

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-513231
(P2024-513231A)

(43)公表日 令和6年3月22日(2024.3.22)

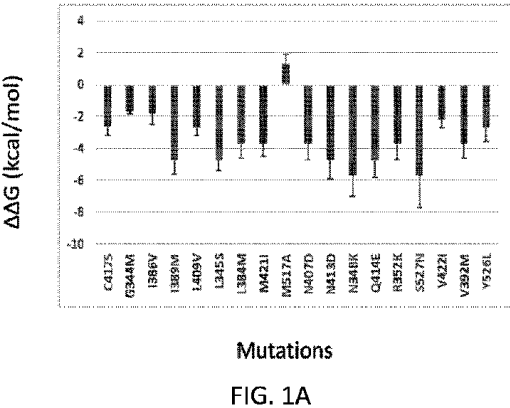
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	4 B 0 6 5	
C 0 7 K	14/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/00	Z N A	4 H 0 4 5
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全158頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-561275(P2023-561275)		(71)出願人	519028678	
(86)(22)出願日	令和4年4月6日(2022.4.6)			センティ バイオサイエンス インコーポレイテッド	
(85)翻訳文提出日	令和5年11月17日(2023.11.17)			アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウスサンフランシスコ コーポレート ドライブ 2 ファースト フロア	
(86)国際出願番号	PCT/US2022/023673		(74)代理人	100102978	
(87)国際公開番号	WO2022/216823			弁理士 清水 初志	
(87)国際公開日	令和4年10月13日(2022.10.13)		(74)代理人	100205707	
(31)優先権主張番号	63/171,227			弁理士 小寺 秀紀	
(32)優先日	令和3年4月6日(2021.4.6)		(74)代理人	100160923	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			弁理士 山口 裕孝	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く		(74)代理人	100119507	
				弁理士 刑部 俊	
			(74)代理人	100142929	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 E R T 2 変異体及びその使用方法

(57)【要約】

本明細書では、エストロゲン受容体アルファリガンド結合ドメイン (E R - L B D) の変異体、及びそのような変異 E R - L B Dを含むキメラタンパク質が提供される。転写を調節し、そのようなキメラタンパク質の局在化を調節する方法もまた提供される。

【選択図】 図 1 A



Mutations

FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のアミノ酸 282～595 に対応するアミノ酸配列を含む、修飾エストロゲン受容体リガンド結合ドメイン（ER-LBD）であって、

前記修飾 ER-LBD が、G400V アミノ酸置換、M543A アミノ酸置換、及び L544A アミノ酸置換と、1 つ以上の追加のアミノ酸置換と、を含み、

前記 1 つ以上の追加のアミノ酸置換が、343～354 位、380～392 位、404～463 位、及び 517～540 位、並びに 547 位からなる群から選択される、配列番号 1 の領域内にあり、

前記修飾 ER-LBD が、前記 1 つ以上の追加のアミノ酸置換の結果として、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む ER-LBD と比較して、又は内因性リガンドと比較して、非内因性リガンドに対するより高い感受性及び／又は選択性を有し、

任意選択的に、前記修飾 ER-LBD が、V595A アミノ酸置換を更に含み、かつ／又は

任意選択的に、前記非内因性リガンドが、4-ヒドロキシタモキシフェン、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンからなる群から選択される、

修飾 ER-LBD。

【請求項 2】

前記 1 つ以上の追加のアミノ酸置換が、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、354、380、384、386、387、388、389、391、392、404、407、409、413、414、417、418、420、421、422、424、428、463、517、521、522、524、525、526、527、528、533、534、536、537、538、539、540、及び 547 からなる群から選択される、配列番号 1 の 1 つ以上の位置にある、請求項 1 に記載の修飾 ER-LBD。

【請求項 3】

a. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 343 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 343 位における前記アミノ酸置換が、M343F、M343I、M343L、及び M343V からなる群から選択され、

b. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 344 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 344 位における前記アミノ酸置換が、G344M であり、

c. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 345 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 345 位における前記アミノ酸置換が、L345S であり、

d. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 346 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 346 位における前記アミノ酸置換が、L346I、L346M、L346F、及び L346V からなる群から選択され、

e. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 347 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 347 位における前記アミノ酸置換が、T347D、T347E、T347F、T347I、T347K、T347L、T347M、T347N、T347Q、T347R、T347S、及び T347V からなる群から選択され、

f. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 348 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 348 位における前記アミノ酸置換が、N348K であり、

g. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 349 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 349 位における前記アミノ酸置換が、L349I、L349M、L349F、及び L349V からなる群から選択され、

h. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 350 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 350 位における前記アミノ酸置換が、A 350 F、A 350 I、A 350 L、A 350 M、及び A 350 V からなる群から選択され、

i. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 351 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 351 位における前記アミノ酸置換が、D 351 E、D 351 F、D 351 I、D 351 L、D 351 M、D 351 N、D 351 Q、及び D 351 V からなる群から選択され、

j. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 352 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 352 位における前記アミノ酸置換が、R 352 K であり、

k. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 354 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 354 位における前記アミノ酸置換が、L 354 I、L 354 M、L 354 F、及び L 354 V からなる群から選択され、

l. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 380 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 380 位における前記アミノ酸置換が、E 380 Q であり、

m. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 384 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 384 位における前記アミノ酸置換が、L 384 I、L 384 M、L 384 F、及び L 384 V からなる群から選択され、

n. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 386 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 386 位における前記アミノ酸置換が、I 386 V であり、

o. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 387 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 387 位における前記アミノ酸置換が、L 387 I、L 387 M、L 387 F、及び L 387 V からなる群から選択され、

p. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 388 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 388 位における前記アミノ酸置換が、M 388 I、M 388 L、及び M 388 F からなる群から選択され、

q. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 389 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 389 位における前記アミノ酸置換が、I 389 M であり、

r. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 391 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 391 位における前記アミノ酸置換が、L 391 I、L 391 M、L 391 F、及び L 391 V からなる群から選択され、

s. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 392 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 392 位における前記アミノ酸置換が、V 392 M であり、

t. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 404 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 404 位における前記アミノ酸置換が、F 404 I、F 404 L、F 404 M、及び F 404 V からなる群から選択され、

u. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 407 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 407 位における前記アミノ酸置換が、N 407 D であり、

v. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 409 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 409 位における前記アミノ酸置換が、L 409 V であり、

w. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 413 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 413 位における前記アミノ酸置換が、N 413 D であり、

x. 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 414 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 414 位における前記アミノ酸置換が、Q 414 E であ

10

20

30

40

50

り、

y . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 4 1 7 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 4 1 7 位における前記アミノ酸置換が、C 4 1 7 S であ

り、

z . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 4 1 8 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 4 1 8 位における前記アミノ酸置換が、V 4 1 8 I、V 4 1 8 L、V 4 1 8 M、及び V 4 1 8 F からなる群から選択され、

a a . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 4 2 0 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 4 2 0 位における前記アミノ酸置換が、G 4 2 0 I、G 4 2 0 M、G 4 2 0 F、及び G 4 2 0 V からなる群から選択され、

10

b b . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 4 2 1 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 4 2 1 位における前記アミノ酸置換が、M 4 2 1 I、M 4 2 1 L、M 4 2 1 F、及び M 4 2 1 V からなる群から選択され、

c c . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 4 2 2 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 4 2 2 位における前記アミノ酸置換が、V 4 2 2 I であり、

d d . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 4 2 4 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 4 2 4 位における前記アミノ酸置換が、I 4 2 4 L、I 4 2 4 M、I 4 2 4 F、及び I 4 2 4 V からなる群から選択され、

e e . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 4 2 8 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 4 2 8 位における前記アミノ酸置換が、L 4 2 8 I、L 4 2 8 M、L 4 2 8 F、及び L 4 2 8 V からなる群から選択され、

20

f f . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 4 6 3 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 4 6 3 位における前記アミノ酸置換が、S 4 6 3 P であり、

g g . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 1 7 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 1 7 位における前記アミノ酸置換が、M 5 1 7 A であり、

h h . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 2 1 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 2 1 位における前記アミノ酸置換が、G 5 2 1 A、G 5 2 1 F、G 5 2 1 I、G 5 2 1 L、G 5 2 1 M、及び G 5 2 1 V からなる群から選択され、

30

i i . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 2 2 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 2 2 位における前記アミノ酸置換が、M 5 2 2 I、M 5 2 2 L、及び M 5 2 2 V からなる群から選択され、

j j . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 2 4 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 2 4 位における前記アミノ酸置換が、H 5 2 4 A、H 5 2 4 I、H 5 2 4 L、H 5 2 4 F、及び H 5 2 4 V からなる群から選択され、

k k . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 2 5 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 2 5 位における前記アミノ酸置換が、L 5 2 5 F、L 5 2 5 I、L 5 2 5 M、L 5 2 5 N、L 5 2 5 Q、L 5 2 5 S、L 5 2 5 T、及び L 5 2 5 V からなる群から選択され、

40

l l . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 2 6 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 2 6 位における前記アミノ酸置換が、Y 5 2 6 L であり、

m m . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 2 7 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 2 7 位における前記アミノ酸置換が、S 5 2 7 N であり、

n n . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 2 8 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 2 8 位における前記アミノ酸置換が、M 5 2 8 F、M

50

5 2 8 I、及び M 5 2 8 V からなる群から選択され、

o o . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 3 3 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 3 3 位における前記アミノ酸置換が、V 5 3 3 F 及び V 5 3 3 W からなる群から選択され、

p p . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 3 4 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 3 4 位における前記アミノ酸置換が、V 5 3 4 Q 及び V 5 3 4 R からなる群から選択され、

q q . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 3 6 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 3 6 位における前記アミノ酸置換が、L 5 3 6 F、及び L 5 3 6 M、L 5 3 6 R、及び L 5 3 6 Y からなる群から選択され、

r r . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 3 7 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 3 7 位における前記アミノ酸置換が、Y 5 3 7 E 及び Y 5 3 7 S からなる群から選択され、

s s . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 3 8 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 3 8 位における前記アミノ酸置換が、D 5 3 8 G 及び D 5 3 8 K からなる群から選択され、

t t . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 3 9 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 3 9 位における前記アミノ酸置換が、L 5 3 9 A 及び L 5 3 9 R からなる群から選択され、

u u . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 4 0 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 4 0 位における前記アミノ酸置換が、L 5 4 0 A 及び L 5 4 0 F からなる群から選択され、又は

v v . 前記 1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 4 7 位を含み、

任意選択的に、配列番号 1 の 5 4 7 位における前記アミノ酸置換が、H 5 4 7 A である、

請求項 2 に記載の修飾 E R - L B D。

【請求項 4】

a . 前記 1 つ以上の追加のアミノ酸置換が、2 つのアミノ酸置換であり、任意選択的に、前記 2 つのアミノ酸置換の各々が、3 4 3、3 4 5、3 4 7、3 4 8、3 5 1、3 5 4、3 8 4、3 8 7、3 8 8、3 8 9、3 9 1、3 9 2、4 0 4、4 1 8、4 2 1、5 2 1、5 2 4、及び 5 2 5 からなる群から選択される、配列番号 1 の位置にあり、

任意選択的に、前記 2 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 4 5 位及び 3 4 8 位にあり、配列番号 1 の 3 4 5 位における前記アミノ酸置換が、L 3 4 5 S であり、配列番号 1 の 3 4 8 位における前記アミノ酸置換が、N 3 4 8 K であり、

任意選択的に、前記 2 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 8 4 位及び 3 8 9 位にあり、配列番号 1 の 3 8 4 位における前記アミノ酸置換が、L 3 8 4 M であり、配列番号 1 の 3 8 9 位における前記アミノ酸置換が、I 3 8 9 M であり、

任意選択的に、前記 2 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 4 2 1 位及び 3 9 2 位にあり、配列番号 1 の 4 2 1 位における前記アミノ酸置換が、M 4 2 1 I であり、配列番号 1 の 3 9 2 位における前記アミノ酸置換が、V 3 9 2 M であり、

任意選択的に、前記 2 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 5 4 位及び 3 9 1 位にあり、配列番号 1 の 3 5 4 位における前記アミノ酸置換が、L 3 5 4 I であり、配列番号 1 の 3 9 1 位における前記アミノ酸置換が、L 3 9 1 F であり、

任意選択的に、前記 2 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 5 4 位及び 3 8 4 位にあり、配列番号 1 の 3 5 4 位における前記アミノ酸置換が、L 3 5 4 I であり、配列番号 1 の 3 8 4 位における前記アミノ酸置換が、L 3 8 4 M であり、

任意選択的に、前記 2 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 5 4 位及び 3 8 7 位にあり、配列番号 1 の 3 5 4 位における前記アミノ酸置換が、L 3 5 4 I であり、配列番号 1 の 3 8 7 位における前記アミノ酸置換が、L 3 8 7 M であり、

任意選択的に、前記 2 つのアミノ酸置換が、3 8 7 位及び 3 9 1 位にあり、配列番号

10

20

30

40

50

1の387位における前記アミノ酸置換が、L387Mであり、配列番号1の391位における前記アミノ酸置換が、L391Fであり、

任意選択的に、前記2つのアミノ酸置換が、配列番号1の384位及び387位にあり、配列番号1の384位における前記アミノ酸置換が、L384Mであり、配列番号1の387位における前記アミノ酸置換が、L387Mであり、

任意選択的に、前記2つのアミノ酸置換が、配列番号1の384位及び391位にあり、配列番号1の384位における前記アミノ酸置換が、L384Mであり、配列番号1の391位における前記アミノ酸置換が、L391Fであり、かつ／又は

b. 前記1つ以上の追加のアミノ酸置換が、3つのアミノ酸置換であり、任意選択的に、前記3つのアミノ酸置換の各々が、343、347、351、354、388、391、404、414、418、463、521、524、及び525からなる群から選択される、配列番号1の位置にあり、

10

任意選択的に、前記3つのアミノ酸置換が、配列番号1の354位、384位、及び391位にあり、配列番号1の354位における前記アミノ酸置換が、L354Iであり、配列番号1の384位における前記アミノ酸置換が、L384Mであり、配列番号1の391位における前記アミノ酸置換が、L391Fであり、

任意選択的に、前記3つのアミノ酸置換が、配列番号1の414位、463位、及び524位にあり、配列番号1の414位における前記アミノ酸置換が、Q414Eであり、配列番号1の463位における前記アミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の524位における前記アミノ酸置換が、H524Lであり、かつ／又は

20

c. 前記1つ以上の追加のアミノ酸置換が、4つのアミノ酸置換であり、任意選択的に、前記4つのアミノ酸置換の各々が、343、347、351、354、384、388、391、404、413、418、463、521、524、及び525からなる群から選択される、配列番号1の位置にあり、

任意選択的に、前記4つのアミノ酸置換が、配列番号1の354位、384位、391位、及び418位にあり、配列番号1の354位における前記アミノ酸置換が、L354Iであり、配列番号1の384位における前記アミノ酸置換が、L384Mであり、配列番号1の391位における前記アミノ酸置換が、L391Fであり、配列番号1の418位における前記アミノ酸置換が、V418Iであり、

任意選択的に、前記4つのアミノ酸置換が、配列番号1の343位、388位、521位、及び404位にあり、配列番号1の343位における前記アミノ酸置換が、M343Iであり、配列番号1の388位における前記アミノ酸置換が、M388Iであり、配列番号1の521位における前記アミノ酸置換が、G521Iであり、配列番号1の404位における前記アミノ酸置換が、F404Lであり、

30

任意選択的に、前記4つのアミノ酸置換が、配列番号1の524位、347位、351位、及び525位にあり、配列番号1の524位における前記アミノ酸置換が、H524Vであり、配列番号1の347位における前記アミノ酸置換が、T347Rであり、配列番号1の351位における前記アミノ酸置換が、D351Qであり、配列番号1の525位における前記アミノ酸置換が、L525Nであり、

任意選択的に、前記4つのアミノ酸置換が、配列番号1の354位、384位、391位、及び463位にあり、配列番号1の354位における前記アミノ酸置換が、L354Iであり、配列番号1の384位における前記アミノ酸置換が、L384Mであり、配列番号1の391位における前記アミノ酸置換が、L391Vであり、配列番号1の463位における前記アミノ酸置換が、S463Pであり、

40

任意選択的に、前記4つのアミノ酸置換が、配列番号1の384位、391位、413位、及び524位にあり、配列番号1の384位における前記アミノ酸置換が、L384Mであり、配列番号1の391位における前記アミノ酸置換が、L391Vであり、配列番号1の413位における前記アミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の524位における前記アミノ酸置換が、H524Fであり、かつ／又は

d. 前記1つ以上の追加のアミノ酸置換が、5つのアミノ酸置換であり、任意選択的に

50

、前記5つのアミノ酸置換の各々が、354、384、391、409、413、414、421、463、及び524からなる群から選択される、配列番号1の位置にあり、

任意選択的に、前記5つのアミノ酸置換が、配列番号1の384位、409位、413位、463位、及び524位にあり、配列番号1の384位における前記アミノ酸置換が、L384Mであり、配列番号1の409位における前記アミノ酸置換が、L409Vであり、配列番号1の413位における前記アミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の463位における前記アミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の524位における前記アミノ酸置換が、H524Lであり、

任意選択的に、前記5つのアミノ酸置換が、配列番号1の391位、413位、414位、463位、及び524位にあり、配列番号1の391位における前記アミノ酸置換が、L391Vであり、配列番号1の413位における前記アミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の414位における前記アミノ酸置換が、Q414Eであり、配列番号1の463位における前記アミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の524位における前記アミノ酸置換が、H524Fであり、

任意選択的に、前記5つのアミノ酸置換が、配列番号1の391位、414位、421位、463位、及び524位にあり、配列番号1の391位における前記アミノ酸置換が、L391Vであり、配列番号1の414位における前記アミノ酸置換が、Q414Eであり、配列番号1の421位における前記アミノ酸置換が、M421Lであり、配列番号1の463位における前記アミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の524位における前記アミノ酸置換が、H524Fであり、

任意選択的に、前記5つのアミノ酸置換が、配列番号1の354位、409位、413位、421位、及び524位にあり、配列番号1の354位における前記アミノ酸置換が、L354Iであり、配列番号1の409位における前記アミノ酸置換が、L409Vであり、配列番号1の413位における前記アミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の421位における前記アミノ酸置換が、M421Lであり、配列番号1の524位における前記アミノ酸置換が、H524Lであり、

任意選択的に、前記5つのアミノ酸置換が、配列番号1の354位、409位、421位、463位、及び524位にあり、配列番号1の354位における前記アミノ酸置換が、L354Iであり、配列番号1の409位における前記アミノ酸置換が、L409Vであり、配列番号1の421位における前記アミノ酸置換が、M421Lであり、配列番号1の463位における前記アミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の524位における前記アミノ酸置換が、H524Lであり、かつ／又は

e. 前記1つ以上の追加のアミノ酸置換が、6つのアミノ酸置換であり、任意選択的に、前記6つのアミノ酸置換の各々が、354、384、391、409、413、414、421、463、及び524からなる群から選択される、配列番号1の位置にあり、

任意選択的に、前記6つのアミノ酸置換が、配列番号1の384位、391位、413位、421位、463位、及び524位にあり、配列番号1の384位における前記アミノ酸置換が、L384Mであり、配列番号1の391位における前記アミノ酸置換が、L391Vであり、配列番号1の413位における前記アミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の421位における前記アミノ酸置換が、M421Lであり、配列番号1の463位における前記アミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の524位における前記アミノ酸置換が、H524Lであり、

任意選択的に、前記6つのアミノ酸置換が、配列番号1の409位、413位、414位、421位、463位、及び524位にあり、配列番号1の409位における前記アミノ酸置換が、L409Vであり、配列番号1の413位における前記アミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の414位における前記アミノ酸置換が、Q414Eであり、配列番号1の421位における前記アミノ酸置換が、M421Lであり、配列番号1の463位における前記アミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の524位における前記アミノ酸置換が、H524Lであり、

任意選択的に、前記6つのアミノ酸置換が、配列番号1の354位、391位、40

10

20

30

40

50

9 位、4 1 3 位、4 1 4 位、及び 5 2 4 位にあり、配列番号 1 の 3 5 4 位における前記アミノ酸置換が、L 3 5 4 I であり、配列番号 1 の 3 9 1 位における前記アミノ酸置換が、L 3 9 1 V であり、配列番号 1 の 4 0 9 位における前記アミノ酸置換が、L 4 0 9 V であり、配列番号 1 の 4 1 3 位における前記アミノ酸置換が、N 4 1 3 D であり、配列番号 1 の 4 1 4 位における前記アミノ酸置換が、Q 4 1 4 E であり、配列番号 1 の 5 2 4 位における前記アミノ酸置換が、H 5 2 4 L であり、かつ／又は

f. 前記 1 つ以上の追加のアミノ酸置換が、7 つのアミノ酸置換であり、任意選択的に、前記 7 つのアミノ酸置換の各々が、3 5 4、3 8 4、3 9 1、4 0 9、4 1 3、4 1 4、4 2 1、4 6 3、5 1 7、及び 5 2 4 からなる群から選択される、配列番号 1 の位置にあり、

10

任意選択的に、前記 7 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 5 4 位、3 8 4 位、4 0 9 位、4 1 3 位、4 2 1 位、4 6 3 位、及び 5 2 4 位にあり、配列番号 1 の 3 5 4 位における前記アミノ酸置換が、L 3 5 4 I であり、配列番号 1 の 3 8 4 位における前記アミノ酸置換が、L 3 8 4 M であり、配列番号 1 の 4 0 9 位における前記アミノ酸置換が、L 4 0 9 V であり、配列番号 1 の 4 1 3 位における前記アミノ酸置換が、N 4 1 3 D であり、配列番号 1 の 4 2 1 位における前記アミノ酸置換が、M 4 2 1 L であり、配列番号 1 の 4 6 3 位における前記アミノ酸置換が、S 4 6 3 P であり、配列番号 1 の 5 2 4 位における前記アミノ酸置換が、H 5 2 4 F であり、

任意選択的に、前記 7 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 5 4 位、3 9 1 位、4 1 3 位、4 2 1 位、4 6 3 位、5 1 7 位、及び 5 2 4 位にあり、配列番号 1 の 3 5 4 位における前記アミノ酸置換が、L 3 5 4 I であり、配列番号 1 の 3 9 1 位における前記アミノ酸置換が、L 3 9 1 V であり、配列番号 1 の 4 1 3 位における前記アミノ酸置換が、N 4 1 3 D であり、配列番号 1 の 4 2 1 位における前記アミノ酸置換が、M 4 2 1 L であり、配列番号 1 の 4 6 3 位における前記アミノ酸置換が、S 4 6 3 P であり、配列番号 1 の 5 1 7 位における前記アミノ酸置換が、M 5 1 7 A であり、配列番号 1 の 5 2 4 位における前記アミノ酸置換が、H 5 2 4 L であり、

20

任意選択的に、前記 7 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 5 4 位、3 9 1 位、4 1 3 位、4 1 4 位、4 2 1 位、5 1 7 位、及び 5 2 4 位にあり、配列番号 1 の 3 5 4 位における前記アミノ酸置換が、L 3 5 4 I であり、配列番号 1 の 3 9 1 位における前記アミノ酸置換が、L 3 9 1 V であり、配列番号 1 の 4 1 3 位における前記アミノ酸置換が、N 4 1 3 D であり、配列番号 1 の 4 1 4 位における前記アミノ酸置換が、Q 4 1 4 E であり、配列番号 1 の 4 2 1 位における前記アミノ酸置換が、M 4 2 1 L であり、配列番号 1 の 5 1 7 位における前記アミノ酸置換が、M 5 1 7 A であり、配列番号 1 の 5 2 4 位における前記アミノ酸置換が、H 5 2 4 F であり、かつ／又は

30

g. 前記 1 つ以上の追加のアミノ酸置換が、8 つのアミノ酸置換であり、任意選択的に、前記 8 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 8 4 位、3 9 1 位、4 0 9 位、4 1 3 位、4 2 1 位、4 6 3 位、5 1 7 位、及び 5 2 4 位にあり、配列番号 1 の 3 8 4 位における前記アミノ酸置換が、L 3 8 4 M であり、配列番号 1 の 3 9 1 位における前記アミノ酸置換が、L 3 9 1 V であり、配列番号 1 の 4 0 9 位における前記アミノ酸置換が、L 4 0 9 V であり、配列番号 1 の 4 1 3 位における前記アミノ酸置換が、N 4 1 3 D であり、配列番号 1 の 4 2 1 位における前記アミノ酸置換が、M 4 2 1 L であり、配列番号 1 の 4 6 3 位における前記アミノ酸置換が、S 4 6 3 P であり、配列番号 1 の 5 1 7 位における前記アミノ酸置換が、M 5 1 7 A であり、配列番号 1 の 5 2 4 位における前記アミノ酸置換が、H 5 2 4 F である、

40

請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の修飾 E R - L B D。

【請求項 5】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の修飾 E R - L B D に融合された関心対象のポリペプチドを含む、キメラタンパク質であって、

任意選択的に、前記関心対象のポリペプチドが、核酸結合ドメインを含み、任意選択的に、前記核酸結合ドメインが、ジンクフィンガードメインを含み、任意選択的に、前記核

50

酸結合ドメインが、ジンクフィンガードメインを含み、任意選択的に、前記ジンクフィンガードメインが、配列：

MSRPGERPFFQCRICMRNFSNMSNLTTRHTRTHTGEEKPFQCR
ICMRNFSDRSVLRRHLRTHTGSSQKPFQCRICMRNFSDP
SNLARHTRTHTGEEKPFQCRICMRNFSDRSSLRRHLRTH
TGSSQKPFQCRICMRNFSQSGTLHRHTRTHTGEEKPFQCR
ICMRNFSQRPNLTRHLRTHLRLRGS（配列番号62）

を含み、

任意選択的に、前記キメラタンパク質が、キメラ転写因子を含み、前記関心対象のポリペプチドが、核酸結合ドメイン及び転写調節因子ドメインを含み、任意選択的に、前記転写調節因子ドメインが、転写活性化因子であり、任意選択的に、前記転写活性化因子が、単純ヘルペスウイルスタンパク質16（VP16）活性化ドメイン；VP16の4つのタンデムコピーを含む活性化ドメイン；VP64活性化ドメイン；NFκBのp65活性化ドメイン（p65）；エプスタイン・バーウイルスRトランス活性化因子（Rta）活性化ドメイン；VP64、p65、及びRta活性化ドメイン（VPR活性化ドメイン）を含む三者活性化因子；VP64、p65、及びHSF1活性化ドメイン（VPH活性化ドメイン）を含む三者活性化因子；並びにヒトE1A関連タンパク質p300のヒストンアセチルトランスフェラーゼコアダメイン（p300 HATコアダメイン）からなる群から選択されるか、又は

任意選択的に、前記転写調節因子ドメインが、以下：

DEFPTMVFPSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMV
SALAQAAPAPVPVLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEAL
LQLQFDDDELGALLGNSTDP AVFTDLASVDNSEFQQLLNQ
GIPVAPHHTTEPMLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGA
PGLPNGLLSGDEDFSSIADMDFSALLSQISS（配列番号64）

の amino 酸配列を含む、p65 転写活性化因子である、キメラタンパク質。

【請求項6】

請求項1～4のいずれか一項に記載の修飾ER-LBDをコードするか、又は請求項5に記載のキメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離ポリヌクレオチド分子。

【請求項7】

請求項6に記載のポリヌクレオチド分子に動作可能に連結されたプロモーターを含む、異種構築物。

【請求項8】

請求項7に記載の異種構築物を含む、プラスミド。

【請求項9】

請求項7に記載の異種構築物又は請求項8に記載のプラスミドを含む、細胞。

【請求項10】

関心対象の遺伝子の転写を調節するための遺伝子スイッチであって、以下：

（a）請求項5に記載のキメラタンパク質であって、前記関心対象の遺伝子に動作可能に連結されたキメラ転写因子応答性（CTF応答性）プロモーターに結合する、キメラタンパク質と、

（b）非内因性リガンドであって、前記修飾ER-LBDへの前記非内因性リガンドの結合が、前記関心対象の遺伝子の転写を調節するように前記キメラタンパク質を誘導する、非内因性リガンドとを含む、遺伝子スイッチ。

【請求項11】

a．前記非内因性リガンドが、4-ヒドロキシタモキシフェン、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンからなる群から選択さ

10

20

30

40

50

れ、かつ／又は

b. 前記関心対象の遺伝子が、サイトカイン、ケモカイン、ホーミング分子、成長因子、細胞死制御因子、共活性化分子、腫瘍微小環境修飾因子a、受容体、リガンド、抗体、ポリヌクレオチド、ペプチド、及び酵素からなる群から選択されるポリペプチドをコードし、かつ／又は

c. 前記関心対象の遺伝子が、IL1-ベータ、IL2、IL4、IL6、IL7、IL10、IL12、IL12p70融合タンパク質、IL15、IL17A、IL18、IL21、IL22、I型インターフェロン、インターフェロングamma、及びTNF- α からなる群から選択されるサイトカインをコードし、かつ／又は

d. 前記関心対象の遺伝子が、以下：

MCHQQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPD
APGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSSEVLGSGKTLTIQVK
EFGDAGQYTCHKGG EVL SHSL L L L LHKKE DGIWSTDILKDK
KEPKNK TFLRCEAKNYSGRFT CWWL T T ISTD L T FSVKSSR
GSSDPQGVT CGAATLSA ERVRGDNKEYEYSVE CQEDSACP
AAEESLP I EV MVD AV HK L KY EN Y T S S F F I R D I I K P D P P K N
LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGK
SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSSWS
EWASVPCSGGGSGGGSGGGSGGGSGRNL PVATPD PGMFPCL
HHSQNL LRAVSNMLQKARQTLEFYPC TSEEIDHEDITKDK
TSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSF
MMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQN
MLAVIDELMQALNFNSE TVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCIL
LHAFRI RAVTIDRVMSYLNAS (配列番号58)

の amino 酸配列を含む IL12p70 融合タンパク質をコードする、
請求項10に記載の遺伝子スイッチ。

【請求項12】

関心対象の遺伝子の転写を調節する方法であって、以下：

(i) 請求項5に記載のキメラタンパク質をコードする異種構築物、及び(ii) 前記関心対象の遺伝子に動作可能に連結されたキメラ転写因子応答性(CTF応答性)プロモーターを含む標的発現カセットで、細胞を形質転換する工程と、

形質転換細胞を非内因性リガンドと接触させることによって、前記関心対象の遺伝子の転写を調節するように前記キメラタンパク質を誘導する工程と
を含み、

任意選択的に、前記方法が、転写を調節するように前記キメラタンパク質を誘導する前に、前記キメラタンパク質の発現に好適な条件下で前記形質転換細胞を培養する工程を更に含み、

任意選択的に、転写を調節することが、前記関心対象の遺伝子の転写を活性化することを含み、

任意選択的に、前記標的発現カセットが、請求項5に記載のキメラタンパク質をコードする前記異種構築物によってコードされているか、又は前記標的発現カセットが、第2の異種構築物によってコードされており、

任意選択的に、前記非内因性リガンドが、4-ヒドロキシタモキシフェン、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンからなる群から選択される、

方法。

【請求項13】

キメラタンパク質の局在化を調節する方法であって、以下：

請求項5に記載のキメラタンパク質をコードする異種構築物で、細胞を形質転換する工程と、

10

20

30

40

50

形質転換細胞を非内因性リガンドと接触させることによって、前記キメラタンパク質の核局在化を誘導する工程と

を含み、

任意選択的に、前記方法が、前記核局在化を誘導する前に、前記キメラタンパク質の発現に好適な条件下で前記形質転換細胞を培養する工程を更に含み、

任意選択的に、前記非内因性リガンドが、4-ヒドロキシタモキシフェン、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンからなる群から選択される、

方法。

【請求項14】

10

前記形質転換細胞が、ヒト又は動物にあり、

前記形質転換細胞を前記非内因性リガンドと接触させることが、薬理学的用量の前記リガンドを前記ヒト又は動物に投与することを含む、

請求項12又は13に記載の方法。

【請求項15】

前記非内因性リガンドが配列番号1の野生型エストロゲン受容体アルファ上で実質的に不活性である濃度で、前記非内因性リガンドが投与される、請求項14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、あらゆる目的のためにその全体で参照により本明細書に組み込まれる、2021年4月6日に提出された米国仮特許出願第63/171,227号の利益を主張する。

【0002】

配列表

本出願には、EFS-Webを介して提出されており、その全体で参照により本明細書に組み込まれる、配列表が含まれる。2022年4月4日に作成された当該ASCIIコピーは、STB-028WO__SL.txtと名付けられ、サイズが212,560バイトである。

30

【背景技術】

【0003】

背景

エストロゲン受容体(ER)は、エストロゲン及びエストラジオールなどの内因性ホルモンのリガンドに結合するリガンド依存性転写因子である。ERに結合する合成リガンドは、ER陽性乳がんなどのER陽性がんを治療するために開発されてきた。例えば、薬物タモキシフェンの活性代謝物は、ERの核転座を誘導し、組織選択的な様式でERに拮抗する。タモキシフェン及びその活性代謝物はまた、研究設定において核局在化を制御するためのツールとして利用される。例えば、ERT2として知られるERリガンド結合ドメインバリエーションは、動物モデル系においてCreリコンビナーゼベースの遺伝子編集を調節するために、Creリコンビナーゼとの融合タンパク質として広く使用されている。合成リガンドを使用して核局在化を操作する能力は、治療用遺伝子の調節のためなどの治療用途でも有用であろう。したがって、合成リガンドに対する感受性及び／又は選択性が改善されたERT2ベースのシステムは、臨床設定においてERT2ベースの遺伝子調節を採用するために有用であろう。

40

【発明の概要】

【0004】

概要

いくつかの実施形態では、タモキシフェン及びその代謝物などの非内因性リガンドに対する感受性及び／又は選択性が改善された修飾エストロゲン受容体リガンド結合ドメイン

50

(ER-LBD) が本明細書で提供される。また、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される修飾ER-LBDを含むキメラタンパク質、遺伝子スイッチ、本明細書に記載される修飾ER-LBD及びキメラタンパク質をコードするポリヌクレオチド分子、本明細書に記載されるポリヌクレオチド分子をコードするか、又は本明細書に記載される修飾ER-LBD及びキメラタンパク質を発現する細胞、並びに本明細書に記載される修飾ER-LBD、キメラタンパク質、ポリヌクレオチド分子、遺伝子スイッチ、又は細胞を使用する方法が本明細書で提供される。

【0005】

本明細書に記載される修飾ER-LBD及びキメラタンパク質は、ERT2と比較して、非内因性リガンド（例えば、「4-OHT」とも称される4-ヒドロキシタモキシフェン）に対するより高い感受性及び／又は選択性を有する。ERT2は、G400Vアミノ酸置換、M543Aアミノ酸置換、及びL544Aアミノ酸置換を含むERのリガンド結合ドメインである（配列番号2を参照）。ERT2はまた、G400V／M543A／L544Aに加えて、V595Aアミノ酸置換を含み得る（配列番号3を参照）。タモキシフェンの典型的な臨床用量後の平均ピーク血漿濃度は、ナノモル範囲（例えば、約40 ng/mL）である。しかしながら、タモキシフェン代謝物（例えば、エンドキシフェン及び4-OHT）に対する野生型ERT2の感受性は、代謝物のナノモル濃度における遺伝子発現を調節するためのその使用にとっては低すぎる。更に、ERT2は、エストラジオールなどの内因性リガンドに応答し得る。したがって、修飾ER-LBD及び修飾ER-LBDを含むキメラタンパク質の非内因性リガンドに対する感受性及び／又は選択性の改善は、遺伝子調節を制御するためのERベースのシステムの使用を可能にする。

【0006】

本明細書では、配列番号1のアミノ酸282～595に対応するアミノ酸配列を含む、修飾エストロゲン受容体リガンド結合ドメイン（ER-LBD）が提供され、修飾ER-LBDは、G400Vアミノ酸置換、M543Aアミノ酸置換、及びL544Aアミノ酸置換と、1つ以上の追加のアミノ酸置換と、を含み、1つ以上の追加のアミノ酸置換は、343～354位、380～392位、404～463位、及び517～540位、並びに547位からなる群から選択される、配列番号1の領域内にあり、修飾ER-LBDは、1つ以上の追加のアミノ酸置換の結果として、配列番号2のアミノ酸を含むER-LBDと比較して、又は内因性リガンドと比較して、非内因性リガンドに対するより高い感受性及び／又は選択性を有する。いくつかの態様では、修飾ER-LBDは、V595Aアミノ酸置換を更に含む。いくつかの態様では、非内因性リガンドは、4-ヒドロキシタモキシフェン、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンからなる群から選択される。

【0007】

いくつかの態様では、1つ以上の追加のアミノ酸置換は、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、354、380、384、386、387、388、389、391、392、404、407、409、413、414、417、418、420、421、422、424、428、463、517、521、522、524、525、526、527、528、533、534、536、537、538、539、540、及び547からなる群から選択される、配列番号1の1つ以上の位置にある。

【0008】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の343位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の343位におけるアミノ酸置換は、M343F、M343I、M343L、及びM343Vからなる群から選択される。

【0009】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の344位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の344位におけるアミノ酸置換は、G344Mである。

【0010】

10

20

30

40

50

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の345位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の345位におけるアミノ酸置換は、L345Sである。

【0011】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の346位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の346位におけるアミノ酸置換は、L346I、L346M、L346F、及びL346Vからなる群から選択される。

【0012】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の347位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の347位におけるアミノ酸置換は、T347D、T347E、T347F、T347I、T347K、T347L、T347M、T347N、T347Q、T347R、T347S、及びT347Vからなる群から選択される。

10

【0013】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の348位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の348位におけるアミノ酸置換は、N348Kである。

【0014】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の349位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の349位におけるアミノ酸置換は、L349I、L349M、L349F、及びL349Vからなる群から選択される。

【0015】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の350位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の350位におけるアミノ酸置換は、A350F、A350I、A350L、A350M、及びA350Vからなる群から選択される。

20

【0016】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の351位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の351位におけるアミノ酸置換は、D351E、D351F、D351I、D351L、D351M、D351N、D351Q、及びD351Vからなる群から選択される。

【0017】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の352位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の352位におけるアミノ酸置換は、R352Kである。

30

【0018】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の354位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354I、L354M、L354F、及びL354Vからなる群から選択される。

【0019】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の380位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の380位におけるアミノ酸置換は、E380Qである。

【0020】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の384位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384I、L384M、L384F、及びL384Vからなる群から選択される。

40

【0021】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の386位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の386位におけるアミノ酸置換は、I386Vである。

【0022】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の387位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の387位におけるアミノ酸置換は、L387I、L387M、L387F、及びL387Vからなる群から選択される。

【0023】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の388位を含む。いくつかの態

50

様では、配列番号 1 の 388 位におけるアミノ酸置換は、M388I、M388L、及び M388F からなる群から選択される。

【0024】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号 1 の 389 位を含む。いくつかの態様では、配列番号 1 の 389 位におけるアミノ酸置換は、I389M である。

【0025】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号 1 の 391 位を含む。いくつかの態様では、配列番号 1 の 391 位におけるアミノ酸置換は、L391I、L391M、L391F、及び L391V からなる群から選択される。

【0026】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号 1 の 392 位を含む。いくつかの態様では、配列番号 1 の 392 位におけるアミノ酸置換は、V392M である。

【0027】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号 1 の 404 位を含む。いくつかの態様では、配列番号 1 の 404 位におけるアミノ酸置換は、F404I、F404L、F404M、及び F404V からなる群から選択される。

【0028】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号 1 の 407 位を含む。いくつかの態様では、配列番号 1 の 407 位におけるアミノ酸置換は、N407D である。

【0029】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号 1 の 409 位を含む。いくつかの態様では、配列番号 1 の 409 位におけるアミノ酸置換は、L409V である。

【0030】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号 1 の 413 位を含む。いくつかの態様では、配列番号 1 の 413 位におけるアミノ酸置換は、N413D である。

【0031】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号 1 の 414 位を含む。いくつかの態様では、配列番号 1 の 414 位におけるアミノ酸置換は、Q414E である。

【0032】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号 1 の 417 位を含む。いくつかの態様では、配列番号 1 の 417 位におけるアミノ酸置換は、C417S である。

【0033】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号 1 の 418 位を含む。いくつかの態様では、配列番号 1 の 418 位におけるアミノ酸置換は、V418I、V418L、V418M、及び V418F からなる群から選択される。

【0034】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号 1 の 420 位を含む。いくつかの態様では、配列番号 1 の 420 位におけるアミノ酸置換は、G420I、G420M、G420F、及び G420V からなる群から選択される。

【0035】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号 1 の 421 位を含む。いくつかの態様では、配列番号 1 の 421 位におけるアミノ酸置換は、M421I、M421L、M421F、及び M421V からなる群から選択される。

【0036】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号 1 の 422 位を含む。いくつかの態様では、配列番号 1 の 422 位におけるアミノ酸置換は、V422I である。

【0037】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号 1 の 424 位を含む。いくつかの態様では、配列番号 1 の 424 位におけるアミノ酸置換は、I424L、I424M、I424F、及び I424V からなる群から選択される。

【 0 0 3 8 】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の428位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の428位におけるアミノ酸置換は、L428I、L428M、L428F、及びL428Vからなる群から選択される。

【 0 0 3 9 】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の463位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の位置463のアミノ酸置換は、S463Pである。

【 0 0 4 0 】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の517位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の517位におけるアミノ酸置換は、M517Aである。

10

【 0 0 4 1 】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の521位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の521位におけるアミノ酸置換は、G521A、G521F、G521I、G521L、G521M、及びG521Vからなる群から選択される。

【 0 0 4 2 】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の522位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の522位におけるアミノ酸置換は、M522I、M522L、及びM522Vからなる群から選択される。

【 0 0 4 3 】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の524位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換は、H524A、H524I、H524L、H524F、及びH524Vからなる群から選択される。

20

【 0 0 4 4 】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の525位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の525位におけるアミノ酸置換は、L525F、L525I、L525M、L525N、L525Q、L525S、L525T、及びL525Vからなる群から選択される。

【 0 0 4 5 】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の526位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の526位におけるアミノ酸置換は、Y526Lである。

30

【 0 0 4 6 】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の527位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の527位におけるアミノ酸置換は、S527Nである。

【 0 0 4 7 】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の528位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の528位におけるアミノ酸置換は、M528F、M528I、及びM528Vからなる群から選択される。

【 0 0 4 8 】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の533位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の533位におけるアミノ酸置換は、V533F及びV533Wからなる群から選択される。

40

【 0 0 4 9 】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の534位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の534位におけるアミノ酸置換は、V534Q及びV534Rからなる群から選択される。

【 0 0 5 0 】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の536位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の536位におけるアミノ酸置換は、L536F、及びL536M、L536R、及びL536Yからなる群から選択される。

【 0 0 5 1 】

50

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の537位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の537位におけるアミノ酸置換は、Y537E及びY537Sからなる群から選択される。

【0052】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の538位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の538位におけるアミノ酸置換は、D538G及びD538Kからなる群から選択される。

【0053】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の539位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の539位におけるアミノ酸置換は、L539A及びL539Rからなる群から選択される。

10

【0054】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の540位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の540位におけるアミノ酸置換は、L540A及びL540Fからなる群から選択される。

【0055】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の547位を含む。いくつかの態様では、配列番号1の547位におけるアミノ酸置換は、H547Aである。

【0056】

いくつかの態様では、1つ以上の追加アミノ酸置換は、2つのアミノ酸置換である。いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換の各々は、343、345、347、348、351、354、384、387、388、389、391、392、404、418、421、521、524、及び525からなる群から選択される、配列番号1の位置にある。いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の345位及び348位にあり、配列番号1の345位におけるアミノ酸置換は、L345Sであり、配列番号1の348位におけるアミノ酸置換は、N348Kである。いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の384位及び389位にあり、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mであり、配列番号1の389位におけるアミノ酸置換は、I389Mである。いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の421位及び392位にあり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換は、M421Iであり、配列番号1の392位におけるアミノ酸置換は、V392Mである。いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の354位及び391位にあり、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354Iであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Fである。いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の354位及び384位にあり、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354Iであり、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mである。いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の354位及び387位にあり、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354Iであり、配列番号1の387位におけるアミノ酸置換は、L387Mである。いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、387位及び391位にあり、配列番号1の387位におけるアミノ酸置換は、L387Mであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Fである。いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の384位及び387位にあり、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mであり、配列番号1の387位におけるアミノ酸置換は、L387Mである。いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の384位及び391位にあり、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Fである。

20

30

40

【0057】

いくつかの態様では、1つ以上の追加アミノ酸置換は、3つのアミノ酸置換である。いくつかの態様では、3つのアミノ酸置換の各々は、343、347、351、354、3

50

88、391、404、414、418、463、521、524、及び525からなる群から選択される、配列番号1の位置にある。いくつかの態様では、3つのアミノ酸置換は、配列番号1の354位、384位、及び391位にあり、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354Iであり、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Fである。いくつかの態様では、3つのアミノ酸置換は、配列番号1の414位、463位、及び524位にあり、配列番号1の414位におけるアミノ酸置換は、Q414Eであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換は、S463Pであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換は、H524Lである。

【0058】

いくつかの態様では、1つ以上の追加アミノ酸置換は、4つのアミノ酸置換である。いくつかの態様では、4つのアミノ酸置換の各々は、343、347、351、354、384、388、391、404、413、418、463、521、524、及び525からなる群から選択される、配列番号1の位置にある。いくつかの態様では、4つのアミノ酸置換は、配列番号1の354位、384位、391位、及び418位にあり、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354Iであり、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Fであり、配列番号1の418位におけるアミノ酸置換は、V418Iである。いくつかの態様では、4つのアミノ酸置換は、配列番号1の343位、388位、521位、及び404位にあり、配列番号1の343位におけるアミノ酸置換は、M343Iであり、配列番号1の388位におけるアミノ酸置換は、M388Iであり、配列番号1の521位におけるアミノ酸置換は、G521Iであり、配列番号1の404位におけるアミノ酸置換は、F404Lである。いくつかの態様では、4つのアミノ酸置換は、配列番号1の524位、347位、351位、及び525位にあり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換は、H524Vであり、配列番号1の347位におけるアミノ酸置換は、T347Rであり、配列番号1の351位におけるアミノ酸置換は、D351Qであり、配列番号1の525位におけるアミノ酸置換は、L525Nである。いくつかの態様では、4つのアミノ酸置換は、配列番号1の354位、384位、391位、及び463位にあり、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354Iであり、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Vであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換は、S463Pである。いくつかの態様では、4つのアミノ酸置換は、配列番号1の384位、391位、413位、及び524位にあり、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換は、N413Dであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換は、H524Fである。

【0059】

いくつかの態様では、1つ以上の追加アミノ酸置換は、5つのアミノ酸置換である。いくつかの態様では、5つのアミノ酸置換の各々は、354、384、391、409、413、414、421、463、及び524からなる群から選択される、配列番号1の位置にある。いくつかの態様では、5つのアミノ酸置換は、配列番号1の384位、409位、413位、463位、及び524位にあり、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mであり、配列番号1の409位におけるアミノ酸置換は、L409Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換は、N413Dであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換は、S463Pであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換は、H524Lである。いくつかの態様では、5つのアミノ酸置換は、配列番号1の391位、413位、414位、463位、及び524位にあり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換は、N413Dであり、配列番号1の414位におけるアミノ酸置換は、Q414Eであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換は、S463Pであり、配列

10

20

30

40

50

番号1の524位におけるアミノ酸置換は、H524Fである。いくつかの態様では、5つのアミノ酸置換は、配列番号1の391位、414位、421位、463位、及び524位にあり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Vであり、配列番号1の414位におけるアミノ酸置換は、Q414Eであり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換は、M421Lであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換は、S463Pであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換は、H524Fである。いくつかの態様では、5つのアミノ酸置換は、配列番号1の354位、409位、413位、421位、及び524位にあり、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354Iであり、配列番号1の409位におけるアミノ酸置換は、L409Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換は、N413Dであり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換は、M421Lであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換は、H524Lである。いくつかの態様では、5つのアミノ酸置換は、配列番号1の354位、409位、421位、463位、及び524位にあり、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354Iであり、配列番号1の409位におけるアミノ酸置換は、L409Vであり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換は、M421Lであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換は、S463Pであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換は、H524Lである。

10

【0060】

いくつかの態様では、1つ以上の追加アミノ酸置換は、6つのアミノ酸置換である。いくつかの態様では、6つのアミノ酸置換の各々は、354、384、391、409、413、414、421、463、及び524からなる群から選択される、配列番号1の位置にある。いくつかの態様では、6つのアミノ酸置換は、配列番号1の384位、391位、413位、421位、463位、及び524位にあり、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換は、N413Dであり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換は、M421Lであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換は、S463Pであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換は、H524Lである。いくつかの態様では、6つのアミノ酸置換は、配列番号1の409位、413位、414位、421位、463位、及び524位にあり、配列番号1の409位におけるアミノ酸置換は、L409Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換は、N413Dであり、配列番号1の414位におけるアミノ酸置換は、Q414Eであり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換は、M421Lであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換は、S463Pであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換は、H524Lである。いくつかの態様では、6つのアミノ酸置換は、配列番号1の354位、391位、409位、413位、414位、及び524位にあり、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354Iであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Vであり、配列番号1の409位におけるアミノ酸置換は、L409Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換は、N413Dであり、配列番号1の414位におけるアミノ酸置換は、Q414Eであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換は、H524Lである。

20

30

40

【0061】

いくつかの態様では、1つ以上の追加アミノ酸置換は、7つのアミノ酸置換である。いくつかの態様では、7つのアミノ酸置換の各々は、354、384、391、409、413、414、421、463、517、及び524からなる群から選択される、配列番号1の位置にある。いくつかの態様では、7つのアミノ酸置換は、配列番号1の354位、384位、409位、413位、421位、463位、及び524位にあり、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354Iであり、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mであり、配列番号1の409位におけるアミノ酸置換は、L409Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換は、N413Dであり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換は、M421Lであり、配列番号1の463

50

位におけるアミノ酸置換は、S 4 6 3 Pであり、配列番号1の5 2 4位におけるアミノ酸置換は、H 5 2 4 Fである。いくつかの態様では、7つのアミノ酸置換は、配列番号1の3 5 4位、3 9 1位、4 1 3位、4 2 1位、4 6 3位、5 1 7位、及び5 2 4位にあり、配列番号1の3 5 4位におけるアミノ酸置換は、L 3 5 4 Iであり、配列番号1の3 9 1位におけるアミノ酸置換は、L 3 9 1 Vであり、配列番号1の4 1 3位におけるアミノ酸置換は、N 4 1 3 Dであり、配列番号1の4 2 1位におけるアミノ酸置換は、M 4 2 1 Lであり、配列番号1の4 6 3位におけるアミノ酸置換は、S 4 6 3 Pであり、配列番号1の5 1 7位におけるアミノ酸置換は、M 5 1 7 Aであり、配列番号1の5 2 4位におけるアミノ酸置換は、H 5 2 4 Lである。いくつかの態様では、7つのアミノ酸置換は、配列番号1の3 5 4位、3 9 1位、4 1 3位、4 1 4位、4 2 1位、5 1 7位、及び5 2 4位にあり、配列番号1の3 5 4位におけるアミノ酸置換は、L 3 5 4 Iであり、配列番号1の3 9 1位におけるアミノ酸置換は、L 3 9 1 Vであり、配列番号1の4 1 3位におけるアミノ酸置換は、N 4 1 3 Dであり、配列番号1の4 1 4位におけるアミノ酸置換は、Q 4 1 4 Eであり、配列番号1の4 2 1位におけるアミノ酸置換は、M 4 2 1 Lであり、配列番号1の5 1 7位におけるアミノ酸置換は、M 5 1 7 Aであり、配列番号1の5 2 4位におけるアミノ酸置換は、H 5 2 4 Fである。

10

【0062】

いくつかの態様では、1つ以上の追加アミノ酸置換は、8つのアミノ酸置換である。いくつかの態様では、8つのアミノ酸置換は、配列番号1の3 8 4位、3 9 1位、4 0 9位、4 1 3位、4 2 1位、4 6 3位、5 1 7位、及び5 2 4位にあり、配列番号1の3 8 4位におけるアミノ酸置換は、L 3 8 4 Mであり、配列番号1の3 9 1位におけるアミノ酸置換は、L 3 9 1 Vであり、配列番号1の4 0 9位におけるアミノ酸置換は、L 4 0 9 Vであり、配列番号1の4 1 3位におけるアミノ酸置換は、N 4 1 3 Dであり、配列番号1の4 2 1位におけるアミノ酸置換は、M 4 2 1 Lであり、配列番号1の4 6 3位におけるアミノ酸置換は、S 4 6 3 Pであり、配列番号1の5 1 7位におけるアミノ酸置換は、M 5 1 7 Aであり、配列番号1の5 2 4位におけるアミノ酸置換は、H 5 2 4 Fである。

20

【0063】

また、本明細書に記載される修飾E R-L B Dに融合された関心対象のポリペプチドを含む、キメラタンパク質も本明細書で提供される。いくつかの態様では、関心対象のポリペプチドは、核酸結合ドメインを含む。いくつかの態様では、核酸結合ドメインは、ジンクフィンガードメインを含む。いくつかの態様では、核酸結合ドメインは、ジンクフィンガードメインを含む。いくつかの態様では、ジンクフィンガードメインは、配列M S R P G E R P F Q C R I C M R N F S N M S N L T R H T R T H T G E K P F Q C R I C M R N F S D R S V L R R H L R T H T G S Q K P F Q C R I C M R N F S D P S N L A R H T R T H T G E K P F Q C R I C M R N F S D R S S L R R H L R T H T G S Q K P F Q C R I C M R N F S Q S G T L H R H T R T H T G E K P F Q C R I C M R N F S Q R P N L T R H L R T H L R G S（配列番号62）を含む。いくつかの態様では、キメラタンパク質は、キメラ転写因子を含み、関心対象のポリペプチドは、核酸結合ドメイン及び転写調節因子ドメインを含む。いくつかの態様では、転写調節因子ドメインは、転写活性化因子である。いくつかの態様では、転写活性化因子は、単純ヘルペスウイルススタンパク質16（V P 1 6）活性化ドメイン；V P 1 6の4つのタンデムコピーを含む活性化ドメイン；V P 6 4活性化ドメイン；N F κ Bのp 6 5活性化ドメイン（p 6 5）；エプスタイン・バーウイルスRトランス活性化因子（R t a）活性化ドメイン；V P 6 4、p 6 5、及びR t a活性化ドメイン（V P R活性化ドメイン）を含む三者活性化因子；V P 6 4、p 6 5、及びH S F 1活性化ドメイン（V P H活性化ドメイン）を含む三者活性化因子；並びにヒトE 1 A関連タンパク質p 3 0 0のヒストンアセチルトランスフェラーゼコアダメイン（p 3 0 0 H A Tコア活性化ドメイン）からなる群から選択される。いくつかの態様では、転写調節因子ドメインは、D E F P T M V F P S G Q I S Q A S A L A P A P P Q V L P Q A P A P A P A M V S A L A Q A P A P V P V L A P G P P Q A V A P P A P K P T Q A G E G T L S E A L L Q L Q F D D E D L G A L L G N S T D P A V F

30

40

50

T D L A S V D N S E F Q Q L L N Q G I P V A P H T T E P M L M E Y P E A I T R L
V T G A Q R P P D P A P A P L G A P G L P N G L L S G D E D F S S I A D M D F S
A L L S Q I S S (配列番号 64) のアミノ酸配列を含む、p 65 転写活性化因子である。

【0064】

また、本明細書に記載される修飾 E R - L B D をコードするか、又は本明細書に記載されるキメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離ポリヌクレオチド分子も本明細書で提供される。

【0065】

また、本明細書に記載されるポリヌクレオチド分子に動作可能に連結されたプロモーターを含む、異種構築物も本明細書で提供される。

【0066】

また、本明細書に記載される異種構築物を含む、プラスミドも本明細書で提供される。

【0067】

また、本明細書に記載される異種構築物又は本明細書に記載されるプラスミドを含む、細胞も本明細書で提供される。

【0068】

また、関心対象の遺伝子の転写を調節するための遺伝子スイッチであって、(a) 本明細書に記載されるキメラタンパク質であって、キメラタンパク質が、関心対象の遺伝子に動作可能に連結されたキメラ転写因子応答性 (C T F 応答性) プロモーターに結合する、キメラタンパク質と、(b) 非内因性リガンドであって、修飾 E R - L B D への非内因性リガンドの結合が、関心対象の遺伝子の転写を調節するようにキメラタンパク質を誘導する、非内因性リガンドと、を含む、遺伝子スイッチも本明細書で提供される。

【0069】

いくつかの態様では、非内因性リガンドは、4-ヒドロキシタモキシフェン、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンからなる群から選択される。

【0070】

いくつかの態様では、関心対象の遺伝子は、サイトカイン、ケモカイン、ホーミング分子、成長因子、細胞死制御因子、共活性化分子、腫瘍微小環境修飾因子 a、受容体、リガンド、抗体、ポリヌクレオチド、ペプチド、及び酵素からなる群から選択されるポリペプチドをコードする。

【0071】

いくつかの態様では、関心対象の遺伝子は、I L 1-ベータ、I L 2、I L 4、I L 6、I L 7、I L 10、I L 12、I L 12 p 70 融合タンパク質、I L 15、I L 17 A、I L 18、I L 21、I L 22、I 型インターフェロン、インターフェロン-ガンマ、及び T N F-アルファからなる群から選択されるサイトカインをコードする。かつ／又は。

【0072】

いくつかの態様では、関心対象の遺伝子は、M C H Q Q L V I S W F S L V F L A S P
L V A I W E L K K D V Y V V E L D W Y P D A P G E M V V L T C D T P E E D G I T
W T L D Q S S E V L G S G K T L T I Q V K E F G D A G Q Y T C H K G G E V L S H
S L L L L H K K E D G I W S T D I L K D Q K E P K N K T F L R C E A K N Y S G R
F T C W W L T T I S T D L T F S V K S S R G S S D P Q G V T C G A A T L S A E R
V R G D N K E Y E Y S V E C Q E D S A C P A A E E S L P I E V M V D A V H K L K
Y E N Y T S S F F I R D I I K P D P P K N L Q L K P L K N S R Q V E V S W E Y P
D T W S T P H S Y F S L T F C V Q V Q G K S K R E K K D R V F T D K T S A T V I
C R K N A S I S V R A Q D R Y Y S S S W S E W A S V P C S G G G S G G G S G G G
S G G G S R N L P V A T P D P G M F P C L H H S Q N L L R A V S N M L Q K A R Q
T L E F Y P C T S E E I D H E D I T K D K T S T V E A C L P L E L T K N E S C L

NSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSSIYEDLKMYQVE
FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNLAVIDELMQALNFNSETV
PQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLN
AS（配列番号58）のアミノ酸配列を含むIL12p70融合タンパク質をコードする

。

【0073】

また、（i）本明細書に記載されるキメラタンパク質をコードする異種構築物、及び（i i）関心対象の遺伝子に動作可能に連結されたキメラ転写因子応答性（CTF応答性）プロモーターを含む標的発現カセットで、細胞を形質転換することと、形質転換細胞を非内因性リガンドと接触させることによって、関心対象の遺伝子の転写を調節するようにキメラタンパク質を誘導することと、を含む、関心対象の遺伝子の転写を調節する方法も本明細書で提供される。いくつかの態様では、方法は、転写を調節するようにキメラタンパク質を誘導する前に、キメラタンパク質の発現に好適な条件下で形質転換細胞を培養することを更に含む。いくつかの態様では、転写を調節することは、関心対象の遺伝子の転写を活性化することを含む。いくつかの態様では、標的発現カセットは、本明細書に記載されるキメラタンパク質をコードする異種構築物によってコードされるか、又は標的発現カセットは、第2の異種構築物によってコードされる。いくつかの態様では、非内因性リガンドは、4-ヒドロキシタモキシフェン、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンからなる群から選択される。

