

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-510215
(P2024-510215A)

(43)公表日 令和6年3月6日(2024.3.6)

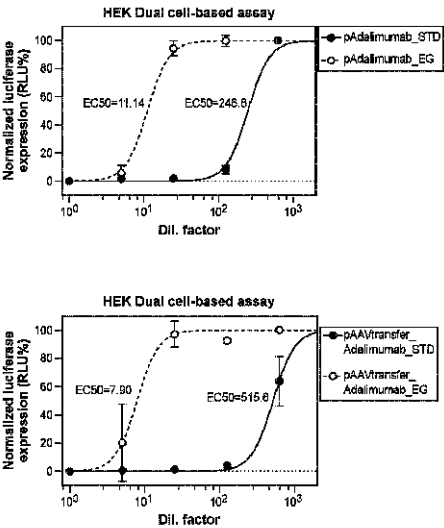
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C Z N A	4 B 0 6 4
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	4 C 0 7 6
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H	4 C 0 8 4
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		4 C 0 8 5
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全151頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-555565(P2023-555565)	(71)出願人	522103443 エクセプジェン インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, ブライアン ト ストリート 7 8 0
(86)(22)出願日	令和4年3月11日(2022.3.11)	(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85)翻訳文提出日	令和5年10月17日(2023.10.17)	(74)代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(86)国際出願番号	PCT/US2022/019984	(74)代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(87)国際公開番号	WO2022/192694	(74)代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(87)国際公開日	令和4年9月15日(2022.9.15)	(74)代理人	230113332 弁護士 山本 健策
(31)優先権主張番号	63/160,672		
(32)優先日	令和3年3月12日(2021.3.12)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 タンパク質発現のための系及び方法

(57)【要約】

本開示は、対象におけるエンハンサータンパク質の共発現を介した標的タンパク質の改善された発現のための方法及び組成物を提供する。標的タンパク質及びエンハンサータンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドのベクター系を投与することを含む、対象において標的タンパク質を発現させるための方法であって、ポリヌクレオチドが作動可能に連結されており、エンハンサータンパク質が核細胞質輸送 (NCT) の阻害剤であり、及び／又は、エンハンサータンパク質が、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質、ピコルナウイルス2 Aプロテアーゼ、ライノウイルス3 Cプロテアーゼ、単純ヘルペスウイルス (HSV) ICP27タンパク質、及びラブドウィルスマトリックス (M) タンパク質からなる群から選択される、方法が本明細書において提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的タンパク質を、それを必要とする対象において発現させる方法であって、1つ以上のベクターを含むベクター系を前記対象に投与することを含み、前記1つ以上のベクターが、

a) 前記標的タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド；及び

b) エンハンサータンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドを含んでおり、

i) 前記エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送（NCT）の阻害剤であり、及び／又は、

ii) 前記エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー（L）タンパク質、ピコルナウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス3Cプロテアーゼ、単純ヘルペスウイルス（HSV）ICP27タンパク質、及びラウドウイルスマトリックス（M）タンパク質からなる群から選択され、

前記第1のポリヌクレオチド及び前記第2のポリヌクレオチドは、1つ以上のプロモーターに作動可能に連結されている、方法。

【請求項 2】

前記エンハンサータンパク質が、核細胞質輸送（NCT）の阻害剤である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記NCT阻害剤が、ウイルスタンパク質である、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記NCT阻害剤が、ピコルナウイルスリーダー（L）タンパク質、ピコルナウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス3Cプロテアーゼ、コロナウイルスORF6タンパク質、エボラウイルスVP24タンパク質、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）カプシドタンパク質、単純ヘルペスウイルス（HSV）ICP27タンパク質、及びラウドウイルスマトリックス（M）タンパク質からなる群から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記NCT阻害剤が、ピコルナウイルスリーダー（L）タンパク質又はその機能的変異体である、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記NCT阻害剤が、ピコルナウイルス2Aプロテアーゼ又はその機能的変異体である、請求項4に記載の方法。

【請求項 7】

前記NCT阻害剤が、ライノウイルス3Cプロテアーゼ又はその機能的変異体である、請求項4に記載の方法。

【請求項 8】

前記NCT阻害剤が、コロナウイルスORF6タンパク質又はその機能的変異体である、請求項4に記載の方法。

【請求項 9】

前記NCT阻害剤が、エボラウイルスVP24タンパク質又はその機能的変異体である、請求項4に記載の方法。

【請求項 10】

前記NCT阻害剤が、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）カプシドタンパク質又はその機能的変異体である、請求項4に記載の方法。

【請求項 11】

前記NCT阻害剤が、単純ヘルペスウイルス（HSV）ICP27タンパク質又はその機能的変異体である、請求項4に記載の方法。

【請求項 12】

前記NCT阻害剤が、ラウドウイルスマトリックス（M）タンパク質又はその機能的変

10

20

30

40

50

異体である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 L タンパク質が、タイラーウイルスの L タンパク質又はその機能的変異体である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 L タンパク質が、配列番号 1 と少なくとも 90 % の同一性を共有する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 L タンパク質が、脳心筋炎ウイルス（EMCV）の L タンパク質又はその機能的変異体である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 L タンパク質が、配列番号 2 と少なくとも 90 % の同一性を共有する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 L タンパク質が、ポリオウイルスの L タンパク質、HRV 16 の L タンパク質、メングウイルスの L タンパク質、及び Saffold ウイルス 2 の L タンパク質又はそれらの機能的変異体からなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 18】

前記系が、発現カセットを含む単一のベクターを含み、前記発現カセットが前記第 1 のポリヌクレオチド及び前記第 2 のポリヌクレオチドを含む、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記発現カセットが、前記第 1 のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第 1 のプロモーター；及び前記第 2 のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第 2 のプロモーターを含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記発現カセットが、前記第 1 のポリヌクレオチド及び前記第 2 のポリヌクレオチドの両方に作動可能に連結された共有プロモーターを含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記発現カセットが、リボソームスキッピング部位をコードするポリヌクレオチドによって連結された前記第 1 のポリヌクレオチド及び前記第 2 のポリヌクレオチドを含むコードポリヌクレオチドを含み、前記コードポリヌクレオチドが、前記共有プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記発現カセットがコードポリヌクレオチドを含み、前記コードポリヌクレオチドがリボソームスキッピング部位によって連結された前記エンハンサータンパク質及び前記標的タンパク質をコードし、前記コードポリヌクレオチドが前記共有プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

請求項 18 ～ 22 のいずれか一項に記載の方法であって、前記発現カセットが、リボソームスキッピング部位によって連結された、前記標的タンパク質及び前記エンハンサータンパク質の両方をコードする単一のメッセンジャー RNA の転写のために構成されており、前記メッセンジャー RNA の翻訳は、別個のポリペプチドとしての前記標的タンパク質及び前記 L タンパク質の発現を生じさせる、方法。

【請求項 24】

前記系が 1 つのベクターを含む、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の方法であって、前記系が、
a) 第 1 のプロモーターに作動可能に連結された、前記第 1 のポリヌクレオチドを含む第 1 のベクター；及び

10

20

30

40

50

b) 第2のプロモーターに作動可能に連結された、前記第2のポリヌクレオチドを含む第2のベクターを含む、方法。

【請求項26】

前記系が2つのベクターを含む、請求項1～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

前記第1のポリヌクレオチド若しくは前記第2のポリヌクレオチドのいずれか、又は両方が、内部リボソーム進入部位(IRES)に作動可能に連結されている、請求項1～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

前記1つ以上のベクターのうちの少なくとも1つが、T7 RNAポリメラーゼによる前記第1のポリヌクレオチド又は前記第2のポリヌクレオチドのいずれか又は両方の転写のために構成されたT7プロモーターを含む、請求項1～27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

前記1つ以上のベクターのうちの少なくとも1つが、T7 RNAポリメラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む、請求項1～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

標的タンパク質を、それを必要とする対象において発現させる方法であって、ベクターを前記対象に投与することを含み、前記ベクターが、

a) 前記標的タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド；及び

b) エンハンサータンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドを含んでおり、

i) 前記エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送(NCT)の阻害剤であり、及び／又は、

ii) 前記エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー(L)タンパク質、ピコルナウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス3Cプロテアーゼ、コロナウイルスORF6タンパク質、エボラウイルスVP24タンパク質、ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEEV)カプシドタンパク質、単純ヘルペスウイルス(HSV)ICP27タンパク質、及びラブドウイルスマトリックス(M)タンパク質からなる群から選択され、

前記第1のポリヌクレオチド及び前記第2のポリヌクレオチドは、少なくとも1つのプロモーターに作動可能に連結されている、方法。

【請求項31】

前記発現カセットが、前記第1のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第1のプロモーター；及び前記第2のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第2のプロモーターを含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記発現カセットが、前記第1のポリヌクレオチド及び前記第2のポリヌクレオチドの両方に作動可能に連結された共有プロモーターを含む、請求項30に記載の方法。

【請求項33】

前記標的タンパク質が治療用タンパク質である、請求項1～32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項34】

前記標的タンパク質が免疫原性タンパク質である、請求項1～33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項35】

前記標的タンパク質が、抗体、ナノボディ、受容体、二重特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)、増殖因子、ホルモン、酵素、免疫調節タンパク質、抗原、構造タンパク質、血液タンパク質、抗菌性ポリペプチド、抗ウイルス性ポリペプチド、腫瘍抑制因子、転写因子、又は翻訳因子である、請求項1～34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項36】

前記標的タンパク質が抗体である、請求項35に記載の方法。

【請求項 37】

前記標的タンパク質が血液タンパク質である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

前記対象において免疫応答を誘発する、請求項 1～37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記対象における疾患を処置する方法であって、前記疾患が、前記標的タンパク質によって引き起こされるか、前記標的タンパク質と相関するか、又は前記標的タンパク質に関連する、請求項 1～38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記対象における疾患を処置する方法であって、前記対象における前記標的タンパク質の発現レベルが、前記疾患を有さない対照対象における前記標的タンパク質の発現レベルよりも低い、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記標的タンパク質が、アブシキシマブ、アレムツズマブ、アリロクマブ、アミバンタマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、バシリキシマブ、ベリムマブ、ベンラリズマブ、ベバシズマブ、ベズロトクスマブ、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブ・ベドチン、プロダルマブ、プロルシズマブ、プロスマブ、カナキヌマブ、カブラシズマブ、カプロマブ、カツマキシマブ、セミピリマブ、セルトリズマブ・ペゴル、セツキシマブ、クリザンリズマブ、ダクリズマブ、ダラツムマブ、デノスマブ、ディヌツキシマブ、デュピルマブ、デュルバルマブ、エクリズマブ、エロツズマブ、エマパルマブ、エミシズマブ、エンフォルツマブ・ベドチン、エプチニズマブ、エレヌマブ、エルツマクソマブ、エタラシズマブ、エボロクマブ、フレマネズマブ、ガルカネズマブ、ゲムツズマブ・オゾガマイシン、ゴリムマブ、グセルクマブ、イバリズマブ、イブリツモマブ・チウキセタン、イダルシズマブ、イムシロマブ、インフリキシマブ、イノツズマブ・オゾガマイシン、イピリムマブ、イサツキシマブ、イトリズマブ、イクセキズマブ、ラナデルマブ、ロキベツマブ、メポリズマブ、モガムリズマブ、モキセツモマブ・パストトックス、ナタリズマブ、ネシツムマブ、ニモツズマブ、ニボルマブ、オビルトキサキシマブ、オビヌツズマブ、オクレリズマブ、オフアツムマブ、オララツムマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペンブロリズマブ、ペルツズマブ、ポラツズマブ・ベドチン、ラコツモマブ、ラムシルマブ、ラニビズマブ、ラキシバクマブ、ラブリズマブ、レスリズマブ、リサンキズマブ、リツキシマブ、Rma b、ロモソズマブ、ロベリズマブ、ルブリズマブ、サシツズマブ・ゴビテカン、サリルマブ、セクキヌマブ、シルトキシマブ、タルケタマブ、テクリスタマブ、テプロツムマブ、チルドラキズマブ、トシリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、トラスツズマブ・デュオカルマジン、トラスツズマブ・エムタンシン、ウステキヌマブ、及びベドリズマブ、ブリナツモマブ、エミシズマブ、ソリトマブ、アドネクチン、アンチカリン、アビマー、フィノマー、クニツツドメイン、ノッチン、アフィボディ、DARPin、血栓溶解薬、トランスフェリン、t-PA、ヒルジン、C1エステラーゼ阻害剤、抗トロンビン薬、血漿カリクレイン阻害薬、プラスミン、プロトロンビン複合体、補体成分、プレアルブミン（トランスサイレチン）、 $\alpha 1$ アンチトリプシン、 $\alpha 1$ -酸性糖タンパク質、 $\alpha 1$ -フェトプロテイン、 $\alpha 2$ -マクログロブリン、 γ グロブリン、 $\beta 2$ ミクログロブリン、ハプトグロビン、セルロプラスミン、補体成分 3、補体成分 4、C 反応性タンパク質（CRP）、リポタンパク質（カイロミクロン、VLDL、LDL、HDL）、トランスフェリン、プロトロンビン、マンノース結合レクチン（MBL）、アルブミン、グロブリン、フィブリノゲン、調節因子、及び凝固因子、例えば第 I 因子、第 II 因子、第 III 因子、第 IV 因子、第 V 因子、第 VI 因子、第 VII 因子、第 VIII 因子、第 IX 因子、第 X 因子、第 XI 因子、第 XII 因子、第 XIII 因子、フォン・ウィルバンド因子、プレカリクレイン、フィッツジェラルド因子、フィブロネクチン、抗トロンビン III、ヘパリン補酵素 II、プロテイン C、プロテイン S、プロテイン Z、プロテイン Z 関連プロテアーゼ阻害剤、プラスミノーゲン、 $\alpha 2$ -アンチプラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤 1、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤 2

10

20

30

40

50

、癌凝血原、EPO、IGF-1、G-CSF、GM-CSF、BMP-2、BMP-7、KGF、PDGF-BB、TMP、アドレノメデュリン（AM）、アンジオポエチン（Ang）、自己分泌運動因子、骨形成タンパク質（BMP）、毛様体神経栄養因子ファミリー、毛様体神経栄養因子（CNTF）、白血病抑制因子（LIF）、インターロイキン-6（IL-6）、コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、上皮増殖因子（EGF）、エフリン-エフリンA1、エフリンA2、エフリンA3、エフリンA4、エフリンA5、エフリンB1、エフリンB2、エフリンB3、エリスロポエチン（EPO）、各線維芽細胞増殖因子（FGF）1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、ウシ胎児性ソマトトロフィン（FBS）、GDNFリガンドファミリー、グリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）、ノイトリン、ペルセフィン、アルテミン、成長分化因子-9（GDF9）、肝細胞増殖因子（HGF）、肝腫由来増殖因子（HDGF）、インスリン、インスリン様増殖因子、インスリン様増殖因子-1（IGF-1）、インスリン様増殖因子-2（IGF-2）、インターロイキン-1（IL-1）、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、ケラチノサイト増殖因子（KGF）、遊走刺激因子（MSF）、マクロファージ刺激タンパク質（MSP）、肝細胞増殖因子様タンパク質（HGF-LP）としても知られる、ミオスタチン（GDF-8）、ニューレグリン1（NRG1）、ニューレグリン2（NRG2）、ニューレグリン3（NRG3）、ニューレグリン4（NRG4）、ニューロトロフィン、脳由来神経栄養因子（BDNF）、神経増殖因子（NGF）、ニューロトロフィン-3（NT-3）、ニューロトロフィン-4（NT-4）、胎盤増殖因子（PGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、レナラーゼ（RNLS）、T細胞増殖因子（TCGF）、トロンボポエチン（TPO）、トランスフォーミング増殖因子 α （TGF- α ）、トランスフォーミング増殖因子 β （TGF- β ）、血管内皮増殖因子（VEGF）、Wntシグナル伝達経路、グルカゴン様ペプチド-1、インスリン、ヒト成長ホルモン、卵胞刺激ホルモン、カルシトニン、ルトロピン、グルカゴン様ペプチド-2、レプチン、副甲状腺ホルモン、絨毛性ゴナドトロピン、甲状腺刺激ホルモン、及びグルカゴン、 α -グリコシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、イデュロン酸-2-硫酸、 α -ガラクトシダーゼ、尿酸オキシダーゼ、N-アセチルガラクトシダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、ヒアルロニダーゼ、DNAse、アスパラギナーゼ、ウリカーゼ、アデノシンデアミナーゼ及びその他のエンテロキナーゼ、シクラーゼ、カスパーゼ、カテプシン、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ及びリガーゼ、アガルシダーゼ β 、アガルシダーゼ α 、イミグルセラーゼ、タリグルセラーゼ α 、ベラグルセラーゼ α 、アルグルセラーゼ、セベリパーゼ α 、ラロニダーゼ、イデュルスルファラーゼ、エロスルファラーゼ α 、ガルスルファラーゼ、アルグルコシダーゼ α 、C3阻害剤、ハーラー及びハンター補正因子、イオンチャネル、ギャップ結合、イオン性受容体、トランスポーター、細胞表面受容体、シグナル伝達タンパク質、ドーパミン受容体1（DRD1）、囊胞性線維症膜貫通コンダクタンス制御因子（CFTR）、C1エステラーゼ阻害剤（C1-Inh）、IL2誘導性T細胞キナーゼ（ITK）、及びNADaseからなる群から選択される、請求項1～40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

前記標的タンパク質が抗体である、請求項1～35及び38～41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

前記標的タンパク質がアダリムマブである、請求項1～35及び38～41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

アダリムマブの重鎖が、配列番号132のアミノ酸配列を有する、請求項43に記載の

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 4 5】

アダリムマブの軽鎖が、配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列を有する、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 6】

アダリムマブの重鎖が、配列番号 1 3 4 の核酸配列によってコードされる、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 7】

アダリムマブの軽鎖が、配列番号 1 3 5 の核酸配列によってコードされる、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 8】

ベクターを投与することを含み、前記エンハンサータンパク質が、前記対象における前記標的タンパク質の活性を増加させる、請求項 1 ～ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

ベクターを投与することを含み、前記エンハンサータンパク質が、前記対象における前記標的タンパク質の発現レベルを低下させる、請求項 1 ～ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

ベクターを投与することを含み、前記エンハンサータンパク質が、前記対象の注射部位における前記標的タンパク質の発現の均一性を増加させる、請求項 1 ～ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 1】

ベクターを投与することを含み、前記エンハンサータンパク質が、前記対象の細胞又は対象における活性標的タンパク質の持続時間を増加させる、請求項 1 ～ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2】

アダリムマブタンパク質を、それを必要とする対象において発現させる方法であって、1 つ以上のベクターを含むベクター系を前記対象に投与することを含み、前記 1 つ以上のベクターが、

a) アダリムマブタンパク質をコードする第 1 のポリヌクレオチド；及び

b) 配列番号 1 ～ 6 及び 2 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、若しくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するピコルナウイルスリーダー（L）タンパク質をコードする第 2 のポリヌクレオチド；を含み、

前記アダリムマブタンパク質をコードする前記第 1 のポリヌクレオチド及び前記 L タンパク質をコードする前記第 2 のポリヌクレオチドが、1 つ以上のプロモーターに作動可能に連結されており、前記アダリムマブタンパク質及び前記 L タンパク質が共発現される、方法。

【請求項 5 3】

前記第 1 のポリヌクレオチドが、配列番号 1 2 4 のアダリムマブ可変重鎖配列、又はそれに対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、若しくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び配列番号 1 2 9 のアダリムマブ可変軽鎖配列、又はそれに対して少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、若しくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記リーダータンパク質及び前記アダリムマブタンパク質の前記共発現が、細胞又は対

10

20

30

40

50

象における前記アダリムマブタンパク質の発現レベルを、約 10 %、約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 80 %、又は約 90 % 減少させる、請求項 52～53 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 55】

前記リーダータンパク質及び前記アダリムマブタンパク質の前記共発現が、前記対象の細胞又は前記対象における前記アダリムマブタンパク質の活性を、約 10 倍、約 20 倍、約 30 倍、約 40 倍、約 50 倍、約 60 倍、約 70 倍、約 80 倍、約 90 倍、約 100 倍、約 150 倍、約 200 倍、又は約 300 倍増加させる、請求項 52～54 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 56】

前記リーダータンパク質及び前記アダリムマブタンパク質の前記共発現が、前記アダリムマブタンパク質が前記対象の細胞又は前記対象において見出される期間を、約 2 倍、約 3 倍、約 4 倍、約 5 倍、約 6 倍、約 7 倍、約 8 倍、約 9 倍、約 10、約 11 倍、約 12 倍、約 13 倍、約 14 倍、約 15 倍、約 16 倍、約 17 倍、約 18 倍、約 19 倍、又は約 20 倍増加させる、請求項 52～55 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】

前記リーダータンパク質及び前記アダリムマブタンパク質の前記共発現が、前記対象の組織又は前記対象における前記標的タンパク質の変動係数（CV %）を約 1.2 倍、約 1.3 倍、約 1.4 倍、約 1.5 倍、約 1.6 倍、約 1.7 倍、約 1.8 倍、約 1.9 倍、約 2 倍、約 2.1 倍、約 2.2 倍、約 2.3 倍、約 2.4 倍、約 2.5 倍、約 2.7 倍、約 2.8 倍、約 2.9 倍、又は約 3 倍増加させる、請求項 52～56 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 58】

前記リーダータンパク質及び前記アダリムマブタンパク質の前記共発現が、前記標的タンパク質の分解を約 10 倍、約 20 倍、約 30 倍、約 40 倍、約 50 倍、約 60 倍、約 70 倍、約 80 倍、約 90 倍、約 100 倍、約 150 倍、約 200 倍、又は約 300 倍減少させる、請求項 52～57 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 59】

前記リーダータンパク質及び前記アダリムマブタンパク質の共発現が、アダリムマブの EC₅₀ を約 10 倍、約 20 倍、約 30 倍、約 40 倍、約 50 倍、約 60 倍、約 70 倍、約 80 倍、約 90 倍、約 100 倍、約 150 倍、約 200 倍、又は約 300 倍減少させる、請求項 52～58 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 60】

前記ベクター系が、配列番号 191～216 のセットのポリヌクレオチド配列又は配列番号 217～242 のセットの配列を含む、請求項 52～59 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

前記ベクター系が、アデノウイルス遺伝子 E4、E2A、VA、及び AAV の Cap タンパク質をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドを含む、請求項 52～60 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 62】

前記ベクター系が、脂質ナノ粒子（LNP）を介して投与される、請求項 52～61 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 63】

前記 LNP が、PEG 化脂質、コレステロール、及び 1 つ以上のイオン化可能脂質を含む、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 64】

前記 LNP が、約 0.5 %～約 2 % の PEG 化脂質、約 35 %～約 45 % のコレステロール、及び約 5 %～約 65 % の 1 つ以上のイオン化可能脂質を含む、請求項 62 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 65】

前記 LNP が、約 1 % の DMG-PEG (2000) 対約 40 % のコレステロール対約 10 % の DOPC 及び約 50 % の DLin-KC2-DMA の比で、DMG-PEG (2000)、コレステロール、DOPC 及び DLin-KC2-DMA を含む、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 66】

前記系が筋肉内又は皮下に送達される、請求項 52～65 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 67】

グルコシルセラミダーゼ (GBA) タンパク質を、それを必要とする対象において発現させる方法であって、1つ以上のベクターを含むベクター系を前記対象に投与することを含み、前記 1つ以上のベクターが、

a) グルコシルセラミダーゼ (GBA) タンパク質をコードする第 1 のポリヌクレオチド；及び

b) 配列番号 1～6 及び 24 からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質をコードする第 2 のポリヌクレオチド；を含み、

前記グルコシルセラミダーゼ (GBA) タンパク質をコードする前記第 1 のポリヌクレオチド及び前記 L タンパク質をコードする前記第 2 のポリヌクレオチドが、1つ以上のプロモーターに作動可能に連結されており、前記 GBA タンパク質及び前記 L タンパク質が共発現される、方法。

【請求項 68】

前記第 1 のポリヌクレオチドが、配列番号 406 の GBA アミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

前記リーダータンパク質及び前記 GBA タンパク質の前記共発現が、前記対象の細胞又は前記対象における前記 GBA タンパク質の発現レベルを約 10 %、約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 80 %、又は約 90 % 低下させる、請求項 67～68 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 70】

前記リーダータンパク質及び前記 GBA タンパク質の前記共発現が、前記対象の細胞又は前記対象における GBA の活性を、約 10 倍、約 20 倍、約 30 倍、約 40 倍、約 50 倍、約 60 倍、約 70 倍、約 80 倍、約 90 倍、約 100 倍、約 150 倍、約 200 倍、又は約 300 倍増加させる、請求項 67～69 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 71】

前記リーダータンパク質及び前記 GBA タンパク質の前記共発現が、GBA が前記対象の細胞又は前記対象において見出される期間を、約 2 倍、約 3 倍、約 4 倍、約 5 倍、約 6 倍、約 7 倍、約 8 倍、約 9 倍、約 10、約 11 倍、約 12 倍、約 13 倍、約 14 倍、約 15 倍、約 16 倍、約 17 倍、約 18 倍、約 19 倍、又は約 20 倍増加させる、請求項 67～70 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 72】

前記エンハンサータンパク質の前記共発現が、前記対象の組織又は前記対象における GBA の変動係数 (CV %) を約 1.2 倍、約 1.3 倍、約 1.4 倍、約 1.5 倍、約 1.6 倍、約 1.7 倍、約 1.8 倍、約 1.9 倍、約 2 倍、約 2.1 倍、約 2.2 倍、約 2.3 倍、約 2.4 倍、約 2.5 倍、約 2.7 倍、約 2.8 倍、約 2.9 倍、又は約 3 倍増加

10

20

30

40

50

させる、請求項 67～71 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 73】

前記リーダータンパク質及び前記 GBA タンパク質の前記共発現が、GBA の分解を約 10 倍、約 20 倍、約 30 倍、約 40 倍、約 50 倍、約 60 倍、約 70 倍、約 80 倍、約 90 倍、約 100 倍、約 150 倍、約 200 倍、又は約 300 倍減少させる、請求項 67～72 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 74】

前記リーダータンパク質及び前記 GBA タンパク質の前記共発現が、最大応答の 50 % を生じるのに有効な GBA の濃度 (EC₅₀) を低下させる、請求項 67～73 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 75】

前記ベクター系が、アデノウイルス遺伝子 E4、E2A、VA、及び AAV の Cap タンパク質をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドを含む、請求項 67～74 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 76】

前記ベクター系が、脂質ナノ粒子 (LNP) を介して投与される、請求項 67～75 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 77】

前記 LNP が、PEG 化脂質、コレステロール、及び 1 つ以上のイオン化可能脂質を含む、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

前記 LNP が、約 0.5 %～約 2 % の PEG 化脂質、約 35 %～約 45 % のコレステロール、及び約 5 %～約 65 % の 1 つ以上のイオン化可能脂質を含む、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 79】

前記 LNP が、約 1 % の DMG-PEG (2000) 対約 40 % のコレステロール対約 10 % の DOPC 及び約 50 % の DLin-KC2-DMA の比で、DMG-PEG (2000)、コレステロール、DOPC 及び DLin-KC2-DMA を含む、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 80】

前記系が筋肉内又は皮下に送達される、請求項 67～79 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 81】

標的タンパク質を、それを必要とする対象において発現させる方法であって、1 つ以上のベクターを含むベクター系を前記対象に投与することを含み、前記 1 つ以上のベクターが、

a) 標的タンパク質をコードする第 1 のポリヌクレオチド；及び

b) 配列番号 1～6 及び 24 からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質をコードする第 2 のポリヌクレオチド；を含み、

前記標的タンパク質をコードする前記第 1 のポリヌクレオチド及び前記 L タンパク質をコードする前記第 2 のポリヌクレオチドが、1 つ以上のプロモーターに作動可能に連結されており、前記標的タンパク質及び前記 L タンパク質が共発現される、方法。

【請求項 82】

前記第 1 のポリヌクレオチドが、表 8 の可変重鎖配列、又はそれに対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び／又は表 8 の可変軽鎖配列、又

10

20

30

40

50

はそれに対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、請求項81に記載の方法。

【請求項83】

前記第1のポリヌクレオチドが、表9のタンパク質配列、又はそれに対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、請求項81に記載の方法。

10

【請求項84】

前記リーダータンパク質及び前記標的タンパク質の前記共発現が、細胞又は対象における前記標的タンパク質の発現レベルを、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、又は約90%減少させる、請求項81～83のいずれか一項に記載の方法。

【請求項85】

前記リーダータンパク質及び前記標的タンパク質の前記共発現が、前記対象の細胞又は前記対象における前記標的タンパク質の活性を、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍、約150倍、約200倍、又は約300倍増加させる、請求項81～84のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項86】

前記リーダータンパク質及び前記標的タンパク質の前記共発現が、前記標的タンパク質が前記対象の細胞又は前記対象において見出される期間を、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10、約11倍、約12倍、約13倍、約14倍、約15倍、約16倍、約17倍、約18倍、約19倍、又は約20倍増加させる、請求項81～85のいずれか一項に記載の方法。

【請求項87】

前記リーダータンパク質及び前記標的タンパク質の前記共発現が、前記対象の組織又は前記対象における前記標的タンパク質の変動係数(CV%)を約1.2倍、約1.3倍、約1.4倍、約1.5倍、約1.6倍、約1.7倍、約1.8倍、約1.9倍、約2倍、約2.1倍、約2.2倍、約2.3倍、約2.4倍、約2.5倍、約2.7倍、約2.8倍、約2.9倍、又は約3倍増加させる、請求項81～85のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項88】

前記リーダータンパク質及び前記標的タンパク質の前記共発現が、前記標的タンパク質の分解を約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍、約150倍、約200倍、又は約300倍減少させる、請求項81～87のいずれか一項に記載の方法。

【請求項89】

前記リーダータンパク質及び前記標的タンパク質の共発現が、標的のEC₅₀を約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍、約150倍、約200倍、又は約300倍減少させる、請求項81～88のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項90】

前記ベクター系が、アデノウイルス遺伝子E4、E2A、VA、及びAAVのCapタンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む、請求項81～89のいずれか一項に記載の方法。

【請求項91】

前記ベクター系が、脂質ナノ粒子(LNP)を介して投与される、請求項81～90のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 9 2】

前記 L N P が、P E G 化脂質、コレステロール、及び 1 つ以上のイオン化可能脂質を含む、請求項 8 1 ～ 9 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記 L N P が、約 0 . 5 % ～ 約 2 % の P E G 化脂質、約 3 5 % ～ 約 4 5 % のコレステロール、及び約 5 % ～ 約 6 5 % の 1 つ以上のイオン化可能脂質を含む、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記 L N P が、約 1 % の D M G - P E G (2 0 0 0) 対約 4 0 % のコレステロール対約 1 0 % の D O P C 及び約 5 0 % の D L i n - K C 2 - D M A の比で、D M G - P E G (2 0 0 0) 、コレステロール、D O P C 及び D L i n - K C 2 - D M A を含む、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記系が筋肉内又は皮下に送達される、請求項 8 1 ～ 9 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 6】

先行する請求項のいずれか一項に記載の方法において使用するためのベクター系。

【請求項 9 7】

1 つ以上のベクターを含むベクター系を含む組成物であって、前記 1 つ以上のベクターが、

a) アダリムマブタンパク質をコードする第 1 のポリヌクレオチド；及び

b) 配列番号 1 ～ 6 及び 2 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、若しくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質をコードする第 2 のポリヌクレオチド；を含み、

前記アダリムマブタンパク質をコードする前記第 1 のポリヌクレオチド及び前記 L タンパク質をコードする前記第 2 のポリヌクレオチドが、1 つ以上のプロモーターに作動可能に連結されており、前記アダリムマブタンパク質及び前記 L タンパク質が共発現される、組成物。

【請求項 9 8】

前記第 1 のポリヌクレオチドが、配列番号 1 2 4 のアダリムマブ可変重鎖配列、又はそれに対して少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、若しくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び配列番号 1 2 9 のアダリムマブ可変軽鎖配列、又はそれに対して少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、若しくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、請求項 9 7 に記載の組成物。

【請求項 9 9】

1 つ以上のベクターを含むベクター系を含む組成物であって、前記 1 つ以上のベクターが、

a) グルコシルセラミダーゼ (G B A) タンパク質をコードする第 1 のポリヌクレオチド；及び

b) 配列番号 1 ～ 6 及び 2 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少なくとも 9 8 % 、若しくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質をコードする第 2 のポリヌクレオチド；を含み、

前記グルコシルセラミダーゼ (G B A) タンパク質をコードする前記第 1 のポリヌクレ

10

20

30

40

50

オチド及び前記 L タンパク質をコードする前記第 2 のポリヌクレオチドが、1 つ以上のプロモーターに作動可能に連結されており、前記 G B A タンパク質及び前記 L タンパク質が共発現される、組成物。

【請求項 100】

前記第 1 のポリヌクレオチドが、配列番号 406 の G B A アミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、請求項 99 に記載の組成物。

【請求項 101】

1 つ以上のベクターを含む組成物であって、

a) 標的タンパク質をコードする第 1 のポリヌクレオチド；及び

b) 配列番号 1～6 及び 24 からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質をコードする第 2 のポリヌクレオチド；を含み、

前記標的タンパク質をコードする前記第 1 のポリヌクレオチド及び前記 L タンパク質をコードする前記第 2 のポリヌクレオチドが、1 つ以上のプロモーターに作動可能に連結されており、前記標的タンパク質及び前記 L タンパク質が共発現される、組成物。

【請求項 102】

前記第 1 のポリヌクレオチドが、表 8 の可変重鎖配列、又はそれに対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び／又は表 8 の可変軽鎖配列、又はそれに対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、請求項 101 に記載の組成物。

【請求項 103】

前記第 1 のポリヌクレオチドが、表 9 のタンパク質配列、又はそれに対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、請求項 102 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照

本出願は、2021 年 3 月 12 日に提出された米国仮特許出願第 63 / 160, 672 号の優先権を主張し、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の組み込み

本明細書と共に電子的に提出されたテキストファイルの内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる：配列表のコンピュータ可読形式コピー（ファイル名：EXCI__002WO__SeqList__ST25、ファイルサイズ 405 キロバイト）。

【背景技術】

【0003】

培養物中で増殖させた真核細胞におけるタンパク質の組換え発現は、科学研究及び医学における用途を有する。組換え生産されたタンパク質（抗体、酵素、G タンパク質共役

10

20

30

40

50

受容体（GPCR）、分泌タンパク質、イオンチャネル、ウイルスタンパク質、及び増殖因子など）は、医薬産業内で、新しい薬物（を開発するために例えば、小分子発見）、治療薬として（例えば、抗体及び他の生物学的薬物）、及び分析方法の重要な資産として使用されている。医薬産業におけるそれらの使用に加えて、組換え産生された哺乳動物タンパク質は、食品産業においてますます使用されている（例えば、いわゆる精肉生産のため）。多くの組換えタンパク質について、機能的形態での組換えタンパク質の発現を達成することは依然として困難である。

【0004】

酵母、植物、動物及びヒトのような生きている生物における導入遺伝子発現は、科学的研究及び医学における適用を有する。現代の治療分野は、酵素又は抗体のような生物製剤の産生に焦点を当てている。現在、この分野における多くの治療薬は、標的対象の外部で製造され、後に注射される。このプロセスは、適切な発現系を見出すこと、及び薬物製品を安定して高収率で産生することなどのそれ自体の課題を伴う。新規治療における別の新たな分野は、ポリヌクレオチドを投与し、身体自身の細胞を使用して最終薬物製品を産生することによる、生体系内での遺伝子の発現である。体内での生物製剤の産生に関する利点は、例えば天然の翻訳後修飾を含む多くの利点を有する。更に、単にポリヌクレオチドを治療剤として使用することによって、生物製剤の生産及び精製における多くの不足が除去され、低コスト、拡張可能、安全かつ安定な薬物製品が残される。この形態の薬物送達

は、1990年代の初めから研究されてきたが、治療の成功はほとんどない。生きている動物又はヒトの体内でこれらの薬物がうまく生産されなかったことについては多くの仮説があるが、依然として解決策はない。

10

20

【0005】

動物又はヒトにおけるインビボでの組換えタンパク質及び生物製剤の産生において有用な組成物及び方法に対する満たされていない必要性が残っている。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】真核細胞における遺伝子発現を調節する6つの例示的な方法を示す。

【図2A】非限定的な例示的構築物：EG1（図2A）；EG2（図2B）；EG3及びEG4（図2C）；EG5（図2D）；EG6（図2E）；EG7（図2F）；EG8（図2G）；EG9（図2H）；EG10及びEG11（図2I）；EG12及びEG4（図2J）；EG10（図2K）；EG13（図2L）；EG14（図2M）；EG15（図2N）；EG16（図2O）；EG17（図2P）；EG18（図2Q）；EG19（図2R）；EG20（図2S）；EG21（図2T）；EG22（図2U）；EG23（図2V）；EG24（図2W）；及びEG25（図2X）の概略図である。

30

【図2B】非限定的な例示的構築物：EG1（図2A）；EG2（図2B）；EG3及びEG4（図2C）；EG5（図2D）；EG6（図2E）；EG7（図2F）；EG8（図2G）；EG9（図2H）；EG10及びEG11（図2I）；EG12及びEG4（図2J）；EG10（図2K）；EG13（図2L）；EG14（図2M）；EG15（図2N）；EG16（図2O）；EG17（図2P）；EG18（図2Q）；EG19（図2R）；EG20（図2S）；EG21（図2T）；EG22（図2U）；EG23（図2V）；EG24（図2W）；及びEG25（図2X）の概略図である。

40

【図2C】非限定的な例示的構築物：EG1（図2A）；EG2（図2B）；EG3及びEG4（図2C）；EG5（図2D）；EG6（図2E）；EG7（図2F）；EG8（図2G）；EG9（図2H）；EG10及びEG11（図2I）；EG12及びEG4（図2J）；EG10（図2K）；EG13（図2L）；EG14（図2M）；EG15（図2N）；EG16（図2O）；EG17（図2P）；EG18（図2Q）；EG19（図2R）；EG20（図2S）；EG21（図2T）；EG22（図2U）；EG23（図2V）；EG24（図2W）；及びEG25（図2X）の概略図である。

【図2D】非限定的な例示的構築物：EG1（図2A）；EG2（図2B）；EG3及びEG4（図2C）；EG5（図2D）；EG6（図2E）；EG7（図2F）；EG8（

50

【図 2 K】非限定的な例示の構築物：EG 1（図 2 A）；EG 2（図 2 B）；EG 3 及び EG 4（図 2 C）；EG 5（図 2 D）；EG 6（図 2 E）；EG 7（図 2 F）；EG 8（図 2 G）；EG 9（図 2 H）；EG 10 及び EG 11（図 2 I）；EG 12 及び EG 4（

50

10

20

30

40

50

図 2 N) ; E G 1 6 (図 2 O) ; E G 1 7 (図 2 P) ; E G 1 8 (図 2 Q) ; E G 1 9 (図 2 R) ; E G 2 0 (図 2 S) ; E G 2 1 (図 2 T) ; E G 2 2 (図 2 U) ; E G 2 3 (図 2 V) ; E G 2 4 (図 2 W) ; 及び E G 2 5 (図 2 X) の概略図である。

【図 2 S】非限定的な例示的構築物 : E G 1 (図 2 A) ; E G 2 (図 2 B) ; E G 3 及び E G 4 (図 2 C) ; E G 5 (図 2 D) ; E G 6 (図 2 E) ; E G 7 (図 2 F) ; E G 8 (図 2 G) ; E G 9 (図 2 H) ; E G 1 0 及び E G 1 1 (図 2 I) ; E G 1 2 及び E G 4 (図 2 J) ; E G 1 0 (図 2 K) ; E G 1 3 (図 2 L) ; E G 1 4 (図 2 M) ; E G 1 5 (図 2 N) ; E G 1 6 (図 2 O) ; E G 1 7 (図 2 P) ; E G 1 8 (図 2 Q) ; E G 1 9 (図 2 R) ; E G 2 0 (図 2 S) ; E G 2 1 (図 2 T) ; E G 2 2 (図 2 U) ; E G 2 3 (図 2 V) ; E G 2 4 (図 2 W) ; 及び E G 2 5 (図 2 X) の概略図である。

10

【図 2 T】非限定的な例示的構築物 : E G 1 (図 2 A) ; E G 2 (図 2 B) ; E G 3 及び E G 4 (図 2 C) ; E G 5 (図 2 D) ; E G 6 (図 2 E) ; E G 7 (図 2 F) ; E G 8 (図 2 G) ; E G 9 (図 2 H) ; E G 1 0 及び E G 1 1 (図 2 I) ; E G 1 2 及び E G 4 (図 2 J) ; E G 1 0 (図 2 K) ; E G 1 3 (図 2 L) ; E G 1 4 (図 2 M) ; E G 1 5 (図 2 N) ; E G 1 6 (図 2 O) ; E G 1 7 (図 2 P) ; E G 1 8 (図 2 Q) ; E G 1 9 (図 2 R) ; E G 2 0 (図 2 S) ; E G 2 1 (図 2 T) ; E G 2 2 (図 2 U) ; E G 2 3 (図 2 V) ; E G 2 4 (図 2 W) ; 及び E G 2 5 (図 2 X) の概略図である。

【図 2 U】非限定的な例示的構築物 : E G 1 (図 2 A) ; E G 2 (図 2 B) ; E G 3 及び E G 4 (図 2 C) ; E G 5 (図 2 D) ; E G 6 (図 2 E) ; E G 7 (図 2 F) ; E G 8 (図 2 G) ; E G 9 (図 2 H) ; E G 1 0 及び E G 1 1 (図 2 I) ; E G 1 2 及び E G 4 (図 2 J) ; E G 1 0 (図 2 K) ; E G 1 3 (図 2 L) ; E G 1 4 (図 2 M) ; E G 1 5 (図 2 N) ; E G 1 6 (図 2 O) ; E G 1 7 (図 2 P) ; E G 1 8 (図 2 Q) ; E G 1 9 (図 2 R) ; E G 2 0 (図 2 S) ; E G 2 1 (図 2 T) ; E G 2 2 (図 2 U) ; E G 2 3 (図 2 V) ; E G 2 4 (図 2 W) ; 及び E G 2 5 (図 2 X) の概略図である。

20

【図 2 V】非限定的な例示的構築物 : E G 1 (図 2 A) ; E G 2 (図 2 B) ; E G 3 及び E G 4 (図 2 C) ; E G 5 (図 2 D) ; E G 6 (図 2 E) ; E G 7 (図 2 F) ; E G 8 (図 2 G) ; E G 9 (図 2 H) ; E G 1 0 及び E G 1 1 (図 2 I) ; E G 1 2 及び E G 4 (図 2 J) ; E G 1 0 (図 2 K) ; E G 1 3 (図 2 L) ; E G 1 4 (図 2 M) ; E G 1 5 (図 2 N) ; E G 1 6 (図 2 O) ; E G 1 7 (図 2 P) ; E G 1 8 (図 2 Q) ; E G 1 9 (図 2 R) ; E G 2 0 (図 2 S) ; E G 2 1 (図 2 T) ; E G 2 2 (図 2 U) ; E G 2 3 (図 2 V) ; E G 2 4 (図 2 W) ; 及び E G 2 5 (図 2 X) の概略図である。

30

【図 2 W】非限定的な例示的構築物 : E G 1 (図 2 A) ; E G 2 (図 2 B) ; E G 3 及び E G 4 (図 2 C) ; E G 5 (図 2 D) ; E G 6 (図 2 E) ; E G 7 (図 2 F) ; E G 8 (図 2 G) ; E G 9 (図 2 H) ; E G 1 0 及び E G 1 1 (図 2 I) ; E G 1 2 及び E G 4 (図 2 J) ; E G 1 0 (図 2 K) ; E G 1 3 (図 2 L) ; E G 1 4 (図 2 M) ; E G 1 5 (図 2 N) ; E G 1 6 (図 2 O) ; E G 1 7 (図 2 P) ; E G 1 8 (図 2 Q) ; E G 1 9 (図 2 R) ; E G 2 0 (図 2 S) ; E G 2 1 (図 2 T) ; E G 2 2 (図 2 U) ; E G 2 3 (図 2 V) ; E G 2 4 (図 2 W) ; 及び E G 2 5 (図 2 X) の概略図である。

【図 2 X】非限定的な例示的構築物 : E G 1 (図 2 A) ; E G 2 (図 2 B) ; E G 3 及び E G 4 (図 2 C) ; E G 5 (図 2 D) ; E G 6 (図 2 E) ; E G 7 (図 2 F) ; E G 8 (図 2 G) ; E G 9 (図 2 H) ; E G 1 0 及び E G 1 1 (図 2 I) ; E G 1 2 及び E G 4 (図 2 J) ; E G 1 0 (図 2 K) ; E G 1 3 (図 2 L) ; E G 1 4 (図 2 M) ; E G 1 5 (図 2 N) ; E G 1 6 (図 2 O) ; E G 1 7 (図 2 P) ; E G 1 8 (図 2 Q) ; E G 1 9 (図 2 R) ; E G 2 0 (図 2 S) ; E G 2 1 (図 2 T) ; E G 2 2 (図 2 U) ; E G 2 3 (図 2 V) ; E G 2 4 (図 2 W) ; 及び E G 2 5 (図 2 X) の概略図である。

40

【図 3 A】対照ベクター E G 1 と比較した、構築物 E G 2 (C M V - G F P - I R E S - L) を用いて発現された G F P の光学顕微鏡法及び蛍光顕微鏡法を示す。図 3 A : E G 1 を含む細胞の光学顕微鏡法。図 3 B : E G 1 を含む細胞の蛍光顕微鏡法。図 3 C : E G 2 を含む細胞の光学顕微鏡法。図 3 D : E G 2 を含む細胞の蛍光顕微鏡法。E G 2 構築物からの蛍光 G F P タンパク質の発現は、系の生存能力を示す。E G 1 を含む細胞 (図 3 B)

50

と比較した、EG2を含む細胞（図3D）における有害な過剰発現の減少は、Lタンパク質の導入によるGFP発現の改善された調節を実証する。図3A～3Dのバーは、400ミクロンを表す。

【図3B】対照ベクターEG1と比較した、構築物EG2（CMV-GFP-IRES-L）を用いて発現されたGFPの光学顕微鏡検査及び蛍光顕微鏡検査を示す。図3A：EG1を含む細胞の光学顕微鏡検査。図3B：EG1を含む細胞の蛍光顕微鏡検査。図3C：EG2を含む細胞の光学顕微鏡検査。図3D：EG2を含む細胞の蛍光顕微鏡検査。EG2構築物からの蛍光GFPタンパク質の発現は、系の生存能力を示す。EG1を含む細胞（図3B）と比較した、EG2を含む細胞（図3D）における有害な過剰発現の減少は、Lタンパク質の導入によるGFP発現の改善された調節を実証する。図3A～3Dのバーは、400ミクロンを表す。

10

【図3C】対照ベクターEG1と比較した、構築物EG2（CMV-GFP-IRES-L）を用いて発現されたGFPの光学顕微鏡検査及び蛍光顕微鏡検査を示す。図3A：EG1を含む細胞の光学顕微鏡検査。図3B：EG1を含む細胞の蛍光顕微鏡検査。図3C：EG2を含む細胞の光学顕微鏡検査。図3D：EG2を含む細胞の蛍光顕微鏡検査。EG2構築物からの蛍光GFPタンパク質の発現は、系の生存能力を示す。EG1を含む細胞（図3B）と比較した、EG2を含む細胞（図3D）における有害な過剰発現の減少は、Lタンパク質の導入によるGFP発現の改善された調節を実証する。図3A～3Dのバーは、400ミクロンを表す。

【図3D】対照ベクターEG1と比較した、構築物EG2（CMV-GFP-IRES-L）を用いて発現されたGFPの光学顕微鏡検査及び蛍光顕微鏡検査を示す。図3A：EG1を含む細胞の光学顕微鏡検査。図3B：EG1を含む細胞の蛍光顕微鏡検査。図3C：EG2を含む細胞の光学顕微鏡検査。図3D：EG2を含む細胞の蛍光顕微鏡検査。EG2構築物からの蛍光GFPタンパク質の発現は、系の生存能力を示す。EG1を含む細胞（図3B）と比較した、EG2を含む細胞（図3D）における有害な過剰発現の減少は、Lタンパク質の導入によるGFP発現の改善された調節を実証する。図3A～3Dのバーは、400ミクロンを表す。

20

【図4A】対照ベクターEG1と比較した、構築物EG3及びEG4（それぞれ、T7-IRES-L-GFP及びCMV-T7）を用いて発現されたGFPの光学顕微鏡検査及び蛍光顕微鏡検査を示す。図4A：EG1を含む細胞の光学顕微鏡検査。図4B：EG1を含む細胞の蛍光顕微鏡検査。図4C：EG3+EG4を含む細胞の光学顕微鏡検査。図4D：EG3+EG4を含む細胞の蛍光顕微鏡検査。EG3+EG4構築物からの蛍光GFPタンパク質の発現は、系の生存能力を示す。EG1を含む細胞（図4B）と比較した、EG3+EG4を含む細胞（図4D）における発現の減少は、Lタンパク質の導入によるGFP発現の改善された調節を実証する。図4A～4Dのバーは、400ミクロンを表す。

30

【図4B】対照ベクターEG1と比較した、構築物EG3及びEG4（それぞれ、T7-IRES-L-GFP及びCMV-T7）を用いて発現されたGFPの光学顕微鏡検査及び蛍光顕微鏡検査を示す。図4A：EG1を含む細胞の光学顕微鏡検査。図4B：EG1を含む細胞の蛍光顕微鏡法。図4C：EG3+EG4を含む細胞の光学顕微鏡検査。図4D：EG3+EG4を含む細胞の蛍光顕微鏡検査。EG3+EG4構築物からの蛍光GFPタンパク質の発現は、系の生存能力を示す。EG1を含む細胞（図4B）と比較した、EG3+EG4を含む細胞（図4D）における発現の減少は、Lタンパク質の導入によるGFP発現の改善された調節を実証する。図4A～4Dのバーは、400ミクロンを表す。

40

【図4C】対照ベクターEG1と比較した、構築物EG3及びEG4（それぞれ、T7-IRES-L-GFP及びCMV-T7）を用いて発現されたGFPの光学顕微鏡検査及び蛍光顕微鏡検査を示す。図4A：EG1を含む細胞の光学顕微鏡検査。図4B：EG1を含む細胞の蛍光顕微鏡検査。図4C：EG3+EG4を含む細胞の光学顕微鏡検査。図4D：EG3+EG4を含む細胞の蛍光顕微鏡検査。EG3+EG4構築物からの蛍光G

50

F Pタンパク質の発現は、系の生存能力を示す。E G 1を含む細胞（図 4 B）と比較した、E G 3 + E G 4を含む細胞（図 4 D）における発現の減少は、L タンパク質の導入によるG F P発現の改善された調節を実証する。図 4 A ~ 4 Dのバーは、4 0 0ミクロンを表す。

【図 4 D】対照ベクターE G 1と比較した、構築物E G 3及びE G 4（それぞれ、T 7 - I R E S - L - G F P及びC M V - T 7）を用いて発現されたG F Pの光学顕微鏡検査及び蛍光顕微鏡検査を示す。図 4 A：E G 1を含む細胞の光学顕微鏡検査。図 4 B：E G 1を含む細胞の蛍光顕微鏡検査。図 4 C：E G 3 + E G 4を含む細胞の光学顕微鏡検査。図 4 D：E G 3 + E G 4を含む細胞の蛍光顕微鏡検査。E G 3 + E G 4構築物からの蛍光G F Pタンパク質の発現は、系の生存能力を示す。E G 1を含む細胞（図 4 B）と比較した、E G 3 + E G 4を含む細胞（図 4 D）における発現の減少は、L タンパク質の導入によるG F P発現の改善された調節を実証する。図 4 A ~ 4 Dのバーは、4 0 0ミクロンを表す。

【図 5 A】構築物E G 1 0（C M V - [D R D 1 - G F P]）（図 5 A）又はE G 8（C M V - [D R D 1 - G F P] - I R E S - L）（図 5 C）からのD R D 1 - G F P融合物の蛍光顕微鏡検査を示す。構築物E G 1 0を使用するD R D 1 - G F Pは発現されるが、受容体を外膜に輸送することができず、封入体の形成をもたらす（図 5 B、矢印）。構築物E G 8を使用するD R D 1 - G F Pは、発現され、膜に確実に輸送され、外膜上に高品質で高収率のG P C Rをもたらす（図 5 D）。

【図 5 B】構築物E G 1 0（C M V - [D R D 1 - G F P]）（図 5 A）又はE G 8（C M V - [D R D 1 - G F P] - I R E S - L）（図 5 C）からのD R D 1 - G F P融合物の蛍光顕微鏡検査を示す。構築物E G 1 0を使用するD R D 1 - G F Pは発現されるが、受容体を外膜に輸送することができず、封入体の形成をもたらす（図 5 B、矢印）。構築物E G 8を使用するD R D 1 - G F Pは、発現され、膜に確実に輸送され、外膜上に高品質で高収率のG P C Rをもたらす（図 5 D）。

【図 5 C】構築物E G 1 0（C M V - [D R D 1 - G F P]）（図 5 A）又はE G 8（C M V - [D R D 1 - G F P] - I R E S - L）（図 5 C）からのD R D 1 - G F P融合物の蛍光顕微鏡検査を示す。構築物E G 1 0を使用するD R D 1 - G F Pは発現されるが、受容体を外膜に輸送することができず、封入体の形成をもたらす（図 5 B、矢印）。構築物E G 8を使用するD R D 1 - G F Pは、発現され、膜に確実に輸送され、外膜上に高品質で高収率のG P C Rをもたらす（図 5 D）。

【図 5 D】構築物E G 1 0（C M V - [D R D 1 - G F P]）（図 5 A）又はE G 8（C M V - [D R D 1 - G F P] - I R E S - L）（図 5 C）からのD R D 1 - G F P融合物の蛍光顕微鏡検査を示す。構築物E G 1 0を使用するD R D 1 - G F Pは発現されるが、受容体を外膜に輸送することができず、封入体の形成をもたらす（図 5 B、矢印）。構築物E G 8を使用するD R D 1 - G F Pは、発現され、膜に確実に輸送され、外膜上に高品質で高収率のG P C Rをもたらす（図 5 D）。

【図 6 A】構築物E G 1 0（C M V - [D R D 1 - G F P]）（図 6 A）又はE G 1 2及びE G 4（それぞれT 7 - I R E S - L - D R D 1 - G F P及びC M V - T 7）（図 6 B）からのD R D 1 - G F P融合物の蛍光顕微鏡検査を示す。E G 1 0を使用するD R D 1 - G F Pは発現されるが、受容体を外膜に正しく輸送することができず、封入体の形成をもたらす（図 6 A、矢印）。E G 4と組み合わせてE G 1 2を使用するD R D 1 - G F Pは、発現され、膜に確実に輸送され、外膜上に高品質で高収量のG P C Rをもたらす（図 6 B）。

【図 6 B】構築物E G 1 0（C M V - [D R D 1 - G F P]）（図 6 A）又はE G 1 2及びE G 4（それぞれT 7 - I R E S - L - D R D 1 - G F P及びC M V - T 7）（図 6 B）からのD R D 1 - G F P融合物の蛍光顕微鏡検査を示す。E G 1 0を使用するD R D 1 - G F Pは発現されるが、受容体を外膜に正しく輸送することができず、封入体の形成をもたらす（図 6 A、矢印）。E G 4と組み合わせてE G 1 2を使用するD R D 1 - G F Pは、発現され、膜に確実に輸送され、外膜上に高品質で高収量のG P C Rをもたらす（図

6 B)。

【図 7】抗 C F T R ウェスタンブロットを示す。P C R 産物又はベクターとして送達される L タンパク質及び C F T R の共発現（破線の左）は、L タンパク質の共発現を伴わない C F T R の対照発現（破線の右）と比較して、収量の減少をもたらすが、より均質な試料をもたらす。

【図 8 A】I T K の H i s タグ精製の結果を示す。図 8 A は、H i s タグを使用してアフィニティー精製した I T K の S D S - P A G E を示す。レーン：レーン 1、S e e B l u e 2 + 予備染色。レーン 2、5 0 0 n g G F P。レーン 3、2 μ g I T K；レーン 4、5 μ g I T K；レーン 5、1 0 μ g I T K。図 8 B は、図 8 A の S D S - P A G E 後のウェスタンブロット分析を示し、矢印は I T K の単量体及び二量体を指す。

10

【図 8 B】I T K の H i s タグ精製の結果を示す。図 8 A は、H i s タグを使用してアフィニティー精製した I T K の S D S - P A G E を示す。レーン：レーン 1、S e e B l u e 2 + 予備染色。レーン 2、5 0 0 n g G F P。レーン 3、2 μ g I T K；レーン 4、5 μ g I T K；レーン 5、1 0 μ g I T K。図 8 B は、図 8 A の S D S - P A G E 後のウェスタンブロット分析を示し、矢印は I T K の単量体及び二量体を指す。

【図 9 A】C M V プロモーター下のルシフェラーゼ遺伝子構築物の模式図を示す。

【図 9 B】図 9 A に示される構築物を有するプラスミドのマッピングを示す。

【図 9 C】共有 C M V プロモーター下で I R E S 配列によって連結されたルシフェラーゼレポーター遺伝子及び E M C V L 1 タンパク質の模式図を示す。

【図 9 D】図 9 C に示される構築物を有するプラスミドのマッピングを示す。

20

【図 1 0】生物発光読み取りによって測定されたルシフェラーゼ発現を示す。図 9 B におけるプラスミドの使用は、初期により高いルシフェラーゼ発現をもたらすが、発現は 1 8 日目を過ぎて減少する。本明細書中に開示されるプラスミド（図 9 D）の使用は、長期間にわたるレポーター遺伝子の安定な発現を可能にする。

【図 1 1】経時的な生物発光画像を示す。注：試験群の動物 4 の注射は実験中に失敗したので、この動物はデータ分析から除外した。図 9 B におけるプラスミドの使用は、1 8 日目を過ぎて、2 匹の個々の動物（動物 1 及び 2）における発現の喪失を含む高度に可変的なルシフェラーゼ発現をもたらす。本明細書中に開示されるプラスミド（図 9 D）の使用は、動物間の変動性が低く、長期間にわたるレポーター遺伝子の安定な発現を可能にする。

30

【図 1 2】ルシフェラーゼのみを発現する代表的なマウス、及びエンハンサータンパク質の存在下でルシフェラーゼを発現する代表的なマウスについての経時的な生物発光画像を示す。本明細書中に開示されるプラスミド（図 9 D）の使用は、長期間にわたるレポーター遺伝子の安定な発現を可能にする。

【図 1 3 A】C M V プロモーター下でアダリムマブ抗体をコードする核酸配列を有するプラスミドのマッピングを示す。

【図 1 3 B】アダリムマブ抗体をコードする核酸配列と、共有 C M V プロモーター下で I R E S をコードする核酸配列によって連結された E M C V L 1 タンパク質をコードする遺伝子とを有するプラスミドのマッピングを示す。

【図 1 4 A】E G 1 4 0 対照プラスミドからアダリムマブを発現する H E K 2 9 3 T 細胞の光学顕微鏡からの画像（上）及び免疫蛍光実験からの画像（下）を示す。

40

【図 1 4 B】E G 1 4 1 プラスミドからの L 1 エンハンサータンパク質と組み合わせてアダリムマブを発現する H E K 2 9 3 T 細胞の光学顕微鏡からの画像（上）及び免疫蛍光実験からの画像を示す。

