

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-508821
(P2025-508821A)

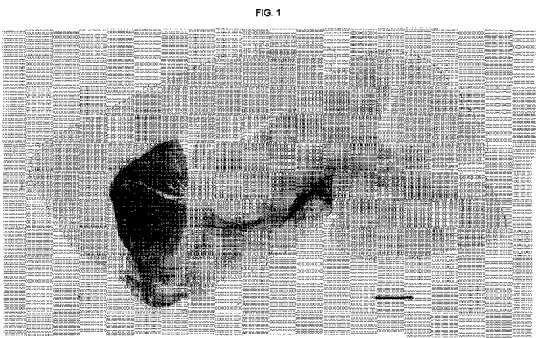
(43)公表日 令和7年4月10日(2025.4.10)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 7
C 1 2 N	5/0793(2010.01)	C 1 2 N	5/0793		
C 1 2 N	15/864(2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全58頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-550135(P2024-550135)		(71)出願人	520046421	
(86)(22)出願日	令和5年2月24日(2023.2.24)			アレク インスティテュート	
(85)翻訳文提出日	令和6年10月22日(2024.10.22)			アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン	
(86)国際出願番号	PCT/US2023/063259			, シアトル, ウエストレイク アヴェニ	
(87)国際公開番号	WO2023/164643			ュー ノース 6 1 5	
(87)国際公開日	令和5年8月31日(2023.8.31)		(74)代理人	100188499	
(31)優先権主張番号	63/313,653			弁理士 勝又 政徳	
(32)優先日	令和4年2月24日(2022.2.24)		(74)代理人	100127568	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			弁理士 酒井 善典	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		(74)代理人	100171402	
	,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),			弁理士 上田 ▲茂▼	
	EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(		(74)代理人	100213779	
	AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,			弁理士 小川 有佳子	
	FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV		(74)代理人	100077012	
	最終頁に続く			弁理士 岩谷 龍	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ドーパミン作動性ニューロンにおいて遺伝子発現を調節するための人工発現コンストラクト

(57)【要約】

標的とする特定の種類の中枢神経系細胞において遺伝子発現を調節するための人工発現コンストラクトについて述べる。本発明の人工発現コンストラクトは、中枢神経系のドーパミン作動性ニューロンにおける合成遺伝子の発現または遺伝子発現の調節に使用することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

人工発現コンストラクトであって、

(i) eHGT_888m、core4_eHGT_888mおよび3Xcore4_eHGT_888mから選択されるエンハンサー；

(ii) プロモーター；ならびに

(iii) 異種コード配列

を含む、人工発現コンストラクト。

【請求項 2】

eHGT_888m、eHGT_606h、eHGT_1039h、hTH、eHGT_888h、MGT_E51またはeHGT_017mのコアを含む人工エンハンサー。

10

【請求項 3】

前記コアが、配列番号83、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号85、配列番号90もしくは配列番号88、または配列番号83、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号85、配列番号90もしくは配列番号88に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、請求項2に記載の人工エンハンサー。

【請求項 4】

eHGT_888m、eHGT_606h、eHGT_1039h、hTH、eHGT_888h、MGT_E51および／またはeHGT_017mを、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、請求項2に記載の人工エンハンサー。

20

【請求項 5】

配列番号83、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号85、配列番号90および／もしくは配列番号88に示される配列、または配列番号83、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号85、配列番号90および／もしくは配列番号88に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、請求項2に記載の人工エンハンサー。

【請求項 6】

配列番号83を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、請求項4に記載の人工エンハンサー。

30

【請求項 7】

配列番号2を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、請求項4に記載の人工エンハンサー。

【請求項 8】

配列番号4を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、請求項4に記載の人工エンハンサー。

【請求項 9】

配列番号6を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、請求項4に記載の人工エンハンサー。

40

【請求項 10】

配列番号8を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、請求項4に記載の人工エンハンサー。

【請求項 11】

配列番号85を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、請求項4に記載の人工エンハンサー。

【請求項 12】

配列番号90を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、請求項4に記載の人工エンハンサー。

50

【請求項 1 3】

配列番号 88 を、1 コピー、2 コピー、3 コピー、4 コピー、5 コピー、6 コピー、7 コピー、8 コピー、9 コピーまたは 10 コピー含む、請求項 4 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 1 4】

配列番号 83 を 1 コピー含む、請求項 4 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 1 5】

配列番号 83 を 3 コピー含む、請求項 4 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 1 6】

配列番号 2 を 3 コピー含む、請求項 4 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 1 7】

配列番号 4 を 3 コピー含む、請求項 4 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 1 8】

配列番号 6 を 3 コピー含む、請求項 4 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 1 9】

配列番号 8 を 3 コピー含む、請求項 4 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 2 0】

配列番号 85 を 3 コピー含む、請求項 4 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 2 1】

配列番号 90 を 3 コピー含む、請求項 4 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 2 2】

配列番号 88 を 3 コピー含む、請求項 4 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 2 3】

配列番号 84 に示される配列を含む、請求項 1 5 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 2 4】

配列番号 3 に示される配列を含む、請求項 1 6 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 2 5】

配列番号 5 に示される配列を含む、請求項 1 7 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 2 6】

配列番号 7 に示される配列を含む、請求項 1 8 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 2 7】

配列番号 9 に示される配列を含む、請求項 1 9 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 2 8】

配列番号 86 に示される配列を含む、請求項 2 0 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 2 9】

配列番号 91 に示される配列を含む、請求項 2 1 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 3 0】

配列番号 89 に示される配列を含む、請求項 2 2 に記載の人工エンハンサー。

【請求項 3 1】

人工発現コンストラクトであって、

(i) eHGT_888m、core4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888m、eHGT_897m、MGT_E68、eHGT_889h、eHGT_1038m、3xcore4_eHGT_606h、3xcore5_eHGT_606h、3xcore_eHGT_1039h、3xCore_hTH、3Xcore4_eHGT_888h、3xCore2-MGT_E51 および 3xcore1_eHGT_017m から選択されるエンハンサー；

(ii) プロモーター；ならびに

(iii) 異種コード配列

を含む、人工発現コンストラクト。

【請求項 3 2】

前記異種コード配列が、エフェクターエレメントまたは発現可能なエレメントをコードする、請求項 3 1 に記載の人工発現コンストラクト。

【請求項 3 3】

10

20

30

40

50

前記エフェクターエレメントが、レポータータンパク質または機能性分子を含む、請求項 3 2 に記載の人工発現コンストラクト。

【請求項 3 4】

前記レポータータンパク質が、蛍光タンパク質である、請求項 3 3 に記載の人工発現コンストラクト。

【請求項 3 5】

前記機能性分子が、機能性イオントランスポーター、機能性酵素、機能性転写因子、機能性受容体、機能性膜タンパク質、機能性細胞輸送タンパク質、機能性シグナル伝達分子、機能性神経伝達物質、機能性カルシウムレポーター、機能性チャンネルロドプシン、機能性 CRISPR/Cas 分子、機能性 editase、機能性ガイド RNA 分子、機能性マイクロ RNA、機能性相同組換えドナーカセット、またはデザイナー薬剤のみで活性化される機能性デザイナー受容体 (DREADD) である、請求項 3 3 に記載の人工発現コンストラクト。

【請求項 3 6】

前記発現可能なエレメントが、非機能性分子を含む、請求項 3 2 に記載の人工発現コンストラクト。

【請求項 3 7】

前記非機能性分子が、非機能性イオントランスポーター、非機能性酵素、非機能性転写因子、非機能性受容体、非機能性膜タンパク質、非機能性細胞輸送タンパク質、非機能性シグナル伝達分子、非機能性神経伝達物質、非機能性カルシウムレポーター、非機能性チャンネルロドプシン、非機能性 CRISPR/Cas 分子、非機能性 editase、非機能性ガイド RNA 分子、非機能性マイクロ RNA、非機能性相同組換えドナーカセット、またはデザイナー薬剤のみで活性化される非機能性デザイナー受容体 (DREADD) である、請求項 3 6 に記載の人工発現コンストラクト。

【請求項 3 8】

血液脳関門を通過するカプシドに関連している、請求項 3 1 に記載の人工発現コンストラクト。

【請求項 3 9】

前記カプシドが、PHP.eB、AAV-BR1、AAV-PHP.S、AAV-PHP.B または AAV-PPS である、請求項 3 8 に記載の人工発現コンストラクト。

【請求項 4 0】

スキッピングエレメントを含むか、またはスキッピングエレメントをコードする、請求項 3 1 に記載の人工発現コンストラクト。

【請求項 4 1】

前記スキッピングエレメントが、2A ペプチドまたは内部リボソーム導入部位 (IRES) である、請求項 4 0 に記載の人工発現コンストラクト。

【請求項 4 2】

前記 2A ペプチドが、T2A、P2A、E2A または F2A である、請求項 4 1 に記載の人工発現コンストラクト。

【請求項 4 3】

eHGT_888m、core4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888m、eHGT_897m、MGT_E68、eHGT_889h、eHGT_1038m、3xcore4_eHGT_606h、3xcore5_eHGT_606h、3xcore_eHGT_1039h、3xCore_hTH、3Xcore4_eHGT_888H、3xCore2-MGT_E51、3xcore1_eHGT_017m、AAV、scAAV、rAAV、pAAV、minBglobin、CMV、minCMV、minRho、minRho*、蛍光タンパク質、Cre、iCre、dgCre、FlpO、tTA2、SP10、タグカセット、10aa、核移行タンパク質、WPRE、hGHpA および／または BGHpA から選択される一連の特徴を含むか、またはこれらから選択される一連の特徴をコードする、請求項 3 1 に記載の人工発現コンストラクト。

【請求項 4 4】

eHGT_888m-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント]；
core4_eHGT_888m-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント]；

10

20

30

40

50

3Xcore4_eHGT_888m-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
eHGT_897m-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
MGT_E68-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
eHGT_889h-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
eHGT_1038m-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
3xcore4_eHGT_606h-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
3xcore5_eHGT_606h-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
3xcore_eHGT_1039h-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
3xCore_hTH-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
3Xcore4_eHGT_888h-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
3xCore2-MGT_E51-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
3xcore1_eHGT_017m-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
eHGT_888m-minBglobin-[異種コード配列]-WPRE3-BGHPA;
core4_eHGT_888m-minBglobin-[異種コード配列]-WPRE3-BGHPA;
3Xcore4_eHGT_888m-minBglobin-[異種コード配列]-WPRE3-BGHPA;
eHGT_897m-minBglobin-[異種コード配列]-WPRE3-BGHPA;
MGT_E68-minBglobin-[異種コード配列]-WPRE-hGHPA;
eHGT_889h-minBglobin-[異種コード配列]-WPRE3-BGHPA;
eHGT_1038m-minBglobin-[異種コード配列]-WPRE3-BGHPA;
3xcore4_eHGT_606h-minBglobin-[異種コード配列]-WPRE3-BGHPA;
3xcore5_eHGT_606h-minBglobin-[異種コード配列]-WPRE3-BGHPA;
3xcore_eHGT_1039h-minBglobin-[異種コード配列]-WPRE3-BGHPA;
3xCore_hTH-minBglobin-[異種コード配列]-WPRE3-BGHPA;
3Xcore4_eHGT_888h-minBglobin-[異種コード配列]-WPRE3-BGHPA;
3xCore2-MGT_E51-minBglobin-[異種コード配列]-WPRE3-BGHPA; および
3xcore1_eHGT_017m-minBglobin-[異種コード配列]-WPRE3-BGHPA
から選択される一連の特徴を含むか、またはこれらから選択される一連の特徴をコードする、請求項 3 1 に記載の人工発現コンストラクト。

10

20

30

40

50

【請求項 4 5】

請求項 3 1 に記載の人工発現コンストラクトを含むベクター。

【請求項 4 6】

ウイルスベクターである、請求項 4 5 に記載のベクター。

【請求項 4 7】

前記ウイルスベクターが、組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、請求項 4 6 に記載のベクター。

【請求項 4 8】

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターであって、

少なくとも 1 つの異種コード配列を含み、該異種コード配列が、eHGT_888m、core4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888m、eHGT_897m、MGT_E68、eHGT_889h、eHGT_1038m、3xcore4_eHGT_606h、3xcore5_eHGT_606h、3xcore_eHGT_1039h、3xCore_hTH、3Xcore4_eHGT_888h、3xCore2-MGT_E51 および 3xcore1_eHGT_017m から選択されるエンハンサーおよびプロモーターの転写制御下にある、AAV ベクター。

【請求項 4 9】

前記異種コード配列が、エフェクターエレメントまたは発現可能なエレメントをコードする、請求項 4 8 に記載の AAV ベクター。

【請求項 5 0】

前記エフェクターエレメントが、レポータータンパク質または機能性分子を含む、請求項 4 9 に記載の AAV ベクター。

【請求項 5 1】

前記レポータータンパク質が、蛍光タンパク質である、請求項 50 に記載の AAV ベクター。

【請求項 52】

前記機能性分子が、機能性イオントランスポーター、機能性酵素、機能性転写因子、機能性受容体、機能性膜タンパク質、機能性細胞輸送タンパク質、機能性シグナル伝達分子、機能性神経伝達物質、機能性カルシウムレポーター、機能性チャンネルロドプシン、機能性 CRISPR/Cas 分子、機能性 editase、機能性ガイド RNA 分子、機能性マイクロ RNA、機能性相同組換えドナーカセット、またはデザイナー薬剤のみで活性化される機能性デザイナー受容体 (DREADD) である、請求項 50 に記載の AAV ベクター。

【請求項 53】

前記発現可能なエレメントが、非機能性分子を含む、請求項 49 に記載の AAV ベクター。

【請求項 54】

前記非機能性分子が、非機能性イオントランスポーター、非機能性酵素、非機能性転写因子、非機能性受容体、非機能性膜タンパク質、非機能性細胞輸送タンパク質、非機能性シグナル伝達分子、非機能性神経伝達物質、非機能性カルシウムレポーター、非機能性チャンネルロドプシン、非機能性 CRISPR/Cas 分子、非機能性 editase、非機能性ガイド RNA 分子、非機能性マイクロ RNA、非機能性相同組換えドナーカセット、またはデザイナー薬剤のみで活性化される非機能性デザイナー受容体 (DREADD) である、請求項 53 に記載の AAV ベクター。

【請求項 55】

請求項 31 に記載の人工発現コンストラクトおよび／または請求項 48 に記載のベクターを含むトランスジェニック細胞。

【請求項 56】

ドーパミン作動性ニューロンである、請求項 55 に記載のトランスジェニック細胞。

【請求項 57】

マウス細胞、ヒト細胞または非ヒト霊長類細胞である、請求項 55 に記載のトランスジェニック細胞。

【請求項 58】

請求項 31 に記載の人工発現コンストラクト、請求項 48 に記載のベクターおよび／または請求項 55 に記載のトランスジェニック細胞を含む非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 59】

マウスまたは非ヒト霊長類である、請求項 58 に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 60】

請求項 31 に記載の人工発現コンストラクト、請求項 48 に記載のベクターおよび／または請求項 55 に記載のトランスジェニック細胞を含む投与可能な組成物。

【請求項 61】

請求項 31 に記載の人工発現コンストラクト、請求項 48 に記載のベクター、請求項 55 に記載のトランスジェニック細胞および／または請求項 58 に記載の非ヒトトランスジェニック動物を含むキット。

【請求項 62】

インビボまたはインビトロにおいて、標的細胞集団内で遺伝子を発現させる方法であって、

標的細胞集団を含む試料または対象に、請求項 60 に記載の投与可能な組成物を十分な用量と十分な期間で提供することによって、前記標的細胞集団内で遺伝子を発現させる工程を含み、

前記投与可能な組成物が、eHGT_888m、core4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888m、eHGT_897m、eHGT_606h、MGT_E68、eHGT_889h、eHGT_1038m、eHGT_589m、eHGT_647m、eHGT_483m、3xcore4_eHGT_606h、3xcore5_e

10

20

30

40

50

HGT_606h、3xcore_eHGT_1039h、3xCore_hTH、3Xcore4_eHGT_888h、3xCore2-MGT_E51および3xcore1_eHGT_017mから選択されるエンハンサーを含む、方法。

【請求項 6 3】

前記遺伝子が、エフェクターエレメントまたは発現可能なエレメントをコードする、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記エフェクターエレメントが、レポータータンパク質または機能性分子を含む、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記レポータータンパク質が、蛍光タンパク質である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記機能性分子が、機能性イオントランスポーター、機能性酵素、機能性転写因子、機能性受容体、機能性膜タンパク質、機能性細胞輸送タンパク質、機能性シグナル伝達分子、機能性神経伝達物質、機能性カルシウムレポーター、機能性チャンネルロドプシン、機能性CRISPR/Cas分子、機能性editase、機能性ガイドRNA分子、機能性マイクロRNA、機能性相同組換えドナーカセット、またはデザイナー薬剤のみで活性化される機能性デザイナー受容体（DREADD）である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記発現可能なエレメントが、非機能性分子を含む、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記非機能性分子が、非機能性イオントランスポーター、非機能性酵素、非機能性転写因子、非機能性受容体、非機能性膜タンパク質、非機能性細胞輸送タンパク質、非機能性シグナル伝達分子、非機能性神経伝達物質、非機能性カルシウムレポーター、非機能性チャンネルロドプシン、非機能性CRISPR/Cas分子、非機能性editase、非機能性ガイドRNA分子、非機能性マイクロRNA、非機能性相同組換えドナーカセット、またはデザイナー薬剤のみで活性化される非機能性デザイナー受容体（DREADD）である、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記提供工程が、ピペッティングを含む、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記ピペッティングが脳切片に対して行われる、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記脳切片が、中脳であるか、または中脳に由来するものである、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記脳切片が、ドーパミン作動性ニューロンを含む、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記脳切片が、マウス、ヒトまたは非ヒト霊長類の脳切片である、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記提供工程が、生体対象への投与を含む、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記生体対象が、ヒト、非ヒト霊長類またはマウスである、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記生体対象への投与が、注射により行われる、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記注射が、静脈内注射、脳組織への脳実質内注射、脳室内（ICV）注射、大槽内（ICM）注射または髄腔内注射である、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

10

20

30

40

50

ドーパミン作動性ニューロン関連疾患の治療の開発に使用される、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記ドーパミン作動性ニューロン関連疾患が、パーキンソン病、パーキンソニズム型多系統萎縮症（MSA-P）、芳香族 L - アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）欠損症、逆耐性統合失調症、レッシューナイハン症候群（LNS）、および注意欠陥多動性障害（ADHD）を含む、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記遺伝子が、芳香族 L - アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）をコードする、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記ドーパミン作動性ニューロン関連疾患が、パーキンソン病、パーキンソニズム型多系統萎縮症（MSA-P）、または芳香族 L - アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）欠損症を含む、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記遺伝子が、芳香族 L - アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）をコードし、前記ドーパミン作動性ニューロン関連疾患が、パーキンソン病、パーキンソニズム型多系統萎縮症（MSA-P）、または芳香族 L - アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）欠損症を含む、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記ドーパミン作動性ニューロン関連疾患が、パーキンソン病を含み、前記治療によって、パーキンソン病の症状が緩和または排除される、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記パーキンソン病の症状の緩和または排除が、統一パーキンソン病評価尺度（UPDRS）、ホーン・ヤールの重症度分類、またはシュワブ・イングランド日常生活活動スケールによって測定される、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

CN4365、CN3406、CN3509、AiP1240、CN3739、CN3889、CN3058、CN3059、CN3829、CN3283、CN3863、CN4830、AiP1417またはCN3551からなるか、実質的にこれらからなる、人工発現コンストラクト。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022年2月24日に出願された米国仮特許出願第63/313,653号の優先権を主張するものであり、この出願の内容は、本明細書に記載されているかのように、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

本開示は、標的とする種類の中枢神経系細胞において遺伝子発現を調節するための人工発現コンストラクトを提供する。本発明の人工発現コンストラクトは、中枢神経系のドーパミン作動性ニューロンにおける合成遺伝子の発現または遺伝子発現の調節に使用することができる。

【0003】

配列表の参照

本願に付随する配列表は、ハードコピーではなくXMLフォーマットで提供され、この配列表は参照により本明細書に援用される。この配列表を含むXMLファイルの名称は、A166-0035PCT.xmlである。このファイルのサイズは152KBであり、2023年2月23日に作成されたものであり、Patent Centerを経由して電子的に提出されたものである。

【背景技術】

【0004】

10

20

30

40

50

脳の生物学を完全に理解するには、様々な種類の細胞を区別してそれらを定義し、詳しく調査する必要があるとともに、それらの細胞を標識して摂動させることができる人工発現コンストラクトを同定する必要がある。マウスでは、リコンビナーゼを発現するドライバー株を用いて、マーカー遺伝子発現を共有する細胞集団の標識に成功を収めている。しかし、特定の種類の細胞を高い特異性で標識することが可能なそのような株の作製、維持および使用には、コストがかかり、3種間でのトランスジェニック動物の交配が必要とされることが多く、所望の実験動物を低頻度でしか得ることができない。さらに、これらのツールは生殖細胞系トランスジェニック動物が必要とされることから、ヒトに応用することはできない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示は、ドーパミン作動性ニューロンにおいて遺伝子発現を誘導する人工発現コンストラクトを提供する。

【0006】

本開示の人工発現コンストラクトの特定の実施形態では、eHGT_888m、eHGT_897m、eHGT_606h、MGT_E68、eHGT_889h、eHGT_1038m、eHGT_589m、eHGT_647mおよびeHGT_483mから選択されるエンハンサーを利用して、ドーパミン作動性ニューロン内で遺伝子発現を誘導する。

【0007】

特定の実施形態では、これらの人工エンハンサーエレメントは、コンカテマー化されたエンハンサーコアである。このようなエンハンサーコアの例として、eHGT_606h、eHGT_1039h、hTH、eHGT_888m、eHGT_888h、eHGT_017mおよび／もしくはMGT_E51のコア、またはコンカテマー化されたこれらのコアが挙げられる。このような人工エンハンサーエレメントを用いることによって、元の（天然の）エンハンサーの全長を単独で使用する場合よりも、導入遺伝子を急速に発現させて高発現を得ることができる。

【0008】

特定の実施形態において、エンハンサーコアとして、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号83、配列番号85、配列番号90または配列番号88に示される配列が挙げられる。特定の実施形態において、これらのエンハンサーコアはコンカテマー化されており、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピーのコア配列を有している。特定の実施形態において、選択されたエンハンサーコアを3コピー含むコンカテマーとして、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号84、配列番号86、配列番号91および配列番号89のいずれかに示される配列が挙げられる。

【0009】

本開示の人工発現コンストラクトの特定の実施形態では、3xCore2-MGT_E51、3xcore4_eHGT_606h、3xcore5_eHGT_606h、3xcore_eHGT_1039h、3xCore_hTH、core4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888hおよび／または3xcore1_eHGT_017mを利用することによって、ドーパミン作動性ニューロン内で遺伝子発現を選択的に誘導する。

【0010】

特定の実施形態では、CN3406、CN3509、AiP1417、CN2436、AiP1240、CN3739、CN3889、CN2839、CN2847、CN2431、CN3058、CN3059、CN3829、CN3283、CN3863、CN4365、CN4830およびCN3551から選択されるベクターなどの本明細書に記載のベクターの特徴を含む人工発現コンストラクトを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

本願で提出された図面の一部は、カラーの方が理解しやすいと考えられる。本出願人ら

10

20

30

40

50

は、これらの図面のカラー版も原出願の一部と見なしており、後の手続きにおいて、図面のカラー画像を提出できる権利を保有している。

【0012】

【図1】 6.0×10^{11} ウイルスゲノムコピーのAAVベクター#CN3406 (eHGT_888m) を後眼窩送達した28日後のマウス脳の矢状面における天然SYFP2の発現を示した落射蛍光顕微鏡（倒立型）画像を示す。スケールバー：1mm。

【0013】

【図2A-2B】（図2A） 6.0×10^{11} ウイルスゲノムコピーのAAVベクター#CN3406 (eHGT_888m) を後眼窩送達した28日後のマウス脳の矢状面において、（ウイルスからのSYFP2の発現の検出用の）抗緑色蛍光タンパク質（GFP）と（ドーパミン作動性ニューロンのマーカーとしての）抗チロシンヒドロキシラーゼ（TH）の共染色を示した落射蛍光顕微鏡画像を示す。スケールバー：1mm。（図2B）図2Aに示した枠で囲んだ領域の拡大画像であり、中脳ドーパミンニューロンにGFPシグナルとTHシグナルが共局在していることが示されている。スケールバー：200ミクロン。

10

【0014】

【図3A-3E】 5×10^{11} ウイルスゲノムコピーの用量で血清型PHP.eBのCN3863をインビボで後眼窩注射した後の成体マウスの中脳ドーパミンニューロンにおける保存されたエンハンサー活性を示す。（図3A）黒質緻密部（SNc）において天然SYFP2の発現が濃縮していることを示すマウスの正中矢状面の脳切片である。（図3B）1,293bpのeHGT_888m全長ゲノム断片（CN3406）と、これよりも小型の287bpのcore4-eHGT_888m断片（CN3863）を比較したダイアグラムであり、いずれの断片も、中脳ドーパミンニューロンにおいて強力な蛍光レポーターの発現を付与する。部分的にオーバーラップしたその他の断片であるcore1、core2およびcore3は、インビボで試験した際に、ドーパミンニューロン活性を示さなかった。（図3C）中脳のドーパミン作動性ニューロンが示された冠状面脳切片の抗チロシンヒドロキシラーゼ（抗TH）免疫染色である。（図3D）エンハンサーウイルスで標識したニューロンの抗GFP免疫染色を示す同じ視野の画像である。（図3E）SNc領域の強力な同時標識を示すオーバーレイ画像であり、ウイルスで標識されたニューロンがドーパミン作動性ニューロンであることが強く示唆されている。略語：VTA：腹側被蓋野；SNr：黒質網様部；SNc：黒質緻密部。スケールバー：（図3A）1mm、（図3C-3E）300ミクロン。

20

30

【0015】

【図4A-4C】黒質緻密部（SNc）領域を標的とした血清型PHP.eBのCN3863をインビボで注射した後の成体アカゲザルの中脳ドーパミンニューロンにおける保存されたエンハンサー活性を示す。（図4A）中脳のドーパミン作動性ニューロンが示された冠状面脳切片の抗チロシンヒドロキシラーゼ（抗TH）免疫染色である。（図4B）エンハンサーウイルスで標識したニューロンの抗GFP免疫染色を示す同じ視野の画像である。（図4C）SNc領域の強力な同時標識を示すオーバーレイ画像であり、ウイルスで標識されたニューロンがドーパミン作動性ニューロンであることが強く示唆されている。アスタリスクは、THが陰性であったまれなウイルス標識ニューロンを示す。点線は、SNc領域の境界を示す。略語：VTA：腹側被蓋野；SNr：黒質網様部；SNc：黒質緻密部。スケールバー：500ミクロン。

40

【0016】

【図5】中脳構造（SNc：黒質緻密部；VTA：腹側被蓋野）におけるウイルスを介した天然SYFP2シグナルの検出の分析に基づくドーパミン作動性エンハンサーのスクリーニング結果と、抗TH抗体と抗GFP抗体で同時標識した免疫組織化学分析の結果のまとめを示す。発現強度は、レポーター導入遺伝子のシグナル強度に基づいて「強」または「弱」で示している。ND：測定されず。

【0017】

【図6】本開示を支持する配列を示す。これらの配列には、eHGT_606h（配列番号1）、core4_eHGT_606h（配列番号2）、3xcore4_eHGT_606h（配列番号3）、core

50

5_eHGT_606h (配列番号4)、3xcore5_eHGT_606h (配列番号5)、Core_hTH (配列番号6)、3xCore_hTH (配列番号7)、Core_eHGT_1039h (配列番号8)、3xCore_eHGT_1039h (配列番号9)、eHGT_888m (配列番号10)、Core4_eHGT_888m (配列番号83)、3Xcore4_eHGT_888m (配列番号84)、Core4_eHGT_888h (配列番号85)、3Xcore4_eHGT_888h (840bp) (配列番号86)、eHGT_017m (配列番号87)、core1_eHGT_017m (配列番号88)、3Xcore1_eHGT_017m (配列番号89)、MGT_E51 (配列番号13)、Core2-MGT_E51 (配列番号90)、3xCore2-MGT_E51 (配列番号91)、eHGT_897m (配列番号11)、MGT_E68 (配列番号12)、eHGT_889h (配列番号15)、eHGT_1038m (配列番号16)、eHGT_589m (配列番号92)、eHGT_647m (配列番号93)、eHGT_483m (配列番号94)、 β -グロビン最小プロモーター (pBGmin/minBGlobin/minBGprom) (配列番号17)、minCMVプロモーター (配列番号18)、変異minCMVプロモーター (SacI制限酵素部位の除去) (配列番号19)、minRhoプロモーター (配列番号20)、minRho*プロモーター (配列番号21)、Hsp68最小プロモーター (proHsp68) (配列番号22)、SYFP2 (配列番号23)、EGFP (配列番号24)、最適化されたFlpリコンビナーゼ (FlpO) (配列番号25)、改良されたCreリコンビナーゼ (iCre) (配列番号26)、SP10インスレーター (SP10ins) (配列番号27)、3xSP10ins (配列番号28)、3XFLAG (配列番号29)、10aa (配列番号30)、H2B (配列番号31)、H2B* (配列番号95)、WPRE3 (配列番号32)、WPRE (配列番号33)、BGHpA (配列番号34)、hGHPA (配列番号35)、P2A (配列番号36)、T2A (配列番号37)、E2A (配列番号38)、F2A (配列番号39)、例示的なプラスミド骨格1-左側のITR (配列番号40)、例示的なプラスミド骨格1-右側のITR (配列番号41)、例示的なプラスミド骨格2-左側のITR (配列番号42)、例示的なプラスミド骨格2-右側のITR (配列番号43)、PHP.eBカプシド (配列番号44)、AAV9 VP1カプシドタンパク質 (配列番号45)、tet-トランス活性化因子バージョン2 (tTA2) (配列番号46)、GTPアーゼHRas [ホモ・サピエンス] (配列番号47)、Protachykinin-1の58~68番目であるサブスタンスP [ホモ・サピエンス] (配列番号48)、オキシトシン-ニューロフィジン1の20~28番目であるオキシトシン [ホモ・サピエンス] (配列番号49)、GCaMP6m (配列番号50)、GCaMP6s (配列番号51)、GCaMP6f (配列番号52)、CN3406 (配列番号53)、CN3509 (配列番号54)、CN3058 (配列番号55)、CN3059 (配列番号56)、CN3829 (配列番号57)、CN2436 (配列番号58)、CN3283 (配列番号59)、AiP1240 (配列番号60)、CN3739 (配列番号63)、CN3889 (配列番号64)、CN2839 (配列番号96)、CN2847 (配列番号97)、CN2431 (配列番号98)、CN3863 (配列番号99)、CN4365 (配列番号100)、CN4830 (配列番号101)、CN3551 (配列番号102)、およびAiP1417 (配列番号103) が含まれる。

【発明を実施するための形態】

【0018】

脳の生物学を完全に理解するには、様々な種類の細胞を区別してそれらを定義し、詳しく調査する必要があるとともに、それらの細胞を標識して摂動させることができる人工発現コンストラクトを同定する必要がある (Tasic, Curr. Opin. Neurobiol. 50, 242-249 (2018); Zeng & Sanes, Nat. Rev. Neurosci. 18, 530-546 (2017))。マウスでは、リコンビナーゼを発現するドライバー株を用いて、マーカー遺伝子発現を共有する細胞集団の標識に成功を収めている (Daigle et al., Cell 174, 465-480.e22 (2018); Taniguchi, et al., Neuron 71, 995-1013 (2011); Gong et al., J. Neurosci. 27, 9817-9823 (2007))。しかし、特定の種類の細胞を高い特異性で標識することが可能なそのような株の作製、維持および使用には、コストがかかり、3種間でのトランスジェニック動物の交配が必要とされることが多く、所望の実験動物を低頻度でしか得ることができない。さらに、これらのツールは生殖細胞系トランスジェニック動物が必要とされることから、ヒトに応用することはできない。

【0019】

本開示は、中枢神経系のドーパミン作動性ニューロンにおいて遺伝子発現を誘導する人工発現コンストラクトを提供する。

【0020】

本開示の人工発現コンストラクトの特定の実施形態では、eHGT_888m、eHGT_897m、eHGT_606h、MGT_E68、eHGT_889h、eHGT_1038m、eHGT_589m、eHGT_647mおよびeHGT_483mから選択されるエンハンサーを利用して、ドーパミン作動性ニューロン内で遺伝子発現を誘導する。

【0021】

特定の実施形態では、これらの人工エンハンサーエレメントは、コンカテマー化されたエンハンサーコアである。このようなエンハンサーコアの例として、MGT_E51、eHGT_606h、eHGT_1039h、hTH、eHGT_888m、eHGT_888hおよび／もしくはeHGT_017mのコア、またはコンカテマー化されたこれらのコアが挙げられる。このような人工エンハンサーエレメントを用いることによって、元の（天然の）エンハンサーの全長を単独で使用する場合よりも、導入遺伝子を急速に発現させて高発現を得ることができる。

【0022】

特定の実施形態において、エンハンサーコアとして、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号83、配列番号85、配列番号90または配列番号88に示される配列が挙げられる。特定の実施形態において、これらのエンハンサーコアはコンカテマー化されており、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピーのコア配列を有している。特定の実施形態において、選択されたエンハンサーコアを3コピー含むコンカテマーとして、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号84、配列番号86、配列番号91および配列番号89のいずれかに示される配列が挙げられる。

【0023】

本開示の人工発現コンストラクトの特定の実施形態では、3xCore-MGT_E51、3xcore4_eHGT_606h、3xcore5_eHGT_606h、3xcore_eHGT_1039h、3xCore_hTH、core4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888hおよび／または3xcore1_eHGT_017mを利用することによって、ドーパミン作動性ニューロン内で遺伝子発現を選択的に誘導する。通常、コアはエンハンサーに由来するものであるが、この特性はすべての実施形態に必要とされるわけではない。

【0024】

特定の実施形態では、CN3406、CN3509、AiP1417、CN2436、AiP1240、CN3739、CN3889、CN2839、CN2847、CN2431、CN3058、CN3059、CN3829、CN3283、CN3863、CN4365、CN4830およびCN3551から選択されるベクターなどの本明細書に記載のベクターの特徴を含む人工発現コンストラクトを提供する。

【0025】

本開示の様々な態様について、さらなる選択肢とともにさらに詳しく以下で説明する。本開示の様々な態様は、以下の項目、すなわち、(i) 標的とする種類の細胞における遺伝子の標的発現のための人工発現コンストラクトおよびベクター；(ii) 投与用組成物；(iii) 人工発現コンストラクトを含む細胞株；(iv) トランスジェニック動物；(v) 使用方法；(vi) キットおよび市販用パッケージ；(vii) 例示的な実施形態；ならびに(viii) 結語に沿って説明する。これらの見出しは、系統的に説明する目的のみで示されており、本開示の範囲や解釈を限定するものではない。

【0026】

(i) 標的とする種類の細胞における遺伝子の標的発現のための人工発現コンストラクトおよびベクター

本明細書に開示する人工発現コンストラクトは、(i) 標的とする種類の中枢神経系細胞においてコード配列の標的発現を誘導するエンハンサー配列と、(ii) 発現されるコード配列と、(iii) 最小プロモーターとを含む。本発明の人工発現コンストラクトは、必要に応じて、または有益である場合、その他の調節エレメントをさらに含んでもよい

10

20

30

40

50

。

【0027】

特定の実施形態において、「エンハンサー」または「エンハンサーエレメント」は、シス作用性配列であり、プロモーターに関連する転写量を増加させ、プロモーターおよび転写されるコード配列に対して正方向でも逆方向でも機能することができ、プロモーターまたは転写されるコード配列に対して上流または下流に配置することができる。当技術分野において、エンハンサーエレメント配列の機能を測定する方法または技術として様々なものが知られている。本明細書に開示する人工発現コンストラクトにおいて使用されるエンハンサー配列の具体例として、eHGT_888m、eHGT_897m、eHGT_606h、MGT_E68、eHGT_889h、eHGT_1038m、eHGT_589m、eHGT_647mおよびeHGT_483m；ならびに3xCore2-MGT_E51、3xcore4_eHGT_606h、3xcore5_eHGT_606h、3xcore_eHGT_1039h、3xCore_hTH、core4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888h、3xcore1_eHGT_017mなどのコンカテマー化されたエンハンサーコアが挙げられる。

10

【0028】

特定の実施形態において、標的とする種類の中枢神経系細胞に使用されるエンハンサーは、標的とする種類の中枢神経系細胞のみで利用されているエンハンサーであるか、または標的とする種類の中枢神経系細胞で主に利用されているエンハンサーである。標的とする種類の中枢神経系細胞において使用されるエンハンサーは、標的とする中枢神経系において遺伝子の発現を増強するエンハンサーである。特定の実施形態において、標的とする種類の中枢神経系細胞において使用されるエンハンサーは、標的とする中枢神経系において遺伝子の発現を増強するが、その他の非標的細胞では遺伝子の発現を実質的に誘導せず、したがって、細胞の種類に特異的な転写活性を有する選択的な標的中枢神経系エンハンサーでもある。

