

(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2019-526270

(P2019-526270A)

(43) 公表日 令和1年9月19日 (2019.9.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/09 1 0 0	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 4
<b>C 1 2 N 15/867 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/867 Z	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 35/12 (2015.01)</b>	A 6 1 K 35/12	4 C 0 8 7
<b>A 6 1 K 38/43 (2006.01)</b>	A 6 1 K 38/43	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 75 頁) 最終頁に続く		

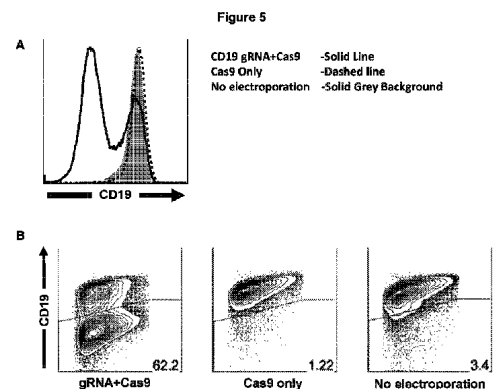
(21) 出願番号	特願2019-513999 (P2019-513999)	(71) 出願人	305023366
(86) (22) 出願日	平成29年9月12日 (2017.9.12)		リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	令和1年5月9日 (2019.5.9)		オブ ミネソタ
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/051182		アメリカ合衆国 ミネソタ 55455-
(87) 国際公開番号	W02018/049401		2020 ミネアポリス, オーク スト
(87) 国際公開日	平成30年3月15日 (2018.3.15)		リートーエス・イー 200, マクナマ
(31) 優先権主張番号	62/393, 512		ラ アラムナイ センター 600
(32) 優先日	平成28年9月12日 (2016.9.12)	(74) 代理人	100099759
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 青木 篤
		(74) 代理人	100123582
			弁理士 三橋 真二
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74) 代理人	100141977
			弁理士 中島 勝
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ゲノム編集初代 B 細胞ならびに作製方法および使用方法

## (57) 【要約】

ゲノム編集初代 B 細胞、ゲノム編集初代 B 細胞の作製方法、初代 B 細胞に導入することができる治療用カセットならびにゲノム編集初代 B 細胞および治療用カセットの使用方法。

【選択図】 図 5



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ゲノム編集初代 B 細胞。

**【請求項 2】**

C D 1 9、I g M、I g D、C D 2 7 <sup>+</sup>、C D 2 1 <sup>+</sup> および C X C R 5 <sup>+</sup> のうちの少なくとも 1 つのものを発現する細胞を含む、請求項 1 に記載のゲノム編集初代 B 細胞。

**【請求項 3】**

末梢血、臍帯細胞、腹水または固形腫瘍から単離された細胞を含む、請求項 1 または 2 のいずれかに記載のゲノム編集初代 B 細胞。

**【請求項 4】**

非クローン性細胞を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のゲノム編集初代 B 細胞。

10

**【請求項 5】**

増殖性細胞を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のゲノム編集初代 B 細胞。

**【請求項 6】**

哺乳動物細胞である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のゲノム編集初代 B 細胞。

**【請求項 7】**

内在遺伝子が欠失している、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のゲノム編集初代 B 細胞。

**【請求項 8】**

内在遺伝子が点変異を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のゲノム編集初代 B 細胞。

20

**【請求項 9】**

外来遺伝子を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のゲノム編集初代 B 細胞。

**【請求項 10】**

前記内在遺伝子および前記外来遺伝子のうちの少なくとも一方が、B 細胞受容体 ( B C R ) の少なくとも一部分をコードする核酸を含む、請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のゲノム編集初代 B 細胞。

**【請求項 11】**

非ゲノム編集初代 B 細胞に比して内在性 B 細胞受容体 ( B C R ) の発現の減少を示す、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のゲノム編集初代 B 細胞。

30

**【請求項 12】**

C D 1 9 の発現または活性を変化させる修飾を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のゲノム編集初代 B 細胞。

**【請求項 13】**

B 細胞受容体 ( B C R ) をコードする核酸と過剰発現させる遺伝子をコードする核酸とを含む治療用カセットを含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のゲノム編集初代 B 細胞。

**【請求項 14】**

対象に請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のゲノム編集初代 B 細胞を含む組成物を投与することを含む、方法。

40

**【請求項 15】**

対象の疾患を治療または予防することを含み、前記疾患が、酵素異常症、癌、前癌状態、病原体による感染症またはウイルス感染症を含む、請求項 14 に記載の方法。

**【請求項 16】**

B 細胞受容体 ( B C R ) をコードする核酸と、過剰発現させる遺伝子をコードする核酸とを含む、治療用カセット。

**【請求項 17】**

前記過剰発現させる遺伝子が、酵素をコードする核酸を含む、請求項 16 に記載の治療用カセット。

50

## 【請求項 18】

前記酵素が、酵素異常症を有する対象に欠如している酵素を含む、請求項 17 に記載の治療用カセット。

## 【請求項 19】

前記 B C R をコードする核酸と前記過剰発現させる遺伝子をコードする核酸が、転写的に結合しているか、翻訳的に結合しているか、またはその両方である、請求項 16 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の治療用カセット。

## 【請求項 20】

前記 B C R をコードする核酸および前記過剰発現させる遺伝子をコードする核酸の転写を駆動するプロモーターを含む、請求項 16 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の治療用カセット。

10

## 【請求項 21】

請求項 16 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の治療用カセットを含む、ベクター。

## 【請求項 22】

レンチウイルスベクターを含む、請求項 20 に記載のベクター。

## 【請求項 23】

B a E V - 偽型レンチウイルスベクター、V S V g - 偽型レンチウイルスベクター、F A M 1 レンチウイルスベクターおよび F A M 2 レンチウイルスベクターのうちの少なくとも 1 つのものを含む、請求項 21 または 22 のいずれかに記載のベクター。

## 【請求項 24】

請求項 16 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の治療用カセットを含む、細胞。

20

## 【請求項 25】

初代 B 細胞を含む、請求項 24 に記載の細胞。

## 【請求項 26】

対象に請求項 24 または 25 のいずれかに記載の細胞を投与することを含む、方法。

## 【請求項 27】

前記対象に抗原を投与することをさらに含み、前記治療用カセットの前記 B C R が前記抗原に特異的なものである、請求項 26 に記載の方法。

## 【請求項 28】

初代 B 細胞のゲノムを編集することを含む方法であって、前記初代 B 細胞が、C D 19、I g M、I g D、C D 27<sup>+</sup>、C D 21<sup>+</sup> および C X C R 5<sup>+</sup> のうちの少なくとも 1 つのものを発現する細胞を含む、方法。

30

## 【請求項 29】

前記初代 B 細胞に外来性のタンパク質または核酸を導入することを含む、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記細胞のエレクトロポレーションを含む、請求項 28 または 29 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 31】

標的化ヌクレアーゼまたは標的化ヌクレアーゼをコードする核酸を導入することを含む、請求項 28 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

## 【請求項 32】

前記初代 B 細胞を活性化、刺激および増殖の段階のうち少なくとも 1 つのものに供することをさらに含む、請求項 28 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 33】

前記初代 B 細胞を活性化、刺激および増殖の段階のうち少なくとも 1 つのものに供すること、

前記初代 B 細胞に外来性タンパク質または外来性核酸を導入するための前記細胞のエレクトロポレーションと

を含む、請求項 32 に記載の方法。

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

( 継続出願データ )

本願は、2016年9月12日に出願された米国仮特許出願第62/393,512号の利益を主張するものであり、上記出願は参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

( 配列表 )

本願には、大きさが90.3キロバイトであり2017年9月12日に作成された「110-05460201\_\_ST25.txt」と題するASCIIテキストファイルとしてEFS-Webから電子形式で米国特許商標庁に提出された配列表が含まれる。配列表を電子形式で出願することによって、電子形式で提出された配列表は、37 CFR 1.821(c)により義務付けられている紙面コピーおよび1.821(e)により義務付けられているCRFの両方の役割を果たす。配列表の含まれている情報は参照により本明細書に組み込まれる。

10

## 【背景技術】

## 【0003】

Bリンパ球は、特異的抗原性エピトープを認識するクローン的に多様な細胞表面免疫グロブリン(Ig)受容体を発現する細胞集団であるとされる適応免疫系の構成要素のひとつである。B細胞成熟の過程は、大部分がヒトとマウスとの間で保存されている。正常なB細胞発生に調節異常があると、先天性免疫不全、自己免疫疾患、さらには白血病またはリンパ腫を引き起こすことがある。B細胞は、最初に抗原に曝露してから数十年にわたって持続する防御的抗体を産生することができる。免疫感作後、長期生存形質細胞が生じることによって、抗原反応性Igが何年もの間にわたって検出される。この長期生存形質細胞は、増殖しない長期生存抗体産生細胞、または抗体成熟の段階で胚中心から生じる細胞から生じ得る。このような形質細胞は何年もの間生存し、さらには数十年もの間生存する可能性があると考えられている。

20

## 【発明の概要】

## 【0004】

本開示には、ゲノム編集初代B細胞、ゲノム編集初代B細胞の作製方法、初代B細胞に導入することができる治療用カセットならびにゲノム編集初代B細胞および治療用カセットの使用方法が記載される。

30

## 【0005】

一態様では、本開示にはゲノム編集初代B細胞が記載される。いくつかの実施形態では、B細胞は、CD19、IgM、IgD、CD27、CD21およびCXCR5のうち少なくとも1つのものを発現する細胞を含む。

## 【0006】

いくつかの実施形態では、B細胞は、末梢血、臍帯細胞、腹水または固形腫瘍から単離される細胞を含む。いくつかの実施形態では、B細胞は、非クローン性細胞、増殖性細胞、哺乳動物細胞および/またはヒト細胞を含む。

40

## 【0007】

ゲノム編集初代B細胞のいくつかの実施形態では、内在遺伝子が欠失しており、ある遺伝子が点変異を含み、かつ/または細胞が外来遺伝子を含む。遺伝子は、B細胞受容体(BCR)の少なくとも一部分をコードする核酸を含み得る。

## 【0008】

いくつかの実施形態では、B細胞は、非ゲノム編集初代B細胞に比して内在性B細胞受容体(BCR)の発現の減少を示す。

## 【0009】

いくつかの実施形態では、B細胞は、CD19の発現または活性を変化させる修飾を含む。いくつかの実施形態では、B細胞は、ゲノムの非コード領域の修飾を含む。

50



## 【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代 B 細胞は、非ゲノム編集初代 B 細胞に比して生存能の増大を示す。

## 【 0 0 1 1 】

別の態様では、本開示には、対象にゲノム編集初代 B 細胞を含む組成物を投与することを含む方法が記載される。いくつかの実施形態では、この方法は、対象の疾患を治療または予防することを含み、疾患は、例えば、酵素異常症、癌、前癌状態、病原体による感染症またはウイルス感染症を含み得る。

## 【 0 0 1 2 】

別の態様では、本開示には、B 細胞受容体 ( B C R ) をコードする核酸と、過剰発現させる遺伝子をコードする核酸とを含む、治療用カセットが記載される。B 細胞受容体は膜貫通領域を含み得る。過剰発現させる遺伝子は酵素をコードする核酸を含み得る。いくつかの実施形態では、酵素は、酵素異常症を有するか、酵素異常症であると診断された対象に欠如している酵素を含む。いくつかの実施形態では、B C R をコードする核酸と過剰発現させる遺伝子をコードする核酸は、転写的に連結しているか、翻訳的に連結しているか、またはその両方である。

10

## 【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態では、治療用カセットは、B C R をコードする核酸および過剰発現させる遺伝子をコードする核酸の転写を駆動するプロモーターを含む。

## 【 0 0 1 4 】

別の態様では、本開示には、治療用カセットを含む細胞が記載される。いくつかの実施形態では、細胞は B 細胞および / または長期生存形質細胞を含む。細胞は、内在性 B 細胞受容体 ( B C R ) をコードする核酸の修飾を含み得る。

20

## 【 0 0 1 5 】

さらなる態様では、本開示には、治療用カセットを含む細胞を投与することを含む、方法が記載される。いくつかの実施形態では、この方法は、対象に抗原を投与することを含むものであり得、治療用カセットの B C R は抗原に特異的なものである。

## 【 0 0 1 6 】

さらに別の態様では、本開示には、初代 B 細胞のゲノムを編集することを含む方法が記載される。初代 B 細胞は、C D 1 9 を発現する細胞 ; I g M もしくは I g D またはその組合せを発現する細胞 ; C D 2 7 <sup>+</sup> 細胞 ; C D 2 1 <sup>+</sup> 細胞 ; ならびに / あるいは C X C R 5 <sup>+</sup> 細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、初代 B 細胞は、末梢血、臍帯細胞、腹水もしくは固形腫瘍から単離された細胞 ; 非クローン性細胞 ; 増殖性細胞 ; 哺乳動物細胞 ; および / またはヒト細胞を含み得る。

30

## 【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態では、この方法は、初代 B 細胞に外来性のタンパク質または核酸を導入することを含む。この方法は、細胞のエレクトロポレーションを含み得る。いくつかの実施形態では、この方法は、標的化ヌクレアーゼまたは標的化ヌクレアーゼをコードする核酸 ( 例えば、C a s 9 または C a s 9 をコードする核酸を含む ) を導入することを含む。いくつかの実施形態では、この方法はガイド RNA ( g RNA ) を導入することを含む。g RNA は化学修飾された g RNA を含み得る。化学修飾された g RNA は、2 ' - O - メチル ( M ) 、 2 ' - O - メチル - 3 ' - ホスホロチオアート ( M S ) または 2 ' - O - メチル - 3 ' - チオホスホノアセタート ( M S P ) を含み得る。

40

## 【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態では、この方法は、ナトロノバクテリウム・グレゴリー ( N a t r o n o b a c t e r i u m g r e g o r y i ) アルゴノート ( N g A g o ) およびガイド DNA ( g DNA ) を導入することを含む。

## 【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態では、ゲノムを編集することは、例えば C D 1 9 をコードする核酸を含む遺伝子を編集すること ; B 細胞受容体 ( B C R ) の一部分をコードする核酸を編集

50

すること；および／またはゲノムの非コード領域を編集することを含む。

【0020】

いくつかの実施形態では、この方法は、B細胞を選択することをさらに含む。いくつかの実施形態では、ゲノムを編集した後に選択を実施する。いくつかの実施形態では、B細胞を編集されたゲノムに関して選択する。

【0021】

いくつかの実施形態では、この方法は、初代B細胞を活性化、刺激および増殖の段階のうち少なくとも1つのものに供する。

【0022】

「好ましい」および「好ましくは」という単語は、特定の状況下で特定の利益をもたらす得る本発明の実施形態を指す。ただし、同じまたは別の状況下でそれ以外の実施形態が好ましい場合もある。さらに、1つまたは複数の好ましい実施形態が記載される場合、それは他の実施形態が有用ではないことを意味するのではなく、また他の実施形態を本発明の範囲から除外することを意図するものではない。

【0023】

「comprises」（「含む」）という用語およびその変化形は、それらの用語が説明および請求項に見られる場合に限定的な意味を有するものではない。

【0024】

特に明記されない限り、「a」、「an」（以上、1つの）、「the」（その）および「at least one」（少なくとも1つの）は互換的に使用され、1つまたは2つ以上という意味である。

【0025】

本明細書ではほかにも、数値の範囲が終点によって記載される場合、その範囲内に含まれるあらゆる数値が含まれる（例えば、1～5には、1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5などが含まれる）。

【0026】

本明細書に開示される個別の段階を含むいずれの方法に関しても、実行可能な順序で諸段階を実施してよい。また、適宜、2つ以上の段階を任意に組み合わせて同時に実施してもよい。

【0027】

見出しはいずれも読者の便宜を図ったものであり、特に明記されない限り、見出しに続く本文の意味を限定するために用いるべきものではない。

【0028】

特に明示されない限り、明細書および請求項で使用される成分、分子量などの量を表すあらゆる数値は、いかなる場合も「約」という用語が修飾しているものと理解されるべきである。したがって、特にそうでないことが明示されない限り、明細書および請求項に記載される数値パラメータは近似値であり、本発明によって得ようとする所望の特性に応じて変化し得るものである。よくても、請求項の範囲に対する均等論を制限しようとするものではないが、各数値パラメータは少なくとも、報告される有効数字の数値を考慮に入れ、通常の丸め法を適用することによって解釈されるべきである。

【0029】

本発明の広い範囲を記載する数値の範囲およびパラメータは近似値ではあるが、具体例に記載される数値は可能な限り正確に報告される。ただし、いかなる数値にも本来、その各試験測定値にみられる標準偏差から必然的に生じる範囲が含まれている。

【0030】

上の本発明の概要は、開示される本発明の各実施形態または本発明のあらゆる実施を記載することを意図するものではない。以下の説明では、例示的实施形態をさらに具体的に例示する。本願全体を通じていくつかの箇所では、例のリストにより指針が示され、その例を様々な組合せで用いることができる。いずれの場合も、記載されるリストは単に代表的なグループとしての役割を果たすものであって、排他的なリストとして解釈されるべき

10

20

30

40

50

ではない。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】刺激初代ヒトB細胞へのeGFPをコードするmRNAの送達を示す図である。(A)生存細胞にゲートをかけた後のeGFP陽性B細胞のパーセントを示すヒストグラム。(B)パネルAに示されるB細胞の生存率をAPC e-Fluor 780 Fixable Viability Dyeに基づき定量化したフロープロット。

【図2】化学修飾gRNAおよびCas9 mRNAまたはタンパク質で処理し刺激した初代ヒトB細胞から得たsurveyor nucleaseアッセイの例示的結果を示す図である。トランスフェクションから3日後にDNAを抽出した。遺伝子修飾率の記載されていないレーンには簡略化のため表示されていないが、編集が0%であったことを示している。各レーンには、用いた条件を示すキーとともに(左から右へ)1~5の番号が付されている。各画像の下には標的遺伝子が括弧内に記されている。

【図3】BCR重鎖遺伝子座での標的化遺伝子組込みのいくつかの例示的实施形態の模式図を示す図である。(A)エンハンサー、D、Jおよび定常エクソンを示すBCR重鎖遺伝子座の略図。導入遺伝子組込みに提案される部位が示されている。(B)BCR重鎖遺伝子座での遺伝子送達のためのカーゴ設計の2つの実施形態の略図。P2A:cDNAを転写的に連結するリボソームスキップ配列、pA:ポリアデニル化配列、スプライスacc:強力なスプライスアクセプターエレメント。

【図4】初代ヒトB細胞のレンチウイルス形質導入の例示的結果を示す図である。等高線図は、APC e-Fluor 780 Fixable Viability Dyeに基づき生存細胞にゲートをかけた後のeGFP発現B細胞のパーセントを示している。実施例2に記載される通りに、急性刺激したB細胞培養物(上の行)、慢性刺激したB細胞培養物(中央の行)および未刺激のB細胞培養物(下の行)でBaEV-偽型(Fusilら, Molecular Therapy, 2015, 23(11):1734-47)(左の列)、VSVg-偽型(中央の列)およびレンチウイルス無しの対照(右の列)を試験した。いずれの条件でも、BaEV偽型ウイルスを用いた場合に、標準的なVSVg偽型で形質導入した細胞よりも効率的にB細胞に形質導入された。

【図5】初代ヒトB細胞培養物のCD19遺伝子をノックアウトした後の例示的なCD19タンパク質の細胞表面発現を示す図である。刺激したB細胞にNEONトランスフェクションシステム(1400ボルト、10ミリ秒(ms)、3パルス)を用いてCas9 mRNAおよび化学修飾gRNA(Trilink社)をエレクトロポレートすることにより、CD19遺伝子座を標的化した。CD19の対照レベルを示すため、gRNAを加えないCas9 mRNAの試料およびエレクトロポレーション無しの試料を含めた。エレクトロポレーションから5日後、フローサイトメトリーによりCD19発現を測定した。(A)Cas9+rRNAで処理した細胞(実線)でのCD19発現をCas9単独で処理した細胞(破線)および無エレクトロポレーション対照(灰色無地の背景)に対して示したヒストグラム。(B)CD19の細胞表面発現が、Cas9単独で処理した細胞および無エレクトロポレーション対照の96~98%からCas9とCD19 gRNAで処理したB細胞の38%に減少した。

【図6A-B】初代ヒトB細胞を操作して抗体を発現させるのに用いた治療用カセットをコードするプラスミドの例示的ベクター構築物を示す図である。これらのプラスミドは、B細胞の成熟状態に応じて膜結合B細胞受容体(BCR)または分泌抗体を発現させる。(A)MNDプロモーターの制御下で抗PEの重鎖および軽鎖ならびにコドン最適化アルファ-L-イズロニダーゼ(coiduA)を発現するよう構築したレンチウイルスベクターの模式図。P2Aペプチド配列を導入することにより、重鎖、軽鎖およびcoiduAを同時発現させた。配列を表3に示す。(B)抗PE B細胞受容体(BCR)/抗体を発現するよう修飾したFAM1レンチウイルスベクターおよびFAM2レンチウイルスベクター(原型はFusilら, Molecular Therapy, 2015, 23(11):1734-47に記載されている)の模式図。配列を表6および8に示す。(

10

20

30

40

50

C) MNDプロモーターの制御下でB12の重鎖および軽鎖ならびにコドン最適化IDUA (coIDUA)を発現するよう構築したレンチウイルスベクターの模式図。P2Aペプチド配列を導入することにより、重鎖、軽鎖およびcoIDUAを同時発現させた。配列を表4に示す。(D) B12 B細胞受容体(BCR)/抗体を発現するよう修飾したFAM1レンチウイルスベクターおよびFAM2レンチウイルスベクター(原型はFusilら, Molecular Therapy, 2015, 23(11):1734-47に記載されている)の模式図。配列を表5および7に示す。

【図6C-D】初代ヒトB細胞を操作して抗体を発現させるのに用いた治療用カセットをコードするプラスミドの例示的ベクター構築物を示す図である。これらのプラスミドは、B細胞の成熟状態に応じて膜結合B細胞受容体(BCR)または分泌抗体を発現させる。

(A) MNDプロモーターの制御下で抗PEの重鎖および軽鎖ならびにコドン最適化アルファ-L-イズロニダーゼ(coIDUA)を発現するよう構築したレンチウイルスベクターの模式図。P2Aペプチド配列を導入することにより、重鎖、軽鎖およびcoIDUAを同時発現させた。配列を表3に示す。(B) 抗PE B細胞受容体(BCR)/抗体を発現するよう修飾したFAM1レンチウイルスベクターおよびFAM2レンチウイルスベクター(原型はFusilら, Molecular Therapy, 2015, 23(11):1734-47に記載されている)の模式図。配列を表6および8に示す。(C) MNDプロモーターの制御下でB12の重鎖および軽鎖ならびにコドン最適化IDUA (coIDUA)を発現するよう構築したレンチウイルスベクターの模式図。P2Aペプチド配列を導入することにより、重鎖、軽鎖およびcoIDUAを同時発現させた。配列を表4に示す。(D) B12 B細胞受容体(BCR)/抗体を発現するよう修飾したFAM1レンチウイルスベクターおよびFAM2レンチウイルスベクター(原型はFusilら, Molecular Therapy, 2015, 23(11):1734-47に記載されている)の模式図。配列を表5および7に示す。

【図7】NEONトランスフェクションシステムを用いて初代ヒトB細胞にeGFPをコードするDNAまたはRNAをトランスフェクトする効果に対する例示的エレクトロポレーションの設定の影響を示す図である。(A) 試験した条件、すなわち、電圧(ボルト); 幅(ミリ秒(ms))およびパルス回数のリストを示している。(B) GFPをコードするプラスミド(左の列)またはGFPをコードするmRNA(右の列)を用いて、トランスフェクションの効果(上の行)、細胞生存率(中央の行)および総細胞カウント数(下の行)に対するエレクトロポレーション条件の影響を試験した。

【図8】実施例2に記載される通りにAlt-R CRISPR-Cas9システムを用いたBCL2遺伝子座でのインデル形成の例示的結果を示す図である。NEONトランスフェクションシステム(1400ボルト、10ms、3パルス)を用いて、初代ヒトB細胞にBCL-2遺伝子座を標的とするAlt-R CRISPR-Cas9システム(Integrated DNA Technology社、コーラルビル、アイオワ州)をエレクトロポレートした。TIDEプログラム(tide.nki.nlのワールドワイドウェブで利用可能)を用いたシーケンシング解析により、総編集効率が11.3%であることがわかった( $R^2 = 0.89$ )。編集の大部分には1ヌクレオチドの挿入または9ヌクレオチドの欠失が含まれているのが観察された。

【図9】末梢血単核球から単離したCD19<sup>+</sup>細胞由来の成熟ナイーブ様B細胞をCD40L架橋抗体(Miltenyi Biotech社、サンディエゴ、カリフォルニア州)およびIL-4で活性化させた後の増殖および拡大に対する細胞密度の影響を示す図である。HSC Expansion Media(Miltenyi Biotech社、サンディエゴ、カリフォルニア州)に高密度の濃度( $1 \times 10^6$ 細胞/mL)で播いた細胞は、第14日までの拡大が、低密度の濃度( $2 \times 10^5$ 細胞/mL)で播いた細胞で観察された30倍の増加と比較して最小限のものであった。