【図 1 5】E G 1 4 0 又は E G 1 4 1 のいずれかで一過的にトランスフェクトした H E K 2 9 3 T 細胞の上清におけるアダリムマブの存在を検出するために実施した E L I S A 実験からの結果を示す。精製組換えヒト抗 T N F α 抗体（N B P 2 - 6 2 5 6 7 N o v u s B i o l o g i c a l s）を、この実験における陽性対照として使用した。

【図 1 6】E G 1 4 0 又は E G 1 4 1 のいずれかで一過的にトランスフェクトした H E K 2 9 3 T 細胞によって分泌されたアダリムマブへのヒト T N F - α の結合を検出するため

50

に行ったELISA実験からの結果を示す。

【図17】ルシフェラーゼレポーターアッセイからの結果を示す。EG140又はEG141のいずれかで一過的にトランスフェクトされたHEK293T細胞の上清中のアダリムマブは、レポーター細胞におけるルシフェラーゼ発現のTNF- α 媒介活性化を抑制することができる。

【図18A】SDS PAGEからの結果を示す。

【図18B】EG140トランスフェクト細胞又はEG-141トランスフェクト細胞から発現されたアダリムマブの重鎖及び軽鎖を示すウェスタンブロット実験からの結果を示す。

【図19】ホタルルシフェラーゼを単独で(Fluc Std)、及びFlucをLエンハンサータンパク質と組み合わせて(Fluc EG)発現するプラスミドを30 μ g皮下注射した後の生物発光イメージングの対数定量を示す。 10

【図20】5'及び3'逆方向末端反復(ITR)領域に対するアダリムマブ発現カセット及びエンハンサータンパク質Lの位置を示す、pAAVtransfer_Adalimumab(Std)プラスミド及びエンハンサータンパク質プラスミドpAAVtransfer_Adalimumab+Lの概略設計を示す。

【図21】pAAVtransfer_Adalimumab(Std)プラスミドのマップを示す。アダリムマブ発現カセットは、AAVトランスファーベクターの5'及び3'逆方向末端反復(ITR)領域の間に位置する。

【図22】エンハンサータンパク質(EMCVgp1)pAAVtransfer_Adalimumab(EG)プラスミドのマップを示す。アダリムマブ発現カセットは、AAVトランスファーベクターの5'及び3'逆方向末端反復(ITR)領域の間に位置する。 20

【図23】pAdalimumab、pAdalimumab+エンハンサーL、pAAVtransfer_adalimumab及びpAAVtransfer_adalimumab+エンハンサーLプラスミドでトランスフェクトされたHEK293T細胞の細胞培養上清中のアダリムマブのタンパク質濃度(ng/ml)を示す。細胞培養上清中のアダリムマブタンパク質濃度を、定量的ELISAを用いて測定した。

【図24】HEKデュアルTNF- α レポーター細胞アッセイで測定した分泌アダリムマブタンパク質EC₅₀値を示す。上、pAdalimumab_STDプラスミド及びエンハンサータンパク質pAdalimumab_EGプラスミドでトランスフェクトした細胞におけるアダリムマブEC₅₀。下、pAAVtransferアダリムマブ_STD及びエンハンサーLプロテインpAAVtransferアダリムマブ_EGプラスミドでトランスフェクトした細胞におけるアダリムマブEC₅₀。表4及び5は、これらの結果を要約する。 30

【図25】分泌されたアダリムマブ濃度の量及びエンハンサータンパク質Lを欠くそれぞれの対照ベクターの活性に対して正規化された相対的アダリムマブ活性を示す。

【図26A】アダリムマブを単独でコードする組換えAAVベクター(AAV_Adalimumab_STD)、及びエンハンサータンパク質Lと共にコードする組換えAAVベクター(AAV_Adalimumab_EG)でマウスを処置した後のマウス血清中のアダリムマブ濃度を示す。図26Aは、筋肉内注射を介して投与されたAAVベクターの結果を示す。図26Bは、皮下注射を介して投与されたAAVベクターの結果を示す。 40

【図26B】アダリムマブを単独でコードする組換えAAVベクター(AAV_Adalimumab_STD)、及びエンハンサータンパク質Lと共にコードする組換えAAVベクター(AAV_Adalimumab_EG)でマウスを処置した後のマウス血清中のアダリムマブ濃度を示す。図26Aは、筋肉内注射を介して投与されたAAVベクターの結果を示す。図26Bは、皮下注射を介して投与されたAAVベクターの結果を示す。

【図27】pGBA-NanoLuc_STD及びエンハンサータンパク質pGBA-NanoLuc_EGプラスミドの概略設計を示す。

【図28A】それぞれpGBA-NanoLuc_STDプラスミド及びエンハンサータ 50

ンパク質 (EMCVgp1) pGBA-NanoLuc-EGプラスミドのマップを示す。

【図28B】それぞれpGBA-NanoLuc-STDプラスミド及びエンハンサータンパク質 (EMCVgp1) pGBA-NanoLuc-EGプラスミドのマップを示す。

【図29】HEK 293T細胞において発現されたpGBA-NanoLuc-STD及びpGBA-NanoLuc-EG構築物のウェスタンブロット結果を示す。pGBA-NanoLucタンパク質キメラの予測サイズは約75kDaである。

【図30A】pGBA-NanoLuc-STDプラスミド及びエンハンサータンパク質pGBA-NanoLuc-EGプラスミドでのトランスフェクション時の、HEK293T細胞溶解物（それぞれ図30A及び図30C）及び上清（それぞれ図30B及び図30D）におけるレポータータンパク質の発現及びGBAの酵素活性を示す。NanoLuc及びGBA活性の両方の総発現は、エンハンサータンパク質Lの非存在下でより高い。

【図30B】pGBA-NanoLuc-STDプラスミド及びエンハンサータンパク質pGBA-NanoLuc-EGプラスミドでのトランスフェクション時の、HEK293T細胞溶解物（それぞれ図30A及び図30C）及び上清（それぞれ図30B及び図30D）におけるレポータータンパク質の発現及びGBAの酵素活性を示す。NanoLuc及びGBA活性の両方の総発現は、エンハンサータンパク質Lの非存在下でより高い。

【図30C】pGBA-NanoLuc-STDプラスミド及びエンハンサータンパク質pGBA-NanoLuc-EGプラスミドでのトランスフェクション時の、HEK293T細胞溶解物（それぞれ図30A及び図30C）及び上清（それぞれ図30B及び図30D）におけるレポータータンパク質の発現及びGBAの酵素活性を示す。NanoLuc及びGBA活性の両方の総発現は、エンハンサータンパク質Lの非存在下でより高い。

【図30D】pGBA-NanoLuc-STDプラスミド及びエンハンサータンパク質pGBA-NanoLuc-EGプラスミドでのトランスフェクション時の、HEK293T細胞溶解物（それぞれ図30A及び図30C）及び上清（それぞれ図30B及び図30D）におけるレポータータンパク質の発現及びGBAの酵素活性を示す。NanoLuc及びGBA活性の両方の総発現は、エンハンサータンパク質Lの非存在下でより高い。

【図31】NanoLuc活性に対して正規化された、GBA-NanoLucキメラタンパク質における相対GBA活性を示す。pGBA-NanoLuc-STDプラスミド及びエンハンサータンパク質pGBA-NanoLuc-EGプラスミドによるトランスフェクション時のHEK293T細胞溶解物及び上清中の活性を示す。細胞培養上清において、相対的GBA活性は、エンハンサータンパク質共発現で有意により高く、エンハンサータンパク質が発現されたGBAタンパク質の質を増加させることを実証している。

【図32A】脂質ナノ粒子 (LNP) に製剤化されたpGBA-NanoLuc-STDプラスミド及びエンハンサータンパク質GBA-NanoLuc-EGプラスミドで処置されたBalb/cマウスの生物発光イメージング結果を示す。図32A及び図32Bにおいて、画像は、それぞれ、腹臥位及び仰臥位から撮影された。図32C及び表6は、ルシフェラーゼ活性の平均変動係数 (CV%) が、Lエンハンサータンパク質の共発現なしでより高かったことを実証する。

【図32B】脂質ナノ粒子 (LNP) に製剤化されたpGBA-NanoLuc-STDプラスミド及びエンハンサータンパク質GBA-NanoLuc-EGプラスミドで処置されたBalb/cマウスの生物発光イメージング結果を示す。図32A及び図32Bにおいて、画像は、それぞれ、腹臥位及び仰臥位から撮影された。図32C及び表6は、ルシフェラーゼ活性の平均変動係数 (CV%) が、Lエンハンサータンパク質の共発現なしでより高かったことを実証する。

【図32C】脂質ナノ粒子 (LNP) に製剤化されたpGBA-NanoLuc-STDプラスミド及びエンハンサータンパク質GBA-NanoLuc-EGプラスミドで処置されたBalb/cマウスの生物発光イメージング結果を示す。図32A及び図32Bにおいて、画像は、それぞれ、腹臥位及び仰臥位から撮影された。図32C及び表6は、ル

10

20

30

40

50

シフェラーゼ活性の平均変動係数（C V %）が、Lエンハンサータンパク質の共発現なしでより高かったことを実証する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、特定のエンハンサータンパク質と標的タンパク質との共発現が、組換え産生されたタンパク質の発現の質及び／若しくは量を改善し、並びに／又は発現の持続時間を延長し、インビトロ、エクスピボ及びインビボでの目的の遺伝子の発現を延長することを認識した。様々な実施形態において、開示される組成物及び方法は、先行技術に対して以下の利点のうちの1つ以上を示す：（1）それらは、真核細胞株又は生きている対象内の標的タンパク質のタンパク質発現（収率）を増加させる；（2）それらは標的タンパク質の発現の調節を制御する；（3）それらは、減少した望ましくない特性（例えば、例えば、ミスフォールディング、活性の変化、不正確な翻訳後修飾、及び／又は毒性）を示す標的タンパク質を発現する；（4）それらは、組換えタンパク質の正確なフォールディング及び／又は高収率を増加させる；（5）それらは、下流活性化経路の性能を改善する（例えば、細胞におけるGPCRシグナル伝達、又はインビボ発現の場合は、発現された抗原に対する免疫系応答）；（6）エンハンサータンパク質の共発現は、標的タンパク質の機能性及び／又は細胞の下流代謝に影響を与えない。本発明は、これらの列挙された利点によって限定されるものではなく、いくつかの実施形態は、これらの利点のいずれも示さないか、これらの利点のいくつか又は全てを示す。

【0008】

一態様では、本開示は、真核細胞における標的タンパク質の組換え発現のための系、及び1つ以上のベクターを含むインビボでの標的タンパク質の発現のための方法を提供する。複数のベクター（又は1つのベクター）は、標的タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド及びエンハンサータンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドを有する。エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送（NCT）の阻害剤であり、及び／又は、エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー（L）タンパク質、ピコルナウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス3Cプロテアーゼ、単純ヘルペスウイルス（HSV）ICP27タンパク質、及びラウドウイルスマトリックス（M）タンパク質からなる群から選択される。第1のポリヌクレオチド及び第2のポリヌクレオチドは、1つ以上のプロモーターに作動可能に連結されている。

【0009】

別の態様では、本開示は、標的タンパク質の発現のための真核細胞であって、エンハンサータンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチドを含む真核細胞を提供する。エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送（NCT）の阻害剤であり、及び／又はエンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー（L）タンパク質、ピコルナウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス3Cプロテアーゼ、コロナウイルスORF6タンパク質、エボラウイルスVP24タンパク質、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）カプシドタンパク質、単純ヘルペスウイルス（HSV）ICP27タンパク質、及びラウドウイルスマトリックス（M）タンパク質からなる群から選択される。外因性ポリヌクレオチドは、プロモーター（必要に応じて、天然プロモーター又は外因性プロモーター）に作動可能に連結される。更に別の態様では、本開示は、プロモーターに作動可能に連結された標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドをこの真核細胞に導入することを含む、標的タンパク質の組換え発現のための方法を提供する。更に別の態様では、本開示は、本開示のベクター系を真核細胞に導入することを含む、標的タンパク質の組換え発現のための方法を提供する。更に別の態様では、本開示は、本開示のベクター系（又はベクター）を真核細胞に導入することによって産生される細胞を提供する。更に別の態様では、本開示は、真核細胞への本開示のベクター系（又はベクター）の導入によって発現されるタンパク質を提供する。更に別の態様では、本開示は、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチド（プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチド）を真核細胞に導入することを含

む、真核細胞において標的タンパク質を発現させるための方法を提供する。この方法は、標的タンパク質の発現レベル、可溶性及び／又は活性を増強するためにエンハンサータンパク質の共発現を利用する。エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送（NCT）の阻害剤であり、及び／又はエンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー（L）タンパク質、ピコルナウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス3Cプロテアーゼ、コロナウイルスORF6タンパク質、エボラウイルスVP24タンパク質、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）カプシドタンパク質、単純ヘルペスウイルス（HSV）ICP27タンパク質、及びラウドウイルスマトリックス（M）タンパク質からなる群から選択される。

【0010】

別の態様では、本開示は、標的タンパク質に対する抗体を生成するための方法であって、本開示の系又は方法を使用して産生された細胞又は標的タンパク質で対象を免疫化することを含む方法を提供する。更に別の態様では、本開示は、細胞選別による抗体発見のための方法であって、本開示の系又は方法を使用して生成された標識細胞又は標識標的タンパク質と、抗体又はその抗原結合断片を各々が含むポリペプチドのライブラリーを発現する組換え細胞の集団とを含む溶液を提供することと、標識細胞又は標識標的タンパク質に結合した組換え細胞を検出することによって、溶液から1つ以上の組換え細胞を選別することを含む方法を提供する。更なる態様では、本開示は、ファージディスプレイライブラリーをパニングするための方法であって、ファージディスプレイライブラリーを、本開示の系又は方法を使用して産生された細胞又は標的タンパク質と混合することと、細胞又は標的タンパク質に結合するファージディスプレイライブラリーのメンバーを精製及び／又は濃縮することを含む方法を提供する。

【0011】

更なる態様及び実施形態は、以下の詳細な開示によって提供される。本発明は、この概要によって限定されない。

【発明を実施するための形態】

【0012】

いくつかの実施形態では、1つ以上のベクターを含む、標的タンパク質の組換え発現のための系が提供される。いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞である。いくつかの実施形態では、発現は、インサイチュ、インビボ、又はエクスピボである。いくつかの実施形態では、複数のベクター（又は1つのベクター）は、標的タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド及びエンハンサータンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドを有する。エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送（NCT）の阻害剤であり、及び／又は、エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー（L）タンパク質、ピコルナウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス3Cプロテアーゼ、単純ヘルペスウイルス（HSV）ICP27タンパク質、及びラウドウイルスマトリックス（M）タンパク質からなる群から選択される。第1のポリヌクレオチド及び第2のポリヌクレオチドは、1つ以上のプロモーターに作動可能に連結されている。

【0013】

理論に束縛されるものではないが、本開示の組成物及び方法は、細胞の調節機構が組換え標的タンパク質の発現に応答して活性化するのを防止し、これが標的タンパク質の収率及び／又は機能性を改善すると考えられる。本開示の方法及び系は、（1）転写開始の阻害、（2）転写終結及びポリアデニル化の阻害；（3）mRNAプロセッシング及びスプライシングの阻害、（4）mRNA輸出の阻害；（5）翻訳開始の阻害；及び（6）ストレス応答を含むがこれらに限定されない、1つ以上の細胞機構を阻害又は妨害し得る（図1）。

【0014】

様々な実施形態において、本開示の組成物及び方法は、エンハンサータンパク質、例えばLタンパク質の共発現を介して標的タンパク質発現を改善してもよい。本開示の組成物及び方法に関連する改善された標的タンパク質発現は、例えば、標的タンパク質の活性を

増加させ、発現レベルを低下させ、発現持続時間を増加させ、安定性を増加させ、細胞又は対象における持続時間を増加させ、送達の均一性を増加させ、分解を減少させ、及び／又はEC₅₀を減少させてもよい。

【0015】

様々な実施形態を図2A～2Y及び表1に示す。いくつかの実施形態では、第1のベクターは、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、第2のベクターは、エンハンサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。他の実施形態では、単一のベクターは、標的タンパク質及びエンハンサータンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む。ベクターは、標的タンパク質及びエンハンサータンパク質の両方をコードする単一のポリヌクレオチドを含んでもよい。あるいは、2つ以上のエンハンサータンパク質及び／又は2つ以上の標的タンパク質が、1つ又は複数のベクターによってコードされる。

10

【0016】

定義

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、別途文脈が明確に示さない限り、単数形「a」、「an」、及び「the」が複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「タンパク質(a protein)」への言及は、1つのタンパク質又はそのようなタンパク質の混合物を指すことができ、「方法(the method)」への言及は、当業者に公知の同等の工程及び／又は方法への言及を含むなどである。

【0017】

明細書で使用される場合、数値に先行する場合の「約」又は「およそ」という用語は、10%の範囲でプラスマイナスされた値を示すものとする。例えば、「約100」は、90及び110を包含する。

20

【0018】

本明細書で使用される場合、「及び／又は」とは、関連する列挙された項目のうちの1つ以上の任意かつ全ての可能な組み合わせ、及び代替(又は)で解釈される場合の組み合わせの欠如を指し、それらを包含する。

【0019】

本明細書中で使用される場合、他に示されない限り、ヌクレオチド配列は、5'から3'方向に列挙され、そしてアミノ酸配列は、N末端からC末端方向に列挙される。

30

【0020】

「核酸配列」、「核酸」、「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、及び「オリゴヌクレオチド」という用語は、互換的に使用される。それらは、デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド、又はそれらの類似体のいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有してもよく、そして公知又は未知の任意の機能を果たしてもよい。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子又は遺伝子断片のコード領域又は非コード領域、連鎖解析から定義される遺伝子座(複数可)、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、低分子干渉RNA(siRNA)、低分子ヘアピン型RNA(shRNA)、マイクロRNA(miRNA)、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ、及びプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体などの1つ以上の修飾ヌクレオチドを含んでもよい。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーのアセンブリの前又は後に付与されてもよい。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、重合後に、標識成分とのコンジュゲーションなどによって更に修飾されてもよい。

40

【0021】

「調節エレメント」としては、プロモーター、エンハンサー、内部リボソーム侵入部位(IRES)、及び他の発現制御エレメント(例えば、ポリアデニル化シグナル及びポリ

50

ーU配列などの転写終結シグナル)が挙げられる。調節エレメントとしては、多くのタイプの宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指向するもの、及び特定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指向するもの(例えば、組織特異的調節配列)が挙げられる。組織特異的プロモーターは、主に、目的の所望の組織(例えば、筋肉、ニューロン、骨、皮膚、血液、特定の器官(例えば、肝臓、脾臓)、又は特定の細胞型(例えば、リンパ球))における発現を指向してもよい。調節エレメントはまた、時間依存的様式(例えば、細胞周期依存的様式又は発生段階依存的様式)で発現を指向してもよく、これはまた、組織特異的又は細胞型特異的であってもよく、又はそうでなくてもよい。いくつかの実施形態では、調節エレメントは、p o l Iプロモーター、p o l I Iプロモーター、1つのp o l I I Iプロモーター、又はそれらの組み合わせであってもよい。p o l I I Iプロモーターの例としては、U 6及びH 1プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。p o l I I Iプロモーターの例としては、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス(RSV)LTRプロモーター(必要に応じてRSVエンハンサーを有する)、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(必要に応じてCMVエンハンサーを有する)、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモーター、 β -アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ(PGK)プロモーター、及びEF1 α プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。「調節エレメント」という用語には、WP RE; CMVエンハンサー; HTLV-IのLTR中のR-U5'セグメント; SV40エンハンサー; 及びウサギ β -グロブリンのエキソン2とエキソン3との間のイントロン配列などのエンハンサーエレメントも包含される。

10

20

【0022】

「ベクター」は、遺伝物質を標的細胞に移入するために使用される。ベクターとしては、一本鎖、二本鎖、又は部分的に二本鎖である核酸分子; 1つ以上の遊離末端を含む核酸分子、遊離末端を含まない核酸分子(例えば、環状); DNA、RNA、又はその両方を含む核酸分子; 及び当技術分野で公知の他の様々なポリヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。ベクターの1つのタイプは「プラスミド」であり、これは、標準的な分子クローニング技術などによって、追加のDNAセグメントを挿入することができる環状二本鎖DNAループを指す。別のタイプのベクターは、ウイルス由来のDNA又はRNA配列が、ウイルス(例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、及びアデノ随伴ウイルス)へのパッケージングのためにベクター中に存在するウイルスベクターである。実施形態では、ウイルスベクターは複製不能であってもよい。ウイルスベクターはまた、宿主細胞へのトランスフェクションのためにウイルスによって保有されるポリヌクレオチドを含む。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞中で自律複製することができる(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター及びエピソード哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソード哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって宿主ゲノムと共に複製される。更に、特定のベクターは、それらが作動可能に連結された遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」と呼ばれる。組換えDNA技術において有用な一般的な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。

30

【0023】

「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」という用語は、本明細書において互換的に使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは、直鎖又は分枝であってもよく、修飾アミノ酸を含んでもよく、非アミノ酸によって中断されていてもよい。これらの用語は、修飾されたアミノ酸ポリマーも包含する。例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、又は標識成分とのコンジュゲーションなどの任意の他の操作である。本明細書中で使用される場合、用語「アミノ酸」は、グリシン及びD光学異性体又はL光学異性体の両方、並びにアミノ酸アナログ及びペプチド模倣物を含む、天然アミノ酸及び／又は非天然アミノ酸又は合成アミノ酸を含む。

40

【0024】

本明細書中で使用される場合、用語「対象」は、ヒト及び他の動物を含む。典型的には

50

、対象はヒトである。例えば、対象は、成人、十代、子供（2歳～14歳）、乳児（1ヶ月～24ヶ月）、又は新生児（最大1ヶ月）であってもよい。いくつかの実施形態では、成人は、約65歳以上、又は約60歳以上の高齢者である。いくつかの実施形態では、対象は、妊婦又は妊娠しようとしている女性である。他の実施形態では、対象はヒトではない；例えば、非ヒト霊長類；例えば、ヒヒ、チンパンジー、ゴリラ、又はマカクである。特定の実施形態では、対象は、イヌ又はネコなどのペットであってもよい。

【0025】

本明細書で使用される場合、「処置」又は「処置すること」又は「緩和すること」又は「改善すること」は、互換的に使用される。これらの用語は、治療的利益及び／又は予防的利益を含むがこれらに限定されない有益な結果若しくは所望の結果を得るためのアプローチを指す。治療的利益とは、処置中の1つ以上の疾患、症状、又は症候における任意の治療的に関連する改善又はそれらに対する効果を指す。予防的利益のために、組成物は、特定の疾患、症状、若しくは症候を発症するリスクがある対象に、又は疾患、症状、若しくは症候がまだ現れていないかもしれないが、疾患の生理学的症候のうちの1つ以上を報告する対象に投与してもよい。

【0026】

本明細書で使用される場合、「アダリムマブ」は、HUMIRA（商標）、MABUR A（商標）、若しくはEXEMPTIA（商標）中の活性医薬成分（API）、又はその機能的変異体を指す。したがって、アダリムマブは、アダリムマブ-a d a z、アダリムマブ-a d b m、アダリムマブ-a f z b、アダリムマブ-a t t o、アダリムマブ-b w w d、又はアダリムマブ-f k j pを指してもよい。いくつかの実施形態では、アダリムマブは、W O 2 0 1 1 1 5 3 4 7 7（その全体が本明細書に組み込まれる）による配列番号137～142のCDRのいずれかを含む。

【0027】

本明細書中で使用される場合、用語「免疫原」、「抗原」、及び「エピトープ」とは、免疫応答を惹起し得る、糖タンパク質を含むタンパク質、及びペプチドのような物質を指す。

【0028】

本明細書中で使用される場合、対象における「免疫原性応答」は、抗原に対する体液性免疫応答及び／又は細胞性免疫応答の対象における発生を生じる。

【0029】

ポリヌクレオチド

本開示は、1つ以上の標的タンパク質及び1つ以上のエンハンサータンパク質の発現のための組換えポリヌクレオチドに関する。いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞である。いくつかの実施形態では、発現は、インサイチュ、インビボ、又はエクスピボである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド（又は核酸若しくは核酸分子）は、1つ以上の目的の遺伝子を含んでもよく、本開示の組成物及び方法を使用して細胞（例えば、真核細胞）に送達される。本開示のポリヌクレオチドは、DNA、RNA、及びDNA-RNAハイブリッド分子を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは天然源から単離されるか；PCR増幅、インビトロ転写、又は化学合成などの技術を使用してインビトロで調製されるか；例えば組換えDNA技術を介してインビボで調製されるか；又は任意の適切な方法によって調製若しくは取得される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、任意の形状（直鎖、環状など）又はトポロジー（一本鎖、二本鎖、直鎖、環状、スーパーコイル状、ねじれ状、ニック状など）である。ポリヌクレオチドはまた、ペプチド核酸（PNAS）及びポリペプチド-核酸コンジュゲートなどの核酸誘導体；少なくとも1つの化学的に修飾された糖残基、骨格、ヌクレオチド間結合、塩基、ヌクレオチド、ヌクレオシド、若しくはヌクレオチド類似体若しくは誘導体、又は塩基性部位を有する核酸；並びに化学修飾された5'又は3'末端を有する核酸；及び2つ以上のような修飾を有する核酸を含んでもよい。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。

10

20

30

40

50

【0030】

ポリヌクレオチドの例としては、オリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、及びRNA干渉（RNAi）に有用なオリゴヌクレオチドを含むが、これらに限定されない）、アプタマー、核酸、人工染色体、クローニングベクター及び構築物、発現ベクター及び構築物、遺伝子治療ベクター及び構築物、rRNA、tRNA、mRNA、mtRNA、及びtmRNAなどが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、インビトロ転写（IVT）mRNAである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドはプラスミドである。

【0031】

ポリヌクレオチドは、タンパク質のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を生成するために、転写及び翻訳（例えば、DNA→RNA→タンパク質）又は翻訳（RNA→タンパク質）することができる核酸配列を含む場合、当該タンパク質を「コードする」と言われる。インビボ（例えば、真核細胞内）転写及び／又は翻訳は、内因性又は外因性酵素によって行われる。いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチドの転写は、真核細胞の内因性ポリメラーゼⅡ（polⅡ）によって行われる。いくつかの実施形態では、外因性RNAポリメラーゼは、同じ又は異なるベクター上に提供される。いくつかの実施形態では、RNAポリメラーゼは、T3 RNAポリメラーゼ、T5 RNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、及びH8 RNAポリメラーゼから選択される。

【0032】

本開示による例示的なポリヌクレオチドとしては、標的タンパク質をコードする「第1のポリヌクレオチド」；エンハンサータンパク質をコードする「第2のポリヌクレオチド」；並びに1つ以上の標的タンパク質、1つ以上のエンハンサータンパク質、及び／又は1つ以上の分離エレメントをコードする「コードポリヌクレオチド」が挙げられる。

【0033】

標的タンパク質

本開示によるポリヌクレオチドは、1つ以上の標的タンパク質をコードする核酸配列を含んでもよい。標的タンパク質をコードする核酸配列は、目的の遺伝子（「GOI」）と呼ばれる。

【0034】

いくつかの実施形態では、タンパク質の発現は、伝統的な発現系において発現される場合、細胞毒性を引き起こしてもよい。いくつかの実施形態では、タンパク質は、従来の発現系において低収率で発現するタンパク質である。いくつかの実施形態では、タンパク質の発現又は質は、従来の発現系と比較して、開示された方法による発現によって有意に改善される。いくつかの実施形態では、開示される方法による標的タンパク質の発現は、従来の発現系と比較して、宿主細胞に対してより少ない毒性を引き起こす。いくつかの実施形態では、開示される方法による標的タンパク質の発現は、宿主細胞に対する毒性を引き起こさない。

【0035】

標的タンパク質は限定されず、発現が所望される任意のタンパク質であってもよい。いくつかの実施形態では、標的タンパク質はウイルスタンパク質である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、可溶性タンパク質、分泌タンパク質（例えば、C-Inhなど）、又は膜タンパク質である。標的タンパク質は、任意のタンパク質又はポリペプチドに由来してもよい。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、1つ以上の動物タンパク質、1つ以上のヒトタンパク質、1つ以上の微生物タンパク質、1つ以上のウイルスタンパク質、1つ以上の真菌タンパク質又はそれらの組み合わせに由来する。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、対象において免疫原性応答を誘発することができる。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、1つ以上の抗原を有する。

【0036】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、1つ以上のタンパク質、1つ以上のタンパク質ドメイン、1つ以上のアイソフォーム、又はキメラタンパク質から構成される。い

10

20

30

40

50

くつかの実施形態では、タンパク質ドメインは、構造ドメイン、機能ドメイン、細胞外ドメイン、又は細胞内ドメインである。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、その天然に存在する対応物と比較して、改変された活性及び／又は改変された循環半減期を有する。例えば、いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、プロテインAの機能ドメイン及びプロテインBの構造ドメインから構成されるキメラタンパク質であり、キメラタンパク質は、タンパク質A又はタンパク質Bのいずれかのものと比較して優れた機能的活性、循環半減時間、及び／又は他の特性を有する。

【0037】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は抗体；抗体様分子；受容体；モノクローナル抗体；抗体部分又は断片；ナノボディ；二重特異性又は多重特異性抗体；又は二重特異性若しくは多重特異性抗体様分子である。いくつかの実施形態では、抗体はアダリムマブである。いくつかの実施形態では、抗体は、アブシキシマブ、アレムツズマブ、アリロクマブ、アミバンタマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、バシリキシマブ、ベリムマブ、ベンラリズマブ、ベバシズマブ、ベズロトクスマブ、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブ・ベドチン、プロダルマブ、プロルシズマブ、プロスマブ、カナキヌマブ、カブラシズマブ、カプロマブ、カツマキソマブ、セミピリマブ、セルトリズマブ・ペゴル、セツキシマブ、クリザンリズマブ、ダクリズマブ、ダラツムマブ、デノスマブ、ディヌツキシマブ、デュピルマブ、デュルバルマブ、エクリズマブ、エロツズマブ、エマパルマブ、エミシズマブ、エンフォルツマブ・ベドチン、エプチニズマブ、エレヌマブ、エルツマクソマブ、エタラシズマブ、エボロクマブ、フレマネズマブ、ガルカネズマブ、ゲムツズマブ・オゾガマイシン、ゴリムマブ、グセルクマブ、イバリズマブ、イブリツモマブ・チウキセタン、イダルシズマブ、イムシロマブ、インフリキシマブ、イノツズマブ・オゾガマイシン、イピリムマブ、イサツキシマブ、イトリズマブ、イクセキズマブ、ラナデルマブ、ロキベツマブ、メボリズマブ、モガムリズマブ、モキセツモマブ・パストトックス、ナタリズマブ、ネシツムマブ、ニモツズマブ、ニボルマブ、オビルトキサキシマブ、オビヌツズマブ、オクレリズマブ、オフアツムマブ、オララツマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペンブロリズマブ、ベルツズマブ、ボラツズマブ・ベドチン、ラコツモマブ、ラムシルマブ、ラニビズマブ、ラキシバクマブ、ラブリズマブ、レスリズマブ、リサンキズマブ、リツキシマブ、Rma b、ロモソズマブ、ロベリズマブ、ルブリズマブ、サシツズマブ・ゴビテカン、サリルマブ、セクキヌマブ、シルトキシマブ、タルケタマブ、テクリスタマブ、テプロツムマブ、チルドラキズマブ、トシリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、トラスツズマブ・デュオカルマジン、トラスツズマブ・エムタンシン、ウステキヌマブ、及びベドリズマブである。そのような抗体のポリペプチド配列は、公的に入手可能である。例えば、Thera-SAbDab database (at opig.stats.ox.ac.uk), described in Raybould et al. (2020) Thera-SAbDab: the Therapeutic Structural Antibody Database. Nucleic Acids Res. 48 (D1): gkz827.

【0038】

いくつかの実施形態では、アダリムマブの重鎖は、配列番号132のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、アダリムマブの軽鎖は、配列番号133のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、アダリムマブの重鎖は、配列番号134の核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、アダリムマブの軽鎖は、配列番号135の核酸配列によってコードされる。

【0039】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、二重特異性抗体又は多重特異性抗体；又は二重特異性若しくは多重特異性抗体様分子である。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、ブリナツモマブ及びエミシズマブである。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、例えば、ブリナツモマブ (MT103) 及びソリトマブなどの二重特異性T細胞エンゲージャー (BiTE) である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、タ

ンパク質足場（例えば、アドネクチン、アンチカリン、アビマー、フィノマー、クニツドメイン、ノッチン、アフィボディ又はDARPin）に基づく結合リガンド又はバインダーである。

【0040】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は血液タンパク質である。血液タンパク質の非限定的な例としては、トランスフェリン、 α - μ PA、ヒルジン、C1エステラーゼ阻害剤、抗トロンビン薬、血漿カリクレイン阻害薬、プラスミン、プロトロンビン複合体、補体成分、ブレアルブミン（トランスサイレチン）、 α 1アンチトリプシン、 α 1-酸性糖タンパク質、 α 1-フェトプロテイン、 α 2-マクログロブリン、 γ グロブリン、 β 2ミクログロブリン、ハプトグロビン、セルロプラスミン、補体成分3、補体成分4、C反応性タンパク質（CRP）、リポタンパク質（カイロミクロン、超低密度リポタンパク質質（VLDL）、低密度リポタンパク質質（LDL）、高密度リポタンパク質質（HDL））、トランスフェリン、プロトロンビン、マンノース結合レクチン（MBL）、アルブミン、グロブリン、フィブリノゲン、調節因子、及び凝固因子、例えば第I因子、第II因子、第III因子、第IV因子、第V因子、第VI因子、第VII因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第XII因子、第XIII因子、フォン・ウィルバンド因子、プレカリクレイン、フィッツジェラルド因子、フィブロネクチン、抗トロンビンIII、ヘパリン補酵素II、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、プロテインZ関連プロテアーゼ阻害剤、プラスミノゲン、 α 2-アンチプラスミン、組織プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ、プラスミノゲン活性化因子阻害剤1、プラスミノゲン活性化因子阻害剤2、及び癌凝血原が挙げられる。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は血栓溶解薬である。血栓溶解薬の非限定的な例には、Eminase（アニストレプラーゼ）、Retavase（レテプラーゼ）、Streptase（ストレプトキナーゼ、カビキナーゼ）、アルテプラーゼ、 α - μ PA（Activaseを含む薬物のクラス）、TNKase（テネクテプラーゼ）、Abbokinase及びKinlytic（ロキナーゼ）が含まれる。

【0041】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は増殖因子である。増殖因子の非限定的な例としては、エリスロポエチン（EPO）、インスリン様増殖因子-1（IGF-1）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、骨形成タンパク質-2（BMP-2）、骨形成タンパク質-7（BMP-7）、ケラチノサイト増殖因子（KGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、アドレノメデュリン（AM）、アンジオポエチン（Ang）、自己分泌運動因子、骨形成タンパク質（BMP）、毛様体神経栄養因子ファミリー、毛様体神経栄養因子（CNTF）、白血病抑制因子（LIF）、インターロイキン-6（IL-6）、コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、上皮増殖因子（EGF）、エフリン-エフリンA1、エフリンA2、エフリンA3、エフリンA4、エフリンA5、エフリンB1、エフリンB2、エフリンB3、各線維芽細胞増殖因子（FGF）1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、ウシ胎児性ソマトトロフィン（FBS）、GDNFリガンドファミリー、グリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）、ノイトリン、ベルセフィン、アルテミン、成長分化因子-9（GDF9）、肝細胞増殖因子（HGF）、肝腫由来増殖因子（HDGF）、インスリン、インスリン様増殖因子、インスリン様増殖因子-1（IGF-1）、インスリン様増殖因子-2（IGF-2）、インターロイキン-1（IL-1）、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、ケラチノサイト増殖因子（KGF）、遊走刺激因子（MSF）、マクロファージ刺激タンパク質（MSP）、肝細胞増殖因子様タンパク質（HGF-LP）としても知られる、ミオスタチン（GDF-8）、ニューレグリン1（NRG1）、ニューレグリン2（NRG2）、ニューレグリン3（NRG3）、ニューレグリン4（NR

G4)、ニューロトロフィン、脳由来神経栄養因子(BDNF)、神経増殖因子(NGF)、ニューロトロフィン-3(NT-3)、ニューロトロフィン-4(NT-4)、胎盤増殖因子(PGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、レナラーゼ(RNLS)、T細胞増殖因子(TCGF)、トロンボポエチン(TPO)、トランスフォーミング増殖因子 α (TGF- α)、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β)、血管内皮増殖因子(VEGF)、及びWntシグナル伝達経路が挙げられる。いくつかの実施形態において、標的タンパク質はホルモンである。ホルモンの非限定的な例としては、グルカゴン様ペプチド-1、インスリン、ヒト成長ホルモン、卵胞刺激ホルモン、カルシトニン、ルトロピン、グルカゴン様ペプチド-2、レプチン、副甲状腺ホルモン、絨毛性ゴナドトロピン、甲状腺刺激ホルモン、及びグルカゴンが挙げられる。

10

【0042】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は酵素である。酵素の非限定的な例としては、 α -グリコシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、イデュロン酸-2-硫酸、 α -ガラクトシダーゼ、尿酸オキシダーゼ、N-アセチルガラクトシダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、ヒアルロニダーゼ、DNAse、アスパラギナーゼ、ウリカーゼ、アデノシンデアミナーゼ及びその他のエンテロキナーゼ、シクラーゼ、カスパーゼ、カテプシン、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ及びリガーゼが挙げられる。本発明の組成物及び方法の使用による発現のための標的タンパク質は、アガルシダーゼ β 、アガルシダーゼ α 、イミグルセララーゼ、タリグルセララーゼ α 、ベラグルセララーゼ α 、アルグルセララーゼ、セベリパーゼ α 、ラロニダーゼ、イデュルスルファラーゼ、エロスルファラーゼ α 、ガルスルファラーゼ、アルグルコシダーゼ α 、C3阻害剤、ハーラー及びハンター補正因子などの酵素置換に関連するタンパク質を含んでもよい。いくつかの実施形態では、本発明の組成物及び方法は、酵素産生のために使用される。このような酵素は、臨床検査キット又は他の診断アッセイの製造において有用であってもよい。

20

【0043】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は膜タンパク質である。例示的な膜タンパク質としては、イオンチャネル、ギャップ結合、イオン性受容体、トランスポーター、細胞表面受容体などの内在性膜タンパク質、シグナル伝達に应答して膜とサイトゾルとの間を往復するタンパク質などが挙げられる。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体は、Gタンパク質共役受容体(GPCR)、チロシンキナーゼ受容体、インテグリンなどである。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体は、Gタンパク質共役受容体である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、7回(パス)膜貫通ドメイン受容体、7回膜貫通(7-TM)受容体、ヘプタヘリカル受容体、蛇行受容体、又はGタンパク質結合受容体(GPLR)である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、クラスA GPCR、クラスB GPCR、クラスC GPCR、クラスD GPCR、クラスE GPCR、又はクラスF GPCRである。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、クラス1 GPCR、クラス2 GPCR、クラス3 GPCR、クラス4 GPCR、クラス5 GPCR、又はクラス6 GPCRである。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、ロドプシン様GPCR、セクレチン受容体ファミリーGPCR、代謝型グルタミン酸/フェロモンGPCR、真菌接合フェロモン受容体、サイクリックAMP受容体、又はFrizzled/Smoothened GPCRである。いくつかの実施形態では、細胞表面受容体は、IL-1受容体、IL-1Ra、腫瘍壊死因子受容体(TNFR)、又は血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は受容体模倣体である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、Rasタンパク質、Racタンパク質、Rafタンパク質、G α サブユニット、アレスチン、Srcタンパク質及び他のエフェクタータンパク質などの、シグナル伝達に应答して膜とサイトゾルとの間を往復するタンパク質である。

30

40

【0044】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、ヌクレオシダーゼ、NAD+ヌクレオシダーゼ、ヒドロラーゼ、グリコシラーゼ、N-グリコシル化合物を加水分解するグリコシ

50

ラーゼ、NAD+グリコヒドロラーゼ、NADase、DPNase、DPNヒドロラーゼ、NADヒドロラーゼ、ジホスホピリジンヌクレオシダーゼ、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドヌクレオシダーゼ、NADグリコヒドロラーゼ、NADヌクレオシダーゼ、又はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドグリコヒドロラーゼである。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、ニコチネート及びニコチンアミド代謝並びにカルシウムシグナル伝達経路に關与する酵素である。

【0045】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、アバタセプト、アフリベルセプト、アガルシダーゼβ、アルビグルチド、アルデスロイキン、アレフェセプト、アルグルセラゼ、アルグルコシダーゼα、アリスキレン、α-1-プロテイナーゼ阻害薬、アルテプラゼ、アナキンラ、アンセシム、アニストレプラゼ、炭疽免疫グロブリンヒト、抗好血球因子、抗トロンビンα、抗トロンビンIIIヒト、抗胸腺細胞グロブリン、抗胸腺細胞グロブリン（ウマ）、抗胸腺細胞グロブリン（ウサギ）、アプロチニン、アルシツモマブ、アスフォターゼα、アスパラギナーゼ、アスパラギナーゼ黒脚病菌（*erwinia chrysanthemi*）、ベカプレミン、ベラタセプト、ベラクタント、ビバリルジン、A型ボツリヌス毒素、B型ボツリヌス毒素、ブセレリン、C1エステラーゼ阻害剤（ヒト）、C1エステラーゼ阻害剤、コリオゴナドトロピンα、絨毛性ゴナドトロピン（ヒト）、絨毛性ゴナドトロピン、凝固第IX因子、凝固第VIIa因子、凝固第X因子ヒト、凝固第XIII因子Aサブユニット、コラゲナーゼ、コネスタットα、コルチコトロピン、コシントロピン、ダブトマイシン、ダルベポエチンα、デフィブロチド、デニロイキンジフチトックス、デシルジン、ドルナーゼα、ドロトコギンα、デュラグルチド、エファリズマブ、エフモロクトコグα、エロスルファゼα、エンフビルチド、エポエチンα、エポエチンγ、エプチフィバチド、エタネルセプト、エキセナチド、第IX因子複合体（ヒト）フィブリノゲン濃縮物（ヒト）、フィブリノリジン別名プラスミン、フィルグラスチム、フィルグラスチム-sndz、フォリトロピンα、フォリトロピンβ、ガルスルファゼ、胃内因子、グラチラマー酢酸塩、組換えグルカゴン、グルカルピダーゼ、グラミシジンD、A型肝炎ワクチン、B型肝炎免疫グロブリン、ヒトカルシトニン、ヒトクロストリジウムテタニトキソイド免疫グロブリン、ヒト狂犬病ウイルス免疫グロブリン、ヒトRh（D）免疫グロブリン、ヒト血清アルブミン、ヒト水痘帯状疱疹免疫グロブリン、ヒアルロニダーゼ、ヒアルロニダーゼ、イブリツモマブ、イデュルスルファゼ、イミグルセラゼ、免疫グロブリンヒト、インフリキシマブ、インスリン・アスパルト、インスリン・ビーフ、インスリン・デグルデク、インスリン・デテミル、インスリン・グラルギン、インスリン・グルリシン、インスリン・リスプロ、インスリン・ポーク、インスリン・レギュラー、インスリン・レギュラー、インスリン・ブタ、インスリン・イソフェン、インターフェロン・α-2a、リコンビナント、インターフェロンα-2b、インターフェロンアルファコン-1、インターフェロンα-n1、インターフェロンα-n9、インターフェロンβ-1a、インターフェロンβ-1b、インターフェロンγ-1b、免疫グロブリン静注、イピリムマブ、イクセキズマブ、ラロニダーゼ、レノグラスチム、レピルジン、リュープロリド、リラグルチド、ルシナクタント、ルトロピンα、ルトロピンα、メカセルミン、メノトロピン、エポエチンβ、メトレプレチン、ムロモナブ、αインターフェロン、ネシリチド、オクリプラスミン、オマリズマブ、オブレルベキン、OspAリポタンパク質、オキシトシン、パリフェルミン、パンクレリパーゼ、ポラクタントα、プラムリンチド、プレオタクト、プロテインSヒト、ラスプリカーゼ、レテプラゼ、リロナセプト、リツキシマブ、ロミブロスチム、サクロシダーゼ、サーモンカルシトニン、サルグラモスチム、サツモマブ・ペンデチド、セベリパーゼα、セクレチン、セクキヌマブ、セルモレリン、血清アルブミン、ヨード化血清アルブミン、シモクトコグα、シプレウセル-T、ソマトトロピン組換え体、ソマトトロピン組換え体、ストレプトキナーゼ、スロデキサイド、スソクトコグα、タリグルセラゼα、テデュグルチド、テイコプラニン、テネクテプラゼ、テリパラチド、テサモレリン、トロンボモジュリンα、チマルファシン、サイログロブリン、チロトロピンα、チロトロピンα、トシリズマブ、トシツモマブ、ツベル

10

20

30

40

50

クリン精製蛋白誘導体、ツロクトコグ α 、ウロフォリトロピン、ウロキナーゼ、バソプレシン、及びベラグルセラゼ α からなる群から選択される。

【0046】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、バイオシミラーである。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、生物製剤としても知られる生物薬物などの治療用ポリペプチド；バイオマーカーを可能にするポリペプチド、例えば、診断バイオマーカー、予後バイオマーカー、又は予測バイオマーカー；予防ポリペプチド、例えばアジュバント、可溶性抗原、サブウイルス粒子、ウイルス様粒子；補助ポリペプチド、例えば、別の分子の活性若しくは結合を支持するか、又は別のタンパク質-タンパク質相互作用を阻害するポリペプチド；研究において使用されるポリペプチド、例えば、動物において新規なモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を生成するための抗原、レポータータンパク質、又は生理学的プロセス若しくは病理学的プロセス及び動物モデルにおけるこれらのプロセスに対する薬物の効果を研究するためのツールポリペプチドである。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、蛍光タンパク質などの顕微鏡法及びイメージングに用途を有するタンパク質である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、例えばルシフェラーゼなどのレポータータンパク質ではない。いくつかの実施形態では、標的タンパク質はヒトタンパク質である。

10

【0047】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は免疫調節薬である。免疫調節薬の非限定的な例としては、サイトカイン、ケモカイン、インターロイキン、インターフェロンが挙げられる。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、ワクチンとして使用するための、又は研究のための抗原である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、タンパク質複合体アセンブリにおいて機能する構造タンパク質などの構造タンパク質である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、抗菌性ポリペプチド；又は抗ウイルス性ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は腫瘍抑制因子である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は転写因子又は翻訳因子である。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、薬物動態調節タンパク質、小分子結合タンパク質、RNA結合タンパク質、又はタンパク質結合タンパク質である。

20

【0048】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、ドーパミン受容体1 (DRD1)、嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス制御因子 (CFTR)、C1エステラーゼ阻害剤 (C1-Inh)、IL2誘導性T細胞キナーゼ (ITK)、又はNADaseである。いくつかの実施形態では、標的タンパク質はホタルルシフェラーゼである。

30

【0049】

エンハンサータンパク質

本開示は、標的タンパク質及びエンハンサータンパク質の共発現に関する。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、収率、品質、フォールディング、翻訳後修飾、活性、局在化、及び下流活性を含むがこれらに限定されない標的タンパク質発現の1つ以上の態様を改善してもよく、又はミスフォールディング、変化した活性、不正確な翻訳後修飾、及び／若しくは毒性の1つ以上を低減してもよい。

40

【0050】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、核孔遮断ウイルスタンパク質である。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、核孔を遮断し、それによって核細胞質輸送 (「NCT」) を阻害することができる天然又は合成ペプチドである。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質はウイルスタンパク質である。いくつかの態様では、ウイルスタンパク質はNCT阻害剤である。

【0051】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質、ピコルナウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス3Cプロテアーゼ、コロナウイルスORF6タンパク質、エボラウイルスVP24タンパク質、ベネズエラウ

50

マ脳炎ウイルス（V E E V）カプシドタンパク質、単純ヘルペスウイルス（H S V）I C P 2 7 タンパク質、及びラブドウイルスマトリックス（M）タンパク質からなる群から選択される。

【0052】

エンハンサータンパク質は、本明細書に開示されるタンパク質のいずれかの機能的変異体である。本明細書で使用される場合、「機能的変異体」という用語は、元のタンパク質と相同であり、かつ／又はその元のタンパク質と実質的な配列類似性例えば、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、又は99%を超える配列同一性）を共有し、元のタンパク質の1つ以上の機能的特徴を共有するタンパク質を指す。例えば、N C T 阻害剤であるエンハンサータンパク質の機能的変異体は、N C T を阻害する能力を保持する。

10

【0053】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルス由来のリーダー（L）タンパク質又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、カルジオウイルス属、ヘパトウイルス、又はアフトウイルス属由来のリーダータンパク質である。例えば、エンハンサータンパク質は、ウシ鼻炎Aウイルス、ウシ鼻炎Bウイルス、ウマ鼻炎Aウイルス、口蹄疫ウイルス、ヘパトウイルスA、ヘパトウイルスB、マルモタ・ヒマラヤナ（*Marmota himalayana*）ヘパトウイルス、フォピウイルス（Phopivirus）、カルジオウイルスA、カルジオウイルスB、タイラマウス脳脊髄炎ウイルス（T M E V）、ビルユイスクヒト脳脊髄炎ウイルス（V H E V）、タイラ様ラットウイルス（T R V）、又はS a f f o l dウイルス（S A F - V）由来であってもよい。

20

【0054】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、タイラーウイルスのLタンパク質又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、Lタンパク質は、配列番号1と少なくとも90%の同一性を共有する。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、配列番号1を含んでもよく、それからなってもよく、又は本質的にそれからなってもよい。エンハンサータンパク質は、配列番号1と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%又は100%の同一性を共有してもよい。

【0055】

いくつかの実施形態では、Lタンパク質は、脳心筋炎ウイルス（E M C V）のLタンパク質又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、Lタンパク質は、配列番号2と少なくとも90%の同一性を共有してもよい。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、配列番号2を含んでもよく、それからなってもよく、又は本質的にそれからなってもよい。エンハンサータンパク質は、配列番号2と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%又は100%の同一性を共有してもよい。

30

【0056】

いくつかの実施形態では、Lタンパク質は、ポリオウイルスのLタンパク質、H R V 1 6 のLタンパク質、メンゴウイルスのLタンパク質、及びS a f f o l dウイルス2のLタンパク質又はそれらの機能的変異体からなる群から選択される。

40

【0057】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルス2 A プロテアーゼ又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、エンテロウイルス、ライノウイルス、アフトウイルス、又はカルジオウイルス由来の2 A プロテアーゼである。

【0058】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、ライノウイルス3 C プロテアーゼ又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、ピコルナイン3 C プロテアーゼである。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク

50

質は、エンテロウイルス、ライノウイルス、アフトウイルス、又はカルジオウイルス由来の 3 C プロテアーゼである。例えば、いくつかの非限定的な実施形態において、エンハンサータンパク質は、ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、ライノウイルス、口蹄疫ウイルス、又はヘパトウイルス A 由来の 3 C プロテアーゼである。

【0059】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、コロナウイルス ORF 6 タンパク質又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、核内移行複合体形成を破壊し、及び／又は STAT1 の核内への輸送を破壊するウイルスタンパク質である。

【0060】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、エボラウイルス VP 24 タンパク質又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、エボラウイルス VP 40 タンパク質又は VP 35 タンパク質である。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、インボルチンタンパク質カリオフィリン-α (KPNA) に結合するウイルスタンパク質である。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、STAT1 の KPNA への結合を阻害するウイルスタンパク質である。

【0061】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) カプシドタンパク質又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、核孔複合体と相互作用するウイルスカプシドタンパク質である。

【0062】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、単純ヘルペスウイルス (HSV) ICP 27 タンパク質又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、HSV ORF 57 タンパク質である。

【0063】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、ラブドウイルスマトリックス (M) タンパク質又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、サイトラブドウイルス (Cytorhabdovirus)、ジコルハウイルス (Dichorhavirus)、エフェメリスウイルス、リッサウイルス (Lyssavirus)、ノビラブドウイルス (Novirhabdovirus)、ヌクレオラブドウイルス (Nucleorhabdovirus)、ペルハブドウイルス (Perhabdovirus)、シグマウイルス (Sigmavirus)、スピリウイルス (Sprivivirus)、チブロウイルス (Tibrovirus)、ツパウイルス (Tupavirus)、バリコサウイルス (Varicosavirus)、又はベシクロウイルス (Vesiculovirus) 由来の M タンパク質である。

【0064】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、表 1 に列挙されるタンパク質又はその機能的変異体から選択される。エンハンサータンパク質をコードするポリヌクレオチドは、表 1 に列挙されるアミノ酸配列と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 % 又は 100 % 同一であるアミノ酸配列をコードしてもよい。エンハンサータンパク質のアミノ酸配列は、表 1 に列挙されたアミノ酸配列と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 % 又は 100 % 同一であってもよい。エンハンサータンパク質のアミノ酸配列は、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は 11 のアミノ酸配列と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、99 %、又は 100 % 同一であってもよい。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、表 1 に列挙されるアミノ酸配列のうちの 1 つを含むか、それからなるか、又はそれから本質的になるアミノ酸配列を有してもよい。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、配列番号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は 11 のアミノ酸配列を含むか、それからなるか、又はそれから本質的になるアミノ酸配列を有してもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 5 】

【 表 1 - 1 】

表 1 : 例示的なエンハンサータンパク質

核孔遮断ウイルスタンパク質	由来元	ファミリー	アミノ酸配列
リーダータンパク質	タイラーウイルス	ピコルナウイルス科	MACKHGYPDVCPICATAVDATPGFEY LLMADGEWYPTDLLCVDLDDDDVFW PSDTSNQSQTMDWTDVPLIRDIVME PQ (配列番号24)
リーダータンパク質	タイラー様カルジオウイルス	ピコルナウイルス科	MACKHGYPLMCPLCTALDKTSDGLF TLLFDNEWYPTDLLTVDLEDEVFYP DDPHMEWTDLPLIQDIEMEPQ (配列番号1)
リーダータンパク質	EMCV	ピコルナウイルス科	MATTMEQETCAHSLTFEECPKCSAL QYRNGFYLLKYDEEWYPEELLTDGE DDVFDPELDMEVVFELQ (配列番号2)
リーダータンパク質	ポリオウイルス(エンテロウイルスC)	ピコルナウイルス科	NYHLATQDDLQNAVNMWSRDLLV TESRAQGTDSIARCNCNAGVYYCES RRKYYPVSFVGPTFQYMEANNYYPA RYQSHMLIGHGFASPGDCGGILRCH HGVIGIITAGGEGLVAFSDIRDLAYE E (配列番号3)
リーダータンパク質	ウマ鼻炎Bウイルス1	ピコルナウイルス科	MVTMAGNMICNVFAGLATEICSPKQ GPLLDNELPLLELAEPNKNDCW VAALSHYYTLCDDVTNHVTKVTPTS GIRYYLTAWQSILQTDLFNGYYPAAF AVETGLCHGPFPMQQHGYVRNATS HPYNFCLCSEPVPGEDYWHAVVKV DLSRTEARVDKWLCIDDDRMVLSGP PTRVKLASSYKIPTWIESLAQFCLQL HPVQHRRTLANSRNEQCR (配列番号4)
リーダータンパク質	メンゴウイルス(カルジオウイルス)	ピコルナウイルス科	MATTMEQEICAHSMTFEECPKCSAL QYRNGFYLLKYDEEWYPEESLTDGE DDVFDPLDMEVVFETQ (配列番号5)
リーダータンパク質	Saffoldウイルス2(カルジオウイルス)	ピコルナウイルス科	MACKHGYPFCLCPLCTAIDTTHDGSF TLLIDNEWYPTDLLTVDLDDDDVFHPD DSVMEWTDLPLIQDVVMEPQ (配列番号6)
2Aプロテアーゼ	ポリオウイルス(エンテロウイルスC)	ピコルナウイルス科	GFGHQNKAVYTAGYKICNYHLATQD DLQNAVNMWSRDLLVTESRAQGT DSIARCNCNAGVYYCESRRKYYPVS FVGPTFQYMEANNYYPARYQSHMLI GHGFASPGDCGGILRCHHGVIGIITA GGEGLVAFSDIRDLAYEEEEAMEQ (配列番号7)
3Cプロテアーゼ	HRV16	ピコルナウイルス科	GPEEEFGMSIKNNTCVVTTTNGKFT GLGIYDRILILPHADPGSEIQVNGIH TKVLDSYDLFNKEGVKLEITVLKLDL NEKFRDIRKYIPESEDDYPECNLALV ANQTEPTIIKVGDVVSYGNILLSGTQ TARMLKYNYPKTSYCGGVLYKIGQI LGIHVGGNGRDGFSSMLLSYFTEQ (配列番号8)

【 0 0 6 6 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

(表 1 の続き)

核孔遮断ウイルスタンパク質	由来元	ファミリー	アミノ酸配列
Mタンパク質	水疱性口内炎ウイルス	ラブドウイルス科	MSSLKKILGLKGKGKKSKKLGIAAPP PYEEDTSMEYAPSAPIDKSYFGVDE MDTYDPNQLRYEKFFFTVKMTVRSN RPFRTYSDVAAAVSHWDHMYIGMA GKRPFYKILAFGLGSSNLKATPAVLAD QGQPEYHHTHCEGRAYLPHRMGKTP PMLNVPEHFRRPFNIGLYKGTIELTM TIYDDESLEAAPMIWDHFNSSKFSD FREKALMFGLIVEKKASGAWVLDSI SHFK (配列番号9)
非構造タンパク質1	A型インフルエンザウイルス	オルソミキソウイルス科	MDPNTVSSFQVDCFLWHVRKRVAD QELGDAPFLDRLRRDQKSLRGRGS TLGLDIETATRAGKQIVERILKEESD EALKMTMASVPASRYLTDMTLEEM SRDWSMLIPKQKVAGPLCIRMDQAI MDKNIILKANFSVIFDRLETILLRAF TEEGAIVGEISPLPSLPGHATAEDVKN AVGVLIGGLEWNDNTVRVSETLQRF AWRSSNENGRPPLTPKQKREMAGT IRSEV (配列番号10)
即時型タンパク質IE63	シンプレックスウイルス	ヘルペスウイルス科	MATDIDMLIDLGLDLSDSDLDEDPP EPAESRRDDLESSSGECSSSDED MEDPHGEDGPEPILDAARPAVRPSR PEDPGVPSTQTPRPTERQGPNDPQ PAPHSVWSRLGARRPSCSPEQHGG KVARLQPPPTKAQPARGGRRGRRR GRGRGGPGAADGLSDPRRRAPRTN RNPGGPRPGAGWTDGPGAPHGEA WRGSEQPDPPGGQRTRGVRQAPPP LMTLAIAPPPADPRAPAPERKAPAA DTIDATTRLVLRISERAADVRISEF GRSAQVMHDPFGGQPFPAANSPWA PVLAGQGGPFDAETR RVSWETLVA HGPSLYRTFAGNPRAASTAKAMRD CVLRQENFIEALASADETLAWCKMC IHNNLPLRPQDPPIIGTTAAVLNLT RLRPFLQCYLKARGLCGLDELCSRR RLADIKDIASFV FVILARLANRVERG VAEIDYATLGVGVGKMHFYLPGAC MAGLIEILDTHRQECSSRVCELTAS HIVAPPYVHGKYFYCNSLF (配列番号11)

【0067】

融合タンパク質

いくつかの実施形態では、標的タンパク質及びエンハンサータンパク質は、単一の融合タンパク質に含まれる。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、連結エレメントを含んでもよい。いくつかの実施形態では、連結エレメントは、酵素的切断のための切断部位を含んでもよい。他の実施形態では、融合タンパク質又は連結エレメントは切断部位を含まず、発現された融合タンパク質は標的タンパク質及びエンハンサータンパク質の両方を含む。

