスター配列は、(5'-AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCA CAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACCTGTGTT GAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACAACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTGAC CAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCG TGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCG TC-3')(配列番号 31)であり、EF-1 プロモーターの制御下で発現可能な単一のクラスターに試験物質 12、試験物質 13、および試験物質 14 が組み込まれている。

miR30CCR5、miR21Vif、および miR185Tat のマイクロ RNA クラスターを含有するレンチウイルスベクターAGT103 の効力に関する機能試験:細胞表面 CCR5 発現の低減に関するアッセイを使用して、CCR5 に対する効力について AGT103 ベクターを試験した(試験物質 12)。細胞表面 Vif 発現の低減に関するアッセイを使用して、Vif に対する効力について AGT103 ベクターを試験した(試験物質 13)。細胞表面 Tat 発現の低減に関するアッセイを使用して、Tat に対する効力について AGT103 ベクターを試験した(試験物質 14)。

結論:miRNA クラスターによる CCR5 発現を低減させる効力は、miR30CCR5 単独で観察された効力と同様であった。miRNA クラスターによる Vif 発現を低減させる効力は、miR21Vif 単独で観察された効力と同様であった。miRNA クラスターによる Tat 発現を低減させる効力は、miR185Tat 単独で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 レベルを低下させ、2つの HIV 遺伝子を阻害するのに強力である。よって、この miRNA クラスターを含有する AGT103 を、本発明者らの HIV 機能的治癒プログラムのための治療用ベクター構築物として選択した。

【0241】

機能アッセイ。CCR5、Tat、またはVif shRNA配列を含有する個々のレンチウイルスベクター、ならびに、実験の目的で、CMV最初期プロモーターの制御下で緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現し、AGT103/CMV-GFPと称されるレンチウイルスベクターを、CCR5、Tat、またはVifの発現をノックダウンする能力について試験した。ポリブレンの存在下または非存在下のいずれかで、哺乳動物細胞にレンチウイルス粒子を形質導入した。2~4日後に細胞を収集し、タンパク質およびRNAをCCR5、Tat、またはVifの発現について分析した。ウェスタンブロットアッセイまたは特異的な蛍光抗体による細胞の標識(CCR5アッセイ)後、CCR5特異的抗体またはアイソタイプ対照抗体のいずれかを使用し、改変および非改変細胞の蛍光を比較する分析的フローサイトメトリーによって、タンパク質レベルを試験した。

【0242】

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

【0243】

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

【0244】

0~12日目:抗原特異的濃縮。0日目、凍結保存されたPBMCを解凍し、10分間1200rpmにて10mlの37℃培地で洗浄し、 2×10^6 /mlの濃度で37℃培

地に再懸濁した。この細胞を、24ウェルプレート中0.5 ml/ウェルにて、37℃、5% CO₂で培養した。最適な刺激条件を定義するために、以下の表3に列挙した試薬の組み合わせで細胞を刺激した。

【表3-1】

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

【0245】

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

【0246】

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

【0247】

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

【0248】

14日目、AGT103/CMV-GFPをMOI20で添加し、培養物を2日間インキュベーターに戻した。このとき、細胞をピペット操作により回収し、1300 rpmで10分間の遠心分離によって収集し、同じ体積の新鮮培地に再懸濁し、再び遠心分離して緩い細胞ペレットを形成した。この細胞ペレットを、先行ステップで使用したものと同一サイトカインを含む新鮮培地に、1 mlあたりの生存細胞 0.5×10^6 個の細胞で再懸濁した。

【0249】

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

【0250】

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

【0251】

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

【0252】

IFNガンマの細胞内サイトカイン染色により抗原特異的T細胞を調査する。ペプチド刺激後または 1×10^6 細胞/ml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（5 µg/mlの個々のペプチド）、またはPHA（5 µg/ml、陽性対照）で刺激した。4時間後、BD GolgiPlug（商標）（1:1000、BD Biosciences）を添加してゴルジ輸送を遮断した。8時間後、細胞を洗浄し、製造元の説明に従ってBD Cytofix/Cytoperm（商標）キットを用い、細胞外抗体（CD3、CD4またはCD8；BD Biosciences）を添加した。

10

20

30

40

50

ces) および細胞内抗体 (IFNガンマ; BD Biosciences) で染色した。BD FACSCalibur (商標) Flow Cytometerで試料を分析した。適切なアイソタイプ適合抗体で標識した対照試料を各実験に含めた。Flowjoソフトウェアを使用してデータを分析した。

【0253】

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

【0254】

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

【0255】

(実施例4：実験的ベクターによるCCR5のノックダウン)

AGTc120は、多量のCD4およびCCR5を安定に発現するHela細胞株である。LV-CMV-mCherry (CMV最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ありまたはなしでAGTc120に形質導入を行った。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最初期プロモーター) 発現カセットによって制御された。LV-CMV-mCherryベクターはマイクロRNAクラスターを欠いていたが、AGT103/CMV-mCherryは、CCR5、Vif、およびTatに対する治療用miRNAを発現した。

【0256】

図9Aに示されるように、形質導入効率は>90%であった。7日後、細胞を収集し、CCR5に対する蛍光モノクローナル抗体で染色し、分析的フローサイトメトリーに供した。CCR5 APCの平均蛍光強度 (x軸) を最頻値に正規化した細胞数 (y軸) に対してプロットするこれらのヒストグラムにおいて、アイソタイプ対照は灰色で示されている。細胞表面CCR5について染色した後、レンチウイルスな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) で処置した細胞はCCR5密度の変化を示さなかったが、AGT103 (右のセクション) は、CCR5染色強度をアイソタイプ対照のレベル近くまで低減させた。7日後、R5向性HIVレポーターウイルスBaL-GFPありまたはなしで細胞を感染させた。3日後に細胞を収集し、フローサイトメトリーによって分析した。90%超の細胞が形質導入されていた。AGT103-CMV/CMVmCherryは、対照ベクターで処置された細胞と比較して、形質導入されたAGTc120細胞におけるCCR5発現を低減させ、R5向性HIV感染を遮断した。

【0257】

図9Bは、トランスフェクトされたAGTc120細胞のHIV感染に対する相対的な非感受性を示す。上記のように、レンチウイルスベクターはmCherryタンパク質を発現し、HIVにも感染した (GFPを発現する) 形質導入細胞は、フォールスカラーフローサイトメトリードットプロットの右上象限に二重陽性細胞として現れることになる。HIVの非存在下 (上パネル) では、いかなる条件下でも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56%の細胞が感染し、LV-CMV-mCherryが形質導入されたAGTc120細胞では53.6%の細胞が感染した。治療用AGT103/CMV-mCherryベクターを細胞に形質導入したとき、細胞が形質導入され感染したことを示す二重陽性象限には、細胞の0.83%しか現れなかった。

【0258】

53.62 (対照ベクターを含む二重陽性細胞の割合) を0.83 (治療用ベクターを

10

20

30

40

50

含む二重陽性細胞の割合)で割ると、この実験系においてAGT103が65倍超のHIVからの保護をもたらしたことが示される。

【0259】

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

阻害性RNAのデザイン。Homo sapiensケモカイン受容体CCR5 (CCR5、NC 000003.12)の配列を使用して、ヒト細胞においてCCR5レベルをノックダウンする潜在的なsiRNAまたはshRNA候補を検索した。Broad InstituteのプログラムまたはThermo ScientificのBLOCK-IT RNA iDesignerなどのsiRNAまたはshRNAデザインプログラムによって選択された候補から、潜在的なRNA干渉配列を選択した。shRNA配列を、RNAポリメラーゼIIIプロモーター、例えばH1、U6、または7SKのすぐ後でプラスミドに挿入し、shRNA発現を調節することができる。shRNA配列は、CMVまたはEF-1アルファなどのRNAポリメラーゼIIIプロモーターによる発現を可能にするために、同様のプロモーターを使用してレンチウイルスベクターに挿入するか、またはマイクロRNA骨格内に包埋してもよい。RNA配列は、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から独立して利用することもできる。

【0260】

プラスミドの構築。CCR5 shRNAについて、BamHIおよびEcoRI制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を、MWG Operonによって合成した。オリゴヌクレオチド配列を70℃でインキュベートすることによってアニールし、次いで室温に冷ました。アニールしたオリゴヌクレオチドを37℃で1時間にわたり制限酵素BamHIおよびEcoRIで消化し、次いで70℃で20分間にわたり酵素を不活化した。並行して、プラスミドDNAを、37℃で1時間にわたり、制限酵素BamHIおよびEcoRIで消化した。消化されたプラスミドDNAをアガロースゲル電気泳動によって精製し、InvitrogenのDNAゲル抽出キットを使用してゲルから抽出した。DNA濃度を決定し、血漿とオリゴヌクレオチド配列を3:1のインサート対ベクター比でライゲートした。ライゲーション反応は、室温で30分間T4 DNAリガーゼを用いて行った。2.5μLのライゲーションミックスを、25μLのSTBL3コンピテント細菌細胞に添加した。形質転換には42℃での熱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Lプロスにおいて拡大増殖させた。オリゴ配列の挿入を調べるために、採取した細胞培養物からInvitrogenのDNAMiniプレップキットを使用してプラスミドDNAを抽出し、制限酵素消化によって試験した。shRNA発現を調節するために使用したプロモーターに特異的なプライマーを使用したDNAシーケンシングにより、プラスミドへのshRNA配列の挿入を検証した。

【0261】

CCR5 mRNAの低減に関する機能アッセイ：CCR5発現の阻害に関するアッセイでは、2つのプラスミドの共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に対して指向された5つの異なるshRNA配列のうちの1つを含有する。第2のプラスミドは、ヒトCCR5遺伝子のcDNA配列を含有する。プラスミドを293T細胞に共トランスフェクトした。48時間後、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SuperScript Kitを使用し、RNAからcDNAを合成した。次いで、Applied Biosystems Step One PCR機械を使用した定量的RT-PCRにより、試料を分析した。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'-AGGAATTGATGGCGAGAAGG-3') (配列番号93)およびリバースプライマー(5'-CCCCAAGAAGGTCAAGGTAATCA-3') (配列番号94)を使用し、InvitrogenのSYBR Greenを用いてCCR5発現を検出した。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' - AGCGCGGCTACAGCTTCA - 3') (配列番号 95) およびリバースプライマー (5' - GGCGACGTAGCACAGCTTCT - 3') (配列番号 96) を使用し、ベータアクチン遺伝子発現に関する mRNA に対して試料を正規化した。各試料についてアクチンメッセンジャー RNA のレベルに正規化した Ct 値によって CCR5 mRNA の相対発現を決定した。結果を図 10 に示す。

【0262】

図 10A に示されるように、CCR5 shRNA 構築物および CCR5 発現プラスミドの共トランスフェクションにより、293T 細胞における CCR5 のノックダウンを試験した。対照試料には、いずれのヒト遺伝子もターゲティング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、試料を採取し、定量的 PCR によって CCR5 mRNA レベルを測定した。さらに、図 10B に示されるように、CCR5 shRNA-1 (配列番号 16) を発現するレンチウイルスの形質導入後の CCR5 ノックダウン。

【0263】

(実施例 6：レンチウイルスベクターにおける shRNA 阻害剤配列による HIV 成分の調節)

阻害性 RNA のデザイン。

HIV1 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、

Rev/Tat:

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

Gag:

(5' GAAGAAATGATGACAGCATTTTCAAGAGAATGCTGTTCATCATTTCTTCTTTTTT - 3') (配列番号 12) の shRNA をデザインした。これらは、上述のように合成し、プラスミドにクローニングした。

【0264】

プラスミドの構築。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的に使用されてい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。さらに、1つのプラスミドは、Rev/Tat shRNA を発現するように構築し、第2のプラスミドは、Gag shRNA を発現するように構築した。プラスミドの構築は上述の通りであった。

【0265】

Rev/Tat または Gag mRNA の shRNA ターゲティングに関する機能アッセイ：本発明者らはプラスミドの共トランスフェクションを使用し、shRNA プラスミドが、共トランスフェクトされた細胞においてルシフェラーゼメッセンジャー RNA を分解し、発光の強度を減少させることができるかどうかを試験した。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最大光収量を確認した。3' - UTR (mRNA の非翻訳領域) に挿入された Rev/Tat 標的配列を含有するルシフェラーゼ構築物を、Rev/Tat shRNA 配列とともに共トランスフェクトすると、発光が約 90% 低減し、shRNA 配列の強力な機能が示された。3' - UTR に Gag 標的配列を含有するルシフェラーゼ構築物を、Gag shRNA 配列とともに共トランスフェクトしたとき、同様の結果が得られた。これらの結果は、shRNA 配列の強力な活性を示す。

【0266】

図 11A に示されるように、293T 細胞における一過性のトランスフェクションによって 3' UTR 内の標的 mRNA 配列に融合した Rev/Tat 標的遺伝子のノックダウンを、ルシフェラーゼ活性の低減によって測定した。図 11B は、ルシフェラーゼ遺伝子に融合した Gag 標的遺伝子配列のノックダウンを示す。結果は、それぞれ三連で行った 3

10

20

30

40

50

つ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。

【0267】

(実施例7：AGT103はTatおよびVifの発現を減少させる)

例示的なベクターAGT103／CMV-GFPを細胞にトランスフェクトした。AGT103および他の例示的なベクターは、以下の表3に定義してある。

【表3-2】

表3

ベクターの呼称	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-細胞表面上の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 タンパク質の発現レベルを低下させることができる合成マイクロRNA	
miR185Tat-HIV RNA および Tat タンパク質の発現レベルを低下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最初期転写プロモーター	
mCherry-mCherry 赤色蛍光タンパク質のコード領域	
GFP-緑色蛍光タンパク質のコード領域	
WPRE-ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント	

【0268】

Tリンパ芽球様細胞株 (CEM; CCRF-CEM; American Type Culture Collectionカタログ番号CCL119) にAGT103／CMV-GFPを形質導入した。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、細胞からRNAを抽出し、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Tat配列のレベルを試験した。図12に示されるように、インタクトなTat RNAの相対発現レベルは、対照レンチウイルスベクターの存在下でおよそ850から、AGT103／CMV-GFPの存在下でおよそ200まで低下し、全体で>4分の1の低下であった。

【0269】

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

阻害性RNAのデザイン。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なsiRNAまたはshRNA候補を検索した。Broad InstituteのプログラムまたはThermo ScientificのBLOCK-IT RNA iDesignerなどのsiRNAまたはshRNAデザインプログラムによって選択された候補から、潜在的なRNA干渉配列を選択した。TatまたはVifのノックダウンに最も強力である選択した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を可能にするために、マイクロRNA骨格内に包埋した。RNA配列は、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から独立して使用することもできる。

【0270】

プラスミドの構築。Tat標的配列 (5'-TCCGCTTCTTCCTGCCATAG

−3′) (配列番号7) をmiR185の骨格に組み込んで、Tat miRNA (5′−GGCCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCC TGCCATAGCGTGGTCCCCCTCCCCCTATGGCAGGCAGAAAGCG GCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTCG−3′) (配列番号3) を作り出し、こ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′−GGGATGTGTACTTCTGAACCTT−3′) (配列番号6) をmiR21の骨格に組み込んで、Vif miRNA (5′−CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACCTTGTGTGTGAATCTCATGGAGTTTCAGAA GAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTGACCA−3′) (配列番号2) を作り出し、こ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。結果として得られた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系を使用して293T細胞内で産生した。VifおよびTat miRNAを、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からなるマイクロRNAクラスターに包埋した。

【0271】

Tat mRNAの蓄積のmiR185 Tatによる阻害に関する機能アッセイ。293T細胞に形質導入するため、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に等しい感染多重度で使用した。形質導入の24時間後、標準的条件下でLipofectamine2000を使用し、HIV株NL4−3を発現するプラスミド (pNL4−3) を細胞にトランスフェクトした。24時間後、RNAを抽出し、Tat特異的プライマーを使用したRT−PCRによってTatメッセンジャーRNAのレベルを試験し、対照のアクチンmRNAレベルと比較した。

【0272】

Vifタンパク質の蓄積のmiR21 Vifによる阻害に関する機能アッセイ。293T細胞に形質導入するため、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に等しい感染多重度で使用した。形質導入の24時間後、Lipofectamine2000を使用し、HIV株NL4−3を発現するプラスミド (pNL4−3) 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。確立された技術に従い、SDS−PAGEによって細胞溶解物を分離した。分離したタンパク質をナイロン膜に移し、Vif特異的モノクローナル抗体またはアクチン対照抗体でプローブした。

【0273】

図13Aに示されるように、対照レンチウイルスベクターか、または合成miR185 TatもしくはmiR155 Tatのいずれかのマイクロ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細胞において、Tatのノックダウンを試験した。24時間後、HIVベクターpNL4−3をLipofectamine2000と共に24時間トランスフェクトし、次いで、Tatに対するプライマーを用いたqPCR分析のためにRNAを抽出した。図13Bに示されるように、対照レンチウイルスベクターか、または合成miR21 Vifのマイクロ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細胞において、Vifのノックダウンを試験した。24時間後、HIVベクターpNL4−3をLipofectamine2000と共に24時間トランスフェクトし、次いで、HIV Vifに対する抗体を用いた免疫ブロット分析のためにタンパク質を抽出した。

【0274】

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

10

20

30

40

50

CCR5の合成miR30配列（AGT103：TGTA AACTGAGCTTGCTCTA（配列番号97）、AGT103-R5-1：TGTA AACTGAGCTTGCTTCGC（配列番号98）、またはAGT103-R5-2：CATAGATTGGACTTGACAC（配列番号99））を含有するレンチウイルスベクターを、CEM-CCR5細胞に形質導入した。6日後、APCコンジュゲートCCR5抗体を用いたFACS分析によってCCR5発現を決定し、平均蛍光強度（MFI）によって定量化した。CCR5レベルは、100%に設定したLV-対照を用いて%CCR5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番と同じ領域内にある。AGT103-R5-2の標的配列は、CCR5標的配列1番と同じである。AGT103（全CCR5の2%）は、AGT103-R5-1（全CCR5の39%）、およびCCR5レベルを低下させないAGT103-R5-2と比較して、CCR5レベルを低下させるのに最も有効である。このデータは本明細書で図14に実証されている。

【0275】

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

【0276】

ベクターの構築。レンチウイルスベクターは、多くの場合、治療用遺伝子または遺伝子構築物の最適な発現のためにRNA調節エレメントを必要とする。一般的な選択肢は、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：

(5' AATCAACCTCTGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCACTCCTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACCTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCTTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCTTCCGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCCGGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCT-3')

（配列番号32）

を含有するAGT103を、短縮されたWPREエレメント

(5' AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTA ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGTCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTC-3')（配列番号80）

を含有する改変されたAGT103ベクターと比較した。

【0277】

ベクター配列における長鎖対短鎖WPREエレメントに応じた細胞表面CCR5発現の調整に関する機能アッセイ。長鎖または短鎖のWPREエレメントを含有するAGT103を、5に等しい感染多重度でCEM-CCR5 T細胞に形質導入するために使用した。形質導入の6日後に細胞を収集し、細胞表面CCR5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。この抗体は蛍光マーカーにコンジュゲートされており、その染色の強度は、細胞表面上のCCR5のレベルに正比例する。対照レンチウイルスは細胞表面CCR5レベルに影響を及ぼさず、平均蛍光強度が73.6単位の単一集団がもたらされた。長鎖WPREエレメントを有する従来のAGT103は、CCR5発現を11単位の平均蛍光強度レベルまで低減させた。短鎖WPREエレメントを組み込むよう

【 0 2 7 8 】

10

【 0 2 8 0 】

20

30

40

50

CTGGCAGTTTCTCCAAAGGGTAACAGGTGTCAGCTGGCTGAGCCTAGGCTGAACCCTGA
GACATGCTACCTCTGTCTTCTCATGGCTGGAGGCAGCCTTTGTAAGTCACAGAAAGTAG
CTGAGGGGCTCTGGAAAAAAGACAGCCAGGGTGGAGGTAGATTGGTCTTTGACTCCTGA
TTTAAGCCTGATTCTGCTTAACCTTTTCCCTTGACTTTGGCATTTCCTTTGACATGTT
CCCTGAGAGCCTGGGGGGTGGGGAACCCAGCTCCAGCTGGTGACGTTTGGGGCCGGCCC
AGGCCTAGGGTGTGGAGGAGCCTTGCCATCGGGCTTCCTGTCTCTCTTCATTTAAGCAC
GACTCTGCAGA-3') (配列番号30)

を使用し、CD4糖タンパク質発現のためのT細胞特異的プロモーターを置換した。

【0284】

細胞表面でのCCR5タンパク質の発現を低減させる効力という点でEF-1およびCD4遺伝子プロモーターを比較する機能アッセイ。通常のEF-1プロモーターの代わりにCD4遺伝子プロモーターを用いることにより改変されたAGT103を、CEM-CCR5 T細胞の形質導入に使用した。形質導入の6日後に細胞を収集し、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。この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おり、染色強度は、細胞表面CCR5タンパク質のレベルに正比例する。対照レンチウイルスの形質導入は、CCR5特異的モノクローナル抗体で染色されたCEM-CCR5 T細胞の集団をもたらし、81.7単位の平均蛍光強度をもたらした。マイクロRNAを発現させるためにEF-1プロモーターの代わりにCD4遺伝子プロモーターを使用して改変されたAGT103は、平均蛍光強度が17.3単位のほぼ等しい広い染色の分布を示した。この結果に基づくと、EF-1プロモーターは、マイクロRNAの発現に関してCD4遺伝子プロモーターと少なくとも同様であり、これより優れている可能性が高い。所望の標的細胞集団に応じて、EF-1プロモーターは、すべての細胞型で普遍的に活性があり、CD4プロモーターは、Tリンパ球においてのみ活性がある。

【0285】

CCR5、Vif、およびTatの合成マイクロRNA配列を調節するCD4プロモーターを含有するレンチウイルスベクター(AGT103)を、CEM-CCR5細胞に形質導入した。6日後、APCコンジュゲートCCR5抗体を用いたFACS分析によってCCR5発現を決定し、平均蛍光強度(MFI)として定量化した。CCR5レベルは、100%に設定したLV-対照を用いて%CCR5として表した。LV-CD4-AGT103を形質導入した細胞において、CCR5レベルは全CCR5の11%であった。これは、EF1プロモーターを含有するLV-AGT103で観察されたものと同等である。このデータは図17に実証されている。

【0286】

(実施例13: HIV Gag 特異的CD4 T細胞の検出)

細胞および試薬。凍結された生存可能な末梢血単核細胞(PBMC)をワクチン会社から得た。候補HIV治療用ワクチンを試験する早期臨床試験(治験登録: clinicaltrials.gov NCT01378156)に登録したHIV+の個体由来する代表的な検体を用い、データを得た。「ワクチン接種前」および「ワクチン接種後」の研究のために2つの検体を得た。細胞培養製品、サプリメント、およびサイトカインは商業的供給元から得た。Thompson, et al. (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の組換え改変ワクチンニアAnkara 62Bに対する応答について、細胞を試験した。HIV-1 Gagポリタンパク質の全体を表す合成ペプチドをGeovaxから得て、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、それぞれ15アミノ酸長であり、11個のアミノ酸が重複している、150個のペプ

チドを含有する。これらを化学的に合成し、次いで精製し、液体クロマトグラフィー質量分析によって分析した。集合的に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性領域を表し、公知のHIV株の間で57.8%の平均カバレッジ (coverage) となるようデザインされている。ペプチド配列は、Los Alamos National LaboratoryのHIV配列データベース (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>) に基づいている。各ペプチドにつき25マイクログラムの乾燥したトリフルオロ酢酸塩としてペプチドを提供し、およそ40マイクロリットルのDMSOに溶解させ、次いで最終濃度までPBSで希釈する。CD4および細胞質のIFNガンマ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て、インターフェロンガンマに対してBD PharmingenのIntracellular Staining Kitを用いて細胞内染色を行った。ペプチドをDMSOに再懸濁した。DMSOのみの対照条件が含まれる。

【0287】

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、サプリメント、およびサイトカインを含有するRPMI培地に再懸濁した。ワクチン接種前または後に収集した、培養されたPBMCを、Golgi Stop試薬の存在下で20時間にわたり、DMSO対照、MVA GeoVax (細胞あたり1プラーク形成単位に等しい感染多重度)、Peptides 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) で処置した。細胞を収集し、洗浄し、固定し、透過処理し、そして細胞表面CD4または細胞内インターフェロンガンマに特異的なモノクローナル抗体で染色した。染色された細胞をFACSCalibur分析用フローサイトメーターで分析し、CD4+T細胞サブセットでデータをゲーティングした。四角で囲まれた領域内の強調された細胞は二重陽性であり、MVAまたはペプチドでの刺激後のインターフェロンガンマ発現に基づいてHIV特異的CD4+T細胞と指定される。四角で囲まれた領域内の数字は、全CD4のうちHIV特異的と特定されたもののパーセンテージを示す。DMSOまたはMVAに対する強い応答は検出されなかった。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細胞を誘発したが、差異はわずかであり、有意ではなかった。

【0288】

図18に示されるように、ワクチン接種前または後のHIV陽性患者由来の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、本明細書ではGagペプチドプール2とも呼ばれる) で20時間刺激した。標準的な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り、IFNγ産生を検出した。フローサイトメトリーデータは、CD4+T細胞に対してゲーティングした。四角内に捕捉された数字は、全CD4+T細胞のうち、抗原特異的刺激に対するサイトカイン応答に基づいて「HIV特異的」と指定されたもののパーセンテージである。

【0289】

(実施例14: HIV特異的CD4+T細胞の拡大増殖およびレンチウイルスの形質導入)

PBMCを濃縮してHIV特異的CD4+T細胞の割合を増加させ、これらの細胞にAGT103を形質導入して細胞産物AGT103Tを産生するための方法のデザインおよび試験。

【0290】

治療用HIVワクチンを受けたHIV陽性患者のPBMC (末梢血単核細胞) のex vivo培養のためのプロトコールをデザインした。この実施例において、治療用ワクチンは、3用量のHIV Gag、Pol、およびEnv遺伝子を発現するプラスミドDN

10

20

30

40

50

Aに続いて、2用量の同じHIV Gag、Pol、およびEnv遺伝子を発現するMVA 62-B（改変ワクシニアAnkara番号62-B）からなった。このプロトコールはワクチン製品に特異的でなく、免疫化後のHIV特異的CD4+T細胞の十分なレベルしか必要としない。静脈血を収集し、Ficoll-Paque密度勾配遠心分離によってPBMCを精製した。代わりに、抗体カクテルを使用した陽性または陰性選択方法および蛍光活性化または磁性ビーズソーティングによって、PBMCまたは規定の細胞トラクション（cellular traction）を調製してもよい。精製されたPBMCを洗浄し、サプリメント、抗生物質、およびウシ胎仔血清を含有する標準的な培地で培養する。これらの培養物に、HIV Gagポリタンパク質内の可能性のあるT細胞エピトープを代表する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の組み合わせを試験した後に選択されたインターロイキン2およびインターロイキン12のサイトカインを添加することにより、培養物を補完する。ペプチド刺激には、およそ12日間の培養期間が続く。12日間の培養中、新鮮培地および新鮮なサイトカインサプリメントをおよそ4日ごとに1回添加した。

【0291】

ペプチド刺激期間は、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デザインされている。これらのHIV特異的CD4 T細胞は、事前の治療的免疫化によって活性化させた。これらは、合成ペプチドへの曝露によって再刺激し、増殖させてもよい。本発明者らの目標は、全体の1%を超えるかまたはこれに等しいCD4 T細胞がペプチド刺激培養期間の終わりまでにHIV特異的であることを達成することである。

