

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6976351号
(P6976351)

(45) 発行日 令和3年12月8日(2021.12.8)

(24) 登録日 令和3年11月11日(2021.11.11)

| | |
|--------------------------------|--------------------|
| (51) Int. Cl. | F I |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 Z N A |
| C 1 2 N 15/70 (2006.01) | C 1 2 N 15/70 Z |
| C 1 2 N 15/74 (2006.01) | C 1 2 N 15/74 Z |
| A 6 1 K 35/74 (2015.01) | A 6 1 K 35/74 A |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 |

請求項の数 14 (全 115 頁)

| | | | |
|--------------------|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2019-554020 (P2019-554020) | (73) 特許権者 | 512154932 ユニヴェルズィテート・バーゼル UNIVERSITÄT BASEL スイス国、ツェーハー 4003 バーゼ ル、ペーターズグラール 35 |
| (86) (22) 出願日 | 平成29年12月20日(2017.12.20) | (74) 代理人 | 110002077 園田・小林特許業務法人 |
| (65) 公表番号 | 特表2020-501609 (P2020-501609A) | (72) 発明者 | イッティグ, シモン スイス国 4103 ボットミンゲン, ツェーンテンフライシュトラーセ 32 |
| (43) 公表日 | 令和2年1月23日(2020.1.23) | (72) 発明者 | アムスタッツ, マリッセ スイス国 4058 バーゼル, ヴィッ トリンガーシュトラーセ 140 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/EP2017/083853 | | |
| (87) 国際公開番号 | W02018/115140 | | |
| (87) 国際公開日 | 平成30年6月28日(2018.6.28) | | |
| 審査請求日 | 令和2年9月24日(2020.9.24) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 16205439.9 | | |
| (32) 優先日 | 平成28年12月20日(2016.12.20) | | |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 欧州特許庁 (EP) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 弱毒化細菌に基づくタンパク質送達

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含む組換え弱毒化グラム陰性菌株であって、

細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列が、プロモーターに作用可能に連結され、異種タンパク質が、インターフェロン(I F N) 応答の誘導又は制御に関与するタンパク質であり、I F N 応答の誘導又は制御に関与するタンパク質が、I 型 I F N 応答の誘導又は制御に関与するタンパク質であり、I 型 I F N 応答の誘導又は制御に関与する異種タンパク質が、R I G - I 様受容体(R L R) ファミリーと、抗ウイルスシグナル伝達及びI 型 I F N 誘導に関与するタンパク質を含有する他の C A R D ドメインと、S T I N G の刺激をもたらす W s p R、D n c V、D i s A 及び D i s A 様、C d a A、C d a S 並びに c G A S からなる群から選択されるサイクリック - ジ A M P、サイクリック - ジ G M P 及びサイクリック - ジ G A M P シクラーゼ等のサイクリックジヌクレオチド生成酵素とからなる群から選択される、組換え弱毒化グラム陰性菌株

【請求項2】

I F N 応答の誘導又は制御に関与するタンパク質が、I 型 I F N 応答の誘導又は制御に関与するタンパク質であり、I 型 I F N 応答の誘導又は制御に関与するタンパク質が、R I G 1、M D A 5、M A V S / I P S - 1、W s p R、D n c V、D i s A 及び D i s A

様、C d a A、並びに c G A S、又はその断片からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株。

【請求項 3】

増殖に必須の内在性タンパク質をコードする染色体遺伝子の欠失、及びプロモーターに作用可能に連結されている増殖に必須の前記内在性タンパク質をコードする遺伝子を含むヌクレオチド配列を含む内在性毒性プラスミドをさらに含む、請求項 1 又は 2 に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株。

【請求項 4】

少なくとも 1 つの細菌エフェクタータンパク質の産生が不十分である、請求項 3 に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株。

10

【請求項 5】

増殖に必須の内在性タンパク質をコードする遺伝子が、アミノ酸産生に必須の酵素をコードする遺伝子、ペプチドグリカン生合成に關与する酵素をコードする遺伝子、L P S 生合成に關与する酵素をコードする遺伝子、ヌクレオチド生合成に關与する酵素をコードする遺伝子、及び翻訳開始因子をコードする遺伝子から選択される、請求項 3 又は 4 に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株。

【請求項 6】

増殖に必須の内在性酵素をコードする遺伝子が、アミノ酸産生に必須の酵素をコードする遺伝子であり、アミノ酸産生に必須の酵素が、アスパラギン酸 - ベータ - セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (a s d) である、請求項 3 から 5 の何れか一項に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株。

20

【請求項 7】

エルシニア属 (*Y e r s i n i a*) 株である、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株。

【請求項 8】

内在性毒性プラスミド上に位置する増殖に必須の内在性酵素をコードする遺伝子が、その内在性プロモーター及びその内在性転写ターミネーターを含む、請求項 3 から 7 の何れか一項に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株。

【請求項 9】

増殖に必須の内在性酵素をコードする遺伝子、その内在性プロモーター、及びその内在性転写ターミネーターが、内在性毒性プラスミド上の o r f 1 5 5 (*S y c O*) の開始点の 1 2 2 b p 上流に位置する、請求項 8 に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株。

30

【請求項 10】

内在性 A r a C 型 D N A 結合タンパク質をコードする遺伝子の上流の R N A 温度センサー領域内のモジュレーションをさらに含む、請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株。

【請求項 11】

内在性 A r a C 型 D N A 結合タンパク質をコードする遺伝子の上流の R N A 温度センサー領域内のモジュレーションが、内在性 A r a C 型 D N A 結合タンパク質をコードする遺伝子の上流の R N A ヘアピン構造又はその一部を除去する欠失を含む、請求項 10 に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株。

40

【請求項 12】

A r a C 型 D N A 結合タンパク質が、V i r F である、請求項 10 又は 11 に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株。

【請求項 13】

エルシニア・エンテロコリティカ (*Y e r s i n i a e n t e r o c o l i t i c a*) である、請求項 1 から 12 の何れか一項に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株。

【請求項 14】

請求項 1 から 13 の何れか一項に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株を含む、対象の がん を治療する ための医薬。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組換え弱毒化グラム陰性菌株及び対象のがんを治療する方法におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

細菌は、タンパク質を標的細胞に直接打ち込むための様々なメカニズムを進化させてきた¹。エルシニア属 (*Yersinia*)、シゲラ属 (*Shigella*) 及びサルモネラ属 (*Salmonella*) のような細菌により使用される III 型分泌系 (T3SS)² は、宿主細胞にいわゆる細菌エフェクタータンパク質を打ち込むナノシリンジのように機能する。

10

【0003】

T3S は、ハイブリッドペプチド及びタンパク質を標的細胞に送達するために活用されてきた。研究対象の細菌が、遺伝学による利用が困難である (トラコーマクラミジア (*Chlamydia trachomatis*) のような) 場合に、異種細菌 T3SS エフェクターが送達されてきた。多くの場合、レポータータンパク質、例えば、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) アデニル酸シクラーゼ、マウス DHFR 又はリン酸化可能なタグが、T3SS 依存性タンパク質送達の研究要件に応じて、潜在的 T3SS 分泌シグナルに融合された。ペプチド送達は、主に、ワクチン接種を目的として行われた。これは、ウイルスエピトープ、細菌エピトープ (リステリオリジン O)、並びにヒトがん細胞のエピトープに相当するペプチドを含む。少数の事例では、機能性真核生物タンパク質が、ナノボディ³、核タンパク質 (Cre-リコンビナーゼ、MyoD)^{4、5} 又は IL10 及び IL-1ra⁶ でなされるように、宿主細胞を調節するために送達されている。何れの場合も一又は複数の内在性エフェクタータンパク質が依然としてコードされているので、上述の系の何れによっても単一のタンパク質を送達することはできない。さらに、使用されたベクターは、最適なタンパク質をコードする他の DNA 断片を簡単にクローニングできるようには設計されておらず、それがこの系の広範な応用を妨げている。

20

【0004】

標的薬物送達を可能にする手法が重要である。例えば、腫瘍細胞の表面構造を認識する抗体であって、最適な場合、腫瘍細胞と選択的に結合する抗体が使用される。そのような抗体のメカニズムを向上させるために、それらを治療剤と、又は薬物が充填された脂質小胞と、コンジュゲートさせることができる。そのような小胞に関する課題の 1 つは、活性試薬の適切な放出である。よりいっそう複雑なのは、治療タンパク質又はペプチドの送達、特に、細胞内機構を標的とする場合の送達である。治療タンパク質の真核細胞への送達の問題を解決するために多くの代替的方法が試みられており、そのような方法には、「細胞透過ペプチド」(CPP) 又は同様の技術、並びにナノ粒子に基づく様々な方法がある。これらの技術には全て、低い有効性という欠点、及びエンドサイトーシスによって細胞により取り込まれる輸送基質が、最終的にリソソーム内で分解されることになる可能性が高いという欠点がある。さらに、ヒトの体内での輸送基質 - 担体の安定性と、標的細胞内での不安定化及び遊離の必要性との矛盾は、そのような技術の固有の問題である。

30

40

【0005】

大腸菌 (*Escherichia coli*)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、サルモネラ菌 (*Salmonella enterica*)、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 及びビフィズス菌 (*Bifidobacteria*) をはじめとする、様々な細菌は、遠位部位から投与された場合、悪性固形腫瘍内で複製することが証明されている。現在、カルメット・ゲラン桿菌 (BCG、ウシ型結核菌 (*Mycobacterium bovis*)) に由来する) のみが臨床診療に使用されている。BCG は、

50

表在性膀胱がんを治療するために投与されるが、その根本的な分子メカニズムは依然としてほとんど分かっていない。例えば、細菌内で産生されたカーゴをがん細胞のような細胞内、すなわち細菌の外、のその作用部位に送達することができる菌株の開発は、依然として大きな課題である。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、組換え弱毒化グラム陰性菌株及び対象のがんを治療する方法におけるその使用に関する。一部の実施態様では、本発明は、がん細胞への、例えば、悪性固形腫瘍細胞への、ウイルスタンパク質の様々なIII型エフェクターの移行を可能にするが、IV型エフェクターの移行も可能にし、最も重要なことに、機能性真核生物タンパク質の移行を可能にする組換え弱毒化グラム陰性菌株、並びに対象のがんを治療するためのそれらの使用を提供する。

10

【0007】

本発明は、異種タンパク質発現及び分泌増加特性を有する組換え弱毒化グラム陰性菌株であって、驚くべきことに、数日又はさらには数週間にわたってインビボで異種タンパク質を安定的にコードすることができる組換え弱毒化グラム陰性菌株を提供する。

【0008】

第1の態様では、本発明は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列がプロモーターに作用可能に連結されている、組換え弱毒化グラム陰性菌株であって、増殖に必須の内在性タンパク質をコードする染色体遺伝子の欠失、及びプロモーターに作用可能に連結されている増殖に必須の前記内在性タンパク質をコードする遺伝子を含むヌクレオチド配列を含む内在性毒性プラスミドをさらに含む組換え弱毒化グラム陰性菌株に関する。

20

【0009】

さらなる態様では、本発明は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列がプロモーターに作用可能に連結されている、組換え弱毒化グラム陰性菌株であって、内在性Arac型DNA結合タンパク質をコードする遺伝子の近位のRNA温度センサー領域内のモジュレーションをさらに含む組換え弱毒化グラム陰性菌株に関する。

30

【0010】

さらなる態様では、本発明は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列がプロモーターに作用可能に連結されている、組換え弱毒化グラム陰性菌株であって、異種タンパク質が、インターフェロン(IFN)応答の誘導又は制御に関与するタンパク質である、組換え弱毒化グラム陰性菌株に関する。

40

【0011】

さらなる態様では、本発明は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列がプロモーターに作用可能に連結されている、組換え弱毒化グラム陰性菌株であって、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、増殖に必須の内在性タンパク質をコードする染色体遺伝子の欠失、及びプロモーターに作用可能に連結されている増殖に必須の前記内在性タンパク質をコードする遺伝子を含むヌクレオチド配列を含む内在性毒性プラスミドをさらに含み、対象のがんを治療する方法において使

50

用するためのものであり、前記方法が、対象に前記組換え弱毒化グラム陰性菌株を投与することを含み、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、対象を治療するために十分な量で投与される、組換え弱毒化グラム陰性菌株に関する。

【0012】

同様に、本発明は、対象のがんを処置する方法であって、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレーションで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列がプロモーターに作用可能に連結されている、組換え弱毒化グラム陰性菌株を対象に投与することを含み、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、増殖に必須の内在性タンパク質をコードする染色体遺伝子の欠失、及びプロモーターに作用可能に連結されている増殖に必須の前記内在性タンパク質をコードする遺伝子を含むヌクレオチド配列を含む内在性毒性プラスミドをさらに含み、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、対象を治療するために十分な量で投与される、方法に関する。

10

【0013】

同様に、本発明は、対象のがんを治療するための医薬を製造するための、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレーションで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードする前記ヌクレオチド配列がプロモーターに作用可能に連結されている、組換え弱毒化グラム陰性菌株の使用であって、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、増殖に必須の内在性タンパク質をコードする染色体遺伝子の欠失、及びプロモーターに作用可能に連結されている増殖に必須の前記内在性タンパク質をコードする遺伝子を含むヌクレオチド配列を含む内在性毒性プラスミドのをさらに含む、使用に関する。

20

【0014】

さらなる態様では、本発明は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレーションで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列がプロモーターに作用可能に連結されている、組換え弱毒化グラム陰性菌株であって、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、内在性AraC型DNA結合タンパク質をコードする遺伝子の上流のRNA温度センサー領域内のモジュレーションをさらに含み、対象のがんを治療する方法において使用するためのものであり、方法が、対象に前記組換え弱毒化グラム陰性菌株を投与することを含み、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、対象を治療するために十分な量で投与される、組換え弱毒化グラム陰性菌株に関する。

30

【0015】

同様に、本発明は、対象のがんを処置する方法であって、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレーションで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含む組換え弱毒化グラム陰性菌株を対象に投与することを含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列が、プロモーターに作用可能に連結されており、前記組換え弱毒化グラム陰性菌株が、内在性AraC型DNA結合タンパク質をコードする遺伝子の上流のRNA温度センサー領域内のモジュレーションをさらに含み、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、対象を治療するために十分な量で投与される、方法に関する。

40

【0016】

同様に、本発明は、対象のがんを治療するための医薬を製造するための、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレーションで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含む組換え弱毒化グラム陰性菌株の使用であって、細菌エフェクタータンパク質から

50

の送達シグナルをコードするヌクレオチド配列が、プロモーターに作用可能に連結されており、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、内在性 A r a C 型 D N A 結合タンパク質をコードする遺伝子上流の R N A 温度センサー領域内のモジュレーションをさらに含む、使用に関する。

【 0 0 1 7 】

さらなる態様では、本発明は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の 3 ' 末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列がプロモーターに作用可能に連結されている、組換え弱毒化グラム陰性菌株であって、異種タンパク質がインターフェロン (I F N) 10 応答の誘導又は制御に関与するタンパク質であり、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、対象のがんを治療する方法において使用するためのものであり、前記方法が、対象に前記組換え弱毒化グラム陰性菌株を投与することを含み、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、対象を治療するために十分な量で投与される、組換え弱毒化グラム陰性菌株に関する。

【 0 0 1 8 】

同様に、本発明は、対象のがんを治療する方法であって、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の 3 ' 末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含む組換え弱毒化グラム陰性菌株を対象に投与することを含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列が、プロモーターに作用可能に連結されてお 20 り、異種タンパク質が、インターフェロン (I F N) 応答の誘導又は制御に関与するタンパク質であり、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、対象を治療するために十分な量で投与される、方法に関する。

【 0 0 1 9 】

同様に、本発明は、対象のがんを治療するための医薬の製造のための、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の 3 ' 末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含む組換え弱毒化グラム陰性菌株の使用であって、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列が、プロモーターに作用可能に連結されており、異種タンパク質が、インターフェロン (I F N) 応答の誘導又は制御に関与するタン 30 パク質である、使用に関する。

【 0 0 2 0 】

さらなる態様では、本発明は、組換え弱毒化グラム陰性菌株と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物であって、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の 3 ' 末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列が、プロモーターに作用可能に連結されており、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、増殖に必須の 40 内在性タンパク質をコードする染色体遺伝子の欠失、及びプロモーターに作用可能に連結されている増殖に必須の前記内在性タンパク質をコードする遺伝子を含むヌクレオチド配列を含む内在性毒性プラスミドをさらに含む、薬学的組成物に関する。

【 0 0 2 1 】

さらなる態様では、本発明は、組換え弱毒化グラム陰性菌株と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物であって、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の 3 ' 末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列が、プロモーターに作用可能に連結されており、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、内在性 A r a C 型 D N A 結合タンパク質をコードする遺伝子上流の R N A 温度センサー領域内のモジュレーションをさらに含む、薬学的組成物に関する。 50

【0022】

さらなる態様では、本発明は、組換え弱毒化グラム陰性菌株と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物であって、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列が、プロモーターに作用可能に連結されており、異種タンパク質が、インターフェロン(IFN)応答の誘導又は制御に關与するタンパク質である、薬学的組成物に關する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】T3SSタンパク質送達の特徴づけの図である。T3SS依存性タンパク質の周囲媒体への分泌(インビトロ分泌)(左側)又は真核細胞への分泌(右側)の模式図。I:3型分泌系を示す。IIは、周囲媒体に分泌されたタンパク質を示し、IIIは、膜を通過して真核細胞のサイトゾル(VII)に移行したタンパク質を示す。VIは、T3SSが挿入される及び下に細菌サイトゾルがある2つの細菌膜の伸張を示す。IVは、YopE₁₋₁₃₈N末端断片(V)に結合している融合タンパク質である。

【図2A-B】III型分泌に基づく送達ツールボックスの説明の図である。(A)YopE₁₋₁₃₈を有する融合構築物を生成するために使用したクローニングプラミドpBad_Si1及びpBad_Si2のベクターマップ。シャペロンSyce、及びYopE₁₋₁₃₈融合体は、ネイティブY.エンテロコリチカプロモーターの下にある。2つのプラスミドは、pBad_Si1上に存在するアラビノース誘導性EGFPの存在の点のみが異なる。(B)pBad_Si1及びpBad_Si2プラスミド上のyopE₁₋₁₃₈断片の直後の多重クローニング部位。

【図3A】この研究に使用したY.エンテロコリチカ株の図である。バックグラウンド株、対応するプラスミド上にコードされたT3SS依存性送達のためのプラスミド及びタンパク質に關する情報を提供する、この研究に使用したY.エンテロコリチカのリスト。さらに、対応するプラスミドの構築に使用したオリゴヌクレオチド、骨格プラスミド及び抗生物質耐性に關する情報を提供する。

【図3B】この研究に使用したY.エンテロコリチカ株の図である。バックグラウンド株、対応するプラスミド上にコードされたT3SS依存性送達のためのプラスミド及びタンパク質に關する情報を提供する、この研究に使用したY.エンテロコリチカのリスト。さらに、対応するプラスミドの構築に使用したオリゴヌクレオチド、骨格プラスミド及び抗生物質耐性に關する情報を提供する。

【図3C】この研究に使用したY.エンテロコリチカ株の図である。バックグラウンド株、対応するプラスミド上にコードされたT3SS依存性送達のためのプラスミド及びタンパク質に關する情報を提供する、この研究に使用したY.エンテロコリチカのリスト。さらに、対応するプラスミドの構築に使用したオリゴヌクレオチド、骨格プラスミド及び抗生物質耐性に關する情報を提供する。

【図3D】この研究に使用したY.エンテロコリチカ株の図である。バックグラウンド株、対応するプラスミド上にコードされたT3SS依存性送達のためのプラスミド及びタンパク質に關する情報を提供する、この研究に使用したY.エンテロコリチカのリスト。さらに、対応するプラスミドの構築に使用したオリゴヌクレオチド、骨格プラスミド及び抗生物質耐性に關する情報を提供する。

【図3E】この研究に使用したY.エンテロコリチカ株の図である。バックグラウンド株、対応するプラスミド上にコードされたT3SS依存性送達のためのプラスミド及びタンパク質に關する情報を提供する、この研究に使用したY.エンテロコリチカのリスト。さらに、対応するプラスミドの構築に使用したオリゴヌクレオチド、骨格プラスミド及び抗生物質耐性に關する情報を提供する。

【図3F】この研究に使用したY.エンテロコリチカ株の図である。バックグラウンド株、対応するプラスミド上にコードされたT3SS依存性送達のためのプラスミド及びタ

10

20

30

40

50

株、対応するプラスミド上にコードされたT3SS依存性送達のためのプラスミド及びタンパク質に関する情報を提供する、この研究に使用したY.エンテロコリチカのリスト。さらに、対応するプラスミドの構築に使用したオリゴヌクレオチド、骨格プラスミド及び抗生物質耐性に関する情報を提供する。

【図3Q】この研究に使用したY.エンテロコリチカ株の図である。バックグラウンド株、対応するプラスミド上にコードされたT3SS依存性送達のためのプラスミド及びタンパク質に関する情報を提供する、この研究に使用したY.エンテロコリチカのリスト。さらに、対応するプラスミドの構築に使用したオリゴヌクレオチド、骨格プラスミド及び抗生物質耐性に関する情報を提供する。

【図4】エルシニア・エンテロコリチカW227毒性プラスミド、pYVの図である。正確な縮尺率で描かれたW227株の69'673 bpエルシニア属毒性プラスミド(pYV)。T3SSエフェクタータンパク質、複製開始点、及びヒ素耐性(arsC、B、R及びH遺伝子によりコードされたもの)が示されている：I：複製開始点、II：yopO、III：yopP、IV：yopQ、V：yopT、VI：sycT、VII：yopM、VIII：yopD、IX：yopB、X：sycD、XI：yopH、XII：sycH、XIII：sycE、XIV：yopE、XV：yadA、XVI-XVII：arsC、B、R及びH。

【図5】アポトーシス促進性が増した合成タンパク質の送達の図である。アポトーシス促進性タンパク質t-BID又はBAX由来の単一BH3ドメイン又はBH3のタンデムリピートからなる単一の合成タンパク質の送達は、4T1及びB16F10がん性細胞においてアポトーシス誘導増強をもたらす。pBad-MycHisA上にIV：YopE₁₋₁₃₈-tBID BH3伸長ドメイン、V：YopE₁₋₁₃₈-リンカー-tBID BH3、VI：YopE₁₋₁₃₈-tBID BH3、VII：YopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂、VIII：YopE₁₋₁₃₈-tBID BH3-BAX BH3又はIV：YopE₁₋₁₃₈-BAX BH3-tBID BH3をコードしているY.エンテロコリチカ yopHOPEMTに、4T1(I)又はB16F10(II)細胞を感染させた。細胞に加えた細菌(感染多重度)の滴度を各株について行い、細胞数を決定し、非線形回帰を使用してIC50を算出した。IC50感染多重度が示されている(III)。

【図6】pYVによりコードされた合成アポトーシス促進性タンパク質によるアポトーシスの誘導の図である。pYV上にコードされた単一BID BH3ドメイン又はBID BH3ドメインのタンデムリピートの送達は、4T1及びB16F10がん性細胞においてアポトーシス誘導をもたらす。4T1(I)又はB16F10(II)細胞を、IV：Y.エンテロコリチカ HOPEMT+pYV-YopE₁₋₁₃₈-BH3-Bid、又はV：Y.エンテロコリチカ HOPEMT+pYV-YopE₁₋₁₃₈-(BH3-Bid)₂、又はVI：Y.エンテロコリチカ HOPEMT pBad-MycHisA-YopE₁₋₁₃₈-(BH3-Bid)₂に、3時間、感染させた。細胞に加えた細菌(感染多重度)の滴度を各株について行い、細胞数を決定し、非線形回帰を使用してIC50(III)を算出した。

【図7】4T1乳がん同種移植モデルにおける静脈内注射したY.エンテロコリチカ yopH、O、P、E、M、Tの腫瘍定着の図である。腫瘍内の細菌数が組織1グラム当りのコロニー形成単位(CFU)として示されている(III)。感染後8日目(I)及び14日目(II)に腫瘍内の数を評価した。各点は、個々のマウスを表す。水平の破線は、検出限界を示す。

【図8】4T1乳がん同種移植モデルにおける静脈内注射したY.エンテロコリチカ yopH、O、P、E、M、Tの生体内分布の図である。血液(I)、脾臓(II)、肝臓(III)、肺(IV)及び腫瘍(V)内の細菌数が、組織1グラム当りのコロニー形成単位(CFU)、又は血液1ml当りのコロニー形成単位(CFU)(VI)として示されている。感染後14日目に数を評価した。各点は、個々のマウスを表す。水平の破線は、検出限界を示す。*は、肺に大きい転移が見られたマウスを示す。

10

20

30

40

50

【図9】4T1乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスにおける腫瘍進行の遅延の図である。4T1乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスに、腫瘍が150-250mm³のサイズに達したら、I:PBS又はII:1×10⁷*Y.エンテロコリチカdHOPEMT HairpinI-VirF+pYV-YopE₁₋₁₃₈(BH3-Bid)₂を静脈内注射した。細菌の静脈内注射の日を0日目と定義した。その後数日(III:細菌の静脈内注射後0日目から9日目)にわたって腫瘍体積をノギスで測定した。0日目の腫瘍体積に正規化した相対腫瘍体積が、mm³として示されている(IV)。平均値が記号で示されており、描かれているエラーバーは、平均値の標準誤差を示す。統計的有意性は、二元配置ANOVAで測定され、*は、p値<0.05を示し、**は、p値<0.005を示す。

10

【図10】4T1乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスにおける腫瘍進行の図である。4T1乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスに、腫瘍が150-250mm³のサイズに達したら、I:PBS又はII:1×10⁷*Y.エンテロコリチカdHOPEMTを静脈内注射した。細菌の静脈内注射の日を0日目と定義した。その後数日(III:細菌の静脈内注射後0日目から9日目)にわたって腫瘍体積をノギスで測定した。0日目の腫瘍体積に正規化した相対腫瘍体積が、mm³として示されている(IV)。平均値が記号で示されており、描かれているエラーバーは、平均値の標準誤差を示す。

【図11】主制御因子VirFの発現を調節することによる、T3SSに基づく分泌の制御の図である。A:YopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂を送達するY.エンテロコリチカ(Y. enterocolitica) HOPEMT株に関するインビトロ分泌アッセイ(37で行った)。VirFの発現は、その天然のプロモーター(I+II)、アラビノース誘導性プロモーター(III+IV)、又は温度依存性発現を調節するそのhairpin I領域が欠失しているその天然のプロモーター(V)の調節下にある。分泌アッセイは、アラビノースの非存在下(I、III及びV)又は0.2%アラビノースの存在下(II及びIV)のどちらかで行った。YopE₁₋₁₃₈領域を認識する抗体を用いるウェスタンブロッティングを使用して、分泌されたYopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂を検出した。B:YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 Cardドメインを送達するY.エンテロコリチカ HOPEMT株に関するインビトロ分泌アッセイ(37で行った)。VirFの発現は、その天然のプロモーター(I+II)、又は温度依存性発現を調節するそのhairpin I領域が欠失しているその天然のプロモーター(III)の調節下にある。分泌アッセイは、アラビノースの非存在下(I及びIII)又は0.2%アラビノースの存在下(II)のどちらかで行った。YopE₁₋₁₃₈領域を認識する抗体を用いるウェスタンブロッティングを使用して、分泌されたYopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 Cardドメインを検出した。

20

30

【図12】インビトロでの増殖の比較:I:Y.エンテロコリチカ HOPEMT、III:Y.エンテロコリチカ HOPEMT asd、IV:Y.エンテロコリチカ HOPEMT asd+pBAD-MycHisA-asd、V:Y.エンテロコリチカ HOPEMT asd+pBAD-MycHisA-asd(逆方向)、VI:pYV上にYopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂をコードしているY.エンテロコリチカ HOPEMT、及びVII:Y.エンテロコリチカ HOPEMT asd+pYV-asd-YopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂についての、インビトロでの増殖の比較の図である。細菌を液体培地中でインキュベートし、3時間増殖させた。その後、OD600(I)を全ての株について判定した。

40

【図13】Y.エンテロコリチカ HOPEMT asd+pBad-MycHisA-asdでの腫瘍定着及びpBad-MycHisA-asdの安定性の図である。B16F10メラノーマ細胞を皮下に同種移植した野生型C57BL/6マウスに、1×10⁶ Y.エンテロコリチカ HOPEMT asd+pBad-MycHisA-asdを静脈内注射した。静脈内注射後1日目(I)又は4日目(II)に、血液(V)、脾臓(VI)、肝臓(VII)、肺(VIII)及び腫瘍(IX)を単離し、ホモジナ

50

イズし、段階希釈し、ナリジクス酸を含有する（及びアンピシリンを含有しない、-IV）LB-寒天プレート上に、又はpBad-MycHisA-asdに対して選択性のあるアンピシリン（+IV）を伴うLB-寒天プレート上に播種した。それぞれの試料中の細菌数が、組織1グラム又は血液1ml当りのコロニー形成単位（CFU）として示されている（III）。各点は、個々のマウスを表す。水平の破線は、検出限界を示す。

【図14】Y.エンテロコリチカ HOPEMT asd+pBad-MycHisA-asdでの腫瘍コロニー形成の図である。4T1乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスに、 1×10^6 Y.エンテロコリチカ HOPEMT asd+pBad-MycHisA-asdを静脈内注射した。細菌の静脈内注射後の示されている日（I）に、腫瘍を単離し、ホモジナイズし、段階希釈し、ナリジクス酸を含有するLB-寒天プレートに播種した。腫瘍内の細菌数が組織1グラム当りのコロニー形成単位（CFU）として示されている（II）。各点は、個々のマウスを表す。水平の破線は、検出限界を示す。

10

【図15】pYVの遺伝的安定性：インビボでの固形腫瘍における天然pYV又はpYV-asdの安定性の図である。4T1乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスに、 1×10^7 のII:Y.エンテロコリチカ HOPEMT hairpinI-virF+pYV-YopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂、III:Y.エンテロコリチカ HOPEMT hairpinI-virF+pYV-YopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂又はIV:Y.エンテロコリチカ HOPEMT asd+pYV-asd-YopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂を静脈内注射した。細菌の静脈内注射後9日目に、腫瘍を単離し、ホモジナイズし、段階希釈し、ナリジクス酸を含有するLB-寒天プレートに播種した。これらのプレート上での増殖後、個々のマウスからの単一のコロニーを、pYVに対して選択性のある亜ヒ酸ナトリウムを伴う及び伴わないLB-寒天プレート上に、再採取した。マウスごとに、亜ヒ酸塩を含有する寒天プレート上で増殖するコロニーの、亜ヒ酸塩を含有しないプレート上で増殖するコロニーの数に対するパーセンテージが示されている（I:%として）。100%は、固形腫瘍から単離された全てのコロニーが、pYVプラスミドをまだ含有することを示す。

20

【図16】腫瘍定着の図である。4T1乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスに、 1×10^7 のII:Y.エンテロコリチカ HOPEMT+pYV-YopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂、III:Y.エンテロコリチカ HOPEMT hairpinI-virF+pYV-YopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂又はIV:Y.エンテロコリチカ HOPEMT asd+pYV-asd-YopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂を静脈内注射した。細菌の静脈内注射後9日目に、腫瘍を単離し、ホモジナイズし、段階希釈し、ナリジクス酸を含有するLB-寒天プレートに播種した。腫瘍内の細菌数が組織1グラム当りのコロニー形成単位（CFU）として示されている（I）。各点は、個々のマウスを表す。水平の破線は、検出限界を示す。

30

【図17】細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達-Rig1経路の図である。ヒト及びマウスRig1 Cardドメインの送達は、B16F10 IFN-レポーター細胞株においてI型IFN誘導をもたらす。B16F10レポーター細胞を、I:Y.エンテロコリチカ HOPEMT、又はpBadMycHisA由来プラスミド上にII:YopE₁₋₁₃₈-ヒトRig1 Cardドメイン、III:YopE₁₋₁₃₈-マウスRig1 CardドメインをコードしているY.エンテロコリチカ HOPEMTに感染させた。細胞に加えた細菌（IV:感染多重度として示す）の滴度を各株について行い、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性（V:OD650）に基づいて、IFN刺激を評価した。

40

【図18】細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達-Rig1経路の図である。ヒトRig1 Cardドメインの送達は、B16F10 IFN-レポーター細胞株においてI型IFN誘導をもたらす。B16F10レポーター細胞を

50

、I : Y . エンテロコリチカ HOPEMT、又はpBadMycHisA由来プラスミド上にII : YopE₁₋₁₃₈ - MycHis、III : YopE₁₋₁₃₈ - HitRig1 CardドメインをコードしているY . エンテロコリチカ HOPEMTに感染させた。細胞に加えた細菌 (IV : 感染多重度として示す) の滴定を各株について行い、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI - ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性 (V : OD650) に基づいて、IFN刺激を評価した。

【図19】細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達 - Rig1経路：ポジティブコントロールの図である。IFNガンマを使用してB16F10 IFN - レポーター細胞株を刺激する、図18と同じ実験におけるポジティブコントロール。B16Fレポーター細胞をマウスIFNガンマで刺激した。IFNガンマの滴定を細胞に加え (I : U/mlとして示す)、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI - ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性 (II : OD650) に基づいて、IFN刺激を評価した。

10

【図20】細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達 - Rig1経路の図である。pYVにコードされたマウスRig1 Cardドメインの送達は、B16F10がん細胞株においてI型IFN誘導をもたらす。B16F10細胞を、I : Y . エンテロコリチカ HOPEMT、又はpYV上にII : YopE₁₋₁₃₈ - マウスRig1 CardドメインをコードしているY . エンテロコリチカ HOPEMTに感染させた。細胞に加えた細菌 (III : 感染多重度として示す) の滴定を各株について行い、IFNレポーター細胞株に細胞上清を添加することにより、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI - ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性 (IV : OD650) に基づいて、IFN刺激を評価した。

20

【図21】細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達 - Rig1経路の図である。pYVにコードされたマウスRig1 Cardドメインの送達は、4T1がん細胞株においてI型IFN誘導をもたらす。4T1細胞を、I : Y . エンテロコリチカ HOPEMT、又はpYV上にII : YopE₁₋₁₃₈ - マウスRig1 CardドメインをコードしているY . エンテロコリチカ HOPEMTに感染させた。細胞に加えた細菌 (III : 感染多重度として示す) の滴定を各株について行い、IFNレポーター細胞株に細胞上清を添加することにより、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI - ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性 (IV : OD650) に基づいて、IFN刺激を評価した。

30

【図22】細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達 - STING経路の図である。サイクリックジヌクレオチド生成酵素の送達は、B16F10 IFN - レポーター細胞株においてI型IFN誘導をもたらす。B16F10レポーター細胞を、I : Y . エンテロコリチカ HOPEMT、又はpBadMycHisA由来プラスミド上にII : YopE₁₋₁₃₈ - 緑膿菌 (P. aeruginosa) WspR (適応スタークドメインを有する) をコードしているY . エンテロコリチカ HOPEMTに感染させた。細胞に加えた細菌 (III : 感染多重度として示す) の滴定を各株について行い、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI - ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性 (IV : OD650) に基づいて、IFN刺激を評価した。

40

【図23】細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達 - STING経路の図である。サイクリックジヌクレオチド生成酵素の送達は、B16F10 IFN - レポーター細胞株においてI型IFN誘導をもたらす。B16F10レポーター細胞を、未処理で放置した (I) か、又はIII : Y . エンテロコリチカ HOPEMT、若しくはpBadMycHisA由来プラスミド上にIII : YopE₁₋₁₃₈ - コレラ菌 (V. cholerae) DncV、IV : YopE₁₋₁₃₈ - セレウス菌 (B

50

. cereus) DisA様タンパク質、V:YopE₁₋₁₃₈-イソギンチャク(A nemonae)cGAS若しくはVI:YopE₁₋₁₃₈-MyChisをコードしているY.エンテロコリチカ HOPEMTに感染させた。細胞に加えた細菌(VII:感染多重度として示す)の滴定を各株について行い、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性(VIII:OD650)に基づいて、IFN刺激を評価した。

【図24】培養上清へのIRF3のT3SS依存性分泌の図である。I.Y.エンテロコリチカ HOPEMT+YopE₁₋₁₃₈-マウスtBID BH3及びII:Y.エンテロコリチカ HOPEMT+YopE₁₋₁₃₈-マウスIRF3 Ser397 Aspのインビトロでの分泌実験。全細菌溶解物(「A」)及び沈殿培養上清(「B」)のタンパク質含有量を、抗YopE抗体を使用するウェスタンブロット法により分析した。記載の数字は、対応する高さの分子量をkDaで示すものである。

10

【図25】免疫細胞への細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達-Rig1及びSTING経路の図である。マウスRig1 Cardドメイン及びサイクリックジヌクレオチド生成酵素の送達は、RAW264.7 IFN-レポーター細胞株においてI型IFN誘導をもたらす。RAW264.7レポーター細胞を、I:Y.エンテロコリチカ HOPEMT、又はpBadMyChisA由来プラスミド上にII:YopE₁₋₁₃₈-コレラ菌DncV、III:YopE₁₋₁₃₈-セレウス菌DisA様タンパク質、IV:YopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGAS若しくはVI:YopE₁₋₁₃₈-マウスRig1 CardドメインをコードしているY.エンテロコリチカ HOPEMTに感染させた。細胞に加えた細菌(VI:感染多重度として示す)の滴定を各株について行い、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性(VII:OD650)に基づいて、IFN刺激を評価した。

20

【図26】B16F10乳がん同種移植モデルにおける静脈内注射したY.エンテロコリチカ株の腫瘍定着の図である。B16F10メラノーマがん細胞を皮下に同種移植した野生型C57BL/6マウスに、腫瘍が100-315mm³のサイズに達したら、I:PBS、II:1×10⁷ Y.エンテロコリチカdHOPEMT、III:Y.エンテロコリチカdHOPEMT+pYV-YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDs₁₋₂₄₆、又はIV:Y.エンテロコリチカdHOPEMT Hairpin I-VirF+pYV-YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDs₁₋₂₄₆を静脈内注射した。腫瘍内の細菌数が組織1グラム当りのコロニー形成単位(CFU)として示されている(V)。感染後5日目又は8日目に腫瘍内の数を評価した。各点は、個々のマウスを表す。水平の破線は、検出限界を示す。

30

【図27】細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達-RIG1の図である。ヒト及びマウスRIG1 CARDドメインの送達は、B16F10 IFN-レポーター細胞株においてI型IFN誘導をもたらす。B16F10細胞を、I:Y.エンテロコリチカ HOPEMT、又はpBadMyChisA由来プラスミド上にII:YopE₁₋₁₃₈-ヒトRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₅、III:YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆、IV:YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₂₉、V:YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₁₈をコードしているY.エンテロコリチカ HOPEMTに感染させた。細胞に加えた細菌(VI:感染多重度として示す)の滴定を各株について行い、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性(VII:OD650)に基づいて、IFN刺激を評価した。

40

【図28】細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達-RIG1の図である。ヒト及びマウスRIG1 CARDドメインの送達は、RAW IFN-レポーター細胞株においてI型IFN誘導をもたらす。RAWレポーター細胞を、I:

50

Y . エンテロコリチカ HOPEMT、又は pBadMyChisA 由来プラスミド上に I I : Y o p E _{1 - 1 3 8} - ヒト R I G 1 C A R D ドメイン _{1 - 2 4 5}、 I I I : Y o p E _{1 - 1 3 8} - マウス R I G 1 C A R D ドメイン _{1 - 2 4 6}、 I V : Y o p E _{1 - 1 3 8} - マウス R I G 1 C A R D ドメイン _{1 - 2 2 9}、 V : Y o p E _{1 - 1 3 8} - マウス R I G 1 C A R D ドメイン _{1 - 2 1 8} をコードしている Y . エンテロコリチカ HOPEMT に感染させた。細胞に加えた細菌 (V I : 感染多重度として示す) の滴定を各株について行い、多量体 I S R E により増強された I F N 誘導性 I S G 5 4 プロモーターを含む I - I S G 5 4 プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性 (V I I : O D 6 5 0) に基づいて、 I F N 刺激を評価した。

【図 2 9】細菌 T 3 S S を介した I 型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達 - M D A 5 経路の図である。マウス M D A 5 の送達は、 B 1 6 F 1 0 I F N - レポーター細胞株において I 型 I F N 誘導をもたらす。 B 1 6 F 1 0 レポーター細胞を、 I : Y . エンテロコリチカ HOPEMT、又は pBadMyChisA 由来プラスミド上に I I : Y o p E _{1 - 1 3 8} - マウス M D A 5 _{1 - 2 9 4}、 I I I : Y o p E _{1 - 1 3 8} - マウス M D A 5 _{1 - 2 3 1} をコードしている Y . エンテロコリチカ HOPEMT に感染させた。細胞に加えた細菌 (I V : 感染多重度として示す) の滴定を各株について行い、多量体 I S R E により増強された I F N 誘導性 I S G 5 4 プロモーターを含む I - I S G 5 4 プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性 (V : O D 6 5 0) に基づいて、 I F N 刺激を評価した。

【図 3 0】細菌 T 3 S S を介した I 型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達 - M A V S の図である。 M A V S C A R D の送達は、 B 1 6 F 1 0 I F N - レポーター細胞株において I 型 I F N 誘導をもたらす。 B 1 6 F 1 0 レポーター細胞を、 I : Y . エンテロコリチカ HOPEMT、又は pBadMyChisA 由来プラスミド上に I I : Y o p E _{1 - 1 3 8} - マウス R I G 1 C A R D ドメイン _{1 - 2 4 6}、 I I I : Y o p E _{1 - 1 3 8} - ヒト c G A S _{1 6 1 - 5 2 2}、 I V : Y o p E _{1 - 1 3 8} - ヒト M A V S C A R D _{1 - 1 0 0} をコードしている Y . エンテロコリチカ HOPEMT に感染させた。細胞に加えた細菌 (V : 感染多重度として示す) の滴定を各株について行い、多量体 I S R E により増強された I F N 誘導性 I S G 5 4 プロモーターを含む I - I S G 5 4 プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性 (V I : O D 6 5 0) に基づいて、 I F N 刺激を評価した。

【図 3 1】細菌 T 3 S S を介した I 型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達 - M A V S の図である。 M A V S C A R D の送達は、 R A W マクロファージ I F N - レポーター細胞株において I 型 I F N 誘導をもたらす。 R A W マクロファージレポーター細胞を、 I : Y . エンテロコリチカ HOPEMT、又は pBadMyChisA 由来プラスミド上に I I : Y o p E _{1 - 1 3 8} - マウス R I G 1 C A R D ドメイン _{1 - 2 4 6}、 I I I : Y o p E _{1 - 1 3 8} - ヒト c G A S _{1 6 1 - 5 2 2}、 I V : Y o p E _{1 - 1 3 8} - ヒト M A V S C A R D _{1 - 1 0 0} をコードしている Y . エンテロコリチカ HOPEMT に感染させた。細胞に加えた細菌 (V : 感染多重度として示す) の滴定を各株について行い、多量体 I S R E により増強された I F N 誘導性 I S G 5 4 プロモーターを含む I - I S G 5 4 プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性 (V I : O D 6 5 0) に基づいて、 I F N 刺激を評価した。

【図 3 2】細菌 T 3 S S を介した I 型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達 - S T I N G 経路の図である。サイクリックジヌクレオチド生成酵素の送達は、 B 1 6 F 1 0 I F N - レポーター細胞株において I 型 I F N 誘導をもたらす。 B 1 6 F 1 0 レポーター細胞を、 I : Y . エンテロコリチカ HOPEMT、又は pBadMyChisA 由来プラスミド上に I I : Y o p E _{1 - 1 3 8} - イソギンチャク c G A S、 I I I : Y o p E _{1 - 1 3 8} - イソギンチャク c G A S _{6 0 - 4 2 2}、 I V : Y o p E _{1 - 1 3 8} - ヒト c G A S _{1 6 1 - 5 2 2}、 V : Y o p E _{1 - 1 3 8} - リステリア属 (L i s t e r i a) C d a A _{1 0 1 - 2 7 3}、 V I : Y o p E _{1 - 1 3 8} - コレラ菌 D n c V、 V I I : Y o p E _{1 - 1 3 8} - セレウス菌 D i s A 様タンパク質をコードしている Y . エンテロコリチ

10

20

30

40

50

力 HOPEMTに感染させた。細胞に加えた細菌(VIII:感染多重度として示す)の滴度を各株について行い、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性(IX:OD650)に基づいて、IFN刺激を評価した。

【図33】細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達-STING経路の図である。サイクリックジヌクレオチド生成酵素の送達は、RAWマクロファージIFN-レポーター細胞株においてI型IFN誘導をもたらす。RAWマクロファージレポーター細胞を、I:Y.エンテロコリチカ HOPEMT、又はpBadMycHisA由来プラスミド上にII:YopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGAS、III:YopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGAS₆₀₋₄₂₂、IV:YopE₁₋₁₃₈-ヒトcGAS₁₆₁₋₅₂₂、V:YopE₁₋₁₃₈-リステリア属CdaA₁₀₁₋₂₇₃、VI:YopE₁₋₁₃₈-コレラ菌DncV、VII:YopE₁₋₁₃₈-セレウス菌DisA様タンパク質をコードしているY.エンテロコリチカ HOPEMTに感染させた。細胞に加えた細菌(VIII:感染多重度として示す)の滴度を各株について行い、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性(IX:OD650)に基づいて、IFN刺激を評価した。

10

【図34】細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達及びSTINGの小分子アゴニストとの比較の図である。サイクリックジヌクレオチド生成酵素の送達は、B16F10 IFN-レポーター細胞株においてI型IFN誘導をもたらす。B16F10レポーター細胞を、I:Y.エンテロコリチカ HOPEMT、又はpBadMycHisA由来プラスミド上にII:YopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGAS、III:YopE₁₋₁₃₈-ヒトcGAS₁₆₁₋₅₂₂、IV:YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₁₈をコードしているY.エンテロコリチカ HOPEMTに感染させた。細胞に加えた細菌(V:感染多重度として示す)の滴度を行い、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性(VI:OD650)に基づいて、IFN刺激を評価した。

20

【図35】細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達及びSTINGの小分子アゴニストとの比較の図である。サイクリックジヌクレオチドの送達は、B16F10 IFN-レポーター細胞株においてI型IFN誘導をもたらす。小分子STINGアゴニスト2'3'-c-ジAM(PS)₂(Rp,Rp)で処理したB16F10レポーター細胞。化合物(I:マイクロモルとして示す)の滴度を行い、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性(II:OD650)に基づいて、IFN刺激を評価した。

30

【図36】細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達及びSTINGの小分子アゴニストとの比較の図である。サイクリックジヌクレオチド生成酵素の送達は、RAW IFN-レポーター細胞株においてI型IFN誘導をもたらす。RAWレポーター細胞を、I:Y.エンテロコリチカ HOPEMT、又はpBadMycHisA由来プラスミド上にII:YopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGAS、III:YopE₁₋₁₃₈-ヒトcGAS₁₆₁₋₅₂₂、IV:YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₁₈)をコードしているY.エンテロコリチカ HOPEMTに感染させた。細胞に加えた細菌(V:感染多重度として示す)の滴度を行い、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性(VI:OD650)に基づいて、IFN刺激を評価した。

40

【図37】細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達及びSTINGの小分子アゴニストとの比較の図である。サイクリックジヌクレオチドの送達は、RAW IFN-レポーター細胞株においてI型IFN誘導をもたらす。RAWレポ-

50

ター細胞を、小分子STINGアゴニスト2'3'-c-ジAM(PS)2(Rp, Rp)で処理した。化合物(I:マイクロモルとして示す)の滴定を行い、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性(II:OD650)に基づいて、IFN刺激を評価した。

【図38】細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達及びT3SS依存性の証明-RIG1及びMAVSの図である。YopE₁₋₁₃₈と融合したRIG1 CARDドメイン又はMAVS CARDドメインの送達は、RAW IFNレポーター細胞株におけるI型IFN誘導をもたらし、これは、厳格にT3SS依存性である。RAWレポーター細胞を、I:Y.エンテロコリチカ HOPEMT、又はII:Y.エンテロコリチカ HOPEMT-yopB、又はpBadMycHisA由来プラスミド上にIII:YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆、V:YopE₁₋₁₃₈-ヒトMAVS CARD₁₋₁₀₀をコードしているY.エンテロコリチカ HOPEMT、又はpBadMycHisA由来プラスミド上にIV:YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆、VI:YopE₁₋₁₃₈-ヒトMAVS CARDs₁₋₁₀₀をコードしているY.エンテロコリチカ HOPEMT-yopBに感染させた。細胞に加えた細菌(VII:感染多重度として示す)の滴定を各株について行い、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型Luciferalシフェラーゼの活性(VIII:OD650)に基づいて、IFN刺激を評価した。

10

20

【図39】腫瘍単離物からの粗細胞混合物における細菌T3SSを介したI型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達-RIG1の図である。YopE₁₋₁₃₈と融合したRIG1 CARDドメインの送達は、粗腫瘍単離物においてI型IFN誘導をもたらす。EMT6乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスを、腫瘍が>200mm³の体積に達したときに屠殺した。腫瘍をすりつぶし、消化し、24ウェルプレートに単一細胞懸濁液として播種した。2つの異なる腫瘍からのそのような細胞を、I及びII:Y.エンテロコリチカ HOPEMT、又はI及びIV:pBadMycHisA由来プラスミド上にYopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆をコードしているY.エンテロコリチカ HOPEMTに感染させた。細胞に加えた細菌(V:感染多重度として示す)の滴定を各株について行い、インターフェロンベータ(VI:ピコグラム/ミリリットル)を用いるELISAを使用してIFN刺激を評価した。破線は、未治療の対応する腫瘍を示したものであり、I/I及びII/IVは、各々、同じ腫瘍に由来する細胞である。

30

【図40】EMT6乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスにおける腫瘍進行の図である。EMT6乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスに、腫瘍が60-130mm³のサイズに達したら、PBSを静脈内注射した。PBSの初回腫瘍内注射の日を0日目と定義し、d0、d1、d5、d6、d10及びd11に治療を行った。その後数日(I:細菌の初回注射後-11日目から80日目まで)にわたって腫瘍体積をノギスで測定した。mm³としての相対腫瘍体積(d0における腫瘍体積で割った対応する日における腫瘍体積)が、各マウスについて、log₂変換して示されている(II)。

40

【図41】EMT6乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスにおける腫瘍進行の図である。EMT6乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスに、腫瘍が60-130mm³のサイズに達したら、7.5×10⁷ Y.エンテロコリチカdHOPEMTを腫瘍内注射した。細菌の初回腫瘍内注射の日を0日目と定義し、d0、d1、d5、d6、d10及びd11に治療を行った。その後数日(I:細菌の初回注射後-11日目から80日目まで)にわたって腫瘍体積をノギスで測定した。mm³としての相対腫瘍体積(d0における腫瘍体積で割った対応する日における腫瘍体積)が、各マウスについて、log₂変換して示されている(II)。

50

【図42】EMT6乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスにおける腫瘍進行の図である。EMT6乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスに、腫瘍が60-130mm³のサイズに達したら、pBadMycHisA由来プラスミド上にYopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1CARDドメイン₁₋₂₄₆をコードする 7.5×10^7 のY.エンテロコリチカdHOPEMTを腫瘍内注射した。細菌の初回腫瘍内注射の日を0日目と定義し、d0、d1、d5、d6、d10及びd11に治療を行った。その後数日(I:細菌の初回注射後-11日目から80日目まで)にわたって腫瘍体積をノギスで測定した。mm³としての相対腫瘍体積(d0における腫瘍体積で割った対応する日における腫瘍体積)が、各マウスについて、log-2変換して示されている(II)。

10

【図43】EMT6乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスにおける腫瘍進行の図である。EMT6乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスに、腫瘍が60-130mm³のサイズに達したら、pBadMycHisA由来プラスミド上にYopE₁₋₁₃₈-ヒトcGAS₁₆₁₋₅₂₂をコードする 7.5×10^7 のY.エンテロコリチカdHOPEMTを腫瘍内注射した。細菌の初回腫瘍内注射の日を0日目と定義し、d0、d1、d5、d6、d10及びd11に治療を行った。その後数日(I:細菌の初回注射後-11日目から80日目まで)にわたって腫瘍体積をノギスで測定した。mm³としての相対腫瘍体積(d0における腫瘍体積で割った対応する日における腫瘍体積)が、各マウスについて、log-2変換して示されている(II)。

【図44】初回完全寛解後にEMT6乳がん細胞を対側の皮下に再投与した野生型Balb/Cマウスにおける腫瘍進行の図である。EMT6乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスに、腫瘍が60-130mm³のサイズに達したら、 7.5×10^7 のII:pBadMycHisA由来プラスミド上にYopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1CARDドメイン₁₋₂₄₆をコードしているY.エンテロコリチカdHOPEMT、III:pBadMycHisA由来プラスミド上にYopE₁₋₁₃₈-ヒトcGAS₁₆₁₋₅₂₂をコードしているY.エンテロコリチカdHOPEMTで、上記(図40-43)の通り腫瘍内治療した。細菌の腫瘍内注射の日を0日目と定義した。完全に腫瘍が退縮したマウス(又はI:コントロールとしてナイーブマウス)の対側側腹部の皮下にEMT6乳がん細胞を同種移植した。その後数日(IV:細菌の初回注射後80日目まで)にわたって腫瘍体積をノギスで測定した。絶対腫瘍体積が各マウスについてmm³として示されている(V)。

