

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-530307  
(P2020-530307A)

(43) 公表日 令和2年10月22日(2020.10.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864 1 0 0 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/35 (2006.01)	C 1 2 N 15/35 Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/015 (2006.01)	C 0 7 K 14/015	4 C 0 8 6
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 304 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-521488 (P2020-521488)  
 (86) (22) 出願日 平成30年6月29日 (2018. 6. 29)  
 (85) 翻訳文提出日 令和2年3月6日 (2020. 3. 6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/040480  
 (87) 国際公開番号 W02019/006418  
 (87) 国際公開日 平成31年1月3日 (2019. 1. 3)  
 (31) 優先権主張番号 62/527, 937  
 (32) 優先日 平成29年6月30日 (2017. 6. 30)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 62/659, 472  
 (32) 優先日 平成30年4月18日 (2018. 4. 18)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(71) 出願人 520004328  
 インティマ・バイオサイエンス, インコー  
 ポレーテッド  
 アメリカ合衆国ニューヨーク州10019  
 , ニューヨーク, コロンバス・サークル  
 3  
 (74) 代理人 100140109  
 弁理士 小野 新次郎  
 (74) 代理人 100118902  
 弁理士 山本 修  
 (74) 代理人 100106208  
 弁理士 宮前 徹  
 (74) 代理人 100120112  
 弁理士 中西 基晴

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子治療のためのアデノ随伴ウイルスベクター

(57) 【要約】

様々な状態および疾患を治療するための、アデノ随伴ウイルスベクターおよび初代細胞などの遺伝子修飾された組成物。癌の治療のための修飾されたアデノ随伴ウイルスもまた開示される。さらに、様々な疾患、状態、および癌の治療において遺伝子修飾された組成物を作製および使用する方法も開示される。

【選択図】 図 2 4 A

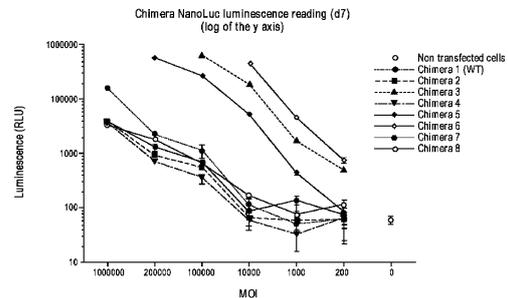


FIG. 24A

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

野生型アデノ随伴ウイルス（AAV）ヌクレオチド配列と比較して、VP1領域に第1の突然変異、およびVP3領域に第2の突然変異を含むAAVキャプシドヌクレオチド配列を含む単離された天然に存在しない核酸であって、前記単離された天然に存在しない核酸は、複数の細胞と接触すると、野生型AAV核酸、または同等の複数の細胞における前記キャプシドタンパク質のVP領域における単一の突然変異を有するAAVヌクレオチド配列と比較して、前記複数の細胞におけるトランスフェクションまたは形質導入後の導入遺伝子の発現が増加している核酸。

## 【請求項 2】

野生型アデノ随伴ウイルス（AAV）ヌクレオチド配列と比較して、VP1領域に第1の突然変異、およびVP2領域に第2の突然変異を含むAAVキャプシドヌクレオチド配列を含む単離された天然に存在しない核酸であって、前記単離された天然に存在しない核酸は、複数の細胞と接触すると、野生型AAV核酸、または同等の複数の細胞における前記キャプシドタンパク質のVP領域における単一の突然変異を有するAAVヌクレオチド配列と比較して、前記複数の細胞におけるトランスフェクションまたは形質導入後の導入遺伝子の発現が増加している核酸。

## 【請求項 3】

前記AAVヌクレオチド配列が、血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、およびそれらの任意の組み合わせのものである、請求項1または2に記載の核酸。

## 【請求項 4】

前記AAVヌクレオチド配列がAAV6血清型のものである、請求項3に記載の核酸。

## 【請求項 5】

前記単離された天然に存在しない核酸が、DNAまたはRNAの少なくとも1つである、請求項1～4のいずれか一項に記載の核酸。

## 【請求項 6】

前記単離された天然に存在しない核酸がDNAである、請求項5に記載の核酸。

## 【請求項 7】

前記第1の突然変異および前記第2の突然変異が、点突然変異、ミスセンス突然変異、ナンセンス突然変異、挿入、欠失、複製、フレームシフト、または反復伸長の少なくとも1つを含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の核酸。

## 【請求項 8】

前記第1の突然変異および前記第2の突然変異が点突然変異である、請求項7に記載の核酸。

## 【請求項 9】

前記第1の突然変異が、前記VP1領域内のフェニルアラニン（F）コード配列の突然変異である、請求項1～8のいずれか一項に記載の核酸。

## 【請求項 10】

前記第1の突然変異が、前記核酸によってコードされるポリペプチドの129位のFコード配列にある、請求項9に記載の核酸。

## 【請求項 11】

前記突然変異が、前記ポリペプチドの129位のFから非極性脂肪族アミノ酸への突然変異をコードする、請求項10に記載の核酸。

## 【請求項 12】

前記非極性脂肪族アミノ酸が、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、およびバリン（V）から選択される、請求項11に記載の核酸。

## 【請求項 13】

前記非極性脂肪族アミノ酸がLである、請求項12に記載の核酸。

## 【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記第 2 の突然変異が、前記ポリペプチドのロイシン ( L ) コード配列にある、請求項 1 および 3 ~ 8 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 1 5】

前記第 2 の突然変異が、前記核酸によってコードされる前記ポリペプチドの 5 8 4 位の L コード配列にある、請求項 1 4 に記載の核酸。

【請求項 1 6】

前記第 2 の突然変異が、前記ポリペプチドの 5 8 4 位の L から極性アミノ酸への突然変異をコードする、請求項 1 5 に記載の核酸。

【請求項 1 7】

前記極性アミノ酸が、アスパラギン ( N ) およびグルタミン ( Q ) から選択される、請求項 1 6 に記載の核酸。

10

【請求項 1 8】

前記極性アミノ酸が N である、請求項 1 7 に記載の核酸。

【請求項 1 9】

前記第 2 の突然変異が、5 8 4 位の L から正に帯電したアミノ酸への突然変異をコードする、請求項 1 4 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 2 0】

前記正に帯電したアミノ酸がヒスチジン ( H ) である、請求項 1 9 に記載の核酸。

【請求項 2 1】

前記第 2 の突然変異が、前記ポリペプチドの 5 8 4 位の L から負に帯電したアミノ酸への突然変異をコードする、請求項 1 4 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の核酸。

20

【請求項 2 2】

前記負に帯電したアミノ酸が、アスパラギン酸 ( D ) およびグルタミン酸 ( E ) から選択される、請求項 2 1 に記載の核酸。

【請求項 2 3】

前記負に帯電したアミノ酸が D である、請求項 2 2 に記載の核酸。

【請求項 2 4】

前記第 2 の突然変異が、前記ポリペプチドのバリン ( V ) コード配列にある、請求項 1 および 3 ~ 8 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 2 5】

前記第 2 の突然変異が、前記核酸によってコードされる前記ポリペプチドの 5 9 8 位の V コード配列にある、請求項 2 4 に記載の核酸。

30

【請求項 2 6】

前記第 2 の突然変異が、前記ポリペプチドの 5 9 8 位の V から非極性脂肪族アミノ酸への突然変異をコードする、請求項 2 5 に記載の核酸。

【請求項 2 7】

前記非極性脂肪族アミノ酸が、ロイシン ( L )、イソロイシン ( I )、およびバリン ( V ) から選択される、請求項 2 6 に記載の核酸。

【請求項 2 8】

前記非極性脂肪族アミノ酸が L である、請求項 2 7 に記載の核酸。

40

【請求項 2 9】

前記非極性脂肪族アミノ酸が I である、請求項 2 7 に記載の核酸。

【請求項 3 0】

前記第 2 の突然変異が、前記ポリペプチドのヒスチジン ( H ) コード領域にある、請求項 1 および 3 ~ 8 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 3 1】

前記第 2 の突然変異が、前記ポリペプチドの 6 4 2 位の H コード領域にある、請求項 3 0 に記載の核酸。

【請求項 3 2】

前記第 2 の突然変異が、前記ポリペプチドの 6 4 2 位の H から極性アミノ酸をコードす

50

る、請求項 3 1 に記載の核酸。

【請求項 3 3】

前記極性アミノ酸が、アスパラギン（N）およびグルタミン（Q）から選択される、請求項 3 2 に記載の核酸。

【請求項 3 4】

前記極性アミノ酸が N である、請求項 3 3 に記載の核酸。

【請求項 3 5】

前記第 1 の突然変異が、前記第 2 の突然変異の前の核酸の芳香族アミノ酸コード配列にあり、前記第 2 の突然変異が、前記核酸によってコードされるポリペプチドの非極性脂肪族アミノ酸をコードする、請求項 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の核酸。

10

【請求項 3 6】

前記芳香族アミノ酸が、前記 V P 1 領域によってコードされる V P 1 ポリペプチドの 1 2 9 位にある、請求項 3 5 に記載の核酸。

【請求項 3 7】

前記第 1 の突然変異が、前記第 2 の突然変異の前の前記配列の位置でコードされるアミノ酸よりも疎水性が高いアミノ酸をコードする配列にある、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 3 8】

前記第 2 の突然変異が、正に帯電したアミノ酸から極性アミノ酸、負に帯電したアミノ酸から極性アミノ酸からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異をコードする、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の核酸。

20

【請求項 3 9】

前記第 2 の突然変異が保存的突然変異をコードする、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 4 0】

前記保存的突然変異が、非極性脂肪族アミノ酸から非極性脂肪族アミノ酸、極性アミノ酸から極性アミノ酸、正に帯電したアミノ酸から正に帯電したアミノ酸、負に帯電したアミノ酸から負に帯電したアミノ酸、および芳香族アミノ酸から芳香族アミノ酸からなる群から選択される、請求項 3 9 に記載の核酸。

【請求項 4 1】

30

前記第 1 の突然変異が、前記第 2 の突然変異の前の前記配列の位置でコードされるアミノ酸よりも疎水性が低いアミノ酸をコードする配列にある、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 4 2】

前記第 2 の突然変異が V P 3 領域にある場合、前記第 2 の突然変異が、H から N、D から N、D から N、V から L、および V から I からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異をコードする、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 4 3】

V P 3 領域における前記第 2 の突然変異が、前記 A A V ヌクレオチド配列によってコードされる A A V ポリペプチド配列の 4 1 8、4 6 2、5 8 4、5 9 8、または 6 4 2 位で生じる、請求項 4 2 に記載の核酸。

40

【請求項 4 4】

前記単離された天然に存在しない核酸が、F 1 2 9 L、H 6 4 2 N、および D 4 1 8 N 突然変異の少なくとも 1 つをコードする、請求項 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 4 5】

前記単離された天然に存在しない核酸が、F 1 2 9 L、H 6 4 2 N、および L 5 8 4 N 突然変異の少なくとも 1 つをコードする、請求項 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 4 6】

前記単離された天然に存在しない核酸が、F 1 2 9 L、H 4 6 2 N、および V 5 9 8 L 突然変異の少なくとも 1 つをコードする、請求項 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の核酸。

50

## 【請求項 47】

前記単離された天然に存在しない核酸が、F129L、H462N、およびV598I突然変異の少なくとも1つをコードする、請求項1～43のいずれか一項に記載の核酸。

## 【請求項 48】

前記複数の細胞が複数の初代細胞である、請求項1～47のいずれか一項に記載の核酸。

## 【請求項 49】

前記単離された天然に存在しない核酸が、外因性受容体配列の少なくとも一部をコードする、請求項1～48のいずれか一項に記載の核酸。

## 【請求項 50】

前記単離された天然に存在しない核酸が医薬組成物に製剤化される、請求項1～49のいずれか一項に記載の核酸。

## 【請求項 51】

前記野生型AAV核酸が、配列番号55と少なくとも60%の配列同一性を含む、請求項1～50のいずれか一項に記載の核酸。

## 【請求項 52】

F129L、H642N、およびD418Nからなる群から選択される少なくとも2つの突然変異をコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシドヌクレオチド配列。

## 【請求項 53】

F129L、H642N、およびD584Nからなる群から選択される少なくとも2つの突然変異をコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシドヌクレオチド配列。

## 【請求項 54】

F129L、H462N、およびV598Lからなる群から選択される少なくとも2つの突然変異をコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシドヌクレオチド配列。

## 【請求項 55】

F129L、H642N、およびV598Iからなる群から選択される少なくとも2つの突然変異をコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシドヌクレオチド配列。

## 【請求項 56】

請求項52～55のいずれか一項に記載のアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシドヌクレオチド配列から生成された、単離および精製されたタンパク質。

## 【請求項 57】

配列番号1～配列番号19の核酸配列のいずれか1つと少なくとも60%の配列同一性または類似性を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシド核酸配列。

## 【請求項 58】

前記配列同一性が、約60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%から最大約100%である、請求項57に記載の単離および精製されたAAV核酸配列。

## 【請求項 59】

VP1、VP2、およびVP3配列を含むアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシドヌクレオチド配列を含む単離された天然に存在しない核酸であって、前記VP1、VP2、およびVP3配列のうち2つは第1のAAV血清型に由来し、前記VP1、VP2、およびVP3配列の1つは第2のAAV血清型に由来し、前記単離された天然に存在しない核酸は、複数の細胞に導入すると、野生型AAV核酸と比較して、トランスフェクションまたは形質導入後の導入遺伝子の発現の増加を付与する核酸。

## 【請求項 60】

10

20

30

40

50

前記第1のAAV血清型および前記第2のAAV血清型が、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、またはそれらの任意の組み合わせから選択される、請求項59に記載の核酸。

【請求項61】

前記第1のAAV血清型および前記第2のAAV血清型が、AAV4およびAAV6、AAV5およびAAV6、AAV11およびAAV6、AAV12およびAAV6、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項59または60に記載の核酸。

【請求項62】

前記単離された天然に存在しない核酸が、DNAまたはRNAの少なくとも1つである、請求項59～61のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項63】

前記単離された天然に存在しない核酸がDNAである、請求項62に記載の核酸。

【請求項64】

前記細胞が初代細胞、不死化細胞、または組換え細胞である、請求項59～63のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項65】

前記導入遺伝子が外因性受容体配列の少なくとも一部をコードする、請求項59～64のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項66】

前記単離された天然に存在しない核酸が医薬組成物に製剤化される、請求項59～65のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項67】

前記VP1、VP2、およびVP3領域が、キャプシドの少なくとも一部の中に含まれる、請求項59～66のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項68】

配列番号195～配列番号213のアミノ酸配列のいずれか1つと少なくとも60%の配列同一性または類似性を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシド核酸配列。

【請求項69】

前記配列同一性が、約60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%から最大約100%である、請求項68に記載の単離および精製されたAAV核酸配列。

【請求項70】

請求項1～67のいずれか一項に記載の単離および精製されたAAV核酸配列で細胞をトランスフェクトすることにより生成された、操作された細胞。

【請求項71】

請求項70に記載の操作された細胞から単離された複数のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子。

【請求項72】

単位剤形で請求項71に記載のアデノ随伴ウイルス粒子を含む組成物。

【請求項73】

前記組成物が凍結保存されている、請求項72に記載の組成物。

【請求項74】

請求項72または73に記載の組成物を含む容器。

【請求項75】

複数の細胞を請求項71に記載の複数のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子と接触させるステップを含む、操作された細胞を作製する方法。

【請求項76】

10

20

30

40

50

前記複数の細胞が哺乳動物細胞である、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記哺乳動物細胞がヒト細胞である、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記ヒト細胞がリンパ球である、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記細胞が、前記複数の A A V 粒子との前記接触の前に刺激される、請求項 7 5 ~ 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記刺激が、抗 C D 3、抗 C D 2 8、およびインターロイキンの少なくとも 1 つで実施される、請求項 7 9 に記載の方法。 10

【請求項 8 1】

前記接触が、前記刺激の前、後、または同時に実施される、請求項 7 9 または 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記複数の細胞と前記複数の A A V 粒子との前記接触が、前記刺激の後に実施される、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記刺激が、前記複数の細胞と前記複数の A A V 粒子との前記接触の 4 日前から 2 4 時間前に実施される、請求項 7 9 ~ 8 2 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 8 4】

前記刺激が、前記複数の細胞と前記複数の A A V 粒子との前記接触の 3 日前に実施される、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記複数の細胞のゲノムにゲノム破壊を導入するステップをさらに含む、請求項 7 5 ~ 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記ゲノム破壊が、クラスター化規則的間隔短鎖回文リピート ( C R I S P R ) システムを含む、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記ゲノム破壊が、前記複数の細胞と前記複数の A A V 粒子との前記接触の前に実施される、請求項 8 5 または 8 6 に記載の方法。 30

【請求項 8 8】

前記操作された細胞を拡大させるステップをさらに含む、請求項 7 5 ~ 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 9】

それを必要とする対象に、単位剤形で前記操作された細胞を投与するステップをさらに含む、請求項 7 5 ~ 8 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記投与が注入である、請求項 8 9 に記載の方法。 40

【請求項 9 1】

前記操作された細胞の前記投与が、それを必要とする前記対象の疾患または状態を少なくとも部分的に改善する、請求項 8 9 または 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記疾患または状態が癌を含む、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記改善が、コンピューター断層撮影 ( C T ) スキャンにより測定した場合、少なくとも約 3 0 % の前記癌の減少を含む、請求項 9 1 または 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記改善が、コンピューター断層撮影 ( C T ) スキャンにより測定した場合、腫瘍病変 50

の径のベースライン測定で10%未満の変化により測定される腫瘍サイズの安定化を含む、請求項91または92に記載の方法。

【請求項95】

複数の操作されたアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子をスクリーニングする方法であって、

a. 突然変異または外因性AAVゲノムの少なくとも1つをアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシドヌクレオチド配列のゲノムに導入して、操作されたAAV粒子を形成するステップ；

b. aからの複数の前記操作されたAAV粒子を複数の細胞ゲノムに導入するステップ；および

c. 前記複数の細胞ゲノム中の前記複数のAAV粒子によってコードされる導入遺伝子の発現レベルを定量化するステップであって、前記発現レベルは、aからの異なる突然変異または外因性AAVゲノムを導入した第2のAAV粒子から得られる第2の発現レベルと比較されるステップ

を含む方法。

【請求項96】

前記突然変異が、点突然変異、ミスセンス突然変異、ナンセンス突然変異、挿入、欠失、複製、フレームシフト、または反復伸長の少なくとも1つを含む、請求項95に記載の方法。

【請求項97】

前記突然変異が点突然変異を含む、請求項96に記載の方法。

【請求項98】

前記アデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシドヌクレオチド配列のゲノムが血清型AAV6のものである、請求項95～97のいずれか一項に記載の方法。

【請求項99】

前記外因性AAVゲノムが、血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、またはAAV12のものである、請求項95～98のいずれか一項に記載の方法。

【請求項100】

前記外因性AAVゲノムがAAV4である、請求項99に記載の方法。

【請求項101】

前記外因性AAVゲノムがAAV5である、請求項99に記載の方法。

【請求項102】

前記外因性AAVゲノムがAAV11である、請求項99に記載の方法。

【請求項103】

前記外因性AAVゲノムがAAV12である、請求項99に記載の方法。

【請求項104】

前記複数の細胞ゲノムが、初代細胞、不死化細胞、または組換え細胞に由来する、請求項95～103のいずれか一項に記載の方法。

【請求項105】

前記発現レベルの前記定量化が、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、またはPCRによって決定される、請求項95～104のいずれか一項に記載の方法。

【請求項106】

前記操作されたAAV粒子が、前記複数の細胞ゲノムに導入された場合、操作されていないAAV粒子と比較して、形質導入後の導入遺伝子の発現の増加を付与する、請求項95～105のいずれか一項に記載の方法。

【請求項107】

前記発現の増加が、前記aからの異なる突然変異または外因性AAVゲノムを導入した第2のAAV粒子から得られる第2の発現レベルと比較して、約30%、40%、50%、60%から最大約100%である、請求項106に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 108】**

前記定量化が、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、またはPCRによって測定される、請求項95～107のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 109】**

操作された細胞を作製する方法であって、複数の細胞を、キャプシドタンパク質のVP1領域の第1の突然変異およびVP3領域の第2の突然変異を含む有効量のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子と接触させ、それにより複数の操作された細胞を生成するステップを含み、前記操作された細胞の形質導入後の導入遺伝子の発現は、野生型AAV粒子、または前記キャプシドタンパク質のVP領域に単一の突然変異を含むAAV粒子と接触した同等の複数の細胞と比較して増加する方法。

10

**【請求項 110】**

操作された細胞を作製する方法であって、複数の細胞を、キャプシドタンパク質のVP1領域の第1の突然変異およびVP3領域の第2の突然変異を含む有効量のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子と接触させ、それにより複数の操作された細胞を生成するステップを含み、前記複数の細胞の形質導入後の導入遺伝子の発現は、200,000GC/mLの平均感染力(MOI)で、野生型AAV粒子、または前記キャプシドタンパク質のVP領域に単一の突然変異を含むAAV粒子と接触した同等の複数の細胞と比較して、前記MOIで約10倍～300倍増加する方法。

**【請求項 111】**

操作された細胞を作製する方法であって、複数の細胞を、導入遺伝子をコードし、キャプシドタンパク質のVP1領域の第1の突然変異およびVP3領域の第2の突然変異を含む有効量のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子と接触させ、それにより複数の操作された細胞を生成するステップを含み、前記複数の細胞における前記導入遺伝子の発現は、野生型AAV粒子、または前記キャプシドタンパク質のVP領域に単一の突然変異を含むAAV粒子と接触した細胞と比較して増加し、前記野生型AAV粒子、または前記キャプシドタンパク質のVP領域に単一の突然変異を含むAAV粒子はまた前記導入遺伝子をコードする方法。

20

**【請求項 112】**

前記導入遺伝子が細胞受容体またはその一部をコードする、請求項109～111のいずれか一項に記載の方法。

30

**【請求項 113】**

前記細胞受容体またはその一部がT細胞受容体である、請求項112に記載の方法。

**【請求項 114】**

前記細胞受容体またはその一部がキメラ抗原受容体(CAR)である、請求項113に記載の方法。

**【請求項 115】**

前記第1の突然変異が、前記核酸によってコードされるポリペプチドの129位のFコード配列にある、請求項109～114のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 116】**

前記第1の突然変異が、前記ポリペプチドの129位のFから非極性脂肪族アミノ酸への突然変異をコードする、請求項115に記載の方法。

40

**【請求項 117】**

前記非極性脂肪族アミノ酸が、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、およびバリン(V)から選択される、請求項116に記載の方法。

**【請求項 118】**

前記非極性脂肪族アミノ酸がLである、請求項117に記載の方法。

**【請求項 119】**

前記第1の突然変異が、前記ポリペプチドのロイシン(L)コード配列にある、請求項109～118のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 120】**

50

前記第1の突然変異が、前記核酸によってコードされる前記ポリペプチドの584位のLコード配列にある、請求項119に記載の方法。

【請求項121】

前記第1の突然変異が、前記ポリペプチドの584位のLから極性アミノ酸への突然変異をコードする、請求項119または120に記載の方法。

【請求項122】

前記極性アミノ酸が、アスパラギン(N)およびグルタミン(Q)から選択される、請求項121に記載の方法。

【請求項123】

前記極性アミノ酸がNである、請求項122に記載の方法。

10

【請求項124】

前記第1の突然変異が、584位のLから正に帯電したアミノ酸への突然変異をコードする、請求項109~123のいずれか一項に記載の方法。

【請求項125】

前記正に帯電したアミノ酸がヒスチジン(H)である、請求項124に記載の方法。

【請求項126】

前記第1の突然変異が、前記ポリペプチドの584位のLから負に帯電したアミノ酸への突然変異をコードする、請求項109~123のいずれか一項に記載の方法。

【請求項127】

前記負に帯電したアミノ酸が、アスパラギン酸(D)およびグルタミン酸(E)から選択される、請求項126に記載の方法。

20

【請求項128】

前記負に帯電したアミノ酸がDである、請求項127に記載の方法。

【請求項129】

前記第1の突然変異が、前記ポリペプチドのバリン(V)コード配列にある、請求項109~128のいずれか一項に記載の方法。

【請求項130】

前記第1の突然変異が、前記核酸によってコードされる前記ポリペプチドの598位のVコード配列にある、請求項129に記載の方法。

【請求項131】

前記第1の突然変異が、前記ポリペプチドの598位のVから非極性脂肪族アミノ酸への突然変異をコードする、請求項130に記載の方法。

30

【請求項132】

前記非極性脂肪族アミノ酸が、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、およびバリン(V)から選択される、請求項131に記載の方法。

【請求項133】

前記非極性脂肪族アミノ酸がLである、請求項132に記載の方法。

【請求項134】

前記非極性脂肪族アミノ酸がIである、請求項132に記載の方法。

【請求項135】

前記第2の突然変異が、前記ポリペプチドのヒスチジン(H)コード領域にある、請求項110~134のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項136】

前記第2の突然変異が、前記ポリペプチドの642位のHコード領域にある、請求項135に記載の方法。

【請求項137】

前記突然変異が、前記ポリペプチドの642位のHから極性アミノ酸への突然変異をコードする、請求項136に記載の方法。

【請求項138】

前記極性アミノ酸が、アスパラギン(N)およびグルタミン(Q)から選択される、請

50

求項 1 3 7 に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

前記極性アミノ酸が N である、請求項 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

前記第 1 の突然変異が、前記第 2 の突然変異の前の核酸の芳香族アミノ酸コード配列にあり、前記第 2 の突然変異が、前記核酸によってコードされるポリペプチドの非極性脂肪族アミノ酸をコードする、請求項 1 0 9 ~ 1 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

前記芳香族アミノ酸が、前記 V P 1 領域を含むポリペプチドの 1 2 9 位にある、請求項 1 4 0 に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

前記第 1 の突然変異が、前記第 2 の突然変異の前の前記配列の位置でコードされるアミノ酸よりも疎水性が高いアミノ酸をコードする配列にある、請求項 1 0 9 ~ 1 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

前記第 2 の突然変異が、正に帯電したアミノ酸から極性アミノ酸、負に帯電したアミノ酸から極性アミノ酸アミノ酸からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異をコードする、請求項 1 1 0 ~ 1 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記第 2 の突然変異が保存的突然変異をコードする、請求項 1 1 0 ~ 1 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記保存的突然変異が、非極性脂肪族アミノ酸から非極性脂肪族アミノ酸、極性アミノ酸から極性アミノ酸、正に荷電したアミノ酸から正に帯電したアミノ酸、負に帯電したアミノ酸から負に帯電したアミノ酸、および芳香族アミノ酸から芳香族アミノ酸からなる群から選択される、請求項 1 4 4 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

前記第 1 の突然変異が、前記第 2 の突然変異の前の前記配列の位置でコードされるアミノ酸よりも疎水性が低いアミノ酸をコードする配列にある、請求項 1 0 9 ~ 1 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

前記キャプシドタンパク質の V P 領域における前記第 1 の突然変異が、前記キャプシドタンパク質の V P 1 または V P 3 領域における単一の突然変異である、請求項 1 0 9 ~ 1 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

V P 1 領域における前記第 1 の突然変異が F から L への突然変異を含む、請求項 1 4 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

V P 1 領域における前記第 1 の突然変異が、前記 A A V ヌクレオチド配列によってコードされる A A V ポリペプチド配列の 1 2 9 位で生じる、請求項 1 4 8 に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

前記第 2 の突然変異が V P 3 領域にある場合、前記第 2 の突然変異が、H から N、D から N、D から N、V から L、および V から I からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異を含む、請求項 1 1 0 ~ 1 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

V P 3 領域における前記第 2 の突然変異が、前記 A A V ヌクレオチド配列によってコードされる A A V ポリペプチド配列の 4 1 8、4 6 2、5 8 4、5 9 8、または 6 4 2 位で生じる、請求項 1 5 0 に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

V P 3 領域における前記第 2 の突然変異が、F 1 2 9 L、H 6 4 2 N、D 4 1 8 N、L

10

20

30

40

50

584N、V598L、V598Iの少なくとも1つを含む、請求項151に記載の方法。

【請求項153】

前記複数の細胞をクラスター化規則的間隔短鎖回文リピート(CRISPR)システムと接触させ、それによりゲノム破壊を含む複数の操作された細胞を生成するステップをさらに含む、請求項109～152のいずれか一項に記載の方法。

【請求項154】

前記接触が、前記AAV粒子との前記接触の前、同時、または後である、請求項153に記載の方法。

【請求項155】

前記ゲノム破壊が免疫チェックポイント遺伝子の少なくとも一部を含む、請求項153または154に記載の方法。

【請求項156】

免疫チェックポイント遺伝子の前記ゲノム破壊が、前記免疫チェックポイント遺伝子によってコードされるタンパク質の発現の減少をもたらす、請求項155に記載の方法。

【請求項157】

前記CRISPRシステムが、ガイドRNA(gRNA)およびエンドヌクレアーゼを含む、請求項153～156のいずれか一項に記載の方法。

【請求項158】

前記gRNAが、前記免疫チェックポイント遺伝子の少なくとも一部に結合する、請求項157に記載の方法。

【請求項159】

前記エンドヌクレアーゼがCasである、請求項157または158に記載の方法。

【請求項160】

前記Casが、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(Csn1またはCsx12としても公知である)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、Cso、Csf4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、それらの相同体、およびそれらの修飾バージョンからなる群から選択される、請求項159に記載の方法。

【請求項161】

前記CRISPRシステムが、前記複数の細胞にエレクトロポレーションまたはヌクレオフェクションされる、請求項153～160のいずれか一項に記載の方法。

【請求項162】

前記CRISPRシステムが、DNA、RNA、またはこれらの組み合わせによってコードされる、請求項153～161のいずれか一項に記載の方法。

【請求項163】

前記CRISPRシステムがRNAによってコードされる、請求項162に記載の方法。

【請求項164】

前記操作された細胞を拡大させるステップをさらに含む、請求項109～163のいずれか一項に記載の方法。

【請求項165】

前記操作された細胞が少なくとも約 $1 \times 10^8$ 個の細胞に拡大される、請求項164に記載の方法。

【請求項166】

前記AAVがAAV6である、請求項109～165のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 167】

前記 AAV キャプシド核酸配列の少なくとも突然変異 F129L および H642N をコードする単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシド核酸配列。

## 【請求項 168】

前記 AAV キャプシド核酸配列の少なくとも突然変異 F129L および L584D をコードする単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシド核酸配列。

## 【請求項 169】

前記 AAV キャプシド核酸配列の少なくとも突然変異 F129L および D418N をコードする単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシド核酸配列。

## 【請求項 170】

前記 AAV キャプシド核酸配列の少なくとも突然変異 F129L および L584H をコードする単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシド核酸配列。

## 【請求項 171】

前記 AAV キャプシド核酸配列の少なくとも突然変異 F129L、H642N および D418N をコードする単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシド核酸配列。

## 【請求項 172】

前記 AAV キャプシド核酸配列の少なくとも突然変異 F129L、H642N および L584D をコードする単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシド核酸配列。

## 【請求項 173】

前記 AAV キャプシド核酸配列の少なくとも突然変異 F129L、H642N および L584N をコードする単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシド核酸配列。

## 【請求項 174】

前記 AAV キャプシド核酸配列の少なくとも突然変異 F129L、H642N および L584H をコードする単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシド核酸配列。

## 【請求項 175】

前記 AAV キャプシド核酸配列の少なくとも突然変異 F129L、H642N および V598L をコードする単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシド核酸配列。

## 【請求項 176】

前記 AAV キャプシド核酸配列の少なくとも突然変異 F129L、H642N および V598I をコードする単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシド核酸配列。

## 【請求項 177】

請求項 167 ~ 176 のいずれか一項に記載の単離および精製されたアデノ随伴ウイルスキャプシド核酸配列を含む細胞。

## 【請求項 178】

外因性細胞受容体配列をコードするポリ核酸をさらに含む、請求項 177 に記載の細胞。

## 【請求項 179】

操作された細胞を作製する方法であって、複数の細胞を、VP1 配列、VP2 配列、および VP3 配列を含む有効量のアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子であって、前記 VP1 配列、VP2 配列、および VP3 配列のうち 2 つは第 1 の AAV 血清型に由来し、前記 VP1 配列、VP2 配列、および VP3 配列の 1 つは第 2 の AAV 血清型に由来する AAV 粒子と接触させ、それにより複数の操作された細胞を生成するステップを含み、前記操作された細胞の形質導入またはトランスフェクション後の導入遺伝子の発現は、野生型 AAV 粒子、または野生型 VP1、VP2、または VP3 配列を含む AAV 粒子と接触した

10

20

30

40

50

同等の複数の細胞と比較して増加する方法。

【請求項 180】

操作された細胞を作製する方法であって、複数の細胞を、VP1配列、VP2配列、およびVP3配列を含む有効量のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子であって、前記VP1配列、VP2配列、およびVP3配列のうち2つは第1のAAV血清型に由来し、前記VP1配列、VP2配列、およびVP3配列の1つは第2のAAV血清型に由来するAAV粒子と接触させ、それにより複数の操作された細胞を生成するステップを含み、前記複数の細胞の形質導入またはトランスフェクション後の導入遺伝子の発現は、200,000 GC/mLの平均感染力(MOI)で、野生型AAV粒子、または野生型VP1、VP2、またはVP3配列を含むAAV粒子と接触した同等の複数の細胞と比較して、前記MOIで約10倍～300倍増加する方法。

10

【請求項 181】

操作された細胞を作製する方法であって、複数の細胞を、導入遺伝子をコードし、VP1配列、VP2配列、およびVP3配列を含む有効量のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子であって、前記VP1配列、VP2配列、およびVP3配列のうち2つは第1のAAV血清型に由来し、前記VP1配列、VP2配列、およびVP3配列の1つは第2のAAV血清型に由来するAAV粒子と接触させ、それにより複数の操作された細胞を生成するステップを含み、前記複数の細胞における前記導入遺伝子の発現は、野生型AAV粒子または野生型VP配列を含むAAV粒子と接触した細胞と比較して増加し、前記野生型AAV粒子または前記キャプシドタンパク質の野生型VP配列を含むAAV粒子はまた前記導入遺伝子をコードする方法。

20

【請求項 182】

前記導入遺伝子が細胞受容体またはその一部をコードする、請求項179～181のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 183】

前記細胞受容体またはその一部がT細胞受容体である、請求項182に記載の方法。

【請求項 184】

前記細胞受容体またはその一部がキメラ抗原受容体である、請求項182に記載の方法。

【請求項 185】

前記AAV粒子が、AAV5 VP1<sub>u</sub>ヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3ヌクレオチド配列を含む、請求項179～184のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 186】

前記AAV粒子が、AAV4 VP1およびVP2ヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP3ヌクレオチド配列を含む、請求項179～184のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 187】

前記AAV粒子が、AAV5 VP1およびVP2ヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3ヌクレオチド配列を含む、請求項179～184のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 188】

前記AAV粒子が、AAV11 VP1およびVP2ヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP3ヌクレオチド配列を含む、請求項179～184のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 189】

前記AAV粒子が、AAV12 VP1およびVP2ヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP3ヌクレオチド配列を含む、請求項179～184のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 190】

50

前記 A A V 粒子が、A A V 1 V P 1 u ヌクレオチド配列、ならびに A A V 6 V P 2 および V P 3 ヌクレオチド配列を含む、請求項 1 7 9 ~ 1 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9 1】

前記 A A V 粒子が、A A V 1 2 V P 1 u ヌクレオチド配列、ならびに A A V 6 V P 2 および V P 3 ヌクレオチド配列を含む、請求項 1 7 9 ~ 1 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9 2】

前記 A A V 粒子が、A A V 5 V P 1 u 配列、ならびに A A V 6 V P 2 および V P 3 配列を含む、請求項 1 7 9 ~ 1 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 9 3】

前記 A A V 粒子が、A A V 4 V P 1 および V P 2 配列、ならびに A A V 6 V P 3 配列を含む、請求項 1 7 9 ~ 1 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9 4】

前記 A A V 粒子が、A A V 5 V P 1 および V P 2 配列、ならびに A A V 6 V P 2 および V P 3 配列を含む、請求項 1 7 9 ~ 1 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9 5】

前記 A A V 粒子が、A A V 1 1 V P 1 および V P 2 配列、ならびに A A V 6 V P 3 配列を含む、請求項 1 7 9 ~ 1 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9 6】

前記 A A V 粒子が、A A V 1 2 V P 1 および V P 2 配列、ならびに A A V 6 V P 3 配列を含む、請求項 1 7 9 ~ 1 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 9 7】

前記 A A V 粒子が、A A V 1 V P 1 u 配列、ならびに A A V 6 V P 2 および V P 3 配列を含む、請求項 1 7 9 ~ 1 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9 8】

前記 A A V 粒子が、A A V 1 2 V P 1 u 配列、ならびに A A V 6 V P 2 および V P 3 配列を含む、請求項 1 7 9 ~ 1 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9 9】

前記複数の細胞をクラスター化規則的間隔短鎖回文リピート ( C R I S P R ) システムと接触させ、それによりゲノム破壊を含む複数の操作された細胞を生成するステップをさらに含む、請求項 1 7 9 ~ 1 9 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 2 0 0】

前記接触が、前記 A A V 粒子との前記接触の前、同時、または後である、請求項 1 9 9 に記載の方法。

【請求項 2 0 1】

前記ゲノム破壊が免疫チェックポイント遺伝子の少なくとも一部を含む、請求項 1 7 9 ~ 2 0 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0 2】

F 1 2 9 L、H 6 4 2 N、および L 5 8 4 D 突然変異をコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) キャプシドヌクレオチド配列。

40

【請求項 2 0 3】

F 1 2 9 L、H 6 4 2 N、および D 4 1 8 N 突然変異をコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) キャプシドヌクレオチド配列。

【請求項 2 0 4】

F 1 2 9 L、H 6 4 2 N、および L 5 8 4 N 突然変異をコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) キャプシドヌクレオチド配列。

【請求項 2 0 5】

F 1 2 9 L、H 6 4 2 N、および L 5 8 4 D 突然変異をコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) キャプシドヌクレオチド配列。

50

## 【請求項 206】

F 1 2 9 L、H 4 6 2 N、および V 5 9 8 L 突然変異をコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

## 【請求項 207】

F 1 2 9 L、H 6 4 2 N、および V 5 9 8 I 突然変異をコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

## 【請求項 208】

請求項 202 ~ 207 のいずれか一項に記載の単離および精製された AAV キャプシドヌクレオチド配列で細胞をトランスフェクトすることにより生成された、操作された細胞。

10

## 【請求項 209】

請求項 208 に記載の操作された細胞から単離された複数のアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子。

## 【請求項 210】

請求項 209 に記載の複数のアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子を含む容器。

## 【請求項 211】

AAV 4 VP 1 および VP 2 ヌクレオチド配列、ならびに AAV 6 VP 3 ヌクレオチド配列を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

## 【請求項 212】

AAV 5 VP 1 および VP 2 ヌクレオチド配列、ならびに AAV 6 VP 2 および VP 3 ヌクレオチド配列を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

20

## 【請求項 213】

AAV 11 VP 1 および VP 2 ヌクレオチド配列、ならびに AAV 6 VP 3 ヌクレオチド配列を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

## 【請求項 214】

AAV 12 VP 1 および VP 2 ヌクレオチド配列、ならびに AAV 6 VP 3 ヌクレオチド配列を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

30

## 【請求項 215】

AAV 1 VP 1 u ヌクレオチド配列、ならびに AAV 6 VP 2 および VP 3 ヌクレオチド配列を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

## 【請求項 216】

AAV 12 VP 1 u ヌクレオチド配列、ならびに AAV 6 VP 2 および VP 3 ヌクレオチド配列を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

## 【請求項 217】

AAV 5 VP 1 u 配列、ならびに AAV 6 VP 2 および VP 3 配列を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

40

## 【請求項 218】

AAV 4 VP 1 および VP 2 配列、ならびに AAV 6 VP 3 配列を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

## 【請求項 219】

AAV 5 VP 1 および VP 2 配列、ならびに AAV 6 VP 2 および VP 3 配列を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

## 【請求項 220】

AAV 11 VP 1 および VP 2 配列、ならびに AAV 6 VP 3 配列を含む、単離お

50

よび精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

【請求項 2 2 1】

AAV 1 2 VP 1 および VP 2 配列、ならびに AAV 6 VP 3 配列を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

【請求項 2 2 2】

AAV 1 VP 1 u 配列、ならびに AAV 6 VP 2 および VP 3 配列を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

【請求項 2 2 3】

AAV 1 2 VP 1 u 配列、ならびに AAV 6 VP 2 および VP 3 配列を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

【請求項 2 2 4】

請求項 2 1 1 ~ 2 2 3 のいずれか一項に記載の単離および精製された AAV ヌクレオチド配列で細胞をトランスフェクトすることにより生成された、操作された細胞。

【請求項 2 2 5】

請求項 2 2 4 に記載の操作された細胞から単離された複数のアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子。

【請求項 2 2 6】

請求項 2 2 5 に記載の複数のアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子を含む容器。

【請求項 2 2 7】

操作された細胞を作製する方法であって、複数の細胞を、キャプシドタンパク質の VP 1 領域の第 1 の突然変異および VP 2 領域の第 2 の突然変異を含む有効量のアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子と接触させ、それにより複数の操作された細胞を生成するステップを含み、前記複数の細胞の形質導入後の導入遺伝子の発現は、200, 000 GC/mL の平均感染力 (MOI) で、野生型 AAV 粒子、または前記キャプシドタンパク質の VP 領域に単一の突然変異を含む AAV 粒子と接触した同等の複数の細胞と比較して、前記 MOI で約 10 倍 ~ 300 倍増加する方法。

【請求項 2 2 8】

操作された細胞を作製する方法であって、複数の細胞を、導入遺伝子をコードし、キャプシドタンパク質の VP 1 領域の第 1 の突然変異および VP 2 領域の第 2 の突然変異を含む有効量のアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子と接触させ、それにより複数の操作された細胞を生成するステップを含み、前記複数の細胞における前記導入遺伝子の発現は、野生型 AAV 粒子、または前記キャプシドタンパク質の VP 領域に単一の突然変異を含む AAV 粒子と接触した細胞と比較して増加し、前記野生型 AAV 粒子、または前記キャプシドタンパク質の VP 領域に単一の突然変異を含む AAV 粒子はまた前記導入遺伝子をコードする方法。

【請求項 2 2 9】

前記第 2 の突然変異が VP 2 領域にある場合、前記第 2 の突然変異が、H から N、D から N、D から N、V から L、および V から I からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異を含む、請求項 1 1 0 ~ 1 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3 0】

前記キャプシドヌクレオチド配列が VP 1 ヌクレオチド配列である、請求項 2 0 2 ~ 2 0 7 のいずれか一項に記載の単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

【請求項 2 3 1】

前記 AAV が AAV 6 である、請求項 2 3 0 に記載の単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列。

【請求項 2 3 2】

前記核酸が AAV 6 VP 1 ポリペプチド (polypeptide) をコードする、請求項 4 4 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の核酸。

10

20

30

40

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 相互参照

[0001]本出願は、2017年6月30日に出願された米国仮特許出願第62/527,937号、2018年4月18日に出願された米国仮特許出願第62/659,472号、および2018年5月1日に出願された米国仮特許出願第62/665,256号の利益を主張する。これらの出願は、参照により本明書に組み込まれる。

## 配列表

[0002]本出願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2018年6月29日に作製された前記ASCIIコピーの名称は、47533-726\_601\_SL.txtであり、サイズは5,955,965バイトである。

## 【背景技術】

## 【0002】

[0003]過去50年にわたる癌治療の顕著な進歩にもかかわらず、化学療法、放射線療法または生物療法に抵抗性のある多数の腫瘍タイプが残存し、特に外科的手法では対処できない進行期にあるものが挙げられる。最近、インビボで腫瘍上の分子標的を認識させるためのリンパ球の遺伝子工学において大きな進歩があり、標的腫瘍の顕著な寛解例がもたらされている。しかしながら、これらの成功は、主に血液腫瘍に限定されていて、特定の腫瘍の細胞によって発現される同定可能な分子の欠如、および腫瘍破壊を媒介するために腫瘍標的に特異的に結合するために使用することができる分子の欠如により、固形腫瘍へのより広範な適用が制限されている。

## 【0003】

[0004]本明細書に開示される組成物および方法は、細胞療法を強化する修飾されたアデノ随伴ウイルスベクター、ならびに修飾されたアデノ随伴ウイルスベクターの同定方法を提供する。修飾されたアデノ随伴ウイルス法を用いた導入細胞の初代細胞への挿入は、癌などの様々な状態に対する免疫療法を拡大および改善するための新しい機会を開く革新的なアプローチである。

## 参照による組み込み

[0005]本明細書のすべての刊行物、特許、および特許出願は、あたかも個々の刊行物、特許、または特許出願が参照により組み込まれることが具体的におよび個別に示されているのと同程度に参照により組み込まれる。本明細書の用語と組み込まれた参照の用語との間に矛盾がある場合では、本明細書の用語が支配する。

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0004】

[0006]本明細書では、野生型AAVヌクレオチド配列と比較して、VP1領域に第1の突然変異、およびVP3領域に第2の突然変異を含むアデノ随伴ウイルス(AAV)ヌクレオチド配列を含む単離された天然に存在しない核酸が開示され、単離された天然に存在しない核酸は、複数の細胞と接触すると、野生型AAV核酸、または同等の複数の細胞におけるキャプシドタンパク質のVP領域における単一の突然変異を有するAAVヌクレオチド配列と比較して、複数の細胞におけるトランスフェクションまたは形質導入後の導入遺伝子の発現が増加している。

## 【0005】

[0007]本明細書では、野生型AAVヌクレオチド配列と比較して、VP1領域に第1の突然変異、およびVP2領域に第2の突然変異を含むアデノ随伴ウイルス(AAV)ヌクレオチド配列を含む単離された天然に存在しない核酸が開示され、単離された天然に存在しない核酸は、複数の細胞と接触すると、野生型AAV核酸、または同等の複数の細胞におけるキャプシドタンパク質のVP領域における単一の突然変異を有するAAVヌクレオ

チド配列と比較して、複数の細胞におけるトランスフェクションまたは形質導入後の導入遺伝子の発現が増加している。場合によっては、AAVヌクレオチド配列は、血清型AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、およびそれらの任意の組み合わせのものである。AAVヌクレオチド配列は、AAV6血清型のものであり得る。単離された天然に存在しない核酸は、DNAまたはRNAの少なくとも1つであり得る。単離された天然に存在しない核酸はDNAであり得る。第1の突然変異および第2の突然変異は、点突然変異、ミスセンス突然変異、ナンセンス突然変異、挿入、欠失、複製、フレームシフト、または反復伸長の少なくとも1つを含む。第1の突然変異および第2の突然変異は点突然変異であり得る。第1の突然変異は、VP1領域のフェニルアラニン(F)コード配列の突然変異であり得る。場合によっては、第1の突然変異は、核酸によってコードされるポリペプチドのVP1領域の129位のFコード配列にあり得る。場合によっては、突然変異は、ポリペプチドの129位のFから非極性脂肪族アミノ酸への突然変異をコードする。場合によっては、非極性脂肪族アミノ酸は、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、およびバリン(V)から選択され得る。場合によっては、非極性脂肪族アミノ酸はLである。場合によっては、第2の突然変異は、ポリペプチドのロイシン(L)コード配列にある。場合によっては、第2の突然変異は、核酸によってコードされるポリペプチドの584位のLコード配列にある。場合によっては、第2の突然変異は、ポリペプチドの584位のLから極性アミノ酸への突然変異をコードする。極性アミノ酸は、アスパラギン(N)およびグルタミン(Q)から選択され得る。極性アミノ酸はNであり得る。場合によっては、第2の突然変異は、584位のLから正に帯電したアミノ酸への突然変異をコードする。正に帯電したアミノ酸はヒスチジン(H)であり得る。第2の突然変異は、ポリペプチドの584位のLから負に帯電したアミノ酸への突然変異をコードし得る。場合によっては、負に帯電したアミノ酸は、アスパラギン酸(D)およびグルタミン酸(E)から選択される。場合によっては、負に帯電したアミノ酸はDである。場合によっては、第2の突然変異は、ポリペプチドのバリン(V)コード配列にある。場合によっては、第2の突然変異は、核酸によってコードされるポリペプチドの598位のVコード配列にある。場合によっては、第2の突然変異は、ポリペプチドの598位のVから非極性脂肪族アミノ酸への突然変異をコードする。場合によっては、非極性脂肪族アミノ酸は、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、およびバリン(V)から選択される。非極性脂肪族アミノ酸はLであり得る。非極性脂肪族アミノ酸はIであり得る。場合によっては、第2の突然変異は、ポリペプチドのヒスチジン(H)コード領域にある。場合によっては、第2の突然変異は、ポリペプチドの642位のHコード領域にあり得る。場合によっては、第2の突然変異は、前記ポリペプチドの642位のHから極性アミノ酸への突然変異をコードする。場合によっては、極性アミノ酸は、アスパラギン(N)およびグルタミン(Q)から選択される。場合によっては、極性アミノ酸はNである。場合によっては、第1の突然変異は、第2の突然変異の前の核酸の芳香族アミノ酸コード配列にあり得、第2の突然変異は、核酸によってコードされるポリペプチドの非極性脂肪族アミノ酸をコードし得る。場合によっては、芳香族アミノ酸は、VP1領域によってコードされるVP1ポリペプチドの129位にあり得る。場合によっては、第1の突然変異は、第2の突然変異の前の配列の位置でコードされるアミノ酸よりも疎水性が高いアミノ酸をコードする配列にある。場合によっては、第2の突然変異は、正に帯電したアミノ酸から極性アミノ酸、負に帯電したアミノ酸から極性アミノ酸からなる群から選択される少なくとも1つの突然変異をコードする。場合によっては、第2の突然変異は保存的突然変異をコードする。保存的突然変異は、非極性脂肪族アミノ酸から非極性脂肪族アミノ酸、極性アミノ酸から極性アミノ酸、正に帯電したアミノ酸から正に帯電したアミノ酸、負に帯電したアミノ酸から負に帯電したアミノ酸、および芳香族アミノ酸から芳香族アミノ酸なる群から選択することができる。場合によっては、第1の突然変異は、第2の突然変異の前に前記配列の位置でコードされるアミノ酸よりも疎水性が低いアミノ酸をコードする配列にある。場合によっては、第2の突然変異はVP3領域にあり、第2の突然変異は、HからN、DからN、DからN、Vか

10

20

30

40

50

ら L、および V から I からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異をコードすることができる。場合によっては、VP3 領域の第 2 の突然変異は、AAV ヌクレオチド配列によってコードされる AAV ポリペプチド配列の 418、462、584、598、または 642 位に生じる。場合によっては、単離された天然に存在しない核酸は、F129L、H642N、および D418N 突然変異の少なくとも 1 つを含む。場合によっては、単離された天然に存在しない核酸は、F129L、H642N、および L584N 突然変異の少なくとも 1 つをコードする。場合によっては、単離された天然に存在しない核酸は、F129L、H462N、および V598L の突然変異の少なくとも 1 つを含む。場合によっては、単離された天然に存在しない核酸は、F129L、H462N、および V598I 突然変異の少なくとも 1 つを含む。場合によっては、複数の細胞は、複数の初代細胞であり得る。場合によっては、単離された天然に存在しない核酸は、外因性受容体配列の少なくとも一部をコードする。場合によっては、単離された天然に存在しない核酸は医薬組成物に製剤化することができる。場合によっては、野生型 AAV 核酸は、配列番号 55 と少なくとも 60% の配列同一性を含む。

【0006】

[0008]本明細書では、F129L、H642N、および D418N からなる群から選択される少なくとも 2 つの突然変異をコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) キャプシドヌクレオチド配列が開示される。

【0007】

[0009]本明細書では、F129L、H642N、および L584N からなる群から選択される少なくとも 2 つの突然変異をコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) ヌクレオチド配列が開示される。

【0008】

[0010]本明細書では、F129L、H462N、および V598L からなる群から選択される少なくとも 2 つの突然変異をコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) ヌクレオチド配列が開示される。

【0009】

[0011]本明細書では、F129L、H642N、および V598I からなる群から選択される少なくとも 2 つの突然変異をコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) ヌクレオチド配列が開示される。

【0010】

[0012]本明細書では、アデノ随伴ウイルス (AAV) ヌクレオチド配列から生成される単離および精製されたタンパク質である。

[0013]本明細書では、配列番号 1 ~ 配列番号 19 の核酸配列のいずれか 1 つと少なくとも 60% の配列同一性または類似性を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス (AAV) 核酸配列である。配列同一性は、約 60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% から最大約 100% であり得る。

【0011】

[0014]本明細書では、VP1、VP2、および VP3 配列を含むアデノ随伴ウイルス (AAV) ヌクレオチド配列を含む単離された天然に存在しない核酸が開示され、VP1、VP2、および VP3 配列のうち 2 つは第 1 の AAV 血清型に由来し、VP1、VP2、および VP3 配列の 1 つは第 2 の AAV 血清型に由来し、単離された天然に存在しない核酸は、複数の細胞に導入すると、野生型 AAV 核酸と比較して、トランスフェクションまたは形質導入後の導入遺伝子の発現の増加をもたらす。場合によっては、第 1 の AAV 血清型および第 2 の AAV 血清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、またはそれらの任意の組み合わせから選択される。場合によっては、第 1 の AAV 血清型および第 2 の AAV 血清型は、AAV4 および AAV6、AAV5 および AAV6、AAV11 および AAV6、AAV12 および AAV6、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。場合によっては、単離された天然に存在しない核酸は、DNA

10

20

30

40

50

またはRNAの少なくとも1つであり得る。場合によっては、単離された天然に存在しない核酸はDNAであり得る。場合によっては、細胞は、初代細胞、不死化細胞、または組換え細胞である。場合によっては、導入遺伝子は、外因性受容体配列の少なくとも一部をコードする。場合によっては、単離された天然に存在しない核酸は医薬組成物に製剤化することができる。場合によっては、VP1、VP2、およびVP3領域は、キャプシドの少なくとも一部の中に含まれる。

【0012】

[0015]本明細書では、配列番号195～配列番号213のアミノ酸配列のいずれか1つと少なくとも60%の配列同一性または類似性を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列が開示される。配列同一性は、約60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%から最大約100%であり得る。

10

【0013】

[0016]本明細書では、細胞を、単離および精製されたAAV核酸配列でトランスフェクトすることにより生成された、操作された細胞である。

[0017]本明細書では、操作された細胞から単離された複数のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子が開示される。

【0014】

[0018]本明細書では、単位剤形でアデノ随伴ウイルス粒子を含む組成物が開示される。組成物は凍結保存することができる。

20

[0019]本明細書では、組成物を含む容器が開示される。

【0015】

[0020]本明細書では、複数の細胞を複数のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子と接触させるステップを含む、操作された細胞を作製する方法が開示される。場合によっては、複数の細胞は哺乳動物細胞である。場合によっては、哺乳動物細胞はヒト細胞である。場合によっては、ヒト細胞はリンパ球である。場合によっては、細胞は、複数のAAV粒子と接触させる前に刺激することができる。場合によっては、刺激は、抗CD3、抗CD28、およびインターロイキンの少なくとも1つで行うことができる。場合によっては、接触は、刺激の前、後、または同時に行うことができる。場合によっては、複数の細胞を複数のAAV粒子と接触させることは、刺激後に行われる。刺激は、複数の細胞を複数のAAV粒子と接触させる4日前から24時間前に行うことができる。刺激は、複数の細胞を複数のAAV粒子と接触させる3日前に行うことができる。方法は、複数の細胞のゲノムにゲノム破壊を導入することをさらに含むことができる。ゲノム破壊は、クラスター化規則的間隔短鎖回文リピート(CRISPR)システムを含むことができる。ゲノム破壊は、複数の細胞を複数のAAV粒子と接触させる前に行うことができる。方法は、操作された細胞を拡大することをさらに含むことができる。方法は、それを必要とする対象に、単位剤形で操作された細胞を投与することをさらに含むことができる。場合によっては、投与は注入である。場合によっては、操作された細胞の投与は、それを必要とする対象の疾患または状態を少なくとも部分的に改善する。場合によっては、疾患または状態は癌を含む。場合によっては、改善は、コンピューター断層撮影(CT)スキャンによって測定した場合、癌の少なくとも約30%の減少を含む。場合によっては、改善には、コンピューター断層撮影(CT)スキャンで測定した場合、腫瘍病変の径のベースライン測定値で10%未満の変化で測定される腫瘍サイズの安定化を含む。

30

40

【0016】

[0021]本明細書では、複数の操作されたアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子をスクリーニングする方法であって、突然変異または外因性AAVゲノムの少なくとも1つをアデノ随伴ウイルス(AAV)ヌクレオチド配列のゲノムに導入して、操作されたAAV粒子を形成するステップ；aからの複数の操作されたAAV粒子を複数の細胞ゲノムに導入するステップ；および複数の細胞ゲノム中の複数のAAV粒子によってコードされる導入遺伝子の発現レベルを定量化するステップであって、発現のレベルは、aからの異なる突然変

50

異または外因性 A A V ゲノムを導入した第 2 の A A V 粒子から得られる第 2 の発現レベルと比較されるステップを含む方法が開示される。場合によっては、突然変異は、点突然変異、ミスセンス突然変異、ナンセンス突然変異、挿入、欠失、複製、フレームシフト、または反復伸長の少なくとも 1 つを含む。場合によっては、突然変異は点突然変異を含む。場合によっては、アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列のゲノムは血清型 A A V 6 のものである。外因性 A A V ゲノムは、血清型 A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、または A A V 12 のものであり得る。外因性 A A V ゲノムは A A V 4 であり得る。外因性 A A V ゲノムは A A V 5 であり得る。外因性 A A V ゲノムは A A V 11 であり得る。外因性 A A V ゲノムは A A V 12 であり得る。複数の細胞ゲノムは、初代細胞、不死化細胞、または組換え細胞に由来し得る。場合によっては、発現レベルの定量化は、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、または P C R によって決定され得る。場合によっては、複数の細胞ゲノムに導入された場合、操作された A A V 粒子は、操作されていない A A V 粒子と比較して、形質導入後の導入遺伝子の発現の増加をもたらす。発現の増加は、a からの異なる突然変異または外因性 A A V ゲノムを導入した第 2 の A A V 粒子から得られた第 2 のレベルの発現と比較して、約 30%、40%、50%、60% から最大約 100% であり得る。定量化は、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、または P C R により測定され得る。

#### 【 0 0 1 7 】

[0022] 本明細書では、操作された細胞を作製する方法であって、複数の細胞を、キャプシドタンパク質の V P 1 領域の第 1 の突然変異および V P 3 領域の第 2 の突然変異を含む有効量のアデノ随伴ウイルス ( A A V ) 粒子と接触させ、それにより複数の操作された細胞を生成するステップを含み、操作された細胞の形質導入後の導入遺伝子の発現は、野生型 A A V 粒子、またはキャプシドタンパク質の V P 領域に単一の突然変異を含む A A V 粒子と接触した同等の複数の細胞と比較して増加する方法が開示される。

#### 【 0 0 1 8 】

[0023] 本明細書では、操作された細胞を作製する方法であって、複数の細胞を、キャプシドタンパク質の V P 1 領域の第 1 の突然変異および V P 3 領域の第 2 の突然変異を含む有効量のアデノ随伴ウイルス ( A A V ) 粒子と接触させ、それにより複数の操作された細胞を生成するステップを含み、複数の細胞の形質導入後の導入遺伝子の発現は、200,000 G C / m L の平均感染力 ( M O I ) で、野生型 A A V 粒子、またはキャプシドタンパク質の V P 領域に単一の突然変異を含む A A V 粒子と接触した同等の複数の細胞と比較して、該 M O I で約 10 倍 ~ 300 倍増加する方法が開示される。

#### 【 0 0 1 9 】

[0024] 本明細書では、操作された細胞を作製する方法であって、複数の細胞を、導入遺伝子をコードし、キャプシドタンパク質の V P 1 領域の第 1 の突然変異および V P 3 領域の第 2 の突然変異を含む有効量のアデノ随伴ウイルス ( A A V ) 粒子と接触させ、それにより複数の操作された細胞を生成するステップを含み、ここで、前記複数の細胞における前記導入遺伝子の発現は、野生型 A A V 粒子、または前記キャプシドタンパク質の V P 領域に単一の突然変異を含む A A V 粒子と接触した細胞と比較して増加し、前記野生型 A A V 粒子、または前記キャプシドタンパク質の V P 領域に単一の突然変異を含む A A V 粒子はまた前記導入遺伝子をコードする方法が開示される。場合によっては、導入遺伝子は細胞受容体またはその一部をコードする。細胞受容体またはその一部は T 細胞受容体であり得る。細胞受容体またはその一部は、キメラ抗原受容体 ( C A R ) であり得る。場合によっては、第 1 の突然変異は、本方法によってコードされるポリペプチドの V P 1 領域の 129 位の F コード配列にある。場合によっては、第 1 の突然変異は、ポリペプチドの 129 位の F から非極性脂肪族アミノ酸への突然変異をコードする。場合によっては、非極性脂肪族アミノ酸は、ロイシン ( L )、イソロイシン ( I )、およびバリン ( V ) から選択することができる。場合によっては、非極性脂肪族アミノ酸は L であり得る。場合によっては、第 1 の突然変異は、ポリペプチドのロイシン ( L ) コード配列にある。場合によ

ては、第1の突然変異は、核酸によってコードされるポリペプチドの584位のLコード配列にある。場合によっては、第1の突然変異は、ポリペプチドの584位のLから極性アミノ酸への突然変異をコードする。極性アミノ酸は、アスパラギン(N)およびグルタミン(Q)から選択することができる。極性アミノ酸はNであり得る。場合によっては、第1の突然変異は、584位のLから正に帯電したアミノ酸への突然変異をコードする。正に帯電したアミノ酸はヒスチジン(H)であり得る。第1の突然変異は、ポリペプチドの584位のLから負に帯電したアミノ酸への突然変異をコードすることができる。負に帯電したアミノ酸は、アスパラギン酸(D)およびグルタミン酸(E)から選択することができる。負に帯電したアミノ酸はDであり得る。場合によっては、第1の突然変異は、ポリペプチドのバリン(V)コード配列にあり得る。場合によっては、第1の突然変異は、核酸によってコードされるポリペプチドの598位のVコード配列にあり得る。第1の突然変異は、ポリペプチドの598位のVから非極性脂肪族アミノ酸への突然変異をコードすることができる。非極性脂肪族アミノ酸は、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、およびバリン(V)から選択することができる。非極性脂肪族アミノ酸はLであり得る。非極性脂肪族アミノ酸はIであり得る。第2の突然変異は、ポリペプチドのヒスチジン(H)コード領域にあり得る。第2の突然変異は、ポリペプチドの642位のHコード領域にあり得る。第2の突然変異は、ポリペプチドの642位のHから極性アミノ酸への突然変異をコードすることができる。場合によっては、極性アミノ酸はアスパラギン(N)およびグルタミン(Q)から選択することができる。極性アミノ酸はNであり得る。第1の突然変異は、前記第2の突然変異の前の核酸の芳香族アミノ酸コード配列にあり得、前記第2の突然変異は、核酸によってコードされるポリペプチドの非極性脂肪族アミノ酸をコードする。場合によっては、芳香族アミノ酸は、VP1領域によってコードされるVP1ポリペプチドの129位にあり得る。場合によっては、第1の突然変異は、第2の突然変異の前の配列の位置でコードされるアミノ酸よりも疎水性が高いアミノ酸をコードする配列にあり得る。場合によっては、第2の突然変異は、正に帯電したアミノ酸から極性アミノ酸、負に帯電したアミノ酸から極性アミノ酸からなる群から選択される少なくとも1つの突然変異をコードする。第2の突然変異は、保存的突然変異をコードし得る。保存的突然変異は、非極性脂肪族アミノ酸から非極性脂肪族アミノ酸、極性アミノ酸から極性アミノ酸、正に帯電したアミノ酸から正に帯電したアミノ酸、負に帯電したアミノ酸から負に帯電したアミノ酸、および芳香族アミノ酸から芳香族アミノ酸からなる群から選択することができる。場合によっては、第1の突然変異は、第2の突然変異の前の前記配列の位置でコードされるアミノ酸よりも疎水性が低いアミノ酸をコードする配列にあり得る。場合によっては、キャプシドタンパク質のVP領域の第1の突然変異は、キャプシドタンパク質のVP1またはVP3領域の単一の突然変異であり得る。場合によっては、VP1領域の第1の突然変異は、FからLへの突然変異を含む。場合によっては、VP1領域の第1の突然変異は、AAVヌクレオチド配列によってコードされるAAVポリペプチド配列の129位で生じる。場合によっては、第2の突然変異はVP3領域にあり、第2の突然変異は、HからN、DからN、DからN、VからL、およびVからIからなる群から選択される少なくとも1つの突然変異を含む。場合によっては、VP3領域の第2の突然変異は、AAVヌクレオチド配列によってコードされるAAVポリペプチド配列の418、462、584、598、または642位で生じる可能性がある。VP3領域の第2の突然変異は、F129L、H642N、D418N、L584N、V598L、V598Iの少なくとも1つを含むことができる。方法は、複数の細胞を、クラスター化規則的間隔短鎖回文リピート(CRISPR)システムと接触させ、それによりゲノム破壊を含む複数の操作された細胞を生成することをさらに含むことができる。場合によっては、接触は、AAV粒子との接触の前、同時、または後であり得る。エンドヌクレアーゼはCasであり得る。Casは、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(Csn1またはCsx12としても公知である)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cm

10

20

30

40

50

r 1、C m r 3、C m r 4、C m r 5、C m r 6、C s b 1、C s b 2、C s b 3、C s x 1 7、C s x 1 4、C s x 1 0、C s x 1 6、C s a X、C s x 3、C s x 1、C s x 1 S、C s f 1、C s f 2、C s O、C s f 4、C p f 1、c 2 c 1、c 2 c 3、C a s 9 H i F i、それらの相同体、およびそれらの修飾バージョンからなる群から選択され得る。C R I S P Rシステムは、複数の細胞にエレクトロポレーションまたはヌクレオフェクションすることができる。C R I S P Rシステムは、D N A、R N A、またはこれらの組み合わせによってコードされ得る。C R I S P RシステムはR N Aによってコードされ得る。方法は、操作された細胞を拡大することをさらに含むことができる。場合によっては、操作された細胞は、少なくとも約  $1 \times 10^8$  細胞に拡大される。A A VはA A V 6であり得る。

10

### 【0020】

[0025]本明細書では、操作された細胞を作製する方法であって、複数の細胞を、クラスター化規則的間隔短鎖回文リPEAT (C R I S P R) システムと接触させ、それによりゲノム破壊を含む複数の操作された細胞を生成するステップ; および操作された細胞を、細胞受容体をコードし、キャプシドタンパク質のV P 1領域の第1突然変異およびV P 3領域の第2突然変異を含む有効量のアデノ随伴ウイルス(A A V)粒子と接触させ、それにより複数の操作された形質導入された細胞を生成するステップを含み、細胞受容体の発現は、操作された形質導入された細胞において、200,000 G C / m Lの平均感染力(M O I)で、野生型A A V粒子、または前記キャプシドタンパク質のV P 1領域に単一の突然変異を含むA A V粒子と接触した同等の細胞と比較して、M O Iで約10倍~300倍増加し、野生型A A V粒子、またはキャプシドタンパク質のV P 1領域に単一の突然変異を含むA A V粒子はまた細胞受容体をコードする方法が開示される。場合によっては、複数の細胞は複数の初代細胞であり得る。場合によっては、初代細胞はリンパ球である。場合によっては、A A V粒子はA A V 6であり得る。場合によっては、第1の突然変異は、核酸によってコードされるポリペプチドのV P 1領域の129位のFコード配列にあり得る。場合によっては、第1の突然変異は、ポリペプチドの129位のFから非極性脂肪族アミノ酸への突然変異をコードする。場合によっては、非極性脂肪族アミノ酸は、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、およびバリン(V)から選択することができる。非極性脂肪族アミノ酸はLであり得る。第2の突然変異は、ポリペプチドのロイシン(L)コード配列であり得る。第2の突然変異は、核酸によってコードされるポリペプチドの584位のLコード配列にあり得る。第2の突然変異は、ポリペプチドの584位のLから極性アミノ酸への突然変異をコードし得る。極性アミノ酸は、アスパラギン(N)およびグルタミン(Q)から選択することができる。極性アミノ酸はNであり得る。場合によっては、第2の突然変異は、584位のLから正に帯電したアミノ酸への突然変異をコードする。場合によっては、正に帯電したアミノ酸はヒスチジン(H)である。場合によっては、突然変異は、ポリペプチドの584位のLから負に帯電したアミノ酸への突然変異をコードする。負に帯電したアミノ酸は、アスパラギン酸(D)およびグルタミン酸(E)から選択することができる。負に帯電したアミノ酸はDであり得る。場合によっては、第2の突然変異は、ポリペプチドのバリン(V)コード配列にあり得る。場合によっては、第2の突然変異は、核酸によってコードされるポリペプチドの598位のVコード配列にあり得る。突然変異は、ポリペプチドの598位のVを非極性脂肪族アミノ酸にコードすることができる。場合によっては、非極性脂肪族アミノ酸は、ロイシン(L)、イソロイシン(I)、およびバリン(V)から選択することができる。非極性脂肪族アミノ酸はLであり得る。非極性脂肪族アミノ酸はIであり得る。第2の突然変異は、ポリペプチドのヒスチジン(H)コード領域にあり得る。第2の突然変異は、ポリペプチドの642位のHコード領域にあり得る。場合によっては、第2の突然変異は、ポリペプチドの642位のHから極性アミノ酸への突然変異をコードする。場合によっては、極性アミノ酸は、アスパラギン(N)およびグルタミン(Q)から選択することができる。極性アミノ酸はNであり得る。第1の突然変異は、第2の突然変異の前の核酸の芳香族アミノ酸コード配列にあり得、第2の突然変異は、核酸によってコードされるポリペプチドの非極性脂肪族アミノ酸

20

30

40

50

をコードし得る。芳香族アミノ酸は、VP1領域によってコードされるVP1ポリペプチドの129位にあり得る。第1の突然変異は、第2の突然変異の前の配列の位置でコードされるアミノ酸よりも疎水性が高いアミノ酸をコードする配列にあり得る。第2の突然変異は、正に帯電したアミノ酸から極性アミノ酸、負に帯電したアミノ酸から極性アミノ酸からなる群から選択される少なくとも1つの突然変異をコードすることができる。第2の突然変異は、保存的突然変異をコードする。保存的突然変異は、非極性脂肪族アミノ酸から非極性脂肪族アミノ酸、極性アミノ酸から極性アミノ酸、正に帯電したアミノ酸から正に帯電したアミノ酸、負に帯電したアミノ酸から負に帯電したアミノ酸、および芳香族アミノ酸から芳香族アミノ酸からなる群から選択することができる。第1の突然変異は、第2の突然変異の前の配列の位置でコードされるアミノ酸よりも疎水性が低いアミノ酸をコードする配列にあり得る。第1の突然変異および第2の突然変異は、F129L、H642N、およびD418N；F129L、H642N、およびL584N；F129L、H462N、およびV598L；F129L、H462N、およびV598Iからなる群から選択することができる。細胞受容体は、T細胞受容体であり得る。方法は、操作された細胞を拡大することをさらに含むことができる。方法は、それを必要とする対象に操作された細胞を投与することをさらに含むことができる。対象は、癌を有することができる。癌は固形癌であり得る。

10

20

30

40

50

**【0021】**

[0026]本明細書では、キャプシド核酸配列によってコードされるAAVポリペプチドに突然変異F129LおよびH642Nを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシド核酸配列が開示される。

**【0022】**

[0027]本明細書では、キャプシド核酸配列によってコードされるAAVポリペプチドに突然変異F129LおよびL584Dを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシド核酸配列が開示される。

**【0023】**

[0028]本明細書では、キャプシド核酸配列によってコードされるAAVポリペプチドに突然変異F129LおよびD418Nを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシド核酸配列が開示される。

**【0024】**

[0029]本明細書では、キャプシド核酸配列によってコードされるAAVポリペプチドに突然変異F129LおよびL584Hを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシド核酸配列が開示される。

**【0025】**

[0030]本明細書では、キャプシド核酸配列によってコードされるAAVポリペプチドに突然変異F129L、H642N、およびD418Nを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシド核酸配列が開示される。

**【0026】**

[0031]本明細書では、キャプシド核酸配列によってコードされるAAVポリペプチドに突然変異F129L、H642N、およびL584Dを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシド核酸配列が開示される。

**【0027】**

[0032]本明細書では、キャプシド核酸配列によってコードされるAAVポリペプチドに突然変異F129L、H642N、およびL584Nを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシド核酸配列が開示される。

**【0028】**

[0033]本明細書では、キャプシド核酸配列によってコードされるAAVポリペプチドに突然変異F129L、H642N、およびL584Hを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシド核酸配列が開示される。

**【0029】**

[0034]本明細書では、キャプシド核酸配列によってコードされるAAVポリペプチドに突然変異F129L、H642N、およびV598Lを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシド核酸配列が開示される。

【0030】

[0035]本明細書では、キャプシド核酸配列によってコードされるAAVポリペプチドに突然変異F129L、H642N、およびV598Iを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)キャプシド核酸配列が開示される。

【0031】

[0036]本明細書では、単離および精製されたポリ核酸を含む細胞が開示される。

[0037]本明細書では、ガイド核酸の配列を細胞に導入するステップを含む、操作された細胞を作製する方法が開示される。

【0032】

[0038]本明細書では、操作された細胞を作製する方法であって、複数の細胞を、VP1配列、VP2配列、およびVP3配列を含む有効量のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子であって、VP1配列、VP2配列、およびVP3配列のうち2つは第1のAAV血清型に由来し、VP1配列、VP2配列、およびVP3配列の1つは第2のAAV血清型に由来するAAV粒子と接触させ、それにより複数の操作された細胞を生成するステップを含み、操作された細胞の形質導入またはトランスフェクション後の導入遺伝子の発現は、野生型AAV粒子、または野生型VP1、VP2、またはVP3配列を含むAAV粒子と接触した同等の複数の細胞と比較して増加する方法が開示される。

【0033】

[0039]本明細書では、操作された細胞を作製する方法であって、複数の細胞を、VP1配列、VP2配列、およびVP3配列を含む有効量のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子であって、VP1配列、VP2配列、およびVP3配列のうち2つは第1のAAV血清型に由来し、VP1配列、VP2配列、およびVP3配列の1つは第2のAAV血清型に由来するAAV粒子と接触させ、それにより複数の操作された細胞を生成するステップを含み、前記複数の細胞の形質導入またはトランスフェクション後の導入遺伝子の発現は、200,000GC/mLの平均感染力(MOI)で、野生型AAV粒子、または野生型VP1、VP2、もしくはVP3配列を含むAAV粒子と接触した同等の複数の細胞と比較して、MOIで約10倍~300倍増加する方法が開示される。

【0034】

[0040]本明細書では、操作された細胞を作製する方法であって、複数の細胞を、導入遺伝子をコードし、VP1配列、VP2配列、およびVP3配列を含む有効量のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子であって、VP1配列、VP2配列、およびVP3配列のうち2つは第1のAAV血清型に由来し、VP1配列、VP2配列、およびVP3配列の1つは第2のAAV血清型に由来するAAV粒子と接触させ、それにより複数の操作された細胞を生成するステップを含み、複数の細胞における導入遺伝子の発現は、野生型AAV粒子、または野生型VP配列を含むAAV粒子と接触した細胞と比較して増加し、野生型AAV粒子、またはキャプシドタンパク質の野生型VP配列を含むAAV粒子はまた導入遺伝子をコードする方法が開示される。場合によっては、導入遺伝子は、細胞受容体またはその一部をコードする。場合によっては、細胞受容体またはその一部はT細胞受容体である。場合によっては、細胞受容体またはその一部はキメラ抗原受容体である。場合によっては、AAV粒子は、AAV5 VP1<sub>u</sub>ヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3ヌクレオチド配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV4 VP1およびVP2ヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP3ヌクレオチド配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV5 VP1およびVP2ヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3ヌクレオチド配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV11 VP1およびVP2ヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP3ヌクレオチド配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV12 VP1およびVP2ヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP3ヌクレオチド配列を含む。場合によって

10

20

30

40

50

は、AAV粒子は、AAV1 VP1uヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3ヌクレオチド配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV12 VP1uヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3ヌクレオチド配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV5 VP1u配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV4 VP1およびVP2配列、ならびにAAV6 VP3配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV5 VP1およびVP2配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV11 VP1およびVP2配列、ならびにAAV6 VP3配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV12 VP1およびVP2配列、ならびにAAV6 VP3配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV1 VP1u配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV12 VP1u配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3配列を含む。場合によっては、方法は、複数の細胞をクラスター化規則的間隔短鎖回文リピート(CRISPR)システムと接触させ、それによりゲノム破壊を含む複数の操作された細胞を生成することをさらに含む。場合によっては、接触は、前記AAV粒子との前記接触の前、同時、または後である。

#### 【0035】

[0041]本明細書では、操作された形質導入された細胞を作製する方法であって、複数の細胞をクラスター化規則的間隔短鎖回文リピート(CRISPR)システムと接触させ、それによりゲノム破壊を含む複数の操作された細胞を生成するステップ；操作された細胞を、細胞受容体をコードし、VP1配列、VP2配列、およびVP3配列を含む有効量のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子であって、VP1配列、VP2配列、およびVP3配列のうち2つは第1のAAV血清型に由来し、VP1配列、VP2配列、およびVP3配列の1つは第2のAAV血清型に由来するAAV粒子と接触させ、それにより複数の操作された形質導入された細胞を生成するステップを含み、細胞受容体の発現は、前記操作された形質導入された細胞において、200,000 GC/mLの平均感染力(MOI)で、野生型AAV粒子、または野生型VP配列を含むAAV粒子と接触した同等の細胞と比較して、該MOIで約10倍~300倍増加し、前記野生型AAV粒子、または野生型VP配列を含むAAV粒子はまた細胞受容体をコードする方法が開示される。場合によっては、複数の細胞は、複数の初代細胞であり得る。方法は、それを必要とする対象に操作された細胞を投与することをさらに含むことができる。場合によっては、対象は癌を有する。場合によっては、AAV粒子は、AAV5 VP1uヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3ヌクレオチド配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV4 VP1およびVP2ヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP3ヌクレオチド配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV5 VP1およびVP2ヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3ヌクレオチド配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV11 VP1およびVP2ヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP3ヌクレオチド配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV1 VP1uヌクレオチド配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3ヌクレオチド配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV5 VP1u配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV4 VP1およびVP2配列、ならびにAAV6 VP3配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV5 VP1およびVP2配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV11 VP1およびVP2配列、ならびにAAV6 VP3配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV12 VP1およびVP2配列、ならびにAAV6 VP3配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV1 VP1u配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3配列を含む。場合

10

20

30

40

50

によっては、AAV粒子は、AAV12 VP1u配列、ならびにAAV6 VP2およびVP3配列を含む。場合によっては、AAV粒子は、AAV6粒子を含むことができる。場合によっては、接触は、AAV粒子との接触の前、同時、または後であり得る。CRISPRシステムは、ガイドRNA(gRNA)およびエンドヌクレアーゼを含む。エンドヌクレアーゼは、Casであり得る。Casは、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(Csn1またはCsn12としても公知である)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csn17、Csn14、Csn10、Csn16、CsaX、Csn3、Csn1、Csn15、Csf1、Csf2、Cso、Csf4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、それらの相同体、およびそれらの修飾バージョンからなる群から選択され得る。CRISPRシステムは、複数の細胞にエレクトロポレーションまたはヌクレオフェクションすることができる。CRISPRシステムは、DNA、RNA、またはこれらの組み合わせによってコードされ得る。CRISPRシステムはRNAによってコードされ得る。方法は、操作された細胞を拡大することをさらに含むことができる。操作された細胞は、少なくとも約 $1 \times 10^8$ 細胞に拡大され得る。

10

## 【0036】

[0042]本明細書では、F129L、H642N、およびL584D突然変異を含むキャプシドをコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)ヌクレオチド配列が開示される。

20

## 【0037】

[0043]本明細書では、F129L、H642N、およびD418N突然変異を含むキャプシドをコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)ヌクレオチド配列が開示される。

## 【0038】

[0044]本明細書では、F129L、H642N、およびL584N突然変異を含むキャプシドをコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)ヌクレオチド配列が開示される。

## 【0039】

[0045]本明細書では、F129L、H642N、およびL584D突然変異を含むキャプシドをコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)ヌクレオチド配列が開示される。

30

## 【0040】

[0046]本明細書では、F129L、H462N、およびV598L突然変異を含むキャプシドをコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)ヌクレオチド配列が開示される。

## 【0041】

[0047]本明細書では、F129L、H642N、およびV598I突然変異を含むキャプシドをコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)ヌクレオチド配列が開示される。

40

## 【0042】

[0048]本明細書では、細胞を、単離および精製されたAAVヌクレオチド配列でトランスフェクトすることにより生成された、操作された細胞が開示される。

[0049]本明細書では、操作された細胞から単離された複数のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子が開示される。

## 【0043】

[0050]本明細書では、複数のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子を含む容器が開示される。

[0051]本明細書では、AAV4 VP1およびVP2ヌクレオチド配列と、AAV6

50

V P 3 ヌクレオチド配列とを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列が開示される。

【 0 0 4 4 】

[0052]本明細書では、A A V 5 V P 1 および V P 2 ヌクレオチド配列と、A A V 6 V P 2 および V P 3 ヌクレオチド配列とを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列が開示される。

【 0 0 4 5 】

[0053]本明細書では、A A V 1 1 V P 1 および V P 2 ヌクレオチド配列と、A A V 6 V P 3 ヌクレオチド配列とを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列が開示される。

【 0 0 4 6 】

[0054]本明細書では、A A V 1 2 V P 1 および V P 2 ヌクレオチド配列と、A A V 6 V P 3 ヌクレオチド配列とを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列が開示される。

【 0 0 4 7 】

[0055]本明細書では、A A V 1 V P 1 ヌクレオチド配列と、A A V 6 V P 2 および V P 3 ヌクレオチド配列とを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列が開示される。一部の実施形態では、A A V 1 V P 1 ヌクレオチド配列は、A A V 1 V P 1 u ヌクレオチド配列である。

【 0 0 4 8 】

[0056]本明細書では、A A V 1 2 V P 1 ヌクレオチド配列と、A A V 6 V P 2 および V P 3 ヌクレオチド配列とを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列が開示される。一部の実施形態では、A A V 1 V P 1 ヌクレオチド配列は、A A V 1 V P 1 u ヌクレオチド配列である。

【 0 0 4 9 】

[0057]本明細書では、A A V 5 V P 1 配列と、A A V 6 V P 2 および V P 3 配列とを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列が開示される。一部の実施形態では、A A V 1 V P 1 ヌクレオチド配列は、A A V 1 V P 1 u ヌクレオチド配列である。

【 0 0 5 0 】

[0058]本明細書では、A A V 4 V P 1 および V P 2 配列と、A A V 6 V P 3 配列を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列が開示される。

【 0 0 5 1 】

[0059]本明細書では、A A V 5 V P 1 および V P 2 配列と、A A V 6 V P 2 および V P 3 配列とを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列が開示される。

【 0 0 5 2 】

[0060]本明細書では、A A V 1 1 V P 1 および V P 2 配列と、A A V 6 V P 3 配列とを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列が開示される。

【 0 0 5 3 】

[0061]本明細書では、A A V 1 2 V P 1 および V P 2 配列と、A A V 6 V P 3 配列とを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列が開示される。

【 0 0 5 4 】

[0062]本明細書では、A A V 1 V P 1 配列と、A A V 6 V P 2 および V P 3 配列とを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列が開示される。一部の実施形態では、A A V 1 V P 1 ヌクレオチド配列は、A A V 1 V P 1 u ヌクレオチド配列である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 5 】

[0063]本明細書では、A A V 1 2 V P 1 配列と、A A V 6 V P 2 および V P 3 配列とを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列が開示される。一部の実施形態では、A A V 1 V P 1 ヌクレオチド配列は、A A V 1 V P 1 u ヌクレオチド配列である。

## 【 0 0 5 6 】

[0064]本明細書では、細胞を、単離および精製された A A V ヌクレオチド配列でトランスフェクトすることにより生成された、操作された細胞が開示される。

[0065]本明細書では、操作された細胞から単離された複数のアデノ随伴ウイルス ( A A V ) 粒子が開示される。

10

## 【 0 0 5 7 】

[0066]本明細書では、複数のアデノ随伴ウイルス ( A A V ) 粒子を含む容器が開示される。

[0067]本明細書では、野生型 A A V ヌクレオチド配列と比較して、V P 1 領域に第 1 の突然変異、および V P 3 領域に第 2 の突然変異を含むアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列を含む、単離された天然に存在しない核酸が開示され、複数の細胞への導入時に、単離された天然に存在しない核酸は、野生型 A A V 核酸と比較して複数の細胞における A A V 形質導入効率の増加をもたらす。場合によっては、A A V は、血清型 A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、およびそれらの任意の組み合わせのものであり得る。場合によっては、A A V は、A A V 6 であり得る。核酸は、DNA または RNA の少なくとも 1 つであり得る。場合によっては、核酸は DNA であり得る。場合によっては、突然変異は、点突然変異、ミスセンス突然変異、ナンセンス突然変異、挿入、欠失、複製、フレームシフト、または反復伸長の少なくとも 1 つを含むことができる。突然変異は、点突然変異であり得る。場合によっては、V P 1 領域の第 1 の突然変異は、F から L への突然変異を含む。場合によっては、V P 1 領域の第 1 の突然変異は、A A V ヌクレオチド配列の 1 2 9 位で生じ得る。場合によっては、V P 3 領域の第 2 の突然変異は、H から N、D から N、D から N、V から L、および V から I からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異を含むことができる。V P 3 領域における第 2 の突然変異は、前記 A A V ヌクレオチド配列によってコードされる A A V ポリペプチド配列の 4 1 8、4 6 2、5 8 4、5 9 8、または 6 4 2 位で生じ得る。場合によっては、核酸は、F 1 2 9 L、H 6 4 2 N、および D 4 1 8 N の少なくとも 1 つを含むことができる。場合によっては、核酸は、F 1 2 9 L、H 6 4 2 N、および L 5 8 4 N の少なくとも 1 つを含むことができる。場合によっては、核酸は、F 1 2 9 L、H 4 6 2 N、または V 5 9 8 L の少なくとも 1 つを含むことができる。場合によっては、核酸は、F 1 2 9 L、H 4 6 2 N、または V 5 9 8 I の少なくとも 1 つを含むことができる。場合によっては、複数の細胞は、初代細胞であり得る。A A V ヌクレオチド配列は、外因性受容体配列の少なくとも一部をコードすることができる。場合によっては、核酸を医薬組成物に製剤化することができる。場合によっては、野生型 A A V 核酸は、配列番号 5 5 と少なくとも 6 0 % の配列同一性を含むことができる。

20

30

40

## 【 0 0 5 8 】

[0068]本明細書では、F 1 2 9 L、H 6 4 2 N、および D 4 1 8 N からなる群から選択される少なくとも 2 つの突然変異を含むキャプシドをコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列が開示される。

## 【 0 0 5 9 】

[0069]本明細書では、F 1 2 9 L、H 6 4 2 N、および L 5 8 4 N からなる群から選択される少なくとも 2 つの突然変異を含むキャプシドをコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列が開示される。

## 【 0 0 6 0 】

[0070]本明細書では、F 1 2 9 L、H 4 6 2 N、および V 5 9 8 L からなる群から選択

50

される少なくとも2つの突然変異を含むキャプシドをコードする、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)ヌクレオチド配列が開示される。

【0061】

[0071]本明細書では、F129L、H642N、およびV598Iからなる群から選択される少なくとも2つの突然変異を含むキャプシドをコードする単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)ヌクレオチド配列が開示される。

【0062】

[0072]本明細書では、アデノ随伴ウイルス(AAV)ヌクレオチド配列から生成される単離および精製されたタンパク質が開示される。

[0073]本明細書では、配列番号1～配列番号19のアミノ酸配列のいずれか1つと少なくとも60%の配列同一性または類似性を含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列が開示される。場合によっては、配列の同一性は、約60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%から最大約100%であり得る。

【0063】

[0074]本明細書では、VP1、VP2、およびVP3配列を含むアデノ随伴ウイルス(AAV)ヌクレオチド配列を含む単離された天然に存在しない核酸であり、VP1、VP2、およびVP3配列のうち2つは第1のAAV血清型に由来し、VP1、VP2、およびVP3配列の1つは第2のAAV血清型に由来し、複数の細胞への導入時に単離された天然に存在しない核酸は、野生型AAV核酸と比較してAAV形質導入効率の増加をもたらす。場合によっては、第1のAAV血清型および第2のAAV血清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、またはそれらの任意の組み合わせから選択することができる。場合によっては、第1のAAV血清型および第2のAAV血清型は、AAV4およびAAV6、AAV5およびAAV6、AAV11およびAAV6、AAV12およびAAV6、ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択することができる。場合によっては、核酸は、DNAまたはRNAの少なくとも1つであり得る。核酸はDNAであり得る。形質導入効率は、複数の細胞上の核酸によってコードされる導入遺伝子の発現を含み得る。場合によっては、細胞が初代細胞であり得る。導入遺伝子は、外因性受容体配列の少なくとも一部をコードし得る。場合によっては、単離された天然に存在しない核酸は、医薬組成物に製剤化することができる。場合によっては、VP1、VP2、およびVP3領域は、キャプシドの少なくとも一部を構成することができる。

【0064】

[0075]本明細書では、配列番号1～配列番号19および配列番号195～配列番号213のアミノ酸配列のいずれか1つと少なくとも60%の配列同一性または類似性を含む単離および精製アデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列が開示される。場合によっては、配列同一性は、約60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%から最大約100%であり得る。

【0065】

[0076]本明細書では、単離および精製されたAAV核酸配列で細胞をトランスフェクトすることにより生成された、操作された細胞が開示される。

[0077]本明細書では、第1のVP1領域の第1の突然変異および第1のVP3領域の第2の突然変異；ならびに第2のVP1、第1のVP2、および第2のVP3配列、の少なくとも1つを含む複数のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子が開示され、第2のVP1、第1のVP2、および第2のVP3配列のうち2つは第1のAAV血清型に由来し、第2のVP1、第1のVP2、および第2のVP3配列の1つは第2のAAV血清型に由来し、AAV粒子が細胞を形質導入する場合、AAV粒子は、複数の野生型AAV粒子と比較して増加した形質導入効率を付与する。場合によっては、第1および第2のAAV血清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、およびそれらの任意の組み合わ

10

20

30

40

50

せから選択することができる。場合によっては、第1のAAV血清型および第2のAAV血清型は、AAV4およびAAV6、AAV5およびAAV6、AAV11およびAAV6、AAV12およびAAV6、ならびにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択することができる。第1のAAV血清型および第2のAAV血清型は、AAV4およびAAV6であり得る。第1のAAV血清型および第2のAAV血清型は、AAV5およびAAV6であり得る。第1のAAV血清型および第2のAAV血清型は、AAV11およびAAV6であり得る。第1のAAV血清型および第2のAAV血清型は、AAV12およびAAV6であり得る。場合によっては、第1および第2の突然変異は、点突然変異、ミスセンス突然変異、ナンセンス突然変異、挿入、欠失、複製、フレームシフト、または反復伸長からなる群から選択することができる。場合によっては、第1の突然変異と第2の突然変異は点突然変異である。点突然変異は、FからL、HからN、DからN、DからN、VからL、およびVからIからなる群から選択することができる。第1のVP1領域の第1の突然変異は、前記AAVヌクレオチド配列によってコードされるAAVポリペプチド配列の129位で生じ得る。第1のVP3領域における第2の突然変異は、前記AAVヌクレオチド配列によってコードされるAAVポリペプチド配列の418、462、584、598、および642からなる群から選択される位置で生じ得る。第1の突然変異および第2の突然変異は、F129L、H642N、およびD418N；F129L、H642N、およびL584N；F129L、H462N、およびV598L；F129L、H462N、およびV598Iからなる群から選択される少なくとも2つの突然変異であり得る。第1のVP1領域の第1の突然変異および第1のVP3領域の第2の突然変異は、F129L、H642N、およびD418Nから選択される少なくとも2つの突然変異であり得る。場合によっては、第1のVP1領域の第1の突然変異および第1のVP3領域の第2の突然変異は、F129L、H642N、およびL584Nから選択される少なくとも2つの突然変異であり得る。場合によっては、第1のVP1領域の第1の突然変異および第1のVP3領域の第2の突然変異は、L584N、F129L、およびH462Nから選択される少なくとも2つの突然変異であり得る。場合によっては、第1のVP1領域の第1の突然変異および第1のVP3領域の第2の突然変異は、F129L、H642N、およびV598Iから選択される少なくとも2つの突然変異であり得る。場合によっては、第1のVP1領域の第1の突然変異および第1のVP3領域の第2の突然変異は、ウイルスキャプシド配列の少なくとも一部で生じ得る。場合によっては、第1のVP1領域の第1の突然変異および第1のVP3領域の第2の突然変異は、AAVヌクレオチド配列のN末端またはC末端に生じる。場合によっては、細胞は哺乳動物細胞であり得る。哺乳動物細胞はヒト細胞であり得る。場合によっては、ヒト細胞は初代細胞であり得る。場合によっては、AAV粒子は、約200GC/mLから最大約 $1 \times 10^8$  GC/mLの感染多重度(MOI)でAAV粒子を細胞に導入され得る。場合によっては、MOIは $1 \times 10^6$  GC/mLであり得る。場合によっては、MOIは、約 $2.77 \times 10^{12}$  GC/mLから $2.80 \times 10^{14}$  GC/mLであり得る。場合によっては、形質導入率は、細胞の約30%、40%、50%、60%から最大100%であり得る。形質導入率は、フローサイトメトリーで測定することができる。場合によっては、AAV粒子は、外因性受容体の少なくとも一部をコードすることができる。AAV粒子は凍結保存することができる。場合によっては、AAV粒子は、細胞に導入する前に解凍することができる。AAV粒子は、適正製造基準(GMP)に適合し得る。

【0066】

[0078]本明細書では、細胞を複数のAAV粒子と接触させるステップを含む、操作された細胞を作製する方法が開示される。場合によっては、細胞は哺乳動物細胞であり得る。哺乳動物細胞はヒト細胞であり得る。ヒト細胞は初代細胞であり得る。場合によっては、細胞は、複数のAAV粒子と接触させる前に細胞を刺激することができる。場合によっては、刺激は、抗CD3、抗CD28、インターロイキン-2(IL-2)、およびそれらの任意の組み合わせで行うことができる。場合によっては、接触は、刺激の前、後、または同時に行うことができる。場合によっては、複数のAAV粒子との細胞の接触は、刺激

10

20

30

40

50

後に行うことができる。場合によっては、刺激は、細胞を複数の A A V 粒子と接触させる 4 日前から 2 4 時間前に行うことができる。場合によっては、刺激は、細胞を複数の A A V 粒子と接触させる 3 日前に行うことができる。場合によっては、方法は、ゲノム破壊をさらに含むことができる。ゲノム破壊は、C R I S P R システムを構成することができる。場合によっては、ゲノム破壊は、細胞を複数の A A V 粒子と接触させる前に行うことができる。場合によっては、方法は、操作された細胞を拡大することをさらに含むことができる。場合によっては、方法は、それを必要とする対象に、単位剤形で操作された細胞を投与することをさらに含むことができる。投与は注入であり得る。操作された細胞の投与は、それを必要とする対象の疾患または状態を少なくとも部分的に改善することができる。疾患または状態は癌を含み得る。場合によっては、改善は、コンピューター断層撮影 ( C T ) スキャンによって測定した場合、少なくとも約 3 0 % の癌の減少を含むことができる。改善は、コンピューター断層撮影 ( C T ) スキャンによって測定した場合、腫瘍病変の径のベースライン測定値の 1 0 % 未満の変化によって測定される腫瘍サイズの安定化を含み得る。

10

**【 0 0 6 7 】**

[0079]本明細書では、複数の操作されたアデノ随伴ウイルス ( A A V ) 粒子をスクリーニングする方法であって、A . 突然変異または外因性 A A V ゲノムの少なくとも 1 つをアデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列のゲノムに導入して、操作された A A V 粒子を形成するステップ ; B . A からの複数の操作された A A V 粒子を複数の細胞ゲノムに導入するステップ ; および C . 複数の細胞ゲノム中の複数の A A V 粒子によってコードされる導入遺伝子の発現レベルを定量化するステップであって、発現レベルは、A からの異なる突然変異または外因性 A A V ゲノムを導入した第 2 の A A V 粒子から得られる第 2 の発現レベルと比較されるステップを含む方法が開示される。突然変異は、点突然変異、ミスセンス突然変異、ナンセンス突然変異、挿入、欠失、複製、フレームシフト、または反復伸長の少なくとも 1 つを含むことができる。突然変異は点突然変異を含むことができる。アデノ随伴ウイルス ( A A V ) ヌクレオチド配列のゲノムは、血清型 A A V 6 であり得る。外因性 A A V ゲノムは、血清型 A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 1 0、A A V 1 1、または A A V 1 2 のものであり得る。外因性 A A V ゲノムは A A V 4 であり得る。外因性 A A V ゲノムは A A V 5 であり得る。外因性 A A V ゲノムは A A V 1 1 であり得る。外因性 A A V ゲノムは A A V 1 2 であり得る。場合によっては、細胞ゲノムは初代細胞に由来し得る。場合によっては、発現レベルの定量化は、フローサイトメトリーにより決定することができる。場合によっては、細胞ゲノムに導入された場合、操作された A A V 粒子は、操作されていない A A V 粒子と比較して、形質導入の増加をもたらすことができる。場合によっては、A からの異なる突然変異または外因性 A A V ゲノムを導入した第 2 の A A V 粒子から得られる第 2 のレベルの発現と比較して、約 3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 % から最大 1 0 0 % の形質導入の増加があり得る。形質導入は、フローサイトメトリーで測定することができる。

20

30

**【 0 0 6 8 】**

[0080]本明細書では、配列番号 1 9 5 ~ 配列番号 2 2 0 の少なくとも 1 つと少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、および最大 9 9 % 同一であるウイルス配列を細胞に導入するステップを含む、操作された細胞を作製する方法が開示される。場合によっては、操作された細胞は、操作された細胞の集団に拡大することができる。操作された細胞の集団は、医薬組成物に製剤化することができる。

40

**【 0 0 6 9 】**

[0081]本明細書では、細胞にポリ核酸を導入するステップを含む、ウイルス上清を作製する方法が開示される。場合によっては、方法は、導入後の少なくとも約 2 4 ~ 7 2 時間から、細胞または複数の細胞からウイルス上清を回収することをさらに含むことができる。場合によっては、回収は、上清中のウイルス粒子の濃度を決定することを含むことができる。方法は、ウイルス上清を単位剤形で凍結保存するステップをさらに含むことができる。

50

## 【0070】

[0082]本明細書では、細胞にウイルス上清を導入するステップを含む、細胞における外因性導入遺伝子の発現を増加させる方法が開示される。

[0083]本明細書では、操作された細胞を作製する方法であって、CRISPRシステムを用いて遺伝子の少なくとも一部をゲノム破壊するステップ；およびキャプシドタンパク質または血清学的にキメラなキャプシドタンパク質の突然変異の少なくとも1つを含む複数のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子を細胞に導入し、細胞を拡大するステップを含む方法が開示される。細胞は初代細胞であり得る。遺伝子は、免疫チェックポイント遺伝子であり得る。AAV粒子はAAV6であり得る。突然変異は、F129L、H642N、およびD418N；F129L、H642N、およびL584N；F129L、H462N、およびV598L；ならびにF129L、H462N、およびV598Iからなる群から選択することができる。血清学的にキメラなキャプシドタンパク質は、AAV4およびAAV6、AAV5およびAAV6、AAV11およびAAV6、AAV12およびAAV6、ならびにそれらの任意の組み合わせ由来のキャプシドの少なくとも一部を含むことができる。AAV粒子は、少なくとも1つの導入遺伝子をコードすることができる。導入遺伝子は、外因性受容体をコードすることができる。場合によっては、方法は、それを必要とする対象に、操作された細胞を投与することをさらに含むことができる。場合によっては、対象は、癌を有し得る。

10

## 【0071】

[0084]本明細書では、AAV核酸配列中に突然変異F129LおよびH642Nを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列が開示される。

20

[0085]本明細書では、AAV核酸配列中に突然変異F129LおよびL584Dを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列が開示される。

## 【0072】

[0086]本明細書では、AAV核酸配列中に突然変異F129LおよびD418Nを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列が開示される。

[0087]本明細書では、AAV核酸配列中に突然変異F129LおよびL584Hを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列が開示される。

## 【0073】

[0088]本明細書では、AAV核酸配列中に突然変異F129L、H642N、およびD418Nを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列が開示される。

30

## 【0074】

[0089]本明細書では、AAV核酸配列中に突然変異F129L、H642N、およびL584Dを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列が開示される。

## 【0075】

[0090]本明細書では、AAV核酸配列中に突然変異F129L、H642N、およびL584Nを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列が開示される。

40

## 【0076】

[0091]本明細書では、AAV核酸配列中に突然変異F129L、H642N、およびL584Hを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列が開示される。

## 【0077】

[0092]本明細書では、AAV核酸配列中に突然変異F129L、H642N、およびV598Lを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列が開示される。

## 【0078】

[0093]本明細書では、AAV核酸配列中に突然変異F129L、H642N、およびV

50

598Iを含む、単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列が開示される。

【0079】

[0094]本明細書では、操作された細胞を作製する方法であって、遺伝子の少なくとも一部をCRISPRシステムでゲノム的に破壊するステップ；複数の細胞に、キャプシドタンパク質、または少なくともAAV6キャプシドタンパク質の一部を含む血清学的にキメラなキャプシドタンパク質において、VP1領域の第1突然変異およびVP3領域の第2突然変異の少なくとも1つを含む複数のアデノ随伴ウイルス(AAV)粒子を導入するステップ；ならびに細胞を拡大するステップを含む方法が開示される。

【0080】

[0095]本発明の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲に具体的に記載されている。本発明の特徴および利点のより良い理解は、本発明の原理が利用される例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、および添付の図面を参照することにより得られる。

【図面の簡単な説明】

【0081】

【図1】[0096]図1は、外因性TCRをコードする例示的なAAVベクターを示す図である。

【図2-1】[0097]図2は、対照(CRISPRなしのエレクトロポレーション)と比較した、標的遺伝子部位でのAAV V1(WT)またはF129L(V2)およびCRISPRで形質導入されたヒト初代細胞における受容体発現パーセントの比較を示す図である。実験は、 $1 \times 10^6$  GC/mLのMOIで行われた。

【図2-2】[0097]図2は、対照(CRISPRなしのエレクトロポレーション)と比較した、標的遺伝子部位でのAAV V1(WT)またはF129L(V2)およびCRISPRで形質導入されたヒト初代細胞における受容体発現パーセントの比較を示す図である。実験は、 $1 \times 10^6$  GC/mLのMOIで行われた。

【図2-3】[0097]図2は、対照(CRISPRなしのエレクトロポレーション)と比較した、標的遺伝子部位でのAAV V1(WT)またはF129L(V2)およびCRISPRで形質導入されたヒト初代細胞における受容体発現パーセントの比較を示す図である。実験は、 $1 \times 10^6$  GC/mLのMOIで行われた。

【図3A】[0098]図3Aは、連続したエレクトロポレーション実験のフローサイトメトリーにより決定された受容体発現パーセントの要約を示す図である。初代ヒト細胞は、標的遺伝子部位にてCRISPR gRNAでエレクトロポレーションされ、AAV V1(WT)で形質導入された。

【図3B】図3Bは、連続したエレクトロポレーション実験のフローサイトメトリーにより決定された受容体発現パーセントの要約を示す図である。ヒト初代細胞は、標的遺伝子部位にCRISPR gRNAでエレクトロポレーションされ、AAV V2(F129L)で形質導入された。

【図4-1】[0099]図4は、CRISPRおよびAAVベクター、V1(WT)、または外因性TCR導入遺伝子をコードするV2(F129L)によるゲノム修飾後の3、7、および14日目のTCR受容体発現パーセントを示す図である。

【図4-2】[0099]図4は、CRISPRおよびAAVベクター、V1(WT)、または外因性TCR導入遺伝子をコードするV2(F129L)によるゲノム修飾後の3、7、および14日目のTCR受容体発現パーセントを示す図である。

【図5A】[00100]図5Aは、標的遺伝子でのCRISPRによるゲノム修飾およびAAV V1(WT)またはF129L(V2)による形質導入後の14日目の受容体発現パーセントを示す図である。

【図5B】図5Bは、標的遺伝子でのCRISPRによるゲノム修飾およびAAV V1(WT)またはF129L(V2)による形質導入後の14日目の平均蛍光強度(MFI)を示す図である。

【図6A】[00101]図6Aは、標的遺伝子でのCRISPRによるゲノム修飾、および高

10

20

30

40

50

力価 ( $1 \times 10^6$  GC/mL の MOI) AAV V1 (WT) または F129L (V2) による形質導入後の 13 または 14 日目の受容体発現パーセントを示す図である。

【図 6 B】図 6 B は、標的遺伝子 AAVS1、CISH、CTLA4、または PD-1 の CRISPR によるゲノム修飾、および高力価 ( $1 \times 10^6$  GC/mL の MOI) AAV V1 または V2 による形質転換後の 13 または 14 日目の平均蛍光強度 (MFI) を示す図である。

【図 7 A】[00102] 図 7 A は、ウイルス上清を生成するための 293T 細胞への AAV ウイルス粒子のトランスフェクション概略図を示す。

【図 7 B】図 7 B は、pDG6-AAV6 ヘルパーフリーパッケージングプラスミドを示す図である。

【図 8】[00103] 図 8 は、隣接する AAV2 逆方向末端反復を伴う外因性 TCR をコードする AAVS1 特異的導入遺伝子ドナーを示す図である。

【図 9】[00104] 図 9 は、AAVS1、CISH、PD1、または CTLA4 のいずれか 1 つに対する相同性アームを有する外因性 TCR をコードする導入遺伝子ドナーの AAV 媒介性相同組換えの概略図を示す。

【図 10】[00105] 図 10 は、リンパ球 CRISPR および AAV 修飾のタイムラインを示す図である。

【図 11 A】[00106] 図 11 A は、WT AAV と比較した、三重突然変異 AAV 変異体 15、17、19、および 20 によるゲノム修飾後の 5 日目の GFP 発現パーセントを示す図である。

【図 11 B】図 11 B は、WT AAV と比較した、三重突然変異 AAV 変異体 15、17、19、および 20 によるゲノム修飾後の 8 日目の GFP 発現パーセントを示す図である。

【図 12】[00107] 図 12 は、WT AAV と比較した、一重、二重、および三重 AAV 突然変異体のゲノム修飾後の 3、7、および 14 日目の GFP 発現パーセントを示す図である。

【図 13】[00108] 図 13 は、注釈付きの AAV6 WT 配列 (配列番号 246) を示す図である。

【図 14 A】[00109] 図 14 A は、異なるゲノム標的での TCR 発現パーセントの変動性を評価するために、三重にして行われた単一ドナーの形質導入後の 7、14、および 21 日目の平均 TCR 発現パーセントを示す図である。細胞は、TCR をコードする VP1 F129L 突然変異 AAV ウイルスで細胞を形質導入され、AAVS1 遺伝子の破壊に特異的な CRISPR システムでゲノム編集もされた。

【図 14 B】図 14 B は、TCR をコードする VP1 F129L 突然変異 AAV ウイルスで形質導入され、CISH 遺伝子の破壊に特異的な CRISPR システムでゲノム編集もされた、三重にして行われた細胞の単一ドナーの形質導入後の 7、14、および 21 日目の平均 TCR 発現パーセントを示す図である。

【図 14 C】図 14 C は、三重にして行われた単一ドナーの形質導入後の 7、14、および 21 日目の平均 TCR 発現パーセントを示す図である。細胞は、TCR をコードする F129L 突然変異 AAV ウイルスで形質導入され、CTLA-4 遺伝子の破壊に特異的な CRISPR システムでゲノム編集も行われた。

【図 14 D】図 14 D は、二重にして行われた単一ドナーの形質導入後の 7、14、および 21 日目の平均 TCR 発現パーセントを示す図である。細胞は、TCR をコードする VP1 F129L 突然変異 AAV ウイルスで形質導入され、PD-1 遺伝子の破壊に特異的な CRISPR システムでゲノム編集も行われた。

【図 15 - 1】[00110] 図 15 は、外因性 TCR をコードする VP1 F129L 突然変異 AAV ウイルス粒子による形質導入後の 7、14、または 21 日目の TCR 発現の 3 重にした実験のフローサイトメトリープロットを示す図である。細胞はまた、CISH 遺伝子破壊に特異的な CRISPR システムでゲノム編集された。

【図 15 - 2】[00110] 図 15 は、外因性 TCR をコードする VP1 F129L 突然変

10

20

30

40

50

異 A A V ウイルス粒子による形質導入後の 7、14、または 21 日目の T C R 発現の 3 重にした実験のフローサイトメトリープロットを示す図である。細胞はまた、C I S H 遺伝子破壊に特異的な C R I S P R システムでゲノム編集された。

【図 16 - 1】[00111] 図 16 は、T C R をコードする V P 1 F 1 2 9 L 突然変異 A A V ウイルス粒子による形質導入後の 7、14、または 21 日目の T C R 発現の 3 重にした実験のフローサイトメトリープロットを示す図である。細胞はまた、A A V S 1 遺伝子破壊に特異的な C R I S P R システムでゲノム編集された。

【図 16 - 2】[00111] 図 16 は、T C R をコードする V P 1 F 1 2 9 L 突然変異 A A V ウイルス粒子による形質導入後の 7、14、または 21 日目の T C R 発現の 3 重にした実験のフローサイトメトリープロットを示す図である。細胞はまた、A A V S 1 遺伝子破壊に特異的な C R I S P R システムでゲノム編集された。

10

【図 17 A - 1】[00112] 図 17 A は、形質導入されていないヒト C D 3 + 細胞（対照）のフローサイトメトリー結果を示す図である。

【図 17 A - 2】[00112] 図 17 A は、形質導入されていないヒト C D 3 + 細胞（対照）のフローサイトメトリー結果を示す図である。

【図 17 B - 1】図 17 B は、表 14 の突然変異体 1 ~ 20 で形質導入されたヒト C D 3 + 細胞のフローサイトメトリーの結果を示す図である。

【図 17 B - 2】図 17 B は、表 14 の突然変異体 1 ~ 20 で形質導入されたヒト C D 3 + 細胞のフローサイトメトリーの結果を示す図である。

【図 17 B - 3】図 17 B は、表 14 の突然変異体 1 ~ 20 で形質導入されたヒト C D 3 + 細胞のフローサイトメトリーの結果を示す図である。

20

【図 17 C】図 17 C は、突然変異体 1 ~ 20 で形質導入された C D 3 + 細胞の G F P パーセントの要約を示す図である。

【図 18 A - 1】[00113] 図 18 A は、異なる対照の 3 日後の C R I S P R / A A V フローサイトメトリーの結果を示す図である：刺激されて拡大されたが、C R I S P R でエレクトロポレーションされていない、形質導入されていないヒト C D 3 + 細胞、G F P 導入遺伝子をコードする対照 A A V 6、Z a p（エレクトロポレーション）対照、G F P m R N A、A A V S 1 g R N A および C a s 9。

【図 18 A - 2】[00113] 図 18 A は、異なる対照の 3 日後の C R I S P R / A A V フローサイトメトリーの結果を示す図である：刺激されて拡大されたが、C R I S P R でエレクトロポレーションされていない、形質導入されていないヒト C D 3 + 細胞、G F P 導入遺伝子をコードする対照 A A V 6、Z a p（エレクトロポレーション）対照、G F P m R N A、A A V S 1 g R N A および C a s 9。

30

【図 18 B - 1】図 18 B は、C R I S P R 修飾された、修飾 A A V（表 14 の変異体 1 ~ 20）形質導入されたヒト細胞のフローサイトメトリーによる G F P パーセントを示す図である。

【図 18 B - 2】図 18 B は、C R I S P R 修飾された、修飾 A A V（表 14 の変異体 1 ~ 20）形質導入されたヒト細胞のフローサイトメトリーによる G F P パーセントを示す図である。

【図 18 B - 3】図 18 B は、C R I S P R 修飾された、修飾 A A V（表 14 の変異体 1 ~ 20）形質導入されたヒト細胞のフローサイトメトリーによる G F P パーセントを示す図である。

40

【図 18 B - 4】図 18 B は、C R I S P R 修飾された、修飾 A A V（表 14 の変異体 1 ~ 20）形質導入されたヒト細胞のフローサイトメトリーによる G F P パーセントを示す図である。

【図 19 A - 1】[00114] 図 19 A は、異なる対照の C R I S P R / A A V フローサイトメトリーの 7 日後の結果を示す図である：刺激されて拡大されたが、C R I S P R でエレクトロポレーションされていない、形質導入されていないヒト C D 3 + 細胞、G F P 導入遺伝子をコードする対照 A A V 6、Z a p（エレクトロポレーション）対照、G F P m R N A、A A V S 1 g R N A および C a s 9。

50

【図19A-2】[00114]図19Aは、異なる対照のCRISPR/AAVフローサイトメトリーの7日後の結果を示す図である：刺激されて拡大されたが、CRISPRでエレクトロポレーションされていない、形質導入されていないヒトCD3+細胞、GFP導入遺伝子をコードする対照AAV6、Zap（エレクトロポレーション）対照、GFP mRNA、AAVS1 gRNAおよびCas9。

【図19B-1】図19Bは、CRISPRおよびAAV後の7日目CRISPR修飾された、AAV（表14の変異体1~20）形質導入されたヒト細胞のフローサイトメトリーによるGFPパーセントを示す図である。

【図19B-2】図19Bは、CRISPRおよびAAV後の7日目CRISPR修飾された、AAV（表14の変異体1~20）形質導入されたヒト細胞のフローサイトメトリーによるGFPパーセントを示す図である。

【図19B-3】図19Bは、CRISPRおよびAAV後の7日目CRISPR修飾された、AAV（表14の変異体1~20）形質導入されたヒト細胞のフローサイトメトリーによるGFPパーセントを示す図である。

【図19B-4】図19Bは、CRISPRおよびAAV後の7日目CRISPR修飾された、AAV（表14の変異体1~20）形質導入されたヒト細胞のフローサイトメトリーによるGFPパーセントを示す図である。

【図20】[00115]図20は、スプライスアクセプターGFPをコードする、表14のAAV変異体粒子1~20による形質導入/CRISPR編集後の3日目および7日目のGFP発現パーセントのプロットを示す図である。細胞はまたAAVS1に特異的なガイドRNAを含むCRISPRシステムで編集された。

【図21A-1】[00116]図21Aは、様々な対照のCRISPR/AAVフローサイトメトリーの14日後の結果を示す図である：刺激されて拡大されたが、CRISPRでエレクトロポレーションされていない、形質導入されていないヒトCD3+細胞、GFP導入遺伝子をコードするAAV6、Zap、GFP mRNA、AAVS1 gRNAおよびCas9。

【図21A-2】[00116]図21Aは、様々な対照のCRISPR/AAVフローサイトメトリーの14日後の結果を示す図である：刺激されて拡大されたが、CRISPRでエレクトロポレーションされていない、形質導入されていないヒトCD3+細胞、GFP導入遺伝子をコードするAAV6、Zap、GFP mRNA、AAVS1 gRNAおよびCas9。

【図21A-3】[00116]図21Aは、様々な対照のCRISPR/AAVフローサイトメトリーの14日後の結果を示す図である：刺激されて拡大されたが、CRISPRでエレクトロポレーションされていない、形質導入されていないヒトCD3+細胞、GFP導入遺伝子をコードするAAV6、Zap、GFP mRNA、AAVS1 gRNAおよびCas9。

【図21B】図21Bは、MOI  $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、または $2 \times 10^2$ で形質導入された、CRISPR修飾されたAV-WT細胞のフローサイトメトリーによるスプライスアクセプター(SA)-GFPの割合を示す図である。

【図21C】図21Cは、MOI  $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、または $2 \times 10^2$ で形質導入された、CRISPR修飾されたAAV変異体15細胞のフローサイトメトリーによるSA-GFPパーセントを示す図である。

【図21D】図21Dは、MOI  $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、または $2 \times 10^2$ で形質導入された、CRISPR修飾およびAAV変異体17細胞のフローサイトメトリーによるSA-GFPパーセントを示す図である。

【図21E】図21Eは、MOI  $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、または $2 \times 10^2$ で形質導入された、CRISPR修飾およびAAV変異体19細胞のフローサイトメトリーによるSA-GFPパーセントを示す図である。

【図21F】図21Fは、MOI  $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1$

10

20

30

40

50

$\times 10^3$ 、または  $2 \times 10^2$  で形質導入された、CRISPR 修飾および AAV 変異体 20 細胞のフローサイトメトリーによる SA - GFP パーセントを示す図である。

【図 2 1 G】図 2 1 G は、様々な MOI で WT または AAV 変異体で形質導入されたヒト CD3 + 細胞の GFP 発現パーセントの要約を示す図である。

【図 2 2 A】[00117] 図 2 2 A は、様々な MOI での CRISPR および AAV (WT または変異体 15、17、19、または 20) 後の 9 日目の発光データを示す図である。凡例を図 2 2 B に示す。

【図 2 2 B】図 2 2 B は、様々な MOI での CRISPR および AAV X (WT または変異体 15、17、19、または 20) 後の 14 日目の発光データを示す図である。

【図 2 2 C】図 2 2 C は、4 つの AAV 変異体の平均パッケージング効率を示す図である。n = 3。

【図 2 3】[00118] 図 2 3 は、様々な MOI での CRISPR および AAV (WT または表 15 のキメラ 1 ~ 8) の 14 日後の発光データを示す図である。

【図 2 4 A】[00119] 図 2 4 A は、様々な MOI での CRISPR および AAV (WT、トランスフェクトされていない、または表 15 のキメラ 1 ~ 8) 後の 7 日目の発光データを示す図である。

【図 2 4 B】図 2 4 B は、様々な MOI での CRISPR および AAV (WT、トランスフェクトされていない、または表 15 のキメラ 1 ~ 8) 後の 14 日目の発光データを示す図である。

【図 2 5 A】[00120] 図 2 5 A および図 2 5 B は、AAV 血清型を同定するために AAV シグネチャー領域の領域を増幅する PCR 戦略の概略図を示す。

【図 2 5 B】[00120] 図 2 5 A および図 2 5 B は、AAV 血清型を同定するために AAV シグネチャー領域の領域を増幅する PCR 戦略の概略図を示す。

【図 2 6 A】[00121] 図 2 6 A は、CISH 対照プライマー、フォワードプライマー：0752 およびリバープライマー 0753 を使用して AAV シグネチャーについてスクリーニングされたヒト PBMC ドナーのウエスタンプロットを示す図である；アンプリコンのサイズ：455 bp、および AAV シグネチャー領域 NTC、pAAV DJ、および pDG。

【図 2 6 B】図 2 6 B は、1600 bp の生成物を生じるプライマーフォワード - 2 およびリバー - 4 を使用して AAV についてスクリーニングされたヒト PBMC ドナーのウエスタンプロットを示す図である。

【図 2 6 C】図 2 6 C は、258 bp 生成物を生じるプライマーフォワード - 2 およびリバー - 3 を使用して AAV についてスクリーニングされたヒト PBMC ドナーのウエスタンプロットを示す図である。

【図 2 6 D】図 2 6 D は、921 bp 生成物を生じるプライマーフォワード - 5 およびリバー - 3 を使用して AAV についてスクリーニングされたヒト PBMC ドナーのウエスタンプロットを示す図である。

【図 2 6 E】図 2 6 E は、1639 bp 生成物を生じるプライマーフォワード - 6 およびリバー - 4 を使用して AAV についてスクリーニングされたヒト PBMC ドナーのウエスタンプロットを示す図である。

【図 2 7 A】[00122] 図 2 7 A は、細胞溶解物および精製後を使用した滴定された (titered) AAV キメラ 3、5、および 6 の qPCR 要約を示す図である。

【図 2 7 B】図 2 7 B は、細胞溶解物および精製後の AAV キメラ 3、5、および 6 の ELISA 結果を示す図である。

【図 2 8 A】[00123] 図 2 8 A は、10,000 GC/mL の MOI での WT - AAV 6 またはキメラ 3、5、もしくは 6 (CMV NanoLuc ウイルス) による CD34 + 細胞の形質導入後の 7 日目の発光 (RLU) の要約を示す図である。ウイルスのみ、およびウイルス + CRISPR が対照として示される。

【図 2 8 B】図 2 8 B は、10,000 GC/mL の MOI での WT - AAV 6 またはキメラ 3、5、もしくは 6 (CMV NanoLuc ウイルス) による T 細胞の形質導入後

10

20

30

40

50

の7日目の発光(RLU)の要約を示す図である。ウイルスのみ、およびウイルス+CRISPRが対照として示される。

【図29A】[00124]図29Aは、AAVキメラの概略図を示す図である。

【図29B-1】図29Bは、AAV6(配列番号309)と比較したAAVキメラ6(配列番号307)および8(配列番号308)の概略図を示す。

【図29B-2】図29Bは、AAV6(配列番号309)と比較したAAVキメラ6(配列番号307)および8(配列番号308)の概略図を示す。

【図30A】[00125]図30Aは、 $10,000\text{GC/mL}$ のMOIでのWT-AAV6またはキメラ3、5、もしくは6(CMV NanoLucウイルス)によるT細胞の形質導入後の7日目の発光(RLU)の要約を示す図である。ウイルスのみ、およびウイルス+CRISPRが対照として示される。

10

【図30B】図30Bは、 $10,000\text{GC/mL}$ のMOIでのWT-AAV6ならびにキメラ3、5、および6(CMV NanoLucウイルス)によるT細胞の形質導入後の14日目の発光(RLU)の要約を示す図である。ウイルスのみ、およびウイルス+CRISPRが対照として示される。CRISPR編集は、88%の編集効率でTIDE分析によって確認された。

【図31】[00126]図31は、 $1e4\text{GC/mL}$ または $1e6\text{GC/mL}$ のMOIでのWT-AAV6またはキメラ3、5、もしくは6(CMV NanoLucウイルス)によるT細胞の形質導入後の7日目の発光(RLU)を示す図である。RCはRep Capの略であり、トランスフェクションで使用されるrep/capプラスミドの量を指す。

20

【図32A】[00127]図32Aは、MOIが $1e4\text{GC/mL}$ または $1e6\text{GC/mL}$ のWT-AAV6またはキメラ6(CMV NanoLucウイルス)によるT細胞の形質導入後の7日目の発光(RLU)を示す図である。

【図32B】図32Bは、 $1e4\text{GC/mL}$ または $1e6\text{GC/mL}$ のMOIでのWT-AAV6またはキメラ6(CMV NanoLucウイルス)によるT細胞の形質導入後の15日目の発光(RLU)を示す図である。

【図32C】図32Cは、 $1e4\text{GC/mL}$ または $1e6\text{GC/mL}$ のMOIでのWT-AAV6またはキメラ6(CMV NanoLucウイルス)によるT細胞の形質導入後の7日目の発光(RLU)を示す図である。

30

【発明を実施するための形態】

【0082】

[00128]以下の説明および実施例は、本発明の実施形態を詳細に説明するものである。本発明は、本明細書に記載される特定の実施形態に限定されるものではなく、したがって、変化し得ることを理解されたい。当業者は、本発明の範囲内に包含される本発明の多数の変形および修飾があることを認識する。

定義

[00129]「AAV」、「AAV構築物」、もしくは「組換えAAV」または「AAV」という用語は、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7、AAV-8、AAV-9、AAV-10、AAV-11、またはAAV-12、scAAV、rh10、キメラもしくはハイブリッドAAV、あるいはその任意の組み合わせ、誘導體、または変異体を含む公知の血清型のいずれかのアデノ随伴ウイルスを指す。AAVは、エンベロープを持たない小さな一本鎖DNAウイルスである。それらは、非病原性パルボウイルスであり、複製にはアデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、CMVなどのヘルパーウイルスが必要である。野生型AAVは、一般集団において通常であり、いずれもの公知の病理とは関連付けられない。ハイブリッドAAVは、1つのAAV血清型のキャプシドタンパク質および別のAAV血清型からのゲノム物質を含むAAVである。キメラAAVは、2つ以上のAAV血清型に由来する遺伝的および/またはタンパク質配列を含み、それらの2つ以上のAAV血清型の遺伝子配列に対して行われた突然変異を含むことができる。例示的なキメラAAVは、キメラA

40

50

AAVキャプシド、例えば、2つ以上のAAV血清型に由来するアミノ酸の1つ以上の領域を有するキャプシドタンパク質を含むことができる。AAV変異体は、その親AAVと比較してそのゲノムまたはタンパク質に1つ以上のアミノ酸突然変異、例えば、その親AAVと比較してそのキャプシドタンパク質に1つ以上のアミノ酸突然変異を含むAAVである。AAVには、本明細書で使用する時、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAV、霊長類AAV、非霊長類AAV、およびヒツジAAVが含まれ、霊長類AAVは、非霊長類に感染するAAVを指し、非霊長類AAVは、鳥類動物に感染する鳥類AAVなどの非霊長類動物に感染するAAVを指す。場合によっては、野生型AAVは、repおよびcap遺伝子を含み、rep遺伝子はウイルスの複製に必要であり、cap遺伝子はキャプシドタンパク質の合成に必要である。本明細書で使用する時、「組換えAAV」および「rAAV」という用語は、交換可能である。

10

## 【0083】

[00130]「組換えAAVベクター」または「AAVベクター」または「AAVベクター」という用語は、前記のAAV血清型のいずれかに由来するベクターを指す。場合によっては、AAVベクターは、repおよび/またはcap遺伝子などの全体または一部が削除された1つ以上のAAV野生型遺伝子を含むことができるが、遺伝子治療用にAAVウイルスのパッケージングおよび使用に必要とされる機能的要素を含む。例えば、オープンリーディングフレームに隣接する機能的な逆方向末端反復配列もしくはITR配列、またはクロニングされた外因性配列は、AAVビリオンの複製およびパッケージングに重要であることが公知であるが、ITR配列は、ヌクレオチドの挿入、欠失、または置換など、野生型ヌクレオチド配列から修飾することができ、そのため、AAVは、遺伝子治療または遺伝子送達システムなどの本明細書に記載される実施形態に使用するのに適している。一部の態様では、自己相補性AAVベクターなどの自己相補性ベクター(sc)を使用することができ、これは、参照により本明細書に組み込まれるWu, Hum Gene Ther. 2007年, 18巻(2号): 171~82頁に記載されるように、ウイルスの二本鎖DNA合成の要件を迂回することができ、導入遺伝子タンパク質の発現率を高めることができる。一部の態様では、AAVベクターを生成して、最適な血清型、プロモーター、および導入遺伝子の選択を可能にすることができる。場合によっては、ベクターは、免疫細胞に選択的に結合または感染する標的ベクターまたは修飾ベクターであり得る。

20

## 【0084】

[00131]「AAVビリオン」または「AAVビリオン」という用語は、本明細書に記載されるAAVベクターをキャプシド化する少なくとも1つのAAVキャプシドタンパク質を含むキャプシドを含むウイルス粒子を指し、ベクターは、異種ポリヌクレオチド配列または一部の実施形態では導入遺伝子をさらに含むことができる。

30

## 【0085】

[00132]参照数値に関する「約」なる用語およびその文法的同等物は、本明細書で使用する時、その値から±10%の範囲の値を含むことができる。例えば、「約10」という量には、9~11の量が含まれる。参照数値に関連する用語「約」はまた、その値からプラスまたはマイナス10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%の範囲を含むことができる。

40

## 【0086】

[00133]本明細書で使用される「活性化」という用語およびその文法的同等物は、細胞が静止状態から活性状態に移行するプロセスを指すことができる。このプロセスは、抗原への応答、移動、および/または機能的に活性な状態への表現型もしくは遺伝的变化を含むことができる。例えば、「活性化」という用語は、T細胞活性化の段階的なプロセスを指すことができる。例えば、T細胞は、完全に活性化になるには、少なくとも2つのシグナルが必要になる場合がある。1番目のシグナルは、抗原-MHC複合体によるTCRの関与後に生じる場合があり、2番目のシグナルは、共刺激分子の関与により発生する可能性がある。抗CD3はインビトロで1番目のシグナルを模倣でき、抗CD28は2番目のシグナルを模倣することができる。

50

## 【 0 0 8 7 】

[00134]本明細書で使用される「隣接する」という用語およびその文法的同等物は、参照対象のすぐ隣りを指すことができる。例えば、ヌクレオチド配列に関連した隣接するという用語は、間にいずれものヌクレオチドが含まれないことを意味し得る。例えば、ポリヌクレオチド B に隣接するポリヌクレオチド A は、A と B の間にいずれものヌクレオチドを含まない A B を意味し得る。

## 【 0 0 8 8 】

[00135]本明細書で使用される「抗原」という用語およびその文法的同等物は、1 つ以上の受容体が結合することができる 1 つ以上のエピトープを含む分子を指すことができる。例えば、抗原は、宿主の免疫系を刺激して、抗原が提示された場合に細胞抗原特異的な免疫応答もしくは体液性抗体応答を引き起こすことができる。抗原はまた、それ自体で、または別の分子と組み合わせて存在する場合に、細胞性および/または体液性応答を誘発する能力も有し得る。例えば、腫瘍細胞抗原は、T C R によって認識され得る。

10

## 【 0 0 8 9 】

[00136]本明細書で使用される「エピトープ」という用語およびその文法的同等物は、抗体、B 細胞、T 細胞または操作された細胞によって認識され得る抗原の一部を指すことができる。例えば、エピトープは、T C R によって認識される癌エピトープであり得る。抗原内の複数のエピトープもまた認識され得る。エピトープはまた突然変異され得る。

## 【 0 0 9 0 】

[00137]本明細書で使用される「自己」という用語およびその文法的同等物は、同一存在に由来するものを指すことができる。例えば、試料（例えば細胞）を取り出して処理し、後で同じ対象（例えば、対象）に戻すことができる。自己プロセスは、ドナーとレシピエントが異なる対象である同種異系プロセスとは区別される。

20

## 【 0 0 9 1 】

[00138]「バーコードされる」という用語は、第 1 の分子が第 2 の分子を識別するために使用できるバーコードを含む分子間の関係を指す。

[00139]本明細書で使用される「癌」という用語およびその文法的同等物は、その独特の特性 - 正常な制御の喪失 - が無秩序な増殖、分化の欠如、局所的な組織浸潤、および転移をもたらす細胞の過剰増殖を指すことができる。本発明の方法に関して、癌は、任意の癌であり得、例えば、急性リンパ球性癌、急性骨髄性白血病、肺胞横紋筋肉腫、膀胱癌、骨癌、脳癌、乳癌、肛門癌、肛門管、直腸、目の癌、肝内胆管の癌、関節の癌、首、胆嚢、または胸膜の癌、鼻、鼻腔、または中耳の癌、口腔の癌、外陰部の癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性癌、結腸癌、食道癌、子宮頸癌、線維肉腫、胃腸カルチノイド腫瘍、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、腎臓癌、喉頭癌、白血病、液体腫瘍、肝臓癌、肺癌、リンパ腫、悪性中皮腫、肥満細胞腫、黒色腫、多発性骨髄腫、鼻咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、卵巣癌、膵臓癌、腹膜、大網、および腸間膜癌、咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、腎臓癌、皮膚癌、小腸癌、軟部組織癌、固形腫瘍、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、尿管癌、および/または膀胱癌が挙げられる。本明細書で使用される「腫瘍」という用語は、例えば、悪性型もしくは良性型の細胞または組織の異常な増殖を指す。

