(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-530277
(P2023-530277A)
(43)公表日　令和5年7月14日(2023.7.14)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/34 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/34	ＺＮＡ　４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*1/21 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21	
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10	
Ｃ１２Ｎ	*7/01 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	7/01	
Ｃ１２Ｎ	*15/866 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/866	Ｚ

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全220頁）

(21)出願番号　特願2022-576003(P2022-576003)
(86)(22)出願日　令和3年6月11日(2021.6.11)
(85)翻訳文提出日　令和5年2月8日(2023.2.8)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/037076
(87)国際公開番号　WO2021/252943
(87)国際公開日　令和3年12月16日(2021.12.16)
(31)優先権主張番号　63/147,056
(32)優先日　令和3年2月8日(2021.2.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/038,603
(32)優先日　令和2年6月12日(2020.6.12)
(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
最終頁に続く

(71)出願人　519397987
フラッグシップ パイオニアリング イノベーションズ ブイ， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， ８ティーエイチ フロア
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　バキュロウイルス発現系

(57)【要約】
本発明は、一般に、アネロベクターを作製するための組成物及びその使用に関する。例えば、本開示は、昆虫細胞を使用して、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質、例えば、ＯＲＦ１を産生するための組成物及び方法を提供する。本開示は、送達ビヒクルとして、例えば、遺伝物質を送達するために、ペイロードなどのエフェクターを送達するために、又は治療薬若しくは治療用エフェクターを真核生物（例えば、ヒト細胞又はヒト組織）に送達するために使用することができるアネロベクター（例えば、合成アネロベクター）を産生するための組成物及び方法を提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ｉ）核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物であって：
ａ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子）をコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターと；
ｂ）昆虫細胞中での前記核酸構築物の複製に好適な骨格領域（例えば、バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域）であって、任意選択で、細菌細胞中での前記核酸構築物の複製にも好適である、骨格領域と
を含む核酸構築物と；
（ｉｉ）外性エフェクターをコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントと
を含む、組成物。
【請求項２】
核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物であって：
ａ）外性エフェクターをコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域と；
ｂ）昆虫細胞中での前記核酸構築物の複製に好適な骨格領域（例えば、バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域）であって、任意選択で、細菌細胞中での前記核酸構築物の複製にも好適である、骨格領域と
を含む、核酸構築物。
【請求項３】
請求項１又は２に記載の核酸構築物又は核酸調製物を含む、細菌細胞。
【請求項４】
請求項１～３のいずれか一項に記載の核酸構築物又は核酸調製物を含む、昆虫細胞。
【請求項５】
アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１アルギニンリッチ領域と、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１　Ｃ－末端ドメインとを含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子を含む、昆虫細胞。
【請求項６】
核酸構築物であって：
ａ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子）をコード化する配列と；
ｂ）前記昆虫細胞中での前記核酸構築物の複製に好適な骨格領域（例えば、バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域）であって、任意選択で、細菌細胞中での前記核酸構築物の複製にも好適である、骨格領域と
を含む核酸構築物を更に含む、請求項２に記載の核酸構築物を含む昆虫細胞。
【請求項７】
アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１アルギニンリッチ領域と、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｃ－末端ドメインとを含み、検出可能なレベルのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含まない、単離されたアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子を含む、組成物。
【請求項８】
少なくとも１０１ｋＤａの分子量を有する単離されたアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子を含み、検出可能なレベルのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含まない、組成物。
【請求項９】
請求項２に記載の核酸構築物を含む、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子。

【請求項１０】
請求項２に記載の核酸構築物を含む、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子の集団。
【請求項１１】
請求項１０に記載のバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子の集団と、複数の昆虫細胞とを含む、反応混合物。
【請求項１２】
核酸構築物であって、以下の順序で：
ａ）第１のトランスポザーゼ認識配列（例えば、Ｔｎ７Ｒ配列）と；
ｂ）外性エフェクターをコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域と；
ｃ）第２のトランスポザーゼ認識配列（例えば、Ｔｎ７Ｌ配列）と；
ｄ）任意選択で、骨格領域であって、例えば、前記ＤＮＡ構築物の複製に好適である、骨格領域と
を含む、核酸構築物。
【請求項１３】
核酸構築物であって、以下の順序で：
ａ）第１のトランスポザーゼ認識配列（例えば、Ｔｎ７Ｒ配列）と；
ｂ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子）をコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターと；
ｃ）第２のトランスポザーゼ認識配列（例えば、Ｔｎ７Ｌ配列）と；
ｄ）任意選択で、骨格領域であって、例えば、前記ＤＮＡ構築物の複製に好適である、骨格領域と
を含む、核酸構築物。
【請求項１４】
バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子を作製する方法であって、前記方法が：
（ｉ）請求項２に記載の核酸構築物を含む昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）を提供することと；
（ｉｉ）前記昆虫細胞を、前記核酸構築物又はそのコピーを含むバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子の産生に好適な条件下でインキュベートし；
それにより、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子を作製することと
を含む、方法。
【請求項１５】
アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含むバクミド構築物を含む昆虫細胞を作製する方法であって、前記方法が：
（ｉ）請求項２に記載の核酸構築物と、空のバクミド構築物とを含む昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）を提供することと；
（ｉｉ）前記昆虫細胞を、前記核酸構築物と前記空のバクミド構築物との間の組換えに好適な条件下でインキュベートし；
それにより、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含むバクミド構築物を含む昆虫細胞を作製することと
を含む、方法。
【請求項１６】
アネロベクターを作製する方法であって、前記方法が：
（ｉ）
ａ）外性エフェクターをコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントと、
ｂ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子と

を含む昆虫細胞を提供することと；
（ｉｉ）前記昆虫細胞を、前記アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子を含むタンパク質性外層中の前記アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントの閉じ込めに好適な条件下でインキュベートすることと
を含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２０年６月１２日に出願された米国仮特許出願第６３／０３８，６０３号明細書、及び２０２１年２月８日に出願された米国仮特許出願第６３／１４７，０５６号明細書の利益を主張する。前述した出願の内容は、その全体を参照により本明細書に組み込む。
【背景技術】
【０００２】
治療用エフェクターを患者に送達するために、好適なベクターを作製するための組成物及び方法を開発する継続的な必要性がある。例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ベースのベクターは、治療用送達のための有望な治療手段である。しかしながら、この分野における取り組みは、完全長の精製されたアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質の産生における困難によって阻まれてきた。精製されたアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質を産生する新しい方法が、当該技術分野において必要とされている。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００３】
本開示は、送達ビヒクルとして、例えば、遺伝物質を送達するために、ペイロードなどのエフェクターを送達するために、又は治療薬若しくは治療用エフェクターを真核生物（例えば、ヒト細胞又はヒト組織）に送達するために使用することができるアネロベクター（例えば、合成アネロベクター）を産生するための組成物及び方法を提供する。例えば、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子及び本明細書に記載される遺伝子エレメント領域と、バキュロウイルスゲノム若しくはその断片などのバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）の産生に好適なエレメント（本明細書では、バクミドとも称される）と、を含む核酸構築物、並びにバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）の産生に好適な細胞（例えば、昆虫細胞）、例えば、そのような核酸構築物を含む細胞が本明細書に記載される。また、遺伝子エレメント領域及び遺伝子エレメント領域のバクミド骨格（例えば、同族リコンビナーゼ認識部位、例えば、Ｔｎ７Ｒ及びＴｎ７Ｌ部位）への移入に好適な１つ又は複数のエレメントを含むドナーベクターも記載される。また、例えば、そのような核酸構築物（例えば、バクミド及び／又はドナーベクター）、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）、及び／又は細胞を使用してアネロベクターを産生する方法が本明細書に記載される。加えて、アネロベクターを産生するために好適な核酸構築物（例えば、バクミド及び／又はドナーベクター）、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）、及び細胞を産生する方法が本明細書に提供される。
【０００４】
アネロベクター（例えば、本明細書に記載される組成物又は方法を使用して産生される）は、一般に、タンパク質性外層（ｐｒｏｔｅｉｎａｃｅｏｕｓ ｅｘｔｅｒｉｏｒ）（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）キャプシドタンパク質、例えば、本明細書に記載されるようなアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸によってコード化されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質、又はポリペプチドを含むタンパク質性外層）に包膜された（ｅｎｃａｐｓｕｌａｔｅｄ）遺伝子エレメント（例えば、エフェクター、例えば、外性若しくは内在性エフェクター、例

えば、治療用エフェクターを含むか、それをコード化する遺伝子エレメント）を含み、これは遺伝子エレメントを細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞）中に導入することができる。一部の実施形態では、アネロベクターは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸（例えば、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）、ベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）、又はガンマトルクウイルス（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）のＯＲＦ１核酸、例えば、本明細書に記載のように、例えば、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）クレード１、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）クレード２、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）クレード３、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）クレード４、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）クレード５、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）クレード６、若しくはアルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）クレード７のＯＲＦ１核酸）によりコードされるポリペプチドを含むタンパク質性外層を含む感染性ビヒクル又は粒子である。本開示のアネロベクターの遺伝子エレメントは、典型的に、環状及び／又は一本鎖ＤＮＡ分子（例えば、環状且つ一本鎖）であり、概して、それを閉じ込めるタンパク質性外層と結合するタンパク質結合配列、又はそれに結合したポリペプチドを含み、これは、タンパク質性外層内への遺伝子エレメントの閉じ込め及び／又はタンパク質性外層内で、他の核酸に対する遺伝子エレメントの濃縮を促進し得る。一部の実施形態では、アネロベクターの遺伝子エレメントは、例えば、本明細書に記載されるバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）、核酸構築物（例えば、バクミド及び／又はドナーベクター）、及び／又は昆虫細胞を使用して産生される。

【０００５】

場合によっては、遺伝子エレメントは、エフェクター（例えば、ノンコーディングＲＮＡなどの核酸エフェクター、又はポリペプチドエフェクター、例えば、タンパク質）を含むか又はコード化し、例えば、これは細胞中で発現され得る。一部の実施形態では、エフェクターは、例えば、本明細書に記載されるような治療薬又は治療用エフェクターである。一部の実施形態では、エフェクターは、例えば、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）又は標的細胞に対して内在性エフェクター又は外性エフェクターである。一部の実施形態では、アネロベクターは、細胞と接触して、細胞によりエフェクターが生成又は発現されるように、エフェクターをコード化する遺伝子エレメントを細胞に導入することによって、エフェクターを細胞中に送達することができる。特定の事例では、エフェクターは、内在性エフェクターである（例えば、標的細胞に対して内在性であるが、例えば、アネロベクターにより、増加した量で供給される）。他の事例では、エフェクターは、外性エフェクターである。エフェクターは、一部の事例では、細胞の機能を調節するか、又は細胞中の標的分子の活性若しくはレベルを調節することができる。例えば、エフェクターは、細胞中の標的タンパク質のレベルを低下させることができる（例えば、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の実施例３及び４に記載されるように）。別の例では、アネロベクターは、エフェクター、例えば、外性タンパク質をインビボで送達及び発現することができる（例えば、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の実施例１９及び２８に記載されるように）。アネロベクターは、例えば、遺伝物質を、標的細胞、組織若しくは被験者に送達するために；エフェクターを標的細胞、組織若しくは被験者に送達するために；又は、例えば、所望の細胞、組織、若しくは被験者に、治療薬として作用し得るエフェクターを送達することにより、疾患若しくは障害の治療のために使用することができる。

【０００６】

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、例えば、宿主細胞中で合成アネロベクターの遺伝子エレメントを産生するために使用することができる。合成アネロベクターは、野生型ウイルス（例えば、本明細書に記載されるものなどの野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）と比較して、少なくとも１つの構造的違い、例えば、

野生型ウイルスに対して欠失、挿入、置換、修飾（例えば、酵素修飾）を有する。概して、合成アネロベクターは、タンパク質性外層内に閉じ込められた外性遺伝子エレメントを含み、これは、遺伝子エレメント、又はそこでコード化されたエフェクター（例えば、外性エフェクター又は内在性エフェクター）（例えば、ポリペプチド若しくは核酸エフェクター）を真核生物（例えば、ヒト）細胞内に送達するために使用することができる。複数の実施形態において、アネロベクターは、検出可能な及び／又は不要な免疫若しくは炎症性応答を引き起こさず、例えば、炎症の分子マーカ、例えば、ＴＮＦ－α、ＩＬ－６、ＩＬ－１２、ＩＦＮ、並びにＢ細胞応答、例えば、反応性若しくは中和性抗体の１％、５％、１０％、１５％を超える増加を引き起こさず、例えば、アネロベクターは、標的細胞、組織又は被験者に対して実質的に非免疫原性であり得る。

【０００７】

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、（ｉ）プロモーターエレメントと、エフェクター（例えば、内在性若しくは外性エフェクター）をコード化する配列と、タンパク質結合配列（例えば、外部タンパク質結合配列、例えば、パッケージングシグナル）と、を含む遺伝子エレメント；及び（ｉｉ）タンパク質性外層を含むアネロベクターの遺伝子エレメントを産生するために使用することができ、ここで遺伝子エレメントはタンパク質性外層（例えば、キャプシド）内に閉じ込められており、且つアネロベクターは遺伝子エレメントを真核生物（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）細胞内に送達することができる。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、一本鎖ＤＮＡ及び／又は環状ＤＮＡである。これに代わり、又はこれと組み合わせて、遺伝子エレメントは、下記特性のうちの１つ、２つ、３つ、又は全部を有する：環状である、一本鎖である、細胞に進入する遺伝子エレメントの約０．０００１％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、１．５％、若しくは２％未満の頻度で細胞のゲノム中に組み込まれる、且つ／又はゲノム当たり１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、若しくは３０コピー未満で標的細胞のゲノム中に組み込まれる。一部の実施形態では、組み込み頻度は、例えば、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２００４，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　１１：７１１－７２１、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、遊離ベクターから分離されたゲノムＤＮＡの定量的ゲル精製アッセイによって決定される。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、タンパク質性外層内に閉じ込められる。一部の実施形態では、アネロベクターは、遺伝子エレメントを真核細胞内に送達することができる。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）の配列（例えば、野生型トルク・テノウイルス（Ｔｏｒｑｕｅ　Ｔｅｎｏ　ｖｉｒｕｓ）（ＴＴＶ）、トルク・テノミニウイルス（Ｔｏｒｑｕｅ　Ｔｅｎｏ　ｍｉｎｉ　ｖｉｒｕｓ）（ＴＴＭＶ）、又はＴＴＭＤＶ配列、例えば本明細書に記載の野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列）に対して少なくとも７５％（例えば、少なくとも７５、７６、７７、７８、７９、８０、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、若しくは１００％）の配列同一性を有する核酸配列（例えば、３００～４０００ヌクレオチド、例えば、３００～３５００ヌクレオチド、３００～３０００ヌクレオチド、３００～２５００ヌクレオチド、３００～２０００ヌクレオチド、３００～１５００ヌクレオチドの核酸配列）を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）の配列（例えば本明細書に記載の野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列）に対して少なくとも７５％（例えば、少なくとも７５、７６、７７、７８、７９、８０、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、若しくは１００％）の配列同一性を有する核酸配列（例えば、少なくとも３００ヌクレオチド、５００ヌクレオチド、１０００ヌクレオチド、１５００ヌクレオチド、２０００ヌクレオチド、２５００ヌクレオチド、３０００ヌクレオチド以上の核酸配列）を含む。一部の実施形態では、核酸配列は、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）細胞での発現のために、コドン最適化される。一部の実施形態では、核酸配列中のコドンの少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％が、例

えば、哺乳動物（例えば、ヒト）細胞での発現のためにコドン最適化される。

【０００８】

一部の実施形態では、本明細書に記載の核酸は、１つ又は複数のコドン最適化オープンリーディングフレームを含む（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、及び／又はＯＲＦ２ｔ／３をコード化する配列であり、この配列は、例えば、動物細胞、例えば、昆虫細胞における発現のためにコドン最適化されている）。一部の実施形態では、本明細書に記載の核酸は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子をコード化するコドン最適化配列を含む。理論に拘束されることを望むものではないが、一部の実施形態では、昆虫細胞に対するコドン最適化は、非コドン最適化配列と比較して、昆虫細胞中のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子の発現を増加させる。

【０００９】

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、感染性（例えば、ヒト細胞への）アネロベクターの遺伝子エレメント、ビヒクル、又はキャプシドに結合するタンパク質結合配列及び治療用エフェクターをコード化する異種（アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）への）配列を含む遺伝子エレメントを包膜するキャプシド（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ、例えば、ＯＲＦ１ポリペプチドを含むキャプシド）を含む粒子を産生するために使用することができる。一部の実施形態では、アネロベクターは、哺乳動物、例えば、ヒトの細胞内に遺伝子エレメントを送達することができる。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム配列に対して約６％未満（例えば、１０％、９％、８％、７％、６％、５．５％、５％、４．５％、４％、３．５％、３％、２．５％、２％、１．５％未満）の同一性を有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム配列に対して１．５％、２％、２．５％、３％、３．５％、４％、４．５％、５％、５．５％又は６％以下の同一性を有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）に対して少なくとも約２％～少なくとも約５．５％（例えば、２～５％、３％～５％、４％～５％）の同一性を有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、非ウイルス配列（例えば、非アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム配列）の約２０００、３０００、４０００、４５００、若しくは５０００超のヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、非ウイルス配列（例えば、非アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム配列）の約２０００～５０００、２５００～４５００、３０００～４５００、２５００～４５００、３５００、又は４０００、４５００（例えば、約３０００～４５００）超のヌクレオチドを有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、一本鎖、環状ＤＮＡである。これに代わり、又はこれと組み合わせて、遺伝子エレメントは、下記特性のうちの１つ、２つ、又は３つを有する：環状である、一本鎖である、細胞に進入する遺伝子エレメントの約０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、１．５％、若しくは２％未満の頻度で細胞のゲノム中に組み込まれる、ゲノム当たり１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、若しくは３０コピー未満で標的細胞のゲノム中に組み込まれるか、或いは細胞に進入する遺伝子エレメントの約０．０００１％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、１．５％、若しくは２％未満の頻度で組み込まれる（例えば、細胞溶解物からの遺伝子エレメント配列に対してゲノムＤＮＡ中への組み込み頻度を比較することによって）。一部の実施形態では、組み込み頻度は、例えば、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２００４，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　１１：７１１－７２１、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているように、遊離ベクターから分離されたゲノムＤＮＡの定量的ゲル精製アッセイによって決定される。

【００１０】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）又はアネロベクターは、本明細書に記載のエフェクターなどの作用物質を標的細胞、例

えば、治療的又は予防的に処置される被験者における標的細胞に導入するための効果的な送達ビヒクルとして使用することができる。

【００１１】

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、下記を含む（例えば、連続して）ポリペプチド（例えば、合成ポリペプチド、例えば、ＯＲＦ１分子）を含むタンパク質性外層を含むアネロベクターの遺伝子エレメントを産生するために使用することができる：

（ｉ）アルギニンリッチ領域、例えば、少なくとも６０％、７０％、若しくは８０％の塩基性残基（例えば、アルギニン、リシン、若しくはそれらの組合せ）を含む少なくとも約４０アミノ酸の配列を含む第１の領域、

（ｉｉ）ゼリーロール（ｊｅｌｌｙ－ｒｏｌｌ）ドメイン、例えば、少なくとも６つのβ鎖を含む配列を含む第２の領域、

（ｉｉｉ）本明細書に記載のＮ２２ドメイン配列を含む第３の領域、

（ｉｖ）本明細書に記載のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１　Ｃ－末端ドメイン（ＣＴＤ）配列を含む第４の領域、並びに

（ｖ）任意選択で、このポリペプチドは、例えば、本明細書に記載される野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質に対して、１００％、９９％、９８％、９５％、９０％、８５％、８０％未満の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【００１２】

一態様では、本発明はエフェクター、例えば、ペイロードをコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターエレメントと、外部タンパク質結合配列と、を含む遺伝子エレメントの配列を含む単離された核酸（例えば、核酸構築物、例えば、バクミド又はドナーベクター）を特徴とする。一部の実施形態では、外部タンパク質結合配列は、例えば、本明細書に開示されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）の５’ＵＴＲ配列と、少なくとも７５％（少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、１００％）同一の配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメントは一本鎖ＤＮＡである、環状である、細胞に進入する遺伝子エレメントの約０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、１．５％、若しくは２％未満の頻度で組み込まれる、且つ／又はゲノム当たり１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、若しくは３０コピー未満で標的細胞のゲノム中に組み込まれるか、或いは細胞に進入する遺伝子エレメントの約０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、１．５％、若しくは２％未満の頻度で組み込まれる。一部の実施形態では、組み込み頻度は、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２００４，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　１１：７１１－７２１、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように決定される。複数の実施形態では、エフェクターはＴＴＶに由来せず、またＳＶ４０－ｍｉＲ－Ｓ１ではない。複数の実施形態では、核酸分子は、ＴＴＭＶ－ＬＹ２のポリヌクレオチド配列を含まない。複数の実施形態では、プロモーターエレメントは、真核生物（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）細胞でのエフェクターの発現を指令することができる。

【００１３】

一部の実施形態では、核酸分子は、昆虫細胞における核酸構築物の複製に好適な骨格領域（例えば、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域、例えば、１つ又は複数のバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）エレメントを含むもの）を含む。一部の実施形態では、核酸分子はバクミドである。一部の実施形態では、核酸分子は、バキュロウイルスゲノム又はその機能性断片を含む。一部の実施形態では、骨格領域は、細菌細胞（例えば、ドナーベクター、例えば、本明細書に記載されるような）での核酸分子の複製に好適である。

【００１４】

一部の実施形態では、核酸分子は、環状である。一部の実施形態では、核酸分子は、線

状である。一部の実施形態では、本明細書に記載の核酸分子は、１つ又は複数の修飾ヌクレオチド（例えば、塩基修飾、糖修飾、若しくは骨格修飾）を含む。

【００１５】

一部の実施形態では、核酸分子は、ＯＲＦ１分子（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質、例えば、本明細書に記載の通り）をコード化する配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、ＯＲＦ２分子（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２タンパク質、例えば、本明細書に記載の通り）をコード化する配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、ＯＲＦ３分子（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ３タンパク質、例えば、本明細書に記載の通り）をコード化する配列を含む。一態様では、本発明は、以下の１つ、２つ、若しくは３つを含む遺伝子エレメントを特徴とする：（ｉ）プロモータエレメントと、エフェクター、例えば、外性若しくは内在性エフェクターをコード化する配列；（ｉｉ）野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列に対して少なくとも７５％（例えば、少なくとも７５、７６、７７、７８、７９、８０、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、若しくは１００％）の配列同一性を有する、少なくとも７２個の連続した核酸（例えば、少なくとも７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、９０、１００、若しくは１５０ヌクレオチド）；又は野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列に対して少なくとも７２％（例えば、少なくとも７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、若しくは１００％）の配列同一性を有する、少なくとも１００個（例えば、少なくとも３００個、５００個、１０００個、１５００個）の連続した核酸；並びに（ｉｉｉ）タンパク質結合配列、例えば、外部タンパク質結合配列、ここで、核酸構築物は、一本鎖ＤＮＡである；並びに、核酸構築物は、環状であり、細胞に進入する遺伝子エレメントの約０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、１．５％、又は２％の頻度で組み込まれる、且つ／又はゲノム当たり１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、若しくは３０コピー未満で標的細胞のゲノム中に組み込まれる。一部の実施形態では、エフェクター（例えば、外性若しくは内在性エフェクター）をコード化する遺伝子エレメントは、コドン最適化される。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、環状である。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、線状である。一部の実施形態では、本明細書に記載の遺伝子エレメントは、１つ又は複数の修飾ヌクレオチド（例えば、塩基修飾、糖修飾、若しくは骨格修飾）を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、ＯＲＦ１分子（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質、例えば、本明細書に記載の通り）をコード化する配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、ＯＲＦ２分子（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２タンパク質、例えば、本明細書に記載の通り）をコード化する配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、ＯＲＦ３分子（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ３タンパク質、例えば、本明細書に記載の通り）をコード化する配列を含む。

【００１６】

一態様では、本発明は、例えば、本明細書に記載されるバクミド又はドナーベクターを含む宿主細胞を特徴とする。一部の実施形態では、バクミドは、昆虫細胞での核酸構築物の複製に好適な骨格（例えば、バキュロウイルスゲノム又はそのエレメントを含む、例えば、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域）を含む核酸構築物である。一部の実施形態では、バクミドの骨格領域は、細菌細胞（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、例えば、ＤＨ　１０Ｂａｃ細胞）での核酸構築物の複製に好適である。一部の実施形態では、ドナーベクターは、細菌細胞（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、例えば、ＤＨ１０Ｂａｃ細胞）での核酸構築物の複製に好適な骨格領域を含む核酸構築物（例えば、プラスミド）である。一部の実施形態では、宿主細胞は、例えば、バクミドを含む、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）である。一部の実施形態では、宿主細胞は、例えば、ドナーベクター及び／又はバクミドを含む、細菌細胞、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞、例

えば、ＤＨ　１０Ｂａｃ細胞）である。一部の実施形態では、宿主細胞は、（ａ）ＯＲＦ１分子、ＯＲＦ２分子、若しくはＯＲＦ３分子のうちの１つ又は複数をコード化する配列（例えば、本明細書に記載のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１ポリペプチドをコード化する配列）を含むバクミド及び／又はドナー細胞と、（ｂ）遺伝子エレメント（例えば、同じバクミド及び／又はドナーベクターに含まれるか、或いは第２のバクミド及び／又はドナーベクターに含まれる）と、を含み、遺伝子エレメントが、（ｉ）エフェクター（例えば、外性エフェクター若しくは内在性エフェクター）をコード化する核酸配列（例えば、ＤＮＡ配列）に作動可能に連結されたプロモーターエレメントと、（ｉｉ）（ａ）のポリペプチドに結合するタンパク質結合配列と、を含み、任意選択で、遺伝子エレメントは、ＯＲＦ１ポリペプチド（例えば、ＯＲＦ１タンパク質）をコード化しない。例えば、宿主細胞は、（ａ）及び（ｂ）をｃｉｓ（同じ核酸分子の両部分）又はｔｒａｎｓ（異なる核酸分子の各部分）のいずれかで含む。複数の実施形態において、（ｂ）の遺伝子エレメントは、環状、一本鎖ＤＮＡである。一部の実施形態では、宿主細胞は、例えば本明細書に記載の製造細胞株である。一部の実施形態では、宿主細胞は、接着性若しくは懸濁状態、又はその両方である。一部の実施形態では、宿主細胞又はヘルパー細胞は、マイクロキャリア中で増殖させる。一部の実施形態では、宿主細胞又はヘルパー細胞は、ｃＧＭＰ製造規範に適合している。一部の実施形態では、宿主細胞又はヘルパー細胞は、細胞増殖を促進するのに好適な培地中で増殖させる。特定の実施形態では、宿主細胞又はヘルパー細胞が十分に（例えば、適切な細胞密度まで）増殖したら、培地を、宿主細胞又はヘルパー細胞によるアネロベクターの産生に好適な培地と交換してもよい。

【００１７】

一態様では、本発明は、本明細書に記載されるようなアネロベクター（例えば、合成アネロベクター）を含む医薬組成物を特徴とする。複数の実施形態において、医薬組成物は、薬学的に許容される担体又は賦形剤をさらに含む。複数の実施形態において、医薬組成物は、対象被験者の１キログラム当たり約10^5～10^{14}（例えば約10^6～10^{13}、10^7～10^{12}、10^8～10^{11}、若しくは10^9～10^{10}）ゲノム当量を含む単位用量を含む。一部の実施形態では、調製物を含む医薬組成物は、許容される期間及び温度で安定しており、且つ／又は所望の投与経路及び／又はこの投与経路が必要とする任意のデバイス、例えば注射針若しくは注射器と適合性である。一部の実施形態では、医薬組成物は、単回用量又は複数回用量としての投与のために製剤化される。一部の実施形態では、医薬組成物は、投与の現場で、例えば、医療従事者によって製剤化される。一部の実施形態では、医薬組成物は、所望の濃度のアネロベクターゲノム又はゲノム当量（例えば、体積当たりのゲノム数によって定義される）を含む。

【００１８】

一態様では、本発明は、被験者の疾患若しくは障害を治療する方法を特徴とし、この方法は、アネロベクター、例えば、本明細書に記載されるような例えば合成アネロベクターを被験者に投与するステップを含む。

【００１９】

一態様では、本発明は、エフェクター又はペイロード（例えば、内在性エフェクター若しくは外性エフェクター）を細胞、組織若しくは被験者に送達する方法を特徴とし、この方法は、アネロベクター、例えば、本明細書に記載されるような例えば合成アネロベクターを被験者に投与するステップを含み、ここで、アネロベクターは、エフェクターをコード化する核酸を含む。複数の実施形態において、ペイロードは、核酸である。複数の実施形態において、ペイロードは、ポリペプチドである。

【００２０】

一態様では、本発明は、アネロベクターを細胞に送達する方法を特徴とし、これは、アネロベクター、例えば、本明細書に記載されるような例えば合成アネロベクターを細胞、例えば、真核細胞、例えば、哺乳動物細胞と、例えば、インビボ若しくはエクスビボで接触させるステップを含む。

【００２１】

一態様では、本発明は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子を作製する方法を特徴とする。方法は：

（ａ）以下：

（ｉ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子）をコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターと、

（ｉｉ）昆虫細胞での核酸構築物の複製に好適な骨格領域（例えば、バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域）であって、任意選択で、細菌細胞での核酸構築物の複製にも好適である、骨格領域と、を含む核酸分子を含む宿主細胞（例えば、昆虫細胞、例えば、Ｓｆ９細胞）を提供するステップと、

（ｂ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子の発現に好適な条件下で、宿主細胞をインキュベートし、それによってアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子を産生するステップと、を含む。

【００２２】

一部の実施形態では、宿主細胞は、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）である。一部の実施形態では、宿主細胞は、細菌細胞（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞、例えば、ＤＨ　１０Ｂａｃ細胞）である。

【００２３】

例えば、この製造方法で提供される宿主細胞は、（ａ）本明細書に記載のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１ポリペプチドをコード化する配列を含む核酸分子（例えば、バクミド又はドナーベクター）と、（ｂ）遺伝子エレメント（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、遺伝子エレメント配列及び／又は遺伝子エレメント領域を含む）を産生することができる核酸構築物（例えば、バクミド）と、を含み、例えば、遺伝子エレメントが、（ｉ）エフェクター（例えば、外性エフェクター若しくは内在性エフェクター）をコード化する核酸配列（例えば、ＤＮＡ配列）に作動可能に連結されたプロモーターエレメントと、（ｉ）（ａ）のポリペプチドに結合するタンパク質結合配列（例えば、パッケージング配列）と、を含み、宿主細胞が、（ａ）及び（ｂ）をｃｉｓ又はｔｒａｎｓのいずれかで含む。複数の実施形態では、（ｂ）の遺伝子エレメントは、環状の、一本鎖ＤＮＡである。一部の実施形態では、宿主細胞は、製造細胞株である。

【００２４】

一部の実施形態では、産生の時点で、アネロベクターの構成体を宿主細胞に導入する（例えば、一過性トランスフェクションにより）。一部の実施形態では、宿主細胞は、アネロベクターの構成体を安定して発現する（例えば、その場合、アネロベクターの構成体をコード化する１つ又は複数の核酸が、宿主細胞、又はその前駆細胞に、例えば、安定なトランスフェクションによって導入される）。

【００２５】

一態様では、本発明は、アネロベクター組成物を製造する方法を特徴とし、これは以下：ａ）本明細書に記載の複数のアネロベクター、又は本明細書に記載のアネロベクターの調製物を提供するステップと、ｂ）アネロベクター又はその調製物を、例えば、被験者への投与に好適な医薬組成物として製剤化するステップと、を含む。

【００２６】

一態様では、本発明は、宿主細胞、例えば、第１の宿主細胞又はプロデューサ細胞（例えば、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の図１２に示すものなど）（例えば、昆虫細胞、例えば、Ｓｆ９細胞）、例えば、アネロベクターを含む第１の宿主細胞の集団を作製する方法を特徴とし、本方法は遺伝子エレメントを産生することができる核酸構築物（例えば、バクミド、例えば、本明細書に記載されるものなど）を宿主細胞に導入するステップと、アネロベクターの産生に好適な条件下で宿主細胞を培養するステップと、を含む。複数の実施形態では、本方法は、ヘルパー、例えば、ヘルパーウイルスを宿主細胞に導入するステップを更に含む。複数の実施形態では、導入するステップは、宿主細胞のアネロベクターによるトランスフェクション（例えば、化学的トランスフェクション）又はエ

レクトロポレーションを含む。

【００２７】

一態様では、本発明は、アネロベクターを作製する方法を特徴とし、これは宿主細胞、例えば、アネロベクター、例えば、本明細書に記載されるものを含む、第１の宿主細胞又はプロデューサ細胞（例えば、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の図１２に示すものなど）（例えば、昆虫細胞、例えば、Ｓｆ９細胞）を提供するステップと、アネロベクターを宿主細胞から精製するステップと、を含む。一部の実施形態では、方法は、提供ステップの前に、宿主細胞を、核酸構築物（例えば、バクミド）又はアネロベクター、例えば、本明細書に記載されるものなどと接触させるステップと、宿主細胞をアネロベクターの産生に好適な条件下でインキュベートするステップと、を更に含む。複数の実施形態では、宿主細胞は、宿主細胞を作製する上記方法で記載された第１の宿主細胞又はプロデューサ細胞である。複数の実施形態では、宿主細胞からアネロベクターを精製するステップは、宿主細胞を溶解させるステップを含む。

【００２８】

一部の実施形態では、本方法は、第１宿主細胞又はプロデューサ細胞により産生されたアネロベクターを第２宿主細胞、例えば、許容細胞（例えば、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の図１２に示す通り）、例えば、第２宿主細胞の集団と接触させる第２ステップをさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、アネロベクターの産生に好適な条件下で第２宿主細胞をインキュベートするステップをさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、さらに、第２宿主細胞からアネロベクターを精製して、例えば、これによりアネロベクターシード集団を産生するステップを含む。複数の実施形態では、第１宿主細胞の集団からのものと比較して、第２宿主細胞の集団から少なくとも約２～１００倍多いアネロベクターが産生される。複数の実施形態では、第２宿主細胞からアネロベクターを精製するステップは、第２宿主細胞を溶解させるステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、第２宿主細胞により産生されたアネロベクターを第３宿主細胞、例えば、許容細胞（例えば、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の図１２に示す通り）、例えば、第３宿主細胞の集団と接触させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、アネロベクターの産生に好適な条件下で第３宿主細胞をインキュベートするステップをさらに含む。一部の実施形態では、本方法は、第３宿主細胞からのアネロベクターを精製して、例えば、これによりアネロベクターストック集団を産生するステップを含む。複数の実施形態では、第３宿主細胞からのアネロベクターの精製は、第３宿主細胞を溶解させるステップを含む。複数の実施形態では、第２宿主細胞の集団からのものと比較して、第３宿主細胞の集団から少なくとも約２～１００倍多いアネロベクターが生成される。

【００２９】

一部の実施形態では、宿主細胞は、細胞増殖を促進するのに好適な培地中で増殖させる。特定の実施形態では、宿主細胞又はヘルパー細胞が十分に（例えば、適切な細胞密度まで）増殖したら、培地を、宿主細胞又はヘルパー細胞によるアネロベクターの産生に好適な培地と交換してもよい。一部の実施形態では、宿主細胞により産生されたアネロベクターは、第２宿主細胞と接触させる前に、宿主細胞から分離する（例えば、宿主細胞を溶解することによって）。一部の実施形態では、宿主細胞により産生されたアネロベクターを、精製ステップの介入なしに、第２宿主細胞と接触させる。

【００３０】

一態様では、本発明は、医薬アネロベクター調製物を作製する方法を特徴とする。この方法は、（ａ）本明細書に記載のようにアネロベクター調製物を作製するステップ、（ｂ）１つ若しくは複数の医薬品質管理パラメータ、例えば、同一性、純度、力価、効力（例えば、アネロベクター粒子当たりのゲノム当量で）、及び／又はアネロベクターに含まれる遺伝子エレメントからの核酸配列について、調製物（例えば、医薬アネロベクター調製物、アネロベクターシード集団若しくはアネロベクターストック集団）を評価するステップ、並びに（ｃ）予め定めた基準を満たす、例えば、医薬品規格を満たす評価の医薬品用途のために調製物を製剤化するステップを含む。一部の実施形態では、同一性を評価する

ステップは、アネロベクターの遺伝子エレメントの配列、例えば、エフェクターをコード化する配列を評価する（例えば、確認する）ことを含む。一部の実施形態では、純度を評価するステップは、不純物、例えば、マイコプラズマ、内毒素、宿主細胞核酸（例えば、宿主細胞ＤＮＡ及び／又は宿主細胞ＲＮＡ）、動物由来の不純物（例えば、血清アルブミン若しくはトリプシン）、複製可能な因子（ＲＣＡ）、例えば、複製可能なウイルス若しくは不要なアネロベクター（例えば、所望のアネロベクター、例えば、本明細書に記載の合成アネロベクター以外のアネロベクター）、遊離ウイルスキャプシドタンパク質、偶発性物質、及び凝集体の量を評価するステップを含む。一部の実施形態では、力価を評価するステップは、調製物中の機能性及び非機能性（例えば、感染性及び非感染性）アネロベクターの比を評価すること（例えば、ＨＰＬＣによる評価など）を含む。一部の実施形態では、効力を評価するステップは、調製物中検出可能なアネロベクター機能のレベル（例えば、そこにコード化されたエフェクターの発現及び／又は機能又はゲノム当量）を評価することを含む。

【００３１】

複数の実施形態において、製剤化された調製物は、実質的に病原体、宿主細胞混入物若しくは不純物を含まず；予め定めたレベルの非感染性粒子又は予め定めた比の粒子：感染性単位（例えば、＜３００：１、＜２００：１、＜１００：１、若しくは＜５０：１）を有する。一部の実施形態では、複数のアネロベクターを単一バッチ中に産生することができる。複数の実施形態では、バッチ中に産生されたアネロベクターのレベルを評価することができる（例えば、個別に、又は一緒に）。

【００３２】

一態様では、本発明は、以下：

（ｉ）本明細書に記載される核酸構築物を含む第１核酸分子（例えばバクミド又はドナーベクター）、及び

（ｉｉ）任意選択で、例えば本明細書に記載のＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、若しくはＯＲＦ１／２から選択されるアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも７０％（例えば、少なくとも約７０、８０、９０、９５、９６、９７、９８、９９、若しくは１００％）の配列同一性を有するアミノ酸配列の１つ若しくは複数をコード化する第２核酸分子（例えばバクミド又はドナーベクター）

を含む宿主細胞を特徴とする。

【００３３】

一態様では、本発明は、本明細書に記載されるアネロベクター及びヘルパーウイルスを含む反応混合物を特徴とし、ここで、ヘルパーウイルスは、例えば、外部タンパク質（例えば、外部タンパク質結合配列に結合することができる外部タンパク質、及び任意選択で、脂質エンベロープ）をコード化するポリヌクレオチド、複製タンパク質（例えば、ポリメラーゼ）をコード化するポリヌクレオチド、又はこれらの任意の組合せを含む。

【００３４】

一部の実施形態では、アネロベクター（例えば、合成アネロベクター）を単離する、例えば、宿主細胞から単離する、及び／又は溶液（例えば、上清）中の他の構成要素から単離する。一部の実施形態では、アネロベクター（例えば、合成アネロベクター）を、例えば、溶液（例えば、上清）から精製する。一部の実施形態では、溶液中の他の構成要素に対してアネロベクターを溶液中で濃縮する。

【００３５】

前述したアネロベクター、組成物又は方法のいずれかの一部の実施形態では、アネロベクターの提供は、アネロベクターを、アネロベクター産生細胞、例えば、本明細書に記載されるものなどを含む組成物から分離する（例えば、採取する）ステップを含む。他の実施形態では、アネロベクターの提供は、アネロベクター又はその調製物を、例えば、第三者から得るステップを含む。

【００３６】

前述したアネロベクター、組成物又は方法のいずれかの一部の実施形態では、遺伝子エ

レメントは、例えば、本明細書に記載の方法に従って、同定されるようなアネロベクターゲノムを含む。複数の実施形態では、アネロベクターゲノムは、ＴＴＶ－ｔｔｈ８核酸配列、例えば、ＴＴＶ－ｔｔｈ８核酸配列のヌクレオチド３４３６～３７０７の少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、若しくは１００％の欠失を有するＴＴＶ－ｔｔｈ８核酸を含む。複数の実施形態では、アネロベクターゲノムは、ＴＴＭＶ－ＬＹ２核酸配列、例えば、ＴＴＭＶ－ＬＹ２核酸配列のヌクレオチド５７４～１３７１、１４３２～２２１０、５７４～２２１０、及び／又は２６１０～２８０９の少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、若しくは１００％の欠失を有するＴＴＭＶ－ＬＹ２核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメントは、自己複製及び／又は自己増幅が可能である。複数の実施形態では、遺伝子エレメントは、自己複製及び／又は自己増幅が不可能である。複数の実施形態では、遺伝子エレメントは、ｔｒａｎｓ、例えば、ヘルパー、例えば、ヘルパーウイルスの存在下で複製及び／又は増幅することができる。

【００３７】

前述したアネロベクター、組成物又は方法のいずれかの追加の特徴は、以下に列挙する実施形態のうちの１つ又は複数を含む。

【００３８】

当業者は、本明細書に記載される本発明の具体的な実施形態に対する多くの同等物を認識するか、又は常用的な実験を用いて確認することができるであろう。そのような同等物は、以下に列挙する実施形態に包含されることが意図される。

【００３９】

実施形態の列挙

１．組成物であって、

（ｉ）以下：

ａ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子）をコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターと、

ｂ）昆虫細胞中での核酸構築物の複製に好適な骨格領域（例えば、バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域）であって、任意選択で、細菌細胞中での核酸構築物の複製にも好適である骨格領域と、を含む核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物と、

（ｉｉ）外性エフェクターをコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントと、を含む、組成物。

【００４０】

２．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントが、核酸構築物の一部である、実施形態１に記載の組成物。

【００４１】

３．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含む第２の核酸構築物を含む、実施形態１に記載の組成物。

【００４２】

４．核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物であって、以下：

ａ）外性エフェクターをコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域と、

ｂ）昆虫細胞中での核酸構築物の複製に好適な骨格領域（例えば、バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域）であって、任意選択で、細菌細胞中での核酸構築物の複製にも好適である骨格領域と、を含む、核酸構築物。

【００４３】

５．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子）をコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む１つ又は複数のカセットを更に

含む、実施形態４に記載の核酸構築物。
【００４４】
６．プロモーターが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）プロモーター又は外性プロモーター（例えば、ポリヘドロンプロモーター）である、実施形態５に記載の核酸構築物。
【００４５】
７．核酸構築物が、単離された核酸構築物である、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物。
【００４６】
８．先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物又は核酸調製物を含む、細菌細胞。
【００４７】
９．先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物又は核酸調製物を含む、昆虫細胞。
【００４８】
１０．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１アルギニンリッチ領域とアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１　Ｃ－末端領域と、を含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１を含む、昆虫細胞。
【００４９】
１１．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、アネロウイルスＯＲＦ１ゼリーロールドメインを含む、実施形態１０に記載の昆虫細胞。
【００５０】
１２．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１超可変ドメインを含む、実施形態１０又は１１に記載の昆虫細胞。
【００５１】
１３．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１　Ｎ２２ドメインを含む、実施形態１０～１２のいずれかに記載の昆虫細胞。
【００５２】
１４．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子の少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、５００、１０００、１０，０００、５０，０００、又は１００，０００コピーを含む、実施形態９～１３のいずれかに記載の昆虫細胞。
【００５３】
１５．実施形態４～７のいずれかに記載の核酸構築物を含む昆虫細胞であって、以下：
ａ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子）をコード化する配列と、
ｂ）昆虫細胞中での核酸構築物の複製に好適な骨格領域（例えば、バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域）であって、任意選択で、細菌細胞中での核酸構築物の複製にも好適である骨格領域と、を含む核酸構築物を更に含む、昆虫細胞。
【００５４】
１６．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１アルギニンリッチ領域とアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｃ－末端ドメインとを含み、且つ検出可能なレベルのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含まない単離されたアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子を含む、組成物。
【００５５】
１７．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１ゼリーロール領域を含む、実施形態１６に記載の組成物。
【００５６】

１８．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１可変ドメインを含む、実施形態１６～１７のいずれかに記載の組成物。

【００５７】

１９．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１　Ｎ２２ドメインを含む、実施形態１６～１８のいずれかに記載の組成物。

【００５８】

２０．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子又はそれをコード化する核酸分子が、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質（例えば、本明細書に記載されるような）と比較して、少なくとも１つの相違（例えば、変異、化学修飾、若しくはエピジェネティックな改変）、例えば、挿入、置換、化学若しくは酵素的修飾、及び／又は欠失、例えば、特定のドメイン（例えば、アルギニンリッチ領域、ゼリーロールドメイン、ＨＶＲ、Ｎ２２、又はＣＴＤ、例えば、本明細書に記載されるようなもののうちの１つ又は複数）の欠失を含む、実施形態１６～１９のいずれかに記載の組成物。

【００５９】

２１．少なくとも１０１ｋＤａの分子量を有し、且つ検出可能なレベルのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含まない単離されたアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子を含む、組成物。

【００６０】

２２．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子又はそれをコード化する核酸分子が、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質（例えば、本明細書に記載されるような）と比較して、少なくとも１つの相違（例えば、変異、化学修飾、若しくはエピジェネティックな改変）、例えば、挿入、置換、化学若しくは酵素的修飾、及び／又は欠失、例えば、特定のドメイン（例えば、アルギニンリッチ領域、ゼリーロールドメイン、ＨＶＲ、Ｎ２２、又はＣＴＤ、例えば、本明細書に記載されるようなもののうちの１つ又は複数）の欠失を含む、実施形態２１に記載の組成物。

【００６１】

２３．先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物を含む、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子。

【００６２】

２４．先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物を含む、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子の集団。

【００６３】

２５．実施形態２４に記載のバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子の集団と複数の昆虫細胞と、を含む、反応混合物。

【００６４】

２６．核酸構築物であって、連続して、以下：

ａ）第１のトランスポザーゼ認識配列（例えば、Ｔｎ７Ｒ配列）と、

ｂ）外性エフェクターをコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントと、

ｃ）第２のトランスポザーゼ認識配列（例えば、Ｔｎ７Ｒ配列）と、

ｄ）任意選択で、骨格領域であって、例えば、ＤＮＡ構築物の複製に好適である骨格領域と、を含む、核酸構築物。

【００６５】

２７．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子をコード化する配列を更に含む、実施形態２６に記載の核酸構築物。

【００６６】

２８．核酸構築物であって、連続して、以下：
ａ）第１のトランスポザーゼ認識配列（例えば、Ｔｎ７Ｒ配列）と、
ｂ）外性エフェクターをコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子）をコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターと、
ｃ）第２のトランスポザーゼ認識配列（例えば、Ｔｎ７Ｌ配列）と、
ｄ）任意選択で、骨格領域であって、例えば、ＤＮＡ構築物の複製に好適である骨格領域と、を含む、核酸構築物。
【００６７】
２９．外性エフェクターをコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域を更に含む、実施形態２８に記載の核酸構築物。
【００６８】
３０．実施形態２６～２９のいずれかに記載の核酸構築物を含む、細菌細胞。
【００６９】
３１．実施形態２６～３０のいずれかに記載の核酸構築物と、細菌細胞（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞）と、を含む、反応混合物。
【００７０】
３２．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含む、昆虫細胞。
【００７１】
３３．外性エフェクターをコード化する配列に動作可能に連結したプロモーターを含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含む、昆虫細胞。
【００７２】
３４．１つ又は複数のＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子）を更に含む、実施形態３２又は３３に記載の昆虫細胞。
【００７３】
３５．ＯＲＦ１分子が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを閉じ込める、実施形態３４に記載の昆虫細胞。
【００７４】
３６．バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子を作製する方法であって、方法が：
（ｉ）先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物を含む昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）を提供するステップと、
（ｉｉ）核酸構築物又はそのコピーを含むバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子の産生に好適な条件下で昆虫細胞をインキュベートし、
それによってバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子を作製するステップと、を含む、方法。
【００７５】
３７．核酸構築物を含む昆虫細胞を提供するステップが、核酸構築物を昆虫細胞中に導入する（例えば、トランスフェクトする又は感染させる）ステップを含む、実施形態３６に記載の方法。
【００７６】
３８．バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子を単離するステップを更に含む、実施形態３６又は３７に記載の方法。
【００７７】
３９．バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を、第２の昆虫細胞と接触させるステップを更に含む、実施形態３６～３８のいずれかに記載の方法。
【００７８】

４０．第２の昆虫細胞を、核酸構築物又はそのコピーを含む第２のバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子の産生に好適な条件下でインキュベートするステップを更に含む、実施形態３９に記載の方法。

【００７９】

４１．先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物を昆虫細胞中に導入する方法であって、方法が、昆虫細胞を、核酸構築物を含むバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子と接触させるステップを含む、方法。

【００８０】

４２．バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子を作製する方法であって、方法が：

（ｉ）先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物を、第１の昆虫細胞中に導入する（例えば、トランスフェクトする）ステップと、

（ｉｉ）昆虫細胞を、核酸構築物又はそのコピーを含む第１のバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子の産生のために好適な条件下でインキュベートするステップと、

（ｉｉｉ）第１のバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子を単離するステップと、

（ｉｖ）第１のバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子を第２の昆虫細胞と接触させるステップと、

（ｖ）第２の昆虫細胞を、核酸構築物又はそのコピーを含む第２のバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子の産生のために好適な条件下でインキュベートするステップと、を含む、方法。

【００８１】

４３．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含むバクミド構築物を含む昆虫細胞を作製する方法であって、方法が：

（ｉ）先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物と、空バクミド構築物とを含む昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）を提供するステップと、

（ｉｉ）昆虫細胞を、核酸構築物と空バクミド構築物との間の組換えに好適な条件下でインキュベートし、

それによってアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含むバクミド構築物を含む昆虫細胞を作製するステップと、を含む、方法。

【００８２】

４４．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含むバクミド構築物を含む昆虫細胞を作製する方法であって、方法が：

（ｉ）空バクミド構築物と連続して：

ａ）第１のトランスポザーゼ認識配列（例えば、Ｔｎ７Ｒ配列）と、

ｂ）外性エフェクターをコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域と、

ｃ）第２のトランスポザーゼ認識配列（例えば、Ｔｎ７Ｌ配列）と、

ｄ）任意選択で、骨格領域であって、例えば、ＤＮＡ構築物の複製に好適な骨格領域と、を含む、核酸構築物とを含む昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）を提供するステップと、

（ｉｉ）昆虫細胞を、核酸構築物と空バクミド構築物との間の組換えに好適な条件下でインキュベートし、

それによってアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含むバクミド構築物を含む昆虫細胞を作製するステップと、を含む、方法。

【００８３】

４５．アネロベクターを作製する方法であって、方法が：

（ｉ）以下：

ａ）外性エフェクターをコード化する配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントと、

ｂ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子と、を含む昆虫細胞を提

供するステップと、
（ｉｉ）昆虫細胞を、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子を含むタンパク質性外層中のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントの閉じ込めに好適な条件下でインキュベートするステップと、を含む、方法。
【００８４】
４６．方法が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを昆虫細胞中に導入する（例えば、トランスフェクトする）ステップを更に含む、実施形態４５に記載の方法。
【００８５】
４７．昆虫細胞が、導入の前に、ＯＲＦ１分子を含む、実施形態４６に記載の方法。
【００８６】
４８．昆虫細胞が、ＯＲＦ１分子をコード化する核酸構築物（例えば、バクミド）を含む、実施形態４５～４７のいずれかに記載の方法。
【００８７】
４９．ＯＲＦ１分子が、ＯＲＦ１分子をコード化する核酸構築物から発現される、実施形態４８に記載の方法。
【００８８】
５０．ステップ（ｉ）の前に、昆虫細胞中に、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントと昆虫細胞中での核酸構築物の複製に好適な骨格領域（例えば、バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域）とを含む核酸構築物を導入するステップを更に含み、任意選択で、骨格領域が、細菌細胞での核酸構築物の複製に好適である、実施形態４５～４９のいずれかに記載の方法。
【００８９】
５１．ステップ（ｉ）の前に、昆虫細胞中に、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子をコード化する配列と昆虫細胞中での核酸構築物の複製に好適な骨格領域（例えば、バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域）とを含む核酸構築物を導入するステップを更に含み、任意選択で、骨格領域が、細菌細胞での核酸構築物の複製に好適である、実施形態４５～５０のいずれかに記載の方法。
【００９０】
５２．ステップ（ｉ）の前に、昆虫細胞中に、以下：
アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子をコード化する配列と、
昆虫細胞中での核酸構築物の複製に好適な骨格領域（例えば、バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域）であって、任意選択で、細菌細胞中での核酸構築物の複製にも好適である、骨格領域と、を含む核酸構築物を導入するステップを更に含む、実施形態４５～５１のいずれかに記載の方法。
【００９１】
５３．少なくとも１、２、３、４、５、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、５００、１０００、５０００、１０，０００、５０，０００、又は１００，０００のアネロベクターが産生される、実施形態４５～５２のいずれかに記載の方法。
【００９２】
５４．アネロベクターを昆虫細胞から単離するステップを更に含む、実施形態４５～５３のいずれかに記載の方法。
【００９３】
５５．昆虫細胞が、現在の適正製造規範（ｃＧＭＰ　ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ　ｐｒａｃｔｉｃｅｓ）に適合する、実施形態４５～５４のいずれかに記載の方法。
【００９４】
５６．２つ以上の異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子を作製する方法であって、方法が：

（ｉ）２つ以上の異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子のうちの２つ以上）をコード化する核酸構築物を含む昆虫細胞を提供するステップと、
（ｉｉ）昆虫細胞を、２つ以上の異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子の発現に好適な条件下でインキュベートするステップと、を含む、方法。
【００９５】
５７．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントが、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子の全部をコード化する配列を含む、実施形態５６に記載の方法。
【００９６】
５８．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントが、完全長アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（例えば、表Ａ１、Ｂ１、又はＣ１のいずれかに列挙されるような）を含み、任意選択で、完全長アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコード化する配列を更に含む、実施形態５６に記載の方法。
【００９７】
５９．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントが、完全長アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）コード領域を含む、実施形態５６に記載の方法。
【００９８】
６０．昆虫細胞を、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子の分泌に好適な条件下でインキュベートするステップを更に含む、実施形態５６に記載の方法。
【００９９】
６１．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子を昆虫細胞から単離するステップを更に含む、実施形態５６に記載の方法。
【０１００】
６２．単離ステップが、昆虫細胞を溶解するステップを含む、実施形態６１に記載の方法。
【０１０１】
６３．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子を含む、実施形態５６～６２のいずれかに記載の方法。
【０１０２】
６４．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子を作製する方法であって、方法が：
（ｉ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子をコード化する核酸構築物を含む昆虫細胞を提供するステップであって、
（ａ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、少なくとも１０１ｋＤａの分子量を有し、
（ｂ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、完全長アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質であり、
（ｃ）複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントの存在下にあるとき、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを閉じ込め、
（ｄ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、ＴＴＶ　ＯＲＦ１タンパク質ではなく、
（ｅ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、ベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）又はガンマトルクウイルス（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子であり、又は
（ｆ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１アルギニンリッチ領域とアネロウイルス（Ａｎｅｌｌ

ｏｖｉｒｕｓ）Ｃ－末端ドメインとを含む、提供するステップと、
（ｉｉ）昆虫細胞を、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子の発現に好適な条件下でインキュベートするステップと、を含む、方法。
【０１０３】
６５．昆虫細胞を、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子の分泌に好適な条件下でインキュベートするステップを更に含む、実施形態６４に記載の方法。
【０１０４】
６６．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子を、昆虫細胞から単離するステップを更に含む、実施形態６４に記載の方法。
【０１０５】
６７．単離するステップが、昆虫細胞を溶解するステップを含む、実施形態６６に記載の方法。
【０１０６】
６８．インキュベーションステップが、例えば、実施例１又は２に記載されるように、ウェスタンブロットによって検出可能な一定量のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子を産生する、先行実施形態のいずれかに記載の方法。
【０１０７】
６９．実施形態３６～４２のいずれかに記載の方法に従って産生される、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子。
【０１０８】
７０．実施形態３６～４２のいずれかに記載の方法に従って産生される複数のバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子を含む、組成物。
【０１０９】
７１．実施形態４５～６８のいずれかに記載の方法に従って産生される、アネロベクター。
【０１１０】
７２．実施形態４５～６８のいずれかに記載の方法に従って産生される複数のアネロベクターを含む、組成物。
【０１１１】
７３．所定のレベルの非感染性粒子又は所定の比の非感染性粒子：感染性単位（例えば、３００：１、２００：１、１００：１、若しくは５０：１未満）を有する、実施形態７２に記載の組成物。
【０１１２】
７４．実施形態４５～６８のいずれかに記載の方法に従って産生される、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子。
【０１１３】
７５．実施形態４５～６８のいずれかに記載の方法に従って産生される複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子を含む、組成物。
【０１１４】
７６．医薬品又は適正製造規範（ＧＭＰ）の基準を満たす、実施形態６９～７５のいずれかに記載の組成物、アネロベクター、又はアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子。
【０１１５】
７７．適正製造規範（ＧＭＰ）の基準に従って作製された、実施形態６９～７６のいずれかに記載の組成物、アネロベクター、又はアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子。
【０１１６】
７８．所定の参照値を下回る病原体レベルを有し、例えば、病原体を実質的に含まない、実施形態６９～７７のいずれかに記載の組成物、アネロベクター、又はアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子。

【０１１７】
７９．所定の参照値を下回る汚染物質レベルを有し、例えば、汚染物質を実質的に含まない、実施形態６９～７８のいずれかに記載の組成物、アネロベクター、又はアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子。
【０１１８】
８０．実質的に非免疫原性である、実施形態６９～７９のいずれかに記載の組成物、アネロベクター、又はアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子。
【０１１９】
８１．被験者を治療する方法であって、方法が、実施形態７１に記載のアネロベクターを被験者に投与するステップを含む、方法。
【０１２０】
８２．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）が、トルクテノウイルス（Ｔｏｒｑｕｅ　ｔｅｎｏ　ｖｉｒｕｓ）（ＴＴＶ）ではない、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。
【０１２１】
８３．昆虫細胞が、鱗翅目（Ｌｅｐｉｄｏｐｔｅｒａ）細胞である、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。
【０１２２】
８４．昆虫細胞が、ヤガ上科（Ｎｏｃｔｕｏｉｄｅａ）細胞である、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。
【０１２３】
８５．昆虫細胞が、ヤガ科（Ｎｏｃｔｕｉｄａｅ）細胞である、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。
【０１２４】
８６．昆虫細胞が、スポドプテラ属（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ）細胞である、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。
【０１２５】
８７．昆虫細胞が、ツマジロクサヨトウ（Ｓ．ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）細胞である、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。
【０１２６】
８８．昆虫細胞が、Ｓｆ９細胞である、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。
【０１２７】
８９．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１が、少なくとも１０１ｋＤａの分子量を有する、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。
【０１２８】

９０．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、完全長アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質である、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。

【０１２９】

９１．複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントの存在下にあるとき、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを閉じ込める、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。

【０１３０】

９２．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子が、ＴＴＶ　ＯＲＦタンパク質ではない、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。

【０１３１】

９３．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、ＴＴＶ　ＯＲＦ１タンパク質ではない、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。

【０１３２】

９４．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子が、ベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）又はガンマトルクウイルス（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子である、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。

【０１３３】

９５．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子１が、ベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）又はガンマトルクウイルス（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子である、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。

【０１３４】

９６．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１アルギニンリッチ領域とアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｃ－末端ドメインとを含む、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。

【０１３５】

９７．遺伝子エレメント又は遺伝子エレメント領域が：

ａ）第１の任意選択で突然変異体の、外性エフェクターをコード化する配列を含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムと、

ｂ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムとタンデムで配置された、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム又はその断片と、

ｃ）任意選択で、（ａ）と（ｂ）との間に位置するスペーサー配列とを含む、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。

【０１３６】
９８．遺伝子エレメント又は遺伝子エレメント領域が：
ａ）外性エフェクターをコード化する配列を含む第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域と、
ｂ）第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域又はその断片と、
ｃ）任意選択で、（ａ）と（ｂ）との間に位置するスペーサー配列とを含む、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。
【０１３７】
９９．遺伝子エレメントが、例えば、実施例５に記載されるように環状である（例えば、遺伝子エレメントが、インビトロ環状化によって生成された）、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。
【０１３８】
１００．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子のアルギニンリッチ領域が、欠失又は短縮されている（例えば、少なくとも５、１０、１５、２０、２５、３０、４０、５０、６０、又は６５個のアミノ酸だけ）、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。
【０１３９】
１０１．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子が、例えば、実施例６に記載されるように等密度遠心分離によって単離、精製、又は濃縮されている、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。
【０１４０】
１０２．それぞれアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子と遺伝子エレメントとを含む複合体が、例えば、実施例６に記載されるように等密度遠心分離によって単離、精製、又は濃縮されている、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。
【０１４１】
１０３．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１分子）をコード化する配列が、動物細胞（例えば、昆虫細胞）中での発現のためにコドン最適化されている、先行実施形態のいずれかに記載の核酸構築物、細胞、組成物、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、集団、反応混合物、アネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）分子、又は方法。
【０１４２】
１０４．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子）を作製する方法であって、方法が：
（ｉ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子をコード化する核酸構築物を含む昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）を提供するステップと、
（ｉｉ）昆虫細胞を、複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子の発現に好適な条件下でインキュベートするステップと、
（ｉｉｉ）任意選択で、複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子を

昆虫細胞又は他の構成体、若しくはその構成要素から単離、精製、及び／又は濃縮し、それによってアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子を作製するステップと、を含む、方法。

【０１４３】

１０５．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子が、マーカー（例えば、Ｈｉｓタグ）に、例えば、そのＮ－末端で又はそのＣ－末端で融合されている（例えば、表Ｘ及び／又は実施例１に記載されるように）、実施形態１０４に記載の方法。

【０１４４】

１０６．昆虫細胞が、１つ又は複数の追加のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子のうちの１つ又は複数）をコード化する核酸構築物を更に含み、方法が：

例えば、ステップ（ｉｉ）の前に、それと同時に、又はそれに続いて、細胞を複数の１つ又は複数の追加のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子の発現に好適な条件下でインキュベートするステップと、

任意選択で、ステップ（ｉｉｉ）の前に、それと同時に、又はそれに続いて、複数の１つ又は複数の追加のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子を、昆虫細胞又は他の構成体、若しくはその構成要素から単離、精製、及び／又は濃縮するステップと、を更に含む、実施形態１０４～１０５のいずれかに記載の方法。

【０１４５】

１０７．１つ又は複数の追加のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子をコード化する核酸構築物が、（ｉ）の核酸構築物と同じである、実施形態１０６に記載の方法。

【０１４６】

１０８．（ｉ）の核酸構築物が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子のうちの２、３、４、５個、又は６個全部をコード化する配列を含む、実施形態１０７に記載の方法。

【０１４７】

１０９．（ｉ）の核酸構築物が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子をコード化する、実施形態１０７に記載の方法。

【０１４８】

１１０．（ｉ）の核酸構築物が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの完全オープンリーディングフレーム領域を含む、実施形態１０７に記載の方法。

【０１４９】

１１１．１つ又は複数の追加のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子をコード化する核酸構築物が、（ｉ）の核酸構築物とは異なる、実施形態１０６に記載の方法。

【０１５０】

１１２．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子が、同じアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムに由来する、実施形態１０６～１１１のいずれかに記載の方法。

【０１５１】

１１３．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子が、複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムに由来する（例えば、ＯＲＦ１分子が１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムに由来し、ＯＲＦ２分子が異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムに由来する）、実施形態１０６～１１１のいずれかに記載の方法。

【０１５２】

１１４．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子のうちの１つ又は複数が、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）（例えば、表Ｙに列挙されるような）に由来する、実施形態１０６～１１３のいずれかに記載の方法。

【０１５３】

１１５．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子のうちの１つ又は複数が、ベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）（例えば、表Ｙに列挙されるような）に由来する、実施形態１０６～１１４のいずれかに記載の方法。

【０１５４】

１１６．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子のうちの１つ又は複数が、ガンマトルクウイルス（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）（例えば、表Ｙに列挙されるような）に由来する、実施形態１０６～１１５のいずれかに記載の方法。

【０１５５】

１１７．核酸構築物が、それぞれ、プロモーター（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子のうちの１つ又は複数の発現を制御するプロモーター、例えば、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）ポリヘドロンプロモーター）を含む、実施形態１０４～１１６のいずれかに記載の方法。

【０１５６】

１１８．昆虫細胞を、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子の分泌に好適な条件下でインキュベートするステップを更に含む、実施形態１０４～１１７のいずれかに記載の方法。

【０１５７】

１１９．単離するステップが、昆虫細胞を溶解するステップを含む、実施形態１０４～１１８のいずれかに記載の方法。

【０１５８】

１２０．インキュベーションステップが、例えば、実施例１又は２に記載されるような、ウェスタンブロットによって検出可能な一定量のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１分子）を産生する、実施形態１０４～１１９のいずれかに記載の方法。

【０１５９】

１２１．インキュベーションステップが、１Ｌの細胞培養物（例えば、Ｓｆ９培養物）当たり少なくとも１、２、３、４、５、又は６ｍｇのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子を産生する、実施形態１０４～１２０のいずれかに記載の方法。

【０１６０】

１２２．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子が、等密度遠心分離によって単離、精製、又は濃縮される、先行実施形態のいずれかに記載の方法。

【０１６１】

１２３．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子であり、方法が：

インビトロで単離され、精製され、又は濃縮されたアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子を、例えば、実施例８に記載されるようなアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子を含むタンパク質性外層による遺伝子エレメントの閉じ込めに好適な条件下で、遺伝子エレメントと接触させるステップを更に含む、先行実施形態のいずれかに記載の方法。

【０１６２】

本発明の他の特徴、目的、及び利点は、説明及び図面、並びに特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【０１６３】

別に定義されない限り、本明細書で使用される全部の技術及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に挙げる全部の刊行物、特許出願、特許、及びその他の参考文献は、その全体を参照により本明

細書に組み込むものとする。加えて、材料、方法、及び例は、例示的なものに過ぎず、限定を意図するものではない。

【図面の簡単な説明】

【０１６４】

【図１】昆虫細胞におけるＣ－末端Ｈｉｓタグを用いたＲｉｎｇ２　ＯＲＦ１の発現を描く。

【図２】昆虫細胞におけるＣ－末端Ｈｉｓタグを用いたＲｉｎｇ１　ＯＲＦ１及びＯＲＦ１／１の発現を描く。

【図３】昆虫細胞におけるＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ切断配列を有するか又は有さずに、Ｎ－末端Ｈｉｓタグを用いたＲｉｎｇ２　ＯＲＦ１の発現を描く。

【図４】昆虫細胞におけるＣ－末端Ｈｉｓタグ付き組換えタンパク質としてのＲｉｎｇ１ＯＲＦ１／１、１／２、２、２／２、及び２／３の発現を描く。

【図５】昆虫細胞における個々のＲｉｎｇ２　ＯＲＦの発現を描く。同じブロットの２回の暴露を、中央パネル及び右パネルに示す。左パネルは、指示されたように試験したＲｉｎｇ２構築物の構造を示す。

【図６】昆虫細胞におけるＲｉｎｇ２　ＯＲＦ１＋「ＦｕｌｌＯＲＦ」、ＯＲＦ１＋ＯＲＦ２、ＯＲＦ１＋ＯＲＦ２／２、及びＯＲＦ１＋ＯＲＦ２／３のバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）媒介共発現を描く。

【図７】バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を使用する昆虫細胞における複数のＲｉｎｇ２タンパク質の同時共発現を描く。

【図８】バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）によって、且つトランスフェクションによって昆虫細胞中に送達されたアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムからのＯＲＦの発現を描く。

【図９】Ｒｉｎｇ１　ＯＲＦ２の発現が、Ｓｆ９細胞におけるポリヘドロンプロモーター（ｐＨと表示された矢印）とは独立していることを示す。

【図１０】Ｒｉｎｇ２　ＯＲＦ１－Ｈｉｓ及びＲｉｎｇ２ゲノムＤＮＡのＳｆ９細胞中への共送達、その後のＣｓＣｌ線形密度勾配に関するインキュベーション及び分画化を描く。分画の抗Ｈｉｓタグウェスタンブロット、並びに各分画のｑＰＣＲアッセイを図の上部に示す。底部パネルは、ウェスタンブロット上のボックスで示されるように、２つの個々の分画及び分画のプールの透過型電子顕微鏡画像を示す。中央パネルの挿入図は、プロテアソーム様構造を示す拡大表示である。

【図１１】電子顕微鏡法によるＳｆ９等密度分画の特性化を描く。

【図１２】追加のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）株からのＯＲＦ１の発現を描く。

【図１３】ＴＴＭｉｎｉＶのＬＹ１株をコード化するカナマイシンベクター（「アネロベクター１」）の概略図を描く。

【図１４】ＴＴＭｉｎｉＶのＬＹ２株をコード化するカナマイシンベクター（「アネロベクター２」）の概略図を描く。

【図１５】２９３Ｔ及びＡ５４９細胞における合成アネロベクターのトランスフェクション効率を描く。

【図１６Ａ】合成アネロベクターによる２９３Ｔ細胞の成功した感染を例示する定量ＰＣＲ結果を描く。

【図１６Ｂ】合成アネロベクターによる２９３Ｔ細胞の成功した感染を例示する定量ＰＣＲ結果を描く。

【図１７Ａ】合成アネロベクターによるＡ５４９細胞の成功した感染を例示する定量ＰＣＲ結果を描く。

【図１７Ｂ】合成アネロベクターによるＡ５４９細胞の成功した感染を例示する定量ＰＣＲ結果を描く。

【図１８Ａ】合成アネロベクターによるＲａｊｉ細胞の成功した感染を例示する定量ＰＣＲ結果を描く。

【図１８Ｂ】合成アネロベクターによるＲａｊｉ細胞の成功した感染を例示する定量ＰＣＲ結果を描く。
【図１９Ａ】合成アネロベクターによるＪｕｒｋａｔ細胞の成功した感染を例示する定量ＰＣＲ結果を描く。
【図１９Ｂ】合成アネロベクターによるＪｕｒｋａｔ細胞の成功した感染を例示する定量ＰＣＲ結果を描く。
【図２０Ａ】合成アネロベクターによるＣｈａｎｇ細胞の成功した感染を例示する定量ＰＣＲ結果を描く。
【図２０Ｂ】合成アネロベクターによるＣｈａｎｇ細胞の成功した感染を例示する定量ＰＣＲ結果を描く。
【図２１】アネロベクター（例えば、本明細書に記載される複製可能又は複製欠損アネロベクター）の産生のための例示的なワークフローを示す概略図である。
【図２２】示されたプラスミドでトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞中のｍｉＲ－６２５発現の倍率変化を示すグラフである。
【図２３】ｎ－ｍｙｃ相互作用タンパク質（ＮＭＩ）を標的とするｍｉＲＮＡをコード化するアネロベクターによるＲａｊｉ　Ｂ細胞の感染を示す図表である。Ｒａｊｉ　Ｂ細胞（矢印）又は対照細胞のＮＭＩ　ｍｉＲＮＡコード化アネロベクターによる感染後に検出されたアネロベクターのゲノム当量の定量化が示される。
【図２４】ｎ－ｍｙｃ相互作用タンパク質（ＮＭＩ）を標的とするｍｉＲＮＡをコード化するアネロベクターによるＲａｊｉ　Ｂ細胞の感染を示す図表である。ウェスタンブロットは、ＮＭＩに対するｍｉＲＮＡをコード化するアネロベクターがＲａｊｉ　Ｂ細胞中のＮＭＩタンパク質発現を低減したが、一方、ｍｉＲＮＡを欠くアネロベクターによって感染したＲａｊｉ　Ｂ細胞が対照と同等のＮＭＩタンパク質発現を示したことを示す。
【図２５】内在性ｍｉＲＮＡコード化配列を含むアネロベクター及び内在性ｍｉＲＮＡコード化配列が、欠失した対応するアネロベクターによる感染後の宿主細胞において生成したアネロベクター粒子の定量化を示す一連のグラフである。
【図２６Ａ】ナノ－ルシフェラーゼを発現するアネロベクターを産生するために使用された構築物（Ａ）及び細胞をトランスフェクトするために使用された一連のアネロベクター／プラスミド組み合わせ（Ｂ）を示す一連の図表である。
【図２６Ｂ】ナノ－ルシフェラーゼを発現するアネロベクターを産生するために使用された構築物（Ａ）及び細胞をトランスフェクトするために使用された一連のアネロベクター／プラスミド組み合わせ（Ｂ）を示す一連の図表である。
【図２７Ａ】アネロベクターを注射したマウスにおけるナノ－ルシフェラーゼ発現を示す一連の図表である。（Ａ）注射後、０～９日のマウスにおけるナノ－ルシフェラーゼ発現。（Ｂ）表示される通り、様々なアネロベクター／プラスミド構築物組合せを注射したマウスにおけるナノ－ルシフェラーゼ発現。（Ｃ）注射後のマウスで検出されたナノ－ルシフェラーゼ発光の定量化。Ａ群は、ＴＴＭＶ－ＬＹ２ベクター±ナノ－ルシフェラーゼを受けた。Ｂ群は、ナノ－ルシフェラーゼタンパク質とＴＴＭＶ－ＬＹ２　ＯＲＦを受けた。
【図２７Ｂ】アネロベクターを注射したマウスにおけるナノ－ルシフェラーゼ発現を示す一連の図表である。（Ａ）注射後、０～９日のマウスにおけるナノ－ルシフェラーゼ発現。（Ｂ）表示される通り、様々なアネロベクター／プラスミド構築物組合せを注射したマウスにおけるナノ－ルシフェラーゼ発現。（Ｃ）注射後のマウスで検出されたナノ－ルシフェラーゼ発光の定量化。Ａ群は、ＴＴＭＶ－ＬＹ２ベクター±ナノ－ルシフェラーゼを受けた。Ｂ群は、ナノ－ルシフェラーゼタンパク質とＴＴＭＶ－ＬＹ２　ＯＲＦを受けた。
【図２７Ｃ】アネロベクターを注射したマウスにおけるナノ－ルシフェラーゼ発現を示す一連の図表である。（Ａ）注射後、０～９日のマウスにおけるナノ－ルシフェラーゼ発現。（Ｂ）表示される通り、様々なアネロベクター／プラスミド構築物組合せを注射したマウスにおけるナノ－ルシフェラーゼ発現。（Ｃ）注射後のマウスで検出されたナノ－ルシフェラーゼ発光の定量化。Ａ群は、ＴＴＭＶ－ＬＹ２ベクター±ナノ－ルシフェラーゼを受けた。Ｂ群は、ナノ－ルシフェラーゼタンパク質とＴＴＭＶ－ＬＹ２　ＯＲＦを受けた。

【図２８Ａ】ＴＴＭＶ－ＬＹ２プラスミドｐＶＬ４６－０６３及びｐＶＬ４６－２４０の環状化を示すゲル電気泳動画像である。
【図２８Ｂ】サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）により決定される、線状及び環状ＴＴＭＶ－ＬＹ２構築物のコピー数を示すクロマトグラムである。
【図２８Ｃ】アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子のドメイン及び異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からの超可変ドメインで置き換えられる可変領域を示す概略図である。
【図２８Ｄ】ＯＲＦ１のドメイン及び非アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）源に由来する目的のタンパク質又はペプチド（ＰＯＩ）で置換されることになる超可変領域を示す概略図である。
【図２９】ヒトエリスロポエチン（ｈＥｐｏ）をコード化する配列を含有するように操作されたｔｔｈ８若しくはＬＹ２に基づくアネロベクターが、機能性トランスジーンを哺乳動物細胞に送達することができたことを示すグラフである。
【図３０】マウスに投与された操作アネロベクターが、静脈内注射から７日後に検出可能であったことを示す一連のグラフである。
【図３１】ｈＧＨをコード化する操作アネロベクターの静脈内投与から７日後の全血の細胞分画中にｈＧＨ　ｍＲＮＡが検出されたことを示すグラフである。
【図３２】インビトロ環状化（ＩＶＣ）ＴＴＶ－ｔｔｈ８ゲノム（ＩＶＣ　ＴＴＶ－ｔｔｈ８）が、プラスミド中のＴＴＶ－ｔｔｈ８ゲノムと比較して、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞中に予想密度でＴＴＶ－ｔｔｈ８ゲノムコピーを産生する能力を示すグラフである。
【図３３】インビトロ環状化（ＩＶＣ）ＬＹ２ゲノム（ＷＴ　ＬＹ２　ＩＶＣ）及びプラスミド内の野生型ＬＹ２ゲノム（ＷＴ　ＬＹ２プラスミド）が、Ｊｕｒｋａｔ細胞中に予想密度でＬＹ２ゲノムコピーを産生する能力を示す一連の図である。
【発明を実施するための形態】
【０１６５】
本発明の実施形態についての以下の詳細な説明は、添付の図面と一緒に読めば、より明瞭に理解されるであろう。本発明を説明する目的のために、図面には、本明細書で例示される実施形態を示す。しかしながら、本発明が、図面に示す実施形態の正確な配置及び有用性に限定されないことは理解すべきである。
【０１６６】
定義
具体的な実施形態に関して、いくつかの図を参照にしながら本発明を説明するが、本発明は、特許請求の範囲を除いて、それらに限定されない。以下に記載する用語は、別に指示されない限り、概してそれらの一般的意味で理解すべきである。
【０１６７】
「含む」という用語が本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、これは、他の要素を排除しない。本発明の目的のために、「から構成される」という用語は、「を含む」という用語の好ましい実施形態であると考えられる。以後、或る群が、少なくとも特定の数の実施形態を含むと定義される場合、これは、好ましくは、これらの実施形態のみから構成される１群を開示するとも理解すべきである。
【０１６８】
単数名詞、例えば、「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」若しくは「その（ｔｈｅ）」を示す際に、不定冠詞又は定冠詞が使用される場合、これは、別のことが特に記載されない限り、複数の当該名詞を包含する。
【０１６９】
「治療、調節などを目的とする化合物、組成物、生成物など」という表現は、それ自体で、治療、調節など、明示される目的に好適な化合物、組成物、生成物などを指すと理解すべきである。「治療、調節などを目的とする化合物、組成物、生成物など」の表現は、さらに、実施形態として、こうした化合物、組成物、生成物などが、治療、調節などに使用されることも開示される。

【０１７０】
「・・・に使用するための化合物、組成物、生成物など」、「・・・のための薬剤、医薬組成物、獣医学組成物、診断用組成物などの製造における化合物、組成物、生成物などの使用」、又は「・・・薬剤としての使用のための、化合物、組成物、生成物など」という表現は、こうした化合物、組成物、生成物などが、ヒト又は動物身体に対して実施され得る治療方法で使用されることが意図されることを示す。それらは、治療方法などに関する実施形態及び請求項の同等の開示物として考えられる。実施形態又は請求項は、従って、「疾患への罹患が疑われるヒト又は動物の治療に使用するための化合物」を指す場合、これはまた、「疾患への罹患が疑われるヒト又は動物の治療を目的とする薬剤の製造における化合物の使用」又は「疾患への罹患が疑われるヒト又は動物に化合物を投与することによる治療方法」の開示であるともみなされる。「治療、調節などを目的とする化合物、組成物、生成物など」という表現は、それ自体で、治療、調節などの明示される目的に好適な化合物、組成物、生成物などを指すと理解すべきである。
【０１７１】
以後、用語、値、数などの例が括弧内に付与される場合、これは、括弧内に記載される例が、実施形態を構成し得ることを示すものとして理解すべきである。例えば、「複数の実施形態では、核酸分子は、表１のヌクレオチド配列をコードするアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１に対して少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列（例えば、表１の核酸配列のヌクレオチド５７１～２６１３）を含む」と記載されている場合、一部の実施形態は、表１の核酸配列のヌクレオチド５７１～２６１３に対して少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸分子に関する。
【０１７２】
用語「増幅」は、本明細書で使用される場合、核酸分子若しくはその一部の１つ又は複数の追加のコピー（例えば、遺伝子エレメント又は遺伝子エレメント領域）を産生するための核酸分子若しくはその一部の複製を指す。一部の実施形態では、増幅は核酸配列の部分的複製をもたらす。一部の実施形態では、増幅はローリングサークル複製を介して起こる。
【０１７３】
本明細書で使用される場合、用語「アネロベクター」は、遺伝子エレメント、例えば、タンパク質性外層内に閉じ込められた環状ＤＮＡ、例えば、タンパク質性外層によってＤＮＡｓｅ　Ｉによる消化から実質的に保護されている遺伝子エレメントを含むビヒクルを指す。「合成アネロベクター」は、本明細書で使用される場合、概して、天然に存在しない、例えば、野生型ウイルス（例えば、本明細書に記載の野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ））と異なる配列を有するアネロベクターを指す。一部の実施形態では、合成アネロベクターは、操作されているか、又は組換え体であり、例えば、野生型ウイルスゲノム（例えば、本明細書に記載の野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム）に対して相違又は修飾を含む遺伝子エレメントを含む。一部の実施形態では、タンパク質性外層内に閉じ込められたとは、タンパク質性外層による１００％の被覆、並びに１００％未満の被覆、例えば、９５％、９０％、８５％、８０％、７０％、６０％、５０％以下の被覆を包含する。例えば、遺伝子エレメントが、例えば、宿主細胞内への進入前に、タンパク質性外層内に保持されているかＤＮＡｓｅ　Ｉによる消化から保護されている限り、間隙又は不連続（例えば、タンパク質性外層を水、イオン、ペプチド、又は小分子に対して透過性にするもの）が、タンパク質性外層中に存在してもよい。一部の実施形態では、アネロベクターは精製され、例えば、これは、元の供給源から分離される、且つ／又は他の構成体を実質的に含まない（＞５０％、＞６０％、＞７０％、＞８０％、＞９０％）。一部の実施形態では、アネロベクターは、遺伝子エレメントを標的細胞に導入することができる（例えば、感染を介して）。一部の実施形態では、アネロベクターは

