

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6175428号
(P6175428)

(45) 発行日 平成29年8月2日(2017.8.2)

(24) 登録日 平成29年7月14日(2017.7.14)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

A 6 1 K 39/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/00 H

A 6 1 K 38/16 (2006.01)

A 6 1 K 38/16

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 D

請求項の数 52 (全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-513212 (P2014-513212)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月1日(2012.6.1)
 (65) 公表番号 特表2014-518062 (P2014-518062A)
 (43) 公表日 平成26年7月28日(2014.7.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/060431
 (87) 国際公開番号 W02012/164083
 (87) 国際公開日 平成24年12月6日(2012.12.6)
 審査請求日 平成27年5月8日(2015.5.8)
 (31) 優先権主張番号 11168495.7
 (32) 優先日 平成23年6月1日(2011.6.1)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 11173588.2
 (32) 優先日 平成23年7月12日(2011.7.12)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 507055501
 イントレクソン・アクトバイオテイクス・
 エヌブイ
 Intrexon Actobiotic
 s NV
 ベルギー国、ペー 9052 ツウェイナ
 ールデ、テクノロジーパーク 4
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100126354
 弁理士 藤田 尚
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌のポリシストロン性発現系

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリシストロン性発現ユニットを含むグラム陽性細菌であって、

__前記ポリシストロン性発現ユニットが内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子を含み、

__前記内因性遺伝子および前記1つまたは複数の外因性遺伝子が前記グラム陽性細菌に対して内因性のプロモーターによって転写制御され、前記プロモーターが前記グラム陽性細菌のエノラーゼ(en o)プロモーター、usp 4 5プロモーター、gap Bプロモーター、pykプロモーター、rpm Bプロモーター、およびrpl Sプロモーターからなる群から選択され、

__前記内因性遺伝子および前記1つまたは複数の外因性遺伝子が、前記グラム陽性細菌において活性な1つまたは複数の遺伝子間領域によって転写可能に結合されており、前記1つまたは複数の遺伝子間領域がrpl W、rpl P、rpm D、rpl B、rps G、rps E、rpl N、rpl M、rpl Eおよびrpl F、並びにそれらの組合せからなる群から選択される遺伝子に直接先行する選択された遺伝子間領域である、グラム陽性細菌

。

【請求項 2】

ポリシストロン性発現ユニットを含む組換え核酸であって、

__前記ポリシストロン性発現ユニットが、グラム陽性細菌に対して内因性の遺伝子、および前記グラム陽性細菌に対して外因性の1つまたは複数の遺伝子を含み、

前記内因性遺伝子および前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子が前記グラム陽性細菌に対して内因性のプロモーターによって転写制御され、前記プロモーターが前記グラム陽性細菌のエノラーゼ (*eno*) プロモーター、 *usp45* プロモーター、 *gapB* プロモーター、 *pyk* プロモーター、 *rpmB* プロモーター、および *rplS* プロモーターからなる群から選択され、

前記内因性遺伝子および前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子が、前記グラム陽性細菌において活性な 1 つまたは複数の遺伝子間領域によって転写可能に結合されており、前記 1 つまたは複数の遺伝子間領域が *rplW*、*rplP*、*rpmD*、*rplB*、*rpsG*、*rpsE*、*rplN*、*rplM*、*rplE* および *rplF*、並びにそれらの組合せからなる群から選択される遺伝子に直接先行する選択された遺伝子間領域である、組換え核酸。

10

【請求項 3】

前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子が前記内因性遺伝子の 3' 末端に転写可能に結合された、請求項 1 に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 4】

前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子が前記ポリシストロン性発現ユニットの最も 3' 側の遺伝子である、請求項 3 に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 5】

前記 1 つまたは複数の遺伝子間領域が前記グラム陽性細菌に対して内因性である、請求項 1 に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 6】

前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子が 1 以上のポリペプチドをコードする、請求項 1 または 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のグラム陽性細菌。

20

【請求項 7】

前記 1 以上のポリペプチドが対象における治療または予防効果を有する、請求項 6 に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 8】

前記 1 以上のポリペプチドが、免疫または免疫寛容を誘導するための抗原、非ワクチン原性の治療活性のあるポリペプチド、抗体またはその機能性断片、融合タンパク質、および多量体タンパク質からなる群から選択される、請求項 6 または 7 に記載のグラム陽性細菌。

30

【請求項 9】

薬剤として使用するための、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 10】

前記内因性遺伝子が前記グラム陽性細菌における天然の染色体遺伝子座に位置する、請求項 1 または 3 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 11】

前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子を前記遺伝子座に染色体上で組み込むことにより、前記内因性遺伝子が前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子に転写可能に結合された、請求項 10 に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 12】

1 つの外因性遺伝子が抗体またはその機能性断片の軽鎖 (*V_L*) をコードし、別の外因性遺伝子が前記抗体またはその機能性断片の重鎖 (*V_H*) をコードする、請求項 1 または 3 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のグラム陽性細菌。

40

【請求項 13】

前記 *V_L* またはその機能性断片をコードする外因性遺伝子が、前記 *V_H* またはその機能性断片をコードする外因性遺伝子の 3' 末端と転写可能に結合された、請求項 12 に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 14】

前記グラム陽性細菌が、乳酸菌である、請求項 1 または 3 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のグラム陽性細菌。

50

【請求項 15】

請求項 1 または 3 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のグラム陽性細菌を含む医薬組成物。

【請求項 16】

前記プロモーターが *eno* プロモーターおよび *gapB* プロモーターからなる群から選択される、請求項 1 に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 17】

前記遺伝子間領域が配列番号 1 ~ 13 のいずれか 1 つから選択される、請求項 1、5 または 16 のいずれか 1 項に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 18】

前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子が単ドメイン抗体をコードする、請求項 8 に記載のグラム陽性細菌。

10

【請求項 19】

前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子が抗 TNF 抗体、抗 TNF 抗体フラグメント、または抗 TNF の単一抗体可変ドメインをコードする、請求項 8 に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 20】

前記 1 以上のポリペプチドが融合タンパク質または多量体タンパク質である、請求項 6 に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 21】

前記抗体またはその機能性断片が Fab である、請求項 8 に記載のグラム陽性細菌。

20

【請求項 22】

前記 1 以上のポリペプチドを対象への投与または送達において使用するための、請求項 9 に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 23】

前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子を前記遺伝子座における前記内因性遺伝子の 3' に染色体上で組み込むことによって、前記内在性遺伝子が前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子に転写可能に結合されている、請求項 11 に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 24】

前記乳酸菌がラクトコッカス属である、請求項 14 に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 25】

前記乳酸菌がラクトコッカス・ラクティスである、請求項 14 に記載のグラム陽性細菌。

30

【請求項 26】

前記乳酸菌がラクトバチルス属である、請求項 14 に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 27】

前記乳酸菌がエンテロコッカス属である、請求項 14 に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 28】

前記乳酸菌がエンテロコッカス・フェシウムである、請求項 14 に記載のグラム陽性細菌。

【請求項 29】

前記グラム陽性細菌がビフィドバクテリウムである、請求項 14 に記載のグラム陽性細菌。

40

【請求項 30】

前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子が前記内因性遺伝子の 3' 末端に転写可能に結合された、請求項 2 に記載の組換え核酸。

【請求項 31】

前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子が前記ポリシストロン性発現ユニットの最も 3' 側の遺伝子である、請求項 30 に記載の組換え核酸。

【請求項 32】

前記 1 つまたは複数の遺伝子間領域が前記グラム陽性細菌に対して内因性である、請求

50

項 2 に記載の組換え核酸。

【請求項 3 3】

前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子が 1 以上のポリペプチドをコードする、請求項 2 または 3 0 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

【請求項 3 4】

前記 1 以上のポリペプチドが対象における治療または予防効果を有する、請求項 3 3 に記載の組換え核酸。

【請求項 3 5】

前記 1 以上のポリペプチドが、免疫または免疫寛容を誘導するための抗原、非ワクチン原性の治療活性のあるポリペプチド、抗体またはその機能性断片、融合タンパク質、および多量体タンパク質からなる群から選択される、請求項 3 3 または 3 4 に記載の組換え核酸。

10

【請求項 3 6】

薬剤として使用するための、請求項 3 3 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

【請求項 3 7】

1 つの外因性遺伝子が抗体またはその機能性断片の軽鎖 (V_L) をコードし、別の外因性遺伝子が前記抗体またはその機能性断片の重鎖 (V_H) をコードする、請求項 2 または 3 0 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

【請求項 3 8】

前記 V_L またはその機能性断片をコードする外因性遺伝子が、前記 V_H またはその機能性断片をコードする外因性遺伝子の 3' 末端と転写可能に結合された、請求項 3 7 に記載の組換え核酸。

20

【請求項 3 9】

前記グラム陽性細菌が、乳酸菌である、請求項 2 または 3 0 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

【請求項 4 0】

請求項 2 または 3 0 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸を含むベクター。

【請求項 4 1】

前記プロモーターが *eno* プロモーターおよび *gapB* プロモーターからなる群から選択される、請求項 2 に記載の組換え核酸。

30

【請求項 4 2】

前記遺伝子間領域が配列番号 1 ~ 1 3 のいずれか 1 つから選択される、請求項 2、3 2 または 4 1 のいずれか 1 項に記載の組換え核酸。

【請求項 4 3】

前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子が単ドメイン抗体をコードする、請求項 3 5 に記載の組換え核酸。

【請求項 4 4】

前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子が抗 TNF 抗体、抗 TNF 抗体フラグメント、または抗 TNF の単一抗体可変ドメインをコードする、請求項 3 5 に記載の組換え核酸。

40

【請求項 4 5】

前記抗体またはその機能性断片が Fab である、請求項 3 5 に記載の組換え核酸。

【請求項 4 6】

前記 1 以上のポリペプチドを対象への投与または送達において使用するための、請求項 3 6 に記載の組換え核酸。

【請求項 4 7】

前記乳酸菌がラクトコッカス属である、請求項 3 9 に記載の組換え核酸。

【請求項 4 8】

前記乳酸菌がラクトコッカス・ラクティスである、請求項 3 9 に記載の組換え核酸。

【請求項 4 9】

50

前記乳酸菌がラクトバチルス属である、請求項 39 に記載の組換え核酸。

【請求項 50】

前記乳酸菌がエンテロコッカス属である、請求項 39 に記載の組換え核酸。

【請求項 51】

前記乳酸菌がエンテロコッカス・フェシウムである、請求項 39 に記載の組換え核酸。

【請求項 52】

前記グラム陽性細菌がビフィドバクテリウムである、請求項 39 に記載の組換え核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明は、生物学および医学、より詳細には分子および細胞生物学の分野に属し、微生物によるペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質などの産物の組換え工学技術および発現に関する。より具体的には、本発明は、微生物によるそのような産物の発現のためのポリシストロン性発現構築物またはカセットに関し、さらに、関連ベクター、形質転換宿主、対象へのそのように発現した産物の送達、特に治療的送達などの使用および応用に関する。

【背景技術】

【0002】

現在までのところ、組換えタンパク質の多くの発現系が様々な生物工学的応用のために開発されている。異種または同種遺伝子発現のための系が原核生物、酵母および真菌なら

20

【0003】

酵母において産生される大部分の組換えタンパク質は、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) を宿主系として用いて発現された。これにもかかわらず、いくつかの制限が *S. セレビシエ* (*S. cerevisiae*) 系に検出された。例は、通常低い産物の収量および非効率的な分泌 (多くの *S. セレビシエ* (*S. cerevisiae*) タンパク質は、培地中に遊離の状態で見いだされずに、細胞周辺腔に保持または細胞壁と結合している) (Dominguezら、*Int. Microbiol.*、1998年、1巻(2号)、131~142頁) である。酵母における産生の制限があるため、安価なブロス中で増殖させるのが容易であり、組換えタンパク質を製造するために頻繁に用いられている、細菌におけるタンパク質の発現が大きな関心

30

【0004】

乳酸菌 (LAB) は、*in vitro*での異種ポリペプチドの組換え発現 (例えば、米国特許第 5,559,007号) ならびに抗原および/または治療上関連するポリペプチドの *in vivo*または *in situ*での発現および送達 (例えば、国際公開第 97/14806号) のための宿主としてますます重要になりつつある。これらのグラム陽性菌宿主において産生される異種タンパク質は、培地中に容易に分泌させることができ、それにより、それらの精製ならびに対象へのそれらの直接的送達が促進される。

40

【0005】

ほとんどの発現系は、1つの単一タンパク質の発現 (1つの単一遺伝子配列の結果として) を非常に首尾よく取り扱うことができる。しかし、場合によって、複数のタンパク質もしくは多重遺伝子性タンパク質複合体を発現することができる、例えば、抗体もしくはタンパク質複合体の *in vitro*発現だけでなく、特定の疾患において相乗効果を有する2つ以上のタンパク質の *in vivo*もしくは *in situ*発現および送達または抗体もしくはその機能性 (多重遺伝子性) 断片の *in vivo*もしくは *in situ*発現および送達も可能である発現系を有することが望ましい。これらの場合、多重遺伝

50

子の緊密な共調節が必要であるため、1つのプロモーターの制御下で所望のタンパク質または抗体をコードしている多重遺伝子を有することが望ましい。

【0006】

組換えタンパク質複合体を製造するための2つの最も一般的なアプローチは、個別に発現させ、精製したサブユニットの*in vitro*での再構成を実施すること、または適切な宿主においてサブユニットを共発現させることにより*in vivo*での再構成を実施することである (Selleck & Tan, 「Recombinant protein complex expression in E. coli」, Curr. Protoc. Protein Sci., 2008年、chapter 5:unit 5、21頁)。 *in vitro*での再構成は成功裏に使用されたが、方法が冗長であり (各サブユニットを発現させ、精製しなければならず、再構成の後に複合体をさらに精製しなければならない)、再構成の収率がしばしば低い。これに反して、共発現による*in vivo*での再構成は、効率の良さ (1ラウンドの発現および精製のみ) ならびに所望の複合体の潜在的により高い収率および質 (複合体の再折りたたみおよび集合が細胞環境におけるタンパク質折りたたみ酵素の存在下で起こる) という利点がある (Selleck & Tan, 2008年、前出)。 *in vivo*での再構成は、個々のタンパク質サブユニットを発現するバキュロウイルスを昆虫細胞に共感染させることにより (Tirodeら, Mol. Cell, 1999年、3巻(1号)、87~95頁)、また複数のプラスミドにより (Johnstonら, Protein Expr. Purif., 2000年、20巻(3号)、435~443頁、McNallyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988年、85巻(19号) 7270~7273頁) または特殊化したポリシストロン性プラスミドにより (Henricksenら, J. Biol. Chem., 1994年、269巻(15号)、11121~11132頁、Ishiaiら, J. Biol. Chem., 1996年、271巻(34号)、20868~20878頁、Liら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997年、94巻(6号)、2278~2283頁) 細菌において成功裏に行われた。

【0007】

大腸菌 (E. Coli) においてタンパク質複合体を産生させるための一般的ポリシストロン性発現系が記載された (Selleck & Tan, 2008年、前出、Tan, Protein. Expr. Purif., 2001年、21巻(1号)、224~234頁、Tanら, Protein Expr. Purif., 2005年、40巻(2号)、385~395頁)。これらの系は、必要な開始および停止コドンを含むコーディング領域を含み、Shine-Dalgarno (SD) 配列などの翻訳開始シグナルおよび翻訳エンハンサーが先行する翻訳カセットの概念を利用する (Tan, 2001年、Tanら, 2005年、前出)。mRNAに転写されたとき、翻訳カセットは、大腸菌 (E. coli) 翻訳機構がmRNAの所望のポリペプチドへの翻訳を開始し、持続するために必要かつ十分な情報を含む (Selleck & Tan, 2008年、前出)。

【0008】

インターロイキン18のバイシストロン性発現ベクターは、大腸菌 (E. coli) において記載されたが、2つの遺伝子の間の遺伝子間領域が合成リンカーからなり、カスパーゼ4の発現がICEの発現よりはるかに高かったことから、明らかに遺伝子特異的である。Smolkeらは、合成遺伝子間領域配列を用いてオペロンにおける2つ以上の遺伝子によりコードされるタンパク質レベルを差別的に制御することが可能であることを以前に示した (Smolkeら, Appl. Environ. Microbiol., 2000年、66巻(12号)、5399~5405頁、Smolke & Keasling, Biotechnol. Bioeng., 2002年、80巻(7号)、762~776頁)。しかし、このアプローチは、ランダムな組合せに依拠し、発現ホストへの合成配列の導入を必要とする。

【0009】

新規かつ改善された抗体産生系の需要が近年生じた。抗体発現のための系が原核生物、酵母および真菌ならびに哺乳類細胞において確立された。単鎖および単ドメイン抗体は、細菌から作製することがより容易であるが、フルサイズ抗体は、注射したとき、一般的により高い結合親和力と中和抗体の形成のより低いリスクを有する。

【0010】

フルサイズ抗体は、細菌から作製することができる (Mazorら, Nat. Biotechnol., 2007年、25巻(5号)、563~565頁、Simmonsら, J. Immunol. Methods, 2002年、263巻(1~2号

10

20

30

40

50

)、133～147頁)。組換え原核生物発現に関する大部分の報告に、ほぼもっぱら大腸菌 (*E. coli*) からであるが、抗体断片の作製が記載されている。多くの操作された L A B は、ジスルフィド結合を修正することができるが、文献には L A B から産生された抗体様分子の限られた数の例のみが含まれている (Krugerら、*Nature Biotechnology*、2002年、20巻(7号)、702～706頁、Beninatiら、*Nature Biotechnology*、2000年、18巻(10号)、1060～1064頁、Chanceyら、*J. Immunol.*、2006年、176巻(9号)、5627～5636頁、Hultbergら、*BMC Biotechnol.*、2007年、7巻、58頁、Yuvarajら、*Mol. Nutr. Food. Res.*、2008年、52巻(8号)、913～920頁)。これらの報告にはラクトバシラス属 (*Lactobacillus*) 種、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) およびストレプトコッカス・ゴルドニ (*Streptococcus gordonii*) において発現した単鎖抗体断片のみが記載され、多重遺伝子性、二本鎖抗体断片またはフルサイズ抗体は記載されていない。ポリシストロン性発現系は、抗体のような複合タンパク質の効率的な原核生物における合成および発現を得るうえで不可欠であり得る。依然として移植拒絶反応の管理に利用できる最も強力な免疫抑制薬の1つである (Hooksら、*Pharmacotherapy*、1991年、11巻(1号)、26～37頁)、ムロモナブ C D 3 (Muromonab-CD3) の 1986 年における F D A 承認以来、フルサイズ抗体および抗体断片は、医学におけるますます重要かつ多目的ツールになっている。

【0011】

現況技術では細菌細胞におけるポリシストロン性発現系のいくつかの例が示されているが、これらは、かなり限定されており、複数の遺伝子を導入し、発現するためのより効率の高い系の必要性を際立たせている。したがって、タンパク質の発現、好ましくは異種タンパク質の発現、より好ましくは複数の異種タンパク質の発現に有利に用いることができるさらなる配列を提供する必要がある。

【0012】

上述のことに加えて、組換え微生物による直接的なタンパク質の送達のためならびにバルクタンパク質の生産および下流精製のためにより多くの量の組換えタンパク質を製造する努力は、多大な技術的努力を意味する。異種タンパク質の産生を増加させるための既存のアプローチは、選択される強プロモーターを使用することである (例えば、国際公開第 2008/084115 号参照)。このアプローチにおいて、微生物により発現された最も豊富な内因性タンパク質を同定するためにプロテオミク解析が行われる。ゲノム配列を用いることにより、それぞれの遺伝子およびプロモーターを同定し、単離することができる。これらの強プロモーター (例えば、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) h I I A 遺伝子プロモーター、P h I I A) は、異種遺伝子の前に配置することができ、このようにして、高発現を達成することができる。しかし、宿主の生理を障害する発現のレベルは、宿主に増殖負荷を負わせる可能性があり、対抗選択をもたらす。これは、発現宿主における所定の異種タンパク質の最高の可能な発現を特定の固有のレベルに本質的に制限する。これは、染色体局在性発現ユニットの開発における特にやっかいな障害である。

【0013】

対抗選択の問題は、選択マーカーの準備によって伝統的に対処されている。実際、例えば、抗生物質耐性遺伝子を準備することによる正または負の選択は、導入された異種遺伝子の損失を防ぐことができる。あるいは、または選択マーカーの使用に加えて、宿主の非カップリング増殖および異種タンパク質の発現を可能にし、それにより、異種遺伝子が発現しない場合に増殖段階における可能性のある対抗選択を予防する、誘導遺伝子発現系を用いることができる。これに関連して、欧州特許第 0569604 号は、異種遺伝子が L a c Z 遺伝子の 5' 側に強制的に配置されている、ストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) における誘導発現系を記載している。このようにして、異種遺伝子の発現は、誘導性であるだけでなく、さらに、L a c Z 遺伝子の発現を必要とする、炭素源としてのラクトースを含むそれらの自然生息環境乳汁中で細菌を増殖させることによって、異種遺伝子の維持も選択される。

【0014】

上述の異種遺伝子発現のための系は、応用分野が限定されていることは明らかである。例えば、抗生物質耐性遺伝子などの選択マーカーの使用は、食物生産または製薬応用分野における応用に容易に耐えられない。さらに、自然生息環境中の増殖に、または増殖のために自然生息環境からの炭素源を用いることに限定することは、異種遺伝子発現のための系の汎用性を著しく低くする。また、誘導系の使用は、誘導物質を添加すべき定義された培地が異種タンパク質の発現を保証するために必要であるような、宿主の増殖条件に本質的に依存する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

10

したがって、当技術分野において異種タンパク質発現を増大させる必要もあり、また様々な異なる条件下で多目的に使用でき、広く適用できると同時に、産業および/または治療環境において十分な量の発現異種タンパク質を得るために高い発現レベルを達成することができる配列、クローニングシステムおよび戦略が必要である。これらの環境において、それぞれがそれ自体の生物学的活性および治療効果を有する複数のタンパク質の発現を得ることも特に有用であると思われる。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明の態様および実施形態は、当技術分野の上述の必要性の少なくとも一部、例えば、1つまたは複数に対応する。

20

【0017】

本発明者らは、驚くべきことにグラム陽性細菌が、これらの細菌の内因性遺伝子（単数または複数）も含むポリシストロン性発現ユニットからの外因性または異種遺伝子を効率的に発現することができることを発見した。このように、グラム陽性細菌は、そのような遺伝子がこれらの細菌の内因性遺伝子（単数または複数）に転写可能または翻訳可能に結合される場合にポリシストロン性発現ユニットからの外因性または異種遺伝子を効率的に発現することができる。意外なことに、本発明者らは、内因性遺伝子およびポリシストロン性発現ユニットにおける外因性遺伝子の転写可能および/または翻訳可能な結合がグラム陽性細菌における外因性遺伝子の高い発現レベルをもたらすことを発見した。特に、グラム陽性細菌の内因性遺伝子に転写可能および/または翻訳可能に結合された外因性遺伝子の発現レベルは、グラム陽性細菌の内因性遺伝子に転写可能または翻訳可能に結合されない外因性遺伝子の発現レベルと少なくとも同等、有利なことにより高いことが見いだされた。

30

【0018】

したがって、一態様において、本発明は、ポリシストロン性発現ユニットを含むグラム陽性細菌に関し、前記ポリシストロン性発現ユニットは、1つまたは複数の内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子を含む。ポリシストロン性発現ユニットは、内因性遺伝子（例えば、制限なしに1つの内因性遺伝子）および1つまたは複数の外因性遺伝子を含むと示すこともできる。好ましくは、ポリシストロン性発現ユニットは、1つまたは複数の内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含む。したがって、そのようなポリシストロン性発現ユニットは、内因性遺伝子（例えば、制限なしに1つの内因性遺伝子）および1つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含むと示すこともできる。ポリシストロン性発現ユニットは、ポリシストロン性mRNAにおける1つまたは複数の内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子の転写をもたらすように構成されている。したがって、本グラム陽性細菌は、1つまたは複数の外因性遺伝子が転写可能または翻訳可能に結合された1つまたは複数の内因性遺伝子を含むと別途示すことができる。したがって、1つまたは複数の外因性遺伝子が転写可能および/または翻訳可能に結合された1つまたは複数の内因性遺伝子を含むグラム陽性細菌も提供する。

40

【0019】

他の態様は、ポリシストロン性発現ユニットを含む組換え核酸を提供し、前記ポリシス

50

トロン性発現ユニットは、グラム陽性細菌に内因性の遺伝子およびグラム陽性細菌に外因性の1つまたは複数の遺伝子を含む。好ましくは、ポリシストロン性発現ユニットは、1つまたは複数の内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含む。したがって、グラム陽性細菌に外因性の1つまたは複数の遺伝子が転写可能および/または翻訳可能に結合されたグラム陽性細菌に内因性の1つまたは複数の遺伝子を含むポリシストロン性発現ユニットを含む組換え核酸も提供する。

【0020】

好ましくは、本明細書を通して意図するように、前記1つまたは複数の外因性遺伝子は、前記1つまたは複数の内因性遺伝子の3'末端に転写可能または翻訳可能に結合させることができる。本発明者らは、そのような構成が異種タンパク質発現レベル、ポリシストロン性発現ユニットの維持および/またはゲノム安定性の点で有益であることを驚くべきことに発見した。さらなる下流のゲノム配列が重要性がより低い、または重要でないことがさらに発見された。

10

【0021】

転写可能または翻訳可能に結合された1つまたは複数の内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子の転写は、グラム陽性細菌における転写を達成することができるプロモーターにより適切に調節または制御することができ、好ましくは前記グラム陽性細菌の内因性プロモーターにより調節または制御することができる。したがって、1つまたは複数の外因性遺伝子が転写可能または翻訳可能に結合された、その天然の染色体遺伝子座に局在する1つまたは複数の内因性遺伝子を含むグラム陽性細菌も提供する。好ましくは、これらの転写可能または翻訳可能に結合された1つまたは複数の内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子の転写は、前記1つまたは複数の内因性遺伝子の天然のプロモーターにより調節または制御される。適切には、転写または翻訳共役は、例えば、1つまたは複数の外因性遺伝子を前記遺伝子座における前記1つまたは複数の内因性遺伝子の3'に染色体上で組み込むことなどにより、1つまたは複数の外因性遺伝子を前記遺伝子座に染色体上で組み込むことによって達成することができる。

20

【0022】

したがって、一態様において、本発明は、ポリシストロン性発現ユニットを含む組換え核酸またはグラム陽性細菌に関し、前記ポリシストロン性発現ユニットは、内因性遺伝子および前記1つまたは複数の内因性遺伝子の3'末端に転写可能に結合された1つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含み、好ましくは前記1つまたは複数の外因性遺伝子がポリシストロン性発現ユニットの最も3'側の遺伝子(単数または複数)(the most 3' gene(s))である。

30

【0023】

本発明者らは、それ自体、例えば、オペロンなどのポリシストロン性遺伝子であり得る天然の遺伝子の3'側に転写可能に結合された外因性または異種遺伝子(または複数の異種遺伝子)の染色体組込みが、(1つまたは複数の)外因性遺伝子に対する対抗選択が予想に反して存在しないか、または最小限である、安定な発現ユニットをもたらすことを驚くべきことに発見した。

【0024】

本発明者らは、ポリシストロン性発現ユニットの発現が特に特定の種類のプロモーターにより特定の条件下で達成されるときに、本明細書で述べる利点がますます明らかになることを思いがけなく発見した。本発明者らは、異種タンパク質(単数または複数)に対する対抗選択が、選択マーカーの使用などの従来の手段により、または誘導系の使用により対処されない、本明細書で述べるポリシストロン性発現系は、それにもかかわらず高レベルで安定に維持し、発現させることができ、それにより、様々な異なる条件下で広く適用でき、選択剤または誘導物質の必要がないことを驚くべきことに発見した。したがって、本明細書で述べるポリシストロン性発現モジュールは、非選択可能(non-selectable)内因性および/または外因性遺伝子の使用を可能にする。

40

【0025】

50

一態様において、本発明は、ポリシストロン性発現ユニットを含む組換え核酸またはグラム陽性細菌に関し、前記ポリシストロン性発現ユニットは、内因性遺伝子および前記内因性遺伝子の3'末端に転写可能に結合された1つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含み、前記ポリシストロン性発現ユニットの発現が構成的プロモーターにより達成される。

【0026】

他の態様において、本発明は、ポリシストロン性発現ユニットを含む組換え核酸またはグラム陽性細菌に関し、前記ポリシストロン性発現ユニットは、内因性遺伝子および前記内因性遺伝子の3'末端に転写可能に結合された1つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含み、前記ポリシストロン性発現ユニットの発現が中心代謝遺伝子プロモーターにより達成される。

10

【0027】

他の態様において、本発明は、ポリシストロン性発現ユニットを含む組換え核酸またはグラム陽性細菌に関し、前記ポリシストロン性発現ユニットは、内因性遺伝子および前記内因性遺伝子の3'末端に転写可能に結合された1つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含み、前記ポリシストロン性発現ユニットの発現がハウスキーピング遺伝子プロモーターにより達成される。

【0028】

他の態様において、本発明は、ポリシストロン性発現ユニットを含む組換え核酸またはグラム陽性細菌に関し、前記ポリシストロン性発現ユニットは、内因性遺伝子および前記内因性遺伝子の3'末端に転写可能に結合された1つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含み、前記ポリシストロン性発現ユニットの発現が必須遺伝子プロモーターにより達成される。

20

【0029】

他の態様において、本発明は、ポリシストロン性発現ユニットを含む組換え核酸またはグラム陽性細菌に関し、前記ポリシストロン性発現ユニットは、内因性遺伝子および前記内因性遺伝子の3'末端に転写可能に結合された1つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含み、前記ポリシストロン性発現ユニットの発現が誘導遺伝子プロモーターにより達成されない。

【0030】

30

他の態様において、本発明は、ポリシストロン性発現ユニットを含む組換え核酸またはグラム陽性細菌に関し、前記ポリシストロン性発現ユニットは、内因性遺伝子および前記内因性遺伝子の3'末端に転写可能に結合された1つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含み、前記ポリシストロン性発現ユニットの発現がリボソーム遺伝子プロモーターにより達成される。

【0031】

他の態様において、本発明は、ポリシストロン性発現ユニットを含む組換え核酸またはグラム陽性細菌に関し、前記ポリシストロン性発現ユニットは、内因性遺伝子および前記内因性遺伝子の3'末端に転写可能に結合された1つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含み、前記ポリシストロン性発現ユニットの発現が解糖遺伝子プロモーターにより達成される。

40

【0032】

上でも示したように、好ましい実施形態において、上述のプロモーターは、内因性遺伝子プロモーターである。さらに下でも詳述するように、好ましくは、本明細書で用いるプロモーターは、強プロモーターである。好ましくは、ただし制限なしに、前記内因性プロモーターは、eno、usp45、gapB、pyk、rpmBおよびrplSのプロモーターからなる群から選択することができる。極めて好ましくは、翻訳可能に結合された内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子の転写は、前記内因性遺伝子(の1つ)の天然のプロモーターにより調節または制御され得る。

【0033】

50

本明細書で述べるプロモーターの特性を本発明により組み合わせることができることを理解すべきである。したがって、実施形態において、本発明は、ポリシストロン性発現ユニットを含む組換え核酸またはグラム陽性細菌に関し、前記ポリシストロン性発現ユニットは、内因性遺伝子および前記内因性遺伝子の3'末端に転写可能に結合された1つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含み、前記ポリシストロン性発現ユニットの発現が、例えば、(内因性)構成的ハウスキーピング遺伝子プロモーター、(内因性)構成的中心代謝遺伝子プロモーター、(内因性)構成的必須遺伝子プロモーター、(内因性)構成的リボソーム遺伝子プロモーター、(内因性)構成的解糖遺伝子プロモーター、(内因性)中心代謝ハウスキーピング遺伝子プロモーター、(内因性)必須中心代謝遺伝子プロモーター、(内因性)必須中心代謝ハウスキーピング遺伝子プロモーター、(内因性)必須ハウスキーピング遺伝子プロモーター、(内因性)構成的中心代謝ハウスキーピング遺伝子プロモーター、(内因性)構成的必須中心代謝ハウスキーピング遺伝子プロモーター、(内因性)必須リボソーム遺伝子プロモーター、(内因性)必須解糖遺伝子プロモーター、(内因性)構成的必須リボソーム遺伝子プロモーター、(内因性)構成的必須解糖遺伝子プロモーターにより達成される。

10

【0034】

好ましくは、本明細書を通して意図するように、前記1つまたは複数の外因性遺伝子は、前記1つまたは複数の内因性遺伝子の3'末端に転写可能または翻訳可能に結合させることができ、それにより、1つまたは複数の内因性遺伝子は、細菌の染色体上のそれら自然位置に存在する。この構成において、1つまたは複数の内因性遺伝子(内因性遺伝子プロモーターを最小限含む)の5'末端における配列は、野生菌株のそれと同じであり、1つまたは複数の外因性遺伝子の3'末端の後の領域は、野生菌株におけるように1つまたは複数の内因性遺伝子の領域3'の配列と同じである。