20

【0029】

本明細書に開示されたエンハンサーに作動可能に連結された異種コード配列が、標的とする種類の細胞において発現される場合、この投与された異種コード配列は、意図した種類の細胞において発現される。

【0030】

異種コード配列が、選択された細胞において選択的に発現される場合、意図した種類の細胞において投与した異種コード配列が発現されるが、その他の種類の細胞では実質的に発現されない。これについては以下でさらに詳しく説明する。特定の実施形態において、その他の種類の細胞において実質的に発現されないとは、標的とする種類の細胞と比較して参照細胞における発現が50%未満であること；標的とする種類の細胞と比較して参照細胞における発現が40%未満であること；標的とする種類の細胞と比較して参照細胞における発現が30%未満であること；標的とする種類の細胞と比較して参照細胞における発現が20%未満であること；または標的とする種類の細胞と比較して参照細胞における発現が10%未満であることを意味する。特定の実施形態において、「参照細胞」とは、非標的細胞を指す。非標的細胞は、標的細胞と同じ解剖学的構造内に存在するものであってもよく、かつ／または共通の解剖学的領域に投射するものであってもよい。特定の実施形態において、参照細胞は、標的とする種類の細胞が含まれる解剖学的構造に隣接した解剖学的構造内に存在する。特定の実施形態では、参照細胞は、標的細胞とは異なる遺伝子発現プロファイルを有する非標的細胞である。

30

40

【0031】

特定の実施形態において、コード配列の転写産物は、選択されていない種類の細胞において低発現されてもよく、例えば、選択された細胞における転写産物の発現量の1%未満または1%、2%、3%、5%、10%、15%もしくは20%の発現量で発現されてもよい。特定の実施形態では、標的となる種類の中枢神経系細胞は、本明細書に開示したエンハンサーに結合して遺伝子発現を誘導することができる様々な転写因子の正しい組み合わせを発現することができる唯一の種類の細胞である。したがって、特定の実施形態では、発現は

50

、標的となる種類の細胞のみでしか起こらない。

【0032】

特定の実施形態において、標的とする種類の細胞（例えば、ニューロン細胞および／または非ニューロン細胞）は、Tasic et al., Nature 563, 72-78 (2018)およびHodge et al., Nature 573, 61-68 (2019)などに記載の転写プロファイルに基づいて同定することができる。

【0033】

ドーパミン作動性ニューロンはドーパミンを分泌する。中脳のドーパミン作動性ニューロンは、哺乳動物の中樞神経系におけるドーパミンの主な供給源である。ドーパミン作動性ニューロンの喪失は、最もよく知られているヒト神経疾患の1つであるパーキンソン病に関連している。脳におけるドーパミン作動性ニューロンの発生に關与する発生経路に関する研究では、Nurr1、Lmx1b、Pitx3などの数種類の特異的転写因子が同定されており、これらはいずれも中脳のドーパミン作動系の発生において重要であることが示されている。

【0034】

特定の実施形態において、コード配列は、エフェクターエレメントをコードする異種コード配列である。エフェクターエレメントは、意図した効果を得るために発現される配列であり、このエフェクターエレメントによって意図した効果が実際に達成される。エフェクターエレメントの例として、レポーター遺伝子／タンパク質および機能性遺伝子／タンパク質が挙げられる。

【0035】

例示的なレポーター遺伝子／タンパク質として、Addgene社のID No.83894 (pAAV-hDlx-Flex-dTomato-Fishell_7)、ID No.83895 (pAAV-hDlx-Flex-GFP-Fishell_6)、ID No.83896 (pAAV-hDlx-GiDREADD-dTomato-Fishell-5)、ID No.83898 (pAAV-mDlx-ChR2-mCherry-Fishell-3)、ID No.83899 (pAAV-mDlx-GCaMP6f-Fishell-2)、ID No.83900 (pAAV-mDlx-GFP-Fishell-1)、およびID No.89897 (pcDNA3-FLAG-mTET2 (N500))によって発現されるものが挙げられる。例示的なレポーター遺伝子として、特に、発現可能な蛍光タンパク質もしくは発現可能なピオチン；青色蛍光タンパク質（例えば、eBFP、eBFP2、Azurite、mKalamal、GFPuv、Sapphire、T-sapphire）；シアン蛍光タンパク質（例えば、eCFP、Cerulean、CyPet、AmCyan1、Midoriishi-Cyan、mTurquoise）；緑色蛍光タンパク質（例えば、GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、EGFP、Emerald、Azami Green、Monomeric Azami Green (mAzamigreen)、CopGFP、AceGFP、avGFP、ZsGreen1、オレゴングリーンTM（サーモフィッシュサイエンティフィック社））；ルシフェラーゼ；橙色蛍光タンパク質（mOrange、mKO、Kusabira-Orange、Monomeric Kusabira-Orange、mTangerine、tdTomato、dTomato）；赤色蛍光タンパク質（mKate、mKate2、mPlum、DsRed monomer、mCherry、mRuby、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed-Monomer、HcRed-Tandem、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry、mStrawberry、Jred、テキサスレッドTM（サーモフィッシュサイエンティフィック社））；遠赤外蛍光タンパク質（例えば、mPlumおよびmNeptune）；黄色蛍光タンパク質（例えば、YFP、eYFP、Citrine、SYFP2、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow1）；またはタンデムに連結された複合体をコードするレポーター遺伝子が挙げられる。

【0036】

GFPは、238個のアミノ酸（26.9kDa）から構成されており、青色光に暴露すると緑色の蛍光を発するAequorea victoria/Aequorea aequorea/Aequorea forskaleaという学名のクラゲから初めて単離された。A. victoriaから単離されたGFPは、395nmの波長に主要な励起ピークを有し、475nmに小さな励起ピークを有する。その発光ピークは509nmにあり、可視スペクトルの緑色光の低波長域にある。ウミシイタケ（Renilla reniformis）から得られるGFPは、498nmに主要な励起ピークを1つ有する。

広範な用途に使用することができ、研究者からさらなる改良が求められていることから、様々なGFP変異体が作製された。最初の主な改良は、1995年にRoger TsienによりNatureで報告された単一の点変異（S65T）であった。この変異によって、GFPのスペクトル特性が劇的に改善し、蛍光と光安定性が増加し、発光ピークを509nmに維持したまま、主要な励起ピークを488nmにシフトさせることができた。37℃での折り畳み効率を改善する点変異（F64L）をGFPに付加することによって、増強されたGFP（EGFP）が得られた。EGFPは、55,000L/mol・cmの吸光係数（ ϵ で示す）を有し、これは、分子1個あたり $9.13 \times 10^{-21} \text{m}^2$ の光学断面積としても知られている。また、折り畳みが不十分なペプチドに融合した場合でも、急速に折り畳まれて成熟することが可能な一連のGFP変異体として、Superfolder GFPが2006年に報告されている。

10

【0037】

「黄色蛍光タンパク質」（YFP）は、Aequorea victoriaに由来する緑色蛍光タンパク質の遺伝的変異体である。その励起ピークは514nmにあり、発光ピークは527nmにある。

【0038】

例示的な機能性分子として、それぞれ機能性を持つ、イオントランスポーター、細胞輸送タンパク質、酵素、転写因子、神経伝達物質、カルシウムレポーター、チャネルロドプシン、ガイドRNA、ヌクレアーゼ、マイクロRNA、またはデザイナードラッグのみで活性化されるデザイナー受容体（DREADD）が挙げられる。

【0039】

イオントランスポーターは、細胞膜を横切ってイオンの輸送を担う膜貫通タンパク質である。イオントランスポーターは、大半の種類の細胞に見られ、細胞の興奮性と恒常性の調節に重要である。イオントランスポーターは、活動電位、シナプス伝達、ホルモン分泌、筋収縮などの多数の細胞プロセスに関与している。生きた細胞に重要な多数の生物学的プロセスには、イオンチャネルを介したカルシウムイオン（ Ca^{2+} ）、カリウムイオン（ K^+ ）、ナトリウムイオン（ Na^+ ）などのカチオンの輸送が関与している。特定の実施形態において、イオントランスポーターとして、電位依存性ナトリウムチャネル（例えばSCN1A）、カリウムチャネル（例えばKCNQ2）、およびカルシウムチャネル（例えばCANAC1C）が挙げられる。

20

【0040】

例示的な酵素、転写因子、受容体、膜タンパク質、細胞輸送タンパク質、シグナル伝達分子および神経伝達物質として、ラクターゼ、リパーゼ、ヘリカーゼ、 α -グルコシダーゼ、アミラーゼ、芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）などの酵素；SP1、AP-1、熱ショック因子タンパク質1、C/EBP（CCAAT/エンハンサー結合タンパク質）、Oct-1などの転写因子；トランスフォーミング増殖因子受容体 β 1、血小板由来成長因子受容体、上皮成長因子受容体、血管内皮増殖因子受容体、インターロイキン8受容体 α などの受容体；クラスリン、ダイナミン、カベオリン、Rab4A、Rab-11Aなどの膜タンパク質および細胞輸送タンパク質；神経成長因子（NGF）、グリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）、血小板由来成長因子（PDGF）、トランスフォーミング増殖因子 β （TGF β ）、上皮成長因子（EGF）、GTPアーゼ、HRasなどのシグナル伝達分子；ならびにコカイン・アンフェタミン調節転写産物、サブスタンスP、オキシトシン、ソマトスタチンなどの神経伝達物質が挙げられる。

30

【0041】

特定の実施形態において、機能性分子として、細胞の機能および状態を示すレポーターが挙げられ、例えば、カルシウムレポーターが挙げられる。細胞内カルシウム濃度は、ニューロンの活性化、筋細胞の収縮、セカンドメッセンジャーによるシグナル伝達などの多数の細胞活動の重要な予測因子である。細胞内カルシウム濃度をモニターするための高感度で簡便な技術として、遺伝子にコードされたカルシウム指示薬（GECI）を用いる方法がある。GECIの中でも、GCaMPという名称の、緑色蛍光タンパク質（GFP）を用いたカルシウムセンサーは効率が高く、広く利用されている。GCaMPは、循環置換型GFPの

40

50

N末端およびC末端にM13とカルモジュリンタンパク質を融合させることによって形成される。いくつかの種類のGCaMPは、特徴的な蛍光発光スペクトルを示す(Zhao et al., Science, 2011, 333(6051): 1888-1891)。緑色蛍光を示す例示的なGECIとして、GCaMP3、GCaMP5G、GCaMP6s、GCaMP6m、GCaMP6f、jGCaMP7s、jGCaMP7c、jGCaMP7b、jGCaMP7f、jGCaMP8s、jGCaMP8mおよびjGCaMP8fが挙げられる。さらに、赤色蛍光を示すGECIとして、jRGECO1aおよびjRGECO1bが挙げられる。GECIを含むAAV製品は市販されている。例えば、Vigene Biosciences社から、AAV8-CAG-GCaMP3(カタログNo.BS4-CX3AAV8)、AAV8-Syn-FLEX-GCaMP6s-WPRE(カタログNo.BS1-NXSAAV8)、AAV8-Syn-FLEX-GCaMP6s-WPRE(カタログNo.BS1-NXSAAV8)、AAV9-CAG-FLEX-GCaMP6m-WPRE(カタログNo.BS2-CXMAAV9)、AAV9-Syn-FLEX-jGCaMP7s-WPRE(カタログNo.BS12-NXSAAV9)、AAV9-CAG-FLEX-jGCaMP7f-WPRE(カタログNo.BS12-CXFAAV9)、AAV9-Syn-FLEX-jGCaMP7b-WPRE(カタログNo.BS12-NXBAAV9)、AAV9-Syn-FLEX-jGCaMP7c-WPRE(カタログNo.BS12-NXCAAV9)、AAV9-Syn-FLEX-NES-jRGECO1a-WPRE(カタログNo.BS8-NXAAAV9)、AAV8-Syn-FLEX-NES-jRCaMP1b-WPRE(カタログNo.BS7-NXBAAV8)などのAAV製品が提供されている。

10

20

30

40

50

【0042】

特定の実施形態において、カルシウムレポーターとして、遺伝子にコードされたカルシウム指示薬(GECI)であるNTnC;ミオシン軽鎖キナーゼとGFPとカルモジュリンを融合させたキメラ;カルシウム指示薬であるTN-XXL;BRET-based auto-luminescent calcium indicator;および/またはカルシウム指示薬タンパク質であるOeNL(Ca²⁺)-18μが挙げられる。

【0043】

特定の実施形態において、機能性分子として、ニューロン活性様チャンネルロドプシンのモジュレーター(例えば、チャンネルロドプシン1、チャンネルロドプシン2およびこれらのバリエーション)が挙げられる。チャンネルロドプシンは、光によって開くイオンチャンネルとして機能するレチニリデンタンパク質(ロドプシン)のサブファミリーである。チャンネルロドプシン1(ChR1)とチャンネルロドプシン2(ChR2)に加えて、いくつかのチャンネルロドプシンバリエーションが開発されている。例えば、Linら(Biophys J, 2009, 96(5): 1803-14)は、部位特異的変異導入を併用したChR1およびChR2の膜貫通ドメインのキメラの作製について述べている。Zhangら(Nat Neurosci, 2008, 11(6): 631-3)は、赤色光にシフトしたチャンネルロドプシンバリエーションであるVChR1について述べている。VChR1は感光性が低く、膜輸送と発現が低下している。その他の公知のチャンネルロドプシンバリエーションとして、Nagel, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(24): 13940-5に記載のChR2バリエーション、ChR2/H134R(Nagel, G., et al., Curr Biol, 2005, 15(24): 2279-84)およびChD/ChEF/ChIEF(Lin, J. Y., et al., Biophys J, 2009, 96(5): 1803-14)が挙げられ、これらはいずれも青色光(470nm)によって活性化されるが、橙色光/赤色光には感受性を示さない。その他のバリエーションは、Lin, Experimental Physiology, 2010, 96.1: 19-25; Knopfel et al., The Journal of Neuroscience, 2010, 30(45): 14998-15004; および Mardinly et al., Nat Neurosci. 2018, 21(6):881-893に記載されている。

【0044】

特定の実施形態において、機能性分子として、CRISPR/Cas(例えば、ガイドRNAとCas、Cas9、cpf1などのヌクレアーゼ)などの、DNAおよびRNAの編集ツールが挙げられる。さらに、機能性分子として、米国特許公開第2018/0030425号、米国特許公開第2016/0208243号、WO/2017/184768およびZetsche et al. (2015) Cell 163: 759-771に記載の組換えCpf1;単鎖gRNA(例えば、Jinek et al. (2012) Science 337:816-821; Jinek et al. (2013) eLife 2:e00471; Segal (2013) eLife 2:e00563を参照されたい)、editase、ガイドRNA分子、マイクロRNA、または相同組換えドナーカセットが挙げられる。

【0045】

特定の実施形態において、機能性分子として、局在化カセットが挙げられる。特定の実施形態において、局在化カセットは、ニューロンの細胞体、軸索、樹状突起などの細胞単位以下の特定のコンパートメントに、分子（例えば、ベクター、タンパク質、センサー）を局在化するために用いられる。特定の実施形態において、局在化カセットとして、細胞体に局在させるための細胞体タグ（例えば細胞体（EE-RR））；軸索に局在化させるための軸索タグ（例えば、GAP43に由来するもの）またはシナプトフィジン（sy）；細胞膜に局在化させるための疎水性テール；および小胞体に局在化させるための疎水性鎖またはアルキル鎖が挙げられる。特定の実施形態において、局在化カセットは、GECIなどのセンサー分子に融合される。特定の実施形態において、局在化カセットとGECIの融合タンパク質として、細胞体-jGCaMP8s、軸索-jRGECO1a、syGCaMP5G、および細胞体-jGCaMP7sが挙げられる。

10

【0046】

特定の実施形態において、機能性分子としてタグカセットが挙げられる。タグカセットとしては、Hisタグ（HHHHHH；配列番号65）、Flagタグ（DYKDDDDK；配列番号66）、Xpressタグ（DLYDDDDK；配列番号67）、Aviタグ（GLNDIFEAQKIEWHE；配列番号68）、カルモジュリンタグ（KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL；配列番号69）、ポリグルタミン酸タグ、HAタグ（YPYDVPDYA；配列番号70）、Mycタグ（EQKLISEEDL；配列番号71）、Strepタグ（オリジナルのSTREP（登録商標）タグを意味する）（WRHPQFGG；配列番号72）、STREPタグII（WSHPQFEK；配列番号73（Institut fur Bioanalytik（IBA）社、ドイツ）；例えば、米国特許公開第7,981,632号を参照されたい）、Softag 1（SLAELLNAGLGGS；配列番号74）、Softag 3（TQDPSRVG；配列番号75）、およびV5タグ（GKPIPNPLLGLDST；配列番号76）が挙げられる。特定の実施形態において、タグカセットとして、3XFLAGなどの融合タグカセットが挙げられる。特定の実施形態において、3XFLAGとして、配列番号29に示される配列が挙げられる。

20

【0047】

前述の機能性分子の配列は公表されている。例えば、ラクターゼ（例えばGenBank：EAX11622.1）、リパーゼ（例えばGenBank：AAA60129.1）、ヘリカーゼ（例えばGenBank：AMD82207.1）、アミラーゼ（例えばGenBank：AAA51724.1）、 α -グルコシダーゼ（例えばGenBank：ABI53718.1）、転写因子SP1（例えばUniProtKB/Swiss-Prot：P08047.3）、転写因子AP-1（例えばNP_002219.1）、熱ショック因子タンパク質1（例えばUniProtKB/Swiss-Prot：Q00613.1）、CCAAT／エンハンサー結合タンパク質（C/EBP） β アイソフォームa（例えばNP_005185.2）、Oct-1（例えばUniProtKB/Swiss-Prot：P14859.2）、TGF β （例えばGenBank：CAF02096.2）、グリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）（例えばNP_001177397.1）、血小板由来成長因子受容体（例えばGenBank：AAA60049.1）、上皮成長因子受容体（例えばGenBank：CAA25240.1）、血管内皮増殖因子受容体（例えばGenBank：AAC16449.2）、インターロイキン8受容体 α （例えばGenBank：AAB59436.1）、カベオリン（例えばGenBank：CAA79476.1）、ダイナミン（例えばGenBank：AAA88025.1）、クラスリン重鎖1アイソフォーム1（例えばNP_004850.1）、クラスリン重鎖2アイソフォーム1（例えばNP_009029.3）、クラスリン軽鎖Aアイソフォームa（例えばNP_001824.1）、クラスリン軽鎖Bアイソフォームa（例えばNP_001825.1）、ras関連タンパク質Rab-4Aアイソフォーム1（例えばNP_004569.2）、ras関連タンパク質Rab-11A（例えばUniProtKB/Swiss-Prot：P62491.3）、血小板由来成長因子（例えばGenBank：AAA60552.1）、トランスフォーミング増殖因子 β 3（例えばGenBank：AAA61161.1）、神経成長因子（例えばGenBank：CAA37703.1）、EGF（例えばGenBank：CAA34902.2）、コカイン・アンフェタミン調節転写産物（A鎖）（例えばPDB：1HY9_A）、protachykinin-1（例えばUniProtKB-P20366）、オキシトシンニューロフィジン1（例えばUniProtKB-P01178）、

30

40

50

ソマトスタチン（例えばGenBank：AAH32625.1）、遺伝的にコードされた緑色カルシウム指示薬NTnC（A鎖）〔合成コンストラクト〕（例えばPDB：5MWC_A）、カルシウム指示薬TN-XXL〔合成コンストラクト〕（例えばGenBank：ACF93133.1）、BRET-based auto-luminescent calcium indicator〔合成コンストラクト〕（例えばGenBank：ADF42668.1）、カルシウム指示薬タンパク質OeNL(Ca²⁺)-18μ〔合成コンストラクト〕（例えばGenBank：BBB18812.1）、ミオシン軽鎖キナーゼ、緑色蛍光タンパク質、カルモジュリンキメラ（A鎖）〔合成コンストラクト〕（例えばPDB：3EKJ_A）、channelopsin 1（例えばUniProtKB-F8UVI5）、channelopsin 1（例えばGenBank：AER58217.1）、チャネルロドプシン2（例えばUniProtKB-B4Y105）、チャネルロドプシン2〔合成コンストラクト〕（例えばGenBank：ABO64386.1）、CRISPR関連タンパク質（Cas）（例えばGenBank：AKG27598.1）、Cas9〔合成コンストラクト〕（例えばGenBank：AST09977.1）、CRISPR関連エンドヌクレアーゼCpf1（例えばUniProtKB/Swiss-Prot：U2UMQ6.1）、リボヌクレアーゼ4またはリボヌクレアーゼL（例えばUniProtKB/Swiss-Prot：Q05823.2）、デオキシリボヌクレアーゼIIβ（例えばGenBank：AAF76893.1）、ナトリウムチャネルタンパク質1型サブユニットα（例えばUniProtKB-P35498）、電位依存性カリウムチャネルサブファミリーKQTのメンバー2（例えばUniProtKB-O43526）および電位依存性L型カルシウムチャネルサブユニットα-1C（例えばUniProtKB-Q13936）が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0048】

さらなるエフェクターエレメントとして、Cre、iCre、dgCre、FlpOおよびtTA2が挙げられる。iCreは、コドンが改良されたCreを指す。dgCreは、大腸菌K12株染色体のジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（DHFRまたはfolA）の最初の159個のアミノ酸がN末端に融合されたことによって増強されたGFP/Creリコンビナーゼ融合遺伝子であり、G67S変異を有し、組換えにより不安定化ドメイン変異R12Y/Y100Iを有している。FlpOは、FLPeのコドン最適化形態であり、マウス細胞におけるタンパク質発現とFRT組換え効率が大幅に向上している。FLP/FRT系は、Cre/LoxP系と同様に、遺伝子発現に広く用いられている（FLP/FRT系を利用した条件付きノックアウトマウスの作製も広く行われている）。tTA2は、テトラサイクリントランス活性化因子を指す。

【0049】

例示的な発現可能なエレメントとして、エフェクターエレメントを含まない発現産物が挙げられ、例えば、非機能性タンパク質または欠陥タンパク質が挙げられる。特定の実施形態において、このような発現可能なエレメントを利用することによって、それに対応する機能性分子の効果を試験する方法を実施することができる。特定の実施形態において、発現可能なエレメントは、それらの機能を無効化する組換え変異によって機能性が失われたものまたは欠陥が起こったものである。これらの態様において、発現可能ではないエレメントは、それに対応する機能性分子と構造が可能な限り類似している。

【0050】

例示的な自己切断ペプチドとして、1つのmRNAから2つのタンパク質を産生させる2Aペプチドが挙げられる。2A配列は短い配列（例えば20アミノ酸長）であり、サイズ制限のあるコンストラクトにおいてよく利用されている。具体的な例として、P2A、T2A、E2AおよびF2Aが挙げられる。特定の実施形態において、人工発現コンストラクトは内部リボソーム導入部位（IRES）配列を含む。IRESは、mRNA分子上の第2の内部部位からのリボソームによる翻訳を開始させることができ、1つのmRNAから2つのタンパク質を産生させることができる。

【0051】

人工発現コンストラクトは、ヒストンH1、ヒストンH2A、ヒストンH2B、ヒストンH3、ヒストンH4、ヒストン様タンパク質であるHPhAやH2B*などの核移行タンパク質をコードしてもよい。

【0052】

本明細書に記載の分子（例えば、RNAやタンパク質）をコードするコード配列は、公的に利用可能なデータベースや刊行物から入手することができる。コード配列には、様々な配列多型、変異および／または配列バリエーションがさらに含まれていてもよく、このような変化は、コードされている分子の機能に影響を与えない。「コードする」は、ベクター、プラスミド、遺伝子、cDNA、mRNAなどの核酸配列が、タンパク質などのその他の分子の合成のための鋳型として機能するという特性を指す。

【0053】

「遺伝子」という用語は、コード配列だけでなく、プロモーター、エンハンサー、インスレーターおよび／または転写後調節エレメント（例えば末端領域）などの調節領域を含んでいてもよい。さらに、この用語は、mRNA転写産物からスプライシングされたあらゆるイントロンおよびその他のDNA配列、ならびに選択的スプライス部位から生じたバリエーションを含んでいてもよい。これらの配列は、特定の種類の生物または細胞においてコドン選択性を付与するために導入してもよい配列または参照配列の縮重コドンを含んでいてもよい。

【0054】

プロモーターとして、一般的なプロモーター、組織特異的プロモーター、細胞特異的プロモーターおよび／または細胞質特異的プロモーターが挙げられる。プロモーターとして、強力なプロモーター、弱いプロモーター、構成的発現プロモーターおよび／または誘導型プロモーターを挙げることもできる。誘導型プロモーターは、特定の条件、シグナルまたは細胞事象に応答して発現を誘導する。例えば、プロモーターは、プロモーターからの転写の誘導に特定のリガンド、低分子、転写因子またはホルモタンパク質を必要とする誘導型プロモーターであってもよい。プロモーターの具体例として、minBglobin（minBGpromとも呼ばれる）、CMV、minCMV、minCMV*（minCMV*は、Sacl制限部位が除去されたminCMVである）、minRho、minRho*（minRho*は、Sacl制限部位が除去されたminRhoである）、SV40最初期プロモーター、Hsp68最小プロモーター（proHSP68）、およびラウス肉腫ウイルス（RSV）長鎖末端反復配列（LTR）プロモーターが挙げられる。最小プロモーターは、それ自身では単独で遺伝子発現を誘導する活性を有していないが、近傍のエンハンサーエレメントと連結された場合に、活性化されて遺伝子発現を誘導することができる。

【0055】

特定の実施形態において、発現コンストラクトは、ベクターに組み込まれて提供される。「ベクター」は、発現コンストラクトなどの別の核酸分子を移入または輸送することができる核酸分子を指す。移入される核酸は、通常、ベクターの核酸分子に連結され、例えば、ベクターの核酸分子に挿入される。ベクターは、細胞の自己複製を誘導する配列を含んでいてもよく、宿主細胞のDNAへの組み込みを可能とする配列を含んでいてもよい。有用なベクターとして、例えば、プラスミド（例えば、DNAプラスミドやRNAプラスミド）、トランスポゾン、コスミド、細菌人工染色体およびウイルスベクターが挙げられる。

【0056】

「ウイルスベクター」という用語は、細胞において非天然核酸分子の移入および発現を容易とするウイルス由来の成分を含む核酸分子を指すために広く用いられる。「アデノ随伴ウイルスベクター」は、主にAAVに由来する構造エレメントおよび機能性遺伝子エレメントまたはその一部を含むウイルスベクターまたはプラスミドを指す。「レトロウイルスベクター」は、主にレトロウイルスに由来する構造エレメントおよび機能性遺伝子エレメントまたはその一部を含むウイルスベクターまたはプラスミドを指す。「レンチウイルスベクター」は、主にレンチウイルスなどに由来する構造エレメントおよび機能性遺伝子エレメントまたはその一部を含むウイルスベクターまたはプラスミドを指す。「ハイブリッドベクター」は、2種以上のウイルスに由来する構造エレメントおよび／または機能性遺伝子エレメントを含むベクターを指す。

【0057】

「アデノウイルスベクター」は、(a) 人工発現コンストラクトのパッケージングを促すのに十分であり、かつ (b) センス方向またはアンチセンス方向にクローニングされたコード配列を発現するのに十分なアデノウイルス配列を含むコンストラクトを指す。組換えアデノウイルスベクターとして、アデノウイルスの遺伝子組換え形態が挙げられる。アデノウイルスの遺伝子構成は、36 kb の線状二本鎖 DNA ウイルスであることから、最大で 7 kb の外来配列でアデノウイルス DNA の大部分を置換することができる。アデノウイルス DNA は、遺伝毒性を起こすことなく、エピソームを利用して複製できることから、レトロウイルスとは異なり、宿主細胞にアデノウイルスを感染させても染色体には組み込まれない。さらに、アデノウイルスは構造的に安定であり、広範な増幅後にゲノムの再構成は検出されない。

10

【0058】

アデノウイルスは、中程度のゲノムサイズ、操作の容易さ、高力価、広い標的細胞範囲および高い感染性を有することから、遺伝子移入ベクターとしての使用に特に適している。アデノウイルスのゲノムの両端には、100~200塩基対長の逆方向反復配列 (ITR) が含まれ、ITR は、ウイルスの DNA の複製およびパッケージングに必要なシスエレメントである。アデノウイルスのゲノムの初期 (E) 領域および後期 (L) 領域は、ウイルスの DNA 複製の開始により分割される様々な転写単位を含んでいる。E1 領域 (E1A および E1B) は、アデノウイルスゲノムおよびいくつかの細胞遺伝子の転写の調節を担うタンパク質をコードする。E2 領域 (E2A および E2B) の発現により、ウイルス DNA の複製のためのタンパク質が合成される。これらのタンパク質は、DNA の複製、後期遺伝子の発現および宿主細胞のタンパク質合成の抑制 (shut-off) に関与する。アデノウイルスのカプシドタンパク質の大半を含む後期遺伝子産物は、主要後期プロモーター (MLP) により誘導された単一の一次転写産物の顕著なプロセッシング後にのみ発現される。MLP は、感染の後期において特に効率的であり、このプロモーターにより誘導された mRNA はいずれも 3 個に分割された 5' - リーダー (TPL) 配列を持ち、翻訳用の mRNA により優先的に選択される。

20

【0059】

アデノウイルスベクターが複製欠損型または少なくとも条件付き欠損型であるという要件以外のアデノウイルスベクターの特性は、本明細書に開示された特定の実施形態を確実に実施するに当たってはそれほど重要ではないと考えられる。アデノウイルスは、公知の 42 種類の血清型または A~F の亜属のうち、どのようなものであってもよい。5 型アデノウイルスは、多くの生化学的情報および遺伝子情報が公知のヒトアデノウイルスであり、アデノウイルスをベクターとして使用した構築の大半において歴史的に使用されていることから、特定の実施形態において、特定の実施形態での使用のための、条件的な複製欠損アデノウイルスベクターを得るには、C 亜属の血清型 5 型のアデノウイルスが出発原料として好ましい。

30

【0060】

本明細書で述べるように、通常のベクターは複製欠損型であり、アデノウイルスの E1 領域を欠損している。したがって、目的の遺伝子をコードするポリヌクレオチドを、E1 領域のコード配列が除去された位置に導入することが最も簡便である。しかし、アデノウイルス配列内のコンストラクトの挿入位置はそれほど重要ではない。目的の遺伝子をコードするポリヌクレオチドは、E3 置換ベクターの欠失させた E3 領域に挿入してもよく、E4 領域に挿入してもよく、E4 領域の欠損は、ヘルパー細胞株またはヘルパーウイルスにより補完される。

40

【0061】

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、アデノウイルスのストックの汚染物として見出されたパルボウイルスである。AAV は普遍的なウイルスであり (米国人口の 85% が抗 AAV 抗体を保有している)、疾患を引き起こさない。さらに、AAV の複製はヘルパーウイルス (例えばアデノウイルス) の存在に依存することから、AAV はディペンドウイルスとしても分類される。様々な血清型が単離されており、そのうちでも、AAV-2 が最も詳しく

50

特性評価されている。AAVは、一本鎖線状DNAを有し、このDNAが、カプシドタンパク質VP1、VP2およびVP3で封入されて、直径20～24nmの正二十面体ビリオンを形成している。

【0062】

AAVのDNAの長さは、4.7キロベースである。AAVのDNAは、2つのオープンリーディングフレームを含み、2つのITRによって挟まれている。AAVゲノムには、repおよびcapという主に2種類の遺伝子が存在する。rep遺伝子は、AAVウイルスの複製を担うタンパク質をコードし、cap遺伝子は、カプシドタンパク質VP1～3をコードする。各ITRは、T字形のヘアピン構造を形成している。これらの末端反復配列は、染色体の組み込みに必要とされるAAVの唯一のシス成分である。したがって、AAVは、ウイルスのコード配列をすべて除去して送達用の遺伝子カセットで置換することが可能なベクターとして使用することができる。3つのAAVウイルスプロモーターが同定されており、そのマップ上の位置からそれぞれp5、p19およびp40と命名されている。p5およびp19からの転写は、repタンパク質の産生をもたらし、p40からの転写はカプシドタンパク質を産生する。

10

【0063】

AAVは、安全性プロファイルが優れており、カプシドおよびゲノムを変更することにより標的細胞集団において発現させることができることから、本開示における使用に対して傑出している。scAAVは、自己相補型AAVを指す。pAAVは、プラスミドアデノ随伴ウイルスを指す。rAAVは、組換えアデノ随伴ウイルスを指す。

20

【0064】

その他のウイルスベクターを使用してもよい。例えば、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、ヘルペスウイルスなどのウイルスに由来するベクターを使用してもよい。これらのベクターは、様々な哺乳動物細胞に対して有益な特徴を提供する。

【0065】

レトロウイルスは、遺伝子送達用ツールとしてよく使用されている。「レトロウイルス」は、RNAウイルスであり、そのゲノムRNAが逆転写されて、二本鎖の線状DNAコピーを産生し、共有結合を介してゲノムDNAを宿主ゲノムに組み込む。宿主ゲノムに組み込まれたレトロウイルスは、「プロウイルス」と呼ばれる。プロウイルスは、RNAポリメラーゼIIの鋳型として機能し、新たなウイルス粒子の産生に必要とされる構造タンパク質と酵素をコードするRNA分子の発現を誘導する。

30

【0066】

特定の実施形態での使用に適したレトロウイルスの例として、モロニー Maus 白血病ウイルス (M-MuLV)、モロニー Maus 肉腫ウイルス (MoMSV)、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス (HaMuSV)、マウス乳癌ウイルス (MuMTV)、テナガザル白血病ウイルス (GaLV)、ネコ白血病ウイルス (FLV)、スプーマウイルス、フレンド Maus 白血病ウイルス、マウス幹細胞ウイルス (MSCV)、ラウス肉腫ウイルス (RSV) およびレンチウイルスが挙げられる。

【0067】

「レンチウイルス」は、複雑レトロウイルス群（または複雑レトロウイルス属）を指す。レンチウイルスの例として、HIV（ヒト免疫不全ウイルス；HIV1型およびHIV2型を含む）；ビスナ・マエディウイルス (VMV)；ヤギ関節炎・脳脊髄炎ウイルス (CAEV)；ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)；ネコ免疫不全ウイルス (FIV)；ウシ免疫不全ウイルス (BIV)；およびサル免疫不全ウイルス (SIV) が挙げられる。特定の実施形態において、HIVに基づくベクター骨格（すなわち、HIVのシス作用性配列エレメント）を用いることができる。

40

【0068】

ベクターを使用する際、一部の種類では、ウイルス粒子の産生においてウイルスゲノムの転写を誘導する5'LTRのU3領域を異種プロモーターで置換することによって、安全性を向上させることができる。この目的で使用可能な異種プロモーターの例として、例えば

50

、シミアンウイルス40 (SV40) (例えば初期または後期) プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) (例えば最初期) プロモーター、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV) プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーターおよび単純ヘルペスウイルス (HSV) (チミジンキナーゼ) プロモーターが挙げられる。通常のプロモーターは、Tatとは無関係に高レベルな転写を誘導することができる。異種プロモーターによるU3領域の置換によって、ウイルス産生系から完全なU3配列が欠失するため、複製可能なウイルスが産生される組換えが起こる可能性が低下する。特定の実施形態において、異種プロモーターは、ウイルスゲノムが転写される方法を制御できるという別の利点がある。例えば、異種プロモーターは、誘導因子が存在する場合にのみ、ウイルスゲノムの全体またはその一部が転写されるような、誘導型プロモーターであってもよい。誘導因子として、1種以上の化合物または生理学的条件が挙げられ、例えば、宿主細胞の培養温度または培養pHが挙げられる。

10

【0069】

特定の実施形態において、ウイルスベクターはTARエレメントを含む。「TAR」は、レンチウイルスのLTRのR領域に存在する「トランス活性化応答」遺伝子エレメントを指す。このエレメントは、レンチウイルスのトランス活性化因子 (tat) 遺伝子エレメントと相互作用して、ウイルスの複製を増強する。しかしながら、このエレメントは、5'LTRのU3領域を異種プロモーターで置換する実施形態では必要とされない。

【0070】

「R領域」は、キャップ部位の開始点 (すなわち転写開始点) からポリ (A) 鎖の開始点の直前までの、レトロウイルスのLTR内の領域を指す。R領域は、U3領域とU5領域に挟まれた領域としても定義される。R領域は、逆転写の際にゲノムの一端から他端へと新生DNAを移動させるという役割を果たしている。

20

【0071】

特定の実施形態において、転写後調節エレメントと効率的なポリアデニル化部位をウイルスベクターに組み込むことによって、ウイルスベクターにおける異種配列の発現を増加させることができ、この際に、転写終結シグナルをさらにウイルスベクターに組み込んでよい。様々な転写後調節エレメントによって、異種核酸の発現を増加させることができる。転写後調節エレメントの例として、ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメント (WPRE; Zufferey et al., 1999, J. Virol., 73:2886) ; B型肝炎ウイルスの転写後調節エレメント (HPRE) (Smith et al., Nucleic Acids Res. 26(21):4818-4827, 1998) ; およびその他の転写後調節エレメント (Liu et al., 1995, Genes Dev., 9:1766) が挙げられる。特定の実施形態において、ベクターは、WPREやHPREなどの転写後調節エレメントを含む。特定の実施形態において、ベクターは、WPREやHPREなどの転写後調節エレメントを欠失しているか、含んでいない。

