(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-530278
(P2023-530278A)
(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　15/86　(2006.01)* | | Ｃ１２Ｎ | 15/86 | ＺＺＮＡ　４Ｂ０６５ |
| *Ｃ１２Ｎ　5/10　(2006.01)* | | Ｃ１２Ｎ | 5/10 | |

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全227頁）

| | |
|---|---|
| (21)出願番号 | 特願2022-576004(P2022-576004) |
| (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/US2021/037091 |
| (87)国際公開番号 | WO2021/252955 |
| (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 | 63/038,483 |
| (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) |
| (31)優先権主張番号 | 63/146,963 |
| (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) |
| (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】　タンデムアネロウイルス構築物

(57)【要約】
本発明は、概して、アネロベクターを作製するための組成物及びその方法に関する。例えば、本明細書に記載の方法は、タンデムで配置された、外性エフェクターをコードする第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムと、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム又はその断片を含む核酸構築物を用意することを含み得る。一部の実施形態では、核酸構築物は、タンパク質性外層に封入された、外性エフェクターをコードするアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含むアネロベクターの生産をもたらす。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）外性エフェクターをコードする配列を含む第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム；
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；及び
ｃ）任意選択で、（ａ）と（ｂ）の間に位置するスペーサー配列
を含む、核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物。
【請求項２】
前記第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム又はその断片が、２８００、２７００、２６００、２５００、２０００、１５００、１０００、９００、８００、７００、６００、又は５００ヌクレオチド未満の長さを有する、請求項１に記載の核酸構築物。
【請求項３】
前記第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム又はその断片が、前記第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムに対して３’側に位置する、請求項１～２のいずれか１項に記載の核酸構築物。
【請求項４】
前記第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム又はその断片が、前記第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムに対して５’側に位置する、請求項１～３のいずれか１項に記載の核酸構築物。
【請求項５】
前記核酸構築物が、スペーサー配列を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の核酸構築物。
【請求項６】
前記スペーサー配列が、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、若しくはそれ以上のアミノ酸長、又は１～５、５～１０、１０～１５、若しくは１５～２０アミノ酸長を有する、請求項５に記載の核酸構築物。
【請求項７】
前記核酸構築物が、前記スペーサー配列を含まない、請求項１～６のいずれか１項に記載の核酸構築物。
【請求項８】
タンパク質性外層に封入された遺伝子エレメントを含むアネロベクターを製造する方法であって、以下：
ａ）先行する実施形態のいずれかに記載の核酸構築物と、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントは、前記核酸構築物から増幅された）の１つ以上のコピーとを含む細胞（例えば、哺乳動物細胞）を用意するステップ；並びに
ｂ）前記アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントが前記細胞中でタンパク質性外層に封入されるのを可能にする条件下で、前記細胞をインキュベートするステップ
を含み、
これにより、前記アネロベクターを製造する方法。
【請求項９】
請求項１～７のいずれか１項に記載の核酸構築物を含む細胞。
【請求項１０】
外性エフェクターを細胞に送達する方法であって、前記方法は、前記細胞中に請求項８に記載の方法によって作製されたアネロベクターを導入するステップと、前記外性エフェクターの発現に好適な条件下で前記細胞をインキュベートするステップとを含む方法。

【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６３／０３８，４８３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６３／１４６，９６３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の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ことが依然として求められている。ウイルスベクターの生産は、一般に、タンパク質性外層への遺伝子エレメントの封入を必要とする。遺伝子エレメントの生産は、例えば、最初に骨格及び所望の遺伝子エレメント配列を含むプラスミドを作製することによって達成され得る。次に、エンドヌクレアーゼ切断とそれに続く連結を、インビトロ環状化（ＩＶＣ）プロセスで行うことによって、骨格配列を除去することができる。但し、ＩＶＣは、ラージスケール工程には望ましくない場合がある。タンパク質性外層に封入するための遺伝子エレメントを生産する新規の方法が当技術分野において求められている。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００３】
本開示は、例えば、遺伝物質を送達するため、エフェクター、例えばペイロードを送達するため、又は真核細胞（例えば、ヒト細胞若しくはヒト組織）に治療薬若しくは治療用エフェクターを送達する目的で、送達ビヒクルとして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）を生産するための核酸構築物を提供する。概して、本明細書に記載される核酸構築物は、タンデムで配置された、遺伝子エレメント配列（例えば、変異型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム）の第１コピーと、遺伝子エレメント配列（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム又はその断片）の第２コピーの少なくとも一部と、を含む。このような構造を有する核酸構築物は、本明細書では概して、タンデム構築物と呼ばれる。このようなタンデム構築物は、アネロベクター遺伝子エレメントを生産するために使用される。遺伝子エレメント配列の第１コピーと遺伝子エレメント配列の第２コピーは、場合によっては、核酸構築物上で互いに隣接していてもよい。他の例では、遺伝子エレメント配列の第１コピーと遺伝子エレメント配列の第２コピーは、例えば、スペーサー配列によって隔てられていてもよい。一部の実施形態では、遺伝子エレメント配列の第２コピー、又はその一部は、例えば、本明細書に記載されるような、上流複製促進配列（ｕＲＦＳ）を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント配列の第２コピー、又はその一部は、例えば、本明細書に記載されるような、下流複製促進配列（ｄＲＦＳ）を含む。一部の実施形態では、ｕＲＦＳ及び／又はｄＲＦＳは、複製起点（ＯＲＩ）（例えば、哺乳動物ＯＲＩ若しくは昆虫ＯＲＩ）又はその一部を含む。一部の実施形態では、ｕＲＦＳ及び／又はｄＲＦＳは、複製起点を含まない。一部の実施形態では、ｕＲＦＳ及び／又はｄＲＦＳは、ヘアピンループ（例えば、５’ＵＴＲ内）を備える。一部の実施形態では、タンデム構築物は、遺伝子エレメント第２コピー又はその一部が欠如している以外は類似の構築物よりも高レベルの遺伝子エレメントを産生する。理論に束縛されるものではないが、本明細書に記載されるタンデム構築物は、ローリングサークル複製によって複製し得る。一部の実施形態では、タンデム構築物は、１つ以上のコドン最適化オープンリーディングフレーム（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をコードする配列、ここで、配列は、例えば、哺乳動物細胞における発現のためにコドン最適化される）を含む。

【０００４】
アネロベクター（例えば、本明細書に記載されるタンデム構築物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、それを封入す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封入及び／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タンデム構築物を使用して産生される。

【０００５】
いくつかの例において、遺伝子エレメントは、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タンデム構築物）を用いて提供される。タンデム構築物は、場合によっては、遺伝子エレメントの配列の第１コピーと、遺伝子エレメントの配列の第２コピー、又はその一部（例えば、ｕＲＦＳ若しくはｄＲＦＳ）とを含み得る。第２コピーは、第１コピー若しくはその一部と同一のコピーであってもよいし、又は１つ以上の配列の違い、例えば置換を含み得ることが理解される。いくつかの事例では、遺伝子エレメント配列の第２コピー又はその一部（例えば、ｕＲＦＳ）は、遺伝子エレメント配列の第１コピーに対して５’側に位置する。いくつかの事例では、遺伝子エレメント配列の第２コピー又はその一部（例えば、ｄＲＦＳ）は、遺伝子エレメント配列の第１コピーに対して３’側に位置する。いくつかの事例では、遺伝子エレメント配列の第２コピー又はその一部と、遺伝子エレメント配列の第１コピーは、タンデム構築物において互いに隣接している。いくつかの事例では、遺伝子エレメント配列の第２コピー又はその一部と、遺伝子エレメント配列の第１コピーは、例えば、スペーサー配列によって隔てられる。いくつかの事例では、遺伝子エレメント構築物は、環状又は線状である。場合によっては、遺伝子エレメントは、環状である。いくつかの事例では、遺伝子エレメントは、一本鎖である。いくつかの事例では、遺伝子エレメントは、ＤＮＡである。一部の実施形態では、タンパク質性外層への封入に適した遺伝子エレメントは、遺伝子エレメント配列の第１コピーのローリングサークル複製によって生産することができる。

【０００６】
いくつかの例において、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、実施例１５及び１９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。

【０００７】

一部の実施形態では、本明細書に記載のタンデム構築物は、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封入さ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、炎症の分子マーカー、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。

【０００８】

一部の実施形態では、本明細書に記載のタンデム構築物は、（ｉ）プロモータエレメントと、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）内に封入されており、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，Ｇｅｎ

ｅ　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封入される。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。

【０００９】

一部の実施形態では、本明細書に記載のタンデム構築物は、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、本明細書に記載のタンデム構築物は、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、タンデム構築物）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－ｍ

ｉＲ－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、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。

【００１４】

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。

【００１５】

一態様では、本発明は、本明細書に記載のタンデム構築物を含む宿主細胞を特徴とする。一部の実施形態では、宿主細胞は、以下：（ａ）ＯＲＦ１分子、ＯＲＦ２分子、又はＯＲＦ３分子のうちの１つ以上をコードする配列（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する配列）を含む核酸分子（例えば、この場合、上記核酸分子は、プラスミド、ウイルス核酸であるか、又は染色体に組み込まれている）；並びに（ｂ）遺伝子エレメントであって、上記遺伝子エレメント

は、以下：（ｉ）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）をコードする核酸配列（例えば、ＤＮＡ配列）に作動可能に連結されたプロモータ要素と、（ｉｉ）（ａ）のポリペプチドに結合するタンパク質結合配列を含み、任意選択で、上記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）をコードしない。例えば、宿主細胞は、（ａ）及び（ｂ）をシス（同じ核酸分子の両部分）又はトランス（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。

【００１６】

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。

【００１７】

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。

【００１８】

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。

【００１９】

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。

【００２０】

一態様では、本発明は、アネロベクター、例えば、合成アネロベクターを作製する方法を特徴とする。この方法は、以下：

（ａ）以下：

（ｉ）例えば、本明細書に記載されるようなアネロベクターの遺伝子エレメントの核酸配列の第１コピーと、アネロベクターの遺伝子エレメントの核酸配列の第２コピー、又はその一部（例えば、ｕＲＦＳ若しくはｄＲＦＳ）とを含む第１核酸分子；及び

（ｉｉ）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ポリペプチド、又はＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、若しくはＯＲＦ１／２から選択される１つ以上のアミノ酸配列、又はそれらと少なくとも７０％（例えば、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コードする第２核酸分子
を含む宿主細胞を用意するステップ；並びに
（ｂ）上記遺伝子エレメントの核酸配列の第１コピーの複製（例えば、ローリングサークル複製）に好適な条件下で、上記宿主細胞をインキュベートし、それにより遺伝子エレメントを生産するステップ；並びに
任意選択で（ｃ）タンパク質性外層（例えば、第２核酸分子によってコードされるポリペプチドを含む）に遺伝子エレメントを封入するのに好適な条件下で、宿主細胞をインキュベートするステップ
を含む。

【００２１】

一部の実施形態では、第１核酸分子及び第２核酸分子は、互いに結合している（例えば、本明細書に記載の核酸構築物の場合、例えば、シスである）。一部の実施形態では、第１核酸分子及び第２核酸分子は、個別である（例えば、トランスである）。一部の実施形態では、第１核酸分子は、プラスミド、コスミド、バクミド、ミニサークル、又は人工染色体である。一部の実施形態では、第２核酸分子は、プラスミド、コスミド、バクミド、ミニサークル、又は人工染色体である。一部の実施形態では、第２核酸分子は、宿主細胞のゲノムに組み込まれている。

【００２２】

一部の実施形態では、この方法は、ステップ（ａ）の前に、第１核酸分子及び／又は第２核酸分子を宿主細胞に導入することをさらに含む。一部の実施形態では、第２核酸分子は、第１核酸分子の前、それと同時、又はその後に宿主細胞に導入される。他の実施形態では、第２核酸分子を宿主細胞のゲノムに組み込む。一部の実施形態では、第２核酸分子は、ヘルパー構築物、ヘルパーウイルス若しくは他のヘルパーベクターであるか、又はそれを含むか、或いはその一部である。

【００２３】

別の態様では、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）例えば、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の１つ以上の成分（例えば、全ての成分）を含む、例えば、それらを発現する宿主細胞を用意するステップ；
ｂ）宿主細胞からアネロベクターの調製物を生産するのに好適な条件下で、宿主細胞を培養し、ここで、調製物のアネロベクターは、遺伝子エレメント（例えば、本明細書に記載されるような）を封入するタンパク質性外層（例えば、アネロベクターＯＲＦ１ポリペプチドを含む）を含み、それにより、アネロベクターの調製物を製造するステップ；並びに
任意選択で、ｃ）アネロベクターの調製物を、例えば、被験者への投与に適した医薬組成物として製剤化するステップ
の１つ以上（例えば、（ａ）、（ｂ）、及び（ｃ）の全てを含む。

【００２４】

例えば、この製造方法で用意される宿主細胞は、（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する配列を含む核酸分子（例えば、この場合、上記核酸分子は、プラスミドであるか、ウイルス核酸若しくはゲノムであるか、又は染色体に組み込まれている）及び；（ｂ）遺伝子エレメントを産生することができるタンデム構築物を含み、上記遺伝子エレメントは、（ｉ）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）をコードする核酸配列（例えば、ＤＮＡ配列）に作動可能に連結されたプロモータ要素と、（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、パッキング配列）を含有するタンデム構築物と、を含み、ここで、上記宿主細胞は、（ａ）及び（ｂ）をシス又はトランスのいずれかで含む。いくつか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、製造細胞株である。

【００２５】

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）。

【００２６】

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。

【００２７】

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、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、例えば本明細書に記載されるような遺伝子エレメントを産生することができるタンデム構築物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さらに含む。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。

【００２８】

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）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、タンデム構築物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、をさらに含む。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。

【００２９】

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。

【００３０】

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。

【００３１】

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。

【００３２】

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）。

【００３３】

一態様では、本発明は、以下：

（ｉ）本明細書に記載されるタンデム構築物を含む第１核酸分子、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
を含む宿主細胞を特徴とする。
【００３４】
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、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。
【００３５】
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。
【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、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。
【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、トランス、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。
【００３８】
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。
【００３９】
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。
【００４０】
実施形態の列挙
１．以下：
ａ）外性エフェクターをコードする配列を含む第１の、任意選択で変異型の、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム；
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（例えば、その

１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～１２５、１２５～１５０、１５０～１７５、１７５～２００、２００～２５０、２５０～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、１０００～１２００、１２００～１４００、１４００～１６００、１６００～１８００、１８００～２０００、２０００～２２００、２２００～２４００、２４００～２６００、２６００～２７００、２７００～２８００、２８００～２９００、若しくは２９００～３０００個の連続したヌクレオチド）；並びに

ｃ）任意選択で、（ａ）と（ｂ）の間に位置するスペーサー配列

を含み；

任意選択で、この場合、（ｉ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム若しくはその断片に対して５’側に位置するか、又は（ｉｉ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム若しくはその断片に対して３’側に位置する、核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物。

【００４１】

２．以下：

ａ）以下：

ｉ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）上流複製促進配列（ｕＲＦＳ）、例えば、５’ＵＴＲ；

ｉｉ）外性エフェクターをコードする配列に作動可能に連結されたプロモータ；

ｉｉｉ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）下流複製促進配列（ｄＲＦＳ）、例えば、３’ＵＴＲ

を含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域；及び

ｂ）第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ｕＲＦＳ（例えば、５’ＵＴＲ）又は第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ｄＲＦＳ（例えば、３’ＵＴＲ）；並びに

ｃ）任意選択で、上記アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域と（ｂ）との間に位置するスペーサー配列

を含む核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物。

【００４２】

３．さらに、ｄ）核酸構築物の複製に好適な骨格、例えば、プラスミド骨格又はバクミド骨格を含む、実施形態１又は２に記載の核酸構築物。

【００４３】

４．ｕＲＦＳが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｒｅｐタンパク質に結合する、実施形態２に記載の核酸構築物。

【００４４】

５．ｕＲＦＳが、複製起点（ＯＲＩ）を含む、実施形態２に記載の核酸構築物。

【００４５】

６．ｕＲＦＳが、複製起点を含まない、実施形態２に記載の核酸構築物。

【００４６】

７．ｕＲＦＳが、ヘアピンループを（例えば、５’ＵＴＲ内に）含む、実施形態２に記載の核酸構築物。

【００４７】

８．ｕＲＦＳとｄＲＦＳが、一緒に、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｒｅｐ置換部位を含む、実施形態２に記載の核酸構築物。

【００４８】

９．ｕＲＦＳとｄＲＦＳが、一緒に、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｒｅｐ結合部位を含む、実施形態２に記載の核酸構築物。

【００４９】

１０．ｕＲＦＳとｄＲＦＳが、一緒に、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｒｅｐ置換開始部位を含む、実施形態２に記載の核酸構築物。

【００５０】

１１．核酸構築物が、複製を可能にする条件下で宿主細胞に導入されると、骨格より高レベルの遺伝子エレメントが、例えば、少なくとも３：１、４：，１　５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、１００：１、５００：１．１０００：１、５０００：１、１０，０００：１、１００，０００：１、又は１，０００，０００：１の比で観察される、実施形態１又は２に記載の核酸構築物。

【００５１】

１２．第１ｕＲＦＳが、第２ｕＲＦＳと同じ配列を有する、実施形態１～１１のいずれかに記載の核酸構築物。

【００５２】

１３．第１ｕＲＦＳが、第２ｕＲＦＳと異なる配列を有する、実施形態１～１１のいずれかに記載の核酸構築物。

【００５３】

１４．核酸構築物が、１つのみのｄＲＦＳを含む、実施形態１～１３のいずれかに記載の核酸構築物。

【００５４】

１５．第１ｄＲＦＳが、第２ｄＲＦＳと同じ配列を有する、実施形態１～１３のいずれかに記載の核酸構築物。

【００５５】

１６．核酸構築物が、１つのみのｕＲＦＳを含む、実施形態１～１５のいずれかに記載の核酸構築物。

【００５６】

１７．ｕＲＦＳ又はｄＲＦＳが、完全長アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含む、実施形態１～１６のいずれかに記載の核酸構築物。

【００５７】

１８．ｕＲＦＳ又はｄＲＦＳが、部分的アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含む、実施形態１～１７のいずれかに記載の核酸構築物。

【００５８】

１９．ｄＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含む、実施形態１～１８のいずれかに記載の核酸構築物。

【００５９】

２０．ｄＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、及び３’ＵＴＲ配列を含む、実施形態１～１９のいずれかに記載の核酸構築物。

【００６０】

２１．ｄＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、及び３’ＵＴＲ配列を含む、実施形態１～２０のいずれかに記載の核酸構築物。

【００６１】

２２．ｄＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、及びＯＲＦ２－２配列を含む、実施形態１～２１のいずれかに記載の核酸構築物。

【００６２】

２３．ｄＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、及びイントロン配列を含む、実施形態１～２２のいずれかに記載の核酸構築物。

【００６３】

２４．ｄＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）及びＯＲＦ２配列を含

む、実施形態１～２３のいずれかに記載の核酸構築物。
【００６４】
２５．ｄＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）を含む、実施形態１～２４のいずれかに記載の核酸構築物。
【００６５】
２６．ｄＲＦＳが、複製起点を含む５’ＵＴＲを含む、実施形態１９～２５のいずれかに記載の核酸構築物。
【００６６】
２７．ｄＲＦＳが、ＧＣリッチ領域配列を含まない、実施形態１～２６のいずれかに記載の核酸構築物。
【００６７】
２８．ｄＲＦＳが、３’ＵＴＲ及びＧＣリッチ領域配列を含まない、実施形態１～２７のいずれかに記載の核酸構築物。
【００６８】
２９．ｄＲＦＳが、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含まない、実施形態１～２８のいずれかに記載の核酸構築物。
【００６９】
３０．ｄＲＦＳが、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含まない、実施形態１～２９のいずれかに記載の核酸構築物。
【００７０】
３１．ｄＲＦＳが、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含まない、実施形態１～３０のいずれかに記載の核酸構築物。
【００７１】
３２．ｄＲＦＳが、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含まない、実施形態１～３１のいずれかに記載の核酸構築物。
【００７２】
３３．ｄＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループ及び／又は複製起点を含む）、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含まない、実施形態１～３２のいずれかに記載の核酸構築物。
【００７３】
３４．ｕＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループ及び／又は複製起点を含む）、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含む、実施形態１～３３のいずれかに記載の核酸構築物。
【００７４】
３５．ｕＲＦＳが、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含む、実施形態１～３４のいずれかに記載の核酸構築物。
【００７５】
３６．ｕＲＦＳが、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含む、実施形態１～３５のいずれかに記載の核酸構築物。
【００７６】
３７．ｕＲＦＳが、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含む、実施形態１～３６のいずれかに記載の核酸構築物。
【００７７】
３８．ｕＲＦＳが、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含む、実施形態１～３７のいずれかに記載の核酸構築物。
【００７８】
３９．ｕＲＦＳが、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含む、実施形態１～３８のいずれかに記載の核酸構築物。
【００７９】
４０．ｕＲＦＳが、ＧＣリッチ領域配列を含む、実施形態１～３９のいずれかに記載の核

酸構築物。
【００８０】
４１．ｕＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）を含まない、実施形態１～４０のいずれかに記載の核酸構築物。
【００８１】
４２．ｕＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）及びＯＲＦ２配列を含まない、実施形態１～４１のいずれかに記載の核酸構築物。
【００８２】
４３．ｕＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、及びイントロン配列を含まない、実施形態１～４２のいずれかに記載の核酸構築物。
【００８３】
４４．ｕＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、及びＯＲＦ２－２配列を含まない、実施形態１～４３のいずれかに記載の核酸構築物。
【００８４】
４５．ｕＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、及びＯＲＦ３配列を含まない、実施形態１～４４のいずれかに記載の核酸構築物。
【００８５】
４６．ｕＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、及び３’ＵＴＲ配列を含まない、実施形態１～４５のいずれかに記載の核酸構築物。
【００８６】
４７．ｕＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含み、ｄＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）を含む、実施形態１～４６のいずれかに記載の核酸構築物。
【００８７】
４８．ｕＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含み、ｄＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）及びＯＲＦ２配列を含む、実施形態１～４７のいずれかに記載の核酸構築物。
【００８８】
４９．ｕＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含み、ｄＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、及びイントロン配列を含む、実施形態１～４８のいずれかに記載の核酸構築物。
【００８９】
５０．ｕＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含み、ｄＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、及びＯＲＦ２－２配列を含む、実施形態１～４９のいずれかに記載の核酸構築物。
【００９０】
５１．ｕＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含み、ｄＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、及びＯＲＦ３配列を含む、実施形態１～５０のいずれかに記載の核酸構築物。
【００９１】
５２．ｕＲＦＳが、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列を含み、ｄＲＦＳが

、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）、ＯＲＦ２、イントロン、ＯＲＦ２－２、ＯＲＦ３、及び３’ＵＴＲ配列を含む、実施形態１～５１のいずれかに記載の核酸構築物。

【００９２】

５３．ｕＲＦＳの５’ＵＴＲが、複製起点を含む、実施形態４１～５２のいずれかに記載の核酸構築物。

【００９３】

５４．ｕＲＦＳの５’ＵＴＲが、複製起点を含まない、実施形態４１～５２のいずれかに記載の核酸構築物。

【００９４】

５５．ｄＲＦＳの５’ＵＴＲが、複製起点を含む、実施形態４１～５４のいずれかに記載の核酸構築物。

【００９５】

５６．ｄＲＦＳの５’ＵＴＲが、複製起点を含まない、実施形態４１～５４のいずれかに記載の核酸構築物。

【００９６】

５７．ｕＲＦＳが、例えば、本明細書に記載される遺伝子エレメント配列の１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、１０００～１１００、１１００～１２００、１２００～１３００、１３００～１４００、１４００～１５００、１５００～１６００、１６００～１７００、１７００～１８００、１８００～１９００、１９００～２０００、２０００～２２００、２２００～２４００、２４００～２５００、２５００～２６００、２６００～２８００、若しくは２８００～３０００ｋｂ、又はそれに対して少なくとも７０％、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、実施形態１～５６のいずれかに記載の核酸構築物。

【００９７】

５８．ｄＲＦＳが、例えば、本明細書に記載される遺伝子エレメント配列の１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、１０００～１１００、１１００～１２００、１２００～１３００、１３００～１４００、１４００～１５００、１５００～１６００、１６００～１７００、１７００～１８００、１８００～１９００、１９００～２０００、２０００～２２００、２２００～２４００、２４００～２５００、２５００～２６００、２６００～２８００、若しくは２８００～３０００ｋｂ、又はそれに対して少なくとも７０％、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、実施形態１～５７のいずれかに記載の核酸構築物。

【００９８】

５９．以下：

ａ）外性エフェクターをコードする配列を含む第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域；

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；及び

ｃ）任意選択で、（ａ）と（ｂ）の間に位置するスペーサー配列

を含む、核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物。

【００９９】

６０．さらにｄ）骨格領域を含み、例えば、ここで、上記骨格領域は、細菌、哺乳動物細胞、又は昆虫細胞におけるＤＮＡ構築物の複製に好適である、実施形態５９に記載の核酸構築物。

【０１００】

６１．核酸構築物が、順に、以下：
アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントの配列を含む遺伝子エレメント領域、
任意選択で、スペーサー配列；
アネロベクタータンデム領域；及び
骨格領域
を含む、実施形態５９に記載の核酸構築物。
【０１０１】
６２．核酸構築物が、順に、以下：
アネロベクタータンデム領域；及び
任意選択で、スペーサー配列；
アネロベクター遺伝子エレメントの配列を含む遺伝子エレメント領域、
骨格領域
を含む、実施形態５９に記載の核酸構築物。
【０１０２】
６３．核酸構築物が、外性エフェクターをコードする配列の１つのみのコピーを含む、実施形態１～６２のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１０３】
６４．上記構築物が、骨格領域の長さを除いて、約１０ｋｂ未満（例えば、９ｋｂ、８ｋｂ、７ｋｂ、６ｋｂ、５ｋｂ、４ｋｂ、又は３ｋｂ）の長さを有する、実施形態１～６３のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１０４】
６５．核酸構築物が、遺伝子エレメント領域の１つのみの完全長コピーを含む、実施形態１～６４のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１０５】
６６．タンデム領域が、２８００、２７００、２６００、２５００、２０００、１５００、１０００、９００、８００、７００、６００、又は５００ヌクレオチド未満の長さを有する、実施形態１～６５のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１０６】
６７．遺伝子エレメントが、例えば、表Ａ１、Ｂ１、若しくはＣ１のいずれかの、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）由来の配列（例えば、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ、及びＧＣリッチ領域配列）、又はそれらと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％配列同一性を有する配列を含む、実施形態１～６６のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１０７】
６８．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）が、ヒトアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）である、実施形態６７に記載の核酸構築物。
【０１０８】
６９．遺伝子エレメントが、ヒト細胞において複製が可能である、実施形態１～６８のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１０９】
７０．遺伝子エレメントが、（例えば、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、及びＯＲＦ１／２の全て）の１つ以上をコードしない、実施形態１～６９のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１１０】
７１．核酸構築物が、二本鎖ＤＮＡである、実施形態１～７０のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１１１】
７２．核酸構築物が、一本鎖ＤＮＡである、実施形態１～７１のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１１２】
７３．核酸構築物が、環状である、実施形態１～７２のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１１３】
７４．核酸構築物が、プラスミド又はウイルスベクター、例えば、バキュロウイルスベクターである、実施形態１～７３のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１１４】
７５．骨格領域が、細菌、哺乳動物細胞、又は昆虫細胞における核酸構築物の複製に十分である、実施形態１～７４のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１１５】
７６．骨格領域が、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループ及び／若しくは複製起点（ＯＲＩ）を含む）と選択マーカー（例えば、正の選択マーカー（例えば、耐性マーカー）、負の選択マーカー、若しくは蛍光マーカー）の一方又は両方を含む、実施形態１～７５のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１１６】
７７．上記ＯＲＩが、細菌ＯＲＩ、ウイルスＯＲＩ、哺乳動物ＯＲＩ、又は昆虫ＯＲＩである、実施形態７６に記載の核酸構築物。
【０１１７】
７８．スペーサー配列が、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、若しくはそれ以上のアミノ酸長、又は１～５、５～１０、１０～１５、若しくは１５～２０アミノ酸長を有する、実施形態１～７７のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１１８】
７９．第１遺伝子エレメント領域が、以下：本明細書に記載される（例えば、表Ａ１～Ｍ１のいずれかに列挙される）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）由来のＴＡＴＡボックス、イニシエーターエレメント、キャップ部位、転写開始部位、５’ＵＴＲ保存ドメイン、ＯＲＦ１－コード配列、ＯＲＦ１／１コード配列、ＯＲＦ１／２コード配列、ＯＲＦ２コード配列、ＯＲＦ２／２コード配列、ＯＲＦ２／３コード配列、ＯＲＦ２／３ｔコード配列、３オープンリーディングフレーム領域、ポリ（Ａ）シグナル、及び／若しくはＧＣリッチ領域の１つ以上、又はそれらと少なくとも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、実施形態１～７８のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１１９】
８０．第２遺伝子エレメント領域若しくは断片、又はタンデム領域が、以下：本明細書に記載される（例えば、表Ａ１～Ｍ１のいずれかに列挙される）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）由来のＴＡＴＡボックス、イニシエーターエレメント、キャップ部位、転写開始部位、５’ＵＴＲ保存ドメイン、ＯＲＦ１－コード配列、ＯＲＦ１／１コード配列、ＯＲＦ１／２コード配列、ＯＲＦ２コード配列、ＯＲＦ２／２コード配列、ＯＲＦ２／３コード配列、ＯＲＦ２／３ｔコード配列、３オープンリーディングフレーム領域、ポリ（Ａ）シグナル、及び／若しくはＧＣリッチ領域の１つ以上、又はそれらと少なくとも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、実施形態１～７９のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１２０】
８１．第１遺伝子エレメント領域が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム配列（例えば、表Ａ１～Ｍ１のいずれかに列挙される）、又はそれらと少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％配列同一性を有する配列を含む、実施形態１～８０のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１２１】
８２．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム配列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％配列同一性を有する配列の少なくとも１個の追加のコピー（例えば、計２、３、４、５、若しくは６コピー）をさらに含む、実施形態８１に記載の核酸構築物。