20

【0035】

例えば、組換え微生物による治療用タンパク質の送達のためなどの外因性タンパク質発現の多くの応用は、特定の選択される宿主微生物における前記治療用タンパク質の発現から恩恵を受け得る。これらの微生物は、例えば、ヒトまたは動物微生物群に由来する選択される菌株のような、それらのコロニー形成能に基づいて選択することができると思われる。微生物はまた、例えば、それらの細胞壁、細胞表面または細胞内内容物と宿主免疫系との相互作用の結果として、例えば、tol様受容体、Igファミリーメンバー、補体、サイトカインおよびその他との相互作用により、特定の送達された治療用タンパク質の活性を増強するそれらの能力に基づいて選択することができると思われる。特定の微生物は、腫瘍内、皮膚、高胆汁含量を有する部位、低いpHを有する部位およびその他などの特定の苛酷な送達部位内または上で存続するそれらの堅牢性に関して選択することができると思われる。本明細書を通して列挙するグラム陽性細菌は、好ましくは乳酸菌(LAB)、より好ましくはラクトコッカス属種(Lactococcus sp.)、より好ましくはラクトコッカス・ラクティス(Lactococcus lactis)またはその亜種またはその菌株であり得る。あるいは、前記LABは、好ましくはエンテロコッカス属種(Enterococcus sp.)、より好ましくはエンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus fecium)またはエンテロコッカス・フェカリス(Enterococcus faecalis)またはその亜種またはその菌株であり得る。

30

40

【0036】

内因性細菌叢への遺伝子水平伝播を避けるために、染色体埋没型発現ユニットからの発現は、医学における治療用タンパク質の送達ツールとしての組換え細菌叢の使用に極めて有利である。また、染色体に局在する発現ユニットは、染色体に局在する発現ユニットがバルクタンパク質の産生に用いられる産生菌株の望ましい構造であり得るように、世代にわたってはるかににより安定に受け継がれることが証明され得る。現況技術において、染色体挿入は、条件付きで非複製型であり、相同的組換えを可能にする異種遺伝子中間フランク領域(in-between flanking regions)を含むノックイン(KI)タイプベクターを用いて実施される。従来のアプローチ(例えば、国際公開第2008/084115号

50

参照)では、K I プラスミドは、同族宿主において構築される(L . ラクティス(L. lactis)のK I プラスミドはL . ラクティス(L. lactis)において構築される)。多くの分泌シグナルが他の宿主に使用するのに適合しないので、これは、特にタンパク質分泌を必要とする異種発現に当てはまる。細菌染色体上に配置することが意図される発現構築物における強プロモーターの使用は、K I プラスミド中間体からの異種遺伝子の発現により妨げられる。異種遺伝子には強プロモーターが直接先行し、これによって、K I プラスミドからの発現が、意図されず、また要求されないが、最強のプロモーターの使用を本質的に制限することとなる。多くの場合、K I プラスミドは、宿主における染色体数の多重度であるコピー数を有し、組込みにより、発現が数倍低くなる。したがって、染色体発現ユニットは、達成可能な最高であるものより本質的に弱い。この問題は、ここに述べる本発明により回避される。このアプローチにおいて、異種遺伝子は、下流に配置され、細菌染色体上の(強く発現した)内因性遺伝子に転写可能および/または翻訳可能に結合される。この戦略は、内因性(強い)プロモーターがK I プラスミド上に存在することを必要としない。むしろ、異種遺伝子の5'末端が配置されている。この種のK I プラスミドは、サイレントであり、強いプロモーターの使用を制限しない。

【0037】

1つまたは複数の外因性遺伝子と1つまたは複数の本明細書で述べる他の遺伝子との転写または翻訳共役は、グラム陽性細菌において活性な(すなわち、機能性の、有効な)遺伝子間領域により、好ましくはグラム陽性細菌の内因性遺伝子間領域により達成することができる。したがって、さらなる態様は、グラム陽性細菌において活性な遺伝子間領域、好ましくは前記グラム陽性細菌に対して外因性の遺伝子に作動可能に連結した、グラム陽性細菌の内因性遺伝子間領域を含む組換え核酸を提供する。作動可能な連結は、mRNA上に存在する遺伝子間領域の転写物ならびに外因性遺伝子の転写物が、グラム陽性細菌における、外因性遺伝子の翻訳の開始のための部位を与えることができることを保証する。好ましくは、遺伝子間領域は、外因性遺伝子の5'に配置することができる。核酸は、各外因性遺伝子に遺伝子間領域が先行する、ポリシストロン性配置の2つ以上の外因性遺伝子を含み得る。遺伝子間領域は、同じまたは異なっているてもよい。例えば、遺伝子間領域が異なる場合、これらは、同じもしくは異なる種の異なる遺伝子に、または異なる種の同じ遺伝子に由来する遺伝子間領域に相当し得る。これらの核酸は、1つまたは複数の他の遺伝子が遺伝子間領域を介して1つまたは複数の外因性遺伝子に転写可能または翻訳可能に結合された、1つまたは複数の外因性遺伝子を含むポリシストロン性発現ユニットを構築するのに有用であり得る。例えば、これらの核酸は、1つまたは複数の内因性遺伝子が遺伝子間領域を介して1つまたは複数の外因性遺伝子に転写可能または翻訳可能に結合された、本明細書で教示したようなポリシストロン性発現ユニットを構築するのに有用であり得る。好ましくはポリシストロン性発現ユニットの第1のシストロンは、強く発現する内因性遺伝子である。

【0038】

本組換え核酸は、レプリコン上に含まれ得る。一態様はまた、本明細書で教示した核酸を含むレプリコンまたはベクターに関する。例えば、ベクターは、原核生物発現ベクター、好ましくは原核生物ポリシストロン性発現ベクターであり得る。しかし、そのようなプラスミド発現系の開発は、特定のレプリコンと強プロモーターの組合せが不安定であり得るため、面倒であり得る。また、特に、治療用タンパク質の送達のための応用の場合のように、抗生物質選択マーカーを発現プラスミドに含めることができない場合でないとするれば、天然のプラスミドの存在のため、選択される微生物を組換えプラスミドにより形質転換し、微生物において組換えプラスミドを安定に維持することは、不可能であり得る。異種遺伝子を下流に配置し、細菌染色体上で(強く発現した)内因性遺伝子に転写可能または翻訳可能に結合させることによって、この問題を回避することができる。この戦略は、プラスミド媒介性発現系を必要としないので、あらゆるタイプの選択される細菌叢の遺伝子工学に適用され得る一般的なアプローチとして用いることができる。要求される唯一の

菌株固有の情報は、最先端技術により速やかに確定することができる。十分に発現したタンパク質のプロテオミク解析と組み合わせた高処理配列決定により、十分に存在するタンパク質をコードする領域のヌクレオチド配列が速やかに得られる。したがって、最も好ましくは、本明細書で述べるベクターは、外因性遺伝子（単数または複数）の染色体組込みを発生させるような、グラム陽性細菌における相同的組換えを達成するように構成することができる。

【0039】

グラム陽性細菌における1つもしくは複数の外因性遺伝子のポリシストロン性発現のための、または1つもしくは複数の内因性遺伝子および1つもしくは複数の外因性遺伝子のポリシストロン性発現のための本明細書で述べる組換え核酸またはベクターの使用をさらに提供する。その上、グラム陽性細菌が1つもしくは複数の外因性遺伝子のポリシストロン性発現または1つもしくは複数の内因性遺伝子および1つもしくは複数の外因性遺伝子のポリシストロン性発現の能力がある、本明細書で教示した組換え核酸またはベクターを含む（例えば、それにより形質転換した）グラム陽性細菌を開示する。さらに、本明細書で教示した組換え核酸またはベクターを前記グラム陽性細菌に導入するステップを含む、グラム陽性細菌における1つもしくは複数の外因性遺伝子のポリシストロン性発現を達成するためのまたは1つもしくは複数の内因性遺伝子および1つもしくは複数の外因性遺伝子のポリシストロン性発現を達成するための方法を提供する。その上、本明細書で教示した組換え核酸またはベクターを前記グラム陽性細菌に導入するステップを含む、1つもしくは複数の外因性遺伝子のポリシストロン性発現の能力のあるまたは1つもしくは複数の内因性遺伝子および1つもしくは複数の外因性遺伝子のポリシストロン性発現の能力のあるグラム陽性細菌を発生させる方法を提供する。

【0040】

本発明は、グラム陽性細菌における単一外因性遺伝子または複数の（例えば、2つ、3つもしくはそれ以上の）異なる外因性遺伝子を発現させる、好ましくは強力に（高度に）発現させる。前記外因性遺伝子または複数の外因性遺伝子は、有利にタンパク質（単数または複数）、ポリペプチド（単数または複数）および/またはペプチド（単数または複数）などの発現産物または複数の発現産物をコードし得る。例として、また制限なしに、そのようなタンパク質（単数または複数）、ポリペプチド（単数または複数）および/またはペプチド（単数または複数）は、抗原（例えば、免疫または免疫寛容を誘導するため）、アレルゲン、非ワクチン原性治療用ポリペプチド（サイトカイン、成長因子、創傷治癒因子、・・・）、抗体またはその機能性断片（例えば、Fab断片）、融合タンパク質、多量体タンパク質などおよびそれらの組合せを含み得る。

【0041】

ポリシストロン性の編成は、本明細書で教示した発現ユニットを、2種以上のポリペプチド鎖を含むタンパク質（例えば、多量体タンパク質、タンパク質複合体）の発現に特に適するものにすることができる。したがって、本明細書で意図する2種以上の外因性遺伝子は、好ましくは多量体タンパク質の異なるモノマーまたはサブユニットをコードすることができ、それによって、遺伝子がポリシストロン性mRNAに共転写され、個々のモノマーまたはサブユニットがこのmRNAから翻訳される。これにより、例えば、個々のモノマーまたはサブユニットの多量体タンパク質へのバランスのとれた最適な集合を達成することなどの、外因性遺伝子の厳密に調節された共発現が可能になり得る。

【0042】

この原理の特に好都合な実例は、抗体またはその機能性断片の発現である。したがって、本明細書で教示した2種以上の外因性遺伝子は、好ましくは抗体またはその機能性断片の別個の鎖をコードし得る。例えば、1つの外因性遺伝子が抗体またはその機能性断片の軽鎖（V_L）をコードし、他の外因性遺伝子が抗体またはその機能性断片の重鎖（V_H）をコードし得る。好ましくは、抗体の機能性断片は、Fabであり得る。特定の非限定的実施形態において、前記Fabは、サイトカイン、サイトカインの受容体、ケモカインまたは免疫/炎症活性化分子に結合し、かつ/またはその生物学的作用を阻害し得る。好ま

しい実施形態において、F a b は、例えば、制限なしに前記 F a b が c A 2 抗 T N F または C D P 8 7 0 抗 T N F であり得ることなどのように、T N F に結合し、かつ / またはその生物学的作用を阻害し得る。

【 0 0 4 3 】

抗体またはその断片の個々の鎖をコードする外因性遺伝子は、グラム陽性細菌におけるポリシストロン性発現のために転写可能または翻訳可能に結合される。好ましくは、V_L またはその機能性断片をコードする外因性遺伝子は、V_H またはその機能性断片をコードする外因性遺伝子の 3' 末端に転写可能または翻訳可能に結合させることができる。この遺伝子編成は、抗体またはその機能性断片の特に有効な発現および集合をもたらす。

【 0 0 4 4 】

ポリシストロン性の編成はまた、本明細書で教示した発現ユニットを、例えば、細菌により *in situ* で送達された場合に、相乗的效果、例えば、相乗的治療または予防効果をもたらすために協力するタンパク質などの産物の共発現に特に適するものにし得る。

【 0 0 4 5 】

他の態様は、1 つまたは複数の外因性遺伝子が、対象において治療または予防効果を有するタンパク質（単数または複数）、ポリペプチド（単数または複数）またはペプチド（単数または複数）などの産物または複数の産物をコードする、本明細書で教示したグラム陽性細菌を提供する。そのような細菌は、詳しくは薬剤として使用するため、より詳しくは対象への前記産物または複数の産物の投与または送達に使用するため、より詳しくは前記産物または複数の産物の投与または送達から恩恵を受け得る疾患の治療に使用するために提供する。また、そのようなグラム陽性細菌を含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 4 6 】

その上、本明細書で教示したグラム陽性細菌を対象に投与するステップを含む、タンパク質（単数または複数）、ポリペプチド（単数または複数）またはペプチド（単数または複数）などの産物または複数の産物を送達する方法を提供し、1 つまたは複数の外因性遺伝子が前記産物または複数の産物をコードする。好ましくは、前記産物または複数の産物は、対象における治療または予防効果を有し得る。

【 0 0 4 7 】

対象への本グラム陽性細菌の *in situ* 送達のために好都合なことに、細菌は、外因性発現産物の配列のほかに、外因性または病原性配列を導入しないか、またはより少ないそれを導入することにより、その内因性の特性をより厳密に保持する。それにより、規制 G R A S または「安全と一般的に認識される」状態ができる限り多く維持され、ひいてはヒトまたは動物における操作された菌株の使用のための臨床承認および販売許可を取得する手続きを促進する。

【 0 0 4 8 】

本発明によるさらなる態様および実施形態を項目 (i) ~ (x x i i) で下文に示す。

【 0 0 4 9 】

(i) 内因性遺伝子および前記 1 つまたは複数の内因性遺伝子の 3' 末端に転写可能に結合された 1 つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含む、ポリシストロン性発現ユニットを含むグラム陽性細菌。

【 0 0 5 0 】

(i i) グラム陽性細菌に対して内因性の遺伝子および前記 1 つまたは複数の内因性遺伝子の 3' 末端に転写可能に結合された、グラム陽性細菌に対して外因性の 1 つまたは複数の遺伝子を連続して含む、ポリシストロン性発現ユニットを含む組換え核酸。

【 0 0 5 1 】

(i i i) 前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子が、対象における治療もしくは予防効果を有するタンパク質、ポリペプチドおよび / もしくはペプチド、または免疫もしくは免疫寛容を誘導する抗原、非ワクチン原性の治療活性のあるポリペプチド、抗体もしくは F a b などのその機能性断片、融合タンパク質もしくは多量体タンパク質をコードする、(i) に記載のグラム陽性細菌または (i i) に記載の組換え核酸。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 2 】

(i v) 1 つまたは複数の外因性遺伝子がタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドなどの産物をコードし、産物が対象における治療または予防効果を有する、薬剤として使用するための、好ましくは対象への前記産物の投与または送達に使用するための、(i)に記載のグラム陽性細菌または(i i)に記載の組換え核酸。

【 0 0 5 3 】

(v) 前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子がポリシストロン性発現ユニットの最 3 ' 遺伝子である、(i)、(i i i) もしくは(i v) に記載のグラム陽性細菌または(i i) ~ (i v) に記載の組換え核酸。

【 0 0 5 4 】

(v i) 前記内因性遺伝子および前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子が、グラム陽性細菌に対して内因性のプロモーターにより転写制御される、(i)、(i i i)、(i v) もしくは(v) のいずれかに記載のグラム陽性細菌または(i i) ~ (v) のいずれかに記載の組換え核酸。

【 0 0 5 5 】

(v i i) 前記プロモーターが必須遺伝子プロモーター、構成的プロモーター、中心代謝遺伝子プロモーターおよび/またはハウスキーピング遺伝子プロモーターである、(v i) に記載のグラム陽性細菌または組換え核酸。

【 0 0 5 6 】

(v i i i) 前記プロモーターがリボソーム遺伝子プロモーターである、(v i) に記載のグラム陽性細菌または組換え核酸。

【 0 0 5 7 】

(i x) 前記プロモーターが解糖遺伝子プロモーターである、(v i) に記載のグラム陽性細菌または組換え核酸。

【 0 0 5 8 】

(x) 前記プロモーターが前記グラム陽性細菌の *eno*、*usp45*、*gap*、*pyk*、*rpmB* および *rplS* のプロモーターからなる群から選択される、(v i) に記載のグラム陽性細菌または組換え核酸。

【 0 0 5 9 】

(x i) 内因性遺伝子がグラム陽性細菌におけるその天然の染色体遺伝子座に局在する、(i) または(i i) ~ (x) のいずれか 1 つに記載のグラム陽性細菌。

【 0 0 6 0 】

(x i i) 1 つまたは複数の外因性遺伝子を前記遺伝子座に染色体上で組み込むことによって、好ましくは内因性遺伝子の 3 ' の 1 つまたは複数の外因性遺伝子を前記遺伝子座に染色体上で組み込むことによって、内因性遺伝子が 1 つまたは複数の外因性遺伝子に転写可能に結合されている、(x i) に記載のグラム陽性細菌。

【 0 0 6 1 】

(x i i i) 内因性遺伝子および 1 つまたは複数の外因性遺伝子がグラム陽性細菌において活性な遺伝子間領域または複数領域によって転写可能に結合されており、遺伝子間領域または複数領域が前記グラム陽性細菌に対して内因性である、(i) もしくは(i i i) ~ (x i i) のいずれか 1 つに記載のグラム陽性細菌または(i i) ~ (x) のいずれかに記載の組換え核酸。

【 0 0 6 2 】

(x i v) 前記遺伝子間領域が *rplW*、*rplP*、*rpmD*、*rplB*、*rpsG*、*rpsE*、*rplN*、*rplM*、*rplE* および *rplF* に先行する遺伝子間領域からなる群から選択される、(x i i i) に記載のグラム陽性細菌または組換え核酸。

【 0 0 6 3 】

(x v) 前記グラム陽性細菌に対して外因性の遺伝子に作動可能に連結したグラム陽性細菌において活性な遺伝子間領域を含み、遺伝子間領域がグラム陽性細菌の内因性遺伝子間領域である、組換え核酸。

10

20

30

40

50

【0064】

(xvi) 前記遺伝子間領域が rplW、rplP、rpmD、rplB、rpsG、rpsE、rplN、rplM、rplE および rplF に先行する遺伝子間領域からなる群から選択される、(xiv) に記載の組換え核酸。

【0065】

(xvii) 1つの外因性遺伝子が抗体またはその機能性断片の軽鎖 (V_L) をコードし、他の外因性遺伝子が抗体またはその機能性断片の重鎖 (V_H) をコードし、より好ましくは、機能性断片が Fab である、(i) もしくは (iii) ~ (xiv) のいずれかが 1つに記載のグラム陽性細菌または (ii) ~ (x) もしくは (xiii) ~ (xvi) のいずれかが 1つに記載の組換え核酸。

10

【0066】

(xviii) V_L またはその機能性断片をコードする外因性遺伝子が V_H またはその機能性断片をコードする外因性遺伝子の 3' 末端に転写可能に結合されている、(xvii) に記載のグラム陽性細菌または組換え核酸。

【0067】

(xi) グラム陽性細菌が乳酸菌、好ましくはラクトコッカス属 (*Lactococcus*)、ラクトバシラス属 (*Lactobacillus*) もしくはエンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、より好ましくはラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) またはエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) であり、またはグラム陽性細菌がビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) である、(i)、(iii) ~ (xiv)、(xvii) もしくは (xviii) のいずれかが 1つに記載のグラム陽性細菌または (ii) ~ (x) もしくは (xiii) ~ (xviii) のいずれかが 1つに記載の組換え核酸。

20

【0068】

(xx) (i)、(iii) ~ (xiv) または (xvii) ~ (xi) のいずれかが 1つに記載のグラム陽性細菌を含む医薬組成物。

【0069】

(xix) 前記 1つまたは複数の外因性遺伝子がタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドなどの産物をコードし、産物が対象における治療または予防効果を有する、(xx) に記載の医薬組成物。

【0070】

(xxi) (ii) ~ (x) または (xiii) ~ (xi) のいずれかが 1つに記載の組換え核酸を含むベクター。

30

【0071】

本発明の上述およびさらなる態様ならびに好ましい実施形態は、以下の項および添付の特許請求の範囲に記載する。添付の特許請求の範囲の主題は、本明細書に具体的に組み込まれている。

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1】ラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (*Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris*) 株 MG1363 対数末期 (end-log) 培養の細胞タンパク質のクーマシーブルー染色を示す図である。顕著なタンパク質バンドを 1 ~ 12 と示す。

40

【図2】対照標準モノシストロン性発現構築物 (上、sAGX0090) および遺伝子 X が内因性遺伝子を表す、本発明の実施形態によるポリシストロン性 (バイシストロン性、デュアルシストロン性) 構築物 (下) の表示を示す図である。両発現構築物は、ここでは具体例としての外因性遺伝子としての機能を果たす、大腸菌 (*E. coli*) uidA 遺伝子からの - グルクロニダーゼの発現を目的とする。

【図3】図2におけるように配置された、対照標準宿主 (モノシストロン性: Ph11A >> uidA, sAGX0090) および本発明の実施形態によるポリシストロン性 (バイシストロン性) 構築物を含む宿主 (内因性遺伝子 X >> rpmD >> uidA) における相対的 - グルクロニダーゼ (GUS) 活性を示すグラフである。内因性遺伝子 X は、

50

この例において、*usp45*、*enoA*、*rplS*、*rpmB*、*pyk*および*gapB*である。この例において、*rpmD*遺伝子間領域は、内因性および外因性遺伝子の転写可能な結合をもたらす。外因性大腸菌 (*E. coli*) *uidA* 遺伝子は、 β -グルクロニダーゼをコードする。すべての発現構築物は、細菌染色体に埋め込まれている。モノシストロン性構築物は、*thyA* 遺伝子座に存在し、バイシストロン性構築物は、遺伝子Xの自然位置に埋め込まれている。データは、すべてのバイシストロン性構築物がモノシストロン性 *Phl1A* >> *uidA* 構築物よりも高い β -ガラクトシダーゼ活性を有することを示している。

【図4】対照標準宿主 (*sAGX0122*) および本発明の実施形態による宿主 (*sAGX0121* および *sAGX0164*) におけるラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) により分泌されたヒトプロインスリン (*ins*) の定量を示す図である。(A) *ins* 発現モジュールの概要図である。菌株 *sAGX0122* は、*thyA* プロモーターがラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) MG1363 染色体における *thyA* 遺伝子座に埋め込まれている分泌リーダー-ヒトプロインスリン融合体 (*SS::ins*) の発現を促進するモノシストロン性発現構築物を運搬する。*sAGX0121* および *sAGX0164* におけるバイシストロン性発現構築物は、*rpmD* 遺伝子間領域を介するそれぞれ内因性 *usp45* および *enoA* と *SS::ins* との転写共役からなる。これらの構築物は、それぞれラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) MG1363 染色体上の *usp45* および *enoA* 遺伝子の自然位置に位置する。(B) 各種の菌株の上清中で検出されたプロインスリンのレベルを示す図である。これらの菌株の上清中のヒトプロインスリンレベルをそれぞれ示すカラムの下に菌株コード (*sAGX0122*、*sAGX0121* および *sAGX0164*) を示す。データは、両バイシストロン性構築物を運搬する菌株がモノシストロン性 *PhyA* >> *ins* 構築物を運搬する菌株より高いヒトプロインスリンレベルを有することを示している。

【図5】ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) における *cA2* 抗TNF Fab の発現を示すグラフである。*VLCL* (L) および *VHCH1* (H) 断片をコードする遺伝子を *rpmD*、*rplB*、*rpsG*、*rpsE* および *rplN* 遺伝子間領域を介して転写可能に結合させた。L または H がバイシストロン性構築物の第1の遺伝子として配置されている構築物を作製した。すべての抗TNF発現構築物は、プラスミド媒介性であり、*PhyA* プロモーターの制御下においた。抗TNF活性は、各種菌株の上清中で測定した。データは、H がバイシストロン性構築物の第1の遺伝子であるすべての構築物においてより高い抗TNF活性があることを示している。

【図6】ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) における *CDP870* 抗TNF Fab の発現を示す図である。(A) 配列 (*SS::CDP870 VLCL* および *SS::CDP870 VHCH1*) をコードする *usp45* 分泌リーダーとの *CDP870* 軽および重鎖融合体を、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) MG1363 染色体における *usp45* から下流に第2および第3のシストロンとして挿入した (*sAGX0219*、*sAGX0220*)。 *sAGX0219* および *sAGX0220* において、*rpmD* を用いて *SS::CDP870* 遺伝子を *usp45* に結合させた。遺伝的不安定性を避けるために、軽および重鎖遺伝子を *rplN* に先行する遺伝子間領域を介して結合させた。 *sAGX0219* では、軽鎖遺伝子が重鎖遺伝子に先行するのに対して、 *sAGX0220* では、重鎖遺伝子が軽鎖遺伝子に先行する。(B) 粗培養上清中の抗ヒトTNF活性の定量を示すグラフである。重鎖および軽鎖の両方がデュアルシストロン構築物により高度に発現し、これが、高レベルの機能性 *CDP870* 抗TNF Fab につながった。 *CDP870* 抗TNF発現は、重鎖が軽鎖の前に配置されている場合に実質的に増加した。

【図7】対照標準宿主 (*sAGX0085*) および本発明の実施形態による宿主 (*sAGX0276*) におけるラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) によるヒトトレフォイル因子1 (*hTFF1*) の分泌の定量を示す図である。(A) *hTFF1* 発現モジュールの概要図である。菌株 *sAGX0085* は、*Phl1A* プロモーターがラクトコ

10

20

30

40

50

ツカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) M G 1 3 6 3 染色体における *t h y A* 遺伝子座に埋め込まれている分泌リーダー - *h T F F 1* 融合体 (*S S* : : *h T F F 1*) の発現を促進するモノシストロン性発現構築物を運搬する。 *s A G X 0 2 7 6* におけるバイシストロン性発現構築物は、 *r p m D* 遺伝子間領域を介する *g a p B* と *S S* : : *h T F F 1* との転写可能な結合からなる。この構築物は、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) M G 1 3 6 3 染色体上の *g a p B* 遺伝子の自然位置に位置する。(B) 各種菌株の上清中で検出された *h T F F 1* のレベルを示すグラフである。これらの菌株の上清中のヒト *h T F F 1* のレベルをそれぞれ示すカラムの下に菌株コード (*s A G X 0 0 8 5* および *s A G X 0 2 7 6*) を示す。データは、バイシストロン性構築物を運搬する *s A G X 0 2 7 6* がモノシストロン性構築物を保持する *s A G X 0 0 8 5* よりも高い *h T F F 1* レベル

10

【図 8】エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) 株 L M G 1 5 7 0 9 対数末期培養の細胞タンパク質のクーマシーブルー染色を示す図である。顕著なタンパク質バンドを 1 ~ 12 と示す。

【図 9】遺伝子 X が内因性遺伝子を表す、本発明の実施形態によるポリシストロン性 (バイシストロン性、デュアルシストロン性) 構築物の表示を示す図である。発現構築物は、ここでは具体例としての外因性遺伝子としての機能を果たす、大腸菌 (*E. coli*) *u i d A* 遺伝子からの - グルクロニダーゼの発現を目的とする。 *g a p* および *e n o* は、代表的な「第 1」の内因性遺伝子である。

【図 10】図 9 におけるように配置された、対照標準宿主 (モノシストロン性 : *P h 1 1 A* > > *u i d A*、 *s A G X 0 0 9 0*) および本発明の実施形態によるポリシストロン性 (バイシストロン性) 構築物を含む宿主 (内因性遺伝子 X > > *r p m D* > > *u i d A*) における相対的 - グルクロニダーゼ (*G U S*) 活性を示すグラフである。内因性遺伝子 X は、この例において、 *g a p B* および *e n o* である。この例において、 *r p m D* 遺伝子間領域は、内因性および外因性遺伝子の転写可能な結合をもたらす。外因性大腸菌 (*E. coli*) *u i d A* 遺伝子は、 - グルクロニダーゼをコードする。すべての発現構築物は、細菌染色体に埋め込まれている。モノシストロン性構築物は、 *t h y A* 遺伝子座に存在し、バイシストロン性構築物は、遺伝子 X の自然位置に埋め込まれている。データは、すべてのバイシストロン性構築物がモノシストロン性 *P h 1 1 A* > > *u i d A* 構築物よりも高い - ガラクトシダーゼ活性を有することを示している。

20

30

【図 11】対照標準宿主 (*s A G X 0 2 7 0*) および本発明の実施形態による宿主 (*s A G X 0 2 7 9*) におけるエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) により分泌されたヒトインターロイキン 10 (*h I L - 1 0*) の定量を示す図である。(A) *h I L - 1 0* 発現モジュールの概要図である。 *s A G X 0 2 7 9* におけるバイシストロン性発現構築物は、 *r p m D* 遺伝子間領域を介する内因性 *g a p* と *S S* : : *h I L 1 0* との転写可能な結合からなる。(B) 各種の菌株の上清中で検出された *h I L 1 0* のレベルを示すグラフである。

【図 12】対照標準宿主 (*s A G X 0 2 7 0*) および本発明の実施形態による宿主 (*s A G X 0 3 1 7*) におけるエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) により分泌されたヒトインターロイキン 27 (*h I L - 2 7*) の定量を示す図である。(A) *h I L - 2 7* 発現モジュールの概要図である。 *s A G X 0 3 1 7* におけるバイシストロン性発現構築物は、 *r p m D* 遺伝子間領域を介する内因性 *g a p* と *S S* : : *h I L 2 7* との転写可能な結合からなる。(B) 各種の菌株の上清中で検出された *h I L - 2 7* のレベルを示すグラフである。

40

【図 13】エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) における C D P 8 7 0 抗 T N F F a b 発現を示す図である。(A) 配列 (*S S* : : C D P 8 7 0 V H C H 1 および *S S* : : C D P 8 7 0 V L C L) をコードする *u p s 4 5* 分泌リーダーとの C D P 8 7 0 軽および重鎖融合体を *g a p* から下流に第 2 および第 3 のシストロンとして挿入した (*s A G X 0 2 7 8*)。遺伝的不安定性を避けるために、軽および重鎖遺伝子をラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) (L L) からの *r p m D* に先行する遺

50

伝子間領域を介して結合させたのに対して、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) (E F) からの *rpmD* を用いて *gap* および重鎖遺伝子を結合させた。(B) 粗培養上清中の抗ヒト TNF 活性の定量を示すグラフである。重鎖および軽鎖の両方がデュアルシストロン構築物により高度に発現し、これが、高レベルの機能性 CDP870 抗 TNF Fab につながった。

【図14-1】A20^{IEC-KO} マウスにおける hTNF 誘発性毒性および炎症性サイトカイン産生に対する抗 hTNF 産生 L. ラクティス (*L. lactis*) 細菌 (sAGX0220) の効果を示す図である。(a) 2 μg (左パネル) および 6 μg (右パネル) の組換え hTNF の注射の 1 時間前に A20^{IEC-KO} マウス (群当たり n = 5) に溶媒、sAGX0220 または MG1363 で前処置し、体温を時間的に追跡した。A20^{IEC-KO} マウスの 1 群に 6 μg の hTNF の注射の前にレミケード (Remicade) を注射した。(b) 2 μg の hTNF の注射の 5 時間後の回腸、近位結腸および血清中の MCP-1 レベルを示すグラフである。(c) 2 μg の hTNF の注射の 5 時間後の回腸ホモジネート中の KC および IL-6 レベルを示すグラフである。(d) 6 μg の hTNF の注射の 5 時間後の回腸、近位結腸および血清中の MCP-1 レベルを示すグラフである。(e) 6 μg の hTNF の注射の 5 時間後の回腸ホモジネート中の KC および IL-6 レベルを示すグラフである。エラーバーは、SEM を表す。*、p < 0.05

10

【図14-2】(図14-1の続き)

【図15-1】本発明の実施形態による菌株における CDP870 の産生を示す図である。(A) *usp45* 遺伝子座、*enoA* 遺伝子座または *gapB* 遺伝子座に組み込まれた CDP870 重鎖および軽鎖を示す図である。(B) 本発明の実施形態による各種菌株における CDP870 発現を示すウエスタンブロット分析を示す図である。(C) および (D) 本発明の実施形態による各種菌株における CDP870 発現を示す ELISA 分析を示す図である。(E) 本発明の実施形態による各種菌株の TNF 中和活性を示すグラフである。

20

【図15-2】(図15-1の続き)

【図15-3】(図15-2の続き)

【図16】野生型 L. ラクティス (*L. lactis*) 株で処置したマウスおよびシムジア (*Cimzia*) で処置したマウスと比較した本発明の実施形態による菌株 (抗 hTNF 分泌 L. ラクティス (*L. lactis*) 株 sAGX0309) での処置後の誘発性 TNBS 大腸炎を有する Tg1278 マウスの生存率を示すグラフである。

30

【図17】野生型 L. ラクティス (*L. lactis*) 株で処置したマウスおよびシムジアで処置したマウスと比較した本発明の実施形態による菌株 (抗 hTNF 分泌 L. ラクティス (*L. lactis*) 株 sAGX0309) での処置後の誘発性 TNBS 大腸炎を有する Tg1278 マウスの体重の漸進的变化を示すグラフである。上パネル：絶対体重 (g)；下パネル：開始体重と相対的な体重 (%)