【0292】

培養のおよそ12日目に細胞を洗浄して、残存する材料を除去し、次いで、CD4 T細胞表面タンパク質のCD3およびCD28に対する抗体で修飾された合成ビーズで刺激する。T細胞のポリクローナル刺激のためのこの十分に確立された方法は、細胞を再活性化し、AGT103レンチウイルスの形質導入に対して細胞をより感受性にする。レンチウイルス形質導入は培養のおよそ13日目に行われ、1から5の間の感染多重度を使用する。形質導入後、細胞を洗浄して残存する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を含有する培地中で培養し、新鮮培地およびサイトカインを培養のおよそ24日目までおよそ4日ごとに1回添加する。

【0293】

培養期間の間中、抗レトロウイルス薬のサキナビルをおよそ100 nMの濃度で添加し、あらゆる可能性のあるHIVの増大を抑制する。

【0294】

培養のおよそ24日目に細胞を採取し、洗浄し、効力およびリリース（release）アッセイのために試料を取っておき、次いで残りの細胞を凍結保存培地に懸濁してから、AGT103が形質導入されたおよそ 1×10^8 個のHIV特異的CD4 T細胞を含有する、1用量あたり細胞およそ 1×10^{10} 個の単一のアリコートにおいて凍結する。

【0295】

2つの交互の効力アッセイのうちの1つにおいて、細胞産物（AGT103T）の効力を試験する。効力アッセイ1では、CD4 T細胞1個あたりのゲノムコピー（組み込まれたAGT103ベクター配列）の平均数を試験する。産物をリリースするための最小の効力は、CD4 T細胞1個あたりおよそ0.5個のゲノムコピーである。このアッセイは、磁性ビーズで標識したモノクローナル抗体を使用してCD3陽性/CD4陽性T細胞の陽性選択を行い、全細胞DNAを抽出し、定量的PCR反応を使用してAGT103ベクターに特有の配列を検出することにより行う。効力アッセイ2では、HIV特異的CD4 T細胞の亜集団内における組み込まれたAGT103のゲノムコピーの平均数を試験する。このアッセイは、まず、HIV Gagタンパク質を代表する合成ペプチドのプールでPBMCを刺激することにより達成される。次いで、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捕捉することもできる特異的抗体試薬で細胞を染色する。CD4陽性／インターフェロンガンマ陽性細胞を磁性ビーズ選択によって捕捉し、全細胞DNAを調製し、細胞1個あたりのAGT103のゲノムコピー数を定量的PCR反応によって決定する。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1個あたり0.5個を超えるかまたはこ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。

【0296】

治療用HIVワクチンを受けたHIV陽性患者のPBMCからHIV特異的CD4 T細胞を濃縮し形質導入するための機能試験。HIV特異的CD4 T細胞の頻度に対する治療用ワクチン接種の影響をペプチド刺激アッセイによって試験した（図19パネルB）。

ワクチン接種前のHIV特異的CD4 T細胞の頻度は、この代表的個体において0.036%であった。ワクチン接種後、HIV特異的CD4 T細胞の頻度は、0.076%の値までおよそ2倍増加した。細胞質のインターフェロンガンマの蓄積により特定される応答細胞（HIV特異的）は、特異的ペプチド刺激後にしか検出されなかった。

【0297】

本発明者らはまた、HIV特異的CD4 T細胞を濃縮するためのペプチド刺激の後にAGT103形質導入を行った場合、培養物中の全CD4 T細胞のうち、HIV特異的であり、かつAGT103が形質導入されたものをおよそ1%生成するという本発明者らの目標が達成されるかどうかを試験した。この場合において本発明者らは、緑色蛍光タンパク質（GFPを参照）を発現する実験用バージョンのAGT103を使用した。図19、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、ワクチン接種後の培養により、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たインターフェロンガンマの発現に基づく）、かつAGT103が形質導入された（GFPの発現に基づく）ことが実証された。

【0298】

治療用HIVワクチン研究における数名の患者を試験して、ペプチド刺激への応答の範囲を評価し、将来のヒトでの臨床試験における遺伝子療法アームに参加するための適格性基準の定義付けを開始した。図19パネルDは、4名のワクチン試験参加者のワクチン接種前および後の検体を比較し、これらの参加者におけるHIV特異的CD4 T細胞の頻度を示す。3つの事例において、ワクチン接種後の検体は、全CD4 T細胞の0.076%を超えるかまたはこれと等しいHIV特異的CD4 T細胞の値を示す。この値に達する能力は、ワクチン接種前の検体からは予想されなかった。なぜなら、患者001-004および患者001-006の両方で、ワクチン接種前のHIV特異的CD4 T細胞の値は0.02%から開始したが、一方ではワクチン接種後のHIV特異的CD4 T細胞の最終的な値が0.12%に達し、他方の個体ではワクチン接種後にこの値が増加していないためである。HIV特異的CD4 T細胞の頻度を増加させるという点でワクチンに良好に応答した同患者3名は、ペプチド刺激および培養後のHIV特異的CD4 T細胞の実質的な濃縮も示した。図19パネルEに示される3つの事例では、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特異的であった試料が生成された。これらの値は、治療用HIVワクチンに応答する個体の大多数が、全CD4 T細胞のうちおよそ1%が、最終的な細胞産物においてHIV特異的でありAGT103が形質導入されたものであることを達成する本発明者らの目標を可能にするために、ペプチド刺激に対して十分に大きなex vivo応答を有することを示す。

【0299】

図19に示されるように、パネルAには処置のスケジュールが記載されている。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FACSによる細胞内染色によって検出した。CD4⁺T細胞を分析のためにゲーティングした。パネルCは、CD4⁺T細胞を拡大増殖し、パネルAに示される方法を使用してAGT103-GFPを形質導入したことを実証する。

拡大増殖したCD4⁺T細胞は、サイトカインを全く含まない新鮮培地中で2日間静置し、GagペプチドまたはDMSO対照で20時間にわたって再刺激した。IFNガンマ産生およびGFP発現をFACSによって検出した。CD4⁺T細胞を分析のためにゲーティングした。パネルDは、HIV特異的CD4⁺T細胞（IFNガンマ陽性、ワクチン接種前および後）の頻度が4名の患者から検出されたことを実証する。パネルEは、4名の患者由来のワクチン接種後のPBMCを拡大増殖し、HIV特異的CD4⁺T細胞を調査したことを実証する。

【0300】

（実施例15：用量応答）

ベクターの構築。AGT103の改変バージョンを構築して、漸増するAGT103に対する用量応答および細胞表面CCR5レベルに対するその影響を試験した。AGT103は、CMVプロモーターの制御下の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 mir185TatマイクロRNAクラスターを発現し、GFPの発現に起因して緑色光を発する。

【0301】

漸増するAGT103-GFP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0～5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。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、形質導入された細胞を染色した。染色の強度は、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。

【0302】

図20に示されるように、パネルAは、漸増するAGT103-GFPに対する用量応答および細胞表面CCR5発現に対するその影響を実証する。0.4に等しい感染多重度では、細胞のうち1.04%だけが、緑色であり（形質導入を示す）、かつ著しく低減したCCR5発現を示す。1に等しい感染多重度では、CCR5 low, GFP+細胞数は、68.1%に増加する／5に等しい感染多重度では、CCR5 low, GFP+細胞数は、95.7%に増加した。これらのデータは、AGT103-GFPの漸増用量と共により低い平均蛍光強度に向かう、CCR5染色という点で正規分布の集団を示す図20のパネルBにおいて、ヒストグラム形態で提示されている。AGT103-GFPの効力は、AGT103-GFPの漸増用量に伴うCCR5発現の阻害パーセンテージを示す図20のパネルCにグラフ形態で提示されている。5に等しい感染多重度では、CCR5発現レベルが99%を超えて低下した。

【0303】

（実施例16：AGT103は初代ヒトCD4⁺T細胞を効率的に形質導入する）

AGT103レンチウイルスベクターでの初代CD4⁺T細胞の形質導入。緑色蛍光タンパク質マーカー（GFP）を含有する改変されたAGT103ベクターを、精製された初代ヒトCD4⁺T細胞に形質導入するため、0.2から5の間の感染多重度で使用した。

【0304】

初代ヒトCD4⁺T細胞におけるAGT103の形質導入効率に関する機能アッセイ。磁性ビーズ標識抗体および標準的な手順を使用して、CD4⁺T細胞をヒトPBMC（HIV陰性ドナー）から単離した。精製されたCD4⁺T細胞をCD3/CD28ビーズでex vivoにて刺激し、AGT103形質導入前にインターロイキン2を含有する培地で1日培養した。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間の関係は、図21パネルAに実証されており、0.2に等しい感染多重度ではCD4陽性T細胞のうち9.27%にAGT103が形質導入され、5に等しい感染多重度ではCD4陽性T細胞の63.1%にAGT103が形質導入されて、この値が増加したことが示されている。初代CD4陽性T細胞の効率的な形質導入を達成することに加えて、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21パネルBでは、細胞あたりの

ゲノムコピー数を決定するために、いくつかの感染多重度で形質導入した初代ヒトCD4⁺T細胞の全細胞DNAを定量的PCRによって試験した。0.2に等しい感染多重度では、パネルAにおける9.27%のGFP陽性CD4⁺T細胞と十分一致する、細胞1個あたり0.096個のゲノムコピーが測定された。1に等しい感染多重度では、細胞1個あたり0.691個のゲノムコピーが生成され、5に等しい感染多重度では、細胞1個あたり1.245個のゲノムコピーが生成された。

【0305】

図21に示されるように、PBMCから単離したCD4⁺T細胞をCD3/CD28ビーズとIL-2で1日間刺激し、様々な濃度でAGT103を形質導入した。2日後にビーズを除去し、CD4⁺T細胞を収集した。パネルAに示されるように、形質導入された細胞（GFP陽性）の頻度をFACSによって検出した。パネルBに示されるように、細胞あたりのベクターコピー数をqPCRによって決定した。5の感染多重度（MOI）では、CD4⁺T細胞の63%に、細胞あたり平均1個のベクターコピーが形質導入された。

【0306】

（実施例17：AGT103は初代CD4⁺T細胞におけるHIV複製を阻害する）

初代ヒトCD4陽性T細胞にAGT103を形質導入することによる細胞のHIV感染からの保護。治療用レンチウイルスAGT103を、初代ヒトCD4陽性T細胞に形質導入するため、細胞あたり0.2から5の間の感染多重度で使用した。次いで形質導入された細胞に、侵入のために細胞表面CCR5を必要としないCXCR4向性HIV株NL4.3を負荷した。このアッセイは、初代CD4陽性T細胞における増殖性感染を防止するという点での、HIVのVifおよびTat遺伝子に対するマイクロRNAの効力を試験するが、感染した初代ヒトCD4⁺T細胞から放出されるHIVの量を検出するためには、間接的な方法を使用する。

【0307】

初代ヒトCD4陽性T細胞のCXCR4向性HIV感染からのAGT103による保護に関する機能アッセイ。磁性ビーズ標識抗体および標準的な手順を使用して、CD4⁺T細胞をヒトPBMC（HIV陰性ドナー）から単離した。精製されたCD4⁺T細胞をCD3/CD28ビーズでex vivoにて刺激し、0.2から5の間の感染多重度を使用して、AGT103形質導入前にインターロイキン2を含有する培地で1日培養した。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を負荷した。形質導入しHIVに曝露した初代CD4⁺T細胞培養物を7日間維持してから、HIVを含有する無細胞培養液を収集した。この無細胞培養液を使用して、高度に許容性のT細胞株C8166を2日間にわたって感染させた。HIVに感染したC8166細胞の割合を、フローサイトメトリーでGFPの蛍光を検出することによって決定した。模擬レンチウイルス感染では、感染多重度0.1の用量のNL4.3 HIVについて、C8166 T細胞の15.4%において増殖性感染を確立することができる量のHIVが培養液中に放出された。感染多重度0.2の用量のAGT103について、C8166細胞のHIV感染に関するこの値は5.3%に低減し、1に等しい感染多重度のAGT103では、C8166 T細胞の3.19%しかHIVに感染しなかった。C8166感染は、5に等しい感染多重度を使用したAGT103形質導入後に、さらに0.62%に低減した。形質導入に使用されるAGT103の量と、培養培地中に放出されるHIVの量との間には、明らかな用量応答関係がある。

【0308】

図22に示されるように、PBMCから単離したCD4⁺T細胞をCD3/CD28ビーズとIL-2で1日間刺激し、様々な濃度（MOI）でAGT103を形質導入した。2日後にビーズを除去し、CD4⁺T細胞を0.1MOIのHIV NL4.3-GFPに感染させた。24時間後、細胞をPBSで3回洗浄し、IL-2（30U/ml）と共に7日間培養した。培養の最後に上清を収集して、HIV許容性細胞株C8166を2日間にわたって感染させた。HIVに感染したC8166細胞（GFP陽性）をFACSによって検出した。C8166細胞の感染低下によって観察されるように、AGT103の

感染多重度の増加に伴い、生存可能なHIVが低減した(MOI 0.2 = 65.6%、MOI 1 = 79.3%、およびMOI 5 = 96%)。

【0309】

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

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細胞へのAGT103の形質導入。健康なHIV陰性ドナーからPBMCを得て、CD3/CD28ビーズで刺激し、次いでインターロイキン2を含有する培地で1日培養してから、0.2から5の間の感染多重度を使用したAGT103の形質導入を行った。

【0310】

HIV媒介性細胞病理からの初代ヒトCD4⁺T細胞のAGT103による保護に関する機能アッセイ。AGT103を形質導入した初代ヒトCD4⁺T細胞を、細胞進入のためにCCR5を必要としないHIV NL4.3株(CXCR4向性)に感染させた。CXCR4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の影響のみが試験されている。HIV NL4.3の用量は感染多重度0.1であった。HIV感染の1日後、細胞を洗浄して残存ウイルスを除去し、インターロイキン2を加えた培地で培養した。14日間の培養中3日ごとに細胞を収集し、次いで、CD4に特異的であり、かつ蛍光マーカーに直接コンジュゲートされた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。無処置のCD4⁺T細胞、または対照レンチウイルスベクターを形質導入したCD4⁺T細胞は、HIV負荷に対して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%未満に下がった。対照的に、AGT103には、HIV負荷による細胞枯渇の防止に対して用量依存的効果があった。感染多重度0.2のAGT103用量では、培養14日目までにPBMCの20%超がCD4⁺T細胞であったが、この値は、5に等しい感染多重度のAGT103用量では、PBMCの50%超が培養14日目までにCD4陽性T細胞となるまで増加した。繰り返すが、AGT103には、ヒトPBMCにおけるHIV細胞変性に対して明らかな用量応答効果がある。

【0311】

図23に示されるように、PBMCをCD3/CD28ビーズとIL-2で1日間刺激し、様々な濃度(MOI)でAGT103を形質導入した。2日後にビーズを除去し、細胞を0.1MOIのHIV NL4.3に感染させた。24時間後、細胞をPBSで3回洗浄し、IL-2(30U/ml)と共に培養した。細胞を3日ごとに収集し、CD4⁺T細胞の頻度をFACSによって分析した。HIVに14日間曝露した後、LV-対照を形質導入したCD4⁺T細胞は87%低減し、AGT103 MOI0.2では60%低減し、AGT103 MOI1では37%低減し、AGT103 MOI5では17%低減した。

【0312】

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

HIVに対する治療用ワクチン接種がCD4⁺、CD8⁺、およびCD4⁺/CD8⁺T細胞の分布に及ぼした影響は最小限であった。図24Aに示されるように、CD4⁺T細胞集団は、分析的フローサイトメトリドットプロットの左上象限に示されており、一連のワクチン接種後に全T細胞の52%から57%に変化している。これらは代表的なデータである。

【0313】

HIV治療用ワクチン治験の参加者由来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において12日間にわたり培養した。一部の培養物は、T細胞刺激のためのエプトープペプチドの供給源としての、HIV-1のp55 Gagタンパク質全体を表す重複するペプチド(HIV(GAG)Ultraペプチド混合物)で刺激した。これらのペプチドは

10

20

30

40

50

10～20アミノ酸長であり、HIV-1 BaL株のGag前駆体タンパク質（p55）の全体を表すようにそれらの長さの20～50%が重複している。個々のペプチドの組成および配列は、主な循環HIV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関して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CD4または抗CD8モノクローナル抗体で染色し、CD3+集団をゲーティングし、ここに表示した。ワクチン接種前または後のいずれの試料についても、HIV（GAG）Ultraペプチド混合物による刺激は培地対照と同様であり、HIV（GAG）Ultraペプチド混合物は細胞に対して毒性ではなく、ポリクローナルマイトジェンとして作用していなかったことが示された。この分析の結果は図24Bに見出すことができる。

10

【0314】

HIV（GAG）Ultra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CD4 T細胞の最適な拡大増殖をもたらした。図24Cの上パネルに示されるように、HIV（GAG）Ultraペプチド混合物に曝露されたワクチン接種後の検体では、サイトカイン（インターフェロンガンマ）を分泌する細胞が増加した。ワクチン接種前の試料では、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%に増加した。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CD4 T細胞のうち0.62から1.76%へ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、HIV抗原へのCD4 T細胞の応答に対するワクチン接種の強い影響を実証する。

20

【0315】

最後に、抗原で拡大増殖したCD4 T細胞にAGT103／CMV-GFPを形質導入すると、HIVの機能的治癒の一環として患者に注入するために必要であるHIV特異的でHIV耐性のヘルパーCD4 T細胞が産生された（他の様々な態様および実施形態によれば、AGT103単独が使用される；例えば、臨床的实施形態はCMV-GFPセグメントを含まなくてもよい）。図24Dの上パネルは、培養物中のCD4+T細胞集団を分析した結果を示す。図24Dのx軸は、個々の細胞にAGT103／CMV-GFPが形質導入されたことを示す、緑色蛍光タンパク質（GFP）の発光を示す。図24Dに示されるように、ワクチン接種後の試料では、全CD4 T細胞のうち、両方のサイトカインを分泌するものが1.11%回収され、これらの細胞がHIV抗原に特異的に応答し、またAGT103／CMV-GFPが形質導入されていることが示された。これが標的細胞集団であり、注入およびHIVの機能的治癒のために意図される臨床産物である。抗原刺激およびその後のex vivo培養のポリクローナル拡大増殖期に細胞拡大増殖の効率により、 4×10^8 個の抗原特異的な、レンチウイルスを形質導入したCD4 T細胞が産生され得る。これは細胞産生の標的を4倍上回り、これにより、抗原特異的でHIV耐性のCD4 T細胞が、血液1マイクロリットルあたり細胞およそ40個、または全循環CD4 T細胞の約5.7%という数が達成できるであろう。

30

【0316】

以下の表4は、開示されているベクターおよび方法を使用した、HIV特異的でHIV耐性のCD4 T細胞のex vivo産生の結果を示す。

40

【表 4】

表 4			
材料/操作	全 CD4 T 細胞	HIV 特異的のパーセンテージ	HIV 特異的および HIV 耐性のパーセンテージ
HIV+患者の白血球除去パック	約 7×10^8	約 0.12	該当なし
ペプチド拡大増殖 ex vivo	約 8×10^8	約 2.4	該当なし
マイトジェン拡大増殖	約 1.5×10^{10}	約 2.4	該当なし
レンチウイルス形質導入	約 1.5×10^{10}	約 2.4	約 1.6

【0317】

(実施例 20：HIV の処置のための臨床研究)

AGT103T は、AGT103 レンチウイルスベクターも形質導入されている、 $> 5 \times 10^7$ 個の HIV 特異的 CD4 T 細胞を含有する、遺伝子改変された自己 PBMC である。

【0318】

第 I 相臨床試験では、cART を受けている間に、HIV 感染、血液 1 mm^3 あたり CD4 + T 細胞数 > 600 個の細胞、および血漿 1 ml あたり 200 個未満のコピーの安定なウイルス抑制が確認された、成人の研究参加者に、ex vivo で改変された自己 CD4 T 細胞 (AGT103T) を注入することの安全性および実現可能性を試験する。研究参加者はすべて、第 I 相臨床試験の間、各自の標準的な抗レトロウイルス薬物適用を継続して受けることになる。最大 40 名の研究参加者が、HIV Gag、Pol、および Env タンパク質を発現する組換え改変ワクシニア Ankara (rMVA) の筋肉内注射による 2 用量を 8 週間おいて受ける。第 2 の免疫化の 7 ~ 10 日後、in vitro 試験のために血液試料を収集し、HIV-1 Gag ポリタンパク質を代表する重複する合成ペプチドのプールによる刺激に応答する CD4 + T 細胞の頻度を測定する。Gag 特異的 CD4 T 細胞の頻度の測定に基づき、ワクチン応答者のうち上位半数の被験体を遺伝子療法アームに登録し、応答者のうち下位半数の被験体は研究を継続しない。上位の応答者のカットオフは、全 CD4 T 細胞のうち $\geq 0.065\%$ の HIV 特異的 CD4 + T 細胞の頻度であることが予測される。本発明者らの試験の遺伝子療法アームに登録された被験体に白血球除去を施し、これに続いて、ex vivo で培養し、HIV Gag ペプチドとインターロイキン 2 およびインターロイキン 12 で 12 日間刺激し、次いで CD3 / CD28 二重特異性抗体で修飾されたビーズで再度刺激した、PBMC の精製を行う (Ficoll 密度勾配遠心分離または抗体による陰性選択を使用する)。ex vivo 培養中の自己 HIV の出現を防止するため、抗レトロウイルス薬のサキナビルを 100 nM で含める。CD3 / CD28 刺激の 1 日後、1 から 10 の間の感染多重度で AGT103 を細胞に形質導入する。形質導入された細胞をさらに 7 ~ 14 日間培養し、この間それらはポリクロナル増殖によって拡大増殖する。培養期間は、細胞を採取および洗浄し、効力および安全性リリースアッセイのためにアリコートを取っておき、残りの細胞を凍結保存培地に再懸濁することによって終了する。単回用量は、 $\leq 1 \times 10^{10}$ 個の自己 PBMC である。効力アッセイは、インターフェロンガンマを発現することによりペプチド刺激に応答する CD4 T 細胞の頻度を測定する。他のリリース基準としては、HIV 特異的であり AGT103 も形質導入されている CD4 T 細胞が 0.5×10^7 個以上生成物に含まれていなければならないことが挙げられる。別のリリース基準は、細胞あたりの AGT103 ゲノムコピー数が 3 を超えてはならないことである。AGT103T 注入

の5日前、被験体は、1用量のブスルフラム (busulfuram) (またはCyttoxan) の馴化レジメンの後、遺伝子改変されたCD4 T細胞を含有する $\leq 1 \times 10^{10}$ 個のPBMCの注入を受ける。

【0319】

第II相研究では、AGT103T細胞療法の有効度を評価する。第II相研究の参加者には、本発明者らの第I相研究に既に登録しており、遺伝子改変された自己のHIV特異的CD4 T細胞の成功裏かつ安定な生着を有し、有効度評価(1.3.)に記載されるようにモニタリングされるパラメータの肯定的な変化として定義される臨床応答を有すると判断された個体が含まれる。研究参加者は、各自の既存の抗レトロウイルス薬物適用のレジメンにマラビロクを加えるよう求められる。マラビロクは、CCR5レベルの低下を目的とする遺伝子療法の有効性を増強するCCR5アンタゴニストである。マラビロクレジメンが実施されたら、被験体は、それまでの抗レトロウイルス薬物レジメンを中止し、28日間にわたり、または2回の連続した毎週の採血時の血漿中ウイルスRNAレベルが1mlあたり10,000を超えるまで、マラビロク単独療法のみを維持するよう求められる。ウイルス血症が持続的に高い場合、参加者は、各自のHIVケアの医師の推奨に従ってマラビロクありまたはなしで、各自の元の抗レトロウイルス薬物レジメンに戻るよう要請される。

【0320】

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

【0321】

患者の選択

組み入れ基準：

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

除外基準：

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

- ・ 別の臨床治験に現在参加しているか、または何らかの以前の遺伝子療法

【0322】

安全性評価

- ・ 急性注入反応
- ・ 注入後安全性追跡調査

【0323】

有効度評価 - 第Ⅰ相

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

【0324】

有効度評価 - 第Ⅱ相

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

【0325】

AGT103Tは、 $\geq 5 \times 10^7$ 個のHIV特異的CD4⁺ T細胞を含有し、AGT103レンチウイルスベクターも形質導入されている、最大 1×10^{10} 個の遺伝子改変された自己CD4⁺ T細胞からなる。第Ⅰ相臨床治験では、cARTを受けている間に、HIV感染、血液1mm³あたりCD4⁺ T細胞数>600個の細胞、および血漿1mlあたり200個未満のコピーの安定なウイルス抑制が確認された、成人の研究参加者において、*ex vivo*で改変された自己CD4⁺ T細胞（AGT103T）を注入することの安全性および実現可能性を試験する。最大40名の研究参加者が、HIV Gag、Pol、およびEnvタンパク質を発現する組換え改変ワクシニアAnkara（rMVA）の筋肉内注射による2回の用量を8週間おいて受ける。第2の免疫化の7~10日後、*in vitro*試験のために血液試料を収集し、HIV-1 Gagポリタンパク質を代表する重複する合成ペプチドのプールによる刺激に応答するCD4⁺ T細胞の頻度を測定する。Gag特異的CD4⁺ T細胞の頻度の測定に基づき、ワクチン応答者のうち上位半数の被験体を遺伝子療法アームに登録し、応答者のうち下位半数の被験体は研究を継続しない。上位の応答者のカットオフは、全CD4⁺ T細胞のうち $\geq 0.065\%$ のHIV特異的CD4⁺ T細胞の頻度であることが予測される。本発明者らの治験の遺伝子療法アームに登録された被験体に白血球除去を施し、CD4⁺ T細胞を陰性選択によって濃縮する。濃縮されたCD4サブセットをCD4陰性サブセットの細胞数の10%と混合して、供給源および抗原提示細胞を提供する。濃縮されたCD4⁺ T細胞をHIV Gagペプチドとインターロイキン2およびインターロイキン12で12日間刺激し、次いで、CD3/CD28二重特異性抗体で修飾されたビーズで再度刺激する。*ex vivo*培養中の自己HIVの出現を防止するため、抗レトロウイルス薬のサキナビルを100nMで含める。CD3/CD28刺激の1日後、1から10の間の感染多重度でAGT103を細胞に形質導入する。形質導入された細胞をさらに7~14日間培養し、この間それらはポリクローナル増殖によって拡大増殖する。培養期間は、細胞を採取および洗浄し、効力および安全性リリースアッセイのためにアリコートを取っておき、残りの細胞を凍結保存培地に再懸濁することによって終了する。単回用量は、CD4⁺ T細胞サブセットが濃縮された $\leq 1 \times 10^{10}$ 個の自己細胞である。効力アッセイは、インターフェロンガンマを発現する

10

20

30

40

50

ことによりペプチド刺激に応答するCD4⁺ T細胞の頻度を測定する。他のリリース基準としては、HIV特異的でありAGT103も形質導入されているCD4⁺ T細胞が 0.5×10^7 個以上生成物に含まれていなければならないことが挙げられる。別のリリース基準は、細胞あたりのAGT103ゲノムコピー数が3を超えてはならないことである。AGT103T注入の5日前、被験体は、1用量のブスルファミン（またはCytotaxan）の馴化レジメンの後、 $\leq 1 \times 10^{10}$ 個の濃縮され遺伝子改変されたCD4⁺ T細胞の注入を受ける。