20

30

【図45】EMT6乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスにおける腫瘍進行の図である。EMT6乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスに、腫瘍が80~250mm³のサイズに達したら、I:PBS、又は 5×10^6 のII:Y.エンテロコリチカdHOPEMT、III:Y.エンテロコリチカdHOPEMT pYV-YopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂、IV:Y.エンテロコリチカdHOPEMT HairpinI-VirF pYV-YopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂、V:Y.エンテロコリチカdHOPEMT HairpinI-VirF asd pYV-asd-YopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂を静脈内注射した。細菌の静脈内注射の日を0日目と定義し、全てのマウスをd-1にデスフェラルで腹腔内治療した。その後数日(VI:細菌の初回注射後0日目から15日目まで)にわたって腫瘍体積をノギスで測定した。腫瘍体積中央値がmm³として示されている(VII)。

40

【図46】B16F10メラノーマ細胞を皮下に同種移植した野生型C57BL/6マウスにおける腫瘍進行の図である。B16F10メラノーマ細胞を皮下に同種移植した野生型C57BL/6マウスに、腫瘍が60-130mm³のサイズに達したら、I:PBS、又は 7.5×10^7 のII:Y.エンテロコリチカdHOPEMT、III:pBadMycHisA由来プラスミド上にYopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1CARDドメイン₁₋₂₄₆をコードしているY.エンテロコリチカdHOPEMT、IV:pBadMycHisA由来プラスミド上にYopE₁₋₁₃₈-ヒトcGAS₁₆₁₋₅₂₂

50

2 をコードしている Y . エンテロコリチカ d H O P E M T を腫瘍内注射した。細菌の初回腫瘍内注射の日を 0 日目と定義し、d 0、d 1、d 2、d 3、d 6 及び d 9 に治療を行った。その後数日 (V : 日) にわたって腫瘍体積をノギスで測定した。腫瘍体積平均値が mm^3 として示されている (V I)。

【図 4 7】B 1 6 F 1 0 メラノーママウス同種移植モデルにおける Y . エンテロコリチカ垂種パレアーケチカの生体内分布：身体的外見についてのスコア付けの図である。I : 日、I I : スコアを有するマウスの分率、I I I : Y . エンテロコリチカ M R S 4 0 w t、I V : Y . エンテロコリチカ y o p H、O、P、E、M、T。矢印は、細菌 2×10^5 個の静脈内注射の日を示す。

【図 4 8】B 1 6 F 1 0 メラノーママウス同種移植モデルにおける Y . エンテロコリチカ垂種パレアーケチカの生体内分布：行動についてのスコア付けの図である。I : 日、I I : スコアを有するマウスの分率、I I I : Y . エンテロコリチカ M R S 4 0 w t、I V : Y . エンテロコリチカ y o p H、O、P、E、M、T。矢印は、細菌 2×10^5 個による静脈内感染の日を示す。

【図 4 9】B 1 6 F 1 0 メラノーママウス同種移植モデルにおける Y . エンテロコリチカ垂種パレアーケチカの生体内分布：マウスの体重の図である。マウスの体重を細菌による静脈内感染後に毎日評価した。I : 日、I I : グラムでの体重、I I I : Y . エンテロコリチカ M R S 4 0 w t、I V : Y . エンテロコリチカ y o p H、O、P、E、M、T。矢印は、細菌 2×10^5 個による静脈内感染の日を示す。

【図 5 0】B 1 6 F 1 0 メラノーママウス同種移植モデルにおける Y . エンテロコリチカ垂種パレアーケチカの生体内分布：Y . エンテロコリチカ y o p H、O、P、E、M、T の生体内分布の図である。示されている時点での臓器内の数を、臓器のホモジナイズ、段階希釈、及び結果として得られるコロニー形成単位 (C F U) の計数により評価した。細菌の静脈内注射の日を 0 日目と定義し、全てのマウスを d - 1 にデスフェラールで腹腔内治療した。I : Y . エンテロコリチカ H O P E M T、I I : 組織 1 グラム又は血液 1 m l 当りの C F U、I I I : 1 日目、I V : 4 日目、V : 血液、V I : 脾臓、V I I : 肝臓、V I I I : 肺、I X : 腫瘍。* は、目に見える腫瘍がないマウスを示す。

【図 5 1】B 1 6 F 1 0 メラノーママウス同種移植モデルにおける Y . エンテロコリチカ垂種パレアーケチカの生体内分布：Y . エンテロコリチカ M R S 4 0 w t の生体内分布の図である。示されている時点での臓器内の数を、臓器のホモジナイズ、段階希釈、及び結果として得られるコロニー形成単位 (C F U) の計数により評価した。細菌の静脈内注射の日を 0 日目と定義し、全てのマウスを d - 1 にデスフェラールで腹腔内治療した。I : Y . エンテロコリチカ M R S 4 0 w t、I I : 組織 1 グラム又は血液 1 m l 当りの C F U、I I I : 1 日目、I V : 4 日目、V : 血液、V I : 脾臓、V I I : 肝臓；V I I I : 肺；I X : 腫瘍。

【図 5 2】細菌 T 3 S S を介した I 型インターフェロン応答誘導タンパク質の送達 - 内在性 M A V S とは無関係の細菌 T 3 S S 送達 M A V S の働きの図である。M A V S C A R D の T 3 S S を介した送達は、M A V S ^{K O} R A W マクロファージ I F N - レポーター (ルシフェラーゼ) 細胞株において I 型 I F N 誘導をもたらす。M A V S ^{K O} R A W マクロファージレポーター細胞を、I : Y . エンテロコリチカ H O P E M T、又は I I : Y . エンテロコリチカ H O P E M T - y o p B、I I I : p B a d M y c H i s A 由来プラスミド上に Y o p E ₁₋₁₃₈ - ヒト M A V S C A R D ₁₋₁₀₀ をコードしている Y . エンテロコリチカ H O P E M T、又は I V : p B a d M y c H i s A 由来プラスミド上に Y o p E ₁₋₁₃₈ - ヒト M A V S C A R D ₁₋₁₀₀ をコードしている Y . エンテロコリチカ H O P E M T - y o p B に感染させた。細胞に加えた細菌 (V : 感染多重度として示す) の滴定を各株について行い、多量体 I S R E により増強された I F N 誘導性 I S G 5 4 プロモーターを含む I - I S G 5 4 プロモーターの調節下にあるルシフェラーゼの活性 (V I : R L U - 相対発光単位) に基づいて、I F N 刺激を評価した。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【 0 0 2 4 】

本発明は、組換え弱毒化グラム陰性菌株及び対象のがん、例えば、悪性固形腫瘍を治療する方法におけるその使用に関する。

【 0 0 2 5 】

本明細書を解釈するために、以下の定義が適用されることになり、適切な場合はいつでも、単数形で用いられる用語は複数系も含むことになり、また逆に複数形で使用される用語は単数形も含むことになる。本明細書において使用する用語法が特定の実施態様の説明を目的にしたものに過ぎず、限定を意図したものでないことは、理解されるはずである。

【 0 0 2 6 】

「グラム陰性菌株」という用語は、本明細書で使用される場合、次々の細菌を含む：エ
 10
 口モナス・サルモニダ (*Aeromonas salmonicida*)、エ口モナス
 ・ヒドロフィラ (*Aeromonas hydrophila*)、エ口モナス・ベロニ (*Aeromonas veronii*)、アナエロミクソバクター・デハロゲナンス (*Anaeromyxobacter dehalogenans*)、気管支敗血症菌 (*Bordetella bronchiseptica*)、パラ百日咳菌 (*Bordetella parapertussis*)、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)、ブラディリゾビウム・ジャポニクム (*Bradyrhizobium japonicum*)、バークホルデリア・セノセパシア (*Burkholderia cenocepacia*)、バークホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*)、鼻疽菌 (*Burkholderia mallei*)、類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、クラミジア・ムリダラム (*Chlamydia muridarum*)、トラコーマクラミジア (*Chlamydia trachomatis*)、クラミドフィラ・アボルトゥス (*Chlamydophila abortus*)、肺炎クラミジア (*Chlamydophila pneumoniae*)、クロモバクテリウム・ビオラセウム (*Chromobacterium violaceum*)、シトロバクター・ローデンチウム (*Citrobacter rodentium*)、デスルホビブリオ・ブルガリス (*Desulfovibrio vulgaris*)、エドワージエラ・タルダ (*Edwardsiella tarda*)、エンドゾイ
 20
 コモナス・エリシコラ (*Endozoicomonas elysicola*)、火傷病
 菌 (*Erwinia amylovora*)、エシェリキア・アルベルティイ (*Escherichia albertii*)、大腸菌、ローソニア・イントラセルラリス (*Lawsonia intracellularis*)、メソリゾビウム・ロティ (*Mesorhizobium loti*)、ミクソコッカス・キサントゥス (*Myxococcus xanthus*)、パントエア・アグロメランズ (*Pantoea agglomerans*)、フォトバクテリウム・ダムセラエ (*Photobacterium damsela*)、フォトラブダス・ルミネッセンス (*Photorhabdus luminescens*)、フォトラブダス・テムペラタ (*Photorhabdus temperate*)、シュードアルテロモナス・スポンギアエ (*Pseudoalteromonas spongiae*)、緑膿菌、シュードモナス・プレコグロシシダ (*Pseudomonas plecoglossicida*)、シュードモナス・シリंगाエ (*Pseudomonas syringae*)、青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*)、根粒菌属種 (*Rhizobium sp*)、サルモネラ菌及び他のサルモ
 30
 ネラ属種 (*Salmonella sp*)、フレクスナー赤痢菌 (*Shigella flexneri*) 及び他のシゲラ属種 (*Shigella sp*)、ソーダリス・グロス
 シニディウス (*Sodalis glossinidius*)、ビブリオ・アルギノリチ
 カス (*Vibrio alginolyticus*)、ビブリオ・アズレウス (*Vibrio azureus*)、ビブリオ・キャンペリイ (*Vibrio campbellii*)、ビブリオ・カルペンティクス (*Vibrio caribbenthicus*)、
 40
 ビブリオ・ハーベイ (*Vibrio harvey*)、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*)、ビブリオ・タスマニエンシス (*Vibrio ta*
 50

smaniensis)、ビブリオ・ツビアシイ(Vibrio tubiashii)、キサントモナス・アキソノポディス(Xanthomonas axonopodis)、キサントモナス・キャンペストリス(Xanthomonas campestris)、イネ白葉枯病菌(Xanthomonas oryzae)、エルシニア・エンテロコリティカ(Yersinia enterocolitica)、ペスト菌(Yersinia pestis)、偽結核菌(Yersinia pseudotuberculosis)。本発明の好ましいグラム陰性菌株は、腸内細菌科(Enterobacteriaceae)及びシュードモナス科(Pseudomonadaceae)に含まれるグラム陰性菌株である。本発明のグラム陰性菌株は、インビトロ及び/又はインビボ、好ましくはインビボでの、細菌T3SSによる異種タンパク質の真核細胞への送達に通常は使用される。

10

【0027】

「組換え弱毒化グラム陰性菌株」という用語は、本明細書で使用される場合、ベクターのようなヌクレオチド分子で遺伝的に形質転換された組換え弱毒化グラム陰性菌株を意味する。そのような組換えグラム陰性菌株の毒性は、分泌系機構の一部である、一又は複数の細菌タンパク質により輸送される毒性活性を有する細菌エフェクタータンパク質の欠失により通常は減弱される。そのようなエフェクタータンパク質は、分泌系機構により宿主細胞内に送達され、そこでそれらは様々な宿主タンパク質及び細胞機構に対してそれらの毒性活性を発揮する。多くの異なるエフェクタータンパク質は、公知であり、様々な分泌系型により輸送され、宿主調節分子の機能を調節する生化学的活性の幅広いレパートリーを示している。本明細書で使用される組換えグラム陰性菌株の毒性は、グラム陰性菌株がシデロホアを産生しない、例えば、シデロホアの産生が不十分であるために、グラム陰性菌株により通常は生産される又は生産されることもあるシデロホアを欠いていることによつて、さらに減弱され得る。したがって、好ましい実施態様では、グラム陰性菌株がシデロホアを産生しない、グラム陰性菌株がシデロホアを産生しない、例えば、シデロホアの産生が不十分であるために、グラム陰性菌株により通常は生産される又は生産されることもあるシデロホアを欠いているグラム陰性菌株が使用され、より好ましくは、グラム陰性菌株がシデロホアを産生しない、例えば、シデロホアの産生が不十分である、特にエルシニアバクチンの産生が不十分であるために、グラム陰性菌株により通常は生産される又は生産されることもあるシデロホアを欠いているエルシニア属株、特に、Y.エンテロコリ

ティカMRS40 yopH、O、P、E、M、T; Y.エンテロコリティカMRS40 yopH、O、P、E、M、T HairpinI-virF; 又はY.エンテロコリティカMRS40 yopH、O、P、E、M、T asd pYV-asdが、使用される。エルシニアバクチンの産生が不十分であるY.エンテロコリティカMRS40 yopH、O、P、E、M、Tは、WO02077249に記載されており、特許手続きを目的とした微生物寄託の国際承認に関するブダペスト条約に従つて、Belgian Coordinated Collections of Microorganisms(BCCM)に2001年9月24日に寄託され、寄託番号LMG P-21013を与えられた。組換え弱毒化グラム陰性菌株は、好ましくは、少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つのシデロホアを産生せず、例えば、少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つのシデロホアの産生が不十分であり、より好ましくは、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、何れのシデロホアも産生しない。

20

30

40

【0028】

本明細書において同義で使用される「シデロホア」、「鉄シデロホア」又は「鉄キレート剤」という用語は、鉄に対して高い親和性を有する化合物、例えば、鉄に対して高い親和性を有する小分子化合物を意味する。

【0029】

グラム陰性菌のシデロホアは、例えば、サルモネラ属、大腸菌属(Escherichia)、クレブシエラ属(Klebsiella)、シゲラ属、セラチア属(Serratia)による合成される(しかし全て腸内細菌により使用される)エンテロバクチン及

50

びジヒドロキシベンゾイルセリン、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) により合成されるピオベルジン、ビブリオ属 (*Vibrio*) により合成されるビブリオバクチン、アシネトバクター属 (*Acinetobacter*) によるアシネトバクチン及びアシネトフェリン、エルシニア属 (*Yersinia*) により合成されるエルシニアバクチン及びエアロバクチン、バークホルデリア属 (*Burkholderia*) により合成されるオルニバクチン、サルモネラ属により合成されるサルモケリン、大腸菌属、シゲラ属、サルモネラ属、及びエルシニア属により合成されるエアロバクチン、ボルデテラ属 (*Bordetella*) により合成されるアルカリジン、ビブリオ属により合成されるビスカペリンである。

【0030】

シデロホアは、ヒドロキサム酸塩、カテコール酸塩及び混合配位子シデロホアを含む。いくつかのシデロホアは、これまでに、主として鉄過剰負荷の治療を目的として、ヒトでの使用に認可されている。好ましいシデロホアは、デフェロキサミン (デスフェリオキサミンB、デスフェロキサミンB、DFO-B、DFOA、DFB又はデスフェラルとしても公知)、デスフェリオキサミンE、デフェラシロクス (エクジェイド、デシロクス、デフリジェット、デシファー) 及びデフェリプロン (フェリプロックス) である。

【0031】

本明細書で使用される「増殖に必須の内在性タンパク質」という用語は、組換え弱毒化グラム陰性菌株のタンパク質を意味し、これなしではグラム陰性菌株は増殖することができない。増殖に必須の内在性タンパク質は、例えば、アミノ酸産生に必須の酵素、ペプチドグリカン生合成に関与する酵素、LPS生合成に関与する酵素、ヌクレオチド生合成に関与する酵素、又は翻訳開始因子である。

【0032】

本明細書で使用される「アミノ酸産生に必須の酵素」は、組換え弱毒化グラム陰性菌株のアミノ酸産生に関係する酵素を意味し、これなしではグラム陰性菌株は増殖することができない。アミノ酸産生に必須の酵素は、例えば、アスパラギン酸 - ベータ - セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (*asd*)、グルタミンシンテターゼ (*glnA*)、トリプトファンニル tRNA シンテターゼ (*trpS*) 若しくはセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (*glyA*)、又はトランスケトラーゼ 1 (*tktA*)、トランスケトラーゼ 2 (*tktB*)、リブロースリン酸 3 - エピメラーゼ (*rpe*)、リブロース - 5 - リン酸イソメラーゼ A (*rpiA*)、トランスアルドラーゼ A (*talA*)、トランスアルドラーゼ B (*talB*)、ホスホリボシルピロリン酸シンターゼ (*prs*)、ATPホスホリボシルトランスフェラーゼ (*hisG*)、ヒスチジン生合成二機能性タンパク質 *HisIE* (*hisI*)、1 - (5 - ホスホリボシル) - 5 - [(5 - ホスホリボシルアミノ)メチリデンアミノ]イミダゾール - 4 - カルボキサミドイソメラーゼ (*hisA*)、イミダゾールグリセロールリン酸シンターゼサブユニット *HisH* (*hisH*)、イミダゾールグリセロールリン酸シンターゼサブユニット *HisF* (*hisF*)、ヒスチジン生合成二機能性タンパク質 *HisB* (*hisB*)、ヒスチジノールリン酸アミノトランスフェラーゼ (*hisC*)、ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ (*hisD*)、3 - デヒドロキナ酸シンターゼ (*aroB*)、3 - デヒドロキナ酸デヒドラターゼ (*aroD*)、シキミ酸デヒドロゲナーゼ (*NADP(+)*) (*aroE*)、シキミ酸キナーゼ 2 (*aroL*)、シキミ酸キナーゼ 1 (*aroK*)、3 - ホスホシキミ酸 1 - カルボキシビニルトランスフェラーゼ (*aroA*)、コリスミ酸シンターゼ (*aroC*)、Pタンパク質 (*pheA*)、Tタンパク質 (*tyrA*)、芳香族アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (*tyrB*)、ホスホ - 2 - デヒドロ - 3 - デオキシヘプトン酸アルドラーゼ (*aroG*)、ホスホ - 2 - デヒドロ - 3 - デオキシヘプトン酸アルドラーゼ (*aroH*)、ホスホ - 2 - デヒドロ - 3 - デオキシヘプトン酸アルドラーゼ (*aroF*)、キナ酸/シキミ酸デヒドロゲナーゼ (*ydiB*)、ATP依存性 6 - ホスホフルクトキナーゼアイソザイム 1 (*pfkA*)、ATP依存性 6 - ホスホフルクトキナーゼアイソザイム 2 (*pfkB*)、フルクトース二リン酸アルドラーゼクラス 2 (*fbxA*)、フルクトース二リン酸アルドラーゼクラス 1 (*fbA*

10

20

30

40

50

B)、トリオースリン酸イソメラーゼ (t p i A)、ピルビン酸キナーゼ (p y k F)、
 ピルビン酸キナーゼ I I (p y k A)、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナー
 ゼ A (g a p A)、ホスホグリセリン酸キナーゼ (p g k)、2, 3 - ビスホスホグリセ
 リン酸依存性ホスホグリセリン酸ムターゼ (g p m A)、2, 3 - ビスホスホグリセリン
 非酸依存性ホスホグリセリン酸ムターゼ (g p m M / y i b O)、高可能性ホスホグリセ
 リン酸ムターゼ (y t j C / g p m B)、エノラーゼ (e n o)、D - 3 - ホスホグリセ
 リン酸デヒドロゲナーゼ (s e r A)、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ (s e r
 C)、ホスホセリンホスファターゼ (s e r B)、L - セリンデヒドラターゼ 1 (s d a
 A)、L - セリンデヒドラターゼ 2 (s d a B)、L - スレオニンデヒドラターゼ・異化
 作用性 (t d c B)、L - スレオニンデヒドラターゼ・生合成性 (i l v A)、L - セリン
 デヒドラターゼ (t d c G)、セリンアセチルトランスフェラーゼ (c y s E)、シス
 テインシクターゼ A (c y s K)、システインシクターゼ B (c y s M)、ベータ - シス
 タチオナーゼ (m a l Y)、シスタチオニンベータ - リアーゼ (m e t C)、5 - メチル
 テトラヒドロプテロイルトリグルタミン酸 - ホモシステインメチルトランスフェラーゼ (m e t E)、
 メチオニンシクターゼ (m e t H)、S - アデノシルメチオニンシクターゼ (m e t K)、シスタチオニンガンマ - シクターゼ (m e t B)、ホモセリン O - スクシ
 ニルトランスフェラーゼ (m e t A)、5' - メチルチオアデノシン / S - アデノシルホ
 モシステインヌクレオシダーゼ (m t n N)、S - リボシルホモシステインリアーゼ (l u x S)、シスタチオンベータリアーゼ、シスタチオンガンマリアーゼ、セリンヒドロキ
 シメチルトランスフェラーゼ (g l y A)、グリシンヒドロキシメチルトランスフェラー
 ゼ (i t a E)、3 - イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼ小サブユニット (l e u D)
 、3 - イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼ大サブユニット (l e u C)、3 - イソプロ
 ピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (l e u B)、L - スレオニンデヒドラターゼ・生合成性
 (i l v A)、アセト乳酸シクターゼアイソザイム 3 大サブユニット (i l v I)、アセ
 ト乳酸シクターゼアイソザイム 3 小サブユニット (i l v H)、アセト乳酸シクターゼア
 イソザイム 1 小サブユニット (i l v N)、アセト乳酸シクターゼアイソザイム 2 小サブ
 ユニット (i l v M)、ケトール酸レダクトイソメラーゼ (N A D P (+)) (i l v C)、
 ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ (i l v D)、分岐鎖アミノ酸アミノトランスフェラ
 ーゼ (i l v E)、二機能性アスパルトキナーゼ / ホモセリンデヒドロゲナーゼ 1 (t h r A)、
 二機能性アスパルトキナーゼ / ホモセリンデヒドロゲナーゼ 2 (m e t L)、2
 - イソプロピルリンゴ酸シクターゼ (l e u A)、グルタミン酸 - ピルビン酸アミノトラ
 ンスフェラーゼ (a l a A)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (a s p C)、
 二機能性アスパルトキナーゼ / ホモセリンデヒドロゲナーゼ 1 (t h r A)、二機能性ア
 スパルトキナーゼ / ホモセリンデヒドロゲナーゼ 2 (m e t L)、リジン感受性アスパル
 トキナーゼ 3 (l y s C)、アスパラギン酸 - セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (a s d)、
 2 - ケト - 3 - デオキシ - ガラクトン酸アルドラーゼ (y a g E)、4 - ヒドロキシ
 - テトラヒドロジピコリン酸シクターゼ (d a p A)、4 - ヒドロキシ - テトラヒドロジ
 ピコリン酸レダクターゼ (d a p B)、2, 3, 4, 5 - テトラヒドロピリジン - 2, 6
 - ジカルボン酸 N - スクシニルトランスフェラーゼ (d a p D)、スクシニル - ジアミノ
 ピメリン酸デスクシニラーゼ (d a p E)、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ (d a p F)
)、推定的リアーゼ (y j h H)、アセチルオルニチン / スクシニルジアミノピメリン酸
 アミノトランスフェラーゼ (a r g D)、クエン酸シクターゼ (g l t A)、アコニット
 酸ヒドラターゼ B (a c n B)、アコニット酸ヒドラターゼ A (a c n A)、特徴づけら
 れていない推定的アコニット酸ヒドラターゼ (y b h J)、イソクエン酸デヒドロゲナー
 ゼ (i c d)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (a s p C)、グルタミン酸 -
 ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ (a l a A)、グルタミン酸シクターゼ [N A D P
 H] 長鎖 (g l t B)、グルタミン酸シクターゼ [N A D P H] 短鎖 (g l t D)、グル
 タミンシクターゼ (g l n A)、アミノ酸アセチルトランスフェラーゼ (a r g A)、
 アセチルグルタミン酸キナーゼ (a r g B)、N - アセチル - ガンマ - グルタミル - リン
 酸レダクターゼ (a r g C)、アセチルオルニチン / スクシニルジアミノピメリン酸アミ

10

20

30

40

50

ノトランスフェラーゼ (argD)、アセチルオルニチンデアセチラーゼ (argE)、
 オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼF鎖 (argF)、オルニチンカルバモイル
 トランスフェラーゼI鎖 (argI)、アルギニノコハク酸シンターゼ (argG)、アル
 ギニノコハク酸リアーゼ (argH)、グルタミン酸5-キナーゼ (proB)、ガン
 マ-グルタミルリン酸レダクターゼ (proA)、ピロリン-5-カルボン酸レダクター
 ゼ (proC)、オルニチンシクロデアミナーゼ、ロイシン-tRNAリガーゼ (leu
 S)、グルタミン-tRNAリガーゼ (glnS)、セリン-tRNAリガーゼ (ser
 S)、グリシン-tRNAリガーゼベータサブユニット (glyS)、グリシン-tRN
 Aリガーゼアルファサブユニット (glyQ)、チロシン-tRNAリガーゼ (tyrS)
)、スレオニン-tRNAリガーゼ (thrS)、フェニルアラニン-tRNAリガーゼ 10
 アルファサブユニット (pheS)、フェニルアラニン-tRNAリガーゼベータサブユ
 ニット (pheT)、アルギニン-tRNAリガーゼ (argS)、ヒスチジン-tRN
 Aリガーゼ (hisS)、バリン-tRNAリガーゼ (valS)、アラニン-tRNA
 リガーゼ (alaS)、イソロイシン-tRNAリガーゼ (ileS)、プロリン-tR
 NAリガーゼ (proS)、システイン-tRNAリガーゼ (cysS)、アスパラギン
 -tRNAリガーゼ (asnS)、アスパラギン酸-tRNAリガーゼ (aspS)、グ
 ルタミン酸-tRNAリガーゼ (gltx)、トリプトファン-tRNAリガーゼ (tr
 pS)、グリシン-tRNAリガーゼベータサブユニット (glyS)、メチオニン-t
 RNAリガーゼ (metG)、リジン-tRNAリガーゼ (lysS)である。アミノ酸
 産生に必須の好ましい酵素は、tktA、rpe、prs、aroK、tyrB、aro 20
 H、fbaA、gapA、pgk、eno、tdcG、cysE、metK、glyA、
 asd、dapA/B/D/E/F、argC、proC、leuS、glnS、ser
 S、glyS/Q、tyrS、thrS、pheS/T、argS、hisS、valS
 、alaS、ileS、proS、cysS、asnS、aspS、gltx、trpS
 、glyS、metG、lysSであり、より好ましいのは、asd、glyA、leu
 S、glnS、serS、glyS/Q、tyrS、thrS、pheS/T、argS
 、hisS、valS、alaS、ileS、proS、cysS、asnS、aspS
 、gltx、trpS、glyS、metG、lysSであり、最も好ましいのは、as
 dである。

【0033】

「増殖に必須のアミノ酸を産生することが不十分なグラム陰性菌株」及び「栄養要求突
 然変異株」という用語は、本明細書では同義で使用され、外から供給される少なくとも1
 つの必須アミノ酸又はその前駆体の非存在下で増殖することができないグラム陰性菌株を
 意味する。株による生産が不十分であるアミノ酸は、例えば、アスパラギン酸塩、メソ-
 2,6-ジアミノピメリン酸、芳香族アミノ酸又はロイシン-アルギニンである。そのよ
 うな株を、例えば、アスパラギン酸-ベータ-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の
 欠失 (asd)により、生じさせることができる。そのような栄養要求突然変異株は、
 外来メソ-2,6-ジアミノピメリン酸の非存在下では増殖することができない。突然変
 異株、例えば、アスパラギン酸-ベータ-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の欠失
 は、本発明の増殖に必須のアミノ酸を産生することが不十分なグラム陰性菌株にとってこ
 こでは好ましい。

【0034】

「真核細胞表面又は細胞外マトリックスと結合する接着タンパク質の生産が不十分なグ
 ラム陰性菌株」という用語は、対応する野生型株により発現される接着タンパク質と比較
 して少なくとも1つの接着タンパク質を発現しない突然変異型グラム陰性菌株を意味する
 。接着タンパク質は、例えば、線毛 (pili) / 線毛 (fimbriae) 又は非線毛
 アドヘシンのような伸長した高分子接着分子を含み得る。線毛アドヘシンは、1型線毛 (例
 えば、FimHアドヘシンを有する大腸菌Fim線毛)、P線毛 (例えば、大腸菌から
 のPgpGアドヘシンを有するPap線毛)、4型線毛 (例えば、緑膿菌からのピリント
 ンパク質) 又はcurlin (サルモネラ菌からのCsgAアドヘシンを有するCsgタン

10

20

30

40

50

パク質)を含む。非線毛アドヘシンは、三量体自己輸送体アドヘシン、例えば、*Y. エンテロコリチカ*からの *YadA*、*BpaA* (類鼻疽菌 (*B. pseudomallei*))、*Hia* (インフルエンザ菌 (*H. influenzae*))、*BadA* (バルトネラ・ヘンセラ菌 (*B. henselae*))、*NadA* (髄膜炎菌 (*N. meningitidis*)) 又は *UspA1* (モラクセラ・カタラーリス (*M. catarrhalis*))、並びに他の自己輸送体アドヘシン、例えば *AIDA-1* (大腸菌)、並びに他のアドヘシン/インベysin、例えば、*Y. エンテロコリチカ*からの *InvA*、又はインチミン (大腸菌)、又は *Dr* ファミリー若しくは *Afa* ファミリーのメンバー (大腸菌) を含む。*YadA* 及び *InvA* という用語は、本明細書で使用される場合、*Y. エンテロコリチカ*からのタンパク質を意味する。自己輸送体 *YadA*⁷ は、フィブロンクチンはもちろんな様々な形態のコラーゲンとも結合し、その一方で、インベysin *InvA*⁸ は、真核細胞膜中の α -インテグリンと結合する。グラム陰性菌株が *Y. エンテロコリチカ* 株である場合、その株には、好ましくは、*InvA* 及び α 又は *YadA* が欠損している。

10

【0035】

本明細書で使用される場合、「腸内細菌科」という用語は、脊椎動物において病原体として出現することが多い、土壌、水、植物及び動物中で見出されるグラム陰性、桿状、通性嫌気性細菌の科を含む。この科の細菌は、類似の生理機能を共有し、それぞれのゲノムの機能性エレメント及び遺伝子内の保存を示す。オキシダーゼ陰性であることはもちろん、この科の全てのメンバーは、グルコース発酵菌であり、大部分が硝酸還元菌である。

【0036】

20

本発明の腸内細菌科細菌は、その科からの何れの細菌であってもよく、具体的には、次の属の細菌を、これらに限定されるものではないが、含む：大腸菌属、シゲラ属、エドワーズエラ属 (*Edwardsiella*)、サルモネラ属、シトロバクター属 (*Citrobacter*)、クレブシエラ属、エンテロバクター属、セラチア属、プロテウス属 (*Proteus*)、エルウィニア属 (*Erwinia*)、モルガネラ属 (*Morganella*)、プロビデンシア属 (*Providencia*)、又はエルシニア属。より具体的な実施態様では、細菌は、大腸菌、エシェリキア・ブラタエ (*Escherichia blattae*)、エシェリキア・ファグソニイ (*Escherichia fergusonii*)、エシェリキア・ハーマンニイ (*Escherichia hermannii*)、エシェリキア・ブルネリス (*Escherichia vulneris*)、サルモネラ菌、サルモネラ・ボンゴリ (*Salmonella bongori*)、志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*)、フレクスナー赤痢菌、ボイド赤痢菌 (*Shigella boydii*)、ソンネ赤痢菌 (*Shigella sonnei*)、エンテロバクター・アエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、エンテロバクター・ジェルゴビアエ (*Enterobacter gergoviae*)、エンテロバクター・サカザキ (*Enterobacter sakazakii*)、エンテロバクター・クロアカ (*Enterobacter cloacae*)、エンテロバクター・アグロメランス (*Enterobacter agglomerans*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*)、霊菌 (*Serratia marcescens*)、偽結核菌、ペスト菌、エルシニア・エンテロコリチカ、火傷病菌、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*)、プロテウス・ブルガリス (*Proteus vulgaris*)、プロテウス・ペンネリ (*Proteus penneri*)、プロテウス・ハウセリ (*Proteus hauseri*)、プロビデンシア・アルカリファシエンス (*Providencia alcalifaciens*)、又はモルガン菌 (*Morganella morgani*) 種のものである。好ましくは、グラム陰性菌株は、エルシニア属、大腸菌属、サルモネラ属、シゲラ属、シュードモナス属、クラミジア属 (*Chlamydia*)、エルウィニア属、パントエア属、ビブリオ属、パークホリデリア属、ラルストニア属、キサントモナス属 (*Xanthomonas*)、クロモバクテリウム属 (*Chromobacterium*)、ソダリス属 (*Soda*

30

40

50

lis)、シトロバクター属、エドワージエラ属、根粒菌属、エロモナス属(Aeromonas)、フォトラブダス属(Photorhabdus)、ボルデテラ属及びデスルホビブリオ属(Desulfovibrio)からなる群から、より好ましくは、エルシニア属、大腸菌属、サルモネラ属及びシュードモナス属からなる群から、最も好ましくは、エルシニア属及びサルモネラ属、特に、エルシニアからなる群から選択される。

【0037】

「エルシニア(属)」という用語は、本明細書で使用される場合、エルシニア・エンテロコリチカ、偽結核菌及びペスト菌をはじめとする、エルシニア属の全ての種を含む。好ましいのは、エルシニア・エンテロコリチカである。

【0038】

「サルモネラ(属)」という用語は、本明細書で使用される場合、サルモネラ菌及びサルモネラ・ボンゴリ(S.bongori)をはじめとする、サルモネラ属の全ての種を含む。好ましいのは、サルモネラ菌である。

【0039】

「プロモーター」という用語は、本明細書で使用される場合、転写単位の発現を制御する核酸配列を意味する。「プロモーター領域」は、細胞内のRNAポリメラーゼに結合することができ、下流の(3'方向の)コード配列の転写を開始させることができる、調節領域である。プロモーター領域内には、転写開始部位(ヌクレアーゼS1を用いてマッピングすることにより簡便に定義される)、並びに推定-35領域及びプリブノーボックス等の、RNAの結合に関与するタンパク質結合ドメイン(コンセンサス配列)が見られる。2つのヌクレオチド、例えば、DNA領域間の関係を記載する際の「作用可能に連結されている」という用語は、単に、それらが互いに機能的に関連していること及びそれらが同じ核酸断片上に位置することを意味する。プロモーターが構造遺伝子の転写を調節する場合、及びプロモーターが構造遺伝子と同じ核酸断片状に位置する場合、プロモーターは、構造遺伝子に作用可能に連結されている。通常、プロモーターは、前記グラム陰性菌株内で機能性である、すなわち、プロモーターは、本発明の融合タンパク質を発現することができ、すなわち、プロモーターは、さらなる遺伝子操作も、さらなるタンパク質の発現も伴わずに、本発明の融合タンパク質を発現することができる。さらに、機能性プロモーターは、細菌T3SSに対する対抗制御を自然に受けてはならない。

【0040】

本明細書で使用される「染色体外遺伝要素」という用語は、染色体以外の本発明のグラム陰性菌株により内在的に保有される遺伝要素、例えば毒性プラスミド、又はグラム陰性菌株の形質転換に用いられ、染色体に、若しくは染色体以外の内在的に保有される遺伝要素、例えば毒性プラスミドに、一時的に若しくは安定的に組み込まれる、外在性遺伝要素である、遺伝要素を意味する。そのような染色体外遺伝要素は、発現ベクター、染色体への、若しくは染色体以外の内在的に保有される遺伝要素、例えば毒性プラスミドへの、相同組換え若しくは他の組込みのためのベクター、染色体への、若しくは染色体以外の内在的に保有される遺伝要素、例えば毒性プラスミドへの、相同組換え若しくは他の組込みのためのDNA断片、又は染色体への、若しくは染色体以外の内在的に保有される遺伝要素、例えば毒性プラスミドへの、部位特異的挿入を誘導するRNA要素、例えば、CRISP/Cas9及び関連ガイドRNAのような、ベクターであり得る。

【0041】

本明細書で使用される「RNA温度センサー」という用語は、関連遺伝子の遺伝子発現を制御している温度感受性ノンコーディングRNA配列を意味する。通常、RNA温度センサー領域は、抑制温度で安定的に形成され、許容温度で不安定であり、リボソーム結合部位等の翻訳に必須のRNA配列を隠蔽し、そうすることで、翻訳に必須のそのようなRNA配列に関連する遺伝子の発現を制御し、RNAヘアピンループのような二次構造を形成することにより機能する。

【0042】

本明細書で使用される「RNAヘアピン構造又はその一部」という用語は、ステム-ル

10

20

30

40

50

ープ構造に至る分子内塩基対合により形成されるRNA二次構造を意味する。一般に同じRNA鎖内の、分子内塩基対合は、相補ヌクレオチド配列又はそれらの一部に起因して形成される。

【0043】

本明細書で使用される、AraC/XylSファミリーとも称される、「AraC型DNA結合タンパク質」という用語は、ヘリックスターンヘリックスモチーフによってDNAに結合する細菌転写制御タンパク質を意味する。AraC型DNA結合タンパク質のほとんどのメンバーは、ポジティブ転写制御因子であり、2つのヘリックスターンヘリックスサブドメインを含有する100残基ストレッチにわたる最小DNA結合ドメインを特徴とし得る。AraC型DNA結合タンパク質は、特に、VirF、LcrF、YbtA、Rns、MxiE、AraC、XylS、ExsA、PerA、MmsR、RhaS、TcpN、HrpX、HrpB、GadX、HilC、HilD、MarA、CafR、FapR及びInvFを含むが、これらに限定されない。好ましいのは、VirF、LcrF、YbtA、Rns、MxiE、ExsA、PerA、HrpX、HrpB、GadX、HilC、HilD、TcpN、CafR、FapR及びInvF等の、毒性関連メカニズムの制御に關与するAraC型DNA結合タンパク質である。より好ましいのは、VirF、LcrF、MxiE、ExsA、PerA、HrpX、HrpB、GadX、HilC、HilD及びInvFのような、3型分泌系活性の制御に關与するAraC型DNA結合タンパク質であり、最も好ましいのは、VirF及び/又はLcrFである。

10

【0044】

本明細書で使用される「送達する」という用語は、組換え弱毒化グラム陰性菌株から真核細胞へのタンパク質の輸送であって、組換え弱毒化グラム陰性菌株において異種タンパク質を発現させるステップ、発現されたタンパク質をそのような組換え弱毒化グラム陰性菌株から分泌するステップ、及びそのような組換え弱毒化グラム陰性菌株による分泌タンパク質を真核細胞のサイトゾルに移行させるステップを含む、輸送を意味する。したがって、本明細書では同義で使用される「送達シグナル」又は「分泌シグナル」という用語は、グラム陰性菌株の分泌及び移行系により認識され得るポリペプチド配列であって、グラム陰性菌株から真核細胞へのタンパク質の送達を指示するポリペプチド配列を意味する。

20

【0045】

本明細書で使用される「細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナル」という用語は、組換えグラム陰性菌株において機能する細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナル、すなわち、組換えグラム陰性菌株において発現された異種タンパク質を、III型、IV型又はVI型分泌系等の分泌系によってそのような組換えグラム陰性菌株から分泌できるようにする、又はIII型、IV型又はVI型分泌系等の分泌系によってそのような組換えグラム陰性菌株により真核細胞のサイトゾルに移行させることができるようにするシグナルを意味する。本明細書で使用される「細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナル」という用語は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルの断片、すなわち、送達シグナルのより短いバージョン、例えば、10アミノ酸以下、好ましくは20アミノ酸以下、より好ましくは50アミノ酸以下、よりいっそう好ましくは100アミノ酸以下、特に140アミノ酸以下の送達シグナル、例えば天然に存在する送達シグナルも含む。したがって、例えば、細菌エフェクタータンパク質から送達シグナルをコードするDNA配列等の、ヌクレオチド配列は、完全長送達シグナルをコードすることもあり、又はその断片であって、通常は30以下、好ましくは60以下、より好ましくは150以下、よりいっそう好ましくは300以下、特に420以下の核酸を含む断片を含むこともある。

30

40

【0046】

本明細書で使用される場合、タンパク質の「分泌」は、組換え弱毒化グラム陰性菌株の細胞膜を横断して外側への異種タンパク質の移行を意味する。タンパク質の「移行」は、組換え弱毒化グラム陰性菌株から真核細胞の原形質膜を横断してそのような真核細胞のサイトゾルへの異種タンパク質の輸送を意味する。

50

【 0 0 4 7 】

「分泌系機構の一部である細菌タンパク質」という用語は、本明細書で使用される場合、細菌3型分泌系(T3SS)、4型分泌系(T4SS)及び6型分泌系(T6SS)、好ましくはT3SSの必須成分を構成する細菌タンパク質を意味する。そのようなタンパク質がなければ、たとえ分泌系の他の全ての成分及び移行されることになる細菌エフェクタータンパク質が依然としてコードされており、生産されるとしても、それぞれの分泌系は宿主細胞にタンパク質を移行させる点では機能しない。

【 0 0 4 8 】

「細菌エフェクタータンパク質」という用語は、本明細書で使用される場合、宿主細胞への分泌系機構の一部である分泌系により、例えば細菌タンパク質により、輸送される細菌タンパク質を意味する。そのようなエフェクタータンパク質は、分泌系により宿主細胞内に送達され、そこでそれらは、例えば、様々な宿主タンパク質及び細胞機構に対して毒性活性を発揮する。多くの異なるエフェクタータンパク質は、公知であり、様々な分泌系型により輸送され、宿主調節分子の機能を調節する生化学的活性の幅広いレパートリーを示している。分泌系は、3型分泌系(T3SS)、4型分泌系(T4SS)及び6型分泌系(T6SS)を含む。一部のエフェクタータンパク質(フレクスナー赤痢菌IpaCのようなもの)も、分泌系機構の一部であってタンパク質移行を可能にする細菌タンパク質のクラスに属する。本明細書で使用される組換え弱毒化グラム陰性菌株は、3型分泌系(T3SS)、4型分泌系(T4SS)及び/又は6型分泌系(T6SS)、好ましくは3型分泌系(T3SS)の必須成分を構成する細菌タンパク質を通常は含む。「細菌T3SSの必須成分を構成する細菌タンパク質」という用語は、本明細書で使用される場合、インジェクチソーム、例えば注射針、を天然に形成しているか、又は真核細胞へのタンパク質の移行におけるその機能に別様に必須である、タンパク質を意味する。インジェクチソームを形成するか、又は真核細胞へのタンパク質の移行におけるその機能に別様に必須である、タンパク質は、SctC、YscC、MxiD、InvG、SsaC、EscC、HrcC、HrcC(セクレチン)、SctD、YscD、MxiG、Prg、SsaD、EscD、HrpQ、HrpW、FliG(外部MSリングタンパク質)、SctJ、YscJ、MxiJ、PrgK、SsaJ、EscJ、HrcJ、HrcJ、FliF(内部MSリングタンパク質)、SctR、YscR、Spa24、SpaP、SpaP、SsaR、EscR、HrcR、HrcR、FliP(非主要輸送装置タンパク質)、SctS、YscS、Spa9(SpaQ)、SpaQ、SsaS、EscS、HrcS、HrcS、FliQ(非主要輸送装置タンパク質)、SctT、YscT、Spa29(SpaR)、SpaR、SsaT、EscT、HrcT、HrcT、FliR(非主要輸送装置タンパク質)、SctU、YscU、Spa40、SpaS、SpaS、SsaU、EscU、HrcU、HrcU、FlhB(輸送装置スイッチタンパク質)、SctV、YscV、MxiA、InvA、SsaV、EscV、HrcV、HrcV、FlhA(主要輸送装置タンパク質)、SctK、YscK、MxiK、OrgA、HrpD(細胞質アクセサリタンパク質)、SctQ、YscQ、Spa33、SpaO、SpaO、SsaQ、EscQ、HrcQA+B、HrcQ、FliM+FliN(Cリングタンパク質)、SctL、YscL、MxiN、OrgB、SsaK、EscL、Orf5、HrpE、HrpF、FliH(固定子)、SctN、YscN、Spa47、SpaL、InvC、SsaN、EscN、HrcN、HrcN、FliI(ATPase)、SctO、YscO、Spa13、SpaM、InvI、SsaO、Orf15、HrpO、HrpD、FliJ(ストーク)、SctF、YscF、MxiH、PrgI、SsaG、EscF、HrpA、HrpY(ニードルフィラメントタンパク質)、SctI、YscI、MxiI、PrgJ、SsaI、EscI、rOrf8、HrpB、HrpJ、(内部ロッドタンパク質)、SctP、YscP、Spa32、SpaN、InvJ、SsaP、EscP、Orf16、HrpP、HpaP、FliK(ニードル長制御因子)、LcrV、IpaD、SipD(親水性トランスロケーター、ニードル先端部タンパク質)、YopB、IpaB、SipB、SseC、EspD、HrpK、PopF1、P

10

20

30

40

50

o p F 2 (疎水性トランスロケーター、孔タンパク質)、Y o p D、I p a C、S i p C、S s e D、E s p B (疎水性トランスロケーター、孔タンパク質)、Y s c W、M x i M、I n v H (P i l o t i n)、S c t W、Y o p N、M x i C、I n v E、S s a L、S e p L、H r p J、H p a A (ゲートキーパー)を含むが、これらに限定されない。

【0049】

「T6SSエフェクタータンパク質」又は「細菌T6SSエフェクタータンパク質」という用語は、本明細書で使用される場合、真核細胞若しくは細菌のサイトゾルにT6S系により自然に打ち込まれるタンパク質、又は例えば真核生物の膜への移行孔を形成し得るT6S系により自然に分泌されるタンパク質を意味する。「T4SSエフェクタータンパク質」又は「細菌T4SSエフェクタータンパク質」という用語は、本明細書で使用される場合、真核細胞のサイトゾルにT4S系により自然に打ち込まれるタンパク質、又は例えば真核生物の膜への移行孔を形成し得るT4S系により自然に分泌されるタンパク質を意味する。

10

【0050】

「T3SSエフェクタータンパク質」又は「細菌T3SSエフェクタータンパク質」という用語は、本明細書で使用される場合、真核細胞のサイトゾルにT3S系により自然に打ち込まれるタンパク質、又は例えば真核生物の膜への移行孔を形成し得るT3S系により自然に分泌されるタンパク質(孔形成トランスロケーター(エルシニアY o p B及びY o p Dのようなもの)、並びにエルシニアL c r Vのようなt i pタンパク質)を意味する。好ましくは、T3S系により真核細胞のサイトゾルに自然に打ち込まれるタンパク質が使用される。これらの毒性因子は、病原体のために真核細胞を麻痺させる又は再プログラミングすることになる。T3SEフェクターは、生化学的活性の幅広いレパートリーを示し、極めて重要な宿主調節分子の機能を調節し、A v r A、A v r B、A v r B s 2、A v r B s 3、A v r B s T、A v r D、A v r D 1、A v r P p h B、A v r P p h C、A v r P p h E P t o、A v r P p i B P t o、A v r P t o、A v r P t o B、A v r R p m 1、A v r R p t 2、A v r X v 3、C i g R、E s p F、E s p G、E s p H、E s p Z、E x o S、E x o T、G o g B、G t g A、G t g E、G A L Aタンパク質ファミリー、H o p A B 2、H o p A O 1、H o p I 1、H o p M 1、H o p N 1、H o p P t o D 2、H o p P t o E、H o p P t o F、H o p P t o N、H o p U 1、H s v B、I c s B、I p a A、I p a B、I p a C、I p a H、I p a H 7 . 8、I p a H 9 . 8、I p g B 1、I p g B 2、I p g D、L c r V、M a p、O s p C 1、O s p E 2、O s p F、O s p G、O s p I、P i p B、P i p B 2、P o p B、P o p P 2、P t h X o 1、P t h X o 6、P t h X o 7、S i f A、S i f B、S i p A / S s p A、S i p B、S i p C / S s p C、S i p D / S s p D、S l r P、S o p A、S o p B / S i g D、S o p D、S o p E、S o p E 2、S p i C / S s a B、S p t P、S p v B、S p v C、S r f H、S r f J、S s e、S s e B、S s e C、S s e D、S s e F、S s e G、S s e I / S r f H、S s e J、S s e K 1、S s e K 2、S s e K 3、S s e L、S s p H 1、S s p H 2、S t e A、S t e B、S t e C、S t e D、S t e E、T c c P 2、T i r、V i r A、V i r P p h A、V o p F、X o p D、Y o p B、Y o p D、Y o p E、Y o p H、Y o p J、Y o p M、Y o p O、Y o p P、Y o p T、Y p k Aを含む。

20

30

40

【0051】

「悪性固形腫瘍内に蓄積する組換え弱毒化グラム陰性菌株」又は「組換え弱毒化グラム陰性菌株は悪性固形腫瘍内に蓄積する」という用語は、本明細書で使用される場合、悪性固形腫瘍内で複製することによって悪性固形腫瘍内のこの組換え弱毒化グラム陰性菌株の細菌数を増加させる、組換え弱毒化グラム陰性菌株を意味する。驚くべきことに、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、対象への投与後、悪性固形腫瘍内に特異的に蓄積し、すなわち、悪性固形腫瘍が存在する臓器に特異的に蓄積し、悪性固形腫瘍が存在しない臓器内の組換え弱毒化グラム陰性菌株の細菌数は、少ないか、又は検出できないことを見出した。

【0052】

50

エルシニア属のような細胞外に存在する細菌の場合、細菌は、腫瘍細胞間に形成された細胞間空間内に主として蓄積する。サルモネラ属のような細胞内で増殖する細菌は、主として、腫瘍細胞に侵入し、そのような細胞内に存在するが、細胞外蓄積がさらに起こることもあり得る。悪性固形腫瘍内に蓄積される組換え弱毒化グラム陰性菌株の細菌数は、例えば、腫瘍組織1グラム当たり 10^4 から 10^9 の細菌範囲であり得る。

【0053】

本明細書で使用される「がん」という用語は、異常細胞が調節されずに分裂して周囲の組織に浸潤し得る疾患を意味する。がん細胞は、血液及びリンパ系によって他の体部にも広がり得る。がんにはいくつかの主要なタイプがある。癌は、皮膚において又は内臓を裏打ちする若しくは覆う組織において始まるがんである。肉腫は、骨、軟骨、脂肪、筋肉、血管、又は他の結合若しくは支持組織において始まるがんである。白血病は、骨髄等の血液形成組織において開始し、多数の異常血液細胞を産生させ、血液に侵入させる、がんである。リンパ腫及び多発性骨髄腫は、免疫系の細胞において始まるがんである。中枢神経系がんは、脳及び脊髄の組織において始まるがんである。本明細書で使用される「がん」という用語は、固形腫瘍、すなわち、例えば肉腫、癌及びリンパ腫等の、悪性固形腫瘍、並びに例えば白血病（血液のがん）等の、非固形腫瘍を含む。悪性固形腫瘍が好ましい。

【0054】

本明細書で使用される「悪性固形腫瘍」又は「悪性固形腫瘍適応症」という用語は、通常は嚢胞も液体領域も有さない、異常な組織塊を意味する。固形腫瘍は、良性である（がんでない）こともあり、又は悪性（がん）であることもある。悪性固形腫瘍は、本発明の方法で治療される。異なるタイプの悪性固形腫瘍は、それらを形成する細胞の型の名を取って名付けられている。悪性固形腫瘍の例は、肉腫、癌及びリンパ腫である。白血病（血液のがん）は、一般に、悪性固形腫瘍を構成しない（NIHの米国国立がん研究所による定義）。悪性固形腫瘍は、これらに限定されるものではないが、肝臓、結腸、結腸直腸、皮膚、乳房、膵臓、子宮頸部、子宮体、膀胱、胆嚢、腎臓、喉頭、口唇、口腔、食道、卵巣、前立腺、胃、精巣、甲状腺又は肺等の様々な組織型から生じ得る異常な細胞塊を含み、したがって、悪性固形肝臓、結腸、結腸直腸、皮膚、乳房、膵臓、子宮頸部、子宮体、膀胱、胆嚢、腎臓、喉頭、口唇、口腔、食道、卵巣、前立腺、胃、精巣、甲状腺又は肺腫瘍を含む。本発明の方法で治療することができる好ましい悪性固形腫瘍は、皮膚、乳房、肝臓、膵臓、膀胱、前立腺及び結腸から生じる悪性固形腫瘍であり、したがって、悪性固形皮膚、乳房、肝臓、膵臓、膀胱、前立腺及び結腸腫瘍を含む。本発明の方法で治療することができる、同様に好ましい悪性固形腫瘍は、肝細胞がん等の肝臓がんに関連する悪性固形腫瘍である。