30

## 【 0 0 9 2 】

[00140]本明細書で使用される「癌ネオ抗原」または「ネオ抗原」または「ネオエピトープ」という用語およびその文法的同等物は、正常な、突然変異していない宿主ゲノムにコードされていない抗原を指すことができる。「ネオ抗原」は、場合によっては、発癌性ウイルスタンパク質、または体細胞突然変異の結果として生じる異常タンパク質のいずれかを表すことができる。例えば、ネオ抗原は、ウイルス抗原の活性を介した細胞機構の破壊により生じる場合がある。別の例は、発癌性化合物の曝露であり得、場合によって、体細胞突然変異をもたらす可能性がある。この体細胞突然変異は、最終的には、腫瘍/癌の形成をもたらす可能性がある。

40

## 【 0 0 9 3 】

[00141]本明細書で使用される「細胞傷害性」という用語は、細胞の正常な状態におけ

50

る意図しないまたは望ましくない変化を指す。細胞の正常な状態とは、細胞が細胞傷害性組成物、薬剤、および/または状態に曝露される前に現れるまたは存在する状態を指すことができる。一般的に、正常な状態にある細胞は、恒常性にある細胞である。細胞の正常な状態の意図しないまたは望ましくない変化は、例えば、細胞死（例えば、プログラム細胞死）、複製能力の低下、膜の完全性などの細胞の完全性の低下、代謝活性の低下、発達能力の低下、または本願に開示されている細胞傷害性効果のいずれかの形で現れ得る。

【0094】

[00142]「細胞傷害性の低下」または「細胞傷害性を低下させる」という語句は、細胞傷害性組成物、薬剤および/または状態への曝露による細胞の正常状態の意図しないまたは望ましくない変化の程度または頻度の低下を指す。語句は、細胞傷害性組成物、薬剤および/または状態に曝露される個々の細胞の細胞傷害性の程度を低下させること、または細胞集団が細胞傷害性組成物、薬剤および/または状態に曝露されるときに細胞傷害性を示す集団の細胞数を低下させることを指すことができる。

10

【0095】

[00143]本明細書で使用される「操作された」という用語およびその文法的同等物は、核酸、例えば生物のゲノム内の核酸、の1つ以上の変化を指すことができる。「操作された」という用語は、遺伝子の変更、付加、および/または欠失を指す場合がある。操作された細胞はまた、遺伝子が付加、欠失、および/または変更された細胞を指すこともあり得る。

【0096】

[00144]本明細書で使用される「細胞」または「操作された細胞」という用語およびそれらの文法的同等物は、ヒトまたは非ヒト動物起源の細胞を指すことができる。

20

[00145]本明細書で使用される「チェックポイント遺伝子」という用語およびその文法的同等物は、免疫応答、例えば、有害な応答の制御されない伝播を軽減する免疫抑制フィードバックループの振幅を調節するように作用する阻害性プロセス（例えば、フィードバックループ）に關与する任意の遺伝子を指すことができる。これらの応答には、感染に対する免疫応答および/または末梢自己寛容の維持中に発生する可能性のある付随的な組織損傷から保護する分子シールドへの貢献が含まれ得る。チェックポイント遺伝子の非限定的な例には、受容体の拡大CD28ファミリーおよびそれらのリガンドのメンバー、ならびに共阻害経路に關与する遺伝子（例えば、CTLA-4およびPD-1）が含まれ得る。「チェックポイント遺伝子」という用語は、免疫チェックポイント遺伝子を指す場合もある。

30

【0097】

[00146]「CRISPR」、「CRISPRシステムシステム」、または「CRISPRヌクレアーゼシステム」およびそれらの文法的同等物は、ヌクレアーゼ機能（例えば、2つのヌクレアーゼドメイン）を有する、DNAおよびCasタンパク質（例えば、Cas9）に結合する非コードRNA分子（例えば、ガイドRNA）を含み得る。例えば、Sander, J. D.ら, 「CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes」, Nature Biotechnology, 32巻: 347~355頁(2014年)を参照されたい。また、例えば、Hsu, P. D.ら, 「Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering」, Cell 157巻(6号): 1262~1278頁(2014年)も参照されたい。

40

【0098】

[00147]本明細書で使用される「破壊する」という用語およびその文法的同等物は、例えば、欠失、挿入、突然変異、再配列、またはそれらの任意の組み合わせにより、遺伝子を変更するプロセスを指し得る。例えば、遺伝子は、ノックアウトによって破壊される場合がある。遺伝子を破壊することは、遺伝子の発現を部分的に低下させるか、または完全に抑制することであり得る。また、遺伝子を破壊することは、異なる遺伝子、例えば、下

50

流の遺伝子の活性化も引き起こす可能性もある。

【0099】

[00148]本明細書で使用される「操作された」という用語およびその文法的同等物は、核酸、例えば生物のゲノム内の核酸、の1つ以上の変化を指すことができる。「操作された」という用語は、遺伝子の変更、付加、および/または欠失を指す場合がある。操作された細胞はまた、遺伝子が付加、欠失、および/または変更された細胞を指すこともあり得る。

【0100】

[00149]本明細書で使用される「機能」という用語およびその文法的同等物は、意図された目的を操作、保有、または提供する能力を指すことができる。機能的は、ベースラインから通常機能の100%までの任意のパーセントで構成することができる。例えば、機能的は、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、および/または100%の通常機能を含むことができるかまたは含む。場合によっては、機能的という用語は、通常機能の100%以上または約100%以上、例えば、125、150、175、200、250、300%および/またはそれ以上の通常機能を意味し得る。

10

【0101】

[00150]本明細書で使用される「遺伝子編集」という用語およびその文法的同等物は、1つ以上のヌクレオチドがゲノムに挿入、置換、または除去される遺伝子工学を指すことができる。遺伝子編集は、ヌクレアーゼ(例えば、天然に存在するヌクレアーゼまたは人工的に操作されたヌクレアーゼ)を使用して行うことができる。

20

【0102】

[00151]本明細書で使用される「適正製造基準」(GMP)という用語およびその文法的同等物は、FDAに従って安全、有効、または純粋な製造物を指すことができる。GMPはまた、「cGMP」と呼ばれることもある。「c」は「現在の(current)」を表す。製造物の製造元は、GMP製造物の規制に準拠するために最新の技術およびシステムを使用できる。GMP互換製造物は、典型的には、研究環境とは対照的に臨床環境で使用される。

【0103】

[00152]本明細書で使用される「突然変異」という用語およびその文法的同等物は、ポリヌクレオチド中の1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、および挿入を含むことができる。例えば、ポリヌクレオチド(cDNA、遺伝子)またはポリペプチド配列の最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、40、50、またはそれ以上のヌクレオチド/アミノ酸が、置換、欠失、および/または挿入され得る。突然変異は、遺伝子のコード配列またはその調節配列に影響を与え得る。突然変異はまた、ゲノム配列の構造またはコードされたmRNAの構造/安定性に影響を与える可能性がある。核酸の突然変異は、突然変異される位置でコードされたアミノ酸の親水性を増加または減少させる突然変異をコードすることができる。核酸の突然変異は、突然変異される位置でコードされたアミノ酸の疎水性を増加または減少させる突然変異をコードすることができる。核酸の突然変異は、非極性脂肪族アミノ酸(例えば、G、A、V、L、I、M)、芳香族アミノ酸(例えば、F、Y、W)、正に帯電したアミノ酸(例えば、K、R、H)、負に帯電したアミノ酸(例えば、D、E)、および極性アミノ酸(例えば、S、T、C、P、N、Q)から選択されるアミノ酸をコードすることができる。核酸の突然変異は、前記のグループの1つ内(例えば、VからIへの突然変異)またはグループ間(例えば、FからLへの突然変異)でコードされたアミノ酸を変更することができる。一部の実施形態では、突然変異は、芳香族アミノ酸から非極性脂肪族アミノ酸への変化をコードすることができる。一部の実施形態では、突然変異は、正に帯電したアミノ酸から極性アミノ酸への変化をコードすることができる。一部の実施形態では、突然変異は、非極性脂肪族アミノ酸から別の非極性アミノ酸への変化をコードすることができる。一部の実施形態では、突然変異は、非極性脂肪族アミノ酸から負に帯電したアミノ

30

40

50

酸への変化をコードすることができる。一部の実施形態では、突然変異は、非極性脂肪族アミノ酸を正に帯電したアミノ酸への変化をコードすることができる。

【0104】

[00153]本明細書で使用される「非ヒト動物」という用語およびその文法的同等物は、天然動物または遺伝子修飾された非ヒト動物であり得る、非ヒト哺乳動物を含むヒト以外のすべての動物種を含み得る。「核酸」、「ポリヌクレオチド」、「ポリ核酸」、および「オリゴヌクレオチド」という用語とそれらの文法的同等物は、互換的に使用することができ、線状または環状の立体構造の、および単一または二本鎖の形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーを指することができる。本開示の目的のために、これらの用語は、長さに関して制限するものとして解釈されるべきではない。この用語はまた、天然ヌクレオチドの類似体、ならびに塩基、糖および/またはリン酸部分で修飾されたヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート骨格）も包含することができる。用語の変更には、脱メチル化、CpGメチル化の追加、細菌のメチル化の除去、および/または哺乳動物のメチル化の追加も含まれ得る。一般的に、特定のヌクレオチドの類似体は、同じ塩基対特異性を有することができる。すなわち、Aの類似体は、Tと塩基対を形成することができる。

10

【0105】

[00154]「同一性パーセント(%)」という用語は、タンパク質の全長またはその断片にわたって、アミノ酸配列について容易に決定することができる。適切には、断片は、長さが少なくとも約8アミノ酸であり、最大約700アミノ酸であり得る。一般的に、2つの異なるアデノ随伴ウイルス間の「同一性」、「相同性」、または「類似性」を指す場合、「同一性」、「相同性」、または「類似性」は、「整列された」配列を基準として決定される。「整列された」配列または「整列」とは、参照配列と比較して、欠落または追加の塩基またはアミノ酸の修正を含むことが多い、複数の核酸配列またはタンパク質(アミノ酸)配列を指す。

20

【0106】

[00155]本明細書で使用される用語「末梢血リンパ球」(PBL)およびその文法的同等物は、血液(例えば、末梢血)を循環するリンパ球を指し得る。末梢血リンパ球とは、臓器に局在しないリンパ球を指することができる。末梢血リンパ球は、T細胞、NK細胞、B細胞、またはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。

30

【0107】

[00156]本明細書で使用される「表現型」という用語およびその文法的同等物は、生物の形態、発生、生化学的または生理学的特性、生物季節学、行動、および行動産物などの生物の観察可能な特徴または特性の複合を指し得る。文脈に応じて、「表現型」という用語は、集団の観察可能な特徴または特性の複合を指す場合がある。

【0108】

[00157]本明細書で使用される「プロトスペーサー」という用語およびその文法的同等物は、ガイドRNAのスペーサー配列または操作された標的部分などのガイドRNAの一部にハイブリダイズすることができるPAM隣接核酸配列を指し得る。プロトスペーサーは、ガイドRNAによって標的とされる遺伝子、ゲノム、または染色体内のヌクレオチド配列である。天然の状態では、プロトスペーサーはPAM(プロトスペーサー隣接モチーフ)に隣接している。RNA誘導型ヌクレアーゼによる切断部位は、プロトスペーサー配列内にある。例えば、ガイドRNAが特定のプロトスペーサーを標的とする場合、Casタンパク質は、プロトスペーサー配列内に二本鎖切断を生成し、それによりプロトスペーサーを切断する。切断後、プロトスペーサーの破壊は、非相同末端接続(NHEJ)または相同性指向修復(HDR)を介してもたらされる可能性がある。プロトスペーサーの破壊は、プロトスペーサーの削除をもたらす場合がある。追加的にまたは代替的に、プロトスペーサーの破壊は、外因性核酸配列をプロトスペーサーに挿入されるかまたは置換させる場合がある。

40

【0109】

50

[00158]本明細書で使用される「レシピエント」という用語およびそれらの文法的同等物は、ヒトまたは非ヒト動物を指すことができる。レシピエントはまた、それを必要としている場合がある。

【0110】

[00159]本明細書で使用される「組換え」という用語およびその文法的同等物は、2つのポリ核酸間で遺伝情報を交換するプロセスを指すことができる。本開示の目的のために、「相同組換え」または「HR」は、例えば、二本鎖切断の修復中に起こり得るこのような遺伝子交換の特殊な形態を指すことができる。このプロセスは、例えば、標的分子（例えば、二本鎖切断を経験した分子）の鋳型修復にドナー分子を使用するヌクレオチド配列相同性を必要とする場合があり、非クロスオーバー遺伝子変換または短管遺伝子変換として公知である場合もある。また、このような移行には、破壊された標的とドナーの間に形成されるヘテロ二重鎖DNAのミスマッチ補正、および/またはドナーを使用して標的の一部になり得る遺伝情報を再合成することができる合成依存的な鎖アニーリング、および/または関連プロセスも含まれる。このような特殊化されたHRは、しばしば、ドナーポリヌクレオチドの配列の一部または全部を標的ポリヌクレオチド内に組み込むことができるように、標的分子の配列の変更をもたらすことができる。場合によっては、「組換えアーム」および「相同性アーム」という用語は互換的に使用することができる。

10

【0111】

[00160]「標的ベクター」および「標的化ベクター」という用語は、本明細書では互換的に使用される。

20

[00161]本明細書で使用される「導入遺伝子」という用語およびその文法的同等物は、生物に移入される遺伝子または遺伝物質を指すことができる。例えば、導入遺伝子は、生物に導入される遺伝子を含むDNAのストレッチまたはセグメントであり得る。導入遺伝子が生物に導入された場合、その生物は、トランスジェニック生物と呼ばれる。導入遺伝子は、トランスジェニック生物でRNAまたはポリペプチド（例えば、タンパク質）を産生する能力を保持することができる。導入遺伝子は、RNAやDNAなどの様々な核酸で構成され得る。導入遺伝子は、TCR導入遺伝子などの操作されたT細胞受容体をコードすることができる。導入遺伝子はTCR配列であり得る。導入遺伝子は受容体であり得る。導入遺伝子は組換えアームを含み得る。導入遺伝子は、操作された部位を含むことができる。

30

【0112】

[00162]本明細書で使用される「T細胞」という用語およびその文法的同等物は、任意の起源からのT細胞を指すことができる。例えば、T細胞は、初代T細胞、例えば、自己T細胞、細胞株などであり得る。T細胞はまた、ヒトまたは非ヒトであり得る。

【0113】

[00163]本明細書で使用される用語「TIL」または腫瘍浸潤リンパ球およびその文法的同等物は、腫瘍から単離された細胞を指すことができる。例えば、TILは、腫瘍に移動した細胞であり得る。TILはまた、腫瘍に浸潤した細胞であり得る。TILは、腫瘍内に見られる任意の細胞であり得る。例えば、TILは、T細胞、B細胞、単球、ナチュラルキラー細胞、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。TILは、細胞の混合集団であり得る。TIL集団は、異なる表現型の細胞、異なる分化程度の細胞、異なる系統の細胞、またはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。

40

【0114】

[00164]治療される状態に変化がある場合、「治療効果」が生じ得る。変化は、プラスまたはマイナスになり得る。例えば、「プラス効果」は、対象の活性化T細胞の数の増加に対応し得る。別の実施例では、「負の効果」は、対象における腫瘍の量またはサイズの減少に対応し得る。少なくとも10%の改善、好ましくは少なくとも25%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも75%、最も好ましくは100%の改善がある場合、治療される状態に「変化」がある。変化は、本発明の組成物が組み合わせて投与される治療組成物による治療の有無による、個体における治療状態の重症度

50

の改善、または個体集団における改善された状態の頻度の違いに基づることができる。同様に、本開示の方法は、「治療上有効な」量の細胞を対象に投与することを含むことができる。「治療上有効な」という用語は、「治療効果を有する」に対応する定義を有すると理解されるべきである。

#### 【0115】

[00165]本明細書で使用される「セーフハーバー」および「免疫セーフハーバー」という用語ならびにそれらの文法的同等物は、外因性核酸を組み込むために使用することができるゲノム内の場所を指し得、その組み込みは、核酸のみの添加による宿主細胞の増殖においていずれもの有意な効果を生じさせない。セーフハーバーの非限定的な例には、H P R T、A A V S S I T E (例えば、A A V S 1、A A V S 2、E T C)、C C R 5、またはR o s a 2 6が含まれる。例えば、ヒトパルボウイルス、A A Vは、優先的にヒト染色体19 q 1 3 . 3 - q t e rまたはA A V S 1遺伝子座に組み込まれることが公知である。A A V S 1遺伝子座に目的の遺伝子を組み込むことは、様々な細胞タイプでの導入遺伝子の安定した発現を支持することができる。場合によっては、ヌクレアーゼを操作して、A A V S 1遺伝子座で導入遺伝子の組み込みを可能にするために、A A V S 1遺伝子座で二本鎖切断の生成を標的とし、または本明細書に開示される目的の導入遺伝子、細胞受容体、もしくは任意の遺伝子などの、A A V S 1部位に外因性の核酸配列を組み込むために、A A V S 1遺伝子座で相同組換えを促進することができる。場合によっては、A A V ウイルスベクターを使用して、外因性ヌクレアーゼの有無にかかわらず、A A V S 1部位に組み込むための導入遺伝子を送達する。A A V S 1を標的とするウイルスベクターは、例えば、図25Aまたは図25Bであり得る。

10

20

#### 【0116】

[00166]本明細書で使用される「配列」という用語およびその文法的同等物は、D N AまたはR N Aであり得るヌクレオチド配列を指すことができ、線状、環状、または分岐であり得、一本鎖または二本鎖のいずれかであり得る。配列を変更することができる。配列は、任意の長さ、例えば、2 ~ 1, 0 0 0, 0 0 0またはそれ以上のヌクレオチド長(またはその間の任意の整数値)、例えば、約1 0 0 ~ 約1 0, 0 0 0ヌクレオチド、または約2 0 0 ~ 約5 0 0ヌクレオチドであり得る。

#### 【0117】

[00167]「ウイルスベクター」という用語は、ウイルスに由来する遺伝子導入ベクターまたは遺伝子送達システムを指す。このようなベクターは、当該技術分野において公知である組換え技術を使用して構築され得る。一部の態様では、このようなベクターを誘導するためのウイルスは、アデノ随伴ウイルス(A A V)、ヘルパー依存性アデノウイルス、ハイブリッドアデノウイルス、エプスタイン-バーウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス、日本血球凝集ウイルス(H V J)、モロニー Maus 白血病ウイルス、ポックスウイルス、およびH I V ベースのウイルスから選択される。

30

#### 概要

[00168]本明細書では、細胞内ゲノム移植を行うに有用な修飾されたアデノ随伴ウイルスベクター組成物および方法が開示される。細胞内ゲノム移植は、修飾されたアデノ随伴ウイルスベクターを利用する治療用途のための遺伝子的に修飾された細胞および核酸を含むことができる。全体にわたって記載されている組成物および方法は、操作された細胞の生理学および免疫学的効力を改善する方法で外因性の細胞受容体を送達するために、突然変異されたまたはキメラなアデノ随伴ウイルスベクターを使用することができる。修飾されたアデノ随伴ウイルスベクターは、例えば、癌(例えば、転移性癌)対象を含む様々な適応症を治療するのに有用であり得る。例えば、自己末梢血リンパ球(P B L)は、アデノ随伴ウイルス法を使用して修飾され、癌細胞上の固有の突然変異、新抗原を認識する外因性の細胞受容体を発現させることができ、細胞内ゲノム移植の開示された組成物および方法で使用することができる。場合によっては、アデノ随伴ベクター修飾細胞はまた、少なくとも1つの遺伝子またはその一部のゲノム破壊を含むことがある。突然変異されたおよびキメラなアデノ随伴ウイルスベクターを利用するこれらの組成物、および細胞内ゲ

40

50

ノム移植のために前記 AAVベクターを利用する方法は、多くの利点を備えた癌治療を提供することができる。例えば、高効率の遺伝子導入、発現、細胞生存率の増加、組換え二本鎖切断の効率的な導入、および非相同末端接続 (NHEJ) メカニズムよりも相同性指向修復 (HDR) を優先するプロセス、ならびに相同組換え体の効率的な回収および拡大を提供することができる。

#### 【0118】

[00169]細胞内ゲノム移植は、治療用途のために細胞および核酸を遺伝的に修飾する方法であり得る。全体にわたって記載されている組成物および方法は、突然変異されたおよびキメラアデノ随伴ウイルスベクターを使用して、既存のウイルス送達メカニズムを改善することができる。効果的な養子細胞移植ベースの免疫療法 (ACT) は、例えば、癌 (例えば、転移癌) 対象を含む様々な適応症の治療に有用であり得る。例えば、自己末梢血リンパ球 (PBL) は、キャプシドタンパク質の少なくとも一部に突然変異を有する修飾されたアデノ随伴ウイルスベクター、または少なくとも2つの異なる血清学からのキャプシドタンパク質を有するアデノ随伴ウイルスベクターを使用して修飾され得る。操作されたアデノ随伴ウイルスベクターは、VP1、VP2、およびVP3のいずれかなどのキャプシドタンパク質に突然変異を含むことができる。現在の文献とは対照的に、開示された修飾されたアデノ随伴ウイルスベクターは、形質導入細胞における導入遺伝子発現率を高めることにより、同等のベクターを改善する。本明細書に記載される修飾されたアデノ随伴ウイルスベクターは、ペイロードを初代細胞に送達するための新規な手段を提供し、増加した程度の形質導入効率および導入遺伝子発現を伴う。修飾されたアデノ随伴ウイルスベクターは、CRISPRなどのゲノム修飾の様々なシステムと組み合わせて、癌などの様々な状態の免疫療法用に、細胞受容体などの少なくとも1つの遺伝子破壊および高い比率の導入遺伝子発現を、操作された細胞に提供することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0119】

[00170]場合によっては、修飾されたアデノ随伴ウイルスベクターで初代細胞を修飾する最初のステップは、初代細胞を少なくとも1つの刺激剤と接触させることによる初代細胞の刺激を含み得る。例えば、CD4 T細胞またはCD8 T細胞の増殖を刺激するために、抗CD3抗体および抗CD28抗体を使用することができる。例えば、シグナルを提供する薬剤は、溶液中にあるかまたは表面に結合することができる。粒子と細胞の比率は、標的細胞に対する粒子サイズに依存し得る。さらなる実施形態では、T細胞などの細胞は、薬剤被覆されたビーズと組み合わせることができ、その後、ビーズおよび細胞は分離され、場合により培養され得る。各ビーズは、抗CD3抗体もしくは抗CD28抗体のいずれか、または場合によっては2つの組み合わせで被覆され得る。別の実施形態では、培養の前に、薬剤被覆されたビーズおよび細胞は分離されず、一緒に培養される。抗CD3および抗CD28を結合させることができる常磁性ビーズ (3x28ビーズ) をT細胞に接触させることにより、細胞表面タンパク質を連結することができる。一実施形態では、細胞およびビーズ (例えば、1:1の比率のDYNABEADS (登録商標) M-450 CD3/CD28 T常磁性ビーズ) は、緩衝液、例えば、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (例えば、二価カチオン、例えばカルシウムおよびマグネシウムを含まない) 中で合わせられる。任意の細胞濃度を使用することができる。混合物は、14日までもしくは約14日までの数時間 (例えば、3時間) または約数時間 (例えば、約3時間)、あるいはその間の任意の毎時の整数時間、培養することができる。別の実施形態では、混合物は、21日間もしくは約21日間、または最大21日間もしくは最大約21日間培養することができる。T細胞培養に適した条件には、血清 (例えば、ウシ胎児血清またはヒト血清)、インターロイキン-2 (IL-2)、インスリン、IFN-g、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-21、IL-15、TGF-beta、およびTNFアルファ、または細胞増殖のための任意の他の添加物などの増殖および生存に必要とされる因子を含むことができる適切な培地 (例えば、Minimal Essential MediaまたはRPMI Media 1640またはX-vivo 5 (Lonza)) が含まれ得る。細胞増殖のための他の添加物には、限定されないが、界面活性剤、プ

ラズマ酸塩、ならびにN - アセチルシステインおよび2 -メルカプトエタノールなどの還元剤が含まれる。培地には、RPMI 1640、A1 M - V、DMEM、MEM、MEM、F - 12、X - Vivo 1、およびX - Vivo 20、オプティマイザー、ならびにアミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、およびビタミンが含まれ、無血清であるか、あるいは適切な量の血清（または血漿）または特定のセットのホルモン、および/もしくはT細胞の増殖と拡大に十分な量のサイトカイン（複数可）が補足され得る。抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンは、実験培養にのみ含めることができ、対象に注入される細胞の培養には含まれない場合がある。標的細胞は、増殖を支持するために必要な条件下；例えば、適切な温度（例えば、37）および大気（例えば、空気 + 5% CO<sub>2</sub>）で維持することができる。場合によっては、様々な刺激時間に曝露されたT細胞は、様々な特性を示すことがある。場合によっては、ヒトCD3、CD28、CD2、またはそれらの任意の組み合わせに対する可溶性の単一特異性の四量体抗体を使用することができる。

10

## 【0120】

[00171]場合によっては、ゲノム移植を受ける細胞は、組織または細胞と共培養することにより活性化または拡大することができる。細胞は抗原提示細胞であり得る。人工抗原提示細胞（aAPC）は、T細胞受容体および共刺激分子のリガンドを発現することができる、場合によってはそれらの効力および機能を向上させながら、移植用にT細胞を活性化および拡大することができる。aAPCは、T細胞活性化のための任意の遺伝子を発現するように設計され得る。aAPCは、T細胞拡大のための任意の遺伝子を発現するように操作され得る。aAPCは、ピーズ、細胞、タンパク質、抗体、サイトカイン、または任意の組み合わせであり得る。aAPCは、ゲノム移植を受けることができる細胞集団にシグナルを送達することができる。例えば、aAPCは、シグナル1、シグナル2、シグナル3、または任意の組み合わせを送達することができる。シグナル1は抗原認識シグナルであり得る。例えば、シグナル1は、ペプチド - MHC複合体によるTCRの連結であるか、またはCD3シグナル伝達複合体の活性化をもたらすことができるCD3に対するアゴニスト抗体の結合であり得る。シグナル2は、共刺激シグナルであり得る。例えば、共刺激シグナルは、それぞれ、ICOS - L、CD70、および4 - 1BBLに結合する抗CD28、誘導性共刺激（ICOS）、CD27、および4 - 1BB（CD137）であり得る。シグナル3は、サイトカインシグナルであり得る。サイトカインは、任意のサイトカインであり得る。サイトカインは、IL - 2、IL - 7、IL - 12、IL - 15、IL - 21、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。場合によっては、IL - 2、IL - 7、およびIL - 15を使用して本発明の細胞を培養する。

20

30

## 【0121】

[00172]場合によっては、人工抗原提示細胞（aAPC）を使用して、細胞集団を活性化および/または拡大することができる。場合によっては、aAPCは同種特異性を誘発しない。場合によっては、aAPCはHLAを発現しない。aAPCは、活性化および/または刺激に使用することができる遺伝子を安定に発現させるように遺伝的に修飾され得る。場合によっては、K562細胞は、活性のために使用することができる。K562細胞もまた拡大に使用することができる。K562細胞は、ヒト赤白血球細胞株であり得る。K562細胞は、目的の遺伝子を発現するように操作され得る。場合によっては、K562細胞は、HLAクラスI、II、またはCD1d分子を内因的に発現しないが、ICAM - 1（CD54）およびLFA - 3（CD58）を発現することができる。K562は、シグナル1をT細胞に送達するように操作され得る。例えば、K562細胞は、HLAクラスIを発現するように操作することができる。場合によっては、K562細胞を操作して、B7、CD80、CD83、CD86、CD32、CD64、4 - 1BBL、抗CD3、抗 - CD3 mAb、抗CD28、抗CD28mAb、CD1d、抗CD2、膜結合IL - 15、膜結合IL - 17、膜結合IL - 21、膜結合IL - 2、切断型CD19、または任意の組み合わせなどの追加の分子を発現するように操作することができる。場合によっては、操作されたK562細胞は、CD80およびCD83に加えて、膜形態

40

50

の抗CD3 mAb、クローンOKT3を発現することができる。場合によっては、操作されたK562細胞は、CD80およびCD83に加えて、膜形態の抗CD3 mAb、クローンOKT3、膜形態の抗CD28 mAbを発現することができる。

#### 【0122】

[00173] aAPCはビーズにすることができる。球状ポリスチレンビーズは、CD3およびCD28に対する抗体でコーティングでき、T細胞の活性化に使用できる。ビーズのサイズは任意である。場合によっては、ビーズは約3および6マイクロメートルであるか、または約3および6マイクロメートルである。ビーズは、サイズが約4.5マイクロメートルであるか、または約4.5マイクロメートルであり得る。ビーズは、セルとビーズの比率で使用できる。例えば、ミリリットルあたり100万個の細胞で3対1のビーズ対細胞比を使用することができる。aAPCはまた、剛体球形粒子、ポリスチレンラテックスマイクロビーズ、磁気ナノ粒子またはマイクロ粒子、ナノサイズの量子ドット、4、ポリ(乳酸-co-グリコール酸)(PLGA)マイクロスフェア、非球形粒子、5、カーボンナノチューブバンドル、6、楕円体PLGA微粒子、7、ナノワーム、流体脂質二重層含有システム、8、2D支持脂質二重層(2D-SLB)、9、リボソーム、10、RAFTsome/マイクロドメインリボソーム、11、SLB粒子、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。

10

#### 【0123】

[00174]場合によっては、aAPCはCD4 T細胞を拡大することができる。例えば、aAPCは、HLAクラスII制限されたCD4 T細胞の抗原処理および提示経路を模倣するように操作され得る。K562は、HLA-D、DP、DP鎖、Ii、DM、DM、CD80、CD83、またはそれらの任意の組み合わせを発現するように操作され得る。例えば、操作されたK562細胞は、HLA制限された抗原特異的CD4 T細胞を拡大するために、HLA制限されたペプチドをパルスすることができる。

20

#### 【0124】

[00175]場合によっては、aAPCの使用は、T細胞の活性化、拡大、または任意の組み合わせのために外因的に導入されたサイトカインと組み合わせることができる。細胞はまた、例えば、ゲノムに移植された細胞を対象に投与した後、対象の血液中、インビボで拡大することができる。

#### 【0125】

[00176]一部の態様では、本明細書に開示される方法は、1つ以上の核酸(例えば、第1の核酸または第2の核酸)を細胞に導入することを含む。当業者は、核酸が、一般的に、その分子が長鎖で連結された多数のヌクレオチドからなる物質を指し得ることを理解する。核酸の非限定的な例には、人工核酸類似体(例えば、ペプチド核酸、モルホリノオリゴマー、ロックド核酸、グリコール核酸、またはトレース核酸)、環状核酸、DNA、一本鎖DNA、二本鎖DNA、ゲノムDNA、ミニサークルDNA、プラスミド、プラスミドDNA、ウイルスDNA、ウイルスベクター、ガンマ-レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、RNA、ショートヘアピンRNA、psiRNAおよび/またはそれらのハイブリッドもしくは組み合わせが含まれる。一部の実施形態では、方法は核酸を含むことができ、核酸は合成である。一部の実施形態では、試料は核酸を含むことができ、核酸は断片化することができる。場合によっては、核酸はミニサークルである。核酸は、外因性TCRなどの導入遺伝子をコードすることができる。外因性TCRは癌細胞に結合することができる。外因性TCRが結合され得る特定のエピトープは、例えば、国際公開第2016/053338号に記載されるように、対象の癌の突然変異によってコードされる免疫原性エピトープであり得る。例えば、癌特異的TCR導入遺伝子は、ランダムまたは特定の挿入を使用して細胞(例えば、T細胞)のゲノムに挿入することができる。場合によっては、挿入はウイルス挿入であり得る。場合によっては、導入遺伝子のウイルス挿入は、特定のゲノム部位を標的とすることができ、または他の場合には、導入遺伝子のウイルス挿入は、ゲノム部位へのランダム挿入であり得る。

30

40

50

## 【 0 1 2 6 】

[00177] 場合によっては、核酸は別の核酸に容易に結合することができる（例えば、核酸は粘着末端またはヌクレオチド突出部を含む）。例えば、核酸は、核酸の第1末端に突出部を含むことができる。一般的に、粘着末端または突出部は、核酸の末端にある一連の不对ヌクレオチドを指す場合がある。場合によっては、核酸は、核酸の1つ以上の末端に一本鎖突出部を含むことができる。場合によっては、核酸の3'末端に突出部が生じる場合がある。場合によっては、核酸の5'末端に突出部が生じる場合がある。突出部は、任意の数のヌクレオチドを含むことができる。例えば、突出部は、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、もしくは5ヌクレオチド、またはそれ以上のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、核酸は、別の核酸に結合する前に修飾を必要とする場合がある（例えば、核酸をエンドヌクレアーゼで消化する必要がある場合がある）。場合によっては、核酸の修飾は、ヌクレオチド突出部が発生させ得、突出部は任意の数のヌクレオチドを含み得る。例えば、突出部は、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、もしくは5ヌクレオチド、またはそれ以上のヌクレオチドを含むことができる。一例では、核酸は制限部位を含むことができ、制限部位にある核酸を制限酵素（例えば、Not I）で消化すると4ヌクレオチドの突出部が生成される。場合によっては、修飾は、核酸の1つ以上の末端に平滑末端を生成することを含む。一般的に、平滑末端とは、両方の鎖が塩基対で終結する二本鎖核酸を指し得る。一例では、核酸は制限部位を含むことができ、制限部位にある核酸を制限酵素（例えば、Bsa I）で消化すると平滑末端が生成される。

10

20

## 【 0 1 2 7 】

[00178] プロモーターは、RNAポリメラーゼと転写因子の結合を調節する核酸の配列であり、遺伝子転写の効率、遺伝子は細胞内のどこで発現され得るか、および/またはどの細胞タイプで遺伝子が発現され得るかに大きな影響を与える場合がある。プロモーターの非限定的な例には、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、伸長因子1アルファ（EF1）プロモーター、サル空胞化ウイルス（SV40）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK1）プロモーター、ユビキチンC（Ubc）プロモーター、ヒトベータアクチンプロモーター、CAGプロモーター、テトラサイクリン応答要素（TRE）プロモーター、UASプロモーター、アクチン5c（Ac5）プロモーター、多面体プロモーター、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII（CaMKIIa）プロモーター、GAL1プロモーター、GAL10プロモーター、TEF1プロモーター、グリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素（GDS）プロモーター、ADH1プロモーター、CaMV35Sプロモーター、Ubiプロモーター、ヒトポリメラーゼII RNA（H1）プロモーター、U6プロモーター、またはその組み合わせが含まれる。

30

## 【 0 1 2 8 】

[00179] プロモーターは、サイトメガロウイルス（CMV）、U6、骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサー、陰性制御領域欠失、d1587revプライマー結合部位置換（MND）、またはEF1aであり得る。場合によっては、プロモーターは、外因性TCR配列に隣接している場合がある。場合によっては、AAVベクターは、スプライシングアクセプターをさらに含むことができる。場合によっては、スプライシングアクセプターは、外因性TCR配列に隣接している場合がある。プロモーター配列は、PKGまたはMNDプロモーターであり得る。MNDプロモーターは、骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサーを有する修飾されたMoMuLV LTRのU3領域を含む合成プロモーターであり得る。

40

修飾されたアデノ随伴ウイルスベクター

[00180] 場合によっては、ウイルスベクターを利用して、導入遺伝子を細胞に導入することができる。ウイルスベクターは、限定されないが、レンチウイルス、レトロウイルス、またはアデノ随伴ウイルスであり得る。ウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルスベクターであり得る。場合によっては、アデノ随伴ウイルスを使用して、細胞受容体などの外

50

因性導入遺伝子を導入することができる。場合によっては、ウイルスベクターは、場合によっては同質遺伝子であり得る。一部の実施形態では、ウイルスベクターは、場合によっては公知のSNPを有するゲノムの一部に組み込まれ得る。一部の実施形態では、アデノ随伴ウイルスベクターは、公知のSNPを有するゲノムの一部に組み込まれない。例えば、AAVは、対象自身のゲノムDNAと同質または相同になるように設計することができる。場合によっては、同質遺伝子ベクターは、相同組換えの効率を改善することができる。場合によっては、gRNAは、公知のSNPを有する領域を標的にしないに設計して、組み込みしたベクター導入遺伝子の発現を改善することができる。PD-1、CISH、AAVS1、CTLA-4などのチェックポイント遺伝子でのSNPの頻度を決定することができる。場合によっては、内因性TCR遺伝子でのSNPの頻度を決定することができる。アデノ随伴ウイルス(AAV)は、非病原性の一本鎖DNAパルボウイルスであり得る。AAVは、約26nm径のキャプシドを有することができる。キャプシドの径はまた、場合によっては約20nmから約50nmであり得る。AAV一本鎖DNAゲノムの各末端は、ゲノム複製およびパッケージングに必要とされる唯一のシス作用要素であり得る逆方向末端反復配列(ITR)を含むことができる。ITRは任意のAAV血清型に由来し得る。例えば、ITRは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、またはAAV12由来であり得る。場合によっては、ITRはAAV2由来である。ゲノムは、repとcapという2つのウイルス遺伝子を保有する。ウイルスは、2つのプロモーターおよび選択的スプライシングを利用して、複製に必要とされる4つのタンパク質(Rep78、Rep68、Rep52およびRep40)を生成し、一方、第3のプロモーターは、3つの構造ウイルスキャプシドタンパク質1、2および3(VP1、VP2およびVP3)を、選択的スプライシングおよび選択的翻訳開始コドンの組み合わせを介して生成する。本明細書で使用する時、VP1uは、VP1の固有配列(すなわち、VP2および/またはVP3と重複しない配列)である。3つのキャプシドタンパク質は、同じC末端533アミノ酸を共有し、一方、VP2およびVP1は、それぞれ65アミノ酸および202アミノ酸の追加のN末端配列を含む。AAVペリオンは、T=1の正二十面体対称に配置された、計60個のVP1、VP2、およびVP3のコピーを1:1:20の比率で含めることができる。場合によっては、REPタンパク質(例えば、Rep78、Rep68、Rep52またはRep40)またはキャプシドタンパク質を修飾し、開示された組成物および方法で利用することができる。場合によっては、キャプシドは、3つのVP:VP1、VP2、およびVP3で構成される。VP1は、固有の137アミノ酸N末端領域(VP1u)に加えて、VP2配列全体を含み、VP2タンパク質は、65アミノ酸N末端領域(VP1/2共通地域)に加えて、VP3配列全体を含む。一部の実施形態では、本明細書で提供されるAAVは、アセンブリ活性化タンパク質(AAP)を含む。特定の実施形態では、AAPは、キャプシドアセンブリを促進する。場合によっては、AAVは、例えば、キャプシドアセンブリを改善することによって、AAVキャプシドの構造および機能を増大させるために修飾されたAAPポリペプチドを含むことができる。

#### 【0129】

[00181]例えば、一部の実施形態では、修飾されたREPタンパク質またはキャプシドタンパク質は、改善されたパッケージング効率、収率、感染性、形質導入効率、またはトランスフェクション効率を提供することができる。

#### 【0130】

[00182]細胞レベルでは、AAVは、遺伝子発現を達成する前に5ステップを受けることができる: 1)細胞表面受容体への結合または付着、2)エンドサイトーシス、3)核への輸送、4)ゲノムを放出するウイルスの脱コーティング、および5)核内での転写の鑄型としての一本鎖DNAから二本鎖DNAへのゲノムの変換。AAVが個々のステップを正常に実行することができる累積効率により、全体的な形質導入効率が決定され得る。AAV形質導入の律速段階には、ウイルスの付着と内在化に必要とされる細胞表面受容体の欠如または低存在量、リソソーム分解をもたらす非効率的なエンドソーム脱出、および

10

20

30

40

50

一本鎖から二本鎖DNA鋳型への遅い変換が含まれる。したがって、ゲノムおよび/またはキャプシドが修飾されたベクターを設計して、遺伝子治療のためのより効率的もしくはより特異的な形質導入または細胞もしくは組織を促進することができる。

#### 【0131】

[00183]本明細書では、AAV血清型を同定する方法が開示され得る。場合によっては、AAV血清型は、PCRアプローチを用いて特定することができる。PCRを使用すると、AAVゲノムの領域、主に、5'および3'配列を保存することができる「シグネチャー領域」と呼ばれるキャプシド遺伝子の255bp断片を増幅することができるが、中央配列は可変性であり、各AAV血清型に固有であり得る。場合によっては、シグネチャー領域は、約50bp、75bp、80bp、100bp、125bp、150bp、175bp、200bp、225bp、255bp、260bp、270bp、280bp、290bp、300bp、325bp、350bp、375bp、または400bpから最大約450bpであり得る。プライマーは、RepおよびCap遺伝子の保存領域にアニーリングして、新規AAV血清型を増幅および同定するように設計することができる（例えば、Gaora, 2002年に示されている）。3つのプライマー対を使用して、単独で、またはAAV repおよびキャプシド遺伝子の隣接配列を含めるようにシグネチャー領域を増幅した（図26Aに示されている）。AAVのシグネチャー領域は、ゲノムDNAから増幅することができる。ゲノムDNAは、哺乳動物細胞または非哺乳動物細胞から抽出することができる。場合によっては、ゲノムDNAは、HCT116、HEK293、Jurkat、U-937、NCI-H838、pDG、AAV DJ、またはそれらの組み合わせなどの細胞株から抽出され得る。場合によっては、ゲノムDNAはヒト細胞から抽出することができる。ゲノムDNAは、末梢血単核細胞（PBMC）から抽出することができる。ゲノムDNAは、肝臓、心臓、脳、腎臓、肺、脾臓、骨、皮膚、頬、血液、唾液などから抽出することができる。

10

20

#### 【0132】

[00184]場合によっては、AAVウイルスキャプシドを修飾することができる。修飾は、任意のAAV血清型のものであり得る。場合によって、修飾は、野生型AAV6のものである（図15）。修飾には、キャプシドコンポーネントの組み合わせの修飾が含まれ得る。例えば、モザイクキャプシドAAVは、異なる血清型由来のウイルスキャプシドタンパク質の混合物で構成され得るピリオンである。キャプシドタンパク質は、様々な比率で混合された別々のプラスミドとの相補性によって提供され得る。ウイルスのアセンブリ中に、異なる血清型のキャプシドタンパク質は、補完するプラスミドの比を化学量論的に反映するサブユニットの比率で、各ピリオンで混合することができる。モザイクキャプシドは、特定の細胞タイプへの結合効率の増加、または未修飾キャプシドと比較した性能の向上を付与することができる。

30

#### 【0133】

[00185]場合によっては、キメラキャプシドAAVを生成することができる。キメラキャプシドは、キャプシド遺伝子のオープンリーディングフレームへの、別の野生型(wt)AAV配列または無関係のタンパク質のいずれかが由来の外来タンパク質配列の挿入を有することができる。キメラ修飾には、鋳型として天然に存在する血清型の使用が含まれ、これは、特定の機能を欠くAAVキャプシド配列が別のキャプシドからのDNA配列と同時トランスフェクトされることを伴う。場合によって、キメラは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、およびAAV12から選ばれるAAV血清型由来の少なくとも1つのキャップポリペプチドを含むことができる。場合によっては、ウイルスベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、およびAAV12から選ばれるAAV血清型由来のVP1を含むポリペプチドを含むことができる。他の場合では、ウイルスベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、およびAAV12から選ばれるAAV血清型由来のVP2を含

40

50

むポリペプチドを含むことができる。さらに他の場合では、ウイルスペクターは、AAV 1、AAV 2、AAV 3、AAV 4、AAV 5、AAV 6、AAV 7、AAV 8、AAV 9、AAV 10、AAV 11、およびAAV 12から選ばれるAAV血清型由来のVP3を含むポリペプチドを含むことができる。

#### 【0134】

[00186]場合によっては、ウイルスペクターは、AAV 4とAAV 6、AAV 5とAAV 6、AAV 11とAAV 6、AAV 12とAAV 6、およびそれらの任意の組み合わせのキャプシドを有するキメラを含むことができる。場合によっては、第1のAAV血清型はAAV 4であり、第2の血清型はAAV 6であり得る。場合によっては、キメラAAVベクターの第1のAAV血清型および第2のAAV血清型はAAV 5およびAAV 6であり得る。場合によっては、キメラAAVベクターの第1のAAV血清型および第2のAAV血清型はAAV 11およびAAV 6であり得る。場合によっては、キメラAAVベクターの第1のAAV血清型および第2のAAV血清型はAAV 12およびAAV 6であり得る。

10

#### 【0135】

[00187]相同組換えは、クロスオーバーポイントで生じ、新しい機能および固有の特性を有するキャプシドをもたらす。他の場合では、遺伝子機能に影響を与えずに、ウイルスキャプシドの表面に新しいペプチドを露出しようとするために、キャプシドコード配列のNまたはC末端のいずれかに融合したエピトープコード配列の使用。場合によっては、キャプシドコード配列の特定の位置に挿入されたエピトープ配列の使用であるが、エピトープをコード配列自体にタグ付けする異なるアプローチの使用を行うことができる。キメラなキャプシドはまた、キャプシドコード配列の特定の位置に挿入されたペプチドライブラリーから同定されたエピトープの使用を含むことができる。遺伝子ライブラリーを使用してスクリーニングを行うことができる。例えば、キメラまたは突然変異AAVのスクリーニングを実施して、細胞を形質導入するために使用した場合、外因性受容体などの導入遺伝子の発現効率および/または発現の増加をもたらすキメラおよび突然変異体を同定することができる。AAVベクターのキメラキャプシドは、トランスフェクトされ得る細胞タイプの範囲を拡大し、形質導入の効率を増加させることができる。形質導入またはトランスフェクションの増加は、未修飾キャプシドを含むAAVを使用した形質導入と比較して、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%の増加から約300%までの増加であり得る。例えば、細胞上または細胞内に存在する(核酸またはポリペプチドとして)導入遺伝子の検出に関して、野生型AAVと比較して、増加した形質導入またはトランスフェクションを測定することができる。一部の実施形態では、2つの異なるAAV血清型のキメラキャプシドを含むAAVは、キャプシドが由来する野生型AAVの一方または両方と比較して、形質導入効率が増加している。キメラキャプシドは、縮重、組換え、シャッフル、または他には修飾されたCapタンパク質を含むことができる。例えば、VPタンパク質のN末端での受容体特異的リガンドまたは一本鎖抗体の標的化挿入を行うことができる。T細胞の結合および感染を改善するために、AAVへのリンパ球抗体または標的の挿入を行うことができる。場合によっては、キメラキャプシド(例えば、変性または他には修飾Capタンパク質を含むキャプシド)を有するビリオンを作製することができる。このようなビリオンのキャプシドをさらに変更するため、例えば、リンパ球などの特定の細胞タイプに対する結合親和性を増大または修飾するために、ビリオンのキャプシドに追加の突然変異を導入することができる。例えば、適切なキメラキャプシドは、特定の細胞タイプへのウイルス標的を促進するためのリガンド挿入突然変異を有する場合がある。挿入突然変異体、アラニンスクリーニング突然変異体、およびエピトープタグ突然変異体を含むAAVキャプシド突然変異体の構築および特徴付けは、Wuら, J. Virol. 74巻: 8635~45頁, 2000年に記載されている。AAVキャプシド突然変異体を作製する方法は公知であり、部位特異的突然変異誘発(Wuら, J. Virol. 72巻: 5919~5926頁); 分子育種、核酸、エクソン、およびDNAファミリーシャッフリング(Soon

20

30

40

50

gら, Nat. Genet. 25巻: 436~439頁, 2000年; Coccoら, Nature Biotech. 2001年; 19巻: 354頁; 米国特許第5, 837, 458; 同第5, 811, 238号; 同第6, 180, 406号; KolkmanおよびStemmer, Nat. Biotech. 19巻: 423~428頁, 2001年; Fischら, Proceedings of the National Academy of Sciences 93巻: 7761~7766頁, 1996年; Christiansら, Nat. Biotech. 17巻: 259~264頁, 1999年); リガンド挿入 (Girodら Nat. Med. 9巻: 1052~1056頁, 1999年); カセット突然変異誘発 (Ruedaら, Virology 263巻: 89~99頁, 1999年; Boyerら, J. Virol. 66巻: 1031~1039頁, 1992年); および短いランダムオリゴヌクレオチド配列の挿入を含む。

【0136】

[00188] 場合によっては、トランスキャプシド化を行うことができる。トランスキャプシド化は、AAVの1つの血清型のITRを異なる血清型のキャプシドにパッケージングするプロセスである。別の場合では、AAVキャプシド表面への受容体リガンドの吸着を行うことができ、AAVキャプシドの表面への外来ペプチドの付加であり得る。場合によっては、これにより、現在AAV血清型が指向性を持たない細胞を特異的に標的とする能力が付与され、これは、遺伝子治療ツールとしてのAAVの使用を大いに拡大する。

【0137】

[00189] 場合によっては、AAVベクターを修飾することができる。例えば、AAVベクターは、挿入、欠失、化学的変更、または合成的修飾などの修飾を含むことができる。場合によっては、単一のヌクレオチドがAAVベクターに挿入される。他の場合では、複数のヌクレオチドがベクターに挿入される。挿入され得るヌクレオチドは、約1ヌクレオチドから約5kbの範囲であり得る。挿入することができるヌクレオチドは、機能性タンパク質をコードすることができる。挿入することができるヌクレオチドは、ベクターを受け取る対象にとって内因性であるかまたは外因性であり得る。例えば、ヒト細胞は、TCRの一部などのマウスゲノムの少なくとも一部を含むことができるAAVベクターを受け入れることができる。場合によっては、AAVベクターの挿入または削除などの修飾は、ベクターのタンパク質コード領域または非コード領域を含むことができる。場合によっては、細胞に導入された場合、修飾によってベクターの活性が改善され得る。例えば、修飾は、ヒト細胞に導入された場合にベクターのタンパク質コード領域の発現を改善することができる。

【0138】

[00190] 場合によっては、宿主細胞は、宿主細胞における新規なAAVキャプシドタンパク質 (またはその断片を含むキャプシドタンパク質) の発現を駆動する配列、およびAAV ITRの供給源と同じ供給源、または相互補完する供給源のrep配列を含み得る。AAV capおよびrep配列は、前記のようにAAV供給源から独立して得ることができ、前記のように当業者に公知である任意の方法で宿主細胞内に導入することができる。さらに、AAVベクターをシュードタイピングする場合、repタンパク質の各々をコードする配列は、異なるAAV供給源 (例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12) から供給することができる。場合によっては、宿主細胞は、適切なプロモーターの制御下でキャプシドタンパク質を安定して含む。他の場合では、キャプシドタンパク質は、誘導性プロモーターの制御下で発現され得る。別の実施形態では、キャプシドタンパク質をトランスで宿主細胞に供給することができる。トランスで宿主細胞に送達される場合、キャプシドタンパク質は、宿主細胞で選択されたキャプシドタンパク質の発現を指向するのに必要な配列を含むプラスミドを介して送達され得る。場合によっては、トランスで宿主細胞に送達される場合、キャプシドタンパク質を保有するプラスミドはまた、AAVのパッケージングに必要な他の配列、例えば、rep配列を保有する。場合によっては、repおよびcap配列を単一の核酸分子で宿主細胞にトランスフェクトし、エビ

ソームとして細胞内に安定して存在させることができる。別の実施形態では、repおよびcap配列は、細胞の染色体に安定して組み込まれている。別の実施形態は、宿主細胞で一過的に発現されるrepおよびcap配列を有する。例えば、このようなトランスフェクションに有用な核酸分子は、5'から3'に、プロモーター、プロモーターとrep遺伝子配列の開始部位との間に挿入される任意のスペーサー、AAV rep遺伝子配列、およびAAVキャップ遺伝子配列を含む。

【0139】

[00191]場合によっては、本開示は、AAVベクター（例えば、外因性受容体配列をコードするベクター）およびキメラなキャプシド（例えば、変性、再結合され、シャッフルされ、または他には修飾されたCapタンパク質を含むキャプシド）で構成されるビリオン10のストックを産生するためのAAV RepおよびCapタンパク質を提供するヘルパーベクターの構築を提供する。場合によっては、修飾は、修飾されるAAVキャップ核酸、例えば、1より多いAAV血清型（例えば、AAV血清型1～12）に由来する配列の部分を含むキャップ核酸の産生を伴うことができる。このようなキメラ核酸は、多数の突然変異誘発技術により産生され得る。キメラなキャップ遺伝子を生成する方法は、インビトロDNA増幅反応における縮重オリゴヌクレオチドの使用を伴うことができる。縮退突然変異（例えば、異なるAAV血清型からの多型）を核酸配列に組み込むためのプロトコールは、Cocoら（Nature Biotechnology 20巻：1246～1250頁，2002年）に記載されている。縮退ホモ二重鎖組換えとして公知であるこの方法では、遺伝子ファミリー内の遺伝子からの多型（縮重）を含む「トップ鎖」オリゴ20ヌクレオチドが構築される。相補的縮重は、複数の架橋「足場」オリゴヌクレオチドに操作される。単一の一連のアニーリング、ギャップフィリング、および連結ステップにより、親の多型のあらゆる可能な順列を捕捉する核酸ライブラリーの産生がもたらされる。キャプシド遺伝子の任意の部分は、縮退ホモ二重鎖組換えなどの方法を使用して突然変異することができる。しかしながら、特定のキャプシド遺伝子配列が好ましい。例えば、AAV2キャプシドのその細胞表面受容体ヘパリン硫酸プロテオグリカン（HSPG）への結合に10関与する重要な残基がマッピングされている。585および588位のアルギニン残基は、これらの残基内の非保存的突然変異がヘパリン-アガロースへの結合を排除するため、結合にとって重要である。AAV2およびAAV4原子構造のコンピューターモデリングにより、アルギニン残基585および588に重なり、キャプシド表面に露出する730つの超可変領域が特定された。これらの超可変領域は、受容体結合を媒介するキャプシド上の表面ループとして露出すると考えられている。したがって、これらのループは、WTビリオンとは異なる指向性を有するキメラビリオンを産生させる方法における突然変異誘発の標的として使用することができる。

【0140】

[00192]場合によっては、新規のAAVアミノ酸配列、ペプチドおよびタンパク質は、本明細書に記載されるAAV核酸配列から発現させることができる。さらに、これらのアミノ酸配列、ペプチドおよびタンパク質は、例えば、化学合成、他の合成技術、または他の方法を含む、当該技術分野において公知である他の方法によって生成することができる。本明細書に提供されるAAVキャプシドのいずれかの配列は、様々な技術を使用して容易に生成することができる。適切な生成技術は、当業者に周知である。例えば、Sambrookら，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY)を参照されたい。あるいは、ペプチドはまた、周知である固相ペプチド合成法（Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85巻：2149頁（1962年）；StewartおよびYoung, Solid Phase Peptide Synthesis (Freeman, San Francisco, 1969年) 27～62頁)によって合成することができる。本明細書に記載される配列およびタンパク質は、組換え生成、化学合成、または他の合成手段を含む、任意の適切な手段によって生成することができる。このような生成方法は、当業者の知識の範囲内である。40

10

20

30

40

50

## 【0141】

[00193] 場合によっては、配列は、本明細書に記載されるAAVキャプシドまたは修飾AAVベクターをコードすることができる。別の実施形態では、ベクターは、少なくとも、AAV repタンパク質またはその断片をコードする配列を含むことができる。任意選択的に、ベクターは、AAV capとrepタンパク質の両方を含むことができる。AAV repとcapの両方が提供されるベクターでは、AAV repおよびAAV cap配列は、同じクレードのAAVに由来し得る。あるいは、本明細書では、rep配列が、cap配列を提供しているものとは異なるAAV源由来であるベクターを提供することができる。一実施形態では、repおよびcap配列は、別個の供給源（例えば、別個のベクター、または宿主細胞およびベクター）から発現される。別の実施形態では、これらのrep配列は、異なるAAV源のキャップ配列にインフレームで融合され、キメラなAAVベクターを形成する。任意選択に、ベクターは、AAVキャプシドにパッケージされたベクターであり得る。本明細書に記載されるこれらのベクターおよび他のベクターは、AAV 5' ITRおよびAAV 3' ITRに隣接する選択された導入遺伝子を含む導入遺伝子をさらに含むことができる。

10

## 【0142】

[00194] 主題の突然変異AAVピリオンは、少なくとも1つのキャプシドタンパク質（例えば、VP1、VP2、およびVP3の少なくとも1つ）に突然変異を含むことができる。したがって、VP1、VP2、およびVP3の少なくとも1つは、野生型AAVキャプシドタンパク質と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を有する。場合によっては、突然変異は、VP1とVP2、VP1とVP3、VP2とVP3、またはVP1とVP2とVP3で生じ得る。場合によっては、VPを削除することができる。例えば、一部の実施形態では、突然変異AAVは、VP1、VP2、またはVP3の少なくとも1つを含まない。場合によっては、VP1領域の突然変異は、FからLへの突然変異であり得る。場合によっては、VP1領域の突然変異は、前記AAVヌクレオチド配列によってコードされるAAV VP1ポリペプチド配列の129位にあり得る。場合によっては、VP2および/またはVP3領域は、任意の数の突然変異を有することができる。VP1、VP2、および/またはVP3領域には、HからN、DからN、DからN、VからL、およびVからIを含み得る突然変異を有することができる。キャプシドの突然変異は、前記AAVヌクレオチド配列によってコードされるAAVポリペプチド配列の418、462、584、598、または642位で生じ得る。任意の数の突然変異は、AAVキャプシドタンパク質またはその一部に対して行われ得る。場合によっては、突然変異は、F129L、H642N、およびD418Nの少なくとも1つを含み得る。場合によっては、突然変異は、F129L、H642N、およびL584Nの少なくとも1つを含み得る。場合によっては、突然変異は、F129L、H462N、またはV598Lを含み得る。場合によっては、配列番号20のポリペプチド、または配列番号20の断片をコードする核酸において、前記の突然変異のいずれかを単独でまたは組み合わせて作製することができる。同様に、前記の突然変異のいずれも、配列番号20に整列する位置で、配列番号21~24のいずれか1つをコードする核酸において、単独でまたは組み合わせて作製され得る。

20

30

## 【0143】

[00195] 場合によっては、突然変異は、F129L、H462N、またはV598Iの少なくとも1つを含むことができる。AAVキャプシドの突然変異は、追加の場所で生じる場合がある。例えば、AAVキャプシドの突然変異は、ポリペプチドまたはヌクレオチド配列の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、

40

50

96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、  
107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、  
117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、  
127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、  
137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、  
147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、  
157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、  
167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、  
177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、  
187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、 10  
197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、  
207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、  
217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、  
227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、  
237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、  
247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、  
257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、  
267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、  
277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、  
287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、 20  
297、298、299、300、301、302、303、304、305、306、  
307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、  
317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、  
327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、  
337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、  
347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、  
357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、  
367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、  
377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、  
387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、 30  
397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、  
407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、  
417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、  
427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、  
437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、  
447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、  
457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、  
467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、  
477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、  
487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、 40  
497、498、499、500、501、502、503、504、505、506、  
507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、  
517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、  
527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、  
537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、  
547、548、549、550、551、552、553、554、555、556、  
557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、  
567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、  
577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、  
587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、 50

597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、  
 607、608、609、610、611、612、613、614、615、616、  
 617、618、619、620、621、622、623、624、625、626、  
 627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、  
 637、638、639、640、641、642、643、644、645、646、  
 647、648、649、650、651、652、653、654、655、656、  
 657、658、659、660、661、662、663、664、665、666、  
 667、668、669、670、671、672、673、674、675、676、  
 677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、  
 687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、  
 697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、  
 707、708、709、710、711、712、713、714、715、716、  
 717、718、719、720、721、722、723、724、725、726、  
 727、728、729、730、731、732、733、734、735、または最  
 大736位で、およびその任意の組み合わせで生じ得る。AAVキャプシドの突然変異は、  
 キャプシドタンパク質の開始場所を参照して行うことができる。AAVキャプシドは、  
 キャップ遺伝子によってコードされる3つのポリペプチド（例えば、AAV6のVP1、  
 VP2、およびVP3）を含む。したがって、VP1ポリペプチドは、VP2およびVP  
 3領域を含むと言うことができる。これらの3つのポリペプチドは、cap遺伝子から転  
 写されたmRNAからの選択的スプライシングによって形成される。本明細書で使用する  
 とき、特定の位置への言及は、VP1キャプシドタンパク質に関する。当業者は、VP1  
 、VP2、およびVP3のうちの2つ以上をコードする位置で突然変異が行われた場合、  
 その位置にアミノ酸を含む得られたポリペプチドの各々にこの突然変異が存在するこ  
 とを理解する。当業者はまた、本明細書に記載される突然変異が、その血清型のキャプシドの  
 対応する位置で、本明細書に記載される選択された血清型のAAVにおいて作製され得る  
 ことを認識する。

10

20

30

40

50

【0144】

[00196]場合によっては、突然変異は、前述のAAVキャプシド位置のいずれかで生じ  
 得、任意の数の突然変異を含み得る。場合によっては、突然変異は、あるアミノ酸から別  
 のアミノ酸への場合がある。標準アミノ酸の任意の組み合わせまたは順列を行うことが  
 できる。VP1、VP2、およびVP3のいずれかで、次のアミノ酸修飾：AからR、Aか  
 らN、AからD、AからC、AからQ、AからE、AからG、AからH、AからI、Aか  
 らL、AからK、AからM、AからF、AからP、AからS、AからT、AからW、Aか  
 らY、AからV、RからN、RからD、RからC、RからQ、RからE、RからG、Rか  
 らH、RからI、RからL、RからK、RからM、RからF、RからP、RからS、Rか  
 らT、RからW、RからY、RからV、NからD、NからC、NからQ、NからE、Nか  
 らG、NからH、NからI、NからL、NからK、NからM、NからF、NからP、Nか  
 らS、NからT、NからW、NからY、NからV、DからC、DからQ、DからE、Dか  
 らG、DからH、DからI、DからL、DからK、DからM、DからF、DからP、Dか  
 らS、DからT、DからW、DからY、DからV、CからQ、CからE、CからG、Cか  
 らH、CからI、CからL、CからK、CからM、CからF、CからP、CからS、Cか  
 らT、CからW、CからY、CからV、QからE、QからG、QからH、QからI、Qか  
 らL、QからK、QからM、QからF、QからP、QからS、QからT、QからW、Qか  
 らY、QからV、EからG、EからH、EからI、EからL、EからK、EからM、Eか  
 らF、EからP、EからS、EからT、EからW、EからY、EからV、GからH、Gか  
 らI、GからL、GからK、GからM、GからF、GからP、GからS、GからT、Gか  
 らW、GからY、GからV、HからI、HからL、HからK、HからM、HからF、Hか  
 らP、HからS、HからT、HからW、HからY、HからV、IからL、IからK、Iか  
 らM、IからF、IからP、IからS、IからT、IからW、IからY、IからV、Lか  
 らK、LからM、LからF、LからP、LからS、LからT、LからW、LからY、Lか

ら V、K から M、K から F、K から P、K から S、K から T、K から W、K から Y、K から V、M から F、M から P、M から S、M から T、M から W、M から Y、M から V、F から P、F から S、F から T、F から W、F から Y、F から V、P から S、P から T、P から W、P から Y、P から V、S から T、S から W、S から Y、S から V、T から W、T から Y、T から V、W から Y、W から V、Y から V、のいずれか、および先に記載した突然変異の逆のいずれかを行うことができる。

【 0 1 4 5 】

[00197]突然変異は、保存的突然変異または置換であり得る。例えば、20個の天然に存在するアミノ酸は、同様の特徴を共有し得る。脂肪族アミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシンであり得る。ヒドロキシルまたは硫黄/セレン含有アミノ酸は、セリン、システイン、セレノシステイン、スレオニン、またはメチオニンであり得る。環状アミノ酸はプロリンであり得る。芳香族アミノ酸は、フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンであり得る。塩基性アミノ酸は、ヒスチジン、リジン、およびアルギニンであり得る。酸性アミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、またはグルタミンであり得る。保存的突然変異は、セリンからグリシン、セリンからアラニン、セリンからセリン、セリンからスレオニン、セリンからプロリンであり得る。保存的突然変異は、アルギニンからアスパラギン、アルギニンからリジン、アルギニンからグルタミン、アルギニンからアルギニン、アルギニンからヒスチジンであり得る。保存的突然変異は、ロイシンからフェニルアラニン、ロイシンからイソロイシン、ロイシンからバリン、ロイシンからロイシン、ロイシンからメチオニンであり得る。保存的突然変異は、プロリンからグリシン、プロリンからアラニン、プロリンからセリン、プロリンからスレオニン、プロリンからプロリンであり得る。保存的突然変異は、スレオニンからグリシン、スレオニンからアラニン、スレオニンからセリン、スレオニンからスレオニン、スレオニンからプロリンであり得る。保存的突然変異は、アラニンからグリシン、アラニンからスレオニン、アラニンからプロリン、アラニンからアラニン、アラニンからセリンであり得る。保存的突然変異は、バリンからメチオニン、バリンからフェニルアラニン、バリンからイソロイシン、バリンからロイシン、バリンからバリンであり得る。保存的突然変異は、グリシンからアラニン、グリシンからスレオニン、グリシンからプロリン、グリシンからセリン、グリシンからグリシンであり得る。保存的突然変異は、イソロイシンからフェニルアラニン、イソロイシンからイソロイシン、イソロイシンからバリン、イソロイシンからロイシン、イソロイシンからメチオニンであり得る。保存的突然変異は、フェニルアラニンからトリプトファン、フェニルアラニンからフェニルアラニン、フェニルアラニンからチロシンであり得る。保存的突然変異は、チロシンからトリプトファン、チロシンからフェニルアラニン、チロシンからチロシンであり得る。保存的突然変異は、システインからセリン、システインからスレオニン、システインからシステインであり得る。保存的突然変異は、ヒスチジンからアスパラギン、ヒスチジンからリジン、ヒスチジンからグルタミン、ヒスチジンからアルギニン、ヒスチジンからヒスチジンであり得る。保存的突然変異は、グルタミンからグルタミン酸、グルタミンからアスパラギン、グルタミンからアスパラギン酸、グルタミンからグルタミンであり得る。保存的突然変異は、アスパラギンからグルタミン酸、アスパラギンからアスパラギン、アスパラギンからアスパラギン酸、アスパラギンからグルタミンであり得る。保存的突然変異は、リジンからアスパラギン、リジンからリジン、リジンからグルタミン、リジンからアルギニン、リジンからヒスチジンであり得る。保存的突然変異は、アスパラギン酸からグルタミン酸、アスパラギン酸からアスパラギン、アスパラギン酸からアスパラギン酸、アスパラギン酸からグルタミンであり得る。保存的突然変異は、グルタミンからグルタミン、グルタミンからアスパラギン、グルタミンからアスパラギン酸、グルタミンからグルタミンであり得る。保存的突然変異は、メチオニンからフェニルアラニン、メチオニンからイソロイシン、メチオニンからバリン、メチオニンからロイシン、メチオニンからメチオニンであり得る。保存的突然変異は、トリプトファンからトリプトファン、トリプトファンからフェニルアラニン、トリプトファンからチロシンであり得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 4 6 】

[00198] 一部の実施形態では、VP1、VP2、およびVP3の少なくとも1つは、野生型AAV VP1、VP2、およびVP3と比較して、1から約25のアミノ酸置換、例えば、野生型AAV VP1、VP2、およびVP3と比較して、約1から約5、約5から約10、約10から約15、約15から約20、または約20から約25のアミノ酸置換を有する。場合によっては、突然変異AAVピリオンは、キャプシド配列などのAAV配列の少なくとも一部において、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98から最大100個の突然変異を有することができる。キャプシド配列の突然変異は、VP1、VP2、VP3のいずれか、またはそれらの組み合わせ内にあり得る。場合によっては、突然変異AAV変異体は、キャプシド配列に1つの突然変異を有することができる。場合によっては、突然変異AAV変異体は、キャプシド配列に2つの突然変異を有することができる。場合によっては、突然変異AAV変異体は、キャプシド配列に3つの突然変異を有することができる。あるいは、主題の突然変異AAVピリオンは、野生型キャプシドタンパク質と比較して、少なくとも1つのキャプシドタンパク質に1つ以上のアミノ酸欠失および/または挿入を含む。一部の実施形態では、主題の突然変異AAVピリオンは、野生型キャプシドタンパク質と比較して、キャプシドタンパク質に1つ以上のアミノ酸置換および/または欠失および/または挿入を含む。場合によっては、突然変異は点突然変異であり得る。場合によっては、AAVの少なくとも一部を突然変異させることができる。例えば、AAVのキャプシドは、点突然変異、ミスセンス突然変異、ナンセンス突然変異、挿入、欠失、複製、フレームシフト、または反復伸長などの突然変異を有することができる。

10

20

## 【 0 1 4 7 】

[00199] 場合によっては、WT AAV cap 遺伝子に関連する1つ以上の突然変異を含む突然変異AAVライブラリーを生成することができる。WT cap 遺伝子は、配列番号55に記載されるヌクレオチド配列を含むキャップであり得る。AAV cap 遺伝子の突然変異は、任意の公知の方法を使用して生成される。スターターAAV cap 遺伝子の突然変異誘発に適した方法には、限定されないが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)ベースの方法、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発、飽和突然変異誘発、ループ交換突然変異誘発、断片シャッフリング突然変異誘発(すなわち、DNAシャッフリング)などが含まれる。突然変異を生じさせる方法は、当該技術分野において十分に説明されている。例えば、Zhaoら, Nat Biotechnol. 1998年5月; 16巻(3号): 234~5頁; Koerberら, Mol Ther. 2008年10月; 16巻(10号): 1703~9頁; Koerberら, Mol Ther. 2009年12月; 17巻(12号): 2088~95頁; 米国特許第6,579,678号; 米国特許第6,573,098号; および米国特許第6,582,914号を参照されたい。これらはすべて、突然変異誘発に関連するそれらの教示のために参照により本明細書に組み込まれる。ライブラリーが生成されると、特定のピリオンの特性(すなわち、感染の特性の変更、またはトランスフェクションもしくは形質導入効率の増加)のためにライブラリーを選択することができる。ウイルス粒子が生成され(したがって、修飾AAVピリオンのライブラリーが生成される)、WT AAVと比較して感染特性が変更した修飾AAVピリオンを特定するために、1つ以上の選択ステップに供される。選択される感染の特性には、限定されないが、以下が含まれる: 1) AAV中和抗体への結合の変更(例えば、結合の減少); 2) AAV中和抗体の回避の増加; 3) AAVの感染に耐性のある細胞の感染性の増加; および4) 形質導入細胞における導入遺伝子発現の増加。場合によっては

30

40

50

、修飾 AAV は、修飾されていない細胞と比較して、トランスフェクション、形質導入、または感染機能を増加することができる。例えば、修飾 AAV ベクターは、同等の WT AAV ベクターと比較して、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98 から最大約 100% 機能し得る。場合によっては、突然変異されたまたはキメラな AAV ベクターは、トランスフェクトまたは形質導入された細胞における導入遺伝子の発現率により測定した場合、WT AAV ベクターの 100% 以上で機能し得る。例えば、トランスフェクトまたは形質導入された細胞は、同等の導入遺伝子をコードする WT AAV ベクターでトランスフェクトまたは形質導入された同等の細胞の 110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000、または最大約 5000% 機能し得る。

10

## 【0148】

[00200] 場合によっては、キャップ遺伝子に突然変異を含む突然変異 AAV ライブラリーは、互い違いの伸長プロセスを使用して生成させることができる。互い違いの伸長プロセスは、PCR ベースの方法を用いた cap 遺伝子の増幅を伴うことができる。特定の PCR プライマーを使用して鋳型キャップ遺伝子をプライミングし、その後、変性および非常に短いアニーリング/ポリメラーゼ触媒伸長のサイクルを繰り返すことができる。各サイクルでは、成長する断片は、配列相補性に基づいて異なる鋳型にアニーリングし、さらに伸長する。変性、アニーリング、伸長のサイクルは、全長の配列が形成されるまで繰り返される。得られた全長配列は、野生型 AAV キャップ遺伝子と比較して、キャップ遺伝子に少なくとも 1 つの突然変異を含む。

20

## 【0149】

[00201] 場合によっては、修飾は、AAV 血清型 6 キャプシドのものであり得る。キャプシドへの修飾は、キャプシド配列内の一重、二重、または三重突然変異であり得る。場合によっては、主題の変異 AAV キャプシドタンパク質（または主題の核酸によってコードされる変異 AAV キャプシドタンパク質）は、表 1 の核酸、配列番号 1 ~ 配列番号 19、またはタンパク質配列、配列番号 267 ~ 配列番号 285 のいずれか 1 つに対して、約 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または最大 100% の相同性を含むことができる。場合によっては、対象の突然変異または変異されたベクターは、表 12 に開示される配列、配列番号 195 ~ 配列番号 213 のいずれか 1 つに対して、約 10%、15%、20%、25%、30% のいずれか 1 つに対する相同性を含むことができる%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または最大 100% の相同性を含むことができる。

30

40

## 【0150】

【表 1 - 1】

表1: 修飾されたキャプシド AAV6 構築物。太字は AAV6 rep 配列である。斜体はスパーサー配列である。核酸キャプシド配列は大文字である。ボックスにした配列は AgeI 制限部位を指す。下線が引かれた配列は VP1 開始を指す。太字であり斜体の配列は VP2 開始部位を指す。太字であり下線が引かれた配列は VP3 開始部位を指す。

配列番号	突然変異	制限部位 HindIII および AgeI を使用して AAV6 Rep Cap ベクターにクローニングする合成断片の核酸配列	配列番号	キャプシドタンパク質配列
1	F129L	<p>ggtacaaaaacaatgttctcgtcactgggcatgaatctgatgctgtttcc  ctgcagacaatgagagagaatgaatcagaattcaaatatctgcttcaactca  cggacagaaagactgttagagtgcttcccggtgcagaatctcaaccggt  tetgtcgtcaaaaaggcgtatcagaaactgtgctacattcatatcatatgg  gaaagggtgccagacgcttgcactgctgcatgctgcaatgtggatttgg  atgactgcatctttgaacaataatgaittaaatcaggtATGGCTGCC  GATGGTTATCTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC  CTCTCTGAGGGCATTCCGCGAGTGGTGGGACTTG  AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA  CAAAAAGCAGGACGACGGCCGGGTCTGGTGC  TTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACG  GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCG  GATGCAGCGGCCCTCGAGCAGACAAGGCCTA  CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT  ACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTTC  AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTGGG  GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTCCAGGCCAA  GAAGAGGGTTCTCGAACCTTTAGGTCTGGTTGA  GGAAGGTGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAAC  GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC  TCCTCCTCGGGCATTGGCAAGACAGGCCAGCA  GCCCGCTAAAAAGAGACTCAATTTTGGTCAGA  CTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCACAA  CCTCTCGGAGAACCTCCAGCAACCCCCGCTGCT  GTGGGACCTACTACAATGGCTTCAGGCGGTGG  CGACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCG  ACGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAAATTGGCAT  TGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCAT  CACCACCAGCACCCGAACATGGGCCTTGCCCA  CCTATAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCA  GTGCTTCAACGGGGCCAGCAACGACAACCCAC  TACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGTATTTT  GATTTCAACAGATTCCACTGCCATTTCTCACCA  CGTACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTG  GGGATTCGGCCCAAGAGACTCAACTTCAAGC  TCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTACGACG  AATGATGGCGTCACGACCATCGCTAATAACCTT  ACCAGCACGGTTCAGTCTTCTCGGACTCGGAG  TACCAGTTGCCGTACGTCCTCGGCTCTGCGCAC  CAGGGCTGCCTCCCTCCGTCCCGGGCGGACGTG  TTCATGATCCCGCAGTACGGCTACCTAACGCTC</p>	267	<p>MAADGYLPDW  LEDNLSEGIREW  WDLKPGAPKPK  ANQKQDDGRG  LVLPGYKYLGP  NGLDKGEPVNA  ADAAALEHDKA  YDQQLKAGDNP  YLRYNHADAFF  QERLQEDTSFG  NLGRAVFQAKK  RVLEPLGLVEEG  AKTAPGKRPV  EQSPQEPDSSSI  GKTGQOPAKKR  LNFQGTGDSSEV  PDPQPLGEPAT  PAAVGPTTMMAS  GGGAPMADNNE  GADGVGNASGN  WHCDSTWLGDR  VITSTRTWALP  TYNNHLYKQISS  ASTGASNDNHY  FGYSTPWGYDF  NRFHCHFSPRD  WQRLINNNWGF  RPKRLNFKLFNI  QVKEVTNDGV  TTIANLSTVQ  VFSDEYQLPYV  LGSAHQGLPPF  PADVFMIPQYGY  LTLNNGSQAVG  RSSFCLEYFPS  QMLRTGNNFTFS  YTFEDVPFHSSY  AHSQSLDRLMN  PLIDQYLYLNR  TQNQSGSAQNK  DLLFSRGSAPGM</p>

10  
20  
30  
40

【 0 1 5 1 】

【表 1 - 1 - 1】

	<p>AACAATGGCAGCCAGGCAAGTGGGACGGTCATC  CTTTACTGCCTGGAATATTTCCCATCGCAGAT  GCTGAGAACGGG</p>	<p>SVQPKNWLPGP  CYRQQRVSKTK  TDNNNSNFTWT  GASKYNLNGRE  SIINPGTAMASH  KDDKDK</p>
--	--	---

50

【 0 1 5 2 】

【 表 1 - 2 】

		<p>CAATAACTTTACCTTCAGCTACACCTTCGAGGA  CGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCA  GAGCCTGGACCGGCTGATGAATCCTCTCATCGA  CCAGTACCTGTATTACCTGAACAGAATCAGA  ATCAGTCCGGAAGTGCCAAAACAAGGACTTG  CTGTTTAGCCGGGGTCTCCAGCTGGCATGTCT  GTTTCAGCCAAAACCTGGCTACCTGGACCCTGT  TACCGGCAGCAGCGCTTTCTAAAACAAAAC  AGACAACAACAACAGCAACTTTACCTGGACTG  GTGCTTCAAAATATAACCTTAATGGGCGTGAAT  CTATAATCAACCTGGCACTGCTATGGCCTCAC  ACAAAGACGACAAAGACAAGTTCTTTCCCATG  AGCGGTGTCATGATTTTTGAAAAGGAGAGCGC  CGGAGCTTCAAACACTGCATTGGACAATGTCAT  GATCACAGACGAAGAGGAAATCAAAGCCACTA  ACCCCGTGCCACCGAAAGATTTGGGACTGTG  GCAGTCAATCTCCAGAGCAGCAGCACAGACCC  TGCGACCGGAGATGTGCATGTTATGGGAGCCTT  ACCTGGAATGGTGTGGCAAGACAGAGACGTAT  ACCTGCAGGGTCCTATTTGGGCCAAAATTCCTC  ACACGGATGGACACTTTCACCCGTCTCCTCTCA  TGGGCGGCTTTGGACTTAAGCACCCGCCTCCTC  AGATCCTCATCAAAAACACGCCTGTTCTGCGA  ATCCTCCGGCAGAGTTTTCGGCTACAAAGTTTG  CTTCATTTCATCACCCAGTATTCCACAGGACAAG  TGAGCGTGGAGATTGAATGGGAGCTGCAGAAA  GAAAACAGCAAACGCTGGAATCCCGAAGTGCA  GTATACATCTAACTATGCAAAATCTGCCAACGT  TGATTTCACTGTGGACAACAATGGACTTTATAC  TGAGCCTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCAC  CCGTCCCCTGTAAAttgtgttaataataaacgggt</p>	<p>FFPMSGVMIFGK  ESAGASNTALD  NVMITDEEEIKA  TNPVATERFGTV  AVNLQSSSTDPA  TGDVHVMGALP  GMVWQDRDVY  LQGPWAKIPHT  DGHFHPSPLMG  GFGLKHPPQILI  KNTPVPANPPAE  FSATKFASFITQY  STGQVSVIEIWE  LQKENSKRWNP  EVQYTSNYAKS  ANVDFTVDNNG  LYTEPRPIGTRYL  TRPL</p>	10
2	D418E	<p>ggtaccnaaacaatgtfctcgtcactgggcatgaatctgatgetgttcc  ctgcagacaatggagagaatgaatcagaattcaaatatctgettcaactca  cggacagaaagactgttagagtgcttcccggtcagaatcaacecgtt  tctgtcgtcaaaaagggtatcagaaactgtgtacattcatatcatatgg  gaaaggtgcccagactgcaactgctgcatctggaatgtggattgg  atgactgcatctttgaacaataaatgalltaaatcaggATGGCTGCC  GATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC  CTCTCTGAGGGCATTCCGCGAGTGGTGGGACTTG  AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA  GCAAAAAGCAGGACGACGGCCGGGTCTGGTGC  TTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACG  GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCG  GATGCAGCGGCCCTCGAGCAGCAAGGCCCTA  CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT  ACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTTC  AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGG</p>	<p>268  MAADGYLPDW  LEDNLSEGIREW  WDLKPGAPKPK  ANQKQDDGRG  LVLPGYKYLGPF  NGLDKGEPVNA  ADAAALEHDKA  YDQQLKAGDNP  YLRYNHADAEF  QERLQEDTSFGG  NLGRAVFAQK  RVLEPFLVEEG  AKTAPGKKRPV  EQSPQEPDSSSGI  GKTGQQPAKKR  LNFQQTGDSSESV</p>	30

【 0 1 5 3 】

【表 1 - 2 - 1】

	GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAA GAAGAGGGTTCTCGAACCTTTTGGTCTGTTGA GGAAGGTGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAAC GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC TCCTCCTCGGGCATTGGCAAGACAGGCCAGCA GCCCCTAAAAAGAGACTCAATTTTGGTCAGA CTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCACAA CCTCTCGGAGAACCTCCAGCAACCCCGCTGCT GTGGGACCTACTACAATGGCTTCAGGCGGTGG CGCAC	PDPQPLGEPAT PAAVGPTTMS GGGAPMADNNE GADGVGNASGN WHCDSTWLGDR VIITSTRTWALP TYNNHLYKQISS ASTGASNDNHY FGYSTPWGYFDF NRFHCHFSPRD WQLINNNWGF RPKRLNFKLFNI QVKEVT
--	--	--

【 0 1 5 4 】

【表 1 - 3】

	<p>CAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCGACGGA  GTGGGTAATGCCTCAGGAAATTGGCATTGCGA  TTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCATCACCA  CCAGCACCCGAACATGGGCCTTGCCACCTATA  ACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCAGTGCTT  CAACGGGGGCCAGCAACGACAACCACTACTTC  GGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTTGATTC  AACAGATTCCACTGCCATTTCTCACCACGTGAC  TGGCAGCGACTCATCAACAACAATTGGGGATT  CCGGCCCAAGAGACTCAACTTCAAGCTCTTCAA  CATCCAAGTCAAGGAGGTACGACGAATGATG  GCGTCACGACCATCGTAATAACCTTACCAGCA  CGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAGTACCAGT  TGCCGTACGTCTCTCGGCTCTGCGCACCAGGGCT  GCCTCCCTCCGTTCCCGGCGGACGTGTTTATGA  TTCCGCAGTACGGCTACCTAACGCTCAACAATG  GCAGCCAGGAGTGGGACGGTCACTTTTACT  GCCTGGAATATTTCCCATCGCAGATGCTGAGAA  CGGGCAATAACTTTACCTTACAGCTACACCTTCG  AGGAGGTGCCTTTCCACAGCAGCTACGCGCAC  AGCCAGAGCCTGGACCGGCTGATGAATCCTCT  CATCGACCAGTACCTGTATTACCTGAACAGAAC  TCAGAATCAGTCCGGAAGTGCCTCAAAACAAGG  ACTTGCTGTTTAGCCGGGGTCTCCAGCTGGCA  TGTCTGTTAGCCCAAAACTGGCTACCTGGAC  CCTGTTACCGGACGACGCGGTTTCTAAAACAA  AAACAGACAACAACAACAGCAACTTTACCTGG  ACTGGTGCTTCAAAATATAACCTTAATGGGCGT  GAATCTATAATCAACCCTGGCACTGCTATGGCC  TCACACAAAGACGACAAAGACAAGTCTTTCC  CATGAGCGGTGTCATGATTTTGGAAAGGAGA  GCGCCGGAGCTTCAAACACTGCATTGGACAAT  GTCATGATCACAGACGAAGAGGAAATCAAAGC  CACTAACCCCGTGGCCACCGAAAGATTTGGGA  CTGTGGCAGTCAATCTCCAGAGCAGCAGCACA  GACCCTGCGACCGGAGATGTGCATGTTATGGG  AGCCTTACCTGGAATGGTGTGGCAAGACAGAG  ACGTATACCTGCAGGGTCTATTTGGGCCAAAA  TTCCTCACACGGATGGACACTTTCACCCGTCTC  CTCTCATGGGCGGCTTTGGACTTAAGCACCCGC  CTCCTCAGATCCTCATCAAAAACAGCCTGTTT  CTGCGAATCCTCCGGCAGAGTTTTCGGCTACAA  AGTTTGCTTCATTCATCACCCAGTATTCCACAG  GACAAGTGAGCGTGGAGATTGAATGGGAGCTG  CAGAAAGAAAACAGCAAAACGCTGGAATCCCGA  AGTGCAGTATACATCTAACTATGCAAAATCTGC  CAACGTTGATTTCACTGTGGACAACAATGGACT  TTATACTGAGCCTCGCCCCATTGGCACCCGTTA  CCTCACCCGTCCCCTGTAAAttgtgtaataataaacgggt</p>	<p>TNDGVTTIANNL  TSTVQVFSDEY  QLPYVLGSAHQ  GCLPPFPADVFM  IPQYGYLTLNNG  SQAVGRSSFYCL  EYFPSQMLRTGN  NFTFSYTFEEVFP  HSSYAHSQSLDR  LMNPLIDQYLYY  LNRTQNSGSA  QNKDLLFSRGS  AGMSVQPKNWL  PGPCYRQQRVS  KTKTDNNSNF  TWTGASKYNLN  GRESIINPGTAM  ASHKDDKDKFF  PMSGVMIFGKES  AGASNTALDNDV  MITDEEEIKATN  PVATERFGTVAV  NLQSSSTDPATG  DVHVMGALPG  MVWQDRDVYL  QGPIWAKIPHTD  GHFHPSPLMGGF  GLKHPPQILIKN  TPVPANPPAEFS  ATKFASFITQYS  TGQVSVEIEWEL  QKENSKRWNPE  VQYTSNYAKSA  NVDFTVDNNGL  YTEPRPIGTRYLT  RPL</p>
--	---	--

10

20

30

【表 1 - 4】

3	D418N	<p>ggfaccaaaacaatgttctcgtcactgggcatgaatctgatgetgtttcc  ctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaaatatctgetteactea  cggacagaaagactgttttagagtctttcccggtgcagaatetcaacecgtt  tctgtcgtcaaaaaggcgtatcagaactgtgtacattcatcatatcatgg  gaaagggtccagacgcttgcactgctgcatctggcaatgtggatttgg  atgactgcactttgaacaataaatgatttaaatcaggATGGCTGCC  GATGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC  CTCTCTGAGGGCATTCGCGAGTGGTGGGACTTG  AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA  GCAAAAGCAGGACGACGCGCCGGGGTCTGGTGC  TTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTCAACG  GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGGC  GATGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTA  CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT  ACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTTC  AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGG  GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAA  GAAGAGGGTTCCTGAACCTTTTGGTCTGGTTGA  GGAAGGTGCTAAGACGGCTCCTGGAAAAGAAAC  GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC  TCCTCCTCGGGCATTGGCAAGACAGGCCAGCA  GCCCCGTA AAAAGAGACTCAATTTTGGTCAGA  CTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCGACCCACAA  CCTCTCGGAGAACCTCCAGCAACCCCGCTGCT  GTGGGACCTACTACAATGGCTTCAGGCGGTGG  CGCACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCG  ACGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAAATTGGCAT  TGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCAT  CACCACCAGCACCCGAACATGGGCCTTGCCCA  CCTATAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCA  GTGCTTCAACGGGGGCCAGCAACGACAACCAC  TACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGTATTTT  GATTTCAACAGATTCCACTGCCATTCTCACCA  CGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTG  GGGATTCGGGCCAAGAGACTCAACTTCAAGC  TCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCACGACG  AATGATGGCGTCACGACCATCGCTAATAACCTT  ACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAG  TACCAGTTGCCGTACGTCTCGGGCTCTGCGCAC  CAGGGCTGCCTCCCTCCGTTCCCGGCGGACGTG  TTCATGATTCCGAGTACGGCTACCTAACGCTC  AACAAATGGCAGCCAGGACGTGGGACGGTCATC  CTTTACTGCCTGGAATATTTCCCATCGCAGAT  GCTGAGAACGGGAATAACTTTACCTTCAGCTA  CACCTTCGAGAACGTGCCTTTCCACAGCAGCTA  CGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCTGATGA  ATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACCTGA  ACAGA ACTCAGAATCAGTCCGGAAGTGCCCAA  AACAAAGACTTGCTGTTTAGCCGGGGTCTCCA  GCTGGCATGTCTGTTACGCCAAA AACTGGCTA  CCTGGACCCTGTTACCGGCAGCAGCGGTTTCT  AAAACAAAACAGACAACAACAACAGCAACTT  TACCTGGACTGGTGCTTCAA AATATAACCTTAA  TGGGCGTGAATCTATAATCAACCCTGGCACTGC</p>	<p>269 MAADGYLPDW  LEDNLSEGIREW  WDLKPGAPKPK  ANQQKQDDGRG  LVLPGYKYLGP  NGLDKGEPVNA  ADAAALEHDKA  YDQQLKAGDNP  YLRYNHADAEF  QERLQEDTSFGG  NLGRAVFQAKK  RVLEPFGLVEEG  AKTAPGKKRPV  EQSPQEPDSSSGI  GKTGQQPAKKR  LNFQGTGDSSEV  PDPQPLGEPAT  PAAVGPTTMS  GGGAPMADNNE  GADGVGNASGN  WHCDSTWLGDR  VITSTRTWALP  TYNNHLYKQISS  ASTGASNDNHY  FGYSTPWGYFDF  NRFHCHFSPRD  WQRLINNNWGF  RPKRLNFKLFNI  QVKEVTTNDGV  TTIANLSTVQ  VFSDEYQLPYV  LGSAHQCLPPF  PADVFMIPQYGY  LTLNNGSQAVG  RSSFYCLEYFPS  QMLRTGNNTFS  YTFENVPFHSSY  AHSQSLDRLMN  PLIDQYLYLNR  TQNQSGSAQNK  DLLFSRGSAGM  SVQPKNWLPGP  CYRQQRVSKTK  TDNNNSNFTWT  GASKYNLNGRE  SIINPGTAMASH  KDDKDKFFPMS  GVMIFGKESAG  ASNTALDNVMIT  DEEEKATNPVA  TERFGTVAVNL  QSSSTDPATGDV  HVMGALPGMV  WQDRDVYLGQP</p>
---	-------	--	--

10

20

30

40

【 0 1 5 6】

【表 1 - 4 - 1】

	<p>TATGGCCTCACAAAAGACGACAAAAGACAAGT  TCTTTCCCATGAGCGGTGTATGATTTTTGGAA  AGGAGAGCGCCGGAGCTTCAAACACTGCATT</p>	<p>IWAKIPHTDGHF  HPSPLMGGFGLK  HPPPQILIKNTPV  PANPPAEFSATK  FASFITQYSTGQ  VSVEIEWELQK</p>
--	--	---

50

【 0 1 5 7 】

【 表 1 - 5 】

		GGACAATGTCATGATCACAGACGAAGAGGAAA TCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCACCGAAAGA TTTGGGACTGTGGCAGTCAATCTCCAGAGCAGC AGCACAGACCCTGCGACCGGAGATGTGCATGT TATGGGAGCCTTACCTGGAATGGTGTGGCAAG ACAGAGACGTATACCTGCAGGGTCTATTGG GCCAAAATTCTCACACGGATGGACACTTTCAC CCGTCTCTCATGGGCGGCTTTGGACTTAAG CACCCGCTCCTCAGATCCTCATAAAAACACG CCTGTTCTGCGAATCCTCCGGCAGAGTTTCG GCTACAAAGTTTGCTTCATTCATCACCCAGTAT TCCACAGGACAAGTGAGCGTGGAGATTGAATG GGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAACGCTGG AATCCCGAAGTGCAGTATACATCTAACTATGCA AAATCTGCCAACGTTGATTTCACTGTGGACAAC AATGGACTTTATACTGAGCCTCGCCCCATTGGC ACCCGTTACCTCACCCGTCCCCTGTAAAttgtgttaat caataaacgggt		ENSKRWNPEVQ YTSNYAKSANY DFTVDNNGLYT EPRPIGTRYLRP L	10
4	L584N	ggtaccaaaacaatgttctcgtcagctgggcatgaatctgatgctttcc ctgcagacaatcgagagaatgaatcagaattcaatatctgcttcaetca cggacagaaaagactggttagagtctttcccgctcagaatcacaaccggt tctcgtcaaaaaggcgtatcagaactgtgetacattcatatcatatg gaaagggtccagacgcttgcactgcctcagatctggcaatgtggattgg atgaetcatctttgaacaataatgatataaacaggATGGCTGCC GATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC CTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGGACTTG AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA GCAAAAGCAGGACGACGCGCCGGGGTCTGGTGC TTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTCAACG GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGGC GATGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTA CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT ACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTT AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGG GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAA GAAGAGGGTTCTCGAACCTTTTGGTCTGGTTGA GGAAGGTGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAAC GTCCGGTAGAGCAGTCCGCCACAAGAGCCAGAC TCTCTCTCGGGCATTGGCAAGACAGGCCAGCA GCCCCGTA AAAAGAGACTCAATTTTGGTCAGA CTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCACAA CCTCTCGGAGAACCTCCAGCAACCCCGCTGCT GTGGGACCTACTACAATGGCTTCAGGCGGTGG CGCACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCG ACGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAAATTGGCAT TGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCAT CACCACCAGCACCCGAACATGGGCCTTGCCCA CCTATAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCA GTGCTTCAACGGGGGCCAGCAACGACAACCAC TACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTT GATTTCAACAGATTCCACTGCCATTTCTACCA CGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTG GGGATTCGGCCCAAGAGACTCAACTTCAAGC TCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCACGACG	270	MAADGYLPDW LEDNLSEGIREW WDLKPGAPKPK ANQKQKDDGRG LVLPGYKYLGP NGLDKGEPVNA ADAAALEHDKA YDQLKAGDNP YLRYNHADAEF QERLQEDTSFGG NLGRAVFQAKK RVLEPFGLVEEG AKTAPGKKRPV EQSPQEPDSSSGI GKTGQQPAKKR LNFQGTGDSSEV PDPQPLGEPAT PAAVGPPTMAS GGGAPMADNNE GADGVGNASGN WHCDSTWLGDR VIITSTRTWALP TYNNHLYKQISS ASTGASNDNHY FGYSTPWGYFDF NRFHCHFSPRD WQRLINNNWGF RPKRLNFKLFNI QVKEVTTNDGV TTIANNLTSTVQ VFSDEYQLPYV LGS AHQGC LPPF PADVFMIPQYGY LTLNNGSQAVG RSSFYCLEYFPS QMLRTGNNTFS	20 30 40

【 0 1 5 8 】

【表 1 - 5 - 1】

		AATGATGGCGTCACGACCATCGCTAATAACCTT ACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAG TACCAGTTGCCGTACGTCCTCGGCTCTG	YTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMN PLIDQYLYLNR TQNQSGSAQNK DLLFSRGSPAGM SVQPKNWLPG
--	--	--	---

【 0 1 5 9 】

【表 1 - 6】

	<p>CGCACCAGGGCTGCCCTCCCTCCGTTCCCGGCGG  ACGTGTTTCATGATTCCCGCAGTACGGCTACCTAA  CGCTCAACAATGGCAGCCAGGCAGTGGGACGG  TCATCCTTTTACTGCTGGAATATTTCCCATCGC  AGATGCTGAGAACGGGCAATAACTTTACCTTC  AGCTACACCTTCGAGGACGTGCCTTTCCACAGC  AGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCT  GATGAATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTA  CCTGAACAGAACTCAGAATCAGTCCGGAAGTG  CCAAAACAAGGACTTGCTGTTTAGCCGGGGG  TCTCCAGCTGGCATGTCTGTTACGCCAAAAAAC  TGGTACCTGGACCCTGTTACCGGCAGCAGCGC  GTTTCTAAAACAAAAACAGACAACAACAACAG  CAACTTTACCTGGACTGGTGTCTCAAATATAA  CCTAATGGGCGTGAATCTATAATCAACCCTGG  CACTGCTATGGCCTCACACAAAGACGACAAAG  ACAAGTTCTTTCCCATGAGCGGTGTCATGATTT  TTGGAAAGGAGAGCGCCGAGCTTCAAACACT  GCATTGGACAATGTCATGATCACAGACGAAGA  GGAAATCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCACCG  AAAGATTTGGGACTGTGGCAGTCAATAACCAG  AGCAGCAGCACAGACCCTGCGACCGGAGATGT  GCATGTTATGGGAGCCTTACCTGGAATGTTGT  GCAAGACAGAGACGTATACCTGCAGGGTCTTA  TTTGGGCCAAAATTCCTCACACGGATGGACT  TTCACCCGTCTCCTCTCATGGGCGGCTTTGGAC  TTAAGCACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAA  ACACGCCTGTTCCCTGCGAATCCTCCGGCAGAGT  TTTCGGCTACAAAGTTTGCTTCATTCATCACCC  AGTATTCACAGGACAAGTGAGCGTGGAGATT  GAATGGGAGCTGCAGAAAAGAAAACAGCAAAC  GCTGGAATCCCGAAGTGCAGTATACATCTAACT  ATGCAAAATCTGCCAACGTTGATTTCACTGTGG  ACAACAATGGACTTTATACTGAGCCTCGCCCA  TTGGCACCCGTTACCTCACCCGTCCTGTAAttg  tgtgtaatacaataaacggg</p>		<p>PCYRQQRVSKT  KTDNNSNFTW  TGASKYNLNGR  ESIINPGTAMAS  HKDDKDKFFPM  SGVMIFGKESAG  ASNTALDNVMIT  DEEEKATNPVA  TERFGTVAVNN  QSSSTD PATGDV  HVMGALPGMV  WQDRDVYLGPF  IWAKIPHTDGHF  HPSPLMGGFGLK  HPPPQILIKNTPV  PANPPAEFSATK  FASFITQYSTGQ  VSVEIEWELQKE  NSKRWNPEVQY  TSNYAKSANVD  FTVDNNGLYTEP  RPIGTRYLTRPL</p>
5	L584H	271	<p>MAADGYLPDW  LEDNLSEGIREW  WDLKPGAPKPK  ANQQKQDDGRG  LVLPGYKYLGPF  NGLDKGEPVNA  ADAAALEHDKA  YDQQLKAGDNP  YLRYNHADAEF  QERLQEDTSFGG  NLGRAVFQAKK  RVLEPFGLVEEG  AKTAPGKKRPV  EQSPQEPDSSSGI  GKTGQQPAKKR  LNFQQTGDSSEV  PDPQLGEPAT  PAAVGPTMAS</p>

【表 1 - 6 - 1】

		GGAAGGTGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAAC GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC TCCTCCTCGGGCATTGGC		GGGAPMADNNE GADGVGNASGN WHCDSTWLGDR VITSTRTWALP TYNNHLYKQISS ASTGASNDNHY
--	--	--	--	---

【 0 1 6 1 】

【表 1 - 7】

5	L584H	<p>AAGACAGGCCAGCAGCCCGCTAAAAAGAGACT  CAATTTTGGTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGT  CCCCGACCCACAACCTCTCGGAGAACCCTCCAG  CAACCCCGCTGCTGTGGGACCTACTACAATG  GCTTCAGGCGGTGGCGACCAATGGCAGACAA  TAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAATGCCT  CAGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTG  GGCGACAGAGTCATACCACCAGCACCCGAAC  ATGGGCCTTGCCACCTATAACAACCACCTCTA  CAAGCAAACTCCAGTGCTTCAACGGGGGCCA  GCAACGACAACCACTACTTCGGGTACAGCACC  CCCTGGGGGTATTTGATTTCAACAGATTCCAC  TGCCATTTCTACCACGTGACTGGCAGCGACTC  ATCAACAACAATTGGGGATTCCGGCCCAAGAG  ACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTCAA  GGAGGTCACGACGAATGATGGCGTCACGACCA  TCGCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAAGTCT  TCTCGGACTCGGAGTACCAGTTGCCGTACGTCC  TCGGCTCTGCGCACCAGGGCTGCCTCCCTCCGT  TCCCGGCGGACGTGTTTCATGATTCCGCAGTACG  GCTACCTAACGCTCAACAATGGCAGCCAGGCA  GTGGGACGGTCATCCTTTTACTGCCTGGAATAT  TTCCCATCGCAGATGCTGAGAACGGGCAATAA  CTTTACCTTCAGCTACACCTTCGAGGACGTGCC  TTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCC  TGGACCGGCTGATGAATCCTCTCATCGACCAGT  ACCTGTATTACCTGAACAGAATCAGAATCAGT  CCGGAAGTGCCAAAACAAGGACTTGCTGTTT  AGCCGGGGGTCTCCAGCTGGCATGTCTGTTCAG  CCCAAAAACCTGGCTACCTGGACCCTGTTACCCG  CAGCAGCGCGTTTCTAAAACAAAACAGACAA  CAACAACAGCAACTTTACCTGGACTGGTGCTTC  AAAATATAACCTTAATGGGCGTGAATCTATAAT  CAACCCTGGCACTGCTATGGCCTCACACAAAG  ACGACAAAAGACAAGTTCTTTCCCATGAGCGGT  GTCATGATTTTTGGAAAGGAGAGCGCCGGAGC  TTCAAACACTGCATTGGACAATGTCATGATCAC  AGACGAAGAGGAAATCAAAGCCACTAACCCCG  TGGCCACCGAAAGATTTGGGACTGTGGCAGTC  AATCACCAGAGCAGCAGCACAGACCCTGCGAC  CGGAGATGTGCATGTTATGGGAGCCTTACCTGG  AATGGTGTGGCAAGACAGAGACGTATACCTGC  AGGGTCCTATTTGGGCCAAAATTCCTCACACGG  ATGGACACTTTACCCCGTCTCCTCTCATGGGCG  GCTTTGGACTTAAGCACCCGCTCCTCAGATCC  TCATCAAAAACACGCCTGTTCTGCGAATCCTC  CGGCAGAGTTTTCGGCTACAAAGTTTGCTTCAT  TCATCACCAGTATTCCACAGGACAAGTGAGC  GTGGAGATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAA  CAGCAAACGCTGGAATCCCGAAGTGAGTATA  CATCTAACTATGCAAAATCTGCCAACGTTGATT  TCAGTGTGGACAACAATGGACTTTATACTGAGC  CTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTC  CCCTGTAAttgtgttaataataaacgggt</p>	271	<p>FGYSTPWGYFDF  NRFHCHFSPRD  WQRLNNNWGF  RPKRLNFKLFNI  QVKEVTNDGV  TTIANNLTSTVQ  VFSDEYQLPYV  LGSAHQGCLPPF  PADVFMIPQYGY  LTLNNGSQAVG  RSSFYCLEYFPS  QMLRTGNNTFSS  YTFEDVPPFHSSY  AHSQSLDRLMN  PLIDQYLYLNR  TQNQSGSAQNK  DLLFSRGSFAGM  SVQPKNWLPGP  CYRQQRVSKTK  TDNNNSNFTWT  GASKYNLNGRE  SIINPGTAMASH  KDDKDKFFPMS  GVMIFGKESAG  ASNTALDNVMIT  DEEEIKATNPVA  TERFGTVAVNH  QSSSTDPATGDV  HVMGALPGMV  WQDRDVYLQGP  IWAKIPHTDGHF  HPSPLMGGFGLK  HPPPQILIKNTPV  PANPPAEFSATK  FASFITQYSTGQ  VSVEIEWELQKE  NSKRWNPEVQY  TSNYAKSANVD  FTVDNNGLYTEP  RPIGTRYLTRPL</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
---	-------	--	-----	---	---

【表 1 - 8】

6	L584D	<p>ggtacaaaacaaatgtctctcactggtggcgaatctgatgctgttcc  ctgcagacaatgegagagaatgaatcagaatcaaatatctctcactca  eggacagaaagactgtttagagtgttcccgtgcagaatcacaaccgtt  tetgtctcaaaaaggcgtatcagaaactgtctacattcatatcatgg  gaaagggtccagacgttgcactgcctgcatctggtaaatgtggattgg  atgactgcatctttgaacaataaigatttaaatcaggATGGCTGCC  GATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC  CTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGGACTTG  AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA  GCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGTCTGGTGC  TTCCTGGTACAAGTACCTCGGACCCCTTCAACG  GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCG  GATGCAGCGGCCCTCGAGCAGACAAGGCCTA  CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT  ACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTT  AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTGGG  GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAA  GAAGAGGGTTCTCGAACCTTTTGGTCTGGTTGA  GGAAGGTGCTAAGACGGCTCTGGAAAGAAAC  GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC  TCTCTCGGGCATTGGCAAGACAGGCCAGCA  GCCCCGTA AAAAGAGACTCAATTTGGTCAGA  CTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCACAA  CCTCTCGGAGAACCTCCAGCAACCCCGCTGCT  GTGGGACCTACTACAATGGCTTCAAGCGGTGG  CGCACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCG  ACGGAGTGGTAATGCCTCAGGAAATTGGCAT  TGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCAT  CACCACCAGCACCCGAACATGGGCCTTGCCCA  CCTATAACAACCACCTTACAAGCAAATCTCCA  GTGCTTCAACGGGGGCCAGCAACGACAACCAC  TACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGTATTTT  GATTTCAACAGATTCCACTGCCATTTCTCACCA  CGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTG  GGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAACTTCAAGC  TCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCACGACG  AATGATGGCGTCACGACCATCGCTAATAACCTT  ACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAG  TACCAGTTGCCGTACGTCCTCGGCTCTGCGCAC  CAGGGCTGCCTCCCTCCGTTCCCGGCGGACGTG  TTCATGATTCCGCGAGTACGGCTACCTAACGCTC  ACAATGGCAGCCAGGCAGTGGGACGGTCATC  CTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCATCGCAGAT  GCTGAGAACGGGCAATAACTTTACCTTCAGCTA  CACCTTCGAGGACGTGCCTTTCCACAGCAGCTA  CGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCTGATGA  ATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACCTGA  ACAGA ACTCAGAATCAGTCCGGAAGTGCCCAA  ACAAGGACTTGCTGTTTAGCCGGGGTCTCCA  GCTGGCATGTCTGTTAGCCCAAAAAGTGGCTA  CCTGGACCCTGTTACCGGCAGCAGCGGCTTTCT  AAAACAAAACAGACAACAACAACAGCAACTT  TACCTGGACTGGTGTCTCAAATATAACCTTAA  TGGCGTGAATCTATAATCAACCCTGGCACTGC</p>	272	<p>MAADGYLPDW  LEDNLSEGIREW  WDLKPGAPKPK  ANQKQDDGRG  LVLPKYKYLGP  NLGDKGEPVNA  ADAAALEHDKA  YDQQLKAGDNP  YLRYNHADAEF  QERLQEDTSF  NLGRAVFQAKK  RVLEPFGLVEE  AK7APGKKRPV  EQSPQEPDSSSI  GKTGQOPAKKR  LNFQGTGDSSEV  PDPQPLGEPAT  PAAVGPPTMAS  GGGAPMADNNE  GADGVGNASGN  WHCDSTWLGDR  VITSTRTWALP  TYNNHLYKQISS  ASTGASNDNHY  FGYSTPWGYFDF  NRFHCHFSPRD  WQRLINNNWGF  RPKRLNFKLFNI  QVKEVTINDGV  TTIANNLTSTVQ  VFSDSEYQLPYV  LGSAHQGLPPF  PADVFMIPQYGY  LTLNNGSQA  RSSFYCLEYFSP  QMLRTGNNTFS  YTFEDVPFHSSY  AHSQSLDRLMN  PLIDQYLYLNR  TQNQSGSAQNK  DLLFSRGS  SVQPKNWLP  CYRQQRVSKTK  TDNNNSNFTWT  GASKYNLNGRE  SIINPGTAMASH  KDDKDKFFPMS  GVMIFGKESAG  ASNTALDNVMIT  DEEIKATNPVA  TERFGTVAVND  QSSSTDPATGDV  HVMGALPGMV  WQDRDVYLQGP</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
---	-------	--	-----	--	---

【表 1 - 8 - 1】

		TATGGCCTCACACAAAGACGACAAAGACAAGT TCITTCCCATGAGCGGTGCATGATTTTGGAA AGGAGAGCGCCGGAGCTTCAAACACTGCATT		IWAKIPHTDGHF HPSPLMGGFGLK HPPQILIKNTPV PANPPAEFSATK FASFITQYSTGQ VSVEIEWELQK
--	--	--	--	---

【 0 1 6 4 】

【表 1 - 9】

		GGACAATGTCATGATCACAGACGAAGAGGAAA TCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCACCGAAAAGA TTTGGGACTGTGGCAGTCAATGACCAGAGCAG CAGCACAGACCCTGCGACCCGGAGATGTGCATG TTATGGGAGCCTTACCTGGAATGGTGTGGCAA GACAGAGACGTATACCTGCAGGGTCCTATTTG GGCCAAAATTCCCTCACACGGATGGACACTTCA CCCGTCTCCTCTCATGGGCGGCTTTGGACTTAA GCACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACAC GCCTGTTCCCTGCGAATCCTCCGGCAGAGTTTT GGCTACAAAGTTTGCTTCATTCATCACCCAGTA TTCCACAGGACAAGTGAGCGTGGAGATTGAAT GGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAACGCTG GAATCCCGAAGTGCAGTATACATCTAACTATGC AAAATCTGCCAACGTTGATTTCACTGTGGACAA CAATGGACTTTATACTGAGCCTCGCCCCATTGG CACCCGTTACCTCACCCGTCCTGTAATTGTG TGTTAATCAATAA[ACCGGT]		ENSKRWNPEVQ YTSNYAKSANV DFTVDNNGLYT EPRPIGTRYLTRP L		10		
7	V598L	ggtacaaaacaaatgttctcgtcactgggcatgaatctgatctgttcc ctgcagacaatcgagagaatgaatcagaatcaaatatctgttctactca cggacagaaagactgttagagtgcttcccggtcagaatcacaaccggt tetgtcgtcaaaaaggcgtatcagaaactgtctacattcatatcatatgg gaaaggtgccagacgcttgcactgctgcgatctggcaatgtggattgg atgactgcactttgaacaataaatgalltaaatcaggATGGCTGCC GATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC CTCTCTGAGGGCATTGCGGAGTGGTGGGACTTG AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA GCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGTCTGGTGC TTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACG GACTCGACAAGGGGAGCCCGTCAACGCGGCG GATGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTA CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT ACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTT AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTGGG GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAA GAAGAGGGTTCTCGAACCTTTTGGTCTGGTTGA GGAAGGTGCTAAGACGGCTCTGGAAAGAAAC GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC TCCTCCTCGGGCATTGGCAAGACAGGCCAGCA GCCCGCTAAAAGAGACTCAATTTTGGTCAGA CTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCACAA CCTCTCGGAGAACCTCCAGCAACCCCGCTGCT GTGGGACCTACTACAATGGCTTCAGGCGGTGG CGACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCG ACGGAGTGGGTAATGCCCTCAGGAAATTGGCAT TGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGATCAT CACCACCAGCACCCGAACATGGGCCTTGCCCA CCTATAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCA GTGCTTCAACGGGGGCCAGCAACGACAACCAC TACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTT GATTTCAACAGATTCCACTGCCATTTCTACCA CGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTG GGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAACTTCAAGC TCTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCACGACG	273	MAADGYLPDW LEDNLSEGIREW WDLKPGAPKPK ANQQKQDDGRG LVLPGYKYLGP NGLDKGEPVNA ADAAALEHDKA YDQQLKAGDNP YLRYNHADAEF QERLQEDTSFGG NLGRAVFQAKK RVLEPFGLVEEG AK7APGKKRPV EQSPQEPDSSSI GKTGQQPAKKR LNFQGTGDSSEV PDPQQLGEPAT PAAVGPTTMMAS GGGAPMADNNE GADGVGNASGN WHCDSTWLGDR VITSTRTWALP TYNNHLYKQISS ASTGASNDNHY FGYSTPWGYFDF NRFHCHFSRDR WQRLNNNWGF RPKRLNFKLFNI QVKEVTTNDGV TTIANLSTVQ VFSSEYQLPYV LGSAHQGLPPF PADVFMIPQYGY LTLNNGSQAVG RSSFYCLEYFPS QMLRTGNNTFS		20	30	40

【 0 1 6 5】

【表 1 - 9 - 1】

		AATGATGGCGTCACGACCATCGTAATAACCTT ACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAG TACCAGTTGCCGTACGTCCTCGGCTCTG		YTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMN PLIDQYLYLNR TQNQSGSAQNK DLLFSRGSFAGM SVQPKNWLP		50
--	--	---	--	--	--	----

【 0 1 6 6 】

【 表 1 - 1 0 】

		<p>CGCACCAGGGCTGCCTCCCTCCGTTCCCGGCGG  ACGTGTTTCATGATTCCGCAGTACGGCTACCTAA  CGCTCAACAATGGCAGCCAGGCAGTGGGACGG  TCATCCTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCATCGC  AGATGCTGAGAACGGGCAATAACTTTACCTTC  AGCTACACCTTCGAGGACGTGCCTTTCCACAGC  AGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCT  GATGAATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTA  CCTGAACAGAACTCAGAATCAGTCCGGAAGTG  CCCAAAAACAAGGACTTGCTGTTTAGCCGGGGG  TCTCCAGCTGGCATGTCTGTTACGCCAAAAAC  TGGCTACCTGGACCCTGTTACCGGCAGCAGCGC  GTTTCTAAAACAAAAACAGACAACAACAACAG  CAACTTTACCTGGACTGGTGCTTCAAATATAA  CCTTAATGGGCGTGAATCTATAATCAACCCTGG  CACTGCTATGGCCTCACACAAGACGACAAAAG  ACAAGTTCTTTCCCATGAGCGGTGTCATGATT  TTGGAAAGGAGAGCGCCGGAGCTTCAAACACT  GCATTGGACAATGTCATGATCACAGACGAAGA  GGAAATCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCACCG  AAAGATTTGGGACTGTGGCAGTCAATCTCCAG  AGCAGCAGCACAGACCCTGCGACCGGAGATGT  GCATCTTATGGGAGCCTTACCTGGAATGGTGTG  GCAAGACAGAGACGTATACCTGCAGGGTCTTA  TTTGGGCCAAAATTCTCACACGGATGGACACT  TTCACCCGTCTCCTCTCATGGGCGGCTTTGGAC  TTAAGCACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAA  ACACGCCTGTTCCCTGCGAATCCTCCGGCAGAGT  TTTCGGCTACAAAGTTTGCTTCAATCATCACC  AGTATTCCACAGGACAAGTGAGCGTGGAGATT  GAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAAC  GCTGGAATCCCGAAGTGCAAGTATACATCTAACT  ATGCAAAATCTGCCAACGTTGATTTCACTGTGG  ACAACAATGGACTTTATACTGAGCCTCGCCCCA  TTGGCACCCGTTACCTCACCCGTCCCCTGTAAtg  tggtaatcaataaacgggt</p>	<p>PCYRQQRVSKT  KTDNNSNFNTW  TGASKYNLNGR  ESIINPGTAMAS  HKDDKDKFFPM  SGVMIFGKESAG  ASNTALDNVMT  DEEEIKATNPVA  TERFGTVAVNL  QSSSTDPATGDV  HLMGALPGMV  WQDRDVYLQGP  IWAKIPHTDGHF  HPSPLMGGFGLK  HPPQILKNTPV  PANPPAEFSATK  FASFITQYSTGQ  VSVEIEWELQKE  NSKRWNPEVQY  TSNYAKSANVD  FTVDNNGLYTEP  RPIGTRYLTRPL</p>	10	
8	V598I	<p>ggfaccaaaacaatggtctcgteactggtggcatgaatctgatgctgtttcc  ctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaaatatctgcttcaactca  cggacagaagactggttagagtggttccggtgacagaatctcaaccggt  tctgctcaaaaagcggtacagaactggetacattcaccatcatatcatgg  gaaagggtccagacgctgactgctgcatctggcaatgtgattgg  atgactgcatcttgacaataatgatgtaaatcagggtATGGCTGCC  GATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC  CTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGGACTTG  AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA  GCAAAAAGCAGGACGACGCGCGGGGTCTGGTGC  TTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACG  GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCG  GATGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCTTA  CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGAACAATCCGT  ACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTTC  AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGG  GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAA  GAAGAGGGTCTCGAACCTTTTGGTCTGGTGA</p>	274	<p>MAADGYLPDW  LEDNLSEGIREW  WDLKPGAPKPK  ANQKQDDGRG  LVLPGYKYLGP  NGLDKGEPVNA  ADAAALEHDKA  YDQLKAGDNP  YLRYNHADAEF  QERLQEDTSFGG  NLGRAVFQAKK  RVLEPFGLVEEG  AKTAPGKKRPV  EQSPQEPDSSSI  GKTGQQPAKCR  LNFQGTGDSSEV  PDPQPLGEPAT  PAAVGPTTMS</p>	40

【 0 1 6 7 】

【表 1 - 1 0 - 1】

GGAAGGTGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAAC GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGGCCAGAC TCCTCCTCGGGCATTGGC	GGGAPMADNNE GADGVGNASGN WHCDSTWLGDR VITSTRTWALP TYNNHLYKQISS ASTGASNDNHY
---	---

【 0 1 6 8 】

【表 1 - 1 1】

AAGACAGGCCAGCAGCCCGCTAAAAAGAGACT CAATTTTGGTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGT CCCCGACCCACAACCTCTCGGAGAACCTCCAG CAACCCCGCTGCTGTGGGACCTACTACAATG GCTTCAGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAA TAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAATGCCT CAGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTG GGCGACAGAGTCATACCACCAGCACCCGAAC ATGGGCCTTGCCACCTATAACAACCACCTCTA CAAGCAAATCTCCAGTGCTTCAACGGGGGCCA GCAACGACAACCACTACTTCGGCTACAGCACC CCCTGGGGGTATTTTGATTTCAACAGATTCCAC TGCCATTTCTACCACGTGACTGGCAGCGACTC ATCAACAACAATTGGGGATTCCGGCCCAAGAG ACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTCAA GGAGGTCACGACGAATGATGGCGTCACGACCA TCGCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAAGTCT TCTCGGACTCGGAGTACCAGTTGCCGTACGTCC TCGGCTCTGCGCACCAGGGCTGCCTCCCTCCGT TCCCGGCGGACGTGTTTCATGATTCCGCAGTACG GCTACCTAACGCTCAACAATGGCAGCCAGGCA GTGGGACGGTCATCCTTTTACTGCCTGGAATAT TTCCCATCGCAGATGCTGAGAACGGGCAATAA CTTTACCTTCAGCTACACCTTCGAGGACGTGCC TTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCC TGGACCGGTGATGAATCCTCTCATCGACCACT ACCTGTATTACCTGAACAGAATCAGAATCAGT CCGGAAGTGCCAAAACAAGGACTTGCTGTTT AGCCGGGGGTCTCCAGCTGGCATGTCTGTTTCA CCCCAAAACCTGGCTACCTGGACCCTGTTACCGG CAGCAGCGCGTTTCTAAAACAAAACAGACAA CAACAACAGCAACTTTACCTGGACTGGTGCTTC AAAATATAACCTTAATGGGCGTGAATCTATAAT CAACCCTGGCACTGCTATGGCCTCACACAAAG ACGACAAAGACAAGTTCCTTCCCATGAGCGGT GTCATGATTTTGGAAAGGAGAGCGCCGGAGC TTCAAACACTGCATTGGACAATGTCATGATCAC AGACGAAGAGGAAATCAAAGCCACTAACCCCG TGGCCACCGAAAAGATTTGGGACTGTGGCAGTC AATCTCCAGAGCAGCAGCACAGACCCTGCGAC CGGAGATGTGCATATTATGGGAGCCTTACCTGG AATGGTGTGGCAAGACAGAGACGTATACCTGC AGGGTCCTATTTGGGCCAAAATTCCTCACACGG ATGGACACTTTCACCCGTCTCCTCTCATGGGCG GCTTTGGACTTAAGCACCCGCCTCCTCAGATCC TCATCAAAAACACGCCTGTTCTGCGAATCCTC CGGCAGAGTTTTCGGCTACAAAGTTTGCTTCAT TCATCACCCAGTATCCACAGGACAAGTGAGC GTGGAGATTGAATGGGAGCTGCAGAAAAGAAAA CAGCAAACGCTGGAATCCCGAAGTGCAGTATA CATCTAACTATGCAAATCTGCCAACGTTGATT TCACTGTGGACAACAATGGACTTTATACTGAGC CTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTC CCCTGTAAAtgtgttaataataaccggt	FGYSTPWGYFDF NRFHCHFSPRD WQRLINNNWGF RPKRLNFKLFNI QVKEVTTNDGV TTIANNLTSTVQ VFSDSEYQLPYV LGSAHQGCLPPF PADVFMIPQYGY LTLNNGSQAVG RSSFYCLEYFPS QMLRTGNNFTFS YTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMN PLIDQYLYLNR TQNQSGSAQNK DLLFSRGSFAGM SVQPKNWLPGP CYRQQRVSKTK TDNNNSNFTWT GASKYNLNGRE SIINPGTAMASH KDDKDKFFPMS GVMIFGKESAG ASNTALDNVMIT DEEIKATNPVA TERFGTVAVNL QSSSTDPATGDV HIMGALPGMVW QDRDVYLQGI WAKIPHTDGHF HPSPLMGGFGLK HPPPQILKNTPV PANPPAEFSATK FASFITQYSTGQ VSVEIEWELQKE NSKRWNPEVQY TSNYAKSANVD FTVDNNGLYTEP RPIGTRYLTRPL
--	---

10

20

30

40

50

【 0 1 6 9 】

【 表 1 - 1 2 】

9	H642N	<p>ggtacaaaacaaatgttctegtcacgtgggcatgaatctgatgctgtttec  ctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaaatatctgcttcaactca  cggacagaaagactgttagagtgcttcccggtgcagaatcacaaccggt  tctgtctcaaaaaggcgtatcagaaactgtgctacattcatatcatatcg  gaaagggtgccagacgcttgcactgcctgcgatcggtaatgtggattgg  atgactgcatctttgaacaataatgatttaaatcagggtATGGCTGCC  GATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC  CTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGGACTTG  AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA  GCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGTCTGGTGC  TTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTTCAACG  GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCG  GATGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTA  CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT  ACCTGCGGTATAACCACGCGGACGCCGAGTTTC  AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGG  GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAA  GAAGAGGGTCTCGAACCTTTTGGTCTGGTTGA  GGAAGGTGCTAAGACGGCTCCTGGAAGAAAC  GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC  TCCTCCTCGGGCATTGGCAAGACAGGCCAGCA  GCCCCGCTAAAAAGAGACTCAATTTTGGTCAGA  CTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCACAA  CCTCTCGGAGAACCTCCAGCAACCCCGCTGCT  GTGGGACCTACTACAATGGCTTCAGGCGGTGG  CGCACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCG  ACGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAAATTGGCAT  TGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCAT  CACCACCAGCACCCGAACATGGGCCTTGCCCA  CCTATAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCA  GTGCTTCAACGGGGGCCAGCAACGACAACCAC  TACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTT  GATTTCAACAGATTCCAATGCCATTTCTACCA  CGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTG  GGGATTCCGGCCCCAAGAGACTCAACTTCAAGC  TCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCACGACG  AATGATGGCGTACGACCATCGCTAATAACCTT  ACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAG  TACCAGTTGCCGTACGTCTCGGCTCTGCGCAC  CAGGGCTGCCTCCCTCCGTTCCCGGCGGACGTG  TTCATGATCCGCAGTACGGCTACCTAACGCTC  ACAATGGCAGCCAGGCAGTGGGACGGTCATC  CTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCATCGCAGAT  GCTGAGAACGGGCAATAACTTTACCTTCAGCTA  CACCTTCGAGGACGTGCCTTTCCACAGCAGCTA  CGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCTGATGA  ATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACCTGA  ACAGAACTCAGAATCAGTCCGGAAGTGCCCAA  AACAAGGACTTGCTGTTAGCCGGGGGTCTCCA  GCTGGCATGTCTGTTAGCCCAAAAAGTGGCTA  CCTGGACCCTGTTACCGGACGACGCGGTTTCT  AAAACAAAACAGACAACAACAACAGCAACTT  TACCTGGACTGGTGTCTCAAATATAACCTTAA  TGGGCGTGAATCTATAATCAACCCTGGCACTGC</p>	<p>275 MAADGYLPDW  LEDNLSEGIREW  WDLKPGAPKPK  ANQQKQDDGRG  LVLPGYKYLGPF  NGLDKGEPVNA  ADAAALEHDKA  YDQQLKAGDNP  YLRYNHADAEF  QERLQEDTSFGG  NLGRAVFQAKK  RVLEPFGLVEEG  AKTAPGKKRPV  EQSPQEPDSSSGI  GKTGQQPAKKR  LNFGQTGDSSEV  PDPQPLGEPAT  PAAVGPPTMAS  GGGAPMADNNE  GADGVGNASGN  WHCDSTWLGDR  VITSTRTWALP  TYNNHLYKQISS  ASTGASNDNHY  FGYSTPWGYDF  NRFHCHFSPRD  WQRLINNNWGF  RPKRLNFKLFNI  QVKEVTTNDGV  TTIANNLSTVQ  VFSDESQYLPYV  LGSAHQGCPLPF  PADVFMIPQYGY  LTLNNGSQAVG  RSSFYCLESYFPS  QMLRTGNFTFS  YTFEDVPFHSSY  AHSQSLDRLMN  PLIDQYLYLNR  TQNQSGSAQNK  DLLFSRGSAGM  SVQPKNWLPGP  CYRQQRVSKTK  TDNNSNFTWT  GASKYNLNGRE  SIINPGTAMASH  KDDKDKFFPMS  GVMIFGKESAG  ASNTALDNVMIT  DEEEKATNPVA  TERFGTVAVNL  QSSSTDPATGDV  HVMGALPGMV  WQDRDVYLOGP</p>
---	-------	--	--

10

20

30

40

【 0 1 7 0 】

【表 1 - 1 2 - 1】

		TATGGCCTCACACAAAGACGACAAAGACAAGT TCTTCCCATGAGCGGTGTCATGATTTTGGAA AGGAGAGCGCCGGAGCTTCAAACACTGCATT		IWAKIPHTDGHF HPSPLMGGFGLK NPPQILKNTPV PANPPAEFSATK FASFITQYSTGQ VSVEIEWELQK
--	--	--	--	--

【 0 1 7 1 】

【表 1 - 1 3】

		GGACAATGTCATGATCACAGACGAAGAGGAAA TCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCACCGAAAAGA TTTGGGACTGTGGCAGTCAATCTCCAGAGCAGC AGCACAGACCCTGCGACCCGGAGATGTGCATGT TATGGGAGCCTTACCTGGAATGGTGTGGCAAAG ACAGAGACGTATACCTGCAGGGTCCTATTTGG GCCAAAATTCCTCACACGGATGGACACTTTCAC CCGTCTCTCTCATGGGCGGCTTTGGACTTAAG AACCCGCCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACG CCTGTTCTGCGAATCCTCCGGCAGAGTTTTCG GCTACAAAGTTTGCTTCATTCATCACCCAGTAT TCCACAGGACAAGTGAGCGTGGAGATTGAATG GGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAACGCTGG AATCCCGAAGTGCAGTATACATCTAACTATGCA AAATCTGCCAACGTTGATTTCACTGTGGACAAC AATGGACTTTATACTGAGCCTCGCCCCATTGGC ACCCGTTACCTCACCCGTCCCCTGTAAAttgtgtgtaat caataaacggg		ENSKRWNPEVQ YTSNYAKSANV DFTVDNNGLYT EPRPIGTRYLTRP L	
10	F129L お よび H642N	ggfaccaaaacaaatgtctctcgtcaegtgggcatgaatctgatgctgtttcc ctcagacaatgegagagaatgaatcagaatcaaatatctgctcactca cggacagaaagactgttagaggtcttcccggtcagaatcaaccgg ctctctcgtcaaaaagcgctatcagaaactgtctcattcatcatatcatgg gaaaggtgccagacgcttgcactgectgcgatctggtaatgtggattgg atgactgcatcttgaacaataatgalltaaatcaggtATGGCTGCC GATGGTTATCTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC CTCTCTGAGGGCATTCCGAGTGGTGGGACTTG AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA GCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGTCTGGTGC TTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACG GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCG GATGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTA CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT ACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTTC AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGG GGCAAACCTCGGGCAGCAGTCTTCCAGGCCAA GAAGAGGGTTCGAACCTTTAGGTCTGGTTGA GGAAGGTGCTAAGACGGCTCTCGAAAGAAAC GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC TCTCCTCGGGCATTGGCAAGACAGGCCAGCA GCCCCGCTAAAAGAGACTCAATTTTGGTCAGA CTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCACAA CCTCTCGGAGAACCTCCAGCAACCCCGCTGCT GTGGGACCTACTACAATGGCTTACAGGCGGTGG CGACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCG ACGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAAATTGGCAT TGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGATCAT CACCACCAGCACCCGAACATGGGCCCTTGCCCA CCTATAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCA GTGCTTCAACGGGGGCCAGCAACGACAACCAC TACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTT GATTCAACAGATTCCACTGCCATTTCTACCA CGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTG GGGATTCGGGCCAAGAGACTCAACTTCAAGC TCTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCACGACG	276	MAADGYLPDW LEDNLSEGIREW WDLKPGAPPK ANQQKQDDGRG LVLPGYKYLGP NGLDKGEPVNA ADAAALEHDKA YDQQLKAGDNP YLRYNHADA EFQERLQEDTS FSGGNLGRAV FQAKKRVLEPL GLVEEGAKTAP GKKRPV EQSPQEPD SSSGIGKTGQ QPAKKR LNFQGTG DSESVPDPQ LPPEPAT PAAVGP TTMAS GGGAPM ADNNEGADG VGNASGN WHCDST WLGDRTVIT STRTWAL PTYNNH LYKQISS ASTGAS NDNHY FGYSTP WGYFDF NRFHCH FSPRD WQRLIN NNWGF RPKRLN FKLFNI QVKEVT TNDGV TTIANN LSTVQ VFSDES YQLPYV LGSAHQ GCLPPF PADVFM IPQYGY LTLNNG SQAVG RSSFYC LEYFPS QMLRTG NNFTFS	10 20 30 40

【表 1 - 1 3 - 1】

	AATGATGGCGTCACGACCATCGCTAATAACCTT ACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAG TACCAGTTGCCGTACGTCCTCGGCTCTG	YTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMN PLIDQYLYLNR TQNQSGSAQNK DLLFSRGSFAGM SVQPKNWLPG
--	--	---