、感染性合成アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ウイルス粒子である。

【０１７４】

本明細書で使用される場合、用語「抗体分子」は、少なくとも１つの免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質、例えば、免疫グロブリン鎖若しくはその断片を指す。用語「抗体分子」は、完全長抗体及び抗体断片（例えば、ｓｃＦｖ）を包含する。一部の実施形態では、抗体分子は、多重特異性抗体分子であり、例えば、抗体分子は、複数の免疫グロブリン可変ドメイン配列を含み、この場合、上記複数の配列の第１免疫グロブリン可変ドメイン配列は、第１エピトープに対して結合特異性を有し、上記複数の配列の第２免疫グロブリン可変ドメイン配列は、第２エピトープに対して結合特異性を有する。複数の実施形態では、多重特異性抗体分子は、二重特異性抗体分子である。二重特異性抗体分子は、一般に、第１エピトープに対して結合特異性を有する第１免疫グロブリン可変ドメイン配列、及び第２エピトープに対して結合特異性を有する第２免疫グロブリン可変ドメイン配列を特徴とする。

【０１７５】

用語「骨格」又は「骨格領域」は、本明細書で使用される場合、宿主細胞中の核酸分子の複製及び／又は維持に関与する（例えば、それに必要である及び／又は十分である）１つ又は複数のエレメントを含む核酸分子内の（例えば、本明細書で記載されるような、例えば、バクミド又はドナーベクター内の）領域を指す。一部の実施形態では、「バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域」などの骨格領域は、例えば、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）における核酸構築物の複製に好適な、１つ又は複数のバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）エレメント（例えば、バキュロウイルスゲノム又はその機能性断片）を含む。一部の実施形態では、骨格は、選択可能マーカーを更に含む。一部の実施形態では、核酸分子は、遺伝子エレメント領域と骨格領域（例えば、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域及び／又は細菌細胞での複製に好適な骨格領域）とを含む。

【０１７６】

用語「バクミド」は、本明細書で使用される場合、十分なバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格エレメントを含む核酸分子であって、それにより昆虫細胞での複製に好適であり、更に細菌細胞での複製に好適であるものを指す。一部の実施形態では、核酸分子は、細菌細胞（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞、例えば、ＤＨ　１０Ｂａｃ細胞）での複製に好適である。

【０１７７】

本明細書で使用される場合、「コード化する」核酸は、アミノ酸配列、ポリヌクレオチド、例えばｍＲＮＡ、又は機能性ポリヌクレオチド（例えば、ノンコーディングＲＮＡ、例えば、ｓｉＲＮＡ若しくはｍｉＲＮＡ）をコード化する核酸配列を指す。

【０１７８】

本明細書で使用される場合、「外性」物質（例えば、エフェクター、核酸（例えば、ＲＮＡ）、遺伝子、ペイロード、タンパク質）は、対応する野生型ウイルス、例えば、本明細書に記載のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）に含まれないか、又はそれによってコード化されない物質を指す。一部の実施形態では、外性物質は、天然に存在するタンパク質又は核酸に対して改変された（例えば、挿入、欠失、若しくは置換により）配列を有するタンパク質又は核酸のように、天然に存在しない。一部の実施形態では、外生物質は、宿主細胞中に天然に存在しない。一部の実施形態では、外性物質は、宿主細胞中に天然に存在するが、ウイルスに対しては外性である。一部の実施形態では、外性物質は、宿主細胞中に天然に存在するが、所望のレベルで、又は所望の時点に存在しない。

【０１７９】

「異種」物質又はエレメント（例えば、エフェクター、核酸配列、アミノ酸配列）は、別の物質又はエレメント（例えば、エフェクター、核酸配列、アミノ酸配列）に関して本明細書に使用される場合、例えば、野生型ウイルス、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）に天然では一緒に存在しない物質又はエレメントを指す。一部の実施形

態では、異種核酸配列は、天然に存在する核酸配列（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）に天然に存在する配列）と同じ核酸中に存在し得る。一部の実施形態では、異種物質又はエレメントは、アネロベクターの他の（残りの）エレメントの基材であるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）に対して外性である。

【０１８０】

本明細書で使用される場合、用語「遺伝子エレメント」は、例えば、本明細書に記載されるアネロベクターを形成するために、タンパク質性外層内に閉じ込められているか、又は閉じ込めることができる（例えば、ＤＮＡｓｅ　Ｉ消化から保護するために）核酸分子を指す。遺伝子エレメントをネイキッドＤＮＡとして産生し、任意選択で、更にタンパク質性外層へとアセンブルすることが理解される。また、アネロベクターは、その遺伝子エレメントを細胞内に挿入することができ、それにより遺伝子エレメントは細胞内に存在するため、タンパク質性外層が必ずしも細胞に進入するわけではないことも理解される。

【０１８１】

本明細書で使用される場合、「遺伝子エレメント構築物」は、遺伝子エレメント配列、又はその断片を含む核酸構築物（例えば、プラスミド、バクミド、ドナーベクター、コスミド、又はミニサークル）を指す。一部の実施形態では、本明細書に記載されるバクミド又はドナーベクターは、遺伝子エレメント配列、又はその断片を含む遺伝子エレメント構築物である。

【０１８２】

用語「遺伝子エレメント領域」は、本明細書で使用される場合、遺伝子エレメントの配列を含む構築物の領域を指す。一部の実施形態では、遺伝子エレメント領域は、タンパク質性外層によって閉じ込められ、それによってアネロベクターを形成するのに十分な野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列又はその断片と同一性を有する配列（例えば、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列又はその断片と少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する配列）を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント領域は、例えば、本明細書に記載されるようなタンパク質結合配列（例えば、本明細書に記載される５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、及び／若しくはＧＣリッチ領域、又はそれと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する配列）を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント領域は、ローリングサークル複製を受けることができる。一部の実施形態では、遺伝子エレメント領域は、Ｒｅｐタンパク質結合部位を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、Ｒｅｐタンパク質置換部位を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント領域を含む構築物はタンパク質性外層に閉じ込められていないが、構築物から産生される遺伝子エレメントはタンパク質性外層内に閉じ込められ得る。一部の実施形態では、遺伝子エレメント領域を含む構築物は、ベクター骨格（例えば、バクミド骨格又はドナーベクター骨格）を更に含む。一部の実施形態では、構築物（例えば、バクミド）は、１つ又は複数のバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）エレメント（例えば、遺伝子エレメント領域を含む、例えば、バキュロウイルスゲノム）を含む。

【０１８３】

本明細書で使用される場合、用語「突然変異体」は、ゲノム（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム）、又はその断片に関して使用されるとき、対応する野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列に対して、少なくとも１つの変化を有する配列を指す。一部の実施形態では、突然変異体ゲノム又はその断片は、対応する野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列に対して、少なくとも１つの一塩基多型、付加、欠失、又はフレームシフトを含む。一部の実施形態では、突然変異体ゲノム又はその断片は、対応する野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列に対して、少なくとも１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２のうちの１つ又は複数）の欠失を含む。一部の実施形態では、突然変異体ゲノム又はそ

の断片は、対応する野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列に対して、全部のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２の全部）の欠失を含む。一部の実施形態では、突然変異体ゲノム又はその断片は、対応する野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列に対して、少なくとも１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）非コード領域（例えば、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、及び／若しくはＧＣリッチ領域のうちの１つ又は複数）の欠失を含む。一部の実施形態では、突然変異体ゲノム又はその断片は、外性エフェクターを含むか、又はそれをコード化する。

【０１８４】

本明細書で使用される場合、用語「ＯＲＦ分子」は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦタンパク質（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２のタンパク質）の活性及び／若しくは構造特徴を有するポリペプチド、又はその機能性断片を指す。一般的に使用される場合（すなわち、「ＯＲＦ分子」）、ポリペプチドは、本明細書に記載のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦのいずれか（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２）の活性及び／若しくは構造特徴、又はその機能性断片を含み得る。特定のオープンリーディングフレームを示すために修飾子と共に使用される場合（例えば、「ＯＲＦ１分子」、「ＯＲＦ２分子」、「ＯＲＦ２／２分子」、「ＯＲＦ２／３分子」、「ＯＲＦ１／１分子」、若しくは「ＯＲＦ１／２分子」）、それは一般的に、ポリペプチドが対応するアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦタンパク質の活性及び／若しくは構造特徴、又はその機能性断片を含むことを意味する（例えば、「ＯＲＦ１分子」について以下に定義されるように）。例えば、「ＯＲＦ２分子」は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２タンパク質の活性及び／若しくは構造特徴、又はその機能性断片を含む。

【０１８５】

本明細書で使用される場合、用語「ＯＲＦ１分子」は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質（例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質）の活性及び／若しくは構造特徴を有するポリペプチド、又はその機能性断片を指す。ＯＲＦ１分子は、一部の事例において、以下：少なくとも６０％の塩基性残基（例えば、少なくとも６０％のアルギニン残基）を含む第１領域、少なくとも約６のβ鎖（例えば、少なくとも４、５、６、７、８、９、１０、１１、若しくは１２のβ鎖）を含む第２領域、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｎ２２ドメイン（例えば、本明細書に記載の通り、例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質由来のＮ２２ドメイン）の構造又は活性を含む第３領域、及び／又はアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｃ末端ドメイン（ＣＴＤ）（例えば、本明細書に記載の通り、例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質由来のＣＴＤ）の構造又は活性を含む第４領域のうち１つ若しくは複数（例えば、１、２、３、若しくは４つ）を含む。一部の事例では、ＯＲＦ１分子は、Ｎ末端からＣ末端の順に、第１、第２、第３、及び第４領域を含む。一部の事例では、アネロベクターは、Ｎ末端からＣ末端の順に、第１、第２、第３、及び第４領域を含むＯＲＦ１分子を含む。ＯＲＦ１分子は、一部の事例において、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸によりコード化されるポリペプチドを含み得る。ＯＲＦ１分子は、一部の事例において、異種配列、例えば、超可変領域（ＨＶＲ）、例えば、本明細書に記載される、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質由来のＨＶＲをさらに含み得る。「アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質」は、本明細書で使用される場合、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム）によってコード化されるＯＲＦ１タンパク質を指す。

【０１８６】
本明細書で使用される場合、「ＯＲＦ２分子」は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２タンパク質（例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２タンパク質）の活性及び／又は構造特徴を有するポリペプチド、又はその機能性断片を指す。本明細書で使用される「アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２タンパク質」は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（例えば、本明細書に記載される、例えば、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム）によりコード化されるＯＲＦ２タンパク質によりコード化されるアミノ酸配列を有するＯＲＦ２タンパク質を指す。
【０１８７】
本明細書で使用される場合、用語「タンパク質性外層」は、主として（例えば、＞５０％、＞６０％、＞７０％、＞８０％、＞９０％）タンパク質である外部構成体を指す。
【０１８８】
本明細書で使用される場合、用語「調節核酸」は、発現産物をコード化するＤＮＡ配列の発現、例えば、転写及び／又は翻訳を修飾する核酸配列を指す。複数の実施形態では、発現産物は、ＲＮＡ又はタンパク質を含む。
【０１８９】
本明細書で使用される場合、用語「調節配列」は、標的遺伝子産物の転写を修飾する核酸配列を指す。一部の実施形態では、調節配列は、プロモータ又はエンハンサーである。
【０１９０】
本明細書で使用される場合、用語「Ｒｅｐ」又は「複製タンパク質」は、ウイルスゲノム複製を促進するたんぱく質、例えば、ウイルスタンパク質を指す。一部の実施形態では、複製タンパク質は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｒｅｐタンパク質である。
【０１９１】
本明細書で使用される場合、用語「Ｒｅｐ結合部位」は、Ｒｅｐタンパク質（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｒｅｐタンパク質）によって認識され、結合される核酸分子内の核酸配列を指す。一部の実施形態では、Ｒｅｐ結合部位は、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを構成する）を含む。一部の実施形態では、Ｒｅｐ結合部位は、複製起点（ＯＲＩ）を含む。
【０１９２】
本明細書で使用される場合、用語「Ｒｅｐ置換部位」は、Ｒｅｐ置換部位に達した際に、核酸分子を放出するために、Ｒｅｐタンパク質（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｒｅｐタンパク質）を核酸分子と関連させる（例えば、それに結合させる）ことができる核酸分子内の核酸配列を指す。一部の実施形態では、Ｒｅｐ置換部位は、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを構成する）を含む。一部の実施形態では、Ｒｅｐ置換部位は、複製起点（ＯＲＩ）を含む。
【０１９３】
本明細書で使用される場合、「実質的に非病原性の」生物、粒子、又は構成体は、例えば、宿主生物、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトに許容され難い疾患又は病的状態を誘発若しくは誘導しない生物、粒子（例えば、本明細書に記載の例えばウイルス若しくはアネロベクター）、又はそれらの構成体を指す。一部の実施形態では、被験者に対するアネロベクターの投与によって、標準治療の一部として許容可能な若干の反応又は副作用が起こり得る。
【０１９４】
本明細書で使用される場合、「非病原性」は、例えば、宿主生物、例えば、哺乳動物、例えば、ヒトに許容され難い疾患又は病的状態を誘発若しくは誘導しない生物又はその構成体を指す。
【０１９５】
本明細書で使用される場合、「実質的に非統合性の」遺伝子エレメントは、宿主細胞（

例えば、真核細胞）又は生物（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）に進入する遺伝子エレメントの約０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、若しくは１％未満が、ゲノムに組み込まれる遺伝子エレメント、例えば、ウイルス又はアネロベクター（例えば、本明細書に記載されるもの）内の遺伝子エレメントを指す。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、例えば、宿主細胞のゲノムに検出可能な程度で組み込まれない。一部の実施形態では、ゲノム内への遺伝子エレメントの組込みは、本明細書に記載の技術、例えば、核酸シークエンシング、ＰＣＲ検出及び／又は核酸ハイブリダイゼーションを用いて検出することができる。一部の実施形態では、組み込み頻度は、例えば、Ｗａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２００４，Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　１１：７１１－７２１、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるように、遊離ベクターから分離されたゲノムＤＮＡの定量的ゲル精製アッセイによって決定される。

【０１９６】

本明細書で使用される場合、「実質的に非免疫原性の」生物、粒子、又は構成体は、宿主組織又は生物（例えば、哺乳動物、例えば、ヒト）に不要の若しくは非標的免疫応答を誘発若しくは誘導しない生物、粒子（例えば、本明細書に記載の例えばウイルス若しくはアネロベクター）、又はそれらの構成体を指す。複数の実施形態では、実質的に非免疫原性の生物、粒子、又は構成体は、臨床上重要な免疫応答を生成しない。複数の実施形態では、実質的に非免疫原性のアネロベクターは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）又はアネロベクター遺伝子エレメントの核酸配列によりコード化されるアミノ酸配列を含むタンパク質に対して臨床上重要な免疫応答を生成しない。複数の実施形態では、免疫応答（例えば、不要の若しくは非標的免疫応答）は、例えば、Ｔｓｕｄａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９；Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　７７：１９９－２０６；参照により本明細書に組み込まれる）に記載される抗ＴＴＶ抗体検出方法及び／又はＫａｋｋｏｌａ　ｅｔ　ａｌ．（２００８；Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　３８２：１８２－１８９；参照により本明細書に組み込まれる）に記載される抗ＴＴＶ　ＩｇＧレベルの測定方法に従って、被験者の抗体（例えば中和抗体）の存在又はレベル（例えば、抗アネロベクター抗体の存在又はレベル、例えば、本明細書に記載のアネロベクターに対する抗体の存在又はレベル）を検定することにより、決定される。アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）又はそれに基づくアネロベクターに対する抗体（例えば中和抗体）もまた、抗ウイルス抗体を検出するための当技術分野の方法、例えば、Ｃａｌｃｅｄｏ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３；Ｆｒｏｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４（３４１）：１－７；参照により本明細書に組み込まれる）に記載される抗ＡＡＶ抗体を検出する方法によっても検出することができる。

【０１９７】

本明細書で使用される「部分配列」は、より大きな核酸配列又はアミノ酸配列にそれぞれ含まれている核酸配列又はアミノ酸配列を指す。一部の事例において、部分配列は、より大きな配列のドメイン又は機能性断片を含み得る。一部の事例において、部分配列は、より大きな配列から単離されたとき、より大きな配列の残りと一緒に存在する場合に部分配列によって形成される二次及び／又は三次構造と類似する、二次及び／又は三次構造を形成することができるより大きな配列の断片を含み得る。一部の事例では、部分配列は、別の配列（例えば、より大きな配列の残りに対して外性の配列又は異種の配列を含む部分配列、例えば、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）由来の対応する部分配列）で置換することができる。

【０１９８】

「トランスポザーゼ認識配列」は、本明細書で使用される場合、トランスポザーゼ酵素によって認識される（例えば、それが特異的に結合することができる）核酸配列を指す。一部の実施形態では、トランスポザーゼは、Ｔｎ７トランスポザーゼである。一部の実施形態では、核酸分子（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、バクミド又はドナーベクター）は、第１のトランスポザーゼ認識配列（例えば、Ｔｎ７又はＴｎ７Ｌ配列）を含む。一部の実施形態では、核酸分子（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、バクミド又はドナーベクター）は、第２のトランスポザーゼ認識配列（例えば、第１の

トランスポザーゼ認識配列への同族の配列、例えば、Ｔｎ７Ｒ又はＴｎ７Ｌ配列の他方のもの）を含む。

【０１９９】

本発明は、概して、アネロベクター、例えば、合成アネロベクター、及びその使用に関する。本開示は、アネロベクター、アネロベクターを含む組成物、及びアネロベクターを作製する方法又は使用する方法を提供する。アネロベクターは、一般に、例えば、治療薬を真核細胞に送達するための送達ビヒクルとして有用である。一般に、アネロベクターは、タンパク質性外層に閉じ込められた、核酸配列（例えば、エフェクター、例えば、外性エフェクター若しくは内在性エフェクターをコード化する）を含む遺伝子エレメントを含有し得る。アネロベクターは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列（例えば、本明細書に記載の通り）と比較して、配列（例えば、本明細書に記載される領域又はドメイン）の１つ又は複数の欠失を含んでもよい。アネロベクターは、例えば、細胞を含む被験者の疾患又は障害を治療する目的で、遺伝子エレメント、又はそこでコード化されるエフェクター（例えば、本明細書に記載される、例えばポリペプチド若しくは核酸エフェクター）を真核細胞に送達するための実質的に非免疫原性のビヒクルとして使用することができる。

【０２００】

目次

Ｉ．アネロベクターを作製するための組成物及び方法
Ａ．バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現系
Ｂ．昆虫細胞
Ｃ．アネロベクターの構成体及びアセンブリ
ｉ．アネロベクターのアセンブリのためのＯＲＦ１分子
ｉｉ．アネロベクターのアセンブリのためのＯＲＦ２分子
Ｄ．遺伝子エレメント構築物
ｉ．プラスミド
ｉｉ．環状核酸構築物
ｉｉｉ．インビトロ環状化
ｉｖ．ｃｉｓ／ｔｒａｎｓ構築物
ｖ．発現カセット
ｖｉ．遺伝子エレメント構築物の設計及び産生
Ｃ．エフェクター
Ｄ．宿主細胞
ｉ．遺伝子エレメントの宿主細胞中への導入
ｉｉ．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質をｃｉｓ又はｔｒａｎｓで提供するための方法
ｉｉｉ．ヘルパー
ｉｖ．例示的な細胞型
Ｅ．培養条件
Ｆ．採取
Ｇ．濃縮及び精製
ＩＩ．アネロベクター
Ａ．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）
Ｂ．ＯＲＦ１分子
Ｃ．ＯＲＦ２分子
Ｄ．遺伝子エレメント
Ｅ．タンパク質結合配列
Ｆ．５’ＵＴＲ領域
Ｇ．ＧＣリッチ領域
Ｈ．エフェクター

Ｉ．調節配列
Ｊ．複製タンパク質
Ｋ．その他の配列
Ｌ．タンパク質性外層
ＩＩＩ．核酸構築物
ＩＶ．組成物
Ｖ．宿主細胞
ＶＩ．使用方法
ＶＩＩ．投与／送達

【０２０１】

Ｉ．アネロベクターを作製するための組成物及び方法

本開示は、一部の態様では、組成物（例えば、バクミド、ドナーベクター、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子、及びそれを含む細胞）並びに、例えば、本明細書に記載されるようなアネロベクターを産生するために使用され得る方法を提供する。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、遺伝子エレメント又は遺伝子エレメント構築物を産生するために使用することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、若しくはＯＲＦ１／２分子、又はその機能性断片若しくはスプライス変異体）を産生するために使用することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物及び方法は、例えば、宿主細胞（例えば、昆虫細胞、例えば、Ｓｆ９細胞）中でタンパク質性外層又はその構成体（例えば、ＯＲＦ１分子）を産生するために使用することができる。

【０２０２】

一部の実施形態では、バクミドは、遺伝子エレメント配列（例えば、遺伝子エレメント領域）と１つ又は複数のバキュロウイルスエレメント（例えば、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム）とを含む核酸構築物である。一部の実施形態では、バクミドは、例えば、遺伝子エレメント構築物及び／又はアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、若しくはＯＲＦ１／２分子、又はその機能性断片若しくはスプライス変異体）を産生するために、バキュロウイルス発現系において、例えば、本明細書に記載されるような、例えば、昆虫細胞において利用することができる。

【０２０３】

理論に拘束されることを望むものではないが、ローリングサークル増幅は、遺伝子エレメント領域（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、バクミド内の）に対して５’に位置する（又はその５’領域内に位置する）Ｒｅｐ結合部位（例えば、５’ＵＴＲを含む、例えば、本明細書に記載されるような、例えば、ヘアピンループ及び／又は複製起点を含む）へのＲｅｐタンパク質結合を介して起こり得る。次いで、Ｒｅｐタンパク質は、遺伝子エレメント領域を通って進み、遺伝子エレメントの合成をもたらすことができる。次いで、遺伝子エレメントは環状化され、次いで、タンパク質性外層内に閉じ込められて、アネロベクターを形成することができる。

【０２０４】

バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現系

ウイルス発現系、例えば、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現系は、例えば、本明細書に記載されるようなタンパク質を発現するために（例えば、アネロベクターの産生のために）使用することができる。バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）は、環状のスーパーコイル状二本鎖ＤＮＡゲノムを有する桿状ウイルスである。バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）の属としては：アルファバキュロウイルス（Ａｌｐｈａｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）（鱗翅目（Ｌｅｐｉｄｏｐｔｅｒａ）から単離された核多角体病ウイルス（ｎｕｃｌｅｏｐｏｌｙｈｅｄｒｏｖｉｒｕｓｅｓ）（ＮＰＶ））、ベータバキュロウイルス（Ｂｅｔａｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓｅｓ）（鱗翅目（Ｌｅｐｉｄｏ

ｐｔｅｒａ）から単離された顆粒病ウイルス（ｇｒａｎｕｌｏｖｉｒｕｓｅｓ）（ＧＶ））、ガンマバキュロウイルス（Ｇａｍｍａｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓｅｓ）（膜翅目（Ｈｙｍｅｎｏｐｔｅｒａ）から単離されたＮＰＶ）、及びデルタバキュロウイルス（Ｄｅｌｔａｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓｅｓ）（双翅目（Ｄｉｐｔｅｒａ）から単離されたＮＰＶ）が挙げられる。ＧＶは、典型的には、エンベロープ当たり１つだけのヌクレオキャプシドを含有するが、ＮＰＶは、典型的には、エンベロープ当たり単一のヌクレオキャプシド（ＳＮＰＶ）又は複数のヌクレオキャプシド（ＭＮＰＶ）のいずれかを含有する。エンベロープビリオンは、ＧＶにおいてはグラニュリンマトリックス内に、及びＮＰＶにおいてはポリヘドリン内に更に閉塞されている。バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）は、典型的には、溶解性及び閉塞性のライフサイクルの両方を有する。一部の実施形態では、溶解性及び閉塞性のライフサイクルは、ウイルス複製の３つの段階：初期、後期、及び最後期を通して独立して現れる。一部の実施形態では、初期の間に、ウイルスの宿主細胞への進入、初期ウイルス遺伝子発現及び宿主遺伝子発現機構のシャットオフ後にウイルスＤＮＡ複製が起こる。一部の実施形態では、後期において、ウイルスＤＮＡ複製をコードする後期遺伝子が発現され、ウイルス粒子がアセンブルされ、細胞外ウイルス（ＥＶ）が宿主細胞によって産生される。一部の実施形態では、最後期において、ポリヘドリン及びｐ１０遺伝子が発現され、閉塞性ウイルス（ＯＶ）が宿主細胞によって産生され、宿主細胞が溶解される。バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）は、昆虫種に感染するため、それらはバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）許容性昆虫細胞又は幼虫において外部タンパク質を産生するための生物学的作用物質として使用することができる。バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）の異なる単離株、例えば、オートグラファ・カリフォルニカ（Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ　ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ）核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）及びボンビックス・モリ（Ｂｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉ）（カイコ）核多角体病ウイルス（ＢｍＮＰＶ）は、外部タンパク質発現で使用され得る。様々なバキュロウイルス発現系は、例えば、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒから市販されている。

【０２０５】

一部の実施形態では、本明細書に記載のタンパク質（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子、例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、若しくはＯＲＦ１／２、又はその機能性断片若しくはスプライス変異体）は、本明細書に記載の１つ又は複数の構成要素を含むバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現ベクター（例えば、バクミド）を使用して発現され得る。例えば、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現ベクターは、選択可能マーカー（例えば、ｋａｎＲ）、複製起点（例えば、細菌複製起点及び昆虫細胞複製起点のうちの１つ又は両方）、リコンビナーゼ認識部位（例えば、ａｔｔ部位）、及びプロモーターのうちの１つ又は複数（例えば、これらの全部）を含んでもよい。一部の実施形態では、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現ベクター（例えば、本明細書に記載されるバクミド）は、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）閉塞体（ｏｃｃｌｕｓｉｏｎ　ｂｏｄｉｅｓ）をコード化する天然の野生型ポリヘドリン遺伝子を、本明細書に記載のタンパク質をコード化する遺伝子で置き換えることによって産生することができる。一部の実施形態では、本明細書に記載のタンパク質をコード化する遺伝子は、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）プロモーターを含有するバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現ベクター（例えば、本明細書に記載されるバクミド）中にクローニングされる。一部の実施形態では、バキュロウイルスベクターは、１つ又は複数の非バキュロウイルスプロモーター、例えば、哺乳動物プロモーター又はアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）プロモーターを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のタンパク質をコード化する遺伝子は、ドナーベクター（例えば、本明細書に記載されるような）中にクローニングされ、次いで、これは本明細書に記載のタンパク質をコード化する遺伝子が、ドナーベクターからバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現ベクター（例えば、バクミド）に移入される（例えば、相同組換え若しくはトランスポザーゼ活性によって）ように、空バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現ベクターと接触される。

一部の実施形態では、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）プロモーターは、非必須ポリヘドリン遺伝子座からのバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）ＤＮＡに隣接している。一部の実施形態では、本明細書に記載のタンパク質は、ウイルス複製の最後期においてＡｃＮＰＶポリヘドリンプロモーターの転写制御下にある。一部の実施形態では、昆虫細胞中のバキュロウイルス発現で使用するために好適な強力プロモーターとしては、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）ｐ１０プロモーター、ポリヘドリン（ｐｏｌｈ）プロモーター、ｐ６．９プロモーター及びキャプシドタンパク質プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。昆虫細胞中のバキュロウイルス発現で使用するために好適な弱いプロモーターとしては、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）のｉｅ１、ｉｅ２、ｉｅ０、ｅｔ１、３９Ｋ（ａｋａ　ｐｐ３１）及びｇｐ６４プロモーターが挙げられる。

【０２０６】

一部の実施形態では、組換えバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）は、バキュロウイルスゲノム（例えば、野生型若しくは突然変異体バキュロウイルスゲノム）と、トランスファーベクターとの間の相同組換えによって産生される。一部の実施形態では、本明細書に記載のタンパク質をコード化する１つ又は複数の遺伝子は、トランスファーベクター中にクローニングされる。一部の実施形態では、トランスファーベクターは、非必須遺伝子座、例えば、ポリヘドリン遺伝子からのＤＮＡに隣接するバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）プロモーターを更に含有する。一部の実施形態では、本明細書に記載のタンパク質をコード化する１つ又は複数の遺伝子は、バキュロウイルスゲノムとトランスファーベクターとの間の相同組換えによってバキュロウイルスゲノム中に挿入される。一部の実施形態では、バキュロウイルスゲノムは、１つ又は複数の特有な部位で線状化される。一部の実施形態では、線状化された部位は、本明細書に記載のタンパク質をコード化する遺伝子のバキュロウイルスゲノム中への挿入のために標的部位の近くに位置する。一部の実施形態では、遺伝子、例えば、ポリヘドリン遺伝子から下流のバキュロウイルスゲノムの断片が欠落している線状化されたバキュロウイルスゲノムは、相同組換えに使用することができる。一部の実施形態では、バキュロウイルスゲノム及びトランスファーベクターは、昆虫細胞中に同時トランスフェクトされる。一部の実施形態では、組換えバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を産生する方法は、本明細書に記載の１つ又は複数のタンパク質をコード化する遺伝子を含有するトランスファーベクターを用いて、相同組換えを実施するためのバキュロウイルスゲノムを調整するステップと、トランスファーベクターとバキュロウイルスゲノムＤＮＡとを昆虫細胞中に同時トランスフェクトするステップと、を含む。一部の実施形態では、バキュロウイルスゲノムは、トランスファーベクターの領域と相同である領域を含む。これらの相同領域は、バキュロウイルスゲノムとトランスファーベクターとの間の組換えの確率を高めることができる。一部の実施形態では、トランスファーベクター中の相同領域は、プロモーターの上流又は下流に位置する。一部の実施形態では、相同組換えを誘導するために、バキュロウイルスゲノムとトランスファーベクターとは、約１：１～１０：１の重量比で混合される。

【０２０７】

一部の実施形態では、組換えバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）は、例えば、それによって本明細書に記載のタンパク質をコード化する遺伝子がバクミドＤＮＡ中に挿入される、例えば、細菌、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）（例えば、ＤＨ　１０Ｂａｃ細胞）中で増殖される、Ｔｎ７との部位特異的転位を含む方法によって生成される。一部の実施形態では、本明細書に記載のタンパク質をコード化する遺伝子は、ｐＦＡＳＴＢＡＣ（登録商標）ベクター中にクローニングされ、ｍｉｎｉ－ａｔｔＴｎ７標的部位を有するバクミドＤＮＡを含有するコンピテント細胞、例えば、ＤＨ１０ＢＡＣ（登録商標）コンピテント細胞を形質転換する。一部の実施形態では、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現ベクター、例えば、ｐＦＡＳＴＢＡＣ（登録商標）ベクターはプロモーター、例えば、二重プロモーター（例えば、ポリヘドリンプロモーター、ｐ１０プロモーター）を有してもよい。市販のｐＦＡＳＴＢＡＣ（登録商標）ドナープラスミドには：

ｐＦＡＳＴＢＡＣ １、ｐＦＡＳＴＢＡＣ ＨＴ、及びｐＦＡＳＴＢＡＣ ＤＵＡＬが含まれる。一部の実施形態では、組換えバクミドＤＮＡ含有コロニーが特定され、バクミドＤＮＡが単離され、昆虫細胞をトランスフェクトする。

【０２０８】

一部の実施形態では、バキュロウイルスベクターは、ヘルパー核酸と一緒に昆虫細胞中に導入される。この導入は、同時又は順次であり得る。一部の実施形態では、ヘルパー核酸は、例えば、バキュロウイルスベクターのパッケージングを促進するために、１つ又は複数のバキュロウイルスタンパク質を提供する。

【０２０９】

一部の実施形態では、昆虫細胞中で産生される（例えば、相同組換えによって）組換えバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）は増殖され、組換えタンパク質発現のために昆虫細胞に感染するために使用される（例えば、中期対数増殖期において）。一部の実施形態では、細菌、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）中の部位特異的転位によって産生される組換えバクミドＤＮＡは、トランスフェクション剤、例えば、Ｃｅｌｌｆｅｃｔｉｎ（登録商標）ＩＩを用いて昆虫細胞をトランスフェクトするために使用される。バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現系に関する追加の情報は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願第１４／４４７，３４１号明細書、同第１４／２７７，８９２号明細書、及び同第１２／２７８，９１６号明細書に論議されている。

【０２１０】

昆虫細胞

本明細書に記載のタンパク質は、例えば、上述したような組換えバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）又はバクミドＤＮＡで感染若しくはトランスフェクトされた昆虫細胞中で発現され得る。一部の実施形態では、昆虫細胞としては：ツマジロクサヨトウ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）に由来するＳｆ９及びＳｆ２１細胞、並びにイラクサギンウワバ（Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ ｎｉ）に由来するＴｎ－３６８及びＨｉｇｈ Ｆｉｖｅ（商標）ＢＴＩ－ＴＮ－５Ｂ１－４細胞（Ｈｉ５細胞とも称される）が挙げられる。一部の実施形態では、ムラサキツマジロクサヨトウＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａの卵巣に由来する昆虫細胞株Ｓｆ２１及びＳｆ９は、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現系を使用する組換えタンパク質の発現のために使用することができる。一部の実施形態では、Ｓｆ２１及びＳｆ９昆虫細胞は、市販の血清補充培地又は無血清補充培地中で培養することができる。昆虫細胞を培養するための好適な培地としては：グレースサプリメント含有培地（ＴＮＭ－ＦＨ）、ＩＰＬ－４１、ＴＣ－１００、シュナイダーショウジョウバエ培地、ＳＦ－９００ ＩＩ ＳＦＭ、及びＥＸＰＲＥＳＳ－ＦＩＶＥ（商標）ＳＦＭが挙げられる。一部の実施形態では、一部の無血清培地配合物は、培養及び組換えタンパク質産生の両方のために、培地ｐＨを６．０～６．４の範囲に維持するためにリン酸緩衝液系を使用する（Ｌｉｃａｒｉ ｅｔ ａｌ．Ｉｎｓｅｃｔ ｃｅｌｌ ｈｏｓｔｓ ｆｏｒ ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｖｅｃｔｏｒｓ ｃｏｎｔａｉｎ ｅｎｄｏｇｅｎｏｕｓ ｅｘｏｇｌｙｃｏｓｉｄａｓｅ ａｃｔｉｖｉｔｙ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｐｒｏｇｒｅｓｓ ９：１４６－１５２（１９９３）及びＤｒｕｇｍａｎｄ ｅｔ ａｌ．Ｉｎｓｅｃｔ ｃｅｌｌｓ ａｓ ｆａｃｔｏｒｉｅｓ ｆｏｒ ｂｉｏｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ａｄｖａｎｃｅｓ ３０：１１４０－１１５７（２０１２））。一部の実施形態では、様々な昆虫細胞株を培養するために、６．０～６．８のｐＨが使用されてもよい。一部の実施形態では、昆虫細胞は、曝気しながら２５℃～３０℃の温度で、懸濁液中で、又は単層として培養される。昆虫細胞に関する追加の情報は、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願第１４／５６４，５１２号明細書、及び同第１４／７７５，１５４号明細書に論議されている。

【０２１１】

アネロベクターの構成体及びアセンブリ

本明細書の組成物及び方法は、アネロベクターを産生するために使用することができる

。本明細書に記載されるように、アネロベクターは、一般に、タンパク質性外層内（例えば、本明細書に記載されるように、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸によってコード化されるポリペプチドを含む）に閉じ込められた遺伝子エレメント（例えば、本明細書に記載される５’ＵＴＲ領域を含む、例えば、一本鎖、環状ＤＮＡ分子）を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、若しくはＯＲＦ１／２のうちの１つ又は複数）をコード化する１つ又は複数の配列を含む。本明細書で使用される場合、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ又はＯＲＦ分子（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、若しくはＯＲＦ１／２）は、対応するアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ配列、例えば、ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０３７３７９号明細書又はＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書（この各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるものに対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメントは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１をコード化する配列、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、ゼリーロール領域）を含む。一部の実施形態では、タンパク質性外層は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片）によってコード化されるポリペプチドを含む。

【０２１２】

一部の実施形態では、アネロベクターは、遺伝子エレメント（例えば、本明細書に記載されるような）をタンパク質性外層（例えば、本明細書に記載されるような）内に閉じ込めることによってアセンブルされる。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、宿主細胞（例えば、昆虫細胞、例えば、Ｓｆ９細胞）中のタンパク質性外層内に閉じ込められる。一部の実施形態では、宿主細胞は、タンパク質性外層に含まれる１つ又は複数のポリペプチド（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸によってコード化されるポリペプチド、例えば、ＯＲＦ１分子）を発現する。例えば、一部の実施形態では、宿主細胞は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子をコード化する核酸配列、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１ポリペプチド（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸によってコード化される野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質若しくはポリペプチド）のスプライス変異体若しくは機能性断片を含む。複数の実施形態では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子をコード化する核酸配列は、宿主細胞中に含まれる核酸構築物（例えば、プラスミド、ウイルスベクター、ウイルス、ミニサークル、バクミド、又は人工染色体）中に含まれる。複数の実施形態では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子をコード化する核酸配列は、宿主細胞のゲノム中に組み込まれる。

【０２１３】

一部の実施形態では、宿主細胞は、遺伝子エレメント及び／又は遺伝子エレメントの配列を含む核酸構築物を含む。一部の実施形態では、核酸構築物は、プラスミド、ウイルス核酸、ミニサークル、バクミド、又は人工染色体から選択される。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、核酸構築物（例えば、バクミド）から切り取られ、任意選択で、二本鎖型から一本鎖型に変換される（例えば、変性によって）。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、核酸構築物（例えば、バクミド）中の鋳型配列に基づいてポリメラーゼによって生成される。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、遺伝子エレメント配列の一本鎖コピーを作り出し、これは任意選択で環状化され、本明細書に記載される遺伝子エレメントを形成することができる。

【０２１４】
一部の実施形態では、宿主細胞は、遺伝子エレメント構築物（例えば、バクミド、プラスミド、又はミニサークル）とアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２　ＯＲＦ分子）をコード化する１つ又は複数の配列、又はその機能性断片を含むバクミドとを含む。一部の実施形態では、タンパク質性外層タンパク質は、バクミドから発現される。複数の実施形態では、バクミドから発現されるタンパク質性外層タンパク質は、遺伝子エレメントを閉じ込め、それによってアネロベクターを形成する。一部の実施形態では、バクミドは、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）における核酸構築物の複製に好適な骨格、例えば、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域を含む。一部の実施形態では、バクミドは、細菌細胞（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞、例えば、ＤＨ　１０Ｂａｃ細胞）における遺伝子構築物の複製に好適な骨格領域を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）における核酸構築物の複製に好適な骨格、例えば、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、細菌細胞（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞、例えば、ＤＨ　１０Ｂａｃ細胞）における遺伝子エレメントの複製に好適な骨格領域を含む。一部の実施形態では、バクミドは、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子を介して宿主細胞中に導入される。複数の実施形態では、バクミドは、プロデューサ細胞、例えば、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）又は細菌細胞（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞、例えば、ＤＨ　１０Ｂａｃ細胞）によって産生される。複数の実施形態では、プロデューサ細胞は、例えば、本明細書に記載されるようなバクミド及び／又はドナーベクターを含む。複数の実施形態では、プロデューサ細胞は、バクミド及び／又はドナーベクターの複製のために十分な細胞機構を更に含む。
【０２１５】
例えば、アネロベクターのアセンブリのためのＯＲＦ１分子
アネロベクターは、例えば、遺伝子エレメントをタンパク質性外層内に閉じ込めることによって作製することができる。一部の実施形態では、閉じ込めは、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）中で起こる。アネロベクターのタンパク質性外層は、一般に、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片）によってコード化されるポリペプチドを含む。一部の実施形態では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸は、例えば、本明細書に記載されるようなバクミド又はドナーベクター中に含まれる。一部の実施形態では、バクミドは、外性エフェクターをコード化する配列（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、遺伝子エレメント領域）を更に含む。他の実施形態では、バクミドは、外性エフェクターをコード化する配列を含まない（例えば、バクミドは、例えば、本明細書に記載されるような遺伝子エレメント領域を含まない）。ＯＲＦ１分子は、一部の実施形態では、以下の：アルギニンリッチ領域、例えば、少なくとも６０％の塩基性残基（例えば、少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、若しくは１００％の塩基性残基；例えば、６０％～９０％、６０％～８０％、７０％～９０％、若しくは７０～８０％の塩基性残基）を有する領域を含む第１の領域と、ゼリーロールドメイン、例えば、少なくとも６つのβ鎖（例えば、４、５、６、７、８、９、１０、１１、若しくは１２のβ鎖）を含む第２の領域と、のうちの１つ又は複数を含み得る。複数の実施形態では、タンパク質性外層は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１アルギニンリッチ領域、ゼリーロール領域、Ｎ２２ドメイン、超可変領域、及び／又はＣ－末端ドメインのうちの１つ又は複数（例えば、１、２、３、４、又は５つ全部）を含む。一部の実施形態では、タンパク性外層は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１ゼリーロール領域（例えば、本明細書に記載されるような）を含む。一部の実施形態では、タンパク性外層は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１アルギニンリッチ領域（例えば、本明細書に記載されるような）を含む。一部の実施形態では、

タンパク質性外層は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１　Ｎ２２ドメイン（例えば、本明細書に記載されるような）を含む。一部の実施形態では、タンパク質性外層は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）超可変領域（例えば、本明細書に記載されるような）を含む。一部の実施形態では、タンパク質性外層は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１　Ｃ－末端ドメイン（例えば、本明細書に記載されるような）を含む。

【０２１６】

一部の実施形態では、アネロベクターは、ＯＲＦ１分子及び／又はＯＲＦ１分子をコード化する核酸を含む。一般に、ＯＲＦ１分子は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質（例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質）の構造特徴及び／若しくは活性を有するポリペプチド、又はその機能性断片を含む。一部の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質（例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質）と比べて短縮を含む。一部の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質の少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、５５０、６００、６５０、若しくは７００のアミノ酸だけ短縮されている。一部の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、例えば、本明細書に記載されるようなアルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）、ベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）、又はガンマトルクウイルス（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質に対して、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ＯＲＦ１分子は、一般に、ＤＮＡ（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、遺伝子エレメント）などの核酸分子に結合することができる。一部の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、細胞の核に局在する。ある特定の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、核小体に局在する。

【０２１７】

理論に拘束されることを望むものではないが、ＯＲＦ１分子は、例えば、タンパク質性外層（例えば、本明細書に記載されるような）を形成するために、他のＯＲＦ１分子に結合することが可能であり得る。そのようなＯＲＦ１分子は、キャプシドを形成するための能力を有するものとして記載され得る。一部の実施形態では、タンパク質性外層は、核酸分子（例えば、本明細書に記載される遺伝子エレメント、例えば、本明細書に記載されるような、例えば、それを含むバクミド、ドナーベクター、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）、又は細胞を使用して産生されるもの）を閉じ込めることができる。一部の実施形態では、複数のＯＲＦ１分子は、例えば、タンパク質性外層を作り出すために、多量体を形成し得る。一部の実施形態では、多量体は、ホモ多量体であり得る。他の実施形態では、多量体は、ヘテロ多量体である。

【０２１８】

例えば、アネロベクターのアセンブリのためのＯＲＦ２分子

本明細書に記載の組成物又は方法を使用してアネロベクターを産生することは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２分子（例えば、本明細書に記載されるような）、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片の発現を伴い得る。一部の実施形態では、アネロベクターは、ＯＲＦ２分子、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片、及び／若しくはＯＲＦ２分子、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片をコード化する核酸を含む。一部の実施形態では、アネロベクターは、ＯＲＦ２分子、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片、及び／若しくはＯＲＦ２分子、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片をコード化する核酸を含まない。一部の実施形態では、アネロベクターを産生することは、ＯＲＦ２分子、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片の発現を含むが、ＯＲＦ２分子はアネロベクター中には組み込まれない。

【０２１９】

ＯＲＦ分子コード化配列を含む構築物

一部の実施形態では、１つ又は複数のＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及びＯＲＦ１／２分子）、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片は、遺伝子エレメントから分離され得る核酸構築物（例えば、バクミド）又は遺伝子エレメント領域を含む核酸構築物によって提供される。１つ又は複数のＯＲＦ分子、又はそのスプライス変異体若しくは断片をコード化する核酸構築物は、骨格領域を含み得る。一部の実施形態では、骨格領域は、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）における核酸構築物の複製に好適であり、例えば、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域である。複数の実施形態では、核酸構築物は、バクミドである。一部の実施形態では、骨格領域は、細菌細胞における核酸構築物の複製に好適である。一部の実施形態では、核酸構築物は、ＯＲＦ１分子、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片をコード化する。一部の実施形態では、核酸構築物は、遺伝子エレメント領域（例えば、核酸構築物によってコード化される、例えば、ＯＲＦ１分子又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片を含む、例えば、タンパク質性外層によって閉じ込められる遺伝子エレメントの配列を含む）を更に含む。

【０２２０】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法は、例えば、上述したような１つ又は複数のＯＲＦ分子をコード化する核酸構築物を含む宿主細胞（例えば、昆虫細胞、例えば、Ｓｆ９細胞）を伴う。宿主細胞は、１つ又は複数のＯＲＦ分子を発現することができる。一部の実施形態では、宿主細胞は、例えば、核酸構築物から、アネロベクタータンパク質性外層を形成することができるポリペプチド（例えば、ＯＲＦ１分子、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片）を発現する。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物（例えば、本明細書に記載されるような）は、宿主細胞中に導入される（例えば、アネロベクタータンパク質性外層を形成することができるポリペプチドの発現の前に、発現と同時に、又は発現後に）。他の実施形態では、１つ又は複数のＯＲＦ分子をコード化する核酸構築物は、遺伝子エレメント構築物（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、遺伝子エレメント領域を含む）でもある。一部の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、本明細書に記載されるように、例えば、遺伝子エレメント構築物から作り出される）は、宿主細胞におけるタンパク質性外層内に閉じ込められ、それによってアネロベクターを作り出す。一部の実施形態では、アネロベクターは、例えば、本明細書に記載されるような宿主細胞又は周辺の上清から採取される。一部の実施形態では、宿主細胞は、核酸構築物を含むバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子を産生する。

【０２２１】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及び／又はＯＲＦ１／２分子）、又はその機能性断片若しくはスプライス変異体をコード化する配列、及び／又は遺伝子エレメント領域を含む核酸構築物（例えば、ドナーベクター）を含む宿主細胞（例えば、細菌細胞、例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞、例えば、ＤＨ　１０Ｂａｃ細胞）を伴う。一部の実施形態では、宿主細胞は、バクミド（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子をコード化する配列及び／又は遺伝子エレメント領域を欠くバクミド）を更に含む。一部の実施形態では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子、又はその機能性断片若しくはスプライス変異体をコード化する配列は、宿主細胞内のバクミド中に移入される。一部の実施形態では、宿主細胞は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子、又はその機能性断片若しくはスプライス変異体をコード化する移入された配列を含むバクミドを含むバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子を産生する。一部の実施形態では、遺伝子エレメント領域は、宿主細胞内のバクミド中に移入される。一部の実施形態では、宿主細胞は、移入された遺伝子エレメント領域を含むバクミドを含むバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）粒子を産生する。

【０２２２】

例えば、アネロベクターのアセンブリのための遺伝子エレメント構築物
本明細書に記載されるアネロベクターの遺伝子エレメントは、遺伝子エレメント領域及び任意選択でバクミド（例えば、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム又はその断片、例えば、１つ又は複数のバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）エレメントを含む）又はドナーベクター骨格などの他の配列を含む遺伝子エレメント構築物から産生されてもよい。一般に、遺伝子エレメント構築物は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）５’ＵＴＲ（例えば、本明細書に記載されるような）を含む。遺伝子エレメント構築物は、遺伝子エレメントがタンパク質性外層内に閉じ込められ得る宿主細胞への遺伝子エレメントの配列の送達に好適な任意の核酸構築物であり得る。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、プロモーターを含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、線状核酸分子である。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、環状核酸分子（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、プラスミド、バクミド、ドナーベクター、又はミニサークル）である。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）配列を含む（例えば、遺伝子エレメント構築物を含む昆虫細胞が、遺伝子エレメント構築物の遺伝子エレメント配列、又はその断片を含むバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を産生することができるように）。遺伝子エレメント構築物は、一部の実施形態では、二本鎖であり得る。他の実施形態では、遺伝子エレメントは、一本鎖である。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、ＤＮＡを含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、ＲＮＡを含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、１つ又は複数の修飾ヌクレオチドを含む。

【０２２３】
一部の態様では、本開示は、本明細書に記載されるアネロベクターの複製及び増殖（例えば、細胞培養系中での）のための方法を提供し、これは以下のステップ：（ａ）遺伝子エレメント（例えば、線状化）をアネロベクター感染に感受性の細胞株中に導入する（例えば、トランスフェクトする）ステップと、（ｂ）細胞を採取し、任意選択で遺伝子エレメントの存在を示す細胞を単離するステップと、（ｃ）実験条件及び遺伝子発現に応じて、ステップ（ｂ）で得られた細胞を培養する（例えば、少なくとも３日間、例えば、少なくとも１週間以上）ステップと、（ｄ）例えば、本明細書に記載されるように、ステップ（ｃ）の細胞を採取するステップと、のうちの１つ又は複数を含み得る。

【０２２４】
プラスミド
一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、プラスミドである。プラスミドは、一般に、本明細書に記載される遺伝子エレメントの配列並びに宿主細胞における複製に好適な複製起点（例えば、細菌細胞における複製のための細菌複製起点）及び選択可能マーカー（例えば、抗生物質耐性遺伝子）を含むであろう。一部の実施形態では、遺伝子エレメントの配列は、プラスミドから切り取ることができる。一部の実施形態では、プラスミドは、細菌細胞中の複製が可能である。一部の実施形態では、プラスミドは、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）における複製が可能である。一部の実施形態では、プラスミドは、少なくとも３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、若しくは５０００ｂｐの長さである。一部の実施形態では、プラスミドは、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、若しくは１０，０００ｂｐ未満の長さである。一部の実施形態では、プラスミドは、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、１０００～１５００、１５００～２０００、２０００～２５００、２５００～３０００、３０００～４０００、若しくは４０００～５０００ｂｐの長さを有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、例えば、本明細書に記載されるような、例えば、ミニサークルを形成するためにプラスミドから切り取ることができる（例えば、インビトロ環状化によって）。複数の実施形態では、遺伝子エレメントの切り取りは、遺伝子エレメ

ント配列をプラスミド骨格から分離する（例えば、遺伝子エレメントを細菌骨格から分離する）。一部の実施形態では、プラスミドは、１つ又は複数のバキュロウイルスエレメント（例えば、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム）を含む。

【０２２５】

小環状核酸構築物

一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、例えば、骨格を欠いている（例えば、細菌複製起点及び／又は選択可能マーカーを欠いている）環状核酸構築物である。複数の実施形態では、遺伝子エレメントは、二本鎖環状核酸構築物である。複数の実施形態では、二本鎖環状核酸構築物は、例えば、本明細書に記載されるようなインビトロ環状化（ＩＶＣ）によって産生される。複数の実施形態では、二本鎖環状核酸構築物は、宿主細胞中に導入されることができ、その中で、それは、例えば、本明細書に記載されるような一本鎖環状遺伝子エレメントに変換され得るか、又はそれを生成するための鋳型として使用され得る。一部の実施形態では、環状核酸構築物は、プラスミド骨格又はその機能性断片を含まない。一部の実施形態では、環状核酸構築物は、少なくとも２０００、２１００、２２００、２３００、２４００、２５００、２６００、２７００、２８００、２９００、３０００、３１００、３２００、３３００、３４００、３５００、３６００、３７００、３８００、３９００、４０００、４１００、４２００、４３００、４４００、若しくは４５００ｂｐの長さである。一部の実施形態では、環状核酸構築物は、２９００、３０００、３１００、３２００、３３００、３４００、３５００、３６００、３７００、３８００、３９００、４０００、４１００、４２００、４３００、４４００、４５００、４６００、４７００、４８００、４９００、５０００、５５００、若しくは６０００ｂｐ未満の長さである。一部の実施形態では、環状核酸構築物は、２０００～２１００、２１００～２２００、２２００～２３００、２３００～２４００、２４００～２５００、２５００～２６００、２６００～２７００、２７００～２８００、２８００～２９００、２９００～３０００、３０００～３１００、３１００～３２００、３２００～３３００、３３００～３４００、３４００～３５００、３５００～３６００、３６００～３７００、３７００～３８００、３８００～３９００、３９００～４０００、４０００～４１００、４１００～４２００、４２００～４３００、４３００～４４００，若しくは４４００～４５００ｂｐの長さである。一部の実施形態では、環状核酸構築物は、ミニサークルである。

【０２２６】

インビトロ環状化

場合によっては、タンパク質性外層にパッケージ化される遺伝子エレメントは、一本鎖環状ＤＮＡである。遺伝子エレメントは、場合によっては、一本鎖環状ＤＮＡ以外の形態を有する遺伝子エレメント構築物を介して宿主細胞中に導入されてもよい。例えば、遺伝子エレメント構築物は、二本鎖環状ＤＮＡであってもよい。二本鎖環状ＤＮＡは、次いで、宿主細胞（例えば、ローリングサークル複製に好適な酵素、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｒｅｐタンパク質、例えば、列挙された酵素に関して参照により本明細書に組み込まれる、例えば、Ｗａｗｒｚｙｎｉａｋ ｅｔ ａｌ．２０１７，Ｆｒｏｎｔ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．８：２３５３に記載されているような、例えば、Ｒｅｐ６８／７８、Ｒｅｐ６０、ＲｅｐＡ、ＲｅｐＢ、Ｐｒｅ、ＭｏｂＭ、ＴｒａＸ、ＴｒｗＣ、Ｍｏｂ０２２８１、Ｍｏｂ０２２８２、ＮｉｋＢ、ＯＲＦ５０２４０、ＮｉｋＫ、ＴｅｃＨ、ＯｒｆＪ、若しくはＴｒａＩを含む宿主細胞）中で一本鎖環状ＤＮＡに変換され得る。一部の実施形態では、二本鎖環状ＤＮＡは、例えば、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の実施例３５に記載されるように、インビトロ環状化（ＩＶＣ）によって産生される。

【０２２７】

一般に、インビトロ環状化されたＤＮＡ構築物は、遺伝子エレメント配列が線状ＤＮＡ分子として切り取られるように、パッケージ化される遺伝子エレメントの配列を含むプラスミドを消化させることによって産生することができる。次いで、得られた線状ＤＮＡは、例えば、ＤＮＡリガーゼを使用して連結され、二本鎖環状ＤＮＡを形成することができ

る。場合によっては、インビトロ環状化によって産生された二本鎖環状ＤＮＡは、例えば、本明細書に記載されるようなローリングサークル複製を受けることができる。理論に拘束されることを望むものではないが、インビトロ環状化は、更なる修飾なしにローリングサークル複製を受けることができる二本鎖ＤＮＡ構築物をもたらし、それによって、例えば、本明細書に記載されるようなアネロベクターにパッケージ化されるのに好適なサイズの一本鎖環状ＤＮＡを産生することが可能になると考えられる。一部の実施形態では、二本鎖ＤＮＡ構築物は、プラスミド（例えば、細菌プラスミド）よりも小さい。一部の実施形態では、二本鎖ＤＮＡ構築物は、プラスミド（例えば、細菌プラスミド）から切り取られ、次いで、例えば、インビトロ環状化によって環状化される。

【０２２８】

ｃｉｓ／ｔｒａｎｓ構築物

一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子エレメント構築物（例えば、バクミド又はドナーベクター）は、１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ、例えば、タンパク質性外層構成体（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸によってコード化されるポリペプチド）をコード化する１つ又は複数の配列を含む。例えば、遺伝子エレメント構築物は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子をコード化する核酸配列を含み得る。そのような遺伝子エレメント構築物は、遺伝子エレメント及びアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦを宿主細胞中にｃｉｓで導入するために好適であり得る。他の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子エレメント構築物は、１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ、例えば、タンパク質性外層構成体（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸によってコード化されるポリペプチド）をコード化する配列を含まない。例えば、遺伝子エレメント構築物は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子をコード化する核酸配列を含まなくてもよい。そのような遺伝子エレメント構築物は、ｔｒａｎｓで提供される１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦを用いて、遺伝子エレメントを宿主細胞中に導入するのに好適であり得る（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦのうちの１つ又は複数をコード化する第２の核酸構築物の導入を介して、又は宿主細胞のゲノム中に組み込まれたアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦカセットを介して）。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）における核酸構築物の複製に好適な骨格、例えば、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）骨格領域を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、細菌細胞（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞、例えば、ＤＨ　１０Ｂａｃ細胞）における遺伝子エレメント構築物の複製に好適な骨格領域を含む。

【０２２９】

一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物（例えば、バクミド又はドナーベクター）は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片をコード化する配列（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、ゼリーロール領域）を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメントの配列を含まない遺伝子エレメントの一部は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片をコード化する配列を含む（例えば、プロモーター及びアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片をコード化する配列を含むカセットで）。更なる実施形態では、遺伝子エレメントの配列を含む構築物の一部は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片をコード化する配列（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、ゼリーロール領域）を含む。複数の実施形態では、そのような遺伝子エレメントのタンパク質性外層（例えば、本明細書に記載されるような）内の閉じ込めは、複製構成体アネロベクター（例えば、細胞に感染する際に、細胞が、例えば、本明細書に記載される１つ又は複数のアネロウイルス（Ａ

ｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦをコード化する更なる核酸構築物を細胞中に導入することなく、アネロベクターの追加のコピーを産生することを可能にするアネロベクター）を作り出す。

【０２３０】

他の実施形態では、遺伝子エレメントは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片をコード化する配列（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、ゼリーロール領域）を含まない。複数の実施形態では、そのような遺伝子エレメントのタンパク質性外層（例えば、本明細書に記載されるような）内の閉じ込めは、複製能力のないアネロベクター（例えば、細胞に感染する際に、感染細胞が、例えば、本明細書に記載される１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦをコード化する、例えば、１つ又は複数の追加の構築物の非存在下で追加のアネロベクターを産生することができないアネロベクター）を作り出す。

【０２３１】

発現カセット

一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物（例えば、バクミド又はドナーベクター）は、ポリペプチド又はノンコーディングＲＮＡ（例えば、ｍｉＲＮＡ若しくはｓｉＲＮＡ）の発現のための１つ又は複数のカセットを含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、エフェクター（例えば、外性若しくは内在性エフェクター）、例えば、本明細書に記載されるポリペプチド又はノンコーディングＲＮＡの発現のためのカセットを含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、若しくはＯＲＦ１／２、又はその機能性断片）の発現のためのカセットを含む。発現カセットは、一部の実施形態では、遺伝子エレメント配列内に位置し得る。複数の実施形態では、エフェクターのための発現カセットは、遺伝子エレメント配列内に位置する。複数の実施形態では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質のための発現カセットは、遺伝子エレメント配列内に位置する。他の実施形態では、発現カセットは、遺伝子エレメントの配列の外側の遺伝子エレメント構築物内の位置に（例えば、骨格中に）配置されている。複数の実施形態では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質のための発現カセットは、遺伝子エレメントの配列の外側の遺伝子エレメント構築物内の位置に（例えば、骨格中に）配置されている。

【０２３２】

ポリペプチド発現カセットは、一般に、プロモーターとポリペプチド、例えば、エフェクター（例えば、本明細書に記載される外性若しくは内在性エフェクター）又はアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質をコード化するコード配列（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、若しくはＯＲＦ１／２、又はその機能性断片をコード化する配列）と、を含む。ポリペプチド発現カセット中に含まれ得る（例えば、ポリペプチドの発現を駆動するために）例示的なプロモーターとしては、構成的プロモーター（例えば、ＣＭＶ、ＲＳＶ、ＰＧＫ、ＥＦ１ａ、又はＳＶ４０）、細胞若しくは組織特異的プロモーター（例えば、骨格筋α－アクチンプロモーター、ミオシン軽鎖２Ａプロモーター、ジストロフィンプロモーター、筋クレアチンキナーゼプロモーター、肝臓アルブミンプロモーター、Ｂ型肝炎ウイルスコアプロモーター、オステオカルシンプロモーター、骨シアロタンパク質プロモーター、ＣＤ２プロモーター、免疫グロブリン重鎖プロモーター、Ｔ細胞受容体ａ鎖プロモーター、ニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）プロモーター、又はニューロフィラメント軽鎖プロモーター）、並びに誘導性プロモーター（例えば、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオニン（ＭＴ）プロモーター；デキサメタゾン（Ｄｅｘ）誘導性マウス乳腺腫瘍ウイルス（ＭＭＴＶ）プロモーター；Ｔ７ポリメラーゼプロモーター系、テトラサイクリン抑制性系、テトラサイクリン誘導性系、ＲＵ４８６誘導性系、ラパマイシン誘導性系）、例えば、本明細書に記載されるものなどが挙げられるが、これらに限定されない。一部

の実施形態では、発現カセットは、例えば、本明細書に記載されるようなエンハンサーを更に含む。

【０２３３】

遺伝子エレメント構築物の設計及び産生

遺伝子エレメント構築物（例えば、バクミド又はドナーベクター）を合成するための様々な方法が利用可能である。例えば、遺伝子エレメント構築物の配列は、合成するのが容易であるより小さな重複片（例えば、約１００ｂｐ～約１０ｋｂの範囲のセグメント又は個々のＯＲＦ）に分割され得る。これらのＤＮＡセグメントは、重複一本鎖オリゴヌクレオチドのセットから合成される。得られた重複シントン（ｓｙｎｔｈｏｎｓ）は、次いで、ＤＮＡのより大きな片、例えば、遺伝子エレメント構築物にアセンブルされる。セグメント又はＯＲＦは、例えば、インビトロ組換え又はライゲーションを可能にするための５’及び３’末端でのユニークな制限部位によって遺伝子エレメント構築物にアセンブルされ得る。

【０２３４】

遺伝子エレメント構築物は、構築物配列をオリゴ長断片にパースし、配列空間の複雑さを考慮に入れる合成のための好適な設計条件を作り出す設計アルゴリズムを用いて合成することができる。次いで、オリゴは、半導体ベースの高密度チップ上で化学合成され、ここでは、チップ当たり２００，０００を超える個々のオリゴが合成される。オリゴは、ＢｉｏＦａｂ（登録商標）などのアセンブリ技法を用いてアセンブルされ、より小さなオリゴからより長いＤＮＡセグメントを構築する。これは、並行して行われるため、数百から数千の合成ＤＮＡセグメントが一度に構築される。

【０２３５】

各遺伝子エレメント構築物又は遺伝子エレメント構築物のセグメントは、配列確認され得る。一部の実施形態では、ＲＮＡ又はＤＮＡのハイスループットシーケンシングは、生物学的工程（例えば、ｍｉＲＮＡ発現又は対立遺伝子変動性（ＳＮＰ検出））の監視を可能にする、ＡｎｙＤｏｔ．チップ（Ｇｅｎｏｖｏｘｘ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して行うことができる。他のハイスループットシーケンシングシステムとしては、Ｖｅｎｔｅｒ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ １６ Ｆｅｂ．２００１；Ａｄａｍｓ，Ｍ．ｅｔ ａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４ Ｍａｒ．２０００；及びＭ．Ｊ，Ｌｅｖｅｎｅ，ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９９：６８２－６８６，Ｊａｎｕａｒｙ ２００３；並びに米国特許出願公開第２００３００４４７８１号明細書、及び同第２００６／００７８９３７号明細書に開示されるものが挙げられる。全体としてそのようなシステムは、核酸の分子に対して測定される重合配列を介しての塩基の一時的付加によって、複数の塩基を有する標的核酸分子を配列決定することを伴い、すなわち、核酸重合酵素の配列決定される鋳型核酸分子に対する活性は、リアルタイムで監視される。一部の実施形態では、ショットガンシーケンシングが実施される。

【０２３６】

遺伝子エレメント構築物は、複製又はパッケージングのための因子が遺伝子エレメントに対してｃｉｓ若しくはｔｒａｎｓで供給され得るように設計することができる。例えば、ｃｉｓで供給される場合、遺伝子エレメントは、本明細書に記載されるような、１つ又は複数の、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、若しくはＯＲＦ２ｔ／３をコード化する遺伝子を含み得る。一部の実施形態では、複製及び／又はパッケージングシグナルは、例えば、増幅及び／又は包膜（ｅｎｃａｐｓｕｌａｔｉｏｎ）を誘導するために、遺伝子エレメント中に組み込まれ得る。一部の実施形態では、エフェクターは、ゲノム内の特定の部位に挿入される。一部の実施形態では、１つ又は複数のウイルスＯＲＦは、エフェクターで置き換えられる。

【０２３７】

別の例では、複製又はパッケージング因子がｔｒａｎｓで供給される場合、遺伝子エレメントは、例えば、本明細書に記載されるようなアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕ

ｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、若しくはＯＲＦ２ｔ／３のうちの１つ又は複数をコード化する遺伝子を欠く可能性があり、このタンパク質は、例えば、別の核酸、例えば、ヘルパー核酸によって供給されてもよい。一部の実施形態では、最小限のｃｉｓシグナル（例えば、５’ＵＴＲ及び／又はＧＣリッチ領域）が遺伝子エレメント内に存在する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、複製又はパッケージング因子（例えば、レプリカーゼ及び／又はキャプシドタンパク質）をコード化しない。そのような因子は、一部の実施形態では、１つ又は複数のヘルパー核酸（例えば、ヘルパーウイルス核酸、ヘルパープラスミド、又は宿主細胞ゲノム中に組み込まれたヘルパー核酸）によって供給され得る。一部の実施形態では、ヘルパー核酸は、増幅及び／又はパッケージングを誘導するのに十分なタンパク質及び／又はＲＮＡを発現するが、それら自体のパッケージングシグナルを欠如し得る。一部の実施形態では、遺伝子エレメント及びヘルパー核酸は、宿主細胞中に導入され（例えば、同時に若しくは順次に）、遺伝子エレメントの増幅及び／又はパッケージングをもたらすが、ヘルパー核酸の増幅及び／又はパッケージングはもたらさない。

【０２３８】

一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、コンピュータ支援設計ツールを使用して設計されてもよい。

【０２３９】

構築物を作製する一般的な方法は、例えば、Ｋｈｕｄｙａｋｏｖ　＆　Ｆｉｅｌｄｓ，Ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ　ＤＮＡ：Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ（２００２）；ｉｎ　Ｚｈａｏ，Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ｔｏｏｌｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，（Ｆｉｒｓｔ　Ｅｄｉｔｉｏｎ），Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ　（２０１３）；及びＥｇｌｉ　＆　Ｈｅｒｄｅｗｉｊｎ，Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｎｄ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　ｏｆ　Ａｒｔｉｆｉｃｉａｌ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ，（Ｆｉｒｓｔ　Ｅｄｉｔｉｏｎ），Ｗｉｌｅｙ－ＶＣＨ（２０１２）に記載されている。

【０２４０】

エフェクター

本明細書に記載の組成物（例えば、バクミド、ドナーベクター、細胞、並びにバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ））及び方法は、例えば、本明細書に記載されるような、エフェクター（例えば、外性エフェクター若しくは内在性エフェクター）をコード化する配列を含むアネロベクターの遺伝子エレメントを産生するために使用することができる。エフェクターは、場合によっては、内在性エフェクター若しくは外因エフェクターであり得る。一部の実施形態では、エフェクターは、治療用エフェクターである。一部の実施形態では、エフェクターは、ポリペプチド（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、治療用ポリペプチド若しくはペプチド）を含む。一部の実施形態では、エフェクターは、ノンコーディングＲＮＡ（例えば、ｍｉＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、ＲＮＡ、ＤＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、又はｇＲＮＡ）を含む。一部の実施形態では、エフェクターは、調節核酸、例えば、本明細書に記載されるようなものを含む。

【０２４１】

一部の実施形態では、エフェクターコード化配列は、例えば、ノンコーディング領域で、例えば、オープンリーディングフレームの３’及び遺伝子エレメントのＧＣリッチ領域の５’に配置されたノンコーディング領域で、ＴＡＴＡボックスの上流の５’ノンコーディング領域において、５’ＵＴＲにおいて、ポリ－Ａシグナルの下流の、若しくはＧＣリッチ領域の上流の３’ノンコーディング領域において、遺伝子エレメント中に挿入され得る。一部の実施形態では、エフェクターコード化配列は、例えば、コード配列において（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、及び／又はＯＲＦ２ｔ／３をコード化する配列において）、遺伝子エレメント中に挿入され

得る。一部の実施形態では、エフェクターコード化配列は、オープンリーディングフレームの全部又は一部に置き換わる。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、エフェクターコード化配列に作動可能に連結された調節配列（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、プロモーター若しくはエンハンサー）を含む。

【０２４２】

一部の実施形態では、エフェクターを含む遺伝子エレメントは、本明細書に記載される遺伝子エレメント構築物（例えば、バクミド）から、例えば、その上に配置された遺伝子エレメント配列のローリングサークル複製によって産生される。一部の実施形態では、バクミドは、エフェクターコード化配列の１つのコピーを含む。一部の実施形態では、バクミドは、１つ又は複数の（例えば、１、２、３、４、５、若しくは全部の）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦタンパク質（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、若しくはＯＲＦ１／２）、又はその機能性断片をコード化する配列を含む。一部の実施形態では、バクミドは、１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦタンパク質（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、若しくはＯＲＦ１／２）、又はその機能性断片をコード化する配列を含まない。複数の実施形態では、バクミドは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦタンパク質又はその機能性断片をコード化するいかなる配列も含まない。

【０２４３】

宿主細胞

本明細書に記載のアネロベクターは、例えば、宿主細胞（例えば、昆虫細胞、例えば、Ｓｆ９細胞）中で産生され得る。一般に、アネロベクター遺伝子エレメントとアネロベクタータンパク質性外層の構成体（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸によってコード化されるポリペプチド又はアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子）とを含む宿主細胞が提供される。一部の実施形態では、宿主細胞は、アネロベクタータンパク質性外層の構成体のうちの１つ又は複数をコード化するバクミドを含む。複数の実施形態では、アネロベクタータンパク質性外層の構成体は、バクミドから宿主細胞中で発現される。一部の実施形態では、宿主細胞は、アネロベクター遺伝子エレメントの配列を含むバクミド（例えば、同じバクミド又は異なるバクミド）を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメントは、その配列を含むバクミドから産生される。次いで、宿主細胞は、遺伝子エレメントのタンパク質性外層内の閉じ込めに好適な条件下で（例えば、本明細書に記載される培養条件で）インキュベートされる。一部の実施形態では、宿主細胞は、アネロベクターの宿主細胞からの放出、例えば、周辺の上清中への放出に好適な条件下で更にインキュベートされる。一部の実施形態では、宿主細胞は、細胞溶解物からのアネロベクターの採取のために溶解される。一部の実施形態では、アネロベクターは、高い細胞密度まで増殖された宿主細胞株に導入され得る。

【０２４４】

遺伝子エレメントの宿主細胞中への導入

遺伝子エレメント、又は遺伝子エレメントの配列を含む核酸構築物は、宿主細胞（例えば、昆虫細胞、例えば、Ｓｆ９細胞）、例えば、アネロベクタータンパク質性外層の１つ又は複数の構成体（例えば、ＯＲＦ１分子又はその機能性断片）を含む宿主細胞中に導入され得る。一部の実施形態では、遺伝子エレメントそれ自体が、宿主細胞中に導入される。一部の実施形態では、遺伝子エレメントの配列を含む遺伝子エレメント構築物（例えば、本明細書に記載されるような）が宿主細胞中に導入される。遺伝子エレメント又は遺伝子エレメント構築物は、例えば、当該技術分野において既知の方法を使用して、宿主細胞中に導入することができる。例えば、遺伝子エレメント又は遺伝子エレメント構築物は、トランスフェクション（例えば、安定なトランスフェクション又は一過性トランスフェクション）によって、宿主細胞中に導入することができる。複数の実施形態では、遺伝子エレメント又は遺伝子エレメント構築物は、リポフェクタミントランスフェクションによって宿主細胞中に導入される。複数の実施形態では、遺伝子エレメント又は遺伝子エレメン

ト構築物は、リン酸カルシウムトランスフェクションによって宿主細胞中に導入される。一部の実施形態では、遺伝子エレメント又は遺伝子エレメント構築物は、エレクトロポレーションによって宿主細胞中に導入される。一部の実施形態では、遺伝子エレメント又は遺伝子エレメント構築物は、遺伝子銃を使用して宿主細胞中に導入される。一部の実施形態では、遺伝子エレメント又は遺伝子エレメント構築物は、ヌクレオフェクションによって宿主細胞中に導入される。一部の実施形態では、遺伝子エレメント又は遺伝子エレメント構築物は、ＰＥＩトランスフェクションによって宿主細胞中に導入される。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、宿主細胞を、遺伝子エレメントを含むアネロベクターと接触させることによって、宿主細胞中に導入される。

【０２４５】

複数の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、宿主細胞中に導入されると、複製することができる。複数の実施形態では、遺伝子エレメントは、宿主細胞中に導入されると、遺伝子エレメント構築物から産生され得る。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、例えば、遺伝子エレメント構築物を鋳型として使用して、ポリメラーゼにより宿主細胞中で産生される。

【０２４６】

一部の実施形態では、遺伝子エレメント又は遺伝子エレメントを含むベクターは、アネロベクターの発現を達成するために、ウイルスポリメラーゼタンパク質を発現する細胞株中に導入される（例えば、トランスフェクトされる）。この目的のために、アネロベクターポリメラーゼタンパク質を発現する細胞株が、適切な宿主細胞として利用され得る。宿主細胞は、他のウイルス機能又は追加の機能を提供するために同様に操作されてもよい。

【０２４７】

本明細書に開示されるアネロベクターを調製するために、遺伝子エレメント構築物を用いて、複製及び産生に必要なアネロベクタータンパク質並びに機能を提供する宿主細胞をトランスフェクトすることができる。或いは、宿主細胞は、本明細書に開示される遺伝子エレメント又は遺伝子エレメントを含むベクターによるトランスフェクション前に、トランスフェクション中に、又はトランスフェクション後にアネロベクタータンパク質並びに機能を提供する第２の構築物（例えば、バクミド）でトランスフェクトされてもよい。一部の実施形態では、第２の構築物は、不完全なウイルス粒子の補完産生に有用であり得る。第２の構築物（例えば、バクミド）は、例えば、その後の遺伝子導入体ウイルスの選択を可能にする、宿主域制限又は温度感受性などの条件付き増殖欠陥を有し得る。一部の実施形態では、第２の構築物は、アネロベクターの発現を達成するために、宿主細胞によって利用される１つ又は複数の複製タンパク質を提供し得る。一部の実施形態では、宿主細胞は、１つ又は複数の複製タンパク質などのウイルスタンパク質をコード化するベクターでトランスフェクトされ得る。一部の実施形態では、第２の構築物は、抗ウイルス感受性を含む。

【０２４８】

本明細書に開示される遺伝子エレメント又は遺伝子エレメントを含むベクターは、場合によっては、当該技術分野において既知の技術を使用して複製され、アネロベクターに産生することができる。例えば、様々なウイルス培養法は、例えば、米国特許第４，６５０，７６４号明細書；米国特許第５，１６６，０５７号明細書；米国特許第５，８５４，０３７号明細書；欧州特許公開第ＥＰ０７０２０８５Ａ１号明細書；米国特許出願第０９／１５２，８４５号明細書；ＰＣＴ９７／１２０３２号；同第９６／３４６２５号；欧州特許公開第ＥＰ－Ａ７８０４７５号明細書；９９／０２６５７号；同第９８／５３０７８号；同第９８／０２５３０号；同第９９／１５６７２号；同第９８／１３５０１号；同第９７／０６２７０号；及びＥＰＯ７８０４７ＳＡ１に記載されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【０２４９】

アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質をｃｉｓ又はｔｒａｎｓで提供するための方法

一部の実施形態（例えば、本明細書に記載のｃｉｓ実施形態）では、遺伝子エレメント構築物（例えば、バクミド）は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、若しくはＯＲＦ１／２、又はその機能性断片）のためのコード配列を含む１つ又は複数の発現カセットを更に含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片のためのコード配列を含む発現カセットを含む。エフェクター並びに１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦのための発現カセットを含むそのような遺伝子エレメント構築物は、宿主細胞中に導入され得る。そのような遺伝子エレメント構築物を含む宿主細胞（例えば、昆虫細胞、例えばＳｆ９細胞）は、場合によっては、追加の核酸構築物又は宿主細胞ゲノム中への発現カセットの組み込みを必要とすることなく、遺伝子エレメント及びタンパク質性外層のための構成体、並びにタンパク質性外層内の遺伝子エレメントの閉じ込めのための構成体を産生することができる。言い換えれば、そのような遺伝子エレメント構築物は、例えば、本明細書に記載されるように、宿主細胞におけるｃｉｓアネロベクター産生方法に使用することができる。

【０２５０】

一部の実施形態（例えば、本明細書に記載のｔｒａｎｓ実施形態）では、遺伝子エレメント構築物は、１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、若しくはＯＲＦ１／２、又はその機能性断片）のためのコード配列を含む発現カセットを含まない。複数の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、バクミドである。複数の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、バクミドではない。複数の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片のためのコード配列を含む発現カセットを含まない。エフェクターのための発現カセットを含むが、１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片）のための発現カセットを欠くそのような遺伝子エレメント構築物は、宿主細胞中に導入され得る。そのような遺伝子エレメント構築物を含む宿主細胞は、場合によっては、アネロベクターの１つ又は複数の構成体（例えば、タンパク質性外層タンパク質）の産生のために、追加の核酸構築物又は宿主細胞ゲノムへの発現カセットの組み込みを必要とする。一部の実施形態では、そのような遺伝子エレメント構築物を含む宿主細胞（例えば、昆虫細胞、例えば、Ｓｆ９細胞）は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子をコード化する追加の核酸構築物の非存在下では、遺伝子エレメントをタンパク質性外層内に閉じ込めることができない。言い換えれば、そのような遺伝子エレメント構築物は、例えば、本明細書に記載されるように宿主細胞におけるｔｒａｎｓアネロベクター産生方法に使用することができる。

【０２５１】

ヘルパー

一部の実施形態では、ヘルパー構築物は、宿主細胞（例えば、本明細書に記載される遺伝子エレメント構築物又は遺伝子エレメントを含む宿主細胞）、例えば、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）中に導入される。一部の実施形態では、ヘルパー構築物は、遺伝子エレメント構築物の導入の前に、宿主細胞中に導入される。一部の実施形態では、ヘルパー構築物は、遺伝子エレメント構築物の導入と同時に、宿主細胞中に導入される。一部の実施形態では、ヘルパー構築物は、遺伝子エレメント構築物の導入後に、宿主細胞中に導入される。

【０２５２】

例示的な細胞型

アネロベクターの産生に好適な例示的な宿主細胞としては、例えば、本明細書に記載さ

れるような、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞、Ｓｆ２１細胞、又はＨｉ５細胞）が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、昆虫細胞は、ボンビックス・モリ（Ｂｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉ）、ヨトウガ（Ｍａｍｅｓｔｒａ　ｂｒａｓｓｉｃａｅ）、ツマジロクサヨトウ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）、イラクサギンウワバ（Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉ）、又はキイロショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ）に由来する。

【０２５３】

一部の実施形態では、アネロベクターは、連続昆虫細胞株（例えば、連続的に増殖可能である不死化細胞株）中で培養される。

【０２５４】

培養条件

遺伝子エレメント及びタンパク質性外層の構成体を含む宿主細胞（例えば、昆虫細胞、例えば、Ｓｆ９細胞）は、遺伝子エレメントのタンパク質性外層の閉じ込めに好適な条件下でインキュベートされ、それによってアネロベクターを産生することができる。好適な培養条件には、例えば、実施例１、９～１１、及び１３～１５に記載されるものが挙げられる。一部の実施形態では、宿主細胞は、液体培地（例えば、グレースサプリメント含有培地（ＴＮＭ－ＦＨ）、ＩＰＬ－４１、ＴＣ－１００、シュナイダーショウジョウバエ培地、ＳＦ－９００　ＩＩ　ＳＦＭ、又は及びＥＸＰＲＥＳＳ－ＦＩＶＥ（商標）ＳＦＭ）中でインキュベートされる。一部の実施形態では、宿主細胞は、接着培養中でインキュベートされる。一部の実施形態では、宿主細胞は、浮遊培養中でインキュベートされる。一部の実施形態では、宿主細胞は、チューブ、ボトル、マイクロキャリア、又はプラスコ中でインキュベートされる。一部の実施形態では、宿主細胞は、皿又はウェル（例えば、プレート上のウェル）中でインキュベートされる。一部の実施形態では、宿主細胞は、宿主細胞の増殖に好適な条件下でインキュベートされる。一部の実施形態では、宿主細胞は、宿主細胞中で産生されたアネロベクターを周辺の上清中に放出するために、宿主細胞に好適な条件下でインキュベートされる。

【０２５５】

本発明によるアネロベクター含有細胞培養物の産生は、異なるスケールで（例えば、フラスコ、ローラーボトル、又はバイオリアクター中で）行うことができる。感染される細胞の培養に使用される培地は、一般に、細胞生存能力に必要な標準栄養素を含むがまた、細胞型に依存する追加の栄養素を含んでもよい。任意選択で、培地は、無タンパク質及び／又は無血清であり得る。細胞型に応じて、細胞は、浮遊状態で又は基材上で培養され得る。一部の実施形態では、異なる培地が宿主細胞の増殖のために、またアネロベクターの産生のために使用される。

