(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2023-516010
(P2023-516010A)
(43)公表日　令和5年4月17日(2023.4.17)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N 15/85 (2006.01)		C12N	15/85	ZZNA　4B065
C12N 15/74 (2006.01)		C12N	15/74	Z　4C076
C12N 15/19 (2006.01)		C12N	15/19	4C085
C12N 15/20 (2006.01)		C12N	15/20	
C12N 15/24 (2006.01)		C12N	15/24	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全81頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-551783(P2022-551783)
(86)(22)出願日　令和3年2月25日(2021.2.25)
(85)翻訳文提出日　令和4年10月25日(2022.10.25)
(86)国際出願番号　PCT/CA2021/050236
(87)国際公開番号　WO2021/168577
(87)国際公開日　令和3年9月2日(2021.9.2)
(31)優先権主張番号　62/981,464
(32)優先日　令和2年2月25日(2020.2.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/079,841
(32)優先日　令和2年9月17日(2020.9.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　522339455
シムビーボ コーポレイション
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００
(74)代理人　110000855
弁理士法人浅村特許事務所
(72)発明者　グレイブス、ハーバート アレクサンダー
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付
(72)発明者　ライタータ、シータル
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　遺伝子送達システム

(57)【要約】
ペイロード核酸を対象の標的細胞に送達し、細胞においてペイロード核酸によってコードされる１つまたは複数のペイロードを生成するためのシステム。システムは、プラスミドおよびトランスポーター核酸を含むビフィドバクテリウム属細菌を含み、トランスポーター核酸は、細菌における発現のために構成されている。トランスポーター核酸は、アミノ末端からカルボキシ末端の順序で、細菌分泌シグナルペプチドと、プラスミドを結合するためのＤＮＡ結合ドメインと、細胞透過性ペプチドとを含むトランスポーターポリペプチドをコードする。トランスポーターポリペプチドは、プラスミドと複合体を形成し、プラスミドを細菌から標的細胞内に輸送する。プラスミドは、標的細胞における生成ための１つ以上のペイロード（タンパク質および／またはリボ核酸）をコードする。標的細胞は、結腸細胞であり得る。ペイロードが抗原を含む場合、システムはＤＮＡワクチンであり得る。

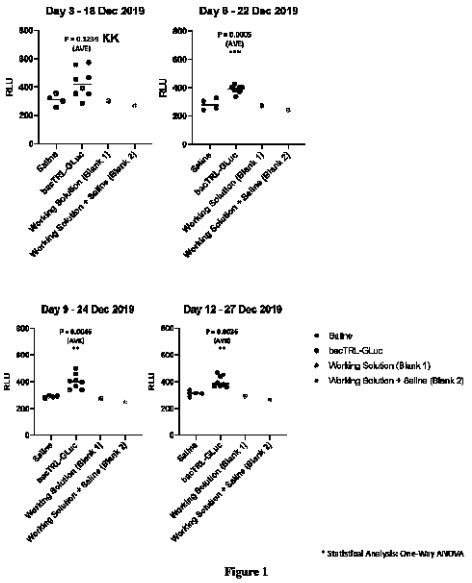


Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象の結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、および／または粘膜固有層の細胞へのペイロード核酸の送達、ならびに前記結腸上皮細胞、結腸免疫細胞および／または粘膜固有層の細胞における前記ペイロード核酸によってコードされるペイロードの生成に使用するためのシステムであって、
ビフィドバクテリウム属細菌が、プラスミドとトランスポーター核酸とを含み、
前記トランスポーター核酸が、前記細菌において前記トランスポーター核酸を発現するように構成された第１のプロモーターおよび第１のターミネーターと作動可能に会合し、
前記トランスポーター核酸が、トランスポーターポリペプチドをコードする配列を有し、トランスポーターポリペプチドをコードする配列が、細菌分泌シグナルペプチドと、ＤＮＡ結合ドメインと、細胞透過性ペプチドとをアミノ末端からカルボキシ末端の順序で含み、前記ＤＮＡ結合ドメインは前記プラスミドと会合してポリペプチド－プラスミド複合体を形成するように構成され、前記細菌分泌シグナルペプチドは前記細菌から前記ポリペプチド－プラスミド複合体を分泌するように構成され、前記細胞透過性ペプチドは前記ポリペプチド－プラスミド複合体を前記対象の結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、および／または粘膜固有層の細胞に導入するように構成され、
前記プラスミドが、ペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸をコードするペイロード核酸を含み、前記ペイロード核酸が、前記結腸上皮細胞、前記結腸免疫細胞、および／または前記粘膜固有層の細胞において前記ペイロード核酸を発現し、前記ペイロードタンパク質または前記ペイロードリボ核酸を生成するように構成された第２のプロモーターおよび第２のターミネーターと作動可能に会合している、システム。
【請求項２】
前記ビフィドバクテリウム属細菌がビフィドバクテリウム・ロンガム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｌｏｎｇｕｍ）である、請求項１に記載のシステム。
【請求項３】
前記細菌分泌シグナルペプチドがα－アラビノシダーゼ分泌シグナルペプチドである、請求項１または２に記載のシステム。
【請求項４】
前記α－アラビノシダーゼ分泌シグナルペプチドが配列番号１３の配列を有する、請求項３に記載のシステム。
【請求項５】
前記ＤＮＡ結合ドメインが配列番号７の配列を有する、請求項１～４のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項６】
前記細胞透過性ペプチドが配列番号１８の配列を有する、請求項１～５のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項７】
前記トランスポーターポリペプチドが配列番号２の配列を有する、請求項１または２に記載のシステム。
【請求項８】
前記プラスミドがトランスポーター核酸をさらに含む、請求項１～７のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項９】
前記ペイロード核酸が、前記結腸上皮細胞の基底外側細胞膜に対してペイロードタンパク質を標的化するための基底外側選別シグナルを含む、請求項１～８のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１０】
前記ペイロード核酸が、前記結腸上皮細胞の内腔細胞膜に対してペイロードタンパク質を標的化するための頂端選別シグナルを含む、請求項１～８のいずれか一項に記載のシス

テム。
【請求項１１】
前記ペイロードタンパク質が、細胞外ドメインを含む膜または膜関連タンパク質である、請求項１～１０のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１２】
前記膜または膜関連タンパク質が内在性膜タンパク質である、請求項１１に記載のシステム。
【請求項１３】
前記プラスミドが、前記ペイロード核酸と作動可能に会合している脂質アンカーシグナルペプチドをさらにコードして、前記ペイロードタンパク質を脂質アンカー型タンパク質として生成する、請求項１～１０のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１４】
前記プラスミドが、前記ペイロード核酸と作動可能に会合している分泌シグナルペプチドをさらにコードして、前記ペイロードタンパク質を分泌する、請求項１～１０のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１５】
前記プラスミドが、前記ペイロードタンパク質を細胞内タンパク質として生成するように構成されている、請求項１～８のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１６】
前記ペイロード核酸が、単独で、または他の核酸と組み合わせて、病原体由来の抗原、病理、場合によりがんに特異的であるかまたは関連する抗原、免疫調節タンパク質、抗体もしくは抗体の断片もしくは誘導体、酵素、受容体、または治療用タンパク質をコードする、請求項１～１５のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１７】
前記ペイロードタンパク質が、コロナウイルススパイクタンパク質、マトリックスタンパク質もしくはヌクレオカプシドタンパク質、またはβコロナウイルススパイクタンパク質、マトリックスタンパク質もしくはヌクレオカプシドタンパク質を含む、請求項１６に記載のシステム。
【請求項１８】
前記コロナウイルススパイクタンパク質、マトリックスタンパク質もしくはヌクレオカプシドタンパク質が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質、マトリックスタンパク質もしくはヌクレオカプシドタンパク質である、請求項１７に記載のシステム。
【請求項１９】
前記ペイロード核酸が複数のペイロードをコードし、前記複数のペイロードが前記病原体由来の抗原性タンパク質の組み合わせを含む、請求項１６～１８のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項２０】
前記ペイロード核酸が複数のペイロードをコードする、請求項１～１８のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項２１】
前記複数のペイロードが、１つまたは複数の免疫調節タンパク質を含み、場合により、前記１つまたは複数の免疫調節タンパク質が、ＩＬ－１２、ＩＮＦｇ、ＴＮＦａ、ＩＬ－１０、ＩＬ－８、ＩＬ－２、ＩＬ－４、Ｉｌ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ１ａ／ｂ、ＩＬ－６、ＩＬ－１７、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ－１３、ＧＳＭＣＦ、ＬＴａ／ｂ、および／または前述の機能性誘導体の１つまたは組み合わせである、請求項１９または２０に記載のシステム。
【請求項２２】
前記ペイロード核酸が複数のペイロードコード配列を含み、前記ペイロード核酸が、前記結腸上皮細胞、前記結腸免疫細胞、および／または前記粘膜固有層の細胞での発現のために単一のプロモーターおよびターミネーターと作動可能に会合し、各ペイロードコード

配列がＩＲＥＳ要素によって分離されている、請求項１９～２１のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項２３】
前記ペイロード核酸が複数のペイロードコード配列を含み、各ペイロードコード配列が、前記結腸上皮細胞、前記結腸免疫細胞、および／または前記粘膜固有層の細胞での発現のために別個のプロモーターおよびターミネーターと作動可能に会合する、請求項１９～２１のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項２４】
対象の結腸上皮細胞および／または結腸免疫細胞へのペイロード核酸の送達、ならびに前記結腸上皮細胞および／または結腸免疫細胞における前記ペイロード核酸によってコードされる前記ペイロードの生成に使用するためのシステムであって、前記細胞透過性ペプチドが、前記ポリペプチド－プラスミド複合体を前記結腸上皮細胞および／または前記結腸免疫細胞に導入するように構成されており、前記第２のプロモーターおよび前記第２のターミネーターが、前記ペイロード核酸を前記結腸上皮細胞および／または前記結腸免疫細胞において発現するように構成されている、請求項１～２３のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項２５】
薬学的に許容される賦形剤をさらに含む医薬組成物として製剤化される、請求項１～２４のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項２６】
前記医薬組成物が経口投与用である、請求項２５に記載のシステム。
【請求項２７】
前記医薬組成物が免疫アジュバントと組み合わせて投与するためのものである、請求項２５または２６に記載のシステム。
【請求項２８】
前記細菌が凍結乾燥される、請求項１～２７のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項２９】
10^5～10^{11}コロニー形成単位（ＣＦＵ）の用量、または場合により10^8～10^{10}ＣＦＵの用量で前記対象に投与するための、請求項１～２８のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項３０】
前記細菌が第１の細菌であり、請求項１で定義される第２の細菌と組み合わせて投与するためのものであり、前記第１の細菌の前記ペイロード核酸によってコードされる前記ペイロードタンパク質または前記ペイロードリボ核酸が、前記第２の細菌の前記ペイロード核酸によってコードされる前記ペイロードタンパク質または前記ペイロードリボ核酸とは異なる、請求項１～２９のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項３１】
前記第１の細菌および前記第２の細菌が、同時投与のために単一剤形に製剤化される、請求項３０に記載のシステム。
【請求項３２】
前記第１の細菌および前記第２の細菌が、別々の剤形として製剤化される、請求項３０に記載のシステム。
【請求項３３】
対象の結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、および／または粘膜固有層の細胞へペイロード核酸を送達し、前記細胞に前記ペイロード核酸によってコードされるペイロードを生成させる方法であって、
プラスミドとトランスポーター核酸とを含むビフィドバクテリウム属細菌を、前記細菌が前記対象の結腸に定着するように前記対象に投与することを含み、
前記トランスポーター核酸が、前記細菌において前記トランスポーター核酸を発現するように構成された第１のプロモーターおよび第１のターミネーターと作動可能に会合し、

前記トランスポーター核酸が、トランスポーターポリペプチドをコードし、トランスポーターポリペプチドが、細菌分泌シグナルペプチドと、ＤＮＡ結合ドメインと、細胞透過性ペプチドとをアミノ末端からカルボキシ末端の順序で含み、前記ＤＮＡ結合ドメインは前記プラスミドと会合してポリペプチド－プラスミド複合体を形成するように構成され、前記細菌分泌シグナルペプチドは前記細菌から前記ポリペプチド－プラスミド複合体を分泌するように構成され、前記細胞透過性ペプチドは前記ポリペプチド－プラスミド複合体を前記対象の結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、および／または粘膜固有層の細胞に導入するように構成され、

前記プラスミドが、ペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸をコードする配列を有するペイロード核酸を含み、前記ペイロード核酸が、前記結腸上皮細胞、前記結腸免疫細胞、または前記粘膜固有層の細胞内で前記ペイロード核酸を発現し、前記ペイロードタンパク質または前記ペイロードリボ核酸を生成するように構成された第２のプロモーターおよび第２のターミネーターと作動可能に会合している、方法。

【請求項３４】

前記細菌が、請求項１～２４のいずれか一項に記載のシステムにおいて定義される通りである、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

前記細菌が、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む医薬組成物で投与される、請求項３３または３４に記載の方法。

【請求項３６】

前記医薬組成物が経口投与される、請求項３５に記載の方法。

【請求項３７】

前記医薬組成物が免疫アジュバントと組み合わせて投与される、請求項３５または３６に記載の方法。

【請求項３８】

前記細菌が前記医薬組成物中で凍結乾燥される、請求項３５～３７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３９】

前記医薬組成物が、10^{5}～10^{11}コロニー形成単位（ＣＦＵ）の用量で、または場合により10^{8}～10^{10}ＣＦＵの用量で前記対象に投与される、請求項３５～３７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４０】

前記細菌が第１の細菌であり、請求項３３または請求項３４で定義される第２の細菌と組み合わせて投与され、前記第１の細菌の前記ペイロード核酸によってコードされる前記ペイロードタンパク質または前記ペイロードリボ核酸が、前記第２の細菌の前記ペイロード核酸によってコードされる前記ペイロードタンパク質または前記ペイロードリボ核酸とは異なる、請求項３３～３９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４１】

前記第１の細菌および前記第２の細菌が、同時投与のために単一剤形に製剤化される、請求項４０に記載の方法。

【請求項４２】

前記第１の細菌および前記第２の細菌が、別々の剤形として製剤化される、請求項４０に記載の方法。

【請求項４３】

ＤＮＡワクチンであって、

プラスミドとトランスポーター核酸とを含むビフィドバクテリウム属細菌を含み、

前記トランスポーター核酸が、前記細菌において前記トランスポーター核酸を発現するように構成された第１のプロモーターおよび第１のターミネーターと作動可能に会合しており、

前記トランスポーター核酸が、トランスポーターポリペプチドをコードし、前記トラン

スポーターポリペプチドが、細菌分泌シグナルペプチドと、ＤＮＡ結合ドメインと、細胞透過性ペプチドとをアミノ末端からカルボキシ末端の順序で含み、前記ＤＮＡ結合ドメインは前記プラスミドと会合してポリペプチド－プラスミド複合体を形成するように構成され、前記細菌分泌シグナルペプチドは前記細菌から前記ポリペプチド－プラスミド複合体を分泌するように構成され、前記細胞透過性ペプチドは前記ポリペプチド－プラスミド複合体を前記対象の細胞に導入するように構成され、

前記プラスミドが、ペイロードタンパク質をコードするペイロード核酸を含み、前記ペイロード核酸が、前記細胞内で前記ペイロード遺伝子を発現し、前記ペイロードタンパク質を生成するように構成された第２のプロモーターおよび第２のターミネーターと作動可能に会合し、前記ペイロードタンパク質が病原体の構成要素であるか、または前記ペイロードタンパク質が病理に特異的な、もしくは関連する抗原を含み、場合により前記病理ががんである、ＤＮＡワクチン。

【請求項４４】

前記対象への前記ＤＮＡワクチンの投与後に前記病原体または前記病理に対する適応免疫応答を前記対象に引き起こす、請求項４３に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項４５】

前記ビフィドバクテリウム属細菌がビフィドバクテリウム・ロンガム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｌｏｎｇｕｍ）である、請求項４３または４４に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項４６】

前記細菌分泌シグナルペプチドがα－アラビノシダーゼ分泌シグナルペプチドである、請求項４３～４５のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項４７】

前記α－アラビノシダーゼ分泌シグナルペプチドが配列番号１３の配列を有する、請求項４６に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項４８】

前記ＤＮＡ結合ドメインが配列番号７の配列を有する、請求項４３～４７のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項４９】

前記細胞透過性ペプチドが配列番号１８の配列を有する、請求項４３～４８のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項５０】

前記トランスポーターポリペプチドが配列番号２の配列を有する、請求項４３～４５のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項５１】

前記プラスミドがトランスポーター核酸をさらに含む、請求項４３～５０のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項５２】

前記病原体がウイルス、細菌または寄生虫である、請求項４３～５１のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項５３】

前記病原体がウイルスである、請求項５２に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項５４】

前記ウイルスが、コロナウイルス、場合によりβコロナウイルス、場合によりＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２である、請求項５３に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項５５】

前記ペイロードタンパク質が、スパイクタンパク質もしくはその抗原性断片、マトリックスタンパク質もしくはその抗原性断片、またはヌクレオカプシドタンパク質もしくはその抗原性断片を含む、請求項５４に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項５６】

前記ペイロードタンパク質が、スパイクタンパク質またはその抗原性断片もしくは誘導体、マトリックスタンパク質またはその抗原性断片もしくは誘導体、あるいはヌクレオカプシドタンパク質またはその抗原性断片もしくは誘導体を含む、請求項５４に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項５７】

前記ペイロードタンパク質が、野生型配列と少なくとも８０％同一のスパイクタンパク質断片または誘導体を含み、前記スパイクタンパク質断片が前記スパイクタンパク質の受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）を含む、請求項５４に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項５８】

前記ペイロードタンパク質が、配列番号５１または５５に示されるアミノ酸配列を含み、前記スパイクタンパク質断片が、配列番号４６のアミノ酸１３～６８５と少なくとも８０％同一の誘導体である、請求項５７に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項５９】

前記ペイロードタンパク質が、配列番号４６および５３～５６のいずれか１つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項５７に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項６０】

前記ペイロードタンパク質が、配列番号４６のアミノ酸１３～６８５もしくは配列番号５３のアミノ酸１３～６８２を含むか、または場合により配列番号４６のアミノ酸１３～１２７３もしくは配列番号５３のアミノ酸１３～１２７０を含む、請求項５７に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項６１】

前記ペイロード核酸が、スパイクタンパク質もしくはその抗原性断片、マトリックスタンパク質もしくはその抗原性断片、および／またはヌクレオカプシドタンパク質もしくはその抗原性断片の組み合わせを含む複数のペイロードをコードする、請求項５５～６０のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項６２】

前記ペイロード核酸が複数のペイロードをコードする、請求項４３～６０のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項６３】

前記複数のペイロードが前記病原体由来の抗原性タンパク質の組み合わせを含む、請求項６２に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項６４】

前記複数のペイロードが、１つまたは複数の免疫調節タンパク質を含み、場合により、前記１つまたは複数の免疫調節タンパク質が、ＩＬ－１２、ＩＮＦｇ、ＴＮＦａ、ＩＬ－１０、ＩＬ－８、ＩＬ－２、ＩＬ－４、Ｉｌ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ１ａ／ｂ、ＩＬ－６、ＩＬ－１７、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ－１３、ＧＳＭＣＦ、ＬＴａ／ｂ、および／または前述の機能性誘導体の１つまたは組み合わせである、請求項６１～６３のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項６５】

前記ペイロード核酸が複数のペイロードコード配列を含み、前記ペイロード核酸が、前記対象の細胞での発現のために単一のプロモーターおよびターミネーターと作動可能に会合し、各ペイロードコード配列がＩＲＥＳ要素によって分離されている、請求項６１～６４のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項６６】

前記ペイロード核酸が複数のペイロードコード配列を含み、各ペイロードコード配列が、別個のプロモーターおよびターミネーターと、前記対象の細胞での発現のために作動可能に会合する、請求項６１～６４のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項６７】

ペイロードタンパク質が、細胞外ドメインを含む膜または膜関連タンパク質である、請求項４３～６６のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項６８】
前記膜または膜関連タンパク質が内在性膜タンパク質である、請求項６７に記載のＤＮＡワクチン。
【請求項６９】
前記プラスミドが、ペイロード核酸と作動可能に会合している脂質アンカーシグナルペプチドをさらにコードして、ペイロードタンパク質を脂質アンカー型タンパク質として生成する、請求項４３～６８のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。
【請求項７０】
前記プラスミドが、ペイロード核酸と作動可能に会合している分泌シグナルペプチドをさらにコードして、ペイロードタンパク質を分泌する、請求項４３～６９のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。
【請求項７１】
前記プラスミドが、ペイロードタンパク質を細胞内タンパク質として生成するように構成されている、請求項４３～７０のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。
【請求項７２】
前記対象の細胞が、結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、および／または粘膜固有層の細胞であり、場合により前記対象の前記細胞が結腸上皮細胞および／または結腸免疫細胞である、請求項４３～７１のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。
【請求項７３】
前記ペイロード核酸が、前記結腸上皮細胞の基底外側細胞膜に対してペイロードタンパク質を標的化するための基底外側選別シグナルを含む、請求項７２に記載のＤＮＡワクチン。
【請求項７４】
前記ペイロード核酸が、前記結腸上皮細胞の内腔細胞膜に対してペイロードタンパク質を標的化するための頂端選別シグナルを含む、請求項７２または７３に記載のＤＮＡワクチン。
【請求項７５】
薬学的に許容される賦形剤をさらに含む医薬組成物として製剤化される、請求項４３～７４のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。
【請求項７６】
前記医薬組成物が経口投与用である、請求項７５に記載のＤＮＡワクチン。
【請求項７７】
前記医薬組成物が免疫アジュバントと組み合わせて投与するためのものである、請求項７５または７６に記載のＤＮＡワクチン。
【請求項７８】
前記細菌が凍結乾燥される、請求項４３～７７のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。
【請求項７９】
10^{5}～10^{11}コロニー形成単位（ＣＦＵ）、または場合により10^{8}～10^{10}ＣＦＵの用量で前記対象に投与するためのものである、請求項４３～７８のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。
【請求項８０】
前記細菌が第１の細菌であり、請求項１または４３で定義される第２の細菌と組み合わせて投与するためのものであり、前記第１の細菌の前記ペイロード核酸によってコードされる前記ペイロードタンパク質が、前記第２の細菌の前記ペイロード核酸によってコードされる前記ペイロードタンパク質または前記ペイロードリボ核酸とは異なる、請求項４３～７９のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。
【請求項８１】
前記第１の細菌および前記第２の細菌が、同時投与のために単一剤形に製剤化される、請求項８０に記載のＤＮＡワクチン。

【請求項８２】
前記第１の細菌および前記第２の細菌が、別々の剤形として製剤化される、請求項８０に記載のＤＮＡワクチン。
【請求項８３】
前記第２の細菌の前記ペイロード核酸によってコードされた前記ペイロードタンパク質または前記ペイロードリボ核酸が、１つまたは複数の免疫調節タンパク質を含み、場合により、前記１つまたは複数の免疫調節タンパク質が、ＩＬ－１２、ＩＮＦｇ、ＴＮＦａ、ＩＬ－１０、ＩＬ－８、ＩＬ－２、ＩＬ－４、Ｉｌ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ１ａ／ｂ、ＩＬ－６、ＩＬ－１７、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ－１３、ＧＳＭＣＦ、ＬＴａ／ｂ、および／または前述の機能性誘導体の１つまたは組み合わせである、請求項８０～８２のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチン。
【請求項８４】
病原体に対して対象にワクチン接種する方法であって、請求項４３～７４のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチンを前記対象に投与することを含み、前記ペイロード核酸が前記病原体の１つ以上の構成要素をコードする、方法。
【請求項８５】
コロナウイルスに対して対象にワクチン接種する方法であって、請求項５４～６１のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチンを前記対象に投与することを含む方法。
【請求項８６】
前記コロナウイルスが、βコロナウイルス、場合によりＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２である、請求項８５に記載の方法。
【請求項８７】
病理に対して対象にワクチン接種する方法であって、請求項４３～７４のいずれか一項に記載のＤＮＡワクチンを前記対象に投与することを含み、前記ペイロード核酸が前記病理に特異的な、または関連する抗原をコードし、場合により前記病理ががんである、方法。
【請求項８８】
前記細菌が、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む医薬組成物で投与される、請求項８７に記載の方法。
【請求項８９】
前記医薬組成物が経口投与される、請求項８８に記載の方法。
【請求項９０】
前記医薬組成物が免疫アジュバントと組み合わせて投与される、請求項８８または８９に記載の方法。
【請求項９１】
前記細菌が前記医薬組成物中で凍結乾燥される、請求項８８～９０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９２】
前記医薬組成物が、10^{5}～10^{11}コロニー形成単位（ＣＦＵ）の用量で、または場合により10^{8}～10^{10}ＣＦＵの用量で前記対象に投与される、請求項８８～９０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９３】
前記細菌が第１の細菌であり、請求項１または４３で定義される第２の細菌と組み合わせて投与され、前記第１の細菌の前記ペイロード核酸によってコードされる前記ペイロードタンパク質が、前記第２の細菌の前記ペイロード核酸によってコードされる前記ペイロードタンパク質または前記ペイロードリボ核酸とは異なる、請求項８４～９２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９４】
前記第１の細菌および前記第２の細菌が、同時投与のために単一剤形に製剤化される、請求項９３に記載の方法。

【請求項９５】
前記第１の細菌および前記第２の細菌が、別々の剤形として製剤化される、請求項９３に記載の方法。
【請求項９６】
前記第２の細菌の前記ペイロード核酸によってコードされた前記ペイロードタンパク質または前記ペイロードリボ核酸が、１つまたは複数の免疫調節タンパク質を含み、場合により、前記１つまたは複数の免疫調節タンパク質が、ＩＬ－１２、ＩＮＦｇ、ＴＮＦａ、ＩＬ－１０、ＩＬ－８、ＩＬ－２、ＩＬ－４、Ｉｌ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ１ａ／ｂ、ＩＬ－６、ＩＬ－１７、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ－１３、ＧＳＭＣＦ、ＬＴａ／ｂ、および／または前述の機能性誘導体の１つまたは組み合わせである、請求項９３～９５のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、遺伝子送達システムに関する。特に、本発明は、対象に定着し、遺伝子ペイロードの発現のためにプラスミドを対象の細胞に送達する細菌に関する。
【背景技術】
【０００２】
新規で感染性の高いコロナウイルス、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の最近の出現は、ＣＯＶＩＤ－１９の脅威的な世界的パンデミックへの急速な進行をもたらした。したがって、例えばＣＯＶＩＤ－１９に対するワクチンを含む、新しいワクチンが必要とされている。
【０００３】
より一般的には、例えば治療目的または免疫保護目的のために、遺伝子ペイロードを対象の細胞に効果的に輸送する遺伝子送達システムが必要とされている。１つの遺伝子送達システムは、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）マーカー、および本明細書において「トランスポーターポリペプチド」または「ハイブリッド輸送タンパク質」（ＨＴＰ）と呼ばれる新規ハイブリッドタンパク質を発現することができるプラスミドによるビフィドバクテリウム・ロンガム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｌｏｎｇｕｍ）細胞の形質転換を開示したＰＣＴ公開番号ＷＯ／２０１５／１２０５４１およびＷＯ／２０１５／１２０５４２に記載されている。トランスポーターポリペプチドは、ＤＮＡ結合ドメイン、細菌分泌シグナルペプチドおよび細胞透過性ペプチド（ＣＰＰ）ドメインを含んでいた。Ｂ．ロンガムにおけるトランスポーターポリペプチドの発現は、Ｂ．ロンガムからのトランスポーターポリペプチド、およびトランスポーターポリペプチドをコードするプラスミドの分泌を引き起こすことが示された。トランスポーターポリペプチドとプラスミドＤＮＡとの複合体は、哺乳動物細胞にインビトロでトランスフェクションして、プラスミドによってコードされるＧＦＰを細胞内で発現することができることも示された。したがって、トランスポーターポリペプチドは、細菌から真核生物標的細胞（哺乳動物細胞を含む）へのプラスミドの輸送に有用であり得、それは、次いで標的細胞でペイロードを発現させる。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
本出願以前、ＰＣＴ公開番号ＷＯ／２０１５／１２０５４１およびＷＯ／２０１５／１２０５４２のトランスポーターポリペプチドなどの遺伝子送達システムが、ワクチンを生成するために適応され得るかどうかは不明であった。このようなシステムを、対象への経口投与（または非静脈内投与の他の形態）に適応させて、結腸における発現のための遺伝子を送達することができるかどうかも不明であった。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
本開示の様々な実施形態は、対象の結腸細胞（例えば、結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、および／または粘膜固有層の細胞）へのペイロード核酸の送達および結腸細胞（例えば、

結腸上皮細胞、結腸免疫細胞および／または結腸免疫細胞）におけるペイロード核酸によってコードされるペイロードの生成に使用するためのシステム；プラスミドと、細菌においてトランスポーター核酸を発現するように構成された第１のプロモーターおよび第１のターミネーターと作動可能に会合しているトランスポーター核酸とを含むビフィドバクテリウム属細菌；細菌からポリペプチド－プラスミド複合体を分泌するように構成された細菌分泌シグナルペプチドと、プラスミドと会合してポリペプチド－プラスミド複合体を形成するように構成されたＤＮＡ結合ドメインと、ポリペプチド－プラスミド複合体を対象の結腸細胞（例えば、結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、または粘膜固有層の細胞）に導入するように構成された細胞透過性ペプチドとをアミノ末端からカルボキシ末端の順序で含むトランスポーターポリペプチドをコードする配列を有するトランスポーター核酸；およびペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸をコードするペイロード核酸を含み、ペイロード核酸は、結腸細胞内でペイロード核酸を発現し、ペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸を生成するように構成された第２のプロモーターおよび第２のターミネーターと作動可能に会合しているプラスミドに関する。

【０００６】

様々な実施形態は、対象の結腸細胞（例えば、結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、および／または粘膜固有層の細胞）へペイロード核酸を送達し、ペイロード核酸によってコードされるペイロードを細胞に生成させるための方法に関し、方法は、プラスミドとトランスポーター核酸とを含むビフィドバクテリウム属細菌を、細菌が対象の結腸に定着するように対象に投与することを含み、トランスポーター核酸は、細菌においてトランスポーター核酸を発現するように構成された第１のプロモーターおよび第１のターミネーターと作動可能に会合しており；トランスポーター核酸は、細菌からポリペプチド－プラスミド複合体を分泌するように構成された細菌分泌シグナルペプチドと、プラスミドと会合してポリペプチド－プラスミド複合体を形成するように構成されたＤＮＡ結合ドメインと、ポリペプチド－プラスミド複合体を対象の結腸細胞（例えば、結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、および／または粘膜固有層の細胞）に導入するように構成された細胞透過性ペプチドとをアミノ末端からカルボキシ末端の順序で含むトランスポーターポリペプチドをコードし；プラスミドは、ペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸をコードする配列を有するペイロード核酸を含み、ペイロード核酸は、結腸細胞内でペイロード核酸を発現し、ペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸を生成するように構成された第２のプロモーターおよび第２のターミネーターと作動可能に会合している。

【０００７】

様々な実施形態は、プラスミドとトランスポーター核酸とを含むビフィドバクテリウム属細菌を含むＤＮＡワクチンに関し、トランスポーター核酸は、細菌においてトランスポーター核酸を発現するように構成された第１のプロモーターおよび第１のターミネーターと作動可能に会合しており、トランスポーター核酸は、細菌からポリペプチド－プラスミド複合体を分泌するように構成された細菌分泌シグナルペプチドと、プラスミドと会合してポリペプチド－プラスミド複合体を形成するように構成されたＤＮＡ結合ドメインと、ポリペプチド－プラスミド複合体を対象の細胞に導入するように構成された細胞透過性ペプチドとをアミノ末端からカルボキシ末端の順序で含むトランスポーターポリペプチドをコードし、プラスミドは、ペイロードタンパク質をコードするペイロード核酸を含み、ペイロード核酸は、細胞内でペイロード遺伝子を発現し、ペイロードタンパク質を生成するように構成された第２のプロモーターおよび第２のターミネーターと作動可能に会合し、ペイロードタンパク質は病原体の構成要素であるか、またはペイロードタンパク質は病理（例えばがん、毒素、または他の任意の外来もしくは病理学関連分子）に特異的な、もしくは関連する抗原を含む。いくつかの実施形態では、ＤＮＡワクチンはコロナウイルスワクチンであり、ペイロード核酸はコロナウイルスの１つまたは複数の構成要素、例えばスパイク、マトリックス（膜糖タンパク質とも呼ばれる）、エンベロープおよび／またはヌクレオカプシド、またはその断片／誘導体をコードする。いくつかの実施形態では、コロナウイルスはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２である。

【０００８】
様々な実施形態は、病原体に対して対象にワクチン接種する方法に関し、方法は、本明細書で定義されるＤＮＡワクチンを対象に投与することを含み、ペイロード核酸は病原体の１つ以上の構成要素をコードする。
【０００９】
様々な実施形態は、コロナウイルスに対して対象にワクチン接種する方法に関し、方法は、本明細書で定義されるＤＮＡワクチンを対象に投与することを含み、ペイロード核酸はコロナウイルスの１つ以上の構成要素（例えば、スパイク、マトリックス、エンベロープおよび／またはヌクレオカプシド、またはそれらの断片／誘導体をコードする。いくつかの実施形態では、コロナウイルスは、βコロナウイルス属のメンバーである。いくつかの実施形態では、コロナウイルスはＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２である。
【００１０】
様々な実施形態は、病理に対して対象にワクチン接種する方法に関し、方法は、本明細書で定義されるＤＮＡワクチンを対象に投与することを含み、ペイロード核酸は病理に特異的な、または関連する抗原をコードする。様々な実施形態は、がんに対して対象にワクチン接種する方法に関し、方法は、本明細書で定義されるＤＮＡワクチンを対象に投与することを含み、ペイロード核酸はがんに特異的な、または関連する抗原をコードする。
【００１１】
本発明のこれらおよび他の特徴は、以下で簡単に説明するように、添付の図面を参照する以下の説明からより明らかになるであろう。
【図面の簡単な説明】
【００１２】
【図１】ｂａｃＴＲＬ処置マウスから３、６、９および１２日目に採取した血液中のＧａｕｓｓｉａルシフェラーゼ蛍光のグラフを示す。
【００１３】
【図２】ｂａｃＴＲＬ処置マウスの結腸から単離されたコロニーの代表的なグラム染色を示す。パネルＡ（Ｍ５）パネルＢ（Ｍ６）パネルＣ（Ｍ７）パネルＤ（Ｍ８）
【００１４】
【図３】ｂａｃＴＲＬ処置マウスＭ９からの代表的なグラム染色ＦＦＰＥ結腸切片を示す。パネルＡ－結腸の近位領域（中央から後半切片）パネルＢ、ＣおよびＤ－１０倍および１００倍拡大
【００１５】
【図４】ｂａｃＴＲＬ処置マウスＭ９からの代表的なグラム染色ＦＦＰＥ結腸切片を示す。パネルＡ－結腸の中央領域の発端パネルＢ、ＣおよびＤ－１００倍拡大
【００１６】
【図５Ａ】ｂａｃＴＲＬ処置マウスＭ１４の内側結腸部分における代表的な免疫蛍光染色結腸切片を示す。
【図５Ｂ】ｂａｃＴＲＬ処置マウスＭ１４の上部遠位部分における代表的な免疫蛍光染色結腸切片を示す。
【図５Ｃ】ｂａｃＴＲＬ処置マウスＭ１４の下部遠位部分における代表的な免疫蛍光染色結腸切片を示す。
【００１７】
【図６】ｂａｃＴＲＬ－Ｓｐｉｋｅ処置マウスのグラム染色された結腸切片を示す。パネルＡは、４倍対物レンズ拡大を示す（矢印はＢ．ロンガムのクラスターを示す）。パネルＢは、パネルＡに示されるＢ．ロンガムクラスターの４０倍対物レンズ拡大を示す。パネルＣは、パネルＡに示されるＢ．ロンガムクラスターの１００倍対物レンズ拡大を示す。
【００１８】
【図７】それぞれ生理食塩水およびｂａｃＴＲＬ－スパイクで処置し、ＤＡＰＩで染色し（核；青色）、蛍光顕微鏡検査に供してスパイクタンパク質の発現および局在化を分析した（緑色；拡大率１０倍の対物レンズ）、マウスの結腸切片を示す。