30

【0072】

異種核酸転写産物の効率的な転写終結とポリアデニル化を誘導することができるエレメントによって、異種遺伝子の発現を増加させることができる。転写終結シグナルは、通常、ポリアデニル化シグナルの下流に見られる。特定の実施形態において、ベクターは、発現される分子 (例えばタンパク質) をコードするポリヌクレオチドの3'末端にポリアデニル化シグナルを含む。「ポリ (A) 部位」または「ポリ (A) 配列」は、RNAポリメラーゼIIにより転写された新生RNA転写産物の転写終結とポリアデニル化の両方を誘導するDNA配列を指す。ポリアデニル化配列は、コード配列の3'末端にポリ (A) テールを付加することによって、mRNAの安定性を向上させることができ、これによって、翻訳効率の向上に寄与する。特定の実施形態では、BGHpA、hGHpAまたはSV40pAを利用してもよい。特定の実施形態において、発現コンストラクトの好ましい一実施形態にはターミネーターエレメントが含まれる。ターミネーターエレメントは、転写量を増加させ、かつリードスルーによるコンストラクトから別のプラスミド配列への転写を最小限に抑えることができる。

40

【0073】

50

特定の実施形態において、ウイルスベクターは1つ以上のインスレーターエレメントをさらに含む。インスレーターエレメントは、例えば、エフェクターエレメントや発現可能なエレメントなどの、ウイルスベクターから発現される配列を組み込み部位効果から保護してもよい。組み込み部位効果は、ゲノムDNA内のシス作用性エレメントを介して起こり、移入配列が発現したり、発現されなかったりすることを意味する（すなわち位置効果；例えば、Burgess-Beusse et al., PNAS, USA, 99:16433, 2002；およびZhan et al., Hum. Genet., 109:471, 2001を参照されたい）。特定の実施形態において、ウイルス移入ベクターは、3'LTRに1つ以上のインスレーターエレメントを含み、宿主ゲノムにプロウイルスが組み込まれると、3'LTRの複製時にこのインスレーターが5'LTRと3'LTRの両方に組み込まれる。特定の実施形態での使用に適しているインスレーターとして、ニワトリβ-グロビンインスレーター（Chung et al., Cell 74:505, 1993；Chung et al., PNAS USA 94:575, 1997；およびBell et al., Cell 98:387, 1999を参照されたい）、SP10インスレーター（Abhyankar et al., JBC 282:36143, 2007）、またはエンハンサー遮断インスレーターとして機能するその他の小型のCTCF認識配列（Liu et al., Nature Biotechnology, 33:198, 2015）が挙げられる。

10

【0074】

上記で説明したもの以外にも、様々な種類の適切な発現ベクターも、当業者に知られている。これらの公知の発現ベクターとして、全般的な組換え操作用に設計された市販の発現ベクターが挙げられ、例えば、1つ以上のレポーター遺伝子と、該レポーター遺伝子を細胞で発現させる際に必要とされる調節エレメントとを含むプラスミドが挙げられる。例えば、インビトロジェン社、ストラタジーン社、クロンテック社などから多数のベクターが市販されており、様々な付随のガイドブックにおいて説明されている。特定の実施形態において、適切な発現ベクターとして、コードされた遺伝子を哺乳動物細胞において発現させることができるあらゆるプラスミド、コスミドまたはファージコンストラクトが挙げられ、このようなものとして、pUCプラスミド系やBluescriptプラスミド系がある。

20

【0075】

本明細書に開示されたベクターの特定の実施形態には、以下の表に記載のものが含まれる。

30

40

50

【表 1】

発現コンストラクトの名称	特徴
CN3406	pAAV:eHGT_888m-minBglobin-SYFP2-P2A-3XFLAG-10aa-H2B-WPRE3-BGHpA
CN3509	pAAV:eHGT_897m-minBglobin-SYFP2-P2A-3XFLAG-10aa-H2B-WPRE3-BGHpA
AiP1417	rAAV:3xCore2-MGT_E51-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA
CN2436	rAAV:eHGT_606h-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA
AiP1240	pAAV:MGT-E68-minBglobin-FlpO-WPRE-hGHpA
CN3739	pAAV:eHGT_889h-minBglobin-SYFP2-P2A-3XFLAG-10aa-H2B-WPRE3-BGHpA
CN3889	pAAV:eHGT_1038m-minBglobin-SYFP2-P2A-3XFLAG-10aa-H2B*-WPRE3-BGHpA
CN2839	rAAV:eHGT_589m-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA
CN2847	rAAV:eHGT_647m-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA
CN2431	rAAV:eHGT_483m-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA
CN3058	rAAV:3xcore4_eHGT_606h-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA
CN3059	rAAV:3xcore5_eHGT_606h-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA
CN3829	rAAV:3xcore_eHGT_1039h-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA
CN3283	rAAV:3xCore_hTH-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA
CN3863	rAAV:core4-eHGT_888m-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA
CN4365	rAAV:3Xcore4_eHGT_888m-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA
CN4830	rAAV:3Xcore4_eHGT_888h-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA
CN3551	rAAV:3xcore1_eHGT_017m-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA

【0076】

大型のベクター配列内のサブコンポーネント配列は、当業者であれば、本開示の記載に基づいて容易に同定することができる（図3参照）。上記表に記載の特定可能なサブコンポーネント間のヌクレオチドは、コンストラクトの組み立て（クローニング）に使用される制限酵素認識部位であり、場合に応じて、同定可能な機能を持たない付加ヌクレオチドである。完全なベクター配列のこれらのセグメントは、様々なクローニング技術および／または様々なベクターを用いて調節することができる。通常、6塩基の短い回文配列は、ベクターの機能にとって重要ではないベクター構築時のアーチファクトを意味する。

【0077】

特定の実施形態において、血液脳関門（BBB）を通過することができるカプシドを有するベクター（例えばAAV）が選択される。特定の実施形態において、ベクターは、血液脳関門を通過するカプシドを含むように組換えられる。血液脳関門を通過するウイルスカプシドを有するAAVの例として、AAV9（Gombash et al., Front Mol Neurosci. 2014; 7:81）、AAVrh.10（Yang, et al., Mol Ther. 2014; 22(7): 1299-1309）、AAV1R6、AAV1R7（Albright et al., Mol Ther. 2018; 26(2): 510）、rAAVrh.8（Yangら、前掲）、AAV-BR1（Marchio et al., EMBO Mol Med. 2016; 8(6): 592）、AAV-PHP.S（Chan et al., Nat Neurosci. 2017; 20(8): 1172）、AAV-PHP.B（Deverman et al., Nat Biotechnol. 2016; 34(2): 204）、AAV-PPS（Chen et al., Nat Med. 2009; 15: 1215）およびPHP.eBが挙げられる。特定の実施形態において、PHP.eBのカプシドは、AAV9を参照として比較すると、586番目以降のアミノ酸残基であるS-AQ-A（配列番号77）がS-DGTLAVPFK-A（配列番号78）に変更されているという点でAAV9とは異なっている。特定の実施形態において、PHP.eBは配列番号44の配列を指す。

【0078】

AAV9は、天然のAAV血清型であり、その他の多くの天然の血清型とは異なり、静脈内注射により血液脳関門（BBB）を通過することができる。AAV9は、中枢神経系（CNS）の広い領域に形質導入することから、最小限の侵襲により治療を行うことができる（Naso et al., *BioDrugs*. 2017; 31(4): 317）。このような事例は、例えば、AveXis社による脊髄性筋萎縮症（SMA）症候群の治療のための臨床試験（AVXS-101、NCT03505099）や、CLN3遺伝子関連神経セロイドリポフスチン症の治療のための臨床試験（NCT03770572）に関連して報告されている。

【0079】

AAVrh.10は、アカゲザルから最初に単離されたAAVであり、遺伝子送達用途に使用されるその他の一般的な血清型と比較してヒト血清反応性が弱陽性であり（Selot et al., *Front Pharmacol*. 2017; 8: 441）、いくつかの臨床試験（LYS-SAF302、LYS OGENEおよびNCT03612869）において評価されている。

【0080】

AAV1R6およびAAV1R7は、キメラAAVベクターのライブラリーから単離された2種のバリエーション（AAVrh.10のカプシドドメインをAAV1のカプシドドメインで置換したもの）であり、BBBを通過して中枢神経系に形質導入する能力を保持しているが、肝臓内皮および血管内皮への形質導入が有意に抑制されている。

【0081】

rAAVrh.8も、アカゲザルから単離されたAAVであり、末梢投与により、臨床的に意義のある領域のグリア細胞およびニューロン細胞への広汎な形質導入を示し、その他のベクターと比べて、末梢組織指向性が抑制されている。

【0082】

AAV-BR1は、NRGTEWDエピトープ（配列番号79）を提示するAAV2バリエーションであり、ランダムAAVディスプレイペプチドライブラリーのインピボスクリーニング中に単離されたものである。AAV-BR1は、脳において導入遺伝子を高発現して高い特異性を示すとともに、オフターゲットな親和性（肝臓に対する親和性を含む）が最小限に抑えられている（Korbelin et al., *EMBO Mol Med*. 2016; 8(6): 609）。

【0083】

AAV-PHP.S（Addgene社、マサチューセッツ州ウォータータウン）は、CREATE法により作製されたAAV9のバリエーションであり、7merの配列QAVRTSL（配列番号80）をコードし、腸神経系のニューロンに形質導入し、脊髄および脳幹に投射する末梢感覚求心神経に強く形質導入する。

【0084】

AAV-PHP.B（Addgene社、マサチューセッツ州ウォータータウン）は、CREATE法で作製されたAAV9のバリエーションであり、7merの配列TLAVPFK（配列番号81）をコードする。AAV-PHP.Bは、AAV9よりも高効率に中枢神経系全体に遺伝子を移入し、複数の中枢神経系領域のアストロサイトおよびニューロンの大部分に形質導入を行う。

【0085】

AAV-PPSは、AAV2のカプシドにDSPAHPSエピトープ（配列番号82）を挿入することによって作製されたAAV2バリエーションであり、AAV2と比べて劇的に改善した脳指向性を示す。

【0086】

血液脳関門を通過するカプシドに関するさらなる情報は、Chan et al., *Nat. Neurosci*. 2017 Aug; 20(8): 1172-1179を参照されたい。

【0087】

(ii) 投与用組成物

本開示の人工発現コンストラクトおよびベクター（本明細書において生理活性成分と呼ぶ）は、細胞、組織切片、動物（例えば、マウスや非ヒト霊長類）またはヒトへの投与に適している担体を用いて製剤化することができる。本明細書に記載の組成物中に含まれる生理活性成分は、中性型として調製することができ、遊離塩基として調製することができ

10

20

30

40

50

、または薬理学的に許容される塩として調製することもできる。

【0088】

薬学的に許容される塩として、（タンパク質の遊離アミノ基から形成される）酸付加塩が挙げられ、この酸付加塩は、例えば、塩酸やリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸を用いて形成される。また、遊離カルボキシル基で形成される塩は、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、鉄水酸化物などの無機塩基、またはイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導することができる。

【0089】

生理活性成分の担体として、溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング剤、希釈剤、等張化剤、吸収遅延剤、緩衝剤、溶液、懸濁液、コロイドなどが挙げられる。生理活性成分に対するこのような担体の使用は当技術分野でよく知られている。従来の媒体または薬剤が本発明の生理活性成分と適合性がない場合を除いて、従来の媒体または薬剤を本明細書に記載の組成物と組み合わせて使用することができる。

10

【0090】

「薬学的に許容される担体」は、ヒトに投与した場合に、特定の実施形態では、静脈内（例えば後眼窩叢）に投与した場合に、アレルギーやこれに類似する不都合な反応を起こさない担体を指す。

【0091】

特定の実施形態において、本発明の組成物は、静脈内用、脳実質内用、眼内用、硝子体内用、非経口用、皮下用、脳室内用、筋肉内用、髄腔内用、脊髄内用、腹腔内用、経口用もしくは鼻孔吸入用、または1個以上の細胞、組織もしくは臓器への直接注射もしくは直接投与用に製剤化することができる。

20

【0092】

本発明の組成物は、リポソーム、脂質、脂質複合体、ミクロスフェア、微粒子、ナノスフェアおよび／またはナノ粒子を含んでいてもよい。

【0093】

リポソームの形成とその使用は、当業者に広く知られている。リポソームは、血清中での安定性と血液中での半減期を向上させるために開発されたものである（例えば、米国特許第5,741,516号を参照されたい）。さらに、リポソームおよびリポソーム様調製物を薬物担体候補として使用する様々な方法が報告されている（例えば、米国特許第5,567,434号；米国特許第5,552,157号；米国特許第5,565,213号；米国特許第5,738,868号；および米国特許第5,795,587号を参照されたい）。

30

【0094】

本開示では、本発明の生理活性成分の薬学的に許容されるナノカプセル製剤も提供される。一般に、ナノカプセル製剤は、安定で再現可能な方法で化合物を封入することができる（Quintanar-Guerrero et al., Drug Dev Ind Pharm 24(12):1113-1128, 1998; Quintanar-Guerrero et al., Pharm Res. 15(7):1056-1062, 1998; Quintanar-Guerrero et al., J. Microencapsul. 15(1):107-119, 1998; Douglas et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 3(3):233-261, 1987）。細胞内に高分子が多量に取り込まれることによる副作用を回避するため、そのような超微粒子は、インビボで分解することができるポリマーを用いて設計することができる。このような要件を満たす生分解性のポリアルキルシアノアクリレートナノ粒子を、本開示において使用することも想定されている。このような微粒子は容易に作製することができ、これについては、例えば、Couvreur et al., J Pharm Sci 69(2):199-202, 1980; Couvreur et al., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 5(1):1-20, 1988; zur Muhlen et al., Eur J Pharm Biopharm, 45(2):149-155, 1998; Zambaux et al., J Control Release 50(1-3):31-40, 1998；および米国特許第5,145,684号において述べられている。

40

【0095】

50

注射用組成物としては、滅菌注射溶液または滅菌分散液を即時調製するための、滅菌水溶液または滅菌分散液および滅菌粉末が挙げられる（米国特許第5,466,468号）。注射により送達される注射用組成物は、注射器を用いて送達できる程度の滅菌流体の形態である。特定の実施形態において、注射用組成物は、通常、製造工程および保存中に安定であり、細菌や真菌などの微生物による汚染作用を防ぐための1種以上の保存剤化合物を含んでいてもよい。担体は、溶媒または分散媒であってもよく、この溶媒または分散媒は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液状ポリエチレングリコールなど）およびこれらの適切な混合物、ならびに／または植物油を含む。適切な流動性を維持するため、例えば、レシチンなどのコーティング剤を使用したり、分散液の場合は粒径を必要とされる大きさに維持したり、かつ／または界面活性剤を使用したりすることができる。微生物の作用を防ぐには、例えば、パラベン類、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどの、様々な抗細菌剤および／または抗真菌剤を使用することができる。様々な実施形態において、注射用組成物は、例えば、糖類や塩化ナトリウムなどの等張化剤を含む。注射用組成物の持続吸収は、例えば、モノステアリン酸アルミニウムやゼラチンなどの、吸収を遅延させる薬剤を注射用組成物に組み込むことによって達成することができる。必要に応じて、注射用組成物に適切な緩衝剤を加えてもよく、希釈された液体は、最初に十分な生理食塩水またはグルコースを用いて等張化される。

10

【0096】

グリセロール、液状ポリエチレングリコールもしくはその混合物または油剤を用いて分散液を調製してもよい。本明細書で述べるように、通常の保存条件および使用条件では、このような調製物は、微生物の増殖を防ぐために保存剤を含んでいてもよい。

20

【0097】

滅菌組成物は、適正量の溶媒中で生理活性成分をその他の任意の成分（例えば、前述の成分）と混合し、滅菌濾過することによって調製することができる。分散液は、通常、基本的な分散媒とその他の必要な原料（例えば、前述の原料など）を含む滅菌溶媒に様々な滅菌生理活性成分を分散させることによって調製される。滅菌注射溶液を調製するための滅菌粉末の場合は、生理活性成分と所望のその他の原料を含む溶液をあらかじめ滅菌濾過し、この溶液を真空乾燥または凍結乾燥することによって、生理活性成分と所望のその他の原料を含む粉末を調製する方法が好ましい。

30

【0098】

経口組成物は、例えば、液剤、シロップ剤、懸濁剤などの液状形態であってもよく、使用前に水またはその他の適切な溶媒で再構築される薬剤製品として提供してもよい。このような液状製剤は、薬学的に許容される添加物を用いた従来の方法によって調製してもよく、このような薬学的に許容される添加物として、例えば、懸濁化剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体または硬化食用脂）；乳化剤（例えば、レシチンやアラビアゴム）；非水性溶媒（例えば、アーモンド油、エステル油または分別植物油）；および保存剤（例えば、p-ヒドロキシ安息香酸メチル、p-ヒドロキシ安息香酸プロピルまたはソルビン酸）が挙げられる。本発明の組成物は、例えば、薬学的に許容される賦形剤を用いた従来の方法によって、錠剤またはカプセル剤の形態で調製してもよく、このような薬学的に許容される賦形剤として、例えば、結合剤（例えば、アルファー化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えば、ラクトース、微結晶セルロースまたはリン酸水素カルシウム）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ）；崩壊剤（例えば、バレイショデンプンまたはデンプングリコール酸ナトリウム）；および湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）が挙げられる。錠剤は、当技術分野で公知の方法でコーティングしてもよい。

40

【0099】

吸入用組成物は、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素またはその他の適切な気体などの適切な噴射剤

50

を用いて、加圧バックまたはネブライザーから噴射されるエアロゾルスプレー剤の形態で送達することができる。加圧エアロゾル剤の場合、投与単位は、定量を送達するバルブを提供することによって決定してもよい。吸入器または噴霧器で使用されるカプセル剤またはカートリッジ（例えば、ゼラチンカプセル剤やゼラチンカートリッジ）に製剤化してもよく、このようなカプセル剤およびカートリッジは、本明細書に記載の組成物と、ラクトースやデンプンなどの適切な粉末基剤とからなる混合粉末を含む。

【0100】

さらに、本発明の組成物として、マイクロチップデバイス（米国特許第5,797,898号）、眼科用製剤（Bourlais et al., Prog Retin Eye Res, 17(1):33-58, 1998）、経皮マトリックス（米国特許第5,770,219号および米国特許第5,783,208号）ならびにフィードバック制御送達（米国特許第5,697,899号）が挙げられる。

10

【0101】

また、補助的な有効成分を本発明の組成物に含有させることもできる。

【0102】

通常、本発明の組成物は、少なくとも0.1%以上の生理活性成分を含んでいてもよいが、言うまでもなく、生理活性成分の割合は様々に変更してもよく、簡便に、本発明の組成物の総重量または総体積に対して、1%または2%～70%または80%以上の範囲であってもよく、0.5～99%の範囲であってもよい。当然のことながら、生理学的に有益な各組成物中の生理活性成分の量は、前記化合物の所定の単位用量により適切な用量が得られるように調整してもよい。溶解度、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与経路、製品の保存期間などの要因およびその他の薬理学的考慮事項は、このような医薬製剤の調製を担当する当業者により検討され、したがって、様々な組成物および用量が望ましいと考えられる。

20

【0103】

特定の実施形態において、ヒトへの投与に際して、本発明の組成物は、米国食品医薬品局（FDA）または他国のその他の担当規制当局の要求に従って、無菌性、発熱性、一般的安全性および純度に関する基準を満たす必要がある。

【0104】

(iii) 人工発現コンストラクトを含む細胞株

本開示は、本明細書に記載の人工発現コンストラクトを含む細胞を含む。人工発現コンストラクトで形質転換された細胞は、神経解剖学的研究、機能性タンパク質および／または非機能性タンパク質の評価、エンハンサーの調節特性を評価するための薬物スクリーニングなどの様々な目的に使用することができる。

30

【0105】

様々な宿主細胞株を用いることができるが、特定の実施形態では、宿主細胞は哺乳動物細胞である。特定の実施形態において、人工発現コンストラクトは、eHGT_888m、eHGT_897m、3xCore2-MGT_E51、eHGT_606h、MGT_E68、eHGT_889h、eHGT_1038m、eHGT_589m、eHGT_647m、eHGT_483m、3xcore4_eHGT_606h、3xcore5_eHGT_606h、3xcore_eHGT_1039h、3xCore_hTH、core4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888hおよび3xcore1_eHGT_017m、ならびに／またはCN3406、CN3509、AiP1417、CN2436、AiP1240、CN3739、CN3889、CN2839、CN2847、CN2431、CN3058、CN3059、CN3829、CN3283、CN3863、CN4365、CN4830およびCN3551から選択されるエンハンサーおよび／またはベクター配列を含み、宿主細胞株は、ヒト細胞、霊長類細胞またはマウス細胞である。さらに、本開示において遺伝子導入に利用することができる細胞株として、ラットやマウスの脳などの生きた組織に由来する初代細胞株や、ラット、マウス、非ヒト霊長類またはヒトの神経外科学的組織のような、動物由来の脳切片などの器官型細胞培養が挙げられる。PC12細胞株（American Type Culture Collection (ATCC)（バージニア州マナッサス）から入手可能）は、神経成長因子（NGF）に応答して多くのニューロンマーカータンパク質を発現することが示されている。PC12細胞株は、ニュー

40

50

ロン細胞株であると考えられており、本開示の使用に適用可能である。JAR細胞（ATCCから入手可能）は、セロトニントランスポーター遺伝子などのいくつかのニューロン遺伝子を発現する血小板由来細胞株であり、本明細書に記載の実施形態において使用してもよい。

【0106】

W091/13150では、ニューロン細胞株を含む様々な細胞株と、それらの製造方法について述べられている。同様に、W097/39117でも、ニューロン細胞株と、そのような細胞株の製造方法について述べられている。これらの特許出願において開示されているニューロン細胞株は、本開示の使用に適用可能である。

【0107】

特定の実施形態において、「ニューロン」という用語は、何らかのニューロン細胞、ニューロン細胞に関連するもの、またはニューロン細胞を含むものについて説明する際に使用される。ニューロン細胞は、軸索と樹状突起を有するという特徴により定義される。「ニューロン特異的」という用語は、ニューロン細胞またはこれに由来する細胞において見られるが、ニューロン細胞に由来しない細胞や非ニューロン細胞（例えば、アストロサイトやオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞）では見られなかったり、実質的に見られない何らかのもの；あるいはニューロン細胞またはこれに由来する細胞において起こるが、ニューロン細胞に由来しない細胞や非ニューロン細胞（例えば、アストロサイトやオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞）では起こらなかったり、実質的に起こらない活動を指す。

【0108】

特定の実施形態において、マウス胚性幹細胞などの非ニューロン細胞株を使用してもよい。培養されたマウス胚性幹細胞にプラスミドコンストラクトを一時的にトランスフェクトさせて、遺伝子コンストラクトの発現を分析することができる。マウス胚性幹細胞は、多能性の未分化細胞である。マウス胚性幹細胞は、白血病抑制因子（LIF）により未分化状態を維持することができる。LIFを除去することによって、マウス胚性幹細胞の分化を誘導することができる。マウス胚性幹細胞は、培養により様々な種類の分化細胞を形成する。マウス胚性幹細胞の分化は、組織特異的転写因子の発現により起こり、これによって、エンハンサー配列の機能の評価が可能となる（例えば、Fiskerstrand et al., FEBS Lett 458: 171-174, 1999を参照されたい）。

【0109】

幹細胞をニューロン細胞に分化させる方法は、幹細胞培養培地から、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）、ヘパリン、N2サプリメント（例えば、トランスフェリン、インスリン、プロゲステロン、ブトレスシンおよびセレナイト）、ラミニンならびにポリオルニチンを含む培地に交換することを含む。髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトを幹細胞から製造する方法は、Hu, et al., 2009, Nat. Protoc. 4:1614-22に記載されている。Bibel, et al., 2007, Nat. Protoc. 2:1034-43には、幹細胞からグルタミン酸作動性ニューロンを製造するプロトコルが記載されており、Chatzi, et al., 2009, Exp. Neurol. 217:407-16には、GABA作動性ニューロンを製造する操作が記載されている。この操作は、オールトランスレチノイン酸に幹細胞を3日間暴露することを含む。次に、B27、bFGFおよびEGFを添加した神経基礎培地などの無血清ニューロン誘導培地において培養することによって、全細胞の95%を占めるGABA作動性ニューロンが得られる。

【0110】

米国特許公開第2012/0329714号では、神経幹細胞数を増加させるためにプロラクチンを使用することが述べられており、米国特許公開第2012/0308530号では、ニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトへのニューロン分化を促すアミノ基を有する培養表面が述べられている。このように、神経幹細胞の運命は、様々な細胞外因子によって制御することができる。よく使用される細胞外因子として、脳由来成長因子（BDNF; Shetty and Turner, 1998, J. Neurobiol. 35:395-425）；線維芽細胞

10

20

30

40

50

増殖因子 (bFGF; 米国特許第5,766,948号; FGF-1、FGF-2); ニューロトロフィン 3 (nt-3) およびニューロトロフィン 4 (nt-4) (Caldwell, et al., 2001, Nat. Biotechnol. 1;19:475-9); 毛様体神経栄養因子 (CNTF); BMP-2 (米国特許第5,948,428号および米国特許第6,001,654号); イソブチル-3-メチルキサンチン; 白血病増殖阻害因子 (LIF; 米国特許第6,103,530号); ソマトスタチン; アンフィレグリン; ニューロトロフィン (例えば、環状アデノシン-リン酸); 上皮成長因子 (EGF); デキサメタゾン (糖質コルチコイドホルモン); フォルスコリン; GDNFファミリー受容体のリガンド; カリウム; レチノイン酸 (米国特許第6,395,546号); 破傷風毒素; ならびにトランスフォーミング増殖因子 α およびTGF- β (米国特許第5,851,832号および米国特許第5,753,506号) が挙げられる。

10

【0111】

特定の実施形態において、酵母ワンハイブリッドシステムを用いて、特異的なタンパク質-DNA間相互作用を抑制する化合物を同定してもよく、このような化合物として、例えば、eHGT_888m、eHGT_897m、3xCore2-MGT_E51、eHGT_606h、MGT_E68、eHGT_889h、eHGT_1038m、eHGT_589m、eHGT_647m、eHGT_483m、3xcore4_eHGT_606h、3xcore5_eHGT_606h、3xcore_eHGT_1039h、3xCore_hTH、core4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888hまたは3xcore1_eHGT_017mの転写因子が挙げられる。

【0112】

トランスジェニック動物については以下で述べる。細胞株は、そのようなトランスジェニック動物に由来するものであってもよい。例えば、(例えば、後述するような) トランスジェニックマウス由来の初代組織培養から、人工発現コンストラクトがゲノムに組み込まれた細胞株を得ることができる (例えば、MacKenzie & Quinn, Proc Natl Acad Sci USA 96: 15251-15255, 1999を参照されたい)。

20

【0113】

(iv) トランスジェニック動物

本開示の別の一態様は、異種コード配列に作動可能に連結された、eHGT_888m、eHGT_897m、3xCore2-MGT_E51、eHGT_606h、MGT_E68、eHGT_889h、eHGT_1038m、eHGT_589m、eHGT_647m、eHGT_483m、3xcore4_eHGT_606h、3xcore5_eHGT_606h、3xcore_eHGT_1039h、3xCore_hTH、core4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888hおよび/または3xcore1_eHGT_017mを含む人工発現コンストラクトをゲノムに含むトランスジェニック動物を含む。特定の実施形態において、トランスジェニック動物のゲノムは、CN3406、CN3509、AiP1417、CN2436、AiP1240、CN3739、CN3889、CN2839、CN2847、CN2431、CN3058、CN3059、CN3829、CN3283、CN3863、CN4365、CN4830および/またはCN3551を含む。特定の実施形態において、非組込み型ベクターを利用する場合、トランスジェニック動物は、eHGT_888m、eHGT_897m、3xCore2-MGT_E51、eHGT_606h、MGT_E68、eHGT_889h、eHGT_1038m、eHGT_589m、eHGT_647m、eHGT_483m、3xcore4_eHGT_606h、3xcore5_eHGT_606h、3xcore_eHGT_1039h、3xCore_hTH、core4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888hおよび/もしくは3xcore1_eHGT_017m、ならびに/またはCN3406、CN3509、AiP1417、CN2436、AiP1240、CN3739、CN3889、CN2839、CN2847、CN2431、CN3058、CN3059、CN3829、CN3283、CN3863、CN4365、CN4830および/もしくはCN3551を含む人工発現コンストラクトを1個以上の細胞に含む。

30

40

【0114】

トランスジェニック動物の製造方法に関する詳細な説明は、米国特許第4,736,866号に記載されている。トランスジェニック動物は、どのような非ヒト生物種であってもよいが、非ヒト霊長類 (NHP)、ヒツジ、ウマ、ウシ、ブタ、ヤギ、イヌ、ネコ、ウサギ、ニワトリ; またはモルモット、ハムスター、スナネズミ、ラット、マウス、フェレットな

50

どのげっ歯類などであることが好ましい。

【0115】

特定の実施形態において、トランスジェニック動物を作製することによって、あらゆる細胞の同じゲノム組み込み部位に組換えコンストラクトが導入された生物が得られる。したがって、そのようなトランスジェニック動物に由来する細胞株は、あらゆる細胞の同じゲノム組み込み部位に組換えコンストラクトを有するという点で一貫した特徴を有し、したがって、これらの細胞はいずれも同じ斑入り位置効果を受ける。これに対して、細胞株または初代細胞培養に遺伝子を導入した場合には、コンストラクトの異種発現が得られる。この方法には、導入されたDNAの発現が、宿主動物の特定の遺伝的背景による影響を受けるという欠点がある。

10

【0116】

細胞株に関連して前述したように、本開示の人工発現コンストラクトは、当技術分野で公知の技術を用いて、マウス胚性幹細胞の遺伝子組換えに使用することができる。通常、人工発現コンストラクトは、培養されたマウス胚性幹細胞に導入される。次に、形質転換されたES細胞を宿主母体由来の胚盤胞に注射し、宿主母体に宿主胚を再移植する。この操作によって、培養細胞株内に存在する胚性幹細胞と宿主胚内に存在する胚性幹細胞の両方に由来する細胞で構成された組織を有するキメラマウスが得られる。通常、遺伝子導入に使用される培養ES細胞を単離するためのマウスは、形質転換細胞が胚に注射される宿主マウスとは異なる毛色のマウスが選択される。したがって、キメラマウスは混色の毛色を有する。生殖細胞系組織の少なくとも一部が遺伝子組換え細胞に由来している場合、次にキメラマウスを適切な系統と交配することによって、導入遺伝子を有する子孫を得ることができる。

20

【0117】

前述の送達方法に加えて、標的細胞もしくは標的組織または動物の臓器、具体的には、哺乳脊椎動物の細胞、臓器または組織に人工発現コンストラクトを送達する別の方法として、ソノフォレーシス（例えば、米国特許第5,656,016号に記載されている超音波）；骨内注射（米国特許第5,779,708号）；マイクロチップデバイス（米国特許第5,797,898号）；眼科用製剤（Bourlais et al., Prog Retin Eye Res, 17(1):33-58, 1998）；経皮マトリックス（米国特許第5,770,219号および米国特許第5,783,208号）；フィードバック制御送達（米国特許第5,697,899号）、ならびに利用可能なその他の送達方法および／または本開示に別記するその他の送達方法が想定されている。

30

【0118】

(v) 使用方法

特定の実施形態において、本明細書に記載の生理活性成分を含む組成物は、対象に投与されて生理的作用をもたらす。

【0119】

特定の実施形態において、本開示は、組換え配列のエンハンサーの下流の位置にその一部または全体がコードされた異種遺伝子の発現を調節するための、本明細書に記載の人工発現コンストラクトの使用を含む。したがって、本明細書において、疾患、機能不全または障害の症状の予防、治療または緩和のための医薬品の調査、研究および将来的な開発において、本開示の人工発現コンストラクトを使用する方法が提供される。

40

【0120】

特定の実施形態は、人工発現コンストラクトを対象に投与することによって、ドーパミン作動性ニューロンにおいて遺伝子の発現を誘導する方法であって、前記人工発現コンストラクトが、本明細書に記載の、eHGT_888m、eHGT_897m、3xCore2-MGT_E51、eHGT_606h、MGT_E68、eHGT_889h、eHGT_1038m、eHGT_589m、eHGT_647m、eHGT_483m、3xcore4_eHGT_606h、3xcore5_eHGT_606h、3xcore_eHGT_1039h、3xCore_hTH、core4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888hおよび／もしくは3xcore1_eHGT_017m、ならびに／またはCN3406、CN3509、AiP1417、CN2436、AiP1240、CN3739、CN3889、CN2

50

839、CN2847、CN2431、CN3058、CN3059、CN3829、CN3283、CN3863、CN4365、CN4830および／もしくはCN3551を含むことを特徴とする方法を含む。前記対象は、単離された細胞、細胞のネットワーク、組織切片、実験動物、獣医学動物またはヒトであってもよい。

【0121】

医学分野においてよく知られているように、対象に投与される用量は、対象の身体の大ささ、表面積および年齢、投与される特定の化合物、性別、投与期間および投与経路、一般的な健康状態、併用投与中のその他の薬剤などの様々な要因に左右される。本開示の化合物の用量は様々に変動するが、特定の実施形態では、本開示の人工発現コンストラクトの用量は、 $10^5 \sim 10^{100}$ コピーであってもよい。特定の実施形態において、静脈内投与、脳実質内投与、脊髄内投与、後眼窩投与または髄腔内投与を受ける患者に対して、 $10^6 \sim 10^{22}$ コピーの人工発現コンストラクトを注入することができる。

10

【0122】

「有効量」は、対象において所望の生理的变化を起こさせるのに必要な組成物の量である。有効量は、研究目的で投与されることが多い。本明細書に開示された有効量は、動物モデル、ヒトでの研究、インビボアッセイまたはインビトロアッセイにおいて、統計学的に有意な効果を引き起こすことができる量である。

【0123】

「治療的処置」は、疾患の症状または徴候を示す対象に対して行われる処置を含み、疾患の徴候または症状を軽減または排除する目的で対象に行われる。治療的処置により、疾患の存在もしくは活性または疾患の原因を抑制、制御もしくは排除することができ、かつ／または疾患の副作用を抑制、制御もしくは排除することができる。特定の実施形態では、ドーパミン作動性ニューロンに対する治療用ペイロードとしての芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）を用いて治療を行ってもよい疾患として、パーキンソン病、パーキンソニズム型多系統萎縮症（MSA-P）、および芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）欠損症が挙げられる。ドーパミン作動性ニューロンの機能低下に関連するその他の病態（「ドーパミン作動性ニューロン関連疾患」とも呼ぶ）として、逆耐性統合失調症、レスキューナイハン症候群（LNS）、および注意欠陥多動性障害（ADHD）が挙げられる。

20

【0124】

特定の実施形態において、本開示の組成物の治療有効量の投与は、単回投与によって行ってもよく、例えば、投与を受ける対象に治療上の利点を提供するのに十分な数の発現コンストラクトを単回注射することによって行ってもよい。別の方法として、状況によっては、比較的短期間または比較的長期間にわたって、本開示の組成物を複数回投与または連続投与することが望ましい場合もある。

30

【0125】

特定の実施形態において、治療有効量を投与することによって、パーキンソン病の重症度が低下する。重症度の低下は、運動症状の測定、日常的な機能活動を行う能力の評価、および医薬品に対する症候性応答により判断される。パーキンソン病の重症度の決定は、数種類の評価尺度を使用して行われ、このような評価尺度として、統一パーキンソン病評価尺度（UPDRS）、ホーン・ヤールの重症度分類、およびシュワブ・イングランド日常生活活動スケールが挙げられる。

40

【0126】

発現コンストラクトの用量およびそのような組成物の投与期間は、本発明の教示の利点を理解している当業者によって決定される。しかし、本開示の組成物の有効量の投与は、単回投与により行ってもよいと考えられ、例えば、対象に効果を付与するのに十分な数の感染性粒子の単回注射により行ってもよい。別の方法として、状況によっては、比較的短期間または比較的長期間にわたって、人工発現コンストラクト組成物またはその他の遺伝子コンストラクトを複数回投与または連続投与することが望ましい場合があり、このような投与を行うかどうかの判断は、そのような組成物の投与を監視する担当者によって決定してもよい。例えば、哺乳動物に投与される感染性粒子の数は、意図した効果を達成する

50

のに必要な、 10^7 個/ml、 10^8 個/ml、 10^9 個/ml、 10^{10} 個/ml、 10^{11} 個/ml、 10^{12} 個/ml、 10^{13} 個/mlまたはそれ以上の用量の単回投与または2回以上の分割投与であってもよい。特定の実施形態において、実際には、所望の効果を得るために、2種以上の発現コンストラクトを組み合わせて投与することが望ましい場合もある。