【0326】

第II相研究では、AGT103T細胞療法の有効度を評価する。第II相研究の参加者には、本発明者らの第I相研究に既に登録しており、遺伝子改変された自己のHIV特異的CD4⁺ T細胞の成功裏かつ安定な生着を有し、有効度評価（1.3.）に記載されるようにモニタリングされるパラメータの肯定的な変化として定義される臨床応答を有すると判断された個体が含まれる。研究参加者は、各自の既存の抗レトロウイルス薬物適用のレジメンにマラビロクを加えるよう求められる。マラビロクは、CCR5レベルの低下を目的とする遺伝子療法の有効性を増強するCCR5アンタゴニストである。マラビロクレジメンが実施されたら、被験体は、それまでの抗レトロウイルス薬物適用のレジメンを中止し、28日間にわたり、または2回の連続した毎週の採血時の血漿中ウイルスRNAレベルが1mlあたり10,000を超えるまで、マラビロク単独療法のみを維持するよう求められる。ウイルス血症が持続的に高い場合、参加者は、各自のHIVケアの医師の推奨に従ってマラビロクありまたはなしで、各自の元の抗レトロウイルス薬物レジメンに戻るよう要請される。

【0327】

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

【0328】

。

【表5-1】

配列

本明細書では、以下の配列が参照される。

配列番号	説明	配列
1	miR30 CCR5	AGGTATATGTCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCT TGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAG TTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT
2	miR21 Vif	CATCTCCATGGCTGTACCACTTGTGCGGGGATGTGACTT CTGAACCTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACAT CCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCACTTGACCA
3	miR185 Tat	GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC CTGCCATAGCGTGG TCCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCC AATGACCGCGTCTTCGTCG
4		CCGGTGCTAGAGAAGGTGGCGGGGTAACTGGGAAAG TGATGTCTGTACTGGCTCCGCTTTTCCCGAGGGTGGGG

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

	伸長因子1アルファ (EF1-アルファ) プロモーター	GAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTATCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAAGTGGGTGGGAGAGTTGAGGGCTTGGCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCTGGCCTGGCGCTGGGGCCGCCGCTGCGAATCGGTGGCACCTTCGCGCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAAATTTTGATGACCTGCTGCACGCTTTTTCGGCAAGATAGTCTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCGTGCGTCCAGCGCACATGTTGCGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCGGGCTGCTGTGTGCTGGCCTCGCGCCCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGCGGCAAGGCTGGCCCGTCCGACCAAGTTGCGTGAGCGGAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTGGGAGAGCGGGCGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAGGGCCTTTTCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCAAGGAGTACCGGGCGCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTATGCGATGGAGTTTCCCACTGAGTGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCCTTGGAAATTGCCCCTTTGGATTGGATCTTGGTTCAATTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTCCTCCATTTCAAGGTGTCGTGA
5	CCR5 標的配列	GAGCAAGCTCAGTTTACA
6	Vif 標的配列	GGGATGTGACTTCTGAACTT
7	Tat 標的配列	TCCGCTCTCTGCTGCAATAG

10

20

【表 5 - 3】

8	TAR デコイ配列	CTTGCAATGATGTCGTAATTTGCGTCTTACCTCGTTCGACAGCGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTGTCAGTAGCTGGTACAGAAGGTTGACGAAAATCTTACTGAGCAAGAAA
9	Rev/Tat 標的配列	GCGGAGACAGCGACGAAGAGC
10	Rev/Tat shRNA 配列	GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTTTT
11	Gag 標的配列	GAAGAAATGATGACAGCAT
12	Gag shRNA 配列	GAAGAAATGATGACAGCATTTCAGAGAATGCTGTCATCATTTCTTTTT
13	Pol target 標的配列	CAGGAGCAGATGATACAG
14	Pol shRNA 配列	CAGGAGATGATACAGTTCAAGAGACTGTATCATCTGCTCTGTTTT
15	CCR5 標的配列1番	GTGTCAAGTCCAATCTATG
16	CCR5 shRNA 配列1番	GTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGAGACATAGATTGGACTTGACACTTTTT
17	CCR5 target 標的配列2番	GAGCATGACTGACATCTAC
18	CCR5 shRNA 配列2番	GAGCATGACTGACATCTACTTCAAGAGAGTAGATGTCAGTCATGCTCTTTTT
19	CCR5 標的配列3番	GTAGCTCTAACAGGTTGGA
20	CCR5 shRNA 配列3番	GTAGCTCTAACAGGTTGGATTCAAGAGATCCAACCTGTTAGAGCTACTTTTT
21	CCR5 target 標的配列4番	GTTCAAGAACTACCTCTTA
22	CCR5 shRNA	GTTCAAGAACTACCTCTTATTCAAGAGATAAGAGGTAGTTT

30

40

50

【表 5 - 4】

	配列4番	CTGAACCTTTT
23	CCR5 標的配列5番	GAGCAAGCTCAGTTTACACC
24	CCR5 shRNA 配列5番	GAGCAAGCTCAGTTTACACCTTCAAGAGAGGTGTAACTG AGCTTGCTCTTTT
25	Homo sapiens CCR5 遺伝子、 配列1	ATGGATTATCAAGTGTCAGTCCAATCTATGACATCAATTA TTATACATCGGAGCCCTGCCAAAAATCAATGTGAAGCAA ATCGCAGCCCGCTCTGCCTCCGCTCTACTACTGGTGT CATCTTTGGTTTGTGGGC
26	Homo sapiens CCR5 遺伝子、 配列2	AACATGCTGGTCATCTCATCTGATAAACTGCAAAAGGCT GAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTCAACCTGGCCATCT CTGACCTGTTTTCTCTTACTGTCCCTTCTGGGCTCACT ATGCTGCCGCCAGTGGGACTTTGGAAATACAATGTGTCAA CTCTGACAGGGCTCTATTATAGGCTTCTCTGGAATC TTCTTCATCATCTCTGACAATCGATAGGTACCTGGCTGT CGTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAAGCCAGGACGGTCACCT TTGGGGTGTGACAAAGTGTGATCACTTGGGTGGTGGTGTG TTTGCTCTCTCCAGGAATCATCTTACCAGATCTCAAAA AGAAGGTCTTATTACACCTGCAGCTCTATTITCCATACA GTCAGTATCAATTCTGGAAGAAATTCAGACATTAAAGATA GTCATCTTGGGGCTGGTCTGCCGTGCTTGTATGGTCAT CTGCTACTCGGGAATCTTAAAACTCTGCTTCGGTGTGAA ATGAGAAGAAGAGGCACAGGGCTGTGAGGCTTATCTTAC CATCATGATTGTTATTTTCTTCTGGCTCCCTACAACAT TGCTCTTCTCTGAAC
27	Homo sapiens CCR5 遺伝子、 配列3	ACCTTCCAGGAATCTTTGGCCTGAATAATTGCAGTAGCTC TAACAGGTGGACCAAGCTATGCAGGTGA
28	Homo sapiens CCR5 遺伝子、 配列4	CAGAGACTCTTGGGATGACGCACTGCTGCATCAACCCATC ATCTATGCCCTTTGTCGGGAGAAAGTTCAGAACTACCTCTT AGTCTCTTCCAAAAGCACATTGCCAAACGCTTCTGCAAT GCTGTTCTATTTCCAG

10

20

【表 5 - 5】

29	Homo sapiens CCR5 遺伝子、 配列5	CAAGAGGCTCCCGAGCGAGCAAGCTCAGTTTACACCCGAT CCACTGGGGAGCAGGAAATATCTGTGGGCTTGTGA
30	CD4プロモーター 配列	TGTTGGGTTCAAATTTGAGCCCAAGCTGTTAGCCCTCTGC AAAGAAAAAAGAAAAAAGAACAAAGGGCTAGAT TTCCCTTCTGAGCCCACTTAAGATGAAGCTTCTTTCA AGGAGTGGGTTGGGTGGAGGCGATCCTGTCAGCTTT GCTCTCTGTGGCTGGCAGTTTCTCAAAGGGTAACAGGT GTCAGCTGGCTGAGCCTAGGCTGAACCTGAGACATGCTA CCTCTGCTTCTCATGGCTGGAGGCGCCTTTGTAAGTCAC AGAAAGTAGCTGAGGGGCTTGGAAAAAGACGCCAGG GTGGAGGTAGATTGGTCTTTGACTCCTGATTAAAGCCTGAT TCTGCTTAACTTTTCTTCTGACTTTGGCATTTCACTTTGA CATGTTCCCTGAGAGCTTGGGGGTGGGAACCCAGCTCC AGCTGGTGACGTTTGGGCGGCCAGGCCTAGGCTGTGG AGGAGCCTTGCCATCGGGCTTCTGCTCTCTTCAATTAAG CACGACTCTGCAGA
31	miR30- CCR5/miR21- Vi/miR185 Tai マイクロRNA クラスター配列	AGGTATATTGCTGTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCT TGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAG TTTACCGCTGCTTACTGCTCGGACTTCAAGGGGCTTCCG GGCATCTCCATGGCTGTACCCTTGTCTGGGGGATGTGTAC TTCTGAACCTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAAGAAACAC ATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAG CGGGCTGGCTCGAGCAGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTT CCTGCCATAGCGTGGTCCCTCCCTATGGCAGGCAGAAAGC GGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCTCTTCGTC
32	長鎖WPRE配列	AATCAACCTCTGATTACAAAATTTGTGAAGATTGACTGGT ATTCTTAACTATGTTGCTCTTTTACGCTATGTGGATACGCT GCTTTAATGCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCGCTATGGCT TTCATTTTCTCTCTTGTATAAATCTGGTGTGCTGTCTTT ATGAGGAGTTGTGGCCGTTGTACGGCAACGTGGCGTGGT GTGCACTGTGTTGCTGACGCAACCCCACTGGTGGGGCA

30

40

50

【表 5 - 6】

		TTGCCACCACCTGTCAGCTCTTTCCGGGACTTTCGCTTCC CCCTCCCTATGCGCACGGGGAACATCGCCGCTGCCTT GCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACA ATTCCGTGTTGTCGGGGAAATCATGCTCTTTCCTTGG CTGCTCGCTGTGTGTCACCTGGATTCTGCGGGGACGTC CTTCTGCTACGTCCTTTCGGGCTCAATCCAGCGGACCTTC CTTCCCGGGCTGCTGCGGGCTCTGCGGCTCTTCCGCGT CTTCGCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCTTTGGGC CGCTCCCCGCT
33	伸長因子1アル ブ (EF1アル ブ)プロモ ーター:miR30CC R5:miR21Vif: miR185 Tat	CCGGTGCTAGAGAAGGTGGCGGGGTAACCTGGGAAAG TGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCTTTTCCCGAGGGTGGGG GAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTT TTTCGCAACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGT GTGTGGTTCCCGGGGCTGGCTCTTACGGGTTATGGCC CTTGCTGCTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTA CGTGATCTTGATCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGG AGAGTTCGAGGCTTGGCTTAAGGAGGCCCTTCGCCCTCGT GCTTGAGTTGAGGCTTGCTGGGCTGGGCGCGCGG TGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCTGCTCGCTGCTTTC GATAAGTCTTAGCCATTAAAAATTTTGATGACCTGCTGC GACGCTTTTTCGGCAAGATAGTCTTGAATGCGGGCC AAGATCTGCACACTGGTATTTGCTTTTGGGCGCGGGC GGCGACGGGGCCGTGCTGCCAGCGCACATGTTGGCGA GGCGGGGCTGCGAGCGCGCCACCGAATCGGACGGGG GTAGTCTCAAGCTGGCGGCTGCTGCTGGTGCCTGGCTCG CGCGCGGTGTATCGCCCGCTGGCGGCAAGGCTGGC CCGGTCCGACAGTTGCTGAGCGGAAAGATGGCGCTT CCCGGCTGCTGAGGAGCTCAAAATGAGGACGCGGC GCTCGGAGAGCGGGCGGTGAGTCAACACACAAAGGAA AAGGGCTTTTCCGTCTCAGCGCTGCTTCAITGACTCCA CGGAGTACCGGGCGCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCG AGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTT

10

20

【表 5 - 7】

		TTATGCGATGGAGTTTCCCACTAGTGGGTGGAGACTG AAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTGGAA TTTGCCCTTTTGAGTTTGGATCTTGGTCAATTCAAGCCT CAGACAGTGGTTCAAAGTTTTCCTTCATTTCAGGTGTCG TGATGTACA <u>AGGTATATTGCTGTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCT</u> <u>TGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAG</u> <u>TTTACCGTGCTTACTGCTCGGACTTCAAGGGGCTTCCG</u> <u>GGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGGGGGATGTGTAC</u> <u>TTCTGAACCTGTGTGTAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACAC</u> <u>ATCCGCACTGACATTTGGTATCTTCATCTGACCACTAG</u> <u>CGGGCTGGCTCGAGCAGGGGCGAGGGATTCCGCTTCT</u> <u>CTTGCCATAGCGTGGTCCCTCCCTATGGCAGGCAGAAAGC</u> <u>GGCACCTTCCCTCCCAATGACCGGCTTTCGTC</u>
34	ラウス肉腫 ウイルス (RSV)プロ モーター	GTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAA CGATGAGTTAGCAACATGCCCTACAAAGGAGAGAAAAGCA CCGTGCATGCCGATTGGTGAAGTAAGGTGGTACGATCGT GCCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTG GACGAACCCTGAATTGCCGATTGACAGAGATATTGATTT AAGTGCTAGCTCGATACAATAAAGC
35	5' 末端反復配列 (LTR)	GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCT GGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAGCTT GCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCGGCTGTTGTGTG ACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCTTTTAGTCAGTG TGGAAAATCTTAGCA
36	Psiバク ンジンシグナル	TACGCCAAAAATTTGACTAGCGAGGCTAGAAGGAGAGA G
37	Rev応答エレ メント (RRE)	AGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCA CTATGGGCGCAGCCTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAG ACAATTATTGCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTGC TGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCAC AGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAACTCTGGCT

30

40

50

【表 5 - 8】

		GTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCC
38	中心ポリブリ ントラクト (cPPT)	TTTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGG GAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTA AAGAATTACAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTTTA
39	3' デルタLTR	TGGAAGGGCTAATTCCTCCCAACGAAGATAAGATCTGCTT TTTGCTTGACTGGGTCTCTCGGTAGACCAGATCTGAGC CTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGC CTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCC CGTCTGTTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACC CTTTTAGTCAGTGTGGAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCAT GTCA
40	ヘル パー/Rev:CMV 初期 (cag)エン ハンサー:転写 を増強する	TAGTTATTAAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTCATA GCCCCATATGGAGTTCGCGTTACATAAATTACGGTAAAT GGCCCGCTGGCTGACCGCCCACGACCCCCGCCCCATTGAC GTCAATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCCAATAGGG ACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAAC TGCCCACTTGCGAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCGCGCTGG CATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTG GCAGTACATCTACGTATTAGTCATC
41	ヘルパー/Rev: ニワトリペー タアクチン (cag)プロモ ター:転写	GCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCA CTCTCCCCTCTCCCCCTCCCAACCCCAATTTGTATT TATTATTTTTTAATTATTTTGTGACGCGATGGGGCGGGG GGGGGGGGGCGCGGCCAGCGGGGCGGGCGGGGCGGA GGGGCGGGGCGGGCGAGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGC CAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTATGGCGA GGCGGCGGCGGGCGGCGCTATAAAAGCGAAGCGCGCG GCGGGCG
42		GGAGTCGCTGCGTTGCCCTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGC CGCTCGCGCGCGCCCGCCGGCTCTGACTGACCGCGTTAC TCCACAGGTGAGCGGGCGGACGGCCCTTCTCCTCCGGG

10

20

【表 5 - 9】

	ヘルパー/Rev: ニワトリペー タアクチンイ ントロン:遺伝 子発現を増強 する	CTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTTCTTTCT GTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGTCCGGGAGGGCCCT TTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGTGCGTGTGTGT GTGTGCGTGGGGAGCGCGCTGCGGCCCGCGTGCCTCGG CGGCTGTGAGCGCTCGGGCGCGGCGCGGGCTTTGTGCG CTCCGCGTGTGCGGAGGGAGCGCGCCGGGGCGGTGC CCCGCGTGCGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGCTGCG TGCGGGTGTGCGGTGGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGG CGCGCGGTGCGGGGTGTAACCCCTCTGACCCCTCC CGAGTTGCTGAGCACGGCCCGCTTCGGGTGCGGGCTCC GTGCGGGCGGTGCGCGGGGCTGCCGTGCCGGGCGGGG GTGGCGGCAAGTGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGCGCCT CGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGCGGCC GGAGCGCCGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCGACCCA TTGCCTTTATGGTAATCTGTCGAGAGGGCGCAGGACTTC CTTTGTCCCAATCTGGCGAGCCGAAATCTGGGAGGCGC CGCCGACCCCTCTAGCGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGG CGCCGCGAGGAAGGAAATGGGCGGGAGGGCTTCTGTGCG TCGCCGCGCCGCGTCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGGG CTGCCGAGGGGACGGGTGCTTCGGGGGGACGGGGCA GGCGGGGTTCGGCTTCTGCGGTGTGACCGGCGG
43	ヘル パー/Rev:HIV Gag:ウイルス カプシド	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTAG ATCGATGGGAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAAGAA AAAATATAAATTAACATATAGTATGGCAAGCAGGGAG CTAGAACGATTGCGAGTTAATCTGGCCTGTTAGAAACATC AGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCC CTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATAC AGTAGCAACCTCTATTGTGTGATCAAGGATAGAGATA AAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAG CAAAACAAAAGTAAAGAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCT GACACAGGACACAGCAATCAGGTACGCCAAAATTACCTTA TAGTGACAGAATCCAGGGGCAATGTTACATCAGGCCAT

30

40

50

【表 5 - 1 0】

		ATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAA GAGAAGGCTTTTCAGCCAGAAAGTGATACCATGTTTTAGC ATTATCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACCATG CTAAACACAGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGT TAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAAATGGGATAG AGTGCATCCAGTGCATGCAGGGCTATTGCACAGGCCAG ATGAGAGAACCAGGGGAAGTGACATAGCAGGAATACTA GTACCCCTCAGGAACAATAGGATGGATGACACATAATCC ACCTATCCAGTAGGAGAAATCTATAAAAGATGGATAATC CTGGGATTAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCA GCATTCTGGACATAAGACAAGGACCAAGGAACCTTTAG AGACTATGTAGACCGATTCTATAAACTCTAAGAGCCGAG CAAGCTTCAACAAGAGGTAAAAATGGGATGACAGAAACCT TGTTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTA AAAGCATTGGGACCAGGAGCGACACTAGAAGAAATGATGA CAGCATGTCAGGGAGTGGGGGACCCGGCCATAAAGCAAG AGTTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATCCAGCT ACCATATGATACAGAAAGGCAATTTTGAAGCAAGAA AGACTGTTAAGTGTTTCAATTGTGGCAAGAAAGGGACAT AGCCAAAATTCAGGGCCCTAGGAAAAGGGCTGTTGG AAATGTGGAAGGAAGGACACCAATGAAGATGTACTG AGAGACAGGCTAATTTTTAGGGAAGATCGGCTTCCAC AAGGGAAGGCCAGGGAATTTTTCAGAGCAGACCAGAGC CAACAGCCCCACCAGAAAGAGAGCTTCAGTTTGGGGAAGA GACAACAACCTCCTCTCAGAACAGGAGCCGATAGACAAG GAACGTATCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAG CGACCCCTCGTCACAATAA
44	ヘル ペー/Rev:HIV Pol:プロテアー ゼおよび逆転写 酵素	ATGAATTGCCAGGAAGATGGAAACAAAAATGATAGGGG GAATTGGAGGTTTTATCAAGTAGGACAGTATGATCAGAT ACTCATAGAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTA TTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCT GTGACTCAGATTGGCTGCACTTAAATTTCCCATAGTCC

10

20

【表 5 - 1 1】

		TATTGAGACTGTACCAAGTAAATTAAGCCAGGAATGGAT GGCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAA TAAAAGCATTAGTAGAAATTTGACAGAAATGGAAAAGGA AGGAAAAATTTCAAAATTTGGGCTGAAAATCCATACAAT ACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAAT GGAGAAAATTAGTAGATTTACAGAACTTAATAAGAGAAC TCAAGATTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCTG CAGGGTTAAAACAGAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGT GGCGATGCATATTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGACTTCA GGAAGTATACTGCAATTAACATACCTAGTATAAACAATGAG ACACCAGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGG GATGGAAAGGATCACAGCAATATTCAGTGTAGCATGAC AAAAATCTTAGAGCCTTTAGAAAAACAATCCAGACATA GTCATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGA CTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAAGTG AGACAACATCTGTTGAGGTGGGATTTACACACCAGACA AAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCTTTGGATGGGTTAT GAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCT GCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAA TTAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTATGCAG GGATTAAAGTAAGGCAATTATGTAACCTTCTTAGGGGAAC CAAAGCACTAACAGAAAGTAGTACCCTAACAGAAAGAGCA GAGCTAGAACTGGCAGAAAACAGGAGATTCTAAAAGAAC CGGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTTAATA GCAGAAATACAGAAAGCAGGGCAAGGCCAATGGACATATC AAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGGAAA ATATGCAAGAATGAAGGGTGCCACACTAATGATGTGAAA CAATTAACAGAGGCAGTACAAAAATAGCCACAGAAAGCA TAGTAATATGGGGAAAGACTCTAAATTTAAATTACCCATA CAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGC AAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTGTCAATACCCCT CCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGAAAGAACCCA
--	--	--

30

40

50

【表 5 - 1 2】

		TAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGGGCAGCCAA TAGGGAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTAAGTAC AGAGGAAGACAAAAAGTTGTCCCTAACGGACACAACAA ATCAGAAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAG GATTCGGGATTAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAAT ATGCAATTGGGAATCATTCAAGCACAAACAGATAAGAGTGA ATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATAAAA AAGGAAAAAGTCTACTGGCATGGGTACCAGCACACAAAG GAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATGGGTGGTCAGTGC TGGAAATCAGGAAAGTACTA
45	ヘルパー Rev: HIVインテ グラーゼ; ウイ ルスRNAの組み 込み	TTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAGA AATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAAC CTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTG ATAAATGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGCATGGACAAGT AGACTGTAGCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACAT TTAGAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTTCATGTAGCCAG TGGATATATAGAAGCAGAAGTAATCCAGCAGAGACAGGG CAAGAAACAGCATACTTCTCTTAAAATTAGCAGGAAGAT GGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTT CACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCTGTTGGTGGCGGGG ATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATCCCCAAGTCA AGGAGTAATAGAATCTATGAATAAGAATTAAAGAAAATT ATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAG CAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTAAAGAAA AGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGT AGACATAATAGCAACAGACATACAACATAAGAATTACAA AAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAG GGACAGCAGAGATCCAGTTGGAAAGGACAGCAAGGCTC CTCTGGAAAGGTGAAGGGGAGTAGTAATACAGATAATA GTGACATAAAGTAGTGCCAAAGAGAAAGCAAGATCAT CAGGGATTATGGAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTG GCAAGTAGACAGGATGAGGATTAA

10

20

【表 5 - 1 3】

46	ヘル パー/Rev: HIV RRE: Revエレ メントに結合 する	AGGAGCTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCA CTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAG ACAATTATTGTCTGGTATAGTGACAGCAGACAATTTGC TGAGGGCTATTGAGGGCAACAGCATCTGTGCAACTCAC AGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCTGGCT GTGGAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCT
47	ヘル パー/Rev: HIV Rev: 核外輸送お よびウイルス mRNAの安定化	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGCAGAAAGTCTCTC AAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTATCAAAGCAACCC ACCTCCAATCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAAT AGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGACAGATCCAT TCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCATTATCTGGGACGATC TGCGGAGCCTGTGCCTCTTACGCTACCACCGCTTGAGAGAC TTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAATCTCTGGGACG CAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAACTCTCTA CAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG
48	ヘルパー/Rev: ウサギベータ ロピンポリ A: RNA安定性	AGATCTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGACATCATGA AGCCCCITGAGCACTGACTCTGGCTAATAAGGAAATTT ATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTGTGTCTCTCA CTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAATCATTAAAAACATC AGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATA TGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCAT CAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCCA TAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTATATTTTG TTTTGTGTTATTTTCTTAAACATCCCTAAAAATTTCTCTTA CATGTTTTACTAGCCAGATTTTCTCTCTCTCTGACTACTC CCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTTATGAAGATC
49	ヘルパー: CMV 初期 (CAG) エン ハンサー: 転写 を増強する	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA GCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAAT GGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGAC GTCAATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCCAATAGGG ACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGAGTATTTACGGTAAAC TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA

30

40

50

【表 5 - 1 4】

		CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGG CAATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTG GCAGTACATCTACGTATTAGTCATC
50	ヘルパー；ニワ トリペータク チン(CAG)プロ モーター；転写	GCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCA CTCTCCCCATCTCCCCCCCCCCCCACCCCCAATTTTGATT TATTTATTTTAAATATTTTGTGACGCGATGGGGCGGGG GGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGGGGGGGCGGGCGA GGGGCGGGGGCGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGC CAATCAGAGCGGCGGCTCCGAAAGTTTCCTTTATGGCGA GGCGGCGGCGGCGGCGGCTATAAAAGCGAAGCGCGCG GCGGGCG
51	ヘルパー；ニワ トリペータク チン；遺伝子発 現を増強する	GGAGTCGCTGCGTTGCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGC CGCCTCGCGCCGCCGCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTAC TCCACAGGTGAGCGGGCGGACGGCCCTTCTCTCCGGG CTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTTCTTTCT GTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGCGCT TTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGTGCGTGTGTGT GTGTGCGTGGGGAGCGCGGTGCGGCCCGCGCTGCCGG CGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGGGGCTTTGTGCG CTCCGCGTGTGCGGAGGGGAGCGCGCGGGGGCGGTGC CCGCGGTGCGGGGGGTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCG TGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGG CGCGGCGGTGCGGCTGTAAACCCCCCTGACCCCCCTCC CGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCC GTGCGGGGCTGTGCGCGGGGCTGCCGTGCCGGCGGGGG GTGCGGCGAGGTGGGGGTGCGGGGCGGGCGGGCGCGCT CGGGCGGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGGGCGGGCC GGAGCGCGGGCGGTGTGAGGCGGGCGAGCCGACCCA TTGCTTTTATGTTAATCTGCGGAGGGGCGAGGGACTTC CTTTGTCCAAATCTGGCGGAGCGAAATCTGGGAGCGC CGCCGACCCCCCTAGCGGGCGGGCGAAGCGGTGCGG CGCGGCGAGGAAGGAATGGCGGGGAGGGCTTCGTGCG

10

20

【表 5 - 1 5】

		TCGCCGCGCCGCGTCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGGG CTGCCGAGGGGACGGCTGCTTTCGGGGGGGACGGGCA GGCGGGGTTCTGGCTTCTGGCTGTGACCGCGG
52	ヘルパー；HIV Gag；ウイルス カプシド	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAAATTAG ATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAAGAA AAAATATAAATTAACAATATAGTATGGGCAAGCAGGAG CTAGAACGATTGCGAGTTAATCTGGCCTGTTAGAAACATC AGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCC CTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATAC AGTAGCAACCTCTATTGTGTGATCAAAGGATAGAGATA AAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAG CAAAACAAAAGTAAGAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCT GACACAGGACACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCTTA TAGTGACAGAACATCCAGGGGCAATGGTACATCAGGCCAT ATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAA GAGAAGGCTTTTCAGCCAGAAAGTATACCATGTTTTCAGC ATTATCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATG CTAAACACAGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAATGT TAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAG AGTGATCCAGTGATGACAGGGCTATTGCACAGGCGCAG ATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACCTACTA GTACCTTCAGGAACAAATAGGATGGATGACACATAATCC ACCTATCCAGTAGGAGAAATCTATAAAAGATGGATAATC CTGGGATTAATAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCA GCATTCTGGACATAAGACAAGGACCAAGGAACCCCTTAG AGACTATGTAGACCGATTCTATAAACTCTAAGAGCCGAG CAAGCTTCACAAGAGGTAAAAAATTGGATGACAGAAACCT TGTTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAGACTATTTTA AAAGCATTTGGGACAGGAGCGACACTAGAAGAAATGATGA CAGCATGTACAGGAGTGGGGGACCCGGCCATAAAGCAAG AGTTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATCCAGCT ACCATAAATGATACAGAAAGGCAATTTAGGAACCAAGAA