【0055】

「真核細胞に対して毒性である細菌エフェクタータンパク質」という用語は、本明細書で使用される場合、細菌エフェクタータンパク質が様々な宿主タンパク質及び細胞機構に対してそれらの毒性活性を発揮する宿主細胞に分泌系により輸送される細菌エフェクタータンパク質を意味する。多くの異なるエフェクタータンパク質は、公知であり、様々な分泌系型により輸送され、宿主調節分子の機能を調節する生化学的活性の幅広いレパートリーを示している。分泌系は、3型分泌系（T3SS）、4型分泌系（T4SS）及び6型分泌系（T6SS）を含む。重要なこととして、真核細胞に対して毒性である一部のエフェクタータンパク質（フレクスナー赤痢菌IpaCのようなもの）も、分泌系機構の一部である細菌タンパク質のクラスに属する。真核細胞に対して毒性である細菌エフェクタータンパク質が分泌機構の機能にとっても必須である場合、そのようなタンパク質は、この定義から除外される。真核細胞に対して毒性であるT3SSエフェクタータンパク質とは、Y.エンテロコリチカYopE、YopH、YopJ、YopM、YopO、YopP、YopT又はフレクスナー赤痢菌OspF、IpgD、IpgB1、又はサルモネラ菌SopE、SopB、SptP又は緑膿菌ExoS、ExoT、ExoU、ExoY又は大腸菌Tir、Map、EspF、EspG、EspH、EspZのような、タンパク質のことである。真核細胞に対して毒性であるT4SSエフェクタータンパク質とは、レ

10

20

30

40

50

ジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) LidA、SidC、SidG、SidH、SdhA、SidJ、SdjA、SdeA、SdeA、SdeC、LepA、LepB、WipA、WipB、YlfA、YlfB、VipA、VipF、VipD、VpdA、VpdB、DrrA、LegL3、LegL5、LegL7、LegLC4、LegLC8、LegC5、LegG2、Ceg10、Ceg23、Ceg29又はバルトネラ・ヘレンセラ菌 (*Bartonella henselae*) BepA、BepB、BepC、BepD、BepE、BepF、BepG又はアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) VirD2、VirE2、VirE3、VirF又はピロリ菌 (*H. pylori*) CagA又は百日咳菌百日咳毒素のような、タンパク質のことである。真核細胞に対して毒性であるT6SSエフェクタータンパク質とは、コレラ菌VgrGタンパク質 (VgrG1) のことである。

10

【0056】

「真核細胞に対して毒性であるT3SSエフェクタータンパク質」又は「真核細胞に対して毒性である細菌T3SSエフェクタータンパク質」という用語は、本明細書で使用される場合、真核細胞のサイトゾルにT3S系により自然に打ち込まれるタンパク質、及び真核細胞に対する毒性因子である、例えば真核生物の膜への移行孔を形成し得る、T3S系により自然に分泌されるタンパク質、すなわち、病原体のために真核細胞を麻痺させる又は再プログラミングするタンパク質を意味する。エフェクターは、生化学的活性の幅広いレパートリーを示し、例えば、食作用及びアクチン細胞骨格、炎症シグナル伝達、アポトーシス、エンドサイトーシス又は分泌経路等の、極めて重要な宿主調節分子の機能を調節し^{2, 9}、AvrA、AvrB、AvrBs2、AvrBs3、AvrBsT、AvrD、AvrD1、AvrPphB、AvrPphC、AvrPphEpto、AvrPpiBpto、AvrPto、AvrPtoB、AvrRpm1、AvrRpt2、AvrXv3、CigR、EspF、EspG、EspH、EspZ、ExoS、ExoT、GogB、GtgA、GtgE、GALAタンパク質ファミリー、HopAB2、HopAO1、HopI1、HopM1、HopN1、HopPtoD2、HopPtoE、HopPtoF、HopPtoN、HopU1、HsvB、IcsB、IpaA、IpaH、IpaH7.8、IpaH9.8、IpgB1、IpgB2、IpgD、LcrV、Map、OspC1、OspE2、OspF、OspG、OspI、PipB、PipB2、PopB、PopP2、PthXo1、PthXo6、PthXo7、SifA、SifB、SipA/SspA、SlrP、SopA、SopB/SigD、SopD、SopE、SopE2、SpiC/SsaB、SptP、SpvB、SpvC、SrfH、SrfJ、Sse、SseB、SseC、SseD、SseF、SseG、SseI/SrfH、SseJ、SseK1、SseK2、SseK3、SseL、SspH1、SspH2、SteA、SteB、SteC、SteD、SteE、TccP2、Tir、VirA、VirPphA、VopF、XopD、YopE、YopH、YopJ、YopM、YopO、YopP、YopT、YpkAを含む。

20

30

【0057】

真核細胞に対して毒性であるエルシニア属のT3SSエフェクター遺伝子であって、例えばY.エンテロコリチカから欠失/変異させることができるT3SSエフェクター遺伝子は、YopE、YopH、YopM、YopO、YopP (別名YopJ)、及びYopT¹⁰である。真核細胞に対して毒性であるそれぞれのエフェクター遺伝子を、フレクスナー赤痢菌 (例えば、OspF、IpgD、IpgB1)、サルモネラ菌 (例えば、SopE、SopB、SptP)、緑膿菌 (例えば、ExoS、ExoT、ExoU、ExoY) 又は大腸菌 (例えば、Tir、Map、EspF、EspG、EspH、EspZ) から欠失/変異させることができる。これらの遺伝子の核酸配列を当業者は、例えば、Genebankデータベースから (NC_002120 GI:10955536からyopH、yopO、yopE、yopP、yopM、yopT; AF386526.1 GI:18462515からのフレクスナー赤痢菌エフェクタータンパク質; NC_

40

50

016810.1 GI:378697983又はFQ312003.1 GI:301156631からのサルモネラ菌エフェクター; AE004091.2 GI:110227054又はCP000438.1 GI:115583796からの緑膿菌エフェクター;及びNC_011601.1 GI:215485161からの大腸菌エフェクタータンパク質)入手することができる。

【0058】

本発明では、遺伝子は、タンパク質と区別するために小文字の斜字により表示する。遺伝子(小文字の斜字により表示)が細菌種名(例えば、大腸菌)の後に続いている場合、それらは、対応する細菌種における対応する遺伝子の変異を意味する。例えば、YopEは、yopE遺伝子によりコードされたエフェクタータンパク質を指す。Y.エンテロコリチカyopEは、yopE遺伝子に変異があるY.エンテロコリチカを表す。

10

【0059】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」、「ペプチド」、「タンパク質」、「ポリペプチドの」及び「ペプチドの」という用語は、隣接する残基のアルファ-アミノ基とカルボキシ基間のペプチド結合により互いに連結されている一連のアミノ酸残基を指定するために同義で使用される。好ましいのは、少なくとも10のアミノ酸、より好ましくは少なくとも20のアミノ酸、を含むアミノ酸配列を有するタンパク質である。

【0060】

本発明によれば、「異種タンパク質」は、天然に存在するタンパク質又はその一部を含み、人工的に操作されたタンパク質又はその一部も含む。本明細書で使用される場合、「異種タンパク質」という用語は、T3SSエフェクタータンパク質又はそれを融合させることができるそのN末端断片以外の、タンパク質又はその一部を指す。特に、異種タンパク質は、本明細書で使用される場合、本発明により提供され、使用される特定の組換え弱毒化グラム陰性菌株のプロテオーム、すなわち全天然タンパク質成分に属さない、例えば、エルシニア属、大腸菌属、サルモネラ属又はシュードモナス属の特定の菌株のプロテオーム、すなわち全天然タンパク質成分に属さないタンパク質又はその一部を意味する。通常、異種タンパク質は、ヒト起源を含む、動物起源のものである。好ましくは、異種タンパク質は、ヒトタンパク質又はその一部である。より好ましくは、異種タンパク質は、インターフェロン(IFN)応答の誘導又は制御に関与するタンパク質、アポトーシス又はアポトーシス調節に関与するタンパク質、細胞周期制御因子、アンキリンリピートタンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、レポータータンパク質、転写因子、プロテアーゼ、低分子量GTPase、GPCR関連タンパク質、ナノボディ融合構築物及びナノボディ、細菌T3SSエフェクター、細菌T4SSエフェクター並びにウイルスタンパク質からなる群から選択される。特に好ましくは、異種タンパク質は、インターフェロン(IFN)応答の誘導又は制御に関与するタンパク質、アポトーシス又はアポトーシス調節に関与するタンパク質、細胞周期制御因子、アンキリンリピートタンパク質、レポータータンパク質、低分子量GTPase、GPCR関連タンパク質、ナノボディ融合構築物、細菌T3SSエフェクター、細菌T4SSエフェクター及びウイルスタンパク質からなる群から選択される。よりいっそう特に好ましいのは、インターフェロン(IFN)応答の誘導又は制御に関与するタンパク質、アポトーシス又はアポトーシス調節に関与するタンパク質、細胞周期制御因子、及びアンキリンリピートタンパク質からなる群から選択される、異種タンパク質である。最も好ましいのは、アポトーシス若しくはアポトーシス調節に関与する動物、好ましくはヒト異種タンパク質、又はインターフェロン(IFN)応答の誘導若しくは制御に関与するヒトタンパク質のような、アポトーシス若しくはアポトーシス調節に関与するタンパク質、又はインターフェロン(IFN)応答の誘導若しくは制御に関与するタンパク質、特に、インターフェロン(IFN)応答の誘導若しくは制御に関与するタンパク質である。インターフェロン(IFN)応答の誘導又は制御に関与するタンパク質は、好ましくは、I型インターフェロン(IFN)応答の誘導又は制御に関与するヒトタンパク質である。

20

30

40

50

【0061】

一部の実施態様では、本発明のグラム陰性菌株は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレームで互いに独立して融合している同一の又は2つの異なる異種タンパク質をコードする、2つのヌクレオチド配列を含む。

【0062】

一部の実施態様では、本発明のグラム陰性菌株は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレームで互いに独立して融合している同一の又は3つの異なる異種タンパク質をコードする、3つのヌクレオチド配列を含む。組換え弱毒化グラム陰性菌株により発現される異種タンパク質は、通常、1 - 150 kDの間、好ましくは1 - 120 kDの間、より好ましくは1 - 100 kDaの間、最も好ましくは10 - 80 kDaの間の分子量を有する。

10

【0063】

一部の実施態様では、異種タンパク質の一部は、異種タンパク質のドメインを含む。したがって、一部の実施態様では、本発明のグラム陰性菌株は、異種タンパク質のドメインをコードするヌクレオチド配列を含む。好ましくは、本発明のグラム陰性菌株は、異種タンパク質の1又は2つのドメイン、より好ましくは異種タンパク質の2つのドメイン、をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0064】

一部の実施態様では、本発明のグラム陰性菌株は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレームで融合している異種タンパク質の反復ドメイン又は異なる異種タンパク質の2つ以上のドメインをコードするヌクレオチド配列を含む。

20

【0065】

「タンパク質の同じ機能クラスに属する異種タンパク質」という用語は、本明細書で使用される場合、同じ機能を有する異種タンパク質、例えば、酵素活性を有する異種タンパク質、例えば細胞周期制御等の、同じ経路で作用する異種タンパク質、又は細菌エフェクタータンパク質の同じクラスに属していることのような、共通の特異的特徴を共有する異種タンパク質を意味する。タンパク質の機能クラスは、例えば、真核細胞に対する毒性を確立する生物学的プロセスにおいて一緒に作用する、アポトーシス若しくはアポトーシス調節に關与するタンパク質、細胞周期制御因子として作用するタンパク質、アンキリンリピートタンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、インターフェロン(IFN)応答の誘導又は制御に關与するタンパク質、レポータータンパク質、転写因子、プロテアーゼ、低分子量GTPase、GPCR関連タンパク質、ナノボディ融合構築物及びナノボディ、細菌T3SSエフェクター、細菌T4SSエフェクター又はウイルスタンパク質である。

30

【0066】

本発明によれば、「異種タンパク質のドメイン」は、天然に存在するタンパク質のドメインを含み、人工的に操作されたタンパク質のドメインも含む。本明細書で使用される場合、「異種タンパク質のドメイン」という用語は、T3SSエフェクタータンパク質のドメイン以外の異種タンパク質のドメイン、又は融合タンパク質を獲得するために融合させることができるそのN末端断片を含むドメイン以外のドメインを意味する。特に、異種タンパク質のドメインは、本明細書で使用される場合、本発明により提供され、使用される特定の組換え弱毒化グラム陰性菌株のプロテオーム、すなわち全天然タンパク質成分に属さない、例えば、エルシニア属、大腸菌属、サルモネラ属又はシュドモナス属の特定の菌株のプロテオーム、すなわち、全天然タンパク質成分に属さない異種タンパク質のドメインを意味する。通常、異種タンパク質のドメインは、ヒト起源を含む、動物起源のものである。好ましくは、異種タンパク質のドメインは、ヒトタンパク質のドメインである。より好ましくは、異種タンパク質のドメインは、アポトーシス又はアポトーシス調節に關与するタンパク質、インターフェロン(IFN)応答の誘導又は制御に關与するタンパク質、細胞周期制御因子、アンキリンリピートタンパク質、細胞シグナル伝達タンパク質、

40

50

レポータータンパク質、転写因子、プロテアーゼ、低分子量GTPase、GPCR関連タンパク質、ナノボディ融合構築物及びナノボディ、細菌T3SSエフェクター、細菌T4SSエフェクター並びにウイルスタンパク質からなる群から選択されるタンパク質のドメインである。特に好ましくは、異種タンパク質のドメインは、アポトーシス又はアポトーシス調節に關与するタンパク質、インターフェロン(IFN)応答の誘導又は制御に關与するタンパク質、細胞周期制御因子、アンキリンリピートタンパク質、レポータータンパク質、低分子量GTPase、GPCR関連タンパク質、ナノボディ融合構築物、細菌T3SSエフェクター、細菌T4SSエフェクター及びウイルスタンパク質からなる群から選択されるタンパク質のドメインである。よりいっそう特に好ましいのは、アポトーシス又はアポトーシス調節に關与するタンパク質、インターフェロン(IFN)応答の誘導又は制御に關与するタンパク質、細胞周期制御因子、及びアンキリンリピートタンパク質からなる群から選択される異種タンパク質のドメインである。最も好ましいのは、インターフェロン(IFN)応答の誘導又は制御に關与する動物タンパク質、好ましくは、インターフェロン(IFN)応答の誘導又は制御に關与するヒト異種タンパク質のドメインのような、インターフェロン(IFN)応答の誘導又は制御に關与するタンパク質のドメインである。

10

【0067】

「異種タンパク質の反復ドメイン」という用語は、本明細書で使用される場合、異種タンパク質のドメインの数度の反復からなる融合タンパク質であって、これらのドメインが互いに直接融合していてもよく、又は可変リンカー、例えば、アミノ酸数1-30の間、好ましくは2-15の間、よりいっそう好ましくは3-10の間のリンカーが、ドメイン間に導入されていてもよい、融合タンパク質を意味する。好ましくは、同一のドメイン、又は80%より高い、通常は85%より高い、好ましくは90%より高い、よりいっそう好ましくは95%より高い、特に96%より高い、より特に97%より高い、よりいっそう特に98%より高い、最も特に99%より高いアミノ酸配列同一性を有する反復ドメインが使用される。また、好ましいのは、100%のアミノ酸同一性を有する同一のドメインである。好ましくは、2つの反復ドメイン、より好ましくは2つの同一の反復ドメイン、又は90%より高い、好ましくは95%より高い、最も好ましくは100%のアミノ酸配列同一性を有する2つの反復ドメインは、本明細書で意味するところの融合タンパク質に含まれる。2つより多くの、例えば、3、4、5又は6つの反復ドメインも、本発明により企図されている。

20

30

【0068】

「異なる異種タンパク質の2つ以上のドメイン」という用語は、本明細書で使用される場合、異なる異種タンパク質の少なくとも2つのドメイン、例えば、80%以下、好ましくは60%以下、より好ましくは40%以下のアミノ酸配列同一性を有する異種タンパク質の少なくとも2つのドメイン、の一度又は数度の反復からなる融合タンパク質であって、これらの異なるドメインが互いに直接融合していてもよく、又は可変リンカー、例えば、アミノ酸数1-30の間、好ましくは2-15の間、よりいっそう好ましくは3-10の間のリンカーが、ドメイン間に導入されていてもよい、融合タンパク質を意味する。好ましくは、異なる異種タンパク質の2つのドメインは、本明細書で意味するところの融合タンパク質に含まれる。異なる異種タンパク質の2つより多くの、例えば、3、4、5又は6つのドメインも、本発明により企図されている。

40

【0069】

組換え弱毒化グラム陰性菌株により発現される異種タンパク質のドメインは、通常、1-150kDaの間、好ましくは1-30kDaの間、より好ましくは1-20kDaの間、最も好ましくは1-10kDaの間の分子量を有する。

【0070】

本発明によれば、「IFN応答の誘導又は制御に關与するタンパク質」は、これらに限定されるものではないが、cGAS、STING、TRIF、TBK1、IKKε、IκBα、IRF3、TREX1、VPS34、ATG9a、DDX3、LC3、DDX4

50

1、IFI16、MRE11、DNA-PK、RIG1、MDA5、LGP2、IPS-1/MAVS/Cardif/VISA、Trim25、Trim32、Trim56、Riplet、TRAF2、TRAF3、TRAF5、TANK、IRF3、IRF7、IRF9、STAT1、STAT2、PKR、TLR3、TLR7、TLR9、DAI、IFI16、IFIX、MRE11、DDX41、LSM14A、LRRFIP1、DHX9、DHX36、DHX29、DHX15、Ku70、IFNAR1、IFNAR2、TYK2、JAK1、ISGF3、IL10R2、IFNLR1、IFNGR1、IFNGR2、JAK2、STAT4、サイクリックジヌクレオチド生成酵素(サイクリック-ジAMP、サイクリック-ジGMP及びサイクリック-ジGAMPシクラーゼ)、例えばWspR、DncV、DisA及びDisA様、CdaA、CdaS並びにcGAS又はその断片を含む。

10

【0071】

本発明によれば、「I型IFN応答の誘導又は制御に關与するタンパク質」は、これらに限定されるものではないが、cGAS、STING、TRIF、TBK1、IKKepsilon、IRF3、TREX1、VPS34、ATG9a、DDX3、LC3、DDX41、IFI16、MRE11、DNA-PK、RIG1、MDA5、LGP2、IPS-1/MAVS/Cardif/VISA、Trim25、Trim32、Trim56、Riplet、TRAF2、TRAF3、TRAF5、TANK、IRF3、IRF7、IRF9、STAT1、STAT2、PKR、TLR3、TLR7、TLR9、DAI、IFI16、IFIX、MRE11、DDX41、LSM14A、LRRFIP1、DHX9、DHX36、DHX29、DHX15、Ku70、サイクリックジヌクレオチド生成酵素(サイクリック-ジAMP、サイクリック-ジGMP及びサイクリック-ジGAMPシクラーゼ)、例えばWspR、DncV、DisA及びDisA様、CdaA、CdaS並びにcGAS又はその断片を含む。

20

【0072】

I型IFN応答の誘導又は制御に關与する好ましいタンパク質は、cGAS、STING、TRIF、TBK1、IKKイプシロン、IRF3、TREX1、VPS34、ATG9a、DDX3、LC3、DDX41、IFI16、MRE11、DNA-PK、RIG1、MDA5、LGP2、IPS-1/MAVS/Cardif/VISA、Trim25、Trim32、Trim56、Riplet、TRAF2、TRAF3、TRAF5、TANK、IRF3、IRF7、IRF9、STAT1、STAT2、PKR、LSM14A、LRRFIP1、DHX29、DHX15、並びにサイクリックジヌクレオチド生成酵素、例えば、WspR、DncV、DisA及びDisA様、CdaA、CdaS並びにcGASからなる群から選択されるサイクリック-ジAMP、サイクリック-ジGMP及びサイクリック-ジGAMPシクラーゼ又はその断片、からなる群から選択される。

30

【0073】

I型IFN応答の誘導又は制御に關与するより好ましいタンパク質は、cGAS(例えばヒトタンパク質についてのUniprot.Q8N884)、RIG1(例えばヒトタンパク質についてのUniprot.O95786)、MDA5(例えばヒトタンパク質についてのUniprot.Q9BYX4)、IPS-1/MAVS(例えばヒトタンパク質についてのUniprot.Q7Z434)、IRF3(例えばヒトタンパク質についてのUniprot.Q14653)、IRF7(例えばヒトタンパク質についてのUniprot.Q92985)、IRF9(例えばヒトタンパク質についてのUniprot.Q00978)並びにサイクリックジヌクレオチド生成酵素、例えば、WspR(例えば緑膿菌タンパク質についてのUniprot.Q9HXT9)、DncV(例えば、コレラ菌タンパク質についてのUniprot.Q9KVG7)、DisA及びDisA様(例えばセレウス菌タンパク質についてのUniprot.Q812L9)、CdaA(例えばリステリア菌(L.monocytogenes)タンパク質についてのUniprot.Q8Y5E4)、CdaS(例えば、枯草菌(B.subtilis)タン

40

50

パク質についての、Uniprot . O31854、若しくは配列場号114におけるような構成的活性L44F突然変異)並びにcGAS(例えばヒトタンパク質についてのUniprot . Q8N884)からなる群から選択されるサイクリック-ジAMP、サイクリック-ジGMP及びサイクリック-ジGAMPシクラーゼ又はこれらのタンパク質の断片からなる群から選択される。

【0074】

IPS-1/MAVS/Cardif/VISAは、N末端CARDドメインを含有し、ヒト配列についてUniprot(www.uniprot.org)識別子「Q7Z434」及びマウス配列について「Q8VCF0」を有する、真核生物ミトコンドリア抗ウイルスシグナル伝達タンパク質を意味する。「IPS-1/MAVS」、「MAVS/IPS-1」、及び「MAVS」という用語は、本明細書では同義で使用され、N末端CARDドメインを含有し、ヒト配列についてUniprot(www.uniprot.org)識別子「Q7Z434」及びマウス配列について「Q8VCF0」を有する、真核生物ミトコンドリア抗ウイルスシグナル伝達タンパク質を意味する。

10

【0075】

一部の実施態様では、I型IFN応答の誘導又は制御に関与する異種タンパク質は、CARDドメイン含有タンパク質又はその断片、及びサイクリックジヌクレオチド生成酵素、例えば、サイクリック-ジAMP、サイクリック-ジGMP及びサイクリック-ジGAMPシクラーゼ又はその断片からなる群から選択される。

20

【0076】

IFN応答又はI型IFN応答の誘導又は制御に関与する異種タンパク質の断片は、通常は25-1000の間のアミノ酸、好ましくは50-600の間のアミノ酸、より好ましくは100-400の間のアミノ酸、よりいっそう好ましくは100-362の間のアミノ酸を含有する。一部の実施態様では、IFN応答又はI型IFN応答の誘導又は制御に関与する異種タンパク質の断片は、通常は25-1000の間のアミノ酸、好ましくは50-600の間のアミノ酸、より好ましくは100-400の間のアミノ酸、よりいっそう好ましくは100-362の間のアミノ酸、特に100-246の間のアミノ酸を含有する、IFN応答若しくはI型IFN応答の誘導若しくは制御に関与する異種タンパク質のN末端断片を含むか、又はN末端アミノ酸のアミノ酸1-アミノ酸160の間を含有するアミノ酸配列の欠失、好ましくはN末端アミノ酸1-59若しくはN末端アミノ酸1-160を含有するアミノ酸配列の欠失を有する、IFN応答若しくはI型IFN応答の誘導若しくは制御に関与する異種タンパク質のN末端断片であって、通常は25-1000の間のアミノ酸、好ましくは50-600の間のアミノ酸、より好ましくは100-400の間のアミノ酸、よりいっそう好ましくは100-362の間のアミノ酸を含有する、IFN応答若しくはI型IFN応答の誘導若しくは制御に関与する異種タンパク質のN末端断片を含む。

30

【0077】

IFN応答又はI型IFN応答の誘導又は制御に関与する異種タンパク質を含有するCARDドメインの断片は、通常は、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸100-500の何れかまでのアミノ酸配列、好ましくは、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸100-400の何れかまでのアミノ酸配列、より好ましくは、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸100300の何れかまでのアミノ酸配列、より好ましくは、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸100-294の何れかまでのアミノ酸配列、より好ましくは、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸100-246の何れかまでのアミノ酸配列を含有する。

40

【0078】

一部の実施態様では、IFN応答又はI型IFN応答の誘導又は制御に関与する異種タンパク質を含有するCARDドメインの断片は、ヒトCARDドメインの、少なくともN末端アミノ酸1且つ最大でN末端アミノ酸294を含むアミノ酸配列、少なくともN末端アミノ酸1且つ最大でN末端アミノ酸246を含むアミノ酸配列、少なくともN末端アミノ酸1且つ最大でN末端アミノ酸245を含むアミノ酸配列、少なくともN末端アミノ酸

50

1 且つ最大でN末端アミノ酸229を含むアミノ酸配列、少なくともN末端アミノ酸1且つ最大でN末端アミノ酸228を含むアミノ酸配列、少なくともN末端アミノ酸1且つ最大でN末端アミノ酸218を含むアミノ酸配列、少なくともN末端アミノ酸1且つ最大でN末端アミノ酸217を含むアミノ酸配列、少なくともN末端アミノ酸1且つ最大でN末端アミノ酸100を含むアミノ酸配列、及び少なくともN末端アミノ酸1且つ最大でN末端アミノ酸101を含むアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含有し、より特に、少なくともN末端アミノ酸1且つ最大でN末端アミノ酸245を含むアミノ酸配列、少なくともN末端アミノ酸1且つ最大でN末端アミノ酸228を含むアミノ酸配列、少なくともN末端アミノ酸1且つ最大でN末端アミノ酸217を含むアミノ酸配列、及び少なくともN末端アミノ酸1且つ最大でN末端アミノ酸100を含むアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含有する。

10

【0079】

一部の好ましい実施態様では、IFN応答又はI型IFN応答の誘導又は制御に關与する異種タンパク質を含有するCARDドメインの断片は、ヒトCARDドメインの、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸294までのアミノ酸配列、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸246までのアミノ酸配列、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸245までのアミノ酸配列、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸229までのアミノ酸配列、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸228までのアミノ酸配列、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸218までのアミノ酸配列、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸217までのアミノ酸配列、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸100までのアミノ酸配列、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸101までのアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含有し、より特に、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸245までのアミノ酸配列、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸228までのアミノ酸配列、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸217までのアミノ酸配列、及びN末端アミノ酸1からN末端アミノ酸100までのアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含有する。

20

【0080】

サイクリック - ジAMP、サイクリック - ジGMP及びサイクリック - ジGAMPシクラーゼ等の、サイクリックジヌクレオチド生成酵素の断片は、ヒトcGASの、通常は、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸100 - 600の何れかまでのアミノ酸配列、好ましくは、N末端アミノ酸50からN末端アミノ酸100 - 550の何れかまでのアミノ酸配列、より好ましくは、N末端アミノ酸60からN末端アミノ酸100 - 530の何れかまでのアミノ酸配列、特に、N末端アミノ酸60からN末端アミノ酸530までのアミノ酸配列、N末端アミノ酸146からN末端アミノ酸507までのアミノ酸配列、又はN末端アミノ酸161からN末端アミノ酸530までのアミノ酸配列、より特に、N末端アミノ酸161からN末端アミノ酸530までのアミノ酸配列を含有する。一部の実施態様では、cGASの断片は、特に、少なくともN末端アミノ酸60且つ最大でN末端アミノ酸N末端アミノ酸422を含むアミノ酸配列、少なくともN末端アミノ酸146且つ最大でN末端アミノ酸N末端アミノ酸507を含むアミノ酸配列、及び少なくともN末端アミノ酸161且つ最大でN末端アミノ酸N末端アミノ酸522を含むアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含有する。一部の実施態様では、cGASの断片は、より特に、N末端アミノ酸60からN末端アミノ酸N末端アミノ酸422までのアミノ酸配列、N末端アミノ酸146からN末端アミノ酸507までのアミノ酸配列、及びN末端アミノ酸161からN末端アミノ酸522までのアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含有する。

30

40

【0081】

より好ましい実施態様では、I型IFN応答の誘導又は制御に關与する異種タンパク質は、RIG1、MDA5及びMAVS/IPS-1又はその断片並びにcGAS及びその断片を含むCARDドメインからなる群から選択され、特に、RIG1及びその断片を含むCARDドメイン、MAVS/IPS-1及びその断片並びにcGAS及びその断片を含むCARDドメインからなる群から選択される。これらのタンパク質の断片が特に好ま

50

しい。このより好ましい実施態様では、R I G 1、M D A 5、M A V S / I P S - 1を含むC A R Dドメインは、天然に存在するC A R Dドメイン及びさらに、天然に存在するC A R Dドメインに続いて、R I G - 1場合は、天然に存在するヘリカーゼドメイン若しくはその断片、好ましくは1 - 5 0 0、より好ましくは1 - 2 5 0、よりいっそう好ましくは1 - 1 5 0アミノ酸を含有する断片（この天然に存在するヘリカーゼドメイン又は断片は、機能性でなく、すなわち、C A R Dドメインに結合しない）を含む追加のC末端アミノ酸を含み、又はM A V S / I P S - 1の場合は、下流のC末端配列若しくはその断片、好ましくは1 - 5 0 0、より好ましくは1 - 2 5 0、よりいっそう好ましくは1 - 1 5 0アミノ酸を含有する断片を含む。これらの実施態様では、c G A S及びその断片は、通常、天然に存在するシンターゼドメイン（N T a s eコア及びC末端ドメイン；^{6 5}に記載されているような及びヒトタンパク質についてのU n i p r o t . Q 8 N 8 8 4の通りの、ヒトc G A Sのアミノ酸1 6 0 - 5 2 2）を含み、好ましくは、c G A S及びその断片は、天然に存在するシンターゼドメインを含むが、部分的又は完全なN末端ドメインの欠失、好ましくは、完全なN末端ヘリカーゼ伸長部（N末端ヘリカル伸長部；^{6 5}に記載されているような及びヒトタンパク質についてのU n i p r o t . Q 8 N 8 8 4の通りのヒトc G A Sのアミノ酸1 - 1 6 0）の欠失を有する。部分的又は完全なN末端ドメインの欠失は、好ましくは、アミノ鎖1 - 5 9の欠失である。

【 0 0 8 2 】

一部の実施態様では、I型I F N応答の誘導又は制御に関与する異種タンパク質は、R I G - I様受容体（R L R）ファミリー（例えば、R I G 1及びM D A 5）及びその断片と、抗ウイルスシグナル伝達及びI型I F N誘導に関与するタンパク質を含有する他のC A R Dドメイン（例えば、M A V S / I P S - 1）及びその断片と、S T I N Gの刺激をもたらすW s p R、D n c V、D i s A及びD i s A様、C d a A、C d a S及びc G A S並びにその断片からなる群から選択されるサイクリック - ジA M P、サイクリック - ジG M P及びサイクリック - ジG A M Pシクラーゼ等のサイクリックジヌクレオチド生成酵素とからなる群から選択される。

【 0 0 8 3 】

一部の実施態様では、I型I F N応答の誘導又は制御に関与する異種タンパク質は、R I G 1、M D A 5、L G P 2、M A V S / I P S - 1、W s p R、D n c V、D i s A及びD i s A様、C d a A、C d a S並びにc G A S又はその断片からなる群から選択され、より好ましくは、R I G 1、W s p R、D n c V、D i s A様及びc G A S又はその断片からなる群から選択される。

【 0 0 8 4 】

より好ましい実施態様では、I型I F N応答の誘導又は制御に関与するタンパク質は、R I G 1、M D A 5、M A V S / I P S - 1、W s p R、D n c V、D i s A及びD i s A様、C d a A並びにc G A S又はその断片からなる群から選択され、よりいっそう好ましくは、R I G 1、M D A 5、M A V S / I P S - 1、W s p R、D n c V、D i s A様、C d a A及びc G A S又はその断片からなる群から選択され、特に、R I G 1、M A V S / I P S - 1及びc G A S又はその断片からなる群から選択される。これらのタンパク質の断片が特に好ましい。

【 0 0 8 5 】

このより好ましい実施態様では、R I G 1、M D A 5、M A V S / I P S - 1の断片は、通常、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸1 0 0 - 5 0 0の何れかまでのアミノ酸配列、好ましくは、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸1 0 0 - 4 0 0の何れかまでのアミノ酸配列、より好ましくは、N末端アミノ酸1からN末端アミノ酸1 0 0 - 3 0 0の何れかまでのアミノ酸配列を含有する。

【 0 0 8 6 】

このより好ましい実施態様では、R I G 1の断片は、少なくともN末端アミノ酸1且つ最大でN末端アミノ酸2 4 6を含むアミノ酸配列、少なくともN末端アミノ酸1且つ最大でN末端アミノ酸2 4 5を含むアミノ酸配列、少なくともN末端アミノ酸1且つ最大でN

10

20

30

40

50

末端アミノ酸 229 を含むアミノ酸配列、少なくとも N 末端アミノ酸 1 且つ最大で N 末端アミノ酸 228 を含むアミノ酸配列、少なくとも N 末端アミノ酸 1 且つ最大で N 末端アミノ酸 218 を含むアミノ酸配列並びに少なくとも N 末端アミノ酸 1 且つ最大で N 末端アミノ酸 217 を含むアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含有し、MAVS / IPS - 1 の断片は、少なくとも N 末端アミノ酸 1 且つ最大で N 末端アミノ酸 100 を含むアミノ酸配列並びに少なくとも N 末端アミノ酸 1 且つ最大で N 末端アミノ酸 101 を含むアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含有する。

【0087】

このより好ましい実施態様では、RIG1 の断片は、より特に、N 末端アミノ酸 1 から N 末端アミノ酸配列 246 までのアミノ酸配列、N 末端アミノ酸 1 から N 末端アミノ酸 245 を含むアミノ酸配列、N 末端アミノ酸 1 から N 末端アミノ酸 229 までのアミノ酸配列、N 末端アミノ酸 1 から N 末端アミノ酸 228 までのアミノ酸配列、N 末端アミノ酸 1 から N 末端アミノ酸 218 までのアミノ酸配列及び N 末端アミノ酸 1 から N 末端アミノ酸 217 までのアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含有し、MAVS / IPS - 1 の断片は、より特に、N 末端アミノ酸 1 から N 末端アミノ酸 100 までのアミノ酸配列及び N 末端アミノ酸 1 から N 末端アミノ酸 101 までのアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含有する。

【0088】

このより好ましい実施態様では、cGAS の断片は、ヒト cGAS の、通常は、N 末端アミノ酸 1 から N 末端アミノ酸 100 - 600 の何れかまでのアミノ酸配列、好ましくは、N 末端アミノ酸 50 から N 末端アミノ酸 100 - 550 の何れかまでのアミノ酸配列、より好ましくは、N 末端アミノ酸 60 から N 末端アミノ酸 100 - 530 の何れかまでのアミノ酸配列、特に、N 末端アミノ酸 60 から N 末端アミノ酸 530 までのアミノ酸配列、N 末端アミノ酸 146 から N 末端アミノ酸 507 までのアミノ酸配列、又は N 末端アミノ酸 161 から N 末端アミノ酸 530 までのアミノ酸配列、より特に、N 末端アミノ酸 60 から N 末端アミノ酸 530 までのアミノ酸配列、又は N 末端アミノ酸 161 から N 末端アミノ酸 530 までのアミノ酸配列を含有する。

【0089】

このより好ましい実施態様では、cGAS の断片は、特に、少なくとも N 末端アミノ酸 60 且つ最大で N 末端アミノ酸 N 末端アミノ酸 422 を含むアミノ酸配列、少なくとも N 末端アミノ酸 146 且つ最大で N 末端アミノ酸 N 末端アミノ酸 507 を含むアミノ酸配列、及び少なくとも N 末端アミノ酸 161 且つ最大で N 末端アミノ酸 N 末端アミノ酸 522 を含むアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含有する。

【0090】

このより好ましい実施態様では、cGAS の断片は、より特に、N 末端アミノ酸 60 から N 末端アミノ酸 422 までのアミノ酸配列、N 末端アミノ酸 146 から N 末端アミノ酸 507 までのアミノ酸配列、N 末端アミノ酸 161 から N 末端アミノ酸 522 までのアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含有する。

【0091】

よりいっそう好ましい実施態様では、I 型 IFN 応答の誘導又は制御に関するタンパク質は、ヒト RIG1 CARD ドメイン₁₋₂₄₅ (配列番号 37)、ヒト RIG1 CARD ドメイン₁₋₂₂₈ (配列番号 128)、ヒト RIG1 CARD ドメイン₁₋₂₁₇ (配列番号 129)、マウス RIG1 CARD ドメイン₁₋₂₄₆ (配列番号 38)、マウス RIG1 CARD ドメイン₁₋₂₂₉ (配列番号 110)、マウス RIG1 CARD ドメイン₁₋₂₁₈ (配列番号 111)、ヒト MAVS CARD ドメイン₁₋₁₀₀ (配列番号 116)、マウス MAVS CARD ドメイン₁₋₁₀₁ (配列番号 130)、N . ベクテンシス (N . v e c t e n s i s) c G A S (配列番号 43)、ヒト cGAS₁₆₁₋₅₂₂ (配列番号 115)、マウス cGAS₁₄₆₋₅₀₇ (配列番号 131) 及び N . ベクテンシス cGAS₆₀₋₄₂₂ (配列番号 117) からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【0092】

特に好ましい実施態様では、I型IFN応答の誘導又は制御に關与するタンパク質、この場合のI型IFN応答の誘導又は制御に關与するタンパク質は、ヒトCARDドメイン₁₋₂₄₅(配列番号37)、ヒトRIG1 CARDドメイン₁₋₂₂₈(配列番号128)、ヒトRIG1 CARDドメイン₁₋₂₁₇(配列番号129)、ヒトMAVS CARDドメイン₁₋₁₀₀(配列番号116)、及びヒトcGAS₁₆₁₋₅₂₂(配列番号115)からなる群から選択される。

【0093】

より特に好ましい実施態様では、I型IFN応答の誘導又は制御に關与するタンパク質は、ヒトRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₅、マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆、マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₂₉、マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₁₈、ヒトMAVS₁₋₁₀₀、N・ベクテンシScGAS、ヒトcGAS₁₆₁₋₅₂₂及びN・ベクテンシScGAS₆₀₋₄₂₂からなる群から選択される。

10

【0094】

RIG-I様受容体(RLR)ファミリーは、RIG1、MDA5及びLGP2からなる群から選択されるタンパク質を含む。I型IFN応答の誘導又は制御に關与する好ましい異種タンパク質は、CARDドメイン含有タンパク質RIG1及びMDA5、特に、CARDドメイン含有タンパク質RIG1である。I型IFN誘導に關与する他のCARDドメイン含有タンパク質は、MAVS/IPs-1からなる群から選択されるタンパク質を含む。

20

【0095】

一部の好ましい態様では、I型IFN応答の誘導又は制御に關与する異種タンパク質は、RIG1のCARDドメイン、MDA5のCARDドメイン、及び/又はMAVS/IPs-1のCARDドメイン、並びにWspR、DncV、DisA及びDisA様、CdaA、CdaS並びにcGAS並びにその断片を含む群から選択され、好ましくは、RIG1のCARDドメイン及び/又はMAVS/IPs-1のCARDドメイン、並びにWspR、DncV、DisA及びDisA様、CdaA並びにcGAS又はその断片を含むタンパク質の群から選択される。

【0096】

一部の好ましい実施態様では、I型IFN応答の誘導又は制御に關与する異種タンパク質は、RIG1のCARDドメイン、MDA5のCARDドメイン、MAVS/IPs-1のCARDドメイン、WspR、DncV、DisA及びDisA様、CdaA、CdaS並びにcGASからなる群から選択され、より好ましくは、RIG1のCARDドメイン、WspR、DncV、DisA様及びcGASからなる群から選択される。

30

【0097】

一部の好ましい実施態様では、I型IFN応答の誘導又は制御に關与する異種タンパク質は、RIG1、MDA5及び/又はMAVS/IPs-1の、好ましくは、RIG1及び/又はMAVS/IPs-1の、一又は複数(例えば、2、3又は4)のCARDドメインを含む。より好ましい実施態様では、I型IFN応答の誘導又は制御に關与する異種タンパク質は、RIG1又はMDA5、特にRIG1の、両方のCARDドメインを含む。

40

【0098】

一部の実施態様では、I型IFN応答の誘導又は制御に關与する異種タンパク質は、酵素機能のないI型IFN応答誘導タンパク質、又は酵素機能を有するI型IFN応答誘導タンパク質からなる群から選択される。本発明により包含される酵素機能のないI型IFN応答誘導タンパク質は、通常は少なくとも1つのCARDドメイン、好ましくは2つのCARDドメインを含む。CARDドメインは、通常は、アルファヘリックス6-7つの束から構成され、好ましくは、疎水性コアと荷電残基から構成される外面とを有する逆平行アルファヘリックス6-7つという構成から構成される。本発明により包含される酵素機能を有するI型IFN応答誘導タンパク質は、通常、STINGの刺激をもたらすサイ

50

クリックジヌクレオチド生成酵素（サイクリック - ジAMP、サイクリック - ジGMP及びサイクリック - ジGAMPシクラーゼ）又はそのドメイン、好ましくは、ジアデニル酸シクラーゼ（DAC）、ジグアニル酸シクラーゼ（DGC）若しくはGMP - AMPシクラーゼ（GAC）又はそのドメインを含む。

【0099】

本発明によれば、「アポトーシス又はアポトーシス調節に關与するタンパク質」は、これらに限定されるものではないが、Bad、Bcl2、Bak、Bmt、Bax、Puma、Noxa、Bim、Bcl-xL、Apaf1、カスパーゼ9、カスパーゼ3、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ10、DFFA、DFFB、ROCK1、APP、CAD、ICAD、CAD、EndoG、AIF、HtrA2、Smac/Diablo、Arts、ATM、ATR、Bok/Mtd、Bmf、Mcl-1(S)、IAPファミリー、LC8、PP2B、14-3-3タンパク質、PKA、PKC、PI3K、Erk1/2、p90RSK、TRAF2、TRADD、FADD、Daxx、カスパーゼ8、カスパーゼ2、RIP、RAIDD、MKK7、JNK、FLIPs、FKHR、GSK3、CDK及びそれらの阻害剤、例えばINK4ファミリー（p16(Ink4a)、p15(Ink4b)、p18(Ink4c)、p19(Ink4d)）、並びにCip1/Waf1/Kip1-2ファミリー（p21(Cip1/Waf1)、p27(Kip1)、p57(Kip2)）を含む。好ましくは、Bad、Bmt、Bcl2、Bak、Bax、Puma、Noxa、Bim、Bcl-xL、カスパーゼ9、カスパーゼ3、カスパーゼ6、カスパーゼ7、Smac/Diablo、Bok/Mtd、Bmf、Mcl-1(S)、LC8、PP2B、TRADD、Daxx、カスパーゼ8、カスパーゼ2、RIP、RAIDD、FKHR、CDK及びそれらの阻害剤、例えばINK4ファミリー（p16(Ink4a)、p15(Ink4b)、p18(Ink4c)、p19(Ink4d)）、最も好ましくは、BIM、Bid、切断型Bid、FADD、カスパーゼ3（及びそのサブユニット）、Bax、Bad、Akt、CDK及びそれらの阻害剤、例えばINK4ファミリー（p16(Ink4a)、p15(Ink4b)、p18(Ink4c)、p19(Ink4d)）が、使用される¹¹⁻¹³。加えて、アポトーシス又はアポトーシス調節に關与するタンパク質は、DIVA、Bcl-Xs、Nbk/Bik、Hrk/Dp5、Bid及びtBid、Egl-1、Bcl-Gs、シトクロムC、ベクリン、CED-13、BNIP1、BNIP3、Bcl-B、Bcl-W、Ced-9、A1、NR13、Bfl-1、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ8を含む。アポトーシス又はアポトーシス調節に關与するタンパク質は、アポトーシス促進性タンパク質、抗アポトーシスタンパク質、アポトーシス阻止経路の阻害剤、及び生存促進性シグナル伝達又は経路の阻害剤からなる群から選択される。アポトーシス促進性タンパク質は、Bax、Bak、Div a、Bcl-Xs、Nbk/Bik、Hrk/Dp5、Bmf、Noxa、Puma、Bim、Bad、Bid及びtBid、Bok、Apaf1、Smac/Diablo、BNIP1、BNIP3、Bcl-Gs、ベクリン1、Egl-1及びCED-13、シトクロムC、FADD、カスパーゼファミリー、並びにCDK及びそれらの阻害剤、例えばINK4ファミリー（p16(Ink4a)、p15(Ink4b)、p18(Ink4c)、p19(Ink4d)）からなる群から選択される、又はBax、Bak、Div a、Bcl-Xs、Nbk/Bik、Hrk/Dp5、Bmf、Noxa、Puma、Bim、Bad、Bid及びtBid、Bok、Egl-1、Apaf1、Smac/Diablo、BNIP1、BNIP3、Bcl-Gs、ベクリン1、Egl-1及びCED-13、シトクロムC、FADD、並びにカスパーゼファミリーからなる群から選択されるタンパク質を含む。好ましいのは、Bax、Bak、Div a、Bcl-Xs、Nbk/Bik、Hrk/Dp5、Bmf、Noxa、Puma、Bim、Bad、Bid及びtBid、Bok、Egl-1、Apaf1、BNIP1、BNIP3、Bcl-Gs、ベクリン1、Egl-1及びCED-13、Smac/Diablo、FADD、カスパーゼファミリー、CDK及びそれらの阻害剤、例えばINK4ファミリー（p16(Ink4a)、p15(Ink4b)

10

20

30

40

50

、 p 1 8 (I n k 4 c)、 p 1 9 (I n k 4 d)) である。同じく好ましいのは、 B a x、 B a k、 D i v a、 B c l - X s、 N b k / B i k、 H r k / D p 5、 B m f、 N o x a、 P u m a、 B i m、 B a d、 B i d 及び t B i d、 B o k、 A p a f 1、 B N I P 1、 B N I P 3、 B c l - G s、 ベクリン 1、 E g l - 1 及び C E D - 1 3、 S m a c / D i a b l o、 F A D D、 カスパーゼファミリーである。

【 0 1 0 0 】

抗アポトーシスタンパク質は、 B c l - 2、 B c l - X 1、 B c l - B、 B c l - W、 M c l - 1、 C e d - 9、 A 1、 N R 1 3、 I A P ファミリー及び B f 1 - 1 からなる群から選択されるタンパク質を含む。好ましいのは、 B c l - 2、 B c l - X 1、 B c l - B、 B c l - W、 M c l - 1、 C e d - 9、 A 1、 N R 1 3 及び B f 1 - 1 である。

10

【 0 1 0 1 】

アポトーシス阻止経路の阻害剤は、 B a d、 N o x a 及び C d c 2 5 A からなる群から選択されるタンパク質を含む。好ましいのは、 B a d 及び N o x a である。

【 0 1 0 2 】

生存促進性シグナル伝達又は経路の阻害剤は、 P T E N、 R O C K、 P P 2 A、 P H L P P、 J N K、 p 3 8 からなる群から選択されるタンパク質を含む。好ましいのは、 P T E N、 R O C K、 P P 2 A 及び P H L P P である。

【 0 1 0 3 】

一部の実施態様では、アポトーシス又はアポトーシス調節に関与する異種タンパク質は、 B H 3 - o n l y タンパク質、カスパーゼ、及びアポトーシスの細胞死受容体調節の細胞内シグナル伝達タンパク質からなる群から選択される。 B H 3 - o n l y タンパク質が好ましい。 B H 3 - o n l y タンパク質は、 B a d、 B I M、 B i d 及び t B i d、 P u m a、 B i k / N b k、 B o d、 H r k / D p 5、 B N I P 1、 B N I P 3、 B m f、 N o x a、 M c l - 1、 B c l - G s、 ベクリン 1、 E g l - 1 並びに C E D - 1 3 からなる群から選択されるタンパク質を含む。好ましいのは、 B a d、 B I M、 B i d 及び t B i d、 特に t B i d である。

20

【 0 1 0 4 】

カスパーゼは、カスパーゼ 1、カスパーゼ 2、カスパーゼ 3、カスパーゼ 4、カスパーゼ 5、カスパーゼ 6、カスパーゼ 7、カスパーゼ 8、カスパーゼ 9、カスパーゼ 10 からなる群から選択されるタンパク質を含む。好ましいのは、カスパーゼ 3、カスパーゼ 8 及びカスパーゼ 9 である。

30

【 0 1 0 5 】

アポトーシスの細胞死受容体調節の細胞内シグナル伝達タンパク質は、 F A D D、 T R A D D、 A S C、 B A P 3 1、 G U L P 1 / C E D - 6、 C I D E A、 M F G - E 8、 C I D E C、 R I P K 1 / R I P 1、 C R A D D、 R I P K 3 / R I P 3、 C r k、 S H B、 C r k L、 D A X X、 1 4 - 3 - 3 ファミリー、 F L I P、 D F F 4 0 及び 4 5、 P E A - 1 5、 S O D D からなる群から選択されるタンパク質を含む。好ましいのは、 F A D D 及び T R A D D である。

【 0 1 0 6 】

一部の実施態様では、アポトーシス又はアポトーシス調節に関与する 2 つの異種タンパク質であって、一方のタンパク質がアポトーシス促進性タンパク質であり、他方のタンパク質が、アポトーシス阻止経路の阻害剤であるか、又は一方のタンパク質がアポトーシス促進性タンパク質であり、他方のタンパク質が生存促進性シグナル伝達若しくは経路の阻害剤である、 2 つの異種タンパク質がグラム陰性菌株に含まれる。

40

【 0 1 0 7 】

本発明により包含されるアポトーシス促進性タンパク質は、通常、アルファヘリックス構造、好ましくは、両親媒性ヘリックスにより取り囲まれた疎水性ヘリックスを有し、通常は、 B H 1、 B H 2、 B H 3 又は B H 4 ドメインのうちの少なくとも 1 つを含み、好ましくは、少なくとも 1 つの B H 3 ドメインを有する。通常、本発明に包含されるアポトーシス促進性タンパク質は、酵素的活性を有さない。

50

【 0 1 0 8 】

本発明に包含される抗アポトーシスタンパク質は、通常、アルファヘリックス構造、好ましくは、両親媒性ヘリックスにより取り囲まれた疎水性ヘリックスを有し、異なるBH1、BH2、BH3及びBH4ドメインの組合せ、好ましくは、BH1及びBH2ドメインが存在する異なるBH1、BH2、BH3及びBH4ドメインの組合せ、より好ましくは、BH4 - BH3 - BH1 - BH2、BH1 - BH2、BH4 - BH1 - BH2又はBH3 - BH1 - BH2 (N末端からC末端へ)を含む。加えて、少なくとも1つのBIRドメインを含有するタンパク質も包含される。

【 0 1 0 9 】

本発明に包含されるアポトーシス阻止経路の阻害剤は、通常、アルファヘリックス構造、好ましくは、両親媒性ヘリックスにより取り囲まれた疎水性ヘリックスを有し、通常は1つのBH3ドメインを含む。

10

【 0 1 1 0 】

BH1、BH2、BH3又はBH4ドメインは、各々、通常は長さが約5 - 約50アミノ酸の間である。したがって、一部の実施態様では、アポトーシス又はアポトーシス調節に關与する異種タンパク質は、長さが約5 - 約200、好ましくは約5 - 約150、より好ましくは約5 - 約100、最も好ましくは約5 - 約50、特に、約5 - 約25アミノ酸である、アポトーシス又はアポトーシス調節に關与する異種タンパク質からなる群から選択される。

【 0 1 1 1 】

20

一部の実施態様では、本発明のグラム陰性菌株は、アポトーシス又はアポトーシス調節に關与する異種タンパク質の2つのドメイン、好ましくは、アポトーシス若しくはアポトーシス調節に關与するタンパク質の2つの反復、より好ましくは2つの同一の反復ドメイン、又はアポトーシス若しくはアポトーシス調節に關与する異なるタンパク質の2つのドメイン、最も好ましくは、アポトーシス又はアポトーシス調節に關与するタンパク質の2つの同一の反復ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む。一部の実施態様では、本発明のグラム陰性菌株は、アポトーシス又はアポトーシス調節に關与する異種タンパク質の2つのドメインであって、一方が、アポトーシス促進性タンパク質のドメインであり、他方が、アポトーシス阻止経路の阻害剤であるタンパク質のドメインであるか、又は一方が、アポトーシス促進性タンパク質のドメインであり、他方が、生存促進性シグナル伝達若しくは経路の阻害剤であるタンパク質のドメインである、2つのドメインをコードするヌクレオチド配列を含む。

30

【 0 1 1 2 】

特に好ましい異種タンパク質は、アポトーシス誘導因子tBIDのBH3ドメイン、より詳細には、配列番号29 - 32、好ましくは、配列番号31又は配列番号32からなる群から選択される配列を含むBH3ドメインである。

【 0 1 1 3 】

同じく好ましいのは、アポトーシス調節因子BAXのBH3ドメイン、より詳細には、配列番号33 - 36、好ましくは配列番号35又は配列番号36からなる群から選択される配列を含むBAXドメインである。ヒト及びマウス配列が配列番号に与えられているが、全ての他の種のtBID及びBAX BH3ドメインも同様に含まれる。

40

【 0 1 1 4 】

一部の実施態様では、異種タンパク質の反復ドメインは、BH3ドメイン、好ましくは、アポトーシス誘導因子tBIDの反復BH3ドメイン、より好ましくは、配列番号29 - 32又は配列番号25又は配列番号19に含まれるアポトーシス誘導因子tBIDの反復BH3ドメイン、よりいっそう好ましくは、アポトーシス誘導因子tBIDの2つの反復BH3ドメイン、最も好ましくは、配列番号29 - 32又は配列番号25又は配列番号19に含まれるアポトーシス誘導因子tBIDの2つの反復BH3ドメイン、特に、配列番号27の配列に含まれるアポトーシス誘導因子tBIDの2つの反復BH3ドメインである。したがって、好ましい実施態様では、本発明のグラム陰性菌株及び/又はベクター