【図10-A】実施例2に詳細に記載されるエレクトロポレーションから3日後のHEK293T細胞の例示的(A)細胞内IDUA活性および(B)分泌IDUA活性を示す図である。

10

20

30

40

50

【図 10 - B】実施例 2 に詳細に記載されるエレクトロポレーションから 3 日後の H E K 293 T 細胞の例示的 ( A ) 細胞内 I D U A 活性および ( B ) 分泌 I D U A 活性を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0032】

( 詳細な説明 )

B 細胞は、長期生存型になることができ、本来大量のタンパク質 ( すなわち、抗体 ) を産生する能力を有することから、例えば酵素異常症の治療を含めた遺伝子治療に理想的なプラットフォームになるものと思われる。B 細胞はまた、末梢血中に容易に得ることができ ( 白血球全体の 1 ~ 7 % を占める )、細胞を拡大する方法も容易に利用することができる。さらに、データから、細胞はタンパク質よりも容易に血液脳関門を通過し、このため、脳に及ぶ酵素異常症には酵素補充療法よりも細胞療法の方が望ましいものとなる可能性が示唆されている。しかし、ゲノム工学法を用いる B 細胞への治療遺伝子の送達も、任意の標的化ヌクレアーゼの初代ヒト B 細胞への使用もこれまで報告されていない。

10

【0033】

本開示には、ゲノム編集初代 B 細胞 ; ゲノム編集初代 B 細胞の作製方法 ; および例えば細胞の投与を含めたゲノム編集初代 B 細胞の使用方法が記載される。本開示にはさらに、初代 B 細胞に導入することができる治療用カセット、治療用カセットの作製方法、治療用カセットを含む B 細胞の作製方法および治療用カセットの使用方法が記載される。

20

【0034】

B 細胞

いくつかの実施形態では、B 細胞は C D 19<sup>+</sup> 細胞であり得る。いくつかの実施形態では、B 細胞は初代 B 細胞であり得る。本明細書で使用される「初代 B 細胞」は非不死化 B 細胞である。いくつかの実施形態では、「初代 B 細胞」は新たに単離した B 細胞である。いくつかの実施形態では、B 細胞は末梢血単核球 ( P B M C ) から単離したものであり得る。いくつかの実施形態では、B 細胞は i P S C から誘導したものであり得る。いくつかの実施形態では、B 細胞は C D 34<sup>+</sup> 細胞の集団から誘導したものであり得る。

【0035】

いくつかの実施形態では、「初代 B 細胞」は、単離してから最大 5 回の複製もしくは分裂、単離してから最大 10 回の複製もしくは分裂、単離してから最大 15 回の複製もしくは分裂、単離してから最大 20 回の複製もしくは分裂、単離してから最大 25 回の複製もしくは分裂、単離してから最大 30 回の複製もしくは分裂、単離してから最大 35 回の複製もしくは分裂、または単離してから最大 40 回を経た B 細胞である。

30

【0036】

いくつかの実施形態では、「初代 B 細胞」は、誘導してから最大 5 回の複製もしくは分裂、誘導してから最大 10 回の複製もしくは分裂、誘導してから最大 15 回の複製もしくは分裂、誘導してから最大 20 回の複製もしくは分裂、誘導してから最大 25 回の複製もしくは分裂、誘導してから最大 30 回の複製もしくは分裂、誘導してから最大 35 回の複製もしくは分裂、または誘導してから最大 40 回を経た B 細胞である。

【0037】

いくつかの実施形態では、初代 B 細胞は非クローン性細胞である。いくつかの実施形態では、初代 B 細胞は増殖性細胞である。いくつかの実施形態では、B 細胞を C D 40 L の存在下で培養するのが好ましい。

40

【0038】

いくつかの実施形態では、B 細胞はナイーブ B 細胞であり得る。いくつかの実施形態では、「ナイーブ B 細胞」は、C D 19<sup>+</sup>、I g D<sup>+</sup>、I g M<sup>+</sup>、C D 27<sup>-</sup>、C D 21<sup>+</sup> および / または C X C R 5<sup>+</sup> である。いくつかの実施形態では、B 細胞は記憶 B 細胞であり得る。いくつかの実施形態では、「記憶 B 細胞」は、C D 19<sup>+</sup>、I g D<sup>-</sup>、C D 27<sup>+</sup>、C D 21<sup>+</sup> および / または C X C R 5<sup>+</sup> である。いくつかの実施形態では、B 細胞は活性化記憶 B 細胞であり得る。いくつかの実施形態では、「活性化記憶 B 細胞」は、C D

50

19<sup>+</sup>、IgD<sup>-</sup>、CD27<sup>+</sup>、CD21<sup>-</sup> および / または CXCR5<sup>+</sup> である。いくつかの実施形態では、B細胞は天然のエフェクターB細胞であり得る。いくつかの実施形態では、「天然のエフェクターB細胞」は、CD19<sup>+</sup>、IgD<sup>+</sup>、IgM<sup>+</sup> および / または CD27<sup>+</sup> である。いくつかの実施形態では、B細胞は形質芽球であり得る。いくつかの実施形態では、「形質芽球」は、CD19<sup>+</sup>、CXCR5<sup>-</sup>、CD38<sup>+</sup>、CD27<sup>-</sup> および / または CD20<sup>-</sup> である。

【0039】

いくつかの実施形態では、B細胞は、クラススイッチ組換えを経たB細胞であり得る。いくつかの実施形態では、B細胞は、クラススイッチ組換えを経ていないB細胞であり得る。

10

【0040】

いくつかの実施形態では、B細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、B細胞はヒト細胞であるのが好ましい。いくつかの実施形態では、B細胞はマウス細胞である。

【0041】

ゲノム編集初代B細胞

初代B細胞が、そのゲノムに非ゲノム編集B細胞と比較して修飾を含む場合、その初代B細胞は「ゲノム編集された」ものである。いくつかの実施形態では、非ゲノム編集B細胞は野生型B細胞である。いくつかの実施形態では、非ゲノム編集B細胞は新たに単離したB細胞である。

20

【0042】

いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代B細胞は、ゲノムの非コード領域および / またはゲノムのコード領域（例えば、遺伝子）に修飾を含む。いくつかの実施形態では、ゲノムの非コード領域は、例えばマイクロRNA（miRNA）を含めた小型の調節非コードRNAの配列を含み得る。いくつかの実施形態では、ゲノムの非コード領域は、B細胞の機能、活性化および / または生存の調節に関与するものであるのが好ましい。

【0043】

いくつかの実施形態では、ゲノム情報の一部分および / または遺伝子を欠失させ得る。いくつかの実施形態では、ゲノム情報の一部分および / または遺伝子を付加し得る。いくつかの実施形態では、付加するゲノム情報および / または遺伝子は外来性である。いくつかの実施形態では、「外来性の」ゲノム情報または「外来性の」遺伝子は、非B細胞由来のゲノム情報または遺伝子であり得る。いくつかの実施形態では、「外来性の」ゲノム情報または「外来性の」遺伝子は、B細胞中に既に存在するゲノム情報または遺伝子の追加のコピーであり得る。いくつかの実施形態では、「外来性の」ゲノム情報または「外来性の」遺伝子は、修飾するB細胞とは別の種の細胞由来のゲノム情報または遺伝子であり得る。いくつかの実施形態では、「外来性の」ゲノム情報または「外来性の」遺伝子は、例えばキメラ抗原受容体をコードする核酸を含めた人為的に作製したものであり得る。いくつかの実施形態では、ゲノム情報の一部分および / または遺伝子を例えば点変異によって変化させ得る。

30

【0044】

いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代B細胞は、ゲノム編集初代B細胞の発現または活性を非ゲノム編集初代B細胞に比して変化させる修飾を含むのが好ましい。例えば、いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代B細胞は、のちにさらに説明するように、治療用カセットを含み得る。

40

【0045】

いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代B細胞は、内在性B細胞受容体（BCR）をコードする核酸の修飾を含むのが好ましい。いくつかの実施形態では、この修飾が内在性BCRの発現に修飾をもたらす。例えば、内在性BCRの発現が非ゲノム編集初代B細胞に比して抑制され得る。いくつかの実施形態では、内在性BCRの発現が非ゲノム編集初代B細胞に比して増強され得る。いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代B細胞は、C

50

D 1 9 をコードする核酸の修飾を含む。いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代 B 細胞は、軽鎖をコードする核酸の修飾を含む。

【 0 0 4 6 】

いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代 B 細胞は、サイトカインをコードする核酸の修飾を含む。サイトカインは、例えば、I L - 1 0、I L - 4、I L - 7、I L - 2、I L - 1 5、I L - 6 もしくは I F N - またはその組合せを含み得る。

【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代 B 細胞は、例えば b c l - 2 様タンパク質 4 としても知られる B A X および b c l - 2 を含めた B c l - 2 ファミリーのメンバーをコードする核酸の修飾を含む。いくつかの実施形態では、B c l - 2 ファミリーのメンバーをコードする核酸の修飾によって、ゲノム編集初代 B 細胞の生存能の増大、例えば培養時の生存能の増大が可能になる。

【 0 0 4 8 】

いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代 B 細胞は、例えば F C R I I、C D 2 2、P D - 1、C D 5、C D 6 6 a、L A I R 1、I L T 2 もしくは C D 7 2 またはその組合せを含めた B 細胞抑制性受容体をコードする核酸の修飾を含む。いくつかの実施形態では、この修飾によって抑制性受容体の発現または活性が非ゲノム編集初代 N K 細胞に比して変化する。例えば、抑制性受容体の発現が減少し得る。

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代 B 細胞は、B 細胞が親和性成熟を経る頻度または速度に影響を及ぼす修飾を含む。いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代 B 細胞は、B C L 6 および / または B L I M P 1 をコードする核酸の修飾を含む。B C L 6 は B L I M P 1 発現を阻害し、B L I M P 1 発現は B C L 6 発現を阻害する。B C L 6 発現は B 細胞を胚中心にとどまらせることができ、そこで B 細胞が親和性成熟し続ける。B L I M P 1 は、B 細胞を形質細胞（短期生存型および長期生存型の両方）に分化させる。いくつかの実施形態では、B C L 6 および / または B L I M P 1 をコードする核酸の修飾を用いて、親和性成熟を経る B 細胞の頻度または速度に影響を及ぼすことが可能である。

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代 B 細胞は、その最初の分化過程でカスパーゼ依存性細胞死の一過性阻止の下、例えば I R E 1、P E R K もしくは A T F 6 またはその組合せを含めた小胞体（E R）ストレス応答経路のメンバーをコードする核酸の修飾を含む。いくつかの実施形態では、E R ストレス応答経路のメンバーをコードする核酸の修飾は、ゲノム編集初代 B 細胞の生存能に影響を及ぼし得る、例えば、培養時の生存能を増大させ得る。

【 0 0 5 1 】

いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代 B 細胞は、ゲノム編集初代 B 細胞の生存能を非ゲノム編集初代 B 細胞に比して変化させる修飾を含むのが好ましい。いくつかの実施形態では、遺伝子編集初代 B 細胞は、非ゲノム編集初代 B 細胞に比して拡大する能力の増大を示す。拡大は、例えば *i n v i v o* または *i n v i t r o* であり得る。いくつかの実施形態では、拡大は、サイトカイン、抗体、抗原、抗原を発現する細胞またはその組合せとの共培養後に *i n v i t r o* であり得る。

【 0 0 5 2 】

B 細胞のゲノム編集

本開示には、ゲノム編集初代 B 細胞を含めたゲノム編集 B 細胞の作製方法も記載される。

【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態では、この方法は、初代 B 細胞にタンパク質または核酸を導入する技術を含む。タンパク質または核酸を導入する任意の適切な方法を用い得る。いくつかの実施形態では、この方法は、初代 B 細胞に例えば D N A、R N A および / または m R N A を含めた遺伝物質を導入するエレクトロポレーションを含むのが好ましい。本明細書で使

10

20

30

40

50

用されるエレクトロポレーションはヌクレオフェクションを含み得る。いくつかの実施形態では、例えばアデノ随伴ウイルス（AAV）、インテグラーゼ欠損レンチウイルス（IDLV）などを含めたウイルスによる形質導入を介して遺伝物質を導入し得る。アデノ随伴ウイルスは、例えばAAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6などを含めた任意の適切な血清型を含み得る。プラスミドDNAはB細胞に対して毒性を示す可能性があるため、いくつかの実施形態では、mRNAまたはタンパク質をベースとするゲノム編集方法が好ましい。いくつかの実施形態では、タンパク質または核酸を導入する技術は、エレクトロポレーション；マイクロインジェクション；ウイルス送達；エキソソーム；リポソーム；微粒子銃；ジェットインジェクション；ハイドロダイナミックインジェクション；超音波；磁場による遺伝子導入；電気パルスによる遺伝子導入；例えば脂質系ナノ粒子を含めたナノ粒子の使用；エンドソーム溶解剤とのインキュベーション；細胞透過性ペプチドの使用などによりタンパク質または核酸を導入することを含み得る。いくつかの実施形態では、この方法は、NEONTランスフェクションシステムを用いる初代B細胞のエレクトロポレーションを含むのが好ましい。

10

20

30

40

50

#### 【0054】

いくつかの実施形態では、この方法は遺伝子を編集することを含む。遺伝子を編集することは、遺伝子の1つもしくは複数のコピーを導入すること、遺伝子を変化させること、遺伝子を欠失させること、遺伝子の発現をアップレギュレートすること、遺伝子の発現をダウンレギュレートすること、遺伝子を変異させること、遺伝子をメチル化すること、遺伝子を脱メチル化すること、遺伝子をアセチル化すること、および/または遺伝子を脱アセチル化することを含み得る。遺伝子を変異させることは、活性化変異を導入すること、不活性化および/または阻害変異を導入すること、ならびに/あるいは点変異を導入することを含み得る。

#### 【0055】

いくつかの実施形態では、この方法は、初代B細胞のゲノム内に二本鎖切断を誘導することを含むのが好ましい。二本鎖切断は、例えば転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、CRISPR関連ヌクレアーゼなどを含めた標的化ヌクレアーゼを用いて導入し得る。いくつかの実施形態では、CRISPR/Cas9システムを用いて二本鎖切断を導入するのが好ましい。いくつかの実施形態では、この方法は、CRISPRヌクレアーゼ（例えば、Cas9および/またはCpf1を含む）またはCRISPRヌクレアーゼをコードするDNAもしくはRNA（例えば、Cas9またはCpf1をコードするDNAまたはRNAを含む）を導入することを含むのが好ましい。この方法は、いくつかの実施形態では、ガイドRNA（gRNA）を導入することを含み得る。

#### 【0056】

いくつかの実施形態では、この方法は、DNA誘導型DNアーゼを導入することを含む。いくつかの実施形態では、この方法はナトロノバクテリウム・グレゴリー（*Natronobacterium gregoryi*）アルゴノート（NgAgg）を導入することを含む。いくつかの実施形態では、NgAggをDNA誘導型エンドヌクレアーゼとして使用し得る。（Gaoら、*Nature Biotechnology*, 2016, doi:10.1038/nbt.354.）。この方法は、例えばガイドDNA（gDNA）を導入することをさらに含み得る。

#### 【0057】

gRNAの標的またはgDNAの標的は任意の適切な標的を含み得る。いくつかの実施形態では、標的は、例えば遺伝子または遺伝子の一部分を含めたB細胞ゲノムの一部分を含む。いくつかの実施形態では、標的遺伝子または同遺伝子の一部分はB細胞機能を増強する。例えば、gRNAの標的またはgDNAの標的は、例えば重鎖遺伝子、軽鎖遺伝子もしくはCD79を含めたB細胞受容体；CD19；例えばBLIMP1もしくはBCL6を含めたB細胞発生調節因子；アデノ随伴ウイルス組込み部位1（AAVS1）；B細胞抑制性受容体（例えば、FCγRII、CD22、PD1、CD5、CD66a、LA



IR1、ILT2、CD72など)；および/またはERストレス応答経路のメンバー(例えば、IRE1、PERK、ATF6など)を含み得る。

【0058】

いくつかの実施形態では、トランスフェクションを用いてCRISPR/Cas9システムを送達し得る場合、gRNAは、化学修飾gRNAを含むのが好ましくあり得る。いくつかの実施形態では、gRNAに対する化学修飾は、細胞がRNAを分解する能力を低下させるものであるのが好ましい。いくつかの実施形態では、化学修飾gRNAは、以下の修飾：2'-フルオロ(2'-F)、2'-O-メチル(2'-O-Me)、S-拘束エチル(cEt)、2'-O-メチル(M)、2'-O-メチル-3'-ホスホロチオアート(MS)および/または2'-O-メチル-3'-チオホスホノアセタート(MSP)のうちの1つまたは複数のものを含む。いくつかの実施形態では、化学修飾gRNAは、Hendelら, Nature Biotechnology, 2015, 33(9): 985-989またはRahdarら, PNAS, 2015, 112(51): E7110-7に記載されているgRNAおよび/または化学修飾を含み得る。

10

【0059】

このような実施形態では、ゲノム編集は、相同組換え(HR)および/または例えばマイクロホモロジー媒介末端結合(MMEJ)によるものを含めた非同源末端結合(NHEJ)経路を介して起こり得る。

【0060】

いくつかの実施形態では、この方法はB細胞を選択することを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子を編集した後に選択を実施する。B細胞は、いくつかの実施形態では、以下の方法：フローソーティング(例えば、GFP発現に関するものを含む)；磁気ビーズ分離(例えば、細胞表面マーカーを標的とすることを含む)；一過性薬物耐性遺伝子発現(例えば、抗生物質耐性を含む)のうちの1つまたは複数のものを用いて選択し得る。いくつかの実施形態では、選択は、編集されたゲノムを有するB細胞に関するものであり得る。

20

【0061】

いくつかの実施形態では、この方法は編集されたB細胞を拡大することを含む。いくつかの実施形態では、B細胞を選択した後に拡大を実施し得る。いくつかの実施形態では、B細胞受容体によって認識される抗原またはB細胞受容体によって認識される抗原を発現する細胞との共インキュベーションによりB細胞を拡大し得る。いくつかの実施形態では、例えばCD40Lおよび/またはIL-4を含めたサイトカインまたはリガンドとの共インキュベーションによりB細胞を拡大し得る。

30

【0062】

トランスフェクション法

いくつかの実施形態では、エレクトロポレーションまたはトランスフェクションを実施する際の初代B細胞は、刺激した細胞、すなわち、活性化、刺激および/または増殖の段階に供した細胞であるのが好ましい。

【0063】

いくつかの実施形態では、B細胞を少なくとも12時間、少なくとも18時間、少なくとも1日間、少なくとも2日間、少なくとも3日間、少なくとも4日間、少なくとも5日間、少なくとも6日間または少なくとも7日間刺激し得る。いくつかの実施形態では、B細胞を最大1日間、最大2日間、最大3日間、最大4日間、最大5日間、最大6日間、最大7日間、最大8日間、最大9日間、最大10日間、最大12日間、最大14日間、最大3週間、最大4週間または最大2か月間刺激し得る。いくつかの実施形態では、B細胞を14日間刺激するのが好ましい。

40

【0064】

いくつかの実施形態では、B細胞をサイトカインで刺激し得る。サイトカインは、例えば、IL-4、IL-7、IL-21および/またはB細胞活性化因子(BAFF)を含み得る。いくつかの実施形態では、例えば(例えば、CD40Lまたは抗CD40抗体に

50

より連結および／または架橋された)CD40を含めた細胞表面受容体を架橋することによりB細胞を刺激し得る。

#### 【0065】

いくつかの実施形態では、B細胞をエレクトロポレーションによりトランスフェクトするのが好ましい。例えば反応1回当たりのB細胞数(例えば、細胞10万個、50万個、100万個、200万個、300万個、400万個または500万個)、パルス回数(例えば、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回または8回)、電圧(例えば、1000ボルト、1100ボルト、1200ボルト、1300ボルト、1500ボルトまたは1600ボルト)、核酸量(例えば、0.5 $\mu$ g、1 $\mu$ g、2 $\mu$ g、5 $\mu$ g、10 $\mu$ g、15 $\mu$ g、20 $\mu$ g、25 $\mu$ g、30 $\mu$ g、35 $\mu$ g、40 $\mu$ g、45 $\mu$ gまたは50 $\mu$ g)およびパルス(1つまたは複数)の持続時間(例えば、2ms、5ms、7ms、9ms、10ms、11ms、13msまたは15ms)を変化させることなどによりエレクトロポレーションのプロトコルを最適化し得る。

10

#### 【0066】

いくつかの実施形態では、AMAXA nucleofectorまたはNEONシステムを用いてB細胞にエレクトロポレートし得る。いくつかの実施形態では、反応1回当たり100万個のB細胞にNEONプラットフォーム、mRNA 25 $\mu$ gならびにパルス3回、1400ボルトおよび持続時間10msのプロトコルを用いてエレクトロポレートし得る。

#### 【0067】

20

いくつかの実施形態では、トランスフェクションから48時間後にトランスフェクションレベルを試験するのが好ましい。いくつかの実施形態では、トランスフェクションから72時間後にトランスフェクションレベルを試験するのが好ましい。いくつかの実施形態では、eGFP mRNAのトランスフェクションを用い、トランスフェクションから48時間後および／または72時間後にフローサイトメトリー解析を実施してeGFP発現レベルおよび細胞生存率を評価することによりトランスフェクションレベルを試験するのが好ましい。

#### 【0068】

一実施形態では、初代ヒトB細胞へのmRNA送達の効率および毒性を試験するため、標準的フィコール-Paque分離を用いてロイコパックから末梢血単核球を単離した。次いで、EasySep Human CD19 Positive Selection Kit(Stem Cell Technologies社、バンクーバー、カナダ)を用いてPBMCからB細胞を単離し、10%ヒト血清を含むX-VIVO 20培地(Lonza Group社、アレンデル、ニュージャージー州)で培養した。AMAXAまたはNEONエレクトロポレーションプラットフォームを用いて、B細胞にeGFPをコードするin vitro転写mRNA(TriLink BioTechnologies社、サンディエゴ、カリフォルニア州)をエレクトロポレートした。この方法を用いた予備結果は、エレクトロポレーションから48時間後にフローサイトメトリー解析による測定で検出されたEGFP<sup>+</sup>B細胞が6%未満であるという不本意なものであった。

30

40

#### 【0069】

これとは対照的に、エレクトロポレーションの前に初代B細胞を例えばIL-4およびCD40L(Miltenyi Biotec社、サンディエゴ、カリフォルニア州)とともに7日間培養することなどを用いて刺激し拡大した場合、エレクトロポレーションから72時間後、EGFP<sup>+</sup>B細胞が最大97.6%というeGFP陽性細胞の割合の増加が観察され、生存率も最大68.6%であった。

#### 【0070】

CRISPR/Cas9技術の適用に対する主な障壁の1つが、トランスフェクトが困難な細胞、種々の初代細胞およびクローン化する(すなわち、単一の単離細胞から増殖させる)ことができない他の細胞を含めた一部のタイプの細胞では遺伝子修飾率が低くなる

50

ことである。例えば、最初に未修飾 gRNA を用いて試みたところ、初代ヒト T 細胞にも CD34<sup>+</sup> 細胞にも検出可能な二本鎖切断を誘導することができなかった。

#### 【0071】

CRISPR/Cas9 システムを用いれば B 細胞への標的化遺伝子送達遺伝子送達が可能になるかどうかを明らかにするため、相同組換え (HR) または非相同末端結合 (NHEJ) 経路による二本鎖切断 (DSB) 誘導を検討した。5' 末端および 3' 末端に直列 2-O-メチル-3-ホスホロチオアート修飾塩基を 3 つ含む RNA オリゴヌクレオチドとして合成した gRNA および Cas9 mRNA またはタンパク質を用いて遺伝子修飾を誘導した (図 2)。これらのデータは、B 細胞に標的化二本鎖切断を誘導することができることを示している。

10

#### 【0072】

##### 治療用カセット

いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代 B 細胞は治療用カセットを含み得る。いくつかの実施形態では、治療用カセットは、BCR をコードする核酸と、過剰発現させる遺伝子をコードする核酸とを含むのが好ましい。いくつかの実施形態では、過剰発現させる遺伝子は、酵素をコードする核酸を含むのが好ましい。BCR をコードする核酸と過剰発現させる遺伝子をコードする核酸は、転写的かつ / または翻訳的に連結されているのが好ましい。

#### 【0073】

いくつかの実施形態では、内在性 BCR が BCR 導入遺伝子の機能に干渉する可能性があるため、それを不活性化することが望まれ得る。いくつかの実施形態では、内在性 BCR の重鎖遺伝子座に治療用カセットを挿入するのが好ましくあり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるトランスフェクション法により内在性 BCR を編集するのが好ましくあり得る。VDJ 組換えによって内在性の重鎖遺伝子座の一部の領域が除去されるため、いくつかの実施形態では、例えば治療用カセットの挿入を含めたゲノム編集を定常領域にみられるエンハンサー付近に標的化し得る。いくつかの実施形態では、ほぼあらゆる重鎖組換え事象で保持される領域である図 3A に示される領域に治療用カセットを標的化し得る。