【 0 1 7 3 】

【表 1 - 1 4】

	CGCACCAGGGCTGCCTCCCTCCGTTCCCGGCGG ACGTGTTTCATGATTCGCGAGTACGGCTACCTAA CGCTCAACAATGGCAGCCAGGCAGTGGGACGG TCATCCTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCATCGC AGATGCTGAGAACGGGCAATAACTTTACCTTC AGCTACACCTTCGAGGACGTGCCTTCCACAGC AGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCT GATGAATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTA CCTGAACAGAACTCAGAATCAGTCCGGAAGTG CCCAAAACAAGGACTTGCTGTTTAGCCGGGGG TCTCCAGCTGGCATGTCTGTTTCAGCCAAAAAC TGGCTACCTGGACCCTGTTACCGGCAGCAGCGC GTTTCTAAAACAAAAACAGACAACAACAACAG CAACTTTACCTGGACTGGTGCTTCAAAATATAA CCTTAATGGGCGTGAATCTATAATCAACCCTGG CACTGCTATGGCCTCACACAAAAGACGACAAAAG ACAAGTTCTTTCCCATGAGCGGTGTCATGATTT TTGGAAGGAGAGCGCCGGAGCTTCAAACACT GCATTGGACAATGTCATGATCACAGACGAAGA GGAAATCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCACCG AAAGATTTGGGACTGTGGCAGTCAATCTCCAG AGCAGCAGCACAGACCCTGCGACCGGAGATGT GCATGTTATGGGAGCCTTACCTGGAATGGTGTG GCAAGACAGAGACGTATACCTGCAGGGTCTTA TTTGGGCCAAAATTCTCACACGGATGGACACT TTCACCCGTCTCCTCTCATGGGCGGCTTTGGAC TTAAGAACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAA ACACGCCTGTTCTCGCAATCCTCCGGCAGAGT TTTCGGCTACAAAAGTTTGCTTCATTTCATCACCC AGTATTCCACAGGACAAGTGAGCGTGGAGATT GAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAAC GCTGGAATCCCGAAGTGCAGTATACATCTAACT ATGCAAAAATCTGCCAACGTTGATTTCACTGTGG ACAACAATGGACTTTATACTGAGCCTCGCCCCA TTGGCACCCGTTACCTCACCCGTCCCCTGTAAtg tgtgtaataataaacccggt	PCYRQQRVSKT KTDNNNSNFTW TGASKYNLNGR ESIINPGTAMAS HKDDKDKFFPM SGVMIFGKESAG ASNTALDNVMIT DEEEIKATNPVA TERFGTVAVNL QSSSTDPATDV HVMGALPGMV WQDRDVYLQGP IWAKIPHTDGHF HPSPLMGGFGLK NPPPQILKNTPV PANPPAEFSATK FASFITQYSTGQ VSVEIEWELOKE NSKRWNANVQY TSNYAKSANVD FTVDNNGLYTEP RPIGTRYLTRPL
11	F129L お よび L584D  ggtaccaaaacaatgttctcgtcactggtgcatgaatctgatgctgttcc ctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaaatctgctcaetca eggacagaaagactgttagagtgcttccggtgcagaatcacaaccggt tctgctcaaaaaggcgtatcagaactgtctacattcatatcatggtg gaaagggtccagacgctgactgctgcatctggtcaatgtggatttgg atgactgcatcttgaacaataatgatttaaatcagggtATGGCTGCC GATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC CTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGGACTTG AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA GCAAAAAGCAGGACGACGCGCCGGGTCTGGTGC TTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTCAACG GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCG GATGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTA CGACCAGCAGTCAAAGCGGGTGACAATCCGT ACCTGCGGTATAACCACGCCGACCGCGAGTTTC AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGG GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAA GAAGAGGGTCTCGAACCTTTAGGTCTGGTTGA	277 MAADGYLPDW LEDNLSEGIREW WDLKPGAPKPK ANQQKQDDGRG LVLPGYKYLGPF NGLDKGEPVNA ADAAALEHDKA YDQQLKAGDNP YLRYNHADAEF QERLQEDTSFGG NLGRAVFAQK RVLEPLGLVEEG AKTAPGKRPV EQSPQEPDSSSI GKTGQPAKRR LNFGQTGDSSEV PDPQLGEPAT PAAVGPTMAS

10

20

30

40

50

【 0 1 7 4 】

【 表 1 - 1 4 - 1 】

		GGAAGGTGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAAC GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC TCCTCCTCGGGCATTGGC		GGGAPMADNNE GADGVGNASGN WHCDSTWLGDR VITTSTRTWALP TYNNHLYKQISS ASTGASNDNHY
--	--	--	--	--

【 0 1 7 5 】

【表 1 - 1 5】

	<p>AAGACAGGCCAGCAGCCCGCTAAAAAGAGACT  CAATTTTGGTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGT  CCCCGACCCACAACCTCTCGGAGAACCTCCAG  CAACCCCCGCTGCTGTGGGACCTACTACAATG  GCTTCAGGGCGGTGGCGCACCAATGGCAGACAA  TAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAATGCCT  CAGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTG  GGCGACAGAGTCATACCACCAGCACCCGAAC  ATGGGCCTTGCCACCTATAACAACCACTCTA  CAAGCAAACTCCAGTGTCTCAACGGGGGCCA  GCAACGACAACCACTACTTCGGCTACAGCACCC  CCCTGGGGGTATTTTGATTTCAACAGATTCCAC  TGCCATTTCTACCACGTGACTGGCAGCGACTC  ATCAACAACAATTGGGGATTCCGGCCCAAGAG  ACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTCAA  GGAGGTCACGACGAATGATGGCGTCACGACCA  TCGCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAAGTCT  TCTCGGACTCGGAGTACCAGTTGCCGTACGTCC  TCGGCTCTGCGCACCCAGGGCTGCCCTCCCTCCGT  TCCCGGCGGACGTGTTTATGATTCCGCGAGTACG  GCTACCTAACGCTCAACAATGGCAGCCAGGCA  GTGGGACGGTACCTTTTACTGCCTGGAATAT  TTCCCATCGCAGATGCTGAGAACGGGCAATAA  CTTTACCTTACGCTACACCTTCGAGGACGTGCC  TTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCC  TGGACCGGCTGATGAATCCTTCTCATCGACCAGT  ACCTGTATTACCTGAACAGAATCAGAATCAGT  CCGGAAGTGCCAAAACAAGGACTTGCTGTTT  AGCCGGGGTCTCCAGCTGGCATGTCTGTTCAG  CCAAAAACTGGCTACCTGGACCCTGTACCCGG  CAGCAGCGCGTTTCAAAAACAAAACAGACAA  CAACAACAGCAACTTACCTGGACTGGTGTCTC  AAAATATAACCTTAATGGGCGTGAATCTATAAT  CAACCCTGGCACTGCTATGGCCTCACACAAAG  ACGACAAAAGACAAGTTCTTTCCCATGAGCGGT  GTCATGATTTTTGGAAAGGAGAGCGCCGGAGC  TTCAAACACTGCATTGGACAATGTCATGATCAC  AGACGAAGAGGAAATCAAAGCCACTAACCCCG  TGGCCACCGAAAGATTTGGGACTGTGGCAGTC  AATGACCAGAGCAGCAGCACAGACCCTGCGAC  CGGAGATGTGCATGTTATGGGAGCCTTACCTGG  AATGGTGTGGCAAGACAGAGACGTATACCTGC  AGGGTCTTATTGGGCCAAAATCCTCACACGG  ATGGACACTTTCACCCGTCTCCTCTCATGGGCG  GCTTTGGACTTAAGCACCCGCTCCTCAGATCC  TCATCAAAAACACGCCTGTTCTGCGAATCCTC  CGGCAGAGTTTTCGGCTACAAAGTTTGCTTCAT  TCATCACCAGTATTCCACAGGACAAGTGAGC  GTGGAGATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAA  CAGCAAACGCTGGAATCCCGAAGTGAGTATA  CATCTAACTATGCAAAATCTGCCAACGTTGATT  TCACTGTGGACAACAATGGACTTTATACTGAGC  CTCGCCCAATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTC  CCCTGTAAAttgtgtaataaataaccggf</p>	<p>FGYSTPWGYFDF  NRFHCHFSRPRD  WQRLINNNWGF  RPKRLNFKLFNI  QVKEVTTNDGV  TTIANNLTSTVQ  VFSDEYQLPYV  LQSAHQGLPPF  PADVFMIPQYGY  LTLNNGSQAVG  RSSFYCLEYFPS  QMLRTGNNFTFS  YTFEDVPHSSY  AHSQSLDRLMN  PLIDQYLYLNR  TQNQSGSAQNK  DLLFSRGSFAGM  SVQPKNWLPGP  CYRQQRVSKTK  TDNNSNFTWT  GASKYNLNGRE  SIINPGTAMASH  KDDKDKFFPMS  GVMIFGKESAG  ASNTALDNVMIT  DEEEIKATNPVA  TERFGTVAVND  QSSSTDPATGDV  HVMGALPGMV  WQDRDVYLQGP  IWAKIPHTDGHF  HPSPLMGGFGLK  HPPPQILIKNTPV  PANPPAEFSATK  FASFITQYSTGQ  VSVEIEWELQKE  NSKRWNPEVQY  TSNYAKSANVD  FTVDNNGLYTEP  RPIGTRYLTRPL</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	---	--	---

【 0 1 7 6】

【表 1 - 1 6】

12	F129L お よび D418N	<p>ggfaccaaaacaatgttctcgtcactgggcatgaatctgatgtgttcc  ctgcagacaatcgagagaatgaatcagaatcaaatctcttactca  cggacagaaagactgttagagtgttcccggtcagaatctcaaccgtt  tctgtcgtcaaaaaggcgtatcagaactgtgtacattcatatcatgg  gaaagggtccagacgttgcactcctgcgatgtgtaattggattfgg  atgaetgcatcttgaacaataatgattaaatcaggATGGCTGCC  GATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC  CTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGGACTTG  AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA  GCAAAGCAGGACGACGGCCGGGGTCTGGTGC  TTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACG  GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCG  GATGCAGCGGCCCTCGAGCAGACAAGGCCTA  CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT  ACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTTC  AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGG  GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAA  GAAGAGGGTTCGAACCTTTAGGTCTGGTTGA  GGAAGGTGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAAC  GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC  TCCTCCTCGGGCATTGGCAAGACAGGCCAGCA  GCCCCGTA AAAAGAGACTCAATTTTGGTCAGA  CTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCACAA  CCTCTCGGAGAACCTCCAGCAACCCCGCTGCT  GTGGGACCTACTACAATGGCTTCAGGCGGTGG  CGCACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCG  ACGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAAATTGGCAT  TGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCAT  CACCACCAGCACCCGAACATGGGCCCTTGCCCA  CCTATAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCA  GTGCTTCAACGGGGGCCAGCAACGACAACCAC  TACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTT  GATTTCAACAGATTCCACTGCCATTTCTCACCA  CGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTG  GGGATTCCGGCCCCAAGAGACTCAACTTCAAGC  TCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTACGACG  AATGATGGCGTCACGACCATCGCTAATAACCTT  ACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAG  TACCAGTTGCCGTACGTCTCGGCTCTGCGCAC  CAGGGCTGCCTCCCTCCGTTCGCCGGCGGACGTG  TTCATGATTCCGAGTACGGCTACCTAACGCTC  AACAATGGCAGCCAGGACGTGGGACGGTCATC  CTTTACTGCCTGGAATATTTCCCATCGCAGAT  GCTGAGAACGGGAATAACTTTACCTTCAGCTA  CACCTTCGAGAACGTGCCTTTCCACAGCAGCTA  CGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCTGATGA  ATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACCTGA  ACAGA ACTCAGAATCAGTCCGGAAGTGCCCAA  AACAAGGACTTGCTGTTTAGCCGGGGTCTCCA  GCTGGCATGTCTGTTTCAGCCAAA AACTGGCTA  CCTGGACCCTGTTACCGGCAGCAGCGGTTTCT  AAAACAAAACAGACAACAACAACAGCAACTT  TACCTGGACTGGTGCTTCAA AATATAACCTTAA  TGGCGGTGAATCTATAATCAACCCTGGCACTGC</p>	278	<p>MAADGYLPDW  LEDNLSEGIREW  WDLKPGAPKPK  ANQKQDDGRG  LVLPGYKYLGP  NGLDKGEPVNA  ADAAALEHDKA  YDQQLKAGDNP  YLRYNHADA EF  QERLQEDTSFGG  NLGRAVFAQK  RVLEPLGLVEEG  AKTAPGKKRPV  EQSPQEPDSSGI  GKTGQQPAKKR  LNFGQTGDSESV  PDPQPLGEPAT  PAAVGPPTMAS  GGGAPMADNNE  GADGVGNASGN  WHCDSTWLGDR  VITSTRTWALP  TYNNHLYKQISS  ASTGASNDNHY  FGYSTPWGYFDF  NRFHCHFSPRD  WQRLINNNWGF  RPKRLNFKLFNI  QVKEVTTNDGV  TTIANNLTSTVQ  VFS DSEYQLPYV  LGS AHQGC LPPF  PADVFMIPQYGY  LTLNNGSQAVG  RSSFYCLEYFPS  QMLRTGNNTFS  YTFENVPFHSSY  AHSQSLDRLMN  PLIDQYLYLNR  TQNQSGSAQNK  DLLFSRGS PGM  SVQPKNWLPGP  CYRQQRVSKTK  TDNNNSNFTWT  GASKYNLNGRE  SIINPGTAMASH  KDDKDKFFPMS  GVMIFGKESAG  ASNTALDNVMIT  DEEBIKATNPVA  TERFGTVAVNL  QSSSTDPATGDV  HVMGALPGMV  WQDRDVY LQGP</p>	10 20 30 40
----	------------------------	--	-----	---	----------------------

【 0 1 7 7】

【表 1 - 1 6 - 1】

	<p>TATGGCCTCACACAAAGACGACAAAGACAAGT  TCTTTCCCATGAGCGGTGTCTGATTTTTTGAA  AGGAGAGCGCCGAGCTTCAAACACTGCATT</p>	<p>IWAKIPHTDGHF  HPSPLMGGFGLK  HPPPQILKNTPV  PANPPAEFSATK  FASFITQYSTGQ  VSVEIEWELQK</p>
--	---	--

【 0 1 7 8 】

【 表 1 - 1 7 】

		GGACAATGTCATGATCACAGACGAAGAGGAAA TCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCACCGAAAGA TTTGGGACTGTGGCAGTCAATCTCCAGAGCAGC AGCACAGACCCTGCGACCGGAGATGTGCATGT TATGGGAGCCTTACCTGGAATGGTGTGGCAAG ACAGAGACGTATACTGCAGGGTCTTATTTGG GCCAAAATTCCTCACACGGATGGACACTTTCAC CCGTCTCCTCTCATGGGCGGCTTTGGACTTAAG CACCCGCCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACAG CCTGTTCTGCGAATCCTCCGGCAGAGTTTTCG GCTACAAAGTTTGCTTATTTCATCACCCAGTAT TCCACAGGACAAGTGAGCGTGGAGATTGAATG GGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAACGCTGG AATCCCGAAGTGCAGTATACATCTAACTATGCA AAATCTGCCAACGTTGATTTCACTGTGGACAAC AATGGACTTTATACTGAGCCTCGCCCCATTGGC ACCCGTTACCTCACCCGTCCCCTGTAAttgtgttaat caataaacccgg		ENSKRWNPEVQ YTSNYAKSANV DFTVDNNGLYT EPRPIGTRYLTRP L		10		
13	F129L お よび L584H	ggtacaaaacaaatgttctcgtcacgtgggatgaatctgatctgttcc ctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaatcaaatatctgctcactca cggacagaagaactgttagagtgcttcccggtgcagaatcaaccgggt ctcgtcgtcaaaaaggcgtatcagaactgtgtacattcatatcatatgg gaaagggtccagacgctgtcactgctcgcgatctgtcaatgtggattgg atgactgcattttgaacaataaatgalltaaatcaggATGGCTGCC GATGGTTATCTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC CTCTCTGAGGGCATTCCGAGTGGTGGGACTTG AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA GCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGTCTGGTGC TTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACG GACTCGACAAGGGGAGCCCCGTCAACGCGGCG GATGCAGCGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTA CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT ACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTT AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGG GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTCCAGGCCAA GAAGAGGGTTCTCGAACCTTTAGGTCTGGTTGA GGAAGGTGCTAAGACGGCTCTGAAAAGAAAC GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC TCCTCCTCGGGCATTGGCAAGACAGGCCAGCA GCCCGCTAAAAAGAGACTCAATTTGGTCAGA CTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCACAA CCTCTCGGAGAACCTCCAGCAACCCCGCTGCT GTGGGACCTACTACAATGGCTCAGGCGGTGG CGCACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCG ACGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAAATTGGCAT TGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGATCAT CACCACCAGCACCCGAACATGGGCCTTGCCCA CCTATAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCA GTGCTTCAACGGGGGCCAGCAACGACAACCAC TACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTT GATTTCAACAGATTCCACTGCCATTTCTACCA CGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTG GGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAACTCAAGC TCTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCACGACG	279	MAADGYLPDW LEDNLSEGIREW WDLKPGAPKPK ANQQKQDDGRG LVLPGYKYLGP NLGLDKGEPVNA ADAAALEHDKA YDQQLKAGDNP YLRYNHADAEF QERLQEDTSF NLGRAVFQAKK RVLEPLGLVEEG AKTAPGKKRPV EQSPQEPDSSSGI GKTGQQPAKKR LNFGQTGDSESV PDPQPLGEPAT PAAVGPPTMAS GGGAPMADNNE GADGVGNASGN WHCDSTWLGDR VITSTRTWALP TYNNHLYKQISS ASTGASNDNHY FGYSTPWGYFDF NRFHCHFSPRD WQRLINNNWGF RPKRLNFKLFNI QVKEVTTNDGV TTIANNLTSTVQ VFSDESQYLPYV LGSAHQGLPPF PADVFMIPQYGY LTLNNGSQAVG RSSFYCLEYFPS QMLRTGNNTFS		20	30	40

【 0 1 7 9 】

【表 1 - 1 7 - 1】

		AATGATGGCGTCACGACCATCGCTAATAACCTT ACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAG TACCAGTTGCCGTACGTCCTCGGCTCTG	YTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMN PLIDQYLYYLN TQNQSGSAQNK DLLFSRGSFAGM SVQPKNWLPG
--	--	--	---

【 0 1 8 0 】

【表 1 - 18】

		CGCACCAGGGGCTGCCTCCCTCCGTTCCCGGCGG ACGTGTTTCATGATTCGCGCAGTACGGCTACCTAA CGCTCAACAATGGCAGCCAGGCAGTGGGACGG TCATCCTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCATCGC AGATGCTGAGAACGGGCAATAACTTACCTTC AGCTACACCTTCGAGGACGTGCCTTTCCACAGC AGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCT GATGAATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTA CCTGAACAGAACTCAGAATCAGTCCGGAAGTG CCCAAACAAGGACTTGCTGTTTAGCCGGGGG TCTCCAGCTGGCATGTCTGTTCAGCCCAAAAAC TGGCTACCTGGACCCTGTACCGGCAGCAGCGC GTTTCTAAAACAAAACAGACAACAACAACAG CAACTTTACCTGGACTGGTGTCTCAAATATAA CCTTAATGGGCGTGAATCTATAATCAACCCTGG CACTGCTATGGCCTCACACAAAGACGACAAAAG ACAAGTTCTTCCCATGAGCGGTGTCATGATTT TTGGAAAGGAGAGCGCCGAGCTTCAAACACT GCATTGGACAATGTCATGATCACAGACGAAGA GGAAATCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCACCG AAAGATTTGGGACTGTGGCAGTCAATCACCAG AGCAGCAGCACAGACCCTGCGACCGGAGATGT GCATGTTATGGGAGCCTTACCTGGAATGGTGTG GCAAGACAGAGACGTATACCTGCGAGGGTCTTA TTTGGGCCAAAATTCCTCACACGGATGGACACT TTCACCCGTCTCCTCTCATGGGCGGCTTTGGAC TTAAGCACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAA ACACGCCTGTCTCCTGCGAATCCTCCGGCAGAGT TTTCGGCTACAAAGTTTGCTTCATTCATCACC AGTATTCCACAGGACAAGTGAGCGTGGAGATT GAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAAAC GCTGGAATCCCGAAGTGCAGTATACATCTAACT ATGCAAAAATCTGCCAACGTTGATTTCACTGTGG ACAACAATGGACTTTATACTGAGCCTCGCCCA TTGGCACCCGTTACCTCACCCGTCCCCTGTAAttg tgtgtaatacaataaccggg		PCYRQQRVSKT KTDNNNSNFTW TGASKYNLNGR ESIINPGTAMAS HKDDDKDFPFM SGVMIFGKESAG ASNTALDNVMIT DEEBIKATNPVA TERFGTVAVNH QSSSTD PATGDV HVMGALPGMV WQDRDVYLQGP IWAKIPHTDGHF HPSPLMGGFGLK HPPPQLIKNTPV PANPPAEFSATK FASFITQYSTGQ VSVEIEWELQKE NSKRWNPEVQY TSNYAKSANVD FTVDNNGLYTEP RPIGTRYLTRPL	10 20
14	F129L, H642N, および D418N	ggtaacaaaacaaatgttctctcagttcggcagtgatgctggttcc ctgcagacaatcgagagaatgaatcagaatcaaatatctgcttactca cggacagaaaagactgttttagagtgttccctgtcagaatctcaaccggt tctgtctcaaaaagcgtatcagaaactgtctacattcatatcatg gaaagtgccagacgcttgcactgctgcatctggcaatgtggattgg atgactgeatcttgaacaataaatgattaaatcaggATGGCTGCC GATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC CTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGGACTTG AAACCTGGAGCCCCGAAAACCCAAAGCCAACCA GCAAAAGCAGGACGACGGCCGGGTCTGGTGC TTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACG GACTCGACAAGGGGAGCCCGTCAACGCGGCG GATGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTA CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT ACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTTC AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCITTTGGG GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAA GAAGAGGGTTCTCGAACCTTATAGGTCTGTTGA	280	MAADGYLPDW LEDNLSEGIREW WDLKPGAPPK ANQQKQDDGRG LVLPKYKYLGP NGLDKGEPVNA ADAAALEHDKA YDQLKAGDNP YLRYNHDAEF QERLQEDTSFGG NLGRAVFQAKK RVLEPLGLVEEG AK7APGKKRPV EQSPQEPDSSSGI GKTGQQPAKKR LNFQGTGDSSEV PDPQPLGEPAT PAAVGPTTMS	30 40

【表 1 - 1 8 - 1】

		GGAAGGTGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAAC GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC TCCTCCTCGGGCATTGGC		GGGAPMADNNE GADGVGNASGN WHCDSTWLGDR VITTSTRTWALP TYNNHLYKQISS ASTGASNDNHY
--	--	--	--	--

【 0 1 8 2 】

【表 1 - 19】

	<p>AAGACAGGCCAGCAGCCCGCTAAAAAGAGACT  CAATTTTGGTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGT  CCCCGACCCACAACCTCTCGGAGAACCTCCAG  CAACCCCGCTGCTGTGGACCTACTACAATG  GCTTCAGGCGGTGGCGACCAATGGCAGACAA  TAACGAAGGGCGCCGACGGAGTGGGTAATGCCT  CAGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTG  GGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAAC  ATGGGCCTTGCCCACCTATAACAACCACCTCTA  CAAGCAAATCTCCAGTGCTTCAACGGGGGCCA  GCAACGACAACCACTACTTCGGCTACAGCACC  CCCTGGGGGTATTTGATTTCAACAGATTCCAC  TGCCATTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTC  ATCAACAACAATTGGGGATTCCGGCCCAAGAG  ACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTCAA  GGAGGTCACGACGAATGATGGCGTCACGACCA  TCGCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAAGTCT  TCTCGGACTCGGAGTACCAGTTGCCGTACGTCC  TCGGCTCTGCGCACCAGGGCTGCCTCCCTCCGT  TCCCGGCGGACGTGTTTCATGATTCCGCAGTACG  GCTACCTAACGCTCAACAATGGCAGCCAGGCA  GTGGGACGGTCATCCTTTACTGCCTGGAATAT  TTCCCATCGCAGATGCTGAGAACGGGCAATAA  CTTTACCTTCAGCTACACCTTCGAGAACGTGCC  TTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCC  TGGACCGGCTGATGAATCCTCTCATCGACCAGT  ACCTGTATTACCTGAACAGAACTCAGAATCAGT  CCGGAAGTGCCAAAACAAGGACTTGCTGTTT  AGCCGGGGGTCTCCAGCTGGCATGTCTGTTT  CCAAAAACTGGCTACCTGGACCCTGTTACCCG  CAGCAGCGCGTTTCTAAAACAAAAACAGACAA  CAACAACAGCAACTTTACCTGGACTGGTGCTTC  AAAATATAACCTTAATGGGCGTGAATCTATAAT  CAACCCCTGGCACTGATGCTCAGCACAAG  ACGACAAAGACAAGTTCTTTCCCATGAGCGGT  GTCATGATTTTTGGAAAGGAGAGCGCCGGAGC  TTCAAACACTGCATTGGACAATGTCATGATCAC  AGACGAAGAGGAAATCAAAGCCACTAACCCCG  TGGCCACCGAAAGATTTGGGACTGTGGCAGTC  AATCTCCAGAGCAGCAGCACAGACCCTGCGAC  CGGAGATGTGCATGTTATGGGAGCCTTACCTGG  AATGGTGTGGCAAGACAGAGACGTATAACCTGC  AGGGTCCTATTTGGGCCAAAATTCCTCACACGG  ATGGACACTTTCACCCGTCTCCTCTCATGGGCG  GCTTTGGACTTAAGAACCCGCTCCTCAGATCC  TCATCAAAAACACGCCTGTTCTGCGAATCCTC  CGGCAGAGTTTTCGGCTACAAAGTTTGCTTCAT  TCATCACCCAGTATTCCACAGGACAAGTGAGC  GTGGAGATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAA  CAGCAAACGCTGGAATCCCGAAGTGAGTATA  CATCTAACTATGCAAAAATCTGCCAACGTTGATT  TCACTGTGGACAACAATGGACTTTATACTGAGC  CTCGCCCATTTGGCACCCGTTACCTCACCCGTC  CCCTGTAAttgtgtaatacaataaccggt</p>	<p>FGYSTPWGYFDF  NRFHCHFSPRD  WQRLNNNWGF  RPKRLNFKLFNI  QVKEVTTNDGV  TTIANNLTSTVQ  VFSDESQYLPYV  LGSAHQGLPPF  PADVFMIPQYGY  LTLNNGSQAVG  RSSFYCLEYFPS  10 QMLRTGNFTFS  YTFENVPFHSSY  AHSQSLDRLMN  PLIDQYLYLNR  TONQSGSAQNK  DLLFSRGSAGM  SVQPKNWLPGP  CYRQQRVSKTK  TDNNNSNFTWT  GASKYNLNGRE  SIINPGTAMASH  KDDKDKFFPMG  20 GVMIFGKESAG  ASNTALDNVMIT  DEEEKATNPVA  TERFGTVAVNL  QSSSTDPATGDV  HVMGALPGMV  WQDRDVYLQGP  IWAKIPHTDGHF  HPSPLMGGFGLK  NPPPQILIKNPV  PANPPAEFSATK  FASFITQYSTGQ  VSVEIEWELQKE  NSKRWNPEVQY  30 TSNYAKSANVD  FTVDNNGLYTEP  RPIGTRYLTRPL</p>	<p>10 20 30 40</p>
--	--	--	--------------------------------

【表 1 - 2 0】

<p>15 F129L, H642N, および L584D</p>	<p>ggtagcaaaacaatgttctcgtcaagtgaggcatgaatctgatgetgttcc ctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaatcaaatatctgttcaactca cggacagaaagactgttagagtggttccggtgcagaatcaaacccggt tctgtcgtcaaaaagcgtatcagaactgtgetacattcatatcatatgg gaaaggtgccagacgctgcactgctgcgatctgcaatgfggattgg atgactgcattttgaacaataatgatttaaatcaggtATGGCTGCC GATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC CTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGGACTTG AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA GCAAAAAGCAGGACGACGCGCCGGGTCTGGTGC TTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACG GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCG GATGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTA CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT ACCTGCGGTATAACCACGCGACGCGGAGTTTC AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGG GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAA GAAGAGGGTCTCGAACCTTTAGGTCTGGTTGA GGAAGTGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAAC GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC TCCTCCTCGGGCATTGGCAAGACAGGCCAGCA GCCCCGCTAAAAAGAGACTCAATTTTGGTCAGA CTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCACAA CCTCTCGGAGAACCTCCAGCAACCCCGCTGCT GTGGGACCTACTACAAATGGCTTCAGGCGGTGG CGCACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCG ACGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAAATTGGCAT TGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCAT CACCACCAGCACCCGAACATGGGCCTTGCCCA CCTATAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCA GTGCTTCAACGGGGGCCAGCAACGACAACCAC TACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTT GATTTCAACAGATTCCACTGCCATTTCTCACCA CGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTG GGGATTCCGGCCCAAGAGACTCAACTTCAAGC TCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCACGACG AATGATGGCGTCACGACCATCGCTAATAACCTT ACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAG TACCAGTTGCCGTACGTCTCGGCTCTGCGCAC CAGGGCTGCCTCCCTCCGTTCCCGGGGACGTG TTCATGATTCCGCAGTACGGCTACCTAACGCTC AACAATGGCAGCCAGGCAGTGGGACGGTCATC CTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCATCGCAGAT GCTGAGAACGGGCAATAACTTTACCTTCAGCTA CACCTTCGAGGACGTGCCTTTCCACAGCAGCTA CGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCTGATGA ATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACCTGA ACAGAACTCAGAATCAGTCCGGAAGTGCCCAA AACAAGGACTTGCTGTTTAGCCGGGGTCTCCA GCTGGCATGTCTGTTAGCCCAAAAAGTGGCTA CCTGGACCCTGTTACCGGCAGCAGCGGTTTCT AAAACAAAACAGACAACAACAACAGCAACTT TACCTGGACTGGTGCTTCAAAATATAACCTTAA TGGGCGTGAATCTATAATCAACCCTGGCACTGC</p>	<p>281 MAADGYLPDW LEDNLSEGIREW WDLKPGAPKPK ANQQKQDDGRG LVLPGYKYLGP NGLDKGEPVNA ADAAALEHDKA YDQQLKAGDNP YLRYNHADA QERLQEDTSFGG NLGRAVFOAKK RVLEPLGLVEEG AKTAPGKRPV EQSPQEPDSSSGI GKTGQQPAKKR LNFQGTGDSSESV PDPQPLGEPAT PAAVGPPTMAS GGGAPMADNNE GADGVGNASGN WHCDSTWLGDR VITSTRTWALP TYNNHLYKQISS ASTGASNDNH FGYSTPWYDFD NRFHCHFSRDR WQRLINNWGF RPKRLNFKLFNI QVKEVTNDGV TTIANNLSTVQ VFSDEYQLPYV LGSAHQGLPPF PADVFMIPQYGY LTLNNGSQAVG RSSFYCLEYFPS QMLRTGNNTFS YTFEDVPHSSY AHSQSLDRLMN PLIDQYLYLNR TONQSGSAQNK DLLFSRGSAGM SVQPKNWLP CYRQQRVSKTK TDNNNSNFTWT GASKYNLNGRE SIINPGTAMASH KDDKDKFFPMS GVMIFGKESAG ASNTALDNVMIT DEEEIKATNPVA TERFGTVAVND QSSSTDPATGDV HVMGALPGMV WQDRDVYLOGP</p>
---	--	---

10

20

30

40

【 0 1 8 4】

【表 1 - 2 0 - 1】

	<p>TATGGCCTCACACAAAGACGACAAAGACAAGT TCTTTCCCATGAGCGGTGTCATGATTTTGGAA AGGAGAGCGCCGAGCTTCAAACACTGCATT</p>	<p>IWAKIPHTDGHF HPSPLMGGFGLK NPPPQILIKNTPV PANPPAEFSATK FASFITQYSTGQ VSVEIEWELQK</p>
--	---	--

50

【 0 1 8 5 】

【 表 1 - 2 1 】

		GGACAAATGTCATGATCACAGACGAAGAGGAAA TCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCACCGAAAGA TTTGGGACTGTGGCAGTCAATGACCAGAGCAG CAGCACAGACCCCTGCGACCGGAGATGTGCATG TTATGGGAGCCTTACCTGGAATGGTGTGGCAA GACAGAGACGTATACCTGCAGGGTCTATTG GGCCAAAATTCCCTCACACGGATGGACACTTTCA CCCGTCTCCTCTCATGGGCGGCTTTGGACTTAA GAACCCGCCTCTCAGATCCTCATCAAAAACAC GCCTGTTTCTCGGAATCCTCCGGCAGAGTTTC GGCTACAAAGTTTGCTTCATTCATCACCCAGTA TTCCACAGGACAAGTGAGCGTGGAGATTGAAT GGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAACGCTG GAATCCCGAAGTGCAGTATACATCTAACTATGC AAAATCTGCCAACGTTGATTCTACTGTGGACAA CAATGGACTTTATACTGAGCCTCGCCCCATTGG CACCCGTTACCTCACCCGTCCCCTGTAAAttgtgtta atcaataaaccggt		ENSKRWNPEVQ YTSNYAKSANV DFTVDNNGLYT EPRPIGTRYLRP L	
16	F129L, H642N, および L584N	ggfaccaaaacaatgttctcgtcagtgggcatgaatctgatgctgttcc ctcagacaatgagagaatgaatcagaattcaaatatctgcttcaactca cggacaganaagactgtagagtgcttcccggtgcagaatcacaaccggt tctgtcgtcaaaaaggcgtatcagaactgctacattcatcatatcatgg gaaaggtgccagactgactgcctgcgactggccaatgtggattgg atgactcatcttgaacaataatgatlltaaacgggATGGCTGCC GATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC CTCTCTGAGGGCATTCCGAGTGGTGGGACTTG AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA GCAAAAAGCAGGACGACGCGCCGGGTCTGGTGC TTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTCAACG GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCG GATGCAGCGGCCCTCGAGCAGACAAGGCCTA CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT ACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTTC AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGG GGCAACCTCGGGCAGCAGTCTTCCAGGCCAA GAAGAGGGTTCTCGAACCTTTAGGTCTGGTTGA GGAAGGTGCTAAGACCGGCTCCTGGAAAGAAAC GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC TCCTCCTCGGGCATTGGCAAGACAGGCCAGCA GCCCCGTA AAAAGAGACTCAATTTTGGTCAGA CTGGCGACTCAGAGTCAGTCCCCGACCCACAA CCTCTCGGAGAACCCTCAGCAACCCCGCTGCT GTGGGACCTACTACAATGGCTTCAGGCGGTGG CGACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCG ACGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAAATTGGCAT TGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCAT CACCACCAGCACCCGAACATGGGCCTTGCCCA CCTATAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCA GTGCTTCAACGGGGGCCAGCAACGACAACCAC TACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTT GATTTCAACAGATTCCACTGCCATTTCTACCA CGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTG GGGATTCGGGCCAAGAGACTCAACTTCAAGC TCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCACGACG	282	MAADGYLPDW LEDNLSEGIREW WDLKPGAPKPK ANQQKQDDGRG LVLPGYKYLGP NGLDKGEPVNA ADAAALEHDKA YDQQLKAGDNP YLRYNHADAEF QERLQEDTSFGG NLGRAVFQAKK RVLEPLGLVEEG AKTAPGKRPV EQSPQEPDSSSI GKTGQQPAKRR LNFQGTGDSSEV PDPQPLGEPPT PAAVGPPTMAS GGGAPMADNNE GADGVGNASGN WHCDSTWLGDR VITTSTRTWALP TYNNHLYKQISS ASTGASNDNHY FGYSTPWGYFDF NRFHCHFSPRD WQRLINNNWGF RPKRLNFKLFNI QVKEVTINDGV TTIANNLTSTVQ VFSDEYQLPYV LGS AHQGLPPF PADVFMPQYGY LTLNNGSQAVG RSSFYCLEYFPS QMLRTGNNTFS	10 20 30 40

【 0 1 8 6 】

【表 1 - 2 1 - 1】

	AATGATGGCGTCACGACCATCGCTAATAACCTT ACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAG TACCAGTTGCCGTACGTCCTCGGCTCTG	YTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMN PLIDQYLYLNR TQNQSGSAQNK DLLFSRGSFAGM SVQPKNWLPG
--	--	---

【 0 1 8 7 】

【表 1 - 2 2】

	CGCACCAGGGCTGCCTCCCTCCGTTCCCGGCGG ACGTGTTTCATGATTCCCGCAGTACGGCTACCTAA CGCTCAACAATGGCAGCCAGGCAGTGGGACGG TCATCCTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCATCGC AGATGCTGAGAACGGGCAATAACTTTACCTTC AGCTACACCTTCGAGGACGTGCCTTTCCACAGC AGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCT GATGAATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTA CCTGAACAGAAGTCAAGATCAGTCCGGAAGTG CCCAAAAACAAGGACTTGCTGTTTAGCCGGGGG TCTCCAGCTGGCATGTCTGTTCAGCCAAAAAAC TGGCTACCTGGACCCTGTTACCGGCAGCAGCGC GTTTCTAAAACAAAAACAGACAACAACAACAG CAACTTTACCTGGACTGGTGTCTCAAAATATAA CCTTAATGGGCGTGAATCTATAATCAACCCTGG CACTGCTATGGCCTCACACAAAGACGACAAAG ACAAGTTCTTTCCCATGAGCGGTGTCATGATTT TTGGAAAGGAGAGCGCCGGAGCTTCAAACACT GCATTGGACAATGTCATGATCACAGACGAAGA GGAAATCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCACCG AAAGATTTGGGACTGTGGCAGTCAATAACCAG AGCAGCAGCACAGACCCTGCGACCGGAGATGT GCATGTTATGGGAGCCTTACCTGGAATGGTGTG GCAAGACAGAGACGTATACCTGCAGGGTCTTA TTGGGCCAAAATTCTCACACGGATGGACTACT TTCACCCGTCTCCTCTCATGGGCGGCTTTGGAC TTAAGAACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAA ACACGCCTGTTCTGCGAATCCTCCGGCAGAGT TTTCGGCTACAAAGTTTGTCTCATTTCATCACCC AGTATTCCACAGGACAAGTGAGCGTGGAGATT GAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAAC GCTGGAATCCCGAAGTGCAGTATACATCTAACT ATGCAAATCTGCCAACGTTGATTTCACTGTGG ACAACAATGGACTTTATACTGAGCCTCGCCCCA TTGGCACCCGTTACCTCACCCGTCCCCTGTAAAttg tgtgtaatacaataaacggg		PCYRQQRVSKT KTDNNNSNFTW TGASKYNLNGR ESIINPGTAMAS HKDDKDKFFPM SGVMIFGKESAG ASNTALDNNVMIT DEEEKATNPVA TERFGTVAVNN QSSSTDPATGDV HVMGALPGMV WQDRDVYLQGP IWAKIPHTDGHF HPSPLMGGFGLK NPPQILKINTPV PANPPAEFSATK FASFITQYSTGQ VSVEIEWELQKE NSKRWNPEVQY TSNYKANSDV FTVDNNGLYTEP RPIGTRYLTRPL	10 20 30 40	
17	F129L, H642N および L584H	ggtacaaaacaatgttctcgtcacgtgggcatgaatctgatgctgttcc ctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaaatatctgctcaactca cggacagaaagactgtttagagtgcttcccgtgcagaatctcaaacgggt tctgtctcaaaaaggcgtatcagaactgtgtacattcattcattcatatg gaaagggtccagacgcttgcactgcctcgatctgtgcaatgtgattgg atgactgcattttgaacaataatgattaaatcaggtATGGCTGCC GATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC CTCTCTGAGGGCATTCCGAGTGGTGGGACTTG AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA GCAAAAAGCAGGACGACGGCCGGGCTGCTGCTG TTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTCAACG GACTCGACAAGGGGAGCCCGTCAACGCGGCG GATGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTA CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT ACCTGCGGTATAACCACGGCCGACCGGAGTTTC AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTGGG GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTCCAGGCCAA GAAGAGGGTCTCGAACCTTAGGTCTGGTTGA	283	MAADGYLPDW LEDNLSEGIREW WDLKPGAPKPK ANQQKQDDGRG LVLPGYKYLPGF NGLDKGEPVNA ADAAALEHDKA YDQQLKAGDNP YLRYNHADAEF QERLQEDTSFSG NLGRAVVFQAKK RVLEPLGLVEEG AKTAPGKKRPV EQSPQEPDSSSGI GKTGQKPAKRR LNFQQTGDSSEV PDPQPLGEPAT PAAVGPTMAS	50

【 0 1 8 8 】

【 表 1 - 2 2 - 1 】

		GGAAGGTGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAAC GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC TCCTCCTCGGGCATTGGC	GGGAPMADNNE GADGVGNASGN WHCDSTWLGDR VITSTRTWALP TYNNHLYKQISS ASTGASNDNHY
--	--	--	---

【 0 1 8 9 】

【表 1 - 2 3】

	<p>AAGACAGGCCAGCAGCCCGCTAAAAAGAGACT  CAATTTTGGTCAGACTGGCGACTCAGAGTCAGT  CCCCGACCCACAACCTCTCGGAGAACCTCCAG  CAACCCCGCTGCTGTGGGACCTACTACAATG  GCTTCAGGCGGTGGCGACCAATGGCAGACAA  TAACGAAGGCGCCGACGGAGTGGGTAATGCCT  CAGGAAATTGGCATTGCGATTCCACATGGCTG  GGCGACAGAGTCATCACCACCAGCACCCGAAC  ATGGGCCTTGCCACCTATAACAACCACCTCTA  CAAGCAAATCTCCAGTGCTTCAACGGGGGCCA  GCAACGACAACCACTACTTCGGCTACAGCACC  CCCTGGGGGTATTTGATTTCAACAGATTCCAC  TGCCATTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGACTC  ATCAACAACAATTGGGGATTCCGGCCCAAGAG  ACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATCCAAGTCAA  GGAGGTCACGACGAATGATGGCGTCACGACCA  TCGCTAATAACCTTACCAGCACGGTTCAAGTCT  TCTCGGACTCGGAGTACCAGTTGCCGTACGTCC  TCGGCTCTGCGCACCAGGGCTGCCTCCCTCCGT  TCCCCGGGACGTGTTTCATGATTCGCGAGTACG  GCTACCTAACGCTCAACAATGGCAGCCAGGCA  GTGGGACGGTCATCCTTTTACTGCCTGGAATAT  TTCCCATCGCAGATGCTGAGAACGGGCAATAA  CTTTACCTTCAGCTACACCTTCGAGGACGTGCC  TTTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCCAGAGCC  TGGACCGGCTGATGAATCCTCTCATCGACCAGT  ACCTGTATTACCTGAACAGAATCAGAATCAGT  CCGGAAGTGCCAAAACAAGGACTTGCTGTTT  AGCCGGGGGTCTCCAGCTGGCATGTCTGTTTCCAG  CCCAAAAAGTGGCTACCTGGACCCTGTTACCGG  CAGCAGCGCGTTTCTAAAACAAAACAGACAA  CAACAACAGCAACTTTACCTGGACTGGTGCTTC  AAAATATAACCTTAATGGGCGTGAATCTATAAT  CAACCTGGCACTGCTATGGCCCTCACACAAAG  ACGACAAAAGACAAGTTCTTTCCCATGAGCGGT  GTCATGATTTTTGGAAAGGAGAGCGCCGGAGC  TTCAAAACTGCATTGGACAATGTCATGATCAC  AGACGAAGAGGAAATCAAAGCCACTAACCCCG  TGGCCACCGAAAGATTTGGGACTGTGGCAGTC  AATCACCAGAGCAGCAGCACAGACCCTGCGAC  CGGAGATGTGCATGTTATGGGAGCCTTACCTGG  AATGGTGTGGCAAGACAGAGACGTATACCTGC  AGGGTCTATTTGGGCCAAAATTCCTCACACGG  ATGGACACTTTCACCCGTCTCCTCTCATGGGCG  GCTTTGGACTTAAGAACCCGCCTCCTCAGATCC  TCATCAAAAACACGCCTGTTCCCTGCGAATCCTC  CGGCAGAGTTTTCGGCTACAAAGTTTGCTTCAT  TCATCACCCAGTATTCCACAGGACAAGTGAGC  GTGGAGATTGAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAA  CAGCAAACGCTGGAATCCCAGAGTGCAGTATA  CATCTAACTATGCAAAATCTGCCAACGTTGATT  TCACTGTGGACAACAATGGACTTTTACTGAGC  CTCGCCCCATTGGCACCCGTTACCTCACCCGTC  CCCTGTAAAttgtgttaatacaataaacccgt</p>	<p>FGYSTPWGYFDF  NRFHCHFSPRD  WQRLINNNWGF  RPKRLNFKLFNI  QVKEVTTNDGV  TTIANNLTSTVQ  VFSSEYQLPYV  LGSAHQGCLPPF  PADVFMIPQYGY  LTLNNGSQAVG  RSSFYCLEYFPS  QMLRTGNNTFS  YTFEDVPFHSSY  AHSQSLDRLMN  PLIDQYLYLNR  TQNQSGSAQNK  DLLFSRGPAGM  SVQPKNWLPGP  CYRQQRVSKTK  TDNNNSNFTWT  GASKYNLNGRE  SIINPGTAMASH  KDDKDKFFPMS  GVMIFGKESAG  ASNTALDNVMIT  DEEEKATNPVA  TERFGTVAVNH  QSSSTDPATGDV  HVMGALPGMV  WQDRDVYLQGP  IWAKIPHTDGHF  HPSPLMGGFGLK  NPPPQILIKNTPV  PANPPAEFSATK  FASFITQYSTGQ  VSVEIEWELQKE  NSKRWNPEVQY  TSNYAKSANVD  FTVDNNGLYTEP  RPIGTRYLTRPL</p>	<p>10  20  30  40</p>
--	--	---	-----------------------------------

【表 1 - 2 4】

<p>18</p> <p>F129L, H642N, および V598L</p>	<p>ggtagcaaaacaatgttctcgtcacgtgggcatgaatctgatgetgttcc ctgcagacaatcgagagaatgaatcagaattcaaatatctgcttcaactca cggacagaaaagactgttagagtgcttcccgtgcagaatctcaaccggt tctgtcgtcaaaaaggcgtatcagaaactgtgtacattcatatcatatg gaaagggtccagacgttgcactgcctgcgatctggccaatgtggattgg atgaetgcatcttgaacaataatgatitaaacaggATCGGCTGCC GATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC CTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGGACTTG AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA GCAAAAGCAGGACGACGCGCCGGGTCTGGTGC TTCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTCAACG GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCG GATGCAGCGGCCCTCGAGCAGCACAAGGCCTA CGACCAGCAGCTCAAAGCGGGTGACAATCCGT ACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTTC AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGG GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAA GAAGAGGGTTCTCGAACCTTTAGGTCTGGTTGA GGAAGGTGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAAC GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC TCCTCCTCGGGCATTGGCAAGACAGGCCAGCA GCCCCGTA AAAAGAGACTCAATTTTGGTCAGA CTGGCGACTCAGAGTCACTCCCCGACCCACAA CCTCTCGGAGAACCTCCAGCAACCCCGCTGCT GTGGGACCTACTACAATGGCTTCAGGCGGTGG CGCACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCG ACGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAAATTGGCAT TGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGAGTCAT CACCACCAGCACCCGAACATGGGCCTTGCCCA CCTATAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCA GTGCTTCAACGGGGGCCAGCAACGACAACCAC TACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTT GATTTCAACAGATTCCACTGCCATTTCTACCA CGTGACTGGCAGCGACTCATCAACAACAATTG GGGATTCCGGGCCAAGAGACTCAACTTCAAGC TCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCACGACG AATGATGGCGTCACGACCATCGCTAATAACCTT ACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAG TACCAGTTGCCGTACGTCTCGGCTCTGCGCAC CAGGGCTGCCTCCCTCCGTTCGCCGGGACGTG TTCATGATTCCGCGAGTACGGCTACCTAACGCTC AACAATGGCAGCCAGGCACTGGGACGGTCATC CTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCATCGCAGAT GCTGAGAACGGGCAATAACTTTACCTTCAGCTA CACCTTCGAGGACGTGCCTTCCACAGCAGCTA CGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCTGATGA ATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTACCTGA ACAGA ACTCAGAATCAGTCCGGAAGTGCCCAA AACAAGGACTTGCTGTTTAGCCGGGGTCTCCA GCTGGCATGTCTGTTACGCCAAAAACTGGCTA CCTGGACCCTGTTACCGGCAGCAGCGGTTTCT AAAAAAAAACAGACAACAACAACAGCAACTT TACCTGGACTGGTGCTTCAAAATATAACCTTAA TGGCCGTGAATCTATAATCAACCCTGGCACTGC</p>	<p>284</p> <p>MAADGYLPDW LEDNLSEGIREW WDLKPGAPKPK ANQQKQDDGRG LVLPGYKYLGP NGLDKGEPVNA ADAAALEHDKA YDQQLKAGDNP YLRYNHADA EF QERLQEDTSFGG NLGRAVFQAKK RVLEPLGLVEEG AKTAPGKKRPF EQSPQEPDSSSGI GKTGQPAKRR LNFQGTGDSSEV PDPQPLGEPAT PAAVGPITMAS GGGAPMADNNE GADGVGNASGN WHCDSTWLGDR VITSTRTWALP TYNNHLYKQISS ASTGASNDNHY FGYSTPWGYFDF NRFHCHFSPRD WQRLINNNWGF RPKRLNFKLFNI QVKEVTTNDGV TTIANLSTVQ VFS DSEYQLPYV LGS AHQGLPPF PADVFMIPQYGY LTLNNSQAVG RSSFYCLEYFPS QMLRTGNNTFS YTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMN PLIDQYLYLNR TQNQSGSAQNK DLLFSRGPAGM SVQPKNWLPGP CYRQQRVSKTK TDNNNSNFTWT GASKYNLNGRE SIINPGTAMASH KDDKDKFFPMS GVMIFGKESAG ASNTALDNVMIT DEEEIKATNPVA TERFGTVAVNL QSSSTDPATGDV HLMGALPGMV WQDRD VYLQGP</p>
--	--	---

10

20

30

40

【表 1 - 2 4 - 1】

		TATGGCCTCACACAAAGACGACAAAGACAAGT TCTTTCCCATGAGCGGTGTCATGATTTTGGAA AGGAGAGCGCCGGAGCTTCAAACACTGCATT	IWAKIPHTDGHF HPSPLMGGFGLK NPPPQILIKNTPV PANPPAEFSATK FASFITQYSTGQ VSVEIEWELQK
--	--	---	--

【 0 1 9 2 】

【表 1 - 2 5】

		GGACAATGTCATGATCACAGACGAAGAGGAAA TCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCACCGAAAGA TTTGGGACTGTGGCAGTCAATCTCCAGAGCAGC AGCACAGACCCCTGCGACCCGGAGATGTGCATCT TATGGGAGCCTTACCTGGAATGGTGTGGCAAG ACAGAGACGTATACCTGCAGGGTCTATTTGG GCCAAAATTCCTCACACGGATGGACACTTTCAC CCGTCTCCTCTCATGGGCGGCTTTGGACTTAAG AACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACG CCTGTTCCCTGCGAATCCTCCGGCAGAGTTTCG GCTACAAAAGTTTGCTTCATTCATCACCAGTAT TCCACAGGACAAGTGAGCGTGGAGATTGAATG GGAGCTGCAGAAAAGAAAACAGCAAACGCTGG AATCCCGAAGTGCAGTATACATCTAACTATGCA AAATCTGCCAACGTTGATTTCACTGTGGACAAC AATGGACTTTATACTGAGCCTCGCCCCATTGGC ACCCGTTACCTACCCGTCCTGTAATTGTGT GTTAATCAATAA[ACCGGT]		ENSKRWNPEVQ YTSNYAKSANV DFTVDNNGLYT EPRPIGTRYLTRP L	
19	F129L, H642N, および V598I	ggfaccaaaaaafgttctctcgtcactgggcatgaatctgatctgttcc ctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaatatctgttcaactca cggacagaaaagactgttttagtgccttccgtgcagaatctcaaccggt tctgtctcaaaaaggcgtatcagaactgtctacatcattcatatcatgg gaaagggtccagacgttgcactgctcgtctgtcaatgtggattgg atgactgcactttgaacaataaatgatttaaatcagggtATGGCTGCC GATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACAAC CTCTCTGAGGGCATTGCGGAGTGGTGGGACTTG AAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACCA GCAAAAAGCAGGACGACGGCCGGGTCTGGTGC TTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTTCAACG GACTCGACAAGGGGGAGCCCGTCAACGCGGCG GATGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTA CGACCAGCAGTCAAAGCGGGTGACAATCCGT ACCTGCGGTATAACCACGCCGACGCCGAGTTTC AGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGG GGCAACCTCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAA GAAGAGGGTCTCGAACCTTTAGGTCTGGTTGA GGAAGGTGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAAC GTCCGGTAGAGCAGTCGCCACAAGAGCCAGAC TCCTCCTCGGGCATTGGCAAGACAGGCCAGCA GCCCGCTAAAAAGAGACTCAATTTTGGTCAGA CTGGCGACTCAGAGTCACTCCCGACCCACAA CCTCTCGGAGAACCTCCAGCAACCCCGCTGCT GTGGGACCTACTACAATGGCTTCAGGCGGTGG CGCACCAATGGCAGACAATAACGAAGGCGCCG ACGGAGTGGGTAATGCCTCAGGAAATTGGCAT TGCGATTCCACATGGCTGGGCGACAGATCAT CACCACCAGCACCCGAACATGGGCCTTGCCCA CCTATAACAACCACCTCTACAAGCAAATCTCCA GTGCTTCAACGGGGGCCAGCAACGACAACCAC TACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTT GATTTCAACAGATTCCACTGCCATTTCTACCA CGTGAAGTGGCAGGACTCATCAACAACAATTG GGGATTCCGGCCCCAAGAGACTCAACTTCAAGC TCTTCAACATCCAAGTCAAGGAGGTCACGACG	285	MAADGYLPDW LEDNLSEGIREW WDLKPGAPKPK ANQQKQDDGRG LVLPGYKYLGP NGLDKGEPVNA ADAAALEHDKA YDQQLKAGDNP YLRYNHADAEF QERLQEDTSFGG NLGRAVFQAKK RVLEPLGLVEEG AKTAPGKRPV EQSPQEPDSSSI GKTGQQPAKKR LNFQGTGDSSEV PDPQPLGEPAT PAAVGPTTMAS GGGAPMADNNE GADGVGNASGN WHCDSTWLGDR VITSTRTWALP TYNNHLYKQISS ASTGASNDNH FGYSTPWGYFDF NRFHCHFSPRD WQRLINNNWGF RPKRLNFKLFNI QVKEVTINDGV TTIANNLTSTVQ VFSSEYQLPYV LGSAHQGCLPPF PADVFMIPQYGY LTLNNGSQAVG RSSFYCLEYFPS QMLRTGNNFTFS	10 20 30 40

【表 1 - 2 5 - 1】

	AATGATGGCGTCACGACCATCGCTAATAACCTT ACCAGCACGGTTCAAGTCTTCTCGGACTCGGAG TACCAGTTGCCGTACGTCCTCGGCTCTG	YTFEDVPFHSSY AHSQSLDRLMN PLIDQYLYYLN TQNQSGSAQNK DLLFSRGPAGM SVQPKNWLPG
--	--	--

【 0 1 9 4 】

【表 1 - 2 6】

	CGCACCAGGGCTGCCTCCCTCCGTTCCCGGCGG ACGTGTTTCATGATTCCCGCAGTACGGCTACCTAA CGCTCAACAATGGCAGCCAGGCAGTGGGACGG TCATCCTTTTACTGCCTGGAATATTTCCCATCGC AGATGCTGAGAACGGGCAATAACTTTACCTTC AGCTACACCTTCGAGGACGTGCCTTTCACAGC AGCTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGCT GATGAATCCTCTCATCGACCAGTACCTGTATTA CCTGAACAGAACTCAGAATCAGTCCGGAAGTG CCCAAAAACAAGGACTTGCTGTTAGCCGGGGG TCTCCAGCTGGCATGTCTGTTAGCCCAAAAAC TGGTACCTGGACCTGTTACCGGCAGCAGCGC GTTTCTAAAAACAAAACAGACAACAACAACAG CAACTTTACCTGGACTGGTGCTTCAAAAATATA CCTTAATGGGCGTGAATCTATAATCAACCCTGG CACTGCTATGGCCTCACACAAAAGACGACAAAG ACAAGTTCTTTCCCATGAGCGGTGTCATGATTT TTGGAAAGGAGAGCGCCGGAGCTTCAAACACT GCATTGGACAATGTCATGATCACAGACGAAGA GGAAATCAAAGCCACTAACCCCGTGGCCACCG AAAGATTTGGGACTGTGGCAGTCAATCTCCAG AGCAGCAGCACAGACCCTGCGACCGGAGATGT GCATATTATGGGAGCCTTACCTGGAATGGTGTG GCAAGACAGAGACGTATACCTGCAGGGTCTTA TTTGGGCCAAAATTCCTCACACGGATGGACACT TTCACCCGTCTCCTCTCATGGGCGGCTTTGGAC TTAAGAACCCGCTCCTCAGATCCTCATCAAAA ACACGCCTGTTCTCGCAATCCTCCGGCAGAGT TTTCGGCTACAAAGTTTGCTTCATTCATCACCC AGTATTCCACAGGACAAAGTGGGCGTGGAGATT GAATGGGAGCTGCAGAAAGAAAACAGCAAAC GCTGGAATCCCGAAGTGCAGTATACATCTAACT ATGCAAAAATCTGCCAACGTTGATTTCACTGTGG ACAACAATGGACTTATACTGAGCCTCGCCCCA TTGGCACCCGTTACCTCACCCGTCCTGTAAttg tgtgtaatacaataaccggt	PCYRQQRVSKT KTDNNSNFTW TGASKYNLNGR ESIINPGTAMAS HKDDKDKFFPM SGVMIFGKESAG ASNTALDNVMIT DEEEIKATNPVA TERFGTVAVNL QSSSTDPATGDV HIMGALPGMVW QDRDVYLQGP WAKIPHTDGHF HPSPLMGGFGLK NPPPQILIKNTPV PANPPAEFSATK FASFITQYSTGQ VSVEIEWELQKE NSKRWNPEVQY TSNYAKSANVD FTVDNNGLYTEP RPIGTRYLTRPL
--	--	---

10

20

30

【 0 1 9 5 】

40

[00202] 場合によっては、修飾は、AAV血清型6キャプシドのものであり得る。場合によっては、AAVキャプシドタンパク質は、突然変異されまたは他には修飾され得る。突然変異させることができるAAVキャプシドタンパク質は、表2のウイルス血清型のいずれか1つであり得る。修飾AAVキャプシドは、配列番号20～配列番号24のタンパク質配列、または配列番号286～配列番号290の核酸配列のいずれか1つに対して、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70から%、75%、80%、85%90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または最大100%の相同性を含むことができる。場合によっては、WT AAVまたは対照AAVは、配列番号20～配列番号24のタンパク質配列、または配列番号286～配列番号290の核酸配列のい

50

れか1つに対して、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%から%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または最大100%の相同性を含むことができる。場合によっては、主題の突然変異または修飾されたベクターは、表13に開示される配列、配列番号214~配列番号220のいずれか1つに対して、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または最大100%の相同性を含むことができる。

【0196】

【表2-1】

表2: WT AAV キャプシド配列

配列番号	ウイルス血清型	タンパク質配列	配列番号	核酸配列
20	AAV6	MAADGYLPDWLEDNLSEGIR EWWDLKPAPKPKANQQKQ DDGRGLVLPYKYLGPFNGL DKGEPVNAADAAALEHDKA YDQQLKAGDNPYLRYNHAD AEFQERLQEDTSFGGNLGRAV FQAKKRVLPEFGLVEEGAKTA PGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGK TGQQPAKKRLNFGQTGDSSES VPDPQPLGEPATPAAVGPPT MASGGGAPMADNNEGADGV GNASGNWHCDSTWLGDRVIT TSTRTWALPTYNNHLYKQISS ASTGASNDNHYFGYSTPWGY FDFNRFHCHFSRPDWQRLINN NWGFRPKRLNFKLFNIQVKEV TTNDGVTIANNLTSTVQVFS DSEYQLPYVLGSAHQCLPPF PADVFMIPQYGYLTLNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGN NFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQS LDRLMNPLIDQYLYLNRTQ NQSGSAQNKDLLFSRGPAG MSVQPKNWLPGPCYRQQRVS KTKTDNNSNFTWTGASKYN LNGRESIINPGTAMASHKDDK DKFFPMSGVMIFGKESAGASN TALDNVMITDEEIKATNPVA TERFGTVAVNLQSSSTDPAATG DVHVMGALPGMVWQDRDV YLQGPWAKIPHTDGHFHPSP LMGGFGLKHPPQILIKNTPVP ANPPAEFSATKFASFITQYSTG QVSVEIEWELQKENSKRWNP EVQYTSNYAKSANVDFTVDN NGLYTEPRPIGTRYLTRPL	286	atggctgccgatggtfatctccagattggctc gaggacaacctctctgagggcattcgcgagt ggtgggacttgaacctggagccccgaaac caaagccaaccagcaaaagcaggacgac ggccggggtctggtgcttctggctacaagt acctcggaccttcaacggactcgacaagg gggagccccgtaacgcggggatgcagcgc gccctcgcagcacgacaaggcctacgacca gcagctcaaacgggtgacaatccgtacctg cggtataaccacgcccagccgagttcagg agcgtctgcaagaatacgtctttggggg caacctcggcgagcagcttccaggccaa gaagagggtctcgaacctttgctggttga ggaaggtgtaagacggctcctgaaagaa acgtccggtagagcagctgcaccaagagcc agactcctcctcggcattgcaagacaggc cagcagcccgtaaaaagagactcaatttg gtcagactggcgactcagagtcagtcctccga cccacaacctctcgggaacctccagcaac ccccgctgctggtggacctactacaatggctt caggcgggtgcgccaccaatggcagacaata acgaaggcggcgagcagtggttaatgctt caggaaattggcattcgatccacatggctg ggcgacagagtcaccaccagcaccgga acatgggcttggccacctataacaaccact ctacaagcaatctccagtcctcaacgggg gccagcaacgacaaccactactcggctaca gcacccctgggggtatttgaattcaacagat tccactgccattctcaccacgtgactggcag cgactcaacaacaatggggattccggc ccaagagactcaactcaagcttcaacatc caagtcaaggaggtcacgacgaatgatggc gtcagcaccatcgctaataac

10

20

30

40

【0197】

【表 2 - 2】

			<p>ctfaccagcacgggtcaagtctctcggactc  ggagtaccagttgccgtacgtcctcggctctg  cgcaccagggctgcctccctccggtcccggc  ggacgtgtcatgattccgcagtacggctacc  taacgctcaacaatggcagccaggcagtg  gacggcatcctttactgcctgggaatattcc  atcgagatgctgagaacgggcaataacttt  acctcagctacacctcgaggacgtgccttc  cacagcagctacgcgcacagccagagcct  ggaccggctgatgaatcctctcatgaccag  tacctgtattacctgaacagaactcagaatca  gtccggaagtgcacaaaacaaggacttgctg  tttagccgggggtctccagctggcatgtctgt  cagccaaaactggctacctggaccctgtt  accggcagcagcgcgtttcaaaacaaaac  agacaacaacaacagcaactttacctggact  gggtctcaaaataacctaattggcgtga  atctataatcaacctggcactgctatggcctc  acacaaagacgacaaagacaagtctttccc  atgagcgggtgcatgattttgaaaggagag  cgccggagctcaaacactgcatggacaat  gtcatgatcacagacgaagaggaaatcaaa  gccactaaccctggccaccgaaagattg  ggactgtggcagtcactccagagcagca  gcacagaccctgcgaccggagatgtgatg  ttatgggagccttacctggaatggtgtggcaa  gacagagacgtatactgcagggtcctattg  ggccaaaattcctcacacggatggacacttc  accgtctcctctcatggcggtttggactta  agcaccgcctcctcagatcctcatcaaaaa  cacgcctgttctcgaatcctccggcagag  tttcggctacaagtttgctcattcatcacc  agtattccacaggacaagtgcgtggagat  tgaatgggagctgcagaaagaaaacagcaa  acgctggaatcccgaagtgcagtatacatcia  actatgcaaaa</p>
--	--	--	---

10

20

【 0 1 9 8 】

30

【表 2 - 3】

				tctgccaacgttgattcactgtggacaacaat ggactftaactgagcctcgccccattggcac ccgftaacctcacccgtccccgtgtaa
21	AAV4	MTDGYPDWLEDNLSEGVRE WWALQPGAPKPKANQQHQD NARGLVLPGYKYLGPNGLD KGEPVNAADAAALEHDKAY DQQLKAGDNPYLKYNHADA EFQQRQLQGDTSFGGNLGRAVF QAKKRVLLEPLGLVEQAGETA PGKKRPLIESPQQPDSSTGIGK KKGQPAKKLVFEDETGA GD GPPEGSTSGAMSDDSEMRAA AGGAAVEGGQGADGVGNAS GDWHCDSTWSEGHVTTTSTR TWVLPITYNNHLYKRLGESLQ SNTYNGFSTPWGYFDFNRFHC HFSPRDWQRLINNNWGMRPK AMRVKIFNIQVKEVTTSNGET TVANNLTSTVQIFADSSYELP YVMDAGQEGSLPPFPNDVFM VPQYGYCGLVTGNTSQQQTD RNAFYCLEYFPSQMLRTGNNF EITYSFEKVPFHSMYAHSQSL DRLMNPLIDQYLWGLQSTTT GTTLNAGTATTNFTKLRPTNF SNFKKNWLPGPSIKQQGFSKT ANQNYKIPATGSDSLIKYETH STLDGRWSALTPGPPMATAGP ADSKFSNSQLIFAGPKQNGNT ATVPGTLIFTSEEELAATNATD TDMWGNLPGGDQSNLPTV DRLTALGAVPGMVWQNRDIY YQGPWAKIPHTDGHFHPSPLI GGFGLKHPPPQIFIKNTPVPAN PATTFSSTPVNSFITQYSTGQV SVQIDWEIQKERSKRWNPEVQ FTSNYQQNSLLWAPDAAGK YTEPRAIGTRYLTHHL	287	atgactgacgggttaccttcagattggctaga ggacaacctctctgaaggcgttcgagagtg tggcgctgcaacctggagcccctaaacct aaggcaaatcaacaacatcaggacaacgct cggggtcttgctcctcgggttacaaatcctc ggaccggcaacggactcgacaaggggga acctgtcaacgcagcggcggcggcggc tcgagcagcacaagcctacgaccagcag ctcaaggccggtgacaacctactcctcaagt acaaccacgccgacgagggtccagcag cggctcaggcgacacatcgttgggggca acctcggcagcagcagctctccaggccaaa agagggtctctaacctctgtctggttgagc aagcgggtgagcagcgtcctctggaagaag agaccgttgattgaatcccccaagcagccg actctccacgggtatcggcaaaaaggca agcagccggctaaaagaagctcgtttcga agcagaaactggagcagcggcggcggc ctgagggtcaactcggagcctatgctgat gacagtgagatgcgtgcagcagctggcggga gctgcagtcgagggcggaagaaggtccgat ggagtggttaatgcctcgggtgattggcatt gcgattccacctggtctgagggccacgtcac gaccaccagcaccagaacctgggtcttgcc cacctacaacaaccacctctacaagcagctc ggagagagcctgcagccaacacctacaac ggattctccacctggggatacttgacttc aacccctcactgccactctcaccacgtga ctggcagcgactatcaacaacaactgggg catgcgaccaaagccatgcgggtcaaaat ctcaacatccaggtcaaggaggtcacgacg tcgaacggcgagacaacgggtgctaataac cttaccagcaggtcagatcttgcggactc gtcgtacgaactgccgtac

10

20

30

【 0 1 9 9 】

【表 2 - 4】

			<p>gtgatggatcgggtcaagaggcagcctg  cctcctttccaacgacgtcttatgggtccc  cagtacggctactgtggactggfaccggca  acactcgcagcaacagactgacagaaatgc  cttctactgcctggagtacttccitcgagatg  ctgaggactggcaacaacttgaattacgta  cagtttgagaagggtccttccactcgtatga  cgcgcacagccagagcctggaccggctgat  gaacctctcatcgaccagtacctgtgggga  ctgcaatcgaccaccaccggaaccaccctg  aatgccgggactgccaccaccaactttacca  agctgcggcctaccaactttccaacttaaaa  agaactggctcccgggcttcaatcaagca  gcagggtcttcaaaagtccaatcaaaac  tacaagatccctgccaccgggtcagacagtc  tcatcaaatcagagacgcacagactctgga  cggagatggagtgcctgacccccggacc  tcaatggccacggctggactcggacag  caagttcagcaacagccagctcatcttgcgg  ggcctaaacagaacggcaacacggccacc  gtaccgggactctgatcttacctcagagga  ggagctggcagccaccaacgccaccgata  cggacatgtgggcaacctggcgggtg  accagagcaacagcaacctgccgaccgtg  gacagactgacagccttgggagccgtgcct  ggaatggcttgcaaaacagagacattact  accagggtccatttggccaagattcctcat  accgatggacacttaccctcaccgctgat  tgggtgggttgggtgaaacaccgcctcctc  aaatfittatcaagaacccccgtacctgcg  aatcctgcaacgacctcagctctaccgggt  aaactccttactactcagtacagcactggcc  aggtgtcgggtcagattgactgggagatcca  gaaggagcgggtccaacgctggaaccccg  aggctccagttacctccaactacggacagca  aaactctctgttgggtcccgat</p>
--	--	--	---

10

20

【 0 2 0 0 】

30

【表 2 - 5】

				gaggctgggaaatacactgagcctagggt atcggtagccgctacctcaccaccacctgta a
22	AAV5	MSFVDHPPDWLEEVGEGFRE FLGLEAGPPKPKPNQQHQDQ ARGLVLPGYNYLPGNGLDR GEPVNRADDEVAREHDISYNEQ LEAGDNPYLKYNHADADEFQE KLADDTSGGNLKGAVFQAK KRVLEPFGLVEEGAKTAPTGK RIDDHFPRKKARTEEDSKPS TSSDAEAGPSGSQQLQIPAQP ASSLGADTMSAGGGGGLGDN NQGADGVGNASGDWHCDST WMGDRVVTKSTRTWVLP SYNNHGYREIKSGSVDGSNANA YFGYSTPWGYDFNRFHSHW SPRDWQRLINNYWGRFRSLR VKIFNIQVKEVTVQDSTTTIAN NLTSTVQVFTDDDYQLPYVV GNGTEGCLPAFPQVFTLPQY GYATLNRDNTENPTERSFFC LEYFPSKMLRTGNNFEFTYNF EEVPFHSSFAPSQNLFKLANPL VDQYLRFVSTNNTGGVQFN KNLAGRYANTYKNWFPGPM GRTQGWNLGSVNRASVSAF ATTNRMELEGASYQVPPQPN GMTNNLQGSNTYALENTMIF NSQPANPGTTATYLEGNMLIT SESETQPVNRVAYNVGGQMA TNNQSSTTAPATGTYNLQEI VPGSVWMERDVYLQGPWAKI PETGAHFHPSAMGGFLKHP PPMMLIKNTPVPGNITSFSDVP VSSFITQYSTGQVTMEMEWEL KKENSKRWNPEIQYTNNYND PQFVDFAPDSTGEYRTRPIGT RYLTRPL	288	atgtctttgtgatccctccagattggtgg aagaagtgtggaaggctcgcgagitttgg gccttgaagcgggcccaccgaaaccaaac ccaatcagcagcatcaagatcaagccogtg gtcttgtgctgctgtataactatctggac ccggaacggctcgcagcagcagcctg tcaacagggcagacgaggtcgcgcgagag cacgacatctgtacaacgagcagctgagg cgggagacaacccctacctcaagtacaacc acggcgagccgagttcaggagaagctcg ccgacgacacatctcggggaaacctcg gaaaggcagcttctcaggccaagaaaagg ttctcgaacctttgacctggtgaagggtg ctaagcggcccctaccgaaagcggatag acgaccacttccaaaagaaagaggctcg gaccgaaggactccaagcctccacctc gtcagacgccaagctggaccagcggatc ccagcagctgcaaatcccagccaaccagc ctcaagttgggagctgataaatgctcggg gaggtggcggccattggcgacaataacc aaggtgccgatggagtgccaatgctcgg gagattggcattgcgattccacgtggatggg ggacagagctgtaccaagtcaccggaac ctgggtgctgccagctacaacaaccacca gtaccgagagatcaaagcggctcgtcga cggaaacacgccaacgcctactttgatac agcaccctgggggactttgactttaaccg ctccacagccactgggccccgagactg gcaaaagactcatcaacaactctgggctc agaccctggctcctcagagcacaatctca acattcaagcacaagaggtcaggtgcagga ctccaccaccaccatcgccaacaacctacc tccaccgtccaaggtttacggagcagacta ccagctgccctacgtcgtcggcaacgggac cgagggatgctcggcctccct

10

20

30

【 0 2 0 1 】

【表 2 - 6】

			<p>ccgcaggctttacgctgccgagctacggta  cgcgacgctgaaccgcgacaacacagaaa  atcccaccgagaggagcagcttcttgccta  gagfacttcccaagaagatgctgagaacgg  gcaacaactttaggtttacctacaacttgagg  aggfgccctccactccagctcgcctccagt  cagaacctgtcaagctggccaaccgctgg  tggaccagtactgtacccttctgtgagcaca  aataaactggcggagtccagttcaacaaga  acctggccgggagatacgaacacacctaca  aaaactgggtcccggggccatgggcccga  cccaggctggaacctgggctccgggtca  accggccagtgtcagccttccaccaga  ccaataggatggagctcagggcgcgagtt  accagggtgccccgcagccgaacggcatg  accaacaacctccaggcagcaaacctat  gccctggagaacctatgatctcaacagcc  agccggcgaaccgggaccaccgccacg  tacctcagggcaacatgctcatcaccagcg  agagcagacgcagccggtgaaccgctg  gctacaacgctggcggcagatggccac  caacaaccagagctccaccactgccccgc  gaccggcacgtacaacctccaggaaatcgt  gcccggcagcgtgtgatggagaggacg  tctacctcaaggacctctggccaagat  cccagagacggggcgcacttaccctct  ccggccatggcggttcgactcaaac  ccaccgccatgatgctcatcaagaacacgc  ctgtgcccggaaatataccagcttctcgac  gtgcccgtcagcagcttcatcaccagtaca  gcaccggcaggtcaccgtggagatggagt  gggagctcaagaaggaaaactccaagaggt  ggaaccagagatccagtacacaacaact  acaacgacccccagtttggacttggcccc  gacagcaccggggaatacagaaccaccag  acctatcgggaaccgataccttaccgaccc  ctttaa</p>
--	--	--	--

10

20

30

【 0 2 0 2 】

【表 2 - 7】

23	AAV11	MAADGYLPDWLEDNLSEGIR EWWDLKPGAPKPKANQQKQ DDGRGLVLPGYKYLGPFNGL DKGEPVNAADAAALEHDKA YDQQLKAGDNPYLRYNHAD AEFQERLQEDTSFGGNLGRAV FQAKKRVLLEPLGLVEEGAKT APGKKRPLESPQEPDSSSGIGK KGKQPARKRLNFEEDTGAGD GPPEGSDTSAMSSDIEMRAAP GGNAVDAGQGSDDVGNASG DWHCDSTWSEKGVTTTSTRT WVLPPTYNNHLYLRLGTTSSSN TYNGFSTPWGYFDNRFHCHF SPRDWQRLINNNWGLRPKAM RVKIFNIQVKEVTTSNGETTV ANNLTSTVQIFADSSYELPYV MDAGQEGSLPPFPNDVFMVP QYGYCGIVTGENQNQTDRNA FYCLEYFPSQMLRTGNNFECA NNFEKVPFHSMYAHQSOLDRL MNPLLDQYLWHLQSTTSGET LNQNAATTFGKIRSGDFAFY RKNWLPGPCVKQQRFSKTAS QNYKIPASGGNALLKYDTHY TLNNRWSNIAPGPPMATAGPS DGDFSNAQLIFGPSVTGNTTT SANNLLFTSEEEIAATNPRDTD MFGQIADNNQNATTA PITGNV TAMGVLPGMVWQNRDIYYQ GPIWAKIPHADGHFHPSPBIGG FGLKHPPPQIFIKNTPVPANPA TTFTAARVDSFITQYSTGQVA VQIEWEIEKERSKRWNPEVQF TSNYGNQSSMLWAPDITGKY TEPRVIGSRYLTNHL	289 atggctgctgacggttatctccagattggetc gaggacaacctctctgagggcattcggagat ggtgggacctgaaacctggagccccgaag cccaaggccaaccagcagaagcaggacga cggccggggcttggctcctggctacaag tacctcggaccctcaacggcactcgacaagg gggagccccgtaacggcggcagcagc ggccctcagcagcagacaaggctacgacc agcagctcaaagcgggtgacaatccgtacct gcggtataaccacgccgacgccgagttcag gagcgtctgaagaagatacgtctttgggg gcaacctcggcgagcagctctccaggcca agaagagggtactcgaacctcgggcctggt tgaaagaggctctaaaacggctcctgaaa gaagagaccgttagatcaccacaagacc cgactcctcctcggcctcggcaaaaagg caaacaaccagccaagaaggcctcaacttt gaagaggacactggagccggagacggacc ccctgaaggatcagataccagcgcctatgctt cagacattgaaatgctgagcaccgggagc gaaatgctgctgagcgggacaaggtccga tggagtgaggtaatgcctcgggtgattgacat gcgattccacctggtctgagggaaggctcac aacaacctcagaccagaacctggctctgcc acctacaacaaccacttgacctgctcctcgg aacaacatcaagcagcaacacctacaacgg attctcaccctcgggataatgacttcaa cagattccactgtcactctcaccacgtgactg gaaaagactatcaacaacaactggggacta cgacaaaagccatgcgcgttaaaatctca ataccaagttaaggaggctcaacaacgtcga cggcgaactacggctcctaataaccttacc agcacgggtcagatattcggactcgtcgtat gagctcccgtacgtgatggacgtggacaa gaggggagcctgcctccttcccaatgacg tggtcatggtgcctcaatggtactgtggca tc
----	-------	---	---

10

20

30

【 0 2 0 3 】

【表 2 - 8】

			<p>gtgactggcgagaatcagaacaaacggac  agaaacgctttactgctggagtatttcctt  cgcaaatgttgagaactggcaacaacttgaa  atggcftacaacttgagaagggtgccgtcca  ctcaatgtatgctcacagccagagcctggac  agactgatgaatcccctcctggaccagtacct  gtggcactfacagtgcactacctctggagag  actctgaatcaaggcaatgcagcaaccacat  ttggaaaaatcaggagtggagacttgccttt  acagaaaagaactggctgctggccttgtgtt  aaacagcagagattctcaaaaactgccagtc  aaaatfacaagattcctgccagcgggggcaa  cgctctgttaaagtatgacaccactatacctt  aaacaaccgctggagcaacatcgccccg  gacctcaatggccacagccggaccttggg  atggggactcagtaaccccagcttalattc  cctggaccatctgtaccggaatacaaca  ctcagccaacaatctgtttttacatcagaag  aagaaatgctgccaccaaccaagagaca  cgacatgtttggccagattgctgacaataat  cagaatgctacaactgctccataaccggca  acgtgactgctatgggagtgtgcctggcat  gggtgtggcaaacagagacattactaccaa  gggccaatttggccaagalcccacacgcg  gacggacatftcaicctcaccgctgattgt  gggtttggactgaaacaccgctcccaga  tattcatcaagaacaccccgtacctgccaatc  ctcgacaacctcactgcagccagagtggga  ctcttcatcacacaatacagcaccggccag  gtcgtgttcagattgaatgggaaattgaaaa  ggaacgctccaacgctggaatcctgaagtg  cagtttactcaaaactatgggaaccagtctct  atgttgggctcctgatacaactgggaagta  tacagagccgagggtattggctctcgttatt  gactaatcattgtaa</p>
--	--	--	--

10

20

【 0 2 0 4 】

30

【表 2 - 9】

24	AAV12	MAADGYLPDWLEDNLSEGIR EWWALKPGAPQPKANQQHQ DNNGRGLVLPGYKYLGPFNGL DKGEPVNEADAAALEHDKAY DKQLEQGDNPYLKYNHADAE FQQLATDTSFGGNLGRAVFQ AKKRILEPLGLVEEVKTAPG KKRPLEKTPNRPTNPDSGKAP AKKKQKDGEPADSARRTLDF EDSGAGDGPPEGSSSGEMSHD AEMRAAPGGNAVEAGQGAD VGVNASGDWHCDSTWSEGR VTTTSTRTWVLPYNNHLYLR IGTTANSNTYNGFSTPWGYFD FNRFHCHFSRPDWQRLINN WGLRPKSMRVKIFNIQVKEVT TSNGETTANNLTSTVQIFAD STYELPYVMDAQEGSFPPFP NDVFMVPQYGYCGVVTGKN QNQTDRNAFYCLEYFQSML RTGNNFEVSYQFEKVPFHSMY AHSQSLDRMMNPLLDQYLW HLQSTTTGNSLNQGTATTTYG KITTGDFAYYRKNWLPGACIK QQKFSKNANQNYKIPASGGD ALLKYDHTTLNGRWSNMAP GPPMATAGAGDSDFSNSQLIF AGPNPSGNITTSNNLLFTSEE EIATTNPRDITDMFGQIADNNQ NATTAPHIANLDAMGIVPGM VWQNRDIYYQGPIWAKVPHT DGHFHPSPMLMGFGLKHPPPQ IFIKNTPVPANPNTTFAARINS FLTQYSTQVAVQIDWEIQKE HSKRWNPEVQFTSNYGTQNS MLWAPDNAGNYHELRAIGSR FLTHHL	290	atggctgctgacgggtatctccagattggctc gaggacaacctctcgaaggcattogcgagt ggfgggcgctgaacctggagctccacaac ccaaggccaaccaacagcatcaggacaac ggcaggggctcttgcttccctgggtacaagta cctcggaccctcaacggactcgacaagg agagccggctcaacgagggacgcccggg ccctcagcagcacaaggcctacgacaagc agctcagcagggggacaaccgtatctca agtacaaccacgccgacccgagttccagc agcgctggcgaccgacaccttttggggg caacctcggcgagcagctccaggccaa aaagaggattctcagcctctgggtcgtgtg aagagggcgtaaaacggctctggaaga aacgccattagaaaagactccaatcggcc gaccaaccggactctggaaggccccgg ccaagaaaaagcaaaaagcggcgaacca gccgactctgctagaaggacactgactttg aagactctggagcagggagacccccctg agggatcatctccggagaaatgctcatgat gctgagatcgtcggcgccaggcggaat gctgtcgggggggacaagggtccgatgg agtgggtaatcctccgggtgattggcatgcg attccacctgtcagagggccgagtcaccac caccagcaccgaaactgggtcctaccac gtacaacaaccactgtacctcggaatcggg acaacggccaacagcaacacctacaacgg attctccaccctggggatacttgactttaa ccgcttccactgccacttttcccacgcgact ggcagcgactcatcaacaactgggggac tcaggccgaaatcgatcgtgttaaatctc aacatacaggtcaaggaggtcacgacgtca aacggcgagactacggctgctaataacctta ccagcacggttcagatcttgcggattcgagc tatgaactcccatacgtgatggacggcggc aggaggggagcttccctccgttcccaacga cgtcttatggttcccaatacggatactgc
----	-------	---	-----	--

10

20

30

【表 2 - 1 0】

			<pre> ggagttgtcactggaaaaaccagaaccag acagacagaaatgccttttactgcctggaata ctttccatcccaaatgctaagaactggcaaca atfttgaagtcagtfaccaatftgaaaagtcc ttccattcaatgtacgcgcacagccagagcc tggacagaatgatgaatccttactggatcagt acctgtggcatctgcaatcgaccactaccgg aaatcccttaatacaaggaacgctaccacca cgtacgggaaaattaccactggagacttgc ctactacagaaaaactgggtcctggagcc tgcattaaacaacaaaaatftcaagaatgcc aatcaaaactacaagatfccgccagcggg ggagagccctttaaagtatgacacgcatac cactctaaatggcgatggagtaacatggct cctggacctccaatggcaaccgaggtgcc ggggactcggatfttagcaacagccagctga tcttggccggaccaatccgagcgtaacac gaccacatctcaacaattgtgttacctca gaagaggagatgccacaacaaccacga gacacggacatgttggacagatgcagata ataatcaaatgccaccaccgccctcacaat cgtaacctggacgctatgggaattgtcccg gaatggctggcaaacagagacatctacta ccaggccctatftggccaaggtccctcac acggacggacactttcaccttcgccgctgat gggaggattggactgaaacacccgccicca cagatttcatcaaaaacacccccgtaaccgc caatccaatactacctttagcgtgcaagga ftaattcttctgacgcagtacagaccggac aagttgccgttcagatcactgggaaattcag aaggagcattccaacgctggaatcccgaa gtcaatttactcaactacggcactcaaat ctatgctgtggctcccgacaatgctggcaa ctaccacgaactccggctattgggtccgtt tcctaccaccactgtaa </pre>
--	--	--	--

10

20

【 0 2 0 6】

[00203] 場合によっては、修飾は、A A V 血清型 6 キャプシドのものであり得る。場合によっては、主題の変異 A A V キャプシドタンパク質（または主題の核酸によってコードされる突然変異 A A V キャプシドタンパク質）は、表 3 におけるタンパク、配列番号 2 5 ~ 配列番号 3 2、または核酸配列、配列番号 2 9 1 ~ 配列番号 2 9 7 のいずれか 1 つに対して、約 1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または最大 1 0 0 % の相同性を含むことができる。

30

【 0 2 0 7】

【表 3 - 1】

表3: AAV キャプシドキメラの主なリーディングフレーム

配列番号	名称	タンパク質配列	配列番号	核酸配列
25	AAV4VP1u - AAV6VP2/ 3 キメラ7	MTDGYLPDWLEDNLSEGVRE WWALQPGAPKPKANQQHQD NARGLVLPGYKYLGPNGLD KGEPVNAADAAALEHDKAY DQQLKAGDNPYLKYNHADA EFQQLRQGDTSFSGNLGRAVF QAKKRVLLEPLGLVEQAGETA PGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGK TGQQPAKKRLNFGQTGDSSES VPDPQPLGEPATPAAVGPTT MASGGGAPMADNNEGADGV GNASGNWHCDSTWLGDREVIT TSTRTWALPTYNNHLYKQISS ASTGASNDNHYFGYSTPWGY FDFNRFHCHFSPRDWQRLINN NWGFRPKRLNFKLFNIQVKEV TTNDGVTIANNLSTVQVFS DSEYQLPYVLGSAHQGLPPF PADVFMIPQYGYLTLNNGSQA VGRSSFYCLEYFPSQMLRTGN NFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQS LDRLMNPLIDQYLYLNRTO NQSGSAQNKDLLFSRGSPAG MSVQPKNWLPGPCYRQQRVS KTKTDNNSNFTWTGASKYN LNGRESIINPGTAMASHKDDK DKFFPMSGVMIFGKESAGASN TALDNVMITDEEIKATNPVA TERFGTVAVNLQSSSTDPATG DVHVMGALPGMVWQDRDV YLQGPWAKIPHTDGHFHPS LMGGFGLKHPPPQILKNTVPV ANPPAEFSATKFASFITQYSTG QVSVEIEWELQKENSKRWN EVQYTSNYAKSANVDFIVDN NGLYTEPRPIGTRYLTRPL	291	atgactgacgggtacctccagattggctaga ggacaacctctctgaaggcgctcagagtg tggcgctgcaacctggagcccctaaacc aaggcaaatcaacaacatcaggacaacgct cggggctctgtgctccgggtacaataacctc ggacccggcaacggactogacaaggggga accctcaacgcagcggagcggcagccc tcgagcagacaaggcctaccagcagcag ctcaaggccggtgacaacccctacctcaagt acaaccacgccgacgaggattccagcag cggctcaggcgacacatggttggggca acctggcagagcagcttccagccaaaa agagggctctgaacctctgtctggtgagc aagcgggtgagcggctcctggaagaaa cgtccggttagagcagctgcacaaagacca gactcctcctcggcattggcaagacaggcc agcagcccctaaaaagactcaatttgg cagactggcgactcagagctcagctcccgac ccacaacctctcggagaacctccagcaacc cccgtgctgtggacactactacaatggcttc aggcgggtggcgaccaatggcagacaataa cgaaggcggcggagtggtggaatgcctc aggaaatggcattgcgattccacatgctgg gagcagagatcatcaccaccagcaccgaa catggccttgccacctataacaaccacctc tacaagcaaatcctcagtgctcaacggggg ccagcaacgacaaccactactcggctacag caccctcgggggtatttgaattcaacagatt ccactgccattctcaccacgtgactggcagc gactcatcaacaacaattgggattccggcc caagagactcaactcaagctctcaaatcc aagtcaaggaggtcagcagcaatgatggcg tc

10

20

30

【 0 2 0 8 】

【表 3 - 2】

			<p>acgaccatcgcctaataaccttaccagcacgg  ftcaagtctctcggactcggagtaccagttgc  cgtacgtcctcggctctcgcaccagggtg  cctccctcgtcccggcggactgttcatga  ftccgcagtacggctacctaacgctcaacaat  ggcagccaggcagtgaggacggatcctttt  actgcctggaatatttccatcgcagatgctg  agaacgggcaataactttaccttcagctacac  cttcgaggacgtgcctttccacagcagctac  gcgcacagccagagcctggaccggctgat  gaatcctctatcagccagctacgttattacct  gaacagaactcagaatcagtcggaaagtgc  ccaaaacaaggactgtctgttagccggggg  tctccagctggcatgtctgttcagccaaaaa  ctggctacctggaccctgttaccggcagcag  cgcgttctaaaaaaaaacagacaacaaca  acagcaactttacctggactgggtctcaaat  ataaccttaatggcgtgaatctataatcaacc  ctggcactgctatggcctcacacaaagacga  caaagacaagtcttccatgagcgggtfca  tgattttgaaaggagagcggcggagcttc  aaactgcatggacaalgtatgatcacag  acgaagaggaaatcaagccactaaccccg  fggccaccgaaaagatttggactgtggcagt  caatcaccagagcagcagcacagaccctgc  gaccggagatgtcatgttatgggagcctfa  cctggaatggtgtggcaagacagagacgtat  acctgcagggtcctatttggccaaaattcct  cacacggatggacacttcacccgtctctct  catggcggcttggacttaagcaccgcct  cctcagatcccatcaaaaacacgcctgttct  gcgaatccccggcagagtttccggctaaa  agtttcttcattcatcaccagatfccacag  gacaagtgagcgtggagattgaatgggagc  tgcagaaaacagcaaacgctggaatc  ccgaagtgcagtat</p>
--	--	--	---

10

20

【 0 2 0 9 】

30



【表 3 - 4】

			<p>acgaccatcgctaataacctaccagcaggg  tcaagcttctcggactcggagtaccagttgc  cgtacgtcctcggctctgcgccaccagggtg  cctccctccgtfcccgcgacgtgtcatga  ttccgcagtacggctacctaacgctcaacaat  ggcagccaggcagtgggacggatcctttt  actgcctggaatattccatcgcagatgctg  agaacgggcaataactttacctcagctacac  cttcgaggacgtgcctttccacagcagctac  gcgcacagccagagcctggaccggctgat  gaatcctctcatcgaccagtacctgtattacct  gaacagaactcagaatcagtcggaaagtgc  ccaaaacaaggacttgcgttttagccggggg  tctccagctggcatgtctgtcagccaaaaa  ctggctaccctggaccctgtaccggcagcag  cgcgtttctaaaacaaaacagacaacaaca  acagcaactttacctggactggtctcaaaat  ataaccttaatgggcgtgaatctataatcaacc  ctggcactgctatggcctcacaaaagacga  caaaagacaagtcttcccatgagcgggtgca  tgattttgaaaggagagcggcggagctc  aaactctcattggacaatgcatgatcacag  acgaaagaggaaatcaaagccaactaaccgg  tggccaccgaaagatttgggactgtggcagt  caatctccagagcagcagcagaccctgc  gaccggagatgtcatgttatgggagcctta  cctggaatggtgtggcaagacagagacgtat  acctgcagggtcctalttggccaaaatcct  cacacggatggacacttcaccctctcctct  catggggccttggacttaagcaccgcct  cotcagatcctcatcaaaaacgcctgttct  gcgaatcctccggcagagtttcggctacaa  agtttgcctcattcatcaccagattccacag  gacaagtgagcgtggagattgaatgggagc  tgcagaaagaaaacagcaaacgctggaatc  ccgaagtgcagtat</p>	10	20
--	--	--	--	----	----

【 0 2 1 1 】

【表 3 - 5】

				<p>acatctaactatgcaaaatctgccaacgtgat                  ttcactgtggacaacaatggactttatactgag                  cctcgcccattggcaccgftacctcacc                  gtcccctgtaa</p>
27	AAV11VP1 u- AAV6VP2/ 3	<p>MAADGYLPDWLEDNLSEGIR                  EWWDLKPGAPKPKANQQKQ                  DDGRGLVLPGYKYLGPFNGL                  DKGEPVNAADAAALEHDKA                  YDQQLKAGDNPYLRYNHAD                  AEFQERLQEDTSFGGNLGRAV                  FOAKKRVLEPLGLVEEGAKT                  APGKKRPVEQSPQEPDSSSGIG                  KTGQQPAKKRLNFGQTDSE                  SVPDPQPLGEPATPAAVGP                  TMASGGGAPMADNNEGADG                  VGNASGNWHCDSTWLGDRVI                  TTSTRTWALPTYNNHLYKQIS                  SASTGASNDNHYFGYSTPWG                  YDFNRFHCHFSPRDWQRLIN                  NNWGFPRKRLNFKLFNIQVKE                  VTTNDGVTTIANNLTSTVQVF                  SDSEYQLPYVLGSAHQGCLPP                  FPADVFMIPQYGYLTLNNGSQ                  AVGRSSFYCLEYFPSQMLRTG                  NNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHS                  QSLDRLMNPLIDQYLYLNRT                  QNQSGSAQNKDLLFSRGSAG                  MSVQPKNWLPGPCYRQQRVS                  KTKTDNNSNFTWTGASKYN                  LNGRESIINPGTAMASHKDDK                  DKFFPMSGVMIFGKESAGASN                  TALDNVMITDEEEIKATNPVA                  TERFGTVAVNLQSSSTD PATG                  DVHVMGALPGMVWQDRDV                  YLQGPIWAKIPHTDGHFHSP                  LMGGFGLKHPPPQLIKNTPVP                  ANPPAEFSATKFASFITQYSTG                  QVSVEIEWELQENSKRWNP                  EVQYTSNYAKSANVDFTVDN                  NGLYTEPRPIGTRYLTRPL</p>		<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>

【 0 2 1 2 】

【表 3 - 6】

<p>28</p> <p>AAV12VP1 u- AAV6VP2/ 3 キメラ8</p>	<p>MAADGYLPDWLEDNLSEGIR EWWALKPGAPQPKANQQHQ DNNGRLVLPGYKYLGPFNGL DKGEPVNEADAAALEHDKAY DKQLEQGDNPYLKYNHADA EQQLATDTSFGGNLGRAVFO AKKRILEPLGLVEEGVKTAPG KKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTG QQPAKKRLNFGQTGDSSEVPD PQPLGEPATPAAVGPTTMS GGGAPMADNNEGADGVGNA SGNWHCDSTWLGDVVITST RTWALPTYNNHLYKQISSAST GASNDNHYFGYSTPWGYFDF NRFHCHFSRWDQRLINNNW GFRPKRLNFKLFNIQVKEVTT NDGVTTIANLNTSTVQVFSDS EYQLPYVLGSAHQGLPPFPA DVFMIQYGYLTLNNGSQAV GRSSFYCLEYFPSQMLRTGNN FTFSYTFEDVPPHSSYAHSQSL DRLMNPLIDQYLYLNRTOQ QSGSAQNKDLLFSRGSFAGMS VQPKNWLPGPCYRQQRVSKT KTDNNNSNFTWTGASKYNLN GRESIINPGTAMASHKDDKDK FFPMSGVMIFGKESAGASNTA LDNVMITDEEIKATNPVATE RFGTVAVNLQSSSDPATGDV HVMGALPGMVWQDRDVYLQ GPIWAKIPHTDGHFHPSPLMG GFGLKHPPQILIKNTPVPANP PAEFSATKFASFITQYSTGQVS VEIEWELQKENSKRWNPEVQ YTSNYAKSANVDFTVDNNGL YTEPRPIGTRYLTRPL</p>	<p>293</p>	<p>atggctgctgacgggtatctccagattggctc gaggacaacctctgaaggcattcgcgagt ggtggcgctgaaacctggagctccacaac ccaaggccaaccaacagcatcaggacaac ggcagggtcttggcttccctgggtacaagta cctcggacctcaacggactcgacaagg agagccggtaacaggcagacgccggg ccctcggcagcacaaggctacgacaagc agctcggcagggggacaacctgtatctca agtacaaccacggcagcggcgagttccagc agcgttggcagccgacacctctttggggg caacctggcgagcagcttccaggccaa aaagaggattctcagcctctgggtctggtg aagggggcgtaaaaggctcctggaaaga aacgtccgtagagcagtcgccacaagagc cagactcctcctgggcatggcaagacagg ccagcagccgctaaaagagactcaatft ggtcagactggcagctcagagcagctccc gaccacaacctctcggagaacctccagca accccgcctgctgggacctactacaatgg ctcagcgggtggcgaccaatggcagaca ataacgaaggcgccgacggagtgggtaatg cctcaggaaattggcattgcattccatgg ctggcgacagagctcaccaccagcacc cgaacatggcctgcccacctaacaacc acctctacaagcaaatctcagcttcaacg ggggccagcaacgacaaccactactcggc tacagcaccctgggggtatfttgattcaac agattccactgccatttctaccacgtactgg cagcagctcatcaacaactgggattcc ggccaagagactcaactcaagctcticaa catccaagtcaaggaggtcacgacgaatgat ggcgtcacgacctcgtataaccttacc gcacgggtcaagcttctcggactcggagtac cagttgccgtactcctcggctcgcgacc agggtgcctcctcctcggcggcagct gttc</p>
--	--	------------	---

10

20

30

【 0 2 1 3 】

【表 3 - 7】

			<p>atgattccgagtagggctaacgctcaa  caatggcagccagggcagtgaggcggatc  cttttactgctggaataatfcccacgcgatg  ctgagaacgggcaataactttaccctcagcta  caccttcgaggacgtgccttccacagcagct  acgcgcacagccagagcctggaccggcctg  atgaatcctctcatcgaccagctgtattac  ctgaacagaactcagaatcagccggaagtg  ccaaaaaaggactgctgttagccgggg  gtctccagctggcatgtctgtcagccaaaa  actggctacctggaccctgtaccggcagca  gcgcgtttctaaaaaaaacagacaacaac  aacagcaactttaccctggactggtgcttcaa  atataaccttaatggcgtggaatctataatcaa  ccctggcactgctatggcctcacacaagac  gacaaagacaagtcttcccatgagcgggtg  catgattttgaaaaggagagcggcggagct  tcaaacactgcattggacaatgcatgacac  agacgaagaggaaatcaaagccactaacc  cgtggccaccgaaagatttggactgtggca  gtcaatciccagagcagcagcacagaccct  gcgaccggagatgtcatgttatgggagcct  tacctggaatggtgtggcaagacagagacgt  atacctgcagggtcctatttggccaaaattc  ctcacacggatggacacttaccctgtcct  ctcatgggcggcttggactaagcaccgc  ctcctcagatcccatcaaaaacgcctgttc  ctgcgaatcctccggcagagtttcggctaca  aagtttctctcattcatcaccagattccacag  gacaagtgagcgtggagattgaatgggagc  tgcaaaaacagcaaacgctggaatc  cogaagtgcagtatacatctaactatgcaaaa  tcigccaacgttgattcactgtggacaacaat  ggacttatactgagcctcggcccattggcac  ccgttacctcaccgtcccctgtaa</p>
--	--	--	---

10

20

【 0 2 1 4 】

30

【表 3 - 8】

<p>29</p> <p>AAV4VP1/ 2- AAV6VP3 キメラ3</p>	<p>MTDGYPDWLEDNLSEGVRE WWALQPGAPKPKANQQHQD NARGLVLPGYKYLGPNGLD KGEPVNAADAAALEHDKAY DQQLKAGDNPYLKYNHADA EFQQLQGDTSFGGNLGRAVF QAKKRVLLEPLGLVEQAGETA PGKKRPLIESPQQPDSSTGIGK KKGQPAKKKLVFEDETGAGD GPPEGSTSGAMSDDSEMASG GGAPMADNNEGADGVGNAS GNWHCDSTWLGDRVITSTR TWALPTYNNHLYKQISSASTG ASNDNHYFGYSTPWGYFDN RFHCHFSPRDWQRLINNNWG FRPKRLNFKLFNIQVKEVTTN DGVTTIANLNTSTVQVFSDE YQLPYVLGSAHQGCLPPFPAD VFMIPQYGYLTLNNGSQAVG RSSFYCLEYFPSQMLRTGNNF TFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLD RLMNPLIDQLYLNRNRTQNQS GSAQNKDLLFSRGSFAGMSV QPKNWLPGPCYRQQRVSKTK TDNNNSNFTWTGASKYNLNG RESIINPGTAMASHKDDDKDF FPMSGVMIFGKESAGASNTAL DNVMITDEEEIKATNPVATER FGTVAVNLQSSSTDPA TG DVH VMGALPGMVWQDRD VYLQG PIWAKIPHTDGHFHPSPLMGG FGLKHPPPQILIKNTPVPANPP AEFSATKFASFITQYSTGQVSV EIEWELQKENSKRWNPEVQY TSNYAKSANVDFTVDNNGLY TEPRPIGTRYLTRPL</p>	<p>294</p>	<p>atgactgacggttacctccagattggctaga ggacaacctctctgaaggcgttgagagtg tggcgctgcaacctggagcccataaacc aaggcaaatcaacaacatcaggacaacgct cggggtctgtgctccgggttacaatactc ggaccggcaacggactcgacaaggggga accgtaacgcagcggacgagccgagcc tcgagcacgacaaggctaccgaccgag ctcaaggccggtgacaacctaccctcaagt acaaccacgcccagcggagttccagcag cggctcaggcggacacatcgtttggggca acctcggcagagcagctctccaggccaaa agagggtctgaacctctgtctggttgagc aagcgggtgagacggctctggaagaag agaccgttgattgaatccccccagcagccg actcctcacgggtatcgcaaaaaggca agcagccggctaaaagaagctgtttcga agacgaaactggagcagcggacggacccc ctgagggatcaactccggagccatgtctgat gacagtgagatggctcagcgggtggcgca ccaatggcagacaatacgaaggcgcgga cggagtggttaatgcctcaggaattggcat tgcgattccacatggctggcgacagagtca tcaccaccagcaccgaacatgggcttgc cacctataacaaccacctcaagcaaatct ccagtctcaacggggccagcaacgaca accactactcggctacagcaccctgggg gtatttgattcaacagattccactccattct caccacgtgactggcagcactcatcaaca caatggggattccggccaagagactcaac ttcaagctctcaacatccaagtaaggaggt cacgacgaatgatggcgtcacgacctcgt aataacctaccagcaggttcaagttctc gactcggagtaccagttccgtacgtctc gctctcgcaccagggtgcctccctccgtt cccggcggacgtgtcatgattccgagtac ggc</p>
---	--	------------	---

10

20

30

【 0 2 1 5 】

【表 3 - 9】

			<p>           tacctaacgctcaacaatggcagccaggca            gtgggacggctacccctttactgctggaatat            tcccatcgagatgctgagaacgggcaata            actttacctcagctacacctcggaggacgtgc            cttccacagcagctacgcgcacagccaga            gcctggaccggctgatgaatcctctcatcga            ccagctgtattacctgaacagaactcaga            atcagtcgggaagtgccaaaacaaggactt            gctgttagccgggggtctccagctggcatgt            ctgtcagccaaaaactggctacctggacc            ctgttaccggcagcagcggcttctaaaaca            aaacagacaacaacaacagcaactttacctg            gactggtcctcaaaataaccttaatgggc            gtgaatctataatcaacctggcactgctatg            gccacacaaaagacgacaagacaagtct            tcccatgagcgggtcatgattttgaaagg            agagcggcggagctcaaacactgcattgga            caatgtcatgatcacagacgaaggaaatc            aaagccactaacccgtggccaccgaaaga            ttgggactgtggcagtcactccagagcag            cagcacagaccctgcgaccggagatgtgca            tgttatgggagcctacctggaatggtgtggc            aagacagagacgtatactgcagggtcctat            ttgggccaaaattcctcacacggatggacact            tcaccctctcctctcatggcggctttggac            ttaagcaccgcctcctcagatcccatcaaa            aacacgcctgtcctgcgaatcctccggcag            agtttcggctacaaagttgctcattcatcac            ccagttccacaggacaagtgagcgtgga            gattgaatgggagctgcagaagaaaacag            caaacgctggaatccgaagtgcagtataca            tctaactatgcaaaatcgccaactgatttca            ctgtggacaacaatggactttatactgagcct            cgccccattggcaccggctacctcaccgctc            ccctgtaa         </p>
--	--	--	---

10

20

【 0 2 1 6 】

【表 3 - 1 0】

<p>30</p> <p>AAV5VP1_2- AAV6VP3 キメラ4</p>	<p>MSFVDHPPDWLEEVGEGGLRE FLGLEAGPPKPKPNQHQDQ ARGLVLPGYNYLGPNGLDR GEPVNRADDEVAREHDISYNEQ LEAGDNPYLKYNHADADEFQE KLADDTSFGGNLGKAVFQAK KRVLEPFGLVEEGAKTAPTGK RIDDHFPKRKKARTEEDSKPS TSSDAEAGPSGSQQLQIPAPQ ASSLGADTMASGGGAPMADN NEGADGVGNASGNWHCDST WLGDRVITSTRTWALPTYN NHLYKQISSASTGASNDNHIF GYSTPWGYFDNRFHCHFSR DWQRLINNNWGRFPRKRLNFK LFNIQVKEVTTNDGVTIANN LTSTVQVFSDEYQLPYVLGS AHQGCLPPFPADVFMIPQYGY LTLNNGSQAVGRSSFYCLEYF PSQMLRTGNNFTFSYTFEDVP FHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQ LYYLNRTQNSGSAQNKDL LFRGSPAGMSVQPKNWLPGP CYRQQRVSKTKTDNNSNFT WTGASKYNLNGRESIINPGTA MASHKDDKDKFFPMSGVMIF GKESAGASNTALDNVMITDEE EIKATNPVATERFGTVAVNLQ SSSDPATGDVHVMGALPGM VWQDRDVYLQGPWAKIPHT DGHFHPSPLMGGFGLKHPPQ ILIKNTPVPANPPAEFSATKFA SFITQYSTGQVSVEIEWELQKE NSKRWNPEVQYTSNYAKSAN VDFTVDNNGLYTEPRPIGTRY LTRPL</p>	<p>295</p>	<p>atgtctttgtgatcacctccagattggtgg aagaaagtggtgaaggtcttcgcgagtttgg gcctfgaagcgggccaccgaaacaaaac ccaatcagcagcatcaagatcaagcccgtg gtctgtgctgcctgggtataactatcicggac ccggaaacggtctcgcgagggagagcctg tcaacaggcagacgaggtcgcgcgagag cacgacatctgtacaacgagcagctgagg cgggagacaacccctacctaagataacc acgcggacgcccaggttcaggagaagctcg ccgacgacacatcttcgggggaaacctg gaaaggcagcttctcaggccaagaaagg ttctgaacctttggcctggtgaagagggtg ctaaagacggcccaccgaaagcggatag acgaccacttccaaaagaagaaggctcg gaccgaagaggactccaagcctccacctc gtcagacgccgaagctggaccagcggatc ccagcagctcaaatccagcccaaccagc ctcaagttgggagctgatacaatgcttcag gggtggcaccacatggcagacaataacg aaggcggcagcaggtgggtaatgcctcag gaaattggcattgcgattccacatggctggc gacagagtcaccaccagcaccgaaaca tgggcctgcccaccataacaaccacctta caagcaaatctccagcttcaacgggggcc agcaacgacaaccactacttcgctacagca ccccctgggggtatttgattcaacagattcc actgccattctcaccagtgactggcagcga ctcatcaacaacaattggggattccggcca agagactcaactcaagctctcaacatccaa gtcaaggaggctcagcaggaatgatggctc acgaccatcgctaataacctaccagcag ttcaagctctcggactcggagtaccagttgc cgtacgtcctcggctcgcgaccagggtg cctcccctggctccggcgcgacgtgtcatga ttccgagctacgctacctaaccgctc</p>
--	--	------------	---

10

20

【 0 2 1 7】

30

【表 3 - 1 1】

			<p>aacaatggcagccaggcagtgaggacggc  atcttttactgctggaatattcccatcgag  atgctgaacggcgaataactttacctcag  ctacacctcgaggacgtgcctttccacagca  gtacgcgcacagccagagcctggaccgg  ctgatgaatcctctcatcgaccagtacctgat  tacctgaacagaactcagaatcagtcggaa  gtgccaaaacaaggactgctgtttagccg  ggggtctccagctggcatgtctgttcagcca  aaaactggctacctggaccctgtaccggca  gcagcgcgtttctaaaacaaaaacagacaac  aacaacagcaactttacctggactggtgctc  aaaatataacctaatggcggtgaatctataat  caaccctggcactgctatggcctcacacaaa  gacgacaaagacaagtccttccatgagcg  gtgtcatgattttgaaaggagagcggcgg  agctcaaacactgattggacaatgtcatgat  cacagacgaagaggaatcaagccactaa  ccccgtggccaccgaaagatttggactgtg  gcagtcaatctccagagcagcagcagac  cctgcgaccggagatgtgcatgttatgggag  ccttacctggaatggtgtggcaagacagaga  cgtatacctcagggtcctatttggccaaaa  ttcctcacaggatggacacttcaccgtctc  ciccatggcggccttggactaagcaccg  cctcctcagatcctcatcaaaaacgcctgtt  cctgcgaatcctccggcagagtttggctac  aaagtttgcttcatcaccagttaccaca  ggacaagtgagcgtggagattgaatgggag  ctgcagaaaagaaacagcaaacctggaat  cccgaagtgcagtatacatctaactatgcaaa  atctgccaacgttgattcactgtggacaacaa  tggactttactgagcctcgccccattggca  cccgttacctcaccgtcccctgtaa</p>
--	--	--	---

10

20

【 0 2 1 8 】

30

【表 3 - 1 2】

31	AAV11VP1 /2- AAV6VP3 キメラ5	MAADGYLPDWLEDNLSEGIR EWWDLKPGAPKPKANQQKQ DDGRGLVLPGYKYLGFNFGL DKGEPVNAADAAALEHDKA YDQQLKAGDNPYLRYNHAD AEFQERLQEDTSFGGNLGRAV FQAKKRVLEPLGLVEEGAKT APGKKRPLESPQEPDSSSGIGK KKGQPARKRLNFEEDTGAGD GPPEGSDTSAMSSDIEMASGG GAPMADNNEGADGVGNASG NWHCDSTWLGDRVITSTRT WALPTYNNHLYKQISSASTGA SNDNHYFGYSTPWGYFDFNR FHCHFSRPDWWQLNNNWGF RPKRLNFKLFNIQVKEVTTND GVTTIANLNTSTVQVFSOSEY QLPYVLGSAHQGLPPFPADV FMIPQYGYLTLNNGSQAVGRS SFYCLEYFPSQMLRTGNNFTF SYTFEDVVPFHSSYAHSQSLDR LMNPLIDQYLYLNRQTQNS GSAQNKDLLFSRGSAPGMSV QPKNWLPGPCYRQQRVSKTK TDNNSNFTWTGASKYNLNG RESIINPGTAMASHKDDKDKF FPMSGVMIFGKESAGASNTAL DNVMITDEEEIKATNPVATER FGTVAVNLQSSSTDPATGDVH VMGALPGMVWQDRDVYLQG PIWAKIPHTDGHFHPSPLMGG FGLKHPPPQILIKNTPVPANPP AEFSATKFASFITQYSTGQVSV EIEWELQKENSQRWNPEVQY TSNYAKSANVDFTVDNNGLY TEPRPIGTRYLTRPL	296	atggctgctgacggttatctccagattggctc gaggacaacctctgagggcattcgcgagt ggtgggacctgaaacctggagccccgaag cccaaggccaaccagcagaagcaggacga cggccggggtctggtgctcctctgctacaag tacctcggaccctcaacgggactgacaagg gggagcccgtcaacgcggcgagcgcagc ggccctcgcagcagacaagcctacgacc agcagctcaaagcgggtgacaatccgtacct gaggataaccacgccgacgccgagttcag gagcgtctgcaagaagatacgtctttgggg gcaacctcggcgcagcagcttccaggcca agaagagggtactcgaacctcgggcctggt tgaagaaggtgctaaaacggctctggaaa gaagagaccgtagatcaccacaagacc cgactcctcctcggcctcggcaaaaagg caaacaaccagccaagaagggtcaacttt gaagaggacactggagccggagcggacc ccctgaaggatcagataccagcccatgtctt cagacattgaaatggctcagcgggtggcgc accaatggcagacaataacgaaggcgcgg acggagtggttaatgctcagaaaattggca tgcgattccacatggctggcgacagagtc atcaccaccagcaccgaacatgggccttgc ccacctataacaaccctctacaagcaaatc tccagtcctcaacggggccagcaacgac aaccactactcggctacagccccctggg ggtattttgattcaacagattccactgccattc tcaccacgtgactggcagcgactcataca acaattgggattccggccaagaactcaa ctcaagctctcaacatccaagtaaggagg tcacgacgaatgatggctcagaccatcgc taafaacctaccagcaggtcaagctctc ggactcggagtaccagttgccgtactcctc ggctctgcgaccagggtgcctcctcctcgt tccggcggagctgtcatgattccgagtac ggc
----	------------------------------------	--	-----	---

10

20

30

【 0 2 1 9】

【表 3 - 1 3】

			<p>           tacctaacgctcaacaatggcagccaggca            gtgggacggfcatcctttactgcctggaatat            ttccatcgcagatgctgagaacgggcaata            actttaccttcagctacaccttcgaggacgtgc            cttccacagcagctacgcgcacagcca            gcctggaccggctgatgaatcctcicacga            ccagtacctgtattacctgaacagaactcaga            atcagtccggagtgcacaaacaaggactt            gctgttagccggggctcagctggcatgt            ctgtcagccaaaaactggctacctggacc            ctgtaccggcagcagcgcgtttctaaaaca            aaacagacaacaacaacagcaacttacctg            gactgggtcctcaaatataaccttaattggc            gtaactataatcaacctggcactgctatg            gcctcacacaaagacgacaaagacaagtct            ttccatgagcgggtgatgatttggaaagg            agagcgcgggagctcaaacactgcatfcca            caatgtcatgatcacagacgaagaggaaatc            aaagccactaacccgtggccaccgaaaga            ttgggactgtggcagcaatcctcagagcag            cagcacagaccctgcgaccggagatgtgca            tgtatgggagccttacctggaatgggtggc            aagacagagacgtataacctgcagggctcctat            ttggccaaaattcctcacacggatggact            ttcaccgtctcctctcatggcggcttggac            itaagcaccgcctcctcagatcctcatcaaa            aacacgcctgtcctgcgaatcctcggcag            agtittcggctacaaagtgtgctcattcatcac            ccagtaltccacaggacaagtgagcgtgga            gattgaatggagctgcagaagaaaacag            caaacgctggaatcccgaagfgcagtataca            tctaactatgcaaaatcgccaacgtgattica            ctgtggacaacaatggactttatactgagcct            cgccccattggacccttacctcaccctgc            ccctgtaa         </p>
--	--	--	---

10

20

【 0 2 2 0】

30

【表 3 - 1 4】

32	AAV12VP1 /2- AAV6VP3 キメラ6	MAADGYLPDWLEDNLSEGIR EWWALKPGAPQPKANQHQ DNGRGLVLPGYKYLGFNGL DKGEPVNEADAAALEHDKAY DKQLEQGDNPYLKYNHADA FQORLATDTSFGGNLGRAV FKKRILEPLGLVEEVKTPAG KKRPLEKTPNRPNPD SGKAPAKKKQKDGEPAD SARRTLDFEDSGAGDGP PEGSSSGEMSHDAEMAS GGGAPMADNNEGADGV GNASGNWHCDSTWLGDR VITSTRTWALPTYNHL YKQISSASTGASNDNH YFGYSTPWGYDFNRFH CHFSPRDWQRLINNN WGFPRKRLNFKLFNIQV KEVTTNDGVTTIAN NLSTVQVFS DSEYQL PYVLGSAHQGCLPP FPADVFMPPYGYLTL NNGSQAVGRSSFYC LEYFPSQMLRTGNN FTFSYTFEDVPFH SSYAHSQSLDRLMN PLIDQLYYLNRTQN QSGSAQNKDLLF SRGSPAGMSVQPKN WLPGPCYRQQRV SKTKTDNNSNFT WTGASKYNLNGRES IINPGTAMASHKD DKDKFFPMSGVM IFGKESAGASNTAL DNVMITDEEEI KATNPVATERFGT VAVNLQSSSDP ATGDVHVMGAL PGMVWQDRDVY LQGPIWAKIPHT DGHFHP SPLMGG FGLKHPPPQIL IKNTPVPANPPA EFSATKFASFI TQYSTGQVSVEI EWELQKENS KRWNPEVQYTS NYAKSANVD FTVDNNGLYTE PRPIGTRYL TRPL	297	atggctgctgacgggtatctccagattggctc gaggacaacctctgaaggcaatcgcgagtg ggtggcgctgaaacctggagctccacaac ccaaggccaaccaacagcatcaggacaac ggcaggggcttctgtctcctgggtacaagta cctcggaccctcaacggactcgacaaggg agagccggtaaacgaggcagaccccgagg ccctcgagcagacaaggcctacgacaagc agctcgagcaggggacaacccgtatctca agtacaaccacgccgacgccgagttccagc agcgttggcgaccgacaccttttggggg caacctgggcgagcagcttccaggccaa aaagaggattctcgagcctctgggtctggtg aagaggggcgtaaaacggctcctggaaga aacgccattagaaaagactccaaatcggcc gaccaaccggactctgggaagccccgg ccaagaaaaagcaaaaagagcgcgaacca gccgactctgctagaaggacactcactttg aagactctggagcagagagcggaccctctg agggatcatctccggagaatgctcctgat gctgagatggcttcaggcgggtggcacca atggcagacaataacgaaggcggcggcagg agtgggtaatgcctcaggaaattggcattgc gattccacatggctgggcgacagatcatca ccaccagcaccgaacatgggccttgccca cctataacaaccacctctacaagcaatctcc agtgtctcaacggggccagcaacgacaac cactactcggctacagcaccctctgggggt atcttgattcaacagattccactcattctca ccacgtgactggcagcagcactcaacaaca atggggattccggcccaagagactcaact caagctctcaacatcaagtaaggaggtc acgacgaatgatggcgtcacgaccatcgcta ataacctaccagcagcgggtcaagctctcgg actcggagtaccagttgccgtacgtcctcgg ctctgcgaccaggcctgacctcctcctcc cggcg
----	------------------------------------	--	-----	--

10

20

30

【 0 2 2 1】

【表 3 - 1 5】

			<p>gacgtgtcatgattccgagctacggctacct  aacgctcaacaatggcagccaggcagtgagg  acggctatcctttactgcctggaatattccca  tcgagatgctgagaacgggcaataacttta  ccttcagctacacctcagaggacgtgccttcc  acagcagctacgcgcacagccagagcctg  gaccggctgatgaatcctctcatcgaccagta  cctgtattacctgaacagaactcagaatcagt  ccggaagtgcctcaaaacaaggactgctgtt  tagccgggggtctccagctggcatgtctgtc  agcccaaaaactggctacctggaccctgta  ccggcagcagcgcgttctaaaaaaaaaca  gacaacaacaacagcaactttacctggactg  gtgctcaaaatataaccttaatggcgtgaat  ctataatcaacctggcactgctatggcctca  cacaagacgacaagacaagtcttcccat  gagcgggtgcatgattttgaaaggagagc  gccggagctcaaacactgcattggacaatg  tcatgatcacagacgaaggaaatcaaag  ccactaacccgtggccaccgaaagattgg  gactgtggcagtaactctcagagcagcagc  acagaccctgcgaccggagatgtgcatgta  tgggagccttacctggaatgggtggcaaga  cagaagcgtatacctgcagggctctattggg  ccaaaattcctcacacggatggacacttcac  cgtctcctctcatggcggccttggacttaag  caccgcctcctcagatcctcatcaaaaaaca  cgctgttctctgcaatcctccggcagagttt  cggctacaaagtggctcattcatcaccagt  attccacaggacaagtgagcgtggagattga  atgggagctgcagaaagaaaacagcaaac  gctggaatcccgaagtgcagtatacatctaac  tatgcaaaatcgccaacgttatttactgtg  gacaacaatggacttatactgagcctcgccc  catggcacccgttacctcaccctccctgt  aa</p>
--	--	--	---

10

20

30

【 0 2 2 2】

[00204]単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列は、AAVキャプシド核酸配列の対応するポリペプチド配列に突然変異F129LおよびH642Nをコードすることができる。単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列は、AAVキャプシド核酸配列の対応するポリペプチド配列に突然変異F129LおよびL584Dを有することができる。単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列は、AAVキャプシド核酸配列の対応するポリペプチド配列に突然変異F129LおよびD418Nを有することができる。単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列は、AAVキャプシド核酸配列の対応するポリペプチド配列に突然変異F129LおよびL584Hを有することができる。単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列は、AAVキャプシド核酸配列の対応するポリペプチド配列に突然変異F129L、H642N、およびD418Nを有することができる。単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列は、AAVキャプシド核酸配列の対応するポリペプチド配列に突然変異F129L、H642N、およびL584Dを有することができる。単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列は、AAVキャプシド核酸配列の対応するポリペプチド配列に突然変異F129L、H642N、およびL584Nを有することができる。単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列は、AAVキャプシド核酸配列の対応するポリペプチド配列に突然変異F129L、H642NおよびL584Hを有することができる。単離および精製されたアデノ随

40

50

伴ウイルス(AAV)核酸配列は、AAVキャプシド核酸配列の対応するポリペプチド配列に突然変異F129L、H642N、およびV598Lを有することができる。単離および精製されたアデノ随伴ウイルス(AAV)核酸配列は、AAVキャプシド核酸配列の対応するポリペプチド配列に突然変異F129L、H642N、およびV598Iを有することができる。

#### 【0223】

[00205]本発明の方法で使用することができる別の突然変異誘発技術は、DNAシャッフリングである。DNAまたは遺伝子シャッフリングは、遺伝子ファミリーのメンバーのランダム断片の作製、および多数の新しい組み合わせを生成するためのそれらの組換えを伴う。AAVキャプシド遺伝子をシャッフルするために、3つのキャプシドタンパク質VP1、VP2、およびVP3の関与、および8つの血清型間の異なる程度の相同性を含むいくつかのパラメータを考慮することができる。細胞または組織特異的な指向性を有する実施可能なAAVベクターを取得する可能性を高めるために、例えば、高い多様性および多数の順列を生じさせるシャッフルプロトコルが好ましい。キメラAAVを生成するためのDNAシャッフリングプロトコルの例は、一過性鋳型上のランダムキメラ化(RACHITT)、Cocoら、*Nat. Biotech.* 19巻:354~358頁, 2001年である。RACHITT法を使用して、2つの異なる血清型(例えば、AAV5d AAV6)のAAVゲノムに由来する2つのPCR断片を組換えることができる。例えば、cap遺伝子の保存領域、85%同一であり、約1kbpにわたる3つの遺伝子すべて(VP1、VP2、およびVP3)の開始コドンを含むセグメントは、RACHITTまたは他のDNAシャッフリングプロトコル、例えば、インビトロシャッフリングプロトコル(米国特許第5,093,257号; Volkovら, *NAR* 27:e18, 1999年; およびWang P.L., *Dis. Markers* 16巻:3~13頁, 2000年)を使用してシャッフルすることができる。得られたコンビナトリアルキメラライブラリーを適切なAAV TR含有ベクターにクローニングして、WT AAVゲノムの各断片を置き換えることができる。Vector NTI 7 SuiteソフトウェアのAlignXアプリケーションを使用して、ランダムクローンを配列決定し、親ゲノムと整列させることができる。配列決定およびアラインメントから、1Kbp遺伝子あたりの組換えクロスオーバー数を決定することができる。あるいは、本発明の方法を使用して、AAVゲノムの可変ドメインをシャッフルすることができる。例えば、VP3に粒子表面ループを形成する可能性が高いAAVの2つのアミノ酸クラスター(アミノ酸509~522および561~591)内で突然変異を生成させることができる。この低相同性ドメインをシャッフルするために、親の相同性とは独立した組換えプロトコル(Ostermeierら, *Nat. Biotechnol.* 17巻:1205~1209頁, 1999年; Lutz et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98巻:11248~11253頁, 2001年; およびLutzら, *NAR* 29:E16, 2001年)、または低い相同性のDNA断片をアニーリングおよび再結合するように修飾されたRACHITTプロトコルを利用することができる。

#### 【0224】

[00206]場合によっては、AAVキャプシド上のS/T/K残基の標的突然変異を行うことができる。受容体を介したエンドサイトーシスによるAAVの細胞内在化後、AAVは、サイトゾルを通過し、エンドソームで酸性化されてから放出される。エンドソーム脱出後、AAVは核輸送を受け、そこではウイルスキャプシドの非コーティングが解除され、そのゲノムの放出および遺伝子発現の誘導がもたらされる。S/T/K残基は、リン酸化とそれに続くポリユビキチン化の潜在的な部位であり、キャプシドタンパク質のプロテアソーム分解の合図として機能する。これは、ベクターの核への輸送を妨げ、その導入遺伝子、外因性TCRを発現させ、低い遺伝子発現をもたらすことができる。また、プロテアソームで分解されたキャプシド断片は、CD8 T細胞認識のために、細胞表面のMHCクラスI分子によって提示され得る。これは、免疫応答が生じさせ、したがって、形質

導入細胞が破壊され、持続的な導入遺伝子の発現をさらに低下させる。S/TからA、およびKからRへの点突然変異は、キャプシド上のリン酸化部位を防止/減少させることができる。これは、ユビキチン化およびプロテオソーム分解の減少をもたらし、より多数の無傷のベクターが核に入り、導入遺伝子を発現させることができるようにする。全体的なキャプシド分解の防止/減少はまた、T細胞への抗原提示を減少させ、ベクターに対する宿主免疫応答の低下をもたらす。

【0225】

[00207]場合によっては、操作されたAAVには、代替の血清型由来の外因性配列が含まれ得る。例えば、少なくとも2つの異なるAAV血清型由来の配列を含むことができるキメラAAVを生成することができる。「血清型」という用語は、血清学的に他のAAV血清型とは異なるキャプシドを有するAAVに対して区別となり得る。血清学的特徴は、他のAAVと比較して、AAVに対する抗体間の交差反応性の欠如に基づいて決定することができる。交差反応性は、中和抗体アッセイで測定することができる。このアッセイでは、アデノ随伴ウイルスを使用して、ウサギまたは他の適切な動物モデルにおける特定のAAVに対してポリクローナル血清を生成させることができる。次に、このアッセイでは、特定のAAVに対して生成された血清は、同じ(同種)または異種のAAVを中和する能力において試験され得る。50%の中和を達成する希釈は、中和抗体力価とみなされる。2つのAAVについて、異種力価を同種力価で割った商が逆数をとって16を下回った場合、これらの2つのベクターは同じ血清型とみなされる。反対に、同種の力価に対する異種の力価の比が逆数をとって16以上である場合、2つのAAVは異なる血清型とみなされる。

10

20

【0226】

[00208]場合によっては、修飾は、AAV血清型6キャプシドのものであり得る。場合によっては、主題の変異AAVキャプシドタンパク質(または主題の核酸によってコードされる変異AAVキャプシドタンパク質)は、表4における核酸配列および/またはそれからコードされるタンパク質配列、配列番号38~の核酸配列45のいずれか1つに対して、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%から、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または最大100%の相同性を含むことができる。

30

【0227】

【表 4 - 1】

表4: AAV キメラキャプシド配列

配列 番号	名称	配列
38	AAV4VPIu- AAV6VP2/3	ggtacaaaaaacaatgtctcgtcacgtgggcatgaatctgatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaat cagaatcaaatatctgtctcactcacggacagaaagactgittagagtgttccctgtcagaatcacaaccgttc tgcgtcaaaaaggcgtatcagaacctgtgctacattcatatcatgggaaagggtgccagacgcttgcactgcct gcgatcggtaafgtggattggatgactgcatcttgaacaataaatgattaaatcaggtatgactgacggftacct ccagatggctagaggacaacctctcgaaggcgtcgaagtggtggcgcigcaacctggagcccataacc caaggcaaatcaacaacatcaggacaacgctcggggtcttfgtctccgggttcaaaatcctcggacccggcaa cggactcgacaagggggaaccgtcaacgacgcggacgcggcagccctcagcacgacaaggcctacgacc agcagctcaaggccgtgacaaccctacctaagtaacaaccacgcccagcggagtccagcagcggctca gggcgacacatcgttggggcaaccctcggcagagcagcttccaggccaaaaaggggtcttgaacctctgg tctggtgagcaagcgggtgagacggctcctggaagaacgctccggtagcagtcgccacaagagccagac tcctcctgggcatggcaagcagcggcagcggcctcaaaaagagactcaatttggctcagactggcactca ggtcagtcctccgaccacaaccctcgggagaaacctccagcaaccctcgtctgtgggacctcaacaatggct fcaggcgggtggcgaccaatggcagacaataacgaaggcggcggacggagtgggtaatgcctcagaaaatggc atgggatccacatggctggcgacagagtcaccaccagcaccgaacatgggcttgcaccctataaca accacctacaagcaaatctcagctcctcaacggggccagcaacgacaaccactctcggctacagcacc cctgggggtatttgaattcaacagattccactgccattctaccacgtgactggcagcgactcatcaacaacaatg gggattccggccaagagactcaactcaagctctcaacatcaagtacaaggaggtcacgacgaatgatggcgt cagcaccatcgfaataacctaccagcacggtcaagctctcggactcggagtaccaggttccgtacgtcctc gctctgcgaccagggtgcctccctccgttccggcggacgtgttcatgatccgcagtacggctacctaacgct caacaatggcagccaggcagtgggacgtcatcctttactgcctggaatattcccatcgcagatgctgagaac ggcaataactttacctcagctacacctcggagacgtgccctccacagcagctacgcgcacagccagacgctgg accggctgatgaatcctcctcagcaccagctgtatfacctgaacagaactcagaatcagtcggaaagtgcctaa aacaaggactgctgttagcgggggtctccagctggcatgtctgtcagccaaaaactggctacctggaccctg ttaccggcagcagcgtttctaaaacaaaaacagacaacaacaacagcaactttacctggactgggtgctcaaat ataacctaatggcgtgaatctataatcaaccctggcactgctatggcctcacacaagacgacaagacaagttc ttccatgagcgggtgatgatttggaaaggagcggcggagctcaaacctgcattggacaatgcatgatc acagacgaagaggaaalcaagccactaaccctggccaccgaaagattgggactgtggcagcaatctcca gagcagcagcacagacctcggaccggagatgcatgttatgggagccttacctggaatggtgtggcaagaca gagacgtatacctgcagggctctatttggccaaaatctctcacacggatggacactttaccctctcctcatgg gcggcttggacttaagcaccctcctcagatcctcaaaaacacgctgtcctcggaaatcctccggcagag ttctcggctcaaaagtgtctcattcatcaccagatccacaggaacagtgagcgtggagattgaatgggagctg cagaaaagaaacagcaaacgctggaatcccgaagtgcagctatacatctaaactatcaaaatcggcaacgttatt cactgtggacaacaatggactttatactgagcctcggccatggcaccgttacctaccctgccctgtaattgtg gttaatcaataaccggt