30

40

50

【表 5 - 1 6】

		AGACTGTTAAGTGTTCATTGTGGCAAAGAAGGGCACAT AGCCAAAAATTGCAGGGCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGG AAATGTGGAAGGAAGGACACCAATGAAAGATTGTAAGT AGAGACAGGCTAATTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCCAC AAGGGAAGGCCAGGGAATTTTTCAGAGCAGACCAGAGC CAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAGA GACAACAATCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAG GAAGTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAG CGACCCCTGTCACAATAA
53	ヘルパー:HIV Pol:プロテ アーゼおよび 逆転写酵素	ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACAAAAATGATAGGGG GAATTGGAGGTTTATCAAAGTAGGACAGTATGATCAGAT ACTCATAGAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTA TTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCT GTTGACTCAGATTGGCTGCACITTAATTTTCCATTAGTCC TATTGAGACTGTACCAGTAAATTTAAAGCCAGGAATGGAT GGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAA TAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAGGA AGGAAAAATTTCAAAATTTGGGCTGAAATCCATACAAT ACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAAT GGAGAAAATTAGTAGATTTCAGAGAACTTAATAAGAGAAC TCAAGATTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCTCTG CAGGGTTAAACAGAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGT GGGCGATGCATATTTTTCAGTCCCTTAGATAAAGACTTCA GGAAATATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAATGAG ACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGG GATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCAGTGTAGCATGAC AAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAAACAAATCCAGACATA GTCATCTATCAATACATGGATGATTGTATGTAGGATCTGA CTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAAGT AGACAACATCTGTTGAGGTGGGGATTACCACACCAGACA AAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTTGGATGGGTAT GAATCCATCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCT

10

20

【表 5 - 1 7】

		GCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAA TTAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTATGCAG GGATTAAAGTAAGGCAATTATGTAACTTCTTAGGGGAAC CAAAGCACTAACAGAAAGTAGTACCCTAACAGAAAGCA GAGCTAGAACTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAGAAC CGGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTTAATA GCAGAAATACAGAAAGCAGGGCAAGGCCAATGGACATATC AAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAAACAGGAAA ATATGCAAGAAATGAAGGGTGGCCACTAATGATGTGAAA CAATTAAAGAGGAGTACAAAAATAGCCACAGAAAGCA TAGTAATATGGGGAAAGACTCTAAATTTAAATTACCCATA CAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGATATTGGC AAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCT CCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGAAAGAACCCA TAATAGGAGCAGAACTTCTATGTAGATGGGGCAGCCAA TAGGGAAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTAATGAC AGAGGAAGACAAAAAGTTGTCCCTTAACGGACACAACAA ATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAG GATTCGGGATTAGAAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAAAT ATGCATTGGGAATCATTCAAGCAACAACCAGATAAGAGTGA ATCAGAGTTAGTCAGTCAATAATAGAGCAGTTAATAAAA AAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTACCAGCACAAAAG GAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATGGGTGGTCACTGC TGAATCAGGAAAGTACTA
54	ヘルパー:HIV インテグラー ゼ:ウイルス RNAの組み込み	TTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAGA AATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTAAC CTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTG ATAAATGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGCATGGACAAGT AGACTGTAGCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACAT TTAGAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTCACTGTAGCCAG TGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCAGCAGAGACAGGG CAAGAAACAGCATACTTCTCTTAAATTAGCAGGAAGAT

30

40

50

【表 5 - 18】

		GGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATT CACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCTGTGGTGGCGGG ATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATCCCAAAGTCA AGGAGTAATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAAGAAAATT ATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAG CAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAGAAA AGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGT AGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAA AAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAG GGACAGCAGAGATCCAGTTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTC CTCTGGAAGGTGAAGGGCAGTAGTAATACAAGATAATA GTGACATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCAT CAGGGATTATGGAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTG GCAAGTAGACAGGATGAGGATTAA
55	ヘルパー:HIV RRE:Revエレ メントに結合 する	AGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTGGGAGCAGCAGGAAGCA CTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAG ACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTGTC TGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCAC AGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCTGGCT GTGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCT
56	ヘルパー:ウサ ギベータグロ ビンポリ A:RNA安定性	AGATCTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGA AGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTT ATTTTCATTGCAATAGTGTGTGGAATTTTGTGTCTCTCA CTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAATCATTTAAACATC AGAATGAGTATTGGTTTAGAGTTGGCAACATATGCCATA TGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCAT CAGTATATGAACAGCCCCCTGCTGCCATTCTTATTTCCA TAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTATATTTTG TTTGTGTATTATTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTA CATGTTTTACTAGCCAGATTTTCTCTCTCTGACTACTC CCAGTCATAGCTGTCCCTTCTCTTATGAAGATC
57		ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAATCTCTC

10

20

【表 5 - 19】

	Rev:RSVプロ モーター:転写	AAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCC ACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAAT AGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCAT TCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATC TGCGGAGCCTGTGCCCTTTCAGTACCACCGCTTGAGAGAC TTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAATCTTGGGACG CAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGAATCTCCTA CAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG
58	Rev:HIV Rev: 核外輸送およ びウイルス mRNAの安定化	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTC AAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCC ACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAAT AGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCAT TCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATC TGCGGAGCCTGTGCCCTTTCAGTACCACCGCTTGAGAGAC TTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAATCTTGGGACG CAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGAATCTCCTA CAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG
59	Rev:ウサギ ベータグロビ ンポリA:RNA安 定性	AGATCTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGA AGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTT ATTTTCATTGCAATAGTGTGTGGAATTTTGTGTCTCTCA CTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAATCATTTAAACATC AGAATGAGTATTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCAT ATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTC ATCAGTATATGAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTC CATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTATATTTT TGTTTTGTGTATTATTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCT TACATGTTTTACTAGCCAGATTTTCTCTCTCTGACTAC TCCAGTCATAGCTGTCCCTTCTCTTATGGAGATC
60	エンベロー プ:CMVプロ モーター:転写	ACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGG GGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACA TAACTTACGGTAAATGGCCGCTGGCTGACCGCCCAACG ACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCATA

30

40

50

【表 5 - 2 0】

		GTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG AGTATTTACGGTAACAGTCCCACTTGGCAGTACATCAAGTG TATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGG TAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTAT GGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC GCTATTACCATGGGTATGCGGTTTGGCAGTACATCAATGG GCGTGGATAGCGGTTTGAATCAGGGGATTTCAGTCTCC ACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTCACCAAAAT CAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACTCCGCCCAT GACGCAATGGCGGTAGCGGTGTACGGTGGGAGGTCTAT ATAAGC
61	エンペロープ、 ベータグロブリン イントロン：遺 伝子発現を増強 する	GTGAGTTTGGGGACCTTGATTGTTCTTTCTTTTCGCTATT GTAAAATTCATGTTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTCAGGGT GTTGTTAGAAATGGGAAGATGTCCTTGTATCACCATGGAC CCTCATGATAATTTGTTTCTTCACTTCTACTCTGTGAC AACCATTGCTCCTCTTATTTCTTTTCATTCTGTAACTTT TTCGTTAACTTTAGCTTGCAATTTGTAACGAATTTTAAATT CACTTTTGTATTATTTGTCAGATTGTAAGTACTTCTCTAATC ACTTTTCTTCAAGGCAATCAGGGTATATTATATGTACTTC AGCACAGTTTATAGAGAACAAATGTTATAATTAATGATAAG GTAGAAATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAAAT ATTTCTATTGGTAGAAACAACTACACCTGGTCAATCCT GCCTTCTCTTTATGTTTACAATGATATACACTGTTTGAGAT GAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCTCTGCT AACCATGTTCTATGCTTCTCTCTTTCTCTACAG
62	エンペロー プ：VSV-G：糖タ ンパク質エン ペロープ：細胞 進入	ATGAAGTGCCTTTTGTACTTACGCTTTTATTTCATTGGGGTG AATTGCAAGTTCACCATAGTTTTCACACAAACCAAAAGG AAACTGGAAATGTTCTTCTAATTACCAATTATGCCCCGT CAAGCTCAGATTAAATGGCATAATGACTTAATAGGCACA GCCTTACAAGTCAAAATGCCAAGAGTCACAAGGCTATTCT AAGCAGACGGTTGGATGTGTCATGCTTCCAAATGGGTCACT ACTTGTGATTTCGCTGGTATGGACCGAAGTATATAACACA

10

20

【表 5 - 2 1】

		TTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGG AAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACCTGGCTGAATCC AGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGACGG ATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTG CTGGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTTGATTACAGTT CATCAACGGAAAATGCAGCAATTACATATGCCCCACTGTCC ATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGG CTATGTGATTCTAACCTCATTTCATGGACATCACCTTCTTC TCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGCA CAGGGTTCAGAAAGTAACACTTTGCTTATGAAACTGGAGGC AAGGCCTGCAAAATGAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCA GACTCCCATCAGGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGAT CTCTTTGCTGCAGCCAGATTCCTGAATGCCAGAGGGTTC AAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTC TAATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATTCCTCTGTC CAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCAATCT CTCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCTAAAAACCCAGGA ACCGGTCCTGCTTTACCATATAATCAATGGTACCCTAAAATA CTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGTCCAA TCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACTACCAC AGAAAGGGAACCTGTGGGATGACTGGGCACTATGAAGAC GTGGAAATGGACCAATGGAGTTCTGAGGACCAAGTTCAG GATATAAGTTTCTTTATACATGATTGGACATGGTATGTTG GACTCCGATCTTCACTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTTGA ACATCCTCACATTCAGAGCGTCTTCGCAACTTCTGTATG ATGAGAGTTTATTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAAT CCAATCGAGCTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAATA GCTCTATTGCTCTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTG GACTATCTTGGTTCTCGAGTTGGTATCCATCTTTGCAATTA AATTAAGCACACCAAGAAAGACAGATTATACAGACAT AGAGATGA
63		AGATCTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGA

30

40

50

【表 5 - 2 2】

	エンベロープ; ウサギベータ グロビンボリ A:RNA安定性	AGCCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTT ATTTTCATTGCAATAGTGTGTGGAAATTTTGTGTCTCTCA CTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAATCATTAAAAACATC AGAATGAGTATTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCAT ATGCTGGCTGCCATGAACAAAGTTGGCTATAAGAGGTC ATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTC CATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTATATTT TGTTTTGTGTTATTTTTCTTTAACATCCCTAAAAATTTTCCT TACATGTTTTACTAGCCAGATTTTCTCTCTCTGACTAC TCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTCTCTTATGGAGATC
64	プロモーター; EF-1	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAG TGATGTCGTGTAAGTGTCCGCTTTTCCCGAGGGTGGGG GAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTT TTTCGCAACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGT GTGTGGTTCCCGCGGGCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCC CTTGCGTGCCCTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTA CGTGATTCTTGATCCGAGCTTCGGTTGGAAGTGGTGGG AGAGTTCGAGGCCCTTGCGCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGT GCTTGAGTTGAGGCCGTGGCTGGGCGCTGGGCGCGCGCG TGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCTGTCTCGCTGCTTTC GATAAGTCTTAGCCATTTAAATTTTGTATGACCTGCTGC GACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCC AAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTGGGGCCGCGGGC GGCGACGGGGCCCTGCGTCCAGCGCACATGTTGCGCGA GGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGG GTAGTCTCAAGCTGGCGGCTGCTGCTGCTGCGCTCG CGCCGCCGTGATCGCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGC CCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTT CCCGGCCCTGCTGCGAGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGC GCTCGGAGAGCGGGCGGTGAGTACCCACACAAGGAA AAGGGCTTTCCGTCTCAGCCGTGCTTATGTGACTCCA CGGAGTACCGGGCGCGCTCCAGGCACCTCGATTAGTTCG

10

20

【表 5 - 2 3】

		AGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTAGGTTGGGGGAGGGGTT TTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTG AAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCCTTGAA TTTGCCCTTTTGAAGTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCT CAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTCTTCCATTCAGGTGTCG TGA
65	プロモーター; PGK	GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTTTG CGCAGGGACGCGGCTGCTCTGGGCGTGGTTCCGGGAAACG CAGCGGCGCGGACCTGGGTCTCGCACATTCTCACGTCCG TTTCGACGCTCACCCGGATCTTCGCGCTACCTTTGTGGC CCCCGGCGACGCTTCTGCTCCGCCCTAAGTCGGGAAGG TTCTTGCGGTTGCGGCGTGCCGACGTGACAAACGGAA GCCGCACGTCTCACTAGTACCTTCGACAGACGACAGCGCC AGGGAGCAATGGCAGCGCGGACCGGATGGGCTGTGGC CAATAGCGGCTGCTAGCAGGGCGCGCGAGAGCAGCGGC CGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGCGGGGTGTGGGGCGTA GTGTGGGCCCTGTTCTGCGCGCGGTTGTTCCGATTCTG CAAGCCTCCGGAGCGCACGTCGGCAGTCGGCTCCCTCGTTG ACCGAATCACGACCTCTCTCCCCAG
66	プロモーター; UbC	GCGCCGGGTTTGGCGCTCCCGCGGGCGCCCTCTCTCA CGGCGAGCGTGCCACGTCAGACGAAGGGCGCAGGAGCGT TCCTGATCTTCCGCCCGGACGCTCAGGACAGCGGCCGCT GCTCATAAGACTCGGCTTAGAACCCAGTATCAGCAGAA GGACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACTTAGGGCACTG GTTTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAGTAGT CCCTTCTCGGCGATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGGGGCGGT GAACGCCGATGATTATATAAGGACGCGCGGGGTGTGGCAC AGCTAGTTCGTCGACGCCGGGATTGGGTGCGGTTCTTG TTTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGGTGAGTTGCGGGCT GCTGGGCTGGCGGGGCTTCTGTGGCGCGGGCGCTCG GTGGGACGGAAGCGTGTGGAGAGACCGCCAAGGGCTGTAG TCTGGGTCCGCGAGCAAGGTTGCCCTGAACCTGGGGTTGG

30

40

50

【表 5 - 2 4】

		GGGGAGCGCACAAAATGGCGGCTGTTCCCGAGTCTTGAAT GGAAGACGCTTGTAAAGCGGGCTGTGAGGTCTGTGAAACA AGGTGGGGGGCATGGTGGCGGCAAGAACCCAAAGTCTTG AGGCCCTTCGCTAATGCGGGAAAGCTCTTATTCGGGTGAGAT GGGCTGGGGCACCATCTGGGGACCTGACGTGAAGTTTGT CACTGACTGGAGAACTCGGGTTTGTCTGTGTTGCGGGGG CGGCAGTTATGCGGTGCCGTTGGGCAGTGCACCCGTACCTT TGGGAGCGCGCCCTCGTCTGTCTGACGTACCCGTTCT GTTGGCTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCGCTAGGT GTGCGGTAGGCTTTTCTCCGTGCGAGGACGAGGGTTCGGG CCTAGGGTAGGCTCTCTGAATCGACAGGCGCCGACCTCT GGTGAGGGGAGGGATAAGTGAGGCGTCACTTCTTGTGTC GGTTTTATGTACCTATCTTCTAAGTAGCTGAAGCTCCGGTT TTGAACTATGCGCTCGGGGTTGGCGAGTGTGTTTGTGAAG TTTTTTAGGCACCTTTTGAAATGTAATCAITTTGGGTCAATAT GTAATTTTCAGTGTAGACTAGTAAA
67	ボリA: SV40	GTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAGCAATAGCA TCACAAATTTCACAAATAAGCAATTTTTTCACTGCATTCT AGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCA
68	ボリA: bGH	GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTC CCCCGTGCCCTTCTTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCACTG TCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTTGTCTG AGTAGGTGTCATCTTATCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGG ACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATG CTGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
69	HIV Gag: Bal	ATGGGTGCGAGAGCGTCACTATTAAGCGGGGAGAAATTAG ATAGGTGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAAGA AAAAATATAGATTAAACATATAGTATGGCAAGCAGGGA ACTAGAAAGATTCCGAGTCAATCTGGCCTGTTAGAAACAT CAGAAAGGTGCGAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATC CCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATA CAGTAGCAACCCCTATTGTGTACATCAAAGATAGAGGT

10

20

【表 5 - 2 5】

		AAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAATAGAGGAAGA GCAAAACAAATGTAAGAAAAAGGCACAGCAAGCAGCAGC TGACACAGGAACACAGCGGTACAGTCAAGCAAAATTTCCCT ATAGTGCAGAACCTCCAGGGGCAAAATGGTACATCAGGCCA TATCACTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAGTAATAGA AGAGAAAGCTTTCAGCCCAGAAGTAATACCATGTTTTCAG CATTATCAGAAAGGAGCCACCCACAAGATTAAACACCAT GCTAAACACAGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAATATG TTAAAGAACCCTATCAATGAGGAAGCTGCAAGATGGGATA GATTGCATCCCGTGCAGGCAGGGCTGTTGACACAGGCCA GATAAGAGATCCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACTACC AGTACCCTTCAGGAACAAATAGGATGGATGACAAGTAATC CACCTATCCAGTAGGAGAAATCTATAAAGATGGATAAT CCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGGATGTATAGCCCTACC AGCATTTTGGACATAAGACAAGGACCAAGGAACCCTTTA GAGACTATGTAGACCGGTTCTATAAACTCTAAGAGCCGA GCAAGCTTCACAGGAGGTAAAAAATGGATGACAGAAACC TTGTTGGTCCAATAATGCGAACCCAGATTGTAAAGCTATTTT AAAAGCATTGGGACCAGCAGCTACACTAGAAGAAATGATG ACAGCATGTCAGGAGTGGGAGGACCCAGCCATAAAGCAA GAATTTTGGCAGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATTCAGC TACCATAATGATGCAGAAAGGCAATTTTAGGAACCAAAGA AAGATTGTTAAATGTTTCAATTGTGGCAAGAAAGGGCACA TAGCCAGAACTGCAGGGCCCTTAGGAAAGGGGCTGTTG GAAATGTGGAAGGAAGGACACCAATGAAGACTGTACT GAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGAATCTGGCCTTCCCA CAAAGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAG CCAACAGCCCCACCGCCCAAGAGAGAGCTTCAGGT TTGGGAAGAGACAACAACCTCCCTCAGAAAGCAGGAGCT GATAGACAAGGAAGTGTATCTTTAGTCTCCCTCAGATCAC TCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACAATAA
70	HIV Pol: Bal	ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAACCAAAATGATAGGGG

30

40

50

【表 5 - 2 6】

		GAATTGGAGGTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGAT ACTCATAGAAATCTGTGGACATAAAGCTATAGGTACAGTA TTAATAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCT GTTGACTCAGATTGGTTGCACCTTAAATTTCCATTAGTCC TATTGAACTGTACCAGTAAATTAACCAGGAATGGAT GGCCCAAAGTTAAACAATGGCCACTGACAGAAGAAAAA TAAAGCATTAAATGGAATCTGTACAGAAATGGAAGGA AGGGAAAATTCAAAAATTGGGCTGAAAATCCATACAAT ACTCCAGATTGTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAAT GGAGAAAATTAGTAGATTTCAGAGAACTTAATAAGAAAC TCAAGACTTCTGGGAAGTACAATTAGGAATACACATCCCG CAGGGGTTAAAAAGAAAAATCAGTAACAGTACTGGATG TGGTGATGCATATTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGAATTC AGGAAGTATACTGCATTACCATACCTAGTATAACAATGA AACACCAGGGATCAGATATCAGTACAATGTACTTCCACAG GGATGGAAGGATCACCAGCAATATTTCAAAGTAGCATGA CAAGAATCTTAGAGCTTTTAGAAAACAAATCCAGAAAT AGTGATCTATCAATACATGGATGTTTGTATGTAGGATCTG ACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAAT GAGACAACATCTGTTGAGGTGGGATTTACCACACCAGAC AAAAAACATCAGAAAGACCTCCATTCTTTGGATGGGTT ATGAACTCCATCTGATAAATGGACAGTACAGCTATAGTG CTGCCAGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGA AGTTAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTACCC AGGAATTAAGTAAAGCAATTATGTAGGCTCCTTAGGGGA ACCAAGGCATTAAACAGAAATACCACTAACAAAAAGAAA CAGAGCTAGAACTGGCAGAGAACAGGGAATTTTAAAGA ACCAAGTACATGGGGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTTA ATAGCAGAAATACAGAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACA TATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAAACAG GAAAAATGCAAGAATGAGGGTGCCACACTAATGATGT AAAACAATTAACAGAGGCAGTGCAAAAAATACACACAGA
--	--	--

10

20

【表 5 - 2 7】

		AAGCATAGTAATATGGGAAAGACTCCTAAATTTAACTA CCCATACAAAAAGAAACATGGGAAACATGGTGGACAGAGT ATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTCAAT ACCCCTCCCTTAGTGAAATATGGTACCAGTTAGAGAAAGA ACCCATAATAGGAGCAGAAACATCTATGTAGATGGAGCA GCTAACCGGGAGACTAAATAGGAAAAGCAGGATATGTTA CTAACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCTCCCTAACTGACAC AACAAATCAGAAAGCTGAGTTACAAGCAATTCATCTAGCT TTACAAGATTCAGGATTAGAAGTAACATAGTAACAGACT CACAAATATGCATTAGGAATCATTCAGCACAACAGATAA AAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAATAATAGAACAGTTA ATAAAAAAGGAAAAGGTCTACCTGGCATGGGTACCAAGCGC ACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAATAGT CAGTACTGGAATCAGGAAAGTACTA
71	HIV インテグラーゼ: Bal	TTTTTAGATGGAATAGATATAGCCCAAGAAGAACATGAGA AATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTAAC CTGCCACCTGTGGTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTG ATAAATGTCAGCTAAAAGGAGAGCCATGCATGGACAAGT AGACTGTAGTCCAGGAATATGGCACTAGATTGTACACATT TAGAAGGAAAAATTATCCTGGTAGCAGTTATGTAGCCAG TGGATATATAGAAGCAGAAGTTATTCAGCAGAGACAGGG CAGGAAACAGCATACTTTCCTTAAATTAGCAGGAAGAT GGCCAGTAAAAACAATACATACAGACAATGGCAGCAATTT CACTAGTACTACAGTCAAGGCCGCTGTGGTGGGCGGG ATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATCCCCAAGTCA GGGAGTAGTAGAATCTATAAATAAGAATTAAAGAAAATT ATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAACAG CAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAGAAA AGGGGGGATTGGGGGTATAGTGCAGGGGAAGAATAGT AGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAA AAACAAATTACAAAAATCAAAATTTTCGGGTTTATTACAG GGACAGCAGAGATCCACTTTGGAAAGGACCAGCAAGCTT

30

40

50

【表 5 - 2 8】

		CTCTGGAAAGGTGAAGGGCAGTAGTAATACAAGATAATA GTGACATAAAAGTAGTACCAAGAAGAAAGCAAAAGATCAT TAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTG GCAAGTAGACAGGATGAGGATTAG
72	エンペロープ; RD114	ATGAAACTCCCAACAGGAATGGTCATTTATGTAGCCTAAT AATAGTTCGGCAGGGTTTGACGACCCCGCAAGGCTATC GCATTAGTACAAAAACAACATGGTAAACCATGCGAATGCA GCGGAGGGCAGGTATCCGAGGCCCCACCGAACTCCATCCA ACAGGTAACCTTGCCAGGCAAGACGGCCTACTTAATGACC AACC AAAATGGAAATGCGAGTCACTCCAAAAATCTCA CCCCAGCGGGGAGAACTCCAGAACTGCCCTGTAAACAC TTTCCAGGACTCGATGCACAGTCTTGTATACTGAATACC GGCAATGCAGGGCGAATAATAAGACATACTACACGGCCAC CTTGCTTAAAAATACGGTCTGGGAGCCTCAACGAGGTACAG ATATTACAAAACCCCAATCAGCTCCTACAGTCCCTTGTAG GGGCTCTATAAATCAGCCGTTTGTGGAGTGCCACAGCCC CCATCCATATCTCCGATGGTGGAGGCCCTCGATACATAAG AGAGTGGGACAGTCCAAAAAGGCTAGACAAATTCATA AGGCTATGCATCCTGAACCTCAATACCACCCCTTAGCCCTG CCCAAAGTCAGAGATGACCTTAGCCTTGATGCACGGACTTT TGATATCCTGAATACCACCTTTAGGTTACTCCAGATGTCCA ATTTTAGCCTTGCCCAAGATTGTTGGCTCTGTTAAAACTA GGTACCCCTACCCCTCTTGCGATACCCACTCCCTCTTAACC TACTCCCTAGCAGACTCCTAGCGAATGCCTCTGTGAGAT TATACCTCCCTCTTGGTTCAACCGATGCGATTCTCCAATC GTCTGTATTATCTTCCCTTTTCAACGATACGGAACAAA TAGACTTAGGTGCAGTCACCTTTACTAAGTGCACCTCTGTA GCCAATGTCAGTAGTCTTTATGTGCCCTAAACGGGTAGT CTTCTCTGTGGAATAACATGGCATACACCTATTTACCCC AAAACTGGACAGGACTTTGCGTCCAAGCTCCCTCTCCCC GACATTGACATCATCCGGGGGATGAGCCAGTCCCCATTC TGCCATTGATCAATTATACATAGACCTAACGAGCTGTAC

10

20

【表 5 - 2 9】

		AGTTATCCCTTTACTAGCTGGACTGGGAATACCGCAGCA TTACACCCGGAGCTACAGGCCTAGGTGTCTCCGTACCCA GTATACAAAATTATCCCATCAGTTAATATCTGATGTCCAAG TCTTATCCGGTACCATAAAGATTACAAAGACAGGTAGAC TCGTTAGCTGAAGTAGTCTCCAAAATAGGAGGGGACTGG ACCTACTAACGGCAGAACAAAGAGGAATTTGTTTAGCCTT ACAAGAAAAATGCTGTTTTATGCTAACAAAGTCAGGAATTG TGAGAAAAAAAATAAGAACCTACAAGAAGAATTACAAAA ACGCAGGGAAAGCCTGGCATCCAACCTCTCTGGACCGGG CTGCAGGGCTTTCTTCCGTACCTCTACCTCTCTGGGACCC CTACTACCCCTCTACTCATACTAACCATTTGGGCCATGCGT TTTCAATCGATTGGTCCAATTTGTTAAAGACAGGATCTCAG TGGTCCAGGCTCTGGTTTGTACTAGCAATATCACCAGCTA AAACCCATAGAGTACGAGCCATGA
73	エンペロープ; GALV	ATGCTTCTCACCTCAAGCCCGCACCTTCGGCACCAGAT GAGTCTGGGAGCTGGAAAAGACTGATCATCTCTTAAAGCT GCGTATTCGGAGACGGCAAAACGAGTCTGCAGATAAGAA CCCCACCAGCCTGTGACCTCACCTGGCAGGTACTGTCCC AAACTGGGGACGTTGTCTGGGACAAAAAGGCAGTCCAGCC CCTTTGGACTTGGTGGCCCTCTCTTACACCTGATGTATGTG CCTGGCGGCGGCTTTGAGTCTGGGATATCCGGGATCCG ATGTATCGTCTCTAAAAGAGTTAGACCTCTGATTCAGAC TATACTGCCGCTTATAAGCAATCACCTGGGGAGCCATAG GGTGCAGCTACCTTCGGCTAGGACCAGGATGGCAAAATTC CCCTTCTACGTGTGTCCTCGAGCTGGCGGAACCCATTACAG AAGCTAGGAGGTGTGGGGGCTAGAATCCCTATACTGTAA AGAAATGGAGTTGTGAGACACGGGTACCGTTATTGGCAA CCCAAGTCTCATGGGACCTCATAACTGTAAAATGGGACC AAAAATGTGAAATGGGAGCAAAAAATTTCAAAAGTGTGAACA AACCAGCTGGTGTAAACCCCTCAAGATAGACTTCACAGAA AAAGGAAAACCTCTCAGAGATTGGATAACGGAAAAAACCT GGGAATTAAGGTTCTATGTATATGGACACCCAGGCATACA