20

#### 【0074】

いくつかの実施形態では、治療用カセットは、BCR をコードする核酸を含むのが好ましい。いくつかの実施形態では、BCR は、免疫感作により対象に投与することができる抗原に特異的なものである。いくつかの実施形態では、BCR は膜貫通領域および / または膜結合抗体を含むのが好ましい。本明細書で使用される BCR は、膜アンカー型 BCR もしくは可溶性 Ig またはその両方を含み得る。

30

#### 【0075】

いくつかの実施形態では、治療用カセットは重鎖をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、重鎖をコードする核酸の転写は内在性プロモーターによって駆動され得る。いくつかの実施形態では、重鎖をコードする核酸の転写は外来性プロモーターによって駆動され得る。いくつかの実施形態では、プロモーターは、例えば、MND プロモーター、CMV プロモーター、CAG プロモーター、PGK プロモーター、EF1A プロモーター、FEEK プロモーターなどを含み得る。いくつかの実施形態では、重鎖をコードする核酸は、単一の可変セグメント、単一の多様性セグメント、単一の結合セグメントおよび単一の C 領域をコードするのが好ましい。いくつかの実施形態では、重鎖をコードする核酸は、例えば M1 および / または M2 ドメインを含めた膜貫通領域をコードするのが好ましい。

40

#### 【0076】

いくつかの実施形態では、治療用カセットは軽鎖をコードする核酸を含み得る。いくつかの実施形態では、軽鎖をコードする核酸の転写は内在性プロモーターによって駆動され得る。いくつかの実施形態では、軽鎖をコードする核酸の転写は外来性プロモーターによって駆動され得る。いくつかの実施形態では、プロモーターは、例えば、MND プロモ-

50

ター、CMVプロモーター、CAGプロモーター、PGKプロモーター、EF1Aプロモーター、FEKプロモーターなどを含み得る。いくつかの実施形態では、軽鎖をコードする核酸は、単一の可変セグメント、単一の結合セグメントおよび単一のC領域をコードするのが好ましい。

【0077】

いくつかの実施形態では、軽鎖をコードする核酸の発現は、例えば内部リボソーム進入部位(IRES)、2Aペプチド配列、「2A様」配列、リボソームスキッピングおよび/またはCHYSEL(シス作用性加水分解酵素エレメント)配列などにより、重鎖をコードする核酸の発現と転写的または翻訳的に連結され得る。2Aペプチド配列は、リボソームスキッピングの機序により正常なペプチド結合形成を障害し、配列内リボソーム進入部位(IRES)も追加のプロモーターも導入せずに2つ以上のタンパク質の発現を可能にする。いくつかの実施形態では、2Aペプチドは、ブタテッショウウイルス-1(P2A)、口蹄疫ウイルス(F2A)またはトセア・アシグナ(Thosea asigna)ウイルス(T2A)に由来するものであり得る。

【0078】

いくつかの実施形態では、治療用カセットの重鎖および/または軽鎖は、免疫感作により対象に投与することができる抗原に特異的なものである。例えば、いくつかの実施形態では、重鎖および/または軽鎖はフィコエリトリン(PE)に特異的なものであり得る。また別の例では、いくつかの実施形態では、重鎖および/または軽鎖は、抗HIVエンペロータンパク質であるB12に特異的なものであり得る。

【0079】

治療用カセットは、過剰発現させる遺伝子をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、過剰発現させる遺伝子をコードする核酸の転写は、BCRの重鎖または軽鎖のうちの少なくとも一方の転写を駆動するプロモーターと同じプロモーターによって駆動されるのが好ましい。いくつかの実施形態では、過剰発現させる遺伝子をコードする核酸の転写は、BCRの重鎖または軽鎖のうちの少なくとも一方の転写を駆動するプロモーターと異なるプロモーターによって駆動され得る。

【0080】

例えば、過剰発現させる遺伝子をコードする核酸の転写がBCRの重鎖または軽鎖のうちの少なくとも一方の転写を駆動するプロモーターと同じプロモーターによって駆動される場合、対象を外来性BCRによって認識される抗原に対して免疫感作させることにより遺伝子の過剰発現を制御することができる。さらに、いくつかの実施形態では、治療用カセットが膜アンカー型のBCRまたは可溶性Ig型のBCRのいずれを産生するかは、治療用カセットを標的化するB細胞の成熟状態に左右される。

【0081】

いくつかの実施形態では、治療用カセットは、図3Bに示される構成要素を含み得る。いくつかの実施形態では、治療用カセットは、図3Bに示されるように配置された構成要素を含み得る。いくつかの実施形態では、治療用カセットは、図6の少なくとも1つのパネルに示される構成要素を含み得る。いくつかの実施形態では、治療用カセットは、図6の少なくとも1つのパネルに示されるように配置された構成要素を含み得る。

【0082】

いくつかの実施形態では、酵素をコードする核酸の発現は、例えば内部リボソーム進入部位(IRES)、2Aペプチド配列、「2A様」配列、リボソームスキッピングおよび/またはCHYSEL(シス作用性加水分解酵素エレメント)配列などによりBCR発現と転写的または翻訳的に連結され得る。いくつかの実施形態では、スプライスアクセプター法または構成的プロモーターを用いて、治療用酵素をコードする核酸と連結したBCRをコードする核酸を駆動し得る。

【0083】

いくつかの実施形態では、過剰発現させる遺伝子は酵素および/または治療用酵素を含むのが好ましい。治療用酵素は、例えば、酵素異常症を有する対象に欠如している酵素を

10

20

30

40

50

含み得る。酵素異常症は、例えば、ゴーシェ病、ファブリー病、MPS I、MPS II（ハンター症候群）、MPS VI、II型糖尿病、アデノシンデアミナーゼ欠損症またはポンペ病を含み得る。いくつかの実施形態では、治療用酵素は、グリコサミノグリカン（GAG）の分解に不可欠な酵素であるアルファ-L-イズロニダーゼ（IDUA）を含む。治療用酵素は、上記のものに加えて、またはこれに代えて、例えば、発現が対象の健康を向上させる酵素を含む。

#### 【0084】

いくつかの実施形態では、治療用カセットは、例えばGFPの遺伝子または薬物耐性の遺伝子を含めたマーカー遺伝子をコードする核酸を含む。

#### 【0085】

いくつかの実施形態では、重鎖をコードする核酸、軽鎖をコードする核酸および過剰発現させる遺伝子をコードする核酸が治療用カセットに含まれており、転写的に連結している。いくつかの実施形態では、治療用カセットは、重鎖をコードする核酸、軽鎖をコードする核酸および治療用酵素と転写的に連結した1つまたは複数の2Aペプチドをさらに含む。

#### 【0086】

治療用カセットはベクター構築物によってコードされ得る。いくつかの実施形態では、ベクター構築物はプラスミドを含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、例えばBaEV-偽型レンチウイルスベクター、VSVg-偽型レンチウイルスベクター、FAM1レンチウイルスベクターおよび/またはFAM2レンチウイルスベクター（Fusilら、Molecular Therapy, 2015, 23(11):1734-47を参照されたい）を含めたレンチウイルスベクターを含み得る。いくつかの実施形態では、ベクターは、例えばウッドチャック肝炎ウイルス（WPRE）の転写後調節エレメントをコードする遺伝子、マウス槽内A型粒子をコードする遺伝子、様々なサルレトロウイルスに由来する構成的輸送エレメント（CTE）をコードする遺伝子の1つまたは複数のコピーなどを含めたシス作用性DNAエレメントを含み得る。

#### 【0087】

ゲノム編集形質細胞およびゲノム編集初代B細胞をゲノム編集形質細胞に分化させる方法

本開示はさらに、ゲノム編集形質細胞およびゲノム編集初代B細胞を長期生存形質細胞に分化させる方法を提供する。

#### 【0088】

いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代B細胞およびゲノム編集形質細胞は、内在性B細胞受容体（BCR）をコードする核酸の修飾を含むのが好ましい。いくつかの実施形態では、内在性BCRの発現が非ゲノム編集初代B細胞に比して抑制され、外来性BCRの発現が非ゲノム編集初代B細胞に比して増強される。

#### 【0089】

いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代B細胞のBCRは、免疫感作により対象に投与することができる抗原に特異的なものである。例えば、いくつかの実施形態では、B細胞受容体はフィコエリトリン（PE）に特異的なものであり得る。また別の例では、いくつかの実施形態では、B細胞受容体は、抗HIVエンベロープタンパク質であるB12に特異的なものであり得る。

#### 【0090】

いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代B細胞を含む対象をBCRによって認識される抗原に曝露する。いくつかの実施形態では、ゲノム編集初代B細胞のBCRがある抗原に特異的なものである場合、その抗原を免疫感作により対象に投与することによって長期生存形質細胞が生じる。BCRの抗原結合部位が抗原と結合する場合、BCRはその抗原に特異的であると考えられる。

#### 【0091】

内在性B細胞受容体の特異性が既知のB細胞受容体に置き換えることにより、B細胞受

10

20

30

40

50

容体の構成要素と同じプロモーターの下で核酸の転写を調節することが可能になる。

【0092】

例えば、フィコエリトリン ( P E ) に特異的な B 細胞受容体を含み、アルファ - L - イズロニダーゼ ( I D U A ) をコードする核酸を含むゲノム編集初代 B 細胞を対象に導入し得る。対象は I D U A 欠損症であり得る。対象を P E で免疫感作することによって、ゲノム編集初代 B 細胞から長期生存形質細胞への分化および I D U A をコードする核酸の転写が起こり、それにより患者のゲノム編集 B 細胞および全身での I D U A 発現が増大し、疾患の交差是正が起こり得る。他の実施形態では、B 細胞の特異性を変化させ、かつ / または過剰発現させる遺伝子をコードする核酸を修飾し得る。

【0093】

投与

本開示はさらに、本明細書に記載されるゲノム編集初代 B 細胞を使用する方法を提供する。例えば、ゲノム編集初代 B 細胞を用いて、対象の疾患を治療または予防し得る。ある方法は、本明細書に記載されるゲノム編集初代 B 細胞または本明細書に記載される方法により作製されるゲノム編集初代 B 細胞を含む組成物を対象に投与することを含み得る。疾患は、例えば、酵素異常症、癌、前癌状態、病原体 (例えば、マラリアを含む) による感染症またはウイルスによる感染症を含み得る。

【0094】

ゲノム編集初代 B 細胞を単独で、または 1 つもしくは複数の他の治療法と併用して対象に投与し得る。例えば、ゲノム編集初代 B 細胞を活性薬剤と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物と併用して、かつ / または例えばキメラ抗原受容体 T 細胞 ( C A R - T ) を含めた細胞療法と併用して、対象に投与し得る。B 細胞は、所望の効果を有するのに有効な量で患者、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトに投与し得る。B 細胞は、例えば静脈内、腫瘍内、動脈内、経皮、カテーテルまたはステントによる局所送達によるもの、針またはその他の腫瘍内注射用の装置によるもの、皮下などを含めた様々な経路によって投与し得る。B 細胞は 1 回または複数回投与し得る。通常の技術を有する医師であれば、ゲノム編集初代 B 細胞および任意選択で必要な医薬組成物の有効な量および投薬を決定し処方することができる。

【0095】

癌としては、例えば、骨癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌、喉頭癌、肺癌、膵臓癌、前立腺癌、皮膚癌、脊椎癌、胃癌、子宮癌、造血系癌および / またはリンパ系癌などが挙げられる。造血系癌および / またはリンパ系癌としては、例えば、急性骨髄性白血病 ( A M L ) 、急性リンパ芽球性白血病 ( A L L ) 、骨髄異形成症候群 ( M D S ) 、非ホジキンリンパ腫 ( N H L ) 、慢性骨髄性白血病 ( C M L ) 、ホジキン病および / または多発性骨髄腫が挙げられる。癌は転移性癌であり得る。

【0096】

さらなる態様では、ゲノム編集初代 B 細胞を投与して、対象の腫瘍の成長を阻害し得る。いくつかの実施形態では、腫瘍は固形腫瘍を含み得る。

【0097】

ウイルスとしては例えば、例えば C M V 、水痘帯状疱疹ウイルス ( V Z V ) 、エプスタイン・バーウイルス ( E B V ) 、単純ヘルペスウイルス ( H S V ) もしくはカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス ( K S H V ) を含めたヘルペスウイルス；例えばデングウイルスもしくはジカウイルスを含めたフラビウイルス科のウイルス；または例えばヒト免疫不全ウイルス ( H I V ) を含めたレンチウイルスが挙げられる。

【0098】

酵素異常症は、いくつかの実施形態では、現時点で酵素補充療法によって治療される、例えばゴーシェ病、ファブリー病、M P S I 、M P S I I (ハンター症候群)、M P S V I 、I I 型糖尿病、アデノシンデアミナーゼ欠損症またはボンペ病を含めた酵素異常症を含み得る。酵素異常症は、いくつかの実施形態では、現時点で遺伝子治療によって治療される酵素異常症を含み得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 9 】

ゲノム編集初代 B 細胞を他の治療の実施前、実施時および / または実施後に投与または調製し得る。このような併用療法は、ゲノム編集初代 B 細胞を他の抗癌剤、他の抗ウイルス剤または他の抗癌剤と他の抗ウイルス剤の組合せの使用前、使用時および / または使用後に投与することを含み得る。このような薬剤としては、例えば、サイトカイン；ケモカイン；例えば抗親和性抗 C M V I g G 抗体を含めた治療用抗体；例えば B i K E もしくは T R i K E を含めた N K 細胞受容体リガンド；アジュバント；抗酸化剤；化学療法剤；および / または放射線が挙げられる。ゲノム編集初代 B 細胞の投与または調製は、他の抗癌剤および / または他の抗ウイルス剤の投与と時間単位、日単位、または場合によって週単位で時間的に分離し得る。上記のものに加えて、またはこれに代えて、投与または調製を他の生物学的に活性な薬剤または様式、例えば、特に限定されないが、抗悪性腫瘍剤および特に限定されないが外科手術などの非薬物療法などと組み合わせ得る。

10

## 【 0 1 0 0 】

いくつかの実施形態では、対象を B 細胞受容体によって認識される抗原で免疫感作する前に、特異性が既知の B 細胞受容体を含むゲノム編集初代 B 細胞を対象に投与し得る。このような実施形態では、抗原で免疫感作することにより、B 細胞受容体の構成要素と同じプロモーターの下で核酸の転写調節を可能にし得る。

## 【 0 1 0 1 】

例えば、ある抗原に特異的な B 細胞受容体を含み、ある酵素をコードする核酸を含むゲノム編集初代 B 細胞を対象に導入し得る。対象は酵素欠損症であり得る。対象を抗原で免疫感作することにより、ゲノム編集初代 B 細胞から長期生存形質細胞への分化および酵素をコードする核酸の転写が起こり、それによりゲノム編集 B 細胞での酵素の発現が増大することが予想される。

20

## 【 0 1 0 2 】

ゲノム編集初代 B 細胞の例示的实施形態

1 . ゲノム編集初代 B 細胞。

## 【 0 1 0 3 】

2 . C D 1 9 を発現する細胞を含む、実施形態 1 のゲノム編集初代 B 細胞。

## 【 0 1 0 4 】

3 . I g M もしくは I g D またはその組合せを発現する細胞を含む、実施形態 1 または 2 のいずれかのゲノム編集初代 B 細胞。

30

## 【 0 1 0 5 】

4 . C D 2 7 <sup>+</sup> 細胞を含む、実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 つのゲノム編集初代 B 細胞。

## 【 0 1 0 6 】

5 . B 細胞が C D 2 1 <sup>+</sup> 細胞を含む、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つのゲノム編集初代 B 細胞。

## 【 0 1 0 7 】

6 . C X C R 5 <sup>+</sup> 細胞を含む、実施形態 1 ~ 5 のいずれか 1 つのゲノム編集初代 B 細胞。

40

## 【 0 1 0 8 】

7 . 末梢血、臍帯細胞、腹水または固形腫瘍から単離された細胞を含む、実施形態 1 ~ 6 のいずれか 1 つのゲノム編集初代 B 細胞。

## 【 0 1 0 9 】

8 . 非クローン性細胞を含む、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つのゲノム編集初代 B 細胞。

## 【 0 1 1 0 】

9 . 増殖性細胞を含む、実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 つのゲノム編集初代 B 細胞。

## 【 0 1 1 1 】

1 0 . 哺乳動物細胞である、実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つのゲノム編集初代 B 細胞。

## 【 0 1 1 2 】

50

- 11．ヒト細胞である、実施形態1～10のいずれか1つのゲノム編集初代B細胞。  
【0113】
- 12．ゲノム編集初代B細胞の内在遺伝子が欠失している、実施形態1～11のいずれか1つのゲノム編集初代B細胞。  
【0114】
- 13．ゲノム編集初代B細胞の内在遺伝子が点変異を含む、実施形態1～12のいずれか1つのゲノム編集初代B細胞。  
【0115】
- 14．外来遺伝子を含む、実施形態1～13のいずれか1つのゲノム編集初代B細胞。  
【0116】
- 15．遺伝子が、B細胞受容体（BCR）の少なくとも一部分をコードする核酸を含む、実施形態12～14のいずれか1つのゲノム編集初代B細胞。  
【0117】
- 16．非ゲノム編集初代B細胞に比して内在性B細胞受容体（BCR）の発現の減少を示す、実施形態1～15のいずれか1つのゲノム編集初代B細胞。  
【0118】
- 17．CD19の発現または活性を変化させる修飾を含む、実施形態1～16のいずれか1つのゲノム編集初代B細胞。  
【0119】
- 18．ゲノムの非コード領域の修飾を含む、実施形態1～17のいずれか1つのゲノム編集初代B細胞。  
【0120】
- 19．非ゲノム編集初代B細胞に比して生存能の増大を示す、実施形態1～18のいずれか1つのゲノム編集初代B細胞。  
【0121】
- 20．B細胞受容体（BCR）をコードする核酸と過剰発現させる遺伝子をコードする核酸とを含む治療用カセットを含む、実施形態1～19のいずれか1つのゲノム編集初代B細胞。  
【0122】
- 21．対象の疾患を治療または予防する方法であって、対象に実施形態1～20のいずれか1つのゲノム編集初代B細胞を含む組成物を投与することを含む、方法。  
【0123】
- 22．疾患が、酵素異常症、癌、前癌状態、病原体による感染症またはウイルス感染症を含む、実施形態21の方法。  
【0124】
- 例示的な治療用カセットの実施形態
- 1．B細胞受容体（BCR）をコードする核酸と、過剰発現させる遺伝子をコードする核酸とを含む、治療用カセット。  
【0125】
- 2．BCRが膜貫通領域を含む、実施形態1の治療用カセット。  
【0126】
- 3．過剰発現させる遺伝子が、酵素をコードする核酸を含む、実施形態1または実施形態2の治療用カセット。  
【0127】
- 4．酵素が、酵素異常症を有する対象に欠如している酵素を含む、実施形態3の治療用カセット。  
【0128】
- 5．酵素がアルファ-L-イズロニダーゼ（IDUA）を含む、実施形態4の治療用カセット。  
【0129】

10

20

30

40

50



6. B C Rをコードする核酸と過剰発現させる遺伝子をコードする核酸が、転写的に結合しているか、翻訳的に結合しているか、またはその両方である、実施形態1～5のいずれか1つの治療用カセット。

【0130】

7. B C Rをコードする核酸および過剰発現させる遺伝子をコードする核酸の転写を駆動するプロモーターを含む、実施形態1～6のいずれか1つの治療用カセット。

【0131】

8. B C Rがフィコエリトリン ( P E ) に特異的なB C Rを含む、実施形態1～7のいずれか1つの治療用カセット。

【0132】

9. B C RがB 1 2に特異的なB C Rを含む、実施形態1～7のいずれか1つの治療用カセット。

【0133】

10. 実施形態1～9のいずれか1つの治療用カセットを含む、ベクター。

【0134】

11. レンチウイルスベクターを含む、実施形態10のベクター。

【0135】

12. B a E V - 偽型レンチウイルスベクター、V S V g - 偽型レンチウイルスベクター、F A M 1 レンチウイルスベクターおよびF A M 2 レンチウイルスベクターのうちの少なくとも1つを含む、実施形態10または実施形態11のいずれかのベクター。

【0136】

13. シス作用性D N Aエレメントを含む、実施形態10～12のいずれか1つのベクター。

【0137】

14. 実施形態1～9のいずれか1つの治療用カセットを含む、細胞。

【0138】

15. 実施形態10～13のいずれか1つのベクターを含む、細胞。

【0139】

16. 内在性B細胞受容体 ( B C R ) をコードする核酸の修飾を含む、実施形態14または実施形態15のいずれかの細胞。

【0140】

17. 修飾が、内在性B C Rの発現を減少させる修飾を含む、実施形態16の細胞。

【0141】

18. B細胞を含む、実施形態15～17のいずれか1つの細胞。

【0142】

19. 長期生存形質細胞を含む、実施形態15～18のいずれか1つの細胞。

【0143】

20. 対象に実施形態14～19のいずれか1つの細胞を投与することを含む、方法。

【0144】

21. 対象に抗原を投与することをさらに含み、治療用カセットのB C Rが抗原に特異的なものである、実施形態20の方法。

【0145】

初代B細胞のゲノムを編集する方法の例示的实施形態

1. 初代B細胞のゲノムを編集することを含む、方法。

【0146】

2. 初代B細胞が、C D 1 9を発現する細胞を含む、実施形態1の方法。

【0147】

3. 初代B細胞が、I g MもしくはI g Dまたはその組合せを発現する細胞を含む、実施形態1または2のいずれかの方法。

【0148】

10

20

30

40

50

4. 初代 B 細胞が C D 2 7 <sup>+</sup> 細胞を含む、実施形態 1 または 3 のいずれかの方法。  
【0149】
5. 初代 B 細胞が C D 2 1 <sup>+</sup> 細胞を含む、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つの方法。  
【0150】
6. 初代 B 細胞が C X C R 5 <sup>+</sup> 細胞を含む、実施形態 1 ~ 5 のいずれか 1 つの方法。  
【0151】
7. 初代 B 細胞が、末梢血、臍帯細胞、腹水または固形腫瘍から単離された細胞を含む、実施形態 1 ~ 6 のいずれか 1 つの方法。  
【0152】
8. 初代 B 細胞が非クローン性細胞を含む、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つの方法。 10  
【0153】
9. 初代 B 細胞が増殖性細胞を含む、実施形態 1 ~ 8 のいずれか 1 つの方法。  
【0154】
10. 初代 B 細胞が哺乳動物細胞である、実施形態 1 ~ 9 のいずれか 1 つの方法。  
【0155】
11. 初代 B 細胞がヒト細胞である、実施形態 1 ~ 10 のいずれか 1 つの方法。  
【0156】
12. 初代 B 細胞に外来性のタンパク質または核酸を導入することを含む、実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つの方法。  
【0157】 20
13. 細胞のエレクトロポレーションを含む、実施形態 1 ~ 12 のいずれか 1 つの方法。  
【0158】
14. 標的化ヌクレアーゼまたは標的化ヌクレアーゼをコードする核酸を導入することを含む、実施形態 1 ~ 13 のいずれか 1 つの方法。  
【0159】
15. ガイド RNA ( g RNA ) を導入することを含む、実施形態 1 ~ 14 のいずれか 1 つの方法。  
【0160】
16. g RNA が、化学修飾 g RNA を含む、実施形態 15 の方法。 30  
【0161】
17. 化学修飾 g RNA が、2' - O - メチル ( M )、2' - O - メチル - 3' - ホスホロチオアート ( M S ) または 2' - O - メチル - 3' - チオホスホノアセタート ( M S P ) を含む、実施形態 16 の方法。  
【0162】
18. ナトロノバクテリウム・グレゴリー ( *Natronobacterium gregoryi* ) アルゴノート ( N g A g o ) およびガイド DNA ( g DNA ) を導入することを含む、実施形態 1 ~ 17 のいずれか 1 つの方法。  
【0163】
19. ゲノムを編集することが、C D 19 の遺伝子を編集することを含む、実施形態 1 ~ 18 のいずれか 1 つの方法。 40  
【0164】
20. ゲノムを編集することが、B 細胞受容体 ( B C R ) の一部分をコードする核酸を編集することを含む、実施形態 1 ~ 19 のいずれか 1 つの方法。  
【0165】
21. ゲノムを編集することが、ゲノムの非コード領域を編集することを含む、実施形態 1 ~ 20 のいずれか 1 つの方法。  
【0166】
22. B 細胞を選択することをさらに含む、実施形態 1 ~ 21 のいずれか 1 つの方法。  
【0167】 50

23. ゲノムを編集した後に選択を実施する、実施形態22の方法。

【0168】

24. B細胞を編集されたゲノムに関して選択する、実施形態22または23のいずれかの方法。

【0169】

25. 初代B細胞を活性化、刺激および増殖の段階のうち少なくとも1つのものに供することをさらに含む、実施形態1～24のいずれか1つの方法。

【0170】

26. 初代B細胞を活性化、刺激および増殖の段階のうち少なくとも1つのものに供することが、B細胞をサイトカインに曝露することを含む、実施形態25の方法。

10

【0171】

27. 初代B細胞を活性化、刺激および増殖の段階のうち少なくとも1つのものに供することが、B細胞をCD40Lに曝露することを含む、実施形態25または26のいずれかの方法。