10

20

30

【 0 2 2 8 】

【表 4 - 2】

39	AAV5VP1u- AAV6VP2/3	<p>gggtaccaaaacaatgttctcgtcacgtgggcatgaatctgatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaat  cagaatfcaaatatctgctcactcacggacagaaagactggttagagtgcttcccgtgcagaatcaaccggttc  tgicgtcaaaaaggcgtatcagaaactgtgctacattcatataicatgggaaagtgccagacgctgcaactgct  gcgatctggcgaatgtggattggatgactgcatctttgacaataaatgattaaatcaggatgctttgttgatcacc  ctccagattgggtggaaggttggggaaggctctcgcgagttttggccttgaagcgggcccaccgaaacaaa  acccaatcagcagcatcaagatcaagcccgtggtcttggctgctggttataactatctcggaccggaaacggtc  tcgatcagggagagcctgtcaacagggcagacgaggtcgcgcgagagcagacatctctacaacgagcagct  tgaggcgggagacaacccctacctcaagtacaaccacgaggacggcaggttcaggagaagctcggcagcagc  acatcctcgggggaaacctcggaaaggcagctcttcaggccaagaaaagggttctcgaaccttggcctgggtga  agaggggtgtaagacggctcctggaagaaacgtccggtagagcagctccacaagagccagactcctcctcg  ggcatfggcaagacagggcagcagcccgtaaaaagagactcaatttggcagactggcagctcagagtcagtc  cccgaccacaacctctcggagaacctccagcaacccccgtgctgtgggacctactacaatggctcaggcgggt  ggcgaccaatggcagacaataacgaaggcggcagcggagtggttaatgctcaggaaattggcattgctgattc  cacatgctggcgacagagctatcaccaccagcaccogaacatgggcttggccacctataacaaccacctta  caagcaaatctcagtgcttcaacggggccagcaacgacaaccactactcggctacagcaccctgggggt  atfttgattcaacagattccactgccaattctcaccacgtgactggcagcagctcaacaacaattggggattccg  gcccagagactcaactcaagctctcaacatcaagtaaggaggtcagcaggaatgatggctcagcagccat  cgtaataacctaccagcagggitcaagtctctcggactggagtgaccagtgccgtactcctcggctctgctgc  accagggctgctcccctcggcggcagctgttcatgattccgagtagggctacctaacgctcaacaatgg  cagccaggcagtgaggacgctatcttactgcttgaataftcccatcgcagatgctgagaacgggcaataact  ttacctcagctacacctcagggacgtgcttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgat  gaatcctctatcgaccagctaccigtattacctgaacagaacagaaatcagctccggaagtgcccaaaacaaggac  ttgctgttagccgggggtctccagctgcatgctgttcagccaaaaactgctacctggaccctgttaccggca  gcagcgcgttctaaaaaaaaacagacaacaacacagcaacttacctggactggtgctcaaaatataacctta  atggcggtgaatctataatcaacctggcactgctatggctcacacaaagacgacaaaagacaggtcttccatg  agcgggtgcatgattttggaaaggagagcggcggaactcaaacactgcattggacaatgctatcagacagcag  aagaggaatcaaaagccactaacccgtggccaccgaaagattgggactgtggcagctcaatctccagagcagc  agcacagacctcggaccggagatgtgcatgttatgggagcctacctggaatggtgtggcaagacagagacgt  atacctgcagggtcctatttgggcaaaattcctcacacggatggacacttaccctcctctcatggggcgttt  ggacttaagcaccgctcctcagatcctcaaaaaacgcctgttctgcgaatcctccggcagagtttccggc  tacaaggttgctcattcatcaccagatccacagagacaagtgagcgtggagattgaatgggagctcagaaa  aaaacagcaaacgctggaatcccgaagtgcagatatacactatgcaaaatctgccaacgtgattcactgtg  gacaacaatggacttatactgagcctcggccattggcaccggtacctcaccgctcccctgtaattgtgttaac  aataaaccggt</p>
----	------------------------	--

10

20

【 0 2 2 9 】

30

【表 4 - 3】

40	AAV11VP1u- AAV6VP2/3	<p>gggtacaaaacaaatgttctcgtcacgtgggcatgaatcfdgatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaat  cagaatcaaatatctgcttactcagacagaaagactggttagagtgcttccctgtcagaatcaaccggttc  tgctgcaaaaaggcgtatcagaaactggtctacatcatatcatgggaaagggtccagacgctgacactgcct  gcgatctggcgaatgtggatgtgactcactcttgaaacaataaatgatttaaatcaggtatggctgctgacggta  tctccagatggctcagggacaacctctctgagggaatcgcgagtggtgggacctgaaacctggagcccga  gcccaggccaaccagcagaagcaggacacggccgggtctggtctctggtctacagtacctcggacc  ttcaacggactcacaagggggagcccgtcaacggcggcggacgcagcggccctcagcagcacaaggccta  caccagcagctcaaagcgggtgacaatcctgacctgctgataaccacggcggcggatctcagggagcgtc  fgcaagagatagcttttgggggcaacctcggcggcagcagcttccaggccaagaggggactcgaacctc  tggccttgggtgaagaagggtgtaaacggctcctggaaagaacgtccggtagagcagctgccacaagagcc  agactcctcctcggcattggcaagacagccagcagcccgtaaaaagagactcaatttggctcagactggcga  ctcagagctgctcccaccacaacctctcggagaacctcagcaacccccgctgctgtgggacctactacaat  ggcttcagcgggtggcggccaatggcagacaataacgaaggcggcggcagggatgggtaactcctcaggaat  aacaaccacctctacaagcaaatctccagtgcttcaacggggccagcaacgacaaccaactctcggctcagc  accccctgggggtatttggatcaacagattccactgccattctcaccacgtgactggcagcgaactcaacaac  aattggggattccggccaagagactcaactcaagctctcaacaaccaagcaagggtcagcagcaatgatg  gctgcacgaccatcgtataaacttaccagcaggggtcaagctctcggactcggagctaccggtccgtactc  ctcggctcggcaccagggctgctccctccgtcccggcggacgtgtcatgattccgagctaccgctaccta  cgtcaacaatggcagccagcagtggtggcggcgtatcttactgcttggaaatatttccatcgcagatgctgaga  acgggcaataactttacctcagctacacctcggagcgtgcttccacagcagctacgcgcacagccagagcc  tggaccggctgatgaatcctctcaccagctacgtatctgaacagaactcagaatcagctccggaggtcc  caaaacaaggactgctgttagccgggggtctccagctggcattgtctgtcagccaaaactggctacctggac  cctgttaccggcagcagcgggttctaaaacaaaacagacaacaacaacgcaactttacctggactggtgctc  aaaataaaccttaatggcgtaactataaacttggcactgctatggccacacacaagagcacaagaagaca  agttcttccatgagcgggtgctatgattttggaaaggagcggcggagcttcaaacactgcaatggacaatgtca  tgcacagaggaaggaaatcaagccactaacccgtggccaccgaaagattgggactgtggcagctcaatc  tccagagcagcagcagacctgcgaccggagatgtgcatgttatgggagccttacctggaaatgggtggcaa  gacagagagctatctcagggctctatttgggcaaaatcctcacaggatggacacttcccccgtctcctc  atggcggcttggactaagcaccgccctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgtcctgcaatcctccggc  agagtttcggctacaaggttcttcatcaccagatctccacaggacaagtgagcgtggagattgaatggga  gctgcagaaagaaaacagcaaacgctggaatcccgagtgcaatatacttaactatgcaaaatctccaacgtt  gattcactgtggacaacaatggacttatactgagcctcgcacctggcaccgttaccctaccctgtccctgta  tgtgtgtaatacaataaacgggt</p>
----	-------------------------	---

10

20

【 0 2 3 0 】

30

【表 4 - 4】

41	AAV12VP1u- AAV6VP2/3	<p>ggtagcaaaacaaatgttctcgtcactggtggcatgaatcigatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaat  cagaattcaaatatctgctcactcagcagagaagactgttagagtgcttcccgtgcagaatctcaaccggttc  tgtcgtcaaaaaggcgtatcagaactgtgctacattcatataicatgggaaagggtccagacgctfgactgcct  gcgatctggcgaatgtggattggatgactgcatcttgaacaataaatgatfataatcaggtatggctgctgacgggta  tctccagatggctcagggacaacctctgaaggcattcgcgagtggtgggcgctgaaacctggagctccacaa  ccaaggccaaccaacagcatcaggacaacggcaggggtctgtgcttctgggtacaagtacctcggaccctc  aacggactcgacaaggagagccgggtcaacgagggcagacgcccggccctcagcagacaaggcctcaga  caagcagctcagcaggggacaacctgtatcagaataaccacggcagccgaggtccagcagcagcgttgg  gcgaccgacaccttftggggcaacctggggcagcagcttccagggcaaaaaggagattctcagacctctg  ggctcgggtgaaggggctgtaaacggctcctggaaagaacgtccgtagagcagctccacaagagccag  actcctcctcgggcatfggcaagacagggcagcagcccgtaaaaagagactcaatttggctcagactggcgact  cagagtcagctcccaccacaacctctcggagaacctccagcaacccccgctgctgtgggacctactacaatgg  cttcaggcgggtggcaccaatggcagacaataacgaaggcggcagcggaggtgggtaatgctcaggaaattg  gcattgcgattccatggctgggagacagatcaccaccagcaccgaacatgggcttcccacctataa  caaccacctcaagaacatctccagtgctcaacggggccagcaacgacaaccactactcggctacagc  ccccgggggtatttgaattcaacagatccactgccattctcaccagtgactggcagcactcaacaacaat  tggggtatcggcccaagagactcaactcaagctctcaacatccaagtcaaggaggtcacgacgaatgatggc  gtcacgacctgctaataacctaccagcaggtcaagcttctcggactcggagtaccagttgccgtactcctc  ggctctgcgaccagggtgctcctcctcgtccggcggagctgtcatgattccgagtagggctacctaacgc  tcaacaatggcagccagcagtgaggacgtatcctttactgctggaatattccatcgcatgctgagaacg  ggcaataactttacctcagctacacctcagagcagctgaccttccacagcagctacgcgacagccagacctgg  accggctgatgaatcctctcatcgaccagctgattacctgaacagaactcagaatcagctccggaatgcccaa  aacaaggactgctgttagccgggggtctccagctggcatgctgtcagcccaaaactggctacctggaccctg  ttaccggcagcagcggcttctaaaaacaaaacagacaacaacaacagcaactttacctggactggtgctcaaat  ataacctaatggcgtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacacaaagacgacaagacaagttc  ttcccatgagcgggtgcatgatttggaaaggagagcggcggagctcaaacactgcattggacaatgcatgac  acagagaaaggaaatcaaaagccactaacccgtggccaccgaaagattgggactgtggcagtaaatctca  gagcagcagcagacctgcgaccggagatgtcatgttatgggagccttacctggaatggtgtggcaagaca  gagactatactgcagggtcctatttggccaaaatctcacacggatggacacttaccctcctctcatgg  gcggcttggactaaaccaccctcctcagatcctcatcaaaaacacgctgtcctgcgaatcctccggcagag  tttcggctacaaagtftgcttcatcaccagatctccacagacaagtgagcgtggagatgaatgggagctg  cagaagaaaaacagcaaacgctggaatcccgaagtgcagatatactcaactatgcaaaatcgccaacgtgatt  cactgtggacaacaatggacttatactgagcctcggccattggcaccgttacctaccctcctctgtaattgtg  gttaatacaataaccggt</p>
----	-------------------------	--

10

20

【表 4 - 5】

42	AAV4VP1/2- AAV6VP3	<p>ggfaccaaaaaatgttctcgtcacgtgggcatgaatctgatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaat  cagaatfcaaatatctgcttcactcacggacagaaagactgtttagagtgcttcccgtfcaagaatcacaaccggttc  tctcgtcaaaaaggcgtatcagaactgtgctacattcatatcatatgggaaagggtccagacgctgcaactgct  gcgatcgggtcaatgggattggatgactgcatcttgaacaataaatgaittaaatcaggatgactgacgggtacct  ccagattggctagaggacaacctctcgaaggcgttcgagaagtggggcgtcgaacctggagcccctaaacc  caaggcaaatcaacaacatcaggacaacgctcggggcttctgcttccgggttacaataacctcggaccggcaa  cggactgcacaagggggaacccgtcaacgcagcggacgcggcagccctcgagcacgacaaggcctacgacc  agcagctcaaggccgggtgacaacccctaccicaagtacaaccacgccagcgggagtccagcagcggctca  gggcgacacatcgttggggcaaccctggcagagcagcttccaggccaaaaagagggtctgaacctctgg  tctggtgagcaagcgggtgagacggctctgaaaagaagaccggtgattgaatccccagcagcccgact  cctccacgggtatcggcaaaaaaggcaagcagcccgtaaaaagaagctcgtttcgaagacgaaactggagca  ggcgacggacccccgtgaggtacactcggagccatgtctgatgacagtgatgcttcaggcgggtggcgc  accaatggcagacaataacgaaggccggcagcggatgggtaatgcctcaggaaatggcattggcattccatg  gctgggcgacagatcatcaccaccagcaccgaacatgggcttggccacctataacaaccacctctacaagc  aatctcagctgctcaacggggccagcaacgacaaccactactcggctacagcaccctcgggggtatttga  ttcaacagattccactgcccatttctcaccagtgactggcagcgaactcaacaacaatggggatccggccaa  gagactcaactcaagctctcaacatccaagtaaggaggtcacgagaatgatggcgtcacgaccatccgcaat  aacctaccagcacggtcaagtctctcggactcggagtaccagtgccgtactcctcggctctcgcaccagg  gctgccctcctcgttcccggcggacggttcatgattccgagtagcgtacctaacgctcaacaatggcagcca  ggcagtgaggcggatccttcttactcctggaatattccatcgagatgctgagaacgggcaataactttacctc  agctacacctcggagcgtgcttccacagcagctacgcgcacagccagcctggaccggctgatgaatcct  ctcatcgaccagctgattacctgaacagaactcagaatcagtcgggaagtgcccacaagaagactgctgtt  tagccgggggtctccagctggcatgctgtcagcccaaaaactggctacctggaccctgttaccggcagcagc  cgtttcaaaaacaaaacagacaacaacaagaactttacctggactggtgcttcaaatataacctaatgggc  gtgaaatcataatcaacctggcactgctatggctcacaacaagacgacaagacaagtcttccatgagcgggt  gtcatgattttgaaaaggagagcggcggagctcaaacactgcatfaggacaatgcatgatcacagacgaagagg  aaatcaaggccaactaaccctggccaccgaaagatttgggactgtggcagtaactcagagcagcagcaca  gaccctgcgaccggagatgctgatgtatgggagccttacctggaatgggtggcaagacagagactatacctg  cagggtcctatttggccaaaatctcacaggatggacacttaccctctctctatggcggcttggactta  agcaccgctcctcagatcctcaaaaaacacgcttctcctgcaatcctccggcagagtttccgctacaag  tttctcattcatcaccagatctccacaggacaagtagcgtggagattgaatgggagctgcagaaagaaaaca  gcaaacgctggaatcccgaagtcagatatacctaactgcaaaatctgccaacgttgaattcactgtggacaac  aatggacttatactgagcctcggccattggcaccgttacctaccctgccctgtaattgtgttaatacaataaac  cggg</p>
----	-----------------------	--

10

20

【表 4 - 6】

43 AAV5VPI_2- AAV6VP3	<p>ggtagcaaaacaaatgtctcgtcacgtgggcatgaatctgatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaat  cagaatfcaaatatctgcttactcacggacagaaaagactgtttagagtgcttccctgtcagaatctcaaccggttc  tgcgtcaaaaaggcgtatcagaactgtgciacatfcatatcatgggaaaagtgccagacgctgcactgcct  gcgatctggtcaatgtggattggatgactgcacfttgaacaataaatgattaaatcaggatgctcttftgfatcacc  ctccagattggtggaagaagttggtgaaggctcgcgagttttgggcttgaagcgggcccaccgaaacaaa  acccaatcagcagcatcaagatcaagccggtggtctgtgctgctgttataactatctggaccggaaacggtc  tcgatcggagagacctgtcaacaggcagacgaggtcgcgcgagagcagacatctctacaacgagcagct  tgaggcgggagacaacccctaccicaagtacaaccacgggacgcccaggttcaggagaaagcgcggcagcagc  acatccttcgggggaaacctcgaaaaggcagcttctcagccaagaaaaggggtctcgaaccttttggcctggttga  agaggggtgctaagacggcccctaccggaagcggatagacgaccacttccaaaaagaaagagggctcggacc  gaagaggactccaagccttccacctgtcagacgcccgaagctggaccagcggatcccagcagctgcaaatcc  cagcccaccagcctcaagtttgggagctgatacaatggctcaggcgtgctgcaccaatggcagacaataac  gaaggcggcagcggagtggttaatccctcaggaattggcattgctgattccacatggctggcgacagagatcat  caccaccagcaccgaaatgggcttcccacctatacaaccacctctacaagcaaatctccagtgcttcaacg  ggggccagcaacgacaaccaactactcggctcagcaccctcggggattttgattcaacagattccactgcc  attctcaccagtgactggcagcagctcatcaacaacaattgggattccggcccaagagactcaactcaactc  ttcaatccaagfcaaggaggtcagcagcaatgatggcgtcacgaccatcgtataaacttaccagcagggttc  aagcttctcggactcggagfaccagttgccgtactcctcggctctgcgcaccaaggctcctccctccgtcccg  gcgagcgtgtcatgattccgacgtacggctacctaacgctcaacaatggcagccagggcagtgaggcggatcc  tttactgcttggatafttccatcgcagatgctgagaacgggcaataacttaccctcagctacaccttcgagcagc  tgccctccacagcagctacgcgcagaccagacgctggaccggctgatgaatcctctcagcagcagctgta  ttacctgaacagaacgagaatcagctccggaagtgcacaaaacaggaactgctgttttagccgggggtctccagct  ggcatgtctgtcagccaaaactggctacctggaccctgttaccggcagcagcgcgttctaaaacaaaacag  acaacaacaacagcaacttacctggactggctcctcaaaatataacctaatgggcgtgaatctataatcaaccctg  gcactgctatggcctcacacaagacgacaagacaagttcttccatgagcgggtgcatgattttggaaggag  agcggcggagcttcaaacactgcatggacaatgtcatgatcacagacgaagagggaatcaagccactaacccc  gtggccaccgaaaatttgggactgtggcagtcactcaccagagcagcagcagaccctgcgaccggagatgt  gcatgttatgggagccttacctggaatggtgtggcaagacagagacgtatactcagggctcctatttggccaaa  attcctcacacggatggacacttaccctctcctctcatggggggcttggactaagcaccggcctcctcagatc  ctcatcaaaaacacgctgttctcgcgaatctcggcagagtttccggctacaagtttgcctcattcatcaccagt  attccacaggacaagtgcgagatgaaatgggagctgcagaaagaaaacagcaaacgctggaatcccga  agtgcagfatacatctaactgcaaaatctccaacgtgatttactgtggacaacaatggacttatactgagcctc  gcccattggcaccgttaccicaccctccctgtaatgtgttataataaacgggt</p>
-----------------------------	---

10

20

【 0 2 3 3 】

【表 4 - 7】

44	AAV11VP1/2- AAV6VP3	<p>ggtagcaaaaacaaatgttctcgtcacgtgggcatgaatctgatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaat  cagaatcaaatatctgcttcaactcacggacagaaaactgtttagagtgcttccctgtcagaatctcaaccggttc  tgcgtcaaaaaggcgtatcagaaactgtgctacattcatatcatatgggaaagggtccagacgctgcaactgcct  gcgatctgggtcaatgtggatttggatgactctttgacaataaatgatttaaatcaggatggctgctgacgggta  tctccagattggctgaggaacaacctctctgaggcattcgcgagtggtgggacctgaaacctggagcccgaa  gcccaggccaaccagcagaagcaggacgacggccgggtctggtgcttctggtcaagctacccggacc  ttcaacggactcgacaagggggagcccgtcaacgcggcggacgcagcggcctcagcacgacaaggccta  cgaccagcagctcaaagcgggtgacaatccgtacctgcggtataaccacggcgcgaggttcaggagcgtc  tgaaggaagatactgtttgggggcaacctcggcgagcagcttccaggccaagaagagggtactcgaacctc  tggcctgggtgaaaggggtctaaaacggcctcctggaaagagagaccgtagtgatcaccacaagagcccgac  tctcctcggcctcggcaaaaaaggcaacaaccagccagaaagaggctcaacttgaagaggacactggag  ccggagacggccccctgaaaggatcagataccagcggcctgtctcagacattgaaatggctcaggcgggtggc  gcaccaatggcagacaataacgaagggccgacggagtggtgtaatgcctcaggaaatggcattgcgattccac  atggctggcgacagagctaccaccagcaccgaacatggccttggccacctataacaaccctctacaa  gcaaatctccagtgctcaacggggccagcaacgacaaccactctcggctacagcaccctgggggtattt  gattcaacagattccactgccattctcaccagtgactggcagcagctatcaacaacaattgggattccggc  caagagactcaactcaagctctcaactcaagcaaggaaggtcacgacgaatgatggctcagaccatcgct  aataacctaccagcaggttcaagctctcggactcggagtaccagttgctcagctcctggcctcgcgacca  gggctgctccctccgttccggcgacgtgtcatgatccgagctacgctacctaactcgaacatggcagc  caggcagtgggacggctaccccttactccttggaaatattccatcgcagatgctgagaacgggcaataacttacc  ttcagctacacctcggagcgtgcttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaat  cctctatcgaccagctacctgtattacctgaacagaactcagaatcagctccgaaagtgcccaaaaacaggactgct  gtttagccgggggtctccagctggcatgtctgttcagccaaaactggctacctggacctgtgcttcaaaataaacctaatgg  gcgtgaaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacacaagacgacaagacaagttcttccatgagcg  gtgcatgatatttggaaaggagagcggcgggctcacaactgcattggacaatgcatgatcacagacgaaga  ggaaatcaaaagccactaacccgtggccaccgaaagattgggactgtggcagtcactcagagcagcagca  cagacctgcgaccggagatgcatgttatgggagccttacctggaatggtgtggcaagacagagcgtatacc  tgcagggtcctatttggccaaaatcctcacacggatggacacttccacctctctcatggcggccttggact  taagcaccgcctcctcagatcctcaaaaaacacgcctgttctcggaaatcctccggcagagtttccgctcaa  agttgctcattcatcaccagatcctcacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcagaaagaaaa  cagcaaacgctggaatcccgaagtgcagtatacttaactatgcaaatctgccaacgttgattcactgtggaca  acaatggactttactgagcctcggccattggcaccctgacctaccctgtaattgtgttaacaataa  accggt</p>
----	------------------------	--

10

20

【表 4 - 8】

45	AAV12VP1/2- AAV6VP3	<pre> gggtacaaaacaatgttctcgtcacgtgggcatgaatctgatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaat cagaatcaaatatctgctcactcacggacagaaaactgtttagagtgcttcccgtgcagaatcicaaccgttctc tgcgtcaaaaaggcgtatcagaaactgtgctacattcatatcatgggaaagggtccagagcgtgcactgcct gcgactgggtcaatgggatitggatgactgcatcttgaacaataaatgatttaaatcaggatggctgctgacggfita tctccagattggctcgaggacaacctctctgaaggcattcgcgagtggtggcgctgaaacctggagctccaca cccaaggccaaccaacagcaicaggacaacggcagggtctgtgctcctgggtacaagtacctggacccttc aacggactcgacaaggagagccggtaacaggcagcagccggcctcgagcagacaaggcctacga caagcagctcgagcaggggacacccgtatctcaagtacaaccacgccgacgccgagtccagcagcgtctg gcgaccgacacctctttgggggcaacctcggcgagcagcttccagccaaaaagaggaitctcgagcctctg ggtctggtgaaaggcggttaaacggctcctggaaagaaacgccattagaaaagactccaaatcgccgac caaccggactctgggagggcccgaagaaaaagcaaaaagacggcgaaccagccgactctgctagaag gacactcgacttgaagactctggagcagagacggacccccgaggatcatctccgggaaatgtctcatgat gctgagatgcttcaggcgtggcgacccaatggcagacaataacgaaggcggcagggagtgggtaatgcct caggaatggcattcgcattccacatggctggcgacagagtcaccaccagcaccgaacatgggcttgc ccactatacaaccacctcacaagcaaatctccagtgctcaacggggccagcaacgacaaccactactcg gtacagcaccctgggggtatttgattcaacagattccactgccattctcaccacgtgactggcagcagactat caacaacaatggggattccggccaagagactcaactcaagctctcaacatcaagcaaggaggtcacgac gaatgatggcgtcacgaccatcgtataaacctaccagcaggttcaagtcttcggactgggagtaccagtgc cgtactcctcggctctgcgaccaggctgcctcctccgttcccggcgagcgttcatgattccgagctacgg ctacctaacgctcaacaatggcagccagcagtgaggagcgtatcttactgcctggaatattccatcgagat gctgagaacgggcaataactttacctcagctacacctcagaggacgtgccttccacagcagctacgcacagc cagagcciggaccggctgatgatcctctcatcgaccagtacctgtattacctgaacagaactcagaatcagtcgg gaatggccaaaacaaggactgctgtttagccggggctcaccagctgcatgtctgttcagccaaaactggct acctggacctgtaccggcagcagcgcgttctataaacaacagacaacaacagcaactttacctggact ggctctcaaatataaccttaatggcgctgaatctataatcaaccctggcactgctatggcctcacacaagacga caagacaaagtcttccatgagcgggtcatgattttgaaaggagagcggcggactcaaacactgcatgg acaatgcatgacacagcaggaaggaaatcaagccactaacccgtggccacgaaagattgggactgtgg cagtcactcagagcagcagcagaccctgcgaccggagatgtgcatgttatgggacctaccctggaatgg tgggcaagacagagactatcctcagggctctatitggccaaaatcctcacacggatggacactttcaccg tctcctcatggcggttggacttaagcaccggcctcctcagatcctcaaaaacagcctgttctcgaat cctccggcagagtttgcgctacaaggttgcctcattcatcaccagatccacaggacaagtggagctggagat gaatgggagctgcagaagaaaacagcaaacgctggaatcccgaagtgcagtaiatatctaactatgcaaatct gccaacgttgattcactgtgacaacaatggactttatactgagcctcggccattggcaccgttacctcaccgt cccctgtaattgtgttaatacaataaacgggt </pre>
----	------------------------	---

10

20

【 0 2 3 5】

[00209] 場合によっては、修飾は、AAV血清型6キャプシドのものであり得る。場合によっては、主題の変異AAVキャプシドタンパク質（または主題のアミノ酸によってコードされる変異AAVキャプシドタンパク質）は、表5のタンパク質または核酸配列のいずれか1つに対して、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または最大100%の相同性を含むことができる。

30

【 0 2 3 6】

【表 5 - 1】

表 5: AAV 対照およびキメラ代替リーディングフレーム(AAP)

配列番号	構築物	タンパク質配列	配列番号	核酸配列
46	AAV6	LATQSQSPHNLSENLQQPPL LWDLLQWLQAVAHQWQTTT KAPTEWVMPQEIGIAIPHW ATESSPPAPEHGPCPPITTTST SKSPVLQRGPATTTTTSATAP PGGILISTDSTAISHHVTGSDS STTIGDSGPRDSTSSSSTSRSR RSRRMMASRPSLITLPAFRKS SRTRSTSCRTSSALRTRAASL RSRRITCS	298	CTGGCGACTCAGAGTCAG TCCCGACCCACAACCTC TCGGAGAACCTCCAGCAA CCCCCGCTGCTGTGGGAC CTACTACAATGGCTTCAG GCGGTGGCGCACCAATGG CAGACAATAACGAAGGC GCCGACGGAGTGGGTAAAT GCCTCAGGAAATTGGCAT TGCGATTCCACATGGCTG GGCGACAGAGTCATCACC ACCAGCACCCGAACATGG GCCTTGCCACCTATAAC AACCACCTCTACAAGCAA ATCTCCAGTGCTTCAACG GGGGCCAGCAACGACAA CCACTACTTCGGCTACAG CACCCCCTGGGGGTATTT TGATTCAACAGATTCCA CTGCCATTTCTCACCACGT GACTGGCAGCGACTCATC AACAACAATTGGGGATTC CGGCCCAAGAGACTCAAC TTCAAGCTCTCAACATCC AAGTCAAGGAGGTCACGA CGAATGATGGCGTCACGA CCATCGCTAATAACCTTA CCAGCACGGTTCAAGTCT TCTCGGACTCGGAGTACC AGTTGCCGTACGTCCTCG GCTCTGCGCACCAGGGCT GCCTCCCTCCGTTCCCGGC GGACGTGTTTCATGA
47	AAV4	LNPPSSPTPPRVSAKKASSRL KRSSFSTKLEQATDPLRDQL PEPCLMTVRCVQQLAELQSR ADKVPMEWVMPRVIGIAIPP GLRATSRPPAPEPGSCPPTTT TSTSDSERACSPPTTDSPPPG DILTSTASTATSHHVTGSDSS TTTGACDPKPCGSKSSTSRSR RSRRRTARQRWLITLPAFRS LRTRRNCR	299	TTGAATCCCCCAGCAGC CCGACTCCTCCACGGGTA TCGGCAAAAAGGCAAG CAGCCGGCTAAAAGAA GCTCGTTTTCGAAGACGA AACTGGAGCAGGCGACG GACCCCCTGAGGGATCAA CTTCCGGAGCCATGTCTG ATGACAGTGAGATGCGTG CAGCAGCTGGCGGAGCTG CAGTCGAGGGCGGACAA GGTGCCGATGGAGTGGGT AATGCCTCGGGTGATTGG CATTGCGATTCCACCTGG TCTGAGGGCCACGTCACG ACCACCAGCACCAGAACC

10

20

30

40

【 0 2 3 7 】

【表 5 - 1 - 1】

				TGGGTCCTGCCACCTAC AACAACCACCTCTACAAG CGACTCGGAGAGAGCCTG CAGTCCAACACCTACAAC GGATTCTCCACCCCTGG GGATACTTTGACTTCAAC CGCTTCC
--	--	--	--	---

【 0 2 3 8 】

【表 5 - 2】

				ACTGCCACTTCTCACCAC GTGACTGGCAGCGACTCA TCAACAACAACACTGGGGCA TGGACCCAAAGCCATGC GGGTCAAAATCTTCAACA TCCAGGTCAAGGAGGTCA CGACGTCGAACGGCGAGA CAACGGTGGCTAATAACC TTACCAGCACGGTTCAGA TCTTTGCGGACTCGTCGTA CGAACTGCCGTACGTGA	
48	AAV5	TTTTQKERRLGPKRTPSLPPR QTPKLDPADPSSCKSQPNQPQ VWELIQCLREVAAHWATITK VPMEWAMPREIGIAIPRGWG TESSPSPPEPGCCPATTTTSTE RSKAAPSTEATPTPLDTAPP GGTLTLTASTATGAPETGKD SSTTTGASDPGPSEKSSSTFKS KRSRCRTPPPSPFTTSPPPSKC LRTTTTSCPTSSATGPRDACR PSLRRSLRCRSTVTRR	300	ACGACCACTTTCAAAAA GAAAGAAGGCTCGGACC GAAGAGGACTCCAAGCCT TCCACCTCGTCAGACGCC GAAGCTGGACCCAGCGGA TCCCAGCAGCTGCAAATC CCAGCCCAACCAGCCTCA AGTTTGGGAGCTGATACA ATGTCTGCGGGAGGTGGC GGCCATTGGGCGACAAT AACCAAGGTGCCGATGGA GTGGGCAATGCCTCGGGA GATTGGCATTGCGATTCC ACGTGGATGGGGGACAG AGTCGTCACCAAGTCCAC CCGAACCTGGGTGCTGCC CAGCTACAACAACCACCA GTACCGAGAGATCAAAAG CGGCTCCGTCGACGGAAG CAACGCCAACGCCTACTT TGGATACAGCACCCCCTG GGGTACTTTGACTTTAA CCGCTTCCACAGCCACTG GAGCCCCGAGACTGGCA AAGACTCATCAACAATA CTGGGGCTTCAGACCCCG GTCCCTCAGAGTCAAAAT CTTCAACATTCAAGTCAA AGAGGTACGGTGCAGGA CTCCACCACCACATCGC CAACAACCTCACCTCCAC CGTCCAAGTGTTTACGGA CGACGACTACCAGCTGCC CTACGTCTGCGCAACGG GACCGAGGGATGCCTGCC GGCCTTCCCTCCGCAGGT CTTTACGCTGCCGAGTA CGGTTACGCGACGCTGA	10 20 30
49	AAV11	SHHSPTPPRASAKKANNQP ERGSTLKRITLEPETDPLKDQI PAPCLQTLKCVQHRAEMLS MRDKVPMEWVMPRVIGIAIP PGLRARSQQPRPEPGSCPPT	301	AGTACCACAAGAGCCCG ACTCCTCCTCGGGCATCG GCAAAAAAGGCAAAACA CCAGCCAGAAAGAGGCTC AACTTTGAAGAGGACACT	40

【 0 2 3 9 】

【表 5 - 2 - 1】

		TTCTCVSEQHQAATPTDSPP PGDILTSTDSTVSHHVTGKD SSTTTGDYDQKPCALKSSISK LRRSQRRARLRSLITLPAF RYLRTRRMSSRT		GGAGCCGGAGACGGACC CCCTGAAGGATCAGATAC CAGCGCCATGTCTTCAGA CATTGAAATGCGTGCAGC ACCGGGCGGAAATGCTGT CGATGCGGGAC
--	--	--	--	--

【 0 2 4 0 】

【表 5 - 3】

				AAGGTTCCGATGGAGTGG GTAATGCCTCGGGTGATT GGCATTGCGATTCCACCT GGTCTGAGGGCAAGTCA CAACAACCTCGACCAGAA CCTGGGTCTTGCCACCT ACAACAACCACTTGTACC TGCGTCTCGGAACAACAT CAAGCAGCAACACCTACA ACGGATTCTCCACCCCT GGGGATATTTGACTTCA ACAGATTCCACTGTCACT TCTACCACGTGACTGGC AAAGACTCATCAACAACA ACTGGGGACTACGACCAA AAGCCATGCGCGTTAAAA TCTTCAATATCCAAGTTA AGGAGGTCACAACGTGCA ACGGCGAGACTACGGTCG CTAATAACCTTACCAGCA CGGTTTCAGATATTTGCGG ACTCGTCGTATGAGCTCC CGTACGTGA	10
50	AAV12	KRLQIGRPRTLGRPRPRKSK KTANQPTLLEGHSTLKTLEQ ETDPLRDHLPEKCLMMLRCV RRQAEMLSRRDKVPMWV MPPVIGIAIPPGQRAESPPPAP EPGSYPRTTTTCTCESEQRPT ATPTDSPPPGLTLTLASTA TFPHATGSDSSTTTGDSGRNR CVLKSSTYRSRRSRRQTARL RSLITLPAFRSLRIRRMNSHT	302	AAAAGACTCCAATCGGC CGACCAACCCGGACTCTG GGAAGGCCCCGGCCAAG AAAAAGCAAAAAGACGG CGAACCAGCCGACTCTGC TAGAAGGACTCGACTT TGAAGACTCTGGAGCAGG AGACGGACCCCTGAGGG ATCATCTCCGGAGAAAT GTCTCATGATGCTGAGAT GCGTGCGGCGCCAGGCGG AAATGCTGTGAGGCGGG ACAAGGTGCCGATGGAGT GGGTAATGCCTCCGGTGA TTGGCATTGCGATTCCAC CTGGTCAGAGGGCCGAGT CACCACCACCAGCACCCG AACCTGGGTCTACCCAC GTACAACAACCACCTGTA CCTGCGAATCGGAACAAC GGCCAACAGCAACACCTA CAACGGATTCTCCACCC CTGGGGATACTTTGACTTT AACCGTTTCCACTGCCAC TTTTCCCCACGCGACTGG CAGCGACTCATCAACAAC AACTGGGGACTCAGGCCG AAATCGATGCGTGTTAAA ATCTTCAACATACAGGTC AAGGAGGTCACGACGTCA AACGGCGAGACTACGGTC	20 30 40

【 0 2 4 1】

【表 5 - 3 - 1】

				GCTAATAACCTTACCAGC ACGGTTCAGATCTTTGCG GATTCGACGTATGAACTC CCATACGTGA
--	--	--	--	--

【 0 2 4 2】

【表 5 - 4】

51	AAV4VP1/ 2- AAV6VP3 カメラ3	LNPPSSPTPPRVSACKASSRL KRSSFSTKLEQATDPLRDQL PEPCLMTVVRWLQAVAHQWQ TITKAPTEWVMPQEIGIAIPH GWATESPPAPEHGPPITT TSTSKSPVLQRGPATTTTTSA TAPPGILISTDSTAISHHVTG SDSSTTIGDSGPRDSTSSSSTS KSRRSRMMASRPSLITLPAR FKSSRTRSTSCRTSSALRTRA ASLRSRRTCS	303	TTGAATCCCCCAGCAGC CCGACTCCTCCACGGGTA TCGGCAAAAAAGGCAAG CAGCCGGCTAAAAAGAA GCTCGTTTTCGAAGACGA AACTGGAGCAGGCGACG GACCCCTGAGGGATCAA CTTCCGGAGCCATGTCTG ATGACAGTGAGATGGCTT CAGGCGGTGGCGCACAA TGGCAGACAATAACGAAG GCGCCGACGGAGTGGGTA ATGCCTCAGGAAATTGGC ATTGCGATTCCACATGGC TGGGCGACAGAGTCATCA CCACCAGCACCCGAACAT GGGCCTTGCCACCTATA ACAACCACCTCTACAAGC AAATCTCCAGTGCTTCAA CGGGGGCCAGCAACGAC AACCCTACTTCGGCTAC AGCACCCCTGGGGTAT TTTGATTTCAACAGATTCC ACTGCCATTTCTACCAC GTGACTGGCAGCGACTCA TCAACAACAATTGGGGAT TCCGGCCCAAGAGACTCA ACTTCAAGCTCTTCAACA TCCAAGTCAAGGAGGTCA CGACGAATGATGGCGTCA CGACCATCGCTAATAACC TTACCAGCACGGTTCAAG TCTTCTCGGACTCGGAGT ACCAGTTGCCGTACGTCC TCGGCTCTGCGCACCAGG GCTGCCTCCCTCCGTTCCC GGCGGACGTGTTTCATGA
52	AAV5VP1_ 2- AAV6VP3 カメラ4	TTTTQKERRLGPKRTPSLPPR QTPKLDPADPSSCKSQPNQPQ VWELIQWLQAVAHQWQTIT KAPTEWVMPQEIGIAIPHW ATESSPPAPEHGPPITTTST SKSPVLQRGPATTTTTSATAP PGGILISTDSTAISHHVTGSDS STTIGDSGPRDSTSSSSTS RSRRMMASRPSLITLPARFKS SRTRSTSCRTSSALRTRAASL RSRRTCS	304	ACGACCACTTTCCAAAAA GAAAGAAGGCTCGGACC GAAGAGGACTCCAAGCCT TCCACCTCGTCAGACGCC GAAGCTGGACCCAGCGGA TCCCAGCAGCTGCAAATC CCAGCCCAACCAGCCTCA AGTTTGGGAGCTGATACA ATGGCTTCAGGCGGTGGC GCACCAATGGCAGACAAT AACGAAGGCGCCGACGG AGTGGGTAATGCCTCAGG AAATTGGCATTGCGATT CACATGGCTGGGCGACAG AGTCATCACCACCAGCAC CCGAACATGGGCCTTGCC

10

20

30

40

【表 5 - 4 - 1】

				CACCTATAACAACCACCT CTACAAGCAAATCTCCAG TGCTTCAACGGGGGCCAG CAACGACAACCACTACTT CGGCTACAGCACCCCTG GGGGTATTTTGATTTCAA CAGAT
--	--	--	--	--

【 0 2 4 4 】

【表 5 - 5】

				TCCACTGCCATTTCTCACC ACGTGACTGGCAGCGACT CATCAACAACAATTGGGG ATTCCGGCCCAAGAGACT CAACTTCAAGCTCTTCAA CATCCAAGTCAAGGAGGT CACGACGAATGATGGCGT CACGACCATCGCTAATAA CCTTACCAGCACGGTTCA AGTCTTCTCGGACTCGGA GTACCAGTTGCCGTACGT CCTCGGCTCTGCGCACCA GGGCTGCCTCCCTCCGTT CCGGCGGACGTGTTTCATG A	10
53	AAV11VP1 /2- AAV6VP3 キメラ5	SHHKSPTPPRASAKKANNQP ERGSTLKRTLEPETDPLKDQI PAPCLQTLKWLQAVAHQWQ TITKAPTEWVMPQEIGIAPH GWATESSPPAPEHGPCPPITT TSTSKSPVLQRGPATTTTTSA TAPPGILISTDSTAISHHVTG SDSSTTIGDSGPRDSTSSSSTS KSRRSRRMMASRPSLITLPAR FKSSRTRSTSCRTSSALRTRA ASLRSRRTCS	305	AGTCACCACAAGAGCCCG ACTCCTCCTCGGGCATCG GCAAAAAAGGCAAACAA CCAGCCAGAAAGAGGCTC AACTTTGAAGAGGACACT GGAGCCGGAGACGGACC CCCTGAAGGATCAGATAC CAGCGCCATGTCCTCAGA CATTGAAATGGCTTCAGG CGGTGGCGCACCAATGGC AGACAATAACGAAGGCG CCGACGGAGTGGGTAATG CCTCAGGAAATTGGCATT GCGATTCCACATGGCTGG GCGACAGAGTCATCACCA CCAGCACCCGAACATGGG CCTTGCCACCTATAACA ACCACCTCTACAAGCAAA TCTCCAGTGCTTCAACGG GGGCCAGCAACGACAACC ACTACTTCGGCTACAGCA CCCCCTGGGGGTATTTTG ATTTCAACAGATTCCACT GCCATTTCTCACCACGTG ACTGGCAGCGACTCATCA ACAACAATTGGGGATTCC GGCCAAGAGACTCAACT TCAAGCTCTTCAACATCC AAGTCAAGGAGGTCACGA CGAATGATGGCGTCACGA CCATCGCTAATAACCTTA CCAGCACGGTTCAAGTCT TCTCGGACTCGGAGTACC AGTTGCCGTACGTCTCG GCTCTGCGCACCAGGGCT GCCTCCCTCCGTTCCCGGC GGACGTGTTTCATGA	20 30 40

【 0 2 4 5 】

【表 5 - 6】

54	AAV12VP1 /2- AAV6VP3 キメラ6	KRLQIGRPTRLGRPRPRKSK KTANQPTLLEGHSTLKTLEQ ETDPLRDHLPEKCLMMLRW LQAVAHQWQITTKAPTEWV MPQEIGIAPHGWATESSPPA PEHGPPITTTSTSKSPVLQR GPATTTTTSATAPPGILISTD STAISHHVTGSDSSTTIGDSGP RDSTSSSSTSKSRRSRMMAS RPSLITLPAFKSSRTRSTSCR TSSALRTRAASLRSRRITCS	306	AAAAGACTCCAAATC GGCCGACCAACCCGGACT CTGGGAAGGCCCGGCA AGAAAAAGCAAAAAGAC GGCGAACCAGCCGACTCT GCTAGAAGGACACTCGAC TTTGAAGACTCTGGAGCA GGAGACGGACCCCTGAG GGATCATCTTCCGGAGAA ATGTCTCATGATGCTGAG ATGGCTTCAGGCGGTGGC GCACCAATGGCAGACAAT AACGAAGGCGCCGACGG AGTGGGTAATGCCTCAGG AAATTGGCATTGCGATT CACATGGCTGGGCGACAG AGTCATCACCACCAGCAC CCGAACATGGGCCTTGCC CACCTATAACAACCACCT CTACAAGCAAATCTCCAG TGCTTCAACGGGGGCCAG CAACGACAACCACTACTT CGGCTACAGCACCCCTG GGGTATTTTGATTTCAA CAGATTCCACTGCCATTTC TCACCACGTGACTGGCAG CGACTCATCAACAACAAT TGGGGATTCCGGCCCAAG AGACTCAACTTCAAGCTC TTCAACATCCAAGTCAAG GAGGTCACGACGAATGAT GGCGTCACGACCATCGCT AATAACCTTACCAGCAG GTTCAAGTCTTCTCGGACT CGGAGTACCAGTTGCCGT ACGTCTCGGCTCTGCCG ACCAGGGCTGCCTCCCTC CGTTCCCGGCGGACGTGT TCATGA
----	---------------------------	--	-----	---

10

20

30

【 0 2 4 6 】

[00210] 場合によっては、タンパク質は、前記で特定したヌクレオチド配列によってコードされる AAV キャプシドタンパク質を含むことができる。AAV キャプシドは、3つのタンパク質、vp1、vp2、およびvp3で構成され得、これらは、代替スプライス変異体であり得る。キャプシドタンパク質の他の望ましい断片には、超可変領域(HVR)間に位置する定常領域および可変領域が含まれる。場合によっては、キャプシドタンパク質の断片には、HVR自体が含まれる。

【 0 2 4 7 】

[00211] 一部の態様では、AAV ITR に隣接する目的のヌクレオチド配列を含むAAVベクターは、異種配列をAAVベクターに直接挿入することにより構築することができる。これらの構築物は、当該技術分野において周知である技術を用いて設計することができる。例えば、Carter B., Adeno-associated virus vectors, Curr. Opin. Biotechnol., 3巻: 533~539頁(1992年); および Kotin RM, Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy, Hum Gene Ther 5巻: 793~801頁(1994年)を参照されたい。

【 0 2 4 8 】

40

50

[00212]一部の実施形態では、AAV発現ベクターは、治療効果を有する導入遺伝子などの目的の異種核酸配列を含む。AAVピリオンは、当該技術分野において周知である方法を用いて構築することができる。例えば、Koerberら(2009年)Mol. Ther. 17巻:2088頁;Koerberら(2008年)Mol. Ther. 16巻:1703~1709頁;米国特許第7,439,065号および同第6,491,907号を参照されたい。例えば、外因性または異種配列(複数可)をAAVゲノムに挿入することができ、その主要なAAVオープンリーディングフレームはそこから切除されている。AAVゲノムの他の部分もまた削除することができ、ITRの特定の部分は、複製およびパッケージング機能をサポートするために無傷のままである。このような構築物は、当該技術分野において周知である技術を用いて設計することができる。例えば、米国特許第5,173,414号および同第5,139,941号;Lebkowskiら(1988年)Molec. Cell. Biol. 8巻:3988~3996頁を参照されたい。

10

## 【0249】

[00213]本明細書では、WTキャプシドタンパク質から変異AAVキャプシドタンパク質を生成する方法であり得、この方法は、WTキャプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を、ポリメラーゼ連鎖反応突然変異誘発、オリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発、飽和突然変異誘発、ループ交換突然変異誘発、断片シャッフリング突然変異誘発、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるあるタイプの突然変異誘発に供することを含む。場合によっては、複数の突然変異されたAAVから非常に効果的な突然変異されたAAVを分離するためのスクリーンを行うことができる。例えば、スクリーンは、WT AAVと比較してより高い効率で初代細胞を形質導入することができる突然変異されたまたはキメラなAAVを決定するためのフローサイトメトリーアッセイを含むことができる。突然変異されたまたはキメラなAAVキャプシドタンパク質(または主題の核酸によってコードされる任意の変異AAVキャプシドタンパク質)は、野生型AAV(例えば、AAV6(野生型AAV血清型6))または野生型キャプシドタンパク質を含むAAVによって示される形質導入と比較して、哺乳動物細胞の形質導入の増加を感染性AAVピリオンに付与すると言することができる。場合によっては、形質導入の増加は、野生型AAV(例えば、AAV6(野生型AAV血清型6))または野生型キャプシドタンパク質を含むAAVによって示される形質導入よりも少なくとも約1.5倍(例えば、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約3倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約7.5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約12倍、少なくとも約15倍、少なくとも約17倍、少なくとも約20倍、少なくとも約25倍、少なくとも約30倍、少なくとも約40倍、少なくとも約50倍、少なくとも約75倍、少なくとも約100倍、少なくとも約150倍、少なくとも約200倍、少なくとも約250倍、少なくとも約300倍など)である。場合によっては、形質導入の増加は、フローサイトメトリーによる導入遺伝子の検出によって測定した場合、野生型AAV(例えば、AAV6(野生型AAV血清型6))または野生型キャプシドタンパク質を含むAAVによって示される形質導入よりも少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または最大約100%大きい。場合によっては、トランスフェクションの増加は、フローサイトメトリーによる導入遺伝子の検出によって測定した場合、野生型AAV(例えば、AAV6(野生型AAV血清型6))または野生型キャプシドタンパク質を含むAAVによって示される形質導入よりも少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または最大約100%大きくなり得る。293T細胞などのプロデューサー細胞、またはリンパ球(例えば、腫瘍浸潤リンパ球)などの初代細胞において形質導入およびトランスフェクションを検出できる。場合によっては、形質導入またはトランスフェクションの増加は、フローサイトメトリーによる導入遺伝子の検出によって測定した場合、野生型AAV(例えば、AAV6(野

20

30

40

50

生型 A A V 血清型 6 ) ) または野生型キャプシドタンパク質を含む A A V によって示される形質導入よりも少なくとも約 5 % ~ 1 0 %、1 5 % ~ 2 0 %、2 5 % ~ 3 0 %、3 5 % ~ 4 0 %、4 5 % ~ 5 0 %、5 5 % ~ 6 0 %、6 5 % ~ 7 0 %、7 5 % ~ 8 0 %、8 5 % ~ 9 0 %、9 5 % または最大約 1 0 0 % 大きい。トランスフェクションまたは形質導入効率は、いくつか例を挙げると、P C R、q P C R、細胞内染色、フローサイトメトリー、定量的ウエスタンブロッティング、E L I S A などのインビトロアッセイにより検出することができる。

#### 【 0 2 5 0 】

[00214] 場合によっては、主題の変異 A A V キャプシドタンパク質 ( または主題の核酸によってコードされる変異 A A V キャプシドタンパク質 ) は、野生型 A A V キャプシドタンパク質に結合する中和抗体への結合の低下を示す。例えば、主題の変異 A A V キャプシドタンパク質は、野生型 A A V キャプシドタンパク質への抗体の結合親和性と比較して、野生型キャプシド A A V タンパク質に結合する中和抗体への少なくとも約 1 . 5 倍 ( 例えば、少なくとも約 1 . 5 倍、少なくとも約 2 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 4 倍、少なくとも約 5 倍、少なくとも約 7 . 5 倍、少なくとも約 1 0 倍、少なくとも約 1 2 倍、少なくとも約 1 5 倍、少なくとも約 1 7 倍、少なくとも約 2 0 倍、少なくとも約 2 5 倍、少なくとも約 3 0 倍、少なくとも約 4 0 倍、少なくとも約 5 0 倍、少なくとも約 7 5 倍、少なくとも約 1 0 0 倍、少なくとも約 1 5 0 倍、少なくとも約 2 0 0 倍、少なくとも約 2 5 0 倍、少なくとも約 3 0 0 倍など ) の結合の低下 ( 例えば、親和性の低下 ) を示すことができる。

修飾された A A V を製造する方法

[00215] 本出願は、細胞内で 1 つ以上の目的のタンパク質を発現することができる組換え A A V を生成するための方法および材料を提供する。本明細書に記載されるように、本明細書に開示される方法および材料は、インビボで治療効果を達成するレベルで目的のタンパク質の高生産または生産を可能にする。目的のタンパク質の例は外因性受容体である。外因性受容体は T C R であり得る。

#### 【 0 2 5 1 】

[00216] 一般的な A A V ビリオンまたはウイルス粒子に対して、A A V 発現ベクターは、トランスフェクションなどの公知の技術を使用して適切な宿主細胞に導入される。トランスフェクション技術は当該技術分野において公知である。例えば、G r a h a m ら ( 1 9 7 3 年 ) V i r o l o g y , 5 2 巻 : 4 5 6 頁 , S a m b r o o k ら ( 1 9 8 9 年 ) M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r i e s , N e w Y o r k , D a v i s ら ( 1 9 8 6 年 ) B a s i c M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , E l s e v i e r , および C h u ら ( 1 9 8 1 年 ) G e n e 1 3 巻 : 1 9 7 頁を参照されたい。適切なトランスフェクション法には、当該技術分野において公知である、リン酸カルシウム共沈殿、直接的なマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リボソーム媒介遺伝子導入、および知られている高速微小発射体を使用した核酸送達が含まれる。

#### 【 0 2 5 2 】

[00217] 場合によっては、組換え A A V を産生する方法は、本明細書に記載されるものなどの A A V の 5 ' 逆方向末端反復配列 ( I T R ) および 3 ' A A V I T R を含むウイルス構築物、産生性 A A V 感染を生じされるためのヘルパー機能、および A A V c a p 遺伝子をパッケージング細胞株に提供し、パッケージング細胞株の上清から組換え A A V を回収することを含む。様々なタイプの細胞をパッケージング細胞株として使用することができる。例えば、使用することができるパッケージング細胞株には、限定されないが、いくつか例を挙げると、H E K 2 9 3 細胞、H e L a 細胞、および V e r o 細胞が含まれる。場合によっては、パッケージング細胞株の上清は、ウイルスを濃縮するために P E G 沈殿によって処理される。他の場合では、遠心分離ステップを使用してウイルスを濃縮することができる。例えば、カラムを使用して、遠心分離中にウイルスを濃縮することが

できる。一部の実施形態では、沈殿は、少なくとも約2時間、少なくとも約3時間、少なくとも約4時間、少なくとも約6時間、少なくとも約9時間、少なくとも約12時間、または少なくとも約24時間、約4以下(例えば、約3、約2、約1、または約1)で生じる。一部の実施形態では、組換えAAVは、低速遠心分離とそれに続くCsCl勾配によって、PEG沈殿させた上清から単離される。低速遠心分離は、約20分間、約30分間、約40分間、約50分間または約60分間、約4000rpm、約4500rpm、約5000rpm、または約6000rpmであり得る。場合によっては、約5000rpmで約30分間の遠心分離とそれに続くCsCl勾配によって、PEG沈殿させた上清から組換えAAVを単離する。場合によっては、CsCl精製をIDX勾配超遠心分離に置き換えることができる。上清は、トランスフェクション後、約12時間、約24時間、約36時間、約48時間、約72時間、約96時間、約120時間、またはこれら2つの時点のいずれかの時点で回収することができる。上清を精製、濃縮、またはそれらを組み合わせてすることもできる。例えば、濃度またはウイルス力価は、qPCRまたは銀染色によって決定することができる。ウイルス力価は、約 $10^2$ vp/mL、 $10^3$ vp/mL、 $10^4$ vp/mL、 $10^5$ vp/mL、 $10^6$ vp/mL、 $10^7$ vp/mL、または $10^8$ vp/mLから最大約 $10^9$ vp/mLであり得る。ウイルス力価は、約 $10^2$ GC/mL、 $10^3$ GC/mL、 $10^4$ GC/mL、 $10^5$ GC/mL、 $10^6$ GC/mL、 $10^7$ GC/mL、または $10^8$ GC/mLから最大約 $10^9$ GC/mLであり得る。場合によっては、ウイルス力価は、約 $10^2$ TU/mL、 $10^3$ TU/mL、 $10^4$ TU/mL、 $10^5$ TU/mL、 $10^6$ TU/mL、 $10^7$ TU/mL、または $10^8$ TU/mLから最大約 $10^9$ TU/mLであり得る。最適なウイルス力価は、形質導入される細胞のタイプに依存して変化し得る。ウイルスの範囲は、約1000MOIから2000MOI、1500MOIから2500MOI、2000MOIから3000MOI、3000MOIから4000MOI、4000MOIから5000MOI、5000MOIから6000MOI、6000MOIから7000MOI、7000MOIから8000MOI、8000MOIから9000MOI、9000MOIから10,000MOIであり得る。例えば、10,000のMOIを使用して100万個の細胞を感染させるには、 $10,000 \times 1,000,000 = 10^{10}$ GCが必要である。

#### 【0253】

[00218]プラスミドまたはウイルスの宿主細胞への導入はまた、当業者に公知である技術を使用して、本明細書の全体にわたって検討されているように達成することができる。場合によっては、標準的なトランスフェクション技術、例えば、CaPO<sub>4</sub>トランスフェクションまたはエレクトロポレーション、および/またはハイブリッドアデノウイルス/AAVベクターによるヒト胎児腎細胞株HEK293(トランス作用性E1タンパク質を提供する機能性アデノウイルスE1遺伝子を含むヒト腎細胞株)などの細胞株への感染が使用される。当業者は、本発明の新規AAV配列が、インビトロ、エキスピボまたはインピボ遺伝子送達のためのこれらおよび他のウイルスベクター系での使用に容易に適合できることを容易に理解する。同様に、当業者は、様々なAAVおよび非AAVベクター系で使用するために、本発明のAAVゲノムの他の断片を容易に選択することができる。このようなベクター系には、とりわけ、例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、ボックスウイルス、ワクシニアウイルス、およびアデノウイルス系が含まれ得る。これらのベクター系の選択は、本発明の限定ではない。

#### 【0254】

[00219]一部の実施形態では、ヘルパー機能は、アデノウイルスヘルパー遺伝子を含む1つ以上のヘルパープラスミドまたはヘルパーウイルスによって提供される。アデノウイルスヘルパー遺伝子の非限定的な例には、AAVパッケージングにヘルパー機能を提供することができるE1A、E1B、E2A、E4およびVAが含まれる。場合によっては、AAVcap遺伝子はプラスミドに存在することができる。プラスミドは、AAVrep遺伝子をさらに含むことができる。

#### 【0255】

[00220]血清学は、ある血清型のウイルスキャプシドタンパク質に応答して、別の血清型のウイルスキャプシドタンパク質を中和することができない抗体として定義することができる。場合によっては、任意のAAV血清型のcap遺伝子および/またはrep遺伝子(限定されないが、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、およびそれらの突然変異体または誘導体を含む)を本明細書で使用して、本明細書で開示される組換えAAVを作製し、目的の1つ以上のタンパク質を発現させることができる。アデノ随伴ウイルスは、AAV5もしくはAAV6またはその変異体であり得る。場合によっては、AAV cap遺伝子は、血清型1、血清型2、血清型3、血清型4、血清型5、血清型6、血清型7、血清型8、血清型9、血清型10、血清型11、血清型12、またはその変異体由来のキャプシドをコードすることができる。一部の実施形態では、パッケージング細胞株は、ヘルパープラスミドまたはヘルパーウイルス、ウイルス構築物、およびAAVキャプシド遺伝子をコードするプラスミドでトランスフェクトされ得る。組換えAAVウイルスは、同時トランスフェクション後の様々な時点で回収することができる。例えば、組換えAAVウイルスは、同時トランスフェクション後の約12時間、約24時間、約36時間、約48時間、約72時間、約96時間、約120時間、またはこれらの2つの時点のいずれかの間の時間で回収することができる。

10

【0256】

[00221]場合によっては、修飾は、AAV血清型6キャプシドのものであり得る。場合によっては、主題の変異AAVキャプシドタンパク質(または主題の核酸によってコードされる変異AAVキャプシドタンパク質)は、配列番号55に対して約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または最大100%の相同性を含むことができるAAV6などのWT AAVと比較することができる。

20

【0257】

【表6】

表6: WTAAV6 キャプシド

配列番号	ヌクレオチド配列
55	atggctgccgatggtatcttccagattggctcgaggacaacctctcaggggcattcgcgagtggtgggactgaaacctggagccccc aaaccctaaagccaaccagcaaaagcaggacgacgcccggggtctggtgcttctcctggctacaagtaacctcggaccctcaacgggactc gacaagggggagcccgtaacgcggcggatgacgcggccctcagagcagacaagggcctacgaccagcagctcaaaagcgggtga caatccgtacctgctgataaccacggcagcggcaggtttcagagcgtctgcaagaagatactctttgggggcaacctcgggcca gcagcttccagggcaagaagggtctcgaacctttggctggttgaggaggtgctaaagcggctcctggaaaagaacgtccggg agagcagctgcccaagagccagactcctcctcggcattggcaagacagggcagcccgctaaaaagagactcaatttggta gactggcactcagatgactgctcccaccacaacctctcggagaacctccagcaacccccgctgctggtgggactactacaatggct tcaggcgggtggcgaccaatggcagacaatacgaaggcggcagcggatgggtaatgctcaggaaattggcattgcattccaca tggctgggcaagagatcaccaccagcaccgaacatggccttggccacctataacaaccacctcacaagcaaatcctcagtg ctcaacgggggccaagcagcaaccactactcgtctacagcaccctggggatatttgaattcaacagattccactgcaattctca ccacgtgactggcagcagctcaacaacaattggggatccggccaagagactcaactcaagcctcaacatccaagtcaagga ggtcacgacgaatgatggcgtcagaccatcgtaataacctaccagcagcgttcaagctctcggactcggagtagcattgcccgt cgtcctcggctctcgcaccagggtgctcctcctcgttcccggcggagctgctcatgattccgagtagcagctacctaacgctcaaca tggcagccaggcagtgaggcgtcactcttactgctggaatattcccacgcagatgctgagaacgggcaataacttacctcagct acacctcagggagctgcttccacagcagctacgcacagcagcagcctggaccggctgatgaacctctcatcgaccagctacgt tattacctgaacagaactcagaatcagctccggaagtgcaccaaaacaggactgctgttagccgggggtctccaagctggcattgctg agcccaaaaactggctacctggaccctgtaccggcagcagcgttttaaaacaaaacagacaacaacagcaacttacctgg actggtgctcaaaataacctaatggcgtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacacaagagcacaagaagacaagt cttccatgagcgggtgcatgattttgaaaaggagcggcggagcttcaaacactgcatggacaatgcatgatcacagacgaaga ggaaatacaagccactaaccctggccaccgaaagattgggactgtggcagctcaatcctcagagcagcagcacagaccctcggc cggagatgctgattgggagcctaccctggaatggtgtgcaagacagagcgtatacctcagggctctattggccaaaattct cacacggatggacacttaccctcctctcattggcggcttggacttaagcaccggcctcctcagatcctcaaaaaacacgcctg ttctcggaaatcccgagaggtttcggctacaaggttgcctcattcaccagattccacagacaagtgagcgtggagattgaa gggagctcgaagaagaacagcaaacgctggaatcccgaagtgcagatatacctcaactatgcaaaatctccaacgtgattcactg tgacaacaatggacttatactgagcctcggccattggcaccctgacctcaccctccctgtaa

30

40

【0258】

50

[00222] 場合によっては、複数の操作されたアデノ随伴ウイルス (AAV) 粒子をスクリーニングする方法は、突然変異または外因性 AAV ゲノムの少なくとも 1 つをアデノ随伴ウイルス (AAV) ヌクレオチド配列のゲノムに導入して、操作された AAV 粒子を形成するステップを含むことができる。場合によっては、次に、操作された AAV 粒子が複数の細胞ゲノムに導入される。スクリーンは、異なる突然変異またはキメラ AAV 変異体の複数の細胞ゲノム中の複数の AAV 粒子によってコードされる導入遺伝子の発現レベルを比較することを含み得る。場合によっては、導入遺伝子の発現レベルは定量化される。他の場合では、形質導入された細胞集団の細胞死のレベルが定量化される。他の場合では、細胞集団における導入遺伝子の持続性レベルが定量化される。

【0259】

[00223] 場合によっては、スクリーニング方法は、ウイルス上清の滴定実験の実施を伴い得る。例えば、細胞は、突然変異されたまたはキメラな修飾された AAV ウイルスからの AAV 上清を用いて形質導入して、修飾 AAV ウイルスからのウイルス粒子の感染性の程度を決定することができる。例えば、MOI は、 $1 \times 10^6$  GC/mL から 200 GC/mL まで滴定することができる。形質導入された細胞での導入遺伝子の発現などの産生量を定量化して、選択され得る突然変異体またはキメラを決定することができる。

【0260】

[00224] AAV のヘルパーウイルスは当該技術分野において公知であり、例えば、アデノウイルス科およびヘルペスウイルス科に由来するウイルスが含まれる。AAV のヘルパーウイルスの例には、限定されないが、米国特許出願公開第 2011/0201088 号に記載される SAdV-13 ヘルパーウイルスおよび SAdV-13 様ヘルパーウイルス、ヘルパーベクター pHELP (Applied Viromics) が含まれる。当業者は、AAV に適切なヘルパー機能を提供することができる AAV の任意のヘルパーウイルスまたはヘルパープラスミドを本明細書において使用することができることを理解する。本明細書に開示される組換え AAV ウイルスはまた、感染性組換え AAV の産生に適した当該技術分野において公知である任意の従来方法を使用して産生することもできる。場合によっては、組換え AAV は、AAV 粒子産生に必要な成分のいくつかを安定して発現する細胞株を使用することにより産生され得る。例えば、AAV rep および cap 遺伝子、およびネオマイシン耐性遺伝子などの選択マーカーを含むプラスミド (または複数のプラスミド) は、細胞 (パッケージング細胞) のゲノムに組み込むことができる。次に、パッケージング細胞株は、ヘルパーウイルス (例えば、ヘルパー機能を提供するアデノウイルス)、ならびに 5' および 3' AAV ITR、ならびに目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むウイルスベクターで同時感染され得る。別の非限定的な例では、プラスミドというよりはむしろアデノウイルスまたはバキュロウイルスを使用して、rep および cap 遺伝子をパッケージング細胞に導入することができる。さらに別の非限定的な例として、5' および 3' AAV ITR と rep-cap 遺伝子の両方を含むウイルスベクターをプロドューサー細胞の DNA に安定して組み込むことができ、ヘルパー機能は、野生型アデノウイルスによって提供されて、組換え AAV を産生することができる。

【0261】

[00225] 場合によっては、パッケージングプラスミドは、1 つのプラスミド上に必要なすべてのウイルスタンパク質を含み、ITR に隣接したドナー鑄型の、複製不能ウイルス粒子へのパッキングを可能にすることができる。

【0262】

[00226] AAV ビリオンまたはウイルス粒子を産生するために使用することができる適切な宿主細胞には、酵母細胞、昆虫細胞、微生物、および哺乳動物細胞が含まれる。様々な安定したヒト細胞株を使用することができ、限定されないが、293 細胞が含まれる。宿主細胞を操作してヘルパー機能を提供し、AAV ITR に隣接するヌクレオチド配列を複製およびキャプシド化して、ウイルス粒子または AAV ビリオンを産生させることができる。AAV ヘルパー機能は、AAV 複製およびパッケージングのためにトランスで A

10

20

30

40

50

AAV遺伝子産物を提供するために、宿主細胞で発現されるAAV由来のコード配列によって提供され得る。AAVウイルスは、複製を可能にし、または複製を不能にすることができる。一般的に、複製欠損AAVウイルスには1つ以上のAAVパッケージング遺伝子を欠損している。細胞は、本明細書に記載されるウイルスベクター、ウイルス粒子、またはウイルスとインビトロ、エクスピボ、またはインスピボで接触させることができる。一部の実施形態では、インビトロで接触する細胞は、樹立された細胞株または対象由来の初代細胞に由来し得、対象に戻すためにエクスピボで修飾されるか、またはインビトロで培養にて増殖させることができる。一部の態様では、ウイルスを使用してエクスピボで初代細胞にウイルスベクターを送達して、細胞を修飾する。例えば、免疫細胞、または特にT細胞に外因性核酸配列、導入遺伝子、または操作された細胞受容体を導入し、続いて、培養における拡大、選択、または限られた数の継代を行った後、このような修飾された細胞を対象に戻す。一部の態様では、このような修飾された細胞は、癌を含む疾患または状態を治療するための細胞ベース療法で使用される。

#### 【0263】

[00227]場合によっては、操作されたAAVは自己相補的AAV (scAAV) ではない。本明細書に記載される実施形態では、組換えAAVを精製するために、AAVの精製に適した任意の従来方法を使用することができる。例えば、組換え体は、パッケージング細胞および/またはパッケージング細胞の上清から単離および精製することができる。一部の実施形態では、AAVは、CsCl勾配を使用する分離方法により精製され得る。また、米国特許出願公開第2002/0136710号は、AAVを精製する方法の別の非限定的な例を記載し、AAVは、AAV付着を媒介する人工受容体または受容体様分子が固定されるマトリックスを含む固体支持体を使用して、試料から単離および精製された。

#### 【0264】

[00228]場合によっては、細胞集団は、ウイルスベクター、例えばAAVで形質導入することができる。ウイルスによる形質導入は、CRISPRシステムによるゲノム破壊前、またはCRISPRシステムによるゲノム破壊後に生じる場合がある。例えば、CRISPRシステムを使用したゲノム破壊は、外因性ポリ核酸のゲノムの一部への組み込みを促進することができる。場合によっては、CRISPRシステムを使用して、免疫チェックポイント遺伝子もしくはセーフハーバー遺伝子またはその一部などの遺伝子を含むゲノムの一部に二本鎖切断を導入することができる。二本鎖切断は、ウイルスベクター、場合によってはAAVによって、細胞に送達される外因性受容体配列を導入することにより修復することができる。AAVは、CRISPRシステムによって破壊された遺伝子の一部への組換えアームを有するポリ核酸を含むことができる。例えば、CRISPRシステムでは、CISH遺伝子に二本鎖切断を導入することができる。次に、CISH遺伝子は、外因性TCRをコードする導入遺伝子の導入によって修復することができ、導入遺伝子は、CRISPRシステムによって以前に破壊されたゲノムの一部に相補的な領域を有する組換えアームに隣接させることができる。ゲノム破壊およびウイルス導入を含む細胞集団を形質導入することができる。形質導入された細胞集団は、約5%~約100%であり得る。

#### 【0265】

[00229]本明細書に記載される方法の1つ以上の導入遺伝子は、細胞のゲノムにランダムに挿入することができる。これらの導入遺伝子は、ゲノムのどこかに挿入されると機能し得る。例えば、導入遺伝子はそれ自身のプロモーターをコードし得るか、または内在性プロモーターの制御下にある位置に挿入され得る。あるいは、導入遺伝子は、遺伝子のイントロン、遺伝子のエクソン、プロモーター、または非コード領域などの遺伝子に挿入することができる。

#### 【0266】

[00230]導入遺伝子配列をコードする核酸、例えばRNAは、細胞の染色体にランダムに挿入され得る。ランダムな組み込みは、細胞に核酸、例えばRNAを導入する任意の方法から生じさせることができる。例えば、この方法は、限定されないが、エレクトロポレ

10

20

30

40

50

ーション、ソノポレーション、遺伝子銃の使用、リポトランスフェクション、リン酸カルシウムトランスフェクション、デンドリマーの使用、マイクロインジェクション、およびアデノウイルス、AAV、およびレトロウイルスベクターを含むウイルスベクターの使用、および/またはグループIIリボザイムであり得る。

【0267】

[00231]また、導入遺伝子またはその発現産物の存在がレポーター遺伝子の活性化を介して検出することができるように、導入遺伝子をコードするRNAはレポーター遺伝子を含むように設計することができる。前記で開示されたものなど、任意のレポーター遺伝子を使用することができる。細胞培養でレポーター遺伝子が活性化された細胞を選択することにより、導入遺伝子を含む細胞を選択することができる。

10

【0268】

[00232]挿入される導入遺伝子は、ゲノム中の標的化された二本鎖切断部位に類似する操作された部位に隣接して、二本鎖切断領域に挿入することができるように、ポリ核酸から導入遺伝子を切り出すことができる。場合によっては、導入遺伝子をウイルス的に導入することができる。例えば、AAVウイルスを利用して、細胞に導入遺伝子を感染させることができる。フローサイトメトリーを利用して、AAVウイルスによって、組み込まれた導入遺伝子の発現を測定することができる。場合によっては、AAVウイルスによる導入遺伝子の組み込みは細胞毒性を誘発しない。場合によっては、AAVウイルスを利用して操作された細胞集団のフローサイトメトリーによって測定した場合の細胞生存率は、約30%から100%の生存率であり得る。操作された細胞集団のフローサイトメトリーによって測定した場合の細胞生存率は、約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%から約100%までであり得る。場合によっては、AAVウイルスは細胞のゲノムに導入遺伝子を導入することができる。組み込まれた導入遺伝子は、ゲノム導入直後から操作された細胞によって、操作された細胞の寿命まで発現させることができる。例えば、組み込まれた導入遺伝子は、細胞のゲノムへの導入後の約0.1分から、導入遺伝子の細胞への最初の導入後の1時間から5時間、5時間から10時間、10時間から20時間、20時間から1日、1日からしてから3日、3日から5日、5日から15日、15日から30日、30日から50日、50日から100日、または最大1000日まで検出することができる。導入遺伝子の発現は、3日から検出することができる。導入遺伝子の発現は、7日から検出することができる。導入遺伝子の発現は、細胞のゲノムへの導入遺伝子の導入後、約4時間、6時間、8時間、12時間、18時間から約24時間まで検出することができる。場合によっては、ウイルス力価が導入遺伝子発現のパーセントに影響を及ぼす場合がある。

20

30

【0269】

[00233]場合によっては、本明細書に記載される目的の遺伝子または導入遺伝子を含むAAVウイルスベクターなどのウイルスベクターは、ウイルスベクターを含むウイルス粒子による細胞のトランスフェクション後に細胞のゲノムにランダムに挿入することができる。このような挿入のためのランダムな部位には、二本鎖切断を伴うゲノム部位が含まれる。レトロウイルスなどの一部のウイルスは、ウイルスベクターのランダム挿入を引き起こす可能性のあるインテグラーゼなどの因子を含む。

40

【0270】

[00234]場合によっては、修飾または操作されたAAVウイルスを使用して、導入遺伝子を細胞に導入することができる。修飾されたまたは野生型のAAVは、少なくとも1つのゲノムの場所への相同性アームを含むことができる。

【0271】

[00235]導入遺伝子をコードするRNAは、エレクトロポレーションを介して細胞に導入することができる。RNAはまた、リポフェクション、感染、または形質転換を介して細胞に導入することもできる。エレクトロポレーションおよび/またはリポフェクションを使用して、初代細胞をトランスフェクションすることができる。エレクトロポレーションおよび/またはリポフェクションを使用して、初代造血細胞をトランスフェクトするこ

50

とができる。場合によっては、細胞内でRNAをDNAに逆転写することができる。次に、DNA基質を相同組換え反応に使用することができる。DNAはまた、相同組換えを使用せずに細胞ゲノムに導入することもできる。場合によっては、ゲノムの標的二本鎖切断領域に相補的な遺伝子操作部位がDNAの側面にある場合がある。場合によっては、DNAをポリ核酸から切り出すことができ、そのため、相同組換えなしに二本鎖切断領域に挿入することができる。

#### 【0272】

[00236]導入遺伝子の発現は、発現アッセイ、例えば、qPCRにより、またはRNAレベルを測定することにより検証することができる。発現レベルはまたコピー数を示すことができる。例えば、発現レベルが非常に高い場合、これは、導入遺伝子の1を超えるコピーがゲノムに組み込まれたことを示し得る。あるいは、高発現は、導入遺伝子が高度に転写された領域、例えば、高度に発現したプロモーターの近傍に組み込まれたことを示し得る。発現はまた、ウエスタンブロッティングを介するなど、タンパク質レベルを測定することによって検証することができる。場合によっては、スプライサクセプターアッセイをレポーターシステムとともに使用して、導入遺伝子の組み込みを測定することができる。例えば、スプライサクセプターは、内在性プロモーターの制御下でゲノムに正常に組み込まれた場合、発現を示すことができる。場合によっては、AAVシステムを使用して導入遺伝子がゲノムに導入された場合、導入遺伝子の組み込みを測定するために、スプライサクセプターアッセイをレポーターシステムとともに使用することができる。

10

#### 【0273】

[00237]本明細書に開示される方法のいずれかにおける1つ以上の導入遺伝子の挿入は、部位特異的であり得る。例えば、1つ以上の導入遺伝子をプロモーターに隣接してまたはその近傍に挿入することができる。別の例では、1つ以上の導入遺伝子は、遺伝子(例えば、PD-1遺伝子)のエクソンに隣接して、その近傍に、またはその中に挿入することができる。このような挿入を使用して、導入遺伝子(例えば、癌特異的TCR導入遺伝子)をノックインすると同時に、別の遺伝子(例えば、PD-1遺伝子)を破壊することができる。別の例では、1つ以上の導入遺伝子は、遺伝子のイントロンに隣接して、その近傍に、またはその中に挿入することができる。導入遺伝子は、AAVウイルスベクターによって導入され、標的のゲノムの場所に組み込まれ得る。場合によっては、AAVベクターを使用して、特定の場所に導入遺伝子を直接挿入することができる。例えば、場合によ

20

30

#### 【0274】

[00238]細胞の標的遺伝子座の修飾は、DNAを細胞に導入することにより生成することができる。DNAは標的遺伝子座と相同性を有する。DNAは、マーカー遺伝子を含むことができ、組み込まれた構築物を含む細胞の選択を可能にする。標的ベクター内の相補的DNAは、標的遺伝子座で染色体DNAと組換えることができる。マーカー遺伝子は、相補的DNA配列、3'組換えアーム、および5'組換えアームが隣接し得る。細胞内の複数の遺伝子座を標的にすることができる。例えば、1つ以上の標的遺伝子座に特異的な組換えアームを有する導入遺伝子を一度に導入して、それにより、単一のステップで複数のゲノム修飾を行うことができる。

40

#### 【0275】

[00239]場合によっては、特定のゲノム部位に対する組換えアームまたは相同性アームは、長さが約0.2kbから約5kbであり得る。組換えアームは、長さが約0.2kb、0.4kb、0.6kb、0.8kb、1.0kb、1.2kb、1.4kb、1.6kb、1.8kb、2.0kb、2.2kb、2.4kb、2.6kb、2.8kb、3.0kb、3.2kb、3.4kb、3.6kb、3.8kb、4.0kb、4.2kb、4.4kb、4.6kb、4.8kbから約5.0kbまでであり得る。組換えアームはまた、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、

50

29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199から最大約200塩基または塩基対であり得る。

10

## 【0276】

[00240]様々な酵素が、外来DNAの宿主ゲノムへの挿入を触媒することができる。例えば、部位特異的リコンビナーゼは、異なる生化学的特性を有する2つのタンパク質ファミリー、すなわち、チロシンリコンビナーゼ（DNAがチロシン残基に共有結合している）およびセリンリコンビナーゼ（共有結合がセリン残基で発生している場合）にクラスター化することができる。場合によっては、リコンビナーゼは、Cre、fC31インテグラーゼ（ストレプトマイセスファージfC31に由来するセリンリコンビナーゼ）、またはバクテリオファージ由来の部位特異的リコンビナーゼ（Flp、ラムダインテグラーゼ、バクテリオファージHK022リコンビナーゼ、バクテリオファージR4インテグラーゼおよびファージTP901-1インテグラーゼを含む）を含むことができる。

20

## 【0277】

[00241]発現制御配列はまた構築物に使用することができる。例えば、発現制御配列は、多種多様な細胞タイプで発現される構成的プロモーターを含むことができる。組織特異的プロモーターはまた使用され得、特定の細胞系統に発現を指向するために使用することができる。

30

## 【0278】

[00242]部位特異的遺伝子編集は、CRISPR、TALEN（米国特許出願第14/193,037号を参照されたい）、トランスポゾンベース、ZFN、メガヌクレアーゼ、またはメガ-TAL、またはトランスポゾンベースシステムなどの非ウイルス遺伝子編集を使用して達成することができる。例えば、PiggyBac（Moriarty, B.S.ら、「Modular assembly of transposon integratable multigene vectors using RecWay assembly」, Nucleic Acids Research (8): e92 (2013年)を参照されたい)またはSleeping Beauty（Aronovich, E.L.ら、「The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy」, Hum. Mol. Genet., 20(R1): R14-R20. (2011年)トランスポゾンシステムを使用することができる。

40

## 【0279】

[00243]部位特異的遺伝子編集はまた、相同組換えなしに達成され得る。相同組換えを使用せずに、外因性ポリ核酸を細胞ゲノムに導入することができる。場合によっては、ゲノム内の標的二本鎖切断領域に相補的である遺伝子操作部位が導入遺伝子に隣接する場合がある。導入遺伝子は、ポリ核酸から切り出すことができるため、相同組換えなしに二本鎖切断領域に挿入され得る。

50

## 【0280】

[00244]導入遺伝子のゲノム組み込みが望ましい一部の実施形態では、ヌクレアーゼがゲノムDNAを切断する部位での導入遺伝子の組み込みを促進するために、外因性または操作されたヌクレアーゼは、導入遺伝子を含むプラスミド、線状もしくは環状ポリヌクレオチド、ウイルスまたは非ウイルスベクターに加えて、細胞に導入することができる。導入遺伝子の細胞ゲノムへの組み込みにより、長期にわたって導入遺伝子の安定した発現が可能になる。一部の局面では、ウイルスベクターを使用して、導入遺伝子に作動可能に連結されたプロモーターを導入することができる。他の場合、ウイルスベクターはプロモーターを含まない。これは、挿入された導入遺伝子を発現するための内因性プロモーターを含む標的遺伝子座での導入遺伝子の挿入を必要とする。

10

## 【0281】

[00245]他の実施形態では、ウイルスベクターは、AAVS1部位またはセーフハーバ部位などの標的ゲノム遺伝子座への導入遺伝子の組み込みを指向する相同性アームを含む。一実施形態では、第1のヌクレアーゼは、特定のゲノム部位で切断して、癌遺伝子、チェックポイント阻害剤遺伝子、または癌などの疾患もしくは状態に係る遺伝子などの有害な遺伝子を抑制または無効にするように操作される。ヌクレアーゼによってこのようなゲノム遺伝子座で二本鎖切断が生成された後、非ウイルスベクターまたはウイルスベクター（例えば、AAVウイルスベクター）を導入して、DNA切断部位またはヌクレアーゼにより生成される二本鎖切断部位で、導入遺伝子または治療効果を有する外因性核酸配列の組み込みを可能にし得る。あるいは、導入遺伝子は、AAVS1部位またはセーフハーバ遺伝子座などの所望の挿入部位に相補的な配列を含む相同性アームを使用して、相同組換えによる部位特異的挿入などの、当該技術分野において公知である方法を使用して異なるゲノム部位に挿入することができる。場合によっては、第1のヌクレアーゼによるDNA切断部位とは異なる遺伝子座での導入遺伝子の部位特異的挿入を促進するために、第2のヌクレアーゼを提供することができる。一部の実施形態では、AAVウイルスまたはAAVウイルスベクターを、T細胞受容体などの導入遺伝子を導入するための送達システムとして使用することができる。AAVドナーの相同性アームは、500塩基対から2000塩基対であり得る。例えば、AAVドナーの相同性アームは、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1000bp、1100bp、1200bp、1300bp、1400bp、1500bp、1600bp、1700bp、1800bp、または1900bpから最大2000bpまでの長さであり得る。相同性アームの長さは850bpであり得る。他の場合では、相同性アームの長さは1040bpであり得る。場合によっては、ドナーの正確な組み込みを可能にするために、相同性アームが拡張される。他の場合では、ドナーの組み込みを改善するために相同性アームが拡張される。場合によっては、ドナーポリ核酸のサイズを損なうことなく相同アームの長さを増加させるために、ドナーポリ核酸の代替部分を排除することができる。場合によっては、ポリA尾部を小さくして、相同性アームの長さを長くすることができる。

20

30

## 【0282】

[00246]本明細書では、機能的AAVが開示され得る。機能性AAVは、AAV6などのWT AAVのいずれか1つと同等またはそれ以上のパッケージングおよび形質導入効率を有するウイルス粒子を産生する能力によって特徴付けられるAAVであり得る。機能は、AAV6 repおよびAAV6 ITRを使用した偽型設定で評価することができる。したがって、変更された親AAVは、従来技術を使用して構築することができ、AAV6などのWT AAVの産生と比較した場合、ウイルスが少なくとも50%の力価で親AAVから産生される場合、AAVベクターは機能的とみなすことができる。さらに、細胞を形質導入するAAVの能力は、当業者によって容易に決定され得る。例えば、親のAAVは、ウイルスをすぐに検出することができるマーカー遺伝子を含むように構築され得る。例えば、AAVには、eGFPまたは蛍光検出を可能にする別の導入遺伝子を含めることができる。AAVにCMV-eGFPが含まれる場合、変更された親AAVキャプシドから産生されたウイルスが $10^4$ の感染多重度で293細胞に形質導入されると、細胞

40

50

が20の感染多重度で2時間、野生型ヒトアデノウイルス5型で前処理された場合との関連で、全細胞のGFP蛍光が5%を超える場合に機能が実証される。

#### 導入遺伝子

【00247】場合によっては、本明細書に開示される方法は、核酸（例えば、第1の核酸および/または第2の核酸）を含むことができる。場合によっては、核酸は導入遺伝子をエンコードすることができる。一般的に、導入遺伝子は、複数のヌクレオチドサブユニットを含む線状ポリマーを指し得る。導入遺伝子は、任意の数のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、約100個未満のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、少なくとも約100個のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、少なくとも約200個のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、少なくとも約300個のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、少なくとも約400個のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、少なくとも約500個のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、少なくとも約1000個のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、少なくとも約5000個のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、少なくとも約10,000個のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、少なくとも約20,000個のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、少なくとも約30,000個のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、少なくとも約40,000個のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、少なくとも約50,000個のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、約500~約5000個のヌクレオチドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、約5000~約10,000ヌクレオチドを含むことができる。本明細書に開示されるいずれの場合においても、導入遺伝子は、DNA、RNA、またはDNAとRNAのハイブリッドを含むことができる。場合によっては、導入遺伝子は、一本鎖であり得る。場合によっては、導入遺伝子は二本鎖であり得る。

10

20

#### 【0283】

【00248】導入遺伝子は、導入遺伝子なしでよりも高いレベルで内因性遺伝子を発現する、例えば過剰発現するのに有用であり得る。さらに、導入遺伝子を使用して、バックグラウンド、すなわち、導入遺伝子でトランスフェクトされていない細胞よりも高いレベルで外因性遺伝子を発現させることができる。導入遺伝子はまた、他のタイプの遺伝子、例えば、ドミナントネガティブ遺伝子を含むことができる。

30

#### 【0284】

【00249】導入遺伝子は、導入遺伝子の産物を生成する方法で、生物、細胞、組織、または臓器に配置することができる。ポリ核酸は、導入遺伝子を含むことができる。ポリ核酸は、外因性受容体をコードすることができる。例えば、本明細書には、アデノシンA2a受容体、CD276、Vセットドメインを含むT細胞活性化阻害剤1、BおよびTリンパ球関連、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ1、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3つのドメイン、長い細胞質尾部、1、リンパ球活性化遺伝子3、プログラム細胞死1、A型肝炎ウイルス細胞受容体2、T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリン抑制因子、またはナチュラルキラー細胞受容体2B4である、ゲノム配列内のポリヌクレオチドに相補的な配列を有する少なくとも2つの組換えアームに隣接する少なくとも1つの外因性T細胞受容体(TCR)配列を含むポリ核酸が開示される。1つ以上の導入遺伝子は、1つ以上の破壊と組み合わせることができる。

40

#### 【0285】

【00250】導入遺伝子（例えば、外因性配列）の挿入は、例えば、ポリペプチドの発現、突然変異遺伝子の修正、または野生型遺伝子の発現増加のために使用することができる。導入遺伝子は、典型的には、配置されているゲノム配列と同一ではない。ドナー導入遺伝子は、目的の場所での効率的なHDRを可能にするために、2つの相同領域に隣接する非

50

相同配列を含むことができる。さらに、導入遺伝子配列は、細胞クロマチンの目的の領域と相同ではない配列を含むベクター分子を含むことができる。導入遺伝子には、細胞クロマチンと相同性のある不連続な領域がいくつか含まれる場合がある。例えば、通常、目的の領域に存在しない配列の標的挿入について、配列は、ドナー核酸分子に存在し、目的の領域の配列と相同性のある領域が隣接し得る。

#### 【0286】

[00251] 導入遺伝子ポリ核酸は、一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNAであり得、線状または環状の形態で細胞に導入され得る。導入遺伝子配列（複数可）は、DNAミニサークル内に含めることができ、これは環状または線状の形態で細胞に導入することができる。線状の形態で導入した場合、導入遺伝子配列の末端は、任意の方法で（例えば、エキソヌクレアーゼ分解から）保護することができる。例えば、1つ以上のジデオキシヌクレオチド残基は、線状分子の3'末端に付加することができる、および/または自己相補的オリゴヌクレオチドを一方または両方の末端に連結することができる。外因性ポリヌクレオチドを分解から保護する追加の方法には、限定されないが、末端アミノ基（複数可）の追加、および、例えば、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、およびO-メチルリボースまたはデオキシリボース残基などの修飾されたヌクレオチド間連結の使用が含まれる。

10

#### 【0287】

[00252] ポリヌクレオチドは、例えば、複製起点、プロモーターおよび抗生物質耐性をコードする遺伝子などの追加の配列を有するベクター分子の一部として細胞内に導入することができる。さらに、導入遺伝子ポリヌクレオチドは、裸の核酸として、リボソームまたはポロキサマーなどの薬剤と複合化された核酸として導入され得るか、またはウイルス（例えば、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスおよびインテグラーゼ欠損レンチウイルス（IDLV））によって送達され得る。導入遺伝子を送達することができるウイルスは、AAVウイルスであり得る。

20

#### 【0288】

[00253] 導入遺伝子は、一般的に、その発現が組み込み部位で内因性プロモーター、すなわち、導入遺伝子が挿入される内因性遺伝子（例えば、AAVS SITE（例えば、AAVS1、AAVS2など）、CCR5、HPRT）の発現を促進するプロモーターによって駆動されるように挿入される。導入遺伝子は、プロモーターおよび/またはエンハンサー、例えば、構成的プロモーターまたは誘導性もしくは組織/細胞特異的プロモーターを含むことができる。ミニサークルベクターは導入遺伝子をコードすることができる。

30

#### 【0289】

[00254] また、非コード核酸配列の標的挿入を達成することができる。アンチセンスRNA、RNAi、shRNA、およびマイクロRNA（miRNA）をコードする配列はまた、標的挿入に使用され得る。

#### 【0290】

[00255] 導入遺伝子は、内因性遺伝子のすべて、一部が発現し、または全く発現しないように内因性遺伝子に挿入することができる。例えば、本明細書に記載される導入遺伝子は、例えば、導入遺伝子との融合として、内因性配列の一部（導入遺伝子に対してN末端および/またはC末端）が発現し、または発現しないように内因性遺伝子座に挿入することができる。他の場合では、導入遺伝子（例えば、内因性遺伝子などの追加のコード配列の有無にかかわらず）は、任意の内因性遺伝子座、例えばセーフハーバー遺伝子座に組み込まれる。例えば、TCR導入遺伝子を内因性TCR遺伝子に挿入することができる。導入遺伝子は、任意の遺伝子、例えば、本明細書に記載される遺伝子に挿入することができる。

40

#### 【0291】

[00256] 内因性配列（内因性または導入遺伝子の一部）が導入遺伝子により発現される場合、内因性配列は、完全長配列（野生型または突然変異体）または部分配列であり得る。内因性配列は機能的であり得る。これらの完全長配列または部分配列の機能の非限定的

50

な例には、導入遺伝子（例えば、治療遺伝子）によって発現されるおよび／または担体として作用するポリペプチドの血清半減期の増加が含まれる。

【0292】

[00257] T細胞は、1つ以上の導入遺伝子を含むことができる。1つ以上の導入遺伝子は、抗原上の少なくとも1つのエピトープ（例えば、癌エピトープ）を認識して結合するか、または抗原上の突然変異されたエピトープに結合する、TCRアルファ、ベータ、ガンマ、および／またはデルタ鎖タンパク質を発現することができる。TCRは癌のneo抗原に結合することができる。TCRは、機能的なTCRであり得る。TCRは、本明細書に定義されるアルファ鎖またはベータ鎖配列の一方のみを含むことができ（例えば、それぞれさらなるアルファ鎖またはベータ鎖と組み合わせる）、または両方の鎖を含むことができる。TCRは、本明細書に定義されるガンマ鎖またはデルタ鎖配列の一方のみを含むことができ（例えば、それぞれさらなるガンマ鎖またはデルタ鎖と組み合わせる）、または両方の鎖を含むことができる。機能的TCRは、融合タンパク質において少なくとも実質的な生物学的活性を維持する。TCRのアルファ鎖および／またはベータ鎖の場合では、これは、両鎖が、（非修飾アルファ鎖および／もしくはベータ鎖、または別の融合タンパク質アルファ鎖および／もしくはベータ鎖を有する）T細胞受容体を形成することができる状態であることを意味し、その生物学的機能、特にTCRの特定のペプチド-MHC複合体への結合、および／またはペプチド活性化時に機能的なシグナル伝達を発揮する。TCRのガンマ鎖および／またはデルタ鎖の場合では、これは、両鎖が、（非修飾ガンマ鎖および／もしくはデルタ鎖、または別の融合タンパク質ガンマ鎖および／もしくはデルタ鎖を有する）T細胞受容体を形成できる状態であることを意味し、その生物学的機能、特にTCRの特定のペプチド-MHC複合体への結合、および／またはペプチド活性化時に機能的なシグナル伝達を発揮する。T細胞はまた、1つ以上のTCRを含むことができる。T細胞はまた、1を超える標的に特異的な単一のTCRを含むことができる。

10

20

【0293】

[00258]使用することができ、特に意図される導入遺伝子には、本明細書に開示する遺伝子、導入遺伝子、またはベクター、例えばTCR遺伝子に対して特定の同一性および／または相同性を示す遺伝子、ベクター、またはベクターカーゴが含まれ得る。したがって、本明細書に記載される配列が、（核酸またはタンパク質レベルで）少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは最大100%の相同性を示すか、または少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは最大100%の相同性を示す場合、導入遺伝子として使用し得ることが意図される。導入遺伝子を含むベクターは、表8の配列のいずれか1つにより記載することができる。導入遺伝子を含むベクターは、表8に記載されている任意の配列に対して約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または最大100%までの同一性パーセントを有することができる。場合によっては、導入遺伝子が機能し得、導入遺伝子が導入されていないかまたは対称の導入遺伝子を受ける同等の細胞と比較して、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または最大100%に、操作された細胞の性能を増大させることができる。

30

40

【0294】

[00259]導入遺伝子を細胞に組み込むことができる。例えば、導入遺伝子を生物の生殖細胞系に組み込むことができる。導入遺伝子は、細胞に挿入された場合、メッセンジャーRNA(mRNA)のコピーである相補的DNA(cDNA)セグメントか、またはゲノ

50

ΔDNAの元の領域に存在する遺伝子自体（イントロンの有無にかかわらず）のいずれかになり得る。タンパク質Xの導入遺伝子は、タンパク質Xをコードするヌクレオチド配列を含む導入遺伝子を指し得る。本明細書で使用する時、場合によっては、タンパク質Xをコードする導入遺伝子は、タンパク質Xのアミノ酸配列の100%または約100%をコードする導入遺伝子であり得る。他の場合では、タンパク質Xをコードする導入遺伝子は、タンパク質Xのアミノ酸配列の少なくとも約99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、もしくは1%、または少なくとも99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、もしくは1%をコードする導入遺伝子であり得る。導入遺伝子の発現は、最終的に、機能性タンパク質、例えば、部分的、完全、または過度に機能的なタンパク質をもたらす場合がある。上述のように、部分配列が発現された場合、最終的な結果は、非機能性タンパク質またはドミナントネガティブタンパク質になり得る。非機能性タンパク質またはドミナントネガティブタンパク質はまた、機能性（内因性または外因性）タンパク質と競合する場合がある。導入遺伝子はまた、RNA（例えば、mRNA、shRNA、siRNA、またはmicroRNA）をコードすることができる。場合によっては、導入遺伝子がmRNAをコードする場合、これをポリペプチド（タンパク質など）に翻訳することができる。したがって、導入遺伝子はタンパク質をコードし得ることが意図される。導入遺伝子は、場合によっては、タンパク質またはタンパク質の一部をコードすることができる。さらに、タンパク質は、野生型ポリペプチドと比較して、1つ以上の突然変異（例えば、欠失、挿入、アミノ酸置換、または再配列）を有する場合がある。タンパク質は、天然のポリペプチドまたは人工のポリペプチド（例えば、組換えポリペプチド）であり得る。導入遺伝子は、2つ以上のポリペプチドによって形成される融合タンパク質をコードすることができる。T細胞は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくはそれ以上の導入遺伝子を含むか、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくはそれ以上の導入遺伝子を含むことができる。例えば、T細胞は、TCR遺伝子を含む1つ以上の導入遺伝子を含むことができる。

#### 【0295】

[00260]導入遺伝子（例えば、TCR遺伝子）は、セーフハーバー遺伝子座に挿入することができる。セーフハーバーは、内在性の活性を乱すことなく導入遺伝子が組み込み、機能することができるゲノムの場所を含むことができる。例えば、1つ以上の導入遺伝子は、HPRT、AAVSサイト（E.G. AAVS1、AAVS2、ETC）、CCR5、hROSA26、および/またはそれらの任意の組み合わせのいずれか1つに挿入することができる。導入遺伝子（例えば、TCR遺伝子）はまた、内在性の免疫チェックポイント遺伝子に挿入することができる。内因性免疫チェックポイント遺伝子は、刺激性チェックポイント遺伝子または阻害性チェックポイント遺伝子であり得る。導入遺伝子（例えば、TCR遺伝子）はまた、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、またはICOSなどの刺激性チェックポイント遺伝子に挿入することができる。免疫チェックポイント遺伝子の場所は、Genome Reference Consortium Human Build 38パッチリリース2（GRCh38.p2）アセンブリを使用して提供される。導入遺伝子（例えば、TCR遺伝子）はまた、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTAまたはCISHなどの内因性の阻害性チェックポイント遺伝子に挿入することができる。例えば、1つ以上の導入遺伝子は、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、HPRT、AAVS部位（例えば、AAVS1、A

AAVS2など)、CCR5、および/またはそれらの任意の組み合わせのいずれかに挿入することができる。内在性TCR遺伝子に導入遺伝子を挿入することができる。導入遺伝子は、コーディングゲノム領域内に挿入することができる。導入遺伝子はまた、非コーディングゲノム領域内に挿入することができる。導入遺伝子は、相同組換えなしにゲノムに挿入することができる。導入遺伝子の挿入は、細胞内ゲノム移植のステップを含むことができる。導入遺伝子は、PD-1遺伝子に挿入することができる。場合によっては、1を超えるガイドは免疫チェックポイントを標的にすることができる。他の場合では、導入遺伝子をCTLA-4遺伝子に組み込むことができる。他の場合では、導入遺伝子をCTLA-4遺伝子およびPD-1遺伝子に組み込むことができる。導入遺伝子はまた、AAVS1などのセーフハーバーに組み込むことができる。導入遺伝子は、AAV組み込み部位に挿入することができる。AAV組み込み部位は、場合によってはセーフハーバーになり得る。第5染色体のAAVS2または第3染色体のAAVS3などの代替のAAV組み込み部位が存在する場合がある。AAVS2、AAVS3、AAVS4、AAVS5、AAVS6、AAVS7、AAVS8などの追加のAAV組み込み部位はまた、TCRなどの外因性受容体可能な組み込み部位であるとみなされる。本明細書で使用されるとき、AAVSは、AAVS1、ならびに関連するアデノ随伴ウイルス(AAVS)組み込み部位を指し得る。

10

**【0296】**

[00261]キメラ抗原受容体は、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメイン、およびT細胞活性化を制御するシグナル伝達領域で構成することができる。細胞外抗原認識ドメインは、マウス、ヒト化または完全ヒトモノクローナル抗体に由来し得る。具体的には、細胞外抗原認識ドメインは、一本鎖可変断片(scFv)の形態でクローニングされ、ヒンジおよび膜貫通ドメインを介してT細胞受容体(TCR)複合体の細胞内シグナル伝達分子に接続したモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の可変領域、ならびに少なくとも1つの共刺激分子で構成される。場合によっては、共刺激ドメインは使用されない。

20

**【0297】**

[00262]細胞受容体などの導入遺伝子は、前記のように、ランダムまたは部位特異的な方法でT細胞のゲノムに挿入することができる。例えば、導入遺伝子は、T細胞のゲノムのランダムな遺伝子座に挿入することができる。これらの導入遺伝子は機能的であり、例えば、ゲノムのどこかに挿入されると完全に機能することができる。例えば、導入遺伝子は、それ自身のプロモーターをコードするか、または内在性プロモーターの制御下にある位置に挿入することができる。あるいは、導入遺伝子は、遺伝子のイントロンもしくは遺伝子のエクソン、プロモーター、または非コード領域などの遺伝子に挿入することができる。挿入が遺伝子、例えば内因性チェックポイントを破壊するように、導入遺伝子を挿入することができる。導入遺伝子の挿入は、内因性チェックポイント領域を含むことができる。導入遺伝子の挿入は、導入遺伝子に隣接することができる組換えアームによって誘導され得る。

30

**【0298】**

[00263]細胞受容体などの導入遺伝子の発現は、1つ以上のプロモーターによって制御することができる。プロモーターは、ユビキタスな構成的(関連遺伝子の連続転写を可能にする調節されないプロモーター)、組織特異的プロモーター、または誘導性プロモーターであり得る。プロモーターに隣接してまたはその近傍に挿入される導入遺伝子の発現を調節することができる。例えば、ユビキタスなプロモーターの近傍またはその隣りに導入遺伝子を挿入することができる。一部のユビキタスなプロモーターは、CAGGSプロモーター、hCMVプロモーター、PGKプロモーター、SV40プロモーター、またはROSA26プロモーターであり得る。

40

**【0299】**

[00264]プロモーターは内因性または外因性であり得る。例えば、1つ以上の導入遺伝子を内因性または外因性ROSA26プロモーターに隣接してまたは近傍に挿入することができる。さらに、プロモーターはT細胞に特異的であり得る。例えば、ブタROSA2

50

6 プロモーターに隣接してまたは近傍に1つ以上の導入遺伝子を挿入することができる。組織特異的プロモーターまたは細胞特異的プロモーターを使用して、発現の場所を制御することができる。例えば、1つ以上の導入遺伝子を組織特異的プロモーターに隣接してまたは近傍に挿入することができる。組織特異的プロモーターは、F A B Pプロモーター、L c kプロモーター、C a m K I Iプロモーター、C D 1 9プロモーター、ケラチンプロモーター、アルブミンプロモーター、a P 2プロモーター、インスリンプロモーター、M C Kプロモーター、M y H Cプロモーター、W A Pプロモーター、またはC o l 2 Aプロモーターであり得る。

#### 【0300】

[00265]誘導性プロモーターも同様に使用することができる。これらの誘導性プロモーターは、誘導剤を追加または除去することにより、必要に応じてオンとオフを切り替えることができる。誘導性プロモーターは、限定されないが、L a c、t a c、t r c、t r p、a r a B A D、p h o A、r e c A、p r o U、c s t - 1、t e t A、c a d A、n a r、P L、c s p A、T 7、V H B、M X、および/またはT r e xであり得ることが意図される。

10

#### 【0301】

[00266]細胞は、内因性遺伝子をノックアウトするように操作され得る。ノックアウトされ得る内因性遺伝子には、免疫チェックポイント遺伝子が含まれ得る。免疫チェックポイント遺伝子は、刺激性チェックポイント遺伝子または阻害性チェックポイント遺伝子であり得る。免疫チェックポイント遺伝子の場所は、Genome Reference Consortium Human Build 38パッチリリース2 (GRCh38.p2)アセンブリを使用して提供することができる。ノックアウトされる遺伝子は、データベースを用いて選択することができる。場合によっては、特定の内因性遺伝子がゲノム工学に対してより修正可能になる。データベースには、エビジェネティックに許容される標的部位を含めることができる。場合によっては、データベースをENCODE (DNAエレメントの百科事典) (<http://www.genome.gov/10005107>)にすることができる。データベース化により、オープンクロマチンを含む領域を同定することができ、これは、ゲノム工学に対してより寛容になる。

20

#### 【0302】

[00267]T細胞は、1つ以上の破壊された遺伝子を含むことができる。例えば、発現が破壊される1つ以上の遺伝子は、アデノシンA2a受容体 (ADORA)、CD276、T細胞活性化阻害剤1を含むVセットドメイン (VTCN1)、BおよびTリンパ球関連 (BTLA)、細胞傷害性T-リンパ球関連タンパク質4 (CTLA4)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ1 (IDO1)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3つのドメイン、長い細胞質尾部、1 (KIR3DL1)、リンパ球活性化遺伝子3 (LAG3)、プログラム細胞死1 (PD-1)、A型肝炎ウイルス細胞受容体2 (HAVCR2)、T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリンサブレッサー (VISTA)、ナチュラルキラー細胞受容体2B4 (CD244)、サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質 (CISH)、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1 (HPRT)、アデノ随伴ウイルス組み込み部位 (AAVS SITE (例えば、AAVS1、AAVS2など))、またはケモカイン (CCモチーフ) 受容体5 (遺伝子/偽遺伝子) (CCR5)、CD160分子 (CD160)、IgおよびITIMドメインを有するT細胞免疫受容体 (TIGIT)、CD96分子 (CD96)、細胞傷害性および調節性T細胞分子 (CRTAM)、受容体1のような白血球関連免疫グロブリン (LAIR1)、レクチン7のようなシアル酸結合Ig (SIGLEC7)、レクチン9のようなシアル酸結合Ig (SIGLEC9)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10b (TNFRSF10B)、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10a (TNFRSF10A)、カスパーゼ8 (CASP8)、カスパーゼ10 (CASP10)、カスパーゼ3 (CASP3)、カスパーゼ6 (CASP6)、カスパーゼ7 (CASP7)、Fas関連死ドメイン (FADD)、Fas細胞表面死受容体 (FAS)、形質転換増殖因子ベータ受容

30

40

50

体 I I ( T G F B R I I )、形質転換増殖因子ベータ受容体 I ( T G F B R 1 )、S M A Dファミリーメンバー 2 ( S M A D 2 )、S M A Dファミリーメンバー 3 ( S M A D 3 )、S M A Dファミリーメンバー 4 ( S M A D 4 )、S K I 癌原遺伝子 ( S K I )、S K I 様癌原遺伝子 ( S K I L )、T G F B 誘導因子ホメオボックス 1 ( T G I F 1 )、インターロイキン 10 受容体サブユニットアルファ ( I L 1 0 R A )、インターロイキン 10 受容体サブユニットベータ ( I L 1 0 R B )、ヘムオキシゲナーゼ 2 ( H M O X 2 )、インターロイキン 6 受容体 ( I L 6 R )、インターロイキン 6 シグナルトランスデューサー ( I L 6 S T )、c - s r c チロシンキナーゼ ( C S K )、スフィンゴ糖脂質マイクロドメイン 1 ( P A G 1 ) を有するリタンパク質膜アンカー、膜貫通アダプター 1 ( S I T 1 ) を調節するシグナル伝達閾値、フォークヘッドボックス P 3 ( F O X P 3 )、P R D 10  
メイン 1 ( P R D M 1 )、塩基性ロイシンジッパー転写因子、A T F 様 ( B A T F )、グアニル酸シクラーゼ 1、可溶性、アルファ 2 ( G U C Y 1 A 2 )、グアニル酸シクラーゼ 1、可溶性、アルファ 3 ( G U C Y 1 A 3 )、グアニル酸シクラーゼ 1、可溶性、ベータ 2 ( G U C Y 1 B 2 )、グアニル酸シクラーゼ 1、可溶性、ベータ 3 ( G U C Y 1 B 3 )、サイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質 ( C I S H )、またはその任意の組み合わせのいずれか 1 つを含み得る。場合によっては、内因性 T C R をロックアウトすることもできる。例えば、単に様々な組み合わせを説明するために、その発現が破壊される 1 つ以上の遺伝子は、P D - 1、C L T A - 4、および C I S H を含むことができる。

### 【 0 3 0 3 】

[00268] T 細胞は、1 つ以上の抑制された遺伝子を含むことができる。例えば、発現が抑制されている 1 つ以上の遺伝子は、アデノシン A 2 a 受容体 ( A D O R A )、C D 2 7 6、T 細胞活性化阻害剤 1 を含む V セットドメイン ( V T C N 1 )、B および T リンパ球関連 ( B T L A )、細胞傷害性 T - リンパ球関連タンパク質 4 ( C T L A 4 )、インドールアミン 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ 1 ( I D O 1 )、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3 つのドメイン、長い細胞質尾部、1 ( K I R 3 D L 1 )、リンパ球活性化遺伝子 3 ( L A G 3 )、プログラム細胞死 1 ( P D - 1 )、A 型肝炎ウイルス細胞受容体 2 ( H A V C R 2 )、T 細胞活性化の V ドメイン免疫グロブリンサブレッサー ( V I S T A )、ナチュラルキラー細胞受容体 2 B 4 ( C D 2 4 4 )、サイトカイン誘導性 S H 2 含有タンパク質 ( C I S H )、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1 ( H P R T )、アデノ随伴ウイルス組み込み部位 ( A A V S 1 )、またはケモカイン ( C C モチーフ) 受容体 5 ( 遺伝子 / 偽遺伝子 ) ( C C R 5 )、C D 1 6 0 分子 ( C D 1 6 0 )、I g および I T I M を含む T 細胞免疫受容体ドメイン ( T I G I T )、C D 9 6 分子 ( C D 9 6 )、細胞傷害性および調節性 T 細胞分子 ( C R T A M )、白血球関連免疫グロブリン様受容体 1 ( L A I R 1 )、レクチン 7 のようなシアル酸結合 I g ( S I G L E C 7 )、レクチン 9 のようなシアル酸結合 I g ( S I G L E C 9 )、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 1 0 b ( T N F R S F 1 0 B )、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 1 0 a ( T N F R S F 1 0 A )、カスパーゼ 8 ( C A S P 8 )、カスパーゼ 1 0 ( C A S P 1 0 )、カスパーゼ 3 ( C A S P 3 )、カスパーゼ 6 ( C A S P 6 )、カスパーゼ 7 ( C A S P 7 )、死ドメインを介した F a s 関連 ( F A D D )、F a s 細胞表面死レセプター ( F A S )、形質転換増殖因子ベータ受容体 I I ( T G F B R I I )、形質転換増殖因子ベータ受容体 I ( T G F B R 1 )、S M A Dファミリーメンバー 2 ( S M A D 2 )、S M A Dファミリーメンバー 3 ( S M A D 3 )、S M A Dファミリーメンバー 4 ( S M A D 4 )、S K I プロト癌遺伝子 ( S K I )、S K I 様プロト癌遺伝子 ( S K I L )、T G F B 誘導因子ホメオボックス 1 ( T G I F 1 )、インターロイキン 10 受容体サブユニットアルファ ( I L 1 0 R A )、インターロイキン 10 受容体サブユニットベータ ( I L 1 0 R B )、ヘムオキシゲナーゼ 2 ( H M O X 2 )、インターロイキン 6 受容体 ( I L 6 R )、インターロイキン 6 シグナルトランスデューサー ( I L 6 S T )、c - s r c チロシンキナーゼ ( C S K )、糖スフィンゴ糖脂質マイクロドメインを有するリタンパク質膜アンカー 1 ( P A G 1 )、膜貫通アダプターを調節するシグナル閾値 1 ( S I T 1 )、フォークヘッドボックス P 3 ( F O X P 3 )、P R D 10  
メイン 1 ( P R D M 1 )、塩基性ロイシ 40  
50

ンジッパー転写因子、ATF様(BATF)、グアニル酸シクラーゼ1、可溶性、アルファ2(GUCY1A2)、グアニル酸シクラーゼ1、可溶性、アルファ3(GUCY1A3)、グアニル酸シクラーゼ1、可溶性、ベータ2(GUCY1B2)、グアニル酸シクラーゼ1、可溶性、ベータ3(GUCY1B3)、サイトカイン誘導性SH2含有タンパク質(CISH)、またはその任意の組み合わせのいずれか1つを含み得る。例えば、単に様々な組み合わせを説明するために、その発現が抑制される1つ以上の遺伝子は、PD-1、CLTA-4、およびCISHを含むことができる。

#### 【0304】

[00269]修飾されたアデノ随伴ウイルスで修飾された細胞などの操作された細胞は、抗原を標的とすることができる。操作された細胞はまた、エピトープを標的にすることもできる。抗原は腫瘍細胞抗原であり得る。エピトープは腫瘍細胞エピトープであり得る。このような腫瘍細胞エピトープは、突然変異に起因する腫瘍の抗原(neo抗原またはneoエピトープ)、共有腫瘍特異抗原、分化抗原、および腫瘍において過剰発現された抗原など、多種多様な腫瘍抗原に由来し得る。これらの抗原は、いくつか例を挙げると、例えば、アルファ-アクチニン-4、ARTC1、BCR-ABL融合タンパク質(b3a2)、B-RAF、CASP-5、CASP-8、ベータ-カテニン、Cdc27、CDK4、CDKN2A、COA-1、dek-can融合タンパク質、EFTUD2、伸長因子2、ETV6-AML1融合タンパク質、FLT3-ITD、FN1、GPNMB、LDLR-フコシルトランスフェラーゼ融合タンパク質、HLA-A2d、HLA-A11d、hsp70-2、KIAA0205、MART2、ME1、MUM-1f、MUM-2、MUM-3、neo-PAP、ミオシンクラスI、NFYC、OGT、OS-9、p53、pml-RARalpha融合タンパク質、PRDX5、PTPRK、K-ras、N-ras、RBAF600、SIRT2、SNRPD1、SYT-SSX1-もしくは-SSX2融合タンパク質、TGF-ベータRII、トリオースリン酸イソメラーゼ、BAGE-1、GAGE-1、2、8、Gage3、4、5、6、7、GnTVf、HERV-K-MEL、KK-LC-1、KM-HN-1、LAGE-1、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-C2、mucinK、NA-88、NY-ESO-1/LAGE-2、SAGE、Sp17、SSX-2、SSX-4、TAG-1、TAG-2、TRAG-3、TRP2-INT2g、XAGE-1b、CEA、gp100/Pmel17、カリクレイン4、マンマグロビンA、メランA/MART-1、NY-BR-1、OA1、PSA、RAB38/NY-MEL-1、TRP-1/gp75、TRP-2、チロシナーゼ、アジポフィリン、AIM-2、ALDH1A1、BCLX(L)、BCMA、BING-4、CPSF、サイクリンD1、DKK1、ENAH(hMena)、EP-CAM、EphA3、EZH2、FGF5、G250/MN/CAIX、HER-2/neu、IL13Rアルファ2、腸内カルボキシルエステラーゼ、アルファフェトプロテイン、M-CSFT、MCSP、mdm-2、MMP-2、MUC1、p53、PBF、PRAME、PSMA、RAGE-1、RGS5、RNF43、RU2AS、secernin1、SOX10、STRAP1、PIK3、スルビピン、テロメラーゼ、VEGF、および/またはWT1に由来し得る。腫瘍関連抗原は、宿主によって通常は発現されない抗原である。それらは、宿主によって通常発現される分子の突然変異、切断、誤った折り畳み、またはその他の異常な発現であり得る。それらは、通常は発現しているが、異常に高レベルで発現している分子と同一である可能性がある。または、それらは異常な事情または環境で発現され得る。腫瘍関連抗原は、例えば、タンパク質またはタンパク質断片、複合炭水化物、ガングリオシド、ハプテン、核酸、他の生体分子またはそれらの任意の組み合わせであり得る。場合によっては、ホスファチジルイノシトール-4,5-ビスリン酸3-キナーゼ(PIK3)、キルステンラット肉腫(KRAS)、またはErbb2相互作用タンパク質(ERBB2IP)(「MB」とも呼ばれる)遺伝子の抗原の一部またはエピトープは、操作された細胞を標的とすることができる。腫瘍抗原に特異的なTCR配列は、例えば国際公開第2017/048593A1号

10

20

30

40

50

および米国特許出願公開第2018/0030110号に記載されよう、配列決定によって容易に同定することができる。

【0305】

[00270]場合によっては、標的はneo抗原またはneoエピトープである。例えば、neo抗原は、ERBB2IPのE805G突然変異によってコードされ得る。ネオ抗原およびネオエピトープは、場合によっては全エクソーム配列決定によって同定することができる。ネオ抗原およびネオエピトープ標的は、場合によっては胃腸癌細胞によって発現され得る。neo抗原およびneoエピトープは、上皮癌で発現することができる。場合によっては、操作された細胞は、ネオ抗原やネオエピトープなどの普遍的抗原を標的とすることができる。

10

【0306】

[00271]エピトープは間質性エピトープであり得る。このようなエピトープは、腫瘍微小環境の間質上にあり得る。抗原は間質抗原であり得る。このような抗原は、腫瘍微小環境の間質上にあり得る。例えば、これらの抗原およびエピトープは、ほんの数例を挙げると、腫瘍内皮細胞、腫瘍血管系、腫瘍線維芽細胞、腫瘍周皮細胞、腫瘍間質、および/または腫瘍間葉細胞に存在し得る。これらの抗原は、例えば、CD34、MCSP、FAP、CD31、PCNA、CD117、CD40、MMP4、および/またはテネイシンを含むことができる。

CRISPRシステム

[00272]本明細書に記載される方法は、CRISPRシステムを利用することができる。少なくとも5種類のCRISPRシステムがあり、これらはすべてRNAおよびCasタンパク質を組み込む。タイプI、III、およびIVは、crRNAに相補的である核酸を切断することができるマルチCasタンパク質複合体をアセンブルする。タイプIとIIIはともに、処理されたcrRNAをマルチCasタンパク質複合体にアセンブルする前に、cr-RNA前処理を必要とする。タイプIIIおよびVのCRISPRシステムは、少なくとも1つの誘導RNAと複合化した単一のCasタンパク質を含む。

20

【0307】

[00273]CRISPRシステムの一般的なメカニズムおよび最近の進歩については、Cong, L.ら, 「Multiplex genome engineering using CRISPR systems」, Science, 339巻(6121号): 819-823頁(2013年); Fu, Y.ら, 「High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells」, Nature Biotechnology, 31巻, 822~826頁(2013年); Chu, VTら 「Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells」, Nature Biotechnology 33巻, 543~548頁(2015年); Shmakov, S.ら, 「Discovery and functional characterization of diverse Class 2 CRISPR-Cas systems」, Molecular Cell, 60巻, 1~13頁(2015年); Makarova, KSら, 「An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems」, Nature Reviews Microbiology, 13巻, 1~15頁(2015年)に検討されている。標的DNAの部位特異的切断は、1)ガイドRNAと標的DNAとの間の塩基対相補性(プロトスペーサーとも呼ばれる)と、2)プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)と呼ばれる標的DNAの短いモチーフの両方によって決定される場所で生じる。例えば、操作された細胞は、CRISPRシステム、例えば、タイプIII CRISPRシステムを使用して生成させることができる。本明細書に開示される方法において使用されるCas酵素は、DNA切断を触媒するCas9であり得る。化膿

30

40

50



%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の配列同一性および/もしくは配列類似性を有するポリペプチドを指すことができる。本明細書に開示される配列同一性は、2つの配列間の同一性パーセントを決定することにより計算することができる。例えば、同一性パーセントは、配列対の一致した数に100を掛け、整列した領域の長さで割ることによって計算することができる。いくつか例を挙げると、例えば、LALIGN、FFAS、BLAST、GeneWise、SIM、SSEAなどの様々な配列アライメントプログラムを利用することができる。

#### 【0311】

[00276]エンドヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチド（例えば、Cas9などのCasタンパク質）は、真核細胞などの特定の細胞における発現のためにコドン最適化することができる。このタイプの最適化では、同じタンパク質をエンコードしながら、意図された宿主生物または細胞のコドン優先度を模倣するために、外来由来（例えば、組換え）DNAの突然変異を伴うことがある。

10

#### 【0312】

[00277]エンドヌクレアーゼは、野生型の例示的な部位特異的ポリペプチド（例えば、化膿連鎖球菌由来のCas9）のヌクレアーゼドメインに対して、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、もしくは100%のアミノ酸配列同一性、または少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、もしくは100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

20

#### 【0313】

[00278]表7の化膿連鎖球菌Cas9 (SpCas9) は、ゲノム工学のためのCRISPRエンドヌクレアーゼとして一般的に使用されるが、それはすべての標的切除部位に対して最良のエンドヌクレアーゼではない場合がある。例えば、SpCas9 (5' NGG 3') のPAM配列は、ヒトゲノムの全体にわたって豊富に存在するが、NGG配列は、修飾のために所望の遺伝子を標的とするために常に正しく配置されとは限らない。場合によっては、特定のゲノム標的を標的にするために、異なるエンドヌクレアーゼを使用することができる。場合によっては、非NGG PAM配列を有する合成SpCas9由来の変異を使用することができる。さらに、様々な種由来の他のCas9オルソログが同定されており、これらの「非SpCas9」はまた、本発明に有用であり得る様々なPAM配列に結合する。例えば、サイズが比較的大きいSpCas9 (約4 kbのコード配列) は、SpCas9 cDNAを保有するプラスミドが細胞内で常に効率的に発現されるとは限らないことを意味する。逆に、黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) Cas9 (SaCas9) のコード配列は、SpCas9よりも約1キロベース短く、細胞内で効率的に発現される可能性がある。SpCas9と同様に、SaCas9エンドヌクレアーゼは、インビトロでの哺乳動物細胞およびインビボでのマウスの標的遺伝子を修飾できる。

30

#### 【0314】

[00279]化膿連鎖球菌Cas9の代替物には、哺乳動物細胞において切断活性を示すCpf1ファミリーからのRNA誘導型エンドヌクレアーゼが含まれ得る。Cas9ヌクレアーゼとは異なり、Cpf1を介したDNA切断の結果は、短い3' 突出部を伴う二本鎖切断である。Cpf1の互い違いの切断パターンは、従来の制限酵素クロニングと同様に、遺伝子編集の効率を高めることができる、指向性のある遺伝子導入の可能性を開くことができる。前記のCas9変異体およびオルソログと同様に、Cpf1はまた、CRISPRによって標的化され得る部位数を、SpCas9が好むNGG PAMサイトを欠損するATリッチ領域またはATリッチゲノムに拡張することができる。

40

#### 【0315】

[00280]ガイドRNA (gRNA) は、標的DNAに特異的であり得るRNAを指すことができ、Casタンパク質と複合体を形成することができる。ガイドRNAは、標的部位を特定し、切断のために特定された標的DNAにRNA/Cas複合体を導くガイド配

50

列またはスペーサー配列を含み得る。場合によっては、ガイドRNAは、CRISPR複合体を3つの遺伝子に標的化し、標的化された二本鎖切断を行うことができる。標的DNAの部位特異的切断は、1)ガイドRNAと標的DNAの間の塩基対相補性(プロトスペーサーとも呼ばれる)と、2)プロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)と呼ばれる標的DNAの短いモチーフの両方によって決定される場所で生じる。誘導ポリ核酸は、例えば、Benchling、MIT、またはWellcome Trustツールなどの公衆に利用可能なソフトウェアを用いて、当業者に公知である方法を使用して設計することができる。

#### 【0316】

[00281]本明細書に開示される方法はまた、少なくとも1つのガイドRNAまたは核酸、例えば、少なくとも1つのガイドRNAをコードするDNA、を細胞または胚に導入することを含めることができる。ガイドRNAは、RNA誘導型エンドヌクラーゼと相互作用して、エンドヌクラーゼを特定の標的部位に指向する。この部位では、ガイドRNAの5'末端が染色体配列の特定のプロトスペーサー配列と対をなす。

10

#### 【0317】

[00282]ガイドRNAは、2つのRNA、例えば、CRISPR RNA(crRNA)およびトランス活性化crRNA(tracrRNA)を含むことができる。ガイドRNAは、crRNAとtracrRNAの一部(例えば、機能的な部分)の融合によって形成される単一ガイドRNA(sgRNA)を含み得る。ガイドRNAはまた、crRNAおよびtracrRNAを含む二重RNAであり得る。ガイドRNAはcrRNAを含み、tracrRNAを欠損している場合がある。さらに、crRNAは、標的DNAまたはプロトスペーサー配列とハイブリダイズすることができる。

20

#### 【0318】

[00283]前記で検討したように、ガイドRNAは発現産物であり得る。例えば、ガイドRNAをコードするDNAは、ガイドRNAをコードする配列を含むベクターであり得る。ガイドRNAは、ガイドRNAをコードする配列およびプロモーターを含む単離されたガイドRNAまたはプラスミドDNAで細胞または生物をトランスフェクトすることにより、細胞または生物に移入することができる。ガイドRNAはまた、ウイルスが媒介した遺伝子送達の使用など、他の方法で細胞または生物に移入することができる。

#### 【0319】

[00284]ガイドRNAを単離することができる。例えば、ガイドRNAは、単離されたRNAの形態で細胞または生物にトランスフェクトすることができる。ガイドRNAは、インビトロ転写システムを使用したインビトロ転写によって調製され得る。ガイドRNAは、ガイドRNAのコード配列を含むプラスミドの形態というよりはむしろ、単離されたRNAの形態で細胞に導入することができる。

30

#### 【0320】

[00285]ガイドRNAは、DNA標的化セグメントおよびタンパク質結合セグメントを含むことができる。DNA標的セグメント(またはDNA標的配列、またはスペーサー配列)は、標的DNA内の特定の配列(例えば、プロトスペーサー)に相補的であり得るヌクレオチド配列を含む。タンパク質結合セグメント(またはタンパク質結合配列)は、部位特異的修飾ポリペプチド、例えば、Casタンパク質などのRNA誘導型エンドヌクラーゼと相互作用することができる。「セグメント」とは、分子のセグメント/セクション/領域、例えば、RNA内の連続したヌクレオチドのストレッチを意味する。セグメントはまた、セグメントが1を超える分子の領域を含むことができるように、複合体の領域/セクションを意味する場合がある。例えば、場合によっては、DNA標的RNAのタンパク質結合セグメントは1つのRNA分子であり、したがってタンパク質結合セグメントはそのRNA分子の領域を含む。他の場合では、DNA標的RNAのタンパク質結合セグメントは、相補性の領域に沿ってハイブリダイズする2つの別個の分子を含む。

40

#### 【0321】

[00286]ガイドRNAは、2つの別個のRNA分子または単一のRNA分子を含むこと

50

ができる。例示的な単一分子ガイドRNAは、DNA標的セグメントとタンパク質結合セグメントの両方を含む。

【0322】

[00287]例示的な2分子DNA標的RNAは、crRNA様(「CRISPR RNA」または「ターゲット(targeter) RNA」または「crRNA」または「crRNA反復」)分子および対応するtracrRNA様(「トランス作用性CRISPR RNA」または「アクティベーターRNA」または「tracrRNA」)分子を含み得る。第1のRNA分子は、crRNA様分子(ターゲットRNA)であり、DNA標的セグメント(例えば、スペーサー)、およびガイドRNAのタンパク質結合セグメントを含む二本鎖RNA(dsRNA)二重鎖の半分を形成することができるヌクレオチドのストレッチを含み得る。第2のRNA分子は、ガイドRNAのタンパク質結合セグメントのdsRNA二重鎖の他の半分を形成することができるヌクレオチドのストレッチを含み得る対応するtracrRNA様分子(アクティベーターRNA)であり得る。言い換えれば、crRNA様分子のヌクレオチドのストレッチは、tracrRNA様分子のヌクレオチドのストレッチと相補的であり、それとハイブリダイズして、ガイドRNAのタンパク質結合ドメインのdsRNA二重鎖を形成することができる。そのため、各crRNA様分子は、対応するtracrRNA様分子を有していると言えることができる。さらに、crRNA様分子は、一本鎖DNA標的セグメント、またはスペーサー配列を提供することができる。したがって、crRNA様およびtracrRNA様分子(対応する対として)はハイブリダイズして、ガイドRNAを形成することができる。主題の2分子ガイドRNAは、任意の対応するcrRNAおよびtracrRNAの対を含むことができる。

10

20

【0323】

[00288]ガイドRNAのDNA標的セグメントまたはスペーサー配列は、ガイドRNAのDNA標的セグメントが標的部位またはプロトスペーサーと塩基対を形成できるように、染色体配列(例えば、プロトスペーサー配列)の標的部位で配列に相補的であり得る。場合によっては、ガイドRNAのDNA標的セグメントは、(約)10ヌクレオチドから(約)25ヌクレオチドまたは以上を含むことができる。例えば、ガイドRNAの第1の領域と染色体配列の標的部位との間の塩基対形成の領域は、長さが(約)10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、23、24、25であるかまたは25を超えるヌクレオチドであり得る。時には、ガイドRNAの第1の領域は、長さ(約)19、20、または21ヌクレオチドであり得る。

30

【0324】

[00289]ガイドRNAは、(約)20ヌクレオチドの核酸配列を標的とすることができる。標的核酸は、(約)20ヌクレオチド未満であり得る。標的核酸は、少なくとも(約)5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30またはそれ以上のヌクレオチドであり得る。標的核酸は、最大で約5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30またはそれ以上のヌクレオチドであり得る。標的核酸配列は、PAMの第1のヌクレオチドのすぐ5'の(約)1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20塩基であり得る。ガイドRNAは、核酸配列を標的にすることができる。

40

【0325】

[00290]ガイド核酸、例えばガイドRNAは、別の核酸、例えば細胞のゲノム中の標的核酸またはプロトスペーサーにハイブリダイズすることができる核酸を指すことができる。ガイド核酸はRNAであり得る。ガイド核酸はDNAであり得る。ガイド核酸は、核酸配列に部位特異的に結合するようにプログラムまたは設計することができる。ガイド核酸はポリヌクレオチド鎖を含むことができ、単一ガイド核酸と呼ばれることがある。ガイド核酸は2つのポリヌクレオチド鎖を含むことができ、二重ガイド核酸と呼ばれることがある。

50

## 【0326】

[00291]ガイド核酸は、核酸に新しいまたは増大された特徴を提供するための1つ以上の修飾を含むことができる。ガイド核酸は、核酸親和性タグを含むことができる。ガイド核酸は、合成ヌクレオチド、合成ヌクレオチド類似体、ヌクレオチド誘導体、および/または修飾ヌクレオチドを含むことができる。

## 【0327】

[00292]ガイド核酸は、例えば、5'末端または3'末端でまたはその近傍に、標的核酸（例えば、プロトスペーサー）の配列にハイブリダイズできるヌクレオチド配列（例えば、スペーサー）を含むことができる。ガイド核酸のスペーサーは、ハイブリダイゼーション（すなわち、塩基対形成）を介して配列特異的な方法で標的核酸と相互作用することができる。スペーサー配列は、プロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）の5'または3'に位置する標的核酸にハイブリダイズすることができる。スペーサー配列の長さは、少なくとも5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30もしくはそれ以上のヌクレオチド、または少なくとも約5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30もしくはそれ以上のヌクレオチドであり得る。スペーサー配列の長さは、最大で5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30もしくはそれ以上のヌクレオチド、または最大で約5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30もしくはそれ以上のヌクレオチドであり得る。

10

20

## 【0328】

[00293]ガイドRNAは、二次構造を形成するdsRNA二重鎖領域も含むことができる。例えば、ガイドRNAによって形成される二次構造は、ステム（またはヘアピン）およびループを含むことができる。ループおよびステムの長さは変化し得る。例えば、ループは、長さが約3～約10ヌクレオチドの範囲であり得、ステムは、長さが約6～約20塩基対の範囲であり得る。ステムは、1～約10ヌクレオチドの1つ以上のバルジを含むことができる。第2の領域の全長は、長さが約16～約60ヌクレオチドの範囲であり得る。例えば、ループは、長さが4ヌクレオチドであり得るかまたは約4ヌクレオチドであり得、ステムは、12塩基対であり得るかまたは約12塩基対であり得る。dsRNA二重鎖領域は、RNA誘導型エンドヌクレアーゼなどのRNA結合タンパク質、例えば、Casタンパク質と複合体を形成できるタンパク質結合セグメントを含むことができる。

30

## 【0329】

[00294]ガイドRNAはまた、本質的に一本鎖であり得る、5'または3'末端に尾部領域を含むことができる。例えば、尾部領域は、目的の細胞のいずれもの染色体配列と相補的でない場合があり、ガイドRNAの残りの部分と相補的でない場合もある。さらに、尾部領域の長さは変化し得る。尾部領域は、長さが4ヌクレオチド以上または約4ヌクレオチド以上であり得る。例えば、尾部領域の長さは、長さが5ヌクレオチド～60ヌクレオチド、または約5ヌクレオチド～約60ヌクレオチドの範囲であり得る。