10

20

【0074】

また、本明細書に記載されるキメラタンパク質をコードする異種構築物で、細胞を形質転換することと、形質転換細胞を非内因性リガンドと接触させることによって、キメラタンパク質の核局在化を誘導することと、を含む、キメラタンパク質の局在化を調節する方法も本明細書で提供される。いくつかの態様では、方法は、核局在化を誘導する前に、キメラタンパク質の発現に好適な条件下で形質転換細胞を培養することを更に含む。いくつかの態様では、非内因性リガンドは、4-ヒドロキシタモキシフェン、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンからなる群から選択される。

【0075】

いくつかの態様では、形質転換細胞は、ヒト又は動物にあり、形質転換細胞を非内因性リガンドと接触させることは、薬理学的用量のリガンドをヒト又は動物に投与することを含む。

30

【0076】

いくつかの態様では、非内因性リガンドが配列番号1の野生型エストロゲン受容体アルファ上で実質的に不活性である濃度で、非内因性リガンドが投与される。

【0077】

本明細書では、配列番号1のアミノ酸282～595に対応するアミノ酸配列と、343～354位、380～392位、404～463位、及び517～540位、並びに547位からなる群から選択される、配列番号1の領域内の1つ以上の追加のアミノ酸置換と、を含む、修飾ER-LBDが提供される。いくつかの態様では、本明細書に記載される修飾ER-LBDは、G400Vアミノ酸置換、M543Aアミノ酸置換、及びL544Aアミノ酸置換を更に含む。いくつかの態様では、修飾ER-LBDは、G400Vアミノ酸置換、M543Aアミノ酸置換、L544A、及びV595Aアミノ酸置換を更に含む。

40

【0078】

いくつかの態様では、修飾ER-LBDは、G400Vアミノ酸置換、M543Aアミノ酸置換、及びL544Aアミノ酸置換、並びに1つ以上の追加のアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、修飾ER-LBDは、配列番号2のアミノ酸配列を含むER-LBDと比較して、非内因性リガンドに対するより高い感受性を有する。いくつかの態様では、修飾ER-LBDは、配列番号2のアミノ酸配列を含むER-LBDと比較して、非内

50

因性リガンドに対するより高い選択性を有する。

【0079】

いくつかの態様では、修飾ER-LBDは、G400Vアミノ酸置換、M543Aアミノ酸置換、L544Aアミノ酸置換、及びV595Aアミノ酸置換、並びに1つ以上の追加のアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、修飾ER-LBDは、配列番号3のアミノ酸配列を含むER-LBDと比較して、非内因性リガンドに対するより高い感受性を有する。いくつかの態様では、修飾ER-LBDは、配列番号3のアミノ酸配列を含むER-LBDと比較して、非内因性リガンドに対するより高い選択性を有する。

【0080】

いくつかの態様では、本開示の修飾ER-LBDは、1つ以上の追加のアミノ酸置換の結果として、内因性リガンドと比較して、非内因性リガンドに対するより高い感受性を有する。

10

【0081】

いくつかの態様では、本開示の修飾ER-LBDは、配列番号2又は配列番号3のアミノ酸配列を含むER-LBDと比較して、非内因性リガンドに対するより高い感受性を有する。

【0082】

いくつかの態様では、本開示の修飾ER-LBDは、配列番号2又は配列番号3のアミノ酸配列を含むER-LBDと比較して、非内因性リガンドに対するより高い選択性を有する。

20

【0083】

いくつかの態様では、1つ以上の追加のアミノ酸置換は、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、354、380、384、386、387、388、389、391、392、404、407、409、413、414、417、418、420、421、422、424、428、463、517、521、522、524、525、526、527、528、533、534、536、537、538、539、540、及び547からなる群から選択される、配列番号1の1つ以上の位置にある。

【0084】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の343位を含む。いくつかの態様では、343位におけるアミノ酸置換は、M343F、M343I、M343L、及びM343Vからなる群から選択される。

30

【0085】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の344位を含む。いくつかの態様では、344位におけるアミノ酸置換は、G344Mである。

【0086】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の345位を含む。いくつかの態様では、345位におけるアミノ酸置換は、L345Sである。

【0087】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の346位を含む。いくつかの態様では、346位におけるアミノ酸置換は、L346I、L346M、L346F、及びL346Vからなる群から選択される。

40

【0088】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の347位を含む。いくつかの態様では、347位におけるアミノ酸置換は、T347D、T347E、T347F、T347I、T347K、T347L、T347M、T347N、T347Q、T347R、T347S、及びT347Vからなる群から選択される。

【0089】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の348位を含む。いくつかの態様では、348位におけるアミノ酸置換は、N348Kである。

50

【0090】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の349位を含む。いくつかの態様では、349位におけるアミノ酸置換は、L349I、L349M、L349F、及びL349Vからなる群から選択される。

【0091】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の350位を含む。いくつかの態様では、350位におけるアミノ酸置換は、A350F、A350I、A350L、A350M、及びA350Vからなる群から選択される。

【0092】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の351位を含む。いくつかの態様では、351位におけるアミノ酸置換は、D351E、D351F、D351I、D351L、D351M、D351N、D351Q、及びD351Vからなる群から選択される。

10

【0093】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の352位を含む。いくつかの態様では、352位におけるアミノ酸置換は、R352Kである。

【0094】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の354位を含む。いくつかの態様では、354位におけるアミノ酸置換は、L354I、L354M、L354F、及びL354Vからなる群から選択される。

20

【0095】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の380位を含む。いくつかの態様では、380位におけるアミノ酸置換は、E380Qである。

【0096】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の384位を含む。いくつかの態様では、384位におけるアミノ酸置換は、L384I、L384M、L384F、及びL384Vからなる群から選択される。

【0097】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の386位を含む。いくつかの態様では、386位におけるアミノ酸置換は、I386Vである。

30

【0098】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の387位を含む。いくつかの態様では、387位におけるアミノ酸置換は、L387I、L387M、L387F、及びL387Vからなる群から選択される。

【0099】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の388位を含む。いくつかの態様では、388位におけるアミノ酸置換は、M388I、M388L、及びM388Fからなる群から選択される。

【0100】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の389位を含む。いくつかの態様では、389位におけるアミノ酸置換は、I389Mである。

40

【0101】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の391位を含む。いくつかの態様では、391位におけるアミノ酸置換は、L391I、L391M、L391F、及びL391Vからなる群から選択される。

【0102】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の392位を含む。いくつかの態様では、392位におけるアミノ酸置換は、V392Mである。

【0103】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の404位を含む。いくつかの態

50

様では、404位におけるアミノ酸置換は、F404I、F404L、F404M、及びF404Vからなる群から選択される。

【0104】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の407位を含む。いくつかの態様では、407位におけるアミノ酸置換は、N407Dである。

【0105】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の409位を含む。いくつかの態様では、409位におけるアミノ酸置換は、L409Vである。

【0106】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の413位を含む。いくつかの態様では、413位におけるアミノ酸置換は、N413Dである。

【0107】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の414位を含む。いくつかの態様では、414位におけるアミノ酸置換は、Q414Eである。

【0108】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の417位を含む。いくつかの態様では、417位におけるアミノ酸置換は、C417Sである。

【0109】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の418位を含む。いくつかの態様では、418位におけるアミノ酸置換は、V418I、V418L、V418M、及びV418Fからなる群から選択される。

【0110】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の420位を含む。いくつかの態様では、420位におけるアミノ酸置換は、G420I、G420M、G420F、及びG420Vからなる群から選択される。

【0111】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の421位を含む。いくつかの態様では、421位におけるアミノ酸置換は、M421I、M421L、M421F、及びM421Vからなる群から選択される。

【0112】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の422位を含む。いくつかの態様では、422位におけるアミノ酸置換は、V422Iである。

【0113】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の424位を含む。いくつかの態様では、424位におけるアミノ酸置換は、I424L、I424M、I424F、及びI424Vからなる群から選択される。

【0114】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の428位を含む。いくつかの態様では、428位におけるアミノ酸置換は、L428I、L428M、L428F、及びL428Vからなる群から選択される。

【0115】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の463位を含む。いくつかの態様では、463位におけるアミノ酸置換は、S463Pである。

【0116】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の517位を含む。いくつかの態様では、517位におけるアミノ酸置換は、M517Aである。

【0117】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の521位を含む。いくつかの態様では、521位におけるアミノ酸置換は、G521A、G521F、G521I、G521L、G521M、及びG521Vからなる群から選択される。

【0118】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の522位を含む。いくつかの態様では、522位におけるアミノ酸置換は、M522I、M522L、及びM522Vからなる群から選択される。

【0119】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の524位を含む。いくつかの態様では、524位におけるアミノ酸置換は、H524A、H524I、H524L、H524F、及びH524Vからなる群から選択される。

【0120】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の525位を含む。いくつかの態様では、525位におけるアミノ酸置換は、L525F、L525I、L525M、L525N、L525Q、L525S、L525T、及びL525Vからなる群から選択される。

10

【0121】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の526位を含む。いくつかの態様では、526位におけるアミノ酸置換は、Y526Lである。

【0122】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の527位を含む。いくつかの態様では、527位におけるアミノ酸置換は、S527Nである。

【0123】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の528位を含む。いくつかの態様では、528位におけるアミノ酸置換は、M528F、M528I、及びM528Vからなる群から選択される。

20

【0124】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の533位を含む。いくつかの態様では、533位におけるアミノ酸置換は、V533F及びV533Wからなる群から選択される。

【0125】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の534位を含む。いくつかの態様では、534位におけるアミノ酸置換は、V534Q及びV534Rからなる群から選択される。

30

【0126】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の536位を含む。いくつかの態様では、536位におけるアミノ酸置換は、L536F、及びL536M、L536R、及びL536Yからなる群から選択される。

【0127】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の537位を含む。いくつかの態様では、537位におけるアミノ酸置換は、Y537E及びY537Sからなる群から選択される。

【0128】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の538位を含む。いくつかの態様では、538位におけるアミノ酸置換は、D538G及びD538Kからなる群から選択される。

40

【0129】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の539位を含む。いくつかの態様では、539位におけるアミノ酸置換は、L539A及びL539Rからなる群から選択される。

【0130】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の540位を含む。いくつかの態様では、540位におけるアミノ酸置換は、L540A及びL540Fからなる群から選

50

択される。

【0131】

いくつかの態様では、1つ以上の位置は、配列番号1の547位を含む。いくつかの態様では、547位におけるアミノ酸置換は、H547Aである。

【0132】

いくつかの態様では、1つ以上の追加アミノ酸置換は、2つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換の各々は、343、345、347、348、351、354、384、387、388、389、391、392、404、418、421、521、524、及び525からなる群から選択される、配列番号1の位置にある。

10

【0133】

いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の345位及び348位にある。いくつかの態様では、配列番号1の345位におけるアミノ酸置換は、L345Sであり、配列番号1の348位におけるアミノ酸置換は、N348Kである。

【0134】

いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の384位及び389位にある。いくつかの態様では、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mであり、配列番号1の389位におけるアミノ酸置換は、I389Mである。

【0135】

いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の421位及び392位にある。いくつかの態様では、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換は、M421Iであり、配列番号1の392位におけるアミノ酸置換は、V392Mである。

20

【0136】

いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の354位及び391位にある。いくつかの態様では、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354Iであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Fである。

【0137】

いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の354位及び384位にある。いくつかの態様では、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354Iであり、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mである。

30

【0138】

いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の354位及び387位にある。いくつかの態様では、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354Iであり、配列番号1の387位におけるアミノ酸置換は、L387Mである。

【0139】

いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、387位及び391位にある。いくつかの態様では、配列番号1の387位におけるアミノ酸置換は、L387Mであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Fである。

【0140】

いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の384位及び387位にある。いくつかの態様では、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mであり、配列番号1の387位におけるアミノ酸置換は、L387Mである。

40

【0141】

いくつかの態様では、2つのアミノ酸置換は、配列番号1の384位及び391位にある。いくつかの態様では、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Fである。

【0142】

いくつかの態様では、1つ以上の追加アミノ酸置換は、3つのアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、3つのアミノ酸置換は各々、343、347、351、354、388、391、404、418、521、524、及び525からなる群から選択される、

50

配列番号 1 の位置にある。

【0143】

いくつかの態様では、3つのアミノ酸置換は、配列番号1の354位、384位、及び391位にある。いくつかの態様では、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354Iであり、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Fである。

【0144】

いくつかの態様では、1つ以上の追加アミノ酸置換は、4つのアミノ酸置換を含む。

【0145】

いくつかの態様では、4つのアミノ酸置換は、配列番号1の354位、384位、391位、及び418位にある。いくつかの態様では、配列番号1の354位におけるアミノ酸置換は、L354Iであり、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換は、L384Mであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換は、L391Fであり、配列番号1の418位におけるアミノ酸置換は、V418Iである。

10

【0146】

いくつかの態様では、4つのアミノ酸置換は、配列番号1の343位、388位、521位、及び404位にある。いくつかの態様では、配列番号1の343位におけるアミノ酸置換は、M343Iであり、配列番号1の388位におけるアミノ酸置換は、M388Iであり、配列番号1の521位におけるアミノ酸置換は、G521Iであり、配列番号1の404位におけるアミノ酸置換は、F404Lである。

20

【0147】

いくつかの態様では、4つのアミノ酸置換は、配列番号1の524位、347位、351位、及び525位にある。いくつかの態様では、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換は、H524Vであり、配列番号1の347位におけるアミノ酸置換は、T347Rであり、配列番号1の351位におけるアミノ酸置換は、D351Qであり、配列番号1の525位におけるアミノ酸置換は、L525Nである。

【0148】

いくつかの態様では、非内因性リガンドは、4-ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT）、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンからなる群から選択される。

30

【0149】

また、本明細書に記載される修飾ER-LBDに融合された関心対象のポリペプチドを含む、キメラタンパク質も本明細書で提供される。いくつかの態様では、関心対象のポリペプチドは、核酸結合ドメインを含む。いくつかの態様では、核酸結合ドメインは、ジンクフィンガー（ZF）ドメインを含む。いくつかの態様では、キメラタンパク質は、転写因子であり、関心対象のポリペプチドは、転写調節因子ドメインを含む。

【0150】

また、本明細書に記載される修飾ER-LBD又は本明細書に記載されるキメラタンパク質をコードする、単離ポリヌクレオチド分子も提供される。

【0151】

また、本明細書に記載される修飾ER-LBD又は本明細書に記載されるキメラタンパク質をコードするポリヌクレオチド分子に動作可能に連結されたプロモーターを含む、異種構築物も提供される。

40

【0152】

また、本明細書に記載される異種構築物を含む、提供される。

【0153】

また、本明細書に記載される異種構築物又は本明細書に記載されるプラスミドを含む、細胞（単離細胞又は細胞集団など）提供される。

【0154】

また、関心対象の遺伝子の転写を調節するための遺伝子スイッチも提供される。いくつ

50

かの態様では、遺伝子スイッチは、本明細書に記載される修飾 E R - L B D と、転写調節因子と、非内因性リガンドと、を含む、キメラタンパク質を含み、修飾 E R - L B D への非内因性リガンドの結合は、関心対象の遺伝子の転写を調節するようにキメラタンパク質を誘導する。いくつかの態様では、遺伝子スイッチの非内因性リガンドは、4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT)、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンからなる群から選択される。

【0155】

また、本明細書では、関心対象の遺伝子の転写を調節する方法も提供される。いくつかの態様では、方法は、(a) (i) 修飾 E R - L B D 及び転写調節因子ドメインを含むキメラタンパク質をコードする異種構築物、並びに (ii) 関心対象の遺伝子を含む標的発現カセットで、細胞を形質転換することと、(b) キメラタンパク質の発現に好適な条件下で形質転換細胞を培養することと、(c) 形質転換細胞を非内因性リガンドと接触させることによって、関心対象の遺伝子の転写を調節するようにキメラタンパク質を誘導することと、を含む。

10

【0156】

いくつかの態様では、転写を調節する方法は、転写を活性化する方法である。

【0157】

いくつかの態様では、転写を調節する方法は、転写を抑制する方法である。

【0158】

いくつかの態様では、標的発現カセットは、キメラをコードする異種構築物によってコードされる。

20

【0159】

いくつかの態様では、標的発現カセットは、キメラをコードする異種構築物とは異なる異種構築物によってコードされる。

【0160】

また、関心対象のポリペプチドの局在化を調節する方法も提供される。いくつかの態様では、方法は、(a) 本明細書に記載される修飾 E R - L B D に融合された関心対象のポリペプチドを含むキメラタンパク質をコードする異種構築物で、細胞を形質転換することと、(b) キメラタンパク質の発現に好適な条件下で形質転換細胞を培養することと、(c) 形質転換細胞を非内因性リガンドと接触させることによって、キメラタンパク質の核局在化を誘導することと、を含む。

30

【0161】

いくつかの態様では、本明細書に記載される方法のうちのいずれかの形質転換細胞は、ヒト又は動物にある。いくつかの態様では、形質転換細胞を非内因性リガンドと接触させることは、薬理学的用量のリガンドをヒト又は動物に投与することを含む。

【0162】

いくつかの態様では、前述の方法のステップ (c) の非内因性リガンドは、4-ヒドロキシタモキシフェン、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンからなる群から選択される。

【0163】

いくつかの実施形態では、非内因性リガンドが野生型エストロゲン受容体アルファ上で実質的に不活性である濃度で、非内因性リガンドが投与される。

40

【図面の簡単な説明】

【0164】

本開示のこれら及び他の特徴、態様、並びに利点は、以下の説明及び添付の図面に関してより良好に理解されるであろう。

【0165】

【図1A】図1A及び図1Bは、インシリコで分析された変異の第1のセットの結合エネルギー計算を提供する。図1Aは、エストラジオールへの結合の結合エネルギー計算を提供し、図1Bは、4-OHTへの結合の結合エネルギー計算を提供する。

50

【図 1 B】図 1 A の説明を参照。

【図 2】インシリコで分析された変異の第 2 のセットについて、4-OHT 結合の結合エネルギー計算を提供する。

【図 3】インシリコで分析された変異の第 3 のセットについて、4-OHT 結合の結合エネルギー計算を提供する。

【図 4】インシリコで分析された変異の第 4 のセットについて、4-OHT 結合の結合エネルギー計算を提供する。

【図 5】インシリコで分析された変異の第 5 のセットについて、4-OHT 結合の結合エネルギー計算を提供する。

【図 6】ヘリックス 12 の配向及びドッキング部位におけるエストラジオール結合型立体構造と非内因性リガンド結合型立体構造との間の構造差を示す。 10

【図 7】インシリコで分析された変異の第 6 のセットについて、アゴニスト結合型立体構造対アンタゴニスト結合型立体構造の結合エネルギー計算を提供する。

【図 8 A】図 8 A、図 8 B、及び図 8 C は、第 1 のトランスフェクションスクリーンでアッセイされた、様々な濃度の 4-OHT にわたるレポーター発現に対する様々な修飾 ER-LBD の影響を示す。

【図 8 B】図 8 A の説明を参照。

【図 8 C】図 8 A の説明を参照。

【図 9 A】図 9 A、図 9 B、及び図 9 C は、第 2 のトランスフェクションスクリーンでアッセイされた、様々な濃度の 4-OHT にわたるレポーター発現に対する様々な修飾 ER-LBD の影響を示す。 20

【図 9 B】図 9 A の説明を参照。

【図 9 C】図 9 A の説明を参照。

【図 10 A】図 10 A、図 10 B、及び図 10 C は、第 3 のトランスフェクションスクリーンでアッセイされた、様々な濃度の 4-OHT にわたるレポーター発現に対する様々な修飾 ER-LBD の影響を示す。

【図 10 B】図 10 A の説明を参照。

【図 10 C】図 10 A の説明を参照。

【図 11 A】図 11 A 及び図 11 B は、第 1 のトランスフェクションスクリーンでアッセイされた、様々な濃度の 4-OHT にわたるレポーター発現に対する様々な修飾 ER-LBD の影響を示す。 30

【図 11 B】図 11 A の説明を参照。

【図 12】第 2 のトランスフェクションスクリーンでアッセイされた、様々な濃度の 4-OHT にわたるレポーター発現に対する様々な修飾 ER-LBD の影響を示す。

【図 13】第 2 のトランスフェクションスクリーンでアッセイされた、様々な濃度の 4-OHT にわたるレポーター発現に対する様々な修飾 ER-LBD の影響を示す。

【図 14 A】図 14 A 及び図 14 B は、ERT2 (SB04401) 及び OFF mCherry レポーター構築物 (SB01066) の高スループットタンパク質工学のための根幹を示す。

【図 14 B】図 14 A の説明を参照。 40

【図 15】図 15 A 及び図 15 B は、組み合わせライブラリスクリーンでアッセイされた、様々な濃度のエンドキシフェン及び 4-OHT にわたるレポーター発現に対する様々な修飾 ER-LBD の影響を示す。

【図 16-1】図 16 A、図 16 B、図 16 C、及び図 16 D は、検証スクリーンでアッセイされた、様々な濃度のエンドキシフェン、4-OHT、及びエストラジオールにわたるレポーター発現に対する様々な修飾 ER-LBD の影響を示す。SB03422 は、野生型 ER-LBD であり、性能のベンチマークとして含まれる。

【図 16-2】図 16-1 の説明を参照。

【図 17】図 17 A 及び図 17 B は、NK 細胞でアッセイされた、様々な濃度のエンドキシフェン及び 4-OHT にわたるレポーター発現に対する様々な修飾 ER-LBD の影響 50

を示す。矢印は、ヒトにおける推定される薬理学的に関連性のある4-OHT又はエンドキシフェン濃度を示す。

【図18】図18A及び図18B NK細胞でアッセイされた、様々な濃度のエンドキシフェンにわたるIL-12発現に対する様々な修飾ER-LBDの影響を示す。

【発明を実施するための形態】

【0166】

詳細な説明

特許請求の範囲及び明細書で使用される用語は、別段の指定がない限り、以下に記載されるように定義される。

【0167】

「インビボ」という用語は、生体内で生じるプロセスを指す。

【0168】

本明細書中で使用される場合の「哺乳動物」という用語は、ヒト及び非ヒトの両方を含み、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ネズミ、ウシ、ウマ、及びブタを含むが、これらに限定されない。

【0169】

2つ以上の核酸又はポリペプチド配列の文脈での「同一性」率という用語は、下記の配列比較アルゴリズム（例えば、BLASTP及びBLASTN、又は当業者に利用可能な他のアルゴリズム）のうちの1つを使用して、又は目視検査によって測定される、最大の一一致について比較及び整列されたときに同じである、ヌクレオチド又はアミノ酸残基の特定の割合を有する2つ以上の配列又は部分配列を指す。用途に応じて、「同一性」率は、例えば、比較される配列の領域にわたって、例えば、機能的ドメインにわたって存在するか、又は代替的に、比較される2つの配列の全長にわたって存在することができる。

【0170】

配列比較については、典型的には、1つの配列が、試験配列が比較される参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験及び参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じて部分配列の座標を指定し、配列アルゴリズムのプログラムパラメータを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性率を計算する。

【0171】

比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981) の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970) の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988) の類似法の検索によって、これらのアルゴリズム (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (575 Science Dr., Madison, Wis.) 内のGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA) のコンピュータ化された実行によって、又は目視検査（一般的にAusubel et al. (下記) を参照）によって、実施することができる。

【0172】

配列同一性率及び配列類似性を決定するために好適なアルゴリズムの一例は、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990) に記載されているBLASTアルゴリズムである。BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、アメリカ国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov/) を通して公的に入手可能である。

【0173】

「十分な量」という用語は、所望の効果を生じるために十分な量、例えば、細胞内のタ

10

20

30

40

50

ンパク質凝集を調節するために十分な量を意味する。

【0174】

「治療有効量」という用語は、疾患の症状を改善するのに有効な量である。治療有効量は、予防を治療とみなすことができるため、「予防有効量」であり得る。

【0175】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。

【0176】

修飾エストロゲン受容体リガンド結合ドメイン(ER-LBD)

本開示は、アミノ酸置換G400V、M543A、及びL544A、又はアミノ酸置換G400V、M543A、L544A、及びV595Aを含み、かつ343~354位置、380~392位置、404~463位置、及び517~540、並びに547位置から選択される、配列番号1の領域内のリガンド結合残基への1つ以上の追加のアミノ酸置換を含む、配列番号1のアミノ酸282~595に対応するアミノ酸配列を含む修飾エストロゲン受容体リガンド結合ドメイン(ER-LBD)(ヒトエストロゲン受容体、UniProt ID番号:P03372)を提供する。いくつかの態様では、1つ以上のアミノ酸置換は、(a)内因性リガンドと比較して、非内因性リガンドに対するより高い感受性、(b)配列番号2若しくは配列番号3のER-LBDと比較して、非内因性リガンドに対するより高い感受性、及び/又は(c)配列番号2若しくは配列番号3のER-LBDと比較して、非内因性リガンドに対するより高い選択性をもたらす。

【0177】

1つ以上のアミノ酸置換は、(a)内因性リガンドと比較して、非内因性リガンドに対するより高い感受性、(b)配列番号2若しくは配列番号3のER-LBDと比較して、非内因性リガンドに対するより高い感受性、及び/又は(c)配列番号2若しくは配列番号3のER-LBDと比較して、非内因性リガンドに対するより高い選択性をもたらす。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加のアミノ酸置換は、配列番号2のER-LBDと比較して、非内因性リガンドに対するより高い感受性をもたらす。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加のアミノ酸置換は、配列番号2のER-LBDと比較して、非内因性リガンドに対するより高い感受性をもたらす。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加のアミノ酸置換は、配列番号2のER-LBDと比較して、非内因性リガンドに対するより高い選択性をもたらす。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加のアミノ酸置換は、配列番号3のER-LBDと比較して、非内因性リガンドに対するより高い選択性をもたらす。

【0178】

「リガンド結合残基」は、エストロゲン受容体(ER)又はERリガンド結合ドメインのリガンド結合ポケットに位置する残基を指し、内因性リガンド(例えば、エストラジオール)に結合するためのポケット、及び4-OHTなどの非内因性リガンドに結合するためのポケットを含む。配列番号1に対応する343~354位、380~392位、及び404~463位内の残基は、内因性リガンド及び非内因性リガンドの両方への結合に参与する。配列番号1に対応する517~547位内の残基(例えば、残基517~40及び残基547)は、ヘリックス12と称されるヘリックス内に位置し、内因性リガンド結合に参与する。

【0179】

非内因性リガンドに対する感受性と比較した、非内因性リガンドに対するより高い感受性は、修飾ER-LBDが、内因性リガンド(例えば、エストラジオール)へのその結合の親和性と比較して、より高い親和性で非内因性リガンド(例えば、エンドキシフェン)に結合することを意味する。

【0180】

1つ以上のアミノ酸置換を含まないER-LBD(例えば、配列番号2又は配列番号3

のアミノ酸配列を含むER-LBD)の感受性と比較した、非内因性リガンドに対するより高い感受性は、1つ以上の追加のアミノ酸置換を含まないER-LBDの非内因性リガンドへの結合の親和性と比較して、修飾ER-LBDが、より高い親和性で非内因性リガンド(例えば、エンドキシフェン)に結合することを意味する。いくつかの実施形態では、より高い感受性は、1つ以上の追加のアミノ酸置換を含まないER-LBDの結合と比較して、非内因性リガンドに対する結合親和性の少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、又は少なくとも5倍の改善である。いくつかの実施形態では、より高い感受性は、1つ以上の追加のアミノ酸置換を欠くER-LBDを含むキメラ転写因子と比較して、修飾ER-LBDを含むキメラ転写因子の更なる転写調節(例えば、更なる転写活性化又は更なる転写抑制)によって、示される。いくつかの実施形態では、形質導入アッセイのトランスフェクションでは、修飾ER-LBDを含むキメラ転写因子は、同じ条件下であるが、1つ以上の追加のアミノ酸置換を欠くER-LBDを伴うレポーターの発現と比較して、非内因性リガンド(例えば、4-OHT)に応答して、キメラ転写因子応答性プロモーター制御下でレポーターの少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、又は少なくとも35%多くの発現を誘導することが可能である(レポーターについて陽性である細胞の%によって測定されるか、又は幾何平均蛍光強度によって測定される)。

10

【0181】

非内因性リガンドに対するより高い選択性は、内因性リガンド(例えば、エストラジオール)と比較して、非内因性リガンド(例えば、4-OHT又はエンドキシフェン)への優先的な結合を指す。選択性は、基質(例えば、修飾ER-LBD)との複合体中の1つのリガンド(例えば、非内因性リガンド)の別のリガンド(例えば、内因性リガンド)による変位の反応のための平衡定数である、選択係数を使用して測定され得る。選択係数が大きいほど、競合リガンド(例えば、内因性リガンド)は、基質(例えば、修飾ER-LBD)と形成された複合体から初期リガンド(例えば、非内因性リガンド)を更に変位させるであろう。いくつかの実施形態では、より高い選択性が、内因性リガンドの存在下での転写調節と比較して、非内因性リガンドの存在下でのキメラ転写因子の転写調節の改善によって示される。いくつかの実施形態では、形質導入アッセイのトランスフェクションでは、修飾ER-LBDを含むキメラ転写因子は、同じ条件下であるが、内因性リガンド(例えば、エストラジオール)に応答するレポーターの発現と比較して、非内因性リガンド(例えば、4-OHT)に応答して、キメラ転写因子応答性プロモーター制御下でレポーターの少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、又は少なくとも35%多くの発現を誘導することが可能である(レポーターについて陽性である細胞の%によって測定されるか、又は幾何平均蛍光強度によって測定される)。

20

30

【0182】

いくつかの態様では、リガンド結合残基への1つ以上のアミノ酸置換は、ヘリックス12内に1つ以上のアミノ酸置換を含む。ER-LBDのヘリックス12は、配列番号1の残基位置533~547を含む。いくつかの実施形態では、ヘリックス12内の1つ以上のアミノ酸置換は、538、536、539、540、547、534、533、及び537から選択される1つ以上の位置にある。

40

【0183】

「非内因性リガンド」は、例えば、エストロゲン受容体を発現する生物によって自然には発現されない合成エストロゲン受容体結合リガンドを指し得る。非内因性エストロゲン受容体結合リガンドとしては、限定されないが、タモキシフェン、並びに4-ヒドロキシタモキシフェン、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンなどのその代謝物が挙げられる。

【0184】

1つ以上の追加のアミノ酸置換は、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、354、380、384、386、387、388

50

、 3 8 9、 3 9 1、 3 9 2、 4 0 4、 4 0 7、 4 0 9、 4 1 3、 4 1 4、 4 1 7、 4 1 8
、 4 2 0、 4 2 1、 4 2 2、 4 2 4、 4 2 8、 4 6 3、 5 1 7、 5 2 1、 5 2 2、 5 2 4
、 5 2 5、 5 2 6、 5 2 7、 5 2 8、 5 3 3、 5 3 4、 5 3 6、 5 3 7、 5 3 8、 5 3 9
、 5 4 0、 及び 5 4 7 から選択される、配列番号 1 の 1 つ以上の位置にあり得る。いくつ
かの実施形態では、1 つ以上の追加のアミノ酸置換は、上記に列挙された位置のうちの 1
つ、上記に列挙された位置のうちの 2 つ、上記に列挙された位置のうちの 3 つ、上記に列
挙された位置のうちの 4 つ、又は上記に列挙された位置のうちの 5 つにおける置換を含む
。

【 0 1 8 5 】

いくつかの態様では、1 つ以上の追加のアミノ酸置換は、表 1 に列挙される置換のうち
の 1 つ以上から選択される。

10

【 0 1 8 6 】

(表 1)

20

30

40

50

アミノ酸置換					
M343I	L349I	L384M	N413D	L428F	L525S
M343L	L349M	L384V	Q414E	M517A	Y526L
M343V	L349V	L384F	C417S	G521A	S527N
M343F	L349F	I386V	V418I	G521I	M528I
G344M	A350L	L387I	V418L	G521L	M528V
L345S	A350M	L387M	V418M	G521M	M528F
L346I	A350V	L387V	V418F	G521V	V533F
L346M	A350F	L387F	G420I	G521F	V533W
L346V	A350I	M388I	G420M	M522I	V534R
L346F	D351I	M388L	G420V	M522L	V534Q
T347I	D351L	M388F	G420F	M522V	L536F
T347L	D351M	I389M	M421I	H524A	L536M
T347M	D351N	L391I	M421L	H524I	L536Y
T347N	D351V	L391M	M421V	H524L	Y537E
T347R	D351E	L391V	M421F	H524V	D538K
T347V	D351F	L391F	V422I	H524F	L539R
T347D	D351Q	V392M	I424L	L525I	L539A
T347E	R352K	F404I	I424M	L525M	L540A
T347F	L354I	F404L	I424V	L525N	L540F
T347K	L354M	F404M	I424F	L525T	H547A
T347Q	L354V	F404V	L428I	L525V	
T347S	L354F	N407D	L428M	L525F	
N348K	L384I	L409V	L428V	L525Q	

10

20

30

40

50

【 0 1 8 7 】

いくつかの態様では、1つ以上の追加の変異は、少なくとも2つの変異、少なくとも3つの変異、少なくとも4つの変異、少なくとも5つの変異、少なくとも6つの変異、少なくとも7つの変異、又は少なくとも8つの変異を含む。いくつかの態様では、1つ以上の追加の変異は、2～10個の変異、2～9個の変異、2～8個の変異、2～7個の変異、2～6個の変異、2～5個の変異、2～4個の変異、2～3個の変異、3～10個の変異、3～9個の変異、3～8個の変異、3～7個の変異、3～6個の変異、3～5個の変異、3～4個の変異、4～10個の変異、4～9個の変異、4～8個の変異、4～7個の変異、4～6個の変異、4～5個の変異、5～10個の変異、5～9個の変異、5～8個の変異、5～7個の変異、5～6個の変異、6～10個の変異、6～9個の変異、6～8個の

変異、6～7個の変異、7～10個の変異、7～9個の変異、7～8個の変異、8～10個の変異、8～9個の変異、又は9～10個の変異を含む。

【0188】

いくつかの態様では、1つ以上の追加の変異は、表2に列挙される変異から選択される少なくとも2つの変異を含む。

【0189】

(表2)

アミノ酸置換の組み合わせ	
L345S_N348K	L384M_L391F
L384M_I389M	L354I_L384M
M421I_V392M	L354I_L384M_L391F
L354I_L391F	L354I_L384M_L391F_V418I
L354I_L387M	M343I_M388I_G521I_F404L
L387M_L391F	H524V_T347R_D351Q_L525N
L384M_L387M	L354I_L384M_L391F_V418I
Q414E_S463P_H524L	L354I_L384M_L391V_S463P
L384M_L391V_N413D_H524F	L384M_L409V_N413D_S463P_H524L
L391V_N413D_Q414E_S463P_H524F	L391V_Q414E_M421L_S463P_H524F
L354I_L409V_N413D_M421L_H524L	L354I_L409V_M421L_S463P_H524L
L384M_L391V_N413D_M421L_S463P_H524L	L409V_N413D_Q414E_M421L_S463P_H524L
L354I_L391V_L409V_N413D_Q414E_H524L	L354I_L384M_L409V_N413D_M421L_S463P_H524F
L354I_L391V_N413D_M421L_S463P_M517A_H524L	L354I_L391V_N413D_Q414E_M421L_M517A_H524F
L384M_L391V_L409V_N413D_M421L_S463P_M517A_H524F	

10

20

30

【0190】

いくつかの実施形態では、バリエーションが、G400V/M543A/L544A三重アミノ酸置換又はG400V/M543A/L544A/V595A四重アミノ酸置換を含み、かつ非内因性リガンドに対するより高い感受性及び／又はより高い選択性を与える1つ以上の追加のアミノ酸置換（例えば、表1及び表2に示されるアミノ酸置換のうちの1つ以上）を含むことを条件として、本明細書に記載される修飾ER-LBDと少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を有する修飾ER-LBDバリエーションが本明細書で提供される。

40

【0191】

キメラタンパク質

いくつかの態様では、本開示は、修飾ER-LBDに融合された関心対象のポリペプチドを含む、キメラタンパク質を提供する。修飾ER-LBDは、非内因性リガンドへの結合時に核局在化が可能である。したがって、関心対象のポリペプチドへの修飾ER-LBDの融合は、関心対象のポリペプチドの細胞局在化の制御を可能にし得る。

【0192】

いくつかの実施形態では、関心対象のポリペプチドは、リンカーを含む。1つ以上のリンカーは、ER-LBDと関心対象のポリペプチドとの間などのキメラタンパク質の様々なドメインの間で使用され得る。例えば、ポリペプチドリンカーは、GGGGSGGGG

50

S G G G G S V D G F（配列番号4）及びA S G G G G S A S（配列番号5）のうちの1つ以上などのアミノ酸配列を含むことができる。

【0193】

いくつかの実施形態では、関心対象のポリペプチドは、少なくとも1つの核酸結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、核酸結合ドメインは、ジンクフィンガードメインである。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、転写活性化因子又は転写抑制因子などの転写調節因子を含む。核酸結合ドメインの包含は、非内因性リガンド（例えば、4-OHT又はエンドキシフェン）によって誘導可能であるキメラタンパク質による標的核酸結合を可能にし得る。

【0194】

いくつかの態様では、核酸結合ドメインは、DNA結合ジンクフィンガータンパク質ドメイン（ZFタンパク質ドメイン）を含む。いくつかの態様では、ZFタンパク質ドメインは、モジュール式の設計であり、ジンクフィンガーアレイ（ZFA）から構成される。いくつかの態様では、転写エフェクタードメインは、単純ヘルペスウイルススタンパク質16（VP16）活性化ドメイン；VP16の4つのタンデムコピーを含む活性化ドメイン；VP64活性化ドメイン；NFκBのp65活性化ドメイン；エプスタイン・バーウイルスRトランス活性化因子（Rta）活性化ドメイン；VP64、p65、及びRta活性化ドメイン（VPR活性化ドメイン）を含む三者活性化因子；VP64、p65、及びHSF1活性化ドメイン（VPH活性化ドメイン）を含む三者活性化因子；ヒトE1A関連タンパク質p300のヒストンアセチルトランスフェラーゼ（HAT）コアダメイン（p300 HATコアダメイン）；Kruppel会合ボックス（KRAB）抑制ドメイン；リプレッサーエレメントサイレンシング転写因子（REST）抑制ドメイン；ヘアリー関連塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックスリプレッサータンパク質のWRPWモチーフ（配列番号82）（当該モチーフは、WRPW（配列番号82）ドメインとして知られている）；DNA（シトシン-5）-メチルトランスフェラーゼ3B（DNMT3B）抑制ドメイン；並びにHP1アルファクロモシャドウ抑制ドメインから選択される。

【0195】

いくつかの実施形態では、ZFタンパク質ドメインは、モジュール式の設計であり、ジンクフィンガーアレイ（ZFA）からなる。ジンクフィンガーアレイは、一緒に連結された複数のジンクフィンガータンパク質モチーフを含む。各ジンクフィンガーモチーフは、異なる核酸モチーフに結合する。これにより、任意の所望の核酸配列に対する特異性を有するZFAがもたらされる。ZFモチーフは、互いに直接隣接するか、又は可動性リンカー配列によって隔てられ得る。いくつかの実施形態では、ZFAは、タンデムに配置されたZFモチーフの配列、ストリング、又は鎖である。ZFAは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15個のジンクフィンガーモチーフを有することができる。ZFAは、1～10、1～15、1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、2～3、2～4、2～5、2～6、2～7、2～8、2～9、2～10、3～4、3～5、3～6、3～7、3～8、3～9、3～10、4～5、4～6、4～7、4～8、4～9、4～10、5～6、5～7、5～8、5～9、5～10、又は5～15個のジンクフィンガーモチーフを有することができる。

【0196】

ZFタンパク質ドメインは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個、又はそれ以上のZFAを有することができる。ZFドメインは、1～10、1～15、1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、2～3、2～4、2～5、2～6、2～7、2～8、2～9、2～10、3～4、3～5、3～6、3～7、3～8、3～9、3～10、4～5、4～6、4～7、4～8、4～9、4～10、5～6、5～7、5～8、5～9、5～10、又は5～15個のZFAを有することができる。いくつかの実施形態では、ZFタンパク質ドメインは、1～10個のZFAを含む。いくつかの実施形態では、ZFタンパク質ドメインは、少なくとも1個のZFAを含む。いくつかの実施形態では、ZFタンパク質ドメインは、少なくとも

10

20

30

40

50

2 個の Z F A を含む。いくつかの実施形態では、Z F タンパク質ドメインは、少なくとも 3 個の Z F A を含む。いくつかの実施形態では、Z F タンパク質ドメインは、少なくとも 4 個の Z F A を含む。いくつかの実施形態では、Z F タンパク質ドメインは、少なくとも 5 個の Z F A を含む。いくつかの実施形態では、Z F タンパク質ドメインは、少なくとも 10 個の Z F A を含む。

【0197】

例示的な Z F タンパク質ドメインは、配列 S R P G E R P F Q C R I C M R N F S R R H G L D R H T R T H T G E K P F Q C R I C M R N F S D H S S L K R H L R T H T G S Q K P F Q C R I C M R N F S V R H N L T R H L R T H T G E K P F Q C R I C M R N F S D H S N L S R H L K T H T G S Q K P F Q C R I C M R N F S Q R S S L V R H L R T H T G E K P F Q C R I C M R N F S E S G H L K R H L R T H L R G S (配列番号 6) に示される。いくつかの実施形態では、Z F タンパク質ドメインは、Z F 5-7 DNA 結合ドメインである。例示的な Z F 5-7 DNA 結合ドメインは、配列 M S R P G E R P F Q C R I C M R N F S N M S N L T R H T R T H T G E K P F Q C R I C M R N F S D R S V L R R H L R T H T G S Q K P F Q C R I C M R N F S D P S N L A R H T R T H T G E K P F Q C R I C M R N F S D R S S L R R H L R T H T G S Q K P F Q C R I C M R N F S Q S G T L H R H T R T H T G E K P F Q C R I C M R N F S Q R P N L T R H L R T H L R G S (配列番号 62) に示される。

10

【0198】

いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、キメラ転写因子であり、修飾 E R-L B D に加えて、核酸結合ドメイン及び転写調節因子ドメインを含む。いくつかの態様では、核酸結合ドメイン及び転写調節因子ドメインは、同じ天然に存在するタンパク質の一部である。いくつかの態様では、核酸結合ドメイン及び転写調節因子ドメインは、異種であり、同じタンパク質内に天然には存在しない。

20

【0199】

本明細書で使用される場合の「転写調節因子ドメイン」は、(例えば、関心対象のプロモーターに特異的に結合する核酸結合ドメインによって) 遺伝子のプロモーター領域に標的化されると、遺伝子の転写を調節することが可能である、ポリペプチドドメインを指す。いくつかの態様では、転写エフェクタードメインは、転写抑制因子を含む。いくつかの態様では、転写抑制因子は、K r u p p e l 会合ボックス (K R A B) 抑制ドメイン、リプレッサーエレメントサイレンシング転写因子 (R E S T) 抑制ドメイン、ヘアリー関連塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックスリプレッサータンパク質の W R P W モチーフ (当該モチーフは W R P W (配列番号 82) 抑制ドメインとして知られている)、DNA (シトシン 5)-メチルトランスフェラーゼ 3 B (D N M T 3 B) 抑制ドメイン、及び H P 1 アルファクロモシャドウ抑制ドメインから選択される転写抑制因子ドメインを含む。

30

【0200】

いくつかの態様では、転写エフェクタードメインは、転写活性化因子を含む。いくつかの態様では、転写活性化因子は、単純ヘルペスウイルスタンパク質 16 (V P 16) 活性化ドメイン; V P 16 の 4 つのタンデムコピーを含む活性化ドメイン; V P 64 活性化ドメイン; N F κ B の p 65 活性化ドメイン (すなわち、p 65); エプスタイン・バーウイルス R トランス活性化因子 (R t a) 活性化ドメイン; V P 64、p 65、及び R t a 活性化ドメイン (V P R 活性化ドメイン) を含む三者活性化因子; V P 64、p 65、及び H S F 1 活性化ドメイン (V P H 活性化ドメイン) を含む三者活性化因子; 並びにヒト E 1 A 関連タンパク質 p 300 のヒストンアセチルトランスフェラーゼ (H A T) コアドメイン (p 300 H A T コア活性化ドメイン) から選択される転写活性化因子ドメインを含む。いくつかの態様では、転写調節因子ドメインは、p 65 転写活性化因子を含む。いくつかの態様では、p 65 転写活性化因子は、アミノ酸配列 D E F P T M V F P S G Q I S Q A S A L A P A P P Q V L P Q A P A P A P A P A M V S A L A Q A P A P V P V L A P G P P Q A V A P P A P K P T Q A G E G T L S E A L L Q L Q F D D E D L G A L L G N S T D P A V F T D L A S V D N S E F Q Q L L N Q G I P V A P H T T E P M

40

50

LMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPPLGAPGLPNGLLSGDE
DFSSIA DMDFSALLSQISS（配列番号64）を含む。

【0201】

遺伝子スイッチ

また、本明細書では、転写を調節するための遺伝子スイッチも提供される。遺伝子スイッチは、（a）修飾ER-LBDを含み、関心対象の遺伝子に動作可能に連結されたキメラ転写因子応答性プロモーター（CTF応答性プロモーター）に結合することが可能であるキメラ転写因子と、（b）キメラタンパク質の修飾ER-LBDに結合する非内因性リガンドと、を含み得る。修飾ER-LBDへの非内因性リガンドの結合時に、キメラタンパク質は、関心対象の遺伝子の転写を調節し得る。

10

【0202】

いくつかの実施形態では、関心対象の遺伝子は、サイトカイン、ケモカイン、ホーミング分子、成長因子、細胞死制御因子、共活性化分子、腫瘍微小環境修飾因子a、受容体、リガンド、抗体、ポリヌクレオチド、ペプチド、及び酵素からなる群から選択されるポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、関心対象の遺伝子は、サイトカインをコードする。いくつかの実施形態では、関心対象の遺伝子は、IL1-ベータ、IL2、IL4、IL6、IL7、IL10、IL12、IL12p70融合タンパク質、IL15、IL17A、IL18、IL21、IL22、I型インターフェロン、インターフェロン-ガンマ、及びTNF-アルファからなる群から選択されるサイトカインをコードする。いくつかの実施形態では、関心対象の遺伝子は、MCHQQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSL L L L LHKKE DGIWSTDILKDKQKEPKNKTF LRC EAKNYSGRFT CWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERVVRGDNKEYEYSVE CQEDSACPAAEESLP I EV MVD AVHKLKYENYTSSFFIRD I IKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSA TVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGSGGGSGGGSGSRNLPVATPDPGMFPC LHH SQNL LRAVSNMLQKARQ TLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSS IYEDLKMYQVEFKTMNAKL LMDPKRQIFLDQNM L AV IDELMQALNFNSE TVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCIL L HAFRIRAVTIDRVMSY LNAS（配列番号58）のアミノ酸配列を含むIL12p70融合タンパク質をコードする。

20

30

【0203】

いくつかの実施形態では、非内因性リガンドは、4-ヒドロキシ-タモキシフェン（4-OHT）、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンから選択される。

【0204】

特定の実施形態では、非内因性リガンドは、4-ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT、アフィモキシフェンとも称される）である。

40

【0205】

特定の実施形態では、非内因性リガンドは、エンドキシフェンである。

【0206】

単離ポリヌクレオチド分子及び異種構築物

また、本明細書に記載される修飾ER-LBD又はキメラタンパク質をコードする単離ポリヌクレオチド分子及び異種構築物も本明細書で提供される。いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載される修飾ER-LBD又はキメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離ポリヌクレオチド分子を提供する。いくつかの態様では、本開

50

示は、修飾 E R - L B D 又はキメラタンパク質をコードするポリヌクレオチド分子に動作可能に連結されたプロモーターを含む、異種構築物を提供する。

【0207】

いくつかの態様では、本開示は、標的遺伝子発現カセットを含む、単離ポリヌクレオチド及び／又は異種構築物を更に提供する。

【0208】

「単離」核酸分子又はポリヌクレオチドは、その天然環境から取り出された DNA 又は RNA などの核酸分子を指す。例えば、異種構築物中に含有される修飾 E R - L B D 又はキメラタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、単離されているとみなされる。単離ポリヌクレオチドの更なる例としては、異種宿主細胞中で維持される組換えポリヌクレオチド、又は溶液中の（部分的若しくは実質的に）精製されたポリヌクレオチドが挙げられる。単離ポリヌクレオチドはまた、通常、ポリヌクレオチド分子を含有する細胞中に含有されるポリヌクレオチド分子を含むが、ポリヌクレオチド分子は、染色体外に、又はその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【0209】

単離ポリヌクレオチド分子には、cDNA ポリヌクレオチド、RNA ポリヌクレオチド、RNA i オリゴヌクレオチド（例えば、siRNA、miRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、shRNA など）、mRNA ポリヌクレオチド、環状プラスミド、直線状 DNA 断片、ベクター、ミニサークル、ssDNA、細菌人工染色体（BAC）、及び酵母人工染色体（YAC）、並びにオリゴヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

【0210】

いくつかの実施形態では、単離ポリヌクレオチド分子は、DNA、cDNA、RNA、mRNA、及びネイキッドプラスミド（直鎖状又は環状）から選択される。

【0211】

本発明の参照ヌクレオチド配列と少なくとも、例えば、95%「同一」であるヌクレオチド配列を有する核酸又はポリヌクレオチドによって、参照ヌクレオチド配列の各100個のヌクレオチド当たり最大5個の点変異を含み得ることを除いて、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が参照配列と同一であることが意図される。言い換えれば、参照ヌクレオチド配列と少なくとも95%同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを取得するために、参照配列中のヌクレオチドの最大5%が、欠失され得るか、若しくは別のヌクレオチドで置換され得るか、又は参照配列中の総ヌクレオチドの最大5%のヌクレオチドの数が、参照配列に挿入され得る。参照配列のこれらの改変は、参照配列中の残基の間で個々に、又は参照配列内の1つ以上の連続基中のいずれかで散在して、参照ヌクレオチド配列の5'若しくは3'末端位置に、又はそれらの末端位置の間のいずれかの場所で生じ得る。実用的な問題として、任意の特定のポリヌクレオチド配列が、本発明のヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一であるかどうかは、既知のコンピュータプログラムを使用して従来的に決定することができる。

【0212】

いくつかの態様では、ポリヌクレオチド分子によってコードされるキメラタンパク質は、キメラ転写因子であり、ポリヌクレオチド分子は、キメラ転写因子応答性（CTF応答性）プロモーターに動作可能に連結された関心対象の遺伝子を含む標的発現カセットを更に含む。いくつかの実施形態では、標的発現カセットは、キメラタンパク質と同じ異種構築物中に存在する。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質及び標的発現カセットは、別個の異種構築物中に存在する。

【0213】

「発現カセット」という用語は、標的細胞における特定のポリヌクレオチドの転写を可能にする一連の核酸要素を有する、組換えによって、又は合成的に生成されたポリヌクレオチドを指す。発現カセットは、プラスミド、染色体、ミトコンドリアDNA、プラスチ

10

20

30

40

50

ドDNA、ウイルス、又は核酸断片に組み込まれ得る。典型的には、発現ベクターの発現カセット部分は、いくつかある配列の中でも特に、転写される核酸配列及びプロモーターを含む。いくつかの態様では、本開示は、修飾ER-LBD、又は修飾ER-LBDを含むキメラタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む、発現カセットを提供する。

【0214】

本明細書に記載される修飾ER-LBDを含む、単離ポリヌクレオチド分子及び異種構築物は、操作されたポリヌクレオチド分子である。「操作されたポリヌクレオチド」は、自然界では発生しないポリヌクレオチドである。しかしながら、操作されたポリヌクレオチドは、全体として天然に存在しない一方で、それは、自然界で発生するヌクレオチド配列を含み得ることが理解されるべきある。いくつかの実施形態では、操作されたポリヌクレオチドは、異なる生物からの（例えば、異なる種からの）ヌクレオチド配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、操作されたポリヌクレオチドは、マウスヌクレオチド配列、細菌ヌクレオチド配列、ヒトヌクレオチド配列、及び／又はウイルスヌクレオチド配列を含む。「操作されたポリヌクレオチド」という用語は、組換え核酸及び合成核酸を含む。「組換えポリヌクレオチド」は、ヌクレオチド分子を結合することによって構築され、いくつかの実施形態では、生細胞中で複製することができる分子を指す。「合成ポリヌクレオチド」は、増幅されるか、又は化学的に、若しくは他の手段によって合成される分子を指す。合成ポリヌクレオチドは、化学的に修飾されるか、又は他の方法で修飾されるが、天然に存在するヌクレオチド分子と塩基対合することができるものを含む。修飾は、1つ以上の修飾ヌクレオチド間結合及び非天然核酸を含むが、これらに限定されない。修飾は、米国特許第6,673,611号及び米国特許出願公開2004/0019001に更に詳細に記載されており、その各々は、それらの全体で参照により組みこまれる。修飾ヌクレオチド間結合は、ホスホロジチオエート又はホスホロチオエート結合であり得る。非天然核酸は、ロックド核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、グリコール核酸(GNA)、ホスホロジアミデートモルホリノオリゴマー(PMO又は「モルホリノ」)、及びトレオース核酸(TNA)であり得る。非天然核酸は、国際出願WO1998/039352、米国出願公開第2013/0156849号、及び米国特許第6,670,461号、第5,539,082号、第5,185,444号に更に詳細に記載されており、各々が、それらの全体で参照により本明細書に組み込まれる。組換えポリヌクレオチド及び合成ポリヌクレオチドはまた、前述のうちのいずれかの複製から生じる分子も含む。本開示の操作されたポリヌクレオチドは、単一の分子（例えば、同じプラスミド又は他のベクターに含まれる）によって、又は複数の異なる分子（例えば、複数の異なる独立して複製する分子）によってコードされ得る。

【0215】

本開示の操作されたポリヌクレオチドは、標準的な分子生物学方法を使用して産生され得る（例えば、Green and Sambrook, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2012, Cold Spring Harbor Pressを参照）。いくつかの実施形態では、操作された核酸構築物は、GIBSON ASSEMBLY（登録商標）クローニングを使用して産生される（例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、Gibson, D. G. et al. Nature Methods, 343-345, 2009、及びGibson, D. G. et al. Nature Methods, 901-903, 2010を参照）。GIBSON ASSEMBLY（登録商標）は、典型的には、単一チューブ反応において3つの酵素活性：5'エキソヌクレアーゼ、DNAポリメラーゼのY伸長活性、及びDNAリガーゼ活性を使用する。5'エキソヌクレアーゼ活性は、5'末端配列を噛み返し、アニーリングのために相補配列を露出させる。次いで、ポリメラーゼ活性は、アニーリングされた領域上のギャップを埋める。次いで、DNAリガーゼは、ニックを密閉し、DNA断片を一緒に共有結合的に連結する。隣接する断片の重複する配列は、Golden Gate Assemblyで使用されるものよりもはるかに長く、したがって、正しい組み立ての高い割合をもたらす。いくつかの実施形態では、操作された核酸構築物は、IN

ー FUSION（登録商標）クローニング（Clontech）を使用して産生される。
【0216】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリヌクレオチド分子は、異種構築物に含まれる。「ベクター」又は「発現ベクター」という用語は、「異種構築物」と同義であり、標的細胞中の構築物と動作可能に会合する1つ以上の遺伝子の発現を導入及び誘導するために使用されるポリヌクレオチド分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としての構築物、並びにそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。本明細書に記載される異種構築物は、発現カセットを含む。いくつかの態様では、修飾 ER-LBD 又は修飾 ER-LBD を含むキメラタンパク質をコードするポリヌクレオチド分子に動作可能に連結されたプロモーターを含む発現カセットを含む、異種構築物が本明細書で提供される。

10

【0217】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」は、核酸配列の残りの転写の開始及び速度が制御される、核酸配列の制御領域を指す。プロモーターはまた、RNAポリメラーゼ及び他の転写因子などの調節タンパク質及び分子が結合し得る小領域を含み得る。プロモーターは、構成的、誘導的、抑制的、組織特異的、又はそれらの任意の組み合わせであり得る。プロモーターは、発現を駆動するか、又はそれが調節する核酸配列の転写を駆動する。本明細書では、プロモーターは、それが調節する核酸配列に関連して、その配列の転写開始及び／又は発現を制御する（「駆動する」）ために正しい機能的位点及び配向にあるときに、「動作可能に連結されている」とみなされる。

20

【0218】

プロモーターは、所与の遺伝子又は配列のコードセグメントの上流に位置する5'非コード配列を単離することにより取得され得るように、遺伝子又は配列と天然に会合するプロモーターであり得る。そのようなプロモーターは、「内因性」と称され得る。いくつかの実施形態では、コード核酸配列は、その天然の環境においてコードされた配列と通常は会合しないプロモーターを指す、組換え又は異種プロモーターの制御下に位置付けられ得る。そのようなプロモーターは、他の遺伝子のプロモーター、任意の他の細胞から単離されたプロモーター、並びに「天然に存在」しない合成プロモーター又はエンハンサー、例えば、当技術分野で公知である遺伝子操作の方法を通して発現を改変する異なる転写調節及び／又は変異の異なる要素を含むものなどを含み得る。プロモーター及びエンハンサーの核酸配列を合成的に産生することに加えて、配列は、組換えクローニング及び／又はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を含む核酸増幅技術を使用して産生され得る（例えば、米国特許第4,683,202号及び米国特許第5,928,906号を参照）。

30

【0219】

本明細書で使用される場合、「誘導性プロモーター」は、シグナルの存在下にあるか、シグナルによる影響を受けたか、又はシグナルによって接触されたときに、転写活性を調節すること（例えば、開始又は活性化すること）によって特徴付けられるプロモーターを指す。このシグナルは、誘導性プロモーターからの転写活性を調節する際に活性であるような方法で誘導性プロモーターに接触する、内因性又は通常は外因性の条件（例えば、光）、化合物（例えば、化学的若しくは非化学的化合物）、又はタンパク質（例えば、本明細書に記載されるキメラ転写因子）であり得る。転写の活性化は、プロモーターに直接的に作用して転写を駆動すること、又はプロモーターが転写を駆動することを防止している抑制因子の不活化によってプロモーターに間接的に作用することを含み得る。逆に、転写の不活化は、プロモーターに直接的に作用して転写を防止すること、又は次いでプロモーターに作用する抑制因子を活性化することによってプロモーターに間接的に作用することを含み得る。

40

【0220】

本明細書で使用される場合、プロモーターは、局所腫瘍状態（例えば、炎症若しくは低酸素）又はシグナルの存在下で、プロモーターからの転写が活性化されるか、不活化されるか、増加するか、又は減少する場合に、その状態若しくはシグナル「に応答する」か、

50

又はその状態若しくはシグナル「によって調節される」。いくつかの実施形態では、プロモーターは、応答エレメントを含む。「応答エレメント」は、プロモーターから遺伝子発現を調節する(modulate)(調節する(regulate))特異的な分子(例えば、転写因子)に結合する、プロモーター領域内のDNAの短い配列である。本開示に従って使用され得る応答エレメントは、限定されないが、フロレチン調整可能制御要素(PEACE)、ジンクフィンガーDNA結合ドメイン(DBD)、インターフェロンガンマ活性化配列(GAS)(Decker, T. et al. J Interferon Cytokine Res. 1997 Mar; 17(3): 121-34、参照により本明細書に組みこまれる)、インターフェロン刺激応答エレメント(ISRE)(Han, K. J. et al. J Biol Chem. 2004 Apr 9; 279(15): 15652-61、参照により本明細書に組み込まれる)、NF- κ B応答エレメント(Wang, V. et al. Cell Reports. 2012; 2(4): 824-839、参照により本明細書に組み込まれる)、及びSTAT3応答エレメント(Zhang, D. et al. J Biol Chem. 1996; 271: 9503-9509、参照により本明細書に組み込まれる)を含む。他の応答エレメントが、本明細書に包含される。応答エレメントはまた、その同族結合分子に対する応答エレメントの感受性を一般的に増加させるために、タンデムリピート(例えば、応答エレメントをコードする同じヌクレオチド配列の連続リピート)を含むことができる。タンデムリピートは、存在するリピートの数を表すために、2 $\times$ 、3 $\times$ 、4 $\times$ 、5 $\times$ などと標識することができる。