【0127】

特定の状況では、人工発現コンストラクトは、ピペットを用いて、あるいは後眼窩注射、皮下投与、眼内投与、硝子体内投与、非経口投与、皮下投与、静脈内投与、脳実質内投与、脳室内投与、筋肉内投与、鞘内投与、脊髄内投与、腹腔内投与、経口投与、鼻孔吸入、または1個以上の細胞、組織もしくは臓器への直接投与もしくは直接注射によって、適切に製剤化された本明細書に開示の組成物の形態で送達することが望ましい。投与方法は、米国特許第5,543,158号；米国特許第5,641,515号および米国特許第5,399,363号に記載されている方法を含んでいてもよい。

【0128】

(vi) キットおよび市販用パッケージ

キットおよび市販用パッケージには、本明細書に記載の人工発現コンストラクトが含まれる。この人工発現コンストラクトは、単離することができる。特定の実施形態では、発現産物の各成分を互いに分離することができる。特定の実施形態では、発現産物は、ベクター内、ウイルスベクター内、細胞内、組織切片または組織試料内、および／またはトランスジェニック動物内に認められる。このようなキットは、1つ以上の試薬、制限酵素、ペプチド、治療薬、医薬品化合物、または本発明の組成物を送達するための手段（例えば、注射器や注射剤など）をさらに含んでいてもよい。

【0129】

キットまたは市販用パッケージの実施形態は、例えば、基礎研究、電気生理学的研究、神経解剖学的研究、ならびに／または障害、疾患もしくは病態の研究および／もしくは治療における、キットまたは市販用パッケージに含まれる成分の使用に関する説明書をさらに含む。

【0130】

以下の例示的な実施形態および実験例は、本開示の特定の実施形態を示すために記載されている。本開示を参照した当業者であれば、本明細書に開示された特定の実施形態に様々な変更を加えることができることを理解し、このような変更を加えたとしても、本開示の要旨および範囲から逸脱することなく、同様の結果または類似した結果が得られることも理解できるであろう。

【0131】

(vii) 例示的な実施形態

1. eHGT_606h、hTH、eHGT_1039h、eHGT_888m、eHGT_888h、MGT_E51および／またはeHGT_017mのコアを含む人工エンハンサー。
2. 前記コアが、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号83、配列番号85、配列番号90もしくは配列番号88、または配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号83、配列番号85、配列番号90もしくは配列番号88に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含む、実施形態1に記載の人工エンハンサー。
3. MGT_E51、eHGT_606h、eHGT_1039h、hTH、eHGT_888m、eHGT_888hおよび／またはeHGT_017mを、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、実施形態1または2に記載の人工エンハンサー。
4. 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号83、配列番号85、配列番号90および／もしくは配列番号88に示される配列、または配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号83、配列番号85、配列番号90および／もしくは配列番号88に示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コ

ピー含む、実施形態1～3のいずれか1つに記載の人工エンハンサー。

5. 配列番号2を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、実施形態1～4のいずれか1つに記載の人工エンハンサー。

6. 配列番号4を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、実施形態1～4のいずれか1つに記載の人工エンハンサー。

7. 配列番号6を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、実施形態1～4のいずれか1つに記載の人工エンハンサー。

8. 配列番号8を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、実施形態1～4のいずれか1つに記載の人工エンハンサー。

9. 配列番号83を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、実施形態1～4のいずれか1つに記載の人工エンハンサー。

10. 配列番号85を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、実施形態1～4のいずれか1つに記載の人工エンハンサー。

11. 配列番号90を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、実施形態1～4のいずれか1つに記載の人工エンハンサー。

12. 配列番号88を、1コピー、2コピー、3コピー、4コピー、5コピー、6コピー、7コピー、8コピー、9コピーまたは10コピー含む、実施形態1～4のいずれか1つに記載の人工エンハンサー。

13. 配列番号2を3コピー含む、実施形態5に記載の人工エンハンサー。

14. 配列番号4を3コピー含む、実施形態6に記載の人工エンハンサー。

15. 配列番号6を3コピー含む、実施形態7に記載の人工エンハンサー。

16. 配列番号8を3コピー含む、実施形態8に記載の人工エンハンサー。

17. 配列番号83を3コピー含む、実施形態9に記載の人工エンハンサー。

18. 配列番号83を1コピー含む、実施形態9に記載の人工エンハンサー。

19. 配列番号85を3コピー含む、実施形態10に記載の人工エンハンサー。

20. 配列番号90を3コピー含む、実施形態11に記載の人工エンハンサー。

21. 配列番号88を3コピー含む、実施形態12に記載の人工エンハンサー。

22. 配列番号3に示される配列を含む、実施形態13に記載の人工エンハンサー。

23. 配列番号5に示される配列を含む、実施形態14に記載の人工エンハンサー。

24. 配列番号7に示される配列を含む、実施形態15に記載の人工エンハンサー。

25. 配列番号9に示される配列を含む、実施形態16に記載の人工エンハンサー。

26. 配列番号84に示される配列を含む、実施形態17に記載の人工エンハンサー。

27. 配列番号86に示される配列を含む、実施形態19に記載の人工エンハンサー。

28. 配列番号91に示される配列を含む、実施形態20に記載の人工エンハンサー。

29. 配列番号89に示される配列を含む、実施形態21に記載の人工エンハンサー。

30. 人工発現コンストラクトであって、

(i) eHGT_888m、eHGT_897m、3xCore2-MGT_E51、eHGT_606h、MGT_E68、eHGT_889h、eHGT_1038m、eHGT_589m、eHGT_647m、eHGT_483m、3xcore4_eHGT_606h、3xcore5_eHGT_606h、3xcore_eHGT_1039h、3xCore_hTH、core4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888hおよび3xcore1_eHGT_017mから選択されるエンハンサー；

(ii) プロモーター（例えば、最小プロモーター）；ならびに

(iii) 異種コード配列

10

20

30

40

50

を含む、人工発現コンストラクト。

31. 前記異種コード配列が、エフェクターエレメントまたは発現可能なエレメントをコードする、実施形態30に記載の人工発現コンストラクト。

32. 前記エフェクターエレメントが、レポータータンパク質または機能性分子を含む、実施形態30または31に記載の人工発現コンストラクト。

33. 前記レポータータンパク質が、蛍光タンパク質である、実施形態32に記載の人工発現コンストラクト。

34. 前記機能性分子が、機能性イオントランスポーター、機能性酵素、機能性転写因子、機能性受容体、機能性膜タンパク質、機能性細胞輸送タンパク質、機能性シグナル伝達分子、機能性神経伝達物質、機能性カルシウムレポーター、機能性チャンネルロドプシン、機能性CRISPR/Cas分子、機能性editase、機能性ガイドRNA分子、機能性マイクロRNA、機能性相同組換えドナーカセット、またはデザイナー薬剤のみで活性化される機能性デザイナー受容体（DREADD）である、実施形態32に記載の人工発現コンストラクト。

35. 前記発現可能なエレメントが、非機能性分子を含む、実施形態31に記載の人工発現コンストラクト。

36. 前記非機能性分子が、非機能性イオントランスポーター、非機能性酵素、非機能性転写因子、非機能性受容体、非機能性膜タンパク質、非機能性細胞輸送タンパク質、非機能性シグナル伝達分子、非機能性神経伝達物質、非機能性カルシウムレポーター、非機能性チャンネルロドプシン、非機能性CRISPR/Cas分子、非機能性editase、非機能性ガイドRNA分子、非機能性マイクロRNA、非機能性相同組換えドナーカセット、またはデザイナー薬剤のみで活性化される非機能性デザイナー受容体（DREADD）である、実施形態35に記載の人工発現コンストラクト。

37. 血液脳関門を通過するカプシドに関連している、実施形態30～36のいずれか1つに記載の人工発現コンストラクト。

38. 前記カプシドが、PHP.eB、AAV-BR1、AAV-PHP.S、AAV-PHP.BまたはAAV-PPSである、実施形態37に記載の人工発現コンストラクト。

39. スキッピングエレメントを含むか、またはスキッピングエレメントをコードする、実施形態30～38のいずれか1つに記載の人工発現コンストラクト。

40. 前記スキッピングエレメントが、2Aペプチドおよび／または内部リボソーム導入部位（IRES）である、実施形態39に記載の人工発現コンストラクト。

41. 前記2Aペプチドが、T2A、P2A、E2AまたはF2Aである、実施形態40に記載の人工発現コンストラクト。

42. eHGT_888m、eHGT_897m、3xCore2-MGT_E51、eHGT_606h、MGT_E68、eHGT_889h、eHGT_1038m、eHGT_589m、eHGT_647m、eHGT_483m、3xcore4_eHGT_606h、3xcore5_eHGT_606h、3xcore_eHGT_1039h、3xCore_hTH、core4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888h、3xcore1_eHGT_017m、hsA2、AAV、scAAV、rAAV、pAAV、minBglobin、CMV、minCMV、minRho、minRho*、蛍光タンパク質（例えば、EGFP、SYFP2、GFP）、Cre、iCre、dgCre、FlpO、tTA2、SP10（例えば、3xSP10）、タグカセット、10aa、核移行タンパク質、WPRE、WPRE3、hGHpAおよび／またはBGHpAから選択される一連の特徴を含むか、またはこれらから選択される一連の特徴をコードする、実施形態30～41のいずれか1つに記載の人工発現コンストラクト。

43. eHGT_888m-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント]；

eHGT_897m-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント]；

3xCore2-MGT_E51-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント]；

eHGT_606h-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント]；

MGT_E68-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント]；

eHGT_889h-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント]；

eHGT_1038m-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント]；

eHGT_589m-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント]；

eHGT_647m-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
eHGT_483m-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
3xcore4_eHGT_606h-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
3xcore5_eHGT_606h-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
3xcore_eHGT_1039h-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
3xCore_hTH-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
core4_eHGT_888m-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
3Xcore4_eHGT_888m-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
3Xcore4_eHGT_888h-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
3xcore1_eHGT_017m-minBglobin-[異種コード配列]-[転写後調節エレメント];
eHGT_888m-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA;
eHGT_897m-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA;
3xCore2-MGT_E51-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA;
eHGT_606h-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA;
MGT_E68-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-hGHPA;
eHGT_889h-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA;
eHGT_1038m-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA;
eHGT_589m-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA;
eHGT_647m-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA;
eHGT_483m-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA;
3xcore4_eHGT_606h-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA;
3xcore5_eHGT_606h-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA;
3xcore_eHGT_1039h-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA;
3xCore_hTH-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA;
core4_eHGT_888m-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA;
3Xcore4_eHGT_888m-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA;
3Xcore4_eHGT_888h-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA; および
3xcore1_eHGT_017m-minBglobin-[異種コード配列]-WPRES-BGHPA
から選択される一連の特徴を含むか、またはこれらから選択される一連の特徴をコードする、実施形態30~42のいずれか1つに記載の人工発現コンストラクト。
44. 実施形態30~43のいずれか1つに記載の人工発現コンストラクトを含むベクター。
45. ウイルスベクターである、実施形態44に記載のベクター。
46. 前記ウイルスベクターが、組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである、実施形態44または45に記載のベクター。
47. アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターであって、少なくとも1つの異種コード配列を含み、該異種コード配列が、eHGT_888m、eHGT_897m、eHGT_606h、3xCore2-MGT_E51、MGT_E68、eHGT_889h、eHGT_1038m、eHGT_589m、eHGT_647m、eHGT_483m、3xcore4_eHGT_606h、3xcore5_eHGT_606h、3xcore_eHGT_1039h、3xCore_hTH、core4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888m、3Xcore4_eHGT_888hおよび3xcore1_eHGT_017mから選択されるエンハンサーおよびプロモーターの転写制御下にある、AAVベクター。
48. 前記異種コード配列が、エフェクターエレメントまたは発現可能なエレメントをコードする、実施形態47に記載のAAVベクター。
49. 前記エフェクターエレメントが、レポータータンパク質または機能性分子を含む、実施形態48に記載のAAVベクター。
50. 前記レポータータンパク質が、蛍光タンパク質である、実施形態49に記載のAAVベクター。
51. 前記機能性分子が、機能性イオントランスポーター、機能性酵素、機能性転写因子、機能性受容体、機能性膜タンパク質、機能性細胞輸送タンパク質、機能性シグナル伝達分子、機能性神経伝達物質、機能性カルシウムレポーター、機能性チャネルロドプシン、

10

20

30

40

50

機能性CRISPR/Cas分子、機能性editase、機能性ガイドRNA分子、機能性マイクロRNA、機能性相同組換えドナーカセット、またはデザイナー薬剤のみで活性化される機能性デザイナー受容体（DREADD）である、実施形態49に記載のAAVベクター。

52. 前記発現可能なエレメントが、非機能性分子を含む、実施形態48に記載のAAVベクター。

53. 前記非機能性分子が、非機能性イオントランスポーター、非機能性酵素、非機能性転写因子、非機能性受容体、非機能性膜タンパク質、非機能性細胞輸送タンパク質、非機能性シグナル伝達分子、非機能性神経伝達物質、非機能性カルシウムレポーター、非機能性チャンネルロドプシン、非機能性CRISPR/Cas分子、非機能性editase、非機能性ガイドRNA分子、非機能性マイクロRNA、非機能性相同組換えドナーカセット、またはデザイナー薬剤のみで活性化される非機能性デザイナー受容体（DREADD）である、実施形態52に記載のAAVベクター。

10

54. 先行する実施形態のいずれか1つに記載の発現コンストラクトまたはベクターを含むトランスジェニック細胞。

55. ドーパミン作動性ニューロンである、実施形態54に記載のトランスジェニック細胞。

56. マウス細胞、ヒト細胞または非ヒト霊長類細胞である、実施形態54または55に記載のトランスジェニック細胞。

57. 先行する実施形態のいずれか1つに記載の人工発現コンストラクト、ベクターまたはトランスジェニック細胞を含む非ヒトトランスジェニック動物。

20

58. マウスまたは非ヒト霊長類である、実施形態57に記載の非ヒトトランスジェニック動物。

59. 先行する実施形態のいずれか1つに記載の発現コンストラクト、ベクターまたはトランスジェニック細胞を含む投与可能な組成物。

60. 先行する実施形態のいずれか1つに記載の人工発現コンストラクト、ベクター、トランスジェニック細胞、トランスジェニック動物および／または投与可能な組成物を含むキット。

61. インビボまたはインビトロにおいて、標的細胞集団内で遺伝子を発現させる方法であって、

標的細胞集団を含む試料または対象に、実施形態59に記載の投与可能な組成物を十分な用量と十分な期間で提供することによって、前記標的細胞集団内で遺伝子を発現させる工程を含む、方法。

30

62. 前記遺伝子が、エフェクターエレメントまたは発現可能なエレメントをコードする、実施形態61に記載の方法。

63. 前記エフェクターエレメントが、レポータータンパク質または機能性分子を含む、実施形態62に記載の方法。

64. 前記レポータータンパク質が蛍光タンパク質である、実施形態63に記載の方法。

65. 前記機能性分子が、機能性イオントランスポーター、機能性酵素、機能性転写因子、機能性受容体、機能性膜タンパク質、機能性細胞輸送タンパク質、機能性シグナル伝達分子、機能性神経伝達物質、機能性カルシウムレポーター、機能性チャンネルロドプシン、機能性CRISPR/Cas分子、機能性editase、機能性ガイドRNA分子、機能性マイクロRNA、機能性相同組換えドナーカセット、またはデザイナー薬剤のみで活性化される機能性デザイナー受容体（DREADD）である、実施形態63に記載の方法。

40

66. 前記発現可能なエレメントが、非機能性分子を含む、実施形態62に記載の方法。

67. 前記非機能性分子が、非機能性イオントランスポーター、非機能性酵素、非機能性転写因子、非機能性受容体、非機能性膜タンパク質、非機能性細胞輸送タンパク質、非機能性シグナル伝達分子、非機能性神経伝達物質、非機能性カルシウムレポーター、非機能性チャンネルロドプシン、非機能性CRISPR/Cas分子、非機能性editase、非機能性ガイドRNA分子、非機能性マイクロRNA、非機能性相同組換えドナーカセット、またはデザイナー薬剤のみで活性化される非機能性デザイナー受容体（DREADD）である、実施形態66に記載の方法。

50

68. 前記提供工程が、ピペッティングを含む、実施形態61～67のいずれか1つに記載の方法。

69. 前記ピペッティングが脳切片に対して行われる、実施形態68に記載の方法。

70. 前記脳切片が、中脳であるか、または中脳に由来するものである、実施形態69に記載の方法。

71. 前記脳切片が、ドーパミン作動性ニューロンを含む、実施形態69または70に記載の方法。

72. 前記脳切片が、マウス、ヒトまたは非ヒト霊長類の脳切片である、実施形態69～71のいずれか1つに記載の方法。

73. 前記提供工程が、生体対象への投与を含む、実施形態68～72のいずれか1つに記載の方法。

74. 前記生体対象が、ヒト、非ヒト霊長類またはマウスである、実施形態73に記載の方法。

75. 前記生体対象への投与が、注射により行われる、実施形態73または74に記載の方法。

76. 前記注射が、静脈内注射、脳組織への脳実質内注射、脳室内（ICV）注射、大槽内（ICM）注射または髄腔内注射である、実施形態75に記載の方法。

77. ドーパミン作動性ニューロン関連疾患の治療の開発またはドーパミン作動性ニューロン関連疾患の治療に使用される、実施形態61～76のいずれか1つに記載の方法。

78. 前記ドーパミン作動性ニューロン関連疾患が、パーキンソン病、パーキンソニズム型多系統萎縮症（MSA-P）、芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）欠損症、逆耐性統合失調症、レッシュ-ナイハン症候群（LNS）、および注意欠陥多動性障害（ADHD）を含む、実施形態77に記載の方法。

79. 前記遺伝子が、芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）をコードする、実施形態77または78に記載の方法。

80. 前記ドーパミン作動性ニューロン関連疾患が、パーキンソン病、パーキンソニズム型多系統萎縮症（MSA-P）、または芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）欠損症を含む、実施形態77～79のいずれか1つに記載の方法。

81. 前記遺伝子が、芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）をコードし、前記ドーパミン作動性ニューロン関連疾患が、パーキンソン病、パーキンソニズム型多系統萎縮症（MSA-P）、または芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素（AADC）欠損症を含む、実施形態77～80のいずれか1つに記載の方法。

82. 前記ドーパミン作動性ニューロン関連疾患が、パーキンソン病を含み、前記治療によって、パーキンソン病の症状が緩和または排除される、実施形態77～81のいずれか1つに記載の方法。

83. 前記パーキンソン病の症状の緩和または排除が、統一パーキンソン病評価尺度（UPDRS）、ホーン・ヤールの重症度分類、またはシュワブ・イングランド日常生活活動スケールによって測定される、実施形態82に記載の方法。

84. CN3406、CN3509、AiP1417、CN2436、AiP1240、CN3739、CN3889、CN2839、CN2847、CN2431、CN3058、CN3059、CN3829、CN3283、CN3863、CN4365、CN4830またはCN3551を含む人工発現コンストラクト。

【0132】

(viii) 結語

本明細書で提供する核酸配列およびアミノ酸配列は、米国特許法施行規則37 C.F.R.規則1.831～1.835に規定され、WIPO標準ST.26（2022年7月1日に発効）にも示されているような、ヌクレオチド塩基およびアミノ酸残基に用いられる略号で示されている。各核酸配列に対して1種類の鎖のみを示しているが、その相補鎖が適切である場合、その相補鎖も実施形態に含まれる。

【0133】

本明細書に開示された配列および引用された配列のバリエーションも本願に含まれる。生物

10

20

30

40

50

学的活性を失うことなく、どのアミノ酸残基を置換、挿入あるいは欠失できるのかということ判断するための指標は、当技術分野でよく知られているコンピュータプログラム、例えば、DNASTARTMソフトウェア（米国ウィスコンシン州マディソン）を使用して見出すことができる。本明細書に開示されたタンパク質バリエーションのアミノ酸変化は保存的アミノ酸変化であることが好ましく、すなわち、電荷が同程度のアミノ酸同士の置換または非電荷のアミノ酸同士の置換であることが好ましい。保存的アミノ酸変化には、側鎖が関連するアミノ酸ファミリーのメンバーによる置換が含まれる。

【0134】

ペプチドまたはタンパク質におけるアミノ酸の適切な保存的置換は当業者に公知であり、通常、最終的に得られる分子の生物学的活性を変えないことなく、このような保存的置換を行うことができる。当業者であれば、通常、ポリペプチドの重要でない領域の1個のアミノ酸を置換しても、生物学的活性は実質的に変化しないことを熟知しているであろう（例えば、Watson et al. *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224を参照されたい）。天然のアミノ酸は、通常、保存的置換ファミリーに分類され、具体的には、第1群：アラニン（Ala）、グリシン（Gly）、セリン（Ser）およびトレオニン（Thr）；第2群：（酸性）：アスパラギン酸（Asp）およびグルタミン酸（Glu）；第3群：（酸性；極性を持つ負電荷残基およびそれらのアミドとしても分類される）：アスパラギン（Asn）、グルタミン（Gln）、AspおよびGlu；第4群：GlnおよびAsn；第5群：（塩基性；極性を持つ正電荷残基としても分類される）：アルギニン（Arg）、リシン（Lys）およびヒスチジン（His）；第6群（大型脂肪族非極性残基）：イソロイシン（Ile）、ロイシン（Leu）、メチオニン（Met）、バリン（Val）およびシステイン（Cys）；第7群（極性無電荷）：チロシン（Tyr）、Gly、Asn、Gln、Cys、SerおよびThr；第8群（大型芳香族残基）：フェニルアラニン（Phe）、トリプトファン（Trp）およびTyr；第9群（非極性）：プロリン（Pro）、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、MetおよびTrp；第11群（脂肪族）：Gly、Ala、Val、LeuおよびIle；第10群（非極性の小型脂肪族残基またはわずかに極性を持つ小型脂肪族残基）：Ala、Ser、Thr、ProおよびGly；ならびに第12群（硫黄含有残基）：MetおよびCysに分類される。さらなる情報は、Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman and Companyに記載されている。

【0135】

そのような変化を加える際に、アミノ酸の疎水性指標を考慮に入れてもよい。タンパク質上で相互に作用する生物学的機能を付与する際に、アミノ酸の疎水性指標が重要であることは、当技術分野で広く理解されている（Kyte and Doolittle, 1982, *J. Mol. Biol.* 157(1), 105-32）。各アミノ酸は、その疎水性と電荷特性に基づいて疎水性指標が割り当てられている（KyteおよびDoolittle, 1982）。各アミノ酸の疎水性指標は、Ile (+4.5)；Val (+4.2)；Leu (+3.8)；Phe (+2.8)；Cys (+2.5)；Met (+1.9)；Ala (+1.8)；Gly (-0.4)；Thr (-0.7)；Ser (-0.8)；Trp (-0.9)；Tyr (-1.3)；Pro (-1.6)；His (-3.2)；グルタミン酸 (-3.5)；Gln (-3.5)；アスパラギン酸 (-3.5)；Asn (-3.5)；Lys (-3.9)；およびArg (-4.5)となっている。

【0136】

同程度の疎水性指標または疎水度を有する別のアミノ酸で特定のアミノ酸を置換しても、類似した生物学的活性を有するタンパク質が得られ、すなわち、生物学的に同等の機能性を有するタンパク質が得られることは当技術分野でよく知られている。そのような変化を加える場合、疎水性指標が±2の範囲内のアミノ酸同士の置換が好ましく、疎水性指標が±1の範囲内のアミノ酸同士の置換が特に好ましく、疎水性指標が±0.5の範囲内のアミノ酸同士の置換がさらに特に好ましい。さらに、類似のアミノ酸同士の置換は、親水性に基づいて効果的に行えることも当技術分野でよく知られている。

【0137】

米国特許第4,554,101号に詳しく述べられているように、各アミノ酸残基には親水性

値が割り当てられており、各アミノ酸残基の親水性値は、Arg (+3.0) ; Lys (+3.0) ; アスパラギン酸 (+3.0±1) ; グルタミン酸 (+3.0±1) ; Ser (+0.3) ; Asn (+0.2) ; Gln (+0.2) ; Gly (0) ; Thr (-0.4) ; Pro (-0.5±1) ; Ala (-0.5) ; His (-0.5) ; Cys (-1.0) ; Met (-1.3) ; Val (-1.5) ; Leu (-1.8) ; Ile (-1.8) ; Tyr (-2.3) ; Phe (-2.5) ; Trp (-3.4) となっている。同程度の親水性値を有する別のアミノ酸で特定のアミノ酸を置換することができ、このような置換を行っても、生物学的に同等のタンパク質が得られ、特に、免疫学的に同等のタンパク質が得られることはよく知られている。そのような変化を加える場合、親水性値が±2の範囲内のアミノ酸同士の置換が好ましく、親水性値が±1の範囲内のアミノ酸同士の置換が特に好ましく、親水性値が±0.5の範囲内のアミノ酸同士の置換がさらに特に好ましい。

10

【0138】

先に概説したように、アミノ酸置換は、アミノ酸側鎖の置換基の相対的な類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、大きさなどに基づいて行ってもよい。

【0139】

本明細書に別記するように、遺伝子配列のバリエーションには、コドン最適化バリエーション、配列多型、スプライスバリエーション、および／またはコードされた産物の機能に統計学的に有意な影響を与えない変異が含まれる。

【0140】

本明細書に開示したタンパク質、核酸および遺伝子配列のバリエーションには、本明細書に開示されたタンパク質、核酸または遺伝子配列と少なくとも70%の配列同一性、少なくとも80%の配列同一性、少なくとも85%の配列同一性、少なくとも90%の配列同一性、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも96%の配列同一性、少なくとも97%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性または少なくとも99%の配列同一性を有する配列も含まれる。

20

【0141】

「配列同一性 (%)」は、配列同士を比較することによって測定された2つ以上の配列の関係性を指す。当技術分野において、「同一性」は、タンパク質配列鎖間、核酸配列鎖間または遺伝子配列鎖間のマッチングによって測定された、タンパク質配列同士、核酸配列同士または遺伝子配列同士の関連性の程度も意味する。「同一性」(「類似性」と呼ぶことも多い)は、公知の方法により容易に計算することができ、このような方法として、Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, NY (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, NY (1994); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.) Humana Press, NJ (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (Von Heijne, G., ed.) Academic Press (1987); および Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.) Oxford University Press, NY (1992)に記載のものが挙げられる。同一性の測定方法としては、試験した配列間でベストマッチが得られるように設計されたものが好ましい。同一性および類似性の測定方法は、公的に利用可能なコンピュータプログラムにおいて体系化されている。配列アラインメントと同一性の計算は、バイオインフォマティクス計算ソフトウェアであるLASERGENEスイートに含まれるMegalignプログラム(DNASTAR社、ウィスコンシン州マディソン)を用いて行ってもよい。配列のマルチプルアラインメントは、Clustal形式のアライメント法を用いて行うこともできる(Higgins and Sharp CABIOS, 5, 151-153 (1989)、デフォルトパラメータ(ギャップペナルティ=10、ギャップ長ペナルティ=10)を使用)。関連するプログラムとして、さらに、GCGプログラムスイート(Wisconsinパッケージバージョン9.0、Genetics Computer Group (GCG)、ウィスコンシン州マディソン); BLASTP、BLASTN、BLASTX (Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)); DNASTAR (DNASTAR社、ウィスコンシン州マディソン); および Smith-Waterman アルゴリズムが組み込まれたFASTAプログラム (Pearson, Comput. Methods Ge

30

40

50

nome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994), Meeting Date 1992, 111-20. Editor(s): Suhai, Sandor. Publisher: Plenum, New York, N.Y.) が挙げられる。本開示において、配列分析ソフトウェアを分析に使用した場合、分析結果は、プログラムの基準となる「デフォルト値」に基づく解釈される。本明細書において、「デフォルト値」は、ソフトウェアの初期化時に、ソフトウェアにあらかじめ登録されている一連の数値またはパラメータを意味する。

【0142】

バリエーションには、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、本明細書に開示された配列にハイブリダイズし、参照配列と同じ機能を持つ核酸分子も含まれる。例示的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には、50%ホルムアミド、5×SSC (750mM NaCl, 75mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム (pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%硫酸デキストランおよび断片処理済み20μg/ml変性サケ精子DNAを含む溶液中において42℃で一晩インキュベーションした後に、0.1×SSCを用いて50℃でフィルターを洗浄することが含まれる。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーの変更およびシグナル検出の変更は、主に、ホルムアミドの濃度（ホルムアミドの割合を低くすると、ストリンジェンシーが低くなる）、塩条件または温度を調節することによって行われる。例えば、中程度に高いストリンジェントな条件には、6×SSPE (20×SSPE=3M NaCl; 0.2M NaH₂PO₄; 0.02M EDTA、pH 7.4)、0.5% SDS、30%ホルムアミド、100μg/mlブロッキング用サケ精子DNAを含む溶液中において37℃で一晩インキュベーションした後に、1×SSPEと0.1% SDSを用いて50℃で洗浄することが含まれる。さらに、さらに低いストリンジェンシーは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション後の洗浄を高い塩濃度（例えば5×SSC）で行うことによって達成される。前述の条件は、ハイブリダイゼーション実験のバックグラウンドを低下させるために使用される別のブロッキング試薬を添加し、かつ／またはこのような別のブロッキング試薬に置き換えることによって様々に変更することができる。一般的なブロッキング試薬として、デンハルト試薬、BLOTTO、ヘパリン、変性サケ精子DNAおよび市販の専売製剤が挙げられる。特定のブロッキング試薬を添加する場合、適合性の問題により、前述のハイブリダイゼーション条件を一部変更することが必要になる場合がある。

【0143】

「コンカテマー化する」という用語は、広い意味で使用され、鎖状に連結することまたは一続きに連結することを意味する。この用語は、複数のヌクレオチド配列を連結して単一のヌクレオチド配列を得ること、または複数のアミノ酸配列を連結して単一のアミノ酸配列を得ることについて述べる際に使用される。また、「コンカテメライズ」は、「コンカテマー化」を指すと解釈される。

【0144】

当業者であれば理解できるように、本明細書に開示された各実施形態は、記載された特定の構成要素、工程、材料または成分を含むか、実質的にこれらからなるか、またはこれらからなる。したがって、「含む」または「含んでいる」という用語は、「含むか、実質的に～からなるか、または～からなる」という意味を有すると解釈すべきである。「含む」という移行句は、その量が多くても、記載されていない構成要素、工程、材料または成分が含まれていることを意味するが、これに限定されない。「からなる」という移行句は、記載されていないあらゆる構成要素、工程、材料または成分を除外する。「実質的に～からなる」という移行句は、記載された構成要素、工程、材料または成分、および実施形態に重大な影響を及ぼさない構成要素、工程、材料または成分に実施形態の範囲を限定する。重大な影響とは、本明細書に開示された人工発現コンストラクトを使用したドーパミン作動性ニューロンにおいて、標的とする発現が統計学的に有意に低下する影響である。

【0145】

特定の実施形態において、「人工」は天然物ではないことを意味する。

【0146】

別段の記載がない限り、本明細書および請求項において、分子量や反応条件などの、材

10

20

30

40

50

料の量や特性を表すあらゆる数値は、あらゆる場合において、「約」という用語で修飾されていると解釈される。したがって、別段の記載がない限り、本明細書および添付の請求項に記載の数値パラメータは、本発明により得ようとする所望の特性に応じて変動する近似値である。請求項に記載の範囲と等価の原則の適用範囲を限定するものではないが、各数値パラメータは、少なくとも、報告された有効数字の数値に照らして、かつ通常の端数処理を行うことによって解釈されるべきである。さらに明確に述べれば、「約」という用語は、記載の数値または範囲とともに使用された場合、当業者によって合理的に解釈される意味を有し、すなわち、記載の数値の $\pm 20\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 19\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 18\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 17\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 16\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 15\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 14\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 13\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 12\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 11\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 10\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 9\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 8\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 7\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 6\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 5\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 4\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 3\%$ の範囲；記載の数値の $\pm 2\%$ の範囲；または記載の数値の $\pm 1\%$ の範囲で、記載の数値または範囲よりもある程度多いまたは少ないことを示す。

10

【0147】

広範な本発明の範囲を示す数値範囲およびパラメータは、近似値および近似範囲であるものの、具体例に記載された数値は、可能な限り正確に報告している。しかし、すべての数値は、各試験用測定に付随する標準偏差により必然的に生じる特定の誤差を本質的に含んでいる。

20

【0148】

本発明の説明において（特に以下の請求項の説明において）使用されている「a」、「an」、「the」およびこれらに類似した指示語は、別段の記載がない限り、または文脈上別の意味が明示されていない限り、単数ものも複数ものも包含すると解釈される。本明細書に記載の数値範囲は、その数値範囲に含まれる各数値を個別に指す簡略的な方法であることを意図している。別段の記載がない限り、各数値は、あたかも個別に本明細書に記載されているかのように、本明細書に記載されている。別段の記載がない限り、または文脈上別の意味が明示されていない限り、本明細書に記載の方法はいずれも任意の適切な順序で実施することができる。本明細書で提供されるあらゆる例示の使用、または例示を示す言語（例えば「など」）は、本発明を詳しく説明することのみを目的としたものであり、請求項に記載の本発明の範囲を限定するものではない。本明細書に記載の用語は、本発明の実施に必須の、請求項に記載されていない構成要素を示していると解釈すべきではない。

30

【0149】

本明細書に開示された本発明のその他の構成要素の群分けまたは本発明の様々な実施形態の群分けは、本発明を限定するものであると解釈すべきではない。各群のメンバーは、本明細書または請求項に個別に記載されていてもよく、本明細書に記載の群のその他のメンバーまたはその他の構成要素と組み合わせて本明細書または請求項に記載されていてもよい。便宜上および／または特許性の理由で、ある群の1つ以上のメンバーを別の群に加えてもよく、あるいは、ある群から1つ以上のメンバーを削除してもよいことが予想される。そのような付加や削除を行う場合、本明細書は、添付の請求項に記載のすべてのマーカッシュ群の説明を充足するように構成された群を含む。

40

【0150】

本発明の特定の実施形態を本明細書に記載しており、これには、本発明の実施に際して本発明者らが最良の形態であると認識している実施形態が含まれている。当然のことながら、当業者であれば、前述の詳細な説明を熟読することにより、本明細書に記載の実施形態を様々に変更できることを容易に理解できるであろう。本発明者らは、当業者がこのような変形例を適宜採用することができると予想しており、本明細書に具体的に記載された態様以外の態様で本発明が実施されることも意図している。したがって、本発明は、準抛法の範囲内で可能な限り、添付の請求項に記載の本発明の主題からのあらゆる変更および

50

本発明の主題のあらゆる等価物を含む。さらに、別段の記載がない限り、または文脈上別の意味が明示されていない限り、あらゆる変形例における前述の構成要素のあらゆる組み合わせも本発明に含まれる。

【0151】

さらに、本明細書を通して、様々な特許、刊行物、雑誌記事およびその他の文書（本明細書の引用文献）を引用している。本明細書において引用された各文献は、本明細書の一部を構成するものとして、その引用された教示が引用により本明細書に個別に援用される。

【0152】

最後に、本明細書に開示された本発明の実施形態は、本発明の原理を説明するものであると解釈される。本発明の範囲内で、その他の変更を採用してもよい。したがって、一例として、本明細書の教示に従って、本発明の別の構成を使用してもよいが、これに限定されない。したがって、本発明は、本明細書中に示したものおよび記載したものに厳密に限定されるものではない。

【0153】

本明細書に記載の詳細は一例であり、本発明の好ましい実施形態を例示することのみを目的としており、最も有用なものであると考えられるものを提供するため、かつ本発明の様々な実施形態の原理と概念上の態様を容易に理解できるものするために提示している。この点に関して、本発明の基本的な理解に必要な情報よりも詳しく本発明の構造の詳細を説明することはしておらず、当業者であれば、図面および／または実施例を参照しながら本発明の説明を熟読することによって、本発明のいくつかの形態をどのようにして実際に具現化すればよいのかを容易に理解できるであろう。

【0154】

本開示において用いられる定義および説明は、以下の実施例において明白かつ明確な変更が加えられない限り、あるいは用語の意味によって解釈が意味をなさなくなったり、実質的に意味なさなくなる場合を除いて、将来的な解釈を制御することが意図されている。用語の解釈から用語の定義が意味をなしていなかったり、実質的に意味をなしていない場合は、ウェブスター辞典（第3版）またはOxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Ed. Anthony Smith, Oxford University Press, Oxford, 2004)などの当業者に公知の辞書から用語の定義を引用されたい。