50

は、BH3ドメインの2つの反復ドメイン、より好ましくはアポトーシス誘導因子tBIDの2つの反復BH3ドメイン、をコードする第2のDNA配列を含む。2つの反復ドメインは、1-30アミノ酸長、好ましくは2-15アミノ酸、より好ましくは3-10アミノ酸長のリンカーにより連結されていることもある。

【0115】

一部の実施態様では、異なる異種タンパク質の2つ以上のドメインは、タンパク質の同じ機能クラスに属する異種タンパク質のドメインであり、好ましくは、2つ以上のドメインの異なる異種タンパク質は、アポトーシス又はアポトーシス調節に關与するタンパク質のクラスとは異なる異種タンパク質である。好ましい実施態様では、異なる異種タンパク質の2つ以上のドメインは、アポトーシス誘導因子tBIDのBH3ドメイン、及びアポトーシス調節因子BAXのBH3ドメイン、特に、配列番号24及び28の配列に含まれる、融合したBH3ドメインである。異なる異種タンパク質の2つのドメインは、1-30アミノ酸長、好ましくは2-15アミノ酸、より好ましくは3-10アミノ酸長のリンカーにより連結されていることもある。

10

【0116】

別の特定の好ましい異種タンパク質は、I型IFN応答の誘導又は制御に關与するタンパク質のドメイン、より特に、配列番号37、38、110、111、128、129からなる群から選択される配列を含むRIG1のCARDドメイン、配列番号44-47、112、113、好ましくは配列番号112若しくは113からなる群から選択される配列を含むMDA5のCARDドメイン、又は配列番号116、48-49からなる群から選択される配列、好ましくは配列番号116、を含むMAVS/IPS-1のCARDドメイン、完全長cGAS、例えば、N.ベクテンシスcGAS(配列番号43)、ヒトcGAS₁₆₁₋₅₂₂(配列番号115)、N.ベクテンシスcGAS₆₀₋₄₂₂(配列番号117)又はマウスcGAS₁₄₆₋₅₀₇(配列番号131)である。最も特に、配列番号37、38、110、111、128、129からなる群から選択される配列を含むRIG1のCARDドメイン、配列番号116、48-49からなる群から選択される配列、好ましくは配列番号116を含むMAVS/IPS-1のCARDドメインタンパク質、及び完全長cGAS、例えば、N.ベクテンシスcGAS(配列番号43)、ヒトcGAS₁₆₁₋₅₂₂(配列番号115)、N.ベクテンシスcGAS₆₀₋₄₂₂(配列番号117)又はマウスcGAS₁₄₆₋₅₀₇(配列番号131)。

20

30

【0117】

一部の実施態様では、異種タンパク質は、プロドラッグ変換酵素である。これらの実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、プロドラッグ変換酵素を発現する、好ましくは、発現し、分泌する。本明細書で意味するところのプロドラッグ変換酵素は、非毒性プロドラッグを毒性プロドラッグに変換する酵素、好ましくは、シトシンデアミナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、チミジンキナーゼ、ベータガラクトシダーゼ、カルボキシエステラーゼ、ニトロレダクターゼ、カルボキシペプチダーゼ及びベータグルクロニダーゼからなる群から選択される酵素、より好ましくは、シトシンデアミナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、チミジンキナーゼ及びベータガラクトシダーゼからなる群から選択される酵素を含む。

40

【0118】

「プロテアーゼ切断部位」という用語は、本明細書で使用される場合、アミノ酸モチーフを認識する特定のプロテアーゼにより切断される、アミノ酸配列内の、例えば、タンパク質又は融合タンパク質のアミノ酸配列内の特定のアミノ酸モチーフを意味する。総説については¹⁴を参照されたい。プロテアーゼ切断部位の例は、エンテロキナーゼ(軽鎖)、エンテロペプチダーゼ、Precisionプロテアーゼ、ヒトライノウイルスプロテアーゼ(HRV-3C)、TEVプロテアーゼ、TMVプロテアーゼ、第Xa因子プロテアーゼ及びトロンピンからなる群から選択されるプロテアーゼにより切断される、アミノ酸モチーフである。

【0119】

50

以下のアミノ酸モチーフは、それぞれプロテアーゼにより認識される：

- Asp - Asp - Asp - Asp - Lys : エンテロキナーゼ (軽鎖) / エンテロペプチダーゼ
- Leu - Glu - Val - Leu - Phe - Gln / Gly - Pro : PreScissionプロテアーゼ / ヒトライノウイルスプロテアーゼ (HRV 3C)
- TEVプロテアーゼ (タバコエッチウイルス) により認識される、Glu - Asn - Leu - Tyr - Phe - Gln - Ser、及びGlu - X - X - Tyr - X - Gln - Gly / Ser (ここでのXは任意のアミノ酸である) に基づく修飾モチーフ
- Glu - Thr - Val - Arg - Phe - Gln - Ser : TVMVプロテアーゼ
- Ile - (Glu又はAsp) - Gly - Arg : 第Xa因子プロテアーゼ
- Leu - Val - Pro - Arg / Gly - Ser : トロンピン。

10

【0120】

本明細書で使用する場合のプロテアーゼ切断部位にはユビキチンが包含される。したがって、一部の好ましい実施態様では、ユビキチンがプロテアーゼ切断部位として使用される。すなわち、ヌクレオチド配列は、N末端部位で特異的ユビキチンプロセシングプロテアーゼにより切断され得る、例えば、融合タンパク質が送達される細胞において脱ユビキチン化酵素と呼ばれる特異的ユビキチンプロセシングプロテアーゼによりN末端部位で内因的に切断され得るプロテアーゼ切断部位として、ユビキチンをコードする。ユビキチンは、そのC末端で、内在性ユビキチン特異的C末端プロテアーゼ (脱ユビキチン化酵素、DUB) 群により、プロセシングされる。DUBによるユビキチンの切断は、ユビキチンのまさにC末端 (G76の後) で起こるはずである。

20

【0121】

「個体」、「対象」又は「患者」は、脊椎動物である。ある特定の実施態様では、脊椎動物は、哺乳動物である。哺乳動物は、霊長類 (ヒト及び非ヒト霊長類) 並びにげっ歯類 (例えば、マウス及びラット) を含むが、これらに限定されない。好ましい実施態様において、対象はヒトである。

【0122】

「変異」という用語は、本明細書で使用される場合、一般用語であり、単一の塩基対と複数の塩基対の両方の変化を含む。そのような変異は、置換、フレームシフト変異、欠失、挿入及びトランケーションを含み得る。

30

【0123】

「核内移行シグナル」という用語は、本明細書で使用される場合、真核細胞の核への取り込みのためのタンパク質を知らせるアミノ酸配列を意味し、好ましくは、SV40ラージT抗原由来のNLS (PPKKKRKV) 等の、ウイルス核内移行シグナルを含む。

【0124】

「多重クローニング部位」という用語は、本明細書で使用される場合、AclI、HindIII、SspI、MluCI、Tsp509I、PciI、AgeI、BspMI、BfuAI、SexAI、MluI、BceAI、HpyCH4IV、HpyCH4II、BaeI、BsaXI、AflIII、SpeI、BsrI、BmrI、BglI、AfeI、AluI、StuI、ScaI、ClaI、BspDI、PI-SceI、NsiI、AseI、SwaI、CspCI、MfeI、BssSI、BmgBI、PmlI、DraIII、AleI、EcoP15I、PvuII、AlwNI、BtsIMutI、TspRI、NdeI、NlaIII、CviAII、FatI、MslI、FspEI、XcmI、BstXI、PflMI、BccI、NcoI、BseYI、FauI、SmaI、XmaI、TspMI、Nt.CviPII、LpnPI、AciI、SacII、BsrBI、MspI、HpaII、ScrFI、BssKI、StyD4I、BsaJI、BslI、BtgI、NciI、AvrII、MnlI、BbvCI、Nb.BbvCI、Nt.BbvCI、SbfI、Bpu10I、Bsu36I、EcoNI、HpyAV、BstNI、PspGI、StyI、BcgI、PvuI、BstUI、EagI、RsrII、BsiEI、BsiWI、BsmBI、Hpy99I、M

40

50

spA1I、MspJI、SgrAI、BfaI、BspCNI、XhoI、EarI、
 AcuI、PstI、BpmI、DdeI、SfcI、AflII、BpuEI、Sml
 I、AvaI、BsoBI、MboII、BbsI、XmnI、BsmI、Nb.Bsm
 I、EcoRI、HgaI、AatII、ZraI、Tth111I PflFI、Ps
 hAI、AhdI、DrdI、Eco53kI、SacI、BseRI、PleI、Nt
 .BstNBI、MlyI、HinfI、EcoRV、MboI、Sau3AI、Dpn
 II BfuCI、DpnI、BsaBI、TfiI、BsrDI、Nb.BsrDI、
 BbvI、BtsI、Nb.BtsI、BstAPI、SfaNI、SphI、NmeA
 III、NaeI、NgoMIV、BglI、AsiSI、BtgZI、HinpI、
 HhaI、BssHII、NotI、Fnu4HI、Cac8I、MwoI、NheI、
 BmtI、SapI、BspQI、Nt.BspQI、BlpI、TseI、ApeKI
 、Bsp1286I、AlwI、Nt.AlwI、BamHI、FokI、BtsCI、
 HaeIII、PhoI、FseI、SfiI、NarI、KasI、SfoI、Plu
 TI、AscI、EciI、BsmFI、ApaI、PspOMI、Sau96I、Nl
 aIV、KpnI、Acc65I、BsaI、HphI、BstEII、AvaII、B
 anI、BaeGI、BsaHI、BanII、RsaI、CviQI、BstZ17I
 、BciVI、SalI、Nt.BsmAI、BsmAI、BcoDI、ApaLI、B
 sgI、AccI、Hpy166II、Tsp45I、HpaI、PmeI、HincI
 I、BsiHKA I、ApoI、NspI、BsrFI、BstYI、HaeII、Cv
 iKI-1、EcoO109I、PpuMI、I-CeuI、SnaBI、I-SceI
 、BspHI、BspEI、MmeI、Taq I、NruI、Hpy188I、Hpy
 188III、XbaI、BclI、HpyCH4V、FspI、PI-PspI、Ms
 cI、BsrGI、MseI、PacI、PsiI、BstBI、DraI、PspXI
 、BsaWI、BsaAI、EaeI、好ましくはXhoI、XbaI、HindIII
 、NcoI、NotI、EcoRI、EcoRV、BamHI、NheI、SacI、S
 alI、BstBI等の、制限エンドヌクレアーゼによる切断のためのいくつかの制限部
 位を含有する短いDNA配列を意味する。「多重クローニング部位」という用語は、本明
 細書で使用される場合、例えばGatewayクローニング戦略におけるような、組換え
 事象に使用される、又はギブソンアセンブリ又はTOPOクローニング等の方法に使用さ
 れる、短いDNA配列をさらに意味する。

10

20

30

【0125】

「野生型株」「野生型のグラム陰性菌株」という用語は、本明細書で使用される場合、
 天然に存在する変異株、又はベクターの使用を可能にする遺伝子修飾、例えば、制限エン
 ドヌクレアーゼ若しくは抗生物質耐性遺伝子の欠失変異を含有する天然に存在する変異株
 を意味する。これらの株は、染色体DNAはもちろん、一部の事例（例えば、Y.エンテ
 ロコリチカ、フレクスナー赤痢菌）では未修飾の毒性プラスミドも含有する。

【0126】

「エルシニア属野生型株」という用語は、本明細書で使用される場合、天然に存在する
 変異株（Y.エンテロコリチカE40のようなもの）、又はベクターの使用を可能にする
 遺伝子修飾、例えば、制限エンドヌクレアーゼ若しくは抗生物質耐性遺伝子の欠失変異
 を含有する天然に存在する変異株（Y.エンテロコリチカE40のアンピシリン感受性
 派生物である、Y.エンテロコリチカMRS40のようなものを意味する。これらの株
 は、染色体DNAはもちろん、未修飾の毒性プラスミド（pYVと呼ばれる）も含有する
 。

40

【0127】

Y.エンテロコリチカ亜種パレアーケティカは、より毒性が高い亜種エンテロコリチ
 カ株とは対照的である、低病原性Y.エンテロコリチカ株を意味する¹⁵、¹⁶。Y
 .エンテロコリチカ亜種パレアーケティカは、Y.エンテロコリチカ亜種エンテロコ
 リチカと比較して、高病原性アイランド（HPI）を欠く。このHPIは、エルシニア
 バクチンと呼ばれる鉄シデロホアをコードする¹⁷。Y.エンテロコリチカ亜種パレア

50

ークティカにおけるエルシニアバクチンの欠如により、この亜種はより低病原性になり、例えば、肝臓又は脾臓における持続感染は、誘導される全身の利用可能な鉄に左右されることになる¹⁷。例えば、患者の鉄過剰負荷を治療するために使用される鉄キレート剤であるデフェロキサミンでの前治療により、個体の体内の細菌に鉄を利用可能にすることができる¹⁸。

【0128】

「含む (comprise)」という用語は、含む (include)、すなわち、一又は複数の特徴又は成分の存在を可能にするという意味で、一般に使用される。

【0129】

「約」という用語は、規定値の値範囲 $\pm 10\%$ を意味する。例えば、「約200」という句は、200の $\pm 10\%$ 、すなわち180 - 220を含む。

10

【0130】

一態様では、本発明は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレイムで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列が、プロモーターに作用可能に連結されている、組換え弱毒化グラム陰性菌株であって、増殖に必須の内在性タンパク質をコードする染色体遺伝子の欠失、及びプロモーターに作用可能に連結されている増殖に必須の前記内在性タンパク質をコードする遺伝子を含むヌクレオチド配列を含む内在性毒性プラスミドをさらに含む組換え弱毒化グラム陰性菌株を提供する。

20

【0131】

さらなる態様では、本発明は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレイムで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列が、プロモーターに作用可能に連結されている、組換え弱毒化グラム陰性菌株であって、内在性AraC型DNA結合タンパク質をコードする遺伝子の近位のRNA温度センサー領域内のRNA内のモジュレーションをさらに含む組換え弱毒化グラム陰性菌株を提供する。

【0132】

さらなる態様では、本発明は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレイムで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子を含み、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列が、プロモーターに作用可能に連結されている、組換え弱毒化グラム陰性菌株であって、異種タンパク質が、インターフェロン(IFN)応答の誘導又は制御に関与するタンパク質である、組換え弱毒化グラム陰性菌株を提供する。

30

【0133】

さらなる態様では、本発明は、対象に前記組換え弱毒化グラム陰性菌株を投与することを含む、対象のがんを治療する方法であって、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、対象を治療するために十分な量で投与される、方法において使用するための本明細書に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株を提供する。好ましくは、本発明は、対象の悪性固形腫瘍がんを治療する方法において使用するための、前記悪性固形腫瘍内に蓄積する、本明細書に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株であって、前記方法が、対象に前記組換え弱毒化グラム陰性菌株を投与することを含み、組換え弱毒化グラム陰性菌株が、対象を治療するために十分な量で投与される、組換え弱毒化グラム陰性菌株を提供する。

40

【0134】

一部の実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、真核細胞に対して毒性である少なくとも1つの細菌エフェクタータンパク質の産生が不十分である。

【0135】

本発明の一実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、5'から3'方向に、

50

プロモーター、

前記プロモーターに作用可能に連結されている、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードする第1のヌクレオチド配列、

前記第1のヌクレオチド配列の3'末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードする第2のヌクレオチド配列

を含む、ヌクレオチド分子、例えばベクターで、形質転換される。

【0136】

本発明の一実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、5'から3'方向に、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナル又はその断片をコードする第1のヌクレオチド配列、

前記第1のヌクレオチド配列の3'末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードする第2のヌクレオチド配列

を含む、ヌクレオチド分子、例えばベクターで、形質転換される。

【0137】

好ましくは、異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、その3'末端に、染色体のヌクレオチド配列と、若しくは内在性毒性プラスミドの細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルの3'末端におけるヌクレオチド配列と相同な、又はその断片と相同な、ヌクレオチド配列が隣接している。より好ましくは、異種タンパク質にその3'末端で隣接しているこのヌクレオチド配列は、染色体上の若しくは細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルの3'末端における内在性毒性プラスミド上の10kbp以内に位置するヌクレオチド配列と、又はその断片と相同である。特に、相同タンパク質にその3'末端で隣接しているこのヌクレオチド配列は、染色体上の若しくは内在性毒性プラスミド上の、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルと同じオペロン内にあるヌクレオチド配列又はその断片と相同である。この実施態様では、形質転換は、融合ヌクレオチド配列が、組換え弱毒化グラム陰性菌株の内在性毒性プラスミド又は染色体、好ましくは内在性毒性プラスミドに対する相同組換えにより挿入され、融合ヌクレオチド配列が、内在性毒性プラスミドの、又は染色体の、例えば染色体病原性アイランドの、プロモーターに作用可能に連結されるように、通常は行われる。好ましくは、融合ヌクレオチド配列は、内在性毒性プラスミドのプロモーターに作用可能に連結される。この実施態様では、ヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列が、内在性プロモーターに作用可能に連結されている染色体又は内在性毒性プラスミド送達シグナルの3'末端とインフレームで配置される結果となるような、染色体の又は内在性毒性プラスミドの、好ましくは内在性毒性プラスミド上の、相同部位での相同組換えをもたらす、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナル又はその断片、好ましくはその断片を含む。

【0138】

本発明のさらなる実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列と、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列と相同若しくは同一であるか又は細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルの断片をコードするヌクレオチド配列と相同若しくは同一であるヌクレオチド配列とを含むヌクレオチド分子、好ましくはDNAヌクレオチド分子で形質転換され、この場合、細菌エフェクタータンパク質又はその断片からの送達シグナルは、組換え弱毒化グラム陰性菌株の染色体上に又は内在性毒性プラスミド上にコードされている。好ましくは、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルのヌクレオチド配列と又はその断片と相同又は同一であるヌクレオチド配列は、異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列の5'末端に位置する。より好ましくは、異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列には、その3'末端で、染色体の若しくは内在性毒性プラスミドの細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルの3'末端におけるヌクレオチド配列と相同な又はその断片と相同なヌクレオチド配列が隣接している。よりいっそう好ましくは、相同タンパク質にその3'末端で隣接しているこのヌクレオチド配列は、染色体上の若しくは内在性毒性プラスミド上の細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルの3'末端において1

10

20

30

40

50

0 k b p 以内に位置するヌクレオチド配列と又はその断片と相同である。特に、相同タンパク質にその3'末端で隣接しているこのヌクレオチド配列は、上記ヌクレオチド配列と相同であり、染色体上の又は内在性毒性プラスミド上の細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナル又はその断片と同じオペロン内にある。この実施態様では、形質転換は、異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、組換え弱毒化グラム陰性菌株の内在性毒性プラスミド又は染色体の、好ましくは内在性毒性プラスミド上の、該染色体又は該内在性毒性プラスミドによりコードされている細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルの3'末端に、挿入され、そこで送達シグナルに融合している異種タンパク質が発現され、分泌されるように行われる。

【0139】

本発明の一実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、増殖に必須の内在性タンパク質をコードする染色体遺伝子の欠失、及びプロモーターに作用可能に連結されている増殖に必須の前記内在性タンパク質をコードする遺伝子を含むヌクレオチド配列を含む内在性毒性プラスミドを含む。通常、内在性毒性プラスミド上の増殖に必須の内在性タンパク質をコードする遺伝子は、欠失される染色体遺伝子によりコードされているのと同じ、増殖に必須の内在性タンパク質をコードする。好ましくは、内在性毒性プラスミド上に位置する、増殖に必須の内在性酵素をコードする遺伝子は、その内在性プロモーター及びその内在性転写ターミネーターを含む。組換え弱毒化グラム陰性菌株が、エルシニア属株である場合、増殖に必須の内在性酵素をコードする遺伝子は、内在性毒性プラスミド p Y V 上に位置し、好ましくは、その内在性プロモーター及びその内在性転写ターミネーターを含む。増殖に必須の内在性酵素をコードする遺伝子、内在性プロモーター及び内在性転写ターミネーターは、好ましくは、内在性毒性プラスミド上の、例えば p Y V 上の、orf 155 (S y c O) の開始点の122 b p 上流に位置する。増殖に必須の内在性酵素をコードする遺伝子、内在性プロモーター及び内在性転写ターミネーターは、通常、Y . エンテロコリチカ M R S 4 0 及び E 4 0 株の毒性プラスミドである p Y V e 4 0 に見られるが、Y . エンテロコリチカ W 2 2 7 0 3 (G e n b a n k : A F 1 0 2 9 9 0 . 1) の毒性プラスミドである p Y V e 2 7 7 には見られない挿入配列を置換する。

【0140】

組換え弱毒化グラム陰性菌株がエルシニア属株である場合、内在性毒性プラスミドは、p Y V (エルシニア属毒性のプラスミド (p l a s m i d o f Y e r s i n i a v i r u l e n c e)) である。組換え弱毒化グラム陰性菌株がサルモネラ属株である場合、挿入のための内在位置は、S p i I 又は S p i I I と呼ばれる (サルモネラ属病原性アイランド (S a l m o n e l l a p a t h o g e n i c i t y i s l a n d) についての) 遺伝子クラスターの1つ、エフェクタータンパク質が他の場所にコードされている位置であるか、或いはサルモネラ属毒性プラスミド (S V P : S a l m o n e l l a v i r u l e n c e p l a s m i d) の1つである。

【0141】

好ましくは、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、内在性毒性プラスミド上の細菌エフェクタータンパク質の天然部位に、例えば毒性因子の天然部位に、好ましくは、組換え弱毒化グラム陰性菌株がエルシニア属株である場合、Y o p E 若しくは別の Y o p (Y o p H , Y o p O , Y o p P , Y o p M , Y o p T) の天然部位に、好ましくは Y o p E の天然部位に、又は組換え弱毒化グラム陰性菌株がサルモネラ属株である場合、S p i I , S p i I I 内にコードされている若しくは他の場所にコードされているエフェクタータンパク質の天然部位に、好ましくは、S i p I 若しくは S p i I I 内にコードされているエフェクタータンパク質の天然部位に、より好ましくは、S o p E 若しくは S t e A の天然部位に、挿入される。好ましくは、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、内在性毒性プラスミド上の細菌エフェクタータンパク質のネイティブプロモーターに、例えば、組換え

10

20

30

40

50

弱毒化グラム陰性菌株がエルシニア属株である場合、下で概要を示すようなエルシニア属ビルロン遺伝子からの天然プロモーターに、より好ましくは、天然YopEプロモーター又は別のYop(YopH、YopO、YopP、YopM、YopT)プロモーターに、好ましくは天然YopEプロモーターに、或いは組換え弱毒化グラム陰性菌株がサルモネラ属株である場合、SpiI若しくはSpiII病原性アイランドからの又は下で概要を示すような他の場所にコードされているエフェクタータンパク質からの天然プロモーターに、より好ましくは、天然SopE、InvB又はSteAプロモーターに、作用可能に連結されている。

【0142】

本発明の一実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、増殖に必須の内在性タンパク質をコードする染色体遺伝子の欠失、及びプロモーターに作用可能に連結されている増殖に必須の前記内在性タンパク質をコードする遺伝子を含むヌクレオチド配列を含む内在性毒性プラスミドを含み、増殖に必須の内在性タンパク質をコードする遺伝子は、アミノ酸産生に必須の酵素をコードする遺伝子、ペプチドグリカン生合成に關与する酵素をコードする遺伝子、LPS生合成に關与する酵素をコードする遺伝子、ヌクレオチド合成に關与する酵素をコードする遺伝子、及び翻訳開始因子をコードする遺伝子から選択される。

【0143】

本発明の一実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、増殖に必須の内在性タンパク質をコードする染色体遺伝子の欠失、及びプロモーターに作用可能に連結されている増殖に必須の前記内在性タンパク質をコードする遺伝子を含むヌクレオチド配列を含む内在性毒性プラスミドを含み、増殖に必須の内在性酵素をコードする遺伝子は、アミノ酸産生に必須の酵素をコードする遺伝子であり、アミノ酸産生に必須の前記酵素は、アスパラギン酸-ベータ-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(aspD)、グルタミンシンターゼ(glnA)、トリプトファンtRNAシンターゼ(trpS)若しくはセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ(glyA)、又はトランスケトラーゼ1(tk tA)、トランスケトラーゼ2(tk tB)、リブロースリン酸3-エピメラーゼ(rpe)、リブロース-5-リン酸イソメラーゼA(rpiA)、トランスアルドラーゼA(talA)、トランスアルドラーゼB(talB)、ホスホリボシルピロリン酸シンターゼ(prs)、ATPホスホリボシルトランスフェラーゼ(hisG)、ヒスチジン生合成二機能性タンパク質HisIE(hisI)、1-(5-ホスホリボシル)-5-[(5-ホスホリボシルアミノ)メチリデンアミノ]イミダゾール-4-カルボキサミドイソメラーゼ(hisA)、イミダゾールグリセロールリン酸シンターゼサブユニットHisH(hisH)、イミダゾールグリセロールリン酸シンターゼサブユニットHisF(hisF)、ヒスチジン生合成二機能性タンパク質HisB(hisB)、ヒスチジノールリン酸アミノトランスフェラーゼ(hisC)、ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ(hisD)、3-デヒドロキナ酸シンターゼ(aroB)、3-デヒドロキナ酸デヒドラターゼ(aroD)、シキミ酸デヒドロゲナーゼ(NADP(+))(aroE)、シキミ酸キナーゼ2(aroL)、シキミ酸キナーゼ1(aroK)、3-ホスホシキミ酸1-カルボキシピニルトランスフェラーゼ(aroA)、コリスミ酸シンターゼ(aroC)、Pタンパク質(pheA)、Tタンパク質(tyrA)、芳香族アミノ酸アミノトランスフェラーゼ(tyrB)、ホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ(aroG)、ホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ(aroH)、ホスホ-2-デヒドロ-3-デオキシヘプトン酸アルドラーゼ(aroF)、キナ酸/シキミ酸デヒドロゲナーゼ(ydiB)、ATP依存性6-ホスホフルクトキナーゼアイソザイム1(pfkA)、ATP依存性6-ホスホフルクトキナーゼアイソザイム2(pfkB)、フルクトース二リン酸アルドラーゼクラス2(fbaA)、フルクトース二リン酸アルドラーゼクラス1(fbaB)、トリオースリン酸イソメラーゼ(tpiA)、ピルビン酸キナーゼ(pykF)、ピルビン酸キナーゼII(pykA)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼA(gapA)、ホスホグリセリン酸キナーゼ(pgk)、2,3-ビスホスホグリセリン酸依存性ホスホグリセリン酸ムターゼ(gpmA)、2,

10

20

30

40

50

3 - ビスホスホグリセリン酸非依存性ホスホグリセリン酸ムターゼ (g p m M / y i b O)、高可能性ホスホグリセリン酸ムターゼ (y t j C / g p m B)、エノラーゼ (e n o)、D - 3 - ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ (s e r A)、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ (s e r C)、ホスホセリンホスファターゼ (s e r B)、L - セリンデヒドラターゼ1 (s d a A)、L - セリンデヒドラターゼ2 (s d a B)、L - スレオニンデヒドラターゼ・異化作用性 (t d c B)、L - スレオニンデヒドラターゼ・生合成性 (i l v A)、L - セリンデヒドラターゼ (t d c G)、セリンアセチルトランスフェラーゼ (c y s E)、システインシクターゼA (c y s K)、システインシクターゼB (c y s M)、ベータ - シスタチオナーゼ (m a l Y)、シスタチオンベータ - リアーゼ (m e t C)、5 - メチルトetraヒドロプテロイルトリグルタミン酸 - ホモシステインメチルトランスフェラーゼ (m e t E)、メチオニンシクターゼ (m e t H)、S - アデノシルメチオニンシクターゼ (m e t K)、シスタチオニンガンマ - シクターゼ (m e t B)、ホモセリンO - スクシニルトランスフェラーゼ (m e t A)、5' - メチルチオアデノシン / S - アデノシルホモシステインヌクレオシダーゼ (m t n N)、S - リボシルホモシステインリアーゼ (l u x S)、シスタチオンベータリアーゼ、シスタチオンガンマリアーゼ、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (g l y A)、グリシンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (i t a E)、3 - イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼ小サブユニット (l e u D)、3 - イソプロピルリンゴ酸デヒドラターゼ大サブユニット (l e u C)、3 - イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (l e u B)、L - スレオニンデヒドラターゼ・生合成性 (i l v A)、アセト乳酸シクターゼアイソザイム3大サブユニット (i l v I)、アセト乳酸シクターゼアイソザイム3小サブユニット (i l v H)、アセト乳酸シクターゼアイソザイム1小サブユニット (i l v N)、アセト乳酸シクターゼアイソザイム2小サブユニット (i l v M)、ケトール酸レダクトイソメラーゼ (N A D P (+)) (i l v C)、ジヒドロキシ酸デヒドラターゼ (i l v D)、分岐鎖アミノ酸アミノトランスフェラーゼ (i l v E)、二機能性アスパルトキナーゼ / ホモセリンデヒドロゲナーゼ1 (t h r A)、二機能性アスパルトキナーゼ / ホモセリンデヒドロゲナーゼ2 (m e t L)、2 - イソプロピルリンゴ酸シクターゼ (l e u A)、グルタミン酸 - ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ (a l a A)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (a s p C)、二機能性アスパルトキナーゼ / ホモセリンデヒドロゲナーゼ1 (t h r A)、二機能性アスパルトキナーゼ / ホモセリンデヒドロゲナーゼ2 (m e t L)、リジン感受性アスパルトキナーゼ3 (l y s C)、アスパラギン酸 - セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (a s d)、2 - ケト - 3 - デオキシ - ガラクトン酸アルドラーゼ (y a g E)、4 - ヒドロキシ - テトラヒドロジピコリン酸シクターゼ (d a p A)、4 - ヒドロキシ - テトラヒドロジピコリン酸レダクターゼ (d a p B)、2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロピリジン - 2 , 6 - ジカルボン酸N - スクシニルトランスフェラーゼ (d a p D)、スクシニル - ジアミノピメリン酸デスクシニラーゼ (d a p E)、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ (d a p F)、推定的リアーゼ (y j h H)、アセチルオルニチン / スクシニルジアミノピメリン酸アミノトランスフェラーゼ (a r g D)、クエン酸シクターゼ (g l t A)、アコニット酸ヒドラターゼB (a c n B)、アコニット酸ヒドラターゼA (a c n A)、特徴づけられていない推定的アコニット酸ヒドラターゼ (y b h J)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (i c d)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (a s p C)、グルタミン酸 - ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ (a l a A)、グルタミン酸シクターゼ [N A D P H] 長鎖 (g l t B)、グルタミン酸シクターゼ [N A D P H] 短鎖 (g l t D)、グルタミンシクターゼ (g l n A)、アミノ酸アセチルトランスフェラーゼ (a r g A)、アセチルグルタミン酸キナーゼ (a r g B)、N - アセチル - ガンマ - グルタミル - リン酸レダクターゼ (a r g C)、アセチルオルニチン / スクシニルジアミノピメリン酸アミノトランスフェラーゼ (a r g D)、アセチルオルニチンデアセチラーゼ (a r g E)、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼF鎖 (a r g F)、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼI鎖 (a r g I)、アルギニノコハク酸シクターゼ (a r g G)、アルギニノコハク酸リアーゼ (a r g H)、グルタミン酸5 - キ

10

20

30

40

50

ナーゼ (*proB*)、ガンマ - グルタミルリン酸レダクターゼ (*proA*)、ピロリン - 5 - カルボン酸レダクターゼ (*proC*)、オルニチンシクロデアミナーゼ、ロイシン - tRNAリガーゼ (*leuS*)、グルタミン - tRNAリガーゼ (*glnS*)、セリン - tRNAリガーゼ (*serS*)、グリシン - tRNAリガーゼベータサブユニット (*glyS*)、グリシン - tRNAリガーゼアルファサブユニット (*glyQ*)、チロシン - tRNAリガーゼ (*tyrS*)、スレオニン - tRNAリガーゼ (*thrS*)、フェニルアラニン - tRNAリガーゼアルファサブユニット (*pheS*)、フェニルアラニン - tRNAリガーゼベータサブユニット (*pheT*)、アルギニン - tRNAリガーゼ (*argS*)、ヒスチジン - tRNAリガーゼ (*hisS*)、バリン - tRNAリガーゼ (*valS*)、アラニン - tRNAリガーゼ (*alaS*)、イソロイシン - tRNAリガーゼ (*ileS*)、プロリン - tRNAリガーゼ (*proS*)、システイン - tRNAリガーゼ (*cysS*)、アスパラギン - tRNAリガーゼ (*asnS*)、アスパラギン酸 - tRNAリガーゼ (*aspS*)、グルタミン酸 - tRNAリガーゼ (*gltx*)、トリプトファン - tRNAリガーゼ (*trpS*)、グリシン - tRNAリガーゼベータサブユニット (*glyS*)、メチオニン - tRNAリガーゼ (*metG*)、リジン - tRNAリガーゼ (*lysS*) からなる群から選択される。アミノ酸産生に必須の好ましい酵素は、*tktA*、*rpe*、*prs*、*aroK*、*tyrB*、*aroH*、*fbaA*、*gapA*、*pgk*、*eno*、*tdcG*、*cysE*、*metK*、*glyA*、*asd*、*dapA/B/D/E/F*、*argC*、*proC*、*leuS*、*glnS*、*serS*、*glyS/Q*、*tyrS*、*thrS*、*pheS/T*、*argS*、*hisS*、*valS*、*alaS*、*ileS*、*proS*、*cysS*、*asnS*、*aspS*、*gltx*、*trpS*、*glyS*、*metG*、*lysS* であり、より好ましいのは、*asd*、*glyA*、*leuS*、*glnS*、*serS*、*glyS/Q*、*tyrS*、*thrS*、*pheS/T*、*argS*、*hisS*、*valS*、*alaS*、*ileS*、*proS*、*cysS*、*asnS*、*aspS*、*gltx*、*trpS*、*glyS*、*metG*、*lysS* であり、最も好ましいのは、*asd* である。

【0144】

本発明の一実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、内在性 *AraC* 型 DNA 結合タンパク質をコードする遺伝子の上流の RNA 温度センサー領域内のモジュレーションをさらに含む。内在性 *AraC* 型 DNA 結合タンパク質をコードする遺伝子の上流の RNA 温度センサー領域内のモジュレーションは、RNA 温度センサー領域内の欠失、挿入又は置換であり得る。欠失又は挿入は、通常は、1つ又はいくつか、好ましくは約 30 - 約 100 の間のヌクレオチド、より好ましくは約 40 - 約 60 の間のヌクレオチドの欠失又は挿入を含む。置換は、通常は、1つ又はいくつか、好ましくは約 3 - 約 30 の間のヌクレオチド、より好ましくは約 3 - 約 15 の間のヌクレオチドの置換を含む。好ましくは、内在性 *AraC* 型 DNA 結合タンパク質をコードする遺伝子の上流の RNA 温度センサー領域内のモジュレーションは、内在性 *AraC* 型 DNA 結合タンパク質をコードする遺伝子の上流の RNA 温度センサー領域内の欠失、好ましくは約 30 - 約 100 の間のヌクレオチドの、より好ましくは約 40 - 約 60 の間のヌクレオチドの欠失である。内在性 *AraC* 型 DNA 結合タンパク質、及び *AraC* 型 DNA 結合タンパク質をコードする遺伝子の上流の RNA 温度センサー領域は、通常、組換え弱毒化グラム陰性菌株に含まれる内在性毒性プラスミド上に位置する。*AraC* 型 DNA 結合タンパク質は、好ましくは、*VirF*、*LcrF*、*MxiE*、*ExsA*、*PerA*、*HrpX*、*HrpB*、*GadX*、*HilC*、*HilD* 及び *InvF* からなる群から選択される。より好ましくは、*AraC* 型 DNA 結合タンパク質は、*VirF* 及び *LcrF* からなる群から選択される。一部の実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、エルシニア・エンテロコリティカ (*Yersinia enterocolitica*) であり、*AraC* 型 DNA 結合タンパク質は、*VirF* である。

【0145】

好ましくは、内在性 *AraC* 型 DNA 結合タンパク質をコードする遺伝子の上流の RNA 温度センサー領域内のモジュレーションは、内在性 *AraC* 型 DNA 結合タンパク質を

10

20

30

40

50

コードする遺伝子上流の、RNAヘアピン、好ましくはHairpin Iに干渉するモジュレーションを含む。より好ましくは、内在性AraC型DNA結合タンパク質をコードする遺伝子上流のRNA温度センサー領域内のモジュレーションは、内在性AraC型DNA結合タンパク質をコードする遺伝子上流の、RNAヘアピン構造又はその一部、好ましくはhairpin Iの一部を除去する欠失を含む。RNAヘアピン構造又はその一部を除去する欠失は、通常は約30 - 約100の間のヌクレオチドの、好ましくは約40 - 約60の間のヌクレオチドの欠失を含む。一部の実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、エルシニア・エンテロコリチカであり、欠失は、virFのコード配列の上流の-111位 - 57位(ここで、-1は、virFコード配列のATG開始コドンのAの1塩基上流である)のヌクレオチドの欠失を含む。

10

【0146】

本発明の一実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、エルシニア属、大腸菌属、サルモネラ属及びシュードモナス属からなる群から選択される。一実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、エルシニア属及びサルモネラ属からなる群から選択される。好ましくは、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、エルシニア属株、より好ましくはエルシニア・エンテロコリチカ株である。最も好ましいのは、Y・エンテロコリチカE40(O:9、生物型2)¹⁹、又は²⁰に記載されているようなY・エンテロコリチカMRS40(別名Y・エンテロコリチカ亜種パレアーケチカMRS40)のような、そのアンピシリン感受性派生物である。²⁰に記載されているようなY・エンテロコリチカE40及びその派生物Y・エンテロコリチカMRS40は、¹⁵、¹⁷、²¹に記載されているようなY・エンテロコリチカ亜種パレアーケチカE40及びその派生物Y・エンテロコリチカ亜種パレアーケチカMRS40と同一である。また、好ましくは、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、サルモネラ属株、より好ましくはサルモネラ菌株である。最も好ましいのは、the Public Health England culture collection(NCTC 13347)によって記載されているようなネズミチフス菌(*Salmonella enterica* Serovar Typhimurium)SL1344である。

20

【0147】

本発明の一部の実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、シデロホアを産生しない、例えば、シデロホアの産生が不十分である株、好ましくは、シデロホアを産生しない、例えば、何れのシデロホアの産生も不十分である株である。そのような株は、例えば、¹⁵、¹⁷、²⁰、²¹に記載されているようなY・エンテロコリチカ亜種パレアーケチカMRS40であり、これは、エルシニアバクチンを産生せず、好ましい。

30

【0148】

本発明の一実施態様では、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルは、細菌エフェクタータンパク質又はそのN末端断片、好ましくは、真核細胞に対して毒性である細菌エフェクタータンパク質又はそのN末端断片を含む。本発明の一実施態様では、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルは、細菌T3SSエフェクタータンパク質又はそのN末端断片を含む細菌T3SSエフェクタータンパク質であって、該T3SSエフェクタータンパク質又はそのN末端断片がシャペロン結合部位を含み得る、細菌T3SSエフェクタータンパク質である。シャペロン結合部位を含む、T3SSエフェクタータンパク質又はそのN末端断片は、本発明の送達シグナルとして特に有用である。好ましいT3SSエフェクタータンパク質又はそれらのN末端断片は、SopE、SopE2、SptP、YopE、ExoS、SipA、SipB、SipD、SopA、SopB、SopD、IpgB1、IpgD、SipC、SifA、SseJ、Sse、SrfH、YopJ、AvrA、AvrBsT、YopT、YopH、YpkA、Tir、EspF、TcP2、IpgB2、OspF、Map、OspG、OspI、IpaH、SspH1、VopF、ExoS、ExoT、HopAB2、XopD、AvrRpt2、HopA01、HopPtD2、HopU1、GALAタンパク質ファミリー、AvrBs2、AvrD1、AvrBs3、YopO、YopP、YopE、YopM、YopT、Esp

40

50

G、EspH、EspZ、IpaA、IpaB、IpaC、VirA、IcsB、OspC1、OspE2、IpaH9.8、IpaH7.8、AvrB、AvrD、AvrPphB、AvrPphC、AvrPphEpto、AvrPpiBpto、AvrPto、AvrPtoB、VirPphA、AvrRpm1、HopPtoE、HopPtoF、HopPtoN、PopB、PopP2、AvrBs3、XopD、及びAvrXv3からなる群から選択される。より好ましいT3SSエフェクタータンパク質又はそれらのN末端断片は、SopE、SptP、YopE、ExoS、SopB、IpgB1、IpgD、YopJ、YopH、EspF、OspF、ExoS、YopO、YopP、YopE、YopM、YopTからなる群から選択され、これらのうち最も好ましいT3SSエフェクタータンパク質又はそれらのN末端断片は、IpgB1、SopE、SopB、SptP、OspF、IpgD、YopH、YopO、YopP、YopE、YopM、YopTからなる群から選択され、特に、YopE又はそのN末端断片である。

10

【0149】

同じく好ましいT3SSエフェクタータンパク質又はそれらのN末端断片は、SopE、SopE2、SptP、SteA、SipA、SipB、SipD、SopA、SopB、SopD、IpgB1、IpgD、SipC、SifA、SifB、SseJ、Sse、SrfH、YopJ、AvrA、AvrBsT、YopH、YpkA、Tir、EspF、TccP2、IpgB2、OspF、Map、OspG、OspI、IpaH、VopF、ExoS、ExoT、HopAB2、AvrRpt2、HopAO1、HopU1、GALAタンパク質ファミリー、AvrBs2、AvrD1、YopO、YopP、YopE、YopT、EspG、EspH、EspZ、IpaA、IpaB、IpaC、VirA、IcsB、OspC1、OspE2、IpaH9.8、IpaH7.8、AvrB、AvrD、AvrPphB、AvrPphC、AvrPphEpto、AvrPpiBpto、AvrPto、AvrPtoB、VirPphA、AvrRpm1、HopPtoD2、HopPtoE、HopPtoF、HopPtoN、PopB、PopP2、AvrBs3、XopD、及びAvrXv3からなる群から選択される。同じくより好ましいT3SSエフェクタータンパク質又はそれらのN末端断片は、SopE、SptP、SteA、SifB、SopB、IpgB1、IpgD、YopJ、YopH、EspF、OspF、ExoS、YopO、YopP、YopE、YopTからなる群から選択され、これらのうち同じく最も好ましいT3SSエフェクタータンパク質又はそれらのN末端断片は、IpgB1、SopE、SopB、SptP、SteA、SifB、OspF、IpgD、YopH、YopO、YopP、YopE及びYopTからなる群から選択され、特に、SopE、SteA、若しくはYopE又はそのN末端断片、より特にSteA若しくはYopE又はそのN末端断片、最も特にYopE又はそのN末端断片である。

20

30

【0150】

一部の実施態様では、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルは、細菌エフェクタータンパク質又はそのN末端断片を含むヌクレオチド配列によりコードされ、そのN末端断片は、細菌T3SSエフェクタータンパク質の少なくとも最初の10、好ましくは少なくとも最初の20、より好ましくは少なくとも最初の100アミノ酸を含む断片を含む。

40

【0151】

一部の実施態様では、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルは、細菌T3SSエフェクタータンパク質又はそのN末端断片を含むヌクレオチド配列によりコードされ、前記細菌T3SSエフェクタータンパク質又はそのN末端断片は、シャペロン結合部位を含む。

【0152】

シャペロン結合部位を含む、好ましいT3SSエフェクタータンパク質又はそれらのN末端断片は、シャペロン結合部位とT3SSエフェクタータンパク質又はそのN末端断片との次の組合せを含む：SycE - YopE、InvB - SopE、SicP - Spt

50

P、SycT-YopT、SycO-YopO、SycN/YscB-YopN、SycH-YopH、SpcS-ExoS、CesF-EspF、SycD-YopB、SycD-YopD。より好ましいのは、SycE-YopE、InvB-SopE、SycT-YopT、SycO-YopO、SycN/YscB-YopN、SycH-YopH、SpcS-ExoS、CesF-EspFである。最も好ましいのは、SycEシャペロン結合部位を含む、YopE若しくはそのN末端断片、例えば、本明細書ではYopE₁₋₁₃₈と表記され、配列番号2で示されるような、YopEエフェクタータンパク質のN末端138アミノ酸を含有する、YopEエフェクタータンパク質のN末端断片であるか、又はInvBシャペロン結合部位を含む、SopE若しくはそのN末端断片、例えば、本明細書ではSopE₁₋₈₁若しくはSopE₁₋₁₀₅とそれぞれと表記され、配列番号6及び7で示されるような、SopEエフェクタータンパク質のN末端81又は105アミノ酸を含有する、SopEエフェクタータンパク質のN末端断片である。

10

【0153】

本発明の一実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株はエルシニア属株であり、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルは、YopEエフェクタータンパク質又はN末端部、好ましくは、YエンテロコリチカYopEエフェクタータンパク質又はそのN末端部を含む。好ましくは、SycE結合部位は、YopEエフェクタータンパク質のN末端部内に含まれる。これに関連して、YopEエフェクタータンパク質のN末端断片は、N末端12、16、18、52、53、80又は138アミノ酸を含み得る²²⁻²⁴。最も好ましいのは、例えば、本明細書ではYopE₁₋₁₃₈と表記され、配列番号2で示される、Forsberg及びWolf-Watz²⁵に記載されているような、YopEエフェクタータンパク質のN末端138アミノ酸を含有するYopEエフェクタータンパク質のN末端断片である。

20

【0154】

本発明の一実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株はサルモネラ属株であり、ヌクレオチド配列によりコードされている細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルは、SopE若しくはSteAエフェクタータンパク質又はそのN末端部、好ましくは、サルモネラ菌SopE若しくはSteAエフェクタータンパク質又はそのN末端部を含む。好ましくは、シャペロン結合部位は、SopEエフェクタータンパク質のN末端部内に含まれる。これに関連して、SopEエフェクタータンパク質のN末端断片は、N末端81又は105アミノ酸を含み得る。最も好ましいのは、例えば配列番号7に記載されているような、完全長SteA(配列番号5)、及びエフェクタータンパク質のN末端105アミノ酸を含有するSopEエフェクタータンパク質のN末端断片である。

30

【0155】

当業者は、タンパク質を送達することができるエフェクタータンパク質のポリペプチド配列を同定する方法に精通している。例えば、1つのそのような方法は、Sorry等¹⁹により記載されている。簡単に述べると、例えばYopタンパク質の様々な部分からの、ポリペプチド配列を、百日咳菌シクロリジンのカルモジュリン活性化アデニル酸シクラーゼドメイン(又はCya)等のレポーター酵素に、インフレイムで融合させることができる。真核細胞のサイトゾルへのYop-Cyaハイブリッドタンパク質の送達は、cAMPの蓄積につながる感染真核細胞におけるシクラーゼ活性の出現により示される。そのような手法を用いることにより、当業者は、タンパク質を送達することができる最小配列要件、すなわち、最も短い長さの連続アミノ酸配列を、必要に応じて決定することができる。例えば¹⁹を参照されたい。したがって、本発明の好ましい送達シグナルは、少なくとも、タンパク質を送達することができるT3SSエフェクタータンパク質のアミノ酸の最小配列からなる。

40

【0156】

一実施態様では、本発明は、少なくとも1つの細菌エフェクタータンパク質の産生が不十分である、より好ましくは、真核細胞に対して毒性である少なくとも1つの細菌エフェクタータンパク質の産生が不十分である、よりいっそう好ましくは、少なくとも1つのT

50

3 S S エフェクタータンパク質の産生が不十分である、最も好ましくは、真核細胞に対して毒性である少なくとも1つのT 3 S S エフェクタータンパク質の産生が不十分である、組換え弱毒化グラム陰性菌株を提供する。一部の実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、真核細胞に対して毒性である少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、より好ましくは少なくとも3つ、よりいっそう好ましくは少なくとも4つ、特に少なくとも5つ、より特に少なくとも6つ、最も特に全ての細菌エフェクタータンパク質の生産が不十分である。一部の実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、結果として得られる組換え弱毒化グラム陰性菌株が、非弱毒化グラム陰性菌野生型株と比較して、すなわち、細菌エフェクタータンパク質を正常に産生するグラム陰性菌野生型株と比較して、少ない細菌エフェクタータンパク質を産生する若しくは少ない程度に細菌エフェクタータンパク質を産生する、又は、結果として得られる組換え弱毒化グラム陰性菌株が、真核細胞に対して毒性である何れの機能性細菌エフェクタータンパク質も、もはや産生しない真核細胞に対して毒性である少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、より好ましくは少なくとも3つ、よりいっそう好ましくは少なくとも4つ、特に少なくとも5つ、より特に少なくとも6つ、最も特に全ての機能性細菌エフェクタータンパク質の生産が不十分である。

10

【0157】

本発明によれば、そのような突然変異型グラム陰性菌株、すなわち、少なくとも1つの細菌エフェクタータンパク質の産生が不十分である、例えば、真核細胞に対して毒性である少なくとも1つの細菌エフェクタータンパク質の生産が不十分である、そのような組換え弱毒化グラム陰性菌株、例えば、そのような突然変異型エルシニア属株は、エフェクターをコードしている少なくとも1つの遺伝子に少なくとも1つの突然変異を導入することにより生じさせることができる。好ましくは、エフェクターをコードしているそのような遺伝子としては、エルシニア属株について言えば、Y o p E、Y o p H、Y o p O / Y p k A、Y o p M、Y o p P / Y o p J 及び Y o p T が挙げられる。好ましくは、エフェクターをコードしているそのような遺伝子としては、サルモネラ属株について言えば、A v r A、C i g R、G o g B、G t g A、G t g E、P i p B、S i f B、S i p A / S s p A、S i p B、S i p C / S s p C、S i p D / S s p D、S l r P、S o p B / S i g D、S o p A、S p i C / S s a B、S s e B、S s e C、S s e D、S s e F、S s e G、S s e I / S r f H、S o p D、S o p E、S o p E 2、S s p H 1、S s p H 2、P i p B 2、S i f A、S o p D 2、S s e J、S s e K 1、S s e K 2、S s e K 3、S s e L、S t e C、S t e A、S t e B、S t e D、S t e E、S p v B、S p v C、S p v D、S r f J、S p t P が挙げられる。最も好ましくは、エフェクターをコードしている全ての遺伝子が欠失している。当業者は、任意の数の標準技術を用いて、これらのT 3 S S エフェクター遺伝子の変異を生じさせることができる。S a m b r o o k 等は、一般にそのような技術を説明している。例えば、S a m b r o o k 等^{2 6}を参照されたい。

20

30

【0158】

本発明によれば、エフェクターをコードする遺伝子のプロモーター領域において、そのようなエフェクター遺伝子の発現を消失させるように変異を生じさせることができる。エフェクターをコードしている遺伝子のコード領域において、コードされているエフェクタータンパク質の触媒活性を消失させるような変異を生じさせることもできる。エフェクタータンパク質の「触媒活性」は、エフェクタータンパク質の抗標的細胞機能、すなわち毒性を通常は意味する。そのような活性は、エフェクタータンパク質の触媒ドメインにおける触媒モチーフにより支配される。エフェクタータンパク質の触媒ドメイン及び/又は触媒モチーフを同定する手法は、当業者に周知である。例えば、^{2 7}、^{2 8}を参照されたい。

40

【0159】

したがって、本発明の1つの好ましい変異は、全触媒ドメインの欠失である。別の好ましい変異は、エフェクターをコードしている遺伝子のフレームシフト変異であり、したがって、触媒ドメインは、そのような「フレームシフトした」遺伝子から発現されるタンバ

50

ク質産物中に存在しない。最も好ましい変異は、エフェクタータンパク質の全コード領域の欠失を伴う変異である。他の変異、例えば、エフェクタータンパク質の触媒モチーフにおいて生じて所与のエフェクタータンパク質の触媒活性の破壊につながる小欠失又は塩基対置換も、本発明により企図されている。

【0160】

機能性細菌エフェクタータンパク質の遺伝子において生じる変異を多数の方法により特定の株に導入することができる。1つのそのような方法は、変異配列をアレル交換により株に導入することができる「自殺」ベクターへの変異遺伝子のクローニングを含む。そのような「自殺」ベクターの例は、²⁹により記載されている。

【0161】

このようにして、複数の遺伝子において生じる変異をグラム陰性菌株にうまく導入して、多重突然変異株、例えば、六重突然変異型組換え株を生じさせることができる。これらの変異配列を導入する順序は重要でない。一部の環境下では、エフェクター遺伝子の全てではなく一部のみを変異させることが所望されることもある。したがって、本発明は、六重突然変異型エルシニア以外の多重突然変異型エルシニア、例えば、二重突然変異型、三重突然変異型、四重突然変異型及び五十突然変異型株をさらに企図している。タンパク質を送達するために、本突然変異株の分泌及び移行系は、インタクトである必要がある。

