



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118813511 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 22

(21) 申请号 202410943767.1

C12N 15/24 (2006.01)

(22) 申请日 2017.09.02

C12N 15/17 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12R 1/01 (2006.01)

62/383,079 2016.09.02 US

(62) 分案原申请数据

201780054190.7 2017.09.02

(71) 申请人 英特瑞克斯顿阿克图比奥帝克斯有限公司

地址 比利时兹威纳尔德

(72) 发明人 P·罗蒂尔斯 L·斯蒂德勒

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

专利代理师 陶家蓉 陈扬扬

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

权利要求书1页 说明书50页

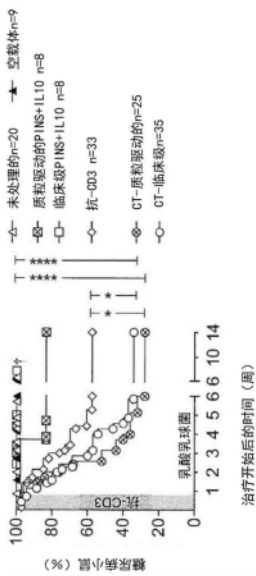
序列表 (电子公布) 附图41页

(54) 发明名称

稳定表达IL-10和胰岛素的遗传修饰的细菌

(57) 摘要

本公开提供了微生物,如乳酸菌(例如,乳酸乳球菌(Lactococcus lactis)),其包含编码IL-10多肽的外源性核酸和编码T1D特异性抗原(例如,胰岛素原)多肽的外源性核酸,其中两种外源性核酸被整合到细菌染色体中。这类微生物菌株适合用于人类治疗。本公开还提供了组合物(例如,药物组合物)使用微生物和组合物的方法,例如,用于治疗1型糖尿病(T1D)的方法,包括具有残留的 β 细胞功能的那些T1D,例如,最近发生的T1D。可以口服给予微生物,将微生物递送至胃肠道,其在其中释放并表达生物活性的多肽,本公开的方法特别适用于具有残留的 β 细胞功能的对象,例如,对于患有最近发生的T1D的对象。



1. 一种乳酸菌 (LAB), 其包含编码人白介素-10 (hIL-10) 的外源性核酸和编码人胰岛素原 (hPINS) 的外源性核酸, 其中所述编码hIL-10的外源性核酸和编码hPINS的外源性核酸经染色体整合。

2. 如权利要求1所述的LAB, 其中, 所述LAB是乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)。

3. 如权利要求1所述的LAB, 其中, 所述hIL-10当以不存在信号肽的成熟hIL-10分泌时, 其在2位包含丙氨酸 (Ala) 而非脯氨酸 (Pro)。

4. 如权利要求1所述的LAB, 其中, 所述hIL-10具有与SEQ ID NO:1至少95%相同性的氨基酸序列, 或者其中所述编码IL-10的外源性核酸具有与SEQ ID NO:2至少95%相同性的核苷酸序列。

5. 如权利要求4所述的LAB, 其中, 所述编码hIL-10的外源性核酸还编码与hIL-10偶联的分泌序列, 其中所述分泌序列是未鉴定的分泌的45-kDa蛋白质 (Usp45) (SSusp45)。

6. 如权利要求4所述的LAB, 其中, 所述编码hIL-10的外源性核酸位于h11A启动子 (Ph11A) 如乳酸乳球菌Ph11A的3' 处。

7. 如权利要求4所述的LAB, 其包含含有h11A启动子的表达盒, 其转录偶联hIL-10的SSusp45, 其中所述表达盒在thyA基因座处经染色体整合。

8. 如权利要求1所述的LAB, 其中, 所述hPINS具有与SEQ ID NO:3至少95%相同性的氨基酸序列, 或者其中所述编码hPINS的外源性核酸具有与SEQ ID NO:4至少95%相同性的核苷酸序列。

9. 如权利要求8所述的LAB, 其中, 所述编码hPINS的外源性核酸还编码与hPINS偶联的分泌序列, 其中所述分泌序列是未鉴定的分泌的45-kDa蛋白质 (Usp45) (SSusp45)。

10. 如权利要求8所述的LAB, 其中, 所述编码hPINS的外源性核酸包含第一多顺反子表达盒, 其包含位于gapB基因5' 处的gapB启动子, hPINS分泌序列, 和所述编码hPINS的外源性核酸。

稳定表达IL-10和胰岛素的遗传修饰的细菌

[0001] 相关申请的交叉援引

[0002] 本申请要求2016年9月2日提交的美国临时专利申请号62/383,079的申请日权益。

[0003] 序列表的引用

[0004] 本申请包含以ASCII格式电子提交的序列表,并通过引用全文纳入本文。2017年8月30日创建的所述ASCII拷贝,命名为205350_0032_WO_567020_ST25.txt,大小为43,027字节。

背景技术

[0005] 已经使用遗传修饰的微生物(例如,细菌)将治疗分子递送至粘膜组织。参见例如Steidler,L.,等,Nat.Biotechnol.2003,21(7):785-789;和Robert S.和Steidler L., Microb.Cell Fact.2014,13增补1:S11。

[0006] 之前已经描述了产生白介素10(IL-10)的乳酸菌,并且已经描述了粘膜给予的IL-10和/或胰岛素或胰岛素原用于治疗1型糖尿病(T1D)。参见例如,国际专利申请公开号W0 2007/063075;Robert S.等,Diabetes 2014,63:2876-2887;Steidler等, Nat.Biotechnol.2003,21(7):785-789;和Takiishi T.等,J.Clin.Invest.2012,122(5): 1717-1725。

[0007] 然而,本领域仍然需要这样的经遗传修饰的细菌菌株,其稳定、组成型表达超过一种生物活性的多肽并且适合用于临床应用,例如,用于治疗T1D。本发明解决了这些需要。

发明内容

[0008] 本公开提供了遗传修饰的微生物,其包含编码IL-10和胰岛素原(PINS)的经染色体整合的核酸,制备这类微生物的方法,以及使用这类微生物的方法。这些遗传修饰的微生物可以适用于人类疗法,包括但不限于治疗糖尿病,例如,T1D。

[0009] 微生物和组合物

[0010] 本公开提供了微生物,例如,革兰氏阳性菌,如乳酸菌(LAB),其包含编码白介素-10(IL-10)多肽的外源性核酸,和编码T1D特异性抗原如胰岛素原(PINS)多肽的外源性核酸,其中编码IL-10多肽的外源性核酸和编码T1D特异性抗原(例如,PINS多肽)的外源性核酸两者经染色体整合,即,被整合到细菌染色体中(或位于其上)。

[0011] 微生物可以是革兰氏阳性细菌,如LAB。所述LAB可以是乳球菌(Lactococcus)种细菌。在一些实施方式中,LAB是乳杆菌(Lactobacillus)种或双歧杆菌(bifidobacteria)种。在一些实施方式中,LAB可以是乳酸乳球菌(Lactococcus lactis)。所述LAB可以是乳酸乳球菌乳脂亚种(Lactococcus lactis subspecies cremoris)。另一示例性LAB是乳酸乳球菌株MG1363。参见例如,Gasson,M.J.,J.Bacteriol.1983,154:1-9。

[0012] 在根据上述实施方式中任一项的一些实例中,IL-10多肽是人IL-10(hIL-10)。在其他实例中,IL-10是IL-10变体多肽,例如,包括至少1个点突变,例如,以增加细菌的IL-10多肽表达。在根据上述实施方式中任一项的一些实例中,IL-10是“成熟”人IL-10(hIL-10),

即,不存在其信号肽。在一些实施方式中,当对成熟肽中氨基酸进行计数时,hIL-10在2位包含脯氨酸(Pro)到丙氨酸(Ala)取代。参见例如SEQ ID NO:1。这类多肽述于例如Steidler等,Nat.Biotechnol.2003,21(7):785-789中,其公开内容通过引用其全部内容纳入本文。在一些实例中,IL-10多肽是野生型人IL-10。在其他实例中,IL-10多肽是不存在其自身信号肽的野生型人IL-10,并且具有与SEQ ID NO:1至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同性的氨基酸序列。在其他实例中,编码IL-10多肽的外源性核酸具有与SEQ ID NO:2至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同性的核苷酸序列。

[0013] 在根据任何上述实施方式中任一项的一些实例中,T1D特异性抗原多肽是PINS多肽,如人PINS(hPINS),例如,野生型PINS。在一些实例中,PINS多肽具有与SEQ ID NO:5至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同性的氨基酸序列。野生型PINS可由这样的核苷酸序列编码,所述核苷酸序列与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在其他实例中,PINS多肽是不存在其信号肽的人PINS,并且具有与SEQ ID NO:3至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同性的氨基酸序列。在其他实例中,编码PINS多肽的外源性核酸具有与SEQ ID NO:4至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同性的核苷酸序列。

[0014] 在根据任何上述实施方式中任一项的一些实例中,微生物(例如,LAB)表达(例如,组成型表达)IL-10多肽。在其他实例中,微生物(例如,LAB)组成型表达并分泌IL-10多肽(例如,hIL-10)。在根据任何上述实施方式中任一项的一些实例中,LAB组成型表达T1D特异性抗原多肽(例如,PINS多肽)。在其他实例中,微生物(例如,LAB)组成型表达并分泌T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽。在其他实例中,微生物(例如,LAB)组成型表达并分泌IL-10多肽(例如,hIL-10)和T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽(例如,hPINS)。

[0015] 在根据任何上述实施方式中任一项的一些实例中,编码hIL-10多肽的外源性核酸位于h11A启动子(Ph11A)如乳酸乳球菌Ph11A的3'处。在根据该实施方式中的一些实例中,编码IL-10多肽的外源性核酸由Ph11A转录调节。在其他实例中,LAB包括IL-10表达盒,其包含Ph11A启动子(例如,乳酸乳球菌Ph11A),IL-10分泌序列(例如,位于Ph11A的3'处),和编码IL-10多肽的外源性核酸(例如,位于IL-10分泌序列的3'处)。在一些实例中,IL-10表达盒经染色体整合。在一些实例中,IL-10表达盒经染色体整合,从而替换或部分替换另一基因。在根据该实施方式的一些实例中,IL-10表达盒在thyA基因座处经染色体整合,例如替换内源性thyA基因,如Steidler等,Nat.Biotechnol.2003,21(7):785-789中所述。在根据上述实施方式中任一项的一些实例中,IL-10分泌序列是编码未鉴定的分泌的45-kDa蛋白质(Usp45)的分泌前导序列的核苷酸序列。这类分泌序列在本文中称之为SSusp45。在一些实例中,SSusp45具有与SEQ ID NO:10至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同性的氨基酸序列。在一些实例中,SSusp45由这样的核酸序列编码,所述核酸序列与SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在一些实例中,IL-10表达盒中的SSusp45由这样的核酸序列编码,所述核酸序列与SEQ ID NO:11至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同。在一些实例中,IL-10表达盒这样阐释:Ph11A>>