10

20

30

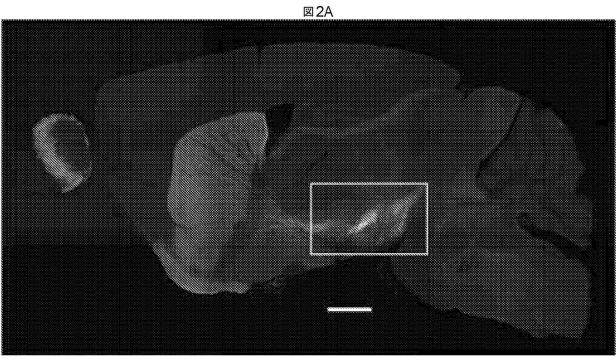
40

50

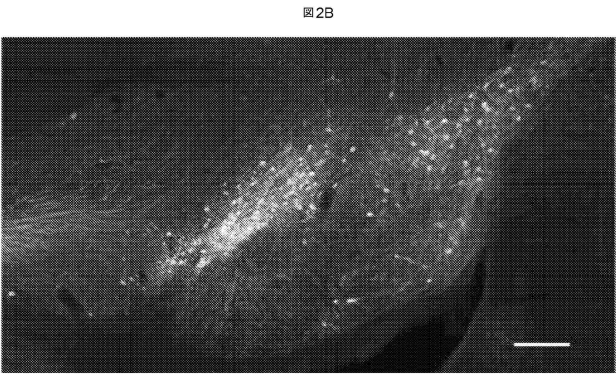
【図面】
【図 1】



【図 2】

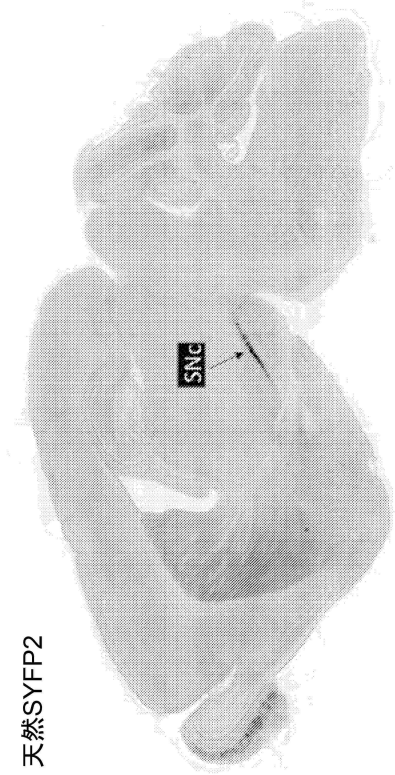


10



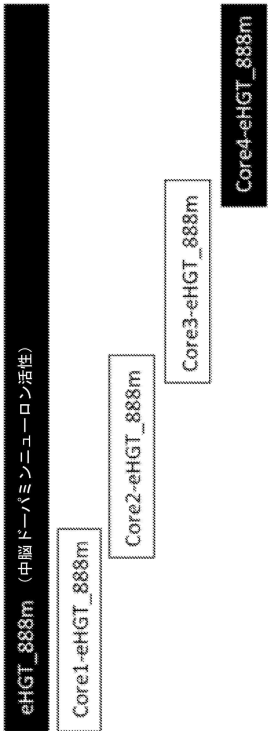
20

【図 3 A】



天然SYFP2

【図 3 B】

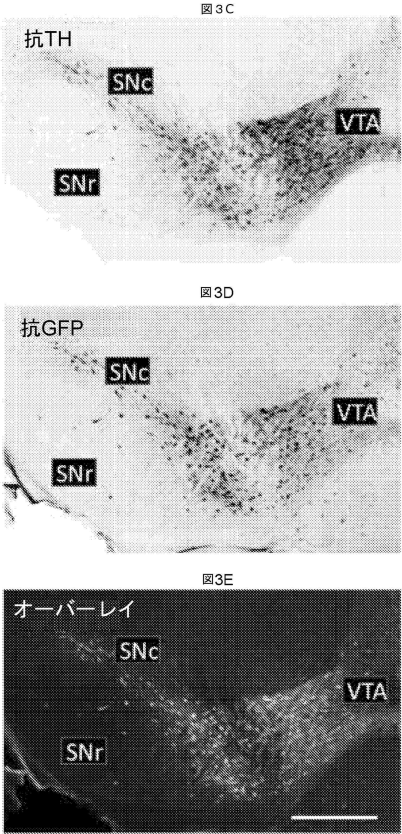


30

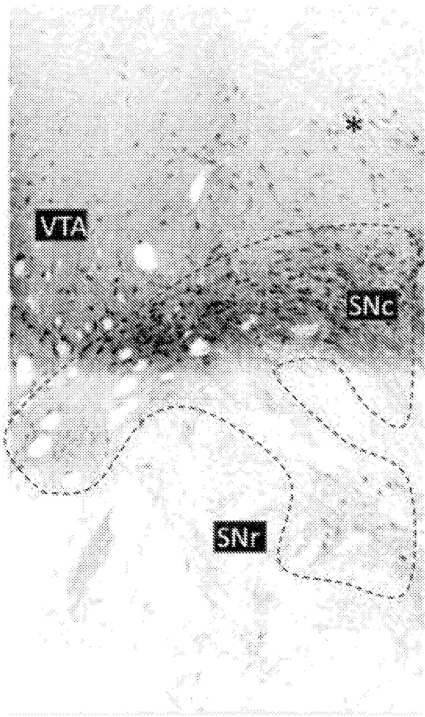
40

50

【図 3 C - E】



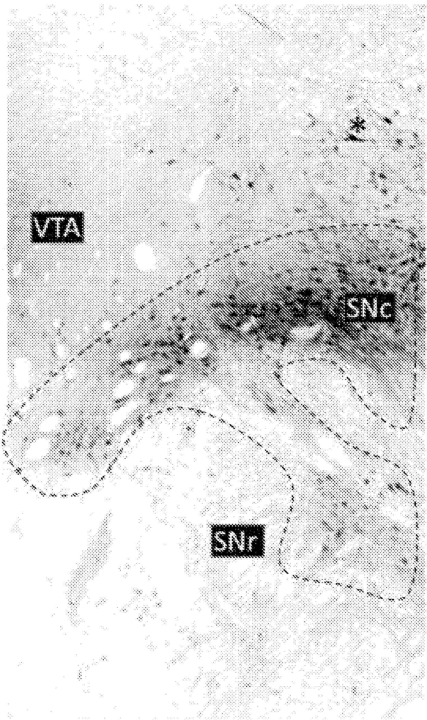
【図 4 A】



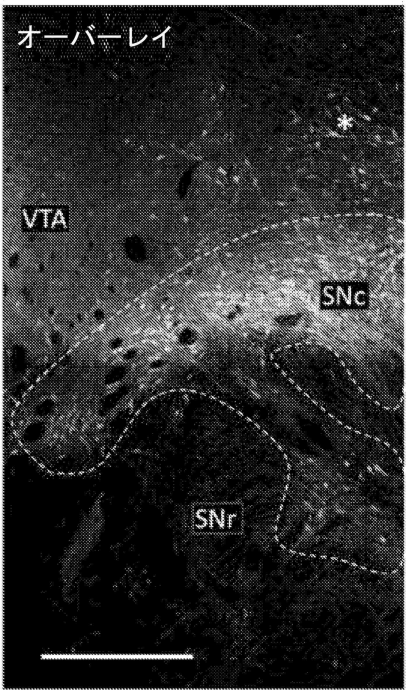
10

20

【図 4 B】



【図 4 C】



30

40

50

【図 5】

		天然 SYFP2		TH+/GFP+細胞		
ベクター ID	エンハンサーID	SNc	VTA	SNc	VTA	発現
CN3406	eHGT_888m	Yes	Yes	高	高	強
CN3863	core4-eHGT_888m	Yes	Yes	高	高	強
CN2436	eHGT_606h	Yes	Yes	高	高	強
AiP1240	MGT_E68	Yes	Yes	高	高	強
CN3551	3xcore1_eHGT_017m	Yes	Yes	高	ND	強
AiP1417	3xcore2-MGT_E51	Yes	Yes	ND	ND	強
CN2431	eHGT_483m	No	Yes	なし	ND	弱
CN3509	eHGT_897m	Yes	Yes	ND	ND	弱
CN2847	eHGT_647m	Yes	Yes	ND	ND	強
CN3058	3xcore4_eHGT_606h	Yes	ND	ND	ND	弱
CN3059	3xcore5_eHGT_606h	Yes	ND	ND	ND	弱
CN2839	eHGT_589m	Yes	ND	ND	ND	強
CN3283	3xCore_hTH	Yes	ND	ND	ND	強

【図 6－1】

eHGT_606h (長さ 824 bp)
GGGAAGAATAGTGAGTTCTGGGGTGGAGGGTTTTGATTTTTTAAAGTGGAAGAGTCAAGAAA
TGCACCACGGAGAAGGTGGCATTGAGTGAACACCTCAAAGTGSTTTGAGAGAAAAGTGGTG
CAGATATCGCGACACGCCCTTCAGGCAGAGAAAATAACCTGGGATGTCTGAGAAAAGCAAA
GAAGCTGGGGCTACTGCAGTAAGAGCAAGAGAGTTAAGAAATAGGTGTAGCCAGAGAGTTA
TCAGAAATATAAGATTGCATAGGGCATTTTTAGGCCAATATAAAGGACTGGCATTTTTTAGGTC
TGATGAGAATGGCATTCTCTGCCTAAAAATAGGAAACCACTGGAGCATTTTTGAGCAGAG
GAGTTGAACTGTCTGATTTAAAAATTTTAAAGGTTCTGGCTACCTTTGTGAGAAGAGAGCTGAA
GTAAGATATGCATGGAAGTAGGTATCAGTTATTAGGTTATTGCAATAATCTAGGCAAGAGA
GATGGATCAGGGTGATAACAGTAACTTCATGAGAGCATTTCAGTTGCAAAATATATTTCCAGA
TTTGCTGACCAGATTTGATAAGGAATATAGAAAAAGAGGAAAGAACAGAGATAACAGAGT
GTAGGCAGAAAAAGAGAAAAGGTTCAAAGACTGAGCCCTGCAGTATTTCAACATTAAAGAGCT
TGAATTGCAGAAATAGGAACCATCTCAAGGCTTTAAATACAAGTGTGTAACACTCTCAAAATTT
ATATTTGTATCCAGACTTCTCTAAAAATTCAGTTCTAAAAATCCAGTTGGTTACTTTATGTCT
CCACTTGAAACAAGTCTTGAAGCAGT (配列番号 1)

core4_eHGT_606h (長さ 194 bp)
TATTAGGTTATTGCAATAATCTAGGCAAGAGAGATGGATCAGGGTGATAACAGTAAACTTCA
TGAGAGCATTTCAGTTGCAAAATATATTTCCAGATTTGCTGACCAGATTTGATAAGGAATATAG
AAAAAGAGGAAAGAACAGAGATAACAGAGTGTAGGCAGAAAAAGAGAAAAGTTCAAAGA
CTGAGCCCTGTATTAGGTTATTGCAATAATCTAGGCAAGAGAGATGGATCAGGGTGATAAC
AGTAACTTCATGAGAGCATTTCAGTTGCAAAATATATTTCCAGATTTGCTGACCAGATTTGAT
AAGGAATATAGAAAAAGAGGAAAGAACAGAGATAACAGAGTGTAGGCAGAAAAAGAGAAA
GGTTCAAAGACTGAGCCCTGTATTAGGTTATTGCAATAATCTAGGCAAGAGAGTGGATCA
GGTGATAACAGTAACTTCATGAGAGCATTTCAGTTGCAAAATATATTTCCAGATTTGCTGAC
CAGATTTGATAAGGAATATAGAAAAAGAGGAAAGAACAGAGATAACAGAGTGTAGGCAGAG
AAAGAGAAAAGGTTCAAAGACTGAGCCCTG (配列番号 2)

3xcore4_eHGT_606h (長さ 582 bp)
TATTAGGTTATTGCAATAATCTAGGCAAGAGAGATGGATCAGGGTGATAACAGTAAACTTCA
TGAGAGCATTTCAGTTGCAAAATATATTTCCAGATTTGCTGACCAGATTTGATAAGGAATATAG
AAAAAGAGGAAAGAACAGAGATAACAGAGTGTAGGCAGAAAAAGAGAAAAGTTCAAAGA
CTGAGCCCTGTATTAGGTTATTGCAATAATCTAGGCAAGAGAGATGGATCAGGGTGATAAC
AGTAACTTCATGAGAGCATTTCAGTTGCAAAATATATTTCCAGATTTGCTGACCAGATTTGAT
AAGGAATATAGAAAAAGAGGAAAGAACAGAGATAACAGAGTGTAGGCAGAAAAAGAGAAA
GGTTCAAAGACTGAGCCCTGTATTAGGTTATTGCAATAATCTAGGCAAGAGAGTGGATCA
GGTGATAACAGTAACTTCATGAGAGCATTTCAGTTGCAAAATATATTTCCAGATTTGCTGAC
CAGATTTGATAAGGAATATAGAAAAAGAGGAAAGAACAGAGATAACAGAGTGTAGGCAGAG
AAAGAGAAAAGGTTCAAAGACTGAGCCCTG (配列番号 3)

core5_eHGT_606h (長さ 193 bp)
GATAACAGAGTGTAGGCAGAAAAAGAGAAAAGGTTCAAAGACTGAGCCCTGCAGTATTTCAA
CATTAAGAGCTTGAATTGCAGAAATAGGAACCATCTCAAGGCTTTAAATACAAGTGTGTAACA
CTCTCAAATTTATATTTGTATCCAGACTTCTCTAAAAATTCAGTTCTAAAAATCCAGTTGGTT
ACTTTAT (配列番号 4)

3xcore5_eHGT_606h (長さ 579 bp)
GATAACAGAGTGTAGGCAGAAAAAGAGAAAAGGTTCAAAGACTGAGCCCTGCAGTATTTCAA
CATTAAGAGCTTGAATTGCAGAAATAGGAACCATCTCAAGGCTTTAAATACAAGTGTGTAACA
CTCTCAAATTTATATTTGTATCCAGACTTCTCTAAAAATTCAGTTCTAAAAATCCAGTTGGTT
ACTTTATGATAACAGAGTGTAGGCAGAAAAAGAGAAAAGGTTCAAAGACTGAGCCCTGCAGT
ATTTCAACATTAAGAGCTTGAATTGCAGAAATAGGAACCATCTCAAGGCTTTAAATACAAGTG
CTGAACACTCTCAAATTTATATTTGTATCCAGACTTCTCTAAAAATTCAGTTCTAAAAATCCA
GTTGGTTACTTTATGATAACAGAGTGTAGGCAGAAAAAGAGAAAAGGTTCAAAGACTGAGCC
CTGCAGTATTTCAACATTAAGAGCTTGAATTGCAGAAATAGGAACCATCTCAAGGCTTTAAAT

【図 6－2】

ACAAGTGCTGAACACTCTCAAATTTATATTTGTATCCAGACTTCTCTAAAAATCAAGTTCTA
AAATCCAGTTGGTTACTTTAT (配列番号 5)

Core_hTH (長さ 80 bp)
ACTGCCGGATGTGGATTTAACTTTTCAGCAAAATGTCTTCCACTGATACAAATATTGCTTTTT
AATTCGGTTTCTCGCCGG (配列番号 6)

3xCore_hTH (長さ 240 bp)
ACTGCCGGATGTGGATTTAACTTTTCAGCAAAATGTCTTCCACTGATACAAATATTGCTTTTT
AATTCGGTTTCTCGCCGGACTGCCGGATGTGGATTTAACTTTTCAGCAAAATGTCTTCCACT
GATACAAATATTGCTTTTTAATTCGGTTTCTCGCCGGACTGCCGGATGTGGATTTAACTTT
CAGCAAAATGTCTTCCACTGATACAAATATTGCTTTTTAATTCGGTTTCTCGCCGG (配列番号
7)

Core_eHGT_1039h (長さ 200 bp)
GAAAAAGAGGAAAGAACAGAGATAACAGAGTGTAGGCAGAAAAAGAGAAAAGGTTCAAAG
ACTGAGCCCTGCAGTATTTCAACATTAAGAGCTTGAATTCAGAAATAGGAACCATCTCAAG
GCCTTAAATACAGATTGCTGAACACTCTCAAATTTATATTTGTATCCAGACTTCTCTAAAAAT
CAAGTCTCAAATCCA (配列番号 8)

3xCore_eHGT_1039h (長さ 600 bp)
GAAAAAGAGGAAAGAACAGAGATAACAGAGTGTAGGCAGAAAAAGAGAAAAGGTTCAAAG
ACTGAGCCCTGCAGTATTTCAACATTAAGAGCTTGAATTCAGAAATAGGAACCATCTCAAG
GCCTTAAATACAGATTGCTGAACACTCTCAAATTTATATTTGTATCCAGACTTCTCTAAAAAT
CAAGTCTCAAATCCAAGAGGAAAGAGGAAAGAACAGAGATAACAGAGTGTAGGCAGAAAAAG
AGAAAAGGTTCAAAGACTGAGCCCTGCAGTATTTCAACATTAAGAGCTTGAATTCAGAAATA
GGAACCATCTCAAGGCTTTAAATACAGATTGCTGAACACTCTCAAATTTATATTTGTATCCCA
GACTTCTCTAAAAATTCAGTTCTAAAAATCCAGAAAAAGAGGAAAGAACAGAGATAACAGAG
TGTAGGCAGAAAAAGAGAAAAGTTCAAAGACTGAGCCCTGCAGTATTTCAACATTAAGAG
TTGAATTCAGAAATAGGAACCATCTCAAGGCTTTAAATACAAGTGTGAACACTCTCAAATTT
TATATTTGTATCCAGACTTCTCTAAAAATTCAGTTCTAAAAATCCA (配列番号 9)

eHGT_888m (長さ 1293 bp)
TGCTTGAAGCCAAAGCCTGTGACTTCAGTGCAGCTCTCTGCAGGACTTAGCCTGTGTCTGC
TCTCAACACAGCTACTGTCCCCCATTTGTGTCCCTGAGAATTCCTAGACTGGAGGCTAGAA
CTAAAGTGGAGCCTCAAAGAGAGAAACTGAGGTAGTGCCACAGAACTAACTCAGTCCAC
AGAGTTCTTGTATACACAGCCTTAGGGCCTAGTCCAATTCCTAGAAGACATGTAACAGCAA
ACTATGGTGGTGATGCTTTGTAATCCAGCAGTGAAGGAGCAGAGGCAAGGAGCATCCCTA
GGACTCAGGTAAACAAATGTAGCCTCCTTGGCAAGCTCCAGGCCAGTGTGAGATACGGCT
TCAGGGAGCAAGGTGAACCTTGCTACTGTGTAACACTATTCTCCAAGCCAAACAACTGCTA
TCTTCATGCGTTCACTTGAGTTAAGCCTGAAGAAGATTTACAGCTGGGCCTGTTGACCCGA
TGACTGCCCATAGACAGAGAGGTAGAGAGATCATAGGACCCAGAAAACTCAGTTT
TTCTGCCCAACAAGTTGTATGTGAGTGTGTGTCGTAATACACTTGGCCTTGGTGCTTAGGG
AAGGGCTACACTTTCATAGGCACITTTATCTAAATGTCAAGACACTGCTGCTATGAGCCAC
CTTATTCGCCAGCACTATCCAGATGTAGCAGTGGTTCTCACCAGCAGCCTCTCAGTACC
ATTTAGCAAGCCATCAGGTTTTGTAAGAGTGAAGGAAAGAGAAAGAGGAGACACAGGG
TGAGTGATGTACAGTGAAGGGCTGGGACAGCCAGGCTTCTGTGTGGGGCTGCCCTCAC
TCTTGTTTCTAGTGAGAACAGGCTACAGTCTGACCCACGGGCAACACCTTCCCCCA

【図 6－3】

GGAGGCCAACCCCATGATCTGTCCATGGGTACACACTGAGGCCCTCTCCGGATGCTCAG
AGCAGGCCAAGTGCAGGCTAGGGCCAGGCTGAAGGCAAGCACAGCTGGCTCAGGTGCC
TGGGCTAATCCTCGAGCTCTGAGGAGGCCCCACCAGTGCATTTCCAGGCTGCAGTGAG
TCTGACCCATCACTGTGATATTTAGACAGTGCTTTTGCCAGGCGATTACTTTGGAGTTG
GAATGAAGGCGCTGACACTGGAGCTGGGCTGTGTTCTCTGGACCTTTTAAATCATCTC
TTCGCCCTGCTTCACTGAGTGTGGCCAACTGCAGACTCTGAGTCCCTACCTGGAAACGAAGAA
CTAAAGGACAGAAGGTGGCTGG (配列番号 10)

Core4_eHGT_888m (長さ 287 bp)
AGCACACGTGGCTCAGGTGCCTGGGCTAATCCTGGAAGTCTGAGGAGGCCCCCACCAGT
GCATTTCCAGGCTGCAGTGAGTCTGACCCATACACTGTGATATTTAGACAGTGCTTGT
GCCAGGCGATTACTTTGGAGTTGGAATGAAGGCCCTGACACTGGAGCTGGGCTGTGTC
TCTGGACCTTTTAAATCATCTCTTGCCTGCTTCACTCAGTCTGGCCAACTGCAGACTCT
GAGTCTACCTGGAACGAAGAACTAAAGGACAGAAGGTGGCTGGAGCACAGCTGGCTCA
GGTGCTGGGCTAATCCTGGAAGTCTGAGGAGGCCCCACCAGTGCATTTCCAGGCTGC
AGTGAAGTCTGACCCATACACTGTGATATTTAGACAGTGCTTTTGCCAGGCGATTACTTTG
GAGTTGGAATGAAGGCGCCTGACACTGGAGCTGGGCTGTGTTCTCTGGACCTTTTAAAT
CATCTCTTGGCCTGCTTCACTCAGTCTGGCCAACTGCAGACTCTGAGTCTCCTAGGAAAC
GAAGAACTAAAGGACAGAAGGTGGCTGGAGCACAGCTGGCTCAGGTGCCTGGGCTAATC
CTGGAAGTCTGAGGAGGCCCCACCAGTGCATTTCCAGGCTGCAGTGAGTCTGACCCAT
ACACTGTGATATTTAGACAGTGCTTTGTTGCCAGGCGATTACTTTGGAGTTGGAATGAAG
GCGCTGACACTGGAGCTGGGCTGTGTTCTCTGGACCTTTTAAATCATCTCTTGGCCTGC
TTCAGTCACTGGCCAACTGCAGACTCTGAGTCCCTACCTGGAACGAAGAACTAAAGGAC
GAAGGTGGCTGG (配列番号 84)

3XCore4_eHGT_888m (長さ 861 bp)
AGCACACGTGGCTCAGGTGCCTGGGCTAATCCTGGAAGTCTGAGGAGGCCCCCACCAGT
GCATTTCCAGGCTGCAGTGAGTCTGACCCATACACTGTGATATTTAGACAGTGCTTGT
GCCAGGCGATTACTTTGGAGTTGGAATGAAGGCCCTGACACTGGAGCTGGGCTGTGTC
TCTGGACCTTTTAAATCATCTCTTGCCTGCTTCACTCAGTCTGGCCAACTGCAGACTCT
GAGTCTACCTGGAACGAAGAACTAAAGGACAGAAGGTGGCTGGAGCACAGCTGGCTCA
GGTGCTGGGCTAATCCTGGAAGTCTGAGGAGGCCCCACCAGTGCATTTCCAGGCTGC
AGTGAAGTCTGACCCATACACTGTGATATTTAGACAGTGCTTTTGCCAGGCGATTACTTTG
GAGTTGGAATGAAGGCGCCTGACACTGGAGCTGGGCTGTGTTCTCTGGACCTTTTAAAT
CATCTCTTGGCCTGCTTCACTCAGTCTGGCCAACTGCAGACTCTGAGTCTCCTAGGAAAC
GAAGAACTAAAGGACAGAAGGTGGCTGGAGCACAGCTGGCTCAGGTGCCTGGGCTAATC
CTGGAAGTCTGAGGAGGCCCCACCAGTGCATTTCCAGGCTGCAGTGAGTCTGACCCAT
ACACTGTGATATTTAGACAGTGCTTTGTTGCCAGGCGATTACTTTGGAGTTGGAATGAAG
GCGCTGACACTGGAGCTGGGCTGTGTTCTCTGGACCTTTTAAATCATCTCTTGGCCTGC
TTCAGTCACTGGCCAACTGCAGACTCTGAGTCCCTACCTGGAACGAAGAACTAAAGGAC
GAAGGTGGCTGG (配列番号 84)

Core4_eHGT_888h (長さ 280 bp)
GGCGCATTCACCTCAGGTACCTCTGCTAATCCCGGGGCTCGGAGGAGCCCCCACCCTCG
GCTGACATTTCCAGGCGCGCTGCGTGGCGCTGCCAGCCGCGCTGATATTTAGACAGGGG
CTGTTGCCATGTGATTACTTTGGGGCTGGGATGAGTCTACCAACAGGCTGAGCTTGTCC
GTTTGTCTCAAAGCTTGTTTTAAATACACTGCTGTGACAGTAAGCCGCGCTCCAGCT
GTGGGGTCCGGTCCCTCTGGGCCAGAGGAGGAGGACTAA (配列番号 85)

3Xcore4_eHGT_888h (840 bp)
GGCGCATTCACCTCAGGTACCTCTGCTAATCCCGGGGCTCGGAGGAGCCCCCACCCTCG
GCTGACATTTCCAGGCGCGCTGCGTGGCGCTGCCAGCCGCGCTGATATTTAGACAGGGG
CTGTTGCCATGTGATTACTTTGGGGCTGGGATGAGTCTACCAACAGGCTGAGCTTGTCC
GCTTTGCTCAAAGCTTGTTTTAAATACACTGCTGTGACAGTAAGCCGCTGAGCTTGTCC
GTGGGCTCCGGTCCCTCCTGGGCCAGAGGAGGAGGACTAAGGCGCATTCATCTCAGGTAC
CTGCTGTAATCCCGGGCTCGGAGGAGCCCCCAGCCCGGCTGAGCTTTCCAGGCGCTG
GCTGTCCGCTGCCCCAGCCGCGGTGATATTTAGACAGGGCTGTTTGCCATGTGATTACTT
TGGGGCTGGGATGAAGTCTACCAACACCTGAGCTTGTCCGCTTTGCTCCAAAGCTTGT

【図 6－4】

TTAATACACTCGCTGTGCAGCTAAGCCGGCTCCCTCCAGCTGTGGGGTCCGGTCCCCCTCT
GGGCGAGAGGGAGGACTAAGGCGCATTCAC TT CAGGTACCTCTGCTAATCCGGGGGCTC
GGAGGAGCCCCACCGGCTGTCGATTCAGGCGCGCCCTCCTCCCCCCACACTAAAC
CCGTGATATTTAGACAGGGCTGTTTGGCATGTGATTACTTTGGGGCCTGGGATGAACCT
ACCAACACCTGAGCTTTGCCGCTTTGCTCCAAAGCTGTTTTTAATCACTCGCTGTGAGCT
AAGCGCGCTCCCTCCAGCTGTGGGGTCCGGTCCCTCCTGGGCGAGAGGGAGGACTAA
(配列番号 86)

エンハンサー eHGT_017m スクレオチド配列 (308 bp):

TGTGTGTGGTCTTAGGGACAGGGGGTGGCTGGCAGGCAGGCAGTGCGGGAGGCGACAG
CTGTGCAGGAGGACGGACTGCTGGCATCAGCAAGCGCCCTCCTCCCCCCACACTAAAC
AATCACGGCACAAATATGCAAATGGTATAATTACTGTTATTTGTTTGGCTGATATAAGTGTTT
GAAATGCAAATGTCAACTCTGGGCGCTGTTGGTTTTTCCACCCCTCTCTCCCGGACATTT
GCAAGTGCATCAGTGAGCCCTCATCTGGGAACACTAGGGGTGCCTCCTTCTGACAGACT
TGGAGC (配列番号 87)

core1_eHGT_017m (長さ 179 bp)

TGTGTGTGGTCTTAGGGACAGGGGGTGGCTGGCAGGCAGGCAGTGCGGGAGGCGACAG
CTGTGCAGGAGGACGGACTGCTGGCATCAGCAAGCGCCCTCCTCCCCCCACACTAAAC
AATCACGGCACAAATATGCAAATGGTATAATTACTGTTATTTGTTTGGCTGATATAAGTGT (配
列番号 88)

3Xcore1_eHGT_017m (長さ 537 bp)

TGTGTGTGGTCTTAGGGACAGGGGGTGGCTGGCAGGCAGGCAGTGCGGGAGGCGACAG
CTGTGCAGGAGGACGGACTGCTGGCATCAGCAAGCGCCCTCCTCCCCCCACACTAAAC
AATCACGGCACAAATATGCAAATGGTATAATTACTGTTATTTGTTTGGCTGATATAAGTGTTG
TGTGTGTCTTAGGGACAGGGGGTGGCTGGCAGGCAGGCAGTGCGGGAGGCGACAGCT
GTGCAGGAGGACGGACTGCTGGCATCAGCAAGCGCCCTCCTCCCCCCACACTAAACAA
TCACGGCACAAATATGCAAATGGTATAATTACTGTTATTTGTTTGGCTGATATAAGTGTTGTG
TGTGTCTTAGGGACAGGGGGTGGCTGGCAGGCAGGCAGTGCGGGAGGCGACAGCTGT
GCAGGAGGACGGACTGCTGGCATCAGCAAGCGCCCTCCTCCCCCCACACTAAAGATTC
ACGGCGACAAATATGCAAATGGTATAATTACTGTTATTTGTTTGGCTGATATAAGTGT (配列番
号 89)

MGT_E51 (長さ 352 bp)

CCCTTTAGAAACACTCCCTTTACCATCTTCAACATGTTTTAGCTGAGAACTCTCTTCCAA
CCCTGTTTCTAACTCTGAGTGCCGTATCATCTCATATTTCTGTGACGGGAAAAAGAAATCA
GCACCTCCCAACAGCTCAACTGTGCTCCTTAGAGTAAGCACTTCCAAAGTCTATATTTCTGAGT
CTAATCTCTCTTGAAAGGTCAGCCTTTTCTTCCAAATACCAAGTGGACATCTTTATGCACA
GGCCTTCAAGGATATTTCAAGTCAAGTGCTGCTCCTACGGAGAAAACTCCTTTTAAACCCGAA
TCTGTGGTTTCCCCAAGATGATTATTTGGGTGGTCACTGCAGC (配列番号 13)

Core2-MGT_E51 (長さ 151 bp)

TTCTGTGTGAGGGAAAAAGAAATCAGCACCTCCCAACAGCTCAACTGTGTCTTTAGAGTA
AGCATTCCAAAGTCTATATTTCTGAGTCTAATCTCTCTTGGAAAGGTCAGCCTTTTCTTCCAA
ATACCAAGTGGCATCTTTATGCACAGG (配列番号 90)

【図 6－6】

CATTATGGCATTAATCTGTGGTGAATTAGCTCGGATTGATCGAGATGTGCATCTCTTGGCTGA
TCCAAATTTATTGAGAACCTTTCAAGAAGGATGTGAGGCTGGACAATGGCCTGTGTTTTGTGA
CATGGTTAATACCCTCTTCAAGCAGCTCTGAGAACACAGCCCTAACTCAAGCCAAAGCTGACA
GTAGGACTGGGTTTGAACAGAAATCTTGCTCTTTCCACTGGCAGTCGGGTCTTGTTCTTGG
ACTCTCTCTGGGCTAGAGAGGTAAGACAGGAGGGAACCCAGTAGGGAAG (配列番号 16)

eHGT_589m (長さ 558 bp)

TGGAAGGAGATGCAATTTGTATTGAAATTTTCTGTTTCATTAAAGTTGTTTTTCTTTAAAT
ACTGGGATATATTTTCTTCTGTAGCCAGTCTGCCTCCTTCCAATTTATGTTACAGGATAAAGA
TTACATTTAGGCCATTTGATAAATGTAGAGTCAATCAACACAGGATAAACATTTCTATAGCAA
TTATTGCAAAATTAACCACTTGGATGTTAATCAATTTCTGTTTGTGCTTTTTTTTTTCCCTCCTA
ATGTTGATTTCTGAGGCTTTAAAGATGGTAACCTTTATATCCTTATAAGATGCCAACATTTG
AGTCATCAACATTTGGTTAAAAATAAGGGGGATCACCTTGAGCTGCAGACATGCAAAATCAA
CTGGAAAAACACCACTGCGCTTAATCTTTCAACCATTTGCAGTTTTTGTGCTCCTCTGCAG
CAGGCTAGCAGGTAGGCTTTTATAGAAACAGGGACTTAGCAGATGTAGCTGCTGTTTCCCT
TCTTGTCAACACTGAAATCTCCTTTTTAGCCCTCTGACACACACAGACACCAACCCGAA (配
列番号 92)

eHGT_647m (長さ 655 bp)

TCCACTTATACCCATCAGCATCTCTATCATTGTCTAAGACATTTTTAATTTGAAATAAATGG
GGAACACTATTATCATGGCCTCAAGGAAATACAGAAACCAAGGATTGCTCTTTTAGTGAC
AGGTGCTCTTCAAATTCACATATTTCTGGATTTAACAAGGAAAAATAAAATCTGACATAGGCTG
AATTTGAAATGGTAAGGATATTTTAACTAAACAAAAAATAGGTAATAGAACATTTTCA
TTGAACCTCCAGGATAGCATTTATCATATTAACCAAGTGAATTTATTCATGCGCTGATAAAT
AACCTTAGCCTCCGGCACAGTAATCTCTCTCACTGAATAATCACCAGGCTCCTCGCCCGTG
GTGTTTTGCTTTACAACATAAATTTAAAAATATTCTGTGTTGGCATACATATGTGAAAGCTC
ATTAACAGATACTGGCATTCTGATTGGTTGGGCACTAAATTTAAACTGTTTTGGAAAGAACT
GAAACACTGAAGGATATGCCATTTCTGTTCTTTATACCTTATCGATGTTTCCTTAACATCG
GTTGAGATTTATGCATCTTTGATAGATTTATCTGAGATAGCTGATATGCATTTGTATGAGT
TCCTTTTTAACGCTGTAATGTTTCATTGGCCCT (配列番号 93)

eHGT_483m (長さ 716 bp)

GTGGAGGTTGGGTTTTCCATCACCTGGCTAACAGAGATCACAATCTCCTTTTGTTCATCTT
AGGGATAAAGGTTTGTCCATAGCTCGACTTGTCTGGATTTCTCTGTCCATCACATGCCTATGT
ACGCTCCCCACACCTCTCTCCTAGTGCCCTTGTTTAAAAATGCCACAGATCGACGCTC
ACAGAAGAACATTTGGCTACTCCCGTTTTTAATCTACTACTTCTGTAATGGGGCTCGGGAG
CTGGGCTGGGTCCCCGAACTGTGGGCAGCTGGCAGCCTGACCCTGGGCTGAGTACCA
GGCATGGGGAGGCGCAGAAGGAAGGGGCAGATTGAGCCAGAGAGGTAAAGACTGCAGAGAG
CCAAATAGGAGGGGAGGCGCAGAGCTGAGGGTCCAGATGGGGCTGGCTGGGCGAC
AGGAGGGCATCTGATGCAATCCGCCAGGAGAGATGCCAGCCGCCGGGTGCTGCAGAGGC
TCTGTTCTTGAAGAGCTAGTGCCCTGCTCTAATTTCTGGCTCTGTGGGAATTTGGGGAAG
ATTTCCTATGAGGTCTCCTGAGCCCGACGAACCTCCCCAAAGGCCCTAGCTCATAAAAGC
ACCTGTGTCTGAACAGCAGGGGTGGGACATGAAGCACTGGGTTGGTGGCTGCCTG
GGGAAGGGCAAGCTGAGATCTTTGTGAGTATAAACACAGTACCTCAGCCCTGC (配列番号
94)

【図 6－5】

3xCore2-MGT_E51 (長さ 453 bp)

TTCTGTGTGTCAGGGGAAAAAGAAATCAGCACCTCCCAACAGCTCAACTGTGTCTTTAGAGTA
AGCATTCCAAAGTCTATATTCTGAGTCTAATCTCTCTTGGAAAGGTCAGCCTTTTCTTCCAA
ATACCAAGTGGACATCTTTATGCACAGGTTCTGTGTGAGGGGAAAAAGAAATCAGCACCTCC
CACACAGTCAACTGTGTCTTTAGAGTAAGCATTCCAAAGTCTATATTTCTGAGTCTAATCTC
TCTTGGAAAGGTCAGCCTTTTCTTCCAAATACCAAGTGGACATCTTTATGCACAGGTTCTGT
GTCAGGGGAAAAAGAAATCAGCACCTCCCAACAGCTCAACTGTGTCTTTAGAGTAAGCATT
CCAAAGTCTATATTCTGAGTCTAATCTCTCTTGGAAAGGTCAGCCTTTTCTTCCAAATACCA
AGTGGACATCTTTATGCACAGG (配列番号 91)

eHGT_897m (長さ 538 bp)