【０１２２】

８３．異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム配列（例えば、本明細書に記載の、例えば、表Ａ１～Ｍ１のいずれかに列挙される）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％配列同一性を有する配列の少なくとも１個のコピー（例えば、計１、２、３、４、５、若しくは６コピー）を含む、実施形態８１に記載の核酸構築物。

【０１２３】

８４．第１遺伝子エレメント領域及び／又は第２遺伝子エレメント領域若しくはその断片、又はタンデム領域が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）由来の５’ＵＴＲヌクレオチド配列（例えば、表Ａ１～Ｍ１のいずれかに列挙される）に対して少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％配列同一性を有する配列を含む、実施形態１～８３のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１２４】

８５．第１遺伝子エレメント領域及び／又は第２遺伝子エレメント領域若しくはその断片、又はタンデム領域が、核酸配列：

（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）ＧＣＧＣＴＴＣＧＣＧＣＣＧＣＣＣＡＣＴＡＧＧＧＧＧＣＧＴＴＧＣＧＣＧ（配列番号１６５）；

（ｉｖ）ＧＣＧＣＴＧＣＧＣＧＣＣＧＣＣＣＡＧＴＡＧＧＧＧＧＣＧＣＡＡＴＧＣＧ（配列番号１６６）；

（ｖ）ＧＣＧＣＴＧＣＧＣＧＣＧＧＣＣＣＣＣＧＧＧＧＧＡＧＧＣＡＴＴＧＣＣＴ（配列番号１６７）；

（ｖｉ）ＧＣＧＣＴＧＣＧＣＧＣＧＣＧＣＣＧＧＧＧＧＧＧＣＧＣＣＡＧＣＧＣＣＣ（配列番号１６８）；

（ｖｉｉ）ＧＣＧＣＴＴＣＧＣＧＣＧＣＧＣＣＧＧＧＧＧＧＣＴＣＣＧＣＣＣＣＣＣ（配列番号１６９）；

（ｖｉｉｉ）ＧＣＧＣＴＴＣＧＣＧＣＧＣＧＣＣＧＧＧＧＧＧＣＴＧＣＧＣＣＣＣＣＣＣ（配列番号１７０）；

（ｉｘ）ＧＣＧＣＴＡＣＧＣＧＣＧＣＧＣＣＧＧＧＧＧＧＣＴＧＣＧＣＣＣＣＣＣＣ（配列番号１７１）；若しくは

（ｘ）ＧＣＧＣＴＡＣＧＣＧＣＧＣＧＣＣＧＧＧＧＧＧＣＴＣＴＧＣＣＣＣＣＣＣＣ（配列番号１７２）

の核酸配列；

又はそれらと少なくとも７５、７６、７７、７８、７９、８０、８５、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

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、実施形態１～８４のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１２５】

８６．第１遺伝子エレメント領域及び／又は第２遺伝子エレメント領域若しくはその断片、又はタンデム領域が、少なくとも７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、若しくは８０．６％のＧＣ含有率を有する少

なくとも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、実施形態１～８５のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１２６】

８７．以下：

ａ）変異型又は野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（任意選択で、外性エフェクターをコードする配列を含む）；

ｂ）（ａ）のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムとタンデムで配置されるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの断片；及び

ｃ）任意選択で、（ａ）と（ｂ）の間に位置するスペーサー配列

を含む、核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物。

【０１２７】

８８．以下：

ａ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域（任意選択で、外性エフェクターをコードする配列を含む）；

ｂ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域の断片；及び

ｃ）任意選択で、（ａ）と（ｂ）の間に位置するスペーサー配列

を含む、核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物。

【０１２８】

８９．以下：

ａ）以下：

ｉ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）上流複製促進配列（ｕＲＦＳ）、例えば、５’ＵＴＲ；

ｉｉ）任意選択で、外性エフェクターをコードする配列に作動可能に連結されたプロモータ；

ｉｉｉ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）下流複製促進配列（ｄＲＦＳ）、例えば、３’ＵＴＲ

を含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域；及び

ｂ）第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ｕＲＦＳ（例えば、５’ＵＴＲ）又は第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ｄＲＦＳ（例えば、３’ＵＴＲ）；並びに

ｃ）任意選択で、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域と（ｂ）との間に位置するスペーサー配列

を含む核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物において、

上記核酸構築物が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域の２つの完全長コピーを含まない、核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物。

【０１２９】

９０．以下：

ａ）以下：

ｉ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）上流複製促進配列（ｕＲＦＳ）、例えば、５’ＵＴＲ；

ｉｉ）任意選択で、外性エフェクターをコードする配列に作動可能に連結されたプロモータ；

ｉｉｉ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）下流複製促進配列（ｄＲＦＳ）、例えば、３’ＵＴＲ

を含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域；及び

ｂ）第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ｕＲＦＳ（例えば、５’ＵＴＲ）又は第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ｄＲＦＳ（例えば、３’ＵＴＲ）（第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ｕＲＦＳは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域の完全長コピーの一部ではない）；並びに

ｃ）任意選択で、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域と

（ｂ）との間に位置するスペーサー配列
を含む核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物。
【０１３０】
９１．実施形態１～９０のいずれかに記載の核酸構築物を含む細胞。
【０１３１】
９２．上記細胞が、細菌細胞、哺乳動物細胞又は昆虫細胞である、実施形態９１に記載の細胞。
【０１３２】
９３．実施形態１～９２のいずれかに記載の核酸構築物を含む反応混合物。
【０１３３】
９４．細胞と核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物を含む反応混合物であって、上記構築物が、以下：
ａ）外性エフェクターをコードする配列を含む、第１の、任意選択で変異型のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム；
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；及び
ｃ）任意選択で、（ａ）と（ｂ）との間に位置するスペーサー配列
を含む、反応混合物。
【０１３４】
９５．細胞と核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物を含む反応混合物であって、上記構築物が、以下：
ａ）外性エフェクターをコードする配列を含む、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム；
ｂ）第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム又はその断片；及び
ｃ）任意選択で、（ａ）と（ｂ）との間に位置するスペーサー配列
を含む、反応混合物。
【０１３５】
９６．細胞と核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物を含む反応混合物であって、上記構築物が、以下：
ａ）以下：
ｉ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）上流複製促進配列（ｕＲＦＳ）、例えば、５’ＵＴＲ；
ｉｉ）任意選択で、外性エフェクターをコードする配列に作動可能に連結されたプロモータ；
ｉｉｉ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）下流複製促進配列（ｄＲＦＳ）、例えば、３’ＵＴＲ
を含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域；及び
ｂ）第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ｕＲＦＳ（例えば、５’ＵＴＲ）又は第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ｄＲＦＳ（例えば、３’ＵＴＲ）；並びに
ｃ）任意選択で、（ａ）と（ｂ）との間に位置するスペーサー配列
を含む、反応混合物。
【０１３６】
９７．上記細胞が、細胞、哺乳動物細胞又は昆虫細胞である、実施形態９３～９６のいずれかに記載の反応混合物。
【０１３７】
９８．上記細胞が、核酸構築物を含む、実施形態９３～９７のいずれかに記載の反応混合物。
【０１３８】
９９．実施形態１～９０のいずれかに記載の核酸構築物を含む組成物を製造する方法であ

って、以下：
ａ）実施形態１～９０のいずれかに記載の核酸構築物を用意するステップ；並びに
ｂ）上記核酸構築物と細胞を、核酸構築物が上記細胞において複製されるのを可能にする条件下で接触させ、それによって核酸構築物の複数のコピーを生産するステップを含み、
これにより、核酸構築物を含む組成物を製造する方法。
【０１３９】
１００．以下：
ｃ）上記細胞から上記核酸構築物の複数のコピーを単離するステップ
をさらに含む、実施形態９９に記載の方法。
【０１４０】
１０１．アネロベクター遺伝子エレメントを製造する方法であって、以下：
ａ）実施形態１～９０のいずれかに記載の核酸構築物を用意するステップ；並びに
ｂ）上記核酸構築物のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントが複製若しくは増幅されるのを可能にする条件下で、核酸構築物と細胞（例えば、哺乳動物細胞）を接触させるステップを含み、
これにより、アネロベクター遺伝子エレメントを含む組成物を製造する方法。
【０１４１】
１０２．さらに以下：
ｃ）増幅されたアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントが、細胞のタンパク質性外層に封入されることを可能にする条件下で上記細胞をインキュベートするステップ
を含む、実施形態１０１に記載の方法。
【０１４２】
１０３．タンパク質性外層に封入された遺伝子エレメントを含むアネロベクターを製造する方法であって、以下：
ａ）実施形態１～９０のいずれかに記載の核酸構築物と、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントは、核酸構築物から増幅された）の１つ以上のコピーを含む細胞（例えば、哺乳動物細胞）を用意するステップ；並びに
ｂ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントが細胞のタンパク質性外層に封入されるのを可能にする条件下で、上記細胞をインキュベートするステップを含み、
これにより、アネロベクターを製造する方法。
【０１４３】
１０４．タンパク質性外層がシス又はトランスで提供される、実施形態１０２又は１０３に記載の方法。
【０１４４】
１０５．タンパク質性外層に封入されたアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントが、感染粒子、例えば、ウイルス粒子を形成する、実施形態１０２～１０４のいずれかに記載の方法。
【０１４５】
１０６．タンパク質性外層に封入された遺伝子エレメントを含むアネロベクターを製造する方法であって、以下：
ａ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントを含むＭＯＬＴ－４細胞を用意するステップ；
ｂ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントが細胞のタンパク質性外層に封入されるのを可能にする条件下で、上記細胞をインキュベートするステップを含み、
これにより、アネロベクターを製造する方法。

【０１４６】
１０７．複数の核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物を含む組成物であって、上記核酸構築物は、各々以下：
ａ）外性エフェクターをコードする配列を含む第１の、任意選択で変異型の、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム；
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；及び
ｃ）任意選択で、（ａ）と（ｂ）との間に位置するスペーサー配列
を含み；
上記組成物が、以下：
ｉ）実施形態１～９０のいずれかに記載の核酸構築物を用意するステップ；
ｉｉ）上記核酸構築物と細胞（例えば、細菌細胞）を、核酸構築物が上記細胞において複製されるのを可能にする条件下で接触させるステップ
を含む方法により生産される、組成物。
【０１４７】
１０８．複数の核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物を含む組成物であって、上記核酸構築物は、各々以下：
ａ）外性エフェクターをコードする配列を含む第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域；
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；及び
ｃ）任意選択で、（ａ）と（ｂ）との間に位置するスペーサー配列
を含み；
上記組成物が、以下：
ｉ）実施形態１～９０のいずれかに記載の核酸構築物を用意するステップ；及び
ｉｉ）上記核酸構築物と細胞（例えば、細菌細胞）を、核酸構築物が上記細胞において複製されるのを可能にする条件下で接触させるステップ
を含む方法により生産される、組成物。
【０１４８】
１０９．複数の核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物を含む組成物であって、上記核酸構築物は各々、以下：
ａ）以下：
ｉ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）上流複製促進配列（ｕＲＦＳ）、例えば、５’ＵＴＲ；
ｉｉ）外性エフェクターをコードする配列に作動可能に連結されたプロモータ；
ｉｉｉ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）下流複製促進配列（ｄＲＦＳ）、例えば、３’ＵＴＲ
を含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域；
ｂ）第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ｕＲＦＳ（例えば、５’ＵＴＲ）又は第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ｄＲＦＳ（例えば、３’ＵＴＲ）；並びに
ｃ）任意選択で、上記アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域と（ｂ）との間に位置するスペーサー配列
を含み；
ここで、上記組成物は、以下：
ｉ）実施形態１～９０のいずれかに記載の核酸構築物を用意するステップ；及び
ｉｉ）上記核酸構築物と細胞（例えば、細菌細胞）を、核酸構築物が上記細胞において複製されるのを可能にする条件下で接触させるステップ
を含む方法により生産される、組成物。
【０１４９】

１１０．外性エフェクターを細胞に送達する方法であって、上記方法は、以下：
上記細胞中に以下：
ａ）外性エフェクターをコードする配列を含む第１の、任意選択で変異型の、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム；
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；及び
ｃ）任意選択で、（ａ）と（ｂ）との間に位置するスペーサー配列
を含む核酸構築物を導入するステップ；並びに
上記外性エフェクターの発現に好適な条件下で細胞をインキュベートするステップ
を含み；
ここで、上記核酸構築物は、以下：
ｉ）実施形態１～９０のいずれかに記載の核酸構築物を用意するステップ；
ｉｉ）上記核酸構築物と細胞（例えば、細菌細胞）を、核酸構築物が上記細胞において複製されるのを可能にする条件下で接触させるステップ
を含む方法により生産される、組成物。
【０１５０】
１１１．外性エフェクターを細胞に送達する方法であって、上記方法は、以下：
上記細胞中に、以下：
ａ）外性エフェクターをコードする配列を含む第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域；
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；及び
ｃ）任意選択で、（ａ）と（ｂ）との間に位置するスペーサー配列
を含む核酸構築物を導入するステップ；並びに
上記外性エフェクターの発現に好適な条件下で上記細胞をインキュベートするステップ
を含み；
ここで、上記組成物は、以下：
ｉ）実施形態１～９０のいずれかに記載の核酸構築物を用意するステップ；
ｉｉ）上記核酸構築物と細胞（例えば、細菌細胞）を、核酸構築物が上記細胞において複製されるのを可能にする条件下で接触させるステップ
を含む方法により生産される、組成物。
【０１５１】
１１２．外性エフェクターを細胞に送達する方法であって、上記方法は、以下：
上記細胞中に、以下：
ａ）以下：
ｉ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）上流複製促進配列（ｕＲＦＳ）、例えば、５’ＵＴＲ；
ｉｉ）外性エフェクターをコードする配列に作動可能に連結されたプロモータ；
ｉｉｉ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）下流複製促進配列（ｄＲＦＳ）、例えば、３’ＵＴＲ
を含むアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域；及び
ｂ）第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ｕＲＦＳ（例えば、５’ＵＴＲ）又は第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ｄＲＦＳ（例えば、３’ＵＴＲ）；及び
ｃ）任意選択で、上記アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域と（ｂ）との間に位置するスペーサー配列
を含む核酸構築物を導入するステップ；並びに
上記外性エフェクターの発現に好適な条件下で上記細胞をインキュベートするステップ
を含み；
ここで、上記組成物は、以下：

ｉ）実施形態１～９０のいずれかに記載の核酸構築物を用意するステップ；及び
ｉｉ）上記核酸構築物と細胞（例えば、細菌細胞）を、核酸構築物が上記細胞において複製されるのを可能にする条件下で接触させるステップ
を含む方法により生産される、方法。
【０１５２】
１１３．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域を細胞のゲノムに導入する方法において、上記方法が、以下：
（ａ）実施形態１～９０のいずれかに記載の核酸構築物と細胞を接触させるステップであって、
ここで、上記核酸構築物は、５’相同性領域と３’相同性領域によりフランキングされたアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域を含み、且つ
５’相同性領域と３’相同性領域は、上記細胞のゲノム中の少なくとも９ヌクレオチド（例えば、少なくとも９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、若しくは２０ヌクレオチド）で少なくとも９０％の配列同一性（例えば、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の配列同一性）を有するステップ；及び
（ｂ）上記細胞のゲノムへのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメント領域の組み込みに好適な条件下で細胞をインキュベートするステップ
を含む、方法。
【０１５３】
１１４．以下：
ａ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（任意選択で、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム配列に対して変異を含む）；
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（任意選択で、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム配列に対して変異を含む）；及び
ｃ）任意選択で、（ａ）と（ｂ）との間に位置するスペーサー配列
を含む核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物であって、
第１又は第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコードする配列を含む、核酸構築物。
【０１５４】
１１５．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、及び／若しくはＯＲＦ２／３、並びに／又はＧＣリッチ領域をコードする１つ以上の配列を含む、実施形態１１４に記載の核酸構築物。
【０１５５】
１１６．第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、及び／若しくはＯＲＦ２／３、並びに／又はＧＣリッチ領域をコードする１つ以上の配列を含む、実施形態１１４に記載の核酸構築物。
【０１５６】
１１７．５’から３’の順に、以下：
ａ）外性エフェクターをコードする配列を含む第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（任意選択で、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム配列に対して変異を含む）；
ｂ）任意選択で、スペーサー配列、及び
ｃ）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（任意選択で、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖ

ｉｒｕｓ）ゲノム配列に対して変異を含む）
を含む核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物であって；
任意選択で、外性エフェクターを含む配列は、約５０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～９５０、９５０～１０００、１０００～１１００、１１００～１２００、１２００～１４００、１４００～１６００、１６００～１８００、１８００～２０００、２０００～２２００、又は２２００～２４００ヌクレオチド長（例えば、約９８６ヌクレオチド長）である、核酸構築物。
【０１５７】
１１８．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが：
（ｉ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２遺伝子を含まない、
（ｉｉ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２／３遺伝子の第１エキソンを含まない、及び／又は
（ｉｉｉ）切断型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子を含む、実施形態１１７に記載の核酸構築物。
【０１５８】
１１９．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが：
（ｉ）切断型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２遺伝子を含む、
（ｉｉ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２／３遺伝子の切断型第１エキソンを含む、及び／又は
（ｉｉｉ）切断型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子を含む、実施形態１１７に記載の核酸構築物。
【０１５９】
１２０．上記切断が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子の５’末端で起こる（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子の約５～１０、１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、１０００～１２００、１２００～１４００、１４００～１６００、１６００～１８００、又は１８００～２０００）が切断されている）、実施形態１１８又は１１９のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１６０】
１２１．上記切断が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子内で起こる（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子の約５～１０、１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、１０００～１２００、１２００～１４００、１４００～１６００、１６００～１８００、又は１８００～２０００）が切断されている）、実施形態１１８又は１１９のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１６１】
１２２．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが：
（ｉ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２／３遺伝子の第２エキソンを含まないか、若しくはアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２／３遺伝子の切断型第２エキソンを含む、
（ｉｉ）ＧＣリッチ領域を含まないか、若しくは切断型ＧＣリッチ領域を含む、及び／又は
（ｉｉｉ）切断型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子を含む、実施形態１１７に記載の核酸構築物。
【０１６２】

１２３．上記切断が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子内で起こる（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子の約５～１０、１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、１０００～１２００、１２００～１４００、１４００～１６００、１６００～１８００、又は１８００～２０００）が切断されている）、実施形態１２２に記載の核酸構築物。

【０１６３】

１２４．上記切断が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子の３’末端で起こる（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子の約５～１０、１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、１０００～１２００、１２００～１４００、１４００～１６００、１６００～１８００、又は１８００～２０００）が切断されている）、実施形態１２２に記載の核酸構築物。

【０１６４】

１２５．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、及び／若しくはＯＲＦ２／３遺伝子の１つ以上（例えば、１、２、若しくは３つ）が、機能性タンパク質をコードしない（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、及び／若しくはＯＲＦ２／３遺伝子の１つ以上（例えば、１、２、若しくは３つ）が、不活性化変異、例えば、未成熟終止コドン変異、フレームシフト変異、又は開始コドンを改変若しくは欠失させる変異を含む）、実施形態１１７～１２４のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１６５】

１２６．第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコードする配列をさらに含み；

任意選択で、外性エフェクターを含む上記配列は、約５０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～９５０、９５０～１０００、１０００～１１００、１１００～１２００、１２００～１４００、１４００～１６００、１６００～１８００、１８００～２０００、２０００～２２００、又は２２００～２４００ヌクレオチド長（例えば、約９８６ヌクレオチド長）である、実施形態１１７～１２５のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１６６】

１２７．５’から３’の順に、以下：

ａ）第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（任意選択で、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム配列に対して変異を含む）；

ｂ）任意選択で、スペーサー配列、及び

ｃ）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（第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、外性エフェクターをコードする配列を含み、任意選択で、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム配列に対して変異を含む）

を含む核酸（例えば、ＤＮＡ）構築物であって；

任意選択で、外性エフェクターを含む配列は、約５０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～９５０、９５０～１０００、１０００～１１００

、１１００～１２００、１２００～１４００、１４００～１６００、１６００～１８００、１８００～２０００、２０００～２２００、又は２２００～２４００ヌクレオチド長（例えば、約９８６ヌクレオチド長）である、核酸構築物。

【０１６７】

１２８．第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが：

（ｉ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２遺伝子を含まない、

（ｉｉ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２／３遺伝子の第１エキソンを含まない、及び／又は

（ｉｉｉ）切断型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子を含む、実施形態１２７に記載の核酸構築物。

【０１６８】

１２９．第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが：

（ｉ）切断型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２遺伝子を含む、

（ｉｉ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２／３遺伝子の切断型第１エキソンを含む、及び／又は

（ｉｉｉ）切断型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子を含む、実施形態１２７に記載の核酸構築物。

【０１６９】

１３０．上記切断が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子の５’末端で起こる（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子の約５～１０、１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、１０００～１２００、１２００～１４００、１４００～１６００、１６００～１８００、又は１８００～２０００）が切断されている）、実施形態１２８又は１２９に記載の核酸構築物。

【０１７０】

１３１．上記切断が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子内で起こる（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子の約５～１０、１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、１０００～１２００、１２００～１４００、１４００～１６００、１６００～１８００、又は１８００～２０００）が切断されている）、実施形態１２８又は１２９に記載の核酸構築物。

【０１７１】

１３２．第２アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが：

（ｉ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２／３遺伝子の第２エキソンを含まないか、若しくはアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ２／３遺伝子の切断型第２エキソンを含む、

（ｉｉ）ＧＣリッチ領域を含まないか、若しくは切断型ＧＣリッチ領域を含む、及び／又は

（ｉｉｉ）切断型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子を含む、実施形態１２７に記載の核酸構築物。

【０１７２】

１３３．上記切断が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子内で起こる（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子の約５～１０、１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、

８００～９００、９００～１０００、１０００～１２００、１２００～１４００、１４００～１６００、１６００～１８００、又は１８００～２０００）が切断されている）、実施形態１３２に記載の核酸構築物。

【０１７３】

１３４．上記切断が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子の３’末端で起こる（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１遺伝子の約５～１０、１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～１５０、１５０～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、１０００～１２００、１２００～１４００、１４００～１６００、１６００～１８００、又は１８００～２０００）が切断されている）、実施形態１３２に記載の核酸構築物。

【０１７４】

１３５．第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムのＯＲＦ１、ＯＲＦ２、及び／又はＯＲＦ２／３の１つ以上（例えば、１、２、若しくは３つ）が、機能性タンパク質をコードしない（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、及び／又はＯＲＦ２／３の１つ以上（例えば、１、２、若しくは３つ）が、不活性化変異、例えば、未成熟終止コドン変異、フレームシフト変異、又は開始コドンを改変若しくは欠失させる変異を含む）、実施形態１２７～１３４のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１７５】

１３６．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコードする配列をさらに含み；

任意選択で、外性エフェクターを含む上記配列は、約５０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～９５０、９５０～１０００、１０００～１１００、１１００～１２００、１２００～１４００、１４００～１６００、１６００～１８００、１８００～２０００、２０００～２２００、又は２２００～２４００ヌクレオチド長（例えば、約９８６ヌクレオチド長）である、実施形態１２７～１３５のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１７６】

１３７．上記核酸構築物が、例えば、外性エフェクターをコードする配列に、以下：プロモータ（例えば、ＳＶ４０プロモータ）、Ｋｏｚａｋ配列、及び／又はポリ－Ａ配列（例えば、ＳＶ４０ポリ－Ａ配列）の１つ以上（例えば、１、２、若しくは３つ）をさらに含む、実施形態１１７～１３６のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１７７】

１３８．上記核酸構築物が、細菌複製起点をさらに含む、実施形態１１７～１３７のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１７８】

１３９．上記核酸構築物が、選択マーカー（例えば、耐性マーカー、例えば、抗生物質耐性遺伝子、例えば、スペクチノマイシン耐性遺伝子）をさらに含む、実施形態１１７～１３８のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１７９】

１４０．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載のような）のゲノム配列に対して、又は少なくとも５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、２０００、２１００、２２００、２３００、２４００、２５００、２６００、２７００、２８００、２９００、若しくは３０００ヌクレオチド長を有するその連続した部分（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）のゲノム配列の要素）に対して、少なくとも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、実施形態１１４～１３９のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１８０】

１４１．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載のような）のゲノム配列に対して、又は約５０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、１０００～１１００、１１００～１２００、１２００～１３００、１３００～１４００、１４００～１５００、１５００～１６００、１６００～１７００、１７００～１８００、１８００～１９００、１９００～２０００、２０００～２１００、２１００～２２００、２２００～２３００、２３００～２４００、２４００～２５００、２５００～２６００、２６００～２７００、２７００～２８００、２８００～２９００、若しくは２９００～３０００ヌクレオチド長を有するその連続した部分（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）のゲノム配列の要素）に対して、少なくとも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、実施形態１１４～１３９のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１８１】

１４２．第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載のような）のゲノム配列に対して、又は少なくとも５０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、２０００、２１００、２２００、２３００、２４００、２５００、２６００、２７００、２８００、２９００、若しくは３０００ヌクレオチド長を有するその連続した部分（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）のゲノム配列の要素）に対して、少なくとも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、実施形態１１４～１４０のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１８２】