【図18】野生型 L. ラクティス (*L. lactis*) 株で処置したマウスおよびシムジアで処置したマウスと比較した本発明の実施形態による菌株 (抗 hTNF 分泌 L. ラクティス (*L. lactis*) 株 sAGX0309) での処置後の誘発性 TNBS 大腸炎を有する Tg1278 マウスの結腸組織の組織学的スコアを示すグラフである。平均値をバーの上に示す。生存率を群ごとに示す。

40

【図19-1】健常なマウス、野生型 L. ラクティス (*L. lactis*) 株で処置したマウスおよびシムジアで処置したマウスと比較した本発明の実施形態による菌株 (抗 hTNF 分泌 L. ラクティス (*L. lactis*) 株 sAGX0309) での処置後の誘発性 TNBS 大腸炎を有する Tg1278 マウスにおける炎症誘発性サイトカイン分泌を示すグラフである。(A)、(B) および (C) にそれぞれ遠位結腸における pg/mg 単位の mIL6、mKC および mMCP1 レベルを示す。

【図19-2】(図19-1の続き)

【発明を実施するための形態】

【0073】

50

本明細書で用いているように、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈上他の状態が明確に指示されない限り、単数形および複数形の両方の指示対象を含む。

【0074】

本明細書で用いている「含むこと (comprising)」、「含む (comprises)」および「を含む (comprised of)」という用語は、「包含すること (including)」、「包含する (includes)」または「含有すること (containing)」、「含有する (contains)」と同義であり、包含的または非制限的であり、追加の非列挙メンバー、エレメントまたは方法ステップを除外しない。「含むこと (comprising)」、「含む (comprises)」および「を含む (comprised of)」という用語が、本明細書で用いているように「からなっている (consisting of)」、「なる (consists)」および「からなる (consists of)」という用語ならびに「から本質的になっている (consisting essentially of)」、「本質的になる (consists essentially)」および「から本質的になる (consists essentially of)」という用語を含むことが十分理解される。

10

【0075】

端点による数値範囲の詳述は、各範囲内に含まれるすべての数および分数ならびに詳述された端点を含む。

【0076】

「約」または「おおよそ」という用語は、本明細書で用いているように例えば、パラメーター、量、持続時間などの測定可能な値に適用する場合、そのような変動が開示した本発明において機能するのが適切である限りにおいて、指定された値の $+/-20\%$ 以下、好ましくは $+/-10\%$ 以下、より好ましくは $+/-5\%$ 以下、より好ましくは $+/-1\%$ 以下の変動を含むことを意味する。修飾語句「約」または「おおよそ」が適用される値は、それ自体も具体的に、また好ましくは開示されることを理解すべきである。

20

【0077】

メンバーの群の1つもしくは複数または少なくとも1つのメンバー（単数または複数）などの「1つもしくは複数」または「少なくとも1つ」という用語は、さらなる例示により、それ自体は明らかであるが、当用語は、前記メンバーのいずれか1つへの、または例えば、前記メンバーのいずれか 3、 4、 5、 6 もしくは 7 等およびすべての前記メンバーまでなどの前記メンバーのいずれか2つ以上への言及をとりわけ含む。

【0078】

30

本明細書で引用したすべての参考文献は、それらの全体として参照により本明細書に組み込まれる。特に、具体的に引用した本明細書におけるすべての参考文献の教示は、参照により組み込まれる。

【0079】

特に定義しない限り、技術および科学用語を含む、本発明を開示するのに用いたすべての用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般的に理解される意味を有する。さらなるガイダンスとして、本発明の教示をより十分に理解するために用語の定義を含める。

【0080】

以下の節において、本発明の種々の態様をより詳細に定義する。そのように定義した各態様は、相反するものが明確に示されない限り、他の1つまたは複数の態様と組み合わせることができる。特に、好ましいまたは有利であると示された特徴は、好ましいまたは有利であると示された他の1つまたは複数の特徴と組み合わせることができる。

40

【0081】

「1つの実施形態」または「実施形態」への本明細書を通しての言及は、当該実施形態に関連して記載された特定の特徴、構造または特性が、本発明の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書全体にわたる様々な箇所における「1つの実施形態において」または「実施形態において」という語句の出現は、同じ実施形態に必ずしもすべて言及するものでないが、そうであり得る。さらに、特定の特徴、構造または特性は、1つまたは複数の実施形態において、この開示から当業者に明らかなよう

50

に、適切な方法で組み合わせることができる。さらに、本明細書で述べたいくつかの実施形態は、他の実施形態に含まれた一部の特徴を含むが、他の特徴を含むものでないが、異なる実施形態の特徴の組合せは、当業者により理解されるように、本発明の範囲内にあり、異なる実施形態を構成することを意味する。例えば、添付の特許請求の範囲において、請求の範囲に記載されている実施形態の何らかの組合せで用いることができる。

【0082】

本発明の以下の詳細な説明において、その一部を構成し、本発明を実施することができる特定の実施形態の例示のみの目的で示す添付図面を参照する。本発明の範囲から逸脱することなく、他の実施形態を利用することができ、構造または論理の変更を行うことができることを理解すべきである。したがって、以下の詳細な説明は、限定的な意味で解釈すべきでなく、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲により定義されている。

10

【0083】

組換えDNA技術の一般的原理を説明する標準的参考資料は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、1～3巻、Sambrookら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N. Y.、1989年、Current Protocols in Molecular Biology、Ausubelら編、Greene Publishing and Wiley-Interscience、New York、1992年（定期的更新を含む）（「Ausubelら1992年」）、Innisら、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications、Academic Press: San Diego、1990年を含む。微生物学の一般的原理は、例えば、Davis、B. D.ら、Microbiology、第3版、Harper & Row、publishers、Philadelphia、Pa. (1980年)に説明されている。

20

【0084】

示したように、本発明の態様は、1つまたは複数の外因性遺伝子が転写可能または翻訳可能に結合された内因性遺伝子を含むグラム陽性細菌に関する。好ましくは、1つまたは複数の外因性遺伝子は、内因性遺伝子の下流（すなわち、3'末端に）に転写可能または翻訳可能に結合される。関連態様は、ポリシストロン性発現ユニットを含むグラム陽性細菌を提供し、前記ポリシストロン性発現ユニットが内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子を含む。好ましくは、ポリシストロン性発現ユニットは、1つまたは複数の内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含む。さらなる態様は、グラム陽性細菌に対して外因性の1つまたは複数の遺伝子が転写可能または翻訳可能に結合されたグラム陽性細菌に対して内因性の遺伝子を含むポリシストロン性発現ユニットを含む組換え核酸を提供する。好ましくは、1つまたは複数の外因性遺伝子は、内因性遺伝子の下流（すなわち、3'末端に）に転写可能または翻訳可能に結合される。

30

【0085】

好ましくは、1つまたは複数の外因性遺伝子（単数または複数）は、ポリシストロン性発現ユニットの最も3'の遺伝子である。すなわち、1つまたは複数の外因性遺伝子（単数または複数）は、ポリシストロン性発現ユニットの最後または最も下流の遺伝子（単数または複数）である。例えば、内因性遺伝子がモノシストロン性である場合、1つまたは複数の外因性遺伝子は、遺伝子のオープンリーディングフレームの後または下流（すなわち、3'末端に）に位置し、それと転写可能に結合される。同様に、内因性遺伝子が、オペロン（の一部）のように、それ自体ポリシストロン性である場合、1つまたは複数の外因性遺伝子は、内因性ポリシストロン性遺伝子の最後の（すなわち、最も下流または最も3'の）内因性遺伝子の後または下流に（すなわち、3'末端に）位置する。

40

【0086】

最も好ましくは、本明細書で説明を通して言及する内因性遺伝子は、モノシストロン性である。したがって、内因性遺伝子は、好ましくは内因性オペロンの一部を構成しない。

【0087】

好ましくは、本明細書で述べるポリシストロン性発現ユニットの発現は、次の特性の1つまたは複数のものであり得るまたは示し得るプロモーターによりもたらされる：構成的プロモーター、中心代謝遺伝子プロモーター、必須遺伝子プロモーター、強プロモーター、ハウスキーピング遺伝子プロモーター、リボソーム遺伝子プロモーター、解糖遺伝子プ

50

ロモーター。最も好ましくは、プロモーターは、構成的プロモーターである。

【 0 0 8 8 】

本明細書で用いているように、「グラム陽性細菌」という用語は、当技術分野で公知のその一般的意味を有する。さらなるガイダンスとして、グラム陽性細菌は、クリスタルバイオレット染色を保持するのでグラム染色により同定することができる。

【 0 0 8 9 】

好ましい実施形態において、本発明によるグラム陽性細菌は、意図した対象に投与した場合に害をもたらさない、または有害な効果をもたらさないという意味で非病原性である。

【 0 0 9 0 】

好ましくは、本発明によるグラム陽性細菌は、ラクトコッカス (*Lactococcus*)、ラクトバシラス (*Lactobacillus*)、ロイコノストック (*Leuconostoc*)、ペディオコッカス (*Pediococcus*)、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)、アエロコッカス (*Aerococcus*)、カルノバクテリウム (*Carnobacterium*)、エンテロコッカス (*Enterococcus*)、エノコッカス (*Oenococcus*)、スポロラクトバシラス (*Sporolactobacillus*)、テトラゲノコッカス (*Tetragenococcus*)、パゴコッカス (*Vagococcus*) およびウェイセラ (*Weissella*) 属を含むが、これらに限定されない乳酸菌 (LAB) である。より好ましくは、LAB は、例えば、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*)、ラクトコッカス・ガルビエ (*Lactococcus garvieae*)、ラクトコッカス・ピスシウム (*Lactococcus piscium*)、ラクトコッカス・プランタラム (*Lactococcus plantarum*) およびラクトコッカス・ラフィノラクティス (*Lactococcus raffinolactis*) ならびにそれらの亜種および菌株などであるが、これらに限定されないラクトコッカス種 (*Lactococcus species*) である。最も好ましくは、ラクトコッカス種 (*Lactococcus species*) は、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) ならびに例えば、制限なしにラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*)、ラクトコッカス・ラクティス亜種ホールドニエ (*Lactococcus lactis* ssp. *hordniae*)、ラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*)、ラクトコッカス・ラクティス亜種bv、ジアセチラクティス (*Lactococcus lactis* ssp. *bv. diacetylactis*) などのそのあらゆる亜種および菌株である。本発明のさらなる好ましい実施形態において、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) は、ラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*) またはラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*)、より好ましくはラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*) であり、例えば、ラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス SK 1 1 (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11)、ラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス MG 1 3 6 3 (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363) またはラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス IL 1 4 0 3 (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403) などのそのあらゆる菌株を含む。他の好ましい実施形態において、LAB は、エンテロコッカス種 (*Enterococcus* sp.)、好ましくはエンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) ならびに例えば、制限なしにエンテロコッカス・フェシウム株 LMG 1 5 7 0 9 (*Enterococcus faecium* strain LMG15709) などのそのあらゆる亜種および菌株である。

【 0 0 9 1 】

他の好ましい実施形態において、本発明によるグラム陽性細菌は、ビフィドバクテリウム属 (*Bifidobacterium*) である。

【 0 0 9 2 】

ビフィドバクテリウム属 (*Bifidobacterium*) は、グラム陽性、非運動性、しばしば分岐嫌気性細菌の属である。ビフィドバクテリアは、本明細書で用いているように、B. アドレセンチス (*B. adolescentis*)、B. アングラタム (*B. angulatum*)、B. アニマリ (*B. animalis*)、B. アステリオデス (*B. asteroides*)、B. ビフィダム (*B. bifidu*

10

20

30

40

50

m)、B.ボウム(B. boum)、B.ブレーベ(B. breve)、B.カテナラタム(B. catenulatum)、B.コエリナム(B. choerinum)、B.コリネホルメ(B. coryneforme)、B.クニクリ(B. cuniculi)、B.デンチコレンス(B. denticolens)、B.デンチウム(B. dentium)、B.ガリクム(B. gallicum)、B.ガリナルム(B. gallinarum)、B.インディクム(B. indicum)、B.インファンチス(B. infantis)、B.イノピナタム(B. inopinatum)、B.ラクティス(B. lactis)、B.ロンガム(B. longum)、B.マグナム(B. magnum)、B.メリシクム(B. merycicum)、B.ミニマム(B. minimum)、B.シュードカテナラタム(B. pseudocatenulatum)、B.シュードロンガム(B. pseudolongum)、B.プルルム(B. pullorum)、B.ルミナンチウム(B. ruminantium)、B.サエクラレ(B. saeculare)、B.サブチル(B. subtile)、B.スイス(B. suis)、B.テルマシドフィラム(B. thermacidophilum)、B.テルモフィラム(B. thermophilum)を含み得る。好ましくは、ビフィドバクテリウム属(Bifidobacterium)は、B.アドレセンチス(B. adolescentis)、B.ビフィダム(B. bifidum)、B.ブレーベ(B. breve)、B.インファンチス(B. infantis)、B.ロンガム(B. longum)である。ビフィドバクテリアのすべての亜種および株も含まれることを理解すべきである。

【0093】

本明細書で用いているように、内因性および外因性遺伝子との関連における「連続して」という用語は、ポリ核酸、ベクターまたは染色体における各遺伝子の5'から3'への順序を意味する。例えば、1つまたは複数の内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含むポリシストロン発現ユニットは、1つまたは複数の内因性遺伝子が1つまたは複数の外因性遺伝子の上流に位置するユニットに関する。したがって、1つまたは複数の外因性遺伝子は、1つまたは複数の内因性遺伝子の3'末端の後に位置する。本明細書で述べた連続的結合または順序付けは、内因性および外因性遺伝子の直接的な結合を必ずしも意味しない。付加的な配列が内因性および外因性遺伝子の間に存在し得る。例として、本明細書でさらに定義する遺伝子間領域が、連続的な内因性および外因性遺伝子の間(すなわち、内因性遺伝子の下流または3'と外因性遺伝子の上流または5'との)に存在し得る。本明細書で用いているように、「内因性遺伝子」、「内因性プロモーター」、「内因性遺伝子間領域」、「内因性リボソーム結合部位」という用語は、それぞれグラム陽性細菌にとって自然である遺伝子、プロモーター、遺伝子間領域もしくはリボソーム結合部位を意味し、またはグラム陽性細菌に天然で見いだすことができる。したがって、内因性遺伝子、プロモーター、遺伝子間領域またはリボソーム結合部位という用語は、グラム陽性細菌の異なる属、種、亜種または菌株間のオーソログス遺伝子、プロモーター、遺伝子間領域およびリボソーム結合部位を含む。特に、グラム陽性細菌の1つの属、種、亜種または菌株から単離された遺伝子、プロモーター、遺伝子間領域またはリボソーム結合部位は、天然におけるグラム陽性細菌の他の属、種、亜種または菌株もそのような遺伝子、プロモーター、遺伝子間領域またはリボソーム結合部位を含むならば、ポリ核酸配列の差異にかわりなく、グラム陽性細菌のすべての他の属、種、亜種または菌株に対して内因性であると言われる。したがって、そのような互いに異なるが、天然に見いだされる遺伝子、プロモーター、遺伝子間領域またはリボソーム結合部位配列は、内因性であるとみなされることになる。例として、また制限なしに、ラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス(Lactococcus lactis ssp. lactis)から単離されるエノラーゼをコードする遺伝子であるenoAは、ラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス(Lactococcus lactis ssp. cremoris)についても内因性であるとみなされる。

【0094】

しかし、好ましくは、本明細書で対象とするグラム陽性細菌の所定の属、種、亜種または菌株の「内因性」遺伝子、プロモーターまたは遺伝子間領域は、天然に見いだされる、すなわち、それぞれグラム陽性細菌の当該同じ属、種、亜種または菌株に固有または独特の遺伝子、プロモーターまたは遺伝子間領域を意味し得る。例として、また制限なしに、ラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス(Lactococcus lactis ssp. lactis)から単離されるエノラーゼをコードする遺伝子であるenoAは、好ましくはラクトコッカス・

ラクティス亜種ラクティス (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) に対して「内因性」である
とみなすことができるが、ラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (*Lactococcus*
lactis ssp. *cremoris*) に対してはそうではない。

【 0 0 9 5 】

本明細書で用いているように、「外因性遺伝子」という用語は、グラム陽性細菌に固有
でない、またはグラム陽性細菌に天然で見いだすことができない遺伝子を意味する。外因
性遺伝子という用語は、異種遺伝子という用語と同義である。外因性遺伝子は、全長遺伝
子であってもよい、または代わりになるべきものとして切断遺伝子もしくは遺伝子断片で
あってもよい。例として、外因性遺伝子は、ウイルス、グラム陰性細菌などの他の原核生
物に由来し得る、または代わりになるべきものとして、また好ましくは、植物、動物、好
ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトなどの真核生物に由来し得る。あるいは、外因性
遺伝子は、完全にまたは部分的に天然に存在しないという意味で、完全にまたは部分的に
合成物または人工物であり得る。さらに、外因性遺伝子は、異なる種に由来する配列また
は天然に存在する配列と合成もしくは人工配列との組合せから構成され得るという意味で
、キメラ型であり得る。また、グラム陽性細菌配列ならびに例えば、グラム陽性細菌分泌
シグナルペプチドおよび外因性タンパク質から構成された融合タンパク質をコードする配
列などのグラム陽性細菌の外因性配列から構成されたキメラ配列が含まれる。

10

【 0 0 9 6 】

真核生物遺伝子は、大部分はエクソンの傍らにイントロンを含むので、当業者は、本発
明によれば、外因性遺伝子への言及がそのような遺伝子のイントロンレスオープンリーデ
ィングフレーム、すなわち、そのような遺伝子のタンパク質コーディング配列に関するも
のであることを十分に理解する。「オープンリーディングフレーム」またはORFという
用語は、翻訳開始コドン（例えば、ATGまたはGTG）で始まり、翻訳終止コドン（例
えば、TAA、TAGまたはTGA）で終わり、単一ポリペプチドをコードするコーディ
ングヌクレオチドトリプレットの連続を意味する。

20

【 0 0 9 7 】

原核生物遺伝子、特にグラム陽性細菌からの遺伝子は、イントロンを含まない。したが
って、原核生物遺伝子のコーディング配列またはオープンリーディングフレームは、翻訳
開始コドンで始まり、原核生物ゲノム、特に細菌染色体上に位置する翻訳終止コドンで終
わるコーディングヌクレオチドトリプレットの連続に対応する。

30

【 0 0 9 8 】

したがって、一態様において、本発明は、1つまたは複数の外因性オープンリーディ
ングフレームまたはコーディング配列が転写可能または翻訳可能に結合された内因性オー
プンリーディングフレームまたはコーディング配列を含むグラム陽性細菌に関する。

【 0 0 9 9 】

当業者は、「遺伝子」という用語は、一般的に、プリブノーボックス、シャイン - ダル
ガルノ配列、オペレーター、ターミネーター、転写領域およびまたは他の機能性配列領域
などの転写および翻訳調節領域に関連する遺伝の単位に対応するゲノム配列の配置可能な
領域を意味し得るが、本明細書で述べる外因性配列との関連での「遺伝子」という用語へ
の言及は、それに反することが明確に示されない限り、好ましくは当遺伝子のコーディ
ング領域またはオープンリーディングフレームを意味することを理解する。本明細書で述べ
る内因性配列との関連での「遺伝子」という用語への言及は、調節領域、転写領域および
または他の機能性配列領域に関連する遺伝の単位に対応するゲノム配列の配置可能な領域
を意味し得るが、あるいは当遺伝子のコーディング領域またはオープンリーディングフレ
ームも意味し得る。

40

【 0 1 0 0 】

本明細書で用いているように、「翻訳可能に結合される (translationally coupled)」
という用語は、「翻訳可能に連結される」または「翻訳可能に接続される」と同義である
。これらの用語は、本質的にポリシストロン性発現系またはユニットに関連する。特に共
通のプロモーターなどの共通の調節エレメント（単数または複数）が、その後2つ以上

50

の個別のポリペプチド配列に翻訳され得る、2つ以上の遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列をコードする1つのmRNAとして前記2つ以上の遺伝子の転写をもたらす場合、2つ以上の遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列は、翻訳可能に結合されると言われる。当業者は、細菌オペロンが2つ以上の遺伝子が翻訳可能または転写可能に結合された天然に存在するポリシストロン性発現系またはユニットであることを十分に理解する。本発明によれば、転写可能な結合は、翻訳可能な結合の基礎となる。

【0101】

したがって、一態様において、本発明は、1つまたは複数の外因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列が転写可能に結合された内因性遺伝子を含むグラム陽性細菌に関する。好ましくは、グラム陽性細菌は、1つまたは複数の外因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列が転写可能に結合された内因性遺伝子を連続して含む。本明細書で用いているように、「転写可能に結合される(transcriptionally coupled)」という用語は、「転写可能に接続される」または「転写可能に連結される」と同義である。これらの用語は、1つのmRNAとして普通に転写され、2つ以上の個別のポリペプチドに翻訳され得る2つ以上のオープンリーディングフレームまたはコーディング配列を含むポリ核酸配列を一般的に意味する。

【0102】

他の態様において、本発明は、ポリシストロン性発現ユニットを含むグラム陽性細菌または組換え核酸に関し、前記ポリシストロン性発現ユニットが内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列を含む。

【0103】

本明細書で用いているように、「ポリシストロン性発現ユニット」または「ポリシストロン性発現系」という用語は、2つ以上の遺伝子の発現が、プロモーター、オペレーターなどの共通の調節メカニズムにより調節されるユニットを意味する。ポリシストロン性発現ユニットという用語は、本明細書で用いているように、マルチシストロン性発現ユニットと同義である。ポリシストロン性発現ユニットの例は、制限なしにバイシストロン性、トリシストロン性、テトラシストロン性発現ユニットである。タンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドなどの個別の発現産物をコードする例えば、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上などの2つ以上のオープンリーディングフレームまたはコーディング領域を含むあらゆるmRNAは、ポリシストロン性という用語に含まれる。

【0104】

一実施形態において、本明細書で述べる翻訳可能または転写可能に結合された1つまたは複数の内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子は、グラム陽性細菌に対して内因性であるプロモーターにより転写制御される。他の実施形態において、本明細書で述べるポリシストロン性発現ユニットまたは系は、グラム陽性細菌に対して内因性であるプロモーターにより転写制御される。

【0105】

「プロモーター」とは、一般的に、RNAポリメラーゼが結合し、転写を開始する、核酸分子上、好ましくはDNA分子上の領域を意味する。プロモーターは、好ましくは、それがその転写を制御する配列の上流、すなわち、5'に位置するが、必ずしもそうでない。

【0106】

さらなる実施形態において、本明細書で述べる翻訳可能または転写可能に結合された1つまたは複数の内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子は、前記1つまたは複数の内因性遺伝子(の1つ)の天然のプロモーターにより転写制御される。他の実施形態において、本明細書で述べるポリシストロン性発現ユニットまたは系は、前記ポリシストロン性発現系またはユニットに含まれる前記1つまたは複数の内因性遺伝子(の1つ)の天然のプロモーターにより転写制御される。他の実施形態において、本明細書で述べるポ

リシストロン性発現ユニットまたは系は、グラム陽性内因性プロモーターに作動可能に連結する。

【 0 1 0 7 】

本明細書で用いているように、「作動可能に連結した」または「作動可能な連結」という用語は、調節 DNA 配列と発現させようとする DNA 配列が、発現を可能にするような方法で連結されている、連結である。連結または接続が前記遺伝子の転写を可能にする、またはもたらすならば、例えば、プロモーターは、遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列に作動可能に連結されると言われる。さらなる例において、連結または接続が少なくとも 3' 遺伝子の翻訳を可能にする、またはもたらすならば、5' および 3' 遺伝子、シストロン、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列は、ポリシストロン性発現ユニットにおいて作動可能に連結されると言われる。

10

【 0 1 0 8 】

例えば、配列の間の連結の性質が (1) フレームシフト突然変異の導入をもたらすこと、(2) オープンリーディングフレームの転写を誘導するプロモーターの能力を妨げること、または (3) プロモーター領域配列により転写されるオープンリーディングフレームの能力を妨げることを行わないならば、例えば、好ましくはプロモーターおよびオープンリーディングフレームなどの DNA 配列は、作動可能に連結されると言われる。

【 0 1 0 9 】

具体例としての好ましい実施形態において、プロモーターは、それが作動可能に連結するオープンリーディングフレーム (単数または複数) の上流、すなわち、5' に配置することができる。

20

【 0 1 1 0 】

当業者は、プロモーターは、付加的な天然の調節配列または領域、例えば、オペレーターと結合させることができることを十分に理解する。発現のために必要な調節領域の正確な性質は、生物ごとに異なり得るが、原核生物において、プロモーター (RNA 転写の開始を誘導する) ならびに RNA に転写されたときに、タンパク質合成の開始をシグナルで伝達する DNA 配列の両方を含むプロモーター領域を一般的に含むべきである。そのような領域は、例えば、プリブノーボックス (T A T A ボックス参照)、シャイン - ダルガルノ配列などの、転写および翻訳の開始と関連性を有する 5' 非コーディング配列を通常含む。

30

【 0 1 1 1 】

さらなる実施形態において、プロモーターは、ポリシストロン性発現ユニットにおける最も 5'、すなわち、最も上流の内因性遺伝子の天然のプロモーターである。

【 0 1 1 2 】

本明細書で用いているように、プロモーターとの関連での (または内因性遺伝子の遺伝子発現に関連する延長による) 「構成的」という用語は、その関連遺伝子の連続的転写を可能にするプロモーターを意味する。特に、そのようなプロモーターの制御下での関連遺伝子または複数遺伝子の転写は、インデューサーまたは他の調節シグナルとは無関係に起こる。

【 0 1 1 3 】

40

本明細書で用いているように、「ハウスキーピング遺伝子」または「ハウスキーピングプロモーター」という用語は、基本的な細胞機能の維持のために必要な遺伝子または遺伝子のプロモーターを意味する。一部のハウスキーピング遺伝子は、比較的 に一定のレベルで発現するが、他のハウスキーピング遺伝子は、外的または実験条件によって変化し得る。ハウスキーピング遺伝子は、例えば、代謝、遺伝子発現 (基礎転写機構など)、シグナル伝達に関与し得るが、構造遺伝子でもあり得る。

【 0 1 1 4 】

本明細書で用いているように、「解糖遺伝子」または「解糖プロモーター」は、解糖経路に関与する遺伝子または遺伝子のプロモーターを意味し、解糖酵素、特に、ヘキソキナーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、フルクトースビスリン

50

酸アルドラーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、ホスホグリセリン酸ムターゼ、エノラーゼおよびピルビン酸キナーゼをコードする遺伝子のプロモーターを含む。

【 0 1 1 5 】

本明細書で用いているように、「リボソーム遺伝子」または「リボソームプロモーター」は、リボソームタンパク質をコードする遺伝子ならびにリボソームRNAに転写された遺伝子を含む、遺伝子またはリボソーム遺伝子のプロモーターを意味する。好ましくは、それは、リボソームタンパク質の遺伝子またはプロモーターを意味し得る。

【 0 1 1 6 】

本明細書で用いているように、「中心代謝遺伝子」もしくは「中心代謝プロモーター」または代わりになるべきものとして「基礎代謝遺伝子」もしくは「基礎代謝プロモーター」は、重要な代謝経路に関与する遺伝子または遺伝子のプロモーターを意味し、解糖、ペントースリン酸経路およびトリカルボン酸 (T C A) 回路に関与する遺伝子を含む。

【 0 1 1 7 】

本明細書で用いているように、遺伝子との関連での (またはそのような遺伝子のプロモーターに関連する延長による) 「必須」という用語は、宿主に対して例えば、特に致死性など、有害である、あるいは、例えば、特に増殖または成長などの正常な生理または機能を変化させる、抑制するまたは妨げるその天然の発現産物が存在しない遺伝子に関連する。本明細書で用いているように、遺伝子または遺伝子のプロモーターとの関連での「必須」という用語は、条件付きで必須と対立するものとして、構成的に必須に関する。例えば、いくつかのグラム陽性細菌、特にラクトコッカス属種 (*Lactococcus* sp.) などの乳酸菌におけるベータガラクトシダーゼ遺伝子などのラクトースオペロンの遺伝子は、細菌が主なまたは唯一の炭素源としてのラクトースを含む培地中で培養される場合には必須であり得る。細菌が代替炭素源を含む培地中で培養される場合、これらの遺伝子は、必須ではない。したがって、これらの遺伝子は、条件付きで必須であるにすぎないが、本明細書で意図するように構成的に必須ではない。

【 0 1 1 8 】

好ましい実施形態において、本明細書で述べる内因性プロモーターおよび / または内因性遺伝子は、以下のラクトコッカス属 (*Lactococcus*) プロモーターおよび / または遺伝子、より詳細にはラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス株 M G 1 3 6 3 (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* strain MG1363) プロモーターおよび / または遺伝子に対応するグラム陽性細菌プロモーターおよび / または遺伝子を含むまたはそれからなる群から選択される： 1) DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ、ベータ' サブユニット / 1 6 0 k D サブユニット (r p o C) 、 2) DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ、ベータサブユニット / 1 4 0 k D サブユニット (r p b 2 または r p o B) 、 3) DNA 結合フェリチン様タンパク質 (酸化損傷プロテクタント) (d p s) 、 4) ピルビン酸キナーゼ (p y k) 、 5) グルタミル - およびグルタミニル - t RNA シンターゼ (g l n S または g l t X) 、 6) エノラーゼ (e n o) 、 7) グルタミンシンターゼ (g l n A) 、 8) H T H 型転写レギュレーター (g l n R) 、 9) X a a - H i s ジペプチダーゼ (a r g E または p e p V) 、 1 0) F 0 F 1 型 A T P シンターゼベータサブユニット (A T P シンターゼ F 1 ベータサブユニット) (a t p D) 、 1 1) 3 - ホスホグリセリン酸キナーゼ (p g k) 、 1 2) グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ / エリスロース - 4 - リン酸デヒドロゲナーゼ (g a p A または g a p B) 、 1 3) 酢酸キナーゼ (a c k A) 、 1 4) 3 - オキソアシル - (アシル - 担体タンパク質) シンターゼ (f a b B または f a b F) 、 1 5) 3 - オキソアシル - (アシル - 担体タンパク質) レダクターゼ (f a b G) 、 1 6) DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ、アルファサブユニット / 4 0 k D サブユニット (r p o A) 、 1 7) X a a - P r o アミノペプチダーゼ (p e p P) 、 1 8) フルクトース / タガトースビスリン酸アルドラーゼ (t b p または f b a A) 、 1 9) リボソームタンパク質 S 4 (r p s D) 、 2 0) スーパーオキシドジスムターゼ (s o d A) 、 2 1) リボソームタンパク質 S 1 2 (r p s L) およびリボソームタンパク質 S 7 (r p

10

20

30

40

50

s G)、22)リボソームタンパク質L18(rplR)およびリボソームタンパク質S5(rpsE)およびリボソームタンパク質L30/L7E(rpmD)、23)S-リボシルホモシステインリアーゼ(luxS)、24)リボソームタンパク質L19(rplS)、25)リボソームタンパク質S11(rpsK)、26)リボソームタンパク質L10(rplJ)、27)リボソームタンパク質L7/L12(rplL)、28)細菌核様体DNA結合タンパク質/DNA結合タンパク質HU(hupまたはhlhA)、29)50Sリボソームタンパク質L28(rpmB)、30)ホスホトランスフェラーゼ系セロピオース特異的成分IIB(laceまたはptcB)、31)F0F1型ATPシンターゼアルファサブユニット(ataA)、32)ABC型糖輸送系(ATPアーゼ成分)(malKまたはmsmK)、33)アセトインデヒドロゲナーゼ複合体E1成分アルファサブユニット(acoAまたはpdhA)、34)細胞分裂タンパク質(diflVAまたはftsA)、35)UDP-ガラクトピラノースムターゼ(glf)、36)グルタミルアミノペプチダーゼ(fruxまたはpepA)、37)予測デヒドロゲナーゼ関連タンパク質(mviMまたはllmg__0272)、38)リボソームタンパク質S2(rpsB)、39)翻訳開始因子3(IF-3)(infC)、40)リボソームタンパク質L4(rplD)およびリボソームタンパク質L23(rplW)およびリボソームタンパク質L2(rplB)、41)EMAPドメイン(ydjD)、42)転写伸長因子(greA)、43)ATP依存性Clpプロテアーゼ(clpP)のプロテアーゼサブユニット、44)リボソームタンパク質L15(rplO)、45)リボソームタンパク質L11(rplK)、46)リボソームタンパク質S8(rpsH)、47)リボソームタンパク質L21(rplU)、48)リボソームタンパク質S13(rpsM)、49)リボソームタンパク質S19(rpsS)およびリボソームタンパク質L22(rplUまたはrplV)およびリボソームタンパク質L16(rplP)およびリボソームタンパク質L14(rplN)、50)リボソームタンパク質S10(rpsJ)、51)コシャペロニンGroES(Hsp10)(cpn10)、52)リボソームタンパク質L24(rplX)、53)仮想タンパク質LACR__0137(duf965)ならびに54)分泌45kDaタンパク質(usp45)。好ましくは、内因性プロモーターおよび/または内因性遺伝子は、enoA、usp45、gapB、pyk、rpmBおよびrplSを含む、またはそれからなる群から選択される。これらのプロモーターおよびそれらの配列は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2008/08411号、例えば、その表1および図1A~Hに開示されている。一実施形態において、本発明は、内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子が、グラム陽性細菌に対して内因性のプロモーターにより、好ましくは前記グラム陽性細菌のeno、usp45、gap、pyk、rpmBおよびrplSのプロモーターからなる群から選択される内因性プロモーターにより転写制御される、本明細書で述べたグラム陽性細菌または組換え核酸に関する。さらなる実施形態において、内因性遺伝子は、グラム陽性細菌におけるその天然の染色体遺伝子座に位置する。