## 【0330】

[00295]ガイドRNAは、RNA分子として細胞または胚に導入することができる。例えば、RNA分子は、インビトロで転写され得、および/または化学的に合成され得る。次に、ガイドRNAをRNA分子として細胞または胚に導入することができる。ガイドRNAはまた、非RNA核酸分子、例えば、DNA分子の形態で細胞または胚に導入することができる。例えば、ガイドRNAをコードするDNAは、目的の細胞または胚においてガイドRNAを発現させるためのプロモーター制御配列に作動可能に連結され得る。RNAコーディング配列は、RNAポリメラーゼIII（Pol III）により認識されるプロモーター配列に作動可能に連結され得る。

40

## 【0331】

[00296]ガイドRNAをコードするDNA分子はまた線状であり得る。ガイドRNAをコードするDNA分子はまた環状であり得る。

50

[00297]ガイドRNAをコードするDNA配列はまた、ベクターの一部であり得る。ベクターのいくつかの例には、プラスミドベクター、ファージミド、コスミド、人工ノミニ染色体、トランスポゾン、およびウイルスベクターが含まれる。例えば、RNA誘導型エンドヌクレアーゼをコードするDNAは、プラスミドベクターに存在する。適切なプラスミドベクターの他の非限定的な例には、pUC、pBR322、pET、pBluescript、およびそれらの変異体が含まれる。さらに、ベクターは、追加の発現制御配列（例えば、エンハンサー配列、コザック配列、ポリアデニル化配列、転写終結配列など）、選択可能なマーカー配列（例えば、抗生物質耐性遺伝子）、複製起点などを含むことができる。

#### 【0332】

[00298]RNA誘導型エンドヌクレアーゼとガイドRNAの両方がDNA分子として細胞内に導入された場合、各々は、別個の分子の一部であり得る（例えば、融合タンパク質コード配列を含む1つのベクターおよびガイドRNAコード配列を含む第2のベクターである）か、または両方が同じ分子（例えば、融合タンパク質とガイドRNAの両方のコーディング（および調節）配列を含む1つのベクター）の一部であり得る。

#### 【0333】

[00299]Cas9タンパク質またはその任意の誘導体などのCasタンパク質は、ガイドRNAと予め複合体化されて、リボヌクレオタンパク質（RNP）複合体を形成することができる。RNP複合体は、初代免疫細胞に導入することができる。RNP複合体の導入は、タイミングを合わせることができる。細胞は、細胞周期のG1、S、および/またはM期で他の細胞と同期することができる。RNP複合体は、HDRが増大されるように細胞期で送達され得る。RNP複合体は、相同性指向型修復を促進することができる。

#### 【0334】

[00300]ガイドRNAはまた修飾することができる。修飾は、化学的変更、合成修飾、ヌクレオチド付加、および/またはヌクレオチド減算を含むことができる。修飾は、CRISPRゲノム工学を増大させることができる。修飾は、gRNAのキラリティを変更することができる。場合によっては、キラリティは、変更後、均一または立体的に純粋であり得る。ガイドRNAを合成することができる。合成されたガイドRNAは、CRISPRゲノム工学を増大させることができる。ガイドRNAはまた切断することができる。切断は、望ましくないオフターゲット突然変異誘発を減らすために使用され得る。切断は、任意の数のヌクレオチド欠失を含むことができる。例えば、切断は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50、またはそれ以上のヌクレオチドを含むことができる。ガイドRNAは、任意の長さの標的相補性の領域を含むことができる。例えば、標的相補性の領域は、長さが20ヌクレオチド未満であり得る。標的相補性の領域は、長さが20ヌクレオチドを超える場合がある。

#### 【0335】

[00301]場合によっては、二本鎖切断を導入するために二重ニックアーゼアプローチを使用することができる。Casタンパク質は、いずれかのヌクレアーゼドメイン内の公知のアミノ酸で突然変異することができ、それにより1つのヌクレアーゼドメインの活性が削除され、一本鎖切断を生成できるニックアーゼCasタンパク質が生成される。ニックアーゼと反対鎖を標的とする2つの異なるガイドRNAを利用して、標的部位内にDSBを生成できる（しばしば「ダブルニック」または「二重ニックアーゼ」CRISPRシステムと呼ばれる）。このアプローチは、DSBを引き起こすのに十分な近さで2つのオフターゲットニックが生成される可能性が低いため、標的の特異性を劇的に高めることができる。

#### 【0336】

[00302]場合によっては、GUIDE-Seq分析を行って、操作されたガイドRNAの特異性を決定することができる。CRISPRシステムのヌクレアーゼによるオフターゲット切断のGUIDE-Seqプロファイリングの一般的なメカニズムとプロトコールは、Tsai, S.ら, 「GUIDE-Seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CR

10

20

30

40

50

ISPR system nucleases」, Nature, 33巻: 187~197頁(2015)において検討されている。

【0337】

[00303] gRNAは、任意の機能的濃度で導入され得る。例えば、gRNAは、10マイクログラムで細胞に導入することができる。他の場合では、gRNAは、0.5マイクログラムから100マイクログラムで導入することができる。gRNAは、0.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100マイクログラムから導入することができる。

【0338】

[00304] 場合によっては、方法は、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、CsO、Csf4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、それらの相同体またはそれらの修飾バージョンからなる群から選択されるエンドヌクレアーゼを含むことができる。Casタンパク質はCas9であり得る。場合によっては、方法は、少なくとも1つのガイドRNA(gRNA)をさらに含むことができる。gRNAは、少なくとも1つの修飾を含むことができる。外因性TCRは、癌の新抗原に結合することができる。

【0339】

[00305] 本明細書では、操作された細胞を作製する方法であって、少なくとも1つの外因性T細胞受容体(TCR)受容体配列をコードする少なくとも1つのポリ核酸を導入するステップ; 少なくとも1つの修飾を含む少なくとも1つのガイドRNA(gRNA)を導入するステップ; および少なくとも1つのエンドヌクレアーゼを導入するステップを含み、gRNAは、少なくとも1つの内因性ゲノムに相補的な少なくとも1つの配列を含む方法が開示される。場合によっては、修飾は、5'末端、3'末端、5'末端から3'末端、単一の塩基修飾、2'リボース修飾、またはそれらの任意の組み合わせで行われる。修飾は、塩基置換、挿入、欠失、化学修飾、物理修飾、安定化、精製、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択することができる。

【0340】

[00306] 場合によっては、修飾は化学修飾である。修飾は、5'アデニル酸、5'グアノシン三リン酸キャップ、5'N7-メチルグアノシン三リン酸キャップ、5'三リン酸キャップ、3'リン酸、3'チオリン酸、5'リン酸、5'チオリン酸、Cis-Synチミジン二量体、三量体、C12スペーサー、C3スペーサー、C6スペーサー、dスペーサー、PCスペーサー、rスペーサー、スペーサー18、スペーサー9、3'-3'修飾、5'-5'修飾、脱塩基、アクリジン、アゾベンゼン、ピオチン、ピオチンBB、ピオチンTEG、コレステリルTEG、デスチオピオチンTEG、DNP TEG、DNP-X、DOTA、dT-ピオチン、二重ピオチン、PCピオチン、ソラレンC2、ソラレンC6、TINA、3'DABCYL、ブラックホールクエンチャー1、ブラックホールクエンチャー2、DABCYL SE、dT-DABCYL、IRDye QC-1、QSY-21、QSY-35、QSY-7、QSY-9、カルボキシリリンカー、チオールリンカー、2'デオキシリボヌクレオシドアナログプリン、2'デオキシリボヌクレオシドアナログピリミジン、リボヌクレオシドアナログ、2'-O-メチルリボヌクレオシド類似体、糖修飾類似体、ゆらぎ/ユニバーサル塩基、蛍光色素ラベル、2'フルオロRNA、2'-O-メチルRNA、メチルホスホネート、ホスホジエステルDNA、ホスホジエステルRNA、ホスホチオエートDNA、ホスホチオエートRNA、UNA、プソイドウリジン-5'-三リン酸、5'-メチルシチジン-5'-三リン酸、2'-O-メチル3ホスホチオエート、またはそれらの任意の組み合わせから選択され得る。修飾は、プソイドウリジン修飾であり得る。場合によっては、修飾は生存率に影響しない。

## 【0341】

[00307] 場合によっては、修飾は、2 - O - メチル3ホスホロチオエート付加である。2 - O - メチル3ホスホロチオエート付加は、1塩基から150塩基で行うことができる。2 - O - メチル3ホスホロチオエート付加は、1塩基から4塩基で行うことができる。2 - O - メチル3ホスホロチオエート付加は、2塩基で行うことができる。2 - O - メチル3ホスホロチオエート付加は、4塩基で行うことができる。修飾はまた切断することができる。切断は、5塩基切断であり得る。

## 【0342】

[00308] 場合によっては、5塩基切断は、Casタンパク質が切断を行うのを防ぐことができる。エンドヌクレアーゼは、CRISPRシステム、TALEN、亜鉛フィンガー、トランスポゾンベース、ZFN、メガヌクレアーゼ、Mega-TAL、および任意の組み合わせからなる群から選択することができる。エンドヌクレアーゼは、Casエンドヌクレアーゼであり得る。Casエンドヌクレアーゼは、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx1S、Csf1、Csf2、CsfO、Csf4、Cpf1、c2c1、c2c3、Cas9HiFi、それらの相同体またはそれらの修飾バージョンからなる群から選択され得る。Casエンドヌクレアーゼは、配列番号221の配列に対して、少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、もしくは最大約100%、または少なくとも約50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、もしくは最大約100%の配列同一性および/または配列類似性を有することができる。Casの修飾バージョンは、クリーンなCasであり得る。Casタンパク質はCas9であり得る。Cas9は、前記少なくとも1つの内因性ゲノムに二本鎖切断を引き起こすことができる。場合によっては、内因性ゲノムは、少なくとも1つの遺伝子を含む。遺伝子は、CISH、PD-1、TRA、TRB、またはそれらの組み合わせであり得る。場合によっては、二本鎖切断は、相同性指向修復(HR)、非同源性末端結合(NHEJ)、マイクロホモロジー媒介性の末端結合(MMEJ)、またはそれらの任意の組み合わせもしくは誘導体を使用して修復することができる。TCRは、二本鎖切断に組み込むことができる。

## 【0343】

[00309] T細胞は、1つ以上の破壊された標的遺伝子および1つ以上の導入遺伝子、例えば、受容体を含むことができる。例えば、その発現が破壊される1つ以上の標的遺伝子は、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、CISH、PPP1R12C、および/またはそれらの任意の組み合わせのいずれか1つを含むことができる。例えば、単に様々な組み合わせを説明するために、その発現が破壊される1つ以上の遺伝子はPD-1を含むことができ、1つ以上の導入遺伝子はTCRを含む。別の例では、その発現が破壊される1つ以上の標的遺伝子はまたCTLA-4を含むことができ、1つ以上の導入遺伝子はTCRを含む。破壊は、破壊された遺伝子またはその一部のゲノム転写物のコピー数の減少をもたらす得る。例えば、破壊され得る標的遺伝子は、破壊されていない細胞内の同じ標的遺伝子と比較して、転写物量が減少している可能性がある。破壊は、145コピー/μL、140コピー/μL、135コピー/μL、130コピー/μL、125コピー/μL、120コピー/μL、115コピー/μL、110コピー/μL、105コピー/μL、100コピー/μL、95コピー/μL、190コピー/μL、185コピー/μL、80コピー/μL、75コピー/μL、70コピー/μL、65コピー/μL、60コピー/μL、55コピー/μL、50コピー/μL、45コピー/μL、40コピー

/ $\mu$ L、35コピー/ $\mu$ L、30コピー/ $\mu$ L、25コピー/ $\mu$ L、20コピー/ $\mu$ L、15コピー/ $\mu$ L、10コピー/ $\mu$ L、5コピー/ $\mu$ L、1コピー/ $\mu$ L、または0.05コピー/ $\mu$ L未満の破壊結果をもたらし得る。破壊は、場合によっては100コピー/ $\mu$ L未満をもたらすことができる。

【0344】

【表8-1】

表8: 標的遺伝子の要約

配列番号	遺伝子記号	省略形	名称	NCBI番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 **GRCh38.p7	元々の開始	元々の終止	ゲノム位置
63	ADORA2A	A2aR; RDC8; ADORA2	アデノシン A2a受容体	135	24423597	24442360	22q11.23
64	CD276	B7H3; B7-H3; B7RP-2; 4Ig-B7- H3	CD276分子	80381	73684281	73714518	15q23-q24
65	VTCN1	B7X; B7H4; B7S1; B7-H4; B7h.5; VCTN1; PRO1291	V-セットド メイン含有 T細胞活性 阻害剤1	79679	117143587	11727036 8	1p13.1
66	BTLA	BTLA1; CD272	BおよびTリン パ球関連	151888	112463966	11249970 2	3q13.2
67	CTLA4	GSE; GRD4; ALP55; CD152; CTLA-4; IDDM12; CELIAC3	細胞傷害性 Tリンパ球 関連タンパ ク質4	1493	203867788	20387396 0	2q33
68	IDO1	IDO; INDO; IDO-1	インドール アミン2,3- ジオキシゲ ナーゼ1	3620	39913809	39928790	8p12-p11
69	KIR3DL1	KIR; NKB1; NKAT3; NKB1B; NKAT- 3; CD158E1; KIR3DL2; KIR3DL1/S1	キラー細胞 免疫グロブ リン様受容 体, 3つのド メイン, 長 い細胞質尾 部, 1	3811	54816438	54830778	19q13.4
70	LAG3	LAG3; CD223	リンパ球活 性化遺伝子3	3902	6772483	6778455	12p13.32
71	PDCD1	PD1; PD-1; CD279; SLEB2; hPD-1; hPD-1; hSLE1	プログラム 細胞死1	5133	241849881	24185890 8	2q37.3
72	HAVCR2	TIM3; CD366; KIM-3; TIMD3; Tim-3; TIMD-3; HAVcr-2	A型肝炎ウ イルス細胞 受容体2	84868	157085832	15710923 7	5q33.3

10

20

30

40

【0345】

【表 8 - 2】

配列番号	遺伝子記号	省略形	名称	NCBI番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 ** GRCh38.p7	元々の開始	元々の終止	ゲノム位置
73	VISTA	C10orf54, ESC-1 (Dies1)の分化; 血小板受容体 Gi24前駆体; PD1ホモログ (PD1H) B7H5; GI24; B7-H5; SISP1; PP2135	T細胞活性化のV-ドメイン免疫グロブリンサプレッサー	64115	71747556	71773580	10q22.1
74	CD244	2B4; 2B4; NAIL; Nmrk; NKR2B4; SLAMF4	CD244分子, ナチュラルキラー細胞受容体2B4	51744	160830158	160862902	1q23.3
75	CISH	CIS; G18; SOCS; CIS-1; BACTS2	サイトカイン誘導性 SH2含有タンパク質	1154	50606454	50611831	3p21.3
76	HPRT1	HPRT; HGPRT	ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1	3251	134452842	134500668	Xq26.1
77	AAV*S1	AAV	アデノ随伴ウイルス組み込み部位1	14	7774	11429	19q13
78	CCR5	CKR5; CCR-5; CD195; CKR-5; CCCKR5; CMKBR5; IDDM22; CC-CKR-5	ケモカイン (C-Cモチーフ)受容体5 (遺伝子/偽遺伝子)	1234	46370142	46376206	3p21.31
79	CD160	NK1; BY55; NK28	CD160分子	11126	145719433	145739288	1q21.1
80	TIGIT	VSIG9; VSTM3; WUCAM	IgおよびITIMドメインを有するT細胞免疫受容体	201633	114293986	114310288	3q13.31
81	CD96	TACTILE	CD96分子	10225	111542079	111665996	3q13.13-q13.2
82	CRTAM	CD355	細胞傷害性および制御性T細胞分子	56253	122838431	122872643	11q24.1

10

20

30

40

【 0 3 4 6 】

【表 8 - 3】

配列番号	遺伝子記号	省略形	名称	NCBI番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 ** GRCh38.p7	元々の開始	元々の終了	ゲノム位置
83	LAIR1	CD305; LAIR-1	白血球関連免疫グロブリン様受容体1	3903	54353624	54370556	19q13.4
84	SIGLEC7	p75; QA79; AIRM1; CD328; CDw328; D-siglec; SIGLEC-7; SIGLECP2; SIGLEC19P; p75/AIRM1	シアル酸結合Ig様レクチン7	27036	51142294	51153526	19q13.3
85	SIGLEC9	CD329; CDw329; FOAP-9; siglec-9; OBBP-LIKE	シアル酸結合Ig様レクチン9	27180	51124880	51141020	19q13.41
86	TNFRSF10B	DR5; CD262; KILLER; TRICK2; TRICKB; ZTNFR9; TRAILR2; TRICK2A; TRICK2B; TRAIL-R2; KILLER/DR5	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10b	8795	23006383	23069187	8p22-p21
87	TNFRSF10A	DR4; APO2; CD261; TRAILR1; TRAILR-1	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10a	8797	23191457	23225167	8p21
88	CASP8	CAP4; MACH; MCH5; FLICE; ALPS2B; Casp-8	カスパーゼ8	841	201233443	20128771 1	2q33-q34
89	CASP10	MCH4; ALPS2; FLICE2	カスパーゼ10	843	201182898	20122940 6	2q33-q34
90	CASP3	CPP32; SCA-1; CPP32B	カスパーゼ3	836	184627696	18464947 5	4q34
91	CASP6	MCH2	カスパーゼ6	839	109688628	10971390 4	4q25
92	CASP7	MCH3; CMH-1; LICE2; CASP-7; ICE-LAP3	カスパーゼ7	840	113679162	11373090 9	10q25
93	FADD	GIG3; MORT1	死ドメインを介したFas関連	8772	70203163	70207402	11q13.3

10

20

30

40

【 0 3 4 7 】

【表 8 - 4】

配列番号	遺伝子記号	省略形	名称	NCBI番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 ** GRCh38.p7	元々の開始	元々の終止	ゲノム位置
94	FAS	APT1; CD95; FAS1; APO-1; FASTM; ALPS1A; TNFRSF6	Fas 細胞表面死受容体	355	88969801	89017059	10q24.1
95	TGFBRII	AAT3; FAA3; LDS2; MFS2; RIIC; LDS1B; LDS2B; TAAD2; TGFR-2; TGFベータ-RII	形質転換増殖因子ベータ受容体II	7048	30606493	30694142	3p22
96	TGFBRI	AAT5; ALK5; ESS1; LDS1; MSSE; SKR4; ALK-5; LDS1A; LDS2A; TGFR-1; ACVRLK4; tbetaR-I	形質転換増殖因子ベータ受容体I	7046	99104038	99154192	9q22
97	SMAD2	JV18; MADH2; MADR2; JV18-1; hMAD-2; hSMAD2	SMADファミリーメンバー2	4087	47833095	47931193	18q21.1
98	SMAD3	LDS3; LDS1C; MADH3; JV15-2; HSPC193; HsT17436	SMADファミリーメンバー3	4088	67065627	67195195	15q22.33
99	SMAD4	JIP; DPC4; MADH4; MYHRS	SMADファミリーメンバー4	4089	51030213	51085042	18q21.1
100	SKI	SGS; SKV	SKI原癌遺伝子	6497	2228695	2310213	1p36.33
101	SKIL	SNO; SnoA; SnoI; SnoN	SKI様原癌遺伝子	6498	170357678	170396849	3q26
102	TGIF1	HPE4; TGIF	TGFB 誘導性因子ホモオボックス1	7050	3411927	3458411	18p11.3
103	IL10RA	CD210; IL10R; CD210a; CDW210A; HIL-10R; IL-10R1	インターロイキン10受容体サブユニットアルファ	3587	117986391	118001483	11q23
104	IL10RB	CRFB4; CRF2-4; D21S58; D21S66; CDW210B; IL-10R2	インターロイキン10受容体サブユニットベータ	3588	33266360	33297234	21q22.11

10

20

30

40

【 0 3 4 8 】

【表 8 - 5】

配列番号	遺伝子記号	省略形	名称	NCBI番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 ** GRCh38.p7	元々の開始	元々の終了	ゲノム位置
105	HMOX2	HO-2	ヘムオキシゲナーゼ2	3163	4474703	4510347	16p13.3
106	IL6R	IL6Q; gp80; CD126; IL6RA; IL6RQ; IL-6RA; IL-6R-1	インターロイキン6受容体	3570	154405193	154469450	1q21
107	IL6ST	CD130; GP130; CDW130; IL-6RB	インターロイキン6シグナルトランスデューサー	3572	55935095	55994993	5q11.2
108	CSK	CSK	c-srcチロシンキナーゼ	1445	74782084	74803198	15q24.1
109	PAG1	CBP; PAG	スフィンゴ糖脂質マイクロドメインを有するリンタンパク質膜アンカー1	55824	80967810	81112068	8q21.13
110	SIT1	SIT1	膜貫通アダプター1を調節するシグナル伝達閾値	27240	35649298	35650950	9p13-p12
111	FOXP3	JM2; AIID; IPEX; PIDX; XPID; DIETER	フォークヘッドボックスP3	50943	49250436	49269727	Xp11.23
112	PRDM1	BLIMP1; PRDI-BF1	PRドメイン1	639	106086320	106109939	6q21
113	BATF	SFA2; B-ATF; BATF1; SFA-2	塩基性ロイシンジッパー転写因子, ATF様	10538	75522441	75546992	14q24.3
114	GUCY1A2	GC-SA2; GUC1A2	グアニル酸シクラーゼ1, 可溶性, アルファ2	2977	106674012	107018445	11q21-q22
115	GUCY1A3	GUCA3; MYMY6; GC-SA3; GUC1A3; GUCA3; GUCY1A1	グアニル酸シクラーゼ1, 可溶性, アルファ3	2982	155666568	155737062	4q32.1

10

20

30

40

【 0 3 4 9 】

【表 8 - 6】

配列番号	遺伝子記号	省略形	名称	NCBI番号 (GRCh38.p2) *AC010327.8 **GRCh38.p7	元々の開始	元々の終止	ゲノム位置
116	GUCY1B2	GUCY1B2	グアニル酸シクラーゼ1, 可溶性, ベータ2 (偽遺伝子)	2974	50994511	51066157	13q14.3
117	GUCY1B3	GUCB3; GCSB3; GUC1B3; GUCSB3; GUCY1B1; GC-S-ベータ-1	グアニル酸シクラーゼ1, 可溶性, ベータ3	2983	155758973	155807642	4q31.3-q33
118	TRA	IMD7; TCRA; TCRD; TRAアルファ; TRAC	T細胞受容体アルファ遺伝子座	6955	21621904	22552132	14q11.2
119	TRB	TCRB; TRBベータ	T細胞受容体ベータ遺伝子座	6957	142299011	142813287	7q34
120	EGLN1	HPH2; PHD2; SM20; ECVT3; HALAH; HPH-2; HIFPH2; ZMYND6; Clorf12; HIF-PH2	egl-9ファミリー低酸素誘導性因子1	54583	231363751	231425044	1q42.1
121	EGLN2	EIT6; PHD1; HPH-1; HPH-3; HIFPH1; HIF-PH1	egl-9ファミリー低酸素誘導性因子2	112398	40799143	40808441	19q13.2
122	EGLN3	PHD3; HIFPH3; HIFP4H3	egl-9ファミリー低酸素誘導性因子3	112399	33924215	33951083	14q13.1
123	PPP1R12C**	p84; p85; LENG3; MBS85	タンパク質ホスファターゼ1 調節サブユニット12C	54776	55090913	55117600	19q13.42

10

20

30

## 【0350】

[00310] T細胞は、1つ以上の抑制された遺伝子および1つ以上の導入遺伝子、例えば、受容体を含むことができる。例えば、その発現が抑制される1つ以上の遺伝子は、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、CISH、および/またはそれらの任意の組み合わせのいずれか1つを含むことができる。例えば、単に様々な組み合わせを説明するために、その発現が抑制される1つ以上の遺伝子はPD-1を含むことができ、1つ以上の導入遺伝子はTCRを含むことができる。別の例では、その発現が抑制される1つ以上の遺伝子はまたCTLA-4を含むことができ、1つ以上の導入遺伝子は外因性TCRを含むことができる。

40

## 【0351】

[00311] 導入遺伝子の挿入は、遺伝子の破壊の有無にかかわらず行うことができる。導入遺伝子は、遺伝子、例えば、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、HPRT、AAVS部位(例えば、AAVS1、AAVS2など)、CCR5、またはCISHに隣

50

接して、その近傍に、または内部に挿入して、遺伝子の活性または発現を低下または排除することができる。例えば、癌特異的TCR導入遺伝子は、遺伝子の活性または発現を低下または排除するために、遺伝子（例えば、PD-1）に隣接して、その近傍に、またはその内部に挿入することができる。導入遺伝子の挿入は、内在性TCR遺伝子で行うことができる。場合によっては、内在性TCRがCRISPRシステムで破壊され得る。

### 【0352】

[00312] 遺伝子の破壊は、任意の特定の遺伝子のものであり得る。この用途内の遺伝子の遺伝的相同体（例えば、遺伝子の任意の哺乳動物バージョン）が網羅されることが意図される。例えば、破壊される遺伝子は、本明細書に開示される遺伝子、例えば、CD27、CD40、CD122、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、HPRT、CCR5、AAVS部位（例えば、AAVS1、AAVS2など）、またはCISHに対して特定の同一性および/または相同性を示し得る。したがって、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性（核酸またはタンパク質レベルで）を示すか、または約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性（核酸またはタンパク質レベルで）を示す遺伝子が破壊され得ることが意図される。また、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性（核酸またはタンパク質レベルで）を示すか、または約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性（核酸またはタンパク質レベルで）を示す遺伝子が破壊され得ることが意図される。一部の遺伝的相同体は当該技術分野に公知であるが、場合によっては、相同体は公知でない。しかしながら、NCBI BLASTなどの公衆に利用可能なデータベースを使用して、核酸（DNAもしくはRNA）配列またはタンパク質配列を比較することにより、哺乳動物間の相同遺伝子を見つけることができる。

### 【0353】

[00313] 破壊することができる遺伝子は、遺伝子ファミリーのメンバーであり得る。例えば、破壊することができる遺伝子は、癌免疫療法の治療可能性を改善し得る。場合によっては、遺伝子はCISHであり得る。CISH遺伝子は、サイトカインシグナルのサブレッサー（SOCS）またはSTAT誘導性STAT阻害剤（SSI）としても知られるサイトカイン誘導性STAT阻害剤（CIS）タンパク質ファミリーのメンバーであり得る（例えば、Palmerら、Cish actively silences TCR signaling in CD8+ T cells to maintain tumor tolerance, The Journal of Experimental Medicine 202巻（12号）、2095-2113頁（2015年））。遺伝子は、サイトカインシグナル伝達を調節することができる古典的な負のフィードバックシステムの一部を形成し得るタンパク質のSOCSファミリーの一部であり得る。破壊される遺伝子はCISHであり得る。CISHは、エリスロポエチン、プロラクチンまたはインターロイキン3（IL-3）受容体などの、JAK-STAT5経路を介してシグナルを伝達するサイトカインの負の調節に関与し得る。遺伝子は、チロシンのリン酸化を抑制することにより、STAT5トランス活性化を阻害することができる。CISHファミリーのメンバーは、サイトカインシグナル伝達のサイトカイン誘導性の負の調節因子であることが公知である。遺伝子の発現は、造血細胞のIL2、IL3、GM-CSFま

たはEPOによって誘導され得る。遺伝子タンパク質のプロテアソーム媒介性分解は、エリスロポエチン受容体の不活性化に關与し得る。場合によっては、標的とする遺伝子を腫瘍特異的T細胞において発現させることができる。標的とされる遺伝子は、破壊された場合、抗原關連腫瘍への操作された細胞の浸潤を増加させることができる。場合によっては、標的とされる遺伝子はCISHであり得る。

【0354】

[00314]破壊され得る遺伝子は、TCRシグナル伝達、機能的結合力、または癌に対する免疫の減弱に關与し得る。場合によっては、破壊される遺伝子は、TCRが刺激された場合、上方制御される。遺伝子は、細胞の拡大、機能的結合力、またはサイトカインの多機能性の阻害に關与し得る。遺伝子は、細胞性サイトカイン産生の負の調節に關与し得る。例えば、遺伝子は、エフェクターサイトカイン、例えば、IFN-ガンマおよび/またはTNFの産生の阻害に關与し得る。遺伝子はまた、TCR刺激後のIL-2などの支持性サイトカインの発現の阻害に關与し得る。

10

【0355】

[00315]遺伝子抑制はまた、多数の方法で行うことができる。例えば、遺伝子発現は、ノックアウト、遺伝子のプロモーターの変更、および/または干渉RNAの投与によって抑制することができる。これは、生物レベルまたは組織、臓器、および/もしくは細胞レベルで行うことができる。1つ以上の遺伝子が細胞、組織、および/または臓器でノックダウンされた場合、1つ以上の遺伝子は、RNA干渉試薬、例えば、siRNA、shRNA、またはマイクロRNAを投与することによって抑制することができる。例えば、shRNAを発現させることができる核酸を細胞に安定的にトランスフェクトして、発現をノックダウンさせることができる。さらに、shRNAを発現することができる核酸をT細胞のゲノムに挿入して、よって、T細胞内の遺伝子をノックダウンさせることができる。

20

【0356】

[00316]T細胞内の1つ以上の遺伝子は、任意の方法を使用してノックアウトまたは破壊することができる。例えば、1つ以上の遺伝子をノックアウトすることは、T細胞のゲノムから1つ以上の遺伝子を削除することを含み得る。ノックアウトはまた、T細胞から遺伝子配列の全部または一部を除去することを含むことができる。また、ノックアウトは、T細胞のゲノム中の遺伝子の全部または一部を1つ以上のヌクレオチドで置換することを含み得ることが意図される。1つ以上の遺伝子をノックアウトすることはまた、1つ以上の遺伝子に配列を挿入し、それにより1つ以上の遺伝子の発現を破壊することを含むことができる。例えば、配列を挿入すると、1つ以上の遺伝子の中央に終止コドンが生成され得る。配列を挿入することはまた、1つ以上の遺伝子の読み取り枠をシフトさせる場合がある。

30

細胞膜へのベクター送達

[00317]ヌクレアーゼおよび転写因子、それをコードするポリヌクレオチド、および/および任意の導入遺伝子ポリヌクレオチド、ならびに本明細書に記載されるタンパク質および/またはポリヌクレオチドを含む組成物は、任意の適切な手段により標的細胞に送達させることができる。

40

【0357】

[00318]適切な細胞には、真核細胞および原核細胞および/または細胞株が含まれ得るが、これらに限定されない。適切な細胞は、ヒト初代細胞であり得る。ヒト初代細胞は免疫細胞であり得る。免疫細胞は、T細胞、B細胞、NK細胞、および/またはTILであり得る。このような細胞、またはこのような細胞から生成された細胞株の非限定的な例には、COS、CHO(例えば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV)、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NSO、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293(例えば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T)、およびperC6細胞、ならびにツマジロクサヨトウ(Spodoptera fu

50

g i p e r d a ) ( S f )、またはサッカロミセス ( Saccharomyces )、ピキア ( Pichia ) およびシゾサッカロミセス ( Schizosaccharomyces ) などの真菌細胞が含まれる。場合によっては、細胞株は、CHO - K 1、MDCK または HEK 293 細胞株であり得る。場合によっては、適切な初代細胞には、末梢血単核細胞 ( P B M C )、末梢血リンパ球 ( P B L )、および、限定されないが、T細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、ナチュラルキラーT細胞、単球前駆細胞、造血幹細胞または非多能性幹細胞などの血液細胞サブセットが含まれる。場合によっては、CD 3 + T細胞、CD 4 + T細胞、CD 8 + T細胞、または任意の他のタイプのT細胞などの腫瘍浸潤細胞 ( T I L ) などの任意のT細胞を含む免疫細胞であり得る。T細胞はまた、記憶T細胞、記憶幹T細胞、またはエフェクターT細胞も含み得る。T細胞はまた、例えば、全血からT細胞を選択するなど、バルク集団から選択することができる。T細胞はまた、バルク集団から拡大することができる。T細胞はまた、特定の集団および表現型に偏っていることもある。例えば、T細胞は、表現型的にCD 45 R O ( - )、C C R 7 ( + )、C D 4 5 R A ( + )、C D 6 2 L ( + )、C D 2 7 ( + )、C D 2 8 ( + ) および / または I L - 7 R ( + ) を含むように偏っている場合がある。CD 45 R O ( - )、C C R 7 ( + )、C D 4 5 R A ( + )、C D 6 2 L ( + )、C D 2 7 ( + )、C D 2 8 ( + ) および / または I L - 7 R ( + ) を含むリストから選択される1つ以上のマーカーを含む適切な細胞を選択することができる。また、適切な細胞には、例えば、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞および間葉幹細胞などの幹細胞も含まれる。適切な細胞は、ヒト細胞、非ヒト細胞、および / またはマウス細胞などの任意の数の初代細胞を含むことができる。適切な細胞は前駆細胞であり得る。適切な細胞は、治療される対象 (例えば、対象) に由来し得る。適切な細胞は、ヒトのドナーに由来し得る。適切な細胞は、CD 45 R O ( - )、C C R 7 ( + )、C D 4 5 R A ( + )、C D 6 2 L + ( L - セレクチン )、C D 2 7 +、C D 2 8 + および I L - 7 R + で構成される幹記憶 T<sub>S C M</sub> 細胞、であり得、幹記憶細胞はまた、CD 95、I L - 2 R、C X C R 3、および L F A - 1 を発現することができ、幹記憶細胞に特有の多数の機能的属性を示す。適切な細胞は、L - セレクチンおよび C C R 7 を含む中心記憶 T<sub>C M</sub> 細胞であり得、中心記憶細胞は、例えば、I L - 2 を分泌するが、I F N および I L - 4 を分泌しない。適切な細胞はまた、L - セレクチンまたは C C R 7 を含むエフェクター記憶 T<sub>E M</sub> 細胞であり得、例えば、I F N および I L - 4 などのエフェクターサイトカインを産生する。

10

20

30

#### 【 0 3 5 8 】

[00319] 場合によっては、C R I S P R および A A V 修飾された細胞は、CD 45 R O ( - )、C C R 7 ( + )、C D 4 5 R A ( + )、C D 6 2 L + ( L - セレクチン )、C D 2 7 +、C D 2 8 + および I L - 7 R + で構成される幹記憶 T<sub>S C M</sub> 細胞、であり得、幹記憶細胞はまた、CD 95、I L - 2 R、C X C R 3、および L F A - 1 を発現することができ、幹記憶細胞に特有の多数の機能的属性を示す。C R I S P R や A A V 修飾された細胞などの操作された細胞は、L - セレクチンと C C R 7 を含む中央記憶 T<sub>C M</sub> 細胞でもあり、中心記憶細胞は、例えば I L - 2 を分泌することができるが、I F N および I L - 4 を分泌することができない。操作された細胞はまた、L - セレクチンまたは C C R 7 を含むエフェクター記憶 T<sub>E M</sub> 細胞であり得、例えば、I F N および I L - 4 などのエフェクターサイトカインを産生することができる。場合によっては、細胞集団を対象に導入することができる。例えば、細胞集団は、T細胞とNK細胞の組み合わせであり得る。他の場合では、集団は、ナイーブ細胞とエフェクター細胞の組み合わせであり得る。

40

#### 【 0 3 5 9 】

[00320] ヒト初代細胞などの適切な細胞を達成する方法は、細胞を選択することを含むことができる。場合によっては、細胞は、細胞用に選択することができるマーカーを含めることができる。例えば、このようなマーカーは、G F P、耐性遺伝子、細胞表面マーカー、内因性タグを含むことができる。細胞は、内在性マーカーを使用して選択され得る。適切な細胞は、任意の技術を使用して選択することができる。このような技術は、フローサイトメトリーおよび / または磁気カラムを含むことができる。次に、選択した細胞を対象

50

に注入することができる。選択した細胞はまた多数に拡大することもできる。選択した細胞は注入前に拡大することができる。

【0360】

[00321]本明細書に記載される転写因子およびヌクレアーゼは、例えば、1つ以上のタンパク質をコードする配列を含むベクターを使用して送達され得る。ポリヌクレオチドをコードする導入遺伝子はまた同様に送達され得る。限定されないが、プラスミドベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ポックスウイルスベクターを含む任意のベクターシステムを使用することができる。さらに、これらのベクターはいずれも、1つ以上の転写因子、ヌクレアーゼ、および/または導入遺伝子を含むことができる。したがって、1つ以上のCRISPR、TALEN、トランスポゾンベース、ZFN、メガヌクレアーゼ、またはMega-TAL分子および/または導入遺伝子が細胞に導入された場合、CRISPR、TALEN、トランスポゾンベース、ZFN、メガヌクレアーゼ、またはMega-TAL分子および/もしくは導入遺伝子は、同じベクターまたは異なるベクターで運搬することができる。複数のベクターを使用する場合、各ベクターは、1つまたは複数のCRISPR、TALEN、トランスポゾンベース、ZFN、メガヌクレアーゼ、またはMega-TAL分子および/もしくは導入遺伝子をコードする配列を含むことができる。

10

【0361】

[00322]従来のウイルスおよび非ウイルスベースの遺伝子導入方法を使用して、細胞（例えば、哺乳動物細胞）および標的組織に遺伝子操作されたCRISPR、TALEN、トランスポゾンベース、ZFN、メガヌクレアーゼ、またはMega-TAL分子および/もしくは導入遺伝子をコードする核酸を導入することができる。このような方法はまた、CRISPR、TALEN、トランスポゾンベース、ZFN、メガヌクレアーゼ、またはMega-TAL分子および/もしくは導入遺伝子をコードする核酸をインビトロ細胞に投与するために使用することができる。一部の例では、CRISPR、TALEN、トランスポゾンベース、ZFN、メガヌクレアーゼ、またはMega-TAL分子および/または導入遺伝子をコードする核酸は、インビボまたはエクスピボでの免疫療法用に投与することができる。非ウイルスベクター送達システムは、DNAプラスミド、裸の核酸、およびリポソームまたはポロキサマーなどの送達ビヒクルと複合化した核酸を含むことができる。ウイルスベクター送達システムには、細胞への送達後にエピソームまたは組み込まれたゲノムのいずれかを有するDNAおよびRNAウイルスを含むことができる。

20

30

【0362】

[00323]核酸の非ウイルス送達の方法には、エレクトロポレーション、リポフェクション、ヌクレオフェクション、金ナノ粒子送達、マイクロインジェクション、バイオリステイクス、ウィロソーム、リポソーム、イムノリポソーム、ポリカチオンまたは脂質：核酸コンジュゲート、裸のDNA、mRNA、人工ピリオン、および薬剤により増大したDNA取り込みなどが含まれる。例えば、ソニトロン2000システム(Rich-Mar)を使用したソノポレーションはまた、核酸の送達に使用することができる。追加の例示的な核酸送達システムには、AMAXA(登録商標) Biosystems(Cologne, Germany)、Life Technologies(Frederick, Md.)、MAXCYTE, Inc(Rockville, Md.)、BTX Molecular Delivery Systems(Holliston, Mass.)およびCopernicus Therapeutics Inc.(例えば、米国特許第6,008,336号を参照)によって提供されているものが含まれる。リポフェクション試薬は市販されている(例えば、TRANSFECTAM(登録商標)およびLIPOFECTIN(登録商標))。送達は、細胞(エクスピボ投与)または標的組織(インビボ投与)に対して行うことができる。追加の送達方法には、送達される核酸をEnGeneIC送達ビヒクル(EDV)にパッケージ化した使用が含まれる。これらのEDVは、抗体の一方のアームが標的組織に特異性を有し、他方のアームがEDVに特異性を有する二重特異性抗体を使用して、標的組織に特異的に送達される。抗体は、EDVを標的細胞表

40

50

面に運び、次に、EDVがエンドサイトーシスによって細胞に運ばれる。

【0363】

[00324]操作されたCRISPR、TALEN、トランスポゾンベース、ZFN、メガヌクレアーゼ、またはメガTAL分子、トランスポゾンおよび/または導入遺伝子をコードする核酸を含むウイルスおよび非ウイルスベクターを含むベクターは、インビボで細胞の形質導入のために生物に直接投与され得る。あるいは、裸のDNAまたはmRNAを投与することができる。投与は、限定されないが、注射、注入、局所適用およびエレクトロポレーションを含む、血液または組織細胞との最終的な接触に分子を導入するために通常使用される経路のいずれかによる。特定の組成物を投与するために、1を超える経路を使用することができる。薬学的に許容される担体は、投与される特定の組成物によって、な

10

【0364】

[00325]場合によっては、外因性TCRをコードするベクターを細胞性ヌクレアーゼにシャトルすることができる。例えば、ベクターには核局在化配列(NLS)を含めることができる。ベクターはまた、タンパク質またはタンパク質複合体によってシャトルされ得る。場合によっては、Cas9はミニサークルベクトルをシャトルする手段として使用することができる。CasはNLSを構成することができる。場合によっては、ベクターは、エレクトロポレーションの前にCasタンパク質と予め複合化させることができる。シャトルに使用することができるCasタンパク質は、ヌクレアーゼ欠損Cas9(dCas9)タンパク質であり得る。シャトルに使用することができるCasタンパク質は、ヌクレアーゼコンピテントCas9であり得る。場合によっては、Casタンパク質は、ガイドRNAおよび外因性TCRをコードするプラスミドと予め混合することができる。

20

【0365】

[00326]ベクターは、個々の対象への投与により、典型的には全身投与(例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、または頭蓋内注入)または下記のような局所適用によりインビボで送達され得る。あるいは、個々の対象から外植された細胞(例えば、リンパ球、T細胞、骨髄穿刺液、組織生検)などの細胞にエクスピボでベクターを送達することができ、続いて、通常は、ベクターが組み込まれた細胞の選択後に、細胞を対象に再移植することができる。選択の前または後に、細胞を拡大することができる。

30

【0366】

[00327]細胞は、外因性TCRおよびCRISPRシステムをコードする突然変異またはキメラなアデノ随伴ウイルスベクターでトランスフェクトすることができる。AAVベクターの濃度は、0.5ナノグラムから50マイクログラムであり得る。場合によっては、エレクトロポレーションによって細胞に導入することができる核酸(例えば、ssDNA、dsDNA、RNA)の量を変えて、トランスフェクション効率および/または細胞生存率を最適化することができる。場合によっては、約100ピコグラム未満の核酸を各細胞(例えば、エレクトロポレーションされる1つ以上の細胞)に追加し得る。場合によっては、少なくとも約100ピコグラム、少なくとも約200ピコグラム、少なくとも約300ピコグラム、少なくとも約400ピコグラム、少なくとも約500ピコグラム、

40

少なくとも約600ピコグラム、少なくとも約700ピコグラム、少なくとも約800ピコグラム、少なくとも約900ピコグラム、少なくとも約1マイクログラム、少なくとも約1.5マイクログラム、少なくとも約2マイクログラム、少なくとも約2.5マイクログラム、少なくとも約3マイクログラム、少なくとも約3.5マイクログラム、少なくとも約4マイクログラム、少なくとも約4.5マイクログラム、少なくとも約5マイクログラム、少なくとも約5.5マイクログラム、少なくとも約6マイクログラム、少なくとも約6.5マイクログラム、少なくとも約7マイクログラム、少なくとも約7.5マイクログラム、少なくとも約8マイクログラム、少なくとも約8.5マイクログラム、少なくとも約9マイクログラム、少なくとも約9.5マイクログラム、少なくとも約10マイクログラム、少なくとも約11マイクログラム、少なくとも約12マイクログラム、少なくと

50

も約13マイクログラム、少なくとも約14マイクログラム、少なくとも約15マイクログラム、少なくとも約20マイクログラム、少なくとも約25マイクログラム、少なくとも約30マイクログラム、少なくとも約35マイクログラム、少なくとも約40マイクログラム、少なくとも約45マイクログラム、または少なくとも約50マイクログラムの核酸が、各細胞試料（例えば、エレクトロポレーションされる1つ以上の細胞）に追加することができる。例えば、1マイクログラムのdsDNAをエレクトロポレーション用に各細胞試料に追加することができる。場合によっては、最適なトランスフェクション効率および/または細胞生存率に必要とされる核酸（例えば、dsDNA）の量は、細胞型に特異的であり得る。場合によっては、各試料に使用される核酸（例えば、dsDNA）の量は、トランスフェクション効率および/または細胞生存率に直接対応し得る。

10

## 【0367】

[00328]本明細書に記載される核酸送達プラットフォームのいずれか、例えば、ヌクレオフェクションまたはエレクトロポレーションを用いた細胞のトランスフェクション効率は、約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、もしくは99.9%超であり得るか、または約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、または99.9%超であり得る。一部の実施形態では、トランスフェクション効率は、対照送達プラットフォーム（例えば、野生型AAVを用いた送達プラットフォーム）を使用した同等の細胞のトランスフェクション効率と比較して、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、もしくは99.9%超であり得るか、または約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、もしくは99.9%超であり得る。場合によっては、細胞の選択、選別などがなければ、トランスフェクションまたは形質導入効率を定量化することができる。

20

30

## 【0368】

[00329]突然変異されたおよびキメラなアデノ随伴ウイルスベクターなどの本明細書に記載されるベクターは、トランスフェクション、エレクトロポレーション、リボソーム送達、膜融合技術、高速DNAコーティングペレット、ウイルス感染およびプロトプラスト融合を含む任意の適切な方法により送達させることができる。本発明の任意の実施形態を構築するために使用される方法は、核酸操作における当業者に公知であり、遺伝子工学、組換え工学、および合成技術が含まれる。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NYを参照されたい。例えば、Neon（登録商標）トランスフェクションシステム（ThermoFisher Scientific）またはAMAXA（登録商標）Nucleofector（AMAXA（登録商標）Biosystems）を使用したエレクトロポレーションはまた、核酸を細胞に送達するために使用することができる。エレクトロポレーションパラメータは、トランスフェクション効率および/または細胞生存率を最適化するために調整され得る。エレクトロポレーション装置は、指数関数的減衰、時定数および方形波などの複数の電気波形パルス設定を有することができる。すべての細胞型は、適用されるパルスパラメータ（例えば、電圧、静電容量および抵抗）に依存する固有の最適電界強度（E）を有する。最適な電界強度の適用は、膜貫通電圧の誘導を介した電気透過性を生じさせ、核酸が細胞膜を通過できるようにする。場合によっては、エレクトロポレーションパルス電圧、エレクトロポレーションパルス幅、パルス数、細胞密度、およびチップタ

40

50

イブを調整して、トランスフェクション効率および/または細胞生存率を最適化することができる。

【0369】

[00330]場合によっては、エレクトロポレーションのパルス電圧を変えて、トランスフェクション効率および/または細胞生存率を最適化することができる。場合によっては、エレクトロポレーション電圧は、約500ボルト未満であり得る。場合によっては、エレクトロポレーション電圧は、少なくとも約500ボルト、少なくとも約600ボルト、少なくとも約700ボルト、少なくとも約800ボルト、少なくとも約900ボルト、少なくとも約1000ボルト、少なくとも約1100ボルト、少なくとも約1200ボルト、少なくとも約1300ボルト、少なくとも約1400ボルト、少なくとも約1500ボルト、少なくとも約1600ボルト、少なくとも約1700ボルト、少なくとも約1800ボルト、少なくとも約1900ボルト、少なくとも約2000ボルト、少なくとも約2100ボルト、少なくとも約2200ボルト、少なくとも約2300ボルト、少なくとも約2400ボルト、少なくとも約2500ボルト、少なくとも約2600ボルト、少なくとも約2700ボルト、少なくとも約2800ボルト、少なくとも約2900ボルト、または少なくとも約3000ボルトであり得る。場合によっては、最適なトランスフェクション効率および/または細胞生存率に必要なとされるエレクトロポレーションパルス電圧は、細胞型に特異的であり得る。例えば、1900ボルトのエレクトロポレーション電圧は、マクロファージ細胞に最適であり得る（例えば、最大の生存率および/またはトランスフェクション効率を提供し得る）。別の例では、約1350ボルトのエレクトロポレーション電圧は、Jurkat細胞、またはT細胞などの初代ヒト細胞に最適であり得る（例えば、最大の生存率および/またはトランスフェクション効率を提供し得る）。場合によっては、ある範囲のエレクトロポレーション電圧が特定の細胞型に最適であり得る。例えば、ヒト578T細胞に対しては、約1000ボルト～約1300ボルトのエレクトロポレーション電圧が最適であり得る（例えば、最大の生存率および/またはトランスフェクション効率を提供し得る）。

10

20

【0370】

[00331]場合によっては、エレクトロポレーションのパルス幅を変えて、トランスフェクション効率および/または細胞生存率を最適化することができる。場合によっては、エレクトロポレーションのパルス幅は、約5ミリ秒未満であり得る。場合によっては、エレクトロポレーション幅は、少なくとも約5ミリ秒、少なくとも約6ミリ秒、少なくとも約7ミリ秒、少なくとも約8ミリ秒、少なくとも約9ミリ秒、少なくとも約10ミリ秒、少なくとも約11ミリ秒、少なくとも約12ミリ秒、少なくとも約13ミリ秒、少なくとも約14ミリ秒、少なくとも約15ミリ秒、少なくとも約16ミリ秒、少なくとも約17ミリ秒、少なくとも約18ミリ秒、少なくとも約19ミリ秒、少なくとも約20ミリ秒、少なくとも約21ミリ秒、少なくとも約22ミリ秒、少なくとも約23ミリ秒、少なくとも約24ミリ秒、少なくとも約25ミリ秒、少なくとも約26ミリ秒、少なくとも約27ミリ秒、少なくとも約28ミリ秒、少なくとも約29ミリ秒、少なくとも約30ミリ秒、少なくとも約31ミリ秒、少なくとも約32ミリ秒、少なくとも約33ミリ秒、少なくとも約34ミリ秒、少なくとも約35ミリ秒、少なくとも約36ミリ秒、少なくとも約37ミリ秒、少なくとも約38ミリ秒、少なくとも約39ミリ秒、少なくとも約40ミリ秒、少なくとも約41ミリ秒、少なくとも約42ミリ秒、少なくとも約43ミリ秒、少なくとも約44ミリ秒、少なくとも約45ミリ秒、少なくとも約46ミリ秒、少なくとも約47ミリ秒、少なくとも約48ミリ秒、少なくとも約49ミリ秒、または少なくとも約50ミリ秒であり得る。場合によっては、最適なトランスフェクション効率および/または細胞生存率に必要なとされるエレクトロポレーションのパルス幅は、細胞型に特異的であり得る。例えば、30ミリ秒のエレクトロポレーションパルス幅は、マクロファージ細胞に最適であり得る（例えば、最大の生存率および/またはトランスフェクション効率を提供し得る）。別の例では、約10ミリ秒のエレクトロポレーション幅は、Jurkat細胞に最適であり得る（例えば、最大の生存率および/またはトランスフェクション効率を提供し得

30

40

50

る)。場合によっては、ある範囲のエレクトロポレーション幅の範囲が、所定の細胞型に最適であり得る。例えば、約20ミリ秒から約30ミリ秒の間のエレクトロポレーション幅は、ヒト578T細胞に最適であり得る(例えば、最大の生存率および/またはトランスフェクション効率を提供し得る)。

#### 【0371】

[00332]場合によっては、エレクトロポレーションパルスの変えて、トランスフェクション効率および細胞生存率を最適化することができる。場合によっては、エレクトロポレーションは、単一のパルスを含み得る。場合によっては、エレクトロポレーションは、1を超えるパルスを含むことができる。場合によっては、エレクトロポレーションは、2パルス、3パルス、4パルス、5パルス、6パルス、7パルス、8パルス、9パルス、もしくは10またはそれ以上のパルスを含むことができる。場合によっては、最適なトランスフェクション効率および/または細胞生存率に必要なとされるエレクトロポレーションパルスの数は、細胞型に特異的であり得る。例えば、単一のパルスを用いたエレクトロポレーションは、マクロファージ細胞に最適であり得る(例えば、最大の生存率および/またはトランスフェクション効率を提供し得る)。別の例では、3パルスのエレクトロポレーションが、初代細胞に対して最適であり得る(例えば、最大の生存率および/またはトランスフェクション効率を提供し得る)。場合によっては、ある範囲のエレクトロポレーション幅が、特定の細胞型に対して最適であり得る。例えば、約1から約3パルスの間のエレクトロポレーションは、ヒト細胞に対して最適であり得る(例えば、最大の生存率および/またはトランスフェクション効率を提供し得る)。

#### 【0372】

[00333]場合によっては、エレクトロポレーションの開始細胞密度を変えて、トランスフェクション効率および/または細胞生存率を最適化することができる。場合によっては、エレクトロポレーションの開始細胞密度は、約 $1 \times 10^5$ 細胞未満であり得る。場合によっては、エレクトロポレーションの開始細胞密度は、少なくとも約 $1 \times 10^5$ 細胞、少なくとも約 $2 \times 10^5$ 細胞、少なくとも約 $3 \times 10^5$ 細胞、少なくとも約 $4 \times 10^5$ 細胞、少なくとも約 $5 \times 10^5$ 細胞、少なくとも約 $6 \times 10^5$ 細胞、少なくとも約 $7 \times 10^5$ 細胞、少なくとも約 $8 \times 10^5$ 細胞、少なくとも約 $9 \times 10^5$ 細胞、少なくとも約 $1 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $1.5 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $2 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $2.5 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $3 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $3.5 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $4 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $4.5 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $5 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $5.5 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $6 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $6.5 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $7 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $7.5 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $8 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $8.5 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $9 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $9.5 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $1 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $1.2 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $1.4 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $1.6 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $1.8 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $2 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $2.2 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $2.4 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $2.6 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $2.8 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $3 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $3.2 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $3.4 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $3.6 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $3.8 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $4 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $4.2 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $4.4 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $4.6 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $4.8 \times 10^7$ 細胞、または少なくとも約 $5 \times 10^7$ 個の細胞であり得る。場合によっては、最適なトランスフェクション効率および/または細胞生存率に必要なとされるエレクトロポレーションの開始細胞密度は、細胞型に特異的であり得る。例えば、 $1.5 \times 10^6$ 細胞のエレクトロポレーションの開始細胞密度は、マクロファージ細胞に最適であり得る(例えば、最大の生存率および/またはトランスフェクション効率を提供し得る)。別の例では、 $5 \times 10^6$ 細胞のエレクトロポレーションの開始細胞密度は、ヒト細胞に最適であり得る(例えば、最大の生存率および/またはトランスフェクション効率を提供し得る)。場合によっては、エレクトロポレーションの開始細胞密度の範囲は、所定の細

胞型に最適であり得る。例えば、 $5.6 \times 10^6$  から  $5 \times 10^7$  の間のエレクトロポレーションの開始細胞密度は、T細胞などのヒト細胞に最適であり得る（例えば、最大の生存率および/またはトランスフェクション効率を提供し得る）。

【0373】

[00334] 外因性TCRをコードする核酸配列の、例えば、CRISPRシステムを用いた細胞のゲノムへの組み込み効率は、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、もしくは99.9%以上であり得るか、または約20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%、もしくは99.9%以上であり得る。

10

【0374】

[00335] TCRなどの外因性ポリ核酸の組み込みは、任意の技術を使用して測定することができる。例えば、組み込みは、フローサイトメトリー、サーベイヤーヌクレアーゼアッセイ、分解によるインデルの追跡（tracking of indels by decomposition）（TIDE）、ジャンクションPCR、またはそれらの任意の組み合わせによって測定することができる。代表的なTIDE分析は、PD-1およびCTLA-4ガイドRNAで示されるように、遺伝子編集効率パーセントで示される。他の場合、導入遺伝子の組み込みは、PCRによって測定することができる。TIDE分析はまた、AAV形質導入と、続く内因性チェックポイント遺伝子のCRISPRノックアウトによって外因性TCRを発現するように操作された細胞において行うことができる。

20

【0375】

[00336] エクスピボ細胞トランスフェクションはまた、診断、研究、または遺伝子治療に使用することができる（例えば、トランスフェクトされた細胞の宿主生物への再注入による）。場合によっては、細胞を対象生物から単離し、核酸（例えば、遺伝子またはcDNA）でトランスフェクトし、対象生物（例えば、対象）に戻し、再注入する。

【0376】

[00337] 対象において治療的に有効であるために必要であり得るCRISPRおよびAAV修飾された細胞の量は、細胞の生存率、および細胞が遺伝的に修飾された効率（例えば、導入遺伝子が1つ以上の細胞に組み込まれた効率）に依存して変化し得る。場合によっては、遺伝子修飾後の細胞の生存率と導入遺伝子の組み込み効率の積（例えば、乗算）は、対象への投与に利用可能な細胞の治療的アリコートに対応し得る。場合によっては、遺伝子改変後の細胞の生存率の増加は、投与が対象において治療的に有効であることが必要である細胞量の減少に対応し得る。場合によっては、導入遺伝子が1つ以上の細胞に組み込まれている効率の増加は、投与が対象において治療的に有効であることが必要である細胞量の減少に対応し得る。場合によっては、治療的に有効であることが必要とされる細胞量を決定することは、経時的な細胞の生存率の変化に対応する機能を決定することを含み得る。場合によっては、治療的に有効であることが必要な細胞の量を決定することは、時間依存変数（例えば、細胞培養時間、エレクトロポレーション時間、細胞刺激時間）に

30

40

【0377】

[00338] 本明細書に記載されるように、AAVなどのウイルス粒子を使用して、目的の遺伝子、または外因性TCRなどの導入遺伝子を含むウイルスベクターをエクスピボまたはインピボで細胞に送達することができる。一部の実施形態では、本明細書に開示される突然変異されたまたはキメラなアデノ随伴ウイルスベクターは、pfu（ブランク形成単位）として測定することができる。場合によっては、本開示の組成物および方法の組換えウイルスまたは突然変異されたもしくはキメラアデノ随伴ウイルスベクターのpfuは、約 $10^8$  ~ 約 $5 \times 10^{10}$  pfuであり得る。場合によって、本開示の組換えウイルスは

50

、少なくとも約  $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $4 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $6 \times 10^8$ 、 $7 \times 10^8$ 、 $8 \times 10^8$ 、 $9 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $4 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $2 \times 10^{10}$ 、 $3 \times 10^{10}$ 、 $4 \times 10^{10}$ 、および  $5 \times 10^{10}$  pfu である。場合によっては、本開示の組換えウイルスは、せいぜい約  $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $4 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $6 \times 10^8$ 、 $7 \times 10^8$ 、 $8 \times 10^8$ 、 $9 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $4 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $2 \times 10^{10}$ 、 $3 \times 10^{10}$ 、 $4 \times 10^{10}$ 、および  $5 \times 10^{10}$  pfu である。一部の態様では、本開示の突然変異されたまたはキメラなアデノ随伴ウイルスベクターは、ベクターゲノムとして測定することができる。場合によっては、本開示の組換えウイルスは、 $1 \times 10^{10} \sim 3 \times 10^{12}$  ベクターゲノム、または  $1 \times 10^9 \sim 3 \times 10^{13}$  ベクターゲノム、もしくは  $1 \times 10^8 \sim 3 \times 10^{14}$  ベクターゲノム、または少なくとも約  $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{15}$ 、 $1 \times 10^{16}$ 、 $1 \times 10^{17}$ 、および  $1 \times 10^{18}$  のベクターゲノムであるか、または  $1 \times 10^8 \sim 3 \times 10^{14}$  のベクターゲノム、もしくはせいぜい約  $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{14}$ 、 $1 \times 10^{15}$ 、 $1 \times 10^{16}$ 、 $1 \times 10^{17}$ 、および  $1 \times 10^{18}$  のベクターゲノムである。

10

20

#### 【0378】

[00339] 場合によっては、本開示の突然変異されたまたはキメラなアデノ随伴ウイルスベクターは、感染多重度 (MOI) を使用して測定することができる。場合によっては、MOI は、ベクターまたはウイルスゲノムの、核酸が送達され得る細胞に対する比率、または倍数を指すことができる。場合によっては、MOI は、 $1 \times 10^6$  GC/mL であり得る。場合によっては、MOI は、 $1 \times 10^5$  GC/mL から  $1 \times 10^7$  GC/mL であり得る。場合によっては、MOI は、 $1 \times 10^4$  GC/mL から  $1 \times 10^8$  GC/mL であり得る。場合によっては、本開示の組換えウイルスは、少なくとも約  $1 \times 10^1$  GC/mL、 $1 \times 10^2$  GC/mL、 $1 \times 10^3$  GC/mL、 $1 \times 10^4$  GC/mL、 $1 \times 10^5$  GC/mL、 $1 \times 10^6$  GC/mL、 $1 \times 10^7$  GC/mL、 $1 \times 10^8$  GC/mL、 $1 \times 10^9$  GC/mL、 $1 \times 10^{10}$  GC/mL、 $1 \times 10^{11}$  GC/mL、 $1 \times 10^{12}$  GC/mL、 $1 \times 10^{13}$  GC/mL、 $1 \times 10^{14}$  GC/mL、 $1 \times 10^{15}$  GC/mL、 $1 \times 10^{16}$  GC/mL、 $1 \times 10^{17}$  GC/mL、 $1 \times 10^{18}$  GC/mL の MOI である。場合によっては、本開示の突然変異されたまたはキメラアデノ随伴ウイルスは、約  $1 \times 10^8$  GC/mL ~ 約  $3 \times 10^{14}$  GC/mL の MOI であるか、またはせいぜい約  $1 \times 10^1$  GC/mL、 $1 \times 10^2$  GC/mL、 $1 \times 10^3$  GC/mL、 $1 \times 10^4$  GC/mL、 $1 \times 10^5$  GC/mL、 $1 \times 10^6$  GC/mL、 $1 \times 10^7$  GC/mL、 $1 \times 10^8$  GC/mL、 $1 \times 10^9$  GC/mL、 $1 \times 10^{10}$  GC/mL、 $1 \times 10^{11}$  GC/mL、 $1 \times 10^{12}$  GC/mL、 $1 \times 10^{13}$  GC/mL、 $1 \times 10^{14}$  GC/mL、 $1 \times 10^{15}$  GC/mL、 $1 \times 10^{16}$  GC/mL、 $1 \times 10^{17}$  GC/mL、および  $1 \times 10^{18}$  GC/mL の MOI である。場合によっては、本開示のウイルスベクターは、修飾されていないベクターと比較して、細胞の形質導入中により効果的であり、オフターゲット効果が低い場合がある。例えば、修飾されたウイルスの低い MOI は、同等の細胞に、修飾されていないベクターを形質導入する場合と比較して、オフターゲット導入遺伝子の挿入が少なくなる場合がある。

30

40

#### 【0379】

[00340] 一部の態様では、非ウイルスベクターまたは核酸は、突然変異されたまたはキメラなアデノ随伴ウイルスベクターを使用せずに送達され得、核酸の量に従って測定され得る。一般的に、任意の適切な量の核酸を本開示の組成物および方法とともに使用することができる。場合によっては、核酸は、少なくとも約 1 pg、10 pg、100 pg、1

50

pg、10 pg、100 pg、200 pg、300 pg、400 pg、500 pg、600 pg、700 pg、800 pg、900 pg、1 μg、10 μg、100 μg、200 μg、300 μg、400 μg、500 μg、600 μg、700 μg、800 μg、900 μg、1 ng、10 ng、100 ng、200 ng、300 ng、400 ng、500 ng、600 ng、700 ng、800 ng、900 ng、1 mg、10 mg、100 mg、200 mg、300 mg、400 mg、500 mg、600 mg、700 mg、800 mg、900 mg、1 g、2 g、3 g、4 g、または5 gであり得る。場合によっては、核酸は、せいぜい約1 pg、10 pg、100 pg、1 pg、10 pg、100 pg、200 pg、300 pg、400 pg、500 pg、600 pg、700 pg、800 pg、900 pg、1 μg、10 μg、100 μg、200 μg、300 μg、400 μg、500 μg、600 μg、700 μg、800 μg、900 μg、1 ng、10 ng、100 ng、200 ng、300 ng、400 ng、500 ng、600 ng、700 ng、800 ng、900 ng、1 mg、10 mg、100 mg、200 mg、300 mg、400 mg、500 mg、600 mg、700 mg、800 mg、900 mg、1 g、2 g、3 g、4 g、または5 gであり得る。

【0380】

[00341]移植前、移植後、および/または移植中の細胞（例えば、操作された細胞または操作された初代T細胞）は機能的であり得る。例えば、移植された細胞は、移植後の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、6、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100日間、または少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、6、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100日間、機能的であり得る。移植された細胞は、移植後の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12カ月間、または少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12カ月間、機能的であり得る。移植された細胞は、移植後の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、もしくは30年間、または少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、もしくは30年間、機能的であり得る。場合によっては、移植された細胞は、レシピエントの最大の寿命まで機能し得る。

【0381】

[00342]さらに、移植された細胞は、その通常の意図された動作の100%で機能することができる。移植された細胞はまた、その通常の意図された動作の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%で機能し得る。

【0382】

[00343]移植された細胞はまた、その通常の意図された動作の100%を超えて機能し得る。例えば、移植された細胞は、その通常の意図された動作の110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000またはそれ以上で機能し得る。

【0383】

[00344]1つ以上のサイトカインは、本発明の細胞とともに導入され得る。サイトカインは、細胞障害性Tリンパ球（養子移植された腫瘍特異的細胞傷害性Tリンパ球を含む）

をブーストして、腫瘍微小環境内で拡大するために利用することができる。場合によっては、IL-2を使用して、本明細書に記載される細胞の拡大を促進することができる。IL-15などのサイトカインはまた使用され得る。IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、またはそれらの任意の組み合わせなどの、免疫療法の分野における他の関連するサイトカインはまた利用することができる。

【0384】

[00345]場合において、IL-2は、細胞注入の24時間以内に投与を開始し、最大約4日間(最大12用量)を継続して投与することができる。場合によっては、IL-2は、初回の投与後、最大約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40日間投与することができる。

10

【0385】

[00346]IL-2の用量は、8時間ごとに投与することができる。場合によっては、IL-2は、初回の投与後、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24時間投与することができる。場合によっては、IL-2投薬は、毒性が検出された場合、停止させることができる。場合によっては、対照が、下痢、悪心、嘔吐、低血圧、皮膚の変化、食欲不振、粘膜炎、嚥下障害などのアルデスロイキンに共通する可逆的なグレード3の毒性を除いたアルデスロイキンによるグレード3もしくはグレード4の毒性に達した場合、または体質の症状および研究室が変更した場合、投薬を遅らせるかまた停止させることができる。場合によっては、これらの毒性が、支援措置によって24時間以内に簡単に回復され得る場合、追加の用量を与えることができる。さらに、投薬は、医師の裁量で保持または停止させることができる。

20

医薬組成物および製剤

[00347]全体にわたって記載される組成物は、薬学的な医薬に製剤化され得、それを必要とする、疾患、例えば癌と診断されたヒトまたは哺乳動物を治療するために使用することができる。これらの薬剤は、1つ以上の化学療法剤または化学療法化合物と併せて、1つ以上のT細胞(例えば、操作されたT細胞)とともにヒトまたは哺乳動物に同時に投与することができる。

30

【0386】

[00348]本明細書で使用される「化学療法剤」または「化学療法化合物」およびそれらの文法的同等物は、癌の治療に有用な化合物であり得る。開示されたT細胞と組み合わせることができる化学療法癌剤には、限定されないが、有糸分裂阻害剤(ピンカルカロイド)が含まれる。これらには、ピンクリスチン、ピンプラスチン、ピンデシン、およびナベルピン(Navelbine(商標))(ピノレルピン、5'-ノルアンヒドロプラスチン)が含まれる。さらに他の場合では、化学療法癌剤には、カンプトテシン化合物などのトポイソメラーゼI阻害剤が含まれる。本明細書で使用するとき、「カンプトテシン化合物」には、カンプトサル(Camptosar(商標))(イリノテカンHCL)、ハイカムチン(Hycamtin(商標))(トポテカンHCL)、ならびにカンプトテシンおよびその類似体由来する他の化合物が含まれる。本明細書に開示される方法および組成物で使用することができる化学療法癌剤の別のカテゴリーは、エトポシド、テニポシドおよびミトポドジドなどのポドフィロトキシン誘導体であり得る。本開示は、腫瘍細胞中の遺伝物質をアルキル化するアルキル化剤として公知である他の化学療法癌剤をさらに包含する。これらには、限定されないが、シスプラチン、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、トリメチレンチオホスホラミド、カルムスチン、プスルファン、クロラムブシル、ベラスチン、ウラシルマスタード、クロマファジン、およびダカルバジンが含まれる。本開示は、化学療法剤としての代謝拮抗剤を包含する。これらのタイプの薬剤の例には、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサート、メルカプトプリン、アザチオプライム、およびプロカルバジンが含まれる。本明細書に開示

40

50

される方法および組成物で使用方法を使用することができる化学療法癌剤の追加のカテゴリーには、抗生物質が含まれる。例としては、限定されないが、ドキソルビシン、プレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、マイトマイシンC、およびダウノマイシンが含まれる。これらの化合物に関して市販されている多くのリポソーム製剤がある。本開示は、限定されないが、抗腫瘍抗体、ダカルバジン、アザシチジン、アムサクリン、メルファラン、イホスファミドおよびミトキサントロンを含む他の化学療法癌剤をさらに包含する。

【0387】

[00349]本明細書に開示されるT細胞は、細胞傷害性/抗腫瘍剤および抗血管新生剤を含む他の抗腫瘍剤と組み合わせて投与することができる。細胞傷害性/抗腫瘍剤は、癌細胞を攻撃しおよび死滅させる薬剤として定義され得る。一部の細胞傷害性/抗腫瘍剤は、腫瘍細胞の遺伝物質をアルキル化するアルキル化剤であり得、例えば、シスプラチン、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、トリメチレンチオホスホラミド、カルムスチン、ブスルファン、クロラムブシル、ベラスチン、ウラシルマスタード、クロマファジン、およびダカバジンが挙げられる。他の細胞傷害性/抗腫瘍剤は、腫瘍細胞の代謝拮抗剤であり得、例えば、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサート、メルカプトプリン、アザチオプライム、およびプロカルバジンが挙げられる。他の細胞傷害性/抗腫瘍剤は、抗生物質であり得、例えば、ドキソルビシン、プレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、マイトマイシンC、およびダウノマイシンが挙げられる。これらの化合物に関して市販されている多数のリポソーム製剤がある。さらに他の細胞傷害性/抗腫瘍剤は、有糸分裂阻害剤(ピンカアルカロイド)であり得る。これらには、ピンクリスチン、ピンブラスチン、およびエトポシドが含まれる。様々な細胞傷害性/抗腫瘍剤には、タキソールおよびその誘導体、L-アスパラギナーゼ、抗腫瘍抗体、ダカルバジン、アザシチジン、アムサクリン、メルファラン、VM-26、イホスファミド、ミトキサントロン、およびビンデシンが含まれる。

【0388】

[00350]抗血管新生剤はまた使用され得る。開示された方法および組成物における使用に適した抗血管新生剤には、ヒト化抗体およびキメラ抗体を含む抗VEGF抗体、抗VEGFアプタマーおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。血管新生の他の阻害剤には、アンジオスタチン、エンドスタチン、インターフェロン、インターロイキン1(およびを含む)、インターロイキン12、レチノイン酸、ならびにメタロプロテイナーゼ-1および-2(TIMP-1および-2)の組織阻害剤が含まれる。抗血管新生活性を有するトポイソメラーゼII阻害剤であるラゾキサンのトポイソメラーゼを含む小分子も使用することができる。

【0389】

[00351]開示されたT細胞と組み合わせて使用することができる他の抗癌剤には、限定されないが、以下が含まれる:アシピシン;アクラルピシン;アコダゾール塩酸塩;アクロニン;アドゼレシン;アルデスロイキン;アルトレタミン;アンボマイシン;アメタントロン酢酸塩;アミノグルテチミド;アムサクリン;アナストロゾール;アントラマイシン;アスパラギナーゼ;アスペルリン;アバスチン;アザシチジン;アゼテパ;アゾトマイシン;パチマスタット;ベンゾデパ;ピカルタミド;ピサントレン塩酸塩;ビスナフィドジメシル酸塩;ピゼレシン;プレオマイシン硫酸塩;プレキナールナトリウム;プロピリミン;ブスルファン;カクチノマイシン;カルステロン;カラセミド;カーベタイマー;カルボプラチン;カルムスチン;カルピシン塩酸塩;カルゼレシン;セデフィンゴール;クロラムブシル;シロレマイシン;シスプラチン;クラドリピン;クリスナトールメシル酸塩;シクロホスファミド;シタラピン;ダカルバジン;ダクチノマイシン;ダウノルビシン塩酸塩;デシタピン;デキソルマプラチン;デザグアニン;デザグアニンメシル酸塩;ジアジコン;ドセタキセル;ドキソルビシン;ドキソルビシン塩酸塩;ドロロキシフェン;ドロロキシフェンクエン酸塩;ドロモスタノロンプロピオン酸塩;デュアゾマイシン;エダトレキサート;エフロルニチン塩酸塩;エルサミトルシン;エンロプラチン;エ

10

20

30

40

50

ンプロメート；エピプロピジン；エピルピシン塩酸塩；エルプロゾール；エソルピシン塩酸塩；エストラムスチン；エストラムスチンリン酸ナトリウム；エタニダゾール；エトポシド；エトポシドリン酸塩；エトプリン；ファドロゾール塩酸塩；ファザラビン；フェンレチニド；フロクスウリジン；フルダラビンリン酸塩；フルオロウラシル；フルロシタピン；フォスホキドン；フォストリシンナトリウム；ゲムシタピン；ゲムシタピン塩酸塩；ヒドロキシウレア；イダルピシン塩酸塩；イホスファミド；イルモフォシン；インターロイキン I I（組換えインターロイキン I I または r I L 2 を含む）、インターフェロナルファ - 2 a；インターフェロナルファ - 2 b；インターフェロナルファ - n 1；インターフェロナルファ - n 3；インターフェロンベータ - I a；インターフェロンガンマ - I b；イプロプラチン；イリノテカン塩酸塩；ランレオチド酢酸塩；レトロゾール；リュープロリド酢酸塩；リアロゾール塩酸塩；ロメトレキソールナトリウム；ロムスチン；ロソキサントロン塩酸塩；マソプロコール；カンタンシン；メクロレタミン塩酸塩；メゲストロール酢酸塩；メレンゲストロール酢酸塩；メルファラン；メノガリル；メルカプトプリン；メトトレキサート；メトトレキサートナトリウム；メトプリン；メツレデバ；ミチンドマイド；ミトカルシン；ミトクロミン；ミトギリン；ミトマルシン；マイトマイシン；ミトスペル；ミトタン；ミトキサントロン塩酸塩；ミコフェノール酸；ノコダゾール；ノガラマイシン；オルマブラチン；オキシスラン；バクリタキセル；ペガスバルガーゼ；ペリオマイシン；ペンタムスチン；ペプロマイシン硫酸塩；ペルホスファミド；ピボプロマン；ピボスルファン；ピロキサントロン塩酸塩；プリカマイシン；プロメスタン；ポルフィメルナトリウム；ポルフィロマイシン；プレドニムスチン；プロカルバジン塩酸塩；ピューロマイシン；ピューロマイシン塩酸塩；ピラゾフリン；リボプリン；ログレチミド；サフィンゴール；サフィンゴール塩酸塩；セムスチン；シムトラゼン；スパルフォセートナトリウム；スパルソマイシン；スピロゲルマニウム塩酸塩；スピロムスチン；スピロプラチン；ストレプトニグリン；ストレプトゾシン；スロフェヌル；タリソマイシン；テコガランナトリウム；テガフル；テロキサントロン塩酸塩；テモポルフィン；テニポシド；テロキシロン；テストラクトン；チアミプリン；チオグアニン；チオテバ；チアゾフリン；チラパザミン；トレミフェンクエン酸塩；トレストロン酢酸塩；トリシリピンリン酸塩；トリメトレキサート；トリメトレキサートグルクロン酸塩；トリプトレリン；ツプロゾール塩酸塩；ウラシルマスタード；ウレデバ；バブレオチド；ベルテポルフィン；ピンラスチン硫酸塩；ピンクリスチン硫酸塩；ピンデシン；ピンデシン硫酸塩；ピネピジン硫酸塩；ピングリシネート硫酸塩；ピンラウロシン硫酸塩；酒石酸ピノレルピン；ピンロシジン硫酸塩；ピンゾリジン硫酸塩；ヴォロゾール；ゼニプラチン；ジノスタチン；ゾルピシン塩酸塩。他の抗癌剤には、限定されないが、以下が含まれる：20 - エピ - 1，25ジヒドロキシビタミンD3；5 - エチニルウラシル；アピラテロン；アクラルピシン；アシルフルベン；アデシペノール；アドゼレシン；アルデスロイキン；A L L - T K アнтаゴニスト；アルトレタミン；アンバムスチン；アミドックス；アミフォスチン；アミノレプリン酸；アムルピシン；アムサクリン；アナグレリド；アナストロゾール；アンドログラフォライド；血管新生阻害剤；アンタゴニストD；アンタゴニストG；アンタレリクス；反背方化形態形成タンパク質 - 1；抗アンドロゲン、前立腺癌；抗エストロゲン；抗新生物；アンチセンスオリゴヌクレオチド；アフィジコリングリシン酸塩；アポトーシス遺伝子モジュレーター；アポトーシス調節因子；プリン酸；a r a - C D P - D L - P T B A；アルギニンデアミナーゼ；アスラクリン；アタメスタン；アトリムスチン；アキシナスタチン1；アキシナスタチン2；アキシナスタチン3；アザセトロン；アザトキシン；アザチロシン；バッカチン I I I 誘導体；バラノール；パチマスタット；B C R / A B L アнтаゴニスト；ベンゾクロリン；ベンゾイルスタウロスポリン；ベータ - ラクタム誘導体；ベータ - アレチン；ベータクラマイシンB；ベツリン酸；b F G F 阻害剤；ピカルタミド；ピサントレン；ピサジリジニルスペルミン；ピスナフィド；ピストラテンA；ピゼレシン；プレフレート；プロピリミン；ブドチタン；ブチオニンスルホキシミン；カルシポトリオール；カルフォスチンC；カンプトテシン誘導体；カナリボックス I L - 2；カベシタピン；カルボキサミド - アミノ - トリアゾール；カルボキシアミドトリア

10

20

30

40

50

ザール；CaRest M3；CARN 700；軟骨由来阻害剤；カルゼレシン；カゼ  
 インキナーゼ阻害剤（ICOS）；カスタノスペルミン；セクロピンB；セトロレリクス  
 ；クロリンス；クロロキノキサリンスルホンアミド；シカプロスト；シス-ポルフィリン  
 ；クラドリピン；クロミフェン類似体；クロトリマゾール；コリスマイシンA；コリスマ  
 イシンB；コンプレタスタチンA4；コンプレタスタチン類似体；コナゲニン；クランベ  
 シジン816；クリスナトール；クリプトフィシン8；クリプトフィシンA誘導體；キュ  
 ラシンA；シクロペンタントラキノン；シクロプラタム；シペマイシン；シタラピンオク  
 ホスファート；細胞溶解因子；サイトスタチン；ダクリキシマブ；デシタピン；デヒドロ  
 ジデムニンB；デスロレリン；デキサメタゾン；デキシホスファミド；デクスラゾキサ  
 ン；デクスベラパミル；ジアジコン；ジデムニンB；ジドックス；ジエチルノルスペルミン  
 ；ジヒドロ-5-アザシチジン；ジヒドロタキソール、9-；ジオキサマイシン；ジフェ  
 ニルスピロムスチン；ドセタキセル；ドコサノール；ドラセトロン；ドキシフルリジン；  
 ドロロキシフェン；ドロナビノール；デュオカルマイシンSA；エブセレン；エコムスチ  
 ン；エデルフォシン；エドレコロマブ；エフロルニチン；エレメン；エミテフル；エビ  
 ルピシン；エプリステリド；エストラムスチン類似体；エストロゲンアゴニスト；エスト  
 ロゲンアンタゴニスト；エタニダゾール；エトポシドリン酸塩；エキセメスタン；ファド  
 ロゾール；ファザラピン；フェンレチニド；フィルグラスチム；フィナステリド；フラボ  
 ピリドール；フレゼラスチン；フルアステロン；フルダラピン；フルオロダウノルニシン  
 塩酸塩；フォルフェニメックス；フォルメスタン；フォストリエシン；フォテムスチン；  
 ガドリニウムテキサフィリン；ガリウム硝酸塩；ガロシタピン；ガニレリクス；ゼラチナ  
 ーゼ阻害剤；ゲムシタピン；グルタチオン阻害剤；ヘプスルファム；ヘレグリン；ヘキサ  
 メチレンビスアセトアミド；ヒペリシン；イバンドロン酸；イダルピシン；イドキシフェ  
 ン；イドラマントン；イルモフォシン；イロマスタット；イミダゾアクリドン；イミキモ  
 ド；免疫刺激ペプチド；インスリン様増殖因子-1受容体阻害剤；インターフェロンアゴ  
 ニスト；インターフェロン；インターロイキン；イオベングアン；ヨードキシソルピシン  
 ；イボメアノール、4-；イロブラクト；イルソグラジン；イソベンガゾール；イソホモ  
 ハリコンドリンB；イタセトロン；ジャスブラキノリド；カハラリドF；ラメラリン-N  
 トリアセテート；ランレオチド；レイナマイシン；レノグラスチム；レンチナン硫酸塩；  
 レプトルスタチン；レトロゾール；白血病抑制因子；白血球アルファインターフェロン；  
 リュープロリド+エストロゲン+プロゲステロン；リュープロレリン；レバミソール；リ  
 アロゾール；線状ポリアミン類似体；親油性二糖ペプチド；親油性白金化合物；リソクリ  
 ンアミド7；ロバプラチン；ロンプリシン；ロメトレキソール；ロニダミン；ロソキサ  
 ントロン；ロバスタチン；ロキシリピン；ルルトテカン；ルテチウムテキサフィリン；リソ  
 フィリン；溶解性ペプチド；マイタンシン；マンノスタチンA；マリマスタット；マソプ  
 ロコール；マスピン；マトリライシン阻害剤；マトリックスメタロプロテインナーゼ阻害剤  
 ；メノガリル；メルパロン；メテリン；メチオニナーゼ；メトクロプラミド；MIF阻害  
 剤；ミフェプリストン；ミルテフォシン；ミリモスチン；ミスマッチの二本鎖RNA；ミ  
 トグアゾン；ミトララクトール；マイトマイシン類似体；ミトナフィド；マイトトキシ  
 ン  
 線維芽細胞増殖長因子-サポリン；ミトキサントロン；モファロテン；モルグラモスチム  
 ；モノクローナル抗体、ヒト絨毛性ゴナドトロピン；モノホスホリルリピドA+ミオバク  
 テリア細胞壁s k；モピダモール；多剤耐性遺伝子阻害剤；複数の腫瘍抑制因子1ベース  
 の治療剤；マスタード抗癌剤；ミカペロキシドB；マイコバクテリア細胞壁抽出物；ミリ  
 アポロン；N-アセチルジナリン；N-置換ベンズアミド；ナファレリン；ナグレスチブ  
 ；ナロキソン+ペンタゾシン；ナパピン；ナフテルピン；ナルトグラスチム；ネダプラチ  
 ン；ネモルピシン；ネリドロロン酸；中性エンドペプチダーゼ；ニルタミド；ニサマイシン  
 ；一酸化窒素モジュレーター；ニトロキシド酸化防止剤；ニトロリン；O6-ベンジルグ  
 アニン；オクトレオチド；オキセノン；オリゴヌクレオチド；オナプリストン；オندان  
 セトロン；オندانセトロン；オラシン；経口サイトカイン誘導剤；オルマプラチン；オ  
 サテロン；オキサリプラチン；オキサウノマイシン；パクリタキセル；パクリタキセル類  
 似体；パクリタキセル誘導體；パラウアミン；バルミトイルリゾキシシン；パミドロロン酸；

10

20

30

40

50

パナキシトリオール；パノミフェン；パラバクチン；パゼリブチン；ペガスパルガーゼ；  
 ペルデシン；ペントサンポリ硫酸ナトリウム；ペントスタチン；ペントロゾール；パー  
 ブロン；ペルホスファミド；ペリリルアルコール；フェナジノマイシン；フェニルアセ  
 テート；ホスファターゼ阻害剤；ピシバニル；ピロカルピン塩酸塩；ピラルピシン；ピリ  
 トレキシム；プラセチンA；プラセチンB；プラスミノゲン活性化因子阻害剤；白金錯  
 体；白金化合物；白金-トリアミン錯体；ポルフィマーナトリウム；ポルフィロマイシン  
 ；ブレドニゾン；プロピルビスアクリドン；プロスタグランジンJ2；プロテアソーム阻  
 害剤；プロテインAベースの免疫モジュレーター；プロテインキナーゼC阻害剤；プロテ  
 インキナーゼC阻害剤、微細藻類；プロテインチロシンホスファターゼ阻害剤；プリンヌ  
 クレオシドホスホリラーゼ阻害剤；ブルプリン；ピラゾロアクリジン；ピリドキシル化ヘ  
 モグロビンポリオキシエチレンコンジュゲート；rafアンタゴニスト；ラルチトレキセ  
 ド；ラモセトロン；rasファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤；ras阻  
 害剤；ras-GAP阻害剤；レトリブチン脱メチル化；  
 レニウムRe 186エチドロネート；リゾキシム；リボザイム；RIIレチンアミド；  
 ログレチミド；ロヒツカイン；ロムルチド；ロキニメックス；ルビジノンB1；ルボキシ  
 ル；サフィンゴール；サントピン；SarCNU；サルコフィトールA；サルグラモステ  
 イム；Sdi 1模倣物；セムスチン；老化由来阻害剤1；センスオリゴヌクレオチド；  
 シグナル伝達阻害剤；シグナル伝達変調器；単鎖抗原結合タンパク質；シゾフィラン；ソ  
 ブゾキサム；ボロカブテン酸ナトリウム；フェニル酢酸ナトリウム；ソルベロール；ソマ  
 トメジン結合タンパク質；ソネルミン；スパルフォス酸；スピカマイシンD；スピロムス  
 チン；スプレノペンチン；スポンギスタチン1；スクアラミン；幹細胞阻害剤；幹細胞分  
 裂阻害剤；スチピアミド；ストロメリシン阻害剤；スルフィノシン；超活性血管作用性腸  
 管ペプチドアンタゴニスト；スラディスタ；スラミン；スワインソニン；合成グリコサミ  
 ノグリカン；タリムスチン；タモキシフェンメチオジド；タウロムスチン；タザロテン；  
 テコガランナトリウム；テガフル；テルラピリウム；テロメラーゼ阻害剤；テモボル  
 フィン；テモゾロミド；テニボシド；テトラクロロデカオキシド；テトラゾミン；タリブ  
 ラスチン；チオコラリン；トロンボポエチン；トロンボポエチン模倣薬；チマルファシ  
 ン；チモポエチン受容体アゴニスト；チモトリナン；甲状腺刺激ホルモン；エチルエチオブ  
 ルプリン錫；チラパザミン；チタノセンビクロライド；トップセンチン；トレミフェン；  
 全能性幹細胞因子；翻訳阻害剤；トレチノイン；トリアセチルウリジン；トリシリピン；  
 トリメトレキサート；トリプトレリン；トロピセトロン；ツロステリド；チロシンキナー  
 ゼ阻害剤；チルホスチン；UBC阻害剤；ウベニメクス；泌尿生殖洞由来の増殖阻害因子  
 ；ウロキナーゼ受容体拮抗薬；バプレオチド；バリオリンB；ベクターシステム、赤血球  
 遺伝子治療；ベラレソール；ベラミン；ベルジン；ベルテボルフィン；ビノレルピン；ピン  
 サルチン；ピタキシム；ヴォロゾール；ザノテロン；ゼニプラチン；ジラスコルブ；およ  
 びジノスタチン刺激因子。一実施形態では、抗癌薬は、5-フルオロウラシル、タキソ  
 ル、またはロイコボリンである。

10

20

30

#### 【0390】

[00352]場合によっては、例えば、癌を治療するための組成物、製剤および方法におい  
 て、投与される組成物または製剤の単位投薬量は、5、10、15、20、25、30、  
 35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または  
 100mgであり得る。場合によっては、投与される組成物または製剤の総量は、0.  
 1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、  
 2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.  
 5、9、9.5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20  
 、25、30、40、50、60、70、80、90、または100gであり得る。

40

#### 【0391】

[00353]場合によっては、本発明は、単独で、または医薬的に許容される担体もしくは  
 賦形剤とともに、任意の経路で投与し得る、T細胞を含む医薬組成物を提供し、このよ  
 うな投与は、単回および複数回投与の両方で実施することができる。より詳細には、医薬組

50

成物は、錠剤、カプセル、ロゼンジ、トローチ、ハンドキャンディー、粉末、スプレー、水性懸濁液、注射液、エリキシル剤、シロップなどの形態で、様々な薬学的に許容される不活性担体と組み合わせることができる。このような担体には、固体希釈剤または充填剤、滅菌水性媒体および様々な非毒性有機溶媒などが含まれる。さらに、このような経口医薬製剤は、このような目的に通常使用されるタイプの様々な薬剤によって適切に甘味および/または風味を付けることができる。

### 【0392】

[00354]例えば、CRISPRおよびAAV修飾された細胞は、限定されないが、抗ウイルス療法、シドフォビル、およびインターロイキン-2、またはシタラビン（ARA-Cとしても公知である）などの薬剤による治療を含む、任意の数の関連する治療法と併せて（例えば、その前、それと同時、またはその後）対象に投与することができる。場合によっては、操作された細胞は、化学療法、放射線、免疫抑制剤、例えば、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸、FK506、抗体、または他の免疫アブレーション（immunoblastic）剤、例えば、CAMPATH、抗CD3抗体もしくは他の抗体療法、サイトキシン、フルダリビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコプリエノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカイン、および照射と組み合わせて使用することができる。また、操作された細胞組成物は、骨髄移植、フルダラビンなどの化学療法剤、外部ビーム放射線療法（XRT）、シクロホスファミド、または抗体、例えば、OKT3もしくはCAMPATHのいずれかを使用したT細胞アブレーション療法と併せて（例えば、その前に、それと同時またはその後）対象に投与することができる。場合によっては、本発明の操作された細胞組成物は、CD20と反応する薬剤、例えば、リツキサンなどのB細胞アブレーション療法後に投与することができる。例えば、対象は、高用量化学療法、それに続く末梢血幹細胞移植による標準治療を受けることができる。特定の場合では、移植後、対象は、本発明の操作された細胞、例えば、拡大された操作された細胞の注入を受けることができる。さらに、拡大されたCRISPRおよびAAV修飾された細胞は、手術の前または後に投与することができる。本明細書に記載される方法のいずれか1つによって得られた操作された細胞は、宿主対移植片（HvG）拒絶および移植片対宿主病（GvHD）に対して、それを必要とする対象を治療するための本発明の特定の態様において使用することができる。したがって、不活性化TCRアルファおよび/またはTCRベータ遺伝子を含む有効量の操作された細胞を対象に投与することにより対象を治療することを含む、宿主対移植片（HvG）拒絶および移植片対宿主病（GvHD）に対してそれを必要とする対象を治療する方法が意図される。

### 【0393】

[00355]場合によっては、免疫介在性の操作された細胞拒絶を最小限に抑えるためにリンパ球の減少を行うことができる。例えば、対象をシクロホスファミド（Cy）で治療した後、フルダラビン（Flu）リンパ球減少治療を行うことができる。Cyなどの化学療法剤の用量は、約1mg/kgから約200mg/kgであり得る。Cyの用量は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190から最大約200mg/kgの対象であり得る。あるいは、Cy治療の例示的な用量およびレジメンは、1~3日間、好ましくは1~2日間、約0.5~5g/m<sup>2</sup>/日、好ましくは0.6~3g/m<sup>2</sup>/日、より好ましくは1~2g/m<sup>2</sup>/日であり得る。

### 【0394】

【00356】インフルエンザの用量は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190から最大約200mg/m<sup>2</sup>の対象であり得る。あるいは、フルダラビン治療の例示的な用量およびレジメンは、2~10、3~8、または4、5、6、または7日間、約20~80mg/m<sup>2</sup>/日、好ましくは25~70mg/m<sup>2</sup>/日または25~30mg/m<sup>2</sup>/日であり得る。

10

## 【0395】

【00357】場合によっては、CyおよびFluの併用を適用することができる。例えば、2~8日または3~6日間の約10~60mg/m<sup>2</sup>/日または15~50mg/m<sup>2</sup>/日または20~30mg/m<sup>2</sup>/日の範囲のFluの初回用量は、その後、1~5または2~3日間の約0.2~1mg/m<sup>2</sup>/日または0.3~0.8mg/m<sup>2</sup>/日または0.4~0.6mg/m<sup>2</sup>/日の量のCyが続く。

## 【0396】

【00358】本明細書に記載されるように、細胞をヒトから抽出することができる。細胞はエクスピドで遺伝的に変更され、それに応じて使用することができる。これらの細胞は、細胞ベースの治療に使用することができる。これらの細胞は、レシピエント（例えば、ヒト）の病気を治療するために使用することができる。例えば、これらの細胞は、癌の治療に使用することができる。

20

## 【0397】

【00359】本明細書には、操作された細胞を含む1つ以上の細胞（臓器および/または組織を含む）をレシピエントに移植するステップを含む、レシピエントにおける疾患（例えば、癌）を治療する方法が記載される。細胞内ゲノム移植によって調製された細胞は、癌の治療に使用することができる。

## 【0398】

【00360】本明細書には、レシピエントに1つ以上のCRISPRおよびAAV修飾された細胞（臓器および/または組織を含む）を移植するステップを含む、レシピエントにおける疾患（例えば、癌）を治療する方法が記載される。一般的に、本明細書に記載されるCRISPRおよびAAV修飾された細胞は、CD3 TCR複合体関連シグナルを刺激することができる薬剤と、T細胞の表面上の共刺激分子を刺激することができるリガンドとが付着している表面との接触により拡大され得る。特に、T細胞集団は、表面上に固定化された抗CD3抗体もしくはその抗原結合断片または抗CD2抗体との接触によって、あるいはプロテインキナーゼC活性化因子（例えば、プリオスタチン）（時にはカルシウムイオノフォアと組み合わせて）との接触などによって、インビトロで刺激することができる。CRISPRおよびAAV修飾された細胞の表面上のアクセサリ分子の共刺激について、アクセサリ分子に結合するリガンドを使用することができる。例えば、T細胞の増殖を刺激することができる条件下で、T細胞の集団を抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させることができる。場合によっては、4-1BBを使用して細胞を刺激することができる。例えば、細胞は、4-1BBおよびIL-21または別のサイトカインで刺激することができる。場合によっては、 $5 \times 10^{10}$ 個の細胞が対象に投与される。他の場合には、 $5 \times 10^{11}$ 個の細胞が対象に投与される。

30

40

## 【0399】

【00361】一部の実施形態では、約 $5 \times 10^{10}$ 個の細胞が対象に投与される。一部の実施形態では、約 $5 \times 10^{10}$ 個の細胞は、対象に投与される細胞の量の中央値を表す。一部の実施形態では、約 $5 \times 10^{10}$ 個の細胞が、対象の治療反応に影響を及ぼすのに必要

50

とされる。一部の実施形態では、少なくとも約  $1 \times 10^7$  細胞、少なくとも約  $2 \times 10^7$  細胞、少なくとも約  $3 \times 10^7$  細胞、少なくとも約  $4 \times 10^7$  細胞、少なくとも約  $5 \times 10^7$  細胞、少なくとも約  $6 \times 10^7$  細胞、少なくとも約  $6 \times 10^7$  細胞、少なくとも約  $8 \times 10^7$  細胞、少なくとも約  $9 \times 10^7$  細胞、少なくとも約  $1 \times 10^8$  細胞、少なくとも約  $2 \times 10^8$  細胞、少なくとも約  $3 \times 10^8$  細胞、少なくとも約  $4 \times 10^8$  細胞、少なくとも約  $5 \times 10^8$  細胞、少なくとも約  $6 \times 10^8$  細胞、少なくとも約  $6 \times 10^8$  細胞、少なくとも約  $8 \times 10^8$  細胞、少なくとも約  $9 \times 10^8$  細胞、少なくとも約  $1 \times 10^9$  細胞、少なくとも約  $2 \times 10^9$  細胞、少なくとも約  $3 \times 10^9$  細胞、少なくとも約  $4 \times 10^9$  細胞、少なくとも約  $5 \times 10^9$  細胞、少なくとも約  $6 \times 10^9$  細胞、少なくとも約  $6 \times 10^9$  細胞、少なくとも約  $8 \times 10^9$  細胞、少なくとも約  $9 \times 10^9$  細胞、少なくとも約  $1 \times 10^{10}$  細胞、少なくとも約  $2 \times 10^{10}$  細胞、少なくとも約  $3 \times 10^{10}$  細胞、少なくとも約  $4 \times 10^{10}$  細胞、少なくとも約  $5 \times 10^{10}$  細胞、少なくとも約  $6 \times 10^{10}$  細胞、少なくとも約  $8 \times 10^{10}$  細胞、少なくとも約  $9 \times 10^{10}$  細胞、少なくとも約  $1 \times 10^{11}$  細胞、少なくとも約  $2 \times 10^{11}$  細胞、少なくとも約  $3 \times 10^{11}$  細胞、少なくとも約  $4 \times 10^{11}$  細胞、少なくとも約  $5 \times 10^{11}$  細胞、少なくとも約  $6 \times 10^{11}$  細胞、少なくとも約  $6 \times 10^{11}$  細胞、少なくとも約  $8 \times 10^{11}$  細胞、少なくとも約  $9 \times 10^{11}$  細胞、または少なくとも約  $1 \times 10^{12}$  細胞。例えば、約  $5 \times 10^{10}$  個の細胞が対象に投与され得る。別の例では、 $3 \times 10^6$  個の細胞から開始して、細胞は、約  $5 \times 10^{10}$  個の細胞に拡大し、対象に投与され得る。場合によっては、細胞は、治療に十分な数に拡大される。例えば、 $5 \times 10^7$  個の細胞は、急速に拡大されて、治療使用に十分な数を生成され得る。場合によっては、治療使用に十分な数は  $5 \times 10^{10}$  個であり得る。任意の数の細胞を治療使用に注入することができる。例えば、 $1 \times 10^6$  個以上  $5 \times 10^{12}$  個以下の数の細胞を対象に注入することができる。対象は、それらのために生成され得る、できる限り多数の細胞を注入することができる。場合によっては、対象に注入される細胞はすべて、操作されているわけではない。例えば、対象に注入される細胞の少なくとも 90% を操作することができる。他の例では、対象に注入される細胞の少なくとも 40% を操作することができる。

#### 【0400】

[00362] 一部の実施形態では、本開示の方法は、対象の治療応答に影響を与えるのに必要な CRISPR および AAV 修飾された細胞の量を計算し、および / または対象に投与することを含む。一部の実施形態では、治療応答に影響を与えるのに必要な操作された細胞の量の計算には、細胞の生存率、および / または導入遺伝子が細胞のゲノムに組み込まれた効率が含まれる。一部の実施形態では、対象の治療応答に影響を与えるために、対象に投与することができる CRISPR および AAV 修飾された細胞は生存可能であり得る。一部の実施形態では、対象において治療応答をもたらすために、少なくとも約 95%、少なくとも約 90%、少なくとも約 85%、少なくとも約 80%、少なくとも約 75%、少なくとも約 70%、少なくとも約 65%、少なくとも約 60%、少なくとも約 55%、少なくとも約 50%、少なくとも約 45%、少なくとも約 40%、少なくとも約 35%、少なくとも約 30%、少なくとも約 25%、少なくとも約 20%、少なくとも約 15%、少なくとも約 10% の細胞が生存細胞である。一部の実施形態では、対象の治療応答に影響を及ぼすために、対象に投与される CRISPR および AAV 修飾された細胞は、細胞のゲノムに首尾よく組み込まれた、外因性 TCR などの 1 つ以上の導入遺伝子を有する細胞であり得る。一部の実施形態では、対象において治療応答をもたらすために、少なくとも約 95%、少なくとも約 90%、少なくとも約 85%、少なくとも約 80%、少なくとも約 75%、少なくとも約 70%、少なくとも約 65%、少なくとも約 60%、少なくとも約 55%、少なくとも約 50%、少なくとも約 45%、少なくとも約 40%、少なくとも約 35%、少なくとも約 30%、少なくとも約 25%、少なくとも約 20%、少なくとも約 15%、少なくとも約 10% の細胞が、細胞のゲノムに首尾よく組み込まれた 1 つ以上の導入遺伝子を有していた。

#### 【0401】

[00363]本明細書に開示される方法は、外因性TCRをコードするCRISPRおよびAAV修飾された細胞を、それを必要とする対象に投与することにより、疾患、例えば、限定されないが、癌、心血管疾患、肺疾患、肝臓疾患、皮膚疾患、または神経疾患の治療または予防に使用することができる。

#### 【0402】

[00364]移植は、任意のタイプの移植によるものであり得る。部位は、限定されないが、肝嚢下腔、脾嚢下腔、腎被膜下腔、大網、胃もしくは腸の粘膜下層、小腸の血管部分、静脈嚢、精巣、脳、脾臓、または角膜を含み得る。例えば、移植は、嚢下移植であり得る。移植はまた、筋肉内移植であり得る。移植は、門脈内移植であり得る。

#### 【0403】

[00365]移植は、ヒト由来の1つ以上の細胞のものであり得る。例えば、1つ以上の細胞は、臓器由来であり得、臓器には、脳、心臓、肺、目、胃、膵臓、腎臓、肝臓、腸、子宮、膀胱、皮膚、毛髪、爪、耳、腺、鼻、口、唇、脾臓、歯茎、歯、舌、唾液腺、扁桃、咽頭、食道、大腸、小腸、直腸、肛門、甲状腺、胸腺、骨、軟骨、腱、靭帯、腎上体、骨格筋、平滑筋、血管、血液、脊髄、気管、尿管、尿道、視床下部、下垂体、幽門、副腎、卵巣、卵管、子宮、膈、乳腺、精巣、精嚢、陰茎、リンパ、リンパ節またはリンパ管が含まれ得る。1つ以上の細胞はまた、脳、心臓、肝臓、皮膚、腸、肺、腎臓、目、小腸、または膵臓に由来し得る。1つ以上の細胞は、膵臓、腎臓、目、肝臓、小腸、肺、または心臓に由来し得る。1つ以上の細胞は、膵臓由来であり得る。1つ以上の細胞は、膵島細胞、例えば、膵細胞であり得る。1つ以上の細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)、リンパ球、単球またはマクロファージなどの任意の血液細胞であり得る。1つ以上の細胞は、リンパ球、B細胞、T細胞などの任意の免疫細胞であり得る。

#### 【0404】

[00366]本明細書に開示される方法はまた、1つ以上の細胞を移植することを含むことができ、1つ以上の細胞は、任意のタイプの細胞であり得る。例えば、1つ以上の細胞は、上皮細胞、線維芽細胞、神経細胞、ケラチノサイト、造血細胞、メラニン細胞、軟骨細胞、リンパ球(BおよびT)、マクロファージ、単球、単核細胞、心筋細胞、他の筋肉細胞、顆粒膜細胞、卵丘細胞、表皮細胞、内皮細胞、膵島細胞、血液細胞、血液前駆細胞、骨細胞、骨前駆細胞、神経幹細胞、始原幹細胞、肝細胞、ケラチノサイト、臍静脈内皮細胞、大動脈内皮細胞、微小血管内皮細胞、線維芽細胞、肝星細胞、大動脈平滑筋細胞、心筋細胞、ニューロン、クッパー細胞、平滑筋細胞、シュワン細胞、および上皮細胞、赤血球、血小板、好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、脂肪細胞、軟骨細胞、膵島細胞、甲状腺細胞、副甲状腺細胞、耳下腺細胞、腫瘍細胞、グリア細胞、星状細胞、赤血球、白血球細胞、マクロファージ、上皮細胞、体細胞、下垂体細胞、副腎細胞、有毛細胞、膀胱細胞、腎臓細胞、網膜細胞、桿体細胞、錐体細胞、心臓細胞、ペースメーカー細胞、脾臓細胞、抗原提示細胞、記憶細胞、T細胞、B細胞、形質細胞、筋肉細胞、卵巣細胞、子宮細胞、前立腺細胞、膈上皮細胞、精子細胞、精巣細胞、生殖細胞、卵細胞、ライディッヒ細胞、尿管周囲細胞、セルトリ細胞、ルテイン細胞、子宮頸部細胞、子宮内膜細胞、乳腺細胞、卵胞細胞、粘液細胞、繊毛細胞、非角化上皮細胞、角化上皮細胞、肺細胞、杯細胞、円柱上皮細胞、ドーパミン作動性細胞、扁平上皮細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、ドーパミン作動性細胞、胚性幹細胞、線維芽細胞および胎児線維芽細胞であり得る。さらに、1つ以上の細胞は、限定されないが、膵臓細胞、膵臓細胞、膵臓細胞、膵臓F細胞(例えば、PP細胞)、または膵臓細胞を含む、膵島細胞および/または細胞クラスターなどであり得る。一例では、1つ以上の細胞は、膵臓細胞であり得る。別の例では、1つ以上の細胞は、膵臓細胞であり得る。

#### 【0405】

[00367]ドナーは、限定されないが、胎児、新生児、若年および成人などの任意の発達段階にあり得る。例えば、ドナーT細胞は成人から分離することができる。ドナーのヒトT細胞は、10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1歳未満であり得る。例えば、T細胞はまた、6歳未満のヒトから分離することができる。T細胞はまた、3歳未満の

10

20

30

40

50

ヒトから分離することができる。ドナーは10歳を超えることができる。  
キット

[00368]本明細書では、組成物を含むキットが開示され得る。また、本明細書には、癌、病原体感染、免疫障害もしくは同種異系移植の治療または予防用のキットが開示され得る。一実施形態では、キットは、有効量のCRISPRおよびAAV修飾された細胞の組成物を単位剤形で含む、治療用または予防用の組成物を含むことができる。一部の実施形態では、キットは、操作されたT細胞の治療組成物を含むことができる滅菌容器を含む。このような容器は、ボックス、アンプル、ボトル、バイアル、チューブ、バッグ、ポーチ、プリスターパック、または当該技術分野において公知である他の適切な容器形態であり得る。このような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネートペーパー、金属箔、または薬剤を保持するのに適した他の材料で作製することができる。場合によっては、CRISPRおよびAAV修飾された細胞は、癌、病原体感染、免疫障害もしくは同種異系移植を有するかまたは発症するリスクのある対象に細胞を投与するための説明書とともに提供することができる。説明書には、一般的に、癌、病原体感染、免疫障害、もしくは同種異系移植の治療または予防のための組成物の使用に関する情報を含めることができる。場合によっては、キットには、約 $1 \times 10^4$ 細胞から約 $1 \times 10^{12}$ 細胞を含めることができる。場合によっては、キットは、少なくとも約 $1 \times 10^5$ 細胞、少なくとも約 $1 \times 10^6$ 細胞、少なくとも約 $1 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $4 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $5 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $6 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $6 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $8 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $9 \times 10^7$ 細胞、少なくとも約 $1 \times 10^8$ 細胞、少なくとも約 $2 \times 10^8$ 細胞、少なくとも約 $3 \times 10^8$ 細胞、少なくとも約 $4 \times 10^8$ 細胞、少なくとも約 $5 \times 10^8$ 細胞、少なくとも約 $6 \times 10^8$ 細胞、少なくとも約 $6 \times 10^8$ 細胞、少なくとも約 $8 \times 10^8$ 細胞、少なくとも約 $9 \times 10^8$ 細胞、少なくとも約 $1 \times 10^9$ 細胞、少なくとも約 $2 \times 10^9$ 細胞、少なくとも約 $3 \times 10^9$ 細胞、少なくとも約 $4 \times 10^9$ 細胞、少なくとも約 $5 \times 10^9$ 細胞、少なくとも約 $6 \times 10^9$ 細胞、少なくとも約 $6 \times 10^9$ 細胞、少なくとも約 $8 \times 10^9$ 細胞、少なくとも約 $9 \times 10^9$ 細胞、少なくとも約 $1 \times 10^{10}$ 細胞、少なくとも約 $2 \times 10^{10}$ 細胞、少なくとも約 $3 \times 10^{10}$ 細胞、少なくとも約 $4 \times 10^{10}$ 細胞、少なくとも約 $5 \times 10^{10}$ 細胞、少なくとも約 $6 \times 10^{10}$ 細胞、少なくとも約 $8 \times 10^{10}$ 細胞、少なくとも約 $9 \times 10^{10}$ 細胞、少なくとも約 $1 \times 10^{11}$ 細胞、少なくとも約 $2 \times 10^{11}$ 細胞、少なくとも約 $3 \times 10^{11}$ 細胞、少なくとも約 $4 \times 10^{11}$ 細胞、少なくとも約 $5 \times 10^{11}$ 細胞、少なくとも約 $6 \times 10^{11}$ 細胞、少なくとも約 $8 \times 10^{11}$ 細胞、少なくとも約 $9 \times 10^{11}$ 細胞、または少なくとも約 $1 \times 10^{12}$ 細胞を含むことができる。例えば、約 $5 \times 10^{10}$ 細胞をキットに含めることができる。別の例では、キットには、 $3 \times 10^6$ 細胞を含めることができる。細胞は、約 $5 \times 10^{10}$ 細胞に拡大され、対象に投与することができる。

#### 【0406】

[00369]場合によっては、キットは、同種異系細胞を含むことができる。場合によっては、キットは、ゲノム修飾を含み得る細胞を含むことができる。場合によっては、キットは、「既製の」細胞を含むことができる。場合によっては、キットは、臨床用に拡大し得る細胞を含むことができる。場合によっては、キットは、研究目的のコンテンツを含めることができる。

#### 【0407】

[00370]場合によっては、指示書は、以下の少なくとも1つを含む：治療薬の説明；新生物、病原体感染、免疫障害もしくは同種異系移植またはそれらの症状の治療または予防のための投薬スケジュールおよび投与；注意事項；警告；適応症；対抗適用；過剰摂取情報；副作用；動物薬理学；臨床研究；および/または参考文献。指示書は、直接容器に（存在する場合）、容器に貼付されるラベルとして、または容器にもしくは容器内に供給される別のシート、パンフレット、カード、もしくはフォルダとして印刷することができる。場合によっては、指示書は、化学療法剤の投与後、少なくとも約1、2、3、4、5、

6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30日目、または最大2日、3日、4日、5日、6日、もしくは7日間、CRISPRおよびAAV修飾された細胞を投与する手順を提供する。場合によっては、説明書は、化学療法薬の投与後の少なくとも24時間に、操作されたT細胞を投与する手順を提供する。CRISPRおよびAAV修飾された細胞は、静脈内注射用に製剤化することができる。CRISPRおよびAAV修飾された細胞は、注入用に製剤化することができる。場合によっては、キットは、小児用量の製品を含めることができる。

【実施例】

【0408】

10

実施例1

ヒトT細胞のAAV/CRISPRゲノム修飾

3日目：回復および刺激

[00371] 10%ヒト血清をX-VIVO15培地に添加し、37℃で予め加温した。ヒトPBMCを水浴中で解凍した。解凍後すぐに、細胞を再懸濁し、300gで5~10分間回転させた。細胞をPBSで洗浄し、血球計でカウントした。次に、細胞をX-VIVO15+10%ヒト血清+300U/mlのIL-2+5ng/mlのIL-7およびIL-15に1mlあたり100万個の細胞で再懸濁した。抗CD3および抗CD28 Dynabeadsを約1~2の比率の細胞：ビーズ刺激するために添加した。細胞を3日間培養した。

20

【0409】

0日目：ビーズの除去、トランスフェクション、および形質導入

[00372]細胞をPBSで洗浄し、約1分間、DynaMag15に入れた。ビーズを2回洗い流し、次に、細胞を1mlあたり100万個の細胞で、X-VIVO15+血清+IL-2+IL-7+IL-15に再懸濁し、ペレット化した。その後、細胞をトランスフェクション前に37℃で2時間培養した。

【0410】

[00373]トランスフェクションのために、細胞をPBSで洗浄し、ペレット化した。細胞ペレットをT緩衝液に再懸濁した。必要とされる体積の細胞(表9を参照)を、Cas9 mRNAおよびgRNAを含む滅菌済み微量遠心チューブに添加した。細胞、cas9 mRNAおよびgRNAを穏やかなピペティングにより混合した。気泡が存在しないことを確保しながら、細胞溶液をNeonチップに慎重に取り込んだ。細胞は、プログラムされた条件で攻撃された。トランスフェクション後、AAVウイルスを添加する前に、細胞を30℃で2時間培養した。トランスフェクションプロトコルの概略図、図7Aおよび代表的なベクター、図7B。三重ベクタートランスフェクションを利用する導入遺伝子カセットの概略図を図14A~図14Cに示す。

30

【0411】

## 【表 9】

表 9: Neon システムによるエレクトロポレーション条件

	10ulチップ	100ulチップ
電解緩衝液	E	E2
細胞数	2x10 <sup>5</sup>	3x10 <sup>6</sup>
再懸濁の体積	試料あたり約10μl	試料あたり約100μl
微量遠心管の最適体積	12ul	115ul
Cas9 mRNA(L-7206)の質量	1.5ug	15ug
gRNAの質量	1ug	10ug
GFP mRNA/TCR mRNAの質量	1.5ug	15ug
培地の体積	200ul	3ml
プレートサイズ	平底96wp(または48wp)	6wp

10

## 【 0 4 1 2 】

## 【表 1 0】

表 10: パルス条件

20

パルス電圧	パルス幅	パルス数
1400	10ms	3

## 【 0 4 1 3 】

[00374] M O I が 1 e 6 の A A V ウイルスを細胞に形質導入し、3 0 で一晩培養した。

1 日目：培地交換

[00375] 形質導入の 2 4 時間後に、細胞を形質導入培地から取り出し、フェノールレッドおよびゲンタマイシンを含む培地（赤色培地） - 血清および I L - 2 + I L - 7 + I L - 1 5 - に移した。細胞を 3 7 で培養した。代表的なプロトコールの概略図、図 1 1。

30

## 【 0 4 1 4 】

## 実施例 2

フローサイトメトリーによる T C R 発現の決定

[00376] C T L A - 4、P D - 1、A A V S 1、および C I S H での C R I S P R によるエレクトロポレーション後、および r A A V 6 での形質導入後の 3 日目以降（典型的には 3、7 および 1 4 日目）に、フローサイトメトリーにより細胞を T C R 導入遺伝子の発現について評価した。細胞のアリコート培養物を培養物から回収し、洗浄し、ペレット化し、P B S + 0 . 5 % F B S で希釈された A b ( e B i o s c i e n c e A n t i - M o u s e T C R ベータ P E ) 1 / 1 0 0 - 試料あたり 5 0 ~ 1 0 0 μ l - に再懸濁した。再懸濁された細胞は、約 5 0 ~ 1 0 0 μ l の A b に含まれた。細胞を 4 で 3 0 分間インキュベートした。また、製造元の指示に従って、生存率染料 e F l u o r 7 8 0 または S Y T O X B l u e 生存率染色を追加した。インキュベーション後、細胞を P B S で 2 回洗浄し、分析のために 1 0 0 ~ 2 0 0 μ l の P B S に再懸濁した。

40

## 【 0 4 1 5 】

[00377] 3 日目、7 日目、および 1 4 日目に、C T L A - 4、P D - 1、A A V S 1、および C I S H で C R I S P R を用いて細胞を修飾し、W T A A V 6 または F 1 2 9 L 突然変異体 A A V 6 ( V P 1 にある F 1 2 9 L 突然変異 ) で形質導入し、外因性 T C R をコードする 2 を T C R 発現についてフローサイトメトリーによって評価した。図 2、図 3

50

A、図3B、および図4。14日目に、TCRの平均蛍光強度を定量化した。図5Bおよび図6B、ならびにTCR発現、図5Aおよび図6A。代表的なフローサイトメトリーアッセイ、図11。21日目、TCR発現パーセント、図12A、および3日目から21日目までのTCR発現の要約、図12B。

【0416】

実施例2

ベクター構築およびウイルス生産を標的とするAAV

[00378] 標的化ベクターは、相同性アームのDNA合成およびmTCR発現カセットのPCR増幅により生成された。合成された断片およびmTCRカセットは、制限酵素消化およびAAV2逆方向末端反復(ITR)配列の2つのコピー間のpAAV-MCS骨格プラスミド(Agilent)への連結によってクローニングされ、ウイルスパッケージングを促進した。図8。連結されたプラスミドをOne Shot TOP10の化学的にコンピテントな大腸菌(Thermo fisher)に形質転換した。各ベクターについて1mgのプラスミドDNAをEndoFree Plasmid Maxiキット(Qiagen)を使用して細菌から精製し、感染性AAVを生産するためにVigen Biosciences、MD USAに送付した。1mlあたり $1 \times 10^{13}$ ウイルスゲノムコピーを超える精製されたウイルスの力価を決定し、表11、凍結ストックを作製した。

10

【0417】

【表11】

20

表11: 組換えAAV6ウイルス力価

ウイルス	力価(GC/mL)
1(WT)	7.7E+09
2	3.87E+09
3	6.95E+09
4	6.30E+09
5	8.58E+08
6	4.89E+09
7	1.04E+10
8	2.69E+10
9	9.32E+09
10	6.65E+09
11	9.55E+08
12	3.48E+08
13	4.18E+09
14	1.88E+09
15	2.84E+09
16	2.54E+09
17	2.39E+09
18	1.39E+09
19	1.63E+09
20	3.75E+09

30

40

【0418】

実施例3

AAV修飾されたT細胞の臨床的拡大

50

[00379]多数の形質導入されたT細胞を生成するために、急速拡大プロトコール(REP)を使用して、T細胞が増殖するように誘導する。REPで使用される前に、T細胞は、抗CD3、抗CD28およびIL-2とともに培養が開始され、上で詳述したように培養開始後の2日目に形質導入される。細胞を75cm<sup>2</sup>フラスコで37、5%CO<sub>2</sub>で培養する。細胞をカウントし、培養中に保持される残りの時間、2日ごとに300IU/mLのIL-2を含む新鮮なT細胞培地に0.5×10<sup>6</sup>細胞/mLの濃度で懸濁する。

【0419】

実施例4

AAVスクリーン：GFP滴定

[00380]細胞に導入した場合、形質導入の増加および結果として生じる発現を付与する推定AAV突然変異体およびキメラを同定および単離するために、スクリーンを行った。4つのAAV6突然変異体が生成された：F129L、H642N、およびD418N；F129L、H642N、およびL584N；F129L、H462N、またはV598L；およびF129L、H462N、またはV598I。OKT3および抗CD28活性化ヒトT細胞をCRISPR/Cas9でゲノム修飾し、AAVS1遺伝子をノックアウトした。CRISPR修飾の2時間後、各突然変異体のウイルス上清を使用して、1×10<sup>6</sup>GC/mLから200GC/mLに下げたMOIでノックアウト細胞を形質導入した。

10

【0420】

[00381]形質導入後5および8日目に、細胞を回収し、GFPの発現についてフローサイトメトリーによって分析した。図13Aおよび図13B。3日目から14日目までの様々な突然変異にわたるGFP発現パーセントの要約。図11Aおよび図11B。

20

【0421】

実施例5

臨床試験

[00382]評価可能な癌を有する対象は、末梢血単核細胞を単離するためにアフエレーシスを受ける。リンパ球を単離し、外因性TCRをコードする組換えAAV6でウイルスによって形質導入し、拡大し、免疫学的試験のためにアリコートを採用する。T細胞投与の-7および-6日目に、対象は、1時間にわたって60mg/kg/日×2日のIVでシクロホスファミドの調製レジメンを受ける。細胞投与の-7および-3日目に、対象は、5日間、30分間にわたって毎日、フルダラビン25mg/m<sup>2</sup>/日のIVPBの調製レジメンを受ける。調製レジメン中、対象は毎日、全血球カウント(CBC)試験を受ける。

30

【0422】

[00383]第I相研究の最初の部分では、対象あたり10<sup>9</sup>個の操作されたT細胞から開始して、グループあたり1人の対象を利用して用量漸増が開始される。個々の対象は、口グの半分の増分で処置される。したがって、以下の用量：10<sup>9</sup>、3×10<sup>9</sup>細胞、10<sup>10</sup>細胞、3×10<sup>10</sup>細胞、および最大1×10<sup>11</sup>細胞が利用される。自己T細胞は、フィルターなしのチューブを介して20~30分かけて静脈内投与される。

40

【0423】

[00384]すべての対象は、細胞生成物の投与後の6週間の評価のために病院に戻る。

実施例6

定量的PCR

[00385]定量的PCR(qPCR)を使用して、T細胞注入の前および後の異なる時点で回収したPBM C中のTCR導入遺伝子を検出することにより、組換えAAV6およびCRISPR修飾されたTリンパ球のAAV被積分を定量する。QIAamp DNA血液ミキキット(Qiagen)でDNAを抽出した後、ABI PRISM 7900 HT配列検出システム(Applied Biosystems)を使用して、TCR導入遺伝子に特異的なプライマーおよびTaqManプローブ(Applied Biosystems)を用いてDNAを3重に増幅する。ベースライン範囲はサイクル6~

50

15に設定され、閾値はベースライン蛍光より10SD高い。DNA標準を生成するために、TCR導入遺伝子カセットをコードするDNAプラスミドの連続希釈を使用する。

【0424】

実施例7

修飾された組換えAAV6ウイルスの品質管理アッセイ

[00386]組換えAAV6ウイルスは、10<sup>9</sup>個のHeK293細胞から産生され、イオジキサノール勾配超遠心分離により精製された。得られたウイルスは500μlに濃縮され、ウイルス力価は10<sup>13</sup>vp/ml以上であった。品質管理アッセイを実施した：ウイルスの力価および純度を評価するために、qPCRおよび銀染色により決定される物理的力価(vg/ml)。AAV粒子はF68/PBSに保存された

10

【0425】

【表12-1】

表12: AAV6突然変異プラスミドベクター配列

配列番号	構築物	配列
195	17AALHUC_A AV6_WT_pAA V-DJ	ccgcatgccgggttttacgagattgtgattaaggccccagcgaccttgacgagcatctgccggcaifftctgacag gctttgtgaactgggtggccgagaagggaatgggagttgccgccagattcgacatggatctgaatctgattgagcag gcacccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgactttctgacggaatggcggcgtgtgagtaaggccccgga ggccctttctgtgcaattgagaaggagagagctacitccacatgcacgtgctcgtgaaaccaccggggtgaa atccatggtttgggacgttctgagtcagattcgcgaaaaactgattcagagaattaccggggatcgagccgact ttgccaactggttcggtcacaagaccagaaatggcggcggaggcgggaacaagggtggtggatgagtgcta catcccaattactgctccccaaaaccagcctgagctccagtggcggtggactaataatggaacgatttaagcgc ctgtttgaatctcacggagcgtaaacgggtggcgcagcatctgacgcacgtgctcagacgcaggagcagaa caaagagaatcagaatccaattctgatgcgggtgacgatcaaaaactcagccaggtacatggagctggtc ggtggctcgtgacaagggtgaltacctggagaagcagtgatccaggaggaccagccctacatctcctcaaa tggcggcctcaactcgggtcccaaatcaaggctgcttgacaatcgggaaagattatgagcctgactaaaacc gccccgactacctggtggccagcagcccgtggagacattccagcaatcggattataaaatttggactaaac gggtacgatcccaatfatggcttccgtttctggatggccacgaaaaagtggcaagaggaaccacctctg gctgtttggcctgcaactaccgggaagaccaatcggaggccatagccccacactgtgcccctctacgggtgc gtaaacggaccaatgagaactttccctcaacgactgtgacacaagatggtgactgtggaggagggaagat gaccgcaaggtcgtggatcggccaaagccatctcggaggaaagcaaggtgcgctggaccagaaatgcaagt cctcggcccagatagaccgactcccgtgatcgtcacctcaacaccaacatgtcgcgctgattgacgggaactc aacgacctcgaacaccagcagccgtgcaagaccggatgtcaattgaaactacccgccgtctggtgatgactt tgggaaggcacaagcagggaatcaaaagacttttccgggtggcacaagatcacgtggtgagggtgagatgaa ttctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagaccgccccagtgacgcagatataagtgacccaaacgggt gcgagatcagttgcgacccatcagcgcagcggaggctcgcacatcagcagagaggtgacaaataatcaat atgttctcgtcacgtggcatgaatctgatcgtgttccctcagacaatcgagagaatgaaatcagaattcaatatc gcttactcacggacagaaagactgttagaggtgttccctcagacaatcgagagaatcgaacccgttctgtc gtaacgaaactgtgtaactcattcattatcattgggaaaggtgccagacgtgcaactgctgcaatgtg gattggatgactgcatctttgaacaataaatgatttaaacaggtatggctgccgatggtatctccagattgctcga ggacaacctctgagggcattcgcgagtggtgggacttgaacctggagccccgaaaccacaagccaccagc aaaagcaggacgacggccgggtctgtgcttctggctacaagtacctggacccttcaacggactcgaagg ggagcccgtcaacgcgccggtatgacggccctcagcagcaagggcctacgaccagcagctcaagcgg gtgacaatccgtacctgcggtataaccagccgacccgagttcaggagcgtctgcaagaaagatacttggg ggcaacctcggcgagcagcttccagccaagagagggttctggaacctttggtcgtggtgaggaggtgctaa gagcgtcctggaagaaagctccgtagagcagtcgccacaagagccagacccctcctcggcaltggaaga caggccagagcccgtaaaaagagactcaatttggcagactggcactcagagtcagctcccagaccacaac ctctcggagaacctccagcaacccccgtgctgtggactactacaatggctcaggcgggtggccaccaatgac agacaataacgaaggccggac

20

30

40

【0426】

【表 1 2 - 2】

	<p>ggagtgggtaatgcctcaggaaatggcattgcgattccacatggctggcgacagatcaccaccagcacc      gaacatgggcctgccacccatataacaaccacccctacaagcaaatccagtgctcaacggggccagcaacga      caaccactactcggctacaacccccctgggggattttgattcaacagattccactgccatttccaccagtgat      ggacagcgactcatcaacaacaatggggattccggcccaagagactcaactcaagctctcaacatccaagtcaag      gaggtcacgacgaatgatggcgtcacgaccatcgtataaacctiaccagcacgggtcaagtctcggactcggg      gtaccagtgccgtacgctcctggctctgcaccaggctgcctccctccgtcccggcgacggttcatgatcc      gcagtagcgtacctaacgctcaacaatggcaccagcagtgaggaggtcatcctttactgctggaatattccc      atcgagatgctgagaacgggcaataactttacctcagctacacctfcgaggacgtgcctttccacagcagctacgc      gcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctctcatcgaccagtacctgtattacctgaacagaactcagaatc      agtccggaaagtgccaaaacaaggacttgctgttagccgggggtctccagctggcatgtctgttcagccaaaac      tggctacctggaccctgttaccggcagcagcgcgtttctaaaacaaaaacagacaacaacaacgaactttacctg      gactggtgctcaaaaataaccttaatggcgtgaatctataatcaacctggcactgctatggctcacacaaagac      gacaaagacaagcttccatgagcgggtgcatgattttgaaaaggagcggcgggactcaaacactgcattg      gacaaatgcatgatcacagcgaaggaaatcaaagcctaaccctggccaccgaaagattgggactggtg      gcagtcaatctcagagcagcagcagcaccctgcgaccggagatgctcatgtatgggagccttaccctggaatgg      tgtggcaagacagagacgtatacctcagggctctattgggcaaaattcctcacaggtggacactttaccctgt      ctctctcatggggcctttggacttaagcaccggcctcctcagatcccatcaaaaacagcctgttctcgtggaatcc      tccggcagagtttccgctacaaagtgtctcatcaccagatattccacaggcaaatgagcgtggagatgaat      gggagctgcagaaaacagcaaacgctggaatcccgaagtgcagtataccttaactgcaaaatctgccaa      cgttgattcactgtgacaacaatggactttatactgagcctcgcceccatggcaccggttacctaccctgccctgt      aattggtgtaataaaccgggtgattcgtttcagttgaacttggctctgcgaaggcgaattcgttaaacctgc      aggactagaggctcctgattagaggctcacgtgagtggttgcgacatttgcgacacatggtgacagcgtggat      agcccagtgagcacgcagggctcctcatttgaagcgggaggttgaacgcgcagccgcaagccgaattctgca      gatacctacactggcggcgtcgaactagagcggccgcccgggtggagctccagctttgttcccttagtg      agggtaattgcgcctggcgtaatcatggtcatagctgttccctgtgaaattgtatccgctcaacaatccacaca      catacagccggaagcataaagttaaagcctggggtgcctaatagtgagctaacctacattaattgcgttgcgctc      actcccgttccagtcgggaaacctgctggtccagctgcattaatgaatcggcaacgcgaggagaggggg      tttcgtattggcgctctcctcctcctcactgactcgtgcgctcgtcgttccgctggcgaggcggtatca      gctcactcaaaaggcgtataacggtatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggc      cagcaaaaggccaggaccgtaaaaggccgctgtgctggcgttttccataggctcccccctgacgagcatc      acaaaaatcgacgctcaagtcagagggtggcgaaccggacaggaactataagataccaggcgttccccctggaa      gcicctcgtgcgctcctgttccgacctgcccgtaccggatacctgtccgcttcccttcccttgggaaagcgtggc      cgtttcctagctcacgctgtaggtatcagttcgtgtaggtcgtcgtccaagctgggctgtgtgcaggaacccc      ccgttcagcccaccgctgcgcttccgtaactatgctttagtccaaccggtaagacacgacttaccgac      tggcagcagccactggtaacaggaatagcagagcgggtatgtaggcgggtctacagagttcttgaagtggggcc      taactaggctacactagaagaacatgtttggtatcgcgctcgtgaagccagttacctcggaaaaagagttgt      agctcttgatc</p>
--	---

10

20

30

【 0 4 2 7 】

【表 1 2 - 3】

		<p>cggaacaacaaccaccgctggfagcgggtgtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcaaaaaaaaaaggatctc  aagaagatccfttgatctttctacggggctgacgctcagtggaacgaaaactacgttaagggatttggcatgaga  ttatcaaaaaggatcttcacctgatctttaaataaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatagtaaacctgg  tctgacaggttaccatgcttaaatcagtgaggcaccatctcagcgcgatctgtctatttcgttcatccatagctgactcc  ccgctggtgagataactacgatacgggaggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgagaccacg  ctcaccggctccagattatcagcaataaacagccagccggaaggccgagcgcaagaagtgctcgaacttta  tccctccatccagcttataatgttggcgggagctagagtaagtagtccagtaaatgttgcgcaactgtgt  gacattgctacagcctcgtgtgctcagctcgtctgttggatggctcctcagctccgggtcccaacgaicaaggc  gagttacatgatccccatgttgcgcaaaaagcgggttagctcctcggctccgatcgttgcagaagtaagtgcc  cgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataatctcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgactg  gtgagactcaaccaagctatctgagaatggtatgctggcgaccgagtgctcttggccgctcaatcaggata  ataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcttgaaaacgtctctggggcgaaaactcgaagatctt  accgctgtgagatccagttcagtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagatctttactttaccagcgttct  gggtgagcaaaaacaggaaaggcaaaatgcccaaaaagggaataaggcgcacacggaatgttgaatactcat  actctccttttcaatatttgaagcattatcagggttattgtctcatgagcggatataatgaaatgattagaataa  aacaatagggggtccgcgcaattccccgaaaagtgccacctaaatgtaagcgttaattttgtaaaatcgcgtt  aaattttgtaaacagctcatttttaaccaatagccgaaatcgcaaaaatccccataatcaaaagaatagaccga  gatagggtgagtggttgcctcagtttggacaagagtgccactataaagaactggacccaacgtcaaaaggcgaaa  aacctctatcagggggatggccactcgtgaaccatcacctaatacaagttttgggctcaggtgcccgtaaaagc  actaatcggaaacctaaaggagccccgatttagagctgacggggaaagccgagcgaactggtgagcaaaag  gaaagggaagaaagcgaaggagcggcgctaggcgcctggcaagtgtagcgtcagcgtcgcgcaaccacc  acaccgccgccttaatgcccgtacagggcgcgtccattcgcattcagcgtcgcgaactgttgggaaagg  cgatcgtgcccgtctctgctattacgcaagctggcgaagggggatgtgctgcaaggcgattaaagtgggtaa  cgccagggtttccagtcacgactgtgtaaacgacggcagtgagcgcgtaatacgaactactatagggcga  atgggtaccggccccctcgtcagggctgacgggtatcggggagctcgcagggtctcatttgaagcggg  aggttgaacgcgcag</p>	<p>10</p> <p>20</p>
196	17AALHVC_A AV6_F129L_pA AV-DJ	<p>ccgccatgccgggtttacgagattggtatgaaggtccccagcgacctgacgagcatcgcggcatttctgaca  gctttgtaactgggtggcggagaaggaatgggagtgccgccagattcagatggatctgaatcgtattgagcag  gcacccctgaccgtggccgagaagctcagcgcgactttctgacggaatggcgcctgtgagtaaggccccgga  ggccctttcttgtcaattgagaaggagagagctacttccacatgcacgtgctcgtggaaccaccggggtgaa  atccatggtttggacgttctgagtcagatcgcgaaaaactgattcagagaattaccggggtcagccgact  ttgcaaaactggtcgcgtcacaagaccagaaatggcggcggagcgggaacaagggtggtgatgagtgcta  catccccattactgctccccaaaaccagcctgagctccagtgggcgtggactaatatgaaacagattaaagcgc  ctgtttgaatcaccgagcgtaaacggttggcgcagcactcagcgcacgtgctcagcagcagcagagcagaa  caaaagagaalcaaatccaattctgctcggcgggtgatcagatcaaaaactcagccaggtaacagctggtc  gggtgctcgtggacaagggttaccctgggagaagcagtgatccaggaggaccaggcctcactatctcctcaa  tgcggcctccaactcgcgtcccaaatca</p>	<p>30</p>