30

40

50

【表 5 - 3 0】

	GTTGACTATCCGCTTAGAGGTCACATGCGCGTTGTGG CAGTGGGCCAGACCTGTCTTGCGGAACAGGACCTCCT AGCAAGCCCCCTACTCTCTCTCTCCACGAAAGCGCC GCCACCCCTCTACCCCGCGGCTAGTGAGCAACCCCTG CGGTGCATGGAGAACTGTTACCTAAACTCTCCGCCTCC ACCAGTGGCGACCGACTCTTGGCCTTGTGCAGGGGGCTT CCTAACCTTGAATGCTACCAACCCAGGGGCCACTAAGTCTT GCTGGCTCTGTTTGGGCATGAGCCCCCTTATTATGAAGGG ATAGCCTCTTACAGGAGAGTCTGCTTATACCTCAACCATAC CCGATGCCACTGGGGGGCCAAGGAAAGCTTACCTCACT GAGGTCTCCGACTCGGGTCATGCATAGGGAAGGTGCCTC TTACCATCAACATCTTTGCAACCAGACCTTACCATCAAT TCCTCTAAAAACCATCAGTATCTGCTCCCTCAAAACCATAG CTGGTGGGCTGCAGCACTGGCCTACCCCTGCCTCTCCA CCTCAGTTTTAATCAGTCTAAAGACTTCTGTGTCAGGTG CAGCTGATCCCCGCATCTATTACATTCTGAAGAACTT GTTACAAGCTATGACAAATACCCCCAGGTTTAAAGA GAGCCTGCCTCACTTACCTAGCTGTCTTCTGGGGTTAGG GATTGCGCAGGTATAGGTACTGGCTCAACCGCCCTAATTA AAGGGCCATAGACCTCCAGCAAGGCTAACCAGCCTCCA AATGCCATGACGCTGACCTCCGGGCCCTTACGAGCTCAA TCAGCAAGCTAGAGACTCACTGACTTCCCTATCTGAGGTA GTACTCAAAATAGGAGAGGCTTGACTTACTATTCCTTAA AGAAGGAGGCTCTGCGCGGCCCTAAAAGAAGAGTGTGT TTTTATGTAGACCACTCAGGTGCACTACGAGACTCCATGAA AAAACTTAAAGAAAGACTAGATAAAAGACAGTTAGAGCGC CAGAAAAACCAAACTGGTATGAAGGGTGGTTCAATAACT CCCCTTGGTTTACTACCTACTATCAACCATCGCTGGGCC CTATGTCTCTCTTTTGTACTACTCTTGGGCCCTGCATC ATCAATAAATTAATCCAATTCATCAATGATAGGATAAGTGC AGTCAAAATTTAGTCTTAGACAGAAATATCAGACCTTAG ATAACGAGGAAAACCTTTAA
--	--

10

20

【表 5 - 3 1】

74	エンベロープ: FUG	ATGGTTCGCGAGTTCTTTTGTGTGACTCTTCTGGGTTTT TCGTTGTGTTTCGGGAAGTTCCCATTTACACGATACCAGA CGAAGTTGGTCCCTGGAGCCCTATTGACATACACCATCTCA GCTGTCCAAATAACCTGGTTGTGGAGGATGAAGGATGTAC CAACCTGTCCGAGTTCTCTACATGGAACCTAAAGTGGGAT ACATCTCAGCCATCAAGTGAACGGGTTCACTTGACACAGGT GTTGTGACAGAGGCAGAGACCTACACCAACTTTGTTGGTTA TGTCAACACCATTCAGAGAAAGCATTTCCGCCCAACC CAGACGCATGTAGAGCCGCTAATACTGGAAGATGGCCGG TGACCCAGATATGAAGAGTCCCTACACAATCCATACCCCG ACTACCACTGGCTTCGAACTGTAAAGAACCAAAAGAGTC CCTATTATCATATCCCAAGTGTGACAGATTGGACCCAT ATGACAAATCCCTTCACTCAAGGGTCTTCCCTGGCGGAAAG TGCTCAGGAATAACGGTGTCTCTACTACTGCTCAACTAA CCATGATTACACCATTTGGATGCCGAGAATCCGAGACCA AGGACACCTTGTGACATTTTACCAATAGCAGAGGGAAGA GAGCATCCAACGGGAACAAGACTTGGGCTTTGTGGATGA AAGAGGCTGTATAAGTCTCTAAAAGGAGCATGCAGGCTC AAGTTATGTGGAGTTCTTGGACTTAGACTTATGGATGGAAC ATGGGTCGCGATGCAACATCAGATGAGACCAATGGTGC CCTCCAGATCAGTTGGTGAATTGACACGACTTTCGCTCAGA CGAGATCGAGCATCTCGTTGTGGAGGAGTTAGTTAAGAAA AGAGAGGAATGTCTGGATGCATTAGAGTCCATCATGACCA CCAAGTCAGTAAGTTTCAGACGTCTCAGTCACCTGAGAAA ACTTGTCCCAGGGTTTGGAAAAGCATATACATATTTCAACA AAACCTTGATGGAGGCTGATGCTCACTACAAGTCAGTCCG GACCTGGAATGAGATCATCCCTCAAAAGGGTGTGTGAAA GTTGGAGGAAGGTGCCATCCTCATGTGAACGGGGTGTTTT CAATGGTATAATATTAGGGCTGACGACCATGTCTAATCC CAGAGATGCAATCATCCCTCTCCAGCAACATATGGAGTTG TTGGAATCTTCAGTTATCCCTGATGCACCCCTGGCAGA CCCTTCTACAGTTTCAAGAAGGTGATGAGGCTGAGGATT
----	---	--

30

40

50

【表 5 - 3 2】

		TTGTTGAAGTTCACCTCCCCGATGTGTACAAACAGATCTCA GGGGTTGACCTGGGTCTCCCGAAGTGGGAAAGTATGTATT GATGACTGCAGGGGCCATGATTGGCCTGGTGTGATATTTT CCCTAATGACATGGTGCAGAGTTGGTATCCATCTTTGCATT AAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTATACAGACA TAGAGATGAACCGACTTGAAAGTAA
75	エンペロープ; LCMV	ATGGGTGAGATTGTGACAATGTTTGAGGCTCTGCCTCACAT CATCGATGAGGTGATCAACATTGTCTATTATTGTGCTTATCG TGATCACGGGTATCAAGGCTGTCTACAATTTTGCCACCTGT GGGATATTGCAATTGATCAGTTTCTACTTCTGGCTGGCAG GTCTGTGGCATGTACGGTCTTAAGGGACCCGACATTACA AAGGAGTTTACCAATTTAAGTCAGTGGAGTTTGATATGTCA CATCTGAACCTGACCATGCCAACGCATGTTACGCCAACAA CTCCCAACATTACATCAGTATGGGGACTTCTGGACTAGAAT TGACCTTCACCAATGATTCCATCATCAGTCACAACTTTTGC AATCTGACCTCTGCCTTCAACAAAAGACCTTTGACCACAC ACTCATGAGTATAGTTTCGAGCCTACACCTCAGTATCAGAG GGAACTCCAACTATAAGGCAGTATCTGCGACTTCAACAA GGCATAACCATCCAAATACAACCTTGACATTCTCAGATCGACA AAGTGCTCAGAGCCAGTGTAGAACCTTACAGAGGTAGAGTC CTAGATATGTTTAGAACTGCCTTCGGGGGAAATACATGA GGAGTGGCTGGGGCTGGACAGGCTCAGATGGCAAGACCAC CTGGTGTAGCCAGACGAGTTACCAATACCTGATTATACAAA ATAGAACCTGGGAAAACCACTGCACATATCAGGTCTTTT GGGATGTCCAGGATTCTCTTTCCCAAGAGAAGACTAAGTT CTTACTAGGAGACTAGCGGGCATTACCTGGACTTTGT CAGACTCTCAGGGGTGGAGAATCCAGGTGGTTATTGCCCTG ACCAAAATGGATGATTCTTGCTGCAGAGCTTAAGTGTTTCGG GAACACAGCAGTTGCGAAATGCAATGTAAATCATGATGCC GAATTCTGTGACATGCTGCGACTAATTGACTACAACAAGGC TGCTTTGAGTAAGTTCAAAGAGGACGTAGAATCTGCCTTGC ACTTATTCAAAACAACAGTGAATCTTTGATTTCAGATCAA

10

20

【表 5 - 3 3】

		CTACTGATGAGGAACCACTTGAGAGATCTGATGGGGTGC CATATTGCAATTACTCAAAGTTTGGTACCTAGAACATGCA AAGACCGGCGAAACTAGTGTCCCAAGTGCTGGCTTGTC CCAATGGTCTTACTTAAATGAGAGCCACTTCAGTGATCAA ATCGAACAGGAAGCCGATAACATGATTACAGAGATGTTGA GGAAGGATTACATAAAGAGGCAGGGGAGTACCCCTAGC ATTGATGGACCTTCTGATGTTTTCCACATCTGCATATCTAGT CAGCATCTTCTGCACTTGTCAAAATACCAACACACAGGC ACATAAAAGGTGGCTCATGTCCAAAGCCACACCGATTAA CAACAAAGGAATTTGAGTTGGTGCATTAAAGGTGCTG GTGTAACCAACGTCTGGAAGACGCTGA
76	エンペロープ; FPV	ATGAACACTCAATCCTGGTTTCGCCCTTGTGGCAGTCAT CCCCACAAATGCAGACAAAATTTGTCTGGACATCATGCTG TATCAATGGCACCAAGTAAACACACTCACTGAGAGAGG AGTAGAAGTTGTCAATGCAACGGAAACAGTGGAGCGGACA AACATCCCCAAAATTTGCTCAAAAGGGAAAAGAACCACTG ATCTTGGCCAATGCGGACTGTTAGGGACCAATTACCGGACCA CCTCAATGCGACCAATTTCTAGAATTTTCAGCTGATCTAAT AATCGAGAGACGAGAAGGAAATGATGTTTGTACCCGGGG AAGTTTGTTAATGAAGAGGCAATGCGACAAATCCTCAGAG GATCAGGTGGGATTGACAAAGAAACAAATGGGATTCACATA TAGTGGAAATAAGGACCAACGGAAACAATACTAGTGCATGAGA AGATCAGGGTCTTCAATCTATGCAGAAATGGAGTGGCTCCT GTCAAATACAGACAATGCTGCTTTCCCAAAATGACAAAA TCATACAAAAACAAAGGAGAGAATCAGCTCTGATAGTCT GGGGAATCCACCAATTCAGGATCAACCAACGAAACAGACCA ACTATATGGGAGTGGAAATAAACTGATAACAGTCGGGAGT TCCAAATATCATCAATCTTTGTGCCGAGTCCAGGAACACG ACCGCAGATAAATGGCCAGTCCGGACGGATTGATTTTCATT GGTTGATCTTGGATCCCAATGATACAGTTACTTTTAGTTTC AATGGGGCTTTCATAGCTCCAATCTGCCAGCTTCTTGAG GGGAAAGTCCATGGGGATCCAGAGCGATGTCAGGTGAT

30

40

50

【表 5 - 3 4】

		GCCATTGCGAAGGGGAATGCTACACAGTGGAGGGACTA TAACAAGCAGATTGCCCTTTTCAAACATCAATAGCAGAGC AGTTGGCAAATGCCCAAGATATGTAAAACAGGAAAGTTTA TTATTGGCAACTGGGATGAAGAAGCTTCCCGAACCTTCCAA AAAAAGGAAAAAAGAGGGCTGTTTGGCGCTATAGCAGGG TTTATTGAAAATGGTTGGGAAGGTCTGGTCGACGGGTGGTA CGGTTTCAGGCATCAGAATGCACAAGGAGAAGGAAGTGA GCAGACTACAAAAGCACCAATCGGCAATTGATCAGATAA CCGGAAGTTAATAGACTCATTGAGAAAACCAACCAGCA ATTTGAGCTAATAGATAATGAATTCAGTGGTGGAAAAG CAGATTGGCAATTTAATTAAGTGGACCAAGACTCCATCAC AGAAGTATGGTCTTACAATGCTGAACCTTGTGGCAATGG AAAACAGCACACTATTGATTGGCTGATTCAGAGATGAA CAAGCTGTATGAGCGAGTGAGGAAACAATTAAGGAAAAAT GCTGAAGAGGATGGCACTGGTTGCTTTGAAATTTTTCATAA ATGTGACGATGATTGTATGGCTAGTATAAGGAACAATACTT ATGATCAGACAAATACAGAGAAGAAGCGATGCAAAATAG AATACAAATTGACCCAGTCAAAATTGAGTAGTGGCTACAAA GATGTGATACTTTGGTTTAGCTTCGGGGCATCATGCTTTTGG CTTCTTGCCATTGCAATGGGCCCTGTTTTCATATGTGTGAAG AACGGAAACATGCGGTGCACTATTGTATATAA
77	エンベロープ; RRV	AGTGTAACAGAGCACTTTAATGTGTATAAGGCTACTAGACC ATACCTAGCACATTGCGCCGATTGCGGGACGGGTACTTCT GCTATAGCCCAGTTGCTATCGAGGAGATCCGAGATGAGGC GTCTGATGGCATGCTTAAGATCCAAGTCTCCGCCAAATAG GTCTGGACAAGGCAGGCACCCACGCCACACGAAGCTCCG ATATATGGCTGGTCAATGATGTTAGGAATCTAAGAGAGATT CCTTGAGGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTCCATACATGGG ACGATGGGACACTTCATCGTCGCACACTGTCCACCAAGCG ACTACCTCAAGGTTTCGTTTCGAGGACGCAGATTTCGACGTG AAGGCATGTAAGGTCCAATACAAGCACATCCATTGCCGG TGGGTAGAGAGAAGTTCGTGGTTAGACCACACTTTGGCGT

10

20

【表 5 - 3 5】

		AGAGCTGCCATGCACCTCATACCAGCTGACAACGGCTCCC ACCGACGAGGAGATTGACATGCATACACCGCCAGATATAC CGGATCGCACCCCTGCTATCACAGACGGCGGGCAACGTCAA AATAACAGCAGGCGGCAGGACTATCAGGTACAAGTGTACC TGCGGCCGTGACAACGTAGGCACTACCAGTACTGACAAGA CCATCAACACATGCAAGATTGACCAATGCCATGCTGCCGTC ACCAGCCATGACAAATGGCAATTTACCTCTCCATTGTTC CAGGGCTGATCAGACAGCTAGGAAAGGCAAGGTACACGTT CCGTTCCCTCTGACTAACGTCACTGCGGAGTGCCGTTGGC TCGAGCGCCGGATGCCACCTATGGTAAGAAGGAGGTGACC CTGAGATTACACCCAGATCACCAGCGCTCTTCTCCTATAG GAGTTTAGGAGCCGAACCGCACCCGTACGAGGAATGGGTT GACAAGTTCTCTGAGCGCATCATCCAGTGACGGAAGAAG GGATTGAGTACCAGTGGGGCAACAACCCGCCGGTCTGCCT GTGGGCGCAACTGACGACCGAGGGCAAAACCCATGGCTGG CCACATGAAATCATTAGTACTATTATGGAATATACCCCGC CGCCACTATTGCCGCGAGTATCCGGGGCGAGTCTGATGGCCC TCCTAACTCTGGCGGCCACATGCTGCATGCTGGCCACCGCG AGGAGAAAAGTGCCTAACACCGTACGCCCTGACGCCAGGAG CGGTGGTACCGTTGACACTGGGGCTGCTTTGCTGCGCACCG AGGGCGAATGCA
78	エンベロープ; MLV 10A1	AGTGTAACAGAGCACTTTAATGTGTATAAGGCTACTAGACC ATACCTAGCACATTGCGCCGATTGCGGGACGGGTACTTCT GCTATAGCCCAGTTGCTATCGAGGAGATCCGAGATGAGGC GTCTGATGGCATGCTTAAGATCCAAGTCTCCGCCAAATAG GTCTGGACAAGGCAGGCACCCACGCCACACGAAGCTCCG ATATATGGCTGGTCAATGATGTTAGGAATCTAAGAGAGATT CCTTGAGGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTCCATACATGGG ACGATGGGACACTTCATCGTCGCACACTGTCCACCAAGCG ACTACCTCAAGGTTTCGTTTCGAGGACGCAGATTTCGACGTG AAGGCATGTAAGGTCCAATACAAGCACATCCATTGCCGG TGGGTAGAGAGAAGTTCGTGGTTAGACCACACTTTGGCGT

30

40

50

【表 5 - 3 6】

		AGAGCTGCCATGCACCTCATACCAGTGACAACGGCTCCC ACCGACGAGGAGATTGACATGCATACACCGCAGATATAC CGGATCGCACCTTGCTATCACAGACGGCGGGCAACGTCAA AATAACAGCAGGCGGCAGGACTATCAGGTACAACGTACC TGCGGCCGTGACAACGTAGGCACTACAGTACTGACAAGA CCATCAACACATGCAAGATTGACCAATGCCATGTGCGCTC ACCAGCCATGACAAATGGCAATTTACCTCTCCATTTGTTCC CAGGGCTGATCAGACAGTAGGAAAGGCAAGGTACACGTT CCGTTCCCTCTGACTAACGTCACCTGCGGAGTGCCGTTGGC TCGAGCGCCGGATGCCACCTATGGTAAGAAGGAGGTGACC CTGAGATTACACCCAGATCATCCGACGCTTCTCTCTATAG GAGTTTAGGAGCCGAACCGCACCCGTACGAGGAATGGTT GACAAGTTCTCTGAGCGCATCATCCAGTGACGGAAGAAG GGATTGAGTACCAGTGGGGCAACAACCGCCGGTCTGCCT GTGGGCGCAACTGACGACCGAGGGCAACCCCATGGCTGG CCACATGAAATCATTCAGTACTATTATGGAATATACCCGC CGCCACTATTGCGCGAGTATCCGGGGCGAGTCTGATGGCCC TCCTAACTCTGGCGGCCACATGCTGCATGCTGGCCACCGCG AGGAGAAAGTGCCCTAACACCGTACGCGCTGACGCCAGGAG CGGTGGTACCGTTGACACTGGGGCTGCTTTGCTGCGCACCG AGGGCGAATGCA
79	エンペロープ; エボラ	ATGGGTGTTACAGGAATATTGCAGTTACCTCGTGATCGATT CAAGAGGACATCATTTCTTTGGGTAATTATCTTTTCCA AAGAACATTTTCCATCCACTTGGAGTCATCCACAATAGCA CATTACAGGTTAGTGATGTGACAACTGGTTTGGCGTGAC AAACTGTATCCACAAATCAATTGAGATCAGTTGGAGTGA ATCTCGAAGGGAATGGAGTGGCAACTGACGTGCCATCTGC AACTAAAAGATGGGGCTTCAGGTCCGGTGTCCACCAAAG GTGGTCAATTATGAAAGCTGGTGAATGGGCTGAAAAGTGT ACAACTTGAATCAAAAAACCTGACGGGAGTGAGTGTCT ACCGACAGCGCCAGACGGGATTCGGGGCTTCCCGCGTGC CGGTATGTGCACAAAGTATCAGGAACGGGACCGTGTGCCG

10

20

【表 5 - 3 7】

		GAGACTTTGCCTTCCACAAAGAGGGTGCTTTCTCTGTAT GACCGACTTGCTTCCACAGTTATCTACCGAGGAACGACTTT CGCTGAAGGTGCTGTTGATTCTGATACTGCCCAAGCTA AGAAAGGACTTCTTACAGTCAACCCCTTGAGAGAGCCGGTC AATGCAACGGAGGACCCGTCTAGTGGTACTATTCTACCA AATTAGATATCAAGCTACCGGTTTGGAAACCAATGAGACA GAGTATTTGTTGAGGTTGACAAATTGACCTACGTCCAAT TGAATCAAGATTCACACCACAGTTTCTGCTCCAGCTGAATG AGACAATATATACAAAGTGGGAAAAGGAGCAATACCACGGG AAAACATAATTTGGAAGGTCAACCCGAAATGTACACA ATCGGGGAGTGGGCTTCTGGGAACTAAAAAACCTCAC TAGAAAAATTCGAGTGAAGAGTTGTCTTACAGCTGTAT CAAAACAGAGCCAAAAACATCAGTGGTCAGAGTCCGGCGG AACTCTTCCGACCCAGGACCAACACAACAAGTGAAGAC CACAAAATCATGGTTCAAGAAATTCCTGTCAATGGTTCA AGTGACACAGTCAAGGAAGGGAAGCTGCAAGTGTGCAATCTG ACAAACCTTGCCACAATCTCCACGAGTCTCAACCCCCAC AACCAAAACAGGTCCGGACAACAGCACCCACAATACACCC GTGTATAAACTTGACATCTCTGAGGCAACTCAAGTTGAACA ACATACCCGAGAACAGACAACGACAGCACAGCCTCCGAC ACTCCCCCGCCACGACCGCAGCGGACCCCTAAAAGCAG AGAACACCAACACGAGCAAGGTAACCGACCTCTGGACCC CGCCACCACAACAAGTCCCAAAACCACAGCGAGACCGCT GGCAACAACAACACTCATCAACGAATACCGGAGAGAGA GTGCCAGCAGCGGGAAGCTAGGCTTAATTACCAATACTATT GCTGGAGTCCGAGGACTGATCACAGGCGGAGGAGAGCTC GAAGAGAAGCAATTGTCAATGCTCAACCCAAATGCAACCC TAATTTACATTACTGGACTACTCAGGATGAAGGTGCTGCAA TCGGACTGGCTGGATACCATATTTCGGGCCAGCAGCCGA GGGAATTTACATAGAGGGGCTGATGCACAATCAAGATGGT TTAATCTGTGGTTGAGACAGCTGGCCAACGAGACGACTC AAGCTCTTCAACTGTTCTGAGAGCCACAACCGAGCTACGC
--	--	--

30

40

50

【表 5 - 3 8】

		ACCTTTTCAATCCTCAACCGTAAGGCAATTGATTCTTGCT GCAGCGATGGGGCGGCACATGCCACATTTTGGGACCGGAC TGCTGTATCGAACCACATGATTGGACCAAGAACATAACAG ACAAAATTGATCAGATTATTCATGATTTTGTGATAAAACC CTTCCGGACCAGGGGGACAATGACAATTGGTGGACAGGAT GGAGACAATGGATACCGGCAGGTATTGGAGTTACAGGCGT TATAATTGCAGTTATCGCTTTATTCTGTATATGCAAAITTTGT CTTTTAG
80	短鎖RNA配列	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGA TATTTCTAACTATGTTGCTCCTTTACGCTGTGTGGATATGC TGCTTTAATGCCCTCTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTACGGC TTTCGTTTCTCCTCCTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTT TATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGT GTGCTCTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGCTGGGGCA TTGCCACCACCTGTCAACTCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCC CCCTCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCTGCCTT GCCCCGTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATA ATTCCTGGTGTGTC
81	プライマー	TAAGCAGAATTC ATGAATTTGCCAGGAAGAT
82	プライマー	CCATACAAATGAATGGACACTAGGCGGCCGACGAAT
83	Gag、Pol、 インテグラーゼ 断片	GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAATGA TAGGGGGAATTGGAGGTTTATCAAAAGTAAGACAGTATGA TCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGT ACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAA GAAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACCTTAAATTTTCCC ATTAGTCTTATTGAGACTGTACCAGTAAATTAAGCCAGG AATGGATGGCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAA GAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGG AAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAATTTGGGCTGAAATCC ATACAATATCCAGTATTGGCCATAAGAAAAAAGACAGT ACTAAATGGAGAAAAATTAGTAGATTTCAGAGAACTTAATA AGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAGTTCATTAGGAATACC

10

20

【表 5 - 3 9】

		ACATCTGCAGGGTTAAAACAGAAAAATCAGTAACAGTA CTGGATGTGGCGATGCATATTTTTCAGTTCCTTAGATAA AGACTTCAGGAAGTATACTGCATTACCATACCTAGTATAA ACAATGAGACACCAGGATTAGATATCAGTACAATGTGCT TCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCAGTGT AGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAAAAACAAAAATC CAGACATAGTCATCTATCAATACATGGATGATTGTATGTA GGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAG AGGAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGATTACAC ACCAGACAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCTTTGG ATGGGTTATGAATCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCC TATAGTGCTGCCAGAAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGAC ATACAGAAATTAGTGGGAAATTGAATTGGGCAAGTCAGA TTTATGCAGGGATTAAGTAAGGCAATTATGTAACCTCTT AGGGGAACCAAGCACTAACAGAAAGTAGTACCCTAACAG AAGAAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAAAAACAGGAGATTCT AAAAAGAACCGGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAA GACTTAATAGCAGAAATACAGAAAGCAGGGGCAAGGCCAAT GGACATATCAAAATTTATCAAGAGCCATTAAAAATCTGAA AACAGGAAAGTATGCAAGAATGAAGGTGCCACACTAAT GATGTGAAACAATTAACAGAGGCAAGTACAAAAATAGCCA CAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCTAAATTTAA ATTACCCATACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACA GAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGT CAATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGA AAGAACCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGG GGCAGCCAATAGGGAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATAT GTAAGTACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCCCCCTAACGG ACACAAACATCAGAAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCT AGCTTTGCAGGATTCGGGATTAGAAGTAAACATAGTGACA GACTCACAAATATGATTGGGAATCATTCAGCACAAACCAG ATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAAATAATAGAGCA
--	--	--

30

40

50

【表 5 - 4 0】

		GTTAATAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTACCA GCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAAT TGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTAGATGGA ATAGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAGAAATATCACAGTA ATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAACCTACCACCTGTA GTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGC TAAAAGGGGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCC AGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAA GTTATCTTGGTAGCAGTTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGA AGCAGAGTAATTCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGC ATACTTCCTCTTAAATAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAA ACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTCACCACTACTA CAGTTAAGGCCCGCTGTGGTGGCGGGGATCAAGCAGGA ATTTGGCATTCCTACAATCCCAAGTCAAGGAGTAATAG AATCTATGAATAAAGAAATTAAGAAAAATTATAGGACAGGT AAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAAATG GCAGTATTACCCACAATTTTAAAGAAAAGGGGGGATTG GGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAAATAGTAGACATAATAGC AACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACA AAAATTCAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAG ATCCAGTTTGGAAAGGACCAGCAAGCTCCTCTGGAAGAG TGAAGGGGAGTAGTAATACAAGATAATAGTAGACATAAAA GTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAGATCATCAGGGATTATG GAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACA GGATGAGGATTAA
84	Rev、RBE、およびウサギベータグロビンポリAを含むDNA断片	TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAG CTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAG CAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGA AGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAG ATCCATTGATTAGTGAACGGATCCTTGGCACCTTATCTGGG ACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTACGCTACCACCGCTTG AGAGACTTACTCTTGATTGTACGAGGATTGTGGAACCTCT