１４３．第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、野生型アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（例えば、本明細書に記載のような）のゲノム配列に対して、又は約５０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、４００～５００、５００～６００、６００～７００、７００～８００、８００～９００、９００～１０００、１０００～１１００、１１００～１２００、１２００～１３００、１３００～１４００、１４００～１５００、１５００～１６００、１６００～１７００、１７００～１８００、１８００～１９００、１９００～２０００、２０００～２１００、２１００～２２００、２２００～２３００、２３００～２４００、２４００～２５００、２５００～２６００、２６００～２７００、２７００～２８００、２８００～２９００、若しくは２９００～３０００ヌクレオチド長を有するその連続した部分（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）のゲノム配列の要素）に対して、少なくとも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、実施形態１１４～１４１のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１８３】

１４４．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコードし、

第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、アネロウイルス（Ａｎｅ

ｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（例えば、Ｒｉｎｇ２）のヌクレオチド１～２８１２を含む切断型ゲノム、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配列であり；
ここで、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの３’側である、実施形態１１４～１４３のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１８４】
１４５．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコードし、
第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（例えば、Ｒｉｎｇ２）のヌクレオチド１～２５８３を含む切断型ゲノム、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配列であり；
ここで、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの３’側である、実施形態１１４～１４３のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１８５】
１４６．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコードし、
第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（例えば、Ｒｉｎｇ２）のヌクレオチド１～２２６４を含む切断型ゲノム、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配列であり；
ここで、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの３’側である、実施形態１１４～１４３のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１８６】
１４７．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコードし、
第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（例えば、Ｒｉｎｇ２）のヌクレオチド１～７２３を含む切断型ゲノム、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配列であり；
ここで、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの３’側である、実施形態１１４～１４３のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１８７】
１４８．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコードし、
第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（例えば、Ｒｉｎｇ２）の５’末端側７２３～２２６４、２２６４～２５８３、若しくは２５８３～２８１２ヌクレオチドを含む切断型ゲノム、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配列であり；
ここで、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの３’側である、実施形態１１４～１４３のいずれかに記載の核酸構築物。
【０１８８】
１４９．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコードし、

第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（例えば、Ｒｉｎｇ２）の５’末端側７００～８００、８００～１０００、１０００～１５００、１５００～２０００、２０００～２５００、若しくは２５００～２９００ヌクレオチドを含む切断型ゲノム、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配列であり；

ここで、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの３’側である、実施形態１１４～１４３のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１８９】

１５０．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコードし、

第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（例えば、Ｒｉｎｇ２）の３’末端側２７１２ヌクレオチド（例えば、ヌクレオチド２６７～２９７９）を含む切断型ゲノム、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配列であり；

ここで、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの５’側である、実施形態１１４～１４３のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１９０】

１５１．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコードし、

第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（例えば、Ｒｉｎｇ２）の３’末端側２５５６ヌクレオチド（例えば、ヌクレオチド４２３～２９７９）を含む切断型ゲノム、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配列であり；

ここで、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの５’側である、実施形態１１４～１４３のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１９１】

１５２．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコードし、

第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（例えば、Ｒｉｎｇ２）の３’末端側２２５６ヌクレオチド（例えば、ヌクレオチド７２３～２９７９）を含む切断型ゲノム、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配列であり；

ここで、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの５’側である、実施形態１１４～１４３のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１９２】

１５３．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコードし、

第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（例えば、Ｒｉｎｇ２）の３’末端側７０６ヌクレオチド（例えば、ヌクレオチド２２７３～２９７９）を含む切断型ゲノム、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配列であり；

ここで、第２アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの５’側である、実施形態１１４～１４３のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１９３】

１５３．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコードし、

第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（例えば、Ｒｉｎｇ２）の３’末端側７０６～２２５６、２２５６～２５５６、若しくは２５５６～２７１２ヌクレオチドを含む切断型ゲノム、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配列であり；

ここで、第２アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの５’側である、実施形態１１４～１４３のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１９４】

１５４．第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、外性エフェクターをコードし、

第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（例えば、Ｒｉｎｇ２）の３’末端側７００～８００、８００～１０００、１０００～１５００、１５００～２０００、２０００～２５００、若しくは２５００～２８００ヌクレオチドを含む切断型ゲノム、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配列であり；

ここで、第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、第１のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの５’側である、実施形態１１４～１４３のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１９５】

１５５．第２のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムが、ＯＲＦ１、ＯＲＦ２、ＯＲＦ２／２、ＯＲＦ２／３、ＯＲＦ１／１、又はＯＲＦ１／２の１つ以上をコードする、請求項１１４～１５４のいずれかに記載の核酸構築物。

【０１９６】

１５６．タンパク質性外層に封入された遺伝子エレメントを含むアネロベクターを製造する方法であって、上記方法が、以下：

ａ）請求項１１４～１５５のいずれかに記載の核酸構築物と、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントの１つ以上のコピーを含む細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えば、ＭＯＬＴ－４細胞）を用意するステップ（例えば、ここで、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントは、核酸構築物から増幅された）；

ｂ）アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）遺伝子エレメントがタンパク質性外層（アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子を含む）に封入されることを可能にする条件下で、上記細胞をインキュベートするステップ

を含み；

それにより、アネロベクターを製造する方法。

【０１９７】

１５７．タンパク質性外層が、シス又はトランスで提供される、実施形態１５６に記載の方法。

【０１９８】

１５８．アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質性外層に封入された遺伝子エレメントが、感染性粒子、例えば、ウイルス粒子を形成する、実施形態１５６又は１５７に記載の方法。

【０１９９】

１５９．ステップａ）の前に、上記細胞を核酸構築物でトランスフェクトするステップをさらに含む、実施形態１５６～１５８のいずれかに記載の方法。
【０２００】
１６０．ステップｂ）の後に、細胞を溶解させるステップをさらに含む、実施形態１５６～１５９のいずれかに記載の方法。
【０２０１】
１６１．さらには、細胞溶解物をベンゾナーゼで処理するステップ（例えば、室温で、例えば、約６０、７０、９０、１００、１１０、又は１２０分にわたり、例えば、１００Ｕ／ｍｌのベンゾナーゼ）、任意選択で細胞溶解物の清澄化及び／又は等密度遠心分離をさらに含む、実施形態１６０に記載の方法。
【０２０２】
１６２．溶解物を分画するステップ及びアネロベクターを含有する画分を収集するステップをさらに含む、実施形態１６０又は１６１に記載の方法。
【０２０３】
１６３．アネロベクターが、細胞（例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞）を感染させることができる、実施形態１５６～１６２のいずれかに記載の方法。
【０２０４】
１６４．細胞に外性エフェクターを送達する方法であって、上記方法が、実施形態９９～１０６又は１５６～１６３のいずれかの方法により作製されたアネロベクターを上記細胞に導入するステップ、及び外性エフェクターの発現に好適な条件下で上記細胞をインキュベートするステップを含む、方法。
【０２０５】
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。
【０２０６】
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】
【０２０７】
【図１ＡＢ】図１Ａ～図１Ｃは、タンデムアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）プラスミドがアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）産生を増加させることができることを示す一連の図である。（Ａ）例示的なタンデムアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）プラスミドのプラスミドマップ。（Ｂ）タンデムアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）プラスミドを用いたＭＯＬＴ－４細胞のトランスフェクションにより、野生型サイズのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの回収が達成された。（Ｃ）タンデムアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）プラスミドからＭＯＬＴ－４細胞で産生されたアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは、包膜されたウイルス粒子について予測される密度で移動する。ＧＣＲ＝ＧＣリッチ領域。細菌ＳＭ＝細菌選択マーカー。細菌ｏｒｉ＝細菌複製起点。ＯＲＦ＝オープンリーディングフレーム。Ｐｒｏｍ．＝プロモータ。５ＣＤ＝５’非翻訳領域保存ドメイン。
【図１Ｃ】同上。
【図２Ａ】図２Ａ～図２Ｅは、Ｒｉｎｇ２ゲノムに基づく例示的なタンデム構築物を示す一連の図である。（Ａ）遺伝子エレメントの第１コピーと、第１コピーに対して３’側に位置する遺伝子エレメントの完全又は部分的な第２コピーとを含むタンデム構築物。連続する各構築物は、第２コピーの３’末端のより大きな切断を含む。構築物は、下流複製促進配列（ｄＲＦＳ）、例えば、表示されるように、５ＣＤ（５’ＵＴＲ保存ドメイン）を含み得る。（Ｂ）遺伝子エレメントの第１コピーと、第１コピーに対して５’側に位置す

る遺伝子エレメントの完全又は部分的な第２コピーとを含むタンデム構築物。連続する各構築物は、第２コピーの５’末端のより大きな切断を含む。（Ｃ）遺伝子エレメントの部分的な第１コピー（例えば、ｕＲＦＳを含む）と、第１コピーに対して５’側に位置する遺伝子エレメントの部分的な第２コピー（例えば、ｄＲＦＳを含む）とを含むタンデム構築物。連続する各構築物は、第１コピーの５’末端のより大きな切断と、第２コピーの３’末端のより大きな割合を含む。（Ｄ）２Ａ及び２Ｂに示す構築物でトランスフェクトされたＭＯＬＴ－４細胞から採取した全ＤＮＡのサザンブロットであり、野生型長さのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの回収を実証するものである。（Ｅ）ＣｓＣｌ密度勾配からのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムのＤＮａｓｅ保護ｑＰＣＲは、ＭＯＬＴ－４細胞で産生されたアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの２Ａ及び２Ｂに示す構築物による封入を実証する。

【図２Ｂ】同上。

【図２Ｃ】同上。

【図２ＤＥ】同上。

【図２Ｆ－１】図２Ｆは、様々なＲｉｎｇ１構築物（表示される通り）でトランスフェクトされたジャーカット（Ｊｕｒｋａｔ）細胞からの完全長Ｒｉｎｇ１　ＯＲＦ１　ｍＲＮＡについての長いＲＮＡリードを示す一連の図であり、これは、Ｒｉｎｇ１骨格の第１コピーにおいて、ｅＧＦＰ－ＯＲＦ１融合タンパク質をコードする配列をコードするタンデムＲｉｎｇ１構築物を含む。

【図２Ｆ－２】同上。

【図２Ｆ－３】同上。

【図２Ｆ－４】同上。

【図２Ｆ－５】同上。

【図２Ｇ】図２Ｇは、ヌクレオフェクションによりＲｉｎｇ２タンデム構築物が導入されたＭＯＬＴ－４細胞におけるＯＲＦ１タンパク質発現の検出を示す一連の図である。

【図２Ｈ】図２Ｈは、タンデムに配置された２つのＲｉｎｇ２ゲノムを含む例示的なバキュロウイルス構築物を示す図である。

【図２Ｉ】図２Ｉは、バキュロウイルスを介したＳｆ９細胞へのタンデムＲｉｎｇ２ゲノムの送達を示す一連の図である。

【図３】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４】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５】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６Ａ】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６Ｂ】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７Ａ】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７Ｂ】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８Ａ】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８Ｂ】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９Ａ】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９Ｂ】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Ｐ

ＣＲ結果を描く。
【図１０Ａ】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１０Ｂ】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１１】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１２】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１３】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１４】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１５】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１６Ａ】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１６Ｂ】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１７Ａ】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１７Ｂ】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１７Ｃ】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１８Ａ】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１８Ｂ】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１８Ｃ】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１８Ｄ】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１９】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２０】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２１】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２２】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２３】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。
【図２４Ａ】図２４Ａ～図２４Ｂは、野生型Ｒｉｎｇ２ゲノムの２つのコピーを各々含む例示的なタンデム構築物を示す一連の図である。第１の構成物では、Ｒｉｎｇ２ゲノムの両方のコピーが野生型配列である。残りの構築物では、Ｒｉｎｇ２ゲノムの一方のコピーは野生型であり、Ｒｉｎｇ２ゲノムの他方のコピーは挿入されたナノ－ルシフェラーゼカセットを含む。ナノ－ルシフェラーゼカセットを有するＲｉｎｇ２ゲノムのコピーは、開始コドンを変異させることにより、さらに変異して、内部でのＯＲＦの遺伝子発現をノックアウトし、Ｒｉｎｇ２ゲノムの野生型コピーのみがＯＲＦ遺伝子を発現できるようにする。
【図２４Ｂ】図２４Ａ～図２４Ｂは、野生型Ｒｉｎｇ２ゲノムの２つのコピーを各々含む例示的なタンデム構築物を示す一連の図である。第１の構成物では、Ｒｉｎｇ２ゲノムの両方のコピーが野生型配列である。残りの構築物では、Ｒｉｎｇ２ゲノムの一方のコピーは野生型であり、Ｒｉｎｇ２ゲノムの他方のコピーは挿入されたナノ－ルシフェラーゼカセットを含む。ナノ－ルシフェラーゼカセットを有するＲｉｎｇ２ゲノムのコピーは、開始コドンを変異させることにより、さらに変異して、内部でのＯＲＦの遺伝子発現をノックアウトし、Ｒｉｎｇ２ゲノムの野生型コピーのみがＯＲＦ遺伝子を発現できるようにする。
【図２５】図２５は、等密度超遠心分離による、タンデム構築物でトランスフェクトしたＭＯＬＴ－４細胞からのＲｉｎｇ２粒子のレスキューを実証する代表的なデータを示すグラフである。各画分の密度は黒色で表され、各画分のＤＮＡｓｅ保護ＲＩＮＧ２力価は灰色で示されている。
【図２６Ａ】図２６Ａ～２６Ｂは、（Ａ）ｑＰＣＲ、ウエスタンブロット、及びクマシー染色；（Ｂ）透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）分析を用いた精製済Ｒｉｎｇ２粒子の特性決定を示す一連の図である。
【図２６Ｂ】図２６Ａ～２６Ｂは、（Ａ）ｑＰＣＲ、ウエスタンブロット、及びクマシー染色；（Ｂ）透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）分析を用いた精製済Ｒｉｎｇ２粒子の特性決定を示す一連の図である。
【発明を実施するための形態】
【０２０８】
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。

【０２０９】
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。
【０２１０】
「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。
【０２１１】
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。
【０２１２】
「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。
【０２１３】
「・・・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。
【０２１４】
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。
【０２１５】
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。

【０２１６】

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封入された環状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封入されたとは、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。

【０２１７】

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。

【０２１８】

本明細書で使用される場合、「下流複製促進配列」（ｄＲＦＳ）は、遺伝子エレメントの配列（例えば、本明細書に記載の通り）の断片を指し、これは、遺伝子エレメント配列の下流に位置する（例えば、遺伝子エレメントは、ｄＲＦＳに対して５’側である）場合、ｄＲＦＳの非存在下で、それ以外は類似の遺伝子エレメント配列と比較して遺伝子エレメント配列の複製を増加させる。一般に、得られる複製鎖は、タンパク質性外層に封入されて、アネロベクター（例えば、本明細書に記載の通り）を形成することができる機能的な遺伝子エレメントである。一部の実施形態では、ｄＲＦＳは、Ｒｅｐタンパク質（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｒｅｐタンパク質）に対する置換部位を含む。一部の実施形態では、ｄＲＦＳは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）３’ＵＴＲ配列若しくはその断片、又は少なくとも７０％、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、ｄＲＦＳは、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）を含む。一部の実施形態では、ｄＲＦＳは、複製起点を含む。

【０２１９】

本明細書で使用される場合、「上流複製促進配列」（ｕＲＦＳ）は、遺伝子エレメント

の配列（例えば、本明細書に記載の通り）の断片を指し、これは、遺伝子エレメント配列の上流に位置する（例えば、遺伝子エレメントは、ｕＲＦＳに対して３’側である）場合、ｕＲＦＳの非存在下で、それ以外は類似の遺伝子エレメント配列と比較して遺伝子エレメント配列の複製を増加させる。一般に、得られる複製鎖は、タンパク質性外層に封入されて、アネロベクター（例えば、本明細書に記載の通り）を形成することができる機能的な遺伝子エレメントである。一部の実施形態では、ｕＲＦＳは、Ｒｅｐタンパク質（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｒｅｐタンパク質）に対する結合及び／又は認識部位を含む。一部の実施形態では、ｕＲＦＳは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）５’ＵＴＲ配列若しくはその断片、又は少なくとも７０％、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、ｕＲＦＳは、５’ＵＴＲ（例えば、ヘアピンループを含む）を含む。一部の実施形態では、ｕＲＦＳは、複製の起点を含む。

【０２２０】

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、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。

【０２２１】

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。

【０２２２】

「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。

【０２２３】

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封入されているか、又は封入されることができる（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、さら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。

【０２２４】

本明細書において使用される場合、「遺伝子エレメント構築物」は、少なくとも１つ（例えば、２つ）の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、コスミド、若しくはミニサークル）を指す。一部の実施形態では、本明細書に記載されるタンデム構築物は、タンデムで配置された２つ以上の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（例えば、本明細書に記載される通り）。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、少なくとも１つの完全長遺

伝子エレメント配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、完全長遺伝子エレメント配列及び部分的遺伝子エレメント配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、２つ以上の部分的遺伝子エレメント配列（例えば、ＰＣＴ／ＵＳ１９／６５９９５号明細書の図２Ｃに示されるように、例えば、５’から３’の順に、３’側切断型遺伝子エレメント配列とタンデムで配置された５’型切断型遺伝子エレメント配列）を含む。

【０２２５】

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封入され、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、ｕＲＦＳを含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント領域は、ｄＲＦＳ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封入されないが、構築物から産生された遺伝子エレメントをタンパク質性外層に封入することができる。一部の実施形態では、遺伝子エレメント領域を含む構築物は、第２のｕＲＦＳ又は第２のｄＲＦＳをさらに含む。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、ベクター骨格をさらに含む。

【０２２６】

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。

【０２２７】

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。

【０２２８】

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。

【０２２９】

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。

【０２３０】

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。

【０２３１】

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。

【０２３２】

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。

【０２３３】

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。

【０２３４】
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。
【０２３５】
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。
【０２３６】
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。
【０２３７】
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み込みは、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。
【０２３８】
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；Ｆｒｏｎ

ｔ．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。

【０２３９】

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。

【０２４０】

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封入された、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。

【０２４１】

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．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
Ｂ．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．シス／トランス構築物
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）タンパク質をシス又はトランス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

【０２４２】

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、いくつかの態様では、例えば、本明細書に記載のネロベクターを生産するために使用することができる核酸タンデム構築物を提供する。タンデム構築物は、一般に、第１の遺伝子エレメント領域を含み、これは、核酸構築物の残りの部分に接続されていない場合、及び／又は環状の一本鎖ＤＮＡ分子に変換されない場合、タンパク質性外層内に封入することができ、それによりアネロベクターを産生することができる。タンデム構築物は、第２の遺伝子エレメント領域、又はその一部をさらに含んでもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載のタンデム構築物を使用して、例えば、ローリングサークル増幅により、タンパク質性外層（例えば、ＯＲＦ１核酸によってコードされるポリペプチドを含む）への封入に好適な遺伝子エレメントを生産することができる。一部の実施形態では、タンパク質性外層への封入に適した遺伝子エレメントは、第１の遺伝子エレメント領域のローリングサークル増幅を介して産生される。

【０２４３】

一部の実施形態では、タンデム構築物は、遺伝子エレメント配列の第１コピー（例えば、遺伝子エレメント領域）と、遺伝子エレメント配列の第２コピーの少なくとも一部（例えば、ｕＲＦＳ又はｄＲＦＳを含む）とを含む核酸構築物である。一部の実施形態では、第２コピーは、遺伝子エレメントの完全配列を含む。一部の実施形態では、第２コピーは、遺伝子エレメントの部分配列（例えば、５’末端又は３’末端から、例えば、遺伝子エレメント配列の少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は９５％）を含む。一部の実施形態では、第１コピーの遺伝子エレメント配列及び第２コピーの遺伝子エレメント配列は、同じ遺伝子エレメント配列（例えば、同じアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）配列）であるか、又はそれに由来する。一部の実施形態では、第１コピーの遺伝子エレメント配列及び第２コピーの遺伝子エレメント配列は、異なる遺伝子エレメント配列（例えば、異なるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）由来の配列）であるか、又はそれらに由来する。一部の実施形態では、遺伝子エレメント配列の第１コピー及び遺伝子エレメント配列の第２コピーは、核酸構築物上で互いに隣接して位置している。他の実施形態では、遺伝子エレメント配列の第１コピー及び遺伝子エレメント配列の第２コピーは、例えば、スペーサー領域によって分離され得る。一部の実施形態では、遺伝子エレメント配列又はその一部の第２コピー（例えば、ｕＲＦＳを含む）は、遺伝子エレメント配列の第１コピーに対して５’側に位置する。一部の実施形態では、遺伝子エレメント配列又はその一部の第２コピー（例えば、ｄＲＦＳを含む）は、遺伝子エレメント配列の

第１コピーに対して３’側に位置する。
【０２４４】
理論に束縛されることは望まないが、ローリングサークル増幅は、第１の遺伝子エレメント領域に対して（例えば、第２の遺伝子エレメント領域内で、例えば、ｕＲＦＳ又はｄＲＦＳにおいて）５’側（又は５’領域内）に位置するＲｅｐ結合部位（例えば、本明細書に記載されるように、例えば、５’ＵＴＲ、例えば、ヘアピンループ及び／若しくは複製起点を含む）に結合するＲｅｐタンパク質を介して起こり得る。次に、Ｒｅｐタンパク質は、第１の遺伝子エレメント領域を通って進行することができ、それにより、遺伝子エレメントの合成が達成される。一部の実施形態では、第２の遺伝子エレメント領域又はその一部は、第１の遺伝子エレメント領域に対して３’側に位置する。理論に束縛されることは望まないが、Ｒｅｐタンパク質は、３’側に位置する第２の遺伝子エレメント領域に到達したとき、例えば、第２の遺伝子エレメント領域におけるＲｅｐ結合部位（例えば、５’ＵＴＲ、ヘアピンループ、及び／又は第２の遺伝子エレメント配列における複製起点）に到達したとき、タンデム構築物から分離し得ると考えられ、それにより、合成された遺伝子エレメントを放出する。放出された遺伝子エレメントは、次に環状化された後、タンパク質性外層内に封入されてアネロベクターを形成することができる。
【０２４５】
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）に封入さ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。
【０２４６】
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）内に封入す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、本明細書に記載されるような）中のタンパク質性外層内に封入される。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。

【０２４７】

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。他の実施形態では、核酸構築物は、インビトロで遺伝子エレメントの核酸配列を環状化することによって生成される二本鎖ミニサークルである。実施形態において、インビトロ環状化（ＩＶＣ）ミニサークルは、宿主細胞に導入され、そこで、本明細書に記載されるように、タンパク質性外層への封入に好適な一本鎖遺伝子エレメントに変換される。

【０２４８】

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に封入することによって作製することができる。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核酸によってコードされるポリペプチド（例えば、アネロウイルスＯＲＦ１分子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もの）を含む。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。

【０２４９】

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。

【０２５０】

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、タンデム構築物を使用して産生されるもの）を封入することができる。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。

【０２５１】

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。

【０２５２】

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封入さ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、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。

【０２５３】

一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、遺伝子エレメント配列の１コピーを含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、遺伝子エレメント配列の複数のコピー（例えば、遺伝子エレメント配列の２つのコピー）を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメントは、遺伝子エレメント配列の１つの完全長コピー及び少なくとも１つの部分遺伝子エレメント配列を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント配列の２つのコピー（例えば、完全長及び／又は部分遺伝子エレメント配列）は、遺伝子エレメント構築物内でタンデムに配置される（例えば、本明細書に記載されるように）。

【０２５４】

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。

【０２５５】

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）。

【０２５６】

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。

【０２５７】

インビトロ環状化

いくつかの例において、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、実施例２０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。

【０２５８】

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、さら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。

【０２５９】

シス／トランス構築物

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を宿主細胞中にシス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、トランスで提供される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）。

【０２６０】

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）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する配列（例えば、本明細書に記載されるように、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）。さらなる実施形態では、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）内の封入は、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（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦをコード化するさら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。

【０２６１】

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）内の封入は、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。

【０２６２】
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。
【０２６３】
ポリペプチド発現カセットは、一般に、プロモータとポリペプチド、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としては、構成的プロモータ（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（例えば、骨格筋α－アクチンプロモータ、ミオシン軽鎖２Ａプロモータ、ジストロフィンプロモータ、筋クレアチンキナーゼプロモータ、肝臓アルブミンプロモータ、Ｂ型肝炎ウイルスコアプロモータ、オステオカルシンプロモータ、骨シアロタンパク質プロモータ、ＣＤ２プロモータ、免疫グロブリン重鎖プロモータ、Ｔ細胞受容体ａ鎖プロモータ、ニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）プロモータ、又はニューロフィラメント軽鎖プロモータ）、並びに誘導性プロモータ（例えば、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さらに含む。
【０２６４】
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。
【０２６５】
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。

【０２６６】

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。

【０２６７】

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シス若しくはトランスで供給され得るように設計することができる。例えば、シスで供給される場合、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。

【０２６８】

別の例では、複製又はパッケージング因子がトランスで供給される場合、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（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）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、最小限のシスシグナル（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。

【０２６９】

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。

【０２７０】

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。

【０２７１】

エフェクター

本明細書に記載の組成物及び方法は、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。

【０２７２】

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、プロモータ若しくはエンハンサー）を含む。

【０２７３】

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、タンデム構築物）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生産される。一部の実施形態では、タンデム構築物は、エフェクターコード配列の厳密に１つのコピーを含む。一部の実施形態では、タンデム構築物は、エフェクターコード配列の２つ以上（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、又はそれ以上）のコピーを含む。一部の実施形態では、タンデム構築物は、エフェクターコード配列の１つの完全長コピーと、エフェクターコード配列の少なくとも１つ（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、又はそれ以上）の部分コピー（例えば、エフェクターコード配列の５’側切断又は３’側切断を含む部分コピー）を含む。

【０２７４】

宿主細胞

本明細書に記載のアネロベクターは、例えば、宿主細胞内で産生することができる。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成分（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１核酸又はアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子によってコードされるポリペプチド）とを含む宿主細胞が提供される。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封入に好適な条件下で（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さら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。

【０２７５】

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。

【０２７６】

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。

【０２７７】

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。

【０２７８】

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細胞をトランスフェクトすることができる。或いは、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、ウイルス）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、ウイルス）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。

【０２７９】

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。

【０２８０】

アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質をシス又はトランスで提供するための方法

一部の実施形態（例えば、本明細書に記載のシス実施形態）では、遺伝子エレメント構築物は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）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さらに含む。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封入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、宿主細胞におけるシスアネロベクター産生方法に使用することができる。

【０２８１】

一部の実施形態（例えば、本明細書に記載のトランス実施形態）では、遺伝子エレメントは、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封入することができない。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トランスアネロベクター産生方法に使用することができる。

【０２８２】

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）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後に宿主細胞に導入される。

【０２８３】

例示的な細胞型

アネロベクターの生産に適した例示的な宿主細胞として、限定するものではないが、哺乳動物細胞及び昆虫細胞が挙げられる。一部の実施形態では、宿主細胞は、ヒト細胞又は細胞株である。一部の実施形態では、細胞は、免疫細胞又は細胞株、例えば、Ｔ細胞又は細胞株、癌細胞株、肝細胞又は細胞株、ニューロン、グリア細胞、皮膚細胞、上皮細胞、間葉系細胞、血球細胞、内皮細胞、眼細胞、胃腸細胞、前駆細胞、前駆体細胞、幹細胞、肺細胞、心臓細胞、又は筋肉細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞は、動物細胞（例えば、マウス細胞、ラット細胞、ウサギ細胞、ハムスター細胞、又は昆虫細胞）である。

【０２８４】

一部の実施形態では、宿主細胞は、リンパ系細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞は、Ｔ細胞又は不死化Ｔ細胞である。実施形態において、宿主細胞は、ジャーカット（Ｊｕｒｋａｔ）細胞である。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、ＭＯＬＴ細胞（例えば、ＭＯＬＴ－４又はＭＯＬＴ－３細胞）である。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、ＭＯＬＴ－４細胞である。実施形態において、宿主細胞は、ＭＯＬＴ－３細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞は、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）細胞、例えば、ＭＯＬＴ細胞、例えば、ＭＯＬＴ－４又はＭＯＬＴ－３細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞は、Ｂ細胞又は不死化Ｂ細胞である。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、タンデム構築物（例えば、本明細書に記載される通り）を含む。