【0172】

28. 初代B細胞に外来性のタンパク質または核酸を導入する前に、初代B細胞を活性化、刺激および増殖の段階のうち少なくとも1つのものに供する、実施形態25～27のいずれか1つの方法。

【0173】

29. 初代B細胞にB細胞受容体(BCR)をコードする核酸と過剰発現させる遺伝子をコードする核酸とを含む治療用カセットを導入することをさらに含む、実施形態1～28のいずれか1つの方法。

20

【0174】

本発明を以下の実施例により説明する。具体的な例、材料、量および手順は、本明細書に記載される本発明の範囲および趣旨に従って広く解釈されるべきであることを理解するべきである。

【0175】

(実施例)

実施例1

培地

30

培養培地:

- X-VIVO 20 (Lonza Group社、アレンドール、ニュージャージー州)

- 10%ヒト血清

または

- HSC Expansion Media XF (Miltenyi Biotec社、サンディエゴ、カリフォルニア州)

- 5%ヒト血清

凍結培地:

- ウシ胎児血清(FBS) 45 mL (熱不活化したもの)

40

- DMSO 5 mL

【0176】

方法

ガイドRNAの設計および構築

CRISPR Design Program (Zhang Lab, MIT 2015)を用いて、表1に示すガイドRNA(gRNA)を遺伝子の所望の領域に対して設計した。オフターゲット位置により求めた最高順位の数値に基づき複数のgRNAを選択した。gRNAをオリゴヌクレオチド対、すなわち、5'-CACCG-gRNA配列-3'および5'-AAAC-逆相補的gRNA配列-C-3'の形で順番に並べた。改変した標的配列クローン化プロトコル(Zhang Lab, MIT)を用いてgRNAを

50

一緒にクローン化した。サーモサイクラーで T4 P N K ( N E B 社 ) および 1 0 × T 4 L i g a t i o n B u f f e r ( N E B 社 ) を用い、37 で 3 0 分、95 で 5 分、次いで 5 / 分で 2 5 まで段階的に低下させるプロトコルでオリゴヌクレオチド対と一緒にリン酸化しアニールさせた。ライゲーション反応には F a s t D i g e s t B b s I ( F e r m e n t a s 社 )、F a s t A P ( F e r m e n t a s 社 ) および 1 0 × F a s t D i g e s t B u f f e r で消化した p E N T R 1 ベクターを用いる。T4 D N A L i g a s e および B u f f e r ( N E B ) を用いて、消化 p E N T R 1 ベクターと、前段階でリン酸化しアニールさせたオリゴ二本鎖 ( 希釈比 1 : 2 0 0 ) とをライゲートした。ライゲーション物を室温で少なくとも 1 時間インキュベートし、次いで形質転換し、ミニプレップした ( G e n e J E T P l a s m i d M i n i p r e p K i t 、 L i f e T e c h n o l o g i e s 社 ) 。プラスミドにシーケンシングを実施して適切な挿入を確認した。

10

【 0 1 7 7 】

【 表 1 】

gRNA の名称	gRNA 配列	配列番号
BAX gRNA 1 Oligo 1	GCGGCGGTGATGGACGGGTCC	配列番号1
BAX gRNA 2 Oligo 1	GCGGCGGTGATGGACGGGTC	配列番号2
BAX gRNA 3 Oligo 1	GTCTCGCCGGGTCCGCGCGGG	配列番号3
BAX gRNA 4 Oligo 1	GCCTCTCGCCGGGTCCGCGC	配列番号4
BAX gRNA 5 Oligo 1	GCGGACCCGGCGAGAGGCGG	配列番号5
BAX gRNA 6 Oligo 1	GTCCCGCCGCGCCTCTCGCC	配列番号6
Lair1 gRNA 1 Oligo 1	GTCTTGCATTGGTGCGCCTC	配列番号7
Lair1 gRNA 2 Oligo 1	GCCTGAGGCGCACCAATGCA	配列番号8
Lair1 gRNA 3 Oligo 1	GCAGAGTTCTGTCTTGCAT	配列番号9
Lair1 gRNA 4 Oligo 1	GCATTGGTGCGCCTCAGGCC	配列番号10
Lair1 gRNA 5 Oligo 1	GCTAGGCCCAGGAGGGCGGTG	配列番号11
Lair1 gRNA 6 Oligo 1	GTCAGGCCAGGCTGCACTGCT	配列番号12
BCL2 gRNA 1 Oligo 1	GCTTCTAGCGCTCGGCACCGG	配列番号13
BCL2 gRNA 2 Oligo 1	GCAGCGCGGGCTTCTAGCGCT	配列番号14
BCL2 gRNA 3 Oligo 1	GGGCTTCTAGCGCTCGGCAC	配列番号15
BCL2 gRNA 4 Oligo 1	GTTCTAGCGCTCGGCACCGGC	配列番号16
BCL2 gRNA 5 Oligo 1	GAAATGAAGGCAGGACGCGCC	配列番号17
BCL2 gRNA 6 Oligo 1	GTCATTTATCCAGCAGCTTTT	配列番号18
CD19 gRNA 1	GAAGCGGGGACTCCCGAGACC	配列番号19
CD19 gRNA 2	GTTCAACGTCTCTCAACAGAT	配列番号20
CD19 gRNA 3	GGGGCCTCATGTGGATTCCC	配列番号21
CD19 gRNA 4	GCTGTGCTGCAGTGCCCTCAA	配列番号22
CD19 gRNA 5	GCTTCTACCTGTGCCAGCCG	配列番号23
CD19 gRNA 6	GTCTCAGAGGGGGGCCCCGGC	配列番号24
CD19 Cell For	TACCCTCTCTGAGCCTCCAT	配列番号25
CD19 Cell Rev	CCTCTCTCCAGCTCCATTGT	配列番号26
hIGKC gRNA 1	GGTGGATAACGCCCTCCAAT	配列番号27
hIGKC gRNA 2	TCAACTGCTCATCAGATGGC	配列番号28
hIGKC gRNA 3	ATCCACCTTCCACTGTACTT	配列番号29
hIGKC gRNA 4	ATTCAGCAGGCACACAACAG	配列番号30
hIGKC gRNA 5	CCTGCTCTGTGACACTCTCC	配列番号31
hIGKC gRNA 6	TCTCCTGGGAGTTACCCGAT	配列番号32

20

30

40

【 0 1 7 8 】

g R N A の 検 証

50

293T細胞を24ウェルプレートに $1 \times 10^5$ 細胞/ウェルの密度で播いた。Opti-MEM培地150 $\mu$ LにgRNAプラスミド1.5 $\mu$ g、Cas9プラスミド1.5 $\mu$ gおよびGFP100ngを混ぜ合せた。また別のOpti-MEM培地150 $\mu$ LにLipofectamine 2000 Transfection試薬(Invitrogen社、Life Technologies社)5 $\mu$ を混ぜた。これらの溶液を混ぜ合わせ、室温で10分~15分間インキュベートした。24ウェルプレートの1つのウェルにDNA-脂質複合体を滴加した。細胞を37 $^{\circ}$ Cで3日間インキュベートし、次いで、GeneJET Genomic DNA Purification Kit(Thermo Scientific社)を用いてゲノムDNAを収集した。Surveyor Digest、ゲル電気泳動およびデンシトメトリーによりgRNAの活性を定量化した(Guschinら、Methods Mol Biol、2010、649:247-56)。

#### 【0179】

ロイコパックからの末梢血単核球(PBMC)の単離

ヒトPBMC(Stem Cell Technologies社、バンクーバー、カナダ)を冷却した1xPBSで3:1に希釈した。50mLのコニカルチューブに入ったLymphoprep(Stem Cell Technologies社、バンクーバー、カナダ)15mLの上に希釈血液を(極めてゆっくりと)滴加した。細胞を400xgで25分間、ブレーキ無し遠心した。パフィーコートを取り出し、新たなコニカルチューブに入れた。細胞を冷却した1xPBSで洗浄し、400xgで10分間遠心した(ブレーキ有り)。上清を除去し、細胞を凍結培地に再懸濁させ、カウントし、凍結させた。

#### 【0180】

CD19<sup>+</sup>B細胞の単離

PBMCを解凍してカウントし、細胞密度を $1 \times 10^8$ 細胞/mLに調整し、細胞を14mLのポリスチレン製丸底チューブに移した。EasySep Human CD19 Positive Selection Kit(Stem Cell Technologies社、バンクーバー、カナダ)を製造業者のプロトコル通りに用いてB細胞を選択した。収集した細胞を400xgで5分間遠心し、増殖培地に再懸濁させた。

#### 【0181】

CD19<sup>+</sup>B細胞の活性化および刺激

B細胞を刺激するため、単離CD19<sup>+</sup>B細胞をカウントし、24ウェルプレートに $1 \times 10^6$ 細胞/mLの密度で播いた。製造業者のプロトコル(Miltenyi Biotec社、サンディエゴ、カリフォルニア州)に従い、細胞をCD40LおよびIL-4とともに播いた。細胞を37 $^{\circ}$ Cで1週間インキュベートし、次いで、血球計数器を用いてカウントした。

#### 【0182】

CD19<sup>+</sup>B細胞のNEONトランスフェクション

NEON Transfection System(100 $\mu$ L Kit、ThermoFisher Scientific社、ウォルサム、マサチューセッツ州)を下に記載する任意の変更以外は製造業者の指示通りに用いて、未刺激のB細胞または刺激したB細胞にエレクトロポレートした。細胞をカウントし、100 $\mu$ LのResuspension Buffer Tに $1 \times 10^6$ 細胞の密度で再懸濁させた。細胞混合物にGFPプラスミドもしくはmRNA 5 $\mu$ gまたはCas9 15 $\mu$ gおよびプラスミドもしくはmRNA gRNA 10 $\mu$ g(分子水中)を加えた。細胞に1400V、10ms、3パルスでエレクトロポレートした。トランスフェクション後、細胞を6ウェルプレートの培養培地2mLに播いた。

#### 【0183】

AMAXA NUCLEOFECTORおよびHuman B Cell NUCLEOFECTOR Kit(Lonza Cologne社、ケルン、ドイツ)を用いて、未刺激のB細胞または刺激したB細胞を製造業者の指示通りにヌクレオポレートした。

## 【0184】

## フローサイトメトリー

トランスフェクションから24～72時間時間後、エレクトロポレートしたB細胞のGFP発現をフローサイトメトリーにより解析した。細胞を0.5%FBSを含む冷却した1×PBSで洗浄することによって調製し、Viability Dye eFlour 780 (eBiosciences社、サンディエゴ、カリフォルニア州)で染色した。LSR II (BD Biosciences社、サンノゼ)およびFlowJo v. 9を用いて細胞を解析した。

## 【0185】

CD19<sup>+</sup>B細胞の相同組換え

刺激したCD19<sup>+</sup>B細胞にNEONトランスフェクションシステム(100μL Kit、ThermoFisher Scientific社、ウォルサム、マサチューセッツ州)を用いてエレクトロポレートした。細胞をカウントし、100μLのResuspension Buffer Tに1.0～3.0×10<sup>6</sup>細胞の密度で再懸濁させた。mRNA Cas9 (TriLink BioTechnologies社、サンディエゴ、カリフォルニア州)15μg、mRNA gRNA (TriLink BioTechnologies社)10μg および相同組換え(HR)標的化ベクター10μgを用いてHRを検討した。HR標的化ベクター10μg単独またはCas9 15μgとmRNA gRNA 10μgを対照として用いた。エレクトロポレーション後、細胞を6ウェルプレートの培養培地2mLに播いた。3日毎にCountess II Automated Cell Counter (ThermoFisher Scientific社、ウォルサム、マサチューセッツ州)を用い細胞をカウントして、上記の様々な条件下での増殖をモニターした。HRをモニターするため、細胞をフローサイトメトリーにより解析し、PCRにより試験した。フローサイトメトリーでは、細胞を週1回で3週間解析した。B細胞をFixable Viability Dye eFluor 780 (eBiosciences社、サンディエゴ)で染色した。LSR II (BD Biosciences社、サンノゼ、カリフォルニア州)およびFlowJo v. 9を用いて細胞を解析した。PCRによりHRを試験するため、B細胞からgDNAを単離し、accuprime taq DNAポリメラーゼ high fidelity (ThermoFisher Scientific社、ウォルサム、マサチューセッツ州)を用いてPCRにより増幅した。CCR5遺伝子およびHR標的化ベクターの両端の両方に対し表2に示すプライマーを設計して、適切な相同組換えを探した。

## 【0186】

## 【表2】

順方向5'HRプライマー	TGC ATG TTC TTT GTG GGC TA	配列番号33
逆方向5'HRプライマー	CAC GGC GAC TAC TGC ACT TA	配列番号34
順方向3'HRプライマー	GGG AGG ATT GGG AAG ACA AT	配列番号35
逆方向3'HRプライマー	TGT CTT TTC TCC CCA TAG CAA	配列番号36

## 【0187】

結果を図1～2に示す。

## 【0188】

## 実施例2

## 方法

## gRNAの検証

293T細胞を24ウェルプレートに1×10<sup>5</sup>細胞/ウェルの密度で播いた。Opti-MEM培地150マイクロリットル(μL)にgRNAプラスミド1.5マイクログラム(μg)、Cas9プラスミド1.5μgおよびGFP 100ナノグラム(ng)を混ぜた。また別のOpti-MEM培地150μLにLipofectamine 2000 Transfection試薬(Invitrogen社、カールスバド、カリ

フォルニア州；Life Technologies社、カールスバド、カリフォルニア州）5  $\mu$ Lを混ぜた。これらの溶液を混ぜ合わせ、室温で10～15分間インキュベートした。24ウェルプレートの1つのウェルにDNA-脂質複合体を滴加した。細胞を37で3日間インキュベートし、次いで、GeneJET ゲノムDNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific社、ウォルサム、マサチューセッツ州)を用いてゲノムDNAを収集した。

#### 【0189】

図5および8では、Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) アルゴリズム (tide.nki.nlのワールドワイドウェブで利用可能)によりgRNAの活性を定量化した。簡潔に述べれば、編集した領域をPCRにより領域特異的プライマーを用いて増幅し、ACGT社(ホイーリング、イリノイ州)に送付してSanger Sequencingに供した。ACGT社から返送されたクロマトグラムファイルをTIDEウェブサイトにアップロードして編集効率を解析した。

10

#### 【0190】

レンチウイルスベクターの作製および力価測定

Lipofectamine 2000 Transfection試薬 (Invitrogen社、ウォルサム、マサチューセッツ州)を製造業者の指示通りに用いた293T細胞の一過性トランスフェクションにより、BaEV-偽型レンチウイルスベクターおよびVSVg-偽型レンチウイルスベクターを作製した。BaEV糖タンパク質 (Fusilra, Molecular Therapy, 2015, 23(11):1734-47) 15  $\mu$ gまたはVSV糖タンパク質 15  $\mu$ gにgagpolパッケージングプラスミドおよびカーゴプラスミド 20  $\mu$ gを混ぜて、それぞれBaEV-偽型ウイルスまたはVSVg-偽型ウイルスを構築した。トランスフェクションから18時間後、培地を10% FBSおよび1xペニシリン-ストレプトマイシンを含有するダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に入れ替えた。24時間後、ウイルス力価を得、ろ過して細胞残屑を除去した。qPCR Lentivirus Titration Kit (Applied Biological Materials社、バンクーバー、カナダ)を製造業者の指示通りに用いてレンチウイルス力価を求めた。結果を図4に示す。

20

#### 【0191】

さらに2種類のレンチウイルスベクターを構築して、MNDプロモーター(骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサーを有する修飾MoMuLV LTRのU3領域を含む合成プロモーター)の制御下でB12の重鎖および軽鎖または抗PEの重鎖および軽鎖ならびにコドン最適化IDUA (coIDUA)を発現させた。P2Aペプチド配列を導入することにより、重鎖、軽鎖およびcoIDUAを同時発現させた。これらのベクターは、mRNA転写物の選択的スプライシングを用いて成熟ナীবB細胞の機能的BCRまたは形質細胞の機能的可溶性抗体の発現を誘導するものであり、このため、BCRまたは可溶性抗体の発現はB細胞の成熟状態に左右される。ベクターの模式図を図6に示す。ベクターの配列を表3～8に示す。

30

#### 【0192】

B細胞の急性活性化および慢性活性化

CD40の架橋によりB細胞を活性化させるB Cell Expansion Kit (Miltenyi Biotec社、サンディエゴ、カリフォルニア州)で急性活性化B細胞および慢性活性化B細胞の両方を活性化させた。急性に活性化させる細胞は、レンチウイルス構築物を加える前に12時間刺激し、慢性に活性化させる細胞は、レンチウイルス構築物を加える前に14日間活性化させた。

40

#### 【0193】

CD19発現の標的化ノックアウト

CRISPR/Cas9システムを用いて、初代ヒトB細胞のCD19発現をノックアウトした。NEON Transfection System (1400ボルト、10

50

ms、3パルス)を用いて、慢性活性化B細胞にCas9タンパク質をコードする化学修飾mRNA(Trilink BioTechnologies社、サンディエゴ、カリフォルニア州)1.5μgおよび化学修飾CD19 gRNA4 oligo1(Trilink BioTechnologies社)1μgをトランスフェクトした。Cas9タンパク質とCD19 gRNAとを組み合わせることにより二本鎖切断が生じ、それにより、遺伝子発現およびタンパク質レベルを打ち消すインデル形成およびフレームシフト変異が生じる。

#### 【0194】

##### CD19発現の評価

エレクトロポレーションから5日後、操作した初代ヒトB細胞をAPC e-Fluor 780 Fixable Viability DyeおよびBV421コンジュゲート抗CD19抗体(BioLegend社、サンディエゴ、カリフォルニア州)で染色した。細胞をLSRIIFローサイトメータ(BD Biosciences社)にかけ、FlowJo Version 9(Tree Star社、アシュランド、オレゴン州)を用いてデータを解析した。結果を図5に示す。

10

#### 【0195】

##### B細胞でのエレクトロポレーション条件の検討

14日間活性化させたB細胞に様々な電圧、幅およびパルス設定の下、NEONトランスフェクションでeGFPをコードするプラスミドDNAまたはmRNAをエレクトロポレートした(図7A)。エレクトロポレーションから2日間後、eGFP発現によりトランスフェクションのパーセントを求め、LSRIIFローサイトメータで測定した。トリパンブルー排除法により細胞カウント数および細胞生存率を求めた。結果を図7Bに示す。

20

#### 【0196】

##### CD19<sup>+</sup>B細胞の遺伝子ノックアウト

刺激したCD19<sup>+</sup>B細胞にNEON Transfection Kit and System(Invitrogen社、カールスバッド、カリフォルニア州)を用いてエレクトロポレートした。Integrated DNA Technologies社(コーラルビル、アイオワ州)のAlt-R CRISPR-Cas9試薬を用いてBCL2遺伝子座での遺伝子編集(gRNA6 Oligo1)を実施した。簡潔に述べれば、200μMのAlt-R CRISPR-Cas9 crRNA 1.1μL、Alt-R tracrRNA 1.1μLおよび無ヌクレアーゼ二本鎖緩衝液2.8μLを95℃で5分間インキュベートし、次いで、室温(RT)で冷却してcrRNA:tracrRNA二本鎖を形成させた。22ピコモル(pmol)のcrRNA:tracrRNA二本鎖0.5μLおよび18pmolのAlt-R Cas9酵素0.5μLをRTで20分間インキュベートしてAlt-R CRISPR-Cas9システムを形成させた。このAlt-R CRISPR-Cas9システムにエレクトロポレーションエンハンサー(Invitrogen社、カールスバッド、カリフォルニア州)を混ぜ、次いで慢性活性化B細胞360,000個に加え、T緩衝液で最終体積12μLとした。10μLのピペットチップを用いて細胞に1400ボルト、10ms、3パルスでエレクトロポレートした。エレクトロポレートした細胞を5日間培養した後、上に記載した通りにTIDE解析を用いて遺伝子編集を測定した。結果を図8に示す。

30

40

#### 【0197】

##### B細胞の拡大

B細胞拡大キット(Miltenyi Biotec社、サンディエゴ、カリフォルニア州)を製造業者のプロトコル通りに用いて、分取したCD19<sup>+</sup>B細胞を14日間拡大した。低密度の開始B細胞濃度( $1 \times 10^5$ 細胞/mL)および高密度の開始B濃度( $1 \times 10^6$ 細胞/mL)の両方を試験した。トリパンブルー排除法を用いて、示される時点での細胞カウント数を求めた。結果を図9に示す。

#### 【0198】

50



## IDUA 活性

NEON System (1400ボルト、10ms、3パルス)を用いて、293T細胞にGFP mRNA単独(対照)またはGFP mRNAとpLL MND B12-IDUA発現プラスミドをエレクトロポレートした。pLL MND B12-IDUA発現プラスミドには、図6Cに示される発現カセットが含まれている。

## 【0199】

細胞内IDUA活性を測定するため、エレクトロポレーションから3日後に細胞を回収した。Oura, 2014, Mol Genet Metab., 2014; 111(2): 113-5に記載されているIDUAアッセイを用いてIDUA活性(nmol/(時・mgタンパク質))を測定した。pLL MND B12-IDUA発現プラスミドを導入したHEK 293T細胞の方が対照よりも有意に高い細胞内IDUA活性(40倍)を示した。結果を図10Aに示す。

10

## 【0200】

細胞培地のIDUA活性を測定するため、エレクトロポレーションから3日後に培地を収集した。Oura, 2014, Mol Genet Metab., 2014; 111(2): 113-5に記載されているIDUAアッセイを用いてIDUA活性(nmol/(時・mL))を測定した。pLL MND B12-IDUA発現プラスミドを導入したHEK 293T細胞が含まれていた培地の方が対照よりも有意に高いIDUA活性(14倍)を示した。結果を図10Bに示す。

## 【0201】

20

本明細書に引用されている特許、特許出願および刊行物ならびに電子的に入手可能な資料(例えば、例えばGenBankおよびRefSeqのヌクレオチド配列提出物および例えばSwissProt、PIR、PRF、PDBのアミノ酸配列提出物ならびにGenBankおよびRefSeqの注釈付きコード領域からの翻訳物を含む)はいずれも、開示全体が参照により組み込まれる。本願の開示と参照により本明細書に組み込まれる任意の文献の開示(1つまたは複数)との間に何らかの不一致が存在する場合、本願の開示の方が適用されるものとする。上記の詳細な説明および実施例は、単に明確な理解を目的に記載したものである。そこから理解されるべき不必要な限定は一切ない。本発明は、当業者に明らかな変形形態が請求項によって定められる本発明の範囲内に含まれることから、図示および記載されている正確な詳細に限定されることはない。

30

## 【0202】

## 【表 3 - 1】

抗 P E 重鎖／軽鎖／c o I D U A レンチウイルス同時発現カセットのコード配列（配列番号 3 7）。長い末端反復配列（L T R）が灰色で強調されている。M N D プロモーターが灰色で強調され、下線が施されている。抗 P E 重鎖、軽鎖および c o I D U A が大文字で示され、下線が施されている。P 2 A がイタリック体で示され、暗灰色で強調されている。

LTR

```

gggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcttgag
lgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagcagt
g
gcgccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggcttgctgaagcgcgacggcaag
agggcagggggcgcgactgggtgagtacgcaaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagtatt
aagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaataataaataacatatagtatgg
gcaagcagggagctagaacgattcgagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaac
catcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaag
acaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccggccgctgatcttc
agacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcac
ccaccaaggcaagagaagagtgggtgcagagagaaaaaagagcagtggggaataggagctttgttccttgggttcttgggagcagcagg
aagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgacgcagcagaacaatttgctga
gggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagctcggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatac
ctaaaggatcaacagctcctggggatttggggttgcctctggaaaactcatttgaccactgctgtgccttggaatgctagtgtggagtaata
aatctctggaacagatttggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattg
aagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaatttggttaacataac
aaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtagggttaagaatagttttgtgtactttctatagtgaatag
agttaggcagggatattcaccattatcgtttcagacccacctcccaaccccgaggggacccgacaggcccggaaggaatagaagaagaa
ggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatcggcactgcgtgcgccaattctgcagacaaatggcagtattca
tcacaatttttaaaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaacta

```

10

20

30

40

## 【表 3 - 2】

aagaattacaaaaaacaattacaaaaattcaaaattttcgggtttattacagggacagcagagatccagtttggttagtaccgggcccgc  
 tctagagatccgacgcgccatctctaggcccgccggccccctcgacagactgtgggagaagctcggctactccccgccccggtt  
 aatttgcatataatatttcttagtaactatagaggcttaattgtgcgataaaagacagataatctgttcttttaatactagctacattttaca  
 tgataggcttggattttctataagagatacaaaatactaaattatttttaaaaaacagcacaaaaggaaactcacctaactgtaaagta  
 attgtgtgttttgagactataaatatcccttgagagaaaagccttgtaacgcgcgggtgacctcgaggctcagcggtatcgataagctcgctt  
 cacgagattccagcaggctcagggacctaataacttcgtatagcatacattatacgaagttatattaagggttccaagcttaagcggccg  
 cgtggataaccgtattaccgccatgcatalcgaicacgagactagcctcgagaagcctlgatcgaattccacggggtggacgcgtctta  
 MND プロモーター  
 attaaggatccaaggtcaggaacagagaaacaggagaatatgggccaaacaggatatctgtgtaagcagttcctgccccggtcagg  
 gccagaacagttggaacagcagaatatgggccaaacaggatatctgtgtaagcagttcctgccccggtcagggccagaacagat  
 ggtccccagatcgggtccccgccccctcagcagtttctagagaacctcagatgtttccagggtgccccaggacctgaaatgacctgtgcct  
 tattlgaactaaccaatcagttcgttctcgttctgttcgcgcgcttctgctccccgagctctatataagcagagctcgtttaglgaaaccgtc  
 agatcgcttgagagcgccatccacgctgttttgacctccatagaagacaccgactctagaggatcgatccccgggctgcaggaattcaa  
 抗 P E 重鎖  
 gcgagaagacaagggcagaaagcaccgctagccaagttgtacaaaaaagcaggctgccaccATGGAAGTACAGCTGGAACA  
 GAGTGGTGCAGAGTTGGCAAGACCAGGGGCCAGCGTGAAACTCTCTTGCAAGGCGAGTGGATATACCTTTACA  
 AGTTACGGTATTTCTTGGGTAAACAGAGGACGGGGCAGGGTCTGGAATGGATAGGTGAAATTTACCCTAAAT  
 CCGGCAATACATACTATAATGAAAAATTCAAAGGACGAGCGACACTTACCGCTGATAAGTCTAGTTCCTACTGCG  
 TATATGGAACCTCGAAGCCTTACCAGCGAGGACTCCACAGTGTATTTTTGCGCGCGACAGGGGTACTATGCAAA  
 TTCACAATTCACGTAAGTGGGTCAAGGGACACTTGTAAAGTAAGCGCAGCCAGTACTAAGGGGCGAGCGTCT  
 TTCCTCTGGCTCCTAGCTCAAAATCCACATCCGGCGGTACCGCAGCGCTCGGATGTCTTGTTAAAGATTATTTCC  
 AGAACCTGTCACAGTCAGTTGGAATAGCGGCGCTTTGACTTCCGGGGTCCATACGTTTCCGGCGGTGCTGCAATC

10

20

30

40

## 【表 3 - 3】

ATCCGGCCTCTATTCCCTCAGCTCTGTTGTTACAGTGCCGAGCTCCTCTCTGGGCACTCAGACTTATATTTGCAAC  
GTAAACCACAAGCCATCTAACACAAAAGTGGATAAGAAGGTAGAACCTAAGAGCTGTGACAAGACGCATACAT  
GCCCGCCGTGCCCTGCCCCAGAACTGCTCGGAGGACCATCCGTATTCTCTTTCCCCCAAGCCCAAAGACACCCT  
GATGATTTCAAGAACGCCGAGGTGACGTGTGTTGTTGTAGATGTCTCCACGAAGACCCGAAGTAAAGTTTA  
ATTGGTATGTTGATGGCGTGGAAGTCCACAACGCCAAAACCAAGCCTAGAGAAGAGCAGTACAATTCAACATA  
TAGAGTAGTGAGTGTATTGACTGTCCTTCACCAGGACTGGCTCAATGGTAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGAGC  
AACAAGGCGCTCCCCGCTCTATAGAAAAAATCAGTAAAGCAAAAGGTCAACCGAGAGAGCCTCAGGTCT  
ATACACTCCCCCAGCCGGGATGAACTGACGAAAAATCAGGTCTCACTTACGTGTCTGGTTAAAGGTTTCTATC  
CGTCTGATATTGCGGTGGAATGGGAATCAAATGGTCAGCCAGAAAACAATTACAAAACGACGCCCCAGTGCT  
GGACTCCGATGGCTCTTTCTTCTTTATTCCAACTTACAGTAGATAAGTCAAGATGGCAACAAGGGAACGTGTT  
TAGTTGCAGCGTTATGCATGAAGCACTCCATAATCACTATACCCAAAAGAGCTTGTCCCTTTCCCAGAGCTTCAA  
CTGGAGGAGTCTTGCGCAGAGGCACAGGATGGTGAGCTGGATGGGTTGTGGACGACAATAACCATCTTTATAA  
CACTTTCTCTTCTGTCTGTCTGCTACAGCGCTACTGTTACCTTTTTCAAAGTTAAGTGGATATTCAGTTCAGTTGTC  
GATTTGAAACAGACTATCATCCAGACTATCGGAACATGATAGGCCAAGGCGCCagagccaaaagaagtgggtctggc  
 P2A 抗 P E 脛鎖  
gcgaccgaatttttggttgcttaagcaagccggagotgtggagggaatcctggatcgATGGACATTGTGTTGACCCAGACA  
CCGGCTATTATGTCTGCCTCACTCGGCGAAAGAGTAACGATGACTTGACCGCGAGTTCTAGCGTCAGCTCTAGC  
TACCTTCATTGGTTTCAGCAAAAACCCGGGTCAAGTCCAAAGCTCTGGATCTACTCTACATCAAATCTGGCATCC  
GGTGTTCTGGTAGGTTCTCCGGCTCCGGCAGCGAAACTTCTTATCCCTGATTATTGGCTCCCTCGAGACAGAA  
GATGCCGCAACCTACTACTGTCACCAATATCACCGGAGCCCGCCACATTTGGAGGAGGAACTAAATTGGAAAT

10

20

30

40

## 【表 3 - 4】

CAAGACAGTTGCAGCGCTAGCGTATTTATTTCCACCCTCAGATGAGCAACTGAAATCCGGGACCGCATCTGT  
TGCTGTCTGCTGAACAACTTCTATCCCCGAGAGGCCAAAGTTCAGTGGAAGTGGACAATGCGCTTCAATCTG  
GTAAGTCTCAAGAATCCGTCACTGAGCAGGATTCTAAGGATTCTACATATAGTCTTTCATCAACCCTTACACTTAG  
TAAGGCGGACTATGAAAAACACAAAGTGTACGCATGTGAGGTAACCTACCAGGGGCTGCGCTCCCCGGTTACC  
AAAAGTTTTAATCGAGGGGAGTGC<sup>P2A</sup>agagccaaaagaagtgggtctggc<sup>colDUA</sup>gcgacgaattttagtttgcttaagcaagccggag  
atgtagaggaaaatcctggaccgATGAGGCCGCTCAGACCGAGGGCTGCTCTTCTCGCCCTTCTTGCATCCTTGCTGG  
CCGCCCCCTGTGCGACCCGCTGAAGCCCCACACCTCGTACACGTGGATGCTGCGCGCGCTGTGGCCATTGC  
GCCGATTTTGGAGGAGCACAGGGTTCTGTCTCCCTTGCCCCACTCTCAAGCGGACCAATACGTCCTCAGTTGGG  
ACCAGCAACTTAACCTGGCCTACGTTGGGGCAGTGCCACATAGAGGCATAAAACAGGTTTGAACCCACTGGCTG  
CTGGAGTTGGTAACTACACGCGGCAGTACCGGTCGAGGTCTCTACATAAATTTTACTCATCTCGACGGATACCTT  
GACTTGCTGAGGGAAAACCAACTGTTGCCCGTTTCGAACTGATGGGTAGCGCATCCGGCCACTTTACTGATTTT  
GAGGACAAACAACAAGTTTTTGAATGGAAGGATTTGGTAAGCAGCCTGGCGAGAAGATATATCGGCCGATACG  
GGCTCGCGCACGTGTCTAAATGGAATTTTGAAACGTGGAACGAACCTGACCATCACGATTTTGACAACGTCAGC  
ATGACAATGCAGGGGTTCTTAACCTATTACGACGCGTGTCTGAAGGTTTGAGAGCGGCTTCCCCTGCACTCCGC  
TTGGGAGGGCCCCGGGGACAGCTTCCATACCCCCCGCGGTACCGTTGTCATGGGGCCTCTTGCGGCACTGTCAT  
GATGGCACAAATTTTTTTACGGGAGAAGCCGGTGTGAGACTGGATTACATTAGTCTCCACCGAAAGGGAGCCCCG  
CTCAAGCATTAGTATCCTGGAACAAGAGAAAGTGGTTGCTCAGCAGATTGGGCAATTGTTCCCAAATTCGCTG  
ACACGCCAATATATAACGATGAAGCTGACCCCTTGGTGGGGTGGAGTCTTCTCAACCTTGGCGCGCCGATGTA  
ACGTACGCTGCAATGGTGGTAAAGGTCATAGCCCAACATCAGAACCTGCTCCTCGCCAATACGACAAGTGCCTTT

10

20

30

40

【表 3 - 5】

CCCTACGCGCTTTTGTCCAATGATAACGCGTTTCTGAGCTACCACCCTCACCGTTTGCTCAGCGAACATTGACCG  
CTAGGTTCCAAGTGAATAATACACGACCGCCCCACGTCCAACCTCTTGCGCAAACCTGTTCTTACCGCGATGGGGC  
TCCTCGCTCTTCTCGACGAAGAGCAACTCTGGGCAGAAGTATCCCAAGCGGGCACTGTGCTGGACTCCAACCATA  
CTGTAGGCGTGCTGGCCTCCGCCACCGCCCCAGGGACCAGCAGACGCGTGAGGGCTGCGGTTCTGATATAT  
GCCAGTGACGACACAAGGGCGCACCCGAATAGGTCAGTCGCTGTGACTTTGCGGCTGAGAGGGGTCCCACCGG  
GTCCTGGACTGGTTTATGTAACGAGATACCTGGACAATGGTCTTTGCTCCCCGATGGCGAGTGGCGGAGGCTG  
GGGAGGCCGTATTTCCGACTGCTGAACAGTTTCGACGAATGCGAGCAGCTGAAGATCCCGTAGCAGCAGCACC  
ACGCCCTCTCCTGCTGGAGGTAGACTTACGTTGCGACCGGCCCTCCGCCTTCTTCACTGCTCCTCGTACATGTCT  
GCGCACGCCCCGAGAAGCCACCAGGCCAGGTCACTCGACTCCGAGCCCTCCGCTCACCCAAGGACAGCTCGTCC  
TTGTCTGGTCTGACGAGCATGTCTGGTAGCAAATGCCTTTGGACGTACGAGATACAGTTTAGCCAGGACGGTAAG  
GCATATACTCCTGTTAGTAGGAAGCCATCTACTTTTAACCTTTTGTATTAGTCCCGACACGGGTGCTGTCAGCG  
GGTCTTACCGGGTCCGCGCCCTGGATTATTGGGCCAGACCCGGACCTTTCTCCGATCCTGTCCCCTATCTCGAGGT  
GCCCGTGCCAAGGGGGCCTCCCAGCCCCGGCAATCCATAATGAaccagcttctgtacaaagtgggtgtacaagtagga  
 attcgtcgaggacctaataacttcgtatagcatatacattatacgaagttatacatgtttaagggttccggttccactaggtacaattcgata  
 tcaagcttatcgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggattcttaactatgttgctcctttacgctatgttgata  
 cgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttccgctatggctttcattttctcctcttgataaatcctgggtgctgtctttatgaggag  
 ttgtggcccggtgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactgggtgggcattgccaccacctgtcagct  
 cctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttggcgtgctggacaggggctcggctgtt  
 gggcactgacaattccgtgggtgtgtcggggaaatcatcgtcctttccttggctgctgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtc  
 cttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcgccctgctgcggctctgcggcctcttccgctcttcgcttcgc

10

20

30

40

## 【表 3 - 6】

cctcagacgagtcggatctccctttgggcccgcctccccgcacgataccgctcgacctcgatcgagacctagaaaaacatggagcaatcac  
 aagtagcaatacagcagctaccaatgctgattgtgcctggctagaagcacaagaggaggaggagggtgggtttccagtcacacctcagg  
 tacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaaagaaaaggggggactggaagggttaattcactccc  
 aacgaagacaagatatccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttcctgattggcagaactacacaccagggccagggatc  
 agatatccactgacctttggatgggtgctacaagctagtaccagttgagcaagagaaggtagaagaagccaatgaaggagagaacaccc  
 gcttgttacacccgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtattagagtggagggttgacagccgcctagcatttcatc  
 LTR  
 acatggcccagagctgcatccggactgtactgggtcctcctggllagaccagatctgagccctgggagctcctggctaaclagggaacc  
 cactgcttaagcctcaataaagcttgcttgagtgcctcaagtagtgtgtgcccgtctgttggtgactctggttaactagagatccctcaga  
 cccttttagtcagtgtggaaaaatctctagca

10

【 0 2 0 3 】



## 【表 4 - 1】

B 1 2 重鎖／軽鎖／c o I D U A レンチウイルス同時発現カセットのコード配列（配列番号 3 8）。長い末端反復配列（L T R）が灰色で強調されている。M N D プロモーターが灰色で強調され、下線が施されている。B 1 2 重鎖、軽鎖および c o I D U A が大文字で示され、下線が施されている。P 2 A がイタリック体で示され、暗灰色で強調されている。

LTR

```

gggtctctctggtagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccctgag
tgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgtgtgtgactctggaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtggaaaatctctagcagt
gcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggttgctgaagcgcgacggcaag
aggcgagggggcgcgactggtagtacgcaaaaaatttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagcgctcagtatt
aagcgggggagaattagatcgcatgggaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaatataaattaaaacatatagtatgg
gcaagcagggagctagaacgattcgagttaatctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaactgggacagctacaac
catcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaag
acaccaaggaagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcgggccggcgctgatcttc
agacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatataaatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcac
ccaccaaggcaagagaagagtgggtgcagagagaaaaaagagcagtggggaataggagctttgttccttgggttcttgggagcagcagg
aagcactatgggcgagcgctcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtcagcagcagaacaatttgctga
gggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatac
ctaaaggatcaacagctcctggggatttgggggtgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttgggaatgctagttggagtaata
aatctctggaacagatttgggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactcctaattg
aagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggttaacataac
aaattggctgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtaggttaagaatagttttgtgtactttctatagtgatag
agttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacctcccaaccccgaggggacccgacaggccgaaggaaatagaagaagaa
ggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatcggcactgcgtgcgcaattctgcagacaaatggcagtttca
tccacaattttaaaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaacta

```

10

20

30

40



## 【表 4 - 2】

aagaattacaaaaaacaattacaaaaattcaaaattttcgggtttattacagggacagcagagatccagtttggttagtaccgggcccgc  
tctagagatccgacgcccgcctctctagggcccgcgcccgcctcgacagacttggtggagaagctcggtactcccctgccccggtt  
aatitgcatataatatttctagtaactatagaggcttaatgtgcgataaaagacagataatctgttcttttaatactagctacattttaca  
tgataggcttggtatttctataagagatacaaaataactaaattattatttttaaaaaacagcacaaaaggaaactcacctaactgtaaagta  
attgtgtgttttgagactataaatatcccttgagaaaaagccttgtaacgcgcggtgacctcgaggtcgacggtatcgataagctcgctt  
cacgagattccagcaggtcgagggacctaataacttcgtatagcatatattatagaagttatattaagggtccaagcttaagcgccg  
MNDプロモーター  
cgtggataaccgtattaccgccatgcatacgaacacgagactagcctcgagaagcttgatcgaattccacggggttgacgcgtctta  
attaaggatccaaggctcaggaacagagaaaacaggagaatatgggccaacaggatatcgtgtgtaagcagttcctgccccggtcagg  
gccaagaacagttggaacagcagaatatgggccaacaggatatcgtgtgtaagcagttcctgccccggtcagggccaagaacagat  
ggtccccagatgcggtccccgcctcagcagtttctagagaaccatcagatgtttccagggtgccccaggacctgaaatgacctgtgctt  
taattgaactaaccaatcagttcgttctcgttctgttgcgcgcttctgtccccgagctctataaagcagagctcgtttagtgaaccgtc  
agatcgcttgagacgccatccacgctgttttgacctccatagaagacaccgactctagaggatcgatccccggggtgcaggaattcaa  
B 1 2 重鎖  
gcgagaagacaagggcagaaaagcacgcgtagccaagttgtacaaaaagcaggctgccaccATGCAAGTCCAAGTGGTACAA  
TCCGGAGCTGAAGTGAAAAAACAGGGGCATCCGTGAAAGTCTCATGCCAAGCCTCCGGTTACCGATTAGTAA  
CTTTGTGATACACTGGGTTTCGGCAAGCCCCAGGACAAAGATTCGAGTGGATGGGCTGGATAAACCCATATAATG  
GTAACAAAGAATTCTCAGCTAAATTCCAAGACCGGGTAACATTTACGGCGGATACTTCAGCTAACACTGCATAC  
ATGGAACCTTCGAGCTTGAGGTCCGCGGACACAGCCGTATATTACTGCGCGAGGGTTGGCCCATATAGCTGGGA  
CGACAGTCCGAGGACAATTATTACATGGACGTGTGGGGGAAGGGTACGACCGTAATAGTCAGTAGTGCGTCC  
ACTAAAGGTCCCTCTGTCTTCCATTGGCACCGAGTTCTAAGTCTACGTCTGGTGGCACAGCTGCACTGGGCTGT  
CTGGTCAAAGACTATTTCCCCGAACCAGTTACGGTTAGTTGGAACAGCGGAGCCCTGACAAGCGGAGTGACAC  
GTTTCCGGCGGTTCTTCAATCTAGTGGACTCTATAGCCTCTCATCCGTAGTAACGGTTCATCCTCATCTCTTGA

10

20

30

40

## 【表 4 - 3】

ACGCAAACGTATATTTGTAACGTTAATCATAAGCCTTCTAATACTAAGGTTGACAAAAAGGTAGAGCCTAAATCT  
TGCGATAAGACGCACACCTGCCCGCCCTGTCCTGCACCCGAACTTTTGGGGGGTCCATCAGTTTTCTGTTTCCTC  
CAAAGCCAAAAGATACTCTGATGATCTCCAGAACGCCAGAGGTAACCTGCGTCGTAGTCGATGTTTCTCACGAA  
GACCCTGAAGTGAAATTTAACTGGTACGTAGATGGTGTGGAAGTGCACAATGCGAAAACTAAACCGCGCGAAG  
AACAGTACAACCTCTACTTACCGAGTCGTGTCCGTCTCACGGTCTCCATCAGGACTGGCTTAACGGAAAAGAAT  
ACAAATGTAAAGTCAGCAACAAAGCGCTCCAGCGCCCATAGAAAAACGATTAGTAAGGCGAAAGGTCAACC  
TAGAGAGCCACAGGTATACACTCTCCACCTTCACGGGACGAACTTACGAAAAACCAGGTTTCACTCACATGTTT  
GGTGAAAGGATTTTATCCTAGCGATATTGCTGTAGAATGGGAGAGTAACGGGCAACCTGAGAACAATTATAAG  
ACAACACCTCCTGTATTGGATTGAGACGGTAGTTTTTCTGTATAGCAAATTGACTGTTGACAAGTCCCGGTGG  
CAACAGGGGAATGTCTTCTCCTGCTCTGTCATGCATGAAGCCCTTCACAACCATTACACCCAGAAAAGTTTGTCCC  
TCTCTCCGAACCTTCAGCTGGAAGAGTCCTGCGCCGAAGCACAAAGATGGAGAACTCGATGGCCTGTGGACGACC  
ATAACTATCTTCATCACTCTCTTCTGCTGAGTGTGTGCTACAGCGCCACCGTTACTTTTTCAAGGTAAAATGGA  
TATTCTCCAGCGTGGTCGATCTCAAACAGACAATCATTCCGGATTACAGAAACATGATTGGGCAGGGCGCTagag  
ccaaaagaagtgggtctggcP2AccgacgaatttttagtttgcttaagccagccggagatgtggagggaaaatcctggacccB 1 2 軽鎖ATGGAAA  
TTGTGTTGACTCAGAGCCCCGGAACCTGTCCCTCAGTCCCGGCGAAAGGGCAACATTAGTTGTAGGTCTTCCC  
ATTCAATTCGAAGTAGGCGCGTTGCGTGGTACCAACACAAACCCGGCCAAGCTCCACGCCTGGTGATCCACGGG  
GTGTCAAATAGGGCATCTGGGATCTCCGATAGGTTTTAGGGTCAGGATCAGGTACGGATTTACCCCTTACCATC  
ACACGGGTTGAACCCGAGGATTTGCCCCTTATTACTGCCAGGTATATGGGGCGAGCAGTTATACGTTTGGTCA  
GGGGACCAAGCTCGAGCGAAAACGGACCGTCGCGGCCCAAGCGTCTTTATCTTCCACCTCTGACGAACAGC

10

20

30

40

## 【表 4 - 4】

TCAAATCCGGTACAGCTTCTGTAGTTTGCTTGCTCAACAACCTTTACCCACGGGAGGCGAAAGTTCAATGGAAAG  
TGGATAATGCCCTTCAATCCGGGAACAGCCAAGAAAGTGTGACGGAACAGGACAGCAAAGACTCTACCTATTC  
ACTCAGTAGCACTCTGACTTTGTCCAAGGCCGATTATGAAAAACATAAGGTTTACGCGTGCGAGGTTACACACC  
AAGGTCTGCGAAGCCCAGTAACAAAATCCTTCAATAGGGGTGAGTGC<sup>P2A</sup>  
agagccaaaagaagtgggtctggcgcgacga  
atfttagttgcttaagcaagccggagatgtggaggaaaatcctggaccg<sup>colDUA</sup>ATGAGGCCGCTCAGACCGAGGGCTGCTCTTC  
TCGCCCTTCTTGATCCTTGCTGGCCGCCCCCTGTGCGACCCGCTGAAGCCCCACACCTCGTACACGTGGATGC  
TGCGCGCGCTGTGGCCATTGCGCCGATTTTGGAGGAGCACAGGGTTCTGTCTCCCTTGCCCCACTCTCAAGC  
GGACCAATACGTCTCAGTTGGGACCAGCAACTTAACCTGGCCTACGTTGGGGCAGTGCCACATAGAGGCATAA  
AACAGGTTCGAACCCACTGGCTGCTGGAGTTGGTAACTACCGCGGCAGTACCGGTCGAGGTCTCTCATACAAT  
TTTACTCATCTCGACGGATACCTTGACTTGCTGAGGGAAAACCAACTGTTGCCGGTTTCGAACTGATGGGTAGC  
GCATCCGGCCACTTTACTGATTTGAGGACAAACAACAAGTTTTTGAATGGAAGGATTTGGTAAGCAGCCTGGC  
GAGAAGATATATCGGCCGATACGGGCTCGCGCACGTGTCTAAATGGAATTTTGAAACGTGGAACGAACCTGAC  
CATCACGATTTTGACAACGTCAGCATGACAATGCAGGGGTTCTTAACTATTACGACGCGTGTCTGAAGGTTTG  
AGAGCGGCTTCCCTGCACTCCGCTTGGGAGGGCCCCGGGGACAGCTTCATACCCCCCGCGGTACCGTTGTCA  
TGGGGCCTCTTGCGGCACTGTGATGGCACAAATTTTTTACGGGAGAAGCCGGTGTGAGACTGGATTACAT  
TAGTCTCCACCGAAAGGGAGCCCGCTCAAGCATTAGTATCCTGGAACAAGAGAAAGTGGTTGCTCAGCAGATTC  
GGCAATTGTTCCCAAAATTCGCTGACACGCCAATATATAACGATGAAGCTGACCCCTTGGTGGGGTGGAGTCTT  
CCTCAACCTTGGCGCGCCGATGTAACGTACGCTGCAATGGTGGTAAAGGTCATAGCCCAACATCAGAACCTGCT  
CCTCGCCAATACGACAAGTGCCTTTCCCTACGCGCTTTGTCCAATGATAACGCGTTTCTGAGCTACCACCCTCAC