SSusp45>>hIL-10。示例性的IL-10表达盒的核苷酸序列述于图11。

[0016] 在根据任何上述实施方式中任一项的一些实例中,编码T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽的外源性核酸位于gapB启动子的3'处,例如,对微生物(例如,LAB)为内源性的gapB启动子。在根据任何上述实施方式中任一项的其他实例中,编码T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽的外源性核酸受gapB启动子转录调节。在其他实例中,编码T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽的外源性核酸位于gapB基因(gapB)和其gapB启动子的3'。在其他实例中,LAB包含第一多顺反子表达盒(例如,双顺反子),其包含位于gapB基因5'处的gapB启动子,T1D特异性抗原分泌序列(例如,PINS分泌序列)(例如,位于gapB的3'处),和编码T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽的外源性核酸(例如,PINS分泌序列的3'处)。在根据该实施方式的一些实例中,多顺反子表达盒还包括基因间区域,例如,gapB和PINS分泌序列之间。在根据任何上述实施方式中任一项的一些实例中,gapB启动子和gapB基因对微生物(例如,LAB)是内源性的。在一些实例中,PINS分泌序列是SSusp45。在上述实施方式的其他实例中,第一多顺反子表达盒经染色体整合。在其他实例中,第一多顺反子表达盒这样阐释:PgapB>>gapB>>基因间区域>>SSusp45>>PINS。在根据上述实施方式中任一项的一些实例中,第一多顺反子表达盒中的基因间区域是rpmD基因5'基因间区域(即,rpmD前的区域)。在根据上述实施方式中任一项的一些实例中,rpmD具有SEQ ID NO:8的核苷酸序列(其包括第一基因的终止密码子,以及第二基因的起始密码子)。不存在起始和终止密码子的情况下,基因间区域rpmD具有根据SEQ ID NO:9的核酸序列。

[0017] 在根据上述实施方式中任一项的一些实例中,微生物(例如,LAB)还包含编码海藻糖-6-磷酸磷酸酶的外源性核酸,例如,otsB,如大肠杆菌otsB。在根据任何这些实施方式的一些实例中,编码海藻糖-6-磷酸磷酸酶的外源性核酸经染色体整合。在一些实例中,编码海藻糖-6-磷酸磷酸酶的外源性核酸经染色体整合未鉴定分泌的45-kDa蛋白质基因(usp45)的3'。在根据该实施方式的一些实例中,LAB包含第二多顺反子表达盒,其包含usp45启动子,usp45基因(例如,启动子的3'),和编码海藻糖-6-磷酸磷酸酶的外源性核酸(例如,usp45基因的3')。在一些实例中,第二多顺反子表达盒进一步包含介于usp45基因和编码海藻糖-6-磷酸磷酸酶的外源性核酸之间的基因间区域。在一些实例中,第二多顺反子表达盒这样阐释:Pusp45>>usp45>>基因间区域>>otsB。在根据这些实施方式的一些实例中,基因间区域是如本文上述的rpmD(例如,具有SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9)。然后,第二多顺反子表达盒可以这样阐释:Pusp45>>usp45>>rpmD>>otsB。

[0018] 在根据任何上述实施方式的一些实例中,在微生物(例如,LAB)中破坏或失活海藻糖-6-磷酸磷酸酶基因(trePP)。例如,已经通过去除trePP基因或其片段将trePP失活,或已经通过插入终止密码子将trePP破坏。因此,在根据这些实施方式的一些实例中,微生物(例如,LAB)缺少trePP活性。

[0019] 在根据任何上述实施方式的其他实例中,已经在微生物(例如,LAB)中破坏或失活纤维二糖特异性PTS系统IIC组分基因(ptcC)。例如,已经通过插入终止密码子破坏ptcC,或已经通过去除ptcC或其片段使ptcC失活。因此,在根据这些实施方式的一些实例中,微生物(例如,LAB)缺少ptcC活性。

[0020] 在根据任何上述实施方式中任一项的一些实例中,LAB进一步包含编码一个或多个海藻糖转运体的一个或多个基因。在一些实例中,编码一个或多个海藻糖转运体的一个

或多个基因对LAB为内源性的。在一些实例中,LAB过表达编码一个或多个海藻糖转运体的一个或多个基因。在根据这些实施方式的一些实例中,编码一个或多个海藻糖转运体的一个或多个基因位于外源性启动子例如h11A启动子(Ph11A)的3'处。例如,编码一个或多个海藻糖转运体的一个或多个基因受Ph11A转录调节。在根据这些实施方式的一些实例中,编码一个或多个海藻糖转运体的一个或多个基因选自11mg_0453、11mg_0454和其任何组合。在一些实例中,11mg_0453和11mg_0454由Ph11A转录调节。

[0021] 在一些实例中,根据上述实施方式中任一项,编码一个或多个海藻糖转运体的一个或多个基因包含编码两个海藻糖转运体的两个基因,其中基因间区域位于两个基因之间。在一些实例中,基因间区域是rpmD,例如,具有SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9。在一些实例中,微生物(例如,LAB)包含多顺反子表达盒,其包含编码两个不同海藻糖转运体(转运体1和转运体2序列)的两个核酸序列(例如,基因)以及介于编码两个不同海藻糖转运体的两个核酸之间的基因间区域。这类表达盒可以这样阐释:Ph11A>>转运体1>>基因间区域>>转运体2。在根据这些实施方式的一些实例中,基因间区域是如本文上述的rpmD(例如,具有SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9)。然后,多顺反子表达盒可以这样阐释:Ph11A>>转运体1>>rpmD>>转运体。

[0022] 因此,在一些实施方式中,LAB在单个菌株中包含数个有用的特征。在一实施方式中,LAB是乳酸乳球菌,其包含

[0023] (A) 染色体整合的启动子>>分泌信号>>治疗性蛋白质,如白介素、抗原或酶;

[0024] (B) 染色体整合的启动子>>信号肽>>任意的第二治疗性蛋白质。

[0025] (C) 突变和插入的组合以促进海藻糖累积,其将增强LAB针对胆汁盐和干燥的生存能力。这些突变选自:

[0026] (i) 一个或多个染色体整合的海藻糖转运体,如Ph11A>>转运体1>>基因间区域>>转运体2,如11mg_0453和/或11mg_0454,用于摄取海藻糖;

[0027] (ii) 位于usp45(Gene ID:4797218)下游的染色体整合的海藻糖-6-磷酸磷酸酶基因(otsB;Gene ID:1036914)以促进海藻糖-6-磷酸转化为海藻糖;

[0028] (iii) 失活的(例如,通过基因缺失)海藻糖-6-磷酸磷酸酶基因(trePP;GeneID:4797140);和

[0029] (iv) 失活的纤维二糖特异性PTS系统IIC组分(Gene ID:4796893),ptcC,(例如,446的密码子位置30处的tga;tga30)。

[0030] LAB可以包含用于生物容纳的营养缺陷型突变,如thyA。

[0031] 在一实施方式中,LAB是乳酸乳球菌,其包含

[0032] (A) 染色体整合的启动子>>分泌信号>>hIL-10以由LAB分泌成熟hIL-10,如Ph11A>>SSusp45>>hIL-10;

[0033] (B) 染色体整合的启动子>>分泌信号>>PINS,以由LAB分泌成熟PINS;如PgapB>>gapB>>基因间区域>>SSusp45>>PINS。基因间区域可以是,例如,rpmD;

[0034] (C) 突变和插入的组合以促进海藻糖累积,其将增强LAB针对胆汁盐和干燥的生存能力。这些突变选自:

[0035] (i) 一个或多个染色体整合的海藻糖转运体,如Ph11A>>转运体1>>基因间区域>>转运体2,如11mg_0453和/或11mg_0454,用于摄取海藻糖;

[0036] (ii) 位于usp45 (Gene ID:4797218) 下游的染色体整合的海藻糖-6-磷酸磷酸酶基因 (otsB; Gene ID:1036914) 以促进海藻糖-6-磷酸转化为海藻糖;

[0037] (iii) 失活的 (例如, 通过基因缺失) 海藻糖-6-磷酸磷酸酶基因 (trePP; GeneID: 4797140); 和

[0038] (iv) 失活的纤维二糖特异性PTS系统IIC组分 (Gene ID:4796893), ptcC, (例如, 446的密码子位置30处的tga;tga30)。

[0039] LAB也可以包含用于生物容纳的营养缺陷型突变, 如thyA。

[0040] 在一实施方式中, LAB是乳酸乳球菌, 其具有:

[0041] (A) thyA突变, 用于生物容纳

[0042] (B) 染色体整合的Phl1A>>SSusp45>>hIL-10以由LAB分泌成熟hIL-10;

[0043] (C) 染色体整合的PgapB>>gapB>>基因间区域>>SSusp45>>PINS, 其中基因间区域选自rpmD, 以由LAB分泌成熟PINS;

[0044] (D) 一个或多个染色体整合的海藻糖转运体, 如Phl1A>>转运体1>>基因间区域>>转运体2, 如llmg_0453和/或llmg_0454, 用于摄取海藻糖;

[0045] (E) 失活的 (例如, 通过基因缺失) 海藻糖-6-磷酸磷酸酶基因 (trePP; Gene ID:

[0046] 4797140);

[0047] (F) 染色体整合的海藻糖-6-磷酸磷酸酶基因 (otsB; Gene ID:1036914) (位于

[0048] usp45 (Gene ID:4797218) 下游处以促进海藻糖-6-磷酸转化为海藻糖; 和

[0049] (G) 失活的纤维二糖特异性PTS系统IIC组分 (Gene ID:4796893), ptcC, (例如, 446的密码子位置30处的tga;tga30)。

[0050] 本公开还提供了包含本文所述微生物 (例如, LAB) 的组合物, 例如, 根据上述实施方式中任一项的微生物 (例如, LAB)。

[0051] 本公开还提供了包含本文所述微生物 (例如, LAB) 的药物组合物, 例如, 根据上述实施方式中任一项的微生物 (例如, LAB), 并且还包含药学上可接受的运载体。

[0052] 本公开还提供了微生物悬浮液 (例如, 细菌悬浮液), 其包含根据上述实施方式中任一项的微生物 (例如, LAB), 并且还包含溶剂和稳定剂。在根据该实施方式的一些实例中, 溶剂选自水、油及其任意组合。例如, 本公开提供了细菌悬浮液, 其包含本公开的LAB, 水性混合物 (例如, 饮品) 和稳定剂。示例性的稳定剂选自蛋白质或多肽 (例如, 糖蛋白), 肽, 单糖、二糖或多糖, 氨基酸, 凝胶, 脂肪酸, 多元醇 (例如, 山梨醇, 甘露醇或纤维醇), 盐 (例如, 氨基酸盐) 或其任何组合。