【０２８５】

一部の実施形態では、宿主細胞は、ＭＯＬＴ細胞（例えば、ＭＯＬＴ－４又はＭＯＬＴ－３細胞）である。

【０２８６】

一部の実施形態では、宿主細胞は、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）細胞、例えば、ＭＯＬＴ細胞、例えば、ＭＯＬＴ－４又はＭＯＬＴ－３細胞である。

【０２８７】

一態様では、本開示は、タンパク質性外層に封入された遺伝子エレメントを含むアネロベクターの製造方法を提供し、この方法は、アネロベクター遺伝子エレメントを含むＭＯＬＴ－４細胞を用意するステップと、アネロベクター遺伝子エレメントがＭＯＬＴ－４細胞内のタンパク質性外層に封入されることを可能にする条件下で、ＭＯＬＴ－４細胞をインキュベートするステップと、を含む。一部の実施形態では、ＭＯＬＴ－４細胞は、タンパク質性外層の一部又は全部を形成する１つ以上のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子）をさらに含む。一部の実施形態では、アネロベクター遺伝子エレメントは、ＭＯＬＴ－４細胞において、例えば、遺伝子エレメント構築物（例えば、本明細書に記載の通り）から

産生される。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、タンデム構築物である（例えば、本明細書に記載の通り）。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、タンデム構築物ではない（例えば、本明細書に記載の通り）。一部の実施形態では、この方法は、アネロベクター遺伝子エレメント構築物をＭＯＬＴ－４細胞に導入することをさらに含む。

【０２８８】

一態様では、本開示は、タンパク質性外層に封入された遺伝子エレメントを含むアネロベクターの製造方法を提供し、この方法は、アネロベクター遺伝子エレメントを含むＭＯＬＴ－３細胞を用意するステップと、アネロベクター遺伝子エレメントがＭＯＬＴ－３細胞内のタンパク質性外層に封入されることを可能にする条件下で、ＭＯＬＴ－３細胞をインキュベートするステップと、を含む。一部の実施形態では、ＭＯＬＴ－３細胞は、タンパク質性外層の一部又は全部を形成する１つ以上のアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）タンパク質（例えば、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１分子）をさらに含む。一部の実施形態では、アネロベクター遺伝子エレメントは、ＭＯＬＴ－３細胞において、例えば、遺伝子エレメント構築物（例えば、本明細書に記載の通り）から産生される。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、タンデム構築物である（例えば、本明細書に記載の通り）。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、タンデム構築物ではない（例えば、本明細書に記載の通り）。一部の実施形態では、この方法は、アネロベクター遺伝子要素構築物をＭＯＬＴ－３細胞に導入することをさらに含む。

【０２８９】

複数の実施形態において、宿主細胞は、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞、ＨＥＫ２９３Ｆ細胞、Ａ５４９細胞、ジャーカット（Ｊｕｒｋａｔ）細胞、Ｒａｊｉ細胞、Ｃｈａｎｇ細胞、ヒーラ（ＨｅＬａ）細胞、フェニックス（Ｐｈｏｅｎｉｘ）細胞、ＭＲＣ－５細胞、ＮＣＩ－Ｈ２９２細胞、又はＷｉ３８細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞は、非ヒト霊長類細胞（例えば、Ｖｅｒｏ細胞、ＣＶ－１細胞、又はＬＬＣＭＫ２細胞）である。一部の実施形態では、宿主細胞は、マウス細胞（例えば、ＭｃＣｏｙ細胞）である。一部の実施形態では、宿主細胞は、ハムスター細胞（例えば、ＣＨＯ細胞又はＢＨＫ２１細胞）である。一部の実施形態では、宿主細胞は、ＭＡＲＣ－１４５、ＭＤＢＫ、ＲＫ－１３、又はＥＥＬ細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞は、上皮細胞（例えば、上皮系譜の細胞株）である。

【０２９０】

いくつかの実施形態では、アネロベクターは、連続した動物細胞株（例えば、連続的に増殖することができる不死化細胞株）で培養する。本発明の一実施形態によれば、細胞株は、ブタ細胞株を含み得る。本発明に関連して想定される細胞株としては、限定されないが、ブタ腎臓上皮細胞株ＰＫ－１５及びＳＫなどの不死化ブタ細胞株、単骨髄系細胞株３Ｄ４／３１及び精巣細胞株ＳＴが挙げられる。

【０２９１】

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は、遺伝子エレメントのタンパク質性外層の封入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、１０、１２～１６、又は２０のいずれか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。

【０２９２】

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。

【０２９３】

採取

宿主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９］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１５］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。

【０２９４】

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。

【０２９５】

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。

【０２９６】

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タンデム構築物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。

【０２９７】

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。

【０２９８】

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封入されており；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。

【０２９９】

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。

【０３００】

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封入されており；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。

【０３０１】

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、これを包膜又は封入するタンパク質性外層

を含むアネロベクターを含む。

【０３０２】

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。

【０３０３】

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。

【０３０４】

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。

【０３０５】

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。

【０３０６】

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。

【０３０７】

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。

【０３０８】

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。

【０３０９】

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、トランス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。

【０３１０】

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。

【０３１１】

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、ＯＲＦ１／１、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。

【０３１２】

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．（２

００２）４４：１６７－１７７；Ｂｉａｇｉｎｉ，Ｐ．，Ｖｅｔ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．（２００４）９８：９５－１０１）。

【０３１３】

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）。

【０３１４】

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。

【０３１５】

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。

【０３１６】

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。

【０３１７】

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。

【０３１８】

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％、８

０％、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。

【０３１９】

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。

【０３２０】

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。

【０３２１】

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％、９

８％、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。

【０３２２】

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。

【０３２３】

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。

【０３２４】

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。

【０３２５】

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。

【０３２６】

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。

【０３２７】

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。

【０３２８】

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タンデム構築物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。

【０３２９】

【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 |

**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
```

【０３３０】

【表２】

AACAACAGGCACAAAAGGAACAAGTTTAAATGCACTAAATACATTTAGAA
CAGAAGGATGCATAAGTCACCCACAACTAAAAAAACCAAACCCACAAATA
AACAAACCATTAGAGTCACAATACTTTGCACCTTTAGATGCCCTCTGGGG
AGACCCCATATACTATAATGATCTAAATGAAAACAAAAGTTTGAACGATA
TCATTGAGAAAATACTAATAAAAAACATGATTACATACCATGCAAAACTA
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

【０３３１】

【表３】

AAAAATCGCCATTTTGGTGACGTCACGGCCGCCATCTTAAGTAGTTGAGG
CGGACGGTGGCGTGAGTTCAAAGGTCACCATCAGCCACACCTACTCAAAA
TGGTGGACAATTTCTTCCGGGTCAAAGGTTACAGCCGCCATGTTAAAACA
CGTGACGTATGACGTCACGGCCGCCATTTTGTGACACAAGATGGCCGACT
TCCTTCCTCTTTTTCAAAAAAAAGCGGAAGTGCCGCCGCGGCGGCGGGGG
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 |
| Cap 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 |

【０３３２】

【表４】

**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) |
| ORF2t/3 | MSFWKPPVHNVTGIQRMWPKKASGRHPKTRNPRRKLTFTPKRIETVGDRGRKRDR SPLAREPRGPLPTAVAAAVPRAAQAQTGNQSPLRAAHKDPTRGPCKPMPTVGPRQ WLFPERKPAPAPSSGDWAMEFLAAKIFDRPVRSNLKDTPYYPYVKNQYNVYFDLK FE (配列番号 20) |

【０３３３】

【表５】

| | |
|---|---|
| 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) |

【０３３４】

【表６】

**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)* |
| 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
```

【０３３５】

【表７】

AAACCTACCAGGTGACACAACACAAATACCAGTAGCAGACCTATTACCAC
TAACAAACCCAAGAATAAACAGACCAGGACAATCACTAAATGAGGCAAAA
ATTACAGACCATATTACTTTCACAGAATACAAAAACAAATTTACAAATTA
TTGGGGTAACCCATTTAATAAACACATTCAAGAACACCTAGATATGATAC
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 |
| Cap 部位 | 260 – 267 |
| 転写開始部位 | 267 |

【０３３６】

【表８】

| | |
|---|---|
| 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 |
| 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領域 | 2441 – 2586 |
| ポリ(A)シグナル | 2808 – 2813 |
| GC リッチ領域 | 2868 – 2929 |