10

20

【0221】

応答性プロモーター(「誘導性プロモーター」とも称される)(例えば、TGF- β 応答性プロモーター)の非限定的な例が、表3に列挙され、これは、プロモーター及び転写因子の設計を示し、転写因子(TF)及び導入遺伝子転写(T)に向けた誘導因子分子の効果も示される(B:結合、D:解離、n.d.:未決定)(A:活性化、DA:非活性化、DR:抑制解除)(Horner, M. & Weber, W. FEBS Letters 586(2012) 20784-2096m、及びその中で引用されている参考文献を参照)。誘導性プロモーターの成分の非限定的な例は、表4に提示されるものを含む。

30

【0222】

(表3)

40

50

系	プロモーター及び オペレーター	転写因子(TF)	誘導因子 分子	誘導因子への 応答	
				TF	T
転写活性化因子応答性プロモーター					
AIR	PAIR(OalcA- PhCMVmin)	AlcR	アセトアル デヒド	n.d.	A
ART	PART(OARG- PhCMVmin)	ArgR-VP16	L-アルギニ ン	B	A
BIT	PBIT3(OBirA3- PhCMVmin)	BIT(BirA- VP16)	ビオチン	B	A
クメイト-活性 化因子	PCR5(OCuO6- PhCMVmin)	cTA(CymR- VP16)	クメイト	D	DA
クメイト-逆活 性化因子	PCR5(OCuO6- PhCMVmin)	rcTA(rCymR- VP16)	クメイト	B	A
E-OFF	PETR(OETR- PhCMVmin)	ET(E-VP16)	エリスロ マイシン	D	DA
NICE-OFF	PNIC(ONIC- PhCMVmin)	NT(HdnoR- VP16)	6-ヒドロ キシニコ チン	D	DA
PEACE	PTtgR1(OTtgR- PhCMVmin)	TtgA1(TtgR- VP16)	フロレチ ン	D	DA
PIP-OFF	PPIR(OPIR- Phsp70min)	PIT(PIP-VP16)	プリスチ ナマイシ ンI	D	DA
QuoRex	PSCA(OscbR- PhCMVmin)PSPA(OpapRI- PhCMVmin)	SCA(ScbR- VP16)	SCB1	D	DA
レドックス	PROP(OROP- PhCMVmin)	レドックス (REX-VP16)	NADH	D	DA
TET-OFF	PhCMV*- 1(OtetO7- PhCMVmin)	tTA(TetR- VP16)	テトラサ イクリン	D	DA
TET-ON	PhCMV*- 1(OtetO7- PhCMVmin)	rtTA(rTetR- VP16)	ドキシサ イクリン	B	A
TIGR	PCTA(OrheO- PhCMVmin)	CTA(RheA- VP16)	熱	D	DA
TraR	O7x(tra box)- PhCMVmin	p65-TraR	3-オキシ-C8- HSL	B	A
VAC-OFF	P1VanO2(OVanO2- PhCMVmin)	VanA1(VanR- VP16)	バニリン 酸	D	DA

10

20

30

40

50

系	プロモーター及びオペレーター	転写因子(TF)	誘導因子分子	誘導因子への応答	
転写抑制因子応答性プロモーター					
クメイト-抑制因子	PCuO(PCM5-OCuO)	CymR	クメイト	D	DR
E-ON	PETRON8(PSV40-OETR8)	E-KRAB	エリスロマイシン	D	DR
NICE-ON	PNIC(PSV40-ONIC8)	NS(HdnoR-KRAB)	6-ヒドロキシニコチン	D	DR
PIP-ON	PPIRON(PSV40-OPIR3)	PIT3(PIP-KRAB)	プリスチナマイシンI	D	DR
Q-ON	PSCAON8(PSV40-OscbR8)	SCS(ScbR-KRAB)	SCB1	D	DR
TET-ON<コンマ>抑制因子ベース	OtetO-PHPRT	tTS-H4(TetR-HDAC4)	ドキシサイクリン	D	DR
T-REX	PTetO(PhCMV-OtetO2)	TetR	テトラサイクリン	D	DR
UREX	PUREX8(PSV40-OhucO8)	mUTS(KRAB-HucR)	尿酸	D	DR
VAC-ON	PVanON8(PhCMV-OVanO8)	VanA4(VanR-KRAB)	バニリン酸	D	DR
ハイブリッドプロモーター					
QuoRexPIP-ON(NOT IFゲート)	OscbR8-OPIR3-PhCMVmin	SCAPIT3	SCB1 プリスチナマイシンI	DD	DADR
QuoRexE-ON(NOT IFゲート)	OscbR-OETR8-PhCMVmin	SCAE-KRAB	SCB1 エリスロマイシン	DD	DADR
TET-OFFE-ON(NOT IFゲート)	OtetO7-OETR8-PhCMVmin	tTAE-KRAB	テトラサイクリン エリスロマイシン	DD	DADR
TET-OFFPIP-ONE-ON	OtetO7-OPIR3-OETR8-PhCMVmin	tTAPIT3E-KRAB	テトラサイクリン プリスチナマイシン エリスロマイシン	DDD	DADR DR

10

20

30

40

【 0 2 2 3 】

(表 4)

50

名称	DNA 配列	供給源
最小プロモーター;minP	AGAGGGTATATAATGGAAGCTCGA CTTCCAG(配列番号 7)	EU581860.1 (Promega)
NFκB 応答エレメントタンパク質プロモーター;5x NFκB-RE	GGGAATTTCCGGGGACTTTCCGGG AATTTCCGGGGACTTTCCGGGAAT TTCC(配列番号 8)	EU581860.1 (Promega)
CREB 応答エレメントタンパク質プロモーター;4x CRE	CACCAGACAGTGACGTCAGCTGCC AGATCCCATGGCCGTCATACTGTG ACGTCTTTCAGACACCCCATTGAC GTCAATGGGAGAA(配列番号 9)	DQ904461.1 (Promega)
NFAT 応答エレメントタンパク質プロモーター;3x NFAT 結合部位	GGAGGAAAACTGTTTCATACAGA AGGCGTGGAGGAAAACTGTTTCA TACAGAAGGCGTGGAGGAAAACT GTTTCATACAGAAGGCGT(配列番号 10)	DQ904462.1 (Promega)
SRF 応答エレメントタンパク質プロモーター;5x SRE	AGGATGTCCATATTAGGACATCTA GGATGTCCATATTAGGACATCTAG GATGTCCATATTAGGACATCTAGG ATGTCCATATTAGGACATCTAGGA TGTCCATATTAGGACATCT(配列番号 11)	FJ773212.1 (Promega)
SRF 応答エレメントタンパク質プロモーター2;5x SRF-RE	AGTATGTCCATATTAGGACATCTA CCATGTCCATATTAGGACATCTACT ATGTCCATATTAGGACATCTTGTAT GTCCATATTAGGACATCTAAAATG TCCATATTAGGACATCT(配列番号 12)	FJ773213.1 (Promega)
AP1 応答エレメントタンパク質プロモーター;6x AP1-RE	TGAGTCAGTGACTCAGTGAGTCAG TGACTCAGTGAGTCAGTGACTCAG(配列番号 13)	JQ858516.1 (Promega)
TCF-LEF 応答エレメントタンパク質プロモーター;8x TCF-LEF-RE	AGATCAAAGGGTTTAAGATCAAAG GGCTTAAGATCAAAGGGTATAAGA TCAAAGGGCCTAAGATCAAAGGGA CTAAGATCAAAGGGTTTAAGATCA AAGGGCTTAAGATCAAAGGGCCTA (配列番号 14)	JX099537.1 (Promega)
SBE _{x4}	GTCTAGACGTCTAGACGTCTAGAC GTCTAGAC(配列番号 15)	Addgene カタログ番号:16495
SMAD2/3-CAGACA _{x4}	CAGACACAGACACAGACACAGAC A(配列番号 16)	Jonk <i>et al.</i> (J Biol Chem.1998 Aug 14;273(33):21145-52.
STAT3 結合部位	Ggatccggtactcgagatctgcgatctaagtaagcttgg cattccggtactgttgtaaagccac(配列番号 17)	Addgene 配列決定結果#211335

10

20

30

40

【0224】

プロモーターの他の非限定的な例としては、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、伸長因子1-アルファ (EF1a) プロモーター、伸長因子 (EFS) プロモーター、MNDプロモーター (骨髄増殖性肉腫ウイルスエンハンサーを伴う修飾MoMuLVLTRのU3領域を含む合成プロモーター)、ホスホグリセレートキナーゼ (PGK) プロモーター、脾臓フォーカス形成ウイルス (SFFV) プロモーター、シミアンウイルス40 (SV40) プロモーター、及びユビキチンC (UbC) プロモーターが挙げられる。

【0225】

50

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載される修飾 E R - L B D 又はキメラタンパク質をコードするポリヌクレオチド分子に動作可能に連結されたプロモーターを含む、異種構築物を提供する。

【0226】

いくつかの実施形態では、修飾 E R - L B D 又はキメラタンパク質をコードするポリヌクレオチド分子に動作可能に連結されたプロモーターは、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、又は合成プロモーターである。

【0227】

いくつかの実施形態では、修飾 E R - L B D 又はキメラタンパク質をコードするポリヌクレオチド分子に動作可能に連結されたプロモーターは、構成的プロモーターである。構成的プロモーターの例が、表 5 に示される。いくつかの実施形態では、構成的プロモーターは、CMV、EFS、SFFV、SV40、MND、PGK、UbC、hEF1aV1、hCAGG、hEF1aV2、hACTb、heIF4A1、hGAPDH、hGRP78、hGRP94、hHSP70、hKINb、及びhUBIbから選択される。

【0228】

(表 5)

名称	DNA配列
CMV	GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCA ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTA AATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCA ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGAC GTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATC AAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTA AATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTC TACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATG CGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGG GGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGC ACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCAT TGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCA GAGCTC(配列番号18)
EF1a	GGCTCCGGTGGCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCC GAGAAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAG GTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGCCGTGTACTGGCTCCGCCT TTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGT GAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGC CGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGC GTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCG AGCTTCGGGTGGAAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTTAAG GAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGG GCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTT CGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTT TTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTG GTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCC AGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGACCACCGAGA ATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGTC CTCGCGCCGCGGTGTATCGCCCCGCCCCGGGCGGCAAGGCTGGCCCGG TCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGTCCTGCT GCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGG TGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTGCG TTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTA GTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCTGCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTT TATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGGAGACTGAAGTTAGG CCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTGGAGTT TGGATCTTGGTTTATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTT CTCCATTTCAGGTGTCGTGA(配列番号19)

10

20

30

40

50

名称	DNA配列
EFS	GGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGC CCACAGTCCCCGAGAAAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGT GCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTA CTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGC AGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACA CAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGCCGCC CTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCTCC CGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTAAAG CTCAGGTCGAGACCGGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGAGGCCTACCTA GACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCCTGACCTGCTTGCTCAACTCTA CGTCTTTGTTTCGTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGAC CGGCGCCTAC(配列番号20)
MND	TTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCACCTGTAG GTTTGGCAAGCTAGGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGAATA TGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTTCTGCCCCGGCTCAGG GCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG TGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCC AGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCC AGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAAC CAATCAGTTTCGTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTC AATAAAAGAGCCCA(配列番号21)
PGK	GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTTTGCAGAGGG ACGCGGCTGCTCTGGGCGTGTTCCGGGAAACGCAGCGGCGCCGACCC TGGGTCTCGCACATTCTTCACGTCCGTTTCGACGCTCACCCGGATCTTC GCCGCTACCTTTGTGGGCCCCCGGCGACGCTTCTGCTCCGCCCTAA GTCGGGAAGGTTCCTTTCGCGTTTCGCGGCGTGCCCGACGTGACAAACGG AAGCCGCACGTCTCACTAGTACCCTCGCAGACGGACAGCGCCAGGGAG CAATGGCAGCGCGCCGACCGCGATGGGCTGTGGCCAATAGCGGCTGCT CAGCGGGGCGCGCCGAGAGCAGCGGCCGGAAGGGGCGGTGCGGGAG GCGGGGTGTGGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTTCTGCCCCGCGCGGTGT TCCGCATTCTGCAAGCCTCCGGAGCGCACGTTCGGCAGTCGGCTCCCTC GTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCCAG(配列番号22)
SFFV	GTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGA AAAAATACCAACCAAGAATAGA GAAGTTCAGATCAAGGGCGGGTACATGAAAATAGCTAACGTTGGGCCA AACAGGATATCTGCGGTGAGCAGTTTCGGCCCCGGCCCGGGGCCAAGA ACAGATGGTCACCGCAGTTTCGGCCCCGGCCGAGGCCAAGAACAGAT GGTCCCCAGATATGGCCCAACCCCTCAGCAGTTTCTTAAGACCCATCAG ATGTTTCCAGGCTCCCCCAAGGACCTGAAATGACCCCTGCGCCTTATTTG AATTAACCAATCAGCCTGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTTCC CGAGCTCTATAAAAGAGCTCACAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCCT CCGACAGACTGAGTCGCCCCGGG(配列番号23)
SV40	CTGTGGAATGTGTGTCAAGTATAGGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCA GCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGG TGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATG CATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACCCGCCCATCC CGCCCCTAACCTCCGCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACT AATTTTTTTTATTTATGCAAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTA TTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCCTAGGCTTTTGCAAA AAGCT(配列番号24)
UbC	GCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCTCCTCACGGCGAG CGCTGCCACGTACAGACGAAGGGCGCAGGAGCGTTCTGATCCTTCCGC CCGACGCTCAGGACAGCGGCCGCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAGA

10

20

30

40

50

名称	DNA配列
	ACCCCAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACTC TAGGGCACTGGTTTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTA GTCCCTTCTCGGCGATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGGGGCGGTGAACG CCGATGATTATATAAGGACGCGCCGGGTGTGGCACAGCTAGTTCCGTC GCAGCCGGGATTTGGGTGCGGTTCTTGTGTGGATCGCTGTGATCGT CACTTGGTGAGTTGCGGGCTGCTGGGCTGGCCGGGGCTTTCGTGGCCG CCGGGCCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTGTGGAGAGACCGCCAAGGGC TGAGTCTGGGTCCGCGAGCAAGGTTGCCCTGAACTGGGGGTGGGGG GAGCGCACAAAATGGCGGCTGTTCCCGAGTCTTGAATGGAAGACGCTT GTAAGGCGGGCTGTGAGGTCGTTGAAACAAGGTGGGGGGCATGGTGG GCGGCAAGAACCAAGGTCTTGAGGCCTTCGCTAATGCGGGAAAGCTC TTATTCGGGTGAGATGGGCTGGGGCACCATCTGGGGACCTGACGTGA AGTTTGTCACTGACTGGAGAACTCGGGTTTGTCTGTGGTTGCGGGGGC GGCAGTTATGCGGTGCCGTTGGGCAGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCG CGCGCCTCGTCTGTGCTGACGTCACCCGTTCTGTTGGCTTATAATGCA GGGTGGGGCCACCTGCCGGTAGGTGTGCGGTAGGCTTTTCTCCGTCGC AGGACGCAGGGTTCGGGCCTAGGGTAGGCTCTCCTGAATCGACAGGCG CCGGACCTCTGGTGAGGGGAGGGATAAGTGAGGCGTCAGTTTCTTTGG TCGGTTTTATGTACCTATCTTCTTAAGTAGCTGAAGCTCCGGTTTTGAA CTATGCGCTCGGGGTTGGCGAGTGTGTTTTGTGAAGTTTTTAGGCACC TTTTGAAATGTAATCATTTGGGTCAATATGTAATTTTCAGTGTTAGACT AGTAAAGCTTCTGCAGGTCGACTCTAGAAAATTGTCCGCTAAATTCTG GCCGTTTTTGCTTTTTTGTAGAC(配列番号25)
hEFlaV 1	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCC GAGAAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAG GTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCT TTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGT GAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGC CGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGC GTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCG AGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAG GAGCCCCCTTCGCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGG GCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTT CGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTT TTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTG GTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCC AGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGA ATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCGTGGT CTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCG TCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCT GCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGG TGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTCAGCCGTCGC TTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTA GTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCTCTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTT TATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGG CCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTTGAGTT TGGATCTTGGTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTT CTTCCATTTACAGGTGTCGTGA(配列番号26)
hCAGG	ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT ATATGGAGTTCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCT GACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTT CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGT

10

20

30

40

50

名称	DNA配列
	ATTTACGGTAAACTGCCCACCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC AAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCA TTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATC TACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCT GCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTA TTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGG GGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGG CGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGA AAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAG CGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCG TGCCCCGCTCCGCCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGCTCTGACTGAC CGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGG CTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGC GTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCG GCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGC GCTCCGCGCTGCCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGGCGCGGGGCG TTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTG CCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGG GGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCCGTCGG GCTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCAGTTGCTGAGCACGGCCC GGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGCGCGGGGGCTCGCCGT GCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCG CGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGG AGCGCCGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTA TGTAATCGTGCAGAGGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGT GCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTCTAGCGGGCGC GGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGG GCCTTCGTGCGTGCCTCGCCGCGCCCGCTCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCG GGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGG CGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTA ACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTG GTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTC(配列番号27)
hEF1aV 2	GGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGG GTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTG GGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCGGAGGGTGGGGG AGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAAC GGGTTTGCCGCCAGAACACAG(配列番号28)
hACTb	CCACTAGTTCCATGTCCTTATATGGACTCATCTTTGCCTATTGCGACAC ACACTCAATGAACACCTACTACGCGCTGCAAAGAGCCCCGAGGCCTG AGGTGCCCCACCTCACCCTCTTCCTATTTTGTGTAATAATCCAGCT TCTTGTACACCTCCAAGGAGGGGGAGGAGGAGGAAGGCAGGTTTCCT CTAGGCTGAGCCGAATGCCCTCTGTGGTCCCACGCCACTGATCGCTGC ATGCCCACCACCTGGGTACACACAGTCTGTGATTCCCGGAGCAGAACG GACCCTGCCCACCCGGTCTTGTGTGCTACTCAGTGGACAGACCCAAGG CAAGAAAGGGTGACAAGGACAGGGTCTTCCCAGGCTGGCTTTGAGTTC CTAGCACCGCCCCGCCCAATCCTCTGTGGCACATGGAGTCTTGGTCC CCAGAGTCCCCCAGCGGCCTCCAGATGGTCTGGGAGGGCAGTTCAGCT GTGGCTGCGCATAGCAGACATACAACGGACGGTGGGCCAGACCCAG GCTGTGTAGACCCAGCCCCCGCCCCGAGTGCCTAGGTCACCCACT AACGCCCCAGGCCTGGTCTTGGCTGGGCGTGACTGTTACCCCTCAAAAG CAGGCAGCTCCAGGGTAAAAGGTGCCCTGCCCTGTAGAGCCACCTTC CTTCCCAGGGCTGCGGCTGGGTAGGTTTGTAGCCTTCATCACGGGCCAC

10

20

30

40

50

名称	DNA配列
	CTCCAGCCACTGGACCGCTGGCCCCTGCCCTGTCCTGGGGAGTGTGGTC CTGCGACTTCTAAGTGGCCGCAAGCCACCTGACTCCCCAACACCACA CTCTACCTCTCAAGCCAGGTCTCTCCCTAGTGACCCACCCAGCACATT TAGCTAGCTGAGCCCCACAGCCAGAGGTCCTCAGGCCCTGCTTTCAGG GCAGTTGCTCTGAAGTCGGCAAGGGGGAGTGAAGTGCCTGGCCACTCCA TGCCCTCCAAGAGCTCCTTCTGCAGGAGCGTACAGAACCCAGGGCCCT GGCACCCGTGCAGACCCTGGCCCCACCCACCTGGGCGCTCAGTGCCCA AGAGATGTCCACACCTAGGATGTCCCGCGGTGGGTGGGGGGCCCCGAGA GACGGGCAGGCCGGGGGCAGGCCCTGGCCATGCGGGGGCCGAACCGGGC ACTGCCAGCGTGGGGCGCGGGGGCCACGGCGCGCGCCCCAGCCCCC GGGGCCAGCACCCCAAGGCGGCCAACGCCAAAACCTCTCCCTCCTCTC TTCCTCAATCTCGCTCTCGCTCTTTTTTTTTTTCGCAAAAGGAGGGGAG AGGGGGTAAAAAATGCTGCACTGTGCGGCGAAGCCGGTGAGTGAGC GGCGCGGGGCCAATCAGCGTGCGCCGTTCGAAAGTTGCCTTTTATGG CTCGAGCGGCCGCGGCGGCCCTATAAACCCAGCGGCGCGACGCGC CACCACCGCCGAGACCGCGTCCGCCCCGCGAGCACAGAGCCTCGCCTT TGCCGATCCGCGCCCGTCCACACCCGCGGCCAGGTAAGCCCGGCCAG CCGACCGGGGCAGGCGGCTCACGGCCCGGCCGAGGCGGCCGCGGCC CCTTCGCCCCGTGCAGAGCCGCCGTCTGGGCCGAGCGGGGGGCGCATG GGGGGGGAACCGGACCGCCGTGGGGGGCGCGGGAGAAGCCCCTGGGC CTCCGGAGATGGGGGACACCCACGCCAGTTCGGAGGCGCGAGGCCG CGCTCGGGAGGCGCGCTCCGGGGGTGCCGCTCTCGGGGCGGGGGCAAC CGGCGGGGTCTTTGTCTGAGCCGGGCTCTTGCCAATGGGGATCGCAGG GTGGGCGCGGCGAGCCCCGCCAGGCCCGGTGGGGGTGGGGCGCC ATTGCGCGTGCGCGTGGTCTTTGGGCGCTAACTGCGTGCGCGCTGG GAATTGGCGCTAATTGCGCGTGCGCGCTGGGACTCAAGGCGCTAACTG CGCGTGCGTTCTGGGGCCCGGGGTGCCGCGCCTGGGCTGGGGCGAAG GCGGGCTCGGCCGGAAGGGGTGGGGTCGCCGCGGCTCCCGGGCGCTTG CGCGCACTTCTGCCCAGCCGCTGGCCGCCCCGAGGGTGTGGCCGCTG CGTGCGCGCGCGCCGACCCGCGCGTGTGTTGAACCGGGCGGAGGCGGG CTGGCGCCCGGTGGGAGGGGGTGGGGCCCTGGCTTCCTGCCGCGCGC CGCGGGGACGCCTCCGACAGTGTGCTTTGCTTTATGGTAATAACGCGG CCGGCCCCGCTTCTTTGTCCCAATCTGGGCGCGCGCGCGCCCCCT GGCGGCCAAGGACTCGGCGCGCCGGAAGTGGCCAGGGCGGGGGCGA CCTCGGCTCACAGCGCGCCCGCTAT(配列番号29)
heIF4A1	GTTGATTTCTTCATCCCTGGCACACGTCCAGGCAGTGTGCAATCCATC TCTGCTACAGGGGAAAACAAATAACATTTGAGTCCAGTGGAGACCGGG AGCAGAAGTAAAGGGAAGTGATAACCCCCAGAGCCCGGAAGCCTCTG GAGGCTGAGACCTCGCCCCCTTGCGTGATAGGGCCTACGGAGCCACA TGACCAAGGCACTGTCGCCTCCGCACGTGTGAGAGTGCAGGGCCCCAA GATGGCTGCCAGGCCTCGAGGCCTGACTCTTCTATGTCATTCCGTACC GGCGAGAAAGGCGGGCCCTCCAGCCAATGAGGCTGCGGGGCGGGCCT TCACCTTGATAGGCACTCGAGTTATCCAATGGTGCCTGCGGGCCGGAG CGACTAGGAACTAACGTCATGCCGAGTTGCTGAGCGCCGGCAGGCGGG GCCGGGGCGGCCAAACCAATGCGATGGCCGGGGCGGAGTCGGGCGCT CTATAAGTTGTGATAGGCGGGCACTCCGCCCTAGTTTCTAAGGACCAT G(配列番号30)
hGAPDH	AGTTCCCCAACTTTCCCGCCTCTCAGCCTTTGAAAGAAAGAAAGGGGA GGGGGCAGGCCGCGTGCACTCGCGAGCGGTGCTGGGCTCCGGCTCCAA TTCCCCATCTCAGTCGCTCCCAAAGTCCTTCTGTTTCATCCAAGCGTGT AAGGGTCCCCGTCCTTGACTCCCTAGTGTCTGCTGCCCCACAGTCCAGT CCTGGGAACCAGCACCGATCACCTCCCATCGGGCCAATCTCAGTCCCTT

10

20

30

40

名称	DNA配列
	CCCCCTACGTCGGGGCCACACGCTCGGTGCGTGCCAGTTGAACCA GGCGGTGCGGAAAAAAAAAAGCGGGGAGAAAGTAGGGCCCGGTAC TAGCGGTTTTACGGGCGCACGTAGCTCAGGCCTCAAGACCTTGGGCTG GGACTGGCTGAGCCTGGCGGGAGGCGGGGTCCGAGTCACCGCCTGCCG CCGCGCCCCCGGTTTCTATAAATTGAGCCCGCAGCCTCCCGCTTCGCTC TCTGCTCCTCTGTTCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTTTGCCTCGCCAG GTGAAGACGGGCGGAGAGAAACCCGGGAGGCTAGGGACGGCCTGAAG GCGGCAGGGGCGGGCGCAGGCCGATGTGTTCGCGCCGCTGCGGGGT GGGCCCCGGGCGCCTCCGCATTGCAGGGGCGGGCGGAGGACGTGATG CGGCGCGGGCTGGGCATGGAGGCCTGGTGGGGGAGGGGAGGGGAGGC GTGGGTGTGCGCGGGGCCACTAGGCGCTCACTGTTCTCTCCCTCCGCG CAGCCGAGCCACATCGCTGAGACAC(配列番号31)
hGRP78	AGTGCAGTTACCAGCGAAATGCCTCGGGGTGAGAAGTCGAGGAGA GATAGACAGCTGCTGAACCAATGGGACCAGCGGATGGGGCGGATGTT ATCTACCATTGGTGAACGTTAGAAACGAATAGCAGCCAATGAATCAGC TGGGGGGGCGGAGCAGTGACGTTATTGCGGAGGGGGCCGCTTCGAAT CGGCGGCGGCCAGCTTGGTGGCCTGGGCCAATGAACGGCCTCCAACGA GCAGGGCCTTCACCAATCGGCGGCCTCCACGACGGGGCTGGGGGAGG GTATATAAGCCGAGTAGGCGACGGTGAGGTGACGCGCGCCAAGACA GCACAGACAGATTGACCTATTGGGGTGTTCGCGAGTGTGAGAGGGAA GCGCCGCGGCCTGTATTTCTAGACCTGCCCTTCGCTGTTCTGTGGCGC CTTGTGACCCCGGGCCCCCTGCCGCCTGCAAGTCGAAATTGCGCTGTG CTCCTGTGCTACGGCCTGTGGCTGGACTGCCTGCTGCTGCCCACTGGC TGGCAC(配列番号32)
hGRP94	TAGTTTCATCACCACCGCCACCCCCCGCCCCCGCCATCTGAAAGGG TTCTAGGGGATTTGCAACCTCTCTCGTGTGTTTCTTTCCGAGAAAGC GCCGCCACACGAGAAAGCTGGCCGCGAAAGTCGTGCTGGAATCACTTC CAACGAAACCCAGGCATAGATGGGAAAGGGTGAAGAACACGTTGCC ATGGCTACCGTTTCCCCGGTCACGGAATAAACGCTCTCTAGGATCCGG AAGTAGTTCCGCCGCGACCTCTCTAAAAGGATGGATGTGTTCTTGCTT ACATTCATTGGACGTTTCCCTTAGAGGCCAAGGCCGCCAGGCAAAG GGGCGGTCCCACGCGTGAGGGGGCCGCGGAGCCATTTGATTGGAGAAA AGCTGCAAACCTGACCAATCGGAAGGAGCCACGCTTCGGGCATCGGT CACCGCACCTGGACAGCTCCGATTGGTGGACTTCCGCCCCCCTCACG AATCCTCATTGGGTGCCGTGGGTGCGTGGTGCGGCGCGATTGGTGGGT TCATGTTTCCCGTCCCCCGCCGCGAGAAGTGGGGGTGAAAAGCGGCC CGACCTGCTTGGGGTGTAGTGGGCGGACCGCGCGGCTGGAGGTGTGAG GATCCGAACCCAGGGGTGGGGGTGGAGGCGGCTCCTGCGATCGAAG GGGACTTGAGACTACCGGCCGACGTC(配列番号33)
hHSP70	GGGCCGCCCCACTCCCCCTTCCTCTCAGGGTCCCTGTCCCCTCCAGTGAA TCCCAGAAGACTCTGGAGAGTTCTGAGCAGGGGGCGGCACTCTGGCCT CTGATTGGTCCAAGGAAGGCTGGGGGGCAGGACGGGAGGCGAAAACC CTGGAATATTCCCGACCTGGCAGCCTCATCGAGCTCGGTGATTGGCTCA GAAGGGAAAAGCGGGTCTCCGTGACGACTTATAAAAGCCCAGGGGC AAGCGGTCCGATAACGCTAGCCTGAGGAGCTGCTGCGACAGTCCAC TACCTTTTTCGAGAGTGACTCCCGTTGTCCAAGGCTTCCAGAGCGAA CCTGTGCGGCTGCAGGCACCGGCGCGTCGAGTTTCCGGCGTCCGGAAG GACCGAGCTCTTCTCGCGGATCCAGTGTTCCGTTTCCAGCCCCAATCT CAGAGCGGAGCCGACAGAGAGCAGGGAACCC(配列番号34)
hKINb	GCCCCACCCCGTCCGCGTTACAACCGGGAGGCCCGCTGGGTCCTGCA CCGTCACCCCTCCTCCCTGTGACCGCCACCTGATACCCAAACAATTTC TCGCCCCCTCCAGTCCCCAGCTCGCCGAGCGCTTGCGGGGAGCCACCCA

10

20

30

40

50

名称	DNA配列
	GCCTCAGTTTCCCCAGCCCCGGGCGGGGCGAGGGGCGATGACGTCATG CCGGCGCGCGGCATTGTGGGGCGGGGCGAGGCGGGGCGCCGGGGGGA GCAACACTGAGACGCCATTTTCGGCGGCGGGAGCGGCGCAGGCGGCC GAGCGGGACTGGCTGGGTTCGGCTGGGCTGCTGGTGCGAGGAGCCGCG GGGCTGTGCTCGGCGGCCAAGGGGACAGCGCGTGGGTGGCCGAGGAT GCTGCGGGGCGGTAGCTCCGGCGCCCCCTCGCTGGTGACTGCTGCGCCG TGCCTCACACAGCCGAGGCGGGCTCGGCGCACAGTCGCTGCTCCGCGC TCGCGCCCCGGCGGCGCTCCAGGTGCTGACAGCGCGAGAGAGCGCGGCC TCAGGAGCAACAC(配列番号35)
hUB1b	TTCCAGAGCTTTCGAGGAAGGTTTCTTCAACTCAAATTCATCCGCCTGA TAATTTTCTTATATTTTCCTAAAGAAGGAAGAGAAGCGCATAGAGGAG AAGGGAATAATTTTATAGGAGCCTTCTTACGGCTATGAGGAATTTGG GGCTCAGTTGAAAAGCCTAAACTGCCTCTCGGGAGGTTGGGCGCGGCG AACTACTTTCAGCGGCGCACGGAGACGGCGTCTACGTGAGGGGTGATA AGTGACGCAACACTCGTTGCATAAATTTGCGCTCCGCCAGCCCGGAGC ATTTAGGGGCGGTTGGCTTTGTTGGGTGAGCTTGTGTTGTGCCCTGTGG GTGGACGTGGTTGGTGATTGGCAGGATCCTGGTATCCGCTAACAGGTA CTGGCCACAGCCGTAAAGACCTGCGGGGGCGTGAGAGGGGGGAATG GGTGAGGTCAAGCTGGAGGCTTCTTGGGGTTGGGTGGGCCGCTGAGGG GAGGGGAGGGCGAGGTGACGCGACACCCGGCCTTTCTGGGAGAGTGG GCCTTGTTGACCTAAGGGGGGCGAGGGCAGTTGGCACGCGCACGCGCC GACAGAACTAACAGACATTAACCAACAGCGATTCCGTCGCGTTTACT TGGGAGGAAGGCGGAAAAGAGGTTAGTTTGTGTGGCTTCTGGAAACCT AAATTTGGAATCCCAGTATGAGAATGGTGTCCCTTCTTGTGTTTCAATG GGATTTTACTTCGCGAGTCTTGTGGGTTTGGTTTTGTTTTCAGTTTGCC TAACACCGTGCTTAGGTTTGAGGCAGATTGGAGTTCGGTCGGGGGAGT TTGAATATCCGGAACAGTTAGTGGGGAAAGCTGTGGACGCTTGTTAAG AGAGCGCTCTGGATTTCCGCTGTTGACGTTGAAACCTTGAATGACGA ATTCGTATTAAGTGACTTAGCCTTGTAATAATTGAGGGGAGGCTTGCG GAATATTAACGTATTTAAGGCATTTTGAAGGAATAGTTGCTAATTTTGA AGAATATTAGGTGTAAAAGCAAGAAATACAATGATCCTGAGGTGACAC GCTTATGTTTTACTTTTAACTAGGTCACC(配列番号36)

10

20

30

40

50

【0229】

標的発現カセットを更に含む発現系

いくつかの態様では、キメラタンパク質は、キメラ転写因子であり、本開示は、キメラ転写因子応答性（CTF応答性）プロモーターを含む標的発現カセットを更に提供する。

【0230】

「標的発現カセット」は、キメラ転写因子で制御可能な発現を有する遺伝子を含む発現カセットを指す。発現は、非内因性リガンド（例えば、4-OHT又はエンドキシフェン）の存在に基づいて、キメラ転写因子によって制御される。

【0231】

いくつかの態様では、本開示は、キメラ転写因子応答性プロモーター（CTF応答性プロモーター）に動作可能に連結された関心対象の遺伝子をコードするポリヌクレオチド分子を提供する。CTF応答性プロモーターは、修飾ER-LBDを含むキメラ転写因子に応答し、4-OHTなどの非内因性リガンドに応答して誘導性である、合成誘導性プロモーターである。

【0232】

いくつかの実施形態では、CTF応答性プロモーターは、コアプロモーター配列、及び本明細書に記載されるキメラ転写因子に結合する結合ドメインを含む。

【0233】

結合ドメインは、1つ以上のジンクフィンガー結合部位を含み得る。結合ドメインは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、又はそれ以上のジンクフィンガー結合部

位を含むことができる。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、1つのジンクフィンガー結合部位を含む。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、2つのジンクフィンガー結合部位を含む。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、3つのジンクフィンガー結合部位を含む。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、4つのジンクフィンガー結合部位を含む。ジンクフィンガー結合部位を含む例示的な結合ドメインは、配列：c g g g t t t c g t a a c a a t c g c a t g a g g a t t c g c a a c g c c t t c G G C G T A G C C G A T G T C G C G c t c c c g t c t c a g t a a a g g t c G G C G T A G C C G A T G T C G C G c a a t c g g a c t g c c t t c g t a c G G C G T A G C C G A T G T C G C G c g t a t c a g t c g c c t c g g a a c G G C G T A G C C G A T G T C G C G c a t t c g t a a g a g g c t c a c t c t c c c t t a c a c g g a g t g g a t a A C T A G T T C T A G A G G G T A T A T A A T G G G G G C C A (配列番号37)に示される。

10

【0234】

コアプロモーター配列は、最小プロモーターを含み得る。最小プロモーターの例としては、minP、minCMV、YB__TATA、及びminTKが挙げられる。

【0235】

いくつかの態様では、修飾ER-LBDを含むキメラタンパク質は、キメラ転写因子であり、異種構築物は、キメラ転写因子応答性プロモーターを含む標的発現カセットを更に含む。いくつかの態様では、修飾ER-LBDを含むキメラ転写因子をコードするポリヌクレオチド分子を含む発現カセットを含む第1の異種構築物、及びキメラ転写因子応答性(CTF応答性)プロモーターを含む標的発現カセットを含む第2の異種構築物が本明細書で提供される。

20

【0236】

いくつかの実施形態では、本開示の操作されたポリヌクレオチド又は構築物は、複数のポリペプチドを産生するように構成される。例えば、ポリヌクレオチドは、2つの異なるポリペプチドを産生するように構成され得る。ポリヌクレオチド分子は、本明細書に記載されるキメラタンパク質を含むポリペプチド、及びキメラタンパク質に応答するプロモーターの制御下で発現される関心対象のポリペプチドを産生するように構成され得る。

【0237】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるER-LBD又はキメラタンパク質、及びER-LBD又はキメラタンパク質によって転写的に調節され得る関心対象の遺伝子は、同じポリヌクレオチド分子又は異種構築物によってコードされ得る。

30

【0238】

いくつかの実施形態では、操作された核酸は、マルチシストロン性であり得、すなわち、1つより多くの別個のポリペプチド(例えば、複数の外因性ポリヌクレオチド)が、単一の転写産物から産生され得る。操作された核酸は、様々なリンカーの使用を通してマルチシストロン性であり得、例えば、第1の外因性ポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチド配列は、5'から3'の配向で第1の遺伝子：リンカー：第2の遺伝子など、第2の外因性ポリヌクレオチドをコードするヌクレオチド配列に連結され得る。リンカーポリヌクレオチド配列は、T2Aなどの1つ以上の2Aリボソームスキッピングエレメントをコードすることができる。他の2Aリボソームスキッピングエレメントは、E2A、P2A、及びF2Aを含むが、これらに限定されない。2Aリボソームスキッピングエレメントは、翻訳中に第1及び第2の遺伝子によってコードされる別個のポリペプチドの産生を可能にする。リンカーは、フーリン切断部位又はTEV切断部位などの切断可能なリンカーポリペプチド配列をコードすることができ、発現に続いて、切断可能なリンカーポリペプチドは、第1及び第2の遺伝子によってコードされる別個のポリペプチドが産生されるように切断される。切断可能なリンカーは、切断を更に促進する、可動性リンカー(例えば、Gly-Ser-Gly配列)などのポリペプチド配列を含むことができる。

40

【0239】

リンカーは、第1及び第2の遺伝子によってコードされる別個のポリペプチドが翻訳中

50

に產生されるように、配列内リボソーム進入部位（IRES）をコードすることができる。リンカーは、ウイルスプライスアクセプターなどのプライスアクセプターをコードすることができる。

【0240】

リンカーは、2Aリボソームスキッピング、続いて、2A残基の完全な除去を可能にするフーリン部位の更なる切断を通して、別個のポリペプチドを產生することができる、フーリン-2Aリンカーなどのリンカーの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、リンカーの組み合わせは、フーリン配列、可動性リンカー、及び2Aリンカーを含むことができる。したがって、いくつかの実施形態では、リンカーは、フーリン-Gly-Ser-Gly-2A融合ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、リンカーは、フーリン-Gly-Ser-Gly-T2A融合ポリペプチドである。

10

【0241】

一般に、マルチシストロン性システムは、任意の数又は組み合わせのリンカーを使用して、任意の数の遺伝子又はその部分を発現することができる（例えば、操作された核酸は、第1、第2、及び第3のポリペプチドによってコードされる別個のポリペプチドが產生されるように、各々がリンカーによって隔てられる、第1、第2、及び第3のポリペプチド分子をコードすることができる）。

【0242】

本明細書中で使用される場合の「リンカー」は、第1のポリペプチド配列及び第2のポリペプチド配列を連結するポリペプチド、又は上記に記載されるマルチシストロン性リンカーを指し得る。

20

【0243】

転写後調節エレメント

いくつかの実施形態では、本開示の操作された核酸は、転写後調節エレメント（PRE）を含む。PREは、三次RNA構造の安定性及び3'末端形成を可能にすることを介して遺伝子発現を強化することができる。PREの非限定的な例としては、B型肝炎ウイルスPRE（HPRE）及びウッドチャック肝炎ウイルスPRE（WPRE）が挙げられる。いくつかの実施形態では、転写後調節エレメントは、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）である。いくつかの実施形態では、WPREは、WPREエレメントのアルファ、ベータ、及びガンマ成分を含む。いくつかの実施形態では、WPREは、WPREエレメントのアルファ成分を含む。WPRE配列の例としては、配列番号38及び配列番号39が挙げられる。

30

【0244】

操作された細胞

また、本明細書では、本開示の1つ以上のポリヌクレオチド分子又は構築物を含む細胞、及び細胞を產生する方法も提供される。これらの細胞は、本明細書では「操作された細胞」と称される。典型的に1つ以上の操作された核酸を含む、これらの細胞は、自然界では発生しない。いくつかの実施形態では、細胞は、1つ以上の操作されたポリヌクレオチドを組換え的に発現する単離細胞である。いくつかの実施形態では、操作されたポリヌクレオチドは、1つ以上のベクター又は細胞のゲノム由来の選択された遺伝子座から発現される。いくつかの実施形態では、細胞は、ヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むポリヌクレオチドを含むように操作される。

40

【0245】

本開示の操作された細胞は、細胞のゲノム内に統合された操作されたポリヌクレオチドを含むことができる。操作された細胞は、例えば、プラスミド又はmRNAなどの一過性発現系で操作された、細胞のゲノムに組み込まれることなく発現が可能である、操作されたポリヌクレオチドを含むことができる。

【0246】

操作された細胞型

本開示の操作された細胞は、ヒト細胞であり得る。操作された細胞は、ヒト初代細胞で

50

あり得る。操作された初代細胞は、任意の体細胞であり得る。操作された初代細胞は、任意の幹細胞であり得る。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、対象由来である。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、対象に関して同種異系である。

【0247】

本開示の操作された細胞は、がんを有することが知られているか、又は疑われる対象などの対象から単離することができる。細胞単離方法は、当業者に公知であり、FACSソーティングなどの細胞表面マーカー発現に基づくソーティング技法、ポジティブ単離技法、及びネガティブ単離、磁気単離、並びにそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。操作された細胞は、治療が施されている対象に関して同種であり得る。同種修飾細胞は、治療が施されている対象にHLA適合させることができる。操作された細胞は、

10

【0248】

いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、T細胞（例えば、CD8+T細胞、CD4+T細胞、又はガンマデルタT細胞）、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、制御性T細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、B細胞、腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）、自然リンパ細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球、好中球、骨髄性細胞、マクロファージ（例えば、M1マクロファージ又はM2マクロファージ）、単球、樹状細胞、赤血球、血小板細胞、ニューロン、乏突起膠細胞、星状膠細胞、プラコード由来細胞、シュワン細胞、心筋細胞、内皮細胞、結節筋細胞、ミクログリア細胞、肝細胞、胆管細胞、ベータ細胞、ヒト胚性幹細胞（ESC）、ESC由来細胞、多能性幹細胞、間葉系間質細胞（MSC）、人工多能性幹細胞（iPSC）、及びiPSC由来細胞から選択される。

20

【0249】

いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、T細胞（例えば、CD8+T細胞、CD4+T細胞、又はガンマデルタT細胞）である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、制御性T細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、ナチュラルキラーT（NKT）細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、ナチュラルキラー細胞（NK）である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、B細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、自然リンパ細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、マスト細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、好酸球である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、好塩基球である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、好中球である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、骨髄性細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、マクロファージ、例えば、M1マクロファージ又はM2マクロファージである。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、単球である。いくつかの実施形態では、本開示の操作又は単離された細胞は、樹状細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、赤血球である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、血小板細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の細胞は、ニューロンである。いくつかの実施形態では、本開示の細胞は、乏突起膠細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の細胞は、星状膠細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の細胞は、プラコード由来細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、シュワン細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、心筋細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、内皮細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、結節細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、ミクログリア細胞である。いく

30

40

50

つかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、肝細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、胆管細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、ベータ細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、ヒト胚性幹細胞（ESC）である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、ESC由来細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、多能性幹細胞である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、間葉系間質細胞（MSC）である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、人工多能性幹細胞（iPSC）である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、iPSC由来細胞である。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、自家である。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、同種異系である。いくつかの実施形態では、本開示の操作された細胞は、CD34+細胞、CD3+細胞、CD8+細胞、CD16+細胞、及び／又はCD4+T細胞である。

10

【0250】

いくつかの実施形態では、本開示の細胞は、腺がん細胞、膀胱腫瘍細胞、脳腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、頸部腫瘍細胞、大腸腫瘍細胞、食道腫瘍細胞、神経膠腫細胞、腎臓腫瘍細胞、肝臓腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、メラノーマ細胞、中皮腫細胞、卵巣腫瘍細胞、膵臓腫瘍細胞、前立腺腫瘍細胞、皮膚腫瘍細胞、甲状腺腫瘍細胞、及び子宮腫瘍細胞から選択される腫瘍細胞である。

【0251】

また、本明細書では、本開示の操作された細胞を培養することを含む方法も提供される。本明細書に記載される、操作された細胞を培養する方法は、公知である。当業者は、培養条件が特定の関心の操作された細胞に依存することを認識するであろう。当業者は、培養条件が、操作された細胞の具体的な下流の使用、例えば、対象への操作された細胞の継続の投与のための具体的な培養条件に依存することを認識するであろう。

20

【0252】

細胞を操作する方法

また、本明細書に記載される任意のポリヌクレオチド分子又は構築物を有する細胞を操作するための組成物及び方法も本明細書で提供される。

【0253】

一般的に、細胞は、本開示の1つ以上のポリヌクレオチドの導入（すなわち、送達）を通して操作される。送達方法は、ウイルス媒介性送達、脂質媒介性トランスフェクション、ナノ粒子送達、エレクトロポレーション、超音波処理、及び物理的手段による細胞膜変形を含むが、これらに限定されない。当業者は、送達方法の選択が、操作される具体的な細胞型に依存し得ることを理解するであろう。

30

【0254】

ウイルス媒介性送達

ウイルスベクターベースの送達プラットフォームを使用して、細胞を操作することができる。一般的に、ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、宿主細胞中へ導入する（すなわち、送達する）ことを通して細胞を操作する。例えば、ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、本明細書に記載される操作された核酸のうちのいずれかを導入することを通して細胞を操作することができる。ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、核酸であり得、そのようなものとして、操作された核酸はまた、操作されたウイルス由来の核酸を包含し得る。そのような操作されたウイルス由来の核酸はまた、組換えウイルス又は操作されたウイルスとも称され得る。

40

【0255】

ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、同じ核酸内の1つより多くの操作された核酸、遺伝子、又は導入遺伝子をコードすることができる。例えば、操作されたウイルス由来の核酸、例えば、組換えウイルス又は操作されたウイルスは、本明細書に記載される操作された核酸のうちのいずれかを含むがこれらに限定されない、1つ以上の導入遺伝子をコードすることができる。1つ以上の導入遺伝子は、本明細書に記載されるポリ

50

ペプチド（例えば、修飾 E R - L B D）を発現するように構成され得る。ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、修飾 E R - L B D をコードする導入遺伝子に加えて、シス作用エレメント又は遺伝子と称される、ウイルス感染性及び／又はウイルス産生に必要とされるウイルス遺伝子（例えば、キャプシドタンパク質、エンベロープタンパク質、ウイルスポリメラーゼ、ウイルス転写酵素など）などの 1 つ以上の遺伝子をコードすることができる。

【0256】

ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、本明細書中に記載され、トランス作用エレメント又は遺伝子と称される、操作された核酸、遺伝子、又は導入遺伝子をコードする別個のウイルスベクターなどの 1 つより多くのウイルスベクターを含むことができる。例えば、ヘルパー依存性ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、修飾 E R - L B D をコードするベクターに加えて、1 つ以上の追加の別個のベクター上にウイルス感染性及び／又はウイルス産生に必要とされる追加の遺伝子を提供することができる。修飾 E R - L B D を産生するように構成される操作されたポリヌクレオチド、及び関心対象の遺伝子を産生するように構成される操作されたポリヌクレオチドを送達する 1 つのベクターなどの 1 つのウイルスベクターは、1 つより多くの操作されたポリヌクレオチドを送達することができる。修飾 E R - L B D を産生するように構成される操作されたポリヌクレオチドを送達する第 1 のベクター、及び追加の操作されたポリヌクレオチドを送達する第 2 のベクターなどの 1 つより多くのウイルスベクターは、1 つより多くの操作された核酸を送達することができる。使用されるウイルスベクターの数は、上述のウイルスベクターベースのワクチンプラットフォームのパッケージング容量に依存し得るが、当業者は、適切な数のウイルスベクターを選択することができる。

【0257】

一般的に、ウイルスベクターベースの系のうちのいずれかを、分子のインビトロ産生に使用するか、又は、例えば、インビトロ送達のために、インビボ及びエクシボ遺伝子治療手順に使用することができる。適切なウイルスベクターベースの系の選択は、カーゴ／ペイロードのサイズ、ウイルス系の免疫原性、関心対象の標的細胞、遺伝子発現の強度及びタイミング、並びに当業者によって認識される他の要因などの様々な要因に依存するであろう。

【0258】

ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、RNA ベースのウイルス又は DNA ベースのウイルスであり得る。例示的なウイルスベクターベースの送達プラットフォームには、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、麻疹ウイルス、インフルエンザウイルス、インディアナベシクロウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、粘液腫ウイルス、レオウイルス、ムンプスウイルス、マラバウイルス、狂犬病ウイルス、ロタウイルス、肝炎ウイルス、風疹ウイルス、デングウイルス、チクングニアウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、モルビリウイルス、レンチウイルス、複製レトロウイルス、ラブドウイルス、セネカバレーウイルス、シンドビスウイルス、及びそれらの任意のバリエーション又は誘導体が含まれるが、これらに限定されない。ワクシニア、鶏痘、自己複製アルファウイルス、マラバウイルス、アデノウイルス（例えば、Tatsis et al., *Adenoviruses, Molecular Therapy* (2004) 10, 616-629 を参照）、又はレンチウイルスなどであり、限定されないが、具体的な細胞型又は受容体を標的化するように設計された第 2、第 3、又はハイブリッド第 2／第 3 世代レンチウイルス及び任意の世代の組換えレンチウイルスを含む（例えば、Hu et al., *Immunization Delivered by Lentiviral Vectors for Cancer and Infectious Diseases, Immunol Rev.* (2011) 239 (1): 45-61、Sakuma et al., *Lentiviral vectors: basic to translational, Biochem J.* (2012) 443 (3): 603-18、Cooper et al., *Re*

scue of splicing-mediated intron loss maximizes expression in lentiviral vectors containing the human ubiquitin C promoter, Nucl. Acids Res. (2015) 43 (1) : 682-690、Zuferey et al., Self-Inactivating Lentiviral Vector for Safe and Efficient In vivo Gene Delivery, J. Virol. (1998) 72 (12) : 9873-9880を参照)、他の例示的なウイルスベクターベースの送達プラットフォームが、当技術分野で記載されている。

【0259】

この配列は、細胞内コンパートメントを標的化する1つ以上の配列で先行され得る。宿主細胞への導入（すなわち、送達）時に、感染細胞（すなわち、操作された細胞）は、修飾ER-LBD（又は修飾ER-LBDを含むキメラポリペプチド）を発現し、場合によっては分泌することができる。免疫化プロトコルにおいて有用なワクシニアベクター及び方法が、例えば、米国特許第4,722,848号に記載されている。別のベクターは、BCG (Bacille Calmette Guérin) である。BCGベクターは、Stover et al. (Nature 351: 456-460 (1991)) に記載されている。操作された核酸の導入（すなわち、送達）に有用な多種多様な他のベクター、例えば、Salmonella typhiベクター、及び同等物が、本明細書の説明から当業者に明らかとなるであろう。

【0260】

ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、本明細書では腫瘍溶解性ウイルスと称される、腫瘍細胞を標的化するウイルスであり得る。腫瘍溶解性ウイルスの例としては、腫瘍溶解性単純ヘルペスウイルス、腫瘍溶解性アデノウイルス、腫瘍溶解性麻疹ウイルス、腫瘍溶解性インフルエンザウイルス、腫瘍溶解性インディアナベシクロウイルス、腫瘍溶解性ニューカッスル病ウイルス、腫瘍溶解性ワクシニアウイルス、腫瘍溶解性ポリオウイルス、腫瘍溶解性粘液腫ウイルス、腫瘍溶解性レオウイルス、腫瘍溶解性ムンプスウイルス、腫瘍溶解性マラバウイルス、腫瘍溶解性狂犬病ウイルス、腫瘍溶解性ロタウイルス、腫瘍溶解性肝炎ウイルス、腫瘍溶解性風疹ウイルス、腫瘍溶解性デングウイルス、腫瘍溶解性チクングニアウイルス、腫瘍溶解性呼吸器合胞体ウイルス、腫瘍溶解性リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、腫瘍溶解性モルビリウイルス、腫瘍溶解性レンチウイルス、腫瘍溶解性複製レトロウイルス、腫瘍溶解性ラブドウイルス、腫瘍溶解性セネカバレーウイルス、腫瘍溶解性シンドビスウイルス、及びそれらの任意のバリエーション又は誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載される腫瘍溶解性ウイルスのうちのいずれかは、もう1つの導入遺伝子（例えば、本明細書に記載される操作された核酸）を含む組換え腫瘍溶解性ウイルスであり得る。導入遺伝子は、修飾ER-LBD（又は修飾ER-LBDを含むキメラポリペプチド）、及び任意選択的に関心対象の遺伝子を発現するように構成され得る。

【0261】

いくつかの実施形態では、ウイルスは、レンチウイルス、レトロウイルス、腫瘍溶解性ウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV)、及びウイルス様粒子 (VLP) から選択される。

【0262】

ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、レトロウイルスベースであり得る。一般的に、レトロウイルスベクターは、最大6~10 kbの外來配列についてのパッケージング能力を伴う、シス作用性の長い末端反復で構成されている。最小のシス作用LTRは、ベクターの複製及びパッケージングのために十分であり、これらは次いで、1つ以上の操作された核酸（例えば、修飾ER-LBDをコードする導入遺伝子）を標的細胞内に統合して、永続的な導入遺伝子の発現を提供するために使用される。レトロウイルスベースの送達系は、マウス白血病ウイルス (MuLV)、テナガザル白血病ウイルス (G

10

20

30

40

50

aLV)、サル免疫不全ウイルス(SIV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、及びそれらの組み合わせに基づく送達系を含むが、これらに限定されない(例えば、Buchsch et al., J. Virol. 66:2731-2739 (1992)、Johann et al., J. Virol. 66:1635-1640 (1992)、Sommnerfelt et al., Virol. 176:58-59 (1990)、Wilson et al., J. Virol. 63:2374-2378 (1989)、Miller et al., J. Virol. 65:2220-2224 (1991)、PCT/US94/05700を参照)。他のレトロウイルス系は、Phoenixレトロウイルス系を含む。

【0263】

ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、レンチウイルスベースであり得る。一般的に、レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に形質導入又は感染させ、典型的には、高いウイルス力価を生じることができる、レトロウイルスベクターである。レンチウイルスベースの送達プラットフォームは、ViraPower系(ThermoFisher)又はpLenti系(Cell Biolabs)などのHIVベースであり得る。レンチウイルスベースの送達プラットフォームは、SIV又はFIVベースであり得る。他の例示的なレンチウイルスベースの送達プラットフォームは、各々があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,311,907号、第7,262,049号、第7,250,299号、第7,226,780号、第7,220,578号、第7,211,247号、第7,160,721号、第7,078,031号、第7,070,993号、第7,056,699号、第6,955,919号により詳細に記載されている。

【0264】

ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、アデノウイルスベースであり得る。一般的に、アデノウイルスベースのベクターは、多くの細胞型において非常に高い形質導入効率が可能であり、細胞分裂を要求せず、高い力価及び発現のレベルを達成し、比較的単純な系において大量に産生することができる。アデノウイルスは、典型的には、宿主のゲノム内に統合しないため、一般的に、アデノウイルスを感染細胞内の導入遺伝子の一過性発現に使用することができる。アデノウイルスベースの送達プラットフォームは、各々があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、Li et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2543-2549, 1994、Borras et al., Gene Ther 6:515-524, 1999、Li and Davidson, PNAS 92:7700-7704, 1995、Sakamoto et al., H Gene Ther 5:1088-1097, 1999、WO94/12649、WO93/03769、WO93/19191、WO94/28938、WO95/11984及びWO95/00655により詳細に記載されている。他の例示的なアデノウイルスベースの送達プラットフォームは、各々があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,585,362号、第6,083,716号、第7,371,570号、第7,348,178号、第7,323,177号、第7,319,033号、第7,318,919号、及び第7,306,793号、並びに国際特許出願WO96/13597により詳細に記載されている。

【0265】

ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベースであり得る。アデノ随伴ウイルス(「AAV」)ベクターは、操作された核酸(例えば、本明細書に記載される操作された核酸のうちのいずれか)で細胞を形質導入するために使用され得る。AAV系は、修飾ER-LBD(又は修飾ER-LBDを含むキメラポリペプチド)のインビトロ生産に使用するか、又は例えば、修飾ER-LBDのインビボ送達のために、インビボ及びエクスビボ遺伝子療法手順に使用することができる(例えば、各々があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、West et al., Virology 160:38-47 (1987)、米国特許第4,797,3

68号、第5,436,146号、第6,632,670号、第6,642,051号、第7,078,387号、第7,314,912号、第6,498,244号、第7,906,111号、米国特許公開US2003-0138772、US2007/0036760、及びUS2009/0197338、Gao, et al., J. Virol., 78(12):6381-6388 (June 2004)、Gao, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 100(10):6081-6086 (May 13, 2003)、並びに国際特許出願WO2010/138263及びWO93/24641、Kotin, Human Gene Therapy 5:793-801 (1994)、Muzyczka, J. Clin. Invest. 94:1351 (1994)を参照)。組換えAAVベクターを構築するための例示的な方法が、各々があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,173,414号、Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 (1985)、Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081 (1984)、Hermonat & Muzyczka, PNAS 81:6466-6470 (1984)、及びSamuiski et al., J. Virol. 63:03822-3828 (1989)により詳細に記載されている。一般的に、AAV系ベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV.Rh10、AAV11及びそれらのバリエーションのうちのいずれか1つに対応するアミノ酸配列を有するキャプシドタンパク質を含む。

10

20

【0266】

ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、ウイルス様粒子(VLP)プラットフォームであり得る。一般的に、VLPは、ウイルス構造タンパク質を産生し、結果として得られたウイルス粒子を精製することによって構築される。次いで、精製後、カーゴ/ペイロード(例えば、本明細書に記載される操作された核酸のうちのいずれか)が、精製された粒子内にエキスポでカプセル化される。したがって、VLPの産生によって、ウイルス構造タンパク質をコードする核酸及びカーゴ/ペイロードをコードする核酸の分離が維持される。VLP産生に使用されるウイルス構造タンパク質は、哺乳動物、酵母、昆虫、細菌、又はインビボ翻訳発現系を含む、様々な発現系において産生することができる。精製されたウイルス粒子を、当業者に公知の方法を使用して、所望のカーゴの存在下で変性及び再形成して、VLPを産生することができる。VLPの産生は、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、Seow et al. (Mol Ther. 2009 May; 17(5):767-777)により詳細に記載されている。

30

【0267】

ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、ある範囲の細胞を標的化する(すなわち、感染させる)か、狭いサブセットの細胞を標的化するか、又は具体的な細胞を標的化するように操作することができる。一般的に、ウイルスベクターベースの送達プラットフォームのために選択されたエンベロップタンパク質により、ウイルスの向性が決定されるであろう。ウイルスベクターベースの送達プラットフォームに使用されるウイルスは、具体的な関心対象の細胞を標的化するようにシュードタイプ化することができる。ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、汎親和性であり、ある範囲の細胞に感染することができる。例えば、汎親和性ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、VSV-Gエンベロップを含むことができる。ウイルスベクターベースの送達プラットフォームは、兩種指向性であり、哺乳動物細胞に感染することができる。したがって、当業者は、所望の細胞型を標的化するための適切な向性、シュードタイプ、及び/又はエンベロップタンパク質を選択することができる。

