(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2024-526938
(P2024-526938A)
(43)公表日　令和6年7月19日(2024.7.19)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*15/864 (2006.01)*	C12N	15/864	100Z	4B064
C12N	*15/62 (2006.01)*	C12N	15/62	ZZNA	4C084
C07K	*14/00 (2006.01)*	C07K	14/00		4C086
C12P	*21/02 (2006.01)*	C12P	21/02	C	4C087
A61P	*21/00 (2006.01)*	A61P	21/00		4H045

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全121頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-503838(P2024-503838)
(86)(22)出願日　令和4年7月22日(2022.7.22)
(85)翻訳文提出日　令和6年2月27日(2024.2.27)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/038032
(87)国際公開番号　WO2023/004125
(87)国際公開日　令和5年1月26日(2023.1.26)
(31)優先権主張番号　63/225,212
(32)優先日　令和3年7月23日(2021.7.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/256,819
(32)優先日　令和3年10月18日(2021.10.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　517025822
ユニヴァーシティ オブ ワシントン
アメリカ合衆国 ワシントン州 ９８１０５－４７２１ シアトル ルーズヴェルト ウェイ ノースイースト ４５４５ スイート ４００
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺 秀紀
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(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】　複数のベクターを共送達することによる、大きなタンパク質の産生方法

(57)【要約】
本明細書において、疾患または障害の処置のために、それを必要とする対象に大きなタンパク質を送達するための方法および組成物が提供される。ある態様において、本明細書に記載される方法および組成物は、筋疾患もしくは筋障害、または神経筋疾患もしくは神経筋障害を処置するために、第1および第2のAAVベクターを含むタンパク質発現システムを用いて大きなタンパク質を対象に送達するのに有用である。

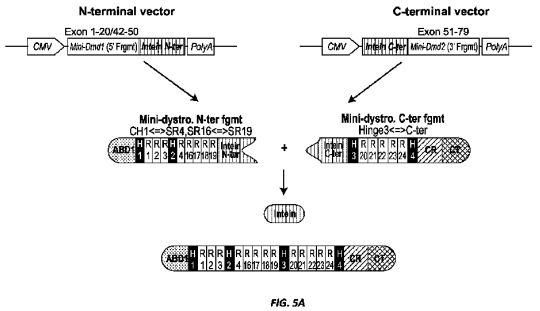
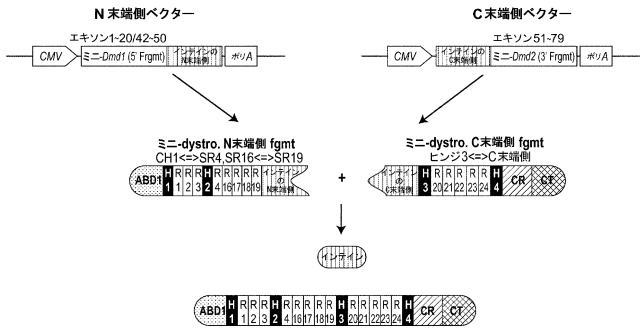


FIG. 5A



10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
外来性ポリペプチドを細胞に送達するための方法であって、
第1の融合ポリペプチドをコードする第1の核酸を含む第1のアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター粒子であって、第1の融合ポリペプチドが、分割型インテインの第1の部分に融合している外来性ポリペプチドの第1の部分を含む、第1のAAVベクター粒子；および
第2の融合ポリペプチドをコードする第2の核酸を含む第2のAAVベクター粒子であって、第2の融合ポリペプチドが、分割型インテインの第2の部分に融合している外来性ポリペプチドの第2の部分を含む、第2のAAVベクター粒子
に細胞を接触させる段階を含み、
第1および第2の融合ポリペプチドが、細胞において第1および第2の核酸から産生され、かつ分割型インテインの第1および第2の部分が、外来性ポリペプチドの第1の部分の、外来性ポリペプチドの第2の部分との連結を促進し、それにより、外来性ポリペプチドが細胞に送達され、
送達される外来性ポリペプチドが、1つのAAVベクター粒子によってコード可能であるよりも大きい、
方法。
【請求項２】
第1および第2の核酸が、筋特異的発現カセット（MSEC）を含む、請求項1に記載の方法。
【請求項３】
分割型インテインが、天然に存在する分割型インテインである、請求項1または請求項2に記載の方法。
【請求項４】
分割型インテインが、遺伝学的に改変された分割型インテインである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
分割型インテインの遺伝学的改変が、哺乳動物細胞における発現および／もしくは安定性のためのコドン最適化、分割型インテインの短縮もしくは延長、または、送達しようとする外来性タンパク質の配列とより厳密に一致させるための、コードされるアミノ酸の分割型インテインにおける変更から選択される、請求項4に記載の方法。
【請求項６】
外来性ポリペプチドの第1および第2の部分が、実質的に同じサイズである、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
外来性ポリペプチドの第1および第2の部分が、サイズにおいて50アミノ酸以下が異なる、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
外来性ポリペプチドが、分割型インテイン由来のフットプリントを4アミノ酸未満含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
外来性ポリペプチドが、分割型インテイン由来のフットプリントを3アミノ酸以下含む、請求項8に記載の方法。
【請求項１０】
外来性ポリペプチドの第1の部分と第2の部分とを分離する分割部位が、分割型インテインのフットプリントと同じ配列を有する部位において選択され、それにより、分割型インテイン由来の余剰アミノ酸なしに外来性ポリペプチドが産生される、請求項9に記載の方法。
【請求項１１】

外来性ポリペプチドが、治療用ポリペプチドである、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２】

治療用ポリペプチドが、ジストロフィン、ミニジストロフィン、ユートロフィン、およびジスフェリン、ネブリン、タイチン、ミオシン、スペクトリンリピート含有核膜タンパク質1（spectrin repeat containing nuclear envelope protein 1）（Syne-1）、ジストログリカン、ATPシンターゼ、凝固因子IIX、ラミンA/C、サイログロブリン、上皮成長因子受容体（EGFR）、α-スペクトリンおよび／またはβ-スペクトリン、ラパマイシンの筋標的（muscle target of rapamycin）（mTOR）、およびリアノジン受容体1から選択される、請求項11に記載の方法。

【請求項１３】

ミニジストロフィンが、160 kDaよりも大きく、かつ全長ジストロフィンよりも小さい、請求項12に記載の方法。

【請求項１４】

治療用ポリペプチドがジストロフィンであり、かつ、ジストロフィンエクステインのN末端側部分が、ジストロフィンのヒンジドメインの中または隣で、分割型インテインのN末端側部分に連結されている、請求項12に記載の方法。

【請求項１５】

ヒンジドメインが、ジストロフィンのヒンジ1、ヒンジ2、ヒンジ3、またはヒンジ4を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項１６】

治療用ポリペプチドがジストロフィンであり、かつ、ジストロフィンエクステインのN末端側部分が、ジストロフィンの24個のスペクトリン様リピートドメインのうちの1個の中の、ヘリックスbをヘリックスcに連結するループドメイン、またはヘリックスcをヘリックスa'に連結するループドメインに、連結されている、請求項12に記載の方法。

【請求項１７】

治療用ポリペプチドがジストロフィンであり、かつ、ジストロフィンエクステインのC末端側部分が、ジストロフィンのヒンジドメインの中もしくは隣で、分割型インテインのC末端側部分に連結されているか、または、ジストロフィンの24個のスペクトリン様リピートドメインのうちの1個の中の、ヘリックスbをヘリックスcに連結するループドメイン、もしくはヘリックスcをヘリックスa'に連結するループドメインに、連結されている、請求項12に記載の方法。

【請求項１８】

ヒンジドメインが、ジストロフィンのヒンジ1、ヒンジ2、ヒンジ3、またはヒンジ4を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項１９】

外来性ポリペプチドが、細胞において機能的である、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２０】

外来性ポリペプチドを細胞に送達するための方法であって、

第1の融合ポリペプチドをコードする第1の核酸を含む第1のアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター粒子であって、第1の融合ポリペプチドが、第1の分割型インテインの第1の部分に融合している外来性ポリペプチドの第1の部分を含み、分割型インテインの第1の部分が、外来性ポリペプチドの第1の部分のカルボキシ末端に融合している、第1のAAVベクター粒子；

第2の融合ポリペプチドをコードする第2の核酸を含む第2のAAVベクター粒子であって、

(i) 外来性ポリペプチドの第2の部分のアミノ末端において第1の分割型インテインの第2の部分に融合しており、かつ(ii) 外来性ポリペプチドの第2の部分のカルボキシ末端において第2の分割型インテインの第1の部分に融合している、外来性ポリペプチドの第

2の部分
を、第2の融合ポリペプチドが含む、第2のAAVベクター粒子；および
第3の融合ポリペプチドをコードする第3の核を含む第3のAAVベクター粒子であって、第3の融合ポリペプチドが、外来性ポリペプチドの第3の部分のアミノ末端において第2の分割型インテインの第2の部分に融合している外来性ポリペプチドの第3の部分を含む、第3のAAVベクター粒子
に細胞を接触させる段階を含み、
第1、第2、および第3の融合ポリペプチドが、細胞において第1、第2、および第3の核酸から産生され、かつ、第1および第2の分割型インテインのそれぞれの部分が、(a) 外来性ポリペプチドの第1の部分のカルボキシ末端の、外来性ポリペプチドの第2の部分のアミノ末端との連結、および(b) 外来性ポリペプチドの第2の部分のカルボキシ末端の、外来性ポリペプチドの第3の部分のアミノ末端との連結を促進し、それにより、外来性ポリペプチドが細胞に送達され、
送達される外来性ポリペプチドが、1つのAAVベクター粒子によってコード可能であるよりも大きい、
方法。
【請求項２１】
第1および第2の分割型インテインが、交差スプライシングしない、請求項20に記載の方法。
【請求項２２】
第1および第2のAAV粒子を含むAAVベクター粒子のセットを含む、タンパク質発現システムであって、
第1のAAVベクター粒子が、第1の融合ポリペプチドをコードする第1の核酸を含み、第1の融合ポリペプチドが、分割型インテインの第1の部分に融合している外来性ポリペプチドの第1の部分を含み；かつ
第2のAAVベクター粒子が、第2の融合ポリペプチドをコードする第2の核酸を含み、第2の融合ポリペプチドが、分割型インテインの第2の部分に融合している外来性ポリペプチドの第2の部分を含む、
タンパク質発現システム。
【請求項２３】
第1および第2のAAVベクター粒子の細胞への共感染が、分割型インテインの第1および第2の部分の除去を伴った、外来性ポリペプチドの第1の部分の、外来性ポリペプチドの第2の部分との連結を促進する、請求項22に記載のタンパク質発現システム。
【請求項２４】
分割型インテインの第1および第2の部分の除去を伴った、外来性ポリペプチドの第1の部分の、外来性ポリペプチドの第2の部分との連結が、1つのAAV粒子においてコード可能であるよりも大きい外来性ポリペプチドを生じさせる、請求項22または23に記載のタンパク質発現システム。
【請求項２５】
第1、第2、および第3のAAV粒子を含むAAVベクター粒子のセットを含む、タンパク質発現システムであって、
第1のAAVベクター粒子が、第1の融合ポリペプチドをコードする第1の核酸を含み、第1の融合ポリペプチドが、第1の分割型インテインの第1の部分に融合している外来性ポリペプチドの第1の部分を含み、分割型インテインの第1の部分が、外来性ポリペプチドの第1の部分のカルボキシ末端に融合しており；
第2のAAVベクター粒子が、第2の融合ポリペプチドをコードする第2の核酸を含み、
(i) 外来性ポリペプチドの第2の部分のアミノ末端において第1の分割型インテインの第2の部分に融合しており、かつ(ii) 外来性ポリペプチドの第2の部分のカルボキシ末端において第2の分割型インテインの第1の部分に融合している、外来性ポリペプチドの第2の部分

を、第2の融合ポリペプチドが含み；かつ
第3のAAVベクター粒子が、第3の融合ポリペプチドをコードする第3の核を含み、第3の融合ポリペプチドが、外来性ポリペプチドの第3の部分のアミノ末端において第2の分割型インテインの第2の部分に融合している外来性ポリペプチドの第3の部分を含む、タンパク質発現システム。
【請求項２６】
第1、第2、および第3のAAVベクター粒子の細胞への共感染が、第1の分割型インテインの第1および第2の部分の除去を伴った、外来性ポリペプチドの第1の部分の、外来性ポリペプチドの第2の部分との連結、ならびに第2の分割型インテインの第1および第2の部分の除去を伴った、外来性ポリペプチドの第2の部分の、外来性ポリペプチドの第3の部分との連結を促進する、請求項25に記載のタンパク質発現システム。
【請求項２７】
第1の分割型インテインの第1および第2の部分の除去を伴った、外来性ポリペプチドの第1の部分の、外来性ポリペプチドの第2の部分との連結、ならびに第2の分割型インテインの第1および第2の部分の除去を伴った、外来性ポリペプチドの第2の部分の、外来性ポリペプチドの第3の部分との連結が、1つのAAV粒子においてコード可能であるよりも大きい外来性ポリペプチドを生じさせる、請求項25または26に記載のタンパク質発現システム。
【請求項２８】
第1および第2の融合ポリペプチドの発現、または第1、第2、および第3の融合ポリペプチドの発現が、筋特異的発現カセットによって駆動される、請求項22～27のいずれか一項に記載のタンパク質発現システム。
【請求項２９】
その必要のある対象において疾患または障害を処置する方法であって、請求項22～28のいずれか一項に記載のタンパク質発現システムを投与する段階を含み、それにより対象が処置される、方法。
【請求項３０】
その必要のある対象が、筋疾患もしくは筋障害、または神経筋疾患もしくは神経筋障害を有する、請求項29に記載の方法。
【請求項３１】
外来性ポリペプチドが、ジストロフィンまたはミニジストロフィンであり、かつその必要のある対象が、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）またはベッカー型筋ジストロフィー（BMD）を有する、請求項29または30に記載の方法。
【請求項３２】
ジストロフィンまたはミニジストロフィンが、ジストロフィー筋の筋力を少なくとも10％増加させる、請求項31に記載の方法。
【請求項３３】
第1および第2の融合ポリペプチドの発現、または第1、第2、および第3の融合ポリペプチドの発現が、筋特異的発現カセットによって駆動される、請求項29～32のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４】
タンパク質発現システムが、血管系への注入によって、または組織への直接注射によって投与される、請求項29～33のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
細胞において外来性ポリペプチドの産生を誘導するための方法であって、
第1の融合ポリペプチドをコードする第1の核酸を含む第1のアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター粒子であって、第1の融合ポリペプチドが、分割型インテインの第1の部分に融合している外来性ポリペプチドの第1の部分を含む、第1のAAVベクター粒子；および
第2の融合ポリペプチドをコードする第2の核酸を含む第2のAAVベクター粒子であっ

て、第2の融合ポリペプチドが、分割型インテインの第2の部分に融合している外来性ポリペプチドの第2の部分を含む、第2のAAVベクター粒子
に細胞を接触させる段階を含み、
第1および第2の融合ポリペプチドが、細胞において第1および第2の核酸から産生され、かつ分割型インテインの第1および第2の部分が、外来性ポリペプチドの第1の部分の、外来性ポリペプチドの第2の部分との連結を促進し、それにより、細胞における外来性ポリペプチドの産生が誘導され、
産生される外来性ポリペプチドが、1つのAAVベクター粒子によってコード可能であるよりも大きい、
方法。

【請求項３６】
第1および第2の核酸が、筋特異的発現カセット（MSEC）を含む、請求項35に記載の方法。

【請求項３７】
分割型インテインが、天然に存在する分割型インテインである、請求項35または36に記載の方法。

【請求項３８】
分割型インテインが、遺伝学的に改変された分割型インテインである、請求項35～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３９】
分割型インテインの遺伝学的改変が、哺乳動物細胞における発現および／もしくは安定性のためのコドン最適化、分割型インテインの短縮もしくは延長、または、産生しようとする外来性タンパク質の配列とより厳密に一致させるための、コードされるアミノ酸の分割型インテインにおける変更から選択される、請求項38に記載の方法。

【請求項４０】
外来性ポリペプチドの第1および第2の部分が、実質的に同じサイズである、請求項35～39のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４１】
外来性ポリペプチドの第1および第2の部分が、サイズにおいて50アミノ酸以下が異なる、請求項35～40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４２】
外来性ポリペプチドが、分割型インテイン由来のフットプリントを4アミノ酸未満含む、請求項35～41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４３】
外来性ポリペプチドが、分割型インテインのフットプリントを3アミノ酸以下含む、請求項42に記載の方法。

【請求項４４】
外来性ポリペプチドの第1の部分と第2の部分とを分離する分割部位が、分割型インテインのフットプリントと同じ配列を有する部位において選択され、それにより、分割型インテイン由来の余剰アミノ酸なしに外来性ポリペプチドが産生される、請求項43に記載の方法。

【請求項４５】
外来性ポリペプチドが、治療用ポリペプチドである、請求項35～44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４６】
治療用ポリペプチドが、ジストロフィン、ミニジストロフィン、ユートロフィン、およびジスフェリン、ネブリン、タイチン、ミオシン、スペクトリンリピート含有核膜タンパク質1（Syne-1）、ジストログリカン、ATPシンターゼ、凝固因子IIX、ラミンA/C、サイログロブリン、上皮成長因子受容体（EGFR）、α-スペクトリンおよび／またはβ-スペクトリン、ラパマイシンの筋標的（mTOR）、およびリアノジン受容体1から選択さ

れる、請求項45に記載の方法。
【請求項４７】
ミニジストロフィンが、160 kDaよりも大きく、かつ全長ジストロフィンよりも小さい、請求項46に記載の方法。
【請求項４８】
治療用ポリペプチドがジストロフィンであり、かつ、ジストロフィンエクステインのN末端側部分が、ジストロフィンのヒンジドメインの中または隣で、分割型インテインのN末端側部分に連結されている、請求項45または46に記載の方法。
【請求項４９】
ヒンジドメインが、ジストロフィンのヒンジ1、ヒンジ2、ヒンジ3、またはヒンジ4を含む、請求項48に記載の方法。
【請求項５０】
治療用ポリペプチドがジストロフィンであり、かつ、ジストロフィンエクステインのN末端側部分が、ジストロフィンの24個のスペクトリン様リピートドメインのうちの1個の中の、ヘリックスbをヘリックスcに連結するループドメイン、またはヘリックスcをヘリックスa'に連結するループドメインに、連結されている、請求項45または46に記載の方法。
【請求項５１】
治療用ポリペプチドがジストロフィンであり、かつ、ジストロフィンエクステインのC末端側部分が、ジストロフィンのヒンジドメインの中もしくは隣で、分割型インテインのC末端側部分に連結されているか、または、ジストロフィンの24個のスペクトリン様リピートドメインのうちの1個の中の、ヘリックスbをヘリックスcに連結するループドメイン、もしくはヘリックスcをヘリックスa'に連結するループドメインに、連結されている、請求項45または46に記載の方法。
【請求項５２】
ヒンジドメインが、ジストロフィンのヒンジ1、ヒンジ2、ヒンジ3、またはヒンジ4を含む、請求項51に記載の方法。
【請求項５３】
外来性ポリペプチドが、細胞において機能的である、請求項35～52のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４】
細胞において外来性ポリペプチドの産生を誘導するための方法であって、
第1の融合ポリペプチドをコードする第1の核酸を含む第1のアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター粒子であって、第1の融合ポリペプチドが、第1の分割型インテインの第1の部分に融合している外来性ポリペプチドの第1の部分を含み、分割型インテインの第1の部分が、外来性ポリペプチドの第1の部分のカルボキシ末端に融合している、第1のAAVベクター粒子；
第2の融合ポリペプチドをコードする第2の核酸を含む第2のAAVベクター粒子であって、
(i) 外来性ポリペプチドの第2の部分のアミノ末端において第1の分割型インテインの第2の部分に融合しており、かつ(ii) 外来性ポリペプチドの第2の部分のカルボキシ末端において第2の分割型インテインの第1の部分に融合している、外来性ポリペプチドの第2の部分
を、第2の融合ポリペプチドが含む、第2のAAVベクター粒子；および
第3の融合ポリペプチドをコードする第3の核を含む第3のAAVベクター粒子であって、第3の融合ポリペプチドが、外来性ポリペプチドの第3の部分のアミノ末端において第2の分割型インテインの第2の部分に融合している外来性ポリペプチドの第3の部分を含む、第3のAAVベクター粒子
に細胞を接触させる段階を含み、
第1、第2、および第3の融合ポリペプチドが、細胞において第1、第2、および第3の

核酸から産生され、かつ、第1および第2の分割型インテインのそれぞれの部分が、(a)外来性ポリペプチドの第1の部分のカルボキシ末端の、外来性ポリペプチドの第2の部分のアミノ末端との連結、および(b)外来性ポリペプチドの第2の部分のカルボキシ末端の、外来性ポリペプチドの第3の部分のアミノ末端との連結を促進し、それにより、細胞において外来性ポリペプチドが産生され、

産生される外来性ポリペプチドが、1つのAAVベクター粒子によってコード可能であるよりも大きい、

方法。

【請求項５５】

第1および第2の分割型インテインが、交差スプライシングしない、請求項54に記載の方法。

【請求項５６】

その必要のある対象における疾患または障害の処置において使用するための、請求項11～28のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項５７】

その必要のある対象が、筋障害または神経筋障害を有する対象を含む、請求項56に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

本出願は、35 U.S.C.§119(e)のもとで、2021年7月23日に提出された米国特許仮出願第63/225,212号および2021年10月18日に提出された米国特許仮出願第63/256,819号の恩典を主張するものであり、該仮出願それぞれの内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【０００２】

技術分野

本発明の分野は、複数のベクターを用いて、大きな治療用タンパク質を送達するまたは該タンパク質の産生を誘導する方法に関連する。

【背景技術】

【０００３】

背景

AAVベクターを用いる遺伝子療法は、機能喪失型のさまざまな遺伝性障害の処置に関して将来性が期待されている（Li 2020）。しかしながら、この治療用モダリティは、該ウイルスベクターのパッケージング能力が小さい（およそ5 kb）という課題を有している。

【発明の概要】

【０００４】

概要

本明細書に記載される方法および組成物は、AAVベクターを用いて大きなポリペプチドを送達することが、分割型インテインによって可能になる、という発見にある程度基づいており、ここで、大きなポリペプチドにはジストロフィンが含まれるが、これに限定されない。

【０００５】

1つの局面において、外来性ポリペプチドを細胞に送達するための方法が本明細書において記載され、該方法は：

第1の融合ポリペプチドをコードする第1の核酸を含む第1のアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター粒子であって、第1の融合ポリペプチドが、分割型インテインの第1の部分に融合している外来性ポリペプチドの第1の部分を含む、第1のAAVベクター粒子；および

第2の融合ポリペプチドをコードする第2の核酸を含む第2のAAVベクター粒子であって、第2の融合ポリペプチドが、分割型インテインの第2の部分に融合している外来性ポリペプチドの第2の部分を含む、第2のAAVベクター粒子
に細胞を接触させる段階を含み、
第1および第2の融合ポリペプチドは、細胞において第1および第2の核酸から産生され、かつ分割型インテインの第1および第2の部分は、外来性ポリペプチドの第1の部分の、外来性ポリペプチドの第2の部分との連結を促進し、それにより、外来性ポリペプチドが細胞に送達され、
送達される外来性ポリペプチドは、1つのAAVベクター粒子によってコード可能であるよりも大きい。

【０００６】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の1つの態様において、第1および第2の核酸は、筋特異的発現カセット（MSEC）を含む。

【０００７】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、分割型インテインは、天然に存在する分割型インテインである。

【０００８】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、分割型インテインは、遺伝学的に改変された分割型インテインである。別の態様において、分割型インテインの遺伝学的改変は、哺乳動物細胞における発現および／もしくは安定性のためのコドン最適化、分割型インテインの短縮もしくは延長、または、送達しようとする外来性タンパク質の配列とより厳密に一致させるための、コードされるアミノ酸の分割型インテインにおける変更から選択される。

【０００９】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、外来性ポリペプチドの第1および第2の部分は、実質的に同じサイズである。

【００１０】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、外来性ポリペプチドの第1および第2の部分は、サイズにおいて50アミノ酸以下が異なる。

【００１１】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、外来性ポリペプチドは、分割型インテイン由来のフットプリントを4アミノ酸未満含む。

【００１２】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、外来性ポリペプチドは、分割型インテイン由来のフットプリントを3アミノ酸以下含む。

【００１３】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、外来性ポリペプチドの第1の部分と第2の部分とを分離する分割部位は、分割型インテインのフットプリントと同じ配列を有する部位において選択され、それにより、分割型インテイン由来の余剰アミノ酸なしに外来性ポリペプチドが産生される。

【００１４】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、外来性ポリペプチドは、治療用ポリペプチドである。

【００１５】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、治療用ポリペプチドは、ジストロフィン、ミニジストロフィン、ユートロフィン、およびジスフェリン、ネブリン、タイチン、ミオシン、スペクトリンリピート含有核膜タンパク質1（spectrin repeat containing nuclear envelope protein 1）（Syne-1）、ジストログリカン、ATPシンターゼ、凝固因子IIX、ラミンA/C、サイログロブリン、上皮成長因子受容体（EGFR）、α-スペクトリンおよび／またはβ-スペクトリン、ラパマイシンの

筋標的（muscle target of rapamycin）（mTOR）、およびリアノジン受容体1から選択される。別の態様において、ミニジストロフィンは、160 kDaよりも大きく、かつ全長ジストロフィンよりも小さい。

【００１６】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、治療用ポリペプチドはジストロフィンであり、かつ、ジストロフィンエクステインのN末端側部分は、ジストロフィンのヒンジドメインの中または隣で、分割型インテインのN末端側部分に連結されている。

【００１７】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、ヒンジドメインは、ジストロフィンのヒンジ1、ヒンジ2、ヒンジ3、またはヒンジ4を含む。

【００１８】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、治療用ポリペプチドはジストロフィンであり、かつ、ジストロフィンエクステインのN末端側部分は、ジストロフィンの24個のスペクトリン様リピートドメインのうちの1個の中の、ヘリックスbをヘリックスcに連結するループドメイン、またはヘリックスcをヘリックスa'に連結するループドメインに、連結されている。

【００１９】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、治療用ポリペプチドはジストロフィンであり、かつ、ジストロフィンエクステインのC末端側部分は、ジストロフィンのヒンジドメインの中もしくは隣で、分割型インテインのC末端側部分に連結されているか、または、ジストロフィンの24個のスペクトリン様リピートドメインのうちの1個の中の、ヘリックスbをヘリックスcに連結するループドメイン、もしくはヘリックスcをヘリックスa'に連結するループドメインに、連結されている。本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、ヒンジドメインは、ジストロフィンのヒンジ1、ヒンジ2、ヒンジ3、またはヒンジ4を含む。

【００２０】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、外来性ポリペプチドは、細胞において機能的である。

【００２１】

別の局面において、外来性ポリペプチドを細胞に送達するための方法が本明細書において記載され、該方法は：

第1の融合ポリペプチドをコードする第1の核酸を含む第1のアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター粒子であって、第1の融合ポリペプチドが、第1の分割型インテインの第1の部分に融合している外来性ポリペプチドの第1の部分を含み、分割型インテインの第1の部分が、外来性ポリペプチドの第1の部分のカルボキシ末端に融合している、第1のAAVベクター粒子；

第2の融合ポリペプチドをコードする第2の核酸を含む第2のAAVベクター粒子であって、

(i) 外来性ポリペプチドの第2の部分のアミノ末端において第1の分割型インテインの第2の部分に融合しており、かつ(ii) 外来性ポリペプチドの第2の部分のカルボキシ末端において第2の分割型インテインの第1の部分に融合している、外来性ポリペプチドの第2の部分

を、第2の融合ポリペプチドが含む、第2のAAVベクター粒子；および

第3の融合ポリペプチドをコードする第3の核を含む第3のAAVベクター粒子であって、第3の融合ポリペプチドが、外来性ポリペプチドの第3の部分のアミノ末端において第2の分割型インテインの第2の部分に融合している外来性ポリペプチドの第3の部分を含む、第3のAAVベクター粒子

に細胞を接触させる段階を含み、

第1、第2、および第3の融合ポリペプチドは、細胞において第1、第2、および第3の

核酸から産生され、かつ、第1および第2の分割型インテインのそれぞれの部分は、(a) 外来性ポリペプチドの第1の部分のカルボキシ末端の、外来性ポリペプチドの第2の部分のアミノ末端との連結、および(b) 外来性ポリペプチドの第2の部分のカルボキシ末端の、外来性ポリペプチドの第3の部分のアミノ末端との連結を促進し、それにより、外来性ポリペプチドが細胞に送達され、

送達される外来性ポリペプチドは、1つのAAVベクター粒子によってコード可能であるよりも大きい。本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の1つの態様において、第1および第2の分割型インテインは交差スプライシングしない。

【００２２】

別の局面において、第1および第2のAAV粒子を含むAAVベクター粒子のセットを含むタンパク質発現システムが、本明細書において記載され、

第1のAAVベクター粒子は、第1の融合ポリペプチドをコードする第1の核酸を含み、第1の融合ポリペプチドは、分割型インテインの第1の部分に融合している外来性ポリペプチドの第1の部分を含み；かつ

第2のAAVベクター粒子は、第2の融合ポリペプチドをコードする第2の核酸を含み、第2の融合ポリペプチドは、分割型インテインの第2の部分に融合している外来性ポリペプチドの第2の部分を含む。

【００２３】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の1つの態様において、第1および第2のAAVベクター粒子の細胞への共感染は、分割型インテインの第1および第2の部分の除去を伴った、外来性ポリペプチドの第1の部分の、外来性ポリペプチドの第2の部分との連結を促進する。

【００２４】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、分割型インテインの第1および第2の部分の除去を伴った、外来性ポリペプチドの第1の部分の、外来性ポリペプチドの第2の部分との連結は、1つのAAV粒子においてコード可能であるよりも大きい外来性ポリペプチドを生じさせる。

【００２５】

別の局面において、第1、第2、および第3のAAV粒子を含むAAVベクター粒子のセットを含むタンパク質発現システムが、本明細書において記載され、

第1のAAVベクター粒子は、第1の融合ポリペプチドをコードする第1の核酸を含み、第1の融合ポリペプチドは、第1の分割型インテインの第1の部分に融合している外来性ポリペプチドの第1の部分を含み、分割型インテインの第1の部分は、外来性ポリペプチドの第1の部分のカルボキシ末端に融合しており；

第2のAAVベクター粒子は、第2の融合ポリペプチドをコードする第2の核酸を含み、

(i) 外来性ポリペプチドの第2の部分のアミノ末端において第1の分割型インテインの第2の部分に融合しており、かつ(ii) 外来性ポリペプチドの第2の部分のカルボキシ末端において第2の分割型インテインの第1の部分に融合している、外来性ポリペプチドの第2の部分

を、第2の融合ポリペプチドは含み；かつ

第3のAAVベクター粒子は、第3の融合ポリペプチドをコードする第3の核を含み、第3の融合ポリペプチドは、外来性ポリペプチドの第3の部分のアミノ末端において第2の分割型インテインの第2の部分に融合している外来性ポリペプチドの第3の部分を含む。

【００２６】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の1つの態様において、第1、第2、および第3のAAVベクター粒子の細胞への共感染は、第1の分割型インテインの第1および第2の部分の除去を伴った、外来性ポリペプチドの第1の部分の、外来性ポリペプチドの第2の部分との連結、ならびに第2の分割型インテインの第1および第2の部分の除去を伴った、外来性ポリペプチドの第2の部分の、外来性ポリペプチドの第3の部分との連結を促進する。

【００２７】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、第１の分割型インテインの第１および第２の部分の除去を伴った、外来性ポリペプチドの第１の部分の、外来性ポリペプチドの第２の部分との連結、ならびに第２の分割型インテインの第１および第２の部分の除去を伴った、外来性ポリペプチドの第２の部分の、外来性ポリペプチドの第３の部分との連結は、１つのＡＡＶ粒子においてコード可能であるよりも大きい外来性ポリペプチドを生じさせる。
【００２８】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、第１および第２の融合ポリペプチドの発現、または第１、第２、および第３の融合ポリペプチドの発現は、筋特異的発現カセットによって駆動される。
【００２９】
別の局面において、その必要のある対象において疾患または障害を処置する方法が本明細書において記載され、該方法は、本明細書に記載されるタンパク質発現システムを投与する段階を含み、それにより対象が処置される。
【００３０】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の１つの態様において、その必要のある対象は、筋疾患もしくは筋障害、または神経筋疾患もしくは神経筋障害を有する。
【００３１】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、外来性ポリペプチドはジストロフィンまたはミニジストロフィンであり、かつその必要のある対象はデュシェンヌ型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）またはベッカー型筋ジストロフィー（ＢＭＤ）を有する。
【００３２】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、ジストロフィンまたはミニジストロフィンは、ジストロフィー筋の筋力を少なくとも１０％増加させる。
【００３３】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、第１および第２の融合ポリペプチドの発現、または第１、第２、および第３の融合ポリペプチドの発現は、筋特異的発現カセットによって駆動される。
【００３４】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、タンパク質発現システムは、血管系への注入によって、または組織への直接注射によって投与される。
【００３５】
別の局面において、細胞において外来性ポリペプチドの産生を誘導するための方法が本明細書において記載され、該方法は：
第１の融合ポリペプチドをコードする第１の核酸を含む第１のアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクター粒子であって、第１の融合ポリペプチドが、分割型インテインの第１の部分に融合している外来性ポリペプチドの第１の部分を含む、第１のＡＡＶベクター粒子；および
第２の融合ポリペプチドをコードする第２の核酸を含む第２のＡＡＶベクター粒子であって、第２の融合ポリペプチドが、分割型インテインの第２の部分に融合している外来性ポリペプチドの第２の部分を含む、第２のＡＡＶベクター粒子
に細胞を接触させる段階を含み、
第１および第２の融合ポリペプチドは、細胞において第１および第２の核酸から産生され、かつ分割型インテインの第１および第２の部分は、外来性ポリペプチドの第１の部分の、外来性ポリペプチドの第２の部分との連結を促進し、それにより、細胞における外来性ポリペプチドの産生が誘導され、

産生される外来性ポリペプチドは、1つのAAVベクター粒子によってコード可能であるよりも大きい。

【００３６】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の1つの態様において、第1および第2の核酸は筋特異的発現カセット（ＭＳＥＣ）を含む。

【００３７】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、分割型インテインは天然に存在する分割型インテインである。

【００３８】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、分割型インテインは遺伝学的に改変された分割型インテインである。別の態様において、分割型インテインの遺伝学的改変は、哺乳動物細胞における発現および／もしくは安定性のためのコドン最適化、分割型インテインの短縮もしくは延長、または、産生しようとする外来性タンパク質の配列とより厳密に一致させるための、コードされるアミノ酸の分割型インテインにおける変更から選択される。

【００３９】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、外来性ポリペプチドの第1および第2の部分は、実質的に同じサイズである。

【００４０】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、外来性ポリペプチドの第1および第2の部分は、サイズにおいて50アミノ酸以下が異なる。

【００４１】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、外来性ポリペプチドは、分割型インテイン由来のフットプリントを4アミノ酸未満含む。

【００４２】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、外来性ポリペプチドは、分割型インテインのフットプリントを3アミノ酸以下含む。

【００４３】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、外来性ポリペプチドの第1の部分と第2の部分とを分離する分割部位は、分割型インテインのフットプリントと同じ配列を有する部位において選択され、それにより、分割型インテイン由来の余剰アミノ酸なしに外来性ポリペプチドが産生される。

【００４４】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、外来性ポリペプチドは治療用ポリペプチドである。

【００４５】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、治療用ポリペプチドは、ジストロフィン、ミニジストロフィン、ユートロフィン、およびジスフェリン、ネブリン、タイチン、ミオシン、スペクトリンリピート含有核膜タンパク質1（Syne-1）、ジストログリカン、ATPシンターゼ、凝固因子IIX、ラミンA/C、サイログロブリン、上皮成長因子受容体（EGFR）、α-スペクトリンおよび／またはβ-スペクトリン、ラパマイシンの筋標的（mTOR）、およびリアノジン受容体1から選択される。

【００４６】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、ミニジストロフィンは160 kDaよりも大きく、かつ全長ジストロフィンよりも小さい。

【００４７】

本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、治療用ポリペプチドはジストロフィンであり、かつ、ジストロフィンエクステインのN末端側部分は、ジストロフィンのヒンジドメインの中または隣で、分割型インテインのN末端側部分に連結されている。

【００４８】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、ヒンジドメインは、ジストロフィンのヒンジ1、ヒンジ2、ヒンジ3、またはヒンジ4を含む。
【００４９】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、治療用ポリペプチドはジストロフィンであり、かつ、ジストロフィンエクステインのN末端側部分は、ジストロフィンの24個のスペクトリン様リピートドメインのうちの1個の中の、ヘリックスbをヘリックスcに連結するループドメイン、またはヘリックスcをヘリックスa'に連結するループドメインに、連結されている。
【００５０】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、治療用ポリペプチドはジストロフィンであり、かつ、ジストロフィンエクステインのC末端側部分は、ジストロフィンのヒンジドメインの中もしくは隣で、分割型インテインのC末端側部分に連結されているか、または、ジストロフィンの24個のスペクトリン様リピートドメインのうちの1個の中の、ヘリックスbをヘリックスcに連結するループドメイン、もしくはヘリックスcをヘリックスa'に連結するループドメインに、連結されている。
【００５１】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、ヒンジドメインは、ジストロフィンのヒンジ1、ヒンジ2、ヒンジ3、またはヒンジ4を含む。
【００５２】
本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の別の態様において、外来性ポリペプチドは細胞において機能的である。
【００５３】
別の局面において、細胞において外来性ポリペプチドの産生を誘導するための方法が本明細書において記載され、該方法は：
第1の融合ポリペプチドをコードする第1の核酸を含む第1のアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター粒子であって、第1の融合ポリペプチドが、第1の分割型インテインの第1の部分に融合している外来性ポリペプチドの第1の部分を含み、分割型インテインの第1の部分が、外来性ポリペプチドの第1の部分のカルボキシ末端に融合している、第1のAAVベクター粒子；
第2の融合ポリペプチドをコードする第2の核酸を含む第2のAAVベクター粒子であって、
(i) 外来性ポリペプチドの第2の部分のアミノ末端において第1の分割型インテインの第2の部分に融合しており、かつ(ii) 外来性ポリペプチドの第2の部分のカルボキシ末端において第2の分割型インテインの第1の部分に融合している、外来性ポリペプチドの第2の部分
を、第2の融合ポリペプチドが含む、第2のAAVベクター粒子；および
第3の融合ポリペプチドをコードする第3の核を含む第3のAAVベクター粒子であって、第3の融合ポリペプチドが、外来性ポリペプチドの第3の部分のアミノ末端において第2の分割型インテインの第2の部分に融合している外来性ポリペプチドの第3の部分を含む、第3のAAVベクター粒子
に細胞を接触させる段階を含み、
第1、第2、および第3の融合ポリペプチドは、細胞において第1、第2、および第3の核酸から産生され、かつ、第1および第2の分割型インテインのそれぞれの部分は、(a) 外来性ポリペプチドの第1の部分のカルボキシ末端の、外来性ポリペプチドの第2の部分のアミノ末端との連結、および(b) 外来性ポリペプチドの第2の部分のカルボキシ末端の、外来性ポリペプチドの第3の部分のアミノ末端との連結を促進し、それにより、細胞において外来性ポリペプチドが産生され、
産生される外来性ポリペプチドは、1つのAAVベクター粒子によってコード可能であるよりも大きい。本明細書に記載されるこの局面および他の全ての局面の1つの態様におい

て、第1および第2の分割型インテインは交差スプライシングしない。

【００５４】

別の局面において、本明細書に記載される組成物であって、その必要のある対象（たとえば、筋障害または神経筋障害を有する対象）における疾患または障害の処置において使用するための組成物が、本明細書において提供される。

【図面の簡単な説明】

【００５５】

【図１】図1A～1B。（図1A）ジストロフィンの「筋特異的」アイソフォームの全長（下）をコードするDMDのコーディング配列（上）の概略図であり、該アイソフォームは、アクチン細胞骨格に結合するアミノ末端の球状ドメインと、それに続く、柔軟性および伸縮性を有する棒状ドメインからなっていて、該棒状ドメインは、プロリンリッチな4個の「ヒンジ」領域がその間に散在している24個のスペクトリン様リピートから構成されている。ジストログリカン結合ドメイン（DgBD）は棒状ドメインの後に位置しており、その後にカルボキシ末端（CT）ドメインが続いていて、該CTドメインは、シントロフィンおよびジストロブレビンのタンパク質ファミリーのための結合部位を含む。DgBDドメインおよびCTドメインは、ジストロフィンと糖タンパク質とのタンパク質複合体（DGC）が組み立てられる際の核となる。（図1B）Pfizer社、Sarepta Therapeutics社、およびSolid Biosciences社による臨床試験において評価されている、さまざまなμDys構築物。

【図２】ミニDys（ΔH2-SR19）を再構成するための、デュアルAAVベクターの相同組み換え戦略。2種類のAAVベクターは、ミニDysのN末端側断片（上）またはC末端側断片（下）のいずれかをコードする。ベクターは両方とも組み換え用配列（エキソン51～53）を保有しており、これは、より大きくかつ機能的なミニDys（ΔH2-SR19）の形成を可能にする。

【図３】連続型インテイン（より一般的）によって媒介される、または分割型インテインによって媒介される、タンパク質トランススプライシングの概略図。

【図４】図4A～4B。HEK293細胞における、分割型インテインNpuを用いたGFPの再構成の例。（図4A）野生型（WT）GFPのプラスミドを用いてトランスフェクトされたか、GFP／NpuインテインのN末端側プラスミドおよび／またはC末端側プラスミドを用いてトランスフェクトされた生HEK293細胞の、明視野顕微鏡写真および蛍光顕微鏡写真。（図4B）GFPの蛍光強度は分光光度計を用いて測定された。値は平均 ± s.e.mとして表される（n = 3）。

【図５Ａ】図5A～5C。ミニDysの再構成のインビトロでの検証。（図5A）ミニDysのインテイン媒介再構成の概略図。左：ヒトDMD配列のエキソン1～50をコードするN末端側ベクターであるが、エキソン21～41を欠いている。右：ヒトDMD配列のエキソン51～79をコードするC末端側ベクター。ミニDys配列は、選択されたインテインのN末端側半分またはC末端側半分に融合される。（図5B）290 kDaのミニDysを示す、HEK293細胞溶解物のウエスタンブロット解析。対照ミニdysの場合、細胞は、ミニDys ΔSR5-15の全体を発現するプラスミドを用いてトランスフェクトされた。分割型ミニDys／インテインの場合、細胞は、N末端側およびC末端側両方のベクターを用いて共トランスフェクトされた。それぞれのレーンは、SR19とヒンジ3との間の、選択された分割部位を表す。（図5C）ローディング対照であるGAPDHに対して正規化された、ミニDys定量化のデンシトメトリー（n = 4～5回の独立した実験）。データは平均 ± s.e.m.として示される。M.W：分子量。kDa：キロダルトン。

【図５Ｂ】図5Aの説明を参照。

【図５Ｃ】図5Aの説明を参照。

【図６Ａ】図6A～6B。SIMPL-GT（Split Intein-Mediated Protein Ligation for Gene Therapy（遺伝子療法のための分割型インテイン媒介タンパク質ライゲーション））アプローチを用いた、AAVに基づくジストロフィン置換の概略図。（図6A）2種類のAAVベクターの同時投与からなるデュアルベクター戦略であり、該2種類のAAVベ

クターは、分割型インテインに融合している、ミニDys（ΔSR5-15）を半分にしたもの2種類を発現する。インテインポリペプチドは、ミニDysのN末端側断片またはC末端側断片と一体となったインフレーム転写および翻訳の後で自己切除され、そして隣接するペプチドを連結し、その結果、高度に機能的なミニDys（ΔSR5-15）が発現する。（図6B）トリプルAAVベクターの投与による全長ジストロフィンの発現。第1のAAVベクターは、分割型インテイン1のN末端側断片に融合している、N末端からSR8までのジストロフィンタンパク質をコードしている。第2のAAVベクターは、インテイン1のC末端側半分とインテイン2のN末端側半分の両者に挟まれている、ジストロフィンの中間断片（SR9-19）をコードしている。一方、第3のAAVベクターは、インテイン2のC末端側半分に融合している、ジストロフィンのC末端側断片をコードしている。インテイン1とインテイン2とで2回のトランススプライシングによって、3つのジストロフィン断片が全長タンパク質へとライゲーションされる。

【図６Ｂ】図6Aの説明を参照。

【図７】分割型GFPシステムを用いた分割型インテインのスクリーニング。GFPのN末端側半分またはC末端側半分は、本発明者らのコドン最適化された分割型インテインのN末端側半分またはC末端側半分に対してインフレームでクローニングされた。ヒト胎児腎293（HEK293）細胞は、GFP／インテインのN末端側プラスミドおよびC末端側プラスミドの両方を用いて共トランスフェクトされた。24時間後、GFPの蛍光強度は分光光度計を用いて測定された。値は、WT GFPに対するパーセンテージの平均 ± s.e.mとして表される（n = 5～6）。それぞれの分割型インテインのタンパク質ライゲーションの効率（所与のインテインのGFP蛍光／内部対照のGFP蛍光）は、バーに記されている。

【図８】分割型GFPシステム使用時の分割型インテインの特異性および交差反応性。所与の分割型インテインのN末端側の、別の分割型インテインのC末端側との交差反応性を試験するため、分割型GFP・インテインのN末端側およびC末端側が、HEK293細胞において試験された。第1群の分割型インテインはアミノ酸の類似性を示しており、そのためこれらは低い特異性を示し、かつ、同じ群の別のインテインと交差反応した。一方、第2群の分割型インテイン、すなわち、gp41.1、IMPDH、およびNrdj1は、同じインテインのもう片方側半分に対してより特異的であり、かつ、他のいかなる分割型インテインとも交差反応しなかった。値は、WT GFPに対するパーセンテージの平均 ± s.e.mとして表される（n = 3～4）。これらの観察は、とりわけトリプルベクター戦略に関して非常に重要であり、ここでトリプルベクター戦略とは、3種類のジストロフィン断片を全長タンパク質へとライゲーションするために、2種類の非常に特異的な分割型インテインを必要とするものである。