【0068】

タンパク質修飾

10

20

30

40

50

標的タンパク質、エンハンサータンパク質、及び／若しくは融合タンパク質、又はそれらをコードするポリヌクレオチドは、1つ以上のマーカー、標識、又はタグを含むように修飾されてもよい。例えば、いくつかの実施形態では、本開示のタンパク質は、その検出を可能にする任意の標識例えば、放射性標識、蛍光剤、ビオチン、ペプチドタグ、酵素断片などで標識されてもよい。タンパク質は、親和性タグ例えば、Hisタグ、GSTタグ、Streptタグ、ビオチンタグ、免疫グロブリン結合ドメイン、例えば、IgG結合ドメイン、カルモジュリン結合ペプチドなどを含んでもよい。いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチドは、選択マーカー、例えば、抗生物質耐性マーカーを含む。

【0069】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、1つ以上の翻訳後修飾を有する。翻訳後修飾のタイプは限定されず、当技術分野で公知の任意の翻訳後であってもよい。翻訳後修飾の非限定的な例としては、グリコシル化、アセチル化、アルキル化、メチル化、ビオチン化、グルタミル化、グリシル化、イソプレニル化、リポイル化、ホスホパンテニル化、リン酸化、スフ化 (sulfation)、セレン化、C末端アミド化、スモイル化、及びそれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【0070】

ポリメラーゼ

標的タンパク質（複数可）及びエンハンサータンパク質（複数可）をコードするポリヌクレオチドの転写のために、内因性ポリメラーゼ又は外因性ポリメラーゼを使用してもよい。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド（複数可）の転写は、細胞（例えば、真核細胞）に含まれる天然ポリメラーゼによって行われる。ウイルスポリメラーゼが、代替的に又は付加的に使用されてもよい。いくつかの実施形態では、ウイルスプロモーターは、1つ以上のウイルスポリメラーゼと組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、真核生物プロモーターは、1つ以上の真核生物ポリメラーゼと組み合わせて使用される。例示的なウイルスポリメラーゼとしては、T7、T5、EMCV、HIV、インフルエンザ、SP6、CMV、T3、T1、SP01、SP2、Phi15などが挙げられるが、これらに限定されない。ウイルスポリメラーゼは、RNAプライミング又はキャッピングポリメラーゼである。いくつかの実施形態では、IRESエレメントは、ウイルスポリメラーゼと併せて使用される。

【0071】

本開示による1つ又は複数のベクターは、ポリメラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼはウイルスポリメラーゼである。ポリメラーゼをコードするポリヌクレオチド配列は、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチド及び／又はエンハンサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターに含まれてもよい。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは、標的タンパク質又はエンハンサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを含まないベクターに含まれてもよい。

【0072】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される系、方法、又は細胞に含まれる1つ以上のベクターのうちの少なくとも1つは、T7 RNAポリメラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含んでもよい。

【0073】

ベクター

いくつかの態様では、本開示は、1つ以上の標的タンパク質及び1つ以上のエンハンサータンパク質の発現のための核酸配列を含むベクターに関する。いくつかの実施形態では、複数のベクター（又は1つのベクター）は、標的タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド及びエンハンサータンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドを有する。

【0074】

本開示による使用のためのベクターは、当技術分野で公知の任意のベクターを含んでもよい。特定の実施形態では、ベクターは、目的のタンパク質若しくはポリペプチド又はそ

10

20

30

40

50

の断片を発現することができる任意の組換えベクター、例えば、アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、複製可能アデノウイルスベクター、複製欠損アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アルファウイルス、フラビウイルス、ラブドウイルス、麻疹ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ポックスウイルス、ピコルナウイルス、ヘルペスウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、アデノウイルス（A d）ベクター又は非ウイルスプラスミドである。いくつかの実施形態では、ベクターは、アデノ随伴ウイルス（A A V）ベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、複製可能アデノウイルスベクター、複製欠損アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アルファウイルス、フラビウイルス、ラブドウイルス、麻疹ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ポックスウイルス、ピコルナウイルス、ヘルペスウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、アデノウイルス（A d）ベクターに基づくウイルス遺伝子送達ベクターである。

10

【0075】

いくつかの実施形態では、ベクターはウイルスベクター、プラスミド、ファージ、ファージミド、コスミド、フォスミド、バクテリオファージ又は人工染色体である。いくつかの実施形態では、ベクターは、細菌人工染色体（B A C）、プラスミド、バクテリオファージP1由来ベクター（P A C）、酵母人工染色体（Y A C）、又は哺乳動物人工染色体（M A C）である。いくつかの実施形態では、ベクターは、裸の又は製剤化されたプラスミドD N A又はミニサークルである。製剤は限定されず、例えば、ペプチド、脂質、ポリマー、又はカチオンなどの非ウイルスD N A担体に基づいてもよい。

20

【0076】

いくつかの実施形態では、ベクターは、構成的に、一過性に、又は調節された様式で発現されるポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、調節は安全スイッチを含む。ベクターからのポリヌクレオチドの調節された発現は、誘導性遺伝子スイッチ（例えば、合成受容体、タンパク質ベースのスイッチ、遺伝子回路、ゲノム編集ツール、リボザイム又はアプタザイム）などの当技術分野で公知の任意の技術の使用；又はアポトーシス自殺遺伝子及びプロドラッグの使用を含んでもよい。タンパク質ベースのスイッチは、当該分野で公知であり、二量体化タンパク質又は抗体（例えば、単量体カスパーゼ9のリミズシンド誘導性二量体化）の使用を含んでもよい。

30

【0077】

本明細書に開示される細胞、系、及び方法は、1つのベクターを含んでもよい。いくつかの実施形態では、細胞、系及び方法は、標的タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド及びエンハンサータンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドを含む単一のベクターを含んでもよい。

【0078】

本明細書に開示される細胞、系、及び方法は、2つのベクターを含んでもよい。いくつかの実施形態では、細胞、系、及び方法は、第1のプロモーターに作動可能に連結された第1のポリヌクレオチドを含む第1のベクター；及び第2のプロモーターに作動可能に連結された第2のポリヌクレオチドを含む第2のベクターを含んでもよい。

40

【0079】

本明細書に開示される細胞、系、及び方法は、2つより多くのベクターを含んでもよく、ベクターは、様々な組み合わせ又は構成で標的タンパク質（複数可）及びエンハンサータンパク質（複数可）をコードしてもよい。

【0080】

いくつかの実施形態では、本開示の1つ又は複数のベクターを含む細胞が提供される。いくつかの実施形態では、本開示のポリヌクレオチドを含む細胞が提供される。いくつかの実施形態では、本開示の標的タンパク質（複数可）及びエンハンサータンパク質（複数可）を発現する細胞が提供される。

【0081】

50

プロモーター

本開示によるベクターは、1つ以上のプロモーターを含んでもよい。「プロモーター」という用語は、転写を開始するためのRNAポリメラーゼ及び他のタンパク質の認識及び結合に参与する、転写開始点の上流又は下流に位置する領域又は配列を指す。本開示によるポリヌクレオチド（複数可）又はベクター（複数可）は、1つ以上のプロモーターを含んでもよい。プロモーターは、当該分野で公知の任意のプロモーターであってもよい。プロモーターは、順方向プロモーター又は逆方向プロモーターであってもよい。いくつかの実施形態では、プロモーターは、哺乳動物プロモーターである。いくつかの実施形態では、1つ以上のプロモーターは、天然プロモーターである。いくつかの実施形態では、1つ以上のプロモーターは、非天然プロモーターである。いくつかの実施形態では、1つ以上のプロモーターは、非哺乳動物プロモーターである。開示される組成物及び方法における使用のためのRNAプロモーターの非限定的な例としては、U1、ヒト伸長因子-1 α （EF-1 α ）、サイトメガロウイルス（CMV）、ヒトユビキチン、脾臓フォーカス形成ウイルス（SFFV）、U6、H1、tRNA^{Lys}、tRNA^{Ser}及びtRNA^{Arg}、CAG、PGK、TRE、UAS、UbC、SV40、T7、Sp6、lac、araBad、trp、及びPtacプロモーターが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0082】

本明細書で使用される「作動可能に連結された」という用語は、物理的位置ではなく作動能力によって連結された核酸配列中のエレメント又は構造を指す。エレメント又は構造は、所望の動作を達成することが可能であるか、又は達成することによって特徴付けられる。核酸配列中のエレメント又は構造が、作動可能に連結されるためにタンデム又は隣接した順序である必要はないことが、当業者によって認識される。

【0083】

いくつかの実施形態では、本開示によるベクターに含まれるプロモーターは、誘導性プロモーターである。

【0084】

本開示によるベクターは、1つ以上のウイルスポリメラーゼによる1つ以上のポリヌクレオチドの転写を可能にする1つ以上のウイルスプロモーターを含んでもよい。いくつかの実施形態では、例えば、ベクターは、T7 RNAポリメラーゼによる第1のポリヌクレオチド（すなわち、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチド）又は第2のポリヌクレオチド（すなわち、エンハンサータンパク質をコードするポリヌクレオチド）のいずれか又は両方の転写のために構成されたT7プロモーターを含んでもよい。

【0085】

発現カセット

本開示による1つ又は複数のベクターは、1つ以上の発現カセットを含んでもよい。「発現カセット」という語句は、本明細書で使用される場合、その核酸分子によってコードされる別の核酸又はタンパク質の産生に必要な最小エレメントを含む核酸分子の定義されたセグメントを指す。いくつかの実施形態では、ベクターは、発現カセットを含んでもよく、この発現カセットは、標的タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド及びエンハンサータンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、発現カセットは、第1のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第1のプロモーター；及び第2のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第2のプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、発現カセットは、第1のポリヌクレオチド及び第2のポリヌクレオチドの両方に作動可能に連結された共有プロモーターを含む。

【0086】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、分離エレメント（例えば、リボソームスキッピング部位又は2Aエレメント）をコードするポリヌクレオチドによって連結された第1のポリヌクレオチド及び第2のポリヌクレオチドを含むコードポリヌクレオチドを含み、コードポリヌクレオチドは、共有プロモーターに作動可能に連結されている。

【0087】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、コードポリヌクレオチドを含み、コードポリヌクレオチドは、分離エレメント（例えば、リボソームスキッピング部位又は 2 A エレメント）によって連結されたエンハンサータンパク質及び標的タンパク質をコードし、コードポリヌクレオチドは、共有プロモーターに作動可能に連結されている。

【0088】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、分離エレメント（例えば、リボソームスキッピング部位又は 2 A エレメント）によって連結された、標的タンパク質及びエンハンサータンパク質の両方をコードする単一のメッセンジャー RNA の転写のために構成されており、メッセンジャー RNA の翻訳は、別個のポリペプチドとしての標的タンパク質及びエンハンサータンパク質（例えば、L タンパク質）の発現を生じさせる。

【0089】

いくつかの実施形態では、発現カセットはコードポリヌクレオチドを含み、コードポリヌクレオチドは、ポリペプチドリinkerを有するか又は有さない融合タンパク質としてエンハンサータンパク質及び標的タンパク質をコードし、必要に応じて、ポリペプチドリinkerは、切断可能なリinker又はインテインベースの切断系である。

【0090】

分離エレメント

いくつかの実施形態では、本開示による標的タンパク質（複数可）及びエンハンサータンパク質（複数可）は、同じベクター上にコードされるか、又は別個のベクター上にコードされる。いくつかの実施形態では、1つ以上の標的タンパク質及び1つ以上のエンハンサータンパク質の核酸配列が同じベクターに含まれる場合、ベクターは、タンパク質の別々の発現のための分離エレメントを含んでもよい。様々な実施形態では、ベクターは、バイストロン性ベクター又はポリストロン性ベクターである。分離エレメントは、内部リボソーム侵入部位（IRES）又は 2 A エレメントであってもよい。いくつかの実施形態では、ベクターは、2 A 自己切断ペプチドをコードする核酸を含んでもよい。例示的な 2 A 自己切断ペプチドとしては、P 2 A、E 2 A、F 2 A、及び T 2 A が挙げられる。

【0091】

いくつかの実施形態では、第 1 のポリヌクレオチド若しくは第 2 のポリヌクレオチドのいずれか、又は両方が、内部リボソーム侵入部位（IRES）に作動可能に連結されている。

【0092】

いくつかの実施形態において、第 1 のポリヌクレオチド若しくは第 2 のポリヌクレオチド、又はその両方は、2 A エレメントに作動可能に連結される。

【0093】

いくつかの実施形態では、ベクターは、図 13 A 又は図 13 B に示される通りである。いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号 132 をコードするポリヌクレオチド及び／又は配列番号 133 をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号 134 の核酸配列を含むポリヌクレオチド及び／又は配列番号 135 をコードするポリヌクレオチドを含む。

【0094】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号 100 の核酸配列、又は配列番号 100 と少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、若しくは少なくとも約 99 % の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【0095】

配列番号 100：

C G C G A T G T A C G G G C C A G A T A T A C G C G T T G A C A T T G A T T A
T T G A C T A G T T A T T A A T A G T A A T C A A T T A C G G G G T C A T T A G
T T C A T A G C C C A T A T A T G G A G T T C C G C G T T A C A T A A C T T A C

GGTAAATGGCCCCGCGCTGGCTGACCGCCCCAACGACCCCCCGC
CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGC
CAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTT
ACGGTAAACTGCCCACTTTGGCAGTACATCAAGTGTATCAT
ATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGGTAAAT
GGCCCCGCGCTGGCATTATGCCCAAGTACATGACCTTATGGGA
CTTTCTACTTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAATCGCT
ATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGC
GTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGGATTTCCAAGTCTCCA
CCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTTGGCACCAAAAT
CAACGGGGACTTTCCAATAATGTCGTAAACAACCTCCGCCCCAT
TGACGCAAAATGGGCGGGTAGGCGTGTACGGGTGGGAGGGTCTA
TATAAGCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAAGATCCGCTAG
CGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCT
GCAGTCGACGGGTACCGCGGGGCCCGGGATCCACCGGTCCGCC
ACGATGAAGTGGGTGACCTTCATCAGCCTGCTGTTCTCTGT
TTTTCTTCCGCCCTACAGCGAAGTGCAGCTGGTTGAAAGCGG
AGGCGGACTGGTCCAGCCAGGCGAGAAAGCCTGAGACTGTCT
TGTGCCCGCCTCTGGCTTTCACCTTTGACGACTACGCCCATGC
ACTGGGTGCGGCGAGGCCCTGGCAAGGGGACTCGAGTGGGT
CAGCGCCATCACCTGGAATAGCGGCCACATCGACTACGCA
GATAGCGTTGAAGGCGAGATTCCACCATCTCCAGGGACAACG
CCAAGAATTCTCTGTACCTGCGAGATGAACAGCCTGCGGGC
CGAGGATACCGCTGTGTACTACTGCGCCAAAGTGTCTCTAC
CTGAGCACCGCCAGCTCCCTGGACTACTGGGGGCCAGGGGCA
CCCTGGTGACAGTGAGCTCTGCTAGCACAAAGGACCTAG
CGTGTTTTCCCCCTGGCCCCCTAGCAGCAAAAGCACCCAGCGGC
GGAACCGCCGCTCTGGGTGTGCTGCTGGTGAAAGGACTATTTCC
CTGAACCTGTGACCGGTGTCTCTGGAACCTCTGGCGGCCCTGAC
TAGCGGCGTGCATACCTTCCCTGCGGTGCTGCAAAAGCTCT
GGCCTGTATAGCCTTTCTTCTGTGGTGACCGGTGCCCTAGCA
GCTCTCTGGGGCACACAGACATACATCTGCAATGTGAACCA
CAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAAAAGGTGGAAACCC
AAGAGCTGCGACAAAGACCCACACCTGTCTCTCGTGGCCCCG
CTCCTGAGCTGCTGGGGCGGCCCTTCTGTGTGTTCTCTGTTCCC
CCCCAAACCTAAAGACACACTGATGATCAGCCGGGACCCCT
GAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGAGCC
CCGAGGTGAAGTTCAACTGGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
CCACAACGCCAAGACCAAAACCTAGAGAGGAACAATAACAAC
AGCACATATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGTCTCCACC
AGGACTGGCTGAACGGGAAGGAATACAAGTGCAGGTGTCT
CAACAAGGCCCTCCCTGCTCCAATCGAGAAAGACCATTAGC
AAGGCCAAGGGGCCAACCTAGAGAGGCCCCAGGTCTACACCC
TGCCACCAAGTAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAG
CCTAACATGCCTGGTGAAGGGGCTTTTACCCCAAGCGACATC
GCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGGCCAGCCTGAGAACAACT
ACAAGACAACACCTCCTGTTCTGGATTCTGATGGCAGCTT
CTTCTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGATAAGAGCCGGGTGG
CAGCAGGGGCAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTTATGCACGAGG
CCCTGCATAATCACTACACCCAGAAAGAGCCTGTCTCTGAG

10

20

30

40

50

CCCTGGCAAGGAAGTGCAGCTGGTTGAAAGCGGAGGCGGA
CTGGTCCAGCCAGGCAGAAAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCG
CCTCTGGCTTTCACCTTTGACGACTACGCCATGCACTGGGT
GCGGCAGGCCCTGGCAAGGGACTCGAGTGGGTTCAGCGCC
ATCACCTGGAATAGCGGCCACATCGACTACGCAGATAGCG
TTGAAGGCGAGATTCAACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAA
TTCTCTGTACCTGCGAGATGAACAGCCTGCGGGGCCGAGGAT
ACCGCTGTGTACTACTGCGCCAAAGTGTCTTACCTGAGCA
CCGCCAGCTCCCTGGACTACTGGGGGCCAGGGGCACCCCTGGT
GACAGTGAGCTCTGCTAGCACAAAAGGACCTAGCGTGT
CCCCTGGCCCCCTAGCAGCAAAAAGCACCCAGCGGGCGGAACCG
CCGCTCTGGGTGTGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCTGAACC
TGTGACCGTGTCTGGAACCTCTGGCGCCCCCTGACTAGCGGC
GTGCATACCTTCCCTGCCGTGCTGCAAAAGCTCTGGCCCTGT
ATAGCCTTTCTTCTGTGGTGAACCGTGCCTAGCAGCTCTCT
GGGCACACAGACATACATCTGCAATGTGAACCAACAAGCCC
TCCAACACCAAGGTGGACA AAAAGGTGGAAACCCAAGAGCT
GCGACAAGACCCACACCTGTCTCTCGTGGCCCCGCTCCTGA
GCTGCTGGGGCGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAA
CCTAAAGACACACTGATGATCAGCCGGACCCCTGAGGTGA
CCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGT
GAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTCCACAAC
GCCAAGACCAAAACCTAGAGAGGAACAATAACAACAGCACAT
ATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGTCTCCACCCAGGACTG
GCTGAACGGAAAGGAATAACAAGTGC AAAGGTGTCCAACAAG
GCCCTCCCTGCTCCAATCGAGAAGACCATTAGCAAGGCCA
AGGGCCAAACCTAGAGAGCCCCAGGTCTACACCCCTGCCACC
AAGTAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTAACA
TGCCTGGTGAAGGGCTTTTACCCCAAGCGACATCGCCGTGG
AATGGGAGAGGCAACGGGCCAGCCTGAGAAACAACCTACAAGAC
AACACCTCCTGTTCTGGATTCTGATGGCAGCTTCTTCTCTG
TACAGCAAGCTGACAGTGGATAAGAGCGGGTGGCAGCAGG
GCAACGTGTTCAAGCTGCTCCGTTATGCACGAGGCCCTGCA
TAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGTCTCTGAGCCCTGGC
AAGCAAGCGAAAAACGGCGCGGGAAGCGGAGCTACTAACTTC
AGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGATGTGGAGGAGAAACCCCTG
GACCTGATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTAGCCTGAG
CGCCAGCGTGGGAGATAGAGTGAACCATCACCTGTAGAGCC
TCTCAAGGCATCCGGAACTACCTGGCCCTGGTATCAGCAGA
AACCTGGCAAGGCTCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTTTC
CACCCCTGCAGAGCGGGCGTTCTCTTAGATTTCAGCGGCAGC
GGCTCCGGAAACAGACTTCAACCCTGACAATTAGCTCCCTGC
AACCTGAAGATGTGGCTACATACTACTGCCAGAGATACAA
TCGGGGCCCCCTTACACCTTTGGACAGGGGCACCAAGGTGGAA
ATCAAGCGGACCGGTGGCCCGCCCCATCTGTGTTCATCTTCC
CCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAAAAGCGGCACAGCCAGCGT
GGTGTGCCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAAGGGAAAGCCAAG
GTGCAGTGGAAAGGTGGACAATGCCCTGCAAGAGCGGGCAACA
GCCAGGAGAGCGTGAACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC
CTACAGCCTGAGCAGCACCCCTCACACTGTCTAAAGCCGAC

10

20

30

40

50

T A C G A G A A G C A C A A G G T C T A C G C C T G C G A G G T G A C C C A C C
A G G G C C T G T C C T C C C C T G T G A C A A A G A G C T T T A A C A G A G G
C G A G T G C T A A G A T A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C T A G C
C T G A G C G C C A G C G T G G G A G A T A G A G T G A C C A T C A C C T G T A
G A G C C T C T C A A G G C A T C C G G A A C T A C C T G G C C T G G T A T C A
G C A G A A A C C T G G C A A G G C T C C T A A G C T G C T G A T C T A C G C C
G C T T C C A C C C T G C A G A G C G G C G T T C C T T C T A G A T T C A G C G
G C A G C G G C T C C G G A A C A G A C T T C A C C C T G A C A A T T A G C T C
C C T G C A A C C T G A A G A T G T G G C T A C A T A C T A C T G C C A G A G A
T A C A A T C G G G C C C C T T A C A C C T T T G G A C A G G G C A C C A A G G
T G G A A A T C A A G C G G A C C G T G G C C G C C C C A T C T G T G T T C A T
C T T C C C C C C A G C G A C G A G C A G C T G A A A A G C G G C A C A G C C
A G C G T G G T G T G C C T G C T G A A C A A C T T C T A C C C C A G G G A A G
C C A A G G T G C A G T G G A A G G T G G A C A A T G C C C T G C A G A G C G G
C A A C A G C C A G G A G A G C G T G A C C G A G C A G G A C A G C A A G G A C
A G C A C C T A C A G C C T G A G C A G C A C C C T C A C A C T G T C T A A A G
C C G A C T A C G A G A A G C A C A A G G T C T A C G C C T G C G A G G T G A C
C C A C C A G G G C C T G T C C T C C C C T G T G A C A A A G A G C T T T A A C
A G A G G C G A G T G C T A A C C C C C C C C C T A A C G T T A C T G G C C G
A A G C C G C T T G G A A T A A G G C C G G T G T G C G T T T G T C T A T A T G
T T A T T T T C C A C C A T A T T G C C G T C T T T T G G C A A T G T G A G G G
C C C G G A A A C C T G G C C C T G T C T T C T T G A C G A G C A T T C C T A G
G G G T C T T T C C C C T C T C G C C A A A G G A A T G C A A G G T C T G T T G
A A T G T C G T G A A G G A A G C A G T T C C T C T G G A A G C T T C T T G A A
G A C A A A C A A C G T C T G T A G C G A C C C T T T G C A G G C A G C G G A A
C
C C C C C A C C T G G C G A C A G G T G C C T C T G C G G C C A A A A G C C A C
G T G T A T A A G A T A C A C C T G C A A A G G C G G C A C A A C C C C A G T G
C C A C G T T G T G A G T T G G A T A G T T G T G G A A A G A G T C A A A T G G
C T C T C C T C A A G C G T A T T C A A C A A G G G G C T G A A G G A T G C C C
A G A A G G T A C C C C A T T G T A T G G G A T C T G A T C T G G G G C C T C G
G T G C A C A T G C T T T A C A T G T G T T T A G T C G A G G T T A A A A A A A
C G T C T A G G C C C C C G A A C C A C G G G G A C G T G G T T T T C C T T T
G A A A A A C A C G A T G A T A A T A T G G C C A C A A C C A T G G A A C A A G
A G A C T T G C G C G C A C T C T C T C A C T T T T G A G G A A T G C C C A A A
A T G C T C T G C T C T A C A A T A C C G T A A T G G A T T T T A C C T G C T A
A A G T A T G A T G A A G A A T G G T A C C C A G A G G A G T T A T T G A C T G
A T G G A G A G G A T G A T G T C T T T G A T C C C G A A T T A G A C A T G G A
A G T C G T T T T C G A G T T A C A G T A A A T C A T A A T C A G C C A T A C C
A C A T T T G T A G A G G T T T T A C T T G C T T T A A A A A A C C T C C C A C
A C C T C C C C C T G A A C C T G A A A C A T A A A A T G A A T G C A A T T G T
T G T T G T T A A C T T G T T T A T T G C A G C T T A T A A T G G T T A C A A A
T A A A G C A A T A G C A T C A C A A A T T T C A C A A A T A A A G C A T T T T
T T T C A C T G C A T T C T A G T T G T G G T T T G T C C A A A C T C A T C A A
T G T A T C T T A A G G C G T C T T C T A C T G G G C G G T T T T A T G G A C A
G C A A G C G A A C C G G A A T T G C C A G C T G G G G C G C C C T C T G G T A
A G G T T G G G A A G C C C T G C A A A G T A A A C T G G A T G G C T T T C T T
G C C G C C A A G G A T C T G A T G G C G C A G G G G A T C A A G C T C T G A T
C A A G A G A C A G G A T G A G G A T C G T T T C G C A T G A T T G A A C A A G
A T G G A T T G C A C G C A G G T T C T C C G G C C G C T T G G G T G G A G A G

10

20

30

40

50

G C T A T T C G G C T A T G A C T G G G C A C A A C A G A C A A T C G G C T G C
 T C T G A T G C C G C C G T G T T C C G G C T G T C A G C G C A G G G G C G C C
 C G G T T C T T T T T G T C A A G A C C G A C C T G T C C G G T G C C C T G A A
 T G A A C T G C A A G A C G A G G C A G C G C G G C T A T C G T G G C T G G C C
 A C G A C G G G C G T T C C T T G C G C A G C T G T G C T C G A C G T T G T C A
 C T G A A G C G G G A A G G G A C T G G C T G C T A T T G G G C G A A G T G C C
 G G G G C A G G A T C T C C T G T C A T C T C A C C T T G C T C C T G C C G A G
 A A A G T A T C C A T C A T G G C T G A T G C A A T G C G G C G G C T G C A T A
 C G C T T G A T C C G G C T A C C T G C C C A T T C G A C C A C C A A G C G A A
 A C A T C G C A T C G A G C G A G C A C G T A C T C G G A T G G A A G C C G G T 10
 C T T G T C G A T C A G G A T G A T C T G G A C G A A G A G C A T C A G G G G C
 T C G C G C C A G C C G A A C T G T T C G C C A G G C T C A A G G C G A G C A T
 G C C C G A C G G C G A G G A T C T C G T C G T G A C C C A T G G C G A T G C C
 T G C T T G C C G A A T A T C A T G G T G G A A A A T G G C C G C T T T T C T G
 G A T T C A T C G A C T G T G G C C G G C T G G G T G T G G C G G A C C G C T A
 T C A G G A C A T A G C G T T G G C T A C C C G T G A T A T T G C T G A A G A G
 C T T G G C G G C G A A T G G G C T G A C C G C T T C C T C G T G C T T T A C G
 G T A T C G C C G C T C C C G A T T C G C A G C G C A T C G C C T T C T A T C G
 C C T T C T T G A C G A G T T C T T C T G A A T T A T T A A C G C T T A C A A T
 T T C C T G A T G C G G T A T T T T C T C C T T A C G C A T C T G T G C G G T A 20
 T T T C A C A C C G C A T A C A G G T G G C A C T T T T C G G G G A A A T G T G
 C G C G G A A C C C C T A T T T G T T T A T T T T T C T A A A T A C A T T C A A
 A T A T G T A T C C G C T C A T G A G A C A A T A A C C C T G A T A A A T G C T
 T C A A T A A T A G C A C G T G C T A A A A C T T C A T T T T T A A T T T A A A
 A G G A T C T A G G T G A A G A T C C T T T T T G A T A A T C T C A T G A C C A
 A A A T C C C T T A A C G T G A G T T T T C G T T C C A C T G A G C G T C A G A
 C C C C G T A G A A A A G A T C A A A G G A T C T T C T T G A G A T C C T T T T
 T T T C T G C G C G T A A T C T G C T G C T T G C A A A C A A A A A A C C A C
 C G C T A C C A G C G G T G G T T T G T T T G C C G G A T C A A G A G C T A C C
 A A C T C T T T T T C C G A A G G T A A C T G G C T T C A G C A G A G C G C A G 30
 A T A C C A A A T A C T G T C C T T C T A G T G T A G C C G T A G T T A G G C C
 A C C A C T T C A A G A A C T C T G T A G C A C C G C C T A C A T A C C T C G C
 T C T G C T A A T C C T G T T A C C A G T G G C T G C T G C C A G T G G C G A T
 A A G T C G T G T C T T A C C G G G T T G G A C T C A A G A C G A T A G T T A C
 C G G A T A A G G C G C A G C G G T C G G G C T G A A C G G G G G G T T C G T G
 C A C A C A G C C C A G C T T G G A G C G A A C G A C C T A C A C C G A A C T G
 A G A T A C C T A C A G C G T G A G C T A T G A G A A A G C G C C A C G C T T C
 C C G A A G G G A G A A A G G C G G A C A G G T A T C C G G T A A G C G G C A G
 G G T C G G A A C A G G A G A G C G C A C G A G G G A G C T T C C A G G G G G A
 A A C G C C T G G T A T C T T T A T A G T C C T G T C G G G T T T C G C C A C C 40
 T C T G A C T T G A G C G T C G A T T T T T G T G A T G C T C G T C A G G G G G
 G C G G A G C C T A T G G A A A A A C G C C A G C A A C G C G G C C T T T T T A
 C G G T T C C T G G G C T T T T G C T G G C C T T T T G C T C A C A T G T T C T
 T G A C T C T T

【0096】

いくつかの実施形態では、ベクターは、以下の遺伝子エレメントを1つ以上含む。

【0097】

図13Bに示されるベクターの遺伝子エレメント。

Misc. : 配列番号101

C G C G A T G T A C G G G C C A G A T A T A C G C G T T

【0098】

CMVエンハンサー：配列番号102

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAAATAGTAATCAATTAC
CGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCCATATATGGAGTTCCCGCGT
TACATAAACTTACGGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCC
AACGACCCCCCGCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTTC
CCATAGTAACGCCCAATAGGGACTTTTCCATTGACGTCAATG
GGTGGACTATTTACGGGTAAACTTGCCCACTTGGCAGTACAT
CAAGTGTATCATATGCCCAAGTACGCCCCCCCTATTGACGTCA
ATGACGGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTTATGCCCAAGTACAT
GACCTTATGGGACTTTTCCTACTTTGGCAGTACATCTACGTA
TTAGTCAATCGCTATTACCATG

10

【0099】

CMVプロモーター：配列番号103

GTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGAATAG
CGGTTTTGACTCACGGGGGATTTTCCAAGTCTCCACCCCCATTG
ACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTTGGCACCAAAATCAACGGGA
CTTTCCAATAATGTCGTAAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAA
ATGGGCGGCTAGGCGGTGTACGGGTGGGAGGGTCTATATAAGCA
GAGCT

20

【0100】

Misc.：配列番号104

GGTTTTAGTGAACCGTTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGGACT
CAGATCTCGAGCTCAAGCTTTCGAATTCTGCAAGTACGACGGT
ACCGCGGGGCCCGGGATCCACCGGTCGCCACG

【0101】

アルブミンシグナルペプチド（コドン最適化）：配列番号105

ATGAAAGTGGGTGACCTTTCATCAGCCTGCTGTTTCCCTGTTT
TCTTCCGCGCTACAGC

【0102】

アダリムマブ重鎖（可変領域）：配列番号106

GAAGTGCAGCTGGTTGAAAGCGGAGGGCGGACTGGTCCAG
CCAGGCAGAAAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCCGCCTCTGGCT
TCACCTTTTGACGACTACGCCATGCACTGGGTGCGGGCAGGC
CCCTGGCAAGGGGACTCGAGTGGGTGAGCGCCATCACCTGG
AATAGCGGGCCACATCGACTACGCAGATAGCGTTTGAAGGCA
GATTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAATTCTCTGTGA
CCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGGCCGAGGATACCGCTGTG
TACTACTGCGCCAAAGTGTCTTACCTGAGCACCGGCCAGCT
CCCTGGACTACTGGGGGCCAGGGGCACCCTGGTGACAGTGAG
CTCT

40

【0103】

ヒトIgG1重鎖（定常領域）：配列番号107

GCTAGCACAAAAGGACCTAGCGTGTTTTCCCTTGGCCCCCT
AGCAGCAAAAAGCACCCAGCGGCGGAACCGCCGCTCTGGGGTT
GTCTGGTGGAAGGACTATTTTCCCTGAACCTGTGACCGTGTCT
CTGGAACTCTGGCGGCCCTGACTAGCGGCGGTGCATACCTTCT
CCTGCCGTGCTGCAAAAGCTCTGGCCCTGTATAGCCTTTCTT
CTGTGGTGACCGGTGCCTAGCAGCTCTCTTGGGGCACACAGAC
ATACATCTGCAATGTGAACCAACAAGCCCTCCAACACCAAG

50

GTGGACAAAAAGGTGGAACCCCAAGAGCTGCGACAAAGACCC
ACACCTGTCTCTCCGTGCCCCGCTCCTGAGCTGCTGGGGCGG
CCCTTCTGTGTTCCTGTTCCTCCCTCCCAAACTTAAGACACA
CTGATGATCAGCCGGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGGTGG
TGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGGTGGAGGTCCACAACGCCAAGACCAAA
CCTAGAGAGGAACAATACAACAGCACATATAGAGTGGTGT
CTGTGCTGACAGTGTCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAA
GGAATACAAGTGCAGGTGTCCAACAAGGCCCTCCCTGCT
CCAATCGAGAAAGACCATTAGCAAGGCCAAGGGCCAACCTA
GAGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCCACCAAGTAGAGATGA
GCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTAACATGCTTGGTGAAG
GGCTTTTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAATGGGAGAGCA
ACGGCCAGCCTGAGAAACAACCTACAAGACAACCTCCTGT
TCTGGATTCTGATGGCAGCTTCTTCTCTGTACAGCAAGCTG
ACAGTGGATAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGGCAACGTGTTCA
GCTGCTCCGTTATGCACGAGGCCCTGCATAATCACTACAC
CCAGAAGAGCCTGTCTCTGAGCCCTGGCAAG

【0104】

アダリムマブ重鎖完全：配列番号134

GAAGTGCAGCTGGTTGAAGAGCGGAGGGCGGACTGGTCCAG
CCAGGCAGAAAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCCTCTGGCT
TCACCTTTGACGACTACGCCATGCACTGGGTGCGGGCAGGC
CCCTGGCAAGGGGACTCGAGTGGGTGAGCGCCATCACCTGG
AATAGCGGCCACATCGACTACGCAGATAGCGTTGAAGGCA
GATTCAACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAATTCTCTGT
CCTGCAAGATGAACAGCCTGCGGGGCCGAGGATACCGCTGT
TACTACTGCGCCAAGGTGTCTCTGAGCACCGCCAGCT
CCCTGGACTACTGGGGGCCAGGGGCAACCCTGGTGAAGTGA
CTCTGCTAGCACAAAAGGACCTAGCGTGTTCCTCCCTGGCC
CCTAGCAGCAAAAAGCACCCAGCGGGCGGAACCGCCGCTCTGG
GTTGTCTGGTGAAGGACTATTTCTCCCTGAACCTGTGACCGT
GTCCTGGAACCTCTGGCGGCCCTGACTAGCGGGCGTGCATACC
TTCCCTGCGGTGTGTGCAAAAGCTCTGGCCTGTATAGCCTTT
CTTCTGTGGTGAACCGTGCCTAGCAGCTCTCTGGGGCACACA
GACATACATCTGCAATGTGAACCAACAAGCCCTCCAACACC
AAGGTGGACAAAAAGGTGGAACCCCAAGAGCTGCGACAAGA
CCCAACACCTGTCTCTCCGTGCCCCGCTCCTGAGCTGCTGGG
CGGCCCTTCTGTGTTCCTGTTCCTCCCTCCCAAACTTAAGAC
ACACTGATGATCAGCCGGACCCCTGAGGTGACCTGCGTGG
TGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAA
CTGGTACGTGGACGGCGGTGGAGGTCCACAACGCCAAGACC
AAACCTAGAGAGGAACAATACAACAGCACATATAGAGTGG
TGTCTGTGCTGACAGTGTCTCCACCAGGACTGGCTGAACGG
AAAGGAATACAAGTGCAGGTGTCCAACAAGGCCCTCCCT
GCTCCAATCGAGAAAGACCATTAGCAAGGCCAAGGGCCAAC
CTAGAGAGCCCCAGGTCTACACCCTGCCACCAAGTAGAGA
TGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTAACATGCTTGGTG
AAGGGCTTTTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAATGGGAGA
GCAACGGCCAGCCTGAGAAACAACCTACAAGACAACACCTCC

10

20

30

40

50

T G T T C T G G A T T C T G A T G G C A G C T T C T T C C T G T A C A G C A A G
C T G A C A G T G G A T A A G A G C C G G T G G C A G C A G G G C A A C G T G T
T C A G C T G C T C C G T T A T G C A C G A G G C C C T G C A T A A T C A C T A
C A C C C A G A A G A G C C T G T C T C T G A G C C C T G G C A A G

【0105】

フューリン切断部位：配列番号：108

C A A G C G A A A A C G G C G C

【0106】

G S G リンカー：配列番号109

G G A A G C G G A

10

【0107】

P2A自己切断ペプチド：配列番号110

G C T A C T A A C T T C A G C C T G C T G A A G C A G G C T G G A G A T G T G
G A G G A G A A C C C T G G A C C T

【0108】

アダリムマブ軽鎖（可変領域）：配列番号111

G A T A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C T A G C C T G A G C G C C
A G C G T G G G A G A T A G A G T G A C C A T C A C C T G T A G A G C C T C T C
A A G G C A T C C G G A A C T A C C T G G C C T G G T A T C A G C A G A A A C C
T G G C A A G G C T C C T A A G C T G C T G A T C T A C G C C G C T T C C A C C
C T G C A G A G C G G C G T T C C T T C T A G A T T C A G C G G C A G C G G C T
C C G G A A C A G A C T T C A C C C T G A C A A T T A G C T C C C T G C A A C C
T G A A G A T G T G G C T A C A T A C T A C T G C C A G A G A T A C A A T C G G
G C C C C T T A C A C C T T T G G A C A G G G C A C C A A G G T G G A A A T C A
A G

20

【0109】

ヒトIg kappa定常（軽鎖の定常領域）：配列番号112

C G G A C C G T G G C C G C C C C A T C T G T G T T C A T C T T C C C C C C C
A G C G A C G A G C A G C T G A A A A G C G G C A C A G C C A G C G T G G T G T
G C C T G C T G A A C A A C T T C T A C C C C A G G G A A G C C A A G G T G C A
G T G G A A G G T G G A C A A T G C C C T G C A G A G C G G C A A C A G C C A G
G A G A G C G T G A C C G A G C A G G A C A G C A A G G A C A G C A C C T A C A
G C C T G A G C A G C A C C C T C A C A C T G T C T A A A G C C G A C T A C G A
G A A G C A C A A G G T C T A C G C C T G C G A G G T G A C C C A C C A G G G C
C T G T C C T C C C C T G T G A C A A A G A G C T T T A A C A G A G G C G A G T
G C T A A

30

【0110】

アダリムマブ軽鎖完全：配列番号135

G A T A T C C A G A T G A C C C A G T C T C C A T C T A G C C T G A G C G C C
A G C G T G G G A G A T A G A G T G A C C A T C A C C T G T A G A G C C T C T C
A A G G C A T C C G G A A C T A C C T G G C C T G G T A T C A G C A G A A A C C
T G G C A A G G C T C C T A A G C T G C T G A T C T A C G C C G C T T C C A C C
C T G C A G A G C G G C G T T C C T T C T A G A T T C A G C G G C A G C G G C T
C C G G A A C A G A C T T C A C C C T G A C A A T T A G C T C C C T G C A A C C
T G A A G A T G T G G C T A C A T A C T A C T G C C A G A G A T A C A A T C G G
G C C C C T T A C A C C T T T G G A C A G G G C A C C A A G G T G G A A A T C A
A G C G G A C C G T G G C C G C C C C A T C T G T G T T C A T C T T C C C C C C
C A G C G A C G A G C A G C T G A A A A G C G G C A C A G C C A G C G T G G T G
T G C C T G C T G A A C A A C T T C T A C C C C A G G G A A G C C A A G G T G C
A G T G G A A G G T G G A C A A T G C C C T G C A G A G C G G C A A C A G C C A

40

50

GGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
AGCCTGAGCAGCACCCCTCACACTGTCTAAAGCCGACTACG
AGAAGCACAAAGGTCTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGG
CCTGTCCTCCCCCTGTGACAAAGAGCTTTAACAGAGGCGAG
TGCTAA

【0111】

Misc. : 配列番号113

CCCCCCCCCTA

【0112】

IRES : 配列番号114

ACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTTGGAATAAGGCCCGGTGTG
CGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATAATTGCCGCTCTTT
TGGCAATGTGAGGGGCCCGGAACCTGGCCCTGTCTTCTTG
ACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCCCTCTCGCCAAAGGAA
TGCAAGGTCTGTGTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCTCTCT
GGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCCTT
TGCAGGCGAGCGGAACCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCCTCT
GCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGC
GGCACAACCCCCAGTGCCACGTGTGTGAGTTGGATAGTTGTG
GAAAGAGTCAAATGGCTCTCTCTCAAGCGTATTCAACAAGG
GGCTGAAGGATGCCCAGAAAGGTACCCCATTTGTATGGGATC
TGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAG
TCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCCGAACCAACGGGG
ACGTGGTTTTTCTTTTGAAAAACACGATGATAAT

10

20

【0113】

エンハンサーペプチド : 配列番号115

ATGGCCACAACCATGGAACAAGAGACTTTGCGCGCACTCT
CTCACTTTTGTAGGAATGCCCAAATGCTCTGCTCTACAAT
ACCGTAATGGATTTTACCTGCTAAAGTATGATGAAGGAATG
GTACCCAGAGGAGTTATTGACTGATGGAGAGGATGATGTC
TTTGATCCCCGAATTAGACATGGAAGTCTGTTTTTCGAGTTAC
AGTAA

30

【0114】

Misc. : 配列番号116

ATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTTACTT
GCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAAC
ATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTT

【0115】

SV40ポリ(A)シグナル : 配列番号117

AACTTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGC
AATAGCATCACAAATTTTCACAAATAAAGCATTTTTTTTTCAC
TGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATC
TTA

40

【0116】

リンカー : 配列番号118

AGGCGTCTTCTACTGGGCGGTTTTTATGGACAGCAAGCGA
ACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGG
AAGCCCTGCAAAGTAACCTGGATGGCTTTTCTTGCCGCCAA
GGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGAC
AGGATGAGGATCGTTTTCGC

50

【0117】

ネオマイシン／カナマイシン耐性遺伝子：配列番号119

```
ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCC
GCTTGGGTGGAGAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGGCACAAAC
AGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCTC
AGCGCAGGGGCGCCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTG
TCCGGTGCCCTGAATGAACCTGCAAGACGAGGCGAGCGCGGC
TATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTTCCTTGCGCAGCTGTG
GCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGGAAGGGGACTGGGCTGCTA
TTGGGGCGAAGTGC CGGGGCGAGGATCTCTCTGTCACTCACCC
TTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGGCTGATGCAAT
GCGGCGGGCTGCATACGCTTGATCCGGGCTACCTGCCCATTC
GACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTC
GGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGGA
AGAGCATCAGGGGGCTCGCGGCCAGCCGAACCTGTTTCGCCAGG
CTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGTGA
CCCATGGCGATGCCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGA AAA
TGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGGCTGGGT
GTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTTGGCTACCCGTG
ATATTGCTGAAGAGCTTGCGGGCGAATGGGCTGACCGCTT
CCTCGTGCTTTACGGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGC
ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGA
```

10

20

【0118】

Misc.：配列番号120

```
ATTATTAAACGCTTACAATTTCCTGATGCGGTATTTTCTC
CTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACAGGTGG
CACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTA
TTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGAC
AATAAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACGTGCTAAA
ACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTT
TTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTT
CGTTTCACTGAGCGTCAAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG
ATCTTC
```

30

【0119】

複製起点：配列番号121

```
TTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTTGCA
AACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTTGCCG
GATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCGGAAGGTAACCTGGCT
TCAGCAGAGCGCAGATACCAAAATCTGTCTTCTAGTGTA
GCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCG
CCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTG
CTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACC GG GTTGGACTC
AAGACGATAGTTACC GG GATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGA
ACGGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGA
CCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA
AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTAT
CCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAAACAGGAGAGCGCACGAGGG
AGCTTCCAGGGGGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCTCTGT
CGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTTGTGA
TGCTCGTCAAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAA
```

40

50

【0120】

Misc. : 配列番号122

AACGCCAGCAACGCGGCGCTTTTACGGTTCTCTGGGCTTT
TGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTGACTCTT

【0121】

図13Bに示されるベクターから発現されたタンパク質のアミノ酸配列。

いくつかの実施形態では、アダリムマブは、単一の前駆体ポリペプチド（すなわち、単一のオープンリーディングフレーム）として発現され、これは、同時翻訳的に成熟抗体重鎖及び軽鎖にプロセッシングされる。タンパク質の成分は以下の通りである。

【0122】

アルブミンシグナルペプチド : 配列番号123

MKWVTFISLLFLFSSAYS

【0123】

アダリムマブ重鎖（可変領域） : 配列番号124

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMHWVRQ
APGKGLEWVSAITWNSGHHIDYADSVETRFTISRDNANKNSL
YLQMNSLR AEDTAVYYCAKVS YLSTASSSLDYWGQGTLVTV
SS

【0124】

ヒトIgG1重鎖（定常） : 配列番号125

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSDDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHY
TQKSLSLSPGK

【0125】

フューリン切断部位（^は切断部位を示す） : 配列番号126

RKRR^

【0126】

リンカー : 配列番号127

GSG

【0127】

P2A自己切断ペプチド（^は切断部位を示す） : 配列番号128

ATNFSLLKQAGDVEENPG^P

【0128】

アダリムマブ軽鎖（可変領域） : 配列番号129

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLAWYQQK
PGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGGTKVEIK

【0129】

ヒトIgG1定常（*は前駆体ポリペプチドの終止コドンを示す） : 配列番号130

RTVAAPS FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

【0130】

エンハンサーペプチドは、以下のように、内部リボソーム侵入部位から発現される。

10

20

30

40

50

【0131】

エンハンサーペプチド（*は停止コドンを示す）配列番号131

MATTMEQETCAHSLTFEECPKCSALQYRNGFYLLKYDEE
WYPEELLTDGEDDVFDPELDMEVVFE LQ

【0132】

アダリムマブ完全重鎖：配列番号132

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFDDYAMHWVRQ
APGKGLEWVSAITWNSGHIADYADSVEGRFTISRDN AKNSL
YLQMNSLR AEDTAVYYCAKVS YLSTASSSLDYWGQG TLT V
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

10

【0133】

アダリムマブ完全軽鎖：配列番号133

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQGIRNYLAWYQQK
PGKAPKLLIYAAS T LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDVATYYCQRYNRAPYTFGGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDS T YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVT KSFNRGEC*

20

【0134】

いくつかの実施形態では、ベクターは、アダリムマブの相補性決定領域（CDR）のい
ずれか、例えば、軽鎖CDRの配列番号137、139、141を含む：

【0135】

配列番号137

QRYNRAPYX

【0136】

配列番号139

AASTLQS

【0137】

配列番号141

RASQGIRNYLA

【0138】

いくつかの実施形態では、ベクターは、アダリムマブの相補性決定領域（CDR）のい
ずれか、例えば、重鎖CDRの配列番号138、140、142を含む：

【0139】

配列番号138

VSYLSTASSLD

【0140】

配列番号140

AITWNSGHIADYADSVEG

【0141】

配列番号142

DYAMH

30

40

50

【 0 1 4 2 】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号 1 3 6 に対して少なくとも約 7 0 % (例えば、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 %、約 9 8 %、約 9 9 %、又は約 1 0 0 %) の同一性を有する核酸配列を含む。

【 0 1 4 3 】

図 1 3 A に示されるベクターの核酸配列。

配列番号 1 3 6

```
C G C G A T G T A C G G G C C A G A T A T A C G C G T T G A C A T T G A T T A
T T G A C T A G T T A T T A A T A G T A A T C A A T T A C G G G G T C A T T A G
T T C A T A G C C C A T A T A T G G A G T T C C G C G T T A C A T A A C T T A C
G G T A A A T G G C C C G C C T G G C T G A C C G C C C A A C G A C C C C C G C
C C A T T G A C G T C A A T A A T G A C G T A T G T T C C C A T A G T A A C G C
C A A T A G G G A C T T T C C A T T G A C G T C A A T G G G T G G A C T A T T T
A C G G T A A A C T G C C C A C T T G G C A G T A C A T C A A G T G T A T C A T
A T G C C A A G T A C G C C C C C T A T T G A C G T C A A T G A C G G T A A A T
G G C C C G C C T G G C A T T A T G C C C A G T A C A T G A C C T T A T G G G A
C T T T C C T A C T T G G C A G T A C A T C T A C G T A T T A G T C A T C G C T
A T T A C C A T G G T G A T G C G G T T T T G G C A G T A C A T C A A T G G G C
G T G G A T A G C G G T T T G A C T C A C G G G G A T T T C C A A G T C T C C A
C C C C A T T G A C G T C A A T G G G A G T T T G T T T T G G C A C C A A A A T
C A A C G G G A C T T T C C A A A A T G T C G T A A C A A C T C C G C C C C A T
T G A C G C A A A T G G G C G G T A G G C G T G T A C G G T G G G A G G T C T A
T A T A A G C A G A G C T G G T T T A G T G A A C C G T C A G A T C C G C T A G
C G C T A C C G G A C T C A G A T C T C G A G C T C A A G C T T C G A A T T C T
G C A G T C G A C G G T A C C G C G G G C C C G G G A T C C A C C G G T C G C C
A C G A T G A A G T G G G T G A C C T T C A T C A G C C T G C T G T T C C T G T
T T T C T T C C G C C T A C A G C G A A G T G C A G C T G G T T G A A A G C G G
A G G C G G A C T G G T C C A G C C A G G C A G A A G C C T G A G A C T G T C T
T G T G C C G C C T C T G G C T T C A C C T T T G A C G A C T A C G C C A T G C
A C T G G G T G C G G C A G G C C C C T G G C A A G G G A C T C G A G T G G G T
C A G C G C C A T C A C C T G G A A T A G C G G C C A C A T C G A C T A C G C A
G A T A G C G T T G A A G G C A G A T T C A C C A T C T C C A G G G A C A A C G
C C A A G A A T T C T C T G T A C C T G C A G A T G A A C A G C C T G C G G G C
C G A G G A T A C C G C T G T G T A C T A C T G C G C C A A A G T G T C C T A C
C T G A G C A C C G C C A G C T C C C T G G A C T A C T G G G G C C A G G G C A
C C C T G G T G A C A G T G A G C T C T G C T A G C A C A A A A G G A C C T A G
C G T G T T T C C C C T G G C C C C T A G C A G C A A A A G C A C C A G C G G C
G G A A C C G C C G C T C T G G G T T G T C T G G T G A A G G A C T A T T T C C
C T G A A C C T G T G A C C G T G T C C T G G A A C T C T G G C G C C C T G A C
T A G C G G C G T G C A T A C C T T C C C T G C C G T G C T G C A A A G C T C T
G G C C T G T A T A G C C T T T C T T C T G T G G T G A C C G T G C C T A G C A
G C T C T C T G G G C A C A C A G A C A T A C A T C T G C A A T G T G A A C C A
C A A G C C C T C C A A C A C C A A G G T G G A C A A A A A G G T G G A A C C C
A A G A G C T G C G A C A A G A C C C A C A C C T G T C C T C C G T G C C C C G
C T C C T G A G C T G C T G G G C G G C C C T T C T G T G T T C C T G T T C C C
C C C C A A A C C T A A A G A C A C A C T G A T G A T C A G C C G G A C C C C T
G A G G T G A C C T G C G T G G T G G T G G A C G T G A G C C A C G A G G A C C
C C G A G G T G A A G T T C A A C T G G T A C G T G G A C G G C G T G G A G G T
C C A C A A C G C C A A G A C C A A A C C T A G A G A G G A A C A A T A C A A C
A G C A C A T A T A G A G T G G T G T C T G T G C T G A C A G T G C T C C A C C
```

A G G A C T G G C T G A A C G G A A A G G A A T A C A A G T G C A A G G T G T C
C A A C A A G G C C C T C C C T G C T C C A A T C G A G A A G A C C A T T A G C
A A G G C C A A G G G C C A A C C T A G A G A G C C C C A G G T C T A C A C C C
T G C C A C C A A G T A G A G A T G A G C T G A C C A A G A A C C A G G T G A G
C C T A A C A T G C C T G G T G A A G G G C T T T T A C C C C A G C G A C A T C
G C C G T G G A A T G G G A G A G C A A C G G C C A G C C T G A G A A C A A C T
A C A A G A C A A C A C C T C C T G T T C T G G A T T C T G A T G G C A G C T T
C T T C C T G T A C A G C A A G C T G A C A G T G G A T A A G A G C C G G T G G
C A G C A G G G C A A C G T G T T C A G C T G C T C C G T T A T G C A C G A G G
C C C T G C A T A A T C A C T A C A C C C A G A A G A G C C T G T C T C T G A G
C C C T G G C A A G C A A G C G A A A A C G G C G C G G A A G C G G A G C T A C
T A A C T T C A G C C T G C T G A A G C A G G C T G G A G A T G T G G A G G A G
A A C C C T G G A C C T A T G A A G T G G G T G A C C T T C A T C A G C C T G C
T G T T C C T G T T T T C T T C C G C C T A C A G C G A T A T C C A G A T G A C
C C A G T C T C C A T C T A G C C T G A G C G C C A G C G T G G G A G A T A G A
G T G A C C A T C A C C T G T A G A G C C T C T C A A G G C A T C C G G A A C T
A C C T G G C C T G G T A T C A G C A G A A A C C T G G C A A G G C T C C T A A
G C T G C T G A T C T A C G C C G C T T C C A C C C T G C A G A G C G G C G T T
C C T T C T A G A T T C A G C G G C A G C G G C T C C G G A A C A G A C T T C A
C C C T G A C A A T T A G C T C C C T G C A A C C T G A A G A T G T G G C T A C
A T A C T A C T G C C A G A G A T A C A A T C G G G C C C C T T A C A C C T T T
G G A C A G G G C A C C A A G G T G G A A A T C A A G C G G A C C G T G G C C G
C C C C A T C T G T G T T C A T C T T C C C C C C A G C G A C G A G C A G C T
G A A A A G C G G C A C A G C C A G C G T G G T G T G C C T G C T G A A C A A C
T T C T A C C C C A G G G A A G C C A A G G T G C A G T G G A A G G T G G A C A
A T G C C C T G C A G A G C G G C A A C A G C C A G G A G A G C G T G A C C G A
G C A G G A C A G C A A G G A C A G C A C C T A C A G C C T G A G C A G C A C C
C T C A C A C T G T C T A A A G C C G A C T A C G A G A A G C A C A A G G T C T
A C G C C T G C G A G G T G A C C C A C C A G G G C C T G T C C T C C C C T G T
G A C A A A G A G C T T T A A C A G A G G C G A G T G C T A A A T C A T A A T C
A G C C A T A C C A C A T T T T G T A G A G G T T T T A C T T G C T T T A A A A A
A C C T C C C A C A C C T C C C C C T G A A C C T G A A A C A T A A A A T G A A
T G C A A T T G T T G T T G T T A A C T T G T T T A T T G C A G C T T A T A A T
G G T T A C A A A T A A A G C A A T A G C A T C A C A A A T T T C A C A A A T A
A A G C A T T T T T T T C A C T G C A T T C T A G T T G T G G T T T G T C C A A
A C T C A T C A A T G T A T C T T A A G G C G T C T T C T A C T G G G C G G T T
T T A T G G A C A G C A A G C G A A C C G G A A T T G C C A G C T G G G G C G C
C C T C T G G T A A G G T T G G G A A G C C C T G C A A A G T A A A C T G G A T
G G C T T T C T T G C C G C C A A G G A T C T G A T G G C G C A G G G G A T C A
A G C T C T G A T C A A G A G A C A G G A T G A G G A T C G T T T C G C A T G A
T T G A A C A A G A T G G A T T G C A C G C A G G T T C T C C G G C C G C T T G
G G T G G A G A G G C T A T T C G G C T A T G A C T G G G C A C A A C A G A C A
A T C G G C T G C T C T G A T G C C G C C G T G T T C C G G C T G T C A G C G C
A G G G G C G C C C G G T T C T T T T T G T C A A G A C C G A C C T G T C C G G
T G C C C T G A A T G A A C T G C A A G A C G A G G C A G C G C G G C T A T C G
T G G C T G G C C A C G A C G G G C G T T C C T T G C G C A G C T G T G C T C G
A C G T T G T C A C T G A A G C G G G A A G G G A C T G G C T G C T A T T G G G
C G A A G T G C C G G G G C A G G A T C T C C T G T C A T C T C A C C T T G C T
C C T G C C G A G A A A G T A T C C A T C A T G G C T G A T G C A A T G C G G C
G G C T G C A T A C G C T T G A T C C G G C T A C C T G C C C A T T C G A C C A

10

20

30

40

50

CC AAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTA CT CGGATG
GAAGCCGGTCTTGTCTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGC
ATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAC TGTTCGCCAGGCTCAA
GGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGTGACCCCAT
GGCGATG CCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAAATGGCC
GCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGC
GGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATT
GCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCTCG
TGCTTTACGGTATCGCCCGCTCCCGATTCTGCGAGCGCATCGC
CTTCTATCGCCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTATTAAC
GCTTACAATTTCTCTGATGCGGTATTTTCTCTCTTACGCGATC
TGTGCGGTATTTTACACCCGCATACAGGTGGCACTTTTTCGG
GGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGT TTTATTTTTCTAAA
TACATTTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTG
ATAAATGCTTCAATAATAGCACGCTGCTAAAACCTTCATTTT
TAATTTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATATC
TCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCTGTTCCACTG
AGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGA
GATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGC AAAACA
AAAAAACCAACCGCTACCAGCGGTGGTTTGT TTTGCCGGATCA
AGAGCTACCAACTCTTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTTCAGC
AGAGCGCAGATACCAAAATCTGTCTTCTAGTG TAGCCGT
AGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTAC
ATACCTCGCTCTGTCTAATCCTGT TACCAGTGGCTGCTGCC
AGTGCGGATAAAGTCGTGTCTTACC GGTTGGACTCAAGAC
GATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGT CGGGCTGAACGGG
GGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTAC
ACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGCTATGAGAAAGCG
CCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG GACAGGTATCCGGT
AAGCGGCAGGGTCTGGAACAGGAGAGCGGCACGAGGGAGCTT
CCAGGGGGAAACGCTTGGTATCTTTATAGTCTCTGTGGGT
TTCGCCACCTCTGACTTGAGCGT CGATTTTTGTGATGCTC
GTCAGGGGGGCGGAGCCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCG
GCCTTTTTTACGGTTCTCTGGGCTTTTGTCTGGCCTTTTGTCTC
ACATGTTCTTGACTCTT