AGGCTAGACAATCTTTAAGGGTCTTGTTTTGATATCTGGGTCTTCAACACTCCCCTGGTCAG
CCTCCCAAGCATGCATCTATTGCTATTCTAAGTCAGGAATATTATATCCTTCTCAAGATAAA
CACATAGATTTGCCATATATTTGCTTAGATTTGAGGTTACTAGATCCCAGCTTAACCTCCAT
ATTTATGAACATGAGTTCGTGTCTATCTCCTTTTACGGTATAAACCTGGTGTTTATTACCTA
CAAAAGGCAGTTAAAAAGGCTTGAAGGAACATAATTAATATGAACAGATTTCTAAGGCAGC
ATGACTTTTGCTATGTTGCTATAGAAACATGGGGAATTTCTGGTCACTGACCTTTCAGATAAT
GCAAGAATATGCTTTTCAAAAATCATAAGAGATAACGCTAGGATAATTCATCTCTAGTTTT
CTGTGGAGCATTTTGAATCCCTTTTGACAGCTCGTGAGATTTTAGAGTTAAATTTGATTGT
TTCAGCGTTACTATAGAGTCAAAGTATAACTCTTTGAAGA (配列番号 11)

MGT_E68 (長さ 528 bp)

CCAGGAAGAAAAAGCAAGCAGCTTTAGTCAACAAGATCCTTTTCAGAAGACCAAAATGCACA
ACCATCCCTCAGGCCCTCACAAAGCTGCTCAGTGTGACGGGCTCTCGCCTCCTCAGACCAC
GCTCAGGGGTTTGCTAACGGCACCCTGGTATTATTGAGAACTTAGCAACGTCAGATCAAAATGC
TTCTGTTTCATGGTCTGACCCAGTCTTACTATGAGTTTACAGTTTATGACTCTCAATTTACTAA
AAAAAGAACTGATGATTTGAGAGGAGAAATGACCCAGCTAAGGCCATTTAGGAATGTCTT
GATGAGCCCAAGGATTTTATCCAGACCTGATTTCTGGGCTGTTCTGCTGTATCCTAATTTGCTCG
GCCATTAAGAACTTCAGTTCTCTTGTGGAATGGGCGAGTGGCCCAACCCCAAGATAGTT
CAGCACCTTTGATGCTCCTTGAGACTCTGTAAAAAATTTTAAAGCAACAAATGACTGAA
AAACTACTTGAACAAAAGCCAGCATGTTTGTTCAGACC (配列番号 12)

eHGT_889h (長さ 645 bp)

ATCAGGCAAGAGATCTGGCTAGAAATGTAGGCAAGGGATAAATAGTCATAAGACTATAAG
GCATTTGCCAGGGGAAGAGGAAAAAGCTTGGAGAATGAGTCAAGAAATCCACACAATAGATTA
AAGATTTAAGTTGTGAGAAAGTTTTTTATGGAGAGTGTCTTGGGGAATAAATTAGAGATTAAT
AAAAAGATAAAAAATCAACCAAGGTAGAAAGGGCATGCATCCTGGTGTGTGCAACATGTGAT
AGCTCATGAATGTCAAGTTTACTATCTTACGTGGCTATGACTATGCAAACTATGCTCT
TCATAGTACGTAAAGTGAAGCATTAGAGGATTTCTGTGTAGTCCATAAAATCCTTTGTGAAT
ACATCATGTTGCTTATTACATTTCTTGCCCATGTTTACATAACCAGACTGACTGTAATATGA
GTATTGTGTGTGCCCCTTTGTATAAAATCCTTTGTATAAACCCCAAGGATTTCTTAAAGA
CAAACTCGGGTGTGCTAAATATTACTCACTCAGGCTAAATTTTATAAAATTCCTATAAAACAT
ATCAGATATTTCTGAGACTTTTGTATTTTAAGTCTGCTCTTTCCCTATTTGGTATTTGCAAT
GGTTACTTTTGTGGGGTGTGCTGCT (配列番号 15)

eHGT_1038m (長さ 414 bp)

GACAGTAAATGGGCTCTTGACTCCAAGAGCCTCTTGGGCAGAAAAACAGAACTAGGGTCA
GAAGGAGAGAGCTAGGTGGGGGTGTCTGTCTTCAACACCCCTCTCCCCATTATCAGGGA

【図 6－7】

β-グロビン最小プロモーター (pBGmin/minBGlobin/minBGprom):

GGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTG (配列番号
17)

minCMV プロモーター:

GAGGTAGGCGGTGACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGA
TCGCTTGG (配列番号 18)

変異 minCMV プロモーター (Sacl 制限酵素部位の除去):

GAGTAGGCGGTGACGGTGGGAGGCCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGA
TCGCTTGG (配列番号 19)

minRho プロモーター:

GATTTCAGCCGGGAGCTTAGGGAGGGGAGGTCACTTCATAAGGGCCTGGGGGGGAGTTG
GAGCCACGAGTCGCCAGCCGAGGCCCGGTGTGGCTGAGCTCCGGCCTCAGAAGCATCC
CC (配列番号 20)

minRho+プロモーター:

GATTTCAGCCGGGAGCTTAGGGAGGGGAGGTCACTTCATAAGGGCTTGGGGGGGAGTTG
GAGCCACGAGTCGCCAGCCGAGGCCCGGTGTGGCTGTGCTCCGGCCTCAGAAGCATCC
CC (配列番号 21)

Hsp68 最小プロモーター (proHsp68):

CAGGAACATCCAAACTGAGCAGCCGGGTGCCCGCCACCCCGCCCGCCCGCCAGCGGG
CAACTTTGAGCCTGTGCTGGGACAGAGCCTCTAGTTCCATAAATAGTCCATGAGGTCAGAG
GCAGCACTGCCATTGTAACGCGATTGGAGAGGATCAGCTACCCGGACACGCCCCAGGC
ATCTCCCTGGGTCTCCTAAACTTGGCGGGGAGAAAGTTTAGCCCTTAAGTTTTAGCCCTTTAA
CCCCATATTCAGAACTGTGCGAGTTGGCGAAACCCCAACAAATCACAAACAACTGTACACA
ACACCGAGCTAGAGGTGATCTTTCTGTGCCATTCCACACAGGCCTTAGTAATGCGTGCGCCA
TAGCAACAGTGTCACTAGTAGCACCAGCACTCCCCACACCTCCCCCTCAGGAATCCGTA
TCTCCAGTGAACCCAGAAACCTCTGGAGAGTTCTGGACAAGGGCGGAACCCCAACTC
CGATTACTCAAGGGAGGCGGGGAAGCTCCACAGACGCGAAACTGCTGGAAGATTCTCTG
GCCCAAGGCCCTCTCCGGCTCGCTGATTGGCCAGCGGAGAGTGGGCGGGGCCGGTG
AAGACTCCTTAAAGGCGCAGGGCGGCGGAGGTCAACAGACGCTGACAGCTACTCAGA
ACCAAACTCTGTTCCATCCAGAGACAAGCGAAGACAAGAGACGAGCGAGCGGCGGCT
TCCGATCTCGGCCAGGACAGCCTTCCCAAGAGCATCCCTCGCGCGAGCGCAACT
TCCAGAGCATCCTGCCGCGAGCGCAACTTTCCCGGAGCATCCACGCCCGGAGC
GCAGCTTCCAGAAGCAGAGCGCGCGGCC (配列番号 22)

SYFP2:

ATGGTTAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGA
CGCGCAGCTAAACGCCCAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCT
ACGGCAAGCTGACCCGAACTGATCTGCACCCAGCGAGGTCAACAGACGCTGCCGTGCCCT
ACCTCTGTGACCACTTGGGCTACGGCGTGCAGTGTCTTCCGCCCTACCCCGACCACT
GAAGCAGCACACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCGAGGAGCGCAACAT
CTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCCGCGCCAGGTAAGTTTCGAGGGCGACA
CCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGCGATCGACTCAAGGAGGACGGCAACATCCTG

【図 6－8】

GGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGCCAGACAAGCAG
AAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGCGCGCGTGCA
GCTCGCCGCCACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCAGCGGCCCGCTGCTGCTGCCCG
ACAACCACTACCTGAGCTACCAAGTCCAAGCTGAGCAAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATC
ACATGGTCTGCTGGAGTTCTGTACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGT
ACAAGTAA (配列番号 23)

EGFP:

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGGTGGTGCCTCTCGTGCAGCTGGA
CGCGCAGCTAAACGCCACAAAGTTCAAGCTGTCGCCGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCT
ACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTTCATCTGCAACACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCA
CCCTCGTGACCCACCTGACCTACGGCGTGCAAGTCTTCAAGCGCTACCCCGACCATATGA
AGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCAGGAGCGCAACATCT
TCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCCGCCAGGTTGAAGTTCGAGGGCGACACC
TCGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGG
GCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTTCTATATCATGCGCGACAAGCAGAA
GAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGCTGCAGCT
CGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCAGCGGCCCGCTGCTGCTGCCCGACA
ACCACTACCTGAGCAGCCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACA
TGGTCTGCTGGAGTTCTGTACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACA
AGTAA (配列番号 24)

最適化された Flp リコンビナーゼ (FlpO):

ATGGCTCCTAAGAAGAAGAGGAAGGTGATGAGCCAGTTTCGACATCCTGTGCAAGACCCCC
CCCAAGGTGCTGGTGCGGCAGTTTCGTGGAGAGATTTCGAGAGGCCACGCGCGCAGAGAAGAT
CGCCAGCTGTGCGCGCCGAGCTGACCTACCTGTGCTGGATGATCACCCACAACGGCACC
CCATCAAGAGGGGCCACCTTCATGAGCTACAACACCATCATCAGCAACAGCCTGAGCTTCGA
CATCGTGAACAAGAGGCTGCAAGTTCAAGTACAAGACCCAGAAGGCCACCATCTGGAGGC
CAGCCTGAAGAAGCTGATCCCGCGCTGGGAGTTACCCATCATCCTTACAACGGGCCAGAA
GCACAGAGCGACATCACCGACATCGTGTCCAGCCTCGAGCTCAGTTGAGAGCAGCG
AGGAGGCCGACAGGGGCAACGAGCCACAGCAAGAAGATGCTGAAGGCCCTGCTGTCCGAG
GCGCAGAGCATCTGGGAGTACCGAGAGAGTGAACAGAGTCCGAACGCTTCGAGTACCCAGCAG
TTCACCAAGACCAAGACCTGTACCAAGTTCCTGTTCTGCGCCACATTTCATCACTCGCGCA
GGTTCAGCGCATCAAGAACGCTGGACCCCAAGAGCTTCAAGCTGGTGCAGAACAGTACC
TGGGCGTGATCATTTCAAGTGGTGGTGACCCGAGACCAAGACAAAGCGTGTCCAGGCATCT
ACTTTTTTCAGCGCCAGAGGCGAGGATCGACCCCTGGTGTACCTGGAGCAGTTCTCGTGA
ACAGCGACGCCCGTGTGAAGAGAGTGAACAGGACCGGCCAACGACGACGACAAACAGCAG
GAGTACCAAGCTGCTGAAGGACAAACCTGGTGCAGCTTACAACAAGGCCCTGAAGAAGAAC
GCCCTTACCCCATCTTCGCTATCAAGAACGGCCCTAAGAGCCACATCGGCAGGCCACTTG
ATGACCAAGCTTTCTGAGCATGAAGGGGCTGACCGAGCTGACAAACGTTGGTGGGCAACTGG
AGCGCAAGAAGGGCTCCCGCGTGGCCAGGACCACTTACACCCACAGATACCCGCCAT
CCCCAGCACTACTTCCGCTGGTGTCCAGGTAACGCGCTACGACCCCATCAGCAAGGA
GATGATCGCCTTGAAGCAGCAACCAACCCCATCGAGGAGTGGCAGCACATCGAGCAGC
TGAAGGGGCGAGCGGAGGGGACGATCAGATACCCCGCTTGAACGGCATCATCAGCCAG
GAGGTGCTGGAATCCTGAGCAGCTACATCAACAGGCGGATCTGA (配列番号 25)

【図 6－10】

GCATCATGAACCTCGTTTGTGAACGACATTTTCGAGCGCATCGCAGGTGAGGCTTCCCGCT
GGCGCATTAACAACAGCGCTCGACCATCACCTCCAGGGAGATCCAGACGCGCGTGCGCC
TGCTGCTGCCTGGGGAGTTGGCCAAGCAGCCCGTGTCCGAGGGTACTAAGGCCATCACC
AAGTACACCAGCGCTAA (配列番号 95)

WPRE3:

ATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTC
CTTTACCGTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCCTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATG
GCTTTCAATTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTAGTTCTTGCCACGGCGGAACATCAGC
CGCCTGCCCTGCCCGTGTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCTGTGG
(配列番号 32)

WPRE:

GCCTATCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAGATTGACTGGTATTCTTAACTA
TGTTGCTCCTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCCTTGTATCATGCTATTGCTT
CCCGTATGGCTTTCAATTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGTTGCTGTCTTTATGAGGAG
TGTGGCCCGTGTGAGGCAACGTCGGCTGGTGTGCACTGTGTTGCTGACGCAACCCCG
ACTGGTTGGGGCACTTGGCAACGCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCGCTCC
CTATTGCCACGGCGGAACATCATGCCGCTGCTTGGCCGCTGCTGGAACAGGGGCTCGG
CTGTTGGGCACTGACAATTCGCTGGTGTGTCGGGGAATATCATGCTCCTTTCCCTTGCGTG
TCGCTATGTTGCCACCTGGAATTCGCGCGGGAACGCTCCTTCTGCTACGCTCCCTTCGGCCC
TCAATCCAGCGAACCTTCTTCCCGCGGCTGCTGCCGCTCTCGGGCTCTTCCGCGTC
TTCGCTTTCGCGCTCAGACGAGTGGATCTCCCTTTGGGCGGCTCCCGGCATCGATACC
G (配列番号 33)

BGHpA:

CGACTGTGCCTCTAGTTGCCAGCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCGCTGCCCTCCTTGAC
CCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGCTCCTTTCTTAATAAAATGAGGAATTCATCGCATGTTG
CTGAGTAGGTTGCTATTCTTTGCGGGGTGGGTCAGGACAGCAAGGGGGAGGA
TTGGAAGACAATAGCAGGCATG (配列番号 34)

hGHpA:

ACGGGTGGCATCCTGTGACCCCTCCCAAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTC
CAGTGGCCCAACCGCTTGTCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCC
TTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGCAAGTTGGGAAGACA
ACCTGTAGAGGCGCTCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCAACATCTGG
CTCCTGCAATCTCGCCCTCGGGTTCAAGGCAATCTCCTGCTCAGCCTCCCGAGTTGT
TGGGATTCAGGCAATGATGACCAAGGCTCAGCTAATTTTGTGTTTGTGATAGCAAGGGG
TTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTTCAACCTCTCAATCTCAGGTGATCTACCAACCTTGG
CCTCCCAAAATGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCTTCCCTGTCTCT (配列番号 35)

P2A:

GCGACGCGCGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCGCGCAGCTGGAGGAGAACCC
CGGCCCGGAGCTAGCGGA (配列番号 36)

T2A:

(GSG)EGRSLLTCGDVEENPGP (配列番号 37)

【図 6－9】

改良された Cre リコンビナーゼ (iCre):

ATGGTGCCCAAGAAGAAGAGGAAAGTCTCCAACCTGCTGACTGTGCACCAAAACCTGCCT
GCCCTCCTGTTGGATGCCACCTCTGATGAAGTCAGGAAGAACCTGATGGACATGTTCAAG
GACAGGCGAGCCCTTCTCTGAACACACCTGGAAGATGCTCCTGTCTGTGTGCAGATCCTGG
GCTGCTGGTGCAAGCTGAACAACAGGAAATGGTTCCCTGTGAACCTGAGGATGTGAGG
GACTACCTCCTGTACCTGCAAGCCAGAGGCCCTGGCTGTGAAGACCATCCAACAGCAGCTG
GGCCAGCTCAACATGCTGCACAGGAGATCTGGCCTGCCCTGCCCTTCTGACTCCAATGCT
GTGTCCCTGGTGATGAGGAGAATCAGAAAGGAGAATGTGATGCTGGGAGAGAGGCCAA
CGAGGCCCTGGCCTTTGAACGCACTGACTTTGACCAAGTCAGATCCCTGATGGAGAACTC
TGACAGATGCCAGGACATCAGGAACCTGGCCTTCTCGGGCATTTGCCACAACACCTGCT
GCCATTGGCGAAATTTGCCAGAATCAGAGTGAAGGACATCTCCGCAACCGATGGTGGGAG
AATGCTGATCCCAATTGGCAGGACCAAGACCTGGTGTCCACAGCTGGTGTGGAGAAGGC
CCTGTCCCTGGGGTTACCAAGCTGGTGGAGAGATCTCTGTGTCTGGTGTGGCTGA
TGACCCCAACAACCTACCTGTTCTGCCGGGTGAGAAGAATGGTGTGGCTGCCCTTCTGC
CACCTCCCAACTTCCACCCCGGCCCTGGAAGGGATCTTTGAGGCCACCCACCGCTGAT
CTATGGTGCCAAAGATGACTCTGGGCAGAGATACCTGCCCTGGTCTGGCCACTCTGCCAG
AGTGGGTGCTGCCAGGACATGGCCAGGGCTGGTGTGTCCATCCCTGAAATCATGCAGG
CTGTGGCTGGACCAATGTGAACATTGTGATGAACATACATCAGAAACCTGGACCTGAGAC
TGGGGCCATGGTGAGGCTGCTCGAGGATGGGGACTAA (配列番号 26)

SP10 インスレーター (SP10ins):

GAAGCTACCCCTAACACACTATTCTACACACAGAAATGCTCTTCACTAG (配列番号 27)

3xSP10ins:

GAAGCTACCCCTAACACACTATTCTACACACAGAAATGCTCTTCACTAGGAAGCTACCCC
TAACACACTATTCTACACACAGAAATGCTCTTCACTAGGAAGCTACCCCTAACACACTATT
CTACACACAGAAATGCTCTTCACTAG (配列番号 28)

3XFLAG:

GACTACAAAGACCATGACGGAGATTATAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATG
ACAAG (配列番号 29)

10aa:

TCCGGACTCAGATCTGGAGGCTCCGGAGGC (配列番号 30)

H2B:

ACGAGGCCAGCGAAGTCTGCTCCCGCCCCGAAAAAGGGCTCCAAGAAGGCGGTGACTAA
GGCGCAGAGAAGAGCGCGCAAGAAGCGCAAGCGCAGCCGCAAGGAGAGCTATTCCATCT
ATGTGTACAAGGTTCTGAAGCAGGTCCACCTGACACCCGCAATTTCTCCAAGGCCATGG
GCATCATGAATTCGTTGTGAACGACATTTTCGAGCGCATCGCAGGAGAGGCTTCCCGCT
GGCGCATTAACAAGCGCTCGACCATCACTCCCGGAGATCCAGACGGCGCTGCGCC
TGCTGCTGCTGGGGAGTTGGCCAAAGCAGCCGCTGTCGAGGGTACTAAGGCCATCACC
AAGTACACCAGCGCTAAGTAA (配列番号 31)

H2B*:

ACGAGGCCAGCGAAGTCTGCTCCCGCCCCGAAAAAGGGCTCCAAGAAGGCGGTGACTAA
GGCGCAGAGAAGAGCGCGCAAGAAGCGCAAGCGCAGCCGCAAGGAGAGCTATTCCATCT
ATGTGTATAAGGTTCTGAAGCAGGTTCCACCTGACACCCGCAATTTCTCCAAGGCCATGG

【図 6－11】

E2A:

(GSG)QCTNYALLKLAGDVESNPGPP (配列番号 38)

F2A:

(GSG)VKQLNFDLLKLAGDVESNPGP (配列番号 39)

例示的なプラスミド骨格 1－左側の ITR:

CTCTGACGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCGTCGGGCGACCTT
TGCTGCCCGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCA
CTAGGGGTTCTCT (配列番号 40)

例示的なプラスミド骨格 1－右側の ITR:

CCTGACGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAGGCCGGGCG
TGCGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG
GCCAACTCCATCACTAGGGTTCTCT (配列番号 41)

例示的なプラスミド骨格 2－左側の ITR:

CATGTCCTGACGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAGGCCCG
GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGG
AGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTCT (配列番号 42)

例示的なプラスミド骨格 2－右側の ITR:

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG
CCGGGCGACCAAGCTGCGCCGACGCGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGA
GCGAGCGCGCAGCTGCTGACGGGCGCCTG (配列番号 43)

PHP.eB カプシド:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQNARGLVLPGYKYLPGNGLDK
GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFOAKK
RLLEPLGLVEEAAKTAAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTDGTSVPDP
QPIGEPPAAPSGVGSGLTMASGGGAPVADNNEGADVGSSSGNWHCDSQWLGDRTVITSTR
WALPTYNNHLKQISNSTSGSSNDNAYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRWDQRLINNHWG
FRPKRLNFKLFNIGQVEVDNNGVKTIANLLTSTVQVFTDSQYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADV
FMIPQGYLTLDNGSQAIVGRSSFYCLEYFPQMLRTGGNNFQSFSEFENVPFHSSYAHQSQSLD
RLMNLPLIDQLYLTSKTINGSGQNQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYPGPGSYRQQRVSTTVTQ
NNSEFAWPAGASSWALNGRNLMPNPGPAMASHKEGDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNDVADK
VMITNEEIKITNPVATESYQVATNHQSDGLTAVPFKAQAQGTGWVQNGQILPGMVWQDRDV
YLQGPWIAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPQLIKNTPTVPADPPTFANBKDNLNFSITQV
QQVSVIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYKSNNEVEFVNTGEGVSEPRPIGTRYLTRNL (配列
番号 44)

AAV9 VP1 カプシドタンパク質:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQNARGLVLPGYKYLPGNGLDK
GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFOAKK
RLLEPLGLVEEAAKTAAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTDGTSVPDP
QPIGEPPAAPSGVGSGLTMASGGGAPVADNNEGADVGSSSGNWHCDSQWLGDRTVITSTR

【図 6－1 2】

WALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFYGYSTPWGYDFNRFHCHFSRDPDWRQLINNWNWG
FRPKRLNFKLFINQYKEVTDNNGVKTIANNLSTVQVFTDSYDQLPYVLGSAHEGCLPPFPADV
FMIPQYLYLTLNDGSAQVGRSSFYCLEYFSPQMLRITGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLD
RLMNPFLIDQYLYLSKITNGSGQNQQLKFSVAGPSNMMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQN
NNSEFAWPCWASSWALNGRNLMPNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADK
VMITNEEIKTNPVATESYQVQVATNHQSAQAQAQTGWVQNGILPGMWVQDRDQVLDLQGPW
AKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPLIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGYQV/SVEIE
WELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVFAVNTGCVYSEPRPIGTRYLTRNL (配列番号 45)

tet-トランス活性化因子バージョン 2 (tTA2):

ATGTCTAGACTGGACAAGAGCAAAAGTCATAAACTCTGCTCTGGAATTACTCAATGAAGTCG
GTATCGAAGGCCTGACGACAAGGAAACCTCGCTCAAAAGCTGGGAGTTGAGCAGCCTACCC
TGTA CTGGC ACGTGAAGAACAGCGGGCCCTGCTCGATGCCCTGGCAATCGAGATGCTGG
ACAGGCATCATACCACTTCTGCCCCCTGGAAGCGGAGTCATGCGCAAGACTTTCGCGGA
ACAACGCCAAGTCATTCCGCTGTGCTCTCCTCTCACATCGCGACGGGGCTAAAGTGCATCT
CGGCACCCGCCCAACAGAGAAGACGTACGAAACCTGGGAAAATCAGCTCGCGTTCCTGTG
TCAGCAAGGCTTCTCCTCTGGAGAACGCACTGACGCTCTGTCCCGCTGGGCCACTTTCAC
ACTGGGCTCGCTATTGGAGGATCAGGAGCATCAAGTAGCAAAAGAGGAAAGAGAGACACC
TACCACCGATTCTATGCGCCCACTCTGAGACAAGCAATTAGCTGTTCGACCATCAGGGA
GCCGCAACCTGCCTTCTCTTTGCGGCTGGAACATATCATATTGGCCCTGGAGAACAGCTAA
AGTGCAGAAAGCGGCGGGCGGGCGAGCCCTTGACGATTTTGACTTAGACATGCTCCCGAG
CGGATGCCCTTGACGATTGACCTTGATGCTGCTGCTGACGCTCTTGACGATTTTGA
CCTTGACATGCTCCCGGGGTAA (配列番号 46)

GTP アーゼ HRas [ホモ・サビエンス]:

MTPEYLVVVGAGGVGKSALTIQLIQLHFVDEYDPTDIESYRKQVVIDGETCLLDILDTAGQEEYS
AMRDQYMRITGEGFLCVFAINNTKSFEDIHYREIQIRKVDSDVPMVLVGNKCDLAARTVESR
QAQDLARSYGIPIYETSAKTRQGVEDAFYTLVREIRQHKRLKLNPPDESGPGCMSCKCVLS (配
列番号 47)

Protachykinin-1 の 58〜68 番目であるサブスタンス P [ホモ・サビエンス]:

RPKPQQFFGLM (配列番号 48)

オキシトシン-ニューロフィリン 1 の 20〜28 番目であるオキシトシン [ホモ・サビエンス]:

CYIQNCPLE (配列番号 49)

GCaMP6m:

ATGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGG
GTCCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCTCGCCACCATGGTCGACTCATCACGCTC
GTAAGTGGAAATAAGACAGGTCACCGCATCAGAGCTATAGGTCCGGCTGAGCTCACTCGAGA
ACGTCATATCAAGGCCGACAAGCAGAGAAGCGCATCAAGCGGAACCTTCAAGATCCGCC
ACAACATCGAGGACGGCGGGCGGTGCGAGCTCGCCTACCACTACCAGCAGAACACCCCATC
GGCGACGCGCCGCTGCTGCTGCCCGACAACACTACCTGAGCGTGAGTGCAGTCAAACTTTGC
AAAGACCCCAACGAGAGAAGCGCGATCACAATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGG
GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTGAAGAGCAGATCGCAGAATTTAAAGAGGATTTCTC
CCTATTTGACAAGGACGGGGATGGGACAATAAACAACCAAGGAGCTGGGGACCGGTGATGC
GGTCTCTGGGGGACGACCAAGCAGAGCTGCGAGGACATGATCAATGAATAGATG
CCGACGGTGACGGCACAATCGACTTCCCTGAGTTCTCGACAAATGATGGCAAGAAAAATGA
AATACAGGAGACCGGAAGAAATATGAKGAAGCGTTCCGTTGTTGATGAAGGATGGCA
ATGGCTACATCAGTGCAGCAGAGCTTCGCCACGTGATGACAAACTTGGAGAGAAGTTAA
CAGATGAAGAGGTTGATGAATGATGAGGAGCAGACATCGATGGGGATGTCACGTTAA
ACTACGAAGAGTTTGTACAATGATGACAGCGAAGTGA (配列番号 52)

【図 6－1 4】

AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGTGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCT
GACCCCTGAAGTTCATCTGCAACACCGCGAAGCTGCCCTGCCCTGGGCCACCCCTCGTGAC
CACCCCTGACTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCACGA
CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCAAGGGCTACATCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC
GACGGCAACTACAAAGCCCGCGCGAGGTGAAGTTCTGAGGGCGACACCTGGTGAAACCG
CATCGAGCTGAAGGGCATCTGCATTTCAAGGAGGACGCGCAACATCTCGGGGACAAAGCTGG
AGTACAACCTGCCCGACCAACTGACTGTGAAGAGCAGATCGCAGAATTTAAAGAGGATTTCTC
CCTATTTGACAAGGACGGGGATGGGACAATAAACAACCAAGGAGCTGGGGACCGGTGATGC
GGTCTCTGGGGGACGACCAAGCAGAGCTGCGAGGACATGATCAATGAATAGATG
CCGACGGTGACGGCACAATCGACTTCCCTGAGTTCTCGACAAATGATGGCAAGAAAAATGA
AATACAGGAGACCGGAAGAAATATGAKGAAGCGTTCCGTTGTTGATGAAGGATGGCA
ATGGCTACATCAGTGCAGCAGAGCTTCGCCACGTGATGACAAACTTGGAGAGAAGTTAA
CAGATGAAGAGGTTGATGAATGATGAGGAGCAGACATCGATGGGGATGTCACGTTAA
ACTACGAAGAGTTTGTACAATGATGACAGCGAAGTGA (配列番号 52)

CN3406: pAAV-eHGT_888m-minBG-SYFP2-P2A-3XFLAG-10aa-H2B-WPRE3-BGHpA (長さ 3198 bp)

GCGGCCGCGACGCGTTGCTTGAAGCCAAAGCCTGTGACTTCAGTGCAGCTCTCTGCAAGGAC
TTAGCCTGTGCTGCTCTCAACACAGCTACTGTCCCCCAATTTGTGTCCCTGAGAATTTCTTA
GACTGGAGGCTAGAAGTAAAGTGGAGCCTCAAAGAGAGAAGAACTGAGGTATGTGCCACAGA
AGTAACTCAGTCCACAGAGTTCTTGTATACAGCCCTATGGGCCTAGTCCAATTTCTAGAAG
ACATGTTAAACAGCAAACTATGGTGGTGCACTGCTTGTAAATCCCAAGCAGTGAGGAGGACAG
GCAGGGAGCATCCCTAGGACTCAGGTAAAACAATGTAGCCTCCTTGGCAAGCTCCAGGGCA
GTGTGAGATACGGTCTCAGGGAGCAAGGTGAACCTTGCTACTGTGTAACATATTTCTCCAA
GCCAAACCACTGCTATCTTCATGCGTTCACTTGAGTTAAGCCTGAAGAAGATTTACAGACT
GGGCCGTGTGACCGATGACTGCCAGCATAGACAGAGGAGTGAAGAGAGCATATAGGAC
CCAGAAAACCTCAGTTCTTCTCCCAACAAGTTGTATGTGAGTCTGTGTAATTTACACTTGGC
CTTGCTGTCTTAGGGAAGGGCTACATTTTCATAGGCACCTTTGTATCTAAATGTCAATGACAGCT
GCTGCTATGGCCACCTTATTTCCAGCAGCACTATCCAGATGGTAGCAGTGGTCTCACCCAGC
AGCCTCTCACTACCAATTTGAGCAAGCCATCAGGTTTTGTAGAAGTGAGGAAAGAGAAACAAG
GGAGGACACAGGGTGAGTGATGTGCTACAGTGAGGGCCTGGGACAGCCAGGCTTTGCTGT
GGGGCTGCCCTACTCTTGTTTCTAGTGAGAACAGGCTACAGTCTGACCCCAACGGGCA
CACCTCTCCCCAGGAGGCCAACCCCATGATCTGTCCATGGGTACACAGCTAGGCGCT
CTCCGATGCTCAGACGCAAGCTAGCTGCGGGCTAGGCGCAGGCTGAAGGCAAGCACAC
GTGGCTCAGGTGCTGGGCTAATCTGAGCTCTGAGGAGGGCCCCACCACATGACATTTT
CAGGCTCGAGTGAGTCTGACCCATACATGCTGATATTTAGACAGTGTGTTTGCGAGGCG
ATTACTTTTGGAGTTGGAATGAAGCGCCCTGACACTGGAGCTGGCCTGTGTTCTCTCGGAC
CTTTTAAATCATCTCTTGCCCTGCTTCACTCAGTCTGGCCAACTCGACACTCTGAGTCTCTA
CTTGGAAACGAAGAACTAAAGGACAGAGGGTGGCTGGAGAGCTCGGGCTGGGCACTAAAA
GTCAGGGCGAGGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGGGATCCAGATCTTTCGAAGCTAG
CGCTACCGGTGACGCTACGATTTGTTCTCCAAAGGGCAGGAGCTGTTCAACGGGGTGCTGGCC
ATCCGTGGTCGAGCTGGACGGCGATGTGCAACGGCCCAAGTTGACGCGTGTCCGGCGAGGG
CGAGGGCAGTGCACATCGGCAAGCTGAGCCTGAAGCTGATCTGACACACGGGACATG
TGCCCGTGGCTGGCCCACTGCTGACCACTCGGGCTACGGCGTGCAAGTGCTTGGCC
CGCTACGCCGACCACATAAGCAGACGACTCTTCTCAAGTCCGCAATGCGCGAAGCTACAA
GTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAAGCAGCAGCGCAACTACAAAGACCCGCGCCAGAGGTG
AAGTTTGAAGGGGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATTGCTTCAAGGA
GGACGCGAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATCAACAGCCACAAACGTCTATAT

【図 6－1 3】

CACCCCTGACCTACGGCGTGCAAGTGTCTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGA
CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACATCCAGGAGGGCACCCTTCTTCAAGGAC
GACGGCAACTACAAGACCCCGCGCAGGTTGAAGTTCCAGGGCGACACCCTGGTGAACCGC
CATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTTGG
GCTACAACCTCCGGGACCAACTGACTGAAGAGAGACTCGCAGAAATTTAAAGAGGCTTTCTC
CCTATTTGACAAGGACGGGGATGGGACAATAACAACCAAGGAGCTGGGACGCGGTGATGC
GGTCTCTGGGGCAGAACCCACAGAAAGCAGAGCTCGAGGATGATGATCAATGAAGTAGATG
CCGACGGTGACGGCAACAATCGACTTCCCTGAGTTCCTGACCAATGATGGCAAGAAAAGGGA
GCTACAGGGACACGGAAGAAGAAATTAGAGAAGCGTTCCGGTGTGTTTGAAGGATGGCA
ATGGCTACATCAGTGCAGCAGAGCTTCCGCCAGTGTGACAAACCTTGGAGAGAAGTTAA
CAGATGAAGAGGTTGATGAAATGATCAGGGAAGCAGACATCGATGGGGATGGTCAGGTAA
ACTACGAAGAGTTTGTACAAATGATGACAGCGAAGTGA (配列番号 50)

GCaMP6s:

ATGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGG
GTCCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCTCGCCACCATGGTCGACTCATCACGCTC
GTAAGTGGAAATAAGACAGGTCACGCACTACGACATAGGTCCGGCTGACGATCGAGTGA
ACGTCATATATCAAGGCCGACAAGCAGAGAAGACGCGCATCAAGCGCAACTTCCACATCCGCC
ACAACATCGAGGACGGCGGGCGTGCAGCTCGCCTACCACTACCAGCAGAACACCCCATC
GGCGCAACCCCGTGCTGCTGCCGACAAGCATACCTGAGCGTGCAATGCTCAAACTTTTCG
AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAATGGTCTGCTGAGGTTCGTGACCCCGCGCGG
GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCGGTACCGGAGGAGCATGGTGAGCA
AGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCATCTCGTGCAGCTGGACGGCGACGTA
AACGGCCACAAGTTGACGCGTGTCCGGCAGGGGTGAGGGCGATGCCCACTACGGCAAGCT
GACCCCTGAAGTTTCACTGCAACACCGCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGAC
CACCTTGACTGACGGCGTGCAAGTGTCTTCAAGCGCTACCCGACCACTGAGTGAAGCAGCA
CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACATCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC
GACGGCAACTACAAGACCCCGCGCAGGTTGAAGTTGAGGGCGACACCTGGTGAACCG
CATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTTGG
AGTACAACCTGCCGGACCAACTGACTGAAGAGCAGATCGCAGAATTTAAAGAGGCTTTCTC
CCTATTTGACAAGGACGGGGATGGGACAATAACAACCAAGGAGCTGGGACGCGGTGATGC
GGTCTCTGGGGCAGAACCCACAGAAAGCAGAGCTCGAGGACATGATGATGAAGTAGATG
CCGACGGTGACGGCAACAATCGACTTCCCTGAGTTCCTGACCAATGATGGCAAGAAAATGA
AATACAGGAGCAGGGAAGAAGAAATTAGAGAAGCGTTCCGGTGTGTTTGAAGGATGGCA
ATGGCTACATCAGTGCAGCAGAGCTTCCGCCAGTGTGACAAACCTTGGAGAGAAGTTAA
CAGATGAAGAGGTTGATGAAATGATCAGGGAAGCAGACATCGATGGGGATGGTCAGGTAA
ACTACGAAGAGTTTGTACAAATGATGACAGCGAAGTGA (配列番号 51)

GCaMP6f:

ATGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGG
GTCCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCTCGCCACCATGGTCGACTCATCACGCTC
GTAAGTGGAAATAAGACAGGTCACGCACTCAGAGATAGGTCCGGCTGAGCTCACTCGAGA
ACGTCATATCAAGGCCGACAAGCAGAGAAGACGCGCATCAAGGCGCAACTTCAAGATCCGCC
ACAACATCGAGGACGGCGGGCGTGCAGCTCGCCTACCACTACCAGCAGAACACCCCATC
GGCGCAACCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCGTGCAATGCTCAAACTTTTCG
AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAATGGTCTGCTGAGGTTCGTGACCCCGCGCGG
GATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCGGTACCGGAGGAGCATGGTGAGCA
AGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCATCTCGTGCAGCTGGACGGCGACGTA