【図９Ａ】図9A～9C。ジストロフィンの再構成に関する、分割型インテインのフットプリントの重要性および最適化。（図9A）インテイン媒介タンパク質トランススプライシングは、天然の細菌エクステインタンパク質に見いだされる、ある並びのアミノ酸に、高度に依存性である。分割型インテインのN末端側断片およびC末端側断片が融合し、そしてスプライシングによって除去された際に、これらの天然のエクステインアミノ酸（AhaおよびSelの両方についてAEYおよびCFN；かつgp41.1についてSGYおよびSSS；IMPDHについてGGGおよびSIC；Nrdj1についてNPCおよびSEI）は、再構成されたタンパク質において、フットプリントとして残される。そこで本発明者らは、このフットプリントを最小限に減らすために、いくつかの組み合わせを試験した。これらのデータは、分割型GFPシステムにおいて試験された際に、分割型インテインAhaを用いると、AEYでAEY/CFNと同じスプライシング効率が達成可能であり、一方でgp41.1を用いると、GY/Sで効率的なGFPライゲーションに十分であることを示す。このフットプリントは、IMPDHおよびNrdj1を用いた場合にいっそう短く、それぞれG/Sのみ、およびC/Sのみであった。値は、WT GFPに対するパーセンテージの平均 ± s.e.mとして表される（n = 4）。全長ジストロフィンの再構成（図9B）またはミニジストロフィン（図9C）の再構成のための、最小限のフットプリントしか残さないAhaおよび／またはgp41.1を用いたタンパク質トランススプライシングの図解例。

【図９Ｂ】図9Aの説明を参照。
【図９Ｃ】図9Aの説明を参照。
【図１０】ヒトジストロフィンタンパク質中のいくつかの分割部位であって、いくつかの天然のアミノ酸がインテインのフットプリントの一部として使用可能である分割部位の同定。
【図１１】図11A～11B。（図11A）290 kDaのミニDysを示す、HEK293細胞溶解物のウエスタンブロット解析。対照ミニdysにおいては、細胞は、ミニDys ΔSR5-15の全体を発現するプラスミドを用いてトランスフェクトされた。分割型ミニDys／インテインにおいては、細胞は、N末端側およびC末端側両方のベクターを用いて共トランスフェクトされた。それぞれのレーンは、SR19とヒンジ3との間の、選択された分割部位を表す。（図11B）ローディング対照であるGAPDHに対して正規化された、ミニDys定量化のデンシトメトリー（n = 4～5回の独立した実験）。データは平均 ± s.e.m.として示される。M.W：分子量。kDa：キロダルトン。これらのデータは、4種類の異なる分割部位に分割型gp41.1を挿入した場合に、ミニジストロフィンΔSR-5-15が効率的に再構成されることを示す。
【図１２Ａ】図12A～12C。AAVの筋肉内注射後のミニジストロフィンΔSR-5-15のインビボでの発現。分割型ミニジストロフィン／インテインのクローンはpAAVプラスミドに挿入されたが、該pAAVプラスミドは、AAV血清型2の2つの末端逆位反復配列（ITR）に挟まれている、筋特異的クレアチンキナーゼ8（CK8）調節カセットと短い合成ポリAとを含むものであった。最終的なpAAVプラスミドをpDG6パッケージングプラスミドとともに用いてHEK293細胞が共トランスフェクトされて、組み換えAAV2/6ベクターが作製され、これはヘパリンアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて精製され、その後、スクロース勾配遠心分離を用いて濃縮された。5 x 10^{10}ウイルスゲノム（v.g）という用量の、分割型ミニジストロフィン／インテインのN末端側および／またはC末端側をコードするAAVが、3週齢のC57BL/6-mdx^{4cv}の前脛骨筋（T.A）に投与された。注射から4週間後、注射を受けた筋が採取され、全タンパク質が抽出され、これは、ウエスタンブロッティングのためにSDSゲルにおいて分離された（図12A）。試験された4つのT.A筋において、ミニジストロフィンΔSR5-15の強力な発現が検出されたが、これは、SIMPLI-GTアプローチの有効性を際立たせるものである。筋は凍結薄切され、ジストロフィンについて免疫染色された（図12B）か、またはヘマトキシリンおよびエオシンを用いて染色され、筋線維のサイズおよび核の位置が測定された（図12C）。再構成されたミニジストロフィン ΔSR5-15は、N末端側およびC末端側というデュアルAAVベクターを注射されたmdx^{4cv}の筋線維鞘において、正しく局在していた。これらの筋は筋組織像全般の改善を示し、炎症は存在していない。
【図１２Ｂ】図12Aの説明を参照。
【図１２Ｃ】図12Aの説明を参照。
【図１３】トリプルベクター戦略による全長ジストロフィンの発現の、インビトロでの概念実証。ヒトジストロフィンのN断片、C断片、または中間断片のいずれかを発現する3種類のプラスミドを用いてトランスフェクトされたHEK293細胞溶解物のウエスタンブロット解析。分割型インテインgp41.1は、中間断片をC末端側断片にライゲーションするために使用され、一方で、6種類の異なる分割型インテインが、N末端側断片と中間断片とのライゲーションに関して試験された。
【図１４】図14A～14B。全長ジスフェリンの発現の、インビトロでの概念実証。（図14A）全長ヒトジスフェリンか、または分割型ジスフェリン／gp41.1インテインか、もしくは分割型ジスフェリン／IMPDHインテインのいずれかを発現するプラスミドを用いてトランスフェクトされたHEK293細胞溶解物のウエスタンブロット解析。3種類の分割部位が試験された。（図14B）ローディング対照であるGAPDHに対して正規化された、全長ジスフェリン発現の定量化のデンシトメトリー（n = 5回の独立した実験）。データは平均 ± s.e.m.として示される。これらのデータは、2種類の異なる分割部位に分割型gp41.1を挿入した場合に、全長ジスフェリンが効率的に再構成されることを示す。

【図１５Ａ】図15A～15W。分割型インテインのDNA配列およびタンパク質配列。図15AはAha（SEQ ID No: 1および2）である。図15BはAov（SEQ ID No: 3および4）である。図15CはAsp（SEQ ID No: 5および6）である。図15DはAva（SEQ ID No: 7および8）である。図15EはCra（SEQ ID No: 9および10）である。図15FはCsp-CCY（SEQ ID No: 11および12）である。図15GはCsp-PCC7424（SEQ ID No: 13および14）である。図15HはCsp-PCC8801（SEQ ID No: 15および16）である。図15IはCwa（SEQ ID No: 17および18）である。図15Jはgp41.1（SEQ ID No: 19および20）である。図15Kはgp41.8（SEQ ID No: 21および22）である。図15LはIMPDH（SEQ ID No: 23および24）である。図15MはMaer（SEQ ID No: 25および26）である。図15NはMcht（SEQ ID No: 27および28）である。図15OはNpu（SEQ ID No: 29および30）である。図15PはNrdj（SEQ ID No: 31および32）である。図15QはOli（SEQ ID No: 33および34）である。図15RはSel（SEQ ID No: 35および36）である。図15SはSsp-PCC6803（SEQ ID No: 37および38）である。図15TはSsp-PCC7002（SEQ ID No: 39および40）である。図15UはTel（SEQ ID No: 41および42）である。図15VはTer（SEQ ID No: 43および44）である。図15WはTvu（SEQ ID No: 45および46）である。

【図１５Ｂ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｃ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｄ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｅ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｆ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｇ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｈ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｉ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｊ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｋ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｌ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｍ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｎ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｏ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｐ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｑ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｒ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｓ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｔ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｕ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｖ】図15Aの説明を参照。

【図１５Ｗ】図15Aの説明を参照。

【図１６】全長ジスフェリンの分割部位。

【図１７】全長ジストロフィンの分割部位（IMPDHインテイン）。

【図１８】全長ジストロフィンの分割部位（Nrdjインテイン）。

【図１９】全長ジストロフィンの分割部位。

【図２０】全長ジストロフィンの分割部位（gp41.1インテイン）。

【図２１－１】ミニジストロフィンΔSR5-15の分割部位。

【図２１－２】図21-1の説明を参照。

【図２２Ａ】図22A～22D。3種類のインテインベクターを筋肉内投与した後の、全長ジストロフィンのインビボでの発現。それぞれの組み合わせの分割型ジストロフィン／インテインのクローンは、CK8eプロモーターを用いるAAV6ベクターにパッケージングされ、構築物1つにつき5 x 10^{10} v.gとして、3週齢のmdx^{4cv}マウスのTA筋に局所投与された。注射から4週間後、ジストロフィンのC末端側終端を認識する抗体を用いたウエス

タンブロットにより、全タンパク質が解析された（図22A）。インビトロでの観察と同様に、両方の組み合わせにおいて427 kDaのバンドが検出され、分割型Nrdj1と分割型gp41.1との組み合わせを用いた場合に、より高い発現が検出された（WTの発現と比べて2～4倍高い）。より重要なことに、この初期のタイムポイントにおいて中心核筋線維の劇的な減少が観察され、これは、未処置のmdx^{4cv}のTA筋におけるおよそ65%に対し、このトリプルベクター戦略で処置された筋においては30～40%というものであり、この短期のタイムポイントにおいて、筋組織像全般の顕著な改善がみられた（図22B、22C）。全長ジストロフィンタンパク質の、N末端側断片、C末端側断片、または中間断片を認識する3種類の異なる抗体のいずれかを用いて評価された際に、再構成された全長ジストロフィンは筋鞘において正しく局在していた。図22A、mdx^{4cv}のTA筋におけるトリプルベクターの投与後の全長ジストロフィンの発現を示すウエスタンブロット（上）。図22B、ベクターのさまざまな組み合わせ（または生理食塩水）で処置され、ヘマトキシリンおよびエオシンを用いて染色されたmdx^{4cv}のTA筋の断面における、中心核筋線維の可視化。齢数を一致させたマウスからの、未処置の野生型（WT）またはmdx^{4cv}のTA筋もまた示される。N末端側のみ：1種類のベクター、この場合はN末端側ベクターのみを注射された筋であり；中間のみ：1種類のベクター、この場合は中間ベクターのみを注射された筋であり；C末端側のみ：1種類のベクター、この場合はC末端側ベクターのみを注射された筋である。他のパネルは、2種類のベクターの組み合わせか、または全3種類のベクターの組み合わせ（トリプル）を注射された筋を示す。図22C、トリプルベクターの記載される組み合わせ（または生理食塩水）で処置され、ヘマトキシリンおよびエオシンを用いて染色されたmdx4cvのTA筋の断面における、中心核筋線維の定量化。未処置の野生型（WT）マウスのTA筋からの値もまた示される。データは、さまざまな筋におけるおよそ400個の筋線維の計数からもたらされている。図22D、ジストロフィンのN末端側断片、C末端側断片、または中間断片に対する抗体を用いた、TA筋の凍結切片のトリプル免疫標識。野生型の筋は未注射である；mdx^{4cv}の筋には、図22Aのように、生理食塩水か、またはトリプルベクターの2種類の組み合わせが注射された。

【図２２Ｂ】図22Aの説明を参照。

【図２２Ｃ】図22Aの説明を参照。

【図２２Ｄ】図22Aの説明を参照。

【図２３Ａ】図23A～23C。デュアルベクターまたはトリプルベクターを静脈内注入した後の、ミニDysおよび全長ジストロフィンのインビボでの発現。8週齢のmdx^{4cv}は、3か月にわたる処置において、全用量で2 x 10^{14} vg/kgとなる全身性の処置を受けた。後肢と横隔膜の両方の筋の収縮特性は、筋のフォーストランスデューサーを用いて評価された（図23A、図23B）。デュアルベクターまたはトリプルベクターでの処置を受けたマウスは、生理食塩水で処置されたmdx^{4cv}マウスの筋、および野生型マウスの筋と比べて、前脛骨筋および横隔膜筋の固有筋力の発生において有意な改善を示した。ウエスタンブロットを用いたところ、これらの筋は、ミニDysおよび全長ジストロフィンの強力な発現を示した（図23C）。図23A、前脛骨筋のインビボでの固有筋力。図23B、単離された横隔膜筋断片のインビトロでの固有筋力。図23C、デュアルベクターまたはトリプルベクターの全身投与を受けた後の、前脛骨筋におけるミニDysおよび全長ジストロフィンの発現を示すウエスタンブロット。

【図２３Ｂ】図23Aの説明を参照。

【図２３Ｃ】図23Aの説明を参照。

【発明を実施するための形態】

【００５６】

詳細な説明

本明細書において、大きい故に、1つのアデノウイルスベクター、1つのアデノ随伴ウイルスベクター、1つのレンチウイルスベクター、または1つのレトロウイルスベクターに収めることができない外来性ポリペプチドを送達するのに有用な、方法および組成物が提供される。本明細書に記載される方法および組成物は、分割型インテインの使用を採用

しており、該分割型インテインは、少なくとも2種類のウイルスベクター（たとえばAAVベクター）を用いることで、送達される大きな外来性ポリペプチドの第1の部分と第2の部分の融合を媒介し、それにより、細胞（たとえば筋細胞）への大きな外来性ポリペプチドの送達を可能にする。該方法および組成物はまた、そのような外来性ポリペプチド（たとえば、ジストロフィン、ユートロフィン、およびジスフェリンなど）の、細胞での筋特異的な発現にも関連する。

【００５７】

定義

便宜のため、本出願全体（明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲が含まれる）において使用されるいくつかの用語が、以下にまとめられている。別途定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が通常理解しているものと同じ意味を有する。

【００５８】

本明細書において使用される場合、「スプライシングする（splice）」または「スプライシングする（splices）」との用語は、ポリペプチドの内部のある一部分を切除するとともに、内部の該部分に隣接する部分を連結して、2つ以上のより小さいポリペプチド分子（たとえば、切除されたポリペプチド、およびスプライシングされたポリペプチドを、形成することを意味する。いくつかの例においては、スプライシングには、より小さなポリペプチドを2つ以上まとめて融合して、新しいポリペプチドを形成する段階もまた含まれる。スプライシングとは、分割型インテインの作用を介して、2つの別個の核酸配列または2つの別個のベクターにコードされる2つのポリペプチドを連結することもまた、指し得る。

【００５９】

本明細書において使用される場合、「切断する（cleave）」または「切断する（cleaves）」との用語は、1つのポリペプチドを切り分けて、2つ以上のより小さいポリペプチド分子を形成することを意味する。いくつかの例においては、切断は、外因性のエンドペプチダーゼを添加することによって媒介され、これはしばしば「タンパク質分解的切断」と称される。他の例においては、切断は、切断されるペプチド配列の一方または両方に内因性である活性によって媒介され得、これはしばしば「自己切断」と称される。切断とはまた、本明細書に記載される分割型インテインシステムの作用におけるもののような、タンパク質分解性ではない第3のペプチドを付加することによって誘導される、2つのポリペプチドの自己切断をも指す。

【００６０】

「融合している」との用語は、共有結合していることを意味する。たとえば、第1のペプチドと第2のペプチドとが（たとえばペプチド結合を介して）互いに共有結合している場合、該2つのペプチドは融合している。

【００６１】

本明細書において使用される場合、「インテイン」との用語は、天然に存在する、自己スプライシングするタンパク質サブドメインであって、自身であるタンパク質サブドメインを、より大きなタンパク質構造体から切除すると同時に、それ以前には隣接していた2つのペプチド領域（「エクステイン」）を合わせて連結して1つの成熟宿主タンパク質を形成することが可能な、タンパク質サブドメインを指す。いくつかのインテインにおいては、前駆体タンパク質は2つの遺伝子に由来しており、これは「分割型インテイン」と称される。

【００６２】

本明細書において使用される場合、「分割型インテイン」との用語は、互いに融合していない2つ以上の別個の要素から構成されるインテインを指す。分割型インテインは天然に存在し得るものであり、または連続型インテインを分割することによって操作することも可能である。典型的には、「分割型インテイン」との用語は、任意のインテインであって、インテインのN末端側セグメントとインテインのC末端側セグメントとの間に、ペプ

チド結合が途切れた箇所が1つまたは複数存在していて、その結果、インテインのN末端側セグメントとインテインのC末端側セグメントとが別個の分子となっており、該別個の分子は、スプライシング反応または切断反応に関して機能的であるインテインとして、非共有的に再結合または再構成することが可能であるという、任意のインテインを指す。本明細書に開示されるシステムおよび方法において使用するための分割型インテインを誘導するために、任意の触媒活性を有するインテインまたはその断片を使用することが可能である。たとえば、1つの局面において、分割型インテインは真核生物のインテインに由来してよい。別の局面において、分割型インテインは細菌のインテインに由来してよい。別の局面において、分割型インテインは古細菌のインテインに由来してよい。好ましくは、そのような由来の分割型インテインは、スプライシング反応を触媒するために必要なアミノ酸配列のみを保持する。

【００６３】

本明細書において使用される場合、「インテインのN末端側セグメント」とは、対応するインテインのC末端側セグメントと組み合わされた際に、スプライシング反応および／または切断反応に関して機能的であるN末端側のアミノ酸配列を含む、任意のインテイン配列を指す。したがって、インテインのN末端側セグメントは、スプライシングが生じた際に、スプライシングによって除去される配列をも含む。インテインのN末端側セグメントは、天然に存在する（天然の）インテイン配列のN末端側部分の改変型である配列を含んでよい。たとえば、インテインのN末端側セグメントは、追加のアミノ酸残基および／または変異した残基を包含させても、スプライシングまたは切断に関してインテインが非機能的にならないのであれば、そのような追加の残基および／または変異した残基を含んでよい。好ましくは、追加の残基および／または変異した残基を包含させることで、インテインのスプライシング活性および／または可制御性が改善または強化される。追加の機能性、たとえば、アフィニティー精製を受ける能力または共有結合による固定化を受ける能力を付与するために、インテインセグメントに、インテインではない残基を遺伝学的に融合することもまた可能である。

【００６４】

本明細書において使用される場合、「インテインのC末端側セグメント」とは、対応するインテインのN末端側セグメントと組み合わされた際に、スプライシング反応および／または切断反応に関して機能的であるC末端側のアミノ酸配列を含む、任意のインテイン配列を指す。1つの局面において、インテインのC末端側セグメントは、スプライシングが生じた際に、スプライシングによって除去される配列を含む。別の局面において、インテインのC末端側セグメントは、そのC末端に融合しているペプチド配列から切断される。C末端側インテインのC末端から切断される配列は、筋障害を処置するためのタンパク質であり、これはたとえば、ジストロフィン、ユートロフィン、ジスフェリン、ミニジストロフィン等である。インテインのC末端側セグメントは、天然に存在するインテイン配列（天然のインテイン配列）のC末端側部分の改変型である配列を含んでよい。たとえば、インテインのC末端側セグメントは、追加のアミノ酸残基および／または変異した残基を包含させても、スプライシングまたは切断に関してインテインのC末端側セグメントが非機能的にならないのであれば、そのような追加の残基および／または変異した残基を含んでよい。好ましくは、追加の残基および／または変異した残基を包含させることで、インテインのスプライシング活性および／または切断活性が改善または強化される。

【００６５】

本明細書において使用される場合、「1つのAAVベクター粒子によってコード可能であるよりも大きい」との用語は、それをコードする核酸が、AAVベクター粒子のパッケージング限界を上回っているポリペプチドを指す。厳密なパッケージング限界は、使用されるAAVベクターの血清型またはバリアントによってわずかに変化し得るが、標的細胞への効率的な感染および形質導入を行うAAVベクターの、最大のゲノムパッケージング能力は約5 kbである（野生型のAAVゲノムは約4.7 kbである；ある特定の条件下で、5.5 kbまで、またはより大きいゲノムをパッケージングすることが可能であるが、それらは

、標的細胞への効率的な感染および形質導入を行わない）。ITRを除外することで、1つのAAVベクター粒子によってトランスジーン構築物を運搬するために、プロモーター、トランスジーンコーディング領域、ポリアデニル化配列、および他の調節エレメントについて、約3.5 kbのDNAの組み込みが可能となる。したがって、所望のタンパク質の発現を行わせるために約3.5 kb超を必要とするトランスジーンは、本明細書において使用される用語のとおり、1つのAAVベクター粒子によってコード可能であるよりも大きい。いくつかの態様において、1つのベクター粒子によってコード可能であるよりも大きいタンパク質は、トランスジーンポリペプチドをコードするために、少なくとも4 kb、少なくとも4.5 kb、少なくとも5 kb、少なくとも5.5 kb、少なくとも6 kb、少なくとも6.5 kb、少なくとも7 kb、少なくとも7.5 kb、少なくとも8 kb、少なくとも8.5 kb、少なくとも9 kb、少なくとも9.5 kb、少なくとも10 kb、少なくとも10.5 kb、少なくとも11 kb、少なくとも11.5 kb、少なくとも12 kb、少なくとも12.5 kb、少なくとも13 kb、少なくとも13.5 kb、少なくとも14 kb、またはそれより長くを必要とする。本明細書の他の箇所においても論じられるように、全長の標的ポリペプチド（または、より短縮化されたミニもしくはマイクロ遺伝子構築物を上回る機能的改善を有する、全長よりは短いポリペプチド）を作製するために、標的タンパク質が、2つの別々のウイルスベクターに収まるよりも長い核酸配列を必要とする場合、該ポリペプチドは、3種類、または潜在的にはより多い種類の分割型インテイン構築物を含む、別々のベクターの間で分割されてよい。この例においては、ベクターセットの共感染により、全長ポリペプチド、または全長よりは短い改善されたポリペプチドが産生され得る。

【００６６】

本明細書において使用される場合、「分割型インテインの第1の部分に融合している外来性ポリペプチドの第1の部分」との用語、および「分割型インテインの第2の部分に融合している外来性ポリペプチドの第2の部分」との用語は、本明細書に記載されるような、外来性ポリペプチドを細胞に送達するための方法に関して、細胞において外来性ポリペプチドを産生するための方法に関して、または、そのような送達または産生に基づく、もしくはそれらのための組成物に基づく、処置方法もしくは予防方法に関して使用される際には、1つのAAVベクター粒子によってコード可能であるよりも大きい、標的ポリペプチドの断片を指す。標的ポリペプチドの第1の部分と第2の部分の断片はそれぞれ、分割型インテインのアミノ末端側部分とカルボキシ末端側部分とに融合しており、ここで該融合は、細胞において両融合タンパク質が発現された際に、インテインの切除と、該ポリペプチドの第1の部分と第2の部分（操作されたエクステイン）の共有結合とを可能にして、標的タンパク質を再構成する様式である。標的ポリペプチドの第1および第2の部分のサイズは異なっていてよく、たとえば、アミノ末端側断片は、カルボキシ末端側断片と比べてより短いか、ほぼ同じサイズであるか、またはより長いものである（かつ、対応するカルボキシ末端側断片は、アミノ末端側断片と比べてより長くなるか、ほぼ同じサイズになるか、またはより短くなるようにそれぞれ変化する）が、標的が2つの断片に切り分けられる場合には、標的タンパク質のほぼ中央付近で標的が分割されることが好ましい。本明細書に記載されるように、標的タンパク質が3つの断片に切り分けられる場合、それらのサイズは異なっていてよいが、3つの断片もまた、ほぼ同じ長さであることが好ましい。構造ドメインの中ではなく、構造ドメインの間で、または構造ドメインのジャンクションにおいて、標的タンパク質を分割することが検討されてよく、これはたとえば、αヘリックス間やβシート間、またはそのような任意の2つの構造ドメイン間などである。非限定的な一例として、ジストロフィンポリペプチドまたはユートロフィンポリペプチドの文脈においては、タンパク質は、スペクトリン様リピートドメインの間で、またはスペクトリン様リピートドメインとヒンジドメインとの間で、分割されることが意図される。例示的な大きなタンパク質であるジストロフィン、ユートロフィン、およびジスフェリンのさまざまなドメインが、本明細書において以下にさらに論じられる。ジストロフィンポリペプチドおよびジスフェリンポリペプチドについてのさまざまなドメインの境界もまた、本明細書において以下に記載されており、かつ、当業者であれば、他のタンパク質においてド

メイン間の境界を決定することが可能である。

【００６７】

本明細書において使用される場合、「含む（comprising）」または「含む（comprises）」との用語は、本発明に必須である組成物、方法、およびそれらの個々の構成要素に関して使用されるが、必須であってもそうでなくてもよい、特定されていない要素の包含を許容する。

【００６８】

本明細書において使用される場合、「から本質的になる」との用語は、所与の態様に必要とされる、それらの要素を指す。該用語は、本発明の該態様の特徴であって基本的かつ新規なまたは機能的な特徴に対して実質的な影響を及ぼさない、追加の要素の存在を許容する。

【００６９】

「からなる」との用語は、態様の説明に記載されていない一切の要素を除外する、本明細書に記載される組成物、方法、およびそれらの個々の構成要素を指す。

【００７０】

本明細書、および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形の、「1つの（a）」、「1つの（an）」、および「その（the）」は、文脈が明確に他を示していない限り、複数形の指示対象を含む。したがって、たとえば、「方法」への言及には、本明細書に記載されているタイプの、および／または本開示等を読んだ際に当業者に明らかとなるであろうタイプの、1つもしくは複数の方法および／または1つもしくは複数の段階が含まれる。上述の詳細な説明および以下の実施例は単なる例示であること、ならびにそれらは本発明の範囲に対する限定として解釈されるべきではないことが理解される。当業者にとって明らかな、開示される態様に対するさまざまな変更および改変は、本発明の精神および範囲から逸脱することなくなされ得る。さらに、特定されている全ての特許、特許出願、および刊行物は、説明および開示を目的として、参照により本明細書に明示的に組み入れられるものであり、これはたとえば、そのような刊行物に説明されていて、本発明に関して使用され得る方法論などである。これらの刊行物は、本出願の提出日よりも前のそれらの開示を、単に提供するのみである。この点に関し、先行発明のために、または他の何らかの理由のために、本発明者らがそのような開示に先行する資格を有さないことを容認している、と解釈されるべきものは、存在しない。これらの文献の日付についての言及、またはこれらの文献の内容についての説明は、全て本出願人らが利用可能な情報に基づいており、かつ、これらの文献の日付または内容の正確性についての何らかの容認となるものではない。

【００７１】

好ましい態様において、本明細書に記載される開示は、以下には関連しない：ヒトをクローニングするためのプロセス、ヒトの生殖系列の遺伝学的アイデンティティを改変するためのプロセス、産業目的もしくは商業目的のためのヒト胚の使用、または、ヒトにも動物にも実質的な医学的恩恵を一切もたらすことなしに、動物に苦しみを与える可能性がある、動物の遺伝学的アイデンティティを改変するためのプロセスと、それに加えて、そのようなプロセスから得られる動物。

【００７２】

筋ジストロフィー

筋ジストロフィーは、進行性の筋力低下および筋組織喪失によって特徴付けられる、遺伝性障害の1群である。

【００７３】

筋ジストロフィーには、いずれもジストロフィン遺伝子における変異によって引き起こされるベッカー型筋ジストロフィーおよびデュシェンヌ型筋ジストロフィー（すなわちＤＭＤ）を含めた、多くの遺伝性障害が含まれる。上記障害は両方とも同様の症状を有するが、ベッカー型筋ジストロフィーは、該疾患のより緩徐進行性の型の1つである。デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、筋ジストロフィーのうちの急速進行性の型の1つである。

【００７４】
上記障害は両方とも、脚および骨盤の進行性の筋力低下によって特徴付けられ、該筋力低下は、筋量の喪失（減少）に関連している。筋力低下はまた、腕、頸部、および他のエリアにおいても生じるが、下半身におけるものほど重度ではない。ふくらはぎの筋肉が最初に肥大化し（筋力の喪失を埋め合わせようとする、身体による試み）、肥大化した筋組織は、最終的には脂肪および結合組織に置き換わる（仮性肥大）。脚およびかかとにおいて筋収縮が生じて、筋を使用することができなくなるが、これは、筋線維の短縮化、および結合組織の線維化に起因する。骨格の発達には異常が生じ、胸部および他のエリアの骨格の変形が引き起こされる。ほぼ全ての症例において心筋症が生じる。ＤＭＤのためのマウスモデルが存在しており、かつこれは、ジストロフィンの正常な機能と疾患の病理の両方についての理解を深めるために有用であることが証明されつつある。特に、ジストロフィンの喪失を埋め合わせる目的で、ジストロフィンの近縁であるユートロフィンの産生を強化する実験は有望であり、かつこれは、この深刻な疾患のための有効な治療法の開発を先導する可能性がある。

【００７５】
ジスフェリン異常症（Dysferlinopathy）は、ジスフェリン遺伝子における変異によって引き起こされる筋ジストロフィーである。ジスフェリン異常症の症状は、個人間で顕著に異なる。ジスフェリン異常症に関連する最も一般的な臨床像には、肢帯型筋ジストロフィー（LGMD2B）、三好型ミオパチー、遠位型前脛骨筋ミオパチー（distal myopathy with anterior tibial onset）（DMAT）、近遠位筋力低下（proximodistal weakness）、偽代謝性ミオパチー（pseudometabolic myopathy）、および高CK血症が含まれる。最も一般的には、患者は10代の頃に遠位の筋力低下を訴え、その後の10年のうちに、遠位の運動機能を喪失する。患者は一般的に、移動のために車椅子を必要とするが、全体的な身体制御能力の程度はさまざまである。ジスフェリン異常症はしばしば誤診されるため、その発生率は決定されていない。筋機能の喪失を遅延させるのに有効な、またはジストロフィー表現型を好転／改善するのに有効な治療法は、現在まで存在していない。

【００７６】
外来性ポリペプチド
本明細書に記載される方法および組成物の際立った利点は、大きなタンパク質をコードし、かつ、細胞、たとえば、とりわけ筋細胞に該タンパク質を送達する、能力である。ベクター、たとえばアデノウイルス随伴ベクター（adenoviral associated vector）（AAV）は、核酸をパッケージングするその能力に限界があり、かつそのため、1つのAAVベクターで大きなタンパク質をコードし送達することができない。本明細書に記載される方法および組成物は、分割型インテインを利用するものであり、ここで、分割型インテインのN末端側領域、および所望の外来性ポリペプチドの一部分は、第1のAAVベクターにおいてコードされ、かつ、分割型インテインのC末端側領域、および所望の外来性ポリペプチドの第2の部分は、第2のAAVベクターにおいてコードされる。細胞において、それぞれのAAVからの産物を共に発現させることで、分割型インテインの第1および第2の部分が、外来性ポリペプチドの第1の部分の、外来性ポリペプチドの第2の部分との連結を促進することが可能になる。当業者であれば理解するであろうが、本明細書に記載される方法および組成物は、任意の大きな遺伝子産物のために利用することが可能であり、該遺伝子産物を機能によって限定する必要はない。

【００７７】
本明細書に記載される方法および組成物は、ジストロフィン、ユートロフィン、およびジスフェリンを含めた筋タンパク質を用いた実施例において例示される。

【００７８】
ジストロフィン：ジストロフィンは427 kDaの細胞骨格タンパク質であり、かつスペクトリン／α-アクチニンスーパーファミリーのメンバーである（たとえば、Blake et al, Brain Pathology, 6:37 (1996); Winder, J. Muscle Res. Cell. Motil., 18:

617 (1997); およびTinsley el al., PNAS, 91:8307 (1994)を参照されたい）。ジストロフィンのN末端はアクチンに結合していて、これは、サルコメアのアクチンよりも非筋アクチンに対してより高い親和性を有している。ジストロフィンは、形質膜の下にある、非筋アクチンの膜下ネットワークに関与している。ジストロフィンは、ジストロフィン結合タンパク質複合体（DPC）に結合しており、これは、オリゴマー型であって膜貫通型の、タンパク質および糖タンパク質の複合体である。ジストロフィンのC末端は、β-ジストログリカンの細胞質側尾部に結合しており、かつアクチンと協働してジストロフィンを筋鞘につなぎ止めている。ジストロフィンのC末端には、DPCの細胞質側メンバーもまた結合している。それによりジストロフィンは、筋線維におけるアクチンベースの細胞骨格と、細胞外マトリックスとの間のリンクを提供している。これこそが、筋ジストロフィーにおいて破壊されるリンクである。

【００７９】

ジストロフィンの中心の棒状ドメインは、24個の弱く繰り返されるおよそ110アミノ酸の単位が一続きとなったものから構成されており、これはスペクトリンにおいて見いだされるものに類似している（すなわち、スペクトリン様リピート）。このドメインはジストロフィンの主要部分を構成しており、かつジストロフィンに、柔軟性を有する棒状の構造をもたらす。棒状ドメインには、プロリンに富むヒンジ領域が4つ入り込んでいる。棒状ドメインは、DPCのメンバー間の構造的リンクを提供していると考えられている。

【００８０】

（表１）全長ジストロフィンcDNAのドメイン

ヌクレオチド	*ドメイン*	*SEQ ID NO:*
1~208	5'非翻訳領域	SEQ ID NO: 47
209~211	開始コドン(ATC)	----
209~964	N末端部	SEQ ID NO: 48
965~1219	ヒンジ1	SEQ ID NO: 49
1220~1546	スペクトリン様リピート No. 1	SEQ ID NO: 50
1547~1879	スペクトリン様リピート No. 2	SEQ ID NO: 51
1880~2212	スペクトリン様リピート No. 3	SEQ ID NO: 52
2213~2359	ヒンジ2	SEQ ID NO: 53
2360~2692	スペクトリン様リピート No. 4	SEQ ID NO: 54
2693~3019	スペクトリン様リピート No. 5	SEQ ID NO: 55
3020~3346	スペクトリン様リピート No. 6	SEQ ID NO: 56
3347~3673	スペクトリン様リピート No. 7	SEQ ID NO: 57
3674~4000	スペクトリン様リピート No. 8	SEQ ID NO: 58
4001~4312	スペクトリン様リピート No. 9	SEQ ID NO: 59
4313~4588	スペクトリン様リピート No. 10	SEQ ID NO: 60
4589~4915	スペクトリン様リピート No. 11	SEQ ID NO: 61
4916~5239	スペクトリン様リピート No. 12	SEQ ID NO: 62
5340~5551	スペクトリン様リピート No. 13	SEQ ID NO: 63
5552~5833	スペクトリン様リピート No. 14	SEQ ID NO: 64
5834~6127	スペクトリン様リピート No. 15	SEQ ID NO: 65
6128~6187	20アミノ酸の挿入（ヒンジではない）	SEQ ID NO: 66
6188~6514	スペクトリン様リピート No. 16	SEQ ID NO: 67
6515~6835	スペクトリン様リピート No. 17	SEQ ID NO: 68
6836~7186	スペクトリン様リピート No. 18	SEQ ID NO: 69
7187~7489	スペクトリン様リピート No. 19	SEQ ID NO: 70
7490~7612	ヒンジ3	SEQ ID NO: 71
7613~7942	スペクトリン様リピート No. 20	SEQ ID NO: 72
7943~8269	スペクトリン様リピート No. 21	SEQ ID NO: 73
8270~8617	スペクトリン様リピート No. 22	SEQ ID NO: 74
8618~9004	スペクトリン様リピート No. 23	SEQ ID NO: 75
9005~9328	スペクトリン様リピート No. 24	SEQ ID NO: 76
9329~9544	ヒンジ4	SEQ ID NO: 77
9545~10431	C末端部の始まり	SEQ ID NO: 78
10432~11254	選択的スプライシングされたエキソン71～78	SEQ ID NO: 79
11255~11266	コーディング領域の終わり	SEQ ID NO: 80
11267~13957	3'非翻訳領域	SEQ ID NO: 81

【００８１】

ジストロフィンのホモログはさまざまな生物において同定されており、これにはマウス（Genbankアクセッション番号M68859）；イヌ（Genbankアクセッション番号AF070485）；およびニワトリ（Genbankアクセッション番号X13369）が含まれる。同様の比較は、利用可能なさまざまなコンピュータープログラムの任意のもの（たとえば、NCBIによるBLAST）を使用することによって、他の生物種由来のホモログを用いて行うことが可能であり、ここで、他の生物種には上述のものが含まれるがこれらに限定されない。候補ホモログは、任意の適切なアッセイを用いて、生物学的活性に関してスクリーニングすることが可能であり、ここで、該アッセイには本明細書に記載されるものが含まれ

るがそれらに限定されない。

【００８２】

ユートロフィン：ユートロフィンは常染色体にコードされるジストロフィンのホモログであり、かつ同様の生理的役割を果たしているとみなされている（最近の総説については、たとえば、Blake et al., Brain Pathology, 6:37 [1996]を参照されたい）。ヒトユートロフィンは、ジストロフィンに対する実質的な相同性を示し、主な差異は棒状ドメインにおいて生じていて、棒状ドメインにおいてユートロフィンは、リピート15およびリピート19、ならびに2つのヒンジ領域を欠いている（たとえば、Love et al., Nature 339:55 [1989]; Winder et al., FEBS Lett., 369:27 [1995]を参照されたい）。したがって、ユートロフィンは22個のスペクトリン様リピート、および2個のヒンジ領域を含む。

【００８３】

ジスフェリン：ジスフェリンは以下のドメインを含む：C2A、C2B、C2C、FerA、DysF、C2D、C2E、C2F、C2G、およびTM。各ドメインの厳密な境界は、オルソログやバリアントの間で変化し得る。ヒトジスフェリンにおける各ドメインについてのおおよそのアミノ酸の範囲は、表2に示される。列挙されるドメインの境界は、最大で約20残基、たとえば、約5、10、15、または20残基が、変化し得る。

【００８４】

（表２）ジスフェリンのドメイン

ドメイン	アミノ酸の範囲
C2A	1~124
C2B	219~352
C2C	366~515
FerA	670~782
DysF	864~1097
C2D	1137~1281
C2E	1314~1465
C2F	1579~1696
C2G	1789~1994
TM	2045~2067

【００８５】

タンパク質バリアント：さらに、上述のように、外来性ポリペプチドのバリアント型（たとえば変異体）もまた、本明細書に記載される方法および組成物において使用されることが意図され、ここで該外来性ポリペプチドは、たとえば、ジストロフィン、ユートロフィン、ミニジストロフィン、またはジスフェリンなどである。たとえば、ロイシンのイソロイシンまたはバリンによる単独置換、アスパラギン酸のグルタミン酸による単独置換、スレオニンのセリンによる単独置換、または、あるアミノ酸の、構造的に関連する別のアミノ酸による同様の置換（すなわち保存的変異）は、得られる分子の生物学的活性に対して大きな影響を必ずしも有さないと考えられている。したがって、いくつかの態様において、外来性ポリペプチドは、アミノ酸の保存的置換を1つまたは複数含み得る。保存的置換とは、その側鎖が関連性を有するアミノ酸ファミリー内で生じる置換である。遺伝学的にコードされているアミノ酸は、以下の4つのファミリーに分けることが可能である：(1)酸性（アスパラギン酸、グルタミン酸）；(2)塩基性（リジン、アルギニン、ヒスチジン）；(3)非極性（アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）；および(4)非荷電極性（グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン）。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、まとめて芳香族アミノ酸として分類されることがある。同様の様式において、アミノ酸レパートリーは、以下のように分類することが可能

である：(1) 酸性（アスパラギン酸、グルタミン酸）；(2) 塩基性（リジン、アルギニン、ヒスチジン）、(3) 脂肪族（グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン）、ここでセリンおよびスレオニンは任意で、脂肪族ヒドロキシルとして別に分類され得る；(4) 芳香族（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン）；(5) アミド（アスパラギン、グルタミン）；ならびに(6) 含硫（システインおよびメチオニン）（たとえば、Stryer（編） "Biochemistry" 第2版 W H Freeman and Co. [1981]を参照されたい）。ペプチドのアミノ酸配列の変更が機能的ホモログをもたらしたかどうかは、バリアントペプチドの、野生型タンパク質と類似する様式で機能する能力を評価することによって、容易に決定することが可能である。複数の置換が生じているペプチドも、同じ様式で容易に試験することが可能である。

【００８６】

いくつかの態様において、外来性ポリペプチドのバリアントは、強化された生物学的活性を含むように操作される。そのようなポリペプチドは、組み換えDNA構築物から発現させた際に、本明細書に記載される治療的態様において使用可能である。

【００８７】

いくつかの態様において、外来性ポリペプチドのバリアントは、対応する野生型タンパク質と比較して、延長された細胞内半減期を含んでよい。たとえば、そのようなバリアントタンパク質は、タンパク質分解性の崩壊に対して、または、該バリアントの破壊あるいは不活性化をもたらす他の細胞内プロセスに対して、より高い安定性またはより低い安定性を有し得る。そのようなバリアント、およびそれらをコードする遺伝子を利用して、外来性ポリペプチドバリアントを発現する構築物の薬学的活性を、タンパク質の半減期を調節することによって変化させることが可能である。たとえば、より短い半減期は、より一過性の生物学的効果を生じさせ得る。上述のように、そのようなタンパク質は、薬学分野への応用において利用されるか、または筋疾患もしくは筋障害を処置するために利用される。

【００８８】

当技術分野においては、点変異によって作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするための、およびある特定の特性を有する遺伝子産物に関してcDNAライブラリーをスクリーニングするための、多様な技術が公知である。そのような技術は、概して、所与の外来性ポリペプチドのコンビナトリアル変異導入によって作製された遺伝子ライブラリーを迅速にスクリーニングするために、適合させることが可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするために最も広く使用されている技術は、典型的には以下を含む：遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングすること、得られたベクターライブラリーを用いて適切な細胞を形質転換すること、および、所望の活性を検出することで、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの容易な単離が相対的に促進される条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現させること。

【００８９】

いくつかの態様において、外来性ポリペプチドはミニジストロフィンまたはマイクロジストロフィンを含む。本明細書において使用される場合、「ミニジストロフィン」は、アミノ末端のアクチン結合ドメイン、β-ジストログリカン結合ドメイン、および複数の（たとえば、少なくとも2つの）スペクトリン様リピートドメインを含む。

【００９０】

アデノウイルス随伴ベクター（Adenoviral Associated Vector）（AAV）

AAVは、非常に低い免疫原性しか示さず、かつ既知のいかなるヒト疾患にも関連していない、小型のウイルスであり、これらの点により該ウイルスは、外来性の遺伝学的物質を（たとえば遺伝子療法のために）送達するためのベクターとして関心を引くものとなっている。しかしながら、AAVカプシドのサイズに起因して、その中にパッケージング可能なDNAの長さには限界がある。AAVゲノムは、およそ4.7キロベース（kb）のサイズである。

【００９１】
本明細書に記載される方法および組成物は、２種類の（またはそれより多い）ＡＡＶベクターであって、そのそれぞれが、発現させようとする外来性ポリペプチドの一部分と分割型インテインの一部分とを有するＡＡＶベクターを投与することによって、大きな（たとえば、４.７ ｋｂよりも大きい）タンパク質を送達することを可能にする。１つの態様において、本明細書に記載される方法および組成物は、少なくとも２種類の異なるアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターを使用する。第１のＡＡＶベクターは、外来性ポリペプチド（たとえば、ジストロフィン、ジスフェリン、ユートロフィン、または、他の所望の治療用タンパク質であって、たとえば、筋疾患もしくは筋障害または他の疾患もしくは他の障害のための治療用タンパク質）の第１の部分に融合している分割型インテインのＮ末端側部分を含み、かつ第２のＡＡＶベクターは、該外来性ポリペプチドの第２の部分に融合している分割型インテインのＣ末端側部分を含む。細胞における第１および第２の融合ポリペプチドの発現の際に、分割型インテインの第１および第２の部分は、外来性ポリペプチドの第１の部分の、外来性ポリペプチドの第２の部分との連結を促進し、それにより、外来性ポリペプチドが細胞に送達される。このシステムまたは配置は、１つのＡＡＶベクター粒子によってコード可能であるよりも大きい外来性ポリペプチドの送達を可能にする。

【００９２】
第１および第２のＡＡＶベクターの態様が本明細書において提供され、かつ該態様には以下の非限定的な態様が含まれる。本明細書において使用されるＡＡＶベクターは、ＡＡＶの成熟した粒子またはビリオンの形態、すなわち、ＡＡＶタンパク質カプシドによって取り囲まれている核酸の形態であってよい。ＡＡＶベクターは、ＡＡＶゲノム、またはその一部分もしくはその誘導体を含んでよい。ＡＡＶゲノムは、ＡＡＶ粒子を産生するのに必要な機能をコードするポリヌクレオチドである。これらの機能には、ＡＡＶゲノムをＡＡＶ粒子に収めてカプシド形成させる機能を含めた、宿主細胞におけるＡＡＶの複製およびパッケージングのサイクルにおいて作動する機能が含まれる。天然に存在するＡＡＶは複製不能であり、かつ、複製およびパッケージングのサイクルを完了させるには、該ＡＡＶにヘルパー機能をトランスに提供する必要がある。したがって、本明細書において使用されるベクターのＡＡＶゲノムは、典型的には複製不能である。

【００９３】
ＡＡＶゲノムは、ポジティブセンスまたはネガティブセンスのいずれかの１本鎖型であってよく、あるいは２本鎖型であってもよい。２本鎖型を使用することで、標的細胞におけるＤＮＡ複製段階を回避することが可能になり、かつそのため、トランスジーンの発現を加速することが可能になる。１つの態様において、ＡＡＶゲノムは１本鎖型である。ＡＡＶゲノムは、天然に由来する、ＡＡＶの任意の血清型、分離株、またはクレードに由来してよい。したがって、ＡＡＶゲノムは、天然に存在するＡＡＶの全長ゲノムであってよく、または組み換えの、操作されたＡＡＶの全長ゲノムであってもよい。当業者には公知であるが、天然に存在するＡＡＶは、さまざまな生物学的システムにしたがって分類され得る。

【００９４】
一般的には、ＡＡＶはその血清型の観点から表現される。血清型はＡＡＶのバリアント亜種に対応しており、該バリアント亜種は、カプシド表面抗原の発現についてのそのプロファイルに起因して、当該バリアント亜種を他のバリアント亜種から区別するために使用することが可能な、独特の反応性を有している。典型的には、ある特定のＡＡＶ血清型を有するウイルスは、他のＡＡＶ血清型に特異的な中和抗体と効率的に交差反応することは一切ない。ＡＡＶ血清型には、ＡＡＶ１、ＡＡＶ２、ＡＡＶ３、ＡＡＶ４、ＡＡＶ５、ＡＡＶ６、ＡＡＶ７、ＡＡＶ８、ＡＡＶ９、ＡＡＶ１０、およびＡＡＶ１１が含まれ、かつまた、組み換え血清型、たとえばＲｅｃ２およびＲｅｃ３なども含まれる。これらのＡＡＶ血清型の任意のものを、本明細書に記載される方法および組成物に使用することが可能である。ＡＡＶ血清型についての総説は、Ｃｈｏｉ ｅｔ ａｌ.（２００５）Ｃｕｒｒ. Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ. ５：２９９-３１０、およびＷｕ ｅｔ ａｌ.（２００６）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ １４：３１６-２７に見いだすことが可能である。ＩＴＲ配列、ｒｅｐ遺伝子、またはｃａｐ遺伝子を含めた、ＡＡＶゲノムの配列、またはＡＡＶゲノムのエレメン

トの配列は、AAVの全ゲノム配列についての以下のアクセッション番号に由来するものであってよい：アデノ随伴ウイルス1についてNC_002077、AF063497；アデノ随伴ウイルス2についてNC_001401；アデノ随伴ウイルス3についてNC_001729；アデノ随伴ウイルス3Bについて NC_001863；アデノ随伴ウイルス4についてNC_001829；アデノ随伴ウイルス5についてY18065、AF085716；アデノ随伴ウイルス6についてNC_001862；鳥類AAV ATCC VR-865についてAY186198、AY629583、NC_004828；鳥類AAV 株DA-1についてNC_006263、AY629583；ウシAAVについてNC_005889、AY388617。