【表 1 2 - 4】

	<p>aggctgcctggacaatgctgggaagattatgagcctgactaaaaccgccccgactacctggtggccagcagc  ccgtggaggacattccagcaatcgattataaaatfttggactaaacgggtacgatccccaatatgctgctccgt  ctttctgggatggccacgaaaaagttcgcaagaggacacatctggctgttggccctgcaactaccgggaag  accaacatcgctggagccatagcccacactgtgccctctacgggtgcgtaaacctggaccaatgagaacttccctt  caacgactgtcgcacaagatggtgatcgggtggaggaggaggagatgaccgcaaggctgtggagtcggcca  aagccatctcggagggaagcaaggtgctggaccgaaatgcaagtcctcggccagatagaccgactccc  gtgatcgtcaccccaacaccaacatgtgcgcgtgatgggaactcaacgacctggaacaccagcagccgtt  gcaagaccggatgtcaaatftgaactaccgccctcggatcatgactttgggaagggtaccaagcagggaatca  aagacttttccgggggcaaaaggatcacgtggtgagggtggagcatgaattctacgtcaaaagggtggagccaag  aaaagaccgccccagtgacgagatataagtgagccaaacgggtgctgagtgactgtcgcagccatcgac  gtcagagcgggaagctcgtacactacgcagacaggtacaaaacaatgtctctgacgtggcatgaatctga  tctgtttccctgcagacaatgogagagaatgaatcagaatcaaatatctgtctcactcagcagaaaactgttta  gagtgctttccgtgacagaatcacccttctgtctcaaaaaggcgtatcagaactgtgtacatcatcatatc  atgggaaaagggtgccagacgcttgcactcctgcgatctggtcaatgtgatttgatgactgcatcttgaacaataa  tgatttaaatcaggtatggctcggatggttatctccagattggctcggagacaacctctctgaggccagcgt  gggtgggactgaaaactggagccccgaaaccgaaagccaaccgcaaaagcaggacgagccggggctggt  gcttctggtacaagtacctcgaccctcaacggactcacaagggggagcccgtcaacgcggcgatgagc  ggccctcagacagcaaaagcctcagaccagcgtcaaaagcgggtgacaatccgtactcgggtataaccacg  ccgacgcccaggttcagagcgtctgcaagagatacgtctttggggcaacctcggcgagcagcttccaggc  caagaaagggttctcgaacctttaggtctggttgaggaggtgctaagacggctcctggaaaagaacgctccgta  gagcagctgccacaagaccagactcctcctcggcattggcaagacagccagcagcccgtaaaaagagact  caatttggctcagactggcgactcagagctacgtcccgaccacaacctctcggagaacctccagcaacccccgt  gctgtggacctaactacaatggctcagcgggtggcgaccaatggcagacaataacgaaggcgccagcggagt  gggtaatgctcaggaatggcattgcatcaccatggctggcgacagagctatcaccaccagcaccggaaca  tggccttggccaccataaacaaccacctcacaagcaaatctcagtgctcaacggggccagcaacgacaacc  actactcggctacagcaccctgggggtatfttgattcaacagatccactgccatttctaccacgtgactggcag  cgactcatcaacaacaatggggattccggcccaagagactcaactcaagcttcaacatccaagicaaggagt  cacgacgaatgatggcgtcagcaccatcgtataaacctaccagcaggtcaagtctctcggactcggagtacc  agttgccgtacgtcctcggctctgcccaccagggctgctccctcctcctcctgcccggcggagctgtcatgatccgact  acggctacctaactcacaatggcagccaggcagtgaggacggtcatctttactcctggaataitctccatcgc  agatgctgagaacggcaataactttacctcagctacacctcggaggcgtgccttccacagcagctacgcgcac  agccagagcctggaccggctgatgaatcctctcagaccagctacgtatctacctgaacagaactcagaatcagtc  ggaggtgcccaaacaggactgtggttagccgggggtcaccgctggcatgtctgtcagcccaaaactggct  acctggacctgtaccggcagcagcgtttctaaacaaaacagacaacaacaacgcaactttacctggactg  gtgctcaaaatataaccttaatggcgtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacacaagagcacia  agacaagttcttccatgagcgggtgatgattttgaaaggagagcggcgagctcaaacactgcatggacaa  tgtcatgatcacagcgaaggaatcaaggccactaacccgtgg</p>
--	---

10

20

30

【 0 4 2 9 】

【表 1 2 - 5】

	<p>ccaccgaaagattgggactgfggcagfcaatctccagagcagcagcacagaccctgcgaccggagatgtgcatg  ttatgggagccttacctggaatggtggtgcaagacagagacgtatactgcagggtcctattggccaaaaatctctc  acacggatggacacttcaccctctctctcatggcggtcttggactaagcaccggcctccicagatcctcaaa  aaacacgctgtctcctgcgaatcctccggcagaggtttcggctacaaaagttgctcattcatcaccagatftccacag  gacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcagaaa gaaaacagcaaacgctggaatcccggaagtgcagtat  acatctaactatgcaaaatctgccaacgttgaatcactgfggacaacaatggactttatactgagcctgccccattgg  caccggtaacctcaccgtcccctgtaattggtgtaatacaaaaccgggtgattcgttgcagttgaaattggtctcgc  gaaaggcggaattcgttaaacctgcaggactagaggtcctgtattagagtcacgtgagtggttgcgacatttgcga  caccatgtggtcacgctgggtatttaagcccagtgagcacgcaagggtcctcaatttgaagcgggaggttgaacgc  gcagccgccaagccgaatctgcagatattccatcacactggcggcgcctcactagagcggcggcaccgcgggt  ggagctccagctttgtcccttagtgagggttaattgcgcgttggcgtaatcatggtcagctgttctgtgtgaaa  ttgtatccgctcacaattccacacaacatagcagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtcctaatgagtgag  ctaactcacattaatgctgtcgtcactgcccgcttccagtcgggaaacctgctgctgccagctgcatatgaatcg  aacacgcgcggggagagggcgggttgcgtattggcgctctccgctcctcctcactgactcgtcgcctcgcgc  gttcggctcggcgcgagcggatcagctcactcaaaaggcggtaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcag  gaaaagaacatgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgctgctgtttccata  ggctccgccccctgcagagcatcaaaaaatcgactcaagtcagaggtggcgaaccggacaggaactataa  agafaccaggcgttccccctggaagctccctcgtgcctcctgcttccaccctgcgcctaccggatactgtcc  gcttctccctcgggaagcgtggcgttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtagctcgtcgtcc  aagctgggctgtgacagcaacccccgtcagcccaccgctgccttaccggtaactatcgtcttgaagtccaac  ccgtaagacacgactatccactgagcagcagccactggttaacaggaatagcagagcgggtatgtagggcgggt  gctacagagttctgaagtgtggcctaactacggctacactagaagaacagatftggtatcgcgctcgtggaagc  aagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatcicaagaagatccttgcattttctacggggtcagcgtcagttg  aacgaaaacacagtaagggtttggtcagagattatcaaaaaggatctcacctagatcctttaaataaaaaatga  agtttaaatcaatctaaagtataatagtaaaactggtctgacagtacccaatgcttaacagtgaggcacctatctcag  cgatctgctattcgttcatccatagttgcctgactccccgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctg  gccccagtgctcaatgataccggagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccg  gaaaggccgagcgcagaagtggtcctgcaacttatccgctccatccagctctatattgttccgggaaagctagag  taagtagttcggcagtaaatggttgcgcaacgttgccttgcctacagcagctggtgacgctcgtcgtttggtat  ggctcattcagctccggttccaacgatcaaggcggatfacatgatccccatggtgcaaaaaagcgggttagctc  ctcggctcctccgatcgtgcaagaagtggtggccgaggttatcactcatggttatggcagcactgcataatctct  actgcatccatccgtaagatgcttctgactggtgagtaactcaaccaagctattctgagaatagtgatgcggcg  accgagtgctcttcccggcgaataacgggataataccggccacatagcagaactttaaagtctcatcattgg  aaaacgtctcggggcgaaaactctcaaggatcaccgctgttgagatccagttcagatgtaaccacatctgcaccc  aacgatcttcagcatcttacttaccagcgttctggtgagcaaaaacaggaaggcaa</p>
--	--

10

20

【 0 4 3 0 】

30

【表 1 2 - 6】

		<p>aatgccgcaaaaaagggaataaaggcgacacggaaatgtgaaatactafatactctcttttcaatatttgaagcat  ttatcagggttattgtctcatgagcggatacaatfttgaatgtattgaaaaaatacaaatagggggtccgcgacattf  ccccgaaaaagtgccacctaattgtaagcgttaaatfttfttaaaattcgcgftaaattttgtaaatcagctcatttttaa  ccaataggccgaaatcgcaaaaatccctfataaatcaaaagaaagaccgagatagggttgatgtgttccagtttg  gaacaagagtccactattaagaacgtggactccaacgtcaaaaggcgcaaaaaccgtctatcaggggcgaaggcc  actacgtgaacatcacctaataagtttttggggtcaggtgcccgtaaagcactaaatcggaaaccataaggagg  ccccgatttagagcttgacggggaagccggcgaacgtggcgagaaaggaaaggaaagcgaaggagc  ggcgctaggggcgttgcaagtgtagcggctacgctgcgcgtaaccaccacaccggcgccttaatgcgccgc  tacagggcgctgccattcggcattcaggctgcgcaactgttggaaaggcgatcgggctggcctctcctgctatta  cgccagctggcgaagggggatgtgctcaaggcgatgaagtgggtaacgccagggtttccagtcacgacgct  gtaaacgacggccagtgagcgcgcgtaatacgaactactataggcggaattgggtaccgggccccctcctgac  gaggctgacggatcgggggagctcgaagggtctccatttgaagcgggaggttgaacgcgcag</p>	10
197	17AALHWC_A AV6_D418E_pA AV-DJ	<p>ccgccatcccgggttttacgagattgtgattaaaggccccagcaccctgacgagcatctgccggcatttctgaca  cctttgtgaactgggtggccgagaaggaatgggagttgccgccagattctgacatggatctgaaatcgtattgagcag  gaaccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgactttctgacggaaatggcggcgtgtgagtaaggccccgga  ggccctttcttctgcaattgagaaggagagagctacttccacatgcacgtgctcgtgaaaccaccgggtgaa  atccatggtttggacgttctctgagtcagattcgcgaaaaactgaticagagaattaccgcgggatcagaccgact  ttgcaaacgtgttcgctcacaagaccagaaatggcggcggagcgggaaacaagggtggatgagtgctata  catccccaaactactgctccccaaaaccagcctgagctccagtgggcgtggaataatggaacgatfttaagcgc  ctgittgaatctacggagcgtaaacgttgggtggcgcagcatctgacgcacgtgtcgcagacgcaggagcagaa  caagagaaatcagaatccaattctgatgcgccggtgatcagatcaaaaactcagccaggtacatggagctgctg  ggtggctcgtggacaagggtgaltaccicggagaagcagtgatccaggaggaccaggcctcatactctcctcaa  tggcgcctccaactcgggtcccaaatcaaggctgccttggacaatgggaaagattatgagcctgactaaaacc  gccccgactacctggtggccagcagcccgtggaggacattccagcaatcggattataaaatttggaaactaac  gggtacgafcccaatfagcggctccttctgggatgggccaagaaaagtccggcaagagggaacacacatctg  gctgttggcctgcaactaccgggaagaccaacatcgcggaggccatagcccacactgtgccccttctcagggtgc  gtaaacgtggacaaatgagaacttccctcaacgactgtgtcacaagatggtgatctggtgggaggagggaagat  gaccgcaaggtcgtgagtcggccaaagccattctcggaggaaagcaaggtgcgcgtggaccagaaatgcaagt  cctcggccagafagaccgactcccgtgatcgtcacctcaacaccaacatgtgcggcgtgattgacgggaactc  aacgacctcgaacaccagcagccgttcaagaccggatgttcaaatfagaacaccccggcgtctggaatgact  tgggaaggtcaccagcaggaagtcaaaagacttttccgggtggcgaaggatcacgtggtgaggtggagcatgaa  ttctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagaccggccccagtgacgcagatataagtgaaccaaacgggt  gcgcgagtcagttgcgcaaccatcagctcagcgcggaagcttcgatcaactcgcagagaaatgaaatcaaatct  atgttctcgtcagtggtgatgaatctgatgctgttccctcagacaatgcgagagaatgaaatcaaatcaaatct  gcttactcagggacagaagactgttagagtgcttccctgtcagaatcacaaccgttctgtcgaaaaaggc  gtatcagaactgtgctacatcatatcatgggaaagggtccagacgctgcaactgctcgtatctgctaatgtg  gattggatgactg</p>	20

10

20

30

【表 1 2 - 7】

	<p>catcttgaacaataaatgatttaaatcaggfatggctgccgatggttatctccagattggctcaggacaacctctctg  agggcattcgcgagtggggacttgaacctggagccccgaaacccaagccaaccagcaaaagcaggacga  cggccggggtctggtcttctggctacaagtacctcggaccttcaacggactcgacaagggggagcccgtcaa  cggcggcggatgacagcggccctcggagcacgacaaggcctcagaccagcaagcctcaagcgggtgacaatcggtac  ctgctgataaacacgcccagccgagtttcaggagcgtctgcaagaagatacgtctttgggggcaacctcgggc  gagcagctctccaggccaagaagggttctcgaaccttttggctggtgaggaaggtgctaaagcggctcctgga  aagaacgtccgtagagcagtcgccacaagagccagactcctcctggcattggcgaagcggccagcagcc  cgtaaaaaagactcaattttgctcagactggcactcagagtcagctcccgaccacaaacctctcggagaacctc  cagcaacccccgctgctggtggactactacaatggctcaggcgggtggcgaccaatggcagacaataacgaag  ggcggcagcggagtgggtaatgcccaggaatggcattgctgattccacatggctggcgacagatcatcaccac  cagcaccggaacatgggcttggccacctataacaaccacctctacaagcaaatctccagtcttaacggggggcc  agcaacgacaaccactactcggctacagcaccctcgggggtattttgattcaacagattccactgccatttctcac  acgtgactggcagcagactatcaacaacaattggggatccggccaagagacicaactcaagctctcaacatcc  aagcaaggaggtcagcagcaatgatggcgtcagcaccatcgtaataaccttaccagcagctcaagtctctc  gactcggagtaccagtgccgtactcctcggctctgcgaccaggctcctcctccctcctccggcggagctgtt  catgattccgcatgactgctacctaaccgtcaacaatggcagccagcagtgaggacggctatcctttactgcctgg  aataattcccacgcatgctgagaacgggcaataactttactctcagctacacctcaggagggtccttccacag  cagctacgcccacagcagcagcctggaccggctgatgaatcctctcaccagcagctctgattactcgaacagaa  ctcagaatcagtcgggaagtgcccaaaaagagactgctgttagccgggggtctccagctggcatgctgtctcagc  ccaaaaactggctactcggaccctgtaccggcagcagcggcttctaaaaacaaaacagacaacaacaacagcaa  ctttacctggactggtctcaaaataaaccttaattggcgtgaaactataataaaccttggcactgctatggcctcac  acaaagcagacaagacaagcttcttccatgagcgggtgatgattttggaaggagagcggccggagctcaaac  actgcatggacaatgcatgatcacagcgaaggaatcaagccactaacccccgtggccaccgaaagattg  ggactgtggcagtaactcctcagagcagcagcacagaccctcgcgaccggagatgcatggtatgggagccttacc  tggaaatggtggcaagacagagcgtatcctcaggggtcctattgggcaaaatcctcacacggatggacactt  tcaccctctcctcctcagggcggcttggactaaagcaccggcctcctcagatcctcatcaaaaaacgcctgttct  gcgaatcctccggcaggtttcggctcaaaatgcttctcattcaccagatcctcacaggacaagtgagcgtgg  agattgaatgggagctgcagaaagaaacagcaaacgctggaatcccgaagtgagatacatctaatatgcaaa  atctgccaacgtgatttactgtggacaacaatggactttactgagccctgcccctatggcaccgttacctcacc  gtcccctgtaattgtgttaatacaataaacgggtgattcgttcaagttggaactttggtctctcgaaggcgaattcgtt  aaacctcagagactagaggtcgtaitagaggtcacgtgaggttttgcgacattttgcgacaccatggtgtcacgct  gggtattaaagccgagtgagcagcaggggtcctcaatttgaagcgggaggttgaacgcgacggcccaagccg  aattctgagataatcacactggcggccgctcgaactagagcggccgccaccgctggagctccagcttttgtt  ccctttagtgagggtaattgctgctggcgaatcagctgcatagctgttctctgtgaaattgtatccgctcaaat  ccacacaatacagccggaagcataaagttaagccctggggtgcctaagtgagctaacctcaatfaattgc  gttgcgctcactgccccttccagtcgggaaacctgtcgtccagctgcaatgaatggccaacgcgggggga  gaggcggtttgcgtattggcgctct</p>
--	--

10

20

30

【 0 4 3 2 】

【表 1 2 - 8】

		<p>tccgcttcctcgtcactgactcgtcgcctcggctcggctcggcgagcggtatcagctcactcaagcggt  aatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaagacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccagga  accgtaaaaaggccgctgttggcgttttccataggctccgccccctgacgagcaccacaaaaatcgacgctca  agtcagagggtggcgaacccgacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtcgcctc  ctgtccgaccctgcccgttaccggatactgtccgcttccctcgggaaagcgtggcgtttctcatagctcacgc  tgtaggatcagctcgggtgtaggtcgtcctcaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagaccgc  tgcgctatcoggttaactatcgtctgagccaacccgtaagacacgactatcggcactggcagcagccactggt  aacaggattagcagagcgagggtatgtaggcgggtgtacagagttcttgaagtggcctaactacggctacactag  aagaacagatattggtatctgcgctcgtgaagccagttacctcggaaaaagagttgtagctctgatccggcaaa  caaacaccgctggtagcgggtgtttttgttgaagcagcagatfacgcccagaaaaaaggatctcaagaagat  cctttgatctttctacggggtcgtacgctcagtggaacgaaaaactcacgttaagggaattttggtcatgagattatcaaaa  aggatctcacctagatccttttaaataaaaatgaagttttaaataaatcaatcaaatatataatgagtaaactggtctgacag  ttaccaatgctaatcagtgagggaccatctcagcgatctgctattcgttcaaccatagttgctgactccccgctcgtg  tagatactacgatacggggggcttaccatctgccccagtgctgcaatgataccgagaccacgctcaccgg  ctccagattatcagcaataaacccagccggaaggccgagcgaagtgctctgcaaccttaccgctc  catccagcttattggttccgggaagcctagagtaagtgtccagtaataagttggcgaacgttggcattg  tacaggcatcgtggtgtcacgctcgttgggtatggctcattcagctccggttcccaacgatcaagcggagtacat  gatccccatggtgtgcaaaaaagcggtagctcctcggctcctccgacgtgtgtcagaagtaagtggccgagtggt  atcactcatggtatggcagcactgcataatctcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtact  caaccaagtcattcigagaatagtgatgcggcgaccgagtgctcttcccggcgtcaataggataataccgg  ccacatagcagaacttataaagtgtctcatctgaaaacgttctcggggcgaaaactcgaaggatcttaccgctgtt  gagatccagctcgtatgtaaccactcgtgcaccaactgatctcagcatctttactttaccagcgtttcgggtgagc  aaaaacagggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgcacacggaaatgtgaaactcatactctcctt  ttcaatattatgaaagcattatcagggttattgtctatgacggatacatattgaaigtattgaaaaataaacaata  gggggtccgcgcacattccccgaaaaagtgccacctaaatgtaagcgttaataattttgtaaaatcgcgttaaatttgt  taaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaacccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggtt  gagtggttccagtttgaacaaagtgccactatfaaagaacgtggacccaacgtcaaaaggcgaaaaaccgtcta  tcaggcgatggcccactacgtgaacatcaccccaatcaagtttttggggcagagtgccgtaaaagcactaaatcg  gaaccctaaagggaagccccgatttagagcttgacgggaaaagccggcgaactggcgagaaaaggaaaggaa  gaaagcgaaggagcggcgctaggggcgtggcaaggtagcggcgcagctgcgtaaccaccaccccgc  gccttaatgcgcccagggcgcgtcccattcgcattcaggtcgcgaactgttgggaaaggcgatcgggtgc  ggcctctcgtattacgccagctggcgaagggggagtgctcgaaggcgatgaagtggtaacgccagggtt  tcccagtcacgactgtgtaaacgacggccagtgagcgcgctaafacgactcactataggcgaaatgggtaccg  ggccccctcagtcagaggtcaggggtatcgggggagctcgaagggtcctcatttgaagcgggaggttgaacg  cgacg</p>
--	--	---

10

20

【 0 4 3 3】

30

【表 1 2 - 9】

198	17AALHXC_A AV6_D418N_p AAV-DJ	ccgcatgccggggttttacgagattgfgattaaggtcccagcgacctfgacgagcatctgccggcatttctgaca gcfttgtgaactgggtggccgagaaggaatgggagtgccgccagattctgacatggatctgaatctgattgagcag gcacccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgacttctgacggaatggcccggtgfgagtaaggccccgga ggccctttcttctgcaatttgagaaggagagagctactccacatgcacgtgctctgfgaaaccaccgggggtgaa atccatggtttgggacgttctgagtcagatcgcgaaaaactgattcagagaattaccggggatcgagccgact ttgccaaactgggtcgggtcacaagaccagaaatggcggcggagcgggaaacaagggtggtgagtgatgagtgta catcccaattactgtctcccaaaaccagcctgagctccagtgggcgtggactaatatggaacagatffaagcgc ctgttgaatctacggagcgtaaacggttggcggcagcatctgacgcacgtgctgcagacgagcagcagaa caaaagaaatcagaatccaattctgatgcggcggatcagatcaaaaactcagccaggtacatggagctggctg gggtgctctggacaagggtattacctggagaagcagtgatccaggaggaccaggcctcacaatctccitcaa tgcggcctccaactcgcggtcccaaatcaaggctgcttgacaatggcggaaagattalagcctgactaaaacc gccccgactactgtggggccagcagccgtggaggacattccagcaatggaattfaaaaatttggaaactaaac gggtacgatcccaatagcggctccgtcttctgggatggccacgaaaaagtgcgcaagaggaaaccactctg gctgttggcctgcaactaccgggaaacccaactcgcggaggccaatagccacactgtgcccctctacgggtg gtaaacctggaccaatgagaacttccctcaacgactgtgcaagaatggtgatctggtggaggaggggagat gaccgcaaggtcgtggatcggcgaagcattctggaggaaagcaggtgctgctggaccagaatgcaagt cctggccagatagaccgactcccgtgatcgtcacctcaacaccaactgtgcggctgattgacgggaactc aacgacctcgaacaccagcagccgttcaagaccggatgtcaaaftgaaactaccggcctctgatcatgactt tgggaagggtcaccgaagcagaagctcaagacttttccgggtggcgaagcagcagctggtgaggtggagcatgaa ttctacgtcaaaaagggtggagcgaagaaaagaccgccccagtgacgagataaagtggcccaaacgggt gcgcgagtcagttgagcaccatcagctcagcagcgggaagctcgaactacgcagacaggtacaaaacaa atgtctctgacgtggcatgaatctgatgctgttccctgcaacaatgcgagagaatgaatcagaattcaaatct gctcactcagcagacaagaagactgttagagtgcttccctgctcagaatcacaaccgttctgctcaaaaaggc gtatcagaactgtgctacattcatatcatatgggaaagggtccagacgcttgcactgctgctgctcaaatgtg gattggatgactgcatcttgaacaataatgattaaatcaggatggctgcccgatggtatctccagattggctcga ggacaacctctctgaggcattcgcgagtggtgggactgaaacctggagccccgaaccacaagccaaccagc aaaaagcaggacgacggccgggtctggtctcctggctcaagctaccctggaccctcaacggactgacaagg gggagcccgtcaacggcggcggatgcagcggccctcagcagcagaagcctacgaccagcagctcaaaagcgg gtgacaatccgtacctgctgataaccacggcagccggatcaggaagcgtctgcaagaagatactctttggg ggcaacctcggcggcagctctcagcccaagaaggggtctcgaacctttggctggtgaggaagggtgctaa gacggctctggaaaagacgtccggtagcagcagcgcacacaagcagcagactcctcctggcattggcaaga caggccaagcagcccgtcaaaaagagactcaatttggcagactggcagctcagagtcagctcccagaccacaac ctctcggagaacctccagcaacccccgtgctgtgggacctactacaatggctcaggcgggtgcaccaatggc agacaataacgaaggcggcagcggagtggtaatgccicaggaaattggcattgcgattccacatggctggcga cagagtcacaccaccagcaccgaacatgggccttgcccacctataacaaccctctacaagcaaatctccagtg ctcaacggggccagcaacgacaaccactactcggctacagcacccttgggggtatttggattcaacagattcc actgccattctaccacgtgactggcagcagctcatcaacaacaattggggattcc
-----	-------------------------------------	---

10

20

30

【表 1 2 - 1 0】

		<p>ggcccaagagactcaactfcaagctfcaacatccaagtcaaggaggtcacgacgaatgatggcgtcacgacct  cgctaafaaccttaccagcacggtfcaagctfctcggactcggagtaccagttgccgtacgtcctcggctctgcga  ccagggtcctcccctccgtcccgccggacgtgtcatgattccgagtagcggctacacgtcaacaatggca  gccagcagtgaggacggatcctcttactgcctggaatattccatcgcatgctgagaacgggcaataactttac  cttcagctacacctcggagaacgtgcctttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaat  cctctatcgaccagtacctgtattacctgaacagaactcagaatcagtcgggaagtgcccaaaacaaggacttgcg  tttagccgggggtcaccgtggactgtctgtcagccaaaaactggctacctggaccctgtaccggcagcagcg  cgtttcaaaaacaaacagacaacaacaacagcaactttacctggactgggtctcaaaataaaccttaaggcgt  gaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacacaagacgacaaaagacaagttcttccatgagcgggtc  atgattttggaaaggagagcggccggagctcaaacactgcatggacaatgtcatgacacagacgaagggaat  caagccactaacccgtggccaccgaaagattgggactgtggcagtaactccagagcagcagcagacagacc  tgcgaccggagatgtcattgtatgggaccttacctggaatgggtggcaagacagagactataacctgcaggg  cctattgggcaaaatctcacacggatggacacttaccctgtcctctcatggcggcttggactaaagcacc  gctcctcagatcctcatcaaaaacacgctgttctcgaatcctcggcagagtttggctcaaaagttgtctcatt  catcaccagatattccacaggaacaagtgagcgtggagattgaatgggagctcagaagaagaaacagcaaacgctg  gaatcccgaagtgagatatactactatgcaaaatctgccaactgattcactgtgacacaactggacttata  ctgagcctcggccattggcaccgttacctaccctcccctgtaattgtgtgtaafcaataaacgggtgattgtt  cagttgaacttggctctcgcgaaggcgaatctgtaaacctcagcagactagaggctctgattagaggctcagctga  gtgtttcgcacatttgcgacacctgtgtcagcgtgggtattagcccagtgagcagcagcagggctcctattga  agcgggaggtttgaacgcgagccgccaagccgaalictgagatattcactcactggcggcggctcagactaga  ggcggccgccaccggctggagctccagctttgttccctttagtgagggttaattgcccgttggcgtaatcatggtca  tagctgttctctgtgaaattgtatccgctcaaatccacacaacatacagccggaaagcataaagttaaaagcctg  gggtgcctaatagtgagctaacacattaattgcttgcgctcactgccgcttccagtcgggaaacctgtcgtgc  cagctgcatlaatgaatcgccaacgcgggggagaggcggtttgcgtatggcgctcttccgcttctcgtcact  gactcgtcgcctcgttccggctcggcggagcggatcagctcactcaaaaggcggtaatacgggtatccacag  aatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccg  cgttgcggcttttccataggctcggcccccagcagcagcaaaaaatcgacgctcaagtcagagggtggcga  aaccgacaggactataaagatacaggcgttcccctggaagctcctcgtgcgctcctgttccgacctgcc  gctaccggataacctgtccgcttctccttccggaaagcgtggcgttctcagatgctcagcgtgtaggtatcagtc  ggtgtaggtcttccgctcgaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccaccgctgcgcttaccggta  actatgctctgagtcacaccggtaagacacgactatcgccactggcagcagccactggtaacaggaftagcaga  ggaggtatgtaggggtgctacagagttctgaagtggtggcetaactacggctacactagaagaacagtalttgt  atctcgcctctcgaagccagttacctcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaaccaccgctgtgt  agcgggtgtttttgttgcagcagcagatcgcgcagaaaaaaggatcctcaagaaatccttcttctacg  gggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttggctatgagattatcaaaaagatctcactaga  tcttttaataaaaaagatttaatacaactaaagtataatgagtaaacctgtgtcagagttaccaatgcttaac</p>
--	--	---

10

20

【 0 4 3 5】

30

【表 1 2 - 1 1】

		<p>agtgaggcacctatctcagcgaatctgtctatcttctgttcacatagttgcctgactccccgtcgtgtagaataactacgata  cgggagggccttaccatctgccccagtgctcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcag  caataaacaccagccagccggaggccgagcgcagaaagtgctcctgcaactttatccgcctccatccagcttataat  tgttccgggaagctagagtaagtagtccagtaaatagttgcgcaacgttggccattgctacaggcatcgtggt  gtcacgctcgtctgttggatggctcattcagctccgggtccaacgatcaaggcaggttaccatgatccccatgtgt  gcaaaaaagcggtagctcctcggctccgatcgttgcagaagtaagtgccgaggtgttaccatcattggtatg  gcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtacacaaagtcattct  gagaatagtgatcggcgaccaggtgctctgcccggcgtcaatacgggataataccgcccacatagcagaac  tttaaaagtgctcattcggaaaacgtctcggggcgaaaactcgaaggatctaccgctgttgagatcaggtcga  tgaacccactcgtgacccaactgatctcagcatctttacttcaccagcgttctgggtgagcaaaaaacaggagg  caaaaagccgcaaaaaagggaataaggcgcacacggaaatgtgaatactcactctctcttttcaatattatgaag  catttatcagggttattgtctcatgacgggatacatattgaatgtattgaaaaataaacaataggggctccgcgcac  atttccccgaaaagtgccacctaattgtaagcgttaaatgtttaaatacgcgttaaatgtttaaatacagctcatttt  taacaaatagccgaaatcggcaaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgaggtgtgttccagtt  tggaaacaagagtcactatataaagaacgtggactccaacgtcaaaaggcgaaaaaccgtctatcaggcgatggc  ccactacgtgaaccatcacccaatcaagtttttgggctcaggtgcccgtaaagcactaaatcggaaacctaaagg  agccccgatttagactgacgggaaagccggcgaacgtggcgaagaaagggaagaaagcgaaggga  gcggcgctaggcgtggcaaggtgacggcgtcgtgcgtgaaccaccaccccggcgctaatgccc  gctacaggcgcgtcccatcgcctacagcgtgcaactgttgggaaggcgatcgggtggcgctctcgtctat  tacgccagctgcgaaaggggatgtgctgcaaggcgatgaagttgggtaaccgccagggtttccagtcacgacg  ttgtaaacgacggccagtgcgcgtaatacgaactatagggcgaattgggtaccggccccccctcgat  cggagctgcagggtatcgggggagctcggggctcctatttgaagcgggaggttgaacgcgcag</p>	10
199	17AALHYC_A AV6_L584N_pA AV-DJ	<p>ccgccatgccggggtttacgagattgtgattaaggtccccagcgacctgacgagcatctgccccgatttctgaca  gcttigtgaactgggtgcccagaaaggaatgggagttgccgccagattctgacatggatctgaatctgattgagcag  gcacccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgacttctgacggaatggcgcctgtgagtaaggccccgga  ggccctttcttctgcaatttgagaaggagagagctactccacatgcacgtgctcgtggaaaccaccgggtgaa  atccatggtttgggacgttctgagtcagattcgcgaaaaactgattcagagaattaccggggatcgagccgact  ttgccaaactgggtcgcgtcacaagaccagaatggcggcggggaacaaggtggtgagatgagtgcta  catccccaaactgtctccccaaaaccagcctgagctccagtgggcgtggactaatatggaacagattatagcgc  ctgttgaatcagggagcgtaaacggttggcgcagcatctgacgcacgtgctcagacgcagggagcagaa  caaaagagaatcagaatccaattctgatgcccgggtgatcagatcaaaaactcagccaggtacatggagctgctg  ggtggctcggacaagggttaccctcggagaagcagtggaicccaggaggaccagccctacatctctctcaa  tggccctccaactcgggtcccaatcaaggctgccttgacaatgcgggaagattatgagcctgactaaaacc  ggccccaactcctggtggccagcagcccgtggaggacattccagcaalcggattataaaatttgaactaaac  gggtacgacccccaatatgcgctcctctgttctgggagggccacgaaaaagttcggcaagaggaaacacatctg  gctgttggcctgcaactaccgggaagaccaatcgcggaggccatagcccactgtgcc</p>	20

【 0 4 3 6 】

【表 1 2 - 1 2】

	<p>cttcfacgggtgcgtaaacggaccaatgagaactttccctcaacgactgtgtcgacaagatggggaictgggtggga  ggagggggaagatgaccgcaaggtcgtggagtcggccaaagccattctcggggaagcaaggtgogcgtggac  cagaatgcaagtcctcggccagatagaccgacfcctcgtatcgtcacctcaacaccaatgctgcgccgtga  ttgacgggaactcaacgacctcgaacaccagccggttcaagaccggatgttcaaatggaactaccccgct  ctggatcatgacttgggaaggtcaccaaagcaggaaagcaaaagactttccggtgggcaaaaggatcacgtgtga  gggtggagcatgaattctcgtcaaaaagggtggagccaagaaaagaccgccccagtgacgagatataagtga  gccccaaacgggtcgcgagtcagttcgcagccatcgactcagacgagcggaaacttcgatcaactacgagaca  gggtacaaaacaatgttctcgtcacgtgggcatgaatctgatctgttccctcgagacaatcgagagaatgaatc  agaatcaaatatctcctcactcacggacagaaaactgtttagagcttccctcgtcagaatctcaaccggttctg  tcgtcaaaaaggcgtatcagaactgtgctcattcatatcatatcagggaaaggtgccagacgttgcactgcctgcg  atctggfcaatgtggattggatgactgcatcttgaacaataatgattaaatcaggatggctgccgatgttattctc  cagattggctcggagacaacctctcgtaggcattcgcgaggtgggactgaaacctggagccccgaaacca  aagccaaccagcaaaagcaggacgacggccgggtctgtgtcttctggctacaagtacctcggacctcaacg  gactcgaagggggagcccgtcaacgcggcggatgagcggccctcgaacacgacaaggcctacgaccagc  agctcaaaagcgggtgacaatccgtacctcgggtataaccacgcgacgccgagttcaggagcgtcgaagaag  atactgttttggggcaacctcggcggcagcgtctccaggccaagaggggtctcgaacctttgtctgtgtg  aggaaaggtgctaagacggctcgtgaaagaaacgtccggtagagcagtcgccacaagagccagactcctcctc  ggcattggcaagacagccagcagcccgtaaaaagagactcaatgtgtcagactggcactcagatcagctcc  ccgccccacaacctctcggagaacctccagcaacccccgctgctgtgggacctactacaatggctcagcgggtg  cgcaccaatggcagacaataacgaagcgcggcggagtgggtaatgcctcaggaatggcattgcgattccac  atggctggcgcagacagtcacaccaccgacccgaacatggcctfgcccactatacaaccacctctacaag  caaatctcagtcctcaacggggccagcaacgacaaccactactcggctacagcaccctgggggtatttga  ttcaacagattccactgacatttctaccacgtgactggcagcactcatcaacaacattggggaattccggccaa  gagactcaactcaagctctcaacatcaaagtcaggagggtcacgacgaatgatggcgtcagaccatcgtata  acctaccagcacgggtcaagctctcggactcggagtaccagttgccgtactcctcggctcgcaccagggct  gctcctcctcctcggcggcagctgttcatgattccgcaftacggctacctaacgctcaacaatggcagccaggca  gtgggacggatcctttactgcttgaatatttccatcgcagatgctgagaacgggcaataacttacctcagcta  cacctcggagcagctgctttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctcctc  gaccagctacgttattacctgaacagaactcagaatcagtcgggaagtgcccaaaacaaggactgctgtttagccg  ggggtctccagctgcatgtctttagcccaaaaactgctacctggaccctgtaccggcagcagcgcgttctaa  aacaanaacagacaacaacaagcaactttacctggactggtgctcaaaaataaacctaatggcgtgaatctat  aatcaacctggcactgctatggcctcacacaagagacaagacaagttcttccatgagcgggtgcatgatttt  ggaaaaggagcgcggagcttcaaacactgcatggacaatgcatgatcacagacgaaagggaaatcaaaagc  caactaacccctggccaccgaaagatttgggactgtggcagtcataaccagagcagcagcacagacctcgcgac  cggagatgcatgtatgggagcctaccctggaatgggtggcaagacagagacgtatactcaggggtcctatttg  ggccaaaatctcacacggatggacacttaccctctcctctcatggcggcttggacttaagcaccgctcct  cagatcctcaaaaacagcctgtctcggatcctccggcaga</p>
--	---

10

20

30

【 0 4 3 7】

【表 1 2 - 1 3】

		<p>gtttcggctacaaagttgctcattcatcaccagtaittccacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctg  cagaaagaaaacagcaaacgctggatcccgaagtgcagatatacatctaactatgcaaaatctgccaacggtgattc  actgtggacaacaatggactttatactgacctcgcgccattggcaccggtacccaccgctccctgtaattgtgtg  taatacaataaacgggtgattcgttcaagtgaactttggtctctgcgaagggcgaaatctgtaaacctgcagactaga  ggctctgtatagaggcagctgagtggttgcgacatttgcgacacatgtggctacgctgggtatttaagcccgag  gagcacgcagggctccatttgaagcgggaggttgaacgcgcagccccaagccgaaitctgcagatatccatc  acactggcggcgcctgactagagcggccgccaccgcggaggcctcagctttgtccctttagtgagggttaatt  gcgcgctggcgtaatcatgtatagctgttccgtgtgaaattgtatccgctcacaattccacacaacatacagc  cggagcataaagttaaaagcctgggggtccctaatgagtgagtaactacattaattgcgttgcgctactgccgc  ttccagctgggaaacctgctgctgagctgcaftaatgaaatcgccaacgcgcggggagagggcgtttgctattg  ggcgtcttccgcttctcgtcactgactgcctgcctgcctgctgcggcggcggagcgtatcagctcactcaaa  aggcggtaatacggttatccacaagaatcaggggataacgcaggaaaagaatgtgagcaaaaggccagcaaaag  gccaggaaaccgtaaaaaaggcggctgtgctggcgttttccatagggctccgcccccctgacgagcatcacaanaat  gacgctcaagtcagaggtggcgaaccggacaggactataaagataccaggcgtttcccctggaagctcccctgt  gcgctcctgttccgacctgcccgttaccggalacctgccccttctcccctgggaaagcgtggcgttctcata  gtcagcctgtaggatctcagctggtgagctgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagc  ccgacctgctgccttaccggtaactatcgtctgagccaaccggtaagacacgactatcggcactggcagca  gccactgtaacaggattagcagagcgggtatgtaggcggctcagagcttgaagtgggcttaactacg  gtctactagaagaacagatttggatctgcgctctgtgaaagcagttaccctggaaaaaggttggtagctctg  atccggcaaaaaccaccgctggtagcgggtgtttttgttgcagcagagattacgcgcagaaaaaaggat  ctcaagaagatccttctacgggctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttggctatg  agattatcaaaaaggatctcacctagaicctttaaaitaaaaatgaagttttaaaitcaatcaaaatataatgataaac  ttggtctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcagatctgtctatttcttcaaccatggtccga  ctccccgtctgtgataactcagatacgggagggcctaccatctggcccagctgcaatgataccgagagacc  acgctcaccgctccagattatcagcaaaaaaccagccagccggaaggccgagcgcagaaaggtgctcctgcaac  ttatccgctccatccagctatfaattgttccgggaagctagagtaagtagtccagtaaatagttgcgcaacgt  gtgccaatgctacaggcatcgtggtgacgctcgtcgttggatggctcattcagctccggttccaacgatcaag  gcgagttacatgatccccatgttgcgcaaaaagcggtagctcctcgggtcccgatcgttgcagaagtaagt  gccgaggttatcactcatgttatggcagcactgcataattcttactgcatccatccgtaagatgctttctgtga  ctggtgagtaactcaaccaagcttctgagaatagtgatgcggcgaccgagtgctcttggccggcgtcaatacggg  ataataccgcccacatagcagaactttaaagtgtctcattggaaaacgtcttggggcgaaaactcctaaggga  tcttaccgctgtgagatccagttgatglaaccactcgtgcaccaactgatctcagcatctttactttaccagcgt  ttctgggtgagcaaaaacaggaaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgttaatact  catactctccttttcaatatttgaagcattatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaaatgatttagaaa  ataaacaataagggttccgcgacatttccccgaaaagtgccacctaaatgtaagcgtfaattttgtaaaaatcgc  gttaattttgttaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcgg</p>
--	--	--

10

20

【 0 4 3 8】

30

【表 1 2 - 1 4】

		<p>caaaatccctfataaatcaaaagaatagaccgagatagggtgagtggttccagttggaacaagagttccactatfaa  agaacgtggactccaacgtcaaaaggcgaacaaaccgtctatcaggcgatggcccactctgaacctacacct  aatcaagtttttggggtcggggtcgggtaaaagcaataatcgaacccaaaggagccccgatttagactgac  ggggaaagccggcgaacgtggcgaagaaggaaaggaaagcgaaggagcgggctagggcgtggc  aaggttagcgggtcagcgtgcgtaaccacacaccggcggcctaatcgccgctacaggggcgtccattc  gccattcagggtgcgcaactgtgggaaggcgcgacgggtgcggcctctcgtattacggcagctggcgaagg  gggatgtgctcaaggcgattaagttgggtaaccggagggtttccagtcacgacgttgaaaacgacggccagtg  agcggcgttaaacgactactataggcgaattgggtaccggccccccctcagtcgaggtcagggatcggg  ggagctcgcagggtctccatttgaagcgggaggttgaacgcgcag</p>
200	17AALHZC_A AV6_L584H_pA AV-DJ	<p>ccgccatgccgggtttacgagattgtgattaagggtcccagcaccctgacgagcactcggccgatttctgaca  gcttltggaactgggtggccgagaaggaaatgggagttgcccagactctgacatgcatgtaactgattgacgag  gcacccctgaccgtggccgagaagctcagcgcgactttctgacggaatggcggcgtgtgagtaaggccccgga  ggccctttctgtcaattgagaaggagagagctacttccacatgacgctcctgggaaccaccgggtgaa  atccatggtttgggaggttctgagtcagattcgcgaaaaactgattcagagaattaccggggatcagccgact  ttccaaaactggttcggtgcacaaaaccagcctgagctccagttggcgtggcgtggaactaatggaacagttaagcgc  catcccaacttctgctcccaaaaccagcctgagctccagttggcgtggcgtggaactaatggaacagttaagcgc  ctgttgaatcaccggagcgtaaacggttggcgcacatctgacgcacgtgtcgcagacgcagggagcaga  caaagagaatcagaatcccaattctgatgcggcgtgatcagatcaaaactcagccaggtacatggagctggtcg  ggtggctcgtgacaagggtgattaccctggagaagcagtggaicaggaggaccagccctafacatctcttcaa  tgcggctccaactcggctcccaaatcaaggctgccttgacaatggggaagattatgacctgactaaaacc  gccccgactacctggtggccagcagcccgtggaggacattccagcaatcggaattataaaatttggaaactaac  gggtacgatcccaatagcggcttccgttctgggatggccacgaaaaagtccgcaagaggaaaccacctctg  gctgttggcctgcaactaccgggaagaccaacatcgcggagggccatagcccacactgtgccctctacgggtgc  gtaactggaccaatgagaacttccctcaacgactgtgtcacaagatggtgatctggtggaggagggggaagat  gaccgccaaggtcgtggagtcggccaaagccattctcggggaagcaaggtgcgcgtggaccagaaatgcaagt  cctcggccagatagaccgactcccgtgatcgtcacctccaacccaacatgtgcgccgtgattgacgggaactc  aacgacctcgaacaccagcagccgttcaagaccggatgtcaaatgaaactaccggcgtctggatcatgactt  tgggaaggctaccaagcaggaagcaaaacttttccgtggcgaaggatcacggtgtgaggtggagcatgaa  ttctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagaccgccccagtgacgagalataagtgaaccaaacgggt  gcgcgagtcagttgcgagccatcagcgtcagacgcggaagctcgtatcaactlacgagacaggtaccaaaacaa  atgtctcgtcaggtggcatgaatctgatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaaatatct  gcttcaactcagcagagaaaactgtttagagtgcttcccgtgtcagaaticcaaccgtttctcgtcaaaaaggc  gtatcagaactgtgctacattcatatcatgggaaagggtccagacgcttgcactgcctgcgatctgtcaatgtg  gattggatgactgcatcttgaacaataatgattaaatcaggatggcctggatggtatctccagattggctcga  ggacaacctctctgaggcattcgcgagttgggactgaaacctggagccccgaaacccaagccaaccagc  aaaaagcaggacgacggccgggtctggtgcttccctggctacaagctcggacctcaaccggactcgaacagg  gggagcccgtcaacgcggcggatgcagcggccctcagcagcagacaaggc</p>

10

20

30

【 0 4 3 9】

【表 1 2 - 1 5】

	<p>ctacgaccagcagctcaaacggggtgacaatccgtacctgcgggtataaccacgccgacgccgagttcaggagcgc  tctgcaagaagatacgtctttgggggcaacctcgggcgagcagcttccaggccaagaagggtctcgaacctt  ttggtctggttgaggaggtgctaaagcggctcctggaaaacgctccggtagagcagctgccacaagagccag  actcctcctcgggcatggcaagcagggccagcagcccgtaaaaagagactcaatttgggtcagactggcgactc  agagtcagctcccgaccacaacctctcgggagaacctccagcaacccccgctgctgctgggacctactacaatggct  tcaggcgggtggcgaccaatggcagacaataacgaaggcggcggacggagtggtatgcccaggaatggca  ttgcatccacatggtggcgacagagtcaccaccagcaccggaatggccttggccacctataacaac  cacctctacaagcaatctcagtgcttcaacggggccagcaacgacaaccactactcgggtacagaccctct  gggggtatttgattcaacagattccactgccattctcaccacgtgactggcagcgactcatcaacaacatgggg  atccggcccaagagactcaactcaagctctcaacatccaagtcaaggagtcacgacgaatgatggcgtcacga  ccatcgctaaataacctaccagcaggttcaagctctcggactcggagtgaccagttgccgtactcctcggctctgc  gcaccagggtgctcctccctcggcggcggagctgctcatgattccgcaagtacggctactcaacgcaacaatg  gcagccagcagctgggacggctactcttctcctggaatattcccacgcagatgctgagaacgggcaataact  ttacctcagctacacctcggagcagctgcttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatg  aatccctcctacgaccagctgattaccctgaacagaactcagaatcagctccggaagtggccaaaacaaggactg  ctgtttgaccggggtctccagctggcatgctgttcagccaaaactggctacctggaccctgtaccggcagcag  cggcttctaaaaaacaacagacaacaacaacgcaactttacctggactggtgcttcaaaataacctaatggg  cgtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacaaaagacgacaaagacaagttcttccatgagcggg  gtcatgattttgaaaggagagcggcggagcttcaaacactgcattggacaatgcatgatcacagcgaagagga  aatcaaaagcactaaccctggccaccgaaagattgggactggtgagctcaatcaccagagcagcagcacaaga  ccctggaccggagatgctgattgggagccttaccggatgggtggcaagacagagcagctatcctgag  ggctctattgggcaaaatctcacacggatggacacttaccctcctctcctcagggcgcttggactlaagca  ccgctcctcagatcctcaaaaaacgcctgtcctcgaatcctccggcagagtttggctacaaaagtgtgct  cattcatcaccagctatccacaggaagctgagcgtggagattgaaaggagctcagaaaacgcaaac  gctggaatcccgaagtgcagctatcactaactatgcaaaatcggcaacgttgattcactggtgacaacaatggact  tatactgagcctcggccatggcaccgttacctaccctcctcctgtaattgtgtgtaatacaataaaccggtgact  gtttcagttgaactttgctctcgaaggcgaaitcgtttaaactgcaggactagaggtcctgtattagaggtcacg  tgagtggttgcgacatttgcgacaccatgtgtcagcctgggtattaaagccgagtgagcagcaggggtcctat  tgaaaggggaggttgaacgcgcagccgcaagccgaaitctcagatatccatcacactggcggcctcagct  agagcggccgccaccgggtggagctccagctttgtcccttagtgagggttaattgcgccttggcgtaacatg  gtcatagctgttccctgtgtaaitgttaccgctcacaattccacacaacatagaccgggaagcataaagttaaag  cctgggggtgctaatgagtgagctaacacattaaitcgttgcgctcactgcccttccagctgggaaacctgtc  gtgccagctgcaatgaatcggccaacgcgcggggagagggcgttgcgtattggcgctcttccctcctcgc  tcactgactcgtcgcctcgtcgtcggctgcggcagcgggtatcagctcaactaaaggcggtataacggttaicc  acagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaaggaaccgtaaaaaag  gcccgtgctggcgttttccataggtccgccccctgacgagcatcaaaaatcagcgtcaagtcagaggtg  gcgaaaccgacagggactataaagat</p>
--	---

10

20

30

【表 1 2 - 1 6】

		<p>accaggcgttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgacctgccggtaccggataacctgtccgctt  tctccctcgggaaagcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggatctcagttcgggtgtaggtcgttccgctcaagc  tggcgtgtgtcacgaacccccgttcagcccaccgctgcgcttatccggtaactatcgtcttgagccaaccg  gtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggatgtagcgggtgcta  cagagttctgaaagtggcctaactacgctacactagaagaacagatattgggtatctgcgctctgctgaaagcag  tacctcggaaaaaggtgtgtagctctgatccggcaaaaccaccgctggtagcgggtgtttttgttgaagc  agcagattacgcgcaaaaaaaggatcaagaagatccttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaagc  aaaactcacgtaagggtttggctatgagattcaaaaaggatctcacctagatccttttaaaatgaaagttt  aatcaatctaaagtataatgagtaaacctggctgacagttaccaatgctaatcagtgaggcacctatctcagcagc  tgtctattctgtcatccatagttgcctgacccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggttaccatctggccc  cagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaag  ggccgagcgcagaagtggctcgaacattatccgctccatccagctatattgttgcgggaaagctagagtaag  tagtgcgcaatgattgttgcgcaacgttggcattgctacagcagcagctgtgtgtcagcgtcgtcgttggatg  ttcattcagctccggttccaacgcaaggcgaftacatgatccccatggtgtgcaaaaaagcggtagcctctc  ggctcccgacgtgtcagaagtaagtgcccgagtgatcactcatggtatggcagcactgcataaattcttact  gtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagctattcagaaatggtatgctggcacc  gagttgctctgcccggcgtcaatcgggataataccgcccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaa  acgttctcggggcgaaaaactcaaggatctaccgctgtgagatccagctcagatgtaaccactcgtgaccaccaac  tgatctcagcatctttacttaccagcgttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaaggga  ataaggcgacacggaaatgtgaatactcatacttcttcttcaatattatgaaagcattatcaggggtattgtc  agcggatacatattgaatgatttagaaaaataaacaataagggttccgcccacatttccccgaaaagtccaccta  aattgtaagcgttaataattgttaaaatcgcgttaaatgtttaaatacagctcatttttaaccaataggccgaaatcggc  aaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggtgaggtgtgttccagtttggacaagaagctccactataa  gaacgtggactccaacgtcaaggcgaaaaaaccgtctatcaggcagatggccactacgtgaaccatcaccccta  atcaagtttttgggtcaggtgcccgtaaaagcaactaaatcggaaacctaaaggagccccgatttagagctgacg  gggaaagccggcgaacgtgcccgaaggaagggaagaaagcgaaggagcggcglaggcgtcgtgca  agtgtagcggcagcgtcgcgtaaccaccacaccgcccgttaatgcgccgctacagggcgcgtccattc  ccattcagcgtcgaactgttggaaaggcagcgtgctggcctctctgctattacccaagctggcgaagggg  ggatgtgctgcaaggcgattagttgggtaaccaggggtttccagtcacgactgtgtaaaacgacggccagtg  gcgcgctgtaatacagctcactataggcgaattgggtaccggccccctcgtatcgaggctcagcgggtatcgggg  gagctcgcagggtcctcatttgaagcgggaggttgaacgcgcag</p>	10
201	17AALH2C_AA V6_L584D_pAA V-DJ	<p>ccgccatgccgggtttacgagattgtgattaagggtcccaaggcaccctgacgagcatctgccggcatttctgaca  gctttgtgaactgggtggccgagaaggaaatgggagttgccccaagattctgacatggatctgaatcigatigacag  gcacccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgacltctgacggaatggcggcgtgtgagtaaggccccgga  ggccctttctgtgcaattgagaaggagagagctactccacatgcacgtgctcgtggaaccaccgggtgaa  atccatggtttgggacgttctgagtcagattcgcgaaaaactgattcagagaattaccgc</p>	20

【 0 4 4 1】

【表 1 2 - 1 7】

	<p>gggatcgagccgactffgccaactggtcgcgggtcacaagaccagaaatggcgcgggagggcgggacaaggt  ggfggatgagtgctacatccccaaactgctccccaaaaccagcctgagctccagtgggcgtggactaatatgg  aacagtattaaagcgcctgftgaatctcacggagcgtaaacgggtggcgcagcatctgacgcacgtgtcgcag  acgcaggagcagaacaaagagaatcgaatccaaactgatgcgccggatgatcaaaaactcagccaggt  acatggagctggcgggtggctcgtggacaaggggattacctcggagaagcagtgatccaggaggaccaggcc  tcatacatctcctcaatggcctccaactcgcggtcccaaaicaaggctgcctggacaatgggaaagattatg  agcctgactaaaaccgccccgactacctggtggccagcagccggtggagacattccagcaatcggattata  aaatftggaactaaacgggtacgatccccaatatggccttccgtcttctgggatgggcccagaaaaatggca  agaggaacaccatctgctgftggcctgcaactaccgggaagaccaacatcgggagggccatagccacactg  tgcctctacgggtgcgtaaaactggaccaatgagaactttccctcaacgactgtgacagaatggatctggtg  ggaggaggggaaatgaccgccaaggctggtggagtcggcgaagccattctggaggaaagcaaggctgcgctg  ggaccagaatgcaagctcctggcccagatagaccgactccctgatcgtacccccaacaccaatgctgccc  tgattgacgggaactcaacacctcgaacaccagcagccggtgcaagaccgagatgtcaaatggactccccgc  cgtctgcatgactttgggaaggtaccaagcaggaaatcaagactttccgggtggcgaaggatcacgtgggt  gaggtggagcatgaattctacgtaaaaagggtggagccaagaaaaacccgccccagtgacgcagataaagt  gagcccaaacgggtgcgagtgctgagccatcgcagcagcggaaagctcagatcaactacgcagaga  caggtaccaaaaacaatgtctcgtcacgtggcatgaatctgatgctgttccctcagacaatgcgagagaatgaa  tcagaattcaaatatctgctcactcagcagacaagaaactgfttagagtgcttccgtgacagaatcaaccgctt  tgtctcaaaaaggctatcagaactgtgctacattcatatcatgggaaaaggccagacgctgactgcctg  cgatctggtcaatgtggattggatgactcatcttgaacaataatgattaaatcaggtatggctgcccgtatct  tccagattggctcagggacaacctctctgaggcattcgcgagtggtggactgaaacctggagccccgaaacc  aaagccaaccagcaaaagcagggacgagccggggctggtgctcctggctacaagtacctcggaccctcaac  ggactcgacaagggggagcccgtcaacgcggcggatgcagcggcccicgagcagcaagccctacgaccag  cagctcaagcgggtgacaatccgtacctgctggtataaccacgccgacgccgagttcaggagcgtcgaagaa  gatacgtctttggggcaacctcgggcgagcagcttccagccaagaaagaggggtctgaacctttggtctggt  gaggaagggtgctaagacgctcctggaaagaaacgtccggtagagcagtcgccacaagagccagacctctc  gggcatggcaagacagggccagcagcccctaaaaagagactcaatttggctcagactggcactcagagtcagt  ccccgaccacaacctcggagaacctccagcaacccccgtgctggtggactactacaatggctcagggcgt  ggcgcaccaatggcagacaataacgaaggcggcagcggatggtaatcctcaggaaitggcatgctgattcc  acatggctgggcagacagtcacaccaccagcaccgaacatgggctgcccactataaaccacctctaca  agcaaatctcagtgctcaacgggggccaagcaacgacaaccactactcggctacagcaccctgggggtatft  gattcaacagatfccaactgcaattctcaccagtgactggcagcagctcatcaacaacatggggattccggccc  aagagactcaactcaagctctcaacatccaagtcaaggaggtcacgacgaatgatggcgtcacgaccatcgctaa  taacctaccagcaggtcaagctctcggactcggagtagcaggtgacctcctcggctcggcaccagggg  ctgcctccctcgttccgggacgtgtcatgattccgagtagcggctacctaaccgtcaacaatggcagccagg  cagtgaggacgtcatcctttactcctggaataftccatcgagatgctgagaacgggcaataactttacctcagc  tacacctcgaggacgtgcctttccacagcagctacggcagcagccagagcctg</p>
--	---

10

20

30

【 0 4 4 2】

【表 1 2 - 1 8】

		<p>gaccggctgatgaatcctctcatcgaccagctaccgtattacctgaacagaactcagaatcagtcggaaagtgccaa  aacaaggactgctgtttagccgggggtctccagctggcatgctgttcagccaaaaactggctacctggaccctgt  taccggcagcagcgcgtttctaaaaacaaacagacaacaacacagcaactttacctggactggctctcaaaat  aacctfaatggcgtgaaatctataatcaaccctggcactgctatggcctcacacaaagacgacaaagacaaagtcttc  ccatgagcgggtgcatgatTTTTGAAAAGGAGAGCGCCGGAGCTCAAACACTGATTGGACAATGTCATGATCACAG  acgaaaggaaatcaaaagccactaacccgtggccaccgaaagatttgggactgtggcagtcaatgaccagagca  gcagcacagaccctgcgaccggagatgcatgttatgggagcctaccggaaatgggtggcaagacagagacg  tatactcagggctctatttggccaaaatcctcacacggatggacactttcacccgtcctctcatgggcggctt  ggacttaagcaccgccctcctcagatcctcatcaaaaacacgctgttctcgaaatcctccggcagagtttcggct  acaaagtgttcttcatcatcaccagatccacagagacaagtgagcgtggagattgaaatgggagctgcagaaaga  aaacagcaaacgctggaatcccgaaagtgcagtatacatctaactatgcaaaatctccaacgttgattcactgtgga  caacaatggactttatactgagcctcgccccattggcacccgtfacctaccctccccgtgaattgtgttaatacaata  aaccgggtgattcgtttcagttgaacttggctctctgcgaaggcggaattcttaaacctgcaggactagaggtcctgt  attagaaggcagcgtgagtggtttgcgacatttgcgacacatgtggtcactgctgggtattaaagccgagtgacg  cagggtctccatttgaagcgggaggttgaacgcgagccgccaagccgaattctcgagatatcatcacactggc  ggccgctcactagagcggccaccgcgggtggagctccagcttcttccctttagtgagggttaattgcggctt  ggcgtaatcatggtatagctgttctgtgaaattgtatccgctcacaattccacacatacagccggaaagc  ataaagtfaaacctggggtgctaatgagtgagctaactacattaattcgttgcgctcactgcccgttccagtc  gggaaacctgtcgtccagctgcaatgaatggcaacgcgcgggagagggcgtttgcgtattggcgctct  tccgcttctcactgactcgtcgtcgtcgttccgctgctggcgagcggtaicagctcactcaaaagcgggt  aatcgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccagga  accgtaaaaaggccgctgtctggcgttttccataggtccgccccctgacgagcaicacaaaaatcagcgtca  agtcaagggtggcgaaccggacagactataaagataccagcgttccccctggaagctccctcgtgcgtctc  ctgttccgaccctggcgttaccggatccttccgcttctccctcgggaagcgtggcgtttctcatagctcagc  tffaggtatctcagctcgggtgagctgtcctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccctcagcccaccgc  tggccttatccgtaactatcgtctgagtcacaaccggtaagacacgactatcggcactggcagcagccactgg  aacaggattagcagagcggatgtagcgggtctacagagttctgaaagtgggtgcttaactcggctacactag  aagaacagatattggtatctgcgctcgtgaaagcagttacctcggaaaaagagttggtagctcttgalccggcaaa  caaacaccgctggtagcgggtgtttttgttgaagcagcagattacgcgagaaaaaaaggatctcaagaagat  ccttggatctttctacgggctcagcgtcagtggaacgaaaactcaggttaaggatttggctatgagattatcaaaa  aggatctcacctagatcctttaaataaaaaatgaagttttaaataatcaatctaaagtatatagtaaacctggctcagag  ttaccaatgctaatcagtgaggcacctatctcagcagatctgtctatttctgtcatccatagttgctgactccccgtctg  tagataactacgatacgggagggcctaccatctggccccagctgcaatgataccgagagaccacgctcaccgg  ctccagattatcagcaataaaccgccaagccggaaggccgagcgcagaagtggctcgtcaactttatccgctc  catccagcttataattgttccgggaagctagagtaagtagtccaggttaagtttgcgcaacgtgtgctattgct  tacaggcatcgtggtcagcctcgtcttggatggcttcatcagctccgggtcccaacgatcaaggcg</p>
--	--	--

10

20

【 0 4 4 3】

30

【表 1 2 - 1 9】

		<p>agttacatgatccccatggtgtgcaaaaaagcgggttagctcctcggctcccgatcgttgcagaagtaagttggcc  gcatggtatcactcatggtatggcagcactgcataatctctactgcatgccatccgtaagatgctttctgtgactg  gtgagctcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttcccggcgtcaatacgggata  ataccgcgccacatagcgaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgttctcggggcgaaaactcacaaggatctt  accgctgtgagatccagtcgatgtaaccactcgtgcacccaactgatcttcagcaatcttactttcaccagcgttct  gggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgcccaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaatacat  acitctctttcaatattatgaagcattatcaggggtattgtctcatgagcggafacataatgaatgatttgaaaaata  aacaatagggttccgcgcacattcccgaaaagtccacctaattgtaagcgttaaatgttgaataatcgcgtt  aaatgttgaatacagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatccctataaaatcaaaagaatagccga  gatagggtgagtggtgtccagtttgaacaagagtgccactattaagAACgtgactccaacgtcaaggggcga  aaccgctatcaggggcagggccactacgtgaacatcacccatcaatcaatgtttttggggtcaggggtccgtaaac  actaaatcggaaacctaaaggagccccgatttagagctgacgggaaagccggcgaacgtggcgaagaag  gaaagggaagaaagcgaaggagcggcgctagggcgctggcaagtgtagcggctacgctgcgcaaccacc  acaccggcgcttaatgcgctcagggcgctccattcgcattcggcgaactgttgggaagg  cgatcgtgcgggcctctcgtattaccagcctggcgaaggggatgtgctgcaaggcgatttgaaggtaa  cgccagggttttccagtcacgactgtgtaaacgacggccagtgagcgcgtaatacactacatagggcga  attgggtaccggccccctcgtcaggtcagcggatcgggggagctcgcagggtctcattttgaagcggg  aggttgaacgcgag</p>	10
202	17AALH3C_AA V6_V598L_pAA V-DJ	<p>ccgcatgcccgggtttacgagattgtgattaagggtccccagcgaacttgacgagcatctgcccggcatttctgaca  gctttgtaactgggtgcccgagaagggaatgggagttgccccaagattctgacatggaatcgaatctgattgagcag  gcaccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgacttctgacggaatggcgcctgtgtgagtaaggccccgga  ggccctttctgtgcaattgagaaggagagactactccatgacacgtgctcgtggaaccaccgggggtgaa  atcatggtttgggacgttctgagtcagatcgcgaaaaactgattcagagaattaccgcgggatcagccgact  ttgccaaactgggtcgggtcacaagaccgaaatggcggcggagcgggaacaagggtgtggaatgagtgctc  catccccaaactgtctccccaaaaccagcctgagctccagtgggcgtggactaataatggaacagtaattaaaggc  ctgttgaatcaccggagcgtaaacgggtgggtggcgcagcatctgacgcacgtgtcgcagacgcaggagcaga  caaaggaatcagaatccaattctgatcggccggtgatcagatcaaaaactcagccagggtacatggagctgctc  gggtgctcgtggacaagggttaccctcggagaagcagtgatccaggaggaccaggcctacatcctcctca  tgcggcctccaactcgcggtcccaaatcaaggctgcttggacaatgggaaagattatgagcctgactaaaacc  gccccgactacctggtggccagcagccgtggaggacattccagcaatcggattataaaatgttgaactaaac  gggtacgatccccaatatgcggtctcgtcttctgggatgggccacgaaaaagtgcgcaagggaacaccatctg  gctgttggcctgcaactaccgggaagaccaacatcgcggaggccatagcccacactgtgccctctacgggtgc  gtaaacggaccaatgagaacttccctcaacgactgtgtcacaagatggtgatctgggtgggaggaagggaagat  gaccgcaaggctggtgagtcggcaaaagccattctcgagggaagcaagggtgcgctggaccagaatgcaagt  cctgcccagatagaccgactccgtgatcgtcacctcaacaccaacatgtcggcgtgattgacgggaactc  aacgactcgaacaccagcagcgtgcaagaccgatgtcaaatgtaactcaccgctctgatcatgactt  tgggaagtcaccaagcaggaagcaaacgtttccgggtggcaaggatc</p>	20

10

20

30

【表 1 2 - 2 0】

	<p>acgtggtfagggfaggatgaattctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagaccgccccagtgacgca  gataaagfagcccaaacgggctgcgcgagtcagttgagcagccatcgacgctcagacgggaagctcgaatcaac  tacgcagacaggtacaaaacaatgttctcgtcacgtgggcatgaatctgatgctgttccctcgacacaatcgag  agaatgaatcagaatcaaatatctgtctcactcacggacagaaaactggttagagtgcttcccgtgcagaatctca  accggttctgtcgtcaaaaaggctgatcagaactgtgctacattcatatcatatgggaaagggtgccagacgcttgc  actgctcgcgatctggtcaatggtgattggatgactgcatcttgaacaataaatgattaaatcaggatggctgcccga  tggttatctccagattggctcgaaggacaacctctctgagggcattcgcgagtggtgggacttgaacctggagcccc  gaaaccaaaagccaaccagcaaaaagcaggacgacggccggggtctggtgcttctggtctacaagtacctggac  ctftcaacggactcgacaagggggagcccgtcaacgcggcggatgcagcggccctcgagcagcacaaggccta  cgaccagcagctcaagcgggtgacaatccgtacctgctggatataaccacgccgacgccgagttcaggagcgtct  gcaagagatacgtcttggggcaacctcgggcgagcagctctccaggccaagaagggttctcgaacctttg  gtctggttgaggaagggtgtaagacggctcctggaaagaaactccggtagagcagtcgccacaagagccagact  cctctcgggcatggcaagcagccagcagcccgtaaaaagagactcaatttggctcagactggcgactcaga  gtcagtcaccgaccacaacctctcgagaacctccagcaacccccgctgctgggacctactacaattggcttca  ggcgggtggcgcaccaatggcagacaataacgaaggcggcggcagcagtggtgtaatgctcaggaattggcattg  cgattccacatggctgggcgagagtcacaccacagcaccgaacatgggcccctggccacctataacaaccac  ctctacaagcaaatctcagctcctcaacggggccagcaacgacaaccactctcggctacagccccctggg  ggatthtgattcaacagattccactgaccttctaccacgtgactggcagcagactcatcaacaacaattgggattc  cggcccaagagactcaactcaagctctcaacatcaagtcaggaggtcacgacgaatgatggctcagacca  tcgtaataacctaccagcacggtcaagctctcggactggagtagcagtgccgtacgctcctggctctcgca  ccaggcctcctccccttccggcgagctgttcatgattccgcagtagcctaacgctcaacaatggca  gccaggcagtgaggacggctatcttactgcctggaatatttccatcgagatgctgagaacgggcaalaactttac  ctcagctacacctcagagcagtgcttccacagcagctacgcccacagcagcctggaccggctgagatgaat  cctctcagcagcagctgattacctgaacagaactcagaatcagctcggagtgcccaaaaacaaggacttctg  tttagccggggctcctcagctggcatgctgttcagcccaaaaactggctacctggaccctgttaccggcagcagcgt  cgtttcaaaaacaaaacagacaacaacaacagcaacttacctggactggtgcttcaaaatataacctaatggcgt  gaaatataatcaacctggcactgctatggcctcacaaaagcagacaagacaagtcttccatgagcgtgctc  atgattttgaaaaggagcggcgggactcaaacactgattggacaatgcatgatcacagcagaagaggaaat  caaaagccactaacccgtggccaccgaaagattgggactgtggcagtaatctccagagcagcagcagacc  tgcaccggagatgctcatctatgggagccttacctggaatggtgtggcaagacagagcgtatctcaggggtc  ctattggccaaaattcctcacaggaaggacattcaccctctcctctatggcggcttggacttaagcacc  gcctctcagatctcatcaaaaacacgcctgttctcggcaatctccggcagagtttctggctcaaaagtgtcttatt  catcaccagattccacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcagaaaacaaacgcaaacgctg  gaatcccgaagtgagatcatcactatgcaaaatctgccaactgatttactgtggacaacaatggactttata  ctgagccctgccattggcaccgttacctcaccgtcccctgtaattgtgtttaatcaataaacgggttattcgtti  cagttgaaacttggctctcgaaggcgaattcgttaaacctgcaggactagaggctcctgtattagaggtcacgtga  gtgtttgcgacatttgcgacacctgt</p>
--	---

10

20

30

【 0 4 4 5】

【表 1 2 - 2 1】

	<p>ggtcacgctgggtatattaagcccagtgagcacgcagggtcctcatttgaagcgggagggttgaacgcgcagccg  ccaagccgaattctcgagatatacactggcggccgctcactagagcggccgccaccgcggggagctcc  agctttgtcccttagtgagggttaaitgcgcgctggcgtaatcatggtcagctgttctctgtgaaattgtatccg  ctcacaattccacacaacatacagccggaaagcataaagttaaagcctggggtgcctaatagtgagctaacacac  atlaaitgcggtgcctcactgccccttccagtcgggaacctgctgccagctgattaatgaatggccaacgc  gcggggagaggcgggttgcgtatfggcgctctccgcttccgctcactgactcgcgctcgcgctggctg  cggcgagcgggtatcagctcactcaaaaggcggtaatacgggtatccacagaiaaggggataaacgaggaaagaa  atgfgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccggtgctggcgtttttccataggtccgc  ccccctgacgagcatcaaaaatgacgctcaagtcagagggtggcgaaccggacagggactataagataccag  ggctttccccctggaagctccctgctgcctcctctgtccgacctggcctaccggataacctgccccttctccc  ttcgggagcgtggcgtttctcagctcagcgtgtaggtatctcagttcgggtgtaggtctgctcccaagctgggt  gtggtgacgaacccccctgaccccggcctgctgccttaccggtaactatcgtctgagttcaacccgtaaga  cacgactatcggcactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgggtatgtaggggtgctacagagt  tcttgaagtgggtgcctaactacggctacactagaagaacagatttggatctgctgctgtaagccagttacctc  ggaaaaagagttgtagctctgacccggcaacaaccaccgctgtagcgggtggtttttttgcaagcagcag  atfacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatccttggatcttttctacgggctgagcgtcagtggaacgaaaac  tcacgtaagggtttggctcagattatcaaaaaggatctcacctagatcctttaaataaaaatgaagttaaatc  aatctaaagtataatagtaaaactggtctgacagttaaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcgtctgct  atfctgtatcatagtgctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggttaccalcggccccagtg  ctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccaaccggaaaggccg  agcgcagaagtggctcctcaactttaccgctccatccagctattaattgttggcgggagctagagtaagtagttc  gccagttaatggttgcgcaacgttggccattgctacaggcatcgtggtgctcagcgtcgtgttggtatggcttcaftc  agctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggtgcaaaaaagcgggttagctcctcggctcct  ccgatcgtgctcagaagtaagttggccgagtgatcactcaggttatggcagcactgcataatccttactgtcatg  ccatccgtaagatgctttctgtgactgggtgagtaactcaaccaagtcattctgagaatagtgatggcgaccgagttg  ctcttggccggcgtcaatacgggataatccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattgaaaaactgtct  tcggggcgaaaactctcaagatctaccgctgttgatccaagctcaggttaaccacactgctgcaaccaactgactt  cagcatctttacttaccagcgttctgggtgagcaaaaacagggaaggcaaaatgcccaaaaaagggaataagg  gcgacacggaaatgtgaaatactatactctccttttcaataatattgaagcattatcagggtattgtctcatgagcgg  atacatattgaatgatttagaaaaatacaaatagggttcgcgcacatttccccgaaaagtgccacctaattgt  aagcgttaataattttgtaaaatcgcgttaaaatgtttaaatacagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaat  cccttaataatcaaaagaatagaccgagatagggtgagtggttccagtttggaaacagagctcactatataaagaac  gtggacccaacgtcaaaaggcgaaaaacogtctatcagggcgatggcccactacgtgaacctaccctaatcaaa  gtttttggggctgaggtgcccgtaaaactaaatcggaaacctaaagggaacccccgatttagagctgacggggga  aagccggcgaacgtggcggaagggaagggaagaaagcgaaggagcggcgctagggcgctggcaaggtg  agcggctcacgctggcgttaaccaccacaccggcggcgttaatgcccgtacagggcgctg</p>
--	---

10

20

30

【 0 4 4 6 】

【表 1 2 - 2 2】

		cccattcgcattcaggctgcgcaactgttgggaaggcgatcgggtcgggctcttcgctattaccagctggcg aaaggggatgtgctcaaggcgattaagtgggtaaccaggggtttccagtcacgacgttataaacgacgg ccagtgaagcgcgtaatacgaactcactatagggcgaattgggtaccggcccccctcgaacgagctgacggg atcgggggagctcgcagggtcctccatttgaagcgggaggttgaacgcgag
203	17AALH5C_AA V6_H642N_pA AV-DJ	ccgcatgccgggtttacgagattgtgattaaggfcccagcgaccttgacgagcatctgccggcatttctgaca gctttgtaactgggtggccgagaaggaaatgggaggtgccggcagattctgacatggatctgaatctgattgagcag gcaccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgacttctgacggaatggcggcgtgtgagtaaggccccgga ggccctttcttctgcaattgagaaggagagagctactccacatgcacgtgctcgtgaaaccaccgggtgaa atccatggtttgggacgttctctgagtcagattcggaaaaactgattcagagaattaccgggacatcagccgact ttgcaaacctgggtcgcggtcacaagaccagaaatggcgccggagggggaacaagggtggtgagtgagtgcta catcccaatctgctcctcccaaacccagcctgagctccagtgggcgtgactaataatggaacagattataagcgc ctgttgaatctcacggagcgtataacgggtggtggcgacatctgacgacgtgtcgcagacgcaggagcagaa caagagaaatcagaatcccaattctgagcggcggatcagcaaaaaactcagccaggatcagagctggctg gggtgctcgtgacaaagggtattacctgggaagcagtggtccaggagaccaggcctcatacatctcctca tggcctccaactcgggtcccaaatcaaggctcctgggacaatcgggaaagattatgagcctgactaaaacc gccccgactacctggtggccagcagcccgtggagacattccgcaatcggattataaaatttggaaactaac gggtacgatcccaatagcggcttccgttctgggatggccacgaaaaagtggcgaagggaacacatctg gctgttggcctgcaactaccgggagaccacacatcgggagccatagccacactgtgcccctctacgggtgc gtaaacggaccaatgagaaacttccctcaacgactgtgcaagaatggtgatctggggagggagggaagat gaccgcaaggtcgtgagtcgccaagaccattctgggaggaagcaagggtgctggaccagaaatgcaagt cctcggccagatagaccgactcccgatcgtcaccccaacccaacatgtgcccgtgattgacgggaactc aacgacctgaacaccaagcagcgggtgcaagaccggatgttcaattgaactaccgccgtcggatcagact tgggaaggtcaccagcaggaagcaaaagactttccgggtggcgaaggatcacgtggttggaggtgagcatgaa ttctacgtcaaaaagggtggagccaaagaaaagaccgccccagtgacgagataatgagcccaaacgggt gcgagcagctgctgcagcattcagctcagacgcggaagcttcgatcaactcgcagacaggtacaaaacaa atgttctcgtcacgtggcatgaatctgagctgttccctcagacaatgcgagagaatgaatcagaatcaaatatct gctcactcagggacagaagactgtttagagtgcttccgtgcaaatcaaccgttctgtcgtcaaaaaggc gtatcagaactgtgctacattcatatcattggaaaagggtgccagacgctgcaactgctcagatctggtcaatgtg gatttgatgactgcatcttgaacaataaatgattaaatcaggtatggctgccgatggttatctccagattggctcga ggacaacctctctgagggcattcgcgagtggtgggacttgaacctggagccccgaaacccaagccaaccagc aaaagcagagcagcggccgggtctggtgctcctggctacaagtacctggaccctcaacggactcgaacagg gggagcccgtcacgcggcgatcagcggccctcagcagcagaagcctacgaccagcagctcaaacggg gtgacaatccgtacctgctgataaccacggcagcggaggttccagagcgtctgcaagaagatacgtctttggg ggcaacctcgggagcagctcagcggcgaagaagggttcgaaacctttggtctggttgggaaaggtgctaa gacggctcctggaaagaaactcggtagagcagctgccacaagaccagactcctcctcgggcaatggcaaga cagggcagcagcccgtaaaaagagactcaatttgggtcagactggcactcagagtcagctcccgaccacaac ctctggagaacctccagcaacccccgctgctgggacctacta

10

20

30

【表 1 2 - 2 3】

		<p>caatggcttcaggcgggtggcgaccaatggcagacaataacgaagggccgacggagtgggtaatgccctcagga  aaitggcattgcgattccacatggctggcgacagagtcacaccaccagcaccggaacatgggcttggcccact  ataacaaccacctctacaagcaaatctccagtgcttcaacggggccagcaacgacaaccactactcggctacag  caccctgggggtatfttgatfcaacaagctccactgcccattctaccacgtgactggcagcgactcatcaacaac  aaitggggatfcccggccaaagagactcaactcaagctctcaacatccaagtcaggaggtcacgacgaaatgatgg  cgtcacgaccatcgctaataaccttaccagcacgggtcaagctctcggactcggagtaccagttgccgtacgtctc  ggctctgcgaccagggtcctccctccgttccggcgacgtgttcatgattccgagctacggctacctaaccgt  caacaatggcagccagggcagtgaggacgtcatcttctactgctggaatattccatcgagatgtgagaacgg  gcaataacttacctcagctacaccttcgaggacgtgcttccacagcagctacggcacagccagagcctggac  cggctgatgaactctctcatcgaccagctctgtattacgtgaacagaactcagaatcagtcggaaatggccaaaac  aaggactgctgttagccgggggtctcagctggcatgctgttcagccaaaaactggctacctggaccctgttac  cggcagcagcgcgttctaaacaaaaacagacaacaacaacagcaactttacctggactggtgtctcaaatataa  cctfaatggggtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacaaaagacgacaaagacaagttcttccc  atgagcgggtgatgattttgaaaggagagcggccggagctcaaacactgcatggacaatgtcatgatcacagac  gaaaggaaatcaaaagccactaacccgtggccaccgaaagatttggactgtggcagtcacatccagagcagc  agcacagaccctggaccggagatgtcatgttatgggagccttacctggaatggtgtggcaagacagagcgtat  acctgacgggtcctatttggccaaaatctcacacggatggacacttaccctcctctcatggggccttgg  actaagaaccggcctccicagatctcatcaaaaacacccgttctcgcgaatctccggcagagttttggctaca  aagttgtctcatcaccagatctccacagacagtgagcgtggagatgaatgggagctgcagaaagaaaa  cagcaaacgctggaatccggaagtgagtalacatctaactatgcaaaatctgccaacgttgatttcactgtggaaa  caatggactttactgagcctcggccattggcaccctgtacctaccctgtaattgtgttaatacaataaac  cgggtgattcgttcaagttgaacttggctctcggaaaggcgaattcgttaaacctgcaggactagaggtcctgata  gaggcacgtgagtggttgcgacatttgcgacaccatgtgtcagctgggtalitaagccagtgagcacgacgag  ggctcctatttgaagcgggaggttgaacgcgacgcccgaagccgaattctcagatalccatcactggcggc  cgtcagactagagcggccggccaccgggtggagctccagcttcttcccttagtgagggttaattgcgccttggc  gtaatcatggtcatagctgttccgtgtgaaattgtatccgtcacaalccacacaacatacagccggaaagcataa  agtgtaaagcctgggtgcctaatgagtgagctaacacattaattgcgttgcctactgcccgcttccagtcggg  aaacctgtcgtgccagctgcaatgaatcggccaacgcgggggagagggcgttgcgtattgggcctctccg  cttctcgtcactgactcgtcgtcgttctcgtcgtcggcgagcgggtatcagctcactcaaaaggcgttaatac  ggttatccagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccg  taaaaaggccgctgtgctggcttctcataggtcctcccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgtcaagtc  agaggtggcgaacccgacaggactataaagataaccaggcgttcccccgggaagtcctcctgctcctctgtt  ccgacctgcccgttaccggatactgtccgcttctccctcgggaaagcgtggcgttctcatagctcacgctgta  ggatctcagttcgggtgaggtgttcgtccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgc  gcttatccggtaactatgctttagtccaaccggtaagacacgacttatgccactggcagcagccactggtaac  aggattagcagagcaggtatgtaggcgtctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaag  aacaglatttggtac</p>
--	--	--

10

20

30

【 0 4 4 8 】

【表 1 2 - 2 4】

		<p>tgcgctctgctgaaaccagttaccttcggaaaaagagttggtagctctgatccggcaacaaccaccgctgtag  cgggtggtttttgttgcagcagcagattacgcgcaaaaaaggatcgaagaagatccttgaictttctacggg  gtctgacgctcagtggaacgaaactcacgttaaggatttggctatgagatfatcaaaaaggatcttccatgac  cttttaaaataaaaatgaagtttaaaactaatcaaaagtataatgagtaaaacttggctgacagttaccaatgcttaacagt  gaggcacctatctcagcgaictgtctatttcttccatcagttgctgactcccgtgtagataactacgatacgg  gagggttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctaccggctccagattatcagcaat  aaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtgctcctcaactttatccgctccatccagictatataatgtg  ccgggaagctagagtaagtagtgcagtaataatgttgcgcaactgttgcattgctacagggatcgtggtgca  cgctcgtcgtttgtagtgcctcattcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggtgca  aaaagcgggttagctcctcggctcccgatcgttgcagaagtaagttggccgaggtttatcactcatggtatggcag  cactgcataattcttactgtcatgcatccgtaagatgcttttctgtgactgtgagtactaaccaagctattctgaga  atagtgtagtggcgaccgagtgctcttgcggcgtaataacgggataataccggccacatagcagaacttaa  aagtgctcatctggaacgtcttccggcgcaaaactcicaaggatctaccgctgttggatccagctcagatgaa  cccactcgtgcaccaactgatctcagcatcttacttccaccagcttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaa  atccgcgcaaaaagggaataaggcgacacggaatgtgaatactcactcttcttttaataatfaggaagcattt  atcagggtatgtctcatgagcggatacatattgaatgtattgaaaaataaacaataggggtccgcgacattc  cccgaagtgcacctaattgtaagcgttaattttgtaaaatcgcgttaattttgtaaatcagctatttttaac  caataggccgaaatcggcaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggtgagtggttccagttgg  aacaagagtcacactataaagaactgagactcaacgtcaaaaggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcca  ctactgaaaccatccctaatcaagtttttgggtcaggtgcccgtaaagcactaaatcgaaccctaaaggggagc  ccccgatttagactgacggggaaaagccggcgaacgtggcgagaaaaggagggaagaaagcgaagggagcg  ggcgctaggcgctggcaagtgtgagcgtcagctgcgtaaccaccacaccggcgttaatgcccgt  acaggcgctgccattcggcattcaggctgcgcaactgttgggaaggcgatcgtgctggcctctcgtctattac  ggcagctggcgaaaaggggatgtctgcaaggcgattaaagtgggtaacggcagggtttccagctacgagctgtg  taaaacgacggccagtggcgcgtaatacgaactcactataggcggaattgggtaccgggccccctcgaicg  aggtcagcgtatcggggagctcgcagggtcctcatttgaagcgggaggttgaacgcgcag</p>	10
204	17AALH6C_AA V6_F129L_H64 2N_pAAV-DJ	<p>ccgcatcccgggttttacgagattgtgattaaaggctcccagcgacctgacgagcatctgcccggcatttctgaca  gctttgtaactgggtggccgagaagggaatgggaggttgcggcagatctgacatggaatctgattgagcag  gcacccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgactttctgacggaaatggcggcgtgtgagtaaggccccgga  ggccctttctgtgcaatttgagaaggagagagctacttccacatgcacgtgctcgtggaaaccaccggggtgaa  atccatgggtttggcagtttctgagtcagattcgcgaaaaactgattcagagaatttaccgggagcagccgact  ttgccaaactggttcgggtcacaagaccagaatggcggcggagggggaacaagggtggtggtgagtgacta  catccccaaftacttgcccccaaaaccagcctgagctcagtgggcgtggaactaataatggaacgatttaagcgc  ctgtttgaaatcagggagcgtaaacgggtgggtggcgcagcatctgacgcacgtgtcgcagacgcaggaagcaga  caaaagagaatcagaatccaatctgatcggcgggtgatcagatcaaaaactcagccaggtacatggagctggtcg  gggtgctcgtggacaagggttacctcggagaagcagtgatccaggagga</p>	20

【 0 4 4 9】

【表 1 2 - 2 5】

	<p>ccaggcctcatacatctcctcaaiaggccctccaactcgggtcccaaatcaaggctgcctfaggacaafgcgggaa  agattafagcctgactaaaaccgcccggactacofggggccagcagcccgtggaggacattccagcaatcg  gattataaaatfaggactaaaagggtacgatcccaatagcgggtccgtcttctgggatggccacgaaaaagt  tcgcaagagggaacaccatcggctgtfaggcctgcaactaccgggaagaccaacatcggaggccatagccc  acactgtgccctctacgggtgcgtaaacgggaccaatgagaacttccctcaacgactgtcgcacaagatgggat  ctgggtggggaggagggaagatgaccgcaaggtcgtggagtcggccaaggccattctcggagggaagcaagggtg  cgggtggaccagaaatgcaagtcctcggcccagatagaccgactcccgtgatcgtaccctcaacaccaafgt  gcccgtgattgacgggaactcaacgacctcgaacaccagcagccgtgcaagaccggatgtcaaatfagaactc  accgccgtctggatcatgactfaggaaaggcaccagcaaggagcaaaagactfctccgggtggcacaaggatca  cgtgttgagggtggagcatgaattctacgcaaaaagggtggagccaagaaaagaccgccccagtgacgcag  ataaagtggcccaaacgggtgcgcgagtcgagccatcgacgacgagcggaaactcgcgatcaact  acgcagacaggtacaaaacaafgtctcgtcacgtgggcatgaatctgatcgtctccctgcagacaatgcgaga  gaatgaatcagaatcaaatatctgctcaccacgacagaaaagactgtttagatgctctccgtgacagaatctca  cccgttctgtcgaaaaaggcgtatcagaactgtctacattcatatcatgggaaagggtccagacgcttga  ctgctcgcgatctggcaatgtgattggatgactcatcttgaacaataaafatfataacaggtatggctgcccgt  ggttatctccagattggctcagagacaacctctctgaggcaatcgcgagtggtggactgaaacctggagcccc  gaaacccaagccaaccagcaaaagcaggacgacgcccgggtctggtgctctcctggtcacaagctcctggac  cctcaacggactcgaacagggggagcccgtcaacgcccggatgacgcccctcagcacgacaaggccca  cgaccagcagctcaaacgggtgacaatccgactcgtggtataaccagccgacgcccaggttcaggagcgtct  gcaagaaatagctctfaggggcaacctggggcagcagctctcagccaagaaagggtctcgaacctfca  ggctctggtgaggaaagggtgtaagacggctcctggaaagaaagctccggtagagcagtcgccacaagaccaga  ctcctcctcggcattggcaagacagccagcccgtcaaaagagactcaattfctgacagctggcactca  gagtcagctcccaccacaacctctcggagaacctccagcaacccccgctcgtgaggacctactacaatggctt  caggcgggtggcgcaccaatggcagacaataacgaaggcggcagcggagtggtaatgcctcaggaatggcat  tgcgaltccacatggctggcgaagatcaccaccagcaccgcaacatgggctfcccacctataacaacc  acctctacaagcaaatctccagctcctcaacggggcagcaacgacaaccactctcggctacagcaccctctg  ggggtattfagtcaacagatccactgccattctcaccacgtgactggcagcgactacacaacaatggggat  fccggcccaagagactcaactcaagctctcaacatcaagcaagggagtcacgacgaatgatggcgtcacgac  catcgtataaacttaccagcacggtcaagctctcggactggagtagcaggtccgtacgtctcggctctcgcg  caccaggctgcctcctccgtcccggcggacgtgtcatgattccgacgacggctacctaacgctcaacaatgg  cagccagcagtgaggacggtcatcctttactgcctggaatattcccatcgacagatgctgagaacgggcaataactt  acctcagctacacctcggagacgtgcctttccacagcagctacgcccacagccagagcctggaccgctgatga  atcctctatcagaccagctacgtatctacctgaacaactcagaatcagctccggaagtgcccaaaacaaggacttgc  tgtttagccggggctcaccagctggcatgtctgttcagccaaaactggctacctggacctgttaccggcagcagc  gctgaaictataatcaacctggcactgctatggcctcacacaagacgacaagacaagctcttccatgagcgggtg  tcatgattttggaaggagagcggcgggactcaaacactgcatt</p>
--	---

10

20

30

【 0 4 5 0】

【表 1 2 - 2 6】

	<p>ggacaatgcatgatcacagacgaagagaaatcaaagccactaaccctgggccaccgaaagattgggactgt  ggcagtcfaatccagagcagcagcagaccctgcgaccggagatgfcgatgtatgggagccttaactggaaatg  gtgtggcaagacagagacgtataccctgcagggtcctalttggccaaaatcctcacaggatggacactttacc  gtcctcctcatggcggcgttggactaagaaccgctcctcagatcccaaaaaacacgctgttctgcgaaat  cctccggcagaggtttcggctacaaagttgctcattcatcaccagattccacaggaagtgagcgtggaagatg  aatgggagctgcagaagaaaacagcaaacgctggaaatcccgaaagtgcagfatacatctaaactatgcaaatctgc  caacgtgatttactgfggacaacaatggactttactgagcctcgcccaatggcaccggtfacctaccctgcc  ctgtaattgtgttaatacaataaaccggtgattcgttcagttgaactttggtctcgcgaaggcgaaatgttaaac  tgcaggactagaggctctgtattagaggcagctgaggttttgcgacatttgcgacacatggtgacacgtgggtat  ftaagcccagtgagcagcagggctcctcatttgaagcgggaggttgaacgcgagccgcaagccaaatctg  cagataccatcacactggcggcctcactagagcggccaccgctgggagctccagctttgtcccttia  gtgagggttaattgcgctgctgtaatacatggtcatagctgttctctgtgaaattgtatccgctcaaatccaca  caacatacagcggagcacaataaagttaaagcctgggggtcctaagtgatgagtaactacattaattgctgtc  gctcactgcccgtttccagctcgggaacctgtcgtccagctgcaataatgaatggccaacgcgggggaggg  cgtttgctgtatggcgtctcctcctcctcactgactcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtc  tcagctcactcaagcggtaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaa  ggccagcaaaaaggccaaggaccgtaaaaaggccgctgtcgtcgttcttccatagctcccccctgacgag  catcaaaaaatcagcctcaagtcagaggtggcgaaccgacagactataaagataaccaggcgtttcccctg  gaagctccctcgtcgtcctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgcttctcctcctcggaaagct  ggcgtttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtaggtcgttcccaagctgggctgtgacgaa  cccccttcagcccagccgctcgccttatccgtaactatcgtcttgatccaaccggtaagacagcattatcg  ccactggcagcagccactggttaacaggattagcagagcaggtatgtagcgggtgctacagagttctgaagtgtg  ggccfaactacggctacactagaagaacagatfittgtatctgcgctcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtc  ttggtagctctgatccgcaacaaccaccgctgtagcgtggtgtttttgttgcagcagcagattacgcgcaag  aaaaaaaggatcacaagaagatccttggatctttctacgggctcgtcagctcagtggaacgaaactcacgttaagg  gatfittgctatgagattatcaaaaaggatctcacctagatcctttaaattaaaaatgaagtttaaatcaactaaagiat  atatgagtaaaactggctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcgtctgtctalttctgtatcc  atagttgctgactcccctcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgata  ccgcgagaccacgctaccgctccagattatcagcaataaaccagccagccgaaaggccgagcgcagaa  gtggtcctgcaactttatccgctccatccagcttatttaattgttccgggaagctagagtaagtagttcggcgttaata  gtttgcgcaacgtgttgcaltgctacaggcactggtgtcagcgtcgtcgttggatggctcaticagcicgggt  cccaacgatcaaggcaggtacatgafcccccattgttgcaaaaaggcgttagctcctcgtcctcogactgtgt  cagaagtaagttggccaggtgattacatggttatggcagcactgcataatctctactgtcatgccatccgtaa  gatgtttctgtgactggtgagtaactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatcggcgaccgagttgctctggccg  gctcaatacgggataatcccgccacatagcagaactttaaagtgctcactatggaaaacgttctcggggcga  aaactcgaaggtatccgctgtgagatccagtcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatctt</p>
--	---

10

20

【 0 4 5 1】

30

【表 1 2 - 2 7】

		<p>cagcatctttiacctaccagcgttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaatgccgcaaaaaagggaataagg          gcgacacggaaatgttgaatactatactcttccctttcaatattatgaagcattatcagggtattgtctcatgagcgg          atacataattgaatgtatttagaaaaataacaataagggtgccgcacattccccgaaaaagtgccacctaattgt          aagcgttaalattttgtaaaattcgcgftaaattttgftaaatcagctcatttttaaccaatagccgaaatcggcaaaa          cccttataaatcaaaaagaatagaccgagataggggtgaggtgtgtccagtttggacaagaagtgccactatataaagaac          gtggactccaacgtcaaaaggcgaaaaaccgtctatcaggcgcgagggccactacgtgaaacctaccctaatcaa          gtttttgggtcaggtgccgtaaaagcactaaatcggaaccctaaaggagccccgatttagagcttgacgggga          aagccggcgaacgtggcgagaaaggaaagggaagaaagcgaaggagcggcgctagggcgctggcaaggt          agcggtcacgtcgcgtaaccaccacaccgccgcgctaatgcgcgctacagggcgctccattcggccattc          aggtcgcgaactgtgggaaggcgatcgtgcggcctcttcgctattacgccagctggcgaagggggatgt          gctgcaagcgaftaagttgggtaaccgaggggtttccagtcacgacgtgtaaaacgacggcagtgagcgcg          cgtaatcagctactatagggcggaattgggtaccggccccccctcagtcgaggtcgacggtatcgggggagct          cgaggggtctcatttgaagggggggttgaaccgagcag</p>	10
205	17AALH7C_AA V6_F129L_L584 D_pAAV-DJ	<p>ccgccatccgggggtttacgagattgtgattaaggtcccagcgaccttgacgagcatctcccggcattctgaca          gcttttgaactgggtggccgagaaggaaaggaggtgccccagattctgacatggatcgaatctgattgagcag          gcacccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgacttctgacggaaatggcggcgtgagtaaggccccgga          ggcccccttctgtgcaattgagaaggagagagctacttccacatgcacgtgctcgtggaaccaccgggtgaa          atccatggtttgggacgttctgagtcagatcgcgaaaaactgattcagagaattaccgcccggatcgagccgact          ttgccaactggttcgcgggtcacaaagaccagaaatggcggcgaggcgggaacaagggtggtgagatgctga          catccccattactgtctcccaaacccagcctgagctcagtgggcgtggactaatafggaacagatttaagcgc          ctggttgaatcagcagcgtaaacgggtggtggcgcagcatctgacgcacgtgctgcagacgcagggagcagaa          caaagagaatcagaatccaattctgatgcggcggatcagatcaaaactcagccaggtacatggagctggctc          ggtggctcgtggacaaggggattaccicgggagaagcagtgatccaggaggaccaggcctacatctcttcaa          tggggcctccaactcgggtcccaatcaaggctgcttggacaatcgggaaaattatgacctgactaaaacc          gccccgactaccctgggtggccagcagccgtggaggacattccagcaatggattataaaatttfgaactaaac          gggtagatccccaatatggcgtccgtcttctgggatggccacgaaaaagttcggcaagaggaacaccatctg          gctgttggcctgcaactaccgggaagaccaatcgcggagccatagccccactgtgccctctacgggtgc          gtaaacggaccatgagaacttccctcaacgactgtgtcacaagatggtgatctggtgggaggagggaagat          gaccgccaaggctcgtggatcggccaagccattctcgagggaagcaagggtgcgctggaccagaaatgcaagt          cctcggccagatagaccgactcccgtgatcgcacctcaacaccaacatgtcggcgtgattgacgggaactc          aacgacctcgaacaccagcagccgtgcaagaccggatgtcaaatfgaactcaccggcctctggatcatgact          tgggaaggcaccagcaggaagcacaagacttttccgggtggcaaaaggatcacgtggtgaggtgagcatgaa          ttctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagaccgccccagtgacgcagatataagtgagcccaaacgggt          gcgcgagtcagttcgcagccatcagctcagacgcggaaagctcagatcaactacgcagacaggtacaaaacaa          atgttctcagcgtggcatgaatcgtatgctgttccctcagacaatcgcgagagaatgaatcagaatcaaatatct          gcttactcagcagagaagactgttagaggtgttccctcagacaatcgcgagagaatcgaacccgttctgtcgtcaaaaaggc          gtatcagaactgtgctacattcatatcatatgggaaag</p>	20 30

【 0 4 5 2】

【表 1 2 - 2 8】

	<p>gtgccagacgctgcactgcctgcgatctggfcaatgtggattggatgactgcatcttgaacaataaatgatttaaatc  aggtatggctgccgatggfatactccagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgcgagtggtgggactt  gaaacctggagccccgaaccgaagcaaccagcaaaagcaggacgacggccggggtctgtgctcctggc  tacaagtacctcggaccctcaacgggactgacaagggggagccgtcaacgcgggatgacgagccctcga  gcacgacaaggcctacgaccagcagctcaaaagcggfagacaatccgtacctggtataaccacggcagcggc  agttcaggagcgtctgcaagaagatagctctttggggcaacctcggcgagcagctctccagccaagagag  ggtctcgaacctttaggtctggtgaggaaggtgctaagacggctcctggaaaagaaagtcggtagagcagctgc  cacaagagccagactcctcctcggcattggcaagacagggcagcagcccgtaaaaagagactcaatfttggca  gactggcagctcagagcagctcccagccacaacctctcggagaacctccagcaacccccgtgctgtgggacc  taciacaatggctcaggcgggtggcgaccaatggcagacaataacgaagcggcggagtggtggtaatgctc  aggaaatggcattgcgattccatgctggcgacagagctatcaccaccagccccgaacatgggcttggcc  acctataacaaccctcacaagcaaatctccagcttcaacggggccgcaacgacaaccactctcggcta  cagcaccctcgggggtatttgaattcaacagattccactgccattctcaccacgtgactggcagcgactcatcaac  aacaattggggattccggccaagagactcaactcaagctctcaacatccaagtcaaggagtgctcagcagatga  tggctgacaccatcgtaataacctaccagcagggttcaagctctcggactcggagtaccagttggcgtgta  cctcggctcgtcgaccagggtgctcctcctcgttcccggcgagctgttcatgattccgagtagctgactcctaa  cgctcaacaatggcagccagcagtgaggacggtcatcttactcctggaatattccatcgcatgctgagaa  cgggcaataacttacctcagctacacctcggagacgtcctttccacagcagctacgcgcacagccaagcctg  gaccggctgatgaatcctctatcgaccagctacctgattacctgaacagaactcagaatcagccggaagtggccaa  aacaaggacttgcgtttagccgggggtcctcagctggcagctgtctgtcagccaaaaactggctacctggaccctgt  taccggcagcagcgcgtttcaaaaacaaaaacagacaacaacaacagcaacttacctggactgggttcaaaafat  aacctaatgggcgtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacacaagagcacaagacaagttcttc  ccatgagcgggtgctatgatttggaaaggagagcggccggagctcaaacactgcaatggacaatgctatgacacag  acgaaagagaaatcaaaagccactaaccctggccaccgaaagatttgggactgtggcagtcaatgaccagagca  gcagcacagaccctcggaccggagatgctatgtagggagccttacctggaatggtgtggcaagacagagagc  tatactcagggctcctatttggccaaaatcctcacacggatggacacttaccctcctcctcatggcggtt  ggacttaagcaccgctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgttctcgaatcctcggcagagtttoggct  acaaagtgtctcattcatcaccagatctcacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcagaaaga  aaacagcaaacgctggaatcccgaatgcaatgatacatctaaactatgcaaaatcggcaacgttatttactgtgga  caacaatggactttatactgagcctcggccattggcaccggtaacctcaccctgcccctgtaattgtgttaataata  aaccggtgattcgttcagtgtaactttgctctcgcgaaggcgaatcgtttaacctgcaggactagaggctctgt  atagaggctcagtgagtggttgcgacatttgcgacaccatgtgtcagcgtgggtatttaagcccagtgagcacg  cagggtcctcatttgaagcgggaggttgaacgcgacggcccaagccgaatctgcagatatcaccactggc  ggcgtcgcactagagcggccgcaaccgggtggagctccagcttggctccctttagtgagggttaattcgcgctt  ggcgtaatcatgctatagctgttctcgtgaaatgttatccgtcacaatccacacaacatacagcgggaaagc  ataaagtgtaaagcctggggtcctaagtgtagctaacacafaaatgctgtcgtcactgcccgcttccagct  gggaaacctgctgccagctgc</p>
--	---

10

20

30

【 0 4 5 3】

【表 1 2 - 2 9】

	<p>           attaatgaatcgccaacgcgcggggagagggcgggttgcgtattggcgctcttccgcttccctcgcctactgactcgc            tgcgctcggctgtcggctcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcagg            ggataacgcaggaaaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccggtgtcgtg            gcgttttccatagggctccgcccccctgacgagcaacacaaaaatcgacgctcaagtcagaggfggcgaaccggga            caggactataaagataccaggcgttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgacctgcccgttaccg            gatacctgtccgccttccctcgggaagcgtggcgttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtag            gtcgttcgctcaagctgggctgtgtgacgaacccccgtcagcccaccgctgcgcttaccgtaactatcgt            ctfgagtccaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactgtaaacaggattagcagagcgagggt            atgtaggcggigtacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagatttggatctgcgc            tctgctgaagccagttacctcggaaaaaggttggtagcctgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcgggtg            gttttttgttgaagcagcagatlacgcgcaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctg            acgctcagtggaacgaaactcagctlaagggatttggctatgagattatcaaaaaggatcttaccctagatccttta            aattaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatagtaaaactggctgacagttaccaatgctfaatcagtgagg            cacctatctcagcagctctatttctcattccatagttgctgactcccgtcgtgtgataaactcagctacgggagg            gcttaccatctggccccagtgctgcaatgataaccgcgagaccacgctcaccgctccagatttatcaataaaac            cagccagccggaaaggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttaccgctcaccagcttataatgttggcg            ggaaagctagagtaagtagtccagtttaatgttgcgcaacgtgttgcattgctacaggcatcgtgtgtcagcgc            tctgtcgttggatggcttcatcagctccggctccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaa            agcgggttagctcctcggctcctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgagttatcactatggttatggcagcac            tgcataatctctactgtcatgccatccgtaagatgcttctgtgactggtagtactcaaccaagtcattctgagaata            gtgtatggcgaccgagttgctcttggccggcgtcaatacgggataataccgcccacatagcagaactttaaag            tgcctacattggaaaacgttctcggggcgaactcctcaaggatctaccgctgtgagatccagttcgtatgtaacc            actgtgcacccaactgatctcagcatctttacttaccagcgttctgggtgagcaaaaacaggaaaggcaaaatg            ccgcaaaaaagggaataaaggcgacaggaatgttgaatactcactctccttttcaatattattgaagcatttac            aggggtattgtctatgagcggatacatattgaaatgtattagaaaaataaacaalagggttccgcgacatttccc            gaaaagtccaccaaattgtaagcgtlaataatttgttaaaatcgcgttaaaatttgttaaatcagctcattttaacaa            taggccgaaatcggcaaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgatgtgttccagtttgaac            aagaatccactattaaagaacgtggactccaacgtaaaaggcgaaaaaccgtctatcaggcggatggcccactac            gtaaccatcaccctaatcaagtttttggggtcaggggtccgtaaaagcactaaatcggaaccctaaagggaagccc            cgatttagagctgacgggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaaaggaaagcgaagggaagggg            cgttagggcgtcggcaagtgtagcggcagctgcgctgtaaccaccacaccggcgcgcttaatgcggcgctaca            gggcgctccattcgcattcaggtcggcaactgttgggaaaggcgatcgggtcgggctctctgctattacgc            agctggcgaagggggatgtgctgcaaggcgatfaagttgggtaacgcaagggtttccagtcacgacgtttaa            aacgagggcagtgagcgcgtaatacgaactcactataggcgcaattgggtaccgggccccccctcagtcgag            gtcgacgggtacggggagcctcagggctcctcatttgaagcgggaggttgaacgcgcag         </p>
--	---

10

20

【表 1 2 - 3 0】

206	17AALIAC_AA V6_F129L_D41 8N_pAAV-DJ	ccgccatgccggggtttacgagattgtgattaagggtcccccagcgacctgacgagcatctgccggcatttctgaca gcfttgtgaactgggtggccgagaagggaatgggagtgccgccagattctgacatggatctgaatctgattgagcag gcacccctgacctggccgagaagctcagcgcgactttctgacggaatggcgcctgtgagtaaggccccgga ggcccctttctgtgcaattggagaaggagagagctacttccacatgcacgtgctcgtggaaccaccgggtgaa atccatggtttgggacgttctgagtcagatfcgcgaaaaactgattcagagaattaccgaggatcggccgact ttccaaaactgggtcgcgtcacaagaccagaatggcgcggagggcgggaacaagggtggtgafgagtgcta catcccattacttctccccaaaaccagcctgagctccagtgggcgtggactaatatggaacagatftaagcgc ctgttgaatctcagcagcgtaaacggttggcgcagcatctgacgcagctgctcagacgcagagcagagcaga caaaagagaatcagaatcccaattctgatgcgccggtgatcagatcaaaactcagccaggatcagagctggctc ggtggctcgtggacaagggttaccctgggagaagcagtgatccaggaggaccaggccctacacatctcctcaa tggcgcctccaactcgcggtcccaaatcaaggctgcttgacaatggcggaaagattatgacctgactaaaacc gccccgactacctggtggccagcagcccgtggagacattccagcaatcgattataaaatttgaactaaac gggtacgatcccaatagcgcctccgtcttctgggatggccacgaaaaagtgcggcaaggaacaccatctg cctgttggccctgcaactaccgggaagaccaacatcgcggagccatagccacactgtgccccttaccgggtgc gtaaacctggacaatgagaacttccctcaacgactgtgacagaagatggtgatctggtggaggaggggaaagat gaccgcaaggtcgtggatcggccaaagccattctggaggaagcaaggtgcgctggaccagaatgcaagt cctggcccagatgaccgactcccgtgatcgtcacctcaacaccaacatgtgcgccgtgatgacgggaactc aacgacctcgaacaccagcagccgtgcaagaccggatgtcaaaftgaactacccgccgtctgatcatgactt tgggaaggcaccagcaggaagctcaagacttttccggtggcgaagatcacgtggtgaggtggagcatgaa ttctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagaccgccccagtgacgagataaagtggccaacgggt gcgcgagtcagtgcgacccaatcagctcagcgcggaaagctcgaacacacgacagacaggtaccaaaca atgtctcgtcacgtggcatgaatctgatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaaatct gctcactcacggacagaagactgtttagatgcttccctgtcagaatcacaaccgttctgtcgtcaaaaaggc gtatcagaactgtgctacattcaatcattatcattgggaaagggtccagacgcttgcactgctcgtgatctgcaatgtg gattgagactgcatcttgaacaataatgatttaaatcaggatggctgccgatggttatctccagattggctcga ggacaacctctctgaggcattcgcgagtggtgggactgaaacctggagccccgaaccacaagccaaccagc aaaagcaggacgacggccgggtctggtgcttctggctacaagtacctggaccctcaacggactgacaagg gggagcccgtcaacgcccggatgcagcggccctcagcagcagaagccctacgaccagcagctcaaaagcgg gtgacaatccgtacctgcccgtataaccacgccgacccgagttcaggagcgtctgcaagaagatacgtctttggg ggcaacctcggcgagcagcttccaggccaagaagagggtctcgaacctttaggctggttgaggaaaggtgcta agacggctcctggaaagaacgtccggtagcagctgccacaagaccagactcctcctcgggattggcaag acaggccagcagcccgtaaaaagagactcaatttggctcagactggcactcagatcagctcccgaccacaa cctctcggagaacctccagcaacccccgctgctgtgggacctactacaatggctcagggcggcgcaccaatgg cagacaataacgaaggcggcagggagtggttaatgcctcaggaatggcattgcatccacatgctggcggcg acagatcatcaccaccagcaccgaacatggccttggccacctataacaaccacctctacaagcaaatcctcag gctcaacggggccagcaaccgactcctggctacagcaccctgggggtatttggattcaacagatfc cactgccattctcaccagctgactggcagcagctcattcaacaactgggattcc
-----	---	---

10

20

30

【表 1 2 - 3 1】

		<p>ggcccaagagactcaactcaagctctcaacatccaagtcaaggaggtcacgacgaatgatggcgtcacgacat  cgctaataaccttaccagcacggttcaagctctcggactcggagtaccagttgccgtacgtcctcggctctgcga  ccagggtcgtccctcccggtcccgaggactggtcatgatcccgactacggctacctaacgctcaacaatggca  gccaggcagtgaggacggtcatcctttactgcttgaatatttccatcgcagatgctgagaacgggcaataacttac  cttcagctacacctcgaagaactgcttccacagcagctacgcgcagcagcagcctggaccggctgatgaat  cctctcatcgaccagtacctgtattacgtgaacagaacacagaatcagctccggaagtgccaaaaaaggactgctg  tttagccgggggtcctcagctggcatgctgttcagccaaaaactggctacctggacctgtaccggcagcagcg  cgtttctaaaaaacaacagacaacaacaacagcaactttacctggactggtgcttcaaaataaacctaatggcgt  gaatctataataacctggcactgctatggcctcacacaagacgacaagacaagttcttccatgagcgggtgc  atgatttttggaaaggagagcggcggacttcaaacactgcaatggacaatgcatgatcacagcaggaaggaaat  caaagccactaacccgtggccaccgaaagatttgggactggtgcaatcctccagagcagcagcagacc  tgcgaccggagatgcatggtatgggaccttacctggaatggtggtgcaagacagagacgtatacctgacgggt  cctatttggccaaaatcctcacacggatggacacttaccctgctcctctcatggcggcttggactaaagacc  gcctcctcagatcctcatcaaaaacacgcttctcggaaatcctcggcagagtttccgctcaaaagtgtctcatt  catcaccagatctccacaggaactgagcgtggagattgaatgggagctgcagaagaaaacaacaacgctg  gaatcccgaagtgcagatatacatcactaactgcaaaaactgccaactgattcactgtggacaacaaatggactata  ctgagcctcgcaccattggcaccgttacctaccctgccccctgtaattgtgttaataataaacgggtgactgtt  cagttgaacttggctcctgcgaaggcgaatcgttaaacctgcaggactagaggctctgtattagaggctcacgtga  gtgtttgcacatttgcgacacctgtgtcagcctgggtatttaagcccagtgagcagcagggctcctatttga  agcgggaggtttgaacgcgagccgcaagccgaattctgcagatattcacactggcggcgtcactaga  gcccggccaccgggtggagctccagcttcttccctttatgaggggttaattgctgcttggcgtaatcatggtca  tagctgttctctgtgaaattgtatccgtcacaattccacacaacatacagaccggagacataaagttaaagcctg  gggtgcctaatgagtgactaacacattaattgctgtgctcactgccgcttccagtcgggaaacctgtcgtgc  cagctgcattaatgaatcgccaacgcggggagagggcggttgctattggcgcctcctcctcctcctcact  gactcgcctcgcctgctgctggctggcggcggatcagctcactcaaggcggtaatacgggttatccacag  aatcaggggataacgaggaagaacatgtgagcaaaaggccaagaaaaaggcaggaaccgtaaaaaggccg  cgtgctggcgttttccatagctcggccccctgacgagcatcaaaaaactgacgctcaagtcagaggtggcga  aaccggacagactataaagatacaggcgttccccctggaaagctccctcgtgctcctccttccgacctgcc  gctfaccgataacctgtccctttcctcctcgggaagcgtggcgttctcatagctcacgctgtaggtatcagttc  gggtaggtcgtcctcaagctggcgtgtgacgaacccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtga  actatgctctgagccaacccgtaagacagactatcggcactggcagcagccactggtaacaggattagcaga  gcgaggtatgtaggggtgctacagagttctgaagtgggtgcctaactacggctacactagaagaacagatttgg  atctggctctgctgaagcagttaccttggaaaaagagttggtagctcttgatccgcaaaacaaaccaccgctgt  agcgggtgtttttgttgaagcagcagatcgcgcagaaaaaaggatcfaagaagatcttggatctttctacg  gggtctgacgctcagtggaacgaaactcacgttaagggtatttggctatgagattcaaaaaaggatctccactaga  tcttttaaaftaaaaatgaagtttaaatcaatcaaaagtatatatgagtaaaactggctgacagttaccaatgctaatc</p>
		10
		20

10

20

30

【 0 4 5 6 】

【表 1 2 - 3 2】

		<p>agtgagccacatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgacccccgtcgtgtagataactacgata  cgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgafaccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcag  caataaaccagccagccggaaaggccgagcgcagaaagtgctcctgcaactttaccgctccatccagcttataat  tggtccgggaagctagagtaagtagtccaggttaataagttgcaaacgttgccattgctacagccatcgtggt  gacacgctcgtggttgatggctcattcagctccggtcccaacgatcaaggcgaagtacatgatccccatggtgt  gcaaaaaagcggftagctcctcggctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgagttatcactcatggttatg  gcagcactgcataatctcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactgggtagtactcaaccaagctatct  gagaatagtgatcgccgaccgagtgctctgcccggcgtcaatacgggataafaccgcccacatagcagaac  fttaaaagtgtcatcttgaaaacgtctcggggcgaaaactctcaaggatctaccgctgttgagatcagctcga  tgaaccactcgtgcaccaactgatctcagcatctttacttaccagcgttctgggtgagcaaaaacaggaagg  caaaatgcccaaaaagggaataaggcgcacacggaaatgtgaactcactctccttttcaatattatgaag  catttatcaggggtattgtctcatgagcggatacatattgaatgtattgaaaaataaacaataaggggtccgcgcac  atttcccgaaaagtgccacctaattgtaagcgttaataatttggtaaaatcgcgttaaaatttggtaaatcagctatttt  taaccaataggccgaatcggcaaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggtgaggtgttccaggt  tggaaacaagagctcaactaataaagaacgtggactccaacgtcaaaaggcgcaaaaaccgtctacagggcgtatggc  ccactacgtgaaccatcaccccaatcaagtgtttggggtcgaaggtccgtaaaagcaactaaatcggaaacctaaagg  agccccgatttagagctgacgggaaagccggcgaacgtggcgagaaagggaagggaagaaagcgaaggga  gcggggcgtcaggcgtcggcaagtgtacgggtcacgctgcgtaaccaccacaccggcggcttaafgccc  gctacaggcgcgtccattcgcattcagggctgcgcaactgttgggaaggcgcgatcgggtcggcctctcgtat  tacgccagctggcgaagggggatgtctgcaaggcgaftaagttggtaaccaggggtttccagctacgacg  ttgtaaaacgacggccaagtgcgcgtaatacagctcactatagggcgaattgggtaccggccccccctcga  cgggtcgcaggtatcggggagctcgcagggtctccatttgaagcgggaggttgaacgcgcag</p>	10
207	17AALIBC_AA V6_F129L_L584 H_pAAV-DJ	<p>ccgccatgcgggggtttacgagattgtgattaaggtcccagcgcacctgacgagcatctgccggcatttctgaca  gcttgtgactgggtggccgagaagggaatgggagttgccgccagatctgacatggatctgaatctgattgacag  gcacccctgacctggccgagaagctgcagcgcgactttctgacggaatggcggcgtgtgagtaaggccccgga  ggccctttcttctgcaattgagaaggagagagctactccacatgcacgtgctcgtggaaccaccgggtgaa  atccatggtttgggacgttctgagtcagatcgcgaaaaactgattcagagaattaccggggtatcgccgact  ttgcaaaactgggtcgcgtcacaagaccagaatggcggcggagggcgggaacaagggtggtgatgagtgcta  catccccattactgtctcccaaaaccagcctgagctcagtgggcgtggactaatggaacagattfaagcgc  ctggttgaatctcagcagcgtaacgggtggcgcagcactcagcgcagctgctcagcagcaggagcagaa  caaaagagaatcagaatccaattctgatcgcggcgtgatcagatcaaaactcagccaggtacatggagctggtcg  ggtggctcgtgacaagggtatcctcgggaagcagtgatccaggaggaccaggcctcatactcctcaa  tggcggcctcaactcgcggcctcaaatcaaggctgcttgacaatggcggaaagattatgacctgactaaaacc  gccccgactacctggtggccagcagcccgtggaggacattccagcaatcggattataaaatttggaaactaac  gggtacgatcccaatatcggctcctctctgggatggccacgaaaaagttcggcaagaggaaacacctctg  gctgttggccctgcaactaccgggaagaccaatcgcggaggccatagccacactgtgcc</p>	20

10

20

30

【 0 4 5 7 】

【表 1 2 - 3 3】

		<p>cttctacgggtcgtaaacggaccaatgagaactttccctcaacgactgtctgcacaagatggatctggtggga  ggaggggagatgaccggccaaggctgfggagctggccaaggccattctcggagggaagcaaggctgcctggac  cagaaatgcaagtcctcggccagatagaccgactcccgtgatcctccaacccaacatgtgcccgtga  ttgacgggaactcaacgacctogaacaccagcagccgtgcaagaccggatgttcaaatggaactcaccgccgt  ctggatcatgactttgggaaggctaccaagcaggaagtcaaaacttttccgggtggcctcagacgataaagtga  ggfggagcatgaattctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagccccagtgacgcagataaagtga  gccaacgggtgcgcgagtcagttgcaagcctcagctcagacgcggaagcttcgatcaactacgcagaca  ggtcacaacaatgttctgctcagctggcagatgaatctgatgctttccctcagacaatgcgagagaatgaatc  agaattcaaatatctcctcacacggacagaaaactgttagagcttcccgtgcagaaactcaaccgtttctg  tcgtcaaaaaggctatcagaaactgtctacatcctacatatacattgggaaagggtgccagacgctgactgcctgcg  atctggcaatggtgattggatgactgcatcttgaacaataaatgattaaatcaggtatgctgccgatggtatctc  cagattggctcagggacaacctctctgaggcaltcgcaggtggtgggacttgaacctggagccccgaaacca  aaaccaaccagcaaaagcagagcagccggggctctggtctcctggctacaagtacctggacctcaacg  gactcgacaagggggagcccgtcaacgcggcgatgacgcggccctcagcacgacaaggctacgaccagc  agctcaaaagggtgacaatcctgactcgcggtataaccagccgacgcggaatcagggagcgtcgaagaag  atactctttggggcaacctcggcgagcagcttccagggcaagaagggttctgaaacctttaggtctggtg  aggaaaggctaaagcggctcctggaaagaacgtccggtagagcagcgcacacaagagccagactcctcctg  ggcattgcaagacagccagcagccgctaaaagagactcaatfttggcagactggcgcacagagcagctcc  ccgaccacaacctctcgagaacctccgcaacccccgtgctgtgggacctactacaatggtctcagggctgg  cgaccaatggcagacaataacgaagccgccgacggagtggttaatccctcaggaatggcattgcgattccac  atggctggcgacagagatcaccaccagcaccgaacatgggcttggccacctatacaaccacctctacaag  caaatctcagtgctcaacggggccagcaacgacaaccaactactcggctcagcaccacctggggatfttga  ttcaacagattccactgccattctcaccacgtgactggcagcagactcaacaacaatggggattccggccca  gagactcaactcaagctctcaactcaagtcaggaaggctcagcagcaatgatggcgtcagaccatcgtata  accttaccagcaggtcaagctctcggactcggagtaccagttgctgactcctcggctctcgcaccagggtct  gcctcctccgtcccggcgacgtgtcatgatccgagtcagcagctaccctaacgctcaacaatggcagccagga  gtgggacgtcatcctttactcctggaaatfttcccaicgcagatgctgagaacgggcaataacttacctcagct  cacttogaaggactgctttcacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctctc  gaccagctctgattacctgaacagaactcagaatcagtcgggaagtggccaaaacaaggactgctgttagccg  ggggtctcagctgcatgtctgtcagccaaaactggctacctggacctgtaccggcagcagcgcgtttctaa  aacaaaaacagacaacaacaacgcaactttacctggactggtgcttcaaatataaccttaatggcgctgaatctat  aatcaacctggcactgctatggctcacacaagagcagaaaagacaagtcttccatgagcgggtgcatgatttt  ggaaaggagagcggcgactcaaacactgcattggacaatgtcatgatcacagacgaagaggaatcaagc  cactaaccctggccaccgaaagattggactgtggcagtaatcaccagagcagcagcagaccctgcgac  cggagatgtcatgttatgggagccttacctggaatggtgtggcaagacagagacgtataacctgcagggctctattg  ggccaaaatcctcacacggatggacactttcaccctcctctcattggcggtttggacttaagcaccggcctct  cagatcctcatcaaaaacacgcctgtcctgcaatcctccggcaga</p>
--	--	---

10

20

30

【 0 4 5 8】

【表 1 2 - 3 4】

	<p>gtttcggctacaaaagtgtctcattcatcaccagatccacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctg  cagaagaaaaacagcaaacgctggaaatcccgaagtgcagtatacatctaactatgcaaaatctgccaacgttgatttc  actgtggacaacaatggactttatactgagcctcgcaccatggcaccgttaccfcaccgtccctgttaattgtgtgt  taatacaalaaccgggtgattcgtttcagttgaactttggtctctcgaaggcgaatcgtttaaacctgacggactaga  ggtccigtatfagaggtcacgtgagtgtttgcgacatttgcgacacatgtggtcacgctgggtattaaagcccagat  gagcacgcagggctcctatttgaagcgggaggttgaaacgcgcagccgccaagccgaatctgcagataccatc  acactggcggccgctcactagagcggccgccaccgggtggagctccagctttgtccctttagtgagggttaatt  gcgcgcttggcgtaatcatggtcatactgtttcctgtgtgaaattgtatccgctcacaattccacacaacatagc  cggaaagcataaagtgtaaaagcctgggggtccctaatgagtgagctaaactacattaatgctgtgctcactgcccgc  ttccagctgggaaccctgtcgtgccagctgcaitaatgaaatggccaacgcgcggggagaggcggtttgctaltg  ggcgccttccgcttccctcactgactgactgctgctgcgctggctgtccggctgagcgggtatcagctcactcaa  aggcggtaatacgggtatccacagaatcaggggataacgcaggaaaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaag  gccaggaaaccgtaaaagcccggttctgtggcgttttccataggtccgccccctgacgagcatcaaaaaatc  gacgtcaagtcaggggtggcgaaccggacaggaactataaagataccagcgtttccctgggaagcgtgcttctc  gcgctcctctgtccgacctgcogctiaccggatacctgtcccttctccctcgggaagcgtgcttctc  gctcacgctgtaggtatcagttcgggtgtaggtcgtcgtccaagctggcgtgtgtcacgaacccccgttcagc  ccgaccgtcgccttaccggtaactatgctcgtgagccaaccggtaagacacgactatgccactggcagca  gcccactggaacaggattaacagagcaggtatgtaggcggctacagagttcttgaagtgtggcctaactacg  gctacactagaagaacagatattgtatctgcgctcgtgaaagccagttacctcggaaaaaggttgtagctctg  atccggcaaaaaccaccgctggtagcgtgtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcaaaaaaaggat  ctcaagaagatcctttgatctttctacggggtcgtacgtcagtggaacgaaactcagctaaagggtttgtcatg  agattatcaaaaaggatctcacctagatcctttaaataaaaatgaaattttaaatacaatctaaagtatatgagtaaac  ttggtctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcagatctgtctatttctcatccatagttgcctga  ctccccgtcgtgtagataaciacgatacgggagggccttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccc  acgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcagaagtgtcctgcaac  ttatccgcctccatccagcttalttaattgttccgggaagctagagtaagtagttccaggttaatagtttgcgcaacgtt  gttgcattgctacaggcatcgtgtgtcacgctcgtgtttggtatggcttattcagctccgggttcccaacgatcaag  gcgagttacatgatccccatgtgtgcaaaaaagcgggttagctcctcgtcctccgacgtgtcagaaataagttg  gccgaggttatcactatggttatggcagcactgcataatctctactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtga  ctggtgagfactcaaccaagtattctgagaatagtgatgcggcgaccaggtgtcctcgtccggcgaataactcaagg  ataataccgcccacatagcagaactttaaagtgtctcattggaaaacgttctcggggcgaataactcaaggga  tcttaccgctgtgagatccagttcagatlaaccactgtgcaccaactgatcttcagcatctttacttaccaggcgt  tctgggtgagcaaaaacaggaaagcaaatgcccaaaaagggaataaggcgcacacgcaaatgttgaatac  catacttcccttcaatattatgaagcaatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaaatgtattgaaaa  ataaacaataagggttccgcgacatttccccgaaaagtgccacctaattgtaagcgttaataattgttaaaatcgc  gttaaattttgttaaacgctcatttttaaccaataggccgaaatcgg</p>
--	---

10

20

30

【 0 4 5 9】

【表 1 2 - 3 5】

		caaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggtgagtggtgtccagtttgaacaagagccactattaa agaactgagactccaacgtcaaaaggcgaaaaaccgtctatcaggcgatggccactactgtgaacctacacct aatcaagtttttgggtcaggtgcccgtaaagcactaaatcggaaacctaaaggagcccccatttagcgtgac ggggaaagccggcgaactggtgcgagaaggaaaggaaaggaaagcgaaggagcggggcctagggcgctggc aagtgtagcgggtcacgctgcgfaaccaccacaccgccgcctaatgcccgtacagggcgctccaitc gccattcaggctgcgcaactgttgggaaaggcgatcgggtgcggcctcttcgctattacgccagctggcgaagg gggatgtgctcaagcggatlaagtgggtaacgccaggggtttccagtcacgacgttgaaaacgacggccagtg agcgcgcgtaatacactcactatagggcgaattgggtaccgggccccccctc gatcgaaggtcgaaggtatcggg ggagctcgcagggtcctcatttgaagcgggaggttgaacgcgcag
208	17AALICC_6_F 129L_H642N_D 418N_pAAV-DJ	ccgccatgccgggttttacgagaitgtgattaagggtcccccagcgaccttgacgagcatctgccggcatttctgaca gctttgtaactgggtggccgagaaggaaatgggagttgccgccagattctgacatgagatctgaatctgattgagcag gcacccctgacctggccgagaagctgcagcgcgactttctgacggaaatggcgccgtgtgagtaaggccccgga ggcccttttctgtgcaattgagaaggagagagactctccacatgcacgtgctcgtgaaaccaccgggtgaa atccatggtttgggacgtttcctgagtcagattcgcgaaaaactgaltcagagaattaccggggatcgaagcctgact ttgccaaactggttcggtcacaagaccagaatggcgccggaggcgggaacaagggtggtgagtgactgcta catcccaattactgctccccaaaaccagcctgagctccagtgggcgtggaactaatatgaacagatftaagcgc ctgtttgaatcicaggagcgtaaacggtgtggtgcgcagcatctgacgcacgtgtcgcagacgcaggagcagaa caaaagagaatcagaatcccaattctgagcggcggatgatcagataaaaactcagcaggtacatggagctggctg ggtggctcgtgacaaggggattacctgggaaagcagtgatccaggaggaccagcctcatacatctcctcaa tggcgcctccaactgcgggtcccaaatcaaggtgccttgacaatgcgggaaagattatgagcctgactaaaacc gccccgactacctgggtggccagcagcccgtggagacattccagcaatcggattataaaatttggactaaac gggtagcatcccaatagcggcttccgttctgggatggccagaaaaatggcgaagagggaacaccatctg gctgttggcctgcaactaccgggaaaccaacatcgggagccatagcccacactgtgccctctacgggtgca gtaaacggaccaatgagaacttccctcaacgactgtcgcacaagatggtgactcgtggggaggagggaagat gaccgcaaggtcgtggatcggcgaagccaatctcgggaggaagcaaggtgcgctggaccagaatgcaagt cctcggcccagatagaccgactcccgtgatcgtcacctcaacaccaacatgtgcggcgtgattgacgggaactc aacgacctcgaacaccagcagccgttgaagaccggatgtcaaatftgaaciaccccgccgtctggtatgactt tgggaaaggtcaccaaagcaggaagtcaaaacttttccgggtggcgaaggaacacgtggtgaggtggagcatgaa ttctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagaccgccccagtgacgcagataaagtggcccaaacgggt gcgcgagtcagttgcgaccatcagcgcagacgcggaagccttgatcaactacgcagacaggtaccaaaacaa atgttctgctacgtgggcatgaaatctgatctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaaacagaatcaaatatct gctcactcacggacagaaaactgfttagtgcttccctgtcagaatcacaaccgttctgtcaaaaaggc gtatcagaaactgtctacattcatatcatgggaaaggtgccagacgctgcactgacctgagatctggtcaatgtg gattggatgactgcatcttgaacaataaatgattaaacaggtatggctgcccagtggtatcttccagattggctcga ggacaacctctctgaggcattcgcgagtggtggacttgaacctggagccccgaaaccacaagccaaccagc aaaaagcagggacgacggccgggtctggtgcttctggctacaagtacctggaccttcaacggactcgaaggg gggagcccgtcaacgcggcggatgcagcggccctcgaacacgacaaggc