【0119】

好ましい実施形態において、前記1つまたは複数の外因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列は、前記1つまたは複数の内因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列の3'末端に翻訳可能または転写可能に結合される。したがって、一実施形態において、本発明は、ポリシストロン性発現ユニットを含むグラム陽性細菌を提供し、前記ポリシストロン性発現ユニットは、1つまたは複数の5'内因性遺伝子および1つまたは複数の3'外因性遺伝子を含む。好ましくは、ポリシストロン性発現ユニットの最も5'遺伝子は、内因性遺伝子である。例として、また制限なしに、ポリシストロン性発現ユニットは、5'末端から3'末端までの内因性遺伝子とそれに続く1つまたは複数の内因性遺伝子とそれに続く1つまたは複数の外因性遺伝子を含みまたはそれから本質的になり得る。あるいは、また制限なしに、ポリシストロン性発現ユニットは、5'末端から3'末端までの内因性遺伝子とそれに続く1つまたは複数の外因性遺伝子を含みまたはそれから本質的になり得る。あるいは、ポリシストロン性発現

10

20

30

40

50

ユニットは、5'末端から3'末端までの内因性遺伝子とそれに続く1つまたは複数の外因性遺伝子とそれに続く1つまたは複数の内因性遺伝子を含みまたはそれから本質的になり得る。

【0120】

本明細書で述べた、翻訳可能に結合されたかまたは転写可能に結合された1つもしくは複数の内因性遺伝子および1つもしくは複数の外因性遺伝子、またはポリシストロン性発現ユニットもしくは系は、本明細書で述べた本発明によるグラム陽性細菌における内因性および外因性遺伝子の維持および/または増殖および発現を可能にするレプリコンに含まれ得る。

【0121】

一実施形態において、本明細書における他所で述べた(内因性)プロモーターを場合によって含む、翻訳可能に結合されたかまたは転写可能に結合された1つもしくは複数の内因性遺伝子および1つもしくは複数の外因性遺伝子、または本明細書で述べた、ポリシストロン性発現ユニットもしくは系は、ベクター、好ましくはグラム陽性細菌における発現を可能にする発現ベクターに含まれ得る。したがって、本発明はまた、本明細書で述べた組換え核酸を含むベクターに関する。

【0122】

本明細書で用いているように、「ベクター」は、核酸断片を挿入し、クローニング、すなわち、増殖させることができる、核酸分子、一般的にDNAを意味する。したがって、ベクターは、一般的に1つまたは複数の独特な制限部位を含み、クローニングされた配列が再現可能なように定義された宿主またはビヒクル生物において自己複製の能力があり得る。ベクターは、必要に応じて、プラスミド、ファージミド、バクテリオファージ、バクテリオファージ由来のベクター、PAC、BAC、直鎖核酸、例えば、直鎖DNA等を制限なしに含み得る(例えば、Sambrookら、1989年、Ausubel、1992年参照)。

【0123】

特定のベクター、例えば、プラスミドを選択するうえで重要な因子は、とりわけ、ベクターを含む受容細胞が認識され、ベクターを含まない受容細胞から選択され得る容易さ、特定の宿主における望ましいベクターのコピー数、ベクターを異なる種の宿主細胞間で「往復させる」ことができることが望ましいかどうかなどを含む。好ましい原核生物ベクターは、例えば、大腸菌(*E. coli*)において複製の能力のあるものなどのプラスミド(例えば、pBR322、ColE1、pSC101、pUC19等など)を含む。そのようなプラスミドは、Sambrookら、1989年、Ausubel、1992年に記載されている。特に好ましいベクターは、大腸菌(*E. coli*)(または他のグラム陰性細菌)ならびにグラム陽性細菌、乳酸菌、好ましくはラクトコッカス属(*Lactococcus*)、より好ましくはラクトコッカス・ラクティス(*Lactococcus lactis*)などの対象の他の宿主細胞において複製できるものであり得る(例えば、Kokら、Appl. Environ. Microbiol.、1984年、48巻(4号)、726~31頁)。他の好ましいベクターは、複製し、かつ/または1つもしくは複数のグラム陽性細菌の間を往復することができるものであり得るが、グラム陰性細菌にはない。好ましい実施形態において、ベクターは、参照により本明細書に特に組み込まれる、Steidlerら、Appl. Environ. Microbiol.、1995年、61巻(4号)、1627~1629頁に記載されているpT1NXである。

【0124】

他の実施形態において、本明細書で述べた、翻訳可能に結合されたかまたは転写可能に結合された1つもしくは複数の内因性遺伝子および1つもしくは複数の外因性遺伝子、またはポリシストロン性発現ユニットもしくは系は、グラム陽性細菌ゲノムまたは染色体に組み込まれる。組換えグラム陽性細菌およびランダムならびに相同的組換えを得る方法、ならびに組換えを達成するためのベクターは、当技術分野で周知である。さらなるガイダンスとして、そのような方法およびベクターは、例えば、参照により全体として組み込まれる、Steidlerら(2003年、Nature Biotechnology、21巻、785~789頁)、Lawら(1995年、J Bacteriol.、177巻(24号)、7011~7018頁)、Leenhoutsら(1998年、Methods in Ce

10

20

30

40

50

II Science、20巻、35～50頁)および国際公開第2004/046346号に開示されている。好ましくは、本明細書で述べたポリシストロン性発現ユニットは、相同的組換えによる細菌染色体における必須の配列の部位特異的組込みによって発生または導入する。

【0125】

一実施形態において、組換えベクターは、本明細書における他所で述べた内因性プロモーターおよび場合による付加的な調節配列ならびに本明細書で述べたポリシストロン性発現ユニットを含む。好ましくは、内因性プロモーターとポリシストロン性発現ユニットは、作動可能に連結されている。相同的組換えは、所定の遺伝子座において達成することができる。そのような系は、高度にモジュール式であり、プロモーター、調節配列、内因性遺伝子および外因性遺伝子の個別の選択および組合せならびに挿入部位の選択を可能にする。

10

【0126】

他の実施形態において、本発明によるグラム陽性細菌は、1つまたは複数の内因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列および1つまたは複数の外因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列を含むポリシストロン性発現ユニットが作動可能に連結している、その天然の遺伝子座における、すなわち、細菌染色体上のその天然のゲノムコンテキスト(native genomic context)における本明細書における他所で述べた内因性プロモーターを含む。作動可能な連結は、プロモーターを含む遺伝子座と相同的組換えを達成するように構成された配列が隣接した、ポリシストロン性発現ユニットを含む組換えベクターとの間の相同的組換えによって達成することができる。したがって、一実施形態において、本発明は、1つまたは複数の外因性遺伝子を前記遺伝子座に染色体上で組み込むことにより、好ましくは1つまたは複数の外因性遺伝子を前記遺伝子座における内因性遺伝子の3'に染色体上で組み込むことにより、内因性遺伝子が1つまたは複数の外因性遺伝子に転写可能に結合されている、本明細書で述べたグラム陽性細菌に関する。

20

【0127】

ベクターデザインは、内因性遺伝子および/または外因性遺伝子のオープンリーディングフレームまたはコーディング配列が単に対象とする染色体遺伝子座に組み込まれるように選択することができる。この場合、転写および/または翻訳をもたらすプロモーターそれ自体の傍らの調節配列、例えば、オペレーター、転写開始部位、シャイン-ダルフアルノ配列、ターミネーター配列等は、プロモーターの天然のゲノム遺伝子座によって備えられている。あるいは、そのような配列は、ポリシストロン性発現ユニットを含む組換えベクター上に備えることができる。後者の場合、必要に応じて、内因性プロモーターと結合した天然の調節配列を相同的組換え時に除去することができる。ここで述べる系は、内因性遺伝子、外因性遺伝子および場合による調節配列の個別の選択に関してモジュール式であるが、選択されるプロモーターの内因性遺伝子座における挿入部位をあらかじめ定める。

30

【0128】

さらなる実施形態において、本発明によるグラム陽性細菌は、1つまたは複数の内因性遺伝子および1つまたは複数の外因性遺伝子のポリシストロン性発現をもたらすような、1つまたは複数の外因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列が作動可能に連結している、その(それらの)天然の遺伝子座における、すなわち、細菌染色体上のその(それらの)天然のゲノムコンテキストにおける本明細書における他所で述べた内因性プロモーターならびに1つまたは複数の内因性遺伝子を含む。この系では、内因性プロモーターおよび1つまたは複数の内因性遺伝子、ならびに前記1つまたは複数の内因性遺伝子の転写および翻訳をもたらす調節配列がそれらの天然の遺伝子座に存在する。そのような系は、グラム陽性細菌の天然の特性を最大限保存している。

40

【0129】

ポリシストロン性発現ユニットは、少なくとも2つの遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列を含む。すべての遺伝子の翻訳を開始するために、これらの遺伝子のそれぞれは、一般的にリボソーム結合をもたらす配列、すなわち、リボソーム

50

結合部位と結合している。原核生物において、リボソーム結合部位は、一般的コンセンサス配列 5' - A G G A G G - 3' を有する表示シャイン - ダルガルノ (S D) 配列である。S D 配列は、翻訳開始コドンまたは出発コドンの平均で約 8 塩基対上流 (すなわち、その 5') に位置する。5' 遺伝子の停止コドンと 3' 遺伝子の出発コドンとの間の距離 (ヌクレオチドの量としての) によって、S D 配列は、一般的に 1) 距離が S D 配列の少なくともサイズである場合、両遺伝子の間の遺伝子間領域に、2) 5' 遺伝子と 3' 遺伝子の間がより小さい距離の場合、両遺伝子の間の遺伝子間領域であるが、5' 遺伝子の停止コドンと重複した領域に、または 3) 5' 遺伝子の停止コドンと 3' 遺伝子の出発コドンとの距離が非常に近い、または重複している場合、5' から 5' 遺伝子の停止コドンまでに配置することができる。

10

【0130】

一実施形態において、本発明は、1つまたは複数の外因性遺伝子の翻訳をもたらすように構成されたりボソーム結合部位を含む1つまたは複数のポリ核酸配列をさらに含む、本明細書で述べたグラム陽性細菌または組換え核酸に関する。他の実施形態において、本発明は、1つまたは複数の外因性遺伝子の翻訳をもたらすように構成された1つまたは複数のリボソーム結合部位をさらに含む、本明細書で述べたグラム陽性細菌または組換え核酸に関する。さらなる実施形態において、本発明は、前記1つまたは複数の内因性遺伝子および前記1つまたは複数の外因性遺伝子が、リボソーム結合部位により転写可能または翻訳可能に結合された、本明細書で述べたグラム陽性細菌または組換え核酸に関する。さらに他の実施形態において、本発明は、リボソーム結合部位を含むまたはそれから (本質的に) なるポリ核酸配列により5' 遺伝子が3' 遺伝子に結合している、本明細書で述べたポリシストロン性発現ユニットを含む、グラム陽性細菌または組換え核酸に関する。好ましい実施形態において、前記リボソーム結合部位は、グラム陽性細菌に対して内因性である。さらなる好ましい実施形態において、前記リボソーム結合部位は、遺伝子間領域、好ましくはオペロン遺伝子間領域に含まれる。

20

【0131】

他の実施形態において、本発明は、1つまたは複数の外因性遺伝子の翻訳をもたらすように構成された遺伝子間領域を含む1つまたは複数のポリ核酸配列をさらに含む、本明細書で述べたグラム陽性細菌または組換え核酸に関する。さらなる実施形態において、本発明は、1つまたは複数の外因性遺伝子の翻訳をもたらすように構成された1つまたは遺伝子間領域をさらに含む、本明細書で述べたグラム陽性細菌または組換え核酸に関する。さらなる実施形態において、本発明は、前記1つまたは複数の内因性遺伝子および前記1つまたは複数の外因性遺伝子が、遺伝子間領域により転写可能または翻訳可能に結合された、本明細書で述べたグラム陽性細菌または組換え核酸に関する。さらに他の実施形態において、本発明は、遺伝子間領域を含むまたはそれからなるポリ核酸配列により5' 遺伝子が3' 遺伝子に結合している、本明細書で述べたポリシストロン性発現ユニットを含む、グラム陽性細菌または組換え核酸に関する。好ましい実施形態において、前記遺伝子間領域は、グラム陽性細菌に対して内因性である。さらなる好ましい実施形態において、前記遺伝子間領域は、オペロン遺伝子間領域である。

30

【0132】

本明細書で用いているように、「遺伝子間領域」という用語は、「遺伝子間リンカー」または「遺伝子間スペーサー」と同義である。遺伝子間領域は、隣接する (すなわち、同じポリ核酸配列上に位置する) 遺伝子、オープンリーディングフレーム、シストロンまたはコーディング配列の間のポリ核酸配列と定義される。伸長により、遺伝子間領域は、前記遺伝子間領域によって連結されている5' 遺伝子の停止コドンおよび/または3' 遺伝子の出発コドンを含み得る。本明細書で定義されているように、遺伝子間領域という用語は、具体的にはポリシストロン性発現ユニットにおける隣接する遺伝子の間の遺伝子間領域に関する。例えば、本明細書で定義した遺伝子間領域は、オペロンにおける隣接する遺伝子の間に見いだすことができる。したがって、一実施形態において、本明細書で定義した遺伝子間領域は、オペロン遺伝子間領域である。

40

50

【0133】

一実施形態において、遺伝子間領域、リンカーまたはスペーサーは、グラム陽性細菌の *rplW*、*rplP*、*rpmD*、*rplB*、*rpsG*、*rpsE* または *rplN* に先行する、すなわちその 5' にある、より詳細には直接 5' にある遺伝子間領域を含むまたはそれからなる遺伝子間領域の群から選択される。一実施形態において、前記グラム陽性細菌は、乳酸菌、好ましくはラクトコッカス属 (*Lactococcus*) 種、より好ましくはラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) およびその亜種または菌株である。一実施形態において、前記遺伝子間領域は、*rplW*、*rplP*、*rpmD*、*rplB*、*rpsG*、*rpsE* もしくは *rplN* の出発コドンおよび / または先行する、すなわち、5' にある遺伝子の停止コドンを含む。好ましい実施形態において、本発明は、内因性遺伝子および 1 つまたは複数の外因性遺伝子がグラム陽性細菌において活性な 1 つまたは複数の遺伝子間領域により転写可能に結合され、好ましくは 1 つまたは複数の遺伝子間領域が前記グラム陽性細菌に対して内因性であり、より好ましくは内因性遺伝子間領域が *rplW*、*rplP*、*rpmD*、*rplB*、*rpsG*、*rpsE*、*rplN*、*rplM*、*rplE* および *rplF* に先行する遺伝子間領域からなる群から選択される、本明細書で述べたグラム陽性細菌または組換え核酸に関する。

10

【0134】

当業者は、遺伝子間領域が 5' 停止コドンおよび / または 3' 出発コドンを含む場合、正しい翻訳開始および / または終止に影響を及ぼし得る二重の出発および / または停止コドンを避けるために、これらのそれぞれのコドンが好ましくは、前記遺伝子間領域により連結される遺伝子に存在しないことを十分に理解する。遺伝子間領域を同定する方法は、当技術分野で公知である。さらなるガイダンスとして、遺伝子間領域は、例えば、十分なソフトウェアが当技術分野で公知であり、利用できるオペロン、ならびに関連プロモーターおよびオープンリーディングフレームの予測に基づいて同定することができる。

20

【0135】

さらなる実施形態において、前記遺伝子間領域配列は、以下の配列番号 1 ~ 7 のいずれかを含む、それから本質的になるまたはそれからなる群から選択される。

配列番号 1 T A A T G

配列番号 2 T A A T C C A T G

配列番号 3 T A A G G A G G A A A A A T G

30

配列番号 4 T A A T A G A G G A G G A A A A T C G T G

配列番号 5 T A A G A A G G G A G A T A A G T A A G A A T G

配列番号 6 T A A G G A A A G G G G T A A T T A A A C A T G

配列番号 7 T A A G C A A A A C T A G G A G G A A T A T A G C A T G。

【0136】

さらなる実施形態において、前記遺伝子間領域配列は、配列番号 1 または配列番号 2 と比べて 1 つのヌクレオチドの 1 つのミスマッチまたは欠失または挿入を示す配列、配列番号 3 または配列番号 4 と比べて 1 つ、2 つもしくは 3 つのミスマッチ、または 1 つ、2 つもしくは 3 つのヌクレオチドの欠失もしくは挿入を示す配列、および配列番号 5、配列番号 6 または配列番号 7 と比べて 1 つ、2 つ、3 つもしくは 4 つのミスマッチ、または 1 つ、2 つ、3 つもしくは 4 つのヌクレオチドの欠失もしくは挿入を示す配列を含む、それから本質的になるまたはそれからなる群から選択される。

40

【0137】

配列番号 1 ~ 7 はすべて、5' 停止コドンおよび 3' 出発コドンを含む。配列番号 1 ~ 7 は、ラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*) 株 MG 1363 (Genbank 寄託番号 AM 406671.1) のそれぞれ *rplW*、*rplP*、*rpmD*、*rplB*、*rpsG*、*rpsE* および *rplN* に先行する遺伝子間領域に対応する。これらの配列は、とりわけ、ラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) 株 CV 56 (Genbank 寄託番号 CP 002365.1)、ラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (*Lactococcus lactis* ssp.

50

. cremoris) 株 N Z 9 0 0 0 (G e n b a n k 寄託番号 C P 0 0 2 0 9 4 . 1)、ラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) 株 K F 1 4 7 (G e n b a n k 寄託番号 C P 0 0 1 8 3 4 . 1)、ラクトコッカス・ラクティス亜種ラクティス (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) 株 I L 1 4 0 3 (G e n b a n k 寄託番号 A E 0 0 5 1 7 6 . 1) およびラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*) 株 S K 1 1 (G e n b a n k 寄託番号 C P 0 0 0 4 2 5 . 1) の対応する配列と同じである。

【 0 1 3 8 】

他の実施形態において、遺伝子間領域、リンカーまたはスペーサーは、グラム陽性細菌の *rplP*、*rpmD*、*rplM*、*rpsE*、*rplE* または *rplF* に先行する、すなわちその 5' にある、より詳細には直接 5' にある遺伝子間領域を含むまたはそれからなる遺伝子間領域の群から選択される。一実施形態において、前記グラム陽性細菌は、乳酸菌、好ましくはエンテロコッカス属 (*Enterococcus*) 種、より好ましくはエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) およびその亜種または菌株である。一実施形態において、前記遺伝子間領域は、*rplP*、*rpmD*、*rplM*、*rpsE*、*rplE* または *rplF* の出発コドンおよび/または先行する、すなわち、5' にある遺伝子の停止コドンを含む。当業者は、遺伝子間領域が 5' 停止コドンおよび/または 3' 出発コドンを含む場合、正しい翻訳開始および/または終止に影響を及ぼし得る二重の出発および/または停止コドンを避けるために、これらのそれぞれのコドンが好ましくは、前記遺伝子間領域により連結される遺伝子に存在しないことを十分に理解する。遺伝子間領域を同定する方法は、当技術分野で公知である。さらなるガイダンスとして、遺伝子間領域は、例えば、十分なソフトウェアが当技術分野で公知であり、利用できるオペロン、ならびに関連プロモーターおよびオープンリーディングフレームの予測に基づいて同定することができる。

【 0 1 3 9 】

さらなる実施形態において、前記遺伝子間領域配列は、以下の配列番号 8 ~ 13 のいずれかを含む、それから本質的になるまたはそれからなる群から選択される。

配列番号 8 T A A T C

配列番号 9 T A A G G A G G A C A A C A A T A

配列番号 10 T A A T A G G A G G G A A T T T C A

配列番号 11 T T A G A A G A A G G A G G A A T A C C A T T C

配列番号 12 T A A A A G T T T A A G G A A G G A G G G T C T T A C T G A

配列番号 13 T A A T C A A G T A G A A T C T A C A A G G A G G T G T C T T T A A

【 0 1 4 0 】

さらなる実施形態において、前記遺伝子間領域配列は、配列番号 8 と比べて 1 つのミスマッチ、または 1 つのヌクレオチドの欠失または挿入を示す配列、配列番号 9 または配列番号 10 と比べて 1 つ、2 つもしくは 3 つのミスマッチ、または 1 つ、2 つもしくは 3 つのヌクレオチドの欠失もしくは挿入を示す配列、および配列番号 11、配列番号 12 または配列番号 13 と比べて 1 つ、2 つ、3 つもしくは 4 つのミスマッチ、または 1 つ、2 つ、3 つもしくは 4 つのヌクレオチドの欠失もしくは挿入を示す配列を含む、それから本質的になるまたはそれからなる群から選択される。配列番号 8 ~ 13 は、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) 株 L M G 1 5 7 0 9 の *rplP*、*rpmD*、*rplM*、*rpsE*、*rplE* および *rplF* にそれぞれ先行する遺伝子間領域に対応する。

【 0 1 4 1 】

一実施形態において、先行する停止コドンを除き、後の出発コドンを除く、本明細書で述べた遺伝子間領域は、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 またはそれ以上などの 1 個超のヌクレオチド、好ましくは 5 超のヌクレオチド、より好ましくは 10 以上のヌクレオチドを含むまたはそれからなることができる。他の実施形態におい

て、遺伝子間領域は、例えば、1～40、1～30、1～25、1～20、1～15または1～10個などの1～50個のヌクレオチド、好ましくは5～50、5～40、5～30、5～25、5～20、5～15または5～10個のヌクレオチド、より好ましくは10～50、10～40、10～30、10～25、10～20または10～15個のヌクレオチドを含み得る。

【0142】

本明細書で述べたポリシストロン性発現ユニットを含むグラム陽性細菌の特に好ましい実施形態を表1および2に示し、前記グラム陽性細菌は、内因性プロモーター、表1および2に示された遺伝子間領域に結合したその3'側の内因性遺伝子、遺伝子間領域に結合したその3'側の1つまたは複数の外因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列を含む。好ましい実施形態において、表1および2に示された各遺伝子は、その天然のプロモーターおよび場合によって調節配列により転写制御される。他の好ましい実施形態において、前記ポリシストロン性発現ユニットは、細菌染色体に組み込まれる。さらなる好ましい実施形態において、前記内因性プロモーターおよび/または内因性遺伝子は、細菌ゲノムまたは染色体上のそれらの天然の遺伝子座に存在する。好ましくは、出発および停止コドンは、存在する場合、それぞれ前記外因性遺伝子および前記内因性遺伝子の出発および停止コドンを置き換える。

10

【0143】

表1：具体例としてのポリシストロン性発現ユニットは、内因性プロモーター>>内因性遺伝子>>遺伝子間領域>>外因性遺伝子を含みまたはそれから本質的になり得、内因性遺伝子および遺伝子間領域は、以下の組合せから選択される。

20

【0144】

【表 1 - 1】

内因性遺伝子	遺伝子間領域
eno	rplW
eno	rplP
eno	rpmD
eno	rplB
eno	rpsG
eno	rpsE
eno	rplN
eno	rplM
eno	rplE
eno	rplF
usp45	rplW
usp45	rplP
usp45	rpmD
usp45	rplB
usp45	rpsG
usp45	rpsE
usp45	rplN
usp45	rplM
usp45	rplE
usp45	rplF
gap	rplW
gap	rplP
gap	rpmD
gap	rplB
gap	rpsG
gap	rpsE
gap	rplN
gap	rplM
gap	rplE
gap	rplF
pyk	rplW
pyk	rplP
pyk	rpmD
pyk	rplB
pyk	rpsG
pyk	rpsE
pyk	rplN
pyk	rplM
pyk	rplE
pyk	rplF

10

20

30

40

【表 1 - 2】

rpmB	rplW
rpmB	rplP
rpmB	rpmD
rpmB	rplB
rpmB	rpsG
rpmB	rpsE
rpmB	rplN
rpmB	rplM
rpmB	rplE
rpmB	rplF
rplS	rplW
rplS	rplP
rplS	rpmD
rplS	rplB
rplS	rpsG
rplS	rpsE
rplS	rplN
rplS	rplM
rplS	rplE
rplS	rplF

10

20

【 0 1 4 5】

好ましくは、遺伝子間領域 *r p l W*、*r p l B*、*r p s G*および*r p l N*は、ラクトコッカス属 (*Lactococcus*) の種、亜種または菌株、好ましくはラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) に由来する。好ましくは、遺伝子間領域 *r p l P*、*r p l M*および*r p l E*は、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*) の種、亜種または菌株、好ましくはエンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) またはエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) に由来する。好ましくは、遺伝子間領域 *r p l P*、*r p m D*および*r p s E*は、ラクトコッカス属 (*Lactococcus*) の種、亜種または菌株、好ましくはラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) に、またはエンテロコッカス属 (*Enterococcus*) の種、亜種または菌株、好ましくはエンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) またはエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) に由来する。

30

【 0 1 4 6】

例えば、ただし制限なしに、ポリシストロン性発現ユニットが2つの外因性遺伝子を含む場合、内因性プロモーター>>内因性遺伝子>>遺伝子間領域>>外因性遺伝子>>遺伝子間領域>>外因性遺伝子と表される構造は、次の通りであり得る：*u s p 4 5*>>*u s p 4 5*>>*r p m D*>>外因性遺伝子1>>*r p l N*>>外因性遺伝子2；*e n o A*>>*e n o A*>>*r p m D*>>外因性遺伝子1>>*r p l N*>>外因性遺伝子2；*g a p B*>>*g a p B*>>*r p m D*>>外因性遺伝子1>>*r p l N*>>外因性遺伝子2。例えば、そのような配置は、本明細書で教示した抗TNF抗体などの抗体の重および軽鎖の発現（好ましくはその順序の）に特に適する可能性がある。

40

【 0 1 4 7】

表2：具体例としてのポリシストロン性発現ユニットは、内因性プロモーター>>内因性遺伝子>>遺伝子間領域>>外因性遺伝子を含みまたはそれから本質的になり得、内因性遺伝子および遺伝子間領域は、以下の組合せから選択される。

【 0 1 4 8】

【表 2 - 1】

内因性遺伝子	遺伝子間領域
eno	配列番号1
eno	配列番号2
eno	配列番号3
eno	配列番号4
eno	配列番号5
eno	配列番号6
eno	配列番号7
eno	配列番号8
eno	配列番号9
eno	配列番号10
eno	配列番号11
eno	配列番号12
eno	配列番号13
usp45	配列番号1
usp45	配列番号2
usp45	配列番号3
usp45	配列番号4
usp45	配列番号5
usp45	配列番号6
usp45	配列番号7
usp45	配列番号8
usp45	配列番号9
usp45	配列番号10
usp45	配列番号11
usp45	配列番号12
usp45	配列番号13
gap	配列番号1
gap	配列番号2
gap	配列番号3
gap	配列番号4
gap	配列番号5
gap	配列番号6
gap	配列番号7
gap	配列番号8
gap	配列番号9
gap	配列番号10
gap	配列番号11
gap	配列番号12
gap	配列番号13

10

20

30

40

【表 2 - 2】

pyk	配列番号1
pyk	配列番号2
pyk	配列番号3
pyk	配列番号4
pyk	配列番号5
pyk	配列番号6
pyk	配列番号7
pyk	配列番号8
pyk	配列番号9
pyk	配列番号10
pyk	配列番号11
pyk	配列番号12
pyk	配列番号13
rpmB	配列番号1
rpmB	配列番号2
rpmB	配列番号3
rpmB	配列番号4
rpmB	配列番号5
rpmB	配列番号6
rpmB	配列番号7
rpmB	配列番号8
rpmB	配列番号9
rpmB	配列番号10
rpmB	配列番号11
rpmB	配列番号12
rpmB	配列番号13
rplS	配列番号1
rplS	配列番号2
rplS	配列番号3
rplS	配列番号4
rplS	配列番号5
rplS	配列番号6
rplS	配列番号7
rplS	配列番号8
rplS	配列番号9
rplS	配列番号10
rplS	配列番号11
rplS	配列番号12
rplS	配列番号13

10

20

30

40

【 0 1 4 9 】

好ましくは、配列番号 1 ~ 7 のいずれかを含むポリシストロン性発現ユニットを有するグラム陽性細菌は、ラクトコッカス属 (*Lactococcus*) の種、亜種または菌株、好ましくはラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) である。好ましくは、配列番号 8 ~ 13 のいずれかを含むポリシストロン性発現ユニットを有するグラム陽性細菌は、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*) の種、亜種または菌株、好ましくはエンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) またはエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) である。

50

【0150】

当業者は、本発明による外因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列を、特定の目的を達成する付加的配列に結合させることができることを十分に理解する。例えば、外因性遺伝子の分泌を増加させるために、遺伝子を分泌シグナルペプチドをコードする核酸配列に結合させることができる。特に好ましい実施形態において、本発明による外因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列を、好ましくはラクトコッカス属 (*Lactococcus*) の種、より好ましくはラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) ならびにその亜種および菌株に由来する *usp45* 分泌シグナルをコードするポリ核酸配列にその 5' 末端において結合させる。

【0151】

一般的に、分泌シグナル配列は、脂質二重層膜に埋め込まれた状態になり、それにより、宿主細胞からの随伴タンパク質またはペプチド配列の分泌を可能にし、当タンパク質またはペプチドから通常切断される疎水性アミノ酸を通常含む、約 16 ~ 約 35 アミノ酸セグメントである。好ましくは、分泌シグナル配列は、前記シグナル配列を含む核酸とともに用いることを目的とした宿主細胞において非常に活性であり得る。

【0152】

適切な宿主細胞において活性な分泌シグナル配列は、当技術分野で公知であり、具体例としてのラクトコッカス属 (*Lactococcus*) シグナル配列は、*usp45* (米国特許第 5,559,007 号参照) およびその他のシグナル配列を含む。例えば、Perez-Martinez ら、*Mol. Gen. Genet.*、1992年、234巻、401~11頁、Sibakov ら、*Appl. Environ. Microbiol.*、1991年、57巻(2号)、341~8頁を参照のこと。好ましくは、シグナル配列は、プロモーター配列と ORF との間に位置する。すなわち、シグナル配列は、プロモーター配列の 3' 側に位置し、対象のポリペプチドの ORF に先行する。好ましい実施形態において、シグナル配列は、アミノ酸配列 M K K K I I S A I L M S T V I L S A A A P L S G V Y A (*usp45*) をコードする。あるいは、対象のポリペプチドのさらなる制御可能な産生および分泌をもたらす突然変異 *usp45* シグナル配列 (*usp45N*) を用いることができる。特に、突然変異体は、4 位にリシン (K) の代わりにアスパラギン (N) を、または K4N 突然変異を含む。好ましい実施形態において、シグナル配列は、アミノ酸配列 M K K N I I S A I L M S T V I L S A A A P L S G V Y A D T N をコードする。

【0153】

本発明はまた、本明細書で述べた本発明によるポリシストロン性発現ユニットを含むポリ核酸配列に関する。特に、一態様において、本発明は、本明細書で述べた本発明によるポリシストロン性発現ユニットを含むポリ核酸配列に関し、前記ポリシストロン性ユニットは、グラム陽性細菌に対して内因性の 1 つまたは複数の遺伝子ならびにグラム陽性細菌に対して外因性の 1 つまたは複数の遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列を含み、1 つまたは複数の内因性遺伝子および 1 つまたは複数の外因性遺伝子は、本明細書で述べた仕方で翻訳可能または転写可能に結合される。好ましくは、1 つまたは複数の内因性遺伝子は、1 つまたは複数の外因性遺伝子の 5' 末端に結合する。好ましくは、1 つまたは複数の内因性遺伝子および 1 つまたは複数の外因性遺伝子は、本明細書で述べた遺伝子間領域、好ましくは、本明細書の他所で述べた *rplW*、*rplP*、*rpmD*、*rplB*、*rpsG*、*rpsE* および *rplN* に先行する遺伝子間領域または配列番号 1 ~ 7 のいずれかに対応する遺伝子間領域または本明細書の他所で述べた *rplP*、*rpmD*、*rplM*、*rpsE*、*rplE* もしくは *rplF* に先行する遺伝子間領域または配列番号 8 ~ 13 のいずれかに対応する遺伝子間領域または上述の関連配列により接続される。一実施形態において、ポリ核酸配列は、プロモーター、好ましくはグラム陽性細菌の内因性のプロモーターをさらに含む。他の実施形態において、ポリ核酸配列は、調節配列、例えば、オペレーター、ターミネーターなどをさらに含む。好ましい実施形態において、プロモーターは、内因性遺伝子の天然のプロモーターである。