[0053] 本公开还提供了如本文所述的微生物 (例如, 根据上述实施方式中任一项的LAB), 如本文所述的组合物, 或如本文所述的药物组合物, 用于治疗1型糖尿病 (T1D)。

[0054] 本公开还提供了如本文所述的微生物 (例如, 根据上述实施方式中任一项的LAB), 如本文所述的组合物, 或如本文所述的药物组合物, 在制备药物中的用途, 例如, 用于治疗疾病, 例如, 自身免疫疾病, 如1型糖尿病 (T1D)。

[0055] 方法1: 治疗疾病的方法

[0056] 本公开还提供了在有此需要的对象中治疗T1D的方法。示例性的方法包括向对象给予治疗有效量的如本文所公开的微生物 (例如, LAB) (例如, 根据上述实施方式中任一项所述的LAB), 如本文所公开的组合物或如本文所公开的药物组合物。在根据这些实施方式

中任一项的一些实例中,对象是人,例如,人患者。在根据这些实施方式中任一项的一些实例中,该方法进一步包括向对象给予免疫调节剂(例如,抗-CD3抗体)。例如,使用共治疗方案向对象给予免疫调节剂(例如,抗-CD3抗体),即,同时用另一免疫调节剂如抗-CD3抗体处理对象(例如,人)。因此,在该实例中,本公开提供了在有此需要的人对象中治疗T1D的方法。示例性的方法包括向人对象给予治疗有效量的如本文所公开的LAB(例如,根据上述实施方式中任一项所述的LAB),如本文所公开的组合物或如本文所公开的药物组合物,其中,进一步给予人对象抗-CD3抗体(例如,同时用抗-CD3抗体处理)。

[0057] 在一些实例中,抗-CD3抗体是单克隆抗体。在其他实例中,抗-CD3抗体是人源化单克隆抗体。在其他实例中,抗-CD3抗体是奥特力昔珠单抗(otelixizumab)或特普利珠单抗(teplizumab)。在一些实例中,当与LAB作为组合法给予时,抗-CD3抗体以不同于单一疗法常用的剂量给予对象。用于组合疗法的抗-CD3的最佳剂量可以通过动物模型和临床试验确定。优选地,抗-CD3的剂量小于用抗-CD3抗体的有效单一疗法通常所需的剂量,即,亚治疗剂量。可以确定对单一疗法有效的剂量,通过参照动物模型和临床试验,和通过本领域技术人员的实践,并且可以是监管批准的剂量。在一些实例中,向进行用LAB的组合法的对象给予这样剂量的抗-CD3,其比单一疗法中抗-CD3的标准剂量小至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%。在其他实例中,组合法中给予的抗-CD3的剂量比单一疗法中抗-CD3的剂量少约10-100%、少约10-90%、少约10-70%、少约10-60%、少约10-50%、少约50-100%或少约20-50%。实验已经显示,48或64mg奥特力昔珠单抗的6个每日剂量在36个月可以足以抑制T细胞活性,治疗组比安慰剂对照保留多80%的 β 细胞功能。然而,这样的剂量与潜在的EB感染的再活化相关。3.1mg/天剂量进行8天并不保护 β -细胞功能。因此,比48mg少至少10%的治疗(即,43mg)将会被认为是“亚治疗”。

[0058] 在一些实施方式中,上述方法中的哺乳动物对象最近已被诊断患有T1D(即患有最近发生的T1D)。在根据这些实施方式的一些实例中,对象可能在给予微生物(例如,LAB)之前的前12个月,前24个月或前36个月内已经诊断为患有T1D。

[0059] 在根据方法1的实施方式中任一项的一些实例中,该方法进一步包括在对象,例如,对象的器官或血液中测量临床标志物(例如,免疫生物标志物)。例如,该方法可以进一步包括测量对象血液中的T1D相关抗体。在一些实例中,该方法可以进一步包括测量对象血液中的胰岛素自身抗体(IAA)。在一些实例中,对象血液中IAA的量指示T1D疾病进展,例如,对象是否可以被分类成具有最近发生的T1D,并且可以指示对象是否将有可能受益于治疗。因此,测量IAA可以发生在将微生物给予对象之前。在一些实例中,疾病发作时IAA阳性预测阳性治疗结果。然而,测量IAA还可以用于监测和测量治疗的结果,并且可以因此在治疗期间(例如,间隔的整个治疗期)以监测治疗效率或结果和/或在治疗期后,例如,以监测对象在治疗停止后是否保持治疗结果(例如,正常血糖)。在一些实例中,IAA阳性的下降指示阳性治疗结果。在其他实例中,方法进一步包括测量对象中的调节T细胞。调节T细胞包括Treg17、Tr1 Th3、CD8⁺CD28⁻、Qa-1限制性T cells、CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺和/或CD4⁺Foxp3⁺CD25⁻T细胞。优选地,CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺和/或CD4⁺Foxp3⁺CD25⁻T细胞。在其他实例中,方法进一步包括测量对象中的初始血液葡萄糖浓度(blood glucose)。在其他实例中,方法进一步包括测量对象中的C-肽水平。

[0060] 在相关实施方式中,本发明是这样的方法,其增加Treg细胞活性以抑制对 β 细胞和/或T1D相关抗原的自身免疫应答,优选地,抑制对所有T1D相关抗原的自身免疫应答。在其他实施方式中,本发明是这样的方法,其基本上减少,优选停止对 β 细胞和/或任何T1D相关抗原的自身免疫应答。优选地,自身免疫应答中的显著减少导致疾病进展的显著减少或停止。

[0061] 在上述方法中任一项的一些实施方式中,口服给予对象微生物(例如,LAB)。例如,微生物(例如,LAB)以用于口服给予的药物组合物的形式(例如,胶囊、片剂、颗粒或液体)给予对象,其包含微生物(例如,LAB)和药物学上可接受的运载体。在其他实例中,微生物(例如,LAB)以食物产品的形式给予对象或添加到食物(例如,饮品)。在其他实例中,微生物(例如,LAB)以膳食补充品的形式给予对象。在其他实例中,微生物(例如,LAB)以栓剂产品的形式给予对象。在一些实例中,本公开的组合物适用于多肽的粘膜递送,其通过微生物(例如,LAB)表达。例如,可以配制组合物用于在对象的胃肠道(例如,肠)中有效释放。

[0062] 根据上述实施方式中任一项,本公开还提供了用于在有此需要取得对象中建立对T1D特异性抗原(例如,PINS)耐受的方法。示例性的方法包括向对象给予治疗有效量的如本文所公开的微生物(例如,LAB)(例如,根据上述实施方式中任一项所述的LAB),如本文所公开的组合物或如本文所公开的药物组合物。在根据这些实施方式中任一项的一些实例中,对象是人,例如,人患者。

[0063] 根据上述实施方式中任一项,本公开还提供了用于在有此需要的对象中减少IAA的方法,或用于在有此需要的对象中增加 $CD4^+Foxp3^+$ T细胞数量的方法。示例性的方法包括向对象给予治疗有效量的如本文所公开的微生物(例如,LAB)(例如,根据上述实施方式中任一项所述的LAB),如本文所公开的组合物或如本文所公开的药物组合物。在根据这些实施方式中任一项的一些实例中,对象是人,例如,人患者。

[0064] 在一些实例中,向对象给予治疗有效量的本公开的微生物(例如,LAB)和本公开的抗-CD3抗体(例如,根据上述方法中的任一项),减少给予(即必需给予)对象的胰岛素量以控制血液葡萄糖水平或维持特定血液葡萄糖水平(例如,如医师所推荐的,或通常认为是安全的)。例如,向对象给予治疗有效量的本公开的微生物(例如,LAB)和本公开的抗-CD3抗体(例如,根据上述方法中的任一项),当与未给予微生物(例如,LAB)和抗-CD3抗体的对应对象所需胰岛素量相比时,或当与用抗-CD3抗体单独处理的对应对象所需胰岛素量相比时,减少控制对象中血液葡萄糖水平或维持特定血液葡萄糖水平所需的胰岛素的量。

[0065] 在其他实例中,向对象给予治疗有效量的本公开的微生物(例如,LAB)和本公开的抗-CD3抗体(例如,根据上述方法中的任一项),在对象中保留 β 细胞功能(例如,保留在治疗开始测量的 β 细胞功能)在对象中例如使用本领域认可的方法测量。本文还描述了用于测量 β 细胞功能的示例性方法(例如,使用C-肽水平)。在一些实例中,对象中的 β 细胞功能在开始给予微生物(例如,LAB)和抗-CD3抗体后保留至少约2个月、至少约4个月、至少约6个月、至少约8个月、至少约10个月、至少约12个月、至少约14个月、至少约16个月、至少约18个月、至少约20个月、至少约22个月或至少约24个月。在其他实例中,向对象给予治疗有效量的本公开的微生物(例如,LAB)和本公开的抗-CD3抗体(例如,根据上述方法中的任一项),当与未给予微生物(例如,LAB)和抗-CD3抗体的对应对象中保留 β 细胞功能的时间相比时,或当与用抗-CD3抗体单独处理的对应对象相比时,增加对象中保留 β 细胞功能的时间。

[0066] 在其他实例中,向对象给予治疗有效量的本公开的微生物(例如,LAB)和本公开的抗-CD3抗体(例如,根据上述方法中的任一项),在对象中维持正常的血糖,例如,使用本领域认可的方法测量。本文描述了与正常血糖关联的血液葡萄糖范围。例如,人对象中的正常血糖可以与两个126mg/dL或更少的连续快速血液葡萄糖测量关联。用于测量血液葡萄糖水平的示例性方法为本领域已知并且述于本文。在一些实例中,对象(经受治疗)中的正常血糖在开始给予微生物(例如,LAB)和抗-CD3抗体后保留至少约2个月、至少约4个月、至少约6个月、至少约8个月、至少约10个月、至少约12个月、至少约14个月、至少约16个月、至少约18个月、至少约20个月、至少约22个月或至少约24个月。在其他实例中,向对象给予治疗有效量的本公开的微生物(例如,LAB)和本公开的抗-CD3抗体(例如,根据上述方法中的任一项),当与未给予微生物(例如,LAB)和抗-CD3抗体的对应对象中维持正常血糖的时间相比时,或当与用抗-CD3抗体单独处理的对应对象中维持正常血糖相比时,增加对象中维持正常血糖的时间。

[0067] 在其他实例中,向对象给予治疗有效量的本公开的微生物(例如,LAB)和本公开的抗-CD3抗体(例如,根据上述方法中的任一项),在对象中维持正常的血红蛋白A1c(HbA1c)水平,例如,使用本领域认可的方法测量。在一些实例中,对象(经受治疗)中的正常HbA1c水平在给予微生物(例如,LAB)和抗-CD3抗体后维持至少约2个月、至少约4个月、至少约6个月、至少约8个月、至少约10个月、至少约12个月、至少约14个月、至少约16个月、至少约18个月、至少约20个月、至少约22个月或至少约24个月。