40

【0268】

脂質構造体送達系

本開示の操作された核酸(例えば、本明細書に記載される修飾ER-LBD又はキメラタンパク質をコードする核酸)は、脂質媒介性送達系を使用して細胞に導入することがで

50

きる。一般的に、脂質媒介性送達系は、内部コンパートメントを包む外部脂質膜で構成される構造を使用する。脂質ベースの構造体の例としては、脂質ベースのナノ粒子、リポソーム、ミセル、エキソソーム、小胞、細胞外小胞、細胞、又は組織が挙げられるが、これらに限定されない。脂質構造体送達系は、インビトロ、インビボ、又はエクスピボで、カーゴ／ペイロード（例えば、本明細書に記載される操作された核酸のうちのいずれか）を送達することができる。

【0269】

脂質ベースのナノ粒子は、単層リポソーム、多層リポソーム、及び脂質調製物を含むことができるが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、「リポソーム」は、所望のカーゴ、例えば、本明細書に記載される操作された核酸のうちのいずれかなどの操作された核酸を、脂質シェル又は脂質凝集体内に封入することによって形成される、脂質媒体のインビトロ調製物を包含する一般名である。リポソームは、一般的にリン脂質を含む二分子膜を伴う小胞構造、及び一般的に水性組成物を含む内部媒質を有するものとして特徴付けられ得る。リポソームは、エマルション、発泡体、ミセル、不溶性単層、液晶、リン脂質分散液、層状層、及び同等物を含むが、これらに限定されない。リポソームは、単層リポソームであり得る。リポソームは、多層リポソームであり得る。リポソームは、多胞性リポソームであり得る。リポソームは、正に荷電、負に荷電、又は中性に荷電し得る。ある特定の実施形態では、リポソームは、中性に荷電している。リポソームは、一般的に、中性及び負に荷電したリン脂質、並びにコレステロールなどのステロールを含む、標準的な小胞形成脂質から形成することができる。脂質の選択は、一般的に、所望の目的の考慮、例えば、リポソームのサイズ、酸の不安定性、及び血流中のリポソームの安定性などのインビボ送達についての基準により導かれる。多様な方法が、リポソームを調製するために利用可能であり、例えば、各々があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、Szokan et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9; 467 (1980)、米国特許第4,235,871号、第4,501,728号、第4,501,728号、第4,837,028号、及び第5,019,369号に記載されているとおりである。

【0270】

多重層リポソームは、複数の脂質層が水性媒質により分離されるように、リン脂質を含む脂質が過剰の水溶液中に懸濁された場合に自発的に生成される。水及び溶解された溶質は、脂質成分の自己再構成後に、脂質二重層の間の閉じた構造中に封入される。所望のカーゴ（例えば、ポリペプチド、核酸、小分子薬、本明細書に記載される操作された核酸のうちのいずれかなどの操作された核酸、ウイルスベクター、ウイルスベースの送達系など）は、それを標的実体に送達することができるように、リポソームの水性内部中にカプセル化するか、リポソーム及びポリペプチド／核酸の両方に会合する連結分子を介してリポソームに付着させるか、リポソームの脂質二重層内に散在させるか、リポソーム中に封入するか、リポソームと複合体を形成させるか、又は別様にリポソームと会合させることができる。親油性分子又は親油性領域を伴う分子がまた、脂質二重層中に溶解するか、又はそれと会合し得る。

【0271】

本実施形態に従って使用されるリポソームは、当業者に公知となるように、異なる方法によって作製することができる。リポソームの調製は、各々があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、WO2016/201323、国際出願PCT/US85/01161及びPCT/US89/05040、並びに米国特許4,728,578、4,728,575、4,737,323、4,533,254、4,162,282、4,310,505、及び4,921,706に更に詳細に記載されている。

【0272】

リポソームは、カチオン性リポソームであり得る。カチオン性リポソームの例は、各々があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,962,016号、第5,030,453号、第6,680,068号、米国出願2004/020

8921、並びに国際特許出願WO03/015757A1、WO04029213A2、及びWO02/100435A1に更に詳細に記載されている。

【0273】

脂質媒介性遺伝子送達方法は、例えば、各々があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、WO96/18372、WO93/24640、Mannino & Gould-Fogerite, BioTechniques 6(7):682-691 (1988)、米国特許第5,279,833号Rose、米国特許第5,279,833号、WO91/06309、及びFelgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7414 (1987)に記載されている。

【0274】

エキソソームは、多小胞体と原形質膜との融合後に細胞外環境中に放出される、エンドサイトーシス起源の小さな膜小胞である。エキソソームのサイズは、直径30~100nmの範囲である。それらの表面は、ドナー細胞の細胞膜からの脂質二重層からなり、それらは、エキソソームを産生した細胞からのサイトゾルを含み、表面上に親細胞からの膜タンパク質を示す。核酸の送達のために有用なエキソソームは、当業者に公知であり、例えば、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第9,889,210号により詳細に記載されているエキソソームである。

【0275】

本明細書で使用される場合、用語「細胞外小胞」又は「EV」は、内部空間を封入する膜を含む細胞由来の小胞を指す。一般的に、細胞外小胞は、それらが由来する細胞よりも小さな直径を有する全ての膜結合小胞を含む。一般的に、細胞外小胞は、直径20nm~1000nmの範囲であり、細胞外小胞の外面上に呈される内部空間内で、及び／又は膜にわたっていずれかで、様々な高分子カーゴを含み得る。カーゴは、核酸（例えば、本明細書に記載される操作された核酸のうちのいずれか）、タンパク質、炭水化物、脂質、小分子、及び／又はそれらの組み合わせを含むことができる。一例として、限定されないが、細胞外小胞は、アポトーシス小体、細胞の断片、直接又は間接操作による（例えば、連続的な押し出し又はアルカリ溶液での処理による）細胞から由来する小胞、小胞化オルガネラ、及び生細胞により（例えば、直接的な原形質膜の出芽又は後期エンドソームと原形質膜との融合により）産生される小胞を含む。細胞外小胞は、生存生物若しくは死滅生物、外植された組織若しくは器官、及び／又は培養細胞に由来し得る。

【0276】

本明細書中で使用される場合、「エキソソーム」という用語は、内部空間を取り囲む膜を含み、直接的な原形質膜の出芽又は後期エンドソームと原形質膜との融合により細胞から生成される、細胞由来の小さな（直径20~300nm、より好ましくは直径40~200nmの）小胞を指す。エキソソームは、脂質又は脂肪酸及びポリペプチドを含み、任意選択的に、ペイロード（例えば、治療剤）、レシーバ（例えば、標的化部分）、ポリヌクレオチド（例えば、本明細書に記載される操作された核酸のうちのいずれかなどの核酸、RNA、又はDNA）、糖（例えば、単糖、多糖、又はグリカン）、又は他の分子を含む。エキソソームは、産生細胞に由来し、そのサイズ、密度、生化学的パラメーター、又はそれらの組み合わせに基づいて産生細胞から単離することができる。エキソソームは、細胞外小胞の一種である。一般的に、エキソソーム産生／生合成は、産生細胞の破壊をもたらさない。エキソソーム及びエキソソームの調製は、その全体で参照により本明細書により組み込まれる、WO2016/201323に更に詳細に記載されている。

【0277】

本明細書で使用される場合、「ナノ小胞」（「マイクロ小胞」とも称される）という用語は、内部空間を取り囲む膜を含み、当該ナノ小胞が直接又は間接操作がないと産生細胞によって産生されないように、当該操作によって当該細胞から生成される、細胞由来の小さな（直径20~250nm、より好ましくは直径30~150nmの間の）小胞を指す。一般的に、ナノ小胞は、細胞外小胞の亜種である。産生細胞の適切な操作は、連続押し出し、アルカリ性溶液での処理、超音波処理、又はそれらの組み合わせを含むが、これらに

10

20

30

40

50

限定されない。ナノ小胞の産生は、いくつかの事例では、当該産生細胞の破壊をもたらし得る。好ましくは、ナノ小胞の集団は、原形質膜からの直接出芽又は後期エンドソームと原形質膜との融合により産生細胞から由来する小胞を実質的に含まない。ナノ小胞は、脂質又は脂肪酸及びポリペプチドを含み、任意選択的に、ペイロード（例えば、治療剤）、レシーバ（例えば、標的化部分）、ポリヌクレオチド（例えば、本明細書に記載される操作された核酸のうちのいずれかなどの核酸、RNA、又はDNA）、糖（例えば、単糖、多糖、又はグリカン）、又は他の分子を含む。ナノ小胞は、一度、それが当該操作に従って産生細胞から誘導されると、そのサイズ、密度、生化学的パラメーター、又はそれらの組み合わせに基づいて産生細胞から単離され得る。

【0278】

脂質ナノ粒子（LNP）は、一般的に、脂質の両親媒性の性質に依拠して膜及び小胞様の構造を形成する合成脂質構造である（Riley 2017）。一般的に、これらの小胞は、標的細胞の膜中に吸収し、カーゴをサイトゾル中に放出することにより、本明細書に記載される操作された核酸又はウイルス系のうちのいずれかなどのカーゴ／ペイロードを送達する。LNP形成に使用される脂質は、カチオン性、アニオン性、又は中性であり得る。脂質は、合成又は天然由来であり、いくつかの事例では、生分解性であり得る。脂質は、脂肪、コレステロール、リン脂質、限定されないが、ポリエチレングリコール（PEG）コンジュゲート（PEG化脂質）を含む脂質コンジュゲート、ワックス、油、グリセリド、及び脂溶性ビタミンを含むことができる。脂質組成物は、一般的に、カチオン性、中性、アニオン性、及び両親媒性脂質などの定義された材料の混合物を含む。いくつかの事例では、具体的な脂質が、LNP凝集を防止する、脂質酸化を防止する、又は追加部分の付着を促進する機能的な化学基を提供するために含まれる。脂質組成は、全体的なLNPサイズ及び安定性に影響を及ぼし得る。一例では、脂質組成物は、ジリノレイルメチル-4-ジメチルアミノブチレート（MC3）又はMC3様分子を含む。MC3及びMC3様脂質組成物は、PEG若しくはPEGコンジュゲート脂質、ステロール、又は中性脂質などの1つ以上の他の脂質を含むように製剤化することができる。加えて、LNPを更に操作又は機能化して、具体的な細胞型の標的化を促進することができる。LNP設計における別の考慮事項は、標的化効率と細胞傷害性との間のバランスである。

【0279】

ミセルは、一般的に、単鎖脂質を使用して形成される球状の合成脂質構造であり、ここで、単鎖脂質の親水性の頭部が外層又は膜を形成し、単鎖脂質の疎水性の尾部がミセル中心を形成する。ミセルは、典型的には、脂質単層のみを含む脂質構造を指す。ミセルは、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、Quader et al. (Mol Ther. 2017 Jul 5; 25(7): 1501-1513) により詳細に記載されている。

【0280】

血清に直接曝露された発現ベクターなどの核酸ベクターは、血清ヌクレアーゼによる核酸の分解又は遊離核酸による免疫系の標的外刺激を含む、いくつかの望ましくない結果を有し得る。同様に、血清に直接曝露されたウイルス送達系は、望ましくない免疫応答及び／又はウイルス送達系の中和を誘発し得る。したがって、操作された核酸及び／又はウイルス送達系のカプセル化を使用して、分解を回避する一方で、潜在的な標的外影響を回避することもできる。ある特定の例では、操作された核酸及び／又はウイルス送達系は、LNPの水性内部内などの送達媒体内に完全にカプセル化される。LNP内での操作された核酸及び／又はウイルス送達系のカプセル化は、マイクロ流体混合及びマイクロ流体液滴生成デバイス上で実行される液滴生成などの当業者に周知の技法によって実行することができる。そのようなデバイスは、標準的なTジャンクションデバイス又はフローフォーカシングデバイスを含むが、これらに限定されない。一例では、MC3又はMC3様含有組成物などの所望の脂質製剤は、送達ベクター及び所望の薬剤がMC3又はMC3様ベースのLNPの内部内に完全にカプセル化されるように、操作された核酸又はウイルス送達系及び任意の他の所望の薬剤と並行して液滴生成デバイスに提供される。一例では、液滴生

10

20

30

40

50

成デバイスは、産生される L N P のサイズ範囲及びサイズ分布を制御することができる。例えば、L N P は、直径 1 ～ 1 0 0 0 ナノメートルの範囲のサイズ、例えば、1、1 0、5 0、1 0 0、5 0 0、又は 1 0 0 0 ナノメートルのサイズを有し得る。液滴生成に続いて、カーゴ／ペイロードをカプセル化する送達媒体（例えば、操作された核酸及び／又はウイルス送達系）を更に処理又は操作して、投与用にそれらを調製することができる。

【0281】

ナノ粒子送達

ナノ材料を使用して、操作された核酸（例えば、本明細書に記載される修飾 E R - L B D 又はキメラタンパク質をコードする核酸）を送達することができる。ナノ材料媒体は、重要なこととして、非免疫原性材料から作製され、一般的に、その送達ベクター自体に対する免疫を誘発することを回避することができる。これらの材料は、脂質（以前に記載されたとおり）、無機ナノ材料、及び他の高分子材料を含むが、これらに限定されない。ナノ材料粒子は、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、R i l e y e t a l . (R e c e n t A d v a n c e s i n N a n o m a t e r i a l s f o r G e n e D e l i v e r y - A R e v i e w . N a n o m a t e r i a l s 2 0 1 7 , 7 (5) , 9 4) により詳細に記載されている。

【0282】

ゲノム編集系

ゲノム編集系を使用して、本開示の修飾 E R - L B D をコードする核酸などの操作された核酸をコードするように宿主ゲノムを操作することができる。一般的に、「ゲノム編集系」は、外因性遺伝子を宿主細胞のゲノム中に組み込むための任意の系を指す。ゲノム編集系は、トランスポゾン系、ヌクレアーゼゲノム編集系、及びウイルスベクターベースの送達プラットフォームを含むが、これらに限定されない。

【0283】

トランスポゾン系を使用して、本開示の操作された核酸などの操作された核酸を宿主ゲノム内に統合することができる。トランスポゾンは、一般的に、カーゴ／ペイロード核酸及びトランスポザーゼに隣接する末端逆位反復（T I R）を含む。トランスポゾン系は、T I R 隣接カーゴを伴って、シスにおいて又はトランスにおいてトランスポゾンを提供することができる。トランスポゾン系は、レトロトランスポゾン系又は D N A トランスポゾン系であり得る。一般的に、トランスポゾン系は、カーゴ／ペイロード（例えば、操作された核酸）をランダムに宿主ゲノム内に統合する。トランスポゾン系の例は、S l e e p i n g B e a u t y トランスポゾン系などの T c 1 / m a r i n e r トランスポゾンスーパーファミリーのトランスポゾンを使用する系を含み、各々があらゆる目的のために参照により本明細書中に組み込まれる、H u d e c e k e t a l . (C r i t R e v B i o c h e m M o l B i o l . 2 0 1 7 A u g ; 5 2 (4) : 3 5 5 - 3 8 0) 、並びに米国特許第 6 , 4 8 9 , 4 5 8 号、第 6 , 6 1 3 , 7 5 2 号、及び第 7 , 9 8 5 , 7 3 9 号により詳細に記載されている。トランスポゾン系の別の例は、各々があらゆる目的のために参照により本明細書中に組み込まれる、米国特許第 6 , 2 1 8 , 1 8 5 号及び第 6 , 9 6 2 , 8 1 0 号により更に詳細に記載される P i g g y B a c トランスポゾン系を含む。

【0284】

ヌクレアーゼゲノム編集系を使用して、本開示の単離ポリヌクレオチド又は異種構築物などの操作された核酸をコードするように宿主ゲノムを操作することができる。理論に束縛されることを望まないが、一般的に、外因性遺伝子を導入するために使用されるヌクレアーゼ媒介性遺伝子編集系は、細胞の天然 D N A 修復機構、特に、相同組換え（H R）修復経路を利用する。簡単には、ゲノム D N A への損傷（典型的には二本鎖切断）に続いて、細胞は、損傷を修復するための D N A 合成中に、その 5 ' 末端及び 3 ' 末端の両方に同一又は実質的に同一の配列を有する別の D N A 供給源をテンプレートとして使用することによって、損傷を解消することができる。天然の状況では、H D R は、細胞中に存在する他の染色体をテンプレートとして使用することができる。遺伝子編集系では、外因性ポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチドが細胞中に導入され、相同組換えテンプレート（HRT又はHRテンプレート）として使用される。一般的に、HRT（例えば、遺伝子又は遺伝子の一部）内の5'及び3'相補的末端の間に含まれる損傷を伴う、染色体に本来は見出されない任意の追加の外因性配列を、テンプレート化されたHDR中に所与のゲノム遺伝子座中に組み込む（すなわち、「統合する」）ことができる。したがって、所与のゲノム遺伝子座の典型的なHRテンプレートは、内因性ゲノム標的遺伝子座の第1の領域と同一のヌクレオチド配列、内因性ゲノム標的遺伝子座の第2の領域と同一のヌクレオチド配列、及びカーゴ／ペイロード核酸（例えば、本明細書に記載される操作された核酸のうちのいずれかなどの本明細書に記載される操作された核酸のうちのいずれか）をコードするヌクレオチド配列を有する。

10

【0285】

いくつかの例では、HRテンプレートは、直線状であり得る。直線状HRテンプレートの例は、直線化したプラスミドベクター、ssDNA、合成DNA、及びPCR増幅DNAを含むが、これらに限定されない。特定の例では、HRテンプレートは、プラスミドなどの環状であり得る。環状テンプレートは、スーパーコイル状のテンプレートを含むことができる。

【0286】

HRテンプレートの5'及び3'末端で見出される同一又は実質的に同一の配列は、導入される外因性配列に関して、一般的にアーム（HRアーム）と称される。HRアームは、内因性ゲノム標的遺伝子座の領域と同一（すなわち、100%同一）であり得る。HRアームは、一部の例では、内因性ゲノム標的遺伝子座の領域と実質的に同一であり得る。実質的に同一のHRアームを使用することができる一方で、HDR経路の効率が、100%未満の同一性を有するHRアームによる影響を受け得るため、HRアームが同一であることが有利であり得る。

20

【0287】

各HRアーム、すなわち、5'及び3'HRアームは、同じサイズ又は異なるサイズであり得る。各HRアームは、各々、50、100、200、300、400、若しくは500個の塩基を超えるか、又はそれと等しい長さであり得る。HRアームは、一般的に、任意の長さであり得るが、全体的な編集効率に対するHRアームの長さ及び全体的なテンプレートサイズの影響などの実際的な考慮事項も考慮に入れることができる。HRアームは、切断部位に直に隣接する内因性ゲノム標的遺伝子座の領域と同一、又は実質的に同一であり得る。各HRアームは、切断部位に直接隣接する内因性ゲノム標的遺伝子座の領域と同一、又は実質的に同一であり得る。各HRアームは、互いに1塩基対、10塩基対未満若しくはそれと等しい、50塩基対未満若しくはそれと等しい、又は100塩基対未満若しくはそれと等しい距離などの切断部位からある特定の距離内にある内因性ゲノム標的遺伝子座の領域と同一、又は実質的に同一であり得る。

30

【0288】

ヌクレアーゼゲノム編集系は、様々なヌクレアーゼを使用して、クラスター化した規則的な配置の短い回文配列リピート（CRISPR）ファミリーヌクレアーゼ又はその誘導体、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）又はその誘導体、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）又はその誘導体、及びホーミングエンドヌクレアーゼ（HE）又はその誘導体を含むがこれらに限定されない、標的ゲノム遺伝子座を切断することができる。

40

【0289】

CRISPR媒介性遺伝子編集系を使用して、本明細書に記載される操作された核酸などの操作された核酸をコードするように宿主ゲノムを操作することができる。CRISPR系は、それが教示する全てについて参照により本明細書中に組み込まれる、M. Adli（“The CRISPR tool kit for genome editing and beyond” Nature Communications; volume 9（2018）, Article number: 1911）により詳細に記載されてい

50

る。一般的に、C R I S P R 媒介性遺伝子編集系は、C R I S P R 関連 (C a s) ヌクレアーゼ及び特定の標的配列に切断を方向付けるRNAを含む。例示的なC R I S P R 媒介性遺伝子編集系は、C a s 9 ヌクレアーゼ、並びにC R I S P R RNA (c r RNA) ドメイン及びトランス活性化C R I S P R (t r a c r RNA) ドメインを有するRNAで構成されるC R I S P R / C a s 9 系である。c r RNAは、典型的には、2つのRNAドメイン：塩基対ハイブリダイゼーションを通して標的配列（「定義されたヌクレオチド配列」）、例えば、ゲノム配列に特異性を方向付けるガイドRNA配列 (g RNA)、及びt r a c r RNAにハイブリダイズするRNAドメインを有する。t r a c r RNAは、ヌクレアーゼ（例えば、C a s 9）と相互作用し、それにより、ゲノム遺伝子座への動員を促進することができる。c r RNA及びt r a c r RNAポリヌクレオチドは、別個のポリヌクレオチドであり得る。c r RNA及びt r a c r RNAポリヌクレオチドは、単一のガイドRNA (s g RNA) とも称される、単一のポリヌクレオチドであり得る。C a s 9 系が本明細書で例証されているが、C p f 1 系などの他のC R I S P R 系を使用することができる。ヌクレアーゼは、C a s 9 機能性変異体などのその誘導体、例えば、C a s 9 酵素によって典型的に産生される完全な二本鎖切断とは対照的に、一般的に、定義されたヌクレオチド配列の一本鎖のみの切断を媒介する、C a s 9 「ニッカーゼ」変異体を含むことができる。

10

【0290】

一般的に、C R I S P R 系の成分は、互いに相互作用してリボ核タンパク質 (R N P) 複合体を形成し、配列特異的な切断を媒介する。いくつかのC R I S P R 系では、各成分を別々に産生し、使用して、R N P 複合体を形成することができる。いくつかのC R I S P R 系では、各成分をインビトロで別々に産生し、インビトロで互いに接触させて（すなわち、「複合体化して」）R N P 複合体を形成することができる。次いで、インビトロで産生されたR N P を、細胞のサイトゾル及び／又は核、例えば、T細胞のサイトゾル及び／又は核中に導入する（すなわち、「送達する」）ことができる。インビトロで産生されたR N P 複合体を、エレクトロポレーション、脂質媒介性トランスフェクション、物理的手段による細胞膜変形、脂質ナノ粒子 (L N P)、ウイルス様粒子 (V L P)、及び超音波処理を含むがこれらに限定されない、様々な手段によって細胞に送達することができる。特定の例では、インビトロで産生されたR N P 複合体を、N u c l e o f a c t o r / N u c l e o f e c t i o n (登録商標) エレクトロポレーションベースの送達系 (L o n z a (登録商標)) を使用して細胞に送達することができる。他のエレクトロポレーション系は、M a x C y t e エレクトロポレーション系、M i l t e n y i C l i n i M A C S エレクトロポレーション系、N e o n エレクトロポレーション系、及びB T X エレクトロポレーション系を含むが、これらに限定されない。C R I S P R ヌクレアーゼ、例えば、C a s 9 は、当技術分野で公知の様々なタンパク質産生技法を使用して、インビトロで産生（すなわち、合成及び精製）することができる。C R I S P R 系RNA、例えば、s g RNAは、インビトロ転写又は化学合成などの当業者に公知の様々なRNA産生技法を使用して、インビトロで産生（すなわち、合成及び精製）することができる。

20

30

【0291】

インビトロで産生されたR N P 複合体は、ヌクレアーゼ対g RNAの異なる比率で複合体化することができる。インビトロで産生されたR N P 複合体はまた、C R I S P R 媒介性編集系において異なる量で使用する可以使用。例えば、編集されることが所望される細胞の数に応じて、反応において多数の細胞を編集するときに追加されるR N P 複合体の量の低減など、追加される総R N P 量を調整することができる。

40

【0292】

いくつかのC R I S P R 系では、各成分（例えば、C a s 9 及びs g RNA）を、ポリヌクレオチドによって別々にコードすることができ、各ポリヌクレオチドは、一緒に又は別々に細胞中に導入される。いくつかのC R I S P R 系では、各成分は、単一のポリヌクレオチド（すなわち、マルチプロモーター又はマルチシストロンベクター、以下の例示的なマルチシストロン系の説明を参照）によってコードし、細胞中に導入することができる

50

。細胞内での各ポリヌクレオチドにコードされたC R I S P R成分の発現（例えば、ヌクレアーゼの翻訳及びC R I S P R R N Aの転写）後、R N P複合体を細胞内で形成することができ、次いで、部位特異的切断に方向付けることができる。

【0293】

いくつかのR N Pは、核中へのR N Pの送達を促進する部分を有するように操作することができる。例えば、C a s 9ヌクレアーゼは、C a s 9 R N P複合体が細胞のサイトゾル中に送達される場合、又はC a s 9の翻訳及び後続のR N P形成後に、N L Sが核中へのC a s 9 R N Pの更なる輸送を促進することができるように、核局在化シグナル（N L S）ドメインを有することができる。

【0294】

本明細書中に記載される操作された細胞は、非ウイルス方法を使用して操作することができ、例えば、本明細書に記載されるヌクレアーゼ及び／又はC R I S P R媒介性遺伝子編集系は、非ウイルス方法を使用して細胞に送達することができる。本明細書に記載される細胞は、ウイルス方法を使用して操作することができ、例えば、本明細書に記載されるヌクレアーゼ及び／又はC R I S P R媒介性遺伝子編集系は、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、又は本明細書に記載される他のウイルスベースの送達方法のうちのいずれかなどのウイルス方法を使用して細胞に送達することができる。

【0295】

いくつかのC R I S P R系では、各々が1つより多くの標的ヌクレオチド配列における同じ遺伝子又は一般的なゲノム遺伝子座を別々に標的化するように、1つより多くのC R I S P R組成物を提供することができる。例えば、2つの別々のC R I S P R組成物を提供して、互いのある特定の距離内の2つの異なる標的ヌクレオチド配列での切断に方向付けることができる。いくつかのC R I S P R系では、各々が同じ遺伝子又は一般的なゲノム遺伝子座の逆ストランドを別々に標的化するように、1つより多くのC R I S P R組成物を提供することができる。例えば、2つの別々のC R I S P R「ニックアーゼ」組成物を提供して、逆ストランドにおける同じ遺伝子又は一般的なゲノム遺伝子座での切断に方向付けることができる。

【0296】

一般的に、本明細書に記載されるC R I S P R媒介性編集系の特徴を、他のヌクレアーゼベースのゲノム編集系に適用することができる。T A L E Nは、T A L E（転写活性化因子様エフェクター）のDNA結合ドメイン及び制限エンドヌクレアーゼF o k Iの触媒ドメインで構成される、操作された部位特異的ヌクレアーゼである。DNA結合ドメインの単量体の高度に可変的な残基領域中に存在するアミノ酸を変化させることにより、異なる人工T A L E Nを作製して様々なヌクレオチド配列を標的化することができる。DNA結合ドメインは、その後、ヌクレアーゼを標的配列に方向付け、二本鎖切断を作製する。T A L E Nベースの系は、米国 第12／965,590号、米国特許第8,450,471号、米国特許第8,440,431号、米国特許第8,440,432号、米国特許第10,172,880号、及び米国 第13／738,381号により詳細に記載されており、それらの全ては、それらの全体で参照により本明細書中に組みこまれる。Z F Nベースの編集系は、あらゆる目的のためのそれらの全体で参照することにより本明細書に

【0297】

他の操作送達系

操作された核酸（例えば、本明細書に記載される修飾E R - L B D又はキメラタンパク質をコードする単離ポリヌクレオチド分子）を、本明細書に記載される脂質構造体のうち

10

20

30

40

50

のいずれかなどの細胞又は他の標的レシピエント実体に導入するための様々な追加の手段。

【0298】

エレクトロポレーションを使用して、ポリヌクレオチドをレシピエント実体に送達することができる。エレクトロポレーションは、電界を印加して、標的細胞又は実体の外膜又はシェルを一時的に透過させることを通して、カーゴ／ペイロードを標的細胞又は実体の内部コンパートメント中に内在化させる方法である。一般的に、本方法は、関心対象のカーゴ（例えば、本明細書に記載される操作された核酸のうちのいずれか）を含む溶液中で2つの電極の間に細胞又は標的実体を配置することを含む。次いで、一過性の設定電圧を印加することによって、細胞の脂質膜を破壊、すなわち、透過させ、それによって、カーゴが細胞の細胞質などの実体の内部に進入することが可能になる。細胞の例では、細胞の大部分ではないが少なくともいくつかは、生存可能なままである。細胞及び他の実体を、インビトロ、インビボ、又はエクスビボでエレクトロポレーションすることができる。エレクトロポレーション条件（例えば、細胞の数、カーゴの濃度、回復条件、電圧、時間、静電容量、パルスタイプ、パルス長、容積、キュベット長、エレクトロポレーション溶液の組成など）は、細胞又は他のレシピエント実体のタイプ、送達されるカーゴ、所望される内在化の効率、及び所望される生存率を含むがこれらに限定されない、いくつかの要因に応じて変動する。そのような基準の最適化は、当業者の技術の範囲内である。様々なデバイス及びプロトコルをエレクトロポレーションのために使用することができる。例としては、Neon（登録商標）トランスフェクション系、MaxCyte（登録商標）Flow Electroporation（商標）、Lonza（登録商標）Nucleofector（商標）系、及びBio-Rad（登録商標）エレクトロポレーション系が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0299】

操作された核酸（例えば、本明細書に記載される修飾ER-LBD又はキメラタンパク質をコードする単離ポリヌクレオチド）を細胞又は他の標的レシピエント実体に導入するための他の手段は、超音波処理、遺伝子銃、流体力学的注射、及び物理的手段による細胞膜変形を含むが、これらに限定されない。

【0300】

ネイキッドプラスミド又はmRNAなどの操作されたmRNAをインビボで送達するための組成物及び方法は、各々があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる、Kowalski et al. (Mol Ther. 2019 Apr 10; 27 (4): 710-728) 及びKaczmarek et al. (Genome Med. 2017; 9: 60) に詳細に記載されている。

30

【0301】

使用方法

本明細書に記載される修飾ER-LBD、キメラタンパク質、又は細胞を使用する方法も、本開示によって包含される。

【0302】

いくつかの態様では、方法は、関心対象の遺伝子の転写を調節することを含む。転写を調節する方法は、(i) 修飾ER-LBDを含むキメラ転写因子をコードする異種構築物、及び(ii) 関心対象の遺伝子に動作可能に連結されたキメラ転写因子応答性(CTF応答性)プロモーターを含む標的発現カセットで、細胞を形質転換することと、キメラタンパク質の発現に好適な条件下で形質転換細胞を培養することと、形質転換細胞を非内因性リガンドと接触させることによって、関心対象の遺伝子の転写を調節するようにキメラタンパク質を誘導することと、を含む。

40

【0303】

いくつかの実施形態では、転写を調節する方法は、転写を活性化する方法である。転写を活性化することは、キメラタンパク質を使用して達成され得る。

【0304】

50

いくつかの実施形態では、方法は、転写を活性化することを含む。転写を活性化することは、例えば、修飾ER-LBD、DNA結合ドメイン、及び転写活性化ドメインを含むキメラタンパク質を使用して達成され得る。

【0305】

いくつかの実施形態では、方法は、転写を抑制することを含む。転写を抑制することは、例えば、修飾ER-LBD、DNA結合ドメイン、及び転写リプレッサードメインを含むキメラタンパク質を使用して達成され得る。

【0306】

いくつかの態様では、方法は、キメラタンパク質の局在化を調節することを含む。局在化を調節する方法は、修飾ER-LBDドメイン及び関心対象のポリペプチドを含むキメラタンパク質をコードする異種構築物で、細胞を形質転換することと、キメラタンパク質の発現に好適な条件下で形質転換細胞を培養することと、形質転換細胞を非内因性リガンドと接触させることによって、キメラタンパク質の核局在化を誘導することと、を含み得る。いくつかの実施形態では、局在化を調節することは、核局在化を誘導することを含む。

10

【0307】

いくつかの実施形態では、非内因性リガンドが野生型エストロゲン受容体アルファ上で実質的に不活性である濃度で、非内因性リガンドが投与される。

【0308】

インビボ方法

本明細書で提供される方法はまた、例えば、インビボで修飾ER-LBD又はキメラタンパク質を発現する細胞に非内因性リガンドを送達することによって、インビボで局在化又は転写を修飾することを含む。

20

【0309】

いくつかの実施形態では、形質転換細胞は、ヒト又は動物にあり、形質転換細胞を非内因性リガンドと接触させることは、薬理的用量のリガンドをヒト又は動物に投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象に投与される非内因性リガンドは、タモキシフェンを含む。タモキシフェンの経口投与時に、薬物は、肝臓内で活性タモキシフェン代謝物に変換される。いくつかの実施形態では、タモキシフェン代謝産物は、4-ヒドロキシータモキシフェン（「4-OHT」）、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンから選択される。いくつかの実施形態では、非内因性リガンドは、1日約1mg～1日約100mgの濃度で対象に投与される。特定の実施形態では、非内因性リガンドは、1日約40mgの濃度で対象に投与される。

30

【0310】

いくつかの態様では、本明細書で提供される方法はまた、例えば、(i) 本明細書に記載されるキメラ転写因子で形質転換された細胞、及び(ii) 非内因性リガンドを対象に送達することによって、インビボで関心対象の遺伝子の転写を調節することを含む。いくつかの実施形態では、形質転換細胞は、関心対象の遺伝子に動作可能に連結されたキメラ転写因子応答性プロモーターを含む標的遺伝子発現カセットを含む。

【0311】

いくつかの実施形態では、対象は、ヒト又は動物であり、形質転換細胞を非内因性リガンドと接触させることは、薬理的用量の非内因性リガンドをヒト又は動物に投与することを含む。

40

【0312】

いくつかの態様では、本明細書で提供される方法はまた、本明細書に記載される操作された細胞を産生することが可能な、例えば、本明細書に記載されるポリヌクレオチド分子をインビボで細胞に送達することが可能な、組成物をインビボで送達することを含む。そのような組成物は、ウイルス媒介性送達プラットフォームのうちのいずれか、脂質構造送達系のうちのいずれか、ナノ粒子送達系のうちのいずれか、ゲノム編集系のうちのいずれか、又は細胞をインビボで操作することが可能な本明細書中に記載される他の操作送達系

50

のうちのいずれかを含む。

【0313】

本明細書で提供される方法はまた、本明細書に記載される修飾ER-LBD、キメラタンパク質、又はキメラ転写因子（及びいくつかの実施形態ではキメラ転写因子によって調節される遺伝子）のうちのいずれかを産生することが可能な組成物をインビボで送達することを含む。修飾ER-LBD、キメラタンパク質、又はキメラ転写因子（及びいくつかの実施形態ではキメラ転写因子によって調節される遺伝子）のインビボ産生が可能な組成物としては、本明細書に記載される操作された核酸のうちのいずれかが挙げられるが、これらに限定されない。誘導性転写因子（及びいくつかの実施形態では誘導性転写因子によって調節される遺伝子）のインビボ産生が可能な組成物は、ネイキッドmRNA又はネイキッドプラスミドであり得る。

10

【0314】

医薬組成物

本開示の修飾ER-LBD、キメラタンパク質、及び細胞は、医薬組成物で製剤化され得る。これらの組成物は、操作された核酸又は操作された細胞のうちの1つ以上に加えて、薬学的に許容される賦形剤、担体、緩衝剤、安定剤、又は当業者に周知の他の材料を含むことができる。そのような材料は、無毒性でなければならず、活性成分の有効性を妨げてはならない。担体又は他の材料の正確な性質は、投与経路、例えば、経口、静脈内、皮膚又は皮下、経鼻、筋肉内、腹腔内経路に依存し得る。

【0315】

個体に投与される、本開示による細胞、ポリペプチド、核酸、小分子、又は他の薬学的に有用な化合物であるかどうかにかかわらず、投与は、好ましくは、「治療有効量」又は「予防有効量」であり（場合によっては、予防は治療とみなされ得るが）、これは個体に利益を示すために十分である。投与される実際の量、並びに投与の速度及び時間経過は、治療されている疾患の性質及び重症度に依存するであろう。治療の処方、例えば、投与量の決定などは、一般開業医及び他の医師の責任の範囲内であり、典型的には、治療される障害、個々の患者の状態、送達部位、投与方法、及び開業医に知られている他の要因を考慮する。上述の技法及びプロトコルの例は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980に見出され得る。

20

30

【0316】

組成物は、治療される状態に応じて、単独で、又は他の治療と組み合わせて、同時又は逐次のいずれかで投与することができる。

【0317】

追加の実施形態

以下の段落は、追加の列挙される実施形態を提供する。

1.

配列番号1のアミノ酸282～595に対応するアミノ酸配列を含む、修飾エストロゲン受容体リガンド結合ドメイン（ER-LBD）であって、修飾ER-LBDが、G400Vアミノ酸置換、M543Aアミノ酸置換、及びL544Aアミノ酸置換と、1つ以上の追加のアミノ酸置換と、を含み、1つ以上の追加のアミノ酸置換が、343～354位、380～392位、404～463位、及び517～540位、並びに547位からなる群から選択される、配列番号1の領域内にあり、修飾ER-LBDが、配列番号2のアミノ酸配列を含むER-LBDと比較して、非内因性リガンドに対するより高い感受性を有する、修飾ER-LBD。

40

2.

配列番号1のアミノ酸282～595に対応するアミノ酸配列を含む、修飾エストロゲン受容体リガンド結合ドメイン（ER-LBD）であって、修飾ER-LBDが、G400Vアミノ酸置換、M543Aアミノ酸置換、及びL544Aアミノ酸置換と、1つ以上の追加のアミノ酸置換と、を含み、1つ以上の追加のアミノ酸置換が、343～354位

50

、380～392位、404～463位、及び517～540位、並びに547位からなる群から選択される、配列番号1の領域内にあり、修飾ER-LBDが、1つ以上の追加のアミノ酸置換の結果として、内因性リガンドと比較して、非内因性リガンドに対するより高い感受性を有する、修飾ER-LBD。

3.

配列番号1のアミノ酸282～595に対応するアミノ酸配列を含む、修飾エストロゲン受容体リガンド結合ドメイン(ER-LBD)であって、修飾ER-LBDが、G400Vアミノ酸置換、M543Aアミノ酸置換、及びL544Aアミノ酸置換と、1つ以上の追加のアミノ酸置換と、を含み、1つ以上の追加のアミノ酸置換が、343～354位、380～392位、404～463位、及び517～540位、並びに547位からなる群から選択される、配列番号1の領域内にあり、修飾ER-LBDが、配列番号2のアミノ酸を含むER-LBDと比較して、非内因性リガンドに対するより高い選択性を有する、修飾ER-LBD。

10

4.

1つ以上の追加のアミノ酸置換が、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、354、380、384、386、387、388、389、391、392、404、407、409、413、414、417、418、420、421、422、424、428、463、517、521、522、524、525、526、527、528、533、534、536、537、538、539、540、及び547からなる群から選択される、配列番号1の1つ以上の位置にある、段落1～3のいずれか1つに記載の修飾ER-LBD。

20

5.

1つ以上の位置が、配列番号1の343位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

6.

配列番号1の343位におけるアミノ酸置換が、M343F、M343I、M343L、及びM343Vからなる群から選択される、段落5に記載の修飾ER-LBD。

7.

1つ以上の位置が、配列番号1の344位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

8.

配列番号1の344位におけるアミノ酸置換が、G344Mである、段落7に記載の修飾ER-LBD。

30

9.

1つ以上の位置が、配列番号1の345位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

10.

配列番号1の345位におけるアミノ酸置換が、L345Sである、段落9に記載の修飾ER-LBD。

11.

1つ以上の位置が、配列番号1の346位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

12.

配列番号1の346位におけるアミノ酸置換が、L346I、L346M、L346F、及びL346Vからなる群から選択される、段落11に記載の修飾ER-LBD。

40

13.

1つ以上の位置が、配列番号1の347位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

14.

配列番号1の347位におけるアミノ酸置換が、T347D、T347E、T347F、T347I、T347K、T347L、T347M、T347N、T347Q、T347R、T347S、及びT347Vからなる群から選択される、段落13に記載の修飾ER-LBD。

15.

1つ以上の位置が、配列番号1の348位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

50

16.

配列番号1の348位におけるアミノ酸置換が、N348Kである、段落15に記載の修飾ER-LBD。

17.

1つ以上の位置が、配列番号1の349位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

18.

配列番号1の349位におけるアミノ酸置換が、L349I、L349M、L349F、及びL349Vからなる群から選択される、段落17に記載の修飾ER-LBD。

19.

1つ以上の位置が、配列番号1の350位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

20.

配列番号1の350位におけるアミノ酸置換が、A350F、A350I、A350L、A350M、及びA350Vからなる群から選択される、段落19に記載の修飾ER-LBD。

21.

1つ以上の位置が、配列番号1の351位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

22.

配列番号1の351位におけるアミノ酸置換が、D351E、D351F、D351I、D351L、D351M、D351N、D351Q、及びD351Vからなる群から選択される、段落21に記載の修飾ER-LBD。

23.

1つ以上の位置が、配列番号1の352位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

24.

配列番号1の352位におけるアミノ酸置換が、R352Kである、段落23に記載の修飾ER-LBD。

25.

1つ以上の位置が、配列番号1の354位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

26.

配列番号1の354位におけるアミノ酸置換が、L354I、L354M、L354F、及びL354Vからなる群から選択される、段落25に記載の修飾ER-LBD。

27.

1つ以上の位置が、配列番号1の380位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

28.

配列番号1の380位におけるアミノ酸置換が、E380Qである、段落27に記載の修飾ER-LBD。

29.

1つ以上の位置が、配列番号1の384位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

30.

配列番号1の384位におけるアミノ酸置換が、L384I、L384M、L384F、及びL384Vからなる群から選択される、段落29に記載の修飾ER-LBD。

31.

1つ以上の位置が、配列番号1の386位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

32.

配列番号1の386位におけるアミノ酸置換が、I386Vである、段落31に記載の修飾ER-LBD。

33.

1つ以上の位置が、配列番号1の387位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

34.

配列番号1の387位におけるアミノ酸置換が、L387I、L387M、L387F、及びL387Vからなる群から選択される、段落33に記載の修飾ER-LBD。

10

20

30

40

50

35.

1つ以上の位置が、配列番号1の388位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

36.

配列番号1の388位におけるアミノ酸置換が、M388I、M388L、及びM388Fからなる群から選択される、段落35に記載の修飾ER-LBD。

37.

1つ以上の位置が、配列番号1の389位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

38.

配列番号1の389位におけるアミノ酸置換が、I389Mである、段落37に記載の修飾ER-LBD。

39.

1つ以上の位置が、配列番号1の391位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

40.

配列番号1の391位におけるアミノ酸置換が、L391I、L391M、L391F、及びL391Vからなる群から選択される、段落39に記載の修飾ER-LBD。

41.

1つ以上の位置が、配列番号1の392位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

42.

配列番号1の392位におけるアミノ酸置換が、V392Mである、段落41に記載の修飾ER-LBD。

43.

1つ以上の位置が、配列番号1の404位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

44.

配列番号1の404位におけるアミノ酸置換が、F404I、F404L、F404M、及びF404Vからなる群から選択される、段落43に記載の修飾ER-LBD。

45.

1つ以上の位置が、配列番号1の407位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

46.

配列番号1の407位におけるアミノ酸置換が、N407Dである、段落45に記載の修飾ER-LBD。

47.

1つ以上の位置が、配列番号1の409位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

48.

配列番号1の409位におけるアミノ酸置換が、L409Vである、段落47に記載の修飾ER-LBD。

49.

1つ以上の位置が、配列番号1の413位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

50.

配列番号1の413位におけるアミノ酸置換が、N413Dである、段落49に記載の修飾ER-LBD。

51.

1つ以上の位置が、配列番号1の414位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

52.

配列番号1の414位におけるアミノ酸置換が、Q414Eである、段落51に記載の修飾ER-LBD。

53.

1つ以上の位置が、配列番号1の417位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

54.

配列番号1の417位におけるアミノ酸置換が、C417Sである、段落53に記載の修飾ER-LBD。

10

20

30

40

50

55.

1つ以上の位置が、配列番号1の418位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

56.

配列番号1の418位におけるアミノ酸置換が、V418I、V418L、V418M、及びV418Fからなる群から選択される、段落55に記載の修飾ER-LBD。

57.

1つ以上の位置が、配列番号1の420位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

58.

配列番号1の420位におけるアミノ酸置換が、G420I、G420M、G420F、及びG420Vからなる群から選択される、段落57に記載の修飾ER-LBD。

59.

1つ以上の位置が、配列番号1の421位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

60.

配列番号1の421位におけるアミノ酸置換が、M421I、M421L、M421F、及びM421Vからなる群から選択される、段落59に記載の修飾ER-LBD。

61.

1つ以上の位置が、配列番号1の422位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

62.

配列番号1の422位におけるアミノ酸置換が、V422Iである、段落61に記載の修飾ER-LBD。

63.

1つ以上の位置が、配列番号1の424位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

64.

配列番号1の424位におけるアミノ酸置換が、I424L、I424M、I424F、及びI424Vからなる群から選択される、段落63に記載の修飾ER-LBD。

65.

1つ以上の位置が、配列番号1の428位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

66.

配列番号1の428位におけるアミノ酸置換が、L428I、L428M、L428F、及びL428Vからなる群から選択される、段落65に記載の修飾ER-LBD。

67.

1つ以上の位置が、配列番号1の463位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

68.

配列番号1の463位におけるアミノ酸置換が、S463Pである、段落67に記載の修飾ER-LBD。

69.

1つ以上の位置が、配列番号1の517位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

70.

配列番号1の517位におけるアミノ酸置換が、M517Aである、段落69に記載の修飾ER-LBD。

71.

1つ以上の位置が、配列番号1の521位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

72.

配列番号1の521位におけるアミノ酸置換が、G521A、G521F、G521I、G521L、G521M、及びG521Vからなる群から選択される、段落71に記載の修飾ER-LBD。

73.

1つ以上の位置が、配列番号1の522位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

74.

配列番号1の522位におけるアミノ酸置換が、M522I、M522L、及びM52

10

20

30

40

50

2 V からなる群から選択される、段落 7 3 に記載の修飾 E R - L B D。

7 5 .

1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 2 4 位を含む、段落 4 に記載の修飾 E R - L B D。

7 6 .

配列番号 1 の 5 2 4 位におけるアミノ酸置換が、H 5 2 4 A、H 5 2 4 I、H 5 2 4 L、H 5 2 4 F、及び H 5 2 4 V からなる群から選択される、段落 7 5 に記載の修飾 E R - L B D。

7 7 .

1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 2 5 位を含む、段落 4 に記載の修飾 E R - L B D。

7 8 .

配列番号 1 の 5 2 5 位におけるアミノ酸置換が、L 5 2 5 F、L 5 2 5 I、L 5 2 5 M、L 5 2 5 N、L 5 2 5 Q、L 5 2 5 S、L 5 2 5 T、及び L 5 2 5 V からなる群から選択される、段落 7 7 に記載の修飾 E R - L B D。

7 9 .

1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 2 6 位を含む、段落 4 に記載の修飾 E R - L B D。

8 0 .

配列番号 1 の 5 2 6 位におけるアミノ酸置換が、Y 5 2 6 L である、段落 7 9 に記載の修飾 E R - L B D。

8 1 .

1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 2 7 位を含む、段落 4 に記載の修飾 E R - L B D。

8 2 .

配列番号 1 の 5 2 7 位におけるアミノ酸置換が、S 5 2 7 N である、段落 8 1 に記載の修飾 E R - L B D。

8 3 .

1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 2 8 位を含む、段落 4 に記載の修飾 E R - L B D。

8 4 .

配列番号 1 の 5 2 8 位におけるアミノ酸置換が、M 5 2 8 F、M 5 2 8 I、及び M 5 2 8 V からなる群から選択される、段落 8 3 に記載の修飾 E R - L B D。

8 5 .

1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 3 3 位を含む、段落 4 に記載の修飾 E R - L B D。

8 6 .

配列番号 1 の 5 3 3 位におけるアミノ酸置換が、V 5 3 3 F 及び V 5 3 3 W からなる群から選択される、段落 8 5 に記載の修飾 E R - L B D。

8 7 .

1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 3 4 位を含む、段落 4 に記載の修飾 E R - L B D。

8 8 .

配列番号 1 の 5 3 4 位におけるアミノ酸置換が、V 5 3 4 Q 及び V 5 3 4 R からなる群から選択される、段落 8 7 に記載の修飾 E R - L B D。

8 9 .

1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 3 6 位を含む、段落 4 に記載の修飾 E R - L B D。

9 0 .

配列番号 1 の 5 3 6 位におけるアミノ酸置換が、L 5 3 6 F、及び L 5 3 6 M、L 5 3 6 R、及び L 5 3 6 Y からなる群から選択される、段落 8 9 に記載の修飾 E R - L B D。

9 1 .

1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 3 7 位を含む、段落 4 に記載の修飾 E R - L B D。

9 2 .

配列番号 1 の 5 3 7 位におけるアミノ酸置換が、Y 5 3 7 E 及び Y 5 3 7 S からなる群から選択される、段落 9 1 に記載の修飾 E R - L B D。

9 3 .

1 つ以上の位置が、配列番号 1 の 5 3 8 位を含む、段落 4 に記載の修飾 E R - L B D。

10

20

30

40

50

94.

配列番号1の538位におけるアミノ酸置換が、D538G及びD538Kからなる群から選択される、段落93に記載の修飾ER-LBD。

95.

1つ以上の位置が、配列番号1の539位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

96.

配列番号1の539位におけるアミノ酸置換が、L539A及びL539Rからなる群から選択される、段落95に記載の修飾ER-LBD。

97.

1つ以上の位置が、配列番号1の540位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

98.

配列番号1の540位におけるアミノ酸置換が、L540A及びL540Fからなる群から選択される、段落97に記載の修飾ER-LBD。

99.

1つ以上の位置が、配列番号1の547位を含む、段落4に記載の修飾ER-LBD。

100.

配列番号1の547位におけるアミノ酸置換が、H547Aである、段落99に記載の修飾ER-LBD。

101.

1つ以上追加のアミノ酸置換が、2つのアミノ酸置換である、段落1~100のいずれか1つに記載の修飾ER-LBD。

102.

2つのアミノ酸置換の各々が、343、345、347、348、351、354、384、387、388、389、391、392、404、418、421、521、524、及び525からなる群から選択される、配列番号1の位置にある、段落101に記載の修飾ER-LBD。

103.

2つのアミノ酸置換が、配列番号1の345位及び348位にある、段落102に記載の修飾ER-LBD。

104.

配列番号1の345位におけるアミノ酸置換が、L345Sであり、配列番号1の348位におけるアミノ酸置換が、N348Kである、段落103に記載の修飾ER-LBD。

105.

2つのアミノ酸置換が、配列番号1の384位及び389位にある、段落102に記載の修飾ER-LBD。

106.

配列番号1の384位におけるアミノ酸置換が、L384Mであり、配列番号1の389位におけるアミノ酸置換が、I389Mである、段落105に記載の修飾ER-LBD。

107.

2つのアミノ酸置換が、配列番号1の421位及び392位にある、段落102に記載の修飾ER-LBD。

108.

配列番号1の421位におけるアミノ酸置換が、M421Iであり、配列番号1の392位におけるアミノ酸置換が、V392Mである、段落107に記載の修飾ER-LBD。

109.

2つのアミノ酸置換が、配列番号1の354位及び391位にある、段落102に記載の修飾ER-LBD。

10

20

30

40

50

1 1 0 .

配列番号 1 の 3 5 4 位におけるアミノ酸置換が、L 3 5 4 I であり、配列番号 1 の 3 9 1 位におけるアミノ酸置換が、L 3 9 1 F である、段落 1 0 9 に記載の修飾 E R - L B D 。

1 1 1 .

2 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 5 4 位及び 3 8 4 位にある、段落 1 0 2 に記載の修飾 E R - L B D 。

1 1 2 .

配列番号 1 の 3 5 4 位におけるアミノ酸置換が、L 3 5 4 I であり、配列番号 1 の 3 8 4 位におけるアミノ酸置換が、L 3 8 4 M である、段落 1 1 1 に記載の修飾 E R - L B D 。

1 1 3 .

2 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 5 4 位及び 3 8 7 位にある、段落 1 0 2 に記載の修飾 E R - L B D 。

1 1 4 .

配列番号 1 の 3 5 4 位におけるアミノ酸置換が、L 3 5 4 I であり、配列番号 1 の 3 8 7 位におけるアミノ酸置換が、L 3 8 7 M である、段落 1 1 3 に記載の修飾 E R - L B D 。

1 1 5 .

2 つのアミノ酸置換が、3 8 7 位及び 3 9 1 位にある、段落 1 0 2 に記載の修飾 E R - L B D 。

1 1 6 .

配列番号 1 の 3 8 7 位におけるアミノ酸置換が、L 3 8 7 M であり、配列番号 1 の 3 9 1 位におけるアミノ酸置換が、L 3 9 1 F である、段落 1 1 5 に記載の修飾 E R - L B D 。

1 1 7 .

2 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 8 4 位及び 3 8 7 位にある、段落 1 0 2 に記載の修飾 E R - L B D 。

1 1 8 .

配列番号 1 の 3 8 4 位におけるアミノ酸置換が、L 3 8 4 M であり、配列番号 1 の 3 8 7 位におけるアミノ酸置換が、L 3 8 7 M である、段落 1 1 7 に記載の修飾 E R - L B D 。

1 1 9 .

2 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 8 4 位及び 3 9 1 位にある、段落 1 0 2 に記載の修飾 E R - L B D 。

1 2 0 .

配列番号 1 の 3 8 4 位におけるアミノ酸置換が、L 3 8 4 M であり、配列番号 1 の 3 9 1 位におけるアミノ酸置換が、L 3 9 1 F である、段落 1 1 7 に記載の修飾 E R - L B D 。

1 2 1 .

1 つ以上追加のアミノ酸置換が、3 つのアミノ酸置換である、段落 1 ~ 1 2 0 のいずれか 1 つに記載の修飾 E R - L B D 。

1 2 2 .

3 つのアミノ酸置換の各々が、3 4 3、3 4 7、3 5 1、3 5 4、3 8 8、3 9 1、4 0 4、4 1 4、4 1 8、4 6 3、5 2 1、5 2 4、及び 5 2 5 からなる群から選択される、配列番号 1 の位置にある、段落 1 2 1 に記載の修飾 E R - L B D 。

1 2 3 .

3 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 5 4 位、3 8 4 位、及び 3 9 1 位にある、段落 1 2 2 に記載の修飾 E R - L B D 。

1 2 4 .

10

20

30

40

50

配列番号 1 の 3 5 4 位におけるアミノ酸置換が、L 3 5 4 I であり、配列番号 1 の 3 8 4 位におけるアミノ酸置換が、L 3 8 4 M であり、配列番号 1 の 3 9 1 位におけるアミノ酸置換が、L 3 9 1 F である、段落 1 2 3 に記載の修飾 E R - L B D。

1 2 5 .

3 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 4 1 4 位、4 6 3 位、及び 5 2 4 位にある、段落 1 2 2 に記載の修飾 E R - L B D。

1 2 6 .

配列番号 1 の 4 1 4 位におけるアミノ酸置換が、Q 4 1 4 E であり、配列番号 1 の 4 6 3 位におけるアミノ酸置換が、S 4 6 3 P であり、配列番号 1 の 5 2 4 位におけるアミノ酸置換が、H 5 2 4 L である、段落 1 2 5 に記載の修飾 E R - L B D。

1 2 7 .

1 つ以上追加のアミノ酸置換が、4 つのアミノ酸置換である、段落 1 ~ 1 2 6 のいずれか 1 つに記載の修飾 E R - L B D。

1 2 8 .

4 つのアミノ酸置換の各々が、3 4 3、3 4 7、3 5 1、3 5 4、3 8 4、3 8 8、3 9 1、4 0 4、4 1 3、4 1 8、4 6 3、5 2 1、5 2 4、及び 5 2 5 からなる群から選択される、配列番号 1 の位置にある、段落 1 2 7 に記載の修飾 E R - L B D。

1 2 9 .

4 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 5 4 位、3 8 4 位、3 9 1 位、及び 4 1 8 位にある、段落 1 2 8 に記載の修飾 E R - L B D。

1 3 0 .

配列番号 1 の 3 5 4 位におけるアミノ酸置換が、L 3 5 4 I であり、配列番号 1 の 3 8 4 位におけるアミノ酸置換が、L 3 8 4 M であり、配列番号 1 の 3 9 1 位におけるアミノ酸置換が、L 3 9 1 F であり、配列番号 1 の 4 1 8 位におけるアミノ酸置換が、V 4 1 8 I である、段落 1 2 9 に記載の修飾 E R - L B D。

1 3 1 .

4 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 4 3 位、3 8 8 位、5 2 1 位、及び 4 0 4 位にある、段落 1 2 8 に記載の修飾 E R - L B D。

1 3 2 .

配列番号 1 の 3 4 3 位におけるアミノ酸置換が、M 3 4 3 I であり、配列番号 1 の 3 8 8 位におけるアミノ酸置換が、M 3 8 8 I であり、配列番号 1 の 5 2 1 位におけるアミノ酸置換が、G 5 2 1 I であり、配列番号 1 の 4 0 4 位におけるアミノ酸置換が、F 4 0 4 L である、段落 1 3 1 に記載の修飾 E R - L B D。

1 3 3 .

4 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 5 2 4 位、3 4 7 位、3 5 1 位、及び 5 2 5 位にある、段落 1 2 8 に記載の修飾 E R - L B D。

1 3 4 .

配列番号 1 の 5 2 4 位におけるアミノ酸置換が、H 5 2 4 V であり、配列番号 1 の 3 4 7 位におけるアミノ酸置換が、T 3 4 7 R であり、配列番号 1 の 3 5 1 位におけるアミノ酸置換が、D 3 5 1 Q であり、配列番号 1 の 5 2 5 位におけるアミノ酸置換が、L 5 2 5 N である、段落 1 3 3 に記載の修飾 E R - L B D。

1 3 5 .

4 つのアミノ酸置換が、配列番号 1 の 3 5 4 位、3 8 4 位、3 9 1 位、及び 4 6 3 位にある、段落 1 2 8 に記載の修飾 E R - L B D。

1 3 6 .

配列番号 1 の 3 5 4 位におけるアミノ酸置換が、L 3 5 4 I であり、配列番号 1 の 3 8 4 位におけるアミノ酸置換が、L 3 8 4 M であり、配列番号 1 の 3 9 1 位におけるアミノ酸置換が、L 3 9 1 V であり、配列番号 1 の 4 6 3 位におけるアミノ酸置換が、S 4 6 3 P である、段落 1 3 5 に記載の修飾 E R - L B D。

1 3 7 .

10

20

30

40

50

4つのアミノ酸置換が、配列番号1の384位、391位、413位、及び524位にある、段落128に記載の修飾ER-LBD。

138.

配列番号1の384位におけるアミノ酸置換が、L384Mであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換が、L391Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換が、H524Fである、段落137に記載の修飾ER-LBD。

139.

1つ以上追加のアミノ酸置換が、5つのアミノ酸置換である、段落1～138のいずれか1つに記載の修飾ER-LBD。

140.

5つのアミノ酸置換の各々が、354、384、391、409、413、414、421、463、及び524からなる群から選択される、配列番号1の位置にある、段落139に記載の修飾ER-LBD。

141.

5つのアミノ酸置換が、配列番号1の384位、409位、413位、463位、及び524位にある、段落140に記載の修飾ER-LBD。

142.

配列番号1の384位におけるアミノ酸置換が、L384Mであり、配列番号1の409位におけるアミノ酸置換が、L409Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換が、H524Lである、段落141に記載の修飾ER-LBD。

143.

5つのアミノ酸置換が、配列番号1の391位、413位、414位、463位、及び524位にある、段落140に記載の修飾ER-LBD。

144.

配列番号1の391位におけるアミノ酸置換が、L391Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の414位におけるアミノ酸置換が、Q414Eであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換が、H524Fである、段落143に記載の修飾ER-LBD。

145.

5つのアミノ酸置換が、配列番号1の391位、414位、421位、463位、及び524位にある、段落140に記載の修飾ER-LBD。

146.