10

20

【表 5 - 4 1】

		GGGACGAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGAAT CTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAAATAGAGGAG CTTGTCTCCTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATG GGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAAT TATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGACAATTTGTGTAGG GCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTGCAACTCAGACTGTG GGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAA AGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTCCCTC TGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCAT CTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCAATTGCAAT AGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTACTCGGAAGGACAT ATGGGAGGGCAATCATTAAAAACATCAGAAATGAGTATTT GGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCAT GAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTATCAGTATATGAAAC AGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCATAGAAAAGCCTTG ACTTGAGGTTAGATTTTTTTATATTTGTGTTTGTGTTATTT TTCTTTAACATCCCTAAATTTTCTTACATGTTTTACTAG CCAGATTTTCTCTCTCTCTGACTACTCCAGTCATAGCTG TCCCTCTCTCTTATGAAGATCCCTGACCTGCAGCCCAAG CTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCTCTGTGTGAAATT GTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAG CATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA CTCACATTAAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTC GGGAAACCTGTCTGTCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTC AGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCCATCCCGCCCC TAACTCCGCCAGTTCGCCCTATCTCCGCCCATGGCTGA CTAATTTTTTTTATTATGCAGAGGCCAGGCCCGCTCGGC CTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAG GCCTAGGCTTTTGCAAAAGCTAACTGTTTATTGCAGCTT ATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTAC AAATAAAGCATTTTTTCACTGCATCTCAGTTGTGTTGTGTC CAAACTCATCAATGTATCTTATCAGCGGCCGCCCGGG
--	--	--

30

40

50

【表 5 - 4 2】

85	CAGエンハンサー/プロモーター/イントロン配列を含有するDNA断片	ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG TTCATAGCCCATATATGGAGTTCGGGTTACATAACTTACG GTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCC CATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCA ATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGTGGACTAATTACG GTAAACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGC CAAGTACGCCCTTATTGACGTCAATGACGTAAATGGCCC GCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCC TACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCA TGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCAT CTCCCCCTCCCAACCCCAATTTGTATTATTATTTT TTAATTATTTTGTGACGCGATGGGGCGGGGGGGGGGG GCGCGGCCAGGCGGGCGGGCGGGCGAGGGCGGGG CGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGCGCGAGCCAATCAGAG CGCGCGCTCCGAAAGTTCTTTTATGGCGAGGCGCGGC GGCGCGGCCCTATAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGG GAGTCGCTGCGTTGCTTCGCCCGTGCCCGCTCCGCGCC GCCTCGCGCGCCGCCCGGCTTGACTGACCGGCTTACT CCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCGGGC TGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTCTTTCTG TGGCTGCGTGAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCT TGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGGTGCGTGCCTGTGTG TGTGCGTGGGAGCGCGCGTGCGCCCGCTGCCCGC GGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGCGCGGGCTTTGTGCGC TCCGCGTGTGCGCAGGGGAGCGCGCGGGGGCGGTGCC CCGCGGTGCGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAGGCTGCGT GCGGGGTGTGCGTGGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGGC GCGGCGGTGCGGCTGTAAACCCCTGCAACCCCTCCCC GAGTTGCTGAGCACGGCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCG TGCGGGGCTGCGCGGGGCTCGCCTGCGGGCGGGGG TGGCGCAGGTGGGGGTGCGGGCGGGCGGGCGCGCTC GGGCGGGGAGGGCTCGGGGAGGGCGCGCGGCCCG
----	------------------------------------	---

10

20

【表 5 - 4 3】

		GAGCGCCGGCGCTGTCGAGCGCGCGAGCCGAGCCAT TGCTTTTATGGTAATCGTGCAGAGGGCGCAGGACTTCC TTTGTCCAAATCTGGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCC GCCGACCCCTCTAGCGGGCGCGGCGAAGCGGTGCGGC GCCGCGAGGAAGGAAATGGCGGGGAGGGCTTCGTGCGT CGCCGCGCCGCCCTCCCTTCTCCATCTCCAGCTCGGGGC TGCCGCGAGGGGAGCGCTGCTTCGGGGGAGCGGGCAG GGCGGGTTCGGCTTCTGGCGTGACCGCGGGAATTC
86	YSY-Gを含有するDNA断片	GAATTCATGAAGTGCCTTTGTACTTAGCCTTTTATTCATT GGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTTTTCACACAACCA AAAAGGAAACTGGAAATGTTCTTCTAATTACCAATTATT GCCCCTCAAGCTCAGATTAAATTGGCATAATGACTTAATA GGCACAGCCTTACAAGTCAAAATGCCCAAGATCACAAGG CTATTCAAGCAGACGGTGGATGTGTCATGCTTCCAAATGG GTCACTACTTGTGATTCCGCTGGTATGACCGAAGTATAT AACACATTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAAT GCAAGGAAAGCATTGAACAACGAAACAAGGAACCTGGCT GAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTG TGACGGATGCCGAAGCAGTGAATTGCTAGGTGACTCTCAC CATGTGCTGGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTGATT ACAGTTCATCAACGGAAAAATGCAGCAATTACATATGCCCC ACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCATTTCTGACTATAAGGT CAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATGGACATCA CCTTCTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAG GAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAACCTTTGCTTATGAAA CTGGAGGCAAGGCTGCAAAATGCAATACTGCAAGCATTG GGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGCTGGITCGAGATGGCTG ATAAGGATCTTTTGTGCGAGCAGATTCCCTGAATGCCCA GAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGA TGTAAGTCTAATTACAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATT CCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCT TCCAATCTCTCAGTGGATCTCAGCTATCTGCTCCTAAAA

30

40

50

【表 5 - 4 4】

		ACCCAGGAACCGGTCCTGCTTTCACCATAATCAATGGTACC CTAAAATACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGC TGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAA CTACACAGAAAGGGAACCTGTGGGATGACTGGGCACCATA TGAAGACGTGGAAATTTGGACCAATGGAGTTCTGAGGACC AGTTCAGGATATAAGTTTCTTTATACATGATTGGACATGG TATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGG TGTTGCAACATCCTCACATCAAGACGCTGCTTCGCAACTT CCTGATGATGAGAGTTTATTTTTGGTGATAGTGGGTATC CAAAAATCCAATCGAGCTTGTAGAAGGTTGGTTTCAGTAGIT GGAAAAGCTCTATTGCCTCTTTTCTTTATCATAGGGTTAA TCATTGGACTATTCTTGGTTCCTCCGAGTTGGTATCCATCTTT GCATTAAATTAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTATAC AGACATAGAGATGAGAATTC
87	RREおよびサ グベータグロビ ンポリhを含む するヘルパーバ ラスミド	TCTAGAAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAG GAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACA GGCCAGACAATTATGTTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAAC AATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCA ACTCACAGCTGGGGCATCAAGCAGTCCAGGCAAGAATC CTGGCTGTGGAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAG ATCTTTTCCCTCTGCCCCAAAATTTAGGGGACATCATGAAG CCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAGGAAATTTAT TTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTGTGTCTCTCACT CGGAAGGACATATGGGAGGGCAATCATTAAACATCAG AATGAGTATTTGGTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATG CTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAGAGGTCATCA GTATATGAAACAGCCCCCTGCTGCCATTCTTATTCATA GAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTATATTTGTT TTGTGTTATTTTTCTTTAAACATCCCTAAATTTTCTTAC ATGTTTTACTAGCCAGATTTTCTCTCTCTGACTACTCC CAGTCATAGCTGCCCTCTCTCTTATGAAGATCCCTCGAC CTGCAGCCCAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTC

10

20

【表 5 - 4 5】

		CTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATA CGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCATAAT GAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCC GCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGCCAGCGGATCCGCAT CTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCC CATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCGC CCCATGGCTGACTAATTTTTTTATTTATGCAAGGCCGAG GCCGCTCGGCCCTGAGCTATTCCAGAAAGTAGTGAGGAG GCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGT TTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAGCAATAGCATC ACAAATTCACAAATAAGCAATTTTTTCACTGCAATTCTAG TTGTGGTTTGCCAAACTCATCAATGTATCTTATCACCCGG G
88	RSVプロモ ーターおよびHIV Rev	CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGG GACTAGGGTGTGTTTAGGCGAAAAGCGGGGCTTCGGTGT ACGCGGTTAGGAGTCCCTCAGGATATAGTAGTTTCGCTTT TGCATAGGGAGGGGAAATGTAGTCTTATGCAATACACTT GTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCT TACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGATGCCGATTGGTGGA AGTAAGGTGGTACGATCGTGCTTATTAGGAAGGCAACAG ACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCGCA TTGCAGAGATAATTGTATTAAAGTGCCTAGCTCGATACAAT AAACGCCATTTGACATTACACCATTTGGTGTGACCTCCA AGCTCGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGAC GCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGAC CGATCCAGCCTCCCTCGAAGCTAGCGATTAGGCATCTCCT ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAACTCTC AAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCC ACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGGAAGGAAT AGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCAT TCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATC TGCGGAGCCTGTGCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGAC

30

40

50

【表 5 - 4 6】

		TTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTCTGGGACG CAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAAATCTCCTA CAATATTGGAGTCAGGAGCTAAGAATAGTCTAGA
89	標的配列	ATGGCAGGAAGAAGCGGAG
90	shRNA 配列	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGTTCAGAGACTCCGCTTCTTC CTGCCATTTTTT
91	H1プロモ- ーターおよび shRNA配列	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGC CCAGTGTCTACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCTGCGCCC TGCCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCC TGCAATATTGTCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCA TAAACGTGAAATGCTTTGGATTGGGAATCTTATAAGTTC TGTATGAGACCACTTGGATCCGCGGAGACAGCGACAAGA GCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGTCTCCGCTTTTT
92	H1 CCR5 配列	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGC CCAGTGTCTACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCTGCGCCC TGCCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCC TGCAATATTGTCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCA TAAACGTGAAATGCTTTGGATTGGGAATCTTATAAGTTC TGTATGAGACCACTTGGATCCGTCAGTCCAACTATATGT TCAAGAGACATAGATTGGACTTGACACTTTTT
93	プライマー	AGGAATTGATGGCGAGAAGG
94	プライマー	CCCCAAGAAGGTCAAGGTAATCA
95	プライマー	AGCGCGGCTACAGCTTCA
96	プライマー	GGCGACGTAGCACAGCTTCT
97	AGT103 CCR5 miR30	TGTAACTGAGCTTGCTCTA
98	AGT103-R5- 1	TGTAACTGAGCTTGCTCGC
99	AGT103-R5- 2	CATAGATTGGACTTGACAC
100	CAG	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA

10

20

【表 5 - 4 7】

	プロモーター	GCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAAT GGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATGAC GTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGG ACTTTCATTGACGTCATGGGTGGACTATTACGGTAAAC TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGG CATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTG GCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTC GAGGTGAGCCCACTTCTGCTTCACTCTCCCATCTCCCC CCCCCCCCCAATTTGTATTTATTTATTTTAAAT ATTTTGTGACGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGC GCCAGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGG GAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGC GCTCCGAAAGTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGG GGCCCTATAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCG
101	H1 エlement	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGC CCAGTGTCTACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCTGCGCCC TGCCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCC TGCAATATTGTCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCA TAAACGTGAAATGCTTTGGATTGGGAATCTTATAAGTTC TGTATGAGACCACTT
102	3' LTR	TGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGATAAGATCTGCTT TTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGC CTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCACTGCTTAAGC CTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCC CGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACC CTTTTAGTCAGTGTGGAATACTCTAGCAGTAGTAGTTCAT GTCA
103	7SK プロモーター	CTGCAGTATTTAGCATGCCCAACCATCTGCAAGGCATTCT GGATAGTGCAAAACAGCCGGAATCAAGTCCGTTTATCTC AAACTTTAGCATTTTGGGAATAAATGATATTGCTATGCTG GTTAAATTAGATTTTAGTTAAATTTCTGCTGAAGCTCTAG

30

40

50

【表 5 - 4 8】

		TACGATAAGCAACTTGACCTAAGTGTAAGTTGAGATTCC TTCAGGTTTATATAGCTTGTGCGCCGCTGGCTACCTC
104	miR155 Tat	CTGGAGGCTTGTGAAGGCTGTATGCTGTCCGCTTCTTCCT GCCATAGGGTTTTGGCCACTGACTGACCCTATGGGGAAGA AGCGGACAGGACACAAGGCCTGTACTAGCACTCACATGG AACAAATGGCC
105	pRSV Rev	AGCGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCCGCGCTTGGCCG ATTCAATTAATGCAGCTGGCAGCAGGTTTCCCGACTGGAA AGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTC ACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGC TCGTATGTTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACA CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCGATGTACG GGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTT AGCGGAAAAGCGGGCTTCGGTTGTACGCGTTAGGAGTC CCCTCAGGATATAGTAGTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGG AAATGATGCTTATGCAATACACTTGTAGTCTTGCAACATG GTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAA AGCACCGTGATGCCGATTGGTGAAGTAAGGTGGTACGA TCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGCAGGTCTGACATGG ATTGGACGAACCACTGAATTCGCTATGACAGATAATTGT ATTTAAGTGCTAGCTCGATACAATAAACGCCATTGACCA TTCACCACATTGGTGTGACCTCAAGCTCGAGCTCGTTTA GTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGTGTTT TGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCCT CGAAGCTAGTCGATTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG CGGAGACAGCGACGAAGACCTCTCAAGCAGTCAGACTC ATCAAGTTTCTCTATCAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGA GGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGTG GAGAGAGAGACAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGG ATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGGGAGCCTGTGCC TCTTCAGTACCACCGCTTGAGAGACTTACTTTGATTGTA ACGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACGACAGGGGTGGGAAG

10

20

【表 5 - 4 9】

		CCCTCAATATTGGTGGAATCTCTACAATATTGGAGTCAG GAGCTAAAGAATAGTGCTGTAGCTTGCTCAATGCCACAGC TATAGCAGTAGCTGAGGGGACAGATAGGGTTATAGAAGTA GTACAAGAAGCTTGCCACTGGCCGCTGTTTACATGATCTG AGCCTGGGAGATCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTA AGCCTCAATAAAGCTTGCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGT GCCCCGTCTGTTGTGACTCTGGTAAGTAGAGATCACAAAG CAACCATAGTAGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGG CGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCTGACCGCTACACTTGCC AGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTT CTCGCCACGTTCCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCG GGGGTCCCTTTAGGGTTCCGATTAGTGCTTTACGGCACC TCGACCCCAAAAACCTTGATTGGGTGATGGTTCACGTAGT GGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTT GGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTCTGTTCACAACTG GAACAACACTCAACCTATCTCGGGCTATTCTTTGATTTA TAAGGGATTTTGGCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAATGA GCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAATAT TAACGTTTACAATTTATGGTGCACTCTAGTACAATCTGC TCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCGACACCCGCCAAC ACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGGCAT CCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATG TGTCAGAGGTTTTCACCGTCAACCCGAAACGCGCAGAC GAAAGGGCCTCGTGATACGCTATTTTATAGGTTAATGTC ATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCCTTTTCG GGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTGTTATTTTCTAAA TACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGA TAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTA TTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTCGCGCAT TTTGCTTCTGTTTTGTGCTACCCAGAAACGCTGTGAAA GTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGACGAGTGGGTT ACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAG
--	--	---

30

40

50

【表 5 - 5 0】

		TTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTA AAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCGTAFTGACGCC GGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCATACACTATTCTCAGA ATGACTTGGTTGAGTACTACCAAGTCACAGAAAGCATCTT ACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCA TAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACA ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCGACA ACATGGGGATCATGTAACCTGCTTGATCGTTGGGAACCG GAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACCA CGATGCTGTAGCAATGGCAACACGTTGCGCAAACTATT AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAA TAGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTGCAGGACCATTCT GCGCTCGGCCCTTCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAAT CTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGC ACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCT ACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG ACAGATCGTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAAGCATTGGT AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATCTTTAGATTGAT TTAAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGAT CCTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGT TTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAA GGATCTTCTTGAGATCTTTTCTTGCGCGTAATCTGCTGC TTGCAAAACAAAAACCACCGCTACCAGCGTGGTTTGT GCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAAGT GCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTGCTCTCTAGTG TAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACC GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACAGTGGCTG CTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTGGACTCA AGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTCTGGGTGAA CGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGAGCGAACGAC CTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAA AGCGCCACGCTTCCCGAAGGAGAAAGCGGACAGGTATC
--	--	--

10

20

【表 5 - 5 1】

		CGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGG AGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTATAGTCCTGTC GGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATG CTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAAC GCGGCCCTTTTACGGTTCTGGCCCTTTGCTGGCCTTTTGCT CACATGTTCTTCTCGCTTATCCCTGATTCTGTGGATAAC CGTATTACCGCCTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAG CCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGC GGAAG
106	pCMV-VSV-G	GAGCTTGGCCCATTCATACGTTGTATCCATATCATAATAT GTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTT GACATTGATTATTGACTAGTTAATAAGTAATCAATTACG GGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTAC ATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAAC GACCCCGCCCATTTGACGTCAATATGACGTATGTTCCCAT AGTAACGCCAATAGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTG GAGTATTTACGGTAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGT GTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACG GTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTA TGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAT CGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTGGCAGTACATCAATG GGCGTGGATAGCGGTTTGAATACGGGGATTTCAGGTCTC CACCCTATTGACGTCAATGGGAGTTGTTTGGCACCAAAA TCAACGGGACTTTCCAAAATGTGTAACAACTCCGCCCAT TGACGCAATGGGCGGTAGGCGGTACGCTGGGAGGTCTA TATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGA GACGCCATCCACGCTGTTTGACCTCCATAGAAGACACCGG GACCGATCCAGCTCCGGTCCGACCGATCCAGAACTTCAG GGTGAGTTGGGGACCTTGATTGTTCTTTCTTTTCGCTAT TGTAAAATTCATGTTATATGGAGGGGGCAAGTTTTCAGGG TGTTGTTTGAATGGGAAGATGTCCTTGTATCACCATGGA

30

40

50

【表 5 - 5 2】

	CCCTCATGATAATTTTGTTCCTTCTACTTCTACTCTGTTGA CAACCATGTGCTCTCTATTTTCTTTTCATTTCTGTAACCT TTTCGTTAAACTTTAGCTTGCAATTGTAAACGAATTTTAAAT TCACCTTTGTTTATTTGTGAGATTGTAAGTACTTTCTCTAAT CACTTTTTTTTCAAGGCAATCAGGGTATATTATATGTACTT CAGCACAGTTTTAGAGACAATTGTTATAATTAATGATAA GGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAAA TATCTTATTGGTAGAAACAACACACCTGGTCATCATCC TGCCTTTCTCTTATGGTTACAATGATATACACTGTTTGAGA TGAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCTCTGCT AACCATGTTCTGCTTCTTCTCTTCTACAGCTCCTGGGC AACGTGCTGGTTGTTGTGCTGTCTCATCTTTTGGCAAAGA ATTCCTCGACGGATCCGCCATGAAGTGCCTTTGTACTTAG CCTTTTATTCATTGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTTT TTCCACACAACCAAAAGGAACTGGAAAAATGTTCTTCTC TAATTACCATTTATGGCCGTCAGCTCAGATTTAAATGGC ATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAAATGCC CAAGAGTCAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGT CATGCTTCCAAATGGGTCACTACTGTGATTTCGGCTGGTA TGGACCGAAGTATATAACACATTCCATCCGATCCTTCACTC CATCTGTAGAACAAATGCAAGGAAAGCAATTGAACAAACGAA ACAAGGAACTTGGCTGAATCCAGGCTTCCCTCTCAAAGTT GTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGT CCAGGTGACTCTCTACCATGTGCTGGTTGATGAATACACAG GAGAATGGGTGATTACAGTTTCATCAACGAAAAATGCAG CAATTACATATGCCCACTGTCTTAACCTCTACAACTGGC ATTCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTC ATTCTCATGGACATCACTTCTCTCAGAGGACGGAGAGCT ATCATCCCTGGGAAAGGAGGGCACAGGGTTCAGAAATGTAAC TACTTTGCTTATGAAACTGGAGGCAGGCTGCAAAATGC AATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGT CTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTGTGTCAGCCA
--	--

10

20

【表 5 - 5 3】

	GATTCCTGAATGCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCA TCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGACGTGA GAGGATCTTGGATTATTCCTCTGCCAAGAACTGGAGCA AAATCAGAGCGGGTCTTCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGC TATCTTGCTCTCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTTTCAC CATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTGAGACCAGATACA TCAGAGTCGATAATTGCTGTCTCAATCTCTCAAGAAATGGTC GGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGGAAGTGGGG ATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGGAAATGGACCCAA TGGAGTTCTGAGGACCAAGTTCAGGATATAAGTTTCTTTAT ACATGATTGGACATGGTATGTTGACTCCGATCTTCACTT AGCTCAAAGGCTCAGGTGTTCAACATCTCTCACATTCAAGA CGCTGCTTCGCAACTTCTGATGATGAGATTATTTTGGG TGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCAGAGCTTGTAAGAA GGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTATTGCTCTTTTTC TTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGGTTCTCCGA GTTGGTATCCATCTTTGCAATTAATAAAGCACACCAAGAA AAGACAGATTATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGGA AAGTGATAAGGATCCGTCGAGGAATTCACCTCAGGTGC AGGCTGCCTATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGC CCTGGCTCACAATACCACTGAGATCTTTTCCCTCTGCCA AAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCATCTGACT TCTGGCTAATAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTG TTGGAATTTTTGTGTCTCTACTCGGAAGGACATATGGGA GGGCAAAATCAATTAACATCAGAAATGAGTATTGGTTTAG AGTTTGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGCATGAACAA AGGTTGGCTATAAAGAGGTCACTAGTATAGAAACAGCCC CCTGCTGCTCATTCCTTATCCATAGAAAAGCCTTGACTTG AGGTTAGATTTTTTTATATTTTGTGTTGTTATTTTTTCT TTAACATCCCTAAAATTTTCTTACATGTTTTACTAGCCAGA TTTTCTCTCTCTCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCT CTTCTTATGGAGATCCCTCGACGGATCGGCCGAATTG
--	--

30

40

50

【表 5 - 5 4】

	TAATCATGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGC TCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG TAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTA ATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCT GTCGTGCCAGTGCATTAAATGAATCGGCCAACGCGCGGG AGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTCCGTTCTCGCT CACTGACTCGTGCCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGG TATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGA ATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGG CCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAGGCCGCGTTGCTG GCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAA AAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA CTATAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGT GCGCTCTCTGTTCCGACCTGCGGCTTACCGGATACCTGT CCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGC TCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTC CAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCGCGACC GCTGCGCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCAACCCG GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTA ACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGA GTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAGA ACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCGAGTTACCTT CGGAAAAGAGTTGGTAGCTTTGATCCGGCAAAACAAACC ACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGAT TACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC TTTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACCTACG TTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCA CCTAGATCCTTTTAAATTAATAAGTATTTAAATCAATC TAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATG CTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTT GTTTATCCATAGTTGCGTGAATCCCGCTGTGATAGATACT ACGATACGGGAGGGCTTACATCTGGGCCAGTGTGCAA
--	---

10

20

【表 5 - 5 5】

	TGATACCGGAGACCCACGCTCACCGCTCCAGATTTATCA GCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGCCGAGCGCAGAAGT GGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGT TGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTT GCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGCAC GCTCGCTGTTGGTATGGCTTATTAGCTCCGGTCCCAA CGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAA AAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGT AAGTTGGCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACT GCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTT TGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCAATTCTGAGAATAGT GTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGG GATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCA TCATTGGAAAACGTTTCTCGGGCGAAAACCTCAAGGATC TTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGC ACCCAATGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCCAGCGTTTC TGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAA GGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATCTCATCTC TTCTTTTTCATAATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGT CTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTAATTTAGAAAAATA ACAAATAGGGGTTCCGCGCATTTCCCCGAAAAGTGCCA CCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCCGCTTA AATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGA AATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAAATAGACCGAG ATAGGGTTGAGTGTGTTCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACT ATTAAAGAACGTGGACTCCACAGTCAAGGGCGAAAAACC GTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTA ATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATC GGAAACCTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTGACGGGG AAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGC GAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTC ACGCTGCGCGTAACCAACACACCGCCGCGCTTAATGCGCC
--	--

30

40

50

【表 5 - 5 6】

		GCTACAGGGCGCGTCCATTGCGCATTCAGGCTGCGCAACT GTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGC CAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTT GGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAC GACGGCCAGTGAGCGCGTAATACGACTCACTATAGGCG GAATTGGAGCTCCACCGCGTGGCGGCCGCTCTAGA
107	PSPAX2 デルタ Rev	GTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATT ACGGGGTCTATTAGTTATAGCCATATATGGAGTTCGCGGT TACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCA ACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC ATAGTAACGCCAATAGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT GGACTATTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAG TGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGAC GGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTT ATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA TCGCTATTACATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTT CACTCTCCCCTCTCCCCCTCCCACCCCAATTTGTA TTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGACGCGATGGGGCGGG GGGGGGGGGGCGCGCGCAGGCGGGCGGGCGGGCGG AGGGGCGGGCGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCGAG CCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCG AGGCGCGGCGGCGGGCGGCTATAAAAAGCGAAGCGCGC GGCGGGCGGAGTCGCTGCGTTGCTTCGCCCGTGCCCCG CTCCGCGCGGCTCGCGCGGCCGCCCGGCTCTGACTGAC CGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGGAGCGGCCCTTCTC CTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTT TCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAGCTTAAAGGGCTCCGGGA GGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGTGCCTG CGTGTGTGTGTGCGTGGGAGCGCGCGTGC GGCGCGCGC TGCCCGCGGCTGTGAGCGCTCGGGCGCGGCGCGGGCT TTGTGCGCTCCGCGTGTGCGGAGGGGAGCGCGCGCGGG

10

20

【表 5 - 5 7】

		GCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAA GGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGTGAGCAGGG GTGTGGGCGCGCGGTGCGGTGTAACCCCCCTGCACCC CCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCGGCTTCGGGTGCGG GGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGGGGCTCGCGTGCCGCGG CGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGTGCCGGCGGGGCGGG GCCGCTCGGGCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGG GGCCCCGAGGCGCGCGGCTGTCGAGGCGCGGCGAGCCG CAGCCATTGCTTTTATGGTAATCGTGCAGAGGGCGCAGG GACTTCCTTTGTCCAAATCTGGCGGAGCCGAAATCTGGGA GGCGCGCGCGCACCCCTTAGCGGGCGCGGGCAAGCGG TGCGCGCGCGCAGGAAGGAATGGCGGGGAGGGCCTTC GTGCGTGC CGCGCGCGCTCCCTTCTCACTCCAGCCT CGGGGCTGCCGAGGGGACGGCTGCTTCGGGGGGGACG GGGAGGGCGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGCGGC TCTAGAGCTCTGCTAACCATGTTTCATGCTTCTTTTTC CTACAGCTCTGGCAACGTGCTGTTATTGTGCTGTCTCA TCAATTTGGCAAGAAATTCGGGCGGGCGGTTGACGCGCA CGGCAAGAGCGAGGGGCGGCACTGGTGAGAGATGGGT GCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAAATTAGATCGAT GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAGAAAAAAT ATAAATTAACATATAGTATGGCAAGCAGGAGCTAGA ACGATTGCGAGTTAATCTGGCTGTTAGAAACATCAGAAG GCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTCA GACAGGATCAGAGAAGCTTAGATCATTATATAACAGTA GCAACCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAG ACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAA ACAAAAGTAAGAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACA CAGGACACAGCAATCAGGTACGCCAAAATTACCTATAGT GCAGAACATCCAGGGGCAATGGTACATCAGGCCATATCA CCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGA AGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCATGTTTTCAGCATTA
--	--	--