【０２５６】

採取

宿主細胞（例えば、昆虫細胞、例えば、Ｓｆ９細胞）によって産生されたアネロベクターは、例えば、当該技術分野において既知の方法に従って採取することができる。例えば、培養中で宿主細胞によって周辺の上清中に放出されたアネロベクターは、上清から採取することができる（例えば、実施例１０に記載されるように）。一部の実施形態では、上清は、宿主細胞から分離されてアネロベクターを得る。一部の実施形態では、宿主細胞は、採取前に又は採取中に溶解される。一部の実施形態では、アネロベクターは、宿主細胞溶解物から採取される（例えば、実施例１６に記載されるように）。一部の実施形態では、アネロベクターは、宿主細胞溶解物及び上清の両方から採取される。一部の実施形態では、アネロベクターの精製及び単離は、例えば、Ｒｉｎａｌｄｉ，ｅｔ　ａｌ．，ＤＮＡ　Ｖａｃｃｉｎｅｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ），３ｒｄ　ｅｄ．２０１４，Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているように、ウイルス産生における既知の方法に従って実施される。一部の実施形態では、アネロベクターは、医薬品賦形剤との製剤化の前に、生物物理学的性質に基づく溶質の分離、例えば

、イオン交換クロマトグラフィー又はタンジェンシャルフロー濾過によって採取及び／又は精製され得る。

【０２５７】

濃縮及び精製

採取されたアネロベクターは、例えば、アネロベクター調製物を作り出すために精製及び／又は濃縮され得る。一部の実施形態では、採取されたアネロベクターは、例えば、ウイルス粒子を精製するための当該技術分野において既知の方法（例えば、沈降、クロマトグラフィー、及び／又は限外濾過による精製）を使用して、採取溶液中に存在する他の構成成分又は汚染物資から単離される。一部の実施形態では、精製ステップは、血清、宿主細胞ＤＮＡ、宿主細胞タンパク質、遺伝子エレメントを欠く粒子、及び／又は調製物からのフェノールレッドのうちの１つ又は複数を除去するステップを含む。一部の実施形態では、採取されたアネロベクターは、例えば、ウイルス粒子を濃縮するために、当該技術分野において既知の方法を使用して、採取溶液中に存在する他の構成成分又は汚染物質に対して濃縮される。

【０２５８】

一部の実施形態では、得られた調製物又は調製物を含む医薬組成物は、許容される期間及び温度で安定しており、且つ／又は所望の投与経路及び／又はこの投与経路が必要とする任意のデバイス、例えば、注射針若しくは注射器と適合性である。

【０２５９】

ＩＩ．アネロベクター

一部の態様では、本明細書に記載される本発明は、組成物並びにアネロベクター、アネロベクター調製物、及び治療用組成物の使用及び作製方法を含む。一部の実施形態では、アネロベクターは、本明細書に記載されるバクミドを使用して作製される。ある特定の実施形態では、アネロベクターの遺伝子エレメントである。一部の実施形態では、アネロベクターは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ））、或いは他の実質的に非病原性のウイルス、例えば、共生ウイルス、片利共生ウイルス、ネイティブウイルスをベースとする配列、構造、及び／又は機能を含む１つ又は複数の核酸若しくはポリペプチド、又はその断片若しくは一部を含む。一部の実施形態では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ベースのアネロベクターは、そのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）に対して外性の少なくとも１つのエレメント、例えば、外性エフェクター又はアネロベクターの遺伝子エレメント内に配置される外性エフェクターをコード化する核酸配列を含む。一部の実施形態では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ベースのアネロベクターは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）由来の別のエレメントとは異種の少なくとも１つのエレメント、例えば、別の連結核酸配列に対して異種であるエフェクターコード化核酸配列、例えば、プロモーターエレメントなどを含む。一部の実施形態では、アネロベクターは、遺伝子エレメント（例えば、環状ＤＮＡ、例えば、一本鎖ＤＮＡ）を含み、これは遺伝子エレメントの残り及び／又はタンパク質性外層（例えば、本明細書に記載される、例えば、エフェクターをコード化する外性エレメント）に対して異種である少なくとも１つのエレメントを含む。アネロベクターは、宿主、例えば、ヒトへのペイロードの送達ビヒクル（例えば、実質的に非病原性送達ビヒクル）であってもよい。一部の実施形態では、アネロベクターは、真核生物細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞中で複製することができる。一部の実施形態では、アネロベクターは、哺乳動物（例えば、ヒト）細胞において、実質的に非病原性であり、且つ／又は実質的に非総合作用性である。一部の実施形態では、アネロベクターは、哺乳動物、例えば、ヒトにおいて、実質的に非免疫原性である。一部の実施形態では、アネロベクターは、複製欠損である。一部の実施形態では、アネロベクターは、複製可能である。

【０２６０】

一部の実施形態では、アネロベクターは、本明細書にその全体が参照により組み込まれる、ＰＣＴ出願番号：ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０３７３７９号明細書に記載されるように

、クロン、又はその構成体（例えば、エフェクターをコード化する配列、及び／又はタンパク質性外層を含む、例えば、遺伝子エレメント）を含む。一部の実施形態では、アネロベクターは、本明細書にその全体が参照により組み込まれる、ＰＣＴ出願番号：ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書に記載されているように、アネロベクター、又はその構成体（例えば、エフェクターをコード化する配列、及び／又はタンパク質性外層を含む、例えば、遺伝子エレメント）を含む。

【０２６１】

一態様では、本発明は、以下：（ｉ）プロモータエレメントと、エフェクター（例えば、内在性エフェクター又は外性エフェクター、例えば、ペイロード）をコード化する配列と、タンパク質結合配列（例えば、外部タンパク質結合配列、例えば、パッケージングシグナル）と、を含む遺伝子エレメントであって、遺伝子エレメントが、一本鎖ＤＮＡであり、さらには、以下の特性：環状である、且つ／又は細胞に進入する遺伝子エレメントの約０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、１．５％、若しくは２％未満の頻度で、真核細胞のゲノム中に組み込まれる、の一方又は両方を有する、遺伝子エレメント；並びに（ｉｉ）タンパク質性外層を含むアネロベクターを含み、ここで、遺伝子エレメントは、タンパク質性外層内に閉じ込められており；且つアネロベクターは、遺伝子エレメントを真核細胞内に送達することができる。

【０２６２】

本明細書に記載されるアネロベクターの一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、細胞に進入する遺伝子エレメントの約０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、１．５％、若しくは２％未満の頻度で組み込まれる。一部の実施形態では、被験者に投与される複数のアネロベクターからの約０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、若しくは５％未満の遺伝子エレメントが、被験者の１つ又は複数の宿主細胞のゲノムに組み込まれる。一部の実施形態では、例えば、本明細書に記載の通り、アネロベクターの集団の遺伝子エレメントは、ＡＡＶウイルスの同等集団の頻度よりも低い頻度で、例えば、ＡＡＶウイルスの同等集団の頻度より約５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％、若しくはそれ以上低い頻度で、宿主細胞のゲノムに組み込まれる。

【０２６３】

一態様では、本発明は、以下：（ｉ）プロモータエレメントと、エフェクター（例えば、内在性エフェクター又は外性エフェクター、例えば、ペイロード）をコード化する配列と、タンパク質結合配列（例えば、外部タンパク質結合配列）と、を含む遺伝子エレメントであって、遺伝子エレメントが、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列（例えば、野生型トルク・テノウイルス（Ｔｏｒｑｕｅ　Ｔｅｎｏ　ｖｉｒｕｓ）（ＴＴＶ）、トルク・テノミニウイルス（Ｔｏｒｑｕｅ　Ｔｅｎｏ　ｍｉｎｉ　ｖｉｒｕｓ）（ＴＴＭＶ）、又はＴＴＭＤＶ配列、例えば、本明細書に記載の野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列）に対して少なくとも７５％（例えば、少なくとも７５、７６、７７、７８、７９、８０、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、若しくは１００％）の配列同一性を有する遺伝子エレメント：及び（ｉｉ）タンパク質性外層を含むアネロベクターを含み、ここで、遺伝子エレメントは、タンパク質性外層内に閉じ込められており；且つアネロベクターは、遺伝子エレメントを真核細胞内に送達することができる。

【０２６４】

一態様では、本発明は、以下：

ａ）（ｉ）非病原性外部タンパク質をコード化する配列と、（ｉｉ）非病原性外部タンパク質に遺伝子エレメントを結合させる外部タンパク質結合配列と、（ｉｉｉ）エフェクター（例えば、内在性又は外性エフェクター）をコード化する配列と、を含む遺伝子エレメント；及び

ｂ）遺伝子エレメントと結合される、例えば、これを包膜又は閉じ込めるタンパク質性外層

を含むアネロベクターを含む。

【０２６５】

一部の実施形態では、アネロベクターは、非包膜、環状、一本鎖ＤＮＡウイルス由来の（又はそれに対して＞７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％、１００％の相同性を有する）配列若しくは発現産物を含む。動物環状一本鎖ＤＮＡウイルスは、一般に、真核非植物宿主に感染し、環状ゲノムを有する一本鎖ＤＮＡ（ｓｓＤＮＡ）の亜群を指す。従って、動物環状ｓｓＤＮＡウイルスは、原核生物に感染するｓｓＤＮＡウイルス（すなわち、ミクロウイルス科（Ｍｉｃｒｏｖｉｒｉｄａｅ）及びイノウイルス科（Ｉｎｏｖｉｒｉｄａｅ））、並びに植物に感染するｓｓＤＮＡウイルス（すなわち、ジェミニウイルス科（Ｇｅｍｉｎｉｖｉｒｉｄａｅ）及びナノウイルス科（Ｎａｎｏｖｉｒｉｄａｅ））から識別可能である。これらはまた、非植物真核細胞に感染する線状ｓｓＤＮＡウイルス（すなわち、パルボウイルス科（Ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅ））からも識別可能である。

【０２６６】

一部の実施形態では、アネロベクターは、宿主細胞の機能を例えば、一過性又は長期に調節する。いくつかの実施形態では、細胞の機能は安定に改変され、例えば、調節は少なくとも約１時間～約３０日、又は少なくとも約２時間、６時間、１２時間、１８時間、２４時間、２日、３日、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、１４日、１５日、１６日、１７日、１８日、１９日、２０日、２１日、２２日、２３日、２４日、２５日、２６日、２７日、２８日、２９日、３０日、６０日、若しくはそれ以上又はこれらの間の任意の時間にわたって持続する。いくつかの実施形態では、細胞の機能は、一過性改変され、例えば、調節は、約３０分～約７日以下、又は約１時間、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１３時間、１４時間、１５時間、１６時間、１７時間、１８時間、１９時間、２０時間、２１時間、２２時間、２４時間、３６時間、４８時間、６０時間、７２時間、４日、５日、６日、７日以下、又はこれらの間の任意の時間にわたって持続する。

【０２６７】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、プロモータエレメントを含む。複数の実施形態では、プロモータエレメントは、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ依存性プロモータ、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ依存性プロモータ、ＰＧＫプロモータ、ＣＭＶプロモータ、ＥＦ－１αプロモータ、ＳＶ４０プロモータ、ＣＡＧＧプロモータ、又はＵＢＣプロモータ、ＴＴＶウイルスプロモータ、アクチベータタンパク質（ＴｅｔＲ－ＶＰ１６、Ｇａｌ４－ＶＰ１６、ｄＣａｓ９－ＶＰ１６など）の上流ＤＮＡ結合部位を有する組織特異的、Ｕ６（ｐｏｌｌＩＩＩ）、最小ＣＭＶプロモータから選択される。複数の実施形態では、プロモータエレメントは、ＴＡＴＡボックスを含む。複数の実施形態では、プロモータエレメントは、例えば、本明細書に記載される野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）に対して内在性である。

【０２６８】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、以下の特徴：一本鎖、環状、マイナス鎖、及び／又はＤＮＡのうち１つ又は複数を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメントは、エピソームを含む。一部の実施形態では、エフェクターを除く遺伝子エレメントの部分は、約２．５～５ｋｂ（例えば、約２．８～４ｋｂ、約２．８～３．２ｋｂ、約３．６～３．９ｋｂ、又は約２．８～２．９ｋｂ）、約５ｋｂ未満（例えば、約２．９ｋｂ、３．２ｋｂ、３．６ｋｂ、３．９ｋｂ、若しくは４ｋｂ未満）、又は少なくとも１００ヌクレオチド（例えば、少なくとも１ｋｂ）の合計サイズを有する。

【０２６９】

本明細書に記載されるアネロベクター、アネロベクターを含む組成物、こうしたアネロベクターを使用する方法などは、一部の事例において、異なるエフェクター、例えば、ｍｉＲＮＡ（例えば、ＩＦＮ若しくはｍｉＲ－６２５に対する）、ｓｈＲＮＡなどと、タンパク質結合配列、例えば、Ｑ９９１５３などのキャプシドタンパク質に結合するＤＮＡ配

列を、タンパク質性外層、例えば、Ａｒｃｈ　Ｖｉｒｏｌ（２００７）１５２：１９６１－１９７５に開示されるキャプシドと組み合わせて、アネロベクターを産生させる（次に、これは、エフェクターを細胞（例えば、動物細胞、例えば、ヒト細胞又はブタ若しくはマウス細胞などのヒト以外の細胞）に送達するために使用することができる）方法を説明する実施例に部分的に基づく。複数の実施形態では、エフェクターは、インターフェロンなどの因子の発現を抑制することができる。実施例はさらに、いかにして、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）由来の配列にエフェクターを挿入することにより、アネロベクターを製造することができるかも説明する。これらの実施例に基づいて、以下の説明は、特定の知見の様々な変形及び実施例で検討される組合せを考慮する。例えば、当業者は、実施例から、特定のｍｉＲＮＡがエフェクターのほんの１例として使用されること、及びその他のエフェクターが、例えば、他の調節核酸又は治療用ペプチドであってもよいことを理解されるであろう。同様に、本実施例で使用される特定のキャプシドの代わりに、本明細書に後述する実質的に非病原性のタンパク質を使用してもよい。また、本実施例に記載する特定のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列の代わりに、本明細書に後述するアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列を使用してもよい。これらの検討事項は、タンパク質結合配列、プロモータなどの調節配列などにも同様に適用される。それらから独立に、当業者は、本実施例に密接に関連するこうした実施形態を特に考慮するであろう。

【０２７０】

一部の実施形態では、アネロベクター、又はアネロベクターに含まれる遺伝子エレメントを細胞（例えば、ヒト細胞）に導入する。一部の実施形態では、例えば、アネロベクター又は遺伝子エレメントが細胞に一旦導入されると、例えば、アネロベクターの遺伝子エレメントによりコード化されたエフェクター（例えば、ＲＮＡ、例えば、ｍｉＲＮＡ）は、細胞（例えば、ヒト細胞）において発現される。一部の実施形態では、アネロベクター、又はそこに含まれる遺伝子エレメントの細胞への導入は、例えば、細胞による標的分子の発現レベルを改変することによって、細胞中の標的分子（例えば、標的核酸、例えば、ＲＮＡ、若しくは標的ポリペプチド）のレベルを調節（例えば、増大若しくは低減）する。複数の実施形態では、アネロベクター、又はそこに含まれる遺伝子エレメントの導入は、細胞により産生されたインターフェロンのレベルを低減する。一部の実施形態では、アネロベクター、又はそこに含まれる遺伝子エレメントの細胞への導入は、細胞の機能を調節（例えば、増大若しくは低減）する。複数の実施形態では、アネロベクター、又はそこに含まれる遺伝子エレメントの細胞への導入は、細胞の生存能を調節（例えば、増大若しくは低減）する。複数の実施形態では、アネロベクター、又はそこに含まれる遺伝子エレメントの細胞への導入は、細胞（例えば、癌細胞）の生存能を低減する。

【０２７１】

一部の実施形態では、本明細書に記載のアネロベクター（例えば、合成アネロベクター）は、７０％未満の抗体陽性率（例えば、約６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、若しくは１０％未満の抗体陽性率）を誘導する。複数の実施形態では、抗体陽性率は、当技術分野で公知の方法に従って測定される。複数の実施形態では、抗体陽性率は、例えば、Ｔｓｕｄａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９；Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　７７：１９９－２０６；参照により本明細書に組み込まれる）に記載される抗ＴＴＶ抗体検出法及び／又はＫａｋｋｏｌａ　ｅｔ　ａｌ．（２００８；Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　３８２：１８２－１８９；参照により本明細書に組み込まれる）に記載される抗ＴＴＶ　ＩｇＧ血清陽性率を決定する方法に従って、生体サンプル中のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載の通り）又はそれに基づくアネロベクターに対する抗体を検出することにより測定される。さらに、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）又はそれに基づくアネロベクターに対する抗体は、抗ウイルス抗体を検出するための当技術分野の方法、例えば、Ｃａｌｃｅｄｏ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３；Ｆｒｏｎｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４（３４１）：１－７；参照により本明細書に組み込まれる）に記載される抗ＡＡＶ抗体を検出する方法により検出することもできる。

【０２７２】
一部の実施形態では、複製欠損、複製欠陥、又は複製不全遺伝子エレメントは、遺伝子エレメントの複製に必要な機構又は成分の全てをコード化しない。一部の実施形態では、複製欠損遺伝子エレメントは、複製因子をコード化しない。一部の実施形態では、複製欠損遺伝子エレメントは、１つ若しくは複数のＯＲＦ（例えば、本明細書に記載される、例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、及び／又はＯＲＦ２ｔ／３）をコード化しない。一部の実施形態では、遺伝子エレメントによってコード化されない機構又は成分は、トランスで提供されて（例えば、ヘルパー、例えば、ヘルパーウイルス若しくはヘルパープラスミド、又は宿主細胞に含まれる核酸中にコード化される、例えば、宿主細胞のゲノム中に組み込まれる）、例えば、それにより、遺伝子エレメントは、ｔｒａｎｓで提供された機構又は成分の存在下で複製を経ることができる。

【０２７３】
一部の実施形態では、パッケージング欠損、パッケージング欠陥、又はパッケージング不能遺伝子エレメントは、タンパク質性外層中にパッケージングされることができない（例えば、ここで、タンパク質性外層は、例えば、本明細書に記載のＯＲＦ１核酸によりコード化されるポリペプチドを含む、キャプシド若しくはその部分を含む）。一部の実施形態では、パッケージング欠損遺伝子エレメントは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載される通り）と比較して、１０％未満（例えば、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．１％、０．０１％、若しくは０．００１％未満）の効率でタンパク質性外層中にパッケージングされる。一部の実施形態では、パッケージング欠損遺伝子エレメントは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載される通り）の遺伝子エレメントのパッケージングを可能にする因子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、若しくはＯＲＦ２ｔ／３）の存在下であっても、タンパク質性外層中にパッケージングされることができない。一部の実施形態では、パッケージング欠損遺伝子エレメントは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載される通り）の遺伝子エレメントのパッケージングを可能にする因子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、若しくはＯＲＦ２ｔ／３）の存在下でも、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載される通り）と比較して、１０％未満（例えば、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．１％、０．０１％、若しくは０．００１％未満）の効率でタンパク質性外層中にパッケージングされる。

【０２７４】
一部の実施形態では、パッケージング可能遺伝子エレメントは、タンパク質性外層中にパッケージングされ得る（例えば、ここで、タンパク質性外層は、例えば、本明細書に記載のＯＲＦ１核酸によりコード化されるポリペプチドを含む、キャプシド若しくはその部分を含む）。一部の実施形態では、パッケージング可能遺伝子エレメントは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載される通り）と比較して、少なくとも２０％（例えば、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、若しくはそれ以上）の効率でタンパク質性外層中にパッケージングされる。一部の実施形態では、パッケージング可能遺伝子エレメントは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載される通り）の遺伝子エレメントのパッケージングを可能にする因子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、若しくはＯＲＦ２ｔ／３）の存在下で、タンパク質性外層中にパッケージングされ得る。一部の実施形態では、パッケージング可能遺伝子エレメントは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載される通り）の遺伝子エレメントのパッケージングを可能にする因子（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲ

Ｆ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、若しくはＯＲＦ２ｔ／３）の存在下、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載される通り）と比較して、少なくとも２０％（例えば、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、若しくはそれ以上）の効率でタンパク質性外層中にパッケージングされる。

【０２７５】

アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）

一部の実施形態では、例えば、本明細書に記載のアネロベクターは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）由来の配列又は発現産物を含む。一部の実施形態では、アネロベクターは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）に対して外性の１つ若しくは複数の配列又は発現産物を含む。一部の実施形態では、アネロベクターは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）に対して内在性の１つ若しくは複数の配列又は発現産物を含む。一部の実施形態では、アネロベクターは、アネロベクター中の１つ若しくは複数の他の配列又は発現産物に対して異種である１つ若しくは複数の配列又は発現産物を含む。アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）は一般に、負極性を有する一本鎖環状ＤＮＡゲノムを有する。アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）は、ヒト疾患と関連付けられていない。しかし、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）感染をヒト疾患と関連付ける試みは、対照コホート集団における無症候性アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ウイルス血症の高い発生率、アネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ウイルス科の著しいゲノム多様性、このウイルスをインビトロでの増殖がこれまで不可能であったこと、並びにアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）疾患の動物モデルがないことによって妨げられている（Ｙｚｅｂｅ ｅｔ ａｌ．，Ｐａｎｍｉｎｅｒｖａ Ｍｅｄ．（２００２）４４：１６７－１７７；Ｂｉａｇｉｎｉ，Ｐ．，Ｖｅｔ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．（２００４）９８：９５－１０１）。

【０２７６】

アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）は一般に、口鼻若しくは糞口感染、母子及び／又は子宮感染により伝播されると思われる（Ｇｅｒｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｅｄ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．Ｊ．（２０００）１９：１０７４－１０７７）。感染した人は、場合により、長期（数ヵ月～数年）にわたるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ウイルス血症の特徴を有し得る。ヒトは、２つ以上の遺伝子群又は系統に同時感染する可能性がある（Ｓａｂａｃｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｓｃａｄ．Ｊ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．（２００１）３３：１２１－１２５）。これらの遺伝子群は、感染したヒトにおいて再結合し得ることが示唆されている（Ｒｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔ．（２００３）３１：２２６－２３３）。二本鎖イソ型（複製）中間体が、肝臓、末梢血単核細胞及び骨髄などのいくつかの組織で見出されている（Ｋｉｋｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｖｉｒｏｌ．（２０００）６１：１６５－１７０；Ｏｋａｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．（２００２）２７０：６５７－６６２；Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ－Ｌｎｉｇｏ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．（２０００）１５６：１２２７－１２３４）。

【０２７７】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、アミノ酸配列若しくはその機能性断片、又は本明細書に記載されるアミノ酸配列のいずれか１つ、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）アミノ酸配列に対して、少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有する配列をコード化する核酸配列を含む。

【０２７８】

一部の実施形態では、本明細書に記載のアネロベクターは、例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列、又はその断片に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、

若しくは１００％の配列同一性を有する配列を含む１つ若しくは複数の核酸分子（例えば、本明細書に記載される遺伝子エレメント）を含む。

【０２７９】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるアネロベクターは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）のＴＡＴＡボックス、キャップ部位、開始要素、転写開始部位、５’ＵＴＲ保存ドメイン、ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ２ｔ／３、３オープンリーディングフレーム領域、ポリ（Ａ）シグナル、ＧＣリッチ領域、又はこれらの任意の組合せに対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する配列を含む、１つ又は複数の核酸分子（例えば、本明細書に記載の遺伝子エレメント）を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、キャプシドタンパク質をコード化する配列、例えば、本明細書に記載のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）のいずれかのＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ２ｔ／３配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質（又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片）、又はアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸によってコード化されるポリペプチドに対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むキャプシドタンパク質をコード化する配列を含む。

【０２８０】

複数の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１／１ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１／２ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２／２ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２／３ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２ｔ／３ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＴＡＴＡボックスヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）開始要素ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１のアネロウイルス

（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）転写開始部位ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）５’ＵＴＲ保存ドメインヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）３オープンリーディングフレーム領域ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ポリ（Ａ）シグナルヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＧＣリッチヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【０２８１】

複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１／１ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１／２ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２／２ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２／３ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＴＡＴＡボックスヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）開始要素ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）転写開始部位ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）５’ＵＴＲ保存ドメインヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９

％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）３オープンリーディングフレーム領域ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ポリ（Ａ）シグナルヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＧＣリッチヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【０２８２】

複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１／１ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１／２ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２／２ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２／３ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＴＡＩＰヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＴＡＴＡボックスヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）開始要素ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）転写開始部位ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）５’ＵＴＲ保存ドメインヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）３オープンリーディングフレーム領域ヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％

、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ポリ（Ａ）シグナルヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＧＣリッチヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【０２８３】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、アミノ酸配列をコード化するヌクレオチド配列若しくはその機能性断片、又は本明細書に記載のアミノ酸配列のいずれか１つ、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）アミノ酸配列に対して、少なくとも約６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する配列を含む。

【０２８４】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるアネロベクターは、例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する配列又はその断片を含む１つ又は複数の核酸分子（例えば、本明細書に記載される遺伝子エレメント）を含む。複数の実施形態では、アネロベクターは、表Ａ１～Ｍ２のいずれかに示される配列から選択される核酸配列、又はそれに対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する配列を含む。複数の実施形態では、アネロベクターは、表のいずれか、表Ａ２～Ｍ２のいずれかに示される配列、又はそれに対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する配列を含むポリペプチドを含む。

【０２８５】

一部の実施形態では、本明細書に記載のアネロベクターは、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）のいずれか（例えば、表Ａ～Ｍのいずれかにアノテートした、又はそこに挙げた１配列によりコード化されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列）の１つ又は複数のＴＡＴＡボックス、開始要素、キャップ部位、転写開始部位、５’ＵＴＲ保存ドメイン、ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ２ｔ／３、３オープンリーディングフレーム領域、ポリ（Ａ）シグナル、ＧＣリッチ領域、又はこれらの任意の組合せに対して少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する配列を含む１つ又は複数の核酸分子（例えば、本明細書に記載の遺伝子エレメント）を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、キャプシドタンパク質をコード化する配列、例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）のいずれか（例えば、表Ａ～Ｍのいずれかにアノテートした、又はそこに挙げた１配列によりコード化されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列）のＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ２ｔ／３配列を含む。複数の実施形態では、核酸分子は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１又はＯＲＦ２タンパク質に対して少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列（例えば、表Ａ２、Ｍ２のいずれかに示すＯＲＦ１若しくはＯＲＦ２アミノ酸配列、又は表Ａ１、Ｍ１のいずれかに示す核酸配列によりコード化されるＯＲＦ１若しくはＯＲＦ２アミノ酸配列）を含むキャプシドタンパク質をコード化する配列を含む。複数の実施形態において、核酸分子は、アネロウイルス（

Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質に対して少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列（例えば、表Ａ２、Ｍ２のいずれかに示されるＯＲＦ１アミノ酸配列、又は表Ａ１、Ｍ１のいずれかに示される核酸配列によりコード化されるＯＲＦ１アミノ酸配列）を含むキャプシドタンパク質をコード化する配列を含む。

【０２８６】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるアネロベクターは、キメラアネロベクターである。一部の実施形態では、キメラアネロベクターは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）以外のウイルスからの１つ又は複数のエレメント、ポリペプチド、又は核酸を更に含む。

【０２８７】

複数の実施形態では、キメラアネロベクターは、複数の異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からの配列を含む複数のポリペプチド（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、及び／又はＯＲＦ２ｔ／３）を含む。例えば、キメラアネロベクターは、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＯＲＦ１分子（例えば、Ｒｉｎｇ１　ＯＲＦ１分子、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸配列同一性を有するＯＲＦ１分子）と、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）とは異なるＯＲＦ２分子（例えば、Ｒｉｎｇ２　ＯＲＦ２分子、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸配列同一性を有するＯＲＦ２分子）と、を含んでもよい。別の例では、キメラアネロベクターは、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からの第１のＯＲＦ１分子（Ｒｉｎｇ　ＯＲＦ１分子又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸配列同一性を有するＯＲＦ１分子）と、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）とは異なる第２のＯＲＦ１分子（例えば、Ｒｉｎｇ２　ＯＲＦ１分子、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸配列同一性を有するＯＲＦ１分子）と、を含んでもよい。

【０２８８】

一部の実施形態では、アネロベクターは、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からの少なくとも１つの部分と、異なるウイルス（例えば、本明細書に記載されるような）からの少なくとも１つの部分とを含む、キメラポリペプチド（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、及び／又はＯＲＦ２ｔ／３）を含む。

【０２８９】

一部の実施形態では、アネロベクターは、例えば、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からの少なくとも１つの部分と、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からの少なくとも１つの部分とを含む、キメラポリペプチド（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、及び／又はＯＲＦ２ｔ／３）を含む。複数の実施形態では、アネロベクターは、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からのＯＲＦ１分子の少なくとも１つの部分、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸配列同一性を有するＯＲＦ１分子と、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からのＯＲＦ１分子の少なくとも１つの部分、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸配列同一性を有するＯＲＦ１分

子と、を含むキメラＯＲＦ１分子を含む。複数の実施形態では、キメラＯＲＦ１分子は、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＯＲＦ１ゼリーロールドメイン、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列と、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＯＲＦ１アミノ酸部分配列（例えば、本明細書に記載されるような）、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列と、を含む。複数の実施形態では、キメラＯＲＦ１分子は、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＯＲＦ１アルギニンリッチ領域、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列と、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＯＲＦ１アミノ酸部分配列（例えば、本明細書に記載されるような）、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列と、を含む。複数の実施形態では、キメラＯＲＦ１分子は、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＯＲＦ１超可変ドメイン、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列と、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＯＲＦ１アミノ酸部分配列（例えば、本明細書に記載されるような）、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列と、を含む。複数の実施形態では、キメラＯＲＦ１分子は、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＯＲＦ１　Ｎ２２ドメイン、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列と、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＯＲＦ１アミノ酸部分配列（例えば、本明細書に記載されるような）、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列と、を含む。複数の実施形態では、キメラＯＲＦ１分子は、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＯＲＦ１　Ｃ－末端ドメイン、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列と、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＯＲＦ１アミノ酸部分配列（例えば、本明細書に記載されるような）、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列と、を含む。複数の実施形態では、アネロベクターは、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からのＯＲＦ１／１分子の少なくとも１つの部分、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸同一性を有するＯＲＦ１／１分子と、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からのＯＲＦ１／１分子の少なくとも１つの部分、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸配列同一性を有するＯＲＦ１／１分子と、を含むキメラＯＲＦ１／１分子を含む。複数の実施形態では、アネロベクターは、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からのＯＲＦ１／２分子の少なくとも１つの部分、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸同一性を有するＯＲＦ１／２分子と、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からのＯＲＦ１／２分子の少なくとも１つの部分、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸配列同一性を有するＯＲＦ１／２分子と、を含むキメラＯＲＦ１／２分子を含む。複数の実施形態では、アネロベクターは、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からのＯＲＦ２分子の少な

くとも１つの部分、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸同一性を有するＯＲＦ２分子と、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からのＯＲＦ２分子の少なくとも１つの部分、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸配列同一性を有するＯＲＦ２分子と、を含むキメラＯＲＦ２分子を含む。複数の実施形態では、アネロベクターは、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からのＯＲＦ２／２分子の少なくとも１つの部分、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸同一性を有するＯＲＦ２／２分子と、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からのＯＲＦ２／２分子の少なくとも１つの部分、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸配列同一性を有するＯＲＦ２／２分子と、を含むキメラＯＲＦ２／２分子を含む。複数の実施形態では、アネロベクターは、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からのＯＲＦ２／３分子の少なくとも１つの部分、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸同一性を有するＯＲＦ２／３分子と、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からのＯＲＦ２／３分子の少なくとも１つの部分、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸配列同一性を有するＯＲＦ２／３分子と、を含むキメラＯＲＦ２／３分子を含む。複数の実施形態では、アネロベクターは、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からのＯＲＦ２Ｔ／３分子の少なくとも１つの部分、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸同一性を有するＯＲＦ２Ｔ／３分子と、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載されるような）からのＯＲＦ２Ｔ／３分子の少なくとも１つの部分、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％のアミノ酸配列同一性を有するＯＲＦ２Ｔ／３分子と、を含むキメラＯＲＦ２Ｔ／３分子を含む。

【０２９０】

その中に含まれる配列又は部分配列が、本明細書に記載の組成物及び方法で使用することができる（例えば、アネロベクターの遺伝子エレメントを形成するために、又は、例えば、本明細書に記載されるようなバクミド中の遺伝子エレメント配列として）追加の例示的なアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、例えば、ＰＣＴ出願番号：ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０３７３７９号明細書及び同ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。一部の実施形態では、例示的なアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列は、参照により本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の表Ａ１、Ａ３、Ａ５、Ａ７、Ａ９、Ａ１１、Ｂ１～Ｂ５、１、３、５、７、９、１１、１３、１５、若しくは１７のいずれかに列挙される核酸配列を含む。一部の実施形態では、例示的なアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列は、参照により本明細書に組み込まれるＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の表Ａ２、Ａ４、Ａ６、Ａ８、Ａ１０、Ａ１２、Ｃ１～Ｃ５、２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、若しくは１８のいずれかに列挙されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、例示的なアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列は、例えば、参照により本明細書に組み込まれるＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の表２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、Ｄ２、Ｄ４、Ｄ６、Ｄ８、Ｄ１０、若しくは３７Ａ～３７Ｃに列挙されるＯＲＦ１分子配列又はそれをコード化する核酸配列を含む。

【０２９１】

【表１】

表 A1. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*)核酸配列(アルファトルクウイルス(*Alphatorquevirus*)、クレード 3)

名称	Ring1
属/クレード	*アルファトルクウイルス(Alphatorquevirus)*、クレード 3
アクセッション番号	AJ620231.1

【０２９２】

【表２】

全配列: 3753 bp

```
1       10        20        30        40        50
|       |         |         |         |         |
TGCTACGTCACTAACCCACGTGTCCTCTACAGGCCAATCGCAGTCTATGT
CGTGCACTTCCTGGGCATGGTCTACATAATTATATAAATGCTTGCACTTC
CGAATGGCTGAGTTTTTGCTGCCCGTCCGCGGAGAGGAGCCACGGCAGGG
GATCCGAACGTCCTGAGGGCGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGAAG
TCAAGGGGCAATTCGGGCTCAGGACTGGCCGGGCTTTGGGCAAGGCTCTT
AAAAATGCACTTTTCTCGAATAAGCAGAAAGAAAAGGAAAGTGCTACTGC
TTTGCGTGCCAGCAGCTAAGAAAAAACCAACTGCTATGAGCTTCTGGAAA
CCTCCGGTACACAATGTCACGGGGATCCAACGCATGTGGTATGAGTCCTT
TCACCGTGGCCACGCTTCTTTTTGTGGTTGTGGGAATCCTATACTTCACA
TTACTGCACTTGCTGAAACATATGGCCATCCAACAGGCCCGAGACCTTCT
GGGCCACCGGGAGTAGACCCCAACCCCCACATCCGTAGAGCCAGGCCTGC
CCCGGCCGCTCCGGAGCCCTCACAGGTTGATTCGAGACCAGCCCTGACAT
GGCATGGGGATGGTGGAAGCGACGGAGGCGCTGGTGGTTCCGGAAGCGGT
GGACCCGTGGCAGACTTCGCAGACGATGGCCTCGATCAGCTCGTCGCCGC
CCTAGACGACGAAGAGTAAGGAGGCGCAGACGGTGGAGGAGGGGGAGACG
AAAAACAAGGACTTACAGACGCAGGAGACGCTTTAGACGCAGGGGACGAA
AAGCAAAACTTATAATAAAACTGTGGCAACCTGCAGTAATTAAAAGATGC
AGAATAAAGGGATACATACCACTGATTATAAGTGGGAACGGTACCTTTGC
CACAAACTTTACCAGTCACATAAATGACAGAATAATGAAAGGCCCCTTCG
GGGGAGGACACAGCACTATGAGGTTCAGCCTCTACATTTTGTTTGAGGAG
CACCTCAGACACATGAACTTCTGGACCAGAAGCAACGATAACCTAGAGCT
AACCAGATACTTGGGGGCTTCAGTAAAAATATACAGGCACCCAGACCAAG
ACTTTATAGTAATATACAACAGAAGAACCCCTCTAGGAGGCAACATCTAC
ACAGCACCCTCTCTACACCCAGGCAATGCCATTTTAGCAAAACACAAAAT
ATTAGTACCAAGTTTACAGACAAGACCAAAGGGTAGAAAAGCAATTAGAC
TAAGAATAGCACCCCCCACACTCTTTACAGACAAGTGGTACTTTCAAAAG
GACATAGCCGACCTCACCCTTTTCAACATCATGGCAGTTGAGGCTGACTT
GCGGTTTCCGTTCTGCTCACCACAAACTGACAACACTTGCATCAGCTTCC
AGGTCCTTAGTTCCGTTTACAACAACTACCTCAGTATTAATACCTTTAAT
AATGACAACTCAGACTCAAAGTTAAAAGAATTTTTAAATAAAGCATTTCC
AACAACAGGCACAAAAGGAACAAGTTTAAATGCACTAAATACATTTAGAA
CAGAAGGATGCATAAGTCACCCACAACTAAAAAAACCAAACCCACAAATA
AACAAACCATTAGAGTCACAATACTTTGCACCTTTAGATGCCCTCTGGGG
AGACCCCATATACTATAATGATCTAAATGAAAACAAAAGTTTGAACGATA
TCATTGAGAAAATACTAATAAAAAACATGATTACATACCATGCAAAACTA
```

【０２９３】

【表３】

AGAGAATTTCCAAATTCATACCAAGGAAACAAGGCCTTTTGCCACCTAAC
AGGCATATACAGCCCACCATACCTAAACCAAGGCAGAATATCTCCAGAAA
TATTTGGACTGTACACAGAAATAATTTACAACCCTTACACAGACAAAGGA
ACTGGAAACAAAGTATGGATGGACCCACTAACTAAAGAGAACAACATATA
TAAAGAAGGACAGAGCAAATGCCTACTGACTGACATGCCCCTATGGACTT
TACTTTTTGGATATACAGACTGGTGTAAAAAGGACACTAATAACTGGGAC
TTACCACTAAACTACAGACTAGTACTAATATGCCCTTATACCTTTCCAAA
ATTGTACAATGAAAAAGTAAAAGACTATGGGTACATCCCGTACTCCTACA
AATTCGGAGCGGGTCAGATGCCAGACGGCAGCAACTACATACCCTTTCAG
TTTAGAGCAAAGTGGTACCCCACAGTACTACACCAGCAACAGGTAATGGA
GGACATAAGCAGGAGCGGGCCCTTTGCACCTAAGGTAGAAAAACCAAGCA
CTCAGCTGGTAATGAAGTACTGTTTTAACTTTAACTGGGGCGGTAACCCT
ATCATTGAACAGATTGTTAAAGACCCCAGCTTCCAGCCCACCTATGAAAT
ACCCGGTACCGGTAACATCCCTAGAAGAATACAAGTCATCGACCCGCGGG
TCCTGGGACCGCACTACTCGTTCCGGTCATGGGACATGCGCAGACACACA
TTTAGCAGAGCAAGTATTAAGAGAGTGTCAGAACAACAAGAAACTTCTGA
CCTTGTATTCTCAGGCCCAAAAAAGCCTCGGGTCGACATCCCAAAACAAG
AAACCCAAGAAGAAAGCTCACATTCACTCCAAAGAGAATCGAGACCGTGG
GAGACCGAGGAAGAAAGCGAGACAGAAGCCCTCTCGCAAGAGAGCCAAGA
GGTCCCCTTCCAACAGCAGTTGCAGCAGCAGTACCAAGAGCAGCTCAAGC
TCAGACAGGGAATCAAAGTCCTCTTCGAGCAGCTCATAAGGACCCAACAA
GGGGTCCATGTAAACCCATGCCTACGGTAGGTCCCAGGCAGTGGCTGTTT
CCAGAGAGAAAGCCAGCCCCAGCTCCTAGCAGTGGAGACTGGGCCATGGA
GTTTCTCGCAGCAAAAATATTTGATAGGCCAGTTAGAAGCAACCTTAAAG
ATACCCCTTACTACCCATATGTTAAAAACCAATACAATGTCTACTTTGAC
CTTAAATTTGAATAAACAGCAGCTTCAAACTTGCAAGGCCGTGGGAGTTT
CACTGGTCGGTGTCTACCTCTAAAGGTCACTAAGCACTCCGAGCGTAAGC
GAGGAGTGCGACCCTCCCCCCTGGAACAACTTCTTCGGAGTCCGGCGCTA
CGCCTTCGGCTGCGCCGGACACCTCAGACCCCCCCTCCACCCGAAACGCT
TGCGCGTTTCGGACCTTCGGCGTCGGGGGGGTCGGGAGCTTTATTAAACG
GACTCCGAAGTGCTCTTGGACACTGAGGGGGTGAACAGCAACGAAAGTGA
GTGGGGCCAGACTTCGCCATAAGGCCTTTATCTTCTTGCCATTTGTCAGT
GTCCGGGGTCGCCATAGGCTTCGGGCTCGTTTTTAGGCCTTCCGGACTAC
AAAAATCGCCATTTTGGTGACGTCACGGCCGCCATCTTAAGTAGTTGAGG
CGGACGGTGGCGTGAGTTCAAAGGTCACCATCAGCCACACCTACTCAAAA
TGGTGGACAATTTCTTCCGGGTCAAAGGTTACAGCCGCCATGTTAAAACA
CGTGACGTATGACGTCACGGCCGCCATTTTGTGACACAAGATGGCCGACT
TCCTTCCTCTTTTTCAAAAAAAAGCGGAAGTGCCGCCGCGGCGGCGGGGG

【０２９４】

【表４】

GCGGCGCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGAGCCATGCGCCCCCCCCC
GCGCATGCGCGGGGCCCCCCCCCGCGGGGGGCTCCGCCCCCCGGCCCCCC
CCG (配列番号 16)

アノテーション:

推定ドメイン	*塩基範囲*
TATA ボックス	83 – 88
キャップ部位	104 – 111
転写開始部位	111
5' UTR 保存ドメイン	170 – 240
ORF2	336 – 719
ORF2/2	336 – 715 ; 2363 – 2789
ORF2/3	336 – 715 ; 2565 – 3015
ORF2t/3	336 – 388 ; 2565 – 3015
ORF1	599 – 2830
ORF1/1	599 – 715 ; 2363 – 2830
ORF1/2	599 – 715 ; 2565 – 2789
3 オープンリーディングフレーム領域	2551 – 2786
ポリ(A)シグナル	3011 – 3016
GC リッチ領域	3632 – 3753

【０２９５】
【表５】

表 A2. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*)アミノ酸配列(アルファトルクウイルス(*Alphatorquevirus*)、クレード 3)

Ring1 (アルファトルクウイルス(*Alphatorquevirus*) クレード 3)	
ORF2	MSFWKPPVHNVTGIQRMWYESFHRGHASFCGCGNPILHITALAETYGHPTGPRPSG PPGVDPNPHIRRARPAPAAPEPSQVDSRPALTWHGDGGSDGGAGGSGSGGPVADFA DDGLDQLVAALDDEE (配列番号 17)
ORF2/2	MSFWKPPVHNVTGIQRMWYESFHRGHASFCGCGNPILHITALAETYGHPTGPRPSG PPGVDPNPHIRRARPAPAAPEPSQVDSRPALTWHGDGGSDGGAGGSGSGGPVADFA DDGLDQLVAALDDEELLKTPASSPPMKYPVPVTSLEEYKSSTRGSWDRTTRSGHGT CADTHLAEQVLRECQNNKKLLTLYSQAQKSLGSTSQNKKPKKKAHIHSKENRDRG RPRKKARQKPSRKRAKRSPSNSSCSSSTKSSSSSDRESKSSSSSS (配列番号 18)
ORF2/3	MSFWKPPVHNVTGIQRMWYESFHRGHASFCGCGNPILHITALAETYGHPTGPRPSG PPGVDPNPHIRRARPAPAAPEPSQVDSRPALTWHGDGGSDGGAGGSGSGGPVADFA DDGLDQLVAALDDEEPKKASGRHPKTRNPRRKLTFTPKRIETVGDRGRKRDRSPLA REPRGPLPTAVAAAVPRAAQAQTGNQSPLRAAHKDPTRGPCKPMPTVGPRQWLFP ERKPAPAPSSGDWAMEFLAAKIFDRPVRSNLKDTPYYPYVKNQYNVYFDLKFE (配列番号 19)

【０２９６】
【表６】

ORF2t/3	MSFWKPPVHNVTGIQRMWPKKASGRHPKTRNPRRKLTFTPKRIETVGDRGRKRDR SPLAREPRGPLPTAVAAAVPRAAQAQTGNQSPLRAAHKDPTRGPCKPMPTVGPRQ WLFPERKPAPAPSSGDWAMEFLAAKIFDRPVRSNLKDTPYYPYVKNQYNVYFDLK FE (配列番号 20)
ORF1	MAWGWWKRRRRWWFRKRWTRGRLRRRWPRSARRRPRRRRVRRRRRWRRGRRK TRTYRRRRRFRRRGRKAKLIIKLWQPAVIKRCRIKGYIPLIISGNGTFATNFTSHINDR IMKGPFGGGHSTMRFSLYILFEEHLRHMNFWTRSNDNLELTRYLGASVKIYRHPDQ DFIVIYNRRTPLGGNIYTAPSLHPGNAILAKHKILVPSLQTRPKGRKAIRLRIAPPTLFT DKWYFQKDIADLTLFNIMAVEADLRFPFCSPQTDNTCISFQVLSSVYNNYLSINTFN NDNSDSKLKEFLNKAFPTTGTKGTSLNALNTFRTEGCISHPQLKKPNPQINKPLESQ YFAPLDALWGDPIYYNDLNENKSLNDIIEKILIKNMITYHAKLREFPNSYQGNKAFC HLTGIYSPPYLNQGRISPEIFGLYTEIIYNPYTDKGTGNKVWMDPLTKENNIYKEGQS KCLLTDMPLWTLLFGYTDWCKKDTNNWDLPLNYRLVLICPYTFPKLYNEKVKDY GYIPYSYKFGAGQMPDGSNYIPFQFRAKWYPTVLHQQQVMEDISRSGPFAPKVEKP STQLVMKYCFNFNWGGNPIIEQIVKDPSFQPTYEIPGTGNIPRRIQVIDPRVLGPHYSF RSWDMRRHTFSRASIKRVSEQQETSDLVFSGPKKPRVDIPKQETQEESSHSLQRESR PWETEEESETEALSQESQEVPFQQQLQQQYQEQLKLRQGIKVLFEQLIRTQQGVHV NPCLR (配列番号 21)
ORF1/1	MAWGWWKRRRRWWFRKRWTRGRLRRRWPRSARRRPRRRRIVKDPSFQPTYEIPG TGNIPRRIQVIDPRVLGPHYSFRSWDMRRHTFSRASIKRVSEQQETSDLVFSGPKKPR VDIPKQETQEESSHSLQRESRPWETEEESETEALSQESQEVPFQQQLQQQYQEQLKL RQGIKVLFEQLIRTQQGVHVNPCLR (配列番号 22)
ORF1/2	MAWGWWKRRRRWWFRKRWTRGRLRRRWPRSARRRPRRRRAQKSLGSTSQNKK PKKKAHIHSKENRDRGRPRKKARQKPSRKRAKRSPSNSSCSSSTKSSSSSDRESKSSS SSS (配列番号 23)

【０２９７】
【表７】

表 B1. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*)核酸配列(ベータトルクウイルス(*Betatorquevirus*))

名称	Ring2
属/クレード	ベータトルクウイルス(*Betatorquevirus*)

【０２９８】

【表８】

アクセッション番号 JX134045.1

全配列: 2797 bp

```
1       10        20        30        40        50
|       |         |         |         |         |
TAATAAATATTCAACAGGAAAACCACCTAATTTAAATTGCCGACCACAAA
CCGTCACTTAGTTCCCCTTTTTGCAACAACTTCTGCTTTTTTCCAACTGC
CGGAAAACCACATAATTTGCATGGCTAACCACAAACTGATATGCTAATTA
ACTTCCACAAAACAACTTCCCCTTTTAAAACCACACCTACAAATTAATTA
TTAAACACAGTCACATCCTGGGAGGTACTACCACACTATAATACCAAGTG
CACTTCCGAATGGCTGAGTTTATGCCGCTAGACGGAGAACGCATCAGTTA
CTGACTGCGGACTGAACTTGGGCGGGTGCCGAAGGTGAGTGAAACCACCG
AAGTCAAGGGGCAATTCGGGCTAGTTCAGTCTAGCGGAACGGGCAAGAAA
CTTAAAATTATTTTATTTTTCAGATGAGCGACTGCTTTAAACCAACATGC
TACAACAACAAAACAAAGCAAACTCACTGGATTAATAACCTGCATTTAAC
CCACGACCTGATCTGCTTCTGCCCAACACCAACTAGACACTTATTACTAG
CTTTAGCAGAACAACAAGAAACAATTGAAGTGTCTAAACAAGAAAAAGAA
AAAATAACAAGATGCCTTATTACTACAGAAGAAGACGGTACAACTACAGA
CGTCCTAGATGGTATGGACGAGGTTGGATTAGACGCCCTTTTCGCAGAAG
ATTTCGAAGAAAAAGAAGGGTAAGACCTACTTATACTACTATTCCTCTAA
AGCAATGGCAACCGCCATATAAAAGAACATGCTATATAAAAGGACAAGAC
TGTTTAATATACTATAGCAACTTAAGACTGGGAATGAATAGTACAATGTA
TGAAAAAAGTATTGTACCTGTACATTGGCCGGGAGGGGGTTCTTTTTCTG
TAAGCATGTTAACTTTAGATGCCTTGTATGATATACATAAACTTTGTAGA
AACTGGTGGACATCCACAAACCAAGACTTACCACTAGTAAGATATAAAGG
ATGCAAAATAACATTTTATCAAAGCACATTTACAGACTACATAGTAAGAA
TACATACAGAACTACCAGCTAACAGTAACAAACTAACATACCCAAACACA
CATCCACTAATGATGATGATGTCTAAGTACAAACACATTATACCTAGTAG
ACAAACAAGAAGAAAAAAGAAACCATACACAAAAATATTTGTAAAACCAC
CTCCGCAATTTGAAAACAAATGGTACTTTGCTACAGACCTCTACAAAATT
CCATTACTACAAATACACTGCACAGCATGCAACTTACAAAACCCATTTGT
AAAACCAGACAAATTATCAAACAATGTTACATTATGGTCACTAAACACCA
TAAGCATACAAAATAGAAACATGTCAGTGGATCAAGGACAATCATGGCCA
TTTAAAATACTAGGAACACAAAGCTTTTATTTTTACTTTTACACCGGAGC
AAACCTACCAGGTGACACAACACAAATACCAGTAGCAGACCTATTACCAC
TAACAAACCCAAGAATAAACAGACCAGGACAATCACTAAATGAGGCAAAA
ATTACAGACCATATTACTTTCACAGAATACAAAAACAAATTTACAAATTA
TTGGGGTAACCCATTTAATAAACACATTCAAGAACACCTAGATATGATAC
```

【０２９９】

【表９】

TATACTCACTAAAAAGTCCAGAAGCAATAAAAAACGAATGGACAACAGAA
AACATGAAATGGAACCAATTAAACAATGCAGGAACAATGGCATTAACACC
ATTTAACGAGCCAATATTCACACAAATACAATATAACCCAGATAGAGACA
CAGGAGAAGACACTCAATTATACCTACTCTCTAACGCTACAGGAACAGGA
TGGGACCCACCAGGAATTCCAGAATTAATACTAGAAGGATTTCCACTATG
GTTAATATATTGGGGATTTGCAGACTTTCAAAAAAACCTAAAAAAAGTAA
CAAACATAGACACAAATTACATGTTAGTAGCAAAAACAAAATTTACACAA
AAACCTGGCACATTCTACTTAGTAATACTAAATGACACCTTTGTAGAAGG
CAATAGCCCATATGAAAAACAACCTTTACCTGAAGACAACATTAAATGGT
ACCCACAAGTACAATACCAATTAGAAGCACAAAACAAACTACTACAAACT
GGGCCATTTACACCAAACATACAAGGACAACTATCAGACAATATATCAAT
GTTTTATAAATTTTACTTTAAATGGGGAGGAAGCCCACCAAAAGCAATTA
ATGTTGAAAATCCTGCCCACCAGATTCAATATCCCATACCCCGTAACGAG
CATGAAACAACTTCGTTACAGAGTCCAGGGGAAGCCCCAGAATCCATCTT
ATACTCCTTCGACTATAGACACGGGAACTACACAACAACAGCTTTGTCAC
GAATTAGCCAAGACTGGGCACTTAAAGACACTGTTTCTAAAATTACAGAG
CCAGATCGACAGCAACTGCTCAAACAAGCCCTCGAATGCCTGCAAATCTC
GGAAGAAACGCAGGAGAAAAAAGAAAAAGAAGTACAGCAGCTCATCAGCA
ACCTCAGACAGCAGCAGCAGCTGTACAGAGAGCGAATAATATCATTATTA
AAGGACCAATAACTTTTAACTGTGTAAAAAAGGTGAAATTGTTTGATGAT
AAACCAAAAAACCGTAGATTTACACCTGAGGAATTTGAAACTGAGTTACA
AATAGCAAAATGGTTAAAGAGACCCCCAAGATCCTTTGTAAATGATCCTC
CCTTTTACCCATGGTTACCACCTGAACCTGTTGTAAACTTTAAGCTTAAT
TTTACTGAATAAAGGCCAGCATTAATTCACTTAAGGAGTCTGTTTATTTA
AGTTAAACCTTAATAAACGGTCACCGCCTCCCTAATACGCAGGCGCAGAA
AGGGGGCTCCGCCCCCTTTAACCCCCAGGGGGCTCCGCCCCCTGAAACCC
CCAAGGGGGCTACGCCCCCTTACACCCCC（**配列番号** 54）

アノテーション:

推定ドメイン	*塩基範囲*
TATA **ボックス**	237– 243
キャップ部位	260 – 267
転写開始部位	267
5’ UTR **保存ドメイン**	323 – 393
ORF2	424 – 723
ORF2/2	424 – 719 ; 2274 – 2589
ORF2/3	424 – 719 ; 2449 – 2812

【０３００】

【表１０】

ORF1	612 – 2612
ORF1/1	612 – 719 ; 2274 – 2612
ORF1/2	612 – 719 ; 2449 – 2589
3 オープンリーディングフレーム	2441 – 2586
ポリ(A)シグナル	2808 – 2813
GC リッチ領域	2868 – 2929

【０３０１】
【表１１】

表 B2. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*)アミノ酸配列(ベータトルクウイルス(*Betatorquevirus*))

Ring2 (ベータトルクウイルス(*Betatorquevirus*))	
ORF2	MSDCFKPTCYNNKTKQTHWINNLHLTHDLICFCPTPTRHLLLALAEQQETIEVSKQE KEKITRCLITTEEDGTTTDVLDGMDEVGLDALFAEDFEEKEG (配列番号 55)
ORF2/2	MSDCFKPTCYNNKTKQTHWINNLHLTHDLICFCPTPTRHLLLALAEQQETIEVSKQE KEKITRCLITTEEDGTTTDVLDGMDEVGLDALFAEDFEEKEGFNIPYPVTSMKQLRY RVQGKPQNPSYTPSTIDTGTTQQQLCHELAKTGHLKTLFLKLQSQIDSNCSNKPSNA CKSRKKRRRKKKKKYSSSSATSDSSSSCTESE (配列番号 56)
ORF2/3	MSDCFKPTCYNNKTKQTHWINNLHLTHDLICFCPTPTRHLLLALAEQQETIEVSKQE KEKITRCLITTEEDGTTTDVLDGMDEVGLDALFAEDFEEKEGARSTATAQTSPRMP ANLGRNAGEKRKRSTAAHQQPQTAAAAVQRANNIIIKGPITFNCVKKVKLFDDKPK NRRFTPEEFETELQIAKWLKRPPRSFVNDPPFYPWLPPEPVVNFKLNFTE (配列番号 57)
ORF1	MPYYYRRRRYNYRRPRWYGRGWIRRPFRRRFRRKRRVRPTYTTIPLKQWQPPYKR TCYIKGQDCLIYYSNLRLGMNSTMYEKSIVPVHWPGGGSFSVSMLTLDALYDIHKL CRNWWTSTNQDLPLVRYKGCKITFYQSTFTDYIVRIHTELPANSNKLTYPNTHPLM MMMSKYKHIIPSRQTRRKKKPYTKIFVKPPPQFENKWYFATDLYKIPLLQIHCTACN LQNPFVKPDKLSNNVTLWSLNTISIQNRNMSVDQGQSWPFKILGTQSFYFYFYTGA NLPGDTTQIPVADLLPLTNPRINRPGQSLNEAKITDHITFTEYKNKFTNYWGNPFNK HIQEHLDMILYSLKSPEAIKNEWTTENMKWNQLNNAGTMALTPFNEPIFTQIQYNP DRDTGEDTQLYLLSNATGTGWDPPGIPELILEGFPLWLIYWGFADFQKNLKKVTNID TNYMLVAKTKFTQKPGTFYLVILNDTFVEGNSPYEKQPLPEDNIKWYPQVQYQLEA QNKLLQTGPFTPNIQGQLSDNISMFYKFYFKWGGSPPKAINVENPAHQIQYPIPRNE HETTSLQSPGEAPESILYSFDYRHGNYTTTALSRISQDWALKDTVSKITEPDRQQLLK QALECLQISEETQEKKEKEVQQLISNLRQQQQLYRERIISLLKDQ (配列番号 58)
ORF1/1	MPYYYRRRRYNYRRPRWYGRGWIRRPFRRRFRRKRRIQYPIPRNEHETTSLQSPGE APESILYSFDYRHGNYTTTALSRISQDWALKDTVSKITEPDRQQLLKQALECLQISEE TQEKKEKEVQQLISNLRQQQQLYRERIISLLKDQ (配列番号 59)
ORF1/2	MPYYYRRRRYNYRRPRWYGRGWIRRPFRRRFRRKRRSQIDSNCSNKPSNACKSRK KRRRKKKKKYSSSSATSDSSSSCTESE (配列番号 60)

【０３０２】

【表１２】

表 C1. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*)核酸配列(ガンマトルクウイルス *(Gammatorquevirus)*)

名称	Ring4
属/クレード	*ガンマトルクウイルス(Gammatorquevirus)*
アクセッション番号	

全配列: 3176 bp

```
1       10        20        30        40        50
|       |         |         |         |         |
TAAAATGGCGGGAGCCAATCATTTTATACTTTCACTTTCCAATTAAAAAT
GGCCACGTCACAAACAAGGGGTGGAGCCATTTAAACTATATAACTAAGTG
GGGTGGCGAATGGCTGAGTTTACCCCGCTAGACGGTGCAGGGACCGGATC
GAGCGCAGCGAGGAGGTCCCCGGCTGCCCATGGGCGGGAGCCGAGGTGAG
TGAAACCACCGAGGTCTAGGGGCAATTCGGGCTAGGGCAGTCTAGCGGAA
CGGGCAAGAAACTTAAAACAATATTTGTTTTACAGATGGTTAGTATATCC
TCAAGTGATTTTTTTAAGAAAACGAAATTTAATGAGGAGACGCAGAACCA
AGTATGGATGTCTCAAATTGCTGACTCTCATGATAATATCTGCAGTTGCT
GGCATCCATTTGCTCACCTTCTTGCTTCCATATTTCCTCCTGGCCACAAA
GATCGTGATCTTACTATTAACCAAATTCTTCTAAGAGATTATAAAGAAAA
ATGCCATTCTGGTGGAGAAGAAGGAGAAAATTCTGGACCAACAACAGGTT
TAATTACACCAAAAGAAGAAGATATAGAAAAAGATGGCCCAGAAGGCGCC
GCAGAAGAAGACCATACAGACGCCCTGTTCGCCGCCGCCGTAGAAAACTT
CGAAAGGTAAAGAGAAAAAAAAAATCTTTAATTGTTAGACAATGGCAACC
AGACAGTATAAGAACTTGTAAAATTATAGGACAGTCAGCTATAGTTGTTG
GGGCTGAAGGAAAGCAAATGTACTGTTATACTGTCAATAAGTTAATTAAT
GTGCCCCCAAAAACACCATATGGGGGAGGCTTTGGAGTAGACCAATACAC
ACTGAAATACTTATATGAAGAATACAGATTTGCACAAAACATTTGGACAC
AATCTAATGTACTGAAAGACTTATGCAGATACATAAATGTTAAGCTAATA
TTCTACAGAGACAACAAAACAGACTTTGTCCTTTCCTATGACAGAAACCC
ACCTTTTCAACTAACAAAATTTACATACCCAGGAGCACACCCACAACAAA
TCATGCTTCAAAAACACCACAAATTCATACTATCACAAATGACAAAGCCT
AATGGAAGACTAACAAAAAAACTCAAAATTAAACCTCCTAAACAAATGCT
TTCTAAATGGTTCTTTTCAAAACAATTCTGTAAATACCCTTTACTATCTC
TTAAAGCTTCTGCACTAGACCTTAGGCACTCTTACCTAGGCTGCTGTAAT
GAAAATCCACAGGTATTTTTTTATTATTTAAACCATGGATACTACACAAT
AACAAACTGGGGAGCACAATCCTCAACAGCATACAGACCTAACTCCAAGG
TGACAGACACAACATACTACAGATACAAAAATGACAGAAAAAATATTAAC
ATTAAAAGCCATGAATACGAAAAAAGTATATCATATGAAAACGGTTATTT
```

【０３０３】

【表１３】

TCAATCTAGTTTCTTACAAACACAGTGCATATATACCAGTGAGCGTGGTG
AAGCCTGTATAGCAGAAAAACCACTAGGAATAGCTATTTACAATCCAGTA
AAAGACAATGGAGATGGTAATATGATATACCTTGTAAGCACTCTAGCAAA
CACTTGGGACCAGCCTCCAAAAGACAGTGCTATTTTAATACAAGGAGTAC
CCATATGGCTAGGCTTATTTGGATATTTAGACTACTGTAGACAAATTAAA
GCTGACAAAACATGGCTAGACAGTCATGTACTAGTAATTCAAAGTCCTGC
TATTTTTACTTACCCAAATCCAGGAGCAGGCAAATGGTATTGTCCACTAT
CACAAAGTTTTATAAATGGCAATGGTCCGTTTAATCAACCACCTACACTG
CTACAAAAAGCAAAGTGGTTTCCACAAATACAATACCAACAAGAAATTAT
TAATAGCTTTGTAGAATCAGGACCATTTGTTCCCAAATATGCAAATCAAA
CTGAAAGCAACTGGGAACTAAAATATAAATATGTTTTTACATTTAAGTGG
GGTGGACCACAATTCCATGAACCAGAAATTGCTGACCCTAGCAAACAAGA
GCAGTATGATGTCCCCGATACTTTCTACCAAACAATACAAATTGAAGATC
CAGAAGGACAAGACCCCAGATCTCTCATCCATGATTGGGACTACAGACGA
GGCTTTATTAAAGAAAGATCTCTTAAAAGAATGTCAACTTACTTCTCAAC
TCATACAGATCAGCAAGCAACTTCAGAGGAAGACATTCCCAAAAAGAAAA
AGAGAATTGGACCCCAACTCACAGTCCCACAACAAAAAGAAGAGGAGACA
CTGTCATGTCTCCTCTCTCTCTGCAAAAAAGATACCTTCCAAGAAACAGA
GACACAAGAAGACCTCCAGCAGCTCATCAAGCAGCAGCAGGAGCAGCAGC
TCCTCCTCAAGAGAAACATCCTCCAGCTCATCCACAAACTAAAAGAGAAT
CAACAAATGCTTCAGCTTCACACAGGCATGTTACCTTAACCAGATTTAAA
CCTGGATTTGAAGAGCAAACAGAGAGAGAATTAGCAATTATATTTCATAG
GCCCCCTAGAACCTACAAAGAGGACCTTCCATTCTATCCCTGGCTACCAC
CTGCACCCCTTGTACAATTTAACCTTAACTTCAAAGGCTAGGCCAACAAT
GTACACTTAGTAAAGCATGTTTATTAAAGCACAACCCCCAAAATAAATGT
AAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAATTGCAAAAATTCGGCGCT
CGCGCGCATGTGCGCCTCTGGCGCAAATCACGCAACGCTCGCGCGCCCGC
GTATGTCTCTTTACCACGCACCTAGATTGGGGTGCGCGCGCTAGCGCGCG
CACCCCAATGCGCCCCGCCCTCGTTCCGACCCGCTTGCGCGGGTCGGACC
ACTTCGGGCTCGGGGGGGCGCGCCTGCGGCGCTTTTTTACTAAACAGACT
CCGAGCCGCCATTTGGCCCCCTAAGCTCCGCCCCCCTCATGAATATTCAT
AAAGGAAACCACATAATTAGAATTGCCGACCACAAACTGCCATATGCTAA
TTAGTTCCCCTTTTACAAAGTAAAAGGGGAAGTGAACATAGCCCCACACC
CGCAGGGGCAAGGCCCCGCACCCCTACGTCACTAACCACGCCCCCGCCGC
CATCTTGGGTGCGGCAGGGCGGGGGC（**配列番号** 886）

アノテーション:

推定ドメイン	*塩基範囲*
TATA **ボックス**	87– 93
キャップ部位	110 – 117
転写開始部位	117
5’ UTR **保存ドメイン**	185 – 254
ORF2	286 – 660
ORF2/2	286 – 656 ; 1998 – 2442
ORF2/3	286 – 656 ; 2209 – 2641
TAIP	385 - 484

【０３０４】

【表１４】

ORF1	501 – 2489
ORF1/1	501 – 656 ; 1998 – 2489
ORF1/2	501 – 656 ; 2209 – 2442
3 オープンリーディングフレーム	2209 – 2439
ポリ(A)シグナル	2672 – 2678
GC リッチ領域	3076 – 3176

【０３０５】
【表１５】

表 C2. 例示的な*アネロウイルス(Anellovirus)*核酸配列*(ガンマトルクウイルス(Gammatorquevirus))*

Ring4 *(ガンマトルクウイルス(Gammatorquevirus))*	
ORF2	MVSISSSDFFKKTKFNEETQNQVWMSQIADSHDNICSCWHPFAHLLASIFPP GHKDRDLTINQILLR DYKEKCHSGGEEGENSGPTTGLITPKEEDIEKDGPEGAAEEDHTDALFAAAV ENFER (**配列番号** 887)
ORF2/2	MVSISSSDFFKKTKFNEETQNQVWMSQIADSHDNICSCWHPFAHLLASIFPP GHKDRDLTINQILLRDYKEKCHSGGEEGENSGPTTGLITPKEEDIEKDGPEGA AEEDHTDALFAAAVENFESGVDHNSMNQKLLTLANKSSMMSPILSTKQYKL KIQKDKTPDLSSMIGTTDEALLKKDLLKECQLTSQLIQISKQLQRKTFPKRKR ELDPNSQSHNKKKRRHCHVSSLSAKKIPSKKQRHKKTSSSSSSSSRSSSSSSR ETSSSSSTN (**配列番号** 888)
ORF2/3	MVSISSSDFFKKTKFNEETQNQVWMSQIADSHDNICSCWHPFAHLLASIFPP GHKDRDLTINQILLRDYKEKCHSGGEEGENSGPTTGLITPKEEDIEKDGPEGA AEEDHTDALFAAAVENFERSASNFRGRHSQKEKENWTPTHSPTTKRRGDTV MSPLSLQKRYLPRNRDTRRPPAAHQAAAGAAAPPQEKHPPAHPQTKRESTN ASASHRHVTLTRFKPGFEEQTERELAIIFHRPPRTYKEDLPFYPWLPPAPLVQ FNLNFKG (**配列番号** 889)
TAIP	MRRRRTKYGCLKLLTLMIISAVAGIHLLTFLLPYFLLATKIVILLLTKFF (**配列番号** 890)

【０３０６】

【表１６】

ORF1	MPFWWRRRRKFWTNNRFNYTKRRRYRKRWPRRRRRRRPYRRPVRRRRRK LRKVKRKKKSLIVRQWQPDSIRTCKIIGQSAIVVGAEGKQMYCYTVNKLINV PPKTPYGGGFGVDQYTLKYLYEEYRFAQNIWTQSNVLKDLCRYINVKLIFY RDNKTDFVLSYDRNPPFQLTKFTYPGAHPQQIMLQKHHKFILSQMTKPNGR LTKKLKIKPPKQMLSKWFFSKQFCKYPLLSLKASALDLRHSYLGCCNENPQ VFFYYLNHGYYTITNWGAQSSTAYRPNSKVTDTTYYRYKNDRKNINIKSHE YEKSISYENGYFQSSFLQTQCIYTSERGEACIAEKPLGIAIYNPVKDNGDGNM IYLVSTLANTWDQPPKDSAILIQGVPIWLGLFGYLDYCRQIKADKTWLDSHV LVIQSPAIFTYPNPGAGKWYCPLSQSFINGNGPFNQPPTLLQKAKWFPQIQYQ QEIINSFVESGPFVPKYANQTESNWELKYKYVFTFKWGGPQFHEPEIADPSK QEQYDVPDTFYQTIQIEDPEGQDPRSLIHDWDYRRGFIKERSLKRMSTYFST HTDQQATSEEDIPKKKKRIGPQLTVPQQKEEETLSCLLSLCKKDTFQETETQE DLQQLIKQQQEQQLLLKRNILQLIHKLKENQQMLQLHTGMLP (配列番号 891)
ORF1/1	MPFWWRRRRKFWTNNRFNYTKRRRYRKRWPRRRRRRRPYRRPVRRRRRK LRKWGGPQFHEPEIADPSKQEQYDVPDTFYQTIQIEDPEGQDPRSLIHDWDY RRGFIKERSLKRMSTYFSTHTDQQATSEEDIPKKKKRIGPQLTVPQQKEEETL SCLLSLCKKDTFQETETQEDLQQLIKQQQEQQLLLKRNILQLIHKLKENQQM LQLHTGMLP (配列番号 892)
ORF1/2	MPFWWRRRRKFWTNNRFNYTKRRRYRKRWPRRRRRRRPYRRPVRRRRRK LRKISKQLQRKTFPKRKR ELDPNSQSHNKKKRRHCHVSSLSAKKIPSKKQRHKKTSSSSSSSSRSSSSSSR ETSSSSTN (配列番号 893)

【０３０７】

一部の実施形態では、アネロベクターは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ出願番号：ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０３７３７９号明細書に列挙される配列を含む核酸を含む。一部の実施形態では、アネロベクターは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ出願番号：ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０３７３７９号明細書に列挙される配列を含むポリペプチドを含む。一部の実施形態では、アネロベクターは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ出願番号：ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書に列挙される配列を含む核酸を含む。一部の実施形態では、アネロベクターは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ出願番号：ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書に列挙される配列を含むポリペプチドを含む。

【０３０８】

ＯＲＦ１分子

一部の実施形態では、アネロベクターは、ＯＲＦ１分子及び／又はＯＲＦ１分子をコード化する核酸配列を含む。一般に、ＯＲＦ１分子は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質（例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質）の構造特徴及び／又は活性を有するポリペプチドを含む。一部の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質（例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質）と比べて短縮を含む。ＯＲＦ１分子は、例えば、タンパク質性外層（例えば、本明細書に記載されるような）、例えば、キャプシドを形成するために、他のＯＲＦ１分子に結合することが可能であり得る。一部の実施形態では、タン

パク質性外層は、核酸分子（例えば、本明細書に記載される遺伝子エレメント）を閉じ込めることができる。一部の実施形態では、複数のＯＲＦ１分子は、例えば、タンパク質性外層を形成するために、多量体を形成し得る。一部の実施形態では、多量体は、ホモ多量体であってもよい。他の実施形態では、多量体は、ヘテロ多量体であってもよい。

【０３０９】

ＯＲＦ１分子は、一部の実施形態において、以下：アルギニンリッチ領域を含む第１領域、例えば、少なくとも６０％の塩基性残基（例えば、少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、又は１００％の塩基性残基；例えば、６０％～９０％、６０％～８０％、７０％～９０％、若しくは７０～８０％の塩基性残基）を有する領域、及びゼリーロールドメイン、例えば、少なくとも６つのβ鎖（例えば、４、５、６、７、８、９、１０、１１、又は１２のβ鎖）を含む第２領域のうち１つ若しくは複数を含み得る。

【０３１０】

アルギニンリッチ領域

アルギニンリッチ領域は、本明細書に記載されるアルギニンリッチ領域配列又は少なくとも６０％、７０％、若しくは８０％の塩基性残基（例えば、アルギニン、リシン、若しくはそれらの組合せ）を含む少なくとも約４０アミノ酸の配列に対して少なくとも７０％（例えば、少なくとも約７０、８０、９０、９５、９６、９７、９８、９９、若しくは１００％）の配列同一性を有する。

【０３１１】

ゼリーロールドメイン

ゼリーロールドメイン又は領域は、以下の特徴：

（ｉ）ゼリーロールドメインのアミノ酸の少なくとも３０％（例えば、少なくとも約３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、９０％、若しくはそれ以上）が、１つ若しくは複数のβシートの部分である；

（ｉｉ）ゼリーロールドメインの二次構造が、少なくとも４つ（例えば、４、５、６、７、８、９、１０、１１、若しくは１２）のβ鎖を含む；且つ／又は

（ｉｉｉ）ゼリーロールドメインの三次構造が、少なくとも２つ（例えば、２、３、若しくは４つ）のβシートを含む；且つ／又は

（ｉｖ）ゼリーロールドメインが、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、若しくは１０：１のβシート：αヘリックスの比を含む

のうち１つ若しくは複数（例えば、１、２、若しくは３）を含むポリペプチド（例えば、より大きなポリペプチドに含まれるドメイン又は領域）を含む（例えば、それから構成される）。

【０３１２】

特定の実施形態では、ゼリーロールドメインは、２つのβシートを含む。

【０３１３】

特定の実施形態では、１つ又は複数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０）のβシートは、約８（例えば、４、５、６、７、８、９、１０、１１、若しくは１２）のβ鎖を含む。特定の実施形態では、１つ又は複数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０）のβシートは、８つのβ鎖を含む。特定の実施形態では、１つ又は複数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０）のβシートは、７つのβ鎖を含む。特定の実施形態では、１つ又は複数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０）のβシートは、６つのβ鎖を含む。特定の実施形態では、１つ又は複数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０）のβシートは、５つのβ鎖を含む。特定の実施形態では、１つ又は複数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０）のβシートは、４つのβ鎖を含む。

【０３１４】

一部の実施形態では、ゼリーロールドメインは、第２βシートに対して逆平行配向の第

１βシートを含む。特定の実施形態では、第１βシートは、約４つ（例えば、３、４、５、又は６つ）のβ鎖を含む。特定の実施形態では、第２βシートは、約４つ（例えば、３、４、５、又は６つ）のβ鎖を含む。複数の実施形態では、第１及び第２βシートは、合計で、約８（例えば、６、７、８、９、１０、１１、又は１２）のβ鎖を含む。

【０３１５】

特定の実施形態では、ゼリーロールドメインは、キャプシドタンパク質（例えば、本明細書に記載されるＯＲＦ１分子）の１成分である。特定の実施形態では、ゼリーロールドメインは、自己集合活性を有する。一部の実施形態では、ゼリーロールドメインを含むポリペプチドは、ゼリーロールドメインを含むポリペプチドの別のコピーに結合する。一部の実施形態では、第１ポリペプチドのゼリーロールドメインは、ポリペプチドの第２コピーのゼリーロールドメインに結合する。

【０３１６】

Ｎ２２ドメイン

ＯＲＦ１分子はまた、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｎ２２ドメイン（例えば、本明細書に記載されるように、例えば、本明細書に記載のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質由来のＮ２２ドメイン）の構造若しくは活性を含む第３領域、及び／又はアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｃ末端ドメイン（ＣＴＤ）（例えば、本明細書に記載されるように、例えば、本明細書に記載のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質由来のＣＴＤ）の構造若しくは活性を含む第４領域も含み得る。一部の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、Ｎ末端からＣ末端の順に、第１領域、第２領域、第３領域、及び第４領域を含む。

【０３１７】

超可変領域（ＨＶＲ）

ＯＲＦ１分子は、一部の実施形態において、超可変領域（ＨＶＲ）、例えば、本明細書に記載される、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質由来のＨＶＲをさらに含む。一部の実施形態では、ＨＶＲは、第２領域と第３領域との間に位置する。一部の実施形態では、ＨＶＲは、少なくとも約５５（例えば、少なくとも約４５、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、又は６５）のアミノ酸（例えば、約４５～１６０、５０～１６０、５５～１６０、６０～１６０、４５～１５０、５０～１５０、５５～１５０、６０～１５０、４５～１４０、５０～１４０、５５～１４０、又は６０～１４０アミノ酸）を含む。

【０３１８】

例示的なＯＲＦ１配列

例示的なアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１アミノ酸配列、及び例示的なＯＲＦ１ドメインの配列が、以下の表に提供されている。一部の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、ＯＲＦ１分子）は、例えば、表Ｎ～Ｚのいずれかに記載されるような、１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１部分配列に対して少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のアネロベクターは、例えば、表Ｎ～Ｚのいずれかに記載されるような、１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１部分配列に対して少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＯＲＦ１分子を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のアネロベクターは、例えば、表Ｎ～Ｚのいずれかに記載されるような、１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１部分配列に対して少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＯＲＦ１分子をコード化する核酸分子（例えば、遺伝子エレメント）を含む。

【０３１９】

一部の実施形態では、１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１部分配列は、アルギニン（Ａｒｇ）リッチドメイン、ゼリーロールドメイン、超可変領域（ＨＶＲ）、Ｎ２２ドメイン、若しくはＣ－末端ドメイン（ＣＴＤ）（例えば、表Ｎ～Ｚのいずれかに列挙されるような）のうちの１つ又は複数、又はそれに対して少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からの複数の部分配列（例えば、表Ｎ～Ｚに列挙されるアルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）クレード１～７部分配列から選択されるＯＲＦ１部分配列の任意の組合せ）を含む。複数の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＡｒｇリッチドメイン、ゼリーロールドメイン、Ｎ２２ドメイン、及びＣＴＤのうちの１つ又は複数と、別のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＨＶＲとを含む。複数の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのゼリーロールドメイン、ＨＶＲ、Ｎ２２ドメイン、及びＣＴＤのうちの１つ又は複数と、別のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＡｒｇリッチドメインとを含む。複数の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＡｒｇリッチドメイン、ＨＶＲ、Ｎ２２ドメイン、及びＣＴＤのうちの１つ又は複数と、別のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのゼリーロールドメインとを含む。複数の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＡｒｇリッチドメイン、ゼリーロールドメイン、ＨＶＲ、及びＣＴＤのうちの１つ又は複数と、別のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＮ２２ドメインと、を含む。複数の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、１つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＡｒｇリッチドメイン、ゼリーロールドメイン、ＨＶＲ、及びＮ２２ドメインのうちの１つ又は複数と、別のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＣＴＤとを含む。

【０３２０】

ＯＲＦ１分子、又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片が、本明細書に記載の組成物及び方法で利用され得る（例えば、遺伝子エレメントを閉じ込めることによって、例えば、アネロベクターのタンパク質外層を形成するために）追加の例示的なアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）は、例えば、ＰＣＴ出願番号：ＰＣＴ／ＵＳ２０１８／０３７３７９号明細書及びＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０３２１】

【表１７】

表 N. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*)ORF1 アミノ酸部分配列(アルファトルクウイルス(*Alphatorquevirus*)、クレード 3)

名称	Ring1
属/クレード	アルファトルクウイルス(*Alphatorquevirus*)、クレード 3
アクセッション番号	AJ620231.1
タンパク質アクセッション番号	CAF05750.1

全配列: 743 AA

```
1       10        20        30        40        50
|       |         |         |         |         |
MAWGWWKRRRRWWFRKRWTRGRLRRRWPRSARRRPRRRRVRRRRRWRRGR
RKTRTYRRRRRFRRRGRKAKLIIKLWQPAVIKRCRIKGYIPLIISGNGTF
ATNFTSHINDRIMKGPFGGGHSTMRFSLYILFEEHLRHMNFWTRSNDNLE
LTRYLGASVKIYRHPDQDFIVIYNRRTPLGGNIYTAPSLHPGNAILAKHK
ILVPSLQTRPKGRKAIRLRIAPPTLFTDKWYFQKDIADLTLFNIMAVEAD
LRFPFCSPQTDNTCISFQVLSSVYNNYLSINTFNNDNSDSKLKEFLNKAF
PTTGTKGTSLNALNTFRTEGCISHPQLKKPNPQINKPLESQYFAPLDALW
GDPIYYNDLNENKSLNDIIEKILIKNMITYHAKLREFPNSYQGNKAFCHL
TGIYSPPYLNQGRISPEIFGLYTEIIYNPYTDKGTGNKVWMDPLTKENNI
YKEGQSKCLLTDMPLWTLLFGYTDWCKKDTNNWDLPLNYRLVLICPYTFP
KLYNEKVKDYGYIPYSYKFGAGQMPDGSNYIPFQFRAKWYPTVLHQQQVM
EDISRSGPFAPKVEKPSTQLVMKYCFNFNWGGNPIIEQIVKDPSFQPTYE
IPGTGNIPRRIQVIDPRVLGPHYSFRSWDMRRHTFSRASIKRVSEQQETS
DLVFSGPKKPRVDIPKQETQEESSHSLQRESRPWETEEESETEALSQESQ
  EVPFQQQLQQQYQEQLKLRQGIKVLFEQLIRTQQGVHVNPCLR
```

（**配列番号** 185）

アノテーション:

推定ドメイン	*AA 範囲*
Arg リッチドメイン	1 – 68
ゼリーロールドメイン	69 - 280
超可変領域	281 - 413
N22	414 – 579
C-末端ドメイン	580 - 743

【０３２２】

【表１８】

表 O. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*)ORF1 アミノ酸部分配列(アルファトルクウイルス(*Alphatorquevirus*)、クレード 3)