配列番号1の391位におけるアミノ酸置換が、L391Vであり、配列番号1の414位におけるアミノ酸置換が、Q414Eであり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換が、M421Lであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換が、H524Fである、段落145に記載の修飾ER-LBD。

147.

5つのアミノ酸置換が、配列番号1の354位、409位、413位、421位、及び524位にある、段落140に記載の修飾ER-LBD。

148.

配列番号1の354位におけるアミノ酸置換が、L354Iであり、配列番号1の409位におけるアミノ酸置換が、L409Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換が、M421Lであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換が、H524Lである、段落147に記載の修飾ER-LBD。

10

20

30

40

50

1 4 9 .

5つのアミノ酸置換が、配列番号1の354位、409位、421位、463位、及び524位にある、段落140に記載の修飾ER-LBD。

1 5 0 .

配列番号1の354位におけるアミノ酸置換が、L354Iであり、配列番号1の409位におけるアミノ酸置換が、L409Vであり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換が、M421Lであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換が、H524Lである、段落149に記載の修飾ER-LBD。

1 5 1 .

1つ以上追加のアミノ酸置換が、6つのアミノ酸置換である、段落1～150のいずれか1つに記載の修飾ER-LBD。

1 5 2 .

6つのアミノ酸置換の各々が、354、384、391、409、413、414、421、463、及び524からなる群から選択される、配列番号1の位置にある、段落151に記載の修飾ER-LBD。

1 5 3 .

6つのアミノ酸置換が、配列番号1の384位、391位、413位、421位、463位、及び524位にある、段落152に記載の修飾ER-LBD。

1 5 4 .

配列番号1の384位におけるアミノ酸置換が、L384Mであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換が、L391Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換が、M421Lであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換が、H524Lである、段落153に記載の修飾ER-LBD。

1 5 5 .

6つのアミノ酸置換が、配列番号1の409位、413位、414位、421位、463位、及び524位にある、段落152に記載の修飾ER-LBD。

1 5 6 .

配列番号1の409位におけるアミノ酸置換が、L409Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の414位におけるアミノ酸置換が、Q414Eであり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換が、M421Lであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換が、H524Lである、段落155に記載の修飾ER-LBD。

1 5 7 .

6つのアミノ酸置換が、配列番号1の354位、391位、409位、413位、414位、及び524位にある、段落152に記載の修飾ER-LBD。

1 5 8 .

配列番号1の354位におけるアミノ酸置換が、L354Iであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換が、L391Vであり、配列番号1の409位におけるアミノ酸置換が、L409Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の414位におけるアミノ酸置換が、Q414Eであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換が、H524Lである、段落157に記載の修飾ER-LBD。

1 5 9 .

1つ以上追加のアミノ酸置換が、7つのアミノ酸置換である、段落1～158のいずれか1つに記載の修飾ER-LBD。

1 6 0 .

10

20

30

40

50

7つのアミノ酸置換の各々が、354、384、391、409、413、414、421、463、517、及び524からなる群から選択される、配列番号1の位置にある、段落159に記載の修飾ER-LBD。

161.

7つのアミノ酸置換が、配列番号1の354位、384位、409位、413位、421位、463位、及び524位にある、段落160に記載の修飾ER-LBD。

162.

配列番号1の354位におけるアミノ酸置換が、L354Iであり、配列番号1の384位におけるアミノ酸置換が、L384Mであり、配列番号1の409位におけるアミノ酸置換が、L409Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換が、M421Lであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換が、H524Fである、段落161に記載の修飾ER-LBD。

163.

7つのアミノ酸置換が、配列番号1の354位、391位、413位、421位、463位、517位、及び524位にある、段落160に記載の修飾ER-LBD。

164.

配列番号1の354位におけるアミノ酸置換が、L354Iであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換が、L391Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換が、M421Lであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の517位におけるアミノ酸置換が、M517Aであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換が、H524Lである、段落163に記載の修飾ER-LBD。

165.

7つのアミノ酸置換が、配列番号1の354位、391位、413位、414位、421位、517位、及び524位にある、段落160に記載の修飾ER-LBD。

166.

配列番号1の354位におけるアミノ酸置換が、L354Iであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換が、L391Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の414位におけるアミノ酸置換が、Q414Eであり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換が、M421Lであり、配列番号1の517位におけるアミノ酸置換が、M517Aであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換が、H524Fである、段落165に記載の修飾ER-LBD。

167.

1つ以上追加のアミノ酸置換が、8つのアミノ酸置換である、段落1～166のいずれか1つに記載の修飾ER-LBD。

168.

8つのアミノ酸置換が、配列番号1の384位、391位、409位、413位、421位、463位、517位、及び524位にある、段落167に記載の修飾ER-LBD。

169.

配列番号1の384位におけるアミノ酸置換が、L384Mであり、配列番号1の391位におけるアミノ酸置換が、L391Vであり、配列番号1の409位におけるアミノ酸置換が、L409Vであり、配列番号1の413位におけるアミノ酸置換が、N413Dであり、配列番号1の421位におけるアミノ酸置換が、M421Lであり、配列番号1の463位におけるアミノ酸置換が、S463Pであり、配列番号1の517位におけるアミノ酸置換が、M517Aであり、配列番号1の524位におけるアミノ酸置換が、H524Fである、段落168に記載の修飾ER-LBD。

170.

修飾ER-LBDが、V595Aアミノ酸置換を更に含む、段落1～169のいずれか

10

20

30

40

50

1 つに記載の修飾 E R - L B D。

1 7 1 .

非内因性リガンドが、4-ヒドロキシタモキシフェン、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンからなる群から選択される、段落 1 ~ 1 7 0 のいずれか 1 つに記載の修飾 E R - L B D。

1 7 2 .

段落 1 ~ 1 7 1 のいずれか 1 つに記載の修飾 E R - L B D に融合された関心対象のポリペプチドを含む、キメラタンパク質。

1 7 3 .

関心対象のポリペプチドが、核酸結合ドメインを含む、段落 1 7 2 に記載のキメラタンパク質。

1 7 4 .

核酸結合ドメインが、ジンクフィンガードメインを含む、段落 1 7 3 に記載のキメラタンパク質。

1 7 5 .

ジンクフィンガードメインが、配列 M S R P G E R P F Q C R I C M R N F S N M S N L T R H T R T H T G E K P F Q C R I C M R N F S D R S V L R R H L R T H T G S Q K P F Q C R I C M R N F S D P S N L A R H T R T H T G E K P F Q C R I C M R N F S D R S S L R R H L R T H T G S Q K P F Q C R I C M R N F S Q S G T L H R H T R T H T G E K P F Q C R I C M R N F S Q R P N L T R H L R T H L R G S (配列番号 6 2) を含む、段落 1 7 4 に記載のキメラタンパク質。

1 7 6 .

キメラタンパク質が、キメラ転写因子を含み、関心対象のポリペプチドが、核酸結合ドメイン及び転写調節因子ドメインを含む、段落 1 7 2 ~ 1 7 5 のいずれか 1 つに記載のキメラタンパク質。

1 7 7 .

転写調節因子ドメインが、転写活性化因子である、段落 1 7 6 に記載のキメラタンパク質。

1 7 8 .

転写活性化因子が、単純ヘルペスウイルスタンパク質 1 6 (V P 1 6) 活性化ドメイン ; V P 1 6 の 4 つのタンデムコピーを含む活性化ドメイン ; V P 6 4 活性化ドメイン ; N F κ B の p 6 5 活性化ドメイン (p 6 5) ; エプスタイン・バーウイルス R トランス活性化因子 (R t a) 活性化ドメイン ; V P 6 4、p 6 5、及び R t a 活性化ドメイン (V P R 活性化ドメイン) を含む三者活性化因子 ; V P 6 4、p 6 5、及び H S F 1 活性化ドメイン (V P H 活性化ドメイン) を含む三者活性化因子 ; 並びにヒト E 1 A 関連タンパク質 p 3 0 0 のヒストンアセチルトランスフェラーゼコアダメイン (p 3 0 0 H A T コア活性化ドメイン) からなる群から選択される、段落 1 7 7 に記載のキメラタンパク質。

1 7 9 .

転写活性化因子が、D E F P T M V F P S G Q I S Q A S A L A P A P P Q V L P Q A P A P A P A P A M V S A L A Q A P A P V P V L A P G P P Q A V A P P A P K P T Q A G E G T L S E A L L Q L Q F D D E D L G A L L G N S T D P A V F T D L A S V D N S E F Q Q L L N Q G I P V A P H T T E P M L M E Y P E A I T R L V T G A Q R P P D P A P A P L G A P G L P N G L L S G D E D F S S I A D M D F S A L L S Q I S S (配列番号 6 4) のアミノ酸配列を含む、p 6 5 転写活性化因子である、段落 1 7 8 に記載のキメラタンパク質。

1 8 0 .

段落 1 ~ 1 7 1 のいずれか 1 つに記載の修飾 E R - L B D をコードするヌクレオチド配列を含む、単離ポリヌクレオチド分子。

1 8 1 .

段落 1 7 2 ~ 1 7 9 のいずれか 1 つに記載のキメラタンパク質をコードするヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド配列を含む、単離ポリヌクレオチド分子。

182.

段落180に記載のポリヌクレオチド分子に動作可能に連結されたプロモーターを含む、異種構築物。

183.

段落181に記載のポリヌクレオチド分子に動作可能に連結されたプロモーターを含む、異種構築物。

184.

段落182に記載の異種構築物を含む、プラスミド。

185.

段落183に記載の異種構築物を含む、プラスミド。

186.

段落182に記載の異種構築物又は段落184に記載のプラスミドを含む、細胞。

187.

段落183に記載の異種構築物又は段落185に記載のプラスミドを含む、細胞。

188.

関心対象の遺伝子の転写を調節するための遺伝子スイッチであって、

(a) 段落176に記載のキメラタンパク質であって、キメラタンパク質が、関心対象の遺伝子に動作可能に連結されたキメラ転写因子応答性 (CTF 応答性) プロモーターに結合する、キメラタンパク質と、

(b) 非内因性リガンドであって、修飾ER-LBDへの非内因性リガンドの結合が、関心対象の遺伝子の転写を調節するようにキメラタンパク質を誘導する、非内因性リガンドと、を含む、遺伝子スイッチ。

189.

非内因性リガンドが、4-ヒドロキシタモキシフェン、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンからなる群から選択される、段落188に記載の遺伝子スイッチ。

190.

関心対象の遺伝子が、サイトカイン、ケモカイン、ホーミング分子、成長因子、細胞死制御因子、共活性化分子、腫瘍微小環境修飾剤a、受容体、リガンド、抗体、ポリヌクレオチド、ペプチド、及び酵素からなる群から選択されるポリペプチドをコードする、段落188又は189に記載の遺伝子スイッチ。

191.

関心対象の遺伝子が、IL1-ベータ、IL2、IL4、IL6、IL7、IL10、IL12、IL12p70融合タンパク質、IL15、IL17A、IL18、IL21、IL22、I型インターフェロン、インターフェロン-ガンマ、及びTNF-アルファからなる群から選択される、段落190に記載の遺伝子スイッチ。

192.

関心対象の遺伝子が、MCHQQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKD
VYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTL DQSSEVL
GSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSL L L L LHKKE D
GIWSTDILKDQKEPKNKTF L RCEAKNYSGRFT CWWLT T T I S
TDLTFSVKSSRGSSDPQGVT CGAATLSAERV R GDNKEYEY
SVE C Q E D S A C P A A E E S L P I E V M V D A V H K L K Y E N Y T S S F F I
R D I I K P D P P K N L Q L K P L K N S R Q V E V S W E Y P D T W S T P H S Y F
S L T F C V Q V Q G K S K R E K K D R V F T D K T S A T V I C R K N A S I S V R
A Q D R Y Y S S S W S E W A S V P C S G G G S G G G S G G G S G G G S R N L P V
A T P D P G M F P C L H H S Q N L L R A V S N M L Q K A R Q T L E F Y P C T S E
E I D H E D I T K D K T S T V E A C L P L E L T K N E S C L N S R E T S F I T N
G S C L A S R K T S F M M A L C L S S I Y E D L K M Y Q V E F K T M N A K L L M

10

20

30

40

50

DPKRQIFLDQNM L AVIDELMQALNFNSE TVPQKSSLEEPD
FYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS (配列番号58)
のアミノ酸配列を含むIL12p70融合タンパク質をコードする、段落191に記載の
遺伝子スイッチ。

193.

関心対象の遺伝子の転写を調節する方法であって、(i)段落176に記載のキメラタンパク質をコードする異種構築物、及び(ii)関心対象の遺伝子に動作可能に連結されたキメラ転写因子応答性(CTF応答性)プロモーターを含む標的発現カセットで、細胞を形質転換することと、形質転換細胞を非内因性リガンドと接触させることによって、関心対象の遺伝子の転写を調節するようにキメラタンパク質を誘導することと、を含む、方法。

194.

方法が、転写を調節するようにキメラタンパク質を誘導する前に、キメラタンパク質の発現に好適な条件下で形質転換細胞を培養することを更に含む、段落193に記載の方法。

195.

転写を調節することが、関心対象の遺伝子の転写を活性化することを含む、段落193又は194に記載の方法。

196.

転写を調節することが、関心対象の遺伝子の転写を抑制することを含む、段落193又は194に記載の方法。

197.

標的発現カセットが、段落174に記載のキメラタンパク質をコードする異種構築物によってコードされる、段落193～196のいずれか1つに記載の方法。

198.

標的発現カセットが、第2の異種構築物によってコードされる、段落193～196のいずれか1つに記載の方法。

199.

キメラタンパク質の局在化を調節する方法であって、段落172～179のいずれか1つに記載のキメラタンパク質をコードする異種構築物で、細胞を形質転換することと、形質転換細胞を非内因性リガンドと接触させることによって、キメラタンパク質の核局在化を誘導することと、を含む、方法。

200.

方法が、核局在化を誘導する前に、キメラタンパク質の発現に好適な条件下で形質転換細胞を培養することを更に含む、段落199に記載の方法。

201.

形質転換細胞が、ヒト又は動物にあり、形質転換細胞を非内因性リガンドと接触させることが、薬理学的用量のリガンドをヒト又は動物に投与することを含む、請求項193又は195～200のいずれか1つに記載の方法。

202.

非内因性リガンドが、4-ヒドロキシタモキシフェン、N-デスメチルタモキシフェン、タモキシフェン-N-オキシド、及びエンドキシフェンからなる群から選択される、段落193～201のいずれか1つに記載の方法。

203.

非内因性リガンドが配列番号1の野生型エストロゲン受容体アルファ上で実質的に不活性である濃度で、非内因性リガンドが投与される、段落201又は202に記載の方法。

【実施例】

【0318】

以下は、本開示を実行するための具体的な実施形態の実施例である。実施例は、あくまで例証目的で示されるものにすぎず、本開示の範囲をいかなる意味においても限定するこ

10

20

30

40

50

とを意図しない。使用される数（例えば、量、温度など）に関する正確性を確実にするために努力がなされてきたが、当然ながら、ある程度の実験誤差及び偏差が許容されるべきである。

【0319】

本開示の実践では、別途指示のない限り、当業者の技術の範囲内で、タンパク質化学、生化学、組換えDNA技法、及び薬理学の従来の方法が用いられるであろう。そのような手法は、文献で完全に説明されている。例えば、T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, 1993)、A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition)、Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989)、Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.)、Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990)、Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B (1992)を参照されたい。

10

【0320】

実施例1：リガンド結合を調節することが予測されるERT2変異

インシリコモデリングを、ERT2として知られるエストロゲン受容体アルファの変異体に結合する4-OHT、エンドキシフェン、及びエストラジオールについて行い、配列番号2のERT2と比較して、4-OHTに対する感受性の増加を有することが予測される変異を同定した。

20

【0321】

材料及び方法

エストラジオールとER α との間(PDB: 1QKU、分解能3.2 Å)、及び4-OHTとER α との間(PDB: 3ERT、分解能1.9 Å)の複合体の利用可能な結晶構造を使用して、エストラジオールとERT2、4-OHTとERT2、及びエンドキシフェンとERT2との間の複合体のモデルを生成した。ERT2配列は、ER α とは3つの残基(G400V/M543A/L544A)で異なる。残基306~551のみが、利用可能な構造がこの領域のみで全て分解されたため、構造モデルで使用された。

30

【0322】

標準プロトコル(Kannan et al., ACS Omega 2017 Nov 30; 2(11): 7881-7891.)を使用して、MDシミュレーションを、apo ERT2、ERT2-エストラジオール、ERT2-4-OHT、及びERT2-エンドキシフェン複合体について実行した(各シミュレーションを、各々3通りに100ナノ秒間実行した)。ERT2及び結合リガンド/薬物の両方は、(標準的手段を使用した)シミュレーション中に安定したままであった。シミュレーションの後半(50ナノ秒)中に生成された立体構造(シミュレーションは平衡化しているとみなされる)を、後続の分析に使用した。

40

【0323】

結果

変異の第1のセットを、4-OHT結合の改善についてインシリコで分析した。リガンド結合ポケット中の残基に対する18個の変異を、他のエストロゲン受容体タンパク質の相同位置に存在するアミノ酸に基づいて選択した。18個の選択された変異のうち、変異体のうちの17個が、野生型ERT2よりも少なくとも1.8 kcal/molだけ緊密に結合し、M517A変異のみが、4-OHTの結合を不安定化すると思われる(図1A)。次に、結合エネルギー計算を実行して、エストラジオールの結合に対する変異の影響

50

を確認した。4-OHT（負の $\Delta\Delta G$ 値によって示されるように、M517Aを除く全ての変異が結合に有利に働く）と比較して、大部分の変異（図1B）は、エストラジールの結合にごくわずかな影響を及ぼした（全ての変異の $\Delta\Delta G$ 値は、変異の大部分について $>2\text{ kcal/mol}$ である4-OHTの $\Delta\Delta G$ 値と比較して、 2 kcal/mol 以内である）。変異L409V、M517A、及びN407Dのみが、 1 kcal/mol 超のエストラジールへの結合の増加を示したが、L409V及びN407Dの両方は、それぞれ、3及び 4 kcal/mol だけ4-OHTにより緊密に結合する。変異の第1のセットが、以下の表6に示される。

【0324】

（表6）

変異		
G344M	I389M	C417S
L345S	V392M	M421I
N348K	N407D	V422I
R352K	L409V	M517A
L384M	N413D	Y526L
I386V	Q414E	S527N

10

20

【0325】

変異の第2のセットを、4-OHT結合の改善についてインシリコで分析した。分子ドッキングシミュレーションを、（表6に示されるものに加えて）リガンド結合ポケットにおける5つの追加の部位での19個の異なる変異について、ERT2への4-OHT及びエストラジール結合に行い、野生型ERT2と比較して、4-OHTに対する感受性が増加した更なる変異体を同定した。結合エネルギー計算を、変異の第1のセットについて実施される計算と一致して実行した。変異のうちの19個全てが、 $1.8\text{ kcal/mol} \sim 7\text{ kcal/mol}$ の範囲内で4-OHTへの結合の改善を示した（図2）。変異の第2のセットが、表7に示される。

【0326】

（表7）

変異		
L354I	L387I	L391V
L354M	L387M	G420I
L354F	L387F	G420M
L354V	L387V	G420F
L384I	L391I	G420V
L384V	L391M	
L384F	L391F	

30

40

【0327】

変異の第3のセットを、4-OHT結合の改善についてインシリコで分析した。リガンド結合ポケットにおける追加の6つの残基位置（残基428、346、349、418、421、及び424）での合計23個の変異を、分子ドッキングシミュレーションのために選択した。結合エネルギー計算を、変異の第1のセットについて実施される計算と一致して実行した。変異のうちの6つ（L346F、L349M、V418I、V418M、I424M、及びM421L）が、少なくとも約 1.5 kcal/mol だけ4-OHTへの結合の改善を示した（図3）。これらの23個の変異が、表8に示される。

【0328】

（表8）

50

変異		
L346I	V418I	I424M
L346M	V418L	I424F
L346F	V418M	I424V
L346V	V418F	L428I
L349I	M421L	L428M
L349M	M421F	L428F
L349F	M421V	L428V
L349V	I424L	

10

【0329】

変異の第4のセットを、4-OHT結合の改善についてインシリコで分析した。リガンド結合ポケットにおける追加の6つの残基位置（残基528、343、388、522、414、及び521）での合計23個の変異を、分子ドッキングシミュレーションのために選択した。結合エネルギー計算を、変異の第1のセットについて実施される計算と一致して実行した。23個の変異のうちの18個が、少なくとも約1.0 kcal/molだけ4-OHTへの結合の改善を示した（図4）。変異の第4のセットが、表9に示される。

【0330】

(表9)

20

変異		
M343I	F404L	G521V
M343L	F404M	M522I
M343F	F404V	M522L
M343V	G521A	M522V
M388I	G521I	M528I
M388L	G521L	M528F
M388F	G521M	M528V
F404I	G521F	

30

【0331】

変異の第5のセットを、4-OHT結合の改善についてインシリコで分析した。追加の5つの残基位置（残基524、525、347、350、及び351）での合計38個の変異を、分子ドッキングシミュレーションのために選択した。結合エネルギー計算を、変異の第1のセットについて実施される計算と一致して実行した。38個の変異のうちの28個が、少なくとも約1.0 kcal/mol及び最大約4.5 kcal/molだけ4-OHTへの結合の改善を示した（図5）。変異の第5のセットが、表10に示される。

【0332】

(表10)

40

50

変異	
H524A	T347S
H524I	A350I
H524L	A350L
H524F	A350M
H524V	A350F
L525N	A350V
L525Q	D351N
L525I	D351Q
L525M	D351E
L525F	D351I
L525S	D351L
L525T	D351M
L525V	D351F
T347V	D351V

10

【 0 3 3 3 】

20

セット 1 ～ 5 の変異の全てを、エンドキシフェン及びエストラジオールへの結合について分子ドッキングシミュレーションで更に分析し、エンドキシフェン及びエストラジオールへの結合のエネルギーを決定した（k c a l / m o l 単位の $\Delta \Delta G$ として計算した）。更に、エストラジオール結合と比較したエンドキシフェン結合の結合エネルギーの間の差を、 $\Delta \Delta \Delta G$ 値として計算した。エストラジオール結合と比較した、4-OHT、エンドキシフェン、及びエストラジオールの各々の結合エネルギー、並びに 4-OHT 及びエンドキシフェンの結合エネルギー差の概要が、表 1 1 に示される。

【 0 3 3 4 】

（表 1 1 ）

30

40

50

	4-OHT($\Delta\Delta G$) (kcal/mol)	END($\Delta\Delta G$) (kcal/mol)	EST($\Delta\Delta G$) (kcal/mol)	4-OHT- EST($\Delta\Delta\Delta G$) (kcal/mol)	END- EST($\Delta\Delta\Delta G$) (kcal/mol)
M343I	-3.4	-2.2	1.5	-4.9	-3.7
M343L	-2.2	-1.6	0.9	-3.1	-2.6
M343V	0	-0.7	1.8	-1.8	-2.5
M343F	-2	-1.6	2.2	-4.2	-3.8
G344M	-1.6	-1.4	-0.6	-1	-0.8
L345S	-4.3	1.1	-0.1	-4.2	1.2
L346I	2.2	-0.8	-0.9	3.1	0.1
L346M	-0.4	-0.8	-0.5	0.1	-0.3
L346V	1.3	0.8	0.5	0.8	0.3
L346F	-1.7	-0.8	-0.1	-1.6	-0.6
T347I	-0.1	-0.7	0.4	-0.5	-1.1
T347L	-1.6	-1.2	0.5	-2	-1.7
T347M	-2.4	-2.3	-1.9	-0.5	-0.3
T347N	-0.3	-2.7	1.1	-1.4	-3.8
T347R	-3.3	-4.3	-0.8	-2.5	-3.5
T347V	-1.7	-0.9	0	-1.7	-0.9
T347D	0.4	3.8	0.4	0	3.4
T347E	-1.2	2.5	1.1	-2.3	1.4
T347F	-3.2	-2.2	0.1	-3.3	-2.2
T347K	-1.3	-2.5	1.4	-2.7	-3.9
T347Q	-0.4	0.4	1.3	-1.8	-0.9
T347S	0.2	-2.7	1.1	-0.9	-3.7
N348K	-5.5	-3.6	0.8	-6.3	-4.4
L349I	3.4	1.4	2	1.4	-0.6
L349M	-1.5	-2	2.6	-4.1	-4.6
L349V	0.5	1.5	1.7	-1.2	-0.2
L349F	0.9	-0.8	-0.7	1.6	-0.1
A350L	0.6	-0.6	1	-0.4	-1.6
A350M	-0.5	-2	1.3	-1.8	-3.3
A350V	-0.2	-1.1	0.5	-0.7	-1.5
A350F	-0.7	-2.3	-1	0.4	-1.3
A350I	-1.3	-3.8	0.6	-1.9	-4.4
D351I	-1.2	-3.5	2	-3.2	-5.5
D351L	-1.7	-3.2	0.4	-2.1	-3.6
D351M	-3.6	-3	-0.2	-3.4	-2.9
D351N	-1.3	-2.1	1.8	-3.2	-4
D351V	-3.2	-3.8	0.6	-3.8	-4.4
D351E	-1.2	1	0.7	-1.8	0.3

10

20

30

40

50

	4-OHT($\Delta\Delta G$) (kcal/mol)	END($\Delta\Delta G$) (kcal/mol)	EST($\Delta\Delta G$) (kcal/mol)	4-OHT- EST($\Delta\Delta\Delta G$) (kcal/mol)	END- EST($\Delta\Delta\Delta G$) (kcal/mol)
D351F	-3.4	-2.2	1.2	-4.6	-3.4
D351Q	-3	0.1	0.3	-3.2	-0.2
R352K	-3.8	-2.5	0.1	-3.9	-2.6
L354I	-6.9	-2.5	0.9	-7.8	-3.4
L354M	-4.2	-1.3	0.9	-5.1	-2.2
L354V	-3.5	-2.5	1.5	-5	-4
L354F	-4.9	-2.6	0.7	-5.6	-3.3
L384I	-2.7	-4.6	0.3	-3	-4.9
L384M	-3.3	0	1.4	-4.7	-1.4
L384V	-3.6	-2.5	3.2	-6.9	-5.7
L384F	-2.6	-0.4	3	-5.5	-3.3
I386V	-1.8	-3.4	0.4	-2.2	-3.8
L387I	-2.9	-2.6	0.4	-3.2	-3
L387M	-7.3	-1.9	0.3	-7.5	-2.2
L387V	-5	-2.4	-0.7	-4.3	-1.6
L387F	-2	-0.4	1.1	-3	-1.4
M388I	-3.2	-1.7	0.3	-3.5	-2
M388L	1	-0.7	1.9	-0.9	-2.6
M388F	-1.8	-1.6	1.2	-3	-2.8
I389M	-4.6	-2.1	0.6	-5.2	-2.7
L391I	-5.8	-2.8	2	-7.8	-4.8
L391M	-4.1	-4.5	0	-4.1	-4.5
L391V	-5.6	-3.4	1.5	-7.1	-4.9
L391F	-7.2	-1.5	0.1	-7.3	-1.6
V392M	-3.9	-2.6	0.6	-4.5	-3.2
F404I	-2.2	-1.3	2	-4.2	-3.4
F404L	-2.8	-1.7	-0.5	-2.3	-1.2
F404M	-1.5	-0.3	2.2	-3.7	-2.4
F404V	1	-1	1.4	-0.4	-2.4
N407D	-3.5	-2.2	-1.1	-2.4	-1.1
L409V	-2.5	-1.8	-1.2	-1.3	-0.6
N413D	-4.7	-0.8	-0.4	-4.3	-0.4
Q414E	-4.5	-1.8	-0.1	-4.4	-1.7
C417S	-2.6	-1	1.2	-3.8	-2.2
V418I	-2.3	-1.1	1.9	-4.2	-3.1
V418L	1.5	-1.3	2	-0.5	-3.2
V418M	-1.2	-1.8	1.4	-2.6	-3.2
V418F	0.4	-2.6	0.6	-0.3	-3.2
G420I	-5.3	-2.8	-0.2	-5.1	-2.6
G420M	-6	-3.9	-1.2	-4.8	-2.7

10

20

30

40

50

	4-OHT($\Delta\Delta G$) (kcal/mol)	END($\Delta\Delta G$) (kcal/mol)	EST($\Delta\Delta G$) (kcal/mol)	4-OHT- EST($\Delta\Delta\Delta G$) (kcal/mol)	END- EST($\Delta\Delta\Delta G$) (kcal/mol)
G420V	-4	-2.5	0.1	-4.1	-2.6
G420F	-4.6	-4	3.3	-7.9	-7.3
M421I	-3.3	-2.1	0.1	-3.4	-2.2
M421L	-0.9	-1.7	0	-0.9	-1.7
M421V	0.5	0.4	0.4	0.1	0
M421F	0.3	-1.4	-0.7	1	-0.8
V422I	-2.4	-2.2	-0.7	-1.7	-1.5
I424L	0.8	-0.8	-0.6	1.3	-0.2
I424M	-1.4	-1.8	0.3	-1.7	-2
I424V	0.8	-1.8	3.1	-2.3	-4.9
I424F	1.3	-1.4	0.8	0.5	-2.2
L428I	1.3	-0.5	0.5	0.8	-1.1
L428M	0	-1.9	0.9	-0.9	-2.8
L428V	-0.2	-0.1	2.3	-2.4	-2.4
L428F	1.3	0.7	1.3	0	-0.6
M517A	1.2	0.8	-1.1	2.3	1.9
G521A	-2	0	0.2	-2.2	-0.2
G521I	-3.2	-0.3	2.3	-5.5	-2.6
G521L	-2	-1	1.9	-3.9	-2.9
G521M	-1.7	-2.5	3.3	-5	-5.8
G521V	-1.8	-1.1	0.5	-2.3	-1.6
G521F	-2	-1.8	3.4	-5.4	-5.3
M522I	-2.9	-2	1.7	-4.6	-3.7
M522L	0.8	-0.7	0.1	0.7	-0.8
M522V	-0.5	-1	-0.7	0.2	-0.3
H524A	-2.1	-3	-0.4	-1.7	-2.6
H524I	-3	-3	2.8	-5.8	-5.8
H524L	-1.2	-1.3	2	-3.3	-3.3
H524V	-3.6	-3.3	0.6	-4.2	-4
H524F	-2.1	-3.9	2.7	-4.8	-6.6
L525I	-1.8	-2.1	0.5	-2.3	-2.6
L525M	-1.2	-1.8	-0.2	-0.9	-1.5
L525N	-4.4	-1.4	-0.4	-4	-0.9
L525T	-1.2	-2.3	0.6	-1.7	-2.9
L525V	-3.6	-4.5	-1	-2.7	-3.5
L525F	-0.8	-1.1	-0.4	-0.4	-0.6
L525Q	-2.8	-3.4	-1.4	-1.4	-2
L525S	1.8	-2.4	0.3	1.5	-2.7
Y526L	-2.8	-2	0.1	-2.9	-2.1
S527N	-5.8	-3	1.5	-7.3	-4.5
M528I	-1	-2.5	0.5	-1.5	-2.9
M528V	-1	-1.1	3	-4	-4.1
M528F	-1.5	-1	2.5	-4	-3.5

10

20

30

40

50

【0335】

変異の第6のセットをインシリコで分析して、アゴニスト結合型確認（すなわち、エストラジオール結合型立体構造）を不安定化し、及び／又はアンタゴニスト結合型確認（すなわち、4-OHT又はエンドキシフェン結合型立体構造）を安定化する変異体を同定した。アゴニスト結合型立体構造とアンタゴニスト結合型立体構造との間の主要な構造差は、ヘリックス12（H12、図6を参照）の配向及びドッキング部位にある。ヘリックス12における8つの残基位置（残基538、536、539、540、547、534、533、及び537）での合計14個の変異を、分析のために選択した。アンタゴニスト結合型立体配置における変異ERT2及び野生型ERT2の自由エネルギーの差、並びに

アゴニスト結合型立体配置における変異 E R T 2 及び野生型 E R T 2 の自由エネルギーの差を、 ΔG 値として計算した。次に、 $\Delta \Delta G$ 値を計算し、負の値は、E R T 2 変異体のアンタゴニスト結合型立体構造が変異体のアゴニスト結合型立体構造よりも好ましいことを示し、正の値は、アゴニスト立体型構造がアンタゴニスト結合型立体構造よりも好ましいことを示した。14 個の変異のうちの 7 個 (D 5 3 8 K、L 5 3 6 F、L 5 3 6 Y、L 5 3 6 M、L 5 3 9 R、H 5 4 7 A、及び V 5 3 4 R) が、アンタゴニスト確認を安定化した (図 7)。変異の第 6 のセットが、表 1 2 に示される。

【 0 3 3 6 】

(表 1 2)

変異	
V533F	Y537E
V533W	D538K
V534R	L539R
V534Q	L539A
L536F	L540A
L536M	L540F
L536Y	H547A

10

【 0 3 3 7 】

実施例 2：トランスフェクションスクリーンによって同定された薬物感受性が増加した E R T 2 変異体

20

E R T 2 変異体を、4-OHT に応答してレポーター発現を誘導する能力についてトランスフェクションアッセイによって分析した。第 1 のトランスフェクションスクリーンでは、実施例 1 に記載される変異を有する E R T 2 をコードする構築物を、配列番号 3 に示される「野生型」E R T 2 (G 4 0 0 V / M 5 4 3 A / L 5 4 4 A / V 5 9 5 A 四重アミノ酸置換を含む) のバックグラウンドで産生した。各 E R T 2 構築物は、DNA 結合のための Z F 1 0 - 1 ドメイン、p 6 5 転写活性化ドメイン、及び E R T 2 変異体を含んだ。各構築物を、4-OHT に対する感受性について試験した。各変異体を、H E K 2 9 3 T + Y B T A T A _ m C h e r r y レポーター細胞株におけるトランスフェクションのための発現構築物にクローニングした。第 2 のトランスフェクションスクリーンでは、実施例 1 に記載される追加の E R T 2 変異体をコードする構築物を産生し、4-OHT に対する感受性について試験した。スクリーンについては、細胞を 3 つの異なる濃度の 4-OHT (0.025、0.1、及び 0.25 μ M) で処置し、次いで、蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) によって m C h e r r y 発現についてアッセイした (図 8 A ~ 8 C、図 9 A ~ 9 C、及び図 10 A ~ 10 C)。

30

【 0 3 3 8 】

材料及び方法

H E K 2 9 3 T 細胞を、Y B T A T A 最小プロモーターに連結された 4 つの Z F 1 0 - 1 結合部位から構成される合成プロモーターをコードするレンチウイルスで形質導入した。この合成プロモーターは、m C h e r r y の発現を駆動する。この細胞株由来の細胞は、「レポーター細胞」と呼ばれた。

40

【 0 3 3 9 】

1 日目に、レポーター細胞を 24 ウェルプレート中に 1.5 $\times 10^5$ 細胞 / ウェルで播種した。2 日目に、細胞を E R T 変異体でトランスフェクトした。0.6 μ g の DNA、1.8 μ L の F u g e n e、及び 30 μ L の O p t i m e m の混合物を、DNA が p 6 5 及び E R T 2 変異体に融合された Z F 1 0 - 1 をコードする各ウェルについて作製した。いくつかのスクリーンでは、GFP をコードするプラスミドを、フローサイトメトリーによってトランスフェクト細胞を選択するための対照として含んだ。3 日目に、細胞を 1 : 20 の比率で分割し、96 ウェルプレート中に播種した。細胞を、0、0.025、0.1、又は 0.25 μ M の 4-OHT で処置した。5 日目に、培地を除去し、細胞をトリプシン

50

処理し、次いで、S y t o x R e d (A P Cチャネルにおける蛍光) 生存能力染料を加えたF A C S緩衝液中に再懸濁させた。細胞をフローサイトメーター上で泳動させ、細胞についてはF S C / S S C、生細胞についてはF S C / S y t o x R e d、単一細胞についてはF S C / F S C - W i d t h、可能な場合、トランスフェクト細胞については(トランスフェクション対照が含まれた場合) G F P +によってゲーティングした。各薬物濃度でのm C h e r r y陽性細胞の割合をプロットし、野生型E R T 2と比較し、4 - O H Tに対してより感受性である変異体を同定した。

【0340】

結果

図8A～8C、図9A～9C、及び図10A～10Cに示されるように、トランスフェクションスクリーンは、E R T 2 (配列番号3)と比較して、m C h e r r y発現の誘導が改善された変異体を同定した。第1のトランスフェクションスクリーンでは、発現誘導の改善が、変異体のうちの17個：L 3 5 4 I (S B 0 3 4 9 8)、L 3 9 1 V (S B 0 3 5 0 5)、Q 4 1 4 E (S B 0 3 3 8 3)、L 4 0 9 V (S B 0 3 3 7 5)、S 4 6 3 P (S B 0 3 3 9 3)、L 3 8 4 M (S B 0 3 3 7 7)、L 3 5 4 I + L 3 8 4 M (S B 0 3 5 1 1)、N 4 1 3 D (S B 0 3 3 8 1)、M 5 1 7 A (S B 0 3 3 7 9)、G 3 4 4 M (S B 0 3 3 7 2)、I 3 8 6 V (S B 0 3 3 7 3)、N 4 0 7 D (S B 0 3 3 8 0)、C 4 1 7 S (S B 0 3 3 7 1)、R 3 5 2 K (S B 0 3 3 8 4)、Y 5 3 7 S (S B 0 3 3 8 9)、M 3 8 8 F (S B 0 3 5 7 9)、及びG 5 2 1 A (S B 0 3 5 8 7)について観察され、発現の最大の改善が、以下の7つの変異体：L 3 5 4 I (S B 0 3 4 9 8)、L 3 9 1 V (S B 0 3 5 0 5)、Q 4 1 4 E (S B 0 3 3 8 3)、L 4 0 9 V (S B 0 3 3 7 5)、及びS 4 6 3 P (S B 0 3 3 9 3)によって誘導された(図8A～8C)。第2のトランスフェクションスクリーンでは、発現誘導の改善が、変異体のうちの10個：I 4 2 4 L (S B 0 3 5 5 8)、M 4 2 1 L (S B 0 3 5 6 6)、M 4 2 1 F (S B 0 3 5 6 7)、T 3 4 7 E (S B 0 3 8 0 1)、L 5 3 6 M (S B 0 3 8 2 8)、Y 5 3 7 E (S B 0 3 8 3 9)、T 3 4 7 I (S B 0 3 8 0 2)、及びT 3 4 7 M (S B 0 3 8 0 5)、V 4 1 8 I (S B 0 3 5 5 0)、並びにV 5 3 3 W (S B 0 3 8 3 8)について観察され、発現の強力な改善が、以下の6つの変異体：I 4 2 4 L (S B 0 3 5 5 8)、M 4 2 1 L (S B 0 3 5 6 6)、M 4 2 1 F (S B 0 3 5 6 7)、T 3 4 7 E (S B 0 3 8 0 1)、L 5 3 6 M (S B 0 3 8 2 8)、及びY 5 3 7 E (S B 0 3 8 3 9)によって誘導された(図9A～9C)。第3のトランスフェクションスクリーン(図10A～10C)では、発現誘導の改善が、表13に示される変異体について観察された。

【0341】

(表13)

10

20

30

40

50

構築物	説明
SB03771	H524L
SB03894	L354I+Q414E
SB03893	L354I+L384M+Q414E
SB03892	L391V+Q414E
SB03772	H524F
SB03882	L409V+L391V
SB03883	L409V+L354I+L384M
SB03881	L409V+S463P
SB03888	S463P+L354I
SB03884	L409V+L354I
SB03890	L391V+L354I+L384M
SB03887	S463P+L354I+L384M
SB03885	L409V+Q414E
SB03891	L391V+L354I
SB03886	S463P+L391V
SB03889	S463P+Q414E

10

20

30

40

50

【 0 3 4 2 】

実施例 3：形質導入スクリーニングによって同定された薬物感受性が増加した変異体

E R T 2 変異体を、4-O H T に応答してレポーター発現を誘導する能力について、3 つの形質導入スクリーンによって分析した。変異体 L 3 5 4 I + L 3 8 4 M (第 1 のトランスフェクションスクリーンで同定される) は、3 つ全ての形質導入スクリーンに含まれた。実施例 2 からのトランスフェクションスクリーニングにおいて 4-O H T への応答の改善を示した E R T 2 変異体をコードするレンチウイルスベクターを、クローニングした。実施例 2 に記載されるレポーター細胞株を、E R T 2 変異体をコードするレンチウイルスで形質導入し、様々な 4-O H T 濃度に応答して m C h e r r y 発現を誘導する変異体の能力を評価した。

【 0 3 4 3 】

材料及び方法

形質導入スクリーンについては、1 日目に、レポーター細胞を 1 2 ウェルプレート中に 2 e 5 細胞／ウェルで播種した。2 日目に、細胞を、トランスフェクションスクリーンからリード E R T 変異体をコードするレンチウイルスで形質導入した。3 日目及び 4 日目に、細胞を継代して、プレート上で < 9 0 % のコンフルエンスを維持した。5 日目に、細胞を 9 6 ウェルプレート中に播種し、0、0. 0 0 1、0. 0 0 2 5、0. 0 0 4、0. 0 2 5、0. 0 5、0. 1、又は 0. 2 5 u M の 4-O H T で処置した。8 日目に、培地を除去し、細胞をトリプシン処理し、次いで、S y t o x R e d (A P C チャンネルにおける蛍光) 生存能力染料を加えた F A C S 緩衝液中に再懸濁させた。細胞をフローサイトメーター上で泳動させ、細胞については F S C / S S C、生細胞については F S C / S y t o x R e d によってゲーティングし、各薬物濃度での m C h e r r y 陽性細胞の割合

をプロットし、野生型 E R T 2 と比較して、より感受性のある変異体を見出した（図 1 1 A）。薬物濃度のうちの 2 つ、0.004 及び 0.025 uM の 4-O H T での m C h e r r y 陽性細胞の割合も、棒グラフに示されている（図 1 1 B）。

【0344】

結果

図 1 1 A 及び 1 1 B に示されるように、第 1 の形質導入スクリーンは、実施例 2 からのトランスフェクションスクリーニングにおいて 4-O H T 結合の改善を有するものとして同定されたいくつかの変異体について、4-O H T 応答の改善を確認した。特に、変異体 L 3 5 4 I、L 3 9 1 V、Q 4 1 4 E、L 4 0 9 V、S 4 6 3 P、L 3 8 4 M、及び L 3 5 4 I + L 3 8 4 M は全て、野生型 E R T 2（構築物 3 4 2 2、配列番号 3）と比較して、4-O H T 応答の改善を示した。第 1 の形質導入スクリーンにおいて 4-O H T 結合の改善を示す E R T 2 変異体が、表 1 4 に示される。

10

【0345】

（表 1 4）

構築物	説明
SB03498	L354I
SB03505	L391V
SB03383	Q414E
SB03375	L409V
SB03393	S463P
SB03377	L384M
SB03511	L354I+L384M

20

30

【0346】

図 1 2 に示されるように、第 2 の形質導入スクリーニングは、実施例 2 からのトランスフェクションスクリーニングで同定された変異体について、4-O H T 応答の改善を確認した。特に、変異体 M 5 1 7 A、及び N 4 1 3 D、並びに L 3 5 4 I + L 3 8 4 M は、野生型 E R T 2（構築物 3 4 2 2）と比較して、4-O H T 応答の改善を示した。特に、L 3 5 4 I + L 3 8 4 M 変異体の 4-O H T 応答の改善は、第 1 及び第 2 の形質導入スクリーンの両方で確認された。第 2 の形質導入スクリーンにおいて 4-O H T 結合の改善を示す E R T 2 変異体が、表 1 5 に示される。

40

【0347】

（表 1 5）

50

構築物	説明
SB03379	M517A
SB03381	N413D
SB03511	L354I+L384M

10

【 0 3 4 8 】

図 1 3 に示されるように、第 3 の形質導入スクリーニングは、実施例 2 からのトランスフェクションスクリーンで同定された変異体について、4-OHT 応答の改善を確認した。特に、変異体 I 5 2 4 L、M 4 2 1 L、及び L 3 5 4 I + L 3 8 4 M は、野生型 E R T 2（構築物 3 4 2 2）と比較して、4-OHT 応答の改善を示した。第 3 の形質導入スクリーンにおいて 4-OHT 結合の改善を示す E R T 2 変異体が、表 1 6 に示される。

【 0 3 4 9 】

（表 1 6）

構築物	説明
SB03558	I524L
SB03566	M421L
SB03511	L354I+L384M

20

【 0 3 5 0 】

実施例 4：エンドキシフェン ON スイッチを開発するための E R T 2 変異体ライブラリスクリーン

材料及び方法

E R T 2 変異体組み合わせライブラリスクリーン

HEK 2 9 3 T 細胞を、各々が、その包含の論理的根拠とともに、表 1 8 に挙げられる変異体の独自の組み合わせである、約 8 0 0 個の独自の E R - L B D バリエントから構成される組み合わせ E R T 2 変異体ライブラリ（図 1 4 A）である、S B 0 4 4 0 1 で形質導入した。各細胞が細胞当たり独自の E R - L B D バリエントを有する、均質な細胞株を生成するために、形質導入 HEK 2 9 3 T 細胞のウイルス統合を、コピー数アッセイによって定量化した。細胞当たり E R T 2 変異体ライブラリの < 1 のコピーの平均ウイルス統合を有する細胞株を同定し、ピューロマイシン選択を受けた。次いで、選択された細胞株を、S B 0 1 0 6 6 m C h e r r y レポーターで形質導入した（図 1 4 B）。次いで、E R - L B D バリエントが約 0 . 1 n M ~ 最大約 1 u M ほどの低い試験濃度に対して感受性である場合に発現するであろう m C h e r r y レポーターを介して、形質導入細胞を、エンドキシフェン及び 4-OHT に対する感受性について試験した。m C h e r r y を発現し、したがって、エンドキシフェンの処置に応答する細胞を選別し、続いて、当該選別された細胞からゲノム DNA の単離を行った。E R T 2 コード配列の P C R 増幅、続いて、p c r 4 T O P O ベクター（L i f e T e c h n o l o g i e s）への P C R 産物の挿入によって、バリエントを単離ゲノム DNA から同定した。次いで、取得されたコ

40

50

ニーをサンガー配列決定のために提出した。同定された変異体を、構築物、例えば、S B 0 6 1 3 6 – S B 0 6 1 5 3 (Z F 1 0 – 1 _ p 6 5 _ E R T 2 変異体) にクローニングした。

【 0 3 5 1 】

(表 1 8)

変異	論理的根拠
L391V	セット 2:ERT2 に対する 4-OHT/エンドキシフェンの親和性を改善する、リガンド結合ポケットにおける単一点変異
L409V	セット 1:4-OHT の親和性を改善する、ER 相同体中に存在する置換に基づいて選択されるリガンド結合ポケットにおける変異、エストラジオールへの結合の増加
Q414E	セット 1:4-OHT の親和性を改善する、ER 相同体中に存在する置換に基づいて選択されるリガンド結合ポケットにおける変異
N413D	セット 1:4-OHT の親和性を改善する、ER 相同体中に存在する置換に基づいて選択されるリガンド結合ポケットにおける変異
S463P	陰性対照、臨床変異
M421L	セット 1:4-OHT の親和性を改善する、ER 相同体中に存在する置換に基づいて選択されるリガンド結合ポケットにおける変異
M517A	セット 1:ER 相同体中に存在する置換に基づいて選択されるリガンド結合ポケットにおける変異、約 1kcal/mol でエストラジオールに結合する(比較すると、4-OHT 結合は約 1.5kcal/mol だけ不利である)
L354I	セット 2:ERT2 に対する 4-OHT/エンドキシフェンの親和性を改善する、リガンド結合ポケットにおける単一点変異
L384M	セット 1:4-OHT の親和性を改善する、ER 相同体中に存在する置換に基づいて選択されるリガンド結合ポケットにおける変異
H524L	セット 5:リガンド結合ポケットにおける MD シミュレーションに焦点を当てた、4-OHT 及びエンドキシフェンへの結合を改善するための ERT2 の合理的な最適化

10

20

30

【 0 3 5 2 】

mCherry レポーターを用いた U 8 7 M G における E R T 2 変異体検証

形質導入の約 1 6 時間前に、1 0 0 k の U 8 7 M G : 1 0 6 6 細胞を 1 2 ウェルプレートフォーマットにおける 1 6 個のウェル中に播種した。形質導入中、各ウェル内の細胞を、E R T 2 バリエーション構築物の 1 0 0 k p g のウイルスで形質導入した。形質導入後、細胞を、2 4 ウェルプレートフォーマットにおけるウェル当たり 5 0 k の細胞に分割し、薬物を含まない培地、又は一連のエンドキシフェン若しくは 4 – O H T 薬物条件で処置した。エンドキシフェン又は 4 – O H T を用いた細胞の処置から約 2 日後に、細胞を収集し、mCherry レポーター発現をフローサイトメトリーによって定量化した。

40

【 0 3 5 3 】

結果

E R T 2 変異体ライブラリのスクリーニングが、1 n M においてエンドキシフェンに感受性があった E R T 2 変異体のサブセットを同定した。このサブセットのうち、1 5 個のバリエーション (表 1 9) を、0 p M、1 0 p M、5 0 p M、1 0 0 p M、及び 1 n M のエンドキシフェン (図 1 5 A) 及び 4 – O H T (図 1 5 B) の一連の濃度において mCherry レポーター (S B 0 1 0 6 6、図 1 4 B) を活性化する能力について、U 8 7 M G 細胞で検証した。mCherry の発現を、エンドキシフェン又は 4 – O H T を用いた処置から約 2 4 時間後に定量化した。実証されるように、1 5 個全てのバリエーションが、約 1 n

50

M以下の濃度におけるエンドキシフェン及び4-OHTに感受性があった一方で、陰性対照U87MG及びU87MG:1066陰性対照は、感受性を示さなかった。

【0354】

(表19)

構築物	説明
SB06136	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 81
SB06138	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 93
SB06139	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 86
SB06140	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 95
SB06141	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 88
SB06142	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 77
SB06143	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 49
SB06144	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 58
SB06145	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 62
SB06146	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 63
SB06147	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 55
SB06149	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 41
SB06150	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 43
SB06151	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 46
SB06152	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 40

10

20

【0355】

以前のスクリーンからの選択ERT2バリエーション(表20)を、野生型ERT2と比較して、エンドキシフェン及び4-OHTに対する感受性について更に試験した。試験は、野生型ERT2の活性化が、約25nMのエンドキシフェン及び約25nMの4-OHTにおいて始まる一方で、試験された3つのERT2バリエーションは、1nM及び0.1nMのエンドキシフェン、並びに1nM及び0.1nMの4-OHTにおいてmCherry発現を活性化することを示した(図16A~16D)。例示的なヒートマップは、2.2pMのエストラジオールを含む様々な濃度で試験された構築物のmCherry発現の活性化倍率を示す(図16B)。ERT2は、エストラジオールに対して非感受性であるように変異されたER-アルファであり、リードERT2バリエーションは、生物学的に観察される濃度のエストラジオールに対して非感受性であり続けることが確認された。各試験条件のgMFI mCherryレベルを、レポーター(SB01066)で形質導入されたU87MG細胞のgMFI mCherryレベルで割ることによって、活性化倍率を計算した。

30

【0356】

(表20)

構築物	説明
SB06141	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 88
SB06146	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 63
SB06149	ZF10-1_p65_ERT2 変異体 41
SB03422	ZF10-1_p65_ERT2 野生型
SB01066	pMinYBTATA:mCherry レポーター

40

【0357】

実施例5：NK細胞におけるERT2変異体の検証

材料及び方法

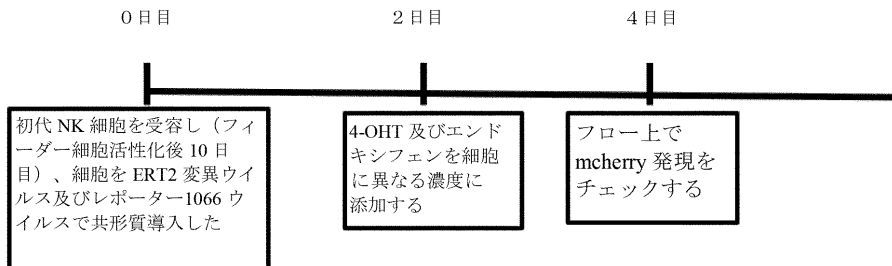
NK細胞におけるmCherryレポーターを用いたERT2変異体の検証

50

10日間のフィーダー細胞活性化後に、NK細胞をERT2変異ウイルス及びレポーターSB01066ウイルスで共形質導入した（実験設定1）。形質導入後2日目に、形質導入NK細胞を、0nM、0.01nM、0.1nM、1nM、及び10nMの一連の濃度におけるエンドキシフェン又は4-OHTで処置した。4日目に、細胞を、フローサイトメトリーによってmCherry発現についてチェックした。

【0358】

実験設定1



10

【0359】

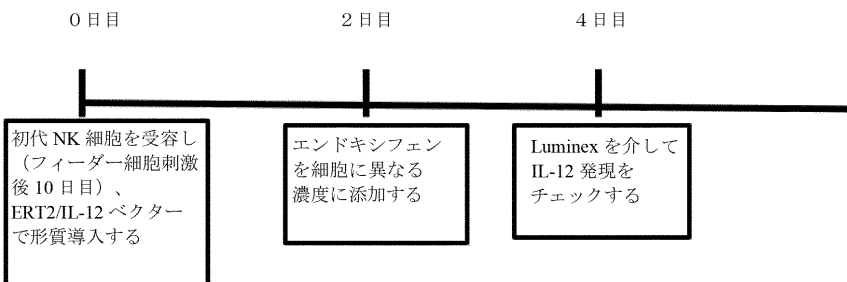
NK細胞におけるIL12レポーターを用いたERT2変異体の検証

10日間のフィーダー細胞活性化後に、NK細胞をERT2/IL12ベクターで形質導入した（表22、実験設定2）。形質導入後2日目に、形質導入NK細胞を、0nM、0.1nM、1nM、10nM、100nM、及び1000nMの一連の濃度におけるエンドキシフェンで処置した。4日目に、細胞を、Luminexを介してIL-12発現についてチェックした。

20

【0360】

実験設定2



30

【0361】

結果

以前のスクリーンからの選択ERT2バリエーション（表21、図17A～17B）を、初代NK細胞におけるエンドキシフェン及び4-OHTに対する感受性について更に試験した。試験された変異体のうち、SB06142（変異体77、L354I/L391V/N413D/M421L/S463P/M517A/H524L）、SB06136（変異体81、L384M/L391V/N413D/M421L/S463P/H524L）、及びSB06145（変異体62、L409V/N413D/Q414E/M421L/S463P/H524L）は、0.1nMの濃度におけるエンドキシフェン及び4-OHTの両方に対して感受性があった（図17A～17B）。

40

【0362】

（表21）

50

構築物	説明
SB06136	ZF10-1_p65_ERT2_変異体 81
SB06138	ZF10-1_p65_ERT2_変異体 93
SB06139	ZF10-1_p65_ERT2_変異体 86
SB06140	ZF10-1_p65_ERT2_変異体 95
SB06141	ZF10-1_p65_ERT2_変異体 88
SB06142	ZF10-1_p65_ERT2_変異体 77
SB06143	ZF10-1_p65_ERT2_変異体 49
SB06144	ZF10-1_p65_ERT2_変異体 58
SB06145	ZF10-1_p65_ERT2_変異体 62
SB06146	ZF10-1_p65_ERT2_変異体 63
SB06147	ZF10-1_p65_ERT2_変異体 55
SB06149	ZF10-1_p65_ERT2_変異体 41
SB06150	ZF10-1_p65_ERT2_変異体 43
SB06151	ZF10-1_p65_ERT2_変異体 46
SB06152	ZF10-1_p65_ERT2_変異体 40

10

【 0 3 6 3 】

治療用ポリペプチドの送達を実証するために、ERT2／IL-12ベクターを表22に示されるように構築し、初代NK細胞におけるエンドキシフェンに対する感受性について試験した。NK細胞におけるERT2／IL-12ベクターの試験は、TL10009が、SB06142及びcrIL12 CD16 CSからのERT2-L354I／L391V／N413D／S463P／H524Lとともに、IL-12において最良の誘導及び倍率変化を示すことを示した（図18A～18B）。

20

【 0 3 6 4 】

(表22)

30

40

50

TL 番号	SB 番号	誘導性 IL-12 (4x ZF5BS YBTATA に よって駆動さ れる)	インス レータ ー	プロモー ター:ZF	ZF DNA 結合ド メイン	活性化 因子	ERT2 変 異体
TL10006	SB07123	ZFN_YB- TATA-sIL-12 1x AUSLDE	A2	SFFV:5-7	ZF5-7	P65	変異体 81
TL10007	SB07127	ZFN_YB- TATA IL12_CD16 TACE 切断部 位_B7-1 TM	A2	SV40:5-7	ZF5-7	P65	変異体 81
TL10008	SB07129	ZFN_YB- TATA-sIL-12 1x AUSLDE	A2	SFFV:5-7	ZF5-7	P65	変異体 77
TL10009	SB07133	ZFN_YB- TATA IL12_CD16 TACE 切断部 位_B7-1 TM	A2	SV40:5-7	ZF5-7	P65	変異体 77
TL10010	SB07135	ZFN_YB- TATA-sIL-12 1x AUSLDE	A2	SFFV 5-7	ZF5-7	P65	変異体 62
TL10011	SB07139	ZFN_YB- TATA IL12_CD16 TACE 切断部 位_B7-1 TM	A2	SV40:5-7	ZF5-7	P65	変異体 62

10

20

【 0 3 6 5 】

(表 1 7) 配列

30

40

50

名称	配列 番号	配列
エストロゲン受容体 (アミノ酸配列)	1	MTMTLHTKASGMALLHQIQGNELEPLNRPQLKIPLERPLGEVY LDSSKPAVYNYPEGAAYEFNAAAAANAQVYGGTGLPYGPGS EAAAFGSNGLGGFPPLNSVSPSPLMLLHPPPQLSPFLQPHGQQ VPYYLENESGYTVREAGPPAFYRPNSDNRRQGGRRERLASTN DKGSMAMESAKETRYCAVCNDYASGYHYGVWSCGCKAFF KRSIQGHNDYMCPATNQCTIDKNRRKSCQACRLRKCYEVGM MKGGIRKDRRGGRMLKHKRQRDDGEGRGEVGSAGDMRAAN LWPSPLMIKRSKKNLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDP TRPFSEASMMGLLTNLADREL VHMINWAKRVP GFVDLTLHD QVHLLCAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLLDRNQGK CVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLKSIILLNSGVY TFLSSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKAGLTLQQQH RLAQLLLILSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNVVPLYDLLLEML DAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHSLQKYYITGE AEGFPATV
例示的 ERT2	2	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLALSLTADQMVSALLDA EPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADREL VHMINWAKRVP GFVDLTLHDQVHLLCAWLEILMIGLVWRSMEHPVKLLFAPN LLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLK SIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKAG LTLQQQHQRRLAQLLLILSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNVVPL YDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHSL QKYYITGEAEGFPATV
例示的 ERT2	3	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLALSLTADQMVSALLDA EPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADREL VHMINWAKRVP GFVDLTLHDQVHLLCAWLEILMIGLVWRSMEHPVKLLFAPN LLLDRNQGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLK SIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKAG LTLQQQHQRRLAQLLLILSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNVVPL YDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHSL QKYYITGEAEGFPATA
ペプチドリンカー	4	GGGGSGGGSGGGGSVDGF
ペプチドリンカー	5	ASGGGGSAS
ジンクフィンガータン	6	SRPGERPFQCRICMRNFSRRHGLDRHTRTHTGEKPFQCRICMR NFS DHSSLKRHLRTHTGSKPFQCRICMRNFSVRHNLTRHLRT HTGEKPFQCRICMRNFS DHSNLSRHLKTHTGSKPFQCRICMR