10

20

30

40

## 【表 4 - 5】

CCGTTTGCTCAGCGAACATTGACCGCTAGGTTCCAAGTGAATAATACACGACCGCCCCACGTCCAACCTTTGCGC  
AAACCTGTTCTTACCGCGATGGGGCTCCTCGCTCTTCTCGACGAAGAGCAACTCTGGGCAGAAGTATCCCAAGCG  
GGCACTGTGCTGGACTCCAACCATACTGTAGGCGTGCTGGCCTCCGCCCACGCCCCAGGGACCAGCAGACGC  
GTGGAGGGCTGCGGTTCTGATATATGCCAGTGACGACACAAGGGCGCACCCGAATAGGTCAGTCGCTGTGACTT  
TGCGGCTGAGAGGGGTCCACCGGGTCTGGACTGGTTTATGTAACGAGATACCTGGACAATGGTCTTTGCTCC  
CCCGATGGCGAGTGGCGGAGGCTGGGGAGGCCGTATTTCCGACTGCTGAACAGTTTCGACGAATGCGAGCAG  
CTGAAGATCCCGTAGCAGCAGCACCACGCCCTCTTCTGCTGGAGGTAGACTTACGTTGCGACCGGCCCTCCGCC  
TTCTTCACTGCTCCTCGTACATGTCTGCGCACGCCCCGAGAAGCCACCAGGCCAGGTCACTCGACTCCGAGCCCT  
TCCGCTCACCCAAGGACAGCTCGTCCTTGTCTGGTCTGACGAGCATGTCGGTAGCAAATGCCTTTGGACGTACGA  
GATACAGTTTAGCCAGGACGGTAAGGCATATACTCCTGTTAGTAGGAAGCCATCTACTTTTAACCTTTTTGTATTC  
AGTCCCGACACGGGTGCTGTGACGGGTCTTACCGGGTCCGCGCCCTGGATTATTGGGCCAGACCCGGACCTTTC  
TCCGATCCTGTCCCCTATCTCGAGGTGCCCGTGCCAAGGGGGCCTCCAGCCCCGGCAATCCATAATGAaccagc  
 tttctgtacaaagtgggtgtacaagtaggaattcgtcgaggacctaataacttcgtatagcatatatacgaagtatacatgtttaa  
 gggttccggttccactaggtacaattcgatatcaagcttatcgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggattctt  
 aactatgttgctcctttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgtattgcttccgtagtgctttcattttctcctcctgt  
 ataaatccctgggtgctgctctttatgaggagttgtggccgtgtgaggcaacgtggcgtgggtgactgtgttgctgacgaaccccc  
 actggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatgccgcctgc  
 cttgcccgtgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtgggtgtgtcggggaaatcatcgtcctttccttggtgctcgc  
 ctgtgttgcacctggattctgcgcgggacgtccttctgtacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcttcccgcggcctgtgcc  
 ggctctgcccctcttccgctcttcgccttcgcctcagacgagtcggatctcctttgggccgcctccccgcacgataccgtcgacctcg

10

20

30

40

## 【表 4 - 6】

atcgagacctagaaaaacatggagcaatcacaagtagcaatacagcagctaccaatgctgattgtgcctggctagaagcacaagagga  
 ggaggaggtgggttttcagtcacacctcaggtaccttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaaagaa  
 aaggggggactggaagggttaattcactcccaacgaagacaagataccttgatctgtggatctaccacacacaaggctacttccctgat  
 tggcagaactacacaccagggccaggatcagatatccactgacctttggatgggtgctacaagctagtaccagttgagcaagagaaggt  
 agaagaagccaatgaaggagagaacacccgcttggtacacccctgtgagcctgcatgggatggatgacccggagagagaagtattagag  
 LTR  
 tggaggtttgacagccgcttagcatttcacacatggcccagagctgcatccggactgtactgggtctctctggttagaccagatctgag  
 cctgggagctctctggctaactaggggaaccacatgcttaagcctcaataaagcttgcttgagtgttcaagtagtggtgcccgtctgttg  
 tgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagca

10

【 0 2 0 4 】

## 【表 5 - 1】

FAM1 B12 ベクターのコード配列 (配列番号 39)。WPRE、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント；FEEK、B細胞特異的プロモーター；T2A、トセア・アシグナ (Those asigna) ウイルス由来 2A ペプチド；M1 および M2、膜貫通コード領域。

```

tgtgtaattgtaatttctctgtccactccatccaggctgtgtgattccaaatctgttcagagatttattactccaactagcattccaaggc
acagcagtggtgcaaatgagtttccagagcaaccccaatcccaggagctgttgatccttaggtatcttccacagccaggattcttg
cctggagctgcttgatgccccagactgtgagttgcaacagatgctgttgcgcctcaatagccctcagcaaattgttctgctgctgactata
ccagacaataattgtctggcctgtaccgtcagcgtcattgacgtgcgcccatagtgcttctgctgctccaagaaccaaggaacaaa
gtcctattcccactgctcttttctctctgcaccactcttctcttgccttgggtgggtgctactcctaattggttcaattttactactttatatt
atataattcacttctccaattgtccctcatatctcctcctccaggctgaagatcagcgccgcttgctgtgcggtggtcttactttgttttgc
tcttctctatcttctgctaaagcttcttgggtgtctttatctctatcctttgatgcacacaatagaggggtgctactgtattatataatgatcta
agtcttctgaicnctgtctgaagggtggtgtgtagctgtccagtatitgtctacagccttctgatgtttctaacaggccaggattaactgc
gaatcgttctagctccctgcttgccatactatatgttttaatttatatttttctttccctggccttaaccgaatttttccatcgcgatcta
atttcccccgcttaatactgacgctctcgacccatctctctccttctagcctccgctagtagcaaaattttggcgactcaccagtcgcccgc
cctcgctcttgccgtgcgcttcagcaagccgagtcctgcgtcgagagagctcctctgggttcccttctgcttcaagtcctgttcgggc
gccactgtagagattttccacactgactaaaagggtctgagggtatcttagttaccagagtcacacaacagacggggcacacactacttg
aagcactcaaggcaagctttattgaggcttaagcagtggttccctagtttagccagagagctccaggctcagatctggtctaaccagag
agaccagtagcaggcaaaacgcgctgttatatagacctccaccgtacacgcctaccgccatttgctcaatggggcgagggtgttac
gacattttgaaagtcccgttgattttggtgcaaaaacaaactccattgacgtcaatgggggtggagacttggaatccccgtgagtcaa
accgctatccacgccattgatgtactgcaaaaaccgcatcaccatggtaatagcgatgactaatacgtagatgtactgcaagtaggaa
agtcccataaggtcatgtactgggcataatgccaggcggggcatttaccgtcattgacgtcaatagggggcgacttggtcatatgataca
cttgatgtactgcaagtgggcagtttaccgtaatactccaccattgacgtcaatggaaagtcctattggcgttactatgggaacata
cgtcattattgacgtcaatgggcgggggtcgttgggcgggtcagccaggcggggcatttaccgtaagttatgtaacgcggaactccatat
gggctatgaactaatgacccgtaattgattactattaataactagtcataatcaatgtcaacgcgtatatctggccgtacatcgcgaa

```

10

20

30

40

0

20

30

40



【表 5 - 3】

cttttgctggccttttctcacatgttcttctcggttatccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataaccgctc  
 gccgcagccgaacgaccgagcgagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgccaatacgcaaaccgcctctccccgcgctt  
 ggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagtttagctcactc  
 attaggcacccaggtttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctat  
 gaccatgattacccaagctctagctagaggtcgacgggtatacagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaccacaactaga  
 atgcagtgaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttgggggtggg  
 cgaagaactccagcatgagatccccgcgtggaggatcatccagccggcgctccggaaaacgattccgaagcccaacctttcatagaag  
 gcggcggtggaatcgaaatctcgtagcacgtgtcagtcctgctcctcgccacgaagtcacgcagttgccggcggggtcgcgagggc  
 gaactccccccccacggctgctcgccgatctcggtcatggccggccggaggcgctccgggaagttcgtggacacgacctccgaccactc  
 ggcttacagctcgtccaggccgacccacacccaggccagggtgttgcggcaccacctggtcctggaccgcgtgatgaacaggg  
 tcacgtcgtccggaccacacccgggaagtcgtcctccacgaagtcggggagaaacccgagccggtcgggtccagaactcgaccgtccg  
 gcgacgtcgcgcggtgagcaccggaacggcactgggtcaacttggccatgggttagttcctcaccttgcgtattatactatgccgatata  
 ctatgccgatgattaattgtcaacacgtgctgaltcagatccgaaaatggatatacaagctcccgaggagcttttgcaaaagcctaggcctc  
 caaaaaagcctcctcactacttctggaatagctcagaggcagaggcgccctcgccctctgcataaataaaaaaattagtcagccatgg  
 ggaggagaatgggaggaaactgggaggagttaggggcgggatgggaggagttaggggcgggactatgggtgctgactaattgagatgca  
 tgctttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccacacctgggtgctgactaattgagatgcatgctttgcatacttctgcctgc  
 tggggagcctggggactttccacaccttaactgacacacattccacagaattaattcgcgtaaattttgttaaatacagctcatTTTTAAC  
 caataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagatagggttagtggttccagtttgaacaagagtc  
 actattaaagaacgtggactccaacgtcaaaggcgaaaaaccgtctatcaggcgatggccactacgtgaaccatcacctaataca  
 gtttttggggtcgagggtccgtaaagcactaaatcggaaccctaaggagcccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaac  
 gtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaaaggagcgggcgctaggcgctggcaagtgtagcggtcacgtcgcgtaaccaccac  
 acccgccgcttaatgcgctgtacaggcgctggggataccccctagagccccagctgggttcttccgcctcagaagccatagagcc

10

20

30

40



【表 5 - 4】

caccgcatccccagcatgctgtctattgtcttcccaatcctcccccttgctgtcctgccccacccacccccagaatagaatgacacctac  
 tcagacaatgcatgcaatttctcatittattagaaaggacagtgggagtgccaccttcagggtcaaggaaggcacgggggagggg  
 caaacaacagatggctggcaactagaaggcacagtcgaggctgatcagcgggtttaaaggccctgctagagatttccacactgact  
 aaaagggtctgaggatctctagttaccagagtcacacaacagacgggcacacactactgaagcactcaaggcaagctttattgaggc  
 ttaagcagtgggttccctagttagccagagagctcccaggctcagatctggcttaaccagagagaccagtcagtcggatgcagctct  
 cgggccatgtgatgaaatgctaggcggctgtcaaacctccactctaatacttctctctcgggtcatccatccatgcaggctcacagggt  
 gtaacaagcgggtgttctctcttcatggcttcttctaccttcttctgctcaactggtagctttagtcacatccaaaggctcagtgata  
 tctgatccctggccctgggtgttagttctgccaatcagggaagtagccttgtgtgtgtagatccacagatcaaggatatctgtcttcgttg  
 ggagtgaattagcccttcagtcaccccttttcttttaaaaagggtgctaagatctacagctgccttgaagtcattggctttaaaggtaacctg  
 aggtgtgactggaaaaccacctcctcctcttctgtctttagccaggcacaatcagcattggtagctgctgtattgctacttgtgattgc

10

20

WPRE

tccatgttttctaggtctcgatcgaggctcgacggtatcgatcggggaggcggcccaaaggagatccgactcgctgaggcggaaggc  
 gaagacgcggaagaggccgcagagccggcagcaggtcgcggaagggaagggtccgctggattgaggccgaagggaagcgtagcagaa  
 ggacgtcccgcgagaatgcagggtggcaacacaggcgagcagccaaggaaaggacgatgatttcccgacaacaccacggaattgtc  
 agtgcacaacagccgagccctgtccagcagcgggcaaggcaggcggcgatgagttccgctggcaataggaggggggaaagcgaa  
 agtcccggaaggagctgacaggtgggtggcaatgccccaccagtggggggttgcgtcagcaaacacagtcacaccacgccacgttgc  
 ctgacaacgggcccacaactcctcataaagagacagcaaccaggatttatacaaggaggagaaaaatgaaagccatacgggaagcaata  
 gcatgatacaaaaggcattaaagcagcgtatccacatagcgtaaaaggagcaacatagttaagaataccagtcattcttcacaaatttg  
 taatccagagggtgattatcgataagcttgatatcgaattgggagggactagagtcgcgccgcttacttgtacagtttaacatctcgag

30

FEK

ccataaagatgggttaattaacccaccaagatctaaaccgggtgagttcatggttacttgccctgagaagattaaaaaagtaatgctacct  
 tatgaggagagatcccagggaaccaagatagcaactgtcatagcaaccgtcacactgcttggtaaggagaagacccttggggaaactg  
 aaaacagaaccttgagcacatctgttgccttccatcctcctcaacagggtgggtggagcactccacaccccttcaccggctcgtat

40

0

20

## 30

T 2 A 部位

## 40

gacgtcgaggagaatcctggcccaacaaglcacaactggtagaactccggagctgaagtgaaaaaaccagggggcatccgtgaaagttcat  
gccaaagcctccggttacgatttagtaactttgtgatacactgggttcggcaagcccaggacaaagattcgagtggaatgggctggataa  
accataataatggtaacaaagaattctcagctaaattccaagaccggglaacatttacggcggatacttcagctaacactgcatacatgg  
aacttcgcagcttgaggctccggacacagccgtatattactgcgcgaggggttgcccatatagctgggacgacagtccgcaggacaatt  
attacatggacgtgtgggggaagggtacgaccgtaatagtcagtagtgcctagcaccaaggggcccatcgggtcttccccctggcaccctct

【表 5 - 6】

ccaagagcaccctctgggggacagcgccctgggctgctgggcaaggactacttcccgaaccggtagcgggtgctgggaactcagggc  
 gccctgaccagcggtgacaccttcccggctgtctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtagcctgcccctcagca  
 gcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagaaagttagcccaaacttctgac  
 aaaactcacacatgccaccgtgccagcaccgaactcctggggggaccgtcagtccttcttcccccaaaaccaaggacacccctc  
 atgatctcccgaccctgaggacacatgcgtgggtgggacgtgagccacgaagaccctgagggtcaagtcaactgggtatgtgacggc  
 gtggaggtgcataatgccaaagacaagccgaggaggagcagtaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgacc  
 aggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggttccaacaagccctcccagccccatcgagaaaacatctcaaagccaa  
 agggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccggtatgagctgaccaagaatcaagtcagcctgacctgctggta  
 aaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgga  
 ctccgacggctccttcttctactcaaaactcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcgtgatgat  
 gaggctctgcacaaccactacacagagaagagccttctcctgtctccgggtaaatgagtccacggccggcaagccccgctccccagg  
 ctctcggggtcgcgcgaggatgcttggcacgtacccgtgtacatacttcccaggcaccagcatggaataaagcaccacgcgttccc  
 tgggccccctgcgagactgtgatggttcttccacgggtcaggccgagctgaggcctgagtggtgcatgaggaggcagagtgggtccact  
 gtccccacactggcccaggctgtgggtgggagctgacctcaggacattgttggccatcccgccgggcccacatcctgggtcctgccac  
 agaggggaatcacccccagaggccaagcccagggggacacagcactgaccaccccttctgtccagagctgcaactggaggagagc  
 tgtgcggaggcgaggacggggagctggacgggctgtggacgaccatcaccatcttcatcacactcttctgttaagcgtgtgtacag  
 M1  
 tgccaccgtcaccttcttcaaggtgaagtggatcttctcctcggtgggtggacctgaagcagaccatcatccccgactacaggaacatgatc  
 ggacagggggcctagggccaccctctgcggggtgtccaggcgcgccaataaaatatctttattttcattacatctgtgtgtgtgtttttgt  
 gtgaatcgatagtactaacatagctctccatcaaaaacaaacgaaacaaaacaaactagcaaaataggctgtcccagtgcaagtgc  
 aggtgccagaacatttctctatttaaatgctagaattaacaaactggatctctgtgtcctgttaataaaccgaaaatttgaattttgt  
 aatttgttttgaattcttttagttttagtctgtgtgttattatgtctaciatcttccccctgcactgtaccccccaatccccctttcttttaa  
 M2

10

20

30

40

## 【表 5 - 7】

aattgtggatgaatactgccatttgtctgcagaattggcgcacgcagtgccgatccgttcactaatcgaatggatctgtctctgtctctct  
ccaccttcttcttctattccttcgggcctgtcgggtcccctcggggttgggaggtgggtctgaaacgataatggatgaatatccctgcctaact  
ctattcactatagaaagtacagcaaaaactattcttaaacctaccaagcctcctactatcattatgaataattttatataccacagccaatt  
tgttatgttaaaccaattccacaaacttgcccatftatctaattccaataattcttgttcattctttcttgctgggtttgcgattcttcaattaa  
ggagtgtattaagct

【 0 2 0 5 】

## 【表 6 - 1】

F A M 1 抗 P E ベクターのコード配列（配列番号 4 0）。W P R E、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント；F E E K、B 細胞特異的プロモーター；T 2 A、トセア・アシグナ（T h o s e a a s i g n a）ウイルス由来 2 A ペプチド；M 1 および M 2、膜貫通コード領域。

```

tgtgtaattgtaatttctctgtccactccatccaggctgtgtgattccaaatctgttcagagatttattactccaactagcattccaaggc
acagcagtggtgcaaatgagtttccagagcaaccccaatccccaggagctgttgatccttaggtatcttccacagccaggattcttg
cctggagctgcttgatccccagactgtgagttgaacagatgctgttgccctcaatagccctcagcaaattgttctgctgctgactata
ccagacaataattgtctggcctgtaccgtcagcgctattgacgctgcgccatagtgcttctgctgctccaagaaccaaggaacaaa
gctcctattcccactgctcttttctctctgcaccactcttctcttgccttgggtgggtgctactcctaattggttcaatttttactactttatatt
atataattcacttctccaattgtccctcatatctcctctccaggctgaagatcagcgccgcttgctgtgcggtggtcttacttttgtttgc
tcttctctatcttgtctaaagcttcttgggtgcttttatctctatccttgatgcacacaatagagggttgctactgtattatataatgatcta
agtcttctgatnctgtctgaagggatggtttagctgtcccagatattgtctacagccttctgatgttctaacaggccaggattaactgc
gaatcgttctagctccctgcttgccatactatatgttttaattatatttttcttccccctggccttaaccgaatttttccatcgcatcta
atttcccccgcttaatactgacgctctcgacccatctctctcttctagcctccgctagtcaaaattttggcgtactcaccagtcgccgc
cctcgctcttgccgtgcgcttcagcaagccgagtcctgctgagagagctcctctggtttcccttctgcttcaagtcctgttcgggc
gccactgctagagattttccacactgactaaaagggtctgagggatctctagttaccagagtcacacaacagacgggcacacactacttg
aagcactcaaggcaagctttattgaggcttaagcagtggttccctagttagccagagagctcccaggctcagatctggtctaaccagag
agaccagtagcaggcaaaacgctgcttatatagacctccaccgtacacgcctaccgcccatttgcgtcaatggggcgaggttggttac
gacattttggaaagtccgcttgattttggtgcaaaacaaactccattgacgtcaatgggggtggagacttggaatccccgtgagtcaa
accgctatccacgccattgatgtactgcaaaacgcctacccatggtaatagcgatgactaatacgtagatgtactgcaagtaggaa
agtcccataaggtcatgtactgggcataatgccaggcgggcatctaccgtcattgacgtcaatagggggcgacttgccatatgatata
cttgatgtactgccaagtgggcagtttaccgtaaatactccaccattgacgtcaatggaaagtcctattggcgttactatgggaacata
cgctattattgacgtcaatgggcgggggtcgttggcggtcagccaggcgggcatctaccgtaagttatgtaacgcggaactccatatat
gggctatgaactaatgacccgtaattgattactattaataactagtcataatcaatgtcaacgcgtatatctggccgtacatcgcgaa

```

10

20

30

40

## 【表 6 - 2】

gcagcgcaaaacgcctaaccctaagcagattcttcatgcaattgtcgggtcaagccttgcttgttagcttaaatttgcgcgcactac  
tcagcgaccitcaacacacaagcagggagcagatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccataggg  
gatcgggagatctccgatccgtcgacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaatacattc  
aaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttcctgtgc  
gcccttattccctttttgcggcatttgccttctgttttgcaccagaaacgctggtaaaagatgctgaagatcagttgggt  
gcacgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcggcgaagaacgtttccaatgatgagcactt  
ttaaagttctgctatgtggcgcggtattatccgtattgacgcgggcaagagcaactcggctgcgcgcatacactatttccagaatgacttg  
gttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgcataaccatgagtataa  
cactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgcctt  
gatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttcgca  
aactattaactggcgaactacttactctagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgc  
gctcggccctccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccaga  
tggtgaagccctccgtatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagatagggtg  
cctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaggatcta  
ggtgaagatccttttataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttcttccactgagcgtcagacccgtagaaaagatcaaa  
ggatcttcttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttgcggatcaa  
gagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagttagccgttagttagccacc  
acttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtctgctaactctgttaccagtggctgctgcagtgataagtcgtgtcttacc  
gggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggtgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaa  
cgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttccgaaggagaaaggcggacaggtatccggt  
aagcggcagggtcggaaacaggagagcgcagggagcctccaggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttccgccc  
tctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggaggagcctatggaaaaacgcagcaacgcggcctttttacggttctggc

10

20

30

40



【表 6 - 3】

cttttgctggccttttgcacatgttctttctgcttatcccttgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctc  
 gccgcagccgaacgaccgagcgagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgccaatacgcaaacgcctctccccgcgctt  
 ggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactc  
 attaggcacccagggctttacactttatgcttccggctcgtatgttgttggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctat  
 gaccatgattacccaagctctagctagaggtcgacggtatacagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaccacaactaga  
 atgcagtgaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttgggggtggg  
 cgaagaactccagcatgagatccccgcgctggaggatcatccagccggcgctccggaaaacgattccgaagcccaacctttcatagaag  
 gcggcggtggaatcgaaatctcgtagcacgtgtcagtcctgctcctcgccacgaagtcacgcagttgccggccgggtcgcgaggggc  
 gaactccccccccacggctgctcgccgatctcggtcatggccggccggaggcgctccggaagttcgtggacacgacctccgaccactc  
 ggcttacagctcgtccaggccgcgacccacacccaggccagggtgttgtccggcaccacctggctcctggaccgctgatgaacaggg  
 tcacgtcgtccggaccacacccggcgaagtctcctccacgaagtccgggagaacccgagccggctcggtccagaactcgaccgctccg  
 gcgacgtcgcgcggtgagcacccgaacggcactgggtcaacttgccatgggttagttcctcaccttgcgtattatactatgccgatata  
 ctatgccgatgattaattgtcaacacgtgctgatcagatccgaaaatggatatacaagctcccgaggagcttttgcaaaagcctaggcctc  
 caaaaaagcctcctcactacttctggaatagctcagaggcagaggcgccctcgccctctgcataaataaaaaaattagtcagccatgg  
 ggccggagaatggcggaactggcgaggtagggcgggatggggcgaggtagggcggggactatgggtgctgactaattgagatgca  
 tgctttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccacacctgggtgctgactaattgagatgcatgctttgcatacttctgcctgc  
 tggggagcctggggactttccacaccttaactgacacacattccacagaattaattcgcgttaaattttgttaaatacagctcatttttaac  
 caataggccgaaatcgcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagataggggtgagtggttccagtttgaacaagagtcc  
 actattaaagaacgtggactccaacgtcaaaggcgaaaaaccgtctatcaggcgcatggccactacgtgaaccatcacctaataca  
 gtttttggggctgagggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaggaggagccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaaac  
 gtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaaaggagcgggcgctaggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgctgaaccaccac  
 acccgccgcttaatgcgccgctacaggcgcggtggggataccccctagagccccagctgggtctttccgcctcagaagccatagagcc

10

20

30

40

【表 6 - 4】

caccgcatccccagcatgctgtctattgtcttcccaatcctcccccttgtgtctgccccacccccccccagaatagaatgacacctac  
 tcagacaatgcgatgcaatttctcattttattaggaaaggacagtgggagtggtcaccttccagggtcaagggaaggcacgggggagggg  
 caaacaacagatggctggcaactagaaggcacagtcgaggctgatcagcgggttaaacgggacctgtagagattttcacactgact  
 aaaagggtctgagggtctctagttaccagagtcacacaacagacgggcacacactacttgaagcactcaaggcaagctttattgaggc  
 ttaagcagtggttccctagtttagccagagagctcccagggtcagatctggtctaaccagagagaccagtagcagtcggatgcagctct  
 cgggccatgtgatgaaatgctaggcggctgtcaaacctccactctaatacttctctcgggtcatccatccatgcagggtcacagggt  
 gtaacaagcgggtgttctctcttcatgttgcttcttctaccttcttctgctcaactggtactagctttagcaccatccaaaggctagtgata  
 tctgatccctggccctggtgtgtagtcttccaatcagggaagtagccttgtgtgtgtagatccacagatcaaggatatctgtcttctgtg  
 ggagtgaattagcccttccagtcacccccctttcttttaaaaagtggctaagatctacagctgccttgaagtcattggtcttaagggtacctg  
 aggtgtgactggaaaacccacctctctctctcttctgtctttagccaggcacatcagattggtagctgctgattgtacttgtgattgc  
 WPRE

10

20

tccatgttttctaggtctcgatcgagggtcgacggtatcgaatgcggggaggcggcccaaaggagatccgactcgtctgaggcggaaggc  
 gaagacgcggaagaggccgcagagccggcagcagccgcgggaagggaaggtccgctggattgaggggccgaaggacgtagcagaa  
 ggacgtcccgcgagaatgcaggtggcaacacaggcgagcagccaaggaaaggacgatgatttcccgacaacaccacggaattgtc  
 agtgcacaacagccgagccctgtccagcagcgggaaggcagggcgatgagttccgctggcaatagggaagggaaggcgaagcga  
 agtcccggaaggagctgacaggtgggtggcaatgccccaccagtggtgggttgcgtcagcaaacacagtgacacaccacgacgttgc  
 ctgacaacgggcccacaactcctcataaagagacagcaaccaggatttatacaggaggagaaaatgaaagccataggggaagcaata  
 gcatgatacaaaaggcattaaagcagcgtatccacatagcgtaaaaggagcaacatagttaagaataccagtcattcttccaaaatttg  
 taatccagagggtgattatcgataagcttgatcgaattgggagggaactagagtcgcgccgctttacttgtacagttaacatctcgag  
 FEEK