【0162】

本発明の好ましい組換え弱毒化グラム陰性菌株は、エフェクターをコードする全ての遺伝子が、結果として得られるエルシニア属が何れの機能性エフェクタータンパク質ももはや産生しないように突然変異した、六重突然変異型エルシニア属株である。そのような六重突然変異型エルシニア属株は、*Y. エンテロコリチカ*については *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T* と表記される。例として、そのような六重突然変異株を *Y. エンテロコリチカ* MRS 40 株から産生させて、好ましい *Y. エンテロコリチカ* MRS 40 *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T* (本明細書での別名 *Y. エンテロコリチカ* 亜種 *パレアークチカ* MRS 40 *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T* 又は *Y. エンテロコリチカ* *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T*) を生じさせることができる。エルシニアバクチンの産生が不十分である *Y. エンテロコリチカ* MRS 40 *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T* は、WO 02077249 に記載されており、特許手続きを目的とした微生物寄託の国際承認に関するブダペスト条約に従って、Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に2001年9月24日に寄託され、寄託番号 LMG P-21013 を与えられた。

【0163】

より好ましいのは、内在性 *AraC* 型 DNA 結合タンパク質をコードする遺伝子上流の *Hairpin I* の欠失等の、RNAヘアピン構造又はその一部を除去する内在性毒性プラスミド *pYV* における欠失 (*Hairpin I-virF*) を含む *Y. エンテロコリチカ* MRS 40 *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T*、例えば、*Y. エンテロコリチカ* MRS 40 *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T* *Hairpin I-virF* (別名 *Y. エンテロコリチカ* *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T* *Hairpin I-virF*) である。同様に好ましいのは、*asd* をコードする染色体遺伝子の欠失、及びプロモーターに作用可能に連結されている *asd* をコードする遺伝子を含むヌクレオチド配列を含む内在性毒性プラスミド *pYV* (*pYV-asd*) を含む *Y. エンテロコリチカ* MRS 40 *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T*、例えば、*Y. エンテロコリチカ* MRS 40 *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T* *asd pYV-asd* (本明細書での別名 *Y. エンテロコリチカ* *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T* *asd pYV-asd*) である。特に好ましいのは、上記の両方の修飾を含む *Y. エンテロコリチカ* MRS 40 *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T* *asd Hairpin I-virF pYV-asd* (本明細書での別名 *Y. エンテロコリチカ* *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T* *asd Hairpin I-virF pYV-asd*) である。特に好ましい株は、*Y. エンテロコリチカ* MRS 40 *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T* *Hairpi*

10

20

30

40

50

nI - vir F (別名 Y . エンテロコリテिका y o p H、 O、 P、 E、 M、 T H a i r p i n I - v i r F)、 Y . エンテロコリテिका M R S 4 0 y o p H、 O、 P、 E、 M、 T a s d p Y V - a s d (本明細書での別名 Y . エンテロコリテिका y o p H、 O、 P、 E、 M、 T a s d p Y V - a s d) 又は Y . エンテロコリテिका M R S 4 0 y o p H、 O、 P、 E、 M、 T a s d H a i r p i n I - v i r F p Y V - a s d (本明細書での別名 Y . エンテロコリテिका y o p H、 O、 P、 E、 M、 T a s d H a i r p i n I - v i r F p Y V - a s d) であり、これらは、 Y . エンテロコリテिका 亜種 パレアーケテिका 株の場合のように、シデロホアの産生が不十分である、好ましくは、シデロホアを産生しない、例えば、何れのシデロホアの産生も不十分である。したがって、同様に特に好ましい株は、 Y . エンテロコリテिका 亜種

10

パレアーケテिका y o p H、 O、 P、 E、 M、 T H a i r p i n I - v i r F (別名 Y . エンテロコリテिका 亜種 パレアーケテिका y o p H、 O、 P、 E、 M、 T H a i r p i n I - v i r F)、 Y . エンテロコリテिका 亜種 パレアーケテिका y o p H、 O、 P、 E、 M、 T a s d p Y V - a s d 本明細書での別名 Y . エンテロコリテिका y o p H、 O、 P、 E、 M、 T a s d p Y V - a s d) 又は Y . エンテロコリテिका 亜種 パレアーケテिका y o p H、 O、 P、 E、 M、 T a s d H a i r p i n I - v i r F p Y V - a s d (本明細書での別名 Y . エンテロコリテिका y o p H、 O、 P、 E、 M、 T a s d H a i r p i n I - v i r F p Y V - a s d) である。

【 0 1 6 4 】

グラム陰性菌株を形質転換するために本発明に従って使用することができるベクターのようなヌクレオチド分子は、当業者に公知であるように、使用されるグラム陰性菌株に依存し得る。本発明に従って使用することができるヌクレオチド分子は、発現ベクター（内在性毒性プラスミドの合成バージョン又は別様に生成された修飾バージョンを含む）、染色体又は毒性プラスミド挿入用のベクター、及び例えば染色体又は毒性プラスミド挿入用の DNA 断片等の、ヌクレオチド配列を含む。例えばエルシニア属、大腸菌属、サルモネラ属又はシュードモナス属 (P s e u d o m o n a s) 株において有用である、発現ベクターは、例えば、 p U C、 p B a d、 p A C Y C、 p U C P 2 0 及び p E T プラスミドである。例えばエルシニア属、大腸菌属、サルモネラ属又はシュードモナス属株において有用である、染色体又は毒性プラスミド挿入用のベクターは、例えば、 p K N G 1 0 1 である。染色体又は毒性プラスミド挿入用の DNA 断片は、例えばラムダレッド遺伝子操作のような、例えばエルシニア属、大腸菌属、サルモネラ属又はシュードモナス属株において使用される方法を意味する。染色体若しくは毒性プラスミド挿入用のベクター又は染色体若しくは毒性プラスミド挿入用の DNA 断片は、例えば、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の 3' 末端とインフレイムで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列が、組換え弱毒化グラム陰性菌株の内在性プロモーターに作用可能に連結されるように、本発明のヌクレオチド配列を挿入することができる。したがって、染色体若しくは毒性プラスミド挿入用のベクター又は染色体若しくは毒性プラスミド挿入用の DNA 断片が使用される場合、内在性プロモーターは、内在性細菌 DNA (染色体又はプラスミド DNA) 上にコードされていることがあり、それぞれのヌクレオチド配列のみが、染色体若しくは毒性プラスミド挿入用の操作ベクター又は染色体若しくは毒性プラスミド挿入用の DNA 断片により提供されることになる。或いは、染色体若しくは毒性プラスミド挿入用のベクター、又は例えば染色体若しくは毒性プラスミド挿入用のヌクレオチド配列等のヌクレオチド分子が使用される場合、内在性プロモーター、及び細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルは、内在性細菌 DNA (染色体又はプラスミド DNA) 上にコードされていることがあり、例えば異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列等のヌクレオチド分子のみが、染色体若しくは毒性プラスミド挿入用のベクターにより、又は例えば染色体若しくは毒性プラスミド挿入用のヌクレオチド配列等のヌクレオチド分子により、提供されることになる。したがって、プロモーターは、必ずしも、組換え弱毒化グラム陰性菌株の形質転換に使用されるベクターに含ま

20

30

40

50

れている必要がなく、すなわち、本発明の組換え弱毒化グラム陰性菌株は、プロモーターを含まないベクターで形質転換されることもある。

【0165】

好ましい実施態様では、ヌクレオチド分子、例えば、本発明のベクターは、5'から3'方向に、

細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナル又はその断片をコードする第1のヌクレオチド配列、

前記第1のヌクレオチド配列の3'末端とインフレームで融合している異種タンパク質をコードする第2のヌクレオチド配列を含む。

10

【0166】

エルシニア属用の好ましいベクター、例えば、好ましい発現ベクターは、pBad__Si__1及びpBad__Si__2からなる群から選択される。pBad__Si__2は、精製pYV40からのYopE及びSycE用の内在性プロモーターを含有するSycE-YopE₁₋₁₃₈断片をpBad-MycHisA(Invitrogen)のKpnI/HindIII部位にクローニングすることにより構築した。さらなる修飾は、消化、クレノウ断片処理及び再ライゲーションによるpBad-MycHisAのNcoI/BglII断片の除去を含む。さらに、YopE₁₋₁₃₈の3'末端に、次の切断部位を加えた：XbaI-XhoI-BstBI-(HindIII)。pBad__Si__1は、pBad__Si__2と同等であるが、アラビノース誘導性プロモーターの下でNcoI/BglII部位においてpEGFP-C1(Clontech)から増幅されたEGFPをコードする。同じく好ましいのは、T3SSシグナル配列への融合体としての、異種タンパク質をコードする内在性エルシニア属毒性プラスミドpYVの修飾バージョンの使用である。サルモネラ属用の好ましいベクター、例えば、好ましい発現ベクターは、pSi__266、pSi__267、pSi__268及びpSi__269からなる群から選択される。対応する内在性プロモーターとSteA₁₋₂₀断片(pSi__266)、完全長SteA配列(pSi__267)、SopE₁₋₈₁断片(pSi__268)又はSopE₁₋₁₀₅断片(pSi__269)とを含むプラスミドpSi__266、pSi__267、pSi__268及びpSi__269を、サルモネラ菌SL1344ゲノムDNAから増幅し、pBad-MycHisA(Invitrogen)のNcoI/KpnI部位にクローニングした。

20

30

【0167】

ヌクレオチド分子、例えば、本発明のベクターは、他の配列エレメント、例えば、3'終止配列(終止コドン及びポリA配列を含む)を含むこともあり、又は本ベクターを受け取った形質転換体の選択を可能にする薬物耐性を付与する遺伝子を含むこともある。ヌクレオチド分子、例えば、本発明のベクターを多数の公知の方法により組換え弱毒化グラム陰性菌株内に形質転換することができる。本発明では、ベクターを導入するための形質転換方法は、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム媒介形質転換、接合伝達、又はそれらの組合せを含むが、これらに限定されない。例えば、標準的なエレクトロポレーション手順によりヌクレオチド分子、例えば、ベクターを第1の菌株内に形質転換することができる。その後、「可動化」とも呼ばれる方法である接合伝達によりそのようなヌクレオチド分子、例えば、ベクターを第1の菌株から所望の株内に移入することができる。形質転換体(すなわち、ベクターを取り込んだグラム陰性菌株)は、例えば抗生物質で、選択することができる。これらの技術は、当該技術分野で周知である。例えば、[16]を参照されたい。

40

【0168】

本発明に従って、本発明の組換え弱毒化グラム陰性菌株の細菌エフェクタータンパク質に作用可能に連結されているプロモーターは、それぞれの株若しくは匹敵する菌株のT3SSエフェクタータンパク質の天然プロモーターであってもよく、又は例えばエルシニア属、大腸菌属、サルモネラ属若しくはシュードモナス属において有用である発現ベクター

50

に使用されるプロモーター、例えば、pUC及びpBadであってもよい。そのようなプロモーターは、T7プロモーター、Placプロモーター、又はアラビノース誘導性Arab-pro-moプロモーターである。

【0169】

組換え弱毒化グラム陰性菌株がエルシニア属株である場合、プロモーターは、エルシニア属ビルロン遺伝子からのものであり得る。「エルシニア属ビルロン遺伝子」は、エルシニア属pYVプラスミド上の遺伝子であって、その発現が温度によっても、標的細胞との接触によっても調節される遺伝子を意味する。そのような遺伝子は、分泌機構のエレメントをコードする遺伝子(Ysc遺伝子)、トランスロケーターをコードする遺伝子(YopB、YopD及びLcrV)、調節エレメントをコードする遺伝子(YopN、TyEA及びLcrG)、T3SSエフェクターシャペロンをコードする遺伝子(SycD、SycE、SycH、SycN、SycO及びSycT)及びエフェクターをコードする遺伝子(YopE、YopH、YopO/YpkA、YopM、YopT及びYopP/YopJ)、並びにVirF及びYadAのような、他のpYVにコードされているタンパク質を含む。

10

【0170】

本発明の好ましい実施態様では、プロモーターは、T3SS機能性エフェクターをコードしている遺伝子の天然プロモーターである。組換え弱毒化グラム陰性菌株がエルシニア属株である場合、プロモーターは、YopE、YopH、YopO/YpkA、YopM及びYopP/YopJの何れか1つから選択される。より好ましくは、プロモーターは、YopE又はSycEからのものである。最も好ましいのは、YopEプロモーターである。

20

【0171】

組換え弱毒化グラム陰性菌株がサルモネラ属株である場合、プロモーターは、SpiI若しくはSpiII病原性アイランドからのものであってもよく、又は他の場所にコードされているエフェクタータンパク質からのものであってもよい。そのような遺伝子は、分泌機構のエレメントをコードする遺伝子、トランスロケーターをコードする遺伝子、調節エレメントをコードする遺伝子、T3SSエフェクターシャペロンをコードする遺伝子、及びエフェクターをコードする遺伝子、並びにSPI-1又はSPI-2によりコードされている他のタンパク質を含む。本発明の好ましい実施態様では、プロモーターは、T3SS機能性エフェクターをコードしている遺伝子の天然プロモーターである。組換え弱毒化グラム陰性菌株がサルモネラ属株である場合、プロモーターは、エフェクタータンパク質の何れか1つからのものであり得る。より好ましくは、プロモーターは、SopE、InvB又はSteAからのものである。

30

【0172】

一部の実施態様では、プロモーターは、好ましい、例えばアラビノース誘導性プロモーターのような、人工誘導性プロモーターである。この場合、通常、アラビノースは、細菌に提供され、次いで、送達されるタンパク質の細菌発現を誘導することになる。

【0173】

本発明の一実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、プロテアーゼ切断部位をコードするヌクレオチド配列を含む。プロテアーゼ切断部位は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端とインフレイムで融合している異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド分子上の、異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列と、送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の間に通常は位置する。機能的且つ一般に適用可能な切断部位の生成は、移行後の送達シグナルの切除を可能にする。送達シグナルは、標的細胞内に移行されるタンパク質の正しい位置及び/又は機能を妨害し得るので、送達シグナルと目的のタンパク質の間にプロテアーゼ切断部位を導入することにより大部分の天然タンパク質が真核細胞内に送達される。好ましくは、プロテアーゼ切断部位は、エンテロキナーゼ(軽鎖)、エンテロペプチダーゼ、PreScissionプロテアーゼ、ヒトライノウイルスプロテアーゼ3C、

40

50

TEVプロテアーゼ、TMVプロテアーゼ、第Xa因子プロテアーゼ及びトロンピンからなる群から選択されるプロテアーゼ又はその触媒ドメインにより切断されるアミノ酸モチーフ、より好ましくは、TEVプロテアーゼにより切断されるアミノ酸モチーフである。同じく好ましいプロテアーゼ切断部位は、エンテロキナーゼ(軽鎖)、エンテロペプチダーゼ、PreScissionプロテアーゼ、ヒトライノウイルスプロテアーゼ3C、TEVプロテアーゼ、TMVプロテアーゼ、第Xa因子プロテアーゼ、脱ユビキチン化酵素と呼ばれるユビキチンプロセシングプロテアーゼ、及びトロンピンからなる群から選択されるプロテアーゼ又はその触媒ドメインにより切断される、アミノ酸モチーフである。最も好ましいのは、TEVプロテアーゼにより、又はユビキチンプロセシングプロテアーゼにより切断される、アミノ酸モチーフである。

10

【0174】

したがって、本発明のさらなる実施態様では、異種タンパク質は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルからプロテアーゼにより切断される。好ましい切断方法は、

a) プロテアーゼが、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルと異種タンパク質としてのプロテアーゼとの融合タンパク質を発現する本明細書に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株により真核細胞に移行される方法、又は

b) プロテアーゼが、真核細胞において構造的に若しくは一過性に発現される方法である。

【0175】

通常、真核細胞に所望のタンパク質を送達するために使用される組換え弱毒化グラム陰性菌株と、真核細胞にプロテアーゼを移行させる組換え弱毒化グラム陰性菌株は、異なる。

20

【0176】

本発明の一実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、標識分子をコードするさらなるヌクレオチド配列を含むか、又は標識分子の受容部位を含む。標識分子をコードするさらなるヌクレオチド配列、又は標識分子の受容部位は、通常、異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列の5'末端と又は3'末端と融合している。好ましい標識分子、又は標識分子の受容部位は、高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP)、クマリン、クマリンリガーゼ受容部位、レゾルフィン、レゾルフィンリガーゼ受容部位、FlasH/ReAsH色素(life technologies)と共に使用されているシータシステインモチーフからなる群から選択される。最も好ましいのは、レゾルフィン及びレゾルフィンリガーゼ受容部位又はEGFPである。標識分子、又は標識分子の受容部位を使用すると、標識分子が目的の異種タンパク質に結合することになり、次いで、真核細胞内等に送達されることになり、例えば細胞のライブ顕微鏡観察により、タンパク質の追跡が可能になる。

30

【0177】

本発明の一実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、ペプチドタグをコードするさらなるヌクレオチド配列を含む。ペプチドタグをコードするさらなるヌクレオチド配列は、通常、異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列の5'末端と又は3'末端と融合している。好ましいペプチドタグは、Mycタグ、Hisタグ、Flagタグ、HAタグ、Strepタグ若しくはV5タグからなる群から選択されるか、又はこれらの群外の2つ以上のタグの組合せである。最も好ましいのは、Mycタグ、Flagタグ、Hisタグ、Flagタグ、及び組み合わせたMycタグとFlagタグである。ペプチドタグを使用すると、例えば、抗タグ抗体を使用する免疫蛍光法又はウェスタンブロット法により、タグ付タンパク質の追跡が可能になる。さらに、ペプチドタグを使用することにより、培養上清への分泌後又は真核細胞への移行後に、どちらの場合も対応するタグに合う精製法(例えば、Hisタグと共に使用されている金属キレートアフィニティー精製、又はFlagタグと共に使用されている抗Flag抗体ベースの精製)を使用して、所望のタンパク質のアフィニティー精製が可能になる。

40

【0178】

50

本発明の一実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、核内移行シグナル(NLS)をコードするさらなるヌクレオチド配列を含む。さらなるヌクレオチド配列が核内移行シグナル(NLS)をコードする場合、核内移行シグナル(NLS)をコードする前記さらなるヌクレオチド配列は、異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列の5'末端と又は3'末端と通常は融合している。好ましいNLSは、SV40ラージT抗原NLS及びその誘導體³⁰並びに他のウイルスNLSからなる群から選択される。最も好ましいのは、SV40ラージT抗原NLS及びその誘導體である。

【0179】

本発明の一実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、多重クローニング部位を含む。多重クローニング部位は、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルをコードするヌクレオチド配列の3'末端に、及び/又は異種タンパク質をコードするヌクレオチド配列の5'末端若しくは3'末端に、通常は位置する。1つ又は1つより多くの多重クローニング部位がベクターに含まれることもある。好ましい多重クローニング部位は、XhoI、XbaI、HindIII、NcoI、NotI、EcoRI、EcoRV、BamHI、NheI、SacI、SalI、BstBIからなる制限酵素の群から選択される。最も好ましいのは、XbaI、XhoI、BstBI及びHindIIIである。

【0180】

本発明の組換え弱毒化グラム陰性菌株により発現される融合したタンパク質は、「融合タンパク質」又は「ハイブリッドタンパク質」、すなわち、送達シグナルと異種タンパク質の融合したタンパク質又はハイブリッドとも呼ばれる。融合タンパク質は、例えば、送達シグナル及び2つ以上の異なる異種タンパク質を含むこともできる。

【0181】

本発明は、対象のがんを治療する、例えば、悪性固形腫瘍を治療する方法であって、本明細書中の上段に記載の異種タンパク質をがん細胞内に、例えば、悪性固形腫瘍の細胞に送達することを含む方法を企図している。タンパク質を、組換え弱毒化グラム陰性菌株を対象に投与すると同時にがん細胞内に、例えば悪性固形腫瘍の細胞に送達してもよく、すなわち移行させてもよく、又は後程、例えば、組換え弱毒化グラム陰性菌株ががん細胞に、例えば悪性固形腫瘍部位に達した後、及び/又はがん細胞、例えば悪性固形腫瘍部位に達し、上で説明したように複製された後、がん細胞内に、例えば、悪性固形腫瘍の細胞に送達してもよい、すなわち移行させてもよい。送達する時は、例えば、組換え弱毒化グラム陰性菌株において異種タンパク質を発現させるために使用されるプロモーターにより、制御することができる。第1の場合、細菌エフェクタータンパク質の構成的プロモーター、又はより好ましい内在性プロモーターのどちらかが、異種タンパク質を駆動し得る。遅延タンパク質送達の場合、アラビノース誘導性プロモーターのような人工的に誘導可能なプロモーターが、異種タンパク質を駆動し得る。この場合、細菌が所望の部位に達し、蓄積したら、アラビノースを対象に投与することになる。すると、アラビノースは、送達されたタンパク質の細菌発現を誘導することになる。

【0182】

したがって、一実施態様では、がんを治療する方法は、

- i) 本明細書に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株を培養すること、
 - ii) がん細胞をi)の組換え弱毒化グラム陰性菌株と接触させること(ここで、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルと異種タンパク質とを含む融合タンパク質が、組換え弱毒化グラム陰性菌株により発現され、がん細胞内に移行される)により前記組換え弱毒化グラム陰性菌株を対象に投与すること、及び任意選択的に、
 - iii) 異種タンパク質ががん細胞内の細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルから切断されるように融合タンパク質を切断すること
- を含み、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、対象を治療するのに十分である量で投与される。

【0183】

異種タンパク質を送達するためのがん細胞は、通常、肉腫、白血病、リンパ腫、多発性

10

20

30

40

50

骨髄腫、中枢神経系がんからなる群から選択される非固形腫瘍と、これらに限定されるものではないが、肝臓、結腸、結腸直腸、皮膚、乳房、膵臓、子宮頸部、子宮体、膀胱、胆嚢、腎臓、喉頭、口唇、口腔、食道、卵巣、前立腺、胃、精巣、甲状腺又は肺等の様々な組織型から生じ得る異常な細胞塊を含み、したがって、悪性固形肝臓、結腸、結腸直腸、皮膚、乳房、膵臓、子宮頸部、子宮体、膀胱、胆嚢、腎臓、喉頭、口唇、口腔、食道、卵巣、前立腺、胃、精巣、甲状腺又は肺腫瘍を含む、悪性固形腫瘍とから選択される、がんからのがん細胞である。好ましくは、異種タンパク質を送達するためのがん細胞は、悪性固形腫瘍である。

【0184】

したがって、1つの好ましい実施態様では、がんは、悪性固形腫瘍であり、方法 r は、

i) 本明細書に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株を培養すること、

ii) 悪性固形腫瘍の細胞を i) の組換え弱毒化グラム陰性菌株と接触させること(ここで、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルと異種タンパク質とを含む融合タンパク質が、組換え弱毒化グラム陰性菌株により発現され、悪性固形腫瘍の細胞内に移行される)により前記組換え弱毒化グラム陰性菌株を対象に投与すること、及び任意選択的に、

iii) 異種タンパク質が悪性固形腫瘍細胞内の細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルから切断されるように融合タンパク質を切断すること

を含み、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、前記対象を治療するために十分である量で投与される。

【0185】

一部の実施態様では、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルと異種タンパク質とを各々が含む少なくとも2つの融合タンパク質が、組換え弱毒化グラム陰性菌株により発現され、本発明の方法により真核細胞、例えば、がん細胞に移行される。

【0186】

組換え弱毒化グラム陰性菌株を、当該技術分野で公知の方法(例えば、FDA、Bacteriological Analytical Manual (BAM)、第8章: *Yersinia enterocolitica*)に従って、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルと異種タンパク質とを含む融合タンパク質が発現されるように培養することができる。好ましくは、組換え弱毒化グラム陰性菌株をブレインハートインフュージョン培地で、例えば28°Cで培養することができる。T3SS及び例えばYopE/SyxEプロモーター依存性遺伝子の発現の誘導のために、細菌を37°Cで増殖させることができる。

【0187】

一実施態様では、第1の組換え弱毒化グラム陰性菌株が、細菌エフェクタータンパク質からの送達シグナルと第1の異種タンパク質とを含む第1の融合タンパク質を発現し、第2の組換え弱毒化グラム陰性菌株が、細菌T3SSエフェクタータンパク質からの送達シグナルと第2の異種タンパク質とを含む第2の融合タンパク質を発現する、i)の2つの組換え弱毒化グラム陰性菌株と、がん細胞、例えば、悪性固形腫瘍の細胞を接触させ、これにより、第1及び第2の融合タンパク質を悪性固形腫瘍の細胞に移行させる。この実施態様は、例えば、2つの異なるハイブリッドタンパク質をそれらの機能的相互作用に取り組むために単一細胞に送達するための有効な方法として、がん細胞、例えば、悪性固形腫瘍の細胞の2つの菌株による同時感染を提供するものであった。

【0188】

当業者は、多数のアッセイを使用して、融合タンパク質の送達が成功したかどうかを判定することができる。例えば、融合したタグ(Mycタグのような)を認識する抗体を使用する免疫蛍光法により、融合タンパク質を検出してもよい。その判定は、送達されることになるタンパク質の酵素的活性、例えば¹⁹により記載されているアッセイに基づくこともある。

【0189】

本発明は、好適な薬学的に許容される担体を任意選択的に含む、本明細書に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株を含む、薬学的組成物も提供する。したがって、本発明は、対象のがん、例えば悪性固形腫瘍、を治療する方法において使用するための、本明細書に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株を含む薬学的組成物も提供する。

【0190】

組換え弱毒化グラム陰性菌株を、薬学的組成物として対象を治療するのに十分である量での適便且つ有効な投与のために、好適な薬学的に許容される担体と配合することができる。投与されることになる組換え弱毒化グラム陰性菌株の又は薬学的組成物の単位投与形態は、例えば、組換え弱毒化グラム陰性菌株を1ml当り細菌約 10^5 - 約 10^9 個、好ましくは1ml当り細菌約 10^6 - 約 10^8 個、より好ましくは1ml当り細菌約 10^7 - 10^8 個、最も好ましくは1ml当り細菌約 10^8 個の量で含有することができる。

10

【0191】

本明細書では同義で使用される「対象を治療するのに有効である量」又は「有効量」とは、正しい医学的判断の範囲内で、治療すべき状態を有意に正に修飾するのに十分な多さの、しかし重篤な副作用を回避するのに十分な少なさの細菌（一又は複数）の（妥当なりスク/ベネフィット比での）量を意味する。細菌の有効量は、達成すべき特定の目標、治療を受ける対象の年齢及び健康状態、治療期間、併用治療の性質、及び用いられる具体的な細菌によって変わることになる。したがって、細菌の有効量は、所望の効果をもたらすことになる最少量であるであろう。通常、体表 $1m^2$ 当り細菌約 10^5 個 - 約 10^9 個、例えば、約 10^5 個 - 約 10^9 個、好ましくは、体表 $1m^2$ 当り細菌約 10^6 個 - 約 10^8 個、例えば、約 10^6 個 - 約 10^8 個、より好ましくは、体表 $1m^2$ 当り細菌約 10^7 個 - 約 10^8 個、例えば、約 10^7 個 - 約 10^8 個、最も好ましくは体表 $1m^2$ 当り細菌 10^8 個、例えば、 10^8 個量が、対象に投与される。

20

【0192】

がん、例えば、悪性固形腫瘍を治療するために対象に、例えばヒトに、投与される組換え弱毒化グラム陰性菌株の単一用量は、通常、全組換え弱毒化グラム陰性菌株の細菌約 10^4 個 - 約 10^{10} 個、例えば、体表 $1m^2$ 当り細菌約 10^4 個 - 体表 $1m^2$ 当り細菌約 10^{10} 個、好ましくは、細菌約 10^5 個 - 約 10^9 個、例えば、体表 $1m^2$ 当り細菌約 10^5 個 - 約 10^9 個、より好ましくは、細菌約 10^6 個 - 約 10^8 個、例えば、体表 $1m^2$ 当り細菌約 10^6 個 - 約 10^8 個、より一相好ましくは、細菌約 10^7 個 - 約 10^8 個、例えば、体表 $1m^2$ 当り細菌約 10^7 個 - 約 10^8 個、最も好ましくは、細菌 10^8 個、例えば、体表 $1m^2$ 当り細菌 10^8 個である。

30

【0193】

薬学的担体として役立つ物質の例は、糖、例えば、ラクトース、グルコース及びスクロース；デンプン、例えば、コーンスターチ及びジャガイモデンプン；セルロース及びその誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース及び酢酸セルロース；トラガカント末；麦芽；ゼラチン；タルク、ステアリン酸；ステアリン酸マグネシウム；硫酸カルシウム；炭酸カルシウム；植物油、例えば、ピーナッツ油、綿実油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油及びカカオ脂；ポリオール、例えば、プロピレングリコール、グリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコール；寒天；アルギン酸；発熱物質不含水；等張食塩水；クランベリー抽出物及びリン酸バッファー溶液；脱脂粉乳；並びに例えばビタミンC、エストロゲン及びエキナセア等の、薬学的製剤に使用される他の非毒性適合性物質である。湿潤剤及び潤滑剤、例えばラウリル硫酸ナトリウム、並びに着色剤、香味剤、潤滑剤、賦形剤、錠剤形成剤、安定剤、抗酸化物質及び防腐剤も存在することもある。

40

【0194】

対象への組換え弱毒化グラム陰性菌株の投与方法は、静脈内、腫瘍内、腹腔内及び経口投与からなる群から選択することができる。本発明は、何れの特定の適用方法に限定されることを意図したものではないが、細菌又は薬学的組成物の静脈内又は腫瘍内投与が好ましい。

50

【0195】

投与経路に依存して、細菌を含む活性成分を、前記生物を不活性にし得る酵素、酸及び他の自然条件の作用から前記生物を保護するための材料で、コーティングする必要があることもある。非経口投与以外により細菌を投与するために、不活性化を防止するための材料によりそれらをコーティングすべきであり、又はそのような材料と共にそれらを投与すべきである。例えば、細菌を酵素阻害剤と又はリポソームで共投与してもよい。酵素阻害剤は、膵臓トリプシン阻害剤、ジイソプロピルフルオロリン酸（DFP）及びトラジロールを含む。リポソームは、水中油中水型P40エマルジョン、並びにラクトバチルス属（*Lactobacillus*）等の細菌又はそれらの副産物を宿主対象の内部標的に輸送する従来の特別設計リポソームを含む。1つの細菌を単独で投与してもよく、又は第2の異なる細菌と共に投与してもよい。任意の数の異なる細菌を共に投与することができる。「と共に」とは、一緒に、実質的に同時に、又は逐次的に、を意味する。組成物を、例えば、本発明の細菌若しくは薬学的組成物を含むフリーズドライカプセル等の、錠剤、ピル若しくはカプセルの形態で投与してもよく、又はDMSO若しくはグリセロールを含有する本発明の細菌若しくは薬学的組成物の凍結溶液として投与してもよい。別の好ましい適用形態は、本発明の細菌又は薬学的組成物の凍結乾燥カプセルの製剤である。さらに別の好ましい適用形態は、本発明の細菌又は薬学的組成物の熱乾燥カプセルの製剤である。

10

【0196】

投与すべき組換え弱毒化グラム陰性菌株又は薬学的組成物を注射により投与することができる。注射剤用に好適な形態は、モノセプティック又は滅菌水溶液（水溶性の場合）又は分散液、及び滅菌注射用溶液又は分散液の即時調製のための滅菌粉末を含む。全ての場合、形態は、モノセプティック又は無菌でなければならず、容易な注入性が存在する程度に流動性でなければならない。形態は、製造及び保管条件下で安定していなければならない。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、それらの好適な混合物、及び植物油を含有する、溶媒又は分散媒であることができる。適正な流動体は、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用により、分散体の場合は必要粒径の維持により、維持することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖又は塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチン、の組成物における使用によりもたらすことができる。

20

30

【0197】

本発明の一部の実施態様では、組換え弱毒化グラム陰性菌株は、対象にシデロホアと共投与される。これらの実施態様は好ましい。共投与することができるシデロホアは、ヒドロキサム酸型シデロホア、カテコール酸型シデロホア、及び混合配位子型シデロホアを含む、シデロホアである。好ましいシデロホアは、デフェロキサミン（デスフェリオキサミンB、デスフェロキサミンB、DFO-B、DFOA、DFB又はデスフェラルとしても公知）、デスフェリオキサミンE、デフェラシロクス（エクジェイド、デシロクス、デフリジェット、デシファー）及びデフェリプロン（フェリプロックス）であり、より好ましいのはデフェロキサミンである。デフェロキサミンは、放線菌門（*Actinobacteria*）ストレプトマイセス・ピロサス（*Streptomyces pilosus*）により産生された細菌シデロホアであり、例えば、Novartis Pharma Schweiz AG（スイス）から市販されている。

40

【0198】

シデロホアとの共投与は、組換え弱毒化グラム陰性菌株の投与前であってもよく、投与と同時にであってもよく、又は投与後であってもよい。好ましくは、シデロホアは、組換え弱毒化グラム陰性菌株の投与前に投与され、より好ましくは、対象への組換え弱毒化グラム陰性菌株の投与の少なくとも1時間、好ましくは少なくとも6時間、より好ましくは少なくとも12時間、特に少なくとも24時間前に投与される。特定の実施態様では、対象は、細菌の増殖を可能にするために、組換え弱毒化グラム陰性菌株による感染の24時間前にデフェロキサミンで前治療される。通常、シデロホアは、体重1kg当り約0.5x

50

10^{-5} Mol - 約 1×10^{-3} Mol、より好ましくは、約 1×10^{-5} Mol - 約 1×10^{-4} Mol、好ましくは約 3.5×10^{-5} Mol - 約 1.1×10^{-4} Mol の単一用量で共投与される。通常、デスフェロキサミンは、体重 1 kg 当り約 20 mg - 約 60 mg、好ましくは約 20 mg - 約 60 mg の単一用量で共投与される。

【0199】

本明細書に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株又は薬学的組成物の投与の投与レジメンは、当業者には公知であるように、達成すべき特定の目標、治療を受ける対象の年齢及び健康状態、治療期間、併用治療の性質並びに用いられる具体的な細菌によって変わることになる。組換え弱毒化グラム陰性菌株は、通常、1 - 20 日毎に、好ましくは 1 - 10 日毎に、より好ましくは 1 - 7 日毎に単一用量からなる投与レジメンに従って、単一用量からなる投与レジメンに従って、対象に投与される。投与の期間は、通常は約 20 - 約 60 日、好ましくは約 30 - 40 日である。或いは、投与の期間は、通常約 8 - 約 32 週間、好ましくは約 8 - 約 24 週間、より好ましくは約 12 - 約 16 週間である。

【0200】

さらなる実施態様では、本発明は、好ましくはヒトの、がん、例えば、悪性固形腫瘍などを治療するためのキットを提供する。そのようなキットは、一般に、本明細書に記載の組換え弱毒化グラム陰性菌株又は薬学的組成物とキットを使用するための説示とを含むことになる。一部の実施態様では、キットは、各々の容器が、本明細書に記載の方法において使用されることになる別々の要素の 1 つを含む、一又は複数の容器、例えばバイアル、チューブなどの受入れるように区画化されている、キャリア、パッケージ又は容器を含む。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、注射器、及び試験管が挙げられる。他の実施態様では、容器は、ガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成されたものである。

【実施例】

【0201】

実施例 1 :

A) 材料及び方法

菌株及び増殖条件。この研究で使用した株を図 3 A - M に列挙する。プラスミド精製及びクローニングに使用した大腸菌 Top 10、及び接合伝達に使用した大腸菌 Sm 10 pir、並びに pKNG 101 を伝播するために使用した大腸菌 BW 19610³¹ を、LB 寒天プレート上及び LB 培地中、37 で常套的に増殖させた。アンピシリンを 200 μ g/ml (エルシニア属) 又は 100 μ g/ml (大腸菌) で使用して、発現ベクターについて選択した。ストレプトマイシンを 100 μ g/ml の濃度で使用して、自殺ベクターについて選択した。Y. エンテロコリチカ MRS 40 (O: 9、生物型 2)²⁰、非アンピシリン耐性 E 40 派生物¹⁹ 及びそれに由来する株をブレインハートインフュージョン (BHI: Difco) 上で、室温で常套的に増殖させた。Y. エンテロコリチカ株に、ナリジクス酸 (35 μ g/ml) を添加し、全ての Y. エンテロコリチカ株に、さらに、100 μ g/ml のメソ - 2, 6 - ジアミノピメリン酸 (mDAP、Sigma Aldrich) を補充した。サルモネラ菌 SL 1344 を LB 寒天プレート上及び LB 培地中、37 で常套的に増殖させた。アンピシリンを 100 μ g/ml の濃度で使用して、サルモネラ菌における発現ベクターについて選択した。

【0202】

Y. エンテロコリチカの遺伝子操作。Y. エンテロコリチカの遺伝子操作は、記載されている³²、³³。簡単に述べると、精製 pYV 40 プラスミド又はゲノム DNA を鋳型として使用して、2 断片オーバーラップ PCR により、pYV プラスミド内又は染色体上の遺伝子の修飾又は欠失のための変異誘発物を構築して、それぞれの遺伝子の欠失又は修飾部分の両側に 200 - 250 bp の隣接配列をもたらし、得られた断片を大腸菌 BW 10610³¹ における pKNG 101²⁹ にクローニングした。配列が検証されているプラスミドを大腸菌 Sm 10 pir 内に形質転換し、そこからプラスミドを対応する Y. エンテロコリチカ株内に移動させた。組込み型ベクターを保有する突然変異株を

選択圧なしで数世代増殖させた。次いで、スクローズを使用して、ベクターを失ってしまったクローンについて選択した。最後に、突然変異株をコロニーPCRにより同定した。特定の変異誘発物 (p S i _ 4 0 8、 p S i _ 4 1 9) を表 I I I に収載する。

【 0 2 0 3 】

プラスミドの構築。プラスミド p B a d _ S i 2 又は p B a d _ S i 1 (図 2) を、 Y o p E の N 末端 1 3 8 アミノ酸 (配列番号 2) を有する融合タンパク質のクローニングに使用した。 p B a d _ S i 2 は、精製 p Y V 4 0 から Y o p E 及び S y c E 用の内在性プロモーターを含有する S y c E - Y o p E ₁₋₁₃₈ 断片を p B a d - M y c H i s A (I n v i t r o g e n) の K p n I / H i n d I I I 部位にクローニングすることにより構築した。さらなる修飾は、消化、クレノウ断片処理及び再ライゲーションによる p B a d - M y c H i s A の N c o I / B g l I I I 断片の除去を含む。二方向転写ターミネーター (B B a _ B 1 0 0 6 ; i G E M f o u n d a t i o n) を、 K p n I 切断及びクレノウ処理 (p B a d _ S i 2) 又は B g l I I I 切断部位 (p B a d _ S i 1) にクローニングした。さらに、 Y o p E ₁₋₁₃₈ の 3' 末端に、次の切断部位を加えた： X b a I - X h o I - B s t B I - (H i n d I I I) (図 2 B)。 p B a d _ S i 1 は、 p B a d _ S i 2 と同等であるが、アラビノース誘導性プロモーターの下で N c o I / B g l I I I 部位において p E G F P - C 1 (C l o n t e c h) から増幅された E G F P をコードする。対応する内在性プロモーターと S t e A ₁₋₂₀ 断片 (p S i _ 2 6 6)、完全長 S t e A 配列 (p S i _ 2 6 7)、 S o p E ₁₋₈₁ 断片 (p S i _ 2 6 8) 又は S o p E ₁₋₁₀₅ 断片 (p S i _ 2 6 9) とを含むプラスミド p S i _ 2 6 6、 p S i _ 2 6 7、 p S i _ 2 6 8 及び p S i _ 2 6 9 を、サルモネラ菌 S L 1 3 4 4 ゲノム DNA から増幅し、 p B a d - M y c H i s A (I n v i t r o g e n) の N c o I / K p n I 部位にクローニングした。

【 0 2 0 4 】

完全長遺伝子又はそれらの断片を、下の表 I に収載されている特定のプライマーで増幅し、 Y o p E ₁₋₁₃₈ との融合体としてプラスミド p B a d _ S i 2 に、又は z - B I M (配列番号 1 6) の場合は p B a d _ S i 1 にクローニングした (下の表 I I を参照されたい)。 S t e A 又は S o p E との融合のために、合成 DNA 構築物を K p n I / H i n d I I I により切断し、 p S i _ 2 6 6、 p S i _ 2 6 7、 p S i _ 2 6 8 又は p S i _ 2 6 9 にそれぞれクローニングした。細菌種の遺伝子の場合、精製ゲノム DNA を鋳型として使用した (フレクスナー赤痢菌 M 9 0 T、サルモネラ菌亜種ネズミチフス菌 S L 1 3 4 4、バルトネラ・ヘレンセラ菌 A T C C 4 9 8 8 2)。ヒト遺伝子については、別段の記述がない場合、汎用 c D N A ライブラリー (C l o n t e c h) を使用し (図 3 A - M)、ゼブラフィッシュ遺伝子を c D N A ライブラリー (M . A f f o l t e r から親切な寄贈品) から増幅した。ライゲーションしたプラスミドを大腸菌 T o p 1 0 にクローニングした。シークエンシング済みプラスミドを、標準的な大腸菌エレクトロポレーションの場合と同様の設定を使用して所望の Y . エンテロコリチカ又はサルモネラ菌株にエレクトロポレーションした。

表 I (プライマー N r . S i _ : 配列)

配列番号 5 1 : プライマー N o . : S i _ 2 8 5

CATACCATGGGAGTGAGCAAGGGCGAG

配列番号 5 2 : プライマー N o . : S i _ 2 8 6

GGAAGATCTtACTTGTACAGCTCGTCCAT

配列番号 5 3 : プライマー N o . : S i _ 2 8 7

CGGGGTACCTCAACTAAATGACCGTGGTG

配列番号 5 4 : プライマー N o . : S i _ 2 8 8

GTAAAGCTTtctgaatctagactcgagCGTGCGAACTGGTC

配列番号 5 5 : プライマー N o . : S i _ 3 8 7

CGTAtctagaATGGACTGTGAGGTCAACAA

配列番号 5 6 : プライマー N o . : S i _ 3 9 1

CGTAtctagaGGCAACCGCAGCA
 配列番号 57 : プライマー No. : Si__389
 GTTAAAGCTTTCAGTCCATCCCATTCTg
 配列番号 58 : プライマー No. : Si__436
 CGTAtctagaATGCCCCGCCCC
 配列番号 59 : プライマー No. : Si__437
 GTTAAAGCTTCTACCCACCGTACTCGTCAAT
 配列番号 60 : プライマー No. : Si__438
 CGTAtctagaATGTCTGACACGTCCAGAGAG
 配列番号 61 : プライマー No. : Si__439 10
 GTTAAAGCTTTCATCTTCTTCGCAGGAAAAAG
 配列番号 62 : プライマー No. : Si__463
 CAGTctcgaggaaagcttggttaaggggc
 配列番号 63 : プライマー No. : Si__464
 cagtTTCGAAAtagcgacggcgacg
 配列番号 64 : プライマー No. : Si__476
 GTTAAAGCTTtACTTGTACAGCTCGTCCAT
 配列番号 65 : プライマー No. : Si__494
 CGTAtctagaATGGCCGAGCCTTG
 配列番号 66 : プライマー No. : Si__495 20
 GTTAAAGCTTttaTTGAAGATTTGTGGCTCC
 配列番号 67 : プライマー No. : Si__504
 CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTCAAAGTATGCCCCGCCCC
 配列番号 68 : プライマー No. : Si__505
 GTTAAAGCTTCCCACCGTACTCGTCAATtc
 配列番号 69 : プライマー No. : Si__508
 CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTCAAAGTATGGCCGAGCCTTG
 配列番号 70 : プライマー No. : Si__509
 GTTAAAGCTTTTGAAGATTTGTGGCTCCc
 配列番号 71 : プライマー No. : Si__511 30
 CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTCAAAGTGTGAGCAAGGGCGAG
 配列番号 72 : プライマー No. : Si__512
 CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTCAAAGTCCGCCGAAAAAAAAAACGTAAAGTTGTGA
 GCAAGGGCGAG
 配列番号 73 : プライマー No. : Si__513
 GTTAAAGCTTtAAACTTTACGTTTTTTTTTCGGCGGCTTGTACAGCTCGTCCAT
 配列番号 74 : プライマー No. : Si__515
 CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTCAAAGTGATTATAAAGATGATGATGATAAAATGG
 CCGAGCCTTG
 配列番号 75 : プライマー No. : Si__677 40
 TTACTATTCGAAGAAATTATTCATAATATTGCCCGCCATCTGGCCCAAATTGGTGATGAAATGGATCATTAAAGCTTGGAG
 TA
 配列番号 76 : プライマー No. : Si__678
 TACTCCAAGCTTAATGATCCATTTTCATCACCAATTTGGGCCAGATGGCGGGCAATATTATGAATAATTTCTTCGAATAGT
 AA
 配列番号 77 : プライマー No. : Si__682
 TTACTACTCGAGAAAAAACTGAGCGAATGTCTGCGCCGATTGGTGATGAACTGGATAGCTAAGCTTGGAGTA
 配列番号 78 : プライマー No. : Si__683
 TACTCCAAGCTTAGCTATCCAGTTCATCACCAATGCGGCGCAGACATTGCTCAGTTTTTTCTCGAGTAGTAA
 配列番号 79 : プライマー No. : Si__580 50

catgccatggatttatggtcatagatatgacctc
 配列番号 80 : プライマー No. : Si__612
 CGGGGTACCatgaggttagcttatttcctgataaag
 配列番号 81 : プライマー No. : Si__613
 CGGGGTACCataattgtccaaatagttaggtagc
 配列番号 82 : プライマー No. : Si__614
 catgccatggCGGCAAGGCTCCTC
 配列番号 83 : プライマー No. : Si__615
 cggggtaccTTTATTTGTCAACTGCCC
 配列番号 84 : プライマー No. : Si__616 10
 cggggtaccTGCGGGTCTTTACTCG
 配列番号 85 : プライマー No. : Si__585
 CAGTctcgagATGCAGATCTTCGTCAAGAC
 配列番号 86 : プライマー No. : Si__586
 GTTAAAGCTTgctagcttcgaaACCACCACGTAGACGTAAGAC
 配列番号 87 : プライマー No. : Si__588
 cagtTTCGAAGATTATAAAGATGATGATGATAAAATGGCCGAGCCTTG
 配列番号 88 : プライマー No. 733
 TTACTACTCGAGGGTGCCATCGATGCCGAAGAAATTATTCATAATATTGCCCG
 配列番号 89 : プライマー No. 735 20
 TACTCCTTCGAATTAATGATCCATTTTCATCACCAATTTG
 配列番号 90 : プライマー No. 736
 TTACTACTCGAGGGTGCCATCGATGCCAAAAAACTGAGCGAATGTCTGCG
 配列番号 91 : プライマー No. 738
 TACTCCTTCGAATTAGCTATCCAGTTCATCACCAATG
 配列番号 92 : プライマー No. 734
 TACTCCTTCGAAGGCACCATGATCCATTTTCATCACCAATTTGG
 配列番号 93 : プライマー No. 725 :
 TTACTATTCGAAGAAATTATTCATAATATTGCC
 配列番号 94 : プライマー No. 726 : 30
 TACTCCAAGCTTACGGTTGAATATTATGATCCATTTTCATCACCAATTTGG
 配列番号 95 : プライマー No. 727 :
 TTACTATTCGAAGCCGGTGGTGCCGAAGAAATTATTCATAATATTGCC
 配列番号 96 : プライマー No. 728 :
 TACTCCAAGCTTAATGATCCATTTTCATCA
 配列番号 97 : プライマー No. 737 :
 TACTCCTTCGAAGGCACCGCTATCCAGTTCATCACCAATG
 配列番号 101 : プライマー No. 869 :
 gatcgtcgacTTAAGTTCAATGGAGCGTTTAATATC
 配列番号 102 : プライマー No. 870 : 40
 ctttgactggcgagaaacgcTCTTAACATGAGGCTGAGCTC
 配列番号 103 : プライマー No. 871 :
 GAGCTCAGCCTCATGTTAAGAgcgtttctcgccagtcgaaag
 配列番号 104 : プライマー No. 872 :
 gatagccccgagcctgtGCACTTTGTCATTAACCTCAGC
 配列番号 105 : プライマー No. 873 :
 GCTGAGGTTAATGACAAAGTGCacaggctcgggggctatc
 配列番号 106 : プライマー No. 874 :
 catgtctagaCCCTCAGCATAATAACGACTC
 配列番号 107 : プライマー No. 600 : 50

catgacatgtTGGCGTTTCTCGCC

配列番号 1 0 8 : プライマー No . 6 0 1 :

catgacatgtATTAACCTCAGCCCTGACTATAAG

配列番号 1 1 9 : プライマー No . 1 0 1 0 :

cacatgtctagaCAACCGTTTCCGAAAGGTGATCTG

配列番号 1 2 0 : プライマー No . 1 0 1 2 :

atccCAagctTATTGGCGTTGGGTGGTAAAAATTTTG

配列番号 1 2 1 : プライマー No . 1 0 2 1 :

cacatgtctagaATGACCGCCGAACAACGC

配列番号 1 2 2 : プライマー No . 1 0 2 2 :

catgaagcttaCGGACCCGGATTTTGGCTC

> 配列番号 1 2 3 : プライマー No . 1 0 2 3 :

catgaagcttaCGGTTCTTCTTGAATAAAAATTTGAATG

配列番号 1 2 4 : プライマー No . 1 0 2 4 :

catgaagcttaTTGCAGCACTTTCGGCCAATTT

配列番号 1 2 5 : プライマー No . 1 0 2 5 :

cacatgtctagaATGAGCATTGTGTGTAGCGC

配列番号 1 2 6 : プライマー No . 1 0 2 6 :

catgaagcttaGCTTTCATCCACGGCCGG

配列番号 1 2 7 : プライマー No . 1 0 2 7 :

catgaagcttaATTACCGTTTGGCGCAGC

10

20

表 II: クローニングした融合タンパク質

| T3SS により送達されることになるタンパク質 | タンパク質配列番号 | 骨格プラスミド | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマー-Si.Nr.: | プライマー配列番号 |
|---|-----------|---------------------------|-------------------|--|----------------|
| YopE1-138-MycHis | 3 | pBad-MycHisA (Invitrogen) | pBad_Si_1 | 285/286 (EGFP), 287/288 (sycE-YopE1-138) | 51/52 及び 53/54 |
| YopE1-138-MycHis | 3 | pBad-MycHisA (Invitrogen) | pBad_Si_2 | 287/288 (sycE-YopE1-138) | 53/54 |
| YopE1-138-ヒト Bid | 16 | pBad_Si_2 | pSi_85 | 387/391 | 55/56 |
| YopE1-138-ヒト t-Bid | 17 | pBad_Si_2 | pSi_87 | 389/391 | 55/57 |
| YopE1-138-ET1 | 9 | pBad_Si_2 | pSi_120 | 436/437 | 58/59 |
| YopE1-138-z-BIM | 16 | pBad_Si_1 | pSi_121 | 438/439 | 60/61 |
| YopE1-138-TEV プロテアーゼ S219V | 12 | pBad_Si_2 | pSi_132 | 463/464 | 62/63 |
| YopE1-138-Ink4C | 8 | pBad_Si_2 | pSi_151 | 494/495 | 65/66 |
| YopE1-138-2x TEV 部位- ET1 | 11 | pBad_Si_2 | pSi_156 | 504/505 | 67/68 |
| YopE1-138-2xTEV部位- EGFP | 98 | pBad_Si_2 | pSi_158 | 511/476 | 71/64 |
| YopE1-138-2xTEV 部位- EGFP - NLS | 99 | pBad_Si_2 | pSi_159 | 511/513 | 71/73 |
| YopE1-138-2xTEV 部位- NLS - EGFP | 100 | pBad_Si_2 | pSi_160 | 512/476 | 72/64 |
| YopE1-138-2x TEV 部位- INK4C | 10 | pBad_Si_2 | pSi_161 | 508/509 | 69/70 |
| YopE1-138-2x TEV 部位- Flag - INK4C | 13 | pBad_Si_2 | pSi_164 | 515/509 | 74/70 |
| YopE1-138-Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス tBid BH3 部分 | 19 | pBad_Si_2 | pSi_318 | 677/678 | 75/76 |
| YopE1-138-Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス Bax BH3 部分 | 20 | pBad_Si_2 | pSi_322 | 682/683 | 77/78 |
| SteA1-20 | 5 | pBad-MycHisA (Invitrogen) | pSi_266 | 580/612 | 79/80 |
| SteA | 4 | pBad-MycHisA (Invitrogen) | pSi_267 | 580/613 | 79/81 |
| SopE1-81 | 6 | pBad-MycHisA (Invitrogen) | pSi_268 | 614/615 | 82/83 |
| SopE1-105 | 7 | pBad-MycHisA (Invitrogen) | pSi_269 | 614/616 | 82/84 |
| YopE1-138-Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス tBid | 21 | pBad_Si_2 | pSi_315 | 合成構築物 | / |