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
バク質ドメイン ZF10-1		NFSQRSSLVRHLRTHHTGEKPFQCRICMRNFSESGHLKRHLRTHLRGS
最小プロモーター;minP	7	AGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAG
NFκB 応答 エレメント タンパク質 プロモーター; 5x NFκB-RE	8	GGGAATTTCCGGGGACTTTCCGGGAATTTCCGGGGACTTTC CGGGAATTTCC
CREB 応答 エレメント タンパク質 プロモーター; 4x CRE	9	CACCAGACAGTGACGTGACGTGCCAGATCCCATGGCCGTCA TACTGTGACGTCTTTCAGACACCCATTGACGTCAATGGGA GAA
NFAT 応答 エレメント タンパク質 プロモーター; 3x NFAT 結合部位	10	GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAA CTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATAC AGAAGGCGT
SRF 応答エレメント タンパク質プロモーター; 5x SRE	11	AGGATGTCCATATTAGGACATCTAGGATGTCCATATTAGGA CATCTAGGATGTCCATATTAGGACATCTAGGATGTCCATAT TAGGACATCTAGGATGTCCATATTAGGACATCT
SRF 応答エレメント タンパク質プロモーター 2;5x SRF-RE	12	AGTATGTCCATATTAGGACATCTACCATGTCCATATTAGGA CATCTACTATGTCCATATTAGGACATCTTGTATGTCCATATT AGGACATCTAAAATGTCCATATTAGGACATCT
API 応答エレメント タンパク質プロモーター; 6x API-RE	13	TGAGTCAGTGACTCAGTGAGTCAGTGACTCAGTGAGTCAGT GACTCAG
TCF-LEF 応答エレメント タンパク質プロモーター; 8x TCF-LEF-RE	14	AGATCAAAGGGTTTAAGATCAAAGGGCTTAAGATCAAAGG GTATAAGATCAAAGGGCCTAAGATCAAAGGGACTAAGATC AAAGGGTTTAAGATCAAAGGGCTTAAGATCAAAGGGCCTA
SBE _{x4}	15	GTCTAGACGTCTAGACGTCTAGACGTCTAGAC

10

20

30

40

50

名称	配列番号	配列
SMAD2/3-CAGACA x4	16	CAGACACAGACACAGACACAGACA
STAT3 結合 部位	17	GGATCCGGTACTCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCA TTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCAC
CMV	18	GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTA CGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTT ACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAA CGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCA TAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTG GAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG GTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTA TGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC GCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGG GCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCC ACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGCACCAAAAT CAACGGGACTTTCAAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATT GACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTAT ATAAGCAGAGCTC
EFla	19	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCAC AGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACC GGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTG ATGCCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGA GAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTT TCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGT GTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTT GCGTGCCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATT CTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTC GAGGCCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTCGCCTCGTGCTTGAG TTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATC TGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCT CTAGCCATTTAAAAATTTTGTATGACCTGCTGCGACGCTTTT TTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCA CACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGG CCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTG CGAGCGCGACCAACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAG CTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCTGTCTCGCGCCGCCGTGT ATCGCCCCGCCCCGGGCGCAAGGCTGGCCCCGTGCGCAC CAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGTCTGCT GCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGC GGCGGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCC GTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGG CGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGAGT ACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGA GTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAG CTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTGT AGTTTGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTC AAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGA
EFS	20	GGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGC ACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCG

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
		GCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAA CTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCG AGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGT GAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGC TGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCCTTCACGCGCCCGC CGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGT TCTGCCGCCTCCCGCCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGC CGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCGAGACCGGGCCTTT GTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTC TCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTT GTTTCGTTTTCTGTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGA CCGGCGCCTAC
MND	21	TTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGAATGAAAGACCCC ACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGGATCAAGGTTAGGAACAG AGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTA AGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAA CAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAG TTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGA TGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATG TTTCCAGGGTGGCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTT ATTTGAACTAACCAATCAGTTCGTTCTCGCTTCTGTTTCGCG CGTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCA
PGK	22	GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTTTG CGCAGGGACGCGGTGCTCTGGGCGTGGTTCCGGGAAACG CAGCGGCGCCGACCCTGGGTCTCGCACATTCTTCACGTCCG TTCGACGCTCACCCGGATCTTCGCCGCTACCTTGTGGGC CCCCCGCGACGCTTCTGCTCCGCCCTAAGTCGGGAAGG TTCCTTGCGGTTGCGGCGGTGCCGGACGTGACAAACGGAAG CCGCACGTCTCACTAGTACCCTCGCAGACGGACAGCGCCAG GGAGCAATGGCAGCGCGCCGACCGCGATGGGCTGTGGCCA ATAGCGGCTGCTCAGCGGGGCGCGCCGAGAGCAGCGGCCG GGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGTGGGGCGGTAGTG TGGGCCCTGTTCTGCCCCGCGCGGTGTTCCGCATTCTGCAA GCCTCCGAGCGCACGTGCGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACC GAATCACCGACCTCTCTCCCCAG
SFFV	23	GTAACGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACCAAACCAA GAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGGCGGGTACATGAAAATA GCTAACGTTGGGCCAAACAGGATATCTGCGGTGAGCAGTTT CGGCCCCGGCCCCGGGCCAAGAACAGATGGTCACCGCAGT TTCGGCCCCGGCCCCGAGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGA TATGGCCCCAACCTCAGCAGTTTCTTAAGACCCATCAGATG TTTCCAGGCTCCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGCGCCTT ATTTGAATTAACCAATCAGCCTGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCG CGTTCTGCTTCCCGAGCTCTATAAAAGAGCTCACAACCCC TCACTCGGCGCGCCAGTCCTCCGACAGACTGAGTCGCCCCG G
SV40	24	CTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGG CTCCCCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATT AGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGC AGGCAGAAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCA ACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAAC

10

20

30

40

50

名称	配列番号	配列
		TCCGCCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAAT TTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGA GCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAG GCTTTTGCAAAAAGCT
UbC	25	GCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCTCCTCA CGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGCGCAGGAGCGT TCCTGATCCTTCCGCCCCGACGCTCAGGACAGCGGCCCGCT GCTCATAAGACTCGGCCTTAGAACCCAGTATCAGCAGAAG GACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACTCTAGGGCACTGGT TTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTAGTCC CTTCTCGGCGATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGGGGCGGTGA ACGCCGATGATTATATAAGGACGCGCCGGGTGTGGCACAG CTAGTTCCGTGCGCAGCCGGGATTTGGGTGCGGGTCTTGTTT GTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGGTGAGTTGCGGGCTGCT GGGCTGGCCGGGGCTTTCGTGGCCGCCGGGCCGCTCGGTGG GACGGAAGCGTGTGGAGAGACCGCCAAGGGCTGTAGTCTG GGTCCGCGAGCAAGGTTGCCCTGAACTGGGGGTTGGGGGG AGCGCACAAAATGGCGGCTGTTCCCGAGTCTTGAATGGAA GACGCTTGTAAGGCGGGCTGTGAGGTCGTTGAAACAAGGT GGGGGGCATGGTGGGCGGCAAGAACCCAAGGTCTTGAGGC CTTCGCTAATGCGGGAAAGCTCTTATTCGGGTGAGATGGGC TGGGGCACCATCTGGGGACCCTGACGTGAAGTTTGTCACTG ACTGGAGAACTCGGGTTTGTCTGTCTGGTTGCGGGGGCGGCA GTTATGCGGTGCCGTTGGGCAGTGCACCCGTACCTTTGGGA GCGCGCGCCTCGTCTGTCTGTGACGTCACCCGTTCTGTTGG CTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCGGTAGGTGTGCGG TAGGCCTTTCTCCGTGCGCAGGACGACGGGTTTCGGGCCTAGG GTAGGCTCTCCTGAATCGACAGGCGCCGACCTCTGGTGAG GGGAGGGATAAGTGAGGCGTCAGTTTCTTTGGTCGGTTTTTA TGTACCTATCTTCTTAAGTAGCTGAAGCTCCGGTTTTGAACT ATGCGCTCGGGGTTGGCGAGTGTGTTTTGTGAAGTTTTTTA GGCACCTTTTGAAATGTAATCATTTGGGTCAATATGTAATTT TCAGTGTTAGACTAGTAAAGCTTCTGCAGGTCGACTCTAGA AAATTGTCCGCTAAATTCTGGCCGTTTTTTGGCTTTTTTGTTA GAC
hEF1aV1	26	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCAC AGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACC GGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTG ATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGA GAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTT TCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGT GTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTT GCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATT CTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTC GAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAG TTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATC TGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCT CTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTT TTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCA CACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCCGGGCGGGCGACGGGG CCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGCAGGCGGGGCTG

10

20

30

40

名称	配列 番号	配列
		CGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAG CTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCCTGGTCTCGCGCCGCCGTGT ATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACC AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTG CAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCG GGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCG TCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGC GCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTA CGTCGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAG TTTCCCACTGAGTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGC TTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTGA GTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCA AAGTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA
hCAGG	27	ACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTCA TAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAA ATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTG ACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAA CTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGT ACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTG GCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTG GCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCG AGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCC CCTCCCCACCCCAATTTGTATTTATTTATTTTAAATTATT TTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCG CCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCG AGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGC TCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGCGG CCCTATAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGGAGTTCGT GCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCT CGCGCCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCA CAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAA TTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCT GCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCG GGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGT GGGGAGCGCCGCTGCGGCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGT GAGCGCTGCGGGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCA GTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGCGGTGCCCCGCG GTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGG GGTGTGTGCGTGGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGGCGCGT CGGTCGGGCTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTT GCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGG GGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCG GCAGGTGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCC GGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGGGCGGGCCCCCGGAGCG CCGGCGGTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTT TTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTC CCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCG ACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCG GCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCCG GCGCCGCCGTCCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTC GCGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGACGGGGCAGGGCG

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
		GGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTC TGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCTACAGCTCCT GGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCA AAGAATTC
hEF1aV2	28	GGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG GGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGG CGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCG CCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAG TAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCC AGAACACAG
hACTb	29	CCACTAGTTCATGTCCTTATATGGACTCATCTTTGCCATT GCGACACACACTCAATGAACACCTACTACGCGCTGCAAAG AGCCCCGCAGGCCTGAGGTGCCCCACCTCACCCTCTTCC TATTTTGTGTAAAAATCCAGCTTCTTGTACCCACCTCCAAG GAGGGGGAGGAGGAGGAAGGCAGGTTCTCTAGGCTGAGC CGAATGCCCCCTCTGTGGTCCACGCCACTGATCGCTGCATG CCCACCACCTGGGTACACACAGTCTGTGATTCCCGGAGCAG AACGGACCCTGCCACCCGGTCTTGTGTGCTACTCAGTGGA CAGACCCAAGGCAAGAAAGGGTGACAAGGACAGGGTCTTC CCAGGCTGGCTTTGAGTTCCTAGCACCGCCCCGCCCCAAT CCTCTGTGGCACATGGAGTCTTGGTCCCCAGAGTCCCCCAG CGGCCTCCAGATGGTCTGGGAGGGCAGTTCAGCTGTGGCTG CGCATAGCAGACATACAACGGACGGTGGGCCAGACCCAG GCTGTGTAGACCCAGCCCCCCCCGCCCGCAGTGCCTAGGTC ACCCACTAACGCCCCAGGCCTGGTCTTGGCTGGGCGTGACT GTTACCCTCAAAAGCAGGCAGCTCCAGGGTAAAAGGTGCC CTGCCCTGTAGAGCCACCTTCCTTCCCAGGGCTGCGGCTG GGTAGGTTTGTAGCCTTCATCACGGGCCACCTCCAGCCACT GGACCGCTGGCCCCCTGCCCTGTCCTGGGGAGTGTGGTCTG CGACTTCTAAGTGGCCGCAAGCCACCTGACTCCCCAACAC CACACTCTACCTCTCAAGCCAGGTCTCTCCCTAGTGACCC ACCCAGCACATTTAGCTAGCTGAGCCCCACAGCCAGAGGTC CTCAGGCCCTGCTTTCAGGGCAGTTGCTCTGAAGTCGGCAA GGGGGAGTGACTGCCTGGCCACTCCATGCCCTCCAAGAGCT CCTTCTGCAGGAGCGTACAGAACCCAGGGCCCTGGCACCCG TGCAGACCCTGGCCACCCACCTGGGCGCTCAGTGCCCAA GAGATGTCCACACCTAGGATGTCCCGCGGTGGGTGGGGGG CCCGAGAGACGGGCAGGCCGGGGGCAGGCCTGGCCATGCG GGGCCGAACCGGGCACTGCCAGCGTGGGGCGCGGGGGCC ACGGCGCGCGCCCCAGCCCCCGGGCCAGCACCCCAAGG CGGCCAACGCCAAAACCTCTCCCTCCTCCTCTCCTCAATCTC GCTCTCGCTCTTTTTTTTTTTCGAAAAGGAGGGGAGAGGG GGTAAAAAATGCTGCACTGTGCGGCGAAGCCGGTGAGTG AGCGGCGCGGGGCAATCAGCGTGCGCCGTTCCGAAAGTT GCCTTTTATGGCTCGAGCGGCCGCGGCGGCCCTATAAAA CCCAGCGGCGCGACGCGCCACCACCGCCGAGACCGCGTCC GCCCCGCGAGCACAGAGCCTCGCCTTTGCCGATCCGCCGCC CGTCCACACCCGCCGCCAGGTAAGCCCGGCCAGCCGACCG GGGCAGGCGGCTCACGGCCCCGCCGAGGCGGCCGCGGCC CCTTCGCCCCGTGCAGAGCCGCCGTCTGGGCCGCGAGCGGGG CGCATGGGGGGGAACCGGACCGCCGTGGGGGGCGCGGG

10

20

30

40

名称	配列 番号	配列
		AGAAGCCCCTGGGCCTCCGGAGATGGGGGACACCCACGC CAGTTCGGAGGCGCGAGGCCGCGCTCGGGAGGCGCGCTCC GGGGGTGCCGCTCTCGGGGCGGGGCAACCGGCGGGGTCT TTGTCTGAGCCGGGCTCTTGCCAATGGGGATCGCAGGGTGG GCGCGGCGGAGCCCCGCCAGGCCCGGTGGGGGCTGGGGC GCCATTGCGCGTGCGCGCTGGTCTTTGGGCGCTAACTGCG TGC GCGCTGGGAATTGGCGCTAATTGCGCGTGCGCGCTGGG ACTCAAGGCGCTAACTGCGCGTGCGTTCTGGGGCCCGGGT GCCGCGGCTGGGCTGGGGCGAAGGCGGGCTCGGCCGAA GGGGTGGGGTCGCCGCGGCTCCCGGGCGCTTGCGCGCACTT CCTGCCCCGAGCCGCTGGCCGCCCGAGGGTGTGGCCGCTGCG TGC GCGCGCGCCGACCCGCGCTGTTTGAACCGGGCGGAG GCGGGGCTGGCGCCCGGTTGGGAGGGGGTGGGGCCTGGC TTCTTGCCGCGCGCCGCGGGGACGCCTCCGACCAAGTGTG CCTTTTATGGTAATAACGCGGCCGGCCCGGCTTCCTTTGTCC CCAATCTGGGCGCGCGCCGCGCCCCCTGGCGGCCAAGG ACTCGGCGCGCCGGAAGTGGCCAGGGCGGGGGCGACCTCG GCTCACAGCGCGCCCGGCTAT
heIF4A1	30	GTTGATTTCCTTCATCCCTGGCACACGTCCAGGCAGTGTG AATCCATCTCTGCTACAGGGGAAAACAAATAACATTTGAGT CCAGTGGAGACCGGGAGCAGAAGTAAAGGGAAGTGATAAC CCCCAGAGCCCGGAAGCCTCTGGAGGCTGAGACCTCGCCCC CCTTGCGTGATAGGGCCTACGGAGCCACATGACCAAGGCA CTGTGCGCTCCGCACGTGTGAGAGTGCAGGGCCCCAAGATG GCTGCCAGGCCTCGAGGCCTGACTCTTCTATGTCACTTCCGT ACCGGCGAGAAAGGCGGGCCCTCCAGCCAATGAGGCTGCG GGGCGGGCCTTCACCTTGATAGGCACTCGAGTTATCCAATG GTGCTGCGGGCCGGAGCGACTAGGAACTAACGTCATGCC GAGTTGCTGAGCGCCGGCAGGCGGGGCCGGGGCGGCCAAA CCAATGCGATGGCCGGGGCGGAGTCGGGCGCTCTATAAGTT GTCGATAGGCGGGCACTCCGCCCTAGTTTCTAAGGACCATG
hGAPDH	31	AGTTCCCCAACTTTCCCGCTCTCAGCCTTTGAAAGAAAGA AAGGGGAGGGGGCAGGCCGCGTGCACTCGCGAGCGGTGCT GGGCTCCGGCTCCAATTCCCCATCTCAGTCGCTCCCAAAGT CCTTCTGTTTCATCCAAGCGTGTAAGGGTCCCGTCCTTGAC TCCCTAGTGTCTGCTGCCCACAGTCCAGTCCCTGGGAACCA GCACCGATCACCTCCCATCGGGCCAATCTCAGTCCCTTCCC CCCTACGTGCGGGGCCACACGCTCGGTGCGTGCCAGTTGA ACCAGGCGGCTGCGGAAAAAAAAAAGCGGGGAGAAAGTA GGGCCCGGCTACTAGCGGTTTACGGGCGCACGTAGCTCAG GCCTCAAGACCTTGGGCTGGGACTGGCTGAGCCTGGCGGG AGGCGGGGTCCGAGTCACCGCCTGCCGCCGCGCCCCCGGTT TCTATAAATTGAGCCCGCAGCCTCCCGCTTCGCTCTCTGCTC CTCTGTTCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTTTTCGCTCGCCAG GTGAAGACGGGCGGAGAGAAACCGGGAGGCTAGGGACG GCCTGAAGGCGGCAGGGGCGGGCGCAGGCCGGATGTGTTC GCGCCGCTGCGGGGTGGGCCCCGGGCGGCTCCGCATTGCA GGGGCGGGCGGAGGACGTGATGCGGCGCGGGCTGGGCATG GAGGCCTGGTGGGGGAGGGGAGGGGAGGCGTGGGTGTGCG CCGGGGCCACTAGGCGCTACTGTTCTCTCCCTCCGCGCAG CCGAGCCACATCGCTGAGACAC

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
hGRP78	32	AGTGC GGTTACCAGCGGAAATGCCTCGGGGTCAGAAGTCG CAGGAGAGATAGACAGCTGCTGAACCAATGGGACCAGCGG ATGGGGCGGATGTTATCTACCATTGGTGAACGTTAGAAACG AATAGCAGCCAATGAATCAGCTGGGGGGGCGGAGCAGTGA CGTTTATTGCGGAGGGGGCCGCTTCGAATCGGCGGCGGCCA GCTTGGTGGCCTGGGCCAATGAACGGCCTCCAACGAGCAG GGCCTTCACCAATCGGCGGCCTCCACGACGGGGCTGGGGG AGGGTATATAAGCCGAGTAGGCGACGGTGAGGTCGACGCC GGCCAAGACAGCACAGACAGATTGACCTATTGGGGTGTTTC GCGAGTGTGAGAGGGAAGCGCCGCGGCCTGTATTTCTAGA CCTGCCCTTCGCCTGGTTCGTGGCGCCTTGTGACCCCGGGC CCCTGCCGCTGCAAGTCGGAATTGCGCTGTGCTCCTGTG CTACGGCCTGTGGCTGGACTGCCTGCTGCTGCCCAACTGGC TGGCAC
hGRP94	33	TAGTTTCATCACCACCGCCACCCCCCGCCCCCGCCATCT GAAAGGGTTCTAGGGGATTTGCAACCTCTCTCGTGTGTTTC TTCTTTCCGAGAAGCGCCGCCACACGAGAAAAGCTGGCCGCG AAAGTCGTGCTGGAATCACTTCCAACGAAACCCAGGCATA GATGGGAAAGGGTGAAGAACACGTTGCCATGGCTACCGTT TCCCCGGTCACGGAATAAACGCTCTCTAGGATCCGGAAGTA GTTCCGCGCGACCTCTCTAAAAGGATGGATGTGTTCTCTG CTTACATTCAATTGGACGTTTTCCCTTAGAGGCCAAGGCCGC CCAGGCAAAGGGGCGGTCCCACGCGTGAGGGGGCCCGCGGA GCCATTTGATTGGAGAAAAGCTGCAAACCTGACCAATCGG AAGGAGCCACGCTTCGGGCATCGGTCACCGCACCTGGACA GCTCCGATTGGTGGAATTCCGCCCCCCTCACGAATCCTCA TTGGGTGCCGTGGGTGCGTGGTGCGGCGCGATTGGTGGGTT CATGTTTCCCGTCCCCCGCCGCGAGAAGTGGGGGTGAAAA GCGGCCCCGACCTGCTTGGGGTGTAGTGGGCGGACCGCGCG GCTGGAGGTGTGAGGATCCGAACCCAGGGGTGGGGGGTGG AGGCGGCTCCTGCGATCGAAGGGGACTTGAGACTCACCGG CCGCACGTC
hHSP70	34	GGGCCGCCCCTCCCCCTTCTCTCAGGGTCCCTGTCCCCTC CAGTGAATCCCAGAAGACTCTGGAGAGTTCTGAGCAGGGG GCGGCACTCTGGCCTCTGATTGGTCCAAGGAAGGCTGGGGG GCAGGACGGGAGGCGAAAACCTGGAATATTCCCGACCTG GCAGCCTCATCGAGCTCGGTGATTGGCTCAGAAGGGAAAA GGCGGGTCTCCGTGACGACTTATAAAAGCCCAGGGGCAAG CGGTCCGATAACGGCTAGCCTGAGGAGCTGCTGCGACAG TCCACTACCTTTTCGAGAGTGACTCCCGTTGTCCCAAGGCT TCCAGAGCGAACCTGTGCGGCTGCAGGCACCGGCGCGTC GAGTTTCCGGCGTCCGGAAGGACCGAGCTCTTCTCGCGGAT CCAGTGTTCGTTTCCAGCCCCCAATCTCAGAGCGGAGCCG ACAGAGAGCAGGGAACCC
hKINb	35	GCCCCACCCCGTCCGCGTTACAACCGGGAGGCCCGCTGGG TCCTGCACCGTCACCCTCCTCCCTGTGACCGCCACCTGATA CCCAAACAACCTTCTCGCCCCCTCCAGTCCCCAGCTCGCCGA GCGCTTGCGGGGAGCCACCCAGCCTCAGTTTCCCCAGCCCC GGGCGGGGCGAGGGGCGATGACGTCATGCCGGCGCGCGGC ATTGTGGGGCGGGGCGAGGCGGGGCGCCGGGGGGAGCAAC ACTGAGACGCCATTTTCGGCGGCGGGAGCGGCGCAGGCGG

10

20

30

40

50

名称	配列番号	配列
		CCGAGCGGGACTGGCTGGGTCGGCTGGGCTGCTGGTGCGA GGAGCCGCGGGGCTGTGCTCGGCGGCCAAGGGGACAGCGC GTGGGTGGCCGAGGATGCTGCGGGGCGGTAGCTCCGGCGC CCCTCGCTGGTGAAGTGTGCGCCGTGCCTCACACAGCCGAG GCGGGCTCGGCGCACAGTCGCTGCTCCGCGCTCGCGCCCG CGGCGCTCCAGGTGCTGACAGCGCGAGAGAGCGCGGCCCTC AGGAGCAACAC
hUBIb	36	TTCCAGAGCTTTCGAGGAAGGTTTCTTCAACTCAAATTCAT CCGCCTGATAATTTTCTTATATTTTCCTAAAGAAGGAAGAG AAGCGCATAGAGGAGAAGGGAAATAATTTTATAGGAGCCT TTCTTACGGCTATGAGGAATTTGGGGCTCAGTTGAAAAGCC TAACTGCCTCTCGGGAGGTTGGGCGCGGCGAACTACTTTC AGCGGCGCACGAGACGGCGTCTACGTGAGGGGTGATAAG TGACGCAACACTCGTTGCATAAATTTGCGCTCCGCCAGCCC GGAGCATTTAGGGGCGGTTGGCTTTGTTGGGTGAGCTTGTT TGTGTCCCTGTGGGTGGACGTGGTTGGTGATTGGCAGGATC CTGGTATCCGCTAACAGGTACTGGCCACAGCCGTAAAGAC CTGCGGGGCGGTGAGAGGGGGGAATGGGTGAGGTCAAGCT GGAGGCTTCTTGGGGTTGGGTGGGCCGCTGAGGGGAGGGG AGGGCGAGGTGACGCGACACCCGGCCTTTCTGGGAGAGTG GGCCTTGTGACCTAAGGGGGGCGAGGGCAGTTGGCACGC GCACGCGCCGACAGAACTAACAGACATTAACCAACAGCG ATCCGTCGCGTTTACTTGGGAGGAAGGCGGAAAAGAGGT AGTTTGTGTGGCTTCTGGAACCCCTAAATTTGGAATCCCAG TATGAGAATGGTGTCCCTTCTTGTGTTTCAATGGGATTTTA CTTCGCGAGTCTTGTGGGTTTGGTTTGTGTTTTCAGTTTGCCT AACACCGTGCTTAGGTTTGAAGGCAGATTGGAGTTTCGGTCGG GGGAGTTTGAATATCCGGAACAGTTAGTGGGGAAAGCTGT GGACGCTTGGTAAGAGAGCGCTCTGGATTTTCCGCTGTTGA CGTTGAAACCTTGAATGACGAATTCGTATTAAGTGACTTA GCCTTGTAATAATTGAGGGGAGGCTTGCGGAATATTAACGTA TTTAAGGCATTTTGAAGGAATAGTTGCTAATTTTGAAGAAT ATTAGGTGTAATAAGCAAGAAATACAATGATCCTGAGGTGA CACGCTTATGTTTTACTTTTAACTAGGTCACC
ZF 結合部 位	37	cgggtttcgaacaatcgatgaggattcgcaacgccttcGGCGTAGCCGATGTGCG CGctcccgctcagtaaaggtcGGCGTAGCCGATGTGCGCGaatcggaactgcct tcgtacGGCGTAGCCGATGTGCGCGcgtatcagtcgctcggaacGGCGTAG CCGATGTGCGCGcattcgtaagaggctcactctcccttacacggagtgataACTAGT TCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCA
例示的な WPRE	38	TCTGTTCCGTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAA AGATTGACTGATATTCTTAAGTATGTTGCTCCTTTTACGCTG TGTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCTGTATCATGCTATTGCT TCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGG TTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAA CGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGTGACGCAACCCCCAC TGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGA CTTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCG CCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTG GGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTC CTTTCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCAACTGGATCCTGCG CGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCTCTCAATCCAGC

10

20

30

40

50

名称	配列番号	配列
		GGACCTCCCTTCCCGAGGCCTTCTGCCGGTTCTGCGGCCTCT CCCGCGTCTTCGCTTTCGGCCTCCGACGAGTCGGATCTCCCT TTGGGCCGCTCCCCGCTGTTTCGCCTCGGCGTCCGGTCCG TGTTGCTTGGTCGTACCTGTGCAGAATTGCGAACCATGGA TTCCA
例示的な WPRE	39	TCTGTTCTGTAAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAA AGATTGACTGATATTCTTAACATGTTGCTCCTTTTACGCTG TGTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCTGTATCATGCTATTGCT TCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGG TTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAA CGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGTGACGCAACCCCCAC TGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGA CTTTCGCTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCG CCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTG GGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTGTCGGGGAAATCATCGTC CTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCAACTGGATCCTGCG CGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCTCTCAATCCAGC GGACCTCCCTTCCCGAGGCCTTCTGCCGGTTCTGCGGCCTCT CCCGCGTCTTCGCTTTCGGCCTCCGACGAGTCGGATCTCCCT TTGGGCCGCTCCCCGCTGTTTCGCCTCGGCGTCCGGTCCG TGTTGCTTGGTCGTACCTGTGCAGAATTGCGAACCATGGA TTCCA
SB03422 野生型	40	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLALSALTADQMVSALLDA EPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVP GFVDLTLDQVHLLCAWLEILMIGLVWRSMHEHPVKLLFAPN LLLDNRNQKCKVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLK SIILLNSGVYTFLSSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKAG LTLQQQHQRQAQLLLILSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNVVPL YDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHS LQKYYITGEAEGFPATA
SB06136 rld.ERT2.変 異体.81 L384M/L391 V/N413D/M 421L/S463P/ H524L	41	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLALSALTADQMVSALLDA EPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVP GFVDLTLDQVHLLCAWMEILMIGVVWRSMHEHPVKLLFAP NLLLDNRDQKCKVEGLVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCL KSIILLNSGVYTFLPSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKA GLTLQQQHQRQAQLLLILSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNVV LYDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHS LQKYYITGEAEGFPATA
SB06138 rld.ERT2.変 異体.93 L384M/L409 V/N413D/S4 63P/H524L	42	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLALSALTADQMVSALLDA EPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVP GFVDLTLDQVHLLCAWMEILMIGLVWRSMHEHPVKLLFAP NLVLDNRDQKCKVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVC LKSIILLNSGVYTFLPSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAK AGLTLQQQHQRQAQLLLILSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNVV PLYDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSH SLQKYYITGEAEGFPATA
SB06139 rld.ERT2.変 異体.86	43	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLALSALTADQMVSALLDA EPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADREIVHMINWAKRVP GFVDLTLDQVHLLCAWMEILMIGVVWRSMHEHPVKLLFAP NLLLDNRNQKCKVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCL KSIILLNSGVYTFLPSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKA

10

20

30

40

名称	配列 番号	配列
L354I/L384 M/L391V/S4 63P		GLTLQQQHQRLAQLLLILSHIRHMSNKGMEHLYSMKCKNVVP LYDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHS LQKYYITGEAEGFPATA
SB06140 rld.ERT2.変 異体.95 L354I/L384 M/L409V/N 413D/M421 L/S463P/H5 24F	44	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLALSALTADQMVSAALLDA EPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADREIVHMINWAKRVP GFVDLTLDHQVHLLECAWMEILMIGLVWRSMEHPVKLLFAP NLVLDQDQKQKCEGLVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCL KSIILLNSGVYTFPLSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAGA GLTLQQQHQRLAQLLLILSHIRHMSNKGMEFLYSMKCKNVVP LYDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHS LQKYYITGEAEGFPATA
SB06141 rld.ERT2.変 異体.88 L391V/N413 D/Q414E/S4 63P/H524F	45	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLALSALTADQMVSAALLDA EPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADRELHMINWAKRVP GFVDLTLDHQVHLLECAWLEILMIGVVWRSMEHPVKLLFAPN LLDRDEGKCEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLK SIILLNSGVYTFPLSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAGA LTLQQQHQRLAQLLLILSHIRHMSNKGMEFLYSMKCKNVVPL YDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHS LQKYYITGEAEGFPATA
SB06142 rld.ERT2.変 異体.77 L354I/L391 V/N413D/M 421L/S463P/ M517A/H52 4L	46	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLALSALTADQMVSAALLDA EPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADREIVHMINWAKRVP GFVDLTLDHQVHLLECAWLEILMIGVVWRSMEHPVKLLFAPN LLDRDQKQKCEGLVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLK SIILLNSGVYTFPLSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAGA LTLQQQHQRLAQLLLILSHIRHASNKGMEFLYSMKCKNVVPL YDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHS LQKYYITGEAEGFPATA
SB06143 rld.ERT2.変 異体.49 L391V/Q414 E/M421L/S4 63P/H524F	47	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLALSALTADQMVSAALLDA EPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADRELHMINWAKRVP GFVDLTLDHQVHLLECAWLEILMIGVVWRSMEHPVKLLFAPN LLDRNEGKCEGLVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLK SIILLNSGVYTFPLSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAGA LTLQQQHQRLAQLLLILSHIRHMSNKGMEFLYSMKCKNVVPL YDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHS LQKYYITGEAEGFPATA
SB06144 rld.ERT2.変 異体.58 L354I/L409 V/N413D/M 421L/H524L	48	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLALSALTADQMVSAALLDA EPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADREIVHMINWAKRVP GFVDLTLDHQVHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPVKLLFAPN LVLDQDQKQKCEGLVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLK SIILLNSGVYTFPLSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAGA LTLQQQHQRLAQLLLILSHIRHMSNKGMEFLYSMKCKNVVPL YDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHS LQKYYITGEAEGFPATA
SB06145 rld.ERT2.変 異体.62 L409V/N413 D/Q414E/M 421L/S463P/ H524L	49	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLALSALTADQMVSAALLDA EPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADRELHMINWAKRVP GFVDLTLDHQVHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPVKLLFAPN LVLDQDQKQKCEGLVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLK SIILLNSGVYTFPLSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAGA LTLQQQHQRLAQLLLILSHIRHMSNKGMEFLYSMKCKNVVPL YDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHS LQKYYITGEAEGFPATA

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
SB06146 rld.ERT2.変 異体.63 L354I/L391 V/N413D/Q 414E/M421L /M517A/H52 4F	50	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKNSLALS LTADQMVSALLDA EPPILYSEYDPT RPFSEASMMGLLTNLADREIVHMINWAKRVP GFVDLT LHDQVHLLECAWLEILMIGVVWRSMEHPVKLLFAPN LLDRDEGK CVEGLVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLK SIILLNSGVYTF LSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAG LTLQQQHQR LAQ LLLILSHIRHASNKGMEFLYSMKCKNVVPL YDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHSL QKYYITGEAEGFPATA
SB06147 rld.ERT2.変 異体.55 L354I/L409 V/M421L/S4 63P/H524L	51	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKNSLALS LTADQMVSALLDA EPPILYSEYDPT RPFSEASMMGLLTNLADREIVHMINWAKRVP GFVDLT LHDQVHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPVKLLFAPN LVLDNRNQGK CVEGLVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLK SIILLNSGVYTF LSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAG LTLQQQHQR LAQ LLLILSHIRHMSNKGMEFLYSMKCKNVVPL YDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHSL QKYYITGEAEGFPATA
SB06149 rld.ERT2.変 異体.41 L354I/L391 V/L409V/N4 13D/Q414E/ H524L	52	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKNSLALS LTADQMVSALLDA EPPILYSEYDPT RPFSEASMMGLLTNLADREIVHMINWAKRVP GFVDLT LHDQVHLLECAWLEILMIGVVWRSMEHPVKLLFAPN LVLDNRDEGK CVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLK SIILLNSGVYTF LSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAG LTLQQQHQR LAQ LLLILSHIRHMSNKGMEFLYSMKCKNVVPL YDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHSL QKYYITGEAEGFPATA
SB06150 rld.ERT2.変 異体.43 Q414E/S463 P/H524L	53	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKNSLALS LTADQMVSALLDA EPPILYSEYDPT RPFSEASMMGLLTNLADREL VHMINWAKRVP GFVDLT LHDQVHLLECAWLEILMIGLVWRSMEHPVKLLFAPN LLDRNEGK CVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCLK SIILLNSGVYTF LSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAG LTLQQQHQR LAQ LLLILSHIRHMSNKGMEFLYSMKCKNVVPL YDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHSL QKYYITGEAEGFPATA
SB06151 rld.ERT2.変 異体.46 L384M/L391 V/L409V/N4 13D/M421L/ S463P/M517 A/H524F	54	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKNSLALS LTADQMVSALLDA EPPILYSEYDPT RPFSEASMMGLLTNLADREL VHMINWAKRVP GFVDLT LHDQVHLLECAWMEILMIGVVWRSMEHPVKLLFAP NLVLDNRDQGK CVEGLVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCL KSIILLNSGVYTF LSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAG GLTLQQQHQR LAQ LLLILSHIRHASNKGMEFLYSMKCKNVV LYDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHS LQKYYITGEAEGFPATA
SB06152 rld.ERT2.変 異体.40 L384M/L391 V/N413D/H 524F	55	SAGDMRAANLWPSPLMIKRSKNSLALS LTADQMVSALLDA EPPILYSEYDPT RPFSEASMMGLLTNLADREL VHMINWAKRVP GFVDLT LHDQVHLLECAWMEILMIGVVWRSMEHPVKLLFAP NLLDRDQGK CVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEEFVCL KSIILLNSGVYTF LSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAG GLTLQQQHQR LAQ LLLILSHIRHMSNKGMEFLYSMKCKNVV LYDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHS LQKYYITGEAEGFPATA
4X ZF5 BD+YB-	56	cgggttctgtaacaatcgcatgaggattcgcaacgcctttGAAGCAGTCGACGCCG AAgtcccgctcagtaaaggttGAAGCAGTCGACGCCGAAgaatcgactgcct

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
TATA min(Syn プ ロモーター)		tcgtatGAAGCAGTCGACGCCGAAGgtatcagtcgcctcggaatGAAGCA GTCGACGCCGAAGattcgtaagaggctcactctcccttacacggagtgataACTA GTTCTAGAGGGTATATAATGGGGGCCA
IL-12	57	ATGTGCCATCAGCAACTCGTCATCTCCTGGTTCTCCCTTGTG TTCCTCGCTTCCCCTCTGGTCGCCATTTGGGAAGTGAAGAA GGACGTCTACGTGGTCGAGCTGGATTGGTACCCGGACGCCC CTGGAGAAATGGTTCGTGCTGACTTGCATACGCCAGAAGA GGACGGCATAACCTGGACCCCTGGATCAGAGCTCCGAGGTG CTCGGAAGCGGAAAGACCCTGACCATTCAAGTCAAGGAGT TCGGCGACGCGGGCCAGTACACTTGCCACAAGGGTGGCGA AGTGTGTCCCACTCCCTGCTGCTGCTGCACAAGAAAGAGG ATGGAATCTGGTCCACTGACATCCTCAAGGACCAAAAAGA ACCGAAGAACAAGACCTTCCTCCGCTGCGAAGCCAAGAAC TACAGCGGTTCGGTTACCTGTTGGTGGCTGACGACAATCTC CACCGACCTGACTTTCTCCGTGAAGTCGTCACGGGGATCAA GCGATCCTCAGGGCGTGACCTGTGGAGCCGCCACTCTGTCC GCCGAGAGAGTCAGGGGAGACAACAAGGAATATGAGTACT CCGTGGAATGCCAGGAGGACAGCGCCTGCCCTGCCGCGGA AGAGTCCCTGCCTATCGAGGTCATGGTCGATGCCGTGCATA AGCTGAAATACGAGAACTACACTTCCTCCTTCTTATCCGC GACATCATCAAGCCTGACCCCCCAAGAACTTGACGCTGAA GCCACTCAAGAACTCCCGCCAAGTGGAAAGTGTCTTGGGAAT ATCCAGACACTTGGAGCACCCCGCACTCATACTTCTCGCTC ACTTTCTGTGTGCAAGTGCAGGGAAAGTCCAAACGGGAGA AGAAAGACCGGGTGTTCACCGACAAAACCTCCGCCACTGT GATTTGTCGGAAGAACGCGTCAATCAGCGTCCGGGCGCAG GATAGATACTACTCGTCCTCCTGGAGCGAATGGGCCAGCGT GCCTTGTTCCGGTGGCGGATCAGGCGGAGGTTCAAGAGGA GGCTCCGGAGGAGGTTCCCGGAACCTCCCTGTGGCAACCCC CGACCCTGGAATGTTCCCGTGCCTACACCACTCCCAAAACC TCCTGAGGGCTGTGTGCAACATGTTGCAGAAGGCCCGCCAG ACCTTGAGTTCTACCCCTGCACCTCGGAAGAAATTGATCA CGAGGACATCACCAAGGACAAGACCTCGACCGTGGAAAGCC TGCTTGCCGCTGGAAGTACCAAGAACGAATCGTGTCTGAA CTCCCGCGAGACAAGCTTTATCTACTAACGGCAGCTGCCTGG CGTCGAGAAAGACCTCATTCATGATGGCGCTCTGTCTTCC TCGATCTACGAAGATCTGAAGATGTATCAGGTGAGTTCAA GACCATGAACGCCAAGCTGCTCATGGACCCGAAGCGGCAG ATCTTCTGGACCAGAATATGCTCGCCGTGATTGATGAACT GATGCAGGCCCTGAATTTCAACTCCGAGACTGTGCCTCAA AGTCCAGCCTGGAAGAACCGGACTTCTACAAGACCAAGAT CAAGCTGTGCATCCTGTTGCACGCTTTCCGCATTCGAGCCG TGACCATTGACCGCGTGATGTCTACCTGAACGCCAGT
IL-12	58	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAP GEMVVLTCDTPEEDGITWTLDSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDA GQYCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKT FLRCEAKNYSGRFTCWWTITSTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTC GAATLSAERVRGDNKEYEYSVEQEDSACPAAEESLPIEVMV DAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVS WEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSAT VICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGSGGGSGGG

10

20

30

40

50

名称	配列番号	配列
		SGGGSRLNPVATPDPGMFPCLLHHSQNLRLRAVSNNMLQKARQTL EFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSF ITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFY KTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
AU/SLDE(不安定化ド メイン)	59	ATTTATTTATTTATTTATTTAacatcggttccCTGTTTAATATTTAA ACAG
A2(インス レーター)	60	AGAGCGAGATTCCGTCTCAAAGAAAAAAAAAGTAATGAAA TGAATAAAATGAGTCCTAGAGCCAGTAAATGTCGTAAATGT CTCAGCTAGTCAGGTAGTAAAAGGTCTCAACTAGGCAGTGG CAGAGCAGGATTCAAATTCAGGGCTGTTGTGATGCCTCCGC AGACTCTGAGCGCCACCTGGTGGTAATTTGTCTGTGCCTCTT CTGACGTGGAAGAACAGCAACTAACACACTAACACGGCAT TTACTATGGGCCAGCCATTGT
ZF5-7 DBD(ZF DNA BD)	61	ATGTCTAGACCTGGCGAGAGGCCCTTCCAGTGCCGGATCTG CATGCGGAACCTCAGCAACATGAGCAACCTGACCAGACAC ACCCGGACACACACAGGCGAGAAGCCTTTTCAGTGCAGAA TCTGTATGCGCAATTTCTCCGACAGAAGCGTGCTGCGGAGA CACCTGAGAACCCACACCGGCAGCCAGAAACCATTCAGT GTCGCATCTGTATGAGAACTTTAGCGACCCCTCCAATCTG GCCCCGCACACCAGAACACATAACCGGGGAAAAACCCCTTTC AGTGTAGGATATGCATGAGGAATTTTTCGACCGGTCCAGC CTGAGGCGGCACCTGAGGACACATACTGGCTCCCAAAAGC CGTTCCAATGTCGGATATGTATGCGCAACTTTAGCCAGAGC GGCACCCTGCACAGACACACAAGAACCATACTGGCGAGA AACCTTTCCAATGTAGAATCTGCATGCGAAATTTTTCAGC CGCCCTAATCTGACCAGGCATCTGAGGACCCACCTGAGAG GATCT
ZF5-7 DBD(ZF DNA BD)	62	MSRPGERPFOCRICMRNFSNMSNLTRHTRHTHTGEKPFQCRICM RNFSDRSVLRRHLRHTHTGSQKPFQCRICMRNFSDPSNLARHTR THTGEKPFQCRICMRNFSDRSSLRHLRHTHTGSQKPFQCRICM RNFSQSGTLHRHTRHTHTGEKPFQCRICMRNFSQRPNLTRHLRT HLRGS
P65(転写活 性化因子)	63	GATGAGTTTCCACCATGGTGTTTCCTTCTGGGCAGATCAG CCAGGCCTCGGCCTTGGCCCCGGCCCCCTCCCCAAGTCCTGC CCCAGGCTCCAGCCCCTGCCCCTGCTCCAGCCATGGTATCA GCTCTGGCCCAGGCCCCAGCCCCTGTCCAGTCCTAGCCCC AGGCCCTCCTCAGGCTGTGGCCCCACCTGCCCCCAAGCCCA CCCAGGCTGGGGAAGGAACGCTGTCAGAGGCCCTGCTGCA GCTGCAGTTTGATGATGAAGACCTGGGGGCCTTGCTTGCA ACAGCACAGACCCAGCTGTGTTACAGACCTGGCATCCGTC GACAACTCCGAGTTTCAGCAGCTGCTGAACCAGGGCATAACC TGTGGCCCCCACAACTGAGCCCATGCTGATGGAGTACC CTGAGGCTATAACTCGCCTAGTGACAGGGGGCCAGAGGCC CCCCGACCCAGCTCCTGCTCCACTGGGGGCCCCGGGGCTCC CCAATGGCCTCCTTTTCAGGAGATGAAGACTTCTCCTCCATT GCGGACATGGACTTCTCAGCCCTGCTGAGTCAGATCAGCTC C

10

20

30

40

50

名称	配列番号	配列
P65(転写活性化因子)AA	64	DEFPTMVFPSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSAL AQAPAPVPVLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFD DEDLGALLGNSTDPVFTDLASVDNSEFQQLNQIPVAPHTT EPMLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAAPGLPNGLLSGDE DFSSIADMDFSALLSQISS
変異体 81(ERT 変異体)	65	gctggagacatgagagctgccaaaccttggccaagcccgctcatgatcaaacgctctaagaagaa cagcctggcctgtccctgacggccgaccagatggcagtgctgtgtggatgtgagccccccat actctattccgagtagatgatctaccagaccctcagtgaaacttcgatgatgggcttactgaccaacc tggcagacaggagCTGGTTCACATGATCAACTGGGCGAAGAGGG TGCCAGGCTTTGTGGATTTGACCCTCCATGATCAGGTCCAC CTTCTAGAATGTGCCTGGATGGAGATCCTGATGATTGGTGT GGTCTGGCGCTCCATGGAGCACCCAGTGAAGCTACTGTTTG CTCCTAACTTGCTCTTGGACAGGGACCAGGGAAAAATGTGTA GAGGGCCTGGTGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATC ATCTCGGTTCCGCATGATGAATCTGCAGGGAGAGGAGTTTG TGTGCCTCAAATCTATTATTTTGCTTAATTCTGGAGTGTACA CATTTCTGCCAGCACCCCTGAAGTCTCTGGAAGAGAAGGAC CATATCCACCGATCCTGGACAAGATCACAGACACTTTGAT CCACCTGATGGCCAAGGCAGGCCTGACCCTGCAGCAGCAG CACCAGCGGCTGGCCCAGCTCCTCCTCATCCTCTCCACAT CAGGCACATGAGTAACAAAGGCATGGAGCTGctgtacagcatgaag tgcaagaacgtggtgcccccttatGaCctgctgctggaggcgccgacgccccaccgctacatg cgccactagccgtggaggggcatccgtggaggagacggaccaaaagccacttggccactgcgg gctctactcatcgattccttgcaaaagtattacatcacggggaggagagggttccctgccac a
変異体 81 (ERT 変異体)	66	AGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLSLALSLTADQMVSALLDAE PPILYSEYDPTTRPFSEASMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVP GFVDLTLHDQVHLLCAWMEILMIGVVWRSMEHPVKLLFAP NLLDRDQGKCEVGLVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCL KSIILLNSGVYTFPSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKA GLTLQQHQRLAQLLLILSHIRHMSNKGMELLYSMKCKNVVP LYDLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSH LQKYYITGEAEGFPAT
SB07123 ベクター	67	aaagctgaattcgagcttgcagtcctgcaggtcgttacataacttacggtaaatggcccgctggct gaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatag ggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccacttggcagtagcatcaagt tatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgcc agtacatgaccttatgggactttctacttggcagtagatctacgtattagtcacgtattaccatggt gatgcggttttggcagtagatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacgggatttccaagtctc cacccttgcagtcgaatgggagtttggcaccataacacgggactttccaaatgtcgtaa caactccgccccattgacgcaatggcggttagcggtgtacgttgggaggtctatataagcagag ctcaataaaagagcccacaacccctcactcggcgccgagtcctccgattgactgagtcgcccgg gtaccgtgtatccaataaacctcttgcagttgcatccgacttgggtctcgtgttccttgggaggg tctcctctgagtgattgactaccggtcagcgggggtcttcttgggggctcgtccgagatcgga gacccctgcccaggaccaccgaccaccacgggaggttaagctggccagcaacttatctgtgt ctgtccgattgtctagtgtctatgactgatttatgcgctgcgtcggtactagttagtaactagctctg tatctggcgacccgtggtggaactgacgagttcggaacacccggccgaacctgggagacgt cccagggacttcgggggcccgttttggcccgcctgagtcctaaaatcccgatcgtttaggactc tttggtagcccccttagaggaggatattgtgttctgtaggagacgagaacctaaaacagttc ccgctcctgtctgaattttgtcttgcgttggaccgaagccgcgcgcgtcttctgtctgcag catcgttctgtgttctctgtctgactgtgttctgtatttctgtaaataatggccccccctcagtc

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
		cccagcatgctgtattcttcccaatcctcccccttgctgtcctgccccacccacccccagaa tagaatgacacctactagacaatgcgatgcaatttctcatttattaggaaaggacagtgggagtg gcaccttcagggtcaaggaaggcacgggggaggggcaaacaacagatggctggcaactaga aggcacagtacttaCTGTTTAAATATTTAAACAGggaaccgatgtTAAATA AATAAATAAATAAATGTTTAAACTAGAGTCGCGGCCTCAGT CAGTCACGCATGCCTGCAGTttaACTGGCGTTCAGGTAGGAC ATCACGCGGTCAATGGTTCACGGCTCGAATGCGGAAAGCGT GCAACAGGATGCACAGCTTGATCTTGGTCTTGTAGAAGTCC GGTTCTTCCAGGCTGGACTTTTGAGGCACAGTCTCGGAGTT GAAATTCAGGGCCTGCATCAGTTCATCAATCACGGCGAGCA TATTCTGGTCCAGGAAGATCTGCCGCTTCGGGTCCATGAGC AGCTTGCGGTTCAATGGTCTTGAACCTCGACCTGATACATCTTC AGATCTTCGTAGATCGAGGAAAGACAGAGCGCCATCATGA ATGAGGTCTTTCTCGACGCCAGGCAGCTGCCGTTAGTGATA AAGCTTGCTCTCGCGGAGTTCAGACACGATTCTGTTGGT CAGTTCCAGCGGCAGGCAGGCTTCCACGGTCGAGGTCTTGT CCTTGGTGATGTCCTCGTGATCAATTTCTTCCGAGGTGCAG GGGTAGAACTCAAGGGTCTGGCGGGCCTTCTGCAACATGTT CGACACAGCCCTCAGGAGGTTTTGGGAGTGGTGTAGGCAC GGGAACATTCCAGGGTCGGGGGTTGCCACAGGGAGGTTCC GGGAACCTCCTCCGAGCCTCCTCCTGAACCTCCGCCTGAT CCGCCACCGGAACAAGGCACGCTGGCCCATTCGCTCCAGG AGGACGAGTAGTATCTATCCTGCGCCCGACGCTGATTGAC GCGTTCTTCCGACAAATCACAGTGGCGGAGGTTTTGTGCGT GAACACCCGGTCTTTCTTCTCCCGTTTGGACTTTCCTGCAC TTGCACACAGAAAGTGAGCGAGAAGTATGAGTGCGGGGTG CTCCAAGTGCTGGATATTCCCAAGACACTTCCACTTGGCG GGAGTTCTTGAGTGGCTTCAGCTGCAAGTCTTGGGGGGGT CAGGCTTGATGATGTCGCGGATAAAGAAGGAGGAAGTGTA GTTCTCGTATTTTCAGCTTATGCACGGCATCGACCATGACCTC GATAGGCAGGGACTCTTCCGCGGCAGGGCAGGCGCTGTCTC CCTGGCATTCACGGAGTACTCATATTCCTTGTGTCTCCCC TGACTCTCTCGGCGGACAGAGTGGCGGCTCCACAGGTCACG CCCTGAGGATCGCTTGATCCCGTGACGACTTCACGGAGAA AGTCAGGTTCGGTGGAGATTGTGCTCAGCCACCAACAGGTG AACCGACCGCTGTAGTTCTTGGCTTCGCAGCGGAGGAAGGT CTTGTTCTTCGGTTCTTTTTGGTCCTTGAGGATGTCAGTGGA CCAGATTCCATCCTCTTTCTTGTGACGACGACGAGGGAGT GGGACAGCACTTCGCCACCTTGTGGCAAGTGTACTGGCCC GCGTCGCCGAACCTTGAATGGTCAGGGTCTTTCC GCTTCCGAGCACCTCGGAGCTCTGATCCAGGGTCCAGGTTA TGCCGTCTCTTCTGGCGTATCGCAAGTCAGCACGACCATT TCTCCAGGGGCGTCCGGGTACCAATCCAGCTCGACCACGTA GACGTCCTTCTCAGTTCCTCAATGGCGACCAGAGGGGAAG CGAGGAACACAAGGGGAGAACCAGGAGATGACGAGTTGCTG ATGGCACATCATGGTGGCGACACCGGTACGCGTTGGCCCC ATTATATACCTCTAGAACTAGTtatccactccgtgaaggagagtgcct cttacgaatTTCGGCGTCGACTGCTTCattccgagcgactgatacTTCGG CGTCGACTGCTTCatacgaaggcagtcgattcTTCGGCGTCGACTGCT TcaacctttactgagacgggacTTCGGCGTCGACTGCTTCaaaggcgttgcaa tcctcatgcgattgttacgaaacccgTTAATTAAAGAGCGAGATTCCGTCT CAAAGAAAAAAAAGTAATGAAATGAATAAAATGAGTCCT

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
		AGAGCCAGTAAATGTCGTAATGTCTCAGCTAGTCAGGTAG TAAAAGGTCTCAACTAGGCAGTGGCAGAGCAGGATTCAAA TTCAGGGCTGTTGTGATGCCTCCGCAGACTCTGAGCGCCAC CTGGTGGTAATTTGTCTGTGCCTCTTCTGACGTGGAAGAAC AGCAACTAACACACTAACACGGCATTACTATGGGCCAGCC ATTGTCCATCTAGATGGccgataaaataaaagattttattagtctccagaaaaagg ggggaatgaaagacccacctgtaggtttgcaagctagctgcagtaacgccattttgcaaggcat ggaaaaataccaaccaagaatagagaagttcagatcaaggcggtacatgaaaatagctaac gttggccaaacaggatatctcggtgagcagtttcggccccggccgggccaagaacagatg gtcaccgcagtttcggccccggccgagccaagaacagatggtccccagatatggcccaacc tcagcagtttttaagacccatcagatgttccaggctccccaaggacctgaaatgacctgcgcc ttattgaattaaccaatcagcctgcttctcgttctgttcgcgcgttctgcttcccagctctataaaa gagctcacaacccctcactcggcgcgccagtcctccgacagactgagtcgccccgggGGATC CGCCACCATGTCTAGACCTGGCGAGAGGCCCTTCCAGTGCC GGATCTGCATGCGGAACCTTCAGCAACATGAGCAACCTGACC AGACACACCCGGACACACACAGGCGAGAAGCCTTTTTCAGT GCAGAATCTGTATGCGCAATTTCTCCGACAGAAGCGTGCTG CGGAGACACCTGAGAACCCACACCGGCAGCCAGAAACCAT TCCAGTGTGCGATCTGTATGAGAACTTTAGCGACCCCTCC AATCTGGCCCGGCACACCAGAACACATAACCGGGGAAAAAC CCTTTTCAGTGTAGGATATGCATGAGGAATTTTTCGACCGG TCCAGCCTGAGGCGGCACCTGAGGACACATACTGGCTCCCA AAAGCCGTTCCAATGTTCGGATATGTATGCGCAACTTTAGCC AGAGCGGCACCCTGCACAGACACACAAGAACCCATACTGG CGAGAAACCTTTCCAATGTAGAATCTGCATGCGAAATTTT CCCAGCGGCCTAATCTGACCAGGCATCTGAGGACCCACCTG AGAGGATCTaCCTGCAGGGATGAGTTTCCCACCATGGTGTT TCCTTCTGGGCAGATCAGCCAGGCCTCGGCCTTGGCCCCGG CCCCCCCCAAGTCCTGCCCCAGGCTCCAGCCCCCTGCCCC GCTCCAGCCATGGTATCAGCTCTGGCCCAGGCCCCAGCCCC TGTCCAGTCCTAGCCCCAGGCCCTCCTCAGGCTGTGGCCC CACCTGCCCCCAAGCCACCCAGGCTGGGGAAGGAACGCT GTCAGAGGCCCTGCTGCAGCTGCAGTTTGATGATGAAGACC TGGGGGCTTGCTTGGCAACAGCACAGACCCAGCTGTGTTT ACAGACCTGGCATCCGTCGACAACTCCGAGTTTCAGCAGCT GCTGAACCAGGGCATACTGTGGCCCCCACAACTGAGC CCATGCTGATGGAGTACCCTGAGGCTATAACTCGCCTAGTG ACAGGGGCCAGAGGCCCCCGACCCAGCTCCTGCTCCACT GGGGGGCCCCGGGGCTCCCCAATGGCCTCCTTTTCAGGAGATG AAGACTTCTCCTCCATTGCGGACATGGACTTCTCAGCCCTG CTGAGTCAGATCAGCTCCaattgtcgtacgcggtacctctgctggagacatga gagctgccaaccttggccaagcccgtcatgatcaaacgctctaagaagaacagcctggccttgt ccctgacggccgaccagatggtcagtgcttgttgatgctgagccccatactctattccgagta tgatctaccagaccttcagtgaagcttcgatggtgcttactgaccaacctggcagacaggga gCTGGTTACATGATCAACTGGGCGAAGAGGGTGCCAGGCT TTGTGGATTTGACCTCCATGATCAGGTCCACCTTCTAGAAT GTGCTGGATGGAGATCCTGATGATTGGTGTGGTCTGGCGC TCCATGGAGCACCCAGTGAAGCTACTGTTTGTCTCTAACTT GCTCTTGGACAGGGACCAGGGAAAATGTGTAGAGGGCCTG GTGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATCATCTCGGTT CCGCATGATGAATCTGCAGGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCA AATCTATTATTTTGCTTAATTCTGGAGTGACACATTTCTGC