【００９５】

AAVを、クレードまたはクローンの観点から表現することも可能である。これは、天然に由来するAAVの系統学的な関係性を指すとともに、典型的には、共通の祖先までさかのぼることが可能なAAVの系統群をも指し、かつその全ての子孫を含む。

【００９６】

加えて、AAVを、特異的な分離株、すなわち天然に見いだされた特異的なAAVの遺伝学的分離株の観点から表現することが可能である。遺伝学的分離株との用語は、AAVの集団であって、天然に存在する他のAAVとの間で受けた遺伝学的混合が限定的であり、それにより、遺伝学的レベルにおいて認識可能なほどに区別される集団が規定されているという、AAVの集団を表す。

【００９７】

当業者は、本明細書に記載される方法および組成物において使用するための、AAVの適切な血清型、クレード、クローン、または分離株を、ある特定のAAVの特徴について当業者が広く有する一般的な知見に基づいて選択することが可能である。

【００９８】

AAVの血清型は、AAVウイルス感染の組織特異性（または指向性）を決定している。したがって、本明細書に記載される方法および組成物にしたがって、患者に投与されるAAVとして使用するための、好ましいAAV血清型は、たとえば、筋肉内の標的細胞に対し、天然の指向性を有するかまたは高効率での感染能力を有するものである。

【００９９】

典型的には、天然に由来するAAVの血清型、分離株、またはクレードのAAVゲノムは、少なくとも1つの末端逆位反復配列（ITR）を含む。ITR配列はシスに作用して機能的な複製起点を提供し、細胞のゲノムへのベクターの組み込み、および該ゲノムからのベクターの切除を可能にする。

【０１００】

AAVゲノムはまた、典型的にはパッケージング遺伝子を含んでおり、これはたとえば、AAV粒子のためのパッケージング機能をコードする、rep遺伝子および／またはcap遺伝子などである。rep遺伝子は、タンパク質であるRep78、Rep68、Rep52、およびRep40、またはそれらのバリアントの、1つまたは複数をコードする。cap遺伝子は、カプシドタンパク質、たとえば、VP1、VP2、およびVP3、またはそれらのバリアントの、1つまたは複数をコードする。これらのタンパク質は、AAV粒子のカプシドを構成する。カプシドバリアントは以下に論じられる。パッケージング遺伝子のそれぞれに、プロモーターが機能的に連結されてよい。そのようなプロモーターの具体的な例には、p5プロモーター、p19プロモーター、およびp40プロモーターが含まれる（Laughlin et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5567-5571）。たとえば、p5プロモーターおよびp19プロモーターは、概してrep遺伝子を発現させるために使用され、一方でp40プロモーターは、概してcap遺伝子を発現させるために使用される。

【０１０１】

典型的には、本明細書に記載される方法および組成物において使用するためのAAVゲノムは、患者への投与を目的として誘導体化される。そのような誘導体化は、当技術分野において一般的である（たとえば、Coura and Nardi (2007) Virology Journal 4: 99を参照されたい）。AAVゲノムの誘導体には、インビボでのトランスジーンの発現を

可能にする、任意の短縮型または改変型のAAVゲノムが含まれる。典型的には、ウイルス配列を最小限しか含まないが上述の機能を保持するように、AAVゲノムを大幅に短縮化することが可能である。これは、ベクターが野生型ウイルスと組み換えを起こすリスクを減少させ、かつまた、標的細胞にウイルス遺伝子のタンパク質が存在することで引き起こされる細胞性免疫応答が回避されるために、安全性の理由から好ましい。

【０１０２】

典型的には、AAVゲノムの誘導体は少なくとも1つの末端逆位反復配列（ITR）を含み、これは好ましくは複数のITRであり、たとえば、2つのITRまたはそれより多いITRなどである。ITRの1つまたは複数は、異なる血清型を有するAAVゲノムに由来してよく、またはキメラITRもしくは変異体ITRであってもよい。好ましい変異体ITRは、trs（末端分離部位（terminal resolution site））の欠失を有するものである。この欠失によって、コーディング配列および相補的配列の両方を含む1本鎖ゲノム、すなわち自己相補的なAAVゲノムを産生するための、ゲノムの連続的な複製が可能になる。これにより、標的細胞におけるDNA複製を回避することが可能になり、かつそのため、トランスジーンの発現を加速することが可能になる。

【０１０３】

1つまたは複数のITRを包含させることは、たとえば、宿主細胞のDNAポリメラーゼの作用による1本鎖ベクターDNAの2本鎖DNAへの変換の後で、宿主細胞の核においてベクターのコンカテマー形成を支援するために好ましい。そのようなエピソーム性コンカテマーの形成により、宿主細胞の寿命の間はベクター構築物が保護され、それにより、インビボでのトランスジーンの発現を延長することが可能になる。

【０１０４】

いくつかの態様において、ITRエレメントは、誘導体において、天然のAAVゲノムから保持され続けている唯一の配列である。したがって、好ましくは誘導体は、天然のゲノムのrep遺伝子および／またはcap遺伝子を含まず、かつ天然のゲノムの他の配列を一切含まない。これは、上述の理由から好ましく、かつ、宿主細胞のゲノムにベクターが組み込まれる可能性を減少させることからも好ましい。したがって、以下の部分は誘導体において除去されてよい：1つの末端逆位反復（ITR）配列、複製（rep）遺伝子、およびカプシド（cap）遺伝子。しかしながら、いくつかの態様において、誘導体は、AAVゲノムのrep遺伝子および／もしくはcap遺伝子またはウイルスの他の配列の、1つまたは複数を追加で含んでよい。天然に存在するAAVは、ヒト第19染色体上のある特定の部位に高頻度で組み込まれ、かつランダムな組み込みについては無視できる程度の頻度しか示さないため、ベクターが組み込み能力を保持している点は、治療的環境において忍容され得る。誘導体が、カプシドタンパク質、すなわち、VP1、VP2、および／またはVP3を含む場合、誘導体は、1種または複数種の天然に存在するAAVの、キメラ誘導体、シャッフル誘導体、またはカプシド改変誘導体であってよい。特に、本明細書に記載される方法および組成物には、同じベクター中に、AAVの異なる血清型由来、異なるクレード由来、異なるクローン由来、または異なる分離株由来のカプシドタンパク質配列が提供されているもの（すなわち、シュードタイプベクター）が包含される。

【０１０５】

キメラ誘導体、シャッフル誘導体、またはカプシド改変誘導体は、典型的には、ウイルスベクターとして望ましい1種または複数種の機能性を提供するように選択される。したがって、これらの誘導体は以下を示し得る：遺伝子送達効率の増加、免疫原性（液性もしくは細胞性）の減少、指向性範囲の変更、ならびに／または天然に存在するAAVゲノム、たとえばAAV2のものなどを含むAAVベクターと比較した、特定の細胞型のターゲティングの改善。遺伝子送達効率の増加は以下によって影響を受け得る：細胞表面における受容体もしくは共受容体の結合の改善、内部移行の改善、細胞内における輸送および核への輸送の改善、ウイルス粒子の脱殻の改善、ならびに／または1本鎖ゲノムから2本鎖型への変換の改善。効率の増加はまた、指向性範囲の変更、または特定の細胞集団のターゲティングにも関連し得、その結果、必要とされていない組織への投与によってベクター用

量が薄まることはない。

【０１０６】

キメラカプシドタンパク質には、天然に存在するAAV血清型のカプシドコーディング配列の2種以上の間で組み換えを行うことによって作製されたものが含まれる。これはたとえば、マーカーレスキューアプローチによって実施されてよく、該アプローチにおいては、ある1つの血清型の非感染性カプシド配列の、別の血清型のカプシド配列との共トランスフェクションが行われ、指向性選択が使用されて、所望の特性を有するカプシド配列が選択される。細胞においてさまざまな血清型のカプシド配列を相同組み換えによって変化させて、新規なキメラカプシドタンパク質を作製することが可能である。

【０１０７】

キメラカプシドタンパク質にはまた、2種以上のカプシドタンパク質の間で、たとえば、異なる血清型の2種以上のカプシドタンパク質の間で、ある特定のカプシドタンパク質ドメイン、表面ループ、またはある特定のアミノ酸残基を移動させる目的で、カプシドタンパク質配列を操作することによって、作製されたものも含まれる。

【０１０８】

シャッフルカプシドタンパク質またはキメラカプシドタンパク質はまた、DNAシャッフリングまたはエラープローンPCRによっても作製することが可能である。AAVカプシドのハイブリッド遺伝子は、関連するAAV遺伝子の配列、たとえば、複数の異なる血清型のカプシドタンパク質をコードする遺伝子の配列を、ランダムに断片化すること、およびそれに続いて、自己プライミングポリメラーゼ反応において断片を再連結することによって、作製可能であり、該手法はまた、配列が相同性を有する領域における交差をも引き起こし得る。いくつかの血清型のカプシド遺伝子をシャッフリングすることによってこの様式で作製されたAAVハイブリッド遺伝子のライブラリーをスクリーニングして、所望の機能性を有するウイルスクローンを同定することが可能である。同様に、エラープローンPCRを、AAVカプシド遺伝子をランダムに変異させてバリアントの多様なライブラリーを作製するために使用してよく、該ライブラリーは、所望の特性に関してその後選択されてよい。

【０１０９】

カプシド遺伝子の配列はまた、天然の野生型配列に対して特定の欠失、置換、または挿入が導入されるように、遺伝学的に改変することも可能である。特に、カプシドコーディング配列のオープンリーディングフレーム内に、またはカプシドコーディング配列のN末端および／もしくはC末端に、別のタンパク質またはペプチドの配列を挿入することによって、カプシド遺伝子を改変してよい。

【０１１０】

本明細書において使用されるベクターには、天然のAAVゲノムのものとは異なる順序および構成で、AAVゲノムの配列を提供するものが包含されてよい。ベクターはまた、AAV配列もしくはAAV遺伝子の1つもしくは複数の、別のウイルス由来の配列との置換をも含んでよく、または、複数のウイルス由来の配列から構成されるキメラ遺伝子との置換をも含んでよい。そのようなキメラ遺伝子は、異なるウイルス種の、関連するウイルスタンパク質の2種以上に由来する配列から構成されてよい。

【０１１１】

本明細書に記載されるように使用するためのAAVベクターにはカプシド転換型（transcapsidated form）が含まれてよく、これにおいては、ある1種の血清型のITRを有するAAVゲノムまたはAAV誘導体が、別の血清型のカプシドにパッケージングされている。そのようなAAVベクターにはまた、モザイク型も含まれてよく、これにおいては、2種以上の異なる血清型由来の未改変カプシドタンパク質の混合物が、ウイルスカプシドを構成している。AAVベクターにはまた、カプシド表面に吸着しているリガンドを担持する、化学的改変型も含まれてよい。たとえば、そのようなリガンドには、ある特定の細胞表面受容体をターゲティングするための抗体が含まれ得る。

【０１１２】

本明細書に記載されるAAVベクターシステムの第1および第2のAAVベクターは、両ベクターを用いた形質導入の後で、標的細胞において完全に機能的な外来性ポリペプチドを再構築するために必要な要素の全てを、両ベクターで含んでいる。当業者であれば、ウイルスベクターを用いて形質導入された細胞においてトランスジーンの発現を確実にするために一般的に使用される、さらなる遺伝学的エレメントを認識するであろう。これらは、発現制御配列と称され得る。したがって、本明細書に記載されるAAVウイルスベクターシステムのAAVベクターは、典型的には、所望の外来性ポリペプチド（たとえば、ジストロフィン、ユートロフィン、ジスフェリン等）をコードするヌクレオチド配列に機能的に連結されている、発現制御配列（たとえば、プロモーター配列を含むもの）を含む。

【０１１３】

任意の適切なプロモーターを使用することが可能である。プロモーター配列は、構成的に活性（すなわち、いかなる宿主細胞バックグラウンドにおいても機能的）であってよく、あるいはプロモーター配列は、ある特定の宿主細胞環境においてのみ活性であってもよく、その結果、ある特定の細胞型を標的とするトランスジーンの発現が可能になる（たとえば、組織特異的プロモーター）。プロモーターは、別の因子、たとえば宿主細胞に存在する因子の存在に応答して、誘導性の発現を示し得る。いずれにしても、治療のためにベクターが投与される場合には、プロモーターは標的細胞バックグラウンドにおいて機能的であることが好ましい。

【０１１４】

いくつかの態様において、トランスジーンが、筋細胞集団において選択的に発現するかまたは該集団においてのみ発現することを可能にするために、プロモーターは筋細胞において高度に有効であることが好ましい。その結果、プロモーターからの発現は、筋細胞に特異的であり得る。1つの態様において、筋特異的プロモーターは、本明細書において使用される用語である、筋特異的発現カセットに含まれる。

【０１１５】

本明細書に記載されるベクターのうちの少なくとも1つは、プロモーターと、ポリペプチドをコードする核酸配列の上流との間に位置する、非翻訳領域（UTR）（すなわち、5'UTR）を含み得る。任意の適切なUTR配列を使用することが可能である。UTRは、以下のエレメントのうちの1つまたは複数を含み得る：ガルス・ガルス（Gallus gallus）のβ-アクチン（CBA）のイントロン1断片、オリクトラガス・クニクラス（Oryctolagus cuniculus）のβ-グロビン（RBG）のイントロン2断片、およびオリクトラガス・クニクラスのβ-グロビンのエキソン3断片。UTRはコザックコンセンサス配列を含み得る。任意の適切なコザックコンセンサス配列を使用することが可能である。

【０１１６】

本明細書に記載されるベクターのうちの少なくとも1つは、転写後応答エレメント（転写後調節エレメントとしても知られる）、すなわちPREをさらに含み得る。任意の適切なPREを使用することが可能である。適切なPREが存在していると、所望のトランスジーンの発現を強化することが可能である。1つの態様において、PREは、ウッドチャック肝炎ウイルスのPRE（WPRE）である。1つまたは複数のベクターはまた、タンパク質をコードする核酸配列の3'側に位置するポリアデニル化配列をも含み得る。任意の適切なポリアデニル化配列を使用することが可能である。1つの態様において、ポリアデニル化配列は、ウシ成長ホルモン（bGH）のポリアデニル化配列である。

【０１１７】

所与の外来性タンパク質の発現は、第1のAAVベクターおよび第2のAAVベクターの両方を用いて標的細胞の形質導入を行うことを必要とする；しかしながら、その順序は重要ではない。したがって標的細胞は、第1のAAVベクターおよび第2のAAVベクターを任意の順序で用いて形質導入されてよく（第1のAAVベクターに続いて第2のAAVベクター、もしくは第2のAAVベクターに続いて第1のAAVベクター）、またはそれらを同時に用いて形質導入されてもよい。AAVベクターを用いて標的細胞を形質導入するための方法は当技術分野において公知であり、かつ当業者はこれに精通しているであろう。標的細胞は

、好ましくは筋細胞であり、好ましくは骨格筋細胞または心筋細胞である。

【０１１８】

本明細書に記載される方法および組成物は、少なくとも2種類のアデノ随伴ベクター（adeno-associated vector）の使用に関連しているが、その一方で、該方法および組成物は、たとえば、第2世代のアデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターを含めた、別のベクターを利用してもよい。

【０１１９】

第2世代のアデノウイルスベクターは、Adゲノムの初期領域（E2A、E2B、およびE4）を欠失している。高度に改変された第2世代のアデノウイルスベクターは、大スケールでのベクター調製の過程で、複製可能ウイルスを生じさせる可能性が低い。したがって、後期のウイルスタンパク質に対する宿主の免疫応答は減少する（Amalfitano et al., "Production and Characterization of Improved Adenovirus Vectors With the E1, E2b, and E3 Genes Deleted," J. Virol. 72:926-933 (1998)を参照されたい）。アデノウイルスゲノムからのE2A遺伝子、E2B遺伝子、およびE4遺伝子の除去はまた、クローニング能力の増加をももたらす。これは、本明細書に記載される分割型インテインアプローチと組み合わされて、外来性にコードされている、導入されるポリペプチドのサイズをさらに増加させることが可能である。

【０１２０】

レンチウイルスに基づくベクターは、該ウイルスの通常の生活環の一部として、非分裂細胞に感染し、ウイルスタンパク質を発現する細胞株において、パッケージング可能なベクター構築物の発現によって産生される。レンチウイルス粒子のサイズは小さいため、該ウイルスが運搬できる外来性DNAの長さは約10 kbに抑えられている。

【０１２１】

モロニーマウス白血病ウイルス（MMLV）および他のレトロウイルスに基づくベクターは、遺伝子療法に適用するのに有用であることが明らかになってきている。これらのベクターは、該ウイルスの通常の生活環の一部として、活発に分裂している細胞への形質導入を安定的に行い、宿主細胞の染色体に組み込まれる。一例として、筋前駆細胞、たとえば、筋芽細胞、衛星細胞、または他の筋幹細胞などへの感染および形質導入の文脈において、レトロウイルスは、本明細書に記載されるように利用されてよい。

【０１２２】

分割型インテイン

インテインは、天然に存在する、自己スプライシングするタンパク質サブドメインであり、これは、自身であるタンパク質サブドメインを、より大きなタンパク質構造体から切除すると同時に、それ以前には隣接していた2つのペプチド領域（「エクステイン」）を合わせて連結して、1つの成熟宿主タンパク質を形成することが可能である。

【０１２３】

隣接するペプチド結合を再配置しつつ活性を保持するというインテインの能力は、その天然のエクステイン以外のタンパク質と融合させた場合に、インテインに基づく多数のバイオテクノロジーをもたらすものとなっている。そのようなバイオテクノロジーには、タンパク質のライゲーションおよび活性化への適用、ならびにタンパク質の標識および追跡への適用の、さまざまなタイプのものが含まれる。インテインの重要な活用の1つは、精製された組み換えタンパク質の作製におけるものである。インテインは特に、慣用の多数の親和性タグおよび精製タグに自己切断活性を付与する能力を有しており、かつしたがって、研究適用、医療適用、および他の商業適用のための組み換えタンパク質産物の作製において、大きな前進を提供するものである。

【０１２４】

本明細書に提供される方法および組成物において分割型インテインを使用することで、大きなタンパク質をコードする配列を、2種類の（またはそれより多くの）異なるベクターの間、たとえばAAVベクターの間で切り分けることが可能になり、これらは、細胞において発現した際に、合わさってライゲーションされて、全長タンパク質が形成される。

タンパク質をコードする配列に関し、AAVベクターが運搬可能なサイズに限界があることを踏まえれば、分割型インテインの使用は、1つのAAVベクター単独ではコードすることができなかった大きなタンパク質の、細胞への送達を可能にするものである。

【０１２５】

本発明の方法において使用するための分割型インテインを誘導するために、任意の触媒活性を有するインテインまたはその断片を使用することが可能である。たとえば、1つの局面において、分割型インテインは真核生物のインテインに由来してよい。別の局面において、分割型インテインは細菌のインテインに由来してよい。別の局面において、分割型インテインは古細菌のインテインに由来してよい。好ましくは、そのような由来の分割型インテインは、トランススプライシング反応を触媒するために必要なアミノ酸配列のみを保持する。

【０１２６】

分割型インテインのN末端側は、該用語が本明細書において使用される場合、天然に存在するインテイン配列のN末端側部分の改変型である配列を含んでよい。たとえば、分割型インテインのN末端側配列は、追加のアミノ酸残基および／または変異した残基を包含させても、外来性ポリペプチドの2つの部分のスプライシングに関してインテインが非機能的にならないのであれば、そのような追加の残基および／または変異した残基を含んでよい。好ましくは、追加の残基および／または変異した残基を包含させることで、インテインのスプライシング活性が改善または強化される。

【０１２７】

本明細書に記載される方法および組成物において使用される、分割型インテインのC末端側は、トランススプライシング反応に関して機能的であるC末端側のアミノ酸配列を含む、任意のインテイン配列であり得る。1つの局面において、分割型インテインのC末端側は4～7個の連続したアミノ酸残基を含み、そのうちの少なくとも4アミノ酸は、それが由来するインテインの、最後のβストランドに由来する。したがって、分割型インテインのC末端側領域は、トランススプライシングが生じた際に、スプライシングによって除去される配列をも含む。分割型インテインのC末端側領域は、天然に存在するインテイン配列のC末端側部分の改変型である配列を含んでよい。たとえば、分割型インテインのC末端側領域は、追加のアミノ酸残基および／または変異した残基を包含させても、スプライシングに関してインテインが非機能的にならないのであれば、そのような追加の残基および／または変異した残基を含んでよい。好ましくは、追加の残基および／または変異した残基を包含させることで、分割型インテインのC末端側領域のスプライシング活性が改善または強化される。

【０１２８】

いくつかの態様において、分割型インテインのC末端側領域またはN末端側領域に連結されるペプチドは、追加の化学的モエティを含んでよく、これには、とりわけ以下が含まれる：蛍光基、ビオチン、ポリエチレングリコール（PEG）、アミノ酸アナログ、非天然アミノ酸、リン酸基、グリコシル基、放射性同位体標識、および薬学的分子。他の態様において、分割型インテインのC末端側領域に連結されているペプチドは、1つまたは複数の化学反応性の基を含んでよく、これには、とりわけ以下が含まれる：ケトン、アルデヒド、Cys残基、およびLys残基。分割型インテインのうちのN-インテインおよびC-インテインは、非共有結合して活性なインテインを形成し、「インテインスプライシングポリペプチド（intein-splicing polypeptide）（ISP）」が存在する場合に、スプライシング反応を触媒することが可能である。「インテインスプライシングポリペプチド（ISP）」とは、分割型インテインのアミノ酸配列の一部分であって、分割型インテインのC末端側領域もしくはN末端側領域、またはそれらの両方が分割型インテインから除去された際に残る、一部分である。ある態様において、分割型インテインのN末端側領域はISPを含む。別の態様において、分割型インテインのC末端側領域はISPを含む。さらなる別の態様において、ISPは、分割型インテインのC末端側領域とN末端側領域のいずれにも共有結合していない、別個のペプチドである。

【０１２９】
タンパク質トランススプライシングにおいては、1つの前駆体タンパク質は、N-エクステイン部分とそれに続くN-インテインからなり、もう1つの前駆体タンパク質は、C-インテインとそれに続くC-エクステイン部分からなっていて、トランススプライシング反応（N-インテインとC-インテインとが協働して触媒する）によって、2つのインテイン配列が切除され、そして2つのエクステイン配列がペプチド結合によって連結される。酵素反応であるタンパク質トランススプライシングは、非常に低濃度（たとえばマイクロモル濃度）のタンパク質に作用することが可能であり、かつ生理学的条件下でも実施することが可能である。
【０１３０】
いくつかの態様において、本明細書において使用される分割型インテインの配列は、ある特定の細胞、たとえば真核細胞（たとえば真核生物の筋細胞）における発現のために、コドン最適化される。真核細胞は、ある特定の生物のものであってよく、またはある特定の生物に由来するものであってよく、該生物はたとえば、ヒト、ネズミ、ラット、ウサギ、イヌ、または非ヒト霊長類を含むがこれらに限定されない、哺乳動物である。一般的にはコドン最適化とは、関心対象の宿主細胞における発現を強化するために核酸配列を改変するプロセスであって、天然の配列の少なくとも1個のコドン（たとえば、約1、2、3、4、5、10、15、20、25、50個もしくはそれより多くのコドン、または、約1、2、3、4、5、10、15、20、25、50個超もしくはそれより多くのコドン）を、宿主細胞の遺伝子においてより高頻度または最も高頻度に使用されつつも天然のアミノ酸配列を維持するコドンで置換することによって、核酸配列を改変するプロセスを指す。さまざまな生物種が、ある特定のアミノ酸のいくつかのコドンに関して特定のバイアスを示している。コドンバイアス（生物間におけるコドン使用法の差異）は、メッセンジャーRNA（mRNA）の翻訳の効率としばしば相関しており、したがってコドンバイアスは、翻訳されようとするコドンの特性、および特定のトランスファーRNA（tRNA）分子の利用可能性に、とりわけ依存性であると考えられている。細胞における、選択されたtRNAの優先性は、概して、ペプチド合成において最も頻繁に使用されるコドンを反映している。したがって、所与の生物において遺伝子を最適に発現させるために、コドン最適化に基づいて遺伝子を調整することが可能である。コドン使用テーブルは、たとえば「Codon Usage Database」において容易に利用可能であり、かつそのようなコドン使用テーブルを、多数の様式で適合させることが可能である。Nakamura, Y., et al. "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28:292 (2000)を参照されたい。ある特定の宿主細胞における発現用に、ある特定の配列をコドン最適化するためのコンピューターアルゴリズムもまた利用可能であり、これはたとえばGene Forge（Aptagen; Jacobus, Pa.）などである。
【０１３１】
いくつかの態様において、本明細書に記載される方法および組成物は、以下の表に提示する1種または複数種の分割型インテインを利用する。本明細書において使用するための例示的な分割型インテインは、本明細書において図15A～15Uに示される。
【０１３２】
（表３）例示的な分割型インテイン

インテイン名	生物名	生物の説明
真核生物		
APMV Pol	アカンソアメーバ・ポリファガ・ミミウイルス (*Acanthomoeba polyphaga* Mimivirus)	分離株 = "Rowbotham-Bradford", ウイルス, アメーバに感染する, 分類群: 212035
Abr PRP8	アスペルギルス・ブレビペス (*Aspergillus brevipes*)FRR2439	真菌, ATCC 16899 分類群: 75551
Aca-G186AR PRP8	アジェロマイセス・カプスラタス (*Ajellomyces capsulatus*)G186AR	分類群: 447093, 株 G186AR
Aca-H143 PRP8	アジェロマイセス・カプスラタス H143	分類群: 544712
Aca-JER2004 PRP8	アジェロマイセス・カプスラタス (アナモルフ: ヒストプラズマ・カプスラタム(*Histoplasma capsulatum*))	株 = JER2004, 分類群: 5037, 真菌
Aca-NAm1 PRP8	アジェロマイセス・カプスラタス NAm1	株 = "NAm1", 分類群: 339724
Ade-ER3 PRP8	アジェロマイセス・デルマティティディス (*Ajellomyces dermatitidis*)ER-3	ヒトの真菌病原体 分類群: 559297
Ade-SLH14081 PRP8	アジェロマイセス・デルマティティディス SLH14081	ヒトの真菌病原体
Afu-Af293 PRP8	アスペルギルス・フミガタス 変種エリプティカス (*Aspergillus fumigatus* var. *ellipticus*), 株 Af293	ヒト病原性真菌 分類群: 330879
Afu-FRR0163 PRP8	アスペルギルス・フミガタス 株FRR0163	ヒト病原性真菌 分類群: 5085
Afu-NRRL5109 PRP8	アスペルギルス・フミガタス 変種エリプティカス 株NRRL 5109	ヒト病原性真菌 分類群: 41121
Agi-NRRL6136 PRP8	アスペルギルス・ギガンテウス (*Aspergillus giganteus*) 株 NRRL 6136	真菌 分類群:5060
Ani-FGSCA4 PRP8	アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*)FGSC A	糸状菌, 分類群: 227321

Avi PRP8	アスペルギルス・ビリディヌタンス (*Aspergillus viridinutans*) 株 FRR0577	真菌, ATCC 16902, 分類群:75553
Bci PRP8	ボトリティス・シネレア(*Botrytis cinerea*) (ボトリオティニア・フケリアナ (*Botryotinia fuckeliana*)B05.10 のテレオモルフ)	植物の真菌病原体
Bde-JEL197 RPB2	バトラコキトリウム・デンドロバティディス (*Batrachochytrium dendrobatidis*) JEL197	ツボカビ菌, 分離株 = "AFTOL-ID 21", 分類群:109871
Bde-JEL423 PRP8-1	バトラコキトリウム・デンドロバティディス JEL423	ツボカビ菌, 分離株 JEL423, 分類群 403673
Bde-JEL423 PRP8-2	バトラコキトリウム・デンドロバティディス JEL423	ツボカビ菌, 分離株 JEL423, 分類群 403673
Bde-JEL423 RPC2	バトラコキトリウム・デンドロバティディス JEL423	ツボカビ菌, 分離株 JEL423, 分類群 403673
Bde-JEL423 eIF-5B	バトラコキトリウム・デンドロバティディス JEL423	ツボカビ菌, 分離株 JEL423, 分類群 403673
Bfu-B05 PRP8	ボトリオティニア・フケリアナ B05.10	分類群: 332648
CIV RIR1	キロ・イリデセントウイルス(Chilo iridescent virus)	dsDNA 真核生物ウイルス, 分類群:10488
CV-NY2A ORF212392	クロレラ(*Chlorella*) NC64A に感染する クロレラウイルス(*Chlorella* virus) NY2A、これは パラメシウム・ブルサリア(*Paramecium bursaria*) に感染する	dsDNA 真核生物ウイルス, 分類群:46021, フィコドナウイルス (Phycodnaviridae)科
CV-NY2A RIR1	クロレラ NC64A に感染する クロレラウイルス NY2A、これは パラメシウム・ブルサリア に感染する	dsDNA 真核生物ウイルス, 分類群:46021, フィコドナウイルス科
CZIV RIR1	コステリトラ・ゼアランディカ・イリデセントウイルス) (*Costelytra zealandica* iridescent virus	dsDNA 真核生物ウイルス, 分類群: 68348
Cba-WM02.98 PRP8	クリプトコッカス・バシリスポラス (*Cryptococcus bacillisporus*) 株 WM02.98 (別名、クリプトコッカス・ネオフォルマンス・ガティイ (*Cryptococcus neoformans gattii*))	酵母, ヒトの病原体, 分類群:37769
Cba-WM728 PRP8	クリプトコッカス・バシリスポラス 株 WM728	酵母, ヒトの病原体, 分類群:37769
Ceu ClpP	クラミドモナス・エウガメトス (*Chlamydomonas eugametos*)(葉緑体)	緑藻, 分類群:3053
Cga PRP8	クリプトコッカス・ガティイ(*Cryptococcus gattii*) (別名、クリプトコッカス・バシリスポラス)	酵母, ヒトの病原体,

Cgl VMA	カンジダ・グラブラタ (*Candida glabrata*)	酵母, 分類群:5478
Cla PRP8	クリプトコッカス・ラウレンティイ (*Cryptococcus laurentii*) 株CBS139	真菌、担子菌酵母 分類群:5418
Cmo ClpP	クラミドモナス・モエウシイ (*Chlamydomonas moewusii*), 株UTEX 97	緑藻, 葉緑体遺伝子 分類群:3054
Cmo RPB2 (RpoBb)	クラミドモナス・モエウシイ 株UTEX 97	緑藻, 葉緑体遺伝子 分類群:3054
Cne-A PRP8 (Fne-A PRP8)	フィロバシディエラ・ネオフォルマンス (*Filobasidiella neoformans*) (クリプトコッカス・ネオフォルマンス (*Cryptococcus neoformans*) 血清型 A, PHLS_8104)	酵母, ヒトの病原体
Cne-AD PRP8 (Fne-AD PRP8)	クリプトコッカス・ネオフォルマンス (フィロバシディエラ・ネオフォルマンス), 血清型AD, CBS132)	酵母, ヒトの病原体 ATCC32045, 分類群:5207
Cne-JEC21 PRP8	クリプトコッカス・ネオフォルマンス 変種ネオフォルマンス (*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*)JEC21	酵母, ヒトの病原体 血清型 = "D" 分類群: 214684
Cpa ThrRS	カンジダ・パラプシロシス (*Candida parapsilosis*), 株CLIB214	酵母, 真菌、 分類群: 5480
Cre RPB2	クラミドモナス・レインハルディイ (*Chlamydomonas reinhardtii*) (核)	緑藻, 分類群:3055
CroV Pol	カフェテリア・ロエンベルゲンシス・ウイルス (*Cafeteria roenbergensis* virus) BV- PW1	分類群:693272, 海洋性従属栄養性ナノ鞭毛虫に感染する巨大ウイルス
CroV RIR1	カフェテリア・ロエンベルゲンシス・ウイルス BV- PW1	分類群:693272, 海洋性従属栄養性ナノ鞭毛虫に感染する巨大ウイルス
CroV RPB2	カフェテリア・ロエンベルゲンシス・ウイルス BV- PW1	分類群:693272, 海洋性従属栄養性ナノ鞭毛虫に感染する巨大ウイルス
CroV Top2	カフェテリア・ロエンベルゲンシス・ウイルス BV- PW1	分類群:693272, 海洋性従属栄養性ナノ鞭毛虫に感染する巨大ウイルス
Cst RPB2	コエロモマイセス・ステゴマイアエ (*Coelomomyces stegomyiae*)	ツボカビ菌, 分離株 = "AFTOL-ID 18", 分類群: 143960
Ctr ThrRS	カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*) ATCC750	酵母

Ctr VMA	カンジダ・トロピカリス（核）	酵母
Ctr-MYA3404 VMA	カンジダ・トロピカリス MYA-3404	分類群: 294747
Ddi RPC2	ディクティオステリウム・ディスコイデウム（*Dictyostelium discoideum*）株AX4（核）	動菌（社会性アメーバ）
Dhan GLT1	デバリオマイセス・ハンセニイ（*Debaryomyces hansenii*）CBS767	真菌，アナモルフ：カンジダ・ファマタ（*Candida famata*），分類群:4959
Dhan VMA	デバリオマイセス・ハンセニイ CBS767	真菌，分類群:284592
Eni PRP8	エメリセラ・ニデュランス（*Emericella nidulans*）R20（アナモルフ：アスペルギルス・ニデュランス（*Aspergillus nidulans*））	分類群: 162425
Eni-FGSCA4 PRP8	エメリセラ・ニデュランス（アナモルフ：アスペルギルス・ニデュランス）FGSC A4	糸状菌 分類群: 162425
Fte RPB2 (RpoB)	フロイディエラ・テレストリス（*Floydiella terrestris*），株UTEX 1709	緑藻，葉緑体遺伝子 分類群: 51328
Gth DnaB	ギラルディア・シータ（*Guillardia theta*）（プラスチド）	クリプト藻
HaV01 Pol	ヘテロシグマ・アカシオ・ウイルス（*Heterosigma akashiwo* virus）01	藻類ウイルス，分類群:97195，株 HaV01
Hca PRP8	ヒストプラズマ・カプスラタム（*Histoplasma capsulatum*）（アナモルフ：アジェロマイセス・カプスラタス（*Ajellomyces capsulatus*））	真菌，ヒトの病原体
IIV6 RIR1	無脊椎動物イリデセントウイルス（Invertebrate iridescent virus）6	dsDNA真核生物ウイルス，分類群:176652
Kex-CBS379 VMA	カザクスタニア・エクシグア（*Kazachstania exigua*），以前はサッカロマイセス・エクシグウス（*Saccharomyces exiguus*），株CBS379	酵母，分類群:34358
Kla-CBS683 VMA	クルイベロマイセス・ラクティス（*Kluyveromyces lactis*），株CBS683	酵母，分類群:28985
Kla-IFO1267 VMA	クルイベロマイセス・ラクティス IFO1267	真菌，分類群:28985
Kla-NRRLY1140 VMA	クルイベロマイセス・ラクティス NRRL Y-1140	真菌，分類群:284590
Lel VMA	ロデロマイセス・エロンギスポラス（*Lodderomyces elongisporus*）	酵母
Mca-CBS113480 PRP8	ミクロスポラム・カニス（*Microsporum canis*）CBS 113480	分類群: 554155
Nau PRP8	ネオサルトリア・アウラタ（*Neosartorya aurata*）NRRL 4378	真菌，分類群:41051

Nfe-NRRL5534 PRP8	ネオサルトリア・フェネリアエ (*Neosartorya fennelliae*) NRRL 5534	真菌, 分類群: 41048
Nfi PRP8	ネオサルトリア・フィシェリ (*Neosartorya fischeri*)	真菌
Ngl-FR2163 PRP8	ネオサルトリア・グラブラ (*Neosartorya glabra*) FRR2163	真菌, ATCC 16909, 分類群: 41049
Ngl-FRR1833 PRP8	ネオサルトリア・グラブラ FRR1833	真菌, 分類群: 41049, (予備的同定)
Nqu PRP8	ネオサルトリア・クアドリシンクタ (*Neosartorya quadricincta*), 株 NRRL 4175	分類群: 41053
Nspi PRP8	ネオサルトリア・スピノサ (*Neosartorya spinosa*) FRR4595	真菌, 分類群: 36631
Pabr-Pb01 PRP8	パラコクシディオイデス・ブラシリエンシス (*Paracoccidioides brasiliensis*) Pb01	分類群: 502779
Pabr-Pb03 PRP8	パラコクシディオイデス・ブラシリエンシス Pb03	分類群: 482561
Pan CHS2	ポドスポラ・アンセリナ (*Podospora anserina*)	真菌, 分類群: 5145
Pan GLT1	ポドスポラ・アンセリナ	真菌, 分類群: 5145
Pbl PRP8-a	ファイコマイセス・ブラケスレエアナス (*Phycomyces blakesleeanus*)	接合菌, 株 NRRL155
Pbl PRP8-b	ファイコマイセス・ブラケスレエアナス	接合菌, 株 NRRL155
Pbr-Pb18 PRP8	パラコクシディオイデス・ブラシリエンシス Pb18	真菌, 分類群: 121759
Pch PRP8	ペニシリウム・クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*)	真菌, 分類群: 5076
Pex PRP8	ペニシリウム・エキスパンサム (*Penicillium expansum*)	真菌, 分類群 27334
Pgu GLT1	ピキア (カンジダ)・ギリエルモンディ (*Pichia* (*Candida*) *guilliermondii*)	真菌, 分類群 294746
Pgu-alt GLT1	ピキア (カンジダ)・ギリエルモンディ	真菌
Pno GLT1	フェオスフェリア・ノドラム (*Phaeosphaeria nodorum*) SN15	真菌, 分類群: 321614
Pno RPA2	フェオスフェリア・ノドラム SN15	真菌, 分類群: 321614
Ppu DnaB	ポルフィラ・プルプレア (*Porphyra purpurea*) (葉緑体)	紅藻
Pst VMA	ピキア・スティピティス (*Pichia stipitis*) CBS 6054, 分類群: 322104	酵母
Ptr PRP8	ピレノフォラ・トリティシ-レペンティス (*Pyrenophora tritici-repentis*) Pt-1C-BF	子嚢菌, 分類群: 426418
Pvu PRP8	ペニシリウム・ブルピナム (*Penicillium vulpinum*) (以前は P. クラビフォルメ (*P. claviforme*))	真菌
Pye DnaB	ポルフィラ・エゾエンシス (*Porphyra yezoensis*) 葉緑体, 栽培品種 U-51	紅藻, オルガネラ = "プラスチド:葉緑体", "分類群: 2788

Sas RPB2	スピロマイセス・アスピラリス (*Spiromyces aspiralis*) NRRL 22631	接合菌, 分離株 = "AFTOL-ID 185", 分類群:68401
Sca-CBS4309 VMA	サッカロマイセス・カステリイ (*Saccharomyces castellii*), 株 CBS4309	酵母, 分類群:27288
Sca-IFO1992 VMA	サッカロマイセス・カステリイ 株 IFO1992	酵母, 分類群:27288
Scar VMA	サッカロマイセス・カリオカナス (*Saccharomyces cariocanus*), 株 = "UFRJ 50791	酵母, 分類群:114526
Sce VMA	サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) (核)	酵母, Sce 株 OUT7163, OUT7045, OUT7163, IFO1992 にも存在
Sce-DH1-1A VMA	サッカロマイセス・セレビシエ 株 DH1-1A	酵母, 分類群:173900, Sce 株 OUT7900, OUT7903, OUT7112 にも存在
Sce-JAY291 VMA	サッカロマイセス・セレビシエ JAY291	分類群:574961
Sce-OUT7091 VMA	サッカロマイセス・セレビシエ OUT7091	酵母, 分類群:4932, Sce 株 OUT7043, OUT7064 にも存在
Sce-OUT7112 VMA	サッカロマイセス・セレビシエ OUT7112	酵母, 分類群:4932, Sce 株 OUT7900, OUT7903 にも存在
Sce-YJM789 VMA	サッカロマイセス・セレビシエ 株 YJM789	酵母, 分類群:307796
Sda VMA	サッカロマイセス・ダイレネンシス (*Saccharomyces dairenensis*), 株 CBS 421	酵母, 分類群:27289, Sda 株 IFO0211 にも存在
Sex-IFO1128 VMA	サッカロマイセス・エクシグウス (*Saccharomyces exiguus*), 株 = "IFO1128"	酵母, 分類群:34358
She RPB2 (RpoB)	スティゲオクロニウム・ヘルベティカム (*Stigeoclonium helveticum*), 株 UTEX 441	緑藻, 葉緑体遺伝子, 分類群:55999
Sja VMA	シゾサッカロマイセス・ジャポニカス (*Schizosaccharomyces japonicus*) yFS275	子嚢菌, 分類群:402676

Spa VMA	サッカロマイセス・パストリアナス (*Saccharomyces pastorianus*) IFO11023	酵母; 分類群:27292
Spu PRP8	スピゼロマイセス・プンクタタス (*Spizellomyces punctatus*)	ツボカビ菌
Sun VMA	サッカロマイセス・ウニスポラス (*Saccharomyces unisporus*), 株CBS 398	酵母; 分類群:27294
Tgl VMA	トルラスポラ・グロボサ (*Torulaspora globosa*), 株CBS 764	酵母; 分類群:48254
Tpr VMA	トルラスポラ・プレトリエンシス (*Torulaspora pretoriensis*), 株CBS 5080	酵母; 分類群:35629
Ure-1704 PRP8	ウンシノカルパス・レエシイ (*Uncinocarpus reesii*)	糸状菌
Vpo VMA	バンデルワルトザイマ・ポリスポラ (*Vanderwaltozyma polyspora*), 以前は クルイベロマイセス・ポリスポラス (*Kluyveromyces polysporus*) 株CBS 2163	酵母; 分類群:36033
WIV RIR1	ウィセアナ・イリデセントウイルス (*Wiseana* iridescent virus)	dsDNA真核生物ウイルス 分類群:68347
Zba VMA	ザイゴサッカロマイセス・バイリイ (*Zygosaccharomyces bailii*), 株CBS 685	酵母; 分類群:4954
Zbi VMA	ザイゴサッカロマイセス・ビスポラス (*Zygosaccharomyces bisporus*), 株CBS 702	酵母; 分類群:4957
Zro VMA	ザイゴサッカロマイセス・ロウキシイ (*Zygosaccharomyces rouxii*), 株 CBS 688	酵母; 分類群:4956
真正細菌		
AP-APSE1 dpol	アシルソシフォン・ピサム (*Acyrthosiphon pisum*) の二次内部共生ファージ1	バクテリオファージ, 分類群: 67571
AP-APSE2 dpol	バクテリオファージAPSE-2, 分離株 = T5A	アシルソシフォン・ピサムの内部共生体であるカンジダタス・ハミルトネラ・デフェンサ (*Candidatus Hamiltonella defensa*)のバクテリオファージ 分類群: 340054
AP-APSE4 dpol	アシルソシフォン・ピサムの内部共生体である カンジダタス・ハミルトネラ・デフェンサ 株5ATacのバクテリオファージ	バクテリオファージ, 分類群: 568990
AP-APSE5 dpol	バクテリオファージAPSE-5	ウロレウコン・ルドベキアエ (*Uroleucon rudbeckiae*) の内部共生体であるカンジダタス・ハミルトネラ・デフェンサの バクテリオファージ, 分類群:568991

AP-Aaphi23 MupF	バクテリオファージ Aaphi23, ヘモフィラス(*Haemophilus*)ファージ Aaphi23	アクチノバチルス・アクチノミセテムコミタンス(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)のバクテリオファージ, 分類群: 230158
Aae RIR2	アクイフェクス・アエオリカス (*Aquifex aeolicus*) 株 VF5	好熱性化学合成無機独立栄養生物, 分類群: 63363
Aave-AAC001 Aave1721	アシドボラクス・アベナエ 亜種シトルリ (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) AAC00-1	分類群: 397945
Aave-AAC001 RIR1	アシドボラクス・アベナエ 亜種シトルリ AAC00-1	分類群: 397945
Aave-ATCC19860 RIR1	アシドボラクス・アベナエ 亜種アベナエ (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*) ATCC 19860	分類群: 643561
Aba Hyp-02185	アシネトバクター・バウマニイ (*Acinetobacter baumannii*) ACICU	分類群: 405416
Ace RIR1	アシドサーマス・セルロリティカス (*Acidothermus cellulolyticus*) 11B	分類群: 351607
Aeh DnaB-1	アルカリリムニコラ・エーリケイ (*Alkalilimnicola ehrlichei*) MLHE-1	分類群: 187272
Aeh DnaB-2	アルカリリムニコラ・エーリケイ MLHE-1	分類群: 187272
Aeh RIR1	アルカリリムニコラ・エーリケイ MLHE-1	分類群: 187272
AgP-S1249 MupF	アグレガティバクター (*Aggregatibacter*)ファージ S1249	分類群: 683735
Aha DnaE-c	アファノテセ・ハロフィティカ (*Aphanothece halophytica*)	シアノバクテリア, 分類群: 72020
Aha DnaE-n	アファノテセ・ハロフィティカ	シアノバクテリア, 分類群: 72020
Alvi-DSM180 GyrA	アロクロマティウム・ビノサム (*Allochromatium vinosum*) DSM 180	分類群: 572477
Ama MADE823	ファージの未同定タンパク質 [アルテロモナス・マクレオディイ (*Alteromonas macleodii*)'ディープ(Deep)エコタイプ']	推定プロファージ遺伝子, 分類群: 314275
Amax-CS328 DnaX	アルスロスピラ・マキシマ (*Arthrospira maxima*) CS-328	分類群: 513049
Aov DnaE-c	アファニゾメノン・オバリスポラム (*Aphanizomenon ovalisporum*)	シアノバクテリア, 分類群: 75695
Aov DnaE-n	アファニゾメノン・オバリスポラム	シアノバクテリア, 分類群: 75695
Apl-C1 DnaX	アルスロスピラ・プラテンシス (*Arthrospira platensis*)	分類群: 118562, 株 C1
Arsp-FB24 DnaB	アルスロバクター属の種 (*Arthrobacter*) FB24	分類群: 290399