Ring1 ORF1 (アルファトルクウイルス(*Alphatorquevirus*)クレード 3)	
Arg-リッチ領域	MAWGWWKRRRRWWFRKRWTRGRLRRRWPRSARRRPRRRRVRRRR RWRRGRRKTRTYRRRRRFRRRGRK (配列番号 186)
ゼリーロールドメイン	AKLIIKLWQPAVIKRCRIKGYIPLIISGNGTFATNFTSHINDRIMKGPFGG GHSTMRFSLYILFEEHLRHMNFWTRSNDNLELTRYLGASVKIYRHPDQ DFIVIYNRRTPLGGNIYTAPSLHPGNAILAKHKILVPSLQTRPKGRKAIRL RIAPPTLFTDKWYFQKDIADLTLFNIMAVEADLRFPFCSPQTDNTCISFQ VLSSVYNNYLSI (配列番号 187)
超可変ドメイン	NTFNNDNSDSKLKEFLNKAFPTTGTKGTSLNALNTFRTEGCISHPQLKK PNPQINKPLESQYFAPLDALWGDPIYYNDLNENKSLNDIIEKILIKNMIT YHAKLREFPNSYQGNKAFCHLTGIYSPPYLNQGR (配列番号 188)
N22	ISPEIFGLYTEIIYNPYTDKGTGNKVWMDPLTKENNIYKEGQSKCLLTD MPLWTLLFGYTDWCKKDTNNWDLPLNYRLVLICPYTFPKLYNEKVKD YGYIPYSYKFGAGQMPDGSNYIPFQFRAKWYPTVLHQQQVMEDISRSG PFAPKVEKPSTQLVMKYCFNFN (配列番号 189)
C 末端ドメイン	WGGNPIIEQIVKDPSFQPTYEIPGTGNIPRRIQVIDPRVLGPHYSFRSWD MRRHTFSRASIKRVSEQQETSDLVFSGPKKPRVDIPKQETQEESSHSLQR ESRPWETEEESETEALSQESQEVPFQQQLQQQYQEQLKLRQGIKVLFEQ LIRTQQGVHVNPCLR (配列番号 190)

【０３２３】

【表１９】

表 P. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*)ORF1 アミノ酸部分配列(ベータトルクウイルス(*Betatorquevirus*))

名称	Ring2
属/クレード	ベータトルクウイルス(*Betatorquevirus*)
アクセッション番号	JX134045.1
タンパク質アクセッション番号	AGG91484.1

全配列: 666 AA

```
1       10        20        30        40        50
|       |         |         |         |         |
MPYYYRRRRYNYRRPRWYGRGWIRRPFRRRFRRKRRVRPTYTTIPLKQWQ
PPYKRTCYIKGQDCLIYYSNLRLGMNSTMYEKSIVPVHWPGGGSFSVSML
TLDALYDIHKLCRNWWTSTNQDLPLVRYKGCKITFYQSTFTDYIVRIHTE
LPANSNKLTYPNTHPLMMMMSKYKHIIPSRQTRRKKKPYTKIFVKPPPQF
ENKWYFATDLYKIPLLQIHCTACNLQNPFVKPDKLSNNVTLWSLNTISIQ
NRNMSVDQGQSWPFKILGTQSFYFYFYTGANLPGDTTQIPVADLLPLTNP
RINRPGQSLNEAKITDHITFTEYKNKFTNYWGNPFNKHIQEHLDMILYSL
KSPEAIKNEWTTENMKWNQLNNAGTMALTPFNEPIFTQIQYNPDRDTGED
TQLYLLSNATGTGWDPPGIPELILEGFPLWLIYWGFADFQKNLKKVTNID
TNYMLVAKTKFTQKPGTFYLVILNDTFVEGNSPYEKQPLPEDNIKWYPQV
QYQLEAQNKLLQTGPFTPNIQGQLSDNISMFYKFYFKWGGSPPKAINVEN
PAHQIQYPIPRNEHETTSLQSPGEAPESILYSFDYRHGNYTTTALSRISQ
DWALKDTVSKITEPDRQQLLKQALECLQISEETQEKKEKEVQQLISNLRQ
QQQLYRERIISLLKDQ (配列番号 215)
```

アノテーション:

推定ドメイン	*AA 範囲*
Arg リッチ領域	1 – 38
ゼリーロールドメイン	39 - 246
超可変領域	247 - 374
N22	375 – 537
C 末端ドメイン	538 – 666

【０３２４】

【表２０】

表 Q.　例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*)ORF1 アミノ酸部分配列(ベータトルクウイルス(*Betatorquevirus*))

Ring2 ORF1 (ベータトルクウイルス(*Betatorquevirus*))	
Arg リッチ領域	MPYYYRRRRYNYRRPRWYGRGWIRRPFRRRFRRKRRVR (配列番号 216)
ゼリーロールドメイン	PTYTTIPLKQWQPPYKRTCYIKGQDCLIYYSNLRLGMNSTMYEKSIVPV HWPGGGSFSVSMLTLDALYDIHKLCRNWWTSTNQDLPLVRYKGCKIT FYQSTFTDYIVRIHTELPANSNKLTYPNTHPLMMMMSKYKHIIPSRQTR RKKKPYTKIFVKPPPQFENKWYFATDLYKIPLLQIHCTACNLQNPFVKP DKLSNNVTLWSLNT (配列番号 217)
超可変ドメイン	ISIQNRNMSVDQGQSWPFKILGTQSFYFYFYTGANLPGDTTQIPVADLL PLTNPRINRPGQSLNEAKITDHITFTEYKNKFTNYWGNPFNKHIQEHLD MILYSLKSPEAIKNEWTTENMKWNQLNNAG (配列番号 218)
N22	TMALTPFNEPIFTQIQYNPDRDTGEDTQLYLLSNATGTGWDPPGIPELIL EGFPLWLIYWGFADFQKNLKKVTNIDTNYMLVAKTKFTQKPGTFYLVI LNDTFVEGNSPYEKQPLPEDNIKWYPQVQYQLEAQNKLLQTGPFTPNI QGQLSDNISMFYKFYFK (配列番号 219)
C 末端ドメイン	WGGSPPKAINVENPAHQIQYPIPRNEHETTSLQSPGEAPESILYSFDYRH GNYTTTALSRISQDWALKDTVSKITEPDRQQLLKQALECLQISEETQEK KEKEVQQLISNLRQQQQLYRERIISLLKDQ (配列番号 220)

【０３２５】

【表２１】

表 R. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*)ORF1 アミノ酸部分配列(ガンマトルクウイルス(*Gammatorquevirus*))

名称	Ring4
属/クレード	*ガンマトルクウイルス(Gammatorquevirus)*
アクセッション番号	
タンパク質アクセッション番号	

全配列: 662 AA

```
1       10        20        30        40        50
|       |         |         |         |         |
MPFWWRRRRKFWTNNRFNYTKRRRYRKRWPRRRRRRRPYRRPVRRRRRKL
RKVKRKKKSLIVRQWQPDSIRTCKIIGQSAIVVGAEGKQMYCYTVNKLIN
VPPKTPYGGGFGVDQYTLKYLYEEYRFAQNIWTQSNVLKDLCRYINVKLI
FYRDNKTDFVLSYDRNPPFQLTKFTYPGAHPQQIMLQKHHKFILSQMTKP
NGRLTKKLKIKPPKQMLSKWFFSKQFCKYPLLSLKASALDLRHSYLGCCN
ENPQVFFYYLNHGYYTITNWGAQSSTAYRPNSKVTDTTYYRYKNDRKNIN
IKSHEYEKSISYENGYFQSSFLQTQCIYTSERGEACIAEKPLGIAIYNPV
KDNGDGNMIYLVSTLANTWDQPPKDSAILIQGVPIWLGLFGYLDYCRQIK
ADKTWLDSHVLVIQSPAIFTYPNPGAGKWYCPLSQSFINGNGPFNQPPTL
LQKAKWFPQIQYQQEIINSFVESGPFVPKYANQTESNWELKYKYVFTFKW
GGPQFHEPEIADPSKQEQYDVPDTFYQTIQIEDPEGQDPRSLIHDWDYRR
GFIKERSLKRMSTYFSTHTDQQATSEEDIPKKKKRIGPQLTVPQQKEEET
LSCLLSLCKKDTFQETETQEDLQQLIKQQQEQQLLLKRNILQLIHKLKEN
            QQMLQLHTGMLP（配列番号 925）
```

アノテーション:

推定ドメイン	*AA 範囲*
Arg リッチ領域	1 – 58
ゼリーロールドメイン	59 - 260
超可変領域	261 - 339
N22	340 – 499
C 末端ドメイン	500 – 662

【０３２６】

【表２２】

表 S.　例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*)ORF1 アミノ酸部分配列(ガンマトルクウイルス(*Gammatorquevirus*))

Ring4 (ガンマトルクウイルス(*Gammatorquevirus*))	
Arg リッチ領域	MPFWWRRRRKFWTNNRFNYTKRRRYRKRWPRRRRRRRPYRRPVRRR RRKLRKVKRKKK (配列番号 926)
ゼリーロールドメイン	SLIVRQWQPDSIRTCKIIGQSAIVVGAEGKQMYCYTVNKLINVPPKTPY GGGFGVDQYTLKYLYEEYRFAQNIWTQSNVLKDLCRYINVKLIFYRDN KTDFVLSYDRNPPFQLTKFTYPGAHPQQIMLQKHHKFILSQMTKPNGR LTKKLKIKPPKQMLSKWFFSKQFCKYPLLSLKASALDLRHSYLGCCNE NPQVFFYYL (配列番号 927)
超可変ドメイン	NHGYYTITNWGAQSSTAYRPNSKVTDTTYYRYKNDRKNINIKSHEYEK SISYENGYFQSSFLQTQCIYTSERGEACIAE (配列番号 928)
N22	KPLGIAIYNPVKDNGDGNMIYLVSTLANTWDQPPKDSAILIQGVPIWLG LFGYLDYCRQIKADKTWLDSHVLVIQSPAIFTYPNPGAGKWYCPLSQS FINGNGPFNQPPTLLQKAKWFPQIQYQQEIINSFVESGPFVPKYANQTES NWELKYKYVFTFK (配列番号 929)
C 末端ドメイン	WGGPQFHEPEIADPSKQEQYDVPDTFYQTIQIEDPEGQDPRSLIHDWDY RRGFIKERSLKRMSTYFSTHTDQQATSEEDIPKKKKRIGPQLTVPQQKE EETLSCLLSLCKKDTFQETETQEDLQQLIKQQQEQQLLLKRNILQLIHKL KENQQMLQLHTGMLP (配列番号 930)

【０３２７】

一部の実施形態では、第１領域は、核酸分子（例えば、ＤＮＡ）に結合することができる。一部の実施形態では、塩基性残基は、アルギニン、ヒスチジン、若しくはリシン、又はそれらの組合せから選択される。一部の実施形態では、第１領域は、少なくとも６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、若しくは１００％のアルギニン残基（例えば、６０％～９０％、６０％～８０％、７０％～９０％、若しくは７０～８０％のアルギニン残基）を含む。一部の実施形態では、第１領域は、約３０～１２０アミノ酸（例えば、約４０～１２０、４０～１００、４０～９０、４０～８０、４０～７０、５０～１００、５０～９０、５０～８０、５０～７０、６０～１００、又は６０～８０個のアミノ酸）を含む。一部の実施形態では、第１領域は、ウイルスＯＲＦ１アルギニンリッチ領域（例えば、本明細書に記載される、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質由来のアルギニンリッチ領域）の構造又は活性を含む。一部の実施形態では、第１領域は、核局在化シグナルを含む。

【０３２８】

一部の実施形態では、第２領域は、ゼリーロールドメイン、例えば、ウイルスＯＲＦ１ゼリーロールドメイン（例えば、本明細書に記載される、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質由来のゼリーロールドメイン）の構造又は活性を含む。一部の実施形態では、第２領域は、別のＯＲＦ１分子の第２領域と結合して、タンパク質性外層（例えば、キャプシド）又はその部分を形成することができる。

【０３２９】

一部の実施形態では、第４領域は、タンパク質性外層（例えば、本明細書に記載される、ＯＲＦ１分子の多量体を含むタンパク質性外層）の表面に曝露される。

【０３３０】

一部の実施形態では、第１領域、第２領域、第３領域、第４領域、及び／又はＨＶＲは

各々、３つ以下（例えば、０、１、２、若しくは３つ）のβシートを含む。
【０３３１】
一部の実施形態では、第１領域、第２領域、第３領域、第４領域、及び／又はＨＶＲの１つ若しくは複数は、異種アミノ酸配列（例えば、異種ＯＲＦ１分子由来の対応する領域）で置換され得る。一部の実施形態では、異種アミノ酸配列は、例えば、本明細書に記載される所望の機能性断片を有する。
【０３３２】
一部の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、複数の保存モチーフ（例えば、約５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、若しくはそれ以上のアミノ酸を含むモチーフ）を含む（例えば、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号の図３４に示す通り）。一部の実施形態では、保存モチーフは、１つ若しくは複数の野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）クレード（例えば、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）、クレード１；アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）、クレード２；アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）、クレード３；アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）、クレード４；アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）、クレード５；アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）、クレード６；若しくはアルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）、クレード７；ベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）；及び／又はガンマトルクウイルス（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）のＯＲＦ１タンパク質に対して６０、７０、８０、８５、９０、９５、若しくは１００％の配列同一性を示し得る。複数の実施形態では、保存モチーフは各々、１～１０００（例えば、５～１０、５～１５、５～２０、１０～１５、１０～２０、１５～２０、５～５０、５～１００、１０～５０、１０～１００、１０～１０００、５０～１００、５０～１０００、又は１００～１０００）アミノ酸長を有する。特定の実施形態では、保存モチーフは、ＯＲＦ１分子の配列の約２～４％（例えば、約１～８％、１～６％、１～５％、１～４％、２～８％、２～６％、２～５％、若しくは２～４％）から構成され、各々、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）クレードのＯＲＦ１タンパク質中の対応するモチーフに対して１００％の配列同一性を示す。特定の実施形態では、保存モチーフは、ＯＲＦ１分子の配列の約５～１０％（例えば、約１～２０％、１～１０％、５～２０％、若しくは５～１０％）から構成され、各々、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）クレードのＯＲＦ１タンパク質中の対応するモチーフに対して８０％の配列同一性を示す。特定の実施形態では、保存モチーフは、ＯＲＦ１分子の配列の約１０～５０％（例えば、約１０～２０％、１０～３０％、１０～４０％、１０～５０％、２０～４０％、２０～５０％、若しくは３０～５０％）から構成され、各々、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）クレードのＯＲＦ１タンパク質中の対応するモチーフに対して６０％の配列同一性を示す。一部の実施形態では、保存モチーフは、表１９に列挙される１つ又は複数のアミノ酸配列を含む。
【０３３３】
一部の実施形態では、ＯＲＦ１分子又はそれをコード化する核酸分子は、例えば、本明細書に記載される野生型ＯＲＦ１タンパク質と比較して、少なくとも１つの相違（例えば、突然変異、化学修飾、若しくはエピジェネティックな改変）を含む。
【０３３４】
Ｎ２２ドメイン内の保存ＯＲＦ１モチーフ
一部の実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチド（例えば、ＯＲＦ１分子）は、アミノ酸配列ＹＮＰＸ^{2}ＤＸＧＸ^{2}Ｎ（配列番号８２９）（Ｘ^{n}は、任意のｎ個のアミノ酸の連続した配列である）を含む。例えば、Ｘ^{n}は、任意の２つのアミノ酸の連続した配列を示す。一部の実施形態では、ＹＮＰＸ^{2}ＤＸＧＸ^{2}Ｎ（配列番号８２９）は、例えば、本明細書に記載されるＯＲＦ１分子のＮ２２ドメイン内に含まれる。一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子エレメントは、アミノ酸配列ＹＮＰＸ^{2}ＤＸＧＸ^{2}Ｎ

（配列番号８２９）（Ｘ^{n}は、任意のｎ個のアミノ酸の連続した配列である）をコード化する核酸配列（例えば、本明細書に記載される、例えば、ＯＲＦ１分子をコード化する核酸配列）を含む。

【０３３５】

一部の実施形態では、ポリペプチド（例えば、ＯＲＦ１分子）は、例えば、Ｎ２２ドメイン中に、例えば、ＹＮＰＸ^{2}ＤＸＧＸ^{2}Ｎ（配列番号８２９）モチーフの１部分とフランキングする及び／又はそれを含む保存二次構造を含む。一部の実施形態では、この保存二次構造は、第１β鎖及び／又は第２β鎖を含む。一部の実施形態では、第１β鎖は、約５～６（例えば、３、４、５、６、７、又は８）アミノ酸長である。一部の実施形態では、第１β鎖は、ＹＮＰＸ^{2}ＤＸＧＸ^{2}Ｎ（配列番号８２９）モチーフのＮ末端にチロシン（Ｙ）残基を含む。一部の実施形態では、ＹＮＰＸ^{2}ＤＸＧＸ^{2}Ｎ（配列番号８２９）モチーフは、ランダムコイル（例えば、ランダムコイルの約８～９アミノ酸）を含む。一部の実施形態では、第２β鎖は、約７～８（例えば、５、６、７、８、９、又は１０）アミノ酸長である。一部の実施形態では、第２β鎖は、ＹＮＰＸ^{2}ＤＸＧＸ^{2}Ｎ（配列番号８２９）モチーフのＣ末端にアスパラギン（Ｎ）残基を含む。

【０３３６】

例示的なＹＮＰＸ^{2}ＤＸＧＸ^{2}Ｎ（配列番号８２９）モチーフフランキング二次構造を、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の実施例４７及び図４８に記載する。一部の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の図４８に示す二次構造エレメント（例えば、ベータ鎖）の１つ又は複数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、若しくは全部）を含む領域を含む。一部の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、ＹＮＰＸ^{2}ＤＸＧＸ^{2}Ｎ（配列番号８２９）モチーフ（例えば、本明細書に記載されるような）とフランキングする、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の図４８に示す二次構造エレメント（例えば、ベータ鎖）の１つ又は複数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、若しくは全部）を含む領域を含む。

【０３３７】

ＯＲＦ１ゼリーロールドメイン内の保存二次構造

一部の実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチド（例えば、ＯＲＦ１分子）は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質（例えば、本明細書に記載の通り）に含まれる１つ又は複数の二次構造エレメントを含む。一部の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質のゼリーロールドメイン（例えば、本明細書に記載の通り）に含まれる１つ又は複数の二次構造エレメントを含む。一般に、ＯＲＦ１ゼリーロールドメインは、Ｎ末端からＣ末端方向の順で、第１β鎖、第２β鎖、第１αヘリックス、第３β鎖、第４β鎖、第５β鎖、第２αヘリックス、第６β鎖、第７β鎖、第８β鎖、及び第９β鎖を含む二次構造を含む。一部の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、Ｎ末端からＣ末端方向の順で、第１β鎖、第２β鎖、第１αヘリックス、第３β鎖、第４β鎖、第５β鎖、第２αヘリックス、第６β鎖、第７β鎖、第８β鎖、及び／又は第９β鎖を含む二次構造を含む。

【０３３８】

一部の実施形態では、１対の保存二次構造エレメント（即ち、β鎖及び／又はαヘリックス）は、例えば、ランダムコイル配列、β鎖、若しくはαヘリックス、又はそれらの組合せを含む、介在アミノ酸配列によって隔てられている。保存二次構造エレメント間の介在アミノ酸配列は、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、又はそれ以上のアミノ酸を含み得る。一部の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、１つ若しくは複数の追加β鎖及び／又はαヘリックス（例えば、ゼリーロールドメイン内に）をさらに含み得る。一部の実施形態では、連続したβ鎖又は連続したαヘリックスを組み合わせてもよい。一部の実施形態では、第１β鎖及び第２β鎖は、より大きなβ鎖に含まれる。一部の実施形態では、第３β鎖及び第４β鎖は、より大き

なβ鎖に含まれる。一部の実施形態では、第４β鎖及び第５β鎖は、より大きなβ鎖に含まれる。一部の実施形態では、第６β鎖及び第７β鎖は、より大きなβ鎖に含まれる。一部の実施形態では、第７β鎖及び第８β鎖は、より大きなβ鎖に含まれる。一部の実施形態では、第８β鎖及び第９β鎖は、より大きなβ鎖に含まれる。

【０３３９】

一部の実施形態では、第１β鎖は、約５～７（例えば、３、４、５、６、７、８、９、又は１０）アミノ酸長である。一部の実施形態では、第２β鎖は、約１５～１６（例えば、１３、１４、１５、１６、１７、１８、又は１９）アミノ酸長である。一部の実施形態では、第１αヘリックスは、約１５～１７（例えば、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、又は２０）アミノ酸長である。一部の実施形態では、第３β鎖は、約３～４（例えば、１、２、３、４、５、又は６）アミノ酸長である。一部の実施形態では、第４β鎖は、約１０～１１（例えば、８、９、１０、１１、１２、又は１３）アミノ酸長である。一部の実施形態では、第５β鎖は、約６～７（例えば、４、５、６、７、８、９、又は１０）アミノ酸長である。一部の実施形態では、第２αヘリックスは、約８～１４（例えば、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、又は１７）アミノ酸長である。一部の実施形態では、第２αヘリックスは、２つのより小さなαヘリックスに切断されていてもよい（例えば、ランダムコイル配列により隔てられている）。一部の実施形態では、２つのより小さなαヘリックスの各々は、約４～６（例えば、２、３、４、５、６、７、又は８）アミノ酸長である。一部の実施形態では、第６β鎖は、約４～５（例えば、２、３、４、５、６、又は７）アミノ酸長である。一部の実施形態では、第７β鎖は、約５～６（例えば、３、４、５、６、７、８、又は９）アミノ酸長である。一部の実施形態では、第８β鎖は、約７～９（例えば、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、又は１３）アミノ酸長である。一部の実施形態では、第９β鎖は、約５～７（例えば、３、４、５、６、７、８、９、又は１０）アミノ酸長である。

【０３４０】

例示的なゼリーロールドメイン二次構造はＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の実施例４７及び図４７に記載されている。一部の実施形態では、ＯＲＦ１分子は、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の図４７に示すゼリーロールドメイン二次構造のいずれかの二次構造エレメント（例えば、β鎖及び／又はαヘリックス）の１つ若しくは複数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、若しくは全部）を含む領域を含む。

【０３４１】

コンセンサスＯＲＦ１ドメイン配列

一部の実施形態では、例えば、本明細書に記載されるＯＲＦ１分子は、ゼリーロールドメイン、Ｎ２２ドメイン、及び／又はＣ末端ドメイン（ＣＴＤ）の１つ若しくは複数を含む。一部の実施形態では、ゼリーロールドメインは、本明細書に記載される（例えば、表３７Ａ～３７Ｃのいずれかに列挙される）ゼリーロールドメインコンセンサス配列を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｎ２２ドメインは、本明細書に記載される（例えば、表３７Ａ～３７Ｃのいずれかに列挙される）Ｎ２２ドメインコンセンサス配列を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＣＴＤドメインは、本明細書に記載される（例えば、表３７Ａ～３７Ｃのいずれかに列挙される）ＣＴＤドメインコンセンサス配列を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、表３７Ａ～３７Ｃのいずれかにフォーマット「（Ｘａ－ｂ）」で列挙されるアミノ酸は、連続したシリーズのアミノ酸を含み、その際、このシリーズは、少なくともａ、且つ多くともｂのアミノ酸を含む。特定の実施形態では、上記シリーズのアミノ酸はすべて同じである。他の実施形態では、上記シリーズは、少なくとも２（例えば、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、又は２１）個の異なるアミノ酸を含む。

【０３４２】

【表２３】

表 37A. アルファトルクウイルス(Alphatorquevius)ORF1 ドメインコンセンサス配列

ドメイン	配列	配列番号
ゼリーロール	LVLTQWQPNTVRRCYIRGYLPLIICGEN(X_{0-3})TTSRNYATHS DDTIQKGPFGGGMSTTTFSLRVLYDEYQRFMNRWTYSNED LDLARYLGCKFTFYRHPDXDFIVQYNTNPPFKDTKLTAPSIH P(X_{1-5})GMLMLSKRKILIPSLKTRPKGKHYVKVRIGPPKLFED KWYTQSDLCDVPLVXLYATAADLQHPFGSPQTDNPCVTFQ VLGSXYNKHLSISP; ここで、X = 任意のアミノ酸。	227
N22	SNFEFPGAYTDITYNPLTDKGVGNMVWIQYLTKPDTIXDKT QS(X_{0-3})KCLIEDLPLWAALYGYVDFCEKETGDSAIIXNXGRV LIRCPYTKPPLYDKT(X_{0-4})NKGFVPYSTNFGNGKMPGGSGY VPIYWRARWYPTLFHQKEVLEDIVQSGPFAYKDEKPSTQLV MKYCFNFN; ここで、X = 任意のアミノ酸。	228
CTD	WGGNPISQQVVRNPCKDSG(X_{0-3})SGXGRQPRSVQVVDPKY MGPEYTFHSWDWRRGLFGEKAIKRMSEQPTDDEIFTGGXPK RPRRDPPTXQXPEE(X_{1-4})QKESSSFR(X_{2-14})PWESSSQEXESES QEEEE(X_{0-30})EQTVQQQLRQQLREQRRLRVQLQLLFQQLLKT (X_{0-4})QAGLHINPLLLSQA(X_{0-40})*; ここで、X = 任意のアミノ酸。	229

【０３４３】

【表２４】

表 37B.　ベータトルクウイルス(Betatorquevius)ORF1 ドメインコンセンサス配列

ドメイン	配列	配列番号
ゼリーロール	LKQWQPSTIRKCKIKGYLPLFQCGKGRISNNYTQYKESIVPH HEPGGGGWSIQQFTLGALYEEHLKLRNWWTKSNDGLPLVR YLGCTIKLYRSEDTDYIVTYQRCYPMTATKLTYLSTQPSRM LMNKHKIIVPSKXT(X_{1-4})NKKKKPYKKIFIKPPSQMQNKWYF QQDIANTPLLQLTXTACSLDRMYLSSDSISNNITFTSLNTNFF QNPNFQ; ここで、X = 任意のアミノ酸。	230
N22	(X_{4-10})TPLYFECRYNPFKDKGTGNKVYLVSNN(X_{1-8})TGWDPP TDPDLIIEGFPLWLLLWGWLDWQKKLGKIQNIDTDYILVIQS XYYIPP(X_{1-3})KLPYYVPLDXD(X_{0-2})FLHGRSPY(X_{3-16})PSDKQH WHPKVRFQXETINNIALTGPGTPKLPNQKSIQAHMKYKFYF K; ここで、X = 任意のアミノ酸。	231
CTD	WGGCPAPMETITDPCKQPKYPIPNNLLQTTSLQXPTTPIETYL YKFDERRGLLTKKAAKRIKKDXTTETTLFTDTGXXTSTTLPT XXQTETTQEEXTSEEE(X_{0-5})ETLLQQLQQLRRKQKQLRXRIL QLLQLLXLL(X_{0-26})*; ここで、X = 任意のアミノ酸。	232

【０３４４】

【表２５】

表 37C. ガンマトルクウイルス(Gammatorquevius)ORF1ドメインコンセンサス配列

ドメイン	配列	配列番号
ゼリーロール	TIPLKQWQPESIRKCKIKGYGTLVLGAEGRQFYCYTNEKDE YTPPKAPGGGGFGVELFSLEYLYEQWKARNNIWTKSNXYK DLCRYTGCKITFYRHPTTDFIVXYSRQPPFEIDKXTYMXXHP QXLLLRKHKKIILSKATNPKGKLKKKIKIKPPKQMLNKWFF QKQFAXYGLVQLQAAACBLRYPRLGCCNENRLITLYYLN; ここで、X = 任意のアミノ酸。	233
N22	LPIVVARYNPAXDTGKGNKXWLXSTLNGSXWAPPTTDKDL IIEGLPLWLALYGYWSYJKKVKKDKGILQSHMFVVKSPAIQP LXTATTQXTFYPXIDNSFIQGKXPYDEPJTXNQKKLWYPTLE HQQETINAIVESGPYVPKLDNQKNSTWELXYXYTFYFK; ここで、X = 任意のアミノ酸。	234
CTD	WGGPQIPDQPVEDPKXQGTYPVPDTXQQTIQIXNPLKQKPE TMFHDWDYRRGIITSTALKRMQENLETDSSFXSDSEETP(X_{0-2})KKKKRLTXELPXPQEETEEIQSCLLSLCEESTCQEE(X_{1-6})ENL QQLIHQQQQQQQLKHNILKLLSDLKZKQRLLQLQTGILE(X_{1-10})*; ここで、X = 任意のアミノ酸。	235

【０３４５】

一部の実施形態では、ゼリーロールドメインは、表２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、Ｄ２、Ｄ４、Ｄ６、Ｄ８、Ｄ１０、若しくは３７Ａ～３７Ｃのいずれかに列挙されるゼリーロールドメインアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Ｎ２２ドメインは、表２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、Ｄ２、Ｄ４、Ｄ６、Ｄ８、Ｄ１０、若しくは３７Ａ～３７Ｃのいずれかに列挙されるＮ２２ドメインアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＣＴＤドメインは、表２１、２３、２５、２７、２９、３１、３３、３５、Ｄ２、Ｄ４、Ｄ６、Ｄ８、Ｄ１０、若しくは３７Ａ～３７Ｃのいずれかに列挙されるＣＴＤドメインアミノ酸配列、又はそれに対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０３４６】

ＯＲＦ１タンパク質配列の同定

一部の実施形態では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質配列、又はＯＲＦ１タンパク質をコード化する核酸配列は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）のゲノム（例えば、核酸シーケンシング技術、例えば、ディープシーケンシング技術によって同定された推定アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム）

から同定することができる。一部の実施形態では、ＯＲＦ１タンパク質配列は、以下の選択基準のうちの１つ又は複数（例えば、１、２、若しくは３つ全部）によって同定される：

【０３４７】

（ｉ）長さ選択：タンパク質配列（例えば、以下の（ｉｉ）又は（ｉｉｉ）に記載の基準に合格する推定アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１配列）は、推定アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質を同定するために、約６００のアミノ酸残基を超えるものについてサイズ選択され得る。一部の実施形態では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質配列は、少なくとも約６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、９５０、若しくは１０００アミノ酸残基の長さである。一部の実施形態では、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質配列は、少なくとも約７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、９００、若しくは１０００アミノ酸残基の長さである。一部の実施形態では、ベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質配列は、少なくとも約６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７５０、８００、９００、若しくは１０００アミノ酸残基の長さである。一部の実施形態では、ガンマトルクウイルス（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質配列は、少なくとも約６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７５０、８００、９００、若しくは１０００アミノ酸残基の長さである。一部の実施形態では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質をコード化する核酸配列は、少なくとも約１８００、１９００、２０００、２１００、２２００、２３００、２４００、若しくは２５００ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質配列をコード化する核酸配列は、少なくとも約２１００、２１５０、２２００、２２５０、２３００、２４００、若しくは２５００ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、ベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質配列をコード化する核酸配列は、少なくとも約１９００、１９５０、２０００、２５００、２１００、２１５０、２２００、２２５０、２３００、２４００、若しくは２５００若しくは１０００ヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、ガンマトルクウイルス（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質配列をコード化する核酸配列は、少なくとも約１９００、１９５０、２０００、２５００、２１００、２１５０、２２００、２２５０、２３００、２４００、若しくは２５００若しくは１０００ヌクレオチドの長さである。

【０３４８】

（ｉｉ）ＯＲＦ１モチーフの存在：タンパク質配列（例えば、上記の（ｉ）又は以下の（ｉｉｉ）に記載される基準に合格する推定アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１配列）は濾過されて、上述したＮ２２ドメイン中の保存ＯＲＦ１モチーフを含有するものを同定することができる。一部の実施形態では、推定アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１配列は、配列ＹＮＰＸＸＤＸＧＸＸＮを含む。一部の実施形態では、推定アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１配列は、配列Ｙ［ＮＣＳ］ＰＸＸＤＸ［ＧＡＳＫＲ］ＸＸ［ＮＴＳＶＡＫ］を含む。

【０３４９】

（ｉｉｉ）アルギニンリッチ領域の存在：タンパク質配列（例えば、上記の（ｉ）及び／又は（ｉｉ）に記載される基準に合格する推定アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１配列）は、アルギニンリッチ領域（例えば、本明細書に記載されるような）を含むものについて濾過することができる。一部の実施形態では、推定アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１配列は、少なくとも３０％（例えば、少なくとも約２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、若しくは５０％）のアルギニン残基を含む少なくとも約３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、若しくは７０のアミノ酸の連続配列を含む。一部の実施形態では、推定アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉ

ｒｕｓ）ＯＲＦ１配列は、少なくとも３０％（例えば、少なくとも約２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、若しくは５０％）のアルギニン残基を含む約３５～４０、４０～４５、４５～５０、５０～５５、５５～６０、６０～６５、若しくは６５～７０アミノ酸の連続配列を含む。一部の実施形態では、アルギニンリッチ領域は、推定アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質の開始コドンの少なくとも約３０、４０、５０、６０、７０、若しくは８０アミノ酸の下流に位置する。一部の実施形態では、アルギニンリッチ領域は、推定アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１タンパク質の開始コドンの少なくとも約５０アミノ酸の下流に位置する。

【０３５０】

ＯＲＦ２分子

一部の実施形態では、アネロベクターは、ＯＲＦ２分子及び／又はＯＲＦ２分子をコード化する核酸を含む。概して、ＯＲＦ２分子は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２タンパク質の構造特徴及び／又は活性を有するポリペプチド（例えば、本明細書に記載される、例えば、表Ａ２、Ａ４、Ａ６、Ａ８、Ａ１０、Ａ１２、Ｃ１～Ｃ５、２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、若しくは１８のいずれかに列挙されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２タンパク質）、又はその機能性断片を含む。一部の実施形態では、ＯＲＦ２分子は、表Ａ２、Ａ４、Ａ６、Ａ８、Ａ１０、Ａ１２、Ｃ１～Ｃ５、２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、若しくは１８のいずれかに示されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２タンパク質配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０３５１】

一部の実施形態では、ＯＲＦ２分子は、例えば、本明細書に記載される、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）、ベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）、又はガンマトルクウイルス（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２タンパク質に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＯＲＦ２分子（例えば、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２タンパク質に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有するＯＲＦ２分子）は、２５０アミノ酸以下（例えば、約１５０～２００アミノ酸）の長さを有する。一部の実施形態では、ＯＲＦ２分子（例えば、ベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２タンパク質に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有するＯＲＦ２分子）は、約５０～１５０アミノ酸）の長さを有する。一部の実施形態では、ＯＲＦ２分子（例えば、ガンマトルクウイルス（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２タンパク質に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有するＯＲＦ２分子）は、約１００～２００アミノ酸（例えば、約１００～１５０アミノ酸）の長さを有する。一部の実施形態では、ＯＲＦ２分子は、ヘリックスターンヘリックスモチーフ（例えば、ターン領域にフランキングする２つのαヘリックスを含むヘリックスターンヘリックスモチーフ）を含む。一部の実施形態では、ＯＲＦ２分子は、ＴＴＶ分離株ＴＡ２７８又はＴＴＶ分離株ＳＡＮＢＡＮのＯＲＦ２タンパク質のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、ＯＲＦ２分子は、タンパク質ホスファターゼ活性を有する。一部の実施形態では、ＯＲＦ２分子又はそれをコード化する核酸分子は、本明細書に記載される（例えば、表Ａ２、Ａ４、Ａ６、Ａ８、Ａ１０、Ａ１２、Ｃ１～Ｃ５、２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、若しくは１８）に記載される、野生型ＯＲＦ２タンパク質と比較して、少なくとも１つの相違（例えば、突然変異、化学修飾、若しくはエピジェネティックな改変）を含む。

【０３５２】

保存ＯＲＦ２モチーフ

一部の実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチド（例えば、ＯＲＦ２モチーフ）は、アミノ酸配列［Ｗ／Ｆ］Ｘ^{7}ＨＸ^{3}ＣＸ^{1}ＣＸ^{5}Ｈ（配列番号９４９）を含み、ここで、Ｘ^{n}は、任意のｎ個のアミノ酸の連続した配列である。複数の実施形態では、Ｘ^{7}は、任意の７アミノ酸の連続した配列を示す。複数の実施形態では、Ｘ^{3}は、任意の３アミノ酸の連続した配列を示す。複数の実施形態では、Ｘ^{1}は、任意の単一アミノ酸を示す。複数の実施形態では、Ｘ^{5}は、任意の５アミノ酸の連続した配列を示す。一部の実施形態では、［Ｗ／Ｆ］は、トリプトファン又はフェニルアラニンのいずれかであり得る。一部の実施形態では、［Ｗ／Ｆ］Ｘ^{7}ＨＸ^{3}ＣＸ^{1}ＣＸ^{5}Ｈ（配列番号９４９）は、例えば、本明細書に記載されるＯＲＦ２のＮ２２ドメイン内に含まれる。一部の実施形態では、本明細書に記載される遺伝子エレメントは、アミノ酸配列［Ｗ／Ｆ］Ｘ^{7}ＨＸ^{3}ＣＸ^{1}ＣＸ^{5}Ｈ（配列番号９４９）（Ｘ^{n}は、任意のｎ個のアミノ酸の連続した配列である）をコード化する核酸配列（例えば、本明細書に記載のように、ＯＲＦ２分子をコード化する核酸配列）を含む。

【０３５３】

遺伝子エレメント

一部の実施形態では、アネロベクターは、遺伝子エレメントを含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、以下の特徴のうち１つ若しくは複数を有する：宿主細胞のゲノムと実質的に相互作用しない、エピソーム核酸である、一本鎖ＤＮＡである、環状である、約１～１０ｋｂである、細胞の核内に存在する、内在性タンパク質によって結合され得る、宿主又は標的細胞の遺伝子、活性、若しくは機能をターゲティングするポリペプチド若しくは核酸（例えば、ＲＮＡ、ｉＲＮＡ、ｍｉｃｒｏＲＮＡ）などのエフェクターを産生する。一実施形態では、遺伝子エレメントは、実質的に非相互作用性ＤＮＡである。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、パッケージングシグナル、例えば、キャプシドタンパク質に結合する配列を含む。一部の実施形態では、パッケージング又はキャプシド結合配列の外部で、遺伝子エレメントは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）核酸配列に対して７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％未満の配列同一性を有し、例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）核酸配列に対して７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％未満の配列同一性を有する。一部の実施形態では、パッケージング又はキャプシド結合配列の外部で、遺伝子エレメントは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）核酸配列に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％同一である５００、４５０、４００、３５０、３００、２５０、２００、１５０、若しくは１００個未満の連続したヌクレオチドを有する。特定の実施形態では、遺伝子エレメントは、プロモータ配列と、治療用エフェクターをコード化する配列と、キャプシド結合タンパク質と、を含む環状の一本鎖ＤＮＡである。

【０３５４】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、２０ｋｂ未満（例えば、約１９ｋｂ、１８ｋｂ、１７ｋｂ、１６ｋｂ、１５ｋｂ、１４ｋｂ、１３ｋｂ、１２ｋｂ、１１ｋｂ、１０ｋｂ、９ｋｂ、８ｋｂ、７ｋｂ、６ｋｂ、５ｋｂ、４ｋｂ、３ｋｂ、２ｋｂ、１ｋｂ未満）の長さを有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、独立に、又は加えて、１０００ｂ超（例えば、少なくとも約１．１ｋｂ、１．２ｋｂ、１．３ｋｂ、１．４ｋｂ、１．５ｋｂ、１．６ｋｂ、１．７ｋｂ、１．８ｋｂ、１．９ｋｂ、２ｋｂ、２．１ｋｂ、２．２ｋｂ、２．３ｋｂ、２．４ｋｂ、２．５ｋｂ、２．６ｋｂ、２．７ｋｂ、２．８ｋｂ、２．９ｋｂ、３ｋｂ、３．１ｋｂ、３．２ｋｂ、３．３ｋｂ、３．４ｋｂ、３．５ｋｂ、３．６ｋｂ、３．７ｋｂ、３．８ｋｂ、３．９ｋｂ、４ｋｂ、４．１ｋｂ、４．２ｋｂ、４．３ｋｂ、４．４ｋｂ、４．５ｋｂ、４．６ｋｂ、４．７ｋｂ、４．８ｋｂ、４．９ｋｂ、５ｋｂ以上）の長さを有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、約２．５～４．６、２．８～４．０、３．０～３．８、又は３．２～３．７ｋｂの長さを有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、約１．５～２．０、１．５～２．５、１

．５～３．０、１．５～３．５、１．５～３．８、１．５～３．９、１．５～４．０、１．５～４．５、又は１．５～５．０ｋｂの長さを有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、約２．０～２．５、２．０～３．０、２．０～３．５、２．０～３．８、２．０～３．９、２．０～４．０、２．０～４．５、又は２．０～５．０ｋｂの長さを有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、約２．５～３．０、２．５～３．５、２．５～３．８、２．５～３．９、２．５～４．０、２．５～４．５、又は２．５～５．０ｋｂの長さを有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメ５ントは、約３．０～５．０、３．５～５．０、４．０～５．０、又は４．５～５．０ｋｂの長さを有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、約１．５～２．０、２．０～２．５、２．５～３．０、３．０～３．５、３．１～３．６、３．２～３．７、３．３～３．８、３．４～３．９、３．５～４．０、４．０～４．５ｋｂ、又は４．５～５．０ｋｂの長さを有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、約３．６～３．９ｋｂの長さを有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、約２．８～２．９ｋｂの長さを有する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、約２．０～３．２ｋｂの長さを有する。

【０３５５】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、本明細書に記載の特徴、例えば、実質的に非病原性のタンパク質をコード化する配列、タンパク質結合配列、調節核酸をコード化する１つ又は複数の配列、１つ又は複数の調節配列、複製タンパク質をコード化する１つ又は複数の配列、及び他の配列のうちの１つ又は複数を含む。

【０３５６】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、二本鎖環状ＤＮＡから産生される（例えば、インビトロ環状化により産生される）。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、二本鎖環状ＤＮＡからのローリングサークル複製により産生される。複数の実施形態では、ローリングサークル複製は、細胞（例えば、宿主細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞、例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ、Ａ５４９細胞、若しくはＪｕｒｋａｔ細胞）中で起こる。複数の実施形態では、遺伝子エレメントは、細胞中のローリングサークル複製により指数関数的に増幅し得る。複数の実施形態では、遺伝子エレメントは、細胞中のローリングサークル複製により線形増幅し得る。複数の実施形態では、二本鎖環状ＤＮＡ又は遺伝子エレメントは、細胞中のローリングサークル複製により、初期量の少なくとも２、４、８、１６、３２、６４、１２８、２５６、５１８、若しくは１０２４倍以上を産生することができる。複数の実施形態では、二本鎖環状ＤＮＡは、例えば、本明細書に記載の通り、細胞内に導入された。

【０３５７】

一部の実施形態では、二本鎖環状ＤＮＡ及び／又は遺伝子エレメントは、１つ又は複数の細菌プラスミドエレメント（例えば、細菌複製起点若しくは選択マーカ、例えば、細菌耐性遺伝子）を含まない。一部の実施形態では、二本鎖環状ＤＮＡ及び／又は遺伝子エレメントは、細菌プラスミドバックボーンを含まない。

【０３５８】

一部の実施形態では、本発明は、（ｉ）実質的に非病原性の外部タンパク質と、（ｉｉ）実質的に非病原性の外部タンパク質に遺伝子エレメントを結合させる外部タンパク質結合配列と、（ｉｉｉ）調節核酸と、をコード化する核酸配列（例えば、ＤＮＡ配列）を含む遺伝子エレメントを含む。こうした実施形態では、遺伝子エレメントは、ネイティブウイルス配列（例えば、本明細書に記載される、例えばネイティブアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列）と比較して、ヌクレオチド配列のいずれか１つに対し少なくとも約６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、及び９９％のヌクレオチド配列同一性を有する１つ若しくは複数の配列を含み得る。

【０３５９】

タンパク質結合配列

多くのウイルスによって使用される戦略は、ウイルスキャプシドタンパク質が、そのゲノム内の特定のタンパク結合配列を認識することである。例えば、酵母のＬ－Ａウイルス

などの非分節型ゲノムを有するウイルスの場合、ゲノムの５’末端に二次構造（ステムループ）と特定の配列があり、その両方がウイルスキャプシドタンパク質との結合に使用される。しかし、レオウイルス科（Ｒｅｏｖｉｒｉｄａｅ）、オルトミクソウイルス科（Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）（インフルエンザ）、ブンヤウイルス科（Ｂｕｎｙａｖｉｒｕｓｅ）及びアレナウイルス科（Ａｒｅｎａｖｉｒｕｓｅｓ）など、分節型ゲノムを有するウイルスは、ゲノムセグメントの各々をパッケージングする必要がある。一部のウイルスは、ウイルスがそれぞれゲノム分子の１つを含有するのを促進するために、セグメントの相補性領域を使用する。他のウイルスは、様々なセグメントの各々に対して特定の結合部位を有する。例えば、Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｓｔｒｕｃｔ Ｂｉｏｌ．２０１０ Ｆｅｂ；２０（１）：１１４－１２０；及びＪｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ（２００３），７７（２４），１３０３６－１３０４１を参照されたい。

【０３６０】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、実質的に非病原性のタンパク質に結合するタンパク結合配列をコード化する。一部の実施形態では、タンパク結合配列は、遺伝子エレメントのタンパク質性外層内へのパッケージングを促進する。一部の実施形態では、タンパク結合配列は、実質的に非病原性のタンパク質のアルギニンリッチ領域に特異的に結合する。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の実施例８に記載のタンパク結合配列を含む。

【０３６１】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、例えば、本明細書に記載されるようなアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列の５’ＵＴＲ保存ドメイン又はＧＣリッチドメインに対して、少なくとも７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有するタンパク質結合配列を含む。

【０３６２】

複数の実施形態では、タンパク質結合配列は、例えば、本明細書に記載されるようなアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）５’ＵＴＲ保存ドメインヌクレオチド配列に対して、少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する。

【０３６３】

５’ＵＴＲ領域

一部の実施形態では、本明細書に記載される核酸分子（例えば、遺伝子エレメント、遺伝子エレメント構築物、又は遺伝子エレメント領域）は、５’ＵＴＲ配列、例えば、本明細書に記載される５’ＵＴＲ保存ドメイン配列（例えば、表Ａ１、Ｂ１、若しくはＣ１のいずれかにおける）、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列を含む。

【０３６４】

一部の実施形態では、５’ＵＴＲ配列は、核酸配列ＡＧＧＴＧＡＧＴＧＡＡＡＣＣＡＣＣＧＡＡＧＴＣＡＡＧＧＧＧＣＡＡＴＴＣＧＧＧＣＴＡＧＧＧＸ$_1$ＣＡＧＴＣＴ、又はそれに対して少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、５’ＵＴＲ配列は、核酸配列ＡＧＧＴＧＡＧＴＧＡＡＡＣＣＡＣＣＧＡＡＧＴＣＡＡＧＧＧＧＣＡＡＴＴＣＧＧＧＣＴＡＧＧＧＸ$_1$ＣＡＧＴＣＴ、又はそれと比べて１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０ヌクレオチド以下の違い（例えば、置換、欠失、又は付加）を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、Ｘ$_1$はＡである。複数の実施形態では、Ｘ$_1$は存在しない。

【０３６５】

一部の実施形態では、５’ＵＴＲ配列は、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）（例えば、Ｒｉｎｇ１）の５’ＵＴＲの核酸配列、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列を含む。複数の実施形態では、５’ＵＴＲ配列は、表

Ａ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインの核酸配列、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して少なくとも９５％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも９５．７７５％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも９７％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ａ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも９７．１８３％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、５’ＵＴＲ配列は、核酸配列ＡＧＧＴＧＡＧＴＴＴＡＣＡＣＡＣＣＧＣＡＧＴＣＡＡＧＧＧＧＣＡＡＴＴＣＧＧＧＣＴＣＧＧＧＡＣＴＧＧＣ、又はそれに対して少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、５’ＵＴＲ配列は、核酸配列ＡＧＧＴＧＡＧＴＴＴＡＣＡＣＡＣＣＧＣＡＧＴＣＡＡＧＧＧＧＣＡＡＴＴＣＧＧＧＣＴＣＧＧＧＡＣＴＧＧＣ、又はそれと比べて、１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０ヌクレオチド以下の違い（例えば、置換、欠失、又は付加）を有する核酸配列を含む。

【０３６６】

一部の実施形態では、５’ＵＴＲ配列は、ベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）（例えば、Ｒｉｎｇ２）の５’ＵＴＲの核酸配列、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列を含む。複数の実施形態では、５’ＵＴＲ配列は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインの核酸配列、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して少なくとも８５％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも８７％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも８７．３２４％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも８８％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも８８．７３２％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも９１％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも９１．５４９％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも９２％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも９２．９５８％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも９４％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも９４．３６６％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも９５％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも９５．７７５％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも９７％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施

形態では、核酸分子は、表Ｂ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも９７．１８３％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、５’ＵＴＲ配列は、核酸配列ＡＧＧＴＧＡＧＴＧＡＡＡＣＣＡＣＣＧＡＡＧＴＣＡＡＧＧＧＧＣＡＡＴＴＣＧＧＧＣＴＡＧＡＴＣＡＧＴＣＴ、又はそれに対して少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、５’ＵＴＲ配列は、核酸配列ＡＧＧＴＧＡＧＴＧＡＡＡＣＣＡＣＣＧＡＡＧＴＣＡＡＧＧＧＧＣＡＡＴＴＣＧＧＧＣＴＡＧＡＴＣＡＧＴＣＴ、又はそれと比べて、１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０ヌクレオチド以下の違い（例えば、置換、欠失、又は付加）を有する核酸配列を含む。

【０３６７】

一部の実施形態では、５’ＵＴＲ配列は、ガンマトルクウイルス（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）（例えば、Ｒｉｎｇ４）の５’ＵＴＲの核酸配列、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列を含む。複数の実施形態では、５’ＵＴＲ配列は、表Ｃ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインの核酸配列、又はそれに対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも９７％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、表Ｃ１に列挙される５’ＵＴＲ保存ドメインに対して、少なくとも９７．１８３％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、５’ＵＴＲ配列は、核酸配列ＡＧＧＴＧＡＧＴＧＡＡＡＣＣＡＣＣＧＡＧＧＴＣＴＡＧＧＧＧＣＡＡＴＴＣＧＧＧＣＴＡＧＧＧＣＡＧＴＣＴ、又はそれに対して少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、５’ＵＴＲ配列は、核酸配列ＡＧＧＴＧＡＧＴＧＡＡＡＣＣＡＣＣＧＡＧＧＴＣＴＡＧＧＧＧＣＡＡＴＴＣＧＧＧＣＴＡＧＧＧＣＡＧＴＣＴ、又はそれと比べて、１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０ヌクレオチド以下の違い（例えば、置換、欠失、又は付加）を有する核酸配列を含む。

【０３６８】

一部の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）の５’ＵＴＲ配列、例えば表３８に示す核酸配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３８に示すコンセンサス５’ＵＴＲ配列の核酸配列を含み、ここで、X_1、X_2、X_3、X_4、及びX_5は、各々独立に任意のヌクレオチドであり、例えば、X_1＝Ｇ又はＴ、X_2＝Ｃ又はＡ、X_3＝Ｇ又はＡ、X_4＝Ｔ又はＣ、及びX_5＝Ａ、Ｃ、又はＴである）。一部の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３８に示すコンセンサス５’ＵＴＲ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３８に示す例示的なＴＴＶ　５’ＵＴＲ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３８に示すＴＴＶ－ＣＴ３０Ｆ　５’ＵＴＲ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３８に示すＴＴＶ－ＨＤ２３ａ　５’ＵＴＲ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９

０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３８に示すＴＴＶ－ＪＡ２０　５’ＵＴＲ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３８に示すＴＴＶ－ＴＪＮ０２　５’ＵＴＲ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３８に示すＴＴＶ－ｔｔｈ８　５’ＵＴＲ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。

【０３６９】

複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク質結合配列）は、表３８に示されるアルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）コンセンサス５’ＵＴＲ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク質結合配列）は、表３８に示されるアルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）クレード１　５’ＵＴＲ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク質結合配列）は、表３８に示されるアルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）クレード２　５’ＵＴＲ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク質結合配列）は、表３８に示されるアルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）クレード３　５’ＵＴＲ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク質結合配列）は、表３８に示されるアルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）クレード４　５’ＵＴＲ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク質結合配列）は、表３８に示されるアルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）クレード５　５’ＵＴＲ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク質結合配列）は、表３８に示されるアルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）クレード６　５’ＵＴＲ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク質結合配列）は、表３８に示されるアルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）クレード７　５’ＵＴＲ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。

【０３７０】
【表２６】

表 38.　*アネロウイルス(Anelloviruses)*由来の例示的な 5' UTR 配列

供給源	配列	配列番号
コンセンサス	CGGGTGCCGX$_1$AGGTGAGTTTACACACCGX$_2$AGT CAAGGGGCAATTCGGGCTCX$_3$GGACTGGCCGGG CX$_4$X$_5$TGGG X$_1$ = G 又は T X$_2$ = C 又は A X$_3$ = G 又は A X$_4$ = T 又は C X$_5$ = A、C、又は T	105
例示的な TTV 配列	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCT WTGGG	106
TTV-CT30F	CGGGTGCCGTAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCT ATGGG	107
TTV-HD23a	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCC CTGGG	108
TTV-JA20	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCT TTGGG	109

【０３７１】

【表２７】

TTV-TJN02	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCT ATGGG	110
TTV-tth8	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGAAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCAGGACTGGCCGGGCT TTGGG	111
アルファトルクウイルス (Alphatorquevirus) コンセンサス 5' UTR	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGC X_1X_2TGGG;ここで、X_1 は T 又は C を含み、及び X_2 は A、C、又は T を含む	112
アルファトルクウイルス (Alphatorquevirus) クレード 1 5' UTR (例えば、TTV-CT30F)	CGGGTGCCGTAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCT ATGGG	113
アルファトルクウイルス (Alphatorquevirus) クレード 2 5' UTR (例えば、TTV-P13-1)	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCC CGGG	114
アルファトルクウイルス (Alphatorquevirus) クレード 3 5' UTR (例えば、TTV-tth8)	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGAAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCAGGACTGGCCGGGCT TTGGG	115
アルファトルクウイルス (Alphatorquevirus) クレード 4 5' UTR (例えば、TTV-HD20a)	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGAGGCCGGGCCAT GGG	116
アルファトルクウイルス (Alphatorquevirus) クレード 5 5' UTR (例えば、TTV-16)	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCC CCGGG	117
アルファトルクウイルス (Alphatorquevirus) クレード 6 5' UTR (例えば、TTV-TJN02)	CGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCT ATGGG	118
アルファトルクウイルス (Alphatorquevirus) クレード 7 5' UTR (例えば、TTV-HD16d)	CGGGTGCCGAAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCT ATGGG	119

【０３７２】

５’ＵＴＲ配列の同定

一部の実施形態では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）５’ＵＴＲ配列は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）のゲノム（例えば、核酸シーケンシング技術、例えば、ディープシーケンシング技術によって同定される推定アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム）内で同定され得る。一部の実施形態では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）５’ＵＴＲ配列は、以下のステップの一方又は両方によって同定される：

【０３７３】

（ｉ）環状化接合点の同定：一部の実施形態では、５’ＵＴＲは、完全長の環状化アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの環状化接合点の近くに位置するであろう。環状化接合点は、例えば、配列の重複領域を同定することによって同定され得る。一部の実施形態では、配列の重複領域は、配列からトリミングされ、環状化された完全長アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム配列を作り出すことができる。一部の実施形態では、ゲノム配列は、ソフトウェアを使用して、この方法で環状化される。理論に拘束されることを望むものではないが、ゲノムをコンピュータ的に環状化することは、非生物学的に配向される配列に対する開始位置をもたらし得る。配列内のランドマークは、配列を適切な方向に再配向させるために使用することができる。例えば、ランドマーク配列は、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム内の１つ又は複数のエレメント（例えば、本明細書に記載されるような、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）のＴＡＴＡボックス、キャップ部位、イニシエータエレメント、転写開始部位、５’ＵＴＲ保存ドメイン、ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ２ｔ／３、３オープンリーディングフレーム領域、ポリ（Ａ）シグナル、又はＧＣリッチ領域のうちの１つ又は複数）に対して実質的相同性を有する配列を含み得る。

【０３７４】

（ｉｉ）５’ＵＴＲ配列の同定：推定アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム配列が一旦得られたら、配列（又はその一部、例えば、約４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、若しくは９０～１００ヌクレオチドの長さを有するもの）を、１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）５’ＵＴＲ配列（例えば、本明細書に記載されるような）と比較して、それに対して実質的相同性を有する配列を同定することができる。一部の実施形態では、推定アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）５’ＵＴＲ領域は、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）５’ＵＴＲ配列に対して、少なくとも５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する。

【０３７５】

ＧＣリッチ領域

一部の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３９に示される核酸配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３９に示されるＧＣリッチ配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。

【０３７６】

複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３９に示される３６ヌクレオチドＧＣリッチ配列（例えば、３６ヌクレオチドコンセンサスＧＣリッチ領域配列１、３６ヌクレオチドコンセンサスＧＣリッチ領域配列２、ＴＴＶクレード１　３６ヌクレオチド領域、ＴＴＶクレード３　３６ヌクレオチド領域、ＴＴＶクレード３分離株ＧＨ１　３６ヌクレオチド領域、ＴＴＶクレード３ｓｌｅ１９３２　３６ヌクレオチド領域、ＴＴＶクレード４ｃｔｄｃ００２　３６ヌクレオチド領域、ＴＴＶクレード５　３６ヌクレオチド領域、ＴＴＶクレード６　３６ヌクレオチド領域、又はＴＴＶクレード７　３６ヌクレオチド領域）に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３９に示される３６ヌクレオチドＧＣリッチ配列（例えば、３６ヌクレオチドコンセンサスＧＣリッチ領域

配列１、３６ヌクレオチドコンセンサスＧＣリッチ領域配列２、ＴＴＶクレード１　３６ヌクレオチド領域、ＴＴＶクレード３　３６ヌクレオチド領域、ＴＴＶクレード３分離株ＧＨ１　３６ヌクレオチド領域、ＴＴＶクレード３ｓｌｅ１９３２　３６ヌクレオチド領域、ＴＴＶクレード４ｃｔｄｃ００２　３６ヌクレオチド領域、ＴＴＶクレード５　３６ヌクレオチド領域、ＴＴＶクレード６　３６ヌクレオチド領域、又はＴＴＶクレード７　３６ヌクレオチド領域）の少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３１、３２、３３、３４、３５、若しくは３６個の連続したヌクレオチドを含む核酸配列を含む。

【０３７７】

複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、例えば、表３９に示されるように、例えば、ＴＴＶ－ＣＴ３０Ｆ、ＴＴＶ－Ｐ１３－１、ＴＴＶ－ｔｔｈ８、ＴＴＶ－ＨＤ２０ａ、ＴＴＶ－１６、ＴＴＶ－ＴＪＮ０２、若しくはＴＴＶ－ＨＤ１６ｄから選択される、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＧＣリッチ領域配列に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、例えば、表３９に示されるように、例えば、ＴＴＶ－ＣＴ３０Ｆ、ＴＴＶ－Ｐ１３－１、ＴＴＶ－ｔｔｈ８、ＴＴＶ－ＨＤ２０ａ、ＴＴＶ－１６、ＴＴＶ－ＴＪＮ０２、若しくはＴＴＶ－ＨＤ１６ｄから選択される、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）ＧＣリッチ領域配列の少なくとも１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１０４、１０５、１０８、１１０、１１１、１１５、１２０、１２２、１３０、１４０、１４５、１５０、１５５、又は１５６個の連続したヌクレオチドを含む。

【０３７８】

複数の実施形態では、３６ヌクレオチドＧＣリッチ領域は、以下：

（ｉ）ＣＧＣＧＣＴＧＣＧＣＧＣＣＧＣＣＣＡＧＴＡＧＧＧＧＧＡＧＣＣＡＴＧＣ（配列番号１６０）；

（ｉｉ）ＧＣＧＣＴＸ$_1$ＣＧＣＧＣＧＣＧＣＣＧＧＧＧＧＧＣＴＧＣＧＣＣＣＣＣＣ（配列番号１６４）（Ｘ$_1$は、Ｔ、Ｇ、若しくはＡから選択される）

（ｉｉｉ）ＧＣＧＣＴＴＣＧＣＧＣＧＣＣＧＣＣＣＡＣＴＡＧＧＧＧＧＣＧＴＴＧＣＧＣＧ（配列番号１６５）；

（ｉｖ）ＧＣＧＣＴＧＣＧＣＧＣＧＣＣＧＣＣＣＡＧＴＡＧＧＧＧＧＣＧＣＡＡＴＧＣＧ（配列番号１６６）；

（ｖ）ＧＣＧＣＴＧＣＧＣＧＣＧＣＧＧＣＣＣＣＣＧＧＧＧＧＡＧＧＣＡＴＴＧＣＣＴ（配列番号１６７）；

（ｖｉ）ＧＣＧＣＴＧＣＧＣＧＣＧＣＧＣＧＣＣＧＧＧＧＧＧＧＣＧＣＣＡＧＣＧＣＣＣ（配列番号１６８）；

（ｖｉｉ）ＧＣＧＣＴＴＣＧＣＧＣＧＣＧＣＧＣＣＧＧＧＧＧＧＣＴＣＣＧＣＣＣＣＣＣＣ（配列番号１６９）；

（ｖｉｉｉ）ＧＣＧＣＴＴＣＧＣＧＣＧＣＧＣＧＣＣＧＧＧＧＧＧＣＴＧＣＧＣＣＣＣＣＣＣ（配列番号１７０）；

（ｉｘ）ＧＣＧＣＴＡＣＧＣＧＣＧＣＧＣＧＣＣＧＧＧＧＧＧＣＴＧＣＧＣＣＣＣＣＣＣ（配列番号１７１）；又は

（ｘ）ＧＣＧＣＴＡＣＧＣＧＣＧＣＧＣＧＣＣＧＧＧＧＧＧＣＴＣＴＧＣＣＣＣＣＣＣＣ（配列番号１７２）；

から選択される。

【０３７９】

複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、核酸配列ＣＧＣＧＣＴＧＣＧＣＧＣＧＣＣＧＣＣＣＡＧＴＡＧＧＧＧＧＡＧＣＣＡＴＧＣ（配列番号１６０）を含む。

【０３８０】
複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３９に示すコンセンサスＧＣリッチ配列の核酸配列を含み、ここで、X_4、X_5、X_6、X_7、X_{12}、X_{13}、X_{14}、X_{15}、X_{20}、X_{21}、X_{22}、X_{26}、X_{29}、X_{30}、及びX_{33}は、各々独立に任意のヌクレオチドであり、また、X_2、X_3、X_8、X_9、X_{10}、X_{11}、X_{16}、X_{17}、X_{18}、X_{19}、X_{23}、X_{24}、X_{25}、X_{27}、X_{28}、X_{31}、X_{32}、及びX_{34}は、各々独立に存在しないか、又は任意のヌクレオチドである。複数の実施形態では、X_1～X_{34}の１つ若しくは複数（例えば、全部）は、各々独立に表３９に記載のヌクレオチド（又は非存在）である。一部の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３９に示す例示的なＴＴＶ　ＧＣリッチ配列（例えば、全配列、断片１、断片２、断片３、又はそれらの任意の組合せ、例えば、順に断片１～３）に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３９に示すＴＴＶ－ＣＴ３０Ｆ　ＧＣリッチ配列（例えば、全配列、断片１、断片２、断片３、断片４、断片５、断片６、断片７、断片８、又はそれらの任意の組合せ、例えば、順に断片１～７）に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３９に示すＴＴＶ－ＨＤ２３ａ　ＧＣリッチ配列（例えば、全配列、断片１、断片２、断片３、断片４、断片５、断片６、又はそれらの任意の組合せ、例えば、順に断片１～６）に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３９に示すＴＴＶ－ＪＡ２０　ＧＣリッチ配列（例えば、全配列、断片１、断片２、又はそれらの任意の組合せ、例えば、順に断片１及び２）に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３９に示すＴＴＶ－ＴＪＮ０２　ＧＣリッチ配列（例えば、全配列、断片１、断片２、断片３、断片４、断片５、断片６、断片７、断片８、又はそれらの任意の組合せ、例えば、順に断片１～８）に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３９に示すＴＴＶ－ｔｔｈ８　ＧＣリッチ配列（例えば、全配列、断片１、断片２、断片３、断片４、断片５、断片６、断片７、断片８、断片９、又はそれらの任意の組合せ、例えば、順に断片１～６）に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３９に示される断片７に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３９に示される断片８に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を有する核酸配列を含む。複数の実施形態では、遺伝子エレメント（例えば、遺伝子エレメントのタンパク結合配列）は、表３９に示される断片９に対して少なくとも約７５％（例えば、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％）の同一性を

有する核酸配列を含む。

【０３８１】

【表２８】

表 39. *アネロウイルス(Anelloviruses)*由来の例示的な GC リッチ配列

供給源	配列	配列番号
コンセンサス	CGGCGGX$_1$GGX$_2$GX$_3$X$_4$X$_5$CGCGCTX$_6$CGCGC GCX$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$CX$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$GGGGX$_{15}$X$_{16}$X$_{17}$X$_{18}$ X$_{19}$X$_{20}$X$_{21}$GCX$_{22}$X$_{23}$X$_{24}$X$_{25}$CCCCCCCX$_{26}$CGCGC ATX$_{27}$X$_{28}$GCX$_{29}$CGGGX$_{30}$CCCCCCCCCX$_{31}$X$_{32}$X$_{33}$GGGGGGCTCCGX$_{34}$CCCCCCGGCCCCCC X$_1$ = G 又は C X$_2$ = G、C、又は存在しない X$_3$ = C 又は存在しない X$_4$ = G 又は C X$_5$ = G 又は C X$_6$ = T、G、又は A X$_7$ = G 又は C X$_8$ = G 又は存在しない X$_9$ = C 又は存在しない X$_{10}$ = C 又は存在しない X$_{11}$ = G、A、又は存在しない X$_{12}$ = G 又は C X$_{13}$ = C 又は T X$_{14}$ = G 又は A	120

【０３８２】

【表２９】

		X_{15} = G 又は A X_{16} = A、G、T、又は存在しない X_{17} = G、C、又は存在しない X_{18} = G、C、又は存在しない X_{19} = C、A、又は存在しない X_{20} = C 又は A X_{21} = T 又は A X_{22} = G 又は C X_{23} = G、T、又は存在しない X_{24} = C 又は存在しない X_{25} = G、C、又は存在しない X_{26} = G 又は C X_{27} = G 又は存在しない X_{28} = C 又は存在しない X_{29} = G 又は A X_{30} = G 又は T X_{31} = C、T、又は存在しない X_{32} = G、C、A、又は存在しない X_{33} = G 又は C X_{34} = C 又は存在しない	
例示的な TTV 配列	全配列	GCCGCCGCGGCGGCGGSGGNGNSGCGCGCT DCGCGCGCSNNNCRCCRGGGGGNNNNCWG CSNCNCCCCCCCCCGCGCATGCGCGGGKCC CCCCCCCNNCGGGGGGCTCCGCCCCCCGGC CCCCCCCCGTGCTAAACCCACCGCGCATGC GCGACCACGCCCCCGCCGCC	121
	断片 1	GCCGCCGCGGCGGCGGSGGNGNSGCGCGCT DCGCGCGCSNNNCRCCRGGGGGNNNNCWG CSNCNCCCCCCCCCGCGCAT	122
	断片 2	GCGCGGGKCCCCCCCCCNNCGGGGGGCTC CG	123
	断片 3	CCCCCCGGCCCCCCCCCGTGCTAAACCCAC CGCGCATGCGCGACCACGCCCCCGCCGCC	124

【０３８３】

【表３０】

TTV-CT30F	全配列	GCGGCGG-GGGGGCG-GCCGCG-TTCGCGCGCCGCCCACCAGGGGGTG--CTGCG-CGCCCCCCCCCGCGCAT GCGCGGGGCCCCCCCCC--GGGGGGGCTCCGCCCCCCCGGCCCCCCCCC GTGCTAAACCCACCGCGCATGCGCGACCAC GCCCCCGCCGCC	125
	断片 1	GCGGCGG	126
	断片 2	GGGGGCG	127
	断片 3	GCCGCG	128
	断片 4	TTCGCGCGCCGCCCACCAGGGGGTG	129
	断片 5	CTGCG	130
	断片 6	CGCCCCCCCCCGCGCAT	131
	断片 7	GCGCGGGGCCCCCCCCC	132
	断片 8	GGGGGGGCTCCGCCCCCCCGGCCCCCCCCC GTGCTAAACCCACCGCGCATGCGCGACCAC GCCCCCGCCGCC	133
TTV-HD23a	全配列	CGGCGGCGGCGGCG-CGCGCGCTGCGCGCGCG---CGCCGGGGGGGGCGCCAGCG-CCCCCCCCCCCCGCGCAT GCACGGGTCCCCCCCCCCCACGGGGGGCTCC G CCCCCCGGCCCCCCCCC	134
	断片 1	CGGCGGCGGCGGCG	135
	断片 2	CGCGCGCTGCGCGCGCG	136
	断片 3	CGCCGGGGGGGCGCCAGCG	137
	断片 4	CCCCCCCCCCCGCGCAT	138
	断片 5	GCACGGGTCCCCCCCCCCCACGGGGGGCTCC G	139
	断片 6	CCCCCCGGCCCCCCCCC	140

【０３８４】

【表３１】

TTV-JA20	全配列	CCGTCGGCGGGGGGGCCGCGCGCTGCGCG CGCGGCCC- CCGGGGGAGGCACAGCCTCCCCCCCCCGCG CGCATGCGCGCGGGTCCCCCCCCCTCCGGG GGGCTCCGCCCCCCGGCCCCCCCC	141
	断片 1	CCGTCGGCGGGGGGGCCGCGCGCTGCGCG CGCGGCCC	142
	断片 2	CCGGGGGAGGCACAGCCTCCCCCCCCCGCG CGCATGCGCGCGGGTCCCCCCCCCTCCGGG GGGCTCCGCCCCCCGGCCCCCCCC	143
TTV-TJN02	全配列	CGGCGGCGGCG-CGCGCGCTACGCGCGCG-- -CGCCGGGGGG----CTGCCGC- CCCCCCCCCGCGCAT GCGCGGGGCCCCCCCCC- GCGGGGGGCTCCG CCCCCCGGCCCCCC	144
	断片 1	CGGCGGCGGCG	145
	断片 2	CGCGCGCTACGCGCGCG	146
	断片 3	CGCCGGGGGG	147
	断片 4	CTGCCGC	148
	断片 5	CCCCCCCCCGCGCAT	149
	断片 6	GCGCGGGGCCCCCCCCC	150
	断片 7	GCGGGGGGCTCCG	151
	断片 8	CCCCCCGGCCCCCC	152

【０３８５】

【表３２】

TTV-tth8	全配列	GCCGCCGCGGCGGCGGGGG- GCGGCGCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGG GGGAGCCATGCG---CCCCCCCCCGCGCAT GCGCGGGGCCCCCCCCC- GCGGGGGGCTCCG CCCCCCGGCCCCCCCCG	153
	断片 1	GCCGCCGCGGCGGCGGGGG	154
	断片 2	GCGGCGCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGG GGGAGCCATGCG	155
	断片 3	CCCCCCCCCGCGCAT	156
	断片 4	GCGCGGGGCCCCCCCCC	157
	断片 5	GCGGGGGGCTCCG	158
	断片 6	CCCCCCGGCCCCCCCCG	159
	断片 7	CGCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGA GCCATGC	160
	断片 8	CCGCCATCTTAAGTAGTTGAGGCGGACGGT GGCGTGAGTTCAAAGGTCACCATCAGCCAC ACCTACTCAAAATGGTGG	161
	断片 9	CTTAAGTAGTTGAGGCGGACGGTGGCGTGA GTTCAAAGGTCACCATCAGCCACACCTACT CAAAATGGTGGACAATTTCTTCCGGGTCAA AGGTTACAGCCGCCATGTTAAAACACGTGA CGTATGACGTCACGGCCGCCATTTTGTGAC ACAAGATGGCCGACTTCCTTCC	162

【０３８６】

【表３３】

追加の GC リッチ配列	36-ヌクレオチドコンセンサス GC リッチ領域配列 1	CGCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGAGCCATGC	163
	36-ヌクレオチド領域コンセンサス配列 2	GCGCTX$_1$CGCGCGCGCCGGGGGGCTGCGCCCCCCC、ここで、X$_1$は T、G、又は A から選択される	164
	TTV クレード 1 36-ヌクレオチド領域	GCGCTTCGCGCGCCGCCCACTAGGGGGCGTTGCGCG	165
	TTV クレード 3 36-ヌクレオチド領域	GCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGCGCAATGCG	166
	TTV クレード 3 単離株 GH1 36-ヌクレオチド領域	GCGCTGCGCGCGCGGCCCCCGGGGGAGGCATTGCCT	167
	TTV クレード 3 sle1932 36-ヌクレオチド領域	GCGCTGCGCGCGCGCCGGGGGGGCGCCAGCGCCC	168
	TTV クレード 4 ctdc002 36-ヌクレオチド領域	GCGCTTCGCGCGCGCCGGGGGGCTCCGCCCCCCC	169
	TTV クレード 5 36-ヌクレオチド領域	GCGCTTCGCGCGCGCCGGGGGGCTGCGCCCCCCC	170
	TTV クレード 6 36-ヌクレオチド領域	GCGCTACGCGCGCGCCGGGGGGCTGCGCCCCCCC	171
	TTV クレード 7 36-ヌクレオチド領域	GCGCTACGCGCGCGCCGGGGGGCTCTGCCCCCCC	172

【０３８７】

【表３４】

追加の アルファトルク ウイルス (Alphatorquevirus) GC-リッチ領域配列	TTV-CT30F	GCGGCGGGGGGGCGGCCGCGTTCGCGCGC CGCCCACCAGGGGGTGCTGCGCGCCCCCCC CCGCGCATGCGCGGGGCCCCCCCCCGGGG GGGCTCCGCCCCCCCGGCCCCCCCCCGTGC TAAACCCACCGCGCATGCGCGACCACGCCC CCGCCGCC	801
	TTV-P13-1	CCGAGCGTTAGCGAGGAGTGCGACCCTACC CCCTGGGCCCACTTCTTCGGAGCCGCGCGC TACGCCTTCGGCTGCGCGCGGCACCTCAGA CCCCCGCTCGTGCTGACACGCTTGCGCGTG TCAGACCACTTCGGGCTCGCGGGGGTCGGG	802
	TTV-tth8	GCCGCCGCGGCGGCGGGGGGCGGCGCGCT GCGCGCGCCGCCCAGTAGGGGGAGCCATG CGCCCCCCCCCGCGCATGCGCGGGGCCCCC CCCCGCGGGGGGCTCCGCCCCCCGGCCCCC CCCG	803
	TTV-HD20a	CGGCCCAGCGGCGGCGCGCGCGCTTCGCGC GCGCGCCGGGGGGCTCCGCCCCCCCCCGCG CATGCGCGGGGCCCCCCCCCCGCGGGGGGCT CCGCCCCCCGGTCCCCCCCCG	804
	TTV-16	CGGCCGTGCGGCGGCGCGCGCGCTTCGCGC GCGCGCCGGGGGCTGCCGCCCCCCCCCGCG CATGCGCGCGGGGCCCCCCCCCCGCGGGGG GCTCCGCCCCCCGGCCCCCCCCCCCG	805
	TTV-TJN02	CGGCGGCGGCGCGCGCGCTACGCGCGCGC GCCGGGGGGCTGCCGCCCCCCCCCCGCGCA TGCGCGGGGCCCCCCCCCGCGGGGGGCTCC GCCCCCCGGCCCCCC	806
	TTV-HD16d	GGCGGCGGCGCGCGCGCTACGCGCGCGCG CCGGGGAGCTCTGCCCCCCCCCGCGCATGC GCGCGGGTCCCCCCCCCGCGGGGGGCTCCG CCCCCCGGTCCCCCCCCCG	807

【０３８８】

エフェクター

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、エフェクター、機能性エフェクター、例えば、内在性エフェクター若しくは外性エフェクター、例えば、治療用ポリペプチド又は核酸、例えば、細胞傷害性若しくは細胞溶解性ＲＮＡ又はタンパク質をコード化する１つ若しくは複数の配列を含んでもよい。一部の実施形態では、機能性核酸は、ノンコーディングＲＮＡである。一部の実施形態では、機能性核酸は、コーディングＲＮＡである。エフェクターは、例えば、酵素活性、遺伝子発現、細胞シグナル伝達、及び細胞若しくは器官機能を増大又は低減するなど、生物活性を調節することができる。エフェクター活性はまた、調節タンパク質と結合して、転写又は翻訳などの調節因子の活性を調節することも含み得る。エフェクター活性は、さらにアクチベータ又はインヒビター機能も含み得る。例

えば、エフェクターは、酵素中の基質親和性増大をトリガーすることにより酵素活性を誘導することができ、例えば、フルクトース２，６－ビスホスフェートは、ホスホフルクトキナーゼ１を活性化して、インスリンに応答する糖分解の速度を高める。別の例では、エフェクターは、基質が受容体に結合するのを阻害して、その活性化を遮断することができ、例えば、ナルトレキソン及びナロキソンは、オピオイド受容体に、それらを活性化することなく結合して、受容体が、オピオイドに結合する能力を遮断する。エフェクター活性はまた、タンパク質安定性／分解及び／又は転写物安定性／分解の調節も含み得る。例えば、タンパク質は、分解のためにそれらをマーキングするタンパク質上の、ポリペプチド補因子、ユビキチンにより、分解の目的でターゲティングされ得る。別の例では、エフェクターは、酵素の活性部位を遮断することにより酵素活性を阻害し、例えば、メトトレキサートは、テトラヒドロ葉酸の構造類似体、すなわち、天然基質の１０００倍超強度にジヒドロ葉酸レダクターゼに結合して、ヌクレオチド塩基合成を阻害する酵素ジヒドロ葉酸レダクターゼの補酵素である。

【０３８９】

一部の実施形態では、エフェクターをコード化する配列は、遺伝子エレメント内の一部であり、例えば本明細書に記載の挿入部位に挿入され得る。複数の実施形態では、エフェクターをコード化する配列は、遺伝子エレメント内のノンコーディング領域、例えば、オープンリーディングフレームの３’側及び遺伝子エレメントのＧＣリッチ領域の５’側に位置するノンコーディング領域、ＴＡＴＡボックス上流の５’ノンコーディング領域、５’ＵＴＲ、ポリ－Ａシグナル３’ノンコーディング領域下流、又はＧＣリッチ領域上流の３’ノンコーディング領域に挿入される。複数の実施形態では、エフェクターをコード化する配列は、遺伝子エレメント内の、例えば、本明細書に記載される通り、ＴＴＶ－ｔｔｈ８プラスミドのヌクレオチド３５８８付近に、又は例えば、本明細書に記載される通り、ＴＴＭＶ－ＬＹ２プラスミドのヌクレオチド２８４３付近に挿入される。複数の実施形態では、エフェクターをコード化する配列は、遺伝子エレメント内の、例えば、本明細書に記載されるように、ＴＴＶ－ｔｔｈ８プラスミドのヌクレオチド３３６～３０１５若しくはその範囲内に、又は例えば、本明細書に記載されるように、ＴＴＶ－ＬＹ２プラスミドのヌクレオチド２４２～２８１２若しくはその範囲内に挿入される。一部の実施形態では、エフェクターをコード化する配列は、オープンリーディングフレームの一部又は全部（例えば、本明細書に記載のＯＲＦ、例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、及び／若しくはＯＲＦ２ｔ／３）を置換する。

【０３９０】

一部の実施形態では、エフェクターをコード化する配列は、１００～２０００、１００～１０００、１００～５００、１００～２００、２００～２０００、２００～１０００、２００～５００、５００～１０００、５００～２０００、又は１０００～２０００ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、エフェクターは、例えば、本明細書に記載するように、核酸又はタンパク質ペイロードである。

【０３９１】

調節核酸

一部の実施形態では、エフェクターは調節核酸である。調節核酸は、内在性遺伝子及び／又は外性遺伝子の発現を修飾する。一実施形態では、調節核酸は、宿主遺伝子をターゲティングする。調節核酸として、限定はされないが、外性遺伝子とハイブリダイズする核酸（例えば、本明細書の他所に記載するｍｉＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、ＲＮＡ、ＤＮＡ、アンチセンスＲＮＡ、ｇＲＮＡ）、ウイルスＤＮＡ若しくはＲＮＡなどの外性核酸とハイブリダイズする核酸、ＲＮＡとハイブリダイズする核酸、遺伝子転写を妨害する核酸、ＲＮＡ翻訳を妨害する核酸、分解のターゲティングなどによってＲＮＡを安定化する、若しくは不安定化する核酸、並びにＤＮＡ若しくはＲＮＡ結合因子を調節する核酸が挙げられる。複数の実施形態では、調節核酸は、ｍｉＲＮＡをコード化する。一部の実施形態では、調節核酸は、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）に対して内在性である。一部の実施形態では、調節核酸は、野生型アネロウイルス（Ａｎ

ｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）に対して外性である。

【０３９２】

一部の実施形態では、調節核酸は、典型的に５～５００塩基対（具体的なＲＮＡ構造に応じて、例えば、ｍｉＲＮＡ５～３０ｂｐ、ｌｎｃＲＮＡ２００～５００ｂｐ）を含有するＲＮＡ又はＲＮＡ様構造を含み、細胞内の発現された標的遺伝子中のコード配列と同一（若しくは相補的な）又はほぼ同一の（若しくは実質的に相補的な）核酸塩基配列、或いは細胞内の発現された標的遺伝子をコード化する配列を有し得る。

【０３９３】

一部の実施形態では、調節核酸は、核酸配列、例えば、ガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）を含む。一部の実施形態では、ＤＮＡターゲティング部分は、ガイドＲＮＡ又はガイドＲＮＡをコード化する核酸を含む。ｇＲＮＡの短い合成ＲＮＡは、不完全なエフェクター部分に結合するために必要な「スカフォールド」配列と、ゲノム標的に対するユーザ設定の約２０ヌクレオチドのターゲティング配列から構成され得る。実際に、ガイドＲＮＡ配列は、一般に、１７～２４ヌクレオチド（例えば、１９、２０、若しくは２１ヌクレオチド）の長さを有するように設計され、標的化核酸配列に対して相補的である。カスタムｇＲＮＡ生成装置及びアルゴリズムが、効果的なガイドＲＮＡの設計で使用するために市販されている。また、遺伝子編集は、キメラ「シングルガイドＲＮＡ」（「ｓｇＲＮＡ」）を用いて達成されており、これは、天然に存在するｃｒＲＮＡ－ｔｒａｃｒＲＮＡ複合体を模倣し、且つ、ｔｒａｃｒＲＮＡ（ヌクレアーゼに結合する）と少なくとも１つのｃｒＲＮＡ（編集のためにターゲティングされる配列にヌクレアーゼを誘導する）の両方を含有する操作（合成）シングルＲＮＡ分子である。また、化学的に修飾されたｓｇＲＮＡも、ゲノム編集に効果的であることが実証されている；例えば、Ｈｅｎｄｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，９８５－９９１を参照されたい。