10

20

30

40

50

40

名称	配列番号	配列	
		gagggccgcaccgatgcccttccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgccgatgc ggtattttctcttacgcatctgtgcgggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctct gatgccgcatagttaagccagccccgacaccgccaacaccgctgacgcgccctgacgggctt gtctgtccccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgctagagg tttaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaaggccctgtgatacgcctattttatagttaat gtcatgataataatgtttcttagacgtcagggtggcacttttcgggaaatgtgcgcggaaccctat ttgtttattttctaatacatcacaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaata atattgaaaaagggaagatgagatattcaacatttccgtgtcgccttattccctttttgcggcatttt gccttctgttttctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgc acgagtggtgttacatcgaactggatctcaacagcggtgaagatccttgagagttttcgccccgaaga acgttttccaatgatgagcacttttaagtctgtctatgtggcggtattatcccgtattgacggcg gcaagagcaactgggtgccgcatacactattctcagaatgacttggtgagtactaccagtcaca gaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgat aacactgcgcgccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcac aacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacaaac gacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttcgcgcaactattaactggcga acttacttctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggaataagttgcaggacca cttctgcgctcggccctccgctgctggttattgtgataaatctggagccggtgagcgtgggtc tcgcggtatcattgcagcactggggccagatgtaagccctccggtatcgtatgtatctacacgacg gggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaa gcattgtaactgtcagaccaagtftactcatatatacttttagattgattaaacttcatttttaatttaa aggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgtccact gagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaagatcttcttgatgccttttttctgcgcgtaactgtct gcttgcaaacaaaaaaccaccgctaccagcggtggttfttgcggatcaagagctaccaactct tttccgaaggttaactgcttcagcagagcgagatacctaactgcttcttagtgtagccgtagt tagggccaccactcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgtaactctgttaccagt gctgctgccagtggcgataagtcgtgttaccgggttgactcaagacgatagttaccgataag gcgcagcgggtcgggctgaacgggggttctgtcacacagcccagcttgagcgaacgacctac accgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaagcgccacgcttcccgaaggagaaagg cggacaggtatccggaagcgcgagggtcggaaacaggagagcgcacgaggggagcttccagg ggaaacgcctggtatctttatgtcctgtcgggttgcaccctctgacttgagcgtcattttgtgat gctcgtcagggggcgccgctatggaaaaacgccaacgcggcctttttacggttcctggcc ttttgctggccttttctcacatgttttctcgtgtatccctgattctgtggataaccgtattaccgcct ttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgcagcagg aagcgggaagagcgcccaatcgcgaaccgcctctccccgcgcttgccgattcattaatgcagc tggcacgacaggtttcccactggaagcggcgatgagcgaacgcaattaatgtgagttagct cactcattaggcaccaccaggtttacactttatgctccggctgtatgtgttggaattgtgagcgg ataacaatttcacacaggaaacagctatgacctgattacgcc	10
		gctggagacatgagagctgccaaccttggccaagcccgctcatgatcaaacgctctaagaagaa cagcctggccttgcctgacggccgaccagatggtcagtgcttgttgatgctgagcccccat actctattccgagatgatcctaccagaccctcagtgaagcttcgatgtggcttactgaccaacc tggcagacagggagATCGTTACATGATCAACTGGGCGAAGAGGG TGCCAGGCTTTGTGGATTTGACCCCTCCATGATCAGGTCCAC CTTCTAGAATGTGCCTGGCTAGAGATCCTGATGATTGGTGT GGTCTGGCGCTCCATGGAGCACCCAGTGAAGCTACTGTTTG CTCCTAACTTGCTCTTGGACAGGGACAGGGAAAAATGTGTA GAGGGCCTGGTGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATC ATCTCGGTTCCGCATGATGAATCTGCAGGGAGAGGAGTTTG TGTGCCTCAAACTCTATTATTTTGCTTAATTCTGGAGTGTACA CATTTCTGCCCAGCACCTGAAGTCTCTGGAAGAGAAGGAC CATATCCACCGAGTCCTGGACAAGATCACAGACACTTTGAT CCACCTGATGGCCAAGGCAGGCCTGACCCTGCAGCAGCAG	20
変異体 77(ERT 変 異体)	68	gctggagacatgagagctgccaaccttggccaagcccgctcatgatcaaacgctctaagaagaa cagcctggccttgcctgacggccgaccagatggtcagtgcttgttgatgctgagcccccat actctattccgagatgatcctaccagaccctcagtgaagcttcgatgtggcttactgaccaacc tggcagacagggagATCGTTACATGATCAACTGGGCGAAGAGGG TGCCAGGCTTTGTGGATTTGACCCCTCCATGATCAGGTCCAC CTTCTAGAATGTGCCTGGCTAGAGATCCTGATGATTGGTGT GGTCTGGCGCTCCATGGAGCACCCAGTGAAGCTACTGTTTG CTCCTAACTTGCTCTTGGACAGGGACAGGGAAAAATGTGTA GAGGGCCTGGTGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATC ATCTCGGTTCCGCATGATGAATCTGCAGGGAGAGGAGTTTG TGTGCCTCAAACTCTATTATTTTGCTTAATTCTGGAGTGTACA CATTTCTGCCCAGCACCTGAAGTCTCTGGAAGAGAAGGAC CATATCCACCGAGTCCTGGACAAGATCACAGACACTTTGAT CCACCTGATGGCCAAGGCAGGCCTGACCCTGCAGCAGCAG	30
			40

名称	配列番号	配列
		CACCAGCGGCTGGCCCAGCTCCTCCTCATCCTCTCCCACAT CAGGCACGCCAGTAACAAAGGCATGGAGCTGctgtacagcatgaag tgcaagaacgtggtgccccctctatGaCctgctgctggaggcggcgacgeccaccgctcatg cgccactagccgtggaggggcatccgtggaggagacggaccaagccacttggccactgceg gctctactcatcgcaftccttgcaaaagtattacatcacgggggaggcagagggttcctgccac a
変異体 77(ERT 変 異体)	69	AGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNSLALSLTADQMVSALLDAE PPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADREIVHMINWAKRVP FVDLTLDHQVHLLCAWLEILMIGVVWRSMHPVKLLFAPNL LLDRDQGKCVEGLVEIFDMLLATSSRFMMNLQGEFVCLKSI ILLNSGVYTFPLPSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKAGL TLQQQHQRQAQLLLILSHIRHASNKGMELLYSMKCKNVPLY DLLLEAADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHSLO KYYITGEAEGFPAT
SB07129 ベ クター	70	aagcttgaaatcgagcttgcatgcctgcaggtcgttacataacttacggtaaatggccgcctggct gaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgtcccatagtaacgcaatag ggactttccattgacgtcaatgggtggagtattacggtaaactgcccacttggcagtcacatcaagt tatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccgcctggcattatgcc agtacatgacctatgggactttcctacttggcagtcacatctacgtattagtcacgtattaccatggt gatgcggttttggcagtcacatcaatggcggtggatagcggttgactcacggggatttccaagtc cacccttggcagtcacatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaatgtcgtaa caactccgccccattgacgcaaatggcggttagcggtgtacggtgggaggtctatataagcagag ctcaataaaagagcccaacccccctactcggcgccagtcctccgattgactgagtcgcccgg gtaccctgtatccaataaacctcttgacgttgcacccgacttgggtctcgtcttcccttgggagg tctctctgagtgattgactaccgtcagcggggtcttcatltgggggctcgtccgagatcggga gaccctgcccagggaccaccgaccaccaccgggaggttaagctggcagcaacttatctgtgt ctgtccgattgtctagtctatgactgattttatgcgctcgtcgtgactagttagtaactagctctg tatctgcggaaccgtggtggaactgacgagttcggaacaccggccgcaaccctgggagacgt cccagggacttcggggccgttttggccccgacctgagtcctaaaatcccgatcgttaggactc tttggtcaccccccttagaggaggatgtgttctggtaggagacgagaacctaaacagttc ccgctcctgtctgaatttttcttgggttggaccgaagccgcccgcgcttctgtctgtcag catcgttctgtgtgtctgtctgactgtgttctgtatttctgtaaaatgaggccccccctcagtc cccagcatgcctgtattctcttccaatctcccccttgcgtcctgccccccccccccccagaa tagaatgacactactcagacaatgcgatgaatttctcattttattaggaaaggacagtgaggagtg gcacctccagggtcaagggaaggcacggggaggggcaacaacagatggctggcaactaga aggcacagtacttaCTGTTTAAATATTTAAACAGggaaccgatgtTAAATA AATAAATAAATAAATGTTTAAACTAGAGTCGCGGCCTCAGT CAGTCACGCATGCCTGCAGTttaACTGGCGTTCAGGTAGGAC ATCACGCGGTCAATGGTCACGGCTCGAATGCGGAAAGCGT GCAACAGGATGCACAGCTTGATCTTGGTCTTGTAGAAAGTCC GGTCTTCCAGGCTGGACTTTTGAGGCACAGTCTCGGAGTT GAAATTCAGGGCCTGCATCAGTTCATCAATCACGGCGAGCA TATTCTGGTCCAGGAAGATCTGCCGCTTCGGGTCCATGAGC AGCTTGGCGTTCATGGTCTTGAACCTCGACCTGATACATCTTC AGATCTTCGTAGATCGAGGAAAGACAGAGCGCCATCATGA ATGAGGTCTTTCTCGACGCCAGGCAGCTGCCGTTAGTGATA AAGCTTGTCTCGCGGGAGTTCAGACACGATTCTGTTCTTGGT CAGTTCAGCGGCAGGCAGGCTTCACGGTCGAGGTCTTGT CCTTGGTGATGTCCTCGTGATCAATTTCTTCCGAGGTGCAG GGGTAGAACTCAAGGGTCTGGCGGGCCTTCTGCAACATGTT CGACACAGCCCTCAGGAGGTTTTGGGAGTGGTGTAGGCAC

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
		GGGAACATTCCAGGGTCGGGGGTTGCCACAGGGAGGTTCC GGGAACCTCCTCCGGAGCCTCCTCCTGAACCTCCGCCTGAT CCGCCACCGGAACAAGGCACGCTGGCCCATTCGCTCCAGG AGGACGAGTAGTATCTATCCTGCGCCCGACGCTGATTGAC GCGTTCTTCCGACAAATCACAGTGGCGGAGGTTTTGTCGGT GAACACCCGGTCTTTCTTCTCCCGTTTGACTTTCCCTGCAC TTGCACACAGAAAGTGAGCGAGAAGTATGAGTGCGGGGTG CTCCAAGTGTCTGGATATTCCCAAGACACTTCCACTTGGCG GGAGTTCTTGAGTGGCTTCAGCTGCAAGTTCTTGGGGGGGT CAGGCTTGATGATGTCGCGGATAAAGAAGGAGGAAGTGTA GTTCTCGTATTTTCACTTATGCACGGCATCGACCATGACCTC GATAGGCAGGGACTTTCGCGGCAGGGCAGGCGCTGTCTC CCTGGCATTCACGGAGTACTCATATTCCTTGTTGTCTCCCC TGACTCTCTCGGCGGACAGAGTGGCGGCTCCACAGGTCACG CCCTGAGGATCGCTTGATCCCGTGACGACTTCACGGAGAA AGTCAGGTCGGTGGAGATTGTCGTCAGCCACCAACAGGTG AACCGACCGCTGTAGTTCTTGGCTTCGCAGCGGAGGAAGGT CTTGTTCTTCGGTTCTTTTTGGTCCTTGAGGATGTCAGTGGA CCAGATTCCATCCTCTTTCTTGTGTCAGCAGCAGCAGGGAGT GGGACAGCACTTCGCCACCTTGTGGCAAGTGTACTGGCCC GCGTCGCCGAACCTTGACTTGAATGGTCAGGGTCTTTCC GCTTCCGAGCACCTCGGAGCTCTGATCCAGGGTCCAGGTTA TGCCGTCTCTTCTGGCGTATCGCAAGTCAGCACGACCAT TCTCCAGGGGCGTCCGGGTACCAATCCAGCTCGACCACGTA GACGTCCTTCTTCAGTTCCCAAATGGCGACCAGAGGGGAAG CGAGGAACACAAGGGAGAACCAGGAGATGACGAGTTGCTG ATGGCACATCATGGTGGCGACACCGGTACGCGTTGGCCCC ATTATATACCCTCTAGAACTAGTtatccactccgtgaaggagagtgcct cttacgaatTTCGGCGTCGACTGCTTCattccgagcgactgataacTTCGG CGTCGACTGCTTCataggaaggcagtcgattcTTCGGCGTCGACTGCT TcaacctttactgagcgggacTTCGGCGTCGACTGCTTCaaaggcgttgcgaa tcctcatcgattgttacgaaacccgTTAATTAAAGAGCGAGATTCCGTCT CAAAGAAAAAAAAAAGTAATGAAATGAATAAAATGAGTCCT AGAGCCAGTAAATGTCGTAAATGTCTCAGCTAGTCAGGTAG TAAAAGGTCTCAACTAGGCAGTGGCAGAGCAGGATTCAAA TTCAGGGCTGTTGTGATGCCTCCGCAGACTCTGAGCGCCAC CTGGTGGTAATTTGTCTGTGCCTCTTCTGACGTGGAAGAAC AGCAACTAACACACTAACACGGCATTACTATGGGCCAGCC ATTGTCCATCTAGATGGccgataaaataaaagattttatttagtctccgaaaaagg ggggaatgaaagacccacctgtaggttgcaagctagctgcagtaacgccatttgcaggcat ggaaaaataccaaaccaagaatagagaagttcagatcaaggcggttacatgaaatagctaac gttgggccaacagatctcgggtgagcagtttcggccccggccggggccaagaacagatg gtcaccgcagtttcggccccggccgagccaagaacagatgggtcccgatatgcccaccc tcagcagtttcttaagacccatcagatgttccaggctcccccaggacctgaaatgacctgcgcc ttatttgaattaaccaatcagcctgcttctcgttctgttcgcgcgcttctgctcccgagctctataaaa gagctcacaacccctcactcggcgccagtcctcgcgacagactgagtcgccccggGGATC CGCCACCATGTCTAGACCTGGCGAGAGGCCCTTCCAGTGCC GGATCTGCATGCGGAACCTCAGCAACATGAGCAACCTGACC AGACACACCCGGACACACACAGGCGAGAAGCCTTTTCAGT GCAGAATCTGTATGCGCAATTTCTCCGACAGAAGCGTGCTG CGGAGACACCTGAGAACCCACACCGGCAGCCAGAAACCAT TCCAGTGTGCATCTGTATGAGAACTTTAGCGACCCCTCC

10

20

30

40

50

名称	配列番号	配列
		AATCTGGCCCGGCACACCAGAACACATACCGGGGAAAAAC CCTTTCAGTGTAGGATATGCATGAGGAATTTTTCCGACCGG TCCAGCCTGAGGCGGCACCTGAGGACACATACTGGCTCCCA AAAGCCGTTCCAATGTCTGGATATGTATGCGCAACTTTAGCC AGAGCGGCACCCCTGCACAGACACACAAGAACCATACTGG CGAGAAACCTTTTCCAATGTAGAATCTGCATGCGAAATTTTT CCGAGCGGCCTAATCTGACCAGGCATCTGAGGACCCACCTG AGAGGATCTaCCTGCAGGGATGAGTTTCCCACCATGGTGTT TCCTTCTGGGCAGATCAGCCAGGCCTCGGCCTTGGCCCCGG CCCCCCCCAAGTCCTGCCCCAGGCTCCAGCCCCTGCCCT GCTCCAGCCATGGTATCAGCTCTGGCCCAGGCCCCAGCCCC TGTCACAGTCCCTAGCCCCAGGCCCTCCTCAGGCTGTGGCCC CACCTGCCCCCCAAGCCCACCCAGGCTGGGGAAGGAACGCT GTCAGAGGCCCTGCTGCAGCTGCAGTTTGATGATGAAGACC TGGGGGCCTTGCTTGGCAACAGCACAGACCCAGCTGTGTTT ACAGACCTGGCATCCGTCGACAACTCCGAGTTTACGACGCT GCTGAACCAGGGCATACTGTGGCCCCCACACAACCTGAGC CCATGCTGATGGAGTACCCTGAGGCTATAACTCGCCTAGTG ACAGGGGGCCAGAGGGCCCCCGACCCAGCTCCTGCTCCACT GGGGGGCCCCGGGGCTCCCCAATGGCCTCCTTTACAGGAGATG AAGACTTCTCCTCCATTGCGGACATGGACTTCTCAGCCCTG CTGAGTCAGATCAGCTCCaaattgtgcgtacgcggatcctctgctggagacatga gagctgccaaaccttggccaaagccgctcatgatcaaacgctctaagaagaacagcctggcctgt ccctgacggccgaccagatggtcagtgctgttgatgctgagcccccatctattccgagta tgatctaccagacccttcagtgaaagcttcgatgatggccttactgaccaacctggcagacaggga gATCGTTTACATGATCAACTGGGCGAAGAGGGTGGCAGGCT TTGTGGATTTGACCCTCCATGATCAGGTCCACCTTCTAGAAAT GTGCTTGCTAGAGATCCTGATGATTGGTGTGGTCTGGCGC TCCATGGAGCACCCAGTGAAGCTACTGTTTGCTCCTAACTT GCTCTTGAGACAGGGACCAGGGAAAATGTGTAGAGGGCCTG GTGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATCATCTCGGTT CCGCATGATGAATCTGCAGGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCA AATCTATTATTTTGCTTAATTCTGGAGTGTACACATTTCTGC CCAGCACCCCTGAAGTCTCTGGAAGAGAAGGACCATATCCA CCGAGTCTTGACAAGATCACAGACACTTTGATCCACCTGA TGGCAAGGCAGGCTGACCCCTGCAGCAGCAGCACCAGCG GCTGGCCCAGCTCCTCCTCATCCTCTCCACATCAGGCACG CCAGTAACAAAGGCATGGAGCTGctgtacagcatgaagtgaagaacgtgg tgccccctctatGaCctgctgtggaggcggcggacgccaccgctcatatgcgccactagcc gtggagggggcatccgtggaggagacggaccaaaagccacttgccactgcgggctctacttcac gcattccttgcaaaagtattacatcacgggggagggcagagggttccctgccacaTaAGTCG ACAATCAACCTCtgattacaaaattgtgaagattgactggtattcttaactatgtgtc cttttacgctatgtgatacgtgctttaatgctttgtatcatgctattgctccgctatggtcttcatttc tctcctgtataaaccttggtgctgctctttatgaggagtgtgtgcccgtgttcaggccaactgtgc gtggtgtgactgtgtgtgacgaacccccactgtgtgggcatgtgcaccactgtacagctcc ttccgggacttttcgtttccccctccctattgccacggcggaaactcatcgccgctgcttgcgcg tgctggacaggggctcggctgtgtgggcaactgacaattccgtgtgtgtcggggaatcatgctcct ttccttgctgctgcctgtgtgtgccacgtgattctgcgcgggacgtcctctgctacgtcccttcgg ccctcaatccagcggaccttcttcccgcggcctgctgcgggctctgcggcctcttccgcgtctacg ccttcgcctcagacagtgatcctccttgggcccgcctccccgcgatatcagtggtccagat ctagtgttgactcaacataaccagctgaagcctatagtagtacgagccatagataaaataaaggat ttatttagtctccagaaaaagggggaatgaagagccccacctgtaggtttgcaagactagacaata

名称	配列 番号	配列
		aaagagcccacaacccctcactcggggcgccagtcctccgattgactgagtcgcccggccgttc gagcagacatgataagatacattgatgatttggacaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaat gctttatttgtgaatttgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttaaca acacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggagatgtgggaggttttttaagcaagttaa acctctacaaatgtggtaaatacgataaggatcgggtaccctgtatccaataaacctcttgcagtt gcatccgacttgtgtctcgtgttcttggagggtcctctgagtgattgactaccctgcagcgg gggtctttcacacatgcagcatgtatcaaaataaattgtgttttttctaagctgtgcctctagtgtcca gccatctgtgtttggccccccccgtgcctccttgaccctggagggtgcactcccactgtctcttc ctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtagtgtctattctattctgggggggtgggtgg ggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcgggtgggc tctatggagatcccggttacctcgcgaatgcatctagatccaatggcctttttggcccagacatgat aagatacattgatgatttggacaacccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtgaaa tttgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttgcggccgcttagccctcc cacacataaccagaggggcagcaattcacgaatcccaactgcctgcgtgtccactcactgtctcttc actatggcctttagatccagatgcagatcgagaagaccctgtcggcaccgtgcagggggctcaa gatgccctgtttctatttccgatcgcgacgatacaagtcagggtgccagctgccgcagcagc agtccccagaccacgagttctgcacaagggtccccagtaaaatgatatacattgacaccagtga gatgcggccgtcgctagagagagctgcgctggcgacgctgtagtcttcagagatggggatgctgt tgattgtagccgttctcttcaatgagggtggaattcttctgagacaaggcttggccatgcggccg ccgctcgggttcgagggccacgcgtcacctaataatgcgaagtgagacctggaccgcgccgcc ccgactgcactcgcgtgttcgaattcgccaatgacaagacgctggcggggtgtgtgtgtcatcataga actaaagacatgcaaaatataatttctccgggggtaccggccttttgggcATTTGatgcagctc ggccaaaaaggcccttaagtatttacctaaatggccatagtacttaaaattacattggcttcttgaa ataaacatggagtattcagaatgtgtcataaataatttctaatttaagatagtatctccattggctttact tttttttttttttttggcctctgtcttccatttgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt attttttttaagatctacactatagttcaagctagactattagctactctgtaaccagggtgacct gaagtcatgggtagcctgctgttttagccttcccacatctaagattacaggatgagctatcattttgg tatattgattgattgattgatgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt tatggTtgtgtgtgaTtgtgtgtatgtatgTtgtgtgtgaTtgtgtgtgtgaTtgtgtgtgtgtgt tgtgtgtgtgaTtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt gtgtgtgtgtTaTaTatattatggtagtgagagGcaacgctccggctcaggtgtcaggtgtgtgtt tgagacagagcttttacttagcttgaattcactggccgtcgtttacaacgtcgtgactgggaaaa ccctggcgtttaccaactaatcgccttgcagcacatcccccttccgacgtggcgtaaatgcgaa gaggcccgcaccgatcgccttcccacagttgcgcagcctgaatggcggaatggcgctgatgc ggtatttttctcttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgactctcagtacaactgctct gatgcgcgatagttaagccagccccgacaccggccaacaccgctgacgctgccttgcagggctt gtcgtctccggcatccgctttacagacaagctgtgaccgtctccggagctgcagctgtgtgcagaggt ttcacccgtcatccaggaaacgcgcgagacgaaaggccctcgtgatacgcctatttttataggttaat gtcatgataataatgttttctagacgtcaggtggcacttttcgggaaatgtgcgcggaaccctat ttgtttatttttctaataacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataacctgataaatgcttcaata atattgaaaaaggagagtagtagtattcaacatttccgtgtcccttattcccttttttgcggcatttt gccttctgtttttctaccagaacgctgtgtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgc acgagtggtgttacatggaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaaga acgttttcaatgatgacacttttaaaatttctgtatgtggcgcggtattatccgtatttgcagccgg gcaagagcaactcgttcgccgcatcactatttccagaaatgactgtgtgtgagtactaccagtacaca gaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctccataacatgagtgat aacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaacgcgttttttcac aacatgggggatcatgttaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaac gacgagcgtgacaccacgatcctgtagcaatggcaacaacgttcgcgaaactattaactggcga actacttactctagcttccggcaacaataatagactggatggaggcgggataaagtgcaggacca cttctgcgtcggcccttccgctggctgtgttattgtctgataaaactgcgagccgtgagctgcggtc tcgctgtatcattgcagactggggccagatgtaagccctccctatcgtatgtattatctacacagca

名称	配列番号	配列
		gggagtcaggcaactatggatgaacgaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaa gcatggtaactgtcagaccaagtftactcatatatactttagattgattaaaacttcattttaatttaa aggatctagggaagatccttttgataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttctgctcact gagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgtaatctgct gcttgcaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtgtgttgcggatcaagagctaccaactct tttccgaaggtaactggcttcagcagagcgagataccaaatactgtccttctagttagccgtagt taggccaccacttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtctgctaactctgttaccagt gctgctgccagtggcgataagtcgtgttaccgggttgactcaagacgatatgaccggataag gcgcagcggctgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacacac accgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaagcggcagcttcccgaaggagaaaagg cggacaggtatccggaacgcgaggtcggaacaggagagcgcagagggagcttccagggg ggaaacgctgtatctttatagctctgctgggttcgccacctctgactgagcgtcgattttgtgat gctcgtcagggggcgagcctatgaaaaacgccagcaacgcgccttttacgggtcctggcc tttctggtgcttttctcacatgttcttctgctgtatcccctgattctgtggataaccgtattaccgct ttgagttagctgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagcagtcagttagcgagg aagcgggaagagcggccaatacgcgaacccgctctccccgcggttgccgattcataatgcagc tgccacgacaggtttccgactggaaagcggcagtgagcgaacgaattaatgtgagttagct cactcattaggcaccaccagcgtttacactttatgcttccggctcgtatgtgtggaattgtgagcgg ataacaatttcacacaggaacagctatgacctgattacgcc
変異体 62(ERT 変 異体)	71	gctggagacatgagagctgccaaacttggccaagcccgtcatgatcaaacgctctaagaagaa cagcctggcctgtccctgacggccgaccagatggtcagtgcttgttgatgctgagcccccat actctattccgagtatgatcctaccagaccctcagtgaaagcttcgatgatggccttactgaccaacc tggcagacagggagCTGGTTCACATGATCAACTGGGCGAAGAGGG TGCCAGGCTTTGTGGATTTGACCTCCATGATCAGGTCCAC CTTCTAGAATGTGCCTGGCTAGAGATCCTGATGATTGGTCT CGTCTGGCGTCCATGGAGCACCCAGTGAAGTACTACTGTTG CTCCTAACTTGGTGTGGACAGGGACGAGGGAAAATGTGTA GAGGGCCTGGTGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATC ATCTCGGTTCCGCATGATGAATCTGCAGGGAGAGGAGTTTG TGTGCCTCAAATCTATTATTTTGCTTAATTCTGGAGTGTACA CATTTCTGCCCAGCACCTGAAGTCTCTGGAAGAGAAGGAC CATATCCACCGAGTCTGGACAAGATCACAGACACTTTGAT CCACCTGATGGCCAAGGCAGGCCTGACCCTGCAGCAGCAG CACCAGCGGCTGGCCCAGCTCCTCCTCATCCTCTCCCACAT CAGGCACATGAGTAACAAAGGCATGGAGCTGctgtacagcatgaag tgcaagaacgtggtgcccctctatGaCctgctgctggaggcggcgacgeccaccgctacatg cgccactagccgtggaggggcatccgtggaggagacggaccaagccacttggccactggg gctctacttcacgcattccttgcaaaagtattacatcacgggggaggcagagggttccctgccac a
変異体 62(ERT 変 異体)	72	AGDMRAANLWPSPLMIKRSKNSLALSLTADQMVSALLDAE PPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLADRELVHMINWAKRVP GFVDLTLHDQVHLLCAWLEILMIGLVWRSMHEHPVKLLFAPN LVLDREDEGKCEGLVEIFDMLLATSSRFRMMNLQGEFVCLK SIILLNSGVYTFPLSTLKSLEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKAG LTLQQHQRLAQLLLILSHIRHMSNKGMELLYSMKCKNVVPL YDLLLEADAHRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHSL QKYYITGEAEGFPAT
SB07135 ベ クター	73	aagcttgaattcagcttgcatgctgcaggtcgttacataacttacggtaaatggccgcctggct gaccgccaacgacccccgccattgacgtcaaatgacgtatgttcccatagtaacgcaatag ggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaaactgcccacttggcagtcacatcaagt tatcatatgccaaagtacggccctattgacgtcaatgacgttaaatggccgcctggcattatgcc

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
		agtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtfacatctacgtattagtcacgctattaccatggg gatgcgggtttggcagtfacatcaatgggcgtggatagcgggttgactcacggggatttccaagtctc cacccttgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgggactttcaaatgctgtaa caactccgcccattgacgcaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagag ctcaataaaagagcccacaacccctcactcggcgccagtcctccgattgactgagtcgcccgg gtacccgtgtatccaataaacctcttcgacttgcacccgacttgggtctcgtcttcttgggaggg tctcctctgagtgattgactaccgctcagcgggggtctttcatttgggggtcgtccgagatcggga gaccctgcccaggaccaccgaccaccaccgggaggtaagctggccagcaacttatctgtgt ctgtccgattgtctagtgtctatgactgattttatgcgctgcgtcggtagttagtaactagctctg tatctggcgaccgtggtggaactgacgagtcggaacacccggccgaacccgtgggagagct cccagggtacttcggggccgttttttggcccacctgagtcctaaaatcccgatcgtttaggactc ttggtgaccccccttagaggaggatgtgtgttctgttaggagacgagaacctaaaacagttc ccgctccgctgaatttttcttctgggttgggaccgaagccgcccgcgctgtgtctgtcgtcag catcgttctgtgtgtctgtctgactgtgttctgtattgtctgaaaatatggccccccctcagtc ccagatgcctgctattctctccaatcctcccccttgcgtcctgccccaccacccccagaa tagaatgacacctactcagacaatgcgatgcaatttctcattttattagaaaaggacagtgggagtg gcacctccagggtcaagggaaggcacggggaggggcaacaacagatggctggcaactaga aggcacagtacttaCTGTTTAAATATTAAACAGggaaccgatgtTAAATA AATAAATAAATAAATGTTTAAACTAGAGTCGCGGCCTCAGT CAGTCACGCATGCCTGCAGTttaACTGGCGTTCAGGTAGGAC ATCACGCGGTCAATGGTCACGGCTCGAATGCGGAAAGCGT GCAACAGGATGCACAGCTTGATCTTGGTCTTGTAGAAGTCC GGTTCTTCCAGGCTGGACTTTTGAGGCACAGTCTCGGAGTT GAAATTCAGGGCCTGCATCAGTTCATCAATCACGGCGAGCA TATTCTGGTCCAGGAAGATCTGCCGCTTCGGGTCCATGAGC AGCTTGGCGTTCATGGTCTTGAACCTCGACCTGATACATCTTC AGATCTTCGTAGATCGAGGAAAGACAGAGCGCCATCATGA ATGAGGTCTTTCTCGACGCCAGGCAGCTGCCGTTAGTGATA AAGCTTGCTCGCGGGAGTTCAGACACGATTCGTTCTTGGT CAGTTCACGCGGAGGCAGGCTTCCACGGTCGAGGTCTTGT CCTTGGTGATGTCCTCGTGATCAATTTCTTCCGAGGTGCAG GGGTAGAACTCAAGGGTCTGGCGGGCCTTCTGCAACATGTT CGACACAGCCCTCAGGAGGTTTGGGAGTGGTGTAGGCAC GGGAAACATTCCAGGGTCGGGGGTGCGCACAGGGAGGTTC GGGAAACCTCCTCCGAGCCTCCTCCTGAACCTCCGCCTGAT CCGCCACCGGAACAAGGCACGCTGGCCCATTCGCTCCAGG AGGACGAGTAGTATCTATCCTGCGCCCGACGCTGATTGAC GCGTTCTTCCGACAAATCACAGTGGCGGAGGTTTGTCTCGGT GAACACCCGGTCTTTCTTCTCCCGTTTGGACTTTCCCTGCAC TTGCACACAGAAAGTGAGCGAGAAGTATGAGTGCGGGGTG CTCCAAGTGTCTGGATATTCCCAAGACACTTCCACTTGGCG GGAGTTCTTGAGTGGCTTCAGCTGCAAGTCTTGGGGGGGT CAGGCTTGATGATGTCGCGGATAAAGAAGGAGGAAGTGTA GTTCTCGTATTTACGCTTATGCACGGCATCGACCATGACCTC GATAGGCAGGACTCTTCCGCGGCAGGCGAGGCGCTGTCTC CCTGGCATTCCACGGAGTACTCATATTCTTGTGTCTCCCC TGACTCTCTCGGCGGACAGAGTGGCGGCTCCACAGGTCACG CCCTGAGGATCGCTTGATCCCCGTGACGACTTCACGGAGAA AGTCAGGTCGGTGGAGATTGTCGTCAGCCACCAACAGGTG AACCGACCGCTGTAGTCTTGGCTTCGCAGCGGAGGAAGGT CTTGTTCTTCGGTCTTTTGGTCTTGGAGATGTCAGTGGA CCAGATTCCATCCTCTTCTTGTGCAGCAGCAGGAGT

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
		GGGACAGCACTTCGCCACCCTTGTGGCAAGTGTACTGGCCC GCGTCGCCGAACCTCCTTGACTTGAATGGTCAGGGTCTTTCC GCTTCCGAGCACCTCGGAGCTCTGATCCAGGGTCCAGGTTA TGCCGTCCTCTTCTGGCGTATCGCAAGTCAGCACGACCATT TCTCCAGGGGCGTCCGGGTACCAATCCAGCTCGACCACGTA GACGTCCTTCTTCAGTTCCCAATGGCGACCAGAGGGGAAG CGAGGAACACAAGGGAGAACCAGGAGATGACGAGTTGCTG ATGGCACATCATGGTGGCGACACCGGTACGCGTTGGCCCCC ATTATATACCCTCTAGAAGTAGTtatccactccgtgtaaggagagtgcct cttagaateTTCGGCGTCGACTGCTTCattccgagcgactgataccTTCGG CGTCGACTGCTTCatacgaaggcagtcggatcTTCGGCGTCGACTGCT TCaacccttactgagacgggacTTCGGCGTCGACTGCTTCaaaggcgttgcgaa tcctcatgcgattgttacgaaacccgTTAATTAAAGAGCGAGATTCCGTCT CAAAGAAAAAAGTAATGAAATGAATAAAATGAGTCCT AGGCCAGTAAATGTCGTAAATGTCTCAGCTAGTCAGGTAG TAAAAGGTCTCAACTAGGCAGTGCCAGAGCAGGATTCAAA TTCAGGGCTGTTGTGATGCCTCCGCAGACTCTGAGCGCCAC CTGGTGGTAATTTGTCTGTGCCTCTTCTGACGTGGAAGAAC AGCAACTAACACACTAACACGGCATTACTATGGGCCAGCC ATTGTCCATCTAGATGGccgataaaataaaagattttattagtctccagaaaaagg ggggaatgaaagacccacgtgtaggttgcaagctagctgcagtaacgccatttgcaggcat ggaaaaataccaaaccaagaatagagaagttcagatcaaggcggtgtacatgaaatagtaac gttgggccaacaggatatctcggtgagcagtttcggccccggccgggccaagaacagatg gtcaccgcagtttcggccccggccggagccaagaacagatggccccagatatggccaaccc tcagcagtttctaagaccatcagatgttccaggctccccaaggacctgaaatgacctgcgcc ttattgaattaaccaatcagcctgcttctcgttctgttcgcgcgttctgcttcccagctctataaaa gagctcacaacccctactcggcgccagtcctccgacagactgagtcggccgggGGATC CGCCACCATGTCTAGACCTGGCGAGAGGCCCTTCCAGTGCC GGATCTGCATGCGGAACCTCAGCAACATGAGCAACCTGACC AGACACACCCGGACACACACAGGCGAGAAGCCTTTTCAGT GCAGAATCTGTATGCGCAATTTCTCCGACAGAAGCGTGCTG CGGAGACACCTGAGAACCCACACCGGCAGCCAGAAACCAT TCCAGTGTGCGATCTGTATGAGAACTTTAGCGACCCCTCC AATCTGGCCCGGCACACCAGAACACATACCGGGGAAAAAC CCTTTTCAGTGATAGGATATGCATGAGGAATTTTTCGACCGG TCCAGCCTGAGGCGGCACCTGAGGACACATACTGGCTCCCA AAAGCCGTTCCAATGTCGGATATGTATGCGCAACTTTAGCC AGAGCGGCACCCCTGCACAGACACACAAGAACCCATACTGG CGAGAAACCTTTCCAATGTAGAATCTGCATGCGAAATTTT CCCAGCGGCCTAATCTGACCAGGCATCTGAGGACCCACCTG AGAGGATCTaCCTGCAGGGATGAGTTTCCACCATGGTGT TCCTTCTGGGCAGATCAGCCAGGCCTCGGCCTTGGCCCCGG CCCCTCCCCAAGTCCTGCCCCAGGCTCCAGCCCCTGCCCC GCTCCAGCCATGGTATCAGCTCTGGCCCAGGCCCCAGCCCC TGTCCCAGTCTTAGCCCCAGGCCCTCCTCAGGCTGTGGCCC CACCTGCCCCCAAGCCCCACCCAGGCTGGGGAAGGAACGCT GTCAGAGGCCCTGCTGCAGCTGCAGTTTGATGATGAAGACC TGGGGGCCCTTGCTTGGCAACAGCACAGACCCAGCTGTGTTC ACAGACCTGGCATCCGTCGACAACTCCGAGTTTCAGCAGCT GCTGAACCAGGGCATACTGTGGCCCCCACAACTGAGC CCATGCTGATGGAGTACCCTGAGGCTATAACTCGCCTAGTG ACAGGGGGCCAGAGGCCCCCGACCCAGCTCCTGCTCCACT

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
		GGGGGCCCCGGGGCTCCCCAATGGCCTCCTTTCAGGAGATG AAGACTTCTCCTCCATTGCGGACATGGACTTCTCAGCCCTG CTGAGTCAGATCAGCTCCaattgtgctacgcgatcctctgctggagacatga gagctgccaaccttggccaagcccgtcatgatcaaagcttaagaagaacagcctggcctgt ccctgacggccgaccagatggtcagtgcttggatgctgagcccccatactctattccgagta tgatcctaccagaccctcagtgaaagctcagtgatggcttactgaccaacctggcagacaggga gCTGGTTACATGATCAACTGGGCGAAGAGGGTGCCAGGCT TTGTGGATTTGACCTCCATGATCAGGTCCACCTTCTAGAAT GTGCCTGGCTAGAGATCCTGATGATTGGTCTCGTCTGGCGC TCCATGGAGCACCCAGTGAAGCTACTGTTTGCTCCTAACTT GGTGTGTGGACAGGGACGAGGAAAATGTGTAGAGGGCCTG GTGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATCATCTCGGTT CCGCATGATGAATCTGCAGGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCA AATCTATTATTTGCTTAATTCTGGAGTGACACATTTCTGC CCAGCACCTGAAGTCTCTGGAAGAGAAGGACCATATCCA CCGAGTCCTGGACAAGATCACAGACACTTTGATCCACCTGA TGGCCAAGGCAGGCCTGACCCTGCAGCAGCAGCACCAGCG GCTGGCCCAGCTCCTCCTCATCCTCTCCCACATCAGGCACA TGAGTAACAAAGGCATGGAGCTGctgtacagcatgaagtgaagaacgtgg tgcccctctatGaCctgctgctggaggcgccgacgccaccgctcatcgccactagcc gtggaggggcatcctgtggaggagacggaccaagccacttggccactgcccgtctacttcac gcattccttgcaaaagtattacatcacgggggagggcagagggttccctgccacaTaAGTCG ACAATCAACCTCtgattacaaaattgtgaaagattgactgtattcttaactatgttgc ctttacgctatgtggatacgtgcttaagtcccttgcctatgctatgctccgtagtgccttatttc tcctcctgtataaatcctggtgtgtctcttattgaggagttgtggccgttgcaggcaacgtggc gtgtgtgctactgtgttgcagcaacccccactggttgggcatgcccaccctgtcagctcc ttccgggacttgccttccccctcctattgccacggcggaactcatcgccgctgccttggccgc tgtgtgacaggggctgctgttggcactgacaattccgtggtgttgcgggaaatcatcgtcct ttccttggtgctgcctgtgttgcacactggattcgcgcgggacgtccttctgctacgtccctcgg ccctcaatccagcggaccttccctcccgccgctgctccggtctgcggccttccgcgtacg ccttcgccctcagacgagtcgcatccttggggccgctcccgcatatcagtggtccaggct ctagttttgactcaacaataaccagctgaagcctatagtagtacgacccatagataaaataaagat tttatttagtccagaaaaagggggaatgaaagacccacctgtaggttggcaagctagcaata aaagagcccacaacccctcactcggggcgccagtcctccgattgactgagtcggcgccgcttc gagcagacatgataagatacattgatgagtttgacaaccacaactagaatgagtgaaaaaaat gcttatttgaataattgtgatgctattgcttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttaaca acaacaattgcattctttatgttcagggttcaggggagatgtggagggttttaagcaagtaaa acctctacaattgtgtaaaatcgataaggatcggttacccgtgatccaataaacctcttgcagtt gcatccgactgtggtctcgtgttccttgggagggtctcctctgagtgattgactaccctgcagcgg gggtctttcacatgcagcatgtatcaaaatatttggttttttcttaagctgtgccttctagtcca gccatctgttgttccccctccccgtgccttcttgacctggaagtgccactcccactgtccttcc ctaataaaatgaggaaatgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggtgg ggcaggacagcaagggggaggttggaagacaatagcagcatgctggggatgcgggtggc tctatggagatcccgcggtacctcgcaatgcatctagatccaatggccttttggccagacatgat aagatacattgatgagtttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgcttatttga tttgtgatgctattgcttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttggcgccgttagccctc cacacataaccagaggcagcaattcacgaatccaactgccgtcggctgtccatcactgtccttc actatggcttgcacccaggatgcagatcgagaagcacctgtcggcaccgtccgagggtcaa gatgccccgttctcatttccgatcgcgacgatacaagtcagggtgccagctgcgcgacgacgac agtgcacgacaccacgagttctgcacaagggtccccagtaaaatgatatacattgacaccagtgaa gatgcggcgctgctagagagagctgcgctggcgacgctgtagcttctcagagatgggatgctgt tgatttagccgttgccttcaatgaggggtgattcttcttgagacaaaggcttggccatcgccg

10

20

30

40

40

名称	配列番号	配列
LR1 分割 N 末端リンカー +CD16Tace(切断部位)	74	AGCGGCGGAGGTGGTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGAATTA CACAGGGACTCGCCGTGTCTACAATCTCCAGCTTCTTTGGT GGCGGTAGTGGCGGCGGTGGCAGTGGCGGTGGATCTCTTCA A
LR1 分割 N 末端リンカー +CD16Tace(切断部位)	75	SGGGSGGGGSGITQGLAVSTISSFFGGGSGGGGSGGSLQ
B7-1(TM ド メイン)	76	CTGCTGCCAAGCTGGGCCATCACACTGATCTCCGTGAACGG CATCTTCGTGATCTGTTGCCTGACCTACTGCTTCGCCCCTCG GTGCAGAGAGCGGAGAAGAAACGAACGGCTGCGGAGAGA ATCTGTGCGGCCTGTG
B7-1(TM ド メイン)	77	LLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRRNERLRRESVRP V
SV40 プロ モーター	78	GTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGC AGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCA ACCAGGTGTGAAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAA GTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTC CCGCCCTAACTCCGCCCATCCGCCCTAACTCCGCCCAG TTCCGCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTAT TTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCTGCCTCTGAGCTATTCC AGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGC AAA
SB07127 ベ クター	79	aagcttgaattcgagcttgcacgtcgcaggtcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggct gaccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatag ggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgccacttggcagtacatcaagt tatcatatcccaagtacgcccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcc agtacatgaccttatggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgtctattaccatggt gatgcggttttggcagtacatcaatggcggtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctc caccctattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaa caactccgccccattgacgcaaatggcggttagcggtgtacggtggaggcttatataagcagag ctcaataaaagagcccacaacccctcactcgccgcgccagtcctccgattgactgagtcgccgg gtaccgtgtatcaataaacctcttgcagttgcatccgacttgggtctcgtgttcttgggaggg tctcctctgagtattgactaccggtcagcggggtcttcaattgggggctcgtccgagatcgga gaccctgcccagggaccacgacccaccacgggaggttaagctggccagcaacttatctgtgt ctgtccgattgtctagtctatgactgattttatgcgcctgcgtcggtactagttagctaactagctctg tatctggcggacccgtggtggaactgacgagttcgggaacacccggccgcaaccctgggagacgt cccagggacttcgggggccgttttttggcccgacctgagtcctaaaaatcccgatcgttttagactc tttggtgaccccccttagaggagggatgtggttctgtaggagacgagaacctaaaacagttc ccgctccgtctgaatttttgccttgcgttgggaccgaagccgcgcgcgtcttctgtctgacg catcgttctgtgttctctgtctgactgtgttctgtatttctgtaaaataggccccccctcagtc ccagcatgcctgtattctcttccaatcctcccccttgcgtcctgccccacccacccccagaa tagaatgacacctactcagacaatgcgatgcaatttctcattttataggaaaggacagtgggagt gcacctccagggtcaaggagacgggggaggggcaacaacagatggctggcaactaga aggcacagtacttaCACAGGCCGCACAGATTCTCTCCGCAGCCGTT CGTTTCTTCTCCGCTCTCTGCACCGAGGGGCGAAGCAGTAG GTCAGGCAACAGATCACGAAGATGCCGTTACGGAGATCA GTGTGATGGCCCAGCTTGGCAGCAGTTGAAGAGATCCACCG

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
		CCACTGCCACCGCCGCCACTACCGCCACCAAAGAAGCTGG AGATTGTAGACACGGCGAGTCCCTGTGTAATTCAGATCCT CCGCTCCGCTACCACCTCCGCCGCTAGAGGCGTTCAGGTA GCTCATCACTCTGTGATGGTCACGGCTCTGATCCGGAAGG CGTGCAGCAGGATGCACAGCTTGATCTTGGTCTTGTAGAA TCGGGTTCTTCCAGGCTAGACTTCTGGGGCACTGTCTCGCT GTTGAAGTTCAGGGCCTGCATCAGCTCGTCGATCACGGCCA GCATATTCTGGTCCAGGAAGATCTGCCGCTTGGGGTCCATC AGCAGCTTGGCGTTCATGGTCTTGAATTCCACCTGGTACAT CTTCAGGTCCTCGTAGATGCTGCTCAGGCACAGGGCCATCA TGAAGGAGGTCTTTCTGCTGGCCAGGCAAGAGCCGTTGGTG ATGAAGCTGGTTTCCCGGCTGTTACAGGCAGCTCTCGTTCTTG GTCAGTTCCAGAGGCAGGCAGGCTTCCACGGTGCTGGTCTT ATCCTTGGTGATGTCTCGTGGTCGATTTCTCGCTGGTGCA GGGGTAGAATTCCAGGGTCTGTCTGGCCTTCTGCAGCATGT TGGACACGGCTCTCAGCAGGTTCTGGCTGTGGTGACAGACAA GGAACATGCCAGGATCAGGAGTGGCCACAGGCAGGTTTC TAGATCCGCCGCCAGATCCACCACCTGATCCGCCACCGCTT CCTCCGCCAGAACATGGCACGCTGGCCCATTCGCTCCAAGA GCTGCTGTAGTACCGGTCTGGGCTCTGACGCTGATGCTGG CGTTCTTTCTGCAGATCACGGTGGCGCTGGTCTTGTCTGGTG AACACCCGGTCTTTTCTCGCGCTTGGACTTGGCCTGCACT TGCACGCAAAAGGTCAGGCTGAAGTAGCTGTGGGGTGTAG ACCAGGTGTGGGGTACTCCAGGACACTTCCACCTGTCTG CTGTTCTTCCAGAGGCTTCAGCTGCAGGTTCTTTGGAGGATC GGGCTTGATGATGTCCCGGATGAAAAAGCTGGAGGTGTAG TTCTCGTACTTCAGCTTGTGCACGGCGTCCACCATCACTTCG ATAGGCAGAGACTCTTCGGCGGCTGGACAGGCGCTGTCTCTC TTGGCATTCCACGCTGTACTCGTATTCTTTGTTGTGCCCCG CACTCTTTCCGGCAGACAGTGTAGCGGCGCCACATGTAACGC CCTGAGGATCACTGCTGCCTCTGCTGGACTTCACGCTGAAG GTCAGGTCGGTGCTGATGGTGGTCAGCCACCAACATGTGAA CCGGCCGCTGTAGTTCTTGGCCTCGCATCTCAGGAAGGTCT TGTTCTTGGGCTCTTTCTGGTCTTCAGGATGTCCGGTGCTCC AAATGCCATCCTCTTTCTTGTGGAGCAGCAGCAGGCTGTGG CTCAGCACTTCTCCGCTTTGTGACAGGTGTACTGGCCGGC GTCGCCAAACTCTTCACTTGGATGGTCAGGGTCTTGCCGC TGCCGAGCACCTCGCTAGACTGATCCAGTGTCCAGGTGATG CCGTCTCTTCCAGGGGTATCGCAGGTCAGCACCACCATCTC GCCAGGAGCATCGGGATACCAGTCCAGTTCACCACGTACA CGTCTTTCTTCCAGCTCCAGATGGCCACCAGAGGAGAGGCC AGGAACACCAGGCTGAACCAGCTGATGACCAGCTGCTGGT GACACATCATGGTGGCGACACCGGTACGCGTTGGCCCCCAT TATATACCCTCTAGAACTAGTtatccactccgtgaaggagagtgagccttt acgaatcTTCGGCGTCGACTGCTTCattccgaggcgactgataccTTCGGC GTCGACTGCTTCatacgaaggcagtcaggattTTCGGCGTCGACTGCTT CaacctttactgagacgggacTTCGGCGTCGACTGCTTCaaaggcgttgcaatc ctcatcgattgttacgaaaccgTTAATTAAAGAGCGAGATTCCGTCTC AAAGAAAAAAAAAAGTAATGAAATGAATAAAATGAGTCCTA GAGCCAGTAAATGTCGTAAATGTCTCAGCTAGTCAGGTAGT AAAAGGTCTCACTAGGCAGTGGCAGAGCAGGATTCAAAAT TCAGGGCTGTTGTGATGCCTCCGCAGACTCTGAGCGCCACC

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
		TGGTGGTAATTTGTCTGTGCCTCTTCTGACGTGGAAGAACA GCAACTAACACACTAACACGGCATTACTATGGGCCAGCCA TTGTCCATCTAGATGGccgataaaataaaagattttatttagtctccagaaaaagggg ggaatgaaagacccacctgtaggttggcaagctagctgcaGTGTGTCAGTTAGG GTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATG CAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAA AGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCAT GCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTC CGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTC CGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAAGAGGCCG AGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGA GGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGGATCCGCCAC CATGTCTAGACCTGGCGAGAGGCCCTTCCAGTGCCGGATCT GCATGCGGAACTTCAGCAACATGAGCAACCTGACCAGACA CACCCGGACACACACAGGCGAGAAGCCTTTTCAGTGCAGA ATCTGTATGCGCAATTTCTCCGACAGAAGCGTGCTGCGGAG ACACCTGAGAACCCACACCGGCAGCCAGAAACCATTCCAG TGTCGCATCTGTATGAGAACTTTAGCGACCCCTCCAATCT GGCCCGGCACACCAGAACACATAACCGGGGAAAAACCCTTT CAGTGTAAGGATATGCATGAGGAATTTTCCGACCGGTCCAG CCTGAGGCGGCACCTGAGGACACATACTGGCTCCCAAAG CCGTTCCAATGTCGGATATGTATGCGCAACTTTAGCCAGAG CGGCACCTGACAGACACACAAGAACCCTACTGGCGAG AAACCTTTCCAATGTAGAATCTGCATGCGAAATTTTCCCA GCGGCCTAATCTGACCAGGCATCTGAGGACCCACCTGAGA GGATCTaCCTGCAGGGATGAGTTTCCCACCATGGTGTTCCT TCTGGGCAGATCAGCCAGGCCTCGGCCTTGGCCCCGGCCCC TCCCCAAGTCCTGCCCCAGGCTCCAGCCCCTGCCCCTGCTC CAGCCATGGTATCAGCTCTGGCCCAGGCCAGCCCCCTGTCT CCAGTCTTAGCCCCAGGCCCTCCTCAGGCTGTGGCCCCACC TGCCCCCAAGCCCACCCAGGCTGGGGAAGGAACGCTGTCA GAGGCCCTGCTGCAGCTGCAGTTTGATGATGAAGACCTGGG GGCCTTGCTTGCAACAGCACAGACCCAGCTGTGTTACAG ACCTGGCATCCGTCGACAACTCCGAGTTTCAGCAGCTGCTG AACCAGGGCATACTGTGGCCCCCACACAACCTGAGCCCAT GCTGATGGAGTACCCTGAGGCTATAACTCGCCTAGTGACAG GGGCCCAGAGGCCCCCGACCCAGCTCCTGCTCCACTGGGG GCCCCGGGGCTCCCCAATGGCCTCCTTTCAGGAGATGAAGA CTTCTCCTCCATTGCGGACATGGACTTCTCAGCCCTGCTGAG TCAGATCAGCTCCaattgtgcgtacgcgatcctctgctggagacatgagagctgcc aaccttggccaagcccgcctcatgatcaaacgctctaagaagaacagcctggcctgtccctgacg gccgaccagatggtcagtgccctgttgatgctgagccccatacttattccgagtatgacctac cagaccttcagtgaaagcttcgatgatgggctactgaccaacctggcagacagggagCTGG TTCACATGATCAACTGGGCGAAGAGGGTGCCAGGCTTTGTG GATTTGACCTCCATGATCAGGTCCACCTTCTAGAATGTGC CTGGATGGAGATCCTGATGATTGGTGTGGTCTGGCGCTCCA TGGAGCACCCAGTGAAGCTACTGTTTGCTCCTAACTTGCTC TTGGACAGGGACCAGGGAAAATGTGTAGAGGGCCTGGTGG AGATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATCATCTCGGTTCCGC ATGATGAATCTGCAGGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCAAATC TATTATTTTGCTTAATTCTGGAGTGACACATTTCTGCCAG CACCCTGAAGTCTCTGGAAGAGAAGGACCATATCCACCGA

10

20

30

40

50

名称	配列番号	配列
		GTCCTGGACAAGATCACAGACACTTTGATCCACCTGATGGC CAAGGCAGGCCTGACCCTGCAGCAGCAGCACCAGCGGCTG GCCCAGCTCCTCCTCATCCTCTCCCACATCAGGCACATGAG TAACAAAGGCATGGAGCTGctgtacagcatgaagtgaagaacgtgggccct ctatGaCctgtctgtgaggcgccggacgccaccgctacatgcgccactagccgtggagg ggcatccgtggaggagacggaccaagccacttggccactgcggctctactcatcgattccct gcaaaagtattacacacgggggagcgaggggttccctgccacaTaAGTCGACAAT CAACCTCtggattacaaaatttgaagattgactggattcttaactatgttgctcctttacgc tatgtgatacgtcttfaatgccttgtatcatgctattgcttcccgatggcttcttctctctg tataaatctgtgtgtctctttatgaggagttgtggccgtgtgcaggcaacgtggcgtgtgtgc actgtgttctgacgcaacccccactgttggggcattgccaccctgtcagctcctttccggga ctttcgttccccctccatttgcacggcggaactcatcgccgctgcttgcgcgtgtggaca ggggctcgtgttgggcactgacaattccgtgtgtgtgtgggaaatcatcgtcctttccttggct gctcgcctgtgtggccactgtattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttgcgcctcaatc cagcggaccttctcccgcgcctgtgcggcctctgcggccttccgcgtctacgccttgcgc ctgagcagagtcggatctcccttggggcgcctcccgcgatatcagtggtccagcgtctagtgtt actcaacaatatcaccagctgaagcctatagtagcagccatagataaaaaaagattttattagt ctccagaaaaagggggaatgaaagaccccactgtaggttggcaagctagcaataaaagagc ccacaacccctcactcggggcgccagtcctccgattgactgagtcggccggcgcttcgagcaga catgataagatacatgtgatgttggacaaccacacataagtcagtgaaaaaatgctttattt gtgaaatttgtatgctattgttattgttaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaat tgcattcattttatgttgcaggtcaggggagatgtggagggtttttaaagcaagtaaaaccttaca aatgtggtaaaatcgataaggatcggtacccgtgtatccaataaacctcttgcagttgcatccga cttgtgtctcgtcttcttgggagggctcctctgagtgattgactaccgtcagcggggcttctc acacatgcagcatgtataaaatattgttttttcttaagctgtgccttctagtgtccagccatctg ttgtttgccccccccgtgccttcttaccctggaaggtgccactccactgtccttcttaataaa atgaggaaattgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcagga cagcaagggggaggttgggaagacaatagcagcagcatgtggggatgcgggtggcctctatgga gatccccgggtacctcgcaatgcatctagatccaatggccttttggccagacatgataagatac attgagtgatttggacaaccacacataagtcagtgaaaaaatgctttattgtgaaatttgtgat gctattgctttattgttaaccattataagctgcaataaacaagttgcggccgcttagcctccacaca taaccagagggcagcaattcacgaatccaactgccgtggcgtgtccatcactgtccttcatatgg ctttgcacccaggtgcagatcgagaagcactgtcggcaccgtccgcaggggctcaagatgcc ctgttctcattccgatcgcgacgatacaagtcaggttgcagctgcgcgagcagcagcagtgccc agcaccacaggttctgcacaaggtccccagtaaaatgatatacatgacaccagtgaaatgcgg ccgtcgtagagagagctgcgtggcgacgtgtagtctcagagatgggatgctgttgattgta gccgtgtcttcaatgagggtggtattcttctgagacaaaggcttggccatgcggccgcccgtcg gtgttcgagggcacacgcgtcaccttaatatgcgaagtggacctcgaccgcgcgcggccgactg catctgcgtgttcgaattcggcaatgacaagacgctggcggggttgtgtcatcatagaaactaaag acatgcaaatatattctccgggggtaccggccttttggccATTGatcggtatcgccaaa aaggcccttaagtatttacattaaatggccatagtactaaagtacattggcttcttgaataacat ggagttatcagaatgtgtcataaatatttctaatttaagatagtatctcattggcttctacttttctt tttttttgtcctctgtcttccatttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgttgtt aaagatcctacactatagttcaagctagactattagctactctgtaacccagggtgacctgaagtc ggtagcctgctgttttagccttccacatctaagattacaggtatgagctatcattttgttatattgatt gattgattgattgatgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt Tgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt Tgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgt TaTaTatatttatgtagtgagagGcaacgctccgctcaggtgtcaggttgggttttgagacaga gtcttctacttagcttgaattcactggcgtctgttacaacgtcgtgactgggaaaacccctggcgtt acccaacttaatgcgcttgcagcacaatcccccttccagctggcgtaatagcgaagaggcccg accgatgccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgctgtatcggtatttctcc

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列	
		ttacgcatctgtgcgggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtaaatctgctctgatgccgcat aggttaagccagccccgacacccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggcttctgctccc ggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtca tcaccgaacgcgcgagacgaaagggcctctgatacgcctattttataggtaatgtcatgataat aatggttcttagacgtcaggtggcactttcggggaaatgtgcgcggaacccctattgttttttct aaatacattcaaatgtatccgctcatgagacaataacccgtataaatgcttcaataattgaaaaa ggagagatagatttcaacatttccgtgtcgccttattccctttttgcggaattttgccttctgttt tgctacccagaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggtta catgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcggcgaagaacgtttccaatg atgagcacttttaagttctgtatgtggcgcggtattatccgtattgacccgggcaagagcaact cggctgcgcgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatctta cggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataaccatgagtataactgcggcca acttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggac atgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgacgagcgtgac accacgatgcctgtgacaatggcaacaacgttgcgcaaaactattaactggcgaactacttacttag cttccggcaacaattaatagactggatggaggcgataaagttgcaggaccacttctgcgctcgg ccctccggctggctggtttattgtgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgcgggtatcatt gcagcactggggcagatggttaagccctccgtatcgtatgtatctacacgacggggagtcaggc aactatggtgaacgaatagacagatcgtgagataggtgcctactgattaagcattggttaactg tcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcttttaatttaaaaggatcaggga agatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgcttccactgagcgtcagaccc cgtagaaaagatcaaggtatcttctgagatccttttttctgcgctaactctgcttgcacaacaaaa aaaccaccgctaccagcgggtgtttgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaa ctggcttcagcagagcgagatacacaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccact caagaacatctgtaccggcctacatacctcgtctgctaactcgtttaccagtggtgctgctccagt gcgataagtcgtgttaccgggtggactcaagacgatagttaccggataaggcgacgcggctc ggctgaacggggggtctgtcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagat acctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaaggagaaagcgcgacaggtatc cggtaagcggcagggctggaacagagagcgacgagggagcttccagggggaacgcctg gtatctttatagctgtcgggttccaccctctgacttgagcgtcgtattttgtgatgctcgtcagg ggggcgagcctatggaaaaacgcagcaacgcggccttttacgggttctggtcctttgtgctgcctt ttgctcacatgttcttctcgttatccctgattctgttgataaccgtattaccggcctttgagtga gataccgtcgtccgacggcgaacgaccgagcgcagcagtgatgagcgaaggagcgaaga gcgccaatacgaacccctctccccgcgctgtggccgattcaatgacagctggcacgaca ggtttcccactggaagcgggcagtgagcgcgaacgaatgaatgagtgtagctcactcattagg caceccaggctttacactttatgttccggctcgtatgtgtggaattgtgagcggataacaatttca cacaggaaacagctatgacctgattacgcc	10
		aaagcgtgaattcgaactgcatgcctgcaggtcgttataacttacggtaaatggcccgcctggct gaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatag ggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaaactgccacttggcagtcacaaagt tatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacgtaaatggccgcctggcattatgcc agtacatgaccttatggactttctacttggcagtcacatctacgtattagtcacgtattaccatggt gatgcggttttggcagtcacatcaatgggcgtggatagcggttgactcacggggtttccaagtctc cacccttggactcaatgggagttgttttggcacaaaatcaacggactttccaaaatgtcgttaa caactccgccccattgacgcaaatggcggttaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagag ctcaataaaaagagcccaacccctactcggcgccagtcctccgattgactgagtcgcccgg gtaccctgtatccaataaacctcttgcagttgcatccgacttgggtctcgtgttcttgggagg tctctctgagtgattgactaccgctcagcgggggtcttcttgggggctcgtccgagatcggga gaccctgcccaggaccaccgaccaccgggaggttaagctggccagcaacttatctgtgt ctgtccgattgtctatgtctatgactgatttatgcgcctgcgtcggtactagtttagctaactagctc tatctggcgagaccgtgtggaactgacgagttcggaaacacccggccgcaaccctgggagacgt cccagggacttcggggccgtttttgtggcccacctgagtcctaaatcccgatcgtttaggactc	20
SB07133 ベ クター	80		30
			40