【図 6－1 5】

CACCGCCGACAAGCAGAGAAGACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGA
GAGCGCGCGCTGCGAGCTCGCCGACCACTACCAAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGGCC
CCGCTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCTACCACTCCAAGCTGAGCAAGAACCCCA
ACGAGAAGCGCGGATCACAATGGTCTGCTGGAGTTCTGTACCGCGCGCGGGATCACTCTC
GGCATGGACAGCGCTGTACAAGGGCTCGTGGTCTACCAACTTCTCACTGTTGAAGACGGCA
GGGATGTAGAGGAGAATCCAGGGCGCTGGTGCTAGTGAGAGATACAAGACCATGACGCGG
AGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAACTCCGAGCTCAGATCT
GAGGGCTCCGGAGGGCCAGAGCCAGCGAAGTCTGCTCCGCCCGGAAAAAGGGCTCCAA
GAGCGCGGTGACTAAGGCGCAGAGAAGAAAGGGCGGCAAGAGCGCAGCGCAGCCGCAAG
GAGAGCTATTCATCTATGTGTACAAGTTTCTGAAGCAGGTTCCACCTGACACCGGCAATTT
CTGACAGGCGCATGGGATGATGAATTCGTTTGTGAACGACATCTGACCGCATCGAG
GAGAGGCTTCCCGCTGGCGCATTACAACAAGCGCTCGACCATCACTTCCCGGAGGATCC
AGACGGCGCTGCGCTGCTGCTGCCCTGGGAGTTGGCCAGGACGCGGCTGTCGAGGGT
ACTAAGGCATACCAAGTACACCAAGCGCTAAGTAAAGAGGGCGGCCGCGCGCAAT
CGATATCATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAGATGACCTGGTATTTCTGCAACGCG
GATCTGCTCTTTACGCTATGTGGAACGCTGTTAATGGCTTTGATCATGCTATTGCTT
CCGATGGCTTCTATTTTCTCCTCTTGTATAAACTCGGTAGTTCTGCCACGGCGAAC
TCATCGCGCCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATT
CCGTGGCTCGAGAGATCTTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGGCATCTGTTGTTTGGCCCT
CCCCGTGCTTCTTTCGACCTTGAAGGTCGCACTCCCACTGCTTCTTCTCTAATAAAATGA
GGAATTTGCATCGCATTTGCTGAGTAGGTGTCAATCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCA
GGACGGAAGGGGGAGGATTGGGAAGACATAGCAGGCATGAGATCTCACGTGCGGACC
GAGCGCGCCG (配列番号 53)

CN3509: pAAV-eHGT_897m-minBG-SYFP2-P2A-3XFLAG-10aa-H2B-WPRE3-BGHpA (長さ 2442 bp)

GCGGCCGCGACGCGTAGGCTAGACAATCTTAAAGGGTCTTGTGTTGATATCTGGGCTCTCAA
CACTCCCTGGTCAGCCTCCCAAGCATGCATCTGTCTATTCTAAGTACGGAATATTATAT
CCTTCTAAGATAAACACATAGATTTGCCACTATATTGCTTAGATTGACGTTACTAGATCC
CAGCTTTACTTCCATTTATGAACATGAGTTTCTGTCTATCTCTTACCGGTATAAACCTG
GTGTTTTATTACCTACAAAGGCGAGTTAAAAAGGCTGGAAGGAACATAATTAATATAAACA
GATTTCTAAGGCAGCATGACTTGTATGTTGCTATAGAACAATGGGATTTCTGCTCACT
GACCTTTCAGATAATGCAAGAATATGCTTTTCAATAAACTCATAGAGTAATCAGCCTAGGAT
ATTCACTTCTAGTTTCTGGTGAGCATTTTGAATCCCCCTTTGCACTCTGGATGATTTTGA
AGTTAAATGTATTGTTCAAGCTTACTATAGAGTCAAGATATAACTCTTTGAAGAGAGCTCG
TCTTCCGAGCATAAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGGGATCGA
GCTTGCAAGCTACGCTACCGGTGCCACCATGGTCTCAAGGGCAGGAGGAGCTGTTTAC
CGGGGTGGTGGCCCATCTGCTGCGAGCTGGACGGCGATGTCAACGGGCCAAGTTGACGG
TCTCGCGCAGGGCGAGGGGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTCAAGCTGATCTGCTCG
ACCCACGGCAAGCTGCCCTGGCCCTGGCCACCCCTGTCGACACCCCTGGGCTACGGCGT
CGAGTGTCTTCCCGCGTACCCCGACCACTAGAAGCAGCACTTCTTCAAGCTGCGCAT
GCCCGAGGCTACGTCGAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAAGACGACGGCACTACAAGAC
CCGCGCGGAGGTGAAAGTTGAGGGCGACACCTGTTGTAACCGCATCGAGCTGAAGGGCA
TCGACTTCAAAGGACGCGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAAGTACAACATCAACAGCC
ACAAGCTCTATATGACCGCCGACAAGCAGAGAAGCGCATCAAGGCACTTCAAGATCT
GCCACAACATCAGGAGCAGCGCGGCTGCGAGCTGCCGACCACTACCAAGCAGAACACCCCT
ATCGCGCAGCGCCGCTGCTGCTGCCGACAACCACTGAGCTACCACTGAGCTACCAAGCTG
AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAATGGTCTGCTGGAGTTGCTGACCGCGCG

10

20

30

40

50

【図 6 - 1 6】

CGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCTCTGGTGCTACCAACTTCTCACT
GTTGAAACAGGCAGGGGATGTAGAGGAGAATCCAGGGCCTGGTGCTAGTGAGAGACTACAA
AGACCATGAGCGAGATTATAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGTG
GGACTCAGATCTGGAGGCTCGGAGGCGCCAGGACGAGCGAAGTCTGCTCCCGCCCGGAA
AAAGGGCTCCAAGAGGCGGTGACTAAGCGCAGAGAAGAGGCGGCAAGAGCGCAAGC
GCAGCGCGCAAGGAGGCTATTCATCTATGTGTACAAGGTTCTGAAGCAGGTCACCCCTG
ACACCGGCATTTTCGCCAAGGCCATGGGCATCAGAATTCGTTTGTGAACGACATTTTCGA
GCGCATCGCAGGAGAGGCTTCCCGCTGGCGCATTACAACAAGCGCTCGACCATCACCTC
CCGGGAGATCCAGACGGCCGTGCGCTGCTGCTGCGTGGGAGTTGGCCAAGCACGCC
GTGTCCGAGGGTACTAAGGCCATCACCAAGTACACACAGCGCTAAGTAATGAGGCGCGCCG
CGCGCGCAATTCGATATCATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTAAAGATTGACTGG
TATTTCTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATTACGCTGCTTTAATGCGCTTTGTATCA
TGCTATTGCTTCCCGATGCGCTTCTATTTCTCCTCTTTGTATAAATCCTGGATTGTTCTTGC
CACGGCGGAAGTCACTCGCGCGCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTGG
GCACGTGACAAATCCGTGGCTCGAGAGATCTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTG
TTGTTTTCGCCCTCCGCCGTGCTCTTCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGCTCCTTTC
CAATAAAATGAGAAATGACATTCGACTTGTCTAGTAGGTGTCTATTCTATTCTGGGGGT
GGGGTGGGGCAGGACACAAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGAGATCTC
ACGTGCGGACCGAGCGGCCG (配列番号 54)

CN3058: rAAV-3xcore4_eHGT_606h-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA (長さ 1934 bp)
GCGGCCGCACGCTTATTAGGTTATTGCAATAATCTAGGCCAAGAGAGATGGATCAGGGTG
ATAACAGTAACTTCATGAGAGCATTTTCAGTTGCAAAATATATCCAGATTTGCTGACCCAGAT
TTGATAGGAATATAGAAAAGAGGAAAGAACAGAGATAACAGAGTGTAGGACAGAAAAAG
GAAAAGGTTCAAAGACTGAGCCCTGTATTAGGTTATTGCAATAATCTAGGCAAGAGAGATG
GATCAGGGTGATAACAGTAACTTCATGAGAGCATTTTCAGTTGCAAAATATTTCCAGATTG
CTGACCCAGATTTGATAAGGAATATAGAAAAAGGAAAGAACAGAGATAACAGAGTGTAG
CGAGAAAGAGAGAAAGGTTCAAAGACTGAGCCCTGTATTAGGTTATTGCAATTAATCTAGG
AAGAGAGATGGATCAGGGTGATAACAGTAACCTTCATGAGAGCATTTTCAGTTGCAAAATAT
TCCAGATTTCGTCAGCCAGTTTCAAAGGATATAGAAAAAGAGGAAAGAACAGAGATTTTCGA
CAGAGTGTAGGCAGAAAAGAGAAAGGTTCAAAGACTGAGCCCTGGAGCTCGGGCTGGG
CATAAAGTCAAGGCGAGGACATATTGCTTCAATTTGCTTCTGGGATCCAGATCTTTGCA
AGCTAGGCGCTACCGGTGCCACCATGTTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGGTG
GTGCCATCTCGTGTGAGCTGAGCGGCCAGCTAACCGGCCACAAGTTCAGGCTGTCCGG
CGAGGGCGAGGGGCATGCCACCTACCGCAAGCTGACCCTGAAGCTGATCTGCACCAACCG
GCAAGCTGCCCCTGCCCCTGCCCACCCCTGTCGACCACCTGGCCTGAGCAGTGTGCAATG
TTGCGCCGCTACCCCGACCCATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCGCCGAA
GGCTACGCTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGCGCACTACAAGACGCGCCG
GAGGTGAAGTTTCAGGGCGACACCCCTGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTT
CAAGGACGCGCGCAACATCTCTGGGCGACAAGCTGGAAGTACAACATACAGAGCCACAACCT
CTATATCAGGCGCGACAAGCAGCAAGCGCATCAAGGCCAAGTCTCAAGTCCGCCACA
CATCGAGGACGCGCGCGTGCAGCTCGCGGACCACTACCAAGCAGAACACCCCATCTGGCG
ACGCGCCCGTGGCTGCTGAGCTGACCAACCACTGAGCTACCGATCCAAGTGAAGCAAG
ACCCCAACGAGAAAGCGGCATCACATGCTGCTGCTGAGTTCGTGACCGCGCGCGGATC
ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACTGACGCGCGCGCGCGCGCAATTCG
ATATACATCAACCTCTCGATTACAAAATTTGTGAAGAGTTGACTGGTATTCTTAACATGTT
TGCTCCTTTTACGCTTGTGGATACGCTGTTTAATGCCCTTTGTATCTGCTATTGCTTCCC
GTATGGCTTTCATTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGTTAGTCTTGCCACGCGCGAAGCTC

【図 6 - 1 8】

TTGAATTGCGAATAGGAACCATCTCAAGGCTTTAAATACAAGTCTGAACACTCTCAAAAT
TATATTTTATCCAGAGCTTCTCTAAATTCAGTTTCTAAATCCAGAAAAAGAGGAAAGAA
CAAGAGATAACAGAGTGTAGGCGAGAAAGAGAAAGGTTCAAAGACTGAGCCGTCAGTA
TTTCAACATTTAAGAGCTTGAATTCGAGAAATAGGAACCATCTCAAGGCTTTAAATACAAGTGC
TGAACACTCTCAAAATTTATATTTGATTCCCGAAGCTTCTCTAAATTCAGTTTCTAAATCCAG
AGCTCGGGCTGGGCATAAAGTCAAGGCGAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGGGA
TCCAGATTCTTTGCAAGTACGCGTACCCGTGCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
GTTCAAGCGGGTGGTGCCATCCTGGTGCAGCTGGACGCGCGACGTAAACGCGCCACAAGT
TCAGCGTGTCCGCGAGGGCGAGGGCGATTGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGCTG
ATCTGCAACCAACGGCAAGCTGCCGCTGCCCTGGCCCAACCCCTCGTGACCACCTCGGGCTA
CGGCGTGGAGTGTCTCGCCGCTGATCCCGGACCAACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTG
GCGCATGCCCGGAGGCTGAGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGAGCAACTA
CAAGACCGCGCGGAGGTGACGTTGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCTGACGATGA
AGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGCGCAACATCTCGGGCGACAAGCTGAGGTACAACTACA
AGCCCAACAGCTTATATACACCGCGACAAAGCAGCAAGCGCATGCAAGGCCAACTTCA
AGATCCGCCCAACATCGAGGACGCGCGCTGCAAGCTCGCCGACCACTACCAAGCAGAAC
ACCCCATCGCGGACGCGCCCTGCTGCTGCCGACAACTACCTGAGCTACCACTG
CAAGCTGAGCAAAAGACCCCAAGGACGCGGATACATGCTGCTGCTGAGTTCGTGAC
CGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGTGAACGCGCGCGCG
GGCGCGAATTCGATATCATAACTCACTCTGGAATTACAAAATTTGTGAAGAGTTGACTGGT
ATTCTTAACATATGTTGCTCCTTTACGCTATGGATACGCTGCTTTAATGCTTTGTATCAT
GCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTATTTTCTCCTCTGTATATAAATCCTGGTTAGTCTTGGC
ACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTGGG
CACTGACAATTCGTGGCTCGAGAGATCTTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGGCCATCTGT
TGTTTGGCCCTCCCGCGTGCCTTCTGACCTGGAAGGTGCCACTCCCAGTGTCTTCC
TAATAAAATGAGGAAATTCATCGAGTGTGCTGAGTAGGTGTCAATTTCTTCTGGGGGTG
GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCACGTGC
GACCGAGCGCGCCG (配列番号 57)

CN2436: rAAV-eHGT_606h-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA (長さ 2182 bp)
GCGGCCGCACGCTGGGAAGAAATGAGTGTCTGGGCTGGAGGGTTTGAATTTTTTAAAG
TGGAAGTCAAGAAATGACCAACGGAGAGGTTGGCATTGAGTGAACACCTCAAAGTGTTT
GAGAGAAAGTGGTGAGATATGCGGACAGCGCTTCAGGCGAGAGAAATAACCTGGGATGT
CTGAGAAAAGCAAAAGCTGGGGCTACTCGATCAAGAGAGAGATTGAAGATAGGT
TAGCCAGAGAGTTATCAGAAATATAAGATTGCATAGGGCATTTTTAGGCCAATATAAGGACTG
GCATTTTATGCTCATGTAGAAGTGGCATTTACTCTGCTTAAATAGGAAATACAGCTGGAG
CATTTTGTAGCAGAGAGTTGAAGCTGTCTGATTTAAATTTTAAAGGTTCTCGGCTACCTTGT
GAGAAGAGACTGAAGTATAGATATGCAATGGAAGTAGGTATCATCAGTTATTGAGGTATTTCGA
AATCTAGGCAAGAGAGATTGGATCAGGGTGATACAGTAACTTCATGAGGATCTTCAGT
GCAAAATATATCCAGATTGCTGACCCAGATTGATAAGGAATATAGAAAAAGAGGAAAGAAC
AAGAGATATACGAGTGTAGGAGCGAGAAAGAGAAAGGTTCAAAGACTGAGCCCTGCGATT
TCAACATTTAAGAGCTTGAATTCGAGAAATAGGAACCATCTCAAGGCTTTAAATACAAGTGTCT
AACACTCTCAAAATTTATATTTGATCCCGAAGCTTCTAAATTTCAAGTTCTAAATCCAGT
GTTTACTTTATGTCTCACTTGGAAACAGCTTGAAGCAGTGAGCTCGGGCTGGGCATAA
AAGTCAGGCGAGGCATCTATTGCTTCAATTTGCTTCTGGGATCCAGATCTTTGAAAGCT
AGCCCTACCCGCTGCCACCATGGTGAGCAGAGGGCGAGGAGCTTGCACCGGGGGTGGTGC
CCATCTGTGCTGAGTGTGAACGCGCAGCTAAACGGCCACAAGTTACGCTGTGCGCGGAG
GGCGAGGGCGATGCCACCTACGCGAAGCTGACCCTGAAGCTGATCTGCACACCGCGCA

【図 6 - 1 7】

ATCGCCGCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTC
CTGGGCTCGAGAGATCTTCGACTGTGCCCTCTAGTTGCCAGGCTATCTGTTGTTGCCCTC
CCCCGTGCTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAGTCTGCTTTCTTAAATAAATGAG
GAAATTTGATCGCATTTGCTGAGTAGGTGTCAATTTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAG
GACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCACGTGCGGACCGAGCGGG
CGC (配列番号 55)

CN3059: rAAV-3xcore5_eHGT_606h-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA (長さ 1931 bp)
CGGCGCGCACGCGTGATAACAGAGTGTAGGCAGAAAAAGGAAAGGTTCAAAGACTGAGC
CCTGCAAGTATTCAACATTAAGAGCTTGAATTCGAGAATAGGAACCATCTCAAGGCTTTAA
TACAAGTGTGCAACACTCTCAAAATTTATATTTGTATCCAGACTTCTCTAAATTCAGGTTCT
AAATCCAGTGTGTTACTTTATGATAACAGAGTGTAGGCAGAAAAAGGAAAGGTTCAAAG
CTAGCGCCCTGCAGTATTTCAACATTAAGAGCTTGAATTCGAGAATAGGAACCATCTCAAG
GCTTTAAATACAAGTGTGCAACACTCTCAAAATTTATATTTGTATCCAGACTTCTCTAAAT
CAAGTTCTAAATCCAGTGTGTTACTTTATGATAACAGAGTGTAGGCAGAAAAAGAGAAAG
GTTCAAAGACTGAGCCCTGCAGTATTTCAACATTAAGAGCTTGAATTCGAGAATAGGAAC
ATCTCAAGGCTTTAAATACAAGTGTGCAACACTCTCAAAATTTATATTTGTATCCGAGACTTCT
CTAAATTTCAAGTTCTAAATCCAGTTGGTTACTTTATGAGCTCGGGCTGGGCATAAAGGT
AGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGGGATCCAGATCTTTCGAAGCTAGGCC
TACCGTTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTTCCACCGGGTGGTGCCCATCT
CTGGTGCAGCTGGACGCGGACGTAAACGGCCACAAGTTGAGCGTGTCCGGCGAGGGCGGA
GGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGCTGATCTGCACACCGGCAAGCTGCG
CCGTGCCCTGGCCCAACCTCGTGACCACCTGGGCTACGGCGTGCAGTGTCTCGCCCGC
TACCCGACCATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTC
CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGCGCAACTACAAGACCCGCGCGGAGGTGAA
GTTGAGGGCGCACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAGCTGACCATCTGCAATTCAGGAG
ACGGCAACATCTCGGGGCGACAAGCTGGAGTACAACACTACAAGCCACACACCTTATATCA
CGCCGCGAGCAGAGAAGAACGCGCATCAAGGCCAAGTCTCAAGATTCGCCGCAAGCTCAGG
ACGGCGGCTGCGAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGCGCAGCGGCCCT
GTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAAGTCAAGCTGAGCAAGCAAGCACTCAAG
GAGAAGCGCGATACATGGTCTGCTGGAAGTTCGTGACCGCGCGCGGGATCACTCTCGG
GTGACGAGCTGTACAAGTAAGTCGACGGCGCGCGCGCGCGAATTCGATATATAA
TCAACTCTGGAATTACAAAATTTGTGAAGAGTTGACTGGTATTCTTAATGATTTGCTCCTTT
TACGCTATGTGAGTACGCTGCTTTAATGCTTTGTATGATCTGCTATCTCCGATGAGCT
TCATTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTATGTTTGGCAACGGCGCAACTATCGCCGCG
TGCTTTCGCCGCTGCTGGACAGGGCTCGGCTGTGGGCTGAGGACTGACATCTGGCTGCT
AGAGATCTTGCAGTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGGCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCGCTGCC
TCTTGTACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCAGTGTCTTCTCTAATGAAATGAGGAAATGCAAT
CGCATTTCTGAGTAGGTGTCTTCTATCTTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGACGACGAG
GGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCACGTGCGGACCGAGCGGCCG (配列番号
56)

CN3829: rAAV-3xcore_eHGT_1039h-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA (長さ 1952 bp)
GCGGCCGCACGCGTGAAAAAGAGGAAAGAACAGAGATAACAGAGTGTAGGCAGAAAAAG
GAAAAAGTTCAAAGACTGAGCCCTGCAGTATTTCAACATTAAGAGCTTGAATTCGAGAATA
GGAACCATCTCAAGGCTTTAAATACAAGTGTGCAACACTCTCAAAATTTATATTTGTATCCCA
GACTTCTCTAAATTCAGTTCTAAATCCAGAAAGAGGAAAGAGAAAGAGATAACAGAG
GTGAGGCAGAAAAAGGAAAGGTTCAAAGACTGAGCCCTGCAGTATTTCAAGCATTAAGAGC

【図 6 - 1 9】

GCTGCCCTGCCCTGGCCCAACCTCGTGACCACCTGGGCTACGGCGTGCAGTGCTTCG
CCGCTACCCCGACCCATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATCGCCGAGGCT
ACGCTCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGGAG
GTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAG
GAGGACGGCAACATCTTGGGGCGACAAGCTGGAGTACAACACTACAAGACCGCAAGCTCAT
ATCACCGCGCGACAAGCAGAGAAGCGGCATCAAGGCCAAGTCAAGATCGCCGCAACATC
GAGGACGGCGCGCTGCAGCTCGCCGACCACTGAGCTACAAGACCCCATCGGACGCGG
CCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAAGTCCAAGTCAAGCAAGAACG
CAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTGTGACCGCGCGCGGAGTCACTCT
CGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGTCGAGCGCGCGCGCGCGCGAATTCGATATC
ATAATCAACCTTGTGATTACAAAATTTGTGAAGAGTTGACTGGTATTCTTAATGATTTGCTC
CTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCTTTGTATCATGCTTACTTCCGATG
GCTTTTATTTCTCCTCTGTATAAATCCTGGTTAGTTTCTGCAAGCGGCAAGCTCATCGC
CGCTGCCCTGCCGCTGCTGGACAGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGG
CTCGAGAGATCTTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGGCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCGG
TGCTTCTCTGACCCCTGGAAGGTGCCACTGCCCTGCTTCTCTAATAAATGAGGAAAT
TGCAATCGCATTTCTGAGTAGGTGTCTATCTTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACGAG
CAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGAGATCTACGTGCGGACCGAGCGG
CCGC (配列番号 58)

CN3283: rAAV-3xCore_hTH-minBG-SYFP2-WPRE3-BGHpA (長さ 1598 bp)
CGGCGCGCACGCGTACTGCCGATGTGGATTAACTTTTACGCAAAATGTCTTCCACTGATA
CAAAATTTGCTTTTAAATTCGGTTTCTCGCGGACTGCCGGATGTGGATTAACTTTTTCAGC
AAATGTTCTTCCACTGATACAAAATTTGCTTTTAAATTCGTTTCTCGCGGACTGCCGGATG
TGATTATAACTTTTCAAGAAATGCTTCCACTGATACAAAATATTGCTTTTAAATTCGGTTTCC
TGCGGGAGCTCGGGCTGGGCATAAAAGTCAAGGCGAGAGCCATCTATTGCTTCAATTTGC
TGTGGGATCGAGATCTTTCGAAGCTAGCGCTACCGGCTGCCACCATGGTGAGCAAGGGC
TAGGAGCTGTTTACCGGGGTGGTGCCCATCTGCTGCAGCTGGAACGCGGACGTAAACCG
CCACAAGTTACGCTGTGCCGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACTACGCGAAGCTGACCC
TGAAGCTGATCTGCACACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCCTGTGACCACC
CTGGGCTACGGGCTGCAGTGTCTGCCCGCTACCCCGACCAACATGAAGCAGCAGCACTTC
TTCAAGTCGCCATGCCGAAGGCTACGCTCAGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGAC
GGCACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCAT
CGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGCGACAAGCTGGAGT
ACAACCTACAACGCGCAACGCTTATATCACCGCGACAAGCAGAAAGCGGCATCAAGG
CCAATCTCAAGATCGCCGCAACATCGAGGACGCGCGGCTGCGAGCTCGCCGACCACTACG
ACGAGAACACCCCATCGGCGACGGCGCCGCTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGC
TACCGTCCAAGCTGAGCAAAAGACCCCAACGAGAGAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAG
TCTGTGACCGCGCGCGGATCACTCTCGGACGTGAGCAGGATGTACAAGTAAGTGCAGCGG
GCGCGCGCGCGCGAATTCGATATCATATCAACCTCTGGATTACAAAATTTTGAAGAGT
TGACTGGTATTCTTAATGTTGCTCCTTTTACGCTTGTGGATACGCTGCTTATTGCTGCT
TTGATGACTGCTATTGCTTCCGCTATGGCTTTTCAATTTCTCCTCCTGTATAAATCCTGGT
GTATTTGCCACGGGAACTCATCGCCGCTGCTGCTGCGGACGCGCACTGTGACAGGGGCTG
GCTGTTGGGCATGACAATTCGCTGGCTCGAGAGATCTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCA
GACCTGCTGTTGTTTGGCCCTCCCGCTGCTTCTGACCTCGGAAGGTGCCACTCCCACT
GTGCTTCTCTAATAAATGAGGAAATGCAATCGCATGTCTGAGTAGGTGTCAATTTCTTCT
GGGGGTGGGGTGGGGAGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGAGATCTACGTGCGGAC

【図 6－2 0】

AlP1240: pAAV-MGT-E68-minBGprom-FlpO-WPRE-hGHPa (長さ 3071 bp)
GCGGCGGCAGCGCTCCAGGAAGAAACAAGAGCAGCTTTAGTCAACAAGATCCTTTTTCAG
AAGACCAATGACAAACCATCCCTCAGGCCCTCTCAAGCTGCTCAGTGTGCAGGGCTCTC
GCCTCCTCAGACCACCGCTCAGGGGTGCTAACGGCCACCTGGTATTATTGAGAACTTAGCA
CGTCAGATCAAAATGCTTCTGTTCTATGGTCTGACCCAGTCTTACTATGAGTTCAGATTATG
ACTCTCAATTTACTAAAAAGAACTGATGATTTGAGAGGAGAAATGACCCAGCTAAGGCC
ATGTTAGGAATGTCTTGATGAGCCAAAGCTTCATCCAGACCTGATTCTGGGGCTCTGTGCTG
TCATCCAATGTGCCTGGCCACTAAAGAACTTCAGTTCCTTTGTGGAATGGGGCCAGATGCC
CACCCCAGATAGTTTACGACACCTTGATGCTCCTTGAGACTCTGTAAAAAATTTTTTAAAG
CAACAAATGACTGAAAACTACTTTGAACAAAGGCCAAGCATGTTTGTTCAGACCAGGCTCG
GGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGGCGTGGCC
ACCATGGCTCCTAAGAAGAAGAGGAGGTGATGAGCCAGTTCGACATCCTGTGCAGAACCC
CCCCCAAGGTGCTGGTGCAGCTTCTGCGGAGATTCTGAGAGAGATTGAGAGGCCAGCGGCGA
GATGCCAGCTGTGCCCGGAGCTGACCTACCTGTGCTGGATGATCACCCACAACGGGCAC
GCCATCAAGAGGGCCACTTCATGAGCTACAAACCATCATCAGCAACAGCCTGAGCTT
CGACATCGTGAACAAGAGCTGCGAGTTCAAGTACAAAGACCAGAACGGCCACCATCTGGGA
GCCAGCTGAAGAAAGCTGATCCCCGCCGCGGAGTTCAACCATCATCCTTTACAACGGCCA
GAAGCACCAGAGCGACATCACCGACATCGTGTCCAGCCTGCAGCTCGAGTTCGAGAGCAG
CGAGGAGGCCGACAGGGGCAACAGCCAGCAAGAAGATGCTGAAGGGCCTGCTGTCCG
AGGGCGAGAGATCTGGGAGATCACCGGAGATCCTGAACAGCTTCGAGTACGACAGCA
GGTTCAACAAGACCAGACCCCTGTACCGAGTTCCTGTCTGCCACGATTCATCAACTGCGG
CAGGTTTCAGCGCATCAAGAAGCTGGACCCCAAGAGCTTCAAGCTGGTGCGAACAAGTA
CCTGGGCGTGATCATTCAGTGCCTGGTGACCGGACAGCAAGCAAGCGTGTCCAGGCACAT
CTACTTTTTCAGCGCCAGAGGCAGGATGACCCGCCCTGGTGTACCTGGAGCAGTTGCTGAG
GAACAGCGAGCCCGTGCTGAAGAGAGTGAACAGGACCGGCCAACAGCAGCAGCAACAAGC
AGGAGTACAGCTGCTGAAGGACAACTGGTGGCGAGCTACAACAAGGCCCTGAAGAAGA
ACGCCCTCATCCCATCTTCCGCTATCAAGAAGCGGCCCTAAGAGCCACATCGGACGAGCACT
TGATGACCACTTTCTGAGCATGAAGGCTGACCGGATGACAACAGCTGGTGGGCACT
GGAGGACAAAGAGGGCCTCGCCGCTGGCCAGGACCACTACACCCACCATGATCACCGCC
ATCCCCAGCAACTGATCGCCCTGGTGTGAGGCTACTACGCCCTACGACCCATCAGCAAG
GAGATGATCGCCCTGAAGGACGAGACCAACCCCATCGAGGAGTGGCAGCAGCATCGAGCA
GCTGAAGGGCAGCGCCGAGGGCAGCATCAGATACCCGCCCTGAAGCGCATCATCAGCC
AGGAGGTGCTGGACTACCTGAGCAGTACATACAAAGCGGATCTGAGAATTCGATATCA
ACTGTTTCGATAATCAACCTCTGGATTACAAATTTGTAAAGATTGACTGGATTGTTCTTA
CTGTGCTCCTTTTACGCTATGTGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATCTGATTGCTT
CCGTTATGGCTTTGACTTTTCTCCTCCTTTGATAAATCCTGGTGTCTCTTTATGAGGAG
TTGTGGCCCTGTTCAGGCAACAGTGGCGGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCCAACCC
ACTGGTTGGGGCATTTGCCACCACTGTGACGCTCTTTCCGGGATCTTCGCTTTCCCCCTCC
CTATTGCCAGCGGCGAAGTCTGCCGCCCTGCCCTTGCCTGCTGTCGAGCAGGGGCTCGG
CTGTTGGCGCATGACAATTCGTGGTGTGTGCGGGAATCATCGCTCTTCTCGTGGCTG
TCGCTATGTTGCCACTTGGATTCGCGCGGACGCTCCTTCTGCTACGCTCCCTTCCGCC
TCAATCAGCGCCACCTCTTCCCCGCCGCTGCGCCGCTTCCGCGCTTCTCCGCGTCT
TTCCGCTTCCGCCCTCAGACGAGTGGATCTCCCTTTGGGCGCCCTCCCGCATCGATACC
GAGCCGTGCTCGAGAGATCTACGGGTGGCATCCGCTGTGACCCCTCCCCAGTGGCTCTCT
GGCCCTGGAAGTGTCCACTCCAGTCCGACCGCCATGCTCTAATAAATTAAGTGTCTCAT
ATTTTGTCTGACTAGGTGTCCCTCTATAATATTATGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCA
AGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGAGTTCGCGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGG

【図 6－2 2】

CCCCCGTGCCTTCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCCAGTGTCTTTTCTAATAAAATGA
GGAAATGTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCACTTCTATTCTGGGGGTGGGTGGGGCA
GGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCAATGAGATCTCAGTGGCGACC
GAGCGGCGCG (配列番号 63)

CN3889: pAAV-eHGT_1038m-minBG-SYFP2-P2A-3XFLAG-10aa-H2B⁺-WPRE3-BGHPa (長さ 2318 bp)
GCGGCGGCAGCGCTGACAGTAATGGGTCTTCTGACTCCAAGAGCCTCTTGGGCAGAAAA
AGAACTAGGGTCAGAAAGGAGAGAGCTAGGTGGGGGTGTCTCTGTCTCCAACACCCCTCT
CCCATATCAGGGCATATTGGCAATCTGTTGTAATAGCTCGGATTGATCGAGATGTG
CATCTCTTGCTGATCCAATTTATTGAGAACCTTTCAAGAGGATGTGAGGCTGGACAATG
GCCTGTGTTTTGTACATGTTATACCTCTTCAACAGCTCTGAGAACACAGCCCTCAACT
AAGCCAAGCTGACAGTAGGATGGGTTGAACAGAAATCTTGTCTTTTCCACTGGCAGTGC
GGTCTTGCTTTGACTTTCTTCCGTGGCTGAGAGGTTAAGACAGGAGGGAACCCAGTAGG
GAAGGGAGCTCGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTT
CTGGAGTCCAGATTCTTTCGAAGTACGCTACCGGTGCGCCACCATGCTTCCAAGGGGGA
GGAGCTGTTCCAGCGGGGTGGTGCCTACTCTGTGAGCTGGAGCGAGGTGTAACGGGCC
ACAAGTTACAGGTGTCCGGCGAGGCGGAGGCGATGCCACCTACGGCAAGTGAACCTG
AAGCTGATCTGACCAACCGCGAAGCTCGCCGTGCCCTGCCGCCACCTCTGTGACCCACCT
GGGCTACGGCGTGCAGTGTCTTCCCGGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGCTTCTT
CAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGACGAGCGG
CAACTACAAGACCCGCGCCAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCG
AGCTGAAGGGCATCGACTTCAGGAGGAGCAGGCAACATCTCGGGCACAAGCTGGAGTAC
AACTACAAGCAGCCACAAGCTCTATATACCCGCCGACAGCAGAGAAGACGGCATCAAGGCC
CAACTTCAAGATCCGCCACAACATCTGAGGACGGCGGCGTGCAGCTCGCGGACCATACAG
CAGAACACCCCATCGGGCAGCGGCCGCTGCTGCTGCCGACAAACCATCACTGAGCTA
CCAGTCCAAGCTGAGCAAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCTGGAGTT
CGTGACCGCGCGCGGATCACTCTCGGATGAGCAGCTGTACAAGGGCTCTGGTGCTA
CCAACCTTCTCACTGTTGAACAGGCGAGGGATGTAGAGGAGAATCCAGGGCCTGGTGCTA
GTGAGAGCTACAAAGACCATGACGGAGATTATAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGA
CGATGACAAGTCCGGACTCAGATCTGGAGGCTCCGGAGGCCAGAGCCAGCGAAGTCTG
CTCCCGCCCCGAAAAAGGGCTCCAAGAGAGCGGTGACTAAGGCGCAGAGAAGAGCGCGC
AAGAAGCGCAAGCGCAGCGCAGGAGAGCTATTCCATCTATGTATCAAGAGTTCTGAAG
CAGGTCCACCTGACACCGGCATTTCTGTCGAAGGCCATGGGCATCATGAATCTGTTGTGA
ACGACATTTTTCAGCGCATCGCAGGAGAGGCTTCCCGCTGGCGCATTAACAACAGGAGCT
CGACACTCACCTCCCGGAGATCCAGAGCGCGCTGCGCCTGCTGCTGCTGGGAGATTG
GCCAAGCAGCGCTGTCGAGGGTACTAAGGCGATCAACCAAGTACACCAAGCTAGGATTA
TGAGCGCGCGCGCGCGCAATTCGATATCAATTAACCTCTGGAATTACAAATTTGTG
AAAGATTGACTGGTATTTCTAATGTTGCTCCTTTTACGCTATGGTATCCAGCTGCTTTA
ATGCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCGCTATGGCTTTCACTTTTCTCCTCTGTATAAATCC
TGTTAGTTTGTGCCACGGCGGAACCTATCGCCCGCTGCCCTGCGCGCTGTCGACAGGG
GCTCGGCTGTGGGCACTGACAATTCGCTGGCTCGAGAGATCTTGCAGTGTGCCTTCTAG
TTCGAGCCATCTGTGTTTGTCCCGCTCCCGCTGCCCTTCTTGACCTTGAAGGTGCCACT
TGCCACTGCTCTTCTTAATAAATGAGGAATTCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCACTT
TATTTCTGGGGGTGGGGTGGGCGAGGACGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA
GGCATGAGATTCACTGCGGACCGAGCGCGCGC (配列番号 64)

【図 6－2 1】

AGTGCACTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCCTCTGGGTTCAAGCGATTCTCC
TGCCCTCAGCCTCCGAGTGTGTTGGGATTCAGGAGTGCATGACCAAGGCTCAGCTAATTTTT
GTTTTTTTGGTAGAGACGGGTTTCAACATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAAGCTCTAATCT
CAGGTGATCTACCCACCTTGGCCCTCCCAATTTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCT
CCCTTCCCTGTCTTCTGATTTTGTAGGTAACCACGTGCGGACCGAGCGCGCC (配列番号
60)