【0154】

さらなる態様において、本発明は、本明細書で述べたポリ核酸配列を含むレプリコンに

10

20

30

40

50

関する。好ましくは、前記レプリコンは、本明細書の他所で述べたベクターである。一実施形態において、前記ベクターは、原核生物発現に適する。他の実施形態において、前記ベクターは、グラム陽性細菌における相同的組換えに適する。

【0155】

他の態様において、本発明は、グラム陽性細菌のリボソーム結合部位および前記細菌に対して外因性の遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列を含むポリ核酸配列に関し、リボソーム結合部位は、外因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列の翻訳を達成するように構成されている。一実施形態において、ポリ核酸配列は、グラム陽性細菌のリボソーム結合部位および前記細菌に対して外因性の遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列を含み、リボソーム結合部位は、外因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列の5'末端に接続されている。

10

【0156】

他の態様において、本発明は、グラム陽性細菌の遺伝子間領域、好ましくはオペロン遺伝子間領域および前記細菌に対して外因性の遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列を含むポリ核酸配列に関し、遺伝子間領域は、外因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列の翻訳を達成するように構成されている。一実施形態において、ポリ核酸配列は、グラム陽性細菌の遺伝子間領域、好ましくはオペロン遺伝子間領域および前記細菌に対して外因性の遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列を含み、遺伝子間領域は、外因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列の5'末端に接続されている。好ましくは、遺伝子間領域は、本明細書の他所で述べた *rplW*、*rplP*、*rpmD*、*rplB*、*rpsG*、*rpsE* もしくは *rplN* に先行する遺伝子間領域または配列番号1~7のいずれかに対応する遺伝子間領域または本明細書の他所で述べた *rplP*、*rpmD*、*rplM*、*rpsE*、*rplE* もしくは *rplF* に先行する遺伝子間領域または配列番号8~13のいずれかに対応する遺伝子間領域または上述の関連配列である。

20

【0157】

さらなる態様において、本発明は、本明細書の他所で述べた *rplW*、*rplP*、*rpmD*、*rplB*、*rpsG*、*rpsE* もしくは *rplN* に先行する遺伝子間領域または配列番号1~7のいずれかに対応する遺伝子間領域または本明細書の他所で述べた *rplP*、*rpmD*、*rplM*、*rpsE*、*rplE* もしくは *rplF* に先行する遺伝子間領域または配列番号8~13のいずれかに対応する遺伝子間領域または上述の関連配列を含むポリシストロン性発現ベクターに関する。一実施形態において、前記ベクターは、前記遺伝子間領域の3'末端における遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列、好ましくはグラム陽性細菌に対して外因性である遺伝子をクローニングするのに適している。一実施形態において、前記ベクターは、グラム陽性細菌において複製されるのに適している。さらなる実施形態において、前記ベクターは、グラム陽性細菌における相同的組換えを達成するために、特に、前記遺伝子間領域および前記遺伝子間領域の3'末端における遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列の染色体組込みに適している。一実施形態において、前記ベクターは、1つまたは複数のプロモーター、好ましくはグラム陽性細菌プロモーターをさらに含む。さらなる実施形態において、前記ベクターは、調節配列、例えば、オペレーター、ターミネーターなどをさらに含む。さらに他の実施形態において、前記ベクターは、抗生物質耐性遺伝子などの1つまたは複数の選択マーカーをさらに含む。

30

40

【0158】

他の態様において、本発明は、外因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列を含み、本明細書で述べた(内因性)プロモーターを場合によってさらに含むベクターを用いて前記グラム陽性細菌を形質転換するステップを含む、グラム陽性細菌における外因性遺伝子発現の方法に関する。

【0159】

50

さらなる態様において、本発明は、グラム陽性細菌に対して外因性の1つまたは複数の遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列のポリシストロン性発現のための本明細書で述べたグラム陽性細菌の遺伝子間領域を含むポリ核酸配列の使用に関する。一実施形態において、本発明は、グラム陽性細菌に対して外因性の1つまたは複数の遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列および前記グラム陽性細菌に対して内因性の1つまたは複数の遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列のポリシストロン性発現のための本明細書で述べたグラム陽性細菌の遺伝子間領域を含むポリ核酸配列の使用に関する。一実施形態において、前記グラム陽性細菌に対して外因性の1つまたは複数の遺伝子は、前記内因性遺伝子の3'末端に結合している。好ましくは、遺伝子間領域は、本明細書の他所で述べたrplW、rplP、rpmD、rplB、rpsG、rpsEもしくはrplNに先行する遺伝子間領域または配列番号1~7のいずれかに対応する遺伝子間領域または本明細書の他所で述べたrplP、rpmD、rplM、rpsE、rplEもしくはrplFに先行する遺伝子間領域または配列番号8~13のいずれかに対応する遺伝子間領域または上述の関連配列である。

【0160】

他の態様において、本発明は、ポリシストロン性mRNAに転写されるような本明細書で述べた1つまたは複数の外因性タンパク質をコードするポリ核酸配列またはベクターをグラム陽性細菌に導入するステップを含む、グラム陽性細菌における1つまたは複数の外因性タンパク質を発現させる方法に関する。

【0161】

さらに他の態様において、本発明は、ポリシストロン性mRNAに転写されるような本明細書で述べた1つまたは複数の外因性タンパク質をコードするポリ核酸配列またはベクターをグラム陽性細菌に導入するステップを含む、1つまたは複数の外因性タンパク質を発現することができるグラム陽性細菌を発生させる方法に関する。

【0162】

本発明によれば、1つまたは複数の外因性遺伝子、コーディング配列のオープンリーディングフレームは、あらゆる種類または起源のものであり得る。一実施形態において、1つまたは複数の外因性遺伝子は、タンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチド、好ましくは対象における治療もしくは予防効果を有するタンパク質、ポリペプチドおよび/もしくはペプチド、または好ましくは免疫もしくは免疫寛容を誘導するための抗原などの抗原、非ワクチン原性の治療活性のあるポリペプチド、抗体もしくはFabなどのその機能性断片、融合タンパク質もしくは多量体タンパク質をコードする。好ましい実施形態において、1つまたは複数の外因性遺伝子は、抗体または機能性抗体断片をコードする。本明細書で用いているように、「機能性」という用語は、その意図された機能、すなわち、抗原結合を依然として発揮し得る抗体断片に適用される。抗体という用語は、本明細書で用いているように、通常の抗体、キメラ抗体、dAb、二重特異性抗体、三重特異性抗体、多重特異性抗体、二価抗体、三価抗体、多価抗体、VHH、ナノボディ、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dAb、Fd、ジアボディ、トリアボディ、単鎖抗体、単ドメイン抗体、単一抗体可変ドメインを含むが、これらに限定されない。

【0163】

本文脈において、「抗体」という用語は、天然であるか、または部分的もしくは完全に操作されたかにかかわらず、免疫グロブリンを記述するために用いる。抗体は多くの方法で修飾することができるので、「抗体」という用語は、特異的結合性分子または分子の対の他のメンバー、すなわち、上文で定義した標的分子に対する所要の結合特異性を有する結合ドメインを有する物質を対象とするものと解釈すべきである。したがって、この用語は、抗体断片、抗体の誘導體、機能性同等物および同族体、ならびに天然であるか、または部分的もしくは完全に操作されたかにかかわらず、免疫グロブリン結合ドメインを含むポリペプチドを含む、単鎖抗体、2機能性抗体、二価抗体、VHH、ナノボディ、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dAb、Fd、ジアボディ、トリアボディおよびラクダ科動物抗体を対象とする。免疫グロブリンの結合ドメインを含むキメ

ラ分子、または他のポリペプチドと融合した同等物は、したがって含まれる。この用語は、抗体の結合ドメインである、またはそれと同族である結合ドメインを有するポリペプチドまたはタンパク質、例えば、抗体模倣体も対象とする。抗体の例は、IgG (IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4)、IgA、IgD、IgMおよびIgEを含む、免疫グロブリンアイソタイプおよびそれらのアイソタイプサブクラスである。したがって、当業者は、本発明が、VHH、ナノボディ、Fab、scFv、Fv、dAb、Fd、ジアボディおよびトリアボディなどの抗原結合ドメインを含む抗体断片にも関することを十分に理解する。一実施形態において、本発明は、1つの外因性遺伝子が抗体またはその機能性断片の軽鎖(V_L)をコードし、他の外因性遺伝子が抗体またはその機能性断片の重鎖(V_H)をコードし、より好ましくは機能性断片がFabである、本明細書で述べたグラム陽性細菌または組換え核酸に関する。一実施形態において、V_Lまたはその機能性断片をコードする外因性遺伝子は、V_Hまたはその機能性断片をコードする外因性遺伝子の3'末端に転写可能に結合される。

10

【0164】

一実施形態において、本明細書で述べた抗体は、サイトカインまたはケモカインなどの標的分子の生物学的活性を少なくとも部分的または完全に阻害、抑制または中和する。本明細書で用いているように、「中和する」または「中和」という表現は、例えば、実施例で詳述するような当技術分野で公知の方法によりin vivoまたはin vitroで測定されるサイトカインの生物学的活性の抑制または低下を意味する。特に、抑制または低下は、大腸炎スコアを測定することにより、または組織もしくは血液試料中の標的分子を測定することにより、測定することができる。本明細書で用いているように、「中和する」または「中和」という表現は、少なくとも10%以上、好ましくは少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、より好ましくは100%の、in vivoまたはin vitroで測定されるサイトカインの生物学的活性の抑制または低下を意味する。

20

【0165】

好ましくは、前記結合分子は、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12 (またはそのサブユニットIL-12p35およびIL12p40)、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-23 (またはそのサブユニットIL-23p19)、IL-27、IL-32 (およびそのスプライス変異体)、IFN (、) およびTNFのリストから選択されるサイトカインに結合し、その生物学的作用を抑制する。好ましくは、前記結合分子は、gp130などの可溶性サイトカイン受容体であるか、または前記サイトカインの受容体、例えば、炎症性シグナルを誘起せずに、IL-2R (CD25、CD122、CD132)、IL-12R (ベータ1、ベータ2)、IL-15R、IL-17R、IL-23RまたはIL-6Rに結合している。好ましくは、前記結合分子は、MIF、MIP-1、MCP-1、RANTESおよびエオタキシンのリストから選択されるケモカインを中和する。好ましくは、前記結合分子は、CD3/CD28、HVEEM、B7.1/B7.2、CD40/CD40L (CD154)、ICOS/ICOSL、OX40/X40L、CD27/CD27L (CD70)、CD30/CD30L (CD153) および41BB/41BBLのリストからの共刺激分子に結合することにより、免疫活性化の阻害を解消する。好ましくは、前記結合分子は、I-CAM1、4インテグリンおよび47インテグリンのリストからの接着分子に結合することにより炎症の阻害を解消する。好ましくは、前記結合分子は、CD3、CTLA4および/またはPD1に対する共刺激およびアゴニスト作用を有する。好ましくは、前記結合分子は、CD25、CD20、CD52、CD95、BAFF、APRILおよび/またはIgEを標的にすることによりT細胞またはB細胞活性を中和する。好ましくは、前記結合分子は、MMPファミリーからの酵素に結合することにより炎症の阻害を解消する。好ましくは、前記結合分子は、v3/51およびIL-8活性を中和することなどの抗血管新生作用を実証する。さらなる好ましい実施形態において、前記結合分子は、TNF、

30

40

50

IL - 12、IFN、IL - 23またはIL - 17の生物学的作用を中和することができる。好ましくは、前記結合分子は、以下のものからなる群から選択される。

- 抗TNF抗体、抗TNF抗体断片、抗TNF単一抗体可変ドメイン、可溶性TNF受容体またはTNFのドミナントネガティブ変異体；
- 抗IL - 12抗体、抗IL - 12抗体断片、抗IL - 12単一抗体可変ドメイン、可溶性IL - 12受容体、IL - 12のドミナントネガティブ変異体またはIL - 12 dAb；
- 抗IL - 12 p35抗体、抗IL - 12 p35抗体断片、抗IL - 12 p35単一抗体可変ドメイン、可溶性IL - 12 p35受容体、IL - 12 p35のドミナントネガティブ変異体またはIL - 12 p35 dAb；
- 抗IL - 12 p40抗体、抗IL - 12 p40抗体断片、抗IL - 12 p40単一抗体可変ドメイン、可溶性IL - 12 p40受容体、IL - 12 p40のドミナントネガティブ変異体またはIL - 12 p40 dAb；
- 抗IL - 23抗体、抗IL - 23抗体断片、抗IL - 23単一抗体可変ドメイン、可溶性IL - 23受容体、IL - 23のドミナントネガティブ変異体またはIL - 23 dAb；
- 抗IL - 23 p19抗体、抗IL - 23 p19抗体断片、抗IL - 23 p19単一抗体可変ドメイン、可溶性IL - 23 p19受容体、IL - 23 p19のドミナントネガティブ変異体またはIL - 23 p19 dAb；
- 抗IFN抗体、抗IFN抗体断片、抗IFN単一抗体可変ドメイン、可溶性IFN受容体、IFNのドミナントネガティブ変異体；
- 抗IL - 17抗体、抗IL - 17抗体断片、抗IL - 17単一抗体可変ドメイン、可溶性IL - 17受容体、IL - 17のドミナントネガティブ変異体またはIL - 17 dAb；
- 抗MCP - 1抗体、抗MCP - 1抗体断片、抗MCP - 1単一抗体可変ドメイン、可溶性IL - 17受容体、MCP - 1のドミナントネガティブ変異体またはMCP - 1 dAb。

【0166】

好ましい実施形態において、前記抗体は、Fab断片（抗原結合断片）である。Fab断片は、当技術分野で周知である。さらなるガイダンスとして、Fab断片は、抗原に結合する抗体上の領域である。それは、重および軽鎖のそれぞれの1つの定常ドメインと1つの可変ドメインから構成されている。

【0167】

一実施形態において、Fabは、cA2抗TNF Fab（その重鎖および軽鎖の可変ドメインのポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列は、米国特許第6,790,444号にそれぞれ配列番号4および5（重鎖）ならびに配列番号2および3（軽鎖）として開示されている）またはCDP870抗TNF Fab（その重鎖および軽鎖のポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列は、国際公開第01/94585にそれぞれ配列番号114および115（重鎖）ならびに配列番号112および113（軽鎖）として開示されている）である。

【0168】

当業者は、抗体、そのままの機能性抗体断片および特にFab断片は、ジスルフィド架橋により共有結合していてもよい異なる個々のポリペプチドから構成されている。特に、重鎖および軽鎖は、別個の個々のコーディング配列によりコードされる。

【0169】

したがって、重および軽鎖のコーディング領域は、それぞれ本明細書で述べたポリシストロン性発現ユニットに含まれ得る。重および軽鎖をコードするポリ核酸配列は、異なるポリシストロン性発現ユニットに組み込むことができる。好ましくは、重鎖および軽鎖をコードするポリ核酸配列は、同じポリシストロン性発現ユニットに組み込む。したがって、一実施形態において、本発明は、翻訳可能または転写可能に結合された、1つまたは複

10

20

30

40

50

数の内因性遺伝子、抗体重鎖をコードする１つまたは複数のポリ核酸配列、またはその断片、好ましくは機能性断片および抗体軽鎖をコードする１つまたは複数のポリ核酸配列、またはその断片、好ましくは機能性断片を含む、本明細書で述べたグラム陽性細菌に関する。他の実施形態において、本発明は、ポリシストロン性発現ユニットを含むグラム陽性細菌に関し、前記ポリシストロン性発現ユニットは、１つまたは複数の内因性遺伝子、抗体重鎖をコードする１つまたは複数のポリ核酸配列、またはその断片、好ましくは機能性断片および抗体軽鎖をコードする１つまたは複数のポリ核酸配列、またはその断片、好ましくは機能性断片を含む。さらに他の実施形態において、軽鎖をコードするポリ核酸配列は、重鎖をコードするポリ核酸配列の３'末端に転写可能または翻訳可能に結合される。有利なことに、そのような結合は、重および軽鎖の両方の発現をさらに増大させる。

10

【０１７０】

本発明はまた、治療のための本明細書で述べた本発明によるグラム陽性細菌の使用に関する。本発明はさらに、本明細書で述べた本発明によるグラム陽性細菌を含む医薬組成物に関する。

【０１７１】

したがって、一態様において、本発明は、薬剤として使用するための本明細書で述べた本発明によるグラム陽性細菌またはグラム陽性細菌を含む医薬組成物に関する。他の態様において、本発明は、療法または治療用の本明細書で述べた本発明によるグラム陽性細菌またはグラム陽性細菌を含む医薬組成物に関する。さらなる態様において、本発明は、薬剤の製造のための本明細書で述べた本発明によるグラム陽性細菌またはグラム陽性細菌を含む医薬組成物の使用に関する。さらに他の態様において、本発明は、本明細書で述べた本発明によるグラム陽性細菌またはグラム陽性細菌を含む医薬組成物を投与するステップを含む、治療の方法に関する。一実施形態において、本発明は、１つまたは複数の外因性遺伝子がタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドなどの産物をコードし、産物が対象における治療または予防効果を有する、好ましくは薬剤として使用するための、好ましくは対象への前記産物の投与または送達に使用するための、本明細書で述べたグラム陽性細菌またはグラム陽性細菌を含む医薬組成物に関する。

20

【０１７２】

関連態様において、本発明は、それを必要とするヒトまたは動物への本発明のグラム陽性細菌に含まれる１つまたは複数の外因性遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列によりコードされるポリペプチドの送達の方法であって、治療上有効量の本明細書で述べた本発明によるグラム陽性細菌を前記ヒトまたは動物に投与するステップを含む、上記方法を提供する。動物は、好ましくは例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、畜牛、乳牛などの家畜、圃場家畜、動物園動物、スポーツ用動物、ペットおよび実験動物、類人猿、サル、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類、イヌおよびオオカミなどのイヌ科動物、ネコ、ライオンおよびトラなどのネコ科動物、ウマ、ロバおよびシマウマなどのウマ科動物、ウシ、ブタおよびヒツジなどの食用動物、シカおよびキリンなどの有蹄動物、マウス、ラット、ハムスターおよびモルモットなどのげっ歯類動物などの哺乳動物であり得る。

30

【０１７３】

本明細書で用いているように、「治療する」または「治療」という用語は、治療上の処置および予防処置の両方を意味し、目的は、望ましくない生理的变化または障害を予防または遅くする（軽減する）ことである。「治療を必要とするヒトまたは動物」は、所定の状態の治療により恩恵を受ける者を含む。

40

【０１７４】

「治療上有効量」という用語は、対象、例えば、ヒトまたは動物における疾患または障害を治療するのに、すなわち、所望の局所または全身効果および成果を得るのに有効な治療用物質または組成物を意味する。例として、治療上有効量の細菌は、例えば、単回または反復投与で少なくとも１個の細菌、または少なくとも１０個の細菌、または少なくとも１０^２個の細菌、または少なくとも１０^３個の細菌、または少なくとも１０^４個の細菌、

50

または少なくとも 10^5 個の細菌、または少なくとも 10^6 個の細菌、または少なくとも 10^7 個の細菌、または少なくとも 10^8 個の細菌、または少なくとも 10^9 個、または少なくとも 10^{10} 個、または少なくとも 10^{11} 個、または少なくとも 10^{12} 個、または少なくとも 10^{13} 個、または少なくとも 10^{14} 個、または少なくとも 10^{15} 個、またはそれ以上のグラム陽性細菌を含み得る。

【0175】

本発明のグラム陽性細菌は、単独でまたは1つまたは複数の活性化合物と併用して投与することができる。後者は、グラム陽性細菌の投与の前、後または同時に投与することができる。

【0176】

抗原および/または治療上有効なポリペプチドの送達に関する多くの従来技術の開示が存在し、そのような開示は、本発明のグラム陽性細菌によりさらに有利に修正することができることが十分に理解されなければならない。例として、また制限なしに、インターロイキン、特に、大腸炎を治療するための IL-10 (例えば、国際公開第 00/23471 号)、炎症反応を調節するための IL-27 (国際公開第 2004/069177 号) の細菌送達、ワクチンとしての抗原の送達 (例えば、国際公開第 97/14806 号)、GLP-2 および関連類似体の送達は、短腸病、クローン病、骨粗鬆症を治療するのに、また癌化学療法時のアジュバント療法等として用いることができる。さらに、トレフォイルペプチドの細菌送達は、消化管の疾患を治療するのに用いることができる (例えば、国際公開第 01/02570 号)。特に、口、食道、胃ならびに大および小腸を含む消化管の障害および損傷の治療のためのならびに消化管外にある組織の保護および治療のためのトレフォイルタンパク質またはペプチドの使用は、国際公開第 97/38712 号および国際公開第 92/14837 号に記載されている。これらのタンパク質は、これらの部位の病変を治療するために、または病変の形成を抑制するために用いることができる。これらの病変は、癌の治療のための放射線療法または化学療法、消化管を損傷するアルコールを含む他の薬物、放射線または原因物質への偶発的曝露、口腔粘膜炎、腸粘膜炎、食道炎、直腸炎、非潰瘍性消化不良症、胃炎、消化性または十二指腸潰瘍、胃癌、大腸癌、MALリンパ腫、メネトリエ症候群、胃食道逆流疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎および化学物質、細菌または不明瞭な原因による急性大腸炎を含むが、これらに限定されない消化器疾患によって引き起こされ得る。本発明のプロモーターおよび宿主細胞を用いたさらなる治療への応用が想定される。

【0177】

本発明による治療用ポリペプチドの送達によりヒトまたは動物における治療可能な疾患の種類のさらなる非限定的な例は、例えば、クローン病および潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患 (例えば、IL-Ira、IL-10、IL-27 またはトレフォイルペプチドにより治療可能)、乾癬、慢性関節リウマチ、紅斑性狼瘡を含むが、これらに限定されない自己免疫疾患 (例えば、IL-Ira、IL-27、IL-10 または関連自己抗原により治療可能)、喘息、食物アレルギーを含むが、これらに限定されないアレルギー性疾患 (関連アレルゲンにより治療可能)、セリアック病 (グルテンアレルゲンにより治療可能)、アルツハイマー病、パーキンソン病および筋萎縮側索硬化症を含むが、これらに限定されない神経疾患 (例えば、脳由来神経栄養因子および毛様体神経栄養因子により治療可能)、癌 (例えば、IL-1、コロニー刺激因子またはインターフェロン W により治療可能)、骨粗鬆症 (例えば、形質転換成長因子 f3 により治療可能)、糖尿病 (例えば、インスリンにより治療可能)、心血管疾患 (例えば、組織プラスミノゲン活性化因子により治療可能)、アテローム動脈硬化症 (例えば、サイトカインおよびサイトカインアンタゴニストにより治療可能)、血友病 (例えば、凝固因子により治療可能)、変性肝疾患 (例えば、肝細胞増殖因子またはインターフェロン a により治療可能)、嚢胞性線維症などの肺疾患 (例えば、アルファ抗トリプシンにより治療可能)、肥満、病原体感染、例えば、ウイルスまたは細菌感染症 (任意の数の上述の組成物または抗原により治療可能) 等を含むが、これらに限定されない。

【0178】

本発明によるグラム陽性細菌は、感染症を治療するためにも用いることができる。一実施形態において、本発明によるグラム陽性細菌により局所的に産生され、分泌される毒素中和抗体によるクロストリジウム属 (*Clostridium*)、好ましくはクロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*) 関連疾患 (CDAD) に対する受動免疫を得ることができる。好ましくは、前記グラム陽性細菌は、ラクトコッカス属の菌種 (*Lactococcus* sp.)、より好ましくはラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) またはその亜種またはその菌株である。

【0179】

CDADは、2種の外毒素、すなわち、毒素A (エンテロトキシン; 例えば、Genbank NC_009089.1参照、領域: DNA配列について795843...803975またはタンパク質配列についてYP_001087137.1) および毒素B (サイトトキシン; 例えば、Genbank NC_009089.1参照、領域: DNA配列について787393...794493またはタンパク質配列についてYP_001087135.1) により媒介される。両者は、腸上皮細胞の表面に結合する高分子量タンパク質であり、そこで内部移行し、細胞死、炎症および下痢をもたらす細胞質rhoタンパク質のグルコシル化を触媒する。それらは、C.ディフィシレ (*C. difficile*) の病原性、定着および好中球の走化性および活性化の促進にも関与していた。細菌自体は、侵襲性でなく、組織損傷を引き起こさない。抗体によりC.ディフィシレ (*C. difficile*) 毒素を中和することにより、病原体の病原機構が遮断され、腸内で生育するその能力を低下させることができ、微生物の生態に対する影響を最小限にすることができ、正常な細菌叢の回復が可能となる。このアプローチの医学的利点は、より速やかな回復、より少ない再発および正常な腸細菌叢における抗生物質耐性に対する選択的圧力の軽減などであり得る。

【0180】

したがって、一実施形態において、本発明は、ポリシストロン性発現ユニットがクロストリジウム属 (*Clostridium*) の毒素Aおよび/または毒素Bに対する本明細書の他所で述べた抗体またはその断片、好ましくはFabを含む、本明細書で述べたグラム陽性細菌に関する。最も好ましくは、前記抗体またはその断片は、中和抗体である。さらなる実施形態において、本発明は、好ましくは細菌染色体に組み込まれたポリシストロン性発現ユニットを含む、グラム陽性細菌、好ましくはラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) などのラクトコッカス属種 (*Lactococcus* sp.) またはエンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) もしくはエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) などのエンテロコッカス属種 (*Enterococcus* sp.) に関し、前記ポリシストロン性発現ユニットは、好ましくはラクトコッカス属種 (*Lactococcus* sp.) またはエンテロコッカス属種 (*Enterococcus* sp.) に由来するeno、usp45、gap、pyk、rpmBおよびrplSからなる群から選択される内因性遺伝子ならびにクロストリジウム属 (*Clostridium*)、好ましくはクロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*) の毒素Aおよび/または毒素Bに対する中和抗体または抗体断片、好ましくはFabをコードする1つまたは複数の外因性遺伝子を含み、前記ポリシストロン性発現ユニットは、好ましくは前記内因性遺伝子の天然の遺伝子座において染色体に組み込まれており、前記毒素Aおよび/または毒素B抗体 (断片) 遺伝子は、好ましくは前記内因性遺伝子の3'末端に転写可能に結合され、前記転写可能な結合は、グラム陽性細菌、好ましくはラクトコッカス属種 (*Lactococcus* sp.) またはエンテロコッカス属種 (*Enterococcus* sp.) のrplW、rplP、rpmD、rplB、rpsG、rpsE、rplN、rplM、rplEおよびrplFに先行する遺伝子間領域からなる群から好ましくは選択される遺伝子間領域によってもたらされる。本明細書で述べたクロストリジウム属 (*Clostridium*) 毒素Aおよび毒素Bの抗体は、当技術分野で公知である (例えば、Leungら、J Pediatr、1991年、118巻(4Pt1)、633~637頁、Wilcox、J Antimicrob Chemother、2004年、53巻(5号)、882~884頁、Sougioultzisら、Gastroenterology、2005年、128巻(3号)、

10

20

30

40

50

764～770頁、Kyneら、N Engl J Med、2000年、342巻(6号)、390～397頁、Lowyら、N Engl J Med、362巻(3号)、197～205頁参照)。両抗体またはその断片は、同じまたは異なるグラム陽性細菌における別個のポリシストロン性発現ユニットに配置することができるが、好ましくは単一ポリシストロン性発現ユニットに配置する。本発明はさらに、そのようなグラム陽性細菌を投与するステップを含む、C D A Dを予防および/または治療する方法に関する。

【0181】

熟練した読者は、本明細書で具体的に列挙した疾患は、例となるものにすぎず、それらの列挙は、本発明により提供される試薬、例えば、本発明のプロモーター、核酸、ベクターおよび宿主細胞の使用をこれらの特定の疾患に限定することを意図するものではないことを十分に理解しなければならない。それよりも、熟練した読者は、本発明の試薬は、列挙したものにおいてだけでなく、ヒトおよび動物の様々なさらなる疾患または状態においても治療上関連性のあり得る、対象の発現産物、好ましくはポリペプチドを原理上は発現させるのに用いることができることを理解する。したがって、適切な発現産物、好ましくはポリペプチド、例えば、抗原、抗体(断片)および/または非ワクチン原性の治療活性のあるポリペプチドが所定の病気について選択または決定されたならば、当業者は、その発現、単離および/または送達を本発明の試薬を用いて達成することができるであろう。

【0182】

本発明はまた、イヌ、ウマ、ネコおよび鳥を含む他の動物における疾患の治療を预期する。イヌにおける疾患は、イヌジステンパー(パラミクソウイルス)、イヌ肝炎(アデノウイルスCav-1)、ケンネルコフまたは咽頭気管炎(アデノウイルスCav-2)、伝染性イヌ腸炎(コロナウイルス)および出血性腸炎(パルボウイルス)を含むが、これらに限定されない。

【0183】

ネコにおける疾患は、ウイルス性鼻気管炎(ヘルペスウイルス)、ネコカリシウイルス感染症(カリシウイルス)、ネコ伝染性腹膜炎(パルボウイルス)およびネコ白血病(ネコ白血病ウイルス)を含むが、これらに限定されない。ウマおよび鳥における他のウイルス性疾患も、本発明の方法および組成物を用いて治療可能であると考えられる。この目的に向けて、組換えインターフェロンを発現する微生物の使用は特に好ましい。

【0184】

本明細書で用いているように、医薬組成物は、好ましくは治療上有効量の本発明のグラム陽性細菌ならびに薬学的に許容される担体、すなわち、1つまたは複数の薬学的に許容される担体物質および/または添加物、例えば、緩衝剤、担体、賦形剤、安定化剤等を含む。

【0185】

「薬学的に許容される」という用語は、本明細書で用いているように、当技術分野と調和し、医薬組成物の他の成分と適合性があり、その受容者に対して有害でないことを意味する。

【0186】

本発明のグラム陽性細菌は、治療すべき疾患を有するヒトまたは動物への投与のための医薬製剤中に懸濁することができる。そのような医薬製剤は、生存グラム陽性細菌および投与に適する媒体を含むが、これらに限定されない。グラム陽性細菌は、ラクトース、他の糖、アルカリおよび/またはアルカリ土類ステアリン酸塩、炭酸塩および/または硫酸塩(例えば、ステアリン酸マグネシウム、炭酸ナトリウムおよび硫酸ナトリウム)、カオリン、シリカ、着香料および香料などの一般的な賦形剤の存在下で凍結乾燥することができる。そのように凍結乾燥されたグラム陽性細菌は、それぞれを経口経路により投与することができる、カプセル剤、錠剤、顆粒剤および散剤(例えば、口内洗浄散剤)の形態で調製することができる。あるいは、一部のグラム陽性細菌は、適切な媒体中水性懸濁剤として調製することができ、または凍結乾燥細菌は、使用直前に適切な媒体、本明細書で言及した賦形剤ならびにグルコース、グリシンおよびサッカリン酸ナトリウムなどの他の賦

10

20

30

40

50

形剤を含むそのような媒体に懸濁することができる。

【0187】

経口投与のために、胃抵抗性経口剤形を調合することができ、その剤形は、グラム陽性細菌の制御放出をもたらす化合物も含み、それにより、その中にコードされている所望のタンパク質の制御放出をもたらす得る。例えば、経口剤形（カプセル剤、錠剤、ペレット剤、顆粒剤および散剤を含む）は、胃内の溶解または崩壊に抵抗するが、腸内ではそうではなく、それにより、腸内での崩壊、溶解および吸収のために胃を通過することを可能にする賦形剤（通常ポリマー、セルロース誘導体および／または親油性物質）の薄層で被覆することができる。

【0188】

経口剤形は、例えば、制御放出、持続放出、持効性放出、持続作用錠剤またはカプセル剤として、グラム陽性細菌および産生された外因性タンパク質の徐放を可能にするように設計することができる。これらの剤形は、通常、親油性、重合性、セルロース系、不溶性、膨潤性賦形剤などの従来型で、周知の賦形剤を含む。制御放出製剤は、腸、結腸、生体接着または舌下送達（すなわち、歯粘膜送達）および気管支送達を含む他の送達部位にも用いることができる。本発明の組成物を直腸または膣に投与すべきである場合、医薬製剤は、軟膏剤、坐剤およびクリーム剤を含み得る。この場合、グラム陽性細菌を脂質も含む一般的な賦形剤の混合物中に懸濁する。前述の製剤のそれぞれは、当技術分野で周知であり、例えば、以下の参考文献に記載されている。Hanselら、Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems、5版、WilliamおよびWilkins、1990年、Chien、1992年、Novel drug delivery system、2版、M. Dekker、Prescottら（1989年、Novel drug delivery、J. Wiley & Sons）、Cazzanigaら、1994年、Oral delayed release system for colonic specific delivery、Int. J. Pharm. 108;7'。