[0068] 在另一实施方式中,本发明的治疗性方法减缓疾病,从而相较于未治疗的对象,使经治疗的对象的高血糖症的频率和程度降低。这类降低可以是未处理的对象的10、20、30、40、50、60、70、80或90%。

[0069] 未处理的T1D随时间发育并且逐渐恶化,因为胰腺中的 β 细胞被破坏。因此,由于本文所述方法可以停止疾病,有利的是在疾病进展中尽可能早的治疗对象。疾病进程的这类标志物包括,但不限于,血糖指标,胰岛素自身抗体(IAA)水平、片段C水平和胰岛炎。因此,在一相关实施方式中,本发明的治疗性方法还包括在治疗前和治疗期间测量疾病的进展。

[0070] 例如,当在对象中测量到下述中任一项时,可以将人对象分类成具有早期发生的T1D: (1) 2次连续空腹血液葡萄糖测试等于或大于126mg/dL; (2) 当任何随机血液葡萄糖测量大于200mg/dL时; (3) 血红蛋白A1c(HbA1c)测试等于或大于6.5%(HbA1c是给予血液糖类3个月平均值的血液测试);或(4)具有超过200mg/dL的任何值的2小时口服葡萄糖耐受测试,或其组合。因此,可以通过下述中任一项表征正常的血糖: (1) 2次连续空腹血液葡萄糖测试低于126mg/dL,低于120mg/dL或低于100mg/dL; (2) 当任何随机血液葡萄糖测量低于200mg/dL、低于180mg/dL、低于160mg/dL或低于140mg/dL时; (3) 血红蛋白A1c(HbA1c)测试小于6.5%或小于6%;或(4)具有低于200mg/dL、低于180mg/dL、低于160mg/dL或低于140mg/dL的值的2小时口服葡萄糖耐受测试,或其任何组合。

[0071] 一旦疾病进展显著地下降(并且优选地中止,特别是对于是致病过程基础的自身免疫),通过方法可以进一步处理对象以恢复 β 细胞功能。因此,在进一步的实施方式中,对象可以用 β 细胞移植物和/或用药物处理,以引起内源性 β 细胞的增殖。因为该方法能够逆转作为T1D基础的自身免疫,所以该方法并不限于早期发生的糖尿病。一旦清除了破坏 β 细胞的自身免疫, β 细胞功能可以通过移植,和/或通过促进内源性 β 细胞的生长和发育恢复。因

此,该方法可以适用于患有慢性糖尿病的对象。

[0072] 在进一步的实施方式中,本发明的治疗性方法减缓疾病进展,从而使恶化的速率是未处理的疾病四分之三、一半、四分之一或更少。例如,这类恶化可以通过血糖指标、胰岛素自身抗体 (IAA) 水平、片段C水平和胰岛炎评估。

[0073] 在进一步的实施方式中,给予本发明的治疗性方法以预防T1D,如在任何临床症状之前给予。优选地,鉴定对象具有T1D风险因子,包括家族史,血液和尿液中糖水平升高(但是并非糖尿病)和对T1D相关抗原的抗体,并且随着时间推移这些标记物逐渐恶化。

[0074] 方法2:制备遗传修饰的生物体用于治疗T1D的方法

[0075] 本公开提供了用于制备遗传修饰的微生物(例如,本文所公开的LAB的方法。示例性的方法包括(i)将微生物(例如,LAB)与编码IL-10多肽的外源性核酸接触;和(ii)将微生物(例如,LAB)与编码T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽的外源性核酸接触,其中,编码IL-10多肽的外源性核酸和编码T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽的外源性核酸经染色体整合(即,整合到微生物例如LAB的染色体中)。当将核酸整合到微生物(例如,细菌)基因组中时,例如,染色体中,形成了遗传修饰的微生物(例如,LAB)。进行当前方法遗传修饰的微生物(例如,LAB)可以是任何微生物菌株,例如,可以是野生型细菌菌株,或者可以在其与编码IL-10多肽的外源性核酸和编码T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽的外源性核酸接触前经遗传修饰。

[0076] 在一些实例中,上述方法采用同源重组以整合核酸到微生物(例如,细菌)染色体中。因此,在一些实例中,根据这些实施方式,编码IL-10多肽的外源性核酸和编码T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽的外源性核酸使用同源重组经染色体整合(例如,采用包含相应的核酸的一个或多个整合质粒)。在根据这些实施方式中任一项的一些实例中,将微生物(例如,LAB)与编码IL-10多肽的外源性核酸(例如,包含编码IL-10多肽的外源性核酸的整合质粒)接触发生在将LAB与编码T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽的外源性核酸(例如,包含编码PINS多肽的外源性核酸的整合质粒)接触之前。在根据这些实施方式中任一项的其他实例中,将微生物(例如,LAB)与编码IL-10多肽的外源性核酸(例如,包含编码IL-10多肽的外源性核酸的整合质粒)接触发生在将LAB与编码T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽的外源性核酸(例如,包含编码PINS多肽的外源性核酸的整合质粒)接触之后。在根据这些实施方式中任一项的其他实例中,将微生物(例如,LAB)同时接触编码IL-10多肽的外源性核酸(例如,包含编码IL-10多肽的外源性核酸的整合质粒)和编码T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽的外源性核酸(例如,包含编码PINS多肽的外源性核酸的整合质粒),或编码hIL-10和PINS两者的外源性核酸。

[0077] 在根据这些实施方式中任一项的一些实例中,方法还包括将遗传修饰的微生物(例如,LAB)的培养物与至少一种稳定剂(例如,冷冻保存剂)组合以形成微生物(例如,细菌)混合物。在一些实例中,方法进一步还包括从微生物(例如,细菌)混合物去除水,形成干燥的组合物。例如,方法可以进一步包括冻干微生物(例如,细菌)混合物以形成冷冻干燥的组合物。在其他实例中,方法可以进一步包括将遗传修饰的微生物(例如,LAB)或干燥的组合物(例如,冷冻干燥的组合物)与药学上可接受的运载体组合以形成药物组合物。方法可以进一步包括配制干燥的组合物(例如,冷冻干燥的组合物)或药物组合物成药学剂量形式。

[0078] 本公开还提供了通过本文所述方法(例如,根据方法2的上述实施方式中任一项的方法)制备的遗传修饰的微生物(例如,遗传修饰的LAB)。

[0079] 方法3:制备药物组合物的方法

[0080] 本公开还提供了用于制备药物组合物的方法。示例性的方法包括将如本文所公开的微生物(例如,LAB)的培养物(例如,根据上述实施方式中任一项所述的LAB)与至少一种稳定剂(例如,冷冻保存剂)接触,从而形成微生物(例如,细菌)混合物。在一些实例中,至少一种稳定剂包括至少一种冷冻保存剂。在一些实例中,微生物(例如,LAB)包含编码白介素-10(IL-10)多肽的外源性核酸,并且还包含编码T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽的外源性核酸,其中,编码IL-10多肽的外源性核酸和编码T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽的外源性核酸经染色体整合,即,整合到微生物(例如,细菌)染色体中(或位于其上)。

[0081] 这类方法可以还包括从微生物(例如,细菌)混合物去除水,从而形成干燥的组合物。例如,方法可以包括冻干微生物(例如,细菌)混合物,从而形成冷冻干燥的组合物。

[0082] 在根据方法3的上述实施方式中任一项的一些实例中,该方法还包括将干燥的组合物(例如,冷冻干燥的组合物)与药学上可接受的运载体接触形成药物组合物。方法可以还包括配制干燥的组合物(例如,冷冻干燥的组合物)成药学剂量形式,如片剂、胶囊或囊剂。

[0083] 单位剂型

[0084] 相应地,本公开还提供了单位剂型,其包含本公开的微生物(例如,LAB)、本公开的干燥的组合物(例如,本公开的冷冻干燥的组合物)或本公开的药物组合物。在一些实例中,单位剂型是口服剂型,如片剂、胶囊(例如,含有粉末或含有微丸或微颗粒的胶囊)、颗粒或囊剂(例如,含有干细菌,用于悬浮于口服给药的液体中)。在一些实施方式中,剂型中含有的非病原性微生物(例如,LAB)是干粉形式或其压缩的形式。

[0085] 在根据这些实施方式的一些实例中,单位剂型包含约 1×10^4 至约 1×10^{12} 菌落形成单位(cfu)的微生物(例如,LAB)。在其他实例中,单位剂型包含约 1×10^6 至约 1×10^{12} 菌落形成单位(cfu)的微生物(例如,LAB)。在其他实例中,单位剂型包含约 1×10^8 至约 1×10^{11} cfu。在其他实例中,单位剂型包含约 1×10^9 至约 1×10^{12} cfu。

[0086] 试剂盒

[0087] 本公开还提供了试剂盒,其包含(1)根据本文所公开的实施方式中任一项的微生物(例如,LAB),包含根据本文所公开的实施方式中任一项的微生物(例如,LAB)的组合物,包含根据本文所公开的实施方式中任一项的微生物(例如,LAB)的药物组合物,或包含根据本文所公开的实施方式中任一项的微生物(例如,LAB)的单位剂型;和(2)说明书,用于向哺乳动物例如人(例如,人患者)给予微生物(例如,LAB),组合物,药物组合物或单位剂型。

[0088] 在相关实施方式中,试剂盒可以还包括用于确定疾病进展和成功治疗的测试(例如,针对血糖指标、胰岛素自身抗体(IAA)水平、片段C水平和胰岛炎的测试)。试剂盒还可以提供用于移植的 β 细胞。

附图说明

[0089] 图1A是这样的图表,其显示了根据本公开的示例性抗原特异性疗法在NOD小鼠中稳定逆转新发生的糖尿病。如指示处理新发生的糖尿病NOD小鼠,并在治疗开始后跟踪血糖

浓度14周。显示了治疗后仍为糖尿病的小鼠的百分比。“†”指示死亡或垂死的小鼠。在所有Kaplan-Meier存活曲线中,组间的统计学显著性通过Mantel-Cox对数秩检验确定; * $P < 0.05$, ****, $P < 0.0001$ 。

[0090] 图1B描述了这样的图表,其显示了根据本公开的示例性抗原特异性疗法在NOD小鼠中保留残留的 β 细胞功能。治疗终止前1-2周在新发生的糖尿病NOD小鼠以及基于乳酸乳球菌的组合疗法(CT)处理的小鼠(响应者和无响应者)上进行腹膜内葡萄糖耐受测试(IPGTT)。显示了超过2小时的葡萄糖耐受曲线下对应面积(AUC葡萄糖;mg/dl $\times$ 120分钟)。本文所用响应者是治疗后恢复正常血糖(例如,无糖尿并且血液葡萄糖测量 >200 mg/dl)的对象。