CN3739: pAAV-eHGT_eHGT_889h-minBG-SYFP2-P2A-3XFLAG-10aa-H2B-WPRE3-BGHPa (長さ 2549 bp)
GCGGCGGCAGCGTATCAGGCAAGAGATCTGGCTAGAATGTAGGCAAGGGATAAATAG
TCATAAGACTATAAGGCATTGCGGAGGGAAGAGGAAAGCTTGGAGAATGAGTCAGAAAT
CCACAAATAGATTAAAGATTTAAGTTTGTGAGAAAGTTTTTATGGAGAGTGTCTTGGGGAA
AAATTAGAGATTAAATAAAGAAATAAAAAATCAACAGGAGTAGAAAGGGCATGCATCCTGGTGT
GTGCAAACTGTATAGCTGCATGAATGTCAAGTTTACTATCTTACGTGGCTATATCACTATG
CAAACTATAGCCTTTCATAGTACGTAAAGTGAAGCATTAGAGGATTATCTGTGTAGTCCCTAA
AATCCTTTTGTGAATACATCAACTTGCCTATTACATTTCTGCCCATGTTTACATAACCAAG
TGACTGTAAATAGATTGTGTGTGCCCTTTGTTAATAAATCCTTTGTATAAACCCTTCAAG
GATTTCTCTAAAGACAAACCTGGCTTGTCTAAATATTACTCACTCCAGGCTAAATTTTATAA
TTCCATAAAACACTATCAGATATATTCTGAGACTTTTGATTTTAAAGTGCTGTCTTTTCTTA
TTTGGTATTGTCATTGGTTACTTTTGTGGGTGTGCTGGTGAAGCTCGGCGTGGGCATAAAA
GTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGGGATCCAGATCTTTTGAAGACTAG
CGCTATCCGGTCCGCCACCATGGTCTCCAAGGGGAGGAGCTGTTTACCGGGGTGGTGGCC
ATCCTGGTGCAGCTGGACGGCGATGTCAACGGCCCAAGTTTACGCGTGTCCGGGAGGGG
CAGGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCGTGAAGCTGATCTGCACCAACGGCAAGC
TGCCCTGTGCCCTGGCCCAACCTCGTGACCAACCTGGGCTACGGCGTGCAGTGTCTGCC
CGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGCATCTTCAAGTCCGCACTGCCGAAGGCTAC
GTCCAGGAGCGGCACCATCTTCTTCAAGACGACGCGCACTACAAGACCCGCGCGAGGGTG
AAGTTTCAGGGGCGACACCTGGTGAACCCGATGTGCTTCCGCGCCGAAAAGGCGTCCAA
GGACGCGCAACATCTCTGGGCGCAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAGCTGTATAT
CACCCGCGACAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAATCTCAAGTACCGCCACAGCATCGA
GGACGCGCGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAAGAACCCCATCGGCGACCGGCC
CCGTGTGCTGTGCCGACAACCACTACCTGAGCTACCGTCAAGCTGAGCAAGCAACCCCA
ACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGAGTTCGTGACCGCGCGCGGATCACTCTC
GGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCTCTGGTGTCTACCAACTTCTCACTGTGAACACGGCA
GGGATGTAGAGGAGAATTCAGGGCCTTGGTGTAGTGAGAGCTACAAGACGATCAGGCGAG
AGATTATAAGAGTCATGACATCGATTACAAAGGATGACGATGACAAAGTCCGGACTCAGATCT
GGAGGCTCGGGAGGCCAGCGGAGCGAGGATGTGCTTCCGCGCCGAAAAGGCGTCCAA
GAAGCGGGTGAAGTAAAGCGCAGAGAAGAAAGGGCGCAAGAGCGCAGCGCAGCGCAAG
GAGAGCTATTCCTATGTGTACAAGTTCTGAAGCAGGTGCCACCTGACACCGGCATTT
CGTCCAAGGCCATGGGCATCAATGATTTGTTGTGAACGACATTTTTCAGCGCATCGCAG
GAGAGGCTTCCCGCTGCGCGATTACAACAGCGCTCGACCATCACTTCCCGGAGATCC
AGACGGCGCGTGCCTGCTGCTGCTGGGAGTTGGCCCAAGCAGCGCGTGTCCGAGGGT
ACTAAGGCCATCAACCAAGTACACCGCGCTAAGTAAAGGCGCGCGCGCGCGCAATTC
CGATATCATATAACCTCTGGATTACAAATTTGTGAAGATGTACTGGTATTCTTAACTAT
GTGTGCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGTTTGAAGCTGCTTTGAGCTGTACTTGTCTC
CGGTATGGCTTTCACTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTGTGCTTGCACCGCGCGAAC
TCTATCGCGCGCTGCCCTTGGCCGCTGCTGACAGGGGCTGAGCTGTGGGCATGACAAT
CCGTGGCTCGAGAGATCTTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTGTCCTT

【図 6－2 3】

CN2839: rAAV-eHGT_589m-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHPa (長さ 1916 bp)
GCGGCGGCAGCGTGGAAAGGAGATGCATTGTATTGAAATTTTCTGTTTCATTTAAAGTTT
GTTTTTTCTTTAAATCTGGGATATATTTTCTCCTGTACAGCTTGCCTCTTCCAATTTAT
GTTCAGGATGAAGATTACATTTTAGGCCATTTATAAATGGTTAGAGTCAATCAACGGTAA
CATCTGATAGCAATATTGCAAAATTAACCACTTGGATGTATATCATTTCTGTTTGTGCTTT
TTTTTTTCCCTCTAATGTTGATTTCTGAGGCTTTTAAAGTGTGATTTTATATGCTTTATA
GAGTCCAACTTTGAGTCATCAACATTTGGTTAAAAAATAAGGGGGATCACTTGAAGTGTGA
GACATGCAAACTCACTGGAAAAACACAGCTGGCCCTTAATCTTTACCATTTGCAATTTTGTG
TGCCCTCTGTGACGAGGCTGACGAGTAGGCTTTTATAGAAACAGGGACTTAGCAGATGTA
GCTGCTTGTCTTCTTGTCAACACTGAAATCTCTCTTTTAGCCCTCTGACACAGCAGACA
CACCACCGAAGAGCTCGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGGCAGGACCATCTATTGGTCTTACA
TGCTGATTTCCGATTTTCAAGCTTTCGAAGCTACGCGTACCGCTGCCACCATGTTGAGGAA
GGGCGAGGAGCTTTCACCGGGGTGGTGGCCATCCTGTGTCAGCTGTGAACGGCGACGTAA
GAGGCTTGTGAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGCGATGCCACTACCGCAAGCTGAC
ACCTCGAAGCTGATCTGCACACCGCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCCAACCTCTGTGAC
CACCTTGGGCTACGCGGTGAGTGTCTTCCCGCTGACCTACCCCGACCATCAAGCAGCAG
ACTTCTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCGAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGG
ACGACGGCACTACAAGACCCGCGCGGAGTGAAGTTGAGGGGCGACACCTGTGTGAAC
CGATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTTGGGCGACAAGCT
GGAGTACAACCTACAAGCCACCAACGTCTATATCACCGCGCGACAGCAAGAAGACGGCAT
CAAGGCCAAGCTTCAAGATCCGCGCACAACTGAGGAGCGGGCGGCTGCGAGCTCGCGAGCC
ACTACGACGAACAACCCCATCGGCGAGCGCGGCTGCTGCTGCCCAACCACTAC
CTGAGTCTCAGCTCCAGCTGAGCAAAAGCCGCGGATCACTTCCGATGTGACGAGCTGAAGA
GACGGCGCGCGCGCGCGCAATTCGATATCATTAATCAACCTTGCATTTACAAATTTGTG
AAGATTGACTGGTATTTCAACTATTTGCTCCTTTTACGTTATGTGGATACGCTGCTTTA
TGCTTTTGTATCATGCTATTGCTTCCGATTTGGCTTTCTATTTCTCCTCTGTATAAATCC
TGTTAGTTTGTGCCACGGCGGAACCTATCGCCCGCTGCCCTGCGCGCTGTCGACAGGG
GCTCGGCTGTGGGCACTGACAATTCGCTGGCTCGAGAGATCTTGCAGTGTGCCTTCTAG
TTCGCAAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCGCGTCCCTTCTGACCTTGAAGGTGCCACT
CCCATTGCTCCTTTCTAAATGAAGGAATTTGATCGCATTTGCTGAGTAGGTTGATTC
TATTTCTGGGGGTGGGGTGGGCGAGGACGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA
GGCATGAGATTCACTGTCGCGACCGAGCGCGCGC (配列番号 96)

CN2847: rAAV-eHGT_647m-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHPa (長さ 2013 bp)
GCGGCGGCAGCGTTCACCTTATACCCCATCAGCATCTCTATCATTTGCTCTAAGACATTTT
ATTTGAATAAATGGGGAACCTATTATGCTGCTCAAGGAAATACGAAGCAACCAAGGATTG
TCCTTTTAGTGACAGGCTGTCTTCTAAATTCACATATTTTGAATTTAACAAGGAAAAATAAAT
CTGACATAGGCTGAAATTTGAAATGGTAAGGATATTTTGAATTAACAAAAAATAGGTAAT
AGAACATTTTCAATTTGAATCCAGGATAGCATTTATCATATCCACCAAGTTGAATTTATCAT
CGCTGATAAACTTAGCCTTACGCTTCCGCGACAGTAATCCTCTCACTTAACATAACCAAGGG
TCCCTGCCGCTGGTGTGTTGCTTTACAACATAAATTTAAATATTTCTGTTTGGCATACAT
ATGTGAAGCTCATTAAAGATAGTGGCATCTGATTGGTTGGCAGCTAAATTTGAGTATCTG
TTGGAAGAAGCTGAACACTGAAGGATAGCCATCTGTTTCTTTATCACTTATCGATGTTT
CCTTAAGAAGCTGGTTGAGATTTATGCATCTTTTATGATGATTTCTAGATAGATGATG
ATTGTAGTATGCTCTTTTAAACGCTGAATGTATTTATGCCCCTGAGCTCGGCTGGGCA
TAAAGTACGGCAGGACGACCTATTGCTTACATTTGCTTCTGGATCCAGATCTTTCGAA
GCTAGGCGTACCGCTGCGCACCATGTGACAGAGGCGAGGAGCTGTTTACCGGGGTG

【図 6 - 2 4】

TGCCATCCTGGTGCAGCTGGACGGCGACGTAACAGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGC
GAGGCGGACGGGCGATGCCACTACGGCAAGCTGACCCTGAAGCTGATCTGCACCACCGG
CAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACACCTCGTGACCAACCCTGGGCTACGGCGTGCAGTGCT
TCGGCCGCTACCCCGACCATGAAAGCAGCAGCACTTCTCAAGTCCGGCATGCCCGAAG
GCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGCCACCGCGCG
AGGTGAAGTTTCAGGGCGCACACCTTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCA
AGGAGGACGGCAACATCTTCTGGGGCACAAGTGGAGTACAACCTACAAGCCACAACGCTC
ATATCACCGCCGACAGCAGAAAGACGGCATCAAGGCCAATCTCAAGATCCGCCACAACA
TCGAGGACGGCGGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAC
GGCCCGGTGCTGCTGCCCGACAAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCAAGCTGAGCAAAGAC
CCCAACGAGAAGCGCATCACATGGTCTCTGCTGGAGTTCTGTACCGCGCGCGGGATCAT
TCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGTCGACGGCGCGCGCGCGCGCGGAATTGAT
ATCATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATTGTT
CTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTAAATGCTTTGATATCGTATTGCTTCCGCT
ATGCTCTTCTATTCTTCTCTTGTATAAATCTGCTTAGTTCTTGCCACCGCGGAACTCAT
CGCCGCGCTGCTTGCCTGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCG
TGGCTCGAGAGATCTTGCAGTGTGCCTTCTAGTTGCCAGGCATCTGTTGTTGCCCTCCC
CCGTGCCCTTCTTGAACCTGGAGGCGGCACCTCCCACTGTCCCTTTCCTAATAAATGAGGA
AATTGATCGCATGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGA
CAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGAGATCTCACGTGCGGACCGGAG
CGGCCG (配列番号 97)

NC2431: rAAV-eHGT_483m-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA (長さ 2074 bp)
GCGGCCGACGCGTGTGGAGTTTGGGTGTTTTCATCATCGCTGGCTAACAGAGATCACAATC
TCCTTTTGTTCATCTTAGGGAATAGGTTTTCATAGCTGACATTGTCTGGATTCTTCTGTGTC
CATCACATGCTATGTACGCTGCCACACCTCTCTCTAGTGGCTCTTGTTTAAATGCT
CCCAGTCTGCAAGCTCAGAGAAGAACATTTGGCTACTCCCGTTTTTAACTACTACTTCTGT
AATGGGCTCGGAGCTGGGCTGGGTGCCGTCGCCGAAGCTGTGGGCGAGCTGGACGCTGACC
CTGGGCTGAGTACCGAGGATGGGAGGCCGAGGAAGGAGGCGAGTTGAGCCAGAGAG
GTAAAGCTCAGAGAGCCAAATAGGAGGGGAGGAGGCCAGAGCCTGAGGCTCAGAGTAG
GGCTGGCTGGGCAAGGGGACCTGATGCAATCGCCAGGAGAGAGTGGCAGCGCGCGC
GGGTGCTGCAAGCGCTCTGTTCTTGAAGAGTCTAGTGCTGCTCTATTAATCTTGCTCTG
TGGGAATGGGGAAGATTTCCTATGAGTGTCTCTGAGCCCAAGCAACCTCCCCAAAGGC
CTTAGCTATAAAGCACTGTGTGCTGAACAGCAGGGGTTGGGACATAGAACCACTGG
GTTGGTGGCTGCCGSGGAAGGCCAAGCTGAAGTATCTTGTGAGTATAAACACAGTACCT
CAGCCGCTCGGAGCTCGGGCTGGGCATAAAAGCTCAGGCGAGCGACTCTATTGCTTACATCT
TGCTTCTGGAGTCCAGATCTTTGCGAGCTAGCGCTACCGGTCCGCCAATGGTGAAGCAAG
GGCAGAGAGCTGTTTACCAGGGGTGGTGCCCATCTCGTGCAGCTGGACGGCGAGCTGAAA
CGGCCAAGATTTCAGCGTGTCCGCGAGGGCGAGGGGATGCCACATACGGCAAGCTGA
CCCTGAAGCTGATCTGCGACCAACGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCCAACCTCGTGACCC
ACCCTGGGCTACGGCGTGCAGTGTCTGCCCGCTACCCGACCCATGAAGCAAGCACGA
CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA
CGACGCGCAACTACAAGACCGCGAGTGAAGTTCAAGGGCGACACCTGTGGTAAGC
GCATCGAGCTGAAGGGCATGCACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCGACAAGCTG
GAGTAGAATCAACAGCAGCAACGCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAAGCAAGGCTA
AAGGCCAACTTCAAGTCCGCCACAACATCGAGGACGGCGCGCTGCAAGCTCGCCGACCA
CTACAGCAGAAACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCCGCAACCACTACTCT
GAGCTACCAGTCCAAGCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGCGCATCACATGCTGCTGCT

【図 6 - 2 6】

GACATTTCCAGGCTGCAGTGAGTCTGACCCATACACTGTGATATTTAGACAGTGCTTGT
GCCAGGCGATTTCTTGGAGTTGGAATGAAGGCGCGCTGACACTGGAAGCTGGGCTGTGTT
TCCTGGACCTTTTAAATCATCTTGTGCCCTGCTTCACTCAGTCTGGCCCACTGCAGACTCT
GAGTCTCACTCGGAAGCAAGAACTTAAGGACAGAAAGTGGCTGGAGCACAGCTGGCTCA
GGTGCTTGGCTTAATCTGGAACTTCTGAGGAGGCCGCCCACTGACATTTCCAGGCTGC
AGTGAGTCTGACCCATACACTGTGATATTTAGACAGTGCTTGTGTTGCCAGGATTTACTTTG
GAGTTTGAATGAAGGCGCTGACACTGGAGCTGGCTGTGTTCTCTGGACCTTTTAAAT
CATCTTGTGCCCTGCTTCACTCAGTCTGGCCCACTGCAGACTCTGAGTCTCACTTGTGAAG
GAGAACTTAAGGACAGAAAGTGGCTGGGCTGGGCTGGGCATAAAGCTCAGGCGAG
AGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGGGATCCAGATCTTTCGAAGCTAGCGCTACCGGT
CGCCACCATGAGTGAAGGCGAGGAGCTGTTCAACGGGGTGGTGCCCATCTGTTGGTGC
AGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTAGCGGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGAT
GCCACCTACGGCAAGCTGACCTTGAAGCTGATCTGACCAACCGCGAAGCTGCCCTGCC
CTGGCCCAACCTCGTGACCAACCTGGGCTACGGCGTGCAGTGCTTCCGCCGTACCCCG
ACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCAGGAGC
GCACATCTTCTTCAAGGACGACGGCACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTTCTGAGG
CGCACACCTGTGTGAAGCCGATCGAGTGAAGGCACTGCACTTCAAGGACGAGCGCAAC
ATCTCGGGGACAAAGCTGGAGTCAACTACAAGCACAAGGTCATATACACCGCGGAC
AAGCAGAAAGCAAGCTACAAGGCCAATCTTCAAGTCCGCCACAACATCGAGGACGGCGG
GTGCAAGTCCGCCACCACTAGCAGCAGAACCCCATCGGCGACGGCGCCGCTGCTGCT
GCCGCAACCTACCACTGAGCTGAGCTTACGCTCAAGCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGC
CGATCACATGAGTCTGCTGGAGTTCTGTACCCGCCGCCGGATCACTCTCGGATCGAGCA
GCTGTCAAGTAAGTGCAGGGGCGCGCGCGCGCAATTGATATCATTAATCAACCTCT
GGATTACAAAATTTGTGAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATG
TGGATACGCTGCTTTAATGCTTGTGATCATGCTATTGCTTCCCGATGGGCTTTCAATTTCTC
CTCCTGTGATAAATCTGGTTAGTCTTGGCCAGCGCGAACTCATCGCCGCTGCTGCTGCC
CGCTCTGGACGAGGCGTGGTGTGGGCATGACAATTCCTGGCTCGAGAGACTTCTG
GACTGTGCCCTTCTAGTTGCCAGCAGTCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGTTGCCCTCTTGACC
CTGGAAGGTGCCACTCCCACTGCTCTTCTTCTAATAAATGAGAAATGCACTGCAATTTGTC
TGAGTAGGTGTATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGCGAGGACGACAAGGGGAGGAT
TGGGAAGACAATAGCAGGCATGAGATCTCACGTGCGGACCGAGCGGCCG (配列番号 100)

NC4830: rAAV-3Xcore4_eHGT_888m-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA (長さ 2198 bp)
GCGGGCGCAGCGTGGGCGATTCACTTCAGGTACCTCTGCTAATCCGGGGCTCGGAGG
AGCCCCACCCCGGCTGACATTTCCAGGCGCGTGCCTGCCGCTGCCCGAGCGCGCGT
ATATTTAGACAGGCTTGTGTGCTGATGTTGTTTGGGGCTGGGATGAACCTACCAA
CACTGAGCTTGTCCGCTTGTGCTCCAAAGCTTGTTTTAAATCACTCGCTGTACGTAAGCC
GGCTCCCTCGAGCTGTGGGCTGGGCTCCCTCGTGGCGCAGAGGGAGGCTGAGGCGCA
TTCACTTCAGTACCTCTGCTATATCCCGGGGCTCGGAGGAGCCCCACCCCGGCTGACA
TTTCCAGGCGCTGCTGCGCGCTGCCACCGCGCGCTGATATTTAGACAGGCTTGTGTT
CCATGTGATTACTTGGGGCTGGGATGAATCTTCAACCAACCTGAGCTGTGCTCGCTTGTG
TCCAAGGCTTGTTTTAACTACCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CCGCTGCCCTCTGGGCGCAGAGGGAGGACTAAGGCGCATTCCTTCAGTACCTCTGCTGCTA
ATCCCGGGGCTCGGAGGAGGCCCAACCCCGGCTGACATTTCAAGGGCGCTGCTGCTGCG
CTGCCCGAGCGCGCTGATATTTAGACAGGGCTTGTGTTGCCATGTGATTACTTTGGGGCT
GGGATGAATCTTCAACCAACCTGAGCTTGGCTGCTTGTCTCAAAGCTTGTGTTTAAACAC
TCGCTGTGAGCTAAGCGGCTCCCTCCAGCTGTGGGGTCCGGTCCCTCTGGGCGAGA
GGGAGGACTAAGAGCTCGGGCTGGGCATAAAAGTCAGGCGAGAGCCATCTATTGCTTACA

【図 6 - 2 5】

GGAGTTCGTGACCGCCCGCGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGTCA
CGGCGCGCGCGCGCGCGCAATTCGATATCATTAATCAACCTTGGATTACAAAATTTGTGA
AGATTGACTGGTATCTTAACTATGTTGCTCCTTTACGATTTGGGATACGCTGCTTTAAT
GCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCTGTATAAATCCTG
GTTAGTTCTTGGCAGCGCGGAACCTATCGCCGCTGCTTCCGCGCTGCTGGACAGGGG
CTCGGCTGTGGGCACTGACAATTCCTGGCTCGAGAGATCTTCGACTGTGCCCTCTAGTT
CGCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCGCGTGCCTTCTTACCTTGAAGAGTGGCACTC
CGACTGTCTTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGATCGCATTTGCTGAGTAGGTGTCATTCT
ATTCTGGGGGGTGGGGTGGGCGAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA
GGCATGAGATCTCACGTGCGGACCGAGCGGCCG (配列番号 98)

NC3863: rAAV-core4-eHGT_888m-minBG-SYFP2-WPRE3-BGHpA (長さ 1645 bp)
GCGGCCGACGCGTAGCACACGTGGCTCAGGTGCCTGGGCTAATCTGGAAGCTCTGAGG
AGGCCCCACCACTGACATTTCCAGGCTGCAAGTGAAGTCTGACCCATACACTGTGATATTTA
GCAGTGGCTGTTTGGCAGGCGATTACTTTGGAAGTTGGAATGAAGGCGCCTGACACTGGA
GCTGGCTGTGTTCTCTGGACCTTTTAAATCATCTTCTGCCCTGCTTCACTCAGTCTGCG
CAACTGCAGCACTGATCCTACCTGGAACAGCAAGCACTAAGGACAGAAAGTGGCTGG
GAGCTCGGCTGGGCATAAAAGTACGGGCGAGGCACTATTGCTTACATTTGCTTCTGG
GATCCAGATCTTTCAAGCTAGCGCTACCGGTGCCACCATTGGTAGCAAGGGCGAGGA
GCTGTTTACCGGGGTGGTGCCCATCTGCTGGCAGTGGACGGCGAGCTAAAGGCCACACA
AGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGGCGATGCCACATACGGCAAGCTGCAAGTGAAG
GTATCTGACCAACCGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCTCGCTGACCAACCTGGG
CTACGGCGTGCAGTGCTTCCGCCGTACCCCGACCCATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAA
GTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCAGGAGCGCCACATCTTCTTCAAGGACGACGGCAA
TACAAAGACCCGCGCGGAGGTGAAGTTCGAGGGCGCACACCTGGTGAACCGCATCGAGC
TGAGAGTCTGATCTTCAAGGAGGACGGCAACCTCTGGGGCACAAGCTGACAGTACAAT
ACAAAGCAGCCAACTGCTATATACCCGCCGACAGCAGCAAGAACCGGCATCAAGGGCACT
TCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCTGAGAGCTGCCACCACTACGAGCAG
AACACCCCATCGGCGACGGCGCGCTGCTGCTGCCGACACCACTACCTGAGTACCA
GTCAAAGTGAAGCAAGACCCCAAGCAGAGAAGGAGTACGATGGCTGTTGGAAGTTGCT
GACCGCGCGCGGAGTCACTCTCGGCATGAGCAGGATGTAACAAGTGAAGTGCAGCGCGCG
CGCCCGCGGAATTCGATATCATAATCAACCTCGGATTCGATTGATAAAGTTGTGAAGATTGACT
GGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTACGCTATGGGATGAGTACGCTGCTTTAATGCTTTGAT
CATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCAATTTCTCCTGTTGATAAAGCTCTGGTGAAGTTCT
GCCACGGCGGAAGTCACTCGCGCGCTGCCCTGCCCGCTGCTGGCAGGGGCTGGCTGTT
GGGCATGACATTCGCTGGCTCGAGAGATCTTCGACTGTGCTTCTGATTTGCCAGCAT
CTGTTATTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGAACCTGGAAGTGGCACTCCCACTGCTCT
TCTCTAATAAATGAGGAATTTGATCGCAATGTCTGAGTAGGTGCTATTCTATGCTGGGG
GTGGGGTGGGCGAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGAGATC
TCACGTGCGGACCGAGCGGCCG (配列番号 99)

NC4365: rAAV-3Xcore4_eHGT_888m-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA (長さ 2219 bp)
GCGGCCGACGCGTAGCACACGTGGCTCAGGTGCCTGGGCTAATCTGGAAGCTCTGAGG
AGGCCCCACCACTGACATTTCCAGGCTGCAAGTGAAGTCTGACCCATACACTGTGATATTTA
GACAGTGTCTTGTGGCAGGCGATTACTTTGGAAGTTGGAATGAAGGCGCCTGACACTGGA
GCTGGCTGTGTTCTCTGGACCTTTTAAATCATCTTCTGCCCTGCTTCACTCAGTCTGCG
CAACTCGAGACTCTGATCCTACCTGGAACAGCAAGCACTAAGGACAGAAAGTGGCTGG
AGCACACGTGGCTCAGGTGCTGGGCTAATCTGGAAGTCTGAGGAGGCCCGCCACCT

【図 6 - 2 7】

TTTGCTTCTGGATCCAGATCTTTTGAAGCTAGCGCTACCGGTGCCACCATTGGTGAAGCA
GGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGGTGGTGCCCATCTTGGTGCAGCTGGAACGGCGACGTA
ACGGCCACAAGTTCAAGCTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACTACGCGCAAGCTG
ACCTCGAAGCTGATCTGCACCAACCGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCCAACCTCTGTGAC
CACCTTGGGCTACGGCGTGCAGTGCTTCCGCCGTACCCGACACATGAAGCAGCAGC
ACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCAGGAGGCGCACCATCTTCTTCAAG
ACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGGAGGTGAAGTTGAGGGCGACACCTGGTGAAC
CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTTGGGGCACAAGCT
GGATCAACTACAAGCCACAACGCTCTATTCACCGCGCAGCAGCAAGCAAGGAGT
CAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGGCTGCGAGCTGCCGACC
ACTACGAGCAGAAACCCCATCGGCGAGCGCCGCTGCTGCTGCCGCAACCACTGAC
CTGAGTACCAGTCCAAGCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGGCGCATCACATGGTCTGCT
CTGAGTCTGCTGACCGCGCGCGGATCACTCTGCGCTGAGCAGCTGTACAAGTAAGT
GACGGCGCGCGCGCGCGCAATTGATATCATAATCAACCTTGAATTACAAAATTTGTG
AAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTACGCTATGGGATACGCTGCTTTA
ATGCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCGCTATGGCTTCTTCTTCTGCTATATAATCTC
TGTTTGAATTTCTGCGACGGCGGAATCTATCCGCCGCTGCTTCCGCTGCTGAGCAGGG
GCTCGGCTGTGGGCACTGACAATTCCGTGGCTCGAGAGATCTTCGACTGTGCTCTTCTAG
TTGCCAGCCATCTGTGTTTGGCCCTCCCGCGTGCCTTCTTACGCTTGAAGGTGCCACT
CCCACTGTGCTTTTCTAATAAATGAGGAATTTGATCGGATTTGCTGAGTAGGTGTCATTCT
TATTTGGGGGGTGGGGTGGGCGAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA
GGCATGAGATCTCAGCTGCGGACCGGACCGCGCCG (配列番号 101)

NC3551: rAAV-3Xcore1_eHGT_017m-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA (長さ 1895 bp)
GCGGCCGACGCGTGTGTGTGCTTAGGGACAGGGGGTGGCTGGCAGGCGAGCGAGT
GGGGGAGGACAGCTGTGCAGGAGGACGGACTGCTGGCATGCAAGCGCCCTCCTC
CCCCCACAATCAACATACGCGCAAAATATGCAAAATGGTATAATTACTGTTATTGTTTT
GCTGATATAAGTGTGTGTGTGCTTGGGACAGGGGTGGCTGGCAGGACGAGCAGT
CGGGGGAGGACAGCTGTGAGGAGGACGGAGCTGCTGGCATAGCAAGCGCCCTCCTCC
CCCCACACTAAACAATACGCGCACAATAATGCAAAATGGTATGCTATTGTTGTTT
CTGATATAAGTGTGTGTGTGCTTAGGGAAGGGGCTGGCAGGACGAGCGAGTGG
CGGAGGAGGACAGCTGTGAGGAGGACGGAGCTGCTGGCATAGCAAGCGCCCTCCTCC
CCCCACACTAAACAATACGCGCACAATAATGCAAAATGGTATGCTATTGTTGTTT
CTGATATAAGTGTGTGTGTGCTTAGGGAAGGGGGTGGCTGGCAGGACGAGCGAGTGG
CGGAGGACAGCTGTGCAAGGAGGACGAGCTGCTGGCATAGCAAGCGCCCTCCTCC
ACCGGCAACTGTTCAAGCTGTCCGGCGAGGGAGTGGCTGAGGCGAGCACTGAGGAGTGA
ACCTCGAAGCTGATCTGCACCAACCGGCAAGCTGCCGCTGCCCTGGCCCACTCTGTGAC
CACCTTGGGCTACGGCGTGCAGTGCTTCCGCCGTACCCGACACCATGAAGCAGCAGC
ACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCAGGAGGCGCACCATCTTCTTCAAG
ACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGGAGTGAAGTTGAGGGCGAGCACTGAGGAGTGA
CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTTGGGGCACAAGCT
GGATCAACTACAACAGCCACAACGCTCTATATCACCGCGCAGCAGTGAAGGAGGAT
CAAGGGCAACTTCAAGATCGGCCACAACATCGAGGAGGCGGGGCTGCGAGCTGCCGACC
ACTACGAGCAAGAACCCCATCGGCGAGCGCCGCTGCTGCTGCCGCAACCACTGAC
CTGAGTACCAGTCCAAGCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGGCGCATCACATGCTGCTGCT
CTGAGTTCGTGACCCGCGCGGATCACTCTCGCATGAGCAGCTGTACAAGTAAGT
GACGGCGCGCGCGCGCGCAATTGATATCATAATCAACCTCTGATTACAAAATTTGTG

10

20

30

40

50

【図 6 - 2 8】

AAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTA
ATGGCCTTTGATCATGCTATTGCTTCCTCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGATAAATCC
TGTTAGTTCTTTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGG
GCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGCTCGAGAGATCTTCGACTGTGCCTCTAG
TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCGCTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACT
CCCACGTGCTTTCTAATAAAATGAGGAAATGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCAATTC
TATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA
GGCATGAGATCTCAGCTGCGGACCGAGCGGCCGC (配列番号 102)

AiP1417: rAAV-3xCore2-MGT_E51-minBglobin-SYFP2-WPRE3-BGHpA (長さ 1811 bp)
GCGGCCGCACGCGTTTCTGTGTACGGGAAAAGAAATCAGCACCTCCCAACGTCAACT
GTGTCCTTTAGAGTAAGCATTCCAAGTCTATATTCTGAGTCTAATCTCTCTTGGAAAGGTC
AGCCTTTTCTCCAAATACCAAGTGGACATCTTTATGCACAGGTTCTGTGTACAGGGGAAAA
GAAATCAGCACCTCCCAACAGTCAACTGTGTCCTTTAGAGTAAGCATTCCAAGTCTATAT
TCTGAGTCTAATCTCTCTTGGAAAGGTGAGCCTTTTCTCCAAATACCAAGTGGACATCTTT
ATGCACAGGTTCTGTGTACAGGGGAAAAGAAATCAGCACCTCCCAACGTCAACTGTGTCCT
TTTAGAGTAAGCATTCCAAGTCTATATTCTGAGTCTAATCTCTCTTGGAAAGGTGAGCCTT
TCTTCCAAATACCAAGTGGACATCTTTATGCACAGGGAGCTCGGGCTGGGCATAAAGTC
AGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGGGATCCAGATCTTTCGAAGCTAGCGC
TACCGGTCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATC
CTGGTCTGAGCTGGACGGCGACGTAACGGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGA
GGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGCTGATCTGCACACCGGCAAGCTGC
CCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCAACCTGGGCTACGGCGTGCAAGTCTTCGCCCGC
TACCCCGACCATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGGAAGGCTACGTC
CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAA
GTTTCGAGGGCGACACCTGGTGAAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGG
ACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGCTCTATATCA
CCGCCGACAAGCAGAGAAGACGGCATCAAGGCCAATTCAAGATCCGCCACAACATCGAGG
ACGGCGCGCTGACGCTCGCCGACCACTACCAAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCC
GTGCTGTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAAGTCCAAAGCTGAGCAAAGACCCCAAC
GAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCTGTGACCGCGCCGGGATCACTCTCGG
CATGGACGAGCTGTACAAGTAAGTCGACGGCGCGCCGCGCGCGAATTCGATATCATAA
TCAACCTCTGGATTACAAAATTGTGAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCCTTT
TACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTT
TCATTTTCTCCTCCTTGATAAATCCTGGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGC
TGCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGCACTGACAATTCCGTGGCTCG
AGAGATCTTCTGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCGGTGCC
TTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGCTCTTCTAATAAAATGAGGAAATGCAAT
CGCATGCTGTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAG
GGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGAGATCTCAGCTGCGGACCGAGCGGCCGC
(配列番号 103)

10

20

【配列表】

202550882100001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/63259

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. C12N 15/79 (2023.01)
ADD.
CPC - INV. C12N 15/79; C12N 5/0619

ADD. C12N 2750/14143; C12N 2830/008

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

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 database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2021/0395780 A1 (ALLEN INSTITUTE) 23 December 2021; Claim: 16	1-2, 4, 31-57, 85
A	W.C. SKARNES, ET AL. "Mus musculus targeted non-conditional, lacZ-tagged mutant allele Th:tm1e(KOMP)Wtsl; transgenic" 1-10. Web:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JN963248.1?report=genbank&log\$=nucitop&blast_rank=1&RID=6RBNZ171013>, 05 November 2011; Entire Document	1-2, 4, 31-57, 85
A	B. BIRREN, ET AL. "Mus musculus chromosome 7, clone RP23-92L23, complete sequence" 1-50. Web:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AC012382.14?report=genbank&log\$=nucitop&blast_rank=3&RID=6RBNZ171013>, 10 February 2001; Entire Document	1-2, 4, 31-57, 85

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 May 2023 (22.05.2023)

Date of mailing of the international search report

AUG 15 2023

Name and mailing address of the ISA/

Mall 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

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/63259

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/63259

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.: 58-64
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:
-***Please See Supplemental Page-***

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1-57, 85, and eHGT_888m (enhancer), CN3406 (expression construct)

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/63259

-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-57, 85, and eHGT_888m (enhancer), CN3406 (expression construct) are directed towards artificial expression constructs, AAV vectors and artificial enhancers associated therewith.

The artificial expression constructs, artificial enhancers, and AAV vectors of Claims 1-2 (each in-part), 4 (in-part), 31 (in-part), 32-42, 43-44 (each in-part), 45-47, 48 (in-part), 49-57, 85 (in-part), are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass eHGT_888m (first exemplary enhancer), CN3406 (first exemplary expression construct).

This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species of each of the genera found in claims 1-2, 4, 31, 43-44, 48, and 85 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional expression construct(s), and enhancer(s), with specified SEQ ID NO: for each, or with specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: such that the sequence of each elected species is fully specified (i.e. no optional or variable residues or substituents), and where available as an option within at least one searchable claim, to be searched. Additional construct(s), and enhancer(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected construct(s), and enhancer(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be core4_eHGT_888m and SEQ ID NO: 83 (enhancer), CN3863 (expression construct).

Groups I+ share the technical features including: an artificial expression construct comprising (i) an enhancer, (ii) a promoter; and (iii) a heterologous coding sequence; an artificial enhancer comprising a core; an adeno-associated viral (AAV) vector comprising at least one heterologous coding sequence, wherein the heterologous coding sequence is under the transcriptional control of a promoter and an enhancer; these shared technical features are previously disclosed by US 2021/0395780 A1 to Allen Institute (hereinafter 'ALLEN'). ALLEN discloses an artificial expression construct comprising (i) an enhancer, (ii) a promoter; and (iii) a heterologous coding sequence (an artificial expression construct comprising an enhancer, a promoter, and a heterologous coding sequence; claim 16); an artificial enhancer comprising a core (an enhancer comprising a core; claim 16); an adeno-associated viral (AAV) vector comprising at least one heterologous coding sequence (an AAV vector comprising at least one heterologous coding sequence; claim 36), wherein the heterologous coding sequence is under the transcriptional control of a promoter and an enhancer (the heterologous coding sequence is under the transcriptional control of a promoter and an enhancer; claim 36).

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the ALLEN references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

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	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	35/76
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/14

,MC,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 デイグル, タニア
 アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン, シアトル, ウェストレイク アヴェニュー ノース 6 1 5
 (72)発明者 レイン, エドワード セバスティアン
 アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン, シアトル, ウェストレイク アヴェニュー ノース 6 1 5
 (72)発明者 レヴィ, ボアズ ピー.
 アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン, シアトル, ウェストレイク アヴェニュー ノース 6 1 5
 (72)発明者 タシック, ポシリカ
 アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン, シアトル, ウェストレイク アヴェニュー ノース 6 1 5
 (72)発明者 ティン, ジョナサン
 アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン, シアトル, ウェストレイク アヴェニュー ノース 6 1 5
 (72)発明者 ゼン, ホンクイ
 アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン, シアトル, ウェストレイク アヴェニュー ノース 6 1 5

F ターム (参考)

4B065 AA90X AA90Y AA95X AA95Y AB01 BA02 CA44
 4C084 AA13 MA66 NA14 ZA021 ZA022
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA66 NA13 NA14 ZA02