【０３３７】

【表９】

**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) |

【０３３８】

【表１０】

**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
CGAAAGGTAAAGAGAAAAAAAAAAATCTTTAATTGTTAGACAATGGCAACC
AGACAGTATAAGAACTTGTAAAATTATAGGACAGTCAGCTATAGTTGTTG
GGGCTGAAGGAAAGCAAATGTACTGTTATACTGTCAATAAGTTAATTAAT
GTGCCCCCAAAAACACCATATGGGGGAGGCTTTGGAGTAGACCAATACAC
ACTGAAATACTTATATGAAGAATACAGATTTGCACAAAACATTTGGACAC
AATCTAATGTACTGAAAGACTTATGCAGATACATAAATGTTAAGCTAATA
TTCTACAGAGACAACAAAACAGACTTTGTCCTTTCCTATGACAGAAACCC
ACCTTTTCAACTAACAAAATTTACATACCCAGGAGCACACCCACAACAAA
TCATGCTTCAAAAACACCACAAATTCATACTATCACAAATGACAAAGCCT
AATGGAAGACTAACAAAAAAACTCAAAATTAAACCTCCTAAACAAATGCT
TTCTAAATGGTTCTTTTCAAAACAATTCTGTAAATACCCTTTACTATCTC
TTAAAGCTTCTGCACTAGACCTTAGGCACTCTTACCTAGGCTGCTGTAAT
GAAAATCCACAGGTATTTTTTTATTATTTAAACCATGGATACTACACAAT
AACAAACTGGGGAGCACAATCCTCAACAGCATACAGACCTAACTCCAAGG
TGACAGACACAACATACTACAGATACAAAAATGACAGAAAAAATATTAAC
```

【０３３９】

【表１１】

ATTAAAAGCCATGAATACGAAAAAAGTATATCATATGAAAACGGTTATTT
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
AAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAATTGCAAAAATTCGGCGCT
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 |
| Cap **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 |

【０３４０】

【表１２】

| | |
|---|---|
| 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領域 | 2209 – 2439 |
| ポリ(A)シグナル | 2672 – 2678 |
| GCリッチ領域 | 3076 – 3176 |

【０３４１】
【表１３】

**表 C2. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*) アミノ酸配列 (*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 ELDPNSQSHNKKKRRHCHVSSLSAKKIPSKKQRHKKTSSSSSSSSRSSSSSR 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) |

【０３４２】

【表１４】

| | |
|---|---|
| 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 ETSSSSSTN (配列番号 893) |

【０３４３】

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。

【０３４４】

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（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕ

ｓ）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）を封入することができる。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。

【０３４５】

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。

【０３４６】

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。

【０３４７】

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）。

【０３４８】

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。

【０３４９】

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。

【０３５０】

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。

【０３５１】

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。

【０３５２】

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。

【０３５３】

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。

【０３５４】

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。

【０３５５】

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。

【０３５６】

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封入することによって、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。

【０３５７】

【表１５】

**表 N. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*) ORF1 アミノ酸サブ配列 (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 リッチ領域 | 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 |

【０３５８】

【表１６】

**表 O. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*)ORF1 アミノ酸サブ配列 (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) |

【０３５９】

【表１７】

**表 P. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*) ORF1 アミノ酸サブ配列 (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 |

【０３６０】

【表１８】

**表 Q. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*) ORF1 アミノ酸サブ配列 (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) |

【０３６１】

【表１９】

**表 R. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*) ORF1 アミノ酸サブ配列 (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 |

【０３６２】

【表２０】

表 S. 例示的なアネロウイルス(*Anellovirus*) ORF1 アミノ酸サブ配列 (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 LFGYLDYCRQIKADKTWLDSHVLVIQSPAIFTYPNPGAGKWYCPLSQSF INGNGPFNQPPTLLQKAKWFPQIQYQQEIINSFVESGPFVPKYANQTESN WELKYKYVFTFK (配列番号 929) |
| C 末端ドメイン | WGGPQFHEPEIADPSKQEQYDVPDTFYQTIQIEDPEGQDPRSLIHDWDY RRGFIKERSLKRMSTYFSTHTDQQATSEEDIPKKKKRIGPQLTVPQQKE EETLSCLLSLCKKDTFQETETQEDLQQLIKQQQEQQLLLKRNILQLIHKL KENQQMLQLHTGMLP (配列番号 930) |

【０３６３】

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。

【０３６４】

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。

【０３６５】

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。

【０３６６】

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。

【０３６７】

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。

【０３６８】

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。

【０３６９】

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。

【０３７０】

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。

【０３７１】

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。

【０３７２】

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。

【０３７３】

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。

【０３７４】

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。

【０３７５】

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。

【０３７６】

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。

【０３７７】

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。

【０３７８】

【表２１】

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;<br><br>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;<br><br>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($X_{0-40}$)*;<br><br>ここで、X = 任意のアミノ酸。 | 229 |

【０３７９】

【表２２】

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;<br><br>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;<br><br>ここで、X = 任意のアミノ酸。 | 231 |
| CTD | WGGCPAPMETITDPCKQPKYPIPNNLLQTTSLQXPTTPIETYL YKFDERRGLLTKKAAKRIKKDXTTETTLFTDTGXXTSTTLPT XXQTETTQEEXTSEEE($X_{0-5}$)ETLLQQLQQLRRKQKQLRXRIL QLLQLLXLL($X_{0-26}$)*;<br><br>ここで、X = 任意のアミノ酸。 | 232 |

【０３８０】

【表２３】

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<br>YTPPKAPGGGGFGVELFSLEYLYEQWKARNNIWTKSNXYK<br>DLCRYTGCKITFYRHPTTDFIVXYSRQPPFEIDKXTYMXXHP<br>QXLLLRKHKKIILSKATNPKGKLKKKIKIKPPKQMLNKWFF<br>QKQFAXYGLVQLQAAACBLRYPRLGCCNENRLITLYYLN;<br><br>ここで、X = 任意のアミノ酸。 | 233 |
| N22 | LPIVVARYNPAXDTGKGNKXWLXSTLNGSXWAPPTTDKDL<br>IIEGLPLWLALYGYWSYJKKVKKDKGILQSHMFVVKSPAIQP<br>LXTATTQXTFYPXIDNSFIQGKXPYDEPJTXNQKKLWYPTLE<br>HQQETINAIVESGPYVPKLDNQKNSTWELXYXYTFYFK;<br><br>ここで、X = 任意のアミノ酸。 | 234 |
| CTD | WGGPQIPDQPVEDPKXQGTYPVPDTXQQTIQIXNPLKQKPE<br>TMFHDWDYRRGIITSTALKRMQENLETDSSFXSDSEETP($X_{0-2}$<br>)KKKKRLTXELPXPQEETEEIQSCLLSLCEESTCQEE($X_{1-6}$)ENL<br>QQLIHQQQQQQQLKHNILKLLSDLKZKQRLLQLQTGILE(X<br>$_{1-10}$)*;<br><br>ここで、X = 任意のアミノ酸。 | 235 |

【０３８１】

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。

【０３８２】

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：

【０３８３】

（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。

【０３８４】

（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。

【０３８５】

（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（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。

【０３８６】

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。

【０３８７】

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。

【０３８８】

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。

【０３８９】

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。

【０３９０】

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。

【０３９１】

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。

【０３９２】

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。

【０３９３】

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、細菌プラスミド骨格を含まない。

【０３９４】

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。

【０３９５】

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。

【０３９６】

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。

【０３９７】

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。

【０３９８】

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。

【０３９９】

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。

【０４００】

一部の実施形態では、５’ＵＴＲ配列は、核酸配列ＡＧＧＴＧＡＧＴＧＡＡＡＣＣＡＣＣＧＡＡＧＴＣＡＡＧＧＧＧＣＡＡＴＴＣＧＧＧＣＴＡＧＧＧ$X_1$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ＡＧＧＴＧＡＧＴＧＡＡＡＣＣＡＣＣＧＡＡＧＴＣＡＡＧＧＧＧＣＡＡＴＴＣＧＧＧＣＴＡＧＧＧ$X_1$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。

【０４０１】

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。

【０４０２】

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。

【０４０３】

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。

【０４０４】

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’Ｕ

ＴＲ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－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。

【０４０５】

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。

【０４０６】

【表２４】

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 | CGGGTGCCG$X_1$AGGTGAGTTTACACACCG$X_2$AGT CAAGGGGCAATTCGGGCTC$X_3$GGACTGGCCGGG C$X_4X_5$TGGG<br>$X_1$ = G 又は T<br>$X_2$ = C 又は A<br>$X_3$ = G 又は A<br>$X_4$ = T 又は C<br>$X_5$ = 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 |

【０４０７】

【表２５】

| | | |
|---|---|---|
| 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 $X_1X_2$TGGG; ここで、$X_1$ は、T 又は C を含み、$X_2$ 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 |

【０４０８】

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：

【０４０９】

（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。

【０４１０】

（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。

【０４１１】

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。

【０４１２】

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。

【０４１３】

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。

【０４１４】

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）ＧＣＧＣＴＡＣＧＣＧＣＧＣＧＣＧＣＣＧＧＧＧＧＧＣＴＧＣＧＣＣＣＣＣＣＣＣ（配列番号１７１）；又は

（ｘ）ＧＣＧＣＴＡＣＧＣＧＣＧＣＧＣＧＣＣＧＧＧＧＧＧＣＴＣＴＧＣＣＣＣＣＣＣＣＣ（配列番号１７２）；

から選択される。

【０４１５】

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。

【０４１６】
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。

【０４１７】

【表２６】

**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<br>GCX$_7$X$_8$X$_9$X$_{10}$CX$_{11}$X$_{12}$X$_{13}$X$_{14}$GGGGX$_{15}$X$_{16}$X$_{17}$X$_{18}$<br>X$_{19}$X$_{20}$X$_{21}$GCX$_{22}$X$_{23}$X$_{24}$X$_{25}$CCCCCCCX$_{26}$CGCGC<br>ATX$_{27}$X$_{28}$GCX$_{29}$CGGGX$_{30}$CCCCCCCCCX$_{31}$X$_{32}$X<br>$_{33}$GGGGGGCTCCGX$_{34}$CCCCCCGGCCCCCC<br><br>X$_1$ = G 又は C<br>X$_2$ = G, C, 又は存在しない<br>X$_3$ = C 又は存在しない<br>X$_4$ = G 又は C<br>X$_5$ = G 又は C<br>X$_6$ = T, G, 又は A<br>X$_7$ = G 又は C<br>X$_8$ = G 又は存在しない<br>X$_9$ = C 又は存在しない<br>X$_{10}$ = C 又は存在しない<br>X$_{11}$ = G, A, 又は存在しない<br>X$_{12}$ = G 又は C<br>X$_{13}$ = C 又は T<br>X$_{14}$ = G 又は A<br>X$_{15}$ = G 又は A | 120 |

【０４１８】

【表２７】

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

【０４１９】

【表２８】

| | | | |
|---|---|---|---|
| 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---CGCCGGGGGGGCGCCAGCG-CCCCCCCCCCCGCGCAT GCACGGGTCCCCCCCCCCACGGGGGGCTCC 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 | GCACGGGTCCCCCCCCCCACGGGGGGCTCC G | 139 |
| | 断片 6 | CCCCCCGGCCCCCCCCC | 140 |

【０４２０】

【表２９】

| | | | |
|---|---|---|---|
| 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 |

【０４２１】

【表３０】

| | | | |
|---|---|---|---|
| TTV-tth8 | 全配列 | GCCGCCGCGGCGGCGGGGG-<br>GCGGCGCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGG<br>GGGAGCCATGCG---CCCCCCCCCGCGCAT<br>GCGCGGGGCCCCCCCCC-<br>GCGGGGGGCTCCG<br>CCCCCCGGCCCCCCCCG | 153 |
| | 断片 1 | GCCGCCGCGGCGGCGGGGG | 154 |
| | 断片 2 | GCGGCGCGCTGCGCGCGCCGCCCAGTAGG<br>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<br>GCCATGC | 160 |
| | 断片 8 | CCGCCATCTTAAGTAGTTGAGGCGGACGGT<br>GGCGTGAGTTCAAAGGTCACCATCAGCCAC<br>ACCTACTCAAAATGGTGG | 161 |
| | 断片 9 | CTTAAGTAGTTGAGGCGGACGGTGGCGTGA<br>GTTCAAAGGTCACCATCAGCCACACCTACT<br>CAAAATGGTGGACAATTTCTTCCGGGTCAA<br>AGGTTACAGCCGCCATGTTAAAACACGTGA<br>CGTATGACGTCACGGCCGCCATTTTGTGAC<br>ACAAGATGGCCGACTTCCTTCC | 162 |

【０４２２】

【表３１】

| | | | |
|---|---|---|---|
| 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分離株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 |

【０４２３】

【表３２】

| | | | |
|---|---|---|---|
| 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 GCGCGCCGGGGGGCTCCGCCCCCCCCCCGCG CATGCGCGGGGCCCCCCCCCGCGGGGGGCT CCGCCCCCCGGTCCCCCCCCG | 804 |
| | TTV-16 | CGGCCGTGCGGCGGCGCGCGCGCTTCGCGC GCGCGCCGGGGGCTGCCGCCCCCCCCCCGCG CATGCGCGCGGGGCCCCCCCCCGCGGGGGG GCTCCGCCCCCCGGCCCCCCCCCCCG | 805 |
| | TTV-TJN02 | CGGCGGCGGCGCGCGCGCTACGCGCGCGC GCCGGGGGGCTGCCGCCCCCCCCCCGCGCA TGCGCGGGGCCCCCCCCCGCGGGGGGCTCC GCCCCCCGGCCCCCC | 806 |
| | TTV-HD16d | GGCGGCGGCGCGCGCGCTACGCGCGCGCG CCGGGGAGCTCTGCCCCCCCCCGCGCATGC GCGCGGGTCCCCCCCCCGCGGGGGGCTCCG CCCCCCGGTCCCCCCCCCG | 807 |

【０４２４】

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。

【０４２５】

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。

【０４２６】

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。

【０４２７】

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（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）に対して外性である。

【０４２８】

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。

【０４２９】

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。

【０４３０】

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。

【０４３１】

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）。

【０４３２】

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。

【０４３３】

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。

【０４３４】

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。

【０４３５】

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。

【０４３６】

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）。

【０４３７】

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）。

【０４３８】

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。

【０４３９】

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。

【０４４０】

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。

【０４４１】

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。

【０４４２】

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。

【０４４３】

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。

【０４４４】
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。
【０４４５】
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。
【０４４６】
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。
【０４４７】
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。
【０４４８】

【表３３】

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 遺伝子 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 から 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 |

【０４４９】

【表３４】

| | | | |
|---|---|---|---|
| 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 |
| 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 |

【０４５０】

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。

【０４５１】

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。

【０４５２】

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。

【０４５３】

【表３５】

**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 遺伝子 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 |
| 増殖ホルモン (GH) | GHR | 2690 | P10912 |
| ヒト 増殖ホルモン (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 |
| パラチロイドホルモン (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 |

【０４５４】

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。

【０４５５】

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。

【０４５６】

【表３６】

**表 52. 例示的な増殖因子**

| 増殖因子 | | Entrez 遺伝子 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 |
| エピグレリン | EGFR, ErbB-4 | 2069 | O14944 |
| ヘレグレリン | EGFR, ErbB-4 | 3084 | Q02297 |
| FGF ファミリー | | | |

【０４５７】

【表３７】

| | | | |
|---|---|---|---|
| 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 |
| 神経栄養因子ファミリー | | | |
| 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 |

【０４５８】
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。

【０４５９】
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。

【０４６０】

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。

【０４６１】

【表３８】

表 53. 凝固関連因子

| エフェクター | 適応症 | Entrez 遺伝子 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 |
| vWF | フォン・ヴィレブランド病 | 7450 | P04275 |

【０４６２】

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。

【０４６３】

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。

【０４６４】

【表３９】

**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 遺伝子 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 |
| アセチル-CoA-グルコサミニド N-アセチルコリン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) II 型 I-C | 138050 | Q68CP4 |
| ADAMTS13 | 血栓性血小板減少性紫斑病 | 11093 | Q76LX8 |
| アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ | アデニンホ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 | 濃化異骨症 | 1513 | P43235 |
| セラミダーゼ | ファーバー病(脂肪性肉芽腫) | 125981, 340485, 55331 | Q8TDN7, Q5QJU3, Q9NUN7 |
| シスタチオニン B 合成酵素 | ホモシスチン尿症 | 875 | P35520 |

【０４６５】

【表４０】

| | | | |
|---|---|---|---|
| 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 の先天性障害 | 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 の先天性障害 | 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 の先天性障害 | 10195 | Q92685 |
| ドリキル-P-グルコース:Glc-1-Man-9-GlcNAc-2-PP-ドリキル-α-3-グルコシルトランスフェラーゼ | N-グリコシル化 CDG Ih の先天性障害 | 79053 | Q9BVK2 |
| ドリキル-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 の先天性障害 | 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・プラウアー因子欠損症 | 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 |

【０４６６】

【表４１】

| | | | |
|---|---|---|---|
| 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 | スフィンゴ脂質症I型 | 2720 | P16278 |
| ガングリオシドβ-ガラクトシダーゼ | スフィンゴ脂質症II型(幼若型) | 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 |
| グリコシダーゼI | N-グリコシダーCDG IIbの先天性障害 | 2548 | P10253 |
| グルコシルセラミドβ-グルコシダーゼ | 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(サンフィリッポ症候群)II型I-A | 6448 | P51688 |
| ホモゲンチセートオキシダーゼ | 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) | 完全なLCAT欠損症、フィッシュアイ病、アテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症 | 3931 | 606967 |
| リジンオキシダーゼ | グルタル酸血症I型 | 4015 | P28300 |
| リソソーム酸性リパーゼ | コレステリルエステル蓄積症(CESD) | 3988 | P38571 |
| リソソーム酸性リパーゼ | リソソーム酸性リパーゼ欠損症 | 3988 | P38571 |
| リソソーム酸性リパーゼ | ウォルマン病 | 3988 | P38571 |

【０４６７】

【表４２】

| | | | |
|---|---|---|---|
| リソソームペプスタチン非感受性ペプチダーゼ | セロイドリポフスチン症幼児型(CLN2、ヤンスキー・ビエルスコウスキー病) | 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 の先天性障害 | 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 の先天性障害 | 4247 | Q10469 |
| メタロプロテアーゼ-2 | ウィンチェスター症候群 | 4313 | P08253 |
| 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 非依存型) | 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 (マロトー・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(サンフィリッポ症候群) 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(サンフィリッポ症候群) 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 (偽性ハーラーポリジストロフィー) | 79158 | Q3T906 |

【０４６８】

【表４３】

| | | | |
|---|---|---|---|
| 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-cell 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(偽性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ン尿症 | 175 | P20933 |
| 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(セロイドリポフスチン症、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・ハルティア病) | 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 の先天性障害(神経症状型及び神経－多内臓器型のみ) | 5373 | O15305 |
| ポルホビリノーゲンデアミナーゼ | 急性間欠性ポルフィリン症 | 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 |

【０４６９】

【表４４】

| | | | |
|---|---|---|---|
| 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 |
| 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 の先天性障害 | 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、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 | No タンパク質 |