【０３９４】

調節核酸は、特定のＤＮＡ配列（例えば、遺伝子のプロモータ、エンハンサー、サイレンサー、又はリプレッサーに隣接する、若しくはその内部の配列）を認識するｇＲＮＡを含む。

【０３９５】

いくつかの調節核酸は、ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）の生物学的プロセスによって遺伝子発現を阻害することができる。ＲＮＡｉ分子は、典型的に、１５～５０塩基対（例えば、約１８～２５塩基対）を含有し、且つ細胞内の発現された標的遺伝子中のコード配列と同一の（相補的な）又はほぼ同一の（実質的に相補的な）核酸塩基配列を有する、ＲＮＡ又はＲＮＡ様構造を含む。ＲＮＡｉ分子として、限定はされないが、以下：低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、メロデュプレックス、及びダイサー基質が挙げられる（米国特許第８，０８４，５９９号明細書、同第８，３４９，８０９号明細書及び同第８，５１３，２０７号明細書）。

【０３９６】

長鎖ノンコーディングＲＮＡ（ｌｎｃＲＮＡ）は、１００ヌクレオチド超の非タンパク質コード転写物として定義される。この幾分任意の制限によって、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、及び他の低分子ＲＮＡなどの小さい調節ＲＮＡからｌｎｃＲＮＡを区別する。一般に、ｌｎｃＲＮＡの大部分（約７８％）は、組織特異的として特徴付けられる。隣接するタンパク質コード遺伝子に対して反対方向に転写される分岐ｌｎｃＲＮＡ（哺乳動物ゲノムの全ｌｎｃＲＮＡの相当の割合、約２０％を占める）は、恐らく隣接遺伝子の転写を調節すると考えられる。

【０３９７】

遺伝子エレメントは、内在性遺伝子又は遺伝子産物（例えば、ｍＲＮＡ）の全部若しくは断片に対して実質的に相補的、若しくは完全に相補的な配列を有する調節核酸をコード化する。調節核酸は、特定の遺伝子の新生核ＲＮＡ転写物が転写のためのｍＲＮＡへと成熟するのを阻止するために、イントロンとエキソンの間の境界で配列を補完することがで

きる。特定の遺伝子に相補的な調節核酸は、その遺伝子のｍＲＮＡとハイブリダイズして、その翻訳を阻止する。アンチセンス調節核酸は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又はその誘導体若しくはハイブリッドであってよい。

【０３９８】

目的の転写物とハイブリダイズする調節核酸の長さは、５～３０ヌクレオチド、約１０～３０ヌクレオチド、又は約１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０以上のヌクレオチドであってよい。標的転写物に対する調節核酸の同一性の割合は、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％であるべきである。

【０３９９】

遺伝子エレメントは、調節核酸、例えば、標的遺伝子の約５～約２５の連続ヌクレオチドと同一のマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）分子をコード化し得る。一部の実施形態では、ｍｉＲＮＡ配列は、ｍＲＮＡをターゲティングし、ジヌクレオチドＡＡで開始し、約３０～７０％（約３０～６０％、約４０～６０％、又は約４５％～５５％）のＧＣ含有率を含み、例えば、標準ＢＬＡＳＴ検索により決定される場合、それを導入しようとする哺乳動物のゲノム内の標的以外のいずれのヌクレオチド配列に対しても高い同一性（％）を持たない。

【０４００】

ｓｉＲＮＡ及びｓｈＲＮＡは、内在性マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）遺伝子（Ｂａｒｔｅｌ，Ｃｅｌｌ　１１６：２８１－２９７，２００４）のプロセシング経路中の中間体と類似する。一部の実施形態では、ｓｉＲＮＡは、ｍｉＲＮＡとして機能することができ、その逆も同様である（Ｚｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　９：１３２７－１３３３，２００２；Ｄｏｅｎｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ　１７：４３８－４４２，２００３）。ｓｉＲＮＡのようなマイクロＲＮＡは、ＲＩＳＣを用いて標的遺伝子を下方制御するが、ｓｉＲＮＡとは異なり、ほとんどの動物ｍｉＲＮＡは、ｍＲＮＡを切断しない。その代わり、ｍｉＲＮＡは、翻訳抑制又はポリＡ除去及びｍＲＮＡ分解によりタンパク質産生を低減する（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　１０３：４０３４－４０３９，２００６）。既知のｍｉＲＮＡ結合部位は、ｍＲＮＡ　３’ＵＴＲ内にあり；ｍｉＲＮＡは、ｍｉＲＮＡの５’末端からのヌクレオチド２～８に対してほぼ完全な相補性を有する部位をターゲティングすると思われる（Ｒａｊｅｗｓｋｙ，Ｎａｔ　Ｇｅｎｅｔ　３８　Ｓｕｐｐｌ：Ｓ８－１３，２００６；Ｌｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　４３３：７６９－７７３，２００５）。この領域は、シード領域として知られる。ｓｉＲＮＡ及びｍｉＲＮＡは、置き換え可能であるため、外性ｓｉＲＮＡは、ｓｉＲＮＡに対してシード相補性を有するｍＲＮＡを下方制御する（Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　３：１９９－２０４，２００６。３’ＵＴＲ内の複数の標的部位は、より強度の下方制御を付与する（Ｄｏｅｎｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ　１７：４３８－４４２，２００３）。

【０４０１】

既知のｍｉＲＮＡ配列表は、中でも、ウェルカム・トラスト・サンガー・インスティチュート（Ｗｅｌｌｃｏｍｅ　Ｔｒｕｓｔ　Ｓａｎｇｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）、ペン・センター・フォア・バイオインフォマティクス（Ｐｅｎｎ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ）、メモリアル・スローン。ケタリング・癌センター（Ｍｅｍｏｒｉａｌ　Ｓｌｏａｎ　Ｋｅｔｔｅｒｉｎｇ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｎｔｅｒ）、及び欧州分子生物学研究所（Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌｅ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）などの研究機関により維持されているデータベースに見出すことができる。既知の有効なｓｉＲＮＡ配列及びコグネイト結合部位も関連文献に十分に記載されている。ＲＮＡｉ分子は、当技術分野で公知の技術によって容易に設計及び作製される。加えて、有効且つ特異的な配列モチーフを見出す可能性を高める計算ツールもある（Ｌａｇａｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏ．，２０１５，１２６９：３９３

－４１２）。
【０４０２】
調節核酸は、遺伝子によりコード化されるＲＮＡの発現を調節することができる。一部の実施形態では、複数の遺伝子が、互いにある程度の配列相同性を共有しているため、調節核酸は、十分な配列相同性を有する遺伝子のクラスをターゲティングするように設計することができる。一部の実施形態では、調節核酸は、様々な遺伝子標的の間で共有されるか、又は特定の遺伝子標的についてユニークな配列に対して相補性を有する配列を含むことができる。一部の実施形態では、調節核酸は、いくつかの遺伝子の間で相同性を有するＲＮＡ配列の保存領域をターゲティングして、これにより、遺伝子ファミリー内のいくつかの遺伝子（例えば、異なる遺伝子イソ型、スプライス変異体、突然変異型遺伝子など）をターゲティングするように設計することができる。一部の実施形態では、調節核酸は、単一の遺伝子の特定のＲＮＡ配列に対してユニークな配列をターゲティングするように設計することができる。
【０４０３】
一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、１つ又は複数の遺伝子の発現を調節する調節核酸をコード化する１つ又は複数の配列を含んでもよい。
【０４０４】
一部の実施形態では、本明細書の他の箇所に記載するｇＲＮＡを、遺伝子編集のためのＣＲＩＳＰＲ系の一環として使用する。遺伝子編集の目的で、所望の標的ＤＮＡ配列に対応する１つ又は複数のガイドＲＮＡ配列を含有するようにアネロベクターを設計してもよい；例えば、Ｃｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｓｃｉｅｎｃｅ，３３９：８１９－８２３；Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｎａｔｕｒｅ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，８：２２８１－２３０８を参照されたい。一般に、ｇＲＮＡの少なくとも約１６又は１７ヌクレオチドが、Ｃａｓ９媒介ＤＮＡ切断を可能にし；Ｃｐｆ１の場合、検出可能なＤＮＡ切断を達成するために、ｇＲＮＡ配列の少なくとも約１６ヌクレオチドが必要である。
【０４０５】
治療用エフェクター（例えば、ペプチド若しくはポリペプチド）
一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、治療用発現配列、例えば、治療用ペプチド若しくはポリペプチド、例えば、細胞内ペプチド若しくは細胞内ポリペプチド、分泌ポリペプチド、又はタンパク質補充治療薬をコード化する配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、タンパク質、例えば、治療用タンパク質をコード化する配列を含む。治療用タンパク質のいくつかの例としては、ホルモン、サイトカイン、酵素、抗体（例えば、少なくとも重鎖又は軽鎖をコード化する１つ又は複数のポリペプチド）、転写因子、受容体（例えば、膜受容体）、リガンド、膜輸送体、分泌タンパク質、ペプチド、担体タンパク質、構造タンパク質、ヌクレアーゼ、又はそれらの構成体が挙げられるが、これらに限定されない。
【０４０６】
一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、ペプチド、例えば、治療用ペプチドをコード化する配列を含む。ペプチドは、直鎖状又は分岐状であってもよい。ペプチドは、約５～約５００アミノ酸、約１５～約４００アミノ酸、約２０～３２５アミノ酸、約２５～約２５０アミノ酸、約５０～約２００アミノ酸、又はこれらの間の任意の範囲の長さを有する。
【０４０７】
一部の実施形態では、治療用発現配列によってコード化されるポリペプチドは、上記のいずれかのその機能性変異体若しくは断片、例えば、そのＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤを参照することによって本明細書の表中に開示されるタンパク質配列に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の同一性を有するタンパク質であり得る。
【０４０８】
一部の実施形態では、治療用発現配列は、上記のいずれかに結合する抗体若しくは抗体

断片、例えば、そのＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤを参照することによって本明細書の表中に開示されるタンパク質配列に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の同一性を有するタンパク質に対する抗体をコード化し得る。本明細書の用語「抗体」は広義で使用され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及びそれらが所望の抗原結合活性を示す限りにおいて抗体断片が挙げられるが、これらに限定されない様々な抗体構造を包含する。「抗体断片」は、少なくとも１つの重鎖又は軽鎖を含み、抗原に結合する分子を指す。抗体断片の例としては、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）2；ダイアボディ；線状抗体；一本鎖抗体分子（例えば、ｓｃＦＶ）；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【０４０９】

例示的な細胞内ポリペプチドエフェクター

一部の実施形態では、エフェクターは、サイトゾルポリペプチド又はサイトゾルペプチドを含む。一部の実施形態では、エフェクターは、ＤＰＰ－４阻害剤、ＧＬＰ－１シグナル伝達のアクチベータ、又は好中球エラスターゼの阻害剤であるサイトゾルペプチドを含む。一部の実施形態では、エフェクターは、増殖因子若しくはその受容体（例えば、ＦＧＦ受容体、例えば、ＦＧＦＲ３）のレベル又は活性を増加させる。一部の実施形態では、エフェクターは、ｎ－ｍｙｃ相互作用タンパク質活性の阻害剤（例えば、ｎ－ｍｙｃ相互作用タンパク質阻害剤）；ＥＧＦＲ活性の阻害剤（例えば、ＥＧＦＲ阻害剤）；ＩＤＨ１及び／又はＩＤＨ２活性の阻害剤（例えば、ＩＤＨ１阻害剤及び／又はＩＤＨ２阻害剤）；ＬＲＰ５及び／又はＤＫＫ２活性の阻害剤（例えば、ＬＲＰ５及び／又はＤＫＫ２阻害剤）；ＫＲＡＳ活性の阻害剤；ＨＴＴ活性のアクチベータ；若しくはＤＰＰ－４活性の阻害剤（例えば、ＤＰＰ－４阻害剤）を含む。

【０４１０】

一部の実施形態では、エフェクターは、調節細胞内ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、調節細胞内ポリペプチドは、標的細胞に対して内在性である１つ又は複数の分子（例えば、タンパク質又は核酸）に結合する。一部の実施形態では、調節細胞内ポリペプチドは、標的細胞に対して内在性である１つ又は複数の分子（例えば、タンパク質又は核酸）のレベル又は活性を増加させる。一部の実施形態では、調節細胞内ポリペプチドは、標的細胞に対して内在性である１つ又は複数の分子（例えば、タンパク質又は核酸）のレベル又は活性を減少させる。

【０４１１】

例示的な分泌ポリペプチドエフェクター

例示的な分泌治療薬が、例えば、以下の表で本明細書に記載される。

【０４１２】

【表３５】

表 50. 例示的なサイトカイン及びサイトカイン受容体

サイトカイン	サイトカイン受容体	Entrez Gene ID	UniProt ID
IL-1α, IL-1β,又はその ヘテロ二量体	IL-1 1 型受容体, IL-1 2 型 受容体	3552, 3553	P01583, P01584
IL-1Ra	IL-1 1 型受容体, IL-1 2 型 受容体	3454, 3455	P17181, P48551
IL-2	IL-2R	3558	P60568
IL-3	IL-3 受容体 α + β c (CD131)	3562	P08700
IL-4	IL-4R I 型, IL-4R II 型	3565	P05112
IL-5	IL-5R	3567	P05113
IL-6	IL-6R (sIL-6R) gp130	3569	P05231
IL-7	IL-7R 及び sIL-7R	3574	P13232
IL-8	CXCR1 及び CXCR2	3576	P10145
IL-9	IL-9R	3578	P15248
IL-10	IL-10R1/IL-10R2 複合体	3586	P22301
IL-11	IL-11Rα 1 gp130	3589	P20809
IL-12 (例えば、p35, p40, 又はそのヘテロ二量体)	IL-12Rβ1 及び IL-12Rβ2	3593, 3592	P29459, P29460
IL-13	IL-13R1α1 及び IL-13R1α2	3596	P35225
IL-14	IL-14R	30685	P40222
IL-15	IL-15R	3600	P40933
IL-16	CD4	3603	Q14005
IL-17A	IL-17RA	3605	Q16552
IL-17B	IL-17RB	27190	Q9UHF5
IL-17C	IL-17RA～IL-17RE	27189	Q9P0M4
e	SEF	53342	Q8TAD2
IL-17F	IL-17RA, IL-17RC	112744	Q96PD4
IL-18	IL-18 受容体	3606	Q14116
IL-19	IL-20R1/IL-20R2	29949	Q9UHD0
IL-20	L-20R1/IL-20R2 及び IL- 22R1/ IL-20R2	50604	Q9NYY1
IL-21	IL-21R	59067	Q9HBE4
IL-22	IL-22R	50616	Q9GZX6

【０４１３】

【表３６】

IL-23 (例えば、p19, p40, 又はそのヘテロ二量体)	IL-23R	51561	Q9NPF7
IL-24	IL-20R1/IL-20R2 及び IL-22R1/ IL-20R2	11009	Q13007
IL-25	IL-17RA 及び IL-17RB	64806	Q9H293
IL-26	IL-10R2 鎖及び IL-20R1 鎖	55801	Q9NPH9
IL-27 (例えば、p28, EBI3, 又はそのヘテロ二量体)	WSX-1 及び gp130	246778	Q8NEV9
IL-28A, IL-28B,及び IL29	IL-28R1/IL-10R2	282617, 282618	Q8IZI9, Q8IU54
IL-30	IL6R/gp130	246778	Q8NEV9
IL-31	IL-31RA/OSMRβ	386653	Q6EBC2
IL-32		9235	P24001
IL-33	ST2	90865	O95760
IL-34	コロニー刺激因子 1 受容体	146433	Q6ZMJ4
IL-35 (例えば、p35, EBI3, 又はそのヘテロ二量体)	IL-12Rβ2/gp130; IL-12Rβ2/IL-12Rβ2; gp130/gp130	10148	Q14213
IL-36	IL-36Ra	27179	Q9UHA7
IL-37	IL-18Rα 及び IL-18BP	27178	Q9NZH6
IL-38	IL-1R1, IL-36R	84639	Q8WWZ1
IFN-α	IFNAR	3454	P17181
IFN-β	IFNAR	3454	P17181
IFN-γ	IFNGR1/IFNGR2	3459	P15260
TGF-β	TβR-I 及び TβR-II	7046, 7048	P36897, P37173
TNF-α	TNFR1, TNFR2	7132, 7133	P19438, P20333

【０４１４】

一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表５０のサイトカイン、又はその機能性変異体、例えば、ホモログ（例えば、オーソログ若しくはパラログ）又はその断片を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、そのＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤを参照することによって、表５０に列挙されるアミノ酸配列に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の配列同一性を有するタンパク質を含む。一部の実施形態では、機能性変異体は、同じ条件下で同じ受容体への対応する野生型サイトカインのＫｄよりも１０％、２０％、３０％、４０％、若しくは５０％以下高い若しくは低いＫｄを有する対応するサイトカイン受容体に結合する。一部の実施形態では、エフェクターは、第１の領域（例えば、表５０のサイトカインポリペプチド又はその機能性変異体若しくは断片）と、第２の異種領域とを含む融合タンパク質を含む。一部の実施形態では、第１の領域は、表５０の第１のサイトカインポリペプチドである。一部の実施形態では、第２の領域は、表５０の第２のサイトカインポリペプチドであり、ここで第１及び第２のサイトカインポリペプチドは、野生型細胞中で互いにサイトカインヘテロ二量体を形成する。一部の実施形態では、表５０のポリペプチド又はその機能性変異体は、シグナル配列、例えば、エフェクターに対して内在性であるシグナル配列、又は異種シグナル配列を含む。一部の実施形態では、表５０のサイトカイン、又はその機能性変異体をコード化するアネロベクターは、本明細書に記載の疾患又は障害の治療に使用

される。

【０４１５】

一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表５０のサイトカインに結合する抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ）を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表５０のサイトカイン受容体に結合する抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ）を含む。一部の実施形態では、抗体分子は、シグナル配列を含む。

【０４１６】

例示的なサイトカイン及びサイトカイン受容体は、例えば、その中の表Ｉを含むその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ａｋｄｉｓ ｅｔ ａｌ．，“Ｉｎｔｅｒｌｅｕｋｉｎｓ（ｆｒｏｍ ＩＬ－１ ｔｏ ＩＬ－３８），ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎｓ，ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ β，ａｎｄ ＴＮＦ－α：Ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ，ｆｕｎｃｔｉｏｎｓ，ａｎｄ ｒｏｌｅｓ ｉｎ ｄｉｓｅａｓｅｓ”Ｏｃｔｏｂｅｒ ２０１６ Ｖｏｌｕｍｅ １３８，Ｉｓｓｕｅ ４，Ｐａｇｅｓ ９８４－１０１０に記載されている。

【０４１７】

【表３７】

表 51. 例示的なポリペプチドホルモン及び受容体

ホルモン	受容体	Entrez Gene ID	UniProt ID
ナトリウム利尿ペプチド、例えば、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)	NPRA, NPRB, NPRC	4878	P01160
脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)	NPRA, NPRB	4879	P16860
C 型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)	NPRB	4880	P23582
成長ホルモン(GH)	GHR	2690	P10912
ヒト成長ホルモン(hGH)	hGH 受容体(ヒト GHR)	2690	P10912
プロラクチン(PRL)	PRLR	5617	P01236
甲状腺刺激ホルモン(TSH)	TSH 受容体	7253	P16473
副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)	ACTH 受容体	5443	P01189
卵胞刺激ホルモン(FSH)	FSHR	2492	P23945
黄体形成ホルモン(LH)	LHR	3973	P22888
抗利尿ホルモン(ADH)	バソプレシン受容体、例えば、V2; AVPR1A; AVPR1B; AVPR3; AVPR2	554	P30518
オキシトシン	OXTR	5020	P01178
カルシトニン	カルシトニン受容体(CT)	796	P01258
副甲状腺ホルモン(PTH)	PTH1R 及び PTH2R	5741	P01270
インスリン	インスリン受容体(IR)	3630	P01308
グルカゴン	グルカゴン受容体	2641	P01275

【０４１８】

一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表５１のホルモン、又はその機能性変異体、例えば、ホモログ（例えば、オーソログ若しくはパラログ）又はその断片

を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、そのＵｎｉＰｒｏｔＩＤを参照することによって、表５１に列挙されるアミノ酸配列に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の配列同一性を有するタンパク質を含む。一部の実施形態では、機能性変異体は、同じ条件下で同じ受容体への対応する野生型ホルモンのＫｄよりも１０％、２０％、３０％、４０％、若しくは５０％以下高いＫｄを有する対応する受容体に結合する。一部の実施形態では、表５１のポリペプチド又はその機能性変異体は、シグナル配列、例えば、エフェクターに対して内在性であるシグナル配列、又は異種シグナル配列を含む。一部の実施形態では、表５１のホルモン又はその機能性変異体をコード化するアネロベクターは、本明細書に記載の疾患又は障害の治療のために使用される。

【０４１９】

一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表５１のホルモンに結合する抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ）を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表５１のホルモン受容体に結合する抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ）を含む。一部の実施形態では、抗体分子は、シグナル配列を含む。

【０４２０】

【表３８】

表 52. 例示的な増殖因子

増殖因子		Entrez Gene ID	UniProt ID
PDGF ファミリー			
PDGF (例えば、PDGF-1, PDGF-2, 又はそのヘテロ二量体)	PDGF 受容体、例えば、PDGFRα, PDGFRβ	5156	P16234
CSF-1	CSF1R	1435	P09603
SCF	CD117	3815	P10721
VEGF ファミリー			
VEGF(例えば、アイソフォーム VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189, 及び VEGF 206)	VEGFR-1, VEGFR-2	2321	P17948
VEGF-B	VEGFR-1	2321	P17949
VEGF-C	VEGFR-2 及び VEGFR -3	2324	P35916
PlGF	VEGFR-1	5281	Q07326
EGF ファミリー			
EGF	EGFR	1950	P01133
TGF-α	EGFR	7039	P01135
アンフィレグリン	EGFR	374	P15514
HB-EGF	EGFR	1839	Q99075
ベータセルリン	EGFR, ErbB-4	685	P35070
エピレグリン	EGFR, ErbB-4	2069	O14944
ヘレグリン	EGFR, ErbB-4	3084	Q02297
FGF ファミリー			

【０４２１】

【表３９】

FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9	FGFR1, FGFR2, FGFR3, 及び FGFR4	2246, 2247, 2248, 2249, 2250, 2251, 2252, 2253, 2254	P05230, P09038, P11487, P08620, P12034, P10767, P21781, P55075, P31371
インスリンファミリー			
インスリン	IR	3630	P01308
IGF-I	IGF-I 受容体, IGF-II 受容体	3479	P05019
IGF-II	IGF-II 受容体	3481	P01344
HGF ファミリー			
HGF	MET 受容体	3082	P14210
MSP	RON	4485	P26927
ニュートロフィンファミリー			
NGF	LNGFR, trkA	4803	P01138
BDNF	trkB	627	P23560
NT-3	trkA, trkB, trkC	4908	P20783
NT-4	trkA, trkB	4909	P34130
NT-5	trkA, trkB	4909	P34130
アンジオポイエチンファミリー			
ANGPT1	HPK-6/TEK	284	Q15389
ANGPT2	HPK-6/TEK	285	O15123
ANGPT3	HPK-6/TEK	9068	O95841
ANGPT4	HPK-6/TEK	51378	Q9Y264

【０４２２】

一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表５２の増殖因子、又はその機能性変異体、例えば、ホモログ（例えば、オーソログ若しくはパラログ）又はその断片を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、そのＵｎｉＰｒｏｔＩＤを参照することによって、表５２に列挙されるアミノ酸配列に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の配列同一性を有するタンパク質を含む。一部の実施形態では、機能性変異体は、同じ条件下で同じ受容体への対応する野生型増殖因子のＫｄよりも１０％、２０％、３０％、４０％、若しくは５０％以下高いＫｄを有する対応する受容体に結合する。一部の実施形態では、表５２のポリペプチド又はその機能性変異体は、シグナル配列、例えば、エフェクターに対して内在性であるシグナル配列、又は異種シグナル配列を含む。一部の実施形態では、表５２の増殖因子又はその機能性変異体をコード化するアネロベクターは、本明細書に記載の疾患又は障害の治療のために使用される。

【０４２３】

一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表５２の増殖因子に結合する抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ）を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表５２の増殖因子受容体に結合する抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ）を含む。一部の実施形態では、抗体分子は、シグナル配列を含む。

【０４２４】
例示的な増殖因子及び増殖因子受容体は、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｂａｆｉｃｏ ｅｔ ａｌ．，“Ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ”Ｈｏｌｌａｎｄ－Ｆｒｅｉ Ｃａｎｃｅｒ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ．６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎに記載されている。
【０４２５】
【表４０】

表 53. 凝固関連因子

エフェクター	適応症	Entrez Gene ID	UniProt ID
第 I 因子 (フィブリノーゲン)	無フィブリノーゲン血症	2243, 2266, 2244	P02671, P02679, P02675
第 II 因子	第 II 因子欠乏症	2147	P00734
第 IX 因子	血友病 B	2158	P00740
第 V 因子	オーレン病	2153	P12259
第 VIII 因子	血友病 A	2157	P00451
第 X 因子	スチュアート・プロワー因子欠乏症	2159	P00742
第 XI 因子	血友病 C	2160	P03951
第 XIII 因子	フィブリン安定化因子欠乏症	2162, 2165	P00488, P05160
vWF	フォン・ヴィレブランド病	7450	P04275

【０４２６】
一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表５３のポリペプチド、又はその機能性変異体、例えば、ホモログ（例えば、オーソログ若しくはパラログ）又はその断片を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、そのＵｎｉＰｒｏｔ ＩＤを参照することによって、表５３に列挙されるアミノ酸配列に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の配列同一性を有するタンパク質を含む。一部の実施形態では、機能性変異体は、例えば、野生型タンパク質よりも１０％、２０％、３０％、４０％、若しくは５０％以下低い割合で、対応する野生型タンパク質と同じ反応を触媒する。一部の実施形態では、表５３のポリペプチド又はその機能性変異体は、シグナル配列、例えば、エフェクターに対して内在性であるシグナル配列、又は異種シグナル配列を含む。一部の実施形態では、表５３のポリペプチド、又はその機能性変異体をコード化するアネロベクターは、表５３の疾患又は障害の治療のために使用される。
【０４２７】
例示的なタンパク質補充治療薬
例示的なタンパク質補充治療薬は、例えば、以下の表で本明細書に記載される。
【０４２８】

【表４１】

表 54. 例示的な酵素エフェクター及び対応する適応症

エフェクター	欠損症	Entrez Gene ID	UniProt ID
3-メチルクロトニル-CoA カルボキシラーゼ	3-メチルクロトニル-CoA カルボキシラーゼ欠損症	56922, 64087	Q96RQ3, Q9HCC0

【０４２９】

【表４２】

アセチル-CoA-グルコサミニド N-アセチルトランスフェラーゼ	ムコ多糖症 MPS III (サンフィリポ症候群)III 型-C	138050	Q68CP4
ADAMTS13	血栓性血小板減少性紫斑病	11093	Q76LX8
アデニンフォスホリボシルトランスフェラーゼ	アデニンフォスホリボシルトランスフェラーゼ欠損症	353	P07741
アデノシンデアミナーゼ	アデノシンデアミナーゼ欠損症	100	P00813
ADP-リボースタンパク質ヒドロラーゼ	グルタミルリボース-5-リン酸蓄積症	26119, 54936	Q5SW96, Q9NX46
αグルコシダーゼ	グリコーゲン蓄積症 2 型 (ポンペ病)	2548	P10253
アルギナーゼ	家族性高アルギニン血症	383, 384	P05089, P78540
アリールスルファターゼ A	異染性白質ジストロフィー	410	P15289
カテプシン K	骨硬化性疾患	1513	P43235
セラミダーゼ	ファーバー病(脂肪肉芽腫症)	125981, 340485, 55331	Q8TDN7, Q5QJU3, Q9NUN7
シスタチオニン B シンターゼ	ホモシスチン尿症	875	P35520
ドリコール-P-マンノースシンターゼ	N-グリコシル化 CDG Ie の先天性異常	8813, 54344	O60762, Q9P2X0
ドリコ-P-Glc:Man9GlcNAc2-PP-ドリコールグルコシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化 CDG Ic の先天性異常	84920	Q5BKT4
ドリコ-P-Man:Man5GlcNAc2-PP-ドリコールマンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化 CDG Id の先天性異常	10195	Q92685

【０４３０】

【表４３】

ドリコール-P-グルコース:Glc-1-Man-9-GlcNAc-2-PP-ドリキル-α-3-グリコシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化 CDG Ih の先天性異常	79053	Q9BVK2
ドリコール-P-マンノース:Man-7-GlcNAc-2-PP-ドリキル-α-6-マンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化 CDG Ig の先天性異常	79087	Q9BV10
第 II 因子	第 II 因子欠損症	2147	P00734
第 IX 因子	血友病 B	2158	P00740
第 V 因子	オーレン病	2153	P12259
第 VIII 因子	血友病 A	2157	P00451
第 X 因子	スチュアート・プロワー因子欠損症	2159	P00742
第 XI 因子	血友病 C	2160	P03951
第 XIII 因子	フィブリン安定化因子欠損症	2162, 2165	P00488, P05160
ガラクトサミン-6-硫酸スルファターゼ	ムコ多糖症 MPS IV (モルキオ症候群)IV-A 型	2588	P34059
ガラクトシルセラミド β-ガラクトシダーゼ	クラッベ病	2581	P54803
ガングリオシド β-ガラクトシダーゼ	GM1 ガングリオシドーシス、全身性	2720	P16278
ガングリオシド β-ガラクトシダーゼ	GM2 ガングリオシドーシス	2720	P16278
ガングリオシド β-ガラクトシダーゼ	スフィンゴリピドーシス I 型	2720	P16278
ガングリオシド β-ガラクトシダーゼ	スフィンゴリピドーシス II 型 (若年型)	2720	P16278
ガングリオシド β-ガラクトシダーゼ	スフィンゴリピドーシス III 型 (成人型)	2720	P16278

【０４３１】

【表４４】

グリコシダーゼ I	N-グリコシル化 CDG IIb の先天性異常	2548	P10253
グルコシルセラミド β-グリコシダーゼ	ゴーシェ病	2629	P04062
ヘパラン-S-硫酸スルファミダーゼ	ムコ多糖症 MPS III (サンフィリポ症候群)III-A 型	6448	P51688
ホモゲンチジン酸酸化酵素	アルカプトン尿症	3081	Q93099
ヒアルロニダーゼ	ムコ多糖症 MPS IX (ヒアルロニダーゼ欠損症)	3373, 8692, 8372, 23553	Q12794, Q12891, O43820, Q2M3T9
イズロン酸硫酸スルファターゼ	ムコ多糖症 MPS II (ハンター症候群)	3423	P22304
レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT)	完全 LCAT 欠損症、魚眼病、アテローム性動脈硬化、高コレステロール血症	3931	606967
リシンオキシダーゼ	グルタミン酸血症 I 型	4015	P28300
リソソーム酸リパーゼ	コレステロールエステル蓄積症(CESD)	3988	P38571
リソソーム酸リパーゼ	リソソーム酸リパーゼ欠損症	3988	P38571
リソソーム酸リパーゼ	ウォルマン病	3988	P38571
リソソームペプスタチン非感受性ペプチダーゼ	遅発型乳児型セロイドリポフスチン沈着症(CLN2、ヤンスキー-ビールショースキー病)	1200	O14773
マンノース(Man)リン酸(P)イソメラーゼ	N-グリコシル化 CDG Ib の先天性異常	4351	P34949
マンノシル-α-1,6-糖タンパク質-β-1,2-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化 CDG IIa の先天性異常	4247	Q10469
メタロプロテイナーゼ-2	ウィンチェスター症候群	4313	P08253

【０４３２】

【表４５】

メチルマロニル-CoA ムターゼ	メチルマロン酸血症(ビタミン b12 不応答性)	4594	P22033
N-アセチルガラクトサミン α-4-硫酸スルファターゼ(アリールスルファターゼ B)	ムコ多糖症 MPS VI(マロト-ラミー症候群)	411	P15848
N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ	ムコ多糖症 MPS III (サンフィリポ症候群)III-B 型	4669	P54802
N-アセチル-ガラクトサミニダーゼ	シンドラー病 I 型(乳児重症型)	4668	P17050
N-アセチル-ガラクトサミニダーゼ	シンドラー病 II 型(神崎病、成人発症型)	4668	P17050
N-アセチル-ガラクトサミニダーゼ	シンドラー病 III 型(中間型)	4668	P17050
N-アセチル-グルコサミニン-6-硫酸スルファターゼ	ムコ多糖症 MPS III(サンフィリポ症候群)III-D 型	2799	P15586
N-アセチルグルコサミニル-1-ホスホトランスフェラーゼ	ムコリピドーシス ML III (偽ハーラーポリジストロフィー)	79158	Q3T906
N-アセチルグルコサミニル-1-ホスホトランスフェラーゼ触媒サブユニット	ムコリピドーシス ML II(I-細胞病)	79158	Q3T906
N-アセチルグルコサミニル-1-ホスホトランスフェラーゼ、基質認識サブユニット	ムコリピドーシス ML III(偽ハーラーポリジストロフィー)III-C 型	84572	Q9UJJ9
N-アスパルチルグルコサミニダーゼ	アスパルチルグルコサミニン尿症	175	P20933

【０４３３】

【表４６】

ノイラミニダーゼ 1 (シアリダーゼ)	シアリドーシス	4758	Q99519
パルミトイル-タンパク質チオエステラーゼ-1	セロイドリポフスチン症成人型(CLN4、クーフス病)	5538	P50897
パルミトイル-タンパク質チオエステラーゼ-1	セロイドリポフスチン症乳児型(CLN1、サンタブオリ・ハルチア病)	5538	P50897
フェニルアラニンヒドロキシラーゼ	フェニルケトン尿症	5053	P00439
ホスホマンノムターゼ-2	N-グリコシル化 CDG Ia の先天性異常(神経及び神経-多臓器型のみ)	5373	O15305
ポルフォビリノーゲンデアミナーゼ	急性間欠性ポルフィリア	3145	P08397
プリンヌクレオシドホスホリラーゼ	プリンヌクレオシドホスホリラーゼ欠損症	4860	P00491
ピリミジン 5'ヌクレオチダーゼ	溶血性貧血及び/又はピリミジン 5'ヌクレオチダーゼ欠損症	51251	Q9H0P0
スフィンゴミエリナーゼ	ニーマン・ピック病 A 型	6609	P17405
スフィンゴミエリナーゼ	ニーマン・ピック病 B 型	6609	P17405
ステロール 27-ヒドロキシラーゼ	脳腱黄色腫症(コレスタノールリピドーシス)	1593	Q02318
チミジンホスホリラーゼ	ミトコンドリア神経性胃腸管系脳筋症(MNGIE)	1890	P19971
トリヘキソシルセラミド α-ガラクトシダーゼ	ファブリー病	2717	P06280
チロシナーゼ、例えば、OCA1	白皮症、例えば、眼白皮症	7299	P14679

【０４３４】

【表４７】

UDP-GlcNAc:ドリキル-PNAcGlc ホスホトランスフェラーゼ	N-グリコシル化 CDG Ij の先天性異常	1798	Q9H3H5
UDP-N-アセチルグルコサミン-2-エピメラーゼ/N-アセチルマンノサミンキナーゼ、シアリン	シアル酸尿症フランス型	10020	Q9Y223
ウリカーゼ	レッシュ・ナイハン症候群、痛風	391051	タンパク質なし
ウリジン二リン酸グルクロニル-トランスフェラーゼ(例えば、UGT1A1)	クリグラー・ナジャー症候群	54658	P22309
α-1,2-マンノシルトランスフェラーゼ	N-グルコシル化 CDG II(608776)の先天性異常	79796	Q9H6U8
α-1,2-マンノシルトランスフェラーゼ	N-グルコシル化、I 型の先天性異常(前ゴルジグリコシル化欠損)	79796	Q9H6U8
α-1,3-マンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化 CDG Ii の先天性異常	440138	Q2TAA5
α-D-マンノシダーゼ	α-マンノシドーシス、I 型(重症)又は II 型(軽症)	10195	Q92685
α-L-フコシダーゼ	フコシドーシス	4123	Q9NTJ4
α-l-イズロニダーゼ	ムコ多糖症 MPS I H/S(ハーラー・シャイエ症候群)	2517	P04066
α-l-イズロニダーゼ	ムコ多糖症 MPS I-H(ハーラー症候群)	3425	P35475
α-l-イズロニダーゼ	ムコ多糖症 MPS I-S(シャイエ症候群)	3425	P35475
β-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化 CDG IId の先天性異常	3425	P35475

【０４３５】

【表４８】

β-1,4-マンノシルトランスフェラーゼ	N-グリコシル化 CDG Ik の先天性異常	2683	P15291
β-D-マンノシダーゼ	β-マンノシドーシス	56052	Q9BT22
β-ガラクトシダーゼ	ムコ多糖症 MPS IV(モルキオ症候群)IV-B 型	4126	O00462
β-グルクロニダーゼ	ムコ多糖賞 MPS VII(スライ症候群)	2720	P16278
β-ヘキソサミニダーゼ A	テイ・サックス病	2990	P08236
β-ヘキソサミニダーゼ B	サンドホフ病	3073	P06865

【０４３６】

一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表５４の酵素、又はその機能性変異体、例えば、ホモログ（例えば、オーソログ若しくはパラログ）又はその断片を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、そのＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤを参照することによって、表５４に列挙されるアミノ酸配列に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の配列同一性を有するタンパク質を含む。一部の実施形態では、機能性変異体は、例えば、野生型タンパク質よりも１０％、２０％、３０％、４０％、若しくは５０％以下低い割合で、対応する野生型タンパク質と同じ反応を触媒する。一部の実施形態では、表５４の酵素又はその機能性変異体をコード化するアネロベクターは、表５４の疾患又は障害の治療のために使用される。一部の実施形態では、アネロベクターは、ウリジン二リン酸グルクロニルトランスフェラーゼ又はその機能性変異体を標的細胞、例えば、肝臓細胞に送達するために使用される。一部の実施形態では、アネロベクターは、ＯＣＡ１又はその機能性変異体を標的細胞、例えば、網膜細胞に送達するために使用される。

【０４３７】

【表４９】

表 55. 例示的な非酵素エフェクター及び対応する適応症

エフェクター	適応症	Entrez Gene ID	UniProt ID
サバイバル運動ニューロンタンパク質(SMN)	脊髄性筋委縮症	6606	Q16637
ジストロフィン又はマイクロジストロフィン	筋ジストロフィー(例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィー又はベッカー型筋ジストロフィー)	1756	P11532

【０４３８】

【表５０】

補体タンパク質、例えば、補体因子C1	補体I因子欠損症	3426	P05156
補体因子H	非典型溶血性尿毒症症候群	3075	P08603
シスチノシン(リソソームシスチントランスポータ)	シスチノーシス	1497	O60931
精巣上体分泌タンパク質1(HE1;NPC2タンパク質)	ニーマン・ピック病C2型	10577	P61916
GDP-フコーストランスポータ-1	N-グルコシル化CDG IIcの先天性異常(ランバン・ハシャロン症候群)	55343	Q96A29
GM2アクチベータタンパク質	GM2アクチベータタンパク質欠損症(テイ・サックス病AB変異体、GM2A)	2760	Q17900
リソソーム膜貫通CLN3タンパク質	若年性セロイドリポフスチン症(CLN3、バッテン病、フォークト・シュピールマイヤー病)	1207	Q13286
リソソーム膜貫通CLN5タンパク質	遅発型小児性セロイドリポフスチン症変異体、フィンランド型(CLN5)	1203	O75503
リン酸ナトリウム共輸送体、シアリン	乳児シアル酸蓄積症	26503	Q9NRA2
リン酸ナトリウム共輸送体、シアリン	シアル酸尿症フィンランド型(サラ病)	26503	Q9NRA2
NPC1タンパク質	ニーマン・ピック病C1型/D型	4864	O15118

【０４３９】

【表５１】

オリゴマーゴルジ複合体-7	N-グリコシル化 CGD IIe の先天性異常	91949	P83436
プロサポシン	プロサポシン欠損症	5660	P07602
保護タンパク質/カテプシン A(PPCA)	ガラクトシアリドーシス(ゴールドバーグ症候群、複合型ノイラミニダーゼ及びβ-ガラクトシダーゼ欠損症)	5476	P10619
マンノース-P-ドリコール使用に関与するタンパク質	N-グリコシル化 CGG If の先天性異常	9526	O75352
サポシン B	サポシン B 欠損症(スルファチドアクチベータ欠損症)	5660	P07602
サポシン C	サポシン C 欠損症(ゴーシェアクチベータ欠損症)	5660	P07602
スルファターゼ修飾因子-I	ムコスルファチドーシス(多発性スルファターゼ欠損症)	285362	Q8NBK3
膜貫通 CLN6 タンパク質	遅発型幼児型セロイドリポフスチン症変異体(CLN6)	54982	Q9NWW5
膜貫通 CLN8 タンパク質	知的障害を伴うセロイドリポフスチン症進行性てんかん	2055	Q9UBY8
vWF	フォン・ヴィレブランド病	7450	P04275
第 I 因子(フィブリノーゲン)	無フィブリノーゲン血症	2243, 2244, 2266	P02671, P02675, P02679
エリスロポエチン(hEPO)			

【０４４０】

一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、エリスロポエチン（ＥＰＯ）、例えば、ヒトエリスロポエチン（ｈＥＰＯ）、又はその機能性変異体を含む。一部の実施形態では、エリスロポエチン、又はその機能性変異体をコード化するアネロベクターは、赤血球生成を刺激するために使用される。一部の実施形態では、エリスロポエチン、又はその機能性変異体をコード化するアネロベクターは、疾患又は障害、例えば、貧血の治療のために使用される。一部の実施形態では、アネロベクターは、ＥＰＯ又はその機能性変異体を、標的細胞、例えば、赤血球に送達させるために使用される。

【０４４１】

一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、表５５のポリペプチド、又は

その機能性変異体、例えば、ホモログ（例えば、オーソログ若しくはパラログ）又はその断片を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、そのＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤを参照することによって、表５５に列挙されるアミノ酸配列に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の配列同一性を有するタンパク質を含む。一部の実施形態では、表５５のポリペプチド、又はその機能性変異体をコード化するアネロベクターは、表５５の疾患又は障害の治療のために使用される。一部の実施形態では、アネロベクターは、ＳＭＮ又はその機能性変異体を、標的細胞、例えば、脊髄及び／又は運動ニューロンの細胞に送達させるために使用される。一部の実施形態では、アネロベクターは、マイクロジストロフィンを標的細胞、例えば、筋細胞に送達させるために使用される。

【０４４２】

例示的なマイクロジストロフィンは、Ｄｕａｎ，“Ｓｙｓｔｅｍｉｃ　ＡＡＶ　Ｍｉｃｒｏ－ｄｙｓｔｒｏｐｈｉｎ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒａｐｙ　Ｆｏｒ　Ｄｕｃｈｅｎｎｅ　Ｍｕｓｃｕｌａｒ　Ｄｙｓｔｒｏｐｈｙ．”Ｍｏｌ　Ｔｈｅｒ．２０１８　Ｏｃｔ　３；２６（１０）：２３３７－２３５６．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｙｍｔｈｅ．２０１８．０７．０１１．Ｅｐｕｂ　２０１８　Ｊｕｌ　１７に記載されている。

【０４４３】

一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、凝固因子、例えば、本明細書の表５４又は表５５に列挙される凝固因子を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、変異すると、リソソーム蓄積症を引き起こすタンパク質、例えば、本明細書の表５４又は表５５に列挙されるタンパク質を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載のエフェクターは、輸送タンパク質、例えば、本明細書の表５５に列挙される輸送タンパク質を含む。

【０４４４】

一部の実施形態では、野生型タンパク質の機能性変異体は、野生型タンパク質の１つ若しくは複数の活性を有するタンパク質を含み、例えば、機能性変異体は、例えば、野生型タンパク質より少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、若しくは５０％低い割合で、対応する野生型タンパク質と同じ反応を触媒する。一部の実施形態では、機能性変異体は、例えば、同じ条件下の同じ結合パートナーに対して、対応する野生型タンパク質のＫｄより多くとも１０％、２０％、３０％、４０％、若しくは５０％高いＫｄで、野生型タンパク質によって結合されるものと同じ結合パートナーに結合する。一部の実施形態では、機能性変異体は、野生型ポリペプチドのそれと少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％同一のポリペプチド配列を有する。一部の実施形態では、機能性変異体は、対応する野生型タンパク質のホモログ（例えば、オーソログ又はパラログ）を含む。一部の実施形態では、機能性変異体は、融合タンパク質である。一部の実施形態では、融合物は、対応する野生型タンパク質、第２、異種領域に対して少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有する第１領域を含む。一部の実施形態では、機能性変異体は、対応する野生型タンパク質の断片を含むか、又はそれから構成される。

【０４４５】

再生、修復、及び線維化因子

本明細書に記載の治療用ポリペプチドはまた、例えば、表５６に開示されるような増殖因子、又はその機能性変異体、例えば、そのＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤを参照することによって表５６に開示されるタンパク質配列に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の同一性を有するタンパク質を含む。また、そのような増殖因子に対する抗体若しくはその断片、又は再生及び修復を促進するｍｉＲＮＡも含まれる。

【０４４６】

【表５２】

表 56.　例示的な再生、修復、及び線維化因子

標的	遺伝子アクセッション#	タンパク質アクセッション#
VEGF-A	NG_008732	NP_001165094
NRG-1	NG_012005	NP_001153471
FGF2	NG_029067	NP_001348594
FGF1	遺伝子 ID: 2246	NP_001341882
miR-199-3p	MIMAT0000232	
miR-590-3p	MIMAT0004801	
mi-17-92	MI0000071	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2732113/figure/F1/
miR-222	MI0000299	
miR-302-367	MIR302A 及び MIR367	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4400607/

【０４４７】

形質転換因子

本明細書に記載の治療用ポリペプチドはまた、形質転換因子、例えば、繊維芽細胞を分化細胞に形質転換するタンパク質因子、例えば、表５７に開示される因子又はその機能性変異体、例えば、そのＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤを参照することによって表５７に開示されるタンパク質配列に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の同一性を有するタンパク質を含む。

【０４４８】

【表５３】

表 57. 例示的な形質転換因子

標的	適応症	遺伝子 アクセッション#	タンパク質 アクセッション#
MESP1	線維芽細胞を形質転換することによる組織修復	遺伝子 ID: 55897	EAX02066
ETS2	線維芽細胞を形質転換することによる組織修復	遺伝子 ID: 2114	NP_005230
HAND2	線維芽細胞を形質転換することによる組織修復	遺伝子 ID: 9464	NP_068808
MYOCARDIN	線維芽細胞を形質転換することによる組織修復	遺伝子 ID: 93649	NP_001139784
ESRRA	線維芽細胞を形質転換することによる組織修復	遺伝子 ID: 2101	AAH92470
miR-1	線維芽細胞を形質転換することによる組織修復	MI0000651	n/a
miR-133	線維芽細胞を形質転換することによる組織修復	MI0000450	n/a
TGFb	線維芽細胞を形質転換することによる組織修復	遺伝子 ID: 7040	NP_000651.3
WNT	線維芽細胞を形質転換することによる組織修復	遺伝子 ID: 7471	NP_005421
JAK	線維芽細胞を形質転換することによる組織修復	遺伝子 ID: 3716	NP_001308784
NOTCH	線維芽細胞を形質転換することによる組織修復	遺伝子 ID: 4851	XP_011517019

【０４４９】

細胞再生を刺激するタンパク質

本明細書に記載の治療用ポリペプチドはまた、細胞再生を刺激するタンパク質、例えば、表５８に開示されるタンパク質又はその機能性変異体、例えば、そのＵｎｉＰｒｏｔＩＤを参照することによって表５８に開示されるタンパク質配列に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６７％、９８％、９９％の同一性を有するタンパク質を含む。

【０４５０】

【表５４】

表 58. 細胞再生を刺激する例示的なタンパク質

標的	遺伝子アクセッション#	タンパク質アクセッション#
MST1	NG_016454	NP_066278
STK30	遺伝子 ID: 26448	NP_036103
MST2	遺伝子 ID: 6788	NP_006272
SAV1	遺伝子 ID: 60485	NP_068590
LATS1	遺伝子 ID: 9113	NP_004681
LATS2	遺伝子 ID: 26524	NP_055387
YAP1	NG_029530	NP_001123617
CDKN2b	NG_023297	NP_004927
CDKN2a	NG_007485	NP_478102

【０４５１】

ＳＴＩＮＧモジュレータエフェクター

一部の実施形態では、本明細書に記載の分泌エフェクターは、ＳＴＩＮＧ／ｃＧＡＳシグナル伝達を調節する。一部の実施形態では、ＳＴＩＮＧモジュレータは、ポリペプチド、例えば、ウイルスポリペプチド又はその機能性変異体である。例えば、エフェクターは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｍａｒｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．“Ｍｅｓｓａｇｅ ｉｎ ａ ｂｏｔｔｌｅ：ｌｅｓｓｏｎｓ ｌｅａｒｎｅｄ ｆｒｏｍ ａｎｔａｇｏｎｉｓｍ ｏｆ ＳＴＩＮＧ ｓｉｇｎａｌｌｉｎｇ ｄｕｒｉｎｇ ＲＮＡ ｖｉｒｕｓ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ”Ｃｙｔｏｋｉｎｅ & Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｖｏｌｕｍｅ ２５，Ｉｓｓｕｅ ６，Ｄｅｃｅｍｂｅｒ ２０１４，Ｐａｇｅｓ ６６９－６７９に記載されるＳＴＩＮＧモジュレータ（例えば、阻害剤）を含んでもよい。追加のＳＴＩＮＧモジュレータ（例えば、アクチベータ）は、例えば、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．“ＳＴＩＮＧ ａｃｔｉｖａｔｏｒ ｃ－ｄｉ－ＧＭＰ ｅｎｈａｎｃｅｓ ｔｈｅ ａｎｔｉ－ｔｕｍｏｒ ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ ｐｅｐｔｉｄｅ ｖａｃｃｉｎｅｓ ｉｎ ｍｅｌａｎｏｍａ－ｂｅａｒｉｎｇ ｍｉｃｅ．”Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１５ Ａｕｇ；６４（８）：１０５７－６６．ｄｏｉ：１０．１００７／ｓ００２６２－０１５－１７１３－５．Ｅｐｕｂ ２０１５ Ｍａｙ １９；Ｂｏｓｅ“ｃＧＡＳ／ＳＴＩＮＧ Ｐａｔｈｗａｙ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ：Ｊｅｋｙｌｌ ａｎｄ Ｈｙｄｅ Ｓｔｏｒｙ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｅ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ”Ｉｎｔ Ｊ Ｍｏｌ Ｓｃｉ．２０１７ Ｎｏｖ；１８（１１）：２４５６；及びＦｕ ｅｔ ａｌ．“ＳＴＩＮＧ ａｇｏｎｉｓｔ ｆｏｒｍｕｌａｔｅｄ ｃａｎｃｅｒ ｖａｃｃｉｎｅｓ ｃａｎ ｃｕｒｅ ｅｓｔａｂｌｉｓｈｅｄ ｔｕｍｏｒｓ ｒｅｓｉｓｔａｎｔ

ｔｏ ＰＤ－１ ｂｌｏｃｋａｄｅ”Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ Ｍｅｄ．２０１５ Ａｐｒ １５；７（２８３）：２８３ｒａ５２に記載されている。

【０４５２】

ペプチドの一部の例として、限定はされないが、蛍光タグ若しくはマーカ、抗原、ペプチド治療薬、天然の生物活性ペプチド由来の合成若しくはアナログペプチド、アゴニスト若しくはアンタゴニストペプチド、抗微生物ペプチド、ターゲティング若しくは細胞傷害性ペプチド、分解若しくは自滅ペプチド及び分解若しくは自滅ペプチドが挙げられる。また、本明細書に記載される本発明で有用なペプチドとして、抗原結合ペプチド、例えば、抗原結合抗体又は抗体様断片、例えば、一本鎖抗体、ナノボディも挙げられる（例えば、Ｓｔｅｅｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．２０１６．Ｎａｎｏｂｏｄｉｅｓ ａｓ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ：ｂｉｇ ｏｐｐｏｒｔｕｎｉｔｉｅｓ ｆｏｒ ｓｍａｌｌ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ Ｔｏｄａｙ：２１（７）：１０７６－１１３を参照）。こうした抗原結合ペプチドは、サイトゾル抗原、核抗原、又はオルガネラ内抗原に結合し得る。

【０４５３】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、低分子ペプチド、ペプチド模倣物（例えば、ペプトイド）、アミノ酸、及びアミノ酸類似体をコード化する配列を含む。そのような治療薬は、一般に、モル当たり約５，０００グラム未満の分子量、モル当たり約２，０００グラム未満の分子量、モル当たり約１，０００グラム未満の分子量、モル当たり約５００グラム未満の分子量、並びにこのような化合物の塩、エステル、及び他の薬学的に許容される形態を有する。このような治療薬としては、神経伝達物質、ホルモン、薬物、毒素、ウイルス若しくは微生物粒子、合成粒子、及びそれらのアゴニスト又はアンタゴニストが挙げられるが、これらに限定されない。

【０４５４】

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物又はアネロベクターは、特定の場所、組織、又は細胞を標的化することができるリガンドに連結したポリペプチドを含む。

【０４５５】

遺伝子編集構成体

アネロベクターの遺伝子エレメントは、遺伝子編集システムの１構成体をコード化する１つ又は複数の遺伝子を含んでもよい。例示的な遺伝子編集システムとして、クラスター化規則間隔短回文反復（ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ ｓｈｏｒｔ ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ ｒｅｐｅａｔ）（ＣＲＩＳＰＲ）システム、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、及び転写アクチベータ様エフェクターベースヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）がある。ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、及びＣＲＩＳＰＲに基づく方法は、例えば、Ｇａｊ ｅｔ ａｌ．Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３１．７（２０１３）：３９７－４０５に記載されており；遺伝子編集のＣＲＩＳＰＲ法は、例えば、Ｇｕａｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ ｓｙｓｔｅｍ ｉｎ ｇｅｎｅ ｔｈｅｒａｐｙ：Ｐｒｅ－ｃｌｉｎｉｃａｌ ｐｒｏｇｒｅｓｓ ｉｎ ａｎｉｍａｌ ｍｏｄｅｌ．ＤＮＡ Ｒｅｐａｉｒ ２０１６ Ｏｃｔ；４６：１－８．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｄｎａｒｅｐ．２０１６．０７．００４；Ｚｈｅｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｅｃｉｓｅ ｇｅｎｅ ｄｅｌｅｔｉｏｎ ａｎｄ ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９ ｓｙｓｔｅｍ ｉｎ ｈｕｍａｎ ｃｅｌｌｓ．ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，Ｖｏｌ．５７，Ｎｏ．３，Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ ２０１４，ｐｐ．１１５－１２４に記載されている。

【０４５６】

ＣＲＩＳＰＲシステムは、初めは、細菌及び古細菌で発見された適応防御システムである。ＣＲＩＳＰＲシステムは、ＣＲＩＳＰＲ関連又は「Ｃａｓ」エンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９若しくはＣｐｆ１）と呼ばれるＲＮＡ誘導ヌクレアーゼを用いて、外来ＤＮＡを切断する。典型的なＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓシステムにおいてエンドヌクレアーゼは、一本鎖若しくは二本鎖ＤＮＡ配列をターゲティングする配列特異的なノンコーディング

「ガイドＲＮＡ」により、標的ヌクレオチド配列（例えば、ゲノム内で配列編集しようとする部位）に向けられる。３つのクラス（Ｉ－ＩＩＩ）のＣＲＩＳＰＲシステムが同定されている。クラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲシステムは、単一のＣａｓエンドヌクレアーゼ（複数のＣａｓタンパク質ではなく）を使用する。あるクラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲシステムは、Ｃａｓ９、ＣＲＩＳＰＲ　ＲＮＡ（「ｃｒＲＮＡ」）、及びトランス活性化ｃｒＲＮＡ（「ｔｒａｃｒＲＮＡ」）などのＩＩ型Ｃａｓエンドヌクレアーゼを含む。ｃｒＲＮＡは、「ガイドＲＮＡ」、典型的には、標的ＤＮＡ配列に対応する約２０ヌクレオチドＲＮＡ配列を含む。ｃｒＲＮＡはまた、ｔｒａｃｒＲＮＡに結合して、部分的に二本鎖の構造を形成する領域も含有し、これはＲＮａｓｅＩＩＩにより切断されて、ｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｒＲＮＡハイブリッドが形成される。次に、ｃｒＲＮＡ／ｔｒａｃｒＲＮＡハイブリッドは、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼを指令して、標的ＤＮＡ配列を認識させ、切断させる。標的ＤＮＡ配列は、一般に、所与のＣａｓエンドヌクレアーゼに特異的な「プロトスペーサ隣接モチーフ」（「ＰＡＭ」）に隣接していなければならない；しかし、ＰＡＭ配列は、所与のゲノム全体に出現する。

【０４５７】

一部の実施形態では、アネロベクターは、ＣＲＩＳＰＲエンドヌクレアーゼの遺伝子を含む。例えば、様々な原核生物種から同定されるいくつかのＣＲＩＳＰＲエンドヌクレアーゼは、ユニークなＰＡＭ配列要件を有し；ＰＡＭ配列の例としては、５’－ＮＧＧ（化膿レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ））、５’－ＮＮＡＧＡＡ（ストレプトコッカス・サーモフィルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ１）、５’－ＮＧＧＮＧ（ストレプトコッカス・サーモフィルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＣＲＩＳＰＲ３）、及び５’－ＮＮＮＧＡＴＴ（髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ　ｍｅｎｉｎｇｉｄｉｔｉｓ））が挙げられる。いくつかのエンドヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓ９エンドヌクレアーゼは、Ｇリッチ ＰＡＭ部位、例えば、５’－ＮＧＧに結合しており、ＰＡＭ部位（その５’側）から上流の３ヌクレオチド位置で標的ＤＮＡの平滑末端切断を実施する。別のクラスＩＩ　ＣＲＩＳＰＲシステムは、Ｃａｓ９より小さいＶ型エンドヌクレアーゼＣｐｆ１を含み；例として、ＡｓＣｐｆ１（アシダミノコッカス種（Ａｃｉｄａｍｉｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｓｐ．）由来）及びＬｂＣｐｆ１（ラクノスピラ科種（Ｌａｃｈｎｏｓｐｉｒａｃｅａｅ　ｓｐ．）由来）が挙げられる。Ｃｐｆ１エンドヌクレアーゼは、ＴリッチＰＡＭ部位、例えば、５’－ＴＴＮと結合している。Ｃｐｆ１はまた、５’－ＣＴＡ　ＰＡＭモチーフを認識することができる。Ｃｐｆ１は、４－又は５－ヌクレオチド５’オーバーハングを伴うオフセット又はスタッガー二本鎖切断を導入し、例えば、コード鎖のＰＡＭ部位（その３’側）から下流の１８ヌクレオチドで、且つ相補鎖のＰＡＭ部位から下流の２３ヌクレオチドに位置する５－ヌクレオチドオフセット又はスタッガーカットで標的ＤＮＡを切断することにより、標的ＤＮＡを切断し；こうしたオフセット切断によって生じた５－ヌクレオチドオーバーハングは、平滑末端切断されたＤＮＡでの挿入と比較して、相同組換えによるＤＮＡ挿入による正確なゲノム編集を可能にする。例えば、Ｚｅｔｓｃｈｅ　ｅｔ　ａｌ．（２０１５）　Ｃｅｌｌ，１６３：７５９－７７１を参照されたい。

【０４５８】

様々なＣＲＩＳＰＲ結合（Ｃａｓ）遺伝子をアネロベクターに含有させてもよい。遺伝子の具体的な例は、クラスＩＩシステムからのＣａｓタンパク質をコード化するものであり、Ｃａｓ１、Ｃａｓ２、Ｃａｓ３、Ｃａｓ４、Ｃａｓ５、Ｃａｓ６、Ｃａｓ７、Ｃａｓ８、Ｃａｓ９、Ｃａｓ１０、Ｃｐｆ１、Ｃ２Ｃ１、又はＣ２Ｃ３が挙げられる。一部の実施形態では、アネロベクターは、Ｃａｓタンパク質、例えば、Ｃａｓ９タンパク質をコード化する遺伝子を含み、これは、多様な原核生物種のいずれに由来するものでもよい。一部の実施形態では、アネロベクターは、特定のＣａｓタンパク質、例えば、特定のＣａｓ９タンパク質をコード化する遺伝子を含み、これは、特定のプロトスペーサ隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列を認識するように選択される。一部の実施形態では、アネロベクターは、２つ以上の異なるＣａｓタンパク質をコード化する核酸、又は２つ以上のＣａｓタンパク

質を含み、例えば、同じ、類似する若しくは異なるＰＡＭモチーフを含む部位の認識及び修飾を可能にするために、アネロベクターを細胞、接合子、胚、又は動物に導入してもよい。一部の実施形態では、アネロベクターは、不活性化ヌクレアーゼ、例えば、ヌクレアーゼ欠失Ｃａｓ９を含む修飾Ｃａｓタンパク質をコード化する遺伝子を含む。

【０４５９】

野生型Ｃａｓ９タンパク質は、ｇＲＮＡによりターゲティングされた特定のＤＮＡ配列に二本鎖切断（ＤＳＢ）を生成するが、修飾された機能性を有するいくつかのＣＲＩＳＰＲエンドヌクレアーゼが知られており、例えば、Ｃａｓエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓ９）の「ニッカーゼ」バージョンは、一本鎖切断しか生成せず；触媒能のないＣａｓエンドヌクレアーゼ、例えばＣａｓ９（「ｄＣａｓ９」）は、標的ＤＮＡを切断しない。ｄＣａｓ９をコード化する遺伝子を、エフェクタードメインをコード化する遺伝子と融合させて、標的遺伝子の発現を抑制（ＣＲＩＳＰＲｉ）又は活性化（ＣＲＩＳＰＲａ）することができる。例えば、遺伝子は、転写サイレンサー（例えば、ＫＲＡＢドメイン）又は転写アクチベータ（例えば、ｄＣａｓ９－ＶＰ６４融合物）をコード化し得る。ＦｏｋＩヌクレアーゼに融合した触媒能のないＣａｓ９（ｄＣａｓ９）をコード化する遺伝子（「ｄＣａｓ９－ＦｏｋＩ」）を含有させて、２つのｇＲＮＡに対して相同的な標的配列にＤＳＢを生成することができる。例えば、Ａｄｄｇｅｎｅリポジトリ（Ａｄｄｇｅｎｅ，７５　Ｓｉｄｎｅｙ　Ｓｔ．，Ｓｕｉｔｅ　５５０Ａ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ　０２１３９；ａｄｄｇｅｎｅ．ｏｒｇ／ｃｒｉｓｐｒ／）に開示され、そこから一般に入手可能な多数のＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９プラスミドを参照されたい。各々が個別のガイドＲＮＡにより指令される２つの個別の二本鎖切断を導入する「ダブルニッカーゼ」Ｃａｓ９は、Ｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１３）Ｃｅｌｌ，１５４：１３８０－１３８９によって、より正確なゲノム編集を達成するものとして記載されている。

【０４６０】

真核細胞の遺伝子を編集するためのＣＲＩＳＰＲ技術は、以下：米国特許出願公開第２０１６／０１３８００８Ａ１号明細書及び同第２０１５／０３４４９１２Ａ１号明細書、並びに米国特許第８，６９７，３５９号明細書、同第８，７７１，９４５号明細書、同第８，９４５，８３９号明細書、同第８，９９９，６４１号明細書、同第８，９９３，２３３号明細書、同第８，８９５，３０８号明細書、同第８，８６５，４０６号明細書、同第８，８８９，４１８号明細書、同第８，８７１，４４５号明細書、同第８，８８９，３５６号明細書、同第８，９３２，８１４号明細書、同第８，７９５，９６５号明細書、及び同第８，９０６，６１６号明細書に開示されている。Ｃｐｆ１エンドヌクレアーゼ並びに対応するガイドＲＮＡ及びＰＡＭ部位は、米国特許出願公開第２０１６／０２０８２４３Ａ１号明細書に開示されている。

【０４６１】

一部の実施形態では、アネロベクターは、本明細書に記載のポリペプチド、例えば、標的化ヌクレアーゼをコード化する遺伝子、例えば、Ｃａｓ９、例えば、野生型Ｃａｓ９、ニッカーゼＣａｓ９（例えば、Ｃａｓ９　Ｄ１０Ａ）、不活性Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９）、ｅＳｐＣａｓ９、Ｃｐｆ１、Ｃ２Ｃ１、又はＣ２Ｃ３、及びｇＲＮＡを含む。ヌクレアーゼをコード化する遺伝子、及びｇＲＮＡの選択は、標的化突然変異がヌクレオチドの欠失、置換、又は付加、例えば、標的化配列に対するヌクレオチドの欠失、置換、又は付加であるか否かによって決定される。（１つ又は複数の）エフェクタードメイン（例えば、ＶＰ６４）の全部又は一部（例えば、その生物活性部分）と係留された触媒能のないエンドヌクレアーゼ、例えば、不活性Ｃａｓ９（ｄＣａｓ９、例えば、Ｄ１０Ａ；Ｈ８４０Ａ）をコード化する遺伝子は、１つ又は複数の標的核酸配列の活性及び／又は発現を調節することができるキメラタンパク質を作製する。

【０４６２】

一部の実施形態では、アネロベクターは、本明細書に記載の方法に有用なキメラタンパク質を作製するために、１つ又は複数のエフェクタードメインの全部又は一部（例えば、完全長野生型エフェクタードメイン、又はその断片若しくは変異体、例えば、その生物活

性部分）とｄＣａｓ９の融合物をコード化する遺伝子を含む。従って、一部の実施形態では、アネロベクターは、ｄＣａｓ９－メチラーゼ融合物をコード化する遺伝子を含む。他の一部の実施形態では、アネロベクターは、内在性遺伝子をターゲティングする部位特異的ｇＲＮＡを含むｄＣａｓ９－酵素融合物をコード化する遺伝子を含む。

【０４６３】

他の態様では、アネロベクターは、ｄＣａｓ９と融合した１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、又はそれ以上のエフェクタードメイン（全部又は生物活性部分）をコード化する遺伝子を含む。

【０４６４】

調節配列

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、調節配列、例えば、プロモータ又はエンハンサーを含み、エフェクターをコードする配列に作動可能に連結される。

【０４６５】

一部の実施形態では、プロモータは、発現産物をコード化するＤＮＡに隣接して位置するＤＮＡ配列を含む。プロモータは、隣接するＤＮＡ配列と作動可能に連結してもよい。プロモータは、典型的に、プロモータが存在しないときに発現された産物の量と比較して、ＤＮＡ配列から発現される産物の量を増加させる。１つの生物由来のプロモータを使用して、別の生物に由来するＤＮＡ配列からの産物の発現を増大することができる。例えば、脊椎動物プロモータは、脊椎動物においてクラゲＧＦＰの発現のために用いることができる。従って、１プロモータエレメントは、１つ又は複数の産物の発現を増大することができる。当業者には、複数のプロモータエレメントが周知である。

【０４６６】

一実施形態では、高レベルの構成性発現が要望される。こうしたプロモータの例として、限定はしないが、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（Ｒｏｕｓ ｓａｒｃｏｍａ ｖｉｒｕｓ）（ＲＶＳ）長末端反復（ＬＴＲ）プロモータ／エンハンサー、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）中間体初期プロモータ／エンハンサー（例えば、Ｂｏｓｈａｒｔ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ，４１：５２１－５３０（１９８５）を参照）、ＳＶ４０プロモータ、ジヒドロ葉酸レダクターゼプロモータ、細胞質βアクチンプロモータ及びホスホグリセロールキナーゼ（ＰＧＫ）プロモータが挙げられる。

【０４６７】

別の実施形態では、誘導性プロモータが要望される場合もある。誘導性プロモータは、例えばシス又はトランスのいずれかで提供される、外部から供給される化合物により調節されるものであり、限定はしないが、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオニン（ＭＴ）プロモータ；デキサメタゾン（Ｄｅｘ）誘導性マウス乳腺腫瘍ウイルス（ＭＭＴＶ）プロモータ；Ｔ７ポリメラーゼプロモータシステム（９８／１００８８号パンフレット）；テトラサイクリン抑制性システム（Ｇｏｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：５５４７－５５５１（１９９２））；テトラサイクリン誘導性システム（Ｇｏｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２６８：１７６６－１７６９（１９９５）；また、Ｈａｒｖｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．，２：５１２－５１８（１９９８））も参照）；ＲＵ４８６誘導性システム（Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．，１５：２３９－２４３（１９９７）及びＷａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，４：４３２－４４１（１９９７）］；並びにラパマイシン誘導性システム（Ｍａｇａｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１００：２８６５－２８７２（１９９７）；Ｒｉｖｅｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄｉｃｉｎｅ．２：１０２８－１０３２（１９９６））が挙げられる。本発明に関して有用となり得る他のタイプの誘導性プロモータは、特定の生理的状態、例えば、温度、急性相によって、又は複製細胞においてのみ調節されるものである。

【０４６８】

一部の実施形態では、目的の遺伝子又は核酸配列のネイティブプロモータを使用する。

ネイティブプロモータは、遺伝子又は核酸配列の発現が、ネイティブ発現を模倣すべきであることが要望される場合に使用することができる。ネイティブプロモータは、遺伝子又は他の核酸配列の発現を一過性若しくは発展的に、又は組織特異的に、又は特定の転写刺激に応答して調節しなければならない場合に使用することができる。別の実施形態では、ネイティブ発現を模倣するために、他のネイティブ発現制御エレメント、例えば、エンハンサーエレメント、ポリアデニル化部位又はコザック（Ｋｏｚａｋ）コンセンサス配列を用いてもよい。

【０４６９】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、組織特異的プロモータに作動可能に連結された遺伝子を含む。例えば、骨格筋での発現が要望される場合、筋肉において活性のプロモータを用いることができる。こうしたものとして、骨格αアクチン、ミオシン軽鎖２Ａ、ジストロフィン、筋クレアチンキナーゼをコード化する遺伝子由来のプロモータ、並びに天然のプロモータより高い活性を有する合成筋肉プロモータが挙げられる。Ｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．，１７：２４１－２４５（１９９９）を参照されたい。組織特異的であるプロモータの例は、中でも、以下のものについて知られている：肝臓アルブミン、Ｍｉｙａｔａｋｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，７１：５１２４－３２（１９９７）；Ｂ型肝炎ウイルスコアプロモータ、Ｓａｎｄｉｇ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．３：１００２－９（１９９６）；αフェトプロテイン（ＡＦＰ）、Ａｒｂｕｔｈｎｏｔ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，７：１５０３－１４（１９９６）］、骨（オステオカルシン、Ｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐ．，２４：１８５－９６（１９９７）；骨シアロタンパク質、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｏｎｅ Ｍｉｎｅｒ．Ｒｅｓ．１１：６５４－６４（１９９６））、リンパ球（ＣＤ２、Ｈａｎｓａｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６１：１０６３－８（１９９８）；免疫グロブリン重鎖；Ｔ細胞受容体ａ鎖）、神経（ニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）プロモータ、Ａｎｄｅｒｓｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．，１３：５０３－１５（１９９３）；ニューロフィラメント軽鎖遺伝子、Ｐｉｃｃｉｏｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：５６１１－５（１９９１）；ニューロン特異的ｖｇｆ遺伝子、Ｐｉｃｃｉｏｌｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｎ，１５：３７３－８４（１９９５）］。

【０４７０】

遺伝子エレメントは、エンハンサー、例えば、遺伝子をコード化するＤＮＡ配列に隣接して位置するＤＮＡ配列を含んでもよい。エンハンサーエレメントは、典型的に、プロモータエレメントの上流に位置するか、又はコーディングＤＮＡ配列（例えば、１つ若しくは複数の産物に転写若しくは翻訳されたＤＮＡ配列）の下流、又はその内部に位置してもよい。従って、エンハンサーエレメントは、産物をコード化するＤＮＡ配列上流又は下流の１００塩基対、２００塩基対、若しくは３００塩基対若しくはそれ以上に位置することができる。エンハンサーエレメントは、プロモータエレメントによってもたらされる発現増大を上回って、ＤＮＡ配列から発現される組換え産物の量を増大することができる。複数のエンハンサーエレメントが当業者には容易に入手可能である。

【０４７１】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、本明細書に記載の発現産物をコード化する配列にフランキングする１つ又は複数の逆方向末端反復（ＩＴＲ）を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、本明細書に記載の発現産物をコード化する配列にフランキングする１つ又は複数の長末端反復（ＬＴＲ）を含む。用いることができるプロモータ配列の例として、限定はされないが、サルウイルス４０（ＳＶ４０）初期プロモータ、マウス乳腺腫瘍ウイルス（ＭＭＴＶ）、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）長末端反復（ＬＴＲ）プロモータ、ＭｏＭｕＬＶプロモータ、トリ白血病ウイルスプロモータ、エプスタイン・バーウイルス（Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒ ｖｉｒｕｓ）前初期プロモータ、及びラウス肉腫ウイルス（Ｒｏｕｓ ｓａｒｃｏｍａ ｖｉｒｕｓ）プロモータが挙げられる。

【０４７２】

複製タンパク質
一部の実施形態では、アネロベクター、例えば、合成アネロベクターの遺伝子エレメントは、１つ又は複数の複製タンパク質をコード化する配列を含んでもよい。一部の実施形態では、アネロベクターは、ローリングサークル複製法、例えば、リーディング鎖の合成により複製することができ、ラギング鎖は結合されない。こうした実施形態では、アネロベクターは、３つの追加エレメント：ｉ）イニシエータタンパク質をコード化する遺伝子、ｉｉ）二本鎖起点、及びｉｉｉ）一本鎖起点を含む。複製タンパク質を含むローリングサークル複製（ＲＣＲ）タンパク質複合体は、リーディング鎖に結合して、複製起点を不安定化する。ＲＣＲ複合体は、ゲノムを切断して、自由３’ＯＨ末端を生成する。細胞ＤＮＡポリメラーゼは、自由３’ＯＨ末端からウイルスＤＮＡ複製を開始する。ゲノムが複製された後、ＲＣＲ複合体は、ループを共有結合により閉鎖する。これにより、環状プラス一本鎖親ＤＮＡ分子、及び親マイナス鎖と新しく合成されたプラス鎖とから構成される環状二本鎖ＤＮＡ分子の放出が起こる。一本鎖ＤＮＡ分子は、包膜されるか、又は第２ラウンドの複製に参加することができる。例えば、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ Ｊｏｕｒｎａｌ ２００９，６：６０ ｄｏｉ：１０．１１８６／１７４３－４２２Ｘ－６－６０を参照されたい。

【０４７３】
遺伝子エレメントは、ポリメラーゼ、例えば、ＲＮＡポリメラーゼ又はＤＮＡポリメラーゼをコード化する配列を含んでもよい。

【０４７４】
その他の配列
一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、産物をコード化する核酸（例えば、リボザイム、タンパク質をコード化する治療用ｍＲＮＡ、外性遺伝子）をさらに含む。

【０４７５】
一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、宿主又は宿主細胞中のアネロベクターの種及び／若しくは組織及び／若しくは細胞指向性（例えば、キャプシドタンパク質配列）、感染力（例えば、キャプシドタンパク質配列）、免疫抑制／活性化（例えば、調節核酸）、ウイルスゲノム結合及び／又はパッケージング、免疫回避（非免疫原性及び／又は寛容性）、薬物動態、エンドサイトーシス及び／又は細胞接着、核内進入、細胞内調節及び局在化、エキソサイトーシス調節、増殖、並びに核酸保護に影響を及ぼす１つ又は複数の配列を含む。

【０４７６】
一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又は人工核酸を含む他の配列を含んでもよい。他の配列として、限定はされないが、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、又はｔＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｒＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｇＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、若しくはその他のＲＮＡｉ分子をコード化する配列を挙げることができる。一実施形態では、遺伝子エレメントは、調節核酸と同じ遺伝子発現産物の異なる遺伝子座をターゲティングするために、ｓｉＲＮＡをコード化する配列を含む。一実施形態では、遺伝子エレメントは、調節核酸とは異なる遺伝子発現産物をターゲティングするために、ｓｉＲＮＡをコード化する配列を含む。

【０４７７】
一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、以下：１つ若しくは複数のｍｉＲＮＡをコード化する配列、１つ若しくは複数の複製タンパク質をコード化する配列、外性遺伝子をコード化する配列、治療薬をコード化する配列、調節配列（例えば、プロモータ、エンハンサー）、内在性遺伝子（ｓｉＲＮＡ、ｌｎｃＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ）をターゲティングする１つ若しくは複数の調節配列をコード化する配列、並びに治療用ｍＲＮＡ若しくはタンパク質をコード化する配列のうち１つ又は複数を含む。

【０４７８】
他の配列は、約２～約５０００ｎｔ、約１０～約１００ｎｔ、約５０～約１５０ｎｔ、約１００～約２００ｎｔ、約１５０～約２５０ｎｔ、約２００～約３００ｎｔ、約２５０

～約３５０ｎｔ、約３００～約５００ｎｔ、約１０～約１０００ｎｔ、約５０～約１０００ｎｔ、約１００～約１０００ｎｔ、約１０００～約２０００ｎｔ、約２０００～約３０００ｎｔ、約３０００～約４０００ｎｔ、約４０００～約５０００ｎｔ、又はこれらの間の任意の範囲の長さを有し得る。

【０４７９】

コードされた遺伝子

例えば、遺伝子エレメントは、シグナル伝達生化学経路に関連する遺伝子、例えば、シグナル伝達生化学経路関連遺伝子又はポリヌクレオチドを含んでもよい。例として、疾患関連遺伝子又はポリヌクレオチドがある。「疾患関連」遺伝子又はポリヌクレオチドは、非疾患対照の組織若しくは細胞と比較して、疾患に罹患した組織由来の細胞において異常なレベル又は異常な形態で転写若しくは翻訳産物をもたらしているあらゆる遺伝子又はポリヌクレオチドを指す。これは、異常に高いレベルで発現される遺伝子であってもよいし；異常に低いレベルで発現される遺伝子であってもよく、その際、改変された発現は、疾患の発生及び／又は進行と相関する。疾患関連遺伝子はまた、遺伝子プロセシング突然変異又は遺伝子変異とも呼ばれ、これは、疾患の直接の原因であるか、又は病因となる遺伝子との連関不均衡状態にある。

【０４８０】

疾患関連遺伝子及びポリヌクレオチドは、ＭｃＫｕｓｉｃｋ－Ｎａｔｈａｎｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｊｏｈｎｓ Ｈｏｐｋｉｎｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ（Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍｄ．）及びＮａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．）から入手可能である。疾患関連遺伝子又はポリヌクレオチドの例は、米国特許第８，６９７，３５９号明細書の表Ａ及びＢに列挙されており、これらは、その全体を参照により本明細書に組み込むものとする。疾患別の情報は、ＭｃＫｕｓｉｃｋ－Ｎａｔｈａｎｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｊｏｈｎｓ Ｈｏｐｋｉｎｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ（Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍｄ．）及びＮａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．）から入手可能である。シグナル伝達生化学経路関連遺伝子及びポリヌクレオチドの例は、米国特許第８，６９７，３５９号明細書の表Ａ～Ｃに列挙されており、これらは、その全体を参照により本明細書に組み込むものとする。

【０４８１】

さらに、遺伝子エレメントは、本明細書の他所に記載する通り、ターゲティング部分をコード化することができる。これは、例えば、糖、糖脂質、又は抗体などのタンパク質をコード化するポリヌクレオチドを挿入することによって達成することができる。当業者は、ターゲティング部分の更なる作製方法について周知している。

【０４８２】

ウイルス配列

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、少なくとも１つのウイルス配列を含む。一部の実施形態では、これらの配列は、一本鎖ＤＮＡウイルス、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）、ビドナウイルス（Ｂｉｄｎａｖｉｒｕｓ）、サーコウイルス（Ｃｉｒｃｏｖｉｒｕｓ）、ジェミニウイルス（Ｇｅｍｉｎｉｖｉｒｕｓ）、ゲノモウイルス（Ｇｅｎｏｍｏｖｉｒｕｓ）、イノウイルス（Ｉｎｏｖｉｒｕｓ）、ミクロウイルス（Ｍｉｃｒｏｖｉｒｕｓ）、ナノウイルス（Ｎａｎｏｖｉｒｕｓ）、パルボウイルス（Ｐａｒｖｏｖｉｒｕｓ）、及びスピラウイルス（Ｓｐｉｒａｖｉｒｕｓ）由来の１つ若しくは複数の配列に対して相同性又は同一性を有する。一部の実施形態では、配列は、二本鎖ＤＮＡウイルス、例えば、アデノウイルス（Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ）、アンプラウイルス（Ａｍｐｕｌｌａｖｉｒｕｓ）、アスコウイルス（Ａｓｃｏｖｉｒｕｓ）、アスファウイルス（Ａｓｆａｒｖｉｒｕｓ）、バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）、フセロ

ウイルス（Ｆｕｓｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）、グロブロウイルス（Ｇｌｏｂｕｌｏｖｉｒｕｓ）、グッタウイルス（Ｇｕｔｔａｖｉｒｕｓ）、ヒトロサウイルス（Ｈｙｔｒｏｓａｖｉｒｕｓ）、ヘルペスウイルス（Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｕｓ）、イリドウイルス（Ｉｒｉｄｏｖｉｒｕｓ）、リポスリックスウイルス（Ｌｉｐｏｔｈｒｉｘｖｉｒｕｓ）、ニマウイルス（Ｎｉｍａｖｉｒｕｓ））、及びポックスウイルス（Ｐｏｘｖｉｒｕｓ）由来の１つ若しくは複数の配列に対して相同性又は同一性を有する。一部の実施形態では、配列は、ＲＮＡウイルス、例えば、アルファウイルス（Ａｌｐｈａｖｉｒｕｓ）、フロウイルス（Ｆｕｒｏｖｉｒｕｓ）、肝炎ウイルス（Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）、ホルデイウイルス（Ｈｏｒｄｅｉｖｉｒｕｓ）、トバモウイルス（Ｔｏｂａｍｏｖｉｒｕｓ）、トブラウイルス（Ｔｏｂｒａｖｉｒｕｓ）、トリコルナウイルス（Ｔｒｉｃｏｒｎａｖｉｒｕｓ）、ルビウイルス（Ｒｕｂｉｖｉｒｕｓ）、ビルナウイルス（Ｂｉｒｎａｖｉｒｕｓ）、シストウイルス（Ｃｙｓｔｏｖｉｒｕｓ）、パルティティウイルス（Ｐａｒｔｉｔｉｖｉｒｕｓ）、及びレオウイルス（Ｒｅｏｖｉｒｕｓ）由来の１つ若しくは複数の配列に対して相同性又は同一性を有する。