10

20

30

40

| | | | | | |
|---|----|-----------|------------|---------|-------|
| YopE1-138-ユビキチン | 14 | pBad_Si_2 | pSi_236 | 585/586 | 85/86 |
| YopE1-138-ユビキチン-Flag-INK4C-MycHis | 15 | pSi_236 | pSi_237_II | 588/509 | 87/70 |
| さらなるドメインの挿入の準備が整っているYopE1-138-(Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス tBid BH3 部分) | 25 | pBad_Si_2 | pSi_357 | 733/735 | 88/89 |
| さらなるドメインの挿入の準備が整っているYopE1-138-(Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス BAX BH3 部分) | 26 | pBad_Si_2 | pSi_358 | 736/738 | 90/91 |
| YopE1-138-(Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス tBid BH3 部分) ₂ | 27 | pSi_357 | pSi_371 | 733/734 | 88/92 |
| YopE1-(138-Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス tBid BH3 部分- Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス BAX BH3 part | 28 | pSi_358 | pSi_373 | 733/734 | 88/92 |
| YopE ₁₋₁₃₈ コドン最適化マウス tBid BH3 伸長部分 | 22 | pBad_Si_2 | pSi_353 | 725/726 | 93/94 |
| YopE ₁₋₁₃₈ -10Aa リンカー-Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス tBid BH3 部分 | 23 | pBad_Si_2 | pSi_354 | 727/728 | 95/96 |
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス Bax BH3 部分-Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス tBid BH3 部分 | 24 | pSi_357 | pSi_374 | 736/737 | 90/97 |
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロコリチカコドン最適化ヒトRIG-1 2つのCARDドメイン(Aa.1-245) | 37 | pBad_Si_2 | pSi_453 | 合成構築物 | / |
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロコリチカコドン最適化マウスRIG-1 2つのCARDドメイン(Aa.1-246) | 38 | pBad_Si_2 | pSi_454 | 合成構築物 | / |
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロコリチカコドン最適化出芽酵母(S.cerevisiae)GCN4(Aa.249~278)-Y.エンテロコリチカコドン最適化緑膿菌WspR(Aa.172-347) | 39 | pBad_Si_2 | pSi_452 | 合成構築物 | / |

10

20

30

40

| | | | | | |
|---|-----|-----------|---------|-----------|---------|
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロコ リチカコドン最適化マ ウスIRF3 S397D | 40 | pBad_Si_2 | pSi_428 | 合成構築物 | / |
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロコ リチカコドン最適化コ レラ菌DncV(M3からL4 13) | 41 | pBad_Si_2 | pSi_482 | 合成構築物 | / |
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロコ リチカコドン最適化セ レウス菌_DisA様(PDB: 2FB5;Aa.76-205) | 42 | pBad_Si_2 | pSi_483 | 合成構築物 | / |
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロコ リチカコドン最適化イ ソギンチャク(N.ベクテ ンシス)cGAS(Ensembl: A7SFB5.1) | 43 | pBad_Si_2 | pSi_484 | 合成構築物 | / |
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロ コリチカコドン最適化 マウスRIG1 CARDドメ イン(Aa.1-229) | 110 | pBad_Si_2 | pSi_521 | 1021/1022 | 122/123 |
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロ コリチカコドン最適化 マウスRIG1 CARDドメ イン(Aa.1-218) | 111 | pBad_Si_2 | pSi_522 | 1021/1023 | 122/124 |
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロ コリチカコドン最適化 マウスMDA5(Aa.1-294) | 112 | pBad_Si_2 | pSi_517 | 合成構築物 | / |
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロ コリチカコドン最適化 マウスMDA5(Aa.1-231) | 113 | pBad_Si_2 | pSi_524 | 1025/1026 | 126/127 |
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロ コリチカコドン最適化 ヒトcGAS(Aa.161-522) | 115 | pBad_Si_2 | pSi_515 | 合成構築物 | / |
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロ コリチカコドン最適化 ヒトMAVS CARD(Aa.1- 100) | 116 | pBad_Si_2 | pSi_539 | 合成構築物 | / |
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロ コリチカコドン最適化 イソギンチャク(N.ベクテ ンシス)cGAS(Aa.60-42 2)(Ensembl:A7SFB5.1) | 117 | pBad_Si_2 | pSi_503 | 1010/1012 | 120/121 |
| YopE ₁₋₁₃₈ -Y.エンテロ コリチカコドン最適化 リステリア属CdaA(Aa.1 01-273) | 118 | pBad_Si_2 | pSi_518 | 合成構築物 | / |

10

20

30

40

表 III: 遺伝子修飾用の変異誘発物

| 変異誘発物/構築物 | 挿入すべき位置: | 骨格プラスミド | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマー Si_Nr.: | プライマー 配列 番号 | 特別な 親株と 共に使 用され るもの |
|---|----------|---------|-------------------------|--|--|---------------------------------|
| YopE ₁₋₁₃₈ - マウスtBID BH3 | pYV | pKNG101 | pSi_408 | 合成遺伝子 | / | / |
| YopE ₁₋₁₃₈ -(マウスtBID BH3) ₂ | pYV | pKNG101 | pSi_437 | 合成遺伝子 | / | pSi_408 で突然 変異さ せた株 |
| YopE ₁₋₁₃₈ - Y.エンテロ コリチカコ ドン最適化 マウスRIG -1 2つのC ARDドメイ ン(Aa.1-24 6) | pYV | pKNG101 | pSi_456 (配列番号 50) | 合成遺伝子 | / | / |
| pYV-asd | pYV | pKNG101 | pSi_417 | PCR1: 869/870; PCR2: 871/872; PCR3: 873/874; オーバ ーラップ PCR 869/874 | PCR1: 101/102; PCR2: 103/104; PCR3: 105/106; オーバ ーラップ PCR 101/106 | Δasd |
| pYV- virF- hairpinI | pYV | pKNG101 | pSi_441 | 合成遺伝子 | / | / |
| pYV- pAra-VirF | pYV | pKNG101 | pSi_439 | 合成遺伝子 | / | / |

10

20

30

40

【 0 2 0 5 】

Yop分泌。培養をBHI-Ox中37 (分泌許容条件)^{3 4}に変えることにより、Yopレギュロンの導入を果たした。炭素源グルコース(4 mg/ml)を添加した。

【 0 2 0 6 】

細胞と上清画分を20 800 gで10分間、4での遠心分離により分離した。細胞ペレットを全細胞画分と見なした。最終10%(w/v)のトリクロロ酢酸を用いて、1

50

時間、4 で、上清中のタンパク質を沈殿させた。遠心分離（15分間、20,800g）及び上清の除去後、得られたペレットを氷冷アセトンで一晩洗浄した。試料を再び遠心分離し、上清を廃棄し、ペレットを空気乾燥させ、1×SDSローディング色素に再懸濁させた。

【0207】

分泌されたタンパク質をSDS-PAGEによる分析し、各場合、細菌 3×10^8 個により分泌されたタンパク質をレーン毎にローディングした。12.5%SDS-PAGEゲルを使用して、イムノプロット法による特定の分泌タンパク質の検出を行った。全細胞内のタンパク質を検出するために、別段の記述がない場合、細菌 2×10^8 個をレーン毎にローディングし、イムノプロット法による検出前に12.5%SDS-PAGEゲルを用いてタンパク質を分離した。

10

【0208】

YopEに対するラットモノクローナル抗体（MIPA193-13A9；1:1000、³⁵）を使用して、イムノプロット法を行った。バックグラウンド染色を低減させるために、Y.エンテロコリチカ HOPEMT asdに対する抗血清を一晩に2回、予備吸着させた。ラット抗体に対する二次抗体であって、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（1:5000；Southern biotech）にコンジュゲートさせた二次抗体を用いて検出を行い、その後、ECL化学発光基質（LumiGlo, KPM）で現像した。

【0209】

細胞培養及び感染。10%FCS及び2mM L-グルタミン（cDMEM）を補充したダルベッコ変性イーグル培地（DMEM）でHeLa Ccl2及びB16F10細胞を培養した。10%FCS及び2mM L-グルタミンを補充したRPMI 1640で4T1細胞を培養した。添加剤を加えたBHIでY.エンテロコリチカを一晩、室温で増殖させ、新たなBHIで希釈して0.2のOD₆₀₀にし、2時間、室温で増殖させた後、さらに30分間、又はEGFPの送達の場合は1時間、37℃水浴振盪機への温度シフトを行った。最後に、細菌を遠心分離（6000rcf、30秒）により回収し、10mM HEPES及び2mM L-グルタミンを補充したDMEMで1回洗浄した。最後に、細菌を遠心分離（6000rcf、30秒）により収集し、10mM HEPES及び2mM L-グルタミンを補充したDMEMで1回洗浄した。96ウェルプレートに（免疫蛍光法のために）又は6ウェルプレートに（ウェスタンブロット法のために）播種した細胞を、10mM HEPES及び2mM L-グルタミンを補充したDMEM中で、示されている感染多重度で感染させた。細菌を添加した後、プレートを1分間、1750rpmで遠心分離し、示されている期間、37℃で置いておいた。細胞外細菌を、示されている場合にはゲンタマイシン（100mg/ml）により殺滅した。免疫蛍光分析の場合、感染アッセイを4%PFA固定により停止した。ウェスタンブロット分析のために、細胞を氷冷PBSで2回洗浄し、Phospho-safe溶解バッファー（Novagen）を添加して細胞を溶解した。氷上でのインキュベーション後、細胞を遠心分離した（16000rcf、25分、4℃）。上清を回収し、Bradford BCAアッセイ（Pierce）により全タンパク質含有量について分析した後、SDS-PAGE、そして抗アクチン（Millipore）、抗Bid（Cell Signaling）、抗Myc（Santa Cruz）、抗カスパーゼ3 p17（Cell Signaling）及び抗Ink4C（Cell Signaling）抗体を使用するウェスタンブロット法を行った。

20

30

40

【0210】

感染細胞からのT3SS移行タンパク質のウェスタンブロット法。6ウェルプレート内のHeLa細胞を、感染多重度100で、上で説明したように感染させた。TEVプロテアーゼ移行性Y.エンテロコリチカ株を用いる同時感染の場合、株のOD₆₀₀を設定し、2つの細胞懸濁液をチューブの中で（別段の指示がない限り）1:1で混合した後、細胞に添加した。感染の最後に、細胞を氷冷PBSで2回洗浄し、少量の氷冷PBS

50

中にかき取るにより回収した。遠心分離 (16000 rcf、5分、4) 後、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche complete、Roche) を補充した0.002%ジギトニンにペレットを溶解した。溶解したペレット氷上で5分間インキュベートし、次いで、遠心分離した (16000 rcf、25分、4)。上清を回収し、全タンパク質含有量を Bradford BCAアッセイ (Pierce) により分析した後、SDS PAGE、そして抗Myc抗体 (Santa Cruz、9E11) 又は抗Ink4C抗体 (Cell Signaling) を使用するウェスタンブロット法を行った。

【0211】

自動顕微鏡観察及び画像分析。ImageXpress Micro (Molecular devices、Sunnyvale、USA) を用いて画像を自動で取得した。MetaXpress (Molecular devices、Sunnyvale、USA) を使用して抗Myc染色強度の定量を行った。核領域及び細菌を含有する領域を除く細胞内の領域を手動で選択し (40画素のエリアを有する円)、平均強度を記録した。

【0212】

B16-F10及び4T1同種移植マウスモデルにおける体内分布

全ての動物実験は、認可されたものであり (license 1908; Kantonales Veterinaramt Basel-Stadt)、地域のガイドライン (Tierschutz-Verordnung; Basel-Stadt) 及びスイス動物保護法 (Tierschutz-Gesetz) に従って行った。6週齢C57BL/6及びBALB/cマウスをJanvier Labsから取り寄せた。少なくとも1週間の馴化後、イソフルランを使用してマウスを麻酔し、10ul B16-F10又は4T1細胞 (細胞 1×10^5 - 1×10^6 個) をC57BL/6及びBALB/cマウスの側副部にそれぞれ皮下注射した。この実験を通して、マウスの行動及び身体的外見についてのスコアを付け、体表温度並びに体重を測定した。

【0213】

腫瘍が発生したら、マウスに8mg/ml デスフェラル溶液 (10ml/kg) を腹腔内注射により投与した。翌日、マウスを尾静脈への注射によりY.エンテロコリチカMRS40又はY.エンテロコリチカMRS40 HOPEMT (細菌 2×10^5 、 1×10^6 又は 1×10^7 個) に感染させた。マウスに静脈内投与した種菌を希釈平板法により検証した。一部の実験では、腫瘍進行をデジタルノギスでの腫瘍長及び幅の毎日の測定により追跡した。腫瘍体積を $0.532 \times \text{長さ} \times \text{幅}^2$ として決定した。注射後のそれぞれの日に、マウスをCO₂ 吸入により屠殺した。直ちに心臓からの吸引により血液試料を単離した。肝臓、脾臓、肺及び腫瘍を単離し、それらの重量を判定した。臓器及び腫瘍をホモジナイズした。ナリジクス酸 (35ug/ml) を含有するLB寒天プレート上への段階希釈物のスポッティングにより、各試料におけるCFUを判定した。

【0214】

直接的I型インターフェロン活性化アッセイ。多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下で分泌型胚性アルカリホスファターゼ (SEAP) 又は分泌型Lucialシフェラーゼを安定的に発現する、マウスB16F10メラノーマ細胞、マウスRAW264.7野生型又はMAVSノックアウトマクロファージを、InvivoGenから購入した (B16-Blue ISG、RAW-Blue ISG、RAW-Lucia ISG及びRAW-Lucia ISG-KO-MAVS)。増殖条件及びI型IFNアッセイは、InvivoGenにより提供されたプロトコールから適応させた。簡単に述べると、1ウェル当り150ulの試験培地 (B16-Blue ISG細胞についてはRPMI+2mM L-グルタミン+10%FCS; RAW-Blue、RAW-Lucia及びRAW-Lucia KO-MAVS ISG細胞についてはDMEM+2mM L-グルタミン+10%FCS) 中、12'500個のB16-Blue ISG細胞又は30'000個のRAW-Blue、RAW-Lucia若しくはRAW-Lucia KO-MAVS IS

10

20

30

40

50

G細胞を、平底96ウェルプレート(NUNC又はCorning)に播種した。翌日、所望の感染多重度(MOI、試験培地で希釈したもの)の1ウェル当り15 μ lを添加することにより、評価すべき菌株に細胞を感染させた。2時間のインキュベーション(37及び5%CO₂)後、ペニシリン(100U/ml)及びストレプトマイシン(100ug/ml)を含有する試験培地を添加することにより細菌を殺滅した。インキュベーションを20-24時間継続した。SEAP及びルシフェラーゼの検出は、それぞれ、QUANTI-Blue(商標)及びQUANTI-Luc(商標)プロトコール(InvivoGen)に従った。SEAP検出について:20 μ lの細胞上清を180 μ lの検出試薬(QUANTI-Blue(商標)、InvivoGen)と共にインキュベートした。プレートを37でインキュベートし、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices)を使用して650nmでのODを読み取ることにより、SEAP活性を測定した。ポリティブコントロールとして、試験培地でそれぞれの濃度に希釈したマウスIFNガンマ(ストック:1'000'000U/ml)を使用した。ルシフェラーゼ検出について:不透明プレート(ThermoScientific)において20 μ lの細胞上清に50 μ lの検出試薬(QUANTI-Blue(商標)、InvivoGen)を添加した。直ちに、プレートリーダー(BioTek)を使用して発光を測定した。

【0215】

間接的I型インターフェロン活性化アッセイ。マウスB16F10又は4T1細胞を、上で説明したように、評価すべき菌株の示した感染多重度(MOI)を用いて合計4時間、感染させた。次いで、細胞上清を、I-ISG54プロモーターの調節下で分泌型胚性アルカリホスファターゼ(SEAP)を安定的に発現するマウスB16Fメラノーマ細胞上に移した(前記プロモーターは多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含む;InvivoGenから購入した、B16-Blue ISG細胞)。増殖条件及びI型IFNアッセイは、InvivoGenにより提供されたプロトコールから適応させた。簡単に述べると、1ウェル当り150 μ lの試験培地(RPMI+2mM L-グルタミン+10%FCS)中、12'500個のB16-Blue ISG細胞を、平底96ウェルプレート(NUNC)に播種した。翌日、全培地を除去し、事前に感染させたB16F10又は4T1の100 μ lの細胞上清を添加した。プレートを20-24時間、37及び5%CO₂でインキュベートした。SEAPの検出は、QUANTI-Blue(商標)プロトコール(InvivoGen)に従った。20 μ lの細胞上清を180 μ lの検出試薬(QUANTI-Blue(商標)、InvivoGen)と共にインキュベートした。プレートを37でインキュベートし、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices)を使用して650nmでのODを読み取ることにより、SEAP活性を測定した。

【0216】

腫瘍内治療時のB16F10腫瘍同種移植マウスモデルにおける腫瘍進行の研究。全ての動物実験は、関係当局により認可されたものであり、地域のガイドライン及び動物保護法に従って行った。5-7週齢雌C57B1/6マウスをCharles River(L'Arbresles)から取り寄せた。少なくとも1週間の馴化後、イソフルランを使用してマウスを麻酔し、200 μ LのRPMI1640中の1 \times 10⁶個のB16-F10細胞をマウスの右側腹部に皮下注射した。定期的な間隔で、マウスを行動及び身体的外見についてモニターし、体重を測定した。

【0217】

腫瘍が60-130mm³の体積に達したら(0日目と定義した)処置を開始した。0、1、2、3、6及び9日目にイソフルラン麻酔下での腫瘍内注射(1投与当り50 μ l PBS中の細菌7.5 \times 10⁷個)により、評価すべき細菌をマウスに投与した。マウスに腫瘍内投与した種菌を希釈平板法により検証した。コントロールとして、内毒素不含PBSのみをマウスに注射した。最終細菌治療(8日目)の24時間前に、8mg/mlのデスフェラル溶液(10ml/kg)を腹腔内注射によってマウスに投与した。デジ

10

20

30

40

50

タルノギスでの腫瘍長及び幅の測定により、腫瘍進行を追跡した。腫瘍体積を $0.5 \times \text{長さ} \times \text{幅}^2$ として決定した。 1500 mm^3 を超える腫瘍体積を、人道的エンドポイントと定義した。

【0218】

腫瘍内治療時の EMT-6 腫瘍同種移植マウスモデルにおける腫瘍進行及び再投与の研究。全ての動物実験は、関係当局により認可されたものであり、地域のガイドライン及び動物保護法に従って行った。5 - 7 週齢雌 BALB/c (BALB/c By J) マウスを Charles River (L'Arbresles) から取り寄せた。少なくとも1週間の馴化後、イソフルランを使用してマウスを麻酔し、 $200 \mu\text{L}$ の RPMI 1640 中の 1×10^6 個の EMT-6 細胞をマウスの右側腹部に皮下注射した。定期的な間隔で、マウスを行動及び身体的外見についてモニターし、体重を測定した。

10

【0219】

腫瘍が $60 - 130 \text{ mm}^3$ の体積に達したら (0 日目と定義した) 処置を開始した。0、1、5、6、10 及び 11 日目にイソフルラン麻酔下での腫瘍内注射 (1 投与当り $50 \mu\text{L}$ PBS 中、細菌 7.5×10^7 個) により、評価すべき細菌をマウスに投与した。マウスに腫瘍内投与した種菌を希釈平板法により検証した。コントロールとして、内毒素不含 PBS のみをマウスに注射した。最終細菌治療 (10 日目) の 24 時間前に、 8 mg/ml のデスフェラル溶液 (10 ml/kg) を腹腔内注射によってマウスに投与した。デジタルノギスでの腫瘍長及び幅の測定により、腫瘍進行を追跡した。腫瘍体積を $0.5 \times \text{長さ} \times \text{幅}^2$ として決定した。 1500 mm^3 を超える腫瘍体積を、人道的エンドポイントと定義した。治療開始後 54 日目に完全腫瘍退縮を示したマウスを、イソフルランを使用して麻酔し、 $200 \mu\text{L}$ の RPMI 1640 中の 1×10^6 個の EMT-6 細胞を、初回腫瘍細胞注射に対して対側 (左側) の側腹部に皮下注射した。コントロール群として、過去に EMT-6 細胞の移植を受けたことがないナイーブマウスを含めた。デジタルノギスでの腫瘍長及び幅の測定により、腫瘍進行を追跡した。腫瘍体積を $0.5 \times \text{長さ} \times \text{幅}^2$ として決定した。 1500 mm^3 を超える腫瘍体積を、人道的エンドポイントと定義した。

20

【0220】

静脈内治療時の EMT-6 腫瘍同種移植マウスモデルにおける腫瘍進行の研究。全ての動物実験は、関係当局により認可されたものであり、地域のガイドライン及び動物保護法に従って行った。5 - 6 週齢雌 BALB/c (BALB/c By J) マウスを Charles River (L'Arbresles) から取り寄せた。少なくとも1週間の馴化後、イソフルランを使用してマウスを麻酔し、 $200 \mu\text{L}$ の RPMI 1640 中の 1×10^6 個の EMT-6 細胞をマウスの右側腹部に皮下注射した。定期的な間隔で、マウスを行動及び身体的外見についてモニターし、体重を測定した。

30

【0221】

腫瘍が $80 - 250 \text{ mm}^3$ の体積に達したら (0 日目と定義した) マウスを治療群に無作為化した。無作為化 (D-1) の 24 時間前に、 8 mg/ml のデスフェラル溶液 (10 ml/kg) を腹腔内注射によりマウスに投与した。0 日目にイソフルラン麻酔下での静脈内注射 (1 投与当り $100 \mu\text{L}$ PBS 中の細菌 5×10^6 個) により、評価すべき細菌をマウスに投与した。マウスに静脈内投与した種菌を希釈平板法により検証した。コントロールとして、内毒素不含 PBS のみをマウスに注射した。デジタルノギスでの腫瘍長及び幅の測定により、腫瘍進行を追跡した。腫瘍体積を $0.5 \times \text{長さ} \times \text{幅}^2$ として決定した。 1500 mm^3 を超える腫瘍体積を、人道的エンドポイントと定義した。

40

【0222】

腫瘍細胞単離物感染時の IFN 分泌の測定。全ての動物実験は、認可されたものであり (license 1908; Kantonales Veterinaramt Basel-Stadt)、地域のガイドライン (Tierschutz-Verordnung; Basel-Stadt) 及びスイス動物保護法 (Tierschutz-Gesetz) に従って行った。6 週齢 BALB/c マウスを Jamvoer Labs から

50

取り寄せた。少なくとも1週間の馴化後、イソフルランを使用してマウスを麻酔し、100 μ l EMT-6細胞(細胞 1×10^6 個)をマウスの側副部に皮下注射した。この実験を通して、マウスの行動及び身体的外見についてのスコアを付け、体表温度及び体重を測定した。デジタルノギスでの腫瘍長及び幅の測定により、腫瘍進行を追跡した。腫瘍体積を $0.5 \times \text{長さ} \times \text{幅}^2$ として決定した。アッセイ当日、腫瘍を単離し、1-2mmの小片に切断し、1-1.5時間消化し、70 μ mナイロンメッシュに通して単一細胞懸濁液を得た。この粗細胞単離物の細胞数を判定し、1ウェル当り細胞300'000個を平板24ウェルプレート(Corning)内の増殖培地(DMEM+L-グルタミン+非必須アミノ酸+10%FCS)に播種した。37及び5%CO₂で1時間のインキュベーション後、1ウェル当り100 μ lの細菌(増殖培地で希釈して、異なる感染多重度)の滴定を加えることにより、評価すべき菌株に細胞を感染させた。1時間のインキュベーション(37及び5%CO₂)後、ペニシリン(100U/ml)及びストレプトマイシン(100 μ g/ml)を含有する増殖培地を添加することにより細菌を殺滅した。インキュベーションをさらに3時間継続した。プレートを遠心分離して全ての細胞をウェルの底に集め、上清を、IFN濃度について、Lumikine(商標)ExpressマウスIFN-ELISA(Invivogen)により、製造業者の説明書に従って分析した。

【0223】

B) 結果

YopE融合タンパク質の3型分泌に基づくタンパク質送達系

Y.エンテロコリチカT3SSエフェクターYopE(配列番号1)のまさにN末端は、異種タンパク質を移行させるのに十分な分泌シグナルを有する²²が、そのシャペロン(SyCE)についてはシャペロン結合部位(CBS)を含まない³⁶。本発明者らは、YopEのN末端138アミノ酸(配列番号2)を選択して、送達すべきタンパク質と融合させた。このYopEのN末端138アミノ酸は、他の異種T3S基質の移行について最良の結果をもたらすことが証明されていた²⁴からであった。YopEのこれらのN末端138アミノ酸はCBSを含有するので、本発明者らは、さらに、SyCEを共発現させることを決めた。精製Y.エンテロコリチカpYV40毒性プラスミドからクローニングしたSyCE-YopE₁₋₁₃₈断片は、YopEの及びそのシャペロンSyCEの内在性プロモーターを含有する(図2)。したがって、SyCEと任意のYopE₁₋₁₃₈の融合タンパク質は、室温での増殖から37への急速な温度シフトにより誘導される。37での培養時間は、細菌内に存在する融合タンパク質量に影響を与えることになる。多重クローニング部位(MCS)をYopE₁₋₁₃₈の3'末端に付加させ(図2B)、その後、Myc及び6xHisタグ及び終止コドン付加させた。

【0224】

バックグラウンド株を注意深く選択した。まず、内在性エフェクターの移行を制限するために、本発明者らは、公知のエフェクター、YopH、O、P、E、M及びTの全てが欠失したY.エンテロコリチカ株(名称HOPEMT)³⁷を使用した。加えて、本発明者らは、外来メソ-2,6-ジアミノピメリン酸の非存在下では増殖することができない栄養要求突然変異株³⁸を時には使用した。この株のアスパラギン酸-ベータ-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子が欠失したものであり(asd)、Swiss safety agencyによりバイオセーフティレベル1に分類されている(A010088/2に対する補正)。加えて、本発明者らは、バックグラウンド株のより大規模な選択をもたらすために接着タンパク質YadA及び/又はInvAを欠失させた。yadA又はyadA/invA株を使用は、誘導されるバックグラウンドシグナルを低減させるが³⁹が、送達されるタンパク質量も同様に影響を受ける⁴⁰。

【0225】

真核細胞への融合タンパク質の移行後のYopE₁₋₁₃₈付属物の除去

YopE₁₋₁₃₈断片は、細菌送達に大いに役立つものであるが、融合タンパク質の機能及び/又は局在化を妨げる可能性がある。したがって、タンパク質送達後にそれを除

10

20

30

40

50

去することが最適であるだろう。この目的のために、本発明者らは、YopE₁₋₁₃₈と融合パートナー（転写制御因子ET1-Myc（配列番号9及び11）⁴⁴及びヒトINK4C（配列番号8及び配列番号10））との間に2つのTEV切断部位（ENLYFQS）⁴¹⁻⁴³を導入した。提供する方法の優位性を保持するために、本発明者らは、別のY.エンテロコリテカ株においてTEVプロテアーゼ（S219Vバリエーション；⁴⁵）をYopE₁₋₁₃₈（配列番号12）とさらに融合した。HeLa細胞を一度に両方の株に感染させた。タンパク質の移行画分のみ分析を可能にするために、感染HeLa細胞を、感染の2時間後に、細菌を溶解しないことが公知であるジギトニンを用いて溶解した（⁴⁶；）。ウェスタンブロット分析は、細胞が対応する株に感染した場合にのみ、YopE₁₋₁₃₈-2×TEV切断部位-ET1-Myc又はYopE₁₋₁₃₈-2×TEV切断部位-Flag-INK4C-Mycの存在を明示した。この細胞溶解物を精製TEVプロテアーゼで一晩消化すると、シフトしたバンドを観察することができた。このバンドは、TEV切断部位のN末端に残存物がある、ET1-Myc又はFlag-INK4Cに対応し、この残存物は、1つのセリンのみの可能性が最も高い。TEVプロテアーゼを送達する株に細胞を同時感染させると、同じ切断ET1-Myc又はFlag-INK4C断片が目に見えるようになった。これは、T3SSを介して送達されたTEVプロテアーゼが機能性であること、及び単一細胞が両方の菌株に感染したことを示す。切断は完全なものではないが、移行したタンパク質の大多数が、感染の2時間後に既に切断され、精製TEVプロテアーゼで一晩消化しても、より高い切断率は得られなかった。報告されているように、TEVプロテアーゼ依存性切断は、融合タンパク質次第で最適化を必要とする可能性がある^{47、48}。したがって、移行後のYopE₁₋₁₃₈付属物のTEVプロテアーゼ依存性除去は、アミノ酸組成をN末端アミノ酸1つだけしか変化させずに、ほとんどの天然異種タンパク質のT3SSタンパク質送達をもたらす初めてのものである。

【0226】

YopE断片のTEVプロテアーゼ依存性切断の代替の手法は、目的の融合タンパク質にユビキチンを組み込むことに存した。実際、ユビキチンは、そのC末端で、内在性ユビキチン特異的C末端プロテアーゼ（脱ユビキチン化酵素、DUB）群により、プロセシングされる。切断はユビキチンのまさにC末端（G76の後ろ）で起こるはずであるので、目的のタンパク質には追加のアミノ酸配列がないはずである。この方法を、YopE₁₋₁₃₈-ユビキチン-Flag-INK4C-MycHis融合タンパク質を用いて試験した。YopE₁₋₁₃₈-Flag-INK4C-MycHisを発現する細菌に感染させたコントロール細胞では、融合タンパク質の効率的移行を示す、YopE₁₋₁₃₈-Flag-INK4C-MycHisに対応するバンドが見られた。YopE₁₋₁₃₈-ユビキチン-Flag-INK4C-MycHisを発現する細菌に細胞を1時間感染させたとき、Flag-INK4C-MycHisのサイズに対応する追加のバンドが目に見えた。これは、融合タンパク質の一部が切断されたことが示す。この結果は、融合タンパク質へのユビキチンの導入により、外来プロテアーゼを必要とすることなくYopE₁₋₁₃₈断片を切り離すことが可能になることを示す。

【0227】

真核細胞に対する毒性活性を有する細菌エフェクタータンパク質の欠失/変異による弱毒化

Y.エンテロコリテカの場合、毒性は、「エルシニア属外部タンパク質」（Yop）と呼ばれる6つの内在性エフェクタータンパク質、詳細には、YopH、O、P、E、M、T（MRS40 pIML421 [yopH₁₋₃₅₂、yopO₆₅₋₅₅₈、yopP₂₃、yopE₂₁、yopM₂₃、yopT₁₃₅]）の欠失により低減される³⁷。これらのYopは、約70kbpサイズのプラスミドである、「エルシニア属毒性プラスミド」（pYV）上にコードされており、プラスミド上には、完全3型分泌系（T3SS）はもちろん他の毒性プレーヤーもコードされている（図4）。YopH、O、P、E、M及びTは、免疫系を調節し弱めるために細菌3型分泌系により宿主細胞に送達

10

20

30

40

50

される6つのエフェクタータンパク質である。各Yopは、宿主細胞において特異的生化学的活性を有する。YopTは、Rho GTPaseのC末端システインを切り離し、かくて、GTPaseを膜に固定化するイソプレニル基を除去する。誤った局在化に起因するRhoのこの活性化により、マクロファージ及び好中球のような免疫細胞による食作用が回避される⁴⁹。同じ経路で、YopEは、Rho GTPaseに対してGTPase活性化タンパク質(GAP)として作用して、Rho GTPaseを不活性化する。この結果、免疫細胞による食作用が減少し、IL-1ベータ放出が阻害されることになる⁴⁹。さらに、YopOは、グアニジンヌクレオチド解離阻害因子(GDI)として作用して、Rho GTPaseを不活性化する。YopOは、アクチン細胞骨格に対してまだ定義されていない方法で作用する、セリン/スレオニンキナーゼドメインを有する⁴⁹。YopHは、接着斑キナーゼ(Fak)のような接着斑タンパク質、パキシリン等に対して作用し、かくてマクロファージ及び好中球による食作用を強力に防止する、チロシンホスファターゼである⁴⁹。YopPは、偽結核菌(*Y. pseudotuberculosis*)又はペスト菌(*Y. pestis*)ではYopJと称するものであり、免疫細胞におけるMAPK/NFκB経路を不活性化して、これらの細菌の存在による刺激を受けた免疫細胞からのTNFα及びIL-8放出を防止することが判明した。さらに、YopPは、免疫細胞においてアポトーシスを誘導することが判明しており、これは、MAPK経路における効果に関係がある可能性があり、これは活性化状態で細胞をアポトーシスから保護する⁴⁹。YopMの役割は、まだ完全に明らかになってはいないが、YopMは、リボソームS6キナーゼ1(RSK1)及びプロテインキナーゼC様2(PRK2)に関連して見出された。YopMは、RSK1のリン酸化を刺激し、かくて、例えば細胞周期進行のような、下流の標的に作用するように思われる⁴⁹。これらのYopのうちの1つ又はいくつかを欠失させることにより、免疫系に対する細菌の防御機構に劇的な影響を与えられる⁵⁰。それぞれのyopの変異を、それぞれの領域に関してPCRにより確認し、またインビトロ分泌アッセイにより確認した。SDS-PAGE及びクマシーブルー染色によるインビトロでの分泌の分析により、完全長YopH、O、M及びYopEの非存在が確認された。

【0228】

さらに、asd(アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ)が欠失しているY. エンテロコリチカ株を構築した。asdの変異は、メソ-ジアミノピメリン酸を加えなくても、増殖能力の完全喪失をもたらす。これにより、それぞれのプラスミド上のasdの存在に基づいて抗生物質不使用のプラスミド維持系の生成が可能になる。同様の方法で、他の栄養要求突然変異株を使用することができるだろう。

【0229】

増強アポトーシス促進性細菌の生成

送達又はアポトーシス促進性タンパク質を最適化するために、様々なアポトーシス促進性タンパク質で形質転換された株が表IVの通りに生成されている。

10

20

30

表 IV: 様々なアポトーシス促進性タンパク質で形質転換された株

| 株名 | バックグラウンド株 | T3SS により送達されることになるタンパク質 | 骨格プラスミド | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマリー.Si.Nr.: | 耐性 |
|---|-----------------------------------|--|-----------|-------------------|----------------|---------|
| YopE1-138-(Y. エンテロコリチカコドン最適化マウス tBid BH3、伸長された部分) | Y.エンテロコリチカ Δ yopH,O,P,E,M, T Δasd | 伸長された (4Aa 伸長された)YopE1-138-Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス tBid BH3 | pBad_Si_2 | pSi_353 | | Nal Amp |
| YopE1-138-10 Aa リンカー-(Y. エンテロコリチカコドン最適化マウス tBid BH3 部分) | Y.エンテロコリチカ Δ yopH,O,P,E,M, T Δasd | YopE1-138-10 Aa リンカー-Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス tBid BH3 | pBad_Si_2 | pSi_354 | 727/728 | Nal Amp |
| YopE1-(138-Y. エンテロコリチカコドン最適化マウス Bax BH3 部分-Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス tBid BH3 部分) | Y.エンテロコリチカ Δ yopH,O,P,E,M, T Δasd | YopE1-138-Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス Bax BH3-Y.エンテロコリチカコドン最適化マウス tBid BH3 | pSi_357 | pSi_374 | 736/737 | Nal Amp |

10

20

30

40

【 0 2 3 0 】

シグナル伝達に必要な必須ドメイン（例えば、t B I D の B H 3 ドメイン（配列番号 19））に送達されるタンパク質の短縮は、細胞殺滅効率を増加させることができる（図 5）。理論に縛られることは望まないが、有効性のこの増加は、送達されるタンパク質のより小さいサイズに起因するタンパク質産生量の増加及び T 3 S S による後続の送達量の増加に関係する可能性が高い。Y o p E 部分と t B I D の B H 3 ドメインの間へのリンカー（配列番号 23）の導入は、さらなるアミノ酸 4 個分 B H 3 ドメイン（配列番号 22）を伸長するばかりでなく、有効性を低下させた（図 5）。

【 0 2 3 1 】

加えて、そのような必須ドメイン（例えば、t - B I D の B H 3 ドメイン（配列番号 2

50

7)) のリピート又はそれらの必須ドメイン (例えば、t - B I D の B H 3 ドメインと B A X の B H 3 ドメイン (配列番号 2 4 及び 2 8)) の組合せを有する合成輸送基質を生成した。驚くべきことに、同じ又は異なる B H 3 ドメインのタンデムリピートは、がん性細胞株 (4 T 1 及び B 1 6 F 1 0 細胞を含む) に対するアポトーシス誘導増強をもたらすことが判明した (図 5) 。真核細胞 1 個当りのそのような細胞の 5 0 % を殺滅するために必要とされる細菌数 (感染多重度) を指す I C 5 0 (半最大阻害濃度) は、単一 t B I D B H 3 ドメインと比較して t B I D B H 3 のタンデムリピートの送達時に減少することが判明した (図 5) 。タンパク質サイズは、t B I D の第 2 の B H 3 ドメインとしての融合により増加されるので、この研究結果は、驚くべきものであった。このために、Y o p E₁₋₁₃₈ - t B I D B H 3 (配列番号 1 9 及び 2 5) と比較して Y o p E₁₋₁₃₈ - (t B I D B H 3)₂ (配列番号 2 7) の発現と送達レベル減少が予想され、最大で同等レベルに達する可能性があった。細胞殺滅活性の増加を達成するために、融合 t B I D B H 3 ドメインは、真核細胞への T 3 S S による送達時に一緒に同時に作用しなければならない。Y o p E₁₋₁₃₈ - (t B I D B H 3)₂ 構築物中の 1 つの t B I D B H 3 ドメインしか機能しない場合、Y o p E₁₋₁₃₈ - t B I D B H 3 を用いた場合とせいぜい同じ効率しか期待できないだろう。

【 0 2 3 2 】

インビボ研究のために Y o p E₁₋₁₃₈ - (t B I D B H 3)₂ (配列番号 2 7) の遺伝的安定性を増加させるために、本発明者らは、Y o p E₁₋₁₃₈ - (t B I D B H 3)₂ (配列番号 2 7) をエルシニア属毒性プラスミド p Y V 上の Y o p E の天然部位に、(変異誘発プラスミド p S I₄₀₈ 及び p S I₄₁₉ を使用して) 天然 Y o p E プロモーターのもとで、相同組替えによりクローニングした。そのような変異誘発物質は、組込みが起こるそれぞれの遺伝子の部位に応じて 2 0 0 - 2 5 0 b p の配列が両側に隣接している、所望のタンパク質をコードする DNA 配列を含有する。これらのプラスミドを大腸菌 S m 1 0 p i r 内に形質転換し、そこからプラスミドを対応する Y . エンテロコリチカ株内に移動させた。組込み型ベクターを保有する突然変異株を選択圧なしで数世代増殖させた。次いで、スクロースを使用して、ベクターを失ってしまったクローンについて選択した。最後に、突然変異株をコロニー P C R により同定した。T 3 S S による輸送のための内在性タンパク質 (「エルシニア属外部タンパク質」、Y o p、と呼ばれる) は、エルシニア属毒性プラスミド (p Y V) という名称の、Y . エンテロコリチカのこの 7 0 k b プラスミド上にコードされており、このプラスミドは、T 3 S S 装置をさらにコードする。

【 0 2 3 3 】

エルシニア毒性プラスミド p Y V 上の Y o p E の天然部位に、天然 Y o p E プロモーターのもとで、Y o p E₁₋₁₃₈ - (t B I D B H 3) (配列番号 1 9 及び 2 5) 又は Y o p E₁₋₁₃₈ - (t B I D B H 3)₂ (配列番号 2 7) をコードする、エルシニア属株を、がん性細胞 (4 T 1 及び B 1 6 F 1 0 細胞を含む) においてアポトーシスを誘導する能力について評価した (図 6) 。真核細胞 1 個当りのそのような細胞の 5 0 % を殺滅するために必要とされる細菌数 (感染多重度) を指す I C 5 0 (半最大阻害濃度) は、単一 t B I D B H 3 ドメインと比較して t B I D B H 3 のタンデムリピートの送達時に、両方のタンパク質が、エルシニア属毒性プラスミド p Y V 上の Y o p E の天然部位に、天然 Y o p E プロモーターのもとでコードされている場合、減少することが判明した (図 6) 。これは、これらのタンパク質の発現プラスミド媒介送達からの研究結果 (図 5) と一致する。重ねて、タンパク質サイズは、t B I D の第 2 の B H 3 ドメインの融合により増加されるので、この研究結果は、驚くべきものであった。このために、Y o p E₁₋₁₃₈ - t B I D B H 3 (配列番号 1 9 及び 2 5) と比較して Y o p E₁₋₁₃₈ - (t B I D B H 3)₂ (配列番号 2 7) の発現と送達レベル減少が予想され、最大で同等レベルに達する可能性があった。細胞殺滅活性の増加を達成するために、融合 t B I D B H 3 ドメインは、真核細胞への T 3 S S による送達時に一緒に同時に作用しなければならない。Y o p E₁₋₁₃₈ - (t B I D B H 3)₂ 構築物中の 1 つの t B I D B H

10

20

30

40

50

3ドメインしか機能しない場合、YopE₁₋₁₃₈-tBID_{BH3}を用いた場合とせいぜい同じ効率しか期待できないだろう。さらに、エルシニア毒性プラスミドpYV上のYopEの天然部位に天然YopEプロモーターのもとでYopE₁₋₁₃₈-(tBID_{BH3})₂(配列番号27)をコードするエルシニア株を、がん性細胞においてアポトーシスを誘導するそれらの能力について、YopE₁₋₁₃₈-(tBID_{BH3})₂の発現プラスミド(pBad-MycHisAに基づく)由来送達と比較した。pYV(1-6コピーと報告される)と比較して高い、pBad-MycHisAのコピー数(20-25コピー)と一致して、YopE₁₋₁₃₈-(tBID_{BH3})₂(配列番号27)のpBad-MycHisAに基づく送達は、4T1及びB16F10細胞のIC50値をわずかに低下させる結果となった(図6)。

10

【0234】

メラノーマのマウスモデルにおける体内分布研究

腫瘍特異的ビヒクルとしての、T3SSエフェクターのような重要な毒性決定因子の変異を有するグラム陰性菌を検証するために、十分に確認されているB16F10メラノーマモデル(ATCC番号CRL-6475)を使用するマウス同種移植腫瘍研究を行った。皮下腫瘍がある特定のサイズ(約100-200mm³)に達したら、マウスを2×10⁵cfuのY.エンテロコリチカ亜種パレアークティカMRS40又はY.エンテロコリチカ亜種パレアークティカMRS40 yopH、O、P、E、M、Tに静脈内感染させた。細菌増殖を可能にするために、感染の24時間前にマウスをデフェロキサミンで前治療した。wt Y.エンテロコリチカ亜種パレアークティカMRS40株に感染したマウスは、身体的外見及び行動について高いスコアが付き(図47-48)、感染の最初の48時間にわたって有意な体重減少を示し(図49)、これに促されて、本発明者らは、この群のマウス全てを既に感染後2日目に屠殺した。対照的に、Y.エンテロコリチカ亜種パレアークティカMRS40 yopH、O、P、E、M、T株に感染したマウスは、感染後4日目でも、有意な体重減少を示さず、身体的外見及び行動について正常なスコアが付与された(図47-49)。wt株(Y.エンテロコリチカ亜種パレアークティカMRS40)に感染したマウスでは、評価した全ての臓器において、及びさらには血液中で、生きている細菌が検出された(図51)。悪性固形腫瘍内に存在するwt細菌が認められたが、同程度に多い又はそれ以上に多い数が他の臓器において認められ、脾臓内が最も多かった(図51)。際だって対照的に、Y.エンテロコリチカ亜種パレアークティカMRS40 yopH、O、P、E、M、Tに感染したマウスでは、生きている細菌は、感染後1日目に主として悪性固形腫瘍内で認められ、少ない細菌数が脾臓、肝臓及び肺で観察された。特に、感染後4日目に、悪性固形腫瘍内の細菌数は、数桁増加した(腫瘍組織1g当り10⁸cfu超に達した)が、評価した全ての他の臓器では、細菌数が検出限界未満に低下した(図50)。したがって、Y.エンテロコリチカ亜種パレアークティカMRS40 yopH、O、P、E、M、Tは、感染後4日目に、脾臓又は肝臓と比較して(検出限界に対して割当量を計算して)悪性固形腫瘍部位で約(最小限)100万倍の割当量で蓄積した。

20

30

【0235】

B16F10メラノーマ担持マウスの外側尾静脈への静脈内投与後5又は8日目に、固形腫瘍1グラム当り、同様の多数の細菌が、Y.エンテロコリチカdHOPEMT、Y.エンテロコリチカdHOPEMT+pYV-YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1CARD又はY.エンテロコリチカdHOPEMT HairpinI-VirF+pYV-YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1CARDについて測定された(図26)。これらにより、T3SS制御に影響を与える異種タンパク質カーゴ及びさらなる突然変異(VirF)が、マウスモデルにおいて固形腫瘍の細菌定着に影響を及ぼさないことが検証される。

40

【0236】

これらの結果は、悪性固形腫瘍を特異的に標的とする細菌ビヒクルを生成するために、重要な毒性決定因子の変異により弱毒化するこの戦略を認証するものであった。

50

【0237】

細菌投与後14日目までのインビトロでの腫瘍特異的増殖の検証

遺伝子修飾Y.エンテロコリテिकाによる腫瘍定着実験を同系マウス同種移植モデル(4T1乳がんモデル)において繰り返し、細菌の定着を2週間にわたって追跡した。このとき、マウスを 1×10^6 コロニー形成単位(CFU)のY.エンテロコリテिका yopH、O、P、E、M、Tに感染させた。感染後まだ間もない頃にB16F10モデルと同様の結果を得たが、本発明者らは、腫瘍定着が、感染後8日目に、そして14日目まで一貫して認められることをさらに明らかにすることができた(図7)。さらに、この定着は非常に特異的であり、評価した他の全ての臓器においてほんの少数の細菌しか検出されなかった(図8)。これらの研究結果は、Y.エンテロコリテिका yopH、O、P、E、M、Tが、腫瘍の持続的定着を確立することによって、免疫系によるクリアランスを防止することができることを示す。

10

【0238】

腫瘍進行を遅らせる点でのY.エンテロコリテिका HOPEMTの有効性

インビボで腫瘍細胞に送達されるYopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂の影響を評価するために、本発明者らは、4T1乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスにおいて研究を行った。本発明者らは、エルシニア属毒性プラスミドpYV上のYopEの天然部位に天然YopEプロモーターのもとでYopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂をコードしているY.エンテロコリテिका HOPEMT株を評価し、それを、VirFの上流のhairpin I領域の欠失によりさらに最適化して送達されるタンパク質量を増加させることを目標とした。腫瘍が150-250mm³のサイズに達したら、PBS又は 1×10^7 のY.エンテロコリテिका HOPEMT HairpinI-virF pYV-YopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂をマウスに静脈内注射した。細菌の静脈内注射の日を0日目と定義した。その後数日(細菌の静脈内注射後0日目から9日目まで)にわたって腫瘍体積をノギスで測定した。腫瘍サイズの一切の初期均質性を補償するために、腫瘍体積を0日目の腫瘍体積に対して正規化した。Y.エンテロコリテिका HOPEMT HairpinI-VirF pYV-YopE₁₋₁₃₈-(tBID BH3)₂での治療は、腫瘍体積進行に対する影響を示し、細菌投与後8、9及び10日目に統計的に有意な腫瘍低減があった(図9)。重要なこととして、単独でのY.エンテロコリテिका HOPEMTは、4T1マウスがんモデルにおいて腫瘍進行に影響を与えないことが判明した(図10)。これらの実験結果は、そのような細菌及びそれらのT3SSを腫瘍進行の妨害に用いることができることに光を当てるものである。

20

30

【0239】

AraC型DNA結合タンパク質をコードする遺伝子のRNA温度センサー領域内に欠失を有するY.エンテロコリテिका HOPEMT

ほとんどの公知エルシニア属毒性遺伝子は、真核生物宿主外では発現されず、宿主環境への侵入後にしか誘導されない。これらの毒性遺伝子の発現は、宿主への侵入に関連する温度の急上昇により誘導される。特に、T3SS及びそのエフェクタータンパク質(Yop)のような、pYVにコードされた毒性因子は、このように制御される。室温(20-25)では、T3SSの制御、T3SS形成に必要な遺伝子それ自体、及び送達されたエフェクターは、発現されず、そのような温度が37に上昇された時のみ、発現が誘導される。pYVにコードされた毒性遺伝子(yadA及びT3SS関連遺伝子)の大多数の発現は、温度により誘導され、Y.エンテロコリテिकाではAraC型DNA結合タンパク質VirF(他のエルシニア属種ではLcrF)を必要とする。LcrFの発現の温度制御は、より高温でのmRNA内のRNAステム-ループの融解によって起こると考えられ、融解されない場合にはリボソーム結合部位を封鎖し、かくて翻訳を防止する⁵¹。対照的に、Y.エンテロコリテिकाの場合、VirFの転写が、主として、温度に依存することが証明されている⁵²。つい最近の研究はより複雑な状況を示し、YmoAと呼ばれる熱不安定性制御因子の関与を示唆するが⁵¹、一方、LcrFの上流のRNA温度セ

40

50

ンサーが、L c r Fの温度制御、したがって温度依存性毒性遺伝子の主な原因であることが判明した。

【0240】

天然Y o p Eプロモーターのもとでp Y Vから発現される異種カーゴの分泌レベルを増加させるために、本発明者らは、Y .エンテロコリチカにおけるV i r Fの上流のこれらのRNAヘアピン構造の1つを欠失させることを目標とした。そのようなRNAステム-ループの重要性は、Y .エンテロコリチカでは明確に示されておらず、温度誘導は、どちらかと言えば転写の変化によるものとされたが、本発明者らは、Y .エンテロコリチカV i r Fの上流のh a i r p i n I^{5 1}を同定することができた。そこで、相同組換えにより、本発明者らは、h a i r p i n Iの一部(^{5 1}におけるような- 1 1 1から- 5 7まで)を除去し、p Y VにコードされたY o p E_{1 - 1 3 8} - (t B I D B H 3)₂ (配列番号27)又はY o p E_{1 - 1 3 8} - マウスR I G - 1 C A R D₂タンパク質(配列番号38)(各々、Y o p Eの天然部位におけるもの)の分泌能をインビトロ分泌アッセイで評価した(図11)。驚くべきことに、Y .エンテロコリチカにおけるV i r Fの上流のヘアピン領域Iの一部の欠失は、インビトロで異種タンパク質の分泌を増加させた(図11A及びB)。これは、V i r Fの転写が温度制御の主要駆動因子であると考えられたY .エンテロコリチカに関する以前の報告^{5 2}とは対照的である。

【0241】

T 3 S Sの発現及びT 3 S Sによるタンパク質の送達を人工的に誘導することができるように、本発明者らは、別の株においてp B a d - M y c H i s Aから公知であるようなアラビノース誘導性プロモーターによってp Y V上のV i r Fの内在性プロモーターを置換した。V i r Fのプロモーターを置換することに加えて、本発明者らは、上流に(逆方向に)全長a r a C遺伝子を導入した。次いで、本発明者らは、インビトロ分泌アッセイにおいて、アラビノースの非存在又は存在下で、Y o p E_{1 - 1 3 8} - (t B I D B H 3)₂ (配列番号27)(p Y Vにコードされており、Y o p Eの天然部位にある)の分泌能を評価した(図11A)。アラビノースの付加時にのみ、異種タンパク質は、T 3 S Sにより分泌されることが判明した。これは、アラビノースによるF i r Fの発現の制御と一致する。

【0242】

異種カーゴの安定性増大を有するY .エンテロコリチカ H O P E M T (インビトロ及びインビボ)

Y .エンテロコリチカ y o p H、O、P、E、M、Tは、本発明者らのマウス実験で固形腫瘍を標的とする非常に特異的な株であることが明らかになり、その一方で、細胞傷害性タンパク質のT 3 S S依存性送達はがん細胞に関する細胞培養で効果的であることが判明した。これら2つの形質を併用するために、数日又はさらには数週間にわたってインビボで細胞傷害性カーゴを安定的にコードするように固形腫瘍定着細菌を最適に操作する必要がある。制御要件のため、細菌内に外来プラスミドを維持するための古典的抗生物質耐性の使用は、不利である。それ故、マウス同種移植研究において、本発明者らは、抗生物質耐性のないプラスミド維持系を評価した。この系は、必須遺伝子(例えば、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ、a s d)の染色体欠失、及び細菌増殖を維持するための異種プラスミド上の同遺伝子のコーディングに基づく。プラスミド維持のためのa s d欠失の補完は以前に明らかにされている^{5 3}が、再現性及び数日にわたっての持続性の相違が報告されている^{5 4}。本発明者らは、この系をY .エンテロコリチカ y o p H、O、P、E、M、Tにおいての使用に適應させ、そこで、本発明者らは、染色体にコードされたa s dをさらに欠失させ(その結果、Y .エンテロコリチカ y o p H、O、P、E、M、T a s dを得)、次いで、中等度コピー数のプラスミドp B a d - M y c H i s A上においてa s dを戻した(p B a d - M y c H i s A - a s d)。a s d遺伝子をY .エンテロコリチカ8081からクローニングし、p B a d - M y c H i s AのP c i I部位にその内在性プロモーター及び転写ターミネーターと共にそれぞれ順方向及び逆方向に挿入した。得られた株Y .エンテロコリチカ y o p H、O、P、