【００１９】
【図８】パネルＡは、ｂａｃＴＲＬ－スパイク処置マウスから採取した連続滴定血清試料における、市販の組換え三量体スパイク外部ドメイン（Ｓ１＋Ｓ２）に対する抗スパイク免疫反応性％のグラフを示す。パネルＢは、ｂａｃＴＲＬ－スパイク処置マウスからの血清中のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２外部ドメイン（Ｓ１＋Ｓ２）に対する抗スパイク血清結合力価のグラフを示す。
【００２０】
【図９】パネルＡは、ｂａｃＴＲＬ－スパイク処置および生理食塩水処置マウスから採取した連続滴定糞便抽出物における、市販の組換え三量体スパイク外部ドメイン（Ｓ１＋Ｓ２）に対する抗スパイク　ＩｇＡ結合活性％のグラフを示す（免疫後２１日目）。パネルＢは、ｂａｃＴＲＬ－スパイク処置マウスから２１日目に採取した抽出物における、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２外部ドメイン（Ｓ１＋Ｓ２）に対する糞便ＩｇＡ抗体結合力価のグラフを示す。
【００２１】
【図１０】それぞれ生理食塩水およびｂａｃＴＲＬ－スパイクで処置したマウスから２１および４０日目に収集した血清中の阻害％（抗体活性中和％）のグラフを示す。
【発明を実施するための形態】
【００２２】
Ｉ．一般的定義
【００２３】
本明細書で使用される場合、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」および「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」という用語およびその文法的変形は、包括的またはオープンエンドであり、列挙されていない追加の要素および／または方法工程を排除しない。用語「から本質的になる」は、組成物、使用または方法に関連して本明細書で使用される場合、追加の要素および／または方法工程が存在し得るが、これらの追加は、列挙された組成物、方法または使用が機能する様式に実質的に影響しないことを示す。本明細書で組成物、使用または方法に関連する「からなる」という用語は（使用される場合）、追加の要素および／または方法工程の存在を排除する。特定の要素および／または工程を含むものとして本明細書に記載される組成物、使用または方法はまた、特定の実施形態では、それらの要素および／または工程から本質的になり得、他の実施形態では、これらの実施形態が具体的に言及されているか否かにかかわらず、それらの要素および／または工程からなり得る。特定の要素および／または工程を含むものとして本明細書に記載される使用または方法はまた、特定の実施形態では、それらの要素および／または工程から本質的になり得、他の実施形態では、これらの実施形態が具体的に言及されているか否かにかかわらず、それらの要素および／または工程からなり得る。
【００２４】
不定冠詞「ａ」が先行する要素への言及は、文脈が要素の１つのみが存在することを明確に要求しない限り、要素のうちの複数が存在する可能性を排除しない。単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、別途内容が明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。「含む」という用語と組み合わせて本明細書で使用される場合の「ａ」または「ａｎ」という単語の使用は、「１つ」を意味し得るが、「１つ以上」、「少なくとも１つ」および「１つまたは複数」の意味とも一致する。
【００２５】
さらに限定されることが示されない限り、本明細書で使用される「複数」という用語は、２つ以上、例えば２つ以上、３つ以上、４つ以上などを意味する。
【００２６】
本明細書で使用される場合、「約」という用語は、所与の値からの約＋／－１０％の変動を指す。
【００２７】

本明細書で使用される場合、端点による数値範囲の列挙は、すべての数、すべての整数、およびすべての小数中間を含む、その範囲内に包含されるすべての数を含む（例えば、１～５は、１、１．５、２、２．７５、３、３．８０、４、および５などを含む）。

【００２８】

特に明記しない限り、「引き起こす（ｃａｕｓｅ）」、「引き起こす（ｃａｕｓｉｎｇ）」、「引き起こされた（ｃａｕｓｅｄ）」という語および類似の用語は、１つまたは複数の中間分子、工程または機構を介して「直接的に引き起こす」ならびに「間接的に引き起こす」ことを含む。

【００２９】

特に明記しない限り、「特定の実施形態」、「様々な実施形態」、「実施形態」および類似の用語は、他の実施形態が直接的または間接的に参照されるかどうかにかかわらず、かつその特徴または実施形態が方法、生成物、使用、組成物などの文脈で記載されているかどうかにかかわらず、その実施形態単独、または本明細書に記載されている任意の他の１つまたは複数の実施形態との組み合わせについて記載される１つまたは複数の特定の特徴を含む。セクションＩ、ＩＩ、ＩＩＩおよびＩＶのいずれも、他のセクションから独立していると見なされるべきではなく、全体として解釈されるべきである。別段の指示がない限り、個々のセクションに記載された実施形態は、他のセクションに記載された特徴の任意の組み合わせをさらに含むことができる。明確に意図されていない限り、任意のセクション中の用語について提示された定義は、代替定義として他のセクションに明示的に組み込まれる。

【００３０】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」（例えば、「トランスポーターポリペプチド」という表現で使用される場合）は、ペプチドまたはタンパク質鎖を含む、ペプチド結合によって連結された２つ以上のアミノ酸残基（例えば、２、１０、５０、１００、２００または任意の他の数の残基）の鎖である。本明細書で使用される場合、「タンパク質」は、１つ以上のポリペプチドを含み、共有結合または非共有結合した補因子、金属、有機化合物、脂質、炭水化物、核酸および／または他の生体分子または分子実体を含む非ポリペプチド要素をさらに含んでも含まなくてもよい。したがって、「タンパク質」という用語は、限定されないが、「ペプチド」という用語を明示的に包含する。したがって、タンパク質の「領域」、「部分」または「ドメイン」は、そのような非ポリペプチド要素からなるか、またはそれらを含むことができる。タンパク質は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０または１０を超えるポリペプチド鎖を共有結合および／または非共有結合で含み得る。非共有結合相互作用の非限定的な例としては、水素結合、疎水性相互作用および／または静電相互作用が挙げられる。ポリペプチド間の共有結合の非限定的な例は、ジスルフィド架橋である。

【００３１】

本明細書で使用される場合、「核酸」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「核酸配列」、「ヌクレオチド配列」、および類似の用語は、典型的には糖リン酸骨格によって連結された塩基のポリマーを指し、一本鎖または二本鎖であり得、センス鎖および／またはアンチセンス鎖を表すゲノムまたは合成起源のＤＮＡまたはＲＮＡを含む。別段示されない限り、本発明の特定の核酸配列は、明示的に示された配列に加えて、相補的配列を包含する。別段特定されない限り、「核酸」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」、「ＤＮＡ」、「ＲＮＡ」および類似の用語は、二本鎖または一本鎖であり得る。

【００３２】

「保存的変異体」、「保存的に修飾された変異体」および類似の語句は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に修飾された変異体とは、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードするそれらの核酸を指すか、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列を指す。遺伝コードの縮重によって、機能的に同一の多数の核酸が任意の所与のタンパク質をコードする。例え

ば、コドンＧＣＡ、ＧＣＣ、ＧＣＧおよびＧＣＵはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンによって指定されるあらゆる位置で、コードされたポリペプチドを改変することなく、コドンを記載の対応するコドンのいずれかに改変することができる。そのような核酸変異は、保存的に修飾された変異の一種である「サイレント変異」である。ポリペプチドをコードする本明細書のすべての核酸配列はまた、核酸のすべての可能なサイレント変異を説明する。当業者は、核酸中の各コドン（通常はメチオニンの唯一のコドンであるＡＵＧ、および通常はトリプトファンの唯一のコドンであるＴＧＧを除く）を修飾して、機能的に同一の分子を得ることができることを認識するであろう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載された各配列に内在する。

【００３３】

アミノ酸配列に関して、コードされた配列中の単一アミノ酸またはわずかな割合のアミノ酸を変更、付加または欠失する核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列への個々の置換、欠失および／または付加は、「保存的に修飾された変異体」であり、ここで、その変更は、化学的に類似したアミノ酸によるアミノ酸の置換をもたらす。機能的に類似するアミノ酸を提供する保存的置換表は、当技術分野で周知である。そのような保存的に修飾された変異体は、多型変異体、種間ホモログおよび対立遺伝子に加えられ、それらを排除しない。限定されないが、以下の８つの群はそれぞれ、互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する。

１）アラニン（Ａ）、グリシン（Ｇ）；
２）アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）；
３）アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）；
４）アルギニン（Ｒ）、リジン（Ｋ）；
５）イソロイシン（Ｉ）、ロイシン（Ｌ）、メチオニン（Ｍ）、バリン（Ｖ）；
６）フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）；
７）セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）；および
８）システイン（Ｃ）、メチオニン（Ｍ）。

【００３４】

特定の基準配列（例えば、全長基準配列）と少なくとも５０、６０、７０、７５、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または１００％のアミノ酸配列同一性を含むアミノ酸配列もまた、前記活性の特定の活性または画分を保持する限り、「保存的に修飾された変異体」である。配列同一性は、本明細書中に記載される方法を使用して、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＡＬＩＧＮ、またはデフォルトパラメータを使用する当技術分野で公知の別のアライメントソフトウェアもしくはアルゴリズムを使用して、２つの配列をアライメントすることによって決定され得る。

【００３５】

特に明記しない限り、用語「対象」（または使用される場合、「患者」もしくは「個体」）は動物を指す。いくつかの実施形態では、対象は脊椎動物である。いくつかの実施形態では、対象は哺乳動物である。限定されないが、哺乳動物は、実験用哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、非ヒト霊長類、哺乳動物疾患モデルなど）であってもよく、または農業用哺乳動物（例えば、ウマ、ヒツジ、ウシ、ブタ、ラクダなど）もしくは家庭内哺乳動物（例えば、イヌ、ネコなど）であってもよい。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。

【００３６】

ＩＩ．遺伝子送達システム

【００３７】

ペイロード遺伝子を送達するためのシステムが本明細書に開示される。このシステムは、プラスミドおよびトランスポーター核酸を含むビフィドバクテリウム属細菌を含む。トランスポーター核酸は、細菌においてトランスポーター核酸を発現するように構成された

第１のプロモーターおよび第１のターミネーターと作動可能に会合している。トランスポーター核酸は、アミノ末端からカルボキシ末端の順序で、細菌分泌シグナルペプチド、ＤＮＡ結合ドメインおよび細胞透過性ペプチドを含むトランスポーターポリペプチドをコードする。ＤＮＡ結合ドメインは、プラスミドと会合してポリペプチド－プラスミド複合体を形成するように構成される。細菌分泌シグナルペプチドは、細菌からポリペプチド－プラスミド複合体を分泌するように構成される。細胞透過性ペプチドは、ポリペプチド－プラスミド複合体を真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞、ヒト細胞など）に導入するように構成される。プラスミドは、ペイロード（例えば、ペイロードタンパク質またはＲＮＡ）をコードする配列を有するペイロード核酸を含み、ペイロード核酸は、真核生物細胞においてペイロード核酸を発現し、ペイロードを生成するように構成された第２のプロモーターおよび第２のターミネーターと作動可能に会合している。

【００３８】

ビフィドバクテリウム属の非限定的な例として、Ｂ．アドレセンティス（Ｂ．ａｄｏｌｅｓｃｅｎｔｉｓ）、Ｂ．アングラータム（Ｂ．ａｎｇｕｌａｔｕｍ）、Ｂ．アニマリス（Ｂ．ａｎｉｍａｌｉｓ）、Ｂ．アステロイデス（Ｂ．ａｓｔｅｒｏｉｄｅｓ）、Ｂ．ビフィダム（Ｂ．ｂｉｆｉｄｕｍ）、Ｂ．ボウム（Ｂ．ｂｏｕｍ）、Ｂ．ブレーベ（Ｂ．ｂｒｅｖｅ）、Ｂ．カテヌラタム（Ｂ．ｃａｔｅｎｕｌａｔｕｍ）、Ｂ．コエリナム（Ｂ．ｃｈｏｅｒｉｎｕｍ）、Ｂ．コリネフォルメ（Ｂ．ｃｏｒｙｎｅｆｏｒｍｅ）、Ｂ．クニクリ（Ｂ．ｃｕｎｉｃｕｌｉ）、Ｂ．デンティコレンス（Ｂ．ｄｅｎｔｉｃｏｌｅｎｓ）、Ｂ．デンティウム（Ｂ．ｄｅｎｔｉｕｍ）、Ｂ．ガリウム（Ｂ．ｇａｌｌｉｃｕｍ）、Ｂ．ガリナルム（Ｂ．ｇａｌｌｉｎａｒｕｍ）、Ｂ．インディカム（Ｂ．ｉｎｄｉｃｕｍ）、Ｂ．イノピナタム（Ｂ．ｉｎｏｐｉｎａｔｕｍ）、Ｂ．インファンティス（Ｂ．ｉｎｆａｎｔｉｓ）、Ｂ．ロンガム（Ｂ．ｌｏｎｇｕｍ）、Ｂ．マグナム（Ｂ．ｍａｇｎｕｍ）Ｂ．メリシカム（Ｂ．ｍｅｒｙｃｉｃｕｍ）、Ｂ．ミニマム（Ｂ．ｍｉｎｉｍｕｍ）、Ｂ．シュードカテニュレイタム（Ｂ．ｐｓｅｕｄｏｃａｔｅｎｕｌａｔｕｍ）、Ｂ．シュードロンガム（Ｂ．ｐｓｅｕｄｏｌｏｎｇｕｍ）、Ｂ．プロラム（Ｂ．ｐｕｌｌｏｒｕｍ）、Ｂ．ルミナンティウム（Ｂ．ｒｕｍｉｎａｎｔｉｕｍ）、Ｂ．サエクラレ（Ｂ．ｓａｅｃｕｌａｒｅ）、Ｂ．サブチル（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｅ）、Ｂ．テルマシドフィラム（Ｂ．ｔｈｅｒｍａｃｉｄｏｐｈｉｌｕｍ），Ｂ．サーモフィラム（Ｂ．ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｍ）およびＢ．ツルミエンス（Ｂ．ｔｓｕｒｕｍｉｅｎｓｅ）が挙げられ、代替の実施形態は、前述の１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、細菌はビフィドバクテリウム・ロンガム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｏｎｇｕｍ）である。いくつかの実施形態では、細菌はビフィドバクテリウム・ロンガム亜種（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｏｎｇｕｍ ｓｕｂｓｐ．ｌｏｎｇｕｍ）である。

【００３９】

本明細書で使用される場合、「プラスミド」は、染色体ＤＮＡから物理的に分離され、独立して複製することができるＤＮＡ分子を意味する。例えば、プラスミドは環状二本鎖ＤＮＡ分子であり得る。プラスミドは「発現ベクター」であり得、それは、特定の宿主生物（例えば、細菌または真核生物の発現ベクター）におけるコード配列の発現を促進する、作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列を含む組換えベクター（プラスミドなど）を指す。発現ベクターは、コード配列に作動可能に連結されたプロモーター、それに続く転写終結部位（すなわち、ターミネーター）含む「発現カセット」を含み得る。発現カセットはまた、カセット内の所望の位置に１つ以上のクローニング部位または多発性のクローニング部位を含んで、配列のカセット内への導入またはカセットからの除去をそれぞれ可能にする。プラスミドは、任意の数の発現カセット、例えば、少なくとも１つ、２つ、３つまたはそれ以上の発現カセットを含み得る。発現ベクターは、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌またはそれらの組み合わせにおける発現のための少なくとも１つ、２つ、３つまたはそれ以上の原核生物発現カセットを含み得るか、またはそれらのみからなり得る。発現ベクターは代替的に、またはさらに、真核生物（例えば、哺乳動物、ヒトなど）細胞における発現のための１つ、２つ、３つまたはそれ以上の真核生物（例えば、哺乳動物、

ヒトなど）発現カセットを少なくとも含み得るか、またはそれらのみからなり得る。プラスミドは、例えばコード配列の発現が意図される標的または宿主細胞における複製に適した複製起点を含む、１つまたは複数の複製起点を有し得る。例えば、プラスミドは、細菌細胞（例えば、ビフィドバクテリウム属細菌）における複製のための１つまたは複数の複製起点を有し得、かつ／または真核生物（例えば哺乳動物）細胞（例えば、ヒト細胞）における複製のための１つまたは複数の複製起点を有し得る。プラスミドはまた、リボソーム結合部位および／または他の配列を含み得る。特定の実施形態では、トランスポーター核酸はプラスミドの一部を形成する。特定の実施形態では、トランスポーター核酸は、プラスミドから分離している（例えば、細菌染色体または第２のプラスミドにおいて）。いくつかの実施形態では、プラスミドは最大１６ｋｂのサイズである。

【００４０】

細菌および／または真核生物（例えば哺乳動物）用途に適したプラスミドは当技術分野で周知であり、特定の目的のために慣例的に設計および開発されている。いくつかの例は、ＷＯ／２０１５／１２０５４１号およびＷＯ／２０１５／１２０５４２号に記載されている。細菌および脊椎動物（例えば哺乳動物）におけるポリペプチドの発現に適したプラスミドの非限定的な例は、ｐＦＲＧ３．５－ＣＭＶ－ＧＬｕｃ（配列番号４３；表１）であり、これは、トランスポーターポリペプチド「ＨＴＰ」（アラビノシダーゼシグナル配列、Ｈｕ　ＤＮＡ結合ドメイン、転写トランス活性化因子（Ｔａｔ）形質導入ドメイン；配列番号２）の非限定的な例を細菌において発現するように、一旦発現したらＨＴＰのＨｕ　ＤＮＡ結合ドメインによって結合されるように、次いで発現、およびペイロード、すなわち分泌されたＧａｕｓｓｉａルシフェラーゼの生成のために真核生物細胞（例えば哺乳動物細胞）に輸送されるように設計されている。

【００４１】

使用／採用され得る多くの他のプラスミドが公知であり、その多くの非限定的な例は、ＷＯ／２０１５／１２０５４１号およびＷＯ／２０１５／１２０５４２号に記載されており、ｐＭＷ２１１、ｐＢＡＤ－ＤＥＳＴ４９、ｐＤＯＮＲＰ４－Ｐ１Ｒ、ｐＥＮＴＲ－ＰＢＡＤ、ｐＥＮＴＲ－ＤＵＡＬ、ｐＥＮＴＲ－ｔｅｒｍ、ｐＢＲ３２２、ｐＤＥＳＴＲ４－Ｒ３、ｐＢＧＳ１８－Ｎ９ｕｃ８、ｐＢＳ２４Ｕｂ、ｐＵｂＮｕｃ、ｐＩＸＹ１５４、ｐＢＲ３２２ＤＥＳＴ、ｐＢＲ３２２ＤＥＳＴ－ＰＢＡＤ－ＤＵＡＬ－ｔｅｒｍ、ｐＪＩＭ２０９３、ｐＴＧ２２４７、ｐＭＥＣ１０、ｐＭＥＣ４６、ｐＭＥＣ１２７、ｐＴＸ、ｐＳＫ３６０、ｐＡＣＹＣ１８４、ｐＢＯＥ９３、ｐＢＲ３２７、ｐＤＷ２０５、ｐＫＣＬ１１、ｐＫＫ２２４７、ｐＭＲ６０、ｐＯＵ８２、ｐＲ２１７２、ｐＳＫ３３０、ｐＳＫ３４２、ｐＳＫ３５５、ｐＵＨＥ２１－２、ｐＥＨＬＹＡ２－ＳＤを含む（限定されない）。例えば、Ｓｔｒｉｔｚｋｅｒ，ｅｔ　ａｌ．Ｉｎｔｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｖｏｌ．２９７，ｐｐ．１５１－１６２（２００７）；Ｇｒａｎｇｅｔｔｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．ｖｏｌ．７２，ｐｐ．２７３１－２７３７（２００４），Ｋｎｕｄｓｅｎ　ａｎｄ　Ｋａｒｌｓｔｒｏｍ，Ａｐｐ．ａｎｄ　Ｅｎｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．ｐｐ．８５－９２，ｖｏｌ．５７，ｎｏ．１（１９９１），Ｒａｏ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ　ｐｐ．１１１９３－１１９９８，ｖｏｌ．１０２，ｎｏ．３４（２００５）．を参照されたい。当業者は、本開示の教示に照らして、代替のプラスミドが使用され得ること、または所望の配列を組み合わせるために、上記のプラスミドが修飾され得ることを理解するであろう。例えば、プラスミドは、さらなる複製起点を挿入すること、または複製起点を置換すること、適切なプロモーターおよび終結配列を含む発現カセットを導入すること、１つまたは複数のＤＮＡ結合配列、ＤＮＡ認識部位を付加すること、または本明細書に記載のペイロードポリペプチド／タンパク質／ＲＮＡ、他の目的の生成物、目的のポリペプチドまたは目的のタンパク質、またはそれらの組み合わせをコードする配列を付加することによって修飾され得る。いくつかの実施形態では、プラスミドの隣接する機能性構成要素は、連結配列によって連結され得る。

【００４２】

限定されないが、本明細書で使用される「コード配列」は、ポリペプチドをコードし、

（そのような場合）少なくとも開始コドンおよび終止コドンによって境界されているヌクレオチド配列を含む。コード配列はまた、ＲＮＡペイロードをコードする核酸配列を含む。本明細書で使用される場合、ペイロード（本明細書では「目的の生成物」または「カーゴ」とも呼ばれ得る）を「コードする（ｅｎｃｏｄｅ）」（または「コードする（ｃｏｄｅ）」）核酸配列とは、前記核酸配列が前記ペイロードのコード配列を含むことを意味する。前駆体または中間体を介してインビボで作られる生成物またはドメイン（例えば、生成物またはドメインが、翻訳後修飾を介して作られ得る場合）を「コードする」という文脈で使用される場合、前記生成物またはドメインを「コードする」核酸は、前記前駆体または中間体のヌクレオチド配列を含む核酸を含む。これは、翻訳後修飾された生成物またはドメインに関する情報が前駆体／中間体の配列内に含まれるためである。翻訳後修飾の非限定的な例としては、シグナルペプチドプロセシング、プロペプチドプロセシング、タンパク質フォールディング、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、カルボニル化、ガンマカルボキシル化、およびβ－ヒドロキシル化、酸化、ミリストイル化、パルミトイル化、イソプレニル化、プレニル化、グリピエーション、リポイル化、フラビン結合、ヘムＣ結合、ホスホパンテエチニル化、レチニリデンシッフ塩基形成、ジフサミド形成、エタノールアミンホスホグリセロール結合、ヒプシン形成、アシル化、アセチル化、ホルミル化、アルキル化、メチル化、アミド化、アミノ酸付加、アルギニル化、ポリグルタミル化、ポリグリシル化、ブチリル化、マロニル化、ヒドロキシル化、ヨウ素化、ヌクレオチド付加、リン酸エステル（Ｏ結合）またはホスホルアミデート（Ｎ結合）形成、リン酸化、アデニル化、プロピオニル化、ピログルタメート形成、Ｓ－グルタチオニル化、Ｓ－ニトロシル化、Ｓ－スルフェニル化、スクシニル化、硫酸化、糖化、カルバミル化、カルボニル化、タンパク質分解切断、ラセミ化およびタンパク質スプライシングが挙げられる。本明細書で使用される場合、用語「遺伝子」（例えば「ペイロード遺伝子」中）は、遺伝子がペプチド、ポリペプチド、タンパク質またはＲＮＡをコードすることができ、多シストロン性コード配列（例えばＩＲＥＳによって分離される）または１つ以上の自己切断配列（例えば、Ｐ２Ａなどの２Ａ自己切断ペプチド）を含むコード配列を含むことができるような「コード配列」を指す。

【００４３】

上記のように、トランスポーター核酸（またはトランスポーター核酸配列）は、細菌において、トランスポーター核酸（またはトランスポーター核酸配列）を発現し、したがってトランスポーターポリペプチドを生成するように構成された第１のプロモーターおよび第１のターミネーターと作動可能に会合している。

【００４４】

本明細書で使用される場合、核酸またはポリペプチドを発現する文脈における「発現する」または「発現」という用語は、核酸の転写を指す。核酸が１つのポリペプチド（または複数のポリペプチド）をコードする場合、「発現」はまた、核酸によってコードされるポリペプチド／タンパク質産物の製造における翻訳（ならびに任意の翻訳後プロセシング）を指す。

【００４５】

「プロモーター」は、排他的ではなく典型的に転写開始部位の５’であり、正確な転写開始を付与するのに十分なＤＮＡ領域である。プロモーターは、典型的には、ＲＮＡポリメラーゼおよび転写を開始するための他のタンパク質または因子の認識および結合に関与するＤＮＡの領域を含む。いくつかの実施形態では、プロモーターは構成的に活性であるが、代替的な実施形態では、プロモーターは条件付きで活性である（例えば、転写が特定の生理学的条件下でのみ開始される場合）。したがって、条件付きで活性なプロモーターは、コード配列の発現が生理学的状態を変化させることによって制御され得るという意味で「誘導性」であり得る。潜在的な誘導性プロモーターの非限定的な例としては、これらに限定されないが、ＩＰＴＧ誘導性プロモーター、例えば、ｌａｃＵＶ５プロモーター（Ｍｏｆｆａｔｔ，Ｂ．Ａ．，ａｎｄ　Ｓｔｕｄｉｅｒ，Ｆ．Ｗ．（１９８６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１８９，１１３－１３０）、テラサイクリン誘導性プロモーター（Ｇａｔｚ

，Ｃ．，１９９７，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｌａｎｔ Ｐｈｙｓｉｏｌ．Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８，８９ １０８）、ステロイド誘導性プロモーター（Ａｏｙａｍａ，Ｔ．ａｎｄ Ｃｈｕａ，Ｎ．Ｈ．，１９９７，Ｐｌａｎｔ Ｊ．２，３９７－４０４）、およびエタノール誘導性プロモーター（Ｓａｌｔｅｒ，Ｍ．Ｇ．，ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｐｌａｎｔ Ｊｏｕｒｎａｌ １６，１２７－１３２；Ｃａｄｄｉｃｋ，Ｍ．Ｘ．，ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．１６，１７７ １８０）が挙げられる。本明細書に記載の任意のプロモーター（例えば、以下に定義されるような第１のプロモーターまたは第２のプロモーターなど）は、天然であっても人工であってもよい。例えば、限定されないが、人工プロモーターは多数のプロモーターを含み得る。

【００４６】

「ターミネーター」または「転写終結部位」は、転写終結を調節し、典型的にはＲＮＡ安定性を付与するヌクレオチド配列を含む遺伝子またはコード配列（例えば、ウイルスゲノムまたはペイロード遺伝子、遺伝子（複数）もしくは配列）の３’隣接領域を指す。

【００４７】

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」、「作動可能に会合して」および類似の語句は、核酸に関して使用される場合、互いに機能する関係にある核酸配列の連結を指す。例えば、作動可能に連結されたプロモーター配列、オープンリーディングフレームおよびターミネーター配列は、ＲＮＡ分子の正確な生成をもたらす。いくつかの態様では、作動可能に連結された核酸要素は、オープンリーディングフレームの転写、および最終的にはポリペプチドの生成（すなわち、オープンリーディングフレームの発現）をもたらす。

【００４８】

第１のプロモーター（「細菌プロモーター」と呼ばれることもある）は、細菌においてトランスポーター核酸配列の転写を開始する任意のプロモーター（または複数のプロモーター）であり得る。様々な細菌において作動するプロモーターは周知である。ビフィドバクテリウム属を含む、いくつかの細菌内の目的の生成物の発現に使用され得る構成的および誘導性プロモーターの非限定的な例は、Ｓｕｎ ｅｔ ａｌ．（２０１２，Ａｐｐｌｉｅｄ Ｅｎｖｉｒｏｎ Ｍｉｃｒｂｉｏｌ ７８：５０３５－５０４２）に見出すことができ、構成的プロモーター、例えば、Ｐｈｕｐ（ヒストン様タンパク質をコードする遺伝子由来のプロモーター；「Ｈｕｐ」プロモーターとも呼ばれる）、Ｐｇａｐ（グリセルアルデヒド３リン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子由来のプロモーター）、Ｐａｍｙ（α－アミラーゼをコードする遺伝子由来のプロモーター）、１６Ｓ ｒＲＮＡをコードする遺伝子由来のプロモーター、Ｐｈｅｌｐ、ラムダファージプロモーターP_{RPL}、およびα－ガラクトシダーゼをコードする遺伝子由来の誘導性プロモーター（ラフィノースの存在下で誘導される）、熱、エタノール、浸透圧誘導性プロモーター、およびアラビノース誘導性ａｒａＣ－P_{BAD}発現系が挙げられる。ある特定の実施形態では、第１のプロモーターは、１６Ｓ ｒＲＮＡプロモーター（または「ＲＢプロモーター」、内因性構成的ビフィドバクテリウム特異的リボソームプロモーター、例えば配列番号４３のヌクレオチド３３６３～３４３６を参照のこと）またはＨｕｐプロモーター（例えば、ビフィドバクテリウム特異的ｈｕｐ遺伝子プロモーター）である。

【００４９】

第１のターミネーターは、細菌中の細菌プロモーターと機能する任意のターミネーターであり得、いくつかの実施形態では、第１のターミネーターは細菌特異的であり得る。細菌ターミネーターの非限定的な例としては、ＨＵターミネーター、ｈｕｐ遺伝子ターミネーターおよび１６Ｓ ｒＲＮＡターミネーターが挙げられる。いくつかの実施形態では、第１のターミネーターは、ＳｙｎＳターミネーター（内因性ビフィドバクテリウム特異的リボソームターミネーター；例えば、配列番号４３のヌクレオチド３８３９～３８８０を参照のこと）またはｈｕｐ遺伝子ターミネーターである。

【００５０】

いくつかの実施形態では、第１のプロモーターおよび第１のターミネーターは、それぞ

れＲＢプロモーターおよびＳｙｎＳターミネーターである。いくつかの実施形態では、第１のプロモーターおよび第１のターミネーターは、それぞれｈｕｐ遺伝子プロモーターおよびターミネーターである。

【００５１】

いくつかの実施形態では、プラスミドは、細菌において耐性遺伝子を発現するように構成されたさらなるプロモーターおよびターミネーターと作動可能に会合する抗生物質または化学耐性遺伝子（例えば、スペクチノマイシン耐性遺伝子）をさらに含み得る。そのようなさらなるプロモーターおよびターミネーターは、第１のプロモーターおよびターミネーターと同じであっても異なっていてもよく、それぞれ第１のプロモーターおよび第１のターミネーターについて上で定義されたいずれかであってもよい。

【００５２】

上記の通り、プラスミドは、真核生物細胞においてペイロード核酸を発現するように構成された第２のプロモーターおよび第２のターミネーターと作動可能に会合しているペイロード核酸を含む。

【００５３】

第２のプロモーターは、真核生物細胞において（例えば哺乳動物細胞において）ペイロード核酸（またはペイロード核酸コード配列）の転写を開始する任意のプロモーターであり得る。いくつかの実施形態では、第２のプロモーターは真核生物プロモーターである。いくつかの実施形態では、第２のプロモーターはウイルスプロモーターである。いくつかの実施形態では、第２のプロモーターはバクテリオファージ由来プロモーターである。限定されないが、腫瘍細胞または腫瘍微小環境中の他の細胞を含む真核生物細胞内に目的の生成物を発現させるために使用され得る構成的および／または誘導性プロモーターは、公知であり、列挙するには数が多すぎる（例えば、現行のリストは、Ｔｈｅ　Ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ　Ｐｒｏｍｏｔｅｒ　Ｄａｔａｂａｓｅ，Ｄｒｅｏｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５，Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．４３（Ｄ１）：Ｄ９２－Ｄ９６で提供され、オンラインで入手可能である）。第２のプロモーター用プロモーターの非限定的な例としては、ＣＭＶ（サイトメガロウイルス）プロモーター（例えば、配列番号４３のヌクレオチド２１６６～２３８５）、ＳＶ４０（シミアンウイルス４０）プロモーター、ＵＢＣ（ヒトユビキチンＣ）プロモーター、ＥＦ１Ａ（ヒト伸長因子１α）プロモーター、ＰＧＫ（マウスホスホグリセリン酸キナーゼ１）プロモーター、ＣＡＧ（ニワトリβ－アクチンに融合したＣＭＶエンハンサー）プロモーター、ＣＨＥＦ－１α（チャイニーズハムスター伸長因子１α）プロモーター、またはテトラサイクリンもしくはＩＰＴＧ誘導性プロモーターが挙げられる。第２のプロモーターは、例えば、ＲＮＡ干渉のための低分子ＲＮＡペイロード（ｓｈＲＮＡなど）の発現のために、ＲＮＡＰ　ＩＩＩによって標的化されるプロモーターであり得、そのようなプロモーターの非限定的な例は、Ｕ６プロモーター（内因性ｓｎＲＮＡプロモーター）、Ｈ１プロモーター（内因性ｎｃＲＮＡ）などである。第２のターミネーターは、第２のプロモーターと共に機能する任意のターミネーターであり得る。例えば、限定するものではないが、第２のターミネーターは、ＴＫ　ポリＡであり得る（例えば、配列番号４３のヌクレオチド３０３６～３３５６を参照のこと）。いくつかの実施形態では、第２のプロモーターはＣＭＶプロモーターまたはＳＶ４０プロモーターを含み、第２のターミネーターはＴＫ　ポリＡである。いくつかの実施形態では、第２のプロモーターは、これらに限定されないが、ＣＭＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＵＢＣプロモーター、ＥＦ１Ａプロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＣＡＧプロモーター、ＣＨＥＦ－１αプロモーター、テトラサイクリンもしくはＩＰＴＧ誘導性プロモーター、Ｕ６プロモーター、またはＨ１プロモーターを含む。

【００５４】

特定の実施形態では、第２のプロモーターは非特異的である。他の実施形態では、第２のプロモーターは組織特異的または細胞特異的である。エンハンサーは、プロモーターの活性を増強するために使用され得る。例えば、ＴＹＲプロモーターの活性は、マウスエンハンサー要素（例えば、ＴＥＴＰプロモーター構築物またはＴｙｒｅｘ２プロモーター）

を含めることの他に、ヒトチロシナーゼ遠位要素（ＴＤＥ）を含めることによっても増強されている（Ｐｌｅｓｈｋａｎ　ｅｔ　ａｌ．、２０１１、同箇所）。代替的な実施形態では、第２のプロモーターは、この要素について上に列挙した例示的なプロモーターのいずれか１つ以上である。

【００５５】

プラスミドは、コザック配列および／またはＩＲＥＳ配列をさらに含み得る。

【００５６】

いくつかの実施形態では、例えば、第２のプロモーターがＣＭＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、または上記もしくは本明細書の他の箇所に列挙された任意の他の第２のプロモーターを含む場合、第２のプロモーター、およびペイロード核酸のコード配列（すなわち、ペイロードコード配列）は、プラスミド上に、それらの間のコザック配列と共に配置される。いくつかの実施形態では、第２のプロモーターおよびペイロードコード配列は、プラスミド上にそれらの間にコザック配列なしで配置される。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）配列を含むか、または２Ａ自己切断ペプチド配列もしくは翻訳中のリボソームスキップを誘導する他の配列をコードする。ペイロード核酸がＩＲＥＳ配列を含むいくつかの実施形態では、コザック配列は存在しない。コザック配列は、哺乳動物リボソームによって翻訳開始部位として認識されるので、コザック配列を除去することは、５’ＵＴＲ（「非翻訳領域」）に位置するＩＲＥＳによって媒介される翻訳に有利であろう。コザック配列が上に定義されるように配置されるいくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）配列を含む。ＩＲＥＳ配列の非限定的な例は、配列番号４５のヌクレオチド６３００～６８７８である。２Ａ自己切断ペプチド配列が知られている（例えば、Ｔ２Ａ、Ｐ２Ａ、Ｅ２Ａ、Ｆ２Ａなど）。

【００５７】

いくつかの実施形態では、第２のプロモーターは、真核生物細胞または標的組織／細胞に固有のＲＮＡポリメラーゼによって認識されるリボソームＲＮＡ遺伝子プロモーターである。これらの実施形態では、第２のターミネーターは、少なくとも１つの「Ｓａｌボックス」配列モチーフ（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０または１０を超えるＳａｌボックス配列モチーフ）を含み得る。Ｓａｌボックスモチーフは、ｒＲＮＡ遺伝子（例えば、ヒト、マウスなどにおいて）に見出され、転写終結因子１（ＴＴＦ－１）と呼ばれるＤＮＡ結合タンパク質によって認識される。Ｓａｌボックス配列モチーフへのＴＴＦ－１の結合は、ＲＮＡポリメラーゼＩ転写の終結および伸長機構からの新生ＲＮＡ鎖の放出に十分である。マウスモチーフに機能的に類似する同様の配列要素がヒトｒＲＮＡ遺伝子に存在する。Ｓａｌボックスモチーフの多数のコピーは、新生転写物を真正プレｒＲＮＡ末端にプロセシングする役割を果たすピリミジンに富む配列に隣接する、ｒＲＮＡ遺伝子ターミネーター領域内に自然に存在する。単一のＳａｌボックス配列モチーフは、ＴＴＦ－１によって結合されると、無細胞転写アッセイおよびトランスフェクション実験の両方において転写を終結させることが示されており、ターミネーターシグナルとして必要とされるのは、単一のＳａｌボックスのみであることを示している。