10

20

30

【表 1 2 - 3 6】

	<p>ctaccaccagcagctcaaaagcgggtgacaatccgtacctgctggtataaccacgccgacgccgagttcaggagcg  tctgcaagaagatagctctttgggggcaacctcgggagcagctctccaggccaagaagggtctcgaacctf  taggtctggtgaggaagggtgtaagacggctcctggaaagaaacgtccggtgtagcagctgccacaaggaccag  actccctcctgggcattggcaagacagggcagcagcccgtaaaaagagactcaattttggtcagactggcgactc  agagtcaagctcccaccacaacctctcgagaacctccagcaacccccgctctgtgtggacactactacaatggct  tcaggcgggtggcgaccatggcagacaataacgaaggcggcagcggagtggtaatgcctcaggaatggca  ttgcgattccacatggctggcgacagagtcaccaccagcaccgaaatgggcttgcccactataacaac  caccctacaagcaaatctccagtgctcaacgggggccaagcaacgacaaccactactctggctacagcaccct  gggggtattttgattcaacagattccactgccattctaccacgtgactggcagcgactcatcaacaatgggg  attcggcccaagagactcaactcaagctctcaacatcgaagtcaggaggtcacgacgaatgatggcgctcacga  ccatcgtaataacctaccagcacgggtcaagctctcggactggagtcaggctggcgtacgtcctggctctgc  gcaccagggtgctccctccctcctccggcggcagctgtcatgattccgcatgacggctactaacgctcaacaatg  gcagccaggcagtgggacggctatcctttactgcctggaaatattccatcgcatgctgagaacgggcaataact  ttacctcagctacacctcagaaagctgctctccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatg  aatcctctcatcgaccagctctgattacctgaacagaactcagaatcagtcggaaatggcccaaaacaaggactg  ctgtttagccggggtctccagctggcatgctgttcagcccaaaactggctacccctggaccctgttaccggcagcag  cgcgtttcaaaacaaaacagacaacaacacagcaactttaccctggactggcttcaaaatataacttaagg  cgtgaatctataatcaacctggcactgctatggctcacacaagacgacaagacaagtcttccatgagcgggt  gtcatgattttggaaaggagagcggcggagcttcaaacactgcatggacaatgtcatgatcacagcgaagagga  aatcaaaagccactaacctggccaccgaaaagattgggactgtggcagtcactccagcagcagcacaga  ccctgcgaccggagatgtcatgttatgggagccttacctggaaatgggtgtgcaagacagagctafactcgag  ggctctatttggccaaaatctccacacggatggacactttcaccctcctctcatggcggtttggacttaagaa  cccgcctcctcagatcctatcaaaaacacgcctgtctcgcgaatcctccggcagagtcttccgctacaaagttgctt  cattcatcaccagatttccacaggaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcaaaaacacagcaaac  gctggaaatcccgaagtgcaagtatactiaactatgcaaaatctgccaacgtgatttactgtggacaacaatggactt  tatactgagccctgcccaltggcaccgttaccctaccctgcccctgtaattgtgtgtaataataaacgggttgattc  gtttcagttgaactttgctctgcaaggcgaattcgttaaacctgcaggactagaggctctgtattaggggtcacg  tgaggttttgcgacattttgcgacacatgtgtcagcgtgggtatttaagcccagtgagcacgagggtctccattt  tgaagcgggaggtttgaacgcgcagccgcaagccgaattctcagatatccatcacactggcggcgcctcagct  agagcggccgccaccgcgggtggagctccagctttgtcccttagtgagggttaattgcgcgcttggcgtaatcatg  gtcatagctgttctgtgaaattgtatccgctcacaattccacacaacatacagccggaagcataaaagttaaag  cctgggggtgccaatgagtgagtaactcacattaattgctgtgctcactgcccgcttccagctgggaaacctgtc  gtgccagctgcattatgaatcggccaacgcgcgggggagaggcgttgcgtatgggctctcgccttccctcgc  tcactgactcgtcgtcggctgttggctgcggcagcgggtatcagctcactcaaaaggcgtataacgggtatcc  acagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacctgaaaaag  gccgactgtctggcgttttccataggctcccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcagaggtg  gcgaaacccgacaggactataaagat</p>
--	---

10

20

30

【 0 4 6 1 】

【表 1 2 - 3 7】

		<p>accaggcgtttccccgggaagctcccctgctcctctcctggtccgacctgccgcttaccggatacctgtccgcctt  tctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatcagcttgggtgtaggtcgttcccaagc  tgggctgtgacacgaacccccgtcagcccagccgctgcgctatccggtaactatcgtcttgagccaacccc  gtaagacacgactatcggcactggcagcagccactggtaacaggatagcagagcagaggtatgtagggcgtgcta  cagagcttctgaaagtggcctaacctacggctacactagaagaaccagatattggtatctgcgctcgtcgaagccagt  taccttcggaaaaagagtggtagctctgatccggcaacaaccaccgctggtagcgggtggtttttgttgcaagc  agcagattacgagcaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacgggctctgacgctcagtggaagc  aaaactcaggttaaggatttggctatgagattatcaaaaaggatctcacctagatcctttaaataaaaaatgaagttt  aaatcaatcaaaatataatagtaaaactggctgacaggtaccaatgctaatcagtgaggcacctatctcagcgatc  tgtctattcgttccatagtgctgactccccgctgtagataactacgatacgggagggctaccatctggccc  cagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccgctccagattatcagcaataaaccagccagccggaag  ggccgagcagagaagtgctcctgcaacttataccgctccatccagcttatttaattgtgcccgggaagctagataag  tagttcggcagtaaatggttgcgaacgtgttgcattgctacagcagcagctggtgtagcgtcgtctgttggatggc  ttcattcagctccgggtcccacgatcaagcaggtacatgatccccatgttgcaaaaaagcggtagctccttc  ggctcctcgatcgtgtcagaaagtggccgagtggtatcactcatggtatgtagcagcactgcaataatctcttact  gtcatgccatccgtaagatgctttctgtagctgtagtactcaaccaagctattctgagaatagtgtagcggcacc  gagtgctcttgcggcgtcaatacgggataataccgcccacatagcagaactttaaagtgctcatattggaaa  acgttctcggggcgaaaactcgaagatctaccgctgtgagatccagctcagtaaccactcgtgacccaac  tgatctcagcatctttacttaccagcgttctggtgagcaaaaacaggaaaggcaaaatgcccaaaaaaggga  ataaggcgcacaggaatgtgaaactacatactctcctttcaatatttgaagcattatcaggggtattgtctcatg  agcggatacatattgaaatgatttagaaaaataaacaataagggttccgcgacattccccgaaaagtgcaccta  aattgtaagcgtataatatttgtaaaatcgcgttaaattttgtaaatcagctcatttttaaccaataggccgaatcggc  aaaatcccctataaatcaaaagaatagaccgagatgggttgagtgtgttccagtttgaacaaagatccactataaa  gaacgtggactccaacgtcaaggcgaaaaaccgtctatcagggcagtgcccactacgtgaacctaccctta  atcaagtttttgggctcaggtgcccgtaaagcactaaatcgaaccctaaaggagccccgalttagagctgacg  gggaaagccggcgaacgtggcgaagaaggaaaggaaagcgaaggagcggcgttagggcgtggca  agtgtagcggcagcgtcgcgtaaccaccacaccgcccgccttaagcggcctacagggcgtcctccattc  ccattcagcgtcgcgaactgttgggaaggcagcggcggcctctcgtattacgcccagctggcgaagg  ggatgtgctgcaagcgaataagttgggtaacgccaggggttccagtcacgagcttgaaaacgacggcaggtga  gcgcgtaatacactactataggggaattgggfacgggccccccctcgcagtgaggtcagcgtgacggtatcgggg  gagctcgcagggctcctatttgaagcgggaggttgaacgcgcag</p>	10
209	17AALIDC_6_F 129L_H642N_L 584D_pAAV-DJ	<p>ccgcatgccggggtttacgagattgtaaaaggccccagcagccttgacgagcatctcccggcatttctgaca  gctttgtaactgggtggccgagaagggaatgggagttgccgccagattcgcactggaatcgtattgagcag  gcacccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcacttctgacggaaatggcggcgtgtgagtaaggccccgga  ggccctttctgtgcaattgagaaggagagagctacttccacatgcacgtgctcgtggaaaccaccggggtgaa  atccatgggttgggacgttccctgagtcagattcgcgaaaaactgattcagagaattaccgc</p>	20

【 0 4 6 2】

【表 1 2 - 3 8】

	<p>gggatcggccgacttgcacaaactggttcggtcacaagaccagaaatggcggcggagggcgggaacaagggt  ggfggatgagtgctacatccccaaactgctccccaaaaccagcctgagctccagtgggcgtggactaatatgg  aacagtattaaagcctgttgaatctcacggagcgtaaacgggtggtggcgcagcatctgacgcaogtgcgag  acgcaggagcagaacaagaatcagaatcccaattctgatgcgccgggatcagatcaaaaacttcagccagggt  acatggagctggctgggtggctcgtggacaagggtgattacctggagaagcagtgatccaggaggaccaggcc  tcatacatctcctcaatgcggcctccaactcgggtcccaaatcaaggctgcctggacaatcgggaaaagtatg  agcctgactaaaaccgccccgactacctgggtggccagcagcccgtggaggacattccagcaatcggattata  aaatitggaaactaaacgggtacgatcccaatatcggtctcgtcttctgggatgggccaagaaaagttcggca  agaggaaaccatctggctgttggcctgcaactaccgggaagaccaacatcggaggccatagccacactg  tgccctctacgggtgcgtaactgaccaatgagaacttccctcaacgactgtgtcgacaagatggtgatctgtg  ggaggagggggaagatgaccgccaaggtcgtggagtcggcacaagccattctcgagggaagcagggtgcgctg  gaccagaaatgcaagctcggccagatagaccgactcccgtgatctcacctcaaccaacaatgtgcccg  tgattgagggaaactcaacgacctcgaaccagcagccgtgcaagaccggagtgatcaaatgaaactaccgcc  cgtctgcatatgacttgggaagggtaccaagcaggaagtcaaaagacttttccgggtggcgaagatcagctgggt  gaggtggagcatgaattctacgtcaaaaagggtggagcgaagaaaagaccgccccagtgacgcagatataagt  gagcccaaacgggtgcgagctggtgcgagccatcagctcagacgcggaaagcttcgatcaactacgacga  cagggtacaaaacaatgtctcgtcagctggcatgaatctgatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaa  tcagaatcaaatatctgctcactcacggacagaagactgttagagtgcttccctgtcagaatcacaaccgttct  tgtctcaaaaaggctatcagaactgtgctacattcatatacatgggaaagggtccagacgctgcactgcctg  cgtctgctcaatgtggattggatgactgcatcttgaacaataaatgattaaatcaggtatggctgccgatggtatct  tccagattggctcggagacaacctctctgaggcaatcgcgagtggtggactgaaacctggagccccgaaacc  aaagcaaccagcaaaagcagcagcagccgggtctggtcttctggctacaagtacctcggaccctcaac  ggactcgacaagggggagcccgtcaacgcggcggatgcagcggccctcagcagcagaagccctacgaccag  cagctcaagcgggtgacaatcctgacctgcggtataaccagccgacgccgagttcaggagcgtctgcaagaa  gatacgtcttggggcaacctcggcgaagctctccaggccaagagagggtctcgaacctttaggtctggtt  gaggaaaggtgctaagcggctcctggaaagaaactccggtgagcagctgccacaagccagaccctcctc  ggcatggcaagacagcagcagcagccgctaaaaagagactcaatitggctcagactggcactcagagtcagt  cccggaccacaacctctcggagaacctcagcaacccccgtgctgtgggacctactacaatggctcaggggt  ggcgcaccaatggcagacaataacgaagcggcggacggagtggttaatgctcaggaatggcattgcgattcc  acatgctggcgcagagtcaccaccagcaccgaacatgggcttggccacctataacaaccctctaca  agcaaatctcagtgctcaacggggccagcaacgacaaccactactcggctacagcaccctgggggtatit  gattcaacagattccactgccattctcaccacgtgactggcagcagctatcaacaacaatggggattccggcc  aagagactcaactcaagctctcaacatcaagtcaggaggtcacgacgaatgatggcgtcacgaccatcgtfaa  taacctaccagcaggtcaagctctcggactcggagtaccagttgccgtactcctcggctctgcgaccagg  ctgctcctcctcctcggcggagcgtgtcatgattccgagtcagggctacctaagctcaacaatggcagccagg  caggggagggctacctcttactcctggaaatitccatcgagatctgagaacgggcaataacttaccctcagc  tacacctcggagcgtgcttccacagcagctacgcgacagccagagcctg</p>
--	--

10

20

30

【 0 4 6 3】

【表 1 2 - 3 9】

		<p>gaccggctgatgaatcctctcafcgaccagiacctgtattacctgaacagaactcagaatcagccggaagtgccaa  aacaaggacttgctgtttagccgggggtctccagctggcatgtctgttcagcccaaaaactggctaccggaccctgt  taccggcagcagcgcgtttctaaaacaaaaacagacaacaacaacagcaactttacctggactggtgcttcaaatat  aaccttaatggcggtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacacaagacgacaagacaagtcttcc  ccatgagcgggtgcatgattttggaaaggagagcgcggcgagcttcaaacactgcatggacaatgcatgatacag  acgaaagggaatcaaaagccactaacccgtggccaccgaaagattgggactggcagctcaatgaccagagca  gcagcacagaccctgcgaccggagatgtgcatgttatgggagcctttacctgggaatggtgtggcaagacagagacg  tatacctgcaaggctctattggccaaaatctcacacggatggacactttaccctctctctatggcggtt  ggacttaagaaccgctctccatgatccatcaaaaacacgctgtctctgcgaatctccggcagagtttccgct  acaaagtgtctcattcaccaccagatccacaggacaagtgagcgtggagattgaatgggagctgcaaaaaga  aaacagcaaacgctggaatcccgaatgagcagatatacctatgcaaaatctgccaacgttatttactgtgga  caacaatggactttatactgagcctcgcgccatggcaccggtaccctaccctgcccctgtaattgtgttaataa  aaccggtgattcgtttcagttgaactttggtctctcgaaggcgcaatctgttaacctgcaggactagagtcctgt  attagaggtcacgtgaggttttgcacatttgcgacaccatggtgtcacgctgggtatttaagcccaggtgagcacg  cagggtctccatttgaagcgggaggttgaacgagcgcgcaagccgaattctgagataccatcacacactggc  ggcgtctgactagagcggcggcaccgctgggagctccagcttttctccittagtggggttaattgctgctt  ggcgttaatcagtgatagctgttctgtgaaattgtatcogctcacaattccacacaacatacagccggaagc  ataaagtgaagcctggggtgcctaatgagtgactaacacattaattgctgtgctactgcccgttccagtc  gggaaacctgtcgtgccagctgcaataatgaatcggccaacgcgcgggagagggcgttgcgtattggcgctct  tccgcttctcgtcactgactgctgctcggctgttcggctgcggcgagcgtatcagctcaactcaaaaggcgt  aatacgggtatccacagaatcaggggataacgaggaagacatgtgagcaaaaaggcagcaaaaaggccagg  accgtaaaaaggccgctgctggcgttttccataggtccgccccctgacgagcatcaaaaaatcagcgtca  agtcaaggtggcgaaccgacaggaactataagataccaggcgtttccccctggaagctccctctgctgctctc  ctgttccgacctggcgttaccggatacctgtccgcttctccctcgggaaagcgtggcgttctcctatagctcacgc  tgtaggtatctcagttcgggtgaggtcgttcgctcaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagccgc  tgcgcttaccgtaactatcgtctgagccaaccggtaagacacgactatcggcactggcagcagccactggt  aacaggattagcagagcgaggtatgtaggggtgtacagagttcttgaagtgggtggcctaaactacggctactag  aagaacagatttggatctgctgctgctgaagccagttacctcggaaaaaggttggtgctctgtatccggcaaa  caaacaccgctggtgagcgtgtttttgttgcaagcagcagattacgcgcaaaaaaaggatctcaagaagat  cctttgatctttctacgggctgacgtcagtggaacgaaactcacgtaagggtatttggctcagagattatcaaaa  aggatctcacctagatcctttaaataaaaatgaagtttaaatcaatcaaaagtataatagtaaaactggtctgacag  ttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttctcctatccatagtgctgactccccgctg  tagataactacgatacggagggttaccatctggcccagtgctgcaatgataccggagaccacgctcaccgg  ctccagattatcagcaataaacagccagccggaaggccgagcgcagaaggtgctcctgcaacttatccgctc  catccagcttaattgttgcgggaagctagagtaagtagtccaggttaatggttgcgcaacgttggctcattgc  tacaggcatggtgtcagcgtcgtgtgtatggctcattcagctccgggtccaacgatcaaggcg</p>
--	--	---

10

20

【 0 4 6 4】

30

【表 1 2 - 4 0】

		<p>agttacatgatccccatggttgcaaaaaagcggtagctcctcggcctccgatcgttgicagaagtaagttggcc  gcaagtgtatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactg  gtgagtactcaaccaagtcattctgagaatggtatgctggcgaccgagttgctcttgcccggcgtaatacgggafa  ataccggccacatagcaaacftfaaaagtgctcatcattggaaaacgtctctggggcgaaaactctcaaggatctt  accgctgttgagatccagttcgtatgtaaccactcgtgcaccaactgatctcagcatctttactttaccagcgtttct  gggtgagcaaaaacaggaaagcaaaatgcccaaaaaagggaafaaggcgacacggaaatggtgaatfactcat  actctctctttcaataatfaggaagcattatcagggtattgtctcatgagcggatacatattgaaatgattgaaaaaata  aacaatagggttccgcgcacattccccgaaaagtccacctaataatgtaagcgttaataatgtaaaattcgcggt  aaattttgtaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatccctataaatcaaaaagaatagaccga  gatagggttgagtggttccagtttgaacaagagtcactataaaagaacgtggactccaacgtcaaaaggcgcaaa  aacctgtatcaggcgatggcccactacgtgaacctacacctaatcaagttttggggctgaggtgcccgtaaaagc  actaaatcggaaacctaaaggggagccccgatfagagctgacgggaaaaccggcgcaacgtggcgagaaag  gaaagggaagaaagcgaagggagcggcgctaggcgctggcaagtgtagggtcacgctgcgcgtaaccacc  acaccggccgcctaatgcccgtacagggcgctcccaatcgcattcagggctgcgcaactgttgggaaggcg  cgtatcgggtggcctctcgtattacccaagctggcgaaaaggggatgctgcaaggcgtaatacagactcactataggcgga  cgccagggtttccagtcacgactgtgtaaaacgacggcagtgagcgcgctlaatacagactcactataggcgga  attgggtaccggcccccccgatcaggtcagcgtatcggggagctcgcagggtctccatttgaagcggg  aggttgaacgcgacg</p>	10
210	17AALIEC_6_F 129L_H642N_L 584N_pAAV-DJ	<p>ccgccatgccgggttttacgagatggtatfagggctcccagcgacctgacgagcaictgccggcattctgaca  gctttgtgaactgggtggccgagaaagggaatgggagtgccgccagattctgacatggatctgaatctgattgagcag  gcacccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgactttctgacggaaatggcgccgtgtgagtaaggccccgga  ggcccttttctgtgcaattgagaaggagagagctactccacatgcacgtgctcgtgaaaccaccgggtgaa  atccatggtttggcagcttctgagtcagatcgcgaaaaactgattcagagaattaccggggatcagaccgact  ttgccaactggttcgctcacaagaccgaaatggcgccggggcggggaacaagggtggtggtgagtgctgcta  catccccaaftacttctccccaaaaccagcctgagctcagtgggcggtgactaataatggaacagtttaagcgc  ctgttgaatctcacggagcgtaaacgggttgggtggcgagcatctgacgcacgtgctcagacgcagagcagaa  caaagagaatcagaatcccaatctgatgccgggtgatcagatcaaaaactcagccaggtacatggagctggtcg  ggtggctcgtggacaagggtattaccgggagaagcagtgatccaggaggaccagccctcatacatctcttcaa  tggcgctccaactcgggtcccaaatcaaggctgccttggacaatcgggaaaagattatgagcctgactaaaacc  gccccgactacctggtggccagcagcccgtggagacattccagcaatcggattataaaatfttgaactaaac  gggtacgatcccaatagcggctccttctgggatgggcccacgaaaagttcggcgaagggaacacacatctg  gctgttggcctgcaactaccgggaagacaacatcgcggagccatagcccacactgtgccctctacgggtgc  gtaaaciggacaatgagaacttccctcaacgactgtgtcgacaagatggtgatctggtgggagggagggaagat  gaccgcaaggctgtggagtcggccaaagccattctggaggaaagcaaggctgcgctggaccagaaatgcaagt  cctcggccagatagaccgactcccgtgatcgtaccctcaacaccaacatgtgcgctgattgacgggaactc  aacgacctcgaacaccagcagccgtgcaagaccggatgtcaaatftgaactcaccgcccgtctggatcatgactt  tgggaaggtcaccagcaggaagtcaaaagacttttccgggtggcgaaggatc</p>	20 30

【表 1 2 - 4 1】

	<p>acgtgggtgaggtggagcatgaattctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagaccgccccagtgacgca  gatataagtgagcccaaacgggtgctgcgagtcagttcgccagccatcgacgtcagacgcggaagcttcgatcaac  tacgacagacgtaccaaaacaatgtctcgtcacgtggcatgaatctgatgctgttccctgcagacaatgcgag  agaatgaalcagaatcaaatatctgctcactcacggacagaaagactggttagagtgcttcccggtcagaatcca  accggttctgctcaaaaaggcgtatcagaacctgctacattcatatcatgggaaagggtgccagacgcttgc  actcctcgcgatctggtcaatgtggattggatgactgcatcttgaacaataaatgattaaatcaggatggctgccga  tggttatctccagatggctcaggacaacctctctgaggcattcgcgagtggtgggactgaaacctggagcccc  gaaacccaaaagccaaccagcaaaagcaggacgacggccggggtctggtcttctggtactaaagctacctcggac  cctcaacggactcgacaagggggagcccgtcaacggcgggatgcagcggccctcgagcacgacaaggccta  cgaccagcagctcaaaagggtgacaatcgtacctgctgataaccacggcggacggcgagttcaggagcgct  gcaagaagatactcttgggggcaacctggcgagcagctctcaggccaagaagggttctcgaaccttta  ggtctggttgaggaaagtgctaaagcggctcctgaaagaaacctccggtagaagcagtcgccacaagagccaga  ctcctcctcgggcatgcaagacagggcagcagcccgtaaaaagagactcaatgtgctcagactggcgactca  gagtcagctcccagcccaaacctctcgggagaacctccagcaacccccgtctgctgggactacataatggctt  caggcgggtggcgaccaatggcagacaataacgaagcggcggacggagtggttaatgcctcaggaatggcat  tgcgattccacatggtggcgacagatcaccaccagcaccgaacatgggcttcccacctataacaacc  acctctacaagcaaatcctcagctcctcaacggggccagcaacgacaaccactactcggctacagcaccctg  ggggtatttgattcaacagattccactgccattctcaccacgtgactggcagcagctcatcaacaatggggat  tccggccaagagactcaactcaagctctcaacatcaagtcagggatcagcgaatgatggcgtacgac  catgctaataacctaccagcaggtcaagctctcggactcggagtagcagttgccgtactcctcggctcgtcg  caccagggctgccctccctgctccggcgagctgttcatgattccgagtagggctacctaacgctcaacaatgg  cagccagcagtgaggacgtcatcttctacgtccctggaatattcccatcgcagatgctgagaacgggcaataactt  atcctctcagaccagctacctgtattacctgaacagaactcagaatcagtcgggaagtgcccaaaacaaggactgc  tgttagccggggtctccagctgcatgctgtcagccaaaactggctacctggacctgtaccggcagcagc  gcttctaaaacaaaacagacaacaacaacgcaacittacctggactggtgctcaaaatataacctaatgggc  gtgaatcfataatcaacctggcactgctatggcctcacacaaagacgacaaa gacaagttcttccatgagcgggtg  tcatgattttggaaaggagagcggcggagctcaaacactgcaatggacaatgcatgatcacagacgaagaggaa  atcaaaagccaactaaccctgcccaccgaaagattgggactggtggcagtcataaccagagcagcagcagac  cctcggaccggagatgcatggtatgggaccttacctggaatggtggcaagacagagacgtatacctcagg  gtcctattgggcaaaatcctcacacggatggacacttaccctcctctcatggggcttggacttaagaac  ccgctcctcagatcctcaaaaaacacctgttctcgaatcctccggcagagtttccgctacaagtttgcctc  attcatcccaagattccacaggaagtgagcgtggagatigaatgggagctgcagaagaaaacaacgcaaacg  ctggaatcccgaagtgagtaacatcaactatgcaaaatctgcaaacgtgatttcaactgtggacaacaatggacttt  atactgagcctcggccaltggcaccgttacctcaccctgcccctgtaattgtggttaatacaataaccggtgattc  gtttcagttgaacttggctctcggaaaggcgaattcgttaaacctgcaggactagaggtcctgtattagaggctcag  tgaggtttgacatttgcgacacatgt</p>
--	---

10

20

30

【 0 4 6 6 】

【表 1 2 - 4 2】

		<p>ggtcacgctgggtattfaagcccagtgagcagcaggggtctccatttgaagcgggaggttgaacgcgagccg  ccaagccgaattctgcagatattcatcacactggcggccgctcactagagcggccgcccacccgggtggagctcc  agcttttggcccttaagtggggttaattgcgccttggcgtaatcatggtcatagctgttctgtgtgaaattgftatccg  ctcacaattccacacaacatagagccggagcataaaagttaaaagcctgggggtgcctaatgagtgagcctaactac  attaattgcgttgcgctcagcggccttccagtcgggaaacctgtcgtccagctgcattaatgaatcggccaacgc  ggggggagagcgggttgcgtattgggcgctctccgcttccctcgtcactgactgctgcgctcggctgtggcctg  cggcgagcggatcagctcactcaaaaggcgttaatacgggtatccacagaatcggggataacgaggaagaac  atgtgagcaaaaggccaacaaaggcaggaaccgtaaaaaggccgctgtgctggcgttttccataggtccgc  ccccctgacgagcatcacaacaaatcagcgtcaagtcagagggtggcgaacccgacaggactataaagataccag  gctttccccctggaagctcccctgctcctctgtccgacctgcccgtaccggatacctgtccgcttttccc  ttcgggaagcgtggcgtttctcatagctcacgctgtaggatctcagttcgggtgagctgctgcctcaagctgggct  gtgtgacgaacccccgtcagcccagccgtgcgcttatccgtaactatgctttagtccaacccggtaaga  cacgactatcgccactggcagcagccactgtaacagggatagcagagcggatgtaggcgggtctacagagt  cttgaagtgggtggcctaactcggctacactagaagaacagctattgggtatctcgcctctgctgaacgtaacctc  ggaaaaagaggttggtagctctgatccggcaacaaaccaccgctgtagcgggtgtttttttgcaagcagcag  attacgcgcaaaaaaaggactcaagaaatctttagcttttctacgggtcagcgtcagtggaacgaaaac  tcaggttaagggtttggtcagatgagattcaaaaaggatctcacctagatcctttaaataaaatgaattttaa  aatcaaatatagtaaaactggtctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcagctgtct  attcgtcatcatagttgcttactcccctgctgtagataactacgatacgggagggttaccatctggccccagtg  ctgcaatgataccggagaccaccgctcaccggctccagattatcagcaataaacagccagccggaaggccg  agcgcaagaagtggctcgaactttatccgctccatccagcttataaattgttccgggaagctagagtaagtgtc  ggcagttaatagtttgcgaacgttggccattgctacagcagctgtggtgacgctcgtgttggtagctcattc  agctccgggtccaacgatcaaggcaggtacatgatccccatggtgtcaaaaaagcgttagctcctcggctct  ccgatggtgtagaagtaagttggccgaggttatcaactcatggtatggcagcactgcataatcttactgtcatg  ccatccgtaagatgcttttctgactgggtgagtaactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatggcgcaccgagttg  ctctggccggcgtcaatacgggataalaccgcccacatagcagaactttaaagtgtcctcattggaacagttct  tcggggcgaaaactcgaagatctaccgctgttgatccagctcgtatgtaaccacacgtgaccccaactgatctt  cagcatctttactttaccagcgttctgggtgagcaaaaacggaaggcaaatgccgaaaaaagggaataagg  gagacaggaatgtgaatactcactcttccctttcaatattatgaagcattatcagggttattgtctatgagcgg  atacataattgattttagaaaaataaacaatagggggtccgcccacatttcccgaaaaagtgccacctaattgt  aagcgttaataatttgttaaaatcgcgttaaaatttgttaaatcagctcatttttaaccaataggcgaatcggcaaat  cccttataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgaggtgttccagtttgaacaaagagctcactataaagaac  gtggactccaacgtcaaaaggcgaaaaaccgtctatcaggcagatggccactacgtgaacctaccctaatca  gttttggggctgaggtgccgtaaaagcactaaacggaaaccctaaaggagccccgatttagagctgacgggga  aagccggcgaacgtggcagaaaaggaaagggaagaaagcgaaggagcggcgtaggcgtgcaaggtg  agcggctacgctgcggttaaccaccacaccgccgcttaatgcccggctacaggcggct</p>
--	--	---

10

20

【 0 4 6 7】

30

【表 1 2 - 4 3】

		cccattcgcattcaggctgcgcaactgttgggaaggcgatcgggtcggcctctcgtaittacgccagctggcg aaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggtttccagtcacgacgttgaataacgacgg ccagtgagcgcgctaatacgaactactatagggcgaattgggtaccggccccctcgtacgaggtcagcgggt atcgggggagctcgcagggtctccatttgaagcgggggttgaacgcgcag
211	17AALIFC_6_F 129L_H642N_L 584H_pAAV-DJ	ccgccatgccgggttttacgagatgtgattaagggtccccagcgacctgacgagcatctgccggcatttctgaca gctttgtgaactgggtggccgagaagggaatgggagttgccccaattctgacatggaatctgaatctgagcag gcaccctgaccgtggccgagaagcigcagcgcgacttctgacggaatggccgctgtgagtaaggccccgga ggccctttctgtgcaattgagaaggagagagctacttccacatgcacgtctcgtggaaccaccggggtgaa atccatggtttgggacgttctgagtcagatcgcgaaaaactgattcagagaattaccgggacgagccgact ttgccaaactggtcgcggtcacaagaccagaaatggcgcggagggcgggaacaagggtggtgagtgagct catccccaaattactgtctccccaaaaccagcctgagctccagtgggcgtgactaataatgggaacagtat ctgtttgaatcaccgagcgtaaacgggtggtggcgcagcatctgacgcacgtctcgcagacgagggagcaga caaaagaatcagaatcccaattctgatcggccgtgatcagatcaaaaactcagccaggtacatggagctggtc gtggctcgtggacaagggttaccctcggagaagcagtgatccagagaccagggcctcatalctcctcaa tgcggcctccaactcgcggtcccaacaaggctgccttggacaatgcgggaaagattatgagcctgactaaaac gccccgactacctggtggccagcagccgtggagacattccagcaatcggattataaaatttggaaactaac gggtacgatccccaatatcggtctcgtcttctggatgggcccagaaaaagttcggcaagggaacaccatctg gctgttggcctgcaactaccgggaagaccaacatcgggagccatagcccacactgtccctctacgggtgc gtaaacctggaccaatgagaacttccctcaacgactgtctgacaagatggtgatctggtgggagggggaagat gaccgccaaggctcgtgagtcggccaaggccattcicggaggaaagcaagggtgcgctggaccagaaatgcaag cctcggcccagatagaccgactcccgatcgtcaccccaacccaacatgtgcgctgattgacgggaactc aacgacctgaacaccagcagccgtgcaagaccggatgtcaaaattgaactcaccgcccgtctggtatgactt tgggaaggcaccagcaggaagtcaaaagacttttccgggtgggcaaggatcacgtggtgaggtggagcatgaa ttctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagaccgccccagtgacgcagatataagtgagccaaaacgggt gctgagtcagttgcgacgccatcagctcagacgcgggaagctcgaactacgcagacaggtgacaaaacaa atgtctcgtcacgtggcatgaatctgatgctgttccctcagacaatgcgagagaatgaatcagaattcaaatct gcttactcagcagacaagaaactgttagagtgcttccctgctcagaatctcaaccgttctgctgcaaaaaggc gtatcagaactgtgctacatcatalcatgggaaagggtccagacgctgactccctgcatctggtcaatgtg gattggatgactgcatcttgaacaataaatgatitaaatcaggtatggtgccgatggtatctccagattggctga ggacaacctctcggggcattcgcgagtggtgggactgaaacctggagccccgaaacccaagccaaccagc aaaagcagcagcagcggcgggtctggtgcttctgctacaagctcctggaccctcaacggacgcgacaagg gggagcccgtcaacggcgggatgcagcggccctcagcagcagacaaggcctacgaccagcagctcaaaaggc gtgacaatccgtacctgctggtataaccacgccgacgccgagttcaggagcgtctgcaagaaatagctctttggg ggcaacctcggcgcgacgtctcaggccaagaaagggttctcgaacctttaggtctggtgaggaagggtgcta agagcgtcctggaaagaaacgtccgggtagagcagtcgccacaagagccagactccctcctggcattggcaag acagcggcagcccgtaaaaagagactcaatttggcagactggcagctcagagtcagctccccgaccacaa cctctcggagaacctcagcaacccccgctgctggtggacctacta

10

20

30

【 0 4 6 8 】

【表 1 2 - 4 4】

		<p>caatggcttcaggcgggtggcgcaccaatggcagacaataacgaaggcggcggagtggtgtaatgcctcaggga  aatggcattgcgattccacatggctggcgacagagtcacaccaccagcaccggaacatgggcoftgcccacct  ataacaaccacctctacaagcaaatctccagtgctcaacgggggccaagcaacgacaaccactactcggctacag  caccacctgggggtatfttgaittaacagatccactgccafttctaccacgtgactggcagcgactcaacaac  aatggggattccggcccaagagactcaactcaagctctcaacccaagtcaaggaggtcacgacgaatgatgg  cgtcacgaccatcgtaataaccftaccagcaggttcaagcttctcggactcggagttaccagttgccgtacgtctc  ggctctgcgcaccagggtgcccctccgftcccggcgagctgtcatgattccgcagttacgctacctaagct  caacaatggcagccaggcagtgaggacgtcatctttactgctggaatattcccatcgagatgctgagaacgg  gcaataacttaccctcagctacacctcagggacgtgcctttccacagcagctacggcagcagcagagccggac  cggctgatgaatcctctcatcgaccagtacctgtataccgaacagaactcagaatcagctcggaaftgcccacaaac  aaggactgctgttagccgggggtctccagctggcatgctgttcagcccaaaactggctacctggaccctgttac  cggcagcagcgcggttcaaaaacaaacagacaacaacaacagcaactttaccctggactggtgcttcaaatataa  ccttaatggcgtgaatctataataacacctggcactgctatggcctcacacaagcagacaagacaagttcttccc  atgagcgggtgatgatttggaaaggagagcggccggagcttcaaacactgcatggacaatgcatgatcacagac  gaaagggaatcaagccactaaccccggtgccaccgaaagattgggactgtggcagtaatcaccagagcagc  agcacagacctcgcaccggagatgctgatgtatgggagccttacctggaatggtgfgcgaagacagagacgtat  acctgcagggtcctatttggccaaaatctcacacggatggacactttaccctcctcatggcggccttgg  actaagaaccgctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgtctcgcgaatcctccggcagagtttccgctaca  aagtttgccttcatcaccagattccacaggacaagtgagcgtggagattgaaaggagctgcagaaagaaaa  cagcaaacgctggaatcccgaagtgcagtafacatctaactatgcaaaatcgccaacgttgattcactgtggaca  caatggacttatactgagcctcgcacctggcaccgttacctaccctcctcctgtaattgtgttaatacaataaac  cgggtgatcgttcagttgaacttggctctcgcgaaggcgaatcgttaaacctgcaggactagaggctcgttatta  gaggtcacgtgaggttctgacatttgcgacaccatgtgtcagcctgggtttaaagcccagtgagcacgcag  ggtctccatttgaagcgggaggttgaacgcgcagccgccaagccgaatcfcagalatccatcacactggcggc  cgctcactagagcggccaccgcgggtggagctccagctttgttccctttagtgagggttaattgcgcgcttggc  gtaatcatggtcagctgttctctgtgaaatgttatccgctcacaatccacacaacatacagaccggaaacataa  agtgtaaacctgggtgcctaatgagtgagtaactcacatfaatgctgtcgcctactgcccgcttccagtcggg  aaacctgtcgtccagctcattaatgaatcgccaacgcgggggagagggcggttgcgtattgggcctctccg  cttccctcactgactcgtcgcctcggctgttcggctgcggcagcgggtatcagctcactcaaaaggcggtaatac  ggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggcagcaaaaggccaagaccg  taaaaaggccggtgtcggcttttccataggctccgcccctgacgagcatcaaaaatcagcgtcaagtc  agaggtggcgaaccggacagactataaagataaccagcgttccccggaaagctccctcgtgctctcctgtt  ccgacctgccgctaccggatacctgtccgcttccctcgggaaagcgtggcgttctcatagctcacgctgta  ggtatctcagttcgtgtaggtcgtcctcaagctggcgtgtgtcacgaacccccgttcagccccgaccgctgc  gccttatccgtaactatcgttggatccaaccggtaagacacgactatgccactggcagcagccactggtaac  aggattagcagcggaggtatgtagcgggtgctacagagttctgaaagtgtggcctaactacggctacactagaag  aacagatttggatc</p>
--	--	---

10

20

30

【 0 4 6 9 】

【表 1 2 - 4 5】

		<p>           tgcgctcgtggaagccagttaccctcggaaaaagagttggtgagctcttgatccggcaaaaccaccgctggtgag            cgggtggttttttggcaagcagcagattacgcgcagaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttaccggg            gtcctgacgctcagtggaacgaaactcacgttaagggttttggcatgagattatcaaaaaggatcttaccatgac            ctttaaaftaaaaatgaagttttaaactaatctaaagtatatatgagtaaaacttggctgacaggtaccaatgcttaacgt            gaggcacctatctcagcgtatcgtctattcgttcacatagttgcctgactccccgtcgtgagataactacgatacgg            gaggccttaccatctggccccagtgctgcaatgataccggcagaccacgctcaccggctccagattatcagcaat            aaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggcctgcaactttaccgctccatccagctcattatgtg            ccgggaaagctagagtaagtagtgcgcaatagttgcaacgttggccattgctacagcagcagctggtgca            cgtcgtcgttggatggcttcaatcagctccgggtcccaacgatcaaggcaggttacatgatccccatggtgca            aaaagcggtagctcctcgtctccgcatcgttcagaagtaagttggcgcaggtttatcactcatggttatggcag            cactgcataatctctactgcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagctcaaccaagctctctgaga            atagtgatgaggcagccaggttgcctgcccggcgtcaatcgggataataccgcccacatagcagaacttaa            aagtgctcatcattgaaaaagctctcggggcgaaaactcacaagatctaccgctgtgagatccagctgcatgtaa            cccactgctgacccaactgactctcagcatctttaccacagcgttctgggtgagcaaaaacggaaggcaaa            atccgcgcaaaaaagggaataaggcgcacacggaatgtgaatactatactcttcttcaattatgaagcattt            atcagggttattgctcatgagcggatataatgaaatgatttagaaaaataacaaataggggctccgcacatctc            cccgaaaagtccacctaattgtaagcgttaattttgtaaaatcgcgttaaattttgtaaatcagctcattttaac            caataggccgaaatcggcaaaatccctataaaatcaaaagaatagaccgagatagggtgagtggttccagttgg            aacaagagctccactattaagaacgtggactccaacgtcaaaaggccgaaaaaccgtctacagggcagtgccca            ctacgtgaaccatcacctaatacaagttttgggtcgaaggtgcccgtaaagcactaaatcgaaccctaaaggagc            ccccgattagagcttgacgggaaagccggcgaacgtggcgaagaaagggaagaaagcgaaggagcgg            ggcgctlagggcgtgcaaggtgtagcggctcacgctgcgtaaccaccacaccgcccgcctfaatgcgcccgt            acagggcgcgtcccattcgcattcaggctgcaactgtgggaaaggcagatcgggtcgggccccttccgctattac            gccagctggcgaagggggatgtgctgcaaggcgattagttgggtaacgccagggtttccagtcacgacggtg            taaaaacgacggcagtgagcgcgtaatacgaactcactataggcgaattgggtaccgggccccccctcagc            aggtcgacggtatcggggagctcgcagggctccatttgaagcgggaggttgaacgcgcag         </p>	10
212	17AALIGC_6_F 129L_H642N_V 598L_pAAV-DJ	<p>           ccgcatgccgggtttacgagattgfgaataagggtccccagcgacctgacgagcatctgccggcatttctgaca            gcittgtgaactgggtggccgagaaggaaaggagtgccgccagattctgacatggatcgaatcagtgagcag            gcaccctgaccgtggccgagaagctgacgagcacttctgacggaatggcggcgtgtagtaaggccccgga            ggccctttcttggcaattgagaaggagagagctacttccatgacacgtgctcgtggaaccaccgggtgaa            atccatggtttgggacgttccctgagtcagattcgcgaaaaactgaticagagaattaccgggagcagccgact            ttgcaaaactggtcgcgtcacaagaccagaatggcggcggagcgggaaacaaggtggtgagtgagtgcta            catccccaaftactgctccccaaaaccagcctgagctccagtgggcgtggactaatatggaacagatitaaagcgc            ctgttgaatctcagggagcgtaaacggttggcgcagcatctgacgcacgtgctcagacgagcagagcagaa            caaagagaatcagaatcccaattctgatcgccggtgagcagatcaaaactcagccaggtacatggagctggtc            ggtggctcgtggacaagggaftacctcggagaagcagtgatccaggagga         </p>	20

【表 1 2 - 4 6】

	<p>ccaggcctacatactctccttcaatgcgccctccaactcgcgggtcccaaatcaaggctgccttggacaatgcgggaa  agattatgagcctgactaaaaccgccccgactacctgggtggccagcagcccgtggaggacattccagcaatcg  gattataaaatfttggactaaaccgggtacgatcccaatatgcggtccgtcttctgggatgggccacgaaaagt  tcggcaagaggaaacacatctggctgttgggctgcaactaccgggaagaccaacatcgcggaggccatagccc  acactgtgccctctacgggtgcgtaaacgggcaaatgagaacttcccttcaacgactgtgtcgacaagatggfgat  ctgggtggaggagggaagatgaccgccaaggtcgtggagtcggccaagccaltctcggaggaaagcaaggtg  cgcgtggaccagaatgcaagtcctcggcccagatagaccgactccgtgatcgtcacctccaacacaacatgt  gcccgtgattgacgggaacccaacgacctcgaacaccagaccgttgaagaccggatgttcaaatggaactc  acccgccgtctgatcatgacttgggaaggtcaccagcaggagcaaaagacttccgggtggcacaaggatca  cgtgggtgaggtggagcatgaattctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagaccgcccccagtgacgcag  ataaagtgagccaaaccgggtgcgcgagtcagtgcgcaaccatcgacgtcagaccgggaagcttcgatacaact  acgcagacaggtaccaaaacaaatgtctcgtcacgtgggatgaatctgatgctgttccctcagacaatgogaga  gaatgaatcagaatcaaatatctgcttcaactcagacagaaagactgtttagagtgcttccctgtcagaatccea  cccgttctgtcgtcaaaaaggcgtatcagaactgtgctacattcatatcatgggaaggtggcagacgttga  ctgctcgtgatctggfcaatgtggattggatgactgcatcttgaacaataaagtattaaacaggtatggctgccaf  ggfctctccagattggctcaggacaacctctctgaggcattcgcgagtggtgggactgaaacctggagcccc  gaaacccaagccaaccagcaaaagcaggacgacggccggggtctgtgcttccgtcactacaagctaccggac  cctcaacggactcgaagggggagcccgtcaacgcggcggatgacgcggccctcagacacgacaagggccta  cgaccagcagctcaaaagggtgacaatccgtacctgctgtataaccacgcccagcggcgaattcaggagcgtct  gcaagagatactgttgggggcaacctcggcgagcagcttccaggccaagaagagggtctcgaaccttta  ggfctgtgtgaggaaagtgtcaagacggctcctggaaagaaactccggtgtagcagctgccacaagaccaga  ctctcctcgggcatggcaagacagccagcagcccgtcaaaaagactcaatttggcagactggcgactca  gagtcagctcccgaaccacaacctctggagaacctccagcaacccccgctctgtgggacctactacaatggctt  caggcgggtggcaccaatggcagacaataacgaaaggcgcgacggagtggtlaatgctcaggaatggcat  tgcgattccacatggctggcgacagatcatcaccaccagccccgaacatgggcttggcccacctatacaacc  acctctacaagcaaatctcagctcctcaacggggccagcaacgacaaccactactctggctacagcaccctctg  ggggatatttgattcaacagattccactgccattctcaccacgtgactggcagcagctcatcaacaacattggggat  tccggcccaagagactcaactcaagctctcaacatccaagtcaaggaggtcacgacgaafgatggcgtcacgac  catcgtataaacttaccagcacggctcaagctctcggactcggagtfaccagttgccgtacgtcctcggctctcg  caccaggctgcctccctcgtcccggcggacgtgtcatgattccgcagctacggctacctaaccgtcaacaatgg  cagccaggcagtgaggacggctaccttctactgcttgaatattccatcgcagatgctgagaacgggcaataactt  acctcagctacacctcagggacgtgcttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatga  atcctctcatcgaccagctgactgaltacctgaacagaactcagaatcagtcgggaagtgcaccaaaacaggaactgc  tgtttagccggggtctccagctggcatgtctgtcagcccaaaaactgctacctggacctgttaccggcagcagc  gcgttctaaaaaacaagacaacaacacagcaacttaccgtgactgtgctcctcaaatataaccttaatgggc  gtgaatctataatcaacctggcactgctatggcctcacacaagacgacaagacaagtcttccatgagcgtg  tcatgattttgaaaggagagcggccggactcaaacactgcatt</p>
--	---

10

20

30

【 0 4 7 1】

【表 1 2 - 4 7】

	<p>ggacaatgcatgatcacagacgaagaggaaafcaaaagccactaacccgfgccaccgaaagattgggactgt  ggcagtcfaatccagagcagcagcagaccctgcgacogagagatgtcatcttatgggagccttacctggaatg  gtfgggcaagacagagacgtatacctcagggctctatttggccaaaatctcacacggatggacacttccacc  gtctctctcatggggcttggacttaagaaccgctctcagatcctcataaaaacacgcctgtctcgggaat  cctccggcagaggttggctacaaaagttgctcaticatcacccagttatccacaggacaagtgagcgtggagattg  aatgggagctgcagaaaagaaacagcaaacgctggaatcccgaagtgcagtatacatctaatatgcaaaatctgc  caacgftgatttactgtggacaacaatggactttatactgagccicgccccattggcaccggttacctcaccctgcc  ctgtaattgtgtgtaataataaacgggtgattcgttgaacttggctctgcgaaggcgaattggttaaac  tgcaggactagaggctctgtatagaggcagcgtgaggtttgcgacatttgcgacaccatgtggcagcgtgggtat  ttaagcccagtgagcagcagggctcctcatttgaagcgggaggttgaacgcgacgcccgaagccgaattctg  cagatafccaatcacactggcggcgcctgactagagcggccaccgctggagctcagcttctgttcccttfa  gtgagggtaattgctgctgctgtaataatggctagctgttctgtgtgaaattgtatccgctcacaattccaca  caacatacagaccgaaacataaaggtgaaagcctgggtgcttaatgagtgagctaacacataaattgctgtgc  gctcactgcccgcttccagctgggaaacctgtcgtccagctgcaataatgaatcggcaacgcggggagagg  cgttttgcgtattggcgcctcctcctcctcctcactgactcctcgcctcggctcgtcgtcggctcggcagcggat  tcagctcactcaaaagcggtaaacggtatccacagaatcaggggataacgcaaggaacatgtgagcaaaa  ggccagcaaaagccaggaacgtaaaaaggccgctgtgctggcgttttccatagctcggccccctgacgag  catcaaaaaatcagcgtcaagcaaggtggcgaacccgacaggactataaagataccagcgtttccccctg  gaaagctccctgtgctcctcctgttcgacctgcccctaccggatactgtccgcttctcctcgggaaagcgt  ggcgttctcatalagctcacgctgtaggtatctcagttcgtgtgagctgtcgtccaaagctggcgtgtgtcacgaa  cccccgctcagcccaccgctgccttatccgtaactatcgtctgagccaaccgtaagacacgactatcgt  ccactggcagcagccactggtaacaggtatgacagcagcaggtatgtagcggctcagagttctgaaagtgtg  ggcctaactacggctacactagaagaacagtttggatctcgcctcgtgaagccagttaccttggaaaaagag  ttgtagctctgatccggcaaacaccaccgctgtagcgggtgtttttgttgcaagcagcagattacgcgcag  aaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacgggctcagcgtcagtggaacgaaaactcacgttaagg  gatttggctatgagatatacaaaaaggacttcacctagatccttfaaataaaaaatgaagtttaaatcaatciaaagt  atatgagtaaaactgtgtgacagttaccaatgcttaacagtgagcaccatctcagcagatctgtctatttctcatcc  atagttcctgactccccgtgtgtagataactacgatacgggagggcttacctctggccccagctgctgcaatgata  ccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaacagccaaggggaaaggccgagcagaa  gtggtcctgcaacttaccgctccatccagctatfaattgttggcgggaaagctagagtaagtagtccaggttaata  gtttgccaacgttgtgacattgctacaggcaltcgtgtgtcagcgtcgtcgtttggtatggcttcaatcagctccggt  cccaacgatcaaggcaggtatcatgatccccatgttgcgcaaaaagcgggtatgctccttgcgtcctccgacgtgt  cagaagtaagttggccgaggttatcactcatggttatggcagcagcagataaattcttactgtcatgcatccgtaa  gatgctttctgtgactggtgactcaaccaagctcaltctgagaatagtgatggcgaccgaggtgctcttccccg  gcgtcaalacgggataataccggccacatagcgaactttaaagtgctcatcattgaaaacgttctcggggcga  aaacfcicaaggatctaccgctgtgagatccagttcgtatgtaaccactcgtgaccccaactgatctt</p>
--	---

10

20

30

【 0 4 7 2】

【表 1 2 - 4 8】

		<p>cagcatctttacttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagg  gcgacacggaaatgttgaatactatactcttcttcaatattatgaagcattatcaggggtattgtctcatgagcgg  atacataattgaatgtattagaataaacaataagggttccgcgcacattccccgaaaagtgccacctaattgt  aagcgttaataatttgttaaaatcgcgttaattttgttaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaat  ccctataaatcaaaaagaatagaccgagatagggtgagtggttccagtttgaacaagagtcaccattaaagaac  gtggactccaacgtcaaaaggcgaaaaaccgtctatcaggcgcgatgccactacgtgaacatcaccciaatcaa  gtttttggggtcgaagggtccgtaaaagcactaaatcggaaaccataaaggaggccccgatttagagcttgacgggga  aagccggcgaacgtggcgagaaggaaagggaagaaagcgaaggagcggcgctaggcgcgtggcaagtgt  agcgggtcacgctgcgcgtaaccaccacaccggcgccttaatgcggcctacagggcgcgtccattcggcattc  aggctgcgcaactgttgggaaggcgcgatcgggtgcggcctcttcgctattacgccagctggcgaagggggatgt  gctgcaaggcgattaagtgggtaaacgccagggtttccagtcacgacgttgaaaacgacggccagtgagcggg  cgtaatcagactcactataggcgaatgggtaccgggccccctcgcgatcgaaggcgcaggtatcgggggagct  cgcagggtctcatttgaagcgggaggttgaacgcgcag</p>	10
213	17AALIHC_6_F 129L_H642N_V 598I_pAAV-DJ	<p>ccgccatccggggtttacgagatgtgattaaggctcccagcgacctgacgagcatctgccggcattctgaca  gctttgtgaactgggtggccgagaaggaaagggaatggcgcagattctgacatggatctgaatcigattgagcag  gcacccctgaccgtggccgagaagctgcagcgcgactttctgacggaaatggcggcgtgtgagtaaggccccggg  ggccctttctttgtcaatttgaagaaggagagagctacttccatgacagctgctcgtggaaaccagggtgaa  atccatgggtttgggacgtttcctgagtcagatcgcgaaaaactgaticagagaattaccggggatcggccgact  ttgcaaaactggttcggtcacaagaccagaaatggcggcggaggcgggaacaagggtgtggatgagtgcta  catcccaactactgclccccaaaaccagcctgagctccagtgggcgtggactaataatggaacgatttaagcgc  ctgttgaatcaccggagcgtaaacgggtgggtggcgcagcatctgacgcagctgctgcagacgagggagcagaa  caaagagaatcagaatccaattctgatgcgggtgatcagatcaaaaactcagccaggtacatggagctggctg  gggtggctgtggacaagggtgattaccctggagaagcagtgatccaggaggaccagggcctcatacatctcctcaa  tggcggcctccaactcgggtcccaaatcaaggctgccttggacaatggggaaagattatgagcctgactaaaacc  gccccgactacctgtggccagcagcccgtggaggaattccagcaatcggattataaaaatttgaactaaac  gggtacgatcccaatagcggcttccgttctgggatgggcccagaaaaagttcggcaaggaacaacccatctg  gctgttggcctgcaactaccgggaagaccaatcgcggaggccatagcccacactgtgcccctctacgggtgc  gtaaacggacaaatgagaactttccctcaacgactgtgctgacaagatggtgatctgtgtggaggagggaagat  gaccgcaaggtcgtggagtcggccaaaaccattctgggaggaagcaaggtgcgctggaccagaaatgcaagt  cctcggccagatagaccgactcccgtgatcgtaccctcaacaccaacatgtgcggcgtgattgacgggaactc  aacgacctcgaacaccagcagccgtgcaagaccggatgtcaaatggaactacccgccgtctggatcatgactt  tgggaaggtcaccagcaggaagtcaaaagacttttccgggtggcaaaaggatcacgtgttgagggtggagcatgaa  ttctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagaccggccccagtgacgagatataagtgacccaaaagggt  gcccagatcagttgcccagccatgacgtcagacgcggaagcttcgatcaactacgcagacaggtaccaaaaaca  atgttctcgtcacgtggcatgaatctgatctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaatcacaatact  gtctactcagcagaaaagactgttagagtgcttccctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaatcacaatact  gtatcagaaactgtgctacattcatatcatatgggaaag</p>	20 30

【 0 4 7 3】

【表 1 2 - 4 9】

		<p>gtgccagacgctgactgcctgcgaictggicaatgtggattggatgactgcatcttgaacaataatgatfitaatc  aggtatggctgccgatggfatactccagattggctcaggacaacctctctgaggcattcgcgagtggtgggactt  gaaacctgggagcccgaaccgaaagccaaccagcaaaagcaggagacggccggggtctggtgcttctggc  tacaagtacctcggacccttaacggactcgaacagggggagcccgtcaacgcccggatgacgcccctcga  gcacgacaaggcctacgaccagcaactcaagcgggtgacaatccgtacctgctgataaccacccgacgccc  agttcaggagcgtctgcaagaagatacgtcttgggggcaacctcggcgagcagcttccaggccaagaagag  ggttctcgaaccttaggtctggttgaggaggtgctaaagcggctcctggaaagaaacgtccggtagagcagtcgc  cacaagaagccagactcctcctcgggcaatggcaagacagccagcagcccgtaaaaagagactcaatttggta  gactggcactcagatcagctccccgaccacaacctctcggagaacctccagcaacccccgctgctggggacc  tactacaatggctcaggcgtgctcaccatggcagacaataacgaagcggcagcggagtggtatgctc  aggaaatggcattgctcaccatggctggcgacagatcaccaccagcaccgaaatgggcttggcc  acctataacaaccacctctacaagaatctcagtgcttcaacggggccagcaacgacaaccactacttggctc  cagcaccacctgggggtatttgaattcaacagatccactgcatctcaccacgtgactggcagcagctcatcaac  aacaatggggattccggccaagagactcaactcaagctctcaacatccaagcaagggtcagcagcaatga  tggcgtcacgacctcgtataacctaccagcacgggtcaagctctcggactcggagtaccagtgctcgtactg  cctcggctcctgcgaccaggcgtgctcctcctcctcggcgacgtgtcagatgcttccatcgcagatgctacgaa  cgctcaacaatggcagccagcagtggtgacgtcatcctttactgctggaatatttccatcgcagatgctgaa  cgggcaataacttactctcagctacacctcagagcgtgcttccacagcagctacgcgacagccagagcctg  gaccggctgatgaatcctcctcagcagcagctgcttaccctgaacagaactcagaatcagctcggaaatggccaa  aacaaggactgctgttgcggggggtctcagctggcagctgctgtcagccaaaaactggctacctggaccctgt  taccggcagcagcgttctaaaacaaaaacagacaacaacaacgcaacttaccctggactggtgctcaaaat  aacctaatggcgtgaaatataatcaacctggcactgctatggcctcacaaaagacgacaagaagaatcttctc  ccatgagcgggtgcatgattttggaaaggagagcggcggagctcaaacactgcaatggcaatgcatgacacag  acgaagaggaatcaagccactaaccctggccaccgaaagattgggactgtggcagtaactcctcagagca  gcagcacagacctcgcgaccggagatgcatattatgggagccttaccctggaatggtggtgcaagacagagac  talacctcagggctcatttggccaaaatctcacacggatggacacttaccctcctcctcagctggcgtt  ggactlaagaaccgctcctcagatcctcacaacacgctgtcctcgaatcctcggcagaggttctggct  acaaggttctcctcctcaccagatccacaggacaagtgagcgtggagatgaaatgggagctcagaaga  aaacagcaaacgctggaatcccgaagtgcagatatacttaactgcaaaatcggcaacgtgacttactgtgga  caacaatggacttatactgagcctcggccattggcaccgttaccctcaccgtccctgtaattgtgttaataata  aaccggtgactgttcaacttggctcctcgcgaaggcgaatcgtttaaacctgcaggactagaggtcctgt  attagagctacgtgagtggttgcgacatfctgcgacaccatgtgtgacgctgggtatttaagcccaggtgagcag  cagggctcatttgaagcgggaggttgacgcgagccgccaagccgaatctcgaafatccatcacactggc  ggccgctcactagagcggccaccgctggagctccagcttcttcccttagtgagggttaattgctgogctt  ggcgtaatcatggtcagctgttctctgtgaaattgtiatccgctcaaatccacacaacatacagcgggaagc  ataaagtgtaaaagcctggggtgctaatgagtgactaactcacatattgctgctcactgcccgttccagtc  gggaaacctgctgcccagctgc</p>	
			10
			20
			30

【 0 4 7 4 】

【表 1 2 - 5 0】

		ataatgaatcggccaacgcgaggggagaggcggtttgcgtattgggctcttccgcttccgctcactgactgcg tgcgctcggctgctggctgcggcagcgggtatcagctcactcaaaggcggtatccacagaatcagg ggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccaagcaaaaggcgaaccgtaaaaaggccggtgctg gcggtttccataggctccgccccctgacgagcatcacaatacgcacgctcaagtgcagggcgaaccgga caggactataaagataccaggcgttccccctggaagctccctgctgctcctgttccgacccctgcgcttaccg gatacctgtccgcttctccctcgggaagcgtggccttctcatagctcagctgtaggtatcagctcgggtgtag gtcgttcctcaagctgggtgtgtgcacgaacccccgttcagcccaccgctgccttatccggtaactatcgt ctgagccaaccggtaagacacacttatcggcactggcagcagccactgtaaacaggattagcagcgggtg atgtagggcgtgtacagaggtcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagattggatctgcgc tctgctgaagccagttaccctcggaaaaagagttggtgactctgatccggcaaacaccaccgctggtgagcgg gttttttggtgcaagcagcagattacggcgagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacgggctg acgctcagtggaacgaaaactcagttfaagggtttgtgcatgagattcaaaaaaggatctcacctagatccttta aatataaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatagtaaacctggctgacagttaccaatgcttaacagtgagg cacctatctcagcgtctgctattctgctcctcctagttgctgactccccgctggtgataactcagacgaggg gcttaccatctgccccagtgctgcaatgataaccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaac cagccagccggaaaggccgagcgcagaagtgctcctgcaactttatccgctccaccagcttataattgtgccc ggaaagctagagtaagtagtccaggttaatagttgcgcaacgtgtgctcattgctacagcagcagctgctcagc tctgctggttggtagcttcaatcagctccggctccaacgatcaaggcagttacatgatccccatggtgcaaaaa agcggtagctcctcggctccgatcgtgtcagaaagtaagtgccgcagtggtatcactatggtatggcagcac tgcataaactcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgactggtgagtagtactcaaccaagcttctgagaata gtgtatgcccgaccgagttgctcttggccggcgtcaatcgggataataaccgcccacatagcagaacttaaaag tgcctcattggaaaacgcttccggggcgaaaactcagaagatctaccgctgtgagatccagctcagatgaaccc actcgtgcaccaactgatctcagcatcttttcttaccagcgttctgggtgagcaaaaacaggaaaggcaaaatg ccgcaaaaaagggaataaggcgcacggaaatgtgaaatacactcctctcttccatattatgaaagcattatc aggggtattgtctatgagcggatacatattgaaatgtattagaaaaataaaacaaatagggttccgcaacattcccc gaaaaagtgccacctaaatgtaagcgttaataatgtttaaatacgcgttaaaattttgtaaatcagctcatttttaacaa taggccgaaatcggcaaaatccccataaatcaaaagaatagaccgagatagggtgagtggtgttccagtttgaac aagagctcactatataaagacgtggactccaacgtcaaaaggcgaaaaaccgctatcaggcagtgcccactac gtgaaccatcacccaatcaagtttttggggtcagggcgttaaaagcaataacggaaccctaaaggagcccc cgatttagagctgacggggaagccggcgaacgtggcgaaggaagggaagaaagcgaaggagcggg cgtagggcgtggcaagtgtagcggcagcctgcgcgtaaccaccacaccggcgcctaatgcccgcctaca gggcgcgtccattcgcattcagctcgcgaactgtgggaaggcgaatgggtgaccggcctcttgcctattacggc agctggcgaaggggatgtgctgcaaggcgalttaagttgggtaacgccagggtttccagtcacgacgtgtaa aacgacggcagtgagcgcgtaatacgaactacatagggcgaattgggtaccggcccccctcgtcagag gtcgacggtaggggagctcagggctcctcatttgaagcgggaggttgaacgcgcag
--	--	--

10

20

【 0 4 7 5】

30

【表 1 3 - 1】

表13: キメラAAVベクター

配列番号	構築物	配列
214	1_pAAV5 VP1u- AAV6VP 2/3	ccgcatgccgggtttacgagattgtgattaagttcccagcgacctgacgagcatctgccggcatttctgacagctt gtgaactgggtggccgagaagaatgggagttgccccagattctgacatggaictgaatctgattgagcaggccacct gaccgtggccgagaagctgcagcgcgacttctgacggatggcgcctgtgaglaaggccccggaggccctttcttgt gcaattfgaagaaggagagagctacttccacatgcacgtctcgtggaaccaccggggtgaaatccatggtttgggacg ttctgagtcagatcgcgaaaaactgattcagagaattaccgaggatcagccgacttgcacaaactggttcgaggca caaagaccagaatggcggcggaggcgggaacaaggtggtgagatgagtgctacatcccaacttctgctccccaaac ccagcctgagctccagtggcgtggactaataatggaacagtattaaagcctggttgaatcicacggagcgtaaacggttg gtggcgcagcatctgacgcacgtgtgcagacgcaggagcagaacaagagaatcagaatccaattctgatgcgcg gtgatcagatcaaaaactcagccaggatcagctggtcgggtggctcgtggacaagggtactctgggagaagca gtgggtccaggaggaccaggcctcatacatctcctcaatgctggcctccaactcgcggtcccaaatcaaggctccttga caatgcgggaaagattatgagcctgactaaaaccgccccgactaccgtggtggccagcagccgtggaggacattcc agcaatcggattataaaatttggaaactaacgggtacgatccccaatatgctgcttccgtcttctgggagggccacgaa aaagttcggcaagaggaaacacatctggctgttggcctgcaactaccgggaagaccaatcgcggagccatagcc cacactgtccctctacgggtgctaaactggaccaatgagaacttccctcaacgactgtgtgcacaagatggtgatctg gtgggaggaggaggaaatgaccgccaaggctggtgagtcggccaaggccattctggaggaaagcaaggctgcgctgg accagaatgcaagtctcggcccagatagaccgactcccgtgatcgtcacctccaaccacaatgctgcccgtgattg acgggaactcaacacctcgaacaccagcagccgtgcaagaccggatgtcaaatgaaactaccgcccgtctggatc atgactttgggaaggtcaccagcaggaagcaaaacttctccggtgggcaaggatcacgtggtgaggtggagcatg aattctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaagaccgccccagtgacgcagatataagtgagcccaaacgggtgc gcgagtcagttgagcagccatcagctcagacgcggagccttcgatcaactacgcaagcaggtaccaaaaactgctc cgtcacgtggcagtaactctgatgctgttccctgcagacaatgagagagaatgaatcagaattcaaatctgcttactcac ggacagaaaactgtttagagcttcccgtgcaaatcaccgcttctgtcgtcaaaaaggcgtatcagaaactgtg ctacatcatatcatgggaaagggtgccagacgttgcactgctcgcgatctggtcaatggtgattggatgactgcatctt gaacaataatgatfataatcaggtatgcttctgtgatcaccctcagattggtggaaagaggtggaaggctctcgcgag ttttggccttgaagcgggcccaccgaaacaaaacccaatcagcagcatcaagatcaagcccgtggtctgtgctgct ggtfataactatctcggaccggaaacggtctcgtatcagagagagcctgtcaacaggcagacgaggtcgcgagag cacgacatctctgacaacgagcagcttgaggcgggagacaacccctacctcaagtacaaccacgcggagccgagttc aggagaagctcggcagacacatcctcgggggaaacctcggaaaggcagcttctcaggccaagaaaagggtctcga acctttggcctggttgaagagggtgctaaagacggctcctggaaagaaacgtccggtagagcagtcgccacaagaacca gactcctcctcggcattggcaagcagccagcagcccglaaaaagagactcaatttggctagactggcgactcaga gtcagctcccgaccacaacctctcggagaacctcagcaacccccgctgctggtggacctaactacaatggctcagggc gtggcgaccaatggcagacaataacgaaggcggcagcaggtgggtaatgctcaggaatggcattgctgattccac atggctggcgacagatcaccaccagcaccgcaatgggcttggccacctataacaaccctctacaagcaaaa tctcagctcaacggggccagcaacgacaaccactactctggctacagcaccctgggggtatfttgattcaacag

10

20

30



【表 1 3 - 3】

		<p>ctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctcagattatcagcaataaacagccagccggga  aggcccagcgcagaagtggctcctgcaactfataccgctccatccagctctatattgttccggggaagcagagtaagta  gttcgccagfataatgtttgcgaacgctgttgcattgctacagggcatcgtgggtgcacgctcgtctgttggatggcttacc  agctccgggtcccaacgatcaaggcggagttacatgatccccatgttgcacaaaaagcggttagctctcggctcccgat  cgttgcagaaagtaagtggccgagttatcatgatccccatgttgcacaaaaagcggttagctctcggctcccgat  agatgctttctgtgactgggtgagtaactcaaccaagtctctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttggccggcg  tcaatacgggataataccgcgccacatagcagaacttaaaagtgcctcatcattggaaaacgttctcggggcgaaaacttc  aagatctfaccgctgtgagatccagctcgtatgaaccactcgtgcaccaactgatctcagcatctttacttaccage  gtttctgggtgagcaaaacagggaagcaaaatgcccgaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgttgaatactca  tactcttctttcaatattatgaagcattatcaggggtattgtctcatgagcggatataattgaatgtattgaaaaataaac  aaatagggggtccgcgacatttcccgaaaagtccacctaattgtaagcgttaattttgttaaaatcgcgttaaaattttg  ttaaactcagctcatitttaacaaatagccgaaatcggcaaaatccctataaatcaaaagaaatagaccgagataggggtgag  tgttggccagtttgaacaagagctcactatataaagaacgtgactccaacgcaaaaggcgcaaaaccgctatcagggc  gatggcccactacgtgaaccatcacctaatcaagtttttggggctgaggtgccgtaaaactaaatcggaaaccctaaag  ggagcaccgatttgaagctgacggggaagcggcgcaacgtggcggaaggaagggaaggaagcgaaggggaagggg  cggcgctagggcgtggcaagtgtagcggcagctgcgtaaccaccacccggcgttaatgcggcgtccgctac  aggcgctgctccattgcccattcagcctcgcgaactgttgggaaggcgatcgggtcggcctctcgtctattaccggc  ctggcgaagggggatgtgctcgaaggcgaatagggttaacggcaggggtttccagctcagcaggttgaaaacgac  ggcagtgagcgcgtaatacactactataggggcaattgggtaccggccccctcgcagtgagctcagcggat  cgggggagctcgcagggctccatttgaagcgggaggttgaacggcgag</p>	10
215	2_rAAV4 P12- AAV6VP 3	<p>ccgcatgcccgggtttacgagattgtgattaagggtcccagcgcacctgacgagcatctgccggcatttctgacagctt  gtgaactgggtggccgagaagggaatgggagttgccgacgattctgacatgcatctgattgagcagcaccct  gaccgtggccgagaagctgcagcggacttctgacggaaatggcgccgtgtgagtaaggccccggaggccctttcttgt  gcaatttgagaagggaagagctacttccacatgcacgtgctcgtggaaaccaccgggtgaaatccatggtttgggacg  ttctcagtcagattcgcgaaaaactgatcagagaattaccgggagcgcgcaacttgcgaacttgcgaacttgcggtca  caaaagaccagaatggcgccggaggcgggaacaagggtggatgagtgctacatccccaaftacttctccccaaaac  ccagcctgagctccagtgggcgtgactaafatggaacagatattaagcgcctgttgaatctcacggagcgtaaacggtt  gtggcgagcatctgacgcacgtgctcagacgcagggagcagaacaaagagaalagaatcccaatctgatggccg  gtgatcagatcaaaaactcagccaggtacatggagctggcgggtggctcgtggacaaggggattaccicggagaagca  gtggatccaggaggaccagccatatactctctcaatgcggcctccaactcgggtcccaaatcaaggctgccttggga  caatgcgggaaagattatgacctgactaaaaccgccccgactacctgggtggccagcagcccgtggaggacattcc  agcaatgggattataaaatttgaactaaacgggtacgatccccaatatgcggcttccgtcttctggatgggcccagaa  aaagtggcaagaggaaacacctctggctgttggcctgcaactaccgggaaagaccaacatcggcgagccatagcc  cacactgtgcccttctacgggtgtaaaactggaccaatgagaacttccctcaacgactgtgtcgacaagatgtgatctg  gtgggaggagggaagatgaccgcaaggctcgtggagctggcgaagccattctcggaggaaagcaaggctcgcgtgg  accagaatgcaagctcctcggcccagatgacccgacccccgtgctcactccaacaccaacatgtcggcctgattg  acgggaactcaacgacctcgaaccaggcagcgggtgcaagaccggatgtca</p>	20

10

20

30

【 0 4 7 8 】

【表 1 3 - 4】

	<p>aatttgaacacaccgccgtctggatcatgactttgggaagggtcaccaagcaggaaagcaaaagacttttccgggtggcaaa  ggatcacgtgggtgaggtggagcatgaattctacgtcaaaaagggtggagccaagaaaaagcccgcccccagtgacgca  gatataagtgagcccaaacgggtgcgcgagtgatgctgcagccatcgcagtcagacgcggaagcttccatcaactacg  cagacaggtaccaaaacaaatgttctcgtcacgtggcatgaatctgatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaa  tcagaattcaaatatctgctcactcacggacagaagactgttagagtgcttcccggtcagaatctcaaccgttctgtc  gtcaaaaaggcgtatcagaactgtgtacatcatcatatcatggaaaagggtccagacgcttgcactgccgtgatgg  tcaatgtggattggatgactgcaicttgaacaataatgattaaatcaggtatgactgacggttaccctccagattggctaga  ggacaacctctctgaaaggctcgaagtggtggggcgtgcaacctggagcccctaaaccaaggcacaatcaacaacat  caggacaacgctcgggtctgtgttccgggtacaaatcctcggaccggcaacggactcgacaagggggaacccc  tcaacgcagcggacgcggcagccctcggacgacagaagcctacgaccagcagctcaaggccgggtgacaaccctac  ctcaagtacaaccacgccgacgcggagttccagcagcggctcagggcgacacatcgttgggggcaacctcgcgaga  gcagcttccagccaaaaagggttctgaaccttggctcgggtgagcaagcgggtgagacggctcctggaagaa  gagaccgttgattgaatccccagcagcccactcctccacgggtatcggcaaaaaaggcaagcagccggctaaaaag  aagctcgtttcgaagacgaaactggagcagggcagcggaccctcggagatcaactcggagccatgctgatgacag  tgaagtggcttcagggcgtggcgaccaatggcagacaatacgaagggcggcagcggagtgggtaatgcccagggaa  ttggcattgctgattccatggctggcgacagagtcaccaccagcaccgcaacatgggcttcccacctataacaa  ccacctacaagcaaatctcaggtctcaacggggccagcaacgacaaccactactcggctacagcaccctggg  ggatftttgattcaacagattccactgccattctcaccacgtgactggcagcgactcatcaacaacatggggattccggc  ccaagagactcaactcaagctctcaacatcaagtgacagggacgacgcaatgatggcgtcacgaccatcgtaata  acctaccagcaggttcaagtctctcggactcggagtaccagtgccgtacgtcctggctctgcgaccagggtcgcct  ccctccgtcccggcgacgtgtcatgattccgagctacggctacctaacgctcaacaatggcagccaggaagtgaggac  ggctaccttttactgcctggaatattcccatcgcagatgctgagaacgggcaataacttaccctcagctacacctcggga  cgtgcccttccacagcagctacgcgcacagccaagcctggaccggctgatgaatcctcctcagaccagctgattac  ctgaacgaactcagaatcagctccggaggtgcccaaaaaggaactgctgttagccgggggtctccagctggcatgct  gttcagcccaaaaactggctaccctggaccctgtaccggcagcagcgcgtttcctaaaaacaaaacagacaacaacaag  caacttaccctgactggtgctcctcaaaatataaccttaatggggcgtgaatctalaatcaaccctggcactgctatggcctaca  caagagcagacaagacaagttcttccatgagcgggtgcatgattttgaaaaggagagcggcggagctcaaacactgc  attggacaatgcatgatcacagcaggaaggaatacaagccactaaccctgggccaccgaaagattgggactgtgg  cagtaatctccagagcagcagcagaccctcggaccggagatgctgatttgggagcctaccctggaatggtgtgg  caagcagagagactataacctcagggctctattggccaaaatcctcaccagggatggacactttaccctcctctcat  ggggcgtttgacttaagcaccgccctcctcagatcctcaaaaaacacgcctgttctcgcgaatcctcggcagagttt  cggctacaagttgcttcatcaccagiatccacaggaacagtgagcgtggagattgaatgggagctcgagaaaag  aaaacagcaaacgctggaatcccgaatgcagataccttaactatgcaaaatcggcaacgttgatttactgtggacaa  caatggactttatactgagcctcggccattggcacccttacctaccctgcccctgtaattgtgtgtaatacaataaccgg  tgaattcgtttcagttgaactttgtctcgcgaaggcgaattcgtttaaactgcaggactagaggtcctgtatttagaggtcac  gtgagtgtttgcgacatttgcgacaccatgtggtcacgctgggtatttaagccgagtgagcacgcaggggtcctcatttga  agcgggaggttgaacgcgcagccccaagccgaattct</p>
--	---

10

20

30

【 0 4 7 9 】

【表 1 3 - 5】

	<p>gcagatatccatcacactggcggccgctcactagagoggccgccaccgctggagctccagcttttgcctttagtg  agggttaattgcgccttggcgttaatacatggtcatagctgttctctgtgtaaattgtatccgctcacaattccacacaacatac  gagccggaaacataaagtfaaagcctggggtgcttaataatgagtgactaacacattaattgcgttgcgctactgccc  ctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcaataatgaatcggccaacgcccggggagagcgggttgcgtatgggc  gctctccgctcctcgtcactgactcgtgcgctcgtcgtcggctggcggagcgggtatcagctcactcaaaaggcgt  aatacggttatccacagaatcaggggataacgcaaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaaggacc  gtaaaaaggccgctgtgctggcgttttccataggctcccccctgacgagcatcacaaaaatcgagctcaagtcaga  gggtggcgaaccggacagactataaagataaccaggcgttccccctggaaactccctcgtgcgctcctctgtccgacc  tgccgcttaccggatacctgtccgcttctccctcgggaagcgtggcgttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttc  gggtgtaggtcgtcctcaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgcgcttatccggtaactat  cgtcttgagccaaccggtaagacacgactatcggcactggcagcagccactggtaacaggtaagcagagcgggta  ttagggcgggtctacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagatttggatctcgcctctgct  gaaagcagttacctcggaaaaagagttggtagctctgacccggcaacaaccaccgctgtagcgggtgtttttgtttg  caagcagcagattaccgccaagaaaaaggatctcaagaaagatccttgcattttctacgggctcagcgtcagtggaac  gaaaaactcacgtaaggatlttggatgagattcaaaaaggatctcacctagatccttttaataaaaaatgaagttaaaa  tcaactaaagtataatgagtaaacctggctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcagctgtctattt  cgttcatcctagttgctgactccccgctgctgtagataactacgatacgggaggccttaccatctggccccagctgctgcaat  gataccgagaccacgctcaccgctccagattatcagcaataaacagccagccggaaggccgagcgcagaag  tggtcctgcaacttatccgctccatcagctatfaattgttccgggaagctagagtaagtgctccagtaataagttgc  gcaacgttgcattgctacagcagctcgtgtgcacgctcgtctgttggatggctcattcagctccggttccaacgac  aaggcaggtatcatgatccccatgttgcataaaagcggtagctcctcggctccgatcgttgcagaagtaagttgg  ccgagtgatcactcatggttatggcagcactgcataatctctactgctatccatccgtaagatgctttctgtgactgggtg  agfctcaaccaagctaitctgagaatagtgatgcggcaccgagttgctcttcccggcgtcaatacgggataataccg  gccacatagcagaactttaaagtgctcaatgggaaacgtctcggggcgaaaactcaagatctaccgctgttga  gatccagttcagatgtaaccacfcgctcaccacaactgactcagcactctttacttaccagcgttctgggtgagcaaaaac  aggaaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaaggcgacacggaaatgtgaatactatactctccttttcaatattat  gaaactattatcagggtattgtctcatgagcggafacataattgaaatgattgaaaaataaacaataagggttccgacac  attccccgaaaaagtgccacctaaatgtaagcgttaataatttgttaaaatcgcgttaaaattttgttaaatcagctattttaa  caataggccgaaatcggcaaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggtgagtggttccagtttgaaca  agagtcaccatataaagacgtggactccaacgtcaaaaggcgaaaaaccgtctatcaggcgtgagcccactacgtgaa  ccatcacctaatacagtttttgggctgaggtgcccgtaaagcactaaatcggaaacctaaaggagccccgatttagag  cttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaggaagggaagaagcgaaggagcgggcgctagggcgtcgtg  gcaagtgtagcggcagcgtgcgtaaccaccaaccgcccgcgttaatgcgcccactacagggcgcgtccattcgc  cattcaggctcggcaactgtgggaaggcagcgtgctggcggcctctcgtattacgccagctggcgaagggggaggt  gctgcaaggcgaftaagttgggtaaccaggggtttccagtcacgactgtgtaaacgacggccagtgagcgcgta  atacgaactactataggcgaattgggtaccgggccccctcagcaggtcagcggatcgggggagctcgcagggt  ctccatttgaagcgggaggttgaacggcgag</p>
--	---

10

20

30

【表 1 3 - 6】

216	3_rAAV5 VP1/2- AAV6VP 3	ccgccatgccggggtttacgagattgtgattaaggtcccagcgacctgacgagcatctcccggcattctgacagctt gtgaactgggtggccgagaaggaatgggagttgccgccagattctgacatggatctgaatctgattgagcaggcaccct gacctggccgagaagctgcaagcgcacttctgacggaatggcgcctgtgagtaaggccccggaggccctttctttgt gcaatttgagaagggaagagacttccacatgcacgtgctcgtggaaccaccggggtgaaatccatggtttgggacg ttcctgagtcagattgcaaaaactgattcagagaattaccgaggatcagccgacttgcacaaactggttcgcgggtca caaagaccagaatggcggcggagcgggaacaagggtggtgagtgctacatcccataacttgcctcccacaaac ccagcctgagctccagtggcgtggaactaataatggaacagtaattaagcgcctgttgaatctcacggagcgtaaacggtg gtggcgcagcatctgacgcacgtgctgcagcagcaggagcagaacaagagaatcagaatcccaatctgactgccc gtgatcagatcaaaaactcagccaggtacatggagctggtcgggtgctcgtggacaaggggattacctggagaagca gtggatccaggaggaccagcctacatctcctcaatgcccctccaactgcggtcacaatcaaggctgcttggga caatgcccggaaaattatgagcctgactaaaaccgccccgactcctggggccagcagcccgtggaggactttcc agcaatcggatattataaaatttgaactaaacgggtacgatcccataatgcccgtctccttctggggtggccacgaa aaagttcggcaagaggaacacatctggtgttggcctgcaactaccgggaagcaacatcggggagccatagcc cacactgtgcccctctacgggtgctgtaaaactggaccaatgagaacttcccctcaactgctgtcgcacaaatggtgatctg gtgggagggagggaagatgaccgcaaggctggtggatcggcaaaagccattcggagggaagcaaggctcggcgtg accagaatgcaagtcctcggcccagatgaccgactcccgtgatcgcacctcaacccaacatgctgcccgtgattg acgggaactcaacgacttgaacaccagcagccgtgcaagaccggatgtcaaaatgaaactaccgccgtctgatc atgacttgggaaggtcaccaagcaggaagtcaaaacttttccggtggcgaagatcagctggtgaggtggagcatg aattctacgtcaaaaagggtgggccaagaaaaaccgccccagtgacgacataaagtggccaacgggtgc ggcagtcagttgcaaccatcagctcagcgcggagcctcgtatcaactacgcagcaggtaccaaaacaatgttct cgtcacgtggcagatgaatctgatgctgttccctgcaacaatgagagaaatgaaatcaaatcaaatctcactcac ggacagaagactgttagagtgcttccctgctcagaatctcaaccgttctgctgcaaaaaggcgtatcagaacatctg ctacattcatatcatgggaaagggtgccagacgcttgcactgctgcgatctggtcaatgtggattggatgactgcatctt gaacaataatgattaaatcaggatgtctttgtgatccctccagattggtggaagaagtgtgaaaggtcttcgcgag ttttgggcttgaagcgggccaccgaaacccaacccaatcagcagcatcaagatcaagcccgtggtctgtgctgct ggttataactatcggaccgggaaacggtctcgaicgaggagagccigtcaacagggcagacgaggtcgcggcgaag cacgacatctgtacaacgagcagctgaggcgggagacaacccctacctaagtaaacaccgagcggcgggattc aggagaagctcggcagcagacatcctcgggggaaacctggaaaaggcagcttccagccaagaaaagggtctcga acctttggcctggtgaaagggtgctaaagcggccctaccggaaagcggatagcagaccatttcaaaaagaaaaga aggctcggaccgaaaggactcaagcctccacctgacagcggcgaagctggaccagcggatcccagcagctgc aaatcccagccaaccagcctcaagttgggagctgatacaatggcctcagggcgtggcgcaccaatggcagacaatac gaaggcggcagcggagtggttaatgcctcaggaatggcattgcgattccacatgctggcggcagagatcatacca ccagcaccgaaatgggcttggccacctataacaaccctctacaagcaaatcctcagtgctcaacggggccagc aacgacaaccactacttggctacagaccccctgggggtattttgatttcaacagattccactgcatctcaccagtgac tggcagcagctatcaacaacaattggggattccggccaagagactcaactcaagctctcaacatcaagctcaaggag gtcacgaggaatgatggctcacgaccatcgtataaacctaccagcagcgttcaagctctcggactcggagtagcaggt tgccgtacgtcctcggctctgcgaccagggtgctcctccctcctgcccggcggagctgt
-----	----------------------------------	---

10

20

30

【表 1 3 - 7】

	<p>tcattgattccgcagctacggctacctaacgctcaacaatggcagccagcagctgggacggctacctttactgcctggaatat  tcccatcgagatgctgagaacgggcaataactttacctcagctacaccttcgaggacgtgcttccacagcagctacgc  gcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctcicacgaccagctacgttattacctgaacagaactcagaatcagtc  cggaaagtgcccaaaaacaggactgctgtttagccgggggtcaccagctggcatgctgttcagcccaaaaactggctacc  tggaccctgttaccggcagcagcgcgttctaaacaaaaacagacaacaacaacagcaactttacctggactggctcctc  aaaataaaccttaatggcgctgaatctataatcaaccctggcactgctatggcctcacacaagacgacaagaagtctt  tcccatgagcgggtgcatgattttgaaaaggagagcgcgggagctcaaacactgcattggacaatgcatgatcacaga  cgaagaggaaatcaaaagcactaacccgtggccaccgaaagatttgggactgtggcagctcaatccagagcagcagc  acagaccctgcgaccggagatgcatgttatgggagccttacctggaatgggtgtggcaagacagagacgtatacctgca  gggtcctatttggccaaaatcctcacacggatggacacttccaccgtcctcctcatggcggttggacttaagacc  cgctcctcagatcctcatcaaaaacacgctgttctcggcaatcctccggcagatgttccggctcaaaagtgttcttattcat  caccagatattccacaggacaagtgcgctggagattgaatgggagctgcagaaaacacgcaaacgctggaatccc  gaaagtcagatatacttaactgcaaaatcgcaaacgtgatttactgtggacaacaatggactttatactgagcctcgc  cccattggcaccgttacctcaccgtccctgtaattgtgttaatcaataaaccggttattcgttcaggttgaacttggctc  ctgcgaaggggcaattcgttaaacctgcagactagaggtcctgtattagaggtcacgtgaggttttgcgacatttgcga  caccatgtgtcacgctgggtatttaagcccagtgagcacgcaaggctcctatttgaagcgggaggttgaacgcgag  ccgccaagccgaattctgcagatattcactcactggcgccgctcactagagcggccaccgctgggagctcca  gctttgttcccttagtgagggttaattgcgccttggcgtaatcatggtcatagctgttctctgtgaaattgtatccgctcac  aattccacacacatacagccggaagcataaagttaaaacctgggggtgcctaatgagtgactaacctacattaattgc  gttgcgctcactgccgcttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatggccaacgcgaggagag  gcggttgcgtattggcgcttccgctcctcgtcactgactcgtcgcctcgtcgtcggctgcggcgagcgtatca  gctcactcaaaaggcgtataatccacagaatcaggggataacgcaaggaaacatgtgagcaaaaaggccagc  aaaaggccagggaaccgtaaaaaggccgctgttggcgttttccataggctcogccccctgacgagcatcacaanaaf  cgacgctcaagtcagaggtggcgaaccggacagactataaagataccaggcgttccccctggaagctccccgtgc  gctcctcttccgacctgccgctaccggatacctgtccgcttctccctcgggaaagcgtggcgttctcatagctcac  gctgtaggatctcagctcgtgtgaggtcgtcgtcctcaagctgggctgtgtgcagcaacccccgttcagccccaccgctg  cgcttaccgtaactatcgtctgagccaaccggtaagacacgactatcggcactggcagcagccactgtaaacag  gattagcagagcaggatgtagcggctgctacagagcttgaagtggctgaactacgctactagaagaacagt  attggatctcgcctctgctgaagccagttacctcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaacaaccaccgctg  gtagcgggtgtttttgttgcagcagcagattacgcgcaaaaaaaggatcctcaagaagatccttgatctttctacggg  gtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttggctatgagattatcaaaaaggatctcacctagatccttfa  aattaaaaatgaagtttaaatcaatcaaaatataatgagtaaaacttggctgacagttaccaatgcttaacagtgaggacc  tatctcagcagctgtctattgttcaatcagtagtgcctgactccccgtcgttagataactacgatacgggagggcttaccat  ctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctcagattatcagcaataaaccagccagccgga  aggccgagcgcagaaagtgtcctgcaactttatccgctcctcctcagcttalttaattgttccgggaaagctagagtaagta  gttcgccagtaataatgttgcgaacgttgtgaccattgctacaggcatcgtgggtcacgctcgtcgttggatggctcatic  agc</p>
--	---

10

20

30

【表 13 - 8】

		<p>tccgggtcccaacgatcaaggcaggttacatgatccccatggtgtgcataaaagcgggttagctctcggctcctccgatcgt  tgtcagaagtaagttggccgcaggttatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaaga  tgcctttctgtgactgggtgactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatcggcgaccgagttgctctgcccggcgta  atcgggataataccgcccacatagcagaactttaaaggtctcaatcattggaaacggttctcggggcgaaaactctcaa  ggatctfaccgctgttgagatccagttcgtatgaacccactcgtgcacccaactgaictcagcatcttcttaccagcgtt  tctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgcccaaaaagggaataaggcgacacggaatgftgaatactcatac  tctctcttttaataattattgaagcattatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaaca  ataggggttccgpcacattccccgaaaagtgcacctaataatgtaagcgttaattttgttaaaatcgcgttaattttgt  aaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgagt  ggttccagittggaacaagagtcactataaagaacgtggactccaacgtcaaggggcgaaaaaccgtctatcagggc  gatggcccactacgtgaacatcaccciaatcaagttttggggtcggggtgccgtaaaacactaaatcgaaacccaag  ggagccccgatttagcgtgacgggggaaagccggcgacgtggcgagaaaggaaaggaaagcgaaggag  cggggcgtaggcgctggcaaggtgtagcgggtcacgctgcgtaaccacaccccggcgcttaatggccgctac  agggcgtcctccattcagcctcgcgaactgtgggaaaggcgatcgggtcggcctctcgtattacgcca  ctggcgaaaaggggatgtgctcgaaggcgalttaagttgggtaacgccagggtttccagtcacgacgttgaaaacgac  ggccagtgagcgcgtaatacgaactcactataggcgaattgggtaccggccccctcgtacgaggtcagcgtat  cgggggagctgcagggtcctcatttgaagcgggaggttgaacgcgcag</p>	10
217	4_prAAV 11VP12- AAV6VP 3	<p>ccgcatccgggggtttacgagatgtgatlaagggtcccagcgcacttgacgagcatctcccggcatttctgacagctt  gtgaactgggtggccgagaaggatgggagttgcccgagattctgacatgatctgaatctgattgagcagcaccct  gaccgtggccgagaagctgcagcgcgactttctgacggaatgcccgtgtgagtaaggccccggagccctttcttctgt  gcaatttgagaaggagagagctactccacatgcacgtgctcgtgaaaccaccggggtgaaatccatggtttgggag  ttctgtgagcagattcgcgaaaaactgattcagagaattaccgcgggacgagccgactttgcaaaactggtcgcggtca  caaagaccagaatggcggcggagggcgggaaacaaggtggtgagtgctacatccccaaactgtctccccaaaac  ccagcctgagctcagtgggcgtgactaataatggaacagtafttaagcgcctgttgaatctcagcagcgaacgggtg  gtggcgagcatctgacgcacgtgtcgcagacgcagcagcagaacaagagaatcagaatcccaatctgagcggc  gtgacagatcaaaaactcagccaggtacatggagctgctgggtggctcgtggacaaggggattacctcgggagaagca  gtgacccaggaggaccagccctacatctccttcaatcggcctccaactcgggtcccaaatcaagcgtccttggg  caatcgggaaagattatgagcctgactaaaaccgccccgactacctgggtggccagcagccgtggaggacattcc  agcaatcggalttataaaatfttggactaaacgggtacgatcccaatcgcgctcctcttctgggatgggcccagaa  aaagttcggcaagaggacaccatctgctgttgggctcgaactaccgggaagaccaatcgcggagccatagcc  cacactgtgccctctacgggtgctaaactggaccaatgagaacttcccttcaacgactgtgtcgacaagatggtgatc  gtgggagggaggagatgaccgccaaggctgtgagtcggcgaagccattctcgaggaaagcaaggctgcgctgg  accagaatgcaagtcctcggcccagatagaccgaccccgtgatcgtcacctccaaccaacatgctgcccgtgattg  acgggaactcaacgacctcgaaccagcagcgttcaagaccggatgtcaaatgtgaactaccgcccgtctggaic  atgacttgggaaaggcaccagcgaagcgaagcacttttccgggtggcgaaggatcacgtgtgtgaggtggagcatg  aattctacgtcaaaaagggtgagccaagaaaagaccgccccagtgacgcagatataagtgagcccaaacgggtgc  gcgagtcagttgcgagccatcagctcagcagcggaa</p>	20

10

20

30

【 0 4 8 3 】

【表 1 3 - 9】

	<p>gcttcgatcaactacgcagacaggtaccacaaaacaatgttctcgtcacgtgggcatgaatcgtatgctgttccctgcagaca  atgcgagagaatgaatcagaatcaaatatctgctcactcacggacagaagactgttagagtgcttcccgtgcagaatc  caacccgttctgctgcaaaaaggcgtatcagaactgtgctacatcatatcatgggaaagggtccagacgcttgca  ctgctcgcgatctggtaatgtggatggatgactgcatcttgaacaataaatgattaaatcaggatggctgctgacgggt  atctccagattggctcaggacaaacctctctgagggtcattcgcgagtggggacctgaaacctggagccccgaagccc  aaggccaaccagcagaagcaggacgacggccgggtctggcttctggctacaagtacctcggacctcaacggga  ctcagacaagggggagcccgtaacgcggcggacgcagcggccctcagcagcagaaggcctacgaccagcagctca  aagggggtgacaatccgtactgcggtataaacacgcgcgacggcgafttcaggagcgtctgcaagaagatacgtcttg  ggggcaacctcggcgagcagctctccaggccaagaagggtactcgaacctctgggctggtgaaagggtgctaa  aacgctcctggaaaagagaccgttagagtcaccacaagagcccgacccctcctcgggcatcggcaaaaaggca  acaaccagccagaagaggctcaactftgaagaggacactggagccggagacggacccccgaagatcagatacca  gcgcatgtctcagacattgaaatggctcaggcgggtggcgcaccaatggcagacaataacgaaggcggcagggagt  gggtaatgcctcagaaatggcattgcatccatggctggcgacagatcaccaccaacccgaacatggg  cctggccacctataacaaccctctacaagcaaatctcagctcctcaaccggggcagcaacgacaaccactactc  gctcagcaccctgggggtatttgaatcaacagattccactccatttctaccacgtgactggcagcagactcaac  aacaattggggattccggccaagagactcaactcaagctctcaacatcaagcaagggaggtcagcaggaatgatggc  gtcagcaccatcgtataaaccttaccagcaggttcaagctctcggactcggagtaccagtgccgtactcctcggctc  tggcaccagggtcgtccctcctcgttcccggcgacgttcatgattccgagtagcctacctaaccfcaacaatgg  cagccaaggcagtgggacgtatcccttactcctggaatattcccacgcagatgctgaaacgggcaataactttact  tcagclacacctcagagcgtgcttccacagcagctacgcgcacagccaagcctggaccgctgatgaatcctctca  tcgaccagctactgtattacctgaacagaactcagaatcagctccggaagtcccaaacagactgctgtttaccggg  ggctcaccagctggcatgtctgtcagccaaaactggclactcggacctgttaccggcagcagcggctttaaaca  aacagacaacaacaacagcaactttacctggactgggtcctcaaaaataaaccttaattgggctgtaataataacccctg  gcactgctatggcctcacacaagagcagacaagcaagctctccatgagcgggtgcatgattttgaaaggagagcgc  cggagctcaaacactgcattggacaatgcatgatcacagacgaagaggaaatacaagccactaacccctggccaccg  aaagattgggactgtggcagcaatctccagagcagcagcagacacctgcgaccggagatgcatgtaagggagcc  ttacctggaaatggtgtggaagacagagcgtataacctgagggctctattgggcaaaatcctcacacggatggacact  ttaccctgctcctctcatggcggtttggactfaagcaccctcctcagatcctcatcaaaaacacgcctgtctctgca  atcctccggcagagtttcggctacaaagtgtctcattcatcaccagatccacaggaagtgagcgtggagatgaat  gggagctcagaaaagaaacagcaaacgctggaatcccgaagtgcagatataactatgcaaaatctgccaacgct  gattcactgtggacaacaatggactttalactgacctcggccattggcaccgttacctcaccctgcccgttaattgtg  ttaacaataaacgggtgattcgttcagttgaactttgtctctgcgaaggcgaatcgtttaaactgcaggactagagg  cctgtattagaggtcacgtgaggtttgcgacatttgcgacaccatgtgtcacgctgggtatttaagcccgagtgacac  gcaagggtctccattttgaaggggaggttgaacgcgagccgcaagccgaattctcagatataccatcacactggcgg  ccgctcactagagcggccgaccgggtggagctccagctttgttccctttagtgagggttaattgcccgttggcgt  atcatggctatagctgttctgtgaaattgttaccgctcaaatccacacaacatacagccggaagcataaagggtaa  agcctgggggtcctaagatgagctaacctacat</p>
--	---

10

20

30

【 0 4 8 4 】

【表 13 - 10】

	<p>taattgcgttgcgtcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcgggg  gagaggcgggttgcgtattggcgctcttccgtctctcgtcactgactcgtcgcgtcggctgtcggctggcgagcg  gtatcagctcactcaaaggcggtaatacgggtatccacagaatcaggggatacgcaggaaagaacatgtgagcaaaag  gccagcaaaaggccaggaaaccgtaaaaaggccggtgctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcac  aaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgacaggactaiaaagataccaggcgtttccccctggaagctccct  cgtgctcctcctgttccgacctgcccgtiaccggatacctgtccgcttctcccttcggaaagcgtggcgttctcatag  ctcacgctgtaggatctcagttcgggtgtagtctgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgticagcccgac  cgtcgcgcttaccgtaactatcgtctgagtcacaaccggtaagacacgactatgccactggcagcagccactggta  acaggattagcagagcgaggatgtagggcgtctacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaa  caglatttggtatctgcgctcgtgaaagccagttacctcggaaaaagagttggtagctctgacccggcaacaaccacc  gctggtagcgggtggtttttgttgcagcagcagattacgcgcagaaaaaagagatcaagaagatcctttgatctttcta  cgggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcaggttaaggatttggctcatgagattcaaaaaggatcttcacctgatc  cttttaaaataaaatgaaatttaaatcaatcaaaatataatagtaaaacttggctgacagttaccaatgcttaacatgtag  gcacctctcagcgatctgctatttctgctatccatagttgccigactccccgctgtgtagataactacgatacggggggct  tacctctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccag  ccggaaggccgagcgcagaaagtggtcctgcaactttaccgctccatccagcttattattgttccgggaaagctagagt  aagtagttgccagtaaatggttgcgcaacggtgtgccattgctacaggcatcgtggtgtcagctcgtctgttggtagctt  cattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgcaaaaaagcggtagctcctcgtgctcct  ccgatcgttgcagaagtaagttggccgaggttatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccat  ccgtaagatgctttctgtgactggtgagttactcaaccaagtcattctgagaatagttgatgcggcgaccgagttgctctggc  cggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactftaaaagtgcicatattggaaaaactctcggggcgaa  aactcicaaggatctfaccgctgtgagatccagttcagatgaaccactcgtgacccaactgatctfcagcatctttacttct  accagcgtttctgggtgagcaaaaacagggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaaatgttga  atactatactctcttttcaatattatgaagcatttatcagggtattgtctcatgagcggatacatattgaatgtatttagaaa  aataaacaataagggggtccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctaaitgtaagcgttaataatttgtfaaaattcgcgtt  aaattttgtfaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcgcaaaatccctataaataaaaagaatagaccgagata  gggttaggtgttccagtttgaacaagatccactatfaaagaacgtggactccaacgtcaaaaggcgaaaaaccgtct  atcagggcgatggcccactacgtgaacctaccctaatcaagtttttggggtcagggtgccgtaaaagcactaaatcggaa  ccctaaaggagccccgatitagagctgacggggaaaagccggcgaacgtggcgaagaaaggaaaggaaagcgcg  aaaggagcggcgctagggcgtggcaaggtgtagcgggtcacgctgcgtaaccaccacccggcgcgttaatgcg  ccgtacagggcgctccatcgcacatcaggctgcgcaactgtgggaaggcgatcgggtggcctctcgtctatfa  cgccagctggcgaagggggatgctgcaaggcgattaaagttgggtaacgccagggttttccagtcacagcgttftaa  aacgacggcagtgagcgcgctaatacgaactactataggcgaaattgggtaccgggccccctcgtcaggtgca  cgggtatcggggagctcgcaggggtctcattttgaagcgggaggttgaacgcgcag</p>
--	--

10

20

【 0 4 8 5 】

30

【表 1 3 - 1 1】

218	5_prAAV 12VP12- AAV6VP 3	<p>ccgcatgccgggtttacagatttgattaaggtccccagcgacctgacgagcatctgcccgcatttctgacagcttt  gtgaactgggtggccgagaagggaatgggagttgccgccagattctgacatggatctgaaatctgattgagcagggccccct  gacctggccgagaagctgcagcgcgactttctgacgggaatggcggcgtgtgagtaaggccccggaggccctttctttgt  gcaatttgagaaggagagagctacttccacatgcacgtgctcgtgaaaccaccggggtgaaatccatggtttgggacg  ttcctgagtcagattcgcgaaaaactgattcagagaattaccgggatcagccgacttgcgcaaaactggctcgggtca  caaaagaccagaatggcggaggcgggaacaagggtggtgagtgctacatccccaaacttctgctccccaaaac  ccagcctgagctccagtgggcgtggactaatatggaacagtattaaagcgcctgttgaatctacggagcgtaaacgggtg  gtggcgcagcatctgacgcacgtgtgcagacgcaggagcaagaacaaagagaatcagaatccaaatctgatcgccg  gtgatcagatcaaaaactcagccaggtacatggagctgctgggtggctcgtggacaaggggattacctggagaagca  gtggatccaggaggaccaggcctacatctccttcaatgcggcctcaactcgggtcccaaatcaaggctccttggga  caatcggggaaagattatgagcctgactaaaaccgccccgactacctgggtggccagcagcccgtggagacattcc  agcaatcggattataaaatttggactaaaacgggtacgatccccaatatgcccgttccgttctggatggccacgaa  aaagctcggcaagaggaaacaccatctggctgttggcctgcaactaccgggaagaccaacatcgcggaggccatagcc  cacactgtcccctctacgggtgctgtaactggaccaatgagaacttccctcaacgactgtgcaagaatggtgatctg  gtggagggaggggaagatgaccgcaagctcgtggagtcggcgaagccattcgggaggaagcaaggtgcgcgctgg  accgaaatgcaagctcggccagatagaccgactccgtgatcgtacctccaacccaacatgtgcccgtgattg  acgggaactcaacgacctcgaaccagcagccgtgcaagaccggatgtcaaatggaactaccggcctgctggatc  atgactttgggaaggtcaccagcaggaagtcgaagacttttcoggtggcaaggaacacgtggtgaggtggagcatg  aattctacgtcaaaaagggtggagccaaagaaagaccgccccagtgacgcagatataagtgaaccaaacgggtgc  gcgagtcagttgcgagccatcagctcagacgcggagcctcagatcaactacgcagacaggtaccaaaaacaatgtct  cgtcacgtggcatgaaatctgatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaatcaaatatctctcactc  ggacagaaagactgttagagtgcttcccgtgcagaatcaaccgttctgtcgtcaaaaaggcgtatcagaactgtg  ctacattcatatcatgggaaaggtgccagacctgacctgcctgcgatctggtcaatgtggatggatgactgcatctt  gaacaataaatgattaaatcaggtatggctgctgacggttatctccagattgctcaggacaacctctcgaaggcattc  cgtggtgggtgctgaaacctggagctccacaaccgaagcccaacacagcatcaggacaacggcaggggtctgtg  gcttccctgggtacaagctcggaccctcaacgggactcgacaagggaagccggctcaacgagcagacggcggc  cctcgaacgacaaggcctacgacaagcagctcagcaggggggacaaccgtatcfaagtaaccacgcccagc  ccgagttccagcagcgttggcggaccgacctctttggggcaacctggggcagcagcttccaggccaaaaagag  gattctcagcctctgggtctggtgaaagggcgttaaaccggctcctggaaagaacgccaltgaaaaagactccaaa  tcggccgaccaaccggactctgggaaggccccggcgaagaaagcaaaaagacggcgaaccagccgactctgcta  gaaggacactcagcttgaagactctggagcagggagaccgccctgagggatcatctccggagaatgtctcatgat  gctgagatggctcaggcggcgcaccaatggcagacaataacgaaggcggcggaggtgggtaatgcctcagga  aatggcaltcagattccatgctggcggcagagatcaccaccagcaccogaacatgggcttggccacctataac  aaccacctctacaagcaaatcctcaggtctcaacggggggcgaacgacaaccactacttggctacagccccctg  gggtatttgaattcaacagattcactgaccttctcaccagctgactggcagcagctatcaacaacaatggggatccg  gccaaagagactcaactcaagctctcaacatccaagtaaggaggtcacgacgaatgatggctcagaccatcgctaa  taaccttaccagcaggtcaagctctcggactcggagttaccagttgccgtactcctggctctg</p>
-----	-----------------------------------	--

10

20

30

【表 1 3 - 1 2】

	<p>cgaccaggctgctccctccgttccggcgacgtgtcatgattccgcagfacggctacctaaccgctcaacaatggca  gcccaggcagtgaggacggtcatcctttactgcttgaatatttccatcgcagatgctgagaacgggcaataactttacctt  agctacacctcgaaggacgtcctttccacagcagctacgcgcacagccaagcctggaccggctgatgaatcctctc  gaccagctacgtgattacctgaacagaactcagaatcagctccggaaagtcccaaaacaaggacttgcctttgaccgggg  tctccagctggcatgtctgttcagcccaaaaactggctacctggaccctgtaccggcagcagcgcgtttcaaaacaaaa  cagacaacaacaacagcaactttacctggactggcttcaaaatataaccttaaggcgtgaatctataatcaacctggc  actgctatggcctcacacaagacgacaagacaagttcttccatgagcgggtgcatgattttggaaaggagagcggccg  gagctcaaacactgcaitggacaatgcatgatcacagacgaagggaaatcaaaagccactaacccgtggccaccgaa  agattgggacttggcagcctcctcagcagcagcagaccctgcgaccggagatgctgcatgttatgggaccctta  cctggaatggtgtggcaagacagagacgtatacctgcaaggctcatttggcccaaaatcctcacacgagtgacatctc  accgtctcctctcatggcggccttggacttaagcaccgctcctcagatcctcatcaaaaacacgctgttctcgcgaa  cctccggcagagtttggctacaagtttgcctcattcatcaccagatctccacaggaagaagtgagcgtggagattgaa  ggagctgcagaagaacacagcaaacgctggaaatccgaaagtgcagtatacatctaaatgcaaaatctgccaactgt  atctcactgtggacaacaatggactttatactgagcctcgcctcattggcaccggtacctcaccctccctgtaattgtgt  taataaataaacgggtgtgcttgcagttgaactttgctctcgcgaaggcgaatctggttaaacctgcaggactaaggtc  ctgtattagaggtcacgtgaggttttgcgacatcttgcgacacctggtgacgctgggtatgaaagcccgagtgagcag  cagggtctcattttgaagcgggaggttgaagcgcgacccgcaagcgaattctgcagatatccatcacactggcggcc  gctcactagagcggccgaccgggtggagctcagctttgttccctttagtgagggttaattgcgcgttggcgaatc  atgtgcatagctgtttcctgtgtgaaattgtatccgctcacaatccacacaacatagcgggaaagcataaagtgtaaagc  ctggggtgcctaatgagtgactaacatcaatgctgtgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtgctgccc  agctgcaatgaaatcgccaacgcgcggggagagggcgttgcgtattgggcgctctcctcctcctcgtcactgactc  gctgctcggctgctgctggctgcccgcgagcgggtatcagctcactcaaaaggcgttaatacgggtatccacagaatcagggg  ataacgcaggaaaagaatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgctggcgtttt  ccatagctccgccccctgacgagcatcaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaacccgacaggactataa  agataaccggcgttccccctggaagctccctcgtgctcctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgctt  ctccctcgggaagcgtggcgttctcagcgcacgtgtaggtatctcagttcgtgtaggtcgttgcctcaagcgtgg  ctgtgtgacgaacccccgttccgcccaccgctgccccttaccgtaactatcgtctgagtcacaccggtaagacac  gactatcggcactggcagcagcactgtaacaggattagcagagcaggtatgtaggcgtctacagagttctgaag  tggtagcttaactcggctacactagaagaacagatattggtatctgctcctgctgaaagcagttaccttcgaaaaagag  tggtagctctgatccggcaacaacaccgctggtgagcgggtgtttttgttgaagcagcagattacggcagaaaaa  aaggatctcaagaagatctttgatctttctacggggtcgtgacgctcagtggaacgaaactcacgttaaggatittgtca  tgagattcaaaaaggatctcacctagatccttttaaatataaatgaagtttaaatcaatcaaaatgatatagtaaaactg  gtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcagatcgtctatttctgtatccatggtgactccccg  tctgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccggaagaccacgctcaccg  gctccagattalacagcaataaacagccagccggaaaggccgagcagaaagtgtctcctgcaactttatccgctccatc  cagctatfaattgttggcgggagcfaagtaagtagttccagttatagtttgcgcaacgttggcctgctacagagca  tc</p>
--	--

10

20

30

【 0 4 8 7】

【表 13 - 13】

		<p>gtgggtcacgctcgtctgtttggtatggcttcaatcagctccgggtcccaacgatcaaggcaggttacatgatccccatggtg  gcaaaaaagcggtagctccttcggctcccgatcgtgtcagaagtaagttggccgcaggttatcacatggttatggca  gcactgcataaftcttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtagtacfaaccaagtcattcagagaata  gtgtatggcggcaccgagttgctcttgcggcgtaatacgggataataaccgccaatagcagaacttfaaaagtgc  caicattggaaaaagctctcggggcgaaaactcgaaggatctaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccactcgtg  caccacactgatctcagcaictttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaaacaggaaggcaaaatgcccaaaaa  gggaataaggcggacacggaaatgftgaatactcactcttctttcaatattatgaagcattatcagggtfaltgtctcat  gagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaatagggttccgcgcacattccccgaaaaagtggccactaat  igtgaagcgttaattttgttaaaatcgcgtaaaatttttgtaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaatcc  ctfataaatcaaaagaaatagaccgagatagggtgaggtgtgttccagtttggacaagagttccactatfaaaagacgtggac  tccaactcgaaggcgaaaaaccgtctatcaggcggatggcccactacgtgaacatcaccctaatacaagtttttgggt  cgaggtgccgtaaaagcactaaatcggaaccctaaaggagccccgatfttagagctgacggggaagccggcgaacg  tggcgagaaaggaaaggaaagcgaaggagcgggcctagggcgcctggcaagtgtagcgggtcacgctgcgcgt  aaccaccacccgcgcgcttaatgcccgcctacaaggcgcgtccattcgcattcagcctgcgaactgttgggaaag  ggcgtggtgcggcctctcgtattaccgctggcgaaggggggtgtgctgcaaggcgaataagttgggtaacg  ccaagggttccagtcacgagctgttaaacgacggcaggtgagcgcgtaatacactcactataggccgaattgggt  accggccccccctcagcaggtgcacggtatcgggggagctcgcagggtctccatttgaagcgggaggttgaacg  cgag</p>	10
219	AAV12V Plu- AAV6VP 2/3	<p>ccgccatgccgggtttacgagattgtattaaggtcccagcgcactgacgagcatctgccggcatttctgacagcttt  gtgaactgggtggccgagaaggaaatgggagttgccgccagattctgacatggatctgaaatctgattgagcaggcaccct  gaccgtggccgagaagctcagcgcgactttctgacggaatggcggctgtgagtaaggccccggaggccctttctttgt  gcaatttgagaaggagagacttccatgacgtgctcgtggaaaccaccgggtgaaatcattggtttgggagc  ttcctgagtcagattcgcgaaaaactgattcagagaatttaccgggagcagcggactttgcaaaactggttcggtgca  caagaccagaaatggcggcggagcgggaacaaagggtggatgagtgctacatcccaatfacttgcctcccaaaac  ccagcctgagctcagtgggcgtggactaatatggaacagatttaagcgcctgttgaatctcacggagcglaaacgggtg  gtggcgcagcaictgacgcacgtgtcgcagcagcagcagcagaacaaagagaatcagaatcccaatctgatcgcggc  gtgatcagatcaaaaactcagccaggatcagagctggctgggtggctcgtggacaaggggattaccctggagaagca  gtggatccaggaggaccaggcctacatccttcaatggcgcctcaactcgcggiccccaaatcaaggctgccttggga  caatggggaaaagattatgagcctgactaaaaccgccccgactacctgggtggccagcagcccgtggaggacattcc  agcaatcggattataaaatfttggactaaacgggtacgatcccaatagcggcttccgtcttctgggtggccacgaa  aaagtgcgcaagagggaacaccatctggtgttggcctgcaactaccgggaagaccaacatcgcggaggccatagcc  cacactgtgccctctacgggtgcgtaaacgggaccatgagaacttccctcaacgactgtgtcgacaagatggtgatctg  gtgggagggagggaagatgaccgcaaggtcgtggagtcggccaaagccattctggaggaagcaaggtgcgcgtgg  accagaaatgcaagctctcggccaagatagaccgactcccgtgatcgtcacctcaaaccaacatgtgcgcgtgattg  acgggaactcaacgacctcgaacaccagcagccgttgcagaccggatgttcaaaatgaaactcaccgccctctgcatc  atgactttgggaaggtcaccagcaggaagtcaagacttttccggtgggcaaggaatcacgtggtgaggtggagcatg  aattctactcaaaaaagggtggagccaagaaaagaccgccccagtgacgcagatata</p>	20

10

20

30

【 0 4 8 8 】

【表 1 3 - 1 4】

	<p>gtgagccaaacgggtgctgcgagtcagttgctgcagccatcgacgtcagacgcggaaagcttcgatcaactacgcagaca  ggtaacaaacaaatgttctcgtcacgtggcatgaatctgatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaat  tcaaatactcgtcactcacggacagaaaactgtttagagtgcttcccgtgacagaatctcaaccggttctgctcaaaa  aggcgtatcagaaaactgtgctacattcatatcatgggaaaagggtgacagcctgactgctcgcgatctggtcaatgig  gattggatgactgcaicttgaacaataatgatitaaatcaggatggctgctgacggttatctccagattggctcgaggac  aacctctgaaggcattcgcgagtggtggcgcctgaaacctggagctccacaaccaaggccaaccaacagcatcagg  acaacggcagggtctgtgcttctgggtacaagtacctggacccttcaacggactcgacaaggagagccgggtcaac  gaggcagacgccggccctcgagcacgacaaggctacgacaagcagctcgagcagggggacaacccgtatctca  agtacaaccacgccgacgccagttccagcagcgtggcgaccgacaccttctggggcaacctcggcgagcagct  ctccaggccaaaaggattctcgagcctctgggtctgggtgaaaggggcgttaaacggctcctggaaaagaacgctc  cggtagagcagtcgccacaagagccagactcctcctggcattggcaagacaggccagcagcccctaaaagaga  ctcaatttggtagactggcagctcagagtgctcccgaacccaacctctcggagaacctccagcaacccccgctgct  gtgggacctactacaatgcttcaggcgggtggcgaccaatggcagacaataacgaaggcggcagcggagtgggtat  gcctcaggaaaatggcattgctgaltccaatggctggcgacagagctaccaccagcaccgaaatgggacctgcc  cacctataacaaccacctacaaagcaaatctcagtgcttcaacggggccagcaacgacaaccactctcggctacag  caccctgggggtatttgattcaacagattccactgccattctaccacgtgactgacgagctcatcaacaactg  gggattccggccaagagactcaactcaagctctcaacatcaagtcgaagggtcagcagcaatgatggctcagca  ccatcgtataaacttaccagcacgggtcaagctctcggactcggagtaccagttgctgactcctcggctcgcgac  cagggctgctcctcctcctggcgagctgttcatgattcgcagctacgctacctaactcgaacatggcagccag  gcagtgaggagctccttcttactgctggaatftccatcgagatgctgagaacgggcaataacttactcagctac  acctcggagcagctccttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgatgaatcctctcatgacca  gtacctgtattacctgaacagaactcagaatcagtcggaaagtgcccaaaacaggactgctgttagccgggggttcca  gctggcatgtctgtcagccaaaaactggctacctggacctgtaccggcagcagcggcttcaaaaacaaacagac  aacaacaacagcaacttactggactggctcctcaaaatataacctaatggcgtgaatctataatcaacctggcactgct  atggctcacaacaagacgacaagacaagttcttccatgagcgggtgctatgatttggaaaggagagcggcgagct  tcaaacactgcaatggacaatgctatgatcacagacgaagaggaaatcaaagccactaaccctgtgcccaccgaaagatt  gggactgtggcagtaactcagagcagcagcagaccctggcaccggagatgctatgtatgggagccttacctgg  aatggtgtggcaagacagagactatcctcagggctctatftgggcaaaatcctcagcagatggacacitcaccgg  tctcctctatggcggttggacttaagcaccgctcctcagatcctcacaacacgcttctcctgcaatcctcgg  gcaagatttgcgcaaaagttgcttactcaccagattccacaggcaagtgagcgtggagattgaatgggagct  gcaaaaagaaacagcaaacgctggaatcccgaagtgcagatatactcaactatgcaaaatcggcaacgtgattcact  gtggacaacaatggacttatactgagcctgcgccatggcaccgttacctcaccgctcctctgtaattgtgttaataat  aaaccggtgattcgttcaacttgaacttggctcctcggaaaggcgaattcgttaaacctgcaggactagaggtcctgatta  gaggtcacgtgagtgcttgcgacatttgcgacacctgtggtcacgctgggtatitaaagccgagtgagcagcagggctc  tcaatttgaagcggggttgaacgcgagccccaagccgaattctgcagatctcactcagactggcgccgctcgc  tagagcggccgaccgggtggagctcagcttcttcccttagtgagggttaattgctgctggcgtgagcaatcagctca  tagctgttctctgtgaaattgttaccgctcac</p>
--	--

10

20

30

【 0 4 8 9】

【表 13 - 15】

	<p>aaticcacacaacatacagaccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaagtgtgagctaacacattaftgc  gttggcctcactgcccgttccagctcgggaacctgtcgtccagctgcattaatgaatcggccaacgcgggggagag  gctggttgcgtattgggcgctctccgtctcgcctcactgactgctcgcctggctgctggctcggcgaagcggatca  cgtcactcaaaaggcggtaaacgggtatccacagaatcagggggataaccaggaagaacatgtgagcaaaaggccagc  aaaaggccaggaaccgtaaaaagccgctgtgctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaaf  cgacgctcaagtcagaggtggcgaaccgacagggactataaagataaccaggcgtttccccctggaagctccccctgtc  gctcctcgttccgacctgcccgtaccggatacctgtccgcttctccccctgggaaagcgtggcgtttctcatagctcac  gctgtaggtatcctcagttcgggtgtagctcgtcgtccaaagcgggctgtgtgcacgaacccccgttcaccccaccgctg  cgccctatccggtaactatcgtctgagtcacaaccggtaagacacgacttatgccactggcagcagccactggtaacag  gattagcagagcgagggtatgtagggcgtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagt  attggatctcgcctctgctgaagccagttaccttggaaaaagagtgtgtagctcttgcacggaacaaaccaccgctg  gtagcgggtgtttttgttgcagaagcagattacggcgaaaaaaaggatcacaagaagatcttgcctttctacggg  gtctgacgctcagtggaacgaaactcagtttaagggtatttggctatgagattatcaaaaaggatctcacctagatcttita  aattaaaaatgaagttttaaactcaactaaagtatatatagtaaaacttggctgacagttaccaatgcttaactagtaggacc  tctcagcagatctgtctatttctgttcatagttgctcactccccgtcgtgtagataactacgacacgggagggcttaccat  ctggccccagtgctgcaatgataccggagaccacgctcaccgctcagattatcagcaataaacagccagccggga  agggccgagcgcagaagtgctcctcaacttaccgctccatccagcttataatgttgcgggaagcctagtagtaagta  gtcgcgcaagtaagttgcaacggtgttgcactgctacagggatcgtggtgtcacgctcgtctgttggatggctcattc  agctccgggtcccaacgatcaaggcaggtatcatgatccccatgttgcacaaaaagcgggtagctcctcggctcccgat  cgttgcagaaagtaagttggccgaggttatcactatggttatggcagcactgcataaactcttactgtcatgccatccgta  agatgctttctgtgactggtgagctactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcaccgaggtgcttccccggcg  tcaatacgggataataccgcccacatagcagaactttaaagtgctcatattggaaaacgttctcggggogaaaaactctc  aaggatctaccgctgtgagatccaggtcgtatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttacttccaccagc  gtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaatgcccaaaaaagggaataaggcgcacaggaatgttgaactca  tactctcctttcaatatttgaagcattatcagggttattgtctcagagcggatacatattgaaigtatttagaaaaataaac  aaatagggggtccgcacatttccccgaaaagtgccacctaattgtaagcgttaataatttgitaaatcgcgttaattttg  ttaaactcagctatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatccctataaatcaaaagaatagaccgagatagggtgag  tgttgttccagtttgaacaagagtcactaltaagaacgtggactccaacgtcaaaaggcgaacacgtctatcagggc  gatggccactacgtgaacatcacccaatcaagtttttggggtcgaaggtccgtaaaagcactaaatcgaaccciaaag  ggagccccgatitagagcttgacgggaaagccggcgaacgtggcgaagaaggaagggaagaagcgaagggag  cgggcgctaggcgtggcaagtgtagcgtcagcgtcgtcgttaaccaccacaccgcccgcgttaatgcccgtac  agggcgcgtcccattcgcattcaggtcgcgcaactgttgggaaggcgatcgggtcgggctctcgtcttaccgag  ctggcgaagggggatgtctgcaaggcatttaagttgggtaaccgaggttttccagtcacgagctgtfaaacgac  ggccagtgagcgcgtaatacagctcactataggcgaattgggtaccgggccccctcgtatcaggtcagcgggtat  cgggggagctcgcaggggtctccatttgaagcgggaggttgaacgcgacg</p>
--	--

10

20

【 0 4 9 0 】

30

【表 1 3 - 1 6】

220	7_AAV4 VP1u- AAV6VP 2/3	ccgccatgccggggtttacgagattgtaftaagggtcccaagcgcacctgacgagcatctgccggcatttctgacagctt gtgaactgggtggccgagaaggaatgggagttgccccagattctgacatggatctgaatctgattgagcaggcaccct gaccgtggccgagaagctgcagcgcgactttctgacggaaatggcgcctgtgagtaagccccggaggccctttcttgt gcaatitgagaaggagagagctacttccacatgcacgtgctctggaaaccaccggggtgaaatccatggttttgggacg ttcctgagtcagattcgcgaaaactgattcagagaattaccgcggtatcgaccactttgccaactggctgcggtca caaaagaccgaaatggcggggaggcgggaacaagggtggatgagtgctacatcccaatfactgccccaaaac ccagctgagctccagtgggcgtgactaatatggaacagtattaaagcgcctgttgaaatctacggagcgtaaacgggtg gtggcgcagcatctgacgacgtgctgcagacgcaggagcaagaacaaagagaatcagaatccaatctgatgcgccc gtgatcagatcaaaaactcagccaggatcaggagcggcggcggcctggtgacaagggtgattacctggagaagca gtggatccaggaggaccagcctcatacatctccitcaatgcgacctccaactcggggtcccaaatcaaggctgacctgga caatggcgggaaagattatgacctgactaaaacgccccogactacctgggtggccagcagcccgtggaggacattcc agcaatggattataaaatitggactaaacgggtacgatcccaaatatggcgttccgtctttctggatgggccacgaa aaagttcggcaagaggaaccatctggctgttggcctgcaactaccgggaagaccaacatcgcggaggccatagccc cacactgtcccctctacgggtgctgaaactggaccaatgagaactttccctcaacgactgtgctgacaagatggtgatctg gtgggaggggaaagatgaccgcaaggtcgtgagtcggcgaagccattctcgggaggaagcaaggtgcccgtgg accgaaatgcaagtcctcggccagatagaccgactcccgtgatctcactccaacccaacatgtgcccgtgattg acgggaactcaacgacctcgaaccaggcagccgtgcaagaccggatgttcaattgaactaccgcccgtctggtatc atgacttgggaaagtcaccaagcaggaagcaaaactttccgggtggcgaagatcacgtggtgaggtggagcatg aattctacgtcaaaaagggtggagccaaagaaagaccgccccagtgacgcagataaagtggcccaaacgggtgctc gcgagtcagttgcgaccatcgactgcagcgcggaagcttgcataactacgcagacaggtaccaaaaacaaatgtct cgtcacgtgggatgaatctgatgctgttccctgcagacaatgcgagagaatgaatcagaatcaaatatctgcttactca ggacagaaagactgttagagcttctccgtgcagaatcaaccggttctgctgcaaaaaggcgtatcagaaactgtg ctacattcatatcatfgggaaaggtgccagacgctgactgacctgcatctggatctggtaatgtgattggatgactgcatctt gaaacaataatgatttaaatcaggatgactgacggttacctccagatggctagaggacaacctctctgaaaggcgttgcg agtgtgggctgcaacctggagccccctaaaccgaagcaaatcaacaacatcaggacaacgctcggggtctgtgctt ccgggttacaataactcggaccggcaacggactgcagaagggggaaccctcaacgcagcggagcggcagccct cgagcagcaaggcctcagaccagcagctcaaggccgggtgacaaccctacctcaagtacaaccaogccgacggg agttccagcagcggctcagggcgacacatcgttggggcaacctcggcagagcagcttccaggccaaaaagagggt tcttgaacctcttggctgtgagcaagcgggtgagacggctcctggaaaagaacgtccggtagagcagctgcacaag agccagactcctcctcgggcatggcaagacaggccagcagcccgtaaaaagagactcaatttggctgagactggcgac tcagagtcagctcccagccacaacctctcggagaacctcagcaacccccgctgctgtggacctactacaatggctca ggcgggtggcgccaatggcagacaataacgaaggcggcagcaggtgggtaatgctcaggaaatggcattgctgatt ccacatggctggcgacagatcaccaccagcaccgaaatgggcttggccacctatacaaccacctctacaag caaatctccagctcaacggggccagcaacgacaaccactcttggctacagcaccctgggggtatttggattca acagattccactgcaattctcaccagctgactggcagcgactcaacaacaatggggattccggcccaagagactca actcaagctctcaacatcaagcaagggtcacgacgaatgagcgtcacgacctcgtataaacctaccagcag ggttcaagctctcggactcggagaccagttgccgtacgtcctcggctctgcaccagggct
-----	----------------------------------	--

10

20

30

【 0 4 9 1】

【表 13 - 17】

	<p>gcctccctccgttcccggcgacgtgtcatgattccgcagctacggctacctaacgctcaacaatggcagccaggcagtg  gacggctacccctttactgcctggaatattcccatcgcagatgctgagaacgggcaataacttacctcagctacacctcga  ggacgtgcccctccacagcagctacggcgcacagccagagccctggaccggctgatgatctctcctacgaccagctcgtat  ttacctgaacagaaactcagaatcagctccggaagtgcacaaaacaggactgctgtttagccgggggtctccagctggcat  gtctgttcagcccaaaaactggctacctggacctgttaccggcagcagcgcgtttctaaaaacaaaacagacaacaaca  cagcaactttacctggactggtgcttcaaaataaacttaattggcgctgaatctataaaccctggcactgctatggcctc  acacaagagcagacaagacaagcttccatgagcgggtgcatgattttgaaaggagagcggcggagcttcaaacac  tgcattggacaatgctatgacacagcgaagagaaatcaaacactaacccctggccaccgaaagattgggactgt  ggcagctcaatccacagcagcagcagaccctgcgaccggagatgctgctatgggaccctacctggaatggtgt  ggcaagacagagacgtataacctgcaaggctctatftggccaaaattcctcacacggatggacactttaccctgctcctc  catggcggtcttggacttaagcaccgctcctcagatcctcaaaaaacgctgttctcggcaatcctccggcagag  tttccggctcaaaaagtgtctcattcatcaccagatftccacagcaagtgagcgtggagatgaaatgggagctgcagaa  agaaaacgcaaacgctggaatcccgaatgctcagctatcaatctcaaatctgccaacgttgattcactgtggac  aacaatggactttactgagcctcgcaccatgacaccctgctaccctcaccctgtaattgtgttaatacaataaacg  gttgattcgttcagttgaaacttggctctcgcgaaggcgaaatcgtttaaacctcagagactagaggtcctgtattagctc  acgtgagtgtttgcgacttttggacacctgtggtcacgctgggtatttaagcccagtgagcagcaggggtctccattt  gaaaggggagggttgaacgcgacccccaagccgaattctcagatatacactggcggccgctcactagagc  ggccgccaccgcggtggagctccagctttgttccctttagtgggttaattgcgctggcgtaatcatgctatagctgt  ttcctgtgtgaaattgtatccgctcacaatccacacaacatagcagccggaagcataaagtfaaacgctggggtgcctaa  tgagtgagctaacacattaattgctgctcactgcccgttccagctgggaaacctgctgtgacagctgcattaatga  atcggccaacgcggggagagggcgttgcgtattggcgctcttccgctcctcactgactgctgctgctcggctc  gttccgtgctggcgagcgggtatcagcactcaaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaa  agaacatgtgagcaaaaaggcagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgtgctggcgttttccataggctccg  ccccctgacgagcatcacaataatcagcctcaagtcagagggtggcgaacccgacagggactataaagataaccaggc  gtttcccccctggaaagctcccctgctgcccctcctgttccgacctgcccgttaccggataacctgccccttcccttggg  aagcgtggcgtttctcatagctcacgctgtaggtaicagctcgggtgtaggtgcttccgctccaagctgctgtgacag  aacccccgttcagcccaccgctcgccttatccggtaactatcgtcttgaagccaaccggtaagacacgactatcgc  actggcagcagccactggtaacaggattagcagagcaggtatgtaggggtgctacagagttctgaagtgtggccta  actacggctacactagaaacaagattttgctatcgcgctcgtgtagcagcttaccctcggaaaaagagttgtagctct  gatccggcaaaccaaccaccgctgtagcgggtgtttttgttcaagcagcagattacgcgcaaaaaaaggatccta  agaagatcctttgatctttcaggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcagttagggttttggctatgagattaca  aaaaaggatctcaccatagatcctttaaataaaaatgaagtttaaatcaatcaaatgataatagtaaacctgctgacagt  accaatgcttaatcagtgaggcacctcicacgcatctgtctatttcttaccatagtgccctgactccccgctgtagata  ctacgatacgggagggcctaccatctggccccagctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattta  tcagcaataaacagccagccggaaggcgagcgaaggtgctcctgcaactttatccgctccatccagctatataat  gttccgggaaagctagagtaagtagtctcaggttaaatgctgcaaacgtgttggcattgctacagggcatctgtgtgca  cgc</p>
--	--