Asp DnaE-c	アナベナ属（*Anabaena*）の種 PCC7120, （ノストク属（*Nostoc*）の種 PCC7120）	シアノバクテリア，窒素固定， 分類群：103690
Asp DnaE-n	アナベナ属の種 PCC7120, （ノストク属の種 PCC7120）	シアノバクテリア，窒素固定， 分類群：103690
Ava DnaE-c	アナベナ・バリアビリス （*Anabaena variabilis*）ATCC29413	シアノバクテリア， 分類群：240292
Ava DnaE-n	アナベナ・バリアビリス ATCC29413	シアノバクテリア， 分類群：240292
Avin RIR1 BIL	アゾトバクター・ビネランディイ （*Azotobacter vinelandii*）	分類群：354
Bce-MCO3 DnaB	バークホルデリア・セノセパシア （*Burkholderia cenocepacia*）MC0-3	分類群：406425
Bce-PC184 DnaB	バークホルデリア・セノセパシア PC184	分類群：350702
Bse-MLS10 TerA	バチルス・セレニティレデュセンス （*Bacillus selenitireducens*）MLS10	推定プロファージ遺伝子， 分類群：439292
BsuP-M1918 RIR1	B.サブティリス（*B. subtilis*）M1918（プロファージ）	B.サブティリス M1918 におけるプロファージ 分類群：157928
BsuP-SPBc2 RIR1	B.サブティリス 株 168 Sp β c2 プロファージ	B.サブティリス 分類群 1423. SPβ c2ファージ， 分類群：66797
Bvi IcmO	バークホルデリア・ベトナミエンシス （*Burkholderia vietnamiensis*）G4	プラスミド＝"pBVIE03" 分類群：269482
CP-P1201 Thy1	コリネバクテリウム（*Corynebacterium*） ファージ P1201	コリネバクテリウム・グルタミカム （*Corynebacterium glutamicum*）NCHU87078 由来の溶菌バクテリオファージ P1201 ウイルス；dsDNAウイルス 分類群：384848
Cag RIR1	クロロクロマティウム・アグレガタム （*Chlorochromatium aggregatum*）	運動性，光栄養性共同体
Cau SpoVR	クロロフレクサス・アウランティアカス （*Chloroflexus aurantiacus*）J-10-fl	酸素非発生型光栄養性， 分類群：324602
CbP-C-St RNR	クロストリジウム・ボツリナム （*Clostridium botulinum*）ファージC-St	ファージ，特異的宿主 = "クロストリジウム・ボツリナム （*Clostridium botulinum*）タイプC 株 C-Stockholm， 分類群：12336
CbP-D1873 RNR	クロストリジウム・ボツリナム ファージ D	クロストリジウム・ボツリナム タイプD株,1873由来の亜種ファージ 分類群：29342
Cbu-Dugway DnaB	コクシエラ・ブルネティイ （*Coxiella burnetii*）Dugway 5J108-111	プロテオバクテリア； レジオネラ目(Legionellales)； 分類群：434922

Cbu-Goat DnaB	コクシエラ・ブルネティイ 'MSU ゴート Q177'	プロテオバクテリア; レジオネラ目; 分類群: 360116
Cbu-RSA334 DnaB	コクシエラ・ブルネティイ RSA 334	プロテオバクテリア; レジオネラ目; 分類群: 360117
Cbu-RSA493 DnaB	コクシエラ・ブルネティイ RSA 493	プロテオバクテリア; レジオネラ目; 分類群: 227377
Cce Hyp1-Csp-2	シアノセイス属(*Cyanothece*)の種 ATCC 51142	海洋性単細胞窒素固定シアノバクテリア, 分類群: 43989
Cch RIR1	クロロビウム・クロロクロマティイ (*Chlorobium chlorochromatii*)CaD3	分類群: 340177
Ccy Hyp1-Csp-1	シアノセイス属 の種 CCY0110	シアノバクテリア, 分類群: 391612
Ccy Hyp1-Csp-2	シアノセイス属 の種 CCY0110	シアノバクテリア, 分類群: 391612
Cfl-DSM20109 DnaB	セルロモナス・フラビゲナ (*Cellulomonas flavigena*) DSM 20109	分類群: 446466
Chy RIR1	カルボキシドサーマス・ハイドロゲノフォルマンス (*Carboxydothermus hydrogenoformans*)Z-2901	好熱生物, 分類群 = 246194
Ckl PTerm	クロストリジウム・クルイベリ (*Clostridium kluyveri*) DSM 555	プラスミド = "pCKL555A", 分類群: 431943
Cra-CS505 DnaE-c	シリンドロスペルモプシス・ラシボルスキイ (*Cylindrospermopsis raciborskii*) CS-505	分類群: 533240
Cra-CS505 DnaE-n	シリンドロスペルモプシス・ラシボルスキイ CS-505	分類群: 533240
Cra-CS505 GyrB	シリンドロスペルモプシス・ラシボルスキイ CS-505	分類群: 533240
Csp-CCY0110 DnaE-c	シアノセイス属 の種 CCY0110	分類群: 391612
Csp-CCY0110 DnaE-n	シアノセイス属 の種 CCY0110	分類群: 391612
Csp-PCC7424 DnaE-c	シアノセイス属 の種 PCC 7424	シアノバクテリア, 分類群: 65393
Csp-PCC7424 DnaE-n	シアノセイス属 の種 PCC7424	シアノバクテリア, 分類群: 65393
Csp-PCC7425 DnaB	シアノセイス属 の種 PCC 7425	分類群: 395961

Csp-PCC7822 DnaE-n	シアノセイス属の種 PCC 7822	分類群: 497965
Csp-PCC8801 DnaE-c	シアノセイス属の種 PCC 8801	分類群: 41431
Csp-PCC8801 DnaE-n	シアノセイス属の種 PCC 8801	分類群: 41431
Cth ATPase BIL	クロストリジウム・サーモセラム (*Clostridium thermocellum*)	ATCC27405, 分類群: 203119
Cth-ATCC27405 TerA	クロストリジウム・サーモセラム ATCC27405	推定プロファージ, ATCC27405, 分類群: 203119
Cth-DSM2360 TerA	クロストリジウム・サーモセラム DSM 2360	推定プロファージ遺伝子, 分類群: 572545
Cwa DnaB	クロコスファエラ・ワトソニイ (*Crocosphaera watsonii*) WH8501 (シネコシスティス属(*Synechocystis*)の種WH 8501)	分類群: 165597
Cwa DnaE-c	クロコスファエラ・ワトソニイ WH 8501 (シネコシスティス属の種 WH 8501)	シアノバクテリア, 分類群: 165597
Cwa DnaE-n	クロコスファエラ・ワトソニイ WH 8501 (シネコシスティス属の種 WH 8501)	シアノバクテリア, 分類群: 165597
Cwa PEP	クロコスファエラ・ワトソニイ WH 8501 (シネコシスティス属の種 WH 8501)	分類群: 165597
Cwa RIR1	クロコスファエラ・ワトソニイ WH 8501 (シネコシスティス属の種 WH 8501)	分類群: 165597
Daud RIR1	カンジダタス・デスルフォルディス・アウダクスビアトール (*Candidatus Desulforudis audaxviator*) MP104C	分類群: 477974
Dge DnaB	デイノコッカス・ゲオサーマリス (*Deinococcus geothermalis*) DSM11300	好熱性, 放射線抵抗性
Dha-DCB2 RIR1	デスルフィトバクテリウム・ハフニエンセ (*Desulfitobacterium hafniense*) DCB-2	嫌気性脱ハロゲン化細菌, 分類群: 49338
Dha-Y51 RIR1	デスルフィトバクテリウム・ハフニエンセ Y51	嫌気性脱ハロゲン化細菌, 分類群: 138119
Dpr-MLMSI RIR1	デルタプロテオバクテリア MLMS-1	分類群: 262489
Dra RIR1	デイノコッカス・ラディオデュランス (*Deinococcus radiodurans*) R1, TIGR株	放射線抵抗性 分類群: 1299

Dra Snf2-c	デイノコッカス・ラディオデュランス R1, TIGR 株	放射線抵抗性 かつ DNA損傷抵抗性, 分類群: 1299
Dra Snf2-n	デイノコッカス・ラディオデュランス R1, TIGR 株	放射線抵抗性 かつ DNA損傷抵抗性, 分類群: 1299
Dra-ATCC13939 Snf2	デイノコッカス・ラディオデュランス R1, ATCC13939/Brooks & Murray 株	放射線抵抗性 かつ DNA損傷抵抗性, 分類群: 1299
Dth UDP GD	ディクチオグロムス・サーモフィラム (*Dictyoglomus thermophilum*) H-6-12	株 = "H-6-12; ATCC 35947, 分類群: 309799
Dvul ParB	デスルホビブリオ・ブルガリス 亜種ブルガリス (*Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris*) DP4	分類群: 391774
EP-Min27 プライマーゼ	エンテロバクテリア (Enterobacteria) ファージ Min27	宿主 = "大腸菌 (*Escherichia coli*) O157: H7 株 Min27" のバクテリオファージ
Fal DnaB	フランキア・アルニ (*Frankia alni*) ACN14a	植物共生体, 分類群: 326424
Fsp-Ccl3 RIR1	フランキア属 (*Frankia*) の種 Ccl3	分類群: 106370
Gob DnaE	ゲマタ・オブスクリグロバス (*Gemmata obscuriglobus*) UQM2246	分類群 114, TIGRゲノム株, 出芽細菌
Gob Hyp	ゲマタ・オブスクリグロバス UQM2246	分類群 114, TIGRゲノム株, 出芽細菌
Gvi DnaB	グロエオバクター・ビオラセウス (*Gloeobacter violaceus*), PCC 7421	分類群: 33072
Gvi RIR1-1	グロエオバクター・ビオラセウス PCC 7421	分類群: 33072
Gvi RIR1-2	グロエオバクター・ビオラセウス PCC 7421	分類群: 33072
Hhal DnaB	ハロロドスピラ・ハロフィラ (*Halorhodospira halophila*) SL1	分類群: 349124
Kfl-DSM17836 DnaB	クリベラ・フラビダ (*Kribbella flavida*) DSM 17836	分類群: 479435
Kra DnaB	キネオコッカス・ラディオトレランス (*Kineococcus radiotolerans*) SRS30216	放射線抵抗性
LLP-KSY1 PolA	ラクトコッカス (*Lactococcus*) ファージ KSY1	バクテリオファージ, 分類群: 388452
LP-phiHSIC ヘリカーゼ	リストネラ・ペラギア (*Listonella pelagia*) ファージ phiHSIC	分類群: 310539, リストネラ・ペラギア (*Listonella pelagia*) のシュードテンペレート海洋性ファージ
Lsp-PCC8106 GyrB	リングビア属 (*Lyngbya*) の種 PCC 8106	分類群: 313612

MP-Be DnaB	マイコバクテリオファージ (Mycobacteriophage) Bethlehem	バクテリオファージ, 分類群: 260121
MP-Be gp51	マイコバクテリオファージ Bethlehem	バクテリオファージ, 分類群: 260121
MP-Catera gp206	マイコバクテリオファージ Catera	マイコバクテリオファージ, 分類群: 373404
MP-KBG gp53	マイコバクテリウム (*Mycobacterium*) ファージ KBG	分類群: 540066
MP-Mcjw1 DnaB	マイコバクテリオファージ CJW1	バクテリオファージ, 分類群: 205869
MP-Omega DnaB	マイコバクテリオファージ Omega	バクテリオファージ, 分類群: 205879
MP-U2 gp50	マイコバクテリオファージ U2	バクテリオファージ, 分類群: 260120
Maer-NIES843 DnaB	ミクロシスティス・エルギノーサ (*Microcystis aeruginosa*) NIES-843	ブルーム形成毒性シアノバクテリア, 分類群: 449447
Maer-NIES843 DnaE-c	ミクロシスティス・エルギノーサ NIES-843	ブルーム形成毒性シアノバクテリア, 分類群: 449447
Maer-NIES843 DnaE-n	ミクロシスティス・エルギノーサ NIES-843	ブルーム形成毒性シアノバクテリア, 分類群: 449447
Mau-ATCC27029 GyrA	ミクロモノスポラ・アウランティアカ (*Micromonospora aurantiaca*) ATCC 27029	分類群: 644283
Mav-104 DnaB	マイコバクテリウム・アビウム (*Mycobacterium avium*) 104	分類群: 243243
Mav-ATCC25291 DnaB	マイコバクテリウム・アビウム 亜種アビウム (*Mycobacterium avium* subsp. *avium*) ATCC 25291	分類群: 553481
Mav-ATCC35712 DnaB	マイコバクテリウム・アビウム	ATCC35712, 分類群 1764
Mav-PT DnaB	マイコバクテリウム・アビウム 亜種パラツベルクロシス (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) 株 k10	分類群: 262316
Mbo Pps1	マイコバクテリウム・ボビス 亜種ボビス (*Mycobacterium bovis* subsp. *bovis*) AF2122/97	株 = "AF2122/97", 分類群: 233413
Mbo RecA	マイコバクテリウム・ボビス 亜種ボビス AF2122/97	分類群: 233413
Mbo SufB (Mbo Pps1)	マイコバクテリウム・ボビス 亜種ボビス AF2122/97	分類群: 233413

Mbo-1173P DnaB	マイコバクテリウム・ボビス BCG Pasteur 1173P	株 = BCG Pasteur 1173P2, 分類群: 410289
Mbo-AF2122 DnaB	マイコバクテリウム・ボビス 亜種ボビス AF2122/97	株 = "AF2122/97", 分類群: 233413
Mca MupF	メチロコッカス・カプスラタス (*Methylococcus capsulatus*) Bath, プロファージ MuMc02	プロファージ MuMc02, 分類群: 243233
Mca RIR1	メチロコッカス・カプスラタス Bath	分類群: 243233
Mch RecA	マイコバクテリウム・チタエ (*Mycobacterium chitae*)	IP14116003, 分類群: 1792
Mcht-PCC7420 DnaE-1	ミクロコレウス・クソノプラステス (*Microcoleus chthonoplastes*) PCC7420	シアノバクテリア, 分類群: 118168
Mcht-PCC7420 DnaE-2c	ミクロコレウス・クソノプラステス PCC7420	シアノバクテリア, 分類群: 118168
Mcht-PCC7420 DnaE-2n	ミクロコレウス・クソノプラステス PCC7420	シアノバクテリア, 分類群: 118168
Mcht-PCC7420 GyrB	ミクロコレウス・クソノプラステス PCC7420	分類群: 118168
Mcht-PCC7420 RIR1-1	ミクロコレウス・クソノプラステス PCC7420	分類群: 118168
Mcht-PCC7420 RIR1-2	ミクロコレウス・クソノプラステス PCC7420	分類群: 118168
Mex ヘリカーゼ	メチロバクテリウム・エキストロクエンス (*Methylobacterium extorquens*) AM1	アルファプロテオバクテリア
Mex TrbC	メチロバクテリウム・エキストロクエンス AM1	アルファプロテオバクテリア
Mfa RecA	マイコバクテリウム・ファラクス (*Mycobacterium fallax*)	CITP8139, 分類群: 1793
Mfl GyrA	マイコバクテリウム・フラベセンス (*Mycobacterium flavescens*) Fla0	分類群: 1776, 参照 #930991
Mfl RecA	マイコバクテリウム・フラベセンス Fla0	株 = Fla0, 分類群: 1776, 参照 #930991
Mfl-ATCC14474 RecA	マイコバクテリウム・フラベセンス ATCC14474	株 = ATCC14474, 分類群: 1776, 参照 #930991

Mfl-PYR-GCK DnaB	マイコバクテリウム・フラベセンス PYR-GCK	分類群: 350054
Mga GyrA	マイコバクテリウム・ガストリ(*Mycobacterium gastri*)	HP4389, 分類群: 1777
Mga RecA	マイコバクテリウム・ガストリ	HP4389, 分類群: 1777
Mga SufB (Mga Pps1)	マイコバクテリウム・ガストリ	HP4389, 分類群: 1777
Mgi-PYR-GCK DnaB	マイコバクテリウム・ギルバム (*Mycobacterium gilvum*) PYR-GCK	分類群: 350054
Mgi-PYR-GCK GyrA	マイコバクテリウム・ギルバム PYR-GCK	分類群: 350054
Mgo GyrA	マイコバクテリウム・ゴルドナエ (*Mycobacterium gordonae*)	分類群: 1778, 参照番号 930835
Min-1442 DnaB	マイコバクテリウム・イントラセルラレ (*Mycobacterium intracellulare*)	株 1442, 分類群: 1767
Min-ATCC13950 GyrA	マイコバクテリウム・イントラセルラレ ATCC13950	分類群: 487521
Mkas GyrA	マイコバクテリウム・カンサシ (*Mycobacterium kansasii*)	分類群: 1768
Mkas-ATCC12478 GyrA	マイコバクテリウム・カンサシ ATCC12478	分類群: 557599
Mle-Br4923 GyrA	マイコバクテリウム・レプラエ (*Mycobacterium leprae*) Br4923	分類群: 561304
Mle-TN DnaB	マイコバクテリウム・レプラエ 株 TN	ヒトの病原体, 分類群:1769
Mle-TN GyrA	マイコバクテリウム・レプラエ TN	ヒトの病原体, 株 = TN, 分類群: 1769
Mle-TN RecA	マイコバクテリウム・レプラエ 株 TN	ヒトの病原体, 分類群:1769
Mle-TN SufB (Mle Pps1)	マイコバクテリウム・レプラエ	ヒトの病原体, 分類群:1769
Mma GyrA	マイコバクテリウム・マルモエンス (*Mycobacterium malmoense*)	分類群: 1780
Mmag Magn8951 BIL	マグネトスピリラム・マグネトタクティカム (*Magnetospirillum magnetotacticum*) MS-1	グラム陰性, 分類群:272627
Msh RecA	マイコバクテリウム シモデイ (*Mycobacterium shimodei*)	ATCC27962, 分類群: 29313
Msm DnaB-1	マイコバクテリウム・スメグマティス (*Mycobacterium smegmatis*) MC2 155	MC2 155, 分類群: 246196
Msm DnaB-2	マイコバクテリウム・スメグマティス MC2 155	MC2 155, 分類群: 246196
Msp-KMS DnaB	マイコバクテリウム属(*Mycobacterium*)の種 KMS	分類群: 189918
Msp-KMS GyrA	マイコバクテリウム属の種 KMS	分類群: 189918
Msp-MCS DnaB	マイコバクテリウム属の種 MCS	分類群: 164756

Msp-MCS GyrA	マイコバクテリウム属の種 MCS	分類群: 164756
Mthe RecA	マイコバクテリウム・サーモレジスティバイル (*Mycobacterium thermoresistibile*)	ATCC19527, 分類群: 1797
Mtu SufB (Mtu Pps1)	マイコバクテリウム・ツベルクロシス (*Mycobacterium tuberculosis*) 株 H37Rv および CDC1551	ヒトの病原体, 分類群: 83332
Mtu-C RecA	マイコバクテリウム・ツベルクロシス C	分類群: 348776
Mtu-CDC1551 DnaB	マイコバクテリウム・ツベルクロシス CDC1551	ヒトの病原体, 分類群: 83332
Mtu-CPHL RecA	マイコバクテリウム・ツベルクロシス CPHL_A	分類群: 611303
Mtu-Canetti RecA	マイコバクテリウム・ツベルクロシス 株 = "*Canetti*"	分類群: 1773
Mtu-EAS054 RecA	マイコバクテリウム・ツベルクロシス EAS054	分類群: 520140
Mtu-F11 DnaB	マイコバクテリウム・ツベルクロシス 株 F11	分類群: 336982
Mtu-H37Ra DnaB	マイコバクテリウム・ツベルクロシス H37Ra	ATCC 25177, 分類群: 419947
Mtu-H37Rv DnaB	マイコバクテリウム・ツベルクロシス H37Rv	ヒトの病原体, 分類群: 83332
Mtu-H37Rv RecA	マイコバクテリウム・ツベルクロシス H37Rv, CDC1551にも存在	ヒトの病原体, 分類群: 83332
Mtu-Haarlem DnaB	マイコバクテリウム・ツベルクロシス 株 Haarlem	分類群: 395095
Mtu-K85 RecA	マイコバクテリウム・ツベルクロシス K85	分類群: 611304
Mtu-R604 RecA-n	マイコバクテリウム・ツベルクロシス '98- R604 INH-RIF-EM'	分類群: 555461
Mtu-So93 RecA	マイコバクテリウム・ツベルクロシス So93/亜種(sub_species) = "*Canetti*"	ヒトの病原体, 分類群: 1773
Mtu-T17 RecA-c	マイコバクテリウム・ツベルクロシス T17	分類群: 537210
Mtu-T17 RecA-n	マイコバクテリウム・ツベルクロシス T17	分類群: 537210
Mtu-T46 RecA	マイコバクテリウム・ツベルクロシス T46	分類群: 611302
Mtu-T85 RecA	マイコバクテリウム・ツベルクロシス T85	分類群: 520141
Mtu-T92 RecA	マイコバクテリウム・ツベルクロシス T92	分類群: 515617

Mvan DnaB	マイコバクテリウム・バンバアレニイ（*Mycobacterium vanbaalenii*）PYR-1	分類群: 350058
Mvan GyrA	マイコバクテリウム・バンバアレニイPYR-1	分類群: 350058
Mxa RAD25	ミクソコッカス・キサンタス（*Myxococcus xanthus*）DK1622	デルタプロテオバクテリア
Mxe GyrA	マイコバクテリウム・ゼノピ（*Mycobacterium xenopi*） 株 IMM5024	分類群: 1789
Naz-0708 RIR1-1	ノストック・アゾラエ（*Nostoc azollae*）0708	分類群: 551115
Naz-0708 RIR1-2	ノストック・アゾラエ 0708	分類群: 551115
Nfa DnaB	ノカルディア・ファルシニカ（*Nocardia farcinica*）IFM 10152	分類群: 247156
Nfa Nfa15250	ノカルディア・ファルシニカ IFM 10152	分類群: 247156
Nfa RIR1	ノカルディア・ファルシニカ IFM 10152	分類群: 247156
Nosp-CCY9414 DnaE-n	ノデュラリア・スプミゲナ（*Nodularia spumigena*）CCY9414	分類群: 313624
Npu DnaB	ノストック・プンクティフォルメ（*Nostoc punctiforme*）	シアノバクテリア, 分類群: 63737
Npu GyrB	ノストック・プンクティフォルメ	シアノバクテリア, 分類群: 63737
Npu-PCC73102 DnaE-c	ノストック・プンクティフォルメ PCC73102	シアノバクテリア, 分類群: 63737, ATCC29133
Npu-PCC73102 DnaE-n	ノストック・プンクティフォルメ PCC73102	シアノバクテリア, 分類群: 63737 ATCC29133
Nsp-JS614 DnaB	ノカルディオイデス属（*Nocardioides*）の種 JS614	分類群: 196162
Nsp-JS614 TOPRIM	ノカルディオイデス属の種 JS614	分類群: 196162
Nsp-PCC7120 DnaB	ノストック属（*Nostoc*）の種 PCC7120, (アナベナ属(*Anabaena*）の種 PCC7120)	シアノバクテリア, 窒素固定, 分類群: 103690
Nsp-PCC7120 DnaE-c	ノストック属の種 PCC7120, (アナベナ属の種 PCC7120)	シアノバクテリア, 窒素固定, 分類群: 103690
Nsp-PCC7120 DnaE-n	ノストック属の種 PCC7120, (アナベナ属の種 PCC7120)	シアノバクテリア, 窒素固定, 分類群: 103690
Nsp-PCC7120 RIR1	ノストック属の種 PCC7120, (アナベナ属の種 PCC7120)	シアノバクテリア, 窒素固定, 分類群: 103690
Oli DnaE-c	オシラトリア・リムネティカ（*Oscillatoria limnetica*） 株 'Solar Lake'	シアノバクテリア, 分類群: 262926

Oli DnaE-n	オシラトリア・リムネティカ 株 'Solar Lake'	シアノバクテリア, 分類群: 262926
PP-PhiEL ヘリカーゼ	シュードモナス・エルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*) ファージ phiEL	シュードモナス・エルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*) に感染するファージ, 分類群: 273133
PP-PhiEL ORF11	シュードモナス・アエルギノーサ ファージ phiEL	シュードモナス・エルギノーサ に感染するファージ, 分類群: 273133
PP-PhiEL ORF39	シュードモナス・アエルギノーサ ファージ phiEL	シュードモナス・エルギノーサ に感染するファージ, 分類群: 273133
PP-PhiEL ORF40	シュードモナス・アエルギノーサ ファージ phiEL	シュードモナス・エルギノーサ に感染するファージ, 分類群: 273133
Pfl Fha BIL	シュードモナス・フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*) Pf-5	植物の共生生物, 分類群: 220664
Plut RIR1	ペロディクティオン・ルテオラム (*Pelodictyon luteolum*) DSM 273	緑色硫黄細菌, 分類群: 319225
Pma-EXH1 GyrA	ペルセフォネラ・マリナ (*Persephonella marina*) EX-H1	分類群: 123214
Pma-ExH1 DnaE	ペルセフォネラ・マリナ EX-H1	分類群: 123214
Pna RIR1	ポラロモナス・ナフタレニボランス (*Polaromonas naphthalenivorans*) CJ2	分類群: 365044
Pnuc DnaB	ポリヌクレオバクター属 (*Polynucleobacter*) の種 QLW-P1DMWA-1	分類群: 312153
Posp-JS666 DnaB	ポラロモナス属 (*Polaromonas*) の種 JS666	分類群: 296591
Posp-JS666 RIR1	ポラロモナス属の種 JS666	分類群: 296591
Pssp-A1-1 Fha	シュードモナス属 (*Pseudomonas*) の種 A1-1	
Psy Fha	シュードモナス・シリンゲ (*Pseudomonas syringae*) 病原型 トマト 株 DC3000	植物 (トマト) の病原体, 分類群: 223283
Rbr-D9 GyrB	ラフィディオプシス・ブロキイ (*Raphidiopsis brookii*) D9	分類群: 533247
Rce RIR1	ロドスピリラム・センテナム (*Rhodospirillum centenum*) SW	分類群: 414684, ATCC 51521
Rer-SK121 DnaB	ロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) SK121	分類群: 596309
Rma DnaB	ロドサーマス・マリナス (*Rhodothermus marinus*)	好熱生物, 分類群: 29549
Rma-DSM4252 DnaB	ロドサーマス・マリナス DSM 4252	分類群: 518766
Rma-DSM4252 DnaE	ロドサーマス・マリナス DSM 4252	好熱生物, 分類群: 518766
Rsp RIR1	ロゼオバリウス属 (*Roseovarius*) の種 217	分類群: 314264

SaP-SETP12 dpol	サルモネラ(*Salmonella*)ファージSETP12	ファージ, 分類群: 424946
SaP-SETP3 ヘリカーゼ	サルモネラファージ SETP3	ファージ, 分類群: 424944
SaP-SETP3 dpol	サルモネラファージ SETP3	ファージ, 分類群: 424944
SaP-SETP5 dpol	サルモネラファージ SETP5	ファージ, 分類群: 424945
Sare DnaB	サリニスポラ・アレニコラ (*Salinispora arenicola*) CNS-205	分類群: 391037
Sav RecG ヘリカーゼ	ストレプトマイセス・アベルミティリス (*Streptomyces avermitilis*) MA-4680	分類群: 227882, ATCC 31267
Sel-PC6301 RIR1	シネココッカス・エロンガタス (*Synechococcus elongatus*) PCC 6301	分類群: 269084 Berkely 株6301 ～別名:亜種 PCC 6301 ～シノニム:アナシスティス・ヌデュランス(*Anacystis nudulans*)
Sel-PC7942 DnaE-c	シネココッカス・エロンガタス PC7942	分類群: 1140
Sel-PC7942 DnaE-n	シネココッカス・エロンガタス PC7942	分類群: 1140
Sel-PC7942 RIR1	シネココッカス・エロンガタス PC7942	分類群: 1140
Sel-PCC6301 DnaE-c	シネココッカス・エロンガタス PCC 6301および PCC7942	シアノバクテリア, 分類群: 269084, "Berkely 株6301 ～別名:シネココッカス属 (*Synechococcus*)の種PCC 6301 ～シノニム:アナシスティス・ヌデュランス
Sel-PCC6301 DnaE-n	シネココッカス・エロンガタス PCC 6301	シアノバクテリア, 分類群: 269084, "Berkely 株6301 ～別名:シネココッカス属の種PCC 6301 ～シノニム:アナシスティス・ヌデュランス
Sep RIR1	スタフィロコッカス・エピデルミディス (*Staphylococcus epidermidis*) RP62A	分類群: 176279
ShP-Sfv-2a-2457T-n プライマーゼ	シゲラ・フレクスネリ (*Shigella flexneri*) 2a 株 2457T	推定バクテリオファージ
ShP-Sfv-2a-301-n プライマーゼ	シゲラ・フレクスネリ 2a 株 301	推定バクテリオファージ
ShP-Sfv-5 プライマーゼ	シゲラ・フレクスネリ 5 株 8401	バクテリオファージ, 分離源エピデミック (isolation_source_epidemic), 分類群: 373384

SoP-SO1 dpol	ソダリス（*Sodalis*）ファージ SO-1	ファージ／分離源 (Phage/isolation_source)＝ “ソダリス・グロシニディウス（*Sodalis glossinidius*)株GA-SG, グロシナ・アウステニ（*Glossina austeni* (Newstead) の二次内部共生体”
Spl DnaX	スピルリナ・プラテンシス（*Spirulina platensis*）, 株 C1	シアノバクテリア, 分類群:1156
Sru DnaB	サリニバクター・ルバー (*Salinibacter ruber*) DSM 13855	分類群: 309807, 株 = “DSM 13855; M31”
Sru PolBc	サリニバクター・ルバー DSM 13855	分類群: 309807, 株 = “DSM 13855; M31”
Sru RIR1	サリニバクター・ルバー DSM 13855	分類群: 309807, 株 = “DSM 13855; M31”
Ssp DnaB	シネコシスティス属(*Synechocystis*)の種, 株 PCC6803	シアノバクテリア, 分類群:1148
Ssp DnaE-c	シネコシスティス属の種, 株 PCC6803	シアノバクテリア, 分類群:1148
Ssp DnaE-n	シネコシスティス属の種, 株 PCC6803	シアノバクテリア, 分類群:1148
Ssp DnaX	シネコシスティス属の種, 株 PCC6803	シアノバクテリア, 分類群:1148
Ssp GyrB	シネコシスティス属の種, 株 PCC6803	シアノバクテリア, 分類群:1148
Ssp-JA2 DnaB	シネココッカス属の種, 株 JA-2-3B'a(2-13)	シアノバクテリア, 分類群:321332
Ssp-JA2 RIR1	シネココッカス属の種 JA-2-3B'a(2-13)	シアノバクテリア, 分類群:321332
Ssp-JA3 DnaB	シネココッカス属の種 JA-3-3Ab	シアノバクテリア, 分類群:321327
Ssp-JA3 RIR1	シネココッカス属の種 JA-3-3Ab	シアノバクテリア, 分類群:321327
Ssp-PCC7002 DnaE-c	シネコシスティス属の種, 株 PCC 7002	シアノバクテリア, 分類群:32049
Ssp-PCC7002 DnaE-n	シネコシスティス属の種, 株 PCC 7002	シアノバクテリア, 分類群:32049
Ssp-PCC7335 RIR1	シネココッカス属の種 PCC 7335	分類群: 91464

StP-Twort ORF6	スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) ファージ Twort	ファージ, 分類群55510
Susp-NBC371 DnaB インテイン	スルフロバム属 (*Sulfurovum*)の種NBC37-1	分類群: 387093
Taq-Y51MC23 DnaE	サーマス・アクアティカス (*Thermus aquaticus*) Y51MC23	分類群: 498848
Taq-Y51MC23 RIR1	サーマス・アクアティカス Y51MC23	分類群: 498848
Tcu-DSM43183 RecA	サーモモノスポラ・クルバタ (*Thermomonospora curvata*) DSM 43183	分類群: 471852
Tel DnaE-c	サーモシネココッカス・エロンガタス (*Thermosynechococcus elongatus*) BP-1	シアノバクテリア, 分類群: 197221
Tel DnaE-n	サーモシネココッカス・エロンガタス BP-1	シアノバクテリア,
Ter DnaB-1	トリコデスミウム・エリスラエウム (*Trichodesmium erythraeum*) IMS101	シアノバクテリア, 分類群: 203124
Ter DnaB-2	トリコデスミウム・エリスラエウム IMS101	シアノバクテリア, 分類群: 203124
Ter DnaE-1	トリコデスミウム・エリスラエウム IMS101	シアノバクテリア, 分類群: 203124
Ter DnaE-2	トリコデスミウム・エリスラエウム IMS101	シアノバクテリア, 分類群: 203124
Ter DnaE-3c	トリコデスミウム・エリスラエウム IMS101	シアノバクテリア, 分類群: 203124
Ter DnaE-3n	トリコデスミウム・エリスラエウム IMS101	シアノバクテリア, 分類群: 203124
Ter GyrB	トリコデスミウム・エリスラエウム IMS101	シアノバクテリア, 分類群: 203124
Ter Ndse-1	トリコデスミウム・エリスラエウム IMS101	シアノバクテリア, 分類群: 203124
Ter Ndse-2	トリコデスミウム・エリスラエウム IMS101	シアノバクテリア, 分類群: 203124
Ter RIR1-1	トリコデスミウム・エリスラエウム IMS101	シアノバクテリア, 分類群: 203124
Ter RIR1-2	トリコデスミウム・エリスラエウム IMS101	シアノバクテリア, 分類群: 203124
Ter RIR1-3	トリコデスミウム・エリスラエウム IMS101	シアノバクテリア, 分類群: 203124
Ter RIR1-4	トリコデスミウム・エリスラエウム IMS101	シアノバクテリア, 分類群: 203124
Ter Snf2	トリコデスミウム・エリスラエウム IMS101	シアノバクテリア, 分類群: 203124
Ter ThyX	トリコデスミウム・エリスラエウム IMS101	シアノバクテリア, 分類群: 203124
Tfus RecA-1	サーモビフィダ・フスカ (*Thermobifida fusca*) YX	好熱生物, 分類群: 269800
Tfus RecA-2	サーモビフィダ・フスカ YX	好熱生物, 分類群: 269800

Tfus Tfu2914	サーモビフィダ・フスカ YX	好熱生物, 分類群: 269800
Thsp-K90 RIR1	チオアルカリビブリオ属 (*Thioalkalivibrio*) の種 K90mix	分類群: 396595
Tth-DSM571 RIR1	サーモアナエロバクテリウム・サーモサッカロリティカム (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*) DSM 571	分類群: 580327
Tth-HB27 DnaE-1	サーマス・サーモフィラス (*Thermus thermophilus*) HB27	好熱生物, 分類群: 262724
Tth-HB27 DnaE-2	サーマス・サーモフィラス HB27	好熱生物, 分類群: 262724
Tth-HB27 RIR1-1	サーマス・サーモフィラス HB27	好熱生物, 分類群: 262724
Tth-HB27 RIR1-2	サーマス・サーモフィラス HB27	好熱生物, 分類群: 262724
Tth-HB8 DnaE-1	サーマス・サーモフィラス HB8	好熱生物, 分類群: 300852
Tth-HB8 DnaE-2	サーマス・サーモフィラス HB8	好熱生物, 分類群: 300852
Tth-HB8 RIR1-1	サーマス・サーモフィラス HB8	好熱生物, 分類群: 300852
Tth-HB8 RIR1-2	サーマス・サーモフィラス HB8	好熱生物, 分類群: 300852
Tvu DnaE-c	サーモシネココッカス・ブルカナス (*Thermosynechococcus vulcanus*)	シアノバクテリア, 分類群: 32053
Tvu DnaE-n	サーモシネココッカス・ブルカナス	シアノバクテリア, 分類群: 32053
Tye RNR-1	サーモデスルホビブリオ・イエローストーニイ (*Thermodesulfovibrio yellowstonii*) DSM 11347	分類群: 289376
Tye RNR-2	サーモデスルホビブリオ・イエローストーニイ DSM 11347	分類群: 289376
古細菌		
Ape APE0745	アエロパイラム・ペルニクス (*Aeropyrum pernix*) K1	好熱生物, 分類群: 56636
Cme-boo Pol-II	カンジダタス・メタノレグラ・ボオネイ (*Candidatus Methanoregula boonei*) 6A8	分類群: 456442
Fac-Fer1 RIR1	フェロプラズマ・アシダルマナス (*Ferroplasma acidarmanus*), 分類群: 97393 および分類群 261390	株 Fer1, 鉄食
Fac-Fer1 SufB (Fac Pps1)	フェロプラズマ・アシダルマナス	株 fer1, 鉄食, 分類群: 97393
Fac-TypeI RIR1	フェロプラズマ・アシダルマナス タイプ I,	鉄食, 分類群 261390
Fac-typeI SufB (Fac Pps1)	フェロプラズマ・アシダルマナス	鉄食, 分類群: 261390

Hma CDC21	ハロアルクラ・マリスモルツイ (*Haloarcula marismortui*) ATCC 43049	分類群: 272569,
Hma Pol-II	ハロアルクラ・マリスモルツイ ATCC 43049	分類群: 272569,
Hma PolB	ハロアルクラ・マリスモルツイ ATCC 43049	分類群: 272569,
Hma TopA	ハロアルクラ・マリスモルツイ ATCC 43049	分類群: 272569
Hmu-DSM12286 MCM	ハロミクロビウム・ムコハタエイ (*Halomicrobium mukohataei*) DSM 12286	分類群: 485914 (ハロバクテリア)
Hmu-DSM12286 PolB	ハロミクロビウム・ムコハタエイ DSM 12286	分類群: 485914
Hsa-R1 MCM	ハロバクテリウム・サリナラム (*Halobacterium salinarum*) R-1	好塩生物, 分類群: 478009, 株 = "R1; DSM 671"
Hsp-NRC1 CDC21	ハロバクテリウム属 (*Halobacterium*) の種 NRC-1	好塩生物, 分類群: 64091
Hsp-NRC1 Pol-II	ハロバクテリウム・サリナラム NRC-1	好塩生物, 分類群: 64091
Hut MCM-2	ハロラブダス・ユタエンシス (*Halorhabdus utahensis*) DSM12940	分類群: 519442
Hut-DSM12940 MCM-1	ハロラブダス・ユタエンシス DSM12940	分類群: 519442
Hvo PolB	ハロフェラクス・ボルカニイ (*Haloferax volcanii*) DS70	分類群: 2246
Hwa GyrB	ハロクアドラタム・ワルスビイ (*Haloquadratum walsbyi*) DSM16790	好塩生物, 分類群: 362976, 株: DSM 16790 = HBSQ001
Hwa MCM-1	ハロクアドラタム・ワルスビイ DSM 16790	好塩生物, 分類群: 362976, 株: DSM 16790 = HBSQ001
Hwa MCM-2	ハロクアドラタム・ワルスビイ DSM 16790	好塩生物, 分類群: 362976, 株: DSM 16790 = HBSQ001
Hwa MCM-3	ハロクアドラタム・ワルスビイ DSM 16790	好塩生物, 分類群: 362976, 株: DSM 16790 = HBSQ001
Hwa MCM-4	ハロクアドラタム・ワルスビイ DSM 16790	好塩生物, 分類群: 362976, 株: DSM 16790 = HBSQ001

Hwa Pol-II-1	ハロクアドラタム・ワルスビイ DSM 16790	好塩生物, 分類群: 362976, 株: DSM 16790 = HBSQ001
Hwa Pol-II-2	ハロクアドラタム・ワルスビイ DSM 16790	好塩生物, 分類群: 362976, 株: DSM 16790 = HBSQ001
Hwa PolB-1	ハロクアドラタム・ワルスビイ DSM 16790	好塩生物, 分類群: 362976, 株: DSM 16790 = HBSQ001
Hwa PolB-2	ハロクアドラタム・ワルスビイ DSM 16790	好塩生物, 分類群: 362976, 株: DSM 16790 = HBSQ001
Hwa PolB-3	ハロクアドラタム・ワルスビイ DSM 16790	好塩生物, 分類群: 362976, 株: DSM 16790 = HBSQ001
Hwa RCF	ハロクアドラタム・ワルスビイ DSM 16790	好塩生物, 分類群: 362976, 株: DSM 16790 = HBSQ001
Hwa RIR1-1	ハロクアドラタム・ワルスビイ DSM 16790	好塩生物, 分類群: 362976, 株: DSM 16790 = HBSQ001
Hwa RIR1-2	ハロクアドラタム・ワルスビイ DSM 16790	好塩生物, 分類群: 362976, 株: DSM 16790 = HBSQ001
Hwa Top6B	ハロクアドラタム・ワルスビイ DSM 16790	好塩生物, 分類群: 362976, 株: DSM 16790 = HBSQ001
Hwa rPol A″	ハロクアドラタム・ワルスビイ DSM 16790	好塩生物, 分類群: 362976, 株: DSM 16790 = HBSQ001
Maeo Pol-II	メタノコッカス・アエオリカス (*Methanococcus aeolicus*) Nankai-3	分類群: 419665
Maeo RFC	メタノコッカス・アエオリカス Nankai-3	分類群: 419665
Maeo RNR	メタノコッカス・アエオリカス Nankai-3	分類群: 419665
Maeo-N3 ヘリカーゼ	メタノコッカス・アエオリカス Nankai-3	分類群: 419665
Maeo-N3 RtcB	メタノコッカス・アエオリカス Nankai-3	分類群: 419665

Maeo-N3 UDP GD	メタノコッカス・アエオリカス Nankai-3	分類群: 419665
Mein-ME PEP	メタノカルドコッカス・インフェルナス (*Methanocaldococcus infernus*) ME	好熱生物, 分類群: 573063
Mein-ME RFC	メタノカルドコッカス・インフェルナス ME	分類群: 573063
Memar MCM2	メタノクレウス・マリスニグリ (*Methanoculleus marisnigri*) JR1	分類群: 368407
Memar Pol-II	メタノクレウス・マリスニグリ JR1	分類群: 368407
Mesp-FS406 PolB-1	メタノカルドコッカス属 (*Methanocaldococcus*) の種 FS406-22	分類群: 644281
Mesp-FS406 PolB-2	メタノカルドコッカス属の種 FS406-22	分類群: 644281
Mesp-FS406 PolB-3	メタノカルドコッカス属の種 FS406-22	分類群: 644281
Mesp-FS406-22 LHR	メタノカルドコッカス属の種 FS406-22	分類群: 644281
Mfe-AG86 Pol-1	メタノカルドコッカス・フェルベンス (*Methanocaldococcus fervens*) AG86	分類群: 573064
Mfe-AG86 Pol-2	メタノカルドコッカス・フェルベンス AG86	分類群: 573064
Mhu Pol-II	メタノスピリラム・フンガテイ (*Methanospirillum hungatei*) JF-1	分類群 323259
Mja GF-6P	メタノコッカス・ジャンナスキイ(*Methanococcus jannaschii*) (メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ (*Methanocaldococcus jannaschii*) DSM 2661)	好熱生物, DSM 2661, 分類群: 2190
Mja ヘリカーゼ	メタノコッカス・ジャンナスキイ (メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ DSM 2661)	好熱生物, DSM 2661, 分類群: 2190
Mja Hyp-1	メタノコッカス・ジャンナスキイ (メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ DSM 2661)	好熱生物, DSM 2661, 分類群: 2190
Mja IF2	メタノコッカス・ジャンナスキイ (メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ DSM 2661)	好熱生物, DSM 2661, 分類群: 2190
Mja KlbA	メタノコッカス・ジャンナスキイ (メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ DSM 2661)	好熱生物, DSM 2661, 分類群: 2190
Mja PEP	メタノコッカス・ジャンナスキイ (メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ DSM 2661)	好熱生物, DSM 2661, 分類群: 2190

Mja Pol-1	メタノコッカス・ジャンナスキイ （メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ　DSM 2661）	好熱生物, DSM 2661, 分類群：2190
Mja Pol-2	メタノコッカス・ジャンナスキイ （メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ　DSM 2661）	好熱生物, DSM 2661, 分類群：2190
Mja RFC-1	メタノコッカス・ジャンナスキイ （メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ　DSM 2661）	好熱生物, DSM 2661, 分類群：2190
Mja RFC-2	メタノコッカス・ジャンナスキイ （メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ　DSM 2661）	好熱生物, DSM 2661, 分類群：2190
Mja RFC-3	メタノコッカス・ジャンナスキイ （メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ　DSM 2661）	好熱生物, DSM 2661, 分類群：2190
Mja RNR-1	メタノコッカス・ジャンナスキイ （メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ　DSM 2661）	好熱生物, DSM 2661, 分類群：2190
Mja RNR-2	メタノコッカス・ジャンナスキイ （メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ　DSM 2661）	好熱生物, DSM 2661, 分類群：2190
Mja RtcB (Mja Hyp-2)	メタノコッカス・ジャンナスキイ （メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ　DSM 2661）	好熱生物, DSM 2661, 分類群：2190
Mja TFIIB	メタノコッカス・ジャンナスキイ （メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ　DSM 2661）	好熱生物, DSM 2661, 分類群：2190
Mja UDP GD	メタノコッカス・ジャンナスキイ （メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ　DSM 2661）	好熱生物, DSM 2661, 分類群：2190
Mja r-Gyr	メタノコッカス・ジャンナスキイ （メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ　DSM 2661）	好熱生物, DSM 2661, 分類群：2190
Mja rPol A'	メタノコッカス・ジャンナスキイ （メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ　DSM 2661）	好熱生物, DSM 2661, 分類群：2190

Mja rPol A″	メタノコッカス・ジャンナスキイ （メタノカルドコッカス・ジャンナスキイ　DSM 2661）	好熱生物，DSM 2661， 分類群：2190
Mka CDC48	メタノパイラス・カンドレリ （*Methanopyrus kandleri*）AV19	好熱生物，分類群：190192
Mka EF2	メタノパイラス・カンドレリ　AV19	好熱生物，分類群：190192
Mka RFC	メタノパイラス・カンドレリ　AV19	好熱生物，分類群：190192
Mka RtcB	メタノパイラス・カンドレリ　AV19	好熱生物，分類群：190192
Mka VatB	メタノパイラス・カンドレリ　AV19	好熱生物，分類群：190192
Mth RIR1	メタノサーモバクター・サームオートトロフィカス （*Methanothermobacter　thermautotrophicus*） （メタノバクテリウム・サーモオートトロフィカム （*Methanobacterium thermoautotrophicum*））	好熱生物，ΔH 株
Mvu-M7 ヘリカーゼ	メタノカルドコッカス・ブルカニウス （*Methanocaldococcus vulcanius*）M7	分類群：579137
Mvu-M7 Pol-1	メタノカルドコッカス・ブルカニウス　M7	分類群：579137
Mvu-M7 Pol-2	メタノカルドコッカス・ブルカニウス　M7	分類群：579137
Mvu-M7 Pol-3	メタノカルドコッカス・ブルカニウス　M7	分類群：579137
Mvu-M7 UDP GD	メタノカルドコッカス・ブルカニウス　M7	分類群：579137
Neq Pol-c	ナノアルカエウム・エクイタンス （*Nanoarchaeum equitans*）Kin4-M	好熱生物，分類群：228908
Neq Pol-n	ナノアルカエウム・エクイタンスKin4- M	好熱生物，分類群：228908
Nma- ATCC43099 MCM	ナトリアルバ・マガディイ （*Natrialba magadii*）ATCC 43099	分類群：547559
Nma- ATCC43099 PolB-1	ナトリアルバ・マガディイ ATCC 43099	分類群：547559
Nma- ATCC43099 PolB-2	ナトリアルバ・マガディイ ATCC 43099	分類群：547559
Nph CDC21	ナトロノモナス・ファラオニス （*Natronomonas pharaonis*）DSM 2160	分類群：348780
Nph PolB-1	ナトロノモナス・ファラオニス　DSM 2160	分類群：348780
Nph PolB-2	ナトロノモナス・ファラオニス　DSM 2160	分類群：348780
Nph rPol A″	ナトロノモナス・ファラオニス　DSM 2160	分類群：348780
Pab CDC21-1	パイロコッカス・アビシ （*Pyrococcus abyssi*）	好熱生物，株 Orsay， 分類群：29292