【００５８】

いくつかの実施形態では、第２のプロモーターはバクテリオファージ由来プロモーターである。バクテリオファージ由来プロモーターの非限定的な例は、Ｔ７プロモーター、Ｔ３プロモーターおよびｓｐ６プロモーターを含む。これらの実施形態では、第２のターミネーターは、ｒｈｏ非依存性ターミネーター（「内因性プロモーター」としても知られる）であり得る。バクテリオファージ由来プロモーターは、哺乳動物細胞では自然発現されない適合性ＲＮＡポリメラーゼ（すなわち、バクテリオファージ由来プロモーターを認識するＲＮＡポリメラーゼ）の存在を必要とする。例えば、Ｔ７、Ｔ３およびＳＰ６は、それぞれＴ７　ＲＮＡポリメラーゼ、Ｔ３　ＲＮＡポリメラーゼおよびＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼを必要とする。したがって、バクテリオファージ由来プロモーターを使用する実施形態では、プラスミドは、哺乳動物細胞（例えば、腫瘍細胞）において、バクテリオフ

ァージ由来プロモーターに特異的な異種または外因性ＲＮＡポリメラーゼを発現するように構成された第３プロモーターおよび第３ターミネーターと作動可能に会合したＲＮＡポリメラーゼ核酸をさらに含む。「バクテリオファージ由来プロモーターを認識するＲＮＡポリメラーゼ」という語句は、特定のバクテリオファージ由来プロモーターと共に機能する同族ＲＮＡポリメラーゼを含むが、これに限定されない。他のバクテリオファージ由来プロモーターおよびそれらの同族ＲＮＡポリメラーゼが知られている。第３のプロモーターおよび第３のターミネーターは、ＲＮＡポリメラーゼを発現するように真核生物細胞において（例えば哺乳動物細胞において）機能する、天然または人工のプロモーターおよびターミネーター、例えば構成的または誘導性プロモーターの任意の組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、第３のプロモーターは、これらに限定されないが、ＣＭＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＵＢＣプロモーター、ＥＦ１Ａプロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＣＡＧプロモーター、ＣＨＥＦ－１αプロモーター、またはテトラサイクリンもしくはＩＰＴＧ誘導性プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、第３のプロモーターは非特異的である。いくつかの実施形態では、第３のプロモーターは組織特異的である。いくつかの実施形態では、第３のターミネーターは、ＴＫポリＡを含む。

【００５９】

いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、単一のペイロードコード配列を含む。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、多数のペイロードコード配列を含む。後者の実施形態は、真核生物細胞において（例えば哺乳動物細胞において）さらなるペイロードを発現するように構成されたさらなるプロモーターおよびターミネーターを含み得る。さらなるプロモーターおよびターミネーターは、真核生物細胞において（例えば哺乳動物細胞において）さらなるペイロードを発現するように真核生物細胞で機能する、天然または人工のプロモーターおよびターミネーター、例えば構成的または誘導性プロモーターの任意の組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、さらなるプロモーターは、これらに限定されないが、ＣＭＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＵＢＣプロモーター、ＥＦ１Ａプロモーター、ＰＧＫプロモーター、ＣＡＧプロモーター、ＣＨＥＦ－１αプロモーター、またはテトラサイクリンもしくはＩＰＴＧ誘導性プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、さらなるプロモーターは非特異的である。いくつかの実施形態では、さらなるプロモーターは組織特異的である。いくつかの実施形態では、さらなるターミネーターは、ＴＫポリＡを含む。

【００６０】

いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、複数のペイロードコード配列を含み、ペイロード核酸は、真核生物細胞（例えば哺乳動物細胞）での発現のために単一のプロモーターおよびターミネーターと作動可能に会合し、各ペイロードコード配列はＩＲＥＳ要素によって分離されている。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、複数のペイロードコード配列を含み、ペイロード核酸は、真核生物細胞（例えば哺乳動物細胞）での発現のために単一のプロモーターおよびターミネーターと作動可能に会合し、各ペイロードコード配列は、翻訳中にリボソームスキップを引き起こす配列（例えば、２Ａ自己切断ペプチドをコードする配列）によって分離されている。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、複数のペイロードコード配列を含み、核ペイロードコード配列は、別個のプロモーターおよびターミネーターと、真核生物細胞（例えば哺乳動物細胞）での発現のために作動可能に会合する。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、複数のプロモーター、ターミネーターおよびＩＲＥＳ配列、またはリボソームスキップを誘導する配列の組み合わせ（すなわち、前述のうちの１つまたは複数の組み合わせ）を含む。いくつかの実施形態では、ペイロードをコードする複数の配列の一部は、本明細書中で定義されるような別個のプラスミド上で分離される場合があり、別個のプラスミドはそれぞれ、本明細書で定義される別個の細菌中に存在し得る。

【００６１】

上記のように、トランスポーター核酸は、アミノ末端からカルボキシ末端の順序で、細菌分泌シグナルペプチド（ＢＳＳＰ）、ＤＮＡ結合ドメイン（ＤＢＤ）および細胞透過性

ペプチド（ＣＰＰ）を含むトランスポーターポリペプチド（「ハイブリッド輸送タンパク質」または新規ハイブリッドタンパク質」とも呼ばれる）をコードする。ＤＮＡ結合ドメインは、プラスミドと会合してポリペプチド－プラスミド複合体を形成するように構成される。細菌分泌シグナルペプチドは、細菌からポリペプチド－プラスミド複合体を分泌するように構成される。細胞透過性ペプチドは、ポリペプチド－プラスミド複合体を真核生物細胞（例えば哺乳動物細胞）に導入するように構成される。

【００６２】

ポリペプチド－プラスミド複合体は、ＤＮＡ結合ドメインのプラスミドへの直接的または間接的な結合（共有結合または非共有結合）を介して会合する。広範囲の適切なドメインおよびそれらの相補的ＤＮＡ結合配列は当業者によって容易に特定されるが、いくつかの非限定的な例示的な例は、米国特許第６，００７，９８８号に開示されている。本明細書中のある特定の実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、ＭｅｒＲ、ジンクフィンガーまたはヒストン様ＤＮＡ結合タンパク質である（またはそれに由来する）か、またはＨｕタンパク質である（またはそれに由来する）か、またはホメオボックスＤＮＡ結合タンパク質である（またはそれに由来する）。Ｈｕタンパク質は、一般にホメオボックス様タンパク質と見なされることが理解されよう。さらなるＤＮＡ結合ドメインおよび変異体（例えば保存的変異体）は、利用可能なデータベース、スクリーニング方法および周知の技術を使用して当業者によって容易に特定されるであろう。適切なＤＮＡ結合ドメインは、任意の一般的な型のものであり得、ヘリックス－ターン－ヘリックス、ジンクフィンガー、ロイシンジッパー、ウィングドヘリックス、ウィングドヘリックス－ターン－ヘリックス、ヘリックスループヘリックス、ＨＭＧボックス、Ｗｏｒ　３およびＲＮＡガイド結合ドメインを含むがこれらに限定されない。ＤＮＡ結合ドメインが実施形態において利用され得るＤＮＡ結合タンパク質のいくつかの非限定的な例示的な例としては、ヒストン、ヒストン様タンパク質、転写プロモーター、転写リプレッサーおよび転写調節因子が挙げられ、これらは広範囲の代替の供給源およびオペロンから引き出され得る。

【００６３】

トランスポーターポリペプチド中のＤＮＡ結合ドメインは、プラスミドの核酸配列を非特異的に結合することができ、またはＤＮＡ結合ドメインは、プラスミド中の対応するＤＮＡ認識部位またはコンセンサス配列に特異的であり得る。特異的ＤＮＡ結合ドメイン－核酸認識部位の組み合わせは、当技術分野で公知である。特定の核酸配列と結合するＤＮＡ結合ドメインの非限定的な例には、ＭｅｒＲ　ＤＮＡ結合ドメイン（例えば、限定されないが、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列についてそれぞれ配列番号４および５）が含まれ、この場合、プラスミドは、ＭｅｒＲ　ＤＮＡ認識部位（例えば、限定されないが、配列番号１０）；およびジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン（例えば、限定されないが、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列についてそれぞれ配列番号８および９）を含み、この場合、プラスミドは、ジンクフィンガーＤＮＡ認識部位（例えば、限定されないが、配列番号１１）をさらに含む。別の非限定的な配列特異的ＤＮＡ結合ドメインはＬａｃＩリプレッサーＤＢＤであり、これは、市販のＰＥＴベクター中の細菌で発現された場合、その同族認識配列に結合することが周知である。非特異的ＤＮＡ結合ドメインの非限定的な例には、Ｈｕ　ＤＮＡ結合ドメイン（例えば、限定されないが、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列についてそれぞれ配列番号６および７）が含まれる。トランスポーター核酸がプラスミドと分離している（例えば、細菌染色体において）実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、プラスミド上の対応するＤＮＡ認識部位に特異的であり得る。

【００６４】

代替的な実施形態では、ＤＮＡ結合ドメインは、上記で言及されたＤＮＡ結合ドメインのうちの１つ以上を含む。トランスポーターポリペプチドは、１つまたは複数のＤＮＡ結合ドメインを含み得、プラスミドは、１つまたは複数のＤＮＡ認識部位を含み得る。例えば、トランスポーターポリペプチドは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１４、１６、１７、１８、１９、２０またはそれ以上のＤＮＡ結合ドメイン、またはそれらの間の任意の数を含み得る。同様に、各プラスミドは、１、２、３、４または４を

超えるＤＮＡ認識部位を含み得る。

【００６５】

本明細書で使用される場合、「細菌分泌シグナルペプチド」または「ＢＳＳＰ」は、配列が細菌から得られたか、人工であるか、または非細菌生物由来であるかどうかにかかわらず、細菌細胞から細菌の細胞外環境への結合ポリペプチドの搬出において機能する配列／ペプチドを意味する。細菌分泌シグナルペプチドは、典型的には、１～３の正に帯電したアミノ酸残基を含有するＮ末端領域（Ｎドメイン）、１０～１５の残基からなる疎水性コア領域（Ｈドメイン）、および、Ｓｅｃ依存性経路のような特定の分泌経路のためにシグナルペプチダーゼ切断部位を含有し得る、より極性の高いＣ末端（Ｃドメイン）を含む三部構造を有する（Ｄｒｉｅｓｓｅｎ＆Ｎｏｕｗｅｎ，２００８，Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ ７７：６４３－６４７）。これらのドメインは配列保存性をほとんど示さないが、細菌分泌シグナルペプチドの存在は、これらのドメインのマッピングおよび適切な分泌シグナルペプチドの測定を支援する適切な分析ツールを使用して、当業者によって容易に決定することができる。例えば、ＳｉｇｎａｌＰ ４．１（Ｐｅｔｅｒｓｅｎ ｅｔ ａｌ．、２０１１、Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｔｈｏｄｓ、８、７８５～７８６）などのシグナル配列予測ソフトウェアを使用して細菌分泌シグナル配列を図示し、決定することができる。さらに、細菌分泌シグナルペプチドは、細菌分泌シグナルペプチドが細菌分泌シグナルペプチドに融合された目的の配列を導入する機能を保持する場合に限り（例えば、トランスポーターポリペプチド）、既知の細菌分泌シグナルペプチドと比較した配列同一性に基づいて分泌シグナルペプチドを選択することによって決定することができる。

【００６６】

細菌分泌シグナルペプチドは、当業者に知られた、さもなければ認識された任意の分泌シグナルペプチドであり得る。例えば、Ｓｕｎ ｅｔ ａｌ．（２０１２，Ａｐｐｌｉｅｄ Ｅｎｖｉｒｏｎ Ｍｉｃｒｂｉｏｌ ７８：５０３５－５０４２）は、ビフィドバクテリウム属と共に使用され得る細菌分泌シグナルペプチドの例を提供している。特定の実施形態では、細菌分泌シグナルペプチドは、Ｂ．アドレッセンティス（Ｂ．ａｄｏｌｅｓｃｅｎｔｉｓ）ＩＮＴ－５７のα－アミラーゼのシグナルペプチド、β－ガラクトシダーゼのシグナルペプチド、Ｂ．ブレーベ（Ｂ．ｂｒｅｖｅ）Ｓｅｃ２からのシグナルペプチド、またはＢ．ロンガム ＸｙｎＦからのシグナルペプチドを含む。特定の実施形態では、細菌分泌シグナルペプチドは、α－Ｌ－アラビノシダーゼシグナルペプチド（例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｏｎｇｕｍ）から）を含む。使用され得るさらなる細菌分泌シグナルペプチドは、Ｓｅｃ依存性タンパク質転位、ＡＢＣトランスポーターまたはオリゴペプチドパーミアーゼに関連するものである。

【００６７】

Ｓｅｃ依存性タンパク質転位の特徴的な細菌分泌シグナルペプチド（Ｄｒｉｅｓｓｅｎ＆Ｎｏｕｗｅｎ，２００８，Ａｎｎ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ ７７：６４３－６６７）は、三部構造（Ｎドメイン－１～３の正荷電アミノ酸残基を有するＮ末端領域；Ｈドメイン－１０～１５の残基を有する疎水性コア領域；Ｃドメイン－シグナルペプチダーゼ切断部位を通常包含する、極性の高いＣ末端）を有する。これらの配列はほとんど保存性を示さない可能性があるが、これらの特性に基づいて都合良く予測することができる。細菌分泌シグナルペプチドの１つの群は、Ｃ末端細胞壁選別シグナルと協調して機能して分泌効率および細胞エンベロープとの会合を増加させ得るＹＳＩＲＫ－Ｇ／Ｓモチーフを有する。

【００６８】

細菌分泌シグナルペプチドは、ＡＴＰのＡＤＰへの加水分解に由来するエネルギーを使用して細胞膜を超えて分子を活発に輸送する内在性膜タンパク質であるＡＢＣトランスポーター（ＡＴＰ結合カセットトランスポーター）と会合し得る（Ｆａｔｈ ａｎｄ Ｋｏｌｔｅｒ，１９９３，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ Ｒｅｖ ５７（４）：９９５－１０１７）。ＡＢＣトランスポーターの例は、Ｍｏｕｓｓａｔｏｖａ ｅｔ ａｌ．（２００８，Ｂｉ

ｏｃｈｅｍｉｃａ ｅｔ Ｂｉｏｐｈｓｙｉｃａ Ａｃｔａ １７７８：１７５７－１７７１）に記載されている。オリゴペプチドパーミアーゼ（Ｏｐｐ）は、多くのグラム陽性およびグラム陰性細菌において同定されているＡＢＣトランスポーターのサブファミリーである。

【００６９】

他の細菌分泌シグナルペプチドは、Ｔａｔ経路に関与するタンパク質（ツインアルギニンシグナルペプチド）、プソイドピリン導入シグナル、ホリン、保留シグナルから使用され得る（例えば、Ｓｉｂｂａｌｄ ｅｔ ａｌ．，２００６，Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃ Ｂｉｏ Ｒｅｖ ７０（３）：７５５－７８８；Ｆｉｌｌｏｕｘ，２０１０，Ｊ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ １９２（１５）：３８４７－３８４９；Ｅｃｏｎｏｍｏｕ ｅｔ ａｌ．，２００６，Ｍｏｌｅｃ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ ６２（２）：３０８－３１９を参照されたい）。

【００７０】

特定の実施形態では、細菌分泌シグナルペプチドは、配列番号１３、１５および１７のいずれか１つ、または配列番号１３、１５および１７のいずれか１つと約５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一である変異体（限定されないが、保存的変異体を含む）配列から選択され、分泌シグナル配列は、ポリペプチド：プラスミド複合体を細菌から導入する機能の少なくとも一部（例えば、少なくとも２５％、少なくとも５０％または少なくとも７５％）を保持するか、またはＤＮＡ結合ドメインに連結された場合にプラスミドを形質転換する（すなわち、逆行性分泌）機能の少なくとも一部（例えば、少なくとも２５％、少なくとも５０％または少なくとも７５％）を保持する。配列番号１３、１５および１７をコードする例示的なヌクレオチド配列をそれぞれ配列番号１２、１４および１６に示すが、所望の配列をコードする任意のヌクレオチド配列が代わりに使用され得、コドンテーブルから入手可能である。特定の実施形態では、細菌分泌シグナルペプチドは、配列番号１３のアミノ酸配列を含む。

【００７１】

ＤＮＡ配列は、特定の細菌に対してコドン最適化されていてもいなくてもよい。いくつかの実施形態では、プラスミド中のコード配列（ペイロードコード配列以外）の１つ以上は、細菌での発現のためにコドン最適化されている。限定されないが、トランスポーター核酸配列は、ビフィドバクテリウム属（例えば、Ｂ．ロンガムなど）における発現のためにコドン最適化され得る。

【００７２】

本明細書で使用される場合、真核生物細胞（例えば、哺乳動物細胞またはヒト細胞）へ「導入する」または「導入」は、真核生物細胞の外部環境から細胞の細胞膜を超えて細胞内に物質を輸送することを意味する。導入の非限定的な例には、ペイロード核酸コード配列の発現のためのポリペプチド－プラスミド複合体の真核生物細胞への輸送が含まれる。本開示では、真核生物細胞の細胞膜を超える導入は、「細胞透過性ペプチド」（ＣＰＰ）を使用して達成される。「ＣＰＰ」という用語は、真核生物細胞の細胞膜を超えて転位することができるペプチドのクラスとして、十分に理解されている。簡潔には、多くのＣＰＰは、複数のアルギニン／リジン残基によってカチオン性かつ親水性であるが、他のＣＰＰは両親媒性または疎水性である。ＣＰＰという用語は、ＴＡＴまたは「転写のトランス活性化因子」（例えばＨＩＶ－１ ＴＡＴまたは任意の他のＴＡＴ）の形質導入ドメインを含む。より確実には、限定するものではないが、ＴＡＴの形質導入ドメイン、すなわちＣＰＰ（ＴＡＴ）または任意の他のＣＰＰへの言及は、天然配列だけでなく、問題のタンパク質またはタンパク質ドメインの所望の機能を実行するのに適したその配列変異体の全範囲も意味すると理解される。例として、ＣＰＰ（ＴＡＴ）の様々な機能性変異体が、Ｓ

ａｌｏｍｏｎｅ ｅｔ ａｌ．（２０１２，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ １６３，２９３－３０３）に記載されている。ＣＰＰの他の非限定的な例としては、単純ヘルペスウイルスのＶＰ２２タンパク質、およびアンテナペディア（Ａｎｔｐ）タンパク質のタンパク質形質導入ドメイン、ならびにタンパク質形質導入ドメインＲｅｖ、Ｐｅｐ１およびトランスポータン（Ｔｒａｎｓｐｏｒｔａｎ）が挙げられる。特定の実施形態では、ＣＰＰドメインは、Ｓａｌｏｍｏｎｅ ｅｔ ａｌ．、（２０１２、同上）に記載されているドメインである。表１は、配列番号１８～４２を含む、例示的なＣＰＰドメインのアミノ酸配列の非限定的な選択を含む。いくつかの実施形態では、ＣＰＰアミノ酸配列は、配列番号１８～４２、または、それと５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％の配列同一性を有し、依然としてＣＰＰ活性を保持する変異体（限定されないが、保存的変異体を含む）（例えば、変異体が由来するＣＰＰの少なくとも２５％、少なくとも５０％または少なくとも７５％のプラスミドトランスフェクション効率によって判定される）の１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、ＣＰＰドメインは、少なくとも３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２のＡｒｇ残基および正味の正電荷を有する、６～３０アミノ酸長（例えば、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９または３０）のペプチドである。いくつかの実施形態では、ＣＰＰドメインは、４～１２残基のポリアルギニンペプチドを含む。当業者は、不相応な実験法または発明的な技術を必要とせずに、アミノ酸配列を、特定の生物において発現させるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に困難なく変換するであろう。したがって、配列番号１８～４２のいずれかのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、これらのアミノ酸配列が与えられたコドンテーブルから得ることができる。例えば、限定されないが、配列番号１８をコードするＤＮＡ配列は、配列番号４３のヌクレオチド３８０３～３８３８に示される。

【００７３】

いくつかの実施形態では、トランスポーターポリペプチドは、配列番号７、１３および１８の３つすべてのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、トランスポーターポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号２、またはその５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％の配列同一性を有し、依然として少なくとも２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％もしくは８０％の細菌分泌活性を保持し、さらに少なくとも２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％もしくは８０％の哺乳動物細胞トランスフェクション効率（インビトロ）を保持する変異体（限定されないが、保存的変異体を含む）を含む。トランスポーターポリペプチドのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、すなわちトランスポーター核酸は、トランスポーターポリペプチドのアミノ酸配列が与えられたコドンテーブルから得ることができる。例えば、限定されないが、配列番号２をコードするＤＮＡ配列は、配列番号４３のヌクレオチド３４３７～３８３８に示される。

【００７４】

いくつかの実施形態では、プラスミドは、不要な遺伝要素を減らすように適応させることができる。例えば、トランスポーター核酸配列は、ペイロードをコードするプラスミドによって運ばれる必要はないが、細菌染色体上でコードされ得る。したがって、いくつかの実施形態では、ペイロード核酸はプラスミド上に含まれ、細菌の染色体はトランスポー

ター核酸を含む。他の実施形態では、プラスミドはトランスポーター核酸配列を含む。転写および翻訳が同時に起こる細菌では、トランスポーターポリペプチドは、それを転写する同じプラスミドに優先的に結合し、同じプラスミドを分泌し得る。

【００７５】

さらなる例では、痕跡的な配列、例えば、細菌または真核生物細胞で使用されない不要な複製起点、プロモーター、エンハンサーおよび／または終結シグナルを除去することができる。例えば、大腸菌の複製起点（大腸菌におけるプラスミドの増殖または操作に有用）は、ビフィドバクテリウム属または対象では使用されず、欠失されてもよい。さらなる例として、ＤＮＡ結合ドメインが非特異的である実施形態（例えば、Ｈｕ　ＤＢＤを使用する場合）では、特異的ＤＮＡ結合ドメイン認識部位（例えば、ジンクフィンガー認識部位）は、存在していれば除去してもよい。

【００７６】

いくつかの実施形態では、細菌は、トランスポーター核酸配列の多数のコピーを含んで、より大きなプラスミドを輸送するためのトランスポーターポリペプチドの発現を増加させることができる。いくつかの実施形態では、トランスポーター核酸に作動可能に連結された第１のプロモーターは、強力なプロモーターである（例えば、特定の細菌に内在するか、さもなければ当技術分野で公知の構成的に活性なプロモーター）。

【００７７】

いくつかの実施形態では、プラスミドは、発現のために最適化される。例えば、真核生物細胞における最適な発現のためにエンハンサーを選択してもよく、または特定の真核生物細胞における（例えば、哺乳動物細胞またはヒト細胞における）発現のためにペイロードをコドン最適化してもよい。

【００７８】

上記のように、プラスミドは、真核生物細胞における発現のためのペイロード核酸を含む。ペイロード核酸は、真核生物細胞において所望の効果（例えば、診断または治療効果）を有するように、または研究において有用であるように構成されたポリペプチドペイロード（または複数のポリペプチドペイロード）および／またはＲＮＡペイロード（または複数のＲＮＡペイロード）をコードし得る。

【００７９】

いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は可溶性タンパク質（例えば、限定されないが、ＧＦＰなどのマーカー、酵素、免疫調節タンパク質、細胞毒素、病原体由来の抗原など）をコードする。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は分泌タンパク質をコードする。タンパク質（Ｇａｕｓｓｉａルシフェラーゼ）を分泌するように設計されたプラスミドの非限定的な例は、ｐＦＲＧ３．５－ＣＭＶ－ＧＬｕｃ（配列番号４３；表１）である。

【００８０】

いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は膜タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、内在性膜タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、細胞表面タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、細胞外ドメインを含む膜または膜関連タンパク質をコードする。

【００８１】

（例えば、結腸細胞での局所送達のための）膜の付着／会合または（例えば全身送達のための）分泌のための、真核生物細胞（例えば哺乳動物細胞）の原形質膜へのタンパク質の標的化は、様々な方法で達成され得る。例えば、Ｎ末端小胞体（ＥＲ）シグナルペプチドまたは膜貫通セグメントを含むプレタンパク質をＥＲの膜を通して挿入し、それによってプレタンパク質を分泌経路に導く。このプロセス中、ＥＲシグナルペプチドはシグナル認識粒子（ＳＲＰ）と相互作用し、これは次に、ＥＲトランスロコンと会合するＳＲＰ受容体によって認識される。翻訳タンパク質が膜貫通セグメント（すなわち、シグナルアンカー配列または転写停止配列／膜アンカー配列）を含む場合、これらのセグメントは次いでＥＲ膜に埋め込まれて、内在性膜タンパク質を生成する。プレタンパク質のＥＲへの挿

入後またはそれと同時に、Ｎ末端ＥＲシグナルペプチドは、シグナルペプチダーゼによってプレタンパク質から切断される。ＥＲ膜およびその中に分離された任意のタンパク質は、次いでゴルジ装置に移動し、次いで分泌小胞に移動する。分泌小胞と原形質膜との融合は、小胞膜に埋め込まれたそれらの膜タンパク質を原形質膜に組み込み、小胞の内容物を細胞外環境に放出する（すなわち、分泌）。ＥＲシグナルペプチドおよび膜貫通セグメントは公知であり、利用可能なソフトウェア（例えば、ＳｉｇｎａｌＰ　４．１；ＭＨＭＭ，Ｋｒｏｇｈ　ｅｔ　ａｌ．Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　２００１；３０５（３）：５６７－５８０；ＯＰＣＯＮＳ－Ｔｓｉｒｉｇｏｓ　ｅｔ　ａｌ．２０１５　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　４３（Ｗｅｂｓｅｒｖｅｒ　ｉｓｓｕｅ）、Ｗ　４０１－Ｗ　４０７；ＴＭｐｒｅｄ－Ｈｏｆｍａｎｎ＆Ｓｔｏｆｆｅｌ　１９９３　Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．Ｈｏｐｐｅ－Ｓｅｙｌｅｒ　３７４，１６６；その他）を使用して確認／予測することができる。特定の膜タンパク質（例えばβ－バレルなど）は、シャペロン、および形質膜への翻訳および挿入のための他の／追加の機構を使用し得る。タンパク質分泌用の代替機構、例えば翻訳後分泌および非従来型タンパク質分泌も存在する。別段特定されない限り、本明細書中に記載される実施形態は、分泌または膜会合の特定の構築物または機構に限定されない。

【００８２】

いくつかの実施形態では、膜または膜関連タンパク質は、内在性膜タンパク質である。そのような実施形態では、ペイロード核酸配列は、膜貫通セグメントまたは膜貫通ドメインをコードする。ある特定の実施形態では、膜貫通セグメントは、シグナル－アンカー配列または転写停止配列／膜－アンカー配列として作用する。ペイロード核酸配列は、ＥＲ内腔への挿入の結果として切断されるＮ末端ＥＲシグナルペプチドをさらにコードし得る。原形質膜中の内在性膜タンパク質の配向は、Ｎ末端ＥＲシグナルペプチドの有無、膜貫通セグメントに隣接する正味の静電電荷、および膜貫通セグメントの長さを含む、ペイロード核酸配列によってコードされるアミノ酸配列によって決定される。一般的に、最も高い正味の正電荷を有する隣接セグメントは原形質膜の細胞質側面に残り、長い疎水性セグメント（＞２０残基）は細胞質Ｃ末端と一緒の配向をとる傾向がある。膜タンパク質のトポロジー／配向は、利用可能なソフトウェア（例えば、ＭＨＭＭ；ＯＰＣＯＮＳ；ＴＭｐｒｅｄ；その他；各々上で引用された）を使用して予測することができる。

【００８３】

膜貫通ドメインは、膜タンパク質ペイロード由来の天然の膜貫通ドメイン、異種膜タンパク質由来の天然の膜貫通ドメイン、または人工の膜貫通ドメインであり得る。限定するものではないが、天然または人工の膜貫通ドメインは、約１５～約２３アミノ酸（例えば、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３または２３を超える残基）の疎水性α－ヘリックスを含み得、多くの場合、膜貫通セグメントに隣接する正電荷を含む。膜貫通ドメインは、１つの膜貫通セグメントまたは２つ以上の膜貫通セグメントを有し得る。

【００８４】

いくつかの実施形態では、膜または膜関連タンパク質は、表在性膜タンパク質である。表在性膜タンパク質は、非共有結合的会合によって原形質膜の外葉と会合し得る。例えば、限定されないが、表在性膜タンパク質は、疎水性相互作用（例えば、膜のリン脂質尾部による）および極性／静電相互作用（荷電／極性リン脂質頭部基による）によって、膜平面に対して平行配向で膜と会合する両親媒性α－ヘリックスを含み得る。別の非限定的な例では、表在性膜タンパク質は、疎水性ループを含み得る。別の非限定的な例では、表在性膜タンパク質は、電気的またはイオン的相互作用（例えばカルシウムイオンなどを介して）を介して原形質膜と相互作用し得る。

【００８５】

いくつかの実施形態では、膜または膜関連タンパク質は、脂質アンカー型タンパク質（脂質結合タンパク質とも呼ばれる）である。脂質アンカー型タンパク質を生成するためのタンパク質の脂質修飾の非限定的な例としては、脂肪酸、イソプレノイド、ステロール、

リン脂質、およびグリコシルホスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）アンカーによる修飾が挙げられる。限定されないが、脂質アンカー型タンパク質は、ＧＰＩアンカー（または任意の他の脂質アンカー）、例えば真核生物細胞において機能するＧＰＩアンカーまたは非ＧＰＩ脂質アンカーを含み得る。脂質修飾部位は、ペイロード核酸配列によってコードされるプレタンパク質アミノ酸配列によって決定される。例えば、いくつかの実施形態では、ＧＰＩアンカー型タンパク質を生成するために、ペイロード核酸配列は、Ｎ末端ＥＲシグナルペプチドおよび／または膜貫通セグメントをコードして、ＥＲに対してタンパク質を標的化し、さらにＧＰＩシグナルペプチドをコードする（例えば、Ｃ末端膜貫通セグメントに）。存在する場合、ＥＲシグナルペプチドは、翻訳タンパク質のＥＲ内腔への挿入の結果として切断される。真核生物細胞中のＧＰＩトランスアミダーゼは、Ｃ末端膜貫通セグメントを切断し、タンパク質を予め形成されたＧＰＩアンカーに移す。真核生物細胞において活性な様々なＧＰＩシグナルペプチド、例えば葉酸受容体ＧＰＩシグナルペプチドなどが公知である。より一般的には、いくつかの実施形態では、ペイロード核酸配列は、ＥＲに対してタンパク質を標的化し、さらに脂質アンカー型シグナルをコードするＥＲシグナルペプチドおよび／または膜貫通セグメントをコードする（例えば、フォールディング時に、脂肪酸、イソプレノイド、ステロール、リン脂質またはグリコシルホスファチジルイノシトールによって、真核生物細胞において翻訳後修飾のための部位を生成するアミノ酸配列）。期待されるＧＰＩシグナルペプチドは、ＧＰＩアンカー予測ソフトウェア（例えばＰｒｅｄＧＰＩ；Ｐｉｅｒｌｅｏｎｉ　ｅｔ　ａｌ．、ＢＭＣ　Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ、９：３９２、２００８）を使用して機能性があると確認され得、シグナル配列予測ソフトウェア（例えば、ＳｉｇｎａｌＰ　４．１）を使用してキメラタンパク質の文脈で機能性があると確認され得る。他の脂質アンカー型シグナルは、同様に知られているか、またはソフトウェアもしくは慣例的な試験によって決定できる。真核生物細胞における脂質アンカー型タンパク質の生成が切断を必要とする場合（例えば、ＧＰＩシグナルペプチドのＣ末端部分の除去）、ペイロード核酸配列は切断前シグナル（例えば、切断前ＧＰＩシグナルペプチド）をコードする。

【００８６】

いくつかの態様では、ペイロード核酸は、細胞外ドメインをコードし、真核生物細胞の細胞膜の外側に（例えば、膜貫通ドメイン、脂質アンカーまたは表在性膜タンパク質ドメインに融合された）細胞外ドメインを外部に表示するための膜貫通ドメイン、脂質アンカーまたは表在性膜タンパク質ドメインをさらにコードする。特定の実施形態では、ペイロード核酸は、Ｎ末端ＥＲシグナルペプチド、および膜貫通ドメインに融合された細胞外ドメインをコードする。例えば、限定されないが、細胞外ドメインは、ＩＬ－１２もしくはその機能的断片を含み得るか、またはＩＬ－１２αおよびβドメイン（例えば、ヒトｐ３５およびｐ４０）の融合物、もしくはそれらの機能的断片の融合物を含み得る。ヒトＩＬ－１２は、α（ｐ３５）ドメインおよびβ（ｐ４０）ドメインから構成される可溶性細胞外タンパク質であり、共有結合的相互作用（ジスルフィド架橋）および非共有結合的相互作用（Ｒｅｉｔｂｅｒｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２０１７）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２９２（１９）：８０７３－８０８１）によって互いに会合する。ペイロードとして、ＩＬ－１２は、真核生物細胞から分泌された２つのドメインの一方と、膜貫通ドメイン、脂質アンカーまたは表在性膜タンパク質（またはそのドメイン）との連結を介して膜に連結された他方のドメインとを用いて真核生物細胞において生成され得る。あるいは、ＩＬ－１２の２つのドメインの融合物は、膜貫通ドメイン、脂質アンカーまたは表在性膜タンパク質（またはそのドメイン）にさらに融合され得る。いくつかの実施形態では、限定されないが、細胞外ドメインは、膜貫通ドメインにさらに融合されたＩＬ－１２のαドメインおよびβドメインの融合物を含む（例えば、配列番号３のように）。各ドメインは、直接またはペプチドリンカーを介して連結され得る。非限定的なペプチドリンカーとしては、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０または２０を超えるアミノ酸残基が挙げられ、ペプチド中の各残基は、独立して任意のアミノ酸であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、主にＧｌｙ

残基を含み、ＳｅｒおよびまたはＴｈｒ残基は少ない。膜貫通ドメインは、任意の膜貫通ドメインであり得る。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインはインスリン受容体膜貫通ドメイン（例えば、ヒトインスリン受容体膜貫通ドメイン；例えば、配列番号３のアミノ酸５４７～５７７）である。いくつかの実施形態では、細胞外ドメインは、配列番号３のアミノ酸１～３２８および３３６～５３２を含む。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸によってコードされる膜または膜関連タンパク質は、配列番号３、または、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％の配列同一性を有し、依然として少なくとも２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％もしくは８０％のＩＬ－１２活性を保持するその変異体（限定されないが、保存的変異体を含む）を含む。インビトロでＩＬ－１２の生体機能性を評価するための標準的な方法は、培養末梢血単球（ＰＢＭＣ）の刺激を含む。例えば、培養ＰＢＭＣを、精製したＩＬ－１２ヘテロ二量体もしくはＩＬ－１２融合構築物と、ＩＬ－１２ヘテロ二量体もしくは融合構築物を発現および分泌する細胞と、または膜性ＩＬ－１２ヘテロ二量体もしくは融合構築物を発現する細胞とインキュベーションすると、関連する免疫細胞型（Ｔ細胞、ＮＫ細胞；ＰＢＭＣ集団のサブセット）上でＩＬ－１２と同族ＩＬ－１２受容体との相互作用が可能になり、それにより、それらの刺激／活性化をもたらす。ＩＬ－１２刺激免疫細胞は、炎症促進性サイトカイン（例えば、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２）を発現および分泌する。ＩＦＮ－γ遺伝子発現は、例えば、刺激されたＰＭＢＣのｑＲＴ－ＰＣＲ分析を用いて測定することができる。ＩＦＮ－γ分泌は、例えば、刺激されたＰＢＭＣ増殖培地のＥＬＩＳＡベースの分析を用いて測定することができる。あるいは、刺激されたＴ細胞を、フローサイトメトリーを使用して細胞表面活性化マーカーの発現についてアッセイすることができ、そのようなマーカーとしては、ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）、ＣＤ１３４（ＯＸ４０）および／またはＣＤ３０が挙げられる。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は配列番号３をコードする。

【００８７】

ペイロード核酸はまた、他の標的化シグナルをさらに含み得るか、または代替的に含み得る。例えば、上皮細胞は、「外部」内腔に面する頂端膜と、隣接する細胞および基底の薄層に面する基底外側膜とを有することによって、器官の内部を区画化するために分極され得る（または非対称であり得る）。これらの２つの異なる膜ドメインは、タイトジャンクションと呼ばれる細胞間結合複合体によって分離され、それにより、上皮細胞単層が選択的に溶質および流体に対して透過性となる。差別的に組織化された頂端膜および基底外側膜は、上皮組織が適切な表面からの分泌および／または吸収を調整する能力の原因である。様々な機能のために発現される新しく合成された膜タンパク質は、トランスゴルジ網（ＴＧＮ）で輸送小胞にパッケージングされ、翻訳およびフォールディング中に、この極性化された細胞組織内の適切な膜を標的とするように差別的に選別される。