【0144】

トランスフェクション、形質導入、形質転換。

「トランスフェクション」、「形質導入」及び「形質転換」という用語は、核酸を細胞（例えば、真核細胞）に導入するプロセスを指す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリヌクレオチド又はベクターは、当技術分野で公知の任意の方法を使用して細胞（例えば、真核細胞）に導入することができる。ポリヌクレオチド又はベクターは、当技術分野で周知であり特定の宿主細胞に部分的に基づいて選択される様々な方法によって細胞に導入されてもよい。例えば、ポリヌクレオチドは、化学的、物理的、生物学的、又はウイルス的手段を用いて細胞に導入することができる。ポリヌクレオチド又はベクターを細胞に導入する方法としては、リン酸カルシウム、デンドリマー、カチオン性ポリマー、リポフェクション、フージェン（fugene）、細胞透過性ペプチド、ペプチドデンドリマー、エレクトロポレーション、細胞圧搾、ソノポレーション、光学的トランスフェクション、プロトプラスト融合、インペールフェクション、流体力学的送達、遺伝子銃、マグネトフェクション、微粒子銃、ヌクレオフェクション、及びウイルス形質導入の使用が挙げられるが、これらに限定されない。

【0145】

標的タンパク質及びエンハンサータンパク質をコードする標的化DNA及び／又は核酸を含むベクターは、種々の方法（例えば、注射、形質転換、トランスフェクション、直接取り込み、発射体衝撃、リポソーム）によって細胞に導入することができる。標的タンパク質及びエンハンサータンパク質は、発現ベクターを用いて細胞内で安定に又は一過性に発現させることができる。真核細胞における発現技術は、当業者に周知である。（Current Protocols in Human Genetics：第12章「Vector Therapy」及び第13章「Delivery Systems for Gene Therapy」を参照のこと）。

【0146】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド又はベクターは、必要に応じてレンチウイルストランスフェクション、哺乳動物細胞へのバキュロウイルス遺伝子移入（BacMam）、レトロウイルストランスフェクション、CRISPR/Cas9、及び／又はトランスポゾンの使用を通じて、安定な細胞株を産生するための標準的な方法を使用して、ゲノムへの挿入によって宿主細胞に導入することができる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド又はベクターは、一過性トランスフェクションのために宿主細胞に導入することができる。いくつかの実施形態では、一過性トランスフェクションは、ウイルスベクター、ヘルパー脂質、例えば、PEI、リポフェクタミン、及び／又はフェクタミン293の使用を介して行われてもよい。遺伝子エレメントは、例えばベクター上のDNAとして、又は例えばPCRからのRNAとしてコードすることができる。遺伝子エレメントは、別に分離することができ、又は同じベクター上で組み合わせることができる。

【0147】

ポリヌクレオチド又はベクターは、当該分野で周知である種々の方法によって細胞に導入されてもよい。例えば、ポリヌクレオチドは、化学的、物理的、生物学的、又はウイルス的手段を用いて細胞に導入することができる。

【0148】

標的タンパク質のインビボ送達

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるポリヌクレオチド又はベクターは、当該分野で公知の任意の方法を使用して対象に導入することができる。ポリヌクレオチド又はベクターは、当該分野で周知である種々の方法によって対象に導入されてもよい。標的タンパク質及びエンハンサータンパク質をコードする標的化DNA及び／又は核酸を含むベクターは、種々の方法（例えば、注射、ウイルストランスフェクション、直接取り込み、発射体衝撃）によって対象に投与することができる。

【0149】

注射による投与は、例えば、筋肉内、静脈内、心臓内、腹腔内、静脈内、動脈内、皮内、皮下、頭蓋内、腰部、硝子体内、鼻腔内、又は他の注射を含んでもよい。ベクター又はポリヌクレオチドは、化学的、物理的、生物学的、又はウイルス的手段を用いて対象の細胞に導入することができる。ポリヌクレオチド又はベクターを対象に投与する方法及び／又はポリヌクレオチド又はベクターを対象の細胞に導入する方法としては、カチオン性又は他のポリマー、脂質、脂質製剤、細胞透過性ペプチド、ナノ粒子ベースの送達ビヒクル、ナノゲル、遺伝子銃、ジェット遺伝子デバイス、微粒子銃及びウイルス形質導入を使用するか又は使用せずに、エレクトロポレーション／ソノポレーションを伴うか又は伴わない直接注射が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、投与は皮膚下への注射によるものである。本出願の他の箇所にも記載されるように、いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるベクター又はポリヌクレオチドは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アルファウイルス、フラビウイルス、ラブドウイルス、麻疹ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ポックスウイルス、ピコルナウイルス、又は任意の他のウイルス送達系などの任意のウイルス遺伝子送達ベクターを使用して、対象の細胞に導入されてもよい。

【0150】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の標的タンパク質及びエンハンサータンパク質をコードするポリヌクレオチド又はベクターは、疾患の少なくとも1つの症候を処置、予防又は管理するために対象に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は、モノクローナル抗体（例えば、アダリムマブ）などの抗体である。いくつかの実施形態では、対象は、標的タンパク質（例えば、アダリムマブ）の発現によって処置、予防又は管理されることが知られているか、又は将来発見される任意の症状を有する対象である。例えば、アダリムマブをコードするポリヌクレオチド又はベクターの投与によって処置され得る症状の非限定的な例としては、関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬、汗腺腫瘍、ブドウ膜炎、及び若年性特発性関節炎が挙げられる。

10

【0151】

したがって、本開示は、対象における疾患を処置又は予防する方法であって、本明細書に開示される標的タンパク質及びエンハンサータンパク質をコードするベクター又はポリヌクレオチドのいずれか1つの治療有効量を対象に投与することを含む方法を提供する。「有効量」又は「治療有効量」という用語は、成果を達成するのに、例えば、有益な結果又は所望の結果をもたらすのに十分な薬剤の量を指す。治療有効量は、処置される対象及び疾患症状、対象の体重及び年齢、疾患症状の重症度、投与様式などのうちの1つ以上に依存して変化してもよく、これは、当業者によって容易に決定することができる。具体的な用量は、選択された特定の薬剤、従うべき投薬レジメン、それが他の化合物と組み合わせて投与されるかどうか、投与のタイミング、画像化される組織、及びそれが運ばれる物理的送達系のうちの1つ以上に依存して変化してもよい。

20

【0152】

エンハンサーの存在下で標的タンパク質を発現する開示された方法は、以下に記載されるように、いくつかの利点を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物又は方法を使用してエンハンサータンパク質の存在下で発現される標的タンパク質は、エンハンサータンパク質の非存在下で発現される標的タンパク質よりも機能的に活性である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物又は方法を使用してエンハンサータンパク質の存在下で発現される標的タンパク質は、エンハンサータンパク質の非存在下で発現される標的タンパク質よりも少なくとも約1.2倍（例えば、約1.5倍、約1.7倍、約2倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍、約5倍、約5.5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約20倍又は約50倍（その間に存在する全ての値及び部分範囲を含む））活性である。

30

【0153】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物又は方法を使用してエンハンサータンパク質の存在下で発現される標的タンパク質は、エンハンサータンパク質の非存在下で発現される標的タンパク質と比較して、より長い期間発現される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物又は方法を使用してエンハンサータンパク質の存在下で発現される標的タンパク質は、エンハンサータンパク質の非存在下で発現される標的タンパク質と比較して、少なくとも約1時間（例えば、約12時間、約1日、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約1週間、約2週間、約3週間、約1ヶ月、約2ヶ月、約6ヶ月、又は約1年）長く発現される。

40

【0154】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物又は方法を使用してエンハンサータンパク質の存在下で発現される標的タンパク質のより少ない割合が、エンハンサータンパク質の非存在下で発現される標的タンパク質と比較して、望ましくない特性（例えば、ミスフォールディング、活性の変化、不正確な翻訳後修飾、及び／又は毒性）を示す。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物又は方法を使用してエンハンサータンパク質の存在下で発現される標的タンパク質の約30%未満（例えば、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約2%未満、又は約1%未満（その間に存在する全ての値及び部分範囲を含む））が、望ましくない特性を

50

示す。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される組成物又は方法を使用してエンハンサータンパク質の存在下で発現される標的タンパク質のより高い割合が、エンハンサータンパク質の非存在下で発現される標的タンパク質と比較して、正しいフォールディングを示す。

【0155】

いくつかの実施形態では、対象に投与される標的タンパク質及びエンハンサータンパク質をコードするベクター又はポリヌクレオチドの治療有効量は、標的タンパク質のみをコードする対照ベクター又は対照ポリヌクレオチドの治療有効量よりも低い。理論に束縛されるものではないが、エンハンサータンパク質の存在下で発現された場合の標的タンパク質の改善された発現の質及び／若しくは量、並びに／又はより長い発現期間に起因して、標的タンパク質及びエンハンサータンパク質をコードするベクター又はポリヌクレオチドの（標的タンパク質のみをコードする対照ベクター又は対照ポリヌクレオチドと比較して）より低い用量が、同様の生物学的効果を誘発するのに十分であると考えられる。

10

【0156】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質及びエンハンサータンパク質をコードするベクター又はポリヌクレオチドを投与される対象は、標的タンパク質のみをコードするベクター又はポリヌクレオチドを投与される対照対象と比較して、抗標的タンパク質抗体の産生の減少を示す。理論に束縛されるものではないが、エンハンサーの非存在下で発現された不十分に折り畳まれた又は折り畳まれていない標的タンパク質の形成は、抗標的タンパク質抗体の生成を促進するとも考えられる。他方で、エンハンサータンパク質の存在下で発現される場合の標的タンパク質の改善された発現の質及び／又は量は、抗標的タンパク質抗体の生成を減少させる。

20

【0157】

細胞、細胞株、宿主細胞

本開示の別の態様は、1つ以上の標的タンパク質及び1つ以上のエンハンサータンパク質をコードするポリヌクレオチド及び／又はベクターを含む細胞に関する。ポリヌクレオチド、ベクター、標的タンパク質、及びエンハンサータンパク質は、本明細書に記載されるもののいずれかであってもよい。

【0158】

いくつかの実施形態では、細胞は、任意の真核細胞又は細胞株である。開示されるポリヌクレオチド、ベクター、系、及び方法は、任意の真核生物初代細胞及び細胞株において使用されてもよい。真核細胞株は、ヒト及び動物細胞株などの哺乳動物細胞株を含んでもよい。真核細胞株は、昆虫、植物、又は真菌細胞株を含んでもよい。このような細胞又はこのような細胞から生成される細胞株の非限定的な例としては、Bc HROC277、COS、CHO（例えば、CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV）、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NSO、5P2/0-Ag14、HeLa、HEK293（例えば、HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T）、及びperC6細胞、並びに昆虫細胞、例えばスポドプテラ・フルギペルダ（*Spodoptera fugiperda*）（Sf、例えば、Sf9）、又は真菌細胞、例えばサッカロミセス（*Saccharomyces*）、ピキア（*Pichia*）及びシゾサッカロミセス（*Schizosaccharomyces*）が挙げられる。

30

40

【0159】

いくつかの実施形態では、標的タンパク質（複数可）及びエンハンサータンパク質（複数可）を発現するための細胞又は細胞株は、ヒト細胞又は細胞株である。特定の態様では、ヒト細胞株の選択は、例えば標的タンパク質におけるグリコシル化、リン酸化、ジスルフィド結合などの翻訳後修飾（「PTM」）に有益である。いくつかの実施形態では、ヒト細胞又は細胞株は、ヒト標的タンパク質の発現のために使用される。

【0160】

いくつかの実施形態では、本開示は、標的タンパク質の発現のための真核細胞であって

50

、エンハンサータンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチドを含む真核細胞を提供する。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチドは、細胞のゲノムに一過性に形質導入され、及び／又は組み込まれない。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチドは安定に組み込まれる。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送（NCT）の阻害剤である。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー（L）タンパク質、ピコルナウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス3Cプロテアーゼ、コロナウイルスORF6タンパク質、エボラウイルスVP24タンパク質、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）カプシドタンパク質、単純ヘルペスウイルス（HSV）ICP27タンパク質、及びラブドウイルスマトリックス（M）タンパク質からなる群から選択される。外因性ポリヌクレオチドは、プロモーター（必要に応じて、天然プロモーター又は外因性プロモーター）に作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、内部リボソーム進入部位（IRES）に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、プロモーターは、誘導性プロモーターである。

10

20

30

40

50

【0161】

インビトロ及びエキスピボの方法

本開示は、真核細胞において標的タンパク質を発現させるための方法を提供する。本方法は、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチド（プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチド）を真核細胞に導入することを含んでもよい。この方法は、標的タンパク質の発現レベル、可溶性及び／又は活性を増強するためにエンハンサータンパク質の共発現を利用する。更に、この方法は、標的タンパク質の発現をより長い期間にわたって延長するために、エンハンサータンパク質の共発現を利用する。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送（NCT）の阻害剤である。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー（L）タンパク質、ピコルナウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス3Cプロテアーゼ、コロナウイルスORF6タンパク質、エボラウイルスVP24タンパク質、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）カプシドタンパク質、単純ヘルペスウイルス（HSV）ICP27タンパク質、及びラブドウイルスマトリックス（M）タンパク質からなる群から選択される。

【0162】

いくつかの態様では、本開示は、1つ以上の標的タンパク質及び1つ以上のエンハンサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む細胞の使用を介して標的タンパク質を産生する方法に関する。いくつかの実施形態では、本方法は、1つ以上のベクターを含む真核細胞において行われる。いくつかの実施形態では、本方法は、前述のセクションに記載されているポリヌクレオチド、ベクター、及び細胞を使用して実施される。いくつかの実施形態では、複数のベクター（又は1つのベクター）は、標的タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド及びエンハンサータンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドを有してもよい。いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチド及び第2のポリヌクレオチドは、1つ以上のプロモーターに作動可能に連結されている。

【0163】

いくつかの実施形態では、本方法は、プロモーターに作動可能に連結されたエンハンサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを真核細胞に導入することを含んでもよい。いくつかの実施形態では、本方法は、1つ以上のDNA分子による真核細胞のトランスフェクション、単一のウイルスベクターによる真核細胞の形質導入、及び／又は2つ以上のウイルスベクターによる真核細胞の形質導入を含んでもよい。

【0164】

プロモーターに作動可能に連結された標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを真核細胞に導入することを含む、標的タンパク質の組換え発現のための方法が更に提供される。いくつかの実施形態では、標的タンパク質発現の方法は、本開示のベクター系を真核細胞に導入することを含む。いくつかの実施形態では、標的タンパク質は膜タンパク質である。いくつかの実施形態では、膜タンパク質の細胞膜への局在化は、膜タンパク質が

エンハンサータンパク質なしで発現される場合に観察される局在化と比較して増加する。

【0165】

インビボ方法

本開示は、標的タンパク質をインビボで発現させるための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチド（プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチド）を対象の細胞に導入することを含む。この方法は、標的タンパク質の発現レベル、可溶性及び／又は活性を増強するためにエンハンサータンパク質の共発現を利用する。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送（NCT）の阻害剤である。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー（L）タンパク質、ピコルナウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス3Cプロテアーゼ、コロナウイルスORF6タンパク質、エボラウイルスVP24タンパク質、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）カプシドタンパク質、単純ヘルペスウイルス（HSV）ICP27タンパク質、及びラブドウイルスマトリックス（M）タンパク質からなる群から選択される。

10

【0166】

いくつかの実施形態では、本方法は、対象において免疫応答を誘発する。免疫応答は、本質的に免疫原性並びに免疫抑制性又は免疫調節性の両方であることができる。いくつかの実施形態では、本方法は、対象における疾患を処置し、疾患は、標的タンパク質によって引き起こされるか、標的タンパク質と相関するか、又は標的タンパク質に関連する。いくつかの実施形態では、本方法は、対象における疾患を処置し、対象における標的タンパク質の発現レベルは、疾患を有さない対照対象における標的タンパク質の発現レベルよりも低い。

20

【0167】

いくつかの実施形態では、本開示は、1つ以上の標的タンパク質及び1つ以上のエンハンサータンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用を介して標的タンパク質を産生する方法に関する。いくつかの実施形態では、本方法は、1つ以上のベクターを含むインビボで行われる。いくつかの実施形態では、本方法は、前述のセクションに記載されているポリヌクレオチド、ベクター、及び細胞を使用して実施される。いくつかの実施形態では、複数のベクター（又は1つのベクター）は、標的タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド及びエンハンサータンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドを有してもよい。いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチド及び第2のポリヌクレオチドは、1つ以上のプロモーターに作動可能に連結されている。

30

【0168】

いくつかの実施形態では、本方法は、プロモーターに作動可能に連結されたエンハンサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に導入することを含んでもよい。いくつかの実施形態では、本方法は、1つ以上のDNA分子、単一のウイルスベクター、及び／又は2つ以上のウイルスベクターの注射を含んでもよい。

【0169】

プロモーターに作動可能に連結された標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを対象に導入することを含む、標的タンパク質のインビボ発現のための方法が更に提供される。いくつかの実施形態では、標的タンパク質発現の方法は、本開示のベクター系を対象に導入することを含む。

40

【0170】

いくつかの実施形態は、標的タンパク質及びエンハンサータンパク質DNA構築物は、脂質ナノ粒子（LNP）を介して送達される。いくつかの実施形態では、LNPは、PEG化脂質、コレステロール、及び1つ以上のイオン化可能脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、約0.5%～約2%のPEG化脂質、約35%～約45%のコレステロール、及び約5%～約65%の1つ以上のイオン化可能脂質を含む。いくつかの実施形態では、LNPは、約1%のDMG-PEG（2000）対約40%のコレステロール対約10%のDOPC及び約50%のDLin-KC2-DMAの比で、DMG-PEG（

50

2000)、コレステロール、DOPC及びDLin-KC2-DMAを含む。

【0171】

下流適用

いくつかの実施形態では、本発明の組成物、系、及び方法の使用を通して産生される標的タンパク質は、治療薬、診断薬として、又は研究及び開発のために使用される。例示的な用途としては、ワクチン、酵素補充療法、ホルモン補充療法、抗体療法、抗ウイルス処置、抗菌処置、免疫調節薬、治療用癌ワクチン、免疫腫瘍学用途、二重特異性T細胞エンゲージャー、スクリーニングアッセイ、診断アッセイ、臨床検査キット、創薬、抗体発見などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0172】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物、系、及び方法の使用を通して産生される標的タンパク質、及びそのようなタンパク質を発現する細胞は、下流適用のために単離され、精製され、及び／又は使用される。例示的な用途としては、小分子スクリーニング、構造決定（例えば、X線結晶学、低温電子顕微鏡法など）、活性アッセイ、治療薬、酵素補充療法、スクリーニングアッセイ、診断アッセイ、臨床検査キット、薬物発見、抗体発見などが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本発明の組成物及び方法は、抗体スクリーニングアッセイのための抗体を産生するため、又は抗原を産生するために使用される。いくつかの実施形態では、標的タンパク質を発現する細胞は、例えば細胞相互作用、抗体結合、又は全細胞系における小分子の影響をスクリーニングするためのアッセイ系として使用することができる。

【0173】

いくつかの実施形態では、本開示は、抗体発見のための系及び方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、標的タンパク質に対する抗体を生成するための方法であって、本開示の系又は方法を使用して産生された細胞又は標的タンパク質で対象を免疫化することを含む方法を提供する。様々な実施形態では、免疫される対象は、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、ラマ、ラクダ、又はヒトである。対象から単離された細胞は、単離細胞として、又は必要に応じて単離細胞からハイブリドーマを生成した後に、更なるラウンドの選択に供することができる。遺伝子クローニング及び／又は配列決定を使用して、単離された細胞又はハイブリドーマから重鎖及び軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列（複数可）を単離することができる。遺伝子クローニング及び／又は配列決定は、単一細胞又は細胞集団に適用することができる。いくつかの実施形態では、本開示の組成物及び方法は、対象の免疫化、その後の対象からの血清の採取を介してポリクローナル抗体を生成するために使用される。

【0174】

本開示は、細胞選別による抗体発見のための方法であって、本開示の系又は方法を使用して生成された標識細胞又は標的タンパク質と、抗体又はその抗原結合断片を各々が含むポリペプチドのライブラリーを発現する組換え細胞の集団とを含む溶液を提供することと、標識細胞又は標識標的タンパク質に結合した組換え細胞を検出することによって、溶液から1つ以上の組換え細胞を選別することを含む方法を更に提供する。他のバリエーションにおいて、細胞選別は、免疫された対象に由来する細胞に対して行われる。対象は、本開示の方法に従って産生された細胞若しくは標的タンパク質で、又は別の適切な免疫原を使用して免疫されてもよい。いくつかの実施形態は、組換え細胞は、ナイーブ抗体ライブラリー（必要に応じてヒトナイーブ抗体ライブラリー）を含む。様々な抗体ライブラリー作製方法が当技術分野で公知であり、本開示の方法と組み合わせることができる。本明細書で使用される場合、「選別」又は「細胞選別」という用語は、蛍光活性化細胞選別、磁気支援細胞選別、並びに標識及び非標識細胞の集団中の標識細胞を選択する他の手段を指す。

【0175】

本開示は、ファージディスプレイライブラリーをパニングするための方法であって、ファージディスプレイライブラリーを、本開示の系又は方法を使用して産生された細胞又は

標的タンパク質と混合することと、細胞又は標的タンパク質に結合するファージディスプレイライブラリーのメンバーを精製及び／又は濃縮することを含む方法を更に提供する。いくつかの実施形態では、ファージディスプレイライブラリーは、一本鎖可変断片（s c F v）又は他のタイプの抗体／抗体断片（F a b など）の集団を発現する。

【0176】

更なる実施形態では、本開示は、任意のタイプのタンパク質バインダーをスクリーニングするための方法を提供する。本開示の細胞及び標的タンパク質を用いて、薬物及び高分子（タンパク質、核酸、及びタンパク質：核酸複合体）を含む様々なタイプの分子のライブラリーをスクリーニングして、標的タンパク質の結合パートナーを同定することができる。他の実施形態では、本開示の系及び方法を用いて、単一ウェルにおいて、いくつかの配列のプールにおいて、又は遺伝子配列のライブラリーにおいて、標的タンパク質のライブラリーを発現させる。

10

【0177】

抗原をその天然型又は疾患関連型で高収率で発現し、かつ／又は細胞の表面上に存在する能力は、先行技術の方法よりも信頼性の高い抗体、抗体断片、及び他の分子の発見及び／又は生成を可能にする。このような抗体、抗体断片、及び他の分子は、治療及び／若しくは研究ツールとして、又は他の適用のために有用であってもよい。

【0178】

いくつかの実施形態では、本開示の系及び方法は、標的分子（例えば、糖タンパク質）上の特定のグリコシル化パターンに結合する、及び／又は特異的である抗体の発見における使用に好適である。いくつかの実施形態では、抗体ライブラリーは、天然にグリコシル化されたタンパク質に対して選別され、不適切にグリコシル化されているか又は脱グリコシル化された同族タンパク質に対して逆選別される。同様に述べると、脱グリコシル化酵素を使用することによって、抗体をグリコシル化パターンに対して特異的に選別することができる。更なる実施形態では、本開示の細胞及び／又は標的タンパク質は、新規抗体又は他の高分子の結合及び／又は機能活性を確認するために使用される。

20

【0179】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物、系、及び方法の使用を通して産生される標的タンパク質は、治療薬、診断薬として、又は研究及び開発のために使用される。例示的な用途としては、ワクチン、酵素補充療法、ホルモン補充療法、抗体療法、抗ウイルス処置、抗菌処置、免疫調節薬、治療用癌ワクチン、二重特異性T細胞エンゲージャースクリーニングアッセイ、診断アッセイ、臨床検査キット、創薬、抗体発見などが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0180】

例示的な利点

本組成物、系、及び方法は、多くの利点を有していてもよい。例えば、実施例11に示されるように、通常アポトーシスを生じ、従って、ヒト細胞株において過剰発現された場合に検出不可能な収率を生じるヒトN A D a s e は、エンハンサータンパク質がこの標的タンパク質と共発現される場合、20mg／Lを超える収率を生じるように確実に発現することができる。更に、この例示的な方法を介して発現されたN A D a s e は、機能的であり（リン酸放出アッセイによって実証される）、バッチ間変動が低いことを示す。

40

【0181】

同様に、いくつかの実施形態では、本方法、系、及び細胞は、発現困難なタンパク質の信頼できる発現のために使用される。いくつかの実施形態では、本開示は、低いバッチ間変動を有するタンパク質の産生に関する。本開示に従って産生されるタンパク質は、以下の改善のうちの1つ以上を示してもよい：精製タグ融合を伴わない精製；機能的活性の改善；信頼性できる生産；一貫した活性；及び治療用途への適合性。

【0182】

本開示の細胞は、標的タンパク質発現に関して、以下の利点のうちの1つ以上を有してもよい：膜における標的膜タンパク質のより高い濃度；より遅い／減少した標的タンパク

50

質分解；全細胞アッセイにおけるシグナル対ノイズ比の改善；下流の細胞代謝に影響を及ぼさない標的タンパク質及び／又はエンハンサータンパク質の発現；膜結合膜タンパク質の脱感作に対する安定性の増加；及びより高い標的タンパク質収率。実施例 1 は、細胞の下流の代謝に影響を及ぼさないエンハンサータンパク質の発現の例示的な例を提供する。実施例 1 に例示された GPCR は、その天然基質と相互作用し、インビトロで測定することができる活性化をもたらすことができた。

【0183】

この系及び方法は、いくつかの実施形態では、以下の利点のうちの 1 つ以上を有してもよい：任意の真核細胞型への適合性；標的タンパク質発現最適化の必要性の減少；及び発現困難なタンパク質の信頼できる発現。

【0184】

本明細書に開示される標的タンパク質をインビボで発現させる方法は、当技術分野においてこの目的のために使用される標準的な方法と比較して優れた特性を有する。例えば、実施例において実証されるように、本明細書に開示される方法は、より長期間にわたる標的タンパク質の安定な発現を確実にし、動物間の発現レベルの変動性を低減する。これらの特性は、疾患の予防及び処置における本明細書に開示される方法の適用を可能にする。

【0185】

システム

本開示は、1 つ以上のベクターを含む、真核細胞における標的タンパク質の組換え発現のための系を提供する。本開示は、標的タンパク質を、それを必要とする対象において発現させる方法であって、a) 標的タンパク質をコードする第 1 のポリヌクレオチドと、b) エンハンサータンパク質をコードする第 2 のポリヌクレオチドとを含む 1 つ以上のベクターを含むベクター系を対象に投与することを含み、i) エンハンサータンパク質が、核細胞質輸送 (NCT) の阻害剤であり、及び／又は ii) エンハンサータンパク質が、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質、ピコルナウイルス 2 A プロテアーゼ、ライノウイルス 3 C プロテアーゼ、単純ヘルペスウイルス (HSV) ICP27 タンパク質、及びラウドウイルスマトリックス (M) タンパク質からなる群から選択され、第 1 のポリヌクレオチド及び第 2 のポリヌクレオチドが、1 つ以上のプロモーターに作動可能に連結されている、方法を更に提供する。複数のベクター (又は 1 つのベクター) は、標的タンパク質をコードする第 1 のポリヌクレオチド及びエンハンサータンパク質をコードする第 2 のポリヌクレオチドを有してもよい。エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送 (NCT) の阻害剤であってもよい。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質、ピコルナウイルス 2 A プロテアーゼ、ライノウイルス 3 C プロテアーゼ、単純ヘルペスウイルス (HSV) ICP27 タンパク質、及びラウドウイルスマトリックス (M) タンパク質からなる群から選択されてもよい。第 1 のポリヌクレオチド及び第 2 のポリヌクレオチドは、1 つ以上のプロモーターに作動可能に連結されてもよい。

【0186】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送 (NCT) の阻害剤である。いくつかの実施形態では、NCT 阻害剤はウイルスタンパク質である。

【0187】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質、ピコルナウイルス 2 A プロテアーゼ、ライノウイルス 3 C プロテアーゼ、コロナウイルス ORF6 タンパク質、エボラウイルス VP24 タンパク質、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) カプシドタンパク質、単純ヘルペスウイルス (HSV) ICP27 タンパク質、及びラウドウイルスマトリックス (M) タンパク質からなる群から選択される NCT 阻害剤である。

【0188】

NCT 阻害剤は、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質又はその機能的変異体であってもよい。いくつかの実施形態では、NCT 阻害剤は、ピコルナウイルス 2 A プロテ

10

20

30

40

50

アーゼ又はその機能的変異体であってもよい。いくつかの実施形態では、NCT阻害剤は、ライノウイルス3Cプロテアーゼ又はその機能的変異体であってもよい。いくつかの実施形態では、NCT阻害剤は、コロナウイルスORF6タンパク質又はその機能的変異体であってもよい。いくつかの実施形態では、NCT阻害剤は、エボラウイルスVP24タンパク質又はその機能的変異体であってもよい。いくつかの実施形態では、NCT阻害剤は、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（VEEV）カプシドタンパク質又はその機能的変異体であってもよい。いくつかの実施形態では、NCT阻害剤は、単純ヘルペスウイルス（HSV）ICP27タンパク質又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、NCT阻害剤は、ラウドウイルスマトリックス（M）タンパク質又はその機能的変異体である。

10

【0189】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質はLタンパク質であり、これはタイラーウイルスのLタンパク質又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、Lタンパク質は、配列番号1と少なくとも90%の同一性を共有してもよい。

【0190】

いくつかの実施形態では、Lタンパク質は、脳心筋炎ウイルス（EMCV）のLタンパク質又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、Lタンパク質は、配列番号2と少なくとも90%の同一性を共有してもよい。

【0191】

いくつかの実施形態では、Lタンパク質は、ポリオウイルスのLタンパク質、HRV16のLタンパク質、メンゴウイルスのLタンパク質、及びSaffoldウイルス2のLタンパク質又はそれらの機能的変異体からなる群から選択される。

20

【0192】

系は、発現カセットを含む単一のベクターを含んでもよく、発現カセットは、第1のポリヌクレオチド及び第2のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、発現カセットは、第1のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第1のプロモーター；及び第2のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第2のプロモーターを含む。いくつかの実施形態では、発現カセットは、第1のポリヌクレオチド及び第2のポリヌクレオチドの両方に作動可能に連結された共有プロモーターを含む。

【0193】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、リボソームスキッピング部位をコードするポリヌクレオチドによって連結された第1のポリヌクレオチド及び第2のポリヌクレオチドを含むコードポリヌクレオチドを含み、コードポリヌクレオチドは、共有プロモーターに作動可能に連結されている。

30

【0194】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、コードポリヌクレオチドを含み、コードポリヌクレオチドは、リボソームスキッピング部位によって連結されたエンハンサータンパク質及び標的タンパク質をコードし、コードポリヌクレオチドは、共有プロモーターに作動可能に連結されている。

【0195】

いくつかの実施形態では、発現カセットは、リボソームスキッピング部位によって連結された、標的タンパク質及びエンハンサータンパク質の両方をコードする単一のメッセージRNAの転写のために構成されており、メッセージRNAの翻訳は、別個のポリペプチドとしての標的タンパク質及びエンハンサータンパク質（例えば、Lタンパク質）の発現を生じさせる。

40

【0196】

系は、1つのベクターを含んでもよい。いくつかの実施形態では、系は、標的タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド及びエンハンサータンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドを含む単一のベクターを含んでもよい。

【0197】

50

系は、2つのベクターを含んでもよい。いくつかの実施形態では、系は、第1のプロモーターに作動可能に連結された第1のポリヌクレオチドを含む第1のベクター；及び第2のプロモーターに作動可能に連結された第2のポリヌクレオチドを含む第2のベクターを含んでもよい。

【0198】

いくつかの実施形態では、第1のポリヌクレオチド若しくは第2のポリヌクレオチドのいずれか、又は両方が、内部リボソーム進入部位（IRES）に作動可能に連結されている。

【0199】

いくつかの実施形態では、系に含まれる1つ以上のベクターのうちの少なくとも1つは、T7 RNAポリメラーゼによる第1のポリヌクレオチド又は第2のポリヌクレオチドのいずれか又は両方の転写のために構成されたT7プロモーターを含んでもよい。

【0200】

いくつかの実施形態では、系に含まれる1つ以上のベクターのうちの少なくとも1つは、T7 RNAポリメラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含んでもよい。

【0201】

本開示の組成物及び方法は、エンハンサータンパク質、例えば、Lタンパク質と共発現される場合、標的タンパク質の改善された発現を提供する。本明細書で使用される場合、「標的タンパク質の発現の改善」には、それだけに限らないが、標的タンパク質と比較した以下の1つ以上が含まれる：活性の増加、発現レベルの低下、発現期間の増加、安定性の増加、細胞又は対象における検出期間の増加、送達の均一性の増加、分解の減少、及びEC₅₀の減少。

【0202】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質の共発現は、細胞又は対象における標的タンパク質の活性を、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍、約150倍、約200倍、又は約300倍増加させる。

【0203】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質の共発現は、標的タンパク質の発現レベルを約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、又は約90%低下させる。

【0204】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質の共発現は、活性標的タンパク質が細胞又は対象において見出される期間を、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10、約11倍、約12倍、約13倍、約14倍、約15倍、約16倍、約17倍、約18倍、約19倍、又は約20倍増加させる。

【0205】

変動係数（CV%）は、標的タンパク質発現の均一性の尺度として提供され、シグナル平均で割った診断部分（例えば、フルオロフォア又は放射性標識）シグナルの標準偏差として定義される。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質の共発現は、組織又は対象における標的タンパク質の発現の均一性を、約1.2倍、約1.3倍、約1.4倍、約1.5倍、約1.6倍、約1.7倍、約1.8倍、約1.9倍、約2倍、約2.1倍、約2.2倍、約2.3倍、約2.4倍、約2.5倍、約2.7倍、約2.8倍、約2.9倍、又は約3倍増加させる。

【0206】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質の共発現は、記標的タンパク質の分解を約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍、約150倍、約200倍、又は約300倍減少させる。

【0207】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質の共発現は、最大応答の50%を生

10

20

30

40

50

じるのに有効な標的タンパク質の濃度（EC50）を減少させる。いくつかの実施形態では、標的タンパク質はアダリムマブであり、応答は、細胞又は対象における腫瘍壊死因子- α （TNF- α ）の中和である。いくつかの実施形態では、アダリムマブのEC50は、細胞又は対象において、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍、約150倍、約200倍又は約300倍減少する。

【0208】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質（例えばLタンパク質）のアダリムマブタンパク質との共発現は、以下から選択される疾患の処置を改善する：関節リウマチ、若年性特発性関節炎（JIA）、乾癬性関節炎（PsA）、強直性脊椎炎（AS）、クローン病（CD）、潰瘍性大腸炎（UC）、尋常性乾癬（Ps）、化膿性汗腺炎（HS）、及びブドウ膜炎（UV）。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるアダリムマブとのエンハンサータンパク質の共発現は、エンハンサータンパク質の共発現を伴わないアダリムマブ処置と比較して、前述の疾患の処置を約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、又は約90%改善する。

10

【0209】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質（例えばLタンパク質）の共発現は、標的タンパク質の発現を改善し、標的タンパク質は、アダリムマブ、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、トラスツズマブ、ベバシズマブ、ウステキヌマブ、オクレリズマブ、セクキヌマブ、ベドリズマブ、イバリズマブ、ニルセビマブ、アトルチビマブ、マフティビマブ、オデシビマブ、カシリビマブ、イムデビマブ、及びプロルシズマブを含む群（表8も参照）から選択される抗体である。

20

【0210】

30

40

50

【表 8 - 1】

表 8：例示的な抗体標のタンパク質

抗体標のタンパク質	VH	配列番号:	VL	配列番号:
アダリムマブ	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCA ASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSAITWNSGHIDYADSVGEGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKVSYLSTASSLDYWGGG TLVTVSS	124	DIQMTQSPSSLSASVGD VTITCRASQGIRNYLAWYQ QKPGKAPKLLIYAASLTQS GVPSRFSGSGSGTDFTLT SSLQPEDVATYYCQRYNR APYTFGGGTKEIK	129
ペンブロリズマブ	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSC KASGYTFTNYYMYWVRQAPGGG LEWMGGINPSNGGTNFNEKFKN RVTLTDDSTTTAYMELKSLQFD DTAVYYCARRDYRFDMGFDYWG QGTTVTVSS	374	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASKGVSTSGYSYL HWYQQKPGQAPRLLIYLA SYLESGVPARFSGSGSGT DFTLTISSELEPEDFAVYYC QHSRDLPFTFGGGTKVEIK	375
ニボルマブ	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDC KASGITFSNSGMHWVRQAPGKG LEWVAVIWDGSKRYADSVKGR FTISRDNKNTLFLQMNSLRAED TAVYYCATNDYWGQGTTLVTVSS	376	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSELEPEDFAVYYCQSSN WPRTFGGGTKVEIK	377
トラスツズマブ	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGDDGYAMDYWGQGT LVTVSS	378	DIQMTQSPSSLSASVGD VTITCRASQDVNTAVAWY QKPGKAPKLLIYASFLY SGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQGHY TTPPTFGGGTKVEIK	379
ペバシズマブ	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGL EWVGVWINTYTGEPTYAADFKRRF TFLSDTSKSTAYLQMNSLRAEDT AVYYCAKYPHYGGSHWYFDVW GGGTLVTVSS	380	DIQMTQSPSSLSASVGD VTITCSASQDISNYLNWYQ QKPGKAPKVLIIYFTSSLHS GVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSELEPEDFATYYCQYST VPWTFGGGTKEIK	381
ウステキヌマブ	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTTYWLGWVRQMPGKGL DWIGIMSPVDSDIRYSPSFQGGV TMSVDKSITTAYLQWNSLKASDT AMYYCARRRPGQGYDFWGGGT LVTVSS	382	DIQMTQSPSSLSASVGD VTITCRASQGISSWLAWY QKPEKAPKSLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSELEPEDFATYYCQY NIYPYTFGGGTKEIK	383
オクレリズマブ	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGL EWVGAIPGNGDTSYNQKFKGRF TISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARVYYYSNSYWFYDVG GGTLVTVSS	384	DIQMTQSPSSLSASVGD VTITCRASSSVSYMHWYQ QKPGKAPKPLIYAPSNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQW SFNPPTFGGGTKVEIK	385
セクキヌマブ	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGL EWVAAINQDGSEKYYVGSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDT AVYYCVRDYYDILTDYYIHYWYFD LWGRGTLVTVSS	386	EIVLTQSPGTLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWY QKPGQAPRLLIYGASSR ATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQY SSPCTFGGQTRLEIK	387
ベドリズマブ	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KSGYFTTSYWMHWVRQAPGQR LEWIGEIDPSESNTNYNQKFKGR VTLTVDISASTAYMELSSLRSED TAVYYCARGGYDGDYDAIDYWG GTLVTVSS	388	DVVMTQSPSLPVTGP ASISCRSSQSLAKSYGNT YLSWYLQKPGQSPQLLIY GISNRFSGVPRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVY YCLQGTHTQPYTFGGGT KEIK	389

【0211】

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

(表 8 の続き)

抗体標的タンパク質	VH	配列番号:	VL	配列番号:
イバリズマブ	QVQLQQSGPEVVKPGASVKMSC KASGYTFTSYVIHWVRQKPGQGL DWIGYINPYNDGTDYDEKFKGKAT LTSDTSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAREKDNATGAWFAYWGQ GTLVTVSS	390	DIVMTQSPDSLAVSLGER VTMNCKSSQSLLYSTNQK NYLAWYQQKPGQSPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISVQAEDVAV YYCQYYSYRTFGGGTKL EIK	391
ニルセビマブ	QVQLVQSGAEVKKPGSSVMVSC QASGGLLEDYIINWVRQAPGQGP EWMGGIIPVLGTVHYGPKFQGRV TITADESTDTAYMELSSLRSEDTA MYYCATETALVVSETYLPHYFDN WGQGTLVTVSS	392	DIQMTQSPSSLSAAVGDR VTITCQASQDIVNYLNWYQ QKPGKAPKLLIYVASNLET GVPSRFSGSGSGTDFSLTI SSLQPEDVATYYCQQYDN LPLTFGGGKTKVEIK	393
アトルチビマブ	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFNNGMHVWRQAPGMG LEWVAVIWDGSDKYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARNWNLFQYWGQGT LTVSS	394	DIQMTQSPSSLSASVGDR TITCRASQSISTYLHWYQQ KPGKAPKLLIYAASLTQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTI SLQPEDFATYYCQQSFST PPINFGGGTKLEIK	395
マフティビマブ	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTSSSYAMNWVRQAPGKGL EWWSTISGMGGSTYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKRGYPHSFDIWGGGT MVTSS	396	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSISSFLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASLTQSG GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYS TLTFGGGTRLEIK	397
オデシビマブ	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSSYDMHWVRQATGKGL EWWSAIGTAGDTYYPGSVKGRFTI SRENAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARTWFGELYFDYWGQGT LTVSS	398	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSG SGTEFTLTITSLQAEDVAV YYCQYYSSPLTFGGGK VEIK	399
カシリビマブ	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSC AASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGL EWWVSITYSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKSSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARDRGTTMVPFDYWGQGT LTVSS	400	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCQASQDITNYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASNLET GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SGLQPEDFATYYCQQYDN LPLTFGGGKTKVEIK	401
イムデビマブ	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFSNYAMYVWRQAPGKG LEWVAVISYDGSNKYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRTE DTAVYYCASGSDYGDYLLVYWGQ GTLTVSS	402	QSALTQPASVSGSPGQSI TISCTGTSSDVGGYNYVS WYQQHPGKAPKLLMIYDVS KRPSGVSNRFSGSKSGNT ASLTISGLQSEDEADYYCN SLTSISTWVFGGGTKLTVL	403
プロルシズマブ	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCT ASGFTSLTDYYMTWVRQAPGKGL EWWGFDIPDDPYATWAKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGT LTVSS	404	EIVMTQSPSTLSASVGDR VIITCQASEIIHSWLAWYQ QKPGKAPKLLIYLASTLAS GVPSRFSGSGSGAEFTLTI SSLQPDDFATYYCQNVYL ASTNGANFGGGTKLTVL	405

10

20

30

40

【0212】

いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質（例えばLタンパク質）の共発現は、標的タンパク質の発現を改善し、標的タンパク質は、rFIX-Fc凝固第IX因子、タリグルセラゼ、アガルシダーゼβ、アルグルコシダーゼα、ラロニダーゼ、イデュルスルファゼ、HLAクラスIα鎖（マウスK2-D1）及びB2m（マウス）、Nlrp5（マウス）、NLRP5（ヒト）、scIL-12（マウス）、scIL-12（ヒト）、並びにHLAクラスIα鎖（ヒト）及びB2M（ヒト）を含む群から選択される血液タンパク質又は免疫腫瘍学タンパク質である（表9も参照）。

【0213】

50

【表 9 - 1】

表 9：例示的な血液及び免疫腫瘍標的タンパク質

標的タンパク質	アミノ酸配列	配列番号:
グルコシルセラミダーゼ (GBA)	ARPCIPKSFGYSSVVCVCNATYCDSDPPTFPALGTFSTRSGR RMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNI LALSPPAQNLLKSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDD FQLHNFSLEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLASPWTSPTWLKTN GAVNGKGSLSKGGPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAEN EPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQDRDFIARDLGPTLANSTHHNVRLLML DDQRLLLPHWAKVVLTDPAAKYVHGIAVHWYLDLAPAKATLG HRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSDRGMQYSHSIITNLLY HVVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYH LGHFSGFIPEGSQVRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGSASVVVVLNRSS KDVPLTIKDPVGFLETISPGYSIHTYLWRRQ	406
rFIX-Fc凝固第IX因子	YNSGKLEEFVQGNLERECMEEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYV DGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKN GRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSV SQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVG EDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKIT VVAGEHNIEETEHTEQKRNIRIIPHHNYNAANKYNHDIALLELDEPL VLNSYVTPICIAADKEYTNIFLKFSGSYVSGWGRVFHKGRSALVLQYL RVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTE VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYKVSRYVNWIKETKLT	407
タリグルセララーゼ	EFARPCIPKSFGYSSVVCVCNATYCDSDPPTFPALGTFSTRSGR GRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAAL NILALSPPAQNLLKSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPD DFQLHNFSLEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLASPWTSPTWLKT NGAVNGKGSLSKGGPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAE NEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQDRDFIARDLGPTLANSTHHNVRLL MLDDQRLLLPHWAKVVLTDPAAKYVHGIAVHWYLDLAPAKATLG ETHRLFPNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSDRGMQYSHSIITNL LYHVVGWTDWNLALNPEGGPNWVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMF YHLGHFSKFIPEGSQVRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGSASVVVVLNR SSKDVPLTIKDPVGFLETISPGYSIHTYLWHRQDLLVDTM	408
アガルシダーゼ β	LDNGLARTPTMGWLHWERFMCNLDCEEPDSCISEKLFMEMAELM VSEGWKDAGYEYLCIDDCWMAQQRDSEGRQLQADPQRFPHGIRQLA NYVHSKGLKLGIIYADVGNKTCAGFPFSFGYYDIDAQTFADWGVDLLK FDGCYCDLENLADGYKHMSLALNRTGRSIVYSCEWPLYMWPFQK PNYTEIRQYCNHWRNFADIDDSWKSISILDWTSFNQERIVDVAGPG GWNDPDMVLVIGNFGLSWNQVQTQMALWAIMAAPLFMSNDRHISP QAKALLQDKDVIAINQDPLGKQGYQLRQGDNFEVWERPLSGLAWAV AMINRQEIGGPRSYTIAVASLGKGVACNPACFITQLLPVKRKLGFYE WTSRLRSHINPTGTVLLQLENTMQMSLKDLL	409

【0214】

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

(表 9 の続き)

標的タンパク質	アミノ酸配列	配列番号:
ラロニダーゼ	APHLVQVDAARALWPLRRFWRSTGFCPPLPHSQADQYVLSWDQQL NLAYVGAVPHRGIKQVRTHWLLELVTTTRGSTGRGLSYNFTHLDGYLD LLRENQLLPGFELMGSGASGHFTDFEDKQQVFEWKDLVSSLARRYIG RYGLAHVSKWNFETWNEPDHHDNDVNSMTMQGFLNYYDACSEGLR AASPALRLGGPGDSFHTPPRSPLSWGLLRHCHDGTNFFTGEAGVRL DYISLHRKGARSSISILEQEKVVAQQIRQLFPKFADTPIYNDEADPLV GWSLPQPWRADVITYAAMVVVKVIAQHQNLLANTTSAPFYALLSNDN AFLSYHPPFAQRTLTARFQVNNTTRPPHVQLLRKPVLTAAGLLALL DEEQLWAEVVSQAGTVLDSNHTVGVLASAHRPQGPADAWRAAVLIY ASDDTRAHPNRSVAVTLRLRGVPPGPGLVYVTRYLDNGLCSPDGEW RRLGRPVPFTAQFRRMRAAEDPVAAAPRPLPAGGRLTLPALRLP SLLLHVHVCARPEKPPGQVTRLRALPLTQGGQLVLVWSDHVGSKCL WTYEQFSQDGKAYTPVSRKPSTFNLVVFSPDTGAVSGSYRVRALD YWARPGPFSDPVPYLEVPVPRGPPSPGNP	410
イデュルスルファ ーゼ	SETQANSTTDALNVLLIIVDDLRLPSLGCGDKLVRSPNIDQLASHSL FQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGRRPDTRLYDFNSYWRVHAGNFSTI PQYFKENGYVTMSVGKVFHPGISSNHTDDSPYSWSFPPYHPSSEKY ENTKTCTRGPDGELHANLLCPVDVLDVPEGTLDPKQSTEQAIQLLEK MKTSASPFFLAVGYHKPHIPFRYPKEFKKLYPLENITLAPDPEVPDG LPPVAYNPWMDIRQREDVQALNISVPYGPVDFQRKIRQSYFASVS YLDTQVGRLLSALDDLQLANSTIIAFTSDHGWALGEHGEWAKYSNFD VATHVPLIFYVPGRTASLPEAGEKLFYLDPFDSASQLMEPGRQSM DLVELVSLFPTLAGLAGLQVPPRCVPVPSFHVELCREGKNLLKHFRF RDLEEDPYLPGNPRELIAYSQYPRPSDIPQWNSDKPSLKDIKIMGYSI RTIDYRYTVWVGFPNDEFANFSDIHAGELYFVDSPLQDHNMYND SQQGDLFQLLMP	411
HLAクラスI α 鎖 (マウスK2-D1)	GPHSMRYFETAVSRPGLEEPYISVGYVDNKEFVRFDSDAENPRYE PRAPWMEQEGPEYWERETQKAKGQEQWFRVSLRNLLGYYNQSAG GSHTLQQMSGCDLGSDWRLLRGYLQFAYEGRDYIALNEDLKTWTAA DMAAQITRRKWEQSGAAEHYKAYLEGECEVWLHRYLKNGNATLLRT DSPKAHVTHHPRSKGEVTLRCWALGFYPADITLTWQLNGEELTQDM ELVETRPAGDGTQKQWASVVVPLGKEQNYTCRVYHEGLPEPLTLRW EPPSTDSYMVIVAVLGVLGAMAIIGAVVAFVMKRRRNTGGKGGDY ALAPGSQSSEMSLRDCKAR	412
B2m(マウス)	IQKTPQIQVYSRHPPENGKPNILNCYVTQFHPPHIEIQMLKNGKKIPK VEMSDMSFSKDWSEFYLAHTEFTPTETDTYACRVKHASMAEPKTVY WDRDMR	413

【 0 2 1 5 】

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

(表 9 の続き)

標的タンパク質	アミノ酸配列	配列番号:
Nirc5 (マウス)	MDAESIRLNNENLWAWLVRLLSKNPEWLSAKLRSFLPTMDLDCSY EPSNPEVIHRQLNRLFAQGMATWKSFINDLCFELDVPLDMEIPLVSI WGPRDEFKQGLGAGEESCPGPQLYHGAKRPFQSYGSSPRRKNKSK QQLELAKKYLKLLKTSAQQWHGGVCPGAWLTPHSPQTYIPPVLQW SRATAPLDAQEGATLGDPEAADNIDVSIQDLFSFKAHKGPRVTVLLG KAGMGKTTLAYRLRWRWAQQQLDRFQALFLFEFRQLNMITQLPTLP QLLFDLYLMPSEPDVAFQYLKENAEVLLIFDGLDEALHADSVGTD NAGSALTLFSELCHGNLLPGCWVMTTSRPGKLPSCVPTEAATVHM WGFDGLRVEKYVTCFFSDLLSQELALKEMRTNARLRGMCAIPALCT VTCFCLRRLLPGSSPGQSAALLPTITQLYLQMVETFSPTSETLLDTSIL GFGKVALRGLDTGKVVSVEDISPQLMSFGAVHSLLTSFCIHTRPGH EEIGYAFVHLSLQEFFAALYLMASHTVDKDTLVEYVTLNSHWVLR TK GRLGLSDHLP AFLAGLASHTCHMFLCQLAQQDRAWVGSRQAAVIQ VLRKLASRKLTGPKMIELYHCVAETQDLELARFTAQSLPSRLSFHNF PLTHADLAALANILEHRDDPIHLDFDGCPLPHCPEALVGCQGQVENL SFKSRKCGDAFAEALCRSLPTMGSLKTLGLTGSRITAQGISHLIQLP LCSQLEEVSLHDNQLKDPEVLSLVELLPSLPKLQKLDLSRNSFSRSI LLSLVKVAITCPTVRKLQVRELDLIFYLSPVTETATQQSGASDVQGK DSLKEGQSRSLQLRLQKCQLRIRDAEALVELFQKSPQLEEVNLSGN HLEDDGCR LVAEAASQLHIAQKLDLSDNGLSQTGVTVLKAMSTCG TLEDLHISLLNNTVVLTFAQEPREQEGSCKGRAPLISFVSPVTSELS QRSRRIRLTHCGFLAKHTETLCEALRASCQTHNLDHLDLSDNSLGG KGVILLTELLPGLGPLKSLNLSRNGLSMDAVFSLVQCLSSLQWVFH LDVSLESDCIFLRGAGTSRDALEPKFQTGVQVLELSQRYTSRSFCLQ ECQLEPTSLTFLCATLEKSPGPLEVQLSCKSLSDDSLKILLQCLPQL PQLSLLQLRHTVLSSRSPFLLADIFNLCPVRVKVTLRSLCHAVLHFD SNEEQEGVCCGFPGCSSLSEHMETLCCALSKCNALSQDLTDNLL GDIGLRCLLECLPQLPISGWLDLSHNNISQEGILYLETLPSPYNIQEV SVSLSSSEQIFRMCFSSKKEGAGTSLRLCECSFSPEQVSKLASSLSQA QQLTELWLTKCHLDLPQLTMLLNLVNRPTGLLGLRLEEPWVDVSLS PALMEVCAQASGCLTELSISEIQRKLWLQLEFPHQEGNSDSMALRL AHCDELEHSHLMIQLVETYARLQQLSLSQVSFNDNDGTSSKLLQNI LLSSCELKSFRLTFSQVSTKSLTHLAFGLGHCHHLEELD FSNNSLRE EDTELLMGALQGTCLRLKHLHSFLPLGASSLALLIQGLSRMTLLQDL CLSHNQIGDVGTQCLAAILPKLPELRKFDLSHNQIGDVGTQCLAAILP KLPELRKFNL SHNQIGHVGTQCLAAILPKLPELRKFDLSRNQIGDVG TQCLAAILPKLPELRKFDLSGNRIGPAGGVQLVKS LTHFEHLEEIKLG NNALGEPTALELAQRLPPQLRVLC LPSSHLGPEGALGLAQALEQCP HIEEVSLAENNLAGGVPRFSKRLPLLRQIDLEFC KIEDQAARHLAAN LTLFPAL EKLLL SGNLLGDEVAAELAQVLPQMGQLKKNLEWNRIT ARGAQLLAQGLVQGS CVPVIRLWNNPILNDVAQSLQSQEPRLD FSIT DQQTLR	414
HLAクラスⅠα 鎖	MAVMAPRTLLLLLSGALALTQTWAGSHSMRYFFTSVSRPGRGEP RF IAVGYVDDTQFVRFDSDAASQKMEPRAPWIEQEGPEYWDQETRNM KAHSQTD RANLGTLRGYYNQSE DGSHTIQIMYGCDVGP DGRFLRGY RQDAYD GKDYIALNEDLRSWTAADMAAQITKRKWEAVHAAEQRRVY LEGRCVDGLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWA LGFYPAEITLTWQRDGEDGTQDELVETRPAGDGT FQKWA AVVVP GEEQRYTCHVQH EGLPKPLTLRWELSSQPTIPIVGIIAGLVLLGAVIT GAVVAAVMWRRKSSDRKGGSYTQAASSDSAQGS DVSLTACKV	415

【 0 2 1 6 】

10

20

30

40

50

【表 9 - 4】

(表 9 の続き)

標的タンパク質	アミノ酸配列	配列番号:
B2M(ヒト)	IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIE KVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTKEDEYACRVNHVTLSPQKIVK WDRDM	416
Nirc5(ヒト)	MDPVGLQLGNKNLWSCLVRLLTKDPEWLNAMKFFLPNTDLDNRN ETLDPEQRVILQLNKLHVQGSSTWQSFHCVCMQLEVPDLEVLNLS TFGYDDGFTSQLGAEGKSQPESQLHHGLKRP HQSCGSSPRRKQCK KQQLELAKKYLQLLRTSAQQRYRSQIPGSGQPFAFHQVYVPPILRR ATASLDTPEGAIMGDVKVEDGADVSISDLFNTRVNKGPRVTVLLGKA GMGKTTLAHRLCQKWAEGHLNCFQALFLFEFRQLNLITRFLTPELL FDLYLSPESDHDVTVFQYLEKNADQVLLIFDGLDEALQPMGPDGPGP VLTLSHLCNGTLLPGCRMATSRPGKLPACLPAAEAMVHMLGFDG PRVEEYVNHFFSAQPSREGALVELQTNGRLRSLCAVPALCQVACLC LHHLLPDHAPGQSVALLPNMTQLYMQMVLALSPPGHLPTSLLDLG EVALRGLETGKVIFYAKDIAPPLIAFGATHSLLTSFCVCTGPGHQQTG YAFTHLSLQEFALAHLMASPKVNKDTLTQYVTLHSRWVQRTKARL GLSDHLPTFLAGLASCTCRPFLSHLAQGNEDCVGAKQAADVQVLKK LATRKLTPGPKVVELCHCVDDETQEPELASLTAQSLPYQLPFHNFPLTC TDLATLTNILEHREAPIHLDLFDGCPLEPHCPEALVGCGQIENLSFKSR KCGDAFAEALSRLPTMGRLLQMLGLAGSKITARGISHLVKALPLCP QLKEVSFRDNQLSDQVVLNIVEVLPHLPRLRKLDLSSNSICVSTLLC LARVAVTCPTVRMLQAREADLIFLLSPPTETTAELQRAPDLQESDGG RKGAQSRSLTLRLQKQQLQVHDAEALIALQEGPHLEEVDSLGNQL EDEGCRMLMAEAASQLHIARKLDLSNNGLSVAGVHCVLRAVSACWTL AELHISLQHKTVIFMFAQEPEEQKGPQERAAFLDSLMLQMPSELPL SSRRMRLTHCGLQEKHLEQLCKALGGSCHLGHHLDFSGNALGDE GAARLAQLLPGLGALQSLNLSENGLSLDAVLGLVRCFSTLQWLFRLL DISFESQHILLRGDKTSRDMWATGSLPDFPAAAKFLGFRQRCIPRSL CLSECPLEPPSLTRLCA TLKDCPGPLELQLSCEFLSDQSLETLLDCL PQLPQLSLLQLSQTGLSPKSPFLLANTLSLCPRVKVLDLRLSHHATL HFRSNEEEEGVCCGRFTGCSLSQEHVESLCWLLSKCKDLSQVDLS ANLLGDSGLRCLLECLPQVPISGLLDLSHNSISQESALYLLETLPSC PRVREASVNLGSEQSFRIHFSREDQAGKTLRLSECSFRPEHVSRLA TGLSKSLQLTELTLTQCCLGQKQLAILLSLVGRPAGLFSLRVQEPWA DRARVLSLLEVCAQASGSVTEISISSETQQQLCVQLEFPRQEENPEAV ALRLAHCDLGAHHSLLVGQLMETCARLQQLSLSQVNLCEDDDASSL LLQSLLLSLSELKTFRLTSSCVSTEGLAHLASGLGHCHHLEELDLSN NQFDEEGTKALMRALEGKWMKRLDLSHLLLSSTLALLTHRLSQ MTCLQSLRLNRNSIGDVGCCHLSEALRAATSLEELDLSHNQIGDAG VQHLATILPGLPELRKIDLSGNSISSAGGVQLAESLVLCRRLEELML GCNALGDPTALGLAQELPQHRLRVLHLPFSLHLPGLGALSLAQALDGS PHLEEISLAENNLGGVLRFCMELPLLRQIDLVSCKIDNQTA KLLTSS FTSCPALEVILLSWNLLGDEAAAEALQVLPQMGRLLKRV DLEKNQITA LGAWLLAEGLAQGSSIQVIRLWNNPIPCDMAQHLLKSQEPRLDFAFF DNQPQAPWGT	417
scIL-12(マウス)	MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWTSDQRHG VIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLLLHKKENGIWST EILKNFKNKTLKCEAPNYSGRFTCSWLVRNMDLKFNKSSSSSP DSRAVTCGMASLSAEKVTL DQRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPI ELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSW EYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKT STEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVS	418

【 0 2 1 7 】

10

20

30

40

【表 9 - 5】
(表 9 の続き)