[0091] 图1C是这样的图表,其显示了根据本公开的示例性抗原特异性疗法在NOD小鼠中停止胰岛炎进展。在治疗的结束时如指示以盲测的方式在新发生的糖尿病和基于乳酸乳球菌的组合疗法(CT)处理的小鼠(响应者和无响应者)的石蜡包埋胰腺切片上进行胰岛炎评分。使用曼-惠特尼(Mann-Whitney) t 检验计算组间的统计学显著性; ** $P < 0.01$ 。

[0092] 图2A是这样的图表,其显示根据起始血液葡萄糖浓度的糖尿病缓解率。基于在研究进入时起始血糖低于或高于 350 mg/dl,对新发生的糖尿病NOD小鼠进行分类。显示了在用本公开的临床级乳酸乳球菌的组合治疗(CT)后保持糖尿病的小鼠的百分比。在Kaplan-Meier存活曲线中,组间的统计学显著性通过Mantel-Cox对数秩检验确定; ** $P < 0.01$ 。

[0093] 图2B是这样的图表,其显示根据研究进入时胰岛素自身抗体(IAA)阳性的糖尿病缓解率。基于在研究进入时起始血糖低于或高于 350 mg/dl,对新发生的糖尿病NOD小鼠进行分类。显示了在用本公开的临床级乳酸乳球菌的组合治疗(CT)后保持糖尿病的小鼠的百分比。

[0094] 图2C是这样的图表,其显示了进入时与治疗成功相关联的起始血糖和IAA阳性。基于在研究进入时起始血糖低于或高于 350 mg/dl和IAA阳性,对新发生的糖尿病NOD小鼠进行分类。显示了治疗后耐受的小鼠的百分比。

[0095] 图2D描述了这样的图表,其显示了治疗前和治疗后之间IAA阳性中的变化在治疗响应者中显著不同。显示了治疗响应者(上图)和非响应者(下图)中糖尿病诊断和基于乳酸乳球菌的组合治疗随访后的IAA水平。使用曼-惠特尼(Mann-Whitney) t 检验计算各组之间的统计学显著性; ** $P < 0.01$ 。对于1个小鼠,IAA的起始水平为139,其在y轴界限外,因此没有示出。

[0096] 图3A描述了这样的图表,其显示基于乳酸乳球菌的组合疗法诱导较高水平的Foxp3⁺T细胞。新发生的糖尿病和基于乳酸乳球菌组合疗法(CT)处理的小鼠(响应者和非响应者)的外周血中CD4⁺T细胞群内CD25⁺Foxp3⁺细胞(左图)、CD25⁻Foxp3⁺细胞(中图)和总Foxp3⁺细胞(右图)的百分比。各符号表示1个小鼠,而水平线指示中值。使用曼-惠特尼 t 检验计算各组之间的统计学显著性; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

[0097] 图3B描述了这样的图表,其显示基于乳酸乳球菌的组合疗法诱导较高水平的Foxp3⁺T细胞。新发生的糖尿病和基于乳酸乳球菌组合疗法(CT)处理的小鼠(响应者和非响应者)的胰腺引流淋巴结中CD4⁺T细胞群内CD25⁺Foxp3⁺细胞(左图)、CD25⁻Foxp3⁺细胞(中图)和总Foxp3⁺细胞(右图)的百分比。各符号表示1个小鼠,而水平线指示中值。使用曼-惠特尼 t 检验计算各组之间的统计学显著性; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

[0098] 图3C描述了这样的图表,其显示基于乳酸乳球菌的组合疗法诱导较高水平的F_{oxp3}⁺T细胞。新发生的糖尿病和基于乳酸乳球菌组合疗法(CT)处理的小鼠(响应者和非响应者)的胰腺中CD4⁺T细胞群内CD25⁺F_{oxp3}⁺细胞(左图)、CD25⁻F_{oxp3}⁺细胞(中图)和总F_{oxp3}⁺细胞(右图)的百分比。各符号表示1个小鼠,而水平线指示中值。使用曼-惠特尼t检验计算各组之间的统计学显著性;*P<0.05,**P<0.01,***,P<0.001;****,P<0.0001。

[0099] 图3D描述了这样的图表,其显示基于乳酸乳球菌的组合疗法诱导较高水平的F_{oxp3}⁺T细胞。新发生的糖尿病和基于乳酸乳球菌组合疗法(CT)处理的小鼠(响应者和非响应者)的外周血中CD4⁺T细胞群内CD25⁺F_{oxp3}⁺CTLA4⁺细胞(左图)、CD25⁻F_{oxp3}⁺CTLA4⁺细胞(中图)和总F_{oxp3}⁺CTLA4⁺细胞(右图)的百分比。各符号表示1个小鼠,而水平线指示中值。使用曼-惠特尼t检验计算各组之间的统计学显著性;*P<0.05,**P<0.01,***,P<0.001;****,P<0.0001。

[0100] 图3E描述了这样的图表,其显示基于乳酸乳球菌的组合疗法诱导较高水平的F_{oxp3}⁺T细胞。新发生的糖尿病和基于乳酸乳球菌组合疗法(CT)处理的小鼠(响应者和非响应者)的胰腺引流淋巴结中CD4⁺T细胞群内

[0101] CD25⁺F_{oxp3}⁺CTLA4⁺细胞(左图)、CD25⁻F_{oxp3}⁺CTLA4⁺细胞(中图)和总F_{oxp3}⁺CTLA4⁺细胞(右图)的百分比。各符号表示1个小鼠,而水平线指示中值。使用曼-惠特尼t检验计算各组之间的统计学显著性;*P<0.05,**P<0.01,***,P<0.001;****,P<0.0001。

[0102] 图3F描述了这样的图表,其显示基于乳酸乳球菌的组合疗法诱导较高水平的F_{oxp3}⁺T细胞。新发生的糖尿病和基于乳酸乳球菌组合疗法(CT)处理的小鼠(响应者和非响应者)的胰腺中CD4⁺T细胞群内CD25⁺F_{oxp3}⁺CTLA4⁺细胞(左图)、CD25⁻F_{oxp3}⁺CTLA4⁺细胞(中图)和总F_{oxp3}⁺CTLA4⁺细胞(右图)的百分比。各符号表示1个小鼠,而水平线指示中值。使用曼-惠特尼t检验计算各组之间的统计学显著性;*P<0.05,**P<0.01,***,P<0.001;****,P<0.0001。

[0103] 图4描述了这样的图表,其显示基于乳酸乳球菌的组合疗法在响应者和非响应者中诱导粉末抑制性IL10的F_{oxp3}⁺T细胞。对于体外多克隆抑制物试验,CD4⁺CD25⁻效应T细胞(Teff)分离自正常血糖的NOD小鼠,染料标记,并使用可溶性抗-CD3在辅助细胞存在的情况下刺激72小时并增加

[0104] CD4⁺CD25⁺F_{oxp3}⁺或CD4⁺CD25⁻F_{oxp3}⁺T细胞(Treg)的比例,其由基于乳酸乳球菌的组合疗法(CT)处理的NOD.F_{oxp3}.hCD2小鼠(响应者和非响应)在诱导的6周治疗结束时分离。通过流式细胞术分析染料稀释来测量Teff细胞的增殖,并以进行两个或多个分裂的Teff细胞的百分比显示,标准化至仅有效应物的培养物。通过流式细胞术分析CD69来测量Teff细胞的活化,并以MFI显示,标准化至仅有效应物的培养物。Treg:Teff培养物中IFN- γ 和IL10浓度的MSD高敏感性多重试验。使用克鲁斯卡尔-沃利斯(Kruskal-Wallis)检验和登尼特(Dunnett's)多重检验计算组间统计学显著性;*P<0.05,**P<0.01,***,P<0.001;*P<0.05,**P<0.01。

[0105] 图5A是这样的图表,其显示了基于乳酸乳球菌的组合疗法诱导的Treg依赖于CTLA4和TGF- β 以控制T效应细胞响应。T效应(Teff)增殖-以进行1个或多个分裂的Teff细胞的百分比显示,标准化至通过仅有效应物的培养物的扩增。用抗-CD3(0.5 μ g/ml)在辅助细胞和CD4⁺CD25⁺F_{oxp3}⁺存在的情况下刺激染料标记的CD4⁺CD25⁻T细胞(Teff),由基于乳酸乳

球菌的组合疗法(CT)处理的NOD.Foxp3.hCD2小鼠(响应者和非响应者)分离,并指示中和抗体($10\mu\text{g}/\text{ml}$)。使用克鲁斯卡尔-沃利斯检验和登尼特多重检验计算组间统计学显著性;* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

[0106] 图5B是这样的图表,其显示了基于乳酸乳球菌的组合疗法诱导的Treg依赖于CTLA4和TGF- β 以控制T效应细胞响应。T效应(Teff)增殖-以进行两个或多个分裂的Teff细胞的百分比显示,标准化至通过仅有效应物的培养物的扩增。用抗-CD3($0.5\mu\text{g}/\text{ml}$)在辅助细胞和CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺细胞(Treg)存在的情况下刺激染料标记的CD4⁺CD25⁻T细胞(Teff),由基于乳酸乳球菌的组合疗法(CT)处理的NOD.Foxp3.hCD2小鼠(响应者和非响应者)分离,并指示中和抗体($10\mu\text{g}/\text{ml}$)。使用克鲁斯卡尔-沃利斯检验和登尼特多重检验计算组间统计学显著性;* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

[0107] 图5C是这样的图表,其显示了基于乳酸乳球菌的组合疗法诱导的Treg依赖于CTLA4和TGF- β 以控制T效应细胞响应。用抗-CTLA4和抗-TGF- β 抗体($n=5$)注射基于乳酸乳球菌的组合疗法治愈的小鼠,然后跟踪糖尿病复发(糖尿和血液葡萄糖测量 $>200\text{mg}/\text{dl}$)。

[0108] 图6A是用于新发生的糖尿病NOD小鼠中同时给予基于乳酸乳球菌的组合疗法(CT)和特异性FOXP3抑制剂P60(i.p. $50\mu\text{g}/\text{每天}$)的治疗方案。

[0109] 图6B是这样的图表,其显示了Treg功能受损疗法诱导的耐受的耐受性抑制。显示了治疗后仍为糖尿病的小鼠的百分比。在Kaplan-Meier存活曲线中,组间的统计学显著性通过Mantel-Cox对数秩检验确定;* $P<0.05$ 。