【0189】

好ましくは、浣腸製剤を直腸投与に用いることができる。「浣腸」という用語は、直腸用の液体製剤をカバーするために用いられる。浣腸は、1回量容器入りで通常供給され、水、グリセロールまたはマクロゴールまたは他の適切な溶媒に溶解または分散させた1つまたは複数の活性物質を含む。

【0190】

したがって、本発明によれば、好ましい実施形態において、所望の外因性遺伝子をコードする本明細書で述べた本発明によるグラム陽性細菌は、特定の経路に適用できる最先端技術を用いた製剤のいずれか1つにより粘膜、例えば、経口、鼻、直腸、膣または気管支経路を経て動物またはヒトに投与することができる。投与のためのグラム陽性細菌の用量は、細菌の種類およびそれによりコードされる遺伝子、治療される疾患の種類および重症度ならびに使用される投与経路などのかなり多数の因子によって異なる。

【0191】

したがって、詳細な用量は、本発明のそれぞれおよびすべての実施形態について定めることはできないが、本発明があるならば当業者に容易に明らかになる。用量は、ELISAまたはピアコア（Biacore）（実施例参照）として公知のものなどの周知の方法を用いてあらかじめ定めた数の細胞の投与後の組換えタンパク質の血清レベル濃度を測定することにより個別的方法で決定することができる可能性がある。送達された組換えタンパク質の速度論的プロファイルおよび半減期の解析は、形質転換宿主細胞の有効量範囲の決定を可能にするのに十分な情報を提供する。

【0192】

一実施形態において、本明細書で述べた本発明によるグラム陽性細菌が抗原を発現する場合、本発明は、ワクチンも提供し得る。

【0193】

「ワクチン」という用語は、動物またはヒト対象に有効量で投与した場合、ワクチンに含まれる免疫原に対する抗体を誘導し、かつ／または対象における防御免疫を誘起することができる薬学的に許容される組成物を指す。

【 0 1 9 4 】

本発明のワクチンは、本明細書で述べた本発明によるグラム陽性細菌を、またさらに賦形剤の場合によって含むことになる。そのようなワクチンは、アジュバント、すなわち、抗原に対する免疫応答を増強する化合物または組成物も含み得る。アジュバントは、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、サポニン、水酸化アルミニウムなどの鉱物ゲル、リゾレシチン、プルロニックポリオールなどの界面活性物質、多価陰イオン、ペプチド、油または炭化水素エマルジョンならびに B C G (カルメット - ゲラン桿菌) およびコリネバクテルム・パルバム (*Corynebacterium parvum*) などの潜在的に有用な薬学的に許容されるヒトアジュバントを含むが、これらに限定されない。

【 0 1 9 5 】

本発明により、骨折治癒障害の診断、予測、予後診断および / またはモニタリングにおける実質的な利点をもたらすバイオマーカー、使用および方法が提供されたことが明らかになる。本発明をその特定の実施形態とともに記述したが、前述の説明に照らして多くの代替形態、修正形態および変形形態が当業者には明らかであることは明白である。したがって、すべてのそのような代替形態、修正形態および変形形態は、以下のように特許請求の精神および広い範囲に含まれるものである。

【 0 1 9 6 】

本発明の態様および実施形態は、以下の非限定的な実施例によってさらに裏付けられる。

【 実施例 1 】

【 0 1 9 7 】

ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) ゲノムからの遺伝子間領域の選択
図 1 に示すように、ラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*) 株 M G 1 3 6 3 の対数末期培養の細胞タンパク質をタンパク質ゲル上でクーマシーブルー染色により視覚化した。レーン A および B は、それぞれ 2 9 μ g および 5 8 μ g の M G 1 3 6 3 タンパク質を含んでいた。レーン A からの 1 2 の明確なタンパク質バンドをゲルから単離した。タンパク質を単離し、遺伝子間領域を以下により同定した。

1) 部分的ペプチド配列決定 (M A L D I - T O F / T O F) ならびにペプチドの質量および配列の複合情報を用いたデータベース検索による断片における多量に発現したタンパク質の同定

2) オペロンに存在する多量に発現したタンパク質 (1) をコードする遺伝子のラクトコッカス・ラクティス亜種クレモリス (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*) 株 M G 1 3 6 3 の染色体配列 (Wegmannら) を用いた同定、ただし、「第 1 の遺伝子」としてでない

3) これらの多量に発現した遺伝子に先行する遺伝子間領域の同定

【 0 1 9 8 】

表 3 にそのように同定された遺伝子間領域を示す。下線を引いた配列は、リボソーム結合部位である。

【 0 1 9 9 】

10

20

30

【表 3】

表3

遺伝子間領域	第2遺伝子	第2遺伝子の機能
TAATG (配列番号1)	rplW	50 Sリボソームタンパク質 L23
TAATCCATG (配列番号2)	rplP	50 Sリボソームタンパク質 L16
TAAGGAGGAAAAATG (配列番号3)	rpmD	50 Sリボソームタンパク質 L30
TAATAGAGGAGGAAAATCGTG (配列番号4)	rplB	50 Sリボソームタンパク質 L2
TAAGAAGGGAGATAAGTAAGAATG (配列番号5)	rpsG	30 Sリボソームタンパク質 S7
TAAGGAAAGGGGTAATTAAACATG (配列番号6)	rpsE	30 Sリボソームタンパク質 S5
TAAGCAAACTAGGAGGAATATAGCATG (配列番号7)	rplN	50 Sリボソームタンパク質 L14

10

【実施例 2】

【0200】

パイシストロン性発現の部位の選択

表4に高レベル発現を推進するものとして実施例1で同定された標的プロモーターを示す。これらのプロモーターは、外因性遺伝子のポリシストロン性発現の標的部位として用いることができる。

20

【0201】

【表 4 - 1】

表4

バンド	MG1363におけるアノテートされた遺伝子	名称
1	DNA依存性RNAポリメラーゼ、ベータ'サブユニット/160kDサブユニット	<i>rpoC</i>
	DNA依存性RNAポリメラーゼ、ベータサブユニット/140kDサブユニット	<i>rpoB</i>
	非ヘム鉄結合フェリチン	<i>dpsA</i>
2	ピルビン酸キナーゼ	<i>pyk</i>
	グルタミル-tRNAシンテターゼ	<i>gltX</i>
3	ホスホピルビン酸ヒドラターゼ	<i>eno</i>
	グルタミンシンテターゼ	<i>glnA</i>
	グルタミンシンテターゼリプレッサー	<i>glnR</i>
	ジペプチダーゼPepV	<i>pepV</i>
	F0F1型ATPシンターゼベータサブユニット(ATPシンターゼF1ベータサブユニット)	<i>atpD</i>
	F0F1型ATPシンターゼアルファサブユニット	<i>atpA</i>
4	マルチプル糖結合輸送ATP結合タンパク質	<i>msmK</i>
	アセトインデヒドロゲナーゼ複合体E1成分アルファサブユニット(<i>acoA</i>)	<i>pdhA</i>
	細胞分裂タンパク質	<i>ftsA</i>
	UDP-ガラクトピラノースムターゼ	<i>glf1</i>
	3-ホスホグリセリン酸キナーゼ	<i>pgk</i>
	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ	<i>gapB</i>
	酢酸キナーゼ	<i>ackA1</i>
	3-オキソアシル-(アシル担体タンパク質)シンターゼII	<i>fabF</i>
5	3-ケトアシル-(アシル担体タンパク質)レダクターゼ	<i>fabG</i>
	DNA依存性RNAポリメラーゼ、アルファサブユニット/40kDサブユニット	<i>rpoA</i>
	プロリンジペプチダーゼ	<i>pepQ</i>
	グルタミルアミノペプチダーゼ	<i>pepA</i>
	予測デヒドロゲナーゼ関連タンパク質	<i>llmg_0272</i>

10

20

30

【表 4 - 2】

6	30Sリボソームタンパク質S2	<i>rpsB</i>
	50Sリボソームタンパク質L4 (<i>rplD</i>)	<i>rplD</i>
	50Sリボソームタンパク質L23	<i>rplW</i>
	50Sリボソームタンパク質L2	<i>rplB</i>
	フェニルアラニル- t R N A シンターゼベータ鎖	<i>pheT</i>
	フルクトース-ビスリン酸アルドラーゼ	<i>fbaA</i>
7	30Sリボソームタンパク質S4	<i>rpsD</i>
	翻訳開始因子3(IF-3)	<i>infC</i>
	転写伸長因子GreA	<i>greA</i>
	ATP依存性Clpプロテアーゼのプロテアーゼサブユニット	<i>clpP</i>
	スーパーオキシドジスムターゼ	<i>sodA</i>
8	30Sリボソームタンパク質S12	<i>rpsL</i>
	30Sリボソームタンパク質S7	<i>rpsG</i>
	50Sリボソームタンパク質L18	<i>rplR</i>
	30Sリボソームタンパク質S5	<i>rpsE</i>
	50Sリボソームタンパク質L30/L7E	<i>rpmD</i>
	S-リボシルホモシステイナーゼ	<i>luxS</i>
	50Sリボソームタンパク質L15	<i>rplO</i>
	50Sリボソームタンパク質L11	<i>rplK</i>
9	30Sリボソームタンパク質S8	<i>rpsH</i>
	50Sリボソームタンパク質L21	<i>rplU</i>
	30Sリボソームタンパク質S13	<i>rpsM</i>
	30Sリボソームタンパク質S19 (<i>rpsS</i>)	<i>rpsS</i>
	リボソームタンパク質L22 (<i>rplV</i>)	<i>rplV</i>
	リボソームタンパク質L16 (<i>rplP</i>)	<i>rplP</i>
	リボソームタンパク質L14 (<i>rplN</i>)	<i>rplN</i>
	30Sリボソームタンパク質L19	<i>rplS</i>
	30Sリボソームタンパク質S11	<i>rpsK</i>
10	30Sリボソームタンパク質S10	<i>rpsJ</i>
	コシャペロニンGroES	<i>groES</i>
	50Sリボソームタンパク質L24	<i>rplX</i>
	50Sリボソームタンパク質L10	<i>rplJ</i>
	50Sリボソームタンパク質L7/L12	<i>rplL</i>
11	HU様DNA結合タンパク質	<i>hllA</i>
	50Sリボソームタンパク質L28	<i>rpmB</i>
	ホストランスフェラーゼ系IIB成分	<i>ptcB</i>

【 0 2 0 2 】

大腸菌 (E. Coli) からの - グルクロニダーゼ (*uidA*) 遺伝子をリポーター遺伝子としてラクトコッカス・ラクティス (Lactococcus lactis) M G 1 3 6 3 に導入した。 *uidA* 遺伝子産物 - グルクロニダーゼは、組織化学的および分光光度測定基質として市販されている様々な - グルクロニドの開裂を触媒する。菌株 s A G X 0 0 9 0 は、 *thyA* 遺伝子座において *Phl1A* > > *uidA* 発現カセットを有する (図 2)。このプロモーターは、菌株 s A G X 0 0 3 7 および s A G X 0 0 8 5 においても用いられた。

【 0 2 0 3 】

図 2 に示すように、デュアルシストロン構築物は、ラクトコッカス・ラクティス (Lactococcus lactis) M G 1 3 6 3 染色体におけるいくつかの内因性遺伝子 (遺伝子 X) の 3

10

20

30

40

50

’末端にuidAを挿入することにより作製した。これによって、rpmDを表4からの対象の内因性遺伝子とuidAとの間の遺伝子間配列として用いて、sAGX0090と比較して高い - グルクロニダーゼ (GUS) 活性をもたらす部位を同定した。

【0204】

ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) 培養を、必要な場合にチミジンを添加したGM17中で30で16時間増殖させた。1mlの培養の細胞を洗浄し、1mlの脱鉱物化水に再懸濁した。細胞を、MP Biomedicals溶解マトリックスBおよびFasprep-24装置を用いて6m/秒で40秒間破壊した。管を遠心分離し、細胞上清の希釈系列を調製した。GUS活性は、p-ニトロフェニル基質および - グルクロニダーゼの存在により溶液に黄色をもたらす - メルカプトエタノールを加えることにより測定した。GUS活性を405nmで測定し、対照標準菌株sAGX0090に対して相対的に表した。すべての菌株を並行して処理した。

10

【0205】

図3に遺伝子X>>rpmD>>uidAデュアルシストロン構築物の相対GUS活性を示す。GUS活性は、Phl1A>>uidA発現カセットを運搬する対照標準菌株sAGX0090に対して相対的に表し、Y軸上に示す。すべてのデュアルシストロン菌株におけるGUS活性は、対照標準菌株より高いことが認められた。特に、sAGX0168 (enoA>>rpmD>>uidA) およびsAGX0222 (gapB>>rpmD>>uidA) におけるGUS活性は、それぞれsAGX0090と比較したとき6.89および20.99倍高いことがわかった。

20

【0206】

これらの結果は、バイシストロン性発現が様々な状況にわたってタンパク質発現レベルの増大をもたらすことを明確に確認するものである。

【実施例3】

【0207】

ヒトプロインスリンのバイシストロン性発現

プロインスリンの分泌を得るためにusp45分泌リーダー (SS) をヒトプロインスリン (ins) に融合させた (SS::ins)。[SS::ins] 発現カセットを、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) MG1363染色体にthyA遺伝子座において組み込み、PthyAから直接発現させた (sAGX0121) か、または SS::insに先行するrpmD遺伝子間領域とともにusp45 (sAGX0121) もしくはenoA (sAGX0164) から下流の第2のシストロンとして挿入した (図4a)。インスリン分泌能力をELISAにより定量して、thyA遺伝子座におけるPthyA促進発現と比較してカーゴ (cargo) のバイシストロン性発現を評価した。

30

【0208】

Phl1A>>SS::ins組み込みプラスミドを構築する試みは、失敗した。

【0209】

菌株を単一コロニーから必要な場合に200μMチミジンを添加した2mlのGM17中に接種し、30で16時間増殖させた。プロインスリン分泌の定量のために、これらの飽和一夜培養を5mlの新鮮GM17培地で1/25に希釈し、30で4時間増殖させた。細胞を、3220×gで10分間の遠心分離により収集し、等量のBAM9培地に再懸濁し、30でさらに3時間培養した。BAM9は、M9塩、0.5%アミノプラスマル、0.5%グルコース、25mM NaHCO₃、25mM Na₂CO₃、2mM MgSO₄、0.1mM CaCl₂ および200μMチミジンを含む。細胞および培養上清を3220×gで10分間の遠心分離により分離した。培養上清中の分泌ヒトプロインスリンの量をMercoDiaにより提供されたELISAにより定量した。すべての菌株を並行して処理した。

40

【0210】

図4bにラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) 株sAGX0122、sAGX0121およびsAGX0164により分泌されたヒトプロインスリンの定量を示

50

す。分泌されたプロインスリンの量を ng/ml として表し、Y 軸上に示した。図からバイシストロン性発現カセットを含む菌株が対照標準菌株より有意に高いカーゴ発現を有することが明瞭にわかる。特に、インスリン分泌は、 $SS::ins$ を $rpmD$ を介して $enoA$ に結合させた場合に最も高かった。

【実施例 4】

【0211】

$cA2$ Fab のバイシストロン性発現

$cA2$ 抗 $hTNF$ Fab の重鎖および軽鎖を用いて、デュアルシストロン発現構築物を作製した。すべての発現ユニットは、 $thyA$ プロモーターにより促進され、プラスミド上に位置する。軽鎖 $VLCL(L)$ および重鎖の Fab 断片 $VHCH1(H)$ のすべての運搬遺伝子は、 $cA2$ インフリキシマブモノクローナル抗体に由来していた。 $L > > H$ および $H > > L$ 配置を $rpmD$ 、 $rplB$ 、 $rpsG$ 、 $rpsE$ または $rplN$ に先行する遺伝子間領域により結合させる。すべての構築物は、プラスミド由来である。

【0212】

図 5 で重鎖および軽鎖の両方がデュアルシストロン構築物により高度に発現し、これが高レベルの機能性 $cA2$ 抗 TNF Fab につながったことがわかる。図 5 でさらに重鎖を軽鎖の前に配置した場合に、遺伝子間領域にかかわりなく、 $cA2$ 抗 TNF の発現が増大したことがわかる。

【0213】

抗 $hTNF$ 分泌の定量のために、菌株を単一コロニーから 2ml の $GM17$ 中に接種し、 30°C で 16 時間増殖させた。これらの飽和一夜培養を 5ml の新鮮 $GM17$ 培地で $1/25$ に希釈し、 30°C で 4 時間増殖させた。細胞を、 $3220 \times g$ で 10 分間の遠心分離により収集し、等量の $BAM9$ 培地に再懸濁し、 30°C でさらに 3 時間培養した。 $BAM9$ は、 $M9$ 塩、 0.5% アミノブラスマル、 0.5% グルコース、 25mM $NaHCO_3$ 、 25mM Na_2CO_3 、 2mM $MgSO_4$ 、 0.1mM $CaCl_2$ および $200\mu\text{M}$ チミジンを含む。細胞および培養上清を $3220 \times g$ で 10 分間の遠心分離により分離した。個々の構築物を運搬する菌株からの粗上清を並行して調製し、抗 TNF 活性の存在について分析した。これは、捕捉タンパク質としてヒト TNF を用いて直接 $ELISA$ により行った。 $VLCL$ 部分は、ウサギ抗ヒト IGG 抗血清により検出され、アルカリホスファターゼコンジュゲート抗ウサギ抗血清により明らかにされた。ホスファターゼ活性は、比色分析により測定し、 OD_{402} として読み取った。すべての菌株を並行して処理した。

【実施例 5】

【0214】

$CDP870$ のバイシストロン性発現

$CDP870$ 抗 TNF Fab の重鎖および軽鎖を用いて、デュアルシストロン発現構築物を作製した。すべての発現ユニットは、細菌染色体上に位置している。

【0215】

図 6 a : 配列 ($SS::CDP870$ $VLCL$ および $SS::CDP870$ $VHCH1$) をコードする $usp45$ 分泌リーダーとの $CDP870$ 軽および重鎖 Fab 融合体を、 $usp45$ から下流に第 2 および第 3 のシストロンとして挿入した ($sAGX0219$ 、 $sAGX0220$)。 $sAGX0219$ および $sAGX0220$ において、 $rpmD$ を用いて $SS::CDP870$ 遺伝子を $usp45$ に結合させた。遺伝的不安定性を避けるために、軽および重鎖遺伝子を $rplN$ に先行する遺伝子間領域を介して結合させた。 $sAGX0219$ では、軽鎖遺伝子が重鎖遺伝子に先行するのに対して、 $sAGX0220$ では、重鎖遺伝子が軽鎖遺伝子に先行する。

【0216】

抗 $hTNF$ 分泌の定量のために、菌株を単一コロニーから 2ml の $GM17$ 中に接種し、 30°C で 16 時間増殖させた。これらの飽和一夜培養を 5ml の新鮮 $GM17$ 培地で $1/25$ に希釈し、 30°C で 4 時間増殖させた。細胞を、 $3220 \times g$ で 10 分間の遠心分

離により収集し、等量のBAM9培地に再懸濁し、30 でさらに3時間培養した。BAM9は、M9塩、0.5%アミノプラスマル、0.5%グルコース、25mM NaHCO₃、25mM Na₂CO₃、2mM MgSO₄、0.1mM CaCl₂および200μMチミジンを含む。細胞および培養上清を3220×gで10分間の遠心分離により分離した。個々の構築物を運搬する菌株からの粗上清を並行して調製し、抗TNF活性の存在について分析した。これは、レミケード(Remicade)を対照標準として、補足タンパク質としてヒトTNFを用いて直接ELISAにより行った。VLC部分、ウサギ抗ヒトIgG抗血清により検出され、アルカリホスファターゼコンジュゲート抗ウサギ抗血清により示された。ホスファターゼ活性は、比色分析により測定し、OD402として読み取った。すべての菌株を並行して処理した。

10

【0217】

図6bで重鎖および軽鎖の両方がデュアルシストロン構築物により高度に発現し、これが高レベルの機能性CDP870抗TNF Fabにつながったことがわかる。図6bでさらに重鎖を軽鎖の前に配置した場合に、CDP870抗TNFの発現が実質的に増大したことがわかる。

【実施例6】

【0218】

ヒトトレフォイル因子1(hTFF1)のバイシストロン性発現

hTFF1に融合したusp45分泌リーダーコーディング配列(SS::hTFF1)を用いて発現構築物を作製した。すべての発現ユニットは、細菌染色体上に位置している。Phl1Aより強いプロモーターを用いてモノシストロン性hTFF1発現のための組込みプラスミドを構築することは、可能でなかった。

20

【0219】

図7a:hTFF1の分泌を得るためにusp45分泌リーダーコーディング配列(SS)をhTFF1に融合させた(SS::hTFF1)。SS::hTFF1発現カセットを、ラクトコッカス・ラクティス(Lactococcus lactis)MG1363染色体にthyA遺伝子座において組み込み、Phl1Aから直接発現させた(sAGX0085)か、またはSS::hTFF1に先行するrpmD遺伝子間領域とともにgapBから下流の第2のシストロンとして挿入した(sAGX0276)。

【0220】

30

図7b:ThyA遺伝子座におけるPhl1A促進発現と比較したカーゴのバイシストロン性発現を評価するために、hTFF1分泌能力をELISAにより定量した。

【0221】

hTFF1分泌の定量のために、菌株を単一コロニーから2mlのGM17中に接種し、30 で16時間増殖させた。これらの飽和一夜培養を5mlの新鮮GM17培地で1/25に希釈し、30 で4時間増殖させた。細胞を、3220×gで10分間の遠心分離により収集し、等量のBAM9培地に再懸濁し、30 でさらに3時間培養した。BAM9は、M9塩、0.5%アミノプラスマル、0.5%グルコース、25mM NaHCO₃、25mM Na₂CO₃、2mM MgSO₄、0.1mM CaCl₂および200μMチミジンを含む。この段階で、すべての培養のコロニー形成単位(CFU)を測定した。細胞および培養上清を3220×gで10分間の遠心分離により分離した。個々の構築物を運搬する菌株からの粗上清を並行して調製し、精製hTFF1を対照標準として用いてELISAにより分析した。分泌hTFF1の量をng/mlおよびng/10⁹CFUとして表した。すべての菌株を並行して処理した。

40

【0222】

図7bにバイシストロン性発現カセットを含む菌株(sAGX0276)が対照標準菌株(sAGX0085)より有意に高いカーゴ発現を有することが示されている。分泌hTFF1発現の量は、hTFF1をrpmDを介してgapBに結合させた場合、実質的に増大した(ml当たり>5倍;CFU当たり>12倍)。

【実施例7】

50

【 0 2 2 3 】

エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) ゲノムからの遺伝子間領域の選択

図 8 に示すように、エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) 株 L M G 1 5 7 0 9 (Enterococcus faecium [Orla-Jensen 1919] Schleifer and Kilpper-Balz 1 984 VP; LMG15709; ATCC6057; DSM2146; NCIMB8842) の対数末期培養の細胞タンパク質をタンパク質ゲル上でクーマシーブルー染色により視覚化した。レーン A、B および C は、それぞれエンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) L M G 1 5 7 0 9 の 2 8 4 μ l、1 4 2 μ l および 5 6 . 8 μ l の対数末期培養の溶解細胞相当物の細胞タンパク質を含んでいた。レーン C からの 1 2 の明確なタンパク質バンドをゲルから単離した。タンパク質を単離し、遺伝子間領域を以下により同定した。

1) 部分的ペプチド配列決定 (N A L D I - T O F / T O F) ならびにペプチドの質量および配列の複合情報を用いたデータベース検索による断片における多量に発現したタンパク質の同定

2) オペロンに存在する多量に発現したタンパク質 (1) をコードする遺伝子のエンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) P C 4 . 1 の染色体配列 (N C B I Genome d a t a b a n k から検索、G e n B a n k 寄託番号 A D M M 0 1 0 0 0 0 0 0) を用いた同定、ただし、「第 1 の遺伝子」としてでない

3) これらの多量に発現した遺伝子に先行する遺伝子間領域の同定 (表 5)

【 0 2 2 4 】

表 5 にエンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) L M G 1 5 7 0 9 における同定された遺伝子間領域を示す。下線を引いた配列は、リボソーム結合部位である。

【 0 2 2 5 】

【表 5】

表5

遺伝子間領域	第2遺伝子	第2遺伝子の機能
TAATC (配列番号8)	<i>rplP</i>	50Sリボソームタンパク質 L16
TAAGGAGGACAACAATA (配列番号9)	<i>rpmD</i>	50Sリボソームタンパク質 L30
TAATAGGAGGGAATTTCA (配列番号10)	<i>rplM</i>	50Sリボソームタンパク質 L13
TTAGAAGAAGGAGGAATACCATTC (配列番号11)	<i>rpsE</i>	30Sリボソームタンパク質 S5
TAAAAGTTTAAGGAAGGAGGGTCTTACTGA (配列番号12)	<i>rplE</i>	50Sリボソームタンパク質 L5
TAATCAAGTAGAATCTACAAGGAGGTGTCTTTA A (配列番号13)	<i>rplF</i>	50Sリボソームタンパク質 L6

【実施例 8】

【 0 2 2 6 】

バイシストロン性発現のためのエンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) ゲノムにおける部位の選択

表 6 に高レベル発現を推進するものとして実施例 7 で同定された高度に発現したエンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) 遺伝子を示す。これらの遺伝子を促進するプロモーターは、外因性遺伝子のポリシストロン性発現のための標的部位として用いることができる。これらの内因性遺伝子はさらに、下流外因性遺伝子に遺伝子間領域を介して転写可能または翻訳可能に結合されたポリシストロン性発現モジュールにおける第 1 の遺伝子として用いることができる。

【 0 2 2 7 】

【表 6 - 1】

表6

バンド	遺伝子アノテーション	名称
1	エノラーゼ[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)DO];gi 69249235	<i>eno</i>
	伸長因子Tu[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)TX13330];gi 227550718	<i>tuf</i>
2	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)TX13330];gi 227552066	<i>gap</i>
3	L-乳酸デヒドロゲナーゼ[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)DO];gi 69245441	<i>ldh</i>
	アスパラギン酸カルバモイルトランスフェラーゼ[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)DO];gi 69247601	<i>pyrB</i>
	リボースリン酸ピロホスホキナーゼ[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)DO];gi 69245416	
4	ピルビン酸キナーゼ[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)DO];gi 69247355	<i>pyk</i>
	オリゴエンドペプチダーゼF[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)E1039];gi 293553061	<i>pepF</i>
	アスパルチル-tRNAシンテターゼ細菌/ミトコンドリア型[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)DO];gi 69247937	<i>aspS</i>
5	リシル-tRNAシンテターゼ[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)TX1330];gi 227552660	<i>lysS</i>
	GroEL[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)];gi 35187728	<i>groEL</i>
6	ホスホグリセリン酸キナーゼ[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)E1039];gi 293557157	<i>pgk</i>
7	フルクトース-ビスリン酸アルドラーゼクラス I I [エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)1,230,933];gi 293557157	
	2,3-ビスホスホグリセリン酸依存性ホスホグリセリン酸ムターゼ[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)E1039];gi 293556592	
	Saicarシンテターゼ[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)1,141,733];gi 257887626	<i>purC</i>
8	2,3-ビスホスホグリセリン酸依存性ホスホグリセリン酸ムターゼ[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)E1039];gi 293556592	
	Saicarシンテターゼ[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)1,231,501];gi 257884790	<i>purC</i>
9	50Sリボソームタンパク質L5[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)DO];gi 69247181	<i>rplE</i>
	50Sリボソームタンパク質L6[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)DO];gi 69247184	<i>rplF</i>
	ペルオキシレドキシン[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)TX1330];gi 227551517	<i>aphC</i>
	キサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ[エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)1,230,933];gi 25787081	

10

20

30

40

【表 6 - 2】

10	伸長因子G[エンテロコッカス・フェシウム(<i>Enterococcus faecium</i>)TX1330];gi 227550717	<i>fusA</i>
11	30Sリボソームタンパク質S5、細菌およびオルガネラ形[エンテロコッカス・フェシウム(<i>Enterococcus faecium</i>)DO];gi 69247186	<i>rpsE</i>
	50Sリボソームタンパク質L16[エンテロコッカス・フェシウム(<i>Enterococcus faecium</i>)];gi 9931590	<i>rplP</i>
	ユニバーサルストレスタンパク質ファミリー[エンテロコッカス・フェシウム(<i>Enterococcus faecium</i>)E980];gi 293571359	
	フェリチン[エンテロコッカス・フェシウム(<i>Enterococcus faecium</i>)1,230,933];gi 257880413	
	30Sリボソームタンパク質S7[エンテロコッカス・フェシウム(<i>Enterococcus faecium</i>)TX1330];gi 227550716	<i>rpsG</i>
	50Sリボソームタンパク質L13[エンテロコッカス・フェシウム(<i>Enterococcus faecium</i>)1,230,933];gi 257880414	<i>rplM</i>
12	M20ファミリーペプチダーゼPepV[エンテロコッカス・フェシウム(<i>Enterococcus faecium</i>)TX1330];gi 227550917	<i>pepV</i>
	グルタミル-tRNAシンテターゼ細菌/ミトコンドリア[エンテロコッカス・フェシウム(<i>Enterococcus faecium</i>)DO];gi 69245495	<i>gltX</i>
	細胞分裂タンパク質FtsA[エンテロコッカス・フェシウム(<i>Enterococcus faecium</i>)DO];gi 69244711	<i>ftsA</i>
	アスパラギニル-tRNAシンテターゼ、クラスIIb[エンテロコッカス・フェシウム(<i>Enterococcus faecium</i>)DO];gi 69247321	<i>asnC</i>

10

20

【0228】

そのような方法で、大腸菌 (*E. coli*) からの α -グルクロニダーゼ (*uidA*) 遺伝子をリポーター遺伝子としてエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) LMG15709に導入した。*uidA* 遺伝子産物 α -グルクロニダーゼは、組織化学的および分光光度測定基質として市販されている様々な α -グルクロニドの開裂を触媒する。図9に示すように、デュアルシストロン構築物は、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) LMG15709 染色体におけるいくつかの内因性遺伝子 (この実施例では遺伝子 *X*、*gap* および *eno*; 図9) の3'末端に *uidA* を挿入することにより作製した。これによって、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) の *rpmD* を表6からの対象の内因性遺伝子と *uidA* との間の遺伝子間領域として用いて、最高の α -グルクロニダーゼ (*GUS*) 活性をもたらす部位を同定した (図10)。

30

【0229】

エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) 培養を、チミジンを添加した GM17 中で30℃で16時間増殖させた。1mlの培養の細胞を洗浄し、1mlの脱鉱物化水に再懸濁した。細胞を、MP Biomedicals 溶解マトリックスBおよび *Fasprep-24* 装置を用いて6m/秒で40秒間破壊した。管を遠心分離し、細胞上清の希釈系列を調製した。*GUS* 活性は、*p*-ニトロフェニル基質および α -グルクロニダーゼの存在により溶液に黄色をもたらす α -メルカプトエタノールを加えることにより測定した。*GUS* 活性を405nmで測定し、対照標準ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) 株 *sAGX0090* に対して相対的に表した。すべての菌株を並行して処理した。

40

【0230】

図10に遺伝子 *X* > *rpmD* > *uidA* デュアルシストロン構築物の相対 *GUS* 活性を示す。*GUS* 活性は、*Ph11A* > *uidA* 発現カセットを運搬する対照標準菌株 *sAGX0090* に対して相対的に表し、Y軸上に示す。すべてのデュアルシストロン菌株における *GUS* 活性は、対照標準菌株より高いことが認められた。

【0231】

特に、*sAGX0270* (*gap* > *rpmD* > *uidA*) および *sAGX0271*

50

(*eno* >> *rpmD* >> *uidA*) における GUS 活性は、それぞれ *sAGX0090* と比較したとき 30.6 および 26.9 倍高いことがわかった。

【0232】

これらの結果は、バイシストロン性発現が様々な状況にわたってタンパク質発現レベルの増大をもたらすことを明確に確認するものである。

【実施例 9】

【0233】

エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) によるヒトインターロイキン 10 (*hIL10*) のバイシストロン性発現

hIL10 の分泌を得るために、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) の *usp45* 分泌リーダーの DNA コーディング配列 (*SS*) を成熟 *hIL10* の DNA 配列にフレームで融合させた。[*SS* : : *hIL10*] 発現カセットを *SS* : : *hIL10* に先行するエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) の *rpmD* 遺伝子間領域とともに、*gap* から下流の第 2 のシストロンとして挿入した (*sAGX0279* ; 図 11a)。*hIL10* 分泌能力を *ELISA* により定量して、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) におけるカーゴのバイシストロン性発現を評価した。エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) *sAGX0270* を陰性対照とした。