10

20

30

40

50

E、M、T *asd*+*pBad*-*MycHisA*-*asd* (順又は逆*asd*方向)の増殖挙動を培養フラスコにおいてインピトロ(BHI培地)で*wt*及び親Y・エンテロコリテカ *yopH*、O、P、E、M、T *asd*株と比較した(図12)。両方の方向で、*pBad*-*MycHisA*-*asd*は、*asd*の欠失時に観察された表現型を回復させた(図12)。対照的に、B16F10メラノーママウスモデル及び4T1モデルでは、本発明者らは、Y・エンテロコリテカ *yopH*、O、P、E、M、T *asd*+*pBad*-*MycHisA*-*asd*が十分に固形腫瘍に定着しないことを見出し(図13及び14)、単離した少数のコロニーから本発明者らは*pBad*-*MycHisA*-*asd*プラスミドを回収することができなかつた。さらに、B16F10メラノーママウスモデルから単離したコロニーを、アンピシリン耐性をコードする*pBad*-*MycHisA*-*asd*プラスミドの存在に有利になるアンピシリン含有プレート上で、増殖について検証した。静脈内注射後4日目に、単離したコロニーのわずかな割合しかアンピシリン耐性を示さなかつた(図13)。これは、*pBad*-*MycHisA*-*asd*の欠損を示す可能性があつたが、アンピシリン耐性遺伝子のみの欠損に、又はアンピシリンによる殺滅を回避するのに十分迅速なアンピシリン耐性遺伝子の発現の再始動の困難に関連する可能性もあつた。いずれにせよ、B16F10メラノーママウスモデル及び4T1モデルにおいて観察されたエンテロコリテカ *yopH*、O、P、E、M、T *asd*+*pBad*-*MycHisA*-*asd*での腫瘍定着は、固形腫瘍内の細菌数の急減を示し、これは、Y・エンテロコリテカ *yopH*、O、P、E、M、Tとは対照的である。このように、染色体*asd*の欠失及び*pBad*-*MycHisA*に対する補完は、インピボでの細菌の適応度の大幅な低下をもたらす。この観察は、バランスの取れていない*asd*レベルによる生存率低下に関する報告^{5 4}と一致する。

【0243】

T3SSによる輸送のための内在性タンパク質(「エルシニア属外部タンパク質」、Yopと呼ばれる)は、Y・エンテロコリテカにより70kbプラスミド上にコードされている。エルシニア属毒性プラスミド(*pYV*)という名のこのプラスミドは、T3SS装置をさらにコードする。本発明者らは、4T1マウス同種移植モデルにおける*pYV*プラスミドの安定性を評価した。本発明者らは、マウス感染後9又は10日目に回収した株からの*pYV*の単離に成功した(図15)。本発明者らは、インピボで固形腫瘍において8日増殖させた後に単離した菌株のT3SSの存在及び機能性を確認する試験をさらに行つた。その結果として、本発明者らは、*pYV*を、インピボでの送達のための異種カーゴをコードするのに最適なベクターと考える。とは言え、本発明者らは、マウスにおける4T1腫瘍において9-10日間増殖させた後、*pYV*プラスミドを有する細菌コロニーの割合が不均質であることを認めた(図15)。*pYV*の固有の不安定性に加えて、株Y・エンテロコリテカ *yopH*、O、P、E、M、Tは、インピボで、毒性を増加させるYopの選択的優位性を失つた。

【0244】

*pYV*を安定させ、ひいては*pYV*上にコードされた異種カーゴを安定させるために、本発明者らは、*pYV*上のY・エンテロコリテカ *yopH*、O、P、E、M、Tにおける使用に「*asd*」系を適応させた。本発明者らは、染色体にコードされた*asd*を欠失させ(その結果、Y・エンテロコリテカ *yopH*、O、P、E、M、T *asd*を得)、次いで、*pYV*上に*asd*を戻した(*pYV*-*asd*と呼ぶ)。*asd*遺伝子をY・エンテロコリテカ8081(Y・エンテロコリテカ亜種エンテロコリテカ8081;NCBI参照配列NC_008800.1)からクローニングし、相同組換えにより*pYV*上に(*SycO*の前の天然挿入領域内に)その内因性プロモーター及び転写ターミネーターと共に挿入した。得られた株Y・エンテロコリテカ *yopH*、O、P、E、M、T *asd*+*pYV*の増殖挙動を、培養フラスコにおいてインピトロ(BHI培地)で*wt*及び親Y・エンテロコリテカ *yopH*、O、P、E、M、T *asd*株と比較した(図12)。*pYV*-*asd*は、*asd*の欠失時に観察された表現型を回復させることができた(図12)が、この回復は完全でなく、インピボでわずかな増殖低減

10

20

30

40

50

を観察することができた。対照的に、インビボでのシンジェニック4T1マウスがんモデルでは、本発明者らは、*Y. エンテロコリチカ* *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T* *asd + pYV - asd*が十分に固形腫瘍に定着することが認められた(図16)。際だったこととして、注射後9 - 10日目に固形腫瘍から単離したコロニーは全て、*pYV*プラスミドを依然として含有すること(亜硫酸塩含有増殖プレートでの選択; 亜硫酸塩耐性は、*pYV*上の*arsRBC*遺伝子の存在に関連している⁵⁵)が判明した(図15)。したがって、驚くべきことに、*pYV - asd*は、*Y. エンテロコリチカ* *yopH*、*O*、*P*、*E*、*M*、*T* *asd*株バックグラウンドで数日及び数週間にわたって定着菌により固形腫瘍において発現される異種タンパク質をコードするためのインビボ安定性ベクターであることが明らかになった。

10

【0245】

腫瘍進行を遅らせる点、及び変化する*VirF*活性に対する影響、並びに安定性を増大させる点での*Y. エンテロコリチカ* *HOPEMT*の有効性

4T1細胞(図9及び10)と同様の実験を、EMT6乳がんマウスモデルにおいて行い、この実験では、野生型*Balb/C*マウスにEMT6乳がん細胞を皮下に同種移植し、腫瘍が約80 - 250mm³のサイズに達したら細菌の単回静脈内投与で治療した。細菌の静脈内注射の日を0日目と定義し、全てのマウスにd0の前日にデスフェラルの腹腔内注射を施した。*Y. エンテロコリチカ* *HOPEMT*での治療は、生理食塩水と比較して腫瘍進行に影響を与えなかった。*Y. エンテロコリチカ* *HOPEMT pYV - YopE₁₋₁₃₈ - (tBID BH3)₂*は、腫瘍進行に対してわずかな影響を与え、これが、*Y. エンテロコリチカ* *HOPEMT HairpinI - VirF pYV - YopE₁₋₁₃₈ - (tBID BH3)₂*の使用により強化された(図45)。これらの研究結果は、そのような細菌及びそれらの*T3SS*を腫瘍進行への干渉に利用することができること、並びに*VirF*活性の操作を、インビボでの投与時の細菌*T3SS*活性の調節に使用することができることに光を当てるものである。さらに、*Y. エンテロコリチカ* *HOPEMT HairpinI - VirF asd pYV - asd - YopE₁₋₁₃₈ - (tBID BH3)₂*の使用は、腫瘍進行に対する影響をさらに強化した(図45)。このことにより、全身投与時の遺伝子安定性増大の利点が強調される。

20

【0246】

I型IFN応答の誘導のための細菌*T3SS*を介した*RIG-1*様受容体経路誘発タンパク質の送達

サイトゾル核酸は、サイトゾル中の病原体由来RNAを検出する*RIG-1*様受容体(*RLR*)ファミリーメンバーのような受容体により感知される⁵⁶。*RIG-1*及び*MAD5*は、2つのN末端*CARD*ドメインと特定の核酸を感知する中心(*DexD/H*)ヘリカーゼドメインとからなる⁵⁶。刺激性RNAへの結合は、オリゴマーを形成するための⁵⁶(及び*MAD5*の場合はフィラメント形成への⁵⁶)非固着*K63*連結ユビキチン鎖とのその後の会合のためにその*CARD*を遊離する*RIG-I*(及び*MAD5*)の構造再構成を誘導する。*RIG-I*及び*MAD5*のオリゴマー化した*CARD*ドメインは、*MAVS*の*CARD*ドメインと相互作用する。この相互作用は、*MAVS*の単一の*CARD*ドメインの重合を促進し、これが下流のシグナル伝達を誘導し、最終的にはI型IFN遺伝子の誘導に至る⁵⁶。

30

40

【0247】

本発明者らは、*T3SS*、特に*YopE₁₋₁₃₈*による送達のためのN末端細菌分泌シグナルと融合したヒト又はマウス由来の*RIG-1*の2つのN末端ドメイン(配列番号37及び38)を発現する菌株を生成した。融合タンパク質*YopE₁₋₁₃₈ - RIG-1 CARD₂*の送達を、標準的なインビトロ分泌アッセイにより評価し、送達されたタンパク質の機能性を、レポーター細胞株でI型IFN誘導について評価した。I型IFN刺激のためのマウス*B16F10*メラノーマレポーター細胞は、多量体*ISRE*により増強されたIFN誘導性*ISG54*プロモーターを含む*I - ISG54*プロモーターの調

50

節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性に基づく。pBadMycHisA由来プラスミド(pBad_Si2)から発現し、YopE₁₋₁₃₈-RIG-1 CARD₂タンパク質を移行させる菌株の様々な量(感染多重度)に、レポーター細胞を感染させた。RIG-1のマウス及びヒトN末端CARDドメインは、レポーター細胞株において用量依存性I型IFN応答を誘導することを示した(図17)が、細菌バックグラウンド株(Y.エンテロコリチカ HOPEMT)は、そのような応答を誘導することができなかった(図17)。ヒト及びマウスRIG-1 CARDドメインは、マウスレポーター細胞株において同様のI型IFN応答を誘導した(図17)。これは、高い配列同一性(76%)及び類似性(88.5%)と一致する。

【0248】

このように、細菌のN末端分泌シグナルとの融合は、細菌により発現されるヒト及びマウスYopE₁₋₁₃₈-RIG-1 CARD₂タンパク質の送達成功につながり、真核細胞内のRIG-1 CARDドメインのフォールディング及び機能を妨げなかった。このことは、YopE融合RIG-1 CARDドメインが、それら自体を多量体化すること、及びMAVSの多量体化を誘導することが依然としてできることを含意し、これは驚くべきことである。

【0249】

このB16F10 I型IFNレポーター細胞株を使用するさらなる実験において、本発明者らは、Y.エンテロコリチカ HOPEMTを、pBadMycHisA由来プラスミド(pBad_Si2)上にYopE₁₋₁₃₈-MycHis又はYopE₁₋₁₃₈-ヒトRig1 CARD₂をコードしているY.エンテロコリチカ HOPEMTと比較した。この場合もやはり、ヒトRIG-1 CARDドメインの送達は、I型IFN応答を誘導したが、Y.エンテロコリチカ HOPEMTも、Y.エンテロコリチカ HOPEMT送達YopE₁₋₁₃₈-MycHisも、I型IFN応答に対して影響を与えなかった(図18)。同じアッセイにおいて、本発明者らは、細菌送達RIG-1 CARDドメインのI型IFN誘導能を、ポジティブコントロール、マウスインターフェロンガンマ(IFN γ)と比較した。非常に驚くべきことに、RIG-1 CARDドメインの細菌送達は、I型IFN誘導についてのポジティブコントロール、IFN γ により得られる応答と同様のレポーター細胞株の最大応答を誘導することができた(図18及び19)。

【0250】

さらなる実験では、本発明者らは、4T1マウス乳がん細胞又はwt B16F10メラノーマ細胞を感染させ、IFNを含む可能性がある上清を、4時間後、B16F10 I型IFNレポーター細胞株上に移した。このように、本発明者らは、Y.エンテロコリチカ HOPEMTを、内在性毒性プラスミド(pYV)上にYopE₁₋₁₃₈-マウスRig1 CARD₂をコードしているY.エンテロコリチカ HOPEMTと比較した。pYVにコードされたマウスRIG-1 CARDドメインの送達は、用量依存性I型IFN応答を誘導したが、Y.エンテロコリチカ HOPEMTは、wt B16F10(図20)においても、4T1細胞(図21)においても、I型IFN応答に影響を与えなかった。

【0251】

さらなる実験では、異なる長さのマウスRIG-1 CARDからなるいくつかのバージョンを、それらのI型IFN応答誘導能について評価した。RIG-1のCARDドメインは、アミノ酸1-172(マウス配列、Uniprot Nr. Q6Q899)によりコードされると予測される。本発明者らは、B16F10メラノーマIFNレポーター細胞で及びRAWマクロファージIFNレポーター細胞で、YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆、YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₂₉、及びYopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₁₈を評価した(図27-28)。YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆、YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₂

10

20

30

40

50

9 及び Y o p E₁₋₁₃₈ - マウス R I G 1 C A R D ドメイン₁₋₂₁₈ は、同様に活性と判明した。

【0252】

後続の実験で、本発明者らは、細菌により送達される M D A 5 の能力を評価した。本発明者らは、異なる長さのマウス M D A 5 C A R D からなるいくつかのバージョンをクローニングし、それらを、B 1 6 F 1 0 I F N レポーター細胞でのそれらの I 型 I F N 応答誘導能について評価した。M D A 5 の C A R D ドメインは、アミノ酸 1 - 1 9 0 (マウス配列、U n i p r o t N r . Q 8 R 5 F 7) によりコードされると予測される。本発明者らは、B 1 6 F 1 0 メラノーマ I F N レポーター細胞で、Y o p E₁₋₁₃₈ - マウス M D A 5 C A R D ドメイン₁₋₂₉₄ 及び Y o p E₁₋₁₃₈ - マウス M D A 5 C A R D ドメイン₁₋₂₃₁ を評価した。全ての変異体は、活性と判明した (図 29)。驚くべきことに、送達された M D A C A R D の活性は、R I G - 1 C A R D の場合より、これらのタンパク質が、非常に類似した生物学的機能、及び 2 つの N 末端 C A R D ドメインと特定のヌクレオチドを感知する中心 (D e x D / H) ヘリカーゼドメインとからなるタンパク質構造を共有する^{5 6} にもかかわらず、はるかに低いことが判明した。

【0253】

I 型 I F N 応答の誘導のための細菌 T 3 S S を介した c G A S / S T I N G 経路誘発タンパク質の送達

c G A S / S T I N G 経路において、サイトゾル二本鎖 D N A は、酵素サイクリック G M P - A M P シンターゼ (c G A S) と結合することにより検出される。d s D N A が結合すると、c G A S は、活性化され、サイクリック C D N 二次メッセンジャーであるサイクリック G M P - A M P (c G A M P) を産生する。次いで、c G A M P は、小胞体受容体タンパク質 S T I N G (I F N 遺伝子の刺激因子) と直接結合する。c G A M P が結合すると、S T I N G は、活性化され、シグナル伝達経路を誘導して、I 型 I F N 及び他の同時制御遺伝子の転写に至る^{5 7}。ヒト c G A S は、2', 3' c G A M P (2' - 5' 及び 3' - 5' ホスホジエステル結合を含有する) を産生するが、他の C D N は、マウス又はヒト S T I N G を様々なレベルで誘導することが証明されている。これは、3', 3' c G A M P (例えば、コレラ菌 (V i b r i o c h o l e r a) D n c V 若しくは一部の真核生物 c G A S により産生される)、サイクリックジ A M P (例えば、様々なグラム陽性種の C d a A 若しくは D i s A により産生される) 又はサイクリックジ G M P (例えば、緑膿菌 (P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a) W s p R により産生される) を含む^{5 7, 5 8}。w t ヒト S T I N G (及びマウス S T I N G) は、2', 3' c G A M P、3', 3' c G A M P、サイクリックジ A M P 及びサイクリックジ G M P を認識するが、いくつかの天然ヒト S T I N G 変異体は、これらのアゴニストに対して異なった応答をする^{5 9}。

【0254】

細菌によるタンパク質の送達時に G A S / S T I N G 経路を活性化するために、本発明者らは、Y . エンテロコリチカにより発現され T 3 S S を介して送達されるサイクリックジ G M P を産生する緑膿菌 W s p R をクローニングした。W s p R の活性を増大させるために、その G G D E F ドメイン (ジグアニル酸シクラーゼドメイン) のみを使用し、上流のストークドメインを酵母からの G C N 4 のロイシンジッパーモチーフで置換した。W s p R の二量体化がその活性に必要であることは公知であり、G C N 4 のロイシンジッパーが、平行コイルドコイルを形成すること、ひいては強力な二量体化モジュールとして役立つことは証明されている。G C N 4 モチーフを、G G D E F とヘリカルストークの間に天然リンカーを含む W s p R の G G D E F ドメインと融合させて、野生型 W s p R に匹敵する内部ドメイン柔軟性を可能にした^{6 0}。

【0255】

融合タンパク質 Y o p E₁₋₁₃₈ - G C N 4 ロイシンジッパー - W s p R G G D E F ドメイン (簡潔に、Y o p E₁₋₁₃₈ - W s p R) (配列番号 39) の送達を、レポーター細胞株で I 型 I F N 誘導について評価した。I 型 I F N 刺激のためのマウス B 1 6

10

20

30

40

50

F10メラノーマレポーター細胞は、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性に基づく。pBadMyChisA由来プラスミド(pBad_Si2)から発現し、YopE₁₋₁₃₈-WspRタンパク質を移行させる菌株の様々な量(感染多重度)に、レポーター細胞を感染させた。GCN4ロイシンジッパーモチーフと融合した緑膿菌WspR-GGDEFドメインは、レポーター細胞株においてI型IFN応答を用量依存的に誘導することを示した(図22)が、細菌バックグラウンド株(Y.エンテロコリチカ HOPEMT)は、そのような応答を誘導することができなかった(図22)。

【0256】

このように、細菌のN末端分泌シグナルとの融合は、細菌により発現されるYopE₁₋₁₃₈-GCN4ロイシンジッパー(酵母)-WspR-GGDEF(緑膿菌)タンパク質の送達成功につながり、真核細胞内のこの3要素タンパク質のフォールディング及び機能を妨げなかった。このことは、YopE融合GCN4ロイシンジッパー-WspR-GGDEFが、依然として二量体化することができ、ひいては活性GGDEFドメインをもたらすことができることを含意し、これは驚くべきことである。

【0257】

さらなる実験のために、本発明者らは、外部刺激の非存在下で細菌による発現及び移行について活性であると報告されている、コレラ菌DncV(3', 3'cGAMPを産生する)⁵⁷、セレウス菌(*Bacillus cereus*)DisA様タンパク質(サイクリックジAMPを産生する)⁶¹及び真核生物イソギンチャク(ネマトステラ・ベクテンシス(*Nematostella vectensis*))cGAS(3', 3'cGAMPを産生する)⁵⁷をクローニングした。DisA型シクラーゼは、通常は八量体を形成し⁶¹、これは、N末端YopE融合及び細菌送達に適合しない可能性があった。セレウス菌DisA様(PDBコード2fb5)は、古典的DisAタンパク質のジアデニル酸シクラーゼ(DAC)ドメインとの構造類似性に基づいて同定された⁶¹が、興味深いことに、これは、多量体化に必要とされる他のDisAタンパク質から公知の全てのヘリックスを欠いている。それ故、本発明者らは、セレウス菌からの、おそらく単量体である活性DisA様タンパク質(PDBコード2fb5; 残基76-205)を利用することを決めた。

【0258】

融合タンパク質YopE₁₋₁₃₈-コレラ菌DncV(配列番号41)、YopE₁₋₁₃₈-セレウス菌DisA様タンパク質(配列番号42)及びYopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGAS(配列番号43)の送達を、レポーター細胞株でI型IFN誘導について評価した。I型IFN刺激のためのマウスB16F10メラノーマレポーター細胞は、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性に基づく。pBadMyChisA由来プラスミド(pBad_Si2)から発現し、YopE₁₋₁₃₈-コレラ菌DncV、YopE₁₋₁₃₈-セレウス菌DisA様タンパク質及びYopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGASを移行させる菌株の様々な量(感染多重度)に、レポーター細胞を感染させた。YopE₁₋₁₃₈-コレラ菌DncV、YopE₁₋₁₃₈-セレウス菌DisA様タンパク質及びYopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGAS全てが、レポーター細胞株においてI型IFN応答を用量依存的に誘導することを示した(図23)が、細菌バックグラウンド株(Y.エンテロコリチカ HOPEMT)又はY.エンテロコリチカ HOPEMT送達YopE₁₋₁₃₈-MyChisAは、そのような応答を誘導することができなかった(図23)。3', 3'cGAMP産生イソギンチャク(ネマトステラ・ベクテンシス)cGASは、最も高い活性を示したが、コレラ菌DncV(3', 3'cGAMPを産生する)及びセレウス菌DisA様タンパク質(サイクリックジAMPを産生する)は、I型IFN応答を同様に活性化することが判明した。

10

20

30

40

50

【0259】

このように、細菌のN末端分泌シグナルとの融合は、細菌により発現されるYopE₁₋₁₃₈-コレラ菌DncV、YopE₁₋₁₃₈-セレウス菌DisA様タンパク質及びYopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGASタンパク質の送達成功につながり、真核細胞内のこれらのタンパク質のフォールディング及び機能を妨げず、このようなことは予測され得なかった。

【0260】

或いは、RLR又はcGAS/STING依存性シグナル伝達の下流の中心転写因子である⁶²、マウスIRF3を、細菌による発現及び輸送のためにクローニングした。活性化の非存在下では、IRF-3は、細胞質内に潜在立体構造で存在する。RIG-1、MDA5又はSTINGのような上流受容体の活性化時のみ、IRF-3は、TBK1及びIKK_αによってリン酸化され、ひいては活性化される。IRF-3のリン酸化は、二量体化、核への移行、及び共活性化因子との会合に至る⁶²。IRF3の構成的活性バージョンを獲得するために、本発明者らは、最も重要なリン酸化部位の1つ(マウスIRF3におけるSer397)をAspにより置換した⁶²。

【0261】

融合タンパク質YopE₁₋₁₃₈-マウスIRF3 Ser397Asp(配列番号40)の送達を、周囲液へのタンパク質分泌を人工的に誘導するインビトロ分泌アッセイで、評価した。TCAに基づくタンパク質沈殿の後、抗YopE抗体でのウェスタンブロット分析を使用して、分泌されたタンパク質量を判定した(図24)。YopE₁₋₁₃₈-マウスtBID BH3をコードするHOPEMT株は、分泌画分に関する強いバンドを(15-20kDaで)もたらした一方で、より小さい程度にだが、YopE₁₋₁₃₈-マウスIRF3 Ser397Asp(50-75Daにおけるもの)も分泌されることが判明した(図24)。全細菌細胞画分分析は、YopE₁₋₁₃₈-マウスtBID BH3及びYopE₁₋₁₃₈-マウスIRF3 Ser397Aspの発現レベルが同等であるが、YopE₁₋₁₃₈-マウスIRF3 Ser397Aspは分解バンドパターンを示すことを明示した(図24)。

【0262】

免疫細胞におけるI型IFN応答の誘導のための細菌T3SSを介したcGAS/STING及びRIG-1様受容体経路誘発タンパク質の送達。

融合タンパク質YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG-1 CARD₂、YopE₁₋₁₃₈-コレラ菌DncV、YopE₁₋₁₃₈-セレウス菌DisA様タンパク質及びYopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGASの送達を、免疫レポーター細胞株でI型IFN誘導について評価した。I型IFN刺激のためのマウスRAW264.7マクロファージレポーター細胞は、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性に基づく。pBadMyHisA由来プラスミド(pBad_Si2)から発現し、YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG-1 CARD₂、YopE₁₋₁₃₈-コレラ菌DncV、YopE₁₋₁₃₈-セレウス菌DisA様タンパク質及びYopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGASを移行させる菌株の様々な量(感染多重度)に、レポーター細胞を感染させた。YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG-1 CARD₂、YopE₁₋₁₃₈-コレラ菌DncV、及びYopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGAS全てが、この免疫レポーター細胞株においてI型IFN応答を用量依存的に誘導することを示した(図25)が、細菌バックグラウンド株(Y.エンテロコリチカ HOPEMT)は、そのような応答を誘導することができなかった(図25)。YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG-1 CARD₂が最も高い活性を示し、これに、3',3'cGAMP産生イソギンチャク(ネマトステラ・ベクテンシス)cGAS及びコレラ菌DncV(3',3'cGAMPを産生する)が続いた。セレウス菌DisA様タンパク質(サイクリックGAMPを産生する)は、I型IFN応答を弱くしか活性化しないことが判明した。

【0263】

さらなる実験のために、本発明者らは、ヒトcGASアミノ酸161-522(Uni prot Nr. Q8N884及び配列番号115; 2', 3' cGAMPを産生する)^{5 7}を細菌による発現及び移行のためにクローニングした。I型IFN刺激のためのマウスB16F10メラノーマ及びマウスRAWマクロファージレポーター細胞は、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性に基づく。pBadMycHisA由来プラスミド(pBad__Si2)から発現し、YopE₁₋₁₃₈-ヒトcGAS₁₆₁₋₅₂₂を移行させ、レポーター細胞株においてI型IFN応答の用量依存的誘導を示した菌株の、並びにpBadMycHisA由来プラスミド(pBad__Si2)から発現し、YopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGAS、YopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGAS₆₀₋₄₂₂、YopE₁₋₁₃₈-リステリア属CdaA₁₀₁₋₂₇₃、YopE₁₋₁₃₈-コレラ菌DncV又はYopE₁₋₁₃₈-セレウス菌DisA様タンパク質を移行させる菌株の、様々な量(感染多重度)に、レポーター細胞を感染させた(図32-33)。最も強い活性がYopE₁₋₁₃₈-ヒトcGAS₁₆₁₋₅₂₂で観察され、これにYopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGAS、YopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGAS₆₀₋₄₂₂が続いた。興味深いことに、短いイソギンチャクcGAS₆₀₋₄₂₂変異体のほうが、わずかに活性が高かった。YopE₁₋₁₃₈-リステリア属CdaA₁₀₁₋₂₇₃、YopE₁₋₁₃₈-コレラ菌DncV又はYopE₁₋₁₃₈-セレウス菌DisA様タンパク質も、cGASタンパク質より小さい程度にだが、用量依存性IFN活性化を示した(図32-33)。

10

20

【0264】

I型IFN応答の誘導のための細菌T3SSを介したMAVSの送達

サイトゾル核酸は、サイトゾル中の病原体由来RNAを検出するRIG-1様受容体(RLR)ファミリーメンバーのような受容体により検知される^{5 6}。RIG-1及びMDA5は、2つのN末端CARDドメインと特定の核酸を検知する中心(DexD/H)ヘリカーゼドメインとからなる^{5 6}。刺激性RNAとの結合は、オリゴマーを形成するための^{5 6}(及びMDA5の場合はフィラメント形成への^{5 6})非固着K63連結ユビキチン鎖とのその後の会合のためにそのCARDを遊離するRIG-I(及びMDA5)の構造再構成を誘導する。RIG-I及びMDA5のオリゴマー化したCARDドメインは、MAVSのCARDドメインと相互作用する。この相互作用は、MAVSの単一のCARDドメインの重合を促進し、これが下流のシグナル伝達を誘導し、最終的にI型IFN遺伝子の誘導に至る^{5 6}。

30

【0265】

本発明者らは、T3SS、特に、YopE₁₋₁₃₈による送達のためのN末端細菌分泌シグナルと融合したヒト由来のMAVSのN末端をCARDドメイン発現する菌株(Y.エンテロコリチカ HOPEMTに基づく)を生成した。融合タンパク質YopE₁₋₁₃₈-MAVS CARDの送達を、標準的なインビトロ分泌アッセイにより評価し、送達されたタンパク質の機能性を、レポーター細胞株でI型IFN誘導について評価した。I型IFN刺激のためのマウスB16F10メラノーマ又はマウスRAWマクロファージレポーター細胞は、多量体ISREにより増強されたIFN誘導性ISG54プロモーターを含むI-ISG54プロモーターの調節下にある分泌型アルカリホスファターゼの活性に基づく。pBadMycHisA由来プラスミド(pBad__Si2)から発現し、YopE₁₋₁₃₈-ヒトMAVS CARDタンパク質を移行させるY.エンテロコリチカ HOPEMTの様々な量(感染多重度)に、レポーター細胞を感染させた。MAVSのマウスN末端CARDドメインは、レポーター細胞株においてI型IFN応答を用量依存的に誘導することを示した(図30-31)が、細菌バックグラウンド株(Y.エンテロコリチカ HOPEMT)は、そのような応答を誘導することができなかった(図30-31)。ヒトcGAS及びマウスRIG-1 CARDドメインは、マウスレポーター細胞株において同様にI型IFN応答を誘導し(図30-31)、RIG-1が最も高い活性化能を示し、これにMAVS及びcGASが続いた。

40

50

【0266】

このように、細菌のN末端分泌シグナルとの融合は、細菌により発現されるヒトYopE₁₋₁₃₈-MAVS CARDタンパク質の送達成功につながり、真核細胞内のMAVS CARDドメインのフォールディング及び機能を妨げなかった。このことは、YopE融合MAVS CARDドメインが、それら自体を多量体化すること、及びMAVSの多量体化を誘導することが依然としてできることを含意し、これは驚くべきことである。よりいっそう驚くべきことに、MAVS CARD単独ではIFN下流シグナル伝達を誘導することができないことが証明されていたが⁶⁴、本発明者らは、I型IFN経路を強く活性化するYopE融合MAVS CARDドメインを見つけた。

【0267】

さらに、MAVSのC末端膜貫通ドメインは、DNAトランスフェクション時のMAVS機能に必須であることが証明されており、単独でのMAVS CARDドメインは、トランスフェクトされたDNA構築物から発現されたとき、不活性であることが証明されていた⁶⁶。さらに加えて、トランスフェクトされたDNAから又は精製タンパク質として発現されたときにI型IFN応答を活性化する能力がある⁶⁴、⁶⁶、膜貫通領域と融合したMAVS CARDは、凝集及びひいては活性化を開始させる⁶⁴内在性MAVSに依存することが明らかになった。本発明者らは、MAVS KO細胞株を使用することにより(図52)、細菌により送達されるYopE融合MAVS CARDが、ミトコンドリア上に存在する内在性MAVSなしに活性であることを明らかにすることができた。YopE融合MAVS CARDが、膜貫通ドメインなしに、さらには内在性MAVSなしに、下流パートナーを多量体化及び活性化することができることは、驚くべきことである。

【0268】

インビトロでのI型IFN応答の誘導についての小分子STINGアゴニストに対する評価

サイクリックジヌクレオチドは、下流のI型IFNシグナル伝達誘導に至るSTING経路の周知アゴニストである。STINGアゴニストは、文献⁵⁹に記載されており、主として免疫細胞に作用し、樹状細胞に対して最も高い活性を示すことが判明している⁵⁹。対照的に、RLRシグナル伝達は、より普遍的に発現されることが判明した⁶³。それ故、本発明者らは、免疫細胞(RAWマクロファージIFNレポーター細胞)及び非免疫細胞(B16F1メラノーマIFNレポーター細胞)上で、インターフェロン誘導能について、サイクリックジヌクレオチド生成酵素(YopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGAS及びYopE₁₋₁₃₈-ヒトcGAS)を送達するY.エンテロコリチカ HOPEMT細菌、又はYopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₁₈を送達する細菌を、小分子STINGアゴニスト2'3'-c-ジAM(PS)2(Rp, Rp)(Aduro BiotechからのADU-S100に類似)と比較した。免疫細胞で、同様の活性化能が、小分子STINGアゴニスト2'3'-c-ジAM(PS)2(Rp, Rp)、及びタンパク質(YopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGAS、YopE₁₋₁₃₈-ヒトcGAS又はYopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₁₈)を送達する3つ全ての被験菌株について観察されたが、タンパク質を送達しないY.エンテロコリチカ HOPEMT細菌は、非常に弱い活性化能を示した(図34-37)。非免疫細胞(がん細胞、メラノーマ)では、細菌により送達されるYopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₁₈、細菌により送達されるYopE₁₋₁₃₈-イソギンチャクcGAS及びYopE₁₋₁₃₈-ヒトcGASは、同様によく働き、ほとんどが小分子STINGアゴニストより優れており、これは、STINGと比較してRLRのより偏在的な存在を強調した(図34-37)。

【0269】

細菌により送達されるRIG1 CARDドメイン又はMAVS CARDの厳格なT3SS依存性

厳密なT3SS依存性輸送を証明するために、真核細胞膜への移行孔を形成するT3S

10

20

30

40

50

Sタンパク質の1つを欠失させた(YopB)。そのようなyopB欠失細菌(Y.エンテロコリチカ HOPEMT-yopBと呼ばれる)についてのYopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆又はYopE₁₋₁₃₈-ヒトMAVS CARD₁₋₁₀₀発現能をRAWマクロファージIFNレポーター細胞株で評価し、同じYopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆又はYopE₁₋₁₃₈-ヒトMAVS CARD₁₋₁₀₀を発現する、yopB発現Y.エンテロコリチカ HOPEMT細菌と比較した(図38)。YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆又はYopE₁₋₁₃₈-ヒトMAVS CARD₁₋₁₀₀を発現するyopB-野生型細菌は、I型IFN応答の用量依存性活性化を示したが、同じタンパク質を発現するyopB欠失株は、そのような応答を、送達されるタンパク質を発現しないバックグラウンド非細菌株により誘導されるバックグラウンドレベルより高く誘導することができなかった(図38)。これにより、YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆又はYopE₁₋₁₃₈-ヒトMAVS CARD₁₋₁₀₀は両方とも、T3SSニードルを通して標的的真核細胞に輸送されることが検証される。

10

【0270】

粗腫瘍単離物におけるI型IFN応答の誘導

I型IFN応答を腫瘍微小環境内で開始させることができることを検証するために、本発明者らは、エクスピボで菌株に感染させた粗腫瘍単離物に関する分析を行い、続いてインターフェロンベータを用いてELISAを行った。EMT6乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスを、腫瘍が の体積に達したときに屠殺した。腫瘍をすりつぶし、消化し、24ウェルプレートに単細胞懸濁液として播種した。2つの異なる腫瘍からのそのような細胞を、未感染で放置した(図39中の破線)か、又はY.エンテロコリチカ HOPEMT、若しくはpBadMyHisA由来プラスミド上にYopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆をコードしているY.エンテロコリチカ HOPEMTに感染させた。インターフェロンベータを用いるELISAを使用してIFN刺激を評価し、これは、Y.エンテロコリチカ HOPEMTが、インターフェロンベータ分泌を誘導することができないが、YopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆をコードしているY.エンテロコリチカ HOPEMTによる感染が、2つの異なる腫瘍の粗腫瘍単離物による用量依存性インターフェロンベータ分泌をもたらすことを示した(図39)。これにより、細菌により送達されるRIG1 CARDドメインは、がん細胞、免疫細胞及び腫瘍微小環境内の他の全ての細胞からなる混合細胞集団においてインターフェロン産生を誘導することができることを検証される。

20

30

【0271】

腫瘍進行を遅らせる点でのY.エンテロコリチカ HOPEMT送達RIG1 CARD又はcGASの有効性

インピボで腫瘍細胞に送達されるYopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆及びYopE₁₋₁₃₈-ヒトcGASの影響を評価するために、本発明者らは、EMT6乳がん細胞を皮下に同種移植した野生型Balb/Cマウスにおいて研究を行った。腫瘍が約60-130mm³のサイズに達したら、PBS(図40)又は7.5×10⁷ Y.エンテロコリチカ HOPEMT、Y.エンテロコリチカ HOPEMT+YopE₁₋₁₃₈マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆若しくはY.エンテロコリチカ HOPEMT+YopE₁₋₁₃₈ヒトcGASをマウスに腫瘍内(it)注射した。細菌の初回腫瘍内注射の日を0日目と定義した。d0、d1、d5、d6、d10及びd11に、マウスに腫瘍内注射した。その後数日にわたって腫瘍体積をノギスで測定した。Y.エンテロコリチカ単独での治療は、腫瘍体積進行に対する影響を示し、4/14匹のマウスが完全腫瘍退縮を示した(図41)。I型IFN応答を誘導するタンパク質であって、RIG1 CARDS又はcGASであるタンパク質を送達するY.エンテロコリチカ HOPEMTは、腫瘍進行に対してより顕著な影響をもた

40

50

らし、8/14 (RIG1 CARD)又は8/15 (cGAS)匹のマウス各々が完全且つ永続的腫瘍退縮を示すことが判明した(図42-43)。これらの研究結果は、そのような細菌及びそれらのT3SSを、腫瘍進行への有意な干渉に利用することができること、及びI型IFN誘導タンパク質の送達、原発性腫瘍の退縮を誘導するのによく適していることに光を当てるものである。

【0272】

完全に腫瘍が退縮したマウスを、初回腫瘍同種移植後65日目までさらに観察し、その後、65日目に、対側側腹部にEMT6乳がん細胞を再投与して、これらのがん細胞に対する免疫介在性記憶及び全身作用を評価した。この再投与研究では、さらなる治療を投与せず、マウスを対側側腹部における腫瘍進行について単に観察し、ナイーブマウス(年齢等)と比較した。ナイーブマウスでは、皮下に同種移植された腫瘍細胞により腫瘍増殖が生じる結果となったが、反対側の側腹部におけるEMT6腫瘍が以前に処置され完全に退縮した全てのマウスは、腫瘍増殖から保護されることが判明した(図44)。注目すべきこととして、細菌治療により誘導された以前の完全退縮を対側側腹部に有するマウスの腫瘍は、数日間、増殖を開始し、 $>100\text{mm}^3$ までの体積に達し(2回目の移植後およそ10日目にピーク体積を有する)、その後、縮小に至った(図44)。この遅延期間は、十分に開始される前に数日を要する適応免疫系応答を示し得る。

【0273】

インビボで腫瘍細胞に送達されるYopE₁₋₁₃₈-マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆及びYopE₁₋₁₃₈-ヒトcGASの影響をさらに評価するためのさらなる実験において、本発明者らは、B16F10メラノーマがん細胞を皮下に同種移植した野生型C57BL/6マウスにおいて研究を行った。腫瘍が約75mm³のサイズに達したら、PBS又は 7.5×10^7 Y.エンテロコリチカ HOPEMT、Y.エンテロコリチカ HOPEMT+YopE₁₋₁₃₈マウスRIG1 CARDドメイン₁₋₂₄₆若しくはY.エンテロコリチカ HOPEMT+YopE₁₋₁₃₈ヒトcGASをマウスに腫瘍内(it)注射した。細菌の初回腫瘍内注射の日を0日目と定義した。d0、d1、d2、d3、d6及びd9に、マウスに腫瘍内注射した。その後数日にわたって腫瘍体積をノギスで測定した。Y.エンテロコリチカ単独での治療は、腫瘍体積進行に対する影響を示し、1/15匹のマウスが完全腫瘍退縮を示した(図46)。I型IFN応答を誘導するタンパク質であって、RIG1 CARDS又はcGASであるタンパク質を送達するY.エンテロコリチカ HOPEMTは、腫瘍進行に対して非常に顕著な影響をもたらし、5/15 (RIG1 CARD)又は8/15 (cGAS)匹のマウス各々が完全且つ永続的腫瘍退縮を示すことが判明した(図46)。これらの研究結果は、そのような細菌及びそれらのT3SSを、腫瘍進行への非常に有意な干渉に利用することができること、及びI型IFN誘導タンパク質の送達、原発性腫瘍の退縮を誘導するのによく適していることに光を当てるものである。注目すべきこととして、特に、YopE₁₋₁₃₈-ヒトcGASを送達する細菌の場合、PBS治療コントロールと比較して、I型IFN誘導cGASタンパク質の細胞内送達により誘導される腫瘍への白血球流入によって誘導され得る腫瘍体積の増加(偽性進行)が初回投与直後に観察された。

【0274】

参考文献リスト

- 1 Hayes, C. S., Aoki, S. K. & Low, D. A. Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu Rev Genet* 44, 71-90, doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091449 (2010).
- 2 Cornelis, G. R. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4, 811-825, doi:nrmicro1526 [pii]10.1038/nrmicro1526 (2006).
- 3 Blanco-Toribio, A., Muyldermans, S., Frankel, G. & Fernandez, L. A. Direct injection of functional single-domain antibodies from *E. coli* into human cells. *PL*

10

20

30

40

50

- oS One 5, e15227, doi:10.1371/journal.pone.0015227 (2010).
- 4 Bichsel, C. et al. Direct reprogramming of fibroblasts to myocytes via bacterial injection of MyoD protein. *Cell Reprogram* 15, 117-125, doi:10.1089/cell.2012.0058 (2013).
- 5 Bichsel, C. et al. Bacterial delivery of nuclear proteins into pluripotent and differentiated cells. *PLoS One* 6, e16465, doi:10.1371/journal.pone.0016465 (2011).
- 6 Chamekh, M. et al. Delivery of biologically active anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1ra in vivo by the *Shigella* type III secretion apparatus. *J Immunol* 180, 4292-4298 (2008). 10
- 7 Skurnik, M. & Wolf-Watz, H. Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol* 3, 517-529 (1989).
- 8 Isberg, R. R., Voorhis, D. L. & Falkow, S. Identification of invasins: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* 50, 769-778 (1987).
- 9 Mota, L. J. & Cornelis, G. R. The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann Med* 37, 234-249, doi:R673752030212825 [pii]10.1080/07853890510037329 (2005).
- 10 Trosky, J. E., Liverman, A. D. & Orth, K. *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol* 10, 557-565, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01109.x (2008). 20
- 11 Brenner, D. & Mak, T. W. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 21, 871-877, doi:S0955-0674(09)00160-4 [pii]10.1016/j.ceb.2009.09.004 (2009).
- 12 Chalah, A. & Khosravi-Far, R. The mitochondrial death pathway. *Adv Exp Med Biol* 615, 25-45, doi:10.1007/978-1-4020-6554-5_3 (2008).
- 13 Fuchs, Y. & Steller, H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147, 742-758, doi:S0092-8674(11)01283-9 [pii]10.1016/j.cell.2011.10.033 (2011).
- 14 Waugh, D. S. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif* 80, 283-293, doi:S1046-5928(11)00203-8 [pii]10.1016/j.pep.2011.08.005 (2011). 30
- 15 Howard, S. L. et al. Application of comparative phylogenomics to study the evolution of *Yersinia enterocolitica* and to identify genetic differences relating to pathogenicity. *J Bacteriol* 188, 3645-3653, doi:10.1128/JB.188.10.3645-3653.2006 (2006).
- 16 Thomson, N. R. et al. The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *PLoS Genet* 2, e206, doi:10.1371/journal.pgen.0020206 (2006).
- 17 Pelludat, C., Hogardt, M. & Heesemann, J. Transfer of the core region genes of the *Yersinia enterocolitica* WA-C serotype O:8 high-pathogenicity island to *Y. enterocolitica* MRS40, a strain with low levels of pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhanced mouse virulence. *Infect Immun* 70, 1832-1841 (2002). 40
- 18 Mulder, B., Michiels, T., Simonet, M., Sory, M. P. & Cornelis, G. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Infect Immun* 57, 2534-2541 (1989).
- 19 Sory, M. P. & Cornelis, G. R. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol* 14, 583-594 (1994).
- 20 Sarker, M. R., Neyt, C., Stainier, I. & Cornelis, G. R. The *Yersinia* Yop vir 50

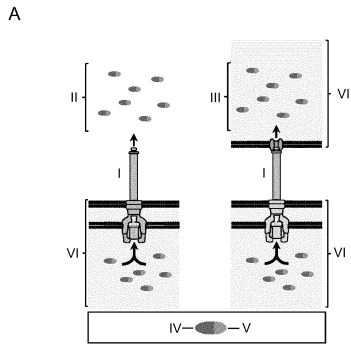
- ulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J Bacteriol* 180, 1207-1214 (1998).
- 21 Neubauer, H., Aleksic, S., Hensel, A., Finke, E. J. & Meyer, H. *Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. *Int J Med Microbiol* 290, 61-64, doi:10.1016/S1438-4221(00)80107-1 (2000).
- 22 Feldman, M. F., Muller, S., Wuest, E. & Cornelis, G. R. SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol Microbiol* 46, 1183-1197, doi:3241 [pii] (2002).
- 23 Ramamurthi, K. S. & Schneewind, O. A synonymous mutation in *Yersinia enterocolitica* yopE affects the function of the YopE type III secretion signal. *J Bacteriol* 187, 707-715, doi:10.1128/JB.187.2.707-715.2005 (2005).
- 24 Wolke, S., Ackermann, N. & Heesemann, J. The *Yersinia enterocolitica* type 3 secretion system (T3SS) as toolbox for studying the cell biological effects of bacterial Rho GTPase modulating T3SS effector proteins. *Cell Microbiol* 13, 1339-1357, doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01623.x (2011).
- 25 Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. Genetic analysis of the yopE region of *Yersinia* spp.: identification of a novel conserved locus, yerA, regulating yopE expression. *J Bacteriol* 172, 1547-1555 (1990).
- 26 Sambrook, J. (ed David W. Russell) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. , 2001).
- 27 Alto, N. M. & Dixon, J. E. Analysis of Rho-GTPase mimicry by a family of bacterial type III effector proteins. *Methods Enzymol* 439, 131-143, doi:S0076-6879(07)00410-7 [pii]10.1016/S0076-6879(07)00410-7 (2008).
- 28 Alto, N. M. et al. Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell* 124, 133-145, doi:S0092-8674(05)01229-8 [pii]10.1016/j.cell.2005.10.031 (2006).
- 29 Kaniga, K., Delor, I. & Cornelis, G. R. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109, 137-141, doi:0378-1119(91)90599-7 [pii] (1991).
- 30 Yoneda, Y. et al. A long synthetic peptide containing a nuclear localization signal and its flanking sequences of SV40 T-antigen directs the transport of IgM into the nucleus efficiently. *Exp Cell Res* 201, 313-320 (1992).
- 31 Metcalf, W. W., Jiang, W. & Wanner, B. L. Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers. *Gene* 138, 1-7 (1994).
- 32 Diepold, A. et al. Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *Embo J* 29, 1928-1940, doi:emboj201084 [pii]10.1038/emboj.2010.84 (2010).
- 33 Iriarte, M., Stainier, I. & Cornelis, G. R. The rpoS gene from *Yersinia enterocolitica* and its influence on expression of virulence factors. *Infect Immun* 63, 1840-1847 (1995).
- 34 Cornelis, G., Vanootegem, J. C. & Sluiter, C. Transcription of the yop regulation from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes. *Microb Pathog* 2, 367-379, doi:0882-4010(87)90078-7 [pii] (1987).
- 35 Grosdent, N., Maridonneau-Parini, I., Sory, M. P. & Cornelis, G. R. Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis. *Infect Immun* 70, 4165-4176 (2002).
- 36 Boyd, A. P., Lambermont, I. & Cornelis, G. R. Competition between the Yops o

- f *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol* 182, 4811-4821 (2000).
- 37 Iriarte, M. & Cornelis, G. R. YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* 29, 915-929 (1998).
- 38 Kudryashev, M. et al. In situ structural analysis of the *Yersinia enterocolitica* injectisome. *Elife* 2, e00792, doi:10.7554/eLife.0079200792 [pii] (2013).
- 39 Schulte, R. et al. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J* 14, 1471-1484 (2000).
- 40 Mota, L. J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C. & Cornelis, G. R. Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* 307, 1278, doi:307/5713/1278 [pii]10.1126/science.1107679 (2005). 10
- 41 Carrington, J. C. & Dougherty, W. G. A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 3391-3395 (1988).
- 42 Kapust, R. B., Tozser, J., Copeland, T. D. & Waugh, D. S. The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 949-955, doi:10.1016/S0006-291X(02)00574-0 [pii] (2002).
- 43 Liang, H., Gao, H., Maynard, C. A. & Powell, W. A. Expression of a self-processing, pathogen resistance-enhancing gene construct in *Arabidopsis*. *Biotechnol Lett* 27, 435-442, doi:10.1007/s10529-005-1884-9 (2005). 20
- 44 Weber, W. et al. Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nat Biotechnol* 20, 901-907, doi:10.1038/nbt731nbt731 [pii] (2002).
- 45 Kapust, R. B. et al. Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng* 14, 993-1000 (2001).
- 46 Lee, V. T., Anderson, D. M. & Schneewind, O. Targeting of *Yersinia* Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. *Mol Microbiol* 28, 593-601 (1998). 30
- 47 Gray, D. C., Mahrus, S. & Wells, J. A. Activation of specific apoptotic caspases with an engineered small-molecule-activated protease. *Cell* 142, 637-646, doi:S0092-8674(10)00783-X [pii]10.1016/j.cell.2010.07.014 (2010).
- 48 Henrichs, T. et al. Target-directed proteolysis at the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4246-4251, doi:102/12/4246 [pii]10.1073/pnas.0408520102 (2005).
- 49 Aepfelbacher, M., Trasak, C. & Ruckdeschel, K. Effector functions of pathogenic *Yersinia* species. *Thromb Haemost* 98, 521-529 (2007).
- 50 Trulzsch, K., Sporleder, T., Igwe, E. I., Russmann, H. & Heesemann, J. Contribution of the major secreted yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun* 72, 5227-5234, doi:10.1128/IAI.72.9.5227-5234.2004 (2004). 40
- 51 Bohme, K. et al. Concerted actions of a thermo-labile regulator and a unique intergenic RNA thermosensor control *Yersinia* virulence. *PLoS Pathog* 8, e1002518, doi:10.1371/journal.ppat.1002518 (2012).
- 52 Rohde, J. R., Luan, X. S., Rohde, H., Fox, J. M. & Minnich, S. A. The *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37 degrees C. *J Bacteriol* 181, 4198-4204 (1999).
- 53 Curtiss, R., 3rd, Galan, J. E., Nakayama, K. & Kelly, S. M. Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo. *Res Microbiol* 141, 797-805 (1990) 50

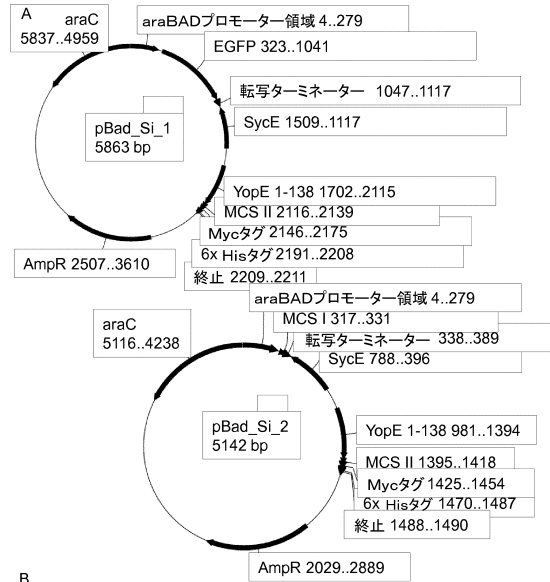
).