Pab CDC21-2	パイロコッカス・アビシ	好熱生物, 株 Orsay, 分類群: 29292
Pab IF2	パイロコッカス・アビシ	好熱生物, 株 Orsay, 分類群: 29292
Pab KlbA	パイロコッカス・アビシ	好熱生物, 株 Orsay, 分類群: 29292
Pab Lon	パイロコッカス・アビシ	好熱生物, 株 Orsay, 分類群: 29292
Pab Moaa	パイロコッカス・アビシ	好熱生物, 株 Orsay, 分類群: 29292
Pab Pol-II	パイロコッカス・アビシ	好熱生物, 株 Orsay, 分類群: 29292
Pab RFC-1	パイロコッカス・アビシ	好熱生物, 株 Orsay, 分類群: 29292
Pab RFC-2	パイロコッカス・アビシ	好熱生物, 株 Orsay, 分類群: 29292
Pab RIR1-1	パイロコッカス・アビシ	好熱生物, 株 Orsay, 分類群: 29292
Pab RIR1-2	パイロコッカス・アビシ	好熱生物, 株 Orsay, 分類群: 29292
Pab RIR1-3	パイロコッカス・アビシ	好熱生物, 株 Orsay, 分類群: 29292
Pab RtcB (Pab Hyp-2)	パイロコッカス・アビシ	好熱生物, 株 Orsay, 分類群: 29292
Pab VMA	パイロコッカス・アビシ	好熱生物, 株 Orsay, 分類群: 29292
Par RIR1	パイロバキュラム・アルセナティカム (*Pyrobaculum arsenaticum*) DSM 13514	分類群: 340102
Pfu CDC21	パイロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*)	好熱生物, 分類群: 186497, DSM3638
Pfu IF2	パイロコッカス・フリオサス	好熱生物, 分類群: 186497, DSM3638
Pfu KlbA	パイロコッカス・フリオサス	好熱生物, 分類群: 186497, DSM3638
Pfu Lon	パイロコッカス・フリオサス	好熱生物, 分類群: 186497, DSM3638
Pfu RFC	パイロコッカス・フリオサス	好熱生物, DSM3638, 分類群: 186497
Pfu RIR1-1	パイロコッカス・フリオサス	好熱生物, 分類群: 186497, DSM3638

Pfu RIR1-2	パイロコッカス・フリオサス	好熱生物, 分類群: 186497, DSM3638
Pfu RtcB (Pfu Hyp-2)	パイロコッカス・フリオサス	好熱生物, 分類群: 186497, DSM3638
Pfu TopA	パイロコッカス・フリオサス	好熱生物, 分類群: 186497, DSM3638
Pfu VMA	パイロコッカス・フリオサス	好熱生物, 分類群: 186497, DSM3638
Pho CDC21-1	パイロコッカス・ホリコシイ (*Pyrococcus horikoshii*) OT3	好熱生物, 分類群: 53953
Pho CDC21-2	パイロコッカス・ホリコシイ OT3	好熱生物, 分類群: 53953
Pho IF2	パイロコッカス・ホリコシイ OT3	好熱生物, 分類群: 53953
Pho KlbA	パイロコッカス・ホリコシイ OT3	好熱生物, 分類群: 53953
Pho LHR	パイロコッカス・ホリコシイ OT3	好熱生物, 分類群: 53953
Pho Lon	パイロコッカス・ホリコシイ OT3	好熱生物, 分類群: 53953
Pho Pol I	パイロコッカス・ホリコシイ OT3	好熱生物, 分類群: 53953
Pho Pol-II	パイロコッカス・ホリコシイ OT3	好熱生物, 分類群: 53953
Pho RFC	パイロコッカス・ホリコシイ OT3	好熱生物, 分類群: 53953
Pho RIR1	パイロコッカス・ホリコシイ OT3	好熱生物, 分類群: 53953
Pho RadA	パイロコッカス・ホリコシイ OT3	好熱生物, 分類群: 53953
Pho RtcB (Pho Hyp-2)	パイロコッカス・ホリコシイ OT3	好熱生物, 分類群: 53953
Pho VMA	パイロコッカス・ホリコシイ OT3	好熱生物, 分類群: 53953
Pho r-Gyr	パイロコッカス・ホリコシイ OT3	好熱生物, 分類群: 53953
Psp-GBD Pol	パイロコッカス属 (*Pyrococcus*) の種 GB-D	好熱生物
Pto VMA	ピクロフィラス・トリダス (*Picrophilus torridus*), DSM 9790	DSM 9790, 分類群: 263820, 好熱好酸性生物
Smar 1471	スタフィロサーマス・マリナス (*Staphylothermus marinus*) F1	分類群: 399550
Smar MCM2	スタフィロサーマス・マリナス F1	分類群: 399550
Tac-ATCC25905 VMA	サーモプラズマ・アシドフィラム (*Thermoplasma acidophilum*), ATCC 25905	好熱生物, 分類群: 2303
Tac-DSM1728 VMA	サーモプラズマ・アシドフィラム , DSM1728	好熱生物, 分類群: 2303
Tag Pol-1 (Tsp-TY Pol-1)	サーモコッカス・アグレガンス (*Thermococcus aggregans*)	好熱生物, 分類群: 110163
Tag Pol-2 (Tsp-TY Pol-2)	サーモコッカス・アグレガンス	好熱生物, 分類群: 110163

Tag Pol-3 (Tsp-TY Pol-3)	サーモコッカス・アグレガンス	好熱生物, 分類群: 110163
Tba Pol-II	サーモコッカス・バロフィラス (*Thermococcus barophilus*) MP	分類群: 391623
Tfu Pol-1	サーモコッカス・フミコランス (*Thermococcus fumicolans*)	好熱生物, 分類群: 46540
Tfu Pol-2	サーモコッカス・フミコランス	好熱生物, 分類群: 46540
Thy Pol-1	サーモコッカス・ハイドロサーマリス (*Thermococcus hydrothermalis*)	好熱生物, 分類群: 46539
Thy Pol-2	サーモコッカス・ハイドロサーマリス	好熱生物, 分類群: 46539
Tko CDC21-1	サーモコッカス・コダカラエンシス (*Thermococcus kodakaraensis*) KOD1	好熱生物, 分類群: 69014
Tko CDC21-2	サーモコッカス・コダカラエンシス KOD1	好熱生物, 分類群: 69014
Tko ヘリカーゼ	サーモコッカス・コダカラエンシス KOD1	好熱生物, 分類群: 69014
Tko IF2	サーモコッカス・コダカラエンシス KOD1	好熱生物, 分類群: 69014
Tko KlbA	サーモコッカス・コダカラエンシス KOD1	好熱生物, 分類群: 69014
Tko LHR	サーモコッカス・コダカラエンシス KOD1	好熱生物, 分類群: 69014
Tko Pol-1 (Pko Pol-1)	パイロコッカス (*Pyrococcus*) / サーモコッカス・コダカラエンシス KOD1	好熱生物, 分類群: 69014
Tko Pol-2 (Pko Pol-2)	パイロコッカス/サーモコッカス・コダカラエンシス KOD1	好熱生物, 分類群: 69014
Tko Pol-II	サーモコッカス・コダカラエンシス KOD1	好熱生物, 分類群: 69014
Tko RFC	サーモコッカス・コダカラエンシス KOD1	好熱生物, 分類群: 69014
Tko RIR1-1	サーモコッカス・コダカラエンシス KOD1	好熱生物, 分類群: 69014
Tko RIR1-2	サーモコッカス・コダカラエンシス KOD1	好熱生物, 分類群: 69014
Tko RadA	サーモコッカス・コダカラエンシス KOD1	好熱生物, 分類群: 69014
Tko TopA	サーモコッカス・コダカラエンシス KOD1	好熱生物, 分類群: 69014
Tko r-Gyr	サーモコッカス・コダカラエンシス KOD1	好熱生物, 分類群: 69014
Tli Pol-1	サーモコッカス・リトラリス (*Thermococcus litoralis*)	好熱生物, 分類群: 2265
Tli Pol-2	サーモコッカス・リトラリス	好熱生物, 分類群: 2265
Tma Pol	サーモコッカス・マリナス (*Thermococcus marinus*)	分類群: 187879
Ton-NA1 LHR	サーモコッカス・オンヌリネウス (*Thermococcus onnurineus*) NA1	分類群: 523850
Ton-NA1 Pol	サーモコッカス・オンヌリネウス NA1	分類群: 342948
Tpe Pol	サーモコッカス・ペプトノフィラス (*Thermococcus peptonophilus*) 株 SM2	分類群: 32644
Tsi-MM739 Lon	サーモコッカス・シビリカス (*Thermococcus sibiricus*) MM 739	好熱生物, 分類群: 604354

Tsi-MM739 Pol-1	サーモコッカス・シビリカス MM 739	分類群: 604354
Tsi-MM739 Pol-2	サーモコッカス・シビリカス MM 739	分類群: 604354
Tsi-MM739 RFC	サーモコッカス・シビリカス MM 739	分類群: 604354
Tsp AM4 RtcB	サーモコッカス属（*Thermococcus*）の種 AM4	分類群: 246969
Tsp-AM4 LHR	サーモコッカス属の種 AM4	分類群: 246969
Tsp-AM4 Lon	サーモコッカス属の種 AM4	分類群: 246969
Tsp-AM4 RIR1	サーモコッカス属の種 AM4	分類群: 246969
Tsp-GE8 Pol-1	サーモコッカス属の種 GE8	好熱生物, 分類群: 105583
Tsp-GE8 Pol-2	サーモコッカス属の種 GE8	好熱生物, 分類群: 105583
Tsp-GT Pol-1	サーモコッカス属の種 GT	分類群: 370106
Tsp-GT Pol-2	サーモコッカス属の種 GT	分類群: 370106
Tsp-OGL-20P Pol	サーモコッカス属の種 OGL-20P	分類群: 277988
Tthi Pol	サーモコッカス・チオレデュセンス（*Thermococcus thioreducens*）	超好熱生物
Tvo VMA	サーモプラズマ・ボルカニウム（*Thermoplasma volcanium*）GSS1	好熱生物, 分類群: 50339
Tzi Pol	サーモコッカス・ジリジイ（*Thermococcus zilligii*）	分類群: 54076
Unc-ERS PFL	未培養古細菌 Gzfos13E1	分離源(isolation source)="イール川堆積物（Eel River sediment）", クローン = "GZfos13E1", 分類群: 285397
Unc-ERS RIR1	未培養古細菌 GZfos9C4	分離源 = "イール川堆積物", 分類群: 285366, クローン = "GZfos9C4"
Unc-ERS RNR	未培養古細菌 GZfos10C7	分離源 = "イール川堆積物", クローン = "GZfos10C7", 分類群: 285400
Unc-MetRFS MCM2	未培養古細菌 (ライスクラスター(Rice Cluster) I)	水田土壌由来の富化されたメタン生成型共同体, 分類群: 198240

【０１３３】

いくつかの態様において、外来性ポリペプチドのコーディング配列は、3つ（またはさらに多く）の部分に分割されてよい。

【０１３４】

分割型インテインは、2つ以上の異種性のエクステインポリペプチドの、効率的な翻訳後スプライシングを媒介することが可能である。しかしながら、得られるスプライシング産物は通常、スプライシングされたエクステインポリペプチドの、アミノ末端側とカルボキシ末端側とのジャンクションに導入された、アミノ酸3～5個のインテイン配列を含んでいる。いくつかの例においては、これらの3～5個の「インテインフットプリント」（

または単に「フットプリント」）アミノ酸は、スプライシングされた最終的なポリペプチドの機能に大きな影響を与えることはないが、他の例においては、そのような挿入されたアミノ酸の存在は、最終産物の構造および機能に対して負の影響を及ぼす可能性がある。そのため、トランススプライシングされた産物において、インテインフットプリントを最小限に抑えるか、またはさらに、インテインフットプリントを完全に回避することが、有益であり得る。

【０１３５】

1つの局面において、インテインフットプリントインサートは、本明細書に記載される方法および組成物において、最小限に抑えられてよく、またはさらに、完全に回避されてもよい。これを達成するために、たとえば、既知の分割型インテインのフットプリントと比べて標的タンパク質の配列を解析して、分割型インテインのフットプリントに一致するかまたはよく似ている、標的内の配列を同定することが可能である。

【０１３６】

（表４）分割型インテインのフットプリントを最小限に抑えるための例示的な配列

分割型インテインのID	6アミノ酸の従来型フットプリント		試験されたフットプリント	タンパク質トランススプライシングが高率となる最小限のフットプリント
	N末端側	C末端側		
分割型Aha, 分割型Sel	AEY	CFN	AEYCFN, AEYCF, AEYC, AEY EYCFN, EYCF, EYC, EY, YCFN, YCF, YC, Y CFN, CF, C	AEY(GFPを用いた分割型Ahaについてのみ)
分割型gp41.1	SGY	SSS	SGYSSS, SGYSS, SGYS, SGY GYSSS, GYSS, GYS, GY YSSS, YSS, YS, Y SSS, SS, S	GYS
分割型IMPDH	GGG	SIC	GGGSIC, GGGSI, GGGS, GGG GGSIC, GGSI, GGS, GG GSIC, GSI, GS, G SIC, SI, S	GS
Nrdj-1	NPC	SEI	NPCSEI, NPCSE, NPCS, NPC PCSEI, PCSE, PCS, PC CSEI, CSE, CS, C SEI, SE, S	CS

アミノ酸の略称：
A：アラニン
C：システイン
E：グルタミン酸
F：フェニルアラニン
G：グリシン
I：イソロイシン
N：アスパラギン
P：プロリン
S：セリン
Y：チロシン

【０１３７】

その後、所与の標的タンパク質において天然に存在するフットプリントを有するそのような分割型インテインを使用して、異種性のエクステイン・インテイン融合体を複数設計し、それらを別々に発現させることが可能であり、かつそれにより、スプライシングされたポリペプチド産物において、天然に存在しないアミノ酸の挿入を最小限に抑えるか、またはさらに、回避することが可能である。たとえば、標的タンパク質の配列を、分割型インテインのフットプリント配列と一致する配列に関してスクリーニングした後で、標的ポ

リペプチド断片がそれぞれ分割型インテインのアミノ末端側断片およびカルボキシ末端側断片に融合していて、フットプリントのアミノ酸がエクステインの融合ポリペプチド配列には存在しない、というアミノ末端側融合体およびカルボキシ末端側融合体をコードする配列を、調製することが可能である。この状況においては、エクステイン配列の切断および結合の際、インテインフットプリントインサートは天然の標的ポリペプチド配列を再構成して、天然の標的ポリペプチドとアミノ酸配列の差異がない、スプライシングされた標的ポリペプチドを生じさせる。つまり、該分割型インテインのフットプリントインサートとしての特徴は、技術的には依然として存在しているが、その配列は、標的タンパク質に存在する配列と一致しており、その結果、生じたスプライシングポリペプチド産物には非天然のフットプリントが存在しない。

【０１３８】

いくつかの例においては、所与の標的ポリペプチドが、分割型インテインのフットプリントとの完全一致を欠いている可能性があり、または、完全一致が、標的タンパク質のアミノ末端もしくはカルボキシ末端のかなり近くに位置していて、そのような位置で標的タンパク質をコードする配列を分割しても、標的タンパク質のコーディング配列は、送達ベクターに収まるそれぞれの断片へと切り分けられることはない、という可能性がある。そのような例であったとしても、標的タンパク質内において、分割型インテインのフットプリント配列と類似しているが同一ではない配列を同定することが依然として有益であり得る。そのような類似性は、たとえば、フットプリントアミノ酸5つのうちの4つの一致や、フットプリントアミノ酸5つのうちの3つの一致であってよく、またはフットプリントアミノ酸5つのうちの2つであったとしてもよい。この文脈における類似性にはまた、たとえば、フットプリントにおけるアミノ酸と類似の特性を有するアミノ酸、たとえば天然に存在するアミノ酸にとって保存的置換となるアミノ酸などを包含させることも含まれてよく、または、一致しているものと保存的置換との組み合わせを包含させることも含まれてよい。フットプリントの類似性に基づくそのようなアプローチは、標的タンパク質の有益な位置においてインテインのフットプリントとの完全一致を同定可能である状況への相似を使用して、インテインのフットプリントを最小限に抑えること、および／またはスプライシングされた標的タンパク質の機能に対するその影響を最小限に抑えることが可能である。したがって、天然に存在するタンパク質配列または所望の標的タンパク質配列と比べて、差異が4つ以下の、3つ以下の、2つ以下の、1つ以下の、または差異がない、インテインフットプリントを有するスプライシング産物が、本明細書に記載されるように産生され得る。

【０１３９】

いくつかの態様において、「操作された」分割型インテインは、1つまたは複数のアミノ酸または核酸の、欠失、付加、置換、または側鎖修飾によって、天然に存在するポリペプチドまたは核酸とは異なっているが、それにもかかわらず、天然に存在する分割型インテイン配列の特異的な機能または生物学的活性の1つまたは複数を保持している。アミノ酸置換には、あるアミノ酸が、天然に存在する別のアミノ酸残基に、または非従来型のアミノ酸残基に置換されるという変更が含まれる。いくつかの置換は「保存的」であるとして分類され得るが、この場合、ポリペプチドに含まれるアミノ酸残基は、極性、側鎖の機能性、またはサイズのいずれかに関して類似の特徴を有する、天然に存在する別のアミノ酸と置換される。本明細書に記載されるバリアントに包含される置換はまた、「非保存的」であってもよく、この場合、ペプチドに存在するアミノ酸残基は、異なる特性を有するアミノ酸に置換される（たとえば、荷電アミノ酸または疎水性アミノ酸が、非荷電アミノ酸または親水性アミノ酸に置換される）か、あるいは天然に存在するアミノ酸が、非従来型のアミノ酸に置換される。

【０１４０】

1つの態様において、分割型インテインはSEQ ID No: 1～46のうちの少なくとも2つを含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 1およびSEQ ID NO: 2を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 3およびSEQ ID NO: 4

を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 5およびSEQ ID NO: 6を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 7およびSEQ ID NO: 8を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 9およびSEQ ID NO: 10を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 11およびSEQ ID NO: 12を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 13およびSEQ ID NO: 14を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 15およびSEQ ID NO: 16を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 17およびSEQ ID NO: 18を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 19およびSEQ ID NO: 20を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 21およびSEQ ID NO: 22を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 23およびSEQ ID NO: 24を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 25およびSEQ ID NO: 26を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 27およびSEQ ID NO: 28を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 29およびSEQ ID NO: 30を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 31およびSEQ ID NO: 32を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 33およびSEQ ID NO: 34を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 35およびSEQ ID NO: 36を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 37およびSEQ ID NO: 38を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 39およびSEQ ID NO: 40を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 41およびSEQ ID NO: 42を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 43およびSEQ ID NO: 44を含む。別の態様において、分割型インテインはSEQ ID NO: 45およびSEQ ID NO: 46を含む。

【０１４１】

対応するインテインを伴った、具体的なジストロフィン断片、ジスフェリン断片、ユートロフィン断片、およびミニジストロフィン断片の例示的な配列は、本明細書において実施例2に提供される。

【０１４２】

MSEC

ある態様において、本明細書に記載される分割型インテイン構築物は、細胞型特異的な発現から恩恵を受け得る。そのように設計することで、最も必要とされる場所における標的タンパク質の発現であって、高レベルの発現、中レベルの発現、低レベルの発現、または調節された発現を含めた発現を確実にすることが可能であるだけでなく、標的以外の細胞または組織における異所性の発現による潜在的な負の影響を回避または制限することもまた可能になる。したがって、組織特異的発現カセットを包含させることで、トランスジーンの導入による治療的恩恵を最大化することが可能である。そのように設計することで、たとえば、感染は標的以外の細胞または組織にも生じ得るが、トランスジーンポリペプチドの発現は、実質的に所望の細胞型または組織型においてのみ生じる、というベクターの全身投与を促進または容認することもまた可能になる。たとえば、所与の組織または細胞型への形質導入に関して指向性を有するかまたは強化された指向性を有するベクターと組み合わせて使用される場合、本明細書に記載される標的タンパク質・分割型インテイン構築物のそれぞれの発現を駆動するために、組織特異的発現カセットを使用することは、非常に有益であり得る。2種類以上のベクターを送達する状況において使用される場合、複数の組織特異的発現カセットが、たとえば、mRNAの産生もしくは蓄積、またはタンパク質の翻訳、産生、もしくは蓄積などがバランスの取れた割合で生じるように、使用され得る。

【０１４３】

「組織特異的発現カセット」とは、該用語が本明細書において使用される場合、ある特定の組織または細胞型に限定された様式で、標的タンパク質の発現を提供するものである。この文脈において「特異的な」または「特異的な様式で」とは、標的組織または標的細胞型における構築物からの発現が、他の組織または他の細胞型におけるものと比べて、少

なくとも5倍高いこと、たとえば、少なくとも5倍高いこと、10倍高いこと、15倍高いこと、20倍高いこと、またはさらに高いことを意味する。発現は、たとえば、mRNAの産生もしくは蓄積のレベルにおいて、またはタンパク質の翻訳、産生、もしくは蓄積のレベルにおいて、測定することが可能である。1つの態様において、組織特異的発現カセットは、本明細書に記載されるような「筋特異的発現カセット」または「MSEC」である。MSECは、筋細胞または筋組織に特異的な様式、該用語は本明細書において上で定義されているが、そのような様式で、連結されている構築物の発現を駆動する。

【0144】

MSECは概して、筋特異的なプロモーターおよびエンハンサーのエレメントを含む。骨格筋および心筋において異種性タンパク質の発現を駆動する目的で、rAAVベクターにおいて使用するために設計される筋特異的発現カセットの例および議論については、たとえば、参照により本明細書に組み入れられるSalva et al., Molecular Therapy 15: 320-329 (2007)を参照されたい。筋特異的発現カセットにはとりわけ、たとえば、筋型クレアチンキナーゼ（MCK）、骨格筋α-アクチン、およびα-ミオシン重鎖遺伝子を含めた筋特異的遺伝子に由来する、プロモーター配列およびエンハンサー配列のエレメントが含まれる。マウスのMCK遺伝子は、転写開始部位のおよそ1.2 kb上流に位置する206 bpのエンハンサーと、358 bpの近位プロモーターとを含む。しかしながら、遺伝子療法ベクター、たとえばAAVなどにおける使用に関し、本明細書において論じられるように、ウイルスにはパッケージング限界があるために、所与のベクターのペイロードタンパク質のコーディング配列の長さを最大化するためには、筋特異的発現を駆動するように設計される調節エレメントを最小限（約800 bp以下）に抑えることが必要である。したがって、本明細書に記載される方法および組成物に有用な筋特異的発現カセットは、筋原性調節因子のための結合部位を提供する短縮型／改変型の筋特異的調節エレメント、ならびにInr（イニシエーターエレメント）および／またはTATAボックス配列から構成され、かつ該カセットは、たとえば、筋特異的遺伝子の5'非翻訳領域由来の追加の配列を含んでもよい。Salvaらが記載しているMHCK7カセットは、本明細書に記載される方法および組成物において有用なMSECの、単なる一例である。該カセットはMM14ミオサイトにおいて、構成的に活性なCMVプロモーターよりも高度に発現を駆動するが、非筋細胞（たとえば、HEK 293線維芽細胞、マウスL細胞線維芽細胞、およびJAWSII樹状細胞など）においては本質的に不活性である。参照により本明細書に組み入れられる米国特許第10,479,821号に記載される発現カセットもまた参照されたい。単なる一例であるが、本明細書に記載されかつCK8と称されるSEQ ID NO: 19は、心筋および骨格筋において高度に活性である。そのようなMSEC配列のバリアントもまた、治療用トランスジーンの高度に活性であって筋特異的な発現をもたらすことが可能であることが意図される。たとえば、そのようなMSECに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはより高い同一性を有する配列もまた、本明細書に記載される方法および組成物において有用であり得る。当業者であれば、たとえば、Salvaらの刊行物に記載されているアッセイを用いて、筋細胞または筋組織における所与のMSECの活性を決定することが可能である。

【0145】

薬学的組成物

本明細書において、対象においてさまざまな異なる疾患および／または障害を処置または予防するのに有用なベクター組成物が提供される。疾患および障害の重要なサブセットの1つは、筋疾患および筋障害である。1つの態様において、組成物は薬学的組成物である。組成物は、外来性ポリヌクレオチドまたは治療物質をコードする少なくとも2種類のベクターの、治療的有効量または予防的有効量を含み得る。この少なくとも2種類のベクターは、分割型インテインを利用して、大きなタンパク質をコードする核酸を所与の細胞に送達することを、支援する。

【0146】

組成物は任意で担体を含んでよく、これはたとえば、薬学的に許容される担体などであ

る。薬学的に許容される担体は、投与される具体的な組成物によってある程度決定され、また、該組成物を投与するのに使用される特定の方法によってもある程度決定される。したがって、薬学的組成物に適した多様な製剤が存在している。非経口投与のために適切な製剤は、たとえば、静脈内経路用に、筋肉内経路用に、皮内経路用に、腹腔内経路用に、および皮下経路用に、製剤化され得る。担体には、滅菌されている等張な水性注射溶液が含まれてよく、これには、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および、意図するレシピエントの血液に対して製剤を等張にする溶質が含まれ得、かつ、担体には水性の滅菌懸濁液および非水性の滅菌懸濁液も含まれてよく、これには、懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、保存剤、リポソーム、マイクロスフェア、およびエマルションが含まれ得る。

【０１４７】

1つの態様において、組成物は筋肉内への送達用に製剤化される。

【０１４８】

治療用組成物は、本明細書に記載されるベクターとともに、生理学的に忍容される担体を含み、該ベクターは有効成分として、それら担体中に溶解または分散している。本明細書において使用される場合、「薬学的に許容される」との用語、「生理学的に忍容される」との用語、およびそれらの文法上の変体は、それらが組成物、担体、希釈剤、および試薬を指している際には、互換性をもって使用され、かつ、望ましくない生理学的作用、たとえば、悪心、めまい、胃の不調等を引き起こすことなく、哺乳動物に投与可能であるか、または哺乳動物においてそれらを引き起こすことのない物質を表す。薬学的に許容される担体は、該担体と混合される作用物質に対する免疫応答の発生を、該発生が望まれない限り、促進することはない。その中に溶解または分散している有効成分を含む薬学的組成物の調製物は、当技術分野において理解されており、かつ該調製物を、製剤に基づいて限定する必要はない。典型的にはそのような組成物は、液体である溶液または懸濁液のいずれかと同様に注入可能であるように調製される；しかしながら、使用前に液体中で溶液または懸濁液とするのに適した固体の形状で調製されてもよい。調製物はまた、乳化されてもよく、またはリポソーム組成物として提供されてもよい。有効成分は賦形剤と混合されてよく、ここで賦形剤は、薬学的に許容されるものであり、かつ該有効成分に対して適合性であり、かつ、本明細書に記載される治療方法において使用するために適切な量である。適切な賦形剤には、たとえば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等、およびそれらの組み合わせが含まれる。加えて、望ましい場合には、組成物は少量の補助物質を含んでよく、これはたとえば、有効成分の有効性を強化する、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤等である。本明細書に記載される方法において使用される治療用組成物は、その成分の、薬学的に許容される塩を含んでよい。薬学的に許容される塩には、酸付加塩（ポリペプチドの遊離のアミノ基と形成される）が含まれ、これは、たとえば塩酸もしくはリン酸などといった無機酸と形成されるか、または、たとえば酢酸、酒石酸、マンデル酸などといった有機酸と形成されるものである。遊離のカルボキシル基と形成される塩はまた、たとえばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄などといった無機塩基に由来してもよく、かつ、たとえばイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどといった有機塩基に由来してもよい。生理学的に忍容される担体は、当技術分野において周知である。液体である例示的な担体は、有効成分と水以外を含まない滅菌水性溶液であるか、または、生理的pH値にある緩衝剤、たとえばリン酸ナトリウムなどを含むか、生理食塩水を含むか、もしくはそれらの両方、たとえばリン酸緩衝生理食塩水などを含む、滅菌水性溶液である。さらに、水性担体は複数種の緩衝塩を含んでよく、かつ、たとえば塩化ナトリウムおよび塩化カリウムなどといった塩、デキストロース、ポリエチレングリコール、ならびに他の溶質を含んでよい。液体組成物はまた、水に加えて液相を含んでもよく、かつ、水を含まずに液相を含んでもよい。そのようなさらなる液相の例は、グリセリン、たとえば綿実油などといった植物油、および水と油とのエマルションである。本明細書において投与されようとするベクターの量であって、ある特定の障害または異常を処置するのに有効であるベクターの量は、該障害または異常の性質や、治療物質の発現に応じて変

化するものであり、かつ、標準的な臨床技術によって決定することが可能である。

【０１４９】

薬学的組成物においては、当業者に公知である任意の適切な担体が利用可能であるが、担体のタイプは、投与様式に応じて変化する。本明細書に記載される用途のための組成物は、たとえば、局所投与、経口投与、鼻投与、静脈内投与、頭蓋内投与、腹腔内投与、皮下投与、または筋肉内投与を含めた、任意の好適な投与様式用に製剤化されてよい。非経口投与、たとえば筋肉内注射または皮下注射に関し、担体は、好ましくは水、生理食塩水、アルコール、油脂、ワックス、または緩衝剤を含む。あるいは、本明細書に記載される組成物は、凍結乾燥物として製剤化されてよい。化合物はまた、リポソーム中に封入されてもよい。

【０１５０】

用法および用量

本明細書に記載される方法および組成物を用いた処置には、疾患の発病の予防（prophylaxis）／予防（prevention）と、進行中の疾患の治療との両方が含まれる。予防または治療は、1つのタイムポイントまたは複数のタイムポイントにおける、1回の直接注射によって達成され得る。投与はまた、複数の部位に対してほぼ同時であってもよい。患者または対象には哺乳動物が含まれ、これはたとえば、ヒト、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ブタ、およびヒツジといった動物、ならびに他の獣医学上の対象などである。好ましくは、患者または対象はヒトである。

【０１５１】

1つの局面において、本明細書に記載される方法は、対象において疾患または障害（たとえば筋疾患または筋障害）を処置するための方法を提供する。1つの態様において、対象は哺乳動物であり得る。別の態様において、哺乳動物はヒトであり得るが、本アプローチは全ての哺乳動物に対して有効である。本方法は、本明細書に記載されるベクターを薬学的に許容される担体中に含む薬学的組成物の有効量を対象に投与する段階を含む。

【０１５２】

作用物質の投薬量の範囲は、治療用タンパク質の有効性や発現レベルに応じて変化するものであり、かつ該範囲は、所望の効果を生じさせるのに、たとえば、処置されようとする疾患の少なくとも1つの症状の低減を生じさせるのに、十分に多い量を含む。投薬量は、許容できない有害な副作用を引き起こすほどに多量とすべきではない。一般的には投薬量は、ベクターから発現する外来性タンパク質のタイプ（たとえば、組み換えポリペプチド、ペプチド、ペプチドミメティック、小分子等）によって変化し、治療用タンパク質の特徴（たとえば、ジストロフィン、ユートロフィン、ジスフェリン等）によって変化し、かつ、患者の年齢、状態、および性別によっても変化する。当業者であれば、投薬量を決定することが可能であり、かつ、何らかの合併症の場合に、個々の医師が投薬量を調節することも可能である。

【０１５３】

いくつかの態様において、ベクターは、少なくとも5の、少なくとも10の、少なくとも20の、少なくとも30の、少なくとも40の、少なくとも50の、少なくとも100の、少なくとも200の、少なくとも500の、またはより高い、感染多重度（ＭＯＩ）で投与される。

【０１５４】

ある態様において、ベクターは、少なくとも$1 x 10^5$個の、$1 x 10^6$個の、$1 x 10^7$個の、$1 x 10^8$個の、$1 x 10^9$個の、$1 x 10^{10}$個の、$1 x 10^{11}$個の、$1 x 10^{12}$個の、またはそれより多いウイルス粒子、という力価で投与される。

【０１５５】

反復投与は、治療の有効性を維持するために、必要に応じて実施され得る。本明細書において使用される場合、「治療的有効量」との用語は、ベクターの量または発現した治療物質の量であって、疾患の少なくとも1種の症状において、統計学的に有意であって測定可能な変化を生じさせるのに十分な量を指す（以下の「有効性の測定」を参照されたい）

。あるいは、治療的有効量とは、ベクターの量または発現した治療用タンパク質の量であって、対象の疾患に関連するバイオマーカーの発現レベルにおいて、統計学的に有意であって測定可能な変化を生じさせるのに十分な量である。そのような有効量は、所与の作用物質についての臨床試験および動物試験において評価することが可能である。

【０１５６】

ベクター組成物は、ある特定の部位に直接投与されてよく（たとえば、筋肉内注射、静脈内へ、ある特定の器官内へ）または経口投与されてもよい。作用物質はまた、静脈内に（ボーラス注入または連続注入によって）、吸入によって、鼻腔内に、腹腔内に、筋肉内に、皮下に、腔内に、送達され得、かつ作用物質は、望ましい場合にはペリスタルティック方式によって、または当業者が公知の他の方式によって送達され得ることもまた、本明細書において意図される。作用物質は、それが望ましい場合、全身投与されてよい。

【０１５７】

少なくとも1種類の作用物質を含む治療用組成物は、一般的に、単位剤形として投与することが可能である。「単位剤形」との用語は、治療用組成物に関して使用される場合、対象にとって単位の投薬量として適している、物理的に分離している単位を指し、ここで各単位は、必要とされる、生理学的に許容される希釈剤、すなわち担体か、またはビヒクルと協働して、所望の治療効果を生じさせるように算定された、あらかじめ決定されている量の活性物質を含む。

【０１５８】

投与するのに必要とされる有効成分の厳密な量は、医師の判断に応じて変化するものであり、かつ、それぞれの個体に固有である。しかしながら、全身性に適用する際の適切な投薬量の範囲は本明細書に開示されており、かつ投与経路に応じて変化する。投与のための適切なレジメンもまた可変であるが、その典型例は、初回投与を行い、その後、1回または複数回のインターバルで、続く注入または他の投与法による反復投与を行う、というものである。あるいは、インビボ療法用に指定される範囲内の血中濃度を維持するのに十分な、連続的な静脈内注入が意図される。

【０１５９】

有効性の測定

ある疾患に対する所与の処置の有効性は、熟練した医師によって決定され得る。しかしながら、本明細書に記載されるベクターを用いた処置の後で、処置を受けている症状の徴候または症状のいずれか1種または全てが有益な様式で変化した場合や、臨床的に認められている他の症状か、または疾患マーカーが、たとえば少なくとも10％、改善した場合、または好転すらした場合、該処置は、本明細書において使用される用語としての「有効な処置」とみなされる。有効性はまた、疾患の安定性、入院、または医学的介入の必要性によって評価された際に、個体において悪化が生じていないこと（すなわち、疾患の進行が停止しているかまたは少なくとも遅延していること）によっても測定することが可能である。これらの指標を測定する方法は当業者に公知であり、かつ／または本明細書に記載されている。処置には、個人または動物（いくつかの非限定的な例にはヒトまたは哺乳動物が含まれる）における疾患に対するあらゆる処置が含まれ、かつ以下が含まれる：(1)疾患を阻害すること、たとえば、疾患の進行を阻止もしくは遅延させること；または(2)疾患を軽減すること、たとえば、症状の回復を引き起こすこと；および(3)疾患の発病を予防することもしくは疾患を発病する可能性を低下させること、もしくは疾患に関連する二次的問題を予防すること。

【０１６０】

いくつかの態様において、筋疾患または筋障害の処置の有効性は、筋機能のパラメーターの1つまたは複数を評価することによって決定することが可能であり、ここで該パラメーターには、固有筋力の発生、可動性、痙性、張力、安定性等が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの態様において、本明細書に記載される処置方法の有効性を評価するために筋機能の改善を決定するための臨床検査、たとえば、筋電図検査、核磁気共鳴画像検査（ＭＲＩ）、または筋生検を使用することが可能である。

【０１６１】
上述の説明および以下の実施例は単なる例示であること、ならびにそれらは本発明の範囲に対する限定として解釈されるべきではないことが理解される。当業者にとって明らかな、開示される態様に対するさまざまな変更および改変は、本発明の精神および範囲から逸脱することなくなされ得る。さらに、特定されている全ての特許、特許出願、および刊行物は、説明および開示を目的として、参照により本明細書に明示的に組み入れられるものであり、これはたとえば、そのような刊行物に説明されていて、本発明に関して使用され得る方法論などである。これらの刊行物は、本出願の提出日よりも前のそれらの開示を、単に提供するのみである。この点に関し、先行発明のために、または他の何らかの理由のために、本発明者らがそのような開示に先行する資格を有さないことを容認している、と解釈されるべきものは、存在しない。これらの文献の日付についての言及、またはこれらの文献の内容についての説明は、全て本出願人らが利用可能な情報に基づいており、かつ、これらの文献の日付または内容の正確性についての何らかの容認となるものではない。

【実施例】
【０１６２】
以下に、本明細書に記載される技術を実証しかつ裏付ける非限定的な例が提供される。
【０１６３】
実施例1
概要
デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、ヒトの最も多い遺伝性障害のうちの1つであり、男性の新生児のおよそ5,000人に1人に影響を及ぼす（Emery 2003）。該疾患は、DMD遺伝子における、機能的なジストロフィンの発現を妨げる遺伝的変異に起因しているが（Monaco 1985, Kunkel 1986）、ここでジストロフィンは、ヒト細胞によって産生される最も大きなタンパク質のうちの1つである。DMDを処置するために、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターに基づく遺伝子送達が活発に使用されている（Crudele 2019）。しかしながら、DMD遺伝子の送達に関する主たる制約は、最大のAAVカーゴ能力が5 kb未満である（Srivastava 1983）のに、DMD遺伝子のコーディング配列が大きい（11 kb）（Koenig 1989, Chamberlain 1989）点である。本発明者らの以前の成果には、小型化させた「マイクロジストロフィン」（μDys）の開発が含まれており、これは、1つのAAVベクター中にパッケージングすることが可能である（Harper 2002, Gregorevic 2006）。短縮化されているが機能的なこれらのジストロフィンは、ジストロフィンの力学的機能とシグナル伝達機能とに必要とされる重要なドメインを欠いており、かつ、1つのAAVベクターでそれら全てを輸送することが不可能であるにもかかわらず、ジストロフィン欠損動物モデルに投与した際に骨格筋の筋力および組織像を改善することが示されている。
【０１６４】
AAVベクターを用いる遺伝子療法は、機能喪失型のさまざまな遺伝性障害の処置に関して将来性が期待されている（Li 2020）。しかしながら、この治療用モダリティは、このウイルスベクターのパッケージング能力が小さい（-5 kb）ことによって、難しいものとなっている。DMDのコーディング配列のサイズが大きい（-11.2 kb）ことに起因して、現在開発中の、AAVベクターを用いるDMDのための治療アプローチは、小型化させたμDysを発現させるか、またはオープンリーディングフレームを回復させた（CRISPR/Cas9媒介遺伝子編集、または核内低分子RNAであるU7によって誘導されるエキソンスキッピング）遺伝学的エレメントを発現させることのいずれかを意図している（Harper 2002, Goyenvalle 2004, Long 2016, Nelson 2016, Bengtsson 2017）。これら戦略の両方において、正常なものよりも小さいジストロフィンが産生される。加えて、CRISPR/Cas9またはU7ツールを用いて、1つまたは複数のエキソンがスキップされた場合には、非常に低い発現と、不安定な二次構造とが観察される（不適切に「配置された」リピートによる可能性が高い；Harper 2002）。以前の研究は、より大きなミ

ニジストロフィンまたは全長ジストロフィンを相同組み換えを介して再構成すること、およびこれを2種または3種のベクターを投与した後で行うことの、実行可能性を示すものであった（図2）（Odom 2011, Koo 2014, Lostal 2014）。しかしながら、これらのイベントはめったに起こらず、かつ、いくつかの例においては、その臨床使用を脅かす可能性のある、望まれておらずかつ潜在的に毒性を有する生成物がもたらされた。

【０１６５】

本明細書において、より大きなジストロフィン、場合によっては最大で全長のジストロフィンを、高度に発現させつつ精密な様式で送達することが可能な新規な治療アプローチが提供される。本方法は、望まれない組み換え産物によって制限を受けることはなく、かつ、デュシェンヌ型筋ジストロフィーまたはベッカー型筋ジストロフィー（BMD）を有するあらゆる患者のための臨床用途に適合させることが可能である。この改善された戦略は、高い特異性および高い効率で、大きくかつ安定なタンパク質の発現を可能にする（SIMPLI-GT（Split Intein-Mediated Protein Ligation for Gene Therapy（遺伝子療法のための分割型インテイン媒介タンパク質ライゲーション））。このアプローチは、分割型インテインに内因性である能力であって、タンパク質トランススプライシングを媒介し、かつしたがって、より大きな治療用構築物を再構成するという能力を利用するものであり、これは、AAVに基づく遺伝子置換アプローチの使用を、AAVベクターの最大カーゴ能力を上回る任意の遺伝子にまで拡大する。

【０１６６】

試験

AAVベクターを用いる遺伝子置換療法は、機能喪失型変異によって引き起こされる遺伝性障害の処置に関して大いに期待されている。現在、何百もの霊長類血清型が分離されており、かつさらなる血清型が開発中である（Li 2020）。本発明者らは以前に、骨格筋および心筋の両方へと高効率で遺伝子を全身性に送達するために、AAVを使用可能であることを示している（Gregorevic 2004）。さまざまな動物モデルにおいて非常に安定な発現が最大で8年間持続することもまた、数々の試験により証明されている（Rivera 2005, Niemeyer 2009）。臨床においては、神経筋障害、たとえばミオチュブラーミオパチーまたは脊髄性筋萎縮症などに罹患している幾人かの患者に対し、それぞれの欠陥遺伝子であるMTMまたはSMNを置換する、単回投与のAAVベクターを用いた処置が最近行われ（NCT03199469、NCT02122952）、その臨床データは、トランスジーンおよびベクターの両方に対する細胞性免疫原性を欠いている、非常に有望な生理学的アウトカムを示している。

【０１６７】

しかしながら、AAVベクターの主な欠点の1つは、そのパッケージング能力に限界がある点（およそ5 kb）であり、そのため、遺伝子トランスポーターとしてAAVベクターを使用する場合、多くの遺伝性障害が除外されてしまう。デュシェンヌ型または肢帯型タイプ2Bのような筋ジストロフィーにおいては欠陥遺伝子のコーディング配列が大きいことに起因して、そのそれぞれについて、DMD遺伝子またはDYSF遺伝子を、罹患している筋に送達するために、1つのAAVベクターで使用することができない。DMDに関し、小型化させた一連のμDysが以前に開発されており、これは1つのAAVベクターによって送達可能である（図1）（Harper 2002, Gregorevic 2006, Banks 2010, Ramos 2019）。短縮化されているが機能的なこれらのジストロフィンは、ジストロフィン欠損動物モデルに投与された際に、骨格筋の筋力および組織像を改善することが示されており、かつ、Sarepta社およびSolid Biosciences社によって、3種類の構築物がヒト臨床試験において現在試験されている（NCT03375164、NCT03368742）。

【０１６８】

これまでに開発されたμDysの大半が、2個または3個のヒンジを有する4～6個のスペクトリンリピート（SR）と、それに加えて、N末端のアクチン結合ドメイン（ABD）、およびジストログリカン結合ドメイン（DgBD）とを含むことは、注目に値する（Ramos, 2019）。元々の全長ジストロフィンを構成している24個のSRドメインおよび4個の

ヒンジドメインから、μDysを作製するために、何千もの組み合わせが可能である。多数の組み合わせが可能であるというこの点は、AAVの運搬能力に限界がある点とともに、μDysが最良の生理学的アウトカムを有するかどうかを予測することを困難にしている。実際、以前の研究により、多くのμDysは機能的ではなく、かつ、これまでにクローニングされた最良の構築物であっても、骨格筋および心筋のレスキューには不完全であることが示されたことが明らかにされている（Wasla 2018, Ramos 2019）。これは、ジストロフィンの構造を安定化させ、かつ追加のタンパク質機能を提供するためには、治療用候補がさらなるドメインを含むべきであることを示唆するものである。

【０１６９】

一方で、46%が欠失したDMD遺伝子（Δエキソン17-48）を有する2名の患者が、ヒンジ2とSR19の中ほどとの間の領域の大半を欠いている、短縮化されているが高度に機能的なジストロフィンを発現し、かつ正常な寿命を有する非常に軽度な表現型を示すとして報告されており（England 1990）、これは、より大きな「ミニジストロフィン」（ミニDys）構築物の開発を促すものであった（Phelps 1995, Harper, 2002, Odom 2011）。ミニDys（ΔH2-SR19）を半分にしたもの2つであって、それぞれに短い相同領域が配置されている2つを発現する、2種類のAAVベクターを同時投与することで、AAVゲノムの組み換えが可能になり、これは、ミニDysの再構成を引き起こす（図2）。この高度に機能的なタンパク質は、mdx^{4cv}マウスモデルにおいて試験された際に、高い潜在的治療能力を示し、筋組織像および生理学的パフォーマンスの改善をもたらした。とはいえ、1本鎖ゲノムの非特異的アニーリングおよびコンカテマーの形成から生じた可能性が高い、望まれない生成物が、サザンブロット解析によって、およびポリメラーゼ連鎖反応によって検出された。これらの非特異的な生成物は、潜在的に毒性である可能性があり、かつ臨床使用を妨げる免疫反応を引き起こす可能性がある。

【０１７０】

このたびの試験において、本発明者らはSIMPLI-GT（Split Intein-Mediated Protein Ligation for Gene Therapy（遺伝子療法のための分割型インテイン媒介タンパク質ライゲーション）の略称）と名付けられた新規な方法を説明するものであり、これは、インテインによって媒介されるタンパク質トランススプライシング機構を用いて、より大きな治療用構築物を再構成することを意図している。このアプローチは、AAVに基づく遺伝子置換に関連する主たる障害を克服することが可能であり、かつ該アプローチは、その適用を、大きな遺伝子の機能喪失によって引き起こされる数々の遺伝性障害にまで拡大する。

【０１７１】

インテインとは、単細胞生物において見いだされる遺伝学的エレメントである。インテインは、DNAの転写、複製、ならびに維持に関与する重要な遺伝子（たとえば、DNAポリメラーゼもしくはRNAポリメラーゼのサブユニット、ヘリカーゼ、ジャイレース、およびリボヌクレオチドレダクターゼ）の中に埋め込まれているか、または重要なプロテアーゼおよび代謝酵素を含めた、他のハウスキーピング遺伝子の中に埋め込まれている（Shah 2014）。インテインポリペプチド（サイズは138～844アミノ酸と変化する）は、宿主遺伝子と一体となったそのインフレーム転写および翻訳の後で、前駆体タンパク質（エクステインとも呼ばれる）から自己切除され、そして隣接するペプチドを連結する。タンパク質スプライシングとして知られる、この翻訳後の改変は、エネルギー供給も、補因子も、外来性プロテアーゼの介入も必要としない。これまでに600種類を超えるインテインが同定されており、かつおよそ30種類は、2つの別々の遺伝子によってコードされるという特殊性を有する。このような分割型インテインは、より一般的な連続型インテインとは異なり、N-インテイン断片およびC-インテイン断片として別々に転写され、翻訳される。次にこれらは結合し、1つの再構成された複合体（N-エクステイン／N-インテイン／C-インテイン／C-エクステイン）を形成し、その後、インテインが自発的にスプライシングされて、再構成されておりかつ完全に機能的なエクステイン（宿主タンパク質）が生じる（図3）。