【００８８】

基底外側選別シグナルは、選別されたタンパク質の一次構造内に埋め込まれ、通常、カーゴタンパク質の細胞質尾部（または細胞質に面するドメイン）に位置する。多くのこのような基底外側選別シグナルが知られている。基底外膜タンパク質の選別に関与する最も一般的なタイプのシグナルは、チロシンベース（ＮＰｘＹまたはＹｘｘΦ）またはジロイシン（Ｄ／Ｅｘｘｘ ＬＬ）またはモノ－ロイシン（ＥＥｘｘｘＬ）モチーフ（ｘは任意のアミノ酸であり得、Φは嵩高い疎水性残基である）である。したがって、いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、上皮細胞（例えば、結腸上皮細胞）の基底外側細胞膜に対してペイロードタンパク質を標的化するための基底外側選別シグナルをさらに含む。これにより、ペイロードタンパク質を血流に表示または分泌することが可能になる。例えば、抗体、抗原性タンパク質、および／または免疫調節タンパク質は、対象の血流中に分泌さ

れ得る。

【００８９】

頂端選別シグナルも公知であり、アミノ酸配列、または脂質もしくは炭水化物に関与する翻訳後修飾に基づいてもよい。一般的に特徴付けられた頂端選別決定基の１つは、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型タンパク質リンカー（ＧＰＩ－ＡＰ）である。ＮおよびＯ結合型グリコシル化はまた、多くの頂端タンパク質用の選別シグナルとして役立つことが示されている。様々なウイルスの一回膜貫通ドメインは、頂端選別用のシグナルとして役立ち得る（例えば、赤血球凝集素、ノイラミニダーゼおよび呼吸器合胞体ウイルスＦタンパク質）したがって、いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、上皮細胞（例えば、結腸上皮細胞）の内腔細胞膜に対してペイロードタンパク質を標的化するための頂端選別シグナルを含む。これにより、ペイロードタンパク質を内腔に表示または分泌することが可能になる。

【００９０】

脊椎動物細胞（例えば哺乳動物細胞またはヒト細胞）において発現される場合、可溶性タンパク質および再利用膜タンパク質および膜アンカー型タンパク質の両方が、抗原提示経路、例えば、哺乳動物における主要な組織適合性（ＭＨＣ）クラスＩ抗原提示経路によってプロセシングされるであろう。

【００９１】

いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、１つ以上の免疫調節タンパク質、例えばＩＬ－１２、ＩＮＦｇ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１０、ＩＬ－８、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ１ａ／ｂ、ＩＬ－６、ＩＬ－１７、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ－１３、ＧＳＭＣＦ、ＬＴａ／ｂ、および／または前述のいずれかの機能性誘導体の１つまたは組み合わせをコードする。ＩＬ－１２の機能性誘導体の例を上に記載する。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、例えば真核生物細胞からの分泌のための抗体または抗体の断片もしくは誘導体をコードする。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、酵素（例えば、リパーゼなど）、血液凝固タンパク質（例えば、ＦＶＩＩＩ、ＦＩＸなど）、ホルモン（例えば、ＨＧＨ、インスリンなど）、受容体（例えば、低密度リポタンパク質受容体など）、または治療用タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、ＲＮＡ（例えば、ＲＮＡｉ、ｓｉＲＮＡなど）をコードする。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、病原体の１つ以上のタンパク構成要素をコードする。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、病理（例えば、がん、毒素、または任意の他の外来もしくは病理学的に関連する分子）に特異的であるかまたは関連する抗原をコードする。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、１つ以上のがん抗原性ペプチド、がん特異的抗原、またはがん関連抗原をコードする。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、前述のペイロードの１つをコードする。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、前述のペイロードの２つ以上をコードする。

【００９２】

ペイロード核酸が病原体の１つ以上の構成要素をコードする場合、システムは、その病原体に対するＤＮＡワクチンとして機能し、ワクチンを投与された対象（例えば、哺乳動物対象またはヒト対象）において適応免疫応答を引き起こし得る。病原体は、任意の病原体であり得る。いくつかの実施形態では、病原体はウイルスである。いくつかの実施形態では、病原体は細菌である。いくつかの実施形態では、病原体は寄生生物である。病原体の１つ以上の構成要素コードすることに加えて、ペイロード核酸は、１つ以上の免疫調節タンパク質または任意の他のペイロードをさらにコードし得る。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、対象（例えば哺乳動物対象またはヒト対象）での発現のためにコドン最適化されている。

【００９３】

いくつかの実施形態では、病原体はウイルスである。これらの実施形態のいくつかにおいて、ペイロード核酸によってコードされるウイルスの構成要素は、ウイルスコートタンパク質である。これらの実施形態のいくつかでは、ペイロード核酸によってコードされる

ウイルスの構成要素はウイルス融合タンパク質であり、これは、ウイルス－細胞融合、したがって細胞またはその細胞外ドメインへのウイルス侵入の原因となる。いくつかの実施形態では、ウイルス融合タンパク質はクラスＩである。いくつかの実施形態では、ウイルス融合タンパク質はクラスＩＩである。いくつかの実施形態では、ウイルス融合タンパク質はクラスＩＩＩである。

【００９４】

いくつかの実施形態では、ウイルスはコロナウイルスである。そのような実施形態では、ペイロード核酸は、コロナウイルススパイクタンパク質（またはその抗原性断片もしくは誘導体）、コロナウイルスマトリックスタンパク質（またはコロナウイルス膜糖タンパク質とも呼ばれる）（またはその抗原性断片もしくは誘導体）、コロナウイルスエンベロープタンパク質（またはその抗原性断片もしくは誘導体）、および／またはコロナウイルスヌクレオカプシドタンパク質（またはその抗原性断片もしくは誘導体）の１つまたは組み合わせをコードし得る。誘導体の各々は、挿入、欠失および／または置換の１つまたは組み合わせを含む、そのそれぞれの野生型基準配列と少なくとも８０％同一であり得る。いくつかの実施形態では、各誘導体は、その基準配列と少なくとも８５％同一であり得る。いくつかの実施形態では、各誘導体は、その基準配列と少なくとも９０％同一であり得る。いくつかの実施形態では、各誘導体は、その基準配列と少なくとも９５％同一であり得る。いくつかの実施形態では、各誘導体は、その基準配列と少なくとも９８％同一であり得る。いくつかの実施形態では、各誘導体は、その基準配列と少なくとも９９％同一であり得る。いくつかの実施形態では、誘導体は、それぞれの基準配列と８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８または９９％同一である。いくつかの実施形態では、置換の少なくとも５０％が保存的置換である。いくつかの実施形態では、置換の少なくとも７５％が保存的置換である。いくつかの実施形態では、置換の少なくとも９０％が保存的置換である。いくつかの実施形態では、置換のすべてが保存的置換である。いくつかの実施形態では、各誘導体は、基準配列に対して同一または置換のいずれかである残基からなる。いくつかの実施形態では、コロナウイルスは、βコロナウイルス種（例えば、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、ＭＥＲＳ－ＣｏＶなど）である。いくつかの実施形態では、コロナウイルススパイクタンパク質は、配列番号４６、５２、５３または５６に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、コロナウイルスマトリックスタンパク質は、配列番号４７に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、コロナウイルスヌクレオカプシドタンパク質は、配列番号４８に示される配列を有する。

【００９５】

コロナウイルススパイクタンパク質は、複数のドメインからなる。例えば、βコロナウイルス属のメンバー由来のスパイクタンパク質には、Ｓ１ドメイン、Ｓ２ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインが含まれる。切断部位は、Ｓ１ドメインとＳ２ドメインとを分離する。Ｓ１ドメインは、受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）を包含する。ＲＢＤは、受容体結合モチーフ（ＲＢＭ）を包含する。βコロナウイルススパイクタンパク質は三量体膜タンパク質を形成し、これが、哺乳動物免疫細胞抗体生成機構と相互作用するための細胞外Ｓ１およびＳ２ドメインを提示する。細胞内に発現したスパイクタンパク質はまた、ＭＨＣクラスＩ複合体による提示のためにより小さなペプチドにプロセシングされて、適応Ｔ細胞免疫を誘導する。

【００９６】

いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、コロナウイルススパイクタンパク質またはその抗原性断片もしくは誘導体（またはβコロナウイルススパイクタンパク質またはその抗原性断片もしくは誘導体）を含むタンパク質をコードする。スパイクタンパク質のシグナルペプチドは、排除されても、または真核生物において機能する、異なるシグナルペプチドで置換されてもよい（例えば、哺乳動物細胞においてより効率的な分泌を提供するＩｇＫシグナルペプチド）。スパイクタンパク質の膜貫通ドメインは、排除されても、または異なる膜貫通ドメインもしくは異なる膜会合ドメイン（例えば、ＧＰＩコード配列な

どの脂質アンカー配列）で置換され得る。膜貫通ドメインまたは膜会合ドメインを欠く実施形態では、シグナルペプチドの包含によって分泌が生じるであろう。細胞質ドメインは、排除されても、または異なる細胞質ドメインで置換されてもよい。Ｓ２ドメインは、排除またはトリミングされ得る。Ｓ１ドメインは、トリミングされてＲＢＤを保持してもよく、またはさらにトリミングされてＲＢＭを保持してもよい。断片（例えば、Ｓ１、Ｓ１＋Ｓ２、ＲＢＤ、ＲＢＭなど）またはその誘導体は、多量体化ドメイン（例えば、三量化ドメイン）に融合され得る。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸によってコードされるタンパク質は、細胞質ドメインを欠く切断された（トリミングされた）スパイクタンパク質（またはその誘導体）を含む。いくつかの実施形態では、切断されたスパイクタンパク質（またはその誘導体）を三量体化ドメインに融合して、細胞質ドメインを置換する。いくつかの実施形態では、切断されたスパイク（例えば、トリミングして膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを除去した）またはその誘導体は、細胞外三量体化ドメインと融合され、場合により膜貫通ドメインまたは膜会合ドメイン（例えば、ＧＰＩなどの脂質アンカー）に融合される。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸によってコードされるタンパク質は、Ｉ型膜貫通ドメインに連結されたＳ１ドメイン（またはその誘導体）を含む。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸によってコードされるタンパク質は、脂質アンカー（例えばＧＰＩなど）に連結されたＳ１ドメイン（またはその誘導体）を含む。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸によってコードされるタンパク質は、分泌のために構成され、シグナルペプチドを含んで膜貫通または膜会合ドメインを含まないＳ１ドメイン（またはその誘導体）を含む。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸によってコードされるタンパク質は、置換膜貫通ドメインに連結されたＳ１およびＳ２ドメイン（またはその誘導体）を含む。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸によってコードされるタンパク質は、脂質アンカー（例えば、ＧＰＩ）に連結されたＳ１およびＳ２ドメイン（またはその誘導体）を含む。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸によってコードされるタンパク質は、分泌のために構成され、シグナルペプチドを含んで膜貫通または膜会合ドメインを含まないＳ１およびＳ２ドメイン（またはその誘導体）を含む。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸によってコードされるタンパク質は、分泌のために構成され、シグナルペプチドを含んで膜貫通または膜会合ドメインを含まないＲＢＤ（またはその誘導体）を含む。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸によってコードされるタンパク質は、分泌のために構成され、シグナルペプチドを含んで膜貫通または膜会合ドメインを含まないＲＢＭを含む。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは野生型コロナウイルスのシグナルペプチドであり、他の実施形態では、シグナルペプチドは置換されている（例えば、ＩｇＫシグナルペプチドなど、哺乳動物においてより効率的なシグナルペプチドで）。いくつかの実施形態では、誘導体は野生型ＲＢＭ配列を含む。いくつかの実施形態では、誘導体は野生型ＲＢＤ配列を含む。いくつかの実施形態では、Ｓ１ドメインは、野生型Ｓ１ドメインである。いくつかの実施形態では、Ｓ２ドメインは、野生型Ｓ１ドメインである。

【００９７】

いくつかの実施形態では、コロナウイルススパイクタンパク質（またはその断片）は、野生型ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に由来する。いくつかの実施形態では、コロナウイルススパイクタンパク質の誘導体（またはその断片）は、野生型ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質またはその断片に由来する。いくつかの実施形態では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質は、配列番号５２（シグナルペプチドなし）または配列番号４６（シグナルペプチドあり）に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質は、配列番号５６（シグナルペプチドなし）または配列番号５３（シグナルペプチドあり）に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ＲＢＭは、配列番号５０に示されるアミノ酸配列を有する（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤ）。いくつかの実施形態では、ＲＢＭは、配列番号５４に示されるアミノ酸配列を有する（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＤ変異体Ｂ．１．３５１）。いくつかの実施形態では、Ｓ１ドメインは、配列番号４６のアミノ酸１３～６８５に示される配列を有す

る。いくつかの実施形態では、Ｓ１ドメインは、配列番号５３のアミノ酸１３～６８２に示される配列を有する。いくつかの実施形態では、ＲＢＭは、配列番号５１に示されるアミノ酸配列を有する（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＭ）。いくつかの実施形態では、ＲＢＭは、配列番号５５に示されるアミノ酸配列を有する（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＲＢＭ変異体Ｂ．１．３５１）。いくつかの実施形態では、Ｓ２ドメインは、配列番号４６のアミノ酸６８６～１２７３に示される配列を有する。いくつかの実施形態では、Ｓ２ドメインは、配列番号５３のアミノ酸６８３～１２７０に示される配列を有する。いくつかの実施形態では、Ｓ２ドメインは、配列番号４６のアミノ酸８１６～１２７３に示される配列を有する（すなわち、Ｓ２’ドメイン）。いくつかの実施形態では、Ｓ２ドメインは、配列番号５３のアミノ酸８１３～１２７０に示される配列を有する（すなわち、Ｓ２’ドメイン）。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号４６のアミノ酸１２１４～１２３４に示される配列を有する。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号５３のアミノ酸１２１１～１２３１に示される配列を有する。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号４６のアミノ酸１２４５～１２７３に示される配列を有する。いくつかの実施形態では、細胞質ドメインは、配列番号５３のアミノ酸１２４２～１２７０に示される配列を有する。

【００９８】

いくつかの実施形態では、ペイロード核酸によってコードされるタンパク質は、コロナウイルススパイクタンパク質の誘導体またはスパイクタンパク質の抗原性断片（例えば、Ｓ１、Ｓ１＋Ｓ２、ＲＢＤ、ＲＢＭなど）の誘導体であるか、またはそれらを含む。誘導体は、挿入、欠失および／または置換の１つまたは組み合わせを含む、そのそれぞれの野生型基準配列と少なくとも８０％同一であり得る。いくつかの実施形態では、誘導体は、その基準配列と少なくとも８５％同一である。いくつかの実施形態では、誘導体は、その基準配列と少なくとも９０％同一である。いくつかの実施形態では、誘導体は、その基準配列と少なくとも９５％同一である。いくつかの実施形態では、誘導体は、その基準配列と少なくとも９８％同一である。いくつかの実施形態では、誘導体は、その基準配列と少なくとも９９％同一である。いくつかの実施形態では、誘導体は、その基準配列と８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％同一である。いくつかの実施形態では、置換の少なくとも５０％が保存的置換である。いくつかの実施形態では、置換の少なくとも７５％が保存的置換である。いくつかの実施形態では、置換の少なくとも９０％が保存的置換である。いくつかの実施形態では、置換のすべてが保存的置換である。いくつかの実施形態では、誘導体は、基準配列に対して同一または置換の残基からなる。いくつかの実施形態では、基準配列は、野生型ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２に由来する。いくつかの実施形態では、誘導体は、ヒトにおいてコロナウイルス疾患（ＣＯＶＩＤ）を引き起こすことができるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２の変異体（例えば、ＣＯＶＩＤ－１９）、例えば、限定するものではないが、変異体Ｂ．１．１３５１系統（南アフリカ）、Ｂ．１．１．７系統（英国）またはＰ．１系統（ブラジル／日本）に由来する。いくつかの実施形態では、誘導体は、スパイク（またはスパイク断片）突然変異Ｎ５０１Ｙ、Ｋ４１７Ｎおよび／またはＥ４８４Ｋ（場合によりＤ６１４Ｇをさらに含む）うちの１つ、２つまたは３つを含む。いくつかの実施形態では、誘導体は、１つ以上のスパイク（またはスパイク断片）突然変異Ｄ８０Ａ、Ｄ２１５Ｇ、Ｋ４１７Ｎ、Ｅ４８４Ｋ、Ｎ５０１Ｙ、Ｄ６１４Ｇ、Ａ７０１Ｖ、δ２４２、δ２４３、および／またはδ２４４を含み、いくつかの実施形態では、誘導体はこれらの変異のすべてを含む。いくつかの実施形態では、誘導体は、スパイク（またはスパイク断片）突然変異Ｌ１８Ｆをさらに含む。いくつかの実施形態では、変異体はＢ．１．１３５１系統である。いくつかの実施形態では、誘導体は、１つ以上のスパイク（またはスパイク断片）突然変異δ６９／７０、δ１４４、Ｎ５０１Ｙ、Ａ５７０Ｄ、Ｄ６１４Ｇ、および／またはＰ６８１Ｈを含み、いくつかの実施形態では、誘導体はこれらの突然変異のすべてを含む。いくつかの実施形態では、変異体はＢ．１．１．７系統である。いくつかの実施形態では、誘導体は、１つ以上のスパイク（またはスパイク断片）突然変異

Ｅ４８４Ｋ、Ｋ４１７Ｎ／Ｔ、Ｎ５０１Ｙを含み、場合によりＤ６１４Ｇをさらに含む。いくつかの実施形態では、変異体はＰ．１系統である。前述のアミノ酸位置番号は、基準として野生型ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク配列（配列番号４６）に基づく。

【００９９】

核酸が１つ以上のがん抗原性ペプチド、がん特異的抗原、またはがん関連抗原をコードする場合、システムはがんに対するＤＮＡワクチンとして機能し得、したがってワクチンを投与された対象（例えば、哺乳動物対象またはヒト対象）において適応免疫応答を引き起こし得る。様々ながん関連抗原が報告されている（Ｃａｎｃｅｒ　Ａｎｔｉｇｅｎｉｃ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｄａｔａｂａｓｅのウェブサイトを参照されたい）。１つ以上のがん抗原性ペプチド、がん特異的抗原またはがん関連抗原をコードすることに加えて、ペイロード核酸は、１つ以上の免疫調節タンパク質または任意の他のペイロードをさらにコードし得る。がん抗原性ペプチドは、固有の抗原（すなわち、遍在して発現される遺伝子における点突然変異から生じる）、共有腫瘍特異的抗原、分化抗原、または過剰発現抗原であり得る。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、がん特異的抗原をコードする。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、がん関連抗原をコードする。

【０１００】

いくつかの実施形態では、真核生物細胞は、対象（例えば、哺乳動物対象またはヒト対象）の細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は対象の結腸細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ビフィドバクテリウム属（例えば、以下の例１を参照のこと）によって容易に定着される結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、または粘膜固有層の細胞である。したがって、システムは、対象の結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、および／または粘膜固有層の細胞へペイロード核酸を送達し、したがって結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、および／または粘膜固有層の細胞においてペイロード核酸によってコードされたペイロードを生成するために使用され得る。細菌は、対象への経口投与を介して結腸細胞にアクセスしてもよいが、代替的に、他の経路（例えば、直腸、例えば坐剤を介して）によって結腸にアクセスしてもよい。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、結腸上皮細胞の基底外側細胞膜に対してペイロードタンパク質を標的化するための基底外側選別シグナルを含む。いくつかの実施形態では、ペイロード核酸は、結腸上皮細胞の内腔細胞膜に対してペイロードタンパク質を標的化するための頂端選別シグナルを含む。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、システムは、１つ以上の薬学的に許容される賦形剤をさらに含む医薬組成物として製剤化され得る。適切な賦形剤の非限定的な例としては、任意の適切な緩衝剤、安定化剤、塩、酸化防止剤、錯化剤、等張化剤、凍結保護物質剤、リオプロテクタント（ｌｙｏｐｒｏｔｅｃｔａｎｔ）、懸濁化剤、乳化剤、抗菌剤、保存剤、キレート化剤、結合剤、界面活性剤、湿潤剤、固定油などの非水性ビヒクル、または持続放出もしくは制御放出のためのポリマーが挙げられる。例えば、Ｂｅｒｇｅ　ｅｔ　ａｌ．１９７７（Ｊ．Ｐｈａｒｍ　Ｓｃｉ．６６：１－１９）、またはＲｅｍｉｎｇｔｏｎ－Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ．ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ，２１ｓｔ　ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｇｅｎｎａｒｏ　ｅｔ　ａｌ．ｅｄｉｔｏｒｓ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｉｎｓ　Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ）を参照されたい。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、凍結保存剤、例えば、ヒトへの投与のための賦形剤として適しているか（例えば、ＵＳＰ－ＮＦまたは同等の規制指示）、または毒性試験時に賦形剤として適用される可能性を有する生細菌細胞を凍結させるための凍結保存剤として機能することができる任意の試薬を含む。適切な凍結保存剤の非限定的な例には、トレハロース、ヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ／ＨＡＥＳ）、プロピレングリコール、単糖類または二糖類（例えば、スクロース）が含まれる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、５～１５％スクロース（ｗ／ｖ）、６～１４％スクロース（ｗ／ｖ）、７～１３％スクロース（ｗ／ｖ）、８～１２％スクロース（ｗ／ｖ）または９～１１％スクロース（ｗ／ｖ）中に腫瘍定着細菌を含む。いくつかの実施形態では、スクロースの量は、約９．５～約１０．５％（ｗ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、スクロースの量（ｗ／

ｖ）は、約５％、約６％、約７％、約８％、約９％、約９．２％、約９．４％、約９．６％、約９．８％、約１０％、約１０．２％、約１０．４％、約１０．６％、約１０．８％、約１１％、約１２％、約１３％、約１４％、または約１５％である。いくつかの実施形態では、スクロースの量は、約１０％（ｗ／ｖ）である。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、場合によりｐＨ６～８、例えば約ｐＨ６．０、６．２、６．４、６．６、６．８、７．０、７．２、７．４、７．６、７．８、８．０、または約ｐＨ７．２の薬学的に許容される緩衝液（例えば、リン酸緩衝剤）をさらに含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、生理食塩水、例えばリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）をさらに含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、約７．２～７．４のｐＨで、約１０％スクロースを含むＰＢＳの溶液中に腫瘍定着細菌を含む。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は経口投与用に製剤化される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、食用食品（例えば、ヨーグルト）として製剤化される。いくつかの実施形態では、細菌は凍結乾燥される。プロバイオティクス細菌の凍結乾燥方法は十分に確立されており、コールドチェーンサプライロジスティクスを必要としない幅広い貯蔵寿命を有する凍結乾燥薬物製品の製造を可能にする。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は直腸投与用に製剤化される。例えば、限定されないが、医薬組成物は坐剤として製剤化され得る。坐剤を調製するための方法および配合は公知である。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、対象への静脈内投与用である。したがって、医薬組成物は、静脈内注射用に製剤化され得る。対象へ細菌を静脈内投与する方法は、静脈内注射用の適切な製剤と同様に公知である。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、免疫アジュバントと組み合わせて対象に投与（例えば、経口、直腸、静脈内など）するためのものである。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、免疫アジュバントなしで対象に投与するためのものである（細菌自体がアジュバントとして作用することができるため）。

【０１０６】

上記では、複数のタンパク質および／またはＲＮＡペイロードが単一のプラスミドに含まれてもよく、または別々のプラスミド上に配置されてもよいことが言及されている。いくつかの実施形態では、別々のプラスミド（ペイロードをコードする配列の固有のセットをコードする）は、同じ細菌に含まれる（すなわち、細菌は、そのペイロードコード配列が異なる複数のプラスミドで形質転換される）。他の実施形態では、別々のプラスミドは、別々の細菌、例えば、第１の細菌および第２の細菌（場合により第３の細菌、場合により第４の細菌、場合によりさらなる細菌）に含まれる。したがって、細菌の組み合わせを投与することによって、複数のペイロードコード配列を送達することができ（対象における発現のために、局所的かつ／または全身的に）、組み合わせ中の各細菌は、別個のペイロード（または別個のペイロードのセット）をコードするプラスミドを含む。例えば、限定するものではないが、いくつかの実施形態では、細菌の１つは、１つ以上の抗原性タンパク質を送達するように構成されてもよく、別の細菌は、１つ以上の免疫調節タンパク質（場合により、１つ以上の免疫調節タンパク質は、ＩＬ－１２、ＩＮＦｇ、ＴＮＦα、ＩＬ－１０、ＩＬ－８、ＩＬ－２、ＩＬ－４、Ｉｌ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ１ａ／ｂ、ＩＬ－６、ＩＬ－１７、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ－１３、ＧＳＭＣＦ、ＬＴａ／ｂ、および／または前述の機能性誘導体）を送達するように構成されてもよい。いくつかの実施形態では、組み合わせた異なる細菌を、同時投与用の単一剤形に製剤化してもよい。例えば、第１の細菌および第２の細菌は、単一剤形で製剤化されてもよい。いくつかの実施形態では、組み合わせた異なる細菌を、同時または連続的に投与するための別々の剤形として製剤化してもよい。例えば、第１の細菌および第２の細菌は、別々の剤形として製剤化され

てもよい。

【０１０７】

対象に投与するための細菌の用量は、任意の適切な用量であり得る。いくつかの実施形態では、用量は10^5～10^{11}コロニー形成単位（ＣＦＵ）であるが、より低い用量およびより高い用量、例えば、10^3～10^4、10^4～10^5、10^5～10^6、10^6～10^7、10^7～10^8、10^8～10^9、10^9～10^{10}、10^{10}～10^{11}および10^{11}ＣＦＵを超える用量が一般に適している。いくつかの実施形態では、用量は10^5～10^{11}ＣＦＵである。いくつかの実施形態では、用量は10^8～10^{10}ＣＦＵである。いくつかの実施形態では、用量は10^9ＣＦＵである。

【０１０８】

コロニー形成を終了することが望ましいか、または必要である場合、システムの方法または使用は、細菌が感受性である抗生物質を続けて対象へ投与することをさらに含み得る。投与された細菌が感受性であった特定の抗生物質は、抗生物質の投与方法および抗生物質の投与量と同様に既知であろう。いくつかの実施形態では、抗生物質はアモキシシリンまたはエリスロマイシンである。

【０１０９】

いくつかの実施形態では、対象は哺乳動物である。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。

【０１１０】

以下は、実施形態の非網羅的なリストである。

Ａ１．対象の結腸細胞（例えば、結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、および／または粘膜固有層の細胞）へのペイロード核酸の送達および結腸細胞におけるペイロード核酸によってコードされるペイロードの生成に使用するためのシステム；

プラスミドおよびトランスポーター核酸を含むビフィドバクテリウム属細菌

細菌においてトランスポーター核酸を発現するように構成された第１のプロモーターおよび第１のターミネーターと作動可能に会合している、トランスポーター核酸；

細菌からポリペプチド－プラスミド複合体を分泌するように構成された細菌分泌シグナルペプチドと、プラスミドと会合してポリペプチド－プラスミド複合体を形成するように構成されたＤＮＡ結合ドメインと、ポリペプチド－プラスミド複合体を対象の結腸細胞（例えば、結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、または粘膜固有層の細胞）に導入するように構成された細胞透過性ペプチドとをアミノ末端からカルボキシ末端の順序で含むトランスポーターポリペプチドをコードする配列を有する、トランスポーター核酸；および

ペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸をコードするペイロード核酸を含み、ペイロード核酸が、結腸細胞内でペイロード核酸を発現し、ペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸を生成するように構成された第２のプロモーターおよび第２のターミネーターと作動可能に会合している、プラスミド。

Ａ２．ビフィドバクテリウム属細菌がビフィドバクテリウム・ロンガム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｌｏｎｇｕｍ）である、実施形態Ａ１に記載のシステム。

Ａ３．細菌分泌シグナルペプチドがα－アラビノシダーゼ分泌シグナルペプチドである、実施形態Ａ１またはＡ２に記載のシステム。

Ａ４．α－アラビノシダーゼ分泌シグナルペプチドが配列番号１３の配列を有する、実施形態Ａ３に記載のシステム。

Ａ５．ＤＮＡ結合ドメインが配列番号７の配列を有する、実施形態Ａ１～Ａ４のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ６．細胞透過性ペプチドが配列番号１８の配列を有する、実施形態Ａ１～Ａ５のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ７．トランスポーターポリペプチドが配列番号２の配列を有する、実施形態Ａ１またはＡ２に記載のシステム。

Ａ８．プラスミドがトランスポーター核酸をさらに含む、実施形態Ａ１～Ａ７のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ９．ペイロード核酸が、結腸上皮細胞の基底外側細胞膜に対してペイロードタンパク質を標的化するための基底外側選別シグナルを含む、実施形態Ａ１～Ａ８のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ１０．ペイロード核酸が、結腸上皮細胞の内腔細胞膜に対してペイロードタンパク質を標的化するための頂端選別シグナルを含む、実施形態Ａ１～Ａ８のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ１１．ペイロードタンパク質が、細胞外ドメインを含む膜または膜関連タンパク質である、実施形態Ａ１～Ａ１０のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ１２．膜または膜関連タンパク質が内在性膜タンパク質である、実施形態Ａ１１に記載のシステム。

Ａ１３．プラスミドが、ペイロード核酸と作動可能に会合している脂質アンカーシグナルペプチドをさらにコードして、ペイロードタンパク質を脂質アンカー型タンパク質として生成する、実施形態Ａ１～Ａ１０のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ１２．プラスミドが、ペイロード核酸と作動可能に会合している分泌シグナルペプチドをさらにコードして、ペイロードタンパク質を分泌する、実施形態Ａ１～Ａ１０のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ１３．プラスミドがペイロードタンパク質を細胞内タンパク質として生成するように構成されている、実施形態Ａ１～Ａ８のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ１４．ペイロード核酸が、単独で、または他の核酸と組み合わせて、病原体由来の抗原、病理、場合によりがんに特異的であるかまたは関連する抗原、免疫調節タンパク質、抗体もしくは抗体の断片もしくは誘導体、酵素、受容体、または治療用タンパク質をコードする、実施形態Ａ１～Ａ１３のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ１５．ペイロードタンパク質が、コロナウイルススパイクタンパク質、マトリックスタンパク質もしくはヌクレオカプシドタンパク質、またはβコロナウイルススパイクタンパク質、マトリックスタンパク質もしくはヌクレオカプシドタンパク質を含む、実施形態Ａ１４に記載のシステム。

Ａ１６．コロナウイルススパイクタンパク質、マトリックスタンパク質またはヌクレオカプシドタンパク質が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２のスパイクタンパク質、マトリックスタンパク質またはヌクレオカプシドタンパク質である、実施形態Ａ１５に記載のシステム。

Ａ１７．ペイロード核酸が複数のペイロードをコードし、複数のペイロードが病原体由来の抗原性タンパク質の組み合わせを含む、実施形態Ａ１４～Ａ１６のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ１８．ペイロード核酸が複数のペイロードをコードする、実施形態Ａ１～Ａ１６のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ１９．複数のペイロードが、１つまたは複数の免疫調節タンパク質を含み、場合により、１つまたは複数の免疫調節タンパク質が、ＩＬ－１２、ＩＮＦｇ、ＴＮＦａ、ＩＬ－１０、ＩＬ－８、ＩＬ－２、ＩＬ－４、Ｉｌ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ１ａ／ｂ、ＩＬ－６、ＩＬ－１７、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ－１３、ＧＳＭＣＦ、ＬＴａ／ｂ、および／または前述の機能性誘導体の１つまたは組み合わせである、実施形態Ａ１７またはＡ１８に記載のシステム。

Ａ２０．ペイロード核酸が複数のペイロードコード配列を含み、ペイロード核酸が、結腸細胞での発現のために単一のプロモーターおよびターミネーターと作動可能に会合し、各ペイロードコード配列がＩＲＥＳ要素によって分離されている、実施形態Ａ１７～Ａ１９のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ２１．ペイロード核酸が複数のペイロードコード配列を含み、各ペイロードコード配列が、別個のプロモーターおよびターミネーターと、結腸細胞での発現のために作動可能に会合する、実施形態Ａ１７～Ａ１９のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ２２．対象の結腸上皮細胞および／または結腸免疫細胞へのペイロード核酸の送達、ならびに結腸上皮細胞および／または結腸免疫細胞におけるペイロード核酸によってコードされるペイロードの生成に使用するためのシステムであって、細胞透過性ペプチドが、

ポリペプチド－プラスミド複合体を結腸上皮細胞および／または結腸免疫細胞に導入するように構成されており、第２のプロモーターおよび第２のターミネーターが、ペイロード核酸を結腸上皮細胞および／または結腸免疫細胞において発現するように構成されている、実施形態Ａ１～Ａ２１のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ２３．薬学的に許容される賦形剤をさらに含む医薬組成物として製剤化される、実施形態Ａ１～Ａ２２のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ２４．医薬組成物が経口投与用である、実施形態Ａ２３に記載のシステム。

Ａ２５．医薬組成物が免疫アジュバントと組み合わせて投与するためのものである、実施形態Ａ２３またはＡ２４に記載のシステム。

Ａ２６．細菌が凍結乾燥される、実施形態Ａ１～Ａ２５のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ２７．10^5～10^{11}コロニー形成単位（ＣＦＵ）の用量、または場合により10^8～10^{10}ＣＦＵの用量で対象に投与するための、実施形態Ａ１～Ａ２６のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ２８．細菌が第１の細菌であり、実施形態Ａ１で定義される第２の細菌と組み合わせて投与するためのものであり、第１の細菌のペイロード核酸によってコードされるペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸が、第２の細菌のペイロード核酸によってコードされるペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸とは異なる、実施形態Ａ１～Ａ２７のいずれか１つに記載のシステム。

Ａ２９．第１の細菌および第２の細菌が、同時投与のために単一剤形に一緒に製剤化される、実施形態Ａ２８に記載のシステム。

Ａ３０．第１の細菌および第２の細菌が、別々の剤形として製剤化される、実施形態Ａ２８に記載のシステム。

Ｂ１．対象の結腸細胞（例えば、結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、および／または粘膜固有層の細胞）へペイロード核酸を送達し、ペイロード核酸によってコードされるペイロードを細胞に生成させる方法であって、

方法は、プラスミドおよびトランスポーター核酸を含むビフィドバクテリウム属細菌を、細菌が対象の結腸に定着するよう対象に投与することを含み、

トランスポーター核酸は、細菌においてトランスポーター核酸を発現するように構成された第１のプロモーターおよび第１のターミネーターと作動可能に会合しており、

トランスポーター核酸は、細菌からポリペプチド－プラスミド複合体を分泌するように構成された細菌分泌シグナルペプチドと、プラスミドと会合してポリペプチド－プラスミド複合体を形成するように構成されたＤＮＡ結合ドメインと、ポリペプチド－プラスミド複合体を対象の結腸細胞（例えば、結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、または粘膜固有層の細胞）に導入するように構成された細胞透過性ペプチドとをアミノ末端からカルボキシ末端の順序で含むトランスポーターポリペプチドをコードし、

プラスミドは、ペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸をコードする配列を有するペイロード核酸を含み、ペイロード核酸は、結腸細胞内でペイロード核酸を発現し、ペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸を生成するように構成された第２のプロモーターおよび第２のターミネーターと作動可能に会合している。

Ｂ２．細菌が、実施形態Ａ１～Ａ２２のいずれか１つに記載のシステムにおいて定義される通りである、実施形態Ｂ１に記載の方法。

Ｂ３．細菌が、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む医薬組成物で投与される、実施形態Ｂ１またはＢ２に記載の方法。

Ｂ４．医薬組成物が経口投与される、実施形態Ｂ３に記載の方法。

Ｂ５．医薬組成物が免疫アジュバントと組み合わせて投与される、実施形態Ｂ３またはＢ４に記載の方法。

Ｂ６．細菌が医薬組成物中で凍結乾燥される、実施形態Ｂ３～Ｂ５のいずれか１つに記載の方法。

Ｂ７．医薬組成物が、10^5～10^{11}コロニー形成単位（ＣＦＵ）の用量で、または

場合により10^8～10^{10}ＣＦＵの用量で対象に投与される、実施形態Ｂ３～Ｂ６のいずれか１つに記載の方法。

Ｂ８．細菌が第１の細菌であり、実施形態Ｂ１または実施形態Ｂ２で定義される第２の細菌と組み合わせて投与され、第１の細菌のペイロード核酸によってコードされるペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸が、第２の細菌のペイロード核酸によってコードされるペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸とは異なる、実施形態Ｂ１～Ｂ７のいずれか１つに記載の方法。