30

40

50

【表 5 - 5 8】

	TCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTAAACACCATGCTAA ACACAGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAATGTTAAA AGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGTG CATCCAGTGCATGCAGGGCCTATTGCACAGGCCAGATGA GAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACCTACTAGTAC CCTTCAGGAACAAATAGGATGGATGACACATAATCCACCT ATCCCAGTAGGAGAAATCTATAAAAGATGGATAATCCTGG GATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCAT TCTGGACATAAGACAAGGACCAAGGAACCCTTTAGAGAC TATGTAGACCGATTCTATAAACTCTAAGAGCCGAGCAAG CTTCACAAGAGGTAAAAATTGGATGACAGAAACCTTGTT GGTCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTAAAA GCATTGGGACCAGGAGCGCACTAGAAGAAATGATGACAG CATGTCAGGGAGTGGGGGACCCGGCCATAAGCAAGAGT TTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATCCAGCTACC ATAATGATACAGAAAGGCAATTTTAGGAACCAAGAAAGA CTGTTAAGTGTTCATTTGTGGCAAGAAAGGGCAGATAGCC AAAAATTGCAGGGCCCTAGGAAAAAGGGCTGTGGAAAT GTGGAAGGAAGGACACCAATGAAAGATTGTACTGAGAG ACAGGCTAATTTTTAGGGAAGATCTGGCCTCCCAAGG GAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAAC AGCCCCACAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGAAGAGACA ACAACCTCCTCTCAGAACGAGGCGATAGACAAGGAAC TGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTTTTGGCAGCGACC CCTCTGTCACATAAAGATAGGGGGGCAATTAAAGGAAGCT CTATTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGAAA TGAATTGGCCAGGAAGATGGAAACCAAAATGATAGGGGG AATTGGAGGTTTTATCAAGTAGGACAGTATGATCAGATA CTCATAGAAATCTGGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATT AGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTG TTGACTCAGATTGGCTGCATTTAAATTTCCATTAGTCCT ATTGAGACTGTACCAGTAAATTAAGCCAGGAATGGATG
--	--

10

20

【表 5 - 5 9】

	GCCCCAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAAT AAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAAGGAA GGAAAAATTTCAAAAATGGGCCGAAAAATCCATACAATA CTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATG GAGAAAAATTAGTAGATTTCAGAGAACTTAATAGAGAACT CAAGATTTCTGGGAAGTTCATTAGGAATACACATCCTGC AGGGTTAAAAACAGAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTG GGCGATGCATATTTTCAGTTCCTTAGATAAAGACTTCAG GAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAATGAGA CACCAGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTCCACAGGG ATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCAGTGTAGCATGACA AAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAAACAAATCCAGACATAG TCATCTATCAATACATGGATGATTGTATGTAGGATCTGAC TTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACCTGA GACAACATCTGTGTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAA AAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTTGGATGGGTTATG AACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTG CCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAAT TAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTATGCAGG GATTAAAGTAAGGCAATTATGTAACTTCTTAGGGGAACC AAAGCACTAACAGAAAGTAGTACCACTAACAGAAAGAGCAG AGCTAGAACTGGCAGAAACAGGGAGATTCTAAAAGAACCC GGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTTAATA GCAGAAATACAGAAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACATATC AAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAAACAGGAAA ATATGCAAGAATGAAGGGTGCCCACTAATGATGTGAAA CAATTAACAGAGGCAGTACAAAAATAGCCACAGAAAGCA TAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTTAAATTACCCATA CAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGATTTGGGC AAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCT CCCTTAGTGAAAGTTATGGTACCAGTTAGAGAAAGAACCCA TAATAGGAGCAGAACTTCTATGTAGATGGGGCAGCCAA
--	---

30

40

50

【表 5 - 6 0】

	TAGGGAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTAAGTACG AGAGGAAGACAAAAAGTTGTCCCTAACGGACACAACAA ATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAG GATTCGGGATTAGAAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAAT ATGCATTGGGAATCATTCAAGCACAAACAGATAAGAGTGA ATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATAAAA AAGGAAAAGTCTACCTGGCATGGGTACCAGCACACAAAG GAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATGGGTTGGTCAGTGC TGGAAATCAGGAAAGTACTATTTTAGATGGAATAGATAAG GCCCAAGAAGAACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAG CAATGGCTAGTATTTTAACCTACCACCTGTAGTAGCAAAA GAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTACGCTAAAAGGGG AAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCCAGGAATATG GCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCTTGG TAGCAGTTTATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGT AATTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCCTC TTAAATTAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAACAGTACATA CAGACAATGCAGCAATTTACCACTACTACAGTTAAGGC CGCCTGTTGGTGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATT CCCTACAATCCCCAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGA ATAAAGAATTAAGAAAAATTATAGGACAGGTAAAGAGATCA GGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAATGGCAGTATTC ATCCACAATTTTAAAGAAAAGGGGGATTGGGGGGTACA GTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACAT ACAAACTAAAGAATTACAAAACAAATTACAAAATTCAA AATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTG GAAAGGACCAGCAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCA GTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAA GAAGAAAAGCAAAGATATCAGGGATTATGGAAAACAGAT GGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATAGGAT TAACACATGGAAATTCGCAACAAGTCTGTTTATCCATTTC AGAATTGGAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGC
--	---

10

20

【表 5 - 6 1】

	AGGAAGCACTATGGGCGAGCGTCAATGACGCTGACGGTA CAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGA ACAATTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTG CAATCTACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAA TCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCT GGGGATTTGGGGTGTCTGGAAAACCTATTGCAACCACTG CTGTGCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAA CAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAG AAATTAACAATTACACAAGCTTGCTAGCAGATCTTTTCCC TCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCTTGAGC ATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTCATTGCA ATAGTGTGTTGGAATTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGAC ATATGGGAGGGCAAAATCATTAAACATCAGAATGAGTAT TTGGTTTAGAGTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCC ATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAA ACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCCATAGAAAAGCCT TGAATTGAGGTAGATTTTTTATATTTTGTGTTGTTATT TTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCTTACATGTTTTACT AGCCAGATTTTCTCTCTCTGACTACTCCAGTCATAGC TGTCTCTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCA AGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAA TTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGA GCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCCTAATGAGTGAGCTA ACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGT CGGGAAACCTGTCTGTCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGT CAGCAACCATAGTCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCC CTAACCTCGCCCAGTTCCGCCATTCTCGCCCCATGGCTG ACTAATTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGG CCTCTGAGCTATTCCAGAAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGA GGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAAGTGTGTTTATGACAGT TATAATGGTTACAAATAAGCAATAGCATCACAAATTCAC AAATAAAGCATTTTTTCTGCTATTCTAGTTGTGGTTTGTG
--	--

30

40

50

【表 5 - 6 2】

	CAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCGCTGCA TTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGCGGTTTGGCT ATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGTGCG CTCGGTCTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA AGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGC AGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAG GAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGC TCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAATCGACGCTCAAG TCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAG GCGTTTCCCTTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCCG ACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCCCTTCG GGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCT CAGTTCGGTGTAGGTGTTCTGCTCCAAGTGGGTGTGTGC ACGAACCCCGTTTACGCCGACCGTGGCGCTTATCCGGT AACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATC GCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCG AGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGC CTAACACGGCTACACTAGAAGGACAGATTTGGTATCTGC GCTCTGTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGTTGGTA GCTCTTGATCCGGCAACAAACACCGCTGGTAGCGGTGG TTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAG GATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGAC GCTCAGTGGAAACGAAACTACGTTAAGGATTTTGGTAT GAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTAAATT AAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTA AACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCAC CTATCTCAGCGATCTGTCTATTCTGTTTATCCATAGTTGCT GACTCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTT ACCATCTGGGCCAGTGTGCAATGATACCGGAGAGCCA CGCTCACCGGTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGC CGGAAGGGCCGAGCGCAGAGTGGTCTGCAACTTTATCC GCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGT
--	---

10

20

【表 5 - 6 3】

	AAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTGCCA TTGCTACAGGCATCGTGGTGACGCTCGTCTTGGTATG GCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTAC ATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGTCTCTCG GTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTA TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTTACTGT CATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACT CAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAG TTGCTCTTGCCCGCGCTAATACGGGATAATACCGGCCAC ATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGGAACGTTCT TCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATC CAGTTCGATGAACCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAG CATCTTTTACTTTACCAAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACA GGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACA CGGAATGTTGAATACTCATCTCTCTTTTCAATATTAT TGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACAT ATTTGAATGTATTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCG CGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTG
--	--

30

40

50

【表 5 - 6 4】

108	伸長因子-1アルファ (EF1アルファ) プロモーター	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAAC TGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCT TTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAA GTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGC AACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGC CGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTA CGGGTTATGGCCCTTGCCTGCCTGAATTACT TCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTATTCTTG ATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAG AGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCCTTC GCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGC GCTGGGGCCGCGCGTGCGAATCTGGTGGCAC CTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCT CTAGCCATTTAAAAATTTTGATGACCTGCTGC GACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA ATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCG GTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCG TGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGG GCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG GGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGT GCCTGGCCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGC CCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCA GTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGG CCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGC GGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCAACC ACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGC CGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGG CGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGC TTTGGAGTACGTCTGCTTTAGGTTGGGGGGA GGGGTTTTATGCGATGGAGTTCCCCACACTGAGT GGTGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT GTAATTCTCCTTGAATTGCCCTTTTGAGTTGGA TCTTGTTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTCAA AGTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGATGTACA
109	5'制限認識部位 を含む miR21 Vif コード化配列	CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTGTGCGGG GATGTGTACTTCTGAACCTGTGTTGAATCTCATGGA GTTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTAT CTTTCATCTGACCA
110	5'制限認識部位 を含む miR185 Tat コード化配列	GCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGAT TCCGCTTCTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTA TGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACC GCGTCTTCGTC
111	miR185 Tat コード化配列	GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCT TCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCA GGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTC TTCGTC

【0329】

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

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に感染した細胞を処置する方法であって、

(a) ex vivoで行われる、HIVに感染した被験体から単離された末梢血単核細胞(PBMC)を治療有効量の刺激剤と接触させるステップと、

10

20

30

40

50

(b) 少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達系を前記P B M Cに e x v i v o で形質導入するステップであって、前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体C C R 5の産生を阻害することができる低分子R N A、またはH I V R N A配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子R N Aを含む、ステップと、

(c) 少なくとも1日間にわたって、形質導入された前記P B M Cを培養するステップとを含む、方法。

(項目2)

前記P B M CからH I V特異的C D 4 + T細胞を陽性選択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H I V特異的C D 4 + T細胞が、少なくとも1つの物理的選択方法を使用して陽性選択される、項目2に記載の方法。

(項目4)

形質導入された前記P B M Cを被験体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5)

前記被験体がヒトである、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記刺激剤がペプチドを含む、項目1に記載の方法。

(項目7)

前記ペプチドがg a gペプチドを含む、項目6に記載の方法。

(項目8)

前記刺激剤がワクチンを含む、項目1に記載の方法。

(項目9)

前記ワクチンがH I Vワクチンを含む、項目8に記載の方法。

(項目10)

前記H I Vワクチンが、M V A / H I V 6 2 Bワクチンまたはそのバリエーションを含む、項目9に記載の方法。

(項目11)

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

(項目12)

前記H I V R N A配列が、H I V V i f配列、H I V T a t配列、またはそれらのバリエーションを含む、項目1または11に記載の方法。

(項目13)

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、マイクロR N Aまたはs h R N Aを含む、項目1または11に記載の方法。

(項目14)

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、マイクロR N Aクラスターを含む、項目13に記載の方法。

(項目15)

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、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%のパーセント同一性を有するマイクロR N Aを含む、項目13に記載の方法。

(項目16)

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、配列番号1を含む、項目13に記載の方法。

(項目17)

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、

10

20

30

40

50

a. 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%のパーセント同一性、または

b. 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%のパーセント同一性

を有するマイクロRNAを含む、項目13に記載の方法。

(項目18)

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、配列番号2または配列番号3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、配列番号31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%のパーセント同一性を有する配列を含む、項目14に記載の方法。

(項目20)

前記マイクロRNAクラスターが、配列番号31を含む、項目14に記載の方法。

(項目21)

被験体においてHIV感染を処置する方法であって、

(a) 有効量の第1の刺激剤で前記被験体を免疫化するステップと、

(b) 前記被験体から白血球を取り出し、末梢血単核細胞(PBMC)を精製するステップと、

(c) 前記PBMCを治療有効量の第2の刺激剤とex vivoで接触させるステップと、

(d) 少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達系を前記PBMCにex vivoで形質導入するステップと、

(e) 少なくとも1日間にわたって、形質導入された前記PBMCを培養するステップとを含む、方法。

(項目22)

前記PBMCからHIV特異的CD4+T細胞を陽性選択するステップをさらに含む、項目21に記載の方法。

(項目23)

前記HIV特異的CD4+T細胞が、少なくとも1つの物理的選択方法を使用して陽性選択される、項目22に記載の方法。

(項目24)

形質導入された前記PBMCを前記被験体に注入するステップをさらに含む、項目21に記載の方法。

(項目25)

前記第1の刺激剤および前記第2の刺激剤が同じである、項目21に記載の方法。

(項目26)

前記第1の刺激剤および前記第2の刺激剤のうちの少なくとも1つが、HIVワクチンを含む、項目21に記載の方法。

(項目27)

前記HIVワクチンが、MVA/HIV62Bワクチンまたはそのバリエーションを含む、項目26に記載の方法。

(項目28)

前記ウイルス送達系がレンチウイルス粒子を含む、項目21に記載の方法。

(項目29)

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができる低分子RNA、またはHIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAを含む、項目21に記載の方法。

(項目30)

被験体においてHIV感染を処置する方法であって、

10

20

30

40

50

- (a) 有効量の第1の刺激剤で前記被験体を免疫化するステップと、
 (b) 前記被験体から白血球を取り出し、末梢血単核細胞（P B M C）を精製するステップと、
 (c) 前記P B M CからH I V特異的C D 4 + T細胞を陽性選択するステップと、
 (d) 前記H I V特異的C D 4 + T細胞を治療有効量の第2の刺激剤とe x v i v oで接触させるステップと、
 (d) 少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達系を前記H I V特異的C D 4 + T細胞にe x v i v oで形質導入するステップと、
 (e) 少なくとも1日間にわたって、形質導入された前記P B M Cを培養するステップとを含む、方法。

【図面】

【図1】

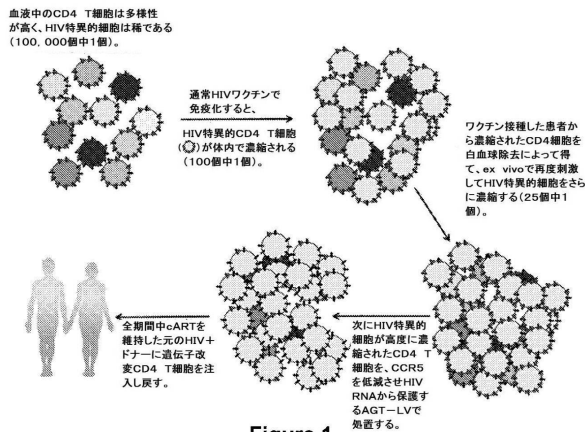


Figure 1

【図2】

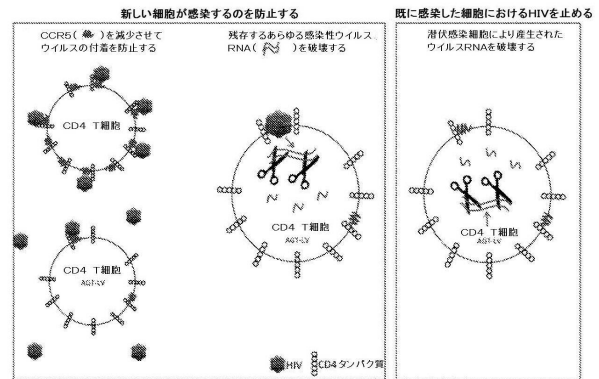


Figure 2

【図 3】

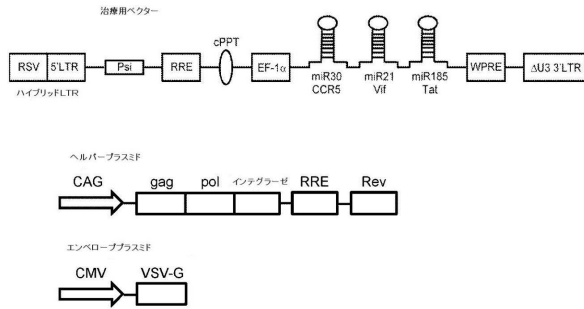


Figure 3

【図 4】

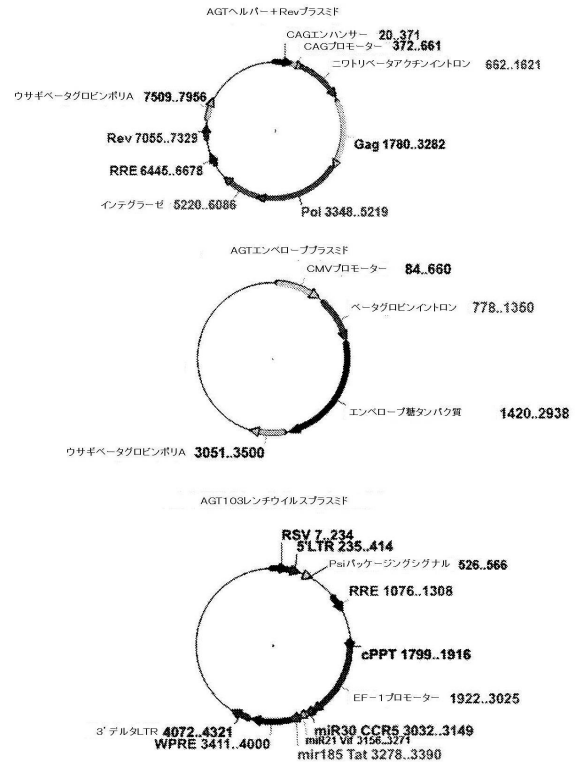


Figure 4

【図 5】

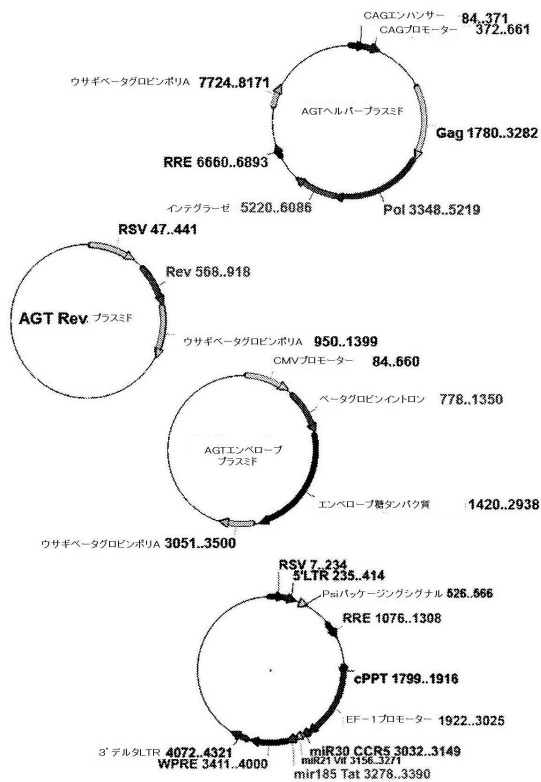


Figure 5

【図 6】

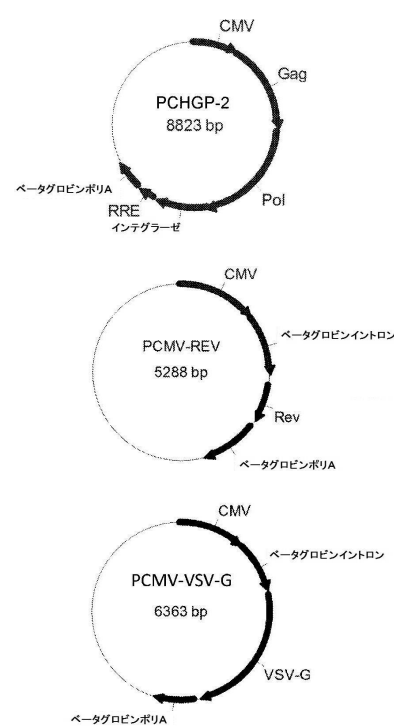


Figure 6

10

20

30

40

50

【図 7】

伸長因子1アルファ(EF1アルファ)プロモーター (配列番号108)

CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGGGGTAACCTGGGAAAGTATGTCGTACTGGCTCCGCTT
 TTTCCTGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCCGCTGAACGTTCTTTTCGCAA
 CGGGTTTCCGCCAGAACACAGTAAAGTCCGCTGTGTGGTTCCCGCGGGCTGGCTCTTTACGG
 GTTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTATTCTTGATCC
 CGAGCTTCGGGTGGAGTGGGTGGAGAGTTCGAGGCCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCGCTC
 GTGCTTGAGTTGAGGCTGGCTGGGCGTGGGCGCGCGGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGC
 GCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTGTAGCTGCTGCGACGCT
 TTTTCTTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGGGGCCAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTG
 GGGCGCGGGCGGACGGGGCCCTGCTGCCAGCGACATGTTCCGCGAGGCGGGGCTGCGA
 GCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCGGGCTGCTTGGTGGCTGGCT
 CGCGCCCGCTGTATCGCCCGCTGGCGGCAAGGCTGGCCGCTCGGCACCACTTGCCTGAG
 CGGAAGATGGCGCTTCCCGCCCTGCTGAGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGA
 GAGCGGCGGGTGAAGTCCACACAAAGGAAAGGGCTTCCGCTCTCAGCCGCTCGCTTATG
 TGACTCCAGGATACCGGGCGGCTCCAGGACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGT
 CGTCTTATGTTGGGGGAGGGTTTTATGCGATGAGTTTCCACACTGAGTGGGTGGAGACT
 GAAGTTAGGCCAGCTTGGCACITGATGTAATCTCTCTGGAATTTGCCCTTTTGGATTGGATC
 TTGTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTCAAAGTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGCTGAT
 GTACA

miR30 CCR5 (配列番号1)

AGGTATATTGCTTTGACAGTGAGCAGCTGTAAGCTGAGCTTGCCTACTGTGAAGCCACAGATG
 GGTAGAGCAAGCAGTTTACCGCTGCCTACTGCCCTCGGACTTCAAGGGGCTT

miR21 Vif (配列番号109)

CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACTTGTGGGGGATGTGACTTCTGAACCTTGTGTGAATC
 TCATGGAGTTCAGAAGACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA

miR185 Tat (配列番号110;配列番号111(下線部分))