- 54 Spreng, S. & Viret, J. F. Plasmid maintenance systems suitable for GMO-based bacterial vaccines. *Vaccine* 23, 2060-2065, doi:10.1016/j.vaccine.2005.01.009 (2005).
- 55 Neyt, C., Iriarte, M., Thi, V. H. & Cornelis, G. R. Virulence and arsenic resistance in *Yersinia*. *J Bacteriol* 179, 612-619 (1997).
- 56 Wu, J. & Chen, Z. J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol* 32, 461-488, doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120156 (2014).
- 57 Kranzusch, P. J. et al. Ancient Origin of cGAS-STING Reveals Mechanism of Universal 2',3' cGAMP Signaling. *Mol Cell* 59, 891-903, doi:10.1016/j.molcel.2015.07.022 (2015). 10
- 58 Commichau, F. M., Dickmanns, A., Gundlach, J., Ficner, R. & Stulke, J. A jack of all trades: the multiple roles of the unique essential second messenger cyclic di-AMP. *Mol Microbiol* 97, 189-204, doi:10.1111/mmi.13026 (2015).
- 59 Corrales, L. et al. Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell Rep* 11, 1018-1030, doi:10.1016/j.celrep.2015.04.031 (2015).
- 60 De, N., Navarro, M. V., Raghavan, R. V. & Sondermann, H. Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. *J Mol Biol* 393, 619-633, doi:10.1016/j.jmb.2009.08.030 (2009). 20
- 61 Witte, G., Hartung, S., Buttner, K. & Hopfner, K. P. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. *Mol Cell* 30, 167-178, doi:10.1016/j.molcel.2008.02.020 (2008).
- 62 Panne, D., McWhirter, S. M., Maniatis, T. & Harrison, S. C. Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation-dependent switch. *J Biol Chem* 282, 22816-22822, doi:10.1074/jbc.M703019200 (2007).
- 63 Engel, C., G. Brugmann, S. Lambing, L.H. Muhlenbeck, S. Marx, C. Hagen, D. Horvath, M. Goldeck, J. Ludwig, A.M. Herzner, J.W. Drijfhout, D. Wenzel, C. Coch, T. Tuting, M. Schlee, V. Hornung, G. Hartmann, and J.G. Van den Boorn. 2017. RIG-I Resists Hypoxia-Induced Immunosuppression and Dedifferentiation. *Cancer Immunol Res.* 5:455-467. 30
- 64 Hou, F., L. Sun, H. Zheng, B. Skaug, Q.X. Jiang, and Z.J. Chen. 2011. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell.* 146:448-461.
- 65 Kranzusch, P.J., A.S. Lee, J.M. Berger, and J.A. Doudna. 2013. Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity. *Cell Rep.* 3:1362-1368.
- 66 Seth, R.B., L. Sun, C.K. Ea, and Z.J. Chen. 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- κ B and IRF 3. *Cell.* 122:669-682. 40

【図 1】



【図 2 A - B】



B

YopE1-138 XhoI XbaI BstBI
 GTTCGCCACG CTCGAGTCTA GATTTCGAA
 HindIII myc epitope
 AAGCTTGGGC CCGAACAAAA ACTCATCTCA
 GAAGAGGATCTGAATAGCGC CGTCGACCAT
 6x His タグ ***
 CATCATCATC ATCATTGAGT TTAACGGTC
 TCCAGCTTGG CTGTTTTGG C

【図 3 A】

| 株の名称 | バックグラウンド株 | 挿入/関連特性 | T3SSにより送達されるタンパク質 | 骨格 | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマー SI_Nr. | 耐性 | 参考文献 |
|----------------------|--|---|-------------------|----|-------------------|---------------------------|-------------|------------------------|
| ΔHOPEMT asd inv yopB | Y. エンテロコロリチカ ΔyopH,O,P,E,M,T | MRS40 pMIL421 [yopHA1-352, yopOA65-588, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135] | | | | | Nal | Iriarte及びCornelis 1998 |
| ΔHOPEMT asd yopB | Y. エンテロコロリチカ ΔyopH,O,P,E,M,T | MRS40 pMIL421 [yopHA1-352, yopOA65-588, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135] | | | | | Nal Kan | |
| ΔHOPEMT asd inv yadA | Y. エンテロコロリチカ ΔyopH,O,P,E,M,T ΔinvΔyadA | MRS40 asdΔ292-610 pMIL421 [yopHA1-352, yopOA65-588, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135] | | | | | Nal | Kudryashov 等., 2013 |
| ΔHOPEMT asd inv yadA | Y. エンテロコロリチカ ΔyopH,O,P,E,M,T ΔinvΔyadA | MRS40 asdΔ292-610 invAA352-2225::aphA_3 pMIL421 [yopHA1-352, yopOA65-588, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135] | | | | 445/446, 447/448, 449/450 | Nal Kan | |
| ΔHOPEMT asd inv yadA | Y. エンテロコロリチカ ΔyopH,O,P,E,M,T ΔinvΔyadA | MRS40 asdΔ587-836 (ベクター-共編込み) yadAA89-354::aphA3 pMIL421 [yopHA1-352, yopOA65-588, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135] | | | | 352/353, 354/355, 356/357 | Nal Kan Tet | |

【図 3 B】

| 株の名称 | バックグラウンド株 | 挿入/関連特性 | T3SSにより送達されるタンパク質 | 骨格 | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマー SI_Nr. | 耐性 | 参考文献 |
|----------------------|-----------------------------------|--|-------------------|---------------------------|-------------------|--|---------|------|
| ΔHOPEMT asd pBad_Si1 | Y. エンテロコロリチカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | EGFP(アラビノース誘導性), SycE-YopE1-138-MycHis断片 | | pBad-MycHisA (Invitrogen) | pBad_Si_1 | 285/286 (EGFP), 287/288 (sycE-YopE1-138) | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT asd pBad_Si2 | Y. エンテロコロリチカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | SycE-YopE ₁₋₁₃₈ -MycHis断片 | YopE1-138-MycHis | pBad-MycHisA (Invitrogen) | pBad_Si_2 | 287/288 (sycE-YopE1-138) | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT asd pSi_85 | Y. エンテロコロリチカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-Bid | pBad_Si_2 | pSi_85 | 387/391 | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT asd pSi_87 | Y. エンテロコロリチカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-tBid | pBad_Si_2 | pSi_87 | 389/391 | Nal Amp | |

【 図 3 C 】

| 株の名称 | バックグラウンド株 | 挿入/関連特性 | T3SSにより送達されることとなるタンパク質 | 骨格プラスミド | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマー-Si_Nr.: | 耐性 | 参考文献 |
|---------------------------|---|---------|------------------------------|-----------|-------------------|---------------|------------|------|
| ΔHOPEMT asd pSi_120 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-ET1 | pBad_Si_2 | pSi_120 | 436/437 | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT asd pSi_121 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-zBIM | pBad_Si_1 | pSi_121 | 438/439 | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT asd pSi_132 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-TEV プロテアーゼS219V | pBad_Si_2 | pSi_132 | 463/464 | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT asd pSi_158 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-2xTEV 部位 | pBad_Si_2 | pSi_158 | 511/476 | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT asd pSi_151 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-Ink4C | pBad_Si_2 | pSi_151 | 494/495 | Nal Amp | |

【 図 3 D 】

| 株の名称 | バックグラウンド株 | 挿入/関連特性 | T3SSにより送達されることとなるタンパク質 | 骨格プラスミド | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマー-Si_Nr.: | 耐性 | 参考文献 |
|---------------------------|---|---------|--------------------------------------|-----------|-------------------|---------------|------------|------|
| ΔHOPEMT asd pSi_156 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-2x TEV部位-ET1 | pBad_Si_2 | pSi_156 | 504/505 | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT asd pSi_159 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138- 2xTEV部位-EGFP NLS | pBad_Si_2 | pSi_159 | 511/513 | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT asd pSi_160 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138- 2xTEV部位-NLS- EGFP | pBad_Si_2 | pSi_160 | 512/476 | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT asd pSi_161 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-2x TEV部位-INK4C | pBad_Si_2 | pSi_161 | 508/509 | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT asd pSi_164 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-2x TEV部位-Flag- INK4C | pBad_Si_2 | pSi_164 | 515/509 | Nal Amp | |

【 図 3 E 】

| 株の名称 | バックグラウンド株 | 挿入/関連特性 | T3SSにより送達されることとなるタンパク質 | 骨格プラスミド | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマー-Si_Nr.: | 耐性 | 参考文献 |
|---------------------------------------|---|---------|---|-----------|-------------------|---------------|------------|------------------------------------|
| ΔHOPEMT SL1344 ΔaroA pSi_318 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-Y. エンテロコリチイカコドン 最適化マウスtBid BH3部分 | pBad_Si_2 | pSi_318 | 677/678 | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT asd pSi_322 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-Y. エンテロコリチイカコドン 最適化マウスBax BH3部分 | pBad_Si_2 | pSi_322 | 682/683 | Nal Amp | |
| S. enterica SL1344 ΔaroA | サルモネラ菌亜種 ネズミチフス菌 SL 1344 ΔaroA | | | | | | | Hoiseth 及び Stocker, 1981. |
| ΔHOPEMT asd pSi_315 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-Y. エンテロコリチイカコドン 最適化マウスtBid | pBad_Si_2 | pSi_315 | 合成 構築物 | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT asd pSi_236 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-Ubiquitin | pBad_Si_2 | pSi_236 | 585/586 | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT asd pSi_237 II | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-Ubiquitin- Flag-INK4C-MycHis | pSi_236 | pSi_237 II | 588/509 | Nal Amp | |

【 図 3 F 】

| 株の名称 | バックグラウンド株 | 挿入/関連特性 | T3SSにより送達されることとなるタンパク質 | 骨格プラスミド | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマー-Si_Nr.: | 耐性 | 参考文献 |
|----------------------------------|---|---------|---|-----------|-------------------|---------------|------------|------|
| ΔHOPEMT Or:ΔHOPEMT pSi_357 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-Y. エンテロコリチイカ コドン最適化 マウスtBid BH3 | pBad_Si_2 | pSi_357 | 733/735 | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT Or:ΔHOPEMT pSi_358 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-Y. エンテロコリチイカ コドン最適化 マウス Bax BH3 | pBad_Si_2 | pSi_358 | 736/738 | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT Or:ΔHOPEMT pSi_371 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-Y. エンテロコリチイカ コドン最適化 マウスtBid, BH3 | pSi_357 | pSi_371 | 733/734 | Nal Amp | |
| ΔHOPEMT Or:ΔHOPEMT pSi_373 | Y. エンテロコリチイカ ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd | | YopE1-138-Y. エンテロコリチイカ コドン最適化マウス tBid BH3-Y. エンテロコリチイカ コドン最適化 マウスBax, BH3 | pSi_358 | pSi_373 | 733/734 | Nal Amp | |

【 図 3 G 】

| 株の名称 | ハックグラウンド株 | インサート/関連特性 | T3SSIにより送達されることとなるタンパク質 | 骨格プラスミド | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマー Si_Nr.: | 参考文献 |
|---------------------------------------|--|--|--|-----------|-------------------|---------------|---------|
| ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_353 | Y. エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | 伸長結合タンパク質 (HA6伸長結合タンパク質) エンテロコリチカ コドン最適化 マウスBId BH3 | pBad_Si_2 | pSi_353 | 725/726 | Nal Amp |
| ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_354 | Y. エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | YopE1-138-Y. エンテロコリチカ コドン最適化 マウスBId BH3 | pBad_Si_2 | pSi_354 | 727/728 | Nal Amp |
| ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_374 | Y. エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | YopE1-138-Y. エンテロコリチカ コドン最適化 マウスBId BH3 | pSi_357 | pSi_374 | 736/737 | Nal Amp |

【 図 3 H 】

| 株の名称 | ハックグラウンド株 | インサート/関連特性 | T3SSIにより送達されることとなるタンパク質 | 骨格プラスミド | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマー Si_Nr.: | 参考文献 |
|---------------------------------------|--|--|---|-----------|-------------------|---------------|---------|
| ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_453 | Y. エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | YopE ₁₋₁₃₈ -Y. エンテロコリチカ コドン最適化 ヒトRIG-1 2つのCARDドメイン | pBad_Si_2 | pSi_453 | | Nal Amp |
| ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_454 | Y. エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | YopE ₁₋₁₃₈ -Y. エンテロコリチカ コドン最適化 マウスRIG-1 2つのCARDドメイン | pBad_Si_2 | pSi_454 | | Nal Amp |
| ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_452 | Y. エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | YopE ₁₋₁₃₈ -Y. エンテロコリチカ コドン最適化 出芽酵母GCN4 (Aa, 249-278) →Y. エンテロコリチカ コドン最適化 緑膿菌WspR (Aa, 172-347) | pBad_Si_2 | pSi_452 | | Nal Amp |

【 図 3 I 】

| 株の名称 | ハックグラウンド株 | インサート/関連特性 | T3SSIにより送達されることとなるタンパク質 | 骨格プラスミド | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマー Si_Nr.: | 参考文献 |
|---------------------------------------|--|--|--|-----------|-------------------|---------------|---------|
| ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_428 | Y. エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | YopE ₁₋₁₃₈ -Y. エンテロコリチカ 最適化マウス IRF3_S397D | pBad_Si_2 | pSi_428 | | Nal Amp |
| ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_482 | Y. エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | YopE ₁₋₁₃₈ -Y. エンテロコリチカ 最適化マウス DncV(M3からL413) | pBad_Si_2 | pSi_482 | | Nal Amp |
| ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_483 | Y. エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | YopE ₁₋₁₃₈ -Y. エンテロコリチカ 最適化マウス DisA様 (PDB:2FB5;Aa, 76-205) | pBad_Si_2 | pSi_483 | | Nal Amp |
| ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_484 | Y. エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | YopE ₁₋₁₃₈ -Y. エンテロコリチカ 最適化マウス DisA様 (Ensembl:A75FB5.1) | pBad_Si_2 | pSi_484 | | Nal Amp |

【 図 3 J 】

| 株の名称 | ハックグラウンド株 | インサート/関連特性 | T3SSIにより送達されることとなるタンパク質 | 骨格プラスミド | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマー Si_Nr.: | 参考文献 |
|-------------------------------------|--|--|---|-----------|------------------------|---|---------|
| ΔHOPEMT asd pYV-asd | Y. エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | MRS40 pMIL421 [yopHΔ1-352, yopΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135, pYV-asd] | / | pKNG101 | pSi_41 7 (表裏誘発株) | PCR1: 869/870; PCR2: 871/872; PCR3: 873/874; オーバーストップ PCR 869/874 | Nal |
| ΔHOPEMT asd pBad-asd | Y. エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | MRS40 pMIL421 [yopHΔ1-352, yopΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135] | YopE1-138-Mychis | pBad_Si_2 | pSi_39 7 | 600/601 | Nal |
| ΔHOPEMT vifF- hairpin | Y. エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | MRS40 [yopHΔ1-352, yopΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135 vifFΔ111-571] | / | pKNG101 | pSi_4 41 (表裏誘発株) | 合成構築物 | Nal |
| ΔHOPEMT vifF- hairpin pSi_371 | Y. エンテロコリチカ エンテロコリチカ ΔyopH,O,P,E, M,T (Δasd) | MRS40 [yopHΔ1-352, yopΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135 vifFΔ111-571] | YopE1-138-Mychis (Y. エンテロコリチカ コドン最適化 マウスBId BH3), | pBad_Si_2 | pSi_3 71 | 733/734 | Nal Amp |

【 図 3 O 】

| 株の名称 | バックグラウンド株 | インサート/関連特性 | T3SSにより送達されることとなるタンパク質 | 菌株 | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマー SI_Nr.: | 参考文献 |
|---------------------------------|-----------------------------------|------------|---|-----------|-------------------|---------------|---------|
| ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_524 | Y. エンテロコリチカ ΔyopH,O,PE,M,T (Δasd) | | YopE _{1,138} Y. エンテロコリチカ MDA5 2つのCARD ドメイン (Aa. 1-231) | pBad_SI_2 | pSi_524 | 1025/1026 | Nal Amp |
| ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_515 | Y. エンテロコリチカ ΔyopH,O,PE,M,T (Δasd) | | YopE _{1,138} Y. エンテロコリチカ MDA5 2つのCARD ドメイン (Aa. 161-522) | pBad_SI_2 | pSi_515 | | Nal Amp |

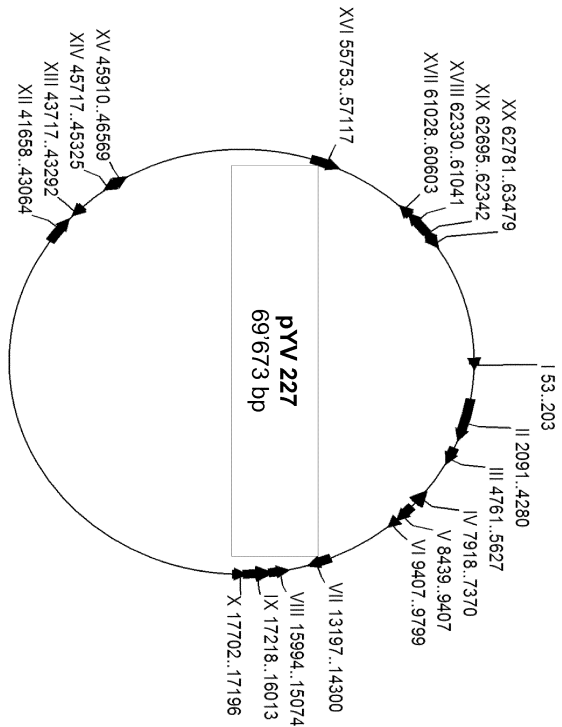
【 図 3 Q 】

| 株の名称 | バックグラウンド株 | インサート/関連特性 | T3SSにより送達されることとなるタンパク質 | 菌株 | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマー SI_Nr.: | 参考文献 |
|---------------------------------|-----------------------------------|------------|---|-----------|-------------------|---------------|---------|
| ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_524 | Y. エンテロコリチカ ΔyopH,O,PE,M,T (Δasd) | | YopE _{1,138} Y. エンテロコリチカ MDA5 2つのCARD ドメイン (Aa. 1-231) | pBad_SI_2 | pSi_524 | 1025/1026 | Nal Amp |
| ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_515 | Y. エンテロコリチカ ΔyopH,O,PE,M,T (Δasd) | | YopE _{1,138} Y. エンテロコリチカ MDA5 2つのCARD ドメイン (Aa. 161-522) | pBad_SI_2 | pSi_515 | | Nal Amp |

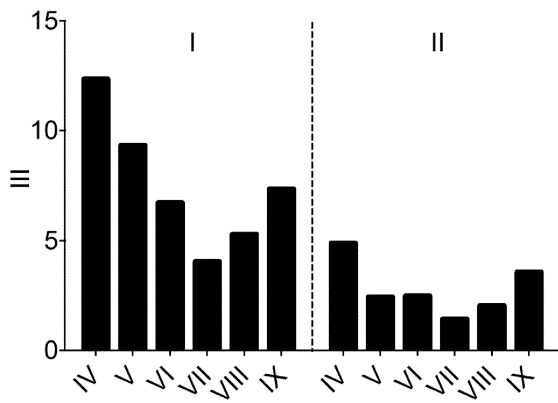
【 図 3 P 】

| 株の名称 | バックグラウンド株 | インサート/関連特性 | T3SSにより送達されることとなるタンパク質 | 菌株 | 結果として得られるプラスミドの名称 | プライマー SI_Nr.: | 参考文献 |
|--|-----------------------------------|------------|---|-----------|-------------------|---------------|---------|
| 635_TsId ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_524 | Y. エンテロコリチカ ΔyopH,O,PE,M,T (Δasd) | | YopE _{1,138} Y. エンテロコリチカ MDA5 2つのCARD ドメイン (Aa. 1-231) | pBad_SI_2 | pSi_524 | 1010/1011 | Nal Amp |
| 305_TsId ΔHOPEMT Or: ΔHOPEMT asd pSi_515 | Y. エンテロコリチカ ΔyopH,O,PE,M,T (Δasd) | | YopE _{1,138} Y. エンテロコリチカ MDA5 2つのCARD ドメイン (Aa. 161-522) | pBad_SI_2 | pSi_515 | | Nal Amp |

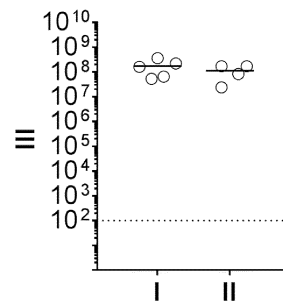
【 図 4 】



【図5】

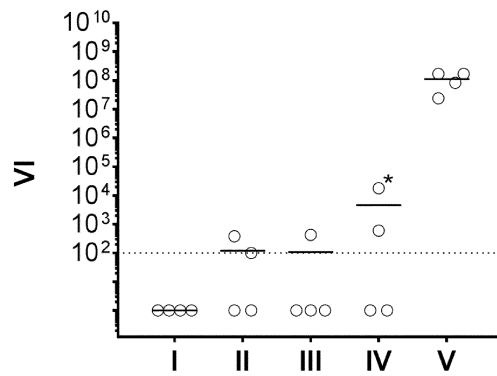
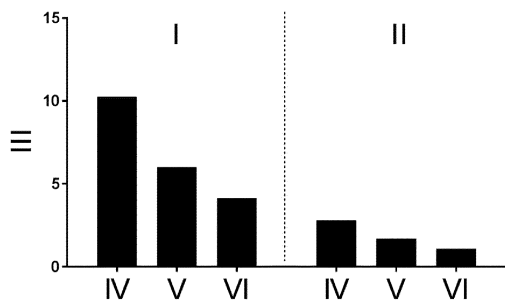


【図7】

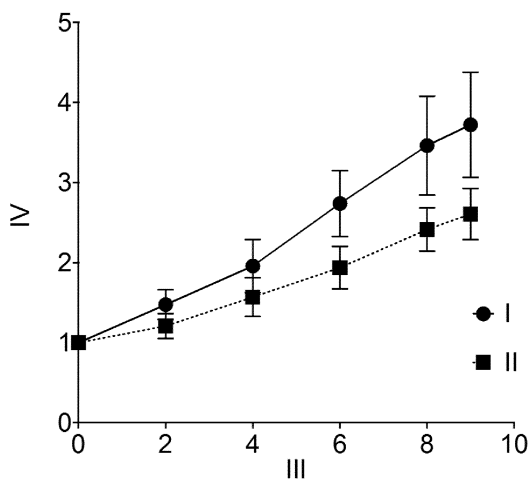


【図8】

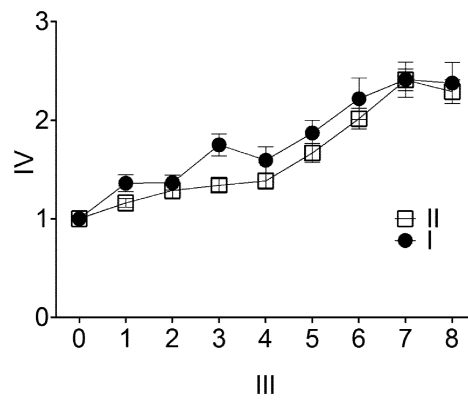
【図6】



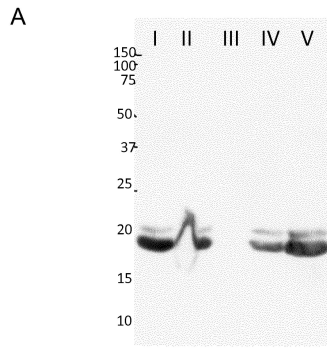
【図9】



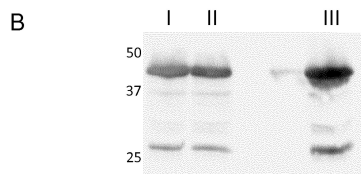
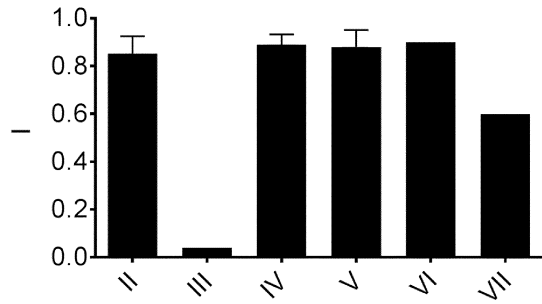
【図10】



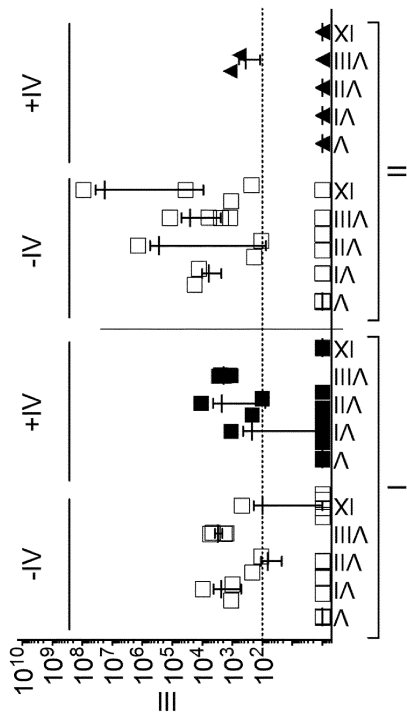
【 1 1 】



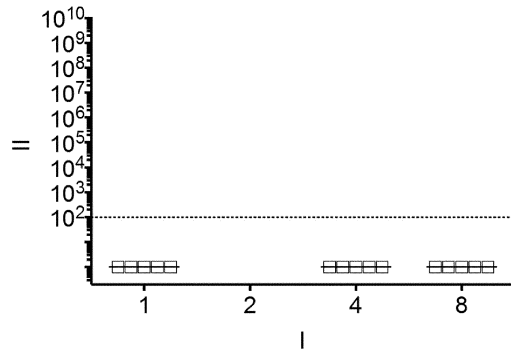
【 1 2 】



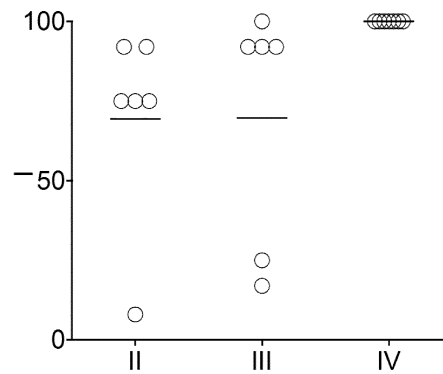
【 1 3 】



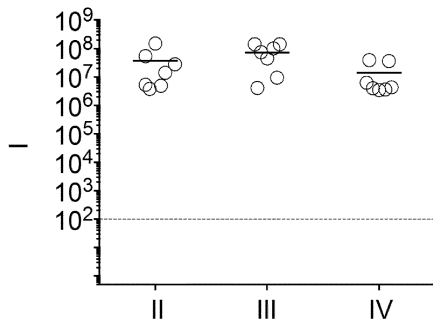
【 1 4 】



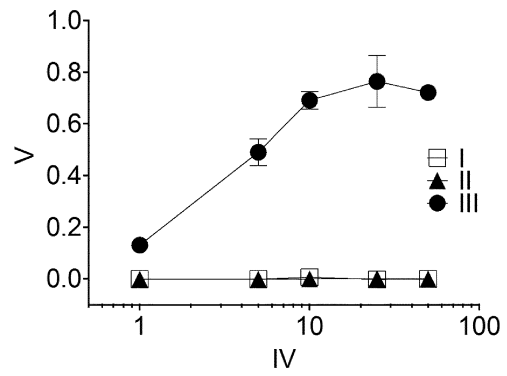
【 1 5 】



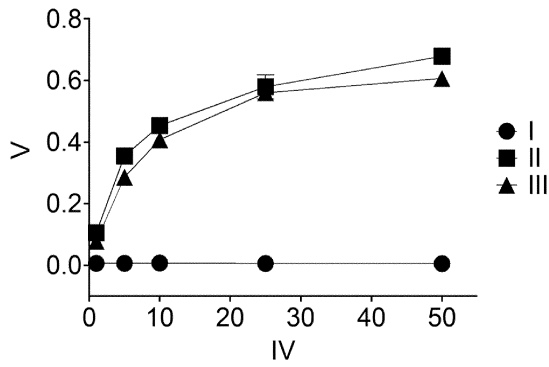
【 図 1 6 】



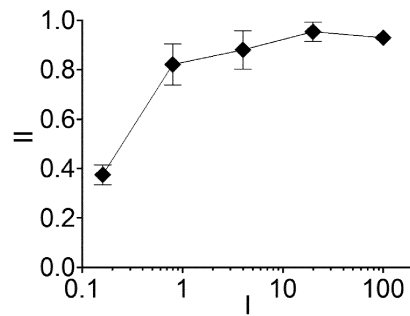
【 図 1 8 】



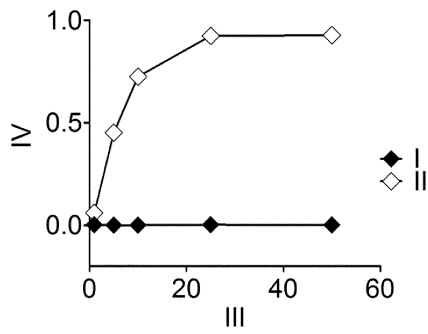
【 図 1 7 】



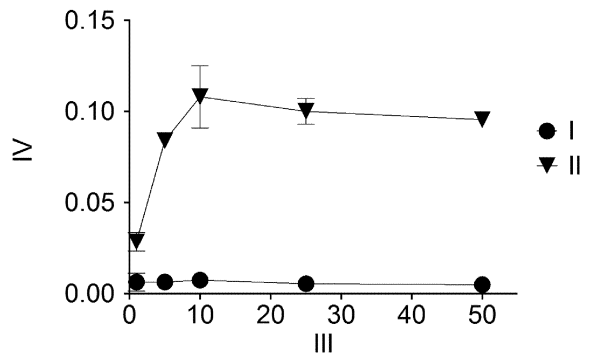
【 図 1 9 】



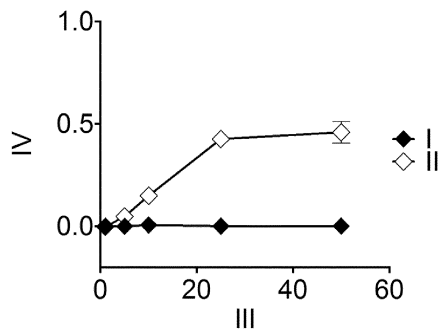
【 図 2 0 】



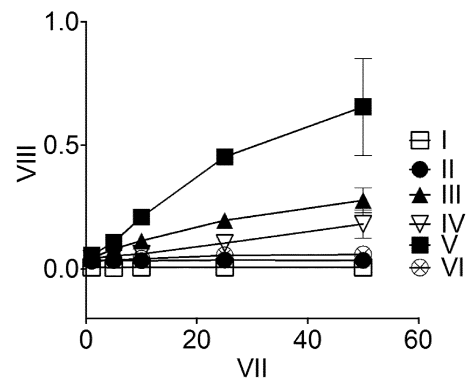
【 図 2 2 】



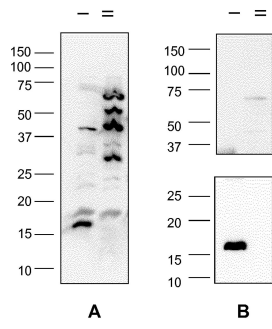
【 図 2 1 】



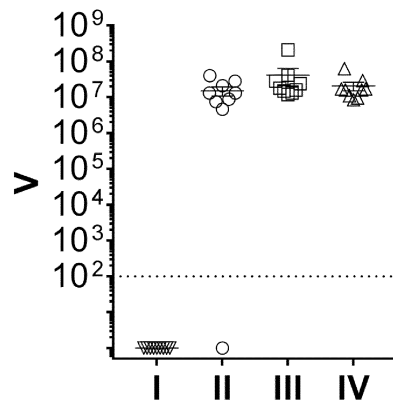
【 図 2 3 】



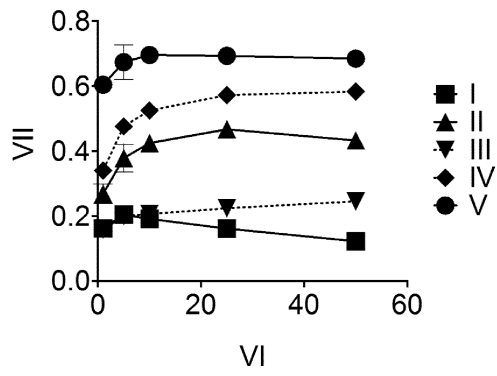
【 2 4 】



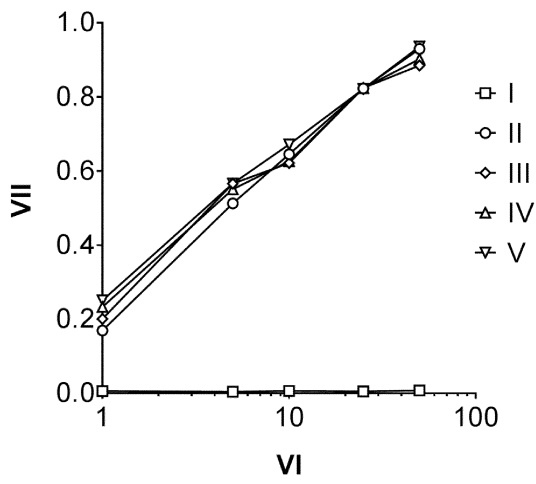
【 2 6 】



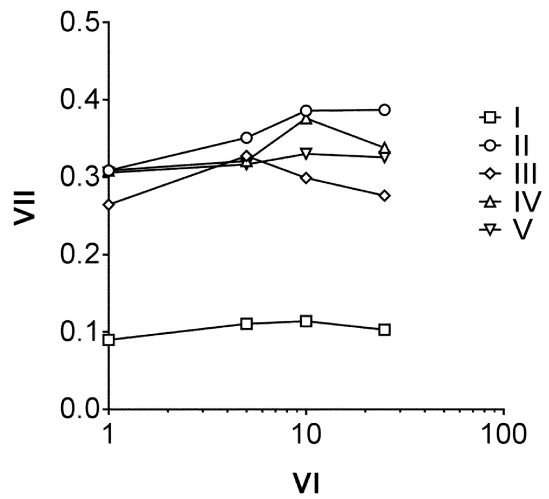
【 2 5 】



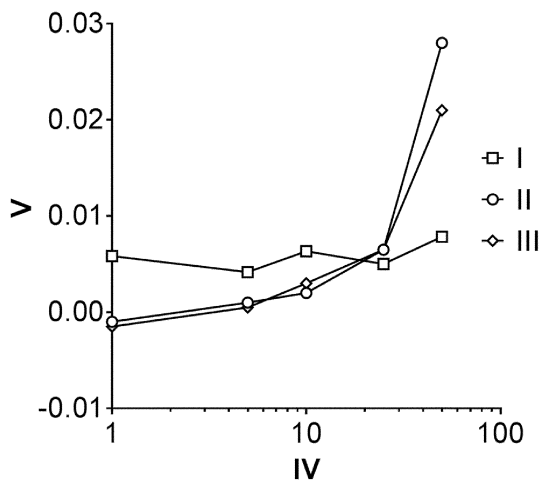
【 2 7 】



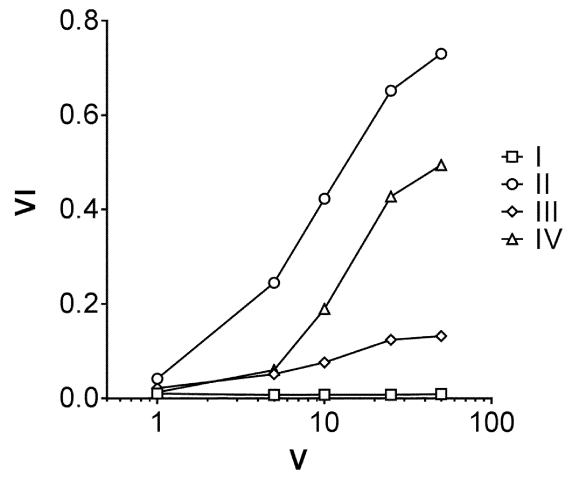
【 2 8 】



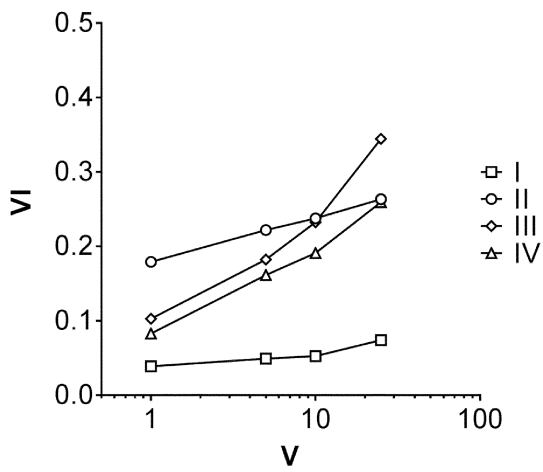
【 図 29 】



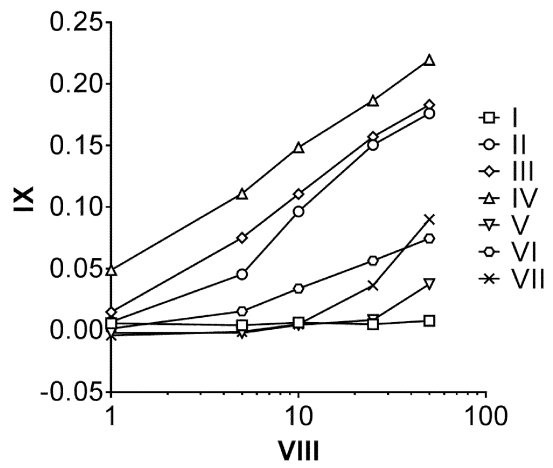
【 図 30 】



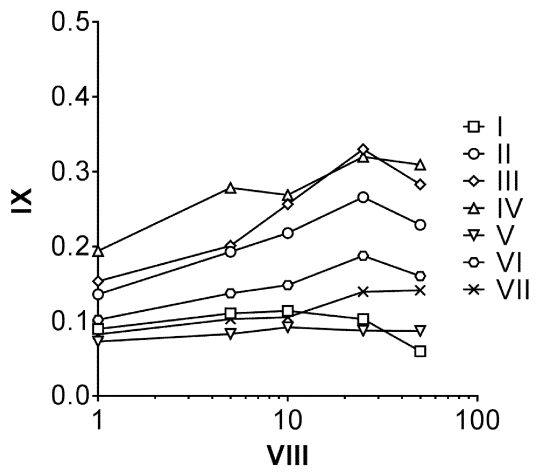
【 図 31 】



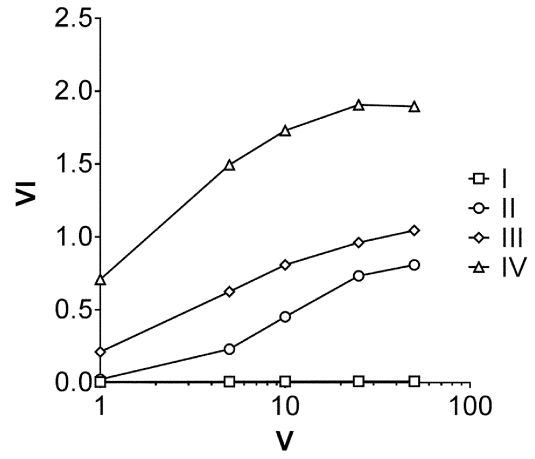
【 図 32 】



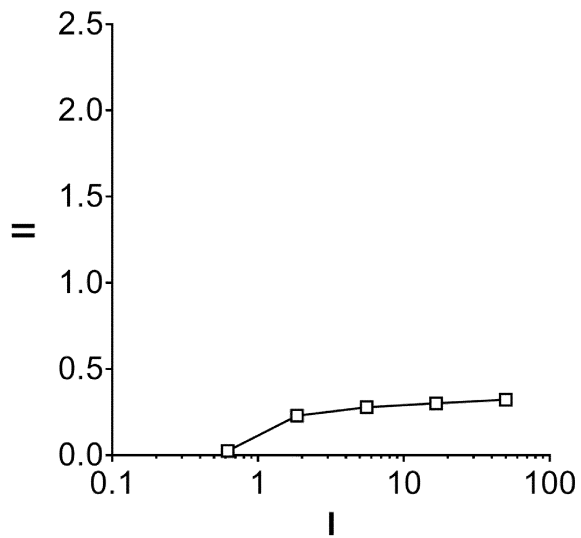
【 図 3 3 】



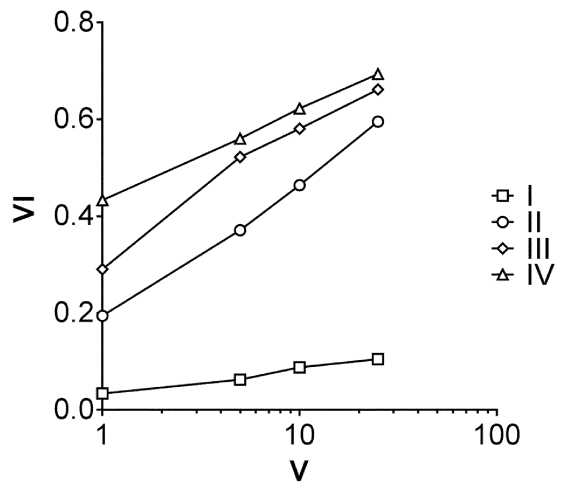
【 図 3 4 】



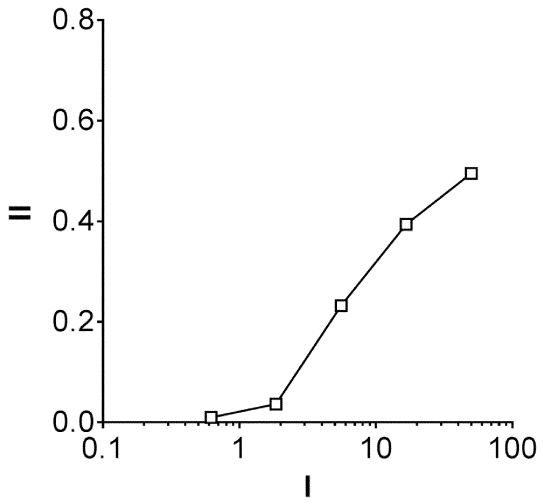
【 図 3 5 】



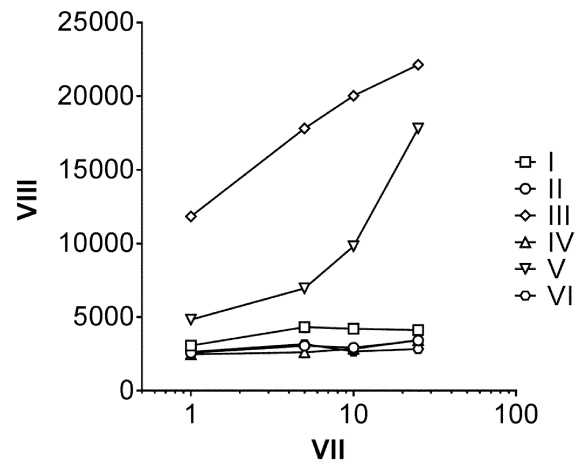
【 図 3 6 】



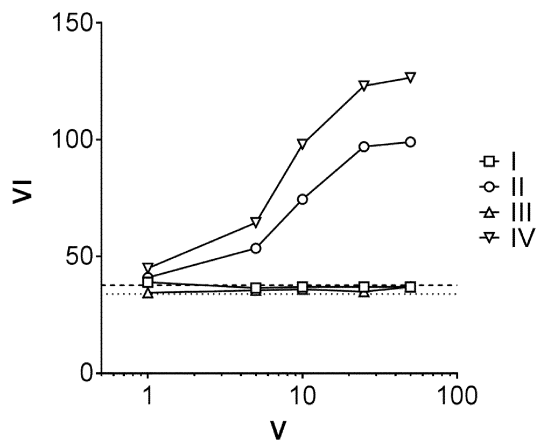
【 図 3 7 】



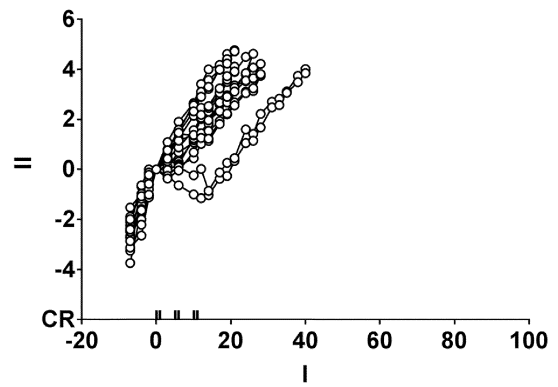
【 図 3 8 】



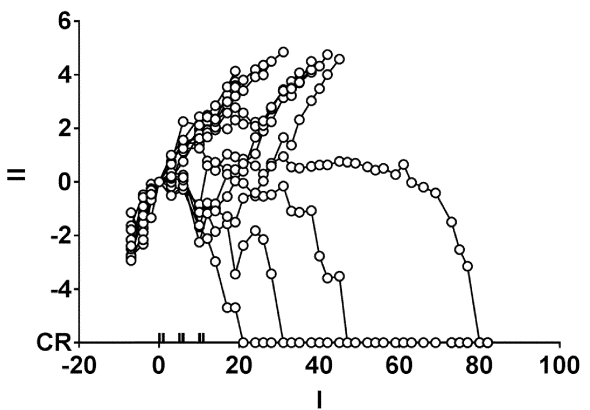
【 図 3 9 】



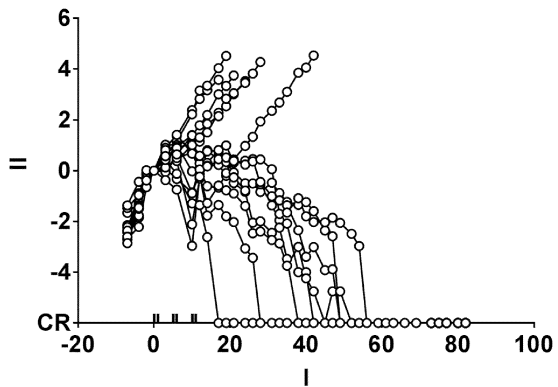
【 図 4 0 】



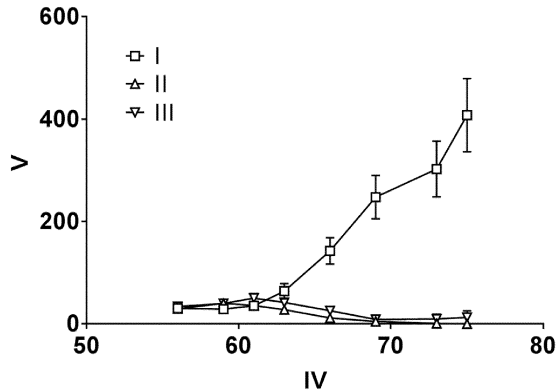
【 図 4 1 】



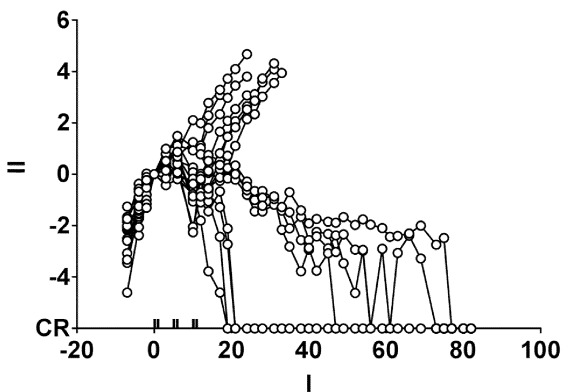
【 4 2 】



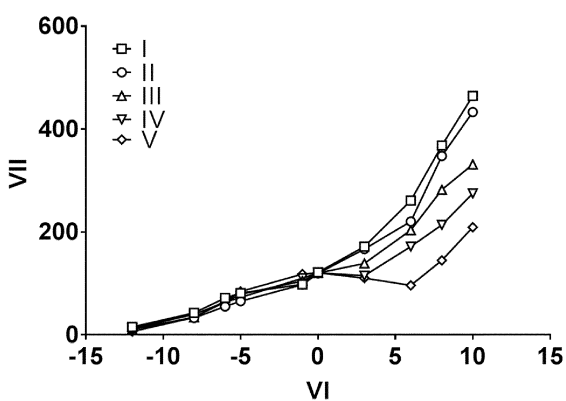
【 4 4 】



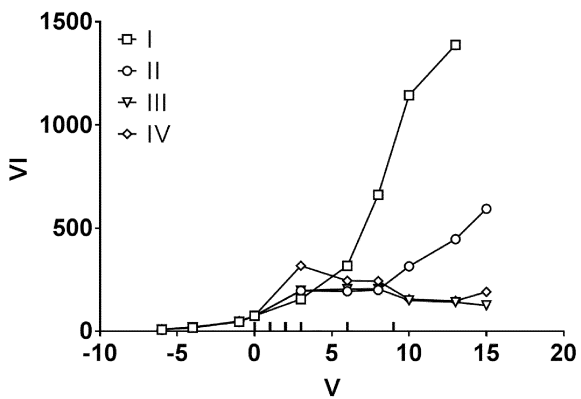
【 4 3 】



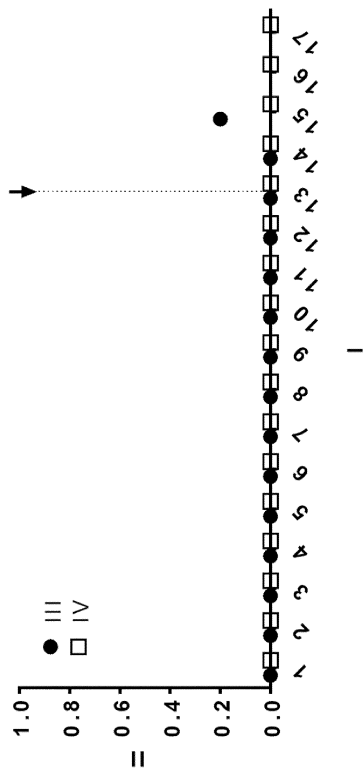
【 4 5 】



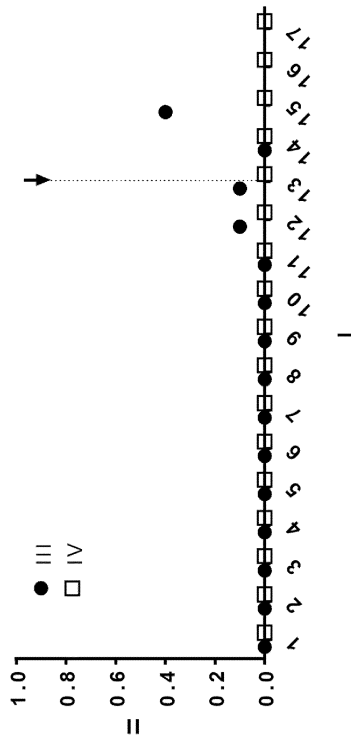
【 4 6 】



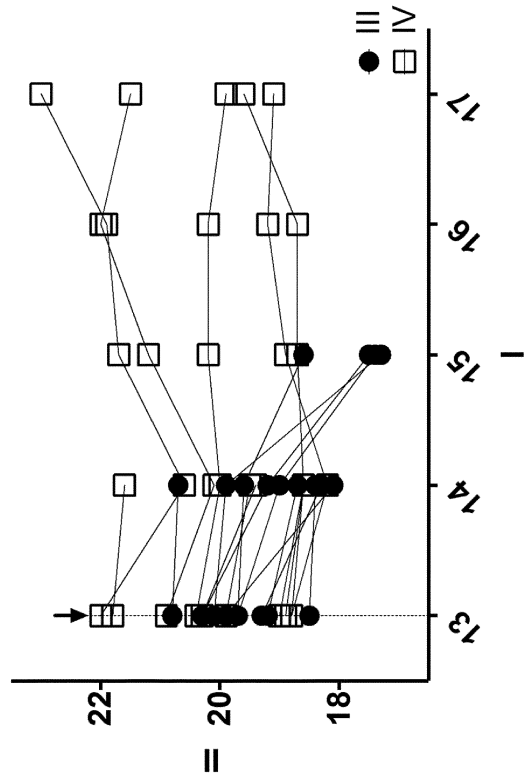
【 4 7 】



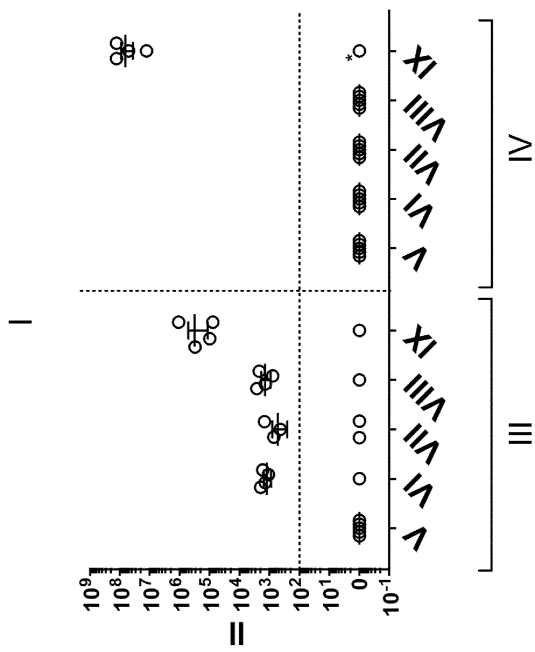
【 図 48 】



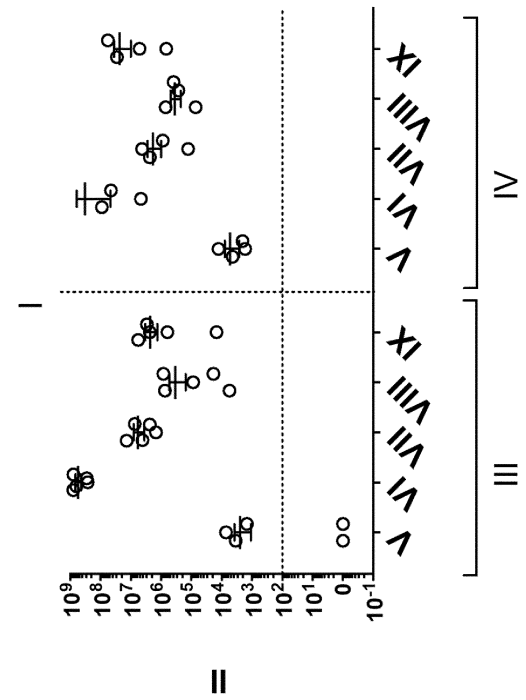
【 図 49 】



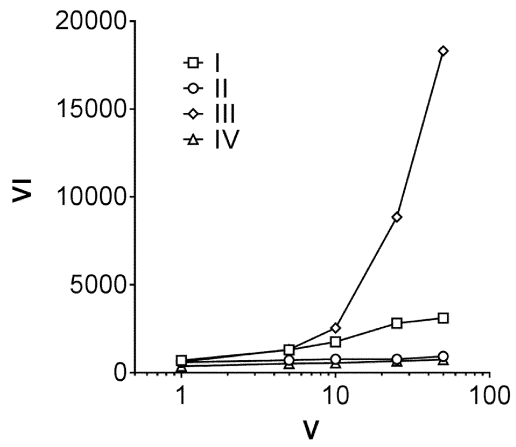
【 図 50 】



【 図 51 】



【 図 5 2 】



【 配列表 】

0006976351000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 カスペル, クリストフ
スイス国 4600 オルテン, ルッティガーヴェーク 4

審査官 中山 基志

(56)参考文献 特表2002-508939(JP,A)
特表2009-510169(JP,A)
国際公開第2015/177197(WO,A1)
特許第3801389(JP,B2)
特表2016-510595(JP,A)
Xian-Yang Li, He-Zhou Guo & Jiang Zhu, Tumor suppressor activity of RIG-I, Molecular & Cellular Oncology, 2014, 1:4, e968016

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N1/00-7/08
C12N15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
PubMed