| ウリジン二リン酸グルクロニルトランスフェラーゼ(例: 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-グリコシル化 CDG II の先天性障害(608776) | 79796 | Q9H6U8 |
| α-1,2-マンノシルトランスフェラーゼ | N-グリコシル化の先天性障害、I 型 (プレ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 の先天性障害 | 440138 | Q2TAA5 |
| α-D-マンノシダーゼ | α-マンノシドーシス、I 型 (重度) 又は II(軽度) | 10195 | Q92685 |
| α-L-フコシダーゼ | フコシドーシス | 4123 | Q9NTJ4 |

【０４７０】

【表４５】

| | | | |
|---|---|---|---|
| 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 の先天性障害 | 3425 | P35475 |
| 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 の先天性障害 | 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 | ムコ多糖症 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 |

【０４７１】

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。

【０４７２】

【表４６】

**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 遺伝子 ID | UniProt ID |
|---|---|---|---|
| 運動神経細胞生存タンパク質 (SMN) | 脊髄性筋萎縮症 | 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 |
| 補体タンパク質、例えば、補体 C1 因子 | 補体因子 I 欠乏症 | 3426 | P05156 |
| 補体 H 因子 | 非定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ー) | シスチン症 | 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ー-1 | N-グリコシル化 CDG IIc(ランバム・ハシャロン症候群)の先天性障害 | 55343 | Q96A29 |
| GM2 アクティベータタンパク質 | GM2 アクティベータタンパク質欠損症 (テイ・サックス病 AB 変異型、GM2A) | 2760 | Q17900 |

【０４７３】

【表４７】

| | | | |
|---|---|---|---|
| リソソーム膜貫通CLN3タンパク質 | セロイドリポフスチン症若年型(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 | セロイドリポフスチン症変異型幼児型、フィンランド型(CLN5) | 1203 | O75503 |
| リン酸Na共輸送体、シアリン | 乳児シアル酸蓄積障害 | 26503 | Q9NRA2 |
| リン酸Na共輸送体、シアリン | シアル酸尿フィンランド型(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 |
| オリゴマーゴルジ複合体-7 | N-グリコシル化CDG IIeの先天性障害 | 91949 | P83436 |
| プロサポシン | プロサポシン欠乏症 | 5660 | P07602 |
| 防御タンパク質/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、複合ノイラミニダーゼ及びβ-ガラクトシダーゼ欠損症) | 5476 | P10619 |

【０４７４】

【表４８】

| | | | |
|---|---|---|---|
| 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 CDG If の先天性障害 | 9526 | O75352 |
| サポシン B | サポシン B 欠損症(スルファチドアクティベータ欠損症) | 5660 | P07602 |
| サポシン C | サポシン C 欠損症(ゴーシェ活アクティベータ欠損症) | 5660 | P07602 |
| スルファターゼ修飾因子-1 | 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 | セロイドリポフスチン症変異型幼児型(CLN6) | 54982 | Q9NWW5 |
| 膜貫通 CLN8 タンパク質 | セロイド脂肪フスチン症知的障害を伴う進行性てんかん | 2055 | Q9UBY8 |
| vWF | フォン・ビレブランド病 | 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) | | | |

【０４７５】

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。

【０４７６】

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。

【０４７７】

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。

【０４７８】

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。

【０４７９】

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。

【０４８０】

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。

【０４８１】

【表４９】

表 56. 例示的な再生、修復、及び線維症因子

| 標的 | 遺伝子<br>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/ |

【０４８２】

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。

【０４８３】

【表５０】

表 57. 例示的な形質転換因子

| 標的 | 適応症 | 遺伝子<br>アクセッション # | タンパク質<br>アクセッション # |
|---|---|---|---|
| MESP1 | 線維芽細胞の形質転換による臓器修復 | 遺伝子 ID: 55897 | EAX02066 |
| ETS2 | 線維芽細胞の形質転換による臓器修復 | 遺伝子 ID: 2114 | NP_005230 |
| HAND2 | 線維芽細胞の形質転換による臓器修復 | 遺伝子 ID: 9464 | NP_068808 |
| MYOCARDIN | 線維芽細胞の形質転換による臓器修復 | 遺伝子 ID: 93649 | NP_001139784 |
| ESRRA | 線維芽細胞の形質転換による臓器修復 | 遺伝子 ID: 2101 | AAH92470 |
| miR-1 | 線維芽細胞の形質転換による臓器修復 | MI0000651 | n/a |
| miR-133 | 線維芽細胞の形質転換による臓器修復 | MI0000450 | n/a |
| TGFb | 線維芽細胞の形質転換による臓器修復 | 遺伝子 ID: 7040 | NP_000651.3 |
| WNT | 線維芽細胞の形質転換による臓器修復 | 遺伝子 ID: 7471 | NP_005421 |
| JAK | 線維芽細胞の形質転換による臓器修復 | 遺伝子 ID: 3716 | NP_001308784 |
| NOTCH | 線維芽細胞の形質転換による臓器修復 | 遺伝子 ID: 4851 | XP_011517019 |

【０４８４】

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。

【０４８５】

【表５１】

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 |

【０４８６】

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 ｖａｃｃｉｎ

es 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。

【0487】

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。

【0488】

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。

【0489】

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。

【0490】

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。

【0491】

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。

【０４９２】

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　ｅｔａｌ．（２０１５）　Ｃｅｌｌ，１６３：７５９－７７１を参照されたい。

【０４９３】

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。

【０４９４】

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。

【０４９５】

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。

【０４９６】

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。

【０４９７】

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。

【０４９８】

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。

【０４９９】

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。

【０５００】

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。加えて、１つのプロモータエレメントは、タンデムで結合した複数のＤＮＡ配列について発現された産物の量を増加することができる。従って、１つの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。

【０５０１】

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。

【０５０２】

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。

【０５０３】

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。

【０５０４】

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）］。

【０５０５】

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。

【０５０６】

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。

【０５０７】

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。

【０５０８】

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。

【０５０９】

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。

【０５１０】

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。

【０５１１】

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。

【０５１２】

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。

【０５１３】
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。
【０５１４】
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。
【０５１５】
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。
【０５１６】
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。
【０５１７】
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。

【０５１８】

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。

【０５１９】

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。

【０５２０】

【表５２】

**表 41:*アネロウイルス(Anelloviruses)*及びその配列の例。**アクセッション番号及び関連する配列情報は、2018 年 12 月 11 日に参照として掲載された www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/から取得することができる。

| 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、分離株: TUS01 |
| AB026345.1 | ORF1 及び ORF2 用の TT ウイルス遺伝子、完全 cds、分離株:TRM1 |
| AB026346.1 | ORF1 及び ORF2 用の TT ウイルス遺伝子、完全 cds、分離株:TK16 |
| AB026347.1 | ORF1 及び ORF2 用の TT ウイルス遺伝子、完全 cds、分離株:TP1-3 |
| AB028669.1 | ORF1 及び ORF2 用の TT ウイルス遺伝子、完全ゲノム、分離株:TJN02 |
| AB030487.1 | pORF2a、pORF2b、pORF1 用の TT ウイルス遺伝子、完全 cds、クローン:JaCHCTC19 |
| AB030488.1 | pORF2a、pORF2b、pORF1 用の TT ウイルス遺伝子、完全 cds、クローン:JaBD89 |
| AB030489.1 | pORF2a、pORF2b、pORF1 用の TT ウイルス遺伝子、完全 cds、クローン:JaBD98 |
| AB038340.1 | ORF2、ORF1、ORF3 用の TT ウイルス遺伝子、完全 cds |
| AB038622.1 | ORF2、ORF1、ORF3 用の TT ウイルス遺伝子、完全 cds、分離株:TTVyon-LC011 |
| AB038623.1 | ORF2、ORF1、ORF3 用の TT ウイルス遺伝子、完全 cds、分離株:TTVyon-KC186 |
| AB038624.1 | ORF2、ORF1、ORF3 用の TT ウイルス遺伝子、完全 cds、分離株:TTVyon-KC197 |
| AB041821.1 | VP1 用の TT ウイルス mRNA、完全 cds |
| AB050448.1 | ORF1、ORF2、ORF3、ORF4 用のトルクテノウイルス(Torque teno virus)遺伝子、完全 cds、分離株:TYM9 |
| AB060592.1 | ORF1、ORF2、ORF3、ORF4 用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 用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 用の TT ウイルス遺伝子、完全 cds、クローン:SAj-30 |
| AB060596.1 | ORF1、ORF2、ORF3、ORF4 用の 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、分離株: CT25F |
| AB064597.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)DNA、完全ゲノム、分離株: CT30F |
| AB064599.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)DNA、完全ゲノム、分離株: JT03F |
| AB064600.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)DNA、完全ゲノム、分離株: JT05F |
| AB064601.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)DNA、完全ゲノム、分離株: JT14F |
| AB064602.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)DNA、完全ゲノム、分離株: JT19F |
| AB064603.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)DNA、完全ゲノム、分離株: JT41F |
| AB064604.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)DNA、完全ゲノム、分離株: CT39F |
| AB064606.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)DNA、完全ゲノム、分離株: JT33F |

【０５２１】

【表５３】

| | |
|---|---|
| AB290918.1 | トルクテノミディウイルス 1(Torque teno midi virus 1) DNA、完全ゲノム、分離株: MD1-073 |
| AF079173.1 | TT ウイルス TTVCHN1 株、完全ゲノム |
| AF116842.1 | TT ウイルス BDH1 株、完全ゲノム |
| AF122914.3 | TT ウイルス分離株 JA20、完全ゲノム |
| AF122917.1 | TT ウイルス分離株 JA4、完全ゲノム |
| AF122919.1 | TT ウイルス分離株 JA10 未知遺伝子 |
| AF129887.1 | TT ウイルス TTVCHN2、完全ゲノム |
| AF247137.1 | TT ウイルス分離株 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 ウイルスポーランド分離株 P / 1C1、完全ゲノム |
| AF315076.1 | TTV 様ウイルス DXL1 未知遺伝子 |
| AF315077.1 | TTV 様ウイルス DXL2 未知遺伝子 |
| AF345521.1 | TT ウイルス分離株 TCHN-G1 Orf2 及び Orf1 遺伝子、完全 cds |
| AF345522.1 | TT ウイルス分離株 TCHN-E Orf2 及び Orf1 遺伝子、完全 cds |
| AF345525.1 | TT ウイルス分離株 TCHN-D2 Orf2 及び Orf1 遺伝子、完全 cds |
| AF345527.1 | TT ウイルス分離株 TCHN-C2 Orf2 及び Orf1 遺伝子、完全 cds |
| AF345528.1 | TT ウイルス分離株 TCHN-F Orf2 及び Orf1 遺伝子、完全 cds |
| AF345529.1 | TT ウイルス分離株 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)、分離株 tth6、完全ゲノム |
| AJ620213.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth10、完全ゲノム |
| AJ620214.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth11g2、完全ゲノム |
| AJ620215.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth18、完全ゲノム |
| AJ620216.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth20、完全ゲノム |
| AJ620217.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth21、完全ゲノム |
| AJ620218.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth3、完全ゲノム |
| AJ620219.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth9、完全ゲノム |
| AJ620220.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth16、完全ゲノム |
| AJ620221.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth17、完全ゲノム |
| AJ620222.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth25、完全ゲノム |
| AJ620223.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth26、完全ゲノム |
| AJ620224.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth27、完全ゲノム |
| AJ620225.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth31、完全ゲノム |

【０５２２】

【表５４】

| | |
|---|---|
| AJ620226.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth4、完全ゲノム |
| AJ620227.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth5、完全ゲノム |
| AJ620228.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth14、完全ゲノム |
| AJ620229.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth29、完全ゲノム |
| AJ620230.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth7、完全ゲノム |
| AJ620231.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth8、完全ゲノム |
| AJ620232.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth13、完全ゲノム |
| AJ620233.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth19、完全ゲノム |
| AJ620234.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 tth22g4、完全ゲノム |
| AJ620235.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)、分離株 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 ウイルス分離株 L01 ORF2 及び ORF1 遺伝子、完全 cds |
| AY026466.1 | TT ウイルス分離株 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 |

【０５２３】

【表５５】

| | |
|---|---|
| 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、完全な cds;及び非機能的な ORF1(ORF1)遺伝子、完全な 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、完全な配列 |
| DQ361268.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)分離株 ViPi04 ORF1 遺伝子、完全 cds |
| EF538879.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)分離株 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)分離株 LTT7 ORF1 遺伝子、完全 cds |
| EU305676.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)分離株 LTT10 ORF1 遺伝子、完全 cds |
| EU889253.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)分離株 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)分離株 TW53A25 ORF2 遺伝子、部分的 cds;及び ORF1遺伝子、完全 cds |
| FJ392107.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)分離株 TW53A27 ORF2 遺伝子、部分的 cds;及び ORF1遺伝子、完全 cds |
| FJ392108.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)分離株 TW53A29 ORF2 遺伝子、部分的 cds;及び ORF1遺伝子、完全 cds |

【０５２４】

【表５６】

| | |
|---|---|
| FJ392111.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)分離株 TW53A35 ORF2 遺伝子、部分的 cds;及び ORF1 遺伝子、完全 cds |
| FJ392112.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)分離株 TW53A39 ORF2 遺伝子、部分的 cds;及び ORF1 遺伝子、完全 cds |
| FJ392113.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)分離株 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)分離株 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)分離株 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)分離株 TW53A37 ORF1 遺伝子、完全 cds |
| FJ426280.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)SIA109 株、完全ゲノム |
| FR751500.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)完全ゲノム、分離株 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 様ミニウイルス分離株 TTMV_LY1、完全ゲノム |
| JX134045.1 | TTV 様ミニウイルス分離株 TTMV_LY2、完全ゲノム |
| KU243129.1 | TTV 様ミニウイルス分離株 TTMV-204、完全ゲノム |
| KY856742.1 | TTV 様ミニウイルス分離株 zhenjiang、完全ゲノム |
| LC381845.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus) ヒト/日本/KS025/2016 DNA、完全ゲノム |
| MH648892.1 | アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.)分離株 ctdc048, 完全ゲノム |
| MH648893.1 | アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.)分離株 ctdh007, 完全ゲノム |
| MH648897.1 | アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.)分離株 ctcb038, 完全ゲノム |
| MH648900.1 | アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.)分離株 ctfc019, 完全ゲノム |
| MH648901.1 | アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.)分離株 ctbb022, 完全ゲノム |
| MH648907.1 | アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.)分離株 ctcf040, 完全ゲノム |
| MH648911.1 | アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.)分離株 cthi018, 完全ゲノム |
| MH648912.1 | アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.)分離株 ctea38, 完全ゲノム |
| MH648913.1 | アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.)分離株 ctbg006, 完全ゲノム |
| MH648916.1 | アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.)分離株 ctbg020, 完全ゲノム |
| MH648925.1 | アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.)分離株 ctci019, 完全ゲノム |
| MH648932.1 | アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.)分離株 ctid031, 完全ゲノム |
| MH648946.1 | アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.)分離株 ctdb017, 完全ゲノム |
| MH648957.1 | アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.)分離株 ctch017, 完全ゲノム |

【０５２５】

【表５７】

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

【０５２６】

【表５８】

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

【０５２７】

【表５９】

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

【０５２８】

【表６０】

| | |
|---|---|
| MK012516.1 | アネロウイルス科種(Anelloviridae sp.)分離株 ctcf003, 完全ゲノム |
| NC_038336.1 | トルクテノウイルス(Torque teno virus)5 分離株 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 分離株 TCHN-D1 Orf2 及び Orf1 遺伝子、完全 cds |
| NC_038339.1 | トルクテノウイルス 13(Torque teno virus) 分離株 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 分離株 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、分離株: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、分離株:TTVyon-KC009 |
| NC_038345.1 | トルクテノミニウイルス(Torque teno mini virus)10 分離株 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 分離株 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 分離株 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 分離株 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 分離株 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、分離株: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、分離株: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、分離株: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、分離株: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、分離株: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、分離株: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、分離株: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、分離株: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、分離株: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、分離株: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、分離株:Pt-TTMDV210 |

【０５２９】

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。

【０５３０】

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。

【０５３１】

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。

【０５３２】

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

ントを封入す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。

【０５３３】

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）。

【０５３４】

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。

【０５３５】

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。

【０５３６】

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。

【０５３７】

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。

【０５３８】

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。

【０５３９】

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。

【０５４０】

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。

【０５４１】

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。

【０５４２】

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。

【０５４３】

ＩＩＩ．核酸構築物

本明細書に記載される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タンデム構築物）に包含され得る。

【０５４４】

一態様では、本発明は、以下：（ｉ）非病原性外部タンパク質（例えば、アネロウイルスＯＲＦ１分子又はそのスプライス変異体若しくは機能性断片）をコードする配列と、（ｉｉ）上記遺伝子エレメントを非病原性外部タンパク質に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する配列と、を含む遺伝子エレメントを含有する核酸遺伝子エレメント構築物（例えば、タンデム構築物）を含む。一部の実施形態では、遺伝子エレメント構築物は、遺伝子エレメントの第２コピー、又はその断片（例えば、本明細書に記載のようなｕＲＦＳ又はｄＲＦＳを含む）をさらに含む。

【０５４５】

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。

【０５４６】

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。

【０５４７】

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。

【０５４８】

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。

【０５４９】

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。

【０５５０】

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、$1\times10^4$、$1\times10^5$、$1\times10^6$、$1\times10^7$、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$1\times10^4$、$1\times10^5$、$1\times10^6$、$1\times10^7$、又は約$1\times10^4$～$1\times10^5$、$1\times10^4$～$1\times10^6$、$1\times10^4$～$1\times10^7$、$1\times10^5$～$1\times10^6$、$1\times10^5$～$1\times10^7$、又は$1\times10^6$～$1\times10^7$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。

【０５５１】

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。

【０５５２】

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。

【０５５３】

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封入す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。

【０５５４】

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）。

【０５５５】

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。

【０５５６】

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 ａｎ

ｄ 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。

【０５５７】

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）。

【０５５８】

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。

【０５５９】

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。

【０５６０】

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。

【０５６１】

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。

【０５６２】

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。

【０５６３】

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。