GCTAGCGGGCTGGCTCGAGCAGGGGCGAGGGATTCGCTTCTTCCAGCCATGAGCGTGGTCCCC
 TCCCCATGGCAGGCAGAACGCGGACCTTCCCTCCCAATGACCGCTCTTCGTC

FIG. 7

【図 8】

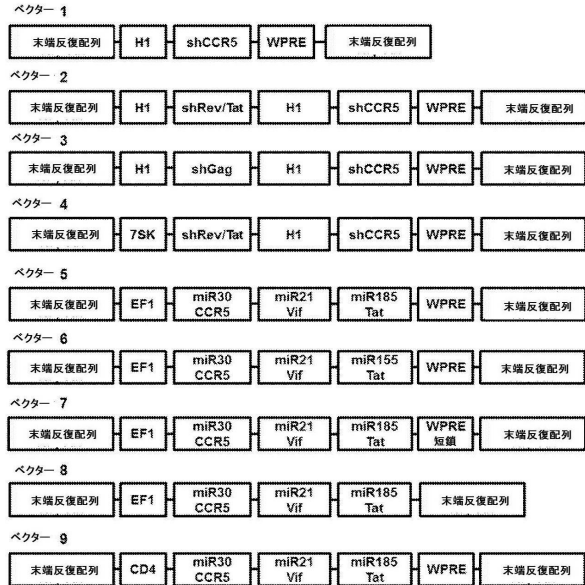


FIG. 8

【図 9 A】

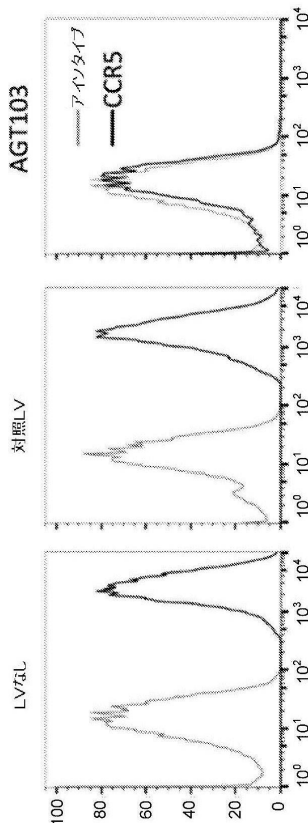


FIG. 9A

【図 9 B】

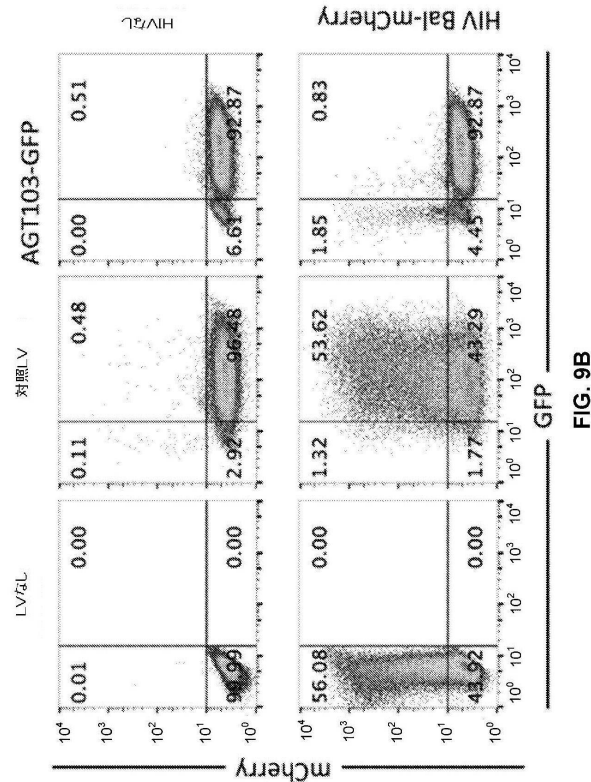


FIG. 9B

10

20

30

40

50

【図 10 A】

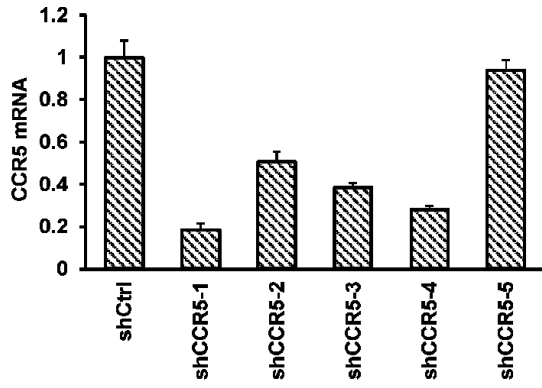


FIG. 10A

【図 10 B】

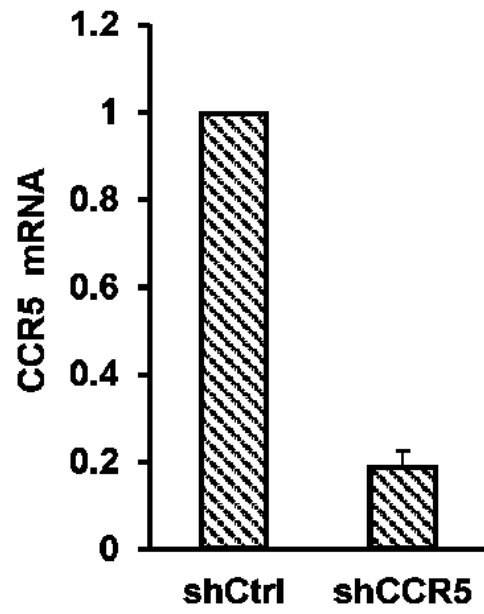


FIG. 10B

【図 11】

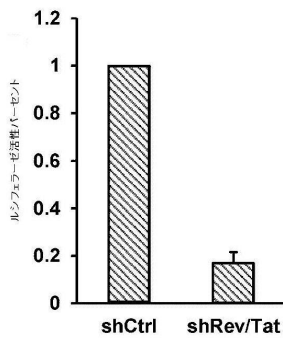


FIG. 11A

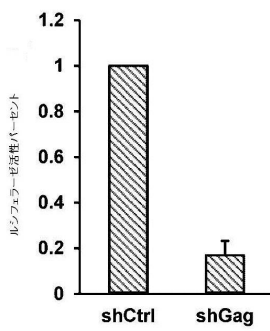


FIG. 11B

【図 12】

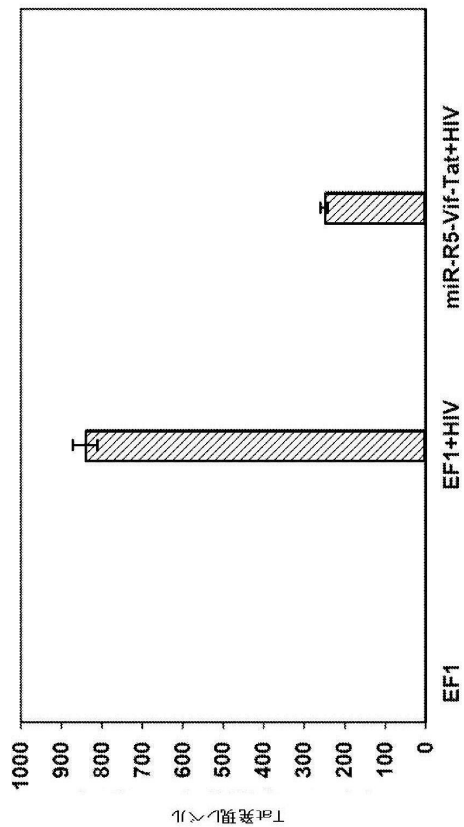


FIG. 12

【図 13】

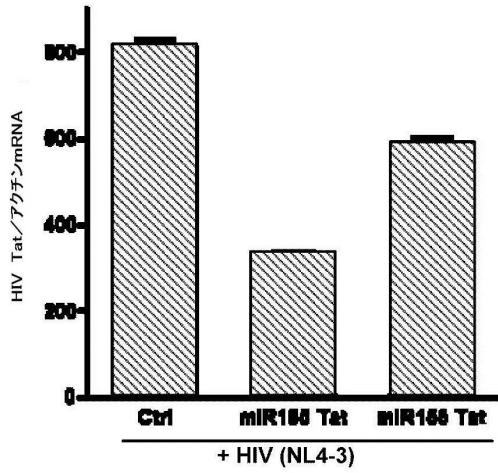


FIG. 13A

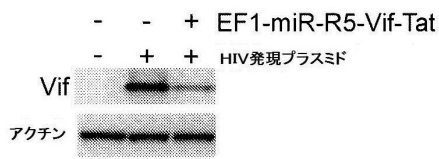


FIG. 13B

【図 14】

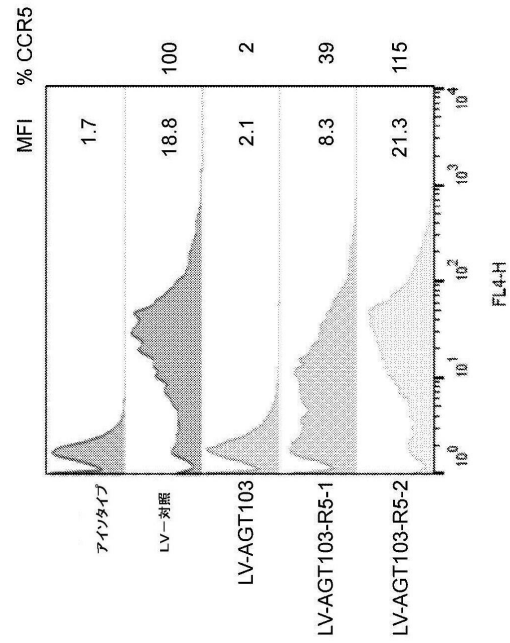


FIG. 14

【図 15】

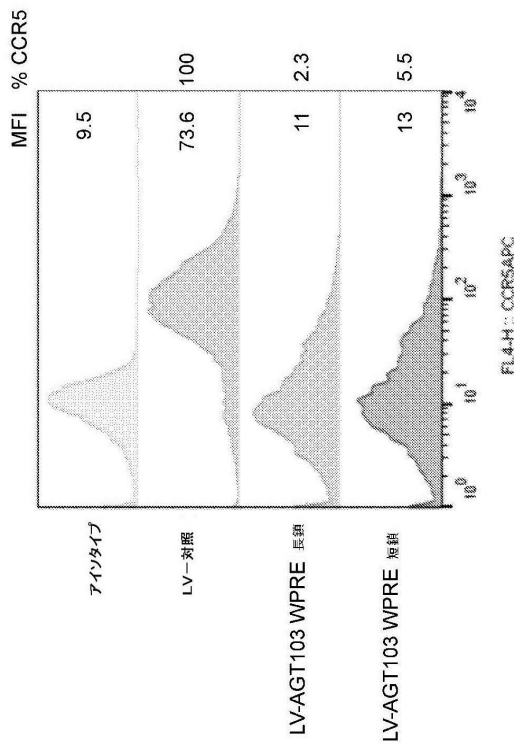
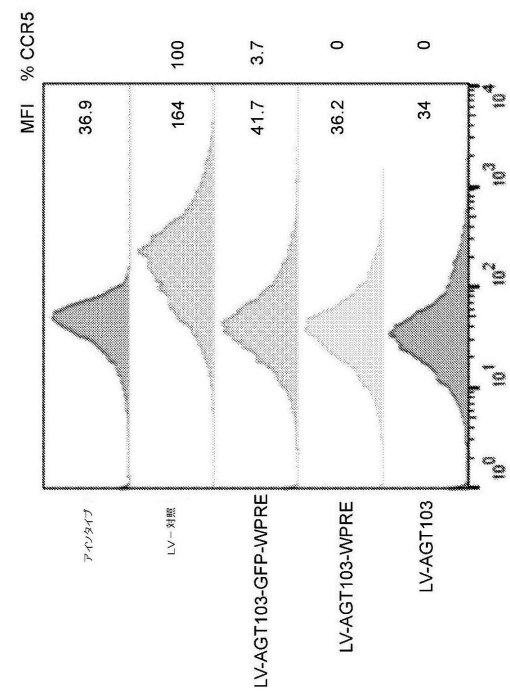


FIG. 15

【図 16】



FL4-H :: CCR5 APC

FIG. 16

10

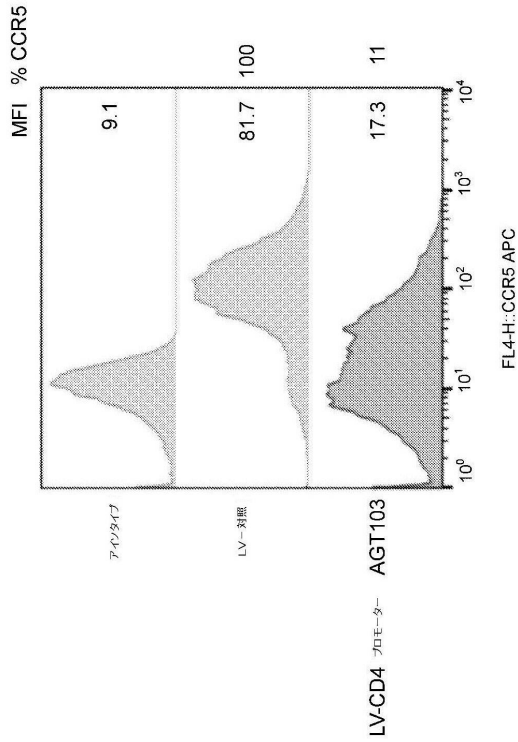
20

30

40

50

【図 17】



【図 18】

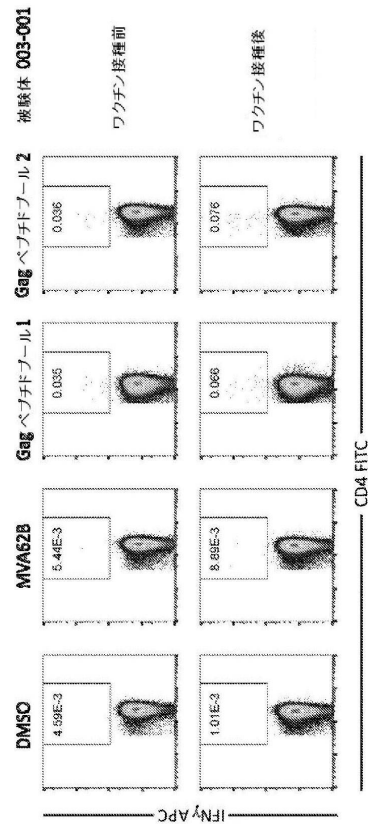
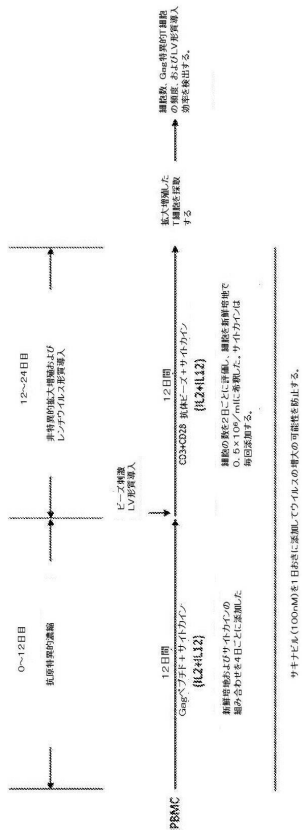


FIG. 17

FIG. 18

【圖 19-1】



【圖 19-2】

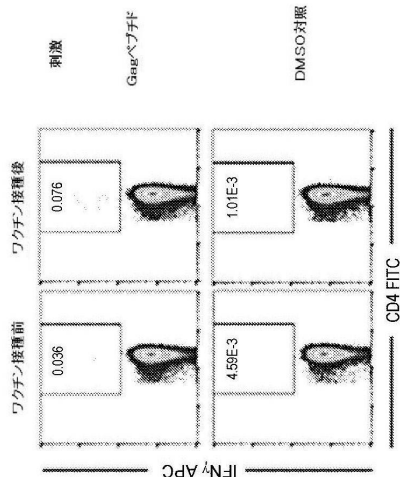


FIG. 19A

FIG. 19B

【図 19 - 3】

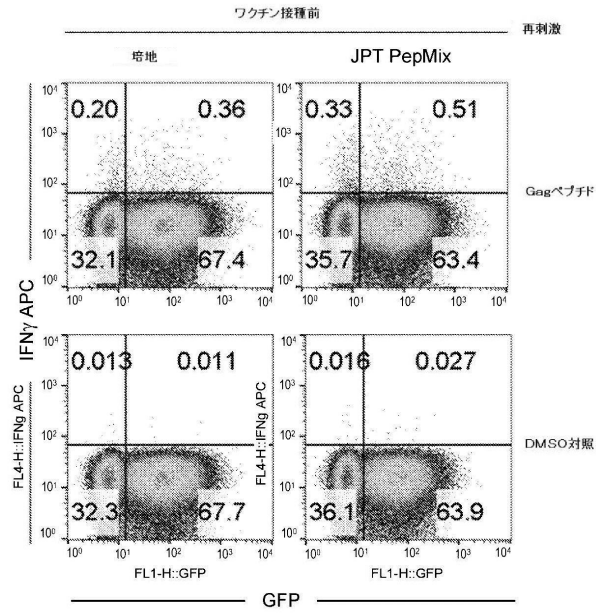


FIG. 19C

【図 19 - 4】

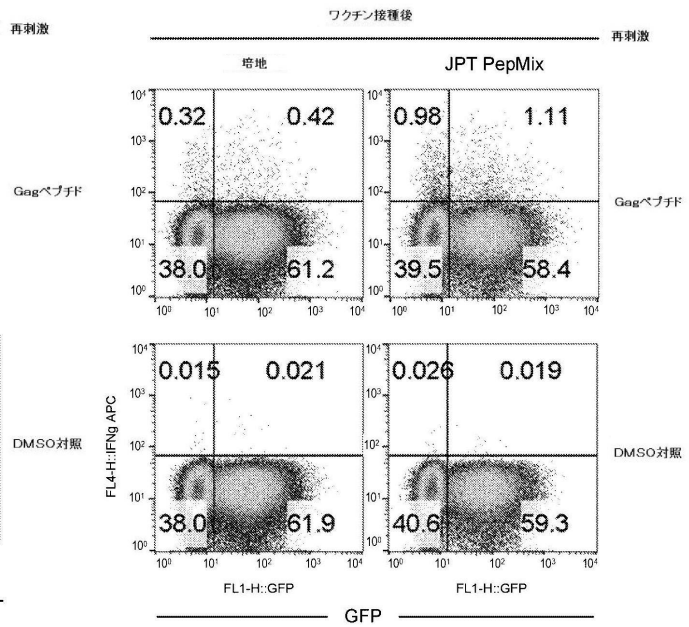


FIG. 19C 続き

【図 19 - 5】

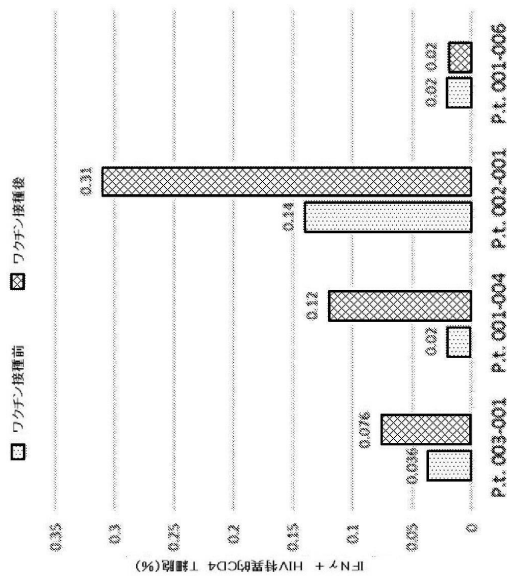


FIG. 19D

【図 19 - 6】

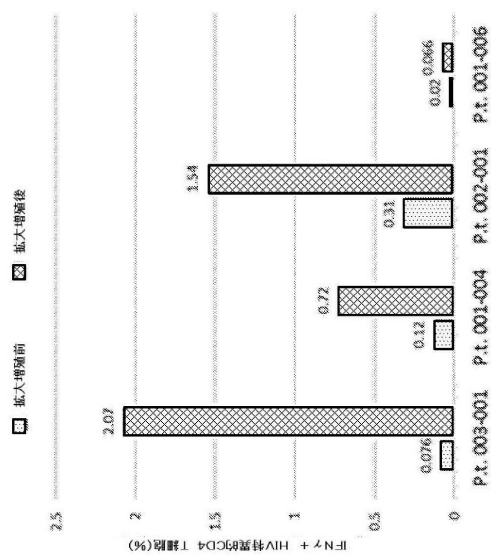


FIG. 19E

【図 20 A】

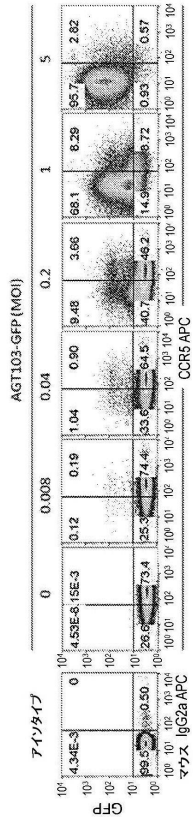


FIG. 20A

【図 20 B】

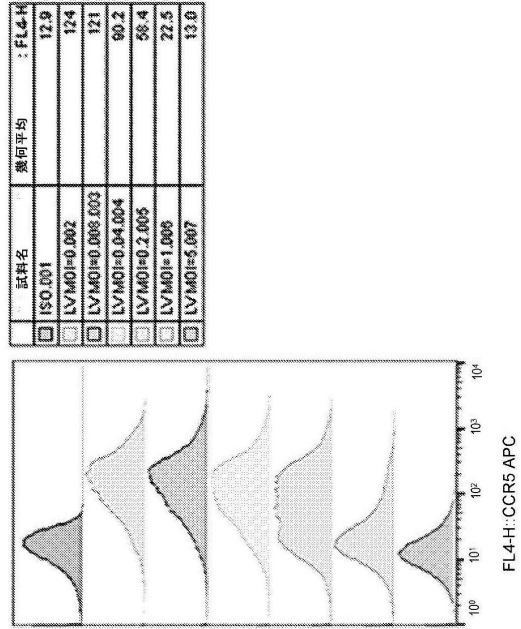


FIG. 20B

【図 20 C】

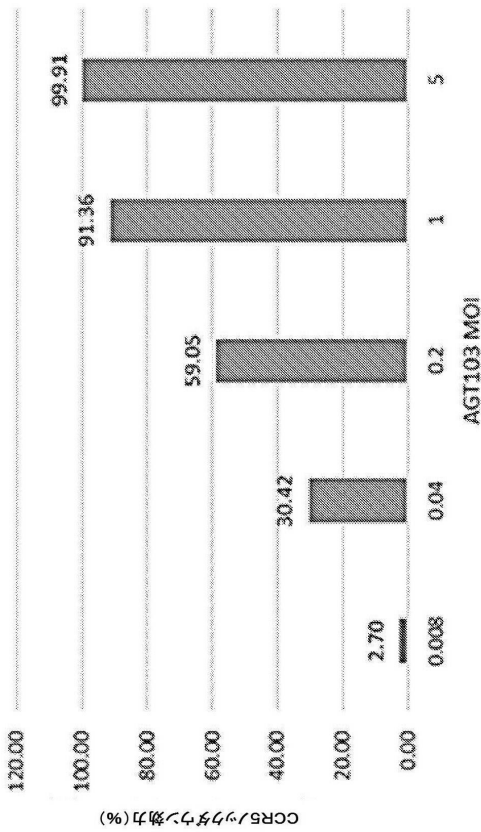


FIG. 20C

【図 21 A】

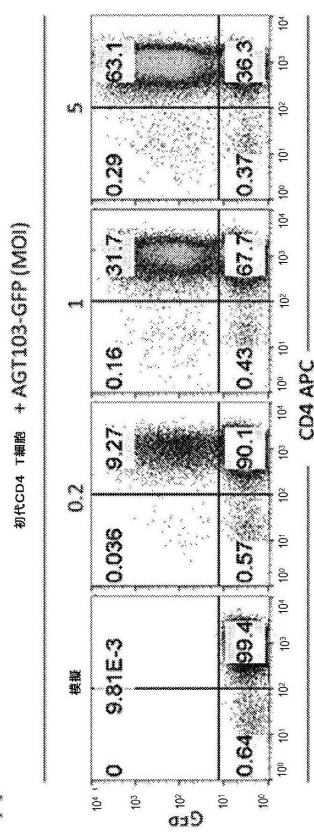
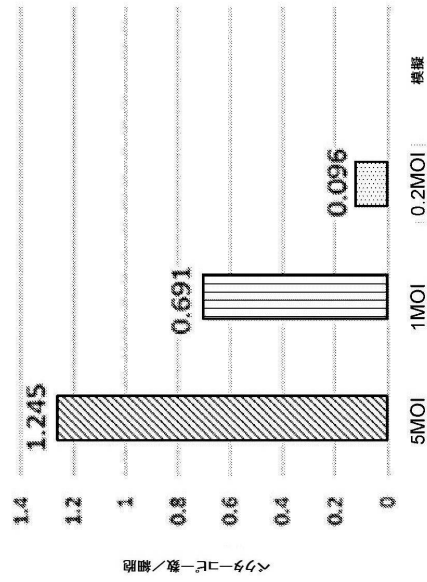


FIG. 21A

【図 2 1 B】



【図 2 2】

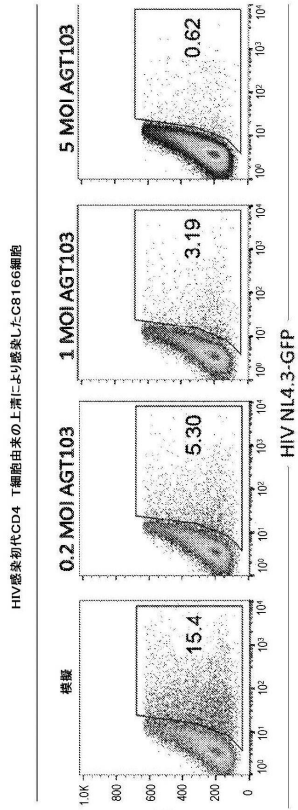


FIG. 21B

FIG. 22

【図 2 3】

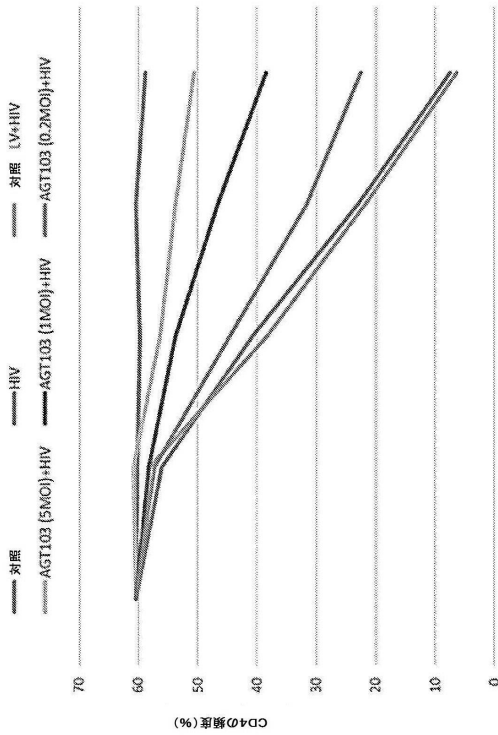


FIG. 23

【図 2 4 A】

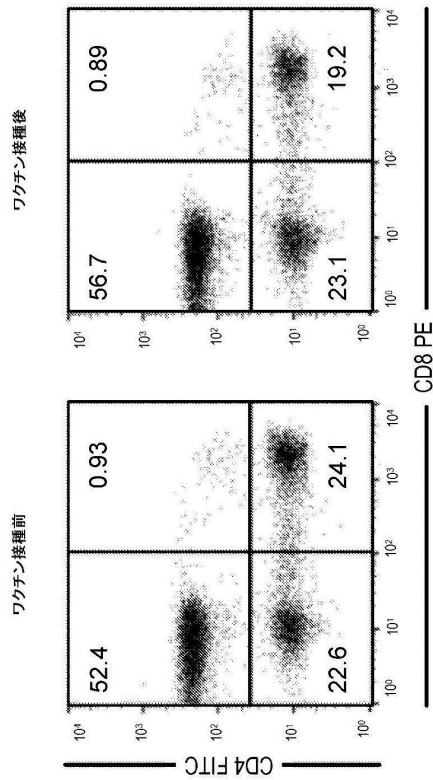


FIG. 24A

【図 2 4 B】

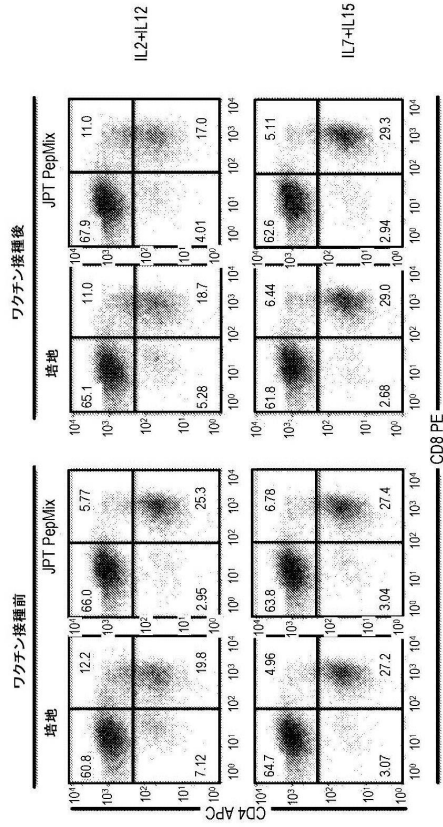


FIG. 24B

【図 2 4 C】

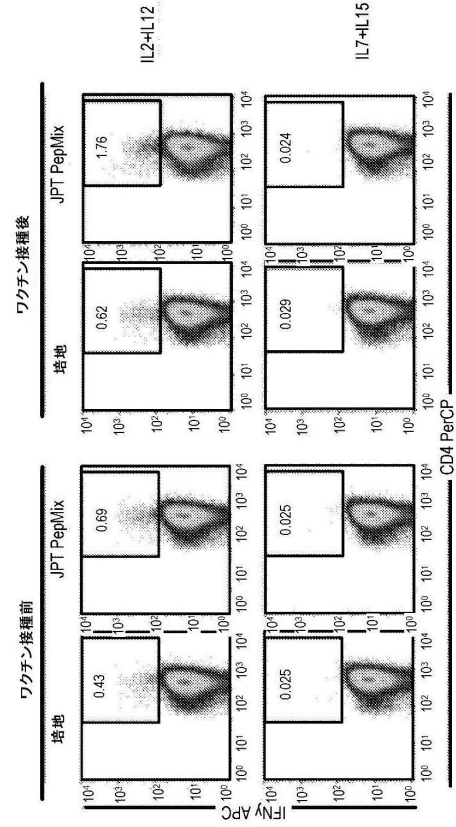


FIG. 24C

【図 2 4 D】

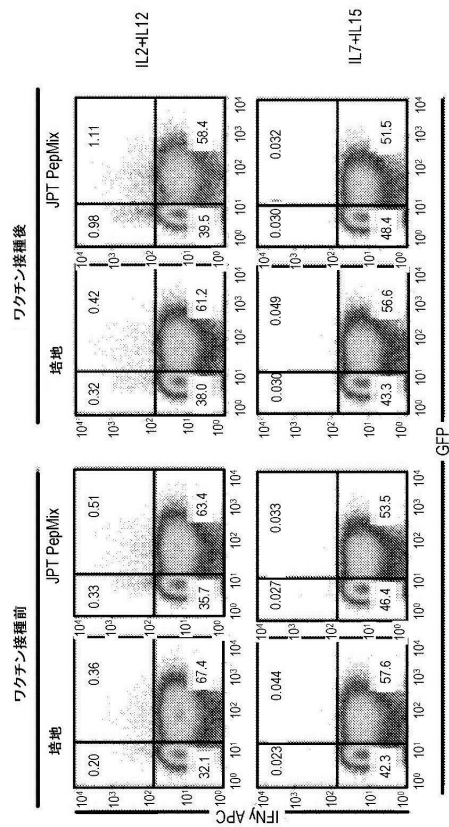


FIG. 24D

10

20

30

40

50

【配列表】
0007162895000001.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

C 1 2 N 5/078 (2010.01)

C 1 2 N 5/078

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/113 1 4 0 Z

C 1 2 N 15/867 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 1 0 2 Z

C 1 2 N 15/867 Z

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/360,185

(32)優先日 平成28年7月8日(2016.7.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 PCT/US2017/013019

(32)優先日 平成29年1月11日(2017.1.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

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 96
40, 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 リ, ハイシャン

アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, メディカル センター ドライブ 96
40, 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 96
40, 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 マンスフィールド, ゲイリー

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 96
40, 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 池上 文緒

(56)参考文献 国際公開第2017/007994 (WO, A1)

国際公開第2017/139065 (WO, A1)

Molecular Therapy (2015) vol.23, no.2, p.310-320, Supplementary materials

Mol. Ther. Nucleic Acids (Apr 2016) vol.5, e312

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K 3 5 / 1 7

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 P 3 1 / 1 8

C 1 2 N 5 / 0 7 8

C 1 2 N 1 5 / 1 1 3

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q