標的タンパク質	アミノ酸配列	配列 番号:
scIL-12(ヒト)	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEV LGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTD ILKDQKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGS SDPQGVTCGAATLSAERVVRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPI EVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVS WEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICR KNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS	419
アルグルコシダーゼ α	AHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQECCARGCCYIPAKQ GLQGAQMGGPWCFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFP KDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSP YSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQ YITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTGANLYGSHPFYLALE DGGSAHGVLNLSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPK SVVQQYLDVVGYPFMPYWGGLGFHLCRWGYSSAITRQVVENMTR AHFPLDVQWNDLDYMDSRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRY MMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGST AFPDTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSE DGCPNNELENPPYVPGVVGGLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYG LTEAIAASHRALVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWE QLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYP FMRNHNLSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTRYALLPHLYTLFHQ AHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKA EVTGYFPLGTWYDLQTVPEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTL PAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTGGGEAR GELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQL QKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQF LVSWC	420

【 0 2 1 8 】

10

20

30

40

50

【表 9 - 6】

(表 9 の続き)

標的タンパク質	アミノ酸配列	配列番号:
Bドメイン欠失ヒト第VIII因子(BDD FVIII)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSFPFNTSVVY KKTLEFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVITLKNMAS HPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVW QVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNLSLMQDRDAASARAWP KMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTF LVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAY VKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSF IQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNG PQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLII FKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYK WTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESV DQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLED PEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFF SGYTFKHKMOVIEDTLTLFPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRN RGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSGNP PVLKRHRQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQS PRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVPGFKK VVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQA SRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKPNETKTYFWKVQHMAP TKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLCHTNTLNPAHGRQV TVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRF HAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTV RKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMS TLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYS SINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYS LDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIIFNPPIIARYIRLHPT HYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMF ATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVGTGVT TQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFGGNQDSF TPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	421

10

20

30

【0219】

40

50

【表 9 - 7】

(表 9 の続き)

標的タンパク質	アミノ酸配列	配列番号:
フォンヴィレブランド因子、組換え体	AEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSMYSFAGYCSYLLAGGCQKR SFSIIGDFQNGKRVSLSVYLGEFFDIHLFVNGTVTQGDQRVSMPIYAS KGLYLETEAGYYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQVLLSDRYFNKTCGLC GNFNIFAEDDFMTQEGTLTSDPYDFANSWALSSGEQWCERASPPS SSCNISSGEMQKGLWEQCQLLKSTSVFARCHPLVDPEPFVALCEKT LCECAGGLECACPALLEYARTCAQEGMVLYGWTDHSAACSPVCPAG MEYRQCVSPCARTCQSLHINEMCQERCVDGCSCEGQLLDEGLCV ESTECPCVHSGKRYPPGTSLSRDCNTCICRNSQWICSNEECPGECL VTGQSHFKSFDNRYFTFSGICQYLLARDCQDHSFSIVIETVQCADDR DAVCTRSVTYRLPLGLHNSLVKLKHGAGVAMDGDQVQLPLLKGDLRI QHTVTASVRLSYGEDLQMDWDGRGRLLVKLSPVYAGKTCGLCGNY NGNQGGDDFLTSPGLAEPRVEDFGNAWKHLHGDCQDLQKQHSDFCAL NPRMTRFSEEACAVLTSPTFEACHRAVSPLPYLRNCRYDVCSCSDG RECLCGALASYAAACAGRGVRVAWREPGRCLENCPKGQVYLQCGT PCNLTCRSLSYDPDEECNEACLEGCFPPGLYMDERGDVCPKAQCP CYYDGEIFQPEDIFSDHHTMCYCEDGFMHCTMSGVPGSLLPDAVLS SPLSHRSKRSLSRPPMVKLVCADNLRAEGLECTKTQNYDLEC MSMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVALERCPCFHHQKEYAPGETVKI GCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKYLFPGEQ YVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSHPSVKCKKRVTLVEGGEIELF DGEVNVKRPMDKETHFEVVESGRYIILLGKALSVVWDRHLSISVVL KQTYQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSS QCADTRKVPDLSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDFVQDCNKL DPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHGVVTVWRT ATLCPQSCCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPV QCVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVT LNPSDPEHCQICHCDVNNLTCEACQEPGGLVVPPTDAPVSPTTLVY EDISEPPLHDFYCSRLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFVVDMM RLRISQKVVVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSRLRRIASQVKYAG SQVASTSEVLKYTLFQIFSKIDRPEASRITLLMASQEPQMRMSRFV RYVQGLKKKKVVIVIPVGIGPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLSVDEL EQQRDEIVSYLCDLAPEAPPPTLPPDMAQVTVGPGLLGVSTLGPKR NSMVLDAVAVLEGSDKIGEADFNRSKEFMEEVIQRMVDVGQDSIHVT VLQYSYMTVEYPFSEAQSKGDILQRVREIRYQGGNRTNTGLALRYL SDHSFLVSQGDREQAPNLVYMTGNPASDEIKRLPGDIQVVPVIGVGP NANVQELERIGWPNAPILIQDFETLPREAPDLVLQRCCSGEGLQIPTL SPAPDCSQPLDVILLDGSSEFPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPRL TQVSVLQYGSITIDVPWNVVPEKAHLLSLVDVMQREGGPSQIGDAL GFAVRYLTSEMHGARGPGASKAVVILVTDVSVDSVDAADAARSNRV TVFPIGIDRYDAAQLRILAGPAGDSNVVKLQRIEDLPTMVTLGNSFL HKLCSGFVRICMDEEDGNEKRPDGVWTLPDQCHTVTCQPDGQTLLK SHRVNCDRGLRSPCNSQSPVKVEETCGCRWTCPCVCTGSSTRHI VTFDGGNFKLTGSCSYVLFQNKQEDLEVILHNGACSPGARQGCMMKS IEVKHSALSVELHSDMEVTVNGRLVSVYPYVGGNMEVNVYGAIMHEV RFNHLGHIFTFTPNNEFQLQLSPKTFASKTYGLCGICDENGANDFM LRDGTVTDDWKTTLVQEWTVQRPQGTCQPILEEQCLVPDSSHCQVLL LPLFAECHKVLAPATFYAICQQDSCHQEQQVCEVIASAHLCRTNGVC VDWRTPDFCAMSCPPSLVYNHCEHGCPRHCDGNVSSCGDHPSEG CFCPPDKVMLEGSCVPEEACTQCIGEDGVQHGFLEAWVPDHPQPCQI CTCLSGRKVNCTTQPCPTAKAPTCLGCEVARLRQADQCCPEYECV CDPVSCDLPVPVPHCERGLQPTLTNPGECPNFTCACRKEECKRVSP PSCPPHRLPTLRKTQCCDEYECACNCVNSTVSCPLGYLASTATNDC GCTTTTCLPDKVCVHRSTIYPVGQFWEEGCDVCTCTDMEDAVMGLR VAQCSQKPCEDSCRSGFYVVLHEGECCGRCLPSACEVVTGSPRGD SQSSWKSQVGSQWASPENPCLINECVRVKEEVFIQGRNVSCPQLEV VTCPSGFQLSCKTSACCPSRCERMEACMLNGTVIGPGKTVMIDVC PTCRCMVQVGVISGFKLECRKTTCNPCLPGYKEENNTGECCGRCLP TACTIQLRGGQIMTLKRDETLQDGCDFHCKVNERGEYFWEKRVTG CPPFDEHKCLAEGGKIMKIPGTCCDTCEEPECNDITARLQYVKVGS KSEVEVDIHYCQGGKASKAMYSIDINDVQDQCSCCSPTREPMQVA LHCTNGSVVYHEVLNAMECKCSPRKCSK	422

10

20

30

40

【0220】

いくつかの実施形態では、表 8 又は 9 のいずれかからの抗体又は標的タンパク質の発現を改善するために、エンハンサータンパク質（例えば L タンパク質）と配列番号 191～216 のポリヌクレオチドのセットとの共発現を使用してもよく、標的タンパク質はアダリマブの代わりに発現される。

【0221】

いくつかの実施形態では、表 8 又は 9 のいずれかからの抗体又は標的タンパク質の発現を改善するために、エンハンサータンパク質（例えば L タンパク質）と配列番号 243～272 のポリヌクレオチドのセット（AAV ベクター）との共発現を使用してもよく、標

50

的タンパク質はアダリムマブの代わりに発現される。

【0222】

例示的な実施形態

実施形態 I

実施形態 I-1. 真核細胞における標的タンパク質の組換え発現のための系であって、1つ以上のベクターを含み、1つ以上のベクターが、

a) 標的タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド；及び

b) エンハンサータンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドを含んでおり、

i) エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送 (NCT) の阻害剤であり、及び／又は、

ii) エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質、ピコルナウイルス 2A プロテアーゼ、ライノウイルス 3C プロテアーゼ、単純ヘルペスウイルス (HSV) ICP27 タンパク質、及びラウドウィルスマトリックス (M) タンパク質からなる群から選択され、

第1のポリヌクレオチド及び第2のポリヌクレオチドは、1つ以上のプロモーターに作動可能に連結されている、系。

【0223】

実施形態 I-2. エンハンサータンパク質が、核細胞質輸送 (NCT) の阻害剤である、実施形態 I-1 に記載の系。

【0224】

実施形態 I-3. NCT 阻害剤が、ウイルスタンパク質である、実施形態 I-2 に記載の系。

【0225】

実施形態 I-4. NCT 阻害剤が、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質、ピコルナウイルス 2A プロテアーゼ、ライノウイルス 3C プロテアーゼ、コロナウイルス ORF6 タンパク質、エボラウイルス VP24 タンパク質、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) カプシドタンパク質、単純ヘルペスウイルス (HSV) ICP27 タンパク質、及びラウドウィルスマトリックス (M) タンパク質からなる群から選択される、実施形態 I-1 ~ I-3 のいずれか 1 つに記載の系。

【0226】

実施形態 I-5. NCT 阻害剤が、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質又はその機能的変異体である、実施形態 I-4 に記載の系。

【0227】

実施形態 I-6. NCT 阻害剤が、ピコルナウイルス 2A プロテアーゼ又はその機能的変異体である、実施形態 I-4 に記載の系。

【0228】

実施形態 I-7. NCT 阻害剤が、ライノウイルス 3C プロテアーゼ又はその機能的変異体である、実施形態 I-4 に記載の系。

【0229】

実施形態 I-8. NCT 阻害剤が、コロナウイルス ORF6 タンパク質又はその機能的変異体である、実施形態 I-4 に記載の系。

【0230】

実施形態 I-9. NCT 阻害剤が、エボラウイルス VP24 タンパク質又はその機能的変異体である、実施形態 I-4 に記載の系。

【0231】

実施形態 I-10. NCT 阻害剤が、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) カプシドタンパク質又はその機能的変異体である、実施形態 I-4 に記載の系。

【0232】

実施形態 I-11. NCT 阻害剤が、単純ヘルペスウイルス (HSV) ICP27 タンパク質又はその機能的変異体である、実施形態 I-4 に記載の系。

10

20

30

40

50

【0233】

実施形態Ⅰ－12．NCT阻害剤が、ラブドウイルスマトリックス（M）タンパク質又はその機能的変異体である、実施形態Ⅰ－4に記載の系。

【0234】

実施形態Ⅰ－13．Lタンパク質が、タイラーウイルスのLタンパク質又はその機能的変異体である、実施形態Ⅰ－5に記載の系。

【0235】

実施形態Ⅰ－14．Lタンパク質が、配列番号1と少なくとも90%の同一性を共有する、実施形態Ⅰ－5に記載の系。

【0236】

実施形態Ⅰ－15．Lタンパク質が、脳心筋炎ウイルス（EMCV）のLタンパク質又はその機能的変異体である、実施形態Ⅰ－5に記載の系。

【0237】

実施形態Ⅰ－16．Lタンパク質が、配列番号2と少なくとも90%の同一性を共有する、実施形態Ⅰ－5に記載の系。

【0238】

実施形態Ⅰ－17．Lタンパク質が、ポリオウイルスのLタンパク質、HRV16のLタンパク質、メンゴウイルスのLタンパク質、及びSaffoldウイルス2のLタンパク質又はそれらの機能的変異体からなる群から選択される、実施形態Ⅰ－5に記載の系。

【0239】

実施形態Ⅰ－18．系が発現カセットを含む単一のベクターを含み、発現カセット第1のポリヌクレオチド及び第2のポリヌクレオチドを含む、実施形態Ⅰ－1～Ⅰ－17のいずれか1つに記載の系。

【0240】

実施形態Ⅰ－19．発現カセットが、第1のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第1のプロモーター；及び第2のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第2のプロモーターを含む、実施形態Ⅰ－18に記載の系。

【0241】

実施形態Ⅰ－20．発現カセットが、第1のポリヌクレオチド及び第2のポリヌクレオチドの両方に作動可能に連結された共有プロモーターを含む、実施形態Ⅰ－18に記載の系。

【0242】

実施形態Ⅰ－21．発現カセットが、リボソームスキッピング部位をコードするポリヌクレオチドによって連結された第1のポリヌクレオチド及び第2のポリヌクレオチドを含むコードポリヌクレオチドを含み、コードポリヌクレオチドが、共有プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態Ⅰ－20に記載の系。

【0243】

実施形態Ⅰ－22．発現カセットがコードポリヌクレオチドを含み、コードポリヌクレオチドがリボソームスキッピング部位によって連結されたエンハンサータンパク質及び標的タンパク質をコードし、コードポリヌクレオチドが共有プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態Ⅰ－20に記載の系。

【0244】

実施形態Ⅰ－23．実施形態Ⅰ－18～Ⅰ－22のいずれか1つに記載の系であって、発現カセットが、リボソームスキッピング部位によって連結された、標的タンパク質及びエンハンサータンパク質の両方をコードする単一のメッセンジャーRNAの転写のために構成されており、メッセンジャーRNAの翻訳は、別個のポリペプチドとしての標的タンパク質及びLタンパク質の発現を生じさせる、系。

【0245】

実施形態Ⅰ－24．1つのベクターを含む、実施形態Ⅰ－1～Ⅰ－23のいずれか1つに記載の系。

10

20

30

40

50

【0246】

実施形態 I-25. 実施形態 I-1~I-17 のいずれか 1 つに記載の系であって、

- a) 第 1 のプロモーターに作動可能に連結された、第 1 のポリヌクレオチドを含む第 1 のベクター；及び
- b) 第 2 のプロモーターに作動可能に連結された、第 2 のポリヌクレオチドを含む第 2 のベクターを含む、系。

【0247】

実施形態 I-26. 2 つのベクターを含む、実施形態 I-1~I-17 又は実施形態 I-25 のいずれか 1 つに記載の系。

【0248】

実施形態 I-27. 第 1 のポリヌクレオチド若しくは第 2 のポリヌクレオチドのいずれか、又は両方が、内部リボソーム進入部位 (IRES) に作動可能に連結されている、実施形態 I-1~I-26 のいずれか 1 つに記載の系。

【0249】

実施形態 I-28. 1 つ以上のベクターのうちの少なくとも 1 つが、T7 RNA ポリメラーゼによる第 1 のポリヌクレオチド又は第 2 のポリヌクレオチドのいずれか又は両方の転写のために構成された T7 プロモーターを含む、実施形態 I-1~I-27 のいずれか 1 つに記載の系。

【0250】

実施形態 I-29. 1 つ以上のベクターのうちの少なくとも 1 つが、T7 RNA ポリメラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む、実施形態 I-1~I-28 のいずれか 1 つに記載の系。

【0251】

実施形態 I-30. 真核細胞における標的タンパク質の組換え発現のためのベクターであって、

- a) 標的タンパク質をコードする第 1 のポリヌクレオチド；及び
 - b) エンハンサータンパク質をコードする第 2 のポリヌクレオチドを含んでおり、
 - i) エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送 (NCT) の阻害剤であり、及び／又は、
 - ii) エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質、ピコルナウイルス 2A プロテアーゼ、ライノウイルス 3C プロテアーゼ、コロナウイルス ORF6 タンパク質、エボラウイルス VP24 タンパク質、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) カプシドタンパク質、単純ヘルペスウイルス (HSV) ICP27 タンパク質、及びラブドウイルスマトリックス (M) タンパク質からなる群から選択され、
- 第 1 のポリヌクレオチド及び第 2 のポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つのプロモーターに作動可能に連結されている、ベクター。

【0252】

実施形態 I-31. 発現カセットが、第 1 のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第 1 のプロモーター；及び第 2 のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第 2 のプロモーターを含む、実施形態 I-30 に記載のベクター。

【0253】

実施形態 I-32. 発現カセットが、第 1 のポリヌクレオチド及び第 2 のポリヌクレオチドの両方に作動可能に連結された共有プロモーターを含む、実施形態 I-30 に記載のベクター。

【0254】

実施形態 I-32. 1 配列番号 100 に対して少なくとも 80% の同一性を有する核酸配列を含む、実施形態 I-30 に記載のベクター。

【0255】

実施形態 I-32. 2 配列番号 132 をコードするポリヌクレオチド及び／又は配列番号 133 をコードするポリヌクレオチドを含む、実施形態 I-30 に記載のベクター。

10

20

30

40

50

【0256】

実施形態Ⅰ-32. 3配列番号134の核酸配列を含むポリヌクレオチド及び／又は配列番号135をコードするポリヌクレオチドを含む、実施形態Ⅰ-30に記載のベクター。

【0257】

実施形態Ⅰ-33. エンハンサータンパク質をコードする外因性ポリヌクレオチドを含む、標的タンパク質の発現のための真核細胞であって

a) エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送 (NCT) の阻害剤であり、及び／又は

b) エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質、ピコルナウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス3Cプロテアーゼ、コロナウイルスORF6タンパク質、エボラウイルスVP24タンパク質、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) カプシドタンパク質、単純ヘルペスウイルス (HSV) ICP27タンパク質、及びラブドウイルスマトリックス (M) タンパク質からなる群から選択され、

外因性ポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結されている、真核細胞。

【0258】

実施形態Ⅰ-34. ポリヌクレオチドが、内部リボソーム進入部位 (IRES) に作動可能に連結されている、実施形態Ⅰ-33に記載の細胞。

【0259】

実施形態Ⅰ-35. プロモーターが誘導性プロモーターである、実施形態Ⅰ-33又は実施形態Ⅰ-34に記載の細胞。

【0260】

実施形態Ⅰ-36. 標的タンパク質の組換え発現のための方法であって、プロモーターに作動可能に連結された、標的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、実施形態Ⅰ-33～Ⅰ-35のいずれか1つに記載の細胞に導入することを含む方法。

【0261】

実施形態Ⅰ-37. 標的タンパク質の組換え発現のための方法であって、実施形態Ⅰ-1～Ⅰ-29のいずれか1つに記載の系又は実施形態Ⅰ-30～Ⅰ-32のいずれか1つに記載のベクターを真核細胞に導入することを含む、方法。

【0262】

実施形態Ⅰ-38. 標的タンパク質が膜タンパク質である、実施形態Ⅰ-36又は実施形態Ⅰ-37に記載の方法。

【0263】

実施形態Ⅰ-39. 膜タンパク質の細胞膜への局在化が、膜タンパク質がエンハンサータンパク質なしで発現される場合に観察される局在化と比較して増加する、実施形態Ⅰ-38のいずれか1つに記載の方法。

【0264】

実施形態Ⅰ-40. 実施形態Ⅰ-1～Ⅰ-29のいずれか1つに記載の系又は実施形態Ⅰ-30～Ⅰ-32のいずれか1つに記載のベクターを真核細胞に導入することによって産生される細胞。

【0265】

実施形態Ⅰ-41. 実施形態Ⅰ-1～Ⅰ-29のいずれか1つに記載の系又は実施形態Ⅰ-30～Ⅰ-32のいずれか1つに記載のベクターを真核細胞に導入することによって発現される標的タンパク質。

【0266】

実施形態Ⅰ-42. 標的タンパク質をコードするポリヌクレオチド (プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチド) を真核細胞に導入することを含む、真核細胞において標的タンパク質を発現させるための方法であって、

方法は、標的タンパク質の発現レベル、可溶性及び／又は活性を増強するためにエンハンサータンパク質の共発現を利用し、

10

20

30

40

50

式中、

a) エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送 (NCT) の阻害剤であり、及び／又は

b) エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質、ピコルナウイルス 2A プロテアーゼ、ライノウイルス 3C プロテアーゼ、コロナウイルス ORF 6 タンパク質、エボラウイルス VP24 タンパク質、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) カプシドタンパク質、単純ヘルペスウイルス (HSV) ICP27 タンパク質、及びラブドウィルスマトリックス (M) タンパク質からなる群から選択される、方法。

【0267】

実施形態 I-43. エンハンサータンパク質の共発現が、プロモーターに作動可能に連結されたエンハンサータンパク質をコードするポリヌクレオチドを真核細胞に導入することを含む、実施形態 I-42 に記載の方法。

10

【0268】

実施形態 I-44. 1つ以上の導入工程が、1つ以上の DNA 分子による真核細胞のトランスフェクション、単一ウイルスベクターによる真核細胞の形質導入、及び／又は2つのウイルスベクターによる真核細胞の形質導入を含む、実施形態 I-42 又は実施形態 I-43 に記載の方法。

【0269】

実施形態 I-45. 標的タンパク質が可溶性タンパク質である、実施形態 I-1～I-29 のいずれか1つに記載のベクター系、実施形態 I-30～I-32 のいずれか1つに記載のベクター、実施形態 I-33～I-35 のいずれか1つに記載の細胞、又は実施形態 I-36～I-44 のいずれか1つに記載の方法。

20

【0270】

実施形態 I-46. 標的タンパク質が分泌タンパク質である、実施形態 I-1～I-29 のいずれか1つに記載のベクター系、実施形態 I-30～I-32 のいずれか1つに記載のベクター、実施形態 I-33～I-35 のいずれか1つに記載の細胞、又は実施形態 I-36～I-44 のいずれか1つに記載の方法。

【0271】

実施形態 I-47. 標的タンパク質が膜タンパク質である、実施形態 I-1～I-29 のいずれか1つに記載のベクター系、実施形態 I-30～I-32 のいずれか1つに記載のベクター、実施形態 I-33～I-35 のいずれか1つに記載の細胞、又は実施形態 I-36～I-44 のいずれか1つに記載の方法。

30

【0272】

実施形態 I-48. 標的タンパク質がドーパミン受容体 1 (DRD1) である、実施形態 I-1～I-29 のいずれか1つに記載のベクター系、実施形態 I-30～I-32 のいずれか1つに記載のベクター、実施形態 I-33～I-35 のいずれか1つに記載の細胞、又は実施形態 I-36～I-44 のいずれか1つに記載の方法。

【0273】

実施形態 I-49. 標的タンパク質が嚢胞性線維症膜貫通コンダクタンス制御因子 (CFTR) である、実施形態 I-1～I-29 のいずれか1つに記載のベクター系、実施形態 I-30～I-32 のいずれか1つに記載のベクター、実施形態 I-33～I-35 のいずれか1つに記載の細胞、又は実施形態 I-36～I-44 のいずれか1つに記載の方法。

40

【0274】

実施形態 I-50. 標的タンパク質が C1 エステラーゼ阻害剤 (C1-Inh) である、実施形態 I-1～I-29 のいずれか1つに記載のベクター系、実施形態 I-30～I-32 のいずれか1つに記載のベクター、実施形態 I-33～I-35 のいずれか1つに記載の細胞、又は実施形態 I-36～I-44 のいずれか1つに記載の方法。

【0275】

実施形態 I-51. 標的タンパク質が IL2 誘導性 T 細胞キナーゼ (ITK) である、

50

実施形態 I-1～I-29 のいずれか 1 つに記載のベクター系、実施形態 I-30～I-32 のいずれか 1 つに記載のベクター、実施形態 I-33～I-35 のいずれか 1 つに記載の細胞、又は実施形態 I-36～I-44 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0276】

実施形態 I-52 . 標的タンパク質が NADase である、実施形態 I-1～I-29 のいずれか 1 つに記載のベクター系、実施形態 I-30～I-32 のいずれか 1 つに記載のベクター、実施形態 I-33～I-35 のいずれか 1 つに記載の細胞、又は実施形態 I-36～I-44 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0277】

実施形態 I-53 . 標的タンパク質に対する抗体を作製するための方法であって、対象を、実施形態 I-33～I-35 のいずれか 1 つに記載の細胞、実施形態 I-40 に記載の細胞、又は実施形態 I-41 に記載の標的タンパク質で免疫化することを含む、方法。

10

【0278】

実施形態 I-54 . 標的タンパク質に特異的な免疫グロブリンタンパク質を発現する 1 つ以上の免疫細胞を単離することを更に含む、実施形態 I-53 に記載の方法。

【0279】

実施形態 I-55 . 1 つ以上の免疫細胞から 1 つ以上のハイブリドーマを生成することを含む、実施形態 I-53 又は実施形態 I-54 に記載の方法。

【0280】

実施形態 I-56 . 1 つ以上の免疫細胞から 1 つ以上の免疫グロブリン遺伝子をクローニングすることを含む、実施形態 I-53～I-55 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【0281】

実施形態 I-57 . 細胞選別による抗体発見のための方法であって、

a) 実施形態 I-33～I-35 のいずれか 1 つに記載の細胞、実施形態 I-40 に記載の細胞、又は実施形態 I-41 に記載の標的タンパク質であって、標識されている細胞又は標的タンパク質と、

b) 抗体又はその抗原結合断片を各々が含むポリペプチドのライブラリーを発現する組換え細胞の集団とを含む溶液を提供すること、及び

標識された細胞又は標識された標的タンパク質に結合した組換え細胞を選別することによって、溶液から 1 つ以上の組換え細胞を単離すること、を含む方法。

30

【0282】

実施形態 I-58 . ファージディスプレイライブラリーをパニングするための方法であって

a) ファージディスプレイライブラリーを、実施形態 I-33～I-35 のいずれか 1 つに記載の細胞、実施形態 I-40 に記載の細胞、又は実施形態 I-41 に記載の標的タンパク質と混合すること；及び

b) 細胞又は標的タンパク質に結合するファージディスプレイライブラリーのメンバーを精製及び／又は濃縮すること、を含む方法。

【0283】

実施形態 I-59 . 標的タンパク質を、それを必要とする対象において発現させる方法であって、1 つ以上のベクターを含むベクター系を対象に投与することを含み、1 つ以上のベクターが、

40

a) 標的タンパク質をコードする第 1 のポリヌクレオチド；及び

b) エンハンサータンパク質をコードする第 2 のポリヌクレオチドを含んでおり、

i) エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送 (NCT) の阻害剤であり、及び／又は、

ii) エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質、ピコルナウイルス 2A プロテアーゼ、ライノウイルス 3C プロテアーゼ、単純ヘルペスウイルス (HSV) ICP27 タンパク質、及びラウドウィルスマトリックス (M) タンパク質からなる群から選択され、

50

第 1 のポリヌクレオチド及び第 2 のポリヌクレオチドは、1 つ以上のプロモーターに作動可能に連結されている、方法。

【0284】

実施形態 I-60. エンハンサータンパク質が、核細胞質輸送 (NCT) の阻害剤である、実施形態 I-59 に記載の方法。

【0285】

実施形態 I-61. NCT 阻害剤が、ウイルスタンパク質である、実施形態 I-60 に記載の方法。

【0286】

実施形態 I-62. NCT 阻害剤が、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質、ピコルナウイルス 2A プロテアーゼ、ライノウイルス 3C プロテアーゼ、コロナウイルス ORF6 タンパク質、エボラウイルス VP24 タンパク質、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) カプシドタンパク質、単純ヘルペスウイルス (HSV) ICP27 タンパク質、及びラウドウイルスマトリックス (M) タンパク質からなる群から選択される、実施形態 I-59~61 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0287】

実施形態 I-63. NCT 阻害剤が、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質又はその機能的変異体である、実施形態 I-62 に記載の方法。

【0288】

実施形態 I-64. NCT 阻害剤が、ピコルナウイルス 2A プロテアーゼ又はその機能的変異体である、実施形態 I-62 に記載の方法。

20

【0289】

実施形態 I-65. NCT 阻害剤が、ライノウイルス 3C プロテアーゼ又はその機能的変異体である、実施形態 I-62 に記載の方法。

【0290】

実施形態 I-66. NCT 阻害剤が、コロナウイルス ORF6 タンパク質又はその機能的変異体である、実施形態 I-62 に記載の方法。

【0291】

実施形態 I-67. NCT 阻害剤が、エボラウイルス VP24 タンパク質又はその機能的変異体である、実施形態 I-62 に記載の方法。

30

【0292】

実施形態 I-68. NCT 阻害剤が、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) カプシドタンパク質又はその機能的変異体である、実施形態 I-62 に記載の方法。

【0293】

実施形態 I-69. NCT 阻害剤が、単純ヘルペスウイルス (HSV) ICP27 タンパク質又はその機能的変異体である、実施形態 I-62 に記載の方法。

【0294】

実施形態 I-70. NCT 阻害剤が、ラウドウイルスマトリックス (M) タンパク質又はその機能的変異体である、実施形態 I-62 に記載の方法。

【0295】

実施形態 I-71. L タンパク質が、タイラーウイルスの L タンパク質又はその機能的変異体である、実施形態 I-63 に記載の方法。

40

【0296】

実施形態 I-72. L タンパク質が、配列番号 1 と少なくとも 90% の同一性を共有する、実施形態 I-63 に記載の方法。

【0297】

実施形態 I-73. L タンパク質が、脳心筋炎ウイルス (EMCV) の L タンパク質又はその機能的変異体である、実施形態 I-63 に記載の方法。

【0298】

実施形態 I-74. L タンパク質が、配列番号 2 と少なくとも 90% の同一性を共有す

50

る、実施形態 I-63 に記載の方法。

【0299】

実施形態 I-75. L タンパク質が、ポリオウイルスの L タンパク質、HRV16 の L タンパク質、メンゴウイルスの L タンパク質、及び Saffold ウイルス 2 の L タンパク質又はそれらの機能的変異体からなる群から選択される、実施形態 I-63 に記載の方法。

【0300】

実施形態 I-76. 系が発現カセットを含む単一のベクターを含み、発現カセット第 1 のポリヌクレオチド及び第 2 のポリヌクレオチドを含む、実施形態 I-59~75 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0301】

実施形態 I-77. 発現カセットが、第 1 のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第 1 のプロモーター；及び第 2 のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第 2 のプロモーターを含む、実施形態 I-76 に記載の方法。

【0302】

実施形態 I-78. 発現カセットが、第 1 のポリヌクレオチド及び第 2 のポリヌクレオチドの両方に作動可能に連結された共有プロモーターを含む、実施形態 I-76 に記載の方法。

【0303】

実施形態 I-79. 発現カセットが、リボソームスキッピング部位をコードするポリヌクレオチドによって連結された第 1 のポリヌクレオチド及び第 2 のポリヌクレオチドを含むコードポリヌクレオチドを含み、コードポリヌクレオチドが、共有プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態 I-78 に記載の方法。

【0304】

実施形態 I-80. 発現カセットがコードポリヌクレオチドを含み、コードポリヌクレオチドがリボソームスキッピング部位によって連結されたエンハンサータンパク質及び標的タンパク質をコードし、コードポリヌクレオチドが共有プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態 I-78 に記載の方法。

【0305】

実施形態 I-81. 実施形態 I-76~I-80 のいずれか 1 つに記載の方法であって、発現カセットが、リボソームスキッピング部位によって連結された、標的タンパク質及びエンハンサータンパク質の両方をコードする単一のメッセンジャー RNA の転写のために構成されており、メッセンジャー RNA の翻訳は、別個のポリペプチドとしての標的タンパク質及び L タンパク質の発現を生じさせる、方法。

【0306】

実施形態 I-82. 系が 1 つのベクターを含む、実施形態 I-59~I-75 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0307】

実施形態 I-83. 実施形態 I-59~I-75 のいずれか 1 つに記載の方法であって、系が、

- a) 第 1 のプロモーターに作動可能に連結された、第 1 のポリヌクレオチドを含む第 1 のベクター；及び
- b) 第 2 のプロモーターに作動可能に連結された、第 2 のポリヌクレオチドを含む第 2 のベクターを含む、方法。

【0308】

実施形態 I-84. 系が 2 つのベクターを含む、実施形態 I-59~I-75 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0309】

実施形態 I-85. 第 1 のポリヌクレオチド若しくは第 2 のポリヌクレオチドのいずれか、又は両方が、内部リボソーム進入部位 (IRES) に作動可能に連結されている、実

10

20

30

40

50

施形態 I-59~I-84 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0310】

実施形態 I-86. 1 つ以上のベクターのうちの少なくとも 1 つが、T7 RNA ポリメラーゼによる第 1 のポリヌクレオチド又は第 2 のポリヌクレオチドのいずれか又は両方の転写のために構成された T7 プロモーターを含む、実施形態 I-59~I-85 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0311】

実施形態 I-87. 1 つ以上のベクターのうちの少なくとも 1 つが、T7 RNA ポリメラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む、実施形態 I-59~I-86 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0312】

実施形態 I-88. 標的タンパク質を、それを必要とする対象において発現させる方法であって、ベクターを対象に投与することを含み、ベクターが、

a) 標的タンパク質をコードする第 1 のポリヌクレオチド；及び

b) エンハンサータンパク質をコードする第 2 のポリヌクレオチドを含んでおり、

i) エンハンサータンパク質は、核細胞質輸送 (NCT) の阻害剤であり、及び／又は、

ii) エンハンサータンパク質は、ピコルナウイルスリーダー (L) タンパク質、ピコルナウイルス 2A プロテアーゼ、ライノウイルス 3C プロテアーゼ、コロナウイルス ORF6 タンパク質、エボラウイルス VP24 タンパク質、ベネズエラマ脳炎ウイルス (VEEV) カプシドタンパク質、単純ヘルペスウイルス (HSV) ICP27 タンパク質、及びラブドウイルスマトリックス (M) タンパク質からなる群から選択され、

第 1 のポリヌクレオチド及び第 2 のポリヌクレオチドは、少なくとも 1 つのプロモーターに作動可能に連結されている、方法。

【0313】

実施形態 I-89. 発現カセットが、第 1 のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第 1 のプロモーター；及び第 2 のポリヌクレオチドに作動可能に連結された第 2 のプロモーターを含む、実施形態 I-88 に記載の方法。

【0314】

実施形態 I-90. 発現カセットが、第 1 のポリヌクレオチド及び第 2 のポリヌクレオチドの両方に作動可能に連結された共有プロモーターを含む、実施形態 I-88 に記載の方法。

【0315】

実施形態 I-91. 標的タンパク質が治療用タンパク質である、実施形態 I-59~I-90 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0316】

実施形態 I-92. 標的タンパク質が免疫原性タンパク質である、実施形態 I-59~I-91 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0317】

実施形態 I-93. 標的タンパク質が、抗体、ナノボディ、受容体、二重特異性 T 細胞エンゲージャー (BiTE)、増殖因子、ホルモン、酵素、免疫調節タンパク質、抗原、構造タンパク質、血液タンパク質、抗菌性ポリペプチド、抗ウイルス性ポリペプチド、腫瘍抑制因子、転写因子、又は翻訳因子である、実施形態 I-59~I-92 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0318】

実施形態 I-94. 標的タンパク質が抗体である、実施形態 I-93 の方法。

【0319】

実施形態 I-95. 標的タンパク質が血液タンパク質である、実施形態 I-93 に記載の方法。

【0320】

10

20

30

40

50

実施形態Ⅰ－９６．対象において免疫応答を誘発する、実施形態Ⅰ－５９～９５のいずれか１つに記載の方法。

【０３２１】

実施形態Ⅰ－９７．対象における疾患を処置する方法であって、疾患が、標的タンパク質によって引き起こされるか、標的タンパク質と相関するか、又は標的タンパク質に関連する、実施形態Ⅰ－５９～９６のいずれか１つに記載の方法。

【０３２２】

実施形態Ⅰ－９８．対象における疾患を処置する方法であって、対象における標的タンパク質の発現レベルが、疾患を有さない対照対象における標的タンパク質の発現レベルよりも低い、実施形態Ⅰ－９７に記載の方法。

【０３２３】

実施形態Ⅰ－９９．標的タンパク質が、アブシキシマブ、アレムツズマブ、アリロクマブ、アミバンタマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、バシリキシマブ、ベリムマブ、ベンラリズマブ、ベバシズマブ、ベズロトクスマブ、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブ・ベドチン、プロダルマブ、プロルシズマブ、プロスマブ、カナキヌマブ、カブラシズマブ、カプロマブ、カツマキソマブ、セミピリマブ、セルトリズマブ・ペゴル、セツキシマブ、クリザンリズマブ、ダクリズマブ、ダラツムマブ、デノスマブ、ディヌツキシマブ、デュピルマブ、デュルバルマブ、エクリズマブ、エロツズマブ、エマパルマブ、エミシズマブ、エンフォルツマブ・ベドチン、エプチニズマブ、エレヌマブ、エルツマクソマブ、エタラシズマブ、エボロクマブ、フレマネズマブ、ガルカネズマブ、ゲムツズマブ・オゾガマイシン、ゴリムマブ、グセルクマブ、イバリズマブ、イブリツモマブ・チウキセタン、イダルシズマブ、イムシロマブ、インフリキシマブ、イノツズマブ・オゾガマイシン、イピリムマブ、イサツキシマブ、イトリズマブ、イクセキズマブ、ラナデルマブ、ロキベツマブ、メボリズマブ、モガムリズマブ、モキセツモマブ・パストトックス、ナタリズマブ、ネシツムマブ、ニモツズマブ、ニボルマブ、オビルトキサキシマブ、オビヌツズマブ、オクレリズマブ、オフアツムマブ、オララツマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ペンブロリズマブ、ベルツズマブ、ボラツズマブ・ベドチン、ラコツモマブ、ラムシルマブ、ラニビズマブ、ラキシバクマブ、ラブリズマブ、レスリズマブ、リサンキズマブ、リツキシマブ、Rmab、ロモソズマブ、ロベリズマブ、ルブリズマブ、サシツズマブ・ゴビテカン、サリルマブ、セクキヌマブ、シルトキシマブ、タルケタマブ、テクリスタマブ、テプロツムマブ、チルドラキズマブ、トシリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、トラスツズマブ・デュオカルマジン、トラスツズマブ・エムタンシン、ウステキヌマブ、及びベドリズマブ、ブリナツモマブ、エミシズマブ、ソリトマブ、アドネクチン、アンチカリン、アビマー、フィノマー、クニッツドメイン、ノッチン、アフィボディ、DARPin、血栓溶解薬、トランスフェリン、t-PA、ヒルジン、C1エステラーゼ阻害剤、抗トロンビン薬、血漿カリクレイン阻害薬、プラスミン、プロトロンビン複合体、補体成分、プレアルブミン（トランスサイレチン）、 $\alpha 1$ アンチトリプシン、 $\alpha 1$ -酸性糖タンパク質、 $\alpha 1$ -フェトプロテイン、 $\alpha 2$ -マクログロブリン、 γ グロブリン、 $\beta 2$ ミクログロブリン、ハプトグロビン、セルロプラスミン、補体成分3、補体成分4、C反応性タンパク質（CRP）、リポタンパク質（カイロミクロン、VLDL、LDL、HDL）、トランスフェリン、プロトロンビン、マンノース結合レクチン（MBL）、アルブミン、グロブリン、フィブリノゲン、調節因子、及び凝固因子、例えば第Ⅰ因子、第ⅠⅠ因子、第ⅠⅠⅠ因子、第ⅠⅤ因子、第Ⅴ因子、第ⅤⅠ因子、第ⅤⅠⅠ因子、第ⅠⅩ因子、第Ⅹ因子、第ⅩⅠ因子、第ⅩⅠⅠ因子、第ⅩⅠⅠⅠ因子、フォン・ウィルバンド因子、プレカリクレイン、フィッツジェラルド因子、フィブロネクチン、抗トロンビンⅠⅠⅠ、ヘパリン補酵素ⅠⅠ、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、プロテインZ関連プロテアーゼ阻害剤、プラスミノーゲン、 $\alpha 2$ -アンチプラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子、ウロキナーゼ、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤1、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤2、癌凝血原、EPO、IGF-1、G-CSF、GM-CSF、BMP-2、BMP-7、KGF、PDGF-BB、TMP、アドレノメデュリン（AM）、アン

10

20

30

40

50

ジオボエチン (Ang)、自己分泌運動因子、骨形成タンパク質 (BMP)、毛様体神経栄養因子ファミリー、毛様体神経栄養因子 (CNTF)、白血病抑制因子 (LIF)、インターロイキン-6 (IL-6)、コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、上皮増殖因子 (EGF)、エフリン-エフリンA1、エフリンA2、エフリンA3、エフリンA4、エフリンA5、エフリンB1、エフリンB2、エフリンB3、エリスロポエチン (EPO)、各線維芽細胞増殖因子 (FGF) 1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、ウシ胎児性ソマトトロフィン (FBS)、GDNFリガンドファミリー、グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF)、ノイトリン、ペルセフィン、アルテミン、成長分化因子-9 (GDF9)、肝細胞増殖因子 (HGF)、肝腫由来増殖因子 (HDGF)、インスリン、インスリン様増殖因子、インスリン様増殖因子-1 (IGF-1)、インスリン様増殖因子-2 (IGF-2)、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、ケラチノサイト増殖因子 (KGF)、遊走刺激因子 (MSF)、マクロファージ刺激タンパク質 (MSP)、肝細胞増殖因子様タンパク質 (HGF-LP) としても知られる、ミオスタチン (GDF-8)、ニューレグリン1 (NRG1)、ニューレグリン2 (NRG2)、ニューレグリン3 (NRG3)、ニューレグリン4 (NRG4)、ニューロトロフィン、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、神経増殖因子 (NGF)、ニューロトロフィン-3 (NT-3)、ニューロトロフィン-4 (NT-4)、胎盤増殖因子 (PGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF)、レナラーゼ (RNLs)、T細胞増殖因子 (TCGF)、トロンプオエチン (TPO)、トランスフォーミング増殖因子 α (TGF- α)、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、Wntシグナル伝達経路、グルカゴン様ペプチド-1、インスリン、ヒト成長ホルモン、卵胞刺激ホルモン、カルシトニン、ルトロピン、グルカゴン様ペプチド-2、レプチン、副甲状腺ホルモン、絨毛性ゴナドトロピン、甲状腺刺激ホルモン、及びグルカゴン、 α -グリコシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、イデュロン酸-2-硫酸、 α -ガラクトシダーゼ、尿酸オキシダーゼ、N-アセチルガラクトシダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、ヒアルロニダーゼ、DNAse、アスパラギナーゼ、ウリカーゼ、アデノシンデアミナーゼ及びその他のエンテロキナーゼ、シクラーゼ、カスパーゼ、カテプシン、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ及びリガーゼ、アガルシダーゼ β 、アガルシダーゼ α 、イミグルセララーゼ、タリグルセララーゼ α 、ベラグルセララーゼ α 、アルグルセララーゼ、セベリパーゼ α 、ラロニダーゼ、イデュルスルファーゼ、エロスルファーゼ α 、ガルスルファーゼ、アルグルコシダーゼ α 、C3阻害剤、ハーラー及びハンター補正因子、イオンチャネル、ギャップ結合、イオン性受容体、トランスポーター、細胞表面受容体、シグナル伝達タンパク質、ドーパミン受容体1 (DRD1)、囊胞性線維症膜貫通コンダクタンス制御因子 (CFTR)、C1エステラーゼ阻害剤 (C1-Inh)、IL2誘導性T細胞キナーゼ (ITK)、及びNADaseからなる群から選択される、実施形態I-59~I-98のいずれか1つに記載の方法。

10

20

30

40

【0324】

実施形態I-100. 標的タンパク質が抗体である、実施形態I-1~29のいずれか1つに記載の系、実施形態I-30~32のいずれか1つに記載のベクター、実施形態I-33~35のいずれか1つに記載の真核細胞、実施形態I-36~39のいずれか1つに記載の方法、実施形態I-40に記載の細胞、実施形態I-41に記載の標的タンパク質、実施形態I-42~44のいずれか1つに記載の方法、実施形態I-45~52のいずれか1つに記載のベクター系、実施形態I-53~93及び96~98のいずれか1つに記載の方法。

【0325】

50

実施形態Ⅰ－１０１．標的タンパク質がアダリムマブである、実施形態Ⅰ－１～２９のいずれか１つに記載の系、実施形態Ⅰ－３０～３２のいずれか１つに記載のベクター、実施形態Ⅰ－３３～３５のいずれか１つに記載の真核細胞、実施形態Ⅰ－３６～３９のいずれか１つに記載の方法、実施形態Ⅰ－４０に記載の細胞、実施形態Ⅰ－４１に記載の標的タンパク質、実施形態Ⅰ－４２～４４のいずれか１つに記載の方法、実施形態Ⅰ－４５～５２のいずれか１つに記載のベクター系、実施形態Ⅰ－５３～９３及び９６～９８のいずれか１つに記載の方法。

【０３２６】

実施形態Ⅰ－１０２．アダリムマブの重鎖が、配列番号１３２のアミノ酸配列を有する、実施形態Ⅰ－１０１に記載の系、ベクター、ベクター系、真核細胞、方法、細胞、又は標的タンパク質。

10

【０３２７】

実施形態Ⅰ－１０３．アダリムマブの軽鎖が、配列番号１３３のアミノ酸配列を有する、実施形態Ⅰ－１０１又は１０２に記載の系、ベクター、ベクター系、真核細胞、方法、細胞、又は標的タンパク質。

【０３２８】

実施形態Ⅰ－１０４．アダリムマブの重鎖が、配列番号１３４の核酸配列によってコードされる、実施形態Ⅰ－１０１～１０３のいずれか１つに記載の系、ベクター、ベクター系、真核細胞、方法、細胞、又は標的タンパク質。

【０３２９】

20

実施形態Ⅰ－１０５．アダリムマブの軽鎖が、配列番号１３５の核酸配列によってコードされる、実施形態Ⅰ－１０１～１０４のいずれか１つに記載の系、ベクター、ベクター系、真核細胞、方法、細胞、又は標的タンパク質。

【０３３０】

実施形態Ⅰ－１０６．エンハンサータンパク質が、標的タンパク質の活性を増加させる、実施形態Ⅰ－８８～９９のいずれか１つに記載の方法。

【０３３１】

実施形態Ⅰ－１０７．エンハンサータンパク質が、標的タンパク質の発現レベルを低下させる、実施形態Ⅰ－８８～９９及び１０６のいずれか１つに記載の方法。

【０３３２】

30

実施形態Ⅰ－１０８．エンハンサータンパク質が、インビボでの標的タンパク質の発現の均一性を増加させる、実施形態Ⅰ－８８～９９及び１０６～１０７のいずれか１つに記載の方法。

【０３３３】

実施形態Ⅰ－１０９．エンハンサータンパク質が、細胞又は生物における活性標的タンパク質の持続時間を増加させる、実施形態Ⅰ－８８～９９及び１０６～１０７のいずれか１つに記載の方法。

【０３３４】

実施形態Ⅰ－１１０．実施形態Ⅰ－３０～３２のいずれか１つに記載のベクターと、１つ以上の脂質とを含む、脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）。

40

【０３３５】

実施形態Ⅰ－１１１．リーダータンパク質及びアダリムマブタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【０３３６】

実施形態Ⅰ－１１２．配列番号１～６及び２４からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、若しくは少なくとも９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するリーダータンパク質をコードする、実施形態Ⅰ－１１１のポリヌクレオチド。

【０３３７】

50

実施形態 I-113. ポリヌクレオチドが、配列番号 124 のアダリムマブ可変重鎖配列、又はそれに対して少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、若しくは少なくとも 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び配列番号 129 のアダリムマブ可変軽鎖配列、又はそれに対して少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、若しくは少なくとも 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、実施形態 I-111 又は 112 に記載のポリヌクレオチド配列。

【0338】

10

実施形態 I-114. リーダータンパク質及びアダリムマブタンパク質の共発現が、細胞又は対象におけるアダリムマブタンパク質の発現レベルを、約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、又は約 90% 減少させる、実施形態 I-111～113 のいずれか 1 つに記載のポリヌクレオチド。

【0339】

実施形態 I-120. 配列番号 191～216 のセットの配列又は配列番号 217～242 のセットの配列を含む、実施形態 I-111 に記載のポリヌクレオチド。

【0340】

実施形態 I-121. 実施形態 I-111 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【0341】

20

実施形態 I-122. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、実施形態 I-121 に記載のベクター。

【0342】

実施形態 I-123. 実施形態 I-121 に記載のトランスファープラスミドと、アデノウイルス遺伝子 E4、E2A、VA、及び AAV の Cap タンパク質をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドとを含む系。

【0343】

実施形態 I-124. 実施形態 I-120 に記載のベクターを含む脂質ナノ粒子 (LNP)。

【0344】

30

実施形態 I-125. LNP が、LNP が、PEG 化脂質、コレステロール、及び 1 つ以上のイオン化可能脂質を含む、実施形態 I-123 に記載の LNP。

【0345】

実施形態 I-126. LNP が、約 0.5%～約 2% の PEG 化脂質、約 35%～約 45% のコレステロール、及び約 5%～約 65% の 1 つ以上のイオン化可能脂質を含む、実施形態 I-123 に記載の LNP。

【0346】

実施形態 I-127. LNP が、約 1% の DMG-PEG (2000) 対約 40% のコレステロール対約 10% の DOPC 及び約 50% の DLin-KC2-DMA の比で、DMG-PEG (2000)、コレステロール、DOPC 及び DLin-KC2-DMA を含む、実施形態 I-123 に記載の LNP。

40

【0347】

実施形態 I-128. 処置を必要とする対象の処置方法であって、実施形態 I-122 に記載の系及び／又は実施形態 I-123～126 のいずれか 1 つに記載の LNP を送達することを含む、方法。

【0348】

実施形態 I-129. 系が筋肉内又は皮下に送達される、実施形態 I-127 に記載の方法。

【0349】

実施形態 I-130. リーダータンパク質及びグルコシルセラミダーゼ (GBA) タン

50

パク質をコードするポリヌクレオチド。

【0350】

実施形態Ⅰ-131．配列番号1～6及び24からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するリーダータンパク質をコードする、実施形態Ⅰ-130のポリヌクレオチド。

【0351】

実施形態Ⅰ-132．ポリヌクレオチドが、配列番号406のGBAアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、実施形態Ⅰ-130又は131に記載のポリヌクレオチド。

10

【0352】

実施形態Ⅰ-139．実施形態Ⅰ-130に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【0353】

実施形態Ⅰ-140．アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである、実施形態Ⅰ-139に記載のベクター。

【0354】

実施形態Ⅰ-141．実施形態Ⅰ-140に記載のトランスファープラスミドと、アデノウイルス遺伝子E4、E2A、VA、及びAAVのCapタンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドとを含む系。

20

【0355】

実施形態Ⅰ-142．実施形態Ⅰ-139に記載のベクターを含む脂質ナノ粒子(LNP)。

【0356】

実施形態Ⅰ-143．LNPが、LNPが、PEG化脂質、コレステロール、及び1つ以上のイオン化可能脂質を含む、実施形態Ⅰ-142に記載のLNP。

【0357】

実施形態Ⅰ-144．LNPが、約0.5%～約2%のPEG化脂質、約35%～約45%のコレステロール、及び約5%～約65%の1つ以上のイオン化可能脂質を含む、実施形態Ⅰ-142に記載のLNP。

30

【0358】

実施形態Ⅰ-145．LNPが、約1%のDMG-PEG(2000)対約40%のコレステロール対約10%のDOPC及び約50%のDLin-KC2-DMAの比で、DMG-PEG(2000)、コレステロール、DOPC及びDLin-KC2-DMAを含む、実施形態Ⅰ-142に記載のLNP。

【0359】

実施形態Ⅰ-146．処置を必要とする対象の処置方法であって、実施形態Ⅰ-141に記載の系及び／又は実施形態Ⅰ-142～145のいずれか1つに記載のLNPを送達することを含む、方法。

40

【0360】

実施形態Ⅰ-147．系が筋肉内又は皮下に送達される、実施形態Ⅰ-146に記載の方法。

【0361】

実施形態Ⅰ-148．リーダータンパク質及び標的タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【0362】

実施形態Ⅰ-149．配列番号1～6及び24からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85

50

%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するリーダータンパク質をコードする、実施形態I-130のポリヌクレオチド。

【0363】

実施形態I-150. 配列番号124、129、374~405のいずれか、及び／又は配列番号406~422のいずれかの標的タンパク質アミノ酸配列、又はそれと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、実施形態I-130又は131に記載のポリヌクレオチド。

【0364】

実施形態I-157. 実施形態I-130に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【0365】

実施形態I-158. アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである、実施形態I-139に記載のベクター。

【0366】

実施形態I-159. 実施形態I-140に記載のトランスファープラスミドと、アデノウイルス遺伝子E4、E2A、VA、及びAAVのCapタンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドとを含む系。

【0367】

実施形態I-160. 実施形態I-139に記載のベクターを含む脂質ナノ粒子(LNP)。

【0368】

実施形態I-161. LNPが、LNPが、PEG化脂質、コレステロール、及び1つ以上のイオン化可能脂質を含む、実施形態I-142に記載のLNP。

【0369】

実施形態I-162. LNPが、約0.5%~約2%のPEG化脂質、約35%~約45%のコレステロール、及び約5%~約65%の1つ以上のイオン化可能脂質を含む、実施形態I-142に記載のLNP。

【0370】

実施形態I-163. LNPが、約1%のDMG-PEG(2000)対約40%のコレステロール対約10%のDOPC及び約50%のDLin-KC2-DMAの比で、DMG-PEG(2000)、コレステロール、DOPC及びDLin-KC2-DMAを含む、実施形態I-142に記載のLNP。

【0371】

実施形態I-164. 処置を必要とする対象の処置方法であって、実施形態I-141に記載の系及び／又は実施形態I-142~145のいずれか1つに記載のLNPを送達することを含む、方法。

【0372】

実施形態I-165. 系が筋肉内又は皮下に送達される、実施形態I-146に記載の方法。

【0373】

実施形態II

実施形態II-52. アダリムマブタンパク質を、それを必要とする対象において発現させる方法であって、1つ以上のベクターを含むベクター系を対象に投与することを含み、1つ以上のベクターが、

a) アダリムマブタンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド；及び

b) 配列番号1~6及び24からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも9

10

20

30

40

50

8 %、若しくは少なくとも99 %の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するピコルナウイルスリーダー（L）タンパク質をコードする第2のポリヌクレオチド；を含み、

アダリムマブタンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド及びLタンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドが、1つ以上のプロモーターに作動可能に連結されており、アダリムマブタンパク質及びLタンパク質が共発現される、方法。

【0374】

実施形態II-53. 第1のポリヌクレオチドが、配列番号124のアダリムマブ可変重鎖配列、又はそれに対して少なくとも70 %、少なくとも75 %、少なくとも80 %、少なくとも85 %、少なくとも90 %、少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、若しくは少なくとも99 %の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び配列番号129のアダリムマブ可変軽鎖配列、又はそれに対して少なくとも70 %、少なくとも75 %、少なくとも80 %、少なくとも85 %、少なくとも90 %、少なくとも95 %、少なくとも96 %、少なくとも97 %、少なくとも98 %、若しくは少なくとも99 %の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、任意の52に記載の方法。

10

【0375】

実施形態II-54. リーダータンパク質及びアダリムマブタンパク質の共発現が、細胞又は対象におけるアダリムマブタンパク質の発現レベルを、約10 %、約20 %、約30 %、約40 %、約50 %、約60 %、約70 %、約80 %、又は約90 %減少させる、実施形態II-52～II-53のいずれか1つに記載の方法。

20

【0376】

実施形態II-55. リーダータンパク質及びアダリムマブタンパク質の共発現が、対象の細胞又は対象におけるアダリムマブタンパク質の活性を、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍、約150倍、約200倍、又は約300倍増加させる、実施形態II-52～II-54のいずれか1つに記載の方法。

【0377】

実施形態II-56. リーダータンパク質及びアダリムマブタンパク質の共発現が、アダリムマブタンパク質が対象の細胞又は対象において見出される期間を、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10、約11倍、約12倍、約13倍、約14倍、約15倍、約16倍、約17倍、約18倍、約19倍、又は約20倍増加させる、実施形態II-52～II-55のいずれか1つに記載の方法。

30

【0378】

実施形態II-57. リーダータンパク質及びアダリムマブタンパク質の共発現が、対象の組織又は対象における標的タンパク質の変動係数（CV %）を約1.2倍、約1.3倍、約1.4倍、約1.5倍、約1.6倍、約1.7倍、約1.8倍、約1.9倍、約2倍、約2.1倍、約2.2倍、約2.3倍、約2.4倍、約2.5倍、約2.7倍、約2.8倍、約2.9倍、又は約3倍増加させる、実施形態II-52～II-56のいずれか1つに記載の方法。

【0379】

実施形態II-58. リーダータンパク質及びアダリムマブタンパク質の共発現が、標的タンパク質の分解を約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍、約150倍、約200倍、又は約300倍減少させる、実施形態II-52～II-57のいずれか1つに記載の方法。

40

【0380】

実施形態II-59. リーダータンパク質及びアダリムマブタンパク質の共発現が、アダリムマブのEC₅₀を約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍、約150倍、約200倍、又は約300倍減少させる、実施形態II-52～II-58のいずれか1つに記載の方法。

【0381】

50

実施形態Ⅱ-60. ベクター系が、配列番号191～216のセットのポリヌクレオチド配列又は配列番号217～242のセットの配列を含む、実施形態Ⅱ-52～Ⅱ-59のいずれか1つに記載の方法。

【0382】

実施形態Ⅱ-61. ベクター系が、アデノウイルス遺伝子E4、E2A、VA、及びAAVのCapタンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む、実施形態Ⅱ-52～Ⅱ-60のいずれか1つに記載の方法。

【0383】

実施形態Ⅱ-62. ベクター系が、脂質ナノ粒子(LNP)を介して投与される、実施形態Ⅱ-52～Ⅱ-61のいずれか1つに記載の方法。

【0384】

実施形態Ⅱ-63. LNPが、PEG化脂質、コレステロール、及び1つ以上のイオン化可能脂質を含む、実施形態Ⅱ-62に記載の方法。

【0385】

実施形態Ⅱ-64. LNPが、約0.5%～約2%のPEG化脂質、約35%～約45%のコレステロール、及び約5%～約65%の1つ以上のイオン化可能脂質を含む、実施形態Ⅱ-62に記載の方法。

【0386】

実施形態Ⅱ-65. LNPが、約1%のDMG-PEG(2000)対約40%のコレステロール対約10%のDOPC及び約50%のDLin-KC2-DMAの比で、DMG-PEG(2000)、コレステロール、DOPC及びDLin-KC2-DMAを含む、実施形態Ⅱ-62に記載の方法。

【0387】

実施形態Ⅱ-66. 系が筋肉内又は皮下に送達される、実施形態Ⅱ-52～Ⅱ-65のいずれか1つに記載の方法。

【0388】

実施形態Ⅱ-67. グルコシルセラミダーゼ(GBA)タンパク質を、それを必要とする対象において発現させる方法であって、1つ以上のベクターを含むベクター系を対象に投与することを含み、1つ以上のベクターが、

a) グルコシルセラミダーゼ(GBA)タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド；及び

b) 配列番号1～6及び24からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するピコルナウイルスリーダー(L)タンパク質をコードする第2のポリヌクレオチド；を含み、

グルコシルセラミダーゼ(GBA)タンパク質をコードする第1のポリヌクレオチド及びLタンパク質をコードする第2のポリヌクレオチドが、1つ以上のプロモーターに作動可能に連結されており、GBAタンパク質及びLタンパク質が共発現される、方法。

【0389】

実施形態Ⅱ-68. 第1のポリヌクレオチドが、配列番号406のGBAアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、実施形態Ⅱ-67に記載の方法。

【0390】

実施形態Ⅱ-69. リーダータンパク質及びGBAタンパク質の共発現が、対象の細胞又は対象におけるGBAタンパク質の発現レベルを約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、又は約90%低下させる、実施形態Ⅱ-67～Ⅱ-68のいずれか1つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0391】