【0234】

菌株を単一コロニーから必要な場合に 200 μ M チミジンを添加した 10 ml の GM17 (GM17T) 中に接種し、30 で 16 時間増殖させた。*hIL10* 分泌の定量のために、これらの飽和一夜培養を 5 ml の新鮮 GM17T 培地で 1/25 に希釈し、30 で 4 時間増殖させた。細胞を、3220 \times g で 10 分間の遠心分離により収集し、等量の BAM9T 培地に再懸濁し、30 でさらに 3 時間培養した。BAM9T は、M9 塩、0.5% アミノプラスマル、0.5% グルコース、25 mM NaHCO_3 、25 mM Na_2CO_3 、2 mM MgSO_4 、0.1 mM CaCl_2 および 200 μ M チミジンを含む。細胞および培養上清を 3220 \times g で 10 分間の遠心分離により分離した。培養上清中の分泌ヒト *hIL10* の量を サンドイッチ *hIL10 ELISA* により定量した。すべての菌株を並行して処理した。

【0235】

図 11b にエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) 株 *sAGX0270* および *sAGX0279* により分泌されたヒト *hIL10* の定量を示す。分泌された *hIL10* の量を 3 時間における $\text{ng} / 10^9 \text{ CFU}$ として表し、Y 軸上に示す。図からバイシストロン性発現カセットを含むエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) 株がかなりの量のカーゴタンパク質 *hIL10* を分泌することができることが明瞭にわかる。

【実施例 10】

【0236】

エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) によるヒトインターロイキン 27 (*hIL27*) のバイシストロン性発現

hIL27 の分泌を得るために、ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) の *usp45* 分泌リーダーの DNA コーディング配列 (*SS*) を成熟 *hIL27* の DNA 配列にフレームで融合させた。[*SS* : : *hIL27*] 発現カセットを *SS* : : *hIL27* に先行するエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) の *rpmD* 遺伝子間領域とともに、*gap* から下流の第 2 のシストロンとして挿入した (*sAGX0317* ; 図 12a)。*hIL27* 分泌能力を *ELISA* により定量して、*hIL27* のバイシストロン性発現を評価した。エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) *sAGX0270* を陰性対照とした。

【0237】

菌株を単一コロニーから 200 μ M チミジンを添加した 10 ml の GM17 (GM17

T) 中に接種し、30 で16時間増殖させた。h I L 2 7 分泌の定量のために、これらの飽和一夜培養を5 m l の新鮮 G M 1 7 T 培地で1 / 2 5 に希釈し、30 で4時間増殖させた。細胞を、3 2 2 0 × g で10分間の遠心分離により収集し、等量の B M 9 T 培地に再懸濁し、30 でさらに3時間培養した。B M 9 T は、M 9 塩、0 . 5 % カジトン、0 . 5 % グルコース、2 5 m M N a H C O ₃、2 5 m M N a ₂ C O ₃、2 m M M g S O ₄、0 . 1 m M C a C l ₂ および200 μ M チミジンを含む。細胞および培養上清を3 2 2 0 × g で10分間の遠心分離により分離した。培養上清中の分泌ヒト h I L 2 7 の量をサンドイッチ h I L 2 7 E L I S A (R & D s y s t e m s) により定量した。すべての菌株を並行して処理した。

【0238】

10

図12bにエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) 株 s A G X 0 2 7 0 および s A G X 0 3 1 7 により分泌されたヒト h I L 2 7 の定量を示す。分泌された h I L 2 7 の量を3時間における n g / 1 0 ⁹ C F U 細胞として表し、Y 軸上に示す。図からエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) g a p 遺伝子の下流に位置したバイシストロン性発現カセットを含むエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) 株 s A G X 0 3 1 7 がかなりの量の外因性タンパク質 h I L 2 7 を効率的に分泌することができることが明瞭にわかる。

【実施例11】

【0239】

エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) による C D P 8 7 0 F a b のバイシストロン性発現

20

C D P 8 7 0 F a b の重鎖および軽鎖遺伝子を用いてデュアルシストロン発現構築物を作製した。すべての発現ユニットは、細菌染色体上に位置している。

【0240】

図13a: 配列 [S S : : C D P 8 7 0 V H C H 1] および [S S : : C D P 8 7 0 V L C L) をコードするラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) M G 1 3 6 3 u s p 4 5 分泌リーダー (S S) との C D P 8 7 0 重および軽鎖 F a b 融合体を、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) L M G 1 5 7 0 9 g a p 遺伝子から下流に第2および第3のシストロンとして挿入した (s A G X 0 2 7 8) 。 s A G X 0 2 7 8 において、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) r p m D の遺伝子間領域を用いて S S : : C D 8 7 0 発現カセットを g a p に結合させた。遺伝的不安定性を避けるために、重および軽鎖遺伝子をラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) r p m D に先行する遺伝子間領域を介して結合させ、異なるコドン使用頻度を2つの S S : : C D 8 7 0 発現カセットの u s p 4 5 分泌シグナルに用いた。重鎖発現カセットが s A G X 0 2 7 8 における軽鎖発現カセットに先行する。

30

【0241】

C D P 8 7 0 f a b 分泌の定量のために、菌株を単一コロニーから10 m l の G M 1 7 T 中に接種し、30 で16時間増殖させた。これらの飽和一夜培養を5 m l の新鮮 G M 1 7 T 培地で1 / 2 5 に希釈し、30 で4時間増殖させた。細胞を、3 2 2 0 × g で10分間の遠心分離により収集し、等量の B A M 9 T 培地に再懸濁し、30 でさらに3時間培養した。B A M 9 T は、M 9 塩、0 . 5 % アミノプラスマル、0 . 5 % グルコース、2 5 m M N a H C O ₃、2 5 m M N a ₂ C O ₃、2 m M M g S O ₄、0 . 1 m M C a C l ₂ および200 μ M チミジンを含む。細胞および培養上清を3 2 2 0 × g で10分間の遠心分離により分離した。個々の構築物を運搬する菌株からの粗上清を並行して調製し、T N F 結合活性の存在について分析した。これは、ヒト T N F を捕捉タンパク質として用い、C i m z i a (登録商標) (P E G に連結した C D P 8 7 0 f a b) を対照標準として直接 E L I S A により行った。C D P 8 7 0 f a b は、ヤギ抗ヒト F a b 抗血清により検出し、H R P コンジュゲートロバ抗ヤギ I g G (H + L) 抗血清により示した。H R P 活性を T M B 基質により視覚化した。反応は、30分後に H C l を加えることにより停止させた。吸光度は、595 n m を参照波長として450 n m で測定した。すべての

40

50

菌株を並行して処理した。

【0242】

図13bから重鎖および軽鎖がエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) における多シストロン構築物により発現し、機能性CDP870抗TNF Fabの分泌につながったことがわかる。

【実施例12】

【0243】

抗hTNF産生L・ラクティス (*L. lactis*) 細菌 (本発明による) がA20IEC-KOマウスにおけるhTNF誘発性腸損傷を防御する

組織特異的A20欠損マウスの作製

tnfaip3遺伝子のエクソンIVおよびVが2つのLoxP部位により隣接されている、条件付きA20/tnfaip3ノックアウトマウスを記載されたように作製した (Piguetら、1999年、Lab Invest、79巻、495~500頁)。A20フロックスマウスをVil1lin-Creトランスジェニックマウスと交配して、IEC特異的A20ノックアウトマウス (A20^{IEC-KO}) を作製した (Madisonら、2002年、J Biol Chem、277巻、33275~33283頁)。実験は、少なくとも4世代にわたってC57BL/6遺伝的バックグラウンドに戻し交配されたマウスにおいて実施した。

【0244】

in vivo TNF毒性

マウスに各種用量のhTNF (50、10、8、6、4および2 µg hTNF/20 g体重) をi.p.注射した。大腸菌 (*E. coli*) 由来組換えhTNFは、 6.8×10^7 IU/mgの比活性を有していた。ヒトTNFは、我々の研究室で産生させ、均一になるまで精製したところ、エンドトキシンレベルは、1 ng/mgのタンパク質を超えなかった。A20IEC-KOマウスにおけるhTNF注射により、腸損傷を示すいくつかの病理学的および免疫学的変化が誘発される。低用量のhTNFは、高度な全身性の影響および致死性をもたらさないが、血清および小腸のホモジネートの両方において測定することができる炎症誘発性サイトカインおよびケモカイン発現を誘導する。マウスは、組織学的分析のために4または5時間後に安楽死させた。治療試験のために、A20^{IEC-KO}マウスにhTNF (2 µgおよび6 µg hTNF/20 g体重) の腹腔内注射の前に抗TNF産生L・ラクティス (*L. lactis*) 細菌 (本発明による) を経口強制投与により5回投与した (30分間隔で 5×10^{10} CFU)。対照群は親L・ラクティス (*L. lactis*) 株MG1363または細菌培地BM9T (媒体) で処置した。さらに、陽性対照群をレミケード (30 mg/kg) の単回注射により処置した。体温を毎時モニターした。

【0245】

組織試料の調製

新たに単離した結腸および回腸セグメントをPBSでフラッシュして、糞内容物を除去し、その後ホルマリン (リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中4%ホルムアルデヒド) でフラッシュし、10倍過剰のホルマリン中で4で一夜のインキュベーションにより固定した。ホルマリンを除去し、標準的な方法でパラフィンワックスに包埋する前に腸をPBSで2回洗浄した。

【0246】

組織学

4 µmの組織切片を切りだし、標準的な技法を用いてヘマトキシリン/エオシンで染色した。複合アルシアンブルー (AB) およびPAS染色のために、脱ろう切片を蒸留水に水和し、アルシアンブルー中で20分間インキュベートした。その後、切片を1%過ヨウ素酸中で10分間インキュベートした後、シッフ試薬中で10分間インキュベートした。核をMayerのヘマトキシリンで30秒間対比染色した。アルカリホスファターゼの検出は、暗所でNBT/BCIP溶液中での脱ろうおよび水和組織切片のインキュベーションにより実施した (70 µl NBT + 70 µl BCIP + 4860 µl 緩衝液A、NBT = 70%ジメチルホルムアミド中1.5%塩化ニトロブルーテトラゾリウム溶液、B

10

20

30

40

50

CIP = 100% ジメチルホルムアミド中1% 5 - ブロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスファターゼ、緩衝液 A = 0.1 M TrisHCl、0.1 M NaCl、0.05 M MgCl₂、pH 9.5)。免疫化学のために、切片を脱ろうし、Dako 抗原性賦活化溶液中でインキュベートし、Pick 細胞クッキングユニット (cell cooking unit) 中で20分間煮沸し、2.5時間にわたって冷却した。スライド標本をペルオキシダーゼブロッキング緩衝液 (0.040 M クエン酸、0.121 M リン酸水素二ナトリウム、0.030 M アジ化ナトリウム、1.5% 過酸化水素) 中に室温で15分間にわたり浸漬することにより、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。ブロッキング緩衝液 (PBS 中1% ウシ血清アルブミン) を室温で30分間スライド標本に加えた。一次抗体 (ウサギ抗リゾチーム; 1:1, 750 希釈 - Dako; ウサギ抗ムチン2; 1:500 22) をブロッキング緩衝液に加え、組織切片を一夜インキュベートした。二次抗体 (ポリマー西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ、Envision) を室温で30分にわたって加えた。ジアミノプテン酸 (DAB) 基質を室温で10分間加えることによってペルオキシダーゼを検出し、核をMayerのヘマトキシリンで2分間対比染色した。パネート (Paneth) 細胞顆粒の半径の顕微鏡による測定は、Leica Image manager 500 ソフトウェアを用いて行った。

【0247】

サイトカインの定量

血清および組織ホモジネート中のサイトカインおよびケモカインをCellQuest Pro および CBA ソフトウェア (BD Biosciences) を搭載した FAC S Calibur サイトメーターで Cytometric Bead Array キット (CBA) (BD Biosciences) により定量した。

【0248】

定量的実時間 PCR

長さ5cmの回腸セグメントを新たに単離し、PBSでフラッシュして、糞内容物を除去した。一端を結紮し、セグメントにRNA溶解緩衝液 (Aurum Total RNA Miniキット、Bio-Rad Laboratories) を満たし、氷上で5分間インキュベートした。Aurum Total RNA Miniキット (Bio-Rad Laboratories) を用いて、RNAを溶解物溶液から精製した。cDNA合成は、iScript cDNA合成キット (Bio-Rad Laboratories) を用いて製造業者の指示に従って実施した。LightCycler 480 (Roche) 上で LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche) および特異的プライマーを用いて、10 µl の総容積で、10 ng の cDNA を定量的 PCR に用いた。実時間 PCR 反応を3連で実施した。次のマウス特異プライマーを用いた: ユビキチンフォワード、5' - AGGTCAACAAGGAAGACAGACGTA - 3' (配列番号14); ユビキチンリバー、5' - TCACACCCAAAGAACAAAGCACAA - 3' (配列番号15)。リゾチームPフォワード、5' - GCCAAGGTCTAACAATCGTTGTGAGTTG - 3' (配列番号16); リゾチームPリバー、5' - CAGTCAGCCAGCTTGACACCACG - 3' (配列番号17); クリプチジン1フォワード、5' - TCAAGAGGCTGCAAAAGGAAGAGAAC - 3' (配列番号18); クリプチジン1リバー、5' - TGGTCTCCATGTTTCAGCGACAGC - 3' (配列番号19)。

【0249】

統計解析

結果は、平均値 ± SEM として表す。実験群間の統計的有意性は、対応のない2標本 Student の t 検定を用いて評価した。

【0250】

A20IEC - KO マウスにおける hTNF 誘発性病理学的および免疫学的変化を防御する抗 hTNF 産生 L. ラクティス (L. lactis) 細菌の特徴付け

2 µg の hTNF を注射した両対照群は、抗 hTNF 産生 L. ラクティス (L. lactis

細菌で処置した A 2 0 I E C - K O マウスと比較して大幅な体温の低下を示した (図 1 4 a、左パネル)。2 μ g の h T N F で処置したマウスで認められた s A G X 0 2 2 0 投与の防御効果は、マウスにより高い濃度の h T N F (6 μ g) を注射した場合にもはや認めることができなかったが、レミケードでの処置は、防御効果を明らかに示した (図 1 4 a、右パネル)。s A G X 0 2 2 0 の前投与は、媒体処置マウスと比較して、2 μ g の h T N F で処置したマウスの回腸および結腸ホモジネート中ならびに血清中の M C P - 1、K C および I L - 6 レベルを有意に低下させた (図 1 4 b、c)。しかし、親 L . ラクティス (L . lactis) 株 M G 1 3 6 3 で処置したマウスにおいて同等の低下があり、細菌自体の投与が既にプロバイオティック防御効果を有し得ることがわかる。6 μ g の h T N F をチャレンジ投与したマウスは、s A G X 0 2 2 0 の前投与により、レミケードの投与と同程度に、血清および組織サイトカインおよびケモカインレベルの同様な低下を示した (図 1 4 d、e)。しかし、この状況において、親 M G 1 3 6 3 株の防御効果は、大部分失われている (図 1 4 d、e)。

【実施例 1 3】

【0 2 5 1】

ラクトコッカス・ラクティス (Lactococcus lactis) により局所的に産生され、分泌された毒素中和抗体によるクロストリジウム・ディフィシレ (Clostridium difficile) 関連疾患に対する受動免疫

a) C . ディフィシレ (C . difficile) 毒素 A および C . ディフィシレ (C . difficile) 毒素 B 中和 m A b の V L C L および V H C H 1 の遺伝子合成

常用の方法 (Stemmer ら、Gene、1995 年、164 巻 (1 号)、49 ~ 53 頁) に従って V H および V L アミノ酸配列情報に基づいて、デノボ遺伝子合成 (L . ラクティス (L . lactis) コドン使用頻度について最適化) を行う。この方法は、コーディング鎖のすべてのオリゴヌクレオチドが、非コーディング鎖における 2 つの連続オリゴヌクレオチドのそれぞれ最後および最初の 2 0 塩基対と 1 0 0 % 相補的である (逆もまた同様) ように、全コーディングならびに非コーディング鎖にわたる合成 4 0 量体オリゴヌクレオチドを利用する。

【0 2 5 2】

L . ラクティス (L . lactis) 未確認分泌 (unidentified secreted) 4 5 k D a タンパク質 (U s p 4 5) の分泌リーダーをコードする遺伝情報を V L C L および V H C H 1 遺伝子の 5 ' 末端に加える。

【0 2 5 3】

共役発現を保証するために、これらの合成 V L C L および V H C H 1 遺伝子をタンデムに配置し、r p m D 遺伝子間領域により結合させる。これが、機能性 V L C L > > V H C H 1 オペロンの形成をもたらす。C 末端 E および F L A G ペプチドタグもコードする上述の合成遺伝子の変異体も構築する。これは、全サイズおよび / または潜在的分解産物を視覚化し、軽鎖および重鎖アセンブリならびに毒素の結合の確認を可能にする。

【0 2 5 4】

得られた遺伝子構築物は、配列を確認する。

【0 2 5 5】

b) 毒素 A / B 中和 F a b を分泌する L . ラクティス (L . lactis) 株の構築 : U s p 4 5 遺伝子座における組込み

この課題は、以下の段階からなる。

1 . 以下の u s p 4 5 遺伝子座の下流の組込みのための組込みベクターの構築

- ・ C . ディフィシレ (C . difficile) 毒素 A 中和 M a b の V L C L > > V H C H 1
- ・ C . ディフィシレ (C . difficile) 毒素 B 中和 M a b の V L C L > > V H C H 1
- ・ 上述のものの 3 ' E および F L A G 標識変異体

合成 V L C L > > V H C H 1 オペロンは、L . ラクティス (L . lactis) u s p 4 5 遺伝子の 3 ' 末端の 1 k b とそれに続く r p 1 N 遺伝子間領域によって 5 ' 末端において隣接されている。V L C L > > V H C H 1 オペロンは、L . ラクティス (L . lactis) u s p 4 5 遺伝子の 3 ' 下流フランキング領域の 1 k b 断片によって 3 ' 末端において隣接さ

10

20

30

40

50

れている。構築物は、オーバーラップPCR DNAアニーリングにより作製される。得られたプラスミドは、配列が確認されている。

【0256】

2. 上述の作製された組込みプラスミドは、L. ラクティス (L. lactis) MG1363のusp45遺伝子への翻訳可能な結合による組込みのために用いられる。組込みは、5'および3'フランキンク領域(usp45の3'末端に隣接する1kb領域に対応する)の両方における二重相同的組換えによって行われ、PCRおよびDNA配列決定により確認される。

【0257】

c) 毒素A/B中和Fabを分泌するL. ラクティス (L. lactis) 株の構築: enoA遺伝子座における組込み

10

この課題は、以下の段階からなる。

1. 以下のenoA遺伝子座の下流の組込みのための組込みベクターの構築

- ・ C. ディフィシレ (C. difficile) 毒素A中和MabのVLCCL>>VHCH1
- ・ C. ディフィシレ (C. difficile) 毒素B中和MabのVLCCL>>VHCH1
- ・ 上述のものの3'EおよびFLAG標識変異体

課題7からの合成VLCCL>>VHCH1オペロンは、L. ラクティス (L. lactis) enoA遺伝子の3'末端の1kbとそれに続くrplN遺伝子間領域によって5'末端において隣接されている。VLCCL>>VHCH1オペロンは、L. ラクティス (L. lactis) enoA遺伝子の3'下流フランキンク領域の1kb断片によって3'末端において隣接されている。構築物は、オーバーラップPCR DNAアニーリングにより作製される。得られたプラスミドは、配列が確認されている。

20

【0258】

2. 上述の作製された組込みプラスミドは、L. ラクティス (L. lactis) MG1363のenoA遺伝子への翻訳可能な結合による組込みのために用いられる。組込みは、5'および3'フランキンク領域(enmAの3'末端に隣接する1kb領域に対応する)の両方における二重相同的組換えによって行われ、PCRおよびDNA配列決定により確認される。

【0259】

d) CDADのTopAct (商標) 適合性ハムスターモデルの確立

30

CDADのハムスターモデルは、毒素誘発性抗生物質関連下痢および大腸炎の研究のための十分に確立されたモデルである。ハムスターにおけるC. ディフィシレ (C. difficile) 感染症の最も広範に研究されたモデルは、一次チャレンジモデルである。手短かに述べると、ハムスターの結腸における正常細菌叢を破壊するためのC. ディフィシレ (C. difficile) 胞子の投与の24時間前に、ハムスターにクリンダマイシン(10~30mg/kg)を経口胃内経路により(orogastrically)前投与する。C. ディフィシレ (C. difficile) 胞子(例えば、株630またはB1の100個の胞子; Gouldingら、Infect Immun、2009年、77巻(12号)、5478~5485頁)を経口胃内投与し、ハムスターを観察する(CDAD一次チャレンジモデル)。一般的に、ハムスターの100%が、胞子の投与後36時間から72時間までの間に疾患のために死亡する。死亡の前には、疾患の症状は、下痢および体重減少を含む。一般的に、症状は、ヒトに見られるものよりもはるかに重症であるが、ハムスターモデルは、バンコマイシンによる治療などの臨床的疾患に用いられる治療戦略に反応する。したがって、CDADの研究に広く用いられている。

40

【0260】

CDAD再発コントロールをシミュレートするために、修正された一次疾患ハムスターモデルを用いる。バンコマイシンは、ヒトにおけるのと同様に、ハムスターをC. ディフィシレ (C. difficile) 疾患から保護する。バンコマイシン治療を中止した場合、ハムスターは重度の疾患を再発するが、発病率は異なる。手短かに述べると、ハムスターにクリンダマイシンの単回投与を行い、続いて、1日後にC. ディフィシレ (C. difficile) 株B1胞子を経口胃内投与する。バンコマイシン治療は、胞子チャレンジの当日または24

50

時間後に開始し、その後2～4日間毎日続ける(CDAD再発モデル)。このプロトコルは、バンコマイシンによる救助の後の再発を保証するためにさらに最適化することができる。

【0261】

ハムスターにおける感染の一次および/または再発モデルにおける死亡の予防におけるL.ラクティス(L. lactis)により腸に送達された毒素中和Fabの恩恵を評価するために、L.ラクティス(L. lactis)の増殖およびFab産生能力に対するクリンダマイシンおよびバンコマイシンによる影響を実証することは重要である。したがって、Fab分泌L.ラクティス(L. lactis)株の生存率および代謝活性を測定するために、以下のようなin vitroおよび/またはin vivo研究を行う。

・ in vitro評価：クリンダマイシン/バンコマイシン添加L.ラクティス(L. lactis)培養からのFab産生(ELISAによる)および増殖(平板培養による)を、抗生物質不含有培養および5 µg/mlのクロラムフェニコール(Cm)を添加した培養と比較する。この濃度では、Cmは、L.ラクティス(L. lactis)が感受性を示す、タンパク質合成および増殖の公知の阻害剤である。

・ in vivo評価：ハムスターへの強制経口投与および各種用量のクリンダマイシン/バンコマイシンとの併用投与後のFab産生(ELISAによる)および生存率(平板培養による)を小/大腸において測定する。

【0262】

これらの評価は、それらの予防および治療効果についてL.ラクティス(L. lactis)送達システムの評価に十分に適する、すなわち、L.ラクティス(L. lactis)の生存率および代謝活性に対する負の影響なしに、C.ディフィシレ(C. difficile)感染症に対する感受性を示す、(より低い)クリンダマイシン(およびバンコマイシン)濃度および/または抗生物質の異なるカクテルを用いるCDADのハムスターモデル(チャレンジおよび再発)をデザインし、適用することを可能にする。

【0263】

e) CDADのハムスターモデルのバリデーション

ハムスター一次チャレンジモデルにおいて、シリアンゴールデンハムスター(70～80 g)にC.ディフィシレ(C. difficile)胞子の投与の3日前から開始して4日間にわたり選択される抗毒素A/B分泌L.ラクティス(L. lactis)(抗毒素Aおよび抗毒素B単独ならびに併用)の各種経口投与(qd、bidもしくはtid)を行うか、または1 mlの抗毒素A/B mAb(陽性対照として)を腹腔内投与する。クリンダマイシン(上記で定義した抗生物質の用量または他のカクテル)は、標準的小動物給餌針を用いてC.ディフィシレ(C. difficile)胞子チャレンジの24時間前に経口胃内投与する。動物を病的状態および死亡について観察し、腸組織を組織学的および肉眼的損傷について評価し、腸管内容物および糞中のC.ディフィシレ(C. difficile)毒素の産生を測定する。

【0264】

ハムスター再発モデルにおいて、シリアンゴールデンハムスター(70～80 g)にクリンダマイシン(上で定義した抗生物質の用量または他のカクテル)を経口胃内投与し、24時間後にC.ディフィシレ(C. difficile)B1胞子を経口胃内経路でチャレンジ投与する。胞子投与時または24時間後に、バンコマイシン処置(上で定義した用量)を経口胃内経路で開始し、合計2～4日間にわたって毎日継続した。バンコマイシンの投与後1、2、3、4または5日目に開始して、合計5～10日間にわたり選択される抗毒素A/B分泌L.ラクティス(L. lactis)(抗毒素Aおよび抗毒素B単独ならびに併用)の各種経口投与(qd、bidもしくはtid)を行うか、または1 mlの抗毒素A/B mAb(陽性対照として、腹腔内)を投与する。動物を病的状態および死亡について観察し、腸組織を組織学的および肉眼的損傷について評価し、腸管内容物および糞中のC.ディフィシレ(C. difficile)毒素の産生を測定する。

【0265】

本発明によるグラム陽性細菌は、C D A Dに対する免疫化に効果的に用いることができると結論することができる。特に、本発明によるグラム陽性細菌は、C D A Dの発生を防ぎ、C D A Dの再発を予防し、ならびにC D A Dを治療することができる。

【実施例 1 4】

【0 2 6 6】

再構成用口内洗浄粉末

口内洗浄剤の製剤原料 (D S) は、本発明による操作された菌株の均一な凍結乾燥粉末であり、凍結防止剤 (デキストリン、ソルビトールおよびグルタミン酸ナトリウム) と混合される。

【0 2 6 7】

製剤原料の製造工程は、次の連続するステップを含む：発酵、バイオマス濃縮 (ダイアフィルトレーション (diafiltration) 遠心分離)、凍結防止剤を用いた製剤化、適切なトレーへの充填およびバルク凍結乾燥。凍結乾燥ケーキの均質化およびふるい分けは、賦形剤との混合および所望の医薬剤形への充填に適する均一な粉末 (製剤原料) を製造するために実施する。

【0 2 6 8】

再構成用の口内洗浄剤原料 (D P) 粉末は、賦形剤としてのマンニトールと混合された凍結乾燥 L . ラクティス (L . lactis) 細菌からなり、(圧縮) 粉末として提供される。臨床製剤は、口内洗浄剤の形態での経口、局所投与である。この口内洗浄剤懸濁液は、D P の選択される溶液への再構成により調製される。

【0 2 6 9】

再構成用の口内洗浄粉末の製造工程は、以下の一連の連続するステップを含む。

- ・ バルク D S をマンニトールと混合するステップ、
- ・ 5 0 0 m g の D P 粉末混合物を 5 0 0 m g の分散性粉末圧粉体に圧縮するステップ、
- ・ 圧縮粉末をガラスバイアルに充填するステップ、
- ・ 不正開封防止小児用安全ネジ蓋によりバイアルを閉鎖するステップ、および
- ・ アルミニウム (A l u) バッグにバイアルを包装するステップ。

【実施例 1 5】

【0 2 7 0】

C D P 8 7 0 のバイシストロン性発現

C D P 8 7 0 抗 T N F F a b の重鎖および軽鎖を用いて、デュアルシストロン発現構築物を作製した。すべての発現ユニットが細菌染色体上に位置する。

【0 2 7 1】

図 1 5 A、様々な菌株における C D P 8 7 0 抗 T N F 発現ユニットの概要図：配列 (S S : : C D P 8 7 0 V L C L および S S : : C D P 8 7 0 V H C H 1) をコードする u s p 4 5 分泌リーダーとの C D P 8 7 0 軽および重鎖 F a b 融合体を、u s p 4 5 (s A G X 0 3 0 9、s A G X 0 3 1 9)、e n o A (s A G X 0 2 7 5) および g a p B (s A G X 0 3 2 3、s A G X 0 3 2 6) から下流に第 2 および第 3 のシストロンとして挿入した。これらの菌株において、r p m D を用いて S S : : C D 8 7 0 遺伝子をそれぞれ u s p 4 5、e n o A または g a p B に結合させた。遺伝的不安定性を避けるために、軽および重鎖遺伝子を r p 1 N に先行する遺伝子間領域を介して結合させた。図 1 5 B および C において、s A G X 0 3 2 6 の 4 つの同一のクローン (クローン 1 ~ 4) を分析し、報告した。菌株は、実験を通して並行に処理した。

【0 2 7 2】

C D P 8 7 0 抗 h T N F 分泌の視覚化および定量的ために、菌株を単一コロニーから 1 0 m l の G M 1 7 T (D i f c o (商標) M 1 7、B D、S p a r k s、M D、+ 0 . 5 % グルコース + 2 0 0 μ M チミジン) 中に接種し、3 0 で 1 6 時間増殖させた。これらの飽和一夜培養からの細菌を 3 2 2 0 × g で 1 0 分間の遠心分離により収集し、1 0 m l の新鮮な G M 1 7 T 培地に再懸濁し、3 0 で 2 時間増殖させた。細菌および粗培養上清

10

20

30

40

50

を $3220 \times g$ で 10 分間の遠心分離により分離した。すべての菌株からの粗上清を並行して調製し、分析のために菌株ごとに分割した (図 15 B および C)。

【0273】

5 ml の容積の粗培養上清の全タンパク質含量をフェノールで抽出し、エタノールで沈殿させ、SDS-PAGE 試料緩衝液に再懸濁した。1 ml の粗培養上清の相当物をヤギ抗ヒト Fab を一次抗血清として用いてウエスタンブロットにより分析し、ウサギ抗ヤギ AP および NBT / BCIP 染色により明らかにした (図 15 B ; 菌株はそれぞれのレーンの右に示す)。

【0274】

個々の構築物を運搬する菌株からの粗上清を hTNF 結合活性の存在について分析した。これは、Cimzia を対照標準とし、hTNF を捕捉タンパク質として用いて直接 ELISA により行った。VLC L 部分は、ヤギ抗ヒト IgG 抗血清により検出され、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲート抗ヤギ抗血清により明らかにされた。HRP 活性は、比色分析により測定した。データを図 15 C に示し、菌株を各バーの下に示す。

10

【0275】

図 15 (B および C) で重鎖および軽鎖の両方がデュアルシストロン構築物により高度に発現し、これが、高レベルの機能性 CDP870 抗 TNF Fab につながったことがわかる。図 15 (B および C) で重および軽鎖遺伝子を enoA から下流に第 2 および第 3 のシストロンとして挿入した場合、usp45 の下流の挿入と比べたとき CDP870 抗 TNF 発現がわずかに増加したことがわかる。図 15 (B および C) でさらに重および軽鎖遺伝子を gapB から下流に第 2 および第 3 のシストロンとして挿入した場合、usp45 または enoA から下流の挿入と比べたとき CDP870 抗 TNF 発現が実質的に増加したことがわかる。

20

【0276】

比 hTNF 中和能力 (TNF 結合タンパク質の量当たりの生物学的活性) の測定のために、菌株を単一コロニーから 5 ml の GM17 T 中に接種し、30 で 16 時間増殖させた。これらの飽和一夜培養からの細菌を $3220 \times g$ で 10 分間の遠心分離により収集し、5 ml の BM9 T 培地に再懸濁し、30 で 2 時間増殖させた。細菌および粗培養上清を $3220 \times g$ で 10 分間の遠心分離により分離した。個々の菌株を運搬する菌株からの粗上清を並行して調製し、分析のために菌株ごとに分割した (図 15 D および E)。

30

【0277】

個々の構築物を運搬する菌株からの粗上清を TNF 結合活性の存在について分析した。これは、Cimzia を対照標準とし、ヒト TNF を捕捉タンパク質として用いて直接 ELISA により行った。VLC L 部分は、ヤギ抗ヒト IgG 抗血清により検出され、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲート抗ヤギ抗血清により明らかにされた。HRP 活性は、比色分析により測定した。すべての菌株は、並行に処理した。データを図 15 D に示し、菌株を各バーの下に示す。

【0278】

個々の構築物を運搬する菌株からの粗上清を TNF 中和活性の存在について分析した。これは、hTNF 感受性 WEHI 細胞をヒト TNF とともにインキュベートし、抗 TNF を加えることにより行った。抗 TNF は、hTNF を除去し、WEHI 細胞を細胞死から保護する。粗上清の 1 / 2 希釈系列ならびに対照標準 (63 ng / ml の Cimzia) を hTNF に曝した細胞培養に加えた。細胞死に対する影響を確認した。データを図 15 E に示し、菌株を各バーの下に示す。

40

【0279】

図 15 D で重鎖および軽鎖の両方がデュアルシストロン構築物により高度に発現し、これが、高レベルの機能性 CDP870 抗 TNF Fab につながったことがわかる。図 15 D で重および軽鎖遺伝子を gapB から下流に第 2 および第 3 のシストロンとして挿入した場合、usp45 の下流の挿入と比べたとき CDP870 抗 TNF 発現が実質的に増