【０１７２】
このタンパク質トランススプライシング機構は、タンパク質の精製および標識の段階を含めた、バイオテクノロジー分野での応用において使用されている（Li 2015）。本発明者らは、パッケージング限界に起因して1つのAAVベクターによって送達することができない、より大きなタンパク質を再構成するために、分割型インテインを利用することを提案する。そのために本発明者らは、2つのポリペプチド断片を1つの機能的なタンパク質へと再構成する能力に関して23種類の分割型インテインをスクリーニングする目的で、該分割型インテインのライブラリーを作製した。この予備スクリーニングは、スクリーニングプラットフォームとして緑色蛍光タンパク質（GFP）を用いて実施されるものであり、該タンパク質は、偏りがなくかつ信頼性のある様式で、いくつかのインテインを同じ条件下で試験することを可能にする。GFPは広く使用されているタンパク質であり、該タンパク質は、小さなサイズであり（238アミノ酸）、容易に使え、特異性があり、かつ細胞毒性が欠如していることに起因して、さまざまな生物学の分野に革命をもたらしている。GFPは、アプタマーおよび小さな抗細菌ペプチドをスクリーニングするためのスキャフォールドとしての適合が以前になされている（Abedi 1988, Soundrarajan 2016）。

【０１７３】
最初に本発明者らは、GFPタンパク質配列において、インテインのN末端側およびC末端側を挿入することが可能な分割部位を同定した。予備試験において2種類のプラスミドがクローニングされたが、これらは、Npuインテイン（最も研究されているインテインの1つであり、シアノバクテリアであるノストク・プンクティフォルメ（nostoc punctiforme）に見いだされる）のN末端側半分またはC末端側半分に融合している、GFPのN末端側半分またはC末端側半分のいずれかをコードする。次に、ヒト胎児腎293（HEK293）細胞が、GFP／インテインのN末端側プラスミドおよびC末端側プラスミドの両方またはどちらかを用いて共トランスフェクトされた。24時間後、GFPの蛍光は、WT GFP（1つのプラスミドから発現させた全長GFP）か、または分割型GFP／インテインのデュアルプラスミドのいずれかを用いてトランスフェクトされた細胞においてのみ検出されたが、該蛍光は、N末端側プラスミド単独、またはC末端側プラスミド単独を用いてトランスフェクトされた細胞においては検出されなかった（図4A）。これらのデータは、Npuインテインによって媒介されるタンパク質トランススプライシングによって、GFPが効率的に再構築されたことを示している。GFPの蛍光強度は、分光光度計を用いて生細胞において測定された。再構成されたタンパク質からのGFPシグナルは、WT GFPからのものよりも低いことが見いだされた（図4B）。これは、短いトランスフェクション時間と、機能的なGFPの形成の前のさまざまな段階（すなわち、転写、翻訳、N末端側断片とC末端側断片の融合、インテインのスプライシング、およびGFPのN末端側とC末端側という2者のライゲーション）にかかる時間とに、起因する可能性がある。加えて、本発明者らは、現在スクリーニング中の他のインテインが、より高い活性を有することを観察した。この最初の試験は、測定可能な蛍光を放出可能な全長GFPを再構成するインテインの能力を試験する目的で、分割型GFPを使用することの、実行可能性を示すものであった。本発明者らは、この精密なシステムを用いてインテインライブラリーのスクリーニングを継続したものであり、さまざまなさらなる分割型インテインからの結果が図7に示される。

【０１７４】
次に、ミニDysを半分にしたもの2つを連結する、インテインの能力が試験された。分割型インテインはサイズが小さいため、デュアルAAVベクターアプローチは、これまでに試験された中で最大のミニDys構築物の発現を可能にする。インシリコモデリングにおいて、2つのAAVベクターが2つのジストロフィン断片のコーディング配列をそれぞれ輸送可能であることが示された：N末端側クローンは、N末端からSR19の終端までのタンパク質をコードするがSR5～SR15を欠いており、一方でC末端側クローンは、ヒンジ3からC末端ドメインまでの配列をコードする。したがって、分割型インテインのトランス

スプライシングに媒介されて再構成されたミニDysは、4個のヒンジ、13個のSR、ABD、CRドメイン、およびCTドメインを含む。ジストロフィンにおいて、エキソンスキッピングまたは遺伝子編集を用いた場合にしばしば産生される、不適切に配置されたリピート（Harper, 2002）とは異なり、この新規なミニDys（ΔSR5-15）は完全なスペクトリン様リピートのみを保持しており、これらは、その二次構造および分子の折りたたみを安定化させる。より重要なことに、このミニDys（ΔSR5-15）は、非常に軽度なベッカー型患者において見いだされた高度に機能的なΔH2-SR19ジストロフィン（「背景」セクションにおいて論じている）よりも大きい。この新規なミニDysは、アクチンの、ジストログリカンの、ジストロブレビンの、シントロフィンの、および神経型一酸化窒素合成酵素（nNOS）の結合部位を含めた、いくつかの機能的ドメインを保持しているが、これらは、その力学的役割とシグナル伝達上の役割のために重要である。

【０１７５】

試験において、本発明者らは、ミニDys／インテインのN末端側またはC末端側いずれかの断片を発現する2種類のプラスミドをクローニングした（図5A）。本発明者らは、SR19とヒンジ3との間のリンカーに位置する、4種類の異なる分割部位を試験した。（たとえば図10を参照されたい）。HEK293細胞は、ミニDys（ΔSR5-15）の全体をコードする対照プラスミドを用いてトランスフェクトされたか、または分割型インテインと融合している分割型ミニDys（ΔSR5-15）をコードする、N末端側ベクターおよびC末端側ベクターを用いてトランスフェクトされた。48時間後、ウエスタンブロット解析のために全タンパク質が回収された。驚くべきことに、分割型ベクターを用いたミニDysタンパク質のレベルは、対照プラスミドと比較して高い（5～11倍）ことが見いだされた（図5Bおよび5C）。この点は、1つのベクターが発現する長い構築物と比べて、2つのベクターによってコードされる半分ずつの2つを同時に処理するのに必要な時間が短いこと、またはトランスフェクション効率によって、説明できる可能性がある。興味深いことに、選択された4つの分割部位の全てがミニDysの効率的な形成を引き起すこと、および最大の発現は部位#2において得られたことに、本発明者らは注目した。加えて、過度に露光した後でさえも、ウエスタンブロット膜上で他のバンドは一切検出されなかったが、この点は、本方法の特異性を際立たせるものである。

【０１７６】

これらのインビトロデータは、インビトロで予備選択されたインテインを検証するために、この新規な分割型ミニDysシステムを使用することが可能であることを示している。最も効率的なインテインが同定されたら、インビボでの検証のために、分割型ミニDys／インテインのセットがAAVベクターにクローニングされる。

【０１７７】

分割型GFPシステムを用いたインテインライブラリーの予備スクリーニング

多数の分割型インテインのペアが記述されているが、本発明者らは、それらの多くのスプライシングを、分割型インテイン・GFPシステムを用いて比較した（図4および5におけるデータと比較）。以下がクローニングされ、これらを用いてHEK293細胞がトランスフェクトされ、相対的な蛍光がモニターされた：CMV-eGFPを発現するプラスミド（対照）、コドン最適化された分割型インテインのN末端側半分またはC末端側半分とともにeGFPのN末端側半分またはC末端側半分を保有するデュアルプラスミド、および、デュアルベクターの分割型インテインの連結によって残され得るフットプリントを有するCMV-eGFPを保有する1つのプラスミド（図7）。データは、分割型インテインのスプライシングの比較に関して、このシステムが良好に働いたことを示している。WT GFPの蛍光と同程度に強力な蛍光を生じさせたペアはなかったが、いくつかの分割型インテインベクターは、エクステインの連結後に残される対応するフットプリントを保有する1つのベクター由来の蛍光と、同様のレベルの蛍光を生じさせた（たとえば、分割型インテインAha；図7）。

【０１７８】

2セットの分割型インテインを3つのベクターにおいて使用して、全長Dysを作製する

ことが可能であるかどうかを評価するため、分割型インテインの半分同士の組み合わせを試験して、別の分割型インテインと交差スプライシングし得るものがあるかどうかを観察したが、これは交差スプライシングが、中間のエクステインを抜かしてしまうために、3つのベクターに由来するエクステインの連結を妨害する可能性があるからである。多くの分割型インテインが交差スプライシングすることが観察されたが、より新しいクラスである「第2群のインテイン」は、概して交差スプライシングしない（図8）。

【０１７９】

次に、フットプリントのサイズを、その通常の6アミノ酸（AA）から減少させることが可能であるかどうかが試験され、いくつかの分割型インテインは、3 AAのフットプリントしか残さないように改変された場合にも、効率的にスプライシングすることが見いだされた（図9A）。これらの結果は、迅速GFPアッセイを用いて、「野生型」の分割型インテインおよび合成の分割型インテインを効率的にスクリーニングすることが可能であること、およびいくつかの分割型インテインペアは、効率的かつ特異的なスプライシングを示しつつ、エクステインの連結後に最小限のフットプリントしか残さないことを示す。

【０１８０】

分割型ミニDysシステムを用いた、予備選択されたインテインのインビトロでの検証

このインテインシステムを、ミニおよび全長のジストロフィン（Dys）に適合させた。1セットまたは2セットの分割型インテインを有する2種類または3種類のベクターが調製され、HEK293細胞において試験された。対照は、対応するミニDys（ΔSR5-15）を発現するプラスミドまたは完全Dysを発現するプラスミドを、単独で使用するものであった。分割型インテインベクターは全て、ベクター1つの場合よりも高いレベルで、正しいタンパク質を産生した（これはおそらく、より大きなプラスミドではトランスフェクション効率が低下する点を反映している；図9B、9C；図5A～5C；図13）。いくつかのより小さな生成物が細胞に蓄積し（デュアルベクター）、かつ、トリプルベクター試験においていくつかの「ミニDys」が蓄積したが、後者は、エクステインのN末端側がエクステインのC末端側に直接スプライシングされたことを示唆している。

【０１８１】

筋肉内注射による、ミニDys／インテインの最良のセットのインビボでの検証

mdx^{4cv}の筋において試験された1セットのデュアルベクターの例により、ΔSR5-15ミニジストロフィンの効率的な発現が明らかとなる（図12）。この例において、分割型ミニジストロフィン／インテインのクローンがAAVプラスミドに挿入され、AAVベクターを作製するのに使用されたが、該AAVプラスミドは、AAV血清型2の2つの末端逆位反復配列（ITR）に挟まれている、筋特異的クレアチンキナーゼ8（CK8）調節カセットと短い合成ポリAとを含むものであった。5 x 10^{10}ウイルスゲノム（v.g）という用量の、分割型ミニジストロフィン／インテインのN末端側および／またはC末端側をコードするAAVが、3週齢のC57BL/6-mdx^{4cv}の前脛骨筋（T.A）に注射された。注射から4週間後、注射を受けた筋が採取され、解析された。試験された4つのT.A筋において、ミニジストロフィンΔSR5-15の強力な発現が検出されたが、これは、SIMPLI-GTアプローチの有効性を際立たせるものである（図12A）。筋はまた、凍結薄切され、ジストロフィンについて免疫染色されたか、またはヘマトキシリンおよびエオシンを用いて染色された。再構成されたミニジストロフィンΔSR5-15は、N末端側およびC末端側というデュアルAAVベクターを注射されたmdx^{4cv}の筋線維鞘において、正しく局在していた（図12B）。これらの筋は筋組織像全般の改善を示し、炎症は存在していない（図12C）。

【０１８２】

任意の所与の分割型インテインに関し、ミニDysエクステインが分割される厳密な場所については柔軟性があるが、これは、スプライシング効率に影響を及ぼし得るものであり、かつエクステインの連結後に残されるフットプリントを最小限に抑え得るものでもある（図B～E）。その取り組みの一環として、本発明者らは、スペクトリン様リピート4（SR4）がSR16に連結されている、ΔSR5-15ミニDys（図10および9C）に注目した。このミニDysは、エキソン17～48の欠失を有する、病状が軽度な患者において産生された

Dysから改変されたものであり、該患者は70代後半まで歩行可能であった（England, 1989）。一方で、本明細書に記載される設計は、エキソン49上にコードされる部分的なSRを除去し（Harper, 2002）、かつSR16～SR17にnNOS局在化ドメインを付加する（Adams et al, 2018; Lai et al., 2009）。このΔSR5-15ミニDysは、完全なDGCを組み立てるものと予測される。エキソンスキッピング法またはCas9切断法とは異なり、Dys配列をエキソンで厳密に分割する（この場合、しばしば部分的なドメインが残される）必要はない。その代わり、いずれかのベクターにSR16～SR19領域の部分を挿入し、それに5'側分割型インテインを続けてよく、一方で3'側ベクターは、残りのSRに連結されている3'側分割型インテインを保有してよい。差異はフットプリントの位置のみである。複数の分割部位があり、かつこれらを、フットプリントを最小限に抑えるために、293細胞においてスプライシング効率をモニタリングしながら試験することが可能である（図10、9B、9C、および13）。フットプリントが候補分割部位（たとえば、ミニDysクローンの中央付近により厳密に一致する、より小さいインテインを作製するために、操作された分割型インテインもまた開発された；図10。これの要点は、分割する際の標的には、インテインのフットプリントをDys配列に一致させることを可能にしつつスプライシング効率（およびタンパク質の安定／機能）を最大化するような、幅広い選択肢が存在することである。理想的には、インテインのフットプリントと完全に一致する6アミノ酸を含むDys領域が使用されることになる。本発明者らは、有用な位置においてはそのような6アミノ酸の領域を見いださなかった一方で、フットプリントが1アミノ酸または2アミノ酸のみDysと異なるという領域を見いだした。それぞれのエクステインベクターは、ITR（360 bp）、ポリA部位（およそ60 bp）、およびMSECを含んでいるAAVのクローニング能力（〈5 kb）内に収めなければならないため、理想的なミニDysタンパク質のサイズを考慮すると、Dysの中央における少なくとも600 bpが分割型インテインの標的となる。フットプリントを最小限に抑えるさらなる様式は、所与のフットプリントとは異なる保存的アミノ酸を示すDys配列を標的とすることである。

【０１８３】

このシステムをジストロフィン以外の遺伝子に適合させるため、ジストロフィンデュアルベクター試験においてなされたのと同様に、本発明者らは、3種類の異なる分割部位を用いて、ジスフェリンcDNAを2つの断片に分割し、そのそれぞれが分割型インテインのセットの1つを保有する、3セットのプラスミドをクローニングした。この試験において、分割型インテイン・ジスフェリンのプラスミドの3セットをそれぞれ別々に用いて、HEK293細胞が共トランスフェクトされ、その後に、細胞の回収、およびジスフェリンタンパク質に対するウエスタンブロットによる解析が続いた（図14）。図14Aに示されるように、分割型インテイン・ジスフェリンのクローン両者のセットを用いた場合に、HEK293細胞において全長ジスフェリンタンパク質が産生された。両者のセットは、全長ジスフェリンcDNAを保有する対照プラスミドと同様のレベルのジスフェリンを産生した。図14Bは該タンパク質のレベルの定量化を示しており、同様の効率が達成されたことを表している。

【０１８４】

この新規なSIMPLI-GTアプローチはいくつかの利点を提供するものであり、かつ、AAVベクターのパッケージング能力よりも大きい欠陥遺伝子を有する任意の遺伝性障害に適用することが可能である。該アプローチはAAVベクターを使用してなされるものであり、AAVベクターは、その効率、血清型の多様性、および組織指向性に起因して、遺伝子療法の分野において広く使用されている。CRISPR-Cas9遺伝子編集法およびU7エキソンスキッピング法とは異なり、本方法は、適切に配置されたドメイン、これはジストロフィンの構造を安定化させるものであるが、このような適切に配置されたドメインを有する、より大きなジストロフィンの高発現を促進する。この戦略は、その遺伝的変異にかかわらず、DMDまたはBMDのいかなる患者にも適用可能であり、かつ最終的に、変動性がより少なくかつ規制に関する障害がより少ない治療物質候補が製造されることとなる。

【０１８５】

引用文献：

Banks G. B., Judge L. M., Allen J. M., Chamberlain J. S. (2010). The polyproline site in hinge 2 influences the functional capacity of truncated dystrophins, PLoS Genet., 6(5):e1000958

Bengtsson N. E., Hall J. K., Odom G. L., Phelps M. P., Andrus C. R., Hawkins R. D., Hauschka S. D., Chamberlain J. R., Chamberlain J. S. (2017). Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy, Nat Commun., 14;8:14454

Chamberlain J. S., Gibbs R. A., Ranier J. E., Nguyen P. N., Caskey C .T. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification, Nucleic Acids Res., 16(23): 11141–11156

Crudele J. M., Chamberlain J.S. (2019). AAV-based gene therapies for the muscular dystrophies, Human Molecular Genetics, Volume 28, Issue R1, Pages R102–R107

Emery E., Muntoni F. (2003). Duchenne muscular dystrophy, Oxford University Press, New York, 3rd edition, ISBN No. 0198515316

England S. B., Nicholson L. V., Johnson M. A., Forrest S. M., Love D. R., Zubrzycka-Gaarn E. E., Bulman D. E., Harris J. B., Davies K. E. (1990). Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin, Nature, 343(6254):180-2

Goyenvalle A., Vulin A., Fougerousse F., Leturcq F., Kaplan J., Garcia L., Danos O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping, Science, 306 (5702):1796-9

Gregorevic P., Allen J. M., Minami E., Blankinship M. J., Haraguchi M., Meuse L., Finn E., Adams M. E., Froehner S. C., Murry C. E., Chamberlain J. S. (2006). rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice, Nat Med. 12(7):787-9

Gregorevic P., Blankinship M. J., Allen J. M., Crawford R. W., Meuse L., Miller D. G., Russell D. W., Chamberlain J. S. (2004). Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors, Nat Med., 10(8):828-34

Harper S. Q., Hauser M. A., DelloRusso C., Duan D., Crawford R. W., Phelps S. F., Harper H. A., Robinson A. S., Engelhardt J. F., Brooks S. V., Chamberlain J. S. (2002). Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy, Nat Med., 8(3):253-61

Koenig M., Beggs A. H., Moyer M., Scherpf S., Heindrich K., Bettecken T., Meng G., Müller C. R., Lindlöf M., Kaariainen H., de la Chapellet A., Kiuru A., Savontaus M. L., Gilgenkrantz H., Récan D., Chelly J., Kaplan J. C., Covone A. E., Archidiacono N., Romeo G., Liechti-Gailati S., Schneider V., Braga S., Moser H., Darras B. T., Murphy P., Francke U., Chen J. D., Morgan G., Denton M., Greenberg C. R., Wrogemann, Blonden L. A., van Paassen M. B., van Ommen G. J., Kunkel L. M. (1989). The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion, Am J Hum Genet., 45(4):498-506

Koo T., Popplewell L., Athanasopoulos T., Dickson G. (2014). Triple trans-splicing adeno-associated virus vectors capable of transferring the coding sequence for full-length dystrophin protein into dystrophic mice, Hum Gene Ther, 25(2):98-108

Kunkel L. M. & co-authors (1986). Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy, Nature, 322, pages73–77

Li C & Samulski R. J. (2020). Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy, Nature Reviews Genetics, 21, p255–272

Li Y. (2015). Split-inteins and their bioapplications, Biotechnol Lett., 37(11):2121-37

Abedi M. R., Caponigro G., Kamb A. (1998). Green fluorescent protein as a scaffold for intracellular presentation of peptides, Nucleic Acids Res., 26(2): 623–630

Long C., Amoasii L., Mireault A. A., McAnally J. R., Li H., Sanchez-Ortiz E., Bhattacharyya S., Shelton J. M., Bassel-Duby R., Olson E. N (2016). Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy, Science, Vol. 351, Issue 6271, pp. 400-403

Lostal W., Kodippili K., Yue Y., Duan D. (2014). Full-length dystrophin reconstitution with adeno-associated viral vectors, Hum Gene Ther., 25(6):552-62

Monaco A. P., Bertelson C. J., Middlesworth W., Colletti C., Aldridge J., Fischbeck K.H., Bartlett R., Pericak-Vance M. A., Roses A.D. & Kunkel L. M. (1985), Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment, Nature, 316, pages842–845

Nelson C. E., Hakim C. H., Ousterout D. G., Thakore P. I., Moreb E. A., Castellanos Rivera R. M., Madhavan S., Pan X., Ann Ran F., Yan W. X., Asokan A., Zhang F., Duan D., Gersbach C. A. (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy, Science, Vol. 351, Issue 6271, pp. 403-407

Niemeyer G. P., Herzog R. W., Mount J., Arruda V. R., Tillson D. M., Hathcock J., van Ginkel F. W., High K. A., Lothrop Jr C. D. (2009). Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy, Blood, 113(4):797-806

Ramos J. N., Hollinger K., Bengtsson N. E., Allen J. M., Hauschka S. D., Chamberlain J. S. (2019). Development of Novel Micro-dystrophins with Enhanced Functionality, Mol Ther., 27(3): 623-635

Rivera V. M., Gao G., Grant R. L., Schnell M. A., Zoltick P. W., Rozamus L. W., Clackson T., Wilson J. M. (2005). Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer, Blood, 105(4):1424-30

Odom G.L., Gregorevic P., Allen J. M., Chamberlain J. S. (2011). Gene therapy of mdx mice with large truncated dystrophins generated by recombination using rAAV6, Mol Ther., 19(1):36-45

Shah N. H., Muir T. W. (2015). Inteins: nature's gift to protein chemists, 2014, Chemical Science, 5 (2), 446-461

Phelps S. F., Hauser M. A., Cole N. M., Rafael J. A., Hinkle R. T., Faulkner J. A., Chamberlain J. S. (1995). Expression of full-length and truncated dystrophin mini-genes in transgenic mdx mice, Hum. mol. gen., Volume 4, Issue 8, Pages 1251–1258

Srivastava A., Lusby E. W., Berns K. I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome, J Virol, 45(2):555-64

Soundrarajan N., Cho H., Ahn B., Choi M., Thong L. M., Choi H., Cha S., Kim J., Park C., Seo K., Park C. (2016). Green fluorescent protein as a scaffold for high efficiency production of functional bacteriotoxic proteins in Escherichia coli, Sci Rep., 6: 20661

Wasala N.B., Shin J.H., Lai Y., Yue Y., Montanaro F., Duan D. (2018). Cardiac specific expression of ΔH2-R15 mini-dystrophin normalized all ECG abnormalities and the end-diastolic volume in a 23-m-old mouse model of Duchenne dilated cardiomyopathy, Hum. Gene Ther., Vol. 29, No. 7

Adams ME, Odom GL, Kim MJ, Chamberlain JS and Froehner SC: Syntrophin binds directly to multiple spectrin-like repeats in dystrophin and mediates binding of nNOS to repeats 16-17. Hum Mol Genet 2018; 27:2978-2985.

Lai Y, Thomas GD, Yue Y, Yang HT, Li D, Long C, Judge L, Bostick B, Chamberlain JS, Terjung RL and Duan D: Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. J Clin Invest 2009; 119:624- 635.

【０１８６】

実施例2：ミニジストロフィン、ジストロフィン、ジスフェリン、またはユートロフィンと組み合わせられた分割型インテインの例示的な配列

MiniDys ΔSR5-15:

1) 分割部位 **#1:**

- **MiniDys-gp41.1 N1 (SEQ ID NO. 82):**

MLWWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLLDLLEGLTGQKL
PKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIILHWQVKNVMK
NIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQ
QSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLP
RPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSQ
HLEAPEDKSFGSSLMESEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEG
YMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETEVQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLH
RVLMDLQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQVRVN
SLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCL
FSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKN
KSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVK
HAQEELPPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEKVN
AIEREKAEKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEY
SYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLKNIKDSLQQSSGRIDIIHSKKT
AALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTE
AEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTLNATGEEIIQQSSKTDASILQEKLGS
LNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASIPLEPGKEQQLKEKLEQ
VKLLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLKQTNLQWIKVSRALPEKQGEIE
AQIKDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFDVQETEIAVQAKQPDVEEI
LSKGQHLYKEKPGYCLDLKTQVQTPQGMKEISNIQVGDLVLSNTGYNEVLNVFPKSKKKSYKIT
LEDGKEIICSEEHLFPTQTGEMNISGGLKEGMCLYVKE*

- **MiniDys-gp41.1 C1 (SEQ ID NO. 83):**

MMLKKILKIEELDERELIDIEVSGNHLFYANDILTHNSATQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLLQELR
AKQPDLAPGLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDW
LSLLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMIIKQKATMQDLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEARTII
TDRIERIQNQWDEVQEHLQNRRQQLNEMLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGPYT

VDAIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADDTRKVHMITENINASWRSIHK
RVSEREAALEETHRLLQQFPLDLEKFLAWLTEAETTANVLQDATRKERLLEDSKGVKELMKQW
QDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDNMNFKWSELRKKSLNIRSHLEA
SSDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVIMST
LETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLLRKQAEEVNTEWEKLNLHSADWQRKI
DETLERLQELQEATDELDLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVS
HVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFLSTSV
QGPWERAISPNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALC
LDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNVPLCVDMCLNWLLN
VYDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLFKQVASSTGFCDQRRLGLLLHDSIQIPRQLGE
VASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETAKHQAKC
NICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKN
KFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSAPASSPQLSHDDTHSRIEHYAS
RLAEMENSNGSYLNDSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLESEERGELERIL
ADLEEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLPSPPEMMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEA
RMQILEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSQTSD
SMGEEDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM*

2) 分割部位**#2:**

- **MiniDys-gp41.1 N2 (SEQ ID NO. 84):**

MLWWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLLDLLEGLTGQKL
PKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIILHWQVKNVMK
NIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQ
QSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLP
RPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSQ
HLEAPEDKSFGSSLMESEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEG
YMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETEVQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLH
RVLMDLQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQVRVN
SLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCL
FSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKN
KSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVK
HAQEELPPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEKVN
AIEREKAEKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEY
SYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLKNIKDSLQQSSGRIDIIHSKKT
AALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTE
AEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTLNATGEEIIQQSSKTDASILQEKLGS
LNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASIPLEPGKEQQLKEKLEQ
VKLLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLKQTNLQWIKVSRALPEKQGEIE
AQIKDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFDVQETEIAVQAKQPDVEEI
LSKGQHLYKEGYCLDLKTQVQTPQGMKEISNIQVGDLVLSNTGYNEVLNVFPKSKKKSYKITLE
DGKEIICSEEHLFPTQTGEMNISGGLKEGMCLYVKE*

- **MiniDys-gp41.1 C2 (SEQ ID NO. 85):**

MMLKKILKIEELDERELIDIEVSGNHLFYANDILTHNSTQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLLQELRA
KQPDLAPGLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLS
LLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMIIKQKATMQDLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEARTIITD
RIERIQNQWDEVQEHLQNRRQQLNEMLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGPYTVD
AIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADDTRKVHMITENINASWRSIHKRV
SEREAALEETHRLLQQFPLDLEKFLAWLTEAETTANVLQDATRKERLLEDSKGVKELMKQWQD
LQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDNMNFKWSELRKKSLNIRSHLEASS
DQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVIMSTLE
TVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLLRKQAEEVNTEWEKLNLHSADWQRKIDE
TLERLQELQEATDELDLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHV
NDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFLSTSVQG

PWERAISPNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLD
LLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNVPLCVDMCLNWLLNV
YDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLFKQVASSTGFCDQRRLGLLLHDSIQIPRQLGEV
ASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETAKHQAKCNI
CKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKNK
FRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASR
LAEMENSNGSYLNDSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLESEERGELERILA
DLEEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLPSPPEMMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEAR
MQILEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSQTSDS
MGEEDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM*

3) 分割部位 **#3:**

- **MiniDys-gp41.1 N3 (SEQ ID NO. 86):**

MLWWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLLDLLEGLTGQKL
PKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIILHWQVKNVMK
NIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQ
QSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLP
RPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSQ
HLEAPEDKSFGSSLMESEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEG
YMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETEVQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLH
RVLMDLQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQVRVN
SLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCL
FSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKN
KSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVK
HAQEELPPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEKVN
AIEREKAEKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEY
SYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLKNIKDSLQQSSGRIDIIHSKKT
AALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTE
AEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTLNATGEEIIQQSSKTDASILQEKLGS
LNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASIPLEPGKEQQLKEKLEQ
VKLLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLKQTNLQWIKVSRALPEKQGEIE
AQIKDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFDVQETEIAVQAKQPDVEEI
LSKGQHLYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLLQELRAKQPDLAPGYCLDLKTQVQTPQG
MKEISNIQVGDLVLSNTGYNEVLNVFPKSKKKSYKITLEDGKEIICSEEHLFPTQTGEMNISGGLK
EGMCLYVKE*

- **MiniDys-gp41.1 C3 (SEQ ID NO. 87):**

MMLKKILKIEELDERELIDIEVSGNHLFYANDILTHNSLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKL
EMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLSLLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMIIKQKATMQDLEQ
RRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEARTIITDRIERIQNQWDEVQEHLQNRRQQLNEMLKDSTQWL
EAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGPYTVDAIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLL
RDYSADDTRKVHMITENINASWRSIHKRVSEREAALEETHRLLQQFPLDLEKFLAWLTEAETTA
NVLQDATRKERLLEDSKGVKELMKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLL
QRRLDNMNFKWSELRKKSLNIRSHLEASSDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFP
AVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLL
RKQAEEVNTEWEKLNLHSADWQRKIDETLERLQELQEATDELDLKLRQAEVIKGSWQPVGDLL
IDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAV
EDRVRQLHEAHRDFGPASQHFLSTSVQGPWERAISPNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELYQSL
ADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYD
RLEQEHNNLVNVPLCVDMCLNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLFKQV
ASSTGFCDQRRLGLLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLE
PQSMVWLPVLHRVAAAETAKHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKM
HYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINF
WPVDSAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLNDSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQ

DSPLSQPRSPAQILISLESEERGELERILADLEEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLPSPPEMMPT
SPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVS
SPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSQTSDSMGEEDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPG
KPMREDTM*

4) 分割部位 #4:

- **MiniDys-gp41.1 N4 (SEQ ID NO. 88):**

MLWWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLLDLLEGLTGQKL
PKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIILHWQVKNVMK
NIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQ
QSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLP
RPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSQ
HLEAPEDKSFGSSLMESEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEG
YMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETEVQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLH
RVLMDLQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQVRVN
SLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCL
FSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKN
KSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVK
HAQEELPPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEKVN
AIEREKAEKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEY
SYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLKNIKDSLQQSSGRIDIIHSKKT
AALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTE
AEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTLNATGEEIIQQSSKTDASILQEKLGS
LNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASIPLEPGKEQQLKEKLEQ
VKLLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLKQTNLQWIKVSRALPEKQGEIE
AQIKDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFDVQETEIAVQAKQPDVEEI
LSKGQHLYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLLQELRAKQPDLAPGLTTIGYCLDLKTQVQ
TPQGMKEISNIQVGDLVLSNTGYNEVLNVFPKSKKKSYKITLEDGKEIICSEEHLFPTQTGEMNIS
GGLKEGMCLYVKE*

- **MiniDys-gp41.1 C4 (SEQ ID NO. 89):**

MMLKKILKIEELDERELIDIEVSGNHLFYANDILTHNSPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSL
MLEVPALADFNRAWTELTDWLSLLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMIIKQKATMQDLEQRRPQLE
ELITAAQNLKNKTSNQEARTIITDRIERIQNQWDEVQEHLQNRRQQLNEMLKDSTQWLEAKEEA
EQVLGQARAKLESWKEGPYTVDAIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSAD
DTRKVHMITENINASWRSIHKRVSEREAALEETHRLLQQFPLDLEKFLAWLTEAETTANVLQDA
TRKERLLEDSKGVKELMKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDN
MNFKWSELRKKSLNIRSHLEASSDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFPAVQKQ
NDVHRAFKRELKTKEPVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLLRKQAE
EVNTEWEKLNLHSADWQRKIDETLERLQELQEATDELDLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQD
HLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQ
LHEAHRDFGPASQHFLSTSVQGPWERAISPNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELYQSLADLNNV
RFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYDRLEQEH
NNLVNVPLCVDMCLNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLFKQVASSTGFC
DQRRLGLLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVW
LPVLHRVAAAETAKHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVE
YCTPTTSGEDVRDFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSA
PASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLNDSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQ
PRSPAQILISLESEERGELERILADLEEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLPSPPEMMPTSPQSPR
DAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSL
QRSDSSQPMLLRVVGSQTSDSMGEEDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMRE
DTM*

全長ジストロフィン：

a. IMPDH およびgp41.1を使用：

1) 分割部位ImS1：

- N末端側断片 (SEQ ID NO. 90):

MLWWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLLDLLEGLTGQKL
PKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIILHWQVKNVM
KNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVV
CQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVE
MLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSP
FPSQHLEAPEDKSFGSSLMESEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFH
THEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETEVQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQ
SNLHRVLMDLQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQ
VRVNSLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLT
EEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDL
LSTLKNKSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTT
REQILVKHAQEELPPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFS
DLKEKVNAIEREKAEKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLS
ERLNWLEYQNNIIAFYNQLQQLEQMTTTAENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQP
QIERLKIQSIALKEKGQGPMFLDADFVAFTNHFKQVFSDVQAREKELQTIFDTLPPMRYQETMS
AIRTWVQQSETKLSIPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEI
SRKYQSEFEEIEGRWKKLSSQLVEHCQKLEEQMNKLRKIQNHIQTLKKWMAEVDVFLKEEWP
ALGGCFVPGTLVNTENGLKKIEEIKVGDKVFSHTGKLQEVVDTLIFDRDEEIISINGIDCTKNHEF
YVIDKENANRVNEDNIHLFARWVHAEELDMKKHLLIELE*

- 中間断片 (SEQ ID NO. 91):

MKFKLKEITSIETKHYKGKVHDLTVNQDHSYNVRGTVVHNSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIQPS
LNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDL
SEMHEWMTQAEEEYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQA
PPVAQEALKKELETLTTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNEVEFKL
KTTENIPGGAEEISEVLDSLENLMRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMDELINEELETFNSRWREL
HEEAVRRQKLLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTS
HEISLEEMKKHNQGKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMKFRLFQKPANFELRLQESKMILDEVK
MHLPALETKSVEQEVVQSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKKQTENPKELDERV
TALKLHYNELGAKVTERKQQLEKCLKLSRKMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSAVEGMPSN
LDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSITEVGEALKTVLGKKETLVEDKLSLLNSNWIAVTSRAEE
WLNLLLEYQKHMETFDQNVDHITKWIIQADTLLDESEKKKPQQKEDVLKRLKAELNDIRPKVD
STRDQAANLMANRGDHCRKLVEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFNSDIQKLLEPL
EAEIQQGVNLKEEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEIKIKQQLLQTKHNA
LKDLRSQRRKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKKE
ELNAVRRQAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTE
DMPLEISYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLKNIKDSLQQSSGRI
DIIHSKKTAALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKI
FNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTLNATGEEIIQQSSKTDA
SILQEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASIPLEPGKE
QQLKEKLEQVKLLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLKQTNLQWIKVSR
ALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFDVQETEIAV
QAKQPDVEEILSKGQHLYKEGYCLDLKTQVQTPQGMKEISNIQVGDLVLSNTGYNEVLNVFPK
SKKKSYKITLEDGKEIICSEEHLFPTQTGEMNISGGLKEGMCLYVKE*

- C末端側断片 (SEQ ID NO. 92):

MMLKKILKIEELDERELIDIEVSGNHLFYANDILTHNSTQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLLQELR
AKQPDLAPGLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDW
LSLLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMIIKQKATMQDLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEARTII
TDRIERIQNQWDEVQEHLQNRRQQLNEMLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGPYT

50

VDAIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADDTRKVHMITENINASWRSIH
KRVSEREAALEETHRLLQQFPLDLEKFLAWLTEAETTANVLQDATRKERLLEDSKGVKELMKQ
WQDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDNMNFKWSELRKKSLNIRSHL
EASSDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVI
MSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLLRKQAEEVNTEWEKLNLHSADW
QRKIDETLERLQELQEATDELDLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLK
ENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHF
LSTSVQGPWERAISPNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRL
QKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNVPLCVDMC
LNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLFKQVASSTGFCDQRRLGLLLHDSI
QIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAET
AKHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVR
DFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSAPASSPQLSHDDT
HSRIEHYASRLAEMENSNGSYLNDSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLES
EERGELERILADLEEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLPSPPEMMPTSPQSPRDAELIAEAKLL
RQHKGRLEARMQILEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPML
LRVVGSQTSDSMGEEDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM*

2) 分割部位 **ImS2:**

- **N**末端側断片**(SEQ ID NO. 93):**

MLWWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLLDLLEGLTGQKL
PKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIILHWQVKNVMK
NIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQ
QSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLP
RPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSQ
HLEAPEDKSFGSSLMESEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEG
YMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETEVQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLH
RVLMDLQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQVRVN
SLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCL
FSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKN
KSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVK
HAQEELPPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEKVN
AIEREKAEKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEY
QNNIIAFYNQLQQLEQMTTTAENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSI
ALKEKGQGPMFLDADFVAFTNHFKQVFSDVQAREKELQTIFDTLPPMRYQETMSAIRTWVQQS
ETKLSIPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEE
IEGRWKKLSSQLVEHCQKLEEQMNKLRKIQNHIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGCFVPGTLV
NTENGLKKIEEIKVGDKVFSHTGKLQEVVDTLIFDRDEEIISINGIDCTKNHEFYVIDKENANRVN
EDNIHLFARWVHAEELDMKKHLLIELE*

- 中間断片**(SEQ ID NO. 94):**

MKFKLKEITSIETKHYKGKVHDLTVNQDHSYNVRGTVVHNSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIQPSL
NSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSE
MHEWMTQAEEEYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPP
VAQEALKKELETLTTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNEVEFKLKTT
ENIPGGAEEISEVLDSLENLMRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMDELINEELETFNSRWRELHEEA
VRRQKLLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHEISL
EEMKKHNQGKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMKFRLFQKPANFELRLQESKMILDEVKMHLP
ALETKSVEQEVVQSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKKQTENPKELDERVTALKL
HYNELGAKVTERKQQLEKCLKLSRKMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSAVEGMPSNLDSEVA
WGKATQKEIEKQKVHLKSITEVGEALKTVLGKKETLVEDKLSLLNSNWIAVTSRAEEWLNLLLE
YQKHMETFDQNVDHITKWIIQADTLLDESEKKKPQQKEDVLKRLKAELNDIRPKVDSTRDQAA
NLMANRGDHCRKLVEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFNSDIQKLLEPLEAEIQQGV
NLKEEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQR
RKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKKEELNAVRRQ

AEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLEISYV
PSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLKNIKDSLQQSSGRIDIIHSKKTAAL
QSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQ
FLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTLNATGEEIIQQSSKTDASILQEKLGSLNL
RWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASIPLEPGKEQQLKEKLEQVK
LLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLKQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQI
KDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFDVQETEIAVQAKQPDVEEILSK
GQHLYKEGYCLDLKTQVQTPQGMKEISNIQVGDLVLSNTGYNEVLNVFPKSKKKSYKITLEDGK
EIICSEEHLFPTQTGEMNISGGLKEGMCLYVKE*

- **C末端側断片 (SEQ ID NO. 95):**

MMLKKILKIEELDERELIDIEVSGNHLFYANDILTHNSTQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLLQELRA
KQPDLAPGLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLS
LLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMIIKQKATMQDLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEARTIITD
RIERIQNQWDEVQEHLQNRRQQLNEMLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGPYTVD
AIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADDTRKVHMITENINASWRSIHKRV
SEREAALEETHRLLQQFPLDLEKFLAWLTEAETTANVLQDATRKERLLEDSKGVKELMKQWQD
LQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDNMNFKWSELRKKSLNIRSHLEASS
DQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVIMSTLE
TVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLLRKQAEEVNTEWEKLNLHSADWQRKIDE
TLERLQELQEATDELDLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHV
NDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFLSTSVQG
PWERAISPNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLD
LLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNVPLCVDMCLNWLLNV
YDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLFKQVASSTGFCDQRRLGLLLHDSIQIPRQLGEV
ASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETAKHQAKCNI
CKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKNK
FRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASR
LAEMENSNGSYLNDSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLESEERGELERILA
DLEEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLPSPPEMMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEAR
MQILEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSQTSDS
MGEEDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM*

3) 分割部位 ImS3:

- **N末端側断片 (SEQ ID NO. 96):**

MLWWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLLDLLEGLTGQKL
PKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIILHWQVKNVMK
NIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQ
QSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLP
RPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSQ
HLEAPEDKSFGSSLMESEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEG
YMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETEVQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLH
RVLMDLQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQVRVN
SLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCL
FSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKN
KSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVK
HAQEELPPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEKVN
AIEREKAEKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEY
QNNIIAFYNQLQQLEQMTTTAENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSI
ALKEKGQGPMFLDADFVAFTNHFKQVFSDVQAREKELQTIFDTLPPMRYQETMSAIRTWVQQS
ETKLSIPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEE
IEGRWKKLSSQLVEHCQKLEEQMNKLRKIQNHIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQ
LKQCRLLVSDIQTIQPSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEA
LKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAEEEYLERDFEYGCFVPGTLVNTENGLKKIEEIKVGDKV

FSHTGKLQEVVDTLIFDRDEEIISINGIDCTKNHEFYVIDKENANRVNEDNIHLFARWVHAEELD
MKKHLLIELE*

- 中間断片 **(SEQ ID NO. 97):**

MKFKLKEITSIETKHYKGKVHDLTVNQDHSYNVRGTVVHNSKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQ
QKEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKKELETLTTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHEL
LSYLEKANKWLNEVEFKLKTTENIPGGAEEISEVLDSLENLMRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVM
DELINEELETFNSRWRELHEEAVRRQKLLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVD
AAQMPQEAQKIQSDLTSHEISLEEMKKHNQGKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMKFRLFQKPA
NFELRLQESKMILDEVKMHLPALETKSVEQEVVQSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQI
VQKKQTENPKELDERVTALKLHYNELGAKVTERKQQLEKCLKLSRKMRKEMNVLTEWLAATD
MELTKRSAVEGMPSNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSITEVGEALKTVLGKKETLVEDKLS
LLNSNWIAVTSRAEEWLNLLLEYQKHMETFDQNVDHITKWIIQADTLLDESEKKKPQQKEDVL
KRLKAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKE
LEQFNSDIQKLLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEI
KIKQQLLQTKHNALKDLRSQRRKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDER
KIKEIDRELQKKKEELNAVRRQAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIH
TVREETMMVMTEDMPLEISYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLK
NIKDSLQQSSGRIDIIHSKKTAALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSV
EKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTLNATG
EEIIQQSSKTDASILQEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEAD
NIASIPLEPGKEQQLKEKLEQVKLLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLKQ
TNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGP
FDVQETEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLLQELRAKQPD
LAPGLTTIGYCLDLKTQVQTPQGMKEISNIQVGDLVLSNTGYNEVLNVFPKSKKKSYKITLEDGK
EIICSEEHLFPTQTGEMNISGGLKEGMCLYVKE*

- **C末端側断片(SEQ ID NO. 98):**

MMLKKILKIEELDERELIDIEVSGNHLFYANDILTHNSPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSL
MLEVPALADFNRAWTELTDWLSLLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMIIKQKATMQDLEQRRPQLE
ELITAAQNLKNKTSNQEARTIITDRIERIQNQWDEVQEHLQNRRQQLNEMLKDSTQWLEAKEEA
EQVLGQARAKLESWKEGPYTVDAIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSAD
DTRKVHMITENINASWRSIHKRVSEREAALEETHRLLQQFPLDLEKFLAWLTEAETTANVLQDA
TRKERLLEDSKGVKELMKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDN
MNFKWSELRKKSLNIRSHLEASSDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFPAVQKQ
NDVHRAFKRELKTKEPVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLLRKQAE
EVNTEWEKLNLHSADWQRKIDETLERLQELQEATDELDLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQD
HLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQ
LHEAHRDFGPASQHFLSTSVQGPWERAISPNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELYQSLADLNNV
RFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYDRLEQEH
NNLVNVPLCVDMCLNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLFKQVASSTGFC
DQRRLGLLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVW
LPVLHRVAAAETAKHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVE
YCTPTTSGEDVRDFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSA
PASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLNDSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQ
PRSPAQILISLESEERGELERILADLEEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLPSPPEMMPTSPQSPR
DAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSL
QRSDSSQPMLLRVVGSQTSDSMGEEDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMRE
DTM*

4) 分割部位 **ImS4:**

- N末端側断片 **(SEQ ID NO. 99):**

MLWWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLLDLLEGLTGQKL
PKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIILHWQVKNVMK
NIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQ
QSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLP
RPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSQ
HLEAPEDKSFGSSLMESEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEG
YMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETEVQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLH
RVLMDLQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQVRVN
SLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCL
FSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKN
KSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVK
HAQEELPPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEKVN
AIEREKAEKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEY
QNNIIAFYNQLQQLEQMTTTAENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSI
ALKEKGQGPMFLDADFVAFTNHFKQVFSDVQAREKELQTIFDTLPPMRYQETMSAIRTWVQQS
ETKLSIPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEE
IEGRWKKLSSQLVEHCQKLEEQMNKLRKIQNHIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQ
LKQCRLLVSDIQTIQPSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEA
LKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAEEEYLERDFEGCFVPGTLVNTENGLKKIEEIKVGDKVFS
HTGKLQEVVDTLIFDRDEEIISINGIDCTKNHEFYVIDKENANRVNEDNIHLFARWVHAEELDMK
KHLLIELE*

- 中間断片 **(SEQ ID NO. 100):**

MKFKLKEITSIETKHYKGKVHDLTVNQDHSYNVRGTVVHNSTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQ
KEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKKELETLTTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELL
SYLEKANKWLNEVEFKLKTTENIPGGAEEISEVLDSLENLMRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMD
ELINEELETFNSRWRELHEEAVRRQKLLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDA
AQMPQEAQKIQSDLTSHEISLEEMKKHNQGKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMKFRLFQKPAN
FELRLQESKMILDEVKMHLPALETKSVEQEVVQSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIV
QKKQTENPKELDERVTALKLHYNELGAKVTERKQQLEKCLKLSRKMRKEMNVLTEWLAATD
MELTKRSAVEGMPSNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSITEVGEALKTVLGKKETLVEDKLS
LLNSNWIAVTSRAEEWLNLLLEYQKHMETFDQNVDHITKWIIQADTLLDESEKKKPQQKEDVL
KRLKAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKE
LEQFNSDIQKLLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEI
KIKQQLLQTKHNALKDLRSQRRKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDER
KIKEIDRELQKKKEELNAVRRQAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIH
TVREETMMVMTEDMPLEISYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLK
NIKDSLQQSSGRIDIIHSKKTAALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSV
EKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTLNATG
EEIIQQSSKTDASILQEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEAD
NIASIPLEPGKEQQLKEKLEQVKLLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLKQ
TNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGP
FDVQETEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLLQELRAKQPD
LAPGLTTIGYCLDLKTQVQTPQGMKEISNIQVGDLVLSNTGYNEVLNVFPKSKKKSYKITLEDGK
EIICSEEHLFPTQTGEMNISGGLKEGMCLYVKE*