実施形態Ⅱ-70. リーダータンパク質及びGBAタンパク質の共発現が、対象の細胞又は対象におけるGBAの活性を、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍、約150倍、約200倍、又は約300倍増加させる、実施形態Ⅱ-67～Ⅱ-69のいずれか1つに記載の方法。

【0392】

実施形態Ⅱ-71. リーダータンパク質及びGBAタンパク質の共発現が、GBAが対象の細胞又は対象において見出される期間を、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10、約11倍、約12倍、約13倍、約14倍、約15倍、約16倍、約17倍、約18倍、約19倍、又は約20倍増加させる、実施形態Ⅱ-67～Ⅱ-70のいずれか1つに記載の方法。

10

【0393】

実施形態Ⅱ-72. エンハンサータンパク質の共発現が、対象の組織又は対象におけるGBAの変動係数(CV%)を約1.2倍、約1.3倍、約1.4倍、約1.5倍、約1.6倍、約1.7倍、約1.8倍、約1.9倍、約2倍、約2.1倍、約2.2倍、約2.3倍、約2.4倍、約2.5倍、約2.7倍、約2.8倍、約2.9倍、又は約3倍増加させる、実施形態Ⅱ-67～Ⅱ-71のいずれか1つに記載の方法。

【0394】

実施形態Ⅱ-73. リーダータンパク質及びGBAタンパク質の共発現が、GBAの分解を約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍、約150倍、約200倍、又は約300倍減少させる、実施形態Ⅱ-67～Ⅱ-72のいずれか1つに記載の方法。

20

【0395】

実施形態Ⅱ-74. リーダータンパク質及びGBAタンパク質の共発現が、最大応答の50%を生じるのに有効なGBAの濃度(EC₅₀)を低下させる、実施形態Ⅱ-67～Ⅱ-73のいずれか1つに記載の方法。

【0396】

実施形態Ⅱ-75. ベクター系が、アデノウイルス遺伝子E4、E2A、VA、及びAAVのCapタンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む、実施形態Ⅱ-67～Ⅱ-74のいずれか1つに記載の方法。

30

【0397】

実施形態Ⅱ-76. ベクター系が、脂質ナノ粒子(LNP)を介して投与される、実施形態Ⅱ-67～Ⅱ-75のいずれか1つに記載の方法。

【0398】

実施形態Ⅱ-77. LNPが、PEG化脂質、コレステロール、及び1つ以上のイオン化可能脂質を含む、実施形態Ⅱ-76に記載の方法。

【0399】

実施形態Ⅱ-78. LNPが、約0.5%～約2%のPEG化脂質、約35%～約45%のコレステロール、及び約5%～約65%の1つ以上のイオン化可能脂質を含む、実施形態Ⅱ-76に記載の方法。

40

【0400】

実施形態Ⅱ-79. LNPが、約1%のDMG-PEG(2000)対約40%のコレステロール対約10%のDOPC及び約50%のDLin-KC2-DMAの比で、DMG-PEG(2000)、コレステロール、DOPC及びDLin-KC2-DMAを含む、実施形態Ⅱ-76に記載の方法。

【0401】

実施形態Ⅱ-80. 系が筋肉内又は皮下に送達される、実施形態Ⅱ-67～Ⅱ-79のいずれか1つに記載の方法。

【0402】

50

実施形態ⅠⅠ－８１．標的タンパク質を、それを必要とする対象において発現させる方法であって、１つ以上のベクターを含むベクター系を対象に投与することを含み、１つ以上のベクターが、

ａ）標的タンパク質をコードする第１のポリヌクレオチド；及び

ｂ）配列番号１～６及び２４からなる群から選択されるアミノ酸配列、又はそれらに対して少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、若しくは少なくとも９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するピコルナウイルスリーダー（Ｌ）タンパク質をコードする第２のポリヌクレオチド；を含み、

標的タンパク質をコードする第１のポリヌクレオチド及びＬタンパク質をコードする第２のポリヌクレオチドが、１つ以上のプロモーターに作動可能に連結されており、標的タンパク質及びＬタンパク質が共発現される、方法。

10

【０４０３】

実施形態ⅠⅠ－８２．第１のポリヌクレオチドが、表８の可変重鎖配列、又はそれに対して少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、若しくは少なくとも９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列；及び／又は表８の可変軽鎖配列、又はそれに対して少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、若しくは少なくとも９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、実施形態ⅠⅠ－８１に記載の方法。

20

【０４０４】

実施形態ⅠⅠ－８３．第１のポリヌクレオチドが、表９のタンパク質配列、又はそれに対して少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、若しくは少なくとも９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、実施形態ⅠⅠ－８１に記載の方法。

【０４０５】

実施形態ⅠⅠ－８４．リーダータンパク質及び標的タンパク質の共発現が、細胞又は対象における標的タンパク質の発現レベルを、約１０％、約２０％、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、又は約９０％減少させる、実施形態ⅠⅠ－８１～ⅠⅠ－８３のいずれか１つに記載の方法。

30

【０４０６】

実施形態ⅠⅠ－８５．リーダータンパク質及び標的タンパク質の共発現が、対象の細胞又は対象における標的タンパク質の活性を、約１０倍、約２０倍、約３０倍、約４０倍、約５０倍、約６０倍、約７０倍、約８０倍、約９０倍、約１００倍、約１５０倍、約２００倍、又は約３００倍増加させる、実施形態ⅠⅠ－８１～ⅠⅠ－８４のいずれか１つに記載の方法。

【０４０７】

実施形態ⅠⅠ－８６．リーダータンパク質及び標的タンパク質の共発現が、標的タンパク質が対象の細胞又は対象において見出される期間を、約２倍、約３倍、約４倍、約５倍、約６倍、約７倍、約８倍、約９倍、約１０、約１１倍、約１２倍、約１３倍、約１４倍、約１５倍、約１６倍、約１７倍、約１８倍、約１９倍、又は約２０倍増加させる、実施形態ⅠⅠ－８１～ⅠⅠ－８５のいずれか１つに記載の方法。

40

【０４０８】

実施形態ⅠⅠ－８７．リーダータンパク質及び標的タンパク質の共発現が、対象の組織又は対象における標的タンパク質の変動係数（ＣＶ％）を約１．２倍、約１．３倍、約１．４倍、約１．５倍、約１．６倍、約１．７倍、約１．８倍、約１．９倍、約２倍、約２．１倍、約２．２倍、約２．３倍、約２．４倍、約２．５倍、約２．７倍、約２．８倍、約２．９倍、又は約３倍増加させる、実施形態ⅠⅠ－８１～ⅠⅠ－８５のいずれか１つに

50

記載の方法。

【0409】

実施形態Ⅱ-88．リーダータンパク質及び標的タンパク質の共発現が、標的タンパク質の分解を約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍、約150倍、約200倍、又は約300倍減少させる、実施形態Ⅱ-81～Ⅱ-87のいずれか1つに記載の方法。

【0410】

実施形態Ⅱ-89．リーダータンパク質及び標的タンパク質の共発現が、標的のEC₅₀を約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、約100倍、約150倍、約200倍、又は約300倍減少させる、実施形態Ⅱ-81～Ⅱ-88のいずれか1つに記載の方法。

10

【0411】

実施形態Ⅱ-90．ベクター系が、アデノウイルス遺伝子E4、E2A、VA、及びAAVのCapタンパク質をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む、実施形態Ⅱ-81～Ⅱ-89のいずれか1つに記載の方法。

【0412】

実施形態Ⅱ-91．ベクター系が、脂質ナノ粒子(LNP)を介して投与される、実施形態Ⅱ-81～Ⅱ-90のいずれか1つに記載の方法。

【0413】

実施形態Ⅱ-92．LNPが、PEG化脂質、コレステロール、及び1つ以上のイオン化可能脂質を含む、実施形態Ⅱ-81～Ⅱ-91のいずれか1つに記載の方法。

20

【0414】

実施形態Ⅱ-93．LNPが、約0.5%～約2%のPEG化脂質、約35%～約45%のコレステロール、及び約5%～約65%の1つ以上のイオン化可能脂質を含む、実施形態Ⅱ-92に記載の方法。

【0415】

実施形態Ⅱ-94．LNPが、約1%のDMG-PEG(2000)対約40%のコレステロール対約10%のDOPC及び約50%のDLin-KC2-DMAの比で、DMG-PEG(2000)、コレステロール、DOPC及びDLin-KC2-DMAを含む、実施形態Ⅱ-92に記載の方法。

30

【0416】

実施形態Ⅱ-95．系が筋肉内又は皮下に送達される、実施形態Ⅱ-81～Ⅱ-94のいずれか1つに記載の方法。

【0417】

実施形態Ⅱ-96．先行する実施形態のいずれか1つに記載の方法において使用するためのベクター系。

【実施例】

【0418】

インビトロ研究のための材料及び方法

DNA分子の構築

全てのアセンブリを、高コピー数複製起点(ColE1)を制御するプロモーター、続いてターミネーター(rrnB T1及びT2ターミネーター)を含む大腸菌中で増殖し得るプラスミド骨格に作製した。この後に、第2のターミネーター(ファージラムダからの転写ターミネーター)によってベクターの残りから単離される抗生物質耐性遺伝子を制御するプロモーターが続く。骨格の元素を含む遺伝子は、ホスホルアミダイト化学によって合成した。

40

【0419】

プラスミドの構築のために使用される構造遺伝子は、ホスホルアミダイト化学、化学によって合成され、増幅され、表2に列挙されるプライマーを使用してNEB HIFI又はGibson Assembly等の等温アセンブリ反応を使用して上記のベクター

50

にクローニングされた。これらの実施例で用いた例示的な構築物に含まれる選択アミノ酸配列を表 3 に示す。

【 0 4 2 0 】

【 表 2 - 1 】

表 2 : 構築物設計

構築物	概略図	プライマー	実施例で使用
EG1	図 2A	1a.) gcccgggatccaccgggtgccaccatggtgagcaaggcgaggagc (配列番号 25) 1b.) agatggctggcaactagaaggcacagttaactgtacagctogtccatgccgag (配列番号 26) 2a.) cactctcggcatggacgagctgtacaagtaactgtgccttctagttgccagccatctgt (配列番号 27) 2b.) cagctcctcggccttgctcaccatggtggcgaccgggtgga tccc (配列番号 28)	1
EG2	図 2B	1a.) cgccagtaacgttaggggggggattactgtacagctcgtccatgccgag (配列番号 29) 1b.) cggtaaccggggccgggatccaccggtgccaccatggtgagcaaggcgaggagc (配列番号 30) 2a.) cactctcggcatggacgagctgtacaagtaactgtgccttctagttgccagccatctgt (配列番号 27) 2b.) cagctcctcggccttgctcaccatggtggcgaccgggtgga tccc (配列番号 28) 3a.) ctggcatggacgagctgtacaagtaatccccccccctaacgttactgg (配列番号 31) 3b.) acgggggaggggcaaacacagatggctggcaactagaaggcacagctgtaactcgaaacgacttccatgtctaattcgg (配列番号 32)	2
EG3 + EG4	図 2C	1a.) cgcgggcccgggatccaccgggtgccaccATGAACA CCATCAATATTGCCAAGAACGACTTTTCTGACAT CG (配列番号 33) 1b.) agatggctggcaactagaaggcacagttagggTCAGG CAAATGCGAAATCGGACTCCAG (配列番号 34) 2a.) CCTGGAGTCCGATTTTCGATTTGCCTGAacct aactgtgccttctagttgccagccatctgt (配列番号 35) 2b.) CGTTCTTGGAATATTGATGGTGTTCATggtg gcgaccgggtggatcccgggcc (配列番号 36) 3a.) accttggccgactctggtaatGTAATACGACTCACT ATAGGaaaaa (配列番号 37) 3b.) agtcagtggcgagggaagccAAAAAACCCTCA AGACCCGTTTA (配列番号 38) 4a.) AAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGGgcttctcog ctcactgac (配列番号 39) 4b.) TAGTGAGTCGTATTACcattaccagagtcggccaag gt (配列番号 40)	1
EG5	図 2D	1a.) gcccgggatccaccgggtgccaccctgccaccatgagga ctctgaacacctctgcatgg (配列番号 41) 1b.) CTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGAGCGGC CGCGTcccCGTggttgggtgctgaccgttttgtgtg (配列番号 42) 2a.) ACGCGGCCGCTCTGGAGCCACCCGCAGTTCG AAAAAGtaaagcgccgactctagatca (配列番号 43) 2b.) gtgttcagagtccatggtggcgagggtggcgacc (配列番 号 44)	2
EG6	図 2E	1a.) atccaccggtgccaccatgaggactctgaacacctotg ccatgg (配列番号 45) 1b.) tgtggtatggctgattatgattactgttaactcgaaaaagac ttccatgtctaattcggg (配列番号 46) 2a.) gttttcgagttacagtaaatcataatcagccataccacatt gtagagggtttacttgct (配列番号 47) 2b.) tggcagagggtgtcagagtcctcatggtggcgaccgggtgg (配列番号 48)	2
EG7	図 2F		2

【 0 4 2 1 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

(表 2 の続き)

構築物	概略図	プライマー	実施例で使用
EG8	図 2G	1a.) atccaccgggtcgccaccatgaggactctgaacacctctg ccatgg (配列番号 45) 1b.) cggccagtaacgttaggggggggggattactgtacagct cgtccatgccgag (配列番号 29) 2a.) ctccggcatggacgagctgtacaagtaatccccccccct aacgttactgg (配列番号 31) 2b.) tggcagagggtgttcagagtcctcatgggtggcgaccgggtgg (配列番号 48)	2、5
EG9	図 2H	1a) CACCATCACCATCACCATGTTatggccacaacccat ggaacaagagactt (配列番号 49) 1b) tcttgatgagctgttcttcaggaggataaagttgttcaggt ggcgaccgggtggatccc (配列番号 50) 2a) cgggcccggggtaccacgggtcgccaccatgaacaacttta tcctcctgggaagaacagctc (配列番号 51) 2b) aagtcctctgttccatggttggccatAACATGGTGAT GGTGATGGTG (配列番号 52)	8
EG10 + EG11	図 2I	1a.) gtgttcagagtcctcatgggtggcgagggtggcgacc (配列 番号 44) 1b.) CTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG (配列 番号 53) 2a.) ttaCTTGACAGCTCGTCCATGCCGAGAG (配 列番号 54) 2b.) gcccgggatccacgggtcgccacctcgccaccatgagg actctgaacacctctgccatgg (配列番号 41) 3a) tgcgcgcaagtctctgttccatggttggccatgggtggcg accggtggatccc (配列番号 55) 3b) cccgaattagacatggaagtcgttttcgagttacag (配列番 号 56) 4a) gggatccacgggtcgccaccatggccacaaccatggaac aagagacttg (配列番号 57) 4b) ctgtaactcgaaaacgacttccatgtctaattcggg (配列番 号 58)	2
EG12 + EG4	図 2J	1a) tctctgttccatggttggccatggtggcgaccgggtgg (配 列番号 59) 1b) acgtggttttccttgaaaaacacgatgataaatgaggactc tgaacacctctgccatgg (配列番号 60) 2a) gcagagggtgttcagagtcctcatttatcatcgtgttttcaaa ggaaaaccacg (配列番号 61) 2b) agtcgttttcgagttacagtaatccccccccctaacgttact gg (配列番号 62) 3a) ccagtaacgttaggggggggggattactgtaactcgaaaac gacttccatgt (配列番号 63) 3b) ccaccgggtcgccaccatggccacaaccatggaacaagag (配列番号 64)	3
EG10	図 2K	1a.) gtgttcagagtcctcatgggtggcgagggtggcgacc (配列 番号 44) 1b.) CTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG (配列 番号 53) 2a.) ttaCTTGACAGCTCGTCCATGCCGAGAG (配 列番号 54) 2b.) gcccgggatccacgggtcgccacctcgccaccatgagg actctgaacacctctgccatgg (配列番号 41)	2、3、4

【 0 4 2 2 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

(表 2 の続き)

構築物	概略図	プライマー	実施例で使用
EG13	図 2L	1a.) cgggcccgggatccaccggtcgccaccatgaacaacttt atcctcctggaagaacagctc(配列番号51) 1b.) GATGGTGTCCCCCGCCACCTCCGCCACCTC Caagtctgattctgcaatttcagccagtt(配列番号65) 2a.) aattgcagaatcaggacttGGAGGTGGCGGAGGT GGCGGGGGACACCATCACCATCACCATGTTTAA ccccccccctaacgttactgg(配列番号66) 2b.) tcttgatgagctgttctccaggaggataaagttgttcaggt tgccgaccggtggatccc(配列番号50)	11
EG14	図 2M	1a.) ttataggcggacagcagcagggtcagcaccatgggtggcg aggtggcgacc(配列番号67) 1b.) CGGCCGCTCGATTACAAGGATGACGACGAT AAGGTTTAAgcccgcgactctagatca(配列番号68) 2a.) TAAACCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGA GCGGCCGCGTttagggcccatggggcg(配列番号69) 2b.) gcccggccgggatccaccggtcgccacctcgccaccat ggtgctgacctgctgctgtcc(配列番号70)	11
EG15	図 2N	1a) ccctgtcttcagtgggcgagtatatgacccaggggccGGA GGTGGCGGAGGTGGC(配列番号71) 1b) ggagggtcagcagggtcagcctggaggccatgggtggcgac cgggtgatcc(配列番号72) 2a) cggtaaccgcccgggatccaccggtcgccaccatgg cctccaggctgacctg(配列番号73) 2b) TGGTGTCCCCCGCCACCTCCGCCACCTCCgg ccctggggtcatatactcgcc(配列番号74)	7
EG16	図 2O	1a) ccctgtcttcagtgggcgagtatatgacccaggggccGGA GGTGGCGGAGGTGGC(配列番号71) 1b) ggagggtcagcagggtcagcctggaggccatgggtggcgac cgggtgatcc(配列番号72) 2a) cggtaaccgcccgggatccaccggtcgccaccatgg cctccaggctgacctg(配列番号73) 2b) TGGTGTCCCCCGCCACCTCCGCCACCTCCgg ccctggggtcatatactcgcc(配列番号74)	7
EG17	図 2P	1a.) cgggcccgggatccaccggtcgccaccatgaacaacttt atcctcctggaagaacagctc(配列番号51) 1b.) GATGGTGTCCCCCGCCACCTCCGCCACCTC Caagtctgattctgcaatttcagccagtt(配列番号65) 2a.) tcttgatgagctgttctccaggaggataaagttgttcaggt tgccgaccggtggatccc(配列番号50) 2b.) aattgcagaatcaggacttGGAGGTGGCGGAGGT GGCGGGGGACACCATCACCATCACCATGTTTAA ccccccccctaacgttactgg(配列番号66)	8、9、10
EG18	図 2Q	1a) aattgcagaatcaggacttGGAGGTGGCGGAGGTG GCGGGGGACACC(配列番号75) 1b) tcttgatgagctgttctccaggaggataaagttgttcaggt ggcgaccggtggatccc(配列番号50) 2a) cgggcccgggatccaccggtcgccaccatgaacaacttta tctcctggaagaacagctc(配列番号51) 2b) GATGGTGTCCCCCGCCACCTCCGCCACCTCC aagtctgattctgcaatttcagccagtt(配列番号65)	5

【0423】

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

(表 2 の続き)

構築物	概略図	プライマー	実施例で使用
EG19	図 2R	1a) cataatcagccataccacattttagaggttttacttgc (配列番号 76) 1b) taCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAG (配列番号 77) 2a) CTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGta (配列番号 78) 2b) gcaagtaaaacctctacaaatgtggtatggctgattatg (配列番号 79)	5
EG20	図 2S	1a) tcctctctgcttctagaataaatcataatcagccataccacattttagaggttttacttgc (配列番号 80) 1b) tgcataaatcagtaggtccgcaaagtaaccagcgtagtgCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAG (配列番号 81) 2a) actttgcggacctaactgattcatgacattgagacaaatccagggatgaactttctacgtaagatagtgaataatt (配列番号 82) 2b) acctctacaaatgtggtatggctgattatgattattctagaaacagagagggaatctttg (配列番号 83)	5
EG21	図 2T	1a) gctggttactttgcggacctaactgattcatgacattgagacaatccagggggtattcggacaccaaacaagcgggtgtacttg (配列番号 84) 1b) aaacctctacaaatgtggtatggctgattatgatttgttccatggcttcttctcgtaggcatacaagtc (配列番号 85) 2a) tgtctcaatgtcatgaatcagtaggtccgcaaagtaaccagcgtagtgCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGA TCCC (配列番号 86) 2b) gagacttgatgcctacgaagaagaagccatggaacaaatcataatcagccataccacattttagaggttttacttgc (配列番号 87)	5
EG22	図 2U	1a) catggcagaggtgttcagagtcctcatggtggcgaccgggtgattcacgacacctgaaatggaagaaaaaac (配列番号 88) 1b) attaccgccatgcattagttattaggctccggtgcccgtcagtgggcagagcg (配列番号 89) 2a) agttttttcttccatttcaggtgtcgtgaatccaccggctgccaccatgaggactctgaacacctc (配列番号 90) 2b) gtgcgctctgcccactgacgggcacccggagcctaataactaatgcatggcggtaat (配列番号 91)	4
EG23	図 2V	1a) gagggcagggccgcctcggcctctgagctaataccaccggtcgccaccatgaggactctgaacacctc (配列番号 92) 1b) ataaccgtattaccgccatgcattagttattagggttggaagtccccaggtccccagcaggcaga (配列番号 93) 2a) ttcagagtcctcatggtggcgaccgggtggattagctcagaggccgaggcggcctcggcctct (配列番号 94) 2b) tctgcctgctggggagcctggggactttccacacctaataactaatgcatggcggtaatatcggtta (配列番号 95)	4

【 0 4 2 4 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

(表 2 の続き)

構築物	概略図	プライマー	実施例で使用
EG24	図2W	1a) GGAGGTGGCGGAGGTGGCGGGGGACACCAT CACCATCA (配列番号96) 1b) AGACAACGCTGGCCTTTTCCAGAGGCGACCT CTGCATggtggcgacoggtggatcccgggcccg (配列番号 97) 2a) cggggcccgggatccaccggtcgccaccATGCAGAGGT CGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCTC (配列番号 98) 2b) CCCC GCCACCTCCGCCACCTCCAAGCCTTGT ATCTTGACCTCTTCTTCTGTCTCC (配列番号99)	6
EG25	図2X	1a) GGAGGTGGCGGAGGTGGCGGGGGACACCAT CACCATCA (配列番号96) 1b) AGACAACGCTGGCCTTTTCCAGAGGCGACCT CTGCATggtggcgacoggtggatcccgggcccg (配列番号 97) 2a) cggggcccgggatccaccggtcgccaccATGCAGAGGT CGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCTC (配列番号 98) 2b) CCCC GCCACCTCCGCCACCTCCAAGCCTTGT ATCTTGACCTCTTCTTCTGTCTCC (配列番号99)	6

10

20

【 0 4 2 5 】

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3 : いくつかの構築物に含まれる例示的なアミノ酸配列

説明	例示的な構築物	アミノ酸配列
DRD1 - GFP	EG7、EG8、EG10、EG12、EG19、EG20、EG21、EG22、EG23	MRTLNTSAMDGTGLVVERDFSVRILTACFLSLLILSTLLGNTLVCA AVIRFRHLRSKVTNFFVISLAVSDLLVAVLVMPWKAVAEIAGFWP FGSFCNIWVAFDIMCSTASILNLCVISVDRYWAISSPFRYERKMTP KAAFILISVAWTLISFIPVQLSWHKAKPTSPSDGNATSLAETI DNCDSLSRITYAIISSSVISFYIPVAIMIVTYTRYIRIAQKQIRRIAL ERAAVHAKNCQTTTGNGKPVESQPESSFKMSFKRETKVLKTL SVIMGVFVCCWLPFFILNCILPFCGSGETQPFIDSNTFDVFWFG WANSSLNPIIYAFNADFRKAFSTLLGCYRLCPATNNAIETVSINNN GAAMFSSHHEPRGSISKECNLVYLIPHAVGSSSEDLKKEEAAGIAR PLEKLSPALSVILDYD TDVSLEKIQPITQNGQHPTGGGGSGGGGS GGGGSMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDAT YGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFARYPDHMKQHDF FKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYN SHKVYITADKQKNGIKVNFKTRHNIED GSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITLGMDELYK (配列番号 12)
GFP	EG1、EG2、EG3、EG7、EG8、EG10、EG12、EG19、EG20、EG21、EG22、EG23	MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKL LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT YGVQCFARYPDHMKQHDFFKSA MPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKE DGNILGHKLEYNYN SHKVYITADKQKNGIKVNFKTRHNIEDGSVQ LADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDH MVLL EFVTAAGITLGMDELYK (配列番号 13)
DRD1 - Strep	EG5、EG6	MRTLNTSAMDGTGLVVERDFSVRILTACFLSLLILSTLLGNTLVCA AVIRFRHLRSKVTNFFVISLAVSDLLVAVLVMPWKAVAEIAGFWP FGSFCNIWVAFDIMCSTASILNLCVISVDRYWAISSPFRYERKMTP KAAFILISVAWTLISFIPVQLSWHKAKPTSPSDGNATSLAETI DNCDSLSRITYAIISSSVISFYIPVAIMIVTYTRYIRIAQKQIRRIAL ERAAVHAKNCQTTTGNGKPVESQPESSFKMSFKRETKVLKTL SVIMGVFVCCWLPFFILNCILPFCGSGETQPFIDSNTFDVFWFG WANSSLNPIIYAFNADFRKAFSTLLGCYRLCPATNNAIETVSINNN GAAMFSSHHEPRGSISKECNLVYLIPHAVGSSSEDLKKEEAAGIAR PLEKLSPALSVILDYD TDVSLEKIQPITQNGQHPTTGTRPLWSHP QFEK (配列番号 14)

10

20

30

【 0 4 2 6 】

40

50

【表 3 - 2】

(表 3 の続き)

説明	例示的な構築物	アミノ酸配列
ITK	EG9、EG17、EG18	MNNFILLEELIKKSQQKRRRTSPSNFKVRFFVLTkasLAYFEDRH GKKRTLKGSIELSRIKCVEIVKSDISIPCHYKYPFQVVHDNYLLYV FAPDRESRQRWVLALKEETRNNNSLVPKYHPNFWMDGKWRCC SQLEKLATGCAQYDPTKNASKKPLPPTPEDNRRPLWEPEETVVI ALYDYQTNDPQELALRRNEEYCLLDSSEIHWWRVQDRNGHEGY VPSSYLVEKSPNNLETYEWYNKSSSRDKAEKLLLDTGKEGAFMV RDSRTAGTYTVSVFTKAVVSENNPCIKHYHIKETNDNPKRYVVAE KYVFDSPILLINYHQHNGGGLVTRLRYPVCFGRQKAPVTAGLRYG KWVIDPSELTFVQEIGSGQFGLVHLGYWLNKDKVAIKTIREGAMS EEDFIEEAEEVMMKLSHPKLVQLYGVCLAQAPICLVFEFMEHGCL SDYLRTQRGFLFAAETLLGMCLDVCEGMAYLEEACVIHRDLAARN CLVGENQVIKVSDFGMTRFVLDDQYTSSTGTGKFPVKWASPEVFS FSRYSSKSDVWSFGVLMWEVFESEKIPYENRSNSEVVEDISTGF RLYKPRLASTHVYQIMNHCWKERPEDRPAFSRLLRQLAEIAESG LGGGGGGGGHHHHHHV (配列番号 15)
C1阻害剤	EG15、EG16	MASRLTLLTLLLLLAGDRASSNPATSSSSSQDPESLQDRGEGK VATTVISKMLFVEPILEVSSLPTTNTTNSATKITANTTDEPTTQPT TEPTTQPTIQPTQPTTQLPTDSPTQPTTGSFCPGPVTLCSDLSEH STEAVLGDALVDFSLKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQV LLGAGENTKTNLESILSYPKDFTCVHQALKGFTTKGVTSVSQIFH SPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWVAKNTN NKISRLLDSLPSDTRLVLLNAIYLSAKWKTTFDPKKTRMEPFHFK NSVIKVPMMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGQLQLSHNLSLVILVPQ NLKHRLEDMEQALSPSVFKAIMEKLEMSKFQPTLLTPLRIKVTTTS QDMLSIMEKLEFFDFSYDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTVLELT ETGVEAAAASAISVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGR VYDPRA (配列番号 16)
T7 RNA ポリメー ゼ	EG4	MNTINIAKNDFSIEIAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEM GEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITLLPKMIARINDWFEE VKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLACLTSAADNTTVQAV ASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVEEQLNKRVGHVYKKAF MQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCIEMLIESTG MVSLHRQNAGVVGQDSEITELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQP CVVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYM PEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREE LPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLE QANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNDMTKGLLTL AKGKPIGKEGYWLVKIHGANCAAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMA CAKSPLNTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPL AFDGSCSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAKKVN EILQADAINGTDNEVVTVDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYG VTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFT QPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVK DKKTGEILRKRCVHVWVTPDGFVPVWQEYKKPIQTRLNLMFLGQF RLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKTVVWAH EKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMDVTDYESCDVLADF YDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNLNLRDILESDFAF (配列番号 17)

10

20

30

40

【 0 4 2 7 】

【表 3 - 3】

(表 3 の続き)

説明	例示的な構築物	アミノ酸配列
CFTR	EG24、EG25	MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPILRKGYRQRLELSDIYQIPSVDS ADNLSEKLEREWRELASKKNPKLINALRRCFFWRFMFYGIFLY LGEVTKAVQPLLLGRIIASYDPDNKEERSIAIYLGIGLCLLFIVRTL LHPAIFGLHHIGMQMRIA MFSLIYKKTLLKSSRVLDKISIGQLVSL LSNNLNKFDEGLALAHFVWIAPLQVALLMGLIWELLQASAF CGL GFLIVLALFQAGLGRMMM KYRDQRAGKISERLVITSEMIENIQSV KAYCWEEAMEKMIENLRQTELKLT RKAAYVRYFNSSAFFFSGFF VVFLSVLPYALIKGIILRKIFTTISFCIVLRMAVTRQFPWAVQTWYD SLGAINKIQDFLQKQEYKTLEYNLTTTEVVMENVTAFWEEGFGEL FEKAKQNNNNRKT SNGDDSLFFSNFSL LGTPVLKDINFKIERGQL LAVAGSTGAGKTSLLMMIMGELEPSEGGIKHSGRISFC SQFSWI MPGTIKENIIFGVSYDEYRYSVIKACQLEEDISKFAEKDNIVLGE GGITLSSGGQRARISLARAVYKDADLYLLDSPFGYLDVLTEKEIFES CVCKLMANKTRILVTSKMEHLKKADKILILHEGSSYFYGTFS ELQ NLQPDFSSKLMGCDSFDQFSAERRNSILTETLHRFSLEGDAPVS WTETKKQSFQKTGEFGEKRKNSILNPINSIRKFSIVQKTPLQMNG IEEDSDEPLERRLSLVPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQARRRQSV LNLMTHSV NQGQNIHRKTTASTRKVSLAPQANLTEDIYSRRLS QETGLEISEEINEEDLKECLFDDMESIPAVTTWNTYLRITVHKSL IFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLWLLGNTPLQDKGNSTHSRNN SYA VIITSTSSYYVFYIYVG VADTLLAMGFFRGLPLVHTLITVSKILHHK MLHSV LQAPMSTLNTLKAGGILNRF SKDIAILDLLPLTIFDFIQLL LIVIGAI AVVAVLQPYIFVATVPVIVAFIMLRAYFLQTSQQLKQLES EGRSPIFTHLVTS LKGLWTLRAFG RQPYFETLFHKALNLHTANWF LYLSTLRWFQMRIEMIFVIFFI AVTFISILT TGEGERVGIILTLAMNI MSTLQWAVNSSIDVDSL MRSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPYK NGQLSKVMIENSHVKKDDIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILE NISFSISP GQVRVGLLGR TGSGKSTLLSAFLRLLNTEGEIQIDGVSW DSITLQQWRKAFGVIPQKV FIFSGTFRKNLDPYEQWSDQEIWKVA DEVGLRSVIEQFP GKLD FVLVDGGCVLSHG HKQLMCLARSVLSK AKILLLDEPSAHLDPVTYQIIRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLEC QQFLVIEENKVRQYDSIQKLLNERSLFRQAISPSDRVKLFPHRNS SKCKSKPQIAALKEETEEEVQDTRL (配列番号18)

10

20

30

【0428】

細胞株—培養及びトランスフェクション

HEK293細胞を使用して、ヒト真核細胞におけるこの系、方法、及び組成物の適用を説明した。HEK293接着細胞(CLS)を、10%ウシ胎仔血清(Gibco)及び50,000UのPen Strep(Gibco)を補充したダルベッコ改変イーグル培地高グルコース(Gibco)中で培養した。HEK293細胞を37℃及び5%CO₂で80%コンフルエントまで増殖させた後、293fectin(ThermoFisher)を製造業者の指示に従って使用して一過的にトランスフェクトした。タンパク質発現細胞を、37℃で5分間、0.5%トリプシン溶液を使用して細胞を剥離し、掻き取ることによって48時間後に収集した。細胞をペレット化し(5,000×g、15分、4℃)、上清を廃棄した。細胞ペレットを、更なる使用まで-80℃で保存した。

40

【0429】

CHO-K1細胞を使用して、真核動物細胞におけるこの系、方法、及び組成物の適用を例示する。CHO-K1接着細胞(CLS)を、10%ウシ胎児血清(Gibco)を補充したF-12K培地(ATCC)中で培養する。CHO-K1細胞を、製造業者の指示に従ってリポフェクタミンLTX(ThermoFisher)を使用して一過的にトランスフェクトする前に、37℃及び5%CO₂で80%コンフルエントまで増殖させる。タンパク質発現細胞を、37℃で5分間、0.5%トリプシン溶液を使用して細胞を剥離し、掻き取ることによって48時間後に収集する。細胞をペレット化し(5,000×

50

g、15分、4℃)、上清を廃棄する。細胞ペレットを、更なる使用まで-80℃で保存する。

【0430】

SF9細胞を使用して、真核昆虫細胞におけるこの系、方法、及び組成物の適用を例示する。SF9浮遊細胞(CLS)を、10%ウシ胎児血清(Gibco)を補充したGraceの昆虫培地(ThermoFisher)中で培養する。SF9細胞を26℃及び130rpmで増殖させた後、Cellfectin II(ThermoFisher)を製造業者の指示に従って使用して一過性にトランスフェクトする。タンパク質発現細胞を48時間後に回収し(5,000×g、15分、4℃)、上清を廃棄する。細胞ペレットを、更なる使用まで-80℃で保存する。

10

【0431】

実施例1: GFPを伴うLエンハンサータンパク質の発現は、GFPタンパク質の過剰発現を減少させた。

CMVプロモーター系

発現中のウイルス核孔遮断タンパク質の導入の影響を実証するために、HEK293細胞を、EG1、EG2のいずれかでトランスフェクトするか、又はEG3及びEG4構築物で同時トランスフェクトした(構築物の詳細については表2及び図2を参照されたい)。ウイルス核孔遮断タンパク質の発現は、タンパク質発現の制御された調節をもたらした。その結果、得られたGFPシグナルは減少した。核孔遮断タンパク質とタンデムにある目的の遺伝子の制御された調節の理由は、ウイルスタンパク質の作用様式である。理論に束縛されるものではないが、タンパク質調節についての可能な機構は、核孔遮断タンパク質を発現することによって、mRNAの核外輸送が阻害され得、結果として、標的タンパク質の翻訳がダウンレギュレートされることである。安定化後、核孔遮断タンパク質は分解され、mRNA輸送が再開する。これは再び、標的タンパク質及びエンハンサータンパク質、例えば、核孔遮断タンパク質の両方の発現をもたらす。この厳密に制御されたフィードバックは、標的タンパク質の安定化及び永続的な発現を確実にし、タンパク質発現の停止をもたらす真核細胞の通常の調節を防止する。

20

【0432】

図3A~3Dは、本開示による例示的なエンハンサータンパク質としてのECMV由来のLタンパク質の非存在下及び存在下でのGFP発現に対する効果を示す。HEK293細胞を24ウェルプレートに0.05×10⁶細胞/ウェルで播種し、37℃及び5%CO₂で一晩インキュベートした後、上記のようにEG1又はEG2のいずれかで一過性にトランスフェクトした。GFP発現を、蛍光顕微鏡を使用して24時間後及び48時間後にモニターした。CCDカメラ(Amscope)を用いて画像を撮影し、ISCapture(Amscope)で分析した。本実施例は、本開示による標的タンパク質ポリヌクレオチド及びエンハンサータンパク質ポリヌクレオチドを含む例示的な系における標的タンパク質発現の改善された調節を実証する。

30

【0433】

T7ポリメラーゼ系

EG2は真核生物宿主の天然ポリメラーゼを使用するが、T7のような他のウイルスポリメラーゼを使用して、核外で転写を開始することができる。ウイルスポリメラーゼは、標準的な真核生物プロモーターの制御下にあり、対応するmRNAは核外輸送に依存する。サイトゾルにおいて、ウイルスポリメラーゼは翻訳され、次いで標的タンパク質ポリヌクレオチド及びエンハンサータンパク質ポリヌクレオチドの転写を開始する。いくつかの実施形態では、エンハンサータンパク質の発現の結果として、ウイルスポリメラーゼの核輸送は減少する。系の安定化は、エンハンサータンパク質の分解をもたらし、ウイルスポリメラーゼのmRNA輸送が再開する。理論に束縛されるものではないが、このフィードバックは、組換えタンパク質を過剰発現している間の細胞の通常の調節を防止し得る。いくつかの状況において、ウイルスポリメラーゼの使用は、真核生物ポリメラーゼを使用する系と比較して、細胞間ベースでより高い発現レベルの利点を与える。

40

50

【0434】

図4A～4Dは、T7保有ベクターで同時トランスフェクトされた場合の、T7プロモーターからのECMV由来のLタンパク質とタンデムなGFPの発現の成功を示す。HEK293細胞を24ウェルプレートに 0.05×10^6 細胞/ウェルで播種し、37℃及び5% CO₂で一晩インキュベートした後、上記のようにEG1又はEG3及びEG4のいずれかで一過性にトランスフェクトした。GFP発現を、蛍光顕微鏡を使用して24時間後及び48時間後にモニターした。CCDカメラ(Amscope)を用いて画像を撮影し、ISCapture(Amscope)で分析した。本実施例は、標的タンパク質としてのGFP及びエンハンサータンパク質としてのECMVのLタンパク質とタンデムで、例示的なウイルスポリメラーゼとしてのT7の使用の成功を実証する。上記の例と同様に、Lタンパク質の導入は、発現のより厳密な調節をもたらし、したがって過剰発現の全体的な減少をもたらした。

10

【0435】

実施例2：Lエンハンサータンパク質のDRD1-GFPとの共発現は、DRD1膜タンパク質の改善された発現及び局在化をもたらした。

DRD1は、高密度の活性膜受容体を得るために、エンハンサータンパク質としての孔遮断タンパク質と組み合わせた標的タンパク質としての膜タンパク質の共発現への開示された系及び方法の適用を例示するために使用された。DRD1は、Gタンパク質共役受容体であり、学術的標準を用いて発現させることが困難であることが知られている。細胞の外膜への正確なトランスロケーションを可視化するために、DRD1-GFP融合物(EG8)をこの系において使用した。学術的及び産業的設定におけるGPCRの問題を説明するために、学術的標準(EG10)を対照として使用した。

20

【0436】

膜タンパク質発現及び膜局在化の改善

DRD1-GFP融合物をHEK293細胞において発現させた。HEK293細胞を24ウェルプレートに 0.05×10^6 細胞/ウェルで播種し、37℃及び5% CO₂で一晩インキュベートした後、上記のようにEG10又はEG8のいずれかで一過性にトランスフェクトした。DRD1-GFP発現を、蛍光顕微鏡を使用して24時間後及び48時間後にモニターした。CCDカメラ(Amscope)を用いて画像を撮影し、ISCapture(Amscope)で分析した。

30

【0437】

図5A～5Dは、EG10が、発現された受容体を正確にトランスロケーションすることができないことを実証する。理論に束縛されるものではないが、EG10構築物を有するヒト細胞におけるヒトDRD1受容体の過剰発現の結果として、細胞は、発現された標的タンパク質を分解又は制御し始めると考えられる。この形態の調節は、封入体として変性されたタンパク質の形成をもたらす(図5B、赤色矢印)。このように細胞による膜タンパク質の発現を制御すると、不活性でミスフォールドしたタンパク質が生じ、その結果、使用できない低品質の発現タンパク質が生じ得る。対照的に、標的膜タンパク質と例示的なエンハンサータンパク質との共発現は、膜への正確な挿入及び封入体の非存在によって見ることができるように、正確にトランスロケーションされたDRD1-GFPをもたらした(図5C～5D)。本実施例は、例示的な標的膜タンパク質(DRD1)と組み合わせた例示的なエンハンサータンパク質(ECMVのLタンパク質)の共発現が、膜タンパク質の改善された発現及び局在化をもたらしたことを実証する。理論に束縛されるものではないが、この系は、標的タンパク質発現の厳密な調節をもたらし、それによって、発現された膜タンパク質の分解をもたらす細胞の正常な調節を回避すると考えられる。したがって、この系は、GPCRの高収率発現及び精製に適している。

40

【0438】

標的タンパク質及びエンハンサータンパク質の別個の発現。

更に、エンハンサータンパク質が別個のDNA分子上に位置することができることを示すために、DRD1-GFP(EG10)構築物を、別個のベクター上の別個のプロモ-

50

ターの制御下で、ECMV (EG11) 由来のLタンパク質と共発現させる。HEK293細胞を24ウェルプレートに 0.05×10^6 細胞/ウェルで播種し、37℃及び5% CO₂で一晩インキュベートした後、上記のようにEG10及びEG11で一過性にトランスフェクトする。DRD1-GFP発現を、蛍光顕微鏡を使用して24時間後及び48時間後にモニターする。CCDカメラ (Amscope) を用いて画像を撮影し、ISCapture (Amscope) で分析する。

【0439】

膜タンパク質の機能的活性

正確にトランスロケーションされたGPCRの説明に加えて、DRD1-Strep融合を用いて活性試験を行った。より小さいstrepタグは、サイトゾルに位置するGタンパク質との正確な相互作用が損なわれておらず、機能的アッセイを行うことができることを確実にする。ドーパミンが結合すると、DRD1は、ヘテロ三量体Gタンパク質をそのG α サブユニット及びそのG $\beta\gamma$ 複合体に放出する。休止状態では、G α はGDPに結合するが、活性化するとGTPをGDPと交換する。G α -GTP複合体は、アデニル酸シクラーゼ (AC) と相互作用し、AC活性の活性化をもたらす、結果としてcAMPレベルを増加させる。細胞内cAMPの変化は、標準的なcAMPアッセイによって測定することができる。再び、学術的及び産業標準 (EG5) を、ECMVのLタンパク質との共発現における同じ標的タンパク質と比較した。

【0440】

DRD1-Strep融合物をHEK293細胞において発現させる。HEK293細胞を5,000細胞/ウェルで96ウェル白色透明底プレートに播種し、37℃及び5% CO₂で一晩インキュベートした後、上記のようにEG5又はEG6のいずれかを一過性にトランスフェクトする。タンパク質を48時間発現させ、製造業者の指示に従ってcAMP (glo) アッセイ (Promega) を使用してDRD1活性を分析する。詳細には、48時間後、細胞を滅菌PBS (pH7.2) で洗浄し、細胞を1mM~1 μ Mの範囲の濃度の20 μ lのドーパミン基質と共に37℃で2時間インキュベートする。非誘導対照として、細胞を20 μ lのPBS (pH7.2) と共にインキュベートする。インキュベーション後、細胞をPBS (pH7.2) で洗浄し、20 μ lの溶解緩衝液を添加する。溶解は、振盪しながら室温 (RT) で15分間行う。続いて、40 μ lの検出溶液を添加し、細胞を振盪しながら室温で20分間インキュベートする。分析前に室温で15分間インキュベートした80 μ lのKinase-Glo試薬を用いて反応を停止させる。プレートリーダー (Synergy LX (BioTek)) を使用して発光を測定し、標準分析プログラムを使用してデータを分析する。

【0441】

実施例3：T7ウイルスプロモーターを使用して、核外のDRD1-GFP及びLエンハンサータンパク質構築物の転写を開始することに成功した。

本実施例では、DRD1-GFPを、T7プロモーターと組み合わせて標的膜タンパク質を発現することが困難な例示的なものとして選択して、T7のようなウイルスポリメラーゼを使用して核外で転写を開始できることを実証した。実施例1と同様に、ウイルスポリメラーゼは標準的な真核生物プロモーターの制御下にあり、対応するmRNAは核外輸送に依存していた。

【0442】

図6A~6Bは、T7保有ベクターで同時トランスフェクトされた場合の、T7プロモーターからのECMV由来のLタンパク質とタンデムなDRD1-GFPの発現の成功を実証している。HEK293細胞を24ウェルプレートに 0.05×10^6 細胞/ウェルで播種し、37℃及び5% CO₂で一晩インキュベートした後、上記のようにEG10又はEG12及びEG4のいずれかで一過性にトランスフェクトした。DRD1-GFP発現を、蛍光顕微鏡を使用して24時間後及び48時間後にモニターした。CCDカメラ (Amscope) を用いて画像を撮影し、ISCapture (Amscope) で分析した。本実施例は、標的タンパク質としてのDRD1-GFP及びエンハンサータンパ

ク質としてのECMVのLタンパク質とタンデムで、ウイルスポリメラーゼとしてのT7の使用の成功を実証する。

【0443】

実施例4：DRD1-GFP及びLエンハンサータンパク質の発現は、異なる哺乳動物プロモーターと適合性である。

本開示による系、方法、及び組成物は、多種多様な哺乳動物プロモーターと適合性である。異なるプロモーターからの標的タンパク質及びエンハンサータンパク質の共発現の適合性を実証するために、DRD1-GFPを例示的な標的タンパク質として使用した。実施例2に記載されるように、DRD1-GFPの正確な発現及びトランスロケーションは、蛍光顕微鏡によって容易に検出することができる。CMVプロモーター（EG10）の他に、EF1- α （EG22）及びSV40（EG23）を使用し、続いて同一のDRD1-GFP IRES Lアセンブリを使用する。

【0444】

異なる哺乳動物プロモーターの制御下のDRD1-GFP融合物を、HEK293細胞において発現させる。HEK293細胞を24ウェルプレートに 0.05×10^6 細胞／ウェルで播種し、37℃及び5% CO₂で一晩インキュベートした後、上記のようにEG8、EG22又はEG23のいずれかで一過性にトランスフェクトする。DRD1-GFP発現を、蛍光顕微鏡を使用して24時間後及び48時間後にモニターする。CCDカメラ（Amscope）を用いて画像を撮影し、ISCapture（Amscope）で分析する。

【0445】

実施例5：試験したLエンハンサータンパク質のいずれかを使用して、DRD1-GFP発現及び局在化が首尾よく増強され得る。

理論に束縛されるものではないが、組換え挿入された標的タンパク質ポリヌクレオチドの発現を調節するために使用され得る1つの機構は、孔遮断タンパク質の導入である。細胞調節を制御する利点を依然として保持しながら、この系の一実施形態において天然又は合成の孔遮断タンパク質を互いに交換することができることを実証するために、ECMVのリーダータンパク質（EG10）、タイラーウイルスのリーダータンパク質（EG19）、ポリオウイルスの2Aプロテアーゼ（EG21）及び水疱性口内炎ウイルスのMタンパク質（EG20）を、例示的な標的タンパク質としてのDRD1-GFPとタンデムにクローニングした。実施例2に記載されるように、DRD1-GFPの正確な発現及びトランスロケーションは、蛍光顕微鏡によって容易に検出することができる。

【0446】

異なるエンハンサータンパク質とタンデムのDRD1-GFP融合物を、HEK293細胞において発現させる。HEK293細胞を24ウェルプレートに 0.05×10^6 細胞／ウェルで播種し、37℃及び5% CO₂で一晩インキュベートした後、上記のようにEG8、EG19、EG20又はEG21のいずれかで一過性にトランスフェクトする。DRD1-GFP発現を、蛍光顕微鏡を使用して24時間後及び48時間後にモニターする。CCDカメラ（Amscope）を用いて画像を撮影し、ISCapture（Amscope）で分析する。

【0447】

実施例6：Lエンハンサータンパク質の発現は、囊胞性線維症膜貫通コンダクタンス制御因子（CFTR）の発現を改善する。

CFTRを更なる例として使用して、エンハンサータンパク質としての孔遮断タンパク質と組み合わせた標的タンパク質としての膜タンパク質の共発現が、高密度の活性イオンチャネルを生じたことを実証した。CFTRは、上皮細胞膜を横断して塩化物イオンを伝導するABCトランスポータークラスの膜貫通トランスポーターである。CFTRは、学術的標準を使用する場合、不均一な様式で発現することが知られている。不均一性は、ABCトランスポーターの精製又は分析における困難性を増大させる。均一性の改善を実証するために、CFTRを、例示的な系（EG25）の骨格にクローニングするか、又はP

10

20

30

40

50

C R 産物として使用した。比較として、学術的標準 (E G 2 4) を対照として併用した。
【0 4 4 8】

C F T R 構築物を H E K 2 9 3 細胞において発現させた。H E K 2 9 3 細胞を 6 ウェルプレートに 0.3×10^6 細胞/ウェルで播種し、 37°C 及び 5 % CO_2 で一晩インキュベートした後、上記のように E G 2 5、E G 2 5 の P C R 産物又は E G 2 4 のいずれかで一過性にトランスフェクトした。C F T R 発現を、顕微鏡を用いて 2 4 時間後及び 4 8 時間後にモニターした。細胞を回収し、4 8 時間後に R I P A 緩衝液 (C e l l G e n e) を用いて溶解した。溶解物を清澄化し、S D S - P A G E (6 ~ 1 2 % B O L T、T h e r m o F i s h e r)、続いて抗 C F T R (A b c a m、第 2 の抗マウス - h r p) を使用するウェスタンブロット (N C 膜、T h e r m o F i s h e r) によって分析した。

10

【0 4 4 9】

図 6 は、L タンパク質と C F T R との共発現の影響を示す。学術的標準はウェスタンブロット上で広いバンドを生じたが、E G 2 5 構築物に基づく転写及び翻訳は、A B C トランスポーターの高度に均一な発現を示す明確なバンドを生じた。更に、この実施例は、発現系がベクター又は P C R 産物として細胞に送達することができることを実証する。

【0 4 5 0】

実施例 7：翻訳後修飾を必要とする例示的なタンパク質として使用される C 1 エステラーゼ阻害剤 (C 1 - I n h) タンパク質の産生。

C 1 - I n h は、正確な翻訳後修飾を生じる分泌タンパク質を発現することが困難な開示された系の適用を例示するための例示的な標的タンパク質として使用される。C 1 - I n h は、セルピンスーパーファミリーに属するプロテアーゼ阻害剤である。分泌タンパク質として、C 1 - I n h は高度にグリコシル化されており、したがって、組換え発現のための困難な標的であることが証明される。この系が正確にグリコシル化された C 1 - I n h を高収率で産生できることを実証するために、提示された系 (E G 1 6) を用いて C 1 - I n h - h i s 融合物を発現させる。比較として、学術的及び産業的標準 (E G 1 5) を一緒に使用する。

20

【0 4 5 1】

C 1 - I n h - h i s 融合物を H E K 2 9 3 細胞において発現させる。H E K 2 9 3 細胞を T 1 7 5 フラスコに 4.9×10^6 細胞で播種し、 37°C 及び 5 % CO_2 で一晩インキュベートした後、上記のように E G 1 5 又は E G 1 6 のいずれかで一過性にトランスフェクトする。C 1 - I n h - h i s 発現を、顕微鏡を用いて 2 4 時間後及び 4 8 時間後にモニターする。タンパク質を含有する上清を 4 8 時間後に回収し、上清を濾過 (2 2 μm 、ニトロセルロース) によって清澄化する。C 1 - I n h を精製するために、H i s - 樹脂 (G E H e a l t h c a r e H i s T r a p) を 2 0 m M T r i s (p H 7.5)、5 0 m M N a C l で平衡化した後、上清に添加する。上清を樹脂と共に 4°C で 2 時間振盪しながらインキュベートする。樹脂を沈降させ、5 C V の 2 0 m M T r i s (p H 7.5)、5 0 m M N a C l で洗浄し、タンパク質を 3 C V の 2 0 m M T r i s (p H 7.5)、5 0 m M N a C l、5 0 0 m M イミダゾールで溶出した。精製を S D S - P A G E (6 ~ 1 2 % B O L T、T h e r m o F i s h e r) によって分析し、タンパク質含有画分をプールし、濃縮する。タンパク質をサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) (S u p e r d e x 2 0 0、T h e r m o F i s h e r) によって更に研磨し、画分を S D S - P A G E (6 ~ 1 2 % B O L T、T h e r m o F i s h e r) によって分析する。タンパク質含有画分をプールし、グリコシル化パターンに関する分析及び配列分析に送る。

30

40

【0 4 5 2】

実施例 8：可溶化が困難なタンパク質の例として使用される、I L 2 誘導性 T 細胞キナーゼ (I T K) の産生。

I T K を例示的な標的タンパク質として使用して、可溶性タンパク質を発現することが困難な開示された系の適用を例証した。I T K は、キナーゼの T E C ファミリーのメンバーであり、T 細胞増殖及び T 細胞における分化において役割を果たすと考えられている。

50

また、ITKを使用して、バッチ間の酵素活性の一貫性及び本明細書に開示される方法のスケラビリティを実証した。ITKを3×10mL、100mL、及び1000mLの増殖培地中で発現させた。更に、ITK-L-hisタンパク質融合構築物（EG9）を使用して、エンハンサータンパク質が、調節を制御する能力を失うことなく、組換え発現された標的タンパク質に融合することができることを実証した。ITK-his融合物を、提示された系（EG17）並びに比較として学術的及び産業的標準（EG18）において発現させた。

【0453】

ITK-his及びITK-L-his融合物をHEK293細胞において発現させた。HEK293細胞を10mL、100mL又は1000mLのExp293培地中に2×10⁶細胞/mLで播種し、37℃、120rpm及び5% CO₂で一晩インキュベートした後、上記のようにEG9、EG17又はEG18のいずれかで一過性にトランスフェクトした。細胞を48時間後に回収し（5,000×g、15分、4℃）、細胞ペレットを、更なる使用まで-80℃で保存した。ITKを精製するために、細胞を溶解緩衝液（40mMトリス、7.5μL；20mM MgCl₂；0.1mg/mL BSA；50μM DTT；及び2mM MnCl₂、プロテアーゼ阻害剤、DNase）中に再懸濁し、超音波処理（2分、10秒ON、10秒OFF、40%振幅）によって溶解させ、粗細胞抽出物を清澄化した（100,000×g、45分、4℃）。His-樹脂（GE Healthcare HisTrap）を洗浄緩衝液（40mM Tris、7.5；20mM MgCl₂；0.1mg/mL BSA；50μM DTT；及び2mM MnCl₂）で平衡化した後、清澄化した溶解物に添加した。溶解物を樹脂と共に4℃で2時間振盪しながらインキュベートした。樹脂を沈降させ、5CVの洗浄緩衝液で洗浄し、タンパク質を3CVの溶出緩衝液（洗浄緩衝液+300mMイミダゾール）で溶出した。

【0454】

精製をSDS-PAGE（6～12%BOLT、ThermoFisher）によって分析した。図9Aは、ITKのHisタグ精製のSDS-PAGE結果を示す。左から右に、レーンは、タンパク質ラダー（Seebblue2+前染色）、500ng GFP、2μg ITK、5μg ITK、及び10μg ITKを示す。次いで、SDS-PAGEゲルを非還元ウェスタンブロットによって分析した。タンパク質をニトロセルロース膜に移し、一次マウス抗His抗体及び二次抗マウスHRP抗体と結合させ、次いでNB T/BCIP溶液を使用して可視化した。図9Bは、ウェスタンブロット分析の結果を示し、ITKタンパク質単量体及び二量体を矢印で示す。

【0455】

SDS-PAGE分析の後、タンパク質含有画分をプールし、濃縮する。タンパク質をサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）（Superdex 200、ThermoFisher）によって更に生成し、画分をSDS-PAGE（6～12%BOLT、ThermoFisher）によって分析する。タンパク質含有画分をプールし、リン酸化パターンに関する分析及び配列分析に送る。

【0456】

製造業者の指示に従ってADP-Gloキナーゼアッセイ（Promega）を使用してITK活性を分析する。E4Y1をITK基質として使用する。ITK濃度は0.1～500ngで変動する。組換え発現されたITKの品質を標準的な入手可能なITKと比較するために、ITKキナーゼ酵素系（Promega）を使用する。ITK、基質及びATPを洗浄緩衝液中で作業濃度に希釈する。ITKを基質及びATPと混合し、室温（RT）で60分間インキュベートする。ADP-Glo試薬を添加し、反応物を室温で40分間インキュベートする。キナーゼ検出試薬を添加することによって反応を停止させ、室温で30分間インキュベートする。プレートリーダー（Synergy LX（BioTek））を使用して発光を測定し、標準分析プログラムを使用してデータを分析する。

【0457】

実施例 9：IL2 誘導性 T 細胞キナーゼ (ITK) の産生は、CHO-K1 細胞と適合性であった。

この系の実施形態と他の真核細胞株との適合性を実証するために、HEK293 の代わりに CHO 細胞を使用して実施例 7 の実験を繰り返す。ITK-his は、提示された系 (EG17) 又は産業的及び学術的標準 (EG18) のいずれかにおいて発現される。

【0458】

ITK-his 融合物を、CHO-K1 細胞において発現させる。CHO-K1 細胞を 2×10^6 細胞/mL 100 mL で播種し、37℃、120 rpm 及び 5% CO₂ で一晩インキュベートした後、上記のように EG17 又は EG18 のいずれかで一過性にトランスフェクトする。細胞を 48 時間後に回収し (5,000×g、15 分、4℃)、細胞ペレットを、更なる使用まで -80℃ で保存する。ITK を精製するために、細胞を溶解緩衝液 (40 mM トリス、7.5 µL; 20 mM MgCl₂; 0.1 mg/mL BSA; 50 µM DTT; 及び 2 mM MnCl₂、プロテアーゼ阻害剤、DNase) 中に再懸濁し、超音波処理 (2 分、10 秒 ON、10 秒 OFF、40% 振幅) によって溶解させ、粗細胞抽出物を清澄化する (100,000×g、45 分、4℃)。His-樹脂 (GE Healthcare HisTrap) を洗浄緩衝液 (40 mM Tris、7.5; 20 mM MgCl₂; 0.1 mg/mL BSA; 50 µM DTT; 及び 2 mM MnCl₂) で平衡化した後、清澄化した溶解物に添加する。溶解物を樹脂と共に 4℃ で 2 時間振盪しながらインキュベートする。樹脂を沈降させ、5 CV の洗浄緩衝液で洗浄し、タンパク質を 3 CV の溶出緩衝液 (洗浄緩衝液 + 300 mM イミダゾール) で溶出する。精製を SDS-PAGE (6~12% BOLT, ThermoFisher) によって分析し、タンパク質含有画分をプールし、濃縮する。タンパク質をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) (Superdex 200, ThermoFisher) によって更に研磨し、画分を SDS-PAGE (6~12% BOLT, ThermoFisher) によって分析した。タンパク質含有画分をプールし、リン酸化パターンに関する分析及び配列分析に送る。

【0459】

実施例 10：IL2 誘導性 T 細胞キナーゼ (ITK) の産生は、Sf9 細胞と適合性であった。

提示された系と他の真核細胞株との適合性を実証するために、HEK293 の代わりに Sf9 細胞を使用して実施例 7 の実験を繰り返す。ITK-his は、提示された系 (EG17) 又は産業的及び学術的標準 (EG18) のいずれかにおいて発現される。