50

加したことがわかる。

【 0 2 8 0 】

図 1 5 D および E に菌株 s A G X 0 3 2 3 および s A G X 0 3 2 6 の粗培養上清中の C D P 8 7 0 抗 T N F の比 T N F 中和能力 (T N F 結合タンパク質の量当たりの生物学的活性) が C i m z i a のそれと同じであることが示されている。

【実施例 1 6】

【 0 2 8 1 】

抗 h T N F F a b 断片を分泌する L . ラクティス (L . lactis) の有効性

実験の構成は、マウス T N F の非存在下で正常に調節されたヒト T N F 発現を有するトランスジェニックマウスである T g 1 2 7 8 T N F k o マウスに基づいている (Kefferら、EMBO.J、10巻、4025 ~ 4031 頁、1991 年) 。大腸炎は、1 回の皮膚前感作の後の 4 0 % エタノール中 4 % T N B S の直腸投与チャレンジにより誘発された。手短かに述べると、マウスを、背部の剃毛した 1 . 5 x 1 . 5 c m の皮膚の部位に 1 容量の 5 % T N B S + 4 容量の 4 : 1 アセトン : オリーブ油を適用することによって直腸内チャレンジの 7 日前 (- 7 日目) に感作した。チャレンジの当日 (0 日目) に、マウスを最初にケタミン / キシラジンにより麻酔し、その後、直腸内に 4 c m 挿入した柔軟なカテーテルを介して 1 0 0 μ l の 4 % T N B S / 4 0 % E t O H を投与した。結腸内の浣腸剤の均等な分布を保証するために、直腸チャレンジ直後の 3 0 秒間マウスを垂直位に保持した。

【 0 2 8 2 】

治療は、直腸 T N B S チャレンジの 1 日前 (- 1 日目) に開始し、さらに 4 日間 (+ 3 日目) 継続した。マウスの 3 群は、 10^{10} C F U の M G 1 3 6 3 (陰性対照) 、 10^{10} C F U の s A G X 0 3 0 9 または 1 0 μ g の C i m z i a (陽性対照) の胃内接種を 1 日 1 回受けた。0 日目に開始して毎日、マウスを体重、病的状態および生存についてモニターした。+ 3 日目にマウスを屠殺し、結腸試料および血清を組織学検査 (結腸) およびサイトカイン (結腸および血清) 分析のために採取した。

【 0 2 8 3 】

本発明の実施形態による菌株 (抗 h T N F 分泌 L . ラクティス (L . lactis) 株 s A G X 0 3 0 9) による治療は、野生型 L . ラクティス (L . lactis) 株 M G 1 3 6 3 と比較して高い生存率 (図 1 6 および表 7) を、また、驚くべきことに、C i m z i a で処置したマウスより高い生存率をもたらした。

【 0 2 8 4 】

【表 7】

表 7

生存率	L.ラクティス (L. lactis) sAGX0309	L.ラクティス(L. lactis) MG1363	Cimzia
1日目	100% (7/7)	100% (9/9)	100% (9/9)
2日目	86% (6/7)	89% (8/9)	89% (8/9)
3日目	86% (6/7)	56% (5/9)	78% (7/9)

【 0 2 8 5 】

マウスの体重も治療中に追跡し、図 1 7 に示す。図 1 7 から、体重減少は、C i m z i a による治療と比較して本発明の実施形態による菌株による治療後に低いことは明らかである。

【 0 2 8 6 】

結腸の組織学的状態も分析し、組織学的スコアを表 8 に従って割り当てた。結果を図 1 8 に示す。図 1 8 から、組織学的スコアの有意な改善と、したがって、結腸の病的状態の減少が、本発明の実施形態による菌株による治療後に明らかである。

【 0 2 8 7 】

【表 8】

表8

組織学的スコア	説明
0	炎症なし、上皮損傷なし
1	陰窩底部の周りの粘膜における炎症、上皮損傷なし
2	粘膜下の炎症、杯細胞の喪失を伴う軽度の上皮損傷
3	粘膜下の炎症、陰窩構造の局所的喪失
4	粘膜下の炎症、粘膜の拡大部位における陰窩構造の喪失

【 0 2 8 8 】

10

最後に、図 19 から、本発明の実施形態による菌株での処置が結腸における炎症誘発性サイトカインの分泌の抑制をもたらしたことは明らかである。

上記の開示によって提供される本願発明の具体例として、以下の発明が挙げられる。

〔 1 〕 ポリシストロン性発現ユニットを含むグラム陽性細菌であって、前記ポリシストロン性発現ユニットが、内因性遺伝子、および前記 1 つまたは複数の内因性遺伝子の 3' 末端に転写可能に結合された 1 つまたは複数の外因性遺伝子を連続して含み、前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子がポリシストロン性発現ユニットの最も 3' 側の遺伝子である、グラム陽性細菌。

〔 2 〕 ポリシストロン性発現ユニットを含む組換え核酸であって、前記ポリシストロン性発現ユニットが、グラム陽性細菌に対して内因性の遺伝子、および前記 1 つまたは複数の内因性遺伝子の 3' 末端に転写可能に結合された、グラム陽性細菌に対して外因性の 1 つまたは複数の遺伝子を連続して含み、前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子がポリシストロン性発現ユニットの最も 3' 側の遺伝子である、組換え核酸。

20

〔 3 〕 前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子が、免疫または免疫寛容を誘導するための抗原、非ワクチン原性の治療活性のあるポリペプチド、抗体または F a b などのその機能性断片、融合タンパク質または多量体タンパク質など、対象における治療または予防効果を有するタンパク質、ポリペプチドおよび / またはペプチドなどの産物をコードする、〔 1 〕に記載のグラム陽性細菌または〔 2 〕に記載の組換え核酸。

〔 4 〕 1 つまたは複数の外因性遺伝子が、免疫または免疫寛容を誘導するための抗原、非ワクチン原性の治療活性のあるポリペプチド、抗体または F a b などのその機能性断片、融合タンパク質または多量体タンパク質など、対象における治療または予防効果を有するタンパク質、ポリペプチドおよび / またはペプチドなどの産物をコードする、薬剤として使用するための、好ましくは対象への前記産物の投与または送達に使用するための、〔 1 〕に記載のグラム陽性細菌または〔 2 〕に記載の組換え核酸。

30

〔 5 〕 前記内因性遺伝子および前記 1 つまたは複数の外因性遺伝子がグラム陽性細菌に対して内因性であるプロモーターにより転写制御される、〔 1 〕、〔 3 〕もしくは〔 4 〕のいずれかに記載のグラム陽性細菌または〔 2 〕から〔 4 〕までのいずれかに記載の組換え核酸。

〔 6 〕 前記プロモーターが必須遺伝子プロモーター、構成的プロモーター、中心的代謝遺伝子プロモーターおよび / またはハウスキーピング遺伝子プロモーターである、〔 5 〕に記載のグラム陽性細菌または組換え核酸。

40

〔 7 〕 前記プロモーターがリボソーム遺伝子プロモーターである、〔 5 〕に記載のグラム陽性細菌または組換え核酸。

〔 8 〕 前記プロモーターが解糖系遺伝子プロモーターである、〔 5 〕に記載のグラム陽性細菌または組換え核酸。

〔 9 〕 前記プロモーターが前記グラム陽性細菌の *eno*、*usp45*、*gap*、*pyk*、*rpmB* および *rplS* のプロモーターからなる群から選択される、〔 5 〕に記載のグラム陽性細菌または組換え核酸。

〔 10 〕 前記内因性遺伝子がグラム陽性細菌における天然の染色体遺伝子座に位置する、〔 1 〕または〔 3 〕～〔 9 〕のいずれか 1 項に記載のグラム陽性細菌。

50

[1 1] 1つまたは複数の外因性遺伝子を前記遺伝子座に染色体上で組み込むことにより、好ましくは1つまたは複数の外因性遺伝子を前記遺伝子座における前記内因性遺伝子の3'に染色体上で組み込むことにより、前記内因性遺伝子が1つまたは複数の外因性遺伝子に転写可能に結合された、[1 0]に記載のグラム陽性細菌。

[1 2] 前記内因性遺伝子および前記1つまたは複数の外因性遺伝子が、前記グラム陽性細菌において活性な遺伝子間領域によって転写可能に結合されており、好ましくは前記遺伝子間領域が前記グラム陽性細菌に対して内因性である、[1]もしくは[3] ~ [1 1]のいずれか1項に記載のグラム陽性細菌または[2 ~ [9のいずれかに記載の組換え核酸。

[1 3] 前記遺伝子間領域が *r p l W*、*r p l P*、*r p m D*、*r p l B*、*r p s G*、*r p s E*、*r p l N*、*r p l M*、*r p l E*および*r p l F*に先行する遺伝子間領域からなる群から選択される、[1 2]に記載のグラム陽性細菌または組換え核酸。

[1 4] 好ましくは遺伝子間領域がグラム陽性細菌の内因性遺伝子間領域である、前記グラム陽性細菌に対して外因性の遺伝子に作動可能に連結されたグラム陽性細菌において活性な遺伝子間領域を含む、組換え核酸。

[1 5] 前記遺伝子間領域が *r p l W*、*r p l P*、*r p m D*、*r p l B*、*r p s G*、*r p s E*、*r p l N*、*r p l M*、*r p l E*および*r p l F*に先行する遺伝子間領域からなる群から選択される、[1 4]に記載の組換え核酸。

[1 6] 1つの外因性遺伝子が抗体またはその機能性断片の軽鎖 (V_L) をコードし、別の外因性遺伝子が抗体またはその機能性断片の重鎖 (V_H) をコードし、より好ましくは機能性断片が *F a b* である、[1]もしくは[3] ~ [1 3]のいずれか1項に記載のグラム陽性細菌または[2] ~ [9]もしくは[1 2] ~ [1 5]のいずれか1項に記載の組換え核酸。

[1 7] 前記 V_L またはその機能性断片をコードする外因性遺伝子が、前記 V_H またはその機能性断片をコードする外因性遺伝子の3'末端と転写可能に結合された、[1 6]に記載のグラム陽性細菌または組換え核酸。

[1 8] 前記グラム陽性細菌が、乳酸菌、好ましくはラクトコッカス属 (*Lactococcus*)、ラクトバシラス属 (*Lactobacillus*) もしくはエンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、より好ましくはラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) またはエンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*) であるか、または前記グラム陽性細菌がビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) である、[1]、[3] ~ [1 3]、[1 6]もしくは[1 7]のいずれか1項に記載のグラム陽性細菌または[2] ~ [9]もしくは[1 2] ~ [1 7]のいずれか1項に記載の組換え核酸。

[1 9] [1]、[3] ~ [1 3]または[1 6] ~ [1 8]のいずれか1項に記載のグラム陽性細菌を含む医薬組成物。

[2 0] 前記1つまたは複数の外因性遺伝子が、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドなどの産物をコードし、前記産物が対象における治療または予防効果を有する、[1 9]に記載の医薬組成物。

[2 1] [2] ~ [9]または[1 2] ~ [1 8]のいずれか1項に記載の組換え核酸を含むベクター。

10

20

30

40

【図 1】

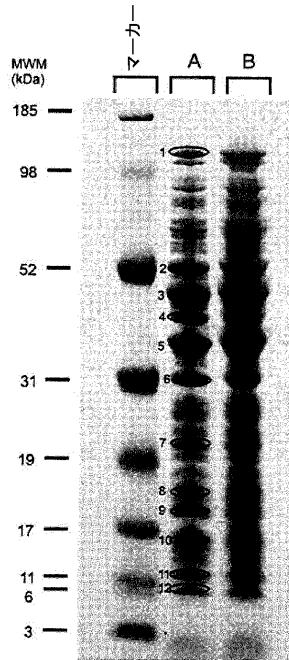


FIG 1

【図 2】

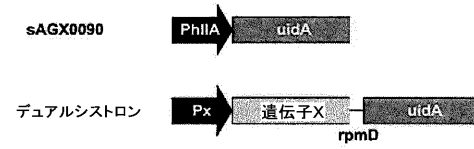


FIG 2

【図 3】

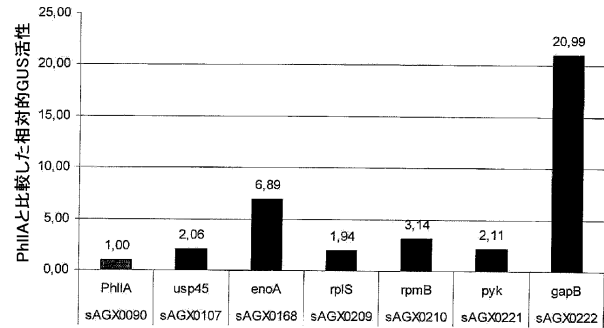


FIG 3

【図 4】

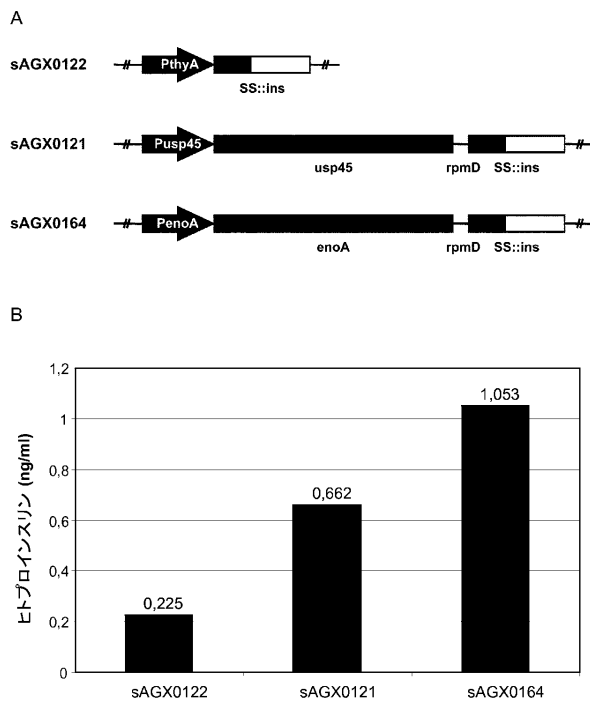


FIG 4

【図 5】

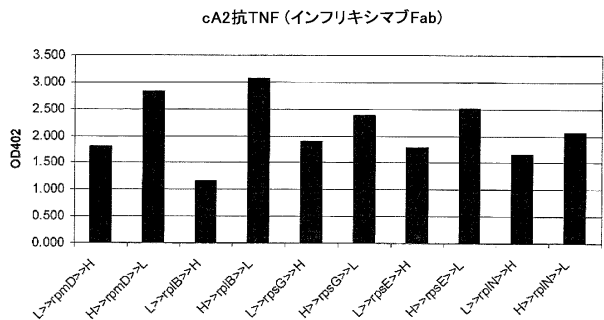


FIG 5

【図 6】

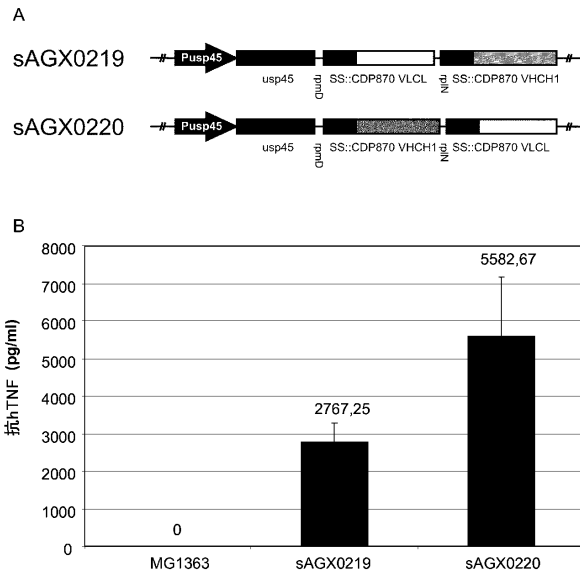


FIG 6

【図 7】

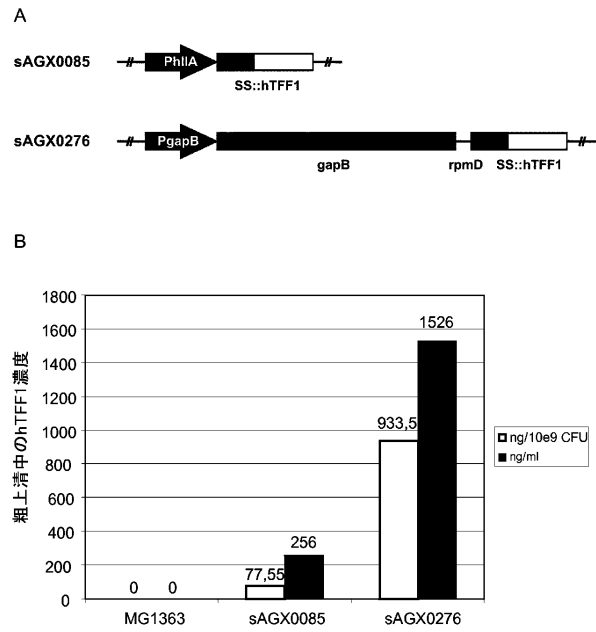


FIG 7

【図 8】

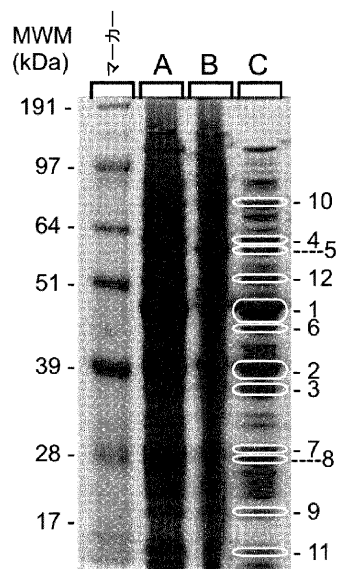


FIG 8

【図 9】

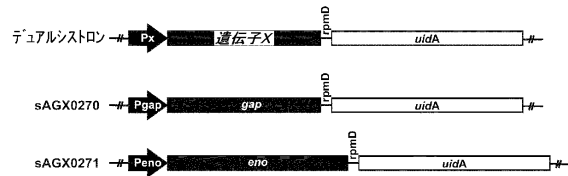


FIG 9

【図 10】

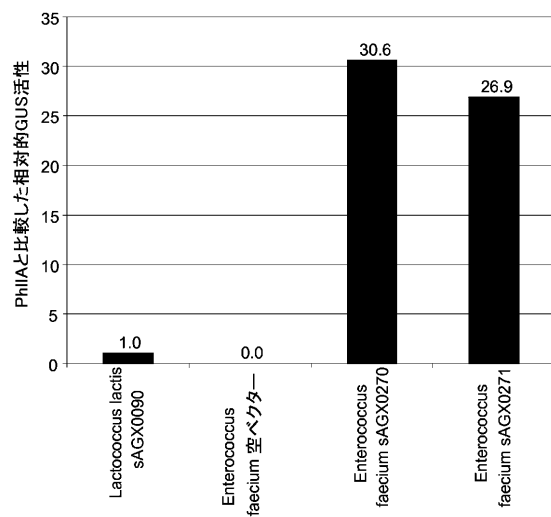


FIG 10

【図 1 1】

A



B

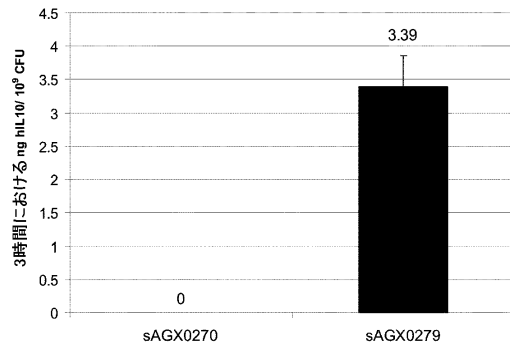


FIG 11

【図 1 2】

A



B

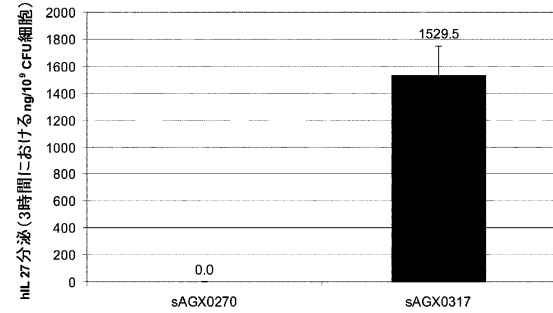


FIG 12

【図 1 3】

A



B

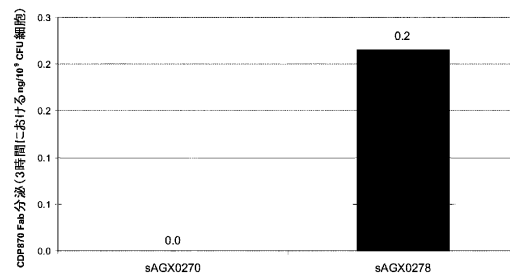
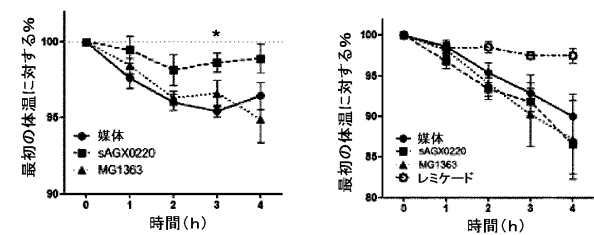


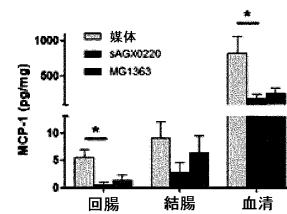
FIG 13

【図 1 4 - 1】

A



B



C

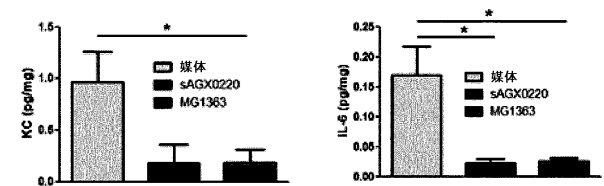
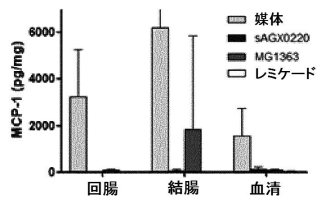


FIG 14

【図 14 - 2】

D



E

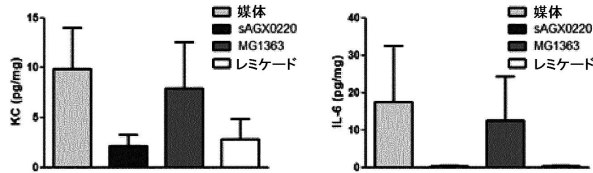
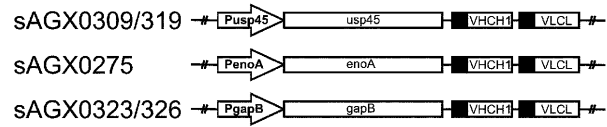


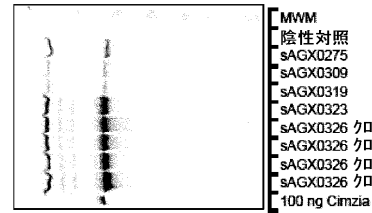
FIG 14 (続き)

【図 15 - 1】

A



B



C

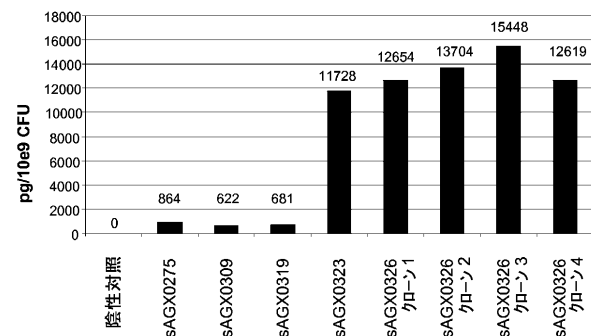


FIG 15

【図 15 - 2】

D

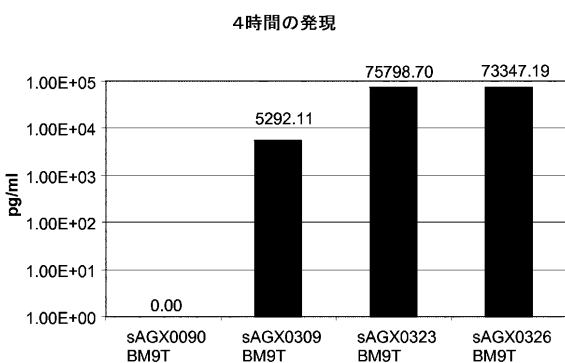
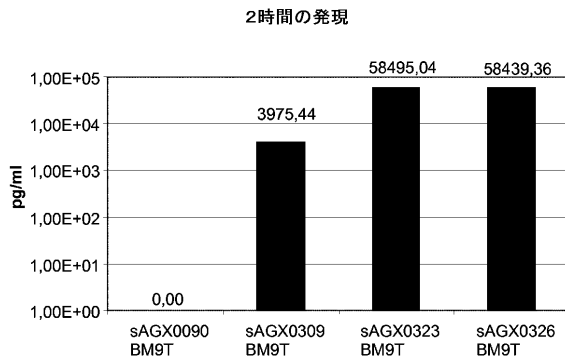


FIG 15 (続き)

【図 15 - 3】

E

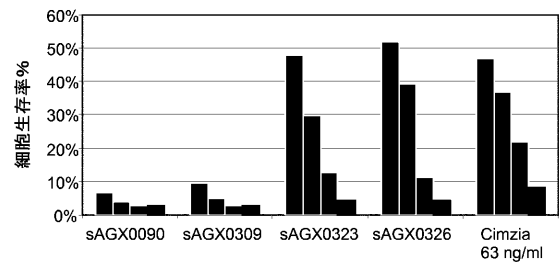


FIG 15 (続き)

【図 16】

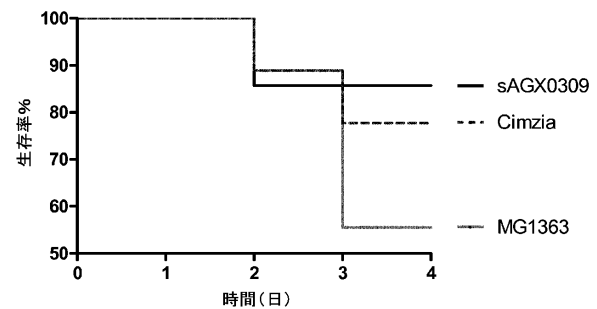


FIG 16

【図 17】

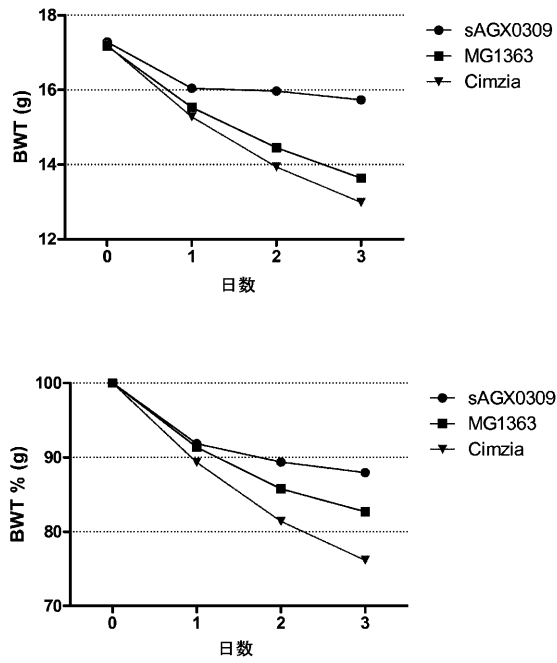


FIG 17

【図 18】

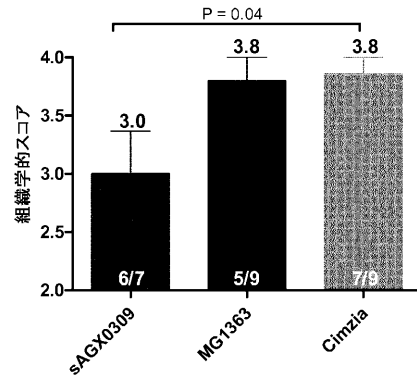


FIG 18

【図 19 - 1】

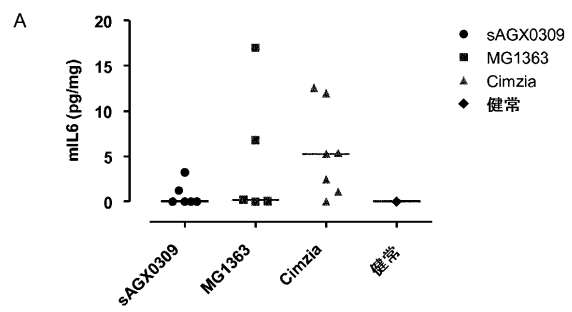


FIG 19

【図 19 - 2】

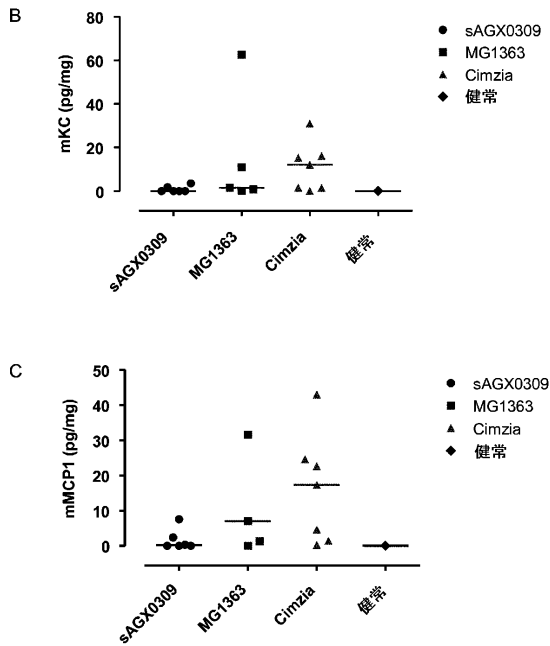


FIG 19 (続き)

【配列表】

0006175428000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/395		N
A 6 1 K 35/74 (2015.01)		A 6 1 K 48/00		
A 6 1 P 1/02 (2006.01)		A 6 1 K 35/74		A
A 6 1 P 1/04 (2006.01)		A 6 1 P 1/02		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 1/04		
A 6 1 P 17/06 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 29/00 (2006.01)		A 6 1 P 17/06		
A 6 1 P 37/02 (2006.01)		A 6 1 P 29/00	1 0 1	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)		A 6 1 P 37/02		
A 6 1 P 37/08 (2006.01)		A 6 1 P 11/06		
A 6 1 P 25/28 (2006.01)		A 6 1 P 37/08		
A 6 1 P 25/16 (2006.01)		A 6 1 P 25/28		
A 6 1 P 21/02 (2006.01)		A 6 1 P 25/16		
A 6 1 P 19/10 (2006.01)		A 6 1 P 21/02		
A 6 1 P 3/10 (2006.01)		A 6 1 P 19/10		
A 6 1 P 9/10 (2006.01)		A 6 1 P 3/10		
A 6 1 P 7/04 (2006.01)		A 6 1 P 9/10		
A 6 1 P 1/16 (2006.01)		A 6 1 P 7/04		
A 6 1 P 11/00 (2006.01)		A 6 1 P 1/16		
A 6 1 P 3/04 (2006.01)		A 6 1 P 11/00		
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P 3/04		
A 6 1 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 P 31/04		
		A 6 1 P 35/02		

- (72)発明者 バンデンブロウケ，クラス
ベルギー国 ベー - 9 8 4 0 デ ピンテ，バチテンボスラーン 5
- (72)発明者 バン ヒュネゲム，カロリエン
ベルギー国 ベー - 9 8 9 0 アスパー，アカシアストラット 4 4
- (72)発明者 ステイドラー，ロザー
ベルギー国 ベー - 9 1 6 0 ロケレン，ボクスラーストラット 4 1

審査官 吉田 知美

- (56)参考文献 国際公開第2 0 0 1 / 0 6 2 9 4 4 (WO , A 1)
BRUECKNER, R. , GENE REPLACEMENT IN STAPHYLOCOCCUS CARNOSUS AND STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS.
 , FEMS MICROBIOLOGY LETTERS , 1 9 9 7 年 6 月 1 日 , Vol.151 No.1 , p.1-8
DOBINSKY, S. et al. , INFLUENCE OF TN917 INSERTION ON TRANSCRIPTION OF THE ICAADBC OPER
ON IN SIX BIOFILM-NEGATIVE TRANSPOSON MUTANTS OF STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS. , PLASMID
 , 2 0 0 2 年 1 月 , Vol.47 No.1 , p.10-17

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C 1 2 N
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)