【０４８３】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、非病原性ウイルス、例えば、共生ウイルス、例えば、片利共生ウイルス、例えば、ネイティブウイルス、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）由来の１つ又は複数の配列を含んでもよい。近年命名に変更がなされ、ヒト細胞に感染することができる３つのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）は、アネロウイルス科（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｉｄａｅ）ウイルスのアルファトルクウイルス属（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）（ＴＴ）、ベータトルクウイルス属（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）（ＴＴＭ）、及びガンマトルクウイルス属（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）（ＴＴＭＤ）に分類された。現在まで、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）は、ヒト疾患に関連付けられていない。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、環状マイナス－センスゲノムを有する非包膜一本鎖ＤＮＡウイルスであるトルク・テノウイルス（Ｔｏｒｑｕｅ Ｔｅｎｏ Ｖｉｒｕｓ）（ＴＴ）に対して相同性又は同一性を有する配列を含み得る。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、ＳＥＮウイルス、センチネルウイルス（Ｓｅｎｔｉｎｅｌ ｖｉｒｕｓ）、ＴＴＶ様ミニウイルス、及びＴＴウイルスに対して相同性又は同一性を有する配列を含み得る。ＴＴウイルス遺伝子型６、ＴＴウイルス群、ＴＴＶ様ウイルスＤＸＬ１、及びＴＴＶ様ウイルスＤＸＬ２をはじめとする様々なタイプのＴＴウイルスが記載されている。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、より小さなウイルス、トルク・テノ様ミニウイルス（Ｔｏｒｑｕｅ Ｔｅｎｏ－ｌｉｋｅ Ｍｉｎｉ Ｖｉｒｕｓ）（ＴＴＭ）、又はトルク・テノ様ミディウイルス（Ｔｏｒｑｕｅ Ｔｅｎｏ－ｌｉｋｅ Ｍｉｄｉ Ｖｉｒｕｓ）（ＴＴＭＤ）と呼ばれる、ＴＴＶとＴＴＭＶの中間のゲノムサイズを有する第３のウイルスに対して相同性又は同一性を有する配列を含み得る。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、本明細書において、例えば、ヌクレオチド配列のいずれか１つに対して少なくとも約６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％及び９９％のヌクレオチド配列同一性を有する非病原性ウイルス由来の１つ若しくは複数の配列又は１配列の断片を含んでもよい。

【０４８４】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、本明細書、例えば、表４１に記載されるヌクレオチド配列のいずれか１つに対して少なくとも約６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、及び９９％のヌクレオチド配列同一性を有する実質的に非病原性ウイルス由来の１つ若しくは複数の配列又は配列の断片を含み得る。

【０４８５】

【表５５】

表 41: *アネロウイルス(Anelloviruses)*及びそれらの配列の例。 アクセッション番号及び関連配列情報は、2018 年 12 月 11 日に参照される通り、www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/から得ることができる。

アクセッション#	記述
AB017613.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus)16 DNA, 完全ゲノム, 単離株: TUS01
AB026345.1	ORF1 及び ORF2 の TT ウイルス遺伝子, 完全 cds, 単離株:TRM1
AB026346.1	ORF1 及び ORF2 の TT ウイルス遺伝子, 完全 cds, 単離株:TK16
AB026347.1	ORF1 及び ORF2 の TT ウイルス遺伝子, 完全 cds, 単離株:TP1-3
AB028669.1	ORF1 及び ORF2 の TT ウイルス遺伝子, 完全ゲノム, 単離株:TJN02
AB030487.1	pORF2a, pORF2b, pORF1 の TT ウイルス遺伝子, 完全 cds, クローン:JaCHCTC19
AB030488.1	pORF2a, pORF2b, pORF1 の TT ウイルス遺伝子, 完全 cds, クローン:JaBD89
AB030489.1	pORF2a, pORF2b, pORF1 の TT ウイルス遺伝子, 完全 cds, クローン:JaBD98
AB038340.1	ORF2s, ORF1, ORF3,の TT ウイルス遺伝子, 完全 cds
AB038622.1	ORF2, ORF1, ORF3 の TT ウイルス遺伝子, 完全 cds, 単離株:TTVyon-LC011
AB038623.1	ORF2, ORF1, ORF3 の TT ウイルス遺伝子, 完全 cds, 単離株:TTVyon-KC186
AB038624.1	ORF2, ORF1, ORF3 の TT ウイルス遺伝子, 完全 cds, 単離株:TTVyon-KC197
AB041821.1	VP1 の TT ウイルス mRNA,完全 cds
AB050448.1	ORF1, ORF2, ORF3, ORF4 のトルク・テノウイルス(Torque teno virus)遺伝子, 完全 cds, 単離株: TYM9
AB060592.1	ORF1, ORF2, ORF3, ORF4 のトルク・テノウイルス(Torque teno virus)遺伝子, クローン: SAa-39
AB060593.1	ORF1, ORF2, ORF3, ORF4,のトルク・テノウイルス(Torque teno virus)遺伝子, 完全 cds, クローン: SAa-38
AB060595.1	ORF1, ORF2, ORF3, ORF4 の TT ウイルス遺伝子, 完全 cds, クローン:SAj-30
AB060596.1	ORF1, ORF2, ORF3, ORF4 の TT ウイルス遺伝子, 完全 cds, クローン: SAf-09
AB064596.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) DNA, 完全ゲノム, 単離株: CT25F
AB064597.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) DNA, 完全ゲノム, 単離株: CT30F
AB064599.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) DNA, 完全ゲノム, 単離株: JT03F
AB064600.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) DNA, 完全ゲノム, 単離株: JT05F
AB064601.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) DNA, 完全ゲノム, 単離株: JT14F
AB064602.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) DNA, 完全ゲノム, 単離株: JT19F
AB064603.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) DNA, 完全ゲノム, 単離株: JT41F
AB064604.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) DNA, 完全ゲノム, 単離株: CT39F
AB064606.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) DNA, 完全ゲノム, 単離株: JT33F

【０４８６】

【表５６】

AB290918.1	トルク・テノ・ミディウイルス(Torque teno midi virus) 1 DNA, 完全ゲノム, 単離株: MD1-073
AF079173.1	TT ウイルス株 TTVCHN1, 完全ゲノム
AF116842.1	TT ウイルス株 BDH1, 完全ゲノム
AF122914.3	TT ウイルス 単離株 JA20, 完全ゲノム
AF122917.1	TT ウイルス 単離株 JA4, 完全ゲノム
AF122919.1	TT ウイルス 単離株 JA10 不明遺伝子
AF129887.1	TT ウイルス TTVCHN2, 完全ゲノム
AF247137.1	TT ウイルス 単離株 TUPB, 完全ゲノム
AF254410.1	TT ウイルス ORF2 タンパク質及び ORF1 タンパク質遺伝子, 完全 cds
AF298585.1	TT ウイルス Polish 単離株 P/1C1, 完全ゲノム
AF315076.1	TTV 様 ウイルス DXL1 不明遺伝子
AF315077.1	TTV 様 ウイルス DXL2 不明遺伝子
AF345521.1	TT ウイルス 単離株 TCHN-G1 Orf2 及び Orf1 遺伝子, 完全 cds
AF345522.1	TT ウイルス 単離株 TCHN-E Orf2 及び Orf1 遺伝子, 完全 cds
AF345525.1	TT ウイルス 単離株 TCHN-D2 Orf2 及び Orf1 遺伝子, 完全 cds
AF345527.1	TT ウイルス 単離株 TCHN-C2 Orf2 及び Orf1 遺伝子, 完全 cds
AF345528.1	TT ウイルス 単離株 TCHN-F Orf2 及び Orf1 遺伝子, 完全 cds
AF345529.1	TT ウイルス 単離株 TCHN-G2 Orf2 及び Orf1 遺伝子, 完全 cds
AF371370.1	TT ウイルス ORF1, ORF3, 及び ORF2 遺伝子, 完全 cds
AJ620212.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth6, 完全ゲノム
AJ620213.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth10, 完全ゲノム
AJ620214.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth11g2, 完全ゲノム
AJ620215.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth18, 完全ゲノム
AJ620216.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth20, 完全ゲノム
AJ620217.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth21, 完全ゲノム
AJ620218.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth3, 完全ゲノム
AJ620219.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth9, 完全ゲノム
AJ620220.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth16, 完全ゲノム
AJ620221.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth17, 完全ゲノム
AJ620222.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth25, 完全ゲノム
AJ620223.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth26, 完全ゲノム
AJ620224.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth27, 完全ゲノム
AJ620225.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth31, 完全ゲノム

【０４８７】

【表５７】

AJ620226.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth4, 完全ゲノム
AJ620227.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth5, 完全ゲノム
AJ620228.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth14, 完全ゲノム
AJ620229.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth29, 完全ゲノム
AJ620230.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth7, 完全ゲノム
AJ620231.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth8, 完全ゲノム
AJ620232.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth13, 完全ゲノム
AJ620233.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth19, 完全ゲノム
AJ620234.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth22g4, 完全ゲノム
AJ620235.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus), 単離株 tth23, 完全ゲノム
AM711976.1	TT ウイルス sle1957 完全ゲノム
AM712003.1	TT ウイルス sle1931 完全ゲノム
AM712004.1	TT ウイルス sle1932 完全ゲノム
AM712030.1	TT ウイルス sle2057 完全ゲノム
AM712031.1	TT ウイルス sle2058 完全ゲノム
AM712032.1	TT ウイルス sle2072 完全ゲノム
AM712033.1	TT ウイルス sle2061 完全ゲノム
AM712034.1	TT ウイルス sle2065 完全ゲノム
AY026465.1	TT ウイルス 単離株 L01 ORF2 及び ORF1 遺伝子, 完全 cds
AY026466.1	TT ウイルス 単離株 L02 ORF2 及び ORF1 遺伝子, 完全 cds
DQ003341.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン P2-9-02 ORF2 (ORF2), ORF1A (ORF1A), 及び ORF1B (ORF1B) 遺伝子, 完全 cds
DQ003342.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン P2-9-07 ORF2 (ORF2), ORF1A (ORF1A), 及び ORF1B (ORF1B) 遺伝子, 完全 cds
DQ003343.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン P2-9-08 ORF2 (ORF2), ORF1A (ORF1A), 及び ORF1B (ORF1B) 遺伝子, 完全 cds
DQ003344.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン P2-9-16 ORF2 (ORF2), ORF1A (ORF1A), 及び ORF1B (ORF1B) 遺伝子, 完全 cds
DQ186994.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン P601 ORF2 (ORF2) 及び ORF1 (ORF1) 遺伝子, 完全 cds
DQ186995.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン P605 ORF2 (ORF2) 及び ORF1 (ORF1) 遺伝子, 完全 cds

【０４８８】

【表５８】

DQ186996.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン BM1A-02 ORF2 (ORF2) 及び ORF1 (ORF1) 遺伝子, 完全 cds
DQ186997.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン BM1A-09 ORF2 (ORF2) 及び ORF1 (ORF1) 遺伝子, 完全 cds
DQ186998.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン BM1A-13 ORF2 (ORF2) 及び ORF1 (ORF1) 遺伝子, 完全 cds
DQ186999.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン BM1B-05 ORF2 (ORF2) 及び ORF1 (ORF1) 遺伝子, 完全 cds
DQ187000.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン BM1B-07 ORF2 (ORF2) 及び ORF1 (ORF1) 遺伝子, 完全 cds
DQ187001.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン BM1B-11 ORF2 (ORF2) 及び ORF1 (ORF1) 遺伝子, 完全 cds
DQ187002.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン BM1B-14 ORF2 (ORF2) 及び ORF1 (ORF1) 遺伝子, 完全 cds
DQ187003.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン BM1B-08 ORF2 (ORF2) 遺伝子, 完全 cds; 及び 非機能性 ORF1 (ORF1) 遺伝子, 完全配列
DQ187004.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン BM1C-16 ORF2 (ORF2) 及び ORF1 (ORF1) 遺伝子, 完全 cds
DQ187005.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン BM1C-10 ORF2 (ORF2) 及び ORF1 (ORF1) 遺伝子, 完全 cds
DQ187007.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン BM2C-25 ORF2 (ORF2) 遺伝子, 完全 cds; 及び非機能性 ORF1 (ORF1) 遺伝子, 完全配列
DQ361268.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 単離株 ViPi04 ORF1 遺伝子, 完全 cds
EF538879.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 単離株 CSC5 ORF2 及び ORF1 遺伝子, 完全 cds
EU305675.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 単離株 LTT7 ORF1 遺伝子, 完全 cds
EU305676.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 単離株 LTT10 ORF1 遺伝子, 完全 cds
EU889253.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 単離株 ViPi08 非機能性 ORF1 遺伝子, 完全配列
FJ392105.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 単離株 TW53A25 ORF2 遺伝子, 部分 cds; 及び ORF1 遺伝子, 完全 cds
FJ392107.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 単離株 TW53A27 ORF2 遺伝子, 部分 cds; 及び ORF1 遺伝子, 完全 cds
FJ392108.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 単離株 TW53A29 ORF2 遺伝子, 部分 cds; 及び ORF1 遺伝子, 完全 cds

【０４８９】

【表５９】

FJ392111.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 単離株 TW53A35 ORF2 遺伝子, 部分 cds; 及び ORF1 遺伝子, 完全 cds
FJ392112.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 単離株 TW53A39 ORF2 遺伝子, 部分 cds; 及び ORF1 遺伝子, 完全 cds
FJ392113.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 単離株 TW53A26 ORF2 遺伝子, 完全 cds; 及び 非機能性 ORF1 遺伝子, 完全配列
FJ392114.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 単離株 TW53A30 ORF2 及び ORF1 遺伝子, 完全 cds
FJ392115.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 単離株 TW53A31 ORF2 及び ORF1 遺伝子, 完全 cds
FJ392117.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 単離株 TW53A37 ORF1 遺伝子, 完全 cds
FJ426280.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 株 SIA109, 完全ゲノム
FR751500.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 完全ゲノム, 単離株 TTV-HD23a (rheu215)
GU797360.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) クローン 8-17, 完全ゲノム
HC742700.1	国際公開第 2010044889 号パンフレットからの配列 7
HC742710.1	国際公開第 2010044889 号パンフレットからの配列 17
JX134044.1	TTV 様ミニウイルス 単離株 TTMV_LY1, 完全ゲノム
JX134045.1	TTV 様ミニウイルス 単離株 TTMV_LY2, 完全ゲノム
KU243129.1	TTV 様ミニウイルス 単離株 TTMV-204, 完全ゲノム
KY856742.1	TTV 様ミニウイルス 単離株 zhenjiang, 完全ゲノム
LC381845.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) Human/Japan/KS025/2016 DNA, 完全ゲノム
MH648892.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctdc048, 完全ゲノム
MH648893.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctdh007, 完全ゲノム
MH648897.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcb038, 完全ゲノム
MH648900.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctfc019, 完全ゲノム
MH648901.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbb022, 完全ゲノム
MH648907.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcf040, 完全ゲノム
MH648911.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 cthi018, 完全ゲノム
MH648912.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctea38, 完全ゲノム
MH648913.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbg006, 完全ゲノム
MH648916.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbg020, 完全ゲノム
MH648925.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctci019, 完全ゲノム
MH648932.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctid031, 完全ゲノム
MH648946.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctdb017, 完全ゲノム
MH648957.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctch017, 完全ゲノム

【０４９０】

【表６０】

MH648958.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbh011, 完全ゲノム
MH648959.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbc020, 完全ゲノム
MH648962.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctif015, 完全ゲノム
MH648966.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctei055, 完全ゲノム
MH648969.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctjg000, 完全ゲノム
MH648976.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcj064, 完全ゲノム
MH648977.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbj022, 完全ゲノム
MH648982.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbf014, 完全ゲノム
MH648983.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbd027, 完全ゲノム
MH648985.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctch016, 完全ゲノム
MH648986.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbd020, 完全ゲノム
MH648989.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctga035, 完全ゲノム
MH648990.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 cthf001, 完全ゲノム
MH648995.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbd067, 完全ゲノム
MH648997.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctce026, 完全ゲノム
MH648999.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctfb058, 完全ゲノム
MH649002.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctjj046, 完全ゲノム
MH649006.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcf030, 完全ゲノム
MH649008.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbg025, 完全ゲノム
MH649011.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbh052, 完全ゲノム
MH649014.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctba003, 完全ゲノム
MH649017.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbb016, 完全ゲノム
MH649022.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctch023, 完全ゲノム
MH649023.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbd051, 完全ゲノム
MH649028.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbf9, 完全ゲノム
MH649038.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbi030, 完全ゲノム
MH649039.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctca057, 完全ゲノム
MH649040.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctch033, 完全ゲノム
MH649042.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctjd005, 完全ゲノム
MH649045.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctdc021, 完全ゲノム
MH649051.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctdg044, 完全ゲノム
MH649056.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcc062, 完全ゲノム
MH649061.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctid009, 完全ゲノム

【０４９１】

【表６１】

MH649062.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctdc018, 完全ゲノム
MH649063.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbf012, 完全ゲノム
MH649068.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcc066, 完全ゲノム
MH649070.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctda011, 完全ゲノム
MH649077.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbh034, 完全ゲノム
MH649083.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctdg028, 完全ゲノム
MH649084.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctii061, 完全ゲノム
MH649085.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 cteh021, 完全ゲノム
MH649092.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbg012, 完全ゲノム
MH649101.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctif053, 完全ゲノム
MH649104.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctei657, 完全ゲノム
MH649106.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctca015, 完全ゲノム
MH649114.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbf050, 完全ゲノム
MH649122.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctdc002, 完全ゲノム
MH649125.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbb15, 完全ゲノム
MH649127.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctba013, 完全ゲノム
MH649137.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbb000, 完全ゲノム
MH649141.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbc019, 完全ゲノム
MH649142.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctid026, 完全ゲノム
MH649144.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctfj004, 完全ゲノム
MH649152.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcj13, 完全ゲノム
MH649156.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctci006, 完全ゲノム
MH649157.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbd025, 完全ゲノム
MH649158.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbf005, 完全ゲノム
MH649161.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcf045, 完全ゲノム
MH649165.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcc29, 完全ゲノム
MH649169.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctib021, 完全ゲノム
MH649172.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbh857, 完全ゲノム
MH649174.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbj049, 完全ゲノム
MH649178.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctfc006, 完全ゲノム
MH649179.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbe000, 完全ゲノム
MH649183.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbb031, 完全ゲノム
MH649186.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcb33, 完全ゲノム

【０４９２】

【表６２】

MH649189.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcc12, 完全ゲノム
MH649196.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctci060, 完全ゲノム
MH649199.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbb017, 完全ゲノム
MH649203.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 cthc018, 完全ゲノム
MH649204.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbj003, 完全ゲノム
MH649206.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbg010, 完全ゲノム
MH649208.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctid008, 完全ゲノム
MH649209.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbg056, 完全ゲノム
MH649210.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctda001, 完全ゲノム
MH649212.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcf004, 完全ゲノム
MH649217.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbe029, 完全ゲノム
MH649223.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctci016, 完全ゲノム
MH649224.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctce11, 完全ゲノム
MH649228.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcf013, 完全ゲノム
MH649229.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcb036, 完全ゲノム
MH649241.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctda027, 完全ゲノム
MH649242.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbf003, 完全ゲノム
MH649254.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctjb007, 完全ゲノム
MH649255.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbb023, 完全ゲノム
MH649256.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctca002, 完全ゲノム
MH649258.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcg010, 完全ゲノム
MH649263.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctgh3, 完全ゲノム
MK012439.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 cthe000, 完全ゲノム
MK012440.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctjd008, 完全ゲノム
MK012448.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctch012, 完全ゲノム
MK012457.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctda009, 完全ゲノム
MK012458.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcd015, 完全ゲノム
MK012485.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctfd011, 完全ゲノム
MK012489.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctba003, 完全ゲノム
MK012492.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctbb005, 完全ゲノム
MK012493.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcj014, 完全ゲノム
MK012500.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcb001, 完全ゲノム
MK012504.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcj010, 完全ゲノム

【０４９３】

【表６３】

MK012516.1	アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.) 単離株 ctcf003, 完全ゲノム
NC_038336.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 5 単離株 TCHN-C1 Orf2 及び Orf1 遺伝子, 完全 cds
NC_038338.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 11 単離株 TCHN-D1 Orf2 及び Orf1 遺伝子, 完全 cds
NC_038339.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 13 単離株 TCHN-A Orf2 及び Orf1 遺伝子, 完全 cds
NC_038340.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 20 ORF4, ORF3, ORF2, ORF1 遺伝子, 完全 cds, クローン: SAa-10
NC_038341.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 21 単離株 TCHN-B ORF2 及び ORF1 遺伝子, 完全 cds
NC_038342.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 23 ORF2, ORF1 遺伝子, 完全 cds, 単離株: s-TTV CH65-2
NC_038343.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 24 ORF4, ORF3, ORF2, ORF1 遺伝子, 完全 cds, クローン: SAa-01
NC_038344.1	トルク・テノウイルス(Torque teno virus) 29 ORF2, ORF1, ORF3 遺伝子, 完全 cds, 単離株: TTVyon-KC009
NC_038345.1	トルク・テノ・ミニウイルス(Torque teno mini virus) 10 単離株 LIL-y1 ORF2, ORF1, ORF3, 及び ORF4 遺伝子, 完全 cds
NC_038346.1	トルク・テノ・ミニウイルス(Torque teno mini virus) 11 単離株 LIL-y2 ORF2, ORF1, 及び ORF3 遺伝子, 完全 cds
NC_038347.1	トルク・テノ・ミニウイルス(Torque teno mini virus) 12 単離株 LIL-y3 ORF2, ORF1, ORF3, 及び ORF4 遺伝子, 完全 cds
NC_038350.1	トルク・テノ・ミディウイルス(Torque teno midi virus) 3 単離株 2PoSMA ORF2 及び ORF1 遺伝子, 完全 cds
NC_038351.1	トルク・テノ・ミディウイルス(Torque teno midi virus) 4 単離株 6PoSMA ORF2, ORF1, 及び ORF3 遺伝子, 完全 cds
NC_038352.1	トルク・テノ・ミディウイルス(Torque teno midi virus) 5 DNA, 完全ゲノム, 単離株: MDJHem2
NC_038353.1	トルク・テノ・ミディウイルス(Torque teno midi virus) 6 DNA, 完全ゲノム, 単離株: MDJHem3-1
NC_038354.1	トルク・テノ・ミディウイルス(Torque teno midi virus) 7 DNA, 完全ゲノム, 単離株: MDJHem3-2
NC_038355.1	トルク・テノ・ミディウイルス(Torque teno midi virus) 8 DNA, 完全ゲノム, 単離株: MDJN1
NC_038356.1	トルク・テノ・ミディウイルス(Torque teno midi virus) 9 DNA, 完全ゲノム, 単離株: MDJN2
NC_038357.1	トルク・テノ・ミディウイルス(Torque teno midi virus) 10 DNA, 完全ゲノム, 単離株: MDJN14
NC_038358.1	トルク・テノ・ミディウイルス(Torque teno midi virus) 11 DNA, 完全ゲノム, 単離株: MDJN47
NC_038359.1	トルク・テノ・ミディウイルス(Torque teno midi virus) 12 DNA, 完全ゲノム, 単離株: MDJN51
NC_038360.1	トルク・テノ・ミディウイルス(Torque teno midi virus) 13 DNA, 完全ゲノム, 単離株: MDJN69
NC_038361.1	トルク・テノ・ミディウイルス(Torque teno midi virus) 14 DNA, 完全ゲノム, 単離株: MDJN97
NC_038362.1	トルク・テノ・ミディウイルス(Torque teno midi virus) 15 DNA, 完全ゲノム, 単離株: Pt-TTMDV210

【０４９４】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、１つ又は複数の非アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓｅｓ）、例えば、アデノウイルス（Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ）、ヘルペスウイルス（Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｕｓ）、ポックスウイルス（Ｐｏｘｖｉｒｕｓ）、ワクシニアウイルス（Ｖａｃｃｉｎｉａ ｖｉｒｕｓ）、ＳＶ４０、パピローマウイルス（ｐａｐｉｌｌｏｍａ ｖｉｒｕｓ）、レトロウイルス（ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）などのＲＮＡウイルス、例えば、レンチウイルス（ｌｅｎｔｉ ｖｉｒｕｓ）、一本鎖ＲＮＡウイルス、例えば、肝炎ウイルス（Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）、又は二本鎖ＤＮＡウイルス、例えば、ロタウイルス（ｒｏｔａｖｉｒｕｓ）由来の１つ若しくは複数の配列に対し

て相同性又は同一性を有する１つ又は複数の配列を含む。一部の実施形態では、組換えレトロウイルス（ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）は、欠損していることから、感染性粒子を産生するために補助を提供することができる。こうした補助は、例えば、ＬＴＲ内で調節配列の制御下、レトロウイルス（ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）の構造遺伝子全てをコード化するプラスミドを含むヘルパー細胞を用いることによって提供することができる。本明細書に記載のアネロベクターを複製するために好適な細胞株としては、当技術分野で公知の細胞株、例えば、Ａ５４９があり、これは、本明細書に記載されるように修飾することができる。前記遺伝子エレメントは、さらに、所望の遺伝子エレメントを同定することができるように、選択マーカをコード化する遺伝子も含み得る。

【０４９５】

一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、配列が、最初のヌクレオチド配列によりコード化されたポリペプチドに対して少なくとも約７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％同一であるか、又はそうでなければ、本発明を実施する上で有用である限り、非サイレント突然変異、例えば、コード化されたポリペプチドにアミノ酸変化をもたらす塩基置換、欠失、又は付加を含む。これに関して、いくつかの保存的アミノ酸置換を実施することができ、これらは一般に、タンパク質機能全体を、例えば、陽荷電アミノ酸（及びその逆）、すなわち、リシン、アルギニン及びヒスチジンに関して；陰荷電アミノ酸（及びその逆）、すなわち、アスパラギン酸及びグルタミン酸に関して；並びにいくつかの中性荷電アミノ酸群（及びあらゆるケース、またその逆）、すなわち（１）アラニン及びセリン、（２）アスパラギン、グルタミン、及びヒスチジン、（３）システイン及びセリン、（４）グリシン及びプロリン、（５）イソロイシン、ロイシン及びバリン、（６）メチオニン、ロイシン及びイソロイシン、（７）フェニルアラニン、メチオニン、ロイシン、及びチロシン、（８）セリン及びトレオニン、（９）トリプトファン及びチロシン、（１０）並びに例えば、チロシン、トリプトファン及びフェニルアラニンに関して、不活性化しないことが認められている。アミノ酸は、物理的特性並びに二次及び三次タンパク質構造への寄与に従って分類することができる。保存的置換は、類似の特性を有する別のアミノ酸による１アミノ酸の置換として、当技術分野では認識されている。

【０４９６】

同一の若しくは指定パーセンテージのヌクレオチド、又は同一の（比較ウインドウ又は指定領域にわたる最大一致について比較し、アラインメントした場合、指定領域にわたって約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくはそれ以上の同一性）アミノ酸残基を有する２つ以上の核酸又はポリペプチド配列の同一性は、以下に記載するデフォルトパラメータを有するＢＬＡＳＴ若しくはＢＬＡＳＴ　２．０配列比較アルゴリズムを用いて、又は手動アラインメント及び視覚検査によって測定することができる（例えば、ＮＣＢＩウェブサイト　ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＢＬＡＳＴ／などを参照）。同一性はまた、試験配列の補体を指すこともあり、或いは補体に適用され得る。同一性はまた、欠失及び／又は付加を有する配列、並びに置換を有する配列も含む。本明細書に記載するように、アルゴリズムはギャップなどを考慮する。同一性は、少なくとも約１０アミノ酸又はヌクレオチド長、約１５アミノ酸又はヌクレオチド長、約２０アミノ酸又はヌクレオチド長、約２５アミノ酸又はヌクレオチド長、約３０アミノ酸又はヌクレオチド長、約３５アミノ酸又はヌクレオチド長、約４０アミノ酸又はヌクレオチド長、約４５アミノ酸又はヌクレオチド長、約５０アミノ酸又はヌクレオチド長、若しくはそれ以上の領域にわたって存在し得る。遺伝コードが縮重しているため、相同ヌクレオチド配列は、任意の数のサイレント塩基変化を、すなわち、それでもなお同じアミノ酸をコード化するヌクレオチド置換を含み得る。

【０４９７】

タンパク質性外層

一部の実施形態では、アネロベクター、例えば、合成アネロベクターは、遺伝子エレメ

ントを閉じ込めるタンパク性外層を含む。タンパク性外層は、哺乳動物において不必要な免疫応答を誘発することができない実質的に非病原性の外部タンパク質を含むことができる。アネロベクターのタンパク質性外層は、典型的に、実質的に非病原性のタンパク質を含み、これは、自己集合して、タンパク質性外層を構成する二十面体を形成し得る。

【０４９８】

一部の実施形態では、タンパク質性外層タンパク質は、アネロベクターの遺伝子エレメントの配列によりコード化される（例えば、遺伝子エレメントとシスである）。他の実施形態では、タンパク質性外層タンパク質は、アネロベクターの遺伝子エレメントとは別の核酸配列によりコード化される（例えば、遺伝子エレメントとトランスである）（例えば、本明細書に記載されるバクミド）。

【０４９９】

一部の実施形態では、タンパク質、例えば、実質的に非病原性のタンパク質及び／又はタンパク質性外層タンパク質は、１つ又は複数、例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、若しくはそれ以上のグリコシル化アミノ酸を含む。

【０５００】

一部の実施形態では、タンパク質、例えば、実質的に非病原性のタンパク質及び／又はタンパク質性外層タンパク質は、少なくとも１つの親水性ＤＮＡ結合領域、アルギニンリッチ領域、トレオニンリッチ領域、グルタミンリッチ領域、Ｎ－末端ポリアルギニン配列、可変領域、Ｃ－末端ポリグルタミン／グルタミン酸配列、及び１つ又は複数のジスルフィド架橋を含む。

【０５０１】

一部の実施形態では、タンパク質は、本明細書に記載されるキャプシドタンパク質をコード化するヌクレオチド配列、例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子及び／又はキャプシドタンパク質配列のうちのいずれかによってコード化されるタンパク質に対して、少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有する。一部の実施形態では、タンパク質又はキャプシドタンパク質の機能性断片は、例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸に対して、少なくとも約６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有するヌクレオチド配列によってコード化される。

【０５０２】

一部の実施形態では、アネロベクターは、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子に対して、少なくとも約６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性を有するキャプシドタンパク質若しくはキャプシドタンパク質の機能性断片又は配列をコード化するヌクレオチド配列を含む。

【０５０３】

一部の実施形態では、配列同一性がより低いアミノ酸の範囲は、本明細書に記載の特性の１つ又は複数、及び細胞／組織／種特異性（例えば、向性）の相違をもたらし得る。

【０５０４】

一部の実施形態では、アネロベクターは、タンパク性外層中に脂質が存在しない。一部の実施形態では、アネロベクターには、脂質二重層、例えば、ウイルスエンベロープが存在しない。一部の実施形態では、アネロベクターの内部は、タンパク性外層によって完全に（例えば、１００％）覆われている。一部の実施形態では、アネロベクターの内部は、外部タンパク質によって１００％未満、例えば、９５％、９０％、８５％、８０％、７０％、６０％、５０％以下の被覆率で覆われている。一部の実施形態では、タンパク性外層は、遺伝子エレメントが、アネロベクター内に保持されている限り、間隙又は不連続（例えば、水、イオン、ペプチド、又は小分子に対する透過性を可能にするもの）を含む。

【０５０５】

一部の実施形態では、タンパク性外層は、宿主細胞内への遺伝子エレメントの進入を媒介するために、宿主細胞を特異的に認識及び／又はそれに結合する１つ若しくは複数のタンパク質又はポリペプチド、例えば、相補的タンパク質又はポリペプチドを含む。

【０５０６】

一部の実施形態では、タンパク質性外層は、以下の：例えば、本明細書に記載されるＯＲＦ１分子のアルギニンリッチ領域、ゼリーロール領域、Ｎ２２ドメイン、超可変領域、及び／又はＣ－末端ドメインうちの１つ又は複数を含む。一部の実施形態では、タンパク質性外層は、以下の：１つ又は複数のグリコシル化タンパク質、親水性ＤＮＡ－結合領域、アルギニンリッチ領域、トレオニンリッチ領域、グルタミン酸リッチ領域、Ｎ－末端ポリアルギニン配列、可変領域、Ｃ－末端ポリグルタミン／グルタミン酸配列、及び１つ又は複数のジスルフィド架橋のうちの１つ又は複数を含む。例えば、タンパク質性外層は、例えば、本明細書に記載されるように、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸によってコード化されるタンパク質を含む。

【０５０７】

一部の実施形態では、タンパク質性外層は、以下の特徴：二十面体対称、１つ又は複数の宿主細胞と相互作用して、宿主細胞内への進入を媒介する分子の認識及び／若しくはそれとの結合、脂質分子の欠失、炭水化物の欠失、ｐＨ及び温度安定性、界面活性剤抵抗性、及び宿主細胞において実質的に非免疫原性若しくは実質的に非病原性であることのうちの１つ又は複数を含む。

【０５０８】

ＩＩＩ．核酸構築物

本明細書に記載の遺伝子エレメントは、核酸構築物（例えば、本明細書に記載されるような、例えば、バクミド又はドナーベクター）内に含有させてもよい。

【０５０９】

一態様では、本発明は、（ｉ）非病原性外部タンパク質をコードする配列（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子又はそのスプライス変異体若しくは機能断片）と、（ｉｉ）遺伝子エレメントを非病原性外部タンパク質と結合させる外部タンパク質結合配列と、（ｉｉｉ）エフェクターをコード化する配列と、を含む遺伝子エレメントを含む核酸遺伝子エレメント構築物（例えば、バクミド又はドナーベクター）を含む。一部の実施形態では、核酸遺伝子エレメント構築物は、１つ又は複数のバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）エレメント（例えば、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム）を含む。複数の実施形態では、核酸遺伝子エレメント構築物は、好適な宿主細胞（例えば、昆虫細胞、例えば、Ｓｆ９細胞）中に導入されるとき、宿主細胞におけるバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、核酸構築物、例えば、バクミドを含む）の産生を駆動するのに十分なエレメントを含む。

【０５１０】

遺伝子エレメント又は遺伝子エレメント内の配列のいずれかは、任意の好適な方法を用いて取得することができる。例えば、標準的技法を用いて、ウイルス配列を含む細胞からのライブラリーのスクリーニング、当該配列を含むことがわかっている核酸構築物からの配列の誘導、又は細胞及びそれを含有する組織からの直接の単離など、様々な組換え方法が当技術分野で公知である。これに代わり、又はこれと組み合わせて、遺伝子エレメントの一部又は全部は、クローニングではなく、合成により産生することができる。

【０５１１】

一部の実施形態では、核酸構築物は、調節エレメントと、標的遺伝子及び／又は相同性の核酸配列と、生存細胞内において及び／又は細胞内分子が標的細胞内に存在するときにリポータ分子の発現を誘発するための様々なリポータ構築物と、を含む。

【０５１２】

リポータ遺伝子は、トランスフェクトされた可能性がある細胞を同定する、及び調節配列の機能性を評価するために使用される。一般に、リポータ遺伝子は、レシピエント生物又は組織に存在しないか、又は発現されない遺伝子であり、その発現が何らかの容易に検

出可能な特性、例えば、酵素活性によって現れるポリペプチドをコード化する遺伝子である。リポータ遺伝子の発現は、ＤＮＡがレシピエント細胞内に導入されてから適切な時間後に検定する。好適なリポータ遺伝子としては、ルシフェラーゼ、βガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌アルカリホスファターゼをコード化する遺伝子、又は緑色蛍光タンパク質遺伝子を挙げることができる（例えば、Ｕｉ－Ｔｅｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０００　ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　４７９：７９－８２）。好適な発現系は周知であり、公知の技法を用いて調製してもよいし、又は市販のものを取得することもできる。一般に、最も高レベルのリポータ遺伝子発現を示す最小５’フランキング領域を有する構築物がプロモータとして同定される。こうしたプロモータ領域をリポータ遺伝子に結合させて、プロモータ駆動転写を調節する能力について物質を評価するために使用することができる。

【０５１３】

一部の実施形態では、核酸構築物は、宿主細胞において実質的に非病原性及び／又は実質的に非統合性であるか、或いは宿主細胞において実質的に非免疫原性である。

【０５１４】

一部の実施形態では、核酸構築物は、表現型、ウイルスレベル、遺伝子発現、他のウイルス、病態との競合などのうち１つ又は複数を少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、若しくはそれ以上調節するのに十分な量で存在する。

【０５１５】

ＩＶ．組成物

本明細書に記載のアネロベクター又はベクターはまた、例えば、本明細書に記載する通り、製剤用賦形剤と一緒に医薬組成物に含有させてもよい。一部の実施形態では、医薬組成物は、少なくとも10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、又は10^{15}個のアネロベクターを含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、10^5～10^{15}、10^5～10^{10}、又は10^{10}～10^{15}個のアネロベクターを含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、約10^8（例えば、約10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、又は10^{10}）ゲノム当量／ｍＬのアネロベクターを含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、例えば、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の実施例１８の方法に従って決定される場合、10^5～10^{10}、10^6～10^{10}、10^7～10^{10}、10^8～10^{10}、10^9～10^{10}、10^5～10^6、10^5～10^7、10^5～10^8、10^5～10^9、10^5～10^{11}、10^5～10^{12}、10^5～10^{13}、10^5～10^{14}、10^5～10^{15}、又は10^{10}～10^{15}ゲノム当量／ｍＬのアネロベクターを含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、細胞当たりアネロベクター中に含まれる少なくとも１、２、５、若しくは１０、１００、５００、１０００、２０００、５０００、８，０００、1×10^4、1×10^5、1×10^6、1×10^7、又はそれ以上の遺伝子エレメントのコピーを真核細胞の集団に送達する上で十分なアネロベクターを含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、細胞当たりアネロベクター中に含まれる少なくとも約1×10^4、1×10^5、1×10^6、1×10^7、又は約1×10^4～1×10^5、1×10^4～1×10^6、1×10^4～1×10^7、1×10^5～1×10^6、1×10^5～1×10^7、又は1×10^6～1×10^7の遺伝子エレメントのコピーを真核細胞の集団に送達する上で十分なアネロベクターを含む。

【０５１６】

一部の実施形態では、医薬組成物は、以下の特徴：医薬組成物が、医薬又は適正製造基準（ＧＭＰ）を満たすこと；医薬組成物が、適正製造基準（ＧＭＰ）に従って作られること；医薬組成物が、予め定めた基準値を下回る病原体レベルを有する、例えば、病原体を実質的に含まないこと；医薬組成物が、予め定めた基準値を下回る混入物レベルを有する、例えば、混入物を実質的に含まないこと；医薬組成物が、低免疫原性を有する、又は例えば、本明細書に記載する通り、実質的に非免疫原性であることのうち１つ又は複数を有する。

【０５１７】
一部の実施形態では、医薬組成物は、閾値量を下回る１又は複数種の混入物を含む。医薬組成物において排除するか、又は最小限に抑えることが望ましい例示的な混入物として、限定はしないが、宿主細胞核酸（例えば、宿主細胞ＤＮＡ及び／又は宿主細胞ＲＮＡ）、動物由来成分（例えば、血清アルブミン若しくはトリプシン）、複製可能ウイルス、非感染性粒子、遊離ウイルスキャプシドタンパク質、外来性汚染生物、及び凝集体が挙げられる。複数の実施形態では、混入物は、宿主細胞ＤＮＡである。複数の実施形態では、組成物は、用量当たり約１０ｎｇ未満の宿主細胞ＤＮＡを含む。複数の実施形態では、組成物中の宿主細胞ＤＮＡのレベルは、宿主細胞ＤＮＡの濾過及び／又は酵素分解により低下させる。複数の実施形態では、医薬組成物は、１０重量％未満（例えば、約１０％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、若しくは０．１％未満）の混入物からなる。
【０５１８】
一態様では本明細書に記載する本発明は、以下：
ａ）（ｉ）非病原性外部タンパク質をコード化する配列と、（ｉｉ）非病原性外部タンパク質に遺伝子エレメントを結合させる外部タンパク質結合配列と、（ｉｉｉ）調節核酸をコード化する配列；及び
遺伝子エレメントと結合される、例えば、これを包膜する又は閉じ込めるタンパク質性外層を含む遺伝子エレメントを含むアネロベクター；並びに
ｂ）製剤用賦形剤
を含む医薬組成物を含む。
【０５１９】
小胞
一部の実施形態では、組成物は、さらに、担体構成体、例えば、マイクロ粒子、リポソーム、小胞、又はエキソソームを含む。一部の実施形態では、リポソームは、内部の水性コンパートメントを取り囲む単一若しくは多重膜脂質二重層と、比較的非透過性の外側親油性リン脂質二重層から構成される球体小胞構造を含む。リポソームは、アニオン性、中性又はカチオン性であってよい。リポソームは、一般に、生体適合性、非毒性であり、親水性及び親油性薬物分子の両方を送達し、それらの積荷を血漿酵素による分解から保護し、生体膜を介してそれらの積荷を輸送することができる（例えば、論文については、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照）。
【０５２０】
小胞は、数種の異なる脂質から作ることができるが；薬物担体としてのリポソームの作製にはリン脂質が最も一般的に使用されている。小胞として、限定はしないが、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＴＡＰ、ＤＯＴＩＭ、ＤＤＡＢ（単独、又はＤＯＴＭＡを得るためにコレステロールと一緒に）、並びにコレステロール、ＤＯＴＡＰとコレステロール、ＤＯＴＩＭとコレステロール、及びＤＤＡＢとコレステロールが挙げられる。多重膜小胞脂質の調製方法は、当技術分野では公知である（例えば、米国特許第６，６９３，０８６号明細書を参照、多重膜小胞脂質調製に関するその教示内容は、参照により本明細書に組み込む）。脂質膜を水溶液と混合すれば、小胞形成は自然に起こり得るが、ホモジナイザー、超音波発生装置、又は押出機を用いて、振盪の形態で力を加えることにより、小胞形成を促進することもできる（例えば、論文については、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照）。押出脂質は、Ｔｅｍｐｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ，１５：６４７－６５２，１９９７（押出脂質調製に関するその教示内容は、参照により本明細書に組み込む）に記載されている通り、サイズが漸減するフィルターを介した押出により作ることができる。
【０５２１】

本明細書に記載する通り、その構造及び／又は特性を修飾するために、添加物を小胞に添加してもよい。例えば、構造の安定化を助け、内部積荷の漏れを防ぐために、コレステロール又はスフィンゴミエリンのいずれかを混合物に添加することができる。さらに、小胞は、水添卵ホスファチジルコリン若しくは卵ホスファチジルコリン、コレステロール、及びリン酸ジセチルから作ることもできる（例えば、論文については、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照）。また、小胞を合成中又は合成後に表面修飾して、レシピエント細胞上の反応基に相補的な反応基を含有させてもよい。こうした反応基としては、限定しないが、マレイミド基がある。一例として、例えば、限定はしないが、ＤＳＰＥ－ＭａＬ－ＰＥＧ２０００などのマレイミド共役リン脂質を含有するように、小胞を合成してもよい。

【０５２２】

小胞製剤は、主として、１，２－ジステアロイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、スフィンゴミエリン、卵ホスファチジルコリン及びモノシアロガングリオシドなどの天然のリン脂質及び脂質から構成され得る。リン脂質のみから構成される製剤は、血漿中で安定性が低い。しかし、コレステロールを用いた脂質膜の操作で、包膜された積荷の急速な放出を抑制するか、又は１，２－ジオレイオイル－ｓｎ－グリセロ－３－ホスホエタノールアミン（ＤＯＰＥ）により安定性を高める（例えば、論文については、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照）。

【０５２３】

複数の実施形態では、脂質を用いて、脂質マイクロ粒子を形成することができる。脂質として、限定はされないが、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ４、Ｃ１２－２００及びコリピドジステロイルホスファチジルコリン、コレステロール、及びＰＥＧ－ＤＭＧが挙げられ、自発的小胞形成手順を用いて製剤化することができる（例えば、Ｎｏｖｏｂｒａｎｔｓｅｖａ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｈｅｒａｐｙ－Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ（２０１２）１，ｅ４；ｄｏｉ：１０．１０３８／ｍｔｎａ．２０１１．３を参照）。構成体モル比は、約５０／１０／３８．５／１．５（ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ又はＣ１２－２００／ジステロイルホスファチジルコリン／コレステロール／ＰＥＧ－ＤＭＧ）であってよい。Ｔｅｋｍｉｒａは、米国及び海外で約９５のパテントファミリーのポートフォリオを有し、これらは、多様な態様の脂質マイクロ粒子及び脂質マイクロ粒子製剤に関し（例えば、米国特許第７，９８２，０２７号明細書；同第７，７９９，５６５号明細書；同第８，０５８，０６９号明細書；同第８，２８３，３３３号明細書；同第７，９０１，７０８号明細書；同第７，７４５，６５１号明細書；同第７，８０３，３９７号明細書；同第８，１０１，７４１号明細書；同第８，１８８，２６３号明細書；同第７，９１５，３９９号明細書；同第８，２３６，９４３号明細書及び同第７，８３８，６５８号明細書並びに欧州特許第１７６６０３５号明細書；同第１５１９７１４号明細書；同第１７８１５９３号明細書及び同第１６６４３１６号明細書を参照）、これらは全て、本発明に使用及び／又は適用することができる。

【０５２４】

一部の実施形態では、マイクロ粒子は、ランダムな様式で配置される１つ又は複数の固体ポリマーを含む。マイクロ粒子は生分解性であり得る。生分解性マイクロ粒子は、例えば、限定はされないが、溶媒蒸発、ホットメルトマイクロカプセル化、溶媒除去、及び噴霧乾燥をはじめとする当技術分野で公知の方法を用いて、合成することができる。マイクロカプセルを合成する例示的な方法は、Ｂｅｒｓｈｔｅｙｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｏｆｔ Ｍａｔｔｅｒ ４：１７８７－１７８７，２００８及び米国特許出願公開第２００８／００１４１４４ Ａ１号明細書に記載されており、マイクロカプセル合成に関する具体的な教示内容は、参照により本明細書に組み込む。

【０５２５】
生分解性マイクロ粒子を形成するために使用することができる例示的な合成ポリマーとして、限定はしないが、以下のものが挙げられる：脂肪族ポリエステル、ポリ（乳酸）（ＰＬＡ）、ポリ（グリコール酸）（ＰＧＡ）、乳酸及びグリコール酸のコポリマー（ＰＬＧＡ）、ポリカプロラクトン（ＰＣＬ）、ポリ無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリウレタン、ポリ（酪酸）、ポリ（吉草酸）、及びポリ（ラクチド－コ－カプロラクトン）、並びにアルブミンなどの天然ポリマー、アルギン酸塩、並びにデキストラン及びセルロースなどの他の多糖類、コラーゲン、例えば、アルキル、アルキレンなどの化学基の置換、付加、ヒドロキシル化、酸化、並びに当業者により常用的に実施されるその他の修飾を含むそれらの化学誘導体）、アルブミン及びその他の親水性タンパク質、ゼイン及びその他のプロラミン並びに疎水性タンパク質、それらのコポリマー及び混合物。一般に、これらの材料は、酵素加水分解又は水への曝露、表面又はバルク浸食のいずれかにより分解する。

【０５２６】
マイクロ粒子の直径は、０．１～１０００マイクロメートル（μｍ）の範囲である。一部の実施形態では、それらの直径は、１～７５０μｍ、又は５０～５００μｍ、又は１００～２５０μｍの範囲のサイズである。一部の実施形態では、それらの直径は、５０～１０００μｍ、５０～７５０μｍ、５０～５００μｍ、又は５０～２５０μｍの範囲のサイズである。一部の実施形態では、それらの直径は、．０５～１０００μｍ、１０～１０００μｍ、１００～１０００μｍ、又は５００～１０００μｍの範囲のサイズである。一部の実施形態では、それらの直径は、約０．５μｍ、約１０μｍ、約５０μｍ、約１００μｍ、約２００μｍ、約３００μｍ、約３５０μｍ、約４００μｍ、約４５０μｍ、約５００μｍ、約５５０μｍ、約６００μｍ、約６５０μｍ、約７００μｍ、約７５０μｍ、約８００μｍ、約８５０μｍ、約９００μｍ、約９５０μｍ、又は約１０００μｍである。マイクロ粒子に関して使用される場合、「約」という用語は、記載される絶対値の＋／－５％を意味する。

【０５２７】
一部の実施形態では、リガンドは、粒子の表面に存在する、及び結合させようとするリガンド上に存在する官能化学基（カルボン酸、アルデヒド、アミン、スルフヒドリル及びヒドロキシル）を介してマイクロ粒子の表面に共役させる。例えば、マイクロ粒子のエマルジョン調製工程中に、官能化学基と一緒に安定剤を組み込むことにより、官能基をマイクロ粒子内に導入することが可能である。

【０５２８】
マイクロ粒子に官能基を導入する別の例は、粒子製造後の工程中に、ホモ又はヘテロ官能性架橋剤を用いて、粒子とリガンドを直接架橋することによるものである。この手順では、好適なケミストリー及び１クラスの架橋剤（以下にさらに詳細に述べる通り、ＣＤＩ、ＥＤＡＣ、グルタルアルデヒドなど）又は製造後の粒子の化学修飾によって粒子表面にリガンドを結合させる任意の他の架橋剤を使用してよい。これはまた、脂肪酸、脂質又は官能性安定化剤などの両親媒性分子を粒子表面に受動的に吸着及び付着させ、これにより、リガンドに係留させるための官能性末端基を導入し得るプロセスも含む。

【０５２９】
一部の実施形態では、マイクロ粒子は、特定の細胞又は組織タイプ（例えば、心筋細胞）をターゲティングさせるために、その外側表面に１つ又は複数のターゲティング基を含むように合成してもよい。これらのターゲティング基として、限定はしないが、受容体、リガンド、抗体などが挙げられる。これらのターゲティング基は、細胞表面上のそのパートナーに結合する。一部の実施形態では、細胞表面を含む脂質二重層内にマイクロ粒子を組み込み、ミトコンドリアを細胞に送達する。

【０５３０】
マイクロ粒子はまた、その最も外側表面に脂質二重層を含んでもよい。この二重層は、同じ又は異なるタイプの１つ又は複数の脂質から構成されてもよい。例として、限定はし

ないが、ホスホコリン及びホスホイノシトールなどのリン脂質が挙げられる。具体的な例として、限定はしないが、ＤＭＰＣ、ＤＯＰＣ、ＤＳＰＣ、並びにリポソーム用に本明細書に記載するものなど、様々な他の脂質が挙げられる。

【０５３１】

一部の実施形態では、担体は、例えば、本明細書に記載の通り、ナノ粒子を含む。

【０５３２】

一部の実施形態では、本明細書に記載する小胞又はマイクロ粒子を診断薬で官能化する。診断薬の例として、限定はされないが、ポジトロン断層法（ＰＥＴ）、コンピュータ断層法（ＣＡＴ）、単光子放射断層撮影、Ｘ線、蛍光分析、及び磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）に使用される市販のイメージング剤；並びに造影剤が挙げられる。ＭＲＩでの造影剤として使用するのに好適な材料の例としては、ガドリニウムキレート、並びに鉄、マグネシウム、マンガン、銅及びクロミウムが挙げられる。

【０５３３】

担体

本明細書に記載の組成物（例えば、医薬組成物）は、担体を含む、担体と一緒に製剤化される、及び／又は担体を用いて送達され得る。一態様では、本発明は、本明細書に記載の組成物（例えば、本明細書に記載されるアネロベクター、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）、若しくは遺伝子エレメント）を含む（例えば、包膜する）担体（例えば、小胞、リポソーム、脂質ナノ粒子、エキソソーム、赤血球、エキソソーム（例えば、哺乳動物若しくは植物エキソソーム）、フソソーム）を含む組成物、例えば、医薬組成物を包含する。

【０５３４】

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物及び系は、リポソーム又は他の類似の小胞内に製剤化することができる。一般に、リポソームは、内部の水性コンパートメントを取り囲む単一若しくは多重膜脂質二重層と、比較的非透過性の外側親油性リン脂質二重層から構成される球体小胞構造を含む。リポソームは、アニオン性、中性又はカチオン性であってよい。リポソームは、一般に、以下の特徴のうち１つ又は複数（例えば、全て）を有する：生体適合性、非毒性、親水性及び親油性薬物分子の両方を送達することができる、それらの積荷を血漿酵素による分解から保護することができる、生体膜及び血液脳関門（ＢＢＢ）を介してそれらの積荷を輸送することができる（例えば、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９；及びＺｙｌｂｅｒｂｅｒｇ ＆ Ｍａｔｏｓｅｖｉｃ．２０１６．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，２３：９，３３１９－３３２９，ｄｏｉ：１０．１０８０／１０７１７５４４．２０１６．１１７７１３６を参照）。

【０５３５】

小胞は、数種の様々な脂質から作ることができるが；薬物担体としてのリポソームの作製にはリン脂質が最も一般的に使用されている。多重膜小胞脂質の調製方法は、公知である（例えば、米国特許第６，６９３，０８６号明細書を参照、多重膜小胞脂質調製に関するその教示内容は、参照により本明細書に組み込む）。脂質膜を水溶液と混合すれば、小胞形成は自然に起こり得るが、ホモジナイザー、超音波発生装置、又は押出機を用いて、振盪の形態で力を加えることにより、小胞形成を促進することもできる（例えば、論文については、Ｓｐｕｃｈ ａｎｄ Ｎａｖａｒｒｏ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，ｖｏｌ．２０１１，Ａｒｔｉｃｌｅ ＩＤ ４６９６７９，１２ ｐａｇｅｓ，２０１１．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１１／４６９６７９を参照）。押出脂質は、Ｔｅｍｐｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ，１５：６４７－６５２，１９９７に記載されている通り、サイズが漸減するフィルターを介した押出により作ることができる。

【０５３６】

脂質ナノ粒子（ＬＮＰ）は、本明細書に記載される医薬組成物の生体適合性且つ生分解

性送達系を提供する担体のもう１つの例である。例えば、Ｇｏｒｄｉｌｌｏ－Ｇａｌｅａｎｏ ｅｔ ａｌ．Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ．Ｖｏｌｕｍｅ １３３，Ｄｅｃｅｍｂｅｒ ２０１８，Ｐａｇｅｓ ２８５－３０８を参照されたい。ナノ構造脂質担体（ＮＬＣ）は、改変された固体脂質ナノ粒子（ＳＬＮ）であり、これは、ＳＬＮの特徴を保持し、薬剤安定性を改善すると共に、薬剤漏出を防ぐ。ポリマーナノ粒子（ＰＮＰ）は、薬剤送達の重要な成分である。これらのナノ粒子は、特定の標的への薬剤送達を効果的に指令し、薬剤安定性及び薬剤放出制御を改善する。また、リポソームとポリマーを組み合わせた新しいタイプの担体である、脂質－ポリマーナノ粒子（ＰＬＮ）を使用してもよい。これらのナノ粒子は、ＰＮＰ及びリポソームの相補的な利点を備えている。ＰＬＮは、コア－シェル構造から構成され；ポリマーコアは、安定した構造を提供し、リン脂質シェルは、優れた生体適合性を付与する。このように、２つの成分が、薬剤包膜効率を高め、表面修飾を促進して、水溶性薬剤の漏出を防ぐ。論文については、例えば、Ｌｉ ｅｔ Ａｌ．２０１７，Ｎａｎｏｍａｔｅｒｉａｌｓ ７，１２２；ｄｏｉ：１０．３３９０／ｎａｎｏ７０６０１２２を参照されたい。

【０５３７】

また、本明細書に記載される組成物及び系の薬剤送達ビヒクルとして、エキソソームを使用することもできる。論文については、例えば、Ｈａ ｅｔ ａｌ．Ｊｕｌｙ ２０１６．Ａｃｔａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａ Ｓｉｎｉｃａ Ｂ．Ｖｏｌｕｍｅ ６，Ｉｓｓｕｅ ４，Ｐａｇｅｓ ２８７－２９６；ｄｏｉ．ｏｒｇ／１０．１０１６／ｊ．ａｐｓｂ．２０１６．０２．００１を参照されたい。

【０５３８】

さらに、本明細書に記載される組成物の担体として、エクスビボ分化赤血球を使用することもできる。例えば、以下：２０１５０７３５８７号パンフレット；同第２０１７１２３６４６号パンフレット；同第２０１７１２３６４４号パンフレット；同第２０１８１０２７４０号パンフレット；同第２０１６１８３４８２号パンフレット；同第２０１５１５３１０２号パンフレット；同第２０１８１５１８２９号パンフレット；同第２０１８００９８３８号パンフレット；Ｓｈｉ ｅｔ ａｌ．２０１４．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．１１１（２８）：１０１３１－１０１３６；米国特許第９，６４４，１８０号明細書；Ｈｕａｎｇ ｅｔ ａｌ．２０１７．Ｎａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｕｎｉｃａｔｉｏｎｓ ８：４２３；Ｓｈｉ ｅｔ ａｌ．２０１４．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．１１１（２８）：１０１３１－１０１３６を参照されたい。

【０５３９】

また、本明細書に記載の組成物を送達するための担体として、例えば、２０１８２０８７２８号パンフレットに記載されているフソソーム組成物を使用してもよい。

【０５４０】

膜貫通ポリペプチド

一部の実施形態では、組成物は、細胞内に、又は膜、例えば、細胞若しくは核膜を通して、構成体を運搬するための膜貫通ポリペプチド（ＭＰＰ）をさらに含む。膜を通した物質の輸送を促進することができる膜貫通ポリペプチドとして、限定はされないが、細胞貫通ペプチド（ＣＰＰ）（例えば、米国特許第８，６，０３，９６６号明細書を参照）、植物細胞内送達のための融合ペプチド（例えば、Ｎｇ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ，２０１６，１１：ｅ０１５４０８１を参照）、タンパク質形質導入ドメイン、Ｔｒｏｊａｎペプチド、及び膜転位シグナル（ＭＴＳ）（例えば、Ｔｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ ５５：２８１－２９４（２００３）を参照）が挙げられる。いくつかのＭＰＰは、アルギニンなどのアミノ酸が豊富で、陽荷電側鎖を有する。

【０５４１】

膜貫通ポリペプチドは、構成体の膜貫通を誘導する能力を有し、全身投与時に、インビボで複数の組織の細胞内での高分子転位を可能にする。また、膜貫通ポリペプチドは、ペ

プチドと呼ばれることもあり、これは、適切な条件下で細胞と接触させたとき、外部環境から、細胞質、ミトコンドリアなどのオルガネル、若しくは細胞の核をはじめとする細胞内環境内に、受動拡散で到達する場合よりも有意に高い量で通過する。

【０５４２】

膜を通して輸送される構成体は、膜貫通ポリペプチドと可逆的又は不可逆的に連結し得る。リンカーは、化学結合、例えば、１つ若しくは複数の共有結合又は非共有結合であってよい。一部の実施形態では、リンカーは、ペプチドリンカーである。こうしたリンカーは、２～３０アミノ酸であるか、又はそれ以上長くてもよい。リンカーとしては、柔軟、硬質又は切断可能リンカーが挙げられる。

【０５４３】

組合せ

一態様では、本明細書に記載するアネロベクター又はアネロベクターを含む組成物は、さらに１つ又は複数の異種部分を含んでもよい。一態様では、本明細書に記載のアネロベクター又はアネロベクターを含む組成物はまた、融合物中に１つ又は複数の異種部分を含み得る。一部の実施形態では、異種部分は、遺伝子エレメントと連結されていてもよい。一部の実施形態では、異種部分は、アネロベクターの一部としてタンパク性外層内に閉じ込めてもよい。一部の実施形態では、アネロベクターと一緒に異種部分を投与してもよい。

【０５４４】

一態様では、本発明は、アネロベクターのいずれか１つと本明細書に記載の異種部分を含む細胞又は組織を含む。

【０５４５】

別の態様では、本発明は、アネロベクターと本明細書に記載の異種部分を含む医薬組成物を含む。

【０５４６】

一部の実施形態では、異種部分は、ウイルス（例えば、エフェクター（例えば、薬物、小分子）、ターゲティング剤（例えば、ＤＮＡターゲティング剤、抗体、受容体リガンド）、タグ（例えば、蛍光団、ＫｉｌｌｅｒＲｅｄなどの感光剤）、又は本明細書に記載の編集若しくはターゲティング部分であってもよい。一部の実施形態では、本発明に記載の膜転位ポリペプチドは、１つ又は複数の異種部分に連結される。一実施形態では、異種部分は、小分子（例えば、ペプチド模倣物又は分子量２０００ダルトン未満の有機小分子）、ペプチド若しくはポリペプチド（例えば、抗体若しくはその抗原結合断片）、ナノ粒子、アプタマー、又は薬物（ｐｈａｒｍａｃｏａｇｅｎｔ）である。

【０５４７】

ウイルス

一部の実施形態では、アネロベクター又は組成物（例えば、本明細書に記載されるような）は、更に、例えば、異種部分として、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）以外のウイルス、例えば、一本鎖ＤＮＡウイルス、例えば、ビドナウイルス（Ｂｉｄｎａｖｉｒｕｓ）、サーコウイルス（Ｃｉｒｃｏｖｉｒｕｓ）、ジェミニウイルス（Ｇｅｍｉｎｉｖｉｒｕｓ）、ゲノモウイルス（Ｇｅｎｏｍｏｖｉｒｕｓ）、イノウイルス（Ｉｎｏｖｉｒｕｓ）、ミクロウイルス（Ｍｉｃｒｏｖｉｒｕｓ）、ナノウイルス（Ｎａｎｏｖｉｒｕｓ）、パルボウイルス（Ｐａｒｖｏｖｉｒｕｓ）、及びスピラウイルス（Ｓｐｉｒａｖｉｒｕｓ）からの１つ又は複数の構成体若しくはエレメント（例えば、核酸又はポリペプチド）を含み得る。一部の実施形態では、組成物は、さらに、二本鎖ＤＮＡウイルス、例えば、アデノウイルス（Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ）、アンプラウイルス（Ａｍｐｕｌｌａｖｉｒｕｓ）、アスコウイルス（Ａｓｃｏｖｉｒｕｓ）、アスファウイルス（Ａｓｆａｒｖｉｒｕｓ）、バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）、フセロウイルス（Ｆｕｓｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）、グロブロウイルス（Ｇｌｏｂｕｌｏｖｉｒｕｓ）、グッタウイルス（Ｇｕｔｔａｖｉｒｕｓ）、ヒトロサウイルス（Ｈｙｔｒｏｓａｖｉｒｕｓ）、ヘルペスウイルス（Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｕｓ）、イリドウイルス（Ｉｒｉｄｏｖｉｒｕｓ）、リポ

スリックスウイルス（Ｌｉｐｏｔｈｒｉｘｖｉｒｕｓ）、ニマウイルス（Ｎｉｍａｖｉｒｕｓ）、及びポックスウイルス（Ｐｏｘｖｉｒｕｓ）を含み得る。一部の実施形態では、組成物は、さらに、ＲＮＡウイルス、例えば、アルファウイルス（Ａｌｐｈａｖｉｒｕｓ）、フロウイルス（Ｆｕｒｏｖｉｒｕｓ）、肝炎ウイルス（Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）、ホルデイウイルス（Ｈｏｒｄｅｉｖｉｒｕｓ）、トバモウイルス（Ｔｏｂａｍｏｖｉｒｕｓ）、トブラウイルス（Ｔｏｂｒａｖｉｒｕｓ）、トリコルナウイルス（Ｔｒｉｃｏｒｎａｖｉｒｕｓ）、ルビウイルス（Ｒｕｂｉｖｉｒｕｓ）、ビルナウイルス（Ｂｉｒｎａｖｉｒｕｓ）、シストウイルス（Ｃｙｓｔｏｖｉｒｕｓ）、パルティティウイルス（Ｐａｒｔｉｔｉｖｉｒｕｓ）、及びレオウイルス（Ｒｅｏｖｉｒｕｓ）を含み得る。一部の実施形態では、アネロベクターは、異種部分としてのウイルスと一緒に投与される。

【０５４８】

一部の実施形態では、異種部分は、非病原性、例えば、共生ウイルス、片利共生ウイルス、ネイティブウイルスを含み得る。一部の実施形態では、非病原性ウイルスは、１若しくは複数種のアネロウイルス、例えば、アルファトルクウイルス属（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）（ＴＴ）、ベータトルクウイルス属（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）（ＴＴＭ）、及びガンマトルクウイルス属（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）（ＴＴＭＤ）である。一部の実施形態では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）は、トルク・テノウイルス（Ｔｏｒｑｕｅ Ｔｅｎｏ Ｖｉｒｕｓ）（ＴＴ）、ＳＥＮウイルス、センチネルウイルス（Ｓｅｎｔｉｎｅｌ ｖｉｒｕｓ）、ＴＴＶ様ミニウイルス、ＴＴウイルス、ＴＴウイルス遺伝子型６、ＴＴウイルス群、ＴＴＶ様ウイルスＤＸＬ１、ＴＴＶ様ウイルスＤＸＬ２、トルク・テノ様ミニウイルス（Ｔｏｒｑｕｅ Ｔｅｎｏ－ｌｉｋｅ Ｍｉｎｉ Ｖｉｒｕｓ）（ＴＴＭ）、又はトルク・テノ様ミディウイルス（Ｔｏｒｑｕｅ Ｔｅｎｏ－ｌｉｋｅ Ｍｉｄｉ Ｖｉｒｕｓ）（ＴＴＭＤ）を含み得る。一部の実施形態では、非病原性ウイルスは、本明細書に記載のヌクレオチド配列のいずれか１つに対して少なくとも少なくとも約６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％及び９９％のヌクレオチド配列同一性を有する１つ若しくは複数の配列を含む。

【０５４９】

一部の実施形態では、異種部分は、被験者に欠失するものとして同定される１又は複数種のウイルスを含んでもよい。例えば、ディビロシス（ｄｙｖｉｒｏｓｉｓ）を有するとして識別された被験者に、アネロベクターを含む組成物と、被験者において不均衡であるか、又は基準値、例えば健常な被験者とは異なる比率を有する１又は複数種のウイルス組成物若しくはウイルスとを投与することができる。

【０５５０】

一部の実施形態では、異種部分は、１又は複数種の非アネロウイルス、例えば、アデノウイルス（Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ）、ヘルペスウイルス（Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｕｓ）、ポックスウイルス（Ｐｏｘｖｉｒｕｓ）、ワクシニアウイルス（Ｖａｃｃｉｎｉａ ｖｉｒｕｓ）、ＳＶ４０、パピローマウイルス（ｐａｐｉｌｌｏｍａ ｖｉｒｕｓ）、レトロウイルス（ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）、例えば、レンチウイルス（ｌｅｎｔｉ ｖｉｒｕｓ）などのＲＮＡウイルス、一本鎖ＲＮＡウイルス、例えば、肝炎ウイルス（Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）、又は二本鎖ＤＮＡウイルス、例えば、ロタウイルス（ｒｏｔａｖｉｒｕｓ）を含み得る。一部の実施形態では、アネロベクター又はウイルスは、欠損しているか、又は感染性粒子を産生するために補助を必要とする。こうした補助は、例えば、ＬＴＲ内で調節配列の制御下、複製欠損アネロベクター若しくはウイルスの構造遺伝子の１つ又は複数（例えば、全て）をコード化する核酸、例えば、ゲノムに組み込まれたプラスミド若しくはＤＮＡを含むヘルパー細胞を用いることによって提供することができる。本明細書に記載のアネロベクターを複製するために好適な細胞株としては、当技術分野で公知の細胞株、例えば、Ａ５４９細胞があり、これは、本明細書に記載されるように修飾することができる。

【０５５１】

ターゲティング部分

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物又はアネロベクターは、さらに、ターゲティング部分、例えば、標的細胞上に存在する目的の分子に特異的に結合するターゲティング部分を含み得る。ターゲティング部分は、目的の分子又は細胞の特定の機能を調節し、特定の分子（例えば、酵素、タンパク質若しくは核酸）、例えば、経路内の目的の分子の下流の特定の分子を調節する、又は標的に特異的に結合して、アネロベクター若しくは遺伝子エレメントを局在化することができる。例えば、ターゲティング部分は、目的の特定の分子と相互作用して、その機能を増大、低減、又はそうでなければ調節する治療薬を含み得る。

【０５５２】

タグ付け又はモニタリング部分

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物又はアネロベクターは、さらに、本明細書に記載の組成物又はアネロベクターを標識若しくはモニターするためのタグを含み得る。タグ付け又はモニタリング部分は、化学物質又は酵素切断、例えば、タンパク質分解若しくはインテインスプライシングにより除去可能であってもよい。アフィニティタグは、アフィニティ技術を用いてタグ付けされたポリペプチドを精製するのに有用となり得る。いくつかの例として、キチン結合タンパク質（ＣＢＰ）、マルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、及びポリ（Ｈｉｓ）タグが挙げられる。可溶化タグは、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）などのシャペロン欠失種に発現される組換えタンパク質が、タンパク質の適正な折り畳みを補助し、それらが沈殿するのを防ぐのを助ける上で有用となり得る。いくつかの例として、チオレドキシン（ＴＲＸ）及びポリ（ＮＡＮＰ）が挙げられる。タグ付け又はモニタリング部分は、感光性タグ、例えば、蛍光を含んでもよい。蛍光タグは、視覚化に有用である。ＧＦＰ及びその変異体が、蛍光タグとして一般に用いられるいくつかの例である。タンパク質タグは、特定の酵素修飾（ビオチンリガーゼによるビオチン化など）又は化学修飾（蛍光イメージングのためのＦｌＡｓＨ－ＥＤＴ２との反応など）を起こすことが可能である。タグ付け又はモニタリング部分は、タンパク質を複数の他の構成体とつなげるために、結合させることが多い。タグ付け又はモニタリング部分は、また、特定のタンパク質分解又は酵素切断（例えば、ＴＥＶプロテアーゼ、トロンビン、Ｘａ因子又はエンテロペプチダーゼによる）によって除去することもできる。

【０５５３】

ナノ粒子

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物又はアネロベクターは、さらに、ナノ粒子を含み得る。ナノ粒子としては、約１～約１０００ナノメートル、約１～約５００ナノメートル、約１～約１００ｎｍ、約５０～約３００ｎｍ、約７５～約２００ｎｍ、及び約１００～約２００ｎｍ、並びにこれらの間の任意の範囲のサイズを有する無機材料が挙げられる。ナノ粒子は、一般に、ナノ単位の寸法の複合構造を有する。一部の実施形態では、ナノ粒子は、典型的に球体であるが、ナノ粒子組成物に応じて様々な形態が可能である。ナノ粒子に対して外部の環境と接触するナノ粒子の部分は、一般に、ナノ粒子の表面として識別される。本明細書に記載するナノ粒子の場合、サイズ制限を２つの寸法に限定することができ、そのため、ナノ粒子は、約１～約１０００ｎｍの直径を有する複合構造を含み、ここで、具体的な直径は、ナノ粒子組成物及び実験設計に従うナノ粒子の意図される使用に応じて変わる。例えば、治療用途に使用されるナノ粒子は、典型的に、約２００ｎｍ以下のサイズを有する。

【０５５４】

表面電荷及び立体安定化といったナノ粒子の追加的な望ましい特性も、意図される具体的な用途を考慮して変わり得る。臨床用途に望ましいと考えられる例示的な特性は、Ｄａｖｉｓ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ ２００８ ｖｏｌ．７，ｐａｇｅｓ７７１－７８２；Ｄｕｎｃａｎ，Ｎａｔｕｒｅ ２００６ ｖｏｌ．６，ｐａｇｅｓ ６８８－７０１；及びＡｌｌｅｎ，Ｎａｔｕｒｅ ２００２ ｖｏｌ．２ ｐａｇｅｓ７５０－７６３に記

載されており、これらの各々は、全体を参照により本明細書に組み込む。追加特性は、当業者が、本開示を読んで確認することができる。ナノ粒子の寸法及び特性を検出するための例示的な技術として、限定はされないが、動的光散乱法（ＤＬＳ）並びに透過型電子顕微鏡検査（ＴＥＭ）及び原子間力顕微鏡検査（ＡＦＭ）などの種々の顕微鏡検査が挙げられる。粒子形態を検出するための例示的な技術として、限定はされないが、ＴＥＭ及びＡＦＭが挙げられる。ナノ粒子の表面電荷を検出するための例示的な技術として、限定はされないが、ゼータ電位法がある。他の化学的特性を検出するための別の技術は、^{1}Ｈ、^{11}Ｂ、及び^{13}Ｃ及び^{19}ＦＮＭＲによるもの、ＵＶ／Ｖｉｓ及び赤外／ラマン分光法及び蛍光分光法（ナノ粒子を蛍光標識と組み合わせて使用する場合）、並びに当業者により確認可能なそれ以外の技術を含む。

【０５５５】

小分子

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物又はアネロベクターは、さらに、小分子を含み得る。小分子として、限定はされないが、概して、モル当たり約５，０００グラム未満の分子量を有する、低分子ペプチド、ペプチド模倣物（例えば、ペプトイド）、アミノ酸、アミノ酸類似体、合成ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、有機及び無機化合物（ヘテロ有機及び有機金属化合物を含む）、例えば、モル当たり約２，０００グラム未満の分子量を有する有機又は無機化合物、例えば、モル当たり約１，０００グラム未満の分子量を有する有機又は無機化合物、例えば、モル当たり約５００グラム未満の分子量を有する有機又は無機化合物、並びにこうした化合物の塩、エステル、及び他の薬学的に許容される形態が挙げられる。小分子は、限定はされないが、神経伝達物質、ホルモン、薬物、毒素、ウイルス若しくは微生物粒子、合成分子、及びアゴニスト又はアンタゴニストを含み得る。

【０５５６】

好適な分子の例は、以下：“Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，” Ｇｏｏｄｍａｎ ａｎｄ Ｇｉｌｍａｎ，ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．，（１９９６），Ｎｉｎｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，ｕｎｄｅｒ ｔｈｅ ｓｅｃｔｉｏｎｓ：Ｄｒｕｇｓ Ａｃｔｉｎｇ ａｔ Ｓｙｎａｐｔｉｃ ａｎｄ Ｎｅｕｒｏｅｆｆｅｃｔｏｒ Ｊｕｎｃｔｉｏｎａｌ Ｓｉｔｅｓ；Ｄｒｕｇｓ Ａｃｔｉｎｇ ｏｎ ｔｈｅ Ｃｅｎｔｒａｌ Ｎｅｒｖｏｕｓ Ｓｙｓｔｅｍ；Ａｕｔａｃｏｉｄｓ：Ｄｒｕｇ Ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ；Ｗａｔｅｒ，Ｓａｌｔｓ ａｎｄ Ｉｏｎｓ；Ｄｒｕｇｓ Ａｆｆｅｃｔｉｎｇ Ｒｅｎａｌ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｅｌｅｃｔｒｏｌｙｔｅ Ｍｅｔａｂｏｌｉｓｍ；Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ Ｄｒｕｇｓ；Ｄｒｕｇｓ Ａｆｆｅｃｔｉｎｇ Ｇａｓｔｒｏｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ；Ｄｒｕｇｓ Ａｆｆｅｃｔｉｎｇ Ｕｔｅｒｉｎｅ Ｍｏｔｉｌｉｔｙ；Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｐａｒａｓｉｔｉｃ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎｓ；Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｄｉｓｅａｓｅｓ；Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ｎｅｏｐｌａｓｔｉｃ Ｄｉｓｅａｓｅｓ；Ｄｒｕｇｓ Ｕｓｅｄ ｆｏｒ Ｉｍｍｕｎｏｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ；Ｄｒｕｇｓ Ａｃｔｉｎｇ ｏｎ Ｂｌｏｏｄ－Ｆｏｒｍｉｎｇ ｏｒｇａｎｓ；Ｈｏｒｍｏｎｅｓ ａｎｄ Ｈｏｒｍｏｎｅ Ａｎｔａｇｏｎｉｓｔｓ；Ｖｉｔａｍｉｎｓ，Ｄｅｒｍａｔｏｌｏｇｙ；及びＴｏｘｉｃｏｌｏｇｙ（全て、参照により本明細書に組み込む）に記載されるものが挙げられる。小分子のいくつかの例として、限定はされないが、タクロリムスなどのプリオン薬、ユビキチンリガーゼ又はヘクリンなどのＨＥＣＴリガーゼ阻害剤、酪酸ナトリウムなどのヒストン修飾薬、５－アザ－シチジンなどの酵素阻害剤、ドキソルビシンなどのアントラサイクリン、ペニシリンなどのβラクタム、抗菌剤、化学療法薬、抗ウイルス剤、ＶＰ６４などの他の生物からのモジュレータ、並びに薬物動態欠損を有する化学療法薬など、バイオアベイラビリティが不十分な薬物が挙げられる。

【０５５７】

一部の実施形態では、小分子は、エピジェネティック修飾剤、例えば、ｄｅ Ｇｒｏｏ

ｔｅ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．（２０１２）：１－１８に記載されるものなどである。例示的な小分子エピジェネティック修飾剤は、Ｌｕ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ １７．５（２０１２）：５５５－７１、例えば、表１又は２に記載されており、これは、参照により本明細書に組み込む。一部の実施形態では、エピジェネティック修飾剤は、ボリノスタット又はロミデプシンを含む。一部の実施形態では、エピジェネティック修飾剤は、クラスＩ、ＩＩ、ＩＩＩ、及び／又はＩＶヒストンデアセチラーゼ（ＨＤＡＣ）の阻害剤を含む。一部の実施形態では、エピジェネティック修飾剤は、ＳｉｒＴＩのアクチベータを含む。一部の実施形態では、エピジェネティック修飾剤は、ガルシノール、Ｌｙｓ－ＣｏＡ、Ｃ６４６、（＋）－ＪＱＩ、Ｉ－ＢＥＴ、ＢＩＣＩ、ＭＳ１２０、ＤＺＮｅｐ、ＵＮＣ０３２１、ＥＰＺ００４７７７、ＡＺ５０５、ＡＭＩ－Ｉ、ピラゾールアミド７ｂ、ベンゾ［ｄ］イミダゾール１７ｂ、アシル化ダプソン誘導体（例えば、ＰＲＭＴＩ）、メチルスタット、４，４’－ジカルボキシ－２，２’－ビピリジン、ＳＩＤ８５７３６３３１、ヒドロキサム酸塩類似体８、トラニルシプロミン（ｔａｎｙｌｃｙｐｒｏｍｉｅ）、ビスグアニジン及びビグアニドポリアミン類似体、ＵＮＣ６６９、ビダザ、デシタビン、フェニル酪酸ナトリウム（ＳＤＢ）、リポ酸（ＬＡ）、ケルセチン、バルプロ酸、ヒドラジン、バクトリム、緑茶エキス（例えば、没食子酸エピガロカテキン（ＥＧＣＧ））、クルクミン、スルホルファン及び／又はアリシン／ジアリルジスルフィドを含む。一部の実施形態では、エピジェネティック修飾剤は、ＤＮＡメチル化を阻害し、例えば、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼの阻害剤（例えば、５－アザシチジン及び／又はデシタビン）である。一部の実施形態では、エピジェネティック修飾剤は、ヒストン修飾、例えば、ヒストンアセチル化、ヒストンメチル化、ヒストンスモイル化、及び／又はヒストンリン酸化を修飾する。一部の実施形態では、エピジェネティック修飾剤は、ヒストンデアセチラーゼの阻害剤である（例えば、ボリノスタット及び／又はトリコスタチンＡである）。

【０５５８】

一部の実施形態では、小分子は、薬学的に有効な薬剤である。一実施形態では、小分子は、代謝活性又は成分の阻害剤である。有用なクラスの薬学的に有効な薬剤として、限定はされないが、抗生物質、抗炎症薬、血管新生又は血管作用剤、成長因子及び化学療法（抗腫瘍）薬（例えば、腫瘍抑制剤）が挙げられる。本明細書に記載のカテゴリー及び例から、又は（Ｏｒｍｅ－Ｊｏｈｎｓｏｎ ２００７，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．２００７；８０：８１３－２６）からの分子の１つ又は組合せを使用することができる。一実施形態では、本発明は、抗生物質、抗炎症薬、血管新生又は血管作用剤、成長因子又は化学療法薬を含む組成物を含む。

【０５５９】

ペプチド又はタンパク質

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物又はアネロベクターは、さらに、ペプチド又はタンパク質を含み得る。ペプチド部分として、限定はされないが、ペプチドリガンド又は抗体フラグメント（例えば、細胞外受容体などの受容体に結合する抗体フラグメント）、神経ペプチド、ホルモンペプチド、ペプチド薬、有毒ペプチド、ウイルス若しくは微生物ペプチド、合成ペプチド、及びアゴニスト若しくはアンタゴニストペプチドを挙げることができる。

【０５６０】

ペプチド部分は、直鎖状又は分岐状であってよい。ペプチドは、約５～約２００アミノ酸、約１５～約１５０アミノ酸、約２０～約１２５アミノ酸、約２５～約１００アミノ酸、又はこれらの間の任意の範囲の長さを有する。

【０５６１】

ペプチドのいくつかの例として、限定はされないが、蛍光タグ若しくはマーカ、抗原、単一ドメイン抗体などの抗体フラグメント、リガンド及び受容体、例えば、グルカゴン様ペプチド－１（ＧＬＰ－１）、ＧＬＰ－２受容体２、コレシストキニンＢ（ＣＣＫＢ）及びソマトスタチン受容体など、ペプチド治療薬、例えば、Ｇタンパク質結合受容体（ＧＰ