【0460】

ITK-his 融合物を、CHO-K1 細胞において発現させる。CHO-K1 細胞を 2×10^6 細胞/mL 100 mL で播種し、26℃ 及び 130 rpm で一晩インキュベートした後、上記のように EG17 又は EG18 のいずれかで一過性にトランスフェクトする。細胞を 48 時間後に回収し (5,000×g、15 分、4℃)、細胞ペレットを、更なる使用まで -80℃ で保存する。ITK を精製するために、細胞を溶解緩衝液 (40 mM トリス、7.5 µL; 20 mM MgCl₂; 0.1 mg/mL BSA; 50 µM DTT; 及び 2 mM MnCl₂、プロテアーゼ阻害剤、DNase) 中に再懸濁し、超音波処理 (2 分、10 秒 ON、10 秒 OFF、40% 振幅) によって溶解させ、粗細胞抽出物を清澄化する (100,000×g、45 分、4℃)。His-樹脂 (GE Healthcare HisTrap) を洗浄緩衝液 (40 mM Tris、7.5; 20 mM MgCl₂; 0.1 mg/mL BSA; 50 µM DTT; 及び 2 mM MnCl₂) で平衡化した後、清澄化した溶解物に添加する。溶解物を樹脂と共に 4℃ で 2 時間振盪しながらインキュベートする。樹脂を沈降させ、5 CV の洗浄緩衝液で洗浄し、タンパク質を 3 CV の溶出緩衝液 (洗浄緩衝液 + 300 mM イミダゾール) で溶出する。精製を SDS-PAGE (6~12% BOLT, ThermoFisher) によって分析し、タンパク質含有画分をプールし、濃縮する。タンパク質をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) (Superdex 200, ThermoFisher) によって更に研磨

し、画分をSDS-PAGE（6～12% BOLT, ThermoFisher）によって分析する。タンパク質含有画分をプールし、リン酸化パターンの分析及び配列分析に送る。

【0461】

実施例11：インビボ研究の材料及び方法

DNA分子の構築

全てのアセンブリを、高コピー数複製起点（ColE1）を制御するプロモーター、続いてターミネーター（rrnB T1及びT2ターミネーター）を含む大腸菌中で増殖し得るプラスミド骨格に作製した。この後に、第2のターミネーター（ファージラムダからの転写ターミネーター）によってベクターの残りから単離される抗生物質耐性遺伝子を制御するプロモーターが続く。骨格の元素を含む遺伝子は、ホスホルアミダイト化学によって合成した。

10

【0462】

プラスミドの構築に使用される構造遺伝子をホスホルアミダイト化学によって合成し、制限消化及びEsp3I制限を介したゴールデンゲートアセンブリを使用して、3'領域についてはGATG及び5'領域についてはTAAG上のアセンブリ部位で上記ベクターにクローニングした。図10を参照のこと。

【0463】

図10Aに示される構築物を合成し、3'についてはGATG、5'についてはTAAGのアセンブリ部位を有するESP3Iを用いてpVax1の適合バージョンにクローニングして、図10Bに示すプラスミドを得た。

20

【0464】

図10Cに示される構築物を合成し、3'についてはGATG、5'についてはTAAGのアセンブリ部位を有するESP3Iを用いてpVax1の適合バージョンにクローニングして、図13Dに示すプラスミドを得た。

【0465】

【表7-1】

表7：挿入物の核酸配列及びアミノ酸配列

プラスミド中の遺伝子名	配列のタイプ	配列決定	特徴	配列番号
図10Bに示されるプラスミド中のルシフェラーゼ	アミノ酸	MEDAKNIKKGPAPFYPLEDGTAGEQLHKAMKRYALVPG TIAFTDAHIEVDITYAEYFEMSVRLAEAMKRYGLNTNHRIV VCSENSLQFFMPVLGALFIGVAVAPANDIYNERELLNSM GISQPTVVVFVSKKGLQKILNVQKKLPPIQKIIIMDSKTDYQ GFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESFDRDKTIALIMNS SGSTGLPKGVALPHRTACVRFSHARDPIFGNQIIPDTAIL SVVPFHHGFGMFTTLGYLICGFRVVLMYRFEELFLRSL QDYKIQSALLVPTLFSFFAKSTLIDKYDLSNLHEIASGGA PLSKEVGEAVAKRFHLPGIRQGYGLTETTSAILITPEGDD KPGAVGKVVPPFEAKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGP MIMSGYVNNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFI VDRLKSLIKYKGYQVAPAELESILLQHPNIFDAGVAGLPD DDAGELPAAVVVLEHGKTMTEKEIVDYVASQVTTAKKLR GGVVFVDEVKGLTGKLDARKIREILIKAKKGGKIAV*		19

30

40

【0466】

50

【表 7 - 2】

(表 7 の続き)

プラスミド 中の遺伝 子名	配列 のタ イプ	配列決定	特徴	配列 番号
	核酸	GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTA CGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGC GTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACC GCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGT ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGA CGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTT GGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCAT TATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGG CAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTG ATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCG GTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTG ACGTC AATGGGAGTTTGT TTTGGCACCAAAATCAACGG GACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGAC GCA AATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGGAGGTCTAT ATAAGCAGAGCTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAA GGGCCCAGCGCCATTCTACCCACTCGAAGACGGGACC GCCGGCGAGCAGCTGCACAAAGCCATGAAGCGCTACG CCCTGGTGGCCGGCACCATCGCCTTTACCGACGCACAT ATCGAGGTGGACATTACCTACGCGGAGTACTTCGAGAT GAGCGTTCGGCTGGCAGAAGCTATGAAGCGCTATGGG CTGAATACAAACCATCGGATCGTGGTGTGCAGCGAGAA TAGCTTGCA GTTCTTCATGCCCGTGTGGGTGCCCTGTT CATCGGTGTGGCTGTGGCCCCAGCTAACGACATCTACA ACGAGCGCGAGCTGCTGAACAGCATGGGCATCAGCCA GCCACCGTCGTATTCGTGAGCAAGAAAGGGCTGCAA AAGATCCTCAACGTGCAAAAGAAGCTACCGATCATACA AAGATCATCATCATGGATAGCAAGACCGACTACCAGG GCTTCCAAAGCATGTACACCTTCGTGACTTCCCATTTG CCACCCGGCTTCAACGAGTACGACTTCGTGCCCGAGA GCTTCGACCGGGACAAAACCATCGCCCTGATCATGAAC AGTAGTGGCAGTACCGGATTGCCCAAGGGCGTAGCCC TACCGCACCGCACCGCTTGTGTCCGATTCAATCATGCC CGCGACCCCATCTTCGGCAACCAGATCATCCCCGACA CCGCTATCCTCAGCGTGGTGCCATTTACCAACGGCTTC GGCATGTTCAACACGCTGGGCTACTTGATCTGCGGCTT TCGGGTGCTGCTCATGTACCGCTTCGAGGAGGAGCTAT TCTTGGCGAGCTTGCAAGACTATAAGATTCAATCTGCC CTGCTGGTGCCCACTATTTAGCTTCTTCGCTAAGAG CACTCTCATCGACAAGTACGACCTAAGCAACTTGCACG AGATCGCCAGCGGCGGGGCGCCGCTCAGCAAGGAGGT AGGTGAGGCCGTGGCCAAACGCTTCCACCTACCAGGC ATCCGCCAGGGCTACGGCCTGACAGAAACAACCAGCG CCATTCTGATCACCCCGAAGGGGACGACAAGCCTGG CGCAGTAGGCAAGGTGGTGCCCTTCTTCGAGGCTAAGG TGGTGGACTTGGACACCGGTAAAGACACTGGGTGTGAAC CAGCGCGGCGAGCTGTGCGTCCGTGGCCCCATGATCA TGAGCGGCTACGTTAAACAACCCGAGGCTACAAACGCT CTCATCGACAAGGACGGCTGGCTGCACAGCGGCGACA TCGCTACTGGGACGAGGACGAGCACTTCTTCATCGTG GACCGGCTGAAGAGCCTGATCAAATACAAGGGCTACC AGGTAGCCCCAGCCGAACCTGGAGAGCATCCTGCTGCA ACACCCCAACATCTTCGACGCGCGGGTCCCGGGCCTG CCCGACGACGATGCCGGCGAGCTGCCCGCCGAGTCCG TCGTGCTGGAACACGGTAAACCATGACCGAGAAGGA GATCGTGGACTATGTGGCCAGCCAGGTTACAACCGCCA AGAAGCTGCGCGGTGGTGTGTGTTCTGTTGGACGAGGTG CCTAAAGGACTGACCGGCAAGTTGGACGCCCGCAAGA TCCGCGAGATTCTCATTAAGGCCAAGAAGGGCGGGCAA GATCGCCTGTGTA	下線CMVエ ンハンサー 太字CMVプ ロモーター イタリック体 ルシフェラー ゼ遺伝子	20

10

20

30

40

【 0 4 6 7 】

【表 7 - 3】

(表 7 の続き)

プラスミド 中の遺伝子 子名	配列 のタイプ	配列決定	特徴	配列 番号
図10D、 13Bに示 されるプ ラスミド中の L1	アミ ノ酸	MATTMEQETCAHSLTFEECPKCSALQYRNGFYLLKYDE EWYPEELLTDGEDDVFDPELDMEVVFELQ*		21
	核酸	ATGGCCACAACCATGGAACAAGAGACTTGCGCGCACT CTCTCACTTTTGAGGAATGCCCAAATGCTCTGCTCTA CAATACCGTAATGGATTTTACCTGCTAAAGTATGATGAA GAATGGTACCCAGAGGAGTTATTGACTGATGGAGAGGA TGATGTCTTTGATCCCGAATTAGACATGGAAGTCGTTTT CGAGTTACAGTAA		22
図10D、 13Bに示 されるIR ES	核酸	CCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAA ATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCAC CATATTGCCGTCTTTTGCAATGTGAGGGCCCGGAAC CTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTT TCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGT CGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGAC AAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTCAGGCAGCGGAAC CCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGC CACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCC CAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGT CAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGA AGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGATGGGATCTGAT CTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTC GAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCCGAACCACGGG GACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAAT		23

10

20

【0468】

細胞株—培養及びトランスフェクション

HEK293細胞を使用して、構築物を動物に注射する前にインビトロで検証した。HEK293接着細胞(CLS)を、10%ウシ胎仔血清(Gibco)及び50,000 UのPen Strep(Gibco)を補充したダルベッコ改変イーグル培地高グルコース(Gibco)中で培養した。HEK293細胞を37℃及び5% CO₂で80%コンフルエントまで増殖させた後、293fectin(ThermoFisher)を製造業者の指示に従って使用して一過的にトランスフェクトした。タンパク質発現細胞を、37℃で5分間、0.5%トリプシン溶液を使用して細胞を剥離し、掻き取ることによって48時間後に収集した。細胞をペレット化し(5,000×g、15分、4℃)、上清を廃棄した。細胞ペレットを、更なる使用まで-80℃で保存した。

30

【0469】

HEK293懸濁適応細胞を、Expi293無血清培地(Gibco)中で培養した。HEK293細胞を3.0×10⁶細胞/mLで37℃、5% CO₂及び120rpmで播種した後、ExpiFectamin 293(Gibco)を製造業者の指示に従って使用して一過性にトランスフェクトした。実施例に応じて、タンパク質発現のために、48時間〜72時間後に細胞をペレット化(5,000×g、15分、4℃)することによって細胞を回収し、上清を廃棄した。細胞ペレットを、更なる使用まで-80℃で保存した。分泌タンパク質については、上清を96時間後に回収し、遠心分離(5,000×g、15分、4℃)によって清澄化した。上清を、更なる分析又は精製のために直ちに使用した。

40

【0470】

動物

動物研究のために、BALB/cマウス(Charles River Laboratories)及び野生型マウスを使用した。対応する疾患モデルも使用することができる。年齢を実施例に示す。同性の動物を、適切な寝具を含むポリカーボネートケージに収

50

容した群とした。マウスは、目に見える尾の刺青又は電子識別チップの埋め込みのいずれかによって識別した。マウスは、動物を実験室環境に慣れさせるために、処置前に少なくとも5日間順応させた。ハウジングは、動物環境強化のための社会的ハウジング及び咀嚼物を用いて、Guide for the Care and Use of Laboratory Animalsに記載されているように設定した。目標環境条件は、19～25℃の温度、30%～70%の湿度、並びに12時間の明及び12時間の暗の光サイクルであった。飼料（Lab Diet Certified CR Rodent Diet 5CR4）をペレットの形態で自由に与えた。水は、逆浸透及び紫外線照射によって処理された都市水道水の形態で自由に利用可能に提供された。

【0471】

10

実施例12：ルシフェラーゼを伴うLエンハンサータンパク質のインビボ発現は、ルシフェラーゼ発現の安定性及び持続時間を増加させる。

インビボでのホタルルシフェラーゼの発現を評価するために、6～8週齢の雌BALB/cマウスの各4匹のマウスの群を使用した。PBS（137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄、1.8mM KH₂PO₄ pH7.4）中25μgの50μlの、（a）図9Bに示されるルシフェラーゼをコードするプラスミド、又は（b）図9Dに示されるエンハンサータンパク質と連続するルシフェラーゼをコードするプラスミドを、群に1回皮内注射した。ベースライン測定のために、4匹のマウスに50μlのPBSのみを皮内注射した。用量の体積は、背部の腰部又は仙骨領域の画定された領域内でシリンジ／針を使用して投与した。

20

【0472】

動物を群に無作為化し、体重を1日目に記録し、その後研究の終了まで隔週で記録した。有害事象（RM、SD、RD）を良好な実験室基準に従って記録した。>30%の体重減少が1回観察されるか、又は>25%の体重減少が3回連続して測定された任意の個々の動物を安楽死させた。

【0473】

ルシフェラーゼの発現を、2日目（注射後24時間）、3日目（注射後48時間）、4日目（注射後72時間）、11日目、18日目、25日目、32日目、38日目、53日目、67日目に動物全体の生物発光イメージングによって測定した。全ての動物を安楽死させた試験のエンドポイントは、67日目であった。生物発光イメージングを麻酔下で行った。背面画像をルシフェリンの基質注射の10分後に撮影した。基質を、最近の体重に基づいて10mL/kgで150mg/kg i.pで投与した。図11及び12を参照されたい。

30

【0474】

これらの結果は、ルシフェラーゼがEMCVのL1タンパク質などのエンハンサータンパク質と共に発現される場合、ルシフェラーゼのインビボ発現がより長く維持されることを示す。図10に示されるように、対照動物におけるルシフェラーゼの発現レベルは、最初は高く、次いで処置後30日までに減少する。対照的に、ルシフェラーゼの発現レベルは、L1タンパク質と組み合わせて発現される場合、より長い期間にわたって、処理後110日まででさえ、定常レベルで維持される。すなわち、ルシフェラーゼがL1タンパク質と共に発現される場合、経時的なルシフェラーゼ発現レベルの変動がより少ない。

40

【0475】

更に、ルシフェラーゼ及びL1タンパク質を発現する動物間のルシフェラーゼの発現レベルの変動は、ルシフェラーゼのみを発現する動物間よりも小さい。この効果は、経時的に、例えば53日の時点で特に明らかである。図11を参照のこと。図9Bのプラスミドを注射した動物の25%（4匹のうち1匹）のみが注射後53日目に検出可能なルシフェラーゼ発現を示すが、図9Dのプラスミドを注射した動物の100%（3匹のうち3匹）が53日目の時点でルシフェラーゼ発現を示した。したがって、開示される方法は、動物間の標的タンパク質の発現レベルの変動性を減少させ、標的タンパク質の発現におけるより多くの再現性を提供し、これは、治療において重要な用途を有する。

50

【0476】

最後に、図12は、エンハンサータンパク質の存在下でのルシフェラーゼの発現が、より長期間にわたってより安定な発現をもたらすことを更に実証する。ルシフェラーゼのみを発現する対照マウスは、数日間高レベルのルシフェラーゼを示し、続いて発現を最小まで漸減させるが、L1タンパク質の存在下でルシフェラーゼを発現するマウスは、123日間、検出可能かつ安定なルシフェラーゼ発現を示す。この結果は、標的タンパク質のインビボ発現のための開示された組成物及び方法の優れた利点を実証する。

【0477】

レポーター遺伝子発現の経時的な有益な効果が、投与経路又は注射部位のいずれかに特異的でないことを実証するために、皮下投与を用いて実験を繰り返した。手短に言えば、6～8週齢の4匹の雌BALB/cマウスの群を使用した。これらの群に、PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ pH 7.4) 中の30 µg 裸プラスミド200 µlを、図9A及び9Bに示されるルシフェラーゼをコードするプラスミド、又は図9C及び9Dに示されるエンハンサータンパク質と連続してルシフェラーゼをコードするプラスミドのいずれかと共に、1回皮下注射した。ベースライン測定のために、4匹の対照マウスをPBSのみで処置した。用量は、肩甲骨間への皮下注射として注射針を用いて投与した。

【0478】

マウスに0日目に投与し、ルシフェラーゼの発現を、1、2、3、7、15、21、28、35及び42日目に動物の全身の生物発光イメージングによって測定した(図19において定量化されたイメージングデータ)。画像化のために、ルシフェリン(すなわち、ホタルルシフェラーゼの基質)を、10 mL/kg 容量で150 mg/kgの用量でマウスの腹腔内(i.p.)腔に注射した。画像は、麻酔下での基質投与の10分後に取得した。注射部位に焦点を合わせるために、マウスを腹臥位で撮像した。

【0479】

図19は、エンハンサータンパク質と組み合わせてホタルルシフェラーゼを発現するプラスミド(Fluc EG)又はエンハンサータンパク質を含まない同じプラスミド(Fluc Std)のいずれかでBALB/cマウスを皮下処置した後のホタルルシフェラーゼ(Fluc)の生物発光イメージングの結果を示す。上記のように、エンハンサータンパク質の添加は、レポーター遺伝子が機能的に発現される時間を増加させる。エンハンサータンパク質は、実験の全期間にわたって安定した発現をもたらすが、エンハンサータンパク質なしでは、活性ルシフェラーゼ発現の喪失を数日以内に検出することができる。驚くべきことに、エンハンサータンパク質の安定化効果は、注射部位に依存しない。この結果は、標的タンパク質のインビボ発現のための本明細書に開示される組成物及び方法の一般的な適用性を実証する。

【0480】

実施例13：アダリムマブを伴うLエンハンサータンパク質の発現は、アダリムマブタンパク質の品質及び発現レベルを改善する

アダリムマブをコードする核酸配列を含む対照プラスミド(EG141、図13A)、及びアダリムマブをコードする核酸配列と組み合わせてエンハンサー遺伝子を含むプラスミド(EG140、図13B)からのHEK293T細胞においてアダリムマブが発現されたかどうかを試験するために、以下の実験を行った。

【0481】

0日目に、HEK293T細胞を24ウェルプレートに20,000細胞/ウェルで播種した。1日目に、増殖培地をOpti-MEM (450 µl/ウェル)に交換した。次いで、標準的なトランスフェクション手順に従って、ウェルあたり0.5 µgのプラスミド及び1 µgのPEIを1:2の比で使用して、細胞をトランスフェクトした。合計6つの複製を使用した。3日目に、細胞培養上清の上清を、ELISA及び免疫蛍光顕微鏡検査のための細胞固定のために収集した。500×gで5分間実施した遠心分離を使用して、残存する細胞破片を除去した。次いで、透明な上清を新しい1.5 mLのエッペンド

ルフチューブにピペットで移し、ELISAによる分析まで -20°C で保存した。

【0482】

細胞を、10%中性緩衝ホルマリンを用いて室温(RT)で10分間固定し、0.2% Triton (登録商標) X-100を用いて室温で10分間透過処理した。DyLight 488 標識抗ヒト抗体 (IgG Fc Cross-Adsorbed Goat anti-Human, DyLight (登録商標) 488, Invitrogen-PI SA510134 ANTI-HUMAN IGG-FC XMIN D488) を1:500希釈で用いて、細胞を室温で1時間染色し、洗浄した。FLoid 蛍光顕微鏡を使用して細胞を画像化した。

【0483】

免疫蛍光の結果を図14に示す。結果は、アダリムマブがHEK293T細胞においてEG140及びEG141プラスミドの両方から発現されたことを示す。いずれのプラスミドからのアダリムマブの発現も容易に検出されたが、EMCV L1タンパク質と組み合わせたアダリムマブの発現(EG141から)は、アダリムマブを単独で発現させた場合(EG140から)よりもわずかに低かった。驚くべきことに、アダリムマブをL1エンハンサータンパク質と組み合わせて発現させると、エンハンサータンパク質の非存在下(図14A)と比較して、抗体の細胞内分布がより均一になる(図14B)。更に、アダリムマブがL1エンハンサーと組み合わせて発現される場合、アダリムマブ単独の発現時に見られるミスフォールドした又は折り畳まれていないタンパク質の存在を示す細胞内病巣は存在しない。これらの結果は、L1エンハンサータンパク質の存在が、細胞中で発現される組換えアダリムマブ抗体の発現の品質及び／又は量を改善することを更に支持する。

【0484】

更に、アダリムマブを細胞培養上清中で検出することができるかどうかを、直接酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)法を用いて試験した。ELISA実験のために、凍結細胞培養上清を解凍し、ELISA高結合プレートをコーティングするために使用した。2倍希釈系列の細胞培養上清を使用して、 $75\mu\text{l}$ /ウェルでコーティングを行った。陽性対照のために、組換えヒト抗TNF α 抗体(NBP2-62567、Novus Biologicals)の希釈系列を代わりに使用した。コーティングは 4°C で一晩行った。

【0485】

翌日、ELISAプレートをPBS-Tを用いて1回洗浄し、EZ Blockを用いて 37°C で2時間、ウェル当たり $150\mu\text{l}$ でブロックした。プレートを洗浄し、1:2000の希釈で二次抗体(抗ヒトHRP標識抗体、IgG(H+L)ヤギ抗ヒト、HRP、Invitrogen-A18805 GTXHU IGG HRP AFFINITY)と共に室温で1時間インキュベートした。プレートを、PBS-Tを用いて5回洗浄した。TMB基質を添加し($75\mu\text{l}$ /ウェル)、20分間インキュベートした後、停止溶液を添加した($75\mu\text{l}$ /ウェル)。Biotekプレートリーダーを使用して450nmでの吸光度を測定した。

【0486】

結果を以下の表15に示す。ELISAプレートをアダリムマブ発現HEK293T細胞に由来する細胞培養上清でコーティングしたので、結果は、アダリムマブがEG140トランスフェクト細胞及びEG141トランスフェクト細胞の両方の上清中で容易に検出可能であることを示唆する。EG140(対照)の発現時のアダリムマブのレベルは、EG141(アダリムマブ及びL1エンハンサーをコードするプラスミド)の発現時よりも>3倍高い。

【0487】

実施例14:Lエンハンサータンパク質の発現は、アダリムマブタンパク質の品質及び発現レベルを有意に改善する。

EG140トランスフェクト細胞又はEG141トランスフェクト細胞から発現及び分

10

20

30

40

50

泌された抗体が組換えヒトTNF- α に特異的に結合することができるかどうかを検出するために、以下の実験を行った。

【0488】

プラスミドEG140及びEG141に加えて、異なるポリアデニル化シグナルによってEG140及びEG141骨格とは異なる同じ発現カセット及び逆方向末端反復（ITR）に隣接する発現カセットを、動物におけるAAVの下流インビボ使用のための組換えAAVベクターを生成する目的で、AAVトランスファープラスミド骨格にクローニングした（図20）。HEK293T細胞において発現されたエンハンサータンパク質を有さない（図21）及び有する（図22）AAVトランスファープラスミドからのアダリムマブが、組換えヒトTNF- α に特異的に結合することができるかどうかを試験するために、以下の実験を行った。

10

【0489】

細胞を増殖させ、実施例13に記載のようにトランスフェクトした。しかしながら、実験13とは対照的に、高結合ELISAプレートを最初に組換えTNF- α （1 μ g/ml、75 μ l/ウェル）で4℃で一晩コーティングした。2日目に、ELISAプレートをPBSTで洗浄し、EZブロック試薬でブロックした。細胞培養上清試料をOpti-MEM（1：256）で希釈し、ブロックしたウェルに添加した（ウェル当たり75 μ l、37℃で1時間）。PBSTを使用してウェルを3回洗浄し、二次抗体（抗ヒトIgG HRP）を1：2000希釈で添加した（ウェル当たり75 μ l、37℃で1時間）。次いで、ウェルをPBSTを使用して5回洗浄した。75 μ lの3，3'，5，5'-テトラメチルベンジジン（TMB）基質を添加して、結合した抗体を検出した。75 μ lのTMB停止溶液を使用して反応を停止させ、BioTekマイクロプレートリーダーを使用して450 nmで吸光度を測定することによってシグナルを読み取った。

20

【0490】

いくつかの実験において、分泌されたアダリムマブの総濃度を、定量的ELISAを用いて測定した。これらの実験において、ELISAは、以下の改変を加えて上記のように実施した。細胞培養上清をEZ Block試薬で予め希釈し、予めコーティング及びブロッキングしたウェルに試料として添加した。陽性対照抗体である組換えモノクローナルアダリムマブ（Novus Biologicals NB001486）を、EZ Block試薬中で0、0.1、1、10及び100 ng/mlの濃度に希釈し、予めコーティング及びブロッキングしたウェルに標準曲線として添加した。他の全ての点において、ELISAを上記のように行った。450 nmでの吸光度を読み取った後、試料の吸光度値を、標準曲線の吸光度値を使用してng/mlの単位で総分泌アダリムマブ濃度に変換した。

30

【0491】

結果は、EG140トランスフェクト細胞からの細胞培養上清が、EG141トランスフェクト細胞と比較して約3倍多いTNF- α 結合ヒト抗体を含有することを示した（図16）。

【0492】

エンハンサータンパク質を含む（配列番号243～272）及び含まない（配列番号217～242）アダリムマブをコードするAAVトランスファープラスミドについての結果を、エンハンサータンパク質を含まない（STD）及びエンハンサータンパク質を含む（EG）アダリムマブをコードするトランスフェクトされたプラスミドの反復実験と共に、図23に示す。分泌されたアダリムマブ濃度を、定量ELISAによってng/mlで定量した。両方の場合において、エンハンサータンパク質の存在は、細胞上清におけるアダリムマブの総量を減少させた。注目すべきことに、エンハンサータンパク質と共に標準プラスミド中のアダリムマブの存在は、上清中のアダリムマブタンパク質の存在を39倍減少させ、一方、AAVトランスファープラスミド中のエンハンサータンパク質は、上清中のアダリムマブタンパク質の存在を77倍減少させた。

40

【0493】

50

アダリムマブ品質の分析を、細胞培養上清中のTNF- α 活性化のレベルによって試験した。活性アダリムマブはTNF- α を遮断する。この実験は、ルシフェラーゼTNF- α レポーター細胞を用いて行った。

【0494】

単離された細胞培養上清を、NF- κ Bの活性化を評価することによって試料中の生物活性TNF- α のレベルをモニターするように設計されたレポーター細胞を用いて分析した。HEK293細胞をNF- κ B誘導性分泌ホタルルシフェラーゼでトランスフェクトすることによって、レポーターHEK-Dual TNF- α 細胞株(InvivoGen)を作製した。TNF- α 処理の際に、NF- κ B経路が活性化され、これは、分泌されたルシフェラーゼの発現を導き、これは、ルシフェラーゼ基質を使用して検出することができる。EG140トランスフェクト細胞及びEG141トランスフェクト細胞の細胞培養上清、又はAAVトランスファープラスミド骨格にクローニングされた同じ発現カセット中のTNF- α 中和抗体の存在下では、NF- κ B活性化が阻害され、ルシフェラーゼシグナルが減少すると予測された。

【0495】

実験は以下のように行った。レポーター細胞を、DMEM+10%FBS中の96ウェルプレート(ウェルあたり5000細胞)に播種した。翌日、EG140トランスフェクト細胞及びEG141トランスフェクト細胞からの細胞培養上清を、示された比で細胞培養培地中に希釈し、1ng/mlヒト組換えTNF- α と室温で30分間混合した。次いで、96ウェルプレート中に予め播種したTNF- α レポーター細胞の細胞培地を、ウェル当たり100 μ lの混合物を使用して、予めインキュベートした細胞培養上清/TNF- α 試料と交換した。次いで、レポーター細胞を37℃で5時間インキュベートした。次いで、分泌されたルシフェラーゼシグナルを、Quant-i-Luc Goldアッセイ(InvivoGen)を製造業者の説明書に従って使用して検出して、TNF- α 活性化を検出し、マイクロプレートリーダーを使用してルシフェラーゼ活性を測定した。

【0496】

結果を図17、図24並びに表4及び5に示す。EG140トランスフェクト細胞及びEG141トランスフェクト細胞の両方から単離された細胞培養上清は、NF- κ B駆動ルシフェラーゼ発現のTNF- α 媒介活性化を阻害することができたが、EG140トランスフェクト細胞の上清は、EG141トランスフェクト細胞の上清と比較して、TNF- α 活性化の抑制において約3倍活性であった。

【0497】

【表4】

表4：エンハンサータンパク質を含む(EG)及び含まない(STD)アダリムマブ構築物の計算されたEC₅₀値

	構築物		倍数差
	pAdalimumab__STD (配列番号169～190)	pAdalimumab__EG (配列番号191～216)	
抗TNF α ELISAによって測定した分泌アダリムマブ濃度(μ g/ml)	121.5	3.1	39.1X
HEK293二重レポーター細胞における分泌アダリムマブ生物学的活性(力価のEC ₅₀)	246.8	11.14	22.2X

【0498】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5：エンハンサータンパク質を含む（EG）及び含まない（STD）アダリムマブ AAV 構築物の計算された EC₅₀ 値

	構築物		倍数差
	pAAVtransfer_ Adalimumab_ STD (配列番号217～ 242)	pAAVtransfer_ pAdalimumab_ EG (配列番号243～ 272)	
抗TNF α ELISAによって測定した分泌アダリムマブ濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	213.2	2.5	77.3X
HEK293二重レポーター細胞における分泌アダリムマブ生物学的活性(力価の EC ₅₀)	515.6	7.9	65.3X

10

【0499】

更に、分泌されたアダリムマブの相対的品質を推定するために、上清中の分泌されたアダリムマブの総量（定量的 ELISA によって測定される ng/ml 単位）を、TNF- α シグナル伝達を抑制する同じ上清の効力（HEK Dual TNF- α レポーター細胞を使用することによって測定される EC₅₀ 単位）と比較した。

【0500】

20

興味深いことに、標準系について産生及び分泌されたアダリムマブの量はより高かったが（図 24 並びに表 4 及び 5）、生物学的活性によって定義される、産生されたアダリムマブの相対的品質は、エンハンサータンパク質を有する構築物においてより高かった。すなわち、エンハンサータンパク質による活性は、標準構築物トランスフェクト細胞では 22.2 倍高く、AAV 構築物トランスフェクト細胞では 65.3 倍高かった。

【0501】

特に、生物学的に活性なアダリムマブの相対パーセンテージを更に分析した。図 25 は、エンハンサータンパク質共発現を伴う活性アダリムマブの相対量が、伴わない場合よりも高かったことを示す。重要なことに、活性発現アダリムマブのパーセンテージは、エンハンサータンパク質共発現で最大 60% 高かった。

30

【0502】

実施例 15：L エンハンサーの発現は、不活性アダリムマブ発現産物の数を減少させるようである。

EG140 プラスミド及び EG141 プラスミドで一過的にトランスフェクトされた HEK293T 細胞の細胞培養上清中の分泌抗体の総量を可視化するために、以下の実験を行った。細胞を 15 cm 細胞培養皿に 4E6 細胞/皿で播種し、40 μg のプラスミド及び 80 μg の PEI を使用してトランスフェクトした。プロテイン A/G アガロース樹脂 (MPbio) を製造業者の指示に従って使用して、細胞培養上清から抗体を精製した。等容量の精製抗体を SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティング (GenScript) により製造業者の指示に従って分析した。

40

【0503】

SDS PAGE (図 18A) 及びウェスタンブロット (図 18B) の結果は、精製されたアダリムマブ軽鎖及び重鎖が、EG140 及び EG141 トランスフェクト HEK293T 細胞の両方の細胞培養上清において検出されたことを示す。結果は、対照 EG140 トランスフェクト細胞において発現された精製アダリムマブの量が、EG141 トランスフェクト細胞において L1 エンハンサーの存在下で発現された精製アダリムマブよりも有意に多いことを示す。理論に束縛されるものではないが、EG140 トランスフェクト細胞によって発現される分泌アダリムマブの大部分は、EG141 トランスフェクト細胞によって発現される分泌アダリムマブと比較して、ミスフォールディング及び/又は細胞内病巣への不適切な局在化のために、潜在的に非機能的であると考えられる。

50

【0504】

実施例16：インビボでのエンハンサータンパク質の発現は、注射部位依存性効果を減少させる。

インビボでのアダリムマブの発現を評価するために、6～8週齢の雌BALB/cマウスの各6匹の群を使用した。これらの群に、PBS（137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na_2HPO_4 、1.8mM KH_2PO_4 pH 7.4）中の組換えAAVの 2×10^{11} ゲノムコピー $50 \mu\text{l}$ を筋肉内（i.m.）又は皮下（s.c.）経路のいずれかを介して1回注射した。使用した組換えAAVベクターは、（a）図21に示されるアダリムマブをコードするプラスミド、又は（b）図22に示されるエンハンサータンパク質を有するアダリムマブをコードするプラスミドのいずれかを使用して作製した。組換えAAVベクターは、AAVトランスファープラスミドをヘルパープラスミド（アデノウイルス遺伝子E4、E2A及びVAをコードする）及びRep-Capプラスミド（AAV血清型8、AAV8のCapタンパク質をコードする）と一緒にHEK293Tパッケージング細胞に三重トランスフェクトすることによって、Vector Builder Inc.によって作製された。同様に、ウイルスゲノム複製及びパッケージングに十分である任意の複製遺伝子、並びにウイルスカプシド形成に十分である任意のウイルスカプシド遺伝子を、Rep-Capの代わりに使用してもよい。トランスフェクションの2日後、細胞を回収し、PEGによって濃縮し、CsCl勾配精製によって精製した。

10

【0505】

AAV8処置マウスにおけるアダリムマブの薬物動態を、抗TNF α 療法の現在の標準治療を模倣する対照としての組換え産生アダリムマブタンパク質で処置したマウスの薬物動態と比較した。対照群では、3匹のマウスに、PBS中100 μg の組換え産生アダリムマブ $50 \mu\text{l}$ を皮下注射した。

20

【0506】

動物を群に無作為化し、体重を1日目に記録し、その後研究の終了まで隔週で記録した。有害事象（RM、SD、RD）を良好な実験室基準に従って記録した。 $>20\%$ の体重減少、正常な生理学的機能（例えば、摂食、飲水及び可動性）を阻害した創傷、又は衰弱、発作及び出血の臨床的観察が1回観察された任意の個々の動物を安楽死させた。

【0507】

全血を顎下静脈によって収集し、分析のために血清を収集するために処理した。0日目（投与前）、3日目、7日目、14日目、21日目、28日目及び42日目に血液を採取した。血清をアダリムマブ濃度について定量的ELISAにより分析した。

30

【0508】

マウス血清試料（EZ Block試薬で予め希釈した）を試料として使用することにより、上記実施例14に記載のように定量的ELISAを行った。陽性対照抗体である組換えモノクローナルアダリムマブ（Novus Biologicals NB001486）を、EZ Block試薬中で0、0.1、1、10及び100ng/mlの濃度に希釈し、標準曲線として使用した。450nmでの吸光度を読み取った後、試料の吸光度値を、標準曲線の吸光度値を使用して $\mu\text{g}/\text{ml}$ の単位で血清中の総分泌アダリムマブ濃度に変換した。

40

【0509】

ELISA実験の結果を図26A及び26Bに示す。直線の点線の閾値は、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアダリムマブ濃度を示し、これを超えると、関節リウマチモデルにおいてアダリムマブの治療効果が観察される。図26Aは、エンハンサータンパク質を含む（EG）及び含まない（STD）AAVの筋肉内注射の結果を示す。図26Bは、同じ材料の皮下注射を示す。本明細書に提示した他の実験に関して上述したように、エンハンサータンパク質を含まない系（STD）は、エンハンサータンパク質を含む系（EG）と比較して血清中のアダリムマブ濃度がより高かった。

【0510】

50

注目すべきことに、エンハンサータンパク質共発現を伴わないアダリムマブの濃度は、注射部位に高度に依存した。合計で、注射部位間に10倍の差を観察することができた。これは、処置投与における比較的小さな偏差が治療導入遺伝子の定常状態血清レベルにおける大きな変化をもたらし得るので、注射部位を変化させることができない特定の遺伝子治療にとって非常に困難であり得る。

【0511】

対照的に、エンハンサータンパク質を有する系（EG）は、注射部位に依存しない血流投与を示した。これらのデータは、エンハンサータンパク質が、治療中の細胞型にかかわらず、同様のタンパク質発現レベルを確実にしたことを実証し、これは、強固で再現可能な治療効果を達成するための重要な結果である。重要なことに、筋肉内投与及び皮下投与の両方において、同じレベルのアダリムマブが、処置されたマウスの血清中に、両方とも必要な治療濃度にわたって見出された。驚くべきことに、エンハンサータンパク質の添加は、アダリムマブが注射部位とは無関係に安定かつ一定のレベルで発現されることを確実にした。

【0512】

実施例17：Lエンハンサータンパク質の発現は、インビトロで分泌されたグルコシルセラミダーゼ（GBA）の活性を相対的に増加させる

HEK293T細胞における、エンハンサーLタンパク質の存在下及び非存在下でのグルコシルセラミダーゼ（GBA）発現を試験するために、以下の実験を行った。

【0513】

HEK293T細胞を、GBA-NanoLuc融合タンパク質を発現する対照プラスミド（図28A）及びエンハンサータンパク質LをGBA-NanoLucキメラと共発現するプラスミド（図28B）でトランスフェクトした。0日目に、HEK293T細胞を、10% FBSを含有する500 μ lのDMEM中の24ウェル細胞培養マイクロプレートに播種した。1日目に、Mirus TransIT-Lentiトランスフェクション試薬を製造業者の指示に従って使用して、細胞をそれぞれのpGBA-NanoLuc-STD（配列番号273～296）及びpGBA-NanoLuc-EG（配列番号297～324）プラスミドでトランスフェクトした。各ウェルを、0.2 μ gのプラスミド、0.6 μ lのMirus TransIT-Lenti試薬及び50 μ lのOpti-MEM培地を用いて作製した複合体で処理した。3日目に、トランスフェクトされた細胞及び細胞培養上清を、NanoLucルシフェラーゼ及びGBAの活性についてアッセイし、ウェスタンブロッティングのために処理した。

【0514】

NanoLucアッセイのために、細胞培養上清をマイクロ遠心管に収集し、遠心分離によって細胞破片を取り除いた。24ウェルプレートに付着したままの細胞を、250 μ lのPBS中0.2% Triton X-100を用いて室温で溶解した。50 μ lの清澄化細胞培養上清又は50 μ lの細胞溶解物を、不透明な黒色96ウェルマイクロプレートにロードした。50 μ lのそれぞれのアッセイ緩衝液（Promega）中の新鮮な1X Nano-Gloアッセイ試薬を各ウェルに添加し、2～5分間インキュベートした後、Biotek Synergy LXプレートリーダーを使用して発光を測定した。細胞溶解物を、A660試薬（Thermo Scientific）を製造業者の指示に従って使用して、それらのタンパク質濃度について更に分析した。簡単に説明すると、40 μ lの試料又は標準を150 μ lのA660アッセイ試薬と混合し、Biotek Synergy LXプレートリーダーを用いて660 nmでの吸光度を測定し、標準曲線に基づいてタンパク質濃度を定量した。細胞溶解物の発光を、細胞溶解物タンパク質 μ g当たりで正規化し（すなわち、相対光単位（RLU）/ μ gタンパク質の単位で発光値を得る）、一方、細胞培養上清の発光を、アッセイで使用した上清の体積を使用して正規化した（すなわち、RLU/ μ l上清の単位で発光値を得る）。

【0515】

GBA活性を決定するために、細胞を播種し、上記のNanoLucアッセイと同様に

それぞれのプラスミドでトランスフェクトした。3日目に、細胞培養上清を回収し、遠心分離によって細胞破片を除去し、分泌されたGBA活性をアッセイするために保存した。接着細胞を、500 μ lのPBSを用いてプレートから剥離し、遠心分離によってペレット化した。細胞ペレットを、溶解の前に37℃に予め平衡化した1×GBAアッセイ緩衝液（0.1 Mクエン酸ナトリウム、0.2 Mリン酸ナトリウム、0.25 % Triton X-100、0.25 % タウロコール酸ナトリウム、1.25 mM EDTA、5 mM DTT）を用いて溶解した。細胞溶解物のタンパク質濃度を、Pierce A660タンパク質アッセイを製造業者の指示に従って使用して決定し、その後、細胞溶解物を、1×GBAアッセイ緩衝液を使用して125 μ g/mlの最終タンパク質濃度に希釈した。40 μ lの予め希釈した細胞溶解物をピペットで透明な96ウェルプレートの個々のウェルに2連で移した。先に収集した20 μ lの細胞培養上清を、透明な96ウェルプレートの個々のウェルに2連で添加し、20 μ lの2×GBAアッセイ緩衝液を、細胞培養上清を含む各ウェルに添加した。その後、20 μ lのアッセイ基質（1×GBAアッセイ緩衝液中で調製した6 mMの4-MU- β -D-グルコピラノシド（glucopuranside））を、細胞溶解物又は細胞培養上清を含有する各ウェルに添加した。隣接するウェルにおいて、4-メチルーウンベリフェロンを使用した検量線を1×GBAアッセイ緩衝液で調製した。試料をアッセイ基質の存在下、37℃で30分～4時間インキュベートし、続いて100 μ lの停止溶液（0.5 Mグリシン、0.3 M NaOH、pH 10）を添加した。その後、Biotek Synergy LXプレートリーダーを用いて360/445 nmの励起/発光波長で各試料及び標準の蛍光を測定した。細胞溶解物試料中のGBA活性を、以下の式を使用して計算した：活性 = $[B / (T \times V \times P)] \times D = \text{pmol} / \text{分} / \text{mg} = \mu\text{U} / \text{mg}$ 、式中、Bは、標準曲線を使用して計算された4-MU量に変換され（pmol）、Tは反応時間（分）であり、Vは試料体積（ml）であり、Pは初期タンパク質試料濃度であり、Dは試料希釈係数（該当する場合）である。細胞培養上清中のGBA活性を、以下の式を使用して計算した：活性 = $[B / (T \times V)] \times D = \text{pmol} / \text{分} / \text{ml} = \mu\text{U} / \text{ml}$ 、式中、Bは、標準曲線を使用して計算された4-MU量に変換され（pmol）、Tは反応時間（分）であり、Vは試料体積（ml）であり、Dは試料希釈係数（該当する場合）である。

10

20

30

40

【0516】

ウェスタンブロッティングのために、トランスフェクトされた細胞を掻き取ることによって回収し、遠心分離によってペレット化した。細胞ペレットを、1×プロテアーゼ阻害剤カクテル及び10 Uのユニバーサルヌクレアーゼを補充した100 μ lのRIPA緩衝液（Cell Signalling technologies）を使用して溶解し、氷上で10分間インキュベートし、続いて10秒間超音波処理した。溶解した試料を14,000 gで10分間遠心分離し、80 μ lの上清を分析のために収集した。各試料のタンパク質濃度を、Pierce A660アッセイを製造業者の指示に従って使用して決定した。40 μ gの細胞溶解物を4～12 % Bis-Tris MESゲルの各ウェルにロードし、実施例15で先に記載したようにウェスタンブロッティングを続けた。GBAを検出するために、ウサギ抗GBA抗体（Abcam ab128879）を1:500希釈で一晩使用した。

【0517】

ウェスタンブロッティングは、設計されたpGBA-NanoLuc-STD及びpGBA-NanoLuc-EG構築物が、HEK 293T細胞において発現された場合、約75 kDaのpGBA-NanoLucタンパク質キメラについての正確な予測サイズの単一バンドとして検出されることを明らかにした。pGBA-NanoLuc-STD構築物のバンドは、pGBA-NanoLuc-EG構築物のバンドよりもいくらか強く（図29）、これは、実施例15に示される発現された分泌タンパク質での以前の観察に対応する。

【0518】

分析中にNanoLucタグ付きGBAタンパク質を使用することによって、目的のタ

50

ンパク質の全発現（NanoLucレポーター読み出し）と、機能的に活性な目的のタンパク質の発現（GBA酵素活性）とを区別することが可能であった。レポータータンパク質（NanoLuc）及び酵素活性（GBA）の両方の総量は、pGBA-NanoLuc-STD構築物の場合に高く（図30A～30D）、上記のウェスタンブロット結果と一致した。しかしながら、産生されたタンパク質の相対的品質は、エンハンサータンパク質が共発現された場合、pGBA-NanoLuc-EG構築物の場合にはるかに高かった（図31）。発現されたGBAタンパク質の相対的品質は、まずNanoLucレポーターシグナルを使用してGBA酵素活性を正規化し（すなわち、特異的GBA活性GBA-S=GBA-活性/NanoLuc-シグナルを得る）、次いで2つの異なる構築物のGBA-Sを比較することによって推定した。この分析は、細胞溶解物において、特異的GBA活性がpGBA-NanoLuc-STDとpGBA-NanoLuc-EG構築物との間で類似していることを明らかにした。

10

【0519】

しかしながら、注目すべきことに、細胞上清において、エンハンサータンパク質の存在下（すなわち、pGBA-NanoLuc-EG構築物）での特異的GBA活性は、エンハンサーLタンパク質の非存在下（すなわち、pGBA-NanoLuc-STD構築物）よりもおよそ300%高かった（図31）。内因性GBAが上清中で完全に活性な分泌タンパク質であることを考慮すると、これらのデータは、本明細書に提示されるように、エンハンサータンパク質Lと共発現された場合のタンパク質の質の増加を支持する。

20

【0520】

実施例18：Lエンハンサータンパク質の発現は、インビボグルコシルセラミダーゼ（GBA）発現の均一性を改善する。

インビボでのGBAの発現を評価するために、以下の実験を行った。pGBA-NanoLuc-STD（エンハンサータンパク質Lを含まない、配列番号273～296）及びpGBA-NanoLuc-EG（エンハンサータンパク質Lを含む、配列番号297～324）のプラスミドの両方を、以下のようにインビボ送達のために脂質ナノ粒子（LNP）に製剤化した。300µgのプラスミドを2.6mLのカプセル化緩衝液（EB、25mM酢酸ナトリウム、pH4）に溶解した。LNP脂質混合物を、1%DMG-PEG（2000）、39%コレステロール、10%DOPC及び50%DLin-KC2-DMAイオン化可能脂質を含有する2.6mLの100%EtOH中で調製し、最終総脂質濃度は4mMであった。等量（各2.6mL）のEB中プラスミド及びEtOH中脂質を、急速混合によって合わせた。混合直後に、5.2mLのneutrbiosimilarffer（NB、300mM NaCl+20mMクエン酸ナトリウム、pH6）をリピド/プラスミド混合物に添加し、急速に混合し、37℃で30分間インキュベートした。Amicon Ultra 15-ml 100kDa MWCOスピンフィルターを使用して、混合物をPBSに対して透析濾過した。ロードされたプラスミドの封入効率及び総濃度を、以下のようにSYBR Safe封入効率アッセイを用いて決定した。5µLのプラスミド/LNPを、TE緩衝液（LNPにロードされていないプラスミドの量を検出するため）又は1%Triton X-100を含有するTE緩衝液（プラスミドの総量、すなわち、LNPにロードされたプラスミド及びロードされていないプラスミドの両方を検出するため）のいずれかにおいて、1×SYBR Safe DNA結合色素と混合した。プラスミドDNA絶対量計算のために、それぞれ、TE緩衝液中又は1%Triton X-100を含有するTE緩衝液中のいずれかの1×SYBR Safe DNA結合色素中に混合された参照裸プラスミドDNAの既知量を使用して、標準曲線を構築した。試料又は標準を5分間インキュベートし、Biotek Synergy LX蛍光マイクロプレートリーダーを使用し、FITC用のフィルターセットを使用して蛍光を読み取った。封入効率は、式：ローディング__効率=（プラスミド__総-プラスミド__非ローディング）/プラスミド__総×100%を使用して計算した。

30

40

【0521】

ローディング効率は>90%であった。プラスミド/LNPを、PBSを使用して、2

50

00 μ l の PBS 当たり 30 μ g の プラスミド の 等価 プラスミド 濃度 に 希釈 した。雌 B a l b / c マウス に 麻酔 を かけ、肩 甲骨 の 間 に 皮下 注射 の ため に 200 μ l の 固定 容量 を 個々 に 投与 した (N = 3 / 群)。示 され た 時点 で、N a n o - G l o (登 録 商 標) I n V i v o S u b s t r a t e、F F z を マウス に 腹腔 内 (i . p .) 注射 する こと に よって 全身 生物 発光 イメー ジング (B L I) を 実施 し、腹 臥 位 及 び 仰 臥 位 で イメー ジング した。腹 臥 位 は 注射 部 位 に 焦点 を 合わせ、仰 臥 位 は 肝 臓 領 域 に 焦点 を 合わせ た。発 光 値 を 定 量 し、表 に し、プ ロット した。

【0522】

生物 発光 イメー ジング (B L I) の 結果 は、検 出 され た 発 光 シグナル が、L N P - p G B A - N a n o L u c _ _ E G 群 と 比較 して L N P - p G B A - N a n o L u c _ _ S T D 群 において わずか に 高くない としても 比較 的 同 等 である こと を 示 し (図 3 2 A ~ C 及 び 表 6)、イン ビトロ 実験 と 一致 した。強い シグナル が、腹 臥 位 B L I (すなわち、注射 部 位) 並び に 仰 臥 位 (すなわち、発 現 され た G B A - N a n o L u c 蓄 積 の 部 位、こ れ は 肝 臓 である 可能性 が あり、イン ビボ で 産 生 され た タンパク 質 が 分 泌 され、標 的 組 織 に 蓄 積 する こと を 示す) の 両 方 で 検 出 され た。

【0523】

【表 6】

表 6 : マウス において 画像 化 され た、エン ハンサー タンパク 質 を 有 する (E G) 及 び 有 しない (S T D)、L N P / ベク ター の 平均 変 動 係 数

全ての 時点 に わた る 平均 変 動 係 数 (C V %)		
	L N P - p G B A - N a n o L u c _ _ S T D (配 列 番 号 273 ~ 296)	L N P - p G B A - N a n o L u c _ _ E G (配 列 番 号 297 ~ 324)
腹 臥 位	30. 5 %	19. 1 %
仰 臥 位	63. 9 %	27. 8 %

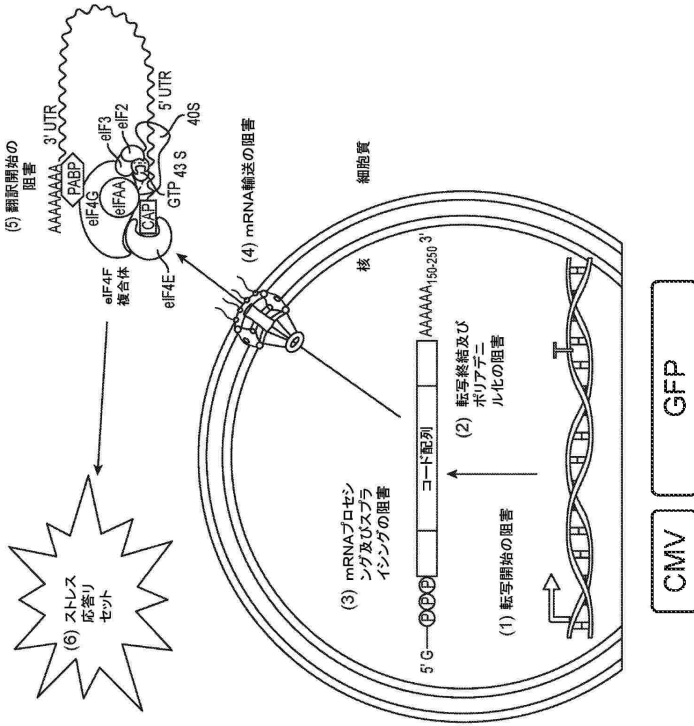
【0524】

L N P - p G B A - N a n o L u c _ _ S T D 群 にお ける B L I シグナル は、L N P - p G B A - N a n o L u c _ _ E G 群 と 比較 して、同 じ 時点 で 測定 した 場合、経 時 的 に も 個々 の 動物 間 で も より 変 動 し やす かった。こ れ を、各 測定 時点 で の シグナル の 変 動 係 数 (C V %) を 定 量 化 し、次 い で 各 処 置 群 に つい て 平均 C V % を 計算 する こと に よって 更 に 調査 した。C V % は、シグナル 平均 で 割 った シグナル の 標準 偏 差 と して 定 義 した。こ の 分析 は、平均 C V % が、エン ハンサー タンパク 質 の 非 存在 下 で より 高 い こと を 明 らか に した (図 3 2 C 及 び 表 6)。腹 臥 位 (すなわち、L N P 投 与 部 位) では、C V % の 差 は 比較 的 小 さ かった が、腹 臥 位 (すなわち、分 泌 され た G B A - N a n o L u c タンパク 質 蓄 積 の 部 位) では、差 は およ そ 2 倍 で あ った。こ れ は、エン ハンサー タンパク 質 L の 存在 下 で、ベク ター 化 され た 分 泌 タンパク 質 を イン ビボ で 使用 する こと が、エン ハンサー タンパク 質 L の 非 存在 下 と 比較 して、より 均 一 かつ 強 固 である こと を 示 唆 する。