名称	配列 番号	配列
		tttggtgcaccccccttagaggaggatgtggttctggtaggagacgagaacctaaaacagttc ccgcctccgtctgaatttttgccttgggttgggaccgaagccgcgcgcgtctgtctgcag catcgttctgtgtgtctctgtctgactgtgttctgtattgtctgaaaatatggccccccctcagtc cccagcatgcctgtattctctcccaatcctcccccttgcgtcctgcccacccccccccagaa tagaatgacacctactcagacaatgcgatgcaatttctcattttattaggaaaggacagtgggagtg gcacctccagggtcaagggaaggcacgggggaggggcaaacaacagatggctggcaactaga aggcacagtacttaCACAGGCCGCACAGATTCTCTCCGCAGCCGTT CGTTTCTTCTCCGCTCTCTGCACCGAGGGGCGAAGCAGTAG GTCAGGCAACAGATCACGAAGATGCCGTTACGGAGATCA GTGTGATGGCCCAGCTTGGCAGCAGTTGAAGAGATCCACCG CCACTGCCACCGCCGCCACTACCGCCACCAAAGAAGCTGG AGATTGTAGACACGGCGAGTCCCTGTGTAATCCAGATCCT CCGCTCCGCTACCACTCCGCCGCTAGAGGCGTTACAGGTA GCTCATCACTCTGTGATGGTCACGGCTCTGATCCGGAAGG CGTCAGCAGGATGCACAGCTTGATCTTGGTCTTGTAAG TCGGGTCTTCCAGGCTAGACTTCTGGGGCACTGTCTCGCT GTTGAAGTTCAGGGCCTGCATCAGCTCGTCGATCACGGCCA GCATATTCTGGTCCAGGAAGATCTGCCGCTTGGGGTCCATC AGCAGCTTGGCGTTCATGGTCTTGAATTCCACCTGGTACAT CTTCAGGTCTCTGATAGTGTGCTCAGGCACAGGGCCATCA TGAAGGAGGTCTTCTGCTGGCCAGGCAAGAGCCGTTGGTG ATGAAGCTGGTTTCCCGGCTGTTACAGCAGCTCTCGTTCTTG GTCAGTTCAGAGGCAGGCAGGCTTCCACGGTGTGGTCTT ATCCTTGGTGATGTCCTCGTGGTCGATTTCTCGTGGTGCA GGGGTAGAATTCCAGGGTCTGTCTGGCCTTCTGCAGCATGT TGGACACGGCTCTCAGCAGGTTCTGGCTGTGGTGACAGCAA GGGAACATGCCAGGATCAGGAGTGGCCACAGGCAGGTTTC TAGATCCGCCGCCAGATCCACCACCTGATCCGCCACCGCTT CCTCCGCCAGAACATGGCACGCTGGCCCATTCGCTCCAAGA GCTGCTGTAGTACCGGTCTTGGGCTCTGACGCTGATGCTGG CGTTCTTTCTGCAGATCACGGTGGCGCTGGTCTTGTGCGTG AACACCCGGTCTTTTCTCGCGCTTGGACTTGCCCTGCACT TGCACGCAAAAGGTCAGGCTGAAGTAGCTGTGGGGTGTAG ACCAGGTGTGGGGTACTCCAGGACACTTCCACCTGTCTG CTGTTCTTACAGAGGCTTCAGCTGCAGGTTCTTGGAGGATC GGGCTTGATGATGTCCCGGATGAAAAAGCTGGAGGTGTAG TTCTCGTACTTCAGCTTGTGCACGGCGTCCACCATCACTTCG ATAGGCAGAGACTCTTCGGCGGCTGGACAGGCGCTGTCTC TTGGCATTCCACGCTGTACTCGTATTCTTTGTTGTGCCCCG CACTCTTTCGGCAGACAGTGTAGCGGCGCCACATGTAACGC CCTGAGGATCACTGCTGCCTCTGCTGGACTTCACGCTGAAG GTCAGGTCGGTGCTGATGGTGGTCAGCCACCAACATGTGAA CCGGCCGCTGTAGTTCTTGGCCTCGCATCTCAGGAAGGTCT TGTTCTTGGGCTCTTCTGGTCTTCAGGATGTGGTGCTCC AAATGCCATCCTCTTCTTGTGGAGCAGCAGCAGGCTGTGG CTCAGCACTTCTCCGCCTTTGTGACAGGTGTACTGGCCGGC GTCGCCAACTCTTCACTTGGATGGTCAGGGTCTTGCCGC TGCCGAGCACCTCGCTAGACTGATCCAGTGTCCAGGTGATG CCGTCTCTTACAGGGTATCGCAGGTGAGCACCACCATCTC GCCAGGAGCATCGGGATACAGTCCAGTTCACCACGTACA CGTCTTTCTTACAGTCCCAGATGGCCACCAGAGGAGAGGCC AGGAACACCAGGCTGAACCAGCTGATGACCAGCTGCTGGT

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
		GACACATCATGGTGGCGACACCGGTACGCGTTGGCCCCCAT TATATACCTCTAGAACTAGTtatccactccgtgtaaggagagtgagcctett acgaatcTTCGGCGTCGACTGCTTCattccgagcgactgataccTTCGGC GTGCGACTGCTTCataggaaggcagtcggatcTTCGGCGTCGACTGCTT CaacctttactgagacgggacTTCGGCGTCGACTGCTTCaaaggcgttgcaatc ctcatgcgattgttacgaaacccgTTAATTAAGAGCGAGATTCCGTCTC AAAGAAAAAAAAAGTAATGAAATGAATAAAATGAGTCCTA GAGCCAGTAAATGTCGTAAATGTCTCAGCTAGTCAAGTAGT AAAAGGTCTCAACTAGGCAGTGGCAGAGCAGGATTCAAAT TCAGGGCTGTTGTGATGCCTCCGCAGACTCTGAGCGCCACC TGGTGGTAATTGTCTGTGCCTCTTCTGACGTGGAAGAACA GCAACTAACACACTAACACGGCATTACTATGGGCCAGCCA TTGTCCATCTAGATGccgataaaataaaagattttatttagtctccagaaaaagggg ggaatgaaagacccacactgtaggttgcaagctagctgcaGTGTGTCAGTTAGG GTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTAGT CAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAA AGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCAT GCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCCGCCCTAACTC CGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTTCTC CGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCGAGAGGCCG AGGCCGCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGA GGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGGATCCGCCAC CATGTCTAGACCTGGCGAGAGGCCCTTCCAGTGCCCGGATCT GCATGCGGAACTTCAGCAACATGAGCAACCTGACCAGACA CACCCGACACACACAGGCGAGAAGCCTTTTCAGTGCAGA ATCTGTATGCGCAATTTCTCCGACAGAAGCGTGCTGCGGAG ACACCTGAGAACCCACACCGGCAGCCAGAAACCATTCCAG TGTCGCATCTGTATGAGAACTTTAGCGACCCCTCCAATCT GGCCCGGCACACCAGAACACATACCGGGGAAAAAACCTTT CAGTGTAGGATATGCATGAGGAATTTTCCGACCGGTCCAG CCTGAGGCGGCACCTGAGGACACATACTGGCTCCCAAAAG CCGTTCCAATGTCGGATATGTATGCGCAACTTTAGCCAGAG CGGCACCCTGCACAGACACACAAGAACCCTAACTGGCGAG AAACCTTTCCAATGTAGAATCTGCATGCGAAATTTTTCCCA GCGGCCTAATCTGACCAGGCATCTGAGGACCCACCTGAGA GGATCTaCCTGCAGGGATGAGTTTCCCACCATGGTGTTCCT TCTGGGCAGATCAGCCAGGCCTCGGCCTTGGCCCCGGCCCC TCCCCAAGTCCTGCCCCAGGCTCCAGCCCCCTGCCCCCTGCTC CAGCCATGGTATCAGCTCTGGCCCAGGCCCCAGCCCCCTGTC CCAGTCTAGCCCCAGGCCCTCCTCAGGCTGTGGCCCCACC TGCCCCCAAGCCCACCCAGGCTGGGGAAGGAACGCTGTCA GAGGCCCTGCTGCAGCTGCAGTTTGATGATGAAGACCTGGG GGCCTTGCTTGGAACAGCACAGACCCAGCTGTGTTACAG ACCTGGCATCCGTCGACAACTCCGAGTTTCAGCAGCTGCTG AACCAGGGCATACTGTGGCCCCCACACAAGTGAAGCCAT GCTGATGGAGTACCCTGAGGCTATAACTCGCCTAGTGACAG GGGCCCAGAGGCCCCCCGACCCAGCTCCTGCTCCACTGGGG GCCCCGGGGCTCCCCAATGGCCTCCTTTAGGAGATGAAGA CTTCTCCTCCATTGCGGACATGGACTTCTCAGCCCTGCTGAG TCAGATCAGCTCCaattgtgcgtacgcgatcctctgctggagacatgagagctgcc aacctttggccaagcccgcctcatgataaacgctctaagaagaacagcctggccttgctcctgacg gccgaccagatggtcagtgccctgttgatgctgagccccccatactctattccgagtatgatcctac

10

20

30

40

50

名称	配列番号	配列
		cagacccttcagtgaagcttcgatgatgggcttactgaccaacctggcagacagggagATCG TTCACATGATCAACTGGGCGAAGAGGGTGCCAGGCTTTGTG GATTTGACCCTCCATGATCAGGTCCACCTTCTAGAATGTGC CTGGCTAGAGATCCTGATGATTGGTGTGGTCTGGCGCTCCA TGGAGCACCCAGTGAAGCTACTGTTTGCTCCTAACTTGCTC TTGGACAGGGACCAGGGAAAATGTGTAGAGGGCCTGGTGG AGATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATCATCTCGGTTCCGC ATGATGAATCTGCAGGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCAAATC TATTATTTTGCTTAATTCTGGAGTGTACACATTTCTGCCAG CACCTGAAGTCTCTGGAAGAGAAGGACCATATCCACCGA GTCCTGGACAAGATCACAGACACTTTGATCCACCTGATGGC CAAGGCAGGCCTGACCCTGCAGCAGCAGCACCAGCGGCTG GCCCAGCTCCTCCTCATCCTCTCCCACATCAGGCACGCCAG TAACAAAGGCATGGAGCTGctgtacagcatgaagtgaagaacgtggtccct ctatGaCctgtgtgagggcgacgcccaccgctacatgcccactagccgtggag ggcatccgtggagggagcggaccaagccacttggccactgaggctctacttcatcgcattcct gcaaaagtattacatcacggggaggcagagggttccctgccacaTaAGTCGACAAT CAACCTCtgattacaaaatttgaaagattgactggtattcttaactatgttgccttttacgc tatgtggatacgtcttaattgcttcttatcatgctattgcttccgtatggcttcttctcctcctg tataaatcctggtgctgcttcttatgaggagttgtgcccgtgtcaggcaacgtgctggtgtgc actgtgttctgacgcaacccccactggtgggacattgccaccacgtgcagctccttccggga ctttgccttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgctgcccgtgctgtggaca ggggctcgctgttgggactgacaattccgtgtgtgtgtcgggaaatcatgctccttccctggct gtcgcctgtgtgtccactggattctgcggggacgtccttctgtactgctccttgcgcccctcaatc cagcggaccttcttcccgccgctgctgcggctctgcggccttccgcgtctacgcttccgccc ctcagacgagtcggatctccttggggccctcccgcgatatcagtggtccaggctctagtttg actcaacaatatcaccagctgaagcctatagatgacgagccatagataaaataaagattttattagt ctccagaaaaaggggggaatgaaagacccacctgtaggttggcaagctagcaataaaagagc ccacaacccctcactcggggcgccagctcctccgattgactgagtcggcgccgcttcgagcaga catgataagatacattgatgatttggacaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgcttattt gtgaaattgtgatgctattgcttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaat tgcattcattttatgttccaggttcaggggagatgtgggagggtttttaaagcaagtaaaaccttaca aatgtgtgtaaaatcgataaggatcggtaccgtgtatccaataaaccttctgcagttgcatccga cttgtgtctcgtgttcttgggagggctcctctgagtgattgactaccgctcagcgggggtcttct acacatgcagcatgtatcaaaattaatttggtttttcttaagctgtgccttctagtgcagccatctg ttgttggccctcccccgctgcttccctgacctgggaaggtgccactccactgtccttcttaataaa atgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtgggcagga cagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcgggtgggctctatgga gatccccggtacctcgcgaatgcatctagatccaatggccttttggcccagacatgataagatac attgatgatttggacaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgcttatttggaaattgtgat gctattgcttatttgaaccattataagctgcaataaacaagttgcggcgcttagccctccacaca taaccagagggcagcaattcacgaatccaactgccgtcggctgctccatcactgcttctactatgg ctttgatccagagatgcagatcgagaagcactgtcggcaccgtccgaggggctcaagatgcc ctgttctcatttccgatcgcagatacaagtcaggttgcagctgccgcagcagcagcagtgccc agcaccacgagttctgcacaaggtccccagtaaaatgatatacattgacaccagtgaaagatcggg ccgtcgtagagagagctgcgctggcgacgctgtagtcttcagagatggggatgctgtgtgattgta gccgtgtcttctaatgagggtggatttcttctgagacaaggctggccatgcggccgcccgtcg gtgttcgagccacacgcgtcaccttaatatcggaagtgacctcggaccgcggcccccactg catctgcgtgttcgaattcgaatgacaagacgctggcggggttgtgtcatcatagaactaaag acatgcaaatatatttctccgggggtaccggccttttggccATTGatcgatctggccaaa aaggccctaaagtatttacattaaatggccatagtaacttaagttacattgcttcttgaataacat ggagtaattcagaatgtgtcataaataatttctaatttaagatagatctccattggcttcttcttctt

10

20

30

40

50

名称	配列 番号	配列
		gatgcggttttggcagtagacatcaatgggcgtggatagcggttgactcacggggatttccaagtctc caccocattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaa caactccgccccattgacgcaaatgggcgttaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagag ctcaataaaagagcccacaacccctcactcggcgccagtcctccgattgactgagtcgcccg gtaccggtgtatccaataaacctcttcgactgcatccgactgtgtgtctcgtgttcttgggaggg tctcctctgagtgattgactaccggtcagcgggggtctttcatttgggggtcgtccgagatcggga gaccctgccagggaccaccgaccaccaccgggaggttaagctggcagcaacttatctgtgt ctgtccgattgtctagtctatgactgattttatgcgctgcgtcggtagtagttaactaactagctctg tatctgcggaccggtgtgtgaactgacgagtcggaacaccggcgccgaacccctgggagacgt ccaggggacttcggggcggttttggcccgacctgagtcctaaaatcccgatcgtttaggactc ttggtgcaccccccttagaggaggatgtgttctgttaggagacgagaacctaataacagttc ccgctccgctgtgaattttgtcttgcgttgggaccgaagccgcgcgcgcttctgtctgcag catcgttctgtgtgtctgtctgactgtgttctgtatttctgtctgaaaataggccccccctcagatc ccagatgcctgtctattctcttccaatctcccccttctgtctctccccacccccccccagaa tagaatgacacctactcagacaatgcgatgcaatttctcattttattaggaaaggacagtgggagtg gcacctccagggtcaagggaaggcacgggggaggggcaaacacagatggctggaactaga aggcacagttacttaCACAGGCCGCACAGATTCTCTCCGCAGCCGTT CGTTTCTTCTCCGCTCTCTGCACCGAGGGGCGAAGCAGTAG GTCAGGCAACAGATCACGAAGATGCCGTTACGGAGATCA GTGTGATGGCCCAGCTTGGCAGCAGTTGAAGAGATCCACCG CCACTGCCACCGCCGCCACTACCGCCACCAAGAAGCTGG AGATTGTAGACACGGCGAGTCCCTGTGTAATTCAGATCCT CCGCCTCCGCTACCACTCCGCCGCTAGAGGCGTTTCAGGTA GCTCATCACTCTGTCTGATGGTCACGGCTCTGATCCGGAAGG CGTGCAGCAGGATGCACAGCTTGATCTTGGTCTTGTAGAAG TCGGGTCTTCCAGGCTAGACTTCTGGGGCACTGTCTCGCT GTTGAAGTTCAGGGCCTGCATCAGCTCGTCTGATCACGGCCA GCATATTCTGGTCCAGGAAGATCTGCCGCTTGGGGTCCATC AGCAGCTTGGCGTTTCATGGTCTTGAATTCACCTGGTACAT CTTAGGTCTCTGATAGTGTGCTCAGGCACAGGGCCATCA TGAAGGAGGTCTTCTGCTGGCCAGGCAAGAGCCGTTGGTG ATGAAGCTGGTTTCCCGGCTGTTTCAGGCAGCTCTCGTTCTTG GTCAGTTCAGAGGCAGGCAGGCTTCCACGGTGTGGTCTT ATCCTTGGTGATGTCTCGTGGTCTGATTTCTCGCTGGTGCA GGGGTAGAATTCCAGGGTCTGTCTGGCCTTCTGCAGCATGT TGGACACGGCTCTCAGCAGGTTCTGGCTGTGGTGCAGACAA GGAACATGCCAGGATCAGGAGTGGCCACAGGCAGGTTTC TAGATCCGCCGCCAGATCCACCACCTGATCCGCCACCGCTT CCTCCGCCAGAACATGGCACGCTGGCCCATTCGCTCCAAGA GCTGCTGTAGTACCGGTCTGGGCTCTGACGCTGATGCTGG CGTTCTTTCTGCAGATCACGGTGGCGCTGGTCTTGTCTGGT AACACCCGCTCTTTTCTCGCGCTTGGACTTGCCCTGCACT TGCACGCAAAAGGTGAGGCTGAAGTAGCTGTGGGGTGTAG ACCAGGTGTGGGGTACTCCCAGGACACTTCCACCTGTCTG CTGTTCTTTCAGAGGCTTTCAGCTGCAGGTTCTTTGGAGGATC GGGCTTGATGATGTCCCGGATGAAAAAGCTGGAGGTGTAG TTCTCGTACTTCAGCTTGTGCACGGCGTCCACCATCACTTCG ATAGGCAGAGACTCTTCGGCGGCTGGACAGGCGCTGTCTCTC TTGGCATTCCACGCTGTACTCGTATTCTTTGTTGTCTGCCCCG CACTCTTTCCGCGAGACAGTGTAGCGGCGCCACATGTAACGC CCTGAGGATCACTGCTGCCTCTGCTGGACTTCACGCTGAAG GTCAGGTCCGTGCTGATGGTGGTCAGCCACCAACATGTGAA

10

20

30

40

名称	配列 番号	配列
		CCGGCCGCTGTAGTTCTTGGCCTCGCATCTCAGGAAGGTCT TGTTCTTGGGCTCTTTCTGGTCCTTCAGGATGTCGGTGCTCC AAATGCCATCCTCTTTCTTGTGGAGCAGCAGCAGGCTGTGG CTCAGCACTTCTCCGCCTTTGTGACAGGTGTACTGGCCGGC GTGCGCAAACCTCTTCACTTGGATGGTCAGGGTCTTGCCGC TGCCGAGCACCTCGCTAGACTGATCCAGTGTCAGGTGATG CCGTCTCTTTCAGGGGTATCGCAGGTCAGCACCAACCATCTC GCCAGGAGCATCGGGATACCAGTCCAGTTCCACCACGTACA CGTCTTTCTTTCAGCTCCAGATGGCCACCAGAGGAGAGGCC AGGAACACCAGGCTGAACCAGCTGATGACCAGCTGCTGGT GACACATCATGGTGGCGACACCGGTACGCGTTGGCCCCCAT TATATACCTCTAGAACTAGTtatccactccgttaagggagagtgaacctt acgaatcTTCGGCGTCGACTGCTTCattccgagcgactgataccTTCGGC GTGCGACTGCTTCatacgaaggcagtcaggatcTTCGGCGTCGACTGCTT CaacctttactgagacgggacTTCGGCGTCGACTGCTTCaaaggcgttcgaatc ctcatcgattgttacgaaacccgTTAATTAAAGAGCGAGATTCCGTCTC AAAGAAAAAAAAGTAATGAAATGAATAAAATGAGTCCTA GAGCCAGTAAATGTCGTAAATGTCTCAGCTAGTCAGGTAGT AAAAGGTCTCAACTAGGCAGTGGCAGAGCAGGATTCAAAT TCAGGGCTGTTGTGATGCCTCCGCAGACTCTGAGCGCCACC TGGTGGTAATTTGTCTGTGCCTCTTCTGACGTGGAAGAACA GCAACTAACACACTAACACGGCATTACTATGGGCCAGCCA TTGTCCATCTAGATGGccgataaaaataaagattttatttagtctccagaaaagggg ggaatgaaagacccacactgtaggtttgcaagctagctgcaGTGTGTCAGTTAGG GTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATG CAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAA AGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCAT GCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCCGCCCTAACTC CGCCCCATCCCGCCCCTAACCTCCGCCAGTTCCGCCATTCTC CGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAAGGGCG AGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGA GGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGGATCCGCCAC CATGTCTAGACCTGGCGAGAGGCCCTTCCAGTGCCGGATCT GCATGCGGAACTTCAGCAACATGAGCAACCTGACCAGACA CACCCGGACACACACAGGCGAGAAGCCTTTTCAGTGCAGA ATCTGTATGCGCAATTTCTCCGACAGAAGCGTGCTGCGGAG ACACCTGAGAACCCACACCGGCAGCCAGAAACCATTCAG TGTCGCATCTGTATGAGAACTTTAGCGACCCCTCCAATCT GGCCCGGCACACCAGAACACATACCGGGGAAAAAACCTTT CAGTGTAAGGATATGCATGAGGAATTTTTCCGACCGGTCCAG CCTGAGGCGGCACCTGAGGACACATACTGGCTCCCAAAAG CCGTTCCAATGTTCGGATATGTATGCGCAACTTTAGCCAGAG CGGCACCCTGCACAGACACACAAGAACCATACTGGCGAG AAACCTTTCCAATGTAGAATCTGCATGCGAAATTTTTCCCA GCGGCCTAATCTGACCAGGCATCTGAGGACCCACCTGAGA GGATCTaCCTGCAGGGATGAGTTTCCACCATGGTGTTTCCT TCTGGGCAGATCAGCCAGGCCTCGGCCTTGCCCCCGGCCCC TCCCCAAGTCCTGCCCCAGGCTCCAGCCCCTGCCCCGTCTC CAGCCATGGTATCAGCTCTGGCCCAGGCCCCAGCCCCTGTC CCAGTCCTAGCCCCAGGCCCTCCTCAGGCTGTGGCCCCACC TGCCCCCAAGCCCACCCAGGCTGGGGAAGGAACGCTGTCA GAGGCCCTGCTGCAGCTGCAGTTTGATGATGAAGACCTGGG

10

20

30

40

50

名称	配列番号	配列
		GGCCTTGCTTGGCAACAGCACAGACCCAGCTGTGTTACACAG ACCTGGCATCCGTCGACAACCTCCGAGTTTCAGCAGCTGCTG AACCAGGGCATACTGTGGCCCCCACACAACCTGAGCCCAT GCTGATGGAGTACCCTGAGGCTATAACTCGCCTAGTGACAG GGGCCCAGAGGGCCCCCGACCCAGCTCCTGCTCCACTGGGG GCCCCGGGGCTCCCCAATGGCCTCCTTTCAGGAGATGAAGA CTTCTCCTCCATTGCGGACATGGACTTCTCAGCCCTGCTGAG TCAGATCAGCTCCcaattgtcgtacgcggatcctctgctggagacatgagagctgcc aacctttggccaagcccgcctcatgatcaaacgctctaagaagaacagcctggcctgtccctgacg gccgaccagatggctcagtgccctgttgatgctgagccccatactatccagtagtatcctac cagacccttcagtgaaagcttgatgatggccttactgaccaacctggcagacagggagCTGG TTCACATGATCAACTGGGCGAAGAGGGTGCCAGGCTTTGTG GATTTGACCCCTCCATGATCAGGTCCACCTTCTAGAATGTGC CTGGCTAGAGATCCTGATGATTGGTCTCGTCTGGCGCTCCA TGGAGACCCAGTGAAGCTACTGTTTGCTCCTAACTTGGTG TTGGACAGGGACGAGGGAAAATGTGTAGAGGGCCTGGTGG AGATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATCATCTCGGTTCCGC ATGATGAATCTGCAGGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCAAATC TATTATTTTGCTTAATTCTGGAGTGTACACATTCTGCCAG CACCTGAAGTCTCTGGAAGAGAAGGACCATATCCACCGA GTCCTGGACAAGATCACAGACACTTTGATCCACCTGATGGC CAAGGCAGGCCTGACCCTGCAGCAGCAGCACCAGCGGCTG GCCCAGCTCCTCCTCATCCTCTCCACATCAGGCACATGAG TAACAAAGGCATGGAGCTGctgtacagcatgaagtgaagaacgtgggccct ctatGaCctgtgctggaggcggcgacgccaccgcctacatgcgccactagccgtggagg ggcatccgtggaggagacggaccaaaagccacttggccactcgggctctactcatcgcattcctt gcaaaagtattacatcacgggggagcgaggggttccctgccacaTaAGTCGACAAT CAACCTCtgattacaaaatttgaagattgactggtatttctaactatgtgtccttttacgc tatgtgatacgtcctttaatgcctttgtatcatgctattgctcccgatggcttcttctcctctg tataaatcctggtgtgtctctttatgaggagttgtgcccgtgtcaggcaacgtggcgtgtgtgc actgtgttctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccctgtcagctcctttccggga cttctgcttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgcttgcctgcccgtgctgaca ggggctcggctgttggcactgacaattccgtgtgtgtcgggaaatcatcgtccttcttggct gctcgcctgtgttgcacctggattctgcgcgggacgtccttctgtacgtcccttcggccctaatc cagcggaccttcttcccgcgcctgtgcgcggctctgcggccttccgcgtctacgccttcgcc ctcagacgagtcggatctcccttggggccctccccgcgatatcagtggtccaggctctagtttg actcaacaatatcaccagctgaagcctatagatcagagccatagataaaaaaagatttttagt ctccagaaaaaggggggaatgaaagacccacctgtaggtttggcaagctagcaataaaagagc ccacaacccctcactcggggcgccagtcctccgattgactgagtcgcccgccgcttcgagcaga catgataagatacattgatgatttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatt gtgaaattgtgatgctattgcttttgaaccattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaat tgcattcattttatgttccagggtcagggggagatgtggagggtttttaaagcaagtaaaaccttaca aatgttgtaaaatcgataaggatcgggtacccgtgtatccaataaacctcttgcagttgcatccga cttggtgtcgtgttcttgggaggtctcctctgagtgattgactaccgtcagcgggggtcttctc acacatgcagcatgatcaaaattaatttgggttttcttaagctgtgccttctagttgccagccatctg ttgttggccctccccgtgccttcttgaccctgggaaggtgccactccactgtccttctcaataaa atgaggaaattgcacgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtgggcagga cagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctgggatgcgggtgggtctatgga gatcccgcggtacctcgcgaatgcacatagatccaatggccttttggcccagacatgataagatac attgatgatttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgtgaaattgtgat gctattgctttattgaaccattataagctgcaataaacaagttgcggccgcttagccctccacaca taaccagagggcagcaattcacgaatcccaactgccgtcggctgtccatcactgtccttactatgg

10

20

30

40

50

40

名称	配列 番号	配列
		gataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaaga gcgccaatacgcgaacgcctctccccgcgcttgccgattcattaatgcagctggcagaca ggtttccgactggaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattagg caccacaggctttacatttatgcttccggctcgtatgtgtgtggaattgtgagcggataacaattca cacaggaacagctatgaccatgattacgcc
WRPW モチ ーフ	82	WRPW
IL-12	83	ATGTGTCACCAAGCAGCTGGTCATCAGCTGGTTCAGCCTGGT GTTCTGGCCTCTCCTCTGGTGGCCATCTGGGAGCTGAAGA AAGACGTGTACGTGGTGGAACTGGACTGGTATCCCGATGCT CCTGGCGAGATGGTGGTGTGCTGACCTGCGATACCCCTGAAGA GGACGGCATCACCTGGACACTGGATCAGTCTAGCGAGGTG CTCGGCAGCGGCAAGACCCTGACCATCCAAGTAAAAGAGT TTGGCGACGCCGGCCAGTACACCTGTCAAAAGGCGGAGA AGTGCTGAGCCACAGCCTGCTGCTGCTCCACAAGAAAGAG GATGGCATTTGGAGCACCGACATCCTGAAGGACCAGAAAAG AGCCCAAGAACAAGACCTTCCTGAGATGCGAGGCCAAGAA CTACAGCGGCCGGTTACATGTTGGTGGCTGACCACCATCA GCACCGACCTGACCTTCAGCGTGAAGTCCAGCAGAGGCAG CAGTGATCCTCAGGGCGTTACATGTGGCGCCGCTACACTGT CTGCCGAAAGAGTGGCGGGCGACAACAAGAATACGAGTA CAGCGTGGAATGCCAAGAGGACAGCGCCTGTCCAGCCGCC GAAGAGTCTCTGCCTATCGAAGTGATGGTGGACGCCGTGCA CAAGCTGAAGTACGAGAACTACACCTCCAGCTTTTTTCATCC GGGACATCATCAAGCCCGATCCTCCAAAGAACCTGCAGCTG AAGCCTCTGAAGAACAGCAGACAGGTGGAAGTGTCTCTGGG AGTACCCCGACACCTGGTCTACACCCACAGCTACTTCAGC CTGACCTTTTGCGTGCAAGTGCAGGGCAAGTCCAAGCGCGA GAAAAAGGACCGGGTGTTACCGACAAGACCAGCGCCACC GTGATCTGCAGAAAGAACGCCAGCATCAGCGTCAGAGCCC AGGACCGGTACTACAGCAGCTCTTGAGCGAATGGGCCAG CGTGCCATGTTCTGGCGGAGGAAGCGGTGGCGGATCAGGT GGTGGATCTGGCGGCGGATCTAGAAACCTGCCTGTGGCCAC TCCTGATCCTGGCATGTTCCCTTGTCTGCACCACAGCCAGA ACCTGCTGAGAGCCGTGTCCAACATGCTGCAGAAGGCCAG ACAGACCCTGGAATTCTACCCCTGCACCAGCGAGGAAATCG ACCACGAGGACATACCAAGGATAAGACCAGCACCGTGGA AGCCTGCCTGCCTCTGGAAGTACCAAGAACGAGAGCTGCC TGAACAGCCGGGAAACCAGCTTCATACCAACGGCTCTTGC CTGGCCAGCAGAAAGACCTCCTTCATGATGGCCCTGTGCCT GAGCAGCATCTACGAGGACCTGAAGATGTACCAGGTGGAA TTCAAGACCATGAACGCCAAGCTGCTGATGGACCCCAAGC GGCAGATCTTCTGGACCAGAAATATGCTGGCCGTGATCGAC GAGCTGATGCAGGCCCTGAACTTCAACAGCGAGACAGTGC CCCAGAAGTCTAGCCTGGAAGAACCCGACTTCTACAAGACC AAGATCAAGCTGTGCATCCTGCTGCACGCCTTCCGGATCAG AGCCGTGACCATCGACAGAGTGATGAGCTACCTGAACGCCT CT

10

20

30

40

【 0 3 6 6 】

本開示は、好ましい実施形態及び様々な代替的实施形態を参照して特異的に示され、説明されているが、本開示及び添付の請求項の趣旨及び範囲から逸脱することなく、形態及び詳細の様々な変更をその中に行うことができることが、当業者によって理解されるであろう。

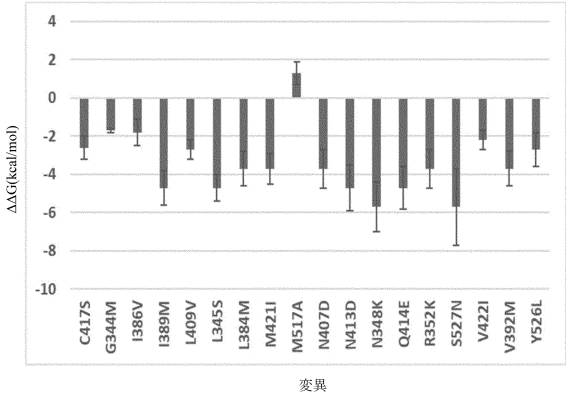
【 0 3 6 7 】

本明細書の本文内で引用された全ての参考文献、発行された特許及び特許出願は、あらゆる目的のためにそれらの全体で参照により本明細書に組み込まれる。

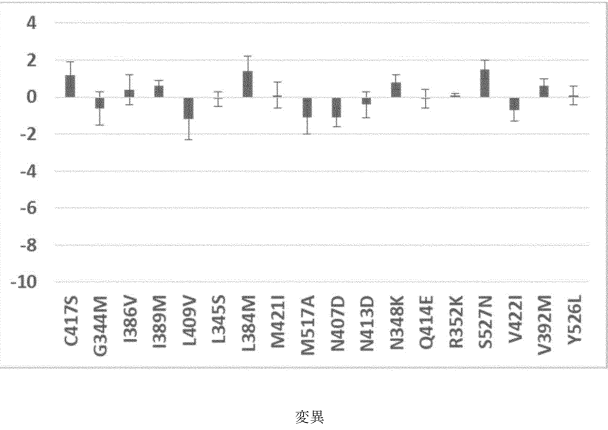
50

【図面】

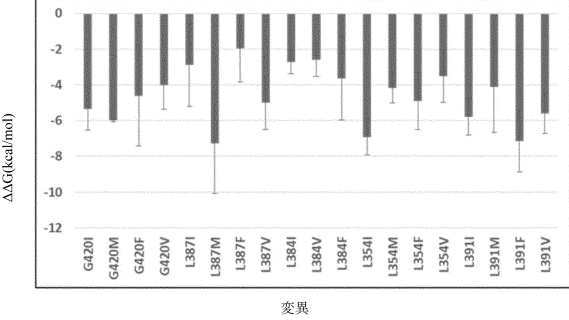
【図 1 A】



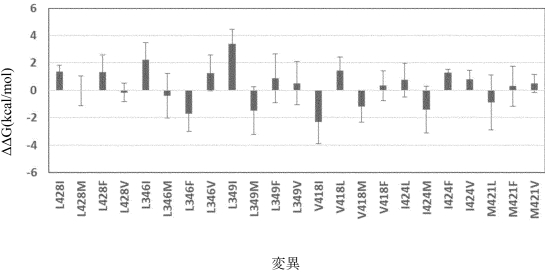
【図 1 B】



【図 2】



【図 3】



10

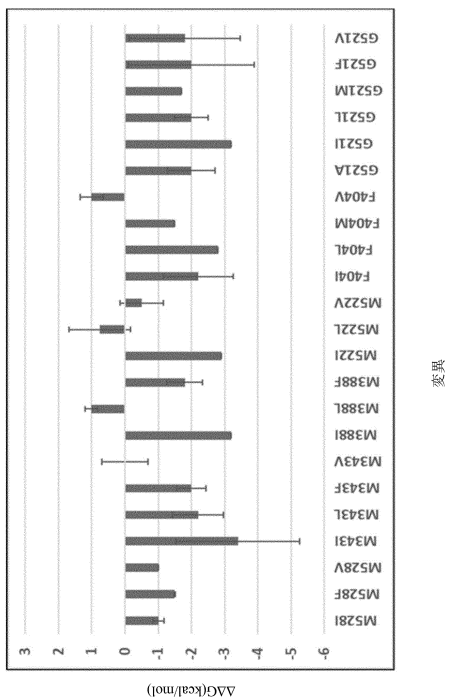
20

30

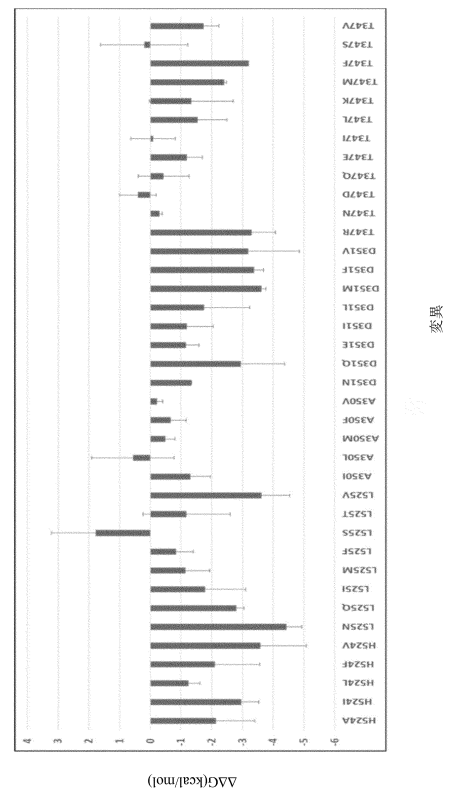
40

50

【図 4】

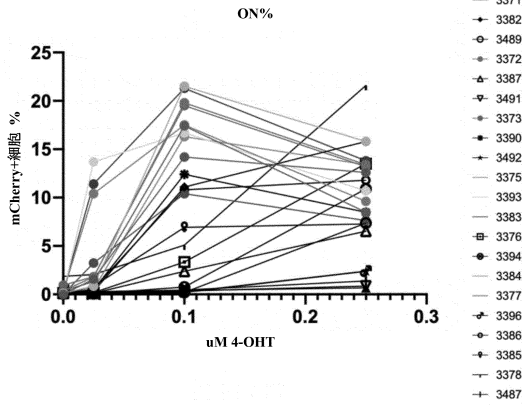


【図 5】

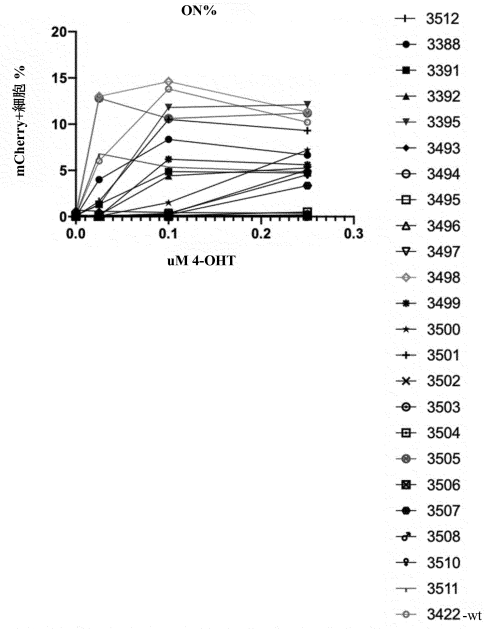


【図 8 A】

ERT2 変異スクリーン



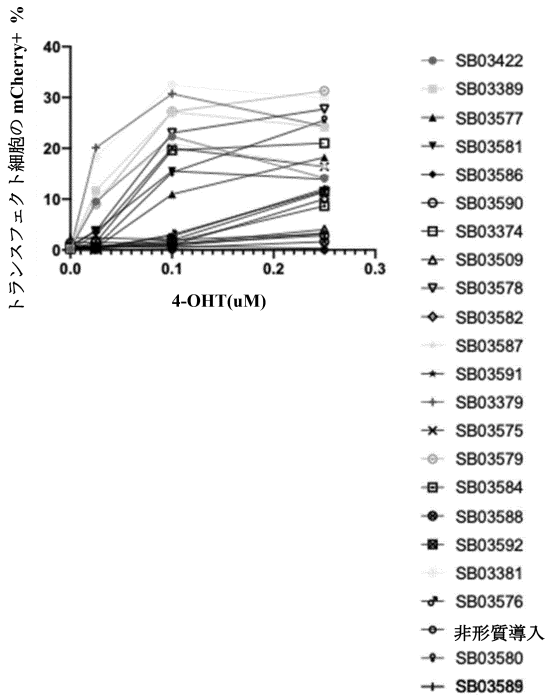
【図 8 B】



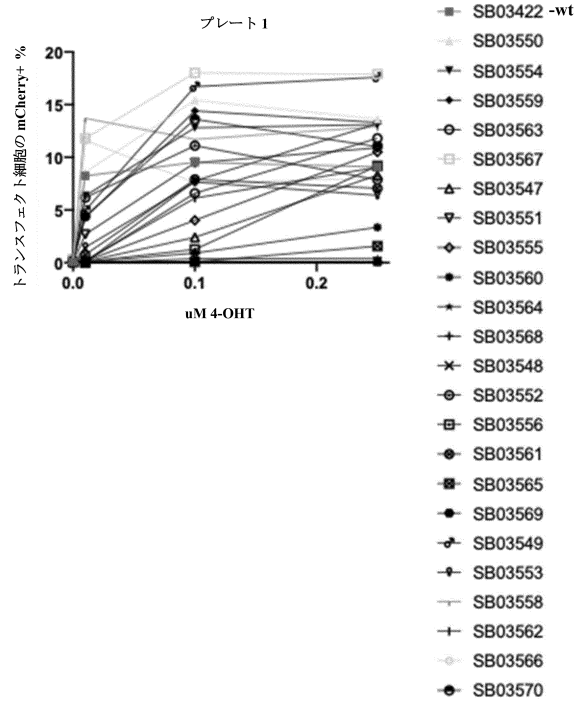
10

20

【図 8 C】



【図 9 A】

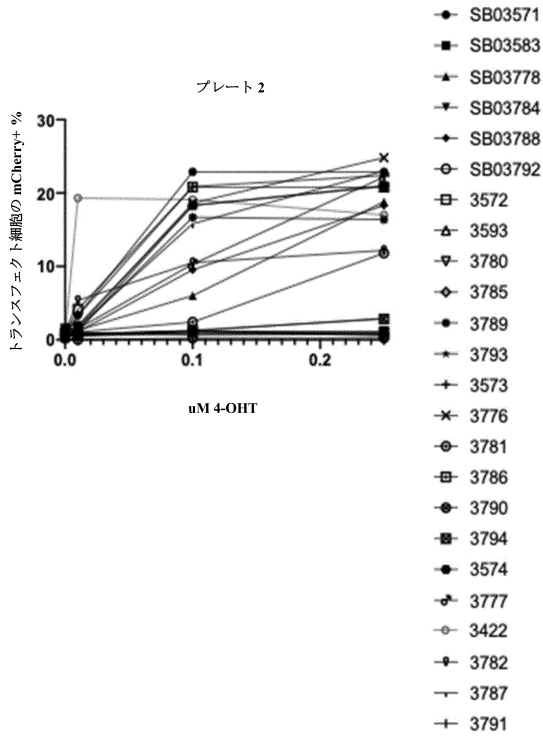


30

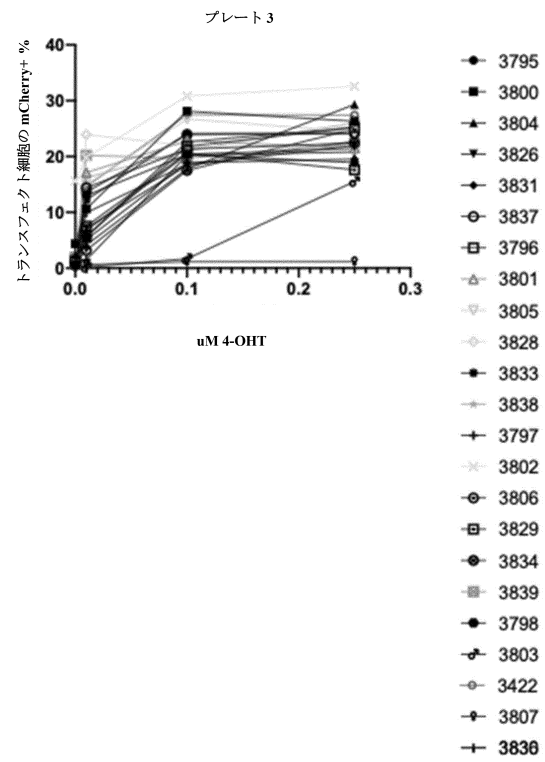
40

50

【図 9 B】



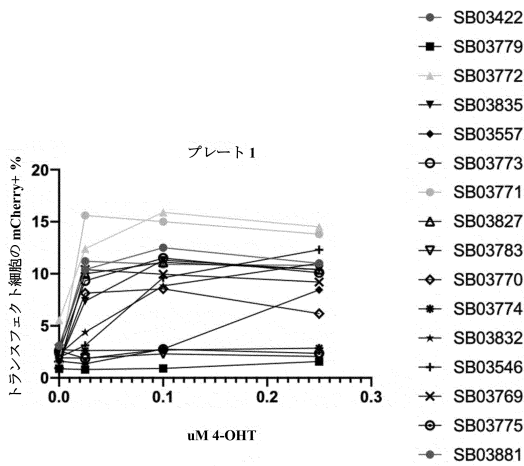
【図 9 C】



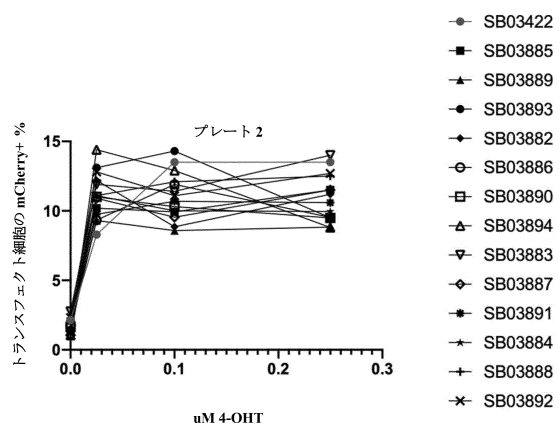
10

20

【図 10 A】



【図 10 B】

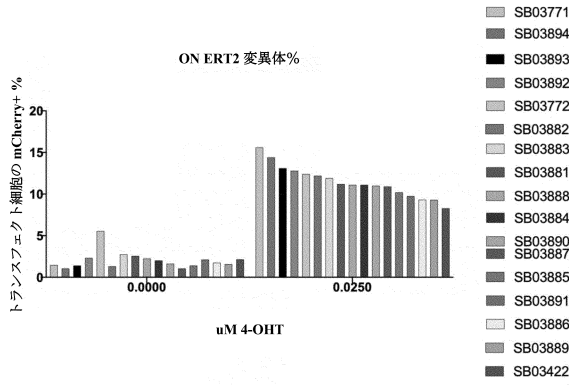


30

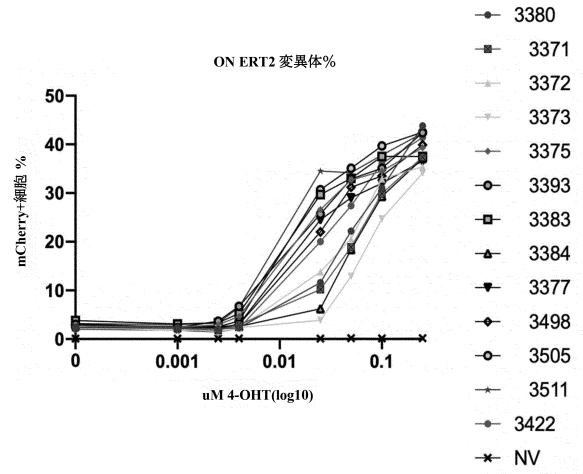
40

50

【図 1 0 C】

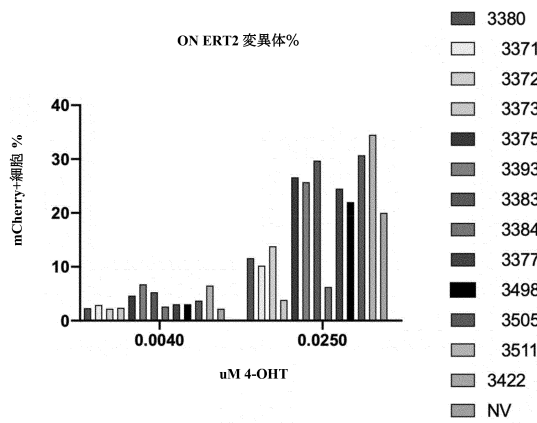


【図 1 1 A】

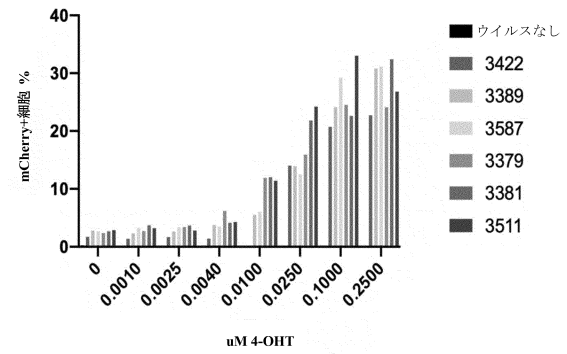


10

【図 1 1 B】



【図 1 2】



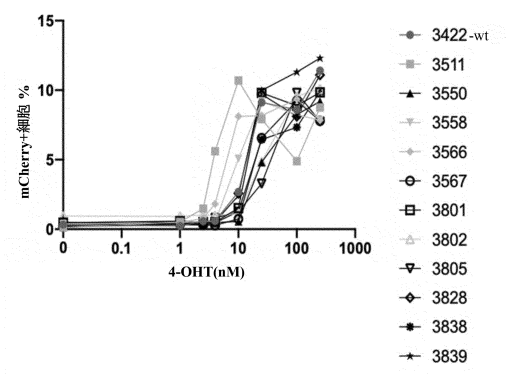
20

30

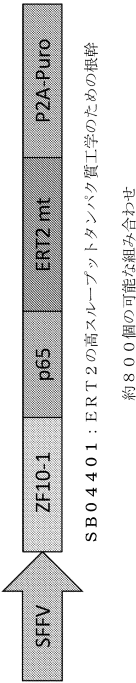
40

50

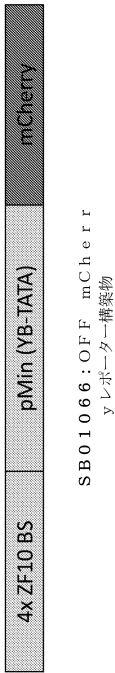
【図 1 3】



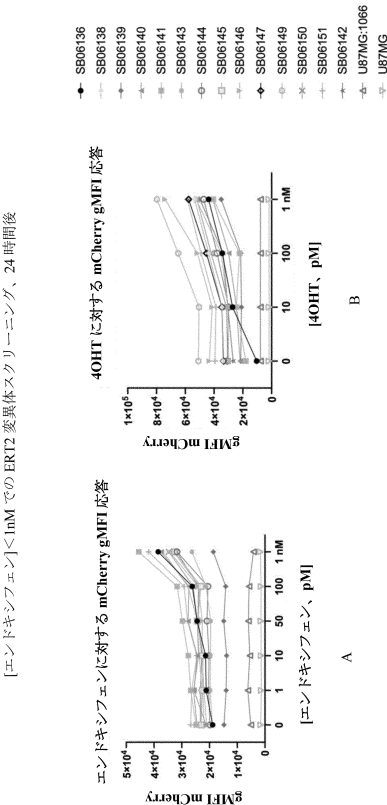
【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



【図 1 5】



10

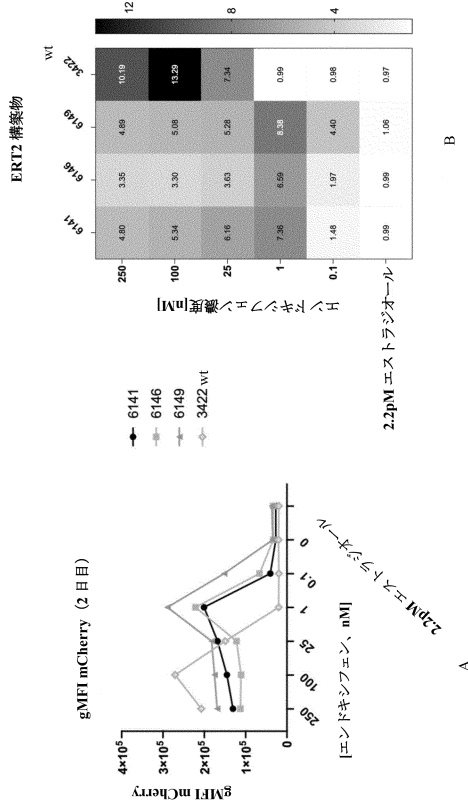
20

30

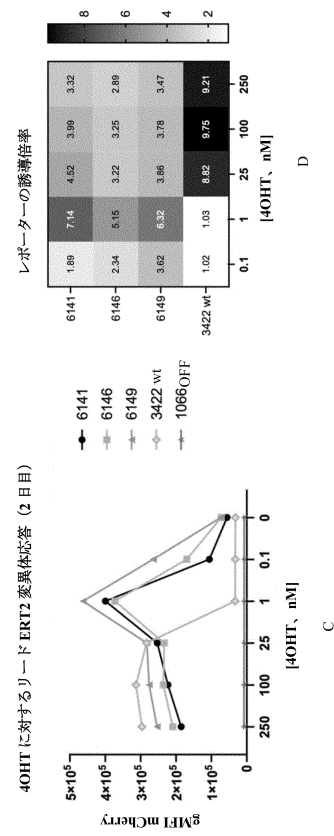
40

50

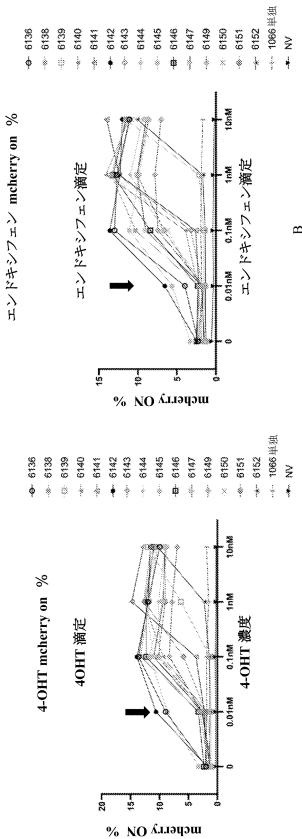
【図 16-1】



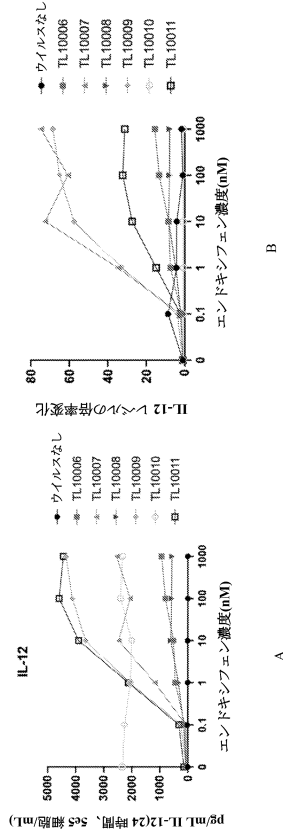
【図 16-2】



【図 17】



【図 18】



10

20

30

40

50

【配列表】

2024513231000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2022/023673
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 5/10; C12N 15/63; C12N 15/85 (2022.01) CPC - A61P 35/00; C07K 14/4705; C07K 2319/715; C12N 5/10; C12N 15/63; C12N 15/85 (2022.05)		
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 data base consulted during the international search (name of data base 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 2003/0143559 A1 (BRACKEN et al) 31 July 2003 (31.07.2003) entire document	1-4
A	US 2003/0235886 A1 (FANDL et al) 25 December 2003 (25.12.2003) entire document	1-4
A	TORA et al. The cloned human oestrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding properties, The EMBO J., August 1989, Vol. 8(7), Pgs. 1981-1986. entire document	1-4
☐ 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 "I" 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 26 July 2022		Date of mailing of the international search report AUG 17 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/023673

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:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1 and 2 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/023673

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-15
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:

See extra sheet(s).

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/023673

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 need to be paid.

Group I+: claims 1-4 are drawn to modified estrogen receptor ligand binding domains (ER-LBD).

The first invention of Group I+ is restricted to a modified estrogen receptor ligand binding domain (ER-LBD) comprising an amino acid sequence corresponding to amino acids 282-595 of SEQ ID NO: 1, wherein the modified ER-LBD comprises amino acid substitutions of M343F, G400V, M543A, and L544A. It is believed that claims 1-4 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on an amino acid sequence corresponding to amino acids 282-595 of SEQ ID NO: 1 comprising amino acid substitutions of M343F, G400V, M543A, and L544A.

Applicant is invited to elect additional modified estrogen receptor ligand binding domains, and their respective, corresponding, amino acids and amino acid substitutions to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a modified estrogen receptor ligand binding domain (ER-LBD) comprising an amino acid sequence corresponding to amino acids 282-595 of SEQ ID NO: 1, wherein the modified ER-LBD comprises amino acid substitutions of M343I, G400V, M543A, and L544A. Additional modified estrogen receptor ligand binding domains, and their respective, corresponding, amino acids and amino acid substitutions will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on 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.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible a modified estrogen receptor ligand binding domains (ER-LBD) requiring the selection of alternative amino acids and amino acid substitutions where "a modified estrogen receptor ligand binding domain (ER-LBD) comprising an amino acid sequence corresponding to amino acids 282-595 of SEQ ID NO: 1, wherein the modified ER-LBD comprises a G400V amino acid substitution, an M543A amino acid substitution, and an L544A amino acid substitution, and one or more additional amino acid substitutions, wherein the one or more additional amino acid substitutions are within a region of SEQ ID NO: 1 selected from the group consisting of: positions 343-354, positions 380-392, positions 404-463, and positions 517-540, and position 547, and wherein the modified ER-LBD has greater sensitivity and/or selectivity to a non-endogenous ligand as compared to an ER-LBD comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or as compared to an endogenous ligand as a result of the one or more additional amino acid substitutions, optionally wherein the modified ER-LBD further comprises a V595A amino acid substitution, and/or optionally wherein the non-endogenous ligand is selected from the group consisting of: 4- hydroxytamoxifen, N-desmethyitamoxifen, tamoxifen-N-oxide, and endoxifen."

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of a modified estrogen receptor ligand binding domain (ER-LBD), however, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2003/0143559 to Bracken et al. (hereinafter, "Bracken") teaches a modified estrogen receptor ligand binding domain (ER-LBD) (Para. [0023], a modified estrogen receptor alpha ligand binding domain comprising at least one amino acid modification in Region 1, at least one amino acid modification in Region 2, or at least one amino acid modification in each of both Regions 1 and 2, wherein said ligand binding domain interacts with a non-endogenous ligand as a result of said at least one amino acid modification. Preferably, the modified estrogen receptor alpha ligand binding domain is a modified human estrogen receptor alpha ligand binding domain; Para. [0263], the mutation of the ER residue 400 from glycine to valine significantly reduces the responsiveness of the wt ER to estradiol).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

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)

C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10

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,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,J
P,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,N
A,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

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 ハン ミシェル エリザベス

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウスサンフランシスコ コーポレイト ドライブ
2 ファースト フロア センティ バイオサイエンシズ インコーポレイテッド内

(72)発明者 コットマン レベッカ テイラー

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウスサンフランシスコ コーポレイト ドライブ
2 ファースト フロア センティ バイオサイエンシズ インコーポレイテッド内

(72)発明者 ゴードリー ラッセル モリソン

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウスサンフランシスコ コーポレイト ドライブ
2 ファースト フロア センティ バイオサイエンシズ インコーポレイテッド内

(72)発明者 リー ゲイリー

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウスサンフランシスコ コーポレイト ドライブ
2 ファースト フロア センティ バイオサイエンシズ インコーポレイテッド内

(72)発明者 ルー ティモシー クアンター

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウスサンフランシスコ コーポレイト ドライブ
2 ファースト フロア センティ バイオサイエンシズ インコーポレイテッド内

(72)発明者 カンナン スリニヴァサラガヴァン

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウスサンフランシスコ コーポレイト ドライブ
2 ファースト フロア センティ バイオサイエンシズ インコーポレイテッド内

(72)発明者 ヴァルマ チャンドラ シェカール

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウスサンフランシスコ コーポレイト ドライブ

2 ファースト フロア センティ バイオサイエンシズ インコーポレイテッド内
F ターム (参考) 4B065 AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4H045 AA10 AA30 EA28 FA74