【０５６４】

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。

【０５６５】

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。

【０５６６】

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。

【０５６７】
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。
【０５６８】
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。
【０５６９】
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）。
【０５７０】
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。
【０５７１】
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。

【０５７２】

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。

【０５７３】

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。

【０５７４】

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。

【０５７５】

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。

【０５７６】

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。

【０５７７】

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。

【０５７８】

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封入してもよい。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。

【０５７９】

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。

【０５８０】

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。

【０５８１】

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。

【０５８２】

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（Ｔｒｉ

ｃｏｒｎａｖｉｒｕｓ）、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。

【０５８３】

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。

【０５８４】

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。

【０５８５】

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。

【０５８６】

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。

【０５８７】

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。

【０５８８】

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。

【０５８９】

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。

【０５９０】

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。

【０５９１】

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。

【０５９２】

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 Ｇｒｏｏｔｅ 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）。

【０５９３】

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。

【０５９４】

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。

【０５９５】

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。

【０５９６】

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（ＧＰＣＲ）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。

【０５９７】

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。

【０５９８】

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。

【０５９９】

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。

【０６００】

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。

【０６０１】

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。

【０６０２】

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。

【０６０３】

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。

【０６０４】

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。

【０６０５】

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。

【０６０６】

Ｖ．宿主細胞

本発明はさらに、本明細書に記載のアネロベクターを含む宿主又は宿主細胞に関する。一部の実施形態では、宿主又は宿主細胞は、植物、昆虫、細菌、真菌、脊椎動物、哺乳動物（例えば、ヒト）、又は他の生物若しくは細胞である。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、多種多様な宿主細胞に感染する。標的宿主細胞は、中胚葉、内胚葉、又は外胚葉起由来の細胞を含む。標的宿主細胞は、例えば、上皮細胞、筋細胞、白血球（例えば、リンパ球）、腎臓組織細胞、肺組織細胞を含む。

【０６０７】

一部の実施形態では、アネロベクターは、宿主において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、宿主の免疫系により望ましくない実質的な応答を生成することができない。いくつかの免疫応答として、限定されないが、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。

【０６０８】

一部の実施形態では、宿主又は宿主細胞をアネロベクターと接触させる（例えば、それに感染させる）。一部の実施形態では、宿主は、ヒトなどの哺乳動物である。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。

【０６０９】

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。

【０６１０】

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。一実施形態では、アネロベクターは、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞内で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、複製欠損性又は複製不能である。

【０６１１】

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。

【０６１２】

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。

【０６１３】

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。

【０６１４】

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。

【０６１５】

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。

【０６１６】

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。

【０６１７】

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。

【０６１８】

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。

【０６１９】

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。

【０６２０】

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。

【０６２１】

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）。

【０６２２】

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。

【０６２３】

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。

【０６２４】

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。

【０６２５】

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。

【０６２６】

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。

【０６２７】

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。

【０６２８】

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】

【０６２９】

目次

実施例１：アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムのタンデムコピー
実施例２：タンデムアネロベクター構築物からのアネロベクターの効率的な複製
実施例３：例示的なタンデムアネロベクター構築物設計
実施例４：哺乳類細胞におけるタンデムアネロウイルス構築物からの遺伝子の転写
実施例５：哺乳類細胞におけるタンデムアネロウイルス構築物から産生されたＯＲＦ１及びＯＲＦ２タンパク質
実施例６：タンデムアネロベクターの感染力の評価
実施例７：バキュロウイルスを介したＳｆ９昆虫細胞へのタンデムアネロウイルスゲノムの送達
実施例８：合成アネロベクターの調製
実施例９：アネロベクターのアセンブリ及び感染
実施例１０：アネロベクターの選択性
実施例１１：複製欠損アネロベクター及びヘルパーウイルス
実施例１２：複製可能アネロベクターのための製造工程
実施例１３：複製欠損アネロベクターの製造工程
実施例１４：懸濁細胞を用いたアネロベクターの産生
実施例１５：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１６：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１７：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１８：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１９：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２０：インビトロ環状化アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム
実施例２１：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２２：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２３：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２４：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２５：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

【０６３０】

実施例１：アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムのタンデムコピー

この実施例は、上流ゲノムのＧＣリッチ領域が下流ゲノムの５’領域付近になるように、タンデムで配置された、単一のアネロウイルスゲノムの２つのコピーを保有するプラスミドベースの発現ベクターを説明する（図１Ａ）。

【０６３１】

いくつかの実施形態では、アネロウイルスは、ローリングサークルによって複製することができ、ここで、レプリカーゼ（Ｒｅｐ）タンパク質が、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｒｅｐ結合部位（例えば、本明細書に記載されるように、例えば、ヘアピンループ及び／又は複製起点を含む、例えば、５’ＵＴＲを含む）でゲノムに結合して、環の周囲でＤＮＡ合成を開始する。プラスミド骨格に含まれるアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの場合、これは、典型的に、天然のウイルスゲノムよりも長いプラスミド全長の複製か、又は最小骨格のゲノムを含むより小さい環をもたらすプラスミドの組換えのいずれかを伴う。そのため、プラスミドからのウイルス複製は非効率的となり得る。ウイルスゲノム複製効率を改善するために、ＴＴＭＶ－ＬＹ２のタンデムコピーを用いて、プラスミドを改変した。理論に束縛されることは望まないが、これらのプラスミドは、アネロウイルスゲノムの循環置換を提示している可能性があり、それによって、Ｒｅｐタンパク質がどこに結合するかにかかわらず、上流アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｒｅｐ結合部位から下流アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｒｅｐ置換部位（例えば、本明細書に記載されるように、例えば、ヘアピンループ及び／又は複製起点を含む、例えば、５’ＵＴＲを含む）へのウイルスゲノムの複製を駆動することができようになる。

【０６３２】

タンデムＴＴＭＶ－ＬＹ２は、Ｇｏｌｄｅｎ－ｇａｔｅアセンブリーによりアセンブリングしたが、これは、同時にゲノムの２つのコピーを１つの骨格に組み込み、ゲノム間に余分なヌクレオチドを残さない。タンデムＴＴＭＶ－ＬＹ２プラスミドは、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの２つの同一のコピーから構成され、第１の５’ＮＣＲから開始して第１のＧＣリッチ領域まで、その直後に第２の５’ＮＣＲから第２のＧＣリッチ領域までが続く（図１Ａ）。また、このプラスミドは、細菌起源及び選択可能なマーカーを有する細菌骨格も含んだ。

【０６３３】

ＴＴＭＶ－ＬＹ２のタンデムコピーを保有するプラスミドを、ヌクレオフェクションを介してＭＯＬＴ－４細胞にトランスフェクトした。ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムの単一コピーを有するプラスミドを、対照として同様にトランスフェクトした。細胞を４日間インキュベートした後、細胞ペレットを回収した。各細胞ペレットの一部をサザンブロッティング

に使用した。全ＤＮＡは、Ｑｉａｇｅｎ　ＤＮｅａｓｙ　Ｂｌｏｏｄ　ａｎｄ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｋｉｔを用いて細胞から単離した。ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノム及びプラスミドに対して異なる効果を有するゲノムＤＮＡを消化する制限エンドヌクレアーゼを用いて、各総ＤＮＡサンプルの１０μｇに対して次の４つの代替的消化を行った：１つ目の消化は、未切断物をゲノム又はプラスミド内で切断しなかった；２番目の消化は、細菌骨格内の１箇所で切断したが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムは切断しなかった；３番目の消化は、ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノム内の単一の遺伝子座で切断したが、細菌骨格内では切断しなかった；最後の消化は、ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノム内で切断し、細菌骨格ではしなかったが、メチル化感受性ＤｐｎＩ酵素も含有しており、これは、細菌内で産生されたインプットプラスミドＤＮＡのみを消化し、哺乳類細胞で複製されたＤＮＡ内では切断しないであろう。消化物を、１×ＴＡＥ溶液中の厚さ７ｍｍの１％アガロースゲル上に０．５Ｖ／ｃｍで３時間泳動させた。次に、ゲルを処理してＤＮＡを脱プリン及び変性させた。続いて、一晩のキャピラリートランスファーにより、ＤＮＡを正荷電ナイロン膜に転移させた。紫外線により、ＤＮＡを膜に架橋させた。次に、ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムに対するランダムヘキサマー生成フラグメントでブロットをプロービングして、ビオチン－ｄＵＴＰをプローブに組み込んだ。ストレプトアビジン結合ＩＲＤｙｅ－８００を用いて、プローブを検出し、ＬｉＣｏｒ　Ｏｄｙｓｓｅｙイメージャーで画像化した。

【０６３４】

サザンブロッティングは、タンデムＴＴＭＶ－ＬＹ２プラスミドが野生型サイズの環状二本鎖アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムを複製できることを実証した（図１Ｂ）。ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムの単一コピーを保有するプラスミドの場合、４～１０ｋｂの未切断スーパーコイルドＤＮＡが観察され（レーン１）、これは、プラスミド骨格内（レーン２）又はＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノム内（レーン３）で切断されると、５．１ｋｂに線状化された。回収された野生型長さの環状又は線状いずれかのＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムと一致するバンドは、ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムの単一コピーを有するプラスミドからは観察されなかった。単一コピーを有するプラスミド全体は、線状化プラスミドのＤｐｎＩ耐性コピー消化により観察されるように、ＭＯＬＴ－４細胞内で複製した（レーン４）。しかし、野生型長さのゲノムは、単一コピーＴＴＭＶ－ＬＹ２プラスミドから回収されなかった。

【０６３５】

ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムのタンデムコピーを保有するプラスミドの場合、４～１０ｋｂのスーパーコイルプラスミドが観察され（レーン５）、これは、プラスミド骨格を切断すると、８．８ｋｂに線状化された（レーン６）。重要なことに、二本鎖ＤＮＡ　ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムの単一コピーと一致する約１．８ｋｂバンドが、未切断及び骨格切断レーンから観察され、これらは、野生型ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムの回収物と一致する（レーン５及び６）。これをＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノム内で切断する酵素で消化すると、１．８ｋｂバンドが、３．０ｋｂバンドで置換され、これは、線状化ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムＤＮＡと一致する（レーン７）。この線状化ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムバンドは、ＤｐｎＩ耐性であり、それが、タンデムＤＮＡの組換えによって産生されたのではなく、哺乳類細胞内で複製されたことを示している（レーン８）。これらのデータを総合すると、野生型長さのＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムは、ＭＯＬＴ－４細胞内のタンデムＴＴＭＶ－ＬＹ２プラスミドから回収されたことが実証された。

【０６３６】

タンデムＴＴＭＶ－ＬＹ２プラスミドでトランスフェクトした追加の細胞ペレットを、０．５％Ｔｒｉｔｏｎの存在下で凍結／解凍した後、線形ＣｓＣｌ勾配で泳動させて、パッケージされていないＤＮＡからウイルス粒子を分離した。線形勾配から画分を取得し、ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノム配列用のＴａｑｍａｎプローブを用いて、ｑＰＣＲを実施した。ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムのピークは、１．３０～１．３５ｇ／ｃｍ$^3$のＣｓＣｌ密度で観察されたが、その場合、アネロウイルスサイズの粒子が認められることが予想される（図１Ｃ）。これは、ＭＯＬＴ－４細胞中で産生されたＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムが、ウイルス

粒子中にうまくパッケージングされたことを示すものであった。全体として、これらのデータは、タンデムアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの操作がウイルスゲノム複製を増大させることができ、アネロウイルス産生を増大させるための戦略として使用できることを実証した。

【０６３７】

実施例２：タンデムアネロベクター構築物からのアネロベクターの効率的な複製

この実施例では、タンデムアネロベクターを、ＨＥＫ２９３又はＭＯＬＴ－４細胞などの哺乳類宿主細胞における増幅についてアッセイする。タンデムアネロベクター構築物は、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの２つの完全長コピー（例えば、本明細書に記載されるように、Ｒｉｎｇ１、Ｒｉｎｇ２、又はＲｉｎｇ４）を含むように構築される。ゲノムの各コピーは、５’から３’の順に、高度に保存されたドメインを含む５’非コード領域、ネイティブアネロウイルスオープンリーディングフレームを置換するカーゴ配列を含む領域、及びＧＣリッチ領域を含む３’ＵＴＲを含む。第１ゲノムコピーの３’末端と第２ゲノムコピーの５’末端は、介在ヌクレオチドがなく、互いに直接結合している。

【０６３８】

手短には、構築物は、ＰＥＩトランスフェクション試薬又はヌクレオフェクションによってＨＥＫ２９３又はＭＯＬＴ－４細胞に導入される。アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ＯＲＦ１を含むトランス複製及びパッケージング要素は、個別のプラスミドからトランスで提供される。トランスフェクトした細胞を３７℃で４日間インキュベートする。アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの複製は、ｑＰＣＲ及びサザンブロットにより測定する。陰性対照の場合、トランス要素を含まないアネロベクター及びタンデムアネロベクターの単一コピーを保有するプラスミドが含まれる。

【０６３９】

実施例３：例示的なタンデムアネロベクター構築物設計

以下に記載する実施例において、タンデムアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）のためのいくつかの例示的な構築物設計を、ＭＯＬＴ－４宿主細胞においてローリングサークル増幅を受ける能力について試験した。理論に束縛されることは望まないが、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ローリングサークル増幅は、レプリカーゼ結合部位（例えば、ヘアピンループ及び／又は複製起点を含む、例えば５’ＵＴＲ）で開始及び終了すると考えられる。環状化された単一アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムでは、同じレプリカーゼ結合部位が、開始部位及び停止部位の両方として作用し得る。タンデムアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）、並びに本実施例に記載される別の設計は、複製しようとするゲノムの両端にそのようなレプリカーゼ結合部位を配置して、ゲノムが、環状化された単一コピーゲノムのように有効に作動するようにする。

【０６４０】

３’末端に部分的アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムを有する構築物

この実施例では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの完全長コピーが部分的アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムに対して５’側に配置された例示的なタンデムアネロベクターを設計した。図２Ａに示すように、第１の代替構築物（ｐＲＴｘ－８４３）は、５’から３’の順に、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（Ｒｉｎｇ２）の完全長コピー、続いて、５’ＮＣＲと、ウイルスオープンリーディングフレームのフルセットを含む領域と、ＧＣリッチ領域を欠く３’ＮＣＲと、からなる部分的アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムを含む。図２Ａに示すように、第２の代替構築物（ｐＲＴｘ－８４４）は、５’から３’の順に、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（Ｒｉｎｇ２）の完全長コピー、続いて、Ｒｉｎｇ２のヌクレオチド１から２８１２まで、５’ＮＣＲと、ウイルスオープンリーディングフレームのフルセットを含む領域とからなる部分的アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムを含む。図２Ａに示すように、第３の代替構築物（ｐＲＴｘ－８４５）は、５’から３’の順に、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（Ｒｉｎｇ２）の完全長コピー

、続いて、Ｒｉｎｇ２のヌクレオチド１から２５８３まで、５’ＮＣＲと、ウイルスオープンリーディングフレームの一部のみを含む領域とからなる部分的アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムを含む。図２Ａに示すように、第４の代替構築物（ｐＲＴｘ－８４６）は、５’から３’の順に、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（Ｒｉｎｇ２）の完全長コピー、続いて、Ｒｉｎｇ２のヌクレオチド１から２２６４まで、５’ＮＣＲと、ウイルスオープンリーディングフレームの一部のみを含む領域とからなる部分的アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムを含む。図２Ａに示すように、第５の代替構築物（ｐＲＴｘ－８４７）は、５’から３’の順に、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（Ｒｉｎｇ２）の完全長コピー、続いて、Ｒｉｎｇ２のヌクレオチド１から７２３まで、５’ＮＣＲと、ウイルスオープンリーディングフレームの一部のみを含む領域とからなる部分的アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムを含む。図２Ａに示すように、第６の代替構築物（ｐＲＴｘ－８４８）は、５’から３’の順に、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（Ｒｉｎｇ２）の完全長コピー、続いて、Ｒｉｎｇ２のヌクレオチド１から４２３まで、５’ＮＣＲからなる部分的アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムを含む。図２Ａに示すように、第７の代替構築物（ｐＲＴｘ－８４９）は、５’から３’の順に、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノム（Ｒｉｎｇ２）の全長コピー、続いて、Ｒｉｎｇ２のヌクレオチド１から２６７まで、５’ＮＣＲの一部からなる部分的アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムを含む。

【０６４１】

手短には、タンデム構築物の各々を、ヌクレオフェクションにより、ＭＯＬＴ－４細胞に導入した。ローリングサークル増幅用のレプリカーゼタンパク質は、完全なウイルスゲノムによってシスで提供された。ＯＲＦ１タンパク質は、完全なウイルスゲノムによってシスで提供された。

【０６４２】

２つの全ゲノム（ｐＶＬ４６－２５７）を有する完全長タンデムＲｉｎｇ２構築物を、ウイルス複製及びパッケージングの陽性対照として使用した。陰性対照には、Ｒｉｎｇ２ゲノム（ｐＶＬ４６－２４０）の単一コピーを保有するプラスミドが使用される。トランスフェクトした細胞を３７℃で４日間インキュベートした後、サザンブロット及びｑＰＣＲ分析のために細胞を回収した。サザンブロットの場合、Ｑｉａｇｅｎ　ＤＮｅａｓｙ　Ｂｌｏｏｄ　ａｎｄ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｋｉｔを用いて、細胞から全ＤＮＡを単離し、プラスミド骨格を１回切断する酵素と、ＤｐｎＩで１０μｇの全ＤＮＡを消化して、細菌において産生された全てのインプットＤＮＡを消化した。消化物を、１×ＴＡＥ溶液中の厚さ７ｍｍの１％アガロースゲル上に０．５Ｖ／ｃｍで３時間泳動させた。次に、ゲルを処理して、ＤＮＡを脱プリン及び変性させた。続いて、一晩のキャピラリートランスファーにより、ＤＮＡを正荷電ナイロン膜に転移させた。紫外線により、ＤＮＡを膜に架橋させた。次に、ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムに対するランダムヘキサマー生成フラグメントでブロットをプロービングして、ビオチン－ｄＵＴＰをプローブに組み込んだ。ストレプトアビジン結合ＩＲＤｙｅ－８００を用いて、プローブを検出し、ＬｉＣｏｒ　Ｏｄｙｓｓｅｙイメージャーで画像化した。プラスミドｐＲＴｘ－８４５からのサンプルは、サザンブロットにより検査されなかったことに留意されたい。複製された環状二本鎖ＤＮＡ　Ｒｉｎｇ２ゲノムの回収物は、ｐＲＴｘ－８４３及び８４４では観察されたが、ｐＲＴｘ－８４６～８４９では観察されなかった（図２Ｄ）。プラスミドＤＮＡの複製は、単一コピーゲノムプラスミドで観察されたものと同様に、ｐＲＴｘ－８４３、８４４、及び８４８についても観察された。

【０６４３】

追加の細胞ペレットを凍結／解凍及び０．５％トリトンを用いて溶解させた。溶解物を塩化セシウムステップ勾配に通過させ、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）含有画分を回収した。アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの複製を、ＤＮａｓｅ保護ｑＰＣＲにより測定した。ｐＲＴｘ－８４３～８４６は、全タンデムｐＲＴｘ－２

５７から観察されたのと同様の細胞当たりのレベルのＲｉｎｇ２ウイルスゲノムを産生したが、これは、包膜ウイルスの産生の成功を示している（図２Ｅ）。ｐＲＴｘ－８４７も、全タンデムで観察されたものより少ないとは言え、保護されたゲノムを産生したが、ｐＲＴｘ－８４８及び８４９はｑＰＣＲにより検査されなかった。

【０６４４】

５’末端に部分的なアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムを有する構築物

この実施例では、例示的なタンデムアネロベクターを設計し、ここで、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの完全長コピーは、部分的アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムに対して３’側に配置される。図２Ｂに示すように、以下の部分的Ｒｉｎｇ２ゲノム、続いて完全長Ｒｉｎｇ２ゲノムを含む一連の構築物を試験した：高度に保存された５’ＮＣＲドメインと、アネロウイルスオープンリーディングフレームのフルセットと、ＧＣリッチ領域を含む３’ＮＣＲと、からなる部分的アネロウイルスゲノムを有する、ｐＲＴｘ－８３６（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド２６７～２９７９）；アネロウイルスオープンリーディングフレームのフルセットと、ＧＣリッチ領域を含む３’ＮＣＲと、からなる部分的アネロウイルスゲノムを有するｐＲＴｘ－８３７（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド４２３～２９７９）；アネロウイルスオープンリーディングフレームの一部と、ＧＣリッチ領域を含む３’ＮＣＲと、からなる部分的アネロウイルスゲノムを有するｐＲＴｘ－８３８（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド７２３～２９７９）；アネロウイルスオープンリーディングフレームの一部と、ＧＣリッチ領域を含む３’ＮＣＲと、からなる部分的アネロウイルスゲノムを有するｐＲＴｘ－８３９（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド２２７３～２９７９）；アネロウイルスオープンリーディングフレームの一部と、ＧＣリッチ領域を含む３’ＮＣＲと、からなる部分的アネロウイルスゲノムを有するｐＲＴｘ－８４０（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド２４５２～２９７９）；ＧＣリッチ領域を含む３’ＮＣＲからなる部分的アネロウイルスゲノムを有する、ｐＲＴｘ－８４１（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド２８１２～２９７９）；並びにＧＣリッチ領域からなる部分的アネロウイルスゲノムを有する、ｐＲＴｘ－８４２（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド２８６７～２９７９）。

【０６４５】

手短には、タンデム構築物の各々を、ヌクレオフェクションによりＭＯＬＴ－４細胞に導入した。ローリングサークル増幅用のレプリカーゼタンパク質は、完全なウイルスゲノムによってシスで提供された。ＯＲＦ１タンパク質は、完全なウイルスゲノムによってシスで提供された。２つの全ゲノム（ｐＶＬ４６－２５７）を有する完全長タンデムＲｉｎｇ２構築物を、ウイルス複製及びパッケージングの陽性対照として使用した。陰性対照には、Ｒｉｎｇ２ゲノム（ｐＶＬ４６－２４０）の単一コピーを保有するプラスミドが使用される。トランスフェクトした細胞を３７℃で４日間インキュベートした後、サザンブロット及びｑＰＣＲ分析のために細胞を回収した。サザンブロットの場合、ＱｉａｇｅｎＤＮｅａｓｙ Ｂｌｏｏｄ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｋｉｔを用いて、細胞から全ＤＮＡを単離し、プラスミド骨格を１回切断する酵素と、ＤｐｎＩで１０μｇの全ＤＮＡを消化して、細菌に産生された全てのインプットＤＮＡを消化した。消化物を、１×ＴＡＥ溶液中の厚さ７ｍｍの１％アガロースゲル上に０．５Ｖ／ｃｍで３時間泳動させた。次に、ゲルを処理して、ＤＮＡを脱プリン及び変性させた。続いて、一晩のキャピラリートランスファーにより、ＤＮＡを正荷電ナイロン膜に転移させた。紫外線により、ＤＮＡを膜に架橋させた。次に、ＴＴＭＶ－ＬＹ２ゲノムに対するランダムヘキサマー生成フラグメントでブロットをプロービングして、ビオチン－ｄＵＴＰをプローブに組み込んだ。ストレプトアビジン結合ＩＲＤｙｅ－８００を用いて、プローブを検出し、ＬｉＣｏｒ Ｏｄｙｓｓｅｙイメージャーで画像化した。複製された環状二本鎖ＤＮＡ Ｒｉｎｇ２ゲノムの回収物は、ｐＲＴｘ－８３６～８３９では観察されたが、ｐＲＴｘ－８４０～８４２では観察されなかった（図２Ｄ）。

【０６４６】

追加の細胞ペレットを凍結／解凍及び０．５％トリトンを用いて溶解した。溶解物を塩化セシウムステップ勾配に通過させ、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）含有画

分を回収した。アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの複製を、ＤＮａｓｅ保護ｑＰＣＲにより測定した。ｐＲＴｘ－８３６～８４０は、全タンデムｐＲＴｘ－２５７から観察されたのと同様の細胞当たりのレベルのＲｉｎｇ２ウイルスゲノムを産生したが、これは、包膜ウイルスの産生の成功を示している（図２Ｅ）。ｐＲＴｘ－８４１及び８４２については、保護されたウイルスゲノムはほとんど又は全く観察されなかった。

【０６４７】

２つの部分的アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムを有する構築物

この実施例では、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの２つの部分コピーを含む例示的なタンデムアネロベクターが設計され、これらの部分コピーは、効率的なローリングサークル増幅を可能にするためにタンデム構造の構造を十分に模倣するように配置される。６つのそのような順列を図２Ｃに示す：５’から３’に、５’ＮＣＲ保存領域から開始し、全Ｒｉｎｇ２オープンリーディングフレームと、ＧＣリッチ領域を有する３’ＮＣＲ部分とを含むＲｉｎｇ２ゲノム（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド２６７～２９７９）、続いて、５’ＮＣＲと、高度に保存された領域とを有する部分Ｒｉｎｇ２ゲノム（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド１～４２３）を含む、順列１；５’から３’に、全Ｒｉｎｇ２オープンリーディングフレームで開始し、ＧＣリッチ領域を備える３’ＮＣＲを有する部分的Ｒｉｎｇ２ゲノム（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド４２３～２９７９）、続いて、高度に保存された領域を備える５’ＮＣＲと、オープンリーディングフレームの一部とを有する部分的Ｒｉｎｇ２ゲノム（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド１～７２３）を含む、順列２；５’から３’に、Ｒｉｎｇ２オープンリーディングフレームの一部で開始して、ＧＣリッチ領域を備える３’ＮＣＲを有する部分的Ｒｉｎｇ２ゲノム（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド７２３～２９７９）、続いて、５’ＮＣＲと、アネロウイルスオープンリーディングフレームの一部とを有する部分的Ｒｉｎｇ２ゲノム（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド１～２２７３）を含む、順列３；５’から３’に、部分的Ｒｉｎｇ２オープンリーディングフレームで開始し、ＧＣリッチ領域を備える３’ＮＣＲを有する部分的Ｒｉｎｇ２ゲノム（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド２２７３～２９７９）、続いて、５’ＮＣＲと、アネロウイルスオープンリーディングフレームの一部とを有する部分的Ｒｉｎｇ２ゲノム（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド１～２４５２）を含む、順列４；５’から３’に、部分的Ｒｉｎｇ２オープンリーディングフレームで開始し、ＧＣリッチ領域を備える３’ＮＣＲを有する部分的Ｒｉｎｇ２ゲノム（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド２４５２～２９７９）、続いて、５’ＮＣＲと、全Ｒｉｎｇ２オープンリーディングフレームとを有する部分的Ｒｉｎｇ２ゲノム（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド１～２８１２）を含む、順列５；並びに５’から３’に、ＧＣリッチ領域を備えて３’ＮＣＲから開始する部分的Ｒｉｎｇ２ゲノム（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド２８１２～２９７９）、続いて、５’ＮＣＲと、全Ｒｉｎｇ２オープンリーディングフレームと、ＧＣリッチ領域のない３’ＮＣＲとを有する部分的Ｒｉｎｇ２ゲノム（Ｒｉｎｇ２ヌクレオチド１～２８６７）を含む、順列６。