Ｂ９．第１の細菌および第２の細菌が、同時投与のために単一剤形に製剤化される、実施形態Ｂ８に記載の方法。

Ｂ１０．第１の細菌および第２の細菌が、別々の剤形として製剤化される、実施形態Ｂ８に記載の方法。

Ｃ１．以下を含むＤＮＡワクチン：

プラスミドおよびトランスポーター核酸を含むビフィドバクテリウム属細菌

細菌においてトランスポーター核酸を発現するように構成された第１のプロモーターおよび第１のターミネーターと作動可能に会合している、トランスポーター核酸；

細菌からポリペプチド－プラスミド複合体を分泌するように構成された細菌分泌シグナルペプチドと、プラスミドと会合してポリペプチド－プラスミド複合体を形成するように構成されたＤＮＡ結合ドメインと、ポリペプチド－プラスミド複合体を対象の細胞に導入するように構成された細胞透過性ペプチドとをアミノ末端からカルボキシ末端の順序で含むトランスポーターポリペプチドをコードする、トランスポーター核酸；および

ペイロードタンパク質をコードするペイロード核酸を含むプラスミドであって、ペイロード核酸は、細胞においてペイロード遺伝子を発現し、ペイロードタンパク質を生成するように構成された第２のプロモーターおよび第２のターミネーターと作動可能に会合しており、ペイロードタンパク質は、病原体の構成要素であるか、またはペイロードタンパク質は、病理に特異的であるかもしくはそれと関連する抗原を含み、病理ががんであってもよい、プラスミド。

Ｃ２．対象へのＤＮＡワクチンの投与後に病原体または病理に対する適応免疫応答を対象に引き起こす、実施形態Ｃ１に記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ３．ビフィドバクテリウム属細菌がビフィドバクテリウム・ロンガム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｌｏｎｇｕｍ）である、実施形態Ｃ１またはＣ２に記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ４．細菌分泌シグナルペプチドがα－アラビノシダーゼ分泌シグナルペプチドである、実施形態Ｃ１～Ｃ３のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ５．α－アラビノシダーゼ分泌シグナルペプチドが配列番号１３の配列を有する、実施形態Ｃ４に記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ６．ＤＮＡ結合ドメインが配列番号７の配列を有する、実施形態Ｃ１～Ｃ５のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ７．細胞透過性ペプチドが配列番号１８の配列を有する、実施形態Ｃ１～Ｃ６のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ８．トランスポーターポリペプチドが配列番号２の配列を有する、実施形態Ｃ１～Ｃ３のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ９．プラスミドがトランスポーター核酸をさらに含む、実施形態Ｃ１～Ｃ８のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ１０．病原体がウイルス、細菌または寄生虫である、実施形態Ｃ１～Ｃ９のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ１１．病原体がウイルスである、実施形態Ｃ１０に記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ１２．ウイルスが、コロナウイルス、場合によりβコロナウイルス、場合によりＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（野生型または変異体）である、実施形態Ｃ１１に記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ１３．ペイロードタンパク質が、スパイクタンパク質もしくはその抗原性断片、マト

リックスタンパク質もしくはその抗原性断片、またはヌクレオカプシドタンパク質もしくはその抗原性断片を含む、実施形態Ｃ１２に記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ１４．ペイロードタンパク質が、スパイクタンパク質もしくはその抗原性断片もしくは誘導体、マトリックスタンパク質もしくはその抗原性断片もしくは誘導体、またはヌクレオカプシドタンパク質もしくはその抗原性断片もしくは誘導体を含む、実施形態Ｃ１２に記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ１５．ペイロードタンパク質が、野生型配列と少なくとも８０％同一のスパイクタンパク質断片または誘導体を含み、スパイクタンパク質断片がスパイクタンパク質の受容体結合ドメイン（ＲＢＤ）を含む、実施形態Ｃ１２に記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ１６．ペイロードタンパク質が、配列番号５１または５５に示されるアミノ酸配列を含み、スパイクタンパク質断片が、配列番号４６のアミノ酸１３～６８５と少なくとも８０％同一の誘導体である、実施形態Ｃ１５に記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ１７．ペイロードタンパク質が、配列番号４６および５３～５６のいずれか１つに示されるアミノ酸配列を含む、実施形態Ｃ１５に記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ１８．ペイロードタンパク質が、配列番号４６のアミノ酸１３～６８５もしくは配列番号５３のアミノ酸１３～６８２を含むか、または場合により配列番号４６のアミノ酸１３～１２７３もしくは配列番号５３のアミノ酸１３～１２７０を含む、実施形態Ｃ１５に記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ１９．ペイロード核酸が、スパイクタンパク質もしくはその抗原性断片、マトリックスタンパク質もしくはその抗原性断片、および／またはヌクレオカプシドタンパク質もしくはその抗原性断片の組み合わせを含む複数のペイロードをコードする、実施形態Ｃ１３～Ｃ１８のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ２０．ペイロード核酸が複数のペイロードをコードする、実施形態Ｃ１～Ｃ１８のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ２１．複数のペイロードが病原体由来の抗原性タンパク質の組み合わせを含む、実施形態Ｃ２０に記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ２２．複数のペイロードが、１つまたは複数の免疫調節タンパク質を含み、場合により、１つまたは複数の免疫調節タンパク質が、ＩＬ－１２、ＩＮＦｇ、ＴＮＦａ、ＩＬ－１０、ＩＬ－８、ＩＬ－２、ＩＬ－４、Ｉｌ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ１ａ／ｂ、ＩＬ－６、ＩＬ－１７、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ－１３、ＧＳＭＣＦ、ＬＴａ／ｂ、および／または前述の機能性誘導体の１つまたは組み合わせである、実施形態Ｃ１９～Ｃ２１のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ２３．ペイロード核酸が複数のペイロードコード配列を含み、ペイロード核酸が、対象の細胞での発現のために単一のプロモーターおよびターミネーターと作動可能に会合し、各ペイロードコード配列がＩＲＥＳ要素によって分離されている、実施形態Ｃ１９～Ｃ２２のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ２４．ペイロード核酸が複数のペイロードコード配列を含み、各ペイロードコード配列が、別個のプロモーターおよびターミネーターと、対象の細胞での発現のために作動可能に会合する、実施形態Ｃ１９～Ｃ２２のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ２５．ペイロードタンパク質が、細胞外ドメインを含む膜または膜関連タンパク質である、実施形態Ｃ１～Ｃ２４のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ２６．膜または膜関連タンパク質が内在性膜タンパク質である、実施形態Ｃ２５に記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ２７．プラスミドが、ペイロード核酸と作動可能に会合している脂質アンカーシグナルペプチドをさらにコードして、ペイロードタンパク質を脂質アンカー型タンパク質として生成する、実施形態Ｃ１～Ｃ２６のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ２８．プラスミドが、ペイロード核酸と作動可能に会合している分泌シグナルペプチドをさらにコードして、ペイロードタンパク質を分泌する、実施形態Ｃ１～Ｃ２７のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。

Ｃ２９．プラスミドがペイロードタンパク質を細胞内タンパク質として生成するように

構成されている、実施形態Ｃ１～Ｃ２８のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。
Ｃ３０．対象の細胞が結腸細胞（例えば、結腸上皮細胞、結腸免疫細胞、および／または粘膜固有層の細胞）であり、場合により対象の細胞が結腸上皮細胞および／または結腸免疫細胞である、実施形態Ｃ１～Ｃ２９のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。
Ｃ３１．ペイロード核酸が、結腸上皮細胞の基底外側細胞膜に対してペイロードタンパク質を標的化するための基底外側選別シグナルを含む、実施形態Ｃ３０に記載のＤＮＡワクチン。
Ｃ３２．ペイロード核酸が、結腸上皮細胞の内腔細胞膜に対してペイロードタンパク質を標的化するための頂端選別シグナルを含む、実施形態Ｃ３０またはＣ３１に記載のＤＮＡワクチン。
Ｃ３３．薬学的に許容される賦形剤をさらに含む医薬組成物として製剤化される、実施形態Ｃ１～Ｃ３２のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。
Ｃ３４．医薬組成物が経口投与用である、実施形態Ｃ３３に記載のＤＮＡワクチン。
Ｃ３５．医薬組成物が免疫アジュバントと組み合わせて投与するためのものである、実施形態Ｃ３３またはＣ３４に記載のＤＮＡワクチン。
Ｃ３６．細菌が凍結乾燥される、実施形態Ｃ１～Ｃ３５のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。
Ｃ３７．ＤＮＡワクチンが、10^5～10^{11}コロニー形成単位（ＣＦＵ）、または場合により10^8～10^{10}ＣＦＵの用量で対象に投与するためのものである、実施形態Ｃ１～Ｃ３６のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。
Ｃ３８．細菌が第１の細菌であり、実施形態Ａ１またはＣ１で定義される第２の細菌と組み合わせて投与するためのものであり、第１の細菌のペイロード核酸によってコードされるペイロードタンパク質が、第２の細菌のペイロード核酸によってコードされるペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸とは異なる、実施形態Ｃ１～Ｃ３７のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。
Ｃ３９．第１の細菌および第２の細菌が、同時投与のために単一剤形に製剤化される、実施形態Ｃ３８に記載のＤＮＡワクチン。
Ｃ４０．第１の細菌および第２の細菌が、別々の剤形として製剤化される、実施形態Ｃ３８に記載のＤＮＡワクチン。
Ｃ４１．第２の細菌のペイロード核酸によってコードされたペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸が、１つまたは複数の免疫調節タンパク質を含み、場合により、１つまたは複数の免疫調節タンパク質が、ＩＬ－１２、ＩＮＦｇ、ＴＮＦａ、ＩＬ－１０、ＩＬ－８、ＩＬ－２、ＩＬ－４、Ｉｌ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ１ａ／ｂ、ＩＬ－６、ＩＬ－１７、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ－１３、ＧＳＭＣＦ、ＬＴａ／ｂ、および／または前述の機能性誘導体の１つまたは組み合わせである、実施形態Ｃ３８～Ｃ４０のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチン。
Ｄ１．病原体に対して対象にワクチン接種する方法であって、実施形態Ｃ１～Ｃ３２のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチンを対象に投与することを含み、ペイロード核酸が病原体の１つ以上の構成要素をコードする、方法。
Ｄ２．コロナウイルスに対して対象にワクチン接種する方法であって、実施形態Ｃ１２～Ｃ１９のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチンを対象に投与することを含む方法。
Ｄ３．コロナウイルスが、βコロナウイルス、場合によりＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２である、実施形態Ｄ２に記載の方法。
Ｄ４．病理に対して対象にワクチン接種する方法であって、実施形態Ｃ１～Ｃ３２のいずれか１つに記載のＤＮＡワクチンを対象に投与することを含み、ペイロード核酸が病理に特異的な、または関連する抗原をコードし、場合により病理ががんである、方法。
Ｄ５．細菌が、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む医薬組成物で投与される、実施形態Ｄ４に記載の方法。
Ｄ６．医薬組成物が経口投与される、実施形態Ｄ５に記載の方法。
Ｄ７．医薬組成物が免疫アジュバントと組み合わせて投与される、実施形態Ｄ５または

Ｄ６に記載の方法。
Ｄ８．細菌が医薬組成物中で凍結乾燥される、実施形態Ｄ５～Ｄ７のいずれか１つに記載の方法。
Ｄ９．医薬組成物が、10^{5}～10^{11}コロニー形成単位（ＣＦＵ）の用量で、または場合により10^{8}～10^{10}ＣＦＵの用量で対象に投与される、実施形態Ｄ５～Ｄ８のいずれか１つに記載の方法。
Ｄ１０．細菌が第１の細菌であり、実施形態Ａ１またはＣ１で定義される第２の細菌と組み合わせて投与され、第１の細菌のペイロード核酸によってコードされるペイロードタンパク質が、第２の細菌のペイロード核酸によってコードされるペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸とは異なる、実施形態Ｄ１～Ｄ９のいずれか１つに記載の方法。
Ｄ１１．第１の細菌および第２の細菌が、同時投与のために単一剤形に一緒に製剤化される、実施形態Ｄ１０に記載の方法。
Ｄ１２．第１の細菌および第２の細菌が、別々の剤形として製剤化される、実施形態Ｄ１０に記載の方法。
Ｄ１３．第２の細菌のペイロード核酸によってコードされたペイロードタンパク質またはペイロードリボ核酸が、１つまたは複数の免疫調節タンパク質を含み、場合により、１つまたは複数の免疫調節タンパク質が、ＩＬ－１２、ＩＮＦｇ、ＴＮＦａ、ＩＬ－１０、ＩＬ－８、ＩＬ－２、ＩＬ－４、Ｉｌ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ１ａ／ｂ、ＩＬ－６、ＩＬ－１７、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ－１３、ＧＳＭＣＦ、ＬＴａ／ｂ、および／または前述の機能性誘導体の１つまたは組み合わせである、実施形態Ｄ１０～Ｄ１２のいずれか１つに記載の方法。

【０１１１】

ＩＩＩ．配列

【０１１２】

表１は、本出願で参照される様々な配列を列挙している。

【０１１３】

【表１－１】

表１：配列

配列番号	配列（アミノ酸またはＤＮＡ　5’～3’）	その他の識別情報
1	［意図的に空欄］	
2	MTLTGTLRKAFATTLAAAMLIGTLAGCSSAAYNKSDLVSKIAQKSNLT KAQAEAAVNAFQDVFVEAMKSGEGLKLTGLFSAERVKRPARTGRNPRT GEQIDIPASYGVRISAGSLLKKAVTEYGRKKRRQRRR	トランスポーターポリペプチド ＨＴＰ（人工配列）
3	MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVL TCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEV LSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWW LTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVE CQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKN LQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDR VFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGGGGGGSR NLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPCTSEEIDH EDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFM MALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELM QALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSY LNASGGGGGGSGGGGGGSIIIGPLIFVFLFSVVIGSIYLFLRKRQPDG P	Ｍ－ＩＬ－１２（人工） Ｈｕ－ＩＬ－１２β（ｐ４０） １－３２８ａａ １ｘ（Ｇ６Ｓ）リンカー ３２９－３３５ａａ Ｈｕ－ＩＬ－１２　α（ｐ３５） ３３６－５３２ａａ ２ｘ（Ｇ６Ｓ）リンカー ５３３－５４６ａａ ＩＮＳＲ－ＴＭドメイン５４７－５７７ａａ
4	gaaaacaatttggagaacctgaccattggcgttttcgccaggacggcc ggggtcaatgtggagaccatccggttctatcagcgcaagggcttgctc ccggaaccggacaagccttacggcagcattcgccgctatggcgagacg gatgtaacgcgggtgcgcttcgtgaaatcagcccagcggttgggcttc agcctggatgagatcgccgagctgctgcggctggaggatggcacccat tgcgaggaagccagcagcctggccgagcacaagctcaaggacgtgcgc gagaggatggctgacctggcgcgcatggaggccgtgctgtctgatttg gtgtgcgcctgccatgcgcgaaggggggaacgtttcctgcccgctgatc gcgtcactacagggtggagcaagcttggcaggttcggctatgcct	ＭｅｒＲ　ＤＮＡ結合ドメイン （供給源：ビフィドバクテリウム・ロンガム）
5	ENNLENLTIGVFARTAGVNVETIRFYQRKGLLPEPDKPYGSIRRYGET DVTRVRFVKSAQRLGFSLDEIAELLRLEDGTHCEEASSLAEHKLKDVR ERMADLARMEAVLSDLVCACHARRGNVSCPLIASLQGGASLAGSAMP	ＭｅｒＲ　ＤＮＡ結合ドメイン （供給源：ビフィドバクテリウム・ロンガム）
6	gcatacaacaagtctgacctcgtttcgaagatcgcccagaagtccaac ctgaccaaggctcaggccgaggctgctgttaacgccttccaggatgtg ttcgtcgaggctatgaagtccggcgaaggcctgaagctcaccggcctg ttctccgctgagcgcgtcaagcgcccggctcgcaccggccgcaacccg cgcactggcgagcagattgacattccggcttcctacggcgttcgtatc tccgctggctccctgctgaagaaggccgtcaccgag	Ｈｕ　ＤＮＡ結合ドメイン （供給源：ビフィドバクテリウム・ロンガム）
7	AYNKSDLVSKIAQKSNLTKAQAEAAVNAFQDVFVEAMKSGEGLKLTGL FSAERVKRPARTGRNPRTGEQIDIPASYGVRISAGSLLKKAVTE	Ｈｕ　ＤＮＡ結合ドメイン （供給源：ビフィドバクテリウム・ロンガム）
8	gaaaaactgcgcaacggcagcggcgatccgggcaaaaaaaaacagcat gcgtgcccggaatgcggcaaaagctttagccagagcagcgatctgcag cgccatcagcgcacccatacccggcgaaaaaccgtataaatgcccggaa tgcggcaaaagctttagccgcagcgatgaactgcagcgccatcagcgc acccataccggcgaaaaaccgtataaatgcccggaatgcggcaaaagc tttagccgcagcgatcatctgagccgccatcagcgcacccatcagaac aaaaaa	ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン （人工）
9	EKLRNGSGDPGKKKQHACPECGKSFSQSSDLQRHQRTHTGEKPYKCPE CGKSFSRSDELQRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLSRHQRTHQN KK	ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン （人工）
10	aagcttgtcgacctgcagccttggcgcttgactccgtacatgagtacg gaagtaaggttacgctatccttggctgcagaagctt	ＭｅｒＲ　ＤＮＡ結合ドメイン認識部位 （供給源：ビフィドバクテリウム・ ロンガム）
11	aagctttttttttttttggggcggctttttttttttaagctt	ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン 認識部位（人工）
12	atgaccctgaccggcaccctgcgcaaggccttcgccaccaccctggcc gccgccatgctgatcggcaccctggccggctgctcctccgcc	αアラビニソシダーゼ分泌シグナルペプチド （供給源：ビフィドバクテリウム・ロンガム）
13	MTLTGTLRKAFATTLAAAMLIGTLAGCSSA	αアラビニソシダーゼ分泌シグナルペプチド （供給源：ビフィドバクテリウム・ロンガム）

【表１－２】

14	atgaaacatcggaaacccgcaccggcctggcataggctggggctgaag attagcaagaaagtggtggtcggcatcaccgccgcggcgaccgccttc ggcggactggcaatc	Ｃ末端欠失を有するαアミラーゼ分泌シグナルペプチド（供給源：ビフィドバクテリウム・ロンガム）
15	MKHRKPAPAWHRLGLKISKKVVVGITAAATAFGGLAI	Ｃ末端欠失を有するαアミラーゼ分泌シグナルペプチド（供給源：ビフィドバクテリウム・ロンガム）
16	atgaaacatcggaaacccgcaccggcctggcataggctggggctgaag attagcaagaaagtggtggtcggcatcaccgccgcggcgaccgccttc ggcggactggcaatcgccagcaccgcagcacaggccagcacc	αアミラーゼ分泌シグナルペプチド（供給源：ビフィドバクテリウム・ロンガム）
17	MKHRKPAPAWHRLGLKISKKVVVGITAAATAFGGLAIASTAAQAST	αアミラーゼ分泌シグナルペプチド（供給源：ビフィドバクテリウム・ロンガム）
18	YGRKKRRQRRR	ＴＡＴ　ＣＰＰ（ＨＩＶ－１）
19	RQIKIWFQNRRMKWKK	Ａｎｔｐ　ＣＰＰ（アンテナペディア・キイロショウジョウバエ（Ａｎｔｅｎｎａｐｅｄｉａ Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ））
20	TRQARRNRRRRWRERQF	Ｒｅｖ　ＣＰＰ（ヒト免疫不全ウイルス）
21	NAKTRRHERRRKLAIER	ＶＰ２２　ＣＰＰ（ヒト免疫不全ウイルス）
22	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	Ｐ－β　ＭＰＧ　ＣＰＰ（シミアンウイルス４０）
23	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	トランスポータン（Ｇａｌａｎｉｎ－ｍａｓｔｏｐａｒａｎ）ＣＰＰ（合成）
24	KETWWETWWTEWSQPKKKR(R/K)V	Ｐｅｐ－１　ＣＰＰ（シミアンウイルス４０）
25	GRKKRRQRRR	ＴＡＴ　ＣＰＰ（ＨＩＶ－１）
26	RRIPNRRPRR	ＨＲＳＶ　ＣＰＰ（人工）
27	RLRWR	ＡＩＰ６　ＣＰＰ（人工）
28	MVRRFLVTLRIRRACGPPRVRV	ＡＲＦ　（１－２２）ＣＰＰ（人工）
29	LLIILRRRIRKQAHAHSK	ｐＶＥＣ　ＣＰＰ（人工）
30	QLALQLALQALQAALQLA	ＭＡＰ１７　ＣＰＰ（人工）
31	DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD	ＶＴ５　ＣＰＰ（人工）
32	RRIRPRPPRLPRPRPRPLPFPRPG	Ｂａｃ７　ＣＰＰ（人工）
33	PPRPPRPPR	（ＰＰＲ）　ｎ　ＣＰＰ（人工）
34	HGLASTLTRWAHYNALIRAF	ｇＨ６２５　ＣＰＰ（ＨＳＶ－１）
35	WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA	ＧＡＬＡ　ＣＰＰ（人工）
36	GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYGC	ＩＮＦ７　ＣＰＰ（インフルエンザ）
37	CSIPPEVKFNKPFVYLI	Ｃ１０５Ｙ　ＣＰＰ（人工）
38	PFVYLI	ＰＦＶＹＬＩ　ＣＰＰ（人工）
39	SDLWEMMMVSLACQY	Ｐｅｐ－７　ＣＰＰ（人工）
40	GLWRALWRLLRSLWRLLWRA	ＣＡＤＹ　ＣＰＰ（人工）
41	KLALKLALKALKAALKLA	ＭＡＰ　ＣＰＰ（人工）
42	RRWWRRWRR	Ｒ６Ｗ３　ＣＰＰ（人工）

【表１－３】

43	atgtgagcaaaaggccagcaaaaggccagggaccgtaaaaaggccgcg ttgctggcgtttttccataggctccgccccccctgacgagcatcacaaa aatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaaga taccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccg accctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagc gtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtag gtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagccc gaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggta agacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagc agagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcct aactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctg aagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaa caaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagatt acgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacg ggtttttttggggcggctttgaattcttttttttggggcggcttttt tttatgcgctcacgcaactggtccagaaccttgaccgaacgcagcggt ggtaacggcgcagtggcggttttcatggcttgttatgactgttttttt ggggtacagtctatgcctcgggcatccaagcagcaagcgcgttacgcc gtgggtcgatgtttgatgttatggagcagcaacgatgttacgcagcag ggcagtcgccctaaaacaaagttaaacatcatgagggaagcggtgatc gccgaagtatcgactcaactatcagaggtagttggcgtcatcgagcgc catctcgaaccgacgttgctggccgtacatttgtacggctccgcagtg gatggcggcctgaagccacacagtgatattgatttgctggttacggtg accgtaaggcttgatgaaacaacgcggcgagctttgatcaacgacctt ttggaaacttcggcttcccctggagagagcgagattctccgcgctgta gaagtcaccattgttgtgcacgacgacatcattccgtggcgttatcca gctaagcgcgaactgcaatttggagaatggcagcgcaatgacattctt gcaggtatcttcgagccagccacgatcgacattgatctggctatcttg ctgacaaaagcaagagaacatagcgttgccttggtaggtccagcggcg gaggaactctttgatccggttcctgaacaggatctatttgaggcgcta aatgaaaccttaacgctatggaactcgccgcccgactgggctggcgat gagcgaaatgtagtgcttacgttgtcccgcatttggtacagcgcagta accggcaaaatcgcgccgaaggatgtcgctgccgactgggcaatggag cgcctgccggcccagtatcagcccgtcatacttgaagctagacaggct tatcttggacaagaagaagatcgcttggcctcgcgcgcagatcagttg gaagaatttgtccactacgtgaaaggcgagatcaccaaggtagtcggc aaataaggtaccgttaggcgttttcgcgatgtacgggccagatatacg cgttgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacgggg tcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacg gtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacg tcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccat tgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagta catcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgac ggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggac tttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatg gtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgac tcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttg ttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactcc gccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctat ataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcctggagacgccat ccacgctgttttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctc cggactctagaggatcgaagctagccaccatgggagtcaaagttctgt ttgccctgatctgcatcgctgtggccgaggccaagcccaccgagaaca acgaagacttcaacatcgtggccgtggccagcaacttcgcgaccacgg atctcgatgctgaccgcgggaagttgcccggcaagaagctgccgctgg aggtgctcaaagagatggaagccaatgcccggaaagctggctgcacca ggggctgtctgatctgcctgtcccacatcaagtgcacgcccaagatga agaagttcatcccaggacgctgccacacctacgaaggcgacaaagagt ccgcacagggcggcataggcgaggcgatcgtcgacattcctgagattc ctgggttcaaggacttggagcccatggagcagttcatcgcacaggtcg atctgtgtgtggactgcacaactggctgcctcaaagggcttgccaacg tgcagtgttctgacctgctcaagaagtggctgccgcaacgctgtgcga cctttgccagcaagatccagggccaggtggacaagatcaaggggccg	ｐＦＲＧ３．５－ＣＭＶ－ＧＬｕｃプラスミドのＤＮＡ配列（人工）、ペイロードはＧａｕｓｓｉａルシフェラーゼを分泌した 大腸菌複製起点１－６９２ｂｐ スペクチノマイシン耐性カセット６９９－１７３４ｂｐ ＣＭＶエンハンサー／プロモーター配列１７４１－２４６７ｂｐ ［ＣＭＶエンハンサー１７９１－２１６５ｂｐ］ ［ＣＭＶプロモーター２１６６－２３８５ｂｐ］ ［ＣＭＶ　５’ＵＴＲ　２３８６－２４５７ｂｐ］ Ｇａｕｓｓｉａルシフェラーゼ２４７８－３０３５ｂｐ ＨＳＶ－ＴＫ　ポリＡシグナル　３０３６－３３５６ｂｐ 細菌Ｒｂプロモーター３３６３－３４３６ｂｐ ＨＴＰ　３４３７－３８３８ｂｐ ［分泌シグナル３４３７－３５２６ｂｐ］ ［ＤＮＡ結合ドメイン３５２７－３８０２　ｂｐ］ ［ＣＰＰ　３８０３－３８３８ｂｐ］ ＳｙｎＳターミネーター３８３９－３８８０ｂｐ Ｂｉｆ複製起点３８８７－５７１４ｂｐ

【表１－４】

	gtggtgactaatcgatccctaccggttagtaatgagtttaaacggggg aggctaactgaaacacggaaggagacaataccggaaggaacccgcgct atgacggcaataaaaagacagaataaaacgcacgggtgttgggtcgtt tgttcataaacgcggggttcggtcccagggctggcactctgtcgatac cccaccgagaccccattggggccaatacgcccgcgtttcttccttttc cccaccccacccccaagttcgggtgaaggcccagggctcgcagccaa cgtcggggcggcaggccctgccatagctttttggggcggcttttctcg agtccttccttaaggacgtgctcgtcaatttttgttttgagagtcatc tattcggatgcttttcatgaagttttttatgaccctgaccggcaccct gcgcaaggccttcgccaccaccctggccgccgccatgctgatcggcac cctggccggctgctcctccgccgcatacaacaagtctgacctcgtttc gaagatcgcccagaagtccaacctgaccaaggctcaggccgaggctgc tgttaacgccttccaggatgtgttcgtcgaggctatgaagtccggcga aggcctgaagctcaccggcctgttctccgctgagcgcgtcaagcgccc ggctcgcaccggccgcaacccgcgcactggcgagcagattgacattcc ggcttcctacggcgttcgtatctccgctggctccctgctgaagaaggc cgtcaccgagtatggacggaagaagcgcaggcagcgacggcgatgagg gtttgcgcttgcgtcgtggagggagcggaacgccgaaaaaggatccac gcgctggagatgttcaacgagtagatcgccacggcgacctccttccac gcgtgcgggcacggggattctcaaggggccggcccgaggccccttgag cccgccgggaggcgccccccggcagggcgggaatccaaagggcggagcc ctgtggccctccccgggcaggggcgggatcgtcaagggcggagccctt ggcccccctcgggagagcgcactgacacaatgctacctccggtagcatt aagtgcgccctccgccatgcggagggacgggccgcgaccggatatgcg gggaacgtccacgacgcgtcttccgtgtcctccgtcctgccttgtgcc gtcgattataatcctcggataacggacgatgattgaaccgattggagg aaacgagatgccgaagagtttcgcgcagcagatcgaggacgacgagaa caagatcaagcgcatccgggagcaccagcgcatggtcagggccaaaca agccaaacaggagcgcaacgcccgcaccaaaaggctcgtggagaccgg agcgatagtggaaaaagcgcacggcggcgcgtacgacgacgaaggacg gcagacgttctcggatggtctgaacggcatcatctcggtctacgaccc gtcccgcggcggcaacgtggacatgagagtcatcgacgtaatcgaccg gcgcatccccagattgccaaggtccgaaaccacaacaggcacggcagc ggcggcatcgcgaaccgtgcaagccaccgcaccacagccagcccacgc ccaaccgcaaagcttcacgcccaaccccccagcgcatcgaacaccggac aggagcacagcagccggatcggtgggcctagccgggacggcgcagccc tcgctccgctgggctgaaatatctgacttggttcgtaacatatttccg acatgtcggaaatatgtcgtatcatcgttgctatgagtactgaacttc gtgagcagtgggagcagctttacctgccgctgcgcccgctgtgcacga acgacttcatcgagggcgtgtaccggcagcccagggcgaaggcgctgg agggctaccggtacatcgaggcgaaccccaagaccgtcagcgacctgc tcgtggtcgacatcgacgacgcgaacgcccgcgcgatggccctatggg agcatgaggggatgctgcccaacgtgatcgtggagaacccgagaaacg gccacgcgcacgccgtgtgggcgctggccgccccgttcagtcgcaccg aatacgcgcggcgcaagccgctcgccctggccgcggcggtcacggagg ggctgcgccgctcgtgcgacggggacaagggatattcggggctgatga ccaagaacccgctgcacgaggcgtggaacagcgaactggtcaccgatc acctgtacgggctggacgaactgcgcgaggcgctggaggagtccgggg acatgccgccggcctcgtggaagcgcacgaaacggcgcaacgtggtcg gattgggccgcaactgccatctgttcgagacggcgcgcacatgggcgt acagggaggtgcgccaccactggggagacagcgaggggctgcggctgg ccatctcggccgaggcgcacgaaatgaacgccgaactgttccccgagc cactggcatggtcggaggtcgagcagatcgccaagagcatccacaagt ggatcgtcacccaaagccgcatgtggcgcgacggccccaccgtctacg aggcgacattcatcaccgtccaaagcgcccgagggaaaaagtcaggca aggccagacgagaaacattcgaactattcgcgagcgaggagatgacgt aa	

【表１－５】

44	atgtgagcaaaaggccagcaaaaggccagggaccgtaaaaaggccgcg ttgctggcgttttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaa aatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaaga taccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccg accctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagc gtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtag gtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccccgttcagccc gaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggta agacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagc agagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcct aactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctg aagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaa caaaccaccgctggtagcggtggttttttgtttgcaagcagcagatt acgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacg ggtttttttggggcggctttgaattcttttttttggggcggcttttttt tttatgcgctcacgcaactggtccagaaccttgaccgaacgcagcggt ggtaacggcgcagtggcggttttcatggcttgttatgactgtttttttt ggggtacagtctatgcctcgggcatccaagcagcaagcgcgttacgcc gtgggtcgatgtttgatgttatggagcagcaacgatgttacgcagcag ggcagtcgccctaaaacaaagttaaacatcatgagggaagcggtgatc gccgaagtatcgactcaactatcagaggtagttggcgtcatcgagcgc catctcgaaccgacgttgctggccgtacatttgtacggctccgcagtg gatggcggcctgaagccacacagtgatattgatttgctggttacggtg accgtaaggcttgatgaaacaacgcggcgagctttgatcaacgacctt ttggaaacttcggcttcccctggagagagcgagattctccgcgctgta gaagtcaccattgttgtgcacgacgacatcattccgtggcgttatcca gctaagcgcgaactgcaatttggagaatggcagcgcaatgacattcttt gcaggtatcttcgagccagccacgatcgacattgatctggctatcttg ctgacaaaagcaagagaacatagcgttgccttggtaggtccagcggcg gaggaactctttgatccggttcctgaacaggatctatttgaggcgcta aatgaaaccttaacgctatggaactcgccgcccgactgggctggcgat gagcgaaatgtagtgcttacgttgtcccgcatttggtacagcgcagta accggcaaaatcgccgccgaaggatgtcgctgccgactgggcaatggag cgcctgccggcccagtatcagcccgtcatacttgaagctagacaggct tatcttggacaagaagaagatcgcttggcctcgcgcgcagatcagttg gaagaatttgtccactacgtgaaaggcgagatcaccaaggtagtcggc aaataaggtaccgttaggcgttttcgcgatgtacgggccagatatacg cgttgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacgggg tcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacg gtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacg tcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccat tgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagta catcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgac ggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggac tttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatg gtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgac tcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttg ttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactcc gccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctat ataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcctggagacgccat ccacgctgttttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctc cggactctagaggatcgaagctagccaccatgtttgtttttcttgttt tattgccactagtctctagtcagtgtgttaatcttacaaccagaactc aattacccccctgcatacactaattctttcacacgtggtgtttattacc ctgacaaagttttcagatcctcagttttacattcaactcaggacttgt tcttacctttctttttccaatgttacttggttccatgctatacatgtct ctgggaccaatggtactaagaggtttgataaccctgtcctaccattta atgatggtgtttattttgcttccactgagaagtctaacataataagag gctggatttttggtactactttagattcgaagacccagtccctactta ttgttaataacgctactaatgttgttattaaagtctgtgaatttcaat tttgtaatgatccatttttgggtgtttattaccacaaaaacaacaaaa gttggatggaaagtgagttcagagtttattctagtgcgaataattgca cttttgaatatgtctctcagccttttcttatggaccttgaaggaaaac agggtaatttcaaaaatcttagggaatttgtgtttaagaatattgatg gttattttaaaatatattctaagcacacgcctatttaatttagtgcgtg atctccctcagggtttttcggctttagaaccattggtagatttgccaa taggtattaacatcactaggtttcaaactttacttgctttacatagaa gttatttgactcctggtgattcttcttcaggttggacagctggtgctg cagcttattatgtgggttatcttcaacctaggacttttctattaaaat ataatgaaaatggaaccattacagatgctgtagactgtgcacttgacc ctctctcagaaacaaagtgtacgttgaaatccttcactgtagaaaaag gaatctatcaaacttctaactttagagtccaaccaacagaatctattg ttagatttcctaatattacaaacttgtgccctttttggtgaagttttta	ｐＦＲＧ３．５－ＣＭＶ－Ｓ遺伝子のＤＮＡ配列（人工） 大腸菌複製起点１－６９２ｂｐ スペクチノマイシン耐性カセット６９９－１７３４ｂｐ ＣＭＶエンハンサー／プロモーター配列 １７４１－２４６７ｂｐ ［ＣＭＶエンハンサー１７９１－２１６５ｂｐ］ ［ＣＭＶプロモーター２１６６－２３８５ｂｐ］ ［ＣＭＶ　５’ＵＴＲ　２３８６－２４５７ｂｐ］ Ｓ遺伝子（スパイク） ｛ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２｝２４７８－６２９９ｂｐ ＨＳＶ－ＴＫ　ポリＡシグナル　６３００－６６２０ｂｐ ＨＴＰ　６７０１－７１０２ｂｐ ［分泌シグナル６７０１－６７９０ｂｐ］ ［ＤＮＡ結合ドメイン ６７９１－７０６６ｂｐ］ ［ＣＰＰ　７０６７－７１０２ｂｐ］ ＳｙｎＳターミネーター ７１０３－７１４４ｂｐ Ｂｉｆ複製起点 ７１５１－８９７８ｂｐ