ＣＲ）若しくはイオンチャネルなどの特定の細胞表面受容体に結合するものなど、天然の生物活性ペプチドからの合成若しくはアナログペプチド、抗微生物ペプチド、孔形成ペプチド、腫瘍ターゲティング若しくは細胞傷害性ペプチド、分解若しくは自滅ペプチド、例えば、アポトーシス誘導ペプチドシグナル又は光増感剤ペプチドが挙げられる。

【０５６２】

本明細書に記載の本発明に有用なペプチドはまた、小分子結合ペプチド、例えば、抗原結合抗体又は抗体様フラグメント、例えば、一本鎖抗体、ナノボディなども含む（例えば、Ｓｔｅｅｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．２０１６．Ｎａｎｏｂｏｄｉｅｓ ａｓ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ：ｂｉｇ ｏｐｐｏｒｔｕｎｉｔｉｅｓ ｆｏｒ ｓｍａｌｌ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ Ｔｏｄａｙ：２１（７）：１０７６－１１３を参照）。こうした低分子抗原結合ペプチドは、サイトゾル抗原、核抗原、オルガネラ内抗原に結合することができる。

【０５６３】

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物又はアネロベクターは、特定の位置、組織、又は細胞をターゲティングすることができるリガンドに連結したポリペプチドを含む。

【０５６４】

オリゴヌクレオチドアプタマー

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物又はアネロベクターは、さらに、オリゴヌクレオチドアプタマーを含み得る。アプタマー部分は、オリゴヌクレオチド又はペプチドアプタマーである。オリゴヌクレオチドアプタマーは、一本鎖ＤＮＡ又はＲＮＡ（ｓｓＤＮＡ又はｓｓＲＮＡ）分子であり、これらは、タンパク質及びペプチドをはじめとする予め選択した標的に、高い親和性及び特異性で結合することができる。

【０５６５】

オリゴヌクレオチドアプタマーは、核酸種であり、これらは、小分子、タンパク質、核酸などの種々の分子標的に、さらには細胞、組織及び生物にも結合するように、反復ラウンドのインビトロ選択又は同様に、ＳＥＬＥＸ（指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化）により操作することができる。アプタマーは、明確な分子認識を提供し、化学合成により生成することができる。加えて、アプタマーは、望ましい保存特性を有し、治療用途では免疫原性をほとんど、又は全く誘発しないであろう。

【０５６６】

ＤＮＡ及びＲＮＡアプタマーはいずれも、様々な標的に対して頑健な結合親和性を示すことができる。例えば、ＤＮＡ及びＲＮＡアプタマーは、ｔリゾチーム、トロンビン、ヒト免疫不全ウイルストランス作用応答性エレメント（ＨＩＶ ＴＡＲ）（ｅｎ．ｗｉｋｉｐｅｄｉａ．ｏｒｇ／ｗｉｋｉ／Ａｐｔａｍｅｒ － ｃｉｔｅ＿ｎｏｔｅ－１０を参照）、ヘミン、インターフェロンγ、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、前立腺特異的抗原（ＰＳＡ）、ドーパミン、及び非古典的オンコジーン、熱ショック因子１（ＨＳＦ１）について選択されている。

【０５６７】

ペプチドアプタマー

一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物又はアネロベクターは、さらに、ペプチドアプタマーを含み得る。ペプチドアプタマーは、低分子量、１２～１４ｋＤａのペプチドを含め、１つ（又は複数の）短い可変ペプチドドメインを有する。ペプチドアプタマーは、細胞内のタンパク質－タンパク質相互作用に特異的に結合し、それを阻害するように、設計することができる。

【０５６８】

ペプチドアプタマーは、特定の標的分子に結合するように、選択又は操作された人工タンパク質である。これらのタンパク質は、可変配列の１つ又は複数のペプチドループを含む。これらは、典型的に、コンビナトリアルライブラリから単離された後、往々にして、指定突然変異又は複数ラウンドの可変領域突然変異誘発及び選択によって改善される。イ

ンビボで、ペプチドアプタマーは、細胞タンパク質標的に結合して、生物学的作用を及ぼすことができ、こうしたものとして、その標的分子と他のタンパク質との正常なタンパク質相互作用の妨害がある。具体的には、転写因子結合ドメインに結合した可変ペプチドアプタマーループを、転写因子活性化ドメインに結合した標的タンパク質に対してスクリーニングする。この選択戦略によるペプチドアプタマーとその標的とのインビボ結合は、下流の酵母マーカ遺伝子の発現として検出される。こうした実験によって、アプタマーにより結合される特定のタンパク質、並びにアプタマーが破壊するタンパク質相互作用を見出して、表現型を生じさせる。加えて、適切な官能部分で誘導体化したペプチドアプタマーは、それらの標的タンパク質の特定の翻訳後修飾を引き起こすか、又は標的の細胞内局在化を変化させることができる。

【０５６９】

ペプチドアプタマーは、インビトロで標的を認識することもできる。これらは、バイオセンサー中の抗体に代わって有用であることが見出され、不活性及び活性タンパク質形態の両方を含有する集団からタンパク質の活性イソ型を検出するために使用されている。タッドポールとして知られる誘導体は、ペプチドアプタマーの「頭部」が、ユニーク配列二本鎖ＤＮＡ「テール」に共有結合されており、それらのＤＮＡテールのＰＣＲ（例えば、定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応を用いて）によって混合物中の乏しい標的分子の定量を可能にする。

【０５７０】

ペプチドアプタマー選択は、様々なシステムを用いて行うことができるが、現在最も使用されているのは、酵母２－ハイブリッドシステムである。ペプチドアプタマーはまた、ファージディスプレイ並びにｍＲＮＡディスプレイ、リボソームディスプレイ、細菌ディスプレイ及び酵母ディスプレイなどの他の表面ディスプレイ技術により構築されたコンビナトリアルペプチドライブラリーから選択することもできる。これらの実験手順はまた、バイオパニングとしても知られる。バイオパニングから得られるペプチドの中でも、ミモトープは、１種のペプチドアプタマーとみなすことができる。コンビナトリアルペプチドライブラリーからパニングされた全てのペプチドは、ＭｉｍｏＤＢという名称の特定のデータベースに保存されている。

【０５７１】

Ｖ．宿主細胞

本発明は更に、例えば、本明細書に記載されるようなアネロベクター、バクミド、又はドナーベクターを含む宿主若しくは宿主細胞を目的とする。一部の実施形態では、宿主若しくは宿主細胞は、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞、Ｓｆ２１細胞、又はＨｉ５細胞）である。一部の実施形態では、昆虫細胞は、ボンビックス・モリ（Ｂｏｍｂｙｘ　ｍｏｒｉ）、ヨトウガ（Ｍａｍｅｓｔｒａ　ｂｒａｓｓｉｃａｅ）、ツマジロクサヨトウ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）、イラクサギンウワバ（Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉ）、又はキイロショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ）に由来する。一部の実施形態では、宿主若しくは宿主細胞は、細菌細胞（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、例えば、ＤＨ　１０Ｂａｃ細胞）である。ある特定の実施形態では、本明細書で確認されるように、提供されるアネロベクターは、広範囲の異なる標的宿主細胞（例えば、植物細胞、昆虫細胞、細菌細胞、真菌細胞、又は動物細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞）に感染する。標的宿主細胞は、中胚葉、内胚葉、又は外胚葉由来の細胞を含む。標的宿主細胞は、例えば、上皮細胞、筋肉細胞、白血球（例えば、リンパ球）、腎組織細胞、肺組織細胞を含む。

【０５７２】

一部の実施形態では、アネロベクターは、宿主内で実質的に非免疫原性である。アネロベクター又は遺伝子エレメントは、宿主の免疫系による望ましくない実質的な応答を生じさせることができない。いくつかの免疫応答としては、体液性免疫応答（例えば、抗原特異的抗体の産生）及び細胞媒介免疫応答（例えば、リンパ球増殖）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５７３】
一部の実施形態では、宿主若しくは宿主細胞を、アネロベクターと接触（例えば、アネロベクターに感染）させる。一部の実施形態では、宿主は、ヒトなどの哺乳動物である。一部の実施形態では、宿主細胞は、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞である。宿主におけるアネロベクターの量は、投与後の任意の時点で測定することができる。ある特定の実施形態では、培養物中のアネロベクター増殖の経過時間を測定する。
【０５７４】
一部の実施形態では、アネロベクター、例えば、本明細書に記載されるアネロベクターは、遺伝性である。一部の実施形態では、アネロベクターは、体液及び／又は細胞中で母から子に線形伝達される。一部の実施形態では、元の宿主細胞由来の娘細胞は、アネロベクターを含む。一部の実施形態では、母は子に、少なくとも２５％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、若しくは９９％の効率でアネロベクターを伝達し、又は宿主細胞から娘細胞に、少なくとも２５％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、若しくは９９％の伝達効率でアネロベクターを伝達する。一部の実施形態では、宿主細胞中のアネロベクターは、減数分裂中に、２５％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、若しくは９９％の伝達効率を有する。一部の実施形態では、宿主細胞中のアネロベクターは、有糸分裂中に、２５％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、若しくは９９％の伝達効率を有する。一部の実施形態では、細胞中のアネロベクターは、約１０％～２０％、２０％～３０％、３０％～４０％、４０％～５０％、５０％～６０％、６０％～７０％、７０％～７５％、７５％～８０％、８０％～８５％、８５％～９０％、９０％～９５％、９５％～９９％、若しくはこれらの間の任意のパーセンテージの伝達効率を有する。
【０５７５】
一部の実施形態では、アネロベクター、例えば、アネロベクターは、宿主細胞内で複製する。複数の実施形態では、宿主細胞は、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞、Ｓｆ２１細胞、又はＨｉ５細胞）である。一実施形態では、アネロベクターは、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞において複製することができる。他の実施形態では、アネロベクターは複製欠損か、複製不全である。
【０５７６】
一部の実施形態では、アネロベクターは、宿主細胞において複製するが、アネロベクターは、宿主のゲノム中に、例えば、宿主の染色体と統合しない。一部の実施形態では、アネロベクターは、例えば、宿主の染色体と、無視できる程度の組換え頻度を有する。一部の実施形態では、アネロベクターは、例えば、宿主の染色体と、例えば、約１．０ｃＭ／Ｍｂ、０．９ｃＭ／Ｍｂ、０．８ｃＭ／Ｍｂ、０．７ｃＭ／Ｍｂ、０．６ｃＭ／Ｍｂ、０．５ｃＭ／Ｍｂ、０．４ｃＭ／Ｍｂ、０．３ｃＭ／Ｍｂ、０．２ｃＭ／Ｍｂ、０．１ｃＭ／Ｍ未満、若しくはそれ以下の組換え頻度を有する。
【０５７７】
ＶＩ．使用方法
本明細書に記載のアネロベクター及びアネロベクターを含む組成物は、例えば、それを必要とする被験者（例えば、哺乳動物被験者、例えば、ヒト被験者）の疾患、障害、又は状態を治療する方法に用いることができる。本明細書に記載の医薬組成物の投与は、例えば、非経口（静脈内、腫瘍内、腹腔内、筋肉内、体腔内、及び皮下を含む）投与により実施してよい。アネロベクターは、単独で投与してもよいし、又は医薬組成物として製剤化してもよい。
【０５７８】
アネロベクターは、単位用量非経口組成物などの単位用量組成物の形態で投与してもよい。こうした組成物は、一般に、混合により調製した後、非経口投与のために好適に適合させることができる。こうした組成物は、例えば、注射液及び注入液若しくは懸濁液又は座薬又はエアゾールの形態であってもよい。
【０５７９】

一部の実施形態では、アネロベクター又は例えば、本明細書に記載する通り、これを含む組成物の投与により、例えば、被験者の標的細胞に対して、アネロベクターに含まれる遺伝子エレメントの送達を達成することができる。

【０５８０】

例えば、エフェクター（内在性若しくは外性エフェクター）を含む、本明細書に記載のアネロベクター又はその組成物は、細胞、組織、又は被験者にエフェクターを送達するために使用することができる。一部の実施形態では、アネロベクター又はその組成物を用いて、骨髄、血液、心臓、胃腸又は皮膚にエフェクターを送達する。本明細書に記載のアネロベクター組成物の投与によるエフェクターの送達によって、細胞、組織、又は被験者におけるノンコーディングＲＮＡ又はポリペプチドの発現レベルを調節（例えば、増大若しくは低減）することができる。この様式での発現レベルの調節は、エフェクターが送達される細胞の機能活性の改変をもたらし得る。一部の実施形態では、調節される機能活性は、天然の酵素、構造、又は調節活性であってよい。

【０５８１】

一部の実施形態では、アネロベクター、又はそのコピーは、細胞内への送達から２４時間（例えば、１日、２日、３日、４日、５日、６日、１週間、２週間、３週間、４週間、３０日、又は１ヵ月）後に細胞内で検出可能である。複数の実施形態では、アネロベクター又はその組成物は、標的細胞に対する作用を媒介し、その作用は、少なくとも１、２、３、４、５、６、若しくは７日、２、３、若しくは４週間、又は１、２、３、６、若しくは１２ヵ月間持続する。一部の実施形態（例えば、アネロベクター又はその組成物が、外性タンパク質をコード化する遺伝子エレメントを含む）では、作用は、１、２、３、４、５、６、若しくは７日、２、３、若しくは４週間、又は１、２、３、６、若しくは１２ヵ月間未満持続する。

【０５８２】

本明細書に記載のアネロベクター、又はアネロベクターを含む組成物を用いて治療することができる疾患、障害、及び状態の例として、限定はしないが、以下：免疫障害、インターフェロン症（例えば、Ｉ型インターフェロン症）、感染症、炎症性障害、自己免疫疾患、癌（例えば、固形腫瘍、例えば肺癌、非小細胞肺癌、例えば、ｍＩＲ－６２５、例えば、カスパーゼ－３に対して応答性の遺伝子を発現する腫瘍）、及び胃腸障害が挙げられる。一部の実施形態では、アネロベクターは、アネロベクターを接触させた細胞の活性又は機能を調節（例えば、増大若しくは低減）する。一部の実施形態では、アネロベクターは、アネロベクターを接触させた細胞中の分子（例えば、核酸若しくはタンパク質）のレベル又は活性を調節（例えば、増大若しくは低減）する。一部の実施形態では、アネロベクターは、アネロベクターを接触させた細胞、例えば、癌細胞の生存能を例えば、少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、又はそれ以上低減する。一部の実施形態では、アネロベクターは、エフェクター、例えば、ｍｉＲＮＡ、例えば、ｍｉＲ－６２５を含み、これは、アネロベクターを接触させた細胞、例えば、癌細胞の生存能を例えば、少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、又はそれ以上低減する。一部の実施形態では、アネロベクターは、アネロベクターを接触させた細胞、例えば、癌細胞のアポトーシスを、例えば、カスパーゼ－３活性を増大することにより、例えば、少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、又はそれ以上増大する。一部の実施形態では、アネロベクターは、エフェクター、例えば、ｍｉＲＮＡ、例えば、ｍｉＲ－６２５を含み、これは、アネロベクターを接触させた細胞、例えば、癌細胞のアポトーシスを例えば、カスパーゼ－３活性を増大することにより、例えば、少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、又はそれ以上増大する。

【０５８３】

ＶＩＩ．投与／送達

組成物（例えば、本明細書に記載のアネロベクターを含む医薬組成物）は、薬学的に許容される賦形剤を含むように、製剤化してもよい。医薬組成物は、任意選択で、１つ又は複数の追加活性物質、例えば、治療及び／又は予防に有効な物質を含んでもよい。本発明の医薬組成物は、滅菌及び／又はパイロジェンフリーであってもよい。医薬剤の製剤化及び／又は製造に関する一般指針は、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ２１ｓｔ ｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ，２００５（参照により本明細書に組み込む）に見出すことができる。

【０５８４】

本明細書に提供される医薬組成物の説明は、主として、ヒトへの投与に好適な医薬組成物に関するが、当業者には、こうした組成物が、一般に、任意の他の動物、例えば、ヒト以外の動物、例えば、ヒト以外の哺乳動物への投与に好適であることは理解されよう。組成物を様々な動物への投与に好適にする目的での、ヒトへの投与に好適な医薬組成物の修飾は十分に理解されており、通常の技能を有する獣医薬理学者は、あったとしても通常の実験を行うだけで、こうした修飾を設計及び／又は実施することができる。医薬組成物の投与が考慮される被験者として、限定はされないが、ヒト及び／又は他の霊長類；商業関連の哺乳動物、例えば、畜牛、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコ、イヌ、マウス、及び／若しくはラットを含む哺乳動物；並びに／又は商業関連のトリ、例えば、家禽、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、及び／若しくはシチメンチョウを含むトリが挙げられる。

【０５８５】

本明細書に記載の医薬組成物は、薬理学の分野で公知の、又は以後開発される任意の方法によって調製することができる。一般に、こうした調製方法は、活性成分を賦形剤及び／又は１つ若しくは複数の他の補助成分と結合させるステップ、並びに必要な場合及び／又は望ましい場合、次に、生成物を分割、造形及び／又は包装するステップを含む。

【０５８６】

一態様では、本発明は、アネロベクターを被験者に送達する方法を特徴とする。この方法は、本明細書に記載のアネロベクターを含む医薬組成物を、被験者に送達するステップを含む。一部の実施形態では、投与されたアネロベクターは、被験者において複製する（例えば、被験者のウイルス集団の一部となる）。

【０５８７】

医薬組成物は、野生型若しくはネイティブウイルスエレメント及び／又は修飾ウイルスエレメントを含み得る。アネロベクターは、１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列（例えば、核酸配列若しくはそのアミノ酸配列をコード化する核酸配列）、又はそれに対して、少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、及び９９％のヌクレオチド配列同一性を有する配列を含み得る。アネロベクターは、１つ又は複数のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸配列）に対して、少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、及び９９％の配列同一性を有する核酸配列を含む核酸分子を含み得る。アネロベクターは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）アミノ酸配列（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子のアミノ酸配列）に対して、少なくとも約約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、及び９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列をコード化する核酸分子を含み得る。アネロベクターは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）アミノ酸配列（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子のアミノ酸配列）に対して、少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、及び９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含み得る。

【０５８８】

一部の実施形態では、アネロベクターは、内在性遺伝子及びタンパク質発現を、参照標

準、例えば、健常な対照と比較して、少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、若しくはそれ以上増大する（刺激する）上で十分である。ある特定の実施形態では、アネロベクターは、内在性遺伝子及びタンパク質発現を、参照基準、例えば、健常な対照と比較して、少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、若しくはそれ以上低減する（阻害する）上で十分である。

【０５８９】

一部の実施形態では、アネロベクターは、宿主若しくは宿主細胞において１つ又は複数のウイルス特性、例えば、向性、感染力、免疫抑制／活性化を、参照基準、例えば、健常な対照と比較して、少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、若しくはそれ以上阻害／増強する。

【０５９０】

一部の実施形態では、ウイルス遺伝子情報に示されていない１つ又は複数のウイルス株をさらに含む医薬組成物を被験者に投与する。

【０５９１】

一部の実施形態では、本明細書に記載のアネロベクターを含む医薬組成物は、ウイルス感染を調節する上で十分な用量及び時間で投与される。ウイルス感染のいくつかの非限定的な例を以下に挙げる；アデノ関連ウイルス、アイチウイルス（Ａｉｃｈｉ ｖｉｒｕｓ）、オーストラリアコウモリ・リッサウイルス（Ａｕｓｔｒａｌｉａｎ ｂａｔ ｌｙｓｓａｖｉｒｕｓ）、ＢＫポリオーマウイルス（ＢＫ ｐｏｌｙｏｍａｖｉｒｕｓ）、バンナウイルス（Ｂａｎｎａ ｖｉｒｕｓ）、バーマ森林ウイルス（Ｂａｒｍａｈ ｆｏｒｅｓｔ ｖｉｒｕｓ）、ブンヤムウェラウイルス（Ｂｕｎｙａｍｗｅｒａ ｖｉｒｕｓ）、ブンヤウイルス・ラ・クロス（Ｂｕｎｙａｖｉｒｕｓ Ｌａ Ｃｒｏｓｓｅ）、カンジキウサギブンヤウイルス（Ｂｕｎｙａｖｉｒｕｓ ｓｎｏｗｓｈｏｅ ｈａｒｅ）、オナガザルヘルペスウイルス（Ｃｅｒｃｏｐｉｔｈｅｃｉｎｅ ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｕｓ）、チャンディプラウイルス（Ｃｈａｎｄｉｐｕｒａ ｖｉｒｕｓ）、チクングニアウイルス（Ｃｈｉｋｕｎｇｕｎｙａ ｖｉｒｕｓ）、コーサウイルスＡ（Ｃｏｓａｖｉｒｕｓ Ａ）、牛痘ウイルス（Ｃｏｗｐｏｘ ｖｉｒｕｓ）、コサッキーウイルス（Ｃｏｘｓａｃｋｉｅｖｉｒｕｓ）、クリミア－コンゴ出血熱ウイルス（Ｃｒｉｍｅａｎ－Ｃｏｎｇｏ ｈｅｍｏｒｒｈａｇｉｃ ｆｅｖｅｒ ｖｉｒｕｓ），デング熱ウイルス（Ｄｅｎｇｕｅ ｖｉｒｕｓ）、ドーリウイルス（Ｄｈｏｒｉ ｖｉｒｕｓ）、デュグベウイルス（Ｄｕｇｂｅ ｖｉｒｕｓ）、デュベンヘイジウイルス（Ｄｕｖｅｎｈａｇｅ ｖｉｒｕｓ）、東部ウマ脳炎ウイルス（Ｅａｓｔｅｒｎ ｅｑｕｉｎｅ ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）、エボラウイルス（Ｅｂｏｌａｖｉｒｕｓ）、エコーウイルス（Ｅｃｈｏｖｉｒｕｓ）、脳心筋炎ウイルス（Ｅｎｃｅｐｈａｌｏｍｙｏｃａｒｄｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）、エプスタイン・バーウイルス（Ｅｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒ ｖｉｒｕｓ）、ヨーロッパコウモリ・リッサウイルス（Ｅｕｒｏｐｅａｎ ｂａｔ ｌｙｓｓａｖｉｒｕｓ）、ＧＢウイルスＣ／Ｇ型肝炎ウイルス（ＧＢ ｖｉｒｕｓ Ｃ／Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ｇ ｖｉｒｕｓ）、ハンターンウイルス（Ｈａｎｔａａｎ ｖｉｒｕｓ）、ヘンドラウイルス（Ｈｅｎｄｒａ ｖｉｒｕｓ）、Ａ型肝炎ウイルス（Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ａ ｖｉｒｕｓ）、Ｂ型肝炎ウイルス（Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ｂ ｖｉｒｕｓ）、Ｃ型肝炎ウイルス（Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ｃ ｖｉｒｕｓ）、Ｅ型肝炎ウイルス（Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ Ｅ ｖｉｒｕｓ）、Ｄ型肝炎ウイルス（Ｈｅｐａｔｉｔｉｓ ｄｅｌｔａ ｖｉｒｕｓ）、ウマポックスウイルス（Ｈｏｒｓｅｐｏｘ ｖｉｒｕｓ）、ヒトアデノウイルス（Ｈｕｍａｎ ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ）、ヒトアストロウイルス（Ｈｕｍａｎ ａｓｔｒｏｖｉｒｕｓ）、ヒトコロナウイルス（Ｈｕｍａｎ ｃｏｒｏｎａｖｉｒｕｓ）、ヒトサイトメガロウイルス（Ｈｕｍａｎ ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ）、ヒトエンテロウイルス６８（Ｈｕｍａｎ ｅｎｔｅｒｏｖｉｒｕｓ ６８）、ヒトエンテロウイルス７０（Ｈｕｍａｎ ｅｎｔｅｒｏｖｉｒｕｓ ７０）、ヒトヘルペスウイルス１型（Ｈｕｍａｎ ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｕｓ １）、ヒトヘルペスウイルス２型（Ｈｕｍａｎ ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｕｓ

２）、ヒトヘルペスウイルス６型（Ｈｕｍａｎ ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｕｓ ６）、ヒトヘルペスウイルス７型（Ｈｕｍａｎ ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｕｓ ７）、ヒトヘルペスウイルス８型（Ｈｕｍａｎ ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｕｓ ８）、ヒト免疫不全ウイルス（Ｈｕｍａｎ ｉｍｍｕｎｏｄｅｆｉｃｉｅｎｃｙ ｖｉｒｕｓ）、ヒトパピローマウイルス１型（Ｈｕｍａｎ ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｕｓ １）、ヒトパピローマウイルス２型（Ｈｕｍａｎ ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｕｓ ２）、ヒトパピローマウイルス１６型（Ｈｕｍａｎ ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｕｓ １６）、ヒトパピローマウイルス１８型（Ｈｕｍａｎ ｐａｐｉｌｌｏｍａｖｉｒｕｓ １８）、ヒトパラインフルエンザウイルス（Ｈｕｍａｎ ｐａｒａｉｎｆｌｕｅｎｚａ）、ヒトパルボウイルスＢ１９（Ｈｕｍａｎ ｐａｒｖｏｖｉｒｕｓ Ｂ１９）、ヒト呼吸器合胞体ウイルス（Ｈｕｍａｎ ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ ｓｙｎｃｙｔｉａｌ ｖｉｒｕｓ）、ヒトライノウイルス（Ｈｕｍａｎ ｒｈｉｎｏｖｉｒｕｓ）、ヒトＳＡＲＳコロナウイルス（Ｈｕｍａｎ ＳＡＲｓ ｃｏｒｏｎａｖｉｒｕｓ）、ヒトスプマレトロウイルス（Ｈｕｍａｎ ｓｐｕｍａｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓ）、ヒトＴ－リンパ好性ウイルス（Ｈｕｍａｎ Ｔ－ｌｙｍｐｈｏｔｒｏｐｉｃ ｖｉｒｕｓ）、ヒトトロウイルス（Ｈｕｍａｎ ｔｏｒｏｖｉｒｕｓ）、Ａ型インフルエンザウイルス（Ｉｎｆｌｕｅｎｚａ Ａ ｖｉｒｕｓ）、Ｂ型インフルエンザウイルス（Ｉｎｆｌｕｅｎｚａ Ｂ ｖｉｒｕｓ）、Ｃ型インフルエンザウイルス（Ｉｎｆｌｕｅｎｚａ Ｃ ｖｉｒｕｓ）、イスファンウイルス（Ｉｓｆａｈａｎ ｖｉｒｕｓ）、ＪＣポリオーマウイルス（ＪＣ ｐｏｌｙｏｍａｖｉｒｕｓ）、日本脳炎ウイルス（Ｊａｐａｎｅｓｅ ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）、フニンアレナウイルス（Ｊｕｎｉｎ ａｒｅｎａｖｉｒｕｓ）、ＫＩポリオーマウイルス（ＫＩ Ｐｏｌｙｏｍａｖｉｒｕｓ）、クンジンウイルス（Ｋｕｎｊｉｎ ｖｉｒｕｓ）、ラゴスコウモリウイルス（Ｌａｇｏｓ ｂａｔ ｖｉｒｕｓ）、レイク・ビクトリア・マーブルグウイルス（Ｌａｋｅ Ｖｉｃｔｏｒｉａ ｍａｒｂｕｒｇｖｉｒｕｓ）、ランガトウイルス（Ｌａｎｇａｔ ｖｉｒｕｓ）、ラッサウイルス（Ｌａｓｓａ ｖｉｒｕｓ）、ローズデールウイルス（Ｌｏｒｄｓｄａｌｅ ｖｉｒｕｓ）、跳躍病ウイルス（Ｌｏｕｐｉｎｇ ｉｌｌ ｖｉｒｕｓ）、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｉｃ ｃｈｏｒｉｏｍｅｎｉｎｇｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）、マチュポウイルス（Ｍａｃｈｕｐｏ ｖｉｒｕｓ）、マヤロウイルス（Ｍａｙａｒｏ ｖｉｒｕｓ）、ＭＥＲＳコロナウイルス（ＭＥＲＳ ｃｏｒｏｎａ ｖｉｒｕｓ）、麻疹ウイルス（Ｍｅａｓｌｅｓ ｖｉｒｕｓ）、メンゴ脳心筋炎ウイルス（Ｍｅｎｇｏ ｅｎｃｅｐｈａｌｏｍｙｏｃａｒｄｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）、メルケル細胞ポリオーマウイルス（Ｍｅｒｋｅｌ ｃｅｌｌ ｐｏｌｙｏｍａｖｉｒｕｓ）、モコラウイルス（Ｍｏｋｏｌａ ｖｉｒｕｓ）、伝染性軟属腫ウイルス（Ｍｏｌｌｕｓｃｕｍ ｃｏｎｔａｇｉｏｓｕｍ ｖｉｒｕｓ）、サル痘ウイルス（Ｍｏｎｋｅｙｐｏｘ ｖｉｒｕｓ）、ムンプスウイルス（Ｍｕｍｐｓ ｖｉｒｕｓ）、マレー渓谷脳炎ウイルス（Ｍｕｒｒａｙ ｖａｌｌｅｙ ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）、ニューヨークウイルス（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ｖｉｒｕｓ）、ニパウイルス（Ｎｉｐａｈ ｖｉｒｕｓ）、ノーウォークウイルス（Ｎｏｒｗａｌｋ ｖｉｒｕｓ）、オニョン－ニョンウイルス（Ｏ’ｎｙｏｎｇ－ｎｙｏｎｇ ｖｉｒｕｓ）、オルフウイルス（Ｏｒｆ ｖｉｒｕｓ）、オロポーシャウイルス（Ｏｒｏｐｏｕｃｈｅ ｖｉｒｕｓ）、ピチンデウイルス（Ｐｉｃｈｉｎｄｅ ｖｉｒｕｓ）、ポリオウイルス（Ｐｏｌｉｏｖｉｒｕｓ）、プンタ・トロ・フレボウイルス（Ｐｕｎｔａ ｔｏｒｏ ｐｈｌｅｂｏｖｉｒｕｓ）、プーマラウイルス（Ｐｕｕｍａｌａ ｖｉｒｕｓ）、狂犬病ウイルス（Ｒａｂｉｅｓ ｖｉｒｕｓ）、リフトバレー熱ウイルス（Ｒｉｆｔ ｖａｌｌｅｙ ｆｅｖｅｒ ｖｉｒｕｓ）、ロサウイルスＡ（Ｒｏｓａｖｉｒｕｓ Ａ）、ロスリバーウイルス（Ｒｏｓｓ ｒｉｖｅｒ ｖｉｒｕｓ）、ロタウイルスＡ（Ｒｏｔａｖｉｒｕｓ Ａ）、ロタウイルスＢ（Ｒｏｔａｖｉｒｕｓ Ｂ）、ロタウイルスＣ（Ｒｏｔａｖｉｒｕｓ Ｃ）、ルベラウイルス（Ｒｕｂｅｌｌａ ｖｉｒｕｓ）、サギヤマウイルス（Ｓａｇｉｙａｍａ ｖｉｒｕｓ）、サリウイルスＡ（Ｓａｌｉｖｉｒｕｓ Ａ）、砂バエ熱シチリアウイルス（Ｓａｎｄｆｌｙ ｆｅｖｅｒ ｓｉｃｉｌｉａｎ ｖｉｒｕｓ）、サッポロウイルス（Ｓａｐｐｏｒｏ ｖｉｒｕｓ）、

セムリキ森林ウイルス（Ｓｅｍｌｉｋｉ ｆｏｒｅｓｔ ｖｉｒｕｓ）、ソウルウイルス（Ｓｅｏｕｌ ｖｉｒｕｓ）、サル泡沫状ウイルス（Ｓｉｍｉａｎ ｆｏａｍｙ ｖｉｒｕｓ）、サルウイルス５型（Ｓｉｍｉａｎ ｖｉｒｕｓ ５）、シンドビスウイルス（Ｓｉｎｄｂｉｓ ｖｉｒｕｓ）、サウサンプトンウイルス（Ｓｏｕｔｈａｍｐｔｏｎ ｖｉｒｕｓ）、セントルイス脳炎ウイルス（Ｓｔ．ｌｏｕｉｓ ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）、ダニ媒介ポワッサンウイルス（Ｔｉｃｋ－ｂｏｒｎｅ ｐｏｗａｓｓａｎ ｖｉｒｕｓ）、トルク・テノウイルス（Ｔｏｒｑｕｅ ｔｅｎｏ ｖｉｒｕｓ）、トスカーナウイルス（Ｔｏｓｃａｎａ ｖｉｒｕｓ）、ウークニエミウイルス（Ｕｕｋｕｎｉｅｍｉ ｖｉｒｕｓ）、ワクシニアウイルス（Ｖａｃｃｉｎｉａ ｖｉｒｕｓ）、水痘帯状疱疹ウイルス（Ｖａｒｉｃｅｌｌａ－ｚｏｓｔｅｒ ｖｉｒｕｓ）、天然痘ウイルス（Ｖａｒｉｏｌａ ｖｉｒｕｓ）、ベネズエラウマ脳炎ウイルス（Ｖｅｎｅｚｕｅｌａｎ ｅｑｕｉｎｅ ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）、水痘性口炎（Ｖｅｓｉｃｕｌａｒ ｓｔｏｍａｔｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）、西部ウマ脳炎ウイルス（Ｗｅｓｔｅｒｎ ｅｑｕｉｎｅ ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ ｖｉｒｕｓ）、ＷＵポリオーマウイルス（ＷＵ ｐｏｌｙｏｍａｖｉｒｕｓ）、西ナイルウイルス（Ｗｅｓｔ Ｎｉｌｅ ｖｉｒｕｓ）、ヤバサル腫瘍ウイルス（Ｙａｂａ ｍｏｎｋｅｙ ｔｕｍｏｒ ｖｉｒｕｓ）、ヤバ様疾患ウイルス（Ｙａｂａ－ｌｉｋｅ ｄｉｓｅａｓｅ ｖｉｒｕｓ）、黄熱病ウイルス（Ｙｅｌｌｏｗ ｆｅｖｅｒ ｖｉｒｕｓ）、及びジカウイルス（Ｚｉｋａ Ｖｉｒｕｓ）。

いくつかの実施形態では、アネロベクターは、被験者に既に存在するウイルスを、参照標準と比較して、例えば、少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、若しくはそれ以上駆逐及び／又は移動させる上で十分である。いくつかの実施形態では、アネロベクターは、慢性又は急性ウイルス感染と競合する上で十分である。いくつかの実施形態では、アネロベクターは、ウイルス感染（例えば、プロウイルス感染）から防御するために予防的に投与してもよい。一部の実施形態では、アネロベクターは、（例えば、表現型、ウイルスレベル、遺伝子発現、他のウイルス、病態との競合などを少なくとも約５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、若しくはそれ以上）調節するのに十分な量で存在する。

一部の実施形態では、治療、治療すること、及びその同類語は、例えば、疾患、病的状態、又は障害を回復させる、改善する、安定化させる、予防する若しくは治すという目的での被検者の医療管理（例えば、アネロベクター、例えば、本明細書に記載されるアネロベクターを投与することによって）を含む。一部の実施形態では、治療は、積極的治療（疾患、病的状態、又は障害を回復させることを目的とする治療）、原因治療（関連する疾患、病的状態、又は障害の原因に向けられる治療）、緩和治療（症状の緩和のために設計された治療）、予防的治療（関連する疾患、病的状態、又は障害の発症を予防し、最小限に抑え、又は部分的若しくは完全に阻害することを目的とする治療）、及び／又は支持療法（別の治療法を補完するために採用された治療）を含む。

【０５９２】

本明細書で引用する全ての参照文献及び刊行物は参照により本明細書に組み込むものとする。

【０５９３】

本発明のいくつかの実施形態を更に詳しく説明するために、以下の実施例を提供するが、これらは、本発明の範囲を何ら制限することは意図されず；それらの例示的な性質から、当業者には周知の他の手順、方法、又は技術が代替的に使用され得ることは理解されよう。

【実施例】

【０５９４】

目次

実施例１：バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現系でのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質の産生
実施例２：Ｓｆ９細胞中でのＲｉｎｇ１ ＯＲＦの発現

実施例３：Ｓｆ９細胞中でのＲｉｎｇ２　ＯＲＦの発現
実施例４：Ｓｆ９細胞中での全てのＲｉｎｇ２　ＯＲＦの同時発現
実施例５：Ｓｆ９細胞中でのアネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム及び組換えアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦの共送達及び独立発現
実施例６：アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１はＳｆ９細胞中でＤＮＡと結びついて等密度遠心分離によって単離される複合体を形成する
実施例７：バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を使用する多種多様なアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＯＲＦ１タンパク質の発現
実施例８：バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）構築物のインビトロアセンブリ
実施例９：合成アネロベクター構築物の調製
実施例１０：アネロベクターのアセンブリ及び感染
実施例１１：アネロベクターの選択性
実施例１２：複製欠損アネロベクター及びヘルパーウイルス
実施例１３：複製可能アネロベクターのための製造工程
実施例１４：複製欠損アネロベクターの製造工程
実施例１５：懸濁細胞を用いたアネロベクターの産生
実施例１６：マウスにおいて外性タンパク質を発現させるためのアネロベクターの使用
実施例１７：外性ｍｉｃｒｏＲＮＡ配列を発現するアネロベクターの機能効果
実施例１８：外性ノンコーディングＲＮＡを発現するためのアネロベクターの調製及び産生
実施例１９：内在性ｍｉＲＮＡのアネロベクターからの発現及び内在性ｍｉＲＮＡの欠失
実施例２０：インビボでの外性タンパク質のアネロベクター送達
実施例２１：インビトロ環状化アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム
実施例２２：異なるトルクテノウイルス（Ｔｏｒｑｕｅ　ｔｅｎｏ　ｖｉｒｕｓ）株由来の超可変ドメインを含むキメラＯＲＦ１を含有するアネロベクターの産生
実施例２３：超可変ドメインの代わりに非ＴＴＶタンパク質／ペプチドを含有するキメラＯＲＦ１の産生
実施例２４：各々が肺癌細胞へのＥＰＯ遺伝子の形質導入を達成したｔｔｈ８及びＬＹ２に基づくアネロベクター
実施例２５：治療用トランスジーンを含むアネロベクターは、静脈内（ｉ．ｖ．）投与後にインビボで検出することができる
実施例２６：アネロベクターをインビトロで産生するための投入材料としてのインビトロ環状化ゲノム

【０５９５】

実施例１：バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現系でのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質の産生

この実施例では、Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃからのバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現系（カタログ番号Ａ３８８４１）を、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質の発現に適応させた。簡単に言うと、目的の遺伝子（例えば、本明細書に記載されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦをコード化する遺伝子）をｐＦａｓｔＢａｃプラスミド中にクローニングし、次いで、これを用いて、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムを担持するＤＨ１０Ｂａｃ大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞を形質転換した。形質転換体をインジケータープレート上で製造者の指示に従って増殖させ、白色コロニーを液体培養及びバクミドＤＮＡの抽出のために選択した。アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦのバクミド中への組換えをＰＣＲによって検証した。

【０５９６】

アネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ遺伝子の組み換えの達成を示す検証されたバクミド構築物を、次いで、ＥｘｐｉＳｆ９昆虫細胞中にトランスフェクトした。細胞を、１２５ｒｐｍに設定したオービタルシェイカー上の２７℃の加湿されていないＣ

O_2を含まない雰囲気のインキュベーター中でインキュベートした。トランスフェクション後から７２時間後に、継代０ストック（Ｐ０）組換えバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を上清から採取した。

【０５９７】

ＥｘｐｉＳｆ９細胞を、２５～１００μＬのＰ０バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）ストックを用いて感染させて、タンパク質産生のための継代１（Ｐ１）バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を作製した。感染後から９６時間後（およそ４日間）に、上清を回収して、Ｐ１バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を得た。

【０５９８】

Ｐ１組換えバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を、新鮮なＥｘｐｉＳｆ　ＣＤ培地中のテストウイルスの５つの１０倍段階希釈物を１２００μＬの総容量で調製することによって力価測定した。８００μＬのＥｘｐｉｓｆ９細胞を１．２５×10^6生細胞／ｍＬで、深型ウェルプレート中に播種し、１０００μＬのテストウイルスの異なる希釈物を各ウェルに添加した。１つのウェルを、陰性対照として設定した。次いで、プレートを、２２５±５ｒｐｍに設定したシェイキングプラットフォーム上の２７℃の加湿されていないインキュベーター中で一晩インキュベートした。約１４～１６時間のインキュベーション後、プレートをインキュベーターから取り出し、全てのものをマイクロ遠心分離チューブに移し、３００×ｇで５分間遠心分離した。上清を吸引し、各細胞ペレットを抗バキュロウイルス（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）エンベロープｇｐ６４　ＡＰＣ抗体を含有する希釈緩衝液（ＰＢＳ＋２％の牛胎児血清）の１００μＬ中に０．１５μｇ／ｍＬの最終濃度で再懸濁させた。チューブを室温で３０分間インキュベートした。次いで、サンプルを１ｍＬのＰＢＳで洗浄し、次いで、３００×ｇで１０分間遠心分離した。上清を吸引し、細胞ペレットを１ｍＬの希釈緩衝液中に再懸濁させた。サンプルを以下のパラメータを使用してフローサイトメーター上で分析した：赤色レーザー励起：６３３～６４７ｎｍ；発光：６６０ｎｍ。ｇｐ６４の陽性率を表す異なるウイルス希釈を有するサンプルを記録し、ウイルス力価を計算するために使用した。

【０５９９】

この実施例及び以下の実施例について、上記の方法を使用して発現するために、一連の組換えバクミド及びバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）ベクターを産生した。以下の表Ｘに示すように、ＬＹ２、ｔｔｈ８、及び他のアネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）株からの様々なＯＲＦをバクミド中にクローニングした。示すように、ＯＲＦを、ヒトライノウイルス（ｈｕｍａｎ　ｒｈｉｎｏｖｉｒｕｓ）３Ｃ（ＨＲＣ　３Ｃ）タンパク質分解切断部位を有するか、又は有さないＮ－末端Ｈｉｓタグと、Ｃ－末端Ｈｉｓタグのいずれかとタグ付けするか、又はタグ付けしないまま残した。

【０６００】

【表６４】

表 X.　産生された組換えバクミド構築物。「FullORF」＝ ノンコーディング領域が除去され；ORF2/3 がタグ付けされた完全 ORF 含有領域

構築物 #/名称	株	Ring #	ORF	タグタイプ	タグ位置	pFastBac	バクミド	バキュロウイルス (Baculovirus)	作製
tth8 ORF1	tth8	Ring1	ORF1	タグなし	NA	あり	あり	なし	自社製
tth8 ORF1 N-His	tth8	Ring1	ORF1	6xHis	N-ter	あり	あり	あり	自社製
tth8 ORF1 C-His	tth8	Ring1	ORF1	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
tth8 ORF2	tth8	Ring1	ORF2	タグなし	NA	あり	あり	あり	自社製
tth8 ORF2 C-His	tth8	Ring1	ORF2	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
tth8 ORF1/1	tth8	Ring1	ORF1/1	タグなし	NA	あり	あり	あり	自社製
tth8 ORF1/1 C-His	tth8	Ring1	ORF1/1	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
tth8 ORF1/2	tth8	Ring1	ORF1/2	タグなし	NA	あり	あり	あり	自社製
tth8 ORF1/2 C-His	tth8	Ring1	ORF1/2	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
tth8 ORF2/2	tth8	Ring1	ORF2/2	タグなし	NA	あり	あり	あり	自社製
tth8 ORF2/2 C-His	tth8	Ring1	ORF2/2	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
tth8 ORF2/3	tth8	Ring1	ORF2/3	タグなし	NA	あり	あり	あり	自社製
tth8 ORF2/3 C-His	tth8	Ring1	ORF2/3	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
tth8 FullORF	tth8	Ring1	FullORF	タグなし	NA	あり	あり	あり	自社製
tth8 FullORF C-His	tth8	Ring1	FullORF	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
tth8 ORF2 C-His	tth8	Ring1	ORF2/ORF1	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
Ring 3.1 ORF1	6B.CD8. contig3	Ring3.1	ORF1	タグなし	NA	なし	なし	なし	自社製
Ring 3.1 ORF1 C-His	6B.CD8. contig3	Ring3.1	ORF1	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
Ring 3.1 ORF2	6B.CD8. contig3	Ring3.1	ORF2	タグなし	NA	なし	なし	なし	自社製
Ring 3.1 ORF2 C-His	6B.CD8. contig3	Ring3.1	ORF2	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
Ring 3.1 ORF2/ORF1 C-His	6B.CD8. contig3	Ring3.1	ORF2/ORF1	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 FullORF	LY2	Ring2	FullORF	タグなし	NA	あり	あり	なし	自社製

【０６０１】

【表６５】

LY2 FullORF N-His	LY2	Ring2	FullORF	6xHis	N-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 FullORF C-His	LY2	Ring2	FullORF	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF1	LY2	Ring2	ORF1	タグなし	NA	あり	あり	なし	自社製
LY2 ORF1 N-His	LY2	Ring2	ORF1	6xHis	N-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF1 C-His	LY2	Ring2	ORF1	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF1(dR)	LY2	Ring2	ORF1 (デルターアルギニンリッチ領域)	タグなし	NA	あり	なし	なし	自社製
LY2 ORF1(dR) N-His	LY2	Ring2	ORF1 (デルターアルギニンリッチ領域)	6xHis	N-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF1(dR) C-His	LY2	Ring2	ORF1 (デルターアルギニンリッチ領域)	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF1/1	LY2	Ring2	ORF1/1	タグなし	NA	あり	あり	なし	自社製
LY2 ORF1/1 N-His	LY2	Ring2	ORF1/1	6xHis	N-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF1/1 C-His	LY2	Ring2	ORF1/1	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF1/2	LY2	Ring2	ORF1/2	タグなし	NA	あり	あり	なし	自社製
LY2 ORF1/2 N-His	LY2	Ring2	ORF1/2	6xHis	N-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF1/2 C-His	LY2	Ring2	ORF1/2	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF2	LY2	Ring2	ORF2	タグなし	NA	あり	あり	なし	自社製
LY2 ORF2 N-His	LY2	Ring2	ORF2	6xHis	N-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF2 C-His	LY2	Ring2	ORF2	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF2/2	LY2	Ring2	ORF2/2	タグなし	NA	あり	あり	なし	自社製
LY2 ORF2/2 N-His	LY2	Ring2	ORF2/2	6xHis	N-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF2/2 C-His	LY2	Ring2	ORF2/2	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF2/3	LY2	Ring2	ORF2/3	タグなし	NA	あり	あり	なし	自社製
LY2 ORF2/3 N-His	LY2	Ring2	ORF2/3	6xHis	N-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF2/3 C-His	LY2	Ring2	ORF2/3	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF2/ORF1 C-His	LY2	Ring2	ORF2/ORF1	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	自社製
LY2 ORF1 HisE354	LY2	Ring2	ORF1	6xHis	After E354	あり	あり	なし	自社製
LY2 ORF1 HisN299	LY2	Ring2	ORF1	6xHis	After N299	あり	あり	なし	自社製
LY2 ORF1 HisL267	LY2	Ring2	ORF1	6xHis	After L267	あり	あり	なし	自社製
tth8 ORF1 (JA20 HVR)	tth8	Ring1	ORF1 (JA20 超可変領域を含む)	6xHis	C-ter	あり	なし	なし	自社製
tth8 ORF1 (TJN02 HVR)	tth8	Ring1	ORF1 (TJN02 超可変領域を含む)	6xHis	C-ter	あり	なし	なし	自社製

【０６０２】

【表６６】

tth8 ORF1 (TTV16 HVR)	tth8	Ring1	ORF1 (TTV16 超可変領域を含む)	6xHis	C-ter	あり	なし	なし	自社製
Ring2 ORF1 (CodOpt)	LY2	Ring2	ORF1 (コドン最適化)	タグなし	NA	あり	あり	あり	Medigen
Ring2 ORF1 (CodOpt) HRV3C-6His	LY2	Ring2	ORF1 (コドン最適化)	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	Medigen
Ring4 ORF1 (CodOpt)	6B.CD8.contig2	Ring4	ORF1 (コドン最適化)	タグなし	NA	あり	あり	あり	Medigen
RIng4 ORF1 (CodOpt) HRV3C-6His	6B.CD8.contig2	Ring4	ORF1 (コドン最適化)	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	Medigen
RIng5.2 ORF1 (CodOpt)	CT30F	Ring5.2	ORF1 (コドン最適化)	タグなし	NA	あり	あり	あり	Medigen
Ring5.2 ORF1 (CodOpt) HRV3C-6His	CT30F	RIng5.2	ORF1 (コドン最適化)	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	Medigen
Ring6 ORF1 (CodOpt)	190783.3	Ring6	ORF1 (コドン最適化)	タグなし	NA	あり	あり	あり	Medigen
Ring6 ORF1 (CodOpt) HRV3C-6His	190783.3	Ring6	ORF1 (コドン最適化)	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	Medigen
Ring1 ORF1 (CosOpt) His	tth8	Ring1	ORF1 (コドン最適化)	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	Medigen
Rig3.1 ORF1 (CodOpt) His	6B.CD8.contig3	Ring3.1	ORF1 (コドン最適化)	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	Medigen
Ring7 ORF1 (CodOpt) His	190783.4	Ring7	ORF1 (コドン最適化)	6xHis	C-ter	あり	あり	あり	Medigen
Ring2 (CodOpt) N-His	LY2	Ring2	ORF1 (コドン最適化)	6xHis	N-ter	あり	あり	あり	Medigen
Ring2 (CodOpt) N-His (PS)	LY2	Ring2	ORF1 (コドン最適化)	6xHis-PreScision プロテアーゼ認識配列)	N-ter	あり	あり	あり	Medigen
Ring2 タンデム	LY2	Ring2	全ゲノム(ポリヘドリンプロモーターなし)	タグなし	NA	あり	あり	あり	Medigen

【０６０３】

【表６７】

WTLY2	LY2	Ring2	全ゲノム	タグなし	NA	あり	あり	あり	自社製
WTtth8	tth8	Ring1	全ゲノム	タグなし	NA	あり	あり	あり	自社製
WTtth8 (逆)	tth8	Ring1	全ゲノム(逆 5' ポリヘドリン プロモーター)	タグなし	NA	あり	あり	あり	自社製
LoxPWTLY2	LY2	Ring2	LoxP-全ゲノム-LoxP	タグなし	NA	あり	あり	あり	自社製
Cre-R	NA	NA	Cre リコンビナーゼ	タグなし	NA	あり	あり	あり	自社製

【０６０４】

感染前の日に、ＥｘｐｉＳｆ９細胞を、１２５ｍｌのＮａｌｇｅｎｅ使い捨てＰＥＴＧＥｒｌｅｎｍｅｙｅｒ平底フラスコ［Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃカタログ番号：４１１５－０１２５］中の２５ｍｌの室温のＥｘｐｉＳｆ９　ＣＤ培地に５×１０^{6}細胞／ｍｌで播種した。細胞生存率を監視し、それが９５％以上で維持されることを確実なものにした。１００μＬのＥｘｐｉＳｆエンハンサー溶液を細胞に滴加した。細胞を、１２５±５ｒｐｍに設定したオービタルシェイカーを使用して、２７℃の加湿されていない空気調節されたCO_2を含まない雰囲気のインキュベーター内で振盪しながら一晩インキュベートした。１日目、ＥｘｐｉＳｆエンハンサーを添加後約１８～２４時間で、細胞を示されたバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）で５の感染多重度（ＭＯＩ）にて感染させた。細胞を感染後７２時間で採取し、生存率が６０～８０％の範囲であることを見出した。サンプルを分析するために、１×Ｂｏｌｔ　ＬＤＳサンプル緩衝液［Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号：Ｂ０００７］及び１×Ｂｏｌｔ還元剤［Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号：Ｂ０００９］を添加し、２．５分間超音波処理することによって細胞を溶解した。図１に示すように、Ｃ－Ｈｉｓタグ付きＬＹ２　ＯＲＦ１は、抗ポリ－ヒスチジン抗体を使用するウェスタンブロッティングによって決定されるように、感染後２日までに感染されたＥｘｐｉＳｆ９細胞中で成功裏に発現された。加えて、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質を、クマシー染色によって検出し、感染の達成を示した。

【０６０５】

図２に示すように、Ｃ－Ｈｉｓタグ付きｔｔｈ８　ＯＲＦ１及びＯＲＦ１／１もまた、感染後２日までに感染されたＥｘｐｉＳｆ９細胞中で成功裏に発現された。

【０６０６】

Ｎ－末端Ｈｉｓタグ付きＬＹ２　ＯＲＦ１の発現も、感染されたＥｘｐｉＳｆ９細胞中で検出された（図３）。ここでは、構築物は、野生型ＯＲＦ１配列のすぐ後に続くＮ－末端Ｈｉｓタグ（レーン１、２、９、１０、若しくは１４）、又はライノウイルス（ｒｈｉｎｏｖｉｒｕｓ）３Ｃ切断配列に続くＮ－末端Ｈｉｓタグ（レーン３、１１）のいずれかを含んだ。レーン１～７におけるサンプルは、ゲルに直接充填された溶解物であり、一方、レーン９～１５におけるサンプルは、超遠心分離を介して馴化培地からタンパク質を最初にペレット化し、ペレットを１００倍少ない容量中で再懸濁させることによって調製した。レーン１～３及び９～１１に示されるサンプルは、小規模（５ｍＬ）で増殖された。レーン６及び１４のサンプルは、１０Ｌの培養物から得られた。従って、この実施例は、Ｎ又はＣ末端ポリ－ヒスチジンタグを有する複数の株からのＯＲＦ１の産生が５ｍＬ～１０Ｌの範囲のスケールで成功裏に行うことができること、及びＯＲＦ１がＳｆ９溶解物又は培養上清（馴化培地）中で見出すことができることを示している。

【０６０７】

実施例２：Ｓｆ９細胞中でのＲｉｎｇ１　ＯＲＦの発現

この実施例では、一連の組換えバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を、各々がＣ－末端ポリ－ヒスチジンでタグ付けされたｔｔｈ８　ＯＲＦの代替配置を用いて産生した（図４）。組換えバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）デザインは、ｔｔｈ８　ＯＲＦスプライス変異体（すなわち、ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、及びＯＲＦ２／３）の各々についての１つのバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）構築物、並びにバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）ポリヘドリンプロモーターによって駆動されるｔｔｈ８からの完全ＯＲＦ領域を含有する「ＦｕｌｌＯＲＦ」構築物を含んだ。これらのバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）は、実施例１に記載されるように産生された。

【０６０８】

次いで、タンパク質発現を、抗ポリ－ヒスチジン抗体を使用するウェスタンブロットによって検出した。図４に示すように、Ｈｉｓタグ付きｔｔｈ８　ＯＲＦのＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２及びＯＲＦ２／３を検出した。

【０６０９】

実施例３：Ｓｆ９細胞中でのＲｉｎｇ２　ＯＲＦの発現

この実施例では、一連の組換えバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を、各々がＣ末端にてポリ－ヒスチジンでタグ付けされたＲｉｎｇ２　ＯＲＦの代替配置を用いて産生した（図５）。組換えバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）デザインは、Ｒｉｎｇ２　ＯＲＦスプライス変異体（すなわち、ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、及びＯＲＦ２／３）の各々についての１つのバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）構築物、Ｎ－末端アルギニンリッチ領域（ＲＲＲ）が欠失されている変異体（ＯＲＦ１ΔＲＲＲ）、並びにバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）ポリヘドリンプロモーターによって駆動されるＲｉｎｇ２からの完全ＯＲＦ領域を含有する「ＦｕｌｌＯＲＦ」構築物を含んだ。各実験条件について、ＥｘｐｉＳｆ９細胞を、５のＭＯＩで個々のＲｉｎｇ２変異体を発現する組換えバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）で感染させた。これについての実験条件は、実施例１及び２に記載される通りであった。

【０６１０】

次いで、タンパク質発現を、抗Ｈｉｓを使用するウェスタンブロットによって検出した。図５に示すように、Ｈｉｓタグ付けしたＲｉｎｇ２　ＯＲＦのＯＲＦ１、ＯＲＦ１ΔＲＲＲ、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、及びＯＲＦ２／３を全て検出した。

【０６１１】

この実施例の一部としての更なる実験では、Ｒｉｎｇ２　ＯＲＦ１コード化配列及び／又はＲｉｎｇ２　ＯＲＦ２スプライス変異体コード化配列を含む組換えバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を使用して、Ｓｆ９細胞を感染させた。テストされた発現条件は、ＯＲＦ１単独、又はＯＲＦ１＋「ＦｕｌｌＯＲＦ」、ＯＲＦ１＋ＯＲＦ２、ＯＲＦ１＋ＯＲＦ２／２、及びＯＲＦ１＋ＯＲＦ２／３の同時感染、並びに「Ｎｅｇ」とラベルされた陰性対照を含んだ。ＥｘｐｉＳｆ９細胞を、各条件について５のＭＯＩにてバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）で同時感染させた。実験条件は、実施例１及び２で記載される通りであった。次いで、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、及びＯＲＦ２／３のタンパク質発現を、抗Ｈｉｓ又は抗Ｒｉｎｇ２　Ｎ２２のいずれかを使用するウェスタンブロットによって各条件について評価した。後者は、マウスを大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）中で産生されるＲｉｎｇ２　ＯＲＦ１のＮ２２断片で免疫化し、次いで、ハイブリドーマを生成することによって得られたモノクローナル抗体である。

【０６１２】

図６に示すように、両方のウェスタンは、ＯＲＦ１感染条件の各々において約８１ｋＤにおけるバンドとしてＯＲＦ１を検出した。ＯＲＦ１バンドは、抗Ｎ２２ウェスタンにおける破線ボックスによって強調されており、陰性対照（Ｎｅｇ）サンプル中には見ること

ができない。両方の抗体によって検出されたより低い分子量（約１０ｋＤ）バンドは、ＯＲＦ１のＣ－末端断片であると考えられる。ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、及びＯＲＦ２／３もまた、対応するサンプル（抗Ｈｉｓブロット）で検出された。従って、この実施例は、ＯＲＦ１及びＯＲＦ２の個々のスプライス変異体の両方が、昆虫細胞中で同時発現され得ることを例証している。

【０６１３】

実施例４：Ｓｆ９細胞中での全てのＲｉｎｇ２　ＯＲＦの同時発現

この実施例では、実施例３に記載されるように、各々がＨｉｓタグでタグ付けされた特定のＲｉｎｇ２　ＯＲＦ（すなわち、ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、及びＯＲＦ２／３）を発現するように各々がデザインされた６つの組換えバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を産生した（図７）。Ｓｆ９細胞を、Ｒｉｎｇ２　ＯＲＦバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）の様々な組み合わせで感染させた－具体的には、各条件は、細胞を、図７に示されるように、１つを除いて全てのＯＲＦ構築物で感染させることが含まれた。次いで、タンパク質発現を、抗Ｈｉｓを使用する全細胞懸濁液のウェスタンブロットによって検出した。図７に示すように、Ｈｉｓタグ付けされたＲｉｎｇ２　ＯＲＦを予想されたパターンで検出した。全てのＯＲＦが検出されたか、省かれたものを除いて全てが検出された。

【０６１４】

実施例５：Ｓｆ９細胞中でのアネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム及び組換えアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦの共送達及び独立発現

この実施例では、インビトロ環状化（ＩＶＣ）アネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムをトランスフェクトし、細胞を、ヘキサ－ヒスチジンを有するそのＣ－末端でタグ付けされたＯＲＦ１をコード化するバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）に感染させることによって、アネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ及びゲノムを、Ｓｆ９細胞中に共送達させた（図８）。次いで、タンパク質発現を、抗Ｈｉｓ、抗ＯＲＦ２、及びＮ２２断片を標的化する抗ＯＲＦ１モノクローナル抗体を用いるウェスタンブロットによって検出した。示されるように（図８、黒丸１）、Ｈｉｓタグ付けされたＯＲＦ１が、この調製物中で検出され、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）ベクターからの組換えＯＲＦ１発現の達成を示している。この結果と一致して、同じＯＲＦ１タンパク質が、抗ＯＲＦ１抗体を使用して検出された（図８、底部パネル、最も右のレーン）。

【０６１５】

処理された細胞の同じサンプルにおいて、ネイティブアネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）プロモーターが、Ｓｆ９細胞中で転写的に活性であることが示され、これは、ＯＲＦ２発現が検出され（図８、黒丸３）、細胞中にトランスフェクトされたＩＶＣゲノムによってのみ産生され得るためである。

【０６１６】

加えて、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦを、インビトロ環状化（ＩＶＣ）構築物及びＦｕｌｌＯＲＦバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を使用して共送達させて、Ｓｆ９細胞中で発現させた。次いで、タンパク質発現を、抗Ｈｉｓ、抗Ｒｉｎｇ２　ＯＲＦ２、及び抗Ｒｉｎｇ２　ＯＲＦ１　Ｎ２２を使用するウェスタンブロットによって検出した。ＯＲＦ１タンパク質が細胞中で検出され（図８、黒丸４）、これは、ＩＶＣ又はＦｕｌｌＯＲＦバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）構築物のいずれかの産物であり得る。驚くべきことに、ＯＲＦ２タンパク質は、容易に検出され、その強度は発現がＦｕｌｌＯＲＦバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）構築物に由来することを示唆している（図８、黒丸２）。

【０６１７】

アネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、その遺伝子を昆虫細胞中で発現する能力の更なるテストとして、ｔｔｈ８アネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）コード領域を、両方の向きでｐＦａｓｔＢａｃベクター中にクローニングした。これにより

、ポリヘドリンプロモーターが、コード領域のセンス又はアンチセンス方向のいずれかの上流に位置付けられている「ＦｕｌｌＯＲＦ」ｔｔｈ８バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）構築物をもたらした。後者の配置は、アネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子の転写を開始する可能性が低い。Ｒｉｎｇ２における本発明者らの驚くべき観察と一致して、ｔｔｈ８　ＯＲＦ２の発現は、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）ポリヘドリンプロモーターに対するコード領域の向きとは無関係であり、発現が、アネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）プロモーターによって駆動されていることを示唆している（図９、約１５及び２０ｋＤａでのバンド）。

【０６１８】

この実施例は、ＩＶＣトランスフェクション及びバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）感染が、機能性アネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子をＳｆ９昆虫細胞に共送達することができること、及びネイティブアネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）プロモーターがこれらの細胞中で活性であることを示している。

【０６１９】

実施例６：アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１はＳｆ９細胞中でＤＮＡと結びついて等密度遠心分離によって単離される複合体を形成する

この実施例では、Ｓｆ９細胞を、Ｃ－末端ポリ－ヒスチジンタグを有するＬＹ２　ＯＲＦ１をコード化するバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）で感染させたＩＶＣアネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムＬＹ２でトランスフェクトし、次いで、分画化して、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現系を使用して発現されたＯＲＦ１が、インビトロで単離され得るタンパク質－ＤＮＡ複合体を形成するかどうかを決定した。

【０６２０】

１．２ｇ／ｍｌのＣｓＣｌ溶液（ＴＮ緩衝液中；２０ｍＭのＴｒｉｓ　ｐＨ８．０、１４０ｍＭのＮａＣｌ）８ｍｌをＳＷ３２．１　Ｔｉローター用の超遠心分離チューブ（Ｕｌｔｒａ－Ｃｌｅａｒ　１７ｍｌ－Ｂｅｃｋｍａｎ　＃３４４０６１）に添加することによって、ＣｓＣｌ勾配を調製した。チューブの下部に４０％のＣａＣｌ（ＴＮ緩衝液中）８ｍｌを配置し、次いでトッパーでキャップをして、Ｇｒｄｉｅｎｔ　Ｍａｓｔｅｒプログラム５～５０％を１３分間実行して、線形勾配を調製した。キャップを外し、各チューブに対して勾配に０．５ｍｌ～２ｍｌのＳｆ９溶解物を重ねて、０．００１％のポロキサマー－１８８を含有するＴＮ緩衝液で最上部近くまで重ねた。超音波遠心分離を、２２，５００×ＲＰＭで１８．５時間行った。チューブの底を穿孔して、約６００ｕｌの分画を深型黒色ウェル中に流入させることによって、分画を勾配から回収した。各サンプルの屈折率を測定して、それらの密度を決定した。

【０６２１】

次いで、分画中のアネロウイルスＤＮＡ含有量を最初にＤＮＡを分画から抽出し、次いで、ｑＰＣＲを行うことによって決定した。Ｐｕｒｅ　Ｌｉｎｋ　Ｖｉｒａｌ　ＤＮＡ抽出は、キット［Ｔｈｅｒｍｏｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃカタログ番号１２２８００５０］を使用して、５０ｕＬの分画からウイルスＤＮＡを精製した。サンプルを、プロテイナーゼＫで処理し、５６℃で１５分間インキュベートすることによってＬｙｓｉｓ緩衝液を使用して溶解させ、９９％のエタノールで洗浄し、Ｖｉｒａｌ　Ｓｐｉｎ　Ｃｏｌｕｍｎに移した。サンプルを６８００×ｇで遠心分離し、５００ｕＬのキットに提供されたＷａｓｈ緩衝液で２回洗浄し、再び遠心分離した。１００ｕＬのＲＮａｓｅフリー水をカラムに添加して、ＤＮＡを溶出させた。

【０６２２】

ｑＰＣＲについては、２×ＴａｑＭａｎ　Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ、１００ｕＭ　ＬＹ２プライマーフォワード（ＡＧＣＡＡＣＡＧＧＴＡＡＴＧＧＡＧＧＡＣ）、１００ｕＭ　ＬＹ２リバース（ＴＧＡＡＧＣＴＧＧＧＧＴＣＴＴＴＡＡＣ）と共に、１００ｕＭ　ＬＹ２プローブ（ＴＣＴＡＣＣＴＡＧＧＴＧＣＡＡＡＧＧＧＣＣ）を各反応について５．８３ｕＬのヌクレアーゼフリー水中で希釈した。以下の条件

を、各ｑＰＣＲサイクルに使用した：５０℃で２分間保持、９５℃で１０分間保持し、続いて、９５℃で１５秒間及び６０℃で１分間の４０サイクルをＡｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｑｕａｎｔ Ｓｔｕｄｉｏ ３ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲ Ｍａｃｈｉｎｅで行う。各サンプルを３回反復で実施し、アッセイ全体を３回繰り返し、これを用いてグラフをプロットした。

【０６２３】

図１０に示すように、等密度分画を、ウェスタンブロッティング定量ＰＣＲ、及び透過型電子顕微鏡によって特性評価した。勾配分画の抗Ｈｉｓウェスタンブロッティングは、１．３２ｇ／ｍＬ及び１．２１ｇ／ｍＬの密度を有する分画中のＬＹ２ ＯＲＦ１についての予想された分子量の明確なバンドを示した。加えて、１．２５～１．２９ｇ／ｍＬの範囲の分画は、予想されたよりも高い分子量及び低い分子量の明確なバンドを有していた。また、ｑＰＣＲは、およそ１．２１ｇ／ｍＬ、１．２９ｇ／ｍｌ、及び１．３２ｇ／ｍＬでピークを有するある特定の分画中に、ＬＹ２ゲノムＤＮＡの存在を示している。

【０６２４】

ネガティブ染色透過型電子顕微鏡法を、１．３２ｇ／ｍＬ及び１．２１ｇ／ｍＬの分画で、並びに１．２５～１．２９ｇ／ｍＬの範囲の分画のプールで行った。プールは、プロテアソームの外観を有するいくつかのものを含む多量の粒子を示している。プロテアソームの存在は、低分子量及び高分子量でのウェスタンブロットバンドを説明することができる。前者はタンパク質分解によるものであり、後者は分解の過程でプロテアソームタンパク質と共有結合したユビキチン化ＯＲＦ１、又はＯＲＦ１断片によるものである。１．２１ｇ／ｍＬの分画は、脂質ベースの粒子と一致していると思われるいくつかを含む様々なサイズの粒子を示している。１．３２ｇ／ｍＬの分画は、ネイキッドＤＮＡとは異なって染色する注目すべきＤＮＡ様構造を示し、タンパク質などの高分子との結合を示唆している。

【０６２５】

ＬＹ２ ＯＲＦ１が、電子顕微鏡写真で観察された構造と結びついているかどうかを判定するために、抗ポリ－ヒスチジン抗体を使用する免疫金検出を行った。図１１は、１．３２及び１．２１ｇ／ｍＬの分画中で観察される構造上に蓄積する金標識を示し、これは、１．３２ｇ／ｍＬの分画中に見られるＤＮＡ、及び１．２１ｇ／ｍＬの分画中に見られる粒子と結合したＯＲＦ１－Ｈｉｓの存在と一致している。

【０６２６】

まとめると、これらの結果は、Ｓｆ９細胞中で発現されるＯＲＦ１がＤＮＡと結合して、アネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）粒子と一致する密度を有する複合体を形成することができることを示している。

【０６２７】

実施例７：バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を使用する多種多様なアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）からのＯＲＦ１タンパク質の発現

この実施例では、Ｓｆ９細胞を、アネロウイルス（ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）株Ｒｉｎｇ３．１、Ｒｉｎｇ４、Ｒｉｎｇ５．２、Ｒｉｎｇ６、並びにＲｉｎｇ１及びＲｉｎｇ２からのＣ－末端Ｈｉｓタグ付きＯＲＦ１タンパク質を発現するように、操作されたバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）で感染させた。図１２に示すように、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）株の各々に由来するＯＲＦ１タンパク質を、Ｓｆ９細胞中で成功裏に発現させた。表Ｙに示すように、全ての３つの属（アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）、ベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）、ガンマトルクウイルス（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ））を代表する株からのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１をテストし、それらの発現レベルが図１、２、３、及び１２に見ることができる。一般に、本発明者らは、この系における発現のレベルがベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）からのＯＲＦ１で最も高く、ガンマトルクウイルス（Ｇａｍｍａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）からのもので中間であり、アルファトルクウイルス（Ａｌｐｈａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）

からのもので最低である。
【０６２８】
【表６８】

表 Y.　組換え ORF1 発現が成功した株

名称	属
Ring1	アルファ
Ring2	ベータ
Ring3.1	ガンマ
Ring4	ガンマ
Ring5.2	アルファ
Ring6	アルファ
HLH	ベータ
ctgh3	ベータ
LY1	ベータ

【０６２９】
実施例８：バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）構築物のインビトロアセンブリ
この実施例では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質（例えば、ＯＲＦ１）の発現に好適なバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）構築物を、インビトロアセンブリによって生成する。
【０６３０】
免疫染色アッセイ（限定されないが、ＥＬＩＳＡ又はウェスタンブロットなど）を通しての精製及び／又は同一性決定で補助するためにタグ付けされていないか、若しくはＮ－末端で、Ｃ－末端で融合されたタグを含有し得るか、又はタグを導入するためにＯＲＦ１タンパク質それ自体の中に突然変異を有し得るアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１（野生型タンパク質、キメラタンパク質、又はその断片）をコード化するＤＮＡを、昆虫細胞株（Ｓｆ９及び／又はＨｉｇｈＦｉｖｅ）中で発現させる。アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１は、単独で、又は限定されないが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２及び／又はＯＲＦ３タンパク質を含む任意の数のヘルパータンパク質と組み合わせて発現され得る。
【０６３１】
タンパク質を、限定されないが、キレート精製、ヘパリン精製、勾配沈降精製、及び／又はサイズ排除精製が含まれる可能性がある開発された精製技術を使用して精製する。ＯＲＦ１を、カプソメア（ｃａｐｓｏｍｅｒｓ）又はＶＬＰを形成するその能力について評価し、核酸キャプシド化のための後続ステップで使用される。
【０６３２】
１つの実施例では、Ｎ－末端HIS_6タグに融合されたＲｉｎｇ２　ＯＲＦ１（ＨＩＳ－ＯＲＦ１）をコード化するＤＮＡを、昆虫発現のためにコドン最適化し、バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）発現ベクターｐＦａｓｔＢａｃ系中にクローニングし、製造者の方法（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に従って、Ｂａｃ－ｔｏ－ＢＡＣ発現系を使用して、Ｒｉｎｇ２　ＯＲＦ－ＨＩＳ組換えタンパク質を発現するバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）を生成した。１０リットルの昆虫細胞（Ｓｆ９）を、Ｒｉｎｇ２　ＨＩＳ－ＯＲＦ１バキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）で感染させて、感染後３日目に遠心分離によって細胞を採取した。細胞を溶解させて、溶解物を、本分野において標準的な技術を使用するキレート樹脂カラムを用いて精製した。Ｈｉｓ－ＯＲＦ１を含有する溶出分画を透析し、ＤＮＡｓｅで処理して、宿主細胞ＤＮ

Ａを消化させた。得られた物質を、キレート樹脂カラムを使用して再度精製し、ＯＲＦ１を含有する分画を、核酸キャプシド化及びウイルスベクター精製のために保持した。

【０６３３】

核酸キャプシド化及びウイルスベクター精製：Ｒｉｎｇ　ＯＲＦ１（野生型タンパク質、キメラタンパク質、又はその断片）を、ＶＬＰ若しくはウイルスキャプシドを解離させて、核酸カーゴとのリアセンブリを可能にするのに十分な条件で処理する。核酸カーゴは、治療薬剤として送達させたい目的の遺伝子をコード化する二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、又はＲＮＡと定義することができる。ＶＬＰ若しくはウイルスキャプシドを解離させるのに十分な潜在的な条件は、限定されるものではないが、異なるｐＨの緩衝液、定義された導電率（塩類含有量）の条件、洗浄剤（ＳＤＳ、Ｔｗｅｅｎ、Ｔｒｉｔｏｎなど）含有条件、カオトロピック剤（尿素など）含有条件、又は定義された温度及び時間に関与する条件（リアニーリング温度）であり得る。定義された濃度の核酸カーゴは、定義された濃度のＲｉｎｇ　ＯＲＦ１と組み合わされ、核酸キャプシド化を可能にするのに十分な条件で処理される。ウイルスベクターと定義される得られた粒子は、その後、例えば、開発された標準的ウイルス精製手順を使用して精製される。

【０６３４】

１つの実施例では、ＧＦＰ発現プラスミドの一本鎖環状ＤＮＡを、Ｒｉｎｇ２　ＨＩＳ－ＯＲＦ１の溶液に添加して、得られたサンプルを、５０ｍＭのＴｒｉｓ　ｐＨ８緩衝液中の０．１％のＳＤＳで３７Ｃにて３０分間処理する。得られた溶液を、ヘパリンカラムを使用して更に精製し、増加するＮａｃｌ濃度の勾配を使用して、ウイルスベクターをカラムから溶出させる。細胞株ＥＫＶＸ及びＨＥＫ２９３を形質導入し、蛍光顕微鏡によって細胞株の少なくとも１つにおけるＧＦＰ産生を観察することによって、ウイルスベクターの統合性をテストし、ウイルスベクターを形成するための核酸カーゴのＯＲＦ１タンパク質によるキャプシド化を実証する。

【０６３５】

実施例９：合成アネロベクター構築物の調製

この実施例は、合成アネロベクター構築物のインビトロ産生を実証する。

【０６３６】

ＥｃｏＲＶ制限酵素部位同士のＴＴＭｉｎｉＶ（Ｅｕｒ　Ｒｅｓｐｉｒ　Ｊ．２０１３　Ａｕｇ；４２（２）：４７０－９）のＬＹ１及びＬＹ２株由来のＤＮＡ配列をカナマイシンベクター（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）にクローニングした。ＴＴＭｉｎｉＶのＬＹ１及びＬＹ２株由来のＤＮＡ配列に基づく得られた遺伝子エレメント構築物は、実施例６及び７において、それぞれアネロベクター１（アネロ１）及びアネロベクター２（アネロ２）と呼ばれる。クローニングした構築物を１０－βコンピテント大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）に形質転換した（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｉｎｃ．）後、プラスミド精製（Ｑｉａｇｅｎ）を製造者のプロトコルに従って実施する。

【０６３７】

ＤＮＡ構築物（図１３及び図１４）をＥｃｏＲＶ制限消化（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｉｎｃ．）により３７℃で６時間線形化して、ＴＴＭｉｎｉＶゲノムを含む二本鎖線状ＤＮＡ断片を取得し、細菌骨格エレメント（例えば、複製起点及び選択マーカーなど）を排除した。続いて、アガロースゲル電気泳動、ＴＴＭｉｎｉＶゲノム断片について正しいサイズのＤＮＡバンド（２．９キロ塩基対）の切除の後、ゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）を用い、製造者のプロトコルに従って、切除したアガロースバンドからのＤＮＡのゲル精製を実施した。

【０６３８】

一部の実施形態では、ＤＮＡ構築物が、１つ又は複数のバキュロウイルス（ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ）エレメントを含むことができる状態で、この実施形態に従う方法を実施することができる。一部の実施形態では、ＤＮＡ構築物は、例えば、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）へのトランスフェクションに、例えば、本明細書に記載されるアネロベクター

の産生に好適なバクミドであり得る。

【０６３９】

実施例１０：アネロベクターのアセンブリ及び感染

この実施例は、実施例５に記載する通り、合成ＤＮＡ配列を用いた感染性アネロベクターのインビトロ産生の達成を実証する。

【０６４０】

二本鎖線形化ゲル精製アネロウイルスゲノムＤＮＡ（実施例５で取得）を、脂質トランスフェクション試薬（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞（ヒト胎児腎細胞株）又はＡ５４９細胞（ヒト肺癌細胞株）のいずれかに、インタクトプラスミド又は線形化形態のいずれかでトランスフェクトした。６ｕｇのプラスミド又は１．５ｕｇの線形化アネロウイルスゲノムＤＮＡをＴ２５フラスコ内での７０％密集細胞のトランスフェクションのために使用した。アネロベクターに含まれるウイルス配列が欠失した空ベクター骨格を陰性対照として用いた。トランスフェクションから６時間後、細胞をＰＢＳで２回洗浄し、３７℃及び５％二酸化炭素の新鮮な増殖培地中で増殖させた。ヒトＥｆ１αプロモータ、続いてＹＦＰ遺伝子をコード化するＤＮＡ配列をＩＤＴから合成した。このＤＮＡ配列をクローニングベクター（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中に平滑末端連結した。得られたベクターを対照として用いて、トランスフェクション効率を評価した。トランスフェクションから７２時間後に、細胞イメージングシステム（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、ＹＦＰを検出した。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞及びＡ５４９細胞のトランスフェクション効率は、それぞれ８５％及び４０％として算出された（図１５）。一部の実施形態では、アネロベクターは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムＤＮＡをバクミド骨格中に挿入し、得られたバクミドを昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）中に導入することによって、代替的に作製することができる。更なる実施形態では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムＤＮＡを、例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ分子（例えば、ＯＲＦ１分子）、又はその機能性断片をコード化する１つ又は複数の配列を含むバクミドを含む昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）中に導入することができる。

【０６４１】

アネロベクターでトランスフェクトした２９３Ｔ及びＡ５４９細胞の上清をトランスフェクションから９６時間後に採取した。採取した上清を４℃にて１０分間２０００ｒｐｍでスピンすることにより、細胞残屑を全て除去した。採取した上清の各々を用いて、２４ウェルプレートのウェル内で７０％密集であった新しい２９３Ｔ及びＡ５４９細胞にそれぞれ感染させた。３７℃及び５％二酸化炭素で２４時間のインキュベーション後に上清を洗い流してから、ＰＢＳで２回洗浄し、新鮮な増殖培地に取り替えた。３７℃及び５％二酸化炭素でさらに４８時間これらの細胞をインキュベートした後、ゲノムＤＮＡ抽出のために細胞を個別に採取した。ゲノムＤＮＡ抽出キット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、製造者のプロトコルに従い、サンプルの各々からゲノムＤＮＡを採取した。

【０６４２】

インビトロで産生されたアネロベクターによる２９３Ｔ及びＡ５４９細胞の感染の達成を確認するために、本明細書に記載の通りに採取した１００ｎｇのゲノムＤＮＡを使用して、ベータトルクウイルスに特異的なプライマー又はＬＹ２特異的配列を用いた定量ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＰＣＲ）を実施した。ＳＹＢＲグリーン試薬（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、製造者のプロトコルに従い、ｑＰＣＲを実施した。ＧＡＰＤＨのゲノムＤＮＡ配列に特異的なプライマーのｑＰＣＲを正規化に使用した。使用した全てのプライマーの配列を表４２に挙げる。

【０６４３】

【表６９】

表 42:

	プライマー配列(5' > 3')	
標的	フォワード	リバース
ベータトルクウイルス (Betatorqueviruses)	ATTCGAATGGCTGAGTTTATGC (配列番号 690)	CCTTGACTACGGTGGTTTCAC (配列番号 693)
LY2 TTMiniV 株	CACGAATTAGCCAAGACTGGGCAC (配列番号 691)	TGCAGGCATTCGAGGGCTTGTT (配列番号 694)
GAPDH	GCTCCCACTCCTGATTTCTG（配列番号 692)	TTTAACCCCCTAGTCCCAGG (配列番号 695)