- C末端側断片 **(SEQ ID NO. 101):**

MMLKKILKIEELDERELIDIEVSGNHLFYANDILTHNSPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSL
MLEVPALADFNRAWTELTDWLSLLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMIIKQKATMQDLEQRRPQLE
ELITAAQNLKNKTSNQEARTIITDRIERIQNQWDEVQEHLQNRRQQLNEMLKDSTQWLEAKEEA
EQVLGQARAKLESWKEGPYTVDAIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSAD
DTRKVHMITENINASWRSIHKRVSEREAALEETHRLLQQFPLDLEKFLAWLTEAETTANVLQDA
TRKERLLEDSKGVKELMKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDN

MNFKWSELRKKSLNIRSHLEASSDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFPAVQKQ
NDVHRAFKRELKTKEPVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLLRKQAE
EVNTEWEKLNLHSADWQRKIDETLERLQELQEATDELDLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQD
HLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQ
LHEAHRDFGPASQHFLSTSVQGPWERAISPNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELYQSLADLNNV
RFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYDRLEQEH
NNLVNVPLCVDMCLNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLFKQVASSTGFC
DQRRLGLLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVW
LPVLHRVAAAETAKHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVE
YCTPTTSGEDVRDFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSA
PASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLNDSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQ
PRSPAQILISLESEERGELERILADLEEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLPSPPEMMPTSPQSPR
DAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSL
QRSDSSQPMLLRVVGSQTSDSMGEEDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMRE
DTM*

b. Nrdj-1を使用:

1) 分割部位 NrS1:

- **N末端側断片 (SEQ ID NO. 102):**

MLWWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLLDLLEGLTGQKL
PKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIILHWQVKNVM
KNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVV
CQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVE
MLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSP
FPSQHLEAPEDKSFGSSLMESEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFH
THEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETEVQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQ
SNLHRVLMDLQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQ
VRVNSLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLT
EEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDL
LSTLKNKSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTT
REQILVKHAQEELPPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFS
DLKEKVNAIEREKAEKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLS
ERLNWLEYQNNIIAFYNQLQQLEQMTTTAENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQP
QIERLKIQSIALKEKGQGPMFLDADFVAFTNHFKQVFSDVQAREKELQTIFDTLPPMRYQETMS
AIRTWVQQSETKLSIPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEI
SRKYQSEFEEIEGRWKKLSSQLVEHCQKLEEQMNKLRKIQNHIQTLKKWMAEVDVFLKEEWP
ALGCCLVGSSEIITRNYGKTTIKEVVEIFDNDKNIQVLAFNTHTDNIEWAPIKAAQLTRPNAELV
ELEIDTLHGVKTIRCTPDHPVYTKNRGYVRADELTDDDELVVAI*

- **中間断片 (SEQ ID NO. 103):**

MEAKTYIGKLKSRKIVSNEDTYDIQTSTHNFFANDILVHNSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIQPSLN
SVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSE
MHEWMTQAEEEYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPP
VAQEALKKELETLTTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNEVEFKLKT
TENIPGGAEEISEVLDSLENLMRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMDELINEELETFNSRWRELHE
EAVRRQKLLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHE
ISLEEMKKHNQGKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMKFRLFQKPANFELRLQESKMILDEVKM
HLPALETKSVEQEVVQSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKKQTENPKELDERVT
ALKLHYNELGAKVTERKQQLEKCLKLSRKMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSAVEGMPSNL
DSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSITEVGEALKTVLGKKETLVEDKLSLLNSNWIAVTSRAEEW
LNLLLEYQKHMETFDQNVDHITKWIIQADTLLDESEKKKPQQKEDVLKRLKAELNDIRPKVDS
TRDQAANLMANRGDHCRKLVEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFNSDIQKLLEPLE
AEIQQGVNLKEEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEIKIKQQLLQTKHNAL
KDLRSQRRKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKKEE

LNAVRRQAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTED
MPLEISYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLKNIKDSLQQSSGRIDII
HSKKTAALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFN
QWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTLNATGEEIIQQSSKTDASIL
QEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASIPLEPGKEQQ
LKEKLEQVKLLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLKQTNLQWIKVSRAL
PEKQGEIEAQIKDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFDVQETEIAVQA
KQPDVEEILSKGQHLYKEGYCLDLKTQVQTPQGMKEISNIQVGDLVLSNTGYNEVLNVFPKSK
KKSYKITLEDGKEIICSEEHLFPTQTGEMNISGGLKEGMCLYVKE*

- **C末端側断片 (SEQ ID NO. 104):**

MMLKKILKIEELDERELIDIEVSGNHLFYANDILTHNSTQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLLQELRA
KQPDLAPGLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLS
LLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMIIKQKATMQDLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEARTIITD
RIERIQNQWDEVQEHLQNRRQQLNEMLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGPYTVD
AIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADDTRKVHMITENINASWRSIHKRV
SEREAALEETHRLLQQFPLDLEKFLAWLTEAETTANVLQDATRKERLLEDSKGVKELMKQWQD
LQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDNMNFKWSELRKKSLNIRSHLEASS
DQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVIMSTLE
TVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLLRKQAEEVNTEWEKLNLHSADWQRKIDE
TLERLQELQEATDELDLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHV
NDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFLSTSVQG
PWERAISPNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLD
LLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNVPLCVDMCLNWLLNV
YDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLFKQVASSTGFCDQRRLGLLLHDSIQIPRQLGEV
ASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETAKHQAKCNI
CKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKNK
FRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASR
LAEMENSNGSYLNDSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLESEERGELERILA
DLEEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLPSPPEMMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEAR
MQILEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSQTSDS
MGEEDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM*

2) 分割部位 NrS2:

- **N末端側断片 (SEQ ID NO. 105):**

MLWWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLLDLLEGLTGQKL
PKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIILHWQVKNVMK
NIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQ
QSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLP
RPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSQ
HLEAPEDKSFGSSLMESEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEG
YMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETEVQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLH
RVLMDLQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQVRVN
SLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCL
FSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKN
KSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVK
HAQEELPPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEKVN
AIEREKAEKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEY
QNNIIAFYNQLQQLEQMTTTAENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSI
ALKEKGQGPMFLDADFVAFTNHFKQVFSDVQAREKELQTIFDTLPPMRYQETMSAIRTWVQQS
ETKLSIPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEE
IEGRWKKLSSQLVEHCQKLEEQMNKLRKIQNHIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDCCLVGSS
EIITRNYGKTTIKEVVEIFDNDKNIQVLAFNTHTDNIEWAPIKAAQLTRPNAELVELEIDTLHGVK
TIRCTPDHPVYTKNRGYVRADELTDDDELVVAI*

- 中間断片 **(SEQ ID NO. 106):**

MEAKTYIGKLKSRKIVSNEDTYDIQTSTHNFFANDILVHNSEILKKQLKQCRLLVSDIQTIQPSLNS
VNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKDLSEM
HEWMTQAEEEYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVA
QEALKKELETLTTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLSYLEKANKWLNEVEFKLKTTENI
PGGAEEISEVLDSLENLMRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMDELINEELETFNSRWRELHEEAVR
RQKLLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHEISLEE
MKKHNQGKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMKFRLFQKPANFELRLQESKMILDEVKMHLPAL
ETKSVEQEVVQSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKKQTENPKELDERVTALKLHY
NELGAKVTERKQQLEKCLKLSRKMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSAVEGMPSNLDSEVAW
GKATQKEIEKQKVHLKSITEVGEALKTVLGKKETLVEDKLSLLNSNWIAVTSRAEEWLNLLLEY
QKHMETFDQNVDHITKWIIQADTLLDESEKKKPQQKEDVLKRLKAELNDIRPKVDSTRDQAAN
LMANRGDHCRKLVEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFNSDIQKLLEPLEAEIQQGVN
LKEEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQRR
KKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKKEELNAVRRQA
EGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEDMPLEISYVP
STYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLKNIKDSLQQSSGRIDIIHSKKTAAL
QSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQ
FLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTLNATGEEIIQQSSKTDASILQEKLGSLNL
RWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASIPLEPGKEQQLKEKLEQVK
LLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLKQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQI
KDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFDVQETEIAVQAKQPDVEEILSK
GQHLYKEGYCLDLKTQVQTPQGMKEISNIQVGDLVLSNTGYNEVLNVFPKSKKKSYKITLEDGK
EIICSEEHLFPTQTGEMNISGGLKEGMCLYVKE*

- **C末端側断片 (SEQ ID NO. 107):**

MMLKKILKIEELDERELIDIEVSGNHLFYANDILTHNSTQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLLQELRA
KQPDLAPGLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLS
LLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMIIKQKATMQDLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEARTIITD
RIERIQNQWDEVQEHLQNRRQQLNEMLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQQARAKLESWKEGPYTVD
AIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADDTRKVHMITENINASWRSIHKRV
SEREAALEETHRLLQQFPLDLEKFLAWLTEAETTANVLQDATRKERLLEDSKGVKELMKQWQD
LQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDNMNFKWSELRKKSLNIRSHLEASS
DQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKEPVIMSTLE
TVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLLRKQAEEVNTEWEKLNLHSADWQRKIDE
TLERLQELQEATDELDLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHV
NDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFLSTSVQG
PWERAISPNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLD
LLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNVPLCVDMCLNWLLNV
YDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLFKQVASSTGFCDQRRLGLLLHDSIQIPRQLGEV
ASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLHRVAAAETAKHQAKCNI
CKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKNK
FRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASR
LAEMENSNGSYLNDSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLESEERGELERILA
DLEEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLPSPPEMMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEAR
MQILEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVGSQTSDS
MGEEDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM*

3) 分割部位 **NrS3:**

- **N末端側断片(SEQ ID NO. 108):**

MLWWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLLDLLEGLTGQKL
PKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIILHWQVKNVMK
NIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQ

QSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLP
RPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSQ
HLEAPEDKSFGSSLMESEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEG
YMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETEVQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLH
RVLMDLQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQVRVN
SLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCL
FSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKN
KSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVK
HAQEELPPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEKVN
AIEREKAEKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEY
QNNIIAFYNQLQQLEQMTTTAENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSI
ALKEKGQGPMFLDADFVAFTNHFKQVFSDVQAREKELQTIFDTLPPMRYQETMSAIRTWVQQS
ETKLSIPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEE
IEGRWKKLSSQLVEHCQKLEEQMNKLRKIQNHIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQ
LKQCRLLVSDIQTIQPSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEA
LKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAEEEYLERDFEYCCLVGSSEIITRNYGKTTIKEVVEIFDND
KNIQVLAFNTHTDNIEWAPIKAAQLTRPNAELVELEIDTLHGVKTIRCTPDHPVYTKNRGYVRAD
ELTDDDELVVAI*

- 中間断片 **(SEQ ID NO. 109):**

MEAKTYIGKLKSRKIVSNEDTYDIQTSTHNFFANDILVHNSKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQK
EAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKKELETLTTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLS
YLEKANKWLNEVEFKLKTTENIPGGAEEISEVLDSLENLMRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMD
ELINEELETFNSRWRELHEEAVRRQKLLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDA
AQMPQEAQKIQSDLTSHEISLEEMKKHNQGKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMKFRLFQKPAN
FELRLQESKMILDEVKMHLPALETKSVEQEVVQSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIV
QKKQTENPKELDERVTALKLHYNELGAKVTERKQQLEKCLKLSRKMRKEMNVLTEWLAATD
MELTKRSAVEGMPSNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSITEVGEALKTVLGKKETLVEDKLS
LLNSNWIAVTSRAEEWLNLLLEYQKHMETFDQNVDHITKWIIQADTLLDESEKKKPQQKEDVL
KRLKAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKE
LEQFNSDIQKLLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEI
KIKQQLLQTKHNALKDLRSQRRKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDER
KIKEIDRELQKKKEELNAVRRQAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIH
TVREETMMVMTEDMPLEISYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLK
NIKDSLQQSSGRIDIIHSKKTAALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSV
EKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTLNATG
EEIIQQSSKTDASILQEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEAD
NIASIPLEPGKEQQLKEKLEQVKLLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLKQ
TNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGP
FDVQETEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLLQELRAKQPD
LAPGLTTIGYCLDLKTQVQTPQGMKEISNIQVGDLVLSNTGYNEVLNVFPKSKKKSYKITLEDGK
EIICSEEHLFPTQTGEMNISGGLKEGMCLYVKE*

- **C末端側断片(SEQ ID NO. 110):**

MMLKKILKIEELDERELIDIEVSGNHLFYANDILTHNSPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSL
MLEVPALADFNRAWTELTDWLSLLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMIIKQKATMQDLEQRRPQLE
ELITAAQNLKNKTSNQEARTIITDRIERIQNQWDEVQEHLQNRRQQLNEMLKDSTQWLEAKEEA
EQVLGQARAKLESWKEGPYTVDAIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSAD
DTRKVHMITENINASWRSIHKRVSEREAALEETHRLLQQFPLDLEKFLAWLTEAETTANVLQDA
TRKERLLEDSKGVKELMKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDN
MNFKWSELRKKSLNIRSHLEASSDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFPAVQKQ
NDVHRAFKRELKTKEPVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLLRKQAE
EVNTEWEKLNLHSADWQRKIDETLERLQELQEATDELDLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQD
HLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQ

LHEAHRDFGPASQHFLSTSVQGPWERAISPNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELYQSLADLNNV
RFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYDRLEQEH
NNLVNVPLCVDMCLNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLFKQVASSTGFC
DQRRLGLLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVW
LPVLHRVAAAETAKHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVE
YCTPTTSGEDVRDFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSA
PASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLNDSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQ
PRSPAQILISLESEERGELERILADLEEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLPSPPEMMPTSPQSPR
DAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSL
QRSDSSQPMLLRVVGSQTSDSMGEEDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMRE
DTM*

4) 分割部位 NrS4:

- N末端側断片 (SEQ ID NO. 111):

MLWWEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIENLFSDLQDGRRLLDLLEGLTGQKL
PKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIILHWQVKNVMK
NIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQ
QSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLP
RPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSQ
HLEAPEDKSFGSSLMESEVNLDRYQTALEEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEG
YMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSEDEETEVQEQMNLLNSRWECLRVASMEKQSNLH
RVLMDLQNQKLKELNDWLTKTEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQVRVN
SLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCL
FSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKN
KSVTQKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILVK
HAQEELPPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEKVN
AIEREKAEKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEY
QNNIIAFYNQLQQLEQMTTTAENWLKIQPTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSI
ALKEKGQGPMFLDADFVAFTNHFKQVFSDVQAREKELQTIFDTLPPMRYQETMSAIRTWVQQS
ETKLSIPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEE
IEGRWKKLSSQLVEHCQKLEEQMNKLRKIQNHIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQ
LKQCRLLVSDIQTIQPSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEA
LKGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAEEEYLERDFECCLVGSSEIITRNYGKTTIKEVVEIFDNDK
NIQVLAFNTHTDNIEWAPIKAAQLTRPNAELVELEIDTLHGVKTIRCTPDHPVYTKNRGYVRADE
LTDDDELVVAI*

- 中間断片 (SEQ ID NO. 112) :

MEAKTYIGKLKSRKIVSNEDTYDIQTSTHNFFANDILVHNSTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKE
AKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKKELETLTTNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHELLSY
LEKANKWLNEVEFKLKTTENIPGGAEEISEVLDSLENLMRHSEDNPNQIRILAQTLTDGGVMDEL
INEELETFNSRWRELHEEAVRRQKLLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAAQ
MPQEAQKIQSDLTSHEISLEEMKKHNQGKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMKFRLFQKPANFEL
RLQESKMILDEVKMHLPALETKSVEQEVVQSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQIVQKK
QTENPKELDERVTALKLHYNELGAKVTERKQQLEKCLKLSRKMRKEMNVLTEWLAATDMELT
KRSAVEGMPSNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSITEVGEALKTVLGKKETLVEDKLSLLNS
NWIAVTSRAEEWLNLLLEYQKHMETFDQNVDHITKWIIQADTLLDESEKKKPQQKEDVLKRLK
AELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRKLVEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQF
NSDIQKLLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEIKIKQ
QLLQTKHNALKDLRSQRRKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEI
DRELQKKKEELNAVRRQAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVRE
ETMMVMTEDMPLEISYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESLKNIKDS
LQQSSGRIDIIHSKKTAALQSATPVERVKLQEALSQLDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWR
RFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIGQRQTVVRTLNATGEEIIQ
QSSKTDASILQEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASI

PLEPGKEQQLKEKLEQVKLLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLKQTNLQ
WIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFDVQ
ETEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLLQELRAKQPDLAPG
LTTIGYCLDLKTQVQTPQGMKEISNIQVGDLVLSNTGYNEVLNVFPKSKKKSYKITLEDGKEIICS
EEHLFPTQTGEMNISGGLKEGMCLYVKE*

- **C末端側断片(SEQ ID NO. 113):**

MMLKKILKIEELDERELIDIEVSGNHLFYANDILTHNSPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSL
MLEVPALADFNRAWTELTDWLSLLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMIIKQKATMQDLEQRRPQLE
ELITAAQNLKNKTSNQEARTIITDRIERIQNQWDEVQEHLQNRRQQLNEMLKDSTQWLEAKEEA
EQVLGQARAKLESWKEGPYTVDAIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSAD
DTRKVHMITENINASWRSIHKRVSEREAALEETHRLLQQFPLDLEKFLAWLTEAETTANVLQDA
TRKERLLEDSKGVKELMKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDN
MNFKWSELRKKSLNIRSHLEASSDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDELSRQAPIGGDFPAVQKQ
NDVHRAFKRELKTKEPVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPEERAQNVTRLLRKQAE
EVNTEWEKLNLHSADWQRKIDETLERLQELQEATDELDLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQD
HLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVEDRVRQ
LHEAHRDFGPASQHFLSTSVQGPWERAISPNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELYQSLADLNNV
RFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINCLTTIYDRLEQEH
NNLVNVPLCVDMCLNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYLFKQVASSTGFC
DQRRLGLLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVW
LPVLHRVAAAETAKHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVE
YCTPTTSGEDVRDFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSA
PASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLNDSISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQ
PRSPAQILISLESEERGELERILADLEEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLPSPPEMMPTSPQSPR
DAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSL
QRSDSSQPMLLRVVGSQTSDSMGEEDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMRE
DTM*

全長ジスフェリン：

1) 分割部位#1 (分割型gp41.1を使用):

- N末端側断片(SEQ ID NO. 114):

MLRVFILYAENVHTPDTDISDAYCSAVFAGVKKRTKVIKNSVNPVWNEGFEWDLKGIPLDQGSE
LHVVVKDHETMGRNRFLGEAKVPLREVLATPSLSASFNAPLLDTKKQPTGASLVLQVSYTPLPG
AVPLFPPPTPLEPSPTLPDLDVVADTGGEEDTEDQGLTGDEAEPFLDQSGGPGAPTTPRKLPSRPP
PHYPGIKRKRSAPTSRKLLSDKPQDFQIRVQVIEGRQLPGVNIKPVVKVTAAGQTKRTRIHKGNS
PLFNETLFFNLFDSPGELFDEPIFITVVDSRSLRTDALLGEFRMDVGTIYREPRHAYLRKWLLLSD
PDDFSAGARGYLKTSLCVLGPGDEAPLERKDPSEDKEDIESNLLRPTGVALRGAHFCLKVFRAE
DLPQMDDAVMDNVKQIFGFESNKKNLVDPFVEVSFAGKMLCSKILEKTANPQWNQNITLPAMF
PSMCEKMRIRIIDWDRLTHNDIVATTYLSMSKISAPGGEIEEEPAGAVKPSKASDLDDYLGFLPTF
GPCYINLYGSPREFTGFPDPYTELNTGKGEGVAYRGRLLLSLETKLVEHSEQKVEDLPADDILRV
EKYLRRRKYSLFAAFYSATMLQDVDDAIQFEVSIGNYGNKFDMTCLPLASTTQYSRAVFDGCH
YYYLPWGNVKPVVVLSSYWEDISHRIETQNQLLGIADRLEAGLEQVHLALKAQCSTEDVDSLV
AQLTDELIAGCSQPLGDIHETPSATHLDQYLYQLRTHHLSQITEAALALKLGYCLDLKTQVQTPQ
GMKEISNIQVGDLVLSNTGYNEVLNVFPKSKKKSYKITLEDGKEIICSEEHLFPTQTGEMNISGGL
KEGMCLYVKE*

- C末端側断片(SEQ ID NO. 115):

MMLKKILKIEELDERELIDIEVSGNHLFYANDILTHNSELPAALEQAEDWLLRLRALAEEPQNSLP
DIVIWMLQGDKRVAYQRVPAHQVLFSRRGANYCGKNCGKLQTIFLKYPMEKVPGARMPVQIR
VKLWFGLSVDEKEFNQFAEGKLSVFAETYENETKLALVGNWGTTGLTYPKFSDVTGKIKLPKDS
FRPSAGWTWAGDWFVCPEKTLLHDMDAGHLSFVEEVFENQTRLPGGQWIYMSDNYTDVNGEK
VLPKDDIECPLGWKWEDEEWSTDLNRAVDEQGWEYSITIPPERKPKHWVPAEKMYYTHRRRR
WVRLRRRDLSQMEALKRHRQAEAEGEGWEYASLFGWKFHLEYRKTDAFRRRRWRRRMEPLE

KTGPAAVFALEGALGGVMDDKSEDSMSVSTLSFGVNRPTISCIFDYGNRYHLRCYMYQARDLA
AMDKDSFSDPYAIVSFLHQSQKTVVVKNTLNPTWDQTLIFYEIEIFGEPATVAEQPPSIVVELYDH
DTYGADEFMGRCICQPSLERMPRLAWFPLTRGSQPSGELLASFELIQREKPAIHHIPGFEVQETSRI
LDESEDTDLPYPPPQREANIYMVPQNIKPALQRTAIEILAWGLRNMKSYQLANISSPSLVVECGG
QTVQSCVIRNLRKNPNFDICTLFMEVMLPREELYCPPITVKVIDNRQFGRRPVVGQCTIRSLESFL
CDPYSAESPSPQGGPDDVSLLSPGEDVLIDIDDKEPLIPIQEEEFIDWWSKFFASIGEREKCGSYLE
KDFDTLKVYDTQLENVEAFEGLSDFCNTFKLYRGKTQEETEDPSVIGEFKGLFKIYPLPEDPAIPM
PPRQFHQLAAQGPQECLVRIYIVRAFGLQPKDPNGKCDPYIKISIGKKSVSDQDNYIPCTLEPVFG
KMFELTCTLPLEKDLKITLYDYDLLSKDEKIGETVVDLENRLLSKFGARCGLPQTYCVSGPNQW
RDQLRPSQLLHLFCQQHRVKAPVYRTDRVMFQDKEYSIEEIEAGRIPNPHLGPVEERLALHVLQQ
QGLVPEHVESRPLYSPLQPDIEQGKLQMWVDLFPKALGRPGPPFNITPRRARRFFLRCIIWNTRD
VILDDLSLTGEKMSDIYVKGWMIGFEEHKQKTDVHYRSLGGEGNFNWRFIFPFDYLPAEQVCTI
AKKDAFWRLDKTESKIPARVVFQIWDNDKFSFDDFLGSLQLDLNRMPKPAKTAKKCSLDQLDD
AFHPEWFVSLFEQKTVKGWWPCVAEEGEKKILAGKLEMTLEIVAESEHEERPAGQGRDEPNMN
PKLEDPRRPDTSFLWFTSPYKTMKFILWRRFRWAIILFIILFILLLFLAIFIYAFPNYAAMKLVKPFS
*

2) 分割部位 **#2 (**分割型**gp41.1**を使用**):**

- **N**末端側断片**(SEQ ID NO. 116):**

MLRVFILYAENVHTPDTDISDAYCSAVFAGVKKRTKVIKNSVNPVWNEGFEWDLKGIPLDQGSE
LHVVVKDHETMGRNRFLGEAKVPLREVLATPSLSASFNAPLLDTKKQPTGASLVLQVSYTPLPG
AVPLFPPPTPLEPSPTLPDLDVVADTGGEEDTEDQGLTGDEAEPFLDQSGGPGAPTTPRKLPSRPP
PHYPGIKRKRSAPTSRKLLSDKPQDFQIRVQVIEGRQLPGVNIKPVVKVTAAGQTKRTRIHKGNS
PLFNETLFFNLFDSPGELFDEPIFITVVDSRSLRTDALLGEFRMDVGTIYREPRHAYLRKWLLLSD
PDDFSAGARGYLKTSLCVLGPGDEAPLERKDPSEDKEDIESNLLRPTGVALRGAHFCLKVFRAE
DLPQMDDAVMDNVKQIFGFESNKKNLVDPFVEVSFAGKMLCSKILEKTANPQWNQNITLPAMF
PSMCEKMRIRIIDWDRLTHNDIVATTYLSMSKISAPGGEIEEEPAGAVKPSKASDLDDYLGFLPTF
GPCYINLYGSPREFTGFPDPYTELNTGKGEGVAYRGRLLLSLETKLVEHSEQKVEDLPADDILRV
EKYLRRRKYSLFAAFYSATMLQDVDDAIQFEVSIGNYGNKFDMTCLPLASTTQYSRAVFDGCH
YYYLPWGNVKPVVVLSSYWEDISHRIETQNQLLGIADRLEAGLEQVHLALKAQCSTEDVDSLV
AQLTDELIAGCSQPLGDIHETPSATHLDQYLYQLRTHHLSQITEAALALKLGHSELPAALEQAED
WLLRLRALAEEPQNSLPDIVIWMLQGDKRVAYQRVPAHQVLFSRRGANYCGKNCGKLQTIFLK
YPMEKVPGARMPVQIRVKLWFGYCLDLKTQVQTPQGMKEISNIQVGDLVLSNTGYNEVLNVFP
KSKKKSYKITLEDGKEIICSEEHLFPTQTGEMNISGGLKEGMCLYVKE*

- **C**末端側断片**(SEQ ID NO. 117):**

MMLKKILKIEELDERELIDIEVSGNHLFYANDILTHNSVDEKEFNQFAEGKLSVFAETYENETKL
ALVGNWGTTGLTYPKFSDVTGKIKLPKDSFRPSAGWTWAGDWFVCPEKTLLHDMDAGHLSFV
EEVFENQTRLPGGQWIYMSDNYTDVNGEKVLPKDDIECPLGWKWEDEEWSTDLNRAVDEQGW
EYSITIPPERKPKHWVPAEKMYYTHRRRRWVRLRRRDLSQMEALKRHRQAEAEGEGWEYASLF
GWKFHLEYRKTDAFRRRRWRRRMEPLEKTGPAAVFALEGALGGVMDDKSEDSMSVSTLSFGV
NRPTISCIFDYGNRYHLRCYMYQARDLAAMDKDSFSDPYAIVSFLHQSQKTVVVKNTLNPTWD
QTLIFYEIEIFGEPATVAEQPPSIVVELYDHDTYGADEFMGRCICQPSLERMPRLAWFPLTRGSQP
SGELLASFELIQREKPAIHHIPGFEVQETSRILDESEDTDLPYPPPQREANIYMVPQNIKPALQRTAI
EILAWGLRNMKSYQLANISSPSLVVECGGQTVQSCVIRNLRKNPNFDICTLFMEVMLPREELYCP
PITVKVIDNRQFGRRPVVGQCTIRSLESFLCDPYSAESPSPQGGPDDVSLLSPGEDVLIDIDDKEPLI
PIQEEEFIDWWSKFFASIGEREKCGSYLEKDFDTLKVYDTQLENVEAFEGLSDFCNTFKLYRGKT
QEETEDPSVIGEFKGLFKIYPLPEDPAIPMPPRQFHQLAAQGPQECLVRIYIVRAFGLQPKDPNGK
CDPYIKISIGKKSVSDQDNYIPCTLEPVFGKMFELTCTLPLEKDLKITLYDYDLLSKDEKIGETVV
DLENRLLSKFGARCGLPQTYCVSGPNQWRDQLRPSQLLHLFCQQHRVKAPVYRTDRVMFQDKE
YSIEEIEAGRIPNPHLGPVEERLALHVLQQQGLVPEHVESRPLYSPLQPDIEQGKLQMWVDLFPK
ALGRPGPPFNITPRRARRFFLRCIIWNTRDVILDDLSLTGEKMSDIYVKGWMIGFEEHKQKTDVH
YRSLGGEGNFNWRFIFPFDYLPAEQVCTIAKKDAFWRLDKTESKIPARVVFQIWDNDKFSFDDFL
GSLQLDLNRMPKPAKTAKKCSLDQLDDAFHPEWFVSLFEQKTVKGWWPCVAEEGEKKILAGK

LEMTLEIVAESEHEERPAGQGRDEPNMNPKLEDPRRPDTSFLWFTSPYKTMKFILWRRFRWAIIL
FIILFILLLFLAIFIYAFPNYAAMKLVKPFS*

3) 分割部位 **#3 (**分割型**IMPDH**を使用**):**

- **N**末端側断片 **(SEQ ID NO. 118):**

MLRVFILYAENVHTPDTDISDAYCSAVFAGVKKRTKVIKNSVNPVWNEGFEWDLKGIPLDQGSE
LHVVVKDHETMGRNRFLGEAKVPLREVLATPSLSASFNAPLLDTKKQPTGASLVLQVSYTPLPG
AVPLFPPPTPLEPSPTLPDLDVVADTGGEEDTEDQGLTGDEAEPFLDQSGGPGAPTTPRKLPSRPP
PHYPGIKRKRSAPTSRKLLSDKPQDFQIRVQVIEGRQLPGVNIKPVVKVTAAGQTKRTRIHKGNS
PLFNETLFFNLFDSPGELFDEPIFITVVDSRSLRTDALLGEFRMDVGTIYREPRHAYLRKWLLLSD
PDDFSAGARGYLKTSLCVLGPGDEAPLERKDPSEDKEDIESNLLRPTGVALRGAHFCLKVFRAE
DLPQMDDAVMDNVKQIFGFESNKKNLVDPFVEVSFAGKMLCSKILEKTANPQWNQNITLPAMF
PSMCEKMRIRIIDWDRLTHNDIVATTYLSMSKISAPGGEIEEEPAGAVKPSKASDLDDYLGFLPTF
GPCYINLYGSPREFTGFPDPYTELNTGKGEGVAYRGRLLLSLETKLVEHSEQKVEDLPADDILRV
EKYLRRRKYSLFAAFYSATMLQDVDDAIQFEVSIGNYGNKFDMTCLPLASTTQYSRAVFDGCH
YYYLPWGNVKPVVVLSSYWEDISHRIETQNQLLGIADRLEAGLEQVHLALKAQCSTEDVDSLV
AQLTDELIAGCSQPLGDIHETPSATHLDQYLYQLRTHHLSQITEAALALKLGHSELPAALEQAED
WLLRLRALAEEPQNSLPDIVIWMLQGDKRVAYQRVPAHQVLFSRRGANYCGKNCGKLQTIFLK
YPMEKVPGARMPVQIRVKLWFGLSVDEKEFNQFAEGKLSVFAETYENETKLALVGNWGTTGLT
YPKFSDVTGKIKLPKDSFRPSAGWTWAGDWFVCPEKTLLHDMDAGHLSFVEEVFENQTRLPGG
QWIYMSDNYTDVNGEKVLPKDDIECPLGWKWEDEEWSTDLNRAVDEQGWEYSITIPPERKPKH
WVPAEKMYYTHRRRRWVRLRRRDLSQMEALKRHRQAEAEGEGWEYASLFGWKFHLEYRKTD
AFRRRRWRRRMEPLEKTGPAAVFALEGALGGVMDDKSEDSMSVSTLSFGVNRPTISCIFDYGNR
YHLRCYMYQARDLAAMDKDSFSDPYAIVSFLHQSQKTVVVKNTLNPTWDQTLIFYEIEIFGEPA
TVAEQPPSIVVELYDHDTYGADEFMGRCICQPSLERMPRLAWFPLTRGCFVPGTLVNTENGLKKI
EEIKVGDKVFSHTGKLQEVVDTLIFDRDEEIISINGIDCTKNHEFYVIDKENANRVNEDNIHLFAR
WVHAEELDMKKHLLIELE*

- **C**末端側断片 **(SEQ ID NO. 119):**

MKFKLKEITSIETKHYKGKVHDLTVNQDHSYNVRGTVVHNSQPSGELLASFELIQREKPAIHHIP
GFEVQETSRILDESEDTDLPYPPPQREANIYMVPQNIKPALQRTAIEILAWGLRNMKSYQLANISS
PSLVVECGGQTVQSCVIRNLRKNPNFDICTLFMEVMLPREELYCPPITVKVIDNRQFGRRPVVGQ
CTIRSLESFLCDPYSAESPSPQGGPDDVSLLSPGEDVLIDIDDKEPLIPIQEEEFIDWWSKFFASIGER
EKCGSYLEKDFDTLKVYDTQLENVEAFEGLSDFCNTFKLYRGKTQEETEDPSVIGEFKGLFKIYP
LPEDPAIPMPPRQFHQLAAQGPQECLVRIYIVRAFGLQPKDPNGKCDPYIKISIGKKSVSDQDNYI
PCTLEPVFGKMFELTCTLPLEKDLKITLYDYDLLSKDEKIGETVVDLENRLLSKFGARCGLPQTY
CVSGPNQWRDQLRPSQLLHLFCQQHRVKAPVYRTDRVMFQDKEYSIEEIEAGRIPNPHLGPVEE
RLALHVLQQQGLVPEHVESRPLYSPLQPDIEQGKLQMWVDLFPKALGRPGPPFNITPRRARRFFL
RCIIWNTRDVILDDLSLTGEKMSDIYVKGWMIGFEEHKQKTDVHYRSLGGEGNFNWRFIFPFDY
LPAEQVCTIAKKDAFWRLDKTESKIPARVVFQIWDNDKFSFDDFLGSLQLDLNRMPKPAKTAKK
CSLDQLDDAFHPEWFVSLFEQKTVKGWWPCVAEEGEKKILAGKLEMTLEIVAESEHEERPAGQ
GRDEPNMNPKLEDPRRPDTSFLWFTSPYKTMKFILWRRFRWAIILFIILFILLLFLAIFIYAFPNYAA
MKLVKPFS*

<u>ミニユートロフィン**ΔSR5-15 (**部位**#1)**または**ΔSR6-14 (**部位**#2):**</u>

1) 分割部位 **#1 (**分割型**IMPDH**を使用**):**

- **N**末端側断片 **(SEQ ID NO. 120):**

MAKYGEHEASPDNGQNEFSDIIKSRSDEHNDVQKKTFTKWINARFSKSGKPPINDMFTDLKDGR
KLLDLLEGLTGTSLPKERGSTRVHALNNVNRVLQVLHQNNVELVNIGGTDIVDGNHKLTLGLL
WSIILHWQVKDVMKDVMSDLQQTNSEKILLSWVRQTTRPYSQVNVLNFTTSWTDGLAFNAVL
HRHKPDLFSWDKVVKMSPIERLEHAFSKAQTYLGIEKLLDPEDVAVQLPDKKSIIMYLTSLFEVL
PQQVTIDAIREVETLPRKYKKECEEEAINIQSTAPEEEHESPRAETPSTVTEVDMDLDSYQIALEEV
LTWLLSAEDTFQEQDDISDDVEEVKDQFATHEAFMMELTAHQSSVGSVLQAGNQLITQGTLSDE
EEFEIQEQMTLLNARWEALRVESMDRQSRLHDVLMELQKKQLQQLSAWLTLTEERIQKMETCP

LDDDVKSLQKLLEEHKSLQSDLEAEQVKVNSLTHMVVIVDENSGESATAILEDQLQKLGERWT
AVCRWTEERWNRLQEINILWQELLEEQCLLKAWLTEKEEALNKVQTSNFKDQKELSVSVRRLAI
LKEDMEMKRQTLDQLSEIGQDVGQLLDNSKASKKINSDSEELTQRWDSLVQRLEDSSNQVTQA
VAKLGMSQIPQKDLLETVRVREQAITKKSKQELPPPPPPKKRQIHVDIEAKKKFDAISAELLNWIL
KWKTAIQTTEIKEYMKMQDTSEMKKKLKALEKEQRERIPRADELNQTGQILVEQMGKEGLPTE
EIKNVLEKVSSEWKNVSQHLEDLERKIQLEEWRQFHCDLNDLTQWITEAEELLVDTCAPGGSLD
LEKARIHQQELEVGISSHQPSFAALNRTGDGIVQKLSQADGSFLKEKLAGLNQRWDAIVAEVKD
RQPRLKGESKQVMKYRHQLDEIICWLTKAEHAMQKRSTTELGENLQELRDLTQEMEVHAEKLK
WLNRTELEMLSDKSLSLPERDKISESLRTVNMTWNKICREVPTTLKECIQEPSSVSQTRIAAHPNV
QKVVLVSSASDIPVQSHRTSEISIPADLDKTITELADWLVLIDQMLKSNIVTVGDVEEINKTVSRM
KITKADLEQRHPQLDYVFTLAQNLKNKASSSDMRTAITEKLERVKNQWDGTQHGVELRQQQLE
DMIIDSLQWDDHREETEELMRKYEARLYILQQARRDPLTKQISDNQILLQELGPGDGIVMAFDN
VLQKLLEEYGCFVPGTLVNTENGLKKIEEIKVGDKVFSHTGKLQEVVDTLIFDRDEEIISINGIDCT
KNHEFYVIDKENANRVNEDNIHLFARWVHAEELDMKKHLLIELE*

- **C末端側断片 (SEQ ID NO. 121):**

MKFKLKEITSIETKHYKGKVHDLTVNQDHSYNVRGTVVHNSDDTRNVKETTEYLKTSWINLKQ
SIADRQNALEAEWRTVQASRRDLENFLKWIQEAETTVNVLVDASHRENALQDSILARELKQQM
QDIQAEIDAHNDIFKSIDGNRQKMVKALGNSEEATMLQHRLDDMNQRWNDLKAKSASIRAHLE
ASAEKWNRLLMSLEELIKWLNMKDEELKKQMPIGGDVPALQLQYDHCKALRRELKEKEYSVL
NAVDQARVFLADQPIEAPEEPRRNLQSKTELTPEERAQKIAKAMRKQSSEVKEKWESLNAVTSN
WQKQVDKALEKLRDLQGAMDDLDADMKEAESVRNGWKPVGDLLIDSLQDHIEKIMAFREEIA
PINFKVKTVNDLSSQLSPLDLHPSLKMSRQLDDLNMRWKLLQVSVDDRLKQLQEAHRDFGPSS
QHFLSTSVQLPWQRSISHNKVPYYINHQTQTTCWDHPKMTELFQSLADLNNVRFSAYRTAIKIRR
LQKALCLDLLELSTTNEIFKQHKLNQNDQLLSVPDVINCLTTTYDGLEQMHKDLVNVPLCVDM
CLNWLLNVYDTGRTGKIRVQSLKIGLMSLSKGLLEEKYRYLFKEVAGPTEMCDQRQLGLLLHD
AIQIPRQLGEVAAFGGSNIEPSVRSCFQQNNNKPEISVKEFIDWMHLEPQSMVWLPVLHRVAAAE
TAKHQAKCNICKECPIVGFRYRSLKHFNYDVCQSCFFSGRTAKGHKLHYPMVEYCIPTTSGEDV
RDFTKVLKNKFRSKKYFAKHPRLGYLPVQTVLEGDNLETPITLISMWPEHYDPSQSPQLFHDDT
HSRIEQYATRLAQMERTNGSFLTDSSSTTGSVEDEHALIQQYCQTLGGESPVSQPQSPAQILKSVE
REERGELERIIADLEEEQRNLQVEYEQLKDQHLRRGLPVGSPPESIISPHHTSEDSELIAEAKLLRQ
HKGRLEARMQILEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPESDSRINGVSPWASPQHSALSYSLDPDASGP
QFHQAAGEDLLAPPHDTSTDLTEVMEQIHSTFPSCCPNVPSRPQAM*

2) 分割部位 #2 (分割型Nrdj-1を使用):

- **N末端側断片 (SEQ ID NO. 122):**

MAKYGEHEASPDNGQNEFSDIIKSRSDEHNDVQKKTFTKWINARFSKSGKPPINDMFTDLKDGR
KLLDLLEGLTGTSLPKERGSTRVHALNNVNRVLQVLHQNNVELVNIGGTDIVDGNHKLTLGLL
WSIILHWQVKDVMKDVMSDLQQTNSEKILLSWVRQTTRPYSQVNVLNFTTSWTDGLAFNAVL
HRHKPDLFSWDKVVKMSPIERLEHAFSKAQTYLGIEKLLDPEDVAVQLPDKKSIIMYLTSLFEVL
PQQVTIDAIREVETLPRKYKKECEEEAINIQSTAPEEEHESPRAETPSTVTEVDMDLDSYQIALEEV
LTWLLSAEDTFQEQDDISDDVEEVKDQFATHEAFMMELTAHQSSVGSVLQAGNQLITQGTLSDE
EEFEIQEQMTLLNARWEALRVESMDRQSRLHDVLMELQKKQLQQLSAWLTLTEERIQKMETCP
LDDDVKSLQKLLEEHKSLQSDLEAEQVKVNSLTHMVVIVDENSGESATAILEDQLQKLGERWT
AVCRWTEERWNRLQEINILWQELLEEQCLLKAWLTEKEEALNKVQTSNFKDQKELSVSVRRLAI
LKEDMEMKRQTLDQLSEIGQDVGQLLDNSKASKKINSDSEELTQRWDSLVQRLEDSSNQVTQA
VAKLGMSQIPQKDLLETVRVREQAITKKSKQELPPPPPPKKRQIHVDIEAKKKFDAISAELLNWIL
KWKTAIQTTEIKEYMKMQDTSEMKKKLKALEKEQRERIPRADELNQTGQILVEQMGKEGLPTE
EIKNVLEKVSSEWKNVSQHLEDLERKIQLQEDINAYFKQLDELEKVIKTKEEWVKHTSISESSRQ
SLPSLKDSCQRELTNLLGLHPKIEMARASCSALMSQPSAPDFVQRGFDSFLGRYQAVQEAVEDR
QQHLENELKLLPTDYLVEINKILLCMDDVELSLNVPELNTAIYEDFSFQEDSLKNIKDQLDKLGE
QIAVIHEKQPDVILEASGPEAIQIRDTLTQLNAKWDRINRMYSDRKGCFDRAMEEWRQFHCDLN
DLTQWITEAEELLVDTCAPGGSLDLEKARIHQQELEVGISSHQPSFAALNRTGDGIVQKLSQADG
SFLKEKLAGLNQRWDAIVAEVKDRQPRLKGESKQVMKYRHQLDEIICWLTKAEHAMQKRSTTE

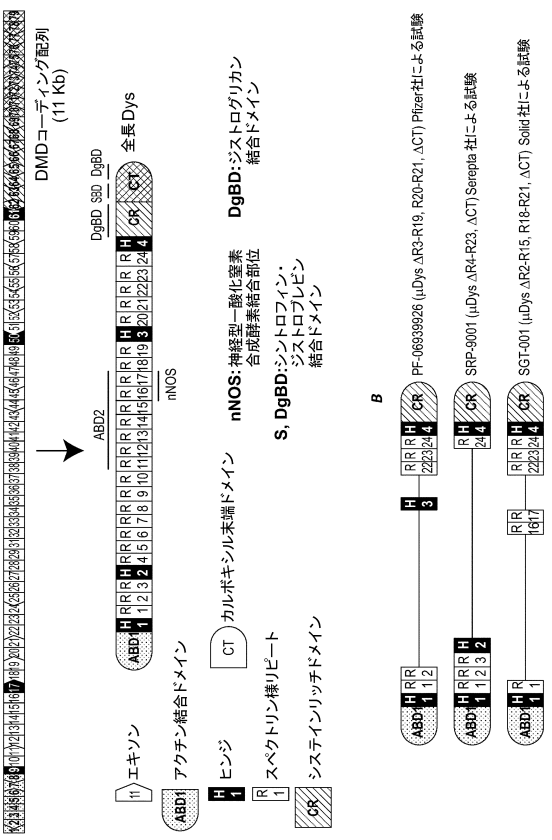
LGENLQELRDLTQEMEVHAEKLKWLNRTELEMLSDKSLSLPERDKISESLRTVNMTWNKICREV
PTTLKECIQEPSSVSQTRIAAHPNVQKVVLVSSASDIPVQSHRTCCLVGSSEIITRNYGKTTIKEVV
EIFDNDKNIQVLAFNTHTDNIEWAPIKAAQLTRPNAELVELEIDTLHGVKTIRCTPDHPVYTKNR
GYVRADELTDDDELVVAI*