30

ccataaagatggttaattaacccacccaagatctaaaccggtgagtttcatggttacttgccctgagaagattaaaaaaagtaatgtacct  
 tatgaggagagtgccagggaaccaagatagcaactgtcatagcaaccgtcacactgctttgggtcaaggagaagaccctttggggaactg  
 aaaacagaaccttgagcacatctgttgccttccatccctccaacagggtgggtggagcactccacacctttcacgggtcgtg

40



0

20

## 30

T 2 A 部位

## 40

ACCAGGGGCTGCGCTCCCCGGTTACCAAAAGTTTAAATCGAGGGGAGTGCgagggcagaggaagtctgttaac  
抗 P E 重鎖  
atgcggtgacgtcgaggagaatcctggcccaGAAGTACAGCTGGAACAGAGTGGTGCAGAGTTGGCAAGACCAG  
GGGCCAGCGTGAAACTCTCTTGCAAGGCGAGTGGATATACCTTTACAAGTTACGGTATTTCTTGGGTAA  
AACAGAGGACGGGGCAGGGTCTGGAATGGATAGGTGAAATTTACCCTAAATCCGGCAATACATACTAT

【表 6 - 6】

AATGAAAAATTCAAAGGACGAGCGACACTTACCGCTGATAAGTCTAGTTCCACTGCGTATATGGAACCTC  
 CGAAGCCTTACCAGCGAGGACTCCACAGTGTATTTTTGCGCGCGACAGGGGTACTATGCAAATTCACAA  
 TTCAGTACTGGGGTCAAGGGACACTTGTAACAGTAAGCGCAGctagcaccaaggggcccatcggtcttccccctggc  
 accctcctccaagagcacctctgggggcacagcgccctgggctgcctggtaaggactacttccccgaaccggtgacgggtgctgga  
 ctgaggcgccctgaccagcggtgcacaccttccggctgtctacagtcctcaggactctactccctcagcagcggtgaccgtgccc  
 tccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaactgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagaaagttgagcccaat  
 ctgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcttcccccaaaacccaagg  
 acaccctcatgatctccggacccctgagggtcacatgctgtgtgtgtggacgtgagccacgaagaccctgagggtcaagttcaactggtatg  
 ttgacggcggtggagggtgcataatgccaagacaaagccgcgaggagcagtagaacagcacgtaccgtgtgtgacgctcctaccgt  
 cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctcc  
 aaagccaaaggcgagccccgagaaccacagggtgtacacctgcccccatccgggatgagctgaccaagaatcaagtcagcctgacct  
 gcctgggtcaaaggcttctatccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcc  
 cgtgctggactccgacggctccttcttctctactcaaaactcacgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc  
 gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagccttctcctgtctccgggtaaatgagtgccacggccggcaagcccccg  
 ctccccaggctctcggggctcgcgcgaggatgcttggcacgtacccgtgtacatacttcccaggcaccagcatggaataaagcaccca  
 gcgttccctgggccccctgcgagactgtgatggttcttccacgggtcaggccgagctctgaggcctgagtggtgagggaggcagagt  
 ggtccactgtccccacactggcccaggctgtgtgtgggagctgacctcaggacattgttgcccatccggccgggcccacatctctgg  
 gtctgccacagagggaatcaccccagaggcccaagcccagggggacacagcactgaccaccccttctgtccagagctgcaactg  
 gaggagagctgtgaggaggcgaggacggggagctggacgggctgtggacgaccatcaccatcttcatcacactcttctgttaagcg  
 M1  
 M2  
 tgtgtacagtgccaccgtcaccttctcaagggtgaagtggatcttctcctcggtgggtggacctgaagcagaccatcatccccgactacag  
 gaacatgatcggacagggggcctaggggccacctctgcggggtgtccaggcgcgccaataaaatatctttatctttcattacatctgtgtg

10

20

30

40

## 【表 6 - 7】

ttgggtttttgtgtgaatcgatagtagtactaacatacgctctccatcaaaacaaaacgaaacaaaacaaactagcaaaataggctgtcccca  
gtgcaagtcagggtgccagaacatttctctattttaaagtctagaattaaccaaactggatctctgctgtccctgtaataaacccgaaaattt  
tgaatttttgaattgtttttgtaattcttagtttgatgtctgttgcctattatgtctactattctttcccctgcactgtacccccaatcccc  
ttttcttttaaaattgtggatgaatactgccatttgtctgcagaattggcgcacgcagtgccgatccgttcactaatcgaatggatctgtctct  
gtctctctccaccttcttcttatttcttgggcctgtcgggtcccctcggggttgggaggtgggtctgaaacgataatggatgaatatccc  
tgctaactctattcactatagaaagtacagcaaaaactattcttaaacctaccaagcctcctactatcattatgaataattttatatacca  
cagccaatttgttatgttaaaccaattccacaaacttgcccatttatctaattccaataattcttgttcattcttttctgtctgggtttgcgattc  
ttcaattaaggagtgatttaagct

10

【 0 2 0 6 】

## 【表 7 - 1】

F A M 2 B 1 2 ベクターのコード配列 (配列番号 4 1)。W P R E、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント；F E E K、B 細胞特異的プロモーター；T 2 A、トセア・アシグナ (T h o s e a a s i g n a) ウイルス由来 2 A ペプチド；M 1 および M 2、膜貫通コード領域。

```

tgtgtaattgttaatttctctgtccactccatccagggtcgtgtgattccaaatctgttcagagatttattactccaactagcattccaaggc
acagcagtggtgcaaagtaggtttccagagcaaccccaaatcccaggagctgttgatccttttaggtatctttccacagccaggattcttg
cctggagctgcttgatgcccagactgtgagttgcaacagatgctgttgcctcaatagccctcagcaaattgttctgctgctgactata
ccagacaataattgtctggcctgtaccgtcagcgtcattgacgtgcgcccatagtgcttctgctgctccaagaaccaaggaacaaa
gctcctattcccactgctcttttctctctgcaccactcttcttttgccttgggtgggtgctactcctaattggttcaattttactactttatatt
atataattcacttctccaattgtccctcatatctcctcctccagggtctgaagatcagcggcgccttgctgtgcggtggttacttttggtttgc
tcttctctatctgtctaaagcttcttgggtgtctttatctctatcctttgatgcacacaatagaggggtgctactgtattatataatgatcta
agttcttctgactcgtctgaagggtggtttagctgtccagatattgtctacagccttctgatgtttctaacaggccaggattaactgcg
aatcgttctagctccctgcttgcctactatattgttttaatttatatttttctttcccttggccttaaccgaatttttcccatcgcatctaa
ttctccccgcttaatactgacgctctgcacccatctctctcttctagcctccgctagtcaaaatttttggcgtactcaccagtcgcccgc
ctcgcctcttgcggtgcgcttcagcaagccgagtcctgcgtcgagagagctcctctggtttcccttctgcttcaagtcctgttcgggcg
ccactgctagagattttccacactgactaaaagggtctgagggtctctagtaccagagtcacacaacagacgggcacacactacttga
agcactcaaggcaagctttatgaggcttaagcagtggttccctagttagccagagagctccagggtcagatctggtctaaccagaga
gaccagtcagggcaaaacgcgtgcttatatagacctccaccgtacacgcctaccgcccatttgcgtcaatggggcgagggtgttacg
acattttggaaagtcctgtgattttggtgccaacaaactccattgacgtcaatggggtggagacttggaaatccccgtgagtcaaac
cgctatccacgcccattgatgtactgcaaaaaccgcatcaccatggtaatagcgatgactaatacgtagatgtactgcaagtaggaaag
tcccataagggtcatgtactgggcataatgccaggcgggcccatttaccgtcattgacgtcaatagggggcgacttggcatatgatacatt
gatgtactgccaagtgggcagtttaccgtaataactccaccattgacgtcaatggaaagtcctattggcgttactatgggaacatacgt
cattattgacgtcaatgggcgggggtcgttggcggtcagccaggcgggcccatttaccgtaagttatgtaacgcggaactccatatatgg
gctatgaactaatgacccgtaattgattactattaataactagtcataatcaatgtcaacgcgtatatctggcccggtacatcggaagc

```

10

20

30

40

## 【表 7 - 2】

agcgcaaaacgcctaaccctaagcagattcttcatgcaattgtcggtaacgcttgcttgttagcttaaatttgctcgcgcactactc  
 agcgacctccaacacacaagcagggagcagatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatagggga  
 tcgggagatctccgatccgtcgacgtcaggtggcacttttcggggaaaatgtgcggaacccctatttgttttttctaaatacattcaa  
 atatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaggaagagtatgagtattcaacatttcggtgctgc  
 ccttattcccttttttgcggtatttgccttctgttttgctcaccagaaacgctggtgaaagtaaagatgctgaagatcagttgggtgc  
 acgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgtttccaatgatgagcactttt  
 aaagtctgctatgtggcgcggtattatccgtattgacgcggggcaagagcaactcggtcgcccatacactattctcagaatgacttgg  
 ttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataaccatgagtataac  
 actgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgcctt  
 gatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgca  
 aactattaactggcgaactacttactctagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgc  
 gctcggccctccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccaga  
 tggtaagccctccgctatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtg  
 cctcactgattaagcatttgtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaggatcta  
 ggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagttttcgttcactgagcgtcagacccgtagaaaagatcaa  
 ggatcttcttgagatccttttttctgcgctaactgctgcttgcacacaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttccggatcaa  
 gagctaccaactcttttccgaaggttaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccacc  
 acttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtctgtaaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttacc  
 ggggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggtgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaa  
 cgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggt  
 aagcggcagggtcggaacaggagagcgacgagggagcttccagggggaaacgccttggtatctttatagtcctgtcgggtttcggccacc  
 tctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggggcggagcctatggaaaaacgcagcaacgcggcctttttacggttctggc

10

20

30

40

## 【表 7 - 3】

cttttgctggccttttgcacatgttcttctcggttatccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctc  
 gccgcagccgaacgaccgagcgcagcagtcagtgagcggaggaagcggaagagcgccaatacgcaaaccgctctccccgcgcgtt  
 ggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcatic  
 attaggcaccccaggcctttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctat  
 gaccatgattacgccaagctctagctagaggtcgacggtatacagacatgataagatacattgatgagtttgacaaaccacaactaga  
 atgcagtgaaaaaatgctttatgtgaaattgtgatgctattgctttattgtaaccattataagctgcaataaacaagttgggggtggg  
 cgaagaactccagcatgagatccccgcgtggaggatcatccagccggcgtcccgaaaacgattccgaagcccaacctttcatagaag  
 gcggcgggtggaatcgaaatctgtagcacgtgtcagtcctgctcctcgccacgaagtgcacgcagttgccggcgggtcgcgagggc  
 gaactccccccccacggctgctcgccgatctcggtcatggccggccggaggcgctccgggaagttcgtggacacgacctccgaccactc  
 ggcttacagctcgtccaggccgcgacccacacccaggccagggtgttgcggcaccacctggctcctggaccgctgatgaacaggg  
 tcacgtcgtccggaccacacccggcgaagtcgtcctccacgaagtcggggagaacccgagccggctcggtccagaactcgaccgctccg  
 cgcacgtcgcgcgcggtgagcaccggaacggcacttggtcaacttgccatggtttagttcctcaccttgcgtattatactatgccgatata  
 ctatgccgatgattaattgtcaacacgtgctgatcagatccgaaaatggatatacaagctccggggagcttttgcaaaagcctaggcctc  
 caaaaaagcctcctcactacttctggaatagctcagaggcagaggcgccctcgccctctgcataaataaaaaaaattagtcagccatgg  
 ggccggagaatggcggaactggcgaggtagggcgggatggcgaggtagggcgggactatggttgcgactaattgagatgca  
 tgccttgcatacttctgcctgctggggagcctggggactttccacacctggttgcgactaattgagatgcatgctttgcatacttctgcctgc  
 tggggagcctggggactttccacacctaaactgacacacattccacagaattaattcgcgtaaatTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTAAAC  
 caataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagatagggttgagtggttccagtttggaaacaagagtc  
 actattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcgaaaaaccgtctatcaggcgcatggccactacgtgaaccatcacctaatcaa  
 gtttttggggctgagggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaaggagccccgatttagagcttgacggggaaagccggcggaac  
 gtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaaaggagcggcgctaggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgctgaaccaccac  
 acccgccgcttaatgcgctgctacaggcgcggtggggataccccctagagccccagctgggttcttccgcctcagaagccatagagcc

10

20

30

40



【表 7 - 4】

caccgcatccccagcatgcctgctattgtcttcccaatcctcccccttgctgtcctgccccacccacccccagaatagaatgacacctac  
 tcagacaatgcgatgcaatttctcattttattagaaaggacagtgggagtgccaccttcagggtcaaggaaaggcacgggggagggg  
 caaacaacagatggctggcaactagaaggcacagtcgaggctgatcagcgggttaaacgggccctgctagagattttccacactgact  
 aaaagggtctgagggatctctagttaccagagtcacacaacagacgggcacacactacttgaagcactcaaggcaagctttattgaggc  
 ttaagcagtgggttccctagttagccagagagctcccaggctcagatctggtctaaccagagagaccagtagcagtcggatgcagctct  
 cgggccatgtgatgaaatgctaggcggctgtcaaacctccactctaatacttctctcggggtcatccatccatgcagggtcacagggt  
 gtaacaagcgggtgttctctcttattggcttcttctaccttcttctgctcaactggtagctttagcaccatcaaaggctcagtgata  
 tctgatccctggccctgggtgtgtagttctgccaatcagggaagtagccttgtgtgtgtagatccacagatcaaggatacttctctctgtg  
 ggagtgaattagcccttcagtcaccccttttcttttaaaaagtggctaagatctacagctgccttgaagtcattggtcttaagggtacctg  
 aggtgtgactggaaaacccacctcctcctcctcttctgtgcttctagccaggcacaatcagcattggtagctgctgtattgctacttgtgattgc  
 WPRE  
 tccatgttttctaggtctcgatcgaggtcgacggtatcgatgcggggaggcgcccaaggagatccgactcgtctgaggcggaaggc  
 gaagacgcggaagaggccgcagagccggcagcaggccgcgggaagggaagggtccgctggattgaggcggaaggacgtagcagaa  
 ggacgtcccgccagaaatgcaggtggcaacacaggcgagcagccaaggaaaggacgatgatttcccgacaacaccacgggaattgtc  
 agtgcacaacagccgagccctgtccagcagcgggcaaggcaggcggcgatgagttccgctggcaataggaggggggaaagcgaa  
 agtcccggaaggagctgacaggtgggtggcaatgcccaaccagtgagggttgctgcagcaaacacagtgacaccacgccacgttgc  
 ctgacaacgggcccacaactcctcataaagagacagcaaccaggattatataaggaggagaaaatgaaagccatacgggaagcaata  
 gcatgatacaaaaggcattaaagcagcgtatccacatagcgtaaaaggagcaacatagttaagaatnccagtcattctttcacaatttt  
 gtaatccagaggttgattatcgataagcttgatatgaattgggagggactagagtcgcgccgcttacttgtacagtttaacatctcga  
 FEEK  
 gccataaagatgggttaattaacccaccaagatctaaaccgggtgagtttcatggttacttgcttgagaagattaaaaaaagtaatgtac  
 ctatgaggagagatcccagggaaccaagatagcaactgicatatgaaccgicacactgcttgggtcaaggagaagacccttggggaac  
 tgaanaacagaacctgagcacatctgttgccttccatcctcctccaacagggtgggtggagcactccacaccccttcaccggctgt

10

20

30

40

0

20

## 30

## T 2 A 部位

## 40

ggtgacgtcaggagaatcctggcccaacaagtcgaactgggtacaatccggagctgaagtgaaaaaaccaggggcalccgtgaaagtc  
catgccaaagcctccggttaccgatttagtaactttgtgatacttgggttcggcaagcccaggacaaagattcgagtggatgggctgga  
taaaccataataalgglaacaaagaatttcagctaaaattccaagaccgggtaacatttacggcggatcttcagctaacactgcataca  
tggaaacttcgcagcttgagggtccgcgacacagccgtatattactgcgcgagggttggcccatatagctgggacgacagtccgcaggac  
aallattacatggacgttgagggaagggtacaccetaatagtcagtagtctagcaccaagggcccatcggtcttcccccaggcacc



【表 7 - 6】

tcctccaagagcaccctctgggggcacagcggccctgggctgcttggtcaaggactacttccccgaaccgggacgggltggtggaactca  
 ggcccttgaccagcggcgtgcacaccttccggctgtctacagctctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctcca  
 gcagcttgggcaccagacctacatctgaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgt  
 gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagcttctcttcccccaaaaaccaaggacacc  
 ctcatgatctcccgacccttgagggtacatgctgggtgggtgacgtgagccacgaagaccctgagggtcaagttcaactggtatgttgac  
 ggctgagggtgcataatgccaagacaaagccggggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctctaccgtcctgc  
 accaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggctccaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaaagc  
 caaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaatcaagtcagcctgacctgctg  
 gtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctccgtgc  
 tggactccgacggctcttctctctactcaaaactcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat  
 gcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagccctctccctgctccgggtaaatgagtgccacggccggcaagccccgctccc  
 caggctctcggggctgcgcgaggatgcttggcacgtaccccggtgtacatacttccaggcaccagcatggaataaagcaccagcgc  
 tccccgggccccctgcgagactgtgatgggtcttccacgggtcaggccgagctgaggccctgagtggtcagggaggcagagtggtgc  
 ccactgtccccacactgcccaggtgtggtggggagctgacctcaggacattgttgcccatcccggccgggcccacatcttggtcct  
 gccacagaggggaatcacccccagaggcccaagcccagggggacacagcactgaccaccccttctgtccagagctgcaactggagga  
 gagctgtcggaggcgcaggacggggagctggacgggctgtggacgaccatcacatcttcatcacacttctctgttaagcgtgtgcta  
 cagtgccaccgtcaccttcttcaaggtcggccgcacgttgtcccagctgtccttgacattgtccccatgctgtcacaactgtctctgac  
 actgtccacaggtgtccccacctgtccctgacgtgcgggtgggtgggccttgggggcagagaggtggcctcagtgccctgaggggt  
 ggggtggggtcgggggcagggctgtggcctcgtcaccctgtgtgtgccttgctacaggtgaagtggatcttctctcgggtgggtgac  
 ctgaagcagaccatcatcccgactacaggaacatgatcggaacagggggcctaggggccacccctctgcggggtgtccagggcgcgcaa

10

20

M1

30

イントロン

M2

40

## 【表 7 - 7】

taaaatatctttatctttcattacatctgtgtgttggtttttgtgtgaatcgatagtagtactaacatacgtctccatcaaaacaaaacgaaaca  
aaacaaactagcaaaataggctgtcccagtgcaagtgagggtccagaaacatttctctatttaaatgctagaattaacaaaactggatc  
tctgctgtccctgtaataaacccgaaaattttgaattttgttaattgtttttgttaattcttttagttgtatgtctgttgcattatgtctactattc  
ttccctgcactgtaccccccaatcccccttttcttttaaaattgtggatgaatactgccatttgcctgcagaattggcgacgcagtgcc  
gatccgttcactaatcgaatggatctgtctctctctctccaccttctctctattccttcgggcctgtcgggtccctcggggttgggag  
gtgggtctgaaacgataatggatgaatatccctgcctaactctattcactatagaaagtacagcaaaaactattcttaaacctaccaagcct  
cctactatcattatgaataattttatataccacagccaatttgttatgttaaccaattccacaaaacttgcccatttatctaattccaataatt  
cttggtcattcttttcttgctggttttgcgattcttcaattaaggagtgatttaagct

10

【 0 2 0 7 】

## 【表 8 - 1】

FAM2 抗PEベクターのコード配列（配列番号42）。WPRE、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント；FEEK、B細胞特異的プロモーター；T2A、トセア・アシグナ（Thosea signa）ウイルス由来2Aペプチド；M1およびM2、膜貫通コード領域。

tgtgtaattgttaatttctctgtccactccatccaggctcgtgtgattccaaatctgttcagagatttattactccaactagcattccaaggc  
 acagcagtggtgcaaagtgatgtttccagagcaaccccaaatccccaggagctgttgatccttttaggtatctttccacagccaggattcttg  
 cctggagctgcttgatgccccagactgtgagttgcaacagatgctgttgcgcctcaatagccctcagcaaatgttctgctgctgactata  
 ccagacaataattgtctggcctgtaccgtcagcgtcattgacgctgcgccatagtgttctctgctgctccaagaacccaaggaacaaa  
 gctcctattcccactgctcttttctctctgcaccactcttctcttgccttggtgggtgctactcctaattggttcaattttactactttatatt  
 atataattcacttctccaattgtccctcatatctcctctccaggctcgaagatcagcggcgttgctgtgcgggtggttacttttgtttgc  
 tcttctctatcttgtctaaagcttcttggtgtcttttatctctatcctttgatgcacacaatagagggttgctactgtattatataatgatcta  
 agttcttctgatccigtctgaagggaagggttgtagctgtcccagtaattgtctacagccttctgatgtttctaacaggccaggattaactgcg  
 aatcgttctagctccctgcttgccatactatatgttttaatttatatttttcttccccctggccttaaccgaatttttccatcgcgatctaa  
 ttctccccgcttaatactgacgctctgcacccatctctctcctctagcctccgctagtcaaaatttttggcgctactaccagtcgcccgc  
 ctgcctcttgccgtgcgcttcagcaagccgagtcctgcgtcgagagagctcctctggtttcccttctgcttcaagtccctgttcgggcg  
 ccactgctagagattttccactgactaaaagggtctgagggatctctagttaccagagtcacacaacagacgggcacacactacttga  
 agcactcaaggcaagctttattgaggcttaagcagtggttccctagtttagccagagagctcccaggctcagatctggttctaaccagaga  
 gaccagtcagggcaaaacgcgctgttatatagacctccaccgtacacgcctaccgcccatttgcgtcaatggggcgagggtgttacg  
 acattttggaaagtccgttgattttggtgccaaaacaaactcccattgacgtcaatgggggtggagacttggaatccccgtgagtcaaac  
 cgctatccacgcccattgatgtactgccaaaaccgcatcaccatggtaatagcgatgactaatacgtagatgtactgccaaagtaggaag  
 tcccataaggctcatgtactgggcataatgccaggcgggccatttaccgtcattgacgtcaatagggggcgctacttggcatatgatacatt  
 gatgtactgccaaagtgggcagtttaccgtaataactccaccattgacgtcaatggaaagtcctatggcgttactatgggaacatacgt  
 cattattgacgtcaatggggcggggtcgttggcggtcagccaggcgggccatttaccgtaagttagtaacgggaactccatatatgg  
 gctatgaactaatgacccgtaattgattactattaataactagtcaataatcaatgtcaacgcgtatatctggcccgtacatcggaagc

10

20

30

40

## 【表 8 - 2】

agcgcaaaacgcctaaccctaagcagattcttcatgcaattgtcggtaagccttgcttggtagcttaaatgttgcgcgcactactc  
 agcgacctccaacacacaagcagggagcagatactggcttaactatgcggcatcagagcagattgtactgagagtgcaccatagggga  
 tcgggagatctccgatccgtcgcgtcaggigggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgttttttctaaatacattcaa  
 atatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttcggtgtgc  
 ccttattcccttttttcgggcattttgccttctgtttttgctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgc  
 acgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcactttt  
 aaagttctgctatgtggcgcgttattatccgtattgacgcgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttgg  
 ttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgcctccataaccatgagtataac  
 actgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgcctt  
 gatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgca  
 aactattaactggcgaactacttacttagcttccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgc  
 gctcggcccttcggcgtggctgtttattgtgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccaga  
 tggtaagccctccgctatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtg  
 cctcactgattaagcatttgtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaggatcta  
 ggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgtccactgagcgtcagacccgtagaaaagatcaaa  
 ggatcttcttgagatccttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaacaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttccggatcaa  
 gagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggccacc  
 acttaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtctgctaatacctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttacc  
 gggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggtgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaa  
 cgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggt  
 aagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgaggagcctccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggttcgccacc  
 tctgacttgagcgtcgtttttgtgatgctcgtcagggggcgaggcctatggaaaaacgcagcaacgcggcctttttacggttctggc