【表１－６】

	acgccaccagatttgcatctgtttatgcttggaacaggaagagaatca gcaactgtgttgctgattattctgtcctatataattccgcatcatttt ccacttttaagtgttatggagtgtctcctactaaattaaatgatctct gctttactaatgtctatgcagattcatttgtaattagaggtgatgaag tcagacaaatcgctccagggcaaactggaaagattgctgattataatt ataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttggaattcta acaatcttgattctaaggttggtggtaattataattacctgtatagat tgtttaggaagtctaatctcaaacctttgagagagatatttcaactg aaatctatcaggccggtagcacaccttgtaatggtgttgaaggtttta attgttactttcctttacaatcatatggtttccaacccactaatggtg ttggttaccaaccatacagagtagtagtactttctttgaacttctac atgcaccagcaactgtttgtggacctaaaaagtctactaatttggtta aaaacaaatgtgtcaatttcaacttcaatggtttaacaggcacaggtg ttcttactgagtctaacaaaaagtttctgcctttccaacaatttggca gagacattgctgacactactgatgctgtccgtgatccacagacacttg agattcttgacattacaccatgttcttttggtggtgtcagtgttataa caccaggaacaaatacttctaaccaggttgctgttctttatcaggatg ttaactgcacagaagtccctgttgctattcatgcagatcaacttactc ctacttggcgtgtttattctacaggttctaatgtttttcaaacacgtg caggctgtttaataggggctgaacatgtcaacaactcatatgagtgtg acatacccattggtgcaggtatatgcgctagttatcagactcagacta attctcctcggcgggcacgtagtgtagctagtcaatccatcattgcct acactatgtcacttggtgcagaaaattcagttgcttactctaataact ctattgccatacccacaaattttactattagtgttaccacagaaattc taccagtgtctatgaccaagacatcagtagattgtacaatgtacattt gtggtgattcaactgaatgcagcaatcttttgttgcaatatggcagtt tttgtacacaattaaaccgtgctttaactggaatagctgttgaacaag acaaaaacacccaagaagtttttgcacaagtcaaacaaatttacaaaa caccaccaattaaagattttggtggtttttaatttttcacaaatattac cagatccatcaaaaccaagcaagaggtcatttattgaagatctacttt tcaacaaagtgacacttgcagatgctggcttcatcaaacaatatggtg attgccttggtgatattgctgctagagacctcatttgtgcacaaaagt ttaacggccttactgttttgccacctttgctcacagatgaaatgattg ctcaatacacttctgcactgttagcgggtacaatcacttctggttgga cctttggtgcaggtgctgcattacaaataccatttgctatgcaaatgg cttataggtttaatggtattggagttacacagaatgttctctatgaga accaaaaattgattgccaaccaatttaatagtgctattggcaaaattc aagactcactttcttccacagcaagtgcacttggaaaacttcaagatg tggtcaaccaaaatgcacaagctttaaacacgcttgttaaacaactta gctccaattttggtgcaatttcaagtgttttaaatgatatcctttcac gtcttgacaaagttgaggctgaagtgcaaattgataggttgatcacag gcagacttcaaagtttgcagacatatgtgactcaacaattaattagag ctgcagaaatcagagcttctgctaatcttgctgctactaaaatgtcag agtgtgtacttggacaatcaaaaagagttgatttttgtggaaagggct atcatcttatgtccttcccctcagtcagcacctcatggtgtagtcttct tgcatgtgactttatgtccctgcacaagaaaagaacttcacaactgctc ctgccatttgtcatgatggaaaagcacactttcctcgtgaaggtgtct ttgtttcaaatggcacacactggtttgtaacacaaaggaatttttatg aaccacaaatcattactacagacaacacatttgtgtctggtaactgtg atgttgtaataggaattgtcaacaacacagtttatgatccctttgcaac ctgaattagactcattcaaggaggagttagataaatattttaagaatc atacatcaccagatgttgatttaggtgacatctctggcattaatgctt cagttgtaaacattcaaaaagaaattgaccgcctcaatgaggttgcca agaatttaaatgaatctctcatcgatctccaagaacttggaaagtatg agcagtatataaaatggccatggtacatttggctaggttttatagctg gcttgattgccatagtaatggtgacaattatgctttgctgtatgacca gttgctgtagttgtctcaagggctgttgttcttgtggatcctgctgca aatttgatgaagacgactctgagccagtgctcaaaggagtcaaattac attacacataatcgatccctaccggttagtaatgagtttaaacggggg aggctaactgaaacacggaaggagacaataccggaaggaacccgcgct atgacggcaataaaaagacagaataaaacgcacgggtgttgggtcgtt tgttcataaacgcggggttcggtcccagggctggcactctgtcgatac cccaccgagaccccattggggccaatacgcccgcgtttcttcctttc cccaccccacccccaagttcgggtgaaggcccagggctcgcagccaa cgtcggggcggcaggccctgccatagcttttttggggcggcttttctcg	

10 20 30 40 50

【表１－７】

	agtccttccttaaggacgtgctcgtcaatttttgttttgagagtcatc tattcggatgcttttcatgaagtttttttatgaccctgaccggcaccct gcgcaaggccttcgccaccaccctggccgccgccatgctgatcggcac cctggccggctgctcctccgccgcatacaacaagtctgacctcgtttc gaagatcgcccagaagtccaacctgaccaaggctcaggccgaggctgc tgttaacgccttccaggatgtgttcgtcgaggctatgaagtccggcga aggcctgaagctcaccggcctgttctccgctgagcgcgtcaagcgccc ggctcgcaccggccgcaacccgcgcactggcgagcagattgacattcc ggcttcctacggcgttcgtatctccgctggctccctgctgaagaaggc cgtcaccgagtatggacggaagaagcgcaggcagcgacggcgatgagg gtttgcgcttgcgtcgtggagggagcggaacgccgaaaaaggatccac gcgctggagatgttcaacgagtagatcgccacggcgacctccttccac gcgtgcgggcacggggattctcaaggggccggcccgaggccccttgag cccgccgggaggcgcccccggcagggcgggaatccaaagggcggagcc ctgtggccctccccgggcaggggcgggatcgtcaagggcggagccctt ggcccccctcgggagagcgcactgacacaatgctacctccggtagcatt aagtgcgccctccgccatgcggagggacgggccgcgaccggatatgcg gggaacgtccacgacgcgtcttccgtgtcctccgtcctgccttgtgcc gtcgattataatcctcggataacggacgatgattgaaccgattggagg aaacgagatgccgaagagtttcgcgcagcagatcgaggacgacgagaa caagatcaagcgcatccgggagcaccagcgcatggtcagggccaaaca agccaaacaggagcgcaacgcccgcaccaaaaggctcgtggagaccgg agcgatagtggaaaaagcgcacggcggcgcgtacgacgacgaaggacg gcagacgttctcggatggtctgaacggcatcatctcggtctacgaccc gtcccgcggcggcaacgtggacatgagagtcatcgacgtaatcgaccg gcgcatccccagattgccaaggtccgaaaccacaacaggcacggcagc ggcggcatcgcgaaccgtgcaagccaccgcaccacagccagcccacgc ccaaccgcaaagcttcacgcccaaccccccagcgcatcgaacaccggac aggagcacagcagccggatcggtgggcctagccgggacggcgcagccc tcgctccgctgggctgaaatatctgacttggttcgtaacatatttccg acatgtcggaaatatgtcgtatcatcgttgctatgagtactgaacttc gtgagcagtgggagcagctttacctgccgctgcgcccgctgtgcacga acgacttcatcgagggcgtgtaccggcagcccagggcgaaggcgctgg agggctaccggtacatcgaggcgaaccccaagaccgtcagcgacctgc tcgtggtcgacatcgacgacgcgaacgcccgcgcgatggccctatggg agcatgaggggatgctgcccaacgtgatcgtggagaacccgagaaacg gccacgcgcacgccgtgtgggcgctggccgccccgttcagtcgcaccg aatacgcgcggcgcaagccgctcgccctggccgcggcggtcacggagg ggctgcgccgctcgtgcgacggggacaagggatattcggggctgatga ccaagaacccgctgcacgaggcgtggaacagcgaactggtcaccgatc acctgtacgggctggacgaactgcgcgaggcgctggaggagtccgggg acatgccgccggcctcgtggaagcgcacgaaacggcgcaacgtggtcg gattgggccgcaactgccatctgttcgagacggcgcgcacatgggcgt acagggaggtgcgccaccactggggagacagcgaggggctgcggctgg ccatctcggccgaggcgcacgaaatgaacgccgaactgttccccgagc cactggcatggtcggaggtcgagcagatcgccaagagcatccacaagt ggatcgtcacccaaagccgcatgtggcgcgacggccccaccgtctacg aggcgacattcatcaccgtccaaagcgcccgagggaaaaagtcaggca aggccagacgagaaacattcgaactattcgcgagcgaggagatgacgt aa	

10

20

30

40

50

【表１－８】

45	atgtgagcaaaaggccagcaaaaggccagggaccgtaaaaaggccgcg ttgctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaa aatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaaga taccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccg accctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagc gtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtag gtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagccc gaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggta agacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagc agagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcct aactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctg aagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaa caaaccaccgctggtagcggtggttttttttgtttgcaagcagcagatt acgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacg ggtttttttggggcggctttgaattcttttttttggggcggctttttt tttatgcgctcacgcaactggtccagaaccttgaccgaacgcagcggt ggtaacggcgcagtggcggttttcatggcttgttatgactgttttttt ggggtacagtctatgcctcgggcatccaagcagcaagcgcgttacgcc gtgggtcgatgtttgatgttatggagcagcaacgatgttacgcagcag ggcagtcgccctaaaacaaagttaaacatcatgagggaagcggtgatc gccgaagtatcgactcaactatcagaggtagttggcgtcatcgagcgc catctcgaaccgacgttgctggccgtacatttgtacggctccgcagtg gatggcggcctgaagccacacagtgatattgatttgctggttacggtg accgtaaggcttgatgaaacaacgcggcgagctttgatcaacgacctt ttggaaacttcggcttcccctggagagagcgagattctccgcgctgta gaagtcaccattgttgtgcacgacgacatcattccgtggcgttatcca gctaagcgcgaactgcaatttggagaatggcagcgcaatgacattctt gcaggtatcttcgagccagccacgatcgacattgatctggctatcttg ctgacaaaagcaagagaacatagcgttgccttggtaggtccagcggcg gaggaactctttgatccggttcctgaacaggatctatttgaggcgcta aatgaaaccttaacgctatggaactcgccgcccgactgggctggcgat gagcgaaatgtagtgcttacgttgtcccgcatttggtacagcgcagta accggcaaaatcgcgccgaaggatgtcgctgccgactgggcaatggag cgcctgccggcccagtatcagcccgtcatacttgaagctagacaggct tatcttggacaagaagaagatcgcttggcctcgcgcgcagatcagttg gaagaatttgtccactacgtgaaaggcgagatcaccaaggtagtcggc aaataaggtaccgttaggcgttttcgcgatgtacgggccagatatacg cgttgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacgggg tcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacg gtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacg tcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccat tgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagta catcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgac ggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggac tttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatg gtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgac tcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttg ttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactcc gccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctat ataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcctggagacgccat ccacgctgttttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctc cggactctagaggatcgaagctagccaccatgtttgtttttcttgttt tattgccactagtctctagtcagtgtgttaatcttacaaccagaactc aattacccccctgcatacactaattctttcacacgtggtgtttattacc ctgacaaagttttcagatcctcagttttacattcaactcaggacttgt tcttacctttctttttccaatgttacttggttccatgctatacatgtct ctgggaccaatggtactaagaggtttgataaccctgtcctaccattta atgatggtgtttattttgcttccactgagaagtctaacataataagag gctggatttttggtactactttagattcgaagacccagtccctactta ttgttaataacgctactaatgttgttattaaagtctgtgaatttcaat tttgtaatgatccatttttgggtgtttattaccacaaaaacaacaaaa gttggatggaaagtgagttcagagtttattctagtgcgaataattgca cttttgaatatgtctctcagccttttcttatggaccttgaaggaaaac agggtaatttcaaaaatcttagggaatttgtgtttaagaatattgatg gttattttaaaatatattctaagcacacgcctattaatttagtgcgtg atctccctcagggtttttcggctttagaaccattggtagatttgccaa taggtattaacatcactaggtttcaaactttacttgctttacatagaa gttatttgactcctggtgattcttcttcaggttggacagctggtgctg cagcttattatgtgggttatcttcaacctaggacttttctattaaaat ataatgaaaatggaaccattacagatgctgtagactgtgcacttgacc ctctctcagaaacaaagtgtacgttgaaatccttcactgtagaaaaag gaatctatcaaacttctaactttagagtccaaccaacagaatctattg ttagatttcctaatattacaaacttgtgccctttttggtgaagtttta acgccaccagatttgcatctgtttatgcttggaacaggaagagaatca gcaactgtgttgctgattattctgtcctatataattccgcatcatttt ccacttttaagtgttatggagtgtctcctactaaattaaatgatctct gctttactaatgtctatgcagattcatttgtaattagaggtgatgaag tcagacaaatcgctccagggcaaactggaaagattgctgattataatt ataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttggaattcta acaatcttgattctaaggttggtggtaattataattacctgtatagat	pＦＲＧ３．５－ＣＭＶ－ ＣＯＶＩＤ１９－ＳｉＭｉＮ のＤＮＡ配列（人工） 大腸菌複製起点１－６９２ｂｐ スペクチノマイシン耐性カセット ６９９－１７３４ｂｐ ＣＭＶエンハンサー／プロモーター配列 １７４１－２４６７ｂｐ ［ＣＭＶエンハンサー １７９１－２１６５ｂｐ］ ［ＣＭＶプロモーター ２１６６－２３８５ｂｐ］ ［ＣＭＶ　５’ＵＴＲ ２３８６－２４５７ｂｐ］ ＳｉＭｉＮ多シストロン性遺伝子 ｛ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２｝ ２４７８－９３８６ｂｐ ［Ｓ遺伝子（スパイク） ２４７８－６２９９ｂｐ］ ［ＩＲＥＳ　６３００－６８７８ｂｐ］ ［Ｍ遺伝子（マトリックス） ６８７９－７５４７ｂｐ］ ［ＩＲＥＳ　７５４８－８１２６ｂｐ］ ［Ｎ遺伝子（ヌクレオカプシド） ８１２７－９３８６ｂｐ］ ＨＳＶ－ＴＫ　ポリＡシグナル ９３８７－９７０７ｂｐ 細菌ＲｂプロモーターＲｂプロモーター ９７１４－９７８７ｂｐ ＨＴＰ　９７８８－１０１８９ｂｐ ［分泌シグナル９７８８－９８７７ｂｐ］ ［ＤＮＡ結合ドメイン９８７８－ １０１５３ｂｐ］ ［ＣＰＰ　１０１５４－１０１８９ｂｐ］ ＳｙｎＳターミネーター １０１９０－１０２３１ｂｐ Ｂｉｆ複製起点１０２３８－１２０６５ｂｐ

【表１－９】

	tgtttaggaagtctaatctcaaacctttgagagagatatttcaactg aaatctatcaggccggtagcacaccttgtaatggtgttgaaggtttta attgttactttcctttacaatcatatggtttccaacccactaatggtg ttggttaccaaccatacagagtagtagtactttctttgaacttctac atgcaccagcaactgtttgtggacctaaaaagtctactaatttggtta aaaacaaatgtgtcaatttcaacttcaatggtttaacaggcacaggtg ttcttactgagtctaacaaaaagtttctgcctttccaacaatttggca gagacattgctgacactactgatgctgtccgtgatccacagacacttg agattcttgacattacaccatgttctttggtggtgtcagtgttataa caccaggaacaaatacttctaaccaggttgctgttctttatcaggatg ttaactgcacagaagtccctgttgctattcatgcagatcaacttactc ctacttggcgtgtttattctacaggttctaatgtttttcaaacacgtg caggctgtttaataggggctgaacatgtcaacaactcatatgagtgtg acatacccattggtgcaggtatatgcgctagttatcagactcagacta attctcctcggcgggcacgtagtgtagctagtcaatccatcattgcct acactatgtcacttggtgcagaaaattcagttgcttactctaataact ctattgccatacccacaaattttactattagtgttaccacagaaattc taccagtgtctatgaccaagacatcagtagattgtacaatgtacattt gtggtgattcaactgaatgcagcaatcttttgttgcaatatggcagtt tttgtacacaattaaaccgtgctttaactggaatagctgttgaacaag acaaaaacacccaagaagtttttgcacaagtcaaacaaatttacaaaa caccaccaattaaagattttggtggttttaatttttcacaaatattac cagatccatcaaaaccaagcaagaggtcatttattgaagatctacttt tcaacaaagtgacacttgcagatgctggcttcatcaaacaatatggtg attgccttggtgatattgctgctagagacctcatttgtgcacaaaagt ttaacggccttactgttttgccacctttgctcacagatgaaatgattg ctcaatacacttctgcactgttagcgggtacaatcacttctggttgga cctttggtgcaggtgctgcattacaaataccatttgctatgcaaatgg cttataggtttaatggtattggagttacacagaatgttctctatgaga accaaaaattgattgccaaccaatttaatagtgctattggcaaaattc aagactcactttcttccacagcaagtgcacttggaaaacttcaagatg tggtcaaccaaaatgcacaagctttaaacacgcttgttaaacaactta gctccaattttggtgcaatttcaagtgttttaaatgatatcctttcac gtcttgacaaagttgaggctgaagtgcaaattgataggttgatcacag gcagacttcaaagtttgcagacatatgtgactcaacaattaattagag ctgcagaaatcagagcttctgctaatcttgctgctactaaaatgtcag agtgtgtacttggacaatcaaaaagagttgatttttgtggaaagggct atcatcttatgtccttccctcagtcagcacctcatggtgtagtcttct tgcatgtgacttatgtccctgcacaagaaaagaacttcacaactgctc ctgccatttgtcatgatggaaaagcacactttcctcgtgaaggtgtct ttgtttcaaatggcacacactggtttgtaacacaaaggaatttttatg aaccacaaatcattactacagacaacacatttgtgtctggtaactgtg atgttgtaataggaattgtcaacaacacagtttatgatcctttgcaac ctgaattagactcattcaaggaggagttagataaatattttaagaatc atacatcaccagatgttgatttaggtgacatctctggcattaatgctt cagttgtaaacattcaaaaagaaattgaccgcctcaatgaggttgcca agaatttaaatgaatctctcatcgatctccaagaacttggaaagtatg agcagtatataaaatggccatggtacatttggctaggttttatagctg gcttgattgccatagtaatggtgacaattatgctttgctgtatgacca gttgctgtagttgtctcaagggctgttgttcttgtggatcctgctgca aatttgatgaagacgactctgagccagtgctcaaaggagtcaaattac attacacataacgcccccccccctaacgttactggccgaagccgctt ggaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgttatttttccaccatatt gccgtcttttggcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtcttctt gacgagcattcctaggggtctttcccctctcgccaaaggaatgcaagg tctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttcttgaag acaaacaacgtctgtagcgacccttgcaggcagcggaacccccccacc tggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacc tgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagttggatagttgt ggaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaa ggatgcccagaaggtaccccattgtatgggatctgatctggggcctcg gtgcacatgctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaaacgtctagg ccccccgaaccacggggacgtggttttcctttgaaaaacacgatgata atatggccacaaccatggcagattccaacggtactattaccgttgaag agcttaaaaagctccttgaacaatggaacctagtaataggtttcctat	

【表１－１０】

	tccttacatggatttgtcttctacaatttgcctatgccaacaggaata ggtttttgtatataattaagttaattttcctctggctgttatggccag taactttagcttgttttgtgcttgctgctgtttacagaataaattgga tcaccggtggaattgctatcgcaatggcttgtcttgtaggcttgatgt ggctcagctacttcattgcttctttcagactgtttgcgcgtacgcgtt ccatgtggtcattcaatccagaaactaacattcttctcaacgtgccac tccatggcactattctgaccagaccgcttctagaaagtgaactcgtaa tcggagctgtgatccttcgtggacatcttcgtattgctggacaccatc taggacgctgtgacatcaaggacctgcctaaagaaatcactgttgcta catcacgaacgctttcttattacaaattgggagcttcgcagcgtgtag caggtgactcaggttttgctgcatacagtcgctacaggattggcaact ataaattaaacacagaccattccagtagcagtgacaatattgctttgc ttgtacagtaacgccccccccccctaacgttactggccgaagccgctt ggaataaggccggtgtgcgtttgtctatatgttattttccaccatatt gccgtcttttggcaatgtgagggcccggaaacctggccctgtcttctt gacgagcattcctaggggtctttcccctctcgccaaaggaatgcaagg tctgttgaatgtcgtgaaggaagcagttcctctggaagcttcttgaag acaaacaacgtctgtagcgacccttgcaggcagcggaacccccaacc tggcgacaggtgcctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacc tgcaaaggcggcacaaccccagtgccacgttgtgagttggatagttgt ggaaagagtcaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaa ggatgcccagaaggtaccccattgtatgggatctgatctggggcctcg gtgcacatgctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaaacgtctagg ccccccgaaccacggggacgtggttttcctttgaaaaacacgatgata atatggccacaaccatgtctgataatggaccccaaaatcagcgaaatg caccccgcattacgtttggtggaccctcagattcaactggcagtaacc agaatggagaacgcagtggggcgcgatcaaaacaacgtcggccccaag gtttacccaataatactgcgtcttggttcaccgctctcactcaacatg gcaaggaagaccttaaattccctcgaggacaaggcgttccaattaaca ccaatagcagtccagatgaccaaattggctactaccgaagagctacca gacgaattcgtggtggtgacggtaaaatgaaagatctcagtccaagat ggtatttctactacctaggaactgggccagaagctggacttccctatg gtgctaacaaagacggcatcatatgggttgcaactgagggagccttga atacaccaaaagatcacattggcacccgcaatcctgctaacaatgctg caatcgtgctacaacttcctcaaggaacaacattgccaaaaggcttct acgcagaagggagcagaggcggcagtcaagcctcttctcgttcctcat cacgtagtcgcaacagttcaagaaattcaactccaggcagcagtaggg gaacttctcctgctagaatggctggcaatggcggtgatgctgctcttg ctttgctgctgcttgacagattgaaccagcttgagagcaaaatgtctg gtaaaggccaacaacaacaaggccaaactgtcactaagaaatctgctg ctgaggcttctaagaagcctcggcaaaaacgtactgccactaaagcat acaatgtaacacaagctttcggcagacgtggtccagaacaaacccaag gaaatttttggggaccaggaactaatcagacaaggaactgattacaaac attggccgcaaattgcacaatttgcccccagcgcttcagcgttcttcg gaatgtcgcgcattggcatggaagtcacaccttcgggaacgtggttga cctacacaggtgccatcaaattggatgacaaagatccaaatttcaaag atcaagtcattttgctgaataagcatattgacgcatacaaaacattcc caccaacagagcctaaaaaggacaaaaagaagaaggctgatgaaactc aagccttaccgcagagacagaagaaacagcaaactgtgactcttcttc ctgctgcagatttggatgatttctccaaacaattgcaacaatccatga gcagtgctgactcaactcaggcctaatcgatccctaccggttagtaat gagtttaaacgggggaggctaactgaaacacggaaggagacaataccg gaaggaacccgcgctatgacggcaataaaaagacagaataaaacgcac gggtgttgggtcgtttgttcataaacgcggggttcggtcccagggctg gcactctgtcgataccccaccgagaccccattggggccaatacgcccg cgtttcttccttttccccacccaccccccaagttcgggtgaaggccc agggctcgcagccaacgtcggggcggcaggccctgccatagcttttg gggcggcttttctcgagtccttccttaaggacgtgctcgtcaatttt gttttgagagtcatctattcggatgcttttcatgaagtttttttatgac cctgaccggcaccctgcgcaaggccttcgccaccaccctggccgccgc catgctgatcggcaccctggccggctgctcctccgccgcatacaacaa gtctgacctcgtttcgaagatcgcccagaagtccaacctgaccaaggc tcaggccgaggctgctgttaacgccttccaggatgtgttcgtcgaggc tatgaagtccggcgaaggcctgaagctcaccggcctgttctccgctga gcgcgtcaagcgcccggctcgcaccggccgcaacccgcgcactggcga	

10 20 30 40 50

【表１－１１】

	gcagattgacattccggcttcctacggcgttcgtatctccgctggctc cctgctgaagaaggccgtcaccgagtatggacggaagaagcgcaggca gcgacggcgatgagggtttgcgcttgcgtcgtggagggagcggaacgc cgaaaaaggatccacgcgctggagatgttcaacgagtagatcgccacg gcgacctccttccacgcgtgcgggcacggggattctcaaggggccggc ccgaggcccccttgagcccgccgggaggcgcccccggcagggcgggaat ccaaagggcggagccctgtggccctccccgggcaggggcgggatcgtc aagggcggagcccttggcccccctcgggagagcgcactgacacaatgct acctccggtagcattaagtgcgccctccgccatgcggagggacgggcc gcgaccggatatgcggggaacgtccacgacgcgtcttccgtgtcctcc gtcctgccttgtgccgtcgattataatcctcggataacggacgatgat tgaaccgattggaggaaacgagatgccgaagagtttcgcgcagcagat cgaggacgacgagaacaagatcaagcgcatccgggagcaccagcgcat ggtcagggccaaacaagccaaacaggagcgcaacgcccgcaccaaaag gctcgtggagaccggagcgatagtggaaaaagcgcacggcggcgcgta cgacgacgaaggacggcagacgttctcggatggtctgaacggcatcat ctcggtctacgacccgtcccgcggcggcaacgtggacatgagagtcat cgacgtaatcgaccggcgcatccccagattgccaaggtccgaaaccac aacaggcacggcagcggcggcatcgcgaaccgtgcaagccaccgcacc acagccagcccacgcccaaccgcaaagcttcacgcccaacccccagcg catcgaacaccggacaggagcacagcagccggatcggtgggcctagcc gggacggcgcagccctcgctccgctgggctgaaatatctgacttggtt cgtaacatatttccgacatgtcggaaatatgtcgtatcatcgttgcta tgagtactgaacttcgtgagcagtgggagcagctttacctgccgctgc gcccgctgtgcacgaacgacttcatcgagggcgtgtaccggcagccca gggcgaaggcgctggagggctaccggtacatcgaggcgaaccccaaga ccgtcagcgacctgctcgtggtcgacatcgacgacgcgaacgcccgcg cgatggccctatgggagcatgaggggatgctgcccaacgtgatcgtgg agaacccgagaaacggccacgcgcacgccgtgtgggcgctggccgccc cgttcagtcgcaccgaatacgcgcggcgcaagccgctcgccctggccg cggcggtcacggaggggctgcgccgctcgtgcgacggggacaagggat attcggggctgatgaccaagaacccgctgcacgaggcgtggaacagcg aactggtcaccgatcacctgtacgggctggacgaactgcgcgaggcgc tggaggagtccggggacatgccgccggcctcgtggaagcgcacgaaac ggcgcaacgtggtcggattgggccgcaactgccatctgttcgagacgg cgcgcacatgggcgtacagggaggtgcgccaccactggggagacagcg aggggctgcggctggccatctcggccgaggcgcacgaaatgaacgccg aactgttccccgagccactggcatggtcggaggtcgagcagatcgcca agagcatccacaagtggatcgtcacccaaagccgcatgtggcgcgacg gccccaccgtctacgaggcgacattcatcaccgtccaaagcgcccgag ggaaaaagtcaggcaaggccagacgagaaacattcgaactattcgcga gcgaggagatgacgtaa	
46	MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVL HSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTE KSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVY YHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREF VFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQT LLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDA VDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLC PFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGC VIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPC NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPK KSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAV RDPQTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAI HADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICA SYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTI SVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALT GIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRS FIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPL LTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVT QNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALN TLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYV TQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSA PHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFV	受容体結合ドメイン３１９－５４１ａａ
	TQRNFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEEL DKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDL QELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCC SCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT	受容体結合モチーフ４３７－５０８ａａ 膜貫通ドメイン１２１４－１２３４ａａ 細胞質ドメイン１２４５－１２７３ａａ

【表１－１２】

47	MADSNGTITVEELKKLLEQWNLVIGFLFLTWICLLQFAYANRNRFLYI IKLIFLWLLWPVTLACFVLAAVYRINWITGGIAIAMACLVGLMWLSYF IASFRLFARTRSMWSFNPETNILLNVPLHGTILTRPLLESELVIGAVI LRGHLRIAGHHLGRCDIKDLPKEITVATSRTLSYYKLGASQRVAGDSG FAAYSRYRIGNYKLNTDHSSSSDNIALLVQ	ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（野生型） マトリックスタンパク質
48	MSDNGPQNQRNAPRITFGGPSDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQGLPNN TASWFTALTQHGKEDLKFPRGQGVPINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRG GDGKMKDLSPRWYFYYLGTGPEAGLPYGANKDGIIWVATEGALNTPKD HIGTRNPANNAAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSSRSRN SSRNSTPGSSRGTSPARMAGNGGDAALALLLLDRLNQLESKMSGKGQQ QQGQTVTKKSAAEASKKPRQKRTATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGD QELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGA IKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTEPKKDKKKKADETQALPQ RQKKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA	ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（野生型） ヌクレオカプシドタンパク質
49	atgtgagcaaaaggccagcaaaaggccagggaccgtaaaaaggccgcg ttgctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaa aatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaaga taccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccg accctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagc gtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtag gtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccccgttcagccc gaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggta agacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagc agagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcct aactacggctacactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctg aagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaa caaaccaccgctggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagatt acgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacg ggtttttttggggcggctttgaattcttttttttggggcggcttttttt tttatgcgctcacgcaactggtccagaaccttgaccgaacgcagcggt ggtaacggcgcagtggcggttttcatggcttgttatgactgtttttttt ggggtacagtctatgcctcgggcatccaagcagcaagcgcgttacgcc gtgggtcgatgtttgatgttatggagcagcaacgatgttacgcagcag ggcagtcgccctaaaacaaagttaaacatcatgagggaagcggtgatc gccgaagtatcgactcaactatcagaggtagttggcgtcatcgagcgc catctcgaaccgacgttgctggccgtacatttgtacggctccgcagtg gatggcggcctgaagccacacagtgatattgatttgctggttacggtg accgtaaggcttgatgaaacaacgcggcgagctttgatcaacgacctt ttggaaacttcggcttcccctggagagagcgagattctccgcgctgta gaagtcaccattgttgtgcacgacgacatcattccgtggcgttatcca gctaagcgcgaactgcaatttggagaatggcagcgcaatgacattctt gcaggtatcttcgagccagccacgatcgacattgatctggctatcttg ctgacaaaagcaagagaacatagcgttgccttggtaggtccagcggcg gaggaactctttgatccggttcctgaacaggatctatttgaggcgcta aatgaaaccttaacgctatggaactcgccgcccgactgggctggcgat gagcgaaatgtagtgcttacgttgtcccgcatttggtacagcgcagta accggcaaaatcgcgccgaaggatgtcgctgccgactgggcaatggag cgcctgccggcccagtatcagcccgtcatacttgaagctagacaggct tatcttggacaagaagaagatcgcttggcctcgcgcgcagatcagttg gaagaatttgtccactacgtgaaaggcgagatcaccaaggtagtcggc	ｐＦＲＧ－ＣＭＶ－Ｓ遺伝子のＤＮＡ配列 （人工） 大腸菌複製起点１－６９２ｂｐ スペクチノマイシン耐性カセット ６９９－１７３４ｂｐ ＣＭＶエンハンサー／プロモーター配列 １７４１－２４６７ｂｐ ［ＣＭＶエンハンサー １７９１－２１６５ｂｐ］ ［ＣＭＶプロモーター ２１６６－２３８５ｂｐ］ ［ＣＭＶ　５’ＵＴＲ ２３８６－２４５７ｂｐ］ Ｓ遺伝子（スパイク）｛ＳＡＲＳ－ ＣｏＶ－２｝２４７８－６２９９ｂｐ ＨＳＶ－ＴＫ　ポリＡシグナル ６３００－６６２０ｂｐ 細菌Ｒｂプロモーター ６６２７－６７００ｂｐ ハイブリッド輸送タンパク質 ６７０１－７１０２ｂｐ

【表１－１３】

	aaataaggtaccgttaggcgttttcgcgatgtacgggccagatatacg cgttgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacgggg tcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacg gtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacg tcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccat tgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagta catcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgac ggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggac tttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatg gtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgac tcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttg ttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactcc gccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctat ataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcctggagacgccat ccacgctgttttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctc cggactctagaggatcgaagctagccaccatgtttgtttttcttgttt tattgccactagtctctagtcagtgtgttaatcttacaaccagaactc aattacccccctgcatacactaattctttcacacgtggtgtttattacc ctgacaaagttttcagatcctcagttttacattcaactcaggacttgt tcttacctttctttttccaatgttacttggttccatgctatacatgtct ctgggaccaatggtactaagaggtttgataaccctgtcctaccattta atgatggtgtttattttgcttccactgagaagtctaacataataagag gctggatttttggtactactttagattcgaagacccagtccctactta ttgttaataacgctactaatgttgttattaaagtctgtgaatttcaat tttgtaatgatccatttttgggtgtttattaccacaaaaacaacaaaa gttggatggaaagtgagttcagagtttattctagtgcgaataattgca cttttgaatatgtctctcagccttttcttatggaccttgaaggaaaac agggtaatttcaaaaatcttagggaatttgtgtttaagaatattgatg gttattttaaaatatattctaagcacacgcctattaatttagtgcgtg atctccctcagggtttttcggctttagaaccattggtagatttgccaa taggtattaacatcactaggtttcaaactttacttgctttacatagaa gttatttgactcctggtgattcttcttcaggttggacagctggtgctg cagcttattatgtgggttatcttcaacctaggacttttctattaaaat ataatgaaaatggaaccattacagatgctgtagactgtgcacttgacc ctctctcagaaacaaagtgtacgttgaaatccttcactgtagaaaaag gaatctatcaaacttctaactttagagtccaaccaacagaatctattg ttagatttcctaatattacaaacttgtgccctttttggtgaagttttta acgccaccagatttgcatctgtttatgcttggaacaggaagagaatca gcaactgtgttgctgattattctgtcctatataattccgcatcatttt ccacttttaagtgttatggagtgtctcctactaaattaaatgatctct gctttactaatgtctatgcagattcatttgtaattagaggtgatgaag tcagacaaatcgctccagggcaaactggaaagattgctgattataatt ataaattaccagatgattttacaggctgcgttatagcttggaattcta acaatcttgattctaaggttggtggtaattataattacctgtatagat tgtttaggaagtctaatctcaaacctttgagagagatatttcaactg aaatctatcaggccggtagcacaccttgtaatggtgttgaaggtttta attgttactttcctttacaatcatatggtttccaacccactaatggtg ttggttaccaaccatacagagtagtagtactttctttgaacttctac atgcaccagcaactgtttgtggacctaaaaagtctactaatttggtta aaaacaaatgtgtcaatttcaacttcaatggtttaacaggcacaggtg ttcttactgagtctaacaaaaagtttctgcctttccaacaatttggca gagacattgctgacactactgatgctgtccgtgatccacagacacttg agattcttgacattacaccatgttctttttggtggtgtcagtgttataa caccaggaacaaatacttctaaccaggttgctgttctttatcaggatg ttaactgcacagaagtccctgttgctattcatgcagatcaacttactc ctacttggcgtgtttattctacaggttctaatgtttttcaaacacgtg caggctgtttaataggggctgaacatgtcaacaactcatatgagtgtg acatacccattggtgcaggtatatgcgctagttatcagactcagacta attctcctcggcgggcacgtagtgtagctagtcaatccatcattgcct acactatgtcacttggtgcagaaaattcagttgcttactctaataact ctattgccatacccacaaattttactattagtgttaccacagaaattc taccagtgtctatgaccaagacatcagtagattgtacaatgtacattt gtggtgattcaactgaatgcagcaatcttttgttgcaatatggcagtt tttgtacacaattaaaccgtgctttaactggaatagctgttgaacaag acaaaaacacccaagaagtttttgcacaagtcaaacaaatttacaaaa	[分泌シグナル６７０１－６７９０ｂｐ] [ＤＮＡ結合ドメイン ６７９１－７０６６ｂｐ] [ＣＰＰ　７０６７－７１０２ｂｐ] ＳｙｎＳターミネーター７１０３－７１４４ｂｐ Ｂｉｆ複製起点７１５１－８９７８ｂｐ