[0110] 图7A是用于在基于乳酸乳球菌的组合疗法(CT)治愈的NOD.Foxp3.DTR小鼠中通过白喉毒素(DT)的Foxp3⁺T细胞消耗的治疗方案。

[0111] 图7B是这样的图表,其显示了在NOD.Foxp3.DTR小鼠中Foxp3⁺T细胞消耗破坏基于乳酸乳球菌的组合疗法(CT)诱导的耐受。新发生的糖尿病NOD.Foxp3.DTR小鼠中基于乳酸乳球菌的组合疗法($n=7$)期间和DT治疗($n=4$)后的血液葡萄糖测量。当随机血液葡萄糖浓度恢复到低于 $200\text{mg}/\text{dl}$ 时认为小鼠被治愈(白色符号),或当小鼠持续血液葡萄糖浓度高于 $200\text{mg}/\text{dl}$ 时认为小鼠未被治愈(黑色符号)。

[0112] 图7C是这样的图表,其显示了DT治疗之前和之后疗法治愈的NOD.Foxp3.DTR小鼠的胰腺中胰岛炎评分。

[0113] 图7D是这样的图表,其显示了DT治疗之前和之后疗法治愈的NOD.Foxp3.DTR小鼠的胰腺中胰岛驻留的Foxp3⁺T细胞的定量。针对胰岛素(红)、CD4(紫)和Foxp3(绿)对来自组合疗法耐受的小鼠的胰腺切片进行染色,其中白色箭头指示具有一些胰岛素阳性的朗格汉斯(Langerhans)胰岛内存在Foxp3⁺T细胞。较高放大倍数的盒状区域清楚地指示了Foxp3⁺细胞是CD4⁺T细胞。使用曼-惠特尼t检验计算统计学显著性;****, $P<0.0001$ 。

[0114] 图8A描述了这样的图表,其显示了新发作糖尿病和基于乳酸乳球菌的组合疗法(CY)处理的小鼠(响应者和非响应者)的外周血中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺(左)、CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺(中)和CD4⁺Foxp3⁺(右)T细胞群内的CTLA4⁺细胞百分比。各符号表示1个小鼠,而水平线指示中值。使用曼-惠特尼t检验计算各组之间的统计学显著性;* $P<0.05$,** $P<0.01$,***, $P<0.001$;****, $P<0.0001$ 。

[0115]

[0116] 图8B描述了这样的图表,其显示了新发作糖尿病和基于乳酸乳球菌的组合疗法

(CY) 处理的小鼠 (响应者和非响应者) 的胰腺引流淋巴结中 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (左)、 $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ (中) 和 $CD4^+Foxp3^+$ (右) T 细胞群内的 $CTLA4^+$ 细胞百分比。各符号表示1 只小鼠, 而水平线指示中值。使用曼-惠特尼 t 检验计算各组之间的统计学显著性; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, ***, $P<0.001$; ****, $P<0.0001$ 。

[0117] 图8C描述了这样的图表, 其显示了新发糖尿病和基于乳酸乳球菌的组合疗法 (CY) 处理的小鼠 (响应者和非响应者) 的胰腺中 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (左)、 $CD4^+CD25^-Foxp3^+$ (中) 和 $CD4^+Foxp3^+$ (右) T 细胞群内的 $CTLA4^+$ 细胞百分比。各符号表示1 只小鼠, 而水平线指示中值。使用曼-惠特尼 t 检验计算各组之间的统计学显著性; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, ***, $P<0.001$; ****, $P<0.0001$ 。

[0118] 图9描述了这样的图表, 其显示基于乳酸乳球菌的组合疗法耐受的小鼠没有消耗病原性T 效应细胞。过继转移分离自明显糖尿病 (白色菱形), 组合治疗 (CT) 响应者 (白色圆圈) 或非响应者 (交叉的圆形) 的全部脾细胞 (1×10^7)。使用Mantel-Cox 对数秩检验进行统计学计算; “ns”: 不显著。

[0119] 图10A是在NOD.Foxp3.DTR 小鼠中用DT 消耗Foxp3⁺ 细胞的原理图。在该原理图中指示了4 个连续的i.p. (腹腔内) DT 注射 (在第1、2、5 和7 天) ($40\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/d)。

[0120] 图10B描述了这样的图表, 其实现了NOD.Foxp3.DTR 小鼠中用DT 消耗Foxp3⁺ 细胞。流式细胞术分析外周血证明DT 处理的NOD.Foxp3.DTR 小鼠中Foxp3⁺ 细胞的有效消耗。胰腺切片的Foxp3 染色显示了DT 处理的NOD.Foxp3.DTR 小鼠中胰岛驻留的Foxp3⁺ 细胞的有效消耗。

[0121] 图10C描述了代表性的流式细胞术概况, 其显示了NOD.Foxp3.DTR 小鼠 (左图) 的两个连续DT 注射 (第3 和5 天) 之后和之前 (第0 天), 对Foxp3 和DTR-GFP 融合蛋白阳性的 $CD4^+$ T 细胞的百分比。

[0122] 图10D是这样的图表, 其证明了在NOD.Foxp3.DTR 小鼠中急性Foxp3⁺ Treg 消耗后快速的糖尿病发作。

[0123] 图11表示示例性IL-10 表达盒 (SEQ ID NO:13), 其包含h11A 启动子 (Ph11A), IL-10 分泌序列 (SSusp45), 和编码人IL-10 的示例性核酸序列 (和对应的氨基酸序列), 其中在没有其天然信号肽的情况下使用序列, 并且序列包括在指定的IL-10 序列 (hIL10aPxA) 的位置2 处的 (Pro 到Ala) 点突变。SEQ ID NO:14 是连接人IGF-10 序列的IL-10 分泌序列的氨基酸序列。

[0124] 图12A和12B 共同地表示示例性PINS 多顺反子表达盒 (SEQ ID NO:15), 其包含gapB 启动子 (PgapB), gapB 基因, 示例性的基因间区域 (rpmD), 示例性的PINS 分泌序列 (SSusp45), 其翻译偶联编码人PINS 的示例性核酸序列。SEQ ID NO:16 是由gapB 基因编码的氨基酸序列。SEQ ID NO:17 是由PINS 分泌序列编码的氨基酸序列, 并且翻译偶联人PINS 序列。

[0125] 图13A、13B 和13C (SEQ ID NO:18) 共同地表示海藻糖-6-磷酸磷酸酶基因 (trePP; Gene ID:4797140) 的缺失; 插入HU 样DNA 结合蛋白基因的组成型启动子 (Ph11A; Gene ID:4797353) 以在海藻糖操纵子中先于推定的磷酸磷酸酶基因 (trePTS; 11mg_0453 和 11mg_0454; ptsI 和 ptsII; 分别为 Gene ID:4797778 和 Gene ID:4797093), 在 ptsI 和 ptsII 之间插入先于高度表达的乳酸乳球菌MG136350S 核糖体蛋白L30 基因的基因间区域 (rpmD; Gene

ID:4797873)。

[0126] 图14A和14B(SEQ ID NO:19)共同地表示将海藻糖-6-磷酸磷酸酶基因(otsB;Gene ID:1036914)插入未鉴定的分泌的45-kDa蛋白基因(usp45;Gene ID:4797218)的下游。将先于高度表达的乳酸乳球菌MG1363 50S核糖体蛋白L30基因(rpmD;Gene ID:4797873)在usp45和otsB之间插入基因间区域。

[0127] 图15A和15B(SEQ ID NO:20、21和25)共同地表示与导入EcoRI限制性位点一起在446的密码子位置30(tga30)插入tga,以破坏编码纤维二糖特异性PTS系统IIC组分(ptcC;Gene ID:4796893)的基因。

[0128] 图16(SEQ ID NO:22)表示将编码usp45分泌前导序列(SSusp45)与编码人胰岛素原的pin基因(PINS;UniProt:P01308,氨基酸25-110)融合体的基因插入高度表达的甘油醛3-磷酸脱氢酶基因(gapB;Gene ID:4797877)的下游。将先于高度表达的乳酸乳球菌MG1363 50S核糖体蛋白L30基因(rpmD;GeneID:4797873)在gapB和pins之间插入基因间区域。

[0129] 图17(SEQ ID NO:23)表示胸苷合成酶基因(thyA;Gene ID:4798358)的缺失。在HU样DNA结合蛋白基因组成型启动子(Ph11A;Gene ID:4797353)的下游,插入SSusp45与hil-10基因的融合体(SEQ ID NO:24)的基因以允许表达和分泌hIL-10,hil-10基因编码人白介素-10(hIL-10;UniProt:P22301,aa 19-178,变体P2A,Steidler等,Nat.Biotechnol.2003,21(7):785-789)。

[0130] 图18:sAGX0407的相关遗传基因座的示意图:trePTS, Δ trePP;otsB;ptcC-;gapB>>pins和Δ thyA,hIL-10具有相关寡核苷酸结合位点(oAGXno),EcoRI限制位点,(/短截的/)遗传特征,基因间区域(IR),PCR扩增产物大小(bp)的指示。

具体实施方式

[0131] 提供了用于在对象中治疗T1D,和/或恢复对T1D特异性抗原(即PINS)耐受的组合物和方法。

[0132] 定义

[0133] 在本说明书和实施方式中,所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括多个指示物,除非上下文中有明显的表示。例如,术语“一个细胞”可以包括多个细胞,并包括其混合物。类似地,除非上下文另有明确规定,否则使用“一种化合物”来治疗或制备如本文所述的药物包括使用一种或多种本发明的化合物进行这种治疗或制备。

[0134] 如本文所用,术语“包括”或“包含”意在表示所述组合物和方法包括所提及的要素,但并不排除其它要素。当用以定义组合物和方法时,“基本由……组成”应表示排除对于该组合物具有任何基本意义的其它要素。因此,基本上由本文定义的元素组成的组合物不排除来自分离和纯化方法的痕量污染物和药学上可接受的运载体,例如磷酸盐缓冲盐水,防腐剂等。“由……组成”表示排除多于用于给予本发明的组合物的微量元素的其它成分和基本方法步骤。通过各这些转换术语定义的实施方式在本发明范围内。

[0135] 如本文所用,术语“表达”基因或多肽或“产生”多肽(例如,IL-10多肽或T1D特异性抗原多肽)或“分泌”多肽意在分别包括“能够表达”和“能够产生”或“能够分泌”。例如,含有外源性核酸的微生物可以在充分条件下(例如,充分水合和/或在营养物存在下)表达和分泌由外源性核酸编码的多肽。然而,微生物可能不总是主动表达编码的多肽。可以将微生物

(例如,细菌)干燥(例如,冷冻干燥),并且在该状态下可以认为是休眠的(即,不是主动产生多肽)。然而,一旦微生物经受足够的条件,例如,给予对象并释放(例如,在对象的胃肠道中),它可以开始表达并分泌多肽。因此,“表达”基因或多肽,“产生”多肽,或“分泌”本公开的多肽的微生物包括处于其“休眠”状态的微生物。本文所用“分泌”意指将蛋白质输出细胞并且进入培养基/上清液或其他胞外环境。

[0136] 本文所用术语“组成型”在启动子上下文中(或通过与多肽的分泌或基因表达关联延伸)表示允许连续转录其相关基因的启动子。组成型启动子相对于“诱导型”启动子。