【図面】

【図 1】

【図 2 A】



10

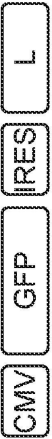
20

30

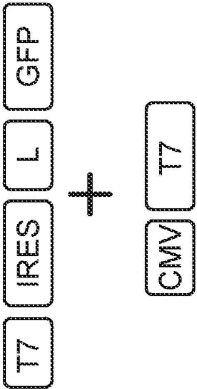
40

50

【 図 2 B 】



【 図 2 C 】



10

20

【 図 2 D 】



【 図 2 E 】



30

40

50

【 図 2 F 】



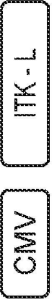
【 図 2 G 】



10

20

【 図 2 H 】



【 図 2 I 】

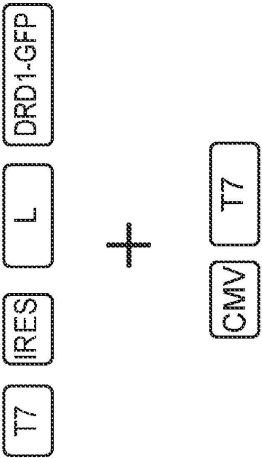


30

40

50

【 図 2 J 】



【 図 2 K 】



10

20

【 図 2 L 】



【 図 2 M 】



30

40

50

【 2 N 】

【 2 O 】



10

20

【 2 P 】

【 2 Q 】



30

40

50

【 図 2 R 】



【 図 2 S 】



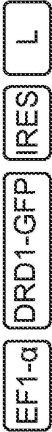
10

20

【 図 2 T 】



【 図 2 U 】



30

40

50

【 図 2 V 】



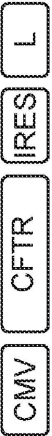
【 図 2 W 】



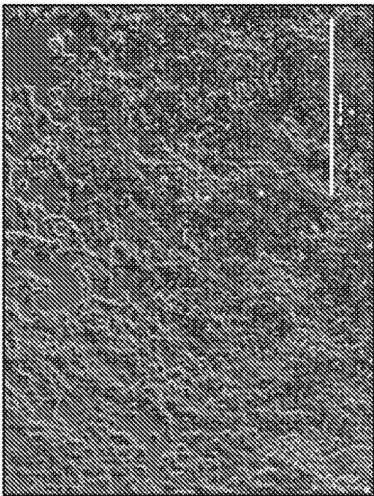
10

20

【 図 2 X 】



【 図 3 A 】

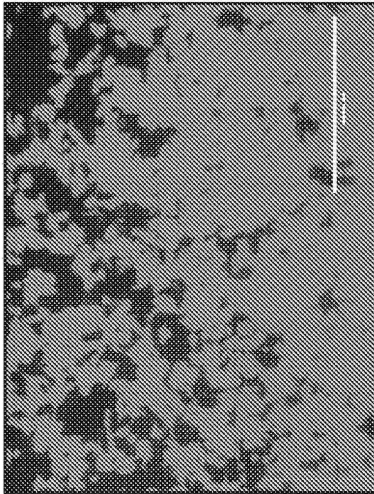


30

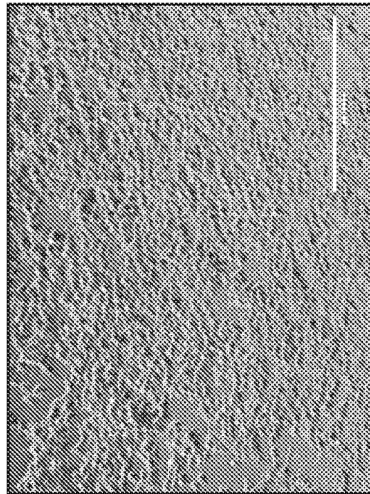
40

50

【図 3 B】



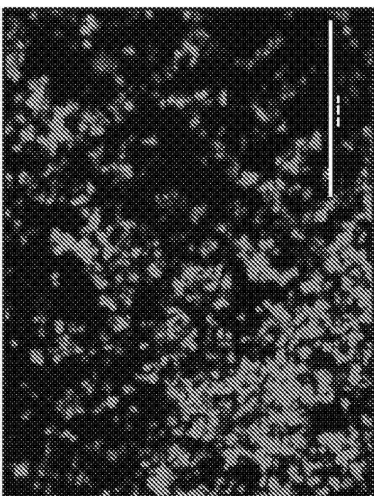
【図 3 C】



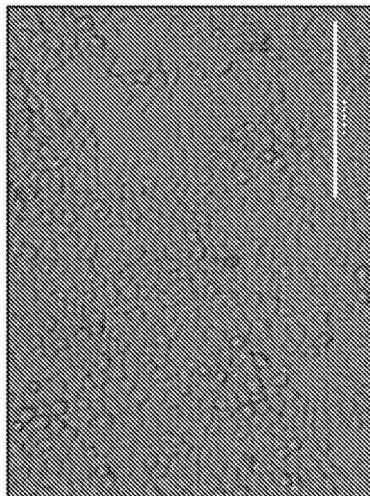
10

20

【図 3 D】



【図 4 A】

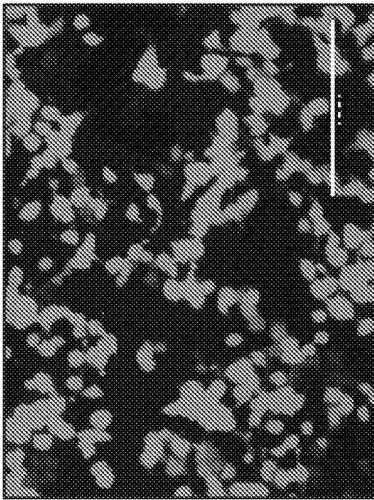


30

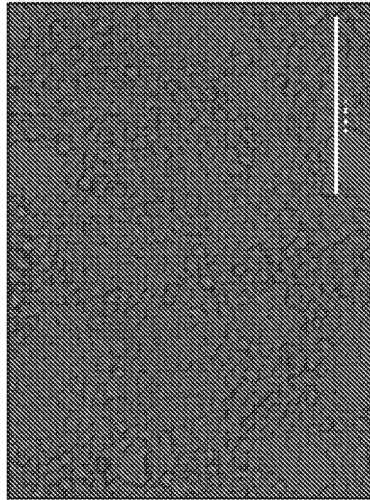
40

50

【図 4 B】



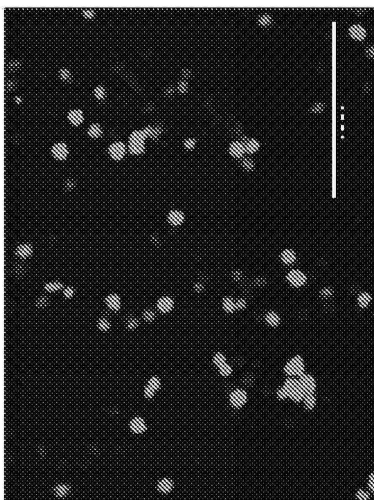
【図 4 C】



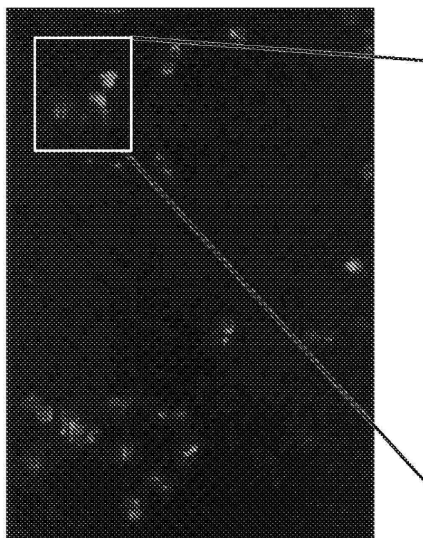
10

20

【図 4 D】



【図 5 A】

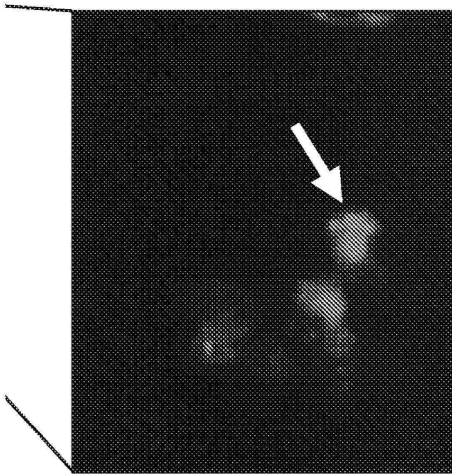


30

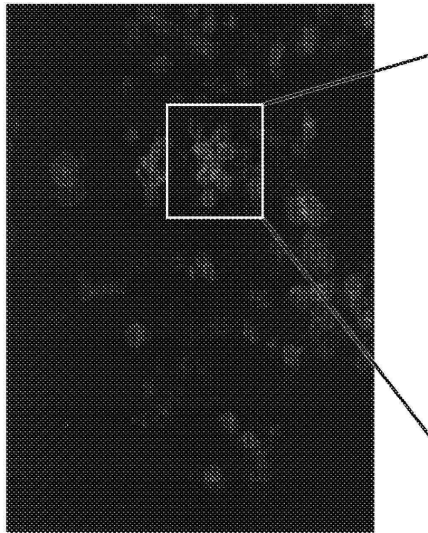
40

50

【図 5 B】



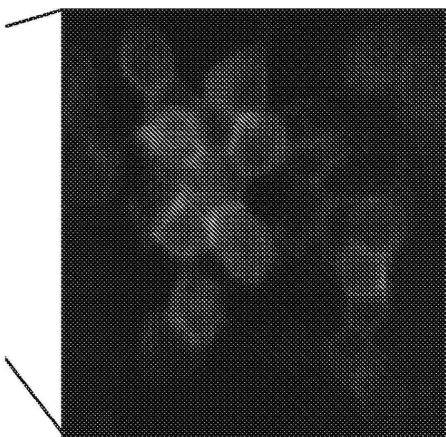
【図 5 C】



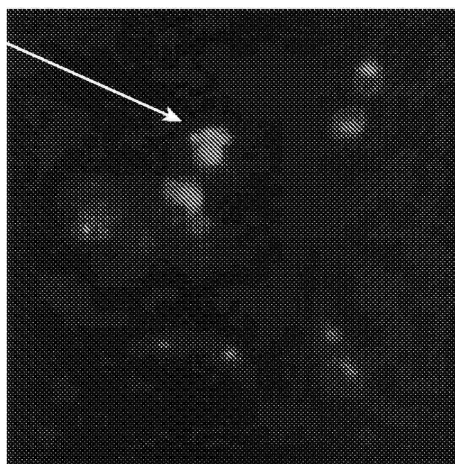
10

20

【図 5 D】



【図 6 A】

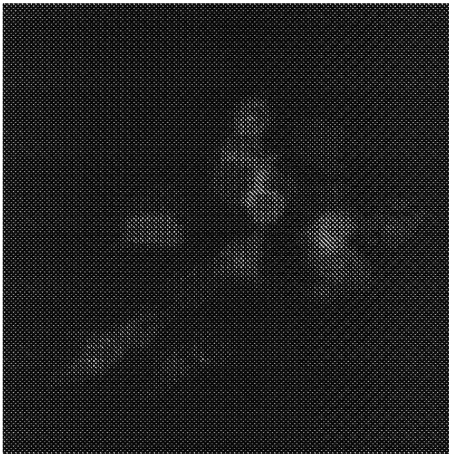


30

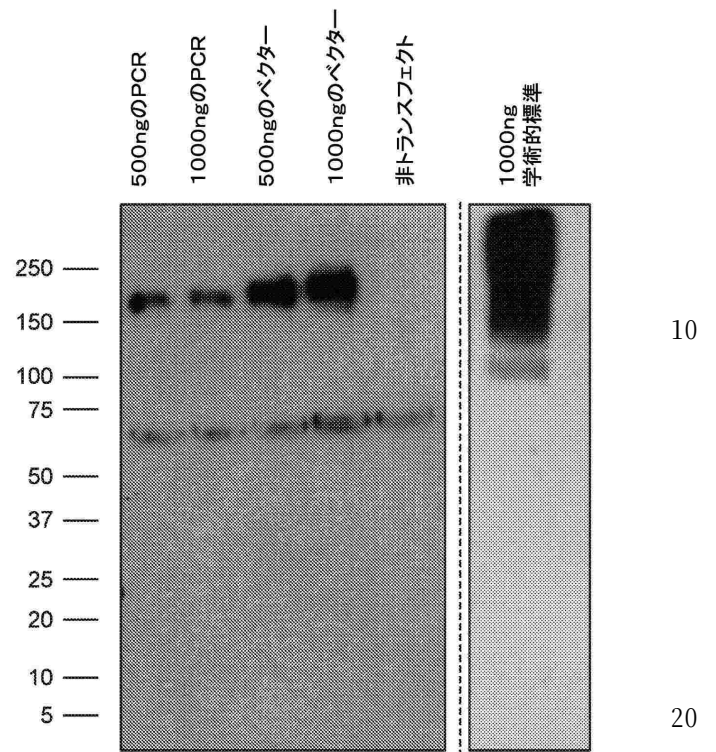
40

50

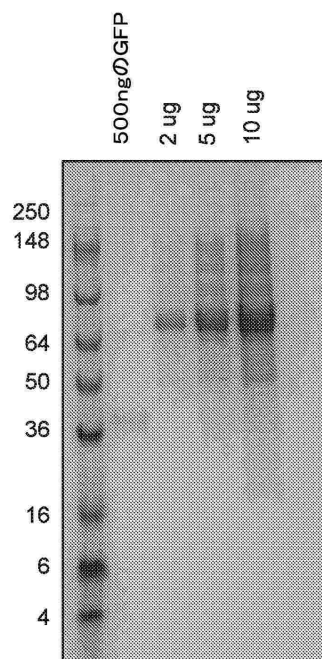
【図 6 B】



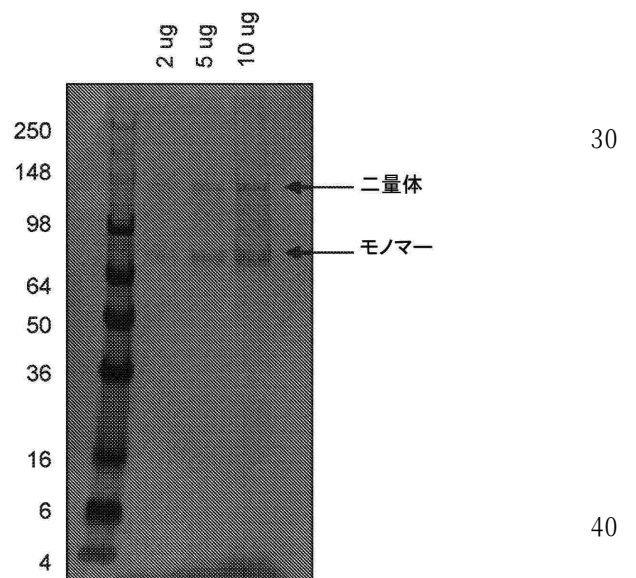
【図 7】



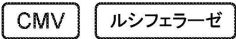
【図 8 A】



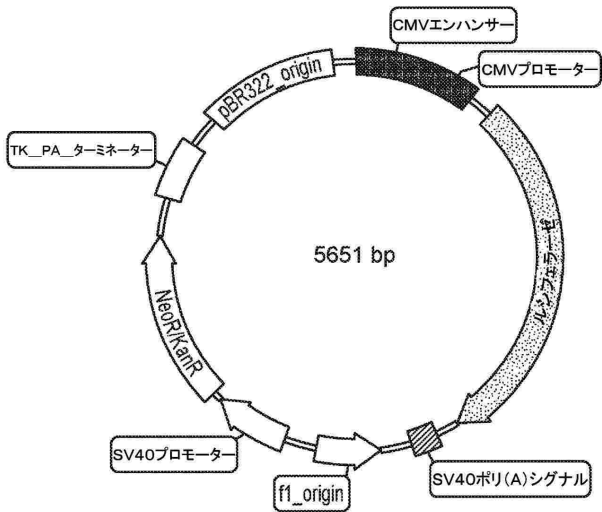
【図 8 B】



【図 9 A】

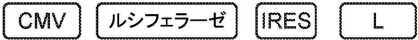


【図 9 B】

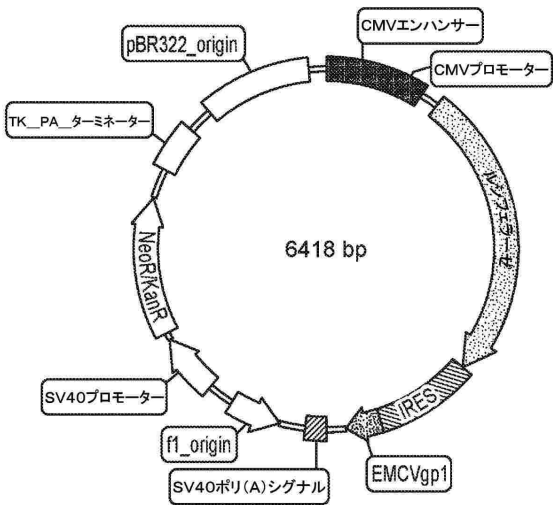


10

【図 9 C】



【図 9 D】



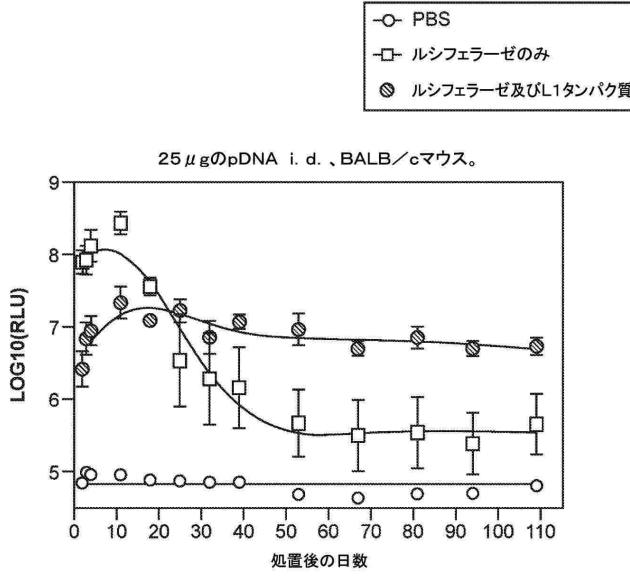
20

30

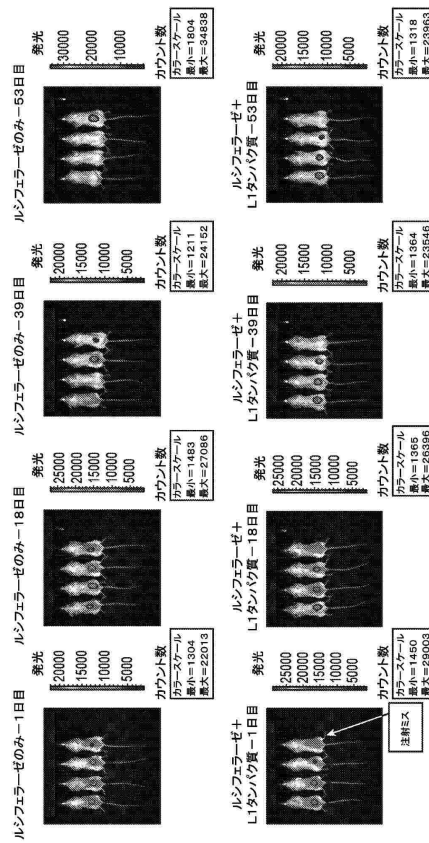
40

50

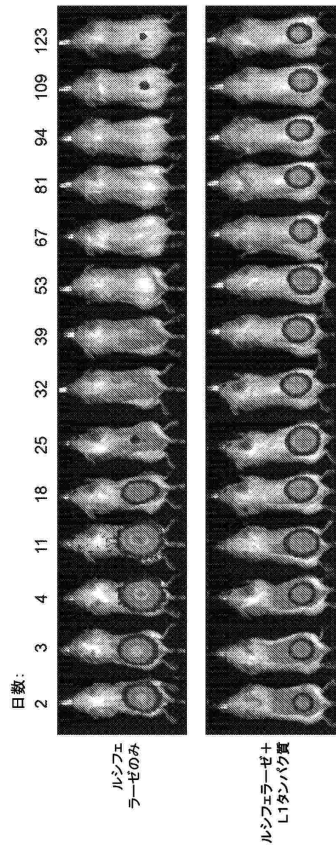
【図 10】



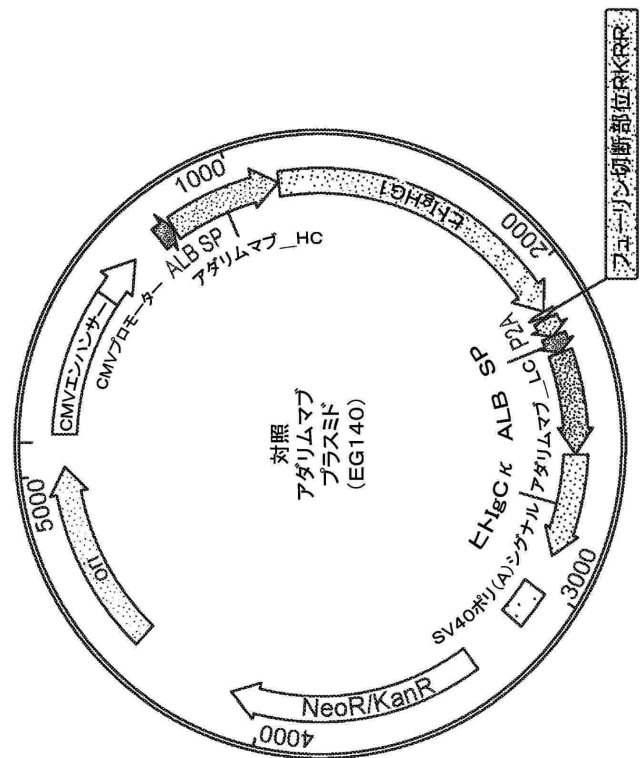
【図 11】



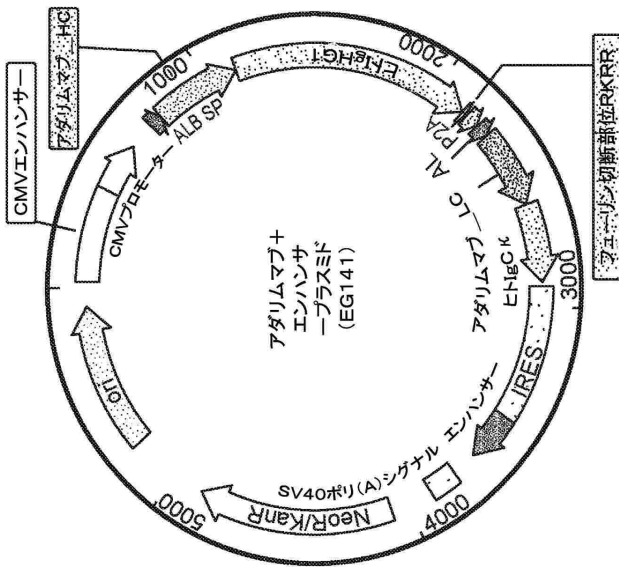
【図 12】



【図 13 A】

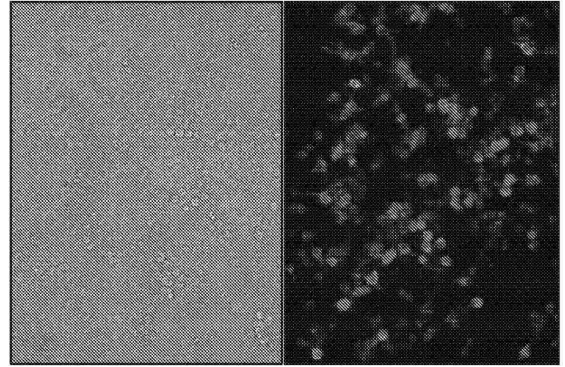


【図 1 3 B】



【図 1 4 A】

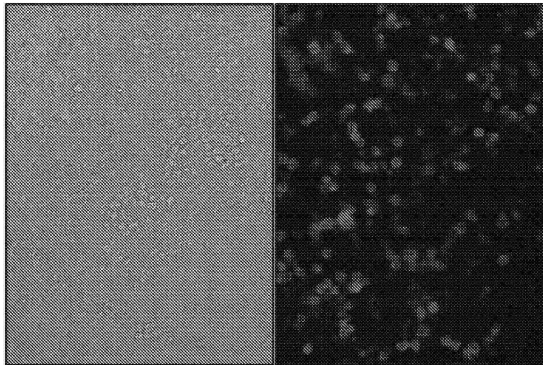
対照アダリムマブプラスミド (EG140) -
トランスフェクトHEK293T細胞



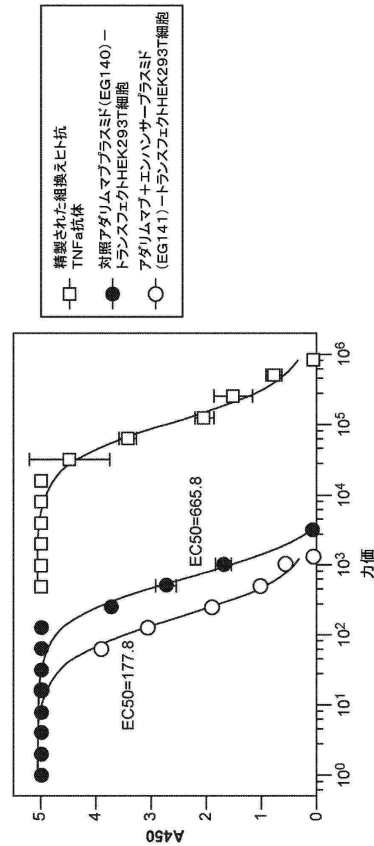
10

【図 1 4 B】

アダリムマブ+エンハンサー+プラスミド
(EG141) -トランスフェクト
HEK293T細胞



【図 1 5】



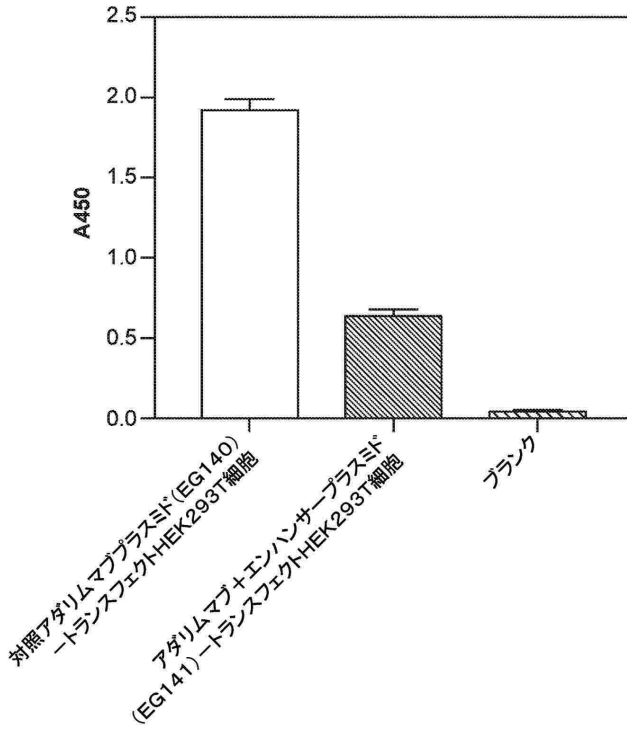
20

30

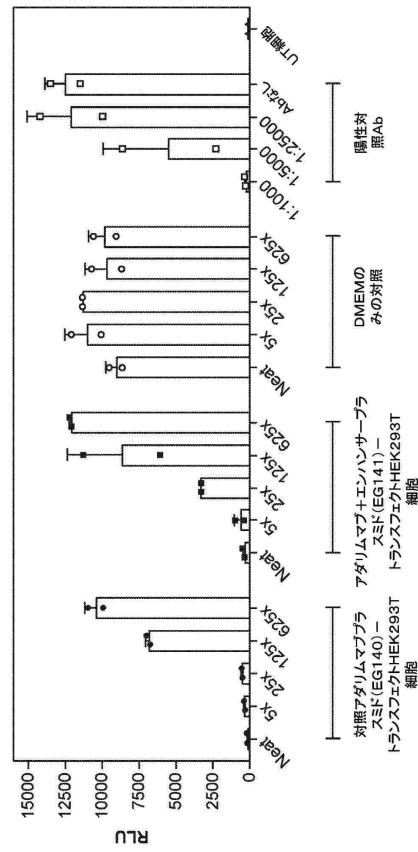
40

50

【図 16】



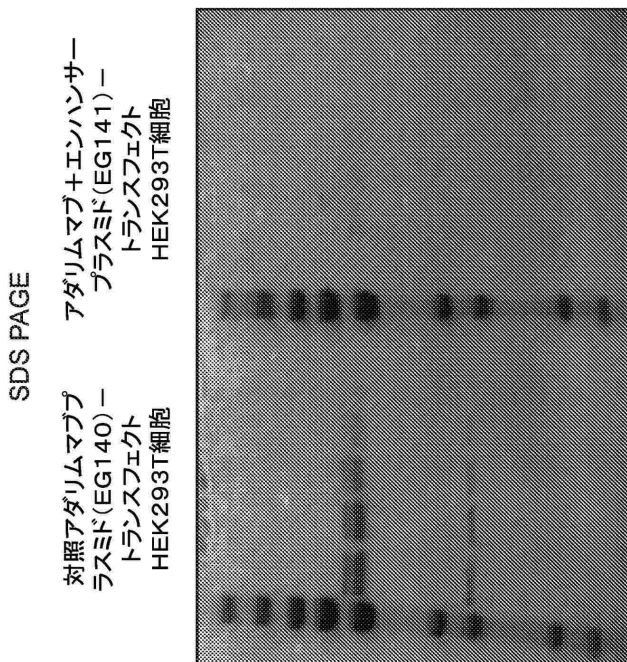
【図 17】



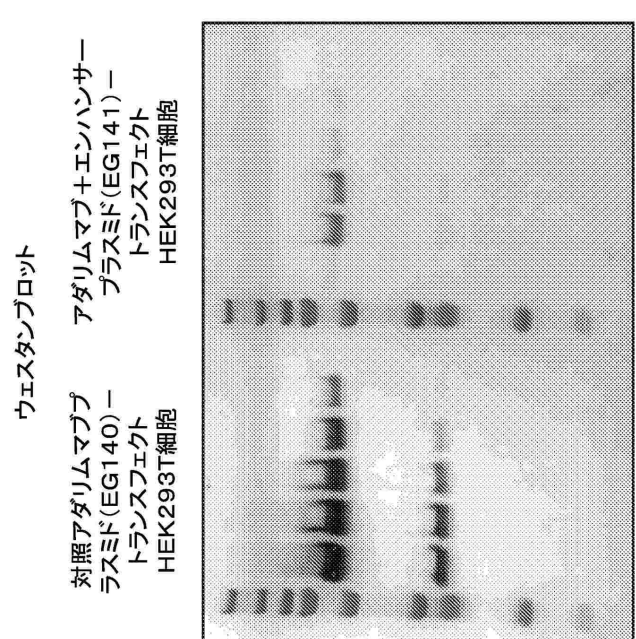
10

20

【図 18 A】



【図 18 B】

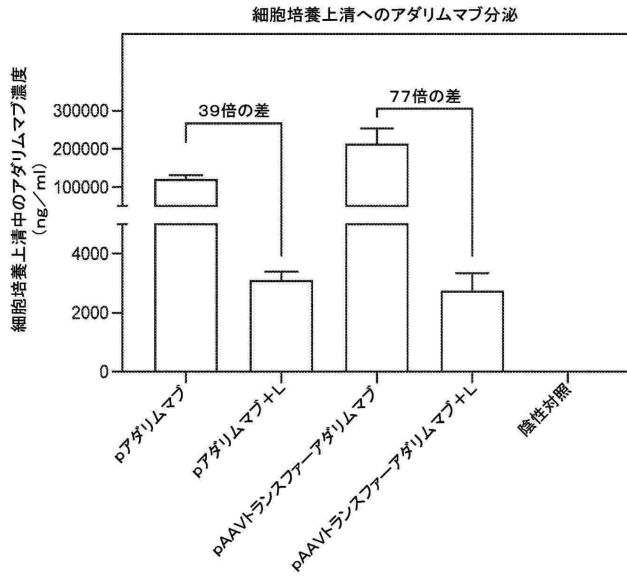


30

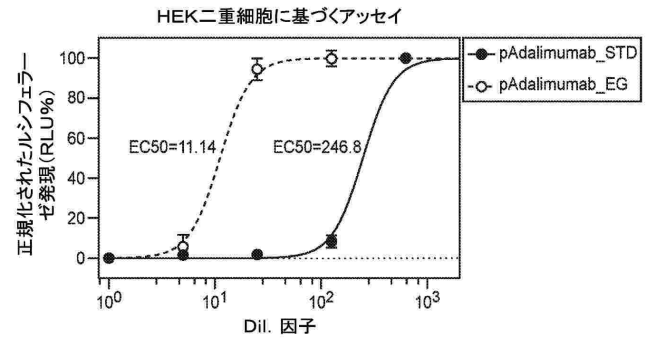
40

50

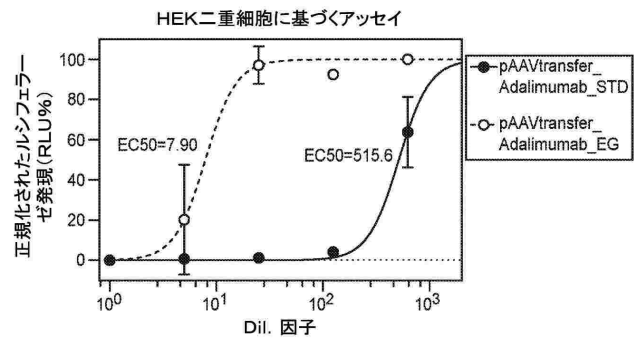
【図 2 3】



【図 2 4】

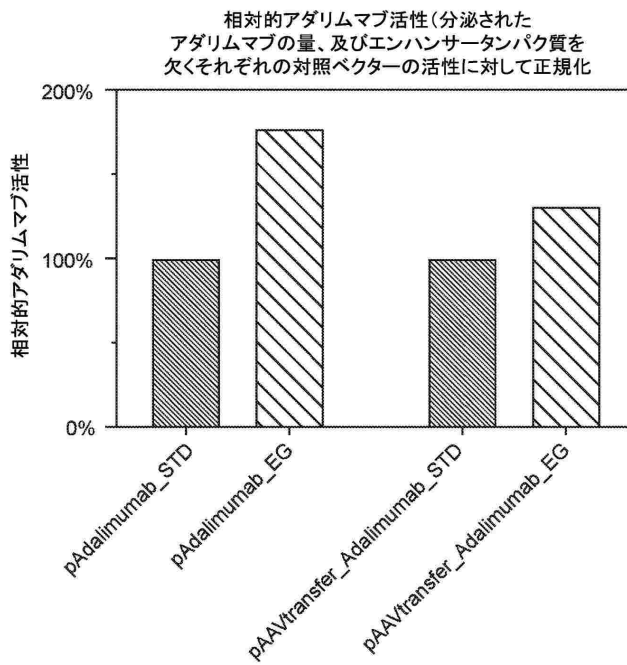


10

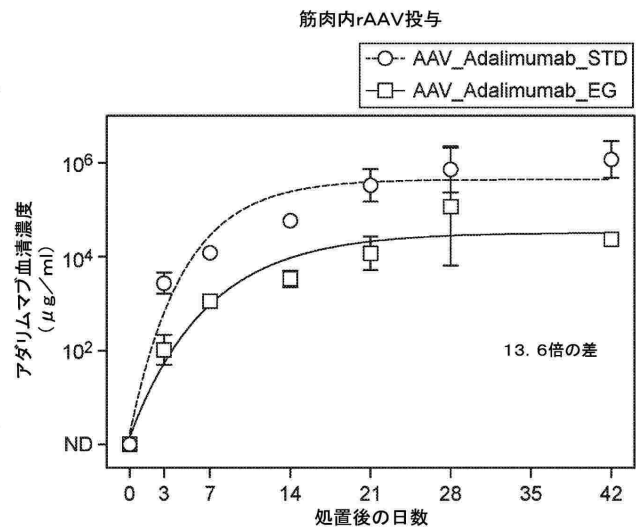


20

【図 2 5】



【図 2 6 A】

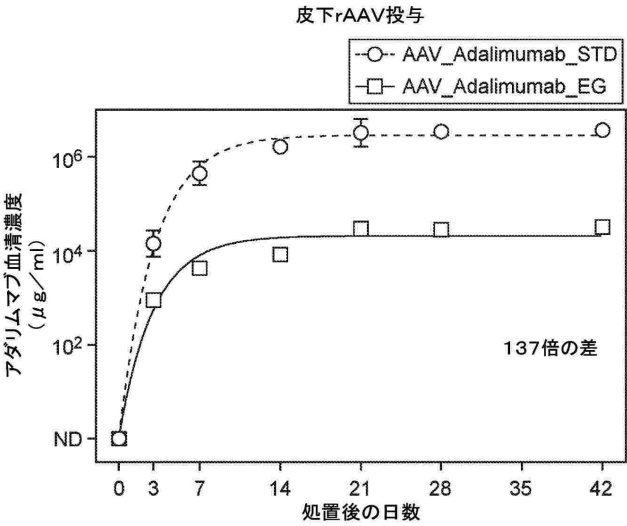


30

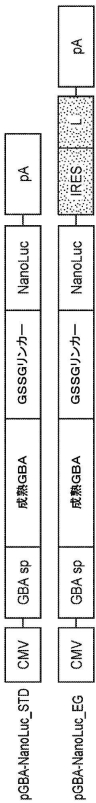
40

50

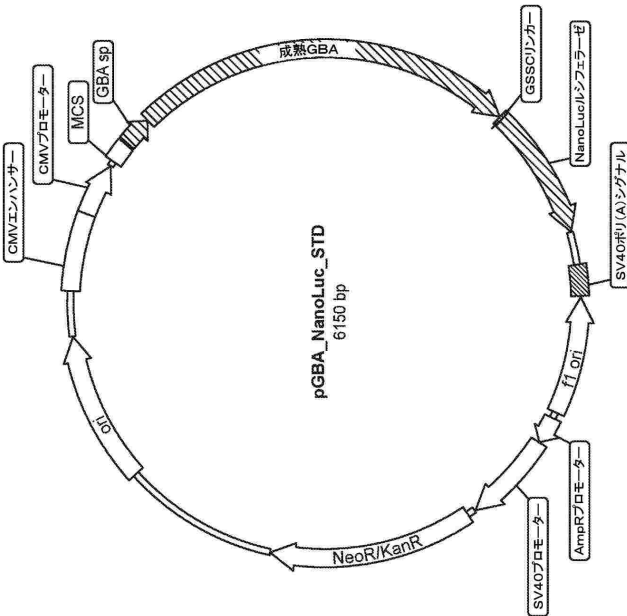
【図 2 6 B】



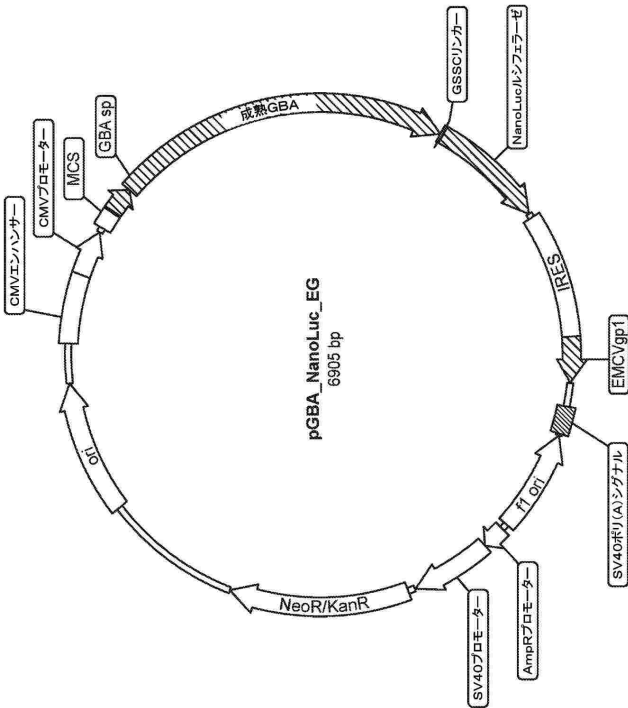
【図 2 7】



【図 2 8 A】



【図 2 8 B】



10

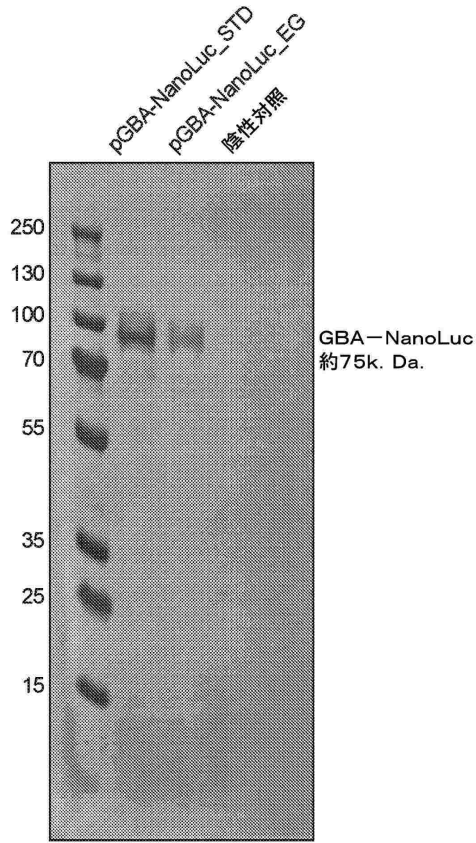
20

30

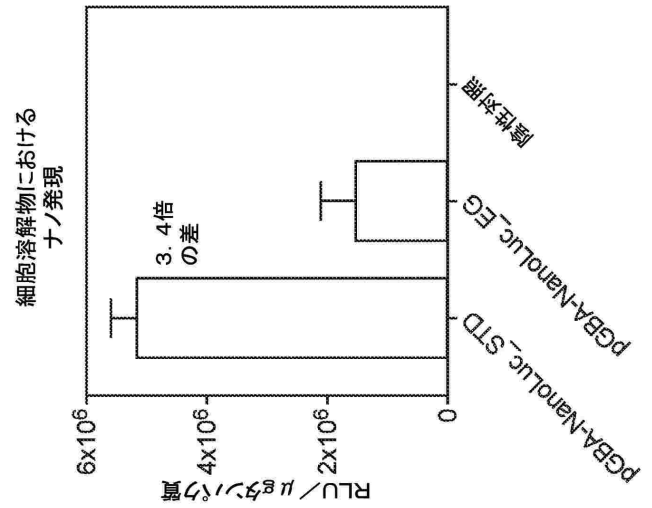
40

50

【図 2 9】



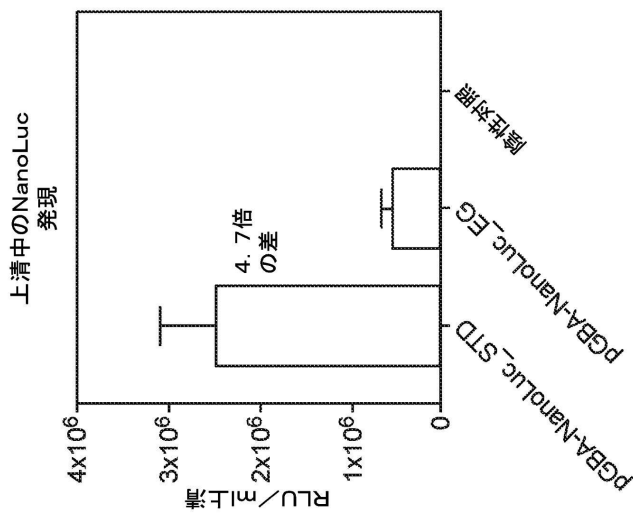
【図 3 0 A】



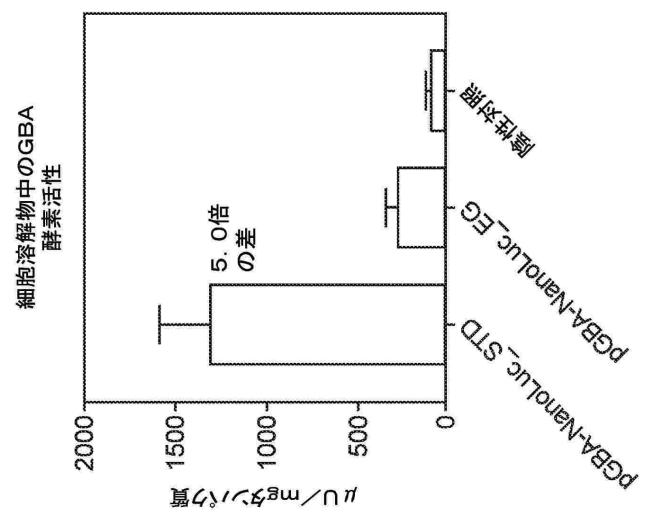
10

20

【図 3 0 B】



【図 3 0 C】

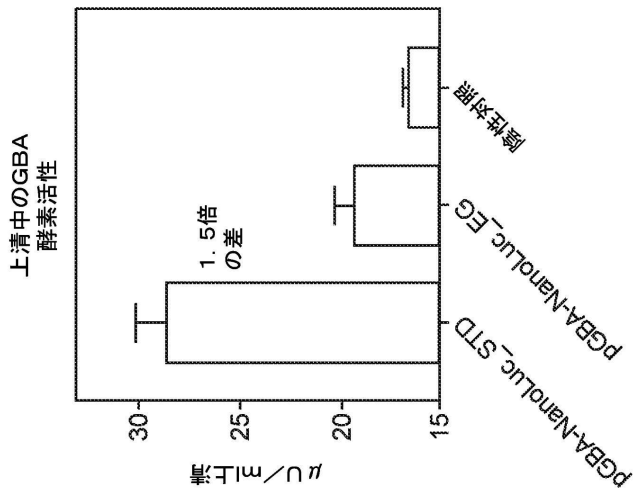


30

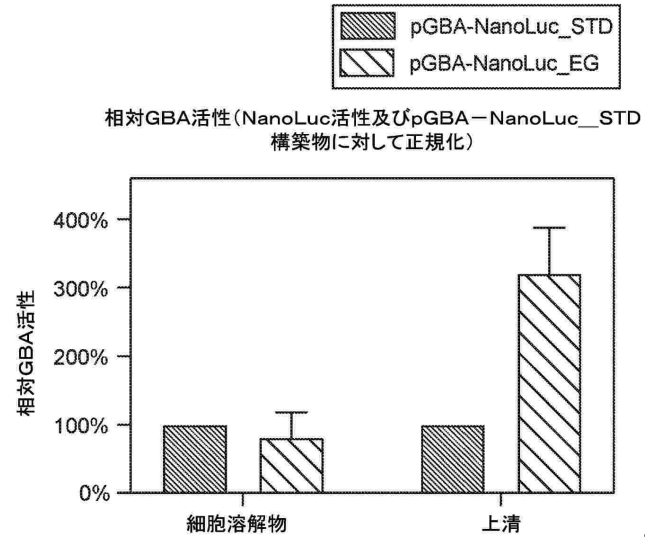
40

50

【図 3 0 D】



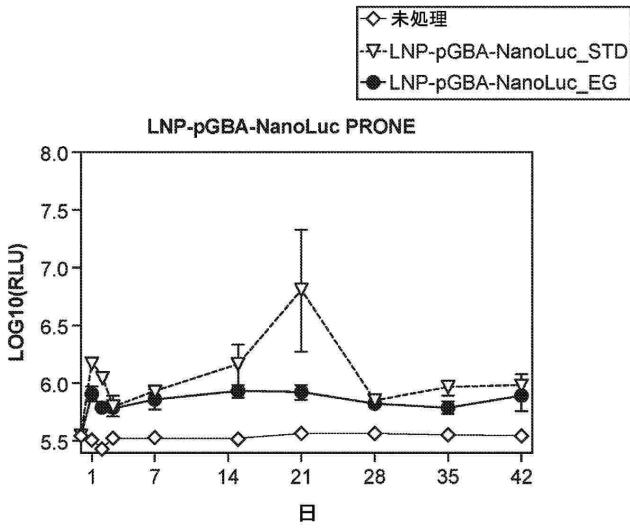
【図 3 1】



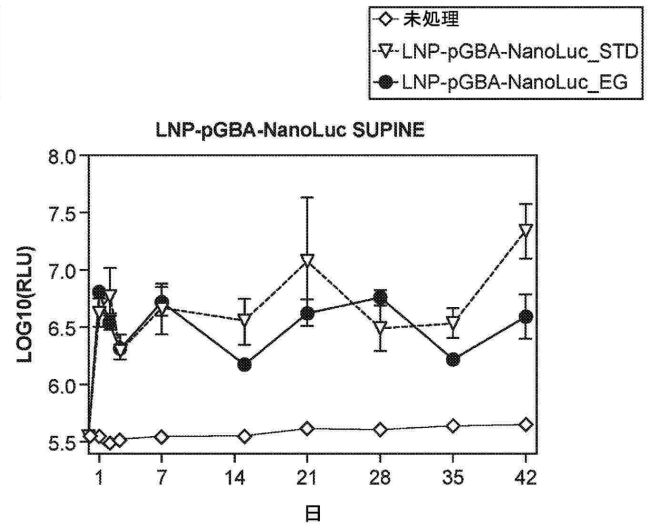
10

20

【図 3 2 A】



【図 3 2 B】

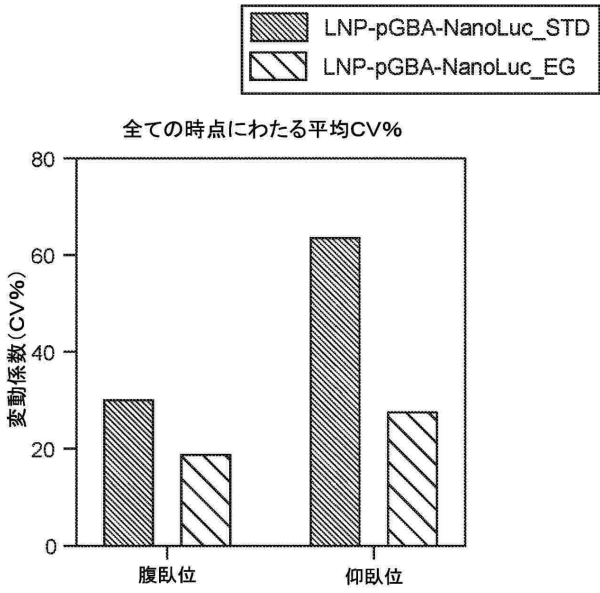


30

40

50

【図 3 2 C】



【配列表】

2024510215000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/019984

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12N 15/63; C07K 14/085; C07K 16/24 (2022.01)

CPC - C12N 15/63; C07K 14/085; C07K 16/241; C12N 2770/32033 (2022.05)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

see Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

see Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2020/219888 A1 (REGENXBIO INC.) 29 October 2020 (29.10.2020) entire document	1-5, 14, 30-32, 52-54, 81, 82, 84, 97, 98, 101, 102
Y	CHIU et al., "Identification of cardioviruses related to Theller's murine encephalomyelitis virus in human infections," Proc Natl Acad Sci USA, 16 September 2008 (03.09.2008), Vol. 105, No. 37, Pgs. 14124-14129, entire document	1-5, 14, 30-32, 52-54, 81, 82, 84, 97, 98, 101, 102
A	US 2019/0298829 A1 (ABBVIE BIOTECHNOLOGY LTD) 03 October 2019 (03.10.2019) entire document	1-5, 14, 30-32, 52-54, 81, 82, 84, 97, 98, 101, 102
A	US 2009/0186862 A1 (AERTS et al) 23 July 2009 (23.07.2009) entire document	1-5, 14, 30-32, 52-54, 81, 82, 84, 97, 98, 101, 102
A	US 2020/0255864 A1 (EXUMA BIOTECH CORP.) 13 August 2020 (13.08.2020) entire document	1-5, 14, 30-32, 52-54, 81, 82, 84, 97, 98, 101, 102
A	US 2007/0243169 A1 (PORTER et al) 18 October 2007 (18.10.2007) entire document	1-5, 14, 30-32, 52-54, 81, 82, 84, 97, 98, 101, 102
P, X	WO 2021/055369 A1 (EXCEPGEN INC.) 25 March 2021 (25.03.2021) entire document	1-5, 14, 30-32, 52-54, 81, 82, 84, 97, 98, 101, 102

☐ 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

13 July 2022

Date of mailing of the international search report

JUL 28 2022**

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Taina Matos

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/019984

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1, 2, 124, and 129 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/019984

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.: 18-29, 33-51, 55-66, 70-80, 85-96
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-5, 14, 30-32, 52-54, 81, 82, 84, 97-98, 101-102

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/019984

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

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

Group I+: claims 1-17, 30-32, 52-54, 67-69, 81-84, and 97-103 are drawn to methods of expressing target proteins and compositions comprising the same.

The first invention of Group I+ is restricted to a method of expressing an adalimumab protein in a subject in need thereof, comprising administering to the subject a vector system comprising: a) a first polynucleotide encoding an adalimumab protein; and b) a second polynucleotide encoding a picornavirus leader (L) protein with an amino acid sequence; wherein the first polynucleotide encoding the adalimumab protein and the second polynucleotide encoding the L protein are operatively linked to a promoter; and wherein the adalimumab variable heavy chain sequence of SEQ ID NO: 124 and an adalimumab variable light chain sequence of SEQ ID NO: 129, and where the second polynucleotide is selected to be SEQ ID NO: 1, and compositions comprising the same. It is believed that claims 1-5, 14, 30-32, 52-54, 81, 82, 84, 87-88, and 101-102 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on SEQ ID NOs: 1, 129, and 124.

Applicant is invited to elect additional polynucleotides encoding target proteins, enhancer proteins, and their respective, corresponding SEQ ID NOs to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a method of expressing an adalimumab protein in a subject in need thereof, comprising administering to the subject a vector system comprising: a) a first polynucleotide encoding an adalimumab protein; and b) a second polynucleotide encoding a picornavirus 2A protease with an amino acid sequence; wherein the first polynucleotide encoding the adalimumab protein and the second polynucleotide encoding the picornavirus 2A protease are operatively linked to a promoter; and wherein the adalimumab protein and the L protein are co-expressed, where the first polynucleotide sequence is selected to encode an adalimumab variable heavy chain sequence of SEQ ID NO: 124 and an adalimumab variable light chain sequence of SEQ ID NO: 129, and where the second polynucleotide is selected to be SEQ ID NO: 2, and compositions comprising the same. Additional polynucleotides encoding target proteins, enhancer proteins, enhancer proteins, and their respective, corresponding SEQ ID NOs will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for expression of target proteins requiring the selection of alternative polynucleotides and enhancer proteins where "A method of expressing a target protein in a subject in need thereof, comprising administering to the subject a vector system comprising one or more vectors, the one or more vectors, comprising: a) a first polynucleotide encoding the target protein; and b) a second polynucleotide encoding an enhancer protein wherein: i) the enhancer protein is an inhibitor of nucleocytoplasmic transport (NCT) and/or ii) the enhancer protein is selected from the group consisting of a picornavirus leader (L) protein, a picornavirus 2A protease, a rhinovirus 3C protease, a herpes simplex virus (HSV) ICP27 protein, and a rhabdovirus matrix (M) protein, wherein the first polynucleotide and the second polynucleotide are operatively linked to one or more promoters," and "A method of expressing an adalimumab protein in a subject in need thereof, comprising administering to the subject a vector system comprising one or more vectors, the one or more vectors, comprising: a) a first polynucleotide encoding an adalimumab protein; and b) a second polynucleotide encoding a picornavirus leader (L) protein with an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOS: 1-6, and 24, or an amino acid sequence with at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% sequence identity thereto; wherein the first polynucleotide encoding the adalimumab protein and the second polynucleotide encoding the L protein are operatively linked to one or more promoters; and wherein the adalimumab protein and the L protein are co-expressed."

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of a method of expressing a target protein in a subject in need thereof, comprising administering to the subject a vector system comprising one or more vectors, the one or more vectors, comprising: a) a first polynucleotide encoding the target protein; and b) a second polynucleotide encoding an enhancer protein wherein: i) the enhancer protein is an inhibitor of nucleocytoplasmic transport (NCT) and/or ii) the enhancer protein is selected from the group consisting of a picornavirus leader (L) protein, a picornavirus 2A protease, a rhinovirus 3C protease, a herpes simplex virus (HSV) ICP27 protein, and a rhabdovirus matrix (M) protein, wherein the first polynucleotide and the second polynucleotide are operatively linked to one or more promoters; a method of expressing a target protein in a subject in need thereof, comprising administering to the subject a vector, the vector comprising: a) a first polynucleotide encoding the target protein; and b) a second polynucleotide encoding an enhancer protein wherein: i) the enhancer protein is an inhibitor of nucleocytoplasmic transport (NCT) and/or ii) the enhancer protein is selected from the group consisting of a picornavirus leader (L) protein, a picornavirus 2A protease, a rhinovirus 3C protease, a coronavirus ORF6 protein, an ebolavirus VP24 protein, a Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) capsid protein, a herpes simplex virus (HSV) ICP27 protein, and a rhabdovirus matrix (M) protein; a method of expressing an adalimumab protein in a subject in need thereof, comprising administering to the subject a vector system comprising one or more vectors, the one or more vectors, comprising: a) a first polynucleotide encoding an adalimumab protein; and b) a second polynucleotide encoding a picornavirus leader (L) protein; wherein the first polynucleotide encoding the adalimumab protein and the second polynucleotide encoding the L protein are operatively linked to one or more promoters; and wherein the adalimumab protein and the L protein are co-expressed; a method of expressing a Glucosylceramidase (GBA) protein in a subject in need thereof, comprising administering to the subject a vector system comprising one or more vectors, the one or more vectors, comprising: a) a first polynucleotide encoding a Glucosylceramidase (GBA) protein; and b) a second polynucleotide encoding a picornavirus leader (L) protein; wherein the first polynucleotide encoding the Glucosylceramidase (GBA) protein and the second polynucleotide encoding the L protein are operatively linked to one or more promoters; and wherein the GBA protein and the L protein are co-expressed; a method of expressing a target protein in a subject in need thereof, comprising administering to the subject a vector system comprising one or more vectors, the one or more vectors, comprising: a) a first polynucleotide encoding a target protein; and b) a second polynucleotide encoding a picornavirus leader (L) protein; wherein the first polynucleotide encoding the target protein and the second polynucleotide encoding the L protein are operatively linked to one or more

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/019984

promoters; and wherein the target protein and the L protein are co-expressed; a composition comprising a vector system comprising one or more vectors, the one or more vectors, comprising: a) a first polynucleotide encoding an adalimumab protein; and b) a second polynucleotide encoding a picornavirus leader (L); wherein the first polynucleotide encoding the adalimumab protein and the second polynucleotide encoding the L protein are operatively linked to one or more promoters; and wherein the adalimumab protein and the L protein are co-expressed; a composition comprising a vector system comprising one or more vectors, the one or more vectors, comprising: a) a first polynucleotide encoding a Glucosylceramidase (GBA) protein; and b) a second polynucleotide encoding a picornavirus leader (L) protein; wherein the first polynucleotide encoding the Glucosylceramidase (GBA) protein and the second polynucleotide encoding the L protein are operatively linked to one or more promoters; and wherein the GBA protein and the L protein are co-expressed; a composition comprising one or more vectors, comprising: a) a first polynucleotide encoding a target protein; and b) a second polynucleotide encoding a picornavirus leader (L) protein; wherein the first polynucleotide encoding the target protein and the second polynucleotide encoding the L protein are operatively linked to one or more promoters; and wherein the target protein and the L protein are co-expressed. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2020/0255864 A1 to Exuma Biotech Corp. discloses a method of expressing a target protein in a subject in need thereof (methods and compositions provided herein, to express such signaling polypeptides, Para. [0145]; in a subject in vivo is a feature of some embodiments of the present disclosure, Para. [0136]), comprising administering to the subject a vector system comprising one or more vectors, the one or more vectors (method of transducing and/or genetically modifying lymphocytes ... methods for administering genetically modified lymphocytes to a subject, Para. [0081]; method provided herein of transducing and/or genetically modifying a PBMC or a lymphocyte, Para. [0068]), comprising: a) a first polynucleotide (includes a first nucleic acid sequence that encodes, Para. [0389]; and b) a second polynucleotide (a second nucleic acid sequence that encodes a chimeric antigen receptor, Para. [0389]); a method of expressing a target protein in a subject in need thereof (methods and compositions provided herein, to express such signaling polypeptides, Para. [0145]; in a subject in vivo is a feature of some embodiments of the present disclosure, Para. [0136]), comprising administering to the subject a vector (method of transducing and/or genetically modifying lymphocytes ... methods for administering genetically modified lymphocytes to a subject, Para. [0081]; method provided herein of transducing and/or genetically modifying a PBMC or a lymphocyte, Para. [0068]); wherein the first polynucleotide and the second polynucleotide are operatively linked to one or more promoters (a polynucleotide comprising one or more transcriptional units operatively linked to a promoter active in T cells and/or NK cells, wherein the one or more transcriptional units encode a first polypeptide comprising a chimeric antigen receptor (CAR), Para. [0108]; operatively linked to a promoter active in T cells and/or NK cells, wherein the one or more transcriptional units encode a first polypeptide comprising a chimeric antigen receptor (CAR) and a second polypeptide comprising a chimeric lymphoproliferative element, Para. [0386]; a composition comprising a vector system comprising one or more vectors (a vector and/or such polynucleotides or polypeptides could be part of a composition, Para. [0034]).

Further, US 2019/0298829 A1 to Abbvie Biotechnology Ltd teaches encoding the target protein a method of expressing an adalimumab protein in a subject in need thereof (antibody genes are inserted into the expression vector by standard methods (e.g., ligation of complementary restriction sites on the antibody gene fragment and vector, or blunt end ligation if no restriction sites are present). Prior to insertion of the adalimumab or adalimumab-related light or heavy chain sequences, the expression vector may already carry antibody constant region sequences, Para. [0207]), a) a first polynucleotide encoding an adalimumab protein (antibody genes are inserted into the expression vector by standard methods (e.g., ligation of complementary restriction sites on the antibody gene fragment and vector, or blunt end ligation if no restriction sites are present). Prior to insertion of the adalimumab or adalimumab-related light or heavy chain sequences, the expression vector may already carry antibody constant region sequences, Para. [0207]).

Further, US 2007/0243169 A1 to Porter et al. teaches encoding an enhancer protein wherein: i) the enhancer protein is an inhibitor of nucleocytoplasmic transport (NCT) and/or ii) the enhancer protein is selected from the group consisting of a picornavirus leader (L) protein, a picornavirus 2A protease, a rhinovirus 3C protease, a herpes simplex virus (HSV) ICP27 protein, and a rhabdovirus matrix (M) protein (a portion of encephalomyocarditis virus (EMCV) leader protein to a cell, Para. [0028]; "emcv-r" was the experimental vector, Para. [0021]; expressing the DNA in the vectors herein are the prokaryote, yeast, or higher eukaryote cells, Para. [0171]), b) a second polynucleotide encoding a picornavirus leader (L) protein a portion of encephalomyocarditis virus (EMCV) leader protein to a cell, Para. [0028]; "emcv-r" was the experimental vector, Para. [0021]).

Further, US 2009/0186862 A1 to Aerts et al. teaches a method of expressing a Glucosylceramidase (GBA) protein in a subject in need thereof (glucosylceramidase we expressed, Para. [0016]; to a subject in need thereof, Para. [0011]), comprising: a) a first polynucleotide encoding a Glucosylceramidase (GBA) protein (expressed GBA2 cDNA in cells, Para. [0016]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/16 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 9/16	
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	
C 0 7 K 14/085 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 0 7 K 14/165 (2006.01)	C 0 7 K 14/085	
C 0 7 K 14/095 (2006.01)	C 0 7 K 14/165	
C 0 7 K 14/145 (2006.01)	C 0 7 K 14/095	
C 0 7 K 14/035 (2006.01)	C 0 7 K 14/145	
C 0 7 K 14/18 (2006.01)	C 0 7 K 14/035	
C 0 7 K 14/08 (2006.01)	C 0 7 K 14/18	
C 0 7 K 14/105 (2006.01)	C 0 7 K 14/08	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 0 7 K 14/105	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 N 15/41 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 15/50 (2006.01)	C 1 2 N 15/41	
C 1 2 N 15/38 (2006.01)	C 1 2 N 15/50	
C 1 2 N 15/47 (2006.01)	C 1 2 N 15/38	
C 1 2 N 15/40 (2006.01)	C 1 2 N 15/47	
	C 1 2 N 15/40	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,J
P,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,N
A,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,
TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 マーティンズ, バーバラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, ブライアント ストリート
7 8 0, エクセブジェン インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 フォリアード, トーマス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, ブライアント ストリート
7 8 0, エクセブジェン インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 メーガー, イムレ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, ブライアント ストリート
7 8 0, エクセブジェン インコーポレイテッド 気付

F ターム (参考) 4B064 AG21 AG27 CA10 CA19 CC24
4C076 AA31 BB15 BB16 CC26 CC29 DD63 DD70 EE23
4C084 AA13 MA41 MA66 NA14 ZB211 ZC411
4C085 AA03 AA14 AA16 CC23 EE01 GG03 GG04
4H045 AA10 AA20 CA01 CA40 DA55 DA89 FA72 FA74