【表１－１４】

	caccaccaattaaagattttggtggtttttaatttttcacaaatattac cagatccatcaaaaccaagcaagaggtcatttattgaagatctacttt tcaacaaagtgacacttgcagatgctggcttcatcaaacaatatggtg attgccttggtgatattgctgctagagacctcatttgtgcacaaaagt ttaacggccttactgttttgccacctttgctcacagatgaaatgattg ctcaatacacttctgcactgttagcgggtacaatcacttctggttgga cctttggtgcaggtgctgcattacaaataccatttgctatgcaaatgg cttataggtttaatggtattggagttacacagaatgttctctatgaga accaaaaattgattgccaaccaatttaatagtgctattggcaaaattc aagactcactttcttccacagcaagtgcacttggaaaacttcaagatg tggtcaaccaaaatgcacaagctttaaacacgcttgttaaacaactta gctccaattttggtgcaatttcaagtgttttaaatgatatccttttcac gtcttgacaaagttgaggctgaagtgcaaattgataggttgatcacag gcagacttcaaagtttgcagacatatgtgactcaacaattaattagag ctgcagaaatcagagcttctgctaatcttgctgctactaaaatgtcag agtgtgtacttggacaatcaaaaagagttgatttttgtggaaagggct atcatcttatgtccttccctcagtcagcacctcatggtgtagtcttct tgcatgtgacttatgtccctgcacaagaaaagaacttcacaactgctc ctgccatttgtcatgatggaaaagcacactttcctcgtgaaggtgtct ttgtttcaaatggcacacactggtttgtaacacaaaggaatttttatg aaccacaaatcattactacagacaacacatttgtgtctggtaactgtg atgttgtaataggaattgtcaacaacacagtttatgatcctttgcaac ctgaattagactcattcaaggaggagttagataaatattttaagaatc atacatcaccagatgttgatttaggtgacatctctggcattaatgctt cagttgtaaacattcaaaaagaaattgaccgcctcaatgaggttgcca agaatttaaatgaatctctcatcgatctccaagaacttggaaagtatg agcagtatataaaatggccatggtacatttggctaggttttatagctg gcttgattgccatagtaatggtgacaattatgctttgctgtatgacca gttgctgtagttgtctcaagggctgttgttcttgtggatcctgctgca aatttgatgaagacgactctgagccagtgctcaaaggagtcaaattac attacacataatcgatccctaccggttagtaatgagtttaaacggggg aggctaactgaaacacggaaggagacaataccggaaggaacccgcgct atgacggcaataaaaagacagaataaaacgcacgggtgttgggtcgtt tgttcataaacgcggggttcggtcccagggctggcactctgtcgatac cccaccgagaccccattggggccaatacgcccgcgtttcttcctttc cccaccccacccccaagttcgggtgaaggcccagggctcgcagccaa cgtcggggcggcaggccctgccatagcttttggggcggctttttctcg agtccttcctttaaggacgtgctcgtcaatttttgttttgagagtcatc tattcggatgctttttcatgaagtttttttatgaccctgaccggcaccct gcgcaaggccttcgccaccaccctggccgccgccatgctgatcggcac cctggccggctgctcctccgccgcatacaacaagtctgacctcgtttc gaagatcgcccagaagtccaacctgaccaaggctcaggccgaggctgc tgttaacgccttccaggatgtgttcgtcgaggctatgaagtccggcga aggcctgaagctcaccggcctgttctccgctgagcgcgtcaagcgccc ggctcgcaccggccgcaacccgcgcactggcgagcagattgacattcc ggcttcctacggcgttcgtatctccgctggctccctgctgaagaaggc cgtcaccgagtatggacggaagaagcgcaggcagcgacggcgatgagg gtttgcgcttgcgtcgtggagggagcggaacgccgaaaaaggatccac gcgctggagatgttcaacgagtagatcgccacggcgacctccttccac gcgtgcgggcacggggattctcaaggggccggcccgaggccccttgag cccgccgggaggcgcccccggcagggcgggaatccaaagggcggagcc ctgtggccctccccgggcaggggcgggatcgtcaagggcggagccctt ggcccccctcgggagagcgcactgacacaatgctacctccggtagcatt aagtgcgccctccgccatgcggagggacgggccgcgaccggatatgcg gggaacgtccacgacgcgtcttccgtgtcctccgtcctgccttgtgcc gtcgattataatcctcggataacggacgatgattgaaccgattggagg aaacgagatgccgaagagtttcgcgcagcagatcgaggacgacgagaa caagatcaagcgcatccgggagcaccagcgcatggtcagggccaaaca agccaaacaggagcgcaacgcccgcaccaaaaggctcgtggagaccgg agcgatagtggaaaaagcgcacggcggcgcgtacgacgacgaaggacg gcagacgttctcggatggtctgaacggcatcatctcggtctacgaccc gtcccgcggcggcaacgtggacatgagagtcatcgacgtaatcgaccg gcgcatccccagattgccaaggtccgaaaccacaacaggcacggcagc ggcggcatcgcgaaccgtgcaagccaccgcaccacagccagcccacgc ccaaccgcaaagcttcacgcccaaccccagcgcatcgaacaccggac aggagcacagcagccggatcggtgggcctagccgggacggcgcagccc tcgctccgctgggctgaaatatctgacttggttcgtaacatatttccg acatgtcggaaatatgtcgtatcatcgttgctatgagtactgaacttc gtgagcagtgggagcagctttacctgccgctgcgcccgctgtgcacga acgacttcatcgagggcgtgtaccggcagcccagggcgaaggcgctgg agggctaccggtacatcgaggcgaaccccaagaccgtcagcgacctgc tcgtggtcgacatcgacgacgcgaacgcccgcgcgatggccctatggg agcatgaggggatgctgcccaacgtgatcgtggagaacccgagaaacg gccacgcgcacgccgtgtgggcgctggccgccccgttcagtcgcaccg aatacgcgcggcgcaagccgctcgccctggccgcggcggtcacggagg ggctgcgccgctcgtgcgacggggacaagggatattcggggctgatga ccaagaacccgctgcacgaggcgtggaacagcgaactggtcaccgatc acctgtacgggctggacgaactgcgcgaggcgctggaggagtccgggg acatgccgccggcctcgtggaagcgcacgaaacggcgcaacgtggtcg gattgggccgcaactgccatctgttcgagacggcgcgcacatgggcgt acagggaggtgcgccaccactggggagacagcgaggggctgcggctgg ccatctcggccgaggcgcacgaaatgaacgccgaactgttccccgagc cactggcatggtcggaggtcgagcagatcgccaagagcatccacaagt ggatcgtcacccaaagccgcatgtggcgcgacggccccaccgtctacg aggcgacattcatcaccgtccaaagcgcccgagggaaaaagtcaggca aggccagacgagaaacattcgaactattcgcgagcgaggagatgacgt aa	

【表１－１５】

50	RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYS VLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQ TGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLK PFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRV VVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF	ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（野生型） スパイク受容体結合ドメイン
51	NSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVE GFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPY	ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（野生型） スパイク受容体結合モチーフ
52	SQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFS NVTWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGT TLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESE FRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIY SKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLLALHRSYLTPG DSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETK CTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFA SVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVY ADSFVIRGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSK VGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPL QSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVN FNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDIT PCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVY STGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRA RSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMT KTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQE VFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTL ADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSA LLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIA NQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGA ISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRA SANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYV PAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIIT TDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDV DLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKW PWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDD SEPVLKGVKLHYT	シグナルペプチド／分泌シグナルを有しない ＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２（野生型） スパイクタンパク質
53	MFVFLVLLPLVSSQCVNFTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVL HSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFANPVLPFNDGVYFASTE KSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVY YHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREF VFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRGLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQT LHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDC ALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFG EVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKL NDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGCVIA WNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGV KGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKST NLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDP QTLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHAD QLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQ TQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGVENSVAYSNNSIAIPTNFTISVT TEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIA VEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIE DLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTD EMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNV LYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLV KQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQ LIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHG VVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQR NFYEPQIITTDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKY FKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQEL GKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCG SCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT	ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２(変異体Ｂ．１．３５１) スパイクタンパク質 シグナルペプチド／ 分泌シグナル１－１２ａａ Ｓ１ドメイン１３－６８２ａａ （Ｒ６８２－Ｓ６８３の切断部位） Ｓ２ドメイン６８３－１２７０ａａ （Ｒ８１２－Ｓ８１３の切断部位） Ｓ２’ドメイン８１３－１２７０ａａ 受容体結合ドメイン３１６－５３８ａａ 受容体結合モチーフ４３４－５０５ａａ 膜貫通ドメイン１２１１－１２３１ａａ 細胞質ドメイン１２４２－１２７０ａａ

【表１－１６】

54	RVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYS VLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRQIAPGQ TGNIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLK PFERDISTEIYQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRV VVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNF	ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク （変異体Ｂ．１．３５１） 受容体結合ドメイン
55	SNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVKG FNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPY	ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク （変異体Ｂ．１．３５１） 受容体結合モチーフ
56	SQCVNFTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFS NVTWFHAIHVSGTNGTKRFANPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGT TLDSKTQSLLIVNNATNVVIKVCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESE FRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIY SKHTPINLVRGLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLHRSYLTPGDSS SGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTL KSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVY AWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADS FVIRGDEVRQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGG NYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQSY GFQPTYGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNF NGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCS FGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTG SNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSV ASQSIIAYTMSLGVENSVAYSNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTS VDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFA QVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADA GFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLA GTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQF NSAIGKIQDSLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISS VLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASAN LAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQ EKNFTTAPAICHDGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITTDN TFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLG DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWY IWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEP VLKGVKLHYT	シグナルペプチド／分泌シグナル を有しないＳＡＲＳ－Ｃｏｖ－２ （変異体Ｂ．１．３５１） スパイクタンパク質

【０１１４】

次に、本発明を以下の例によってさらに説明する。

【０１１５】

ＩＶ．例

【０１１６】

「ｂａｃＴＲＬ」という用語は、一般に、細菌におけるトランスポーターポリペプチドの発現および真核生物細胞におけるペイロードの発現をコードするプラスミド（本明細書に開示される）を含む細菌宿主細胞を指す。

【０１１７】

例１．経口投与、結腸上皮細胞へのルシフェラーゼ遺伝子の送達および血流へのルシフェラーゼの分泌

【０１１８】

この例は、Ｇａｕｓｓｉａルシフェラーゼ（ＧＬｕｃ）遺伝子をコードするプラスミドを哺乳動物細胞に送達するように設計された細菌であるｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃが結腸（大腸）に定着し、大腸の細胞によってペイロード／レポータータンパク質としてのＧＬｕｃを結腸を介して血液中に分泌させることを確認する。ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃ細菌は、公知の形質転換プロトコル（例えば、ＰＣＴ公開番号ＷＯ／２０１５／１２０５４１およびＷＯ／２０１５／１２０５４２を参照のこと）を使用して、プラスミドｐＦＲＧ３．５－ＣＭＶ－ＧＬｕｃ（配列番号４３；表１を参照）でビフィドバクテリウム・ロンガム亜種ロンガム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｏｎｇｕｍ ｓｕｂｓｐ．ｌｏｎｇｕｍ）を形質転換することによって調製した。８匹のマウス（雌Ｃ５７ＢＬ／６）に、ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃ（10^9ＣＦＵの２００μＬ総量を強制経口投与；ｐＨ７．４のＰＢＳ＋１０％ｗ／ｖのスクロース中に配合）を１２日間１日１回投与した。ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃの試料を、強制経口投与の直前に室温で５～６分間凍結から解凍した。４匹の対照マウス（雌Ｃ５７ＢＬ／６）に生理食塩水を１日１回１２日間投与した。すべての動物

に、ＩＰ経路で５００μＬの４０％ラクツロースを毎日投与した。
【０１１９】
１．１　全身ＧＬｕｃレベル
【０１２０】
循環ＧＬｕｃレベルを評価するために、３、６、９および１２日目（　殺日）に各マウスから５０μＬの血液を得て、１０μＬの２０ｍＭ　ＥＤＴＡに添加した（５：１比率）。ＧＬｕｃは、市販のキット「Ｐｉｅｒｃｅ　Ｇａｕｓｓｉａ　Ｌｕｉｃｅｒａｓｅ　Ｇｌｏｗ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔ（＃１６１６０、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用して測定した。Ｗｕｒｄｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　５（２）：１７１－１７３も参照されたい。例えば：５０μＬの血液または血清を１２５μＬの作業溶液（ＧＬｕｃアッセイ緩衝液＋セレンテラジン）に添加し、光子計数を４８５ｎｍで１０秒間取得した。１秒当たりの総相対発光量単位（ＲＬＵ）を記録した。ＧＬｕｃの全身送達は、ＲＬＵ（ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃ処置）－ＲＬＵ（ベースラインまたは生理食塩水対照）と推定された。ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃで経口処置したすべてのマウスの血液中における（ＧＬｕｃの存在に由来する）蛍光シグナルの増加が、試験のすべての時点において検出されたことを示す結果を図１にグラフで示す。さらに、より後の時点で統計学的に有意な増加が観察され、安定したＧＩコロニー形成ならびに安定した遺伝子送達、分泌および全身的有用性が示された。
【０１２１】
１．２　結腸のインビボｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃコロニー形成
【０１２２】
すべてのマウスを１２日間の最後に　殺した。
【０１２３】
２つの生理食塩水結腸および４つのｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃ結腸を、内腔構成要素を傷つけずに回収し、液体窒素中で急速凍結した。次いで、結腸を均質化し、現存のｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃコロニー形成についてアッセイした。簡潔には、全結腸ホモジネートをＱｉａｇｅｎ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｌｙｓｅｒを用いて処理し、３７℃で２～３日間嫌気的にインキュベートし、２５０ｕＬスペクチノマイシンを補充したＲＣＡプレートで平板培養して形質転換ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃ増殖を選択した。形成されたコロニーを定量し、結腸組織１グラム当たりの総ＣＦＵを決定した。各生物学的複製は、試料体積および入手可能性に基づいて３つの技術的複製を有する。１ｍＬ当たりの最終的なＣＦＵおよび結腸組織１ｇ当たりのＣＦＵを表２（下記）に報告し、ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃコロニー形成生存可能数が、使用した組織１ｇ当たりの総ＣＦＵ、９．４×10^2という低いコロニー形成数を示したＭ５を除いて、すべての組織ホモジネートについて１ｇ当たり１．２～４．８×10^5ＣＦＵで得られたことを示す。図２に示すように、Ｍ５（Ａ）、Ｍ６（Ｂ）、Ｍ７（Ｃ）およびＭ８（Ｄ）ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃ処置結腸からのコロニーをグラム染色すると、細菌がＢ．ロンガム細胞形態の特徴を示していることが確認された（グラム陽性の紫色に着色、桿状細菌、短く連鎖、分岐、および短枝、場合により散乱）。
【０１２４】

【表２】

表２：結腸における選択的ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃコロニー形成を測定するための、ＧＩ試験のエンドポイント試料からの全結腸組織１ｇ当たりのＣＦＵを使用したＣＦＵ分析の概要。

対象試験マウスの呼称 （全結腸組織ホモジネート）	細胞数 （ＧＩ組織１ｇ当たりのＣＦＵ）
ｂａｃＴＬＲ－ＧＬｕｃ（Ｍ５）	９．４×１０^{2}ＣＦＵ／ｇ
ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃ（Ｍ６）	４．８×１０^{5}ＣＦＵ／ｇ
ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃ（Ｍ７）	１．２×１０^{5}ＣＦＵ／ｇ
ｂａｃＴＲＬ　ＧＬｕｃ（Ｍ８）	２．９×１０^{5}ＣＦＵ／ｇ
生理食塩水（Ｍ１）	０ＣＦＵ／ｇ
生理食塩水（Ｍ２）	０ＣＦＵ／ｇ

【０１２５】

残りの２つの生理食塩水結腸（Ｍ３，Ｍ４）および４つのｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃ結腸（Ｍ９、Ｍ１０、Ｍ１１およびＭ１２）を、スイスロールベース配向の標準プロトコルに従い（Ｂｉａｌｋｏｗｓｋａ　ｅｔ　ａｌ．２０１６　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｖｉｓｕａｌｉｚｅｄ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ　Ｖｏｌ．１１３（ｅ５４１６１）：１－８を参照されたい）、ホルマリン固定およびパラフィン包埋（ＦＦＰＥ）し、組織学的ランドスケープ内でのｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃ局在化およびＧＬｕｃレポーター遺伝子発現について調べた。

【０１２６】

図３および図４は、Ｍ９　ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃ処置マウス由来の全結腸組織切片のＦＦＰＥの代表的なグラム染色を示す。捕捉および分析に使用されるＭｏｔｉｃＰｌｕｓ３．０ソフトウェアを備えたＭｏｔｉｃａｍ　Ｓ６カメラを備えたＭｏｔｉｃ　Ｐａｎｔｈｅｒａ三眼顕微鏡を使用して、可視化を行った。図３パネルＡ：タートラジン処理なしでまばらなＢ．ロンガム特有の染色形態を示した、結腸の近位領域（中央から後半の切片）。図３のパネルＢ、ＣおよびＤ：短く連鎖し、群となり、散乱し、分岐したグラム陽性桿菌（１０倍および１００倍対物レンズ）さらに、Ｂ．ロンガム特有の特徴的な細胞外多糖マトリックスも細菌細胞の周囲に観察された。図４のパネルＡ：結腸の中央領域の発端図４のパネルＢ、ＣおよびＤ：Ｂ．ロンガム特有の染色形態（１００倍対物レンズ）。グラム陽性桿菌は短く連鎖し、群となり、散乱し、分岐している。

【０１２７】

Ｍ３（生理食塩水）ならびにＭ１１およびＭ１２（ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃ）のＦＦＰＥ（スイスロール調製）結腸も、ＯＰＡＬ　ＩＨＣ　Ｋｉｔ（ＮＥＬ８１０００１ＫＴ、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用してＧＬｕｃ発現について免疫蛍光染色することによって調べた。スライドを脱パラフィンし、再水和した。ＡＲ６緩衝液中でのマイクロ波処理によって、抗原のアンマスキング（ｕｎｍａｓｋｉｎｇ）を行った。スライドを冷却し、室温で１０分間ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ抗体希釈剤で遮断した。スライドを、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ抗体希釈液（１／４００）中の抗ＧＬｕｃポリクローナル抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＰＡ１－１８１）で室温にて２時間精査した。組織をＴＢＳＴで洗浄し、次いで、室温で１０分間、Ｏｐａｌ　Ｐｏｌｙｍｅｒ　ＨＲＰ　Ｍｓ＋Ｒｂで再び精査し、続いて、Ｏｐａｌ　Ｆｌｕｏｒｏｐｈｏｒｅ作業溶液（１／１００　ＧＦＰ、５２０）とインキュベートした。組織をＤＡＰＩ（核）で対比染色し、ＶｅｃｔｏＳｈｉｅｌｄでマウントした。蛍光顕微鏡法を使用して結果を分析した。代表的な結果を図５Ａ（内側結腸部）、図５Ｂ（上部遠位部）および図５Ｃ（下部遠位）、２０倍拡大で示す。曝露時間は、緑色チャネルでは７００ｍｓ、ＤＡＰＩでは３０ｍｓであった。陰性対照（一次Ａｂなし）はシグナルを示さなかった（データは示さず）。

【０１２８】

要約すると、ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃは、生細菌の経口投与を介して宿主消化管内層にペイロード導入遺伝子を特異的に送達するように設計された。ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃで毎日処置したマウスから回収する血液の定期的な試料採取によって、処置を３日を超えて続行した場合の、安定性の増加および一貫したレポーター遺伝子発現および全身利用可能性が実証された。下部ＧＩ組織に特異的なｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃの強力なコロニー形成は、すべての経口処置マウスにおいて明らかであった。Ｇ．ルシフェラーゼ遺伝子送達および発現の明確なパターンが結腸のランドスケープ全体にわたって明らかであり、ＧＩ内層へのより多くの送達が大腸の遠位部分で観察された。組織全体にわたって非上皮細胞の潜在的染色も検出され、免疫細胞（例えばマクロファージ）もトランスフェクションされた可能性があることを示している。

【０１２９】

例２．多価（スパイク、マトリックス、およびヌクレオカプシド）遺伝子送達のためのＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２　ＤＮＡワクチン

【０１３０】

プラスミドｐＦＲＧ３．５－ＣＭＶ－ＣＯＶＩＤ１９－ＳｉＭｉＮ（配列番号４５；表１）は、プラスミドを哺乳動物細胞に輸送し、そこで配列中にＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）、マトリックス（Ｍ）およびヌクレオカプシド（Ｎ）遺伝子の野生型配列を、ＩＲＥＳ配列によって分離された単一プロモーターの制御下で発現するように設計された多価ｂａｃＴＲＬプラスミド構築物である。合成され、配列決定されると、多価ｂａｃＴＲＬプラスミド構築物は、適切な導入遺伝子発現および抗原局在化を確認するために、確立されたヒト細胞株にトランスフェクションされる。

【０１３１】

プラスミド構築物をＢ．ロンガムに形質転換する。形質転換された細菌を増殖させ、抗生物質選択寒天プレートで平板培養し、コロニー形成を発生させる。次いで、個々のコロニーを選択し、さらに増殖させ、様々な分子分析技術によって分析して、多価プラスミド構築物の存在および活性を確認する。その後、クローンを増殖させてマスターセルバンクを作成し、これを将来の製造活動のベースとして使用する。マスターセルバンクが確立されると、７５回用量の２００ｕＬのスクロース中10^9ｂａｃＴＲＬ細菌溶液からなる小規模な生産ランが生み出される。

【０１３２】

マウス試験を実施して、例えば、以下に試験ＡおよびＢについて考察するように、ｂａｃＴＲＬ（すなわち、ｐＦＲＧ３．５－ＣＭＶ－ＣＯＶＩＤ１９－ＳｉＭｉＮで形質転換された）が抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２免疫学的応答をもたらす能力を実証する。

（試験Ａ）合計１１匹の健康なＣ５７ＢＬ／６マウスを２つの実験群で使用する。処置群は、１４日間にわたって２日毎に10^9のｂａｃＴＲＬ－ＣＯＶＩＤ－１９細菌の強制経口投与を受ける８匹のマウスから構成される。陰性対照群は、同じスケジュールで対応する生理食塩水処置を受ける３匹のマウスで構成される。５日目から血液および糞便試料を採取し、その後５日毎に採取する。血液試料をＥＬＩＳＡ血清学的分析に供して、標的Ｓ、ＭおよびＮ抗原に対する中和抗体の生成の存在および動態を確認する。糞便試料は、抗原特異的ＩｇＡ分泌について同様の分析を受けるであろう。４０日目にマウスのサブセットを　　殺し、それらの結腸組織を切除し、結腸の近位端および遠位端を一緒に丸めて、大腸の路に沿って単一の組織切片が分子情報を提供することを可能にする、組織学的「スイスロール」技術に従って調製する。切片化した組織を次いで分子分析に供して、ｂａｃＴＲＬ－ＣＯＶＩＤ－１９細菌の濃度および位置を定量化し、同様にＳ、ＭおよびＮ抗原発現の程度および位置を定量化する。その後、残りのマウスに組換えＳ、ＭおよびＮタンパク質を静脈内投与し、抗体力価を監視して「チャレンジ」免疫学的応答を確認する。残りのマウスを　　殺し、同様の方法で処理する。

（試験Ｂ）代わりに、合計で最大９６匹の健康なＣ５７ＢＬ／６マウスを１２の実験群で使用する。各処置群は、毎日10^9のｂａｃＴＲＬ細菌の強制経口投与を１日、３日または７日間のいずれかにわたって受ける８匹のマウスで構成される。これらの用量レジメ

ンは、プライミングワクチン接種用量を構成するであろう。さらなる投与の前にプライミング投与に対する免疫学的応答を考慮する期間は、最初の投与の１４～２８日後である。次いで、各用量レジメンからの一組の治療群に、最初の投与の１４日後、最初の投与の２１日後、または最初の投与の２８日後のいずれかから開始して、１日、３日間、または７日間のいずれかにわたって毎日10^9のｂａｃＴＲＬ細菌の毎日強制経口投与の第２の相同スケジュールを投与する。この第２の用量は、ブーストワクチン接種用量を構成する。試験のエンドポイントの前にブースト投与に対する免疫学的応答を考慮する期間は、最初の投与の４２～５６日後である。陰性対照群は、同じスケジュールで対応する生理食塩水処置またはｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃを受ける８匹のマウスで構成される。７日目から血液および糞便試料を採取し、その後７日毎に採取する。血液試料をＥＬＩＳＡベースの血清学的分析に供して、標的Ｓ、ＭおよびＮ抗原を特異的に標的とすることができる抗体の生成の存在および動態を確認する。これらの血清のさらなる評価を行って、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２特異的抗体を含有するこれらの試料が中和しているかどうか、すなわち宿主細胞へのウイルス侵入の阻害の程度を判定する。糞便試料は、分泌された抗原特異的ＩｇＡの存在、すなわち腸上皮によって発現されるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２抗原に対する局所粘膜応答の程度について同様の分析を受ける。ブースト投与の日に、マウスのサブセットをブースト前に　殺し、それらの結腸組織を切除し、結腸の近位端および遠位端を一緒に丸めて、大腸の路に沿って単一の組織切片が分子情報を提供することを可能にする、組織学的「スイスロール」技術に従って調製する。試験の終わりに、残りのマウスを　殺し、それらの結腸組織を切除し、結腸の近位端および遠位端を一緒に丸めて、大腸の路に沿って単一の組織切片が分子情報を提供することを可能にする、組織学的「スイスロール」技術に従って調製する。切片化した組織を次いで分子分析に供して、ｂａｃＴＲＬ細菌の濃度および位置を定量化し、同様にＳ、ＭおよびＮ抗原発現の程度および位置を定量化する。

【０１３３】

第Ｉ相試験を実施して、ＣＯＶＩＤ－１９感染の有意なリスクがある健康なボランティアにおいて、ｂａｃＴＲＬワクチン接種の安全性、免疫原性および保護能力を実証する。各ｂａｃＴＲＬカプセルは、10^9の凍結乾燥細菌を含む。対象のコホートは、1×10^9、3×10^9、または1×10^{10}のいずれかからの範囲に及ぶ総ｂａｃＴＲＬ用量を含む、１～１０カプセルを経口投与される。適切なプラセボ対照を各コホートに含める。対象は、細菌コロニーの確立および維持を支援し得る栄養ガイドラインに基づいて助言される。対象およびその医療提供者は、２つの重要な禁忌、すなわちｂａｃＴＲＬコロニーを完全に排除する抗生物質治療およびｂａｃＴＲＬコロニーに取って代わる可能性がある追加のプロバイオティクス補助食品について助言される。ビフィズス菌を根絶するためのアモキシシリンまたはエリスロマイシンの経口投与は、臨床上意味のある毒性の事象において投与される。

【０１３４】

血液試料は、ＩｇＧ抗体、ならびにＳ、ＭおよびＮ抗原に特異的な$CD4^+$および$CD8^+$Ｔ細胞リンパ球の中和について定期的に分析される。糞便試料を分析して、コロニー形成中の細菌の存在、およびＳ、Ｍ、およびＮ抗原に特異的な中和ＩｇＡ抗体の存在を確認する。対象と、適切に階層化され、マッチさせた対照とをワクチン接種後１２ヶ月間追跡して、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染の発生率を特徴付ける。

【０１３５】

ｂａｃＴＲＬワクチンの経口投与ならびにその後のヒト細胞への結腸コロニー形成およびＤＮＡ送達の際に、細菌ベクター中に存在する病原体関連抗原は免疫応答を誘発し、腸内の常在マクロファージおよび樹状細胞を活性化する。宿主細胞によるＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質の過剰発現と組み合わせて、特異的ウイルスタンパク質および断片は、次いで活性化マクロファージおよび樹状細胞によって取り込まれ、次いで腸間膜リンパ節に移動し、そこで同族Ｔ細胞がその後活性化する。活性化Ｔ細胞は、同族Ｂ細胞の活性化を開始し、ＩｇＧおよびＩｇＡを生成するためのＢ細胞クラススイッチ、高親和性Ｂ細胞クローン用に選択するための胚中心における体細胞超変異、ならびにメモリーＢ細胞および

形質細胞への分化を促進する。免疫化に対する応答の消散後、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２タンパク質に特異的なメモリーＴ細胞およびメモリーＢ細胞は循環中に存続する。上記の例は、ｂａｃＴＲＬ構築物の安全性および有効性を実証するであろう。

【０１３６】

例３：ｂａｃＴＲＬ－スパイク

【０１３７】

この例は、マウス結腸上皮および粘膜においてウイルスのスパイクタンパク質の、強力であるが一過性の発現を引き起こす、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２感染に対する経口投与可能なワクチンの様々な前臨床試験を記載する。この例は、スパイクタンパク質が防御免疫の生成に適した立体配座で発現されることを確認する。この例は、体液性全身免疫の急速な発達を実証し、ＩｇＧのセロコンバージョンは免疫後１４日で明らかであり、レベルはプライミング投与後少なくとも４０日まで持続する。中和抗体の発生が観察され、２１日目および４０日目の血清試料は、ヒトＡＣＥ２受容体へのスパイクの結合を阻害する競合能力を維持していた。腸上皮およびその下の粘膜への抗原遺伝子送達を標的とするこのワクチンの経口投与も防御粘膜免疫を誘発し、ワクチン接種後２１日の排泄された糞便試料中で抗スパイクＩｇＡ力価が検出可能である。

【０１３８】

ｂａｃＴＲＬ－スパイク構築物

【０１３９】

プラスミドｐＦＲＧ－ＣＭＶ－Ｓ遺伝子（配列番号４９；表１）は、哺乳動物細胞においてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイク（Ｓ）遺伝子の全長野生型配列を構成的に送達かつ発現するように設計された、一価ｂａｃＴＲＬプラスミド構築物である。全長スパイクタンパク質配列は哺乳動物細胞膜に自然に移行するので、このペイロードタンパク質は、細胞内膜に結合したエンドソーム区画内および細胞表面上で検出することができ、そこでＳ１＋Ｓ２外部ドメインはトランスフェクションされた細胞の表面に提示される。ペイロードはまた、スパイク膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを含むので、トランスフェクションされた細胞の表面上に生来の三量体構造を形成するはずである。プラスミドを合成し、公知の形質転換プロトコルを使用してビフィドバクテリウム・ロンガム亜種ロンガム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｌｏｎｇｕｍ　ｓｕｂｓｐ．ｌｏｎｇｕｍ）に形質転換した（例えば、ＰＣＴ公開番号ＷＯ／２０１５／１２０５４１およびＷＯ／２０１５／１２０５４２を参照のこと）。形質転換された細菌は、本明細書では「ｂａｃＴＲＬ－スパイク」と呼ばれる。

【０１４０】

グラム染色を用いたマウス結腸組織切片の組織学的検査。

【０１４１】

マウス（Ｃ５７ＢＬ／６）に、１日用量5×10^{8}ＣＦＵのｂａｃＴＲＬ－スパイクを３回連続して経口投与した。マウスを４日目に回収し、組織学的検査のために準備した。内側結腸領域を標準的なグラム染色に供し、次いで、ビフィドバクテリウム・ロンガム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｌｏｎｇｕｍ）の存在について顕微鏡で分析した。結果を図６に示し、染色によって、腸上皮内層に近位かつ結合した位置に、特徴的なＢ．ロンガム特有の形態の散在したクラスターが明らかになった。図６パネルＡは、矢印がＢ．ロンガムのクラスターを示す、４倍対物レンズ拡大を示す。図６パネルＢは、パネルＡに示すＢ．ロンガムクラスターの４０倍対物レンズ拡大を示す。図６パネルＣは、パネルＡに示すＢ．ロンガムクラスターの１００倍対物レンズ拡大を示す。視覚的識別のための重要な形態学的パラメータには、短い連鎖の、散乱／クラスター化した群中で分岐を有するグラム陽性桿菌が含まれた。捕捉および分析に使用されるＭｏｔｉｃＰｌｕｓ　３．０ソフトウェアを備えたＭｏｔｉｃａｍ　Ｓ６カメラを備えたＭｏｔｉｃ　Ｐａｎｔｈｅｒａ三眼顕微鏡を使用して、可視化を行った。したがって、図６は、ｂａｃＴＲＬ－スパイクの経口投与が、大腸内腔にＢ．ロンガムのニッチ環境を見つけて大腸内腔の強固なコロニー形成を確立するまで、上部胃腸経路を横断することを確認する。

【０１４２】
コロニー形成は、（１）経口投与の程度と相関し、コロニー形成単位（ＣＦＵ）は用量の増加と共に増加し、（２）投与を中止すると急速に減退することが観察され、最後の投与後約３～５日でのクリアランスを実証している。
【０１４３】
ｂａｃＴＲＬ－スパイクで経口処置したマウスの組織学的結腸切片におけるスパイクタンパク質発現について免疫蛍光染色する。
【０１４４】
Ｃ５７ＢＬ／６マウスに、（ｉ）生理食塩水または（ｉｉ）５×１０^{8}ＣＦＵのｂａｃＴＲＬ－スパイクの１日用量を３回連続して経口投与した。処置マウスから採取した結腸をホルマリンで固定し、標準的な技術を用いて切断した。組織切片を、抗ウサギ抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２（２０１９－ｎＣｏＶ）ｐＡｂ（Ｓｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ ４０１５０－Ｒ ００７；２０１９－ＳＡＲＳ－Ｃｏ－Ｖ－２スパイクと交差反応するヒトＳＡＲＳコロナウイルスのポリクローナル抗体）を使用する免疫蛍光検出のための標準的な方法に従って処理した。組織を室温で１０分間、Ｏｐａｌ Ｐｏｌｙｍｅｒ ＨＲＰ Ｍｓ＋Ｒｂで精査し、続いて、Ｏｐａｌ Ｆｌｕｏｒｏｐｈｏｒｅ作業溶液（１／１００ ＧＦＰ、５２０）とインキュベートした。組織をＤＡＰＩで対比染色し（核；青色）、蛍光顕微鏡検査に供してスパイクタンパク質の発現および局在化（緑色）を分析した。図７に示すように、生理食塩水処置マウスの結腸切片ではスパイク発現は観察されなかったが、ｂａｃＴＲＬ－Ｓｐｉｋｅ処置マウスの結腸切片では陽性スパイク発現が観察された。
【０１４５】
ｂａｃＴＲＬ－スパイクコロニー形成およびスパイク遺伝子発現の両方の生体内分布を、様々な非結腸組織（肺および気管、尾側食道、胃、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、脳）について評価した。これらの組織の組織学的検査によって、意図された結腸上皮以外では、ｂａｃＴＲＬ－スパイクコロニー形成、スパイク遺伝子発現のいずれの証拠もないことが明らかになった。小腸（十二指腸、空腸および回腸）に由来する組織もまた、腸上皮内層においていかなる陽性シグナルも示さなかった。
【０１４６】
市販のスパイクタンパク質に反応性のｂａｃＴＲＬ－スパイク処置マウスの血清および糞便中の抗体。
【０１４７】
経口投与後のＣ５７ＢＬ／６マウスにおいてｂａｃＴＲＬ－スパイクの免疫原性を評価した。６～８週齢の雄および雌に、生存可能ｂａｃＴＲＬ－スパイクを５×１０^{8}ＣＦＵ／投与の１日用量で、７日間連続して強制経口投与によって投与した。擬ワクチン接種（対照）を、ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃ（例１参照）または標準的な生理食塩水と同様の経口処置を用いて行った。
【０１４８】
ｂａｃＴＲＬ－スパイク処置マウスおよび対照マウスから１４、２１および４０日目に血清を採取して、ｂａｃＴＲＬ－スパイクの免疫原性が媒介した大腸内層へのスパイク遺伝子送達を評価した。ｂａｃＴＲＬ－スパイクで免疫したマウスからの血清の免疫反応性を、Ｓ１＋Ｓ２外部ドメインを構成する市販の三量体化安定化組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質構築物（製品番号４６３２８、ＬａｋｅＰｈａｒｍａ、ＣＡ、米国）に対してＥＬＩＳＡを使用して測定した。図８パネルＡは、ｂａｃＴＲＬ－スパイク処置マウス（１４、２１および４０日目）、ｂａｃＴＲＬ－スパイク擬処置マウス（１５日目）、および生理食塩水処置マウス（２１日目）から採取した連続滴定血清試料における、組換え三量体スパイク外部ドメイン（Ｓ１＋Ｓ２）に対する抗スパイク免疫反応性の平均（±ＳＥ）％を示す。市販のスパイク外部ドメイン（Ｓ１＋Ｓ２）に対して段階希釈した市販の抗ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクＳ１抗体（ウサギモノクローナル、Ｓｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃａｔ番号４０１５０－Ｒ００７）の抗スパイク結合活性の平均（±ＳＥ）％を確立して、読み出しを適格とした。分析された血清試料のＥＬＩＳＡ測定

値は、５ｎｇのスパイク外部ドメイン（Ｓ１＋Ｓ２）に対する抗スパイクＳ１　ｍＡｂ（１／１０希釈）の最大活性の％として計算される抗スパイク活性％として報告される。図８パネルＢは、ｂａｃＴＲＬ－スパイク処置マウスから１４、２１および４０日目に採取した血清における、市販のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２外部ドメイン（Ｓ１＋Ｓ２）に対する血清抗体結合力価を示す。血清中の抗スパイク免疫反応性についてのＥＬＩＳＡ力価を、最大半量の結合活性が観察された希釈度（％ＥＣ$_{50}$）で測定し、この値（％ＥＣ$_{50}$での希釈係数）での逆希釈として報告する。Ｐ値は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（ｖ８．４．２）を用いて、対応のないｔ検定によって導出した。