- **C末端側断片 (SEQ ID NO. 123):**

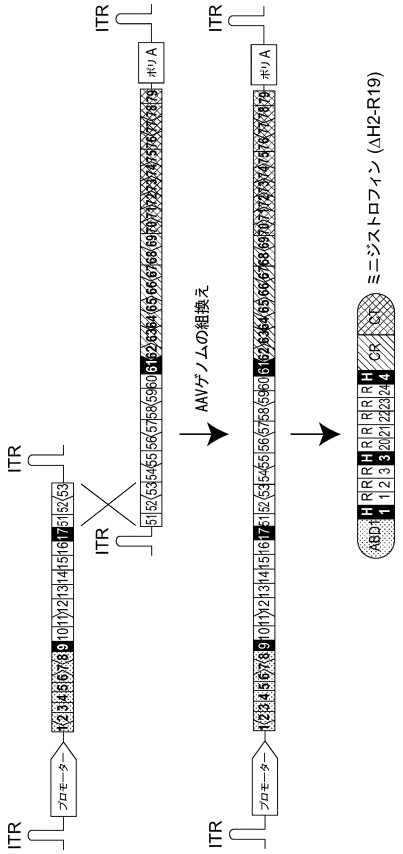
MEAKTYIGKLKSRKIVSNEDTYDIQTSTHNFFANDILVHNSEISIPADLDKTITELADWLVLIDQM
LKSNIVTVGDVEEINKTVSRMKITKADLEQRHPQLDYVFTLAQNLKNKASSSDMRTAITEKLER
VKNQWDGTQHGVELRQQQLEDMIIDSLQWDDHREETEELMRKYEARLYILQQARRDPLTKQIS
DNQILLQELGPGDGIVMAFDNVLQKLLEEYGSDDTRNVKETTEYLKTSWINLKQSIADRQNALE
AEWRTVQASRRDLENFLKWIQEAETTVNVLVDASHRENALQDSILARELKQQMQDIQAEIDAH
NDIFKSIDGNRQKMVKALGNSEEATMLQHRLDDMNQRWNDLKAKSASIRAHLEASAEKWNRL
LMSLEELIKWLNMKDEELKKQMPIGGDVPALQLQYDHCKALRRELKEKEYSVLNAVDQARVF
LADQPIEAPEEPRRNLQSKTELTPEERAQKIAKAMRKQSSEVKEKWESLNAVTSNWQKQVDKA
LEKLRDLQGAMDDLDADMKEAESVRNGWKPVGDLLIDSLQDHIEKIMAFREEIAPINFKVKTVN
DLSSQLSPLDLHPSLKMSRQLDDLNMRWKLLQVSVDDRLKQLQEAHRDFGPSSQHFLSTSVQLP
WQRSISHNKVPYYINHQTQTTCWDHPKMTELFQSLADLNNVRFSAYRTAIKIRRLQKALCLDLL
ELSTTNEIFKQHKLNQNDQLLSVPDVINCLTTTYDGLEQMHKDLVNVPLCVDMCLNWLLNVYD
TGRTGKIRVQSLKIGLMSLSKGLLEEKYRYLFKEVAGPTEMCDQRQLGLLLHDAIQIPRQLGEVA
AFGGSNIEPSVRSCFQQNNNKPEISVKEFIDWMHLEPQSMVWLPVLHRVAAAETAKHQAKCNIC
KECPIVGFRYRSLKHFNYDVCQSCFFSGRTAKGHKLHYPMVEYCIPTTSGEDVRDFTKVLKNKF
RSKKYFAKHPRLGYLPVQTVLEGDNLETPITLISMWPEHYDPSQSPQLFHDDTHSRIEQYATRLA
QMERTNGSFLTDSSSTTGSVEDEHALIQQYCQTLGGESPVSQPQSPAQILKSVEREERGELERIIA
DLEEEQRNLQVEYEQLKDQHLRRGLPVGSPPESIISPHHTSEDSELIAEAKLLRQHKGRLEARMQI
LEDHNKQLESQLHRLRQLLEQPESDSRINGVSPWASPQHSALSYSLDPDASGPQFHQAAGEDLL
APPHDTSTDLTEVMEQIHSTFPSCCPNVPSRPQAM*

【図面】

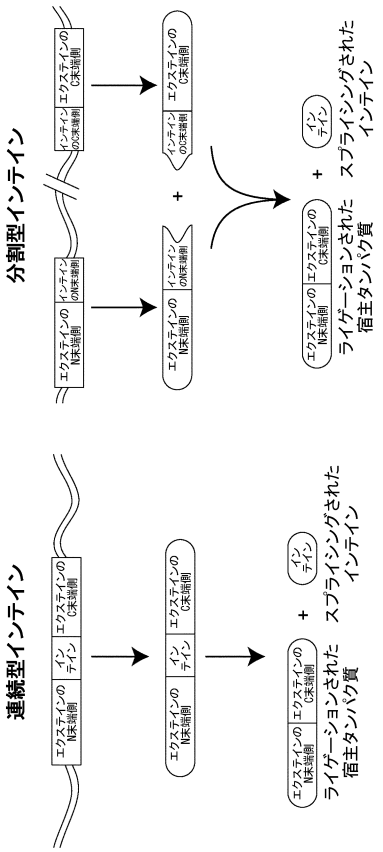
【図１】



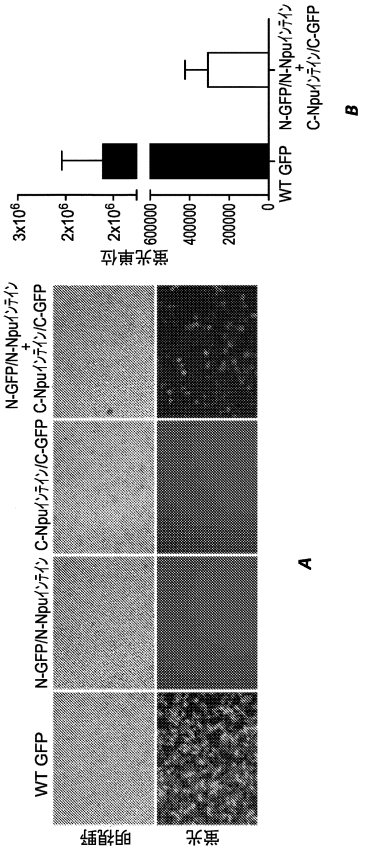
【図２】



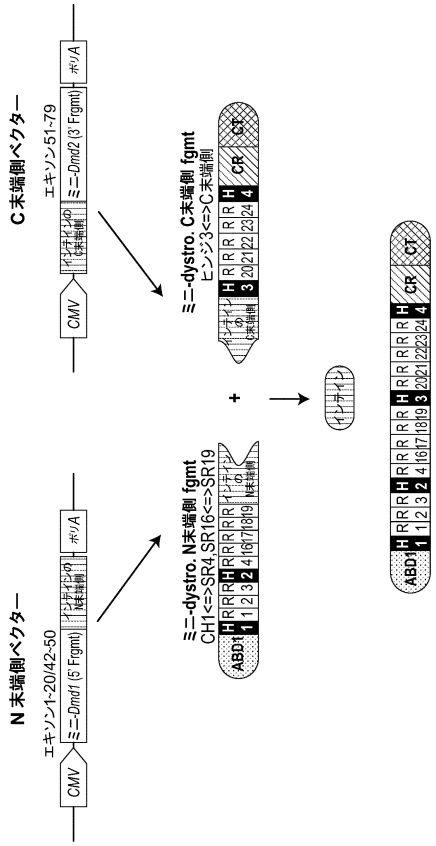
【図３】


連続型インテイン
エクステインのN末端側
インテイン
エクステインのC末端側
ライゲーションされた宿主タンパク質
スプライシングされたインテイン
分割型インテイン
インテインのN末端側
インテインのC末端側

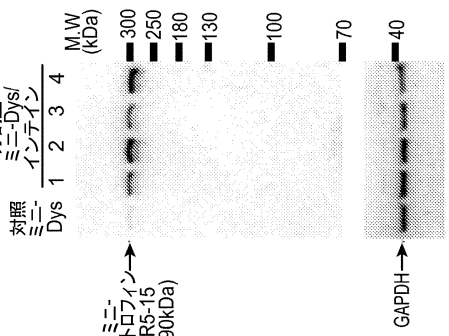
【図４】


WT GFP
N-GFP/N-Npuインテイン
C-Nputインテイン/C-GFP
N-GFP/N-Npuインテイン+C-Nputインテイン/C-GFP
明視野
蛍光
A
蛍光単位
3x10^6
2x10^6
2x10^6
600000
400000
200000
0
WT GFP
N-GFP/N-Npuインテイン+C-Nputインテイン/C-GFP
B

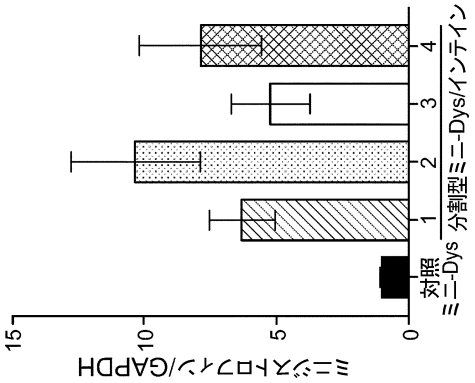
【図５Ａ】


N末端側ベクター
エキソン1-20/42-50
CMV
ミニ-Dmd1 (5' Fgmt)
インテインのN末端側
ポリA
C末端側ベクター
エキソン51-79
ミニ-Dmd2 (3' Fgmt)
ミニ-dystro. N末端側 fgmt
CH1<=>SR4,SR16<=>SR19
ABD1
H
R
CR
CT
ミニ-dystro. C末端側 fgmt
ヒンジ3<=>C末端側
インテインのC末端側
エクステインのN末端側
エクステインのC末端側
ライゲーションされた宿主タンパク質
スプライシングされたインテイン

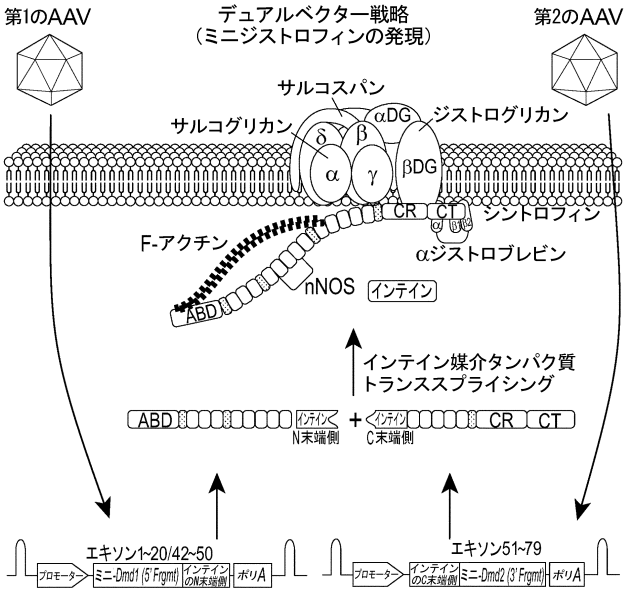
【図５Ｂ】


対照
ミニ-Dys
分割型
ミニ-Dys/インテイン
1 2 3 4
M.W (kDa)
300
250
180
130
100
70
40
ミニ-ジストロフィン→ ΔR5-15 (290kDa)
GAPDH→

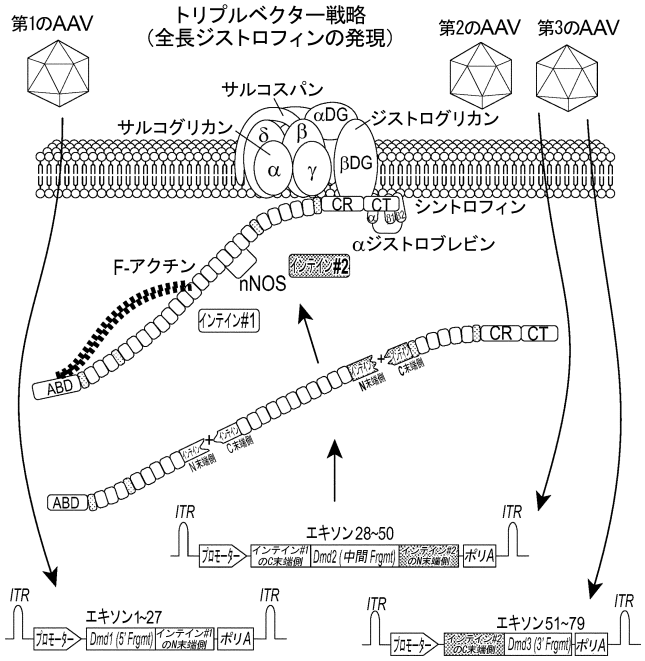
【図５Ｃ】



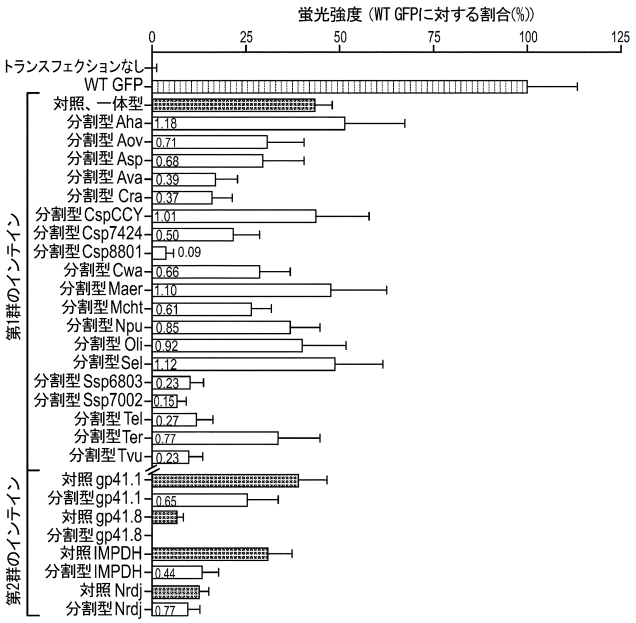
【図６Ａ】



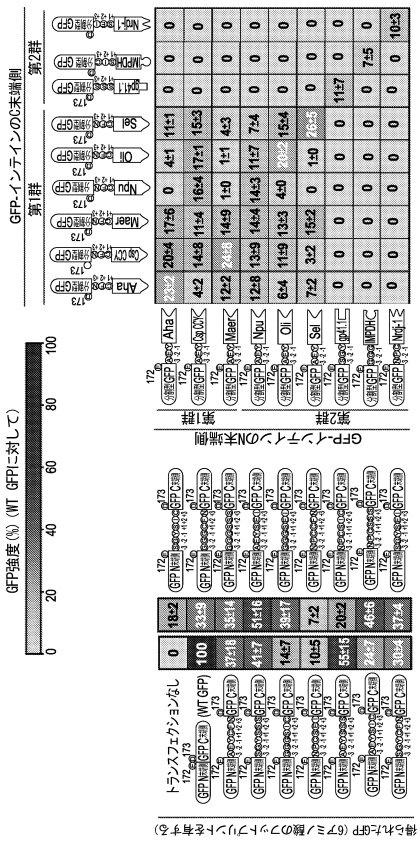
【図６Ｂ】



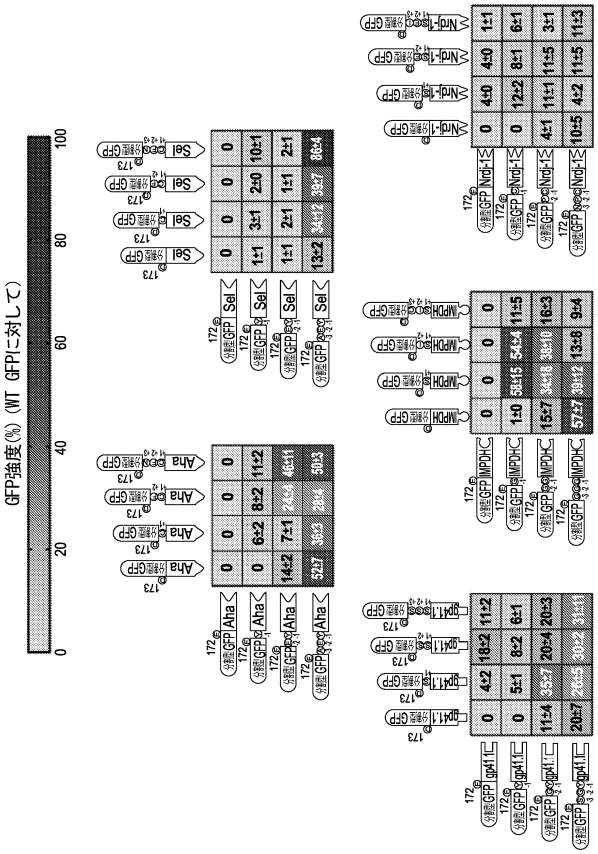
【図７】



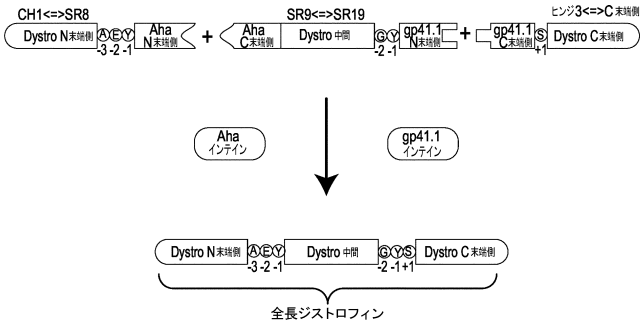
【図８】



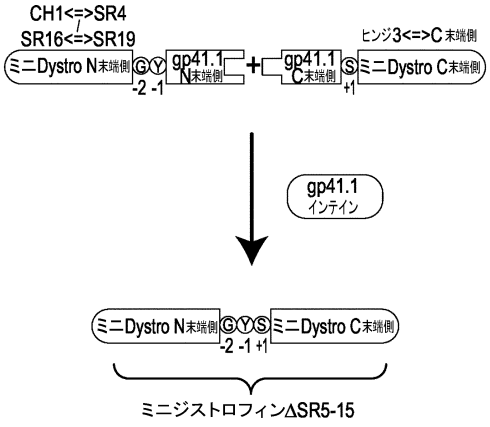
【図９Ａ】



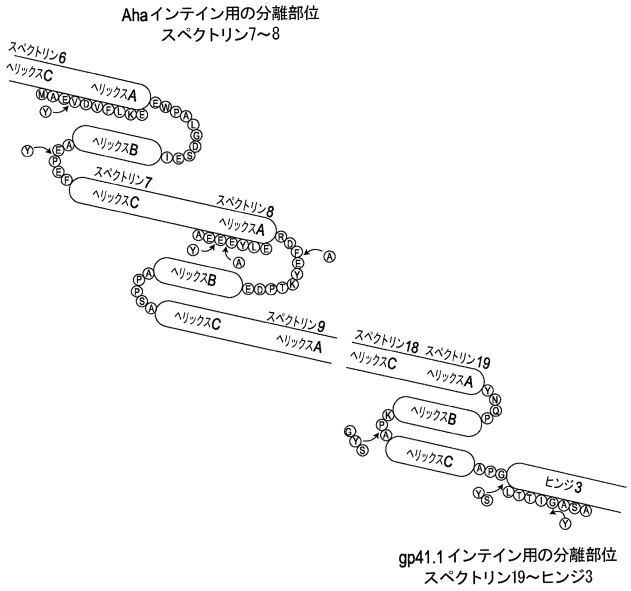
【図９Ｂ】



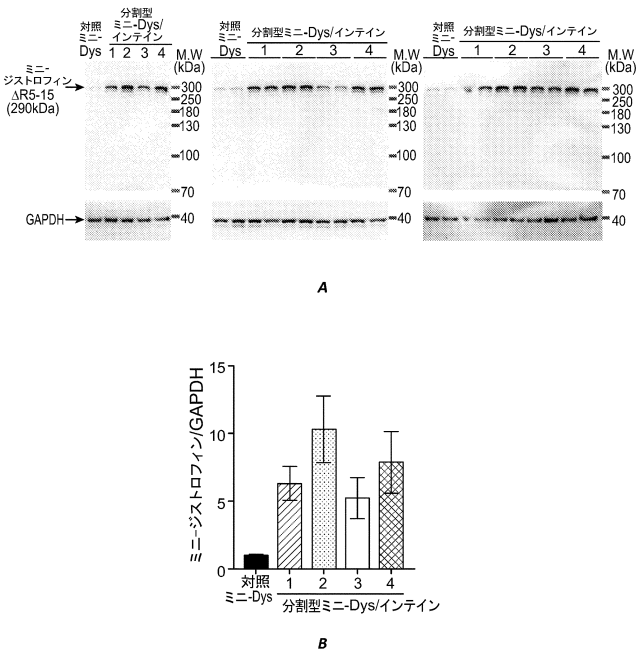
【図９Ｃ】



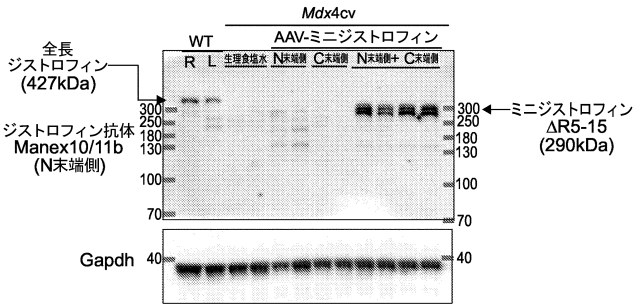
【図１０】



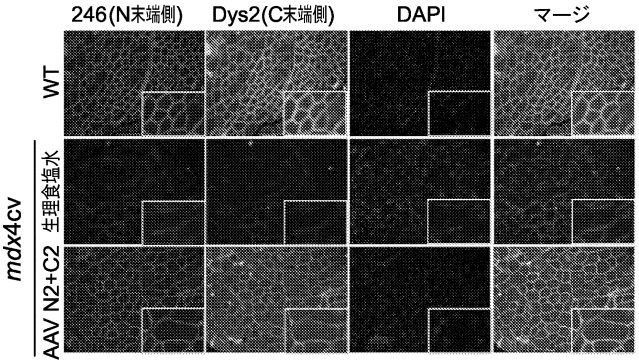
【図１１】



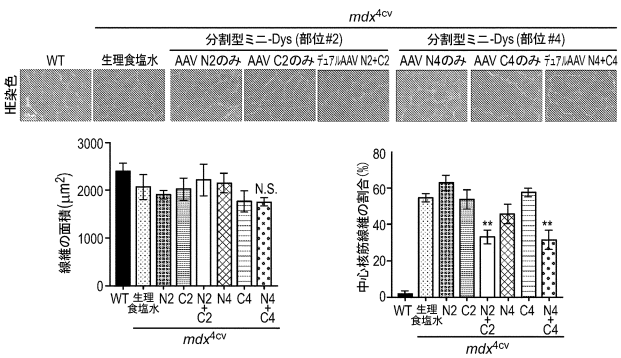
【図１２Ａ】



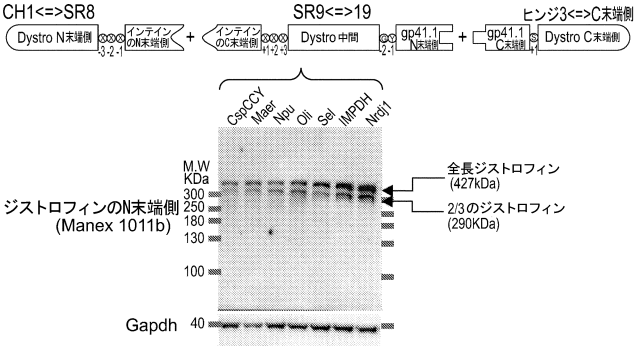
【図１２Ｂ】



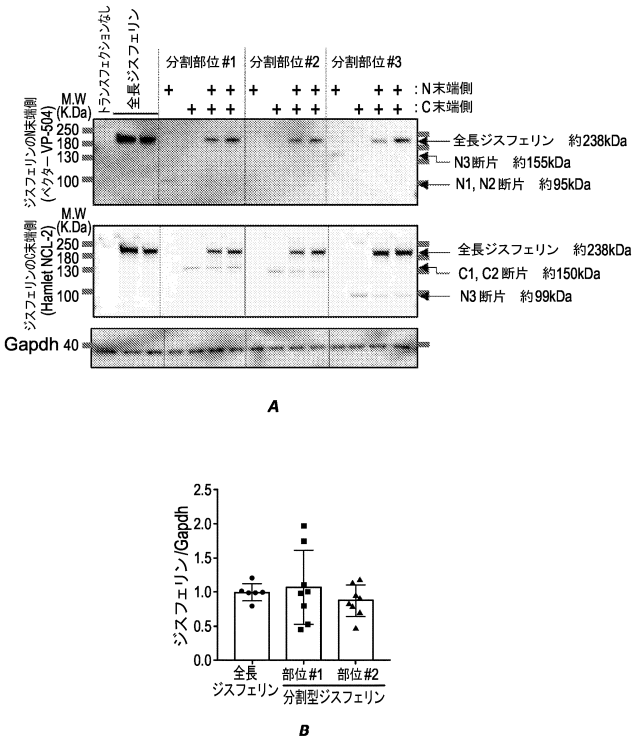
【図１２Ｃ】



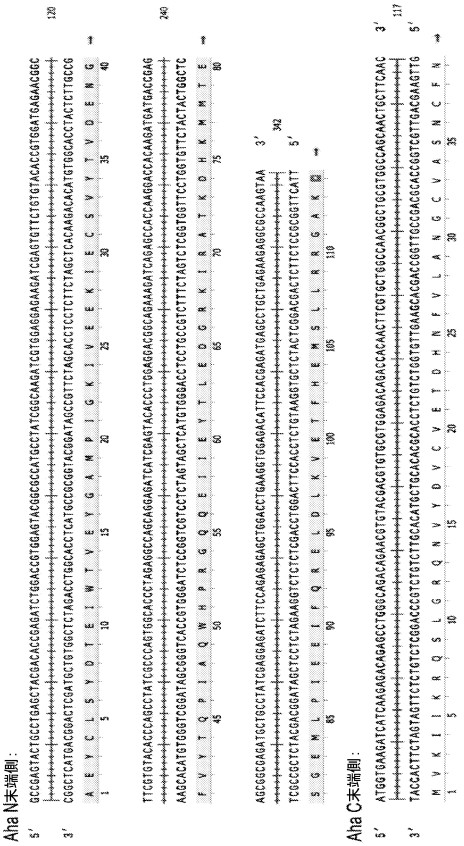
【図１３】



【図１４】



【図１５Ａ】



【図１５Ｂ】

【図１５Ｃ】

【図１５Ｄ】

【図１５Ｅ】

【図１５Ｆ】

【図１５Ｇ】

【図１５Ｈ】

【図１５Ｉ】

【図１５Ｊ】

【図１５Ｋ】

【図１５Ｌ】

【図１５Ｍ】

【図１５Ｎ】

【図１５Ｏ】

【図１５Ｐ】

【図１５Ｑ】

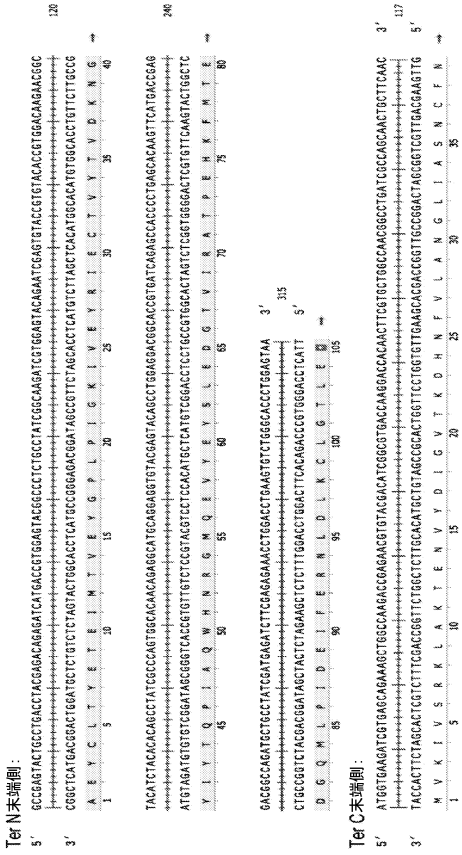
【図１５Ｒ】

【図１５Ｓ】

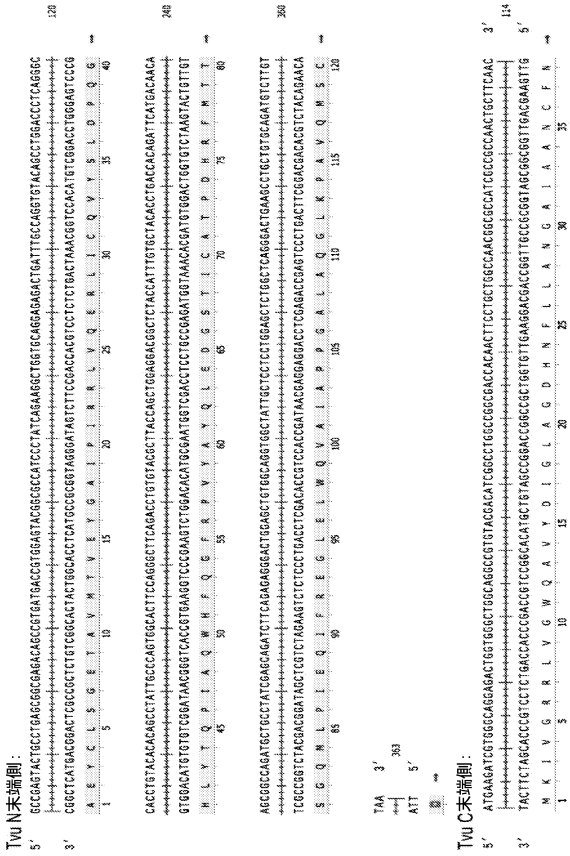
【図１５Ｔ】

【図１５Ｕ】

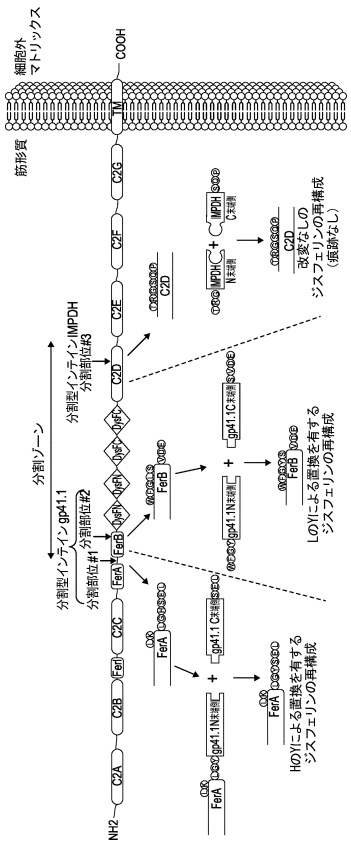
【図１５Ｖ】



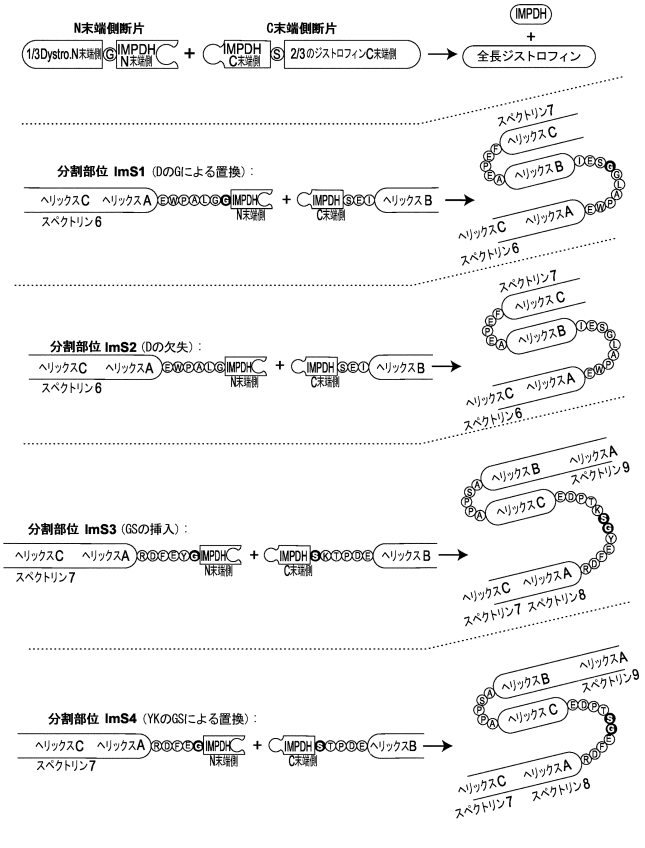
【図１５Ｗ】



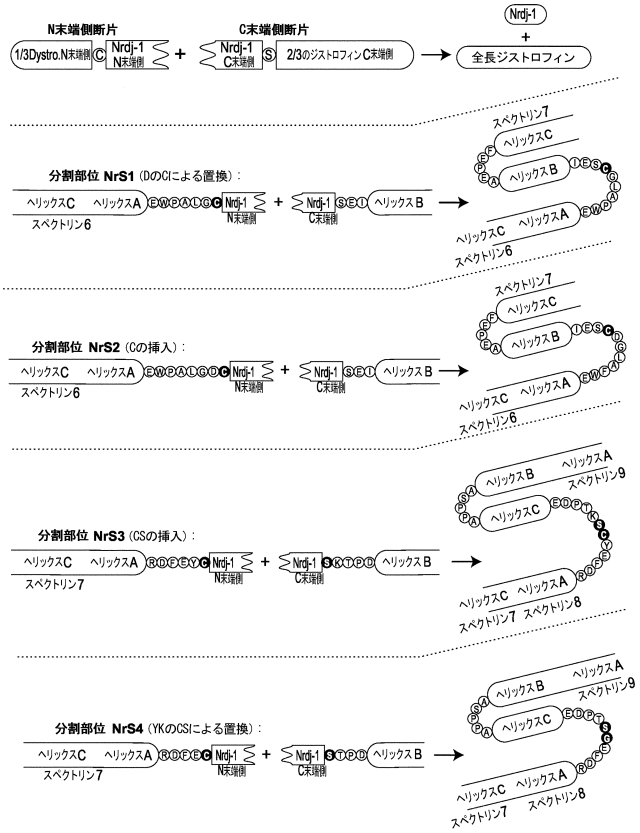
【図１６】



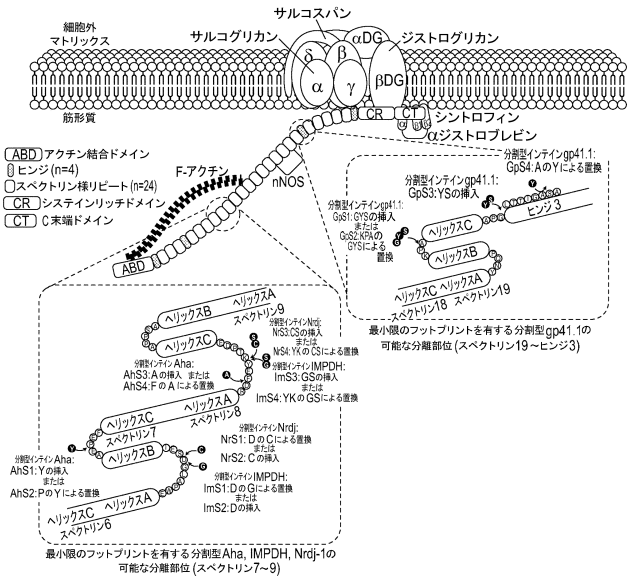
【図１７】



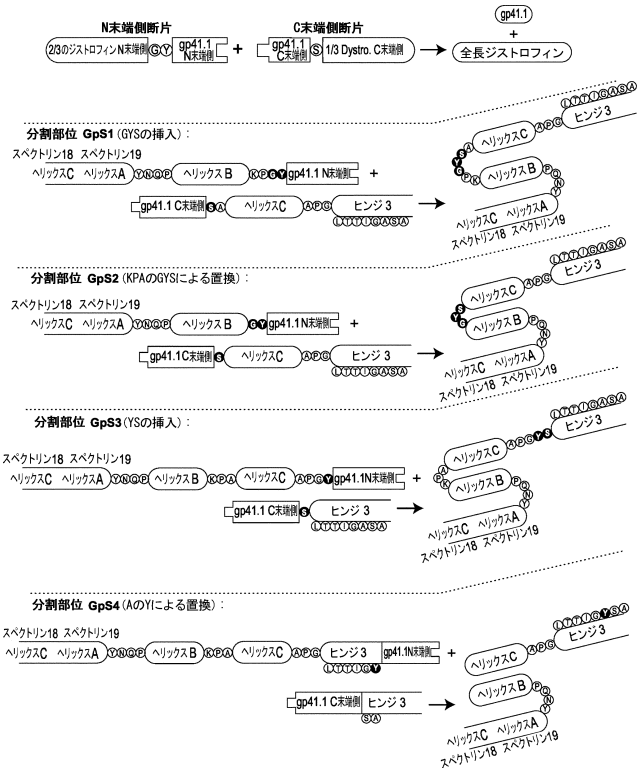
【図１８】



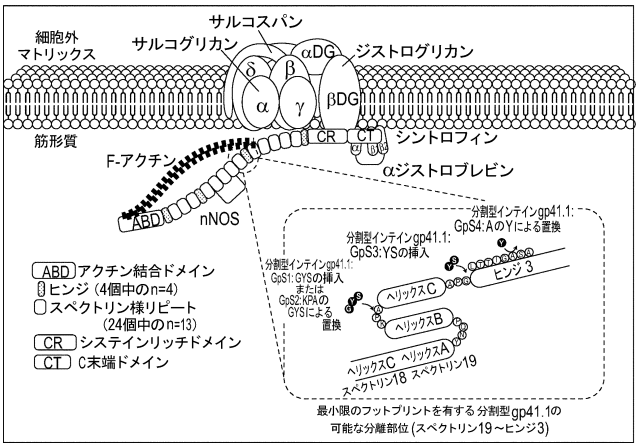
【図１９】



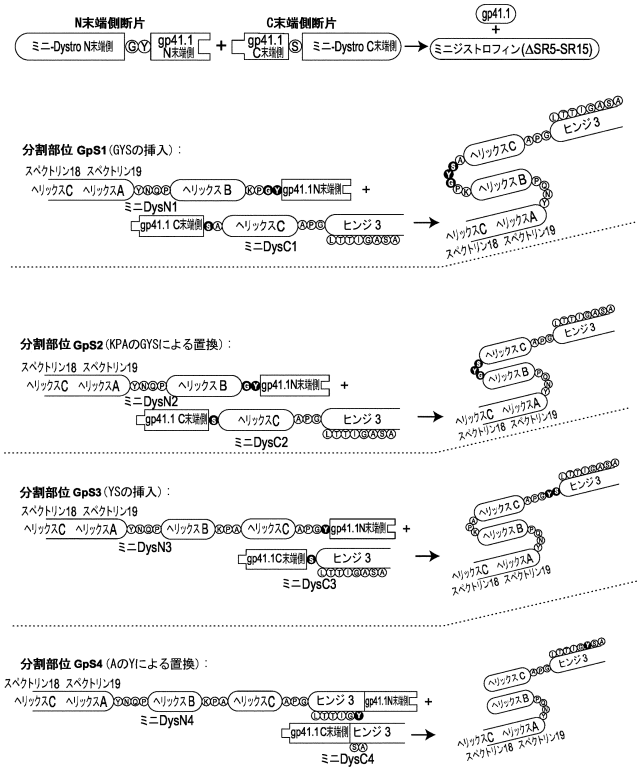
【図２０】



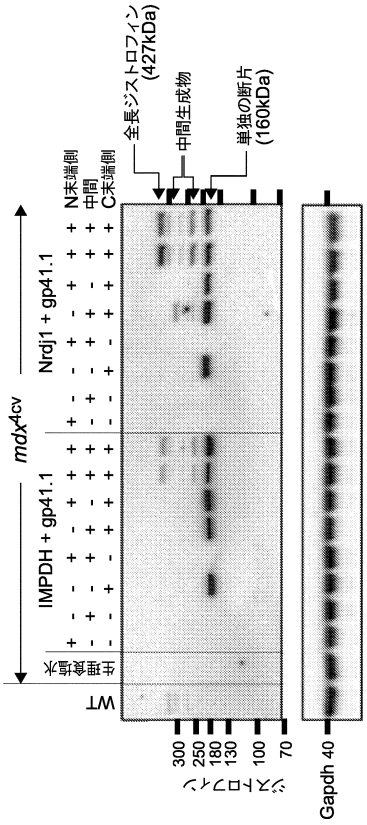
【図２１－１】



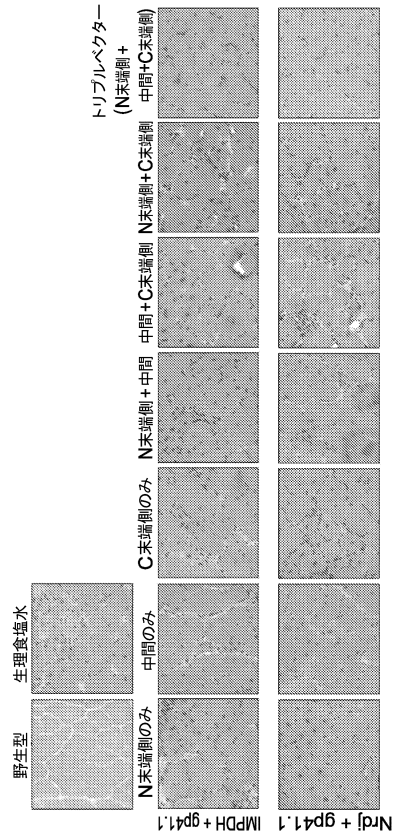
【図２１－２】



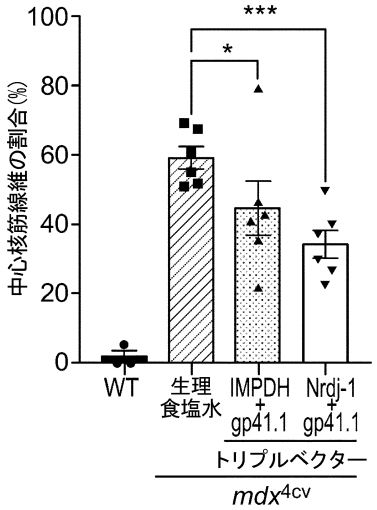
【図２２Ａ】



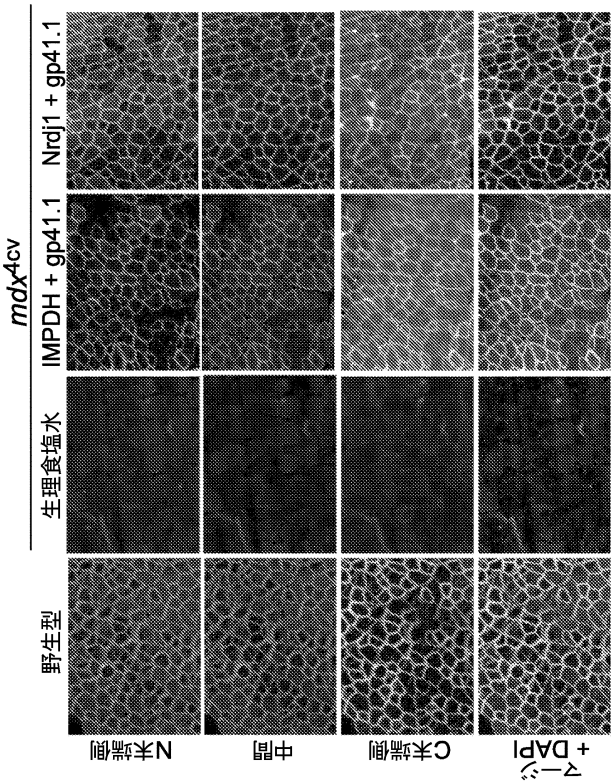
【図２２Ｂ】



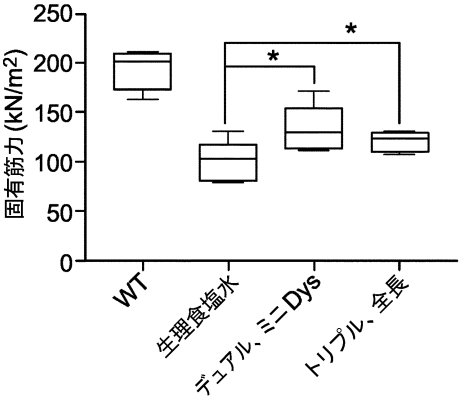
【図２２Ｃ】



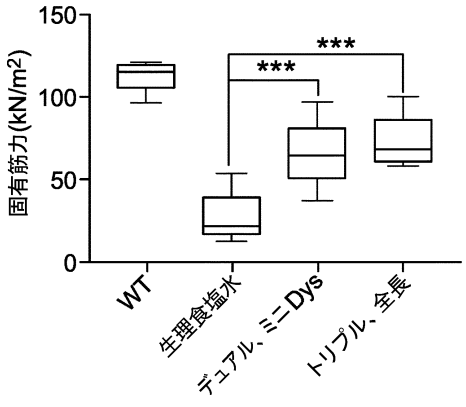
【図２２Ｄ】



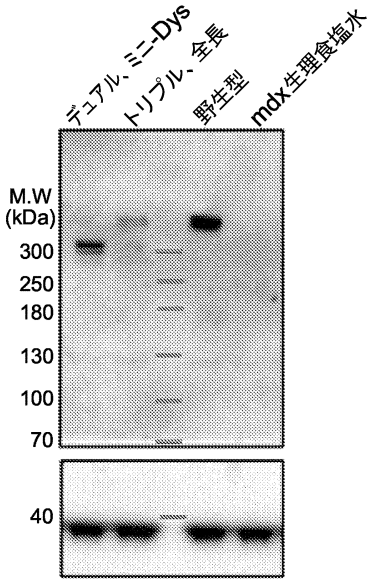
【図２３Ａ】



【図２３Ｂ】



【図２３Ｃ】



【手続補正書】
【提出日】令和６年４月２４日(２０２４.４.２４)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
２０２４５２６９３８０００００１.ｘｍｌ

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/38032

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 fi led.

   b. ☒ furnished subsequent to the international fi ling date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),

      ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/38032

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-19, 28-34, 38-53, 56-57
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 22/38032

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. C12N 15/86, C12N 15/861, C12N 9/22 (2022.01)
ADD. C07K 14/47, C07K 14/705 (2022.01)
CPC - INV. C12N 15/86, C12N 15/861, C12N 9/22
ADD. C07K 2319/92, C12N 2800/40
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.
X	WO 2020/079034 A2 (FONDAZIONE TELETHON) 23 April 2020 (23.04.2020) pg 4, ln 4-6, 30-31; pg 6, ln 1-3, 18-26; pg 7, ln 1-4, 15-24; pg 9, ln 29-30; pg 10, ln 1-5, 23-25; pg 13, ln 3-4; pg 146, ln 10-12	1-3, 20-27, 35-37, 54-55
A	KOO et al., Triple Trans-Splicing Adeno-Associated Virus Vectors Capable of Transferring the Coding Sequence for Full-Length Dystrophin Protein into Dystrophic Mice. Human Gene Therapy. February 2014, Vol. 25, No 2, pages 98-108; entire document	1-3, 20-27, 35-37, 54-55

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 December 2022 (14.12.2022)	JAN 20 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Karl Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
Ａ６１Ｋ	*38/17 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/17		
Ａ６１Ｋ	*38/36 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/36		
Ａ６１Ｋ	*38/43 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/43		
Ａ６１Ｋ	*35/76 (2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76		
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		
Ａ６１Ｋ	*31/7088(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,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　チェンバレン ジェフリー エス.
アメリカ合衆国 ワシントン州 ９８１０５ シアトル ルーズヴェルト ウェイ ノースイースト ４５４５ スイート ４００ ユニヴァーシティ オブ ワシントン内
(72)発明者　タスファウト ヒシャム
アメリカ合衆国 ワシントン州 ９８１０５ シアトル ルーズヴェルト ウェイ ノースイースト ４５４５ スイート ４００ ユニヴァーシティ オブ ワシントン内

Ｆターム（参考）　4B064　AG01 CA19 CC24 CE10 CE12 DA01
4C084　AA01 AA02 AA13 CA18 DB63 DC01 DC10 DC50 MA65 MA66 NA13 NA14 ZA94 ZB21
4C086　AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 MA65 MA66 NA13 NA14 ZA94 ZB21
4C087　AA01 AA02 BC83 CA12 MA65 MA66 NA13 NA14 ZA94 ZB21
4H045　AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 EA20 FA74 GA21 GA26