【０６４８】

手短には、タンデム構築物の各々を、ヌクレオフェクションによりＭＯＬＴ－４細胞に導入する。ローリングサークル増幅及びウイルスパッケージング用のタンパク質（Ｒｅｐ因子及びＲｉｎｇ２　ＯＲＦなど）は、他のプラスミドからトランスで提供される。トランスフェクトした細胞を３７℃で４日間インキュベートする。アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）ゲノムの複製を、ｑＰＣＲ及びサザンブロットによって測定する。２つの全ゲノム（ｐＶＬ４６－２５７）を有する完全長タンデムＲｉｎｇ２構築物を、ウイルス複製及びパッケージングの陽性対照として使用する。陰性対照には、Ｒｉｎｇ２ゲノム（ｐＶＬ４６－２４０）の単一コピーを保有するプラスミドを使用する。

【０６４９】

実施例４：哺乳類細胞におけるタンデムアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）構築物からの遺伝子の転写

この実施例では、骨格としてのＲｉｎｇ１に基づいて一連のアネロベクター構築物を生産した（図２Ｆに示す通り）。構築物には、ｅＧＦＰ－ＯＲＦ１融合タンパク質（コドン

最適化）をコードするＲｉｎｇ１配列と、タンデムＲｉｎｇ１配列を含むタンデム構築物が含まれた。次いで、構築物をジャーカット細胞にトランスフェクトした。続いて、アネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）（Ｒｉｎｇ１）ＯＲＦ１の転写を、長鎖ＲＮＡリードのシーケンシングによって評価した。

【０６５０】

図２Ｆに示されるように、代替構築物でトランスフェクトしたジャーカット細胞と比較して、Ｒｉｎｇ１ベースのタンデムＧＦＰ構築物でトランスフェクトしたジャーカット細胞中に、より多量の完全長Ｒｉｎｇ１　ＯＲＦ１転写物が検出された。

【０６５１】

実施例５：哺乳類細胞におけるタンデムアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）構築物から産生されたＯＲＦ１及びＯＲＦ２タンパク質

この実施例では、骨格としてのアネロウイルス（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｕｓ）Ｒｉｎｇ２に基づいて、一連のアネロベクター構築物を生産した（図２Ｇに示す通り）。構築物には、第１Ｒｉｎｇ２配列と第２Ｒｉｎｇ２配列をタンデムで含むタンデム構築物が含まれた。構築物をＭＯＬＴ４細胞（ヒトＴリンパ芽細胞株）にヌクレオフェクトし、次に、Ｒｉｎｇ２　ＯＲＦ１タンパク質をウエスタンブロットで検出した。手短には、１Ｅ０７　ＭＯＬＴ４細胞に、タンデムＲｉｎｇ２ゲノム（Ｒｅｐ）を含むプラスミド又は１４９ｂｐのＲｉｎｇ２ゲノムを含む陰性対照プラスミドのいずれか２５ｕｇでヌクレオフェクトした。ヌクレオフェクトしたサンプルの各々を２５ｍｌ増殖培地（ＲＰＭＩ＋１０％ＦＢＳ＋０．０１％ポリアクスマー（ｐｏｌｙａｘｍｅｒ）＋１ｍＭピルビン酸ナトリウム）に接種した。ヌクレオフェクション後１日目から３日目まで毎日各サンプルから、１ｍｌの培養物をペレット化した。ペレット化した細胞を５０ｕｌの溶解バッファー（０．５％Ｔｒｉｔｏｎ、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ８．０）に再懸濁させることにより溶解させ、続いて２ラウンドの凍結融解を実施した。次に、溶解物を１０，０００×ｇで３０分間回転させることによって清澄化した。２０ｕｌの清澄化された溶解物をウエスタンブロット解析に使用して、Ｒｉｎｇ２　ＯＲＦ１に対して産生された２つのウサギポリクローナル抗体のカクテルを用いることにより、Ｒｉｎｇ２　ＯＲＦ１タンパク質を検出した。

【０６５２】

図２Ｇに示されるように、ヌクレオフェクション後２日目及び３日目に、Ｒｉｎｇ２ベースのタンデムＧＦＰ構築物でヌクレオフェクトしたＭＯＬＴ－４細胞中にＲｉｎｇ２　ＯＲＦ１タンパク質が検出された。

【０６５３】

実施例６：タンデムアネロベクターの感染力の評価

この例では、タンデムアネロベクターは、外性遺伝子をコードする遺伝子エレメントを封入するタンパク質性外層として生産される。タンデムアネロベクターは、例えば、実施例１～４のいずれかに記載のように生産される。手短には、宿主細胞をタンデムアネロベクターＤＮＡでトランスフェクトした後、タンデムアネロベクター遺伝子エレメントの複製及びタンパク質性外層への封入に好適な条件下でインキュベートする。次いで、封入されたアネロベクターを、例えば本明細書に記載のように、培養物から単離する。　続いて、細胞の感染に好適な条件下で、アネロベクターを細胞（例えば、ＭＯＬＴ－４又はジャーカット細胞）と接触させる。

【０６５４】

感染力は、例えば、感染細胞中のアネロウイルス核酸を検出するための定量的リアルタイムＰＣＲ（ｑＰＣＲ）を用いて評価することができる。例えば、感染細胞を採取してＤＮＡを入手し、次に、アネロウイルス特異的配列に特異的なプライマーを用いてｑＰＣＲを実施する。例えば、ＧＡＰＤＨのゲノムＤＮＡ配列に特異的なプライマー用のｑＰＣＲを正規化のために用いることができる。ｑＰＣＲを使用して、検出されたアネロウイルスＤＮＡのゲノム相当量に従って感染力を定量することができる。

【０６５５】

或いは、感染力は、外性遺伝子の発現又は外性遺伝子の下流活性を検出することによって評価することもできる。例えば、ＧＦＰ又はナノルシフェラーゼなどの外性蛍光マーカーは、例えば、蛍光の検出により、又はマーカーを認識する抗体を用いたイムノアッセイによって検出することができる。

【０６５６】

実施例７：バキュロウイルスを介したＳｆ９昆虫細胞へのタンデムアネロウイルスゲノムの送達

この実施例では、Ｒｉｎｇ２ゲノムのタンデムコピーを保有するバキュロウイルスを作製し、Ｓｆ９細胞に送達した。タンデムＲｉｎｇ２ゲノムは、前述したようにアセンブリングした。完全長Ｒｉｎｇ２ゲノムをＰＣＲにより増幅して、ＩＩＳ型制限部位を付加し、細菌の複製起点及び選択マーカーを備えるプラスミド骨格に、ゴールデンゲートアセンブリを介して挿入した。得られたプラスミドは、介在ヌクレオチドなしで、互いに隣接した２つの完全なＲｉｎｇ２ゲノムを含み、これらは、５’非コード領域からＧＣリッチ領域までの第１ゲノム、続いて５’非コード領域からＧＣリッチ領域までの第２ゲノムと共に配置された。このゲノムのペアは、プラスミド骨格内のＡｓｉＳＩ及びＰａｃＩ制限酵素部位によりフランキングされた。

【０６５７】

タンデムＲｉｎｇ２ゲノムをバキュロウイルスに挿入するために、最初に修飾ｐＦａｓｔＢａｃをアセンブリングした。修飾ｐＦａｓｔＢａｃは、昆虫細胞プロモータが除去されており、プロモータ及び標準的な多重クローニング部位が、ＡｓｉＳＩ及びＰａｃＩ部位を含むカスタム多重クローニングサイトで置換されている。タンデムＲｉｎｇ２ゲノム構築物を、ＡｓｉＳＩ及びＰａｃＩによる消化を介してｐＦａｓｔＢａｃプラスミドにクローニングした後、溶解に付した。最終ｐＦａｓｔＢａｃ－ＴａｎｄｅｍＲｉｎｇ２プラスミドは、Ｔｎ７Ｌ組換え配列、タンデムＲｉｎｇ２ゲノム、ゲンタマイシン耐性遺伝子、及びＴｎ７Ｒ組換え配列、続いて、細菌複製起点及びアンピシリン耐性マーカーを有するプラスミド骨格を含んだ（図２Ｈ）。タンデムＲｉｎｇ２ゲノムの含有は、シーケンシング及びＰＣＲ産物分析によって確認された。ｐＦａｓｔＢａｃを用いて、タンデムＲｉｎｇ２ゲノムを保有するバクミドを生産し、続いて前述したようにバキュロウイルスを生産した。

【０６５８】

タンデムＲｉｎｇ２ゲノムを保有するバキュロウイルスを使用して、１のＭＯＩでＳｆ９細胞に感染させた。さらに、サンプルは、Ｒｉｎｇ２　ＯＲＦ１発現バキュロウイルスのみに感染したＳｆ９細胞、又はＲｉｎｇ２タンデムゲノムバキュロウイルスとＲｉｎｇ２　ＯＲＦ１発現バキュロウイルスに同時感染したＳｆ９細胞を有するものが含まれた。３日後、遠心分離によりＳｆ９細胞をペレット化した。全ＤＮＡを、Ｑｉａｇｅｎ　ＤＮｅａｓｙ　Ｂｌｏｏｄ　ａｎｄ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｋｉｔを用いて採取した。１０μｇの全ＤＮＡをＥｓｐ３Ｉ制限酵素で消化したが、これは、タンデムＲｉｎｇ２ゲノムと隣接するバキュロウイルス内で切断した（図２Ｉ参照）。消化されたＤＮＡをアガロースゲル上で泳動させた。次に、ＤＮＡを化学的に変性及び脱プリン化し、キャピラリートランスファーにより正荷電ナイロン膜に転移させた。ＤＮＡを膜にＵＶ架橋し、次に、Ｒｉｎｇ２ゲノムに対して設計されたビオチン含有プローブとハイブリダイズさせた。プローブは、ストレプトアビジン－ＩＲＤｙｅ８００により検出し、ＬｉＣｏｒ　Ｏｄｙｓｓｅｙイメージャーで画像化した。

【０６５９】

タンデムＲｉｎｇ２ゲノムサイズと一致するバンドが、タンデムＲｉｎｇ２バキュロウイルスに感染した全てのサンプル中で観察され、タンデムＲｉｎｇ２ゲノムのＳｆ９細胞への送達の成功を実証した（図２Ｉ）。さらに、バキュロウイルスから単離されたＲｉｎｇ２ゲノムの単一コピーと一致するバンドが観察されたが、これは、バキュロウイルス産生中に何らかのＤＮＡ組換えが起こり、その結果、バキュロウイルス集団の一部でＲｉｎｇ２ゲノムの１コピーが失われたことを示している。バキュロウイルスの約５０％は、タ

ンデムコピーではなく単一コピーＲｉｎｇ２ゲノムを示した。環状Ｒｉｎｇ２ゲノムは、バキュロウイルスからは検出されなかった（ＭＯＬＴ－４細胞に導入されたタンデムＲｉｎｇ２構築物とは対照的に、環状単一コピーｄｓＤＮＡゲノムが検出された；図２Ｉ）。しかし、この組換えは、ＳＦ９細胞へのタンデムゲノムコピーの好適な送達を阻害しなかった。

【０６６０】

実施例８：合成アネロベクターの調製

この実施例は、合成アネロベクターのインビトロ産生を実証する。

【０６６１】

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。

【０６６２】

ＤＮＡ構築物（図３及び図４）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。

【０６６３】

実施例９：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。

【０６６４】

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％と算出された（図５）。

【０６６５】

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。

【０６６６】

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。

【０６６７】

【表６１】

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) |

【０６６８】

図６Ａ、６Ｂ、７Ａ、及び７Ｂ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。

【０６６９】

実施例１０：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。

【０６７０】

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。

【０６７１】

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。

【０６７２】

図６Ａ～１０Ｂ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。

【０６７３】

実施例１１：複製欠損アネロベクター

アネロベクターの複製及びパッケージングのために、いくつかの要素をトランスで提供することができる。これらには、ＤＮＡ複製又はパッケージングを指示又はサポートするタンパク質又はノンコーディングＲＮＡが含まれる。トランス要素は、場合によっては、アネロベクターに代わる供給源、例えばウイルス、プラスミド、又は細胞ゲノムから提供することができる。

【０６７４】

他の要素は一般に、シスで提供される。これらの要素は、例えば、複製起点として作用するアネロベクターＤＮＡ中の配列又は構造（例えば、アネロベクターＤＮＡの増幅を可能にするため）又はパッケージングシグナル（例えば、タンパク質に結合してゲノムをキャプシドにロードする）であり得る。一般に、複製欠損ウイルス又はアネロベクターは、これらの要素の１つ以上を失っているため、他の要素がトランスで提供されたとしても、ＤＮＡを感染性ビリオン又はアネロベクターにパッケージングすることはできない。

【０６７５】

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）の複製を制御する上で有用であり得る。場合によっては、複製欠損ウイルスは、シス複製又はパッケージング要素を欠いているが、タンパク質及び非コードＲＮＡなどのトランス要素を発現する。一般に、治療用アネロベクターは、これらのトランス要素の一部又は全てを欠いているため、それ自体で複製することはできないが、シス要素は保持する。細胞に同時トランスフェクト／感染すると、複製欠損ウイルスがアネロベクターの増幅及びパッケージングを促進する。従って、収集されたパッケージ粒子は、トランス要素を提供するウイルスによる汚染なしに、治療用アネロベクターだけで構成される。

【０６７６】

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。

【０６７７】

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。

【０６７８】
実施例１２：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、トランス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。
【０６７９】
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。
【０６８０】
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。
【０６８１】
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１１に提供する。
【０６８２】
実施例１３：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。
【０６８３】
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。

【０６８４】

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。

【０６８５】

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。

【０６８６】

実施例１４：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。

【０６８７】

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、$1\times10^{6}$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。

【０６８８】

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。

【０６８９】

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。

【０６９０】

実施例１５：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。
【０６９１】
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。
【０６９２】
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。
【０６９３】
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。
【０６９４】
実施例１６：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。
【０６９５】
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）空のプラスミド骨格
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
【０６９６】
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１２にプロットする。図１２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。

【０６９７】
実施例１７：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。
【０６９８】
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。
【０６９９】
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。
【０７００】
実施例１８：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１３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１４）。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。
【０７０１】
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１５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。
【０７０２】
実施例１９：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。

【０７０３】
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１６Ａ～１６Ｂ）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、トランス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。

【０７０４】
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１７Ａ）。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１７Ｂ）。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１７Ａ及び１７Ｂ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１７Ｂ）と比較して、アネロベクター調製物を注射したマウス（図１７Ａ）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。

【０７０５】
実施例２０：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。

【０７０６】
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、又はプラスミド骨格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（Ａｎｅｌ

ｌｏｖｉｒｕｓ）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。

【０７０７】

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Ｅｃｏ ＲＶ－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１８Ａ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。

【０７０８】

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　ＭＷＣＯ　ｍＰＥＳ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　ＨＲ　ＳＥＣ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１８Ｂ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。

【０７０９】

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。

【０７１０】

【表６２】

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 |
| プレヌクレアーゼ収集物 | 2.78E+12 | 2.17E+12 | 1.04E+11 | 4.39E+11 |
| 清澄化された収集物 | 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% |

【０７１１】

実施例２１：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。

【０７１２】

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１８Ｃ）。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。

【０７１３】

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。

【０７１４】

実施例２２：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。

【０７１５】

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１８Ｄ）。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。

【０７１６】

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。

【０７１７】

実施例２３：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にトランスで供給した。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１９）。

【０７１８】

実施例２４：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にトランスで供給した。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。

【０７１９】

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２０Ａ）。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２０Ｂ）。

【０７２０】

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２１）。

【０７２１】

実施例２５：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。

【０７２２】

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）プラスミド骨格中の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２２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。

【０７２３】

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２３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２３に示すように、予想密度で鮮明なピークをもたらした。

【０７２４】

実施例２６：Ｒｉｎｇ２タンデムアネロベクター構築物の設計と構築

この実施例は、ＲＩＮＧ２アネロベクターをレスキューするのに適した例示的なタンデム構築物の設計を説明する。手短には、野生型ＲＩＮＧ２ゲノムの２つのコピーをタンデムヘッドトゥーテール（ｔａｎｄｅｍ ｈｅａｄ ｔｏ ｔａｉｌ）で含むプラスミド構築物が設計及び構築される。プラスミドはまた、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞での増殖のための細菌複製起点及びスペクチノマイシン耐性遺伝子もコードする。これらのプラスミドの１６の誘導体も設計及び構築され、タンデムプラスミドの第１コピー又は第２コピーのいずれかにおいて３００塩基対毎の後に、ＲＩＮＧ２ゲノムの９８６塩基対がｎＬｕｃカセットに置換される（図２４Ａ～２４Ｂに示す概略図）。９８６塩基対のｎＬｕｃカセットは、ＳＶ４０プロモータ、コザック配列、ナノルシフェラーゼ遺伝子のコード配列、及びＳＶ４０ポリＡ配列から構成される。「ｎＬｕｃカセット」を含むゲノムコピーのＯＲＦの発現は、それらの開始コドンを変異させることによってノックアウトされるが、タンデムの他のコピーは、依然として全てのＯＲＦを発現する。クローニング後、これらの構築物は、反復要素を含むプラスミドの単離のために操作された大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞において増殖させる（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ）。プラスミドは、エンドフリープラスミド抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて抽出される。

【０７２５】

実施例２７：タンデム構築物を用いたＲＩＮＧ２アネロベクターの回収

この実施例は、ＭＯＬＴ４細胞におけるタンデム構築物を用いた組換えＲＩＮＧ２アネロベクターの回収を説明する。

【０７２６】

実施例２６に記載されるタンデムプラスミドをそれぞれ１００ｕｇずつ、１Ｅ７ ＭＯＬＴ４細胞に個別にトランスフェクトする。トランスフェクトされたＭＯＬＴ４細胞をそれらの完全増殖培地（１０％ＦＢＳ、１００ｍＭピルビン酸ナトリウム及び０．０１％プルロン酸を含むＲＰＭＩ）に４Ｅ５／ｍｌで接種し、５％二酸化炭素を含む３７℃のインキュベーターにおいて１２５ＲＰＭで振盪しながら培養する。トランスフェクションの４日後に、細胞をペレットとして回収し、増殖培地を廃棄する。細胞ペレットを、０．５％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００、５０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ８．０及び３００ｍＭ塩化ナトリウムを含む溶解バッファー中に再懸濁させる。細胞を２ラウンドの凍結融解によって溶解させ、続いて１００Ｕ／ｍｌのベンゾナーゼで室温にて９０分間処理する。次に、ベンゾナーゼ処理した溶解物を１０，０００×ｇで、４℃にて３０分間回転させることにより清澄化する。清澄化溶解物を等密度遠心分離に付す。等密度遠心分離後、チューブの上部から１ｍｌの画分を回収する。収集した画分の各々を密度について分析し、ｑＰＣＲ分析により、ＤＮＡｓｅで保護されたｎＬｕｃコピーを定量する。ＲＩＮＧ２アネロベクターのパッケージングを、ＲＩＮＧ２粒子の予測密度での力価に基づいて、並びにＲＩＮＧ２アネロベクターを含むこれらの画分を用いて決定して、インビトロ形質導入を検査する。アネロベクターをレスキューすることができるタンデム構築物は、追加の変異体を作製することによってさらに最適化される。

【０７２７】

実施例２８：タンデム構築物を用いたＭＯＬＴ４細胞中のＲＩＮＧ２粒子のレスキュー

この実施例は、等密度遠心分離によって決定される通り、タンデム構築物を用いた野生

型ＲＩＮＧ２粒子のレスキューの成功を説明する。

【０７２８】

２Ｅ９ ＭＯＬＴ４細胞を、タンデムヘッドトゥーテール（ｔａｎｄｅｍ ｈｅａｄ ｔｏ ｔａｉｌ）でＲＩＮＧ２ゲノムを含むプラスミド２ｍｇでトランスフェクトした。トランスフェクト細胞を、５％二酸化炭素を含む３７℃インキュベーターにおいて１００ＲＰＭで振盪しながら、その完全増殖培地（１０％ＦＢＳ、１００ｍＭピルビン酸ナトリウム及び０．０１％プルロン酸を含むＲＰＭＩ）に４Ｅ５／ｍｌで接種した。トランスフェクションの４日後に、トランスフェクト細胞をペレットとして回収した。細胞を、再懸濁バッファー（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ８．０、１００ｍＭ塩化ナトリウム）中に再懸濁させてから、１０，０００ＰＳＩのマイクロフルイダイザーを用いる溶解に付した。溶解細胞を１００Ｕ／ｍｌのベンゾナーゼで室温にて９０分間処理した後、０．５％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００で室温にて４５分間処理した。デタージェント処理した溶解物を１０，０００×ｇで３０分間回転させることにより清澄化及び分画した。清澄化溶解物を等密度遠心分離に付した。回転後、チューブの上部から１ｍｌの画分を収集した。画分の各々を密度について分析し、ｑＰＣＲ分析によりＲＩＮＧ２ウイルスゲノムのＤＮＡｓｅ耐性定量化を行った。等密度超遠心についての代表的なデータを図２５に示す。

【０７２９】

実施例２９：ＭＯＬＴ４細胞で生産されたＲＩＮＧ２粒子の精製

この実施例は、実施例２８に記載されるタンデムプラスミド構築物を用いたＭＯＬＴ４細胞においてレスキューされたＲＩＮＧ２粒子の精製を説明する。

【０７３０】

ＲＩＮＧ２粒子を含む実施例２８で生産された画分を一緒にプールした。さらなるクロマトグラフィー精製のために、優れた精製及び回収をもたらすことから、Ｃｅｌｌｕｆｉｎｅ Ｍａｘ ＤｅｘＳ Ｈｂｐ吸着剤及びＭｕｓｔａｎｇ Ｑアニオン交換フィルターを選択した。５０ｍＬ（１．６×２５ｃｍ）Ｃｅｌｌｕｆｉｎｅ Ｍａｘ ＤｅｘＳ Ｈｂｐカラムを以下のようにして実行した：カラムを５０ｍＭトリスｐＨ ７．５＋１５０ｍＭ ＮａＣｌ＋０．０１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）８０で平衡化した。プールを平衡化バッファーで１：１希釈して（ｐＨ及び導電率を調整するため）から、カラムにロードした。ロード後、カラムを平衡化バッファーでＡ２８０ベースラインまで洗浄してから、結合タンパク質を２．５Ｍ ＮａＣｌで溶出する。ＲＩＮＧ２粒子がフロースルー画分に含まれていた。この画分を、１／１０容量１ＭトリスｐＨ ９．０を用いてｐＨ調整し、５０ｍＭトリスｐＨ９．０＋０．０１％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）８０で予め平衡化しておいたＭｕｓｔａｎｇ Ｑ ＸＴフィルター（３ｍＬの吸着剤相当）を通してロードした。ロード後、カラムをＡ２８０ベースラインまで洗浄し、生成物を１Ｍ ＮａＣｌで溶出した。この溶出画分を、Ｍｉｃｒｏｓｅｐ－１０遠心濃縮装置を用いて１０～１００倍濃縮し、最終プールをＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ウェスタンブロット、ｑＰＣＲ、及びＥＭにより分析した（図２６Ａ～２６Ｂ）。

【図面】

【図１ＡＢ】

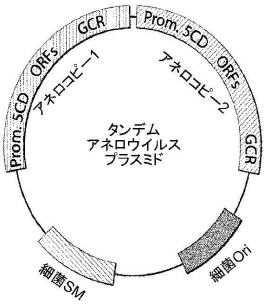



図1A

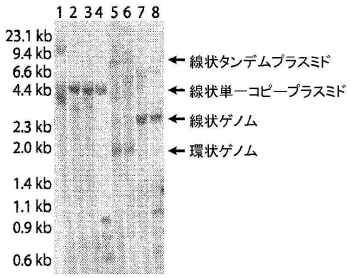



図1B

【図１Ｃ】

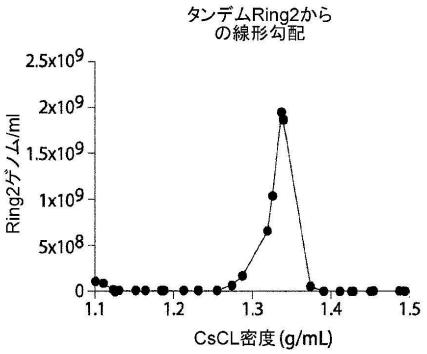



図1C

【図２Ａ】

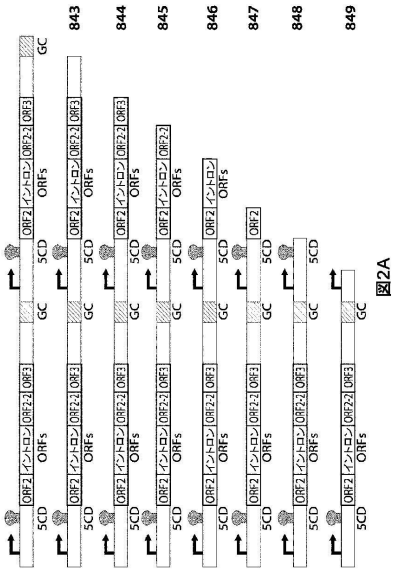



図2A

【図２Ｂ】

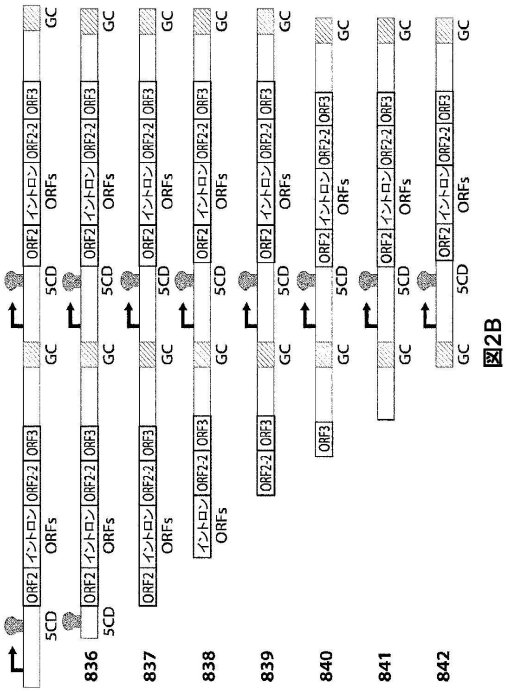



図2B

【図２Ｃ】

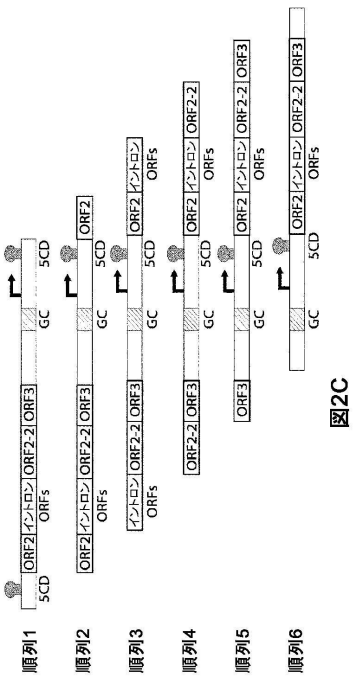



図2C

【図２Ｄ Ｅ】

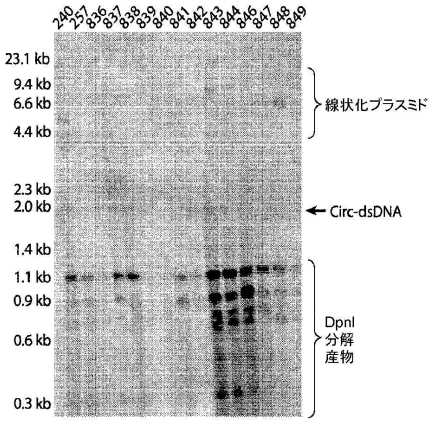



図2D

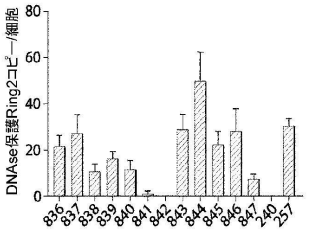



図2E

【図２Ｆ－１】

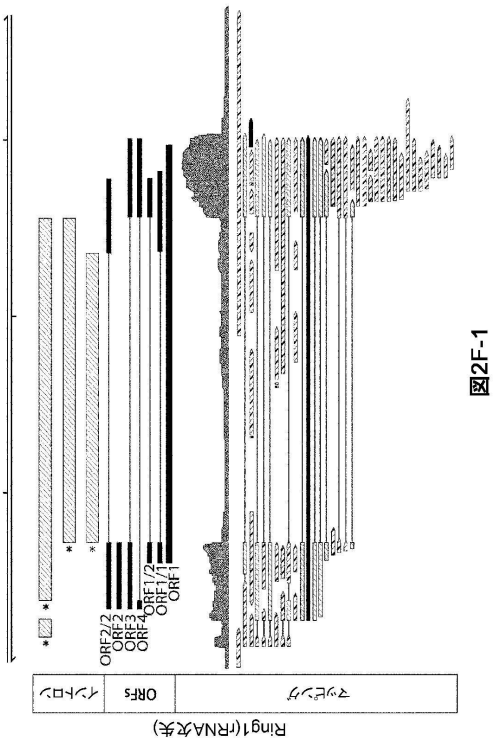



図2F-1

【図２Ｆ－２】

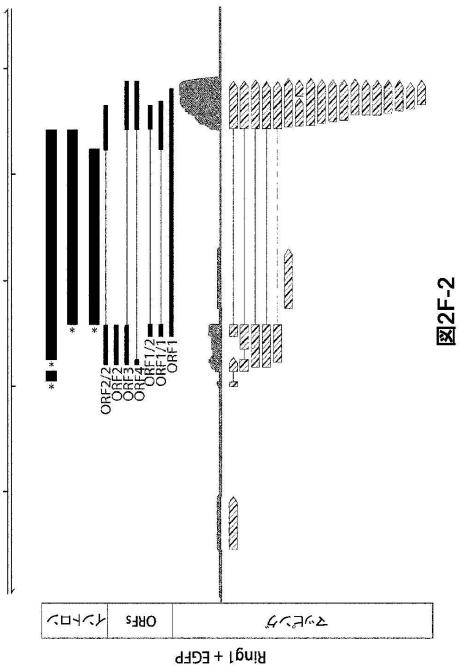



図2F-2

【図２Ｆ－３】

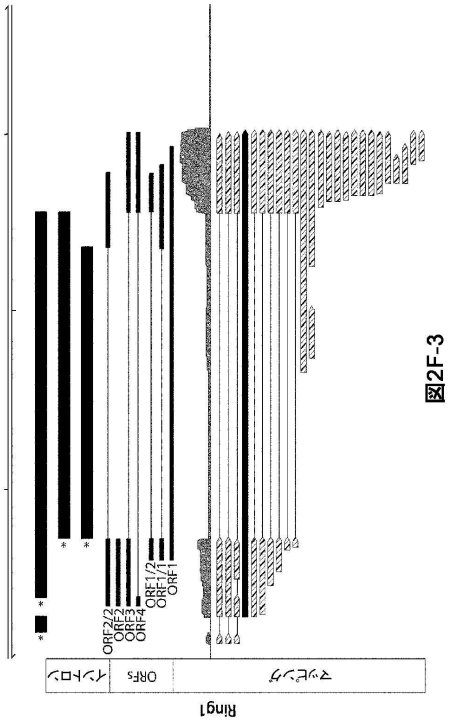



図2F-3

【図２Ｆ－４】

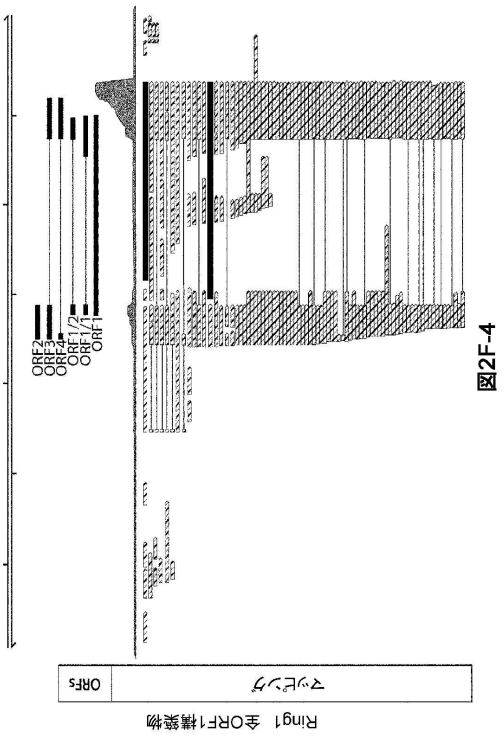



図2F-4

【図２Ｆ－５】

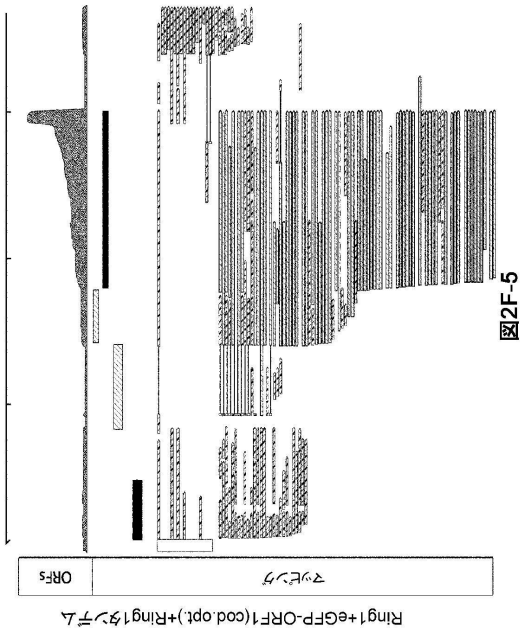



図2F-5

【図２Ｇ】

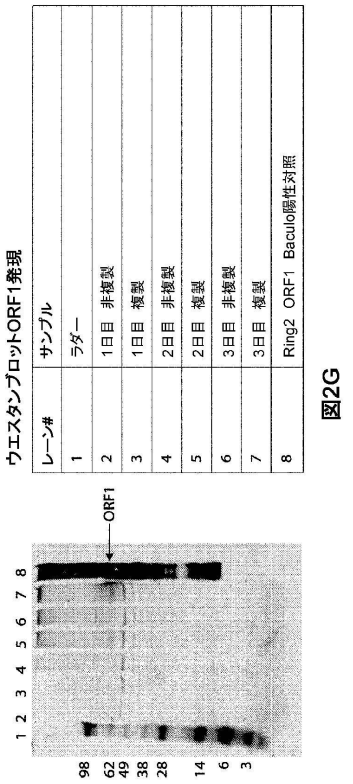



図2G

【図２Ｈ】

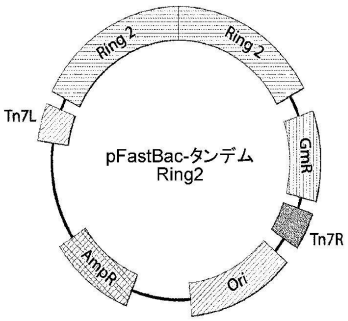



図2H

【図２Ｉ】

| レーン | バキュロウイルス |
|---|---|
| 1 | タンデムΔRing2のみ |
| 2 | Ring2　ORF1発現 |
| 3 | タンデムΔRing2+Ring2　ORF1 |
| 4 | タンデムΔRing2+Ring2　ORF1 |
| 5 | タンデムΔRing2+Ring2　ORF1 |

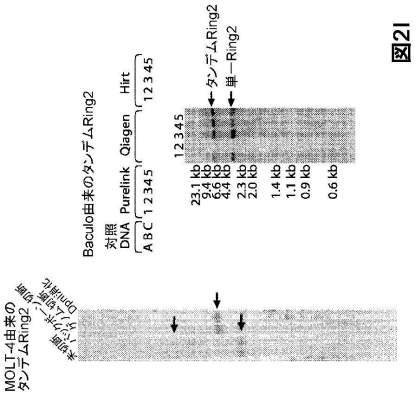
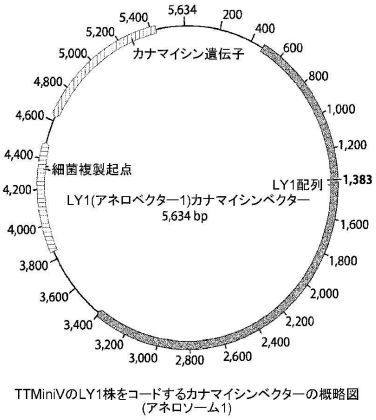



図2I

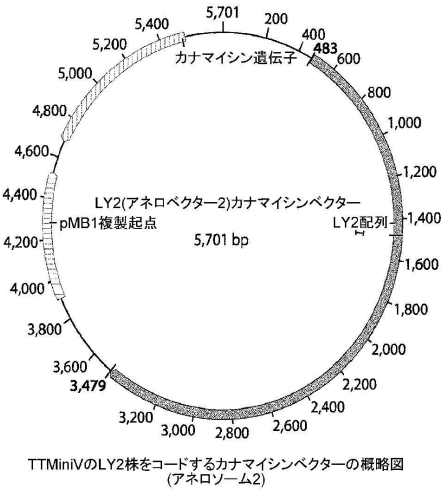
【図３】




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

図3

【図４】




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

図4

【図５】

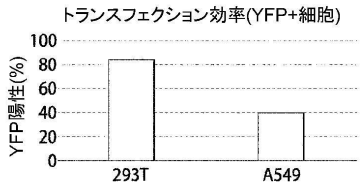



図5

【図６Ａ】

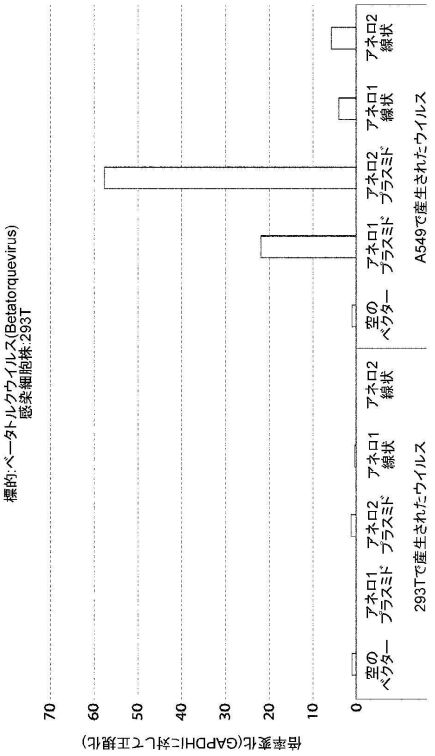



図6A

【図６Ｂ】

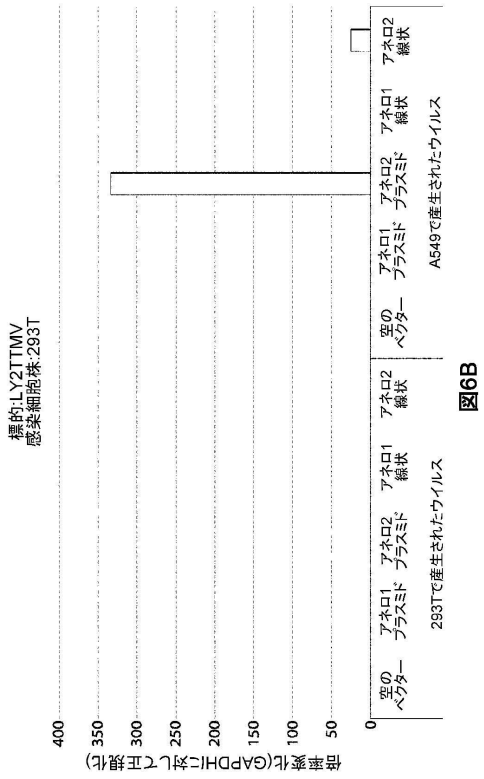



図6B

【図７Ａ】

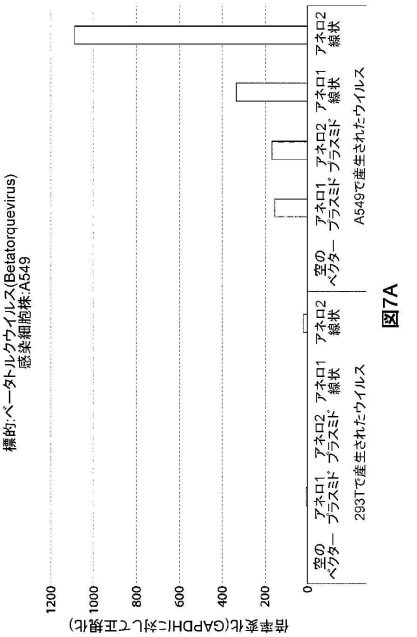



図7A

【図７Ｂ】

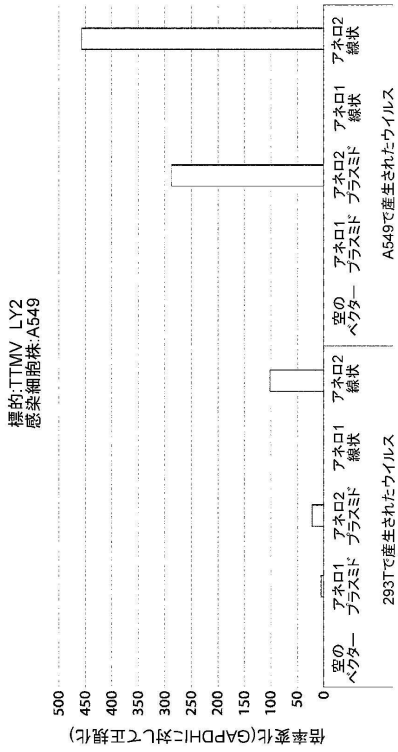



図7B

【図８Ａ】

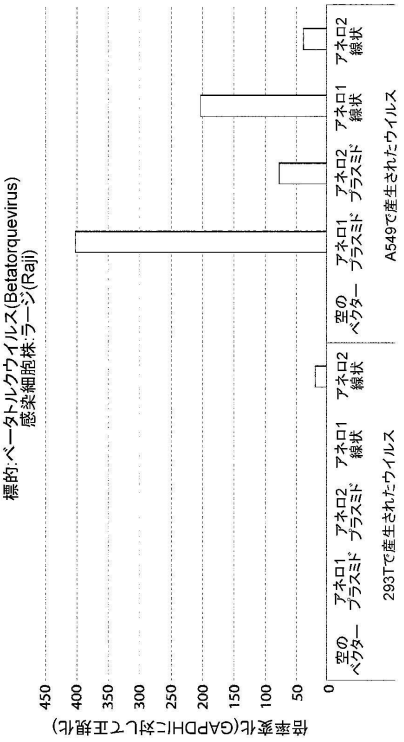



図8A

【図８Ｂ】

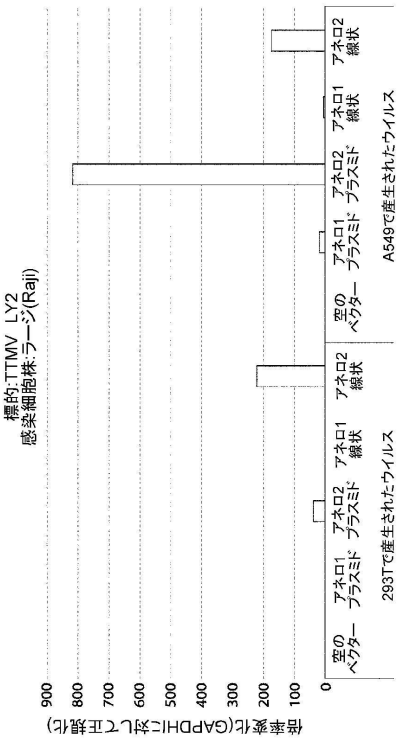



図8B

【図９Ａ】

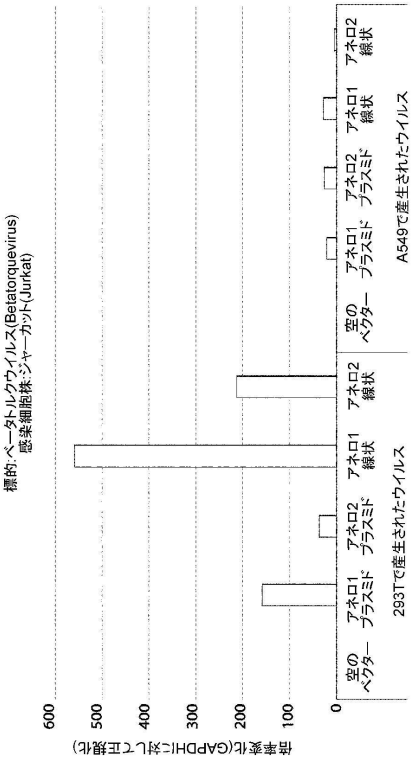



図9A

【図９Ｂ】

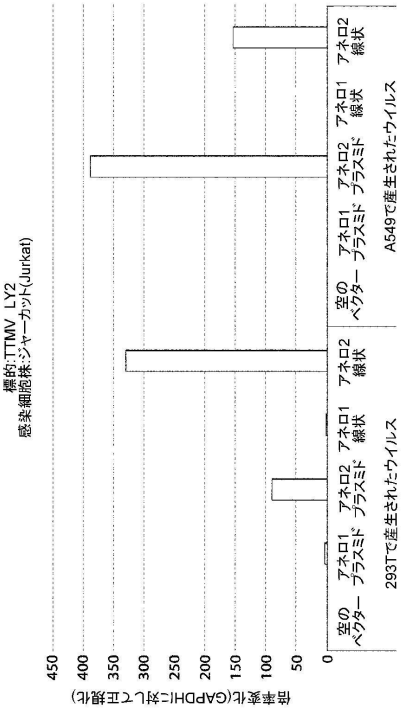



図9B

【図１０Ａ】

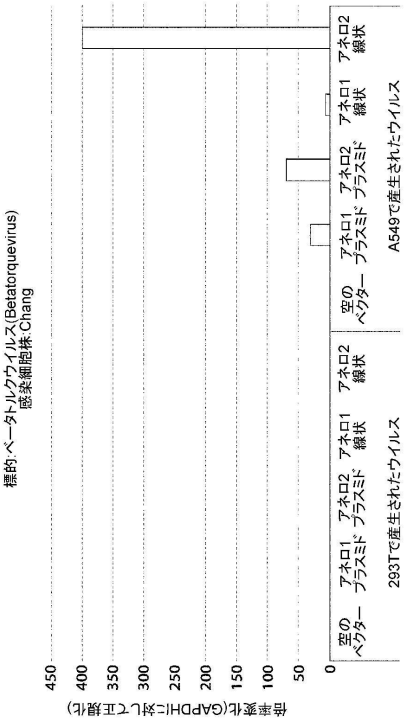



図10A

【図１０Ｂ】

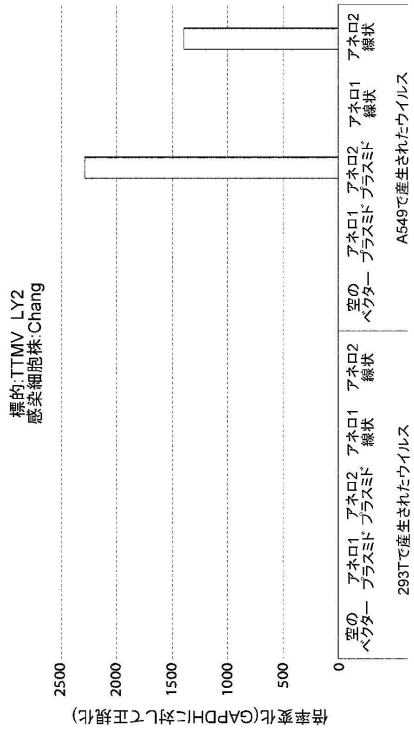



図10B

【図１１】

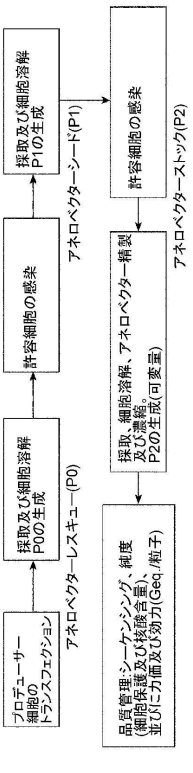



図11

【図１２】

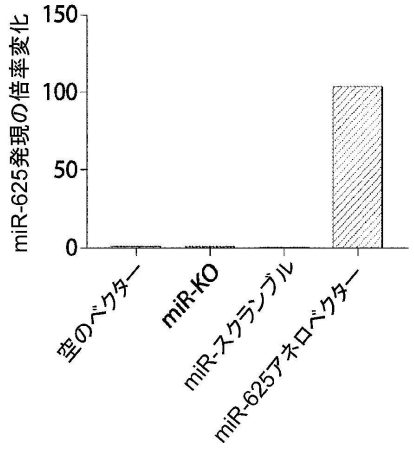



図12

【図１３】

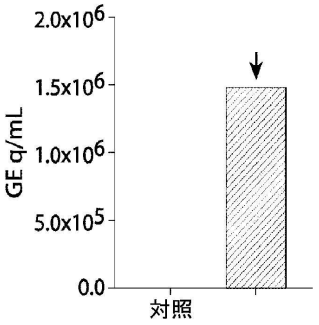



図13

【図１４】

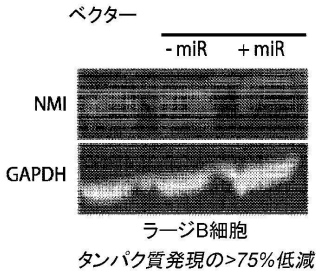



図14

【図１５】

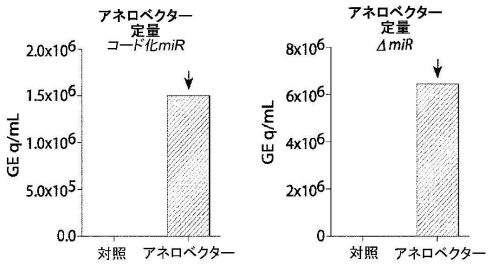



図15

【図１６Ａ】

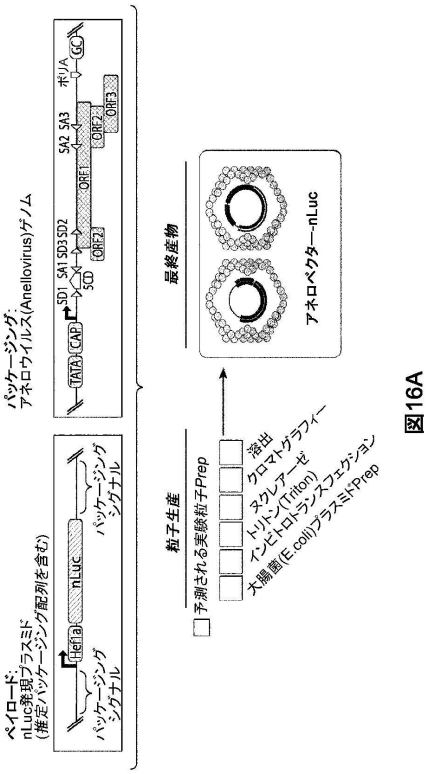



図16A

【図１６Ｂ】

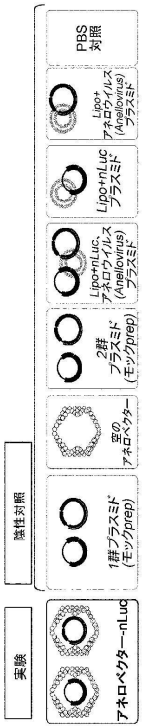



図16B

【図１７Ａ】

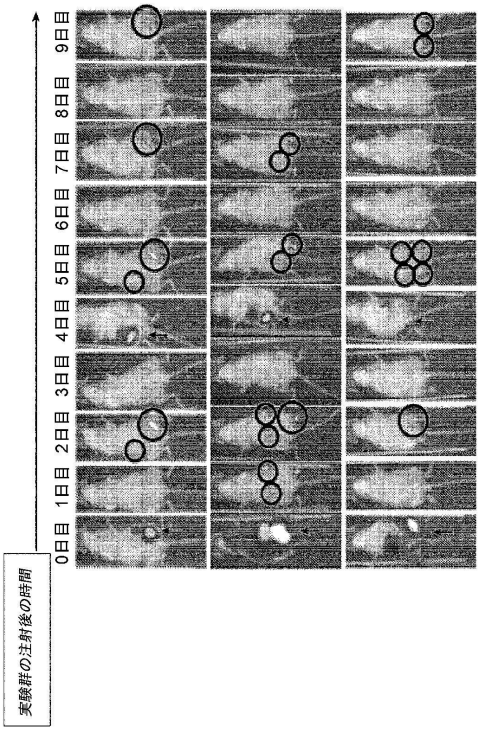



図17A

【図１７Ｂ】

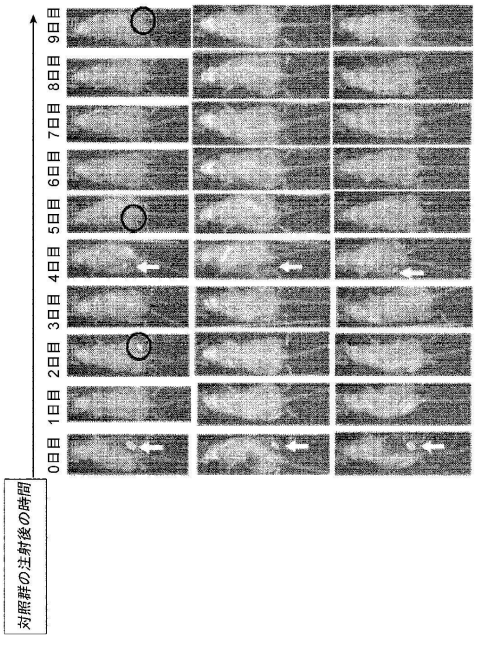



図17B

【図１７Ｃ】

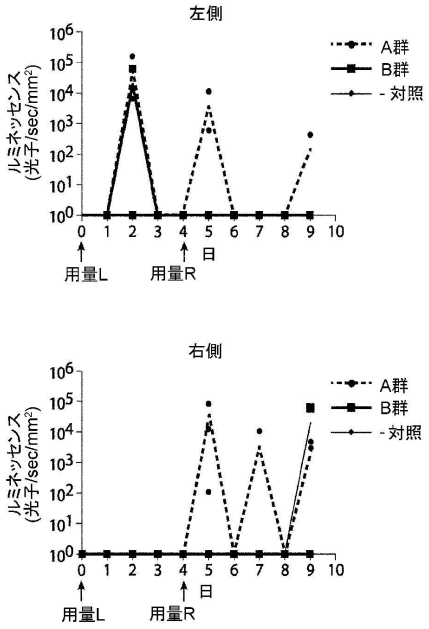



図17C

【図１８Ａ】

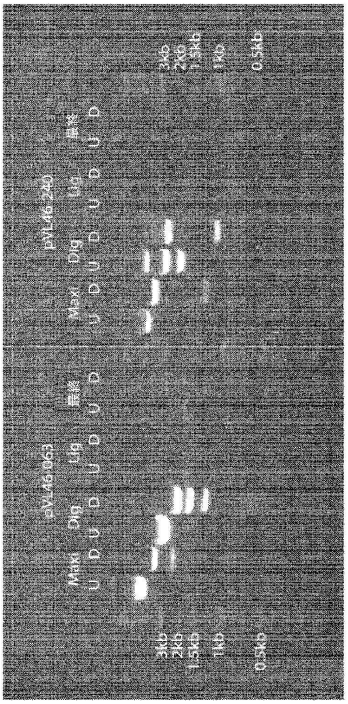


図18A

【図１８Ｂ】

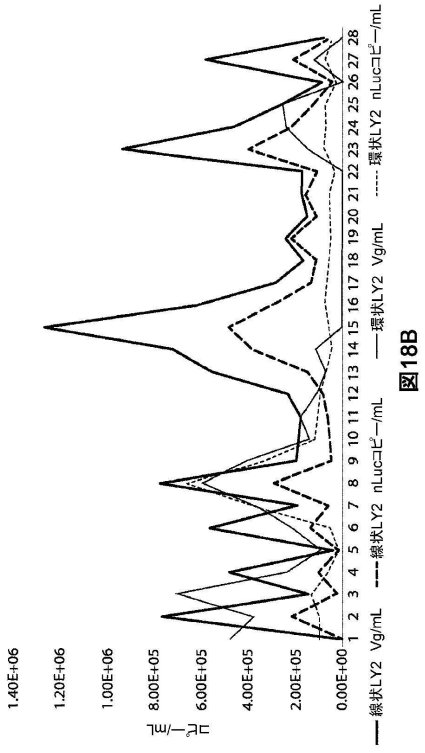



図18B

【図１８Ｃ】

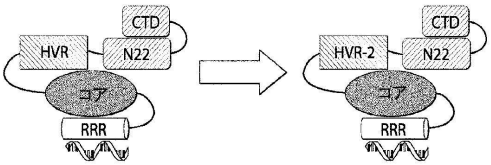



図18C

【図１８Ｄ】

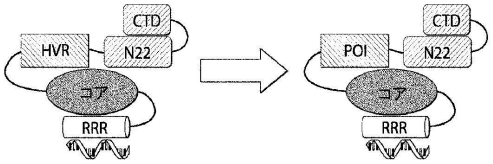



図18D

【図１９】

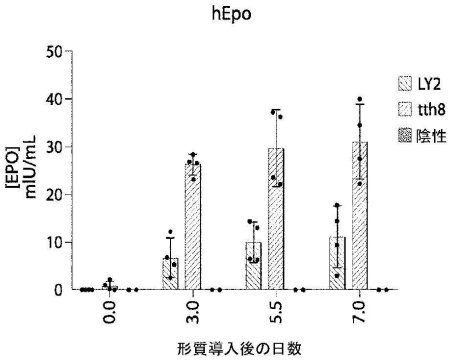



図19

【図２０】

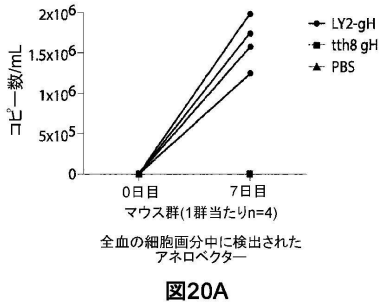



図20A

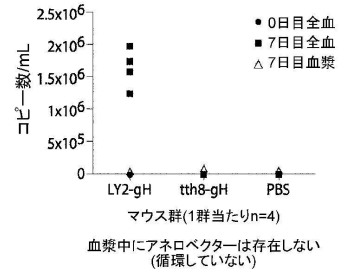



図20B

【図２１】

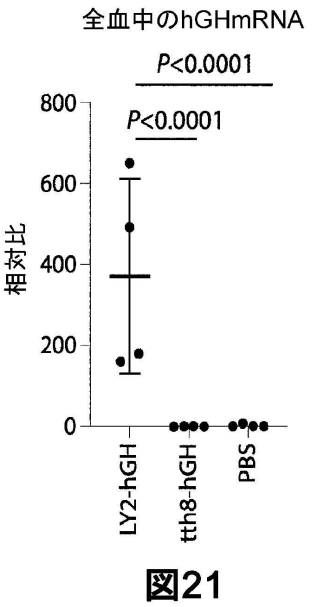



図21

【図２２】

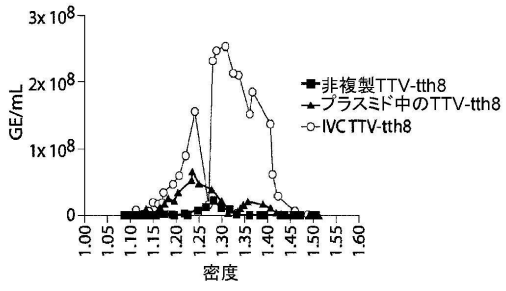



図22

【図２３】

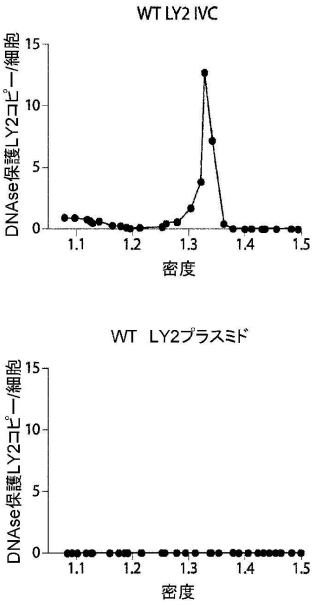



図23

【図２４Ａ】

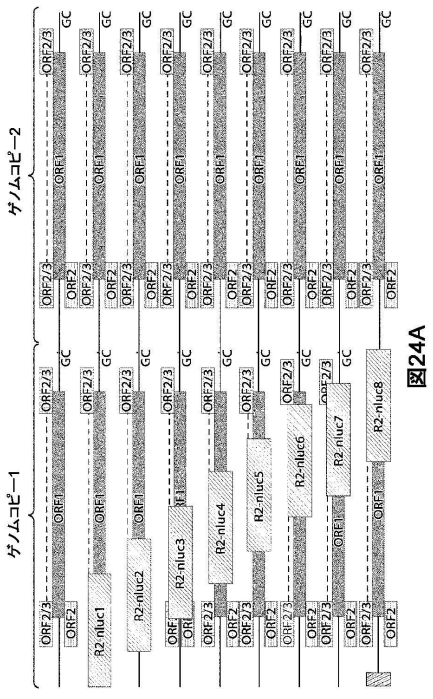



図24A

【図２４Ｂ】

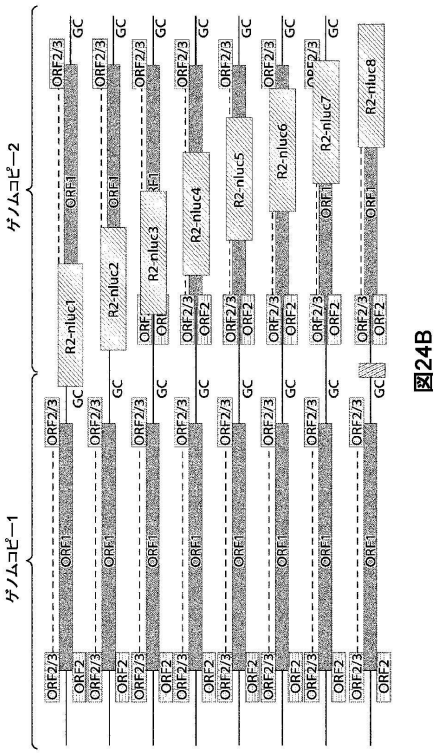



図24B

【図２５】

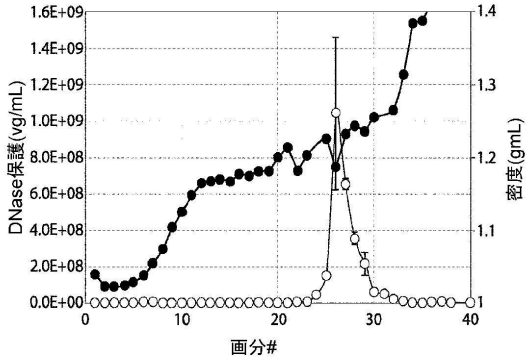



図25

【図２６Ａ】

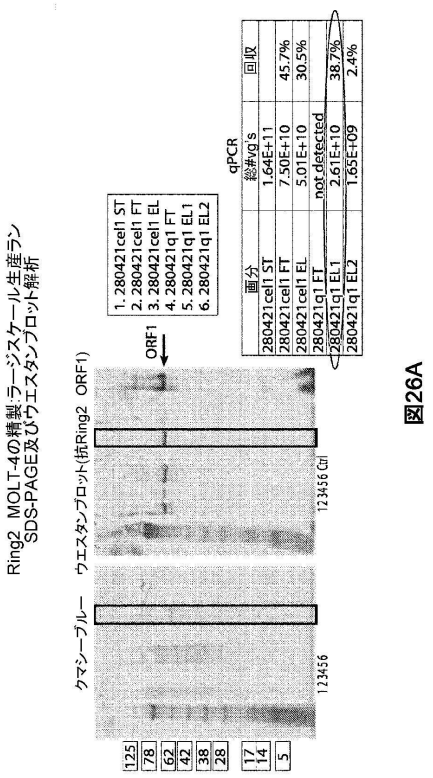



図26A

【図２６Ｂ】

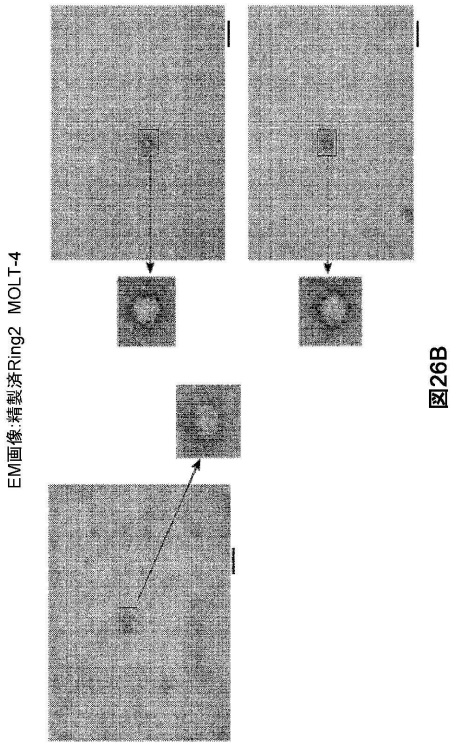



図26B

【配列表】
20235302780000001.app

【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 21/37091

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - C12N 15/86, C12N 7/00, A61K 48/00, A61P 31/00 (2021.01)
CPC - C12N 15/113, C12N 2750/00021, C12N 2750/00043, C12N 2750/00022, C12N 15/1136, C12N 2320/32

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 | US 2020/0123203 A1 (FLAGSHIP PIONEERING INNOVATIONS V, INC.) 23 April 2020 (23.04.2020) Claim 1; Claim 36; Claim 38; para [0110]; para [0127]; para [0443] | 1-3 |
| A | US 9,228,242 B2 (MENG et al.) 5 January 2016 (05.01.2016) Abstract | 1-3 |

☐ 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 |
|---|---|
| 9 September 2021 | OCT 06 2021 |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-8300 | Authorized officer<br>Karl Rodriquez<br>Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 21/37091

**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 21/37091

**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.: 4-10
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

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．ＴＲＩＴＯＮ

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　レボ， ケビン ジェイムズ

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　ナワンダル， ダナンジャイ マニクラール

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　ティンポナ， ジョセフ ルイス

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　AA90X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44