【０６４４】
図１６Ａ、１６Ｂ、１７Ａ、及び１７Ｂで描かれるｑＰＣＲの結果で示されるように、インビトロで産生され、この実施例に記載されるアネロベクターは、感染性であった。
【０６４５】
実施例１１：アネロベクターの選択性
この実施例は、インビトロで産生された合成アネロベクターが、様々な組織に由来する細胞株に感染する能力を実証する。
【０６４６】
感染性ＴＴＭｉｎｉＶアネロベクター（実施例５に記載する）を含む上清を、２４ウェルプレートのウェル内の７０％密集２９３Ｔ、Ａ５４９、Ｊｕｒｋａｔ（急性Ｔ細胞性白血病細胞株）、Ｒａｊｉ（バーキットリンパ腫Ｂ細胞株）、及びＣｈａｎｇ細胞株と一緒に、３７℃及び５％二酸化炭素でインキュベートした。感染から２４時間後に細胞をＰＢＳで２回洗浄してから、新鮮な増殖培地に取り替えた。次に、３７℃及び５％二酸化炭素でさらに４８時間細胞を再度インキュベートした後、ゲノムＤＮＡ抽出のために採取した。ゲノムＤＮＡ抽出キット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、製造者のプロトコルに従い、サンプルの各々からのゲノムＤＮＡを採取した。
【０６４７】
先の実施例で産生されたアネロベクターによるこれらの細胞株の感染の達成を確認するために、本明細書に記載の通りに採取した１００ｎｇのゲノムＤＮＡを使用して、ベータトルクウイルスに特異的なプライマー又はＬＹ２特異的配列を用いた定量ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＰＣＲ）を実施した。ＳＹＢＲグリーン試薬（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、製造者のプロトコルに従い、ｑＰＣＲを実施した。ＧＡＰＤＨのゲノムＤＮＡ配列に特異的なプライマーのｑＰＣＲを正規化に使用した。使用した全てのプライマーの配列を表４２に挙げる。
【０６４８】
図１６Ａ～２０Ｂに描くように、インビトロで産生されたアネロベクターは、感染性であるだけでなく、上皮細胞、肺組織細胞、肝細胞、癌細胞、リンパ球、リンパ芽球、Ｔ細胞、Ｂ細胞、及び腎細胞の例を含め、多様な細胞株に感染することができた。また、合成アネロベクターは、ＨｅｐＧ２細胞（肝細胞株）に感染することができ、それにより、対照に比して１００倍超の増加が起こったことも観察された。
【０６４９】
或いは、この実施例の方法は、例えば、本明細書に記載されるような、バクミド／昆虫細胞系を使用して産生されたアネロベクターを用いて実施することができる。
【０６５０】
実施例１２：複製欠損アネロベクター及びヘルパーウイルス
アネロベクターの複製及びパッケージングのために、いくつかのエレメントをｔｒａｎ

ｓで提供することができる。これらは、ＤＮＡ複製又はパッケージングを指令若しくは支持するタンパク質又はノンコーディングＲＮＡを含む。ｔｒａｎｓエレメントは、一部の事例において、バクミド、ヘルパーウイルス、プラスミドなどのアネロベクターに代わる供給源、又は細胞ゲノムから供給することができる。一部の実施形態では、エレメントは、別の構築物において（例えば、別のバクミドにおいて）ｔｒａｎｓで提供される。一部の実施形態では、ｔｒａｎｓエレメント及び遺伝子エレメントは、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）中に含まれる。

【０６５１】

他のエレメントは、典型的に、ｃｉｓで提供される。これらのエレメントは、例えば、複製起点として作用するアネロベクターＤＮＡ（例えば、アネロベクターＤＮＡの増幅を可能にするために）又はパッケージングシグナル（例えば、タンパク質を結合して、ゲノムをキャプシドにロードするために）内の配列又は構造であってもよい。一般に、複製欠損ウイルス又はアネロベクターは、これらのエレメントの１つ又は複数が欠失しているため、他のエレメントがｔｒａｎｓで提供されても、ＤＮＡは、感染性ビリオン又はアネロベクターにパッケージされることが不可能である。一部の実施形態では、ｃｉｓエレメントは、例えば、本明細書に記載されるような遺伝子エレメント構築物（例えば、バクミド又は非バクミド構築物）中に含まれる。

【０６５２】

複製欠損ウイルスは、例えば、同じ細胞内でのアネロベクター（例えば、複製欠損アネロベクター又はパッケージング欠損アネロベクター）の複製を制御するために、ヘルパーウイルスとして有用となり得る。一部の事例では、ヘルパーウイルスは、シス複製又はパッケージングエレメントを欠失しているが、タンパク質及びノンコーディングＲＮＡなどのトランスエレメントは発現する。一般に、治療用アネロベクターは、これらのトランスエレメントの一部又は全部を欠失しているため、それ自体で複製することはできないが、シスエレメントは保持する。細胞に同時トランスフェクト／感染すると、複製欠損ヘルパーウイルスは、アネロベクターの増幅及びパッケージングを駆動する。そのため、収集されるパッケージ粒子は、治療用アネロベクターだけから構成され、ヘルパーウイルス混入を含まない。

【０６５３】

複製欠損アネロベクターを作製するために、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）のノンコーディング領域内の保存エレメントを除去する。特に、保存５’ＵＴＲ及びＧＣリッチドメインの欠失を個別に、及び一緒に試験する。両エレメントは、ウイルス複製又はパッケージングに重要であると考えられる。加えて、これまで不明であった目的の領域を同定するために、ノンコーディング領域全体にわたって一連の欠失を実施する。

【０６５４】

複製エレメントの欠失が達成されると、例えば、ｑＰＣＲにより測定した場合、細胞内のアネロベクターＤＮＡ増幅の低減が起こるが、例えば、感染細胞に対するアッセイ（ｑＰＣＲ、ウエスタンブロット、蛍光アッセイ、又はルミネセンスアッセイのいずれか若しくは全てを含み得る）によりモニターした場合、一部の感染性アネロベクター産生を支持するであろう。パッケージングエレメントの欠失の達成は、アネロベクターＤＮＡ増幅を崩壊させないため、ｑＰＣＲによって、トランスフェクト細胞にアネロベクターＤＮＡの増加が観察されるであろう。しかし、アネロベクターゲノムは包膜されないため、感染性アネロベクターの産生は観察されないであろう。

【０６５５】

実施例１３：複製可能アネロベクターのための製造工程

この実施例は、複製可能アネロベクターの回収及びその産生のスケール拡大方法を説明する。アネロベクターは、細胞内で複製するのに必要な全ての遺伝子エレメント及びＯＲＦをそのゲノムにコード化するとき、複製可能である。これらのアネロベクターは、その複製に欠損がないため、ｔｒａｎｓで提供される補完活性を必要としない。しかしながら、これらは、転写のエンハンサー（例えば、酪酸ナトリウム）又はウイルス転写因子（例

えば、アデノウイルスＥ１、Ｅ２、Ｅ４、ＶＡ；ＨＳＶ　Ｖｐ１６及び前初期タンパク質）などのヘルパー活性を必要とし得る。一部の実施形態では、複製可能アネロベクターは、例えば、本明細書に記載されるようなバクミドを使用して、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）中で産生される。

【０６５６】

この実施例では、線状又は環状いずれかの形態の合成アネロベクターの完全長配列をコード化する二本鎖ＤＮＡを、Ｔ７５フラスコ内の５Ｅ＋０５接着哺乳動物細胞に化学トランスフェクションにより、又は懸濁液中の５Ｅ＋０５細胞にエレクトロポレーションにより導入する。最適時間後（例えば、トランスフェクションから３～７日後）に、細胞を上清培地中に掻き入れることにより、細胞及び上清を収集する。胆汁酸塩などの中性洗剤を最終濃度０．５％まで添加した後、３７℃で３０分間インキュベートする。塩化カルシウム及びマグネシウムをそれぞれ最終濃度０．５ｍＭ及び２．５ｍＭまで添加する。エンドヌクレアーゼ（例えば、ＤＮＡｓｅ　Ｉ、ベンゾナーゼ）を添加し、２５～３７℃で０．５～４時間インキュベートする。アネロベクター懸濁液を１０００×ｇで、４℃にて１０分間遠心分離する。清澄化した上清を新しいチューブに移し、凍結防止バッファー（安定化バッファーとしても知られる）で１：１希釈した後、必要に応じて－８０℃で保存する。これは、継代０のアネロベクター（Ｐ０）を産生する。洗剤の濃度を培養細胞に用いられる安全限界未満にするために、この接種材料をアネロベクター力価に応じて、無血清培地（ＳＦＭ）中で少なくとも１００倍以上に希釈する。

【０６５７】

Ｔ２２５フラスコ内の新鮮な単層の哺乳動物細胞を、培養物表面を被覆するのに十分な最少量で覆い、穏やかに揺らしながら、３７℃及び５％二酸化炭素で９０分間インキュベートする。このステップに用いる哺乳動物細胞は、Ｐ０回収に用いたものと同じ細胞型であってもよいし、そうでなくてもよい。このインキュベーション後、接種材料を４０ｍｌの無血清、非動物由来培地に取り替えた。細胞を３７℃及び５％二酸化炭素で３～７日間インキュベートする。先に使用したのと同じ中性洗剤の４ｍｌの１０×溶液を添加して、最終洗剤濃度０．５％を達成してから、混合物を穏やかに攪拌しながら、３７℃で３０分間インキュベートする。エンドヌクレアーゼを添加し、２５～３７℃で０．５～４時間インキュベートする。次に、培地を収集し、１０００×ｇで、４℃にて１０分間遠心分離する。清澄化した上清を４０ｍｌの安定化バッファーと混合した後、－８０℃で保存する。これは、シードストック、又は継代１のアネロベクター（Ｐ１）を産生する。

【０６５８】

ストックの力価に応じて、これをＳＦＭ中で１００倍以下に希釈してから、必要なサイズの多層フラスコで増殖させた細胞に添加する。感染多重度（ＭＯＩ）及びインキュベーション時間を、より小さなスケールで最適化して、最大アネロベクター産生を確実にする。採取した後、必要に応じて、アネロベクターを精製及び濃縮してもよい。例えば、本実施例に記載するようなワークフローを示す概略図を図２１に提供する。

【０６５９】

実施例１４：複製欠損アネロベクターの製造方法

この実施例は、複製欠損アネロベクターの回収及び産生スケール拡大方法を説明する。

【０６６０】

複製に関与する１つ又は複数のＯＲＦ（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ１／１、ＯＲＦ１／２、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、及び／又はＯＲＦ２ｔ／３）の欠失により、アネロベクターを複製欠損にすることができる。複製欠損アネロベクターは、補完細胞株において増殖させることができる。このような細胞株はアネロベクター増殖を促進するが、アネロベクターのゲノム内では存在しないか、又は非機能性である構成体を構成的に発現する。一部の実施形態では、複製欠損アネロベクターは、例えば、本明細書に記載されるようなバクミドを含む昆虫細胞株（例えば、Ｓｆ９細胞）中で増殖される。

【０６６１】

一例では、アネロベクター増殖に関与する任意のＯＲＦの配列を、選択マーカをコード

化する安定した細胞株の作製に好適なレンチウイルス（ｌｅｎｔｉ　ｖｉｒｕｓ）発現系にクローニングすると、本明細書に記載のようにレンチウイルス（ｌｅｎｔｉ　ｖｉｒｕｓ）ベクターが産生される。アネロベクター増殖を支持することができる哺乳動物細胞株をこのレンチウイルス（ｌｅｎｔｉ　ｖｉｒｕｓ）ベクターで感染させて、選択マーカ（例えば、プロマイシン又は他の抗生物質）による選択圧に付すことによって、クローニングされたＯＲＦを安定に組み込んだ細胞集団を選択する。この細胞株を特性決定して、この細胞株が操作アネロベクターの欠損を補完し、従って、こうしたアネロベクターの成長及び増殖を支持することが証明されたら、これを拡大し、凍結保存で保管する。これらの細胞の拡大及び維持の間、選択圧を維持するために、選択抗生物質を培地に添加する。アネロベクターがこれらの細胞に導入されたら、選択抗生物質の添加を停止してもよい。

【０６６２】

この細胞株が樹立されたら、例えば、実施例１５に記載のように、複製欠損アネロベクターの増殖及び産生を実施する。

【０６６３】

実施例１５：懸濁細胞を用いたアネロベクターの産生

この実施例は、懸濁液中の細胞におけるアネロベクターの産生を説明する。

【０６６４】

この実施例では、懸濁液条件下で増殖するように改変されたＡ５４９又は２９３Ｔプロデューサ細胞を、３７℃及び５％二酸化炭素のＷＡＶＥバイオリアクターバッグ内の動物性成分及び抗生物質無添加の懸濁培地（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中で増殖させる。これらの細胞は、１×１０^{6}生存細胞／ｍＬで接種され、アネロベクター配列を含むプラスミド、さらには、アネロベクターをパッケージするのに好適又は必要な任意の補完プラスミドと一緒に（例えば、実施例１６に記載の通り、複製欠損アネロベクターの場合）、現在の適正製造基準（ｃＧＭＰ）に従い、リポフェクタミン２０００（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いてトランスフェクトする。補完プラスミドは、一部の事例において、アネロベクターゲノム（例えば、ウイルスゲノム、例えば、本明細書に記載のように、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムに基づくアネロベクターゲノム）から欠失されているが、アネロベクターの複製及びパッケージングに有用又は必要なウイルスタンパク質をコード化することができる。トランスフェクト細胞をＷＡＶＥバイオリアクターバッグ内で増殖させた後、上清を下記の時点：トランスフェクションから４８、７２、及び９６時間後に採取する。遠心分離を用いて、各サンプルの細胞ペレットから上清を分離する。次に、採取した上清及び溶解細胞ペレットから、イオン交換クロマトグラフィーを用いて、パッケージアネロベクター粒子を精製する。

【０６６５】

例えば、精製調製物の少量アリコートを用いて、ウイルスゲノム抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）によりアネロベクターゲノムを採取した後、例えば、実施例１８に記載の通り、アネロベクターＤＮＡ配列に対してターゲティングさせるプライマー及びプローブを用いたｑＰＣＲを実施することにより、アネロベクターの精製調製物中のゲノム当量を決定することができる。

【０６６６】

精製調製物中のアネロベクターの感染力は、新しいＡ５４９細胞に感染する精製調製物の階段希釈物を調製することにより、定量することができる。トランスフェクションから７２時間後にこれらの細胞を採取し、アネロベクターＤＮＡ配列に特異的なプライマー及びプローブを用いて、ゲノムＤＮＡに関するｑＰＣＲアッセイを実施する。

【０６６７】

一部の実施形態では、アネロベクターは、懸濁液中で、例えば、本明細書に記載されるようなバクミドを含む昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）中で産生される。

【０６６８】

実施例１６：マウスにおいて外性タンパク質を発現させるためのアネロベクターの使用

この実施例は、マウスにおいてホタルルシフェラーゼタンパク質を発現するように、トルク・テノミニウイルス（Ｔｏｒｑｕｅ　Ｔｅｎｏ　Ｍｉｎｉ　Ｖｉｒｕｓ）（ＴＴＭＶ）が操作されているアネロベクターの使用を説明する。

【０６６９】

ホタルルシフェラーゼ遺伝子をコード化する操作ＴＴＭＶのＤＮＡ配列をコード化するプラスミドを化学トランスフェクションによりＡ５４９細胞（ヒト肺癌細胞株）に導入する。１８ｕｇのプラスミドＤＮＡを１０ｃｍ組織培養プレート内の７０％密集細胞のトランスフェクションに使用する。ＴＴＭＶ配列が欠失した空ベクター骨格を陰性対照として用いた。トランスフェクションから５時間後、細胞をＰＢＳで２回洗浄してから、３７℃及び５％二酸化炭素の新鮮な増殖培地中で増殖させた。

【０６７０】

トランスフェクションから９６時間後、トランスフェクトＡ５４９細胞をその上清と一緒に採取する。採取した材料を０．５％デオキシコール酸塩（重量／体積）で３７℃にて１時間処理した後、エンドヌクレアーゼ処理を実施する。イオン交換クロマトグラフィーを用いて、この溶解物からアネロベクター粒子を精製する。アネロベクター濃度を決定するために、アネロベクターストックのサンプルをウイルスＤＮＡ精製キットに通過させ、アネロベクターＤＮＡ配列に向けてターゲティングされたプライマー及びプローブを用いて、ｍｌ当たりのゲノム当量をｑＰＣＲにより測定する。

【０６７１】

１×リン酸緩衝食塩水中のアネロベクターのゲノム当量の用量範囲を８～１０週齢のマウスに様々な注射経路で（例えば、静脈内、腹腔内、皮内、筋肉内）実施する。注射から３、７、１０及び１５日後、各動物について背側及び腹側バイオルミネセンスイメージングを実施する。イメージングは、製造者のプロトコルに従って、指示時点に各動物にルシフェラーゼ基質（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ）を腹腔内添加した後、生体内イメージングすることにより実施する。

【０６７２】

一部の実施形態では、アネロベクターは、例えば、本明細書に記載されるようなバクミド及び昆虫細胞を使用して産生される。

【０６７３】

実施例１７：外性ｍｉｃｒｏＲＮＡ配列を発現するアネロベクターの機能効果

この実施例は、ネイティブプロモータを用いた、アネロベクターゲノムからの外性ｍｉＲＮＡ（ｍｉＲ－６２５）の発現の達成を実証する。

【０６７４】

５００ｎｇの下記プラスミドＤＮＡを２４ウェルプレート内のＨＥＫ２９３Ｔ細胞の６０％密集ウェルにトランスフェクトした：

ｉ）空のプラスミドバックボーン

ｉｉ）内在性ｍｉＲＮＡがノックアウト（ＫＯ）されたＴＴＶ－ｔｔｈ８ゲノムを含有するプラスミド

ｉｉｉ）内在性ｍｉＲＮＡが非ターゲティングスクランブルｍｉＲＮＡで置換されているＴＴＶ－ｔｔｈ８

ｉｖ）内在性ｍｉＲＮＡが、ｍｉＲ－６２５をコード化するｍｉＲＮＡで置換されているＴＴＶ－ｔｔｈ８

【０６７５】

トランスフェクションから７２時間後、Ｑｉａｇｅｎ　ｍｉＲＮｅａｓｙキットを用いて、トランスフェクトした細胞から全ｍｉＲＮＡを回収した後、ｍｉＲＮＡ　Ｓｃｒｉｐｔ　ＲＴ　ＩＩキットを用いて、逆転写を行った。ｍｉＲ－６２５又はＲＮＵ６低分子ＲＮＡを特異的に検出するプライマーを用いて、逆転写ＤＮＡについて定量ＰＣＲを実施した。ＲＮＵ６低分子ＲＮＡをハウスキーピング遺伝子として使用し、空のベクターに対する倍率変化としてデータを図２２にプロットする。図２２に示すように、ｍｉＲ－６２５アネロベクターは、ｍｉＲ－６２５発現に約１００倍の増大をもたらしたが、空のベクタ

ー、ｍｉＲＮＡノックアウト（ＫＯ）、及びスクランブルｍｉＲの場合、シグナルは検出されなかった。

【０６７６】

一部の実施形態では、代わりに、細胞は、例えば、本明細書に記載されるようなバクミド及び昆虫細胞を使用して産生されたアネロベクターで感染させることができる。

【０６７７】

実施例１８：外性ノンコーディングＲＮＡを発現するためのアネロベクターの調製及び産生

この実施例は、外性低分子ノンコーディングＲＮＡを発現するためのアネロベクターの合成及び産生を説明する。

【０６７８】

ＴＴＶのｔｔｈ８株からのＤＮＡ配列（Ｊｅｌｃｉｃ ｅｔ ａｌ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，２００４）を合成し、細菌の複製起点と細菌の抗生物質耐性遺伝子を含むベクターにクローニングする。このベクターでは、ＴＴＶ ｍｉＲＮＡヘアピンをコード化するＤＮＡ配列は、ｍｉＲＮＡ又はｓｈＲＮＡなどの外性低分子ノンコーディングＲＮＡをコード化するＤＮＡ配列により置換される。次に、操作構築物をエレクトロコンピテント細菌に形質転換した後、製造者のプロトコルに従い、プラスミド精製キットを用いてプラスミド単離を実施する。一部の実施形態では、ベクターは、例えば、本明細書に記載されるようなバクミド又はドナーベクターである。

【０６７９】

外性低分子ノンコーディングＲＮＡをコード化するアネロベクターＤＮＡを真核プロデューサ細胞株（例えば、昆虫細胞）にトランスフェクトして、アネロベクター粒子を産生させる。トランスフェクション後の様々な時点で、アネロベクター粒子を含有するトランスフェクト細胞の上清を採取する。濾過した上清からのアネロベクター粒子又は精製後のアネロベクター粒子のいずれかを、例えば、本明細書に記載のように下流適用のために使用する。

【０６８０】

実施例１９：内在性ｍｉＲＮＡのアネロベクターからの発現及び内在性ｍｉＲＮＡの欠失

１つの実施例では、修飾ＴＴＶ－ｔｔｈ８株ゲノム（実施例２７に記載されるように、ＧＣリッチ領域中の欠失でＴＴＶ－ｔｔｈ８株ゲノムを修飾した）を含むアネロベクターを用いて、培養中のＲａｊｉ Ｂ細胞を感染させた。これらのアネロベクターは、ＴＴＶ－ｔｔｈ８アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）の内在性ペイロードをコード化する配列（ｎ－ｍｙｃ相互作用タンパク質（ＮＭＩ）をコード化するｍＲＮＡをターゲティングするｍｉＲＮＡである）を含み、これらは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムを含むプラスミドを宿主細胞内に導入することによって産生された。ＮＭＩは、ＪＡＫ／ＳＴＡＴ経路の下流で作動して、インターフェロン刺激遺伝子、増殖及び成長遺伝子、並びに炎症反応の媒介物質をはじめとする多様な細胞内シグナルの転写を調節する。図２３に示すように、標的Ｒａｊｉ Ｂ細胞中にウイルスゲノムが検出された。対照細胞と比較して、標的Ｒａｊｉ Ｂ細胞中にＮＭＩのノックダウンの達成が観察された（図２４）。ＮＭＩに対するｍｉＲＮＡを含むアネロベクターは、対照細胞と比較して、ＮＭＩタンパク質レベルの７５％超の低下を誘導した。この実施例は、ネイティブアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ｍｉＲＮＡを含むアネロベクターが、宿主細胞中の標的分子をノックダウンすることができることを実証する。

【０６８１】

別の実施例では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）に基づくアネロベクターの内在性ｍｉＲＮＡを欠失させた。次に、得られたアネロベクター（ΔｍｉＲ）を宿主細胞と一緒にインキュベートした。続いて、アネロベクター遺伝子エレメントのゲノム等量を、内在性ｍｉＲＮＡが保持された対応するアネロベクターと比較した。図２５に示すように、内在性ｍｉＲＮＡが欠失したアネロベクターゲノムは、内在性ｍｉＲＮＡが依然として存在するアネロベクターに認められるものと同等のレベルで細胞中に検出された。こ

の実施例は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）に基づくアネロベクターの内在性ｍｉＲＮＡを突然変異させる、又は完全に欠失させても、アネロベクターゲノムが、依然として標的細胞中に検出され得ることを実証する。

【０６８２】

一部の実施形態では、代わりに、細胞を、例えば、本明細書に記載されるようなバクミド及び昆虫細胞を使用して産生されたアネロベクターで感染させることができる。

【０６８３】

実施例２０：インビボでの外性タンパク質のアネロベクター送達

この実施例は、投与後のアネロベクターのインビボでのエフェクター機能（例えば、タンパク質の発現）を実証する。

【０６８４】

ナノ－ルシフェラーゼ（ｎＬｕｃ）をコード化するトランスジーンを含むアネロベクター（図２６Ａ～２６Ｂ）を調製した。手短には、ＴＴＭＶ－ＬＹ２ノンコーディング領域とｎＬｕｃ発現カセットを保有する二本鎖ＤＮＡプラスミドを、ｔｒａｎｓ複製及びパッケージング因子として働く全ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムをコード化する二本鎖ＤＮＡプラスミドと一緒にＨＥＫ２９３Ｔ細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション後、細胞をインキュベートして、アネロベクター産生を可能にし、アネロベクター材料を回収して、ヌクレアーゼ処理、限外濾過／透析濾過、及び滅菌濾過により濃縮した。「非ウイルス」陰性対照として用いるために、さらに別のＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、ｎＬｕｃ発現カセット及びＴＴＭＶ－ＬＹ２　ＯＲＦトランスフェクションカセットを保有するが、複製及びパッケージング必須のノンコーディングドメインを欠失した非複製ＤＮＡでトランスフェクトした。アネロベクター材料と同じプロトコルに従って、非ウイルスサンプルを調製した。

【０６８５】

アネロベクター調製物を３匹の健康なマウスのコホートに筋肉内投与し、９日の期間にわたってＩＶＩＳ　Ｌｕｍｉｎａ　ｉｍａｇｉｎｇ（Ｂｒｕｋｅｒ）によりモニターした（図２７Ａ）。非ウイルス対照として、別の３匹のマウスに非複製調製物を投与した（図２７Ｂ）。２５μＬのアネロベクター又は非ウイルス調製物の注射は、第０日に左後脚に投与し、第４日に右後脚に再投与した（図２７Ａ及び２７Ｂの矢印を参照）。ＩＶＩＳイメージングの９日後、非ウイルス調製物（図２７Ｂ）と比較して、アネロベクター調製物を注射したマウス（図２７Ａ）に、より多くのｎＬｕｃ発光シグナル発生が観察されたが、これは、インビボアネロベクター形質導入後のトランス遺伝子発現と一致する。

【０６８６】

一部の実施形態では、代わりに、マウスに、例えば、本明細書に記載されるようなバクミド及び昆虫細胞を使用して産生されたアネロベクターを投与することができる。

【０６８７】

実施例２１：インビトロ環状化アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム

この実施例は、最小非ウイルスＤＮＡと共に、環状二本鎖環状アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムＤＮＡを含む構築物を説明する。これらの環状ウイルスゲノムは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）複製中に見出される二本鎖ＤＮＡ中間体と、より高度に一致する。細胞に導入したら、最小非ウイルスＤＮＡを含むこのような環状の二本鎖アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムＤＮＡをローリングサークル複製に付して、例えば、本明細書に記載される遺伝子エレメントを産生することができる。

【０６８８】

１つの実施例では、ＴＴＶ－ｔｔｈ８変異体及びＴＴＭＶ－ＬＹ２を保有するプラスミドを、ゲノムＤＮＡとフランキングする部位を認識する制限エンドヌクレアーゼで消化した。次に、得られた線状化ゲノムを連結して、環状ＤＮＡを形成した。これらの連結反応は、分子内連結を最適化するために、様々なＤＮＡ濃度を用いて実施した。連結した環は、哺乳動物細胞に直接トランスフェクトとするか、又はプラスミドバックボーンを切断す

るために制限エンドヌクレアーゼで、また線状ＤＮＡを分解するためにエキソヌクレアーゼで消化することによりさらに処理して、非環状ゲノムＤＮＡを除去した。ＴＴＶ－ｔｔｈ８の場合、ＸｍａＩエンドヌクレアーゼを用いて、ＤＮＡを線状化し；連結した環は、ＧＣリッチ領域と５’ノンコーディング領域との間に５３ｂｐの非ウイルスＤＮＡを含有した。ＴＴＭＶ－ＬＹ２の場合、ＩＩＳ型制限酵素Ｅｓｐ３１を使用し、非ウイルスＤＮＡを含まないウイルスゲノムＤＮＡ環を取得した。このプロトコルは、以前公開されたＴＴＶ－ｔｔｈ８の環状化（Ｋｉｎｃａｉｄ ｅｔ ａｌ．，２０１３，ＰＬｏＳ Ｐａｔｈｏｇｅｎｓ ９（１２）：ｅ１００３８１８）から改変した。アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）産生の改善を実証するために、環状化ＴＴＶ－ｔｔｈ８及びＴＴＭＶ－ＬＹ２をＨＥＫ２９３Ｔ細胞にトランスフェクトした。７日のインキュベーション後、細胞を溶解させ、ｑＰＣＲを実施して、環状化アネロウイルスとプラスミドに基づくアネロウイルスの間でアネロウイルスゲノムのレベルを比較した。アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムのレベル増加は、ウイルスＤＮＡの環状化が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）産生を増加する上で有用な戦略であることを示している。

【０６８９】

別の実施例では、ＴＴＭＶ－ＬＹ２プラスミド（ｐＶＬ４６－２４０）及びＴＴＭＶ－ＬＹ２－ｎＬｕｃをそれぞれ、Ｅｓ３Ｉ又はＥｃｏＲＶ－ＨＦで線状化した。消化したプラスミドを１％アガロースゲルで精製した後、電気泳動溶出又はＱｉａｇｅｎカラム精製及びＴ４ ＤＮＡリガーゼを用いた連結に付した。環状化ＤＮＡを１００ｋＤａ ＵＦ／ＤＦ膜で濃縮した後、トランスフェクションを実施した。図２８Ａに示すように、環状化をゲル電気泳動により確認した。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ ２０００によるリポフェクションの１日前に、Ｔ－２２５フラスコを３×１０^{4}細胞／ｃｍ^{2}のＨＥＫ２９３Ｔで接種した。フラスコ接種から１日後に、９マイクログラムの環状化ＴＴＭＶ－ＬＹ２ ＤＮＡ及び５０μｇの環状化ＴＴＭＶ－ＬＹ２－ｎＬｕｃを共トランスフェクトした。比較として、追加のＴ－２２５フラスコを５０μｇの線状化ＴＴＭＶ－ＬＹ２及び５０μｇの線状化ＴＴＭＶ－ＬＹ２－ｎＬｕｃで共トランスフェクトした。

【０６９０】

アネロベクター産生は、Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００ハーベストバッファー中で細胞回収前の８日間実施した。一般に、アネロベクターは、例えば、宿主細胞の溶解、溶解物の清浄化、濾過、及びクロマトグラフィーによって濃縮することができる。この実施例では、回収した細胞をヌクレアーゼで処理した後、塩化ナトリウム調節、続いて１．２μｍ／０．４５μｍ正常流濾過を実施した。清浄化した回収物を濃縮し、７５０ｋＤａ ＭＷＣＯｍＰＥＳ中空糸膜上でＰＢＳ中にバッファー交換した。ＴＦＦ保持液を０．４５μｍフィルターで濾過した後、ＰＢＳ中で予め平衡させたＳｅｐｈａｃｒｙｌ Ｓ－５００ ＨＲＳＥＣカラムにロードした。アネロベクターを３０ｃｍ／ｈｒでＳＥＣカラムを介して処理した。個々の画分を収集し、図２８Ｂに示すように、ウイルスゲノムコピー数及びトランスジーンコピー数についてｑＰＣＲにより検定した。ウイルスゲノム及びトランスジーンコピーは、ＳＥＣクロマトグラムの空隙容積、画分７から開始して観測した。残留プラスミドピークを画分１５で観測した。ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノム及びＴＴＭＶ－ＬＹ２－ｎＬｕｃトランスジーンのコピー数は、画分７～画分１０で、環状化インプットＤＮＡを用いて産生されたアネロベクターについて十分に一致しており、これは、ｎＬｕｃトランスジーンを含有するパッケージ済アネロベクターを示す。ＳＥＣ画分をプールし、１００ｋＤａ ＭＷＣＯ ＰＶＤＦ膜を用いて濃縮してから、０．２μｍで濾過した後、インビボ投与した。

【０６９１】

インプットアネロベクターＤＮＡの環状化によって、線状化アネロベクターＤＮＡと比較して、精製工程全体を通して、ヌクレアーゼ保護ゲノムの３倍の回収率増加が達成され、これは、表４６に示されるように、環状化インプットアネロベクターＤＮＡを用いた製造効率の改善を示している。

【０６９２】

一部の実施形態では、ＩＶＣアネロベクターゲノムを昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）中に導入し、例えば、本明細書に記載されるように、バクミドから発現されたタンパク質性外層タンパク質内に閉じ込めることができる。

【０６９３】

【表７０】

表 46. 精製工程収率

ステップ	線状化 TTMV-LY2		環状化 TTMV-LY2	
	総ウイルスゲノムコピー	総 nLuc トランスジーンゲノムコピー	総ウイルスゲノムコピー	総 nLuc トランスジーンゲノムコピー
ヌクレアーゼ前の回収物	2.78E+12	2.17E+12	1.04E+11	4.39E+11
清浄化した回収物	9.96E+09	5.48E+09	6.55E+08	9.81E+08
TFF	1.01E+10	7.66E+09	2.58E+08	3.56E+08
SEC	3.18E+07	8.73E+06	9.16E+06	7.75E+06
UF/DF	8.82E+06	3.25E+06	1.78E+06	2.73E+06
滅菌濾過	5.60E+06	2.64E+06	8.66E+05	1.63E+06
精製工程収率 (%)	0.0002%	0.0001%	0.0006%	0.0004%

【０６９４】

実施例２２：異なるトルクテノウイルス（Ｔｏｒｑｕｅ　ｔｅｎｏ　ｖｉｒｕｓ）株由来の超可変ドメインを含むキメラＯＲＦ１を含有するアネロベクターの産生

この実施例は、ＯＲＦ１アルギニンリッチ領域、ゼリーロールドメイン、Ｎ２２、及び１つのＴＴＶ株のＣ末端ドメイン、及び異なるＴＴＶ株のＯＲＦ１タンパク質由来の超可変ドメインを含むキメラアネロベクターを産生するための、ＯＲＦ１の超可変領域のドメインスワッピングを説明する。

【０６９５】

ベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）の完全長ゲノムＬＹ２株を哺乳動物細胞での発現用の発現ベクターにクローニングした。このゲノムを変異させて、ＬＹ２の超可変ドメインを除去すると共に、これを遠縁のベータトルクウイルス（Ｂｅｔａｔｏｒｑｕｅｖｉｒｕｓ）の超可変ドメインで置換した（図２８Ｃ）。次に、置換された超可変ドメインを有するＬＹ２ゲノムを含むプラスミド（ｐＴＴＭＶ－ＬＹ２－ＨＶＲａ－ｚ）を、以前公開された方法（Ｋｉｎｃａｉｄ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｐａｔｈｏｇｅｎｓ　２０１３）を用いて、線状化及び環状化した。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を環状化

ゲノムでトランスフェクトし、５～７日間インキュベートして、アネロベクター産生を可能にした。インキュベーション期間後、アネロベクターを上清及びトランスフェクト細胞の細胞ペレットから勾配超遠心法により精製した。

【０６９６】

キメラアネロベクターが依然として感染性であるか否かを決定するために、単離したウイルス粒子を、感染していない細胞に添加した。細胞を５～７日間インキュベートして、ウイルス複製を可能にした。インキュベーション後、免疫蛍光、ウエスタンブロット、及びｑＰＣＲによって、キメラアネロベクターが感染を定着させる能力をモニターする。キメラウイルスの構造完全性は、陰性株及び低温電子顕微鏡により評価する。細胞にインビボで感染する能力について、キメラアネロベクターをさらに試験することができる。超可変ドメインのスワッピングにより機能性キメラアネロベクターを産生する能力が証明されれば、指向性を改変して、免疫検出を回避することが可能なウイルスの操作を達成することができる。

【０６９７】

一部の実施形態では、キメラアネロベクター及び／又はキメラＯＲＦ１は、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）中に導入され、例えば、本明細書に記載されるようなバクミドから発現されたタンパク質性外層タンパク質内に閉じ込めることができる。

【０６９８】

実施例２３：超可変ドメインの代わりに非ＴＴＶタンパク質／ペプチドを含有するキメラＯＲＦ１の産生

この実施例は、１つのＴＴＶ株のアルギニンリッチ領域、ゼリーロールドメイン、Ｎ２２、及びＣ末端ドメインと、超可変ドメインの代わりに非ＴＴＶタンパク質／ペプチドと、を含有するキメラＯＲＦ１タンパク質を産生するための、目的の他のタンパク質又はペプチドを含むＯＲＦ１の超可変ドメインの置換を説明する。

【０６９９】

実施例Ｂに示す通り、ＬＹ２の超可変ドメインをゲノムから欠失させ、目的のタンパク質又はペプチドをこの領域に挿入することができる（図２８Ｄ）。この領域に導入することができる配列のタイプの例として、限定されないが、アフィニティタグ、抗体の一本鎖可変領域（ｓｃＦｖ）、及び抗原ペプチドが挙げられる。実施例Ｂに記載のように、プラスミド（ｐＴＴＭＶ－ＬＹ２－ΔＨＶＲ－ＰＯＩ）中の変異ゲノムを線状化及び環状化する。環状化ゲノムをＨＥＫ２９３Ｔ細胞にトランスフェクトし、５～７日間インキュベートする。インキュベーション後、ＰＯＩを含有するキメラアネロベクターを、上清及び細胞ペレットから勾配超遠心法及び／又は必要に応じてアフィニティクロマトグラフィーにより精製する。

【０７００】

様々な技術を用いて、ＰＯＩを含有する機能性キメラアネロベクターを産生する能力を評価する。最初に、精製済ウイルスを非感染細胞に添加して、キメラアネロベクターが、複製し、且つ／又はペイロードをナイーブ細胞に送達することができるか否かを決定する。加えて、電子顕微鏡を用いて、キメラアネロベクターの構造完全性を評価する。インビトロで機能性のキメラアネロベクターの場合、インビボでの複製／ペイロード送達の能力も評価する。

【０７０１】

一部の実施形態では、キメラアネロベクター及び／又はキメラＯＲＦ１は、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）中に導入され、例えば、本明細書に記載されるようなバクミドから発現されたタンパク質性外層タンパク質内に閉じ込めることができる。

【０７０２】

実施例２４：各々が肺癌細胞へのＥＰＯ遺伝子の形質導入を達成したｔｔｈ８及びＬＹ２に基づくアネロベクター

この実施例では、エリスロポイエチン遺伝子（ＥＰＯ）を担持する２つの異なるアネロベクターを用いて、非小細胞肺癌株（ＥＫＶＸ）を形質導入した。アネロベクターは、本

明細書に記載される通り、インビトロ環状化により作製したが、これらは、ＬＹ２又はｔｔｈ８骨格に基づく２つのタイプのアネロベクターを含んだ。ＬＹ２－ＥＰＯ及びｔｔｈ８－ＥＰＯアネロベクターは各々、ＥＰＯコード化カセット及びＬＹ２又はｔｔｈ８ゲノムのノンコーディング領域（５’ＵＴＲ、ＧＣリッチ領域）をそれぞれ含むが、例えば、実施例３９に記載のような、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦは含まない遺伝子エレメントを含んだ。細胞に精製アネロベクター又は陽性対照（高用量又はアネロベクターと同じ用量のＡＡＶ２－ＥＰＯ）を接種した後、７日間インキュベートした。アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦを個別のインビトロ環状化ＤＮＡにｔｒａｎｓで供給した。インキュベーションから３、５．５、及び７日後に培養上清をサンプリングし、市販のＥＬＩＳＡキットを用いて検定し、ＥＰＯを検出した。ＬＹ２－ＥＰＯ及びｔｔｈ８－ＥＰＯアネロベクターのいずれも、良好に細胞に形質導入され、非処理（陰性）対照細胞と比較して、有意に高いＥＰＯ力価を示した（全時点で、Ｐ＜０．０１３）（図２９）。

【０７０３】

一部の実施形態では、代わりに、細胞を、例えば、本明細書に記載されるようなバクミド及び昆虫細胞を使用して産生されたアネロベクターで感染させることができる。

【０７０４】

実施例２５：治療用トランスジーンを含むアネロベクターは、静脈内（ｉ．ｖ．）投与後にインビボで検出することができる

この実施例では、静脈内（ｉ．ｖ．）投与後に、ヒト成長ホルモン（ｈＧＨ）をコード化するアネロベクターをインビボで検出した。ＬＹ２骨格に基づき、且つ外性ｈＧＨをコード化する複製欠損アネロソーム（ＬＹ２－ｈＧＨ）を、本明細書に記載されるインビトロ環状化により生成した。ＬＹ２－ｈＧＨアネロベクターの遺伝子エレメントは、ＬＹ２ノンコーディング領域（５’ＵＴＲ、ＧＣリッチ領域）及びｈＧＨコード化カセットを含むが、例えば、実施例３９に記載のように、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦは含まなかった。ＬＹ２－ｈＧＨアネロベクターをマウスに静脈内投与した。アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦを個別のインビトロ環状化ＤＮＡにｔｒａｎｓで供給した。手短には、アネロベクター（ＬＹ２－ｈＧＨ）又はＰＢＳを第０日に静脈内注射した（ｎ＝４マウス／群）。アネロベクターは、マウス当たり４．６６Ｅ＋０７アネロベクターゲノムで、独立した動物群に投与した。

【０７０５】

最初の実施例では、アネロベクターウイルスゲノムＤＮＡコピーを検出した。第７日に、血液及び血漿を採取し、ｑＰＣＲによりｈＧＨ　ＤＮＡアンプリコンについて分析した。ＬＹ２－ｈＧＨアネロベクターは、インビボでの感染から７日後の全血の細胞分画中に存在した（図３０Ａ）。更に、血漿中のアネロベクターの非存在は、これらのアネロベクターが、インビボで複製不可能であることを実証する（図３０Ｂ）。

【０７０６】

第２の実施例では、インビボ形質導入後にｈＧＨ　ｍＲＮＡ転写物を検出した。第７日に血液を採取し、ｑＲＴ－ＰＣＲによりｈＧＨ　ｍＲＮＡ転写物アンプリコンについて分析した。ＧＡＰＤＨを対照ハウスキーピング遺伝子として使用した。ｈＧＨ　ｍＲＮＡ転写物を全血の細胞分画中で測定した。アネロベクターコード化トランスジーンからのｍＲＮＡをインビボで検出した（図３１）。

【０７０７】

一部の実施形態では、代わりに、マウスに、例えば、本明細書に記載されるようなバクミド及び昆虫細胞を使用して産生されたアネロベクターを投与することができる。

【０７０８】

実施例２６：アネロベクターをインビトロで産生するための投入材料としてのインビトロ環状化ゲノム

この実施例は、本明細書に記載されるアネロベクター遺伝子エレメントの材料物質としてのインビトロ環状化（ＩＶＣ）二本鎖アネロウイルスＤＮＡが、予想密度のパッケージ

済アネロベクターゲノムを取得する上で、プラスミド中のアネロウイルスゲノムＤＮＡよりも頑健であることを実証する。

【０７０９】

Ｔ７５フラスコ内の１．２Ｅ＋０７　ＨＥＫ２９３Ｔ細胞（ヒト胎児腎細胞株）を１１．２５ｕｇの以下：（ｉ）インビトロ環状化二本鎖ＴＴＶ－ｔｔｈ８ゲノム（ＩＶＣ　ＴＴＶ－ｔｔｈ８）、（ｉｉ）プラスミドバックボーン中のＴＴＶ－ｔｔｈ８ゲノム、又は（ｉｉｉ）ＴＴＶ－ｔｔｈ８のＯＲＦ１配列のみを含むプラスミド（非複製ＴＴＶ－ｔｔｈ８）のいずれかでトランスフェクトした。トランスフェクションから７日後に細胞を回収し、０．１％Ｔｒｉｔｏｎで溶解させた後、１ｍｌ当たり１００単位のベンゾナーゼで処理した。溶解物を塩化セシウム密度分析のために使用し；密度を測定し、塩化セシウム線形勾配の各画分についてＴＴＶ－ｔｔｈ８コピー定量を実施した。図３２に示すように、ＩＶＣ　ＴＴＶ－ｔｔｈ８は、ＴＴＶ－ｔｔｈ８プラスミドと比較して、予想密度１．３３で、顕著に多量のゲノムコピーを産生した。

【０７１０】

１Ｅ＋０７　Ｊｕｒｋａｔ細胞（ヒトＴリンパ球株）をインビトロ環状化ＬＹ２ゲノム（ＬＹ２ＩＶＣ）又はプラスミド中のＬＹ２ゲノムのいずれかでヌクレオフェクトした。トランスフェクションから４日後に細胞を回収し、０．５％ｔｒｉｔｏｎ及び３００ｍＭ塩化ナトリウムを含有するバッファーを用いて溶解させた後、２ラウンドの瞬間凍結融解に付した。溶解物を１００単位／ｍｌのベンゾナーゼで処理した後、塩化セシウム密度分析を実施した。塩化セシウム線形勾配の各画分について、密度測定及びＬＹ２ゲノム定量を実施した。図３３に検出可能なピークを示さなかったＬＹ２ゲノム含有プラスミドのトランスフェクションと比較して、Ｊｕｒｋａｔ細胞中でのインビトロ環状化ＬＹ２ゲノムのトランスフェクションは、図３３に示すように、予想密度で鮮明なピークをもたらした。

【０７１１】

一部の実施形態では、ＩＶＣアネロベクター遺伝子エレメント構築物を、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ９細胞）中に導入し、例えば、本明細書に記載されるようなバクミドから発現されたタンパク質性外層タンパク質内に閉じ込めることができる。

【図面】

【図１】

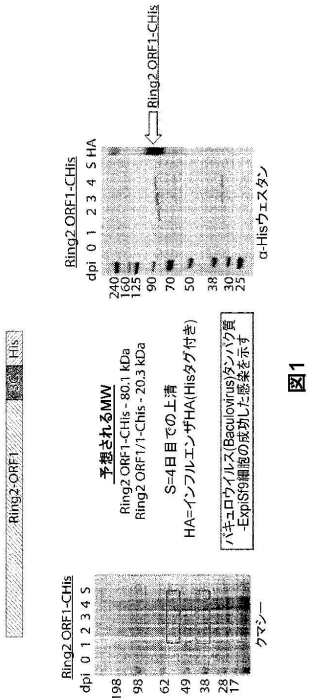


図1

【図２】

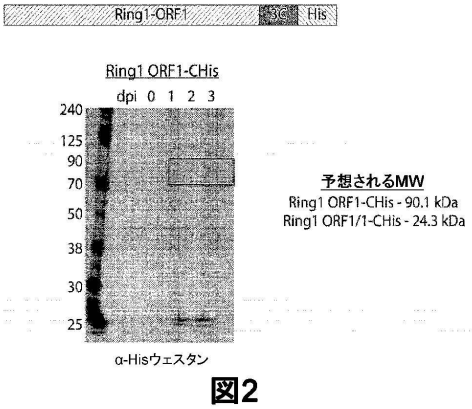


図2

【図３】

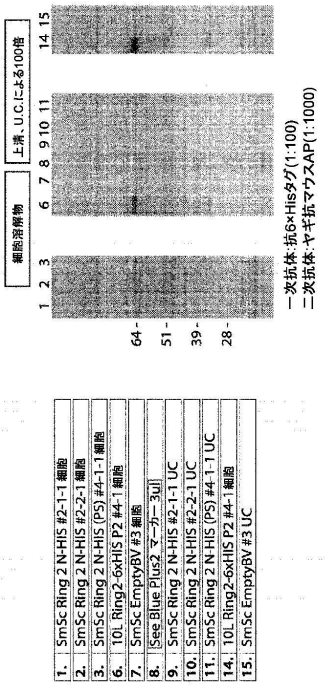


図3

【図４】

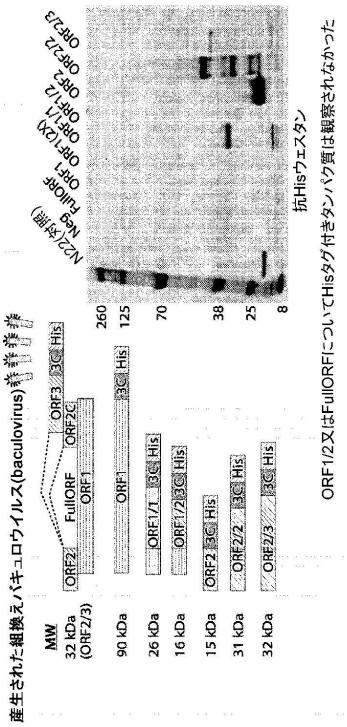


図4

【図５】

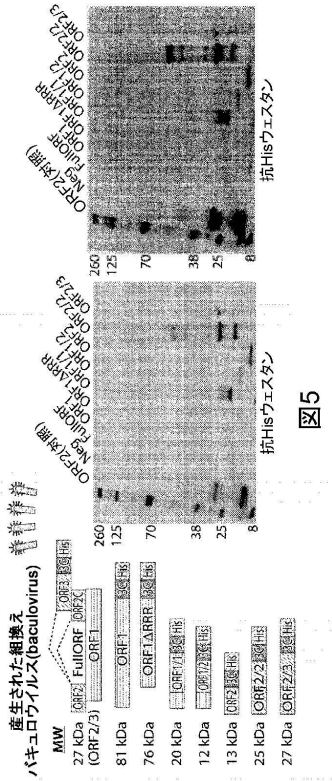


図5

【図６】

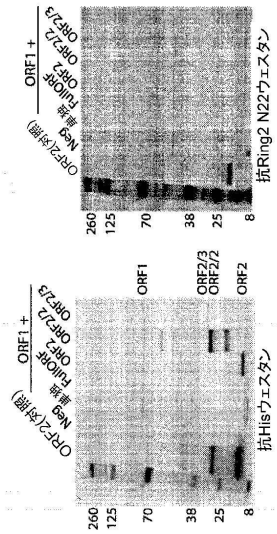


図6

【図７】

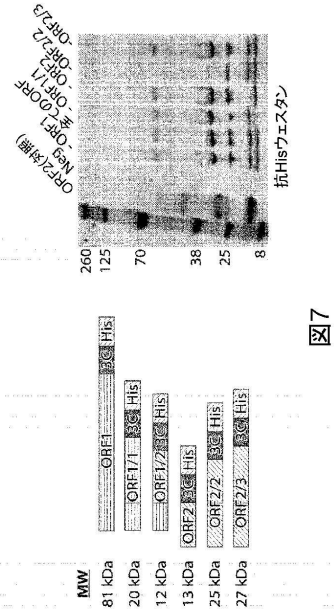


図7

【図８】

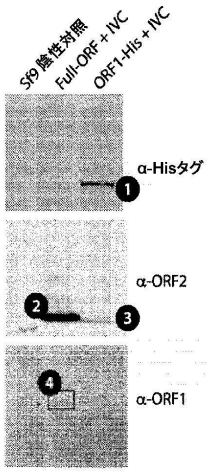


図8

【図９】

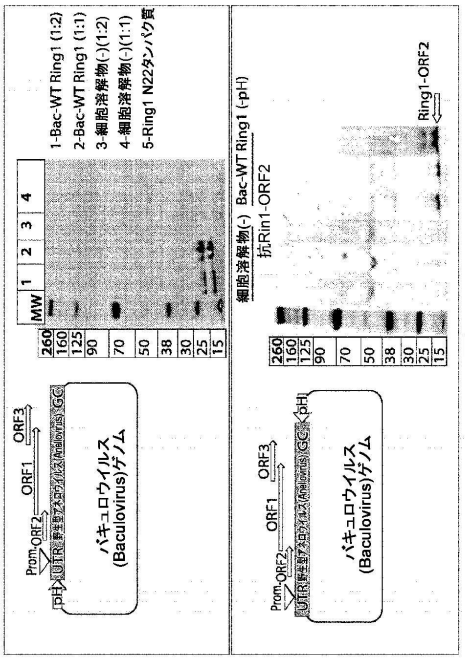


図9

【図１０】

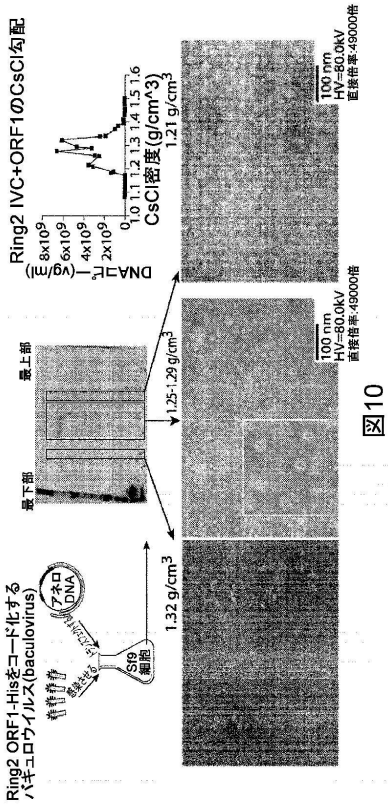


図10

【図１１】

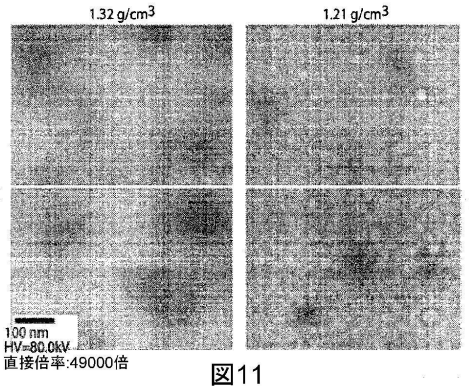


図11

【図１２】

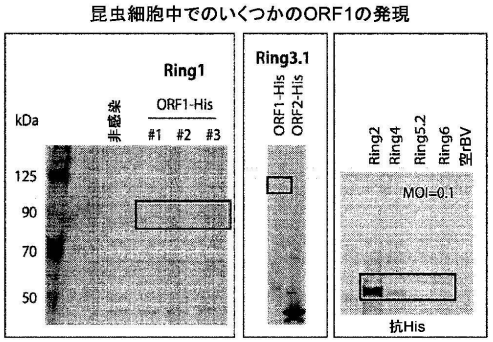
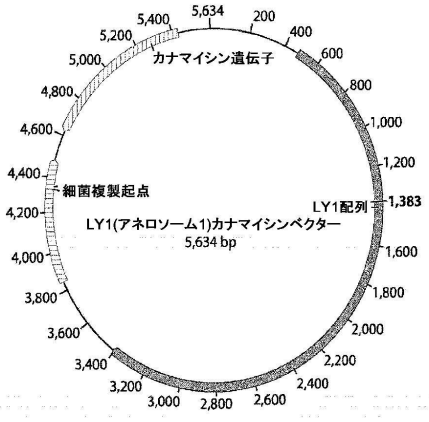


図12

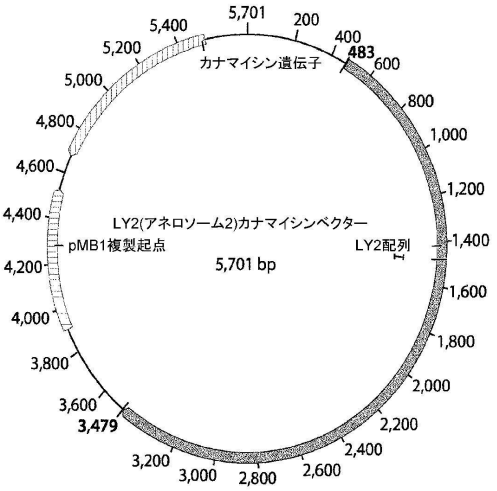
【図１３】



TTMiniVのLY1株(アネロソーム1)をコード化するカナマイシンベクターの概略図

図13

【図１４】



TTMiniVのLY2株(アネロソーム2)をコード化するカナマイシンベクターの概略図

図14

【図１５】

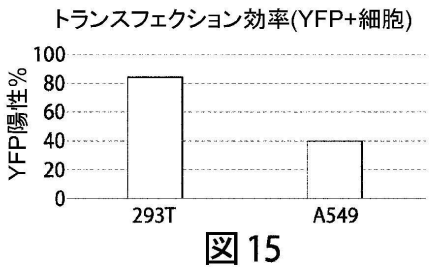


図15

【図１６Ａ】

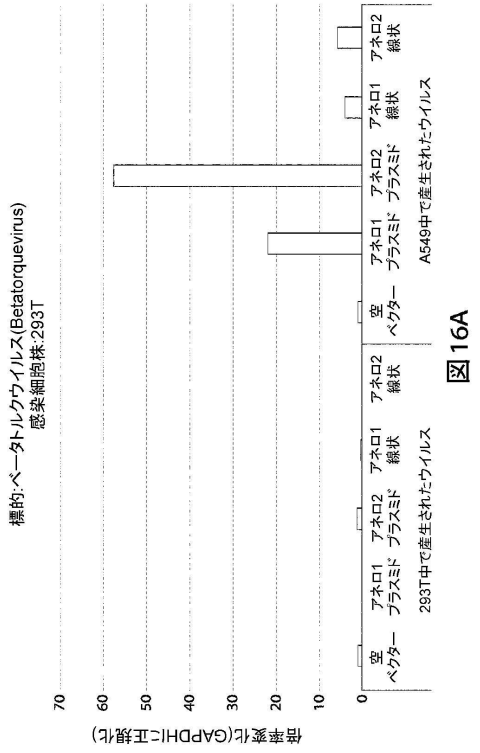


図16A

【図１６Ｂ】

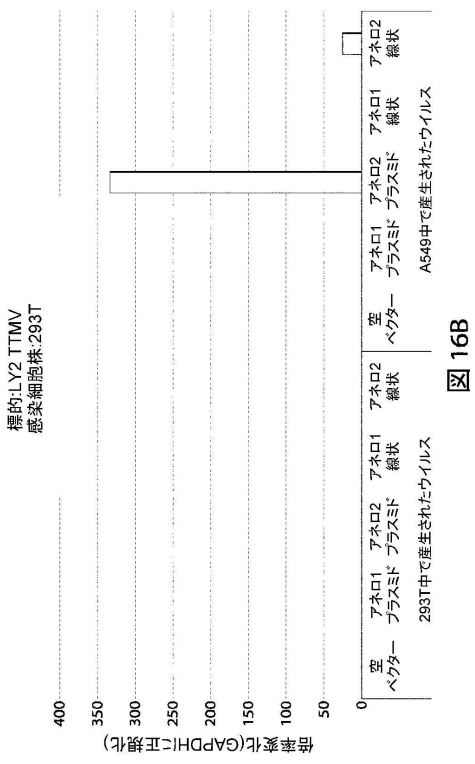


図 16B

【図１７Ａ】

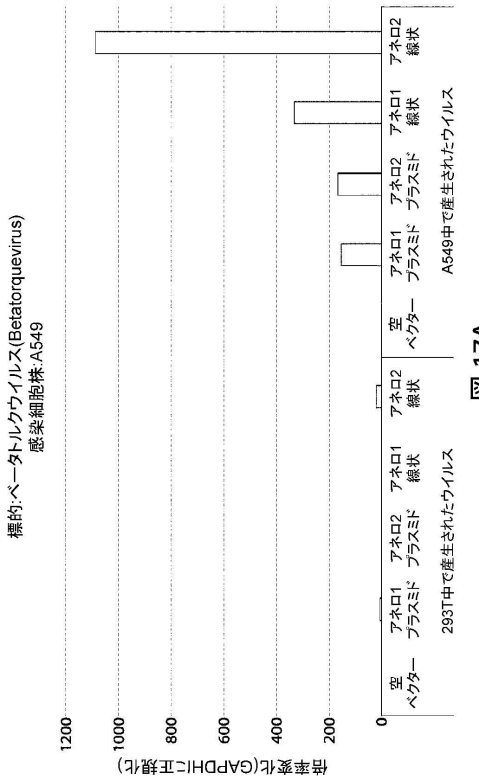


図 17A

【図１７Ｂ】

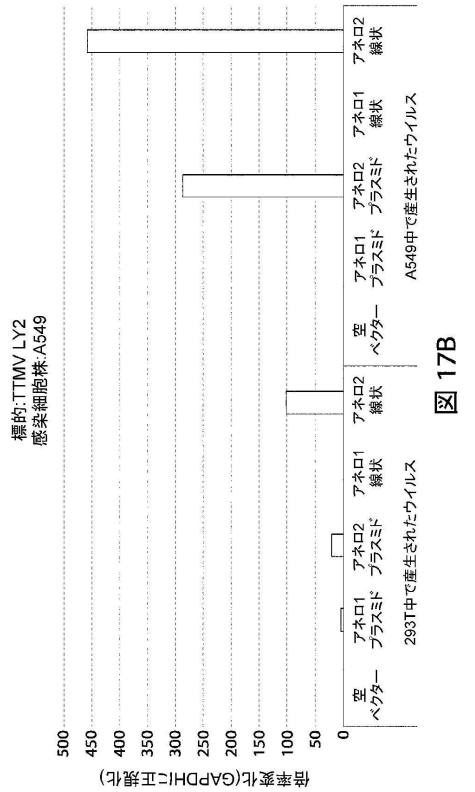


図 17B

【図１８Ａ】

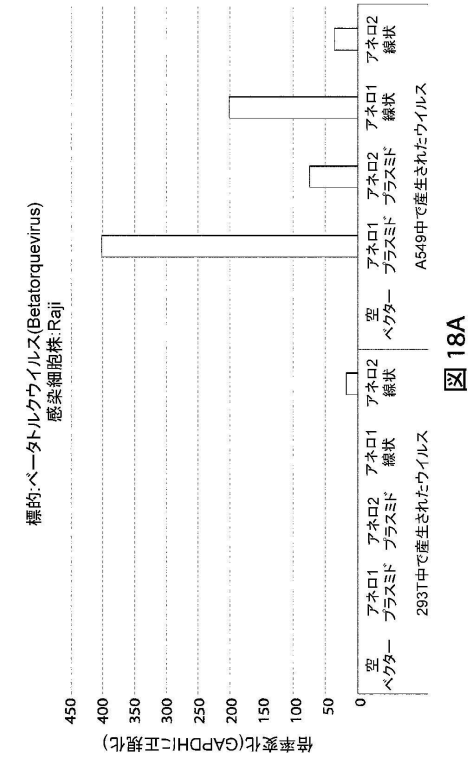


図 18A

【図１８Ｂ】

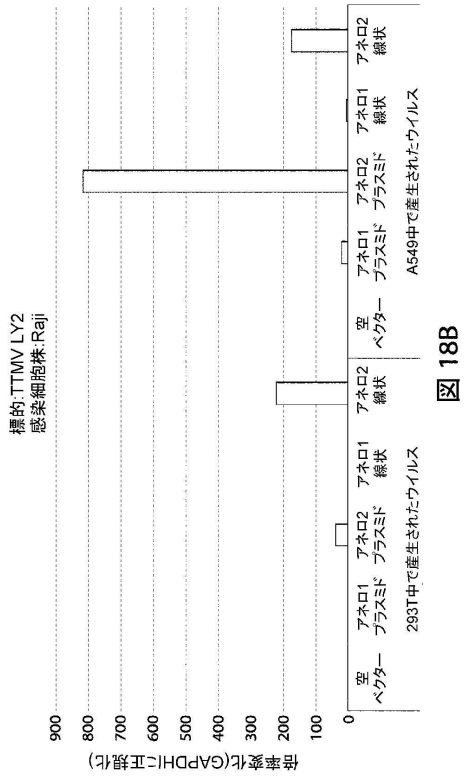


図 18B

【図１９Ａ】

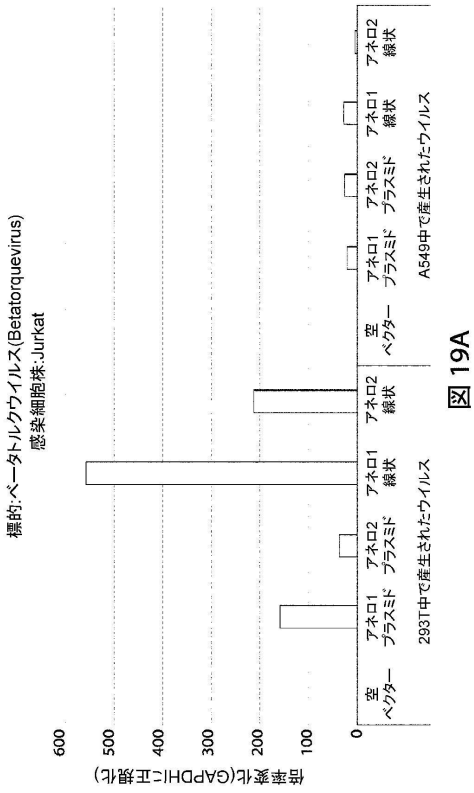


図 19A

【図１９Ｂ】

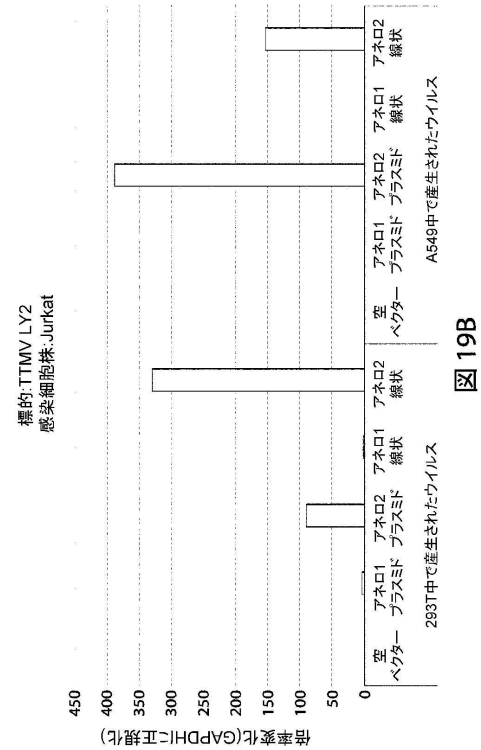


図 19B

【図２０Ａ】

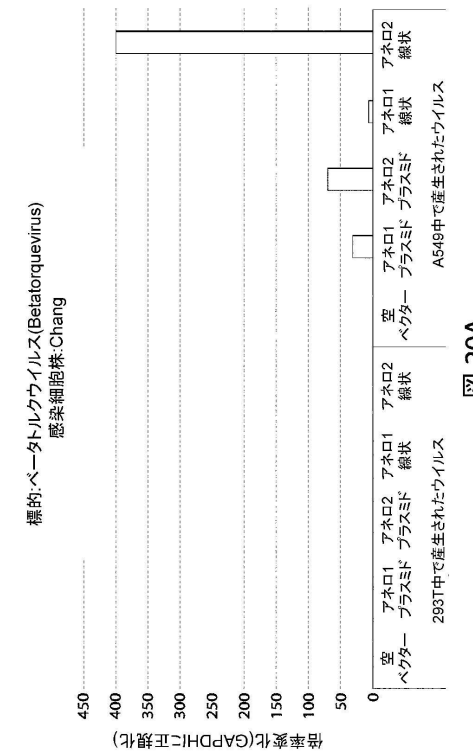


図 20A

【図２０Ｂ】

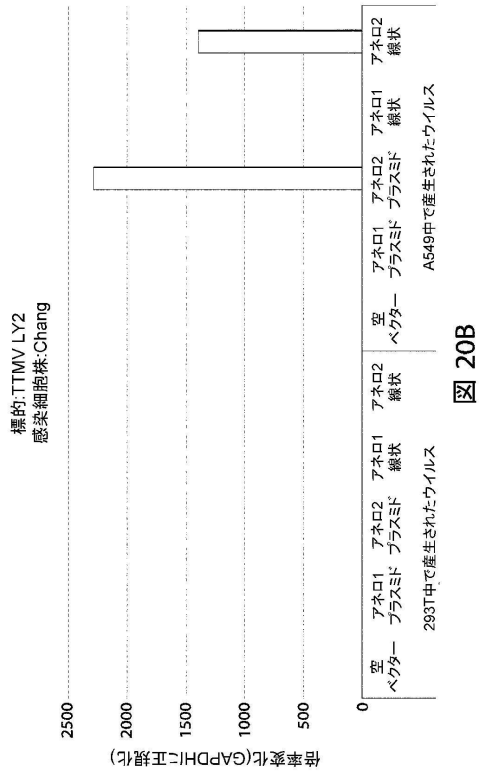


図 20B

【図２１】

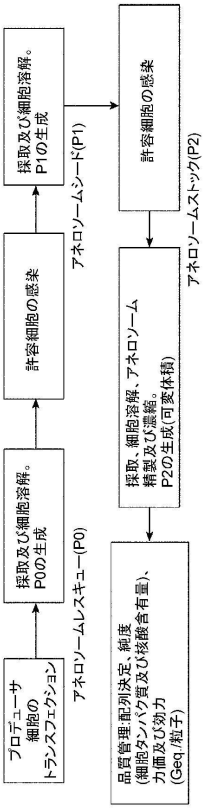


図 21

【図２２】

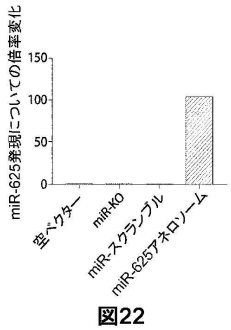


図22

【図２３】

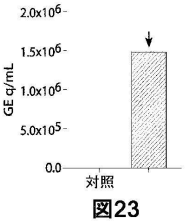


図23

【図２４】

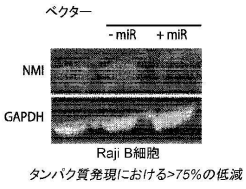


図24

【図２５】

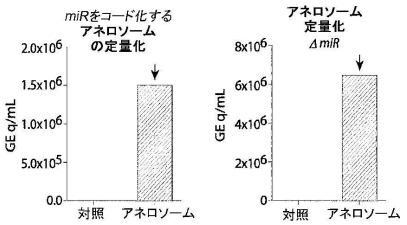


図25

【図２６Ａ】

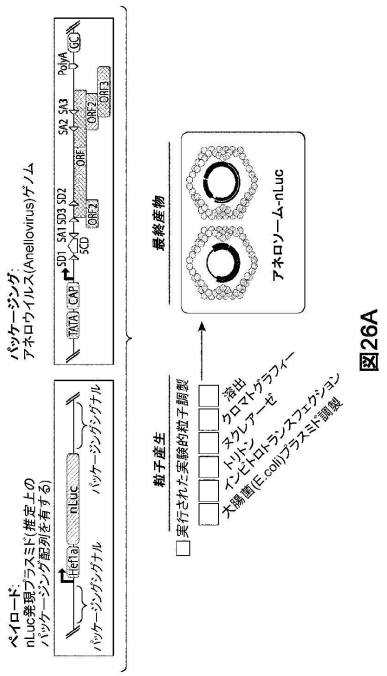


図26A

【図２６Ｂ】

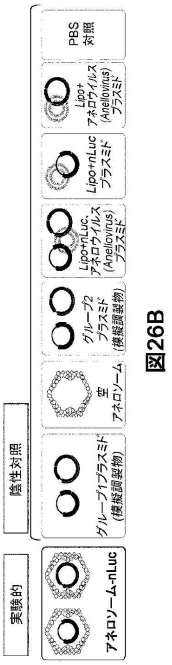


図26B

【図２７Ａ】

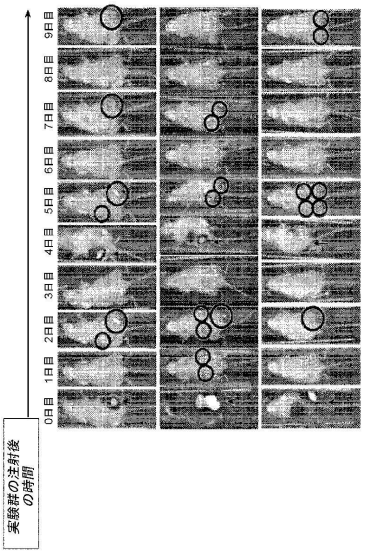


図27A

【図２７Ｂ】

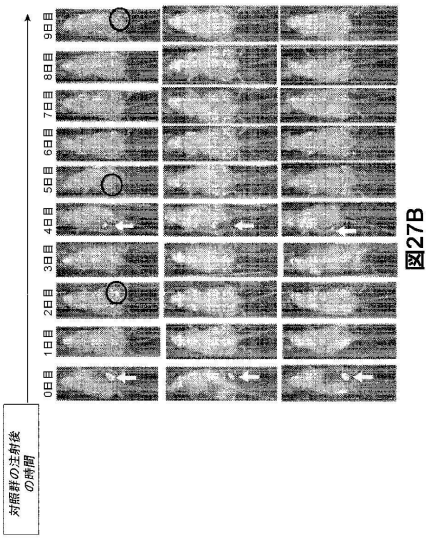


図27B

【図２７Ｃ】

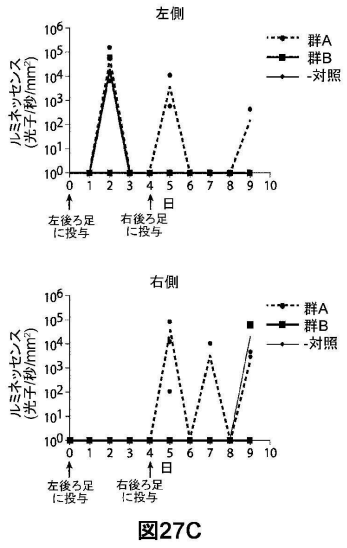


図27C

【図２８Ａ】

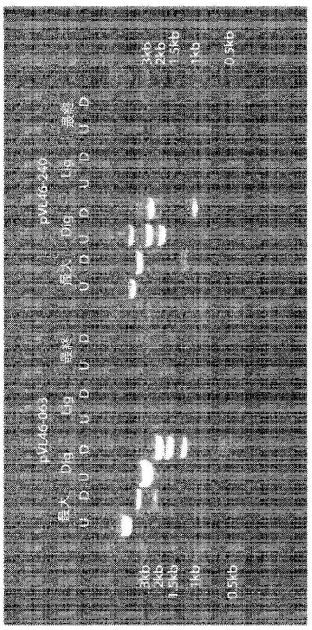


図28A

【図２８Ｂ】

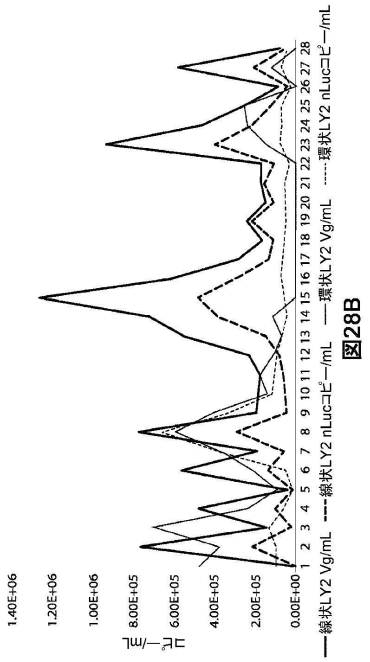


図28B

【図２８Ｃ】

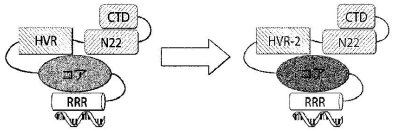


図28C

【図２８Ｄ】

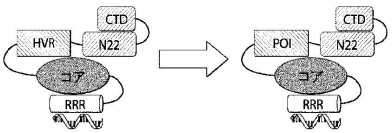


図28D

【図２９】

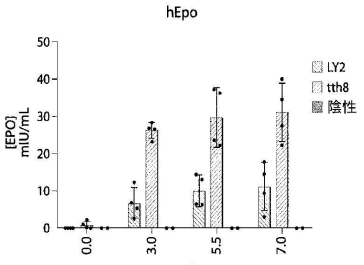


図29

【図３０】

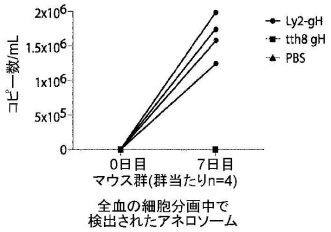


図30A

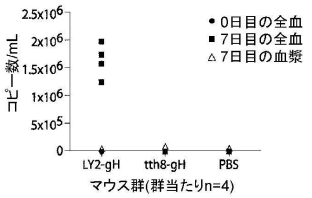


図30B

【図３１】

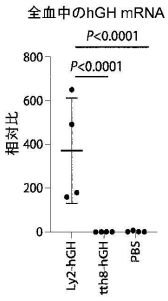


図31

【図３２】

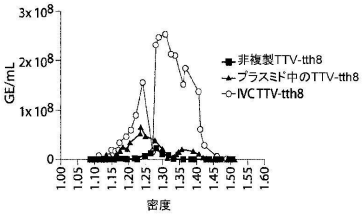


図32

【図３３】

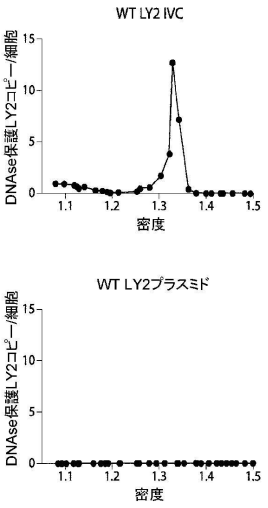


図33

【配列表】
20235302770000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/37076

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - A61K 35/76; C12N 15/11; C12N 15/86; C12N 7/00 (2021.01)
CPC - C12N 15/86; C12N 2750/00022; C12N 2750/00043; C12N 2750/00023; C12N 15/111; C12N 2310/141

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/232017 A1 (FLAGSHIP PIONEERING, INC.) 20 December 2018 (20.12.2018); especially abstract; pg 2, ln 5-6; pg 39, ln 3-4; pg 42, ln 28-33; pg 46, ln 3-16; pg 251, ln 5-8; pg 298, ln 1-4; pg 304, ln 27-28; pg 312, ln 27-30; claims 36, 38-39	1-3, 6, 9-11
A	KAKKOLA et al. Expression of all six human Torque teno virus (TTV) proteins in bacteria and in insect cells, and analysis of their IgG responses. Virology. 20 December 2008, Vol. 382, No. 2, pg 182-189; entire document	1-3, 6, 9-11

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 November 2021	DEC 08 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/37076

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 13*ter*.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 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/37076

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 4
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:
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 searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-3, 6, 9-11, directed to a nucleic acid construct comprising an Anellovirus genetic element region and a backbone region suitable for replication of the nucleic acid construct in insect cells; or a composition, cell or viral particle(s) comprising said nucleic acid construct.

Group II, claims 5, 7-8, directed to a composition comprising an isolated Anellovirus ORF1 molecule (comprising an Anellovirus ORF1 Arginine-rich region and an Anellovirus ORF1 C-terminal domain), and not comprising detectable levels of an Anellovirus genetic element.

Continued on Supplemental Page

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 6, 9-11

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/37076

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Group III, claims 12-13, directed to a nucleic acid construct comprising a first and second transposase recognition sequences (e.g., a Tn7R sequence);

Group IV, claims 14-16, directed to a method of making a baculovirus particle, an insect cell comprising a bacmid construct, or an Anellovector.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features:

Group I has the special technical feature of a backbone region, e.g., wherein the backbone region is suitable for replication of the DNA construct, that is not required by Group II-IV.

Group II has the special technical feature of a composition comprising an Anellovirus ORF1 Arginine-rich region and an Anellovirus ORF1 C-terminal domain, and/or not comprising detectable levels of an Anellovirus genetic element, that is not required by Group I, III, IV.

Group III has the special technical feature of a first and second transposase recognition sequence, that is not required by Group I, II, IV.

Group IV has the special technical feature of providing an insect cell, and incubating the insect cell under conditions suitable for incorporation of the Anellovirus genetic element, that is not required by Group I-III.

Common technical features:

Groups I-IV share the common technical feature of nucleic acid construct comprising: a nucleic acid (e.g., DNA) construct comprising: a promoter operably linked to a sequence encoding an Anellovirus ORF molecule; and an additional construct/sequence.

Groups I, III and IV further share the common technical feature of a nucleic acid construct comprising an Anellovirus genetic element comprising a promoter operably linked to a sequence encoding an exogenous effector.

Groups I and IV further share the common technical feature of baculovirus particle or insect cell comprising the construct.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because these shared technical features are previously taught or made obvious by WO 2018/232017 A1 to Flagship Pioneering, Inc. et al. (hereinafter 'Flagship'), and US 2011/0150913 A1 to Nitzel et al. (hereinafter 'Nitzel').

Flagship discloses a composition (abstract - "This invention relates generally to pharmaceutical compositions and preparations of curons and uses thereof.") comprising (i) a nucleic acid (e.g., DNA) construct (pg 39, ln 3-4 - "As used herein, the term "curon" refers to a vehicle comprising a genetic element, e.g., an episome, e.g., circular DNA, enclosed in a proteinaceous exterior.") comprising:
a) a promoter operably linked to a sequence encoding an Anellovirus ORF molecule (e.g., an ORF1, ORF2, ORF2/2, ORF2/3, ORF1/1, and/or ORF1/2 molecule) (pg 46, ln 3-16 - "In some embodiments, a curon as described herein comprises one or more nucleic acid molecules (e.g., a genetic element as described herein) comprising... an Anellovirus sequence... In some embodiments, the nucleic acid molecule comprises a sequence encoding a capsid protein, e.g., an ORF1, ORF1/1, ORF1/2, ORF2, ORF2/2, ORF2/3, ORF2t/3 sequence of any of the Anelloviruses described herein..."; pg 251, ln 5-8 - "In some embodiments, the genetic element comprises a regulatory sequence, e.g., a promoter or an enhancer. In some embodiments, a promoter includes a DNA sequence that is located adjacent to a DNA sequence that encodes an expression product."); and
b) a backbone region suitable for replication of the nucleic acid construct in insect cells (e.g., a Baculovirus backbone region), optionally wherein the backbone region is also suitable for replication of the nucleic acid construct in bacterial cells (pg 304, ln 27-28 - "In some embodiments, the host or host cell is a plant, insect, bacteria"; pg 298, ln 1-4 - "In some embodiments, the composition may further comprise a double stranded DNA virus, e.g., ...baculovirus..."); and
wherein (ii) an Anellovirus genetic element comprising a promoter operably linked to a sequence encoding an exogenous effector (pg 42, ln 28-33 - "a synthetic curon comprising: (i) a genetic element comprising a promoter element and a sequence encoding an exogenous effector (e.g., a payload)... wherein the genetic element has... 100% sequence identity to a wild-type Anellovirus sequence (e.g., a wild-type Torque Teno virus (TTV), Torque Teno mini virus (TTMV), or TTMDV sequence...").

Nitzel discloses an insect cell or a baculovirus comprising an Anellovirus ORF1 molecule (para [0093] - "A series of experiments was then undertaken to express the genotype 2 TTV ORF1 protein utilizing insect cells and recombinant baculovirus."; Note, Torque Teno virus is an annelovirus, see instant pg 3, ln 29-30) comprising an Anellovirus ORF1 Arginine-rich region and an Anellovirus ORF1 C-terminal domain (para [0093]; para [0031] - "FIG. 5 (panels A, B and C) provides identification of in-common arginine rich regions of ORF1 proteins as expressed from various TTV isolates."; Figure 5 - depicts genotype 2 TTV ORF1 comprising arginine-rich portions; Note, the expression of g2 TTV ORF1 in insect cells appears to be expression of the entire protein, and therefore comprises the identified arginine-rich region and C-terminal domain).

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I-IV inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

*Continuation of Item 4 above: Claim 4 is held unsearchable because it is a dependent claim and is not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

２．ＴＲＩＴＯＮ

３．ＳＤＳ

弁理士　石川 大輔

(74)代理人　230113332

弁護士　山本 健策

(72)発明者　デラグレイブ， サイモン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， ８ティーエイチ フロア， スイート ８００イー

(72)発明者　ピッツ， ジャレド デイビッド

アメリカ合衆国 マサチューセッツ ０２１４２， ケンブリッジ， ケンブリッジ パークウェイ ５５， ８ティーエイチ フロア， スイート ８００イー

Ｆターム（参考）　4B065　AA01X AA01Y AA90X AA90Y AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44