10

20

30

【 0 4 9 2 】

【表 13 - 18】

	<p>tcgctgttggatggctcattcagctccgttcccaacgatcaaggcaggtacatgatccccatgtgtgcaaaaaagc  gttagctcctcggcctccgatcgtgtcagaagtaagtgccgcaggttatcactcatggttatggcagcactgcataat  ctctactgctatgccatccgtaagatcgttctgtgactggtgagctactcaaccaagctcctgagaatggtatcggcg  accgagtgtcctcggccggcgtcaatacgggataataccgcccacatagcagaacttaaaagtctcatatggaaaa  cgttctcggggcaaaactcgaagatctaccgctgtgagatccagttcgtatgtaaccactcgtgacccaactgatct  tcagcatctttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcg  acacggaaatgtgaatactcactctctcttttaataatattgaagcattatcagggttatgtctcatgagcggatacatat  tgaatgtattagaataaacaataatggggtccgcccacattccccgaaagtgccacctaaattgtaagcttaataatt  tgtaaaatcgcgttaaatftttgtaaacagctcatttttaaccaataggccgaaatggcaaaatccctataaatcaaaag  aatagaccgagatagggtgaggtgttccagtttggacaagagctccactattaagaacgtggactccaacgtcaaaagg  gcgaaaaaccgtctatcaggcgatggcccactacgtgaacctaccctaatcaagttttggggctcaggtgctgcaaa  gcactaaatcgaaccctaaggagccccgatttagagctgacggggaagccggcgaacgtggcgaagaaaggga  agggaagaaagcgaaggagcgggogctagggcgctggcaagtgtgagctcagctcgcgtaaccaccacacc  ggcgcgttaatgcgccctacagggcgcgtccattcgcctacagggctcgcgaactgttggaaaggcagctggtgc  ggcctctcgtatfacgccagctgcgaaaggggatgtgctgcaaggcgattaaagttggtaaccgaggggtttccc  agtacgacgtgtaaacgacggccagtgagcgcgctaatcagactactatagggcgaattgggtaccggcccc  cctcgtacgaggtcagcgtatcggggagctcgcagggtctcattttgaagcgggagggttgaacgcgcag</p>
--	---

40

【 0 4 9 3 】

実施例 8

組換え AAV6 変異ウイルス産生および細胞形質導入

ウイルス産生

50

[00387] 20個のウイルス変異体は、AAV6タンパク質のキャプシド配列に一重、二重、または三重の突然変異を含むように設計された(表1)。HEK293細胞は、組換えAAV6(表12のウイルス変異体のいずれか1つに特異的なap配列を含むプラスミド)、CMV-GFP、およびpヘルパープラスミドで同時トランスフェクトされた。トランスフェクションの72時間後、ウイルス粒子を回収し、AAVanced濃縮試薬で精製した。ウイルス力価は、CMVプロモーター標準曲線(Taqman)、 $y = -1.054 \ln(x) + 36.685$ に基づいて計算された。 $R^2 = 0.9755$ 。細胞形質導入: 20キャプシド変異体

[00388]細胞培養物は、形質導入前の3日間、抗CD3および抗CD28 Dynabeads (Gibco)で刺激された。0日目に、 $4 \times 10^4$ のCD3+T細胞に、MOIが $1 \times 10^4$  GC/mLでウイルスを感染させた。ウイルス11、12、および18を形質導入した細胞は力価が低く、したがって、6000、800、および7300 GC/mLなどの低いMOIをそれぞれ使用した。形質導入後の1日目に、培地(X-Vivo 15培地+10%ヒト血清(Sigma)、IL-2(3000 U/mL)、IL-7(5 ng/mL)、およびIL-15(5 ng/mL)(Peptrotech))を交換した。形質導入後の7日目に、GFP発現をフローサイトメトリーにより測定し、図17A、図17B、および図17Cに要約した。

組換えAAV6変異体およびCRISPR

[00389]細胞培養物は、CRISPRによる編集前の3日間、抗CD3および抗CD28 Dynabeads (Gibco)で刺激された。0日目に、 $3 \times 10^6$ 個のCD3+T細胞は、パラメータ:パルス電圧1400、パルス幅10ms、3パルスを用いたNeonエレクトロポレーションシステムを使用して、Cas9 mRNA(15  $\mu$ g)、AAVS1 gRNA(10  $\mu$ g)をエレクトロポレートされた。細胞をエレクトロポレーション後に2時間インキュベートし、次に、組換えAAV6変異ウイルスと接触させた。

【0494】

[00390]0日目に、CRISPR後の2時間のインキュベーションの完了時に、 $2 \times 10^5$ 個のCD3+T細胞は、 $1 \times 10^6$  GC/mLのMOIで、AAVS1スプライスアクセプター-GFP(SA-GFP)を含むウイルスに感染された。形質導入後の1日目に、培地(X-Vivo 15培地+10%ヒト血清(Sigma)、IL-2(3000 U/mL)、IL-7(5 ng/mL)、およびIL-15(5 ng/mL)(Peptrotech))を交換した。対照は、刺激および拡大されたがCRISPRでエレクトロポレートされていない、形質導入されていないヒトCD3+細胞、AAV6 GFP:CMV GFP陽性対照を含むWT AAV6で感染された $2 \times 10^5$ 個のT細胞、Zap:2  $\mu$ Lの1xPBSとともにNeonでエレクトロポレートされた $2 \times 10^5$ 個のT細胞、GEP mRNA:陽性対照として0.35  $\mu$ g GFP mRNAと1.5  $\mu$ Lの1xPBSでエレクトロポレートされたかまたはAAVS1 gRNAでエレクトロポレートされた $2 \times 10^5$ 個のT細胞、およびCas9:1  $\mu$ gのAAVS1 gRNAおよび1.5  $\mu$ gのCas9 mRNAでエレクトロポレートされた $2 \times 10^5$ 個のT細胞からなった。

【0495】

[00391]CRISPRおよび組換えAAV6修飾後の3日目および7日目に、GFP発現をフローサイトメトリーにより測定した(図18A、図18B、図19A、図19B、および図20)(変異体1~20におけるGFP発現の要約)。

組換えAAV6変異スプライスアクセプター-GFP滴定

[00392]4つの三重突然変異体(ウイルス番号:15、17、19、および20)をGFP発現パーセントに基づいて選択し、滴定アッセイで利用して、突然変異体(mutant variant)がより低いMOIでWT AAV6より優れているかどうかを決定した。細胞培養物は、CRISPRによる編集前に、抗CD3および抗CD28 Dynabeads (Gibco)で3日間刺激された。0日目に、 $3 \times 10^6$ 個のCD3+T細胞は、パル

ス電圧1400、パルス幅10ms、3パルスのエレクトロポレーションパラメータでNeonシステムを使用して、Cas9 mRNA (15 µg) およびAAVS1 gRNA (10 µg) でトランスフェクトされた。細胞は、エレクトロポレーション後の2時間、CRISPRでインキュベートされた。

【0496】

[00393] 0日目に、CRISPR後の2時間のインキュベーションの完了時に、 $2 \times 10^5$  個のCD3+T細胞を5つの条件下で感染させた：WT、ウイルス番号：15、17、19、または20 (AAVS1スプライスアクセプターGFP含有 (SA-GFP))、MOIは $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、または $2 \times 10^2$  である。形質導入後の1日目に、培地 (X-Vivo 15培地 + 10%ヒト血清 (Sigma)、IL-2 (3000 U/ml)、IL-7 (5 ng/ml)、およびIL-15 (5 ng/ml)) (PeproTech) を交換した。5日目、8日目、および14日目に、GRPパーセントをフローサイトメトリーにより測定した。図21A ~ 図21F。図21Gはデータの要約を示す。

スプライスアクセプターNanoLuc変異体

[00394] 4つの三重突然変異体 (ウイルス番号15、17、19、および20) を使用して、AAVS1スプライスアクセプターNanoLuc (CMV-NanoLuc) を含む組換えAAV6ウイルス粒子を生成した。NanoLucは、それが使用される実験の範囲および感受性を向上させる高度に発現されたレポーターである。細胞培養物は、CRISPRによる編集前に、抗CD3および抗CD28 Dynabeads (Gibco) で3日間刺激された。0日目に、 $3 \times 10^6$  個のCD3+T細胞は、パルス電圧1400、パルス幅10ms、3パルスのエレクトロポレーションパラメータでNeonシステムを使用して、Cas9 mRNA (15 µg) およびAAVS1 gRNA (10 µg) でトランスフェクトされた。細胞は、エレクトロポレーション後の2時間、CRISPRでインキュベートされた。

【0497】

[00395] 0日目に、CRISPR後の2時間のインキュベーションの完了時に、 $3 \times 10^5$  個のCD3+T細胞を5つの条件下で感染させた：WT、ウイルス番号：15、17、19、または20 (SA-NanoLuc含有)、MOIは $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、または $2 \times 10^2$  である。トランスフェクションの完了時に、細胞を30 で一晩インキュベートした。形質導入後の1日目に、細胞を37 に移した。9日目および14日目に、GFPパーセントは、プレートリーダーを用いて発光 (RLU) により測定された。図22Aおよび図22B。

【0498】

[00396] ウイルス変異体15、17、19、および20のパッケージング効率は、各変異体のウイルスゲノム対ウイルスキャプシド比として計算された。1に最も近いキャプシド比は、最良のパッケージング効率を示す。qPCRを使用してゲノム力価を決定し、ADK1 ELISA (Progen) を使用してキャプシドを定量した。図22C。

【0499】

10

20

30

## 【表 1 4】

表 14: 組換え AAV6 ウイルス変異体および力価

ウイルス番号:	突然変異	力価(GC/mL)
ウイルス1	WT	7.73E+09
ウイルス2	F129L	3.87E+09
ウイルス3	D418E	6.95E+09
ウイルス4	D418N	6.30E+09
ウイルス5	L584N	8.58E+08
ウイルス6	L584H	4.89E+09
ウイルス7	L584D	1.04E+10
ウイルス8	V598L	2.69E+10
ウイルス9	V598I	9.32E+09
ウイルス10	H642N	6.65E+09
ウイルス11	F129L_H642N	9.55E+08
ウイルス12	F129L_L584D	3.48E+08
ウイルス13	F129L_D418N	4.18E+09
ウイルス14	F129L_L584H	1.88E+09
ウイルス15	F129L_H642N_D418N	2.84E+09
ウイルス16	F129L_H642N_L584D	2.54E+09
ウイルス17	F129L_H642N_L584N	2.39E+09
ウイルス18	F129L_H642N_L584H	1.39E+09
ウイルス19	F129L_H642N_V598L	1.63E+09
ウイルス20	F129L_H642N_V598I	3.75E+09

10

20

## 【 0 5 0 0】

実施例 9

変異 r A A V 6

キメラ NanoLuc 滴定

[00397]細胞培養物は、CRISPRによる編集前の3日間、抗CD3および抗CD28 Dynabeads (Gibco)で刺激された。0日目に、 $3 \times 10^6$ 個のCD3 + T細胞は、パルス電圧1400、パルス幅10ms、3パルスのエレクトロポレーションパラメータでNeonシステムを使用して、表16の核酸由来のCas9 mRNA (15  $\mu$ g)、およびAAVS1 gRNA (10  $\mu$ g)でトランスフェクトされた。細胞は、エレクトロポレーション後の2時間、CRISPRでインキュベートされた。

30

## 【 0 5 0 1】

[00398]0日目に、CRISPRの完了時に、修飾されたCD3 + T細胞をプールし、 $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、または $2 \times 10^2$ 個で96ウェルプレートに分注した。編集された細胞を30で一晚インキュベートした。編集後の1日目に、細胞を37に移し、7日目および14日目までインキュベートした。編集後の7日目と14日目に、Nano-Glo試薬 (Promega)を添加し、蛍光は、プレートリーダーを用いて $5 \times 10^4$ 細胞から測定された。発光を3重にして計算し、HCT116 NanoLuc細胞株陽性対照と比較した。図23、図24A、図24B。Cas9 mRNA、AAVS1 gRNAによるトランスフェクション、およびCMVプロモーターから発現されたNanoLuc導入遺伝子を含むウイルスによる形質導入後の14日目にNano-Glo試薬 (Promega)を添加した後の $5 \times 10^4$ 細胞から得られた発光読み取り。WT AAV6は赤色で、キメラ3、5、および6はそれぞれ薄緑色、黒色、ピンク色 (plink)で示される。キメラ3、5、および6は、力価が低すぎて、滴定実験で高いMOIを達成することができなかった。WT AAV6および非トランスフェクト細胞と比較した場合、AAVキメラ3、5、および6でトランスフェクトされた細胞は、0から1,000,000のMIで修飾後の7および14日目に、発光 (RLU)の増加を示し、これはトランスフェクション効率の増加を示す。キメラ3、

40

50

5、および6は、WT AAV6よりも優れた発光レベルを示し、CMV-NanoLuc導入遺伝子も含むWT AAV6よりも約100倍優れていた。

【0502】

[00399]初代細胞にキメラ3、5、および6を形質導入した。細胞溶解物を回収し、qPCRを実行して、AAVキメラ3、5、および6のコピー数を決定した。図55A。また、形質導入された初代細胞の上清は、溶解物対精製後について回収され、抗ADK1(AAV6 capsid上の立体構造エピトープに特異的である)ELISAをWT、ならびにAAVキメラ3、5、および6で形質導入された細胞で実行された。図55B。

【0503】

【表15】

10

表15: キメラ変異組換えAAV6構築物、図29Aにも示される。

キメラ	キメラの詳細	ウイルス力価(GC/ml)
1	WT	1.90E+13
2	AAV5VP1u-AAV6VP2/3	3.55E+13
3	rAAV4VP1/2-AAV6VP3	5.89E+10
4	rAAV5VP1/2-AAV6VP3	1.76E+13
5	rAAV11VP1/2-AAV6VP3	7.45E+10
6	rAAV12VP1/2-AAV6VP3	3.89E+09
7	AAV4VP1u-AAV6VP2/3	2.53E+13
8	AAV12VP1u-AAV6VP2/3	4.34E+13

20

【0504】

【表 16 - 1】

表 16: 修飾された化膿連鎖球菌 Cas9

配列番号	配列
221	ggaaataagagagaaaagaagagtaagaagaataaagagccacatggcccaagaagaagcggaaaggtcggatccacggagtc agcagccgacaagaagfacagcatggcctggacatcgccaccaactctgtgggctggccgtgatcaccgacgagtaaacgggcccagc aagaaatcaagggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcgggcccctgctgtcagacggcgaacacggc aggccaccggctgaaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggagaaccggatctgctatcgaagagatctcagcaacgagat ggccaagggtgacgacagcttctccacagactggaaagatcctcctgtggaagaggacaagaagcacgagagacacccatctcggca acatcgtggagcagggtggcctaccacgagaagtacccacatctaccacctgagaagaactggtggacagcaccgacaagggcgacct gagactgatciactggcccggccacatgatcaagttcagggccacttctgatcggggcaccctgaaccccgacaacagcgactgga caagctgttcatccagctgggtgcaacacacagctgttcgaggaacccatcaacgccaagcggcgtggacgccaaggctatcctgtct gccagactgagcaagagcaagggtggaaaatctgatcgccagctgcccggcgagaagaagcggcgtgctggcaacctgattgcc tggagcaacctgtggcaccgatcgccgaccgatcgccgacctgttctgcccgccaagaacctgtgacgcatctctgtgagcagact ctgagagtgaaaccgagatcaccaaggccccctgagcgcctctatgatcaagagatagcagagcaccaccagggacctgacctgtgaa agctctctgctggcagcagctgctgagagtaaaagaatcttctgaccagagcaagaacggctacggcgtacatcgtggcggc ctgaccggaagagttctacaagttcatcaagccatcctggaaaagatggagcggcaccgaggaactgctctggaagctgaacagagggac ctgctgagaagcagagaaccttcgacaacggcagcatccccaccagatccacctgggagagctgcacgctatcctgagaaggcaggag attttaccattctgaaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgacctcagggatcccctactactggtggccccctggcagaggc cagcagatcgcctggatgaccagaagagcgaaggaaaccatcacccccgtaactcagggaggtggtggacaaggcggcagcggcca gagctcatcgagaatgacaactcgtataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcagacgctgctgtacgactcaccgtg tacaacgagctgacaaaagtgaatactgaccgaggaatgagaaaagcccgcctcctgagcggcgagcagaaaaaggcatcgtggacc tctgttcaagacacagaaaaagtgaccgtgaaagcagctgaaaagggactactcaaaaaatcagagtgcttgcactccgtgaaatcctgg ctggaagatagattcaacgctcctgggcacataccagatctgctgaaaatfcaaggacaaggactcctgataaacgaaagacagag gacatctggaagatctgctgacacctgacactgtttgagaccgcaagatgatcaggaagggctgaaaaacctacgctcaccctgtctgacga caaaatgatgaagcagctgaaagagaagggcgtacaccggctggggcaggtgagcagaagctgatcaacggcatcagagacaagcaga gggcgaagacaatcctggattcctgaaagtcggacgcttcccaaccggactcagcagctgatccacgacgacagcctgacattcaaaaga ggacatccaagaagcccaggtgtccggcagggcagctctctgacgagcatalcgttaacctggccggcagcccgcctatcaagaaggc atcctgacagagtgaaaggtggggcagagctctgaaagtgatgggcagacacaagcccgagaacatcgtgatcagatgcttagagaga accagaccaccagaaggagcagaagaactcccgcgagagatgaaagagaatcgaaggggcagcaagaagctggcagccagatcctg aaagaacaccccgtgaaaaacaccagctgcgaacgagaagctgactcctgactactcagaaatggccgggatgactgacggaccgga actggacatcaacagactgtccgactacgatgfgaccatactgtcctcagagcttctgaaaggacgactccatcagatacaaaagtgtgactog gagcgacaagaacagggcaagcgcacaacgtgccctccgaaaggtctgaaagatgaaagaactcggcgacagctgctgaacgc caagctgattaccagaggaagttcgataacctgaccaagggcgaagagggcggcctgagcagctggaataaggccgctcatcaagagg cagctgtgaaaccagacagatcaaaaagcagctggcagacatcctggaactccggatgaacactaaagtagcagcaaaacgataagctgat cggggaagtgaaatgacacctgaagtcgaagctggtgtccgattccggaaggattccagtttacaaggtgcgcgagatcaacaactacc accacggccagcagcctacctgaacgctgtgggaaccgacctgacaaaaatccttaagctgaaagcggatctg

10

20

30

【0505】

【表 16 - 2】

	gtacggcactacaagggtgacgactgctggaaagatgatcgcaagagcagcaggaatcggcaaggctaccgcaagctacttcttaca gcaacatcatgaacttttcaagaccgaaatcaccctggccaacggcgagatcagaaaagcgcctctgatcagacaacaggcgaacccggg gagatcgtgtgggataaggcagagactcggcacagtgcgaaaggctgctgagcatgcccgaagtgaatctgtaaaaagaccgaggtgca gacagggcggctcagcaaaagtctatcctgcccaagaggaacagcgacaagctgatcgccagaagaaggactgggaccccaagaagatc ggccgcttcgacagccctaccgtggcctactctgctgctggtggtgctaaagggtggaaaaaggcaagtcgaagaactgaagagtgtaaga gctgctggggatcacatcatggaagaagcagctttgagaagaacctatgacttctggaagccaagggtacaaagaagtgaaaaaggaa cctgatcatcaagctgcctaaagtactcctgtcagctggaaaacggcagaagaagaatgctggcctcctggcggcagactgcaagaaggaaa cgagctggccctgcctagcaaatatgtaactcctgtacctggcctcccactatgagaagctgaaaggcagccctgaggaacaacgaaaga acagctgtttgtgaaacagcataagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcaggttccaaagagagtgatcctggccagccaat ctggacaaggctgctgtcctcaacaagcaggggacaagcctatcagagagcagggcgaataatcatccactgttccacctgacaacac ctggcgctcctcggcctcaagtaactgtgacaccacatcgaccggaagaggttacaccagcacaagaaggtgctggacgcccacctgatc caccagatcacccggctgtacgagacaagaatcgacctgtctcagctgggagggcgacaagaagcctgcccactaaagaaaggcggcagc aggcaaaaaagaaggtgagcggcgccttaataagctgcttctgctgggctgctcctctgcccactgccccttctctcctctgacctgacc tcttggcttgaataaagcctgagtaggaagaaaaaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataa aaaaaataa
--	---

40

【0506】

実施例 10

AAVスクリーン

[00400] 新規な AAV 血清型を同定するために、図 25B に示されるように AAV シグネチャー領域の領域を増幅するゲノム DNA において PCR 反応を行った。対照プライマ

50

ー 1 ~ 4 は、領域 A V 1 N S、1 9 s、1 8 a s、および A V 2 C a s に対応する ( G a o ら , 2 0 0 2 年 )。

【 0 5 0 7 】

[00401]

【 0 5 0 8 】

【 表 1 7 】

表 17. AAV シグネチャー領域プライマー

配列番号	プライマー	配列
261	1	GCTGCGTCAACTGGACCAATGAGAAC
262	2	GGTAATGCCTCAGGAAATTGGCA
263	3	GAATCCCCAGTTGTTGTTGTTGATGAGTC
264	4	CGCAGAGACCAAAGTTCAACTGAAACGA
265	5	ATGGCTGCCGATGGTTATCT
266	6	GCACCAATGGCAGACAATAAv

10

【 0 5 0 9 】

[00402] P C R アッセイは、表 1 8 において以下の通りに設定された。

【 0 5 1 0 】

【 表 1 8 】

表 18: AAV 血清型スクリーン PCR アッセイプライマー

アンプリコン/PCR番号	フォワードプライマー	リバースプライマー	およそのアンプリコンサイズbp (AAV6に基づく)
1	1	3	1746
2	2	4	1600
3	2	3	258
4	1	4	3088
5	5	3	921
6	6	3	297
7	6	4	1639
8	5	4	2263

30

【 0 5 1 1 】

[00403] P C R 条件は、表 1 9 において以下の通りであった。P C R は、9 6 ウェルプレートで設定された。各 P C R 実行に含まれる対照は、鋳型なし対照 ( 負の対照として鋳型の代わりにヌクレアーゼ不含有水 )、肝臓 D N A ( 陽性シグネチャー領域対照 ) および 2 つの A A V ヘルパープラスミド陽性対照 ( p D G および A A V D J ) であった。図 2 6 A ~ 2 6 E。T 細胞 D N A 試料の品質を確認するために、ハウスキーピング遺伝子 G A P D H が含まれた。

40

【 0 5 1 2 】

[00404]

【 0 5 1 3 】

## 【表 19】

表 19: AAV 血清型スクリーンのための PCR 条件

ステップ	温度(°C)	時間	サイクル
1	97	1分	1
2	97	15秒	42
	50	15秒	
	68	45秒	
3	68	10分	1

10

## 【0514】

## 実施例 11

CD34+細胞およびT細胞のAAVキメラ形質導入

CD34細胞

[00405]複数の細胞型におけるAAVキメラの相同組換えの有効性を評価するために、CD34+細胞は、10,000 GC/mLのMOIでWT AAV6またはAAVキメラ3、5もしくは6(CMV NanoLucウイルス)で形質導入された。AAV6ウイルスおよびCRISPR(gRNA+Cas9)を対照として使用した。形質導入後の7日目に、細胞を発光(RLU)についてアッセイした。

20

## 【0515】

[00406]結果は、WTと比較して、キメラ3、5、および6がCD34+細胞において約100倍の優れた感染性を示すことを示している。図28Aおよび図28B。

キメラ3、5、または6で形質導入されたT細胞

[00407]細胞におけるAAVキメラの相同組換えの有効性を評価するために、T細胞は、10,000 GC/mLのMOIでWT AAV6またはAAVキメラ3、5もしくは6(CMV NanoLucウイルス)で形質導入された。AAV6ウイルスおよびCRISPR(gRNA+Cas9)を対照として使用した。CRISPR編集は、TIDEによって88%の編集効率を有することが確認された。形質導入後の7日目および14日目に、細胞を発光(RLU)についてアッセイした。

30

## 【0516】

[00408]結果は、WTと比較して、キメラ3、5、および6は、T細胞において約100の優れた感染性を示すことを示している。図30Aおよび30B。

キメラ6で形質導入されたT細胞

[00409]キメラ6(1e4 GC/mLのMOI ODで)が1e6 GC/mLのMOIでWT AAV6と比較する方法を決定するために、T細胞は、1e6または1e4 GC/mLのMOIでWT AAV6およびキメラ6(CMV NanoLucウイルス)に感染された。

## 【0517】

[00410]NanoLucの結果は、WTと比較して、キメラ6がT細胞において優れた感染性を示すことを示している、図31、7日目(図32A)、14日目(図32B)、および21日目(図32C)。結果は、GFPreポーターを使用した同等の実験で検証されている。

40

## 【0518】

【表 20 - 1】

表 20: キメラデータの要約

キメラ	ウイルスカ価 (GC/ml)				T細胞NanoLoc滴定実験 (発光RLU)*			CRISPRなしの NanoLoc実験 (発光RLU)*	
	一次	二次	三次 qPCR	三次 ELISA	第1実験	第2実験		CD34+ 細胞	T 細胞
					(14日)	(14日)		(7日)	(7日)
1: WT AAV 6	1.90E +13	1.21E+ 13	1.20E+1 3	3.74E+ 12	30	119	38	84	124
2: AAV 5VP1 u- AAV 6VP2 /3	3.55E +13	2.44E+ 13			89	68	54		
3: AAV 4VP1 /2- AAV 6VP3	5.59E +10	2.23E+ 10	2.19E+1 1	5.34E+ 10	5953	19950	5243	3596	5014
4: AAV 5VP1 /2- AAV 6VP3	1.76E +13				56	59	37		

10

20

30

40

【 0 5 1 9 】

【表 2 0 - 2】

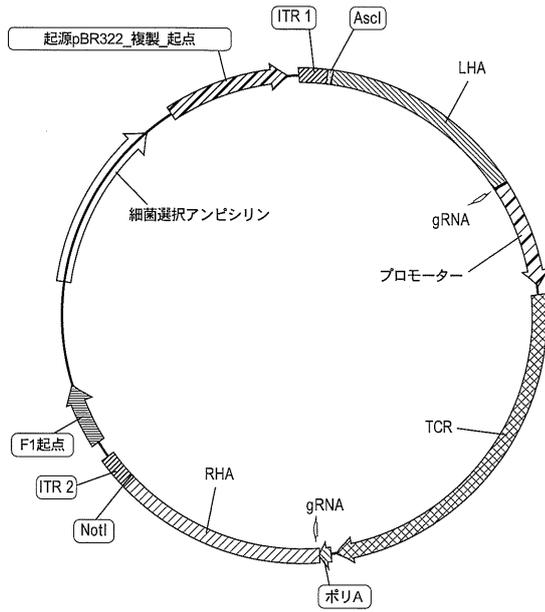
5:AA V11 VP1/ 2- AAV 6VP3	7.45E +10	5.54E+ 10	2.46E+1 0	3.56E+ 09	553	5265	1194	9445	1894 4
6:AA V12 VP1/ 2- AAV 6VP3	3.89E +09	4.21E+ 09	3.45E+1 0	4.58E+ 09	33606	45290	8801	6536	8055
7: AAV 4VP1 u- AAV 6VP3	2.53E +13				50	134	46		
8: AAV 12VP lu- AAV 6VP2 /3	4.34E +13				53	173	65		

10

20

30

【 図 1 】



【 図 2 - 1 】

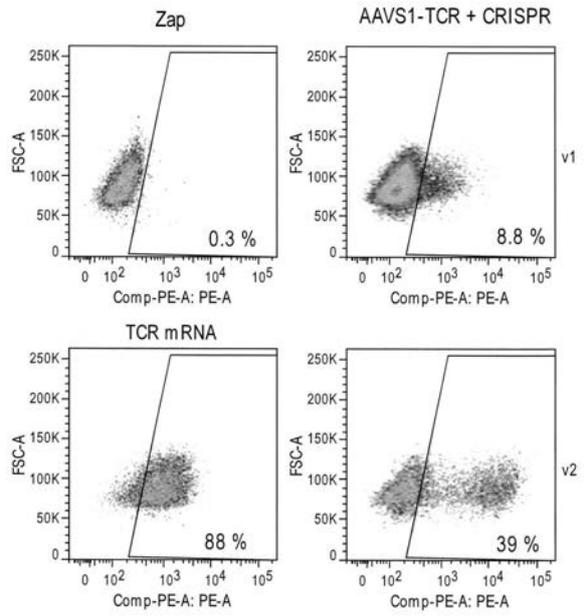


FIG. 2

【 図 2 - 2 】

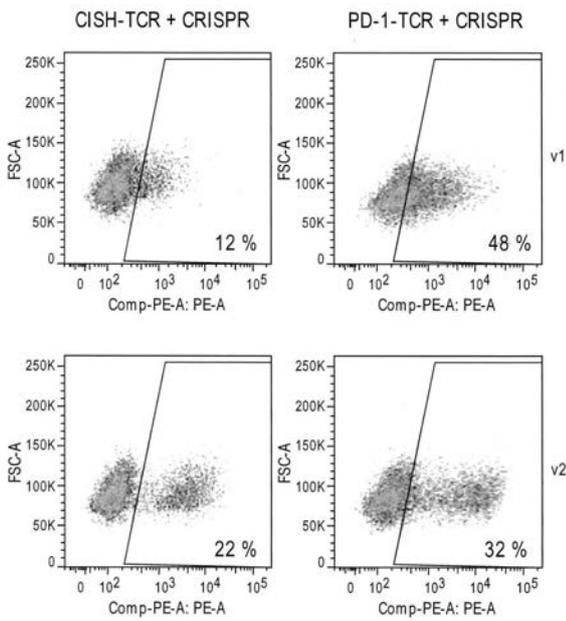


FIG. 2 (CONT.)

【 図 2 - 3 】

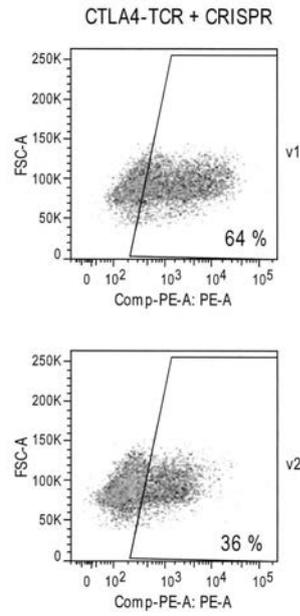
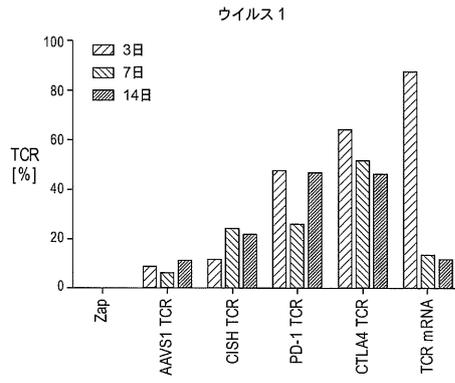
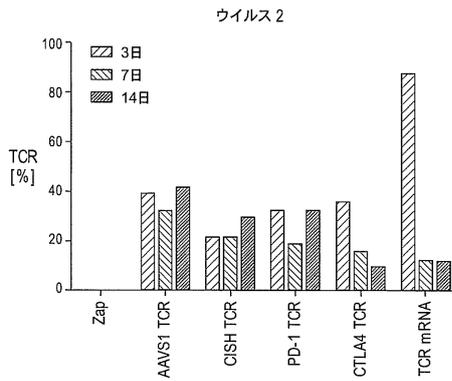


FIG. 2 (CONT.)

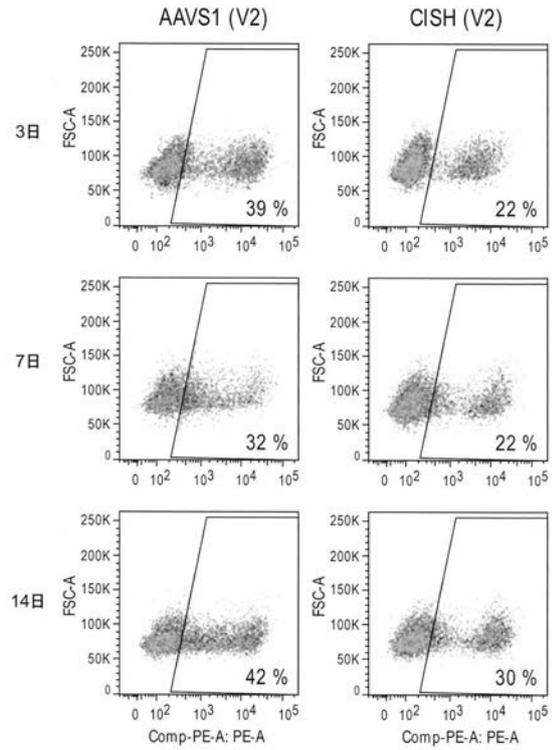
【 図 3 A 】



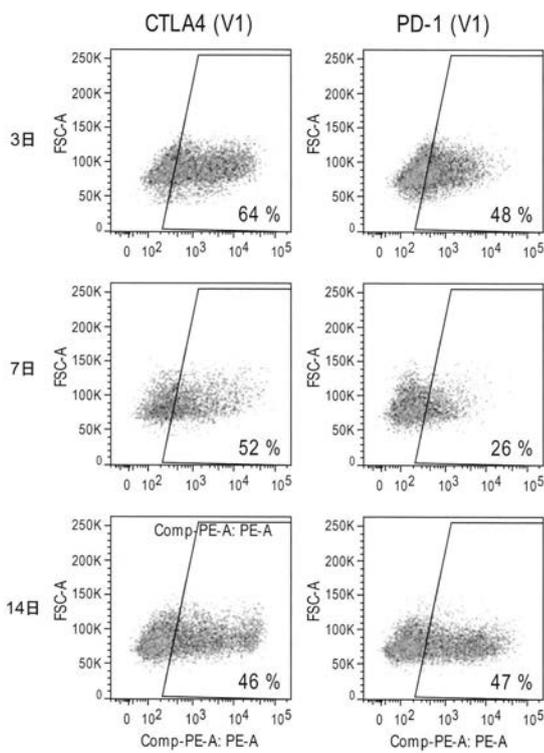
【 図 3 B 】



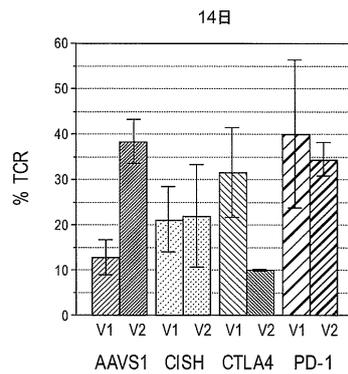
【 図 4 - 1 】



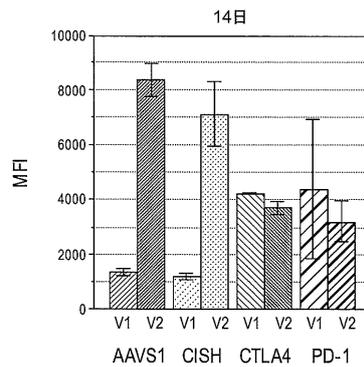
【 図 4 - 2 】



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 6 A 】

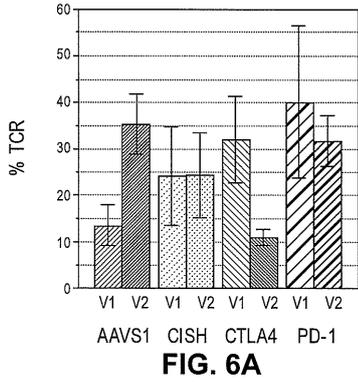


FIG. 6A

【 図 6 B 】

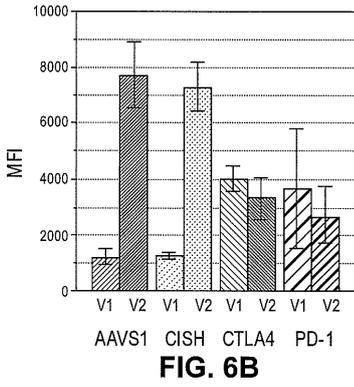
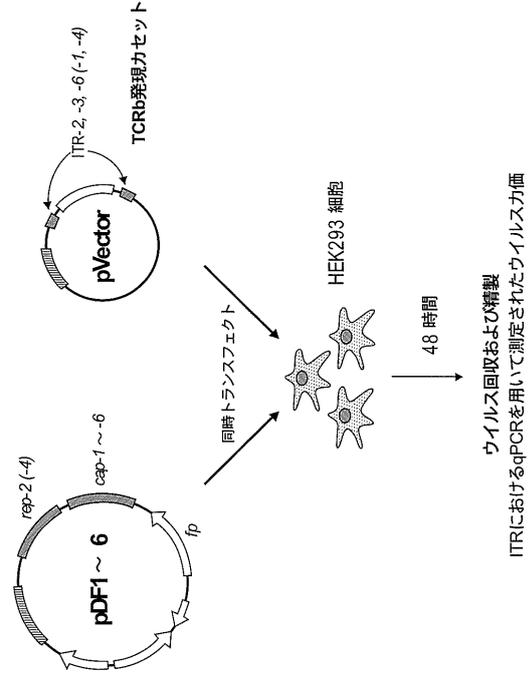


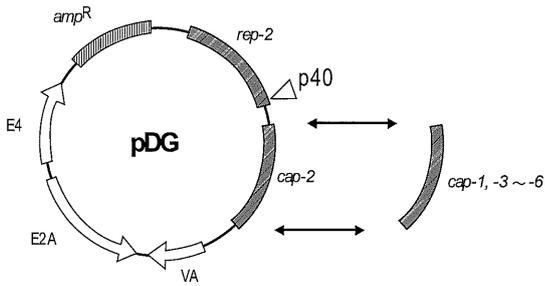
FIG. 6B

【 図 7 A 】

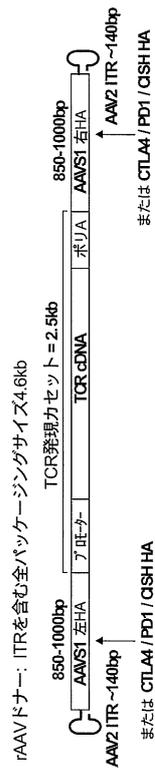


ウイルス回収および精製  
ITRにおけるqPCRを用いて測定されたウイルスカラム

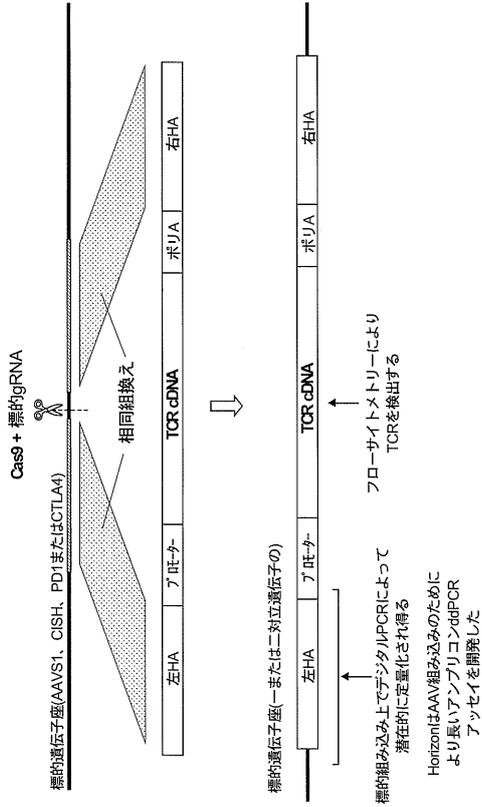
【 図 7 B 】



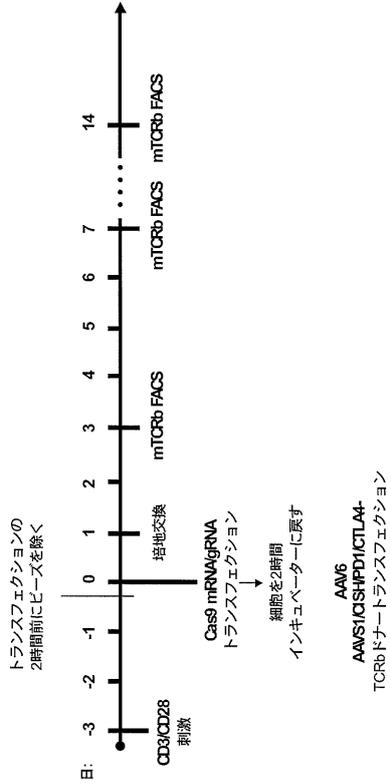
【 図 8 】



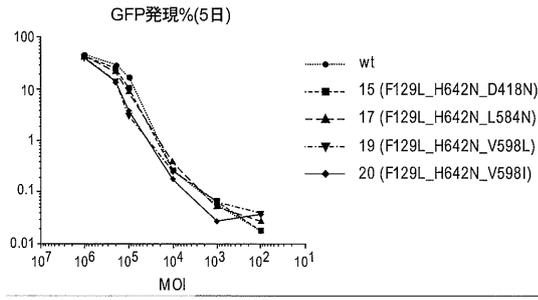
【 図 9 】



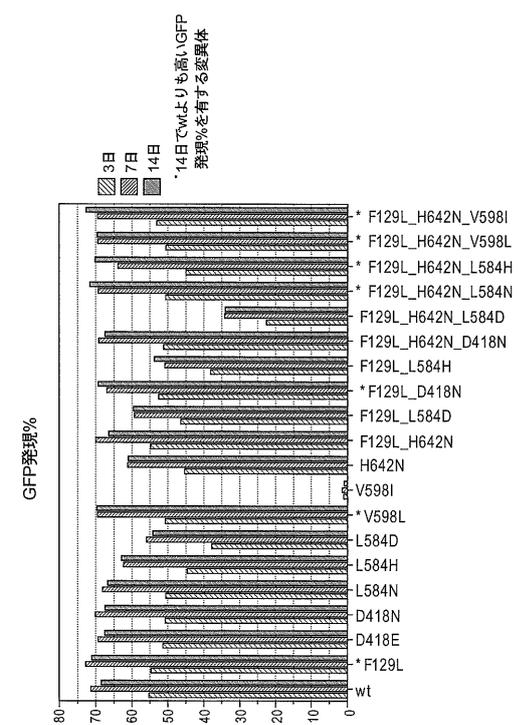
【 図 10 】



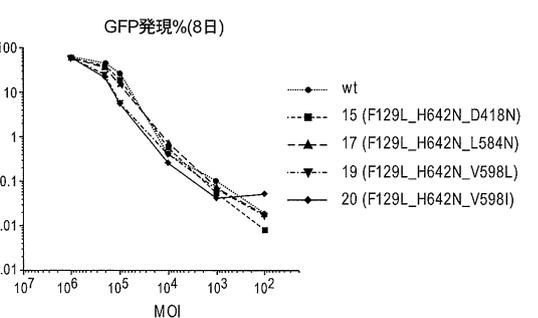
【 図 11 A 】



【 図 12 】



【 図 11 B 】



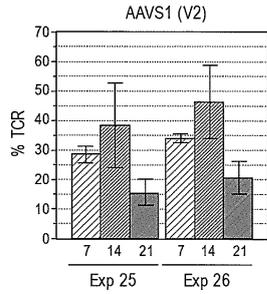
【 図 1 3 】

隣接制限部位: Kpn(GGTACC)/ Agl(ACCGGT)  
 以前のORF(rep)の終止コドンは黄色でマークされる。  
 太字の配列はpAAV DJベクターに由来する  
 ハイライトの黄色 = wt AAV6 cap ORF

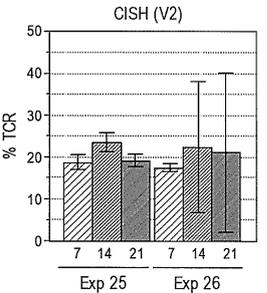
```
>AAV6_WT
GGTACCAAAACAATGTTCTCTGTCACGTGGGCATGAATCTGATGCTGTTCCCTGCAGACAATGGCAG
AGAATGAATCAGAATCAAAATATCTGCTTCACTCAGGCACAGAAAGACTGTTAGAGTGTCTTCCCGT
GTCAGATCTCAACCCGTTTCTGCTCAAAAAGCGTATCAGAAACTGTCTACATTCATCATATCA
TGGGAAGGTCGCAGCGCTTGCATGCCTGGATCTGGTCAATGGATTGGATGCTGCATCTTT
GAACAATAAATGATTAAATCAGGTAttggctgcogaggttatcttcagattggctcgaggacaacq
ctctcgaggcattcgcagtggtgggacttgaacctggagcccgaaacccaagccaaccagcaa
aagcagagcagcgcggctctggtgctctcctgctacaagtacctcgaccctcaacggactcga
caaggggagcccgctcaacgcgggatgcagcggccctcgagcaagcgaagcctacgaccagcag
tcaagcgggtgacaatcgcctacctcggataaacacgcgcaagccgagtttcaggagcgtctgca
gaagatcgtctttggggcaacctcgggcagcagctctccagccaagaagaggttctcgaaac
tttggctggttgaggaaggtctaagcgcgctcctcgaaagaacgtccgtagagcagtgccac
aaagccagactcctcctcgggcatggcaagcagccagcagcccgctcaaaagagactcaattt
ggtcagactggcactcagactcagtcctccogaccaaacctctcgggaaacctccagcaaccoc
gctgtgggacctactcaaatgctctcagcggctggcgaccaatggagacaataacgaagggocg
ccggagtggttaagctcaggaaattggcttgcattccacatgctggcgacagagtcatacc
accagcccccagcaactgggcttggccacctataaaccaacctctcaagcaaatctccagctct
aacggggccagcaacgcaacctactcggctacagcaccocctggggtatttgattcaaca
gattccactgctcttctcaacactgactggcagcagctcaacaacaattggggatccggcc
aagactcaactcaagctctcaacatcaagtcaggaggtcagcaggaatgatggcgtcagca
ctcgtataaacctcaacagcggctcaagctctcctcggactcggagaccagttcgcctcagct
ctcggctcgcgcaagcggctcctccctcggctcccgccggagcgttctgatccgagtcagg
tacctaacctcaacatggcagcagcagcagggagcagctcctttactgctggaatttcc
atcgagctgctgagacgggcaataacttaacctcagctacacctcgaggagcgtccttccac
gcagctcgcgcaagcagcagcctggagcggctgatgaatcctctcagcagcagctcgtattad
ctgacagaaactcagaatcagtcgggaagtcgcaaaacaggaactgctgttagccggggctct
agctggcagctgctgtagcccaaaactgctacctggacctgcttacccgagcagcggcttota
aaacaaacagcaacaaacagcaacttaacctggaactggttcaaaataaaccttaagg
ctggaatctataatcaacctggcctgctatggctcacaacaagcaaaagcaaatctcttcc
catgagcgggtgctatgattttggaaagagagccggagctcaaacactgcatggacaatgctca
tgatcagagcgaagaggaatcaaacgcaactaacccctggccaccgaaagattgggactggca
gtcaactccagagcagcagcagcagcctggcagcggagatgtagatgtagggacctcactgg
aatggttggcaagcagagagctatacctgagggctctatttgggcaaaatctccacagga
gacacttcaaccctgctcctctcagggcggcttggacttaagcaccgctcctcagatcctc
aaaaacagcctgctcctcgaaatcctcggcagagtttccgctacaaagttagctcattc
ccagatctccacaggaagtgagcgtggagatgtagggagctcagaaagaaacagcaaacct
ggaatccgagagtcagatacacttaactagcaaaatcgcacagctgattcactgaggcaac
aatggacttatactgagcctcggccattggcaccgcttaacctcaccgctccctgtaaTTGTGTG
TAAATCAATAAACCGGT
```

(配列番号246)

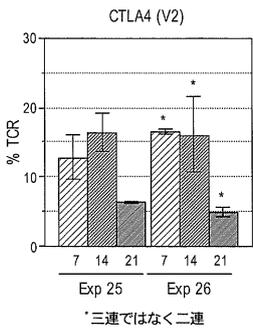
【 図 1 4 A 】



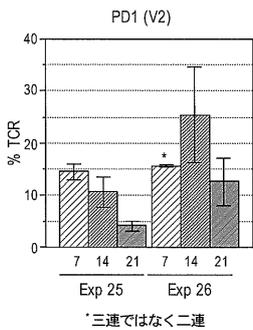
【 図 1 4 B 】



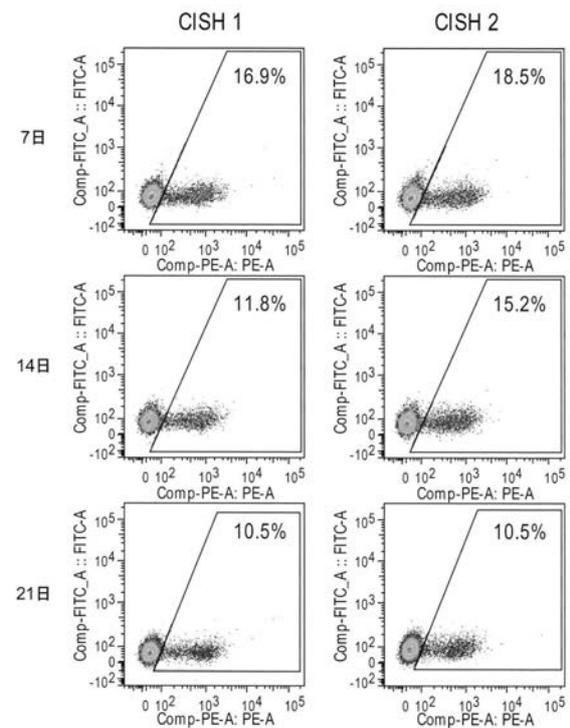
【 図 1 4 C 】



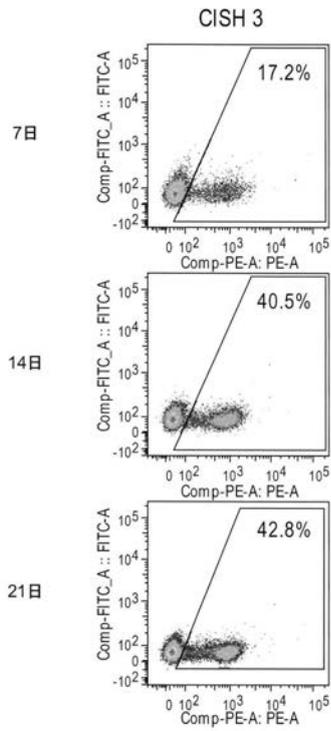
【 図 1 4 D 】



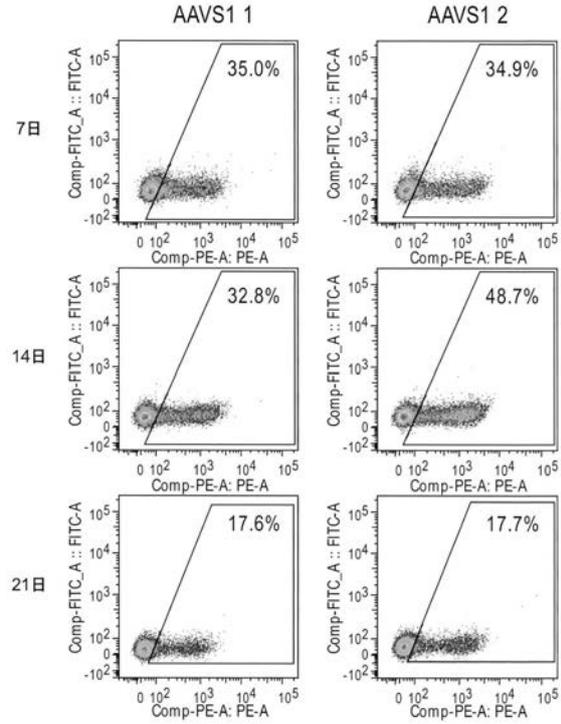
【 図 1 5 - 1 】



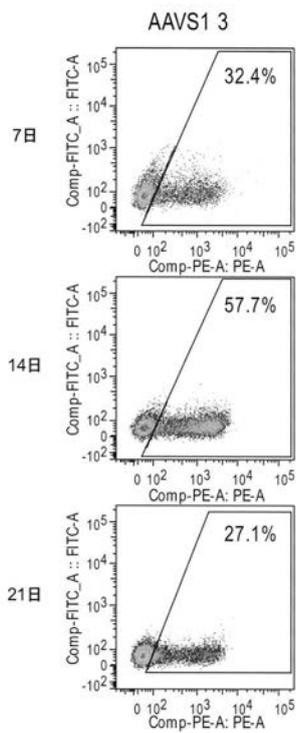
【 図 1 5 - 2 】



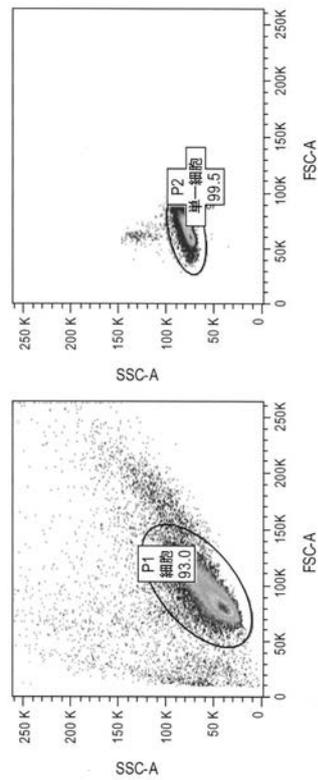
【 図 1 6 - 1 】



【 図 1 6 - 2 】



【 図 1 7 A - 1 】



【 図 17 A - 2 】

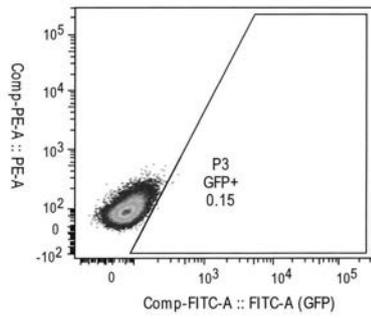
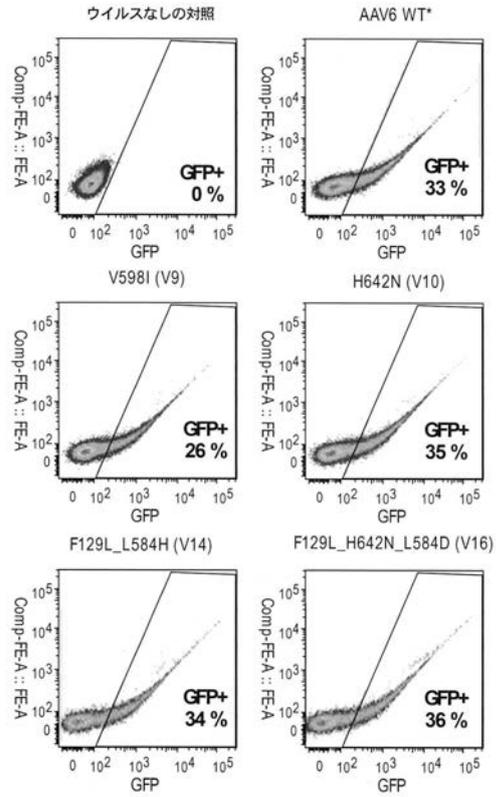


FIG. 17A (CONT.)

【 図 17 B - 1 】



【 図 17 B - 2 】

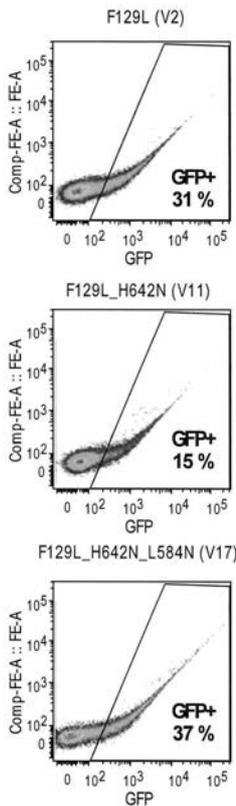
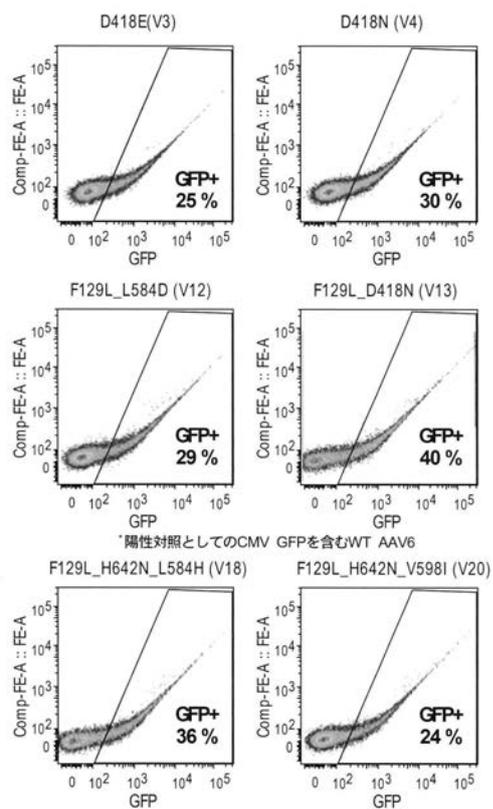
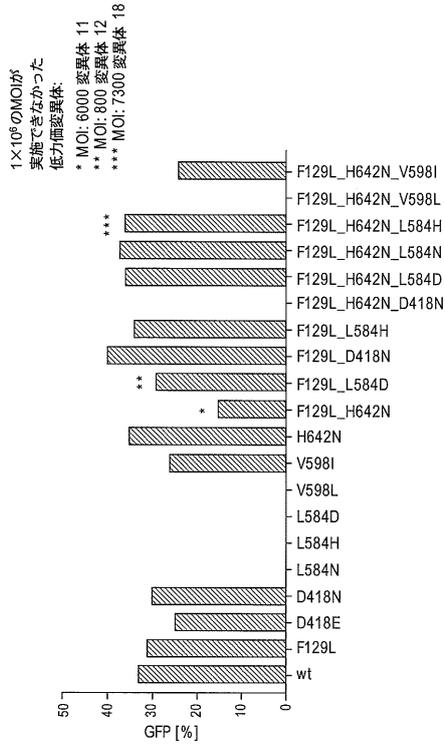


FIG. 17B (CONT.)

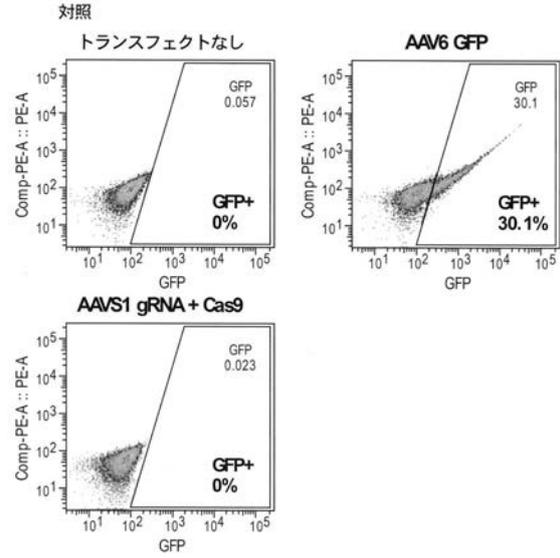
【 図 17 B - 3 】



【 図 17 C 】



【 図 18 A - 1 】



【 図 18 A - 2 】

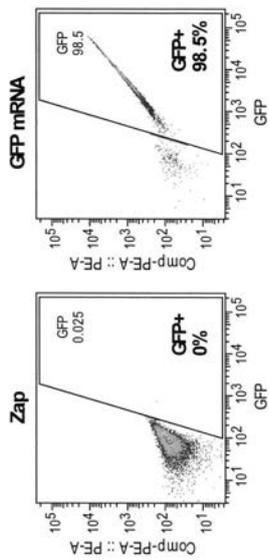


FIG. 18A (CONT.)

【 図 18 B - 1 】

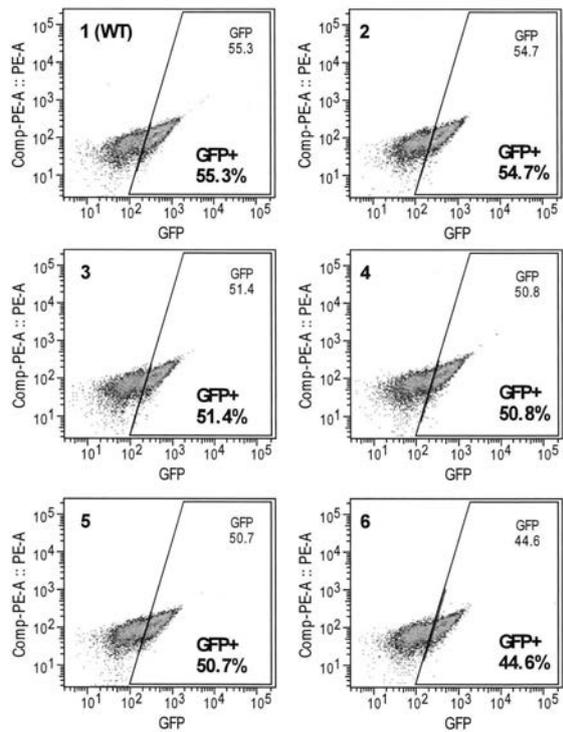


FIG. 18B

【 18 B - 2 】

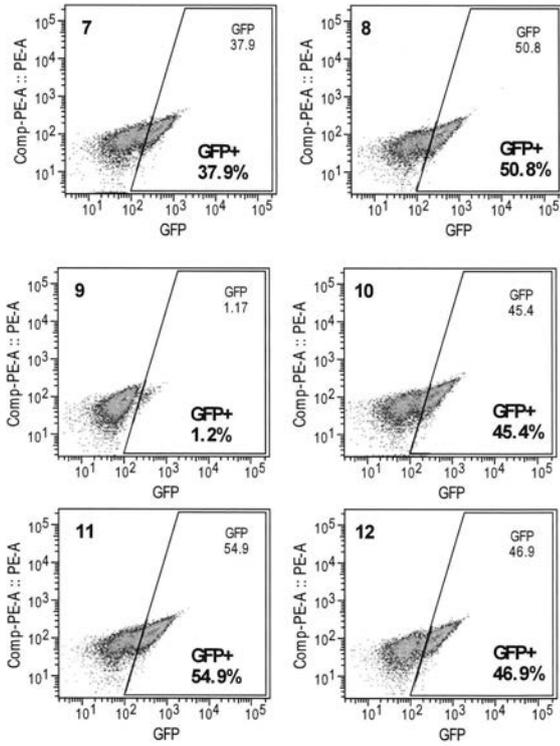


FIG. 18B (CONT.)

【 18 B - 3 】

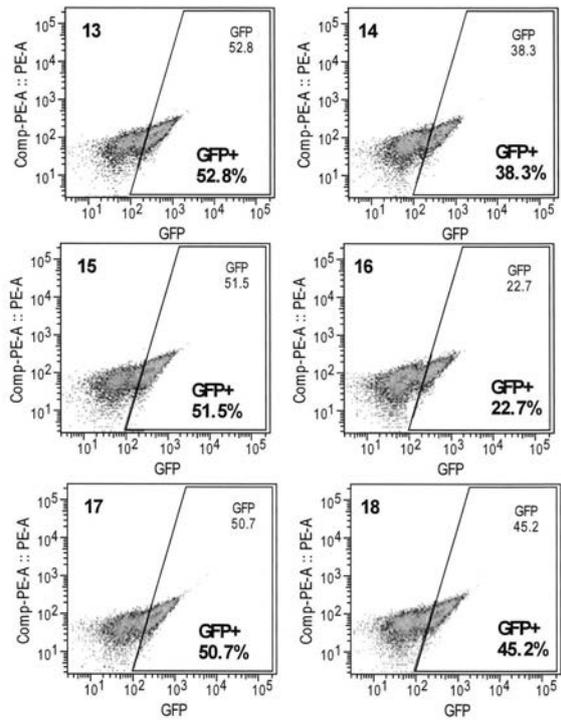


FIG. 18B (CONT.)

【 18 B - 4 】

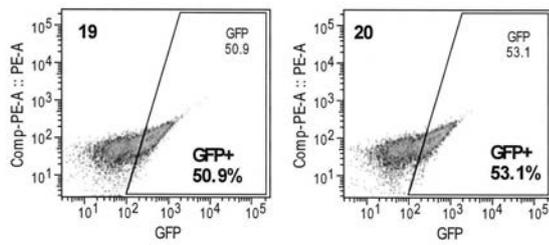
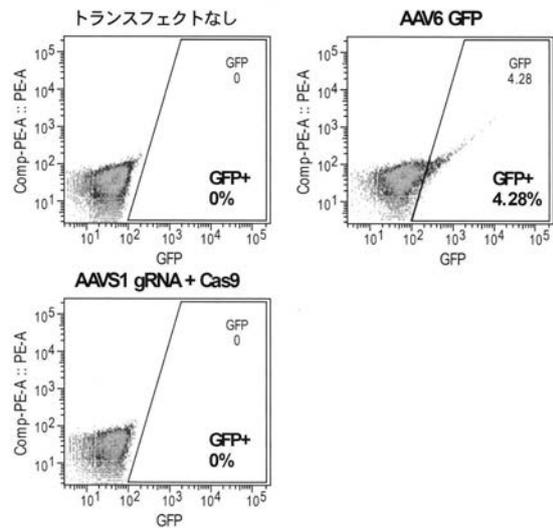


FIG. 18B (CONT.)

【 19 A - 1 】



【 19 A - 2 】

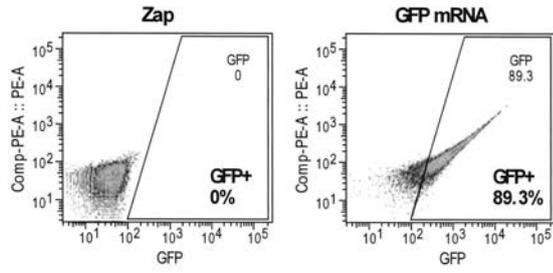


FIG. 19A (CONT.)

【 19 B - 1 】

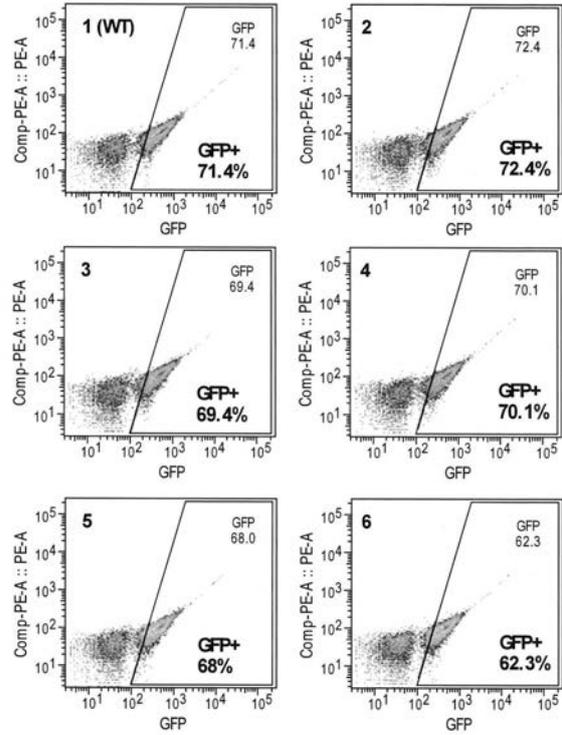


FIG. 19B

【 19 B - 2 】

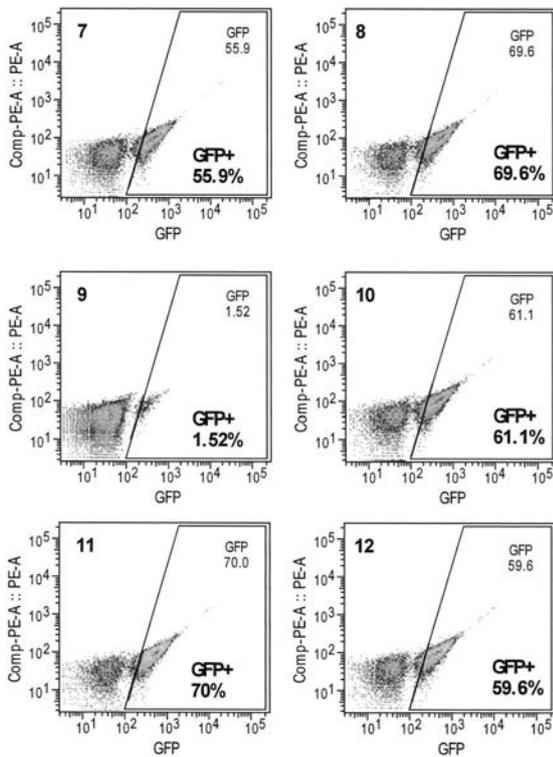


FIG. 19B (CONT.)

【 19 B - 3 】

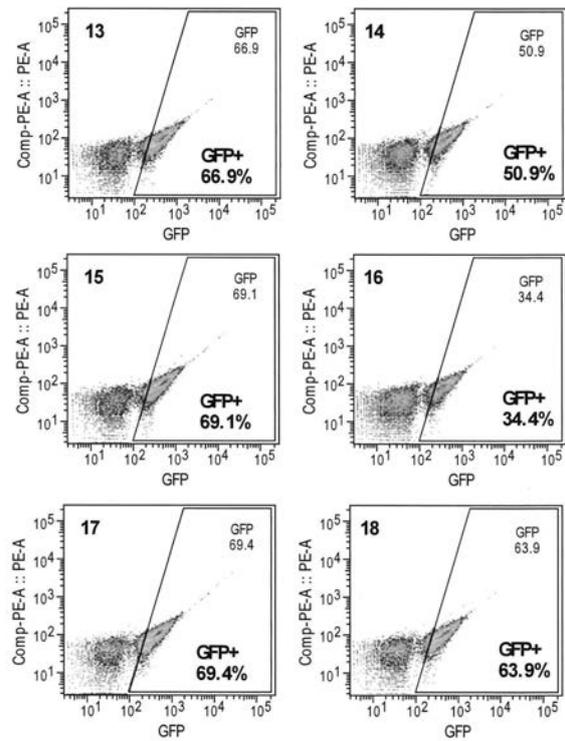


FIG. 19B (CONT.)

【 図 19 B - 4 】

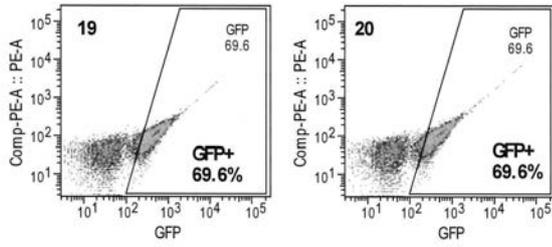
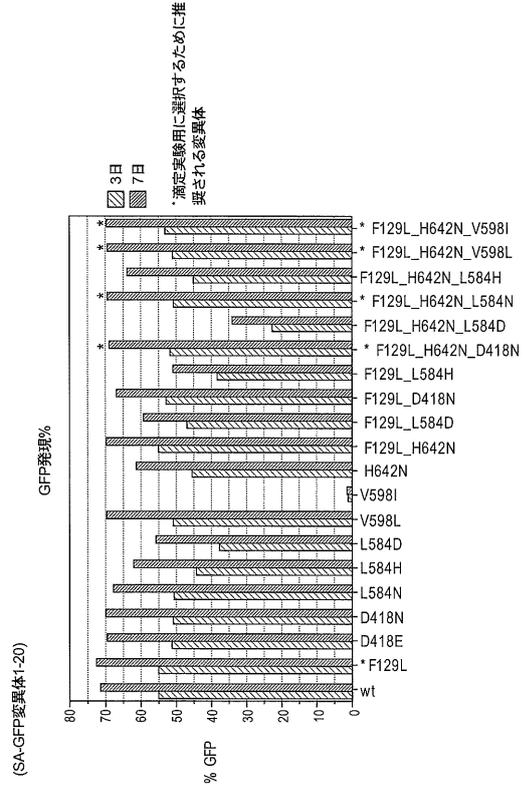
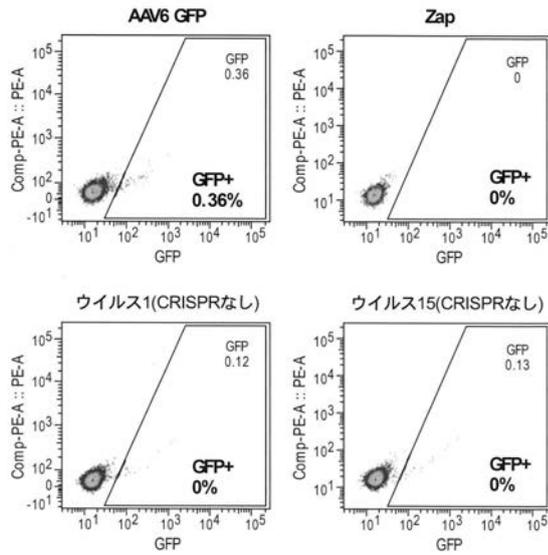


FIG. 19B (CONT.)

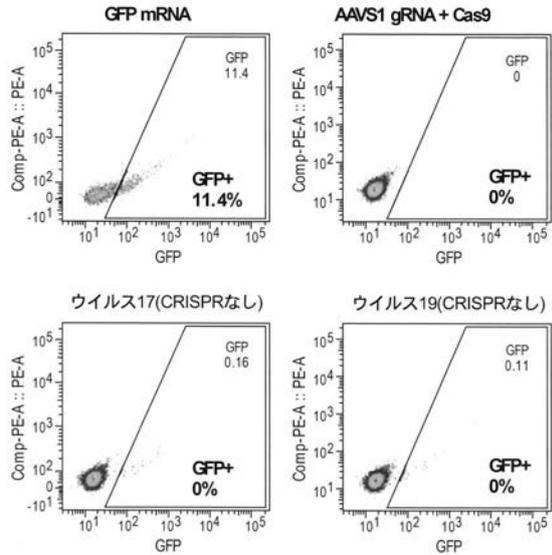
【 図 20 】



【 図 21 A - 1 】

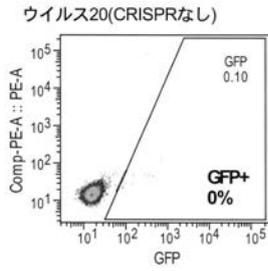


【 図 21 A - 2 】

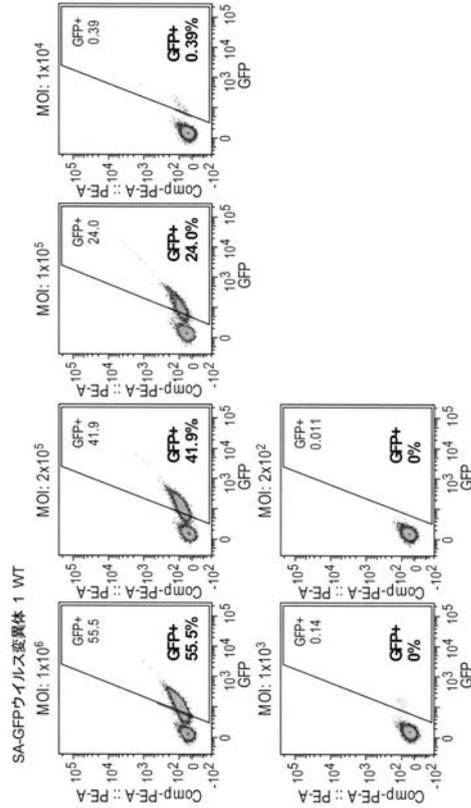


【図 2 1 A - 3】

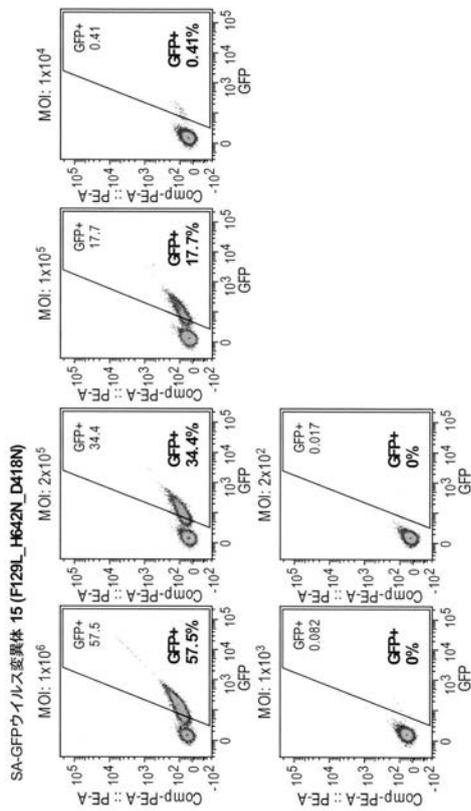
注釈: ウイルスのみの対照は、2μlの1×PBS(Cas9 mRNAまたはgRNAなし)でエレクトロポレートされた2×10<sup>5</sup>のCD3+T細胞であり、ウイルスは4時間後に1×10<sup>6</sup>GC/mlのMOIで添加される



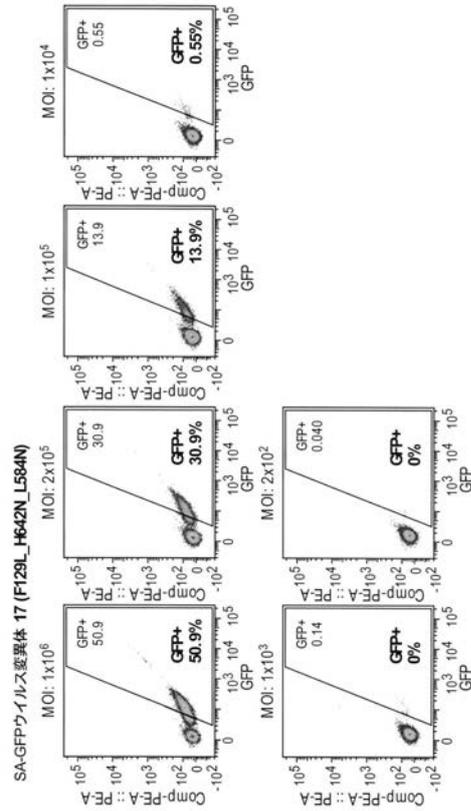
【図 2 1 B】



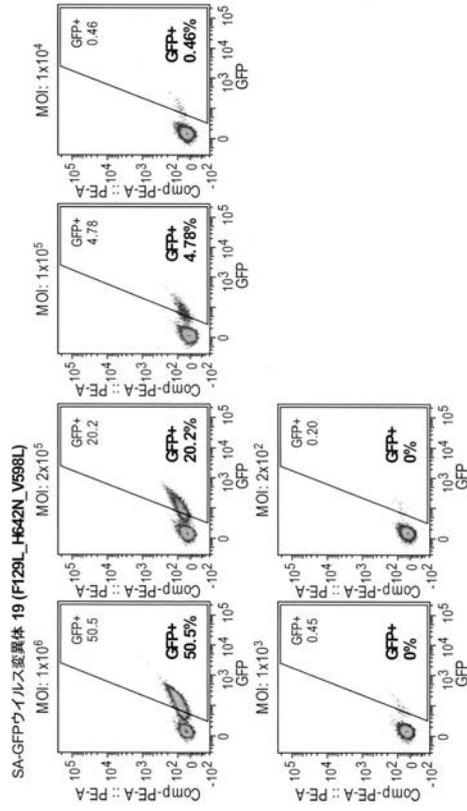
【図 2 1 C】



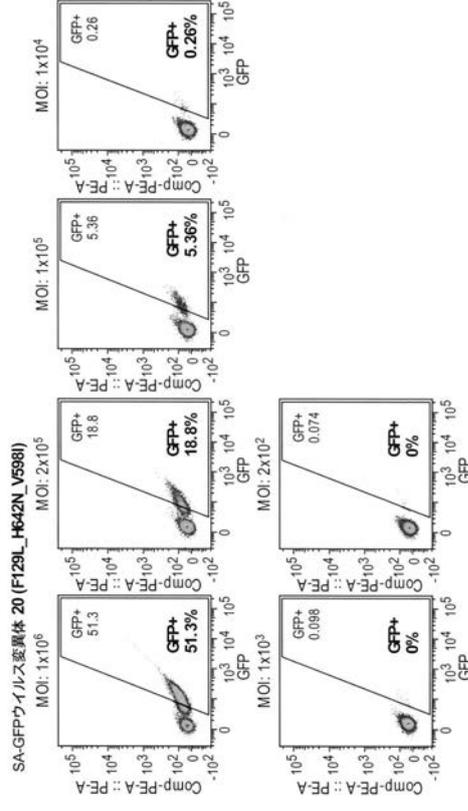
【図 2 1 D】



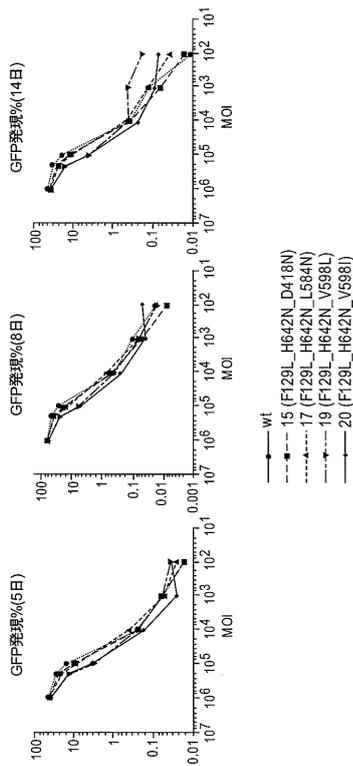
【 図 2 1 E 】



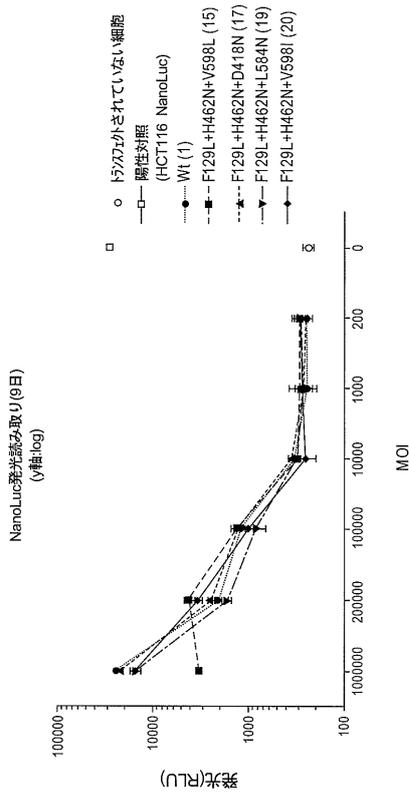
【 図 2 1 F 】



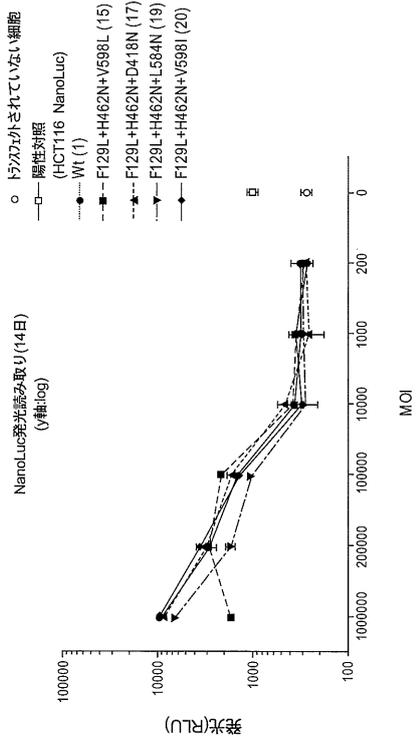
【 図 2 1 G 】



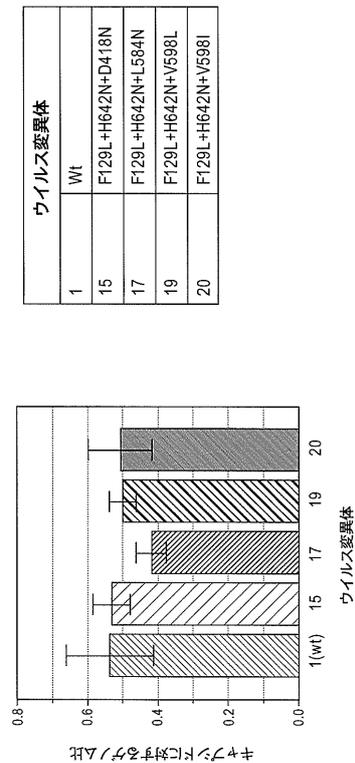
【 図 2 2 A 】



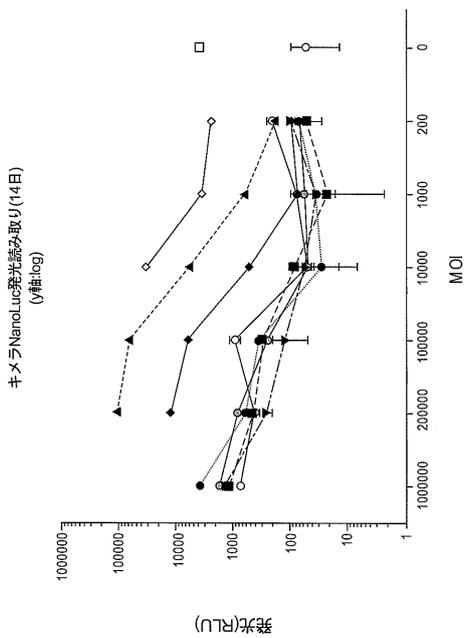
【 図 2 2 B 】



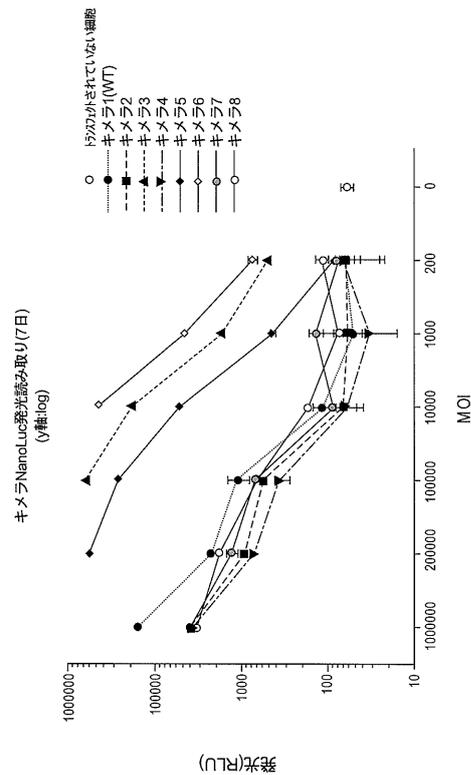
【 図 2 2 C 】



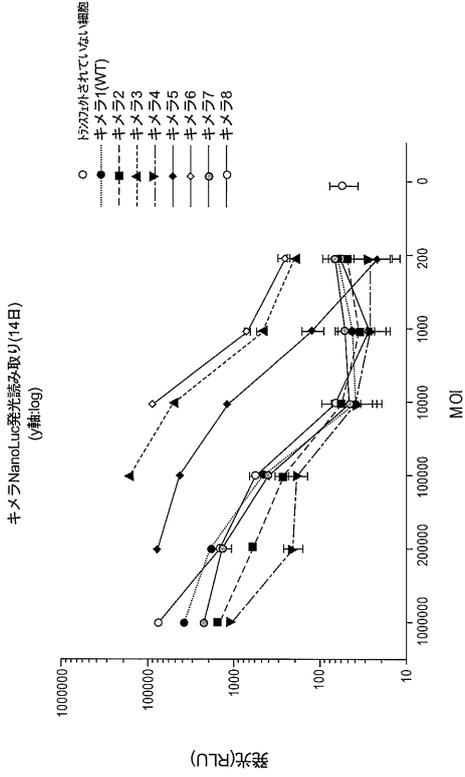
【 図 2 3 】



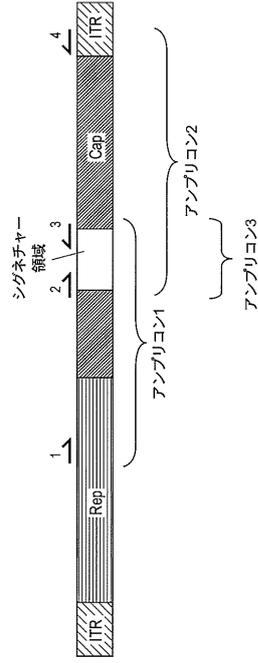
【 図 2 4 A 】



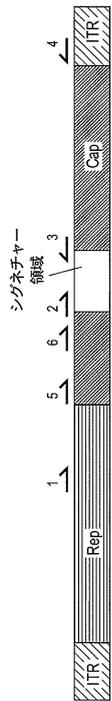
【図 2 4 B】



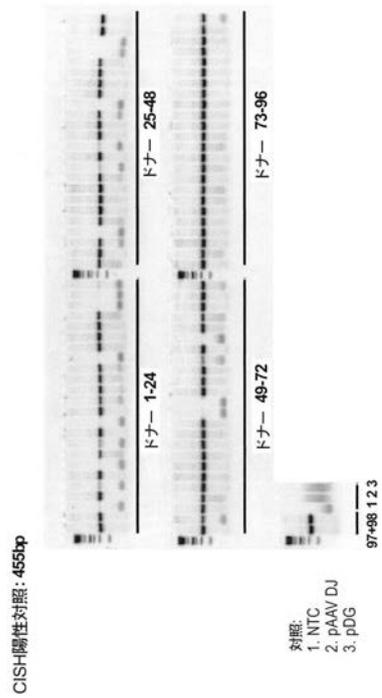
【図 2 5 A】



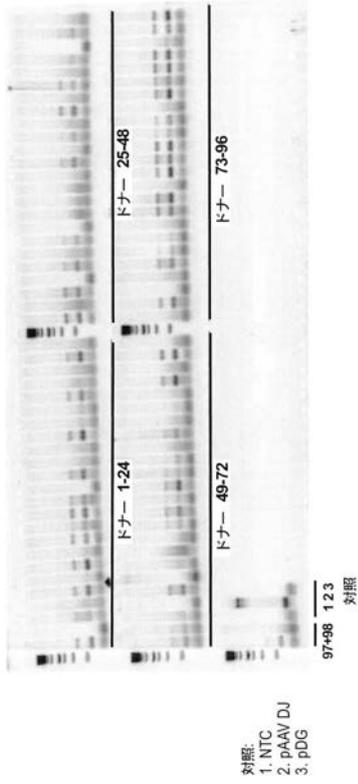
【図 2 5 B】



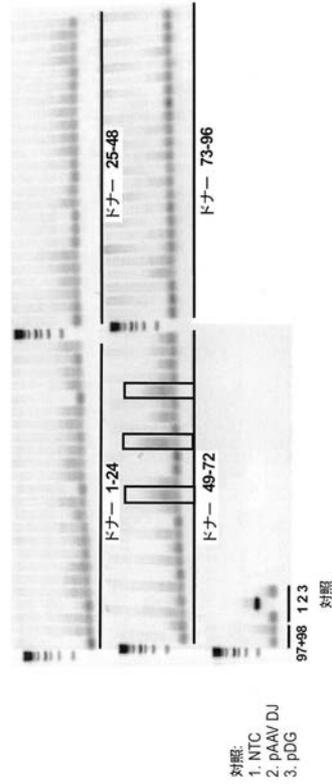
【図 2 6 A】



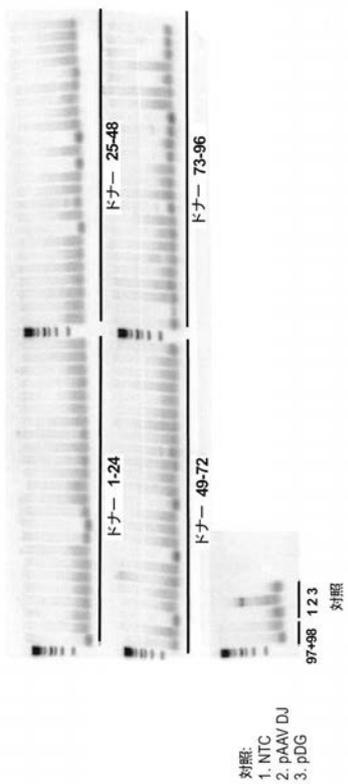
【 図 2 6 B 】



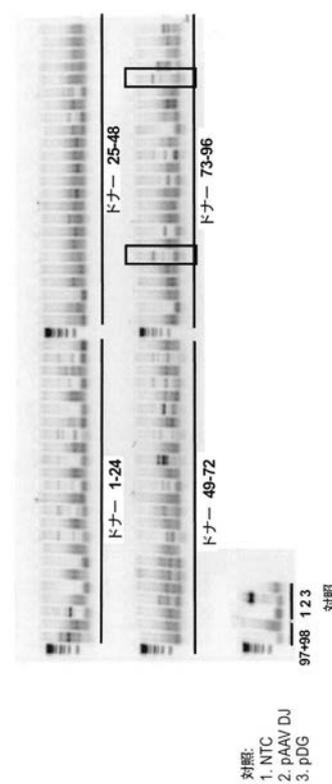
【 図 2 6 C 】



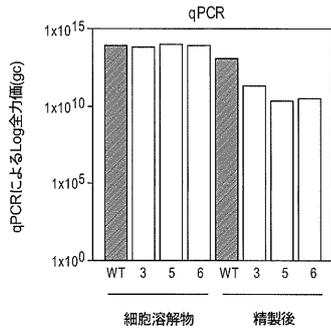
【 図 2 6 D 】



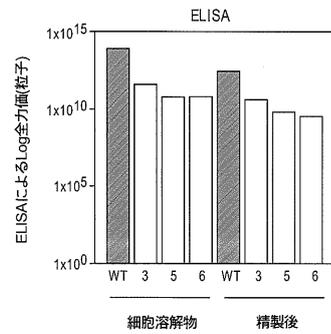
【 図 2 6 E 】



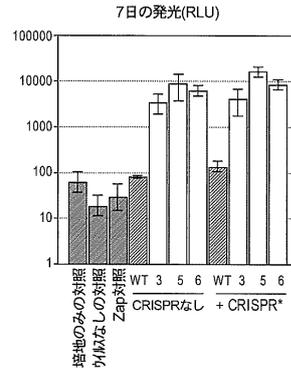
【 図 2 7 A 】



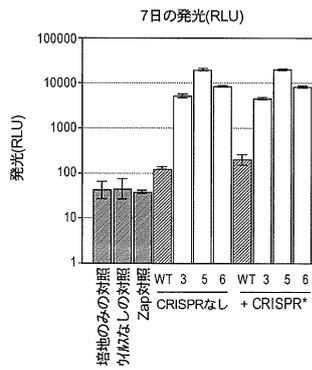
【 図 2 7 B 】



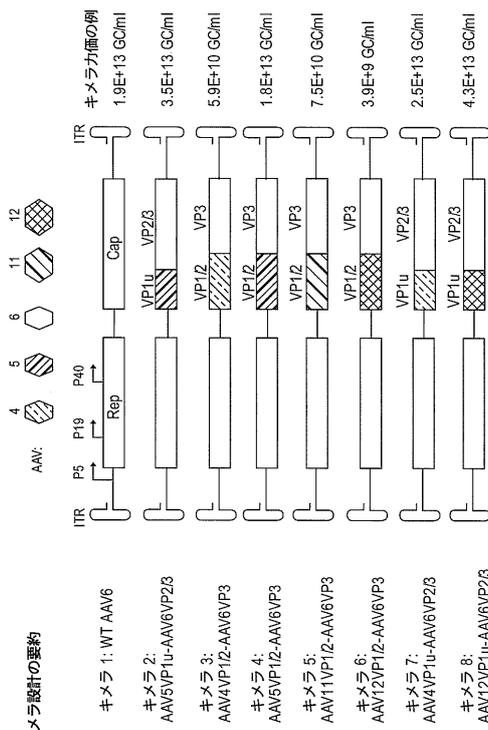
【 図 2 8 A 】



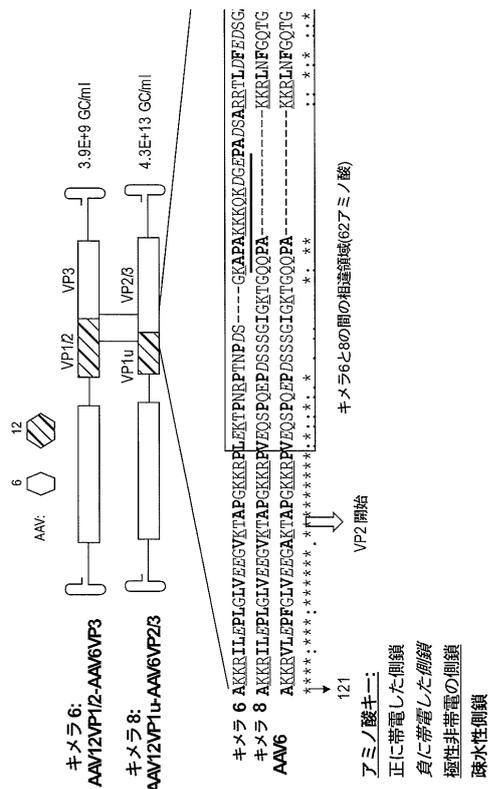
【 図 2 8 B 】



【 図 2 9 A 】



【 図 2 9 B - 1 】



【 図 2 9 B - 2 】

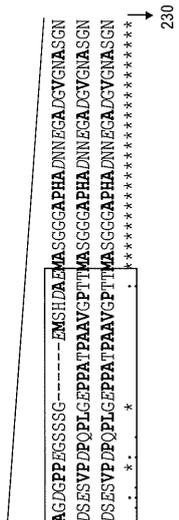
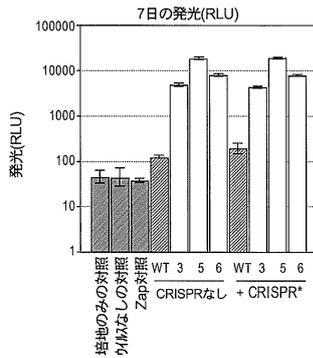
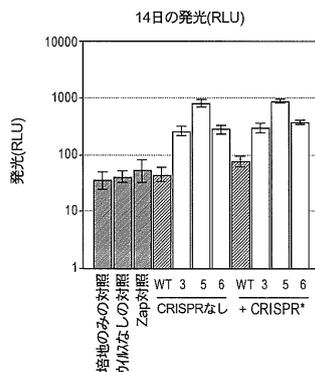


FIG. 29B (CONT.)

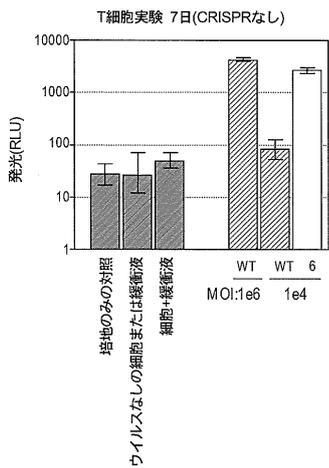
【 図 3 0 A 】



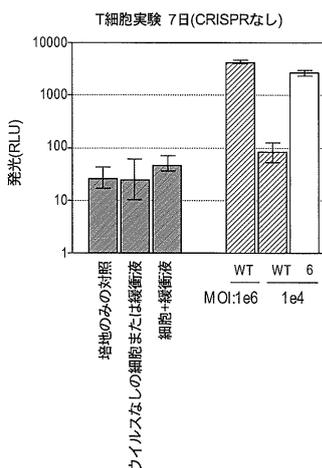
【 図 3 0 B 】



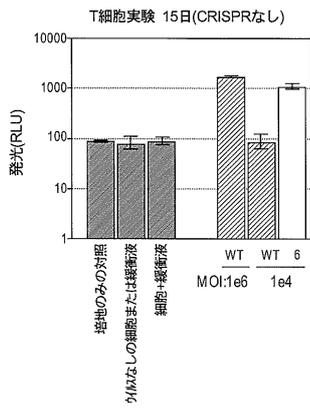
【 図 3 1 】



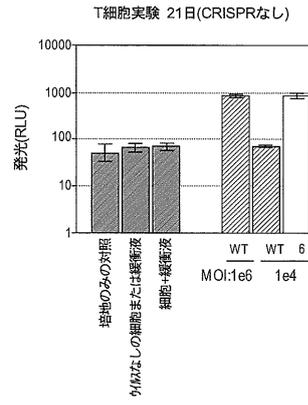
【 図 3 2 A 】



【 図 3 2 B 】



【 図 3 2 C 】



【 配 列 表 】

2020530307000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/40480

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC - A61K 35/17; C12N 5/0783, 15/63, 15/74, 15/113, 15/861, 15/864; C07H 21/04 (2018.01) CPC - A61K 9/5184, 35/17, 48/0008, 48/0091; C12N 5/0636, 15/113, 15/63, 15/74, 15/113, 15/861, 15/864; C07H 21/04; C07K 14/005, 14/075, 14/47, 14/4718, 14/7051		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	WO 2010/093784 A2 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 19 August 2010; page 5, lines 13-15; page 7, lines 21-24; page 11, line 29; page 12, lines 28-29; page 14, line 32; page 18, line 32; page 34, lines 25-26; page 35, lines 11-12, 22; page 36, line 1; page 37, lines 4-7; page 40, lines 8-10; page 51, lines, 35-36; page 52, lines 1-2; page 67, line 31; page 68, lines 9-10; Figure 9	1, 3/1, 95-97, 109, 111 ----- 4, 56/52-55, 98/95-97, 110, 112/109-111, 113/112/109-111, 114/113/112/109-111
X -- Y	(YAN, Z et al.) Distinct transduction difference between adeno-associated virus type 1 and type 6 vectors in human polarized airway epithelia. Gene Therapy. March 2013, Epub 14 June 2012, Vol. 20, No. 3; pages 328-337; page 328, 1st column, 1st paragraph; page 328, 2nd column, 2nd paragraph; page 329, 1st column, 3rd paragraph; page 329, 1st column, 4th paragraph; page 336, 2nd column, 1st paragraph; DOI: 10.1038/gt.2012.46	52-55, 167-176, 177/167-176, 202-207, 208/202-207, 209/208/202-207, 210/209/208/202-207, 230/202-207, and 231/230/202-207 ----- 4, 56/52-55, 98/95-97, 178/177/167-176
X	US 2017/0172936 A1 (NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY) 22 June 2017; paragraph [0148]	57-58
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"Y" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 22 October 2018 (22.10.2018)	Date of mailing of the international search report 11 JAN 2019	
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/40480

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	(UNIVERSITY OF IOWA CARVER COLLEGE OF MEDICINE) Storage and Transduction Instructions for AAV Vectors. Webpage [online]. 04 July 2017 [date verified by web.archive.org; retrieved on 12 September 2018]. Retrieved from the Internet: <URL: <a href="https://medicine.uiowa.edu/vectorcore/sites/medicine.uiowa.edu/vectorcore/files/wysiwyg_uploads/Storage%20and%20Transduction%20Instructions%20AAV.pdf">https://medicine.uiowa.edu/vectorcore/sites/medicine.uiowa.edu/vectorcore/files/wysiwyg_uploads/Storage%20and%20Transduction%20Instructions%20AAV.pdf</a> >; page 1, 5th paragraph	110, 112/110, 113/112/110, 114/113/112/110
Y	WO 2017/011519 A1 (SANGAMO BIOSCIENCES, INC.) 19 January 2017; paragraphs [0021], [0168], [0172]	112/109-111, 113/112/109-111, 114/113/112/109-111, 178/177/167-176
A	US 2009/0197338 A1 (VANDENBERGHE, L et al.) 06 August 2009; entire document	1, 3/1, 4, 52-55, 56/52-55, 57-58, 95-97, 98/95-97, 109-111, 112/109-111, 113/112/109-111, 114/113/112/109-111, 167-176, 178/177/167-176, 202-207, 208/202-207, 209/208/202-207, 210/209/208/202-207, 230/202-207, 231/230/202-207
A	US 2017/0028082 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 02 February 2017; entire document	1, 3/1, 4, 52-55, 56/52-55, 57-58, 95-97, 98/95-97, 109-111, 112/109-111, 113/112/109-111, 114/113/112/109-111, 167-176, 178/177/167-176, 202-207, 208/202-207, 209/208/202-207, 210/209/208/202-207, 230/202-207, 231/230/202-207
A	WO 2011/117258 A2 (ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE et al.) 29 September 2011; entire document	1, 3/1, 4, 52-55, 56/52-55, 57-58, 95-97, 98/95-97, 109-111, 112/109-111, 113/112/109-111, 114/113/112/109-111, 167-176, 178/177/167-176, 202-207, 208/202-207, 209/208/202-207, 210/209/208/202-207, 230/202-207, 231/230/202-207
P, X	(BENNETT, A et al) Thermal Stability as a Determinant of AAV Serotype Identity. Molecular Therapy: Methods & Clinical Development. 24 July 2017, Vol. 6; pages 171-182; DOI: 10.1016/j.omtm.2017.07.003	1, 3/1, 4, 52-55, 56/52-55, 57-58, 95-97, 98/95-97, 109-111, 112/109-111, 113/112/109-111, 114/113/112/109-111, 167-176, 178/177/167-176, 202-207, 208/202-207, 209/208/202-207, 210/209/208/202-207, 230/202-207, and 231/230/202-207

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/40480

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 5-51, 62-67, 70-94, 99-108, 115-166, 185-201, 229, 232  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1, 3-4 (each In-part), 52-58, 68, 69, 95-98, 109-114, 167-178, 202-210, 230, 231, SEQ ID NO: 1 (AAV capsid nucleic acid sequence encoding an F129L mutation) are directed toward adeno-associated virus (AAV) capsid sequences that comprises a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP3 region.

\*\*\*-Continued on Supplemental Page-\*\*\*

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1, 3/1, 4, 52-55, 56/52-55, 57-58, 95-97, 98/95-97, 109-111, 112/109-111, 113/112/109-111, 114/113/112/109-111, 167-178, 178/177/167-178, 202-207, 208/202-207, 209/208/202-207, 210/209/208/202-207, 230/202-207, 231/230/202-207; SEQ ID NO: 1 (AAV capsid nucleic acid sequence encoding an F129L mutation)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/40480

\*\*\*Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking.\*\*\*

The AAV capsid will be searched to the extent that it comprises nucleotide sequence encompassing SEQ ID NO: 1 (first exemplary AAV capsid nucleic acid sequence encoding an F129L mutation). Applicant is invited to elect additional AAV capsid nucleotide sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO., such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), to be searched. Additional AAV capsid nucleotide sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1, 3-4 (each in-part), 52-58 (each in-part), 95-98, 109-114, 167-176 (each in-part), 202-210 (each in-part), and 230-231 (each in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (AAV capsid nucleic acid sequence encoding an F129L mutation). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be SEQ ID NO: 2 (AAV capsid nucleic acid sequence encoding an D418E mutation)

Group II: Claims 2, 227, 228 are directed toward adeno-associated virus (AAV) capsid sequences that comprises a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP2 region.

Groups III+, Claims 59-61, 179-184, 211-226; AAV1 and AAV2 serotypes (AAV serotypes) are directed toward adeno-associated virus (AAV) capsid sequences from first and second AAV serotypes.

The AAV capsid can be searched to the extent that it comprises AAV1 and AAV2 serotypes (first exemplary AAV serotypes). Additional AAV serotype(s) can be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 59, 60 (in-part), and 179-184 encompass this first named invention and thus these claims can be searched without fee to the extent that they encompass AAV1 and AAV2 serotypes (AAV serotypes). Applicants must specify the claims that encompass any additionally serotype(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) can result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would comprise AAV3 and AAV4 serotypes.

The inventions listed as Groups I+, II, and III+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Groups I+ include an AAV capsid comprising mutations in the VP1 and VP3 regions, not present in any of Groups II and III+; the special technical features of Group II includes an AAV capsid comprising mutations in the VP1 and VP2 regions, not present in Groups I+ and III+; the special technical features of Groups III+ include an AAV capsid comprising capsid sequences from first and second AAV serotypes, not present in Groups I+ and II.

Groups I+, II, and III+ share the technical features including: an isolated non-naturally occurring nucleic acid comprising an adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence, wherein said isolated non-naturally occurring nucleic acid, upon contacting with a plurality of cells, has increased expression of a transgene post transfection or transduction in said plurality of cells as compared to a wild-type AAV nucleic acid in a comparable plurality of cells; a method of making engineered cells comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles thereby generating a plurality of engineered cells, wherein an expression of a transgene after transduction of said engineered cells is increased as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles; a method of making engineered cells comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles thereby generating a plurality of engineered cells, wherein an expression of a transgene after transduction of said plurality of cells is increased between about 10x to 300x at a mean of infectivity (MOI) of 200,000 GC/mL as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles at said MOI; a method of making engineered cells comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles encoding a transgene, wherein expression of said transgene in said plurality of cells is increased as compared to cells contacted with wild type AAV particles, wherein said wild type AAV also encode said transgene; and a cell comprising the isolated and purified adeno-associated virus capsid nucleic acid sequences.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2010/093784 A2 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) (hereinafter 'UNC').

UNC discloses an isolated non-naturally occurring nucleic acid comprising an adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence (nucleic acids encoding capsids that comprise modified AAV capsid proteins (an isolated non-naturally occurring nucleic acid comprising an adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence); abstract; page 7, lines 20-24; page 26, lines 8-9), wherein said isolated non-naturally occurring nucleic acid, upon contacting with a plurality of cells, has increased expression of a transgene post transfection or transduction in said plurality of cells (enhanced transduction of muscle tissue (wherein said isolated non-naturally occurring nucleic acid, upon contacting with a plurality of cells, has increased expression of a transgene post transfection or transduction in said plurality of cells); page 17, lines 4-14) as compared to a wild-type AAV nucleic acid in a comparable plurality of cells (as compared to AAV8 (wild-type nucleic acid) vectors; page 17, lines 4-22); a method of making engineered cells (abstract; page 3, lines 13-15) comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles thereby generating a plurality of engineered cells (comprising contacting a plurality of cells with an adeno-associated viral (AAV) particles comprising a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP3 region in a capsid protein thereby generating a plurality of engineered cells that express a transgene (effective amount); abstract; page 3, lines 13-15; page 7, lines 20-24), wherein an expression of a transgene after transduction of said engineered cells is increased as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles (wherein an expression of a transgene after transduction of said engineered cells is increased as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles or AAV particles comprising a single mutation in a VP region of said capsid protein; page 17, lines 4-25; page 65, lines 23-34); a method of making engineered cells (abstract; page 3, lines 13-15) comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles thereby generating a plurality of engineered cells (comprising contacting a plurality of cells with an adeno-associated viral (AAV) particles comprising a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP3 region in a capsid protein thereby generating a plurality of engineered cells that express a transgene (effective amount); abstract; page 3, lines 13-15; page 7, lines 20-24), wherein an expression of a transgene after transduction of said plurality of cells is increased between about 10x to 300x (wherein an expression of a transgene after transduction of ...cont. next page...

\*\*\*Continued Within the Next Supplemental Box.\*\*\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/40480

-\*\*\*-Continued from Previous Supplemental Box-\*\*\*-

...cont. from prev. page... said engineered cells is increased as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles (wherein an expression of a transgene after transduction of said engineered cells is increased as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles or AAV particles comprising a single mutation in a VP region of said capsid protein; page 17, lines 4-25; page 65, lines 23-34); a method of making engineered cells (abstract; page 3, lines 13-15) comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles thereby generating a plurality of engineered cells (comprising contacting a plurality of cells with an adeno-associated viral (AAV) particles comprising a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP3 region in a capsid protein thereby generating a plurality of engineered cells that express a transgene (effective amount); abstract; page 3, lines 13-15; page 7, lines 20-24), wherein an expression of a transgene after transduction of said plurality of cells is increased between about 10x to 300x (wherein an expression of a transgene after transduction of said plurality of cells is increased between about 10x to 300x; page 17, lines 19-22); a method of making engineered cells (abstract; page 3, lines 13-15) comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles encoding a transgene (comprising contacting a plurality of cells with an adeno-associated viral (AAV) particles comprising a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP3 region in a capsid protein thereby generating a plurality of engineered cells that express a transgene (effective amount); abstract; page 3, lines 13-15; page 7, lines 20-24), wherein expression of said transgene in said plurality of cells is increased as compared to cells contacted with wild type AAV particles (wherein an expression of a transgene after transduction of said engineered cells is increased as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles or AAV particles comprising a single mutation in a VP region of said capsid protein; page 17, lines 4-25; page 65, lines 23-34), wherein said wild type AAV also encode said transgene (wherein said wild type AAV particles comprising the single mutation in the VP region of said capsid protein also encode said transgene; page 17, lines 4-25; page 65, lines 23-24); and a cell comprising the isolated and purified adeno-associated virus capsid nucleic acid sequences (a cell comprising the isolated and purified adeno-associated virus capsid nucleic acid sequences; page 3, lines 13-15).

UNC does not disclose at a mean of infectivity (MOI) of 200,000 GC/mL as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles at said MOI.

However, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have implemented a mean of infectivity (MOI) of 200,000 GC/mL, as the previous disclosure of UNC provides guidance for in vitro transduction of the AAV capsid mutants to suit the needs of intracellular expression (page 3, lines 32-34), and such a MOI could have been readily achieved and implemented through routine experimentation and testing.

No technical features are shared between the AAV capsid nucleic acid sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the additional technical features including: UNC discloses an isolated non-naturally occurring nucleic acid comprising an adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence that comprises a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP3 region as compared to a wild-type AAV nucleotide sequence, wherein said isolated non-naturally occurring nucleic acid, upon contacting with a plurality of cells, has increased expression of a transgene post transfection or transduction in said plurality of cells as compared to a wild-type AAV nucleic acid; an isolated and purified adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence that encodes at least two mutations; an isolated and purified protein generated from the adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence; an isolated and purified adeno-associated virus (AAV) capsid nucleic acid sequence; a method of screening a plurality of engineered adeno associated viral (AAV) particles comprising: a. introducing at least one of a mutation to a genome of an adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence to form engineered AAV particles; b. introducing a plurality of said engineered AAV particles from a to a plurality of cellular genomes; and c. quantifying a level of expression of a transgene encoded by said plurality of AAV particles in said plurality of cellular genomes wherein said level of expression is compared to a second level of expression obtained from a second AAV particle introduced a different mutation or exogenous AAV genome from a; a method of making engineered cells comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles comprising a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP3 region in a capsid protein thereby generating a plurality of engineered cells, wherein an expression of a transgene after transduction of said engineered cells is increased as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles or AAV particles comprising a single mutation in a VP region of said capsid protein; a method of making engineered cells comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles comprising a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP3 region in a capsid protein thereby generating a plurality of engineered cells, wherein an expression of a transgene after transduction of said plurality of cells is increased between about 10x to 300x at a mean of infectivity (MOI) of 200,000 GC/mL as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles at said MOI; a method of making engineered cells comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles encoding a transgene and comprising a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP3 region in a capsid protein thereby generating a plurality of engineered cells, wherein expression of said transgene in said plurality of cells is increased as compared to cells contacted with wild type AAV particles or AAV particles comprising a single mutation in a VP region of said capsid protein, wherein said wild type AAV particles or AAV particles comprising the single mutation in the VP region of said capsid protein also encode said transgene; an isolated and purified adeno-associated virus (AAV) capsid nucleic acid sequence that encodes mutations in said AAV capsid nucleic acid sequence; and a cell comprising the isolated; purified adeno-associated virus capsid nucleic acid sequences; a plurality of adeno-associated viral (AAV) particles isolated from the engineered cell; and a container comprising the plurality of adeno-associated viral (AAV); these shared technical features are previously disclosed by UNC;

UNC discloses an isolated non-naturally occurring nucleic acid comprising an adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence (nucleic acids encoding capsids that comprise modified AAV capsid proteins (an isolated non-naturally occurring nucleic acid comprising an adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence); abstract; page 7, lines 20-24; page 28, lines 8-9) that comprises a first mutation in a VP1 region (VP1 capsid protein comprising a modification; abstract; page 7, lines 20-24) and a second mutation in a VP3 region as compared to a wild-type AAV nucleotide sequence (VP3 capsid protein comprising a modification compared to wild-type AAV nucleotide sequence; abstract; page 7, lines 20-24), wherein said isolated non-naturally occurring nucleic acid, upon contacting with a plurality of cells, has increased expression of a transgene post transfection or transduction in said plurality of cells (enhanced transduction of muscle tissue (wherein said isolated non-naturally occurring nucleic acid, upon contacting with a plurality of cells, has increased expression of a transgene post transfection or transduction in said plurality of cells); page 17, lines 4-14) as compared to a wild-type AAV nucleic acid (as compared to AAV8 (wild-type nucleic acid) vectors; page 17, lines 4-22); an isolated ...cont. next page...

-\*\*\*-Continued Within the Next Supplemental Box-\*\*\*-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/40480

-\*\*\*-Continued from Previous Supplemental Box-\*\*\*-

...cont. from prev. page... and purified adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence that encodes at least two mutations (an isolated and purified adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence that encodes at least two mutations; abstract; page 7, lines 20-24; page 28, lines 8-9); an isolated and purified protein generated from the adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence (an isolated and purified protein generated from the adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence; abstract; page 7, lines 20-24; page 12, lines 24-30; page 17, lines 21-25; page 28, lines 8-9); an isolated and purified adeno-associated virus (AAV) capsid nucleic acid sequence (an isolated and purified adeno-associated virus (AAV) capsid nucleic acid sequence; abstract; page 7, lines 20-24; page 12, lines 17-23; page 17, lines 21-25; page 28, lines 8-9); a method of screening a plurality of engineered adeno-associated viral (AAV) particles (a method of screening a plurality of engineered adeno-associated viral (AAV) particles; page 22, lines 1-4; page 48, lines 24-26) comprising: a. introducing at least one of a mutation to a genome of an adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence to form engineered AAV particles (comprising: a. introducing at least one of a mutation to a genome of an adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence to form engineered AAV particles; abstract; page 13, lines 34-35); b. introducing a plurality of said engineered AAV particles from a to a plurality of cellular genomes (b. introducing a plurality of said engineered AAV particles from a to a plurality of cellular genomes; page 48, lines 24-26); and c. quantifying a level of expression of a transgene encoded by said plurality of AAV particles in said plurality of cellular genomes wherein said level of expression is compared to a second level of expression obtained from a second AAV particle introduced a different mutation or exogenous AAV genome from a (c. quantifying a level of expression of a transgene encoded by said plurality of AAV particles in said plurality of cellular genomes wherein said level of expression is compared to a second level of expression obtained from a second AAV particle introduced a different mutation or exogenous AAV genome from a; page 17, lines 4-25; page 65, lines 23-34); a method of making engineered cells (abstract; page 3, lines 13-15) comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles comprising a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP3 region in a capsid protein thereby generating a plurality of engineered cells (comprising contacting a plurality of cells with an adeno-associated viral (AAV) particles comprising a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP3 region in a capsid protein thereby generating a plurality of engineered cells that express a transgene (effective amount); abstract; page 3, lines 13-15; page 7, lines 20-24), wherein an expression of a transgene after transduction of said engineered cells is increased as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles or AAV particles comprising a single mutation in a VP region of said capsid protein (wherein an expression of a transgene after transduction of said engineered cells is increased as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles or AAV particles comprising a single mutation in a VP region of said capsid protein; page 17, lines 4-25; page 65, lines 23-34); a method of making engineered cells (abstract; page 3, lines 13-15) comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles comprising a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP3 region in a capsid protein thereby generating a plurality of engineered cells (comprising contacting a plurality of cells with an adeno-associated viral (AAV) particles comprising a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP3 region in a capsid protein thereby generating a plurality of engineered cells that express a transgene (effective amount); abstract; page 3, lines 13-15; page 7, lines 20-24), wherein an expression of a transgene after transduction of said plurality of cells is increased between about 10x to 300x (wherein an expression of a transgene after transduction of said plurality of cells is increased between about 10x to 300x; page 17, lines 19-22); a method of making engineered cells (abstract; page 3, lines 13-15) comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles encoding a transgene and comprising a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP3 region in a capsid protein thereby generating a plurality of engineered cells (comprising contacting a plurality of cells with an adeno-associated viral (AAV) particles comprising a first mutation in a VP1 region and a second mutation in a VP3 region in a capsid protein thereby generating a plurality of engineered cells that express a transgene (effective amount); abstract; page 3, lines 13-15; page 7, lines 20-24), wherein expression of said transgene in said plurality of cells is increased as compared to cells contacted with wild type AAV particles or AAV particles comprising a single mutation in a VP region of said capsid protein (wherein an expression of a transgene after transduction of said engineered cells is increased as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles or AAV particles comprising a single mutation in a VP region of said capsid protein; page 17, lines 4-25; page 65, lines 23-34), wherein said wild type AAV particles or AAV particles comprising the single mutation in the VP region of said capsid protein also encode said transgene (wherein said wild type AAV particles or AAV particles comprising the single mutation in the VP region of said capsid protein also encode said transgene; page 17, lines 4-25; page 65, lines 23-34); an isolated and purified adeno-associated virus (AAV) capsid nucleic acid sequence that encodes mutations in said AAV capsid nucleic acid sequence (an isolated and purified adeno-associated virus (AAV) capsid nucleic acid sequence that encodes mutations in said AAV capsid nucleic acid sequence; abstract; page 7, lines 20-24; page 28, lines 8-9); a cell comprising the isolated and purified adeno-associated virus capsid nucleic acid sequences (a cell comprising the isolated and purified adeno-associated virus capsid nucleic acid sequences; page 3, lines 13-15); a plurality of adeno-associated viral (AAV) particles isolated from the engineered cell (a plurality of adeno-associated viral (AAV) particles isolated from the engineered cell; page 12, lines 31-35; page 37, lines 2-3; 15-17); and a container comprising the plurality of adeno-associated viral (AAV) (mice were injected (container) with plurality of adeno-associated viral (AAV); page 4, lines 9-20).

UNC does not disclose a mean of infectivity (MOI) of 200,000 GC/mL as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles or AAV particles comprising a single mutation in a VP region of said capsid protein at said MOI.

However, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have implemented a mean of infectivity (MOI) of 200,000 GC/mL, as the previous disclosure of UNC provides guidance for in vitro transduction of the AAV capsid mutants to suit the needs of intracellular expression (page 3, lines 32-34), and such a MOI could have been readily achieved and implemented through routine experimentation and testing.

No technical features are shared between the AAV serotypes of Groups III+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups III+ were considered to share the additional technical features including: an isolated non-naturally occurring nucleic acid that comprises an adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence that comprises VP1, VP2, and VP3 sequences, wherein two of said VP1, VP2, and VP3 sequences are from a first AAV serotype, and one of said VP1, VP2, and VP3 sequences is from a second AAV serotype, wherein said isolated non-naturally occurring nucleic acid upon introduction into a plurality of cells confers an increased expression of a transgene after transfection or transduction as compared to a wild-type AAV nucleic acid; a method of making engineered cells comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles comprising a VP1 sequence, a VP2 sequence, and a VP3 sequence, wherein two of said VP1 sequence, VP2 sequence, and VP3 sequence are from a first AAV serotype, and one of said VP1 sequence, VP2 sequence, and VP3 sequence ...cont. next page...

-\*\*\*-Continued Within the Next Supplemental Box-\*\*\*-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/40480

-\*\*\*-Continued from Previous Supplemental Box-\*\*\*-

...cont. from prev. page... are from a second AAV serotype, thereby generating a plurality of engineered cells, wherein expression of a transgene after transduction or transfection of said plurality of cells is increased between about 10x to 300x at a mean of infectivity (MOI) of 200,000 GC/mL as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles or AAV particles comprising wild-type VP 1, VP2, or VP3 sequences, at said MOI; a method of making engineered cells comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles encoding a transgene and comprising a VP1 sequence, a VP2 sequence, and a VP3 sequence, wherein two of said VP1 sequence, VP2 sequence, and VP3 sequence are from a first AAV serotype, and one of said VP1 sequence, VP2 sequence, and VP3 sequence are from a second AAV serotype, thereby generating a plurality of engineered cells, wherein expression of said transgene in said plurality of cells is increased as compared to cells contacted with wild type AAV particles or AAV particles comprising a wild-type VP sequence, wherein said wild type AAV particles or AAV particles comprising the wild-type VP sequence of said capsid protein also encode said trans gene; an isolated and purified adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence that comprises AAV4 VP1 and VP2 nucleotide sequences and an AAV6 VP3 nucleotide sequence; an engineered cell generated by transfecting a cell with the isolated and purified AAV nucleotide sequence; a plurality of adeno-associated viral (AAV) particles isolated from the engineered cell; a container comprising the plurality of adeno-associated viral (AAV); these shared technical features are previously disclosed by UNC.

UNC discloses an isolated non-naturally occurring nucleic acid that comprises an adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence that comprises VP1, VP2, and VP3 sequences (An isolated non-naturally occurring nucleic acid that comprises an adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence that comprises VP1, VP2, and VP3 sequences; abstract; page 7, lines 20-24), wherein two of said VP1, VP2, and VP3 sequences are from a first AAV serotype (modified VP1 + VP2 wherein one AAV can be substituted into the native AAV2 capsid protein (wherein two of said VP1, VP2, and VP3 sequences are from a first AAV serotype); page 7, lines 20-24; page 17, lines 30-34), and one of said VP1, VP2, and VP3 sequences is from a second AAV serotype (modified VP1 + VP2 wherein one AAV can be substituted into the native AAV2 capsid protein (one of said VP1, VP2, and VP3 sequences is from a second AAV serotype); page 7, lines 20-24; page 17, lines 30-34), wherein said isolated non-naturally occurring nucleic acid upon introduction into a plurality of cells confers an increased expression of a transgene after transfection or transduction as compared to a wild-type AAV nucleic acid (wherein said isolated non-naturally occurring nucleic acid upon introduction into a plurality of cells confers an increased expression of a transgene after transfection or transduction as compared to a wild-type AAV nucleic acid; page 17, lines 4-25; page 65, lines 23-34); a method of making engineered cells (abstract; page 3, lines 13-15) comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles comprising a VP1 sequence, a VP2 sequence, and a VP3 sequence (comprising contacting a plurality of cells with an adeno-associated viral (AAV) particles comprising a VP1 sequence, a VP2 sequence, and a VP3 sequence thereby generating a plurality of engineered cells that express a transgene (effective amount); abstract; page 3, lines 13-15; page 7, lines 20-24), wherein two of said VP1 sequence, VP2 sequence, and VP3 sequence are from a first AAV serotype (modified VP1 + VP2 wherein one AAV can be substituted into the native AAV2 capsid protein (wherein two of said VP1, VP2, and VP3 sequences are from a first AAV serotype); page 7, lines 20-24; page 17, lines 30-34), and one of said VP1 sequence, VP2 sequence, and VP3 sequence are from a second AAV serotype (modified VP1 + VP2 wherein one AAV can be substituted into the native AAV2 capsid protein (one of said VP1, VP2, and VP3 sequences is from a second AAV serotype); page 7, lines 20-24; page 17, lines 30-34), thereby generating a plurality of engineered cells (abstract; page 3, lines 13-15; page 7, lines 20-24), wherein expression of a transgene after transduction or transfection of said plurality of cells is increased between about 10x to 300x (wherein an expression of a transgene after transduction of said plurality of cells is increased between about 10x to 300x; page 17, lines 19-22); a method of making engineered cells (abstract; page 3, lines 13-15) comprising contacting a plurality of cells with an effective amount of adeno-associated viral (AAV) particles encoding a transgene and comprising a VP1 sequence, a VP2 sequence, and a VP3 sequence (comprising contacting a plurality of cells with an adeno-associated viral (AAV) particles comprising a VP1 sequence, a VP2 sequence, and a VP3 sequence thereby generating a plurality of engineered cells that express a transgene (effective amount); abstract; page 3, lines 13-15; page 7, lines 20-24), wherein two of said VP1 sequence, VP2 sequence, and VP3 sequence are from a first AAV serotype (modified VP1 + VP2 wherein one AAV can be substituted into the native AAV2 capsid protein (wherein two of said VP1, VP2, and VP3 sequences are from a first AAV serotype); page 7, lines 20-24; page 17, lines 30-34), and one of said VP1 sequence, VP2 sequence, and VP3 sequence are from a second AAV serotype (modified VP1 + VP2 wherein one AAV can be substituted into the native AAV2 capsid protein (one of said VP1, VP2, and VP3 sequences is from a second AAV serotype); page 7, lines 20-24; page 17, lines 30-34), thereby generating a plurality of engineered cells (abstract; page 3, lines 13-15; page 7, lines 20-24), wherein expression of said transgene in said plurality of cells is increased as compared to cells contacted with wild type AAV particles or AAV particles comprising a wild-type VP sequence (wherein expression of said transgene in said plurality of cells is increased as compared to cells contacted with wild type AAV particles or AAV particles comprising a wild-type VP sequence; page 17, lines 4-25; page 65, lines 23-34), wherein said wild type AAV particles or AAV particles comprising the wild-type VP sequence of said capsid protein also encode said transgene (wherein said wild type AAV particles or AAV particles comprising the wild-type VP sequence of said capsid protein also encode said transgene; page 17, lines 4-25; page 65, lines 23-34); an isolated and purified adeno-associated virus (AAV) capsid nucleotide sequence (an isolated and purified adeno-associated virus (AAV) capsid nucleic acid sequence; abstract; page 7, lines 20-24; page 28, lines 8-9); an engineered cell generated by transfecting a cell with the isolated and purified AAV nucleotide sequence (an engineered cell generated by transferring a nucleic acid to a cell (transfecting a cell with the isolated and purified AAV nucleotide sequence); page 52, lines 9-16); a plurality of adeno-associated viral (AAV) particles isolated from the engineered cell (a plurality of adeno-associated viral (AAV) particles isolated from the engineered cell; page 12, lines 31-35; page 37, lines 2-3; 15-17); and a container comprising the plurality of adeno-associated viral (AAV) (mice were injected (container) with plurality of adeno-associated viral (AAV); page 4, lines 9-20).

UNC does not disclose at a mean of infectivity (MOI) of 200,000 GC/mL as compared to a comparable plurality of cells contacted with wild type AAV particles or AAV particles comprising wild-type VP 1, VP2, or VP3 sequences, at said MOI.

However, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art, at the time of the invention, to have implemented a mean of infectivity (MOI) of 200,000 GC/mL, as the previous disclosure of UNC provides guidance for in vitro transduction of the AAV capsid mutants to suit the needs of intracellular expression (page 3, lines 32-34), and such a MOI could have been readily achieved and implemented through routine experimentation and testing.

Since none of the special technical features of the Groups I+, II, and III+ inventions are found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the UNC reference, unity of invention is lacking.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	1 1 0
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	

(31)優先権主張番号 62/665,256

(32)優先日 平成30年5月1日(2018.5.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

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

(74)代理人 100122644

弁理士 寺地 拓己

(72)発明者 ヘンリー, トーマス

イギリス国ケンブリッジシャー シービー7・5ズィーイー, ソハム, サイプリアン・ラスト・ウェイ 75

(72)発明者 アグバンジ - マッケナ, メイビス

アメリカ合衆国フロリダ州32607, ゲインズビル, サウスウエスト・セブンティーンズ・プレイス 10202

(72)発明者 ブルクシュトゥマ, ティルマン

オーストリア国 1060 ヴィエナ, コルネリウスガッセ 3/26

(72)発明者 バイニー, リディア

イギリス国ケンブリッジシャー シービー22・3イーティー, パンピスフォード, チャーチ・レーン 5

(72)発明者 ショウドリー, モダシル

アメリカ合衆国ニューヨーク州10019, ニューヨーク, セントラル・パーク・サウス 106, ナンバー29エイ

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA93X AA94X AA95X AB01 AC14 AC20 BA02 BD39 CA24

CA44

4C084 AA13 NA14 ZB091 ZB092 ZB211 ZB212 ZB261 ZB262

4C086 AA01 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB09 ZB21 ZB26

4C087 AA01 AA03 BB37 BB65 BC83 NA14 ZB09 ZB21 ZB26

4H045 AA10 CA01 EA20 FA74