【０１４９】

図８は、ｂａｃＴＲＬ－スパイク免疫マウスにおけるスパイク反応性の発生を実証する。抗スパイク抗体のセロコンバージョンは、経口免疫化後、早くも１４日で検出され、スパイク（Ｓ１＋Ｓ２）抗原に対する抗体力価は平均１３２．４であった。著しく増強された抗スパイク免疫反応性が、免疫化の２１日後に収集された試料において認められ、ピーク抗体力価は平均して８１１．４２であった。抗スパイク免疫反応性は、４０日目の試験終了時に収集された血清試料で持続し、平均力価は４２５．７であった（図８パネルＢ）。検出可能なスパイク（Ｓ１＋Ｓ２）抗原結合は、経口ｂａｃＴＲＬ－ＧＬｕｃまたは経口生理食塩水で処置したいずれのマウスの血清でも検出されなかった。したがって、腸内層の細胞によって発現させた場合、ｂａｃＴＲＬ－スパイク由来の全長ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質は、抗原特異的な全身体液性応答を誘発することができ、プライミング免疫化レジメン後少なくとも４０日間持続する抗スパイク反応性を実証する。

【０１５０】

ｂａｃＴＲＬ－スパイク処置マウスおよび対照マウスから１４、２１および４０日目に糞便試料も採取して、ｂａｃＴＲＬ－スパイクの免疫原性が媒介した大腸内層へのスパイク遺伝子送達によって誘導される潜在的粘膜免疫を評価した。ｂａｃＴＲＬ－Ｓｐｉｋｅで免疫したマウスからの糞便抽出物のＩｇＡ特異的免疫反応性を、Ｓ１＋Ｓ２外部ドメインを構成する三量体化安定化組換えＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質構築物（製品番号４６３２８、ＬａｋｅＰｈａｒｍａ、ＣＡ、米国）に対して同じＥＬＩＳＡを使用して測定した。図９パネルＡは、ｂａｃＴＲＬ－スパイク処置マウスおよび生理食塩水マウス（免疫後２１日目）に由来する糞便抽出物の連続滴定を使用して、三量体スパイク外部ドメイン（Ｓ１＋Ｓ２）に対するＥＬＩＳＡによって測定された抗スパイクＩｇＡ結合活性の平均（±ＳＥ）％を示す。分析された糞便抽出物のＥＬＩＳＡ測定値は、５ｎｇのスパイク外部ドメイン（Ｓ１＋Ｓ２）に対する最大活性の％として計算される抗スパイク活性％として報告される。図９パネルＢは、ｂａｃＴＲＬ－スパイク処置マウスから２１日目に採取した抽出物における、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２外部ドメイン（Ｓ１＋Ｓ２）に対する糞便ＩｇＡ抗体結合力価を示す。糞便抽出物中の抗スパイク免疫反応性についてのＥＬＩＳＡ力価を、最大半量の結合活性が観察された希釈度（％ＥＣ$_{50}$）で測定し、この値（％ＥＣ$_{50}$での希釈係数）での逆希釈として報告する。Ｐ値を、二元配置ＡＮＯＶＡを使用して導出した。

【０１５１】

図９に示すように、スパイク（Ｓ１＋Ｓ２）外部ドメインに対するＩｇＡベースの免疫反応性は、ｂａｃＴＲＬ－スパイク処置マウスから採取した糞便試料で有意に上昇し（パネルＡ）、１６４．５の平均ＩｇＡ結合力価を実証した（パネルＢ）。生理食塩水で処置したマウスの糞便試料では、検出可能なスパイク結合ＩｇＡ活性は検出されなかった。これらの結果は、ｂａｃＴＲＬ－スパイクによって送達された腸上皮細胞におけるスパイク導入遺伝子の抗原発現が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２スパイクタンパク質に対して粘膜ＩｇＡ免疫を誘発することができる適切な立体配座のスパイクタンパク質複合体を提示していることを確認する。経口ワクチン送達は、腸組織内に粘膜免疫をもたらす。この局所粘膜免疫保護は、他の粘膜表面にも同様に広がることが知られている。

【０１５２】

中和抗スパイク抗体の生成

【０１５３】
経口投与されたｂａｃＴＲＬ－スパイクがスパイクを標的とする中和抗体を生成する能力を確認するために、市販のＥＬＩＳＡベースのアッセイを使用して、マウス血清試料をその同族ヒト受容体ＡＣＥ２へのスパイク結合の阻害についてスクリーニングした。スパイクタンパク質の受容体結合モチーフ（ＲＢＭ）のヒト宿主受容体ＡＣＥ２への会合を阻害することができる抗体の競合活性は、潜在的な中和機能の代替え的尺度として以前に確立されている。免疫後２１日目および４０日目にｂａｃＴＲＬ－スパイク処置マウスから精製した血清試料を、市販のＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２中和抗体ＥＬＩＳＡアッセイキット（Ｃｒｅａｔｉｖｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）を使用してスパイク－ＲＢＤ結合阻害について１：１０希釈で検査した。結果を図１０に示す。このキットは、可溶性ＨＲＰ抱合化スパイク－ＲＢＤ構築物（ＨＲＰ－ＲＢＤ）を分子標的として利用する。ブロッキングＥＬＩＳＡ検出ツールとして、未結合ＨＲＰ－ＲＢＤおよび中和抗体によって結合されたＨＲＰ－ＲＢＤをｈＡＣＥ２により捕捉し、比色ＨＲＰ基質反応性（ＯＤ$_{450}$）を用いて測定する。陰性および陽性対照試薬との反応はアッセイパラメータを確立して、アッセイが定義した陰性対照と比較した阻害率として示される阻害パーセントの適切な解釈のための読み出しのダイナミックレンジを決定する。キット中の陽性対照試薬は、これらのパラメータ内で８２．５％の最大阻害をもたらした（上の点線）。定義されたアッセイベースラインのカットオフは、２０％未満の阻害パーセントであると報告されている（下の点線）。対応のないｔ検定を用いてＰ値を導出した。

【０１５４】
図１０に示すように、ｂａｃＴＲＬ－スパイク誘導抗スパイク抗体は、ＡＣＥ２のスパイク－ＲＢＤドメインへの結合と効果的に競合し、平均阻害パーセントは、アッセイ陰性対照と比較して、２１日目の血清で４２．３％、４０日目の血清で４３．０％であった。対照的に、経口生理食塩水で処置したマウスから採取した血清は、ＡＣＥ２結合の阻害に対してごくわずかな競合活性を示し、測定値は、この市販のＥＬＩＳＡアッセイの確立されたカットオフに近かった。ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２細胞侵入に対する一次受容体として、ヒトＡＣＥ２との相互作用を遮断することができる抗体の生成は、一般に、宿主保護免疫の状況において重要であると認められている。

【０１５５】
本発明は、１つまたは複数の実施形態に関して説明されてきた。しかしながら、特許請求の範囲に定義される本発明の範囲から逸脱することなく、多くの変形および修正を行うことができることは当業者には明らかであろう。

【０１５６】
米国仮特許出願第６３／０７９，８４１号（２０２０年９月１７日出願）および第６２／９８１，４６４号（２０２０年２月２５日出願）の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

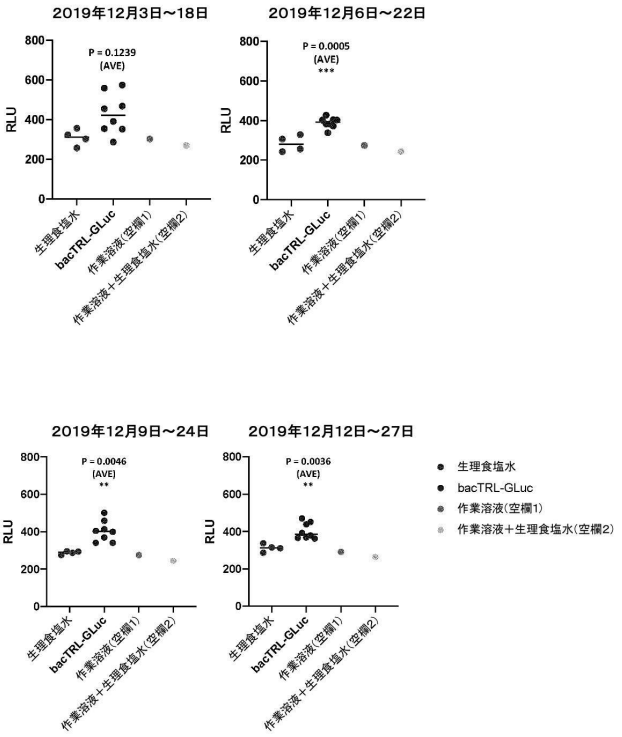
【配列表フリーテキスト】

【０１５７】
配列表２　＜２２３＞トランスポーターポリペプチドＨＴＰ
配列表３　＜２２３＞Ｍ－ＩＬ－１２
配列表８～９　＜２２３＞ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン
配列表１１　＜２２３＞ジンクフィンガーＤＮＡ結合ドメイン認識部位
配列表２３　＜２２３＞トランスポータン（Ｇａｌａｎｉｎ－ｍａｓｔｏｐａｒａｎ）ＣＰＰ
配列表２４　＜２２３＞Ｘはアルギニンまたリシンの可能性あり
配列表２６　＜２２３＞ＨＲＳＶ　ＣＰＰ
配列表２７　＜２２３＞ＡＩＰ６　ＣＰＰ
配列表２８　＜２２３＞ＡＲＦ（１－２２）　ＣＰＰ
配列表２９　＜２２３＞ｐＶＥＣ　ＣＰＰ
配列表３０　＜２２３＞ＭＡＰ１７　ＣＰＰ

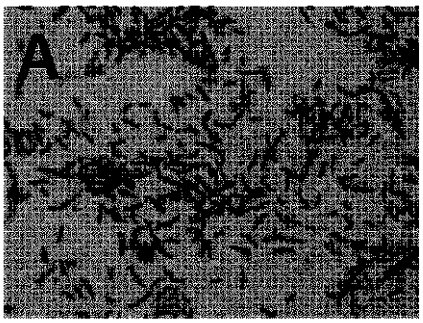
配列表３１　＜２２３＞ＶＴ５　ＣＰＰ
配列表３２　＜２２３＞Ｂａｃ７　ＣＰＰ
配列表３３　＜２２３＞（ＰＰＲ）ｎ　ＣＰＰ
配列表３５　＜２２３＞ＧＡＬＡ　ＣＰＰ
配列表３７　＜２２３＞Ｃ１０５Ｙ　ＣＰＰ
配列表３８　＜２２３＞ＰＦＶＹＬＩ　ＣＰＰ
配列表３９　＜２２３＞Ｐｅｐ－７　ＣＰＰ
配列表４０　＜２２３＞ＣＡＤＹ　ＣＰＰ
配列表４１　＜２２３＞ＭＡＰ　ＣＰＰ
配列表４２　＜２２３＞Ｒ６Ｗ３　ＣＰＰ
配列表４３　＜２２３＞ｐＦＲＧ３．５－ＣＭＶ－ＧＬｕｃ
配列表４４　＜２２３＞ｐＦＲＧ３．５－ＣＭＶ－Ｓ遺伝子
配列表４５　＜２２３＞ｐＦＲＧ３．５－ＣＭＶ－ＣＯＶＩＤ１９－ＳｉＭｉＮ
配列表４９　＜２２３＞ｐＦＲＧ－ＣＭＶ－Ｓ遺伝子のＤＮＡ配列

【図面】

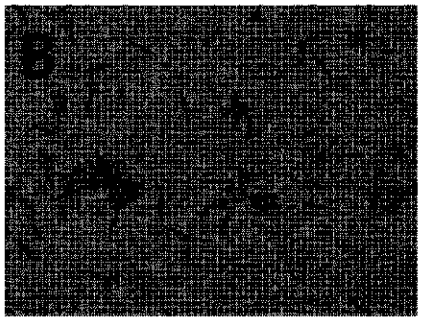
【図１】



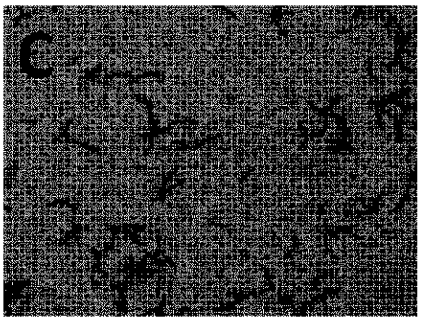
【図２Ａ】



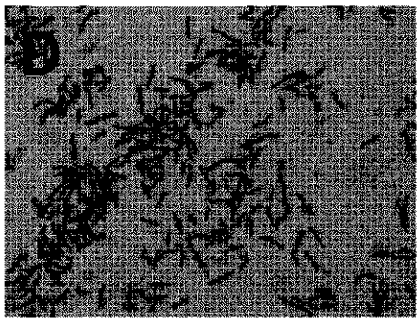
【図２Ｂ】



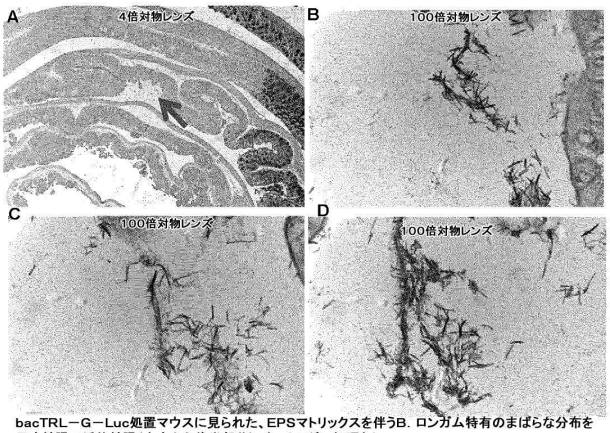
【図２Ｃ】



【図２Ｄ】

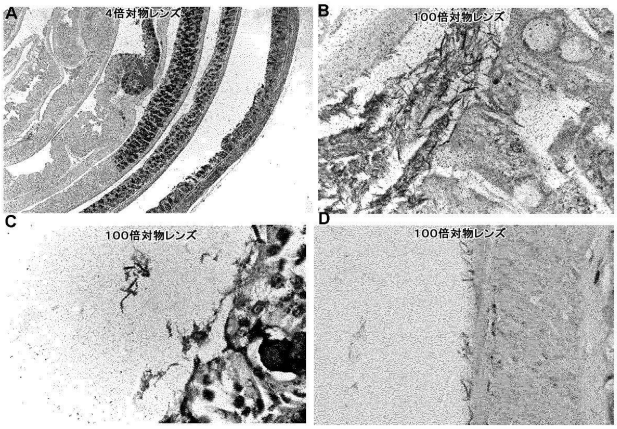


【図３】



bacTRL－G－Luc処置マウスに見られた、EPSマトリックスを伴うB. ロンガム特有のまばらな分布を示す結腸の近位結腸（中央から後半部分）。タートラジン処理なし。

【図４】



bbacTRL－G－Luc処置マウスにおける、まばらな／散乱したB．ロンガム特有の分布を示す結腸の中央領域の発端。タートラジン処理なし。

【図５Ａ】



Figure 5A

【図５Ｂ】

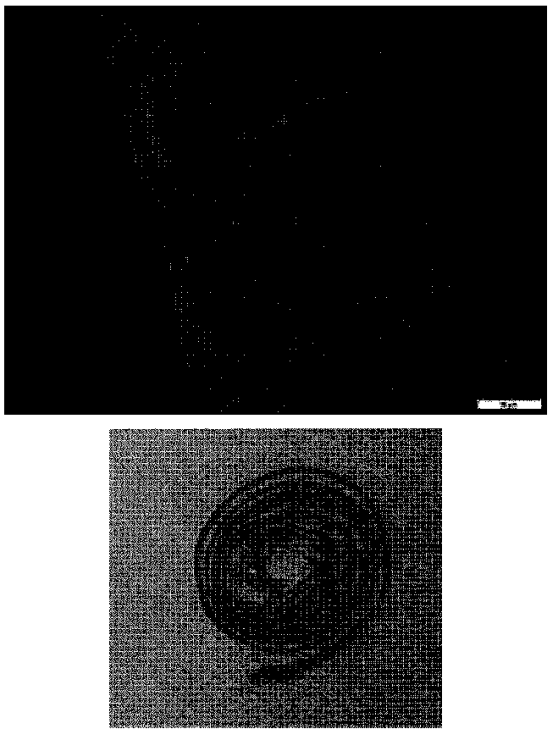


Figure 5B

【図５Ｃ】

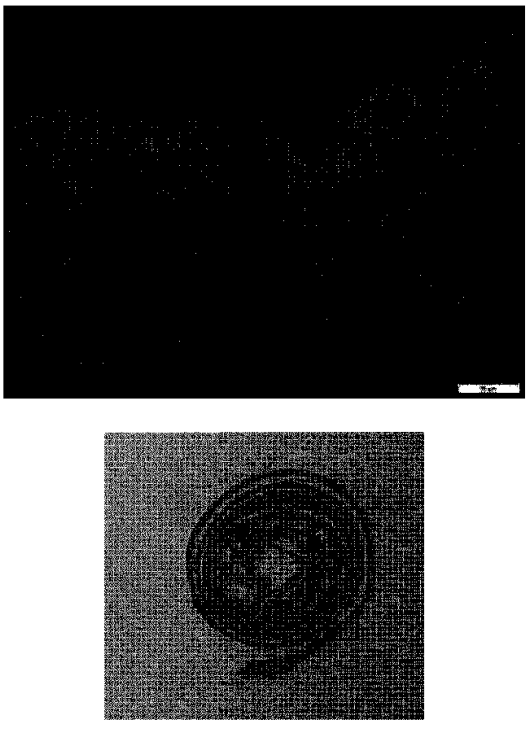
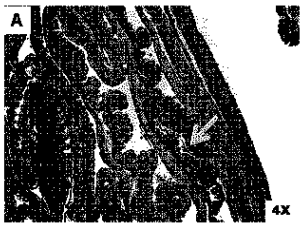


Figure 5C

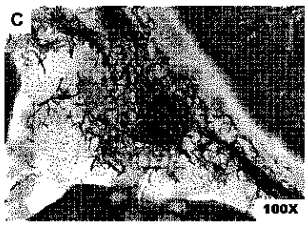
【図６Ａ】



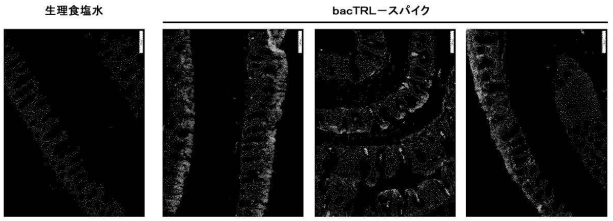
【図６Ｂ】



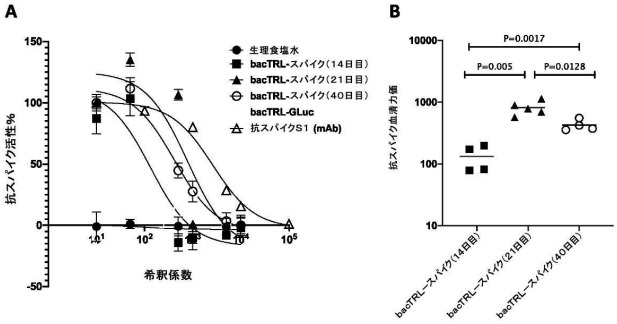
【図６Ｃ】



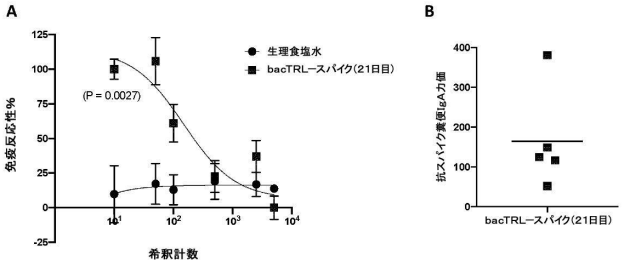
【図７】



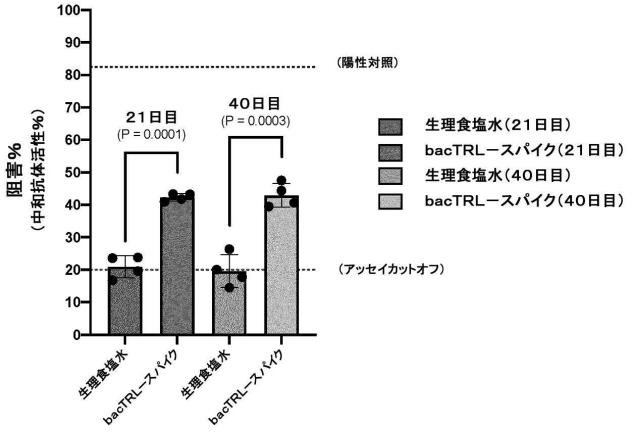
【図８】



【図９】



【図１０】



【配列表】

20235160100000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2021/050236

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: **A61K 47/62** (2017.01), ***A61K 35/74*** (2015.01), ***A61K 39/00*** (2006.01), ***A61P 37/04*** (2006.01), ***C12N 1/21*** (2006.01), ***C12N 15/63*** (2006.01) (more IPCs on the last page)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K 47/62 (2017.01), ***A61K 35/74*** (2015.01), ***A61K 39/00*** (2006.01), ***A61P 37/04*** (2006.01), ***C12N 1/21*** (2006.01), ***C12N 15/63*** (2006.01), ***C12N 15/74*** (2006.01), ***C12N 15/87*** (2006.01)

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

Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)
Databases: Canadian Patent Database, Questel Orbit, Scopus
Keywords : bifidobacterium, plasmid, colon, colonic, lamina propria, nucleic acid, payload, promoter, terminator, DNA vaccine, dna binding, cell penetrating, signal, hybrid protein

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, D	US 2015/0232862 A1 (Graves et al.) August 20 2015 (20-08-2015) Paragraph 0015 Paragraphs 0033 and 0106 Paragraph 0018	1-8, 11, 12, 14, 15, 25 and 33-35
A	CA 2 978 315 A1 (Falb et al.) September 09 2016 (09-09-2016) Whole Document	1-96
A	US 2020/0157534 A1 (Wang et al.) May 21 2020 (21-05-2020 Whole Document	1-96

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

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

Date of the actual completion of the international search 21 April 2021 (21-04-2021)	Date of mailing of the international search report 04 May 2021 (04-05-2021)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476	Authorized officer Pierre Tessier (819) 639-9392

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2021/050236

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2021/050236

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
US2015232862A1	20 August 2015 (20-08-2015)	US2015232862A1	20 August 2015 (20-08-2015)
		US10066240B2	04 September 2018 (04-09-2018)
		CA2939541A1	20 August 2015 (20-08-2015)
		EP3105254A1	21 December 2016 (21-12-2016)
		EP3105254A4	12 July 2017 (12-07-2017)
		EP3105254B1	20 November 2019 (20-11-2019)
		JP2017505637A	23 February 2017 (23-02-2017)
		JP6744224B2	19 August 2020 (19-08-2020)
		JP2017505638A	23 February 2017 (23-02-2017)
		JP6744225B2	19 August 2020 (19-08-2020)
		US2017101652A1	13 April 2017 (13-04-2017)
		US10435716B2	08 October 2019 (08-10-2019)
		US2015232578A1	20 August 2015 (20-08-2015)
		US2019376092A1	12 December 2019 (12-12-2019)
		WO2015120541A1	20 August 2015 (20-08-2015)
		WO2015120542A1	20 August 2015 (20-08-2015)
		WO2015120542A8	27 October 2016 (27-10-2016)
CA2978315A1	09 September 2016 (09-09-2016)	CA2978315A1	09 September 2016 (09-09-2016)
		AU2015357549A1	29 June 2017 (29-06-2017)
		AU2015369627A1	06 July 2017 (06-07-2017)
		AU2016226234A1	21 September 2017 (21-09-2017)
		AU2016262569A1	04 January 2018 (04-01-2018)
		AU2016274311A1	18 January 2018 (18-01-2018)
		AU2016276973A1	18 January 2018 (18-01-2018)
		AU2016303662A1	22 February 2018 (22-02-2018)
		AU2016346646A1	17 May 2018 (17-05-2018)
		AU2016356684A1	31 May 2018 (31-05-2018)
		AU2017213646A1	23 August 2018 (23-08-2018)
		AU2018205276A1	18 July 2019 (18-07-2019)
		AU2018301668A1	19 December 2019 (19-12-2019)
		BR112017011923A2	27 February 2018 (27-02-2018)
		BR112017018656A2	17 April 2018 (17-04-2018)
		BR112017024384A2	24 July 2018 (24-07-2018)
		BR112019013863A2	03 March 2020 (03-03-2020)
		CA2969724A1	09 June 2016 (09-06-2016)
		CA2971876A1	30 June 2016 (30-06-2016)
		CA2985819A1	17 November 2016 (17-11-2016)
		CA2988930A1	15 December 2016 (15-12-2016)
		CA2988981A1	15 December 2016 (15-12-2016)
		CA2996535A1	09 February 2017 (09-02-2017)
		CA3002965A1	04 May 2017 (04-05-2017)
		CA3005451A1	26 May 2017 (26-05-2017)
		CA3011283A1	20 July 2017 (20-07-2017)
		CA3013770A1	10 August 2017 (10-08-2017)
		CA3049579A1	12 July 2018 (12-07-2018)
		CA3066109A1	17 January 2019 (17-01-2019)
		CN107208044A	26 September 2017 (26-09-2017)
		CN107636146A	26 January 2018 (26-01-2018)
		CN110913875A	24 March 2020 (24-03-2020)
		CN111246865A	05 June 2020 (05-06-2020)
		EP3227440A1	11 October 2017 (11-10-2017)
		EP3237437A1	01 November 2017 (01-11-2017)
		EP3265105A1	10 January 2018 (10-01-2018)
		EP3294757A1	21 March 2018 (21-03-2018)
		EP3294760A1	21 March 2018 (21-03-2018)
		EP3294760B1	24 March 2021 (24-03-2021)
		EP3307870A1	18 April 2018 (18-04-2018)
		EP3307879A2	18 April 2018 (18-04-2018)
		EP3313371A2	02 May 2018 (02-05-2018)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2021/050236

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
US2015232862A1	20 August 2015 (20-08-2015)	EP3328988A1	06 June 2018 (06-06-2018)
		EP3344266A1	11 July 2018 (11-07-2018)
		EP3368696A1	05 September 2018 (05-09-2018)
		EP3377518A1	26 September 2018 (26-09-2018)
		EP3402497A1	21 November 2018 (21-11-2018)
		EP3402498A1	21 November 2018 (21-11-2018)
		EP3411051A2	12 December 2018 (12-12-2018)
		EP3565566A1	13 November 2019 (13-11-2019)
		EP3651782A1	20 May 2020 (20-05-2020)
		HK1250244A1	07 December 2018 (07-12-2018)
		IL252627D0	31 July 2017 (31-07-2017)
		IL252627A	30 November 2020 (30-11-2020)
		IL254226D0	31 October 2017 (31-10-2017)
		IL255616D0	31 January 2018 (31-01-2018)
		IL256216D0	28 February 2018 (28-02-2018)
		IL267830D0	26 September 2019 (26-09-2019)
		IL270892D0	30 January 2020 (30-01-2020)
		IL278150D0	30 November 2020 (30-11-2020)
		JP2018504919A	22 February 2018 (22-02-2018)
		JP6768689B2	14 October 2020 (14-10-2020)
		JP2018523978A	30 August 2018 (30-08-2018)
		JP6817966B2	20 January 2021 (20-01-2021)
		JP2018515106A	14 June 2018 (14-06-2018)
		JP6843768B2	17 March 2021 (17-03-2021)
		JP2018501797A	25 January 2018 (25-01-2018)
		JP2018512841A	24 May 2018 (24-05-2018)
		JP2018521674A	09 August 2018 (09-08-2018)
		JP2018532412A	08 November 2018 (08-11-2018)
		JP2018535678A	06 December 2018 (06-12-2018)
		JP2020505016A	20 February 2020 (20-02-2020)
		JP2020527025A	03 September 2020 (03-09-2020)
		KR20170097078A	25 August 2017 (25-08-2017)
		KR20170121291A	01 November 2017 (01-11-2017)
		KR20200064980A	08 June 2020 (08-06-2020)
		MX2017007148A	11 October 2017 (11-10-2017)
		MX2017011037A	02 March 2018 (02-03-2018)
		MX2019008196A	16 December 2019 (16-12-2019)
		RU2017130462A	02 April 2019 (02-04-2019)
		RU2017130462A3	23 September 2019 (23-09-2019)
		SG10202003100XA	28 May 2020 (28-05-2020)
		SG10202010444UA	27 November 2020 (27-11-2020)
		SG11201704543XA	28 July 2017 (28-07-2017)
		SG11201707025WA	28 September 2017 (28-09-2017)
		SG11201906161VA	27 August 2019 (27-08-2019)
		SG11201911031TA	30 January 2020 (30-01-2020)
		US2016177274A1	23 June 2016 (23-06-2016)
		US9487764B2	08 November 2016 (08-11-2016)
		US2016333326A1	17 November 2016 (17-11-2016)
		US2017137789A9	18 May 2017 (18-05-2017)
		US9688967B2	27 June 2017 (27-06-2017)
		US2017136073A1	18 May 2017 (18-05-2017)
		US9889164B2	13 February 2018 (13-02-2018)
		US2017014457A1	19 January 2017 (19-01-2017)
		US9943555B2	17 April 2018 (17-04-2018)
		US2017312320A1	02 November 2017 (02-11-2017)
		US10195234B2	05 February 2019 (05-02-2019)
		US2017128499A1	11 May 2017 (11-05-2017)
		US10273489B2	30 April 2019 (30-04-2019)
		US2016340665A1	24 November 2016 (24-11-2016)
		US10610546B2	07 April 2020 (07-04-2020)
		US2018169154A1	21 June 2018 (21-06-2018)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2021/050236

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
US2015232862A1	20 August 2015 (20-08-2015)	US2018280451A9	04 October 2018 (04-10-2018)
		US10933102B2	02 March 2021 (02-03-2021)
		US2016206666A1	21 July 2016 (21-07-2016)
		US2017067065A1	09 March 2017 (09-03-2017)
		US2017216370A1	03 August 2017 (03-08-2017)
		US2017232043A1	17 August 2017 (17-08-2017)
		US2017253862A1	07 September 2017 (07-09-2017)
		US2019359954A9	28 November 2019 (28-11-2019)
		US2017360850A1	21 December 2017 (21-12-2017)
		US2018273956A1	27 September 2018 (27-09-2018)
		US2018312851A1	01 November 2018 (01-11-2018)
		US2018320161A1	08 November 2018 (08-11-2018)
		US2018325963A1	15 November 2018 (15-11-2018)
		US2019010506A1	10 January 2019 (10-01-2019)
		US2019160115A1	30 May 2019 (30-05-2019)
		US2019282628A1	19 September 2019 (19-09-2019)
		US2019298779A1	03 October 2019 (03-10-2019)
		US2019336544A1	07 November 2019 (07-11-2019)
		US2020149053A1	14 May 2020 (14-05-2020)
		US2020246394A1	06 August 2020 (06-08-2020)
		US2021095297A1	01 April 2021 (01-04-2021)
		WO2016090343A1	09 June 2016 (09-06-2016)
		WO2016090343A9	09 September 2016 (09-09-2016)
		WO2016106343A1	30 June 2016 (30-06-2016)
		WO2016106343A8	11 August 2016 (11-08-2016)
		WO2016141108A1	09 September 2016 (09-09-2016)
		WO2016141108A8	21 December 2017 (21-12-2017)
		WO2016183531A1	17 November 2016 (17-11-2016)
		WO2016183532A1	17 November 2016 (17-11-2016)
		WO2016183532A8	23 February 2017 (23-02-2017)
		WO2016200614A2	15 December 2016 (15-12-2016)
		WO2016200614A3	12 January 2017 (12-01-2017)
		WO2016201380A1	15 December 2016 (15-12-2016)
		WO2016201380A8	26 January 2017 (26-01-2017)
		WO2016201380A9	16 February 2017 (16-02-2017)
		WO2016210373A2	29 December 2016 (29-12-2016)
		WO2016210373A3	09 February 2017 (09-02-2017)
		WO2016210378A2	29 December 2016 (29-12-2016)
		WO2016210378A3	09 February 2017 (09-02-2017)
		WO2016210384A2	29 December 2016 (29-12-2016)
		WO2016210384A3	16 March 2017 (16-03-2017)
		WO2017023818A1	09 February 2017 (09-02-2017)
		WO2017040719A1	09 March 2017 (09-03-2017)
		WO2017074566A1	04 May 2017 (04-05-2017)
		WO2017075485A1	04 May 2017 (04-05-2017)
		WO2017087580A1	26 May 2017 (26-05-2017)
		WO2017123418A1	20 July 2017 (20-07-2017)
		WO2017123592A1	20 July 2017 (20-07-2017)
		WO2017123592A8	31 August 2017 (31-08-2017)
		WO2017123610A2	20 July 2017 (20-07-2017)
		WO2017123610A3	28 September 2017 (28-09-2017)
		WO2017123675A1	20 July 2017 (20-07-2017)
		WO2017123675A8	24 August 2017 (24-08-2017)
		WO2017123676A1	20 July 2017 (20-07-2017)
		WO2017123676A9	14 September 2017 (14-09-2017)
		WO2017136792A2	10 August 2017 (10-08-2017)
		WO2017136792A3	08 September 2017 (08-09-2017)
		WO2017136792A8	28 September 2017 (28-09-2017)
		WO2017136795A1	10 August 2017 (10-08-2017)
		WO2017136795A8	28 September 2017 (28-09-2017)
		WO2017139697A1	17 August 2017 (17-08-2017)
		WO2017139697A8	19 October 2017 (19-10-2017)

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
US2015232862A1	20 August 2015 (20-08-2015)	WO2017139697A9	07 December 2017 (07-12-2017)
		WO2017139708A1	17 August 2017 (17-08-2017)
		WO2017139708A8	21 September 2017 (21-09-2017)
		WO2018129404A1	12 July 2018 (12-07-2018)
		WO2018129404A8	13 June 2019 (13-06-2019)
		WO2019014391A1	17 January 2019 (17-01-2019)
		ZA201707678B	31 March 2021 (31-03-2021)
US2020157534A1	21 May 2020 (21-05-2020)	US2020157534A1	21 May 2020 (21-05-2020)
		AU2018301667A1	06 February 2020 (06-02-2020)
		BR112020000731A2	14 July 2020 (14-07-2020)
		CA3069522A1	17 January 2019 (17-01-2019)
		CN111093679A	01 May 2020 (01-05-2020)
		EP3651781A1	20 May 2020 (20-05-2020)
		IL271883D0	27 February 2020 (27-02-2020)
		JP2020530309A	22 October 2020 (22-10-2020)
		KR20200056980A	25 May 2020 (25-05-2020)
		SG11202000145XA	27 February 2020 (27-02-2020)
		WO2019014390A1	17 January 2019 (17-01-2019)

C12N 15/74 (2006.01) , ***C12N 15/87*** (2006.01)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/26 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/26		
Ｃ１２Ｎ	*15/31 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/31		
Ｃ１２Ｎ	*15/50 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/50		
Ｃ１２Ｎ	*1/21 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ａ６１Ｋ	*39/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/00	Ｈ	
Ａ６１Ｋ	*47/46 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/46		
Ａ６１Ｐ	*31/14 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/14		

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付

(72)発明者 シーヴァース、エリック
アメリカ合衆国 ９２０３７ カリフォルニア、ラ ホヤ、エル カミノ デル テアトロ １６４０

(72)発明者 ラマシャンドラン、ウーメシュ
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付

(72)発明者 チャン、ケビン
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付

(72)発明者 トプシーイ、エレナ
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付

(72)発明者 ギル、ナヴィ
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付

(72)発明者 セイヤー、サリー
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付

(72)発明者 シャー、フェニル
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付

(72)発明者 スティーア、カテリーヌ
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付

(72)発明者 トーマス、ライアン
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付

(72)発明者 チェン、メイ
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付

(72)発明者 シヴァラマン、シャラニア
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付

(72)発明者　ルー、ルーシー
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付
(72)発明者　ユリスト － ドゥッチ、ソフィー
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付
(72)発明者　チューリン、オレグ
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付
(72)発明者　マッケンジー、ロイド
カナダ ブイ５ジェイ ５ジェイ８ ブリティッシュ コロンビア、バーナビー、グレンライオン パークウェイ ８９００、シムビーボ コーポレイション 気付

Ｆターム（参考）　4B065　AA21X AA93X AB01 AC14 BA01 CA24 CA45
4C076　AA95 BB01 CC35 EE56
4C085　AA03 BA99 CC07 DD62 EE01 EE05 GG08