10

20

30

40

【表 8 - 3】

cttttgctggccttttgcacatgttcttctcggttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctc  
 gccgcagccgaacgaccgagcgagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgtt  
 ggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactc  
 attaggcaccccaggcctttacactttatgcttcggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacagctat  
 gaccatgattacgccaagctctagctagaggtcgacggtatacagacatgataagatacattgatgagttggacaaaccacaactaga  
 atgcagtgaaaaaatgctttattgtgaaattgtgatgctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagtgggggtggg  
 cgaagaactccagcatgagatccccgcgctggaggatcatccagccggcgtccggaaaaacgattccgaagcccaacctttcatagaag  
 gggcggtggaatcgaaatctcgtacgctgtcagtcctgctcctcgccacgaagtgcacgcagttgccggcgggtcgcgagggc  
 gaactccccccccacggctgctcgccgatctcggtcatggccggccggaggcgctccgggaagttcgtggacacgacctccgaccactc  
 ggcttacagctcgtccaggccgcacccacacccaggccagggtgttgcggcaccacctggtcctggaccgcgtgatgaacaggg  
 tcacgtcgtccggaccacacccggcgaagtcgtcctccacgaagtcggggagaacccgagccggctcggatccagaactcgaccgctccg  
 gcgacgtcgcgcggtgagcaccggaacggcactggtcaactggccatggttagttcctcaccttgcgtattatactatgccgatata  
 ctatgccgatgattaattgtcaacacgtgctgatcagatccgaaaatggataatacaagctccgggagcttttgcaaaagcctaggcctc  
 caaaaaagcctcctcactacttctggaatagctcagaggcagaggcgccctcgccctctgcataaataaaaaaaattagtcagccatgg  
 ggcgagaatggcggaactggcgagtagggcgggatggcgagtagggcgggactatggttgctgactaattgagatgca  
 tgctttgcatacttctgctgctggggagcctggggactttccacacctggttgcgtgactaattgagatgcatgctttgcatacttctgctgc  
 tggggagcctggggactttccacaccttaactgacacacattccacagaattaattcgcgtaaattttgttaaatcagctcatttttaac  
 caataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagataggggtgagtggttccagtttgaacaagagtcc  
 actattaaagaacgtggactccaacgtcaaaggcgaaaaaccgtctatcaggcgcatggccactacgtgaaccatcacccaatcaa  
 gtttttggggctgaggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaaggagccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaaac  
 gtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaaaggagcggcgctaggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaccaccac  
 accgcccgcgttaatgcgccgtacaggcgcggtggggataccccctagagccccagctgggtcttccgctcagaagccatagagcc

10

20

30

40

【表 8 - 4】

caccgcatccccagcatgctgtctattgtcttcccaatcctcccccttgctgtcctgccccacccccccccagaatagaatgacacctac  
 tcagacaatgcatgcaatttctcattttattaggaaaggacagtgggagtgccaccttcagggtcaaggaaaggcacgggggagggg  
 caaacaacagatggctggcaactagaaggcacagtcgagggtgatcagcgggtttaaacgggcccctgtagagattttccacactgact  
 aaaagggtctgagggtatcttagttaccagagtcacacaacagacgggcacacactacttgaagcactcaaggcaagctttattgaggc  
 ttaagcagtgggttccctagtttagccagagagctcccagggtcagatctggcttaaccagagagaccagtagcagtcgggatgcagctct  
 cgggccatgtgatgaaatgctaggcggctgtcaaacctccactctaatacttctctcctcggtcatccatccatgcagggtcacagggt  
 gtaacaagcgggtgttctctcttctattggcttcttctaccttcttctgctcaactggtagctttagcaccatccaaagggtcagtgata  
 tctgatccctggccctgggtgttagttctgccaatcagggaagtagccttgtgtgtgtagatccacagatcaaggatatcttgtcttctgtg  
 ggagtgaattagcccttccagtcacccccctttcttttaaaaagggtgtaagatctacagctgccttgaagtcattgggtcttaagggtacctg  
 aggtgtgactggaaaaccacctcctcctcctcttctgtcttctagccaggcaccaatcagattggtagctgtgtattgctacttgtgattgc

10

20

## WPRE

tccatgttttctaggtctcgatcgagggtcgacggtatcgatgcggggagggcgcccaaggagatccgactcgtctgaggcggaaggc  
 gaagacgcggaagaggccgcagagccggcagcaggccgcgggaagggaagggtcgctggattgaggcggaagggtacgtagcagaa  
 ggacgtcccgcgcagaatgcagggtggcaacacaggcgagcagccaaggaaaggacgatgatttcccgacaacaccacggaattgtc  
 agtgcacaacagccgagccctgtccagcagcgggcaaggcaggcggcgatgagttccgctggcaataggaggggggaaagcgaa  
 agtcccggaaggagctgacagggtgggtggcaatgccccaccagtggggggttgcgtcagcaaacacagtgcacaccacgccacgttgc  
 ctgacaacgggccacaactcctcataaagagacagcaaccaggatttatacaaggaggagaaaatgaaagccatacgggaagcaata  
 gcatgatacaaaaggcattaaagcagcgtatccatagcgtaaaaggagcaacatagtttaagaatnccagtcattctttcacaatttt  
 gtaatccagaggttgattatcgataagcttgatcgaattgggagggactagagtcgcggccgctttacttgtacagtttaacatctcga

30

## FEK

gccataaagatgggttaattaaccaccaagatctaaaccgggtgagtttcatggttacttgctgagaagattaaaaaaagtaatgtac  
 cttatgaggagagatcccagggaaccaagatagcaactgtcatagcaaccgtcacactgcttgggtcaaggagaagacccttggggaac  
 tgaaaacagaaccttgagcacatctgttcttctgctccatcctcctccaacagggtgggtggagcactccacaccctttcacgggtcgt

40



0

20

30

T 2 A 部位

抗 P E 重鎖

40

【表 8 - 6】

ATAATGAAAAATTCAAAGGACGAGCGACACTTACCGCTGATAAGTCTAGTTCCTACTGCGTATATGGAAC  
 TCCGAAGCCTTACCAGCGAGGACTCCACAGTGTATTTTTGCGCGCGACAGGGGTACTATGCAAATTCAC  
 AATTCACGTAAGGGTCAAGGGACACTTGTAAACAGTAAGCGCAGctagcaccaagggcccatcggtcttccccctg  
 gcacccctcctccaagagcacctctgggggcacagcgccctgggctgcctggtaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctgtg  
 aactcaggcgccctgaccagcggtgacaccttccccggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgacgtg  
 cctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagaaagttgagcccaa  
 atcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcttccccccaaaaccaag  
 gacaccctcatgatctccggacccctgaggtcacatgcgtgggtgggacgtgagccacgaagaccctgagggtcaagttcaactggtat  
 gtgacggcggtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccg  
 tcttgaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagggtcctcaacaagccctccagccccatcgagaaaacctctcc  
 aaagccaaaggcgagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccggtgagctgaccaagaatcaagtcagcctgacct  
 gcctggtcaaaggcttctatccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagacaactacaagaccacgcctcc  
 cgtgctggactccgacggctcttcttcttactcaaaactcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc  
 gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagccttctcctgtctccgggtaaatgagtccacggccggcaagcccccg  
 ctccccaggctctcggggtcgcgcgaggatgcttggcacgtaccccggtgtacatacttccaggcaccagcatggaaataaagcaccca  
 gcgcttccctggggccctgcgagactgtgatggttctttccaggggtcaggccgagctgaggcctgagtggtgagggaggcagagt  
 ggtccactgtccccacactggcccaggctgtggtggggagctgacctcaggacattgttggccatcccgccgggcccctacatcctgg  
 gtccctgccacagagggaatcacccccagaggcccaagcccagggggacacagcactgaccaccccttctgtccagagctgcaactg  
 gaggagagctgtgcggaggcgaggacggggagctggacgggctgtggacgacctcaccatcttcatcacacttctctgttaagcgt  
 gtgctacagtgccaccgtcaccttcttcaaggtcgggccgcacgttgtccccagctgtccttgacattgtccccatgctgtcacaactgtc  
 tctgacactgtccccaggtgtccccacctgtcctgacgtgcgggtgggtgggcttgggggcagagaggtggcctcagtgccctga

10

20

30

40

M1

イントロン



【表 8 - 7】

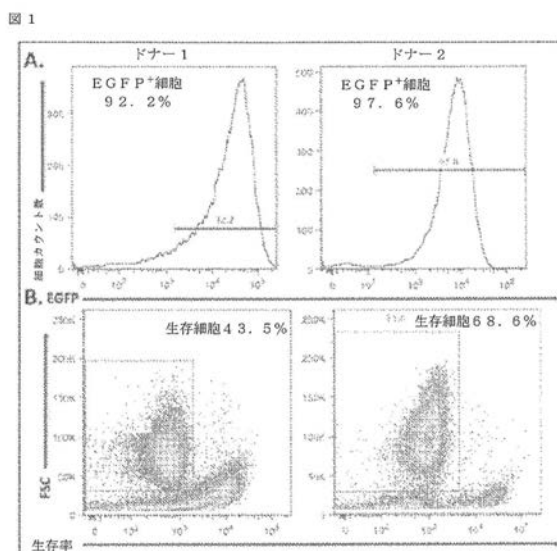
M2

ggggtgggtggggctcgggggcagggctgtggcctcgtcaccctgtgctgtgccttgctacaggtgaagtggatcttctcctcgggtg  
 tggacctgaagcagaccatcatccccgactacaggaacatgatcggacagggggcctagggccaccctctcgggggtgtccagggcgc  
 gccataaaaatatcttttttattacatctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgaatcgatagtactaacatacgctctccatcaaaacaaaacg  
 aaacaaaacaaactagcaaaataggctgtccccagtgcaagtcaggtgccagaacatttctctatttaaatgctagaattaacaaaact  
 ggatctctgtgtccctgtataaaacccgaaaatttgaattttgttaattgttttgaattcttttagttgtatgtctgtgtctattatgtcta  
 ctattctttccctgcactgtaccccccaatcccccttttcttttaaaattgtggatgaatactgccatttctcgcagaattggcgacgca  
 gtgccgatccgttcactaatgaatggatctgtctctctctctcaccttcttcttattccttcgggcctgtcgggtccctcgggggtt  
 gggagggtgggtctgaaacgataatggtgaatatccctgcctaactctattcactatagaaagtacagcaaaaactattcttaacctacc  
 aagcctctactatcattatgaataattttatataccacagccaatttgttatgtaaaccaattccacaaaacttgccatttatctaattcca  
 ataattcttgttcatcttttctgtggttttgcgattcttcaattaaggagtgattaaagct

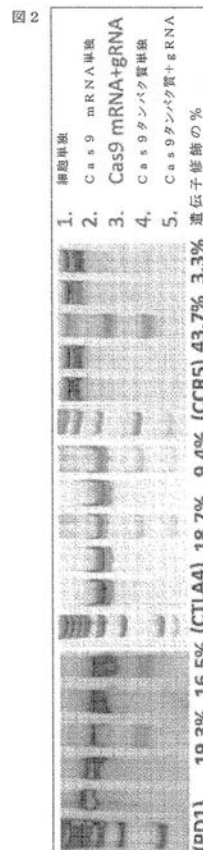
10

20

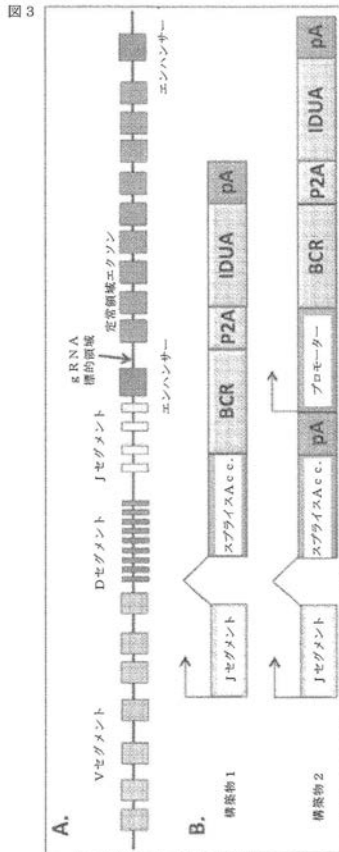
【図 1】



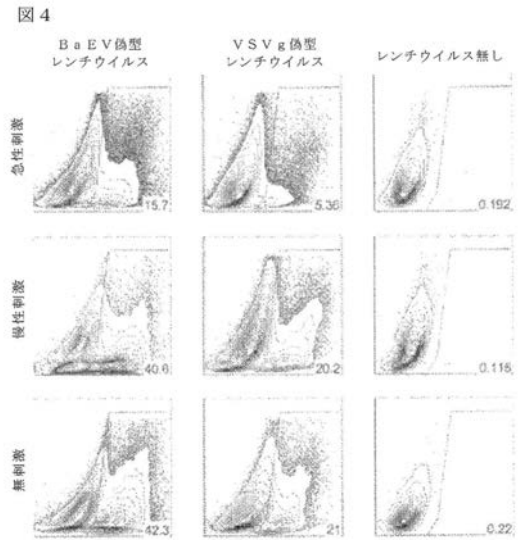
【図 2】



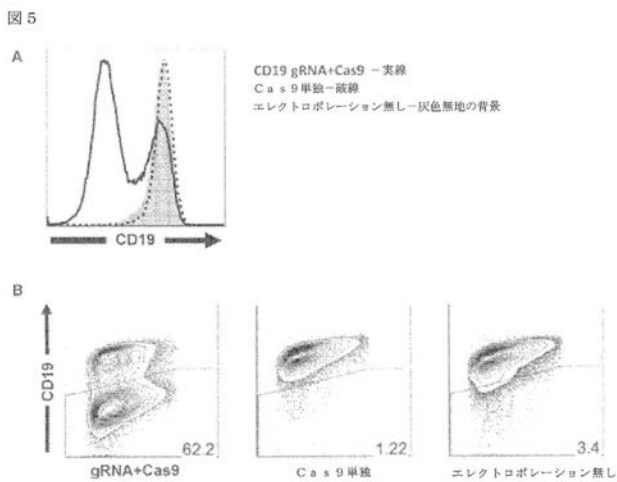
【図 3】



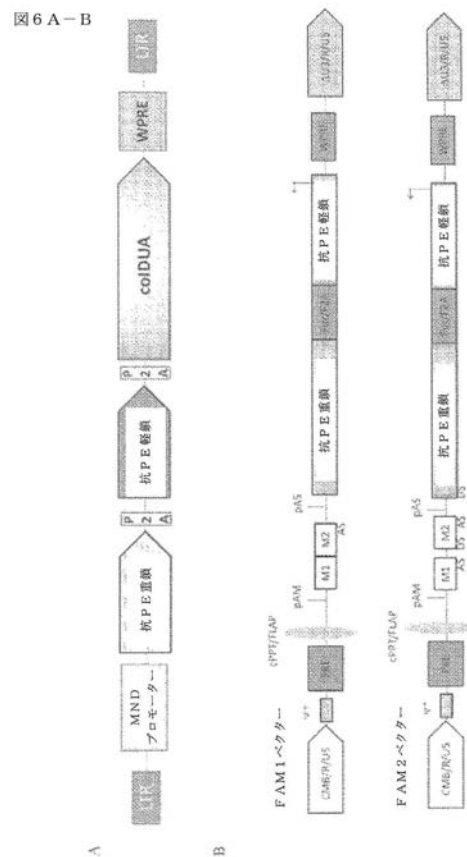
【図 4】



【図 5】

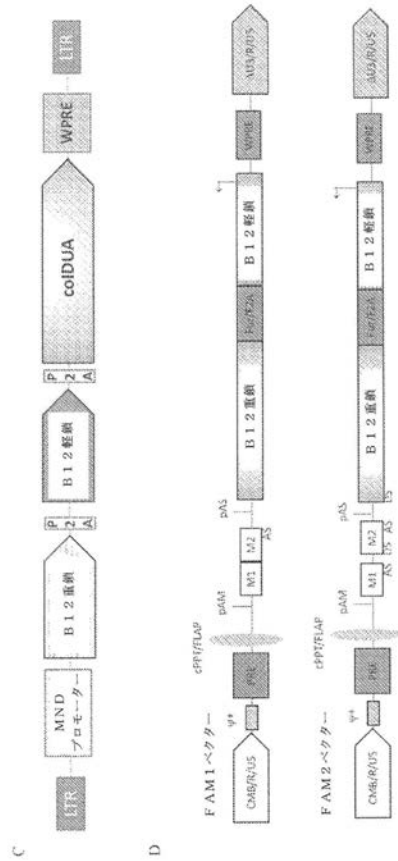


【図 6 A - B】



【 図 6 C - D 】

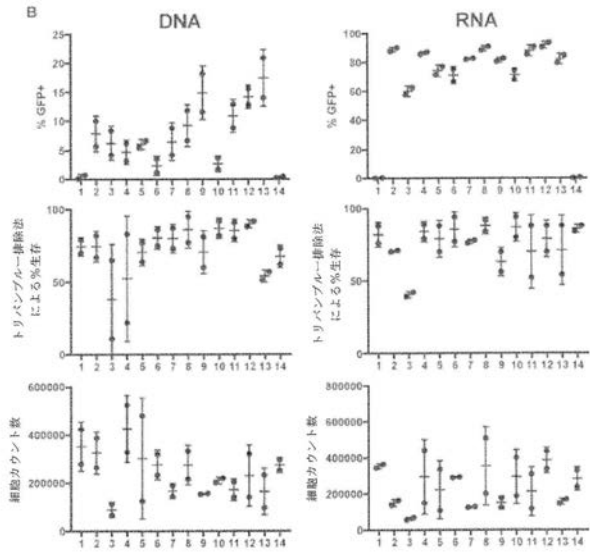
图 6 C-D



【 図 7 】

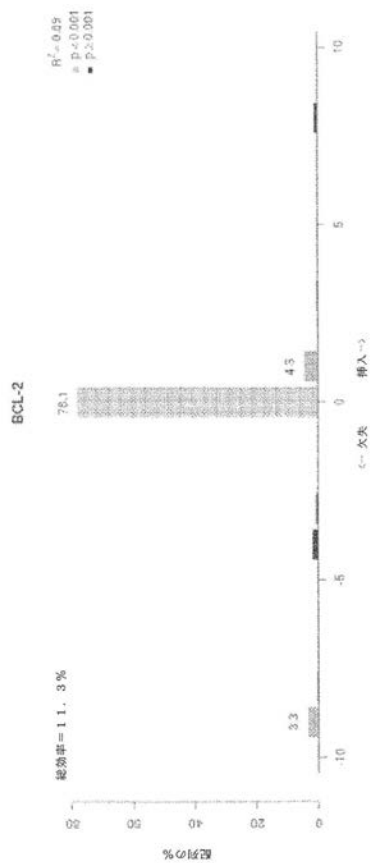
图 7

条件	電圧	幅	パルス
	n/a	n/a	n/a
1			
2	1500	20	1
3	1700	20	1
4	1200	30	1
5	1400	30	1
6	1000	40	1
7	1200	40	1
8	1200	20	2
9	1400	20	2
10	950	30	2
11	1150	30	2
12	1400	10	3
13	1600	10	3



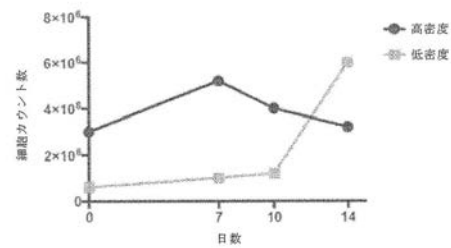
【圖 8】

图 8



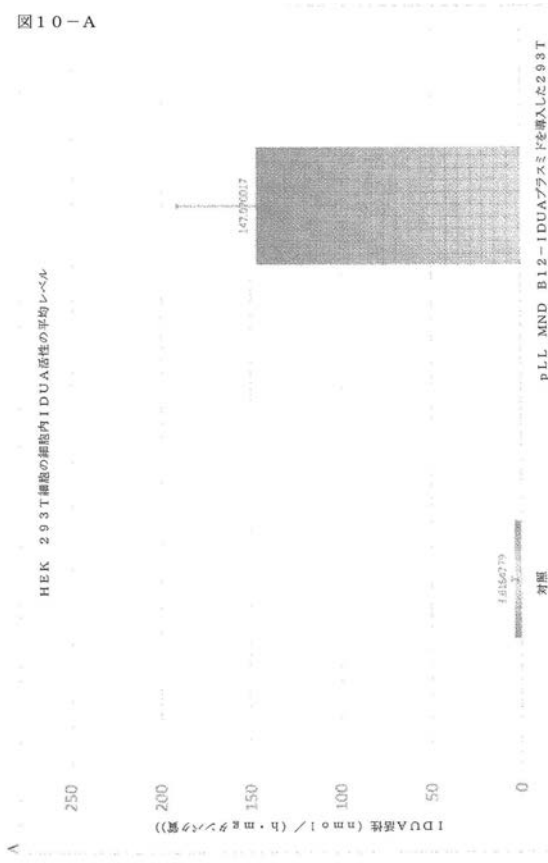
【 図 9 】

图 9



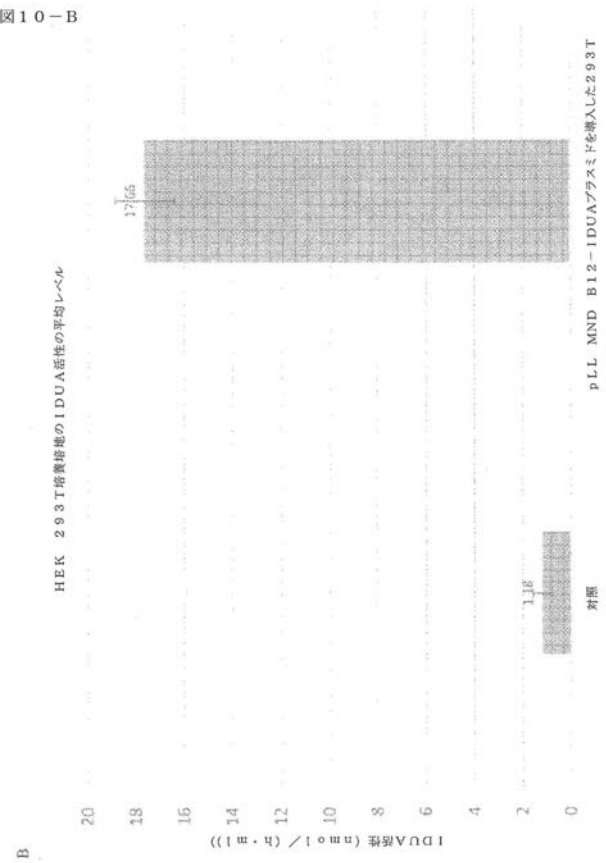
【図 10 - A】

図 10-A



【図 10 - B】

図 10-B



【配列表】

2019526270000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/51182

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC - A61K 31/7088, 31/7115, 38/17, 38/43; C12N 5/0781, 15/11, 15/67, 15/87 (2017.01) CPC - A61K 31/7088, 31/7115, 38/43, 38/177; C12N 5/0635, 15/11, 15/67, 15/87		
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	WO 2016/100932 A1 (IMMUSOFT CORPORATION) 23 June 2016; abstract; page 2, lines 18-31; page 4, lines 2-3, line 30; page 5, line 4; page 9; lines 2-5; page 17, lines 2-11; page 26, lines 15-16; page 30, lines 25-29; page 31, line 32; page 39, lines 17-19; page 41, lines 26-27; page 42, lines 16-17; page 54, lines 20-21; page 60, line 4	1-2, 3/1-2, 16-18, 19/16-18, 28-29, 30/28-29
P, X	US 2016/0289637 A1 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.) 6 October 2016	1-2, 3/1-2, 16-18, 19/16-18, 28-29, 30/28-29
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 November 2017 (02.11.2017)		Date of mailing of the international search report <b>17 NOV 2017</b>
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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/51182

**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.: 4-15, 20-27, 31-33  
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:

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.:

**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.

## 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 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00		
A 6 1 K 39/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/00	H	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 2 1	
A 6 1 P 5/00 (2006.01)		A 6 1 P 5/00		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P 31/04		
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 31/12		
A 6 1 K 35/76 (2015.01)		A 6 1 K 35/76		
A 6 1 P 37/04 (2006.01)		A 6 1 P 37/04		
C 1 2 N 15/12 (2006.01)		C 1 2 N 15/12	Z N A	
C 1 2 N 15/52 (2006.01)		C 1 2 N 15/52	Z	

(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 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 ブランデン エス・モリアリティ

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 4 5 5 , ミネアポリス, シックス ストリート サウス イースト 2 2 3 1 , キャンサー カーディオバスキュラー リサーチ ビルディング, 3 - 1 2 8

(72)発明者 ジョン ハンゼカー

アメリカ合衆国, 0 9 7 5 1 , エーピーオー エーイー, シーエムアール 4 8 9 ボックス 1 4 6 7 , シーノオー カトリーナ シュワイカー

(72)発明者 マシュー ジョンソン

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 4 5 5 , ミネアポリス, シックス ストリート サウス イースト 2 2 3 1 , キャンサー カーディオバスキュラー リサーチ ビルディング, 3 - 1 2 8

(72)発明者 カナット ラオハラウィー

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 4 5 5 - 0 2 5 0 , ミネアポリス, ジャクソン ホール 6 - 1 6 0 , チャーチ ストリート サウス イースト 3 2 1

F ターム(参考) 4B065 AA90X AB01 AC20 BA02 BA03 CA44

4C084 AA02 AA13 AA19 BA44 CA53 DC01 NA14 ZB09 ZB26 ZB33

ZB35 ZC01 ZC75

4C085 AA03 BB11 EE03

4C087 AA01 AA02 BB43 BB65 CA12 MA02 NA14 ZB09 ZB26 ZB33

ZB35 ZC01 ZC75