[0137] 与参考数值相关的术语“约”及其在此使用的语法等同物可以包括参考数值本身和从该参考数值加上或减去10%的值的范围。例如,术语“约10”包括10和从9到11的任何量。在一些情况下,与参考数值相关的术语“约”还可以包括值的范围加或减该参考数值的10%,9%,8%,7%,6%,5%,4%,3%,2%或1%。在一些实施方式中,与通过特定方法测量的范围或数字有关的“约”指示给定的数值包括通过该方法变异确定的值。

[0138] “IL-10基因”是指编码“IL-10多肽”的白细胞介素10基因。术语“IL-10基因”包括编码“IL-10变体多肽”的“IL-10变体基因。”在LAB中编码IL-10的DNA序列可以经密码子优化以促进在LAB中的表达,并且因此可以与其在天然生物体(例如,人)中不同。

[0139] 术语“IL-10”或“IL-10多肽”是这样的功能性IL-10多肽(例如,人IL-10多肽),其至少具有成熟形式(即,不存在其分泌信号)的氨基酸序列,但是还包括膜结合形式和可溶形式,以及“IL-10变体多肽”。

[0140] “IL-10变体”或“IL-10变体多肽”是指修饰的(例如,截短的或突变的)但功能性IL-10多肽,例如人IL-10的截短或突变形式。术语“IL-10变体多肽”包括与相应的野生型IL-10多肽相比具有增强的活性或活性降低的IL-10多肽。“IL-10变体多肽”保留至少一些IL-10活性(功能性多肽)。

[0141] 可以使用商业上可获得的算法计算多肽序列间的“百分比相同性”,所述算法比较参考序列与查询序列。在一些实施方式中,使用默认参数,多肽与参考多肽或其片段是70%,至少70%,75%,至少75%,80%,至少80%,85%,至少85%,90%,至少90%,92%,至少92%,95%,至少95%,97%,至少97%,98%,至少98%,99%或至少99%或100%相同(例如,通过BLASTP或CLUSTAL或其他比对软件)。类似地,核酸也可以参考起始核酸来描述,例如,它们可以是与参考核酸或其片段50%,至少50%,60%,至少60%,70%,至少70%,75%,75%,80%,至少80%,85%,至少85%,90%,至少90%,95%,至少95%,97%,至少97%,98%,至少98%,99%,至少99%或100%相同(例如,通过BLASTN或CLUSTAL或使用默认参数的其他比对软件测量)。当一个分子被认为与较大分子具有一定百分比的序列相同性时,这意味着当两个分子是最佳比对时,较小分子中所述百分比的残基根据两个分子最佳比对的顺序在较大分子中找到匹配残基,并且根据较小分子的长度计算“% (百分比) 相同性”。

[0142] 术语“染色体整合”或“整合到染色体中”或其任何变化指核酸序列(例如,基因;开放阅读框;编码多肽的外源性核酸;启动子;表达盒;等)位于微生物(例如,细菌)染色体(整合到其中),即并不位于附加型载体如质粒上。在一些实施方式中,其中的核酸序列经染色体整合,组成型表达由这类染色体整合的核酸编码的多肽。

[0143] 术语“自身抗原”或“自体抗原”在本文中可互换使用。这些术语在本文中根据本领域公认的自身抗原或自抗原的含义使用,并且通常是指源自对象自身体内(由对象自身体

内产生)的多肽/蛋白质,其中所述抗原被对象自身的免疫系统识别,通常产生针对这种抗原的抗体。自身免疫疾病通常与某些疾病特异性自身抗原相关。例如,在T1D中,对象的免疫系统可以产生针对与 β 细胞破坏过程相关的至少一种抗原的抗体。这种自身抗原包括胰岛素原(PINS),谷氨酸脱羧酶(GAD65),胰岛素瘤相关蛋白2(IA-2),胰岛特异性葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基相关蛋白(IGRP)和锌转运蛋白(ZnT)8。临床T1D还可以与由 β 细胞表达的其他候选靶分子相关,例如嗜铬粒蛋白A,(前原)胰岛淀粉样蛋白多肽(ppIAPP),外周蛋白和瓜氨酸化葡萄糖调节蛋白(GRP)。

[0144] 术语“T1D特异性抗原基因”是指编码上述“T1D特异性抗原的基因”。术语“T1D特异性抗原基因”包括编码“T1D特异性抗原变体多肽”的“T1D特异性抗原变体基因”。在LAB中编码T1D抗原的DNA序列可以经密码子优化以促进在LAB中的表达,并且因此可以与其在天然生物体(例如,人)中不同。

[0145] 术语“T1D特异性抗原多肽”是指功能性的,例如全长的多肽,以及“T1D特异性抗原变体多肽,与相应的野生型多肽相比,其可具有增强的活性或降低的活性。”T1D特异性抗原还可以缺少真核信号序列。

[0146] 术语“T1D特异性抗原变体”或“T1D特异性抗原变体多肽”是指修饰的(例如,截短的或突变的)但功能性的多肽,例如人PINS的截短或突变形式。术语“变体多肽”包括与相应的野生型多肽相比具有增强的活性或活性降低的多肽。“变体多肽”保留至少一些生物活性(功能性多肽)。GAD65和IA-2的示例性变体包括其修剪形式(例如,分别为GAD65₃₇₀₋₅₇₅和IA-2₆₃₅₋₉₇₉;相对于NCBI登录号NP_000809.1和NP_002837.1,保留抗原性质,因此可用于本公开的组合物和方法,例如,在刺激Tregs和诱导受试者耐受中。通常,T1D特异性抗原的修剪或截短形式由微生物(例如,乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*))有效表达和分泌。

[0147] 术语“可操作地连接”表示并置位置,其中如此描述的组分的关系允许其以所需方式发挥功能。“可操作地连接”至编码序列的控制序列以在与控制序列相容的条件下完成编码序列表达的方式连接。例如,如果连接或结合允许或影响所述基因的转录,据信启动子将操作性地连接基因,开放阅读框或编码序列。在另一实例中,如果连接或结合允许或影响至少3'基因的转录,据信5'和3'基因,顺反子,开放阅读框或编码序列将操作性地连接于多顺反子表达单元例如,如果序列间连接的性质并不(1)导致引入移码突变,(2)干扰启动子指导开放阅读框转录的能力或(3)干扰开放阅读框被启动子区域序列转录的能力,据信DNA序列例如启动子和开放阅读框将操作性地连接。

[0148] 抗-CD3抗体

[0149] “抗-CD3抗体”可以是在T细胞表面结合CD3受体的任何抗体,例如,靶向CD3 ϵ 链(CD3E)的抗体。术语“抗-CD3抗体”包括这种抗体的任何片段,如Fab片段,单域抗体,纳米抗体等。在一些实例中,抗-CD3抗体或其片段是单克隆抗体。在其他实例中,抗-CD3抗体是人源化单克隆抗体,例如,嵌合或人源化杂合抗体。在一些实例中,抗-CD3抗体是单域抗体或纳米抗体。在其他实例中,抗-CD3抗体是米莫单抗(muromonab)-CD3。其他已知的单克隆抗-CD3抗体包括奥特力昔珠单抗、特普利珠单抗和其片段。研究这些抗体用于治疗病症如克罗恩病,溃疡性结肠炎和1型糖尿病(参见例如,Herold K.C.和Taylor L.;“用抗-CD3单克隆抗体治疗1型糖尿病:诱导免疫调节?(Treatment of Type 1 diabetes with anti-CD3 monoclonal antibody:induction of immune regulation?)”。Immunologic Research

2003, 28 (2) : 141-50) 和用于诱导免疫耐受。参见例如, Bisikirska等“用经修饰的抗-CD3 mAb的TCR刺激扩增CD8+T细胞群并诱导CD8+CD25+Treg (TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+T cell population and induces CD8+CD25+Tregs)” (2005), 和Bisikirska等, “在1型糖尿病中使用抗-CD3单克隆抗体以诱导免疫调节 (Use of Anti-CD3 Monoclonal Antibody to Induce Immune Regulation in Type 1 Diabetes)” . Annals of the New York Academy of Sciences 2004, 1037: 1-9。在一些实例中, 抗-CD3抗体阻断效应T细胞的功能 (例如, 其攻击并破坏产生胰岛素的 β 细胞) 和/或刺激调节性T细胞。因此, 在一些实例中, 抗-CD3抗体保护对象免于效应T细胞破坏, 例如, 保留 β 细胞产生胰岛素的能力。在一些实例中, 抗-CD3抗体适合给予人, 例如, 在进行临床试验或已经被监管机构所批准。在一些实例中, 抗-CD3抗体是奥特力昔珠单抗 (otelixizumab) 或特普利珠单抗 (teplizumab)。

[0150] 最近发生的T1D

[0151] 发明人已经发现具有特定最小量残留 β 细胞功能的对象对本文所述的治疗方法反应特别好。可以根据本领域所认可的方法和如本文所述测量残留的 β 细胞功能。然而, 显著残留的 β 细胞功能通常存在于还未太久暴露于靶向对象的 β 细胞的有害自身免疫功能的对象。因此, 在一些实施方式中, 上述方法中的哺乳动物对象最近已被诊断患有T1D。例如, 这类对象可以指患有“最近发生的T1D”或“新发生的T1D” (可以在本文中互换使用)。在根据这些实施方式的一些实例中, 对象可能在给予本公开的组合物之前的前12个月, 前18个月或前24个月内已经诊断为患有T1D。在其他实例中, 已经用胰岛素处理对象少于约12周, 少于约8周, 少于约6周或少于约4周。在其他实例中, 根据上述实施方式中任一项, 经测试对象对至少一种自身抗体呈阳性, 例如, 经测试对胰岛素自身抗体 (IAA)、胰岛细胞自身抗体、谷氨酸脱羧酶 (例如, GAD65) 自身抗体和/或ICA512抗体呈阳性。在其他实例中, 根据上述实施方式中任一项, 对象具有大于约100mg/dL, 或大于约120mg/dL或大于约126mg/dL的空腹血浆葡萄糖水平。在其他实例中, 根据上述实施方式中任一项, 对象具有每分升约80-约250mg (mg/dL) 或约10mmol/L-约14mmol/L的空腹血浆葡萄糖水平。在其他实例中, 根据上述实施方式中任一项, 对象具有约100-约500mg/dL的血浆葡萄糖水平, 在其他实例中, 根据上述实施方式中任一项, 对象患有多尿症小于约8个月, 小于约6个月, 或小于约4个月。

[0152] 在一些实例中, 当在对象中测量到下述中任一项时, 可以将人对象分类成具有早期发生的T1D: (1) 2次连续空腹血液葡萄糖测试等于或大于126mg/dL; (2) 当任何随机血液葡萄糖测量大于200mg/dL时; (3) 血红蛋白A1c (HbA1c) 测试等于或大于6.5% (HbA1c是给予血液糖类3个月平均值的血液测试); 或 (4) 具有超过200mg/dL的任何值的2小时口服葡萄糖耐受测试, 或其组合。因此, 可以通过下述中任一项表征正常的血糖: (1) 2次连续空腹血液葡萄糖测试低于126mg/dL, 低于120mg/dL或低于100mg/dL; (2) 当任何随机血液葡萄糖测量低于200mg/dL、低于180mg/dL、低于160mg/dL或低于140mg/dL时; (3) 血红蛋白A1c (HbA1c) 测试小于6.5%或小于6%; 或 (4) 具有低于200mg/dL、低于180mg/dL、低于160mg/dL或低于140mg/dL的值的2小时口服葡萄糖耐受测试, 或其任何组合。

[0153] 治疗后恢复正常血糖 (例如, 无糖尿并且血液葡萄糖测量 $>200\text{mg/dl}$) 的对象可以被认为是治疗的“响应者”。不恢复基本的正常血糖的对象是“非响应者”。

[0154] 对象血液或尿液中的C-肽浓度可以用于评估对象的 β 细胞功能和T1D疾病阶段, 其

中较高的C-肽浓度指示较高的 β 细胞功能。在一些实例中,对象(例如,人患者)患有最近发生的T1D,通过具有小于约1nmol/L但是至少约0.2nmol/L的空腹血液C-肽浓度表征。在其他实例中,最近发生的对象(例如,人患者)具有受刺激的血液C-肽浓度,例如,在4小时混合饮食耐受测试(MMTT)期间,小于约5nmol/L,但至少约0.2nmol/L,或小于约4nmol/L,但至少约0.5nmol/L。本文描述了其他合适的C-肽范围。因此,可以使用曲线C-肽下的MMTT面积测量受刺激的C-肽,或者可以任选地使用90分钟MMTT受刺激的CP(90CP后MMTT或90CP)测量。

[0155] 启动子

[0156] 述及“启动子”通常意指核酸分子例如DNA分子的区域,RNA聚合酶与其结合并启动转录。例如,启动子位于其所控制转录的序列的上游,即,5'。本领域技术人员将会理解的是,启动子可以与其他天然调节性序列或区域例如操纵子关联。表达所需的调节性区域的精确性质在不同生物体之间可以不同,但是通常应包括启动子区域,在原核生物中其包含启动子(其指导RNA转录的启动)以及DNA序列,当将其转录到RNA中时,将发信号启动蛋白质合成。这类区域将通常包括涉及启动转录和翻译的这些5'非编码序列,如普里布诺盒(Pribnow-box)(参见TATA盒),Shine-Dalgarno序列等。

[0157] 表达盒

[0158] 术语“表达盒”或“表达单元”根据本领域通常理解的含义使用,并且指这样的核酸,其包含一个或多个基因和控制一个或多个基因表达的序列。示例性的表达盒包含至少一个启动子序列和至少一个开放阅读框。

[0159] 多顺反子表达盒

[0160] 术语“多顺反子表达盒”、“多顺反子表达单元”或“多顺反子表达系统”在本文中可以互换使用,并且根据其本领域通常理解的含义使用。它们指核酸序列,其中两个或多个基因的表达通过共同调节机制控制,如启动子、操纵子等。本文所用术语多顺反子(polycistronic)表达单元是多重顺反子(multicistronic)表达单元的同义词。多顺反子表达单元的实例并不限于双顺反子、三顺反子、四顺反子表达单元。包含下述的任何mRNA都包括在术语多顺反子内:两个或多个,如3、4、5、6、7、8、9、10或更多个编码单个表达产物,如蛋白质、多肽和/或肽的编码区域或开放阅读框。多顺反子表达盒包括至少1个启动子,和受启动子控制的至少2个开放阅读框,其中,整合区域任选地被置于2个开放阅读框之间。

[0161] 在一些实例中,“多顺反子表达盒”包括一个或多个内源性基因和一个或多个外源性基因,通过对微生物(例如,LAB)为内源性的启动子对其进行转录控制。本文所述多顺反子表达单元或系统可以通过对微生物(例如,LAB)外源性的启动子进行转录控制。在另一实施方式中,如本文所述的翻译偶联的或转录偶联的一个或多个内源性基因和一个或多个外源性基因通过所述一个或多个内源性基因(之一)的天然启动子进行转录控制。在另一实施方式中,多顺反子表达单元通过所述一个或多个内源性基因(之一)的天然启动子进行转录控制,所述内源性基因包含在所述多顺反子表达单元中。在另一实施方式中,多顺反子表达单元操作性地连接革兰氏阳性内源性启动子。在一示例性实施方式中,启动子可以位于其操作性连接的一个或多个开放阅读框的上游,即5'。在另一实施方式中,启动子是多顺反子表达单元中内源性基因最5'(即,最上游)的天然启动子。因此,在一些实例中,多顺反子表达单元包含内源性基因和1个或多个外源性基因,其转录偶联所述1个或多个内源性基因的3'末端,例如,其中所述1个或多个外源性基因是多顺反子表达单元的3'基因。

[0162] 如本文所用,术语“转录偶联”与术语“翻译偶联”或“翻译连接”同义。这些术语主要涉及多顺反子表达盒或单元。当一个或多个共同调节元件,特别是诸如共同启动子以编码两个或多个基因、开放阅读框或编码序列的1个mRNA实现所述两个或多个基因的转录时,据信两个或多个基因、开放阅读框或编码序列将转录偶联,其后可以翻译成两个或多个单独的多肽序列。本领域技术人员将意识到,细菌操纵子是自然存在的多顺反子表达系统或单元,其中2个或多个基因经翻译或转录偶联。

[0163] 基因间区域

[0164] 如本文所用,术语“基因间区域”与术语“基因间接头”或“基因间间隔物”同义。将基因间区域定义为介于邻接(即,位于相同多核酸序列上)基因、开放阅读框、顺反子或编码序列之间的多核酸序列。通过延伸,基因间区域可以包括通过所述基因间区域连接的3'基因的起始密码子和/或5'基因的终止密码子。如本文所定义,术语基因间区域具体涉及多顺反子表达单元中邻接基因间的基因间区域。例如,本文所定义的基因间区域可以存在于操纵子中邻接基因之间。相应地,在实施方式中,本文所定义的基因间区域是操纵子基因间区域。

[0165] 在一些实例中,基因间区域、接头或间隔子选自这样的基因间区域,所述基因间区域先于革兰氏阳性细菌的rp/W、rpf P、rpmD、rp/8、rpsG、rpsE或rp/N,即其5',更具体地,紧接其5'。在实施方式中,所述革兰氏阳性细菌是乳酸菌,例如,乳球菌(*Lactococcus*)物种,例如乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)和其任何亚种或菌株。在实施方式中,所述基因间区域包括rp/W、rp/P、rpmD、rp/8、rpsG、rpsE或rp/N的起始密码子和/或先前即5'基因的终止密码子。在优选的实施方式中,本发明涉及革兰氏阳性细菌或重组核酸,如本文所述,其中内源性基因和一个或多个外源性基因通过在革兰氏阳性细菌中有活性的一个或多个基因间区域转录偶联,例如,其中一个或多个基因间区域对所述革兰氏阳性细菌为内源性的,例如,其中内源性基因间区域选自先于rp/W、rpf P、rpmD、rp/8、rpsG、rpsE、rp/N、rp1M、rp1E和rp1F的基因间区域。

[0166] 本领域技术人员将意识到,如果基因间区域包括5'终止密码子和/或3'起始密码子,那么在一些情况下的这些相应的密码子不存在于通过所述基因间区域连接的基因中,从而避免双起始密码子和/或终止密码子,其可以影响正确翻译起始和/或终止。用于鉴定基因间区域的方法为本领域所知。通过进一步的指导,例如,鉴定基因间区域可以基于预测操纵子,以及相关启动子和开放阅读框,用于其的软件是已知的并可以在本领域获得。示例性的基因间区域术语国际专利申请公开W02012/164083,其全部内容通过引用纳入本文。

[0167] 对象

[0168] “对象”是生物体,其可以受益于例如根据本公开内容的方法施用本公开的组合物。对象可以是哺乳动物(“哺乳动物对象”)。示例性哺乳动物对象包括人,农场动物(如牛,猪,马,绵羊,山羊),宠物或家养动物(如狗,猫和兔)和其他动物,如小鼠,大鼠和灵长类动物。在一些实例中,哺乳动物对象是人患者。

[0169] 术语“国际单位”(IU)在本文中根据其本领域公认的含义使用,并且表示物质(例如多肽)的量。构成一个国际单位的质量或数量根据所测量的物质而变化。世界卫生组织(WHO)提供生物活性多肽的单位表征。

[0170] T1D特异性抗原

[0171] 本公开的至少一个微生物含有编码至少一个疾病特异性(即,T1D特异性)自身抗原基因的外源性核酸,并且可以在足以表达的条件下表达这种基因。示例性的T1D特异性自身抗原包括与 β 细胞破坏过程相关的胰岛抗原。在一些实施方式中,在上述组合和方法中的任一项中,T1D特异性抗原选自与T1D相关的已知自身抗原,并且包括胰岛素原(PINS);胰岛素(INS);谷氨酸脱羧酶(GAD)(例如,GAD65、GAD67或GAD2);胰岛瘤相关蛋白2(胰岛抗原-2;IA-2)(还称之为蛋白质酪氨酸磷酸酶,受体型,N(PTPRN),酪氨酸磷酸酶样蛋白质或ICA512)(参见例如,Long等,Diabetes 2013,62(6),2067-2071);胰岛特异性葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基相关蛋白(IGRP)锌转运蛋白8(ZnT8)。其他实例包括由 β 细胞表达的分子,如嗜铬粒蛋白A,(前原)胰岛淀粉样蛋白多肽(ppIAPP),外周蛋白和瓜氨酸化葡萄糖调节蛋白(例如,GRP78);参见例如,Rondas等,Diabetes 2015;64(2):573-586;和Ye等,Diabetes 2010,59(1):6-16),和这些抗原中2种或多种的组合。在其他实施方式中,在上述组合物和方法中,T1D特异性抗原是PINS、GAD65或IA-2。在其他实施方式中,在上述组合物和方法中,T1D特异性抗原是PINS。在各种实施方式中,T1D特异性抗原由比全长(例如,野生型)基因短的变体核酸序列编码,因此“修整的”型式通常被使用的微生物(例如,乳酸乳球菌)更有效地表达和/或分泌。虽然分泌更加有效,但是许多“修整的”形式保留其所有(或主要部分)的生物活性,例如,保留足够的Treg刺激和/或诱导耐受的能力。

[0172] PINS多肽的实例包括野生型人PINS和与这种野生型人PINS具有至少约60%,至少约70%,至少约80%,至少约90%,至少约95%,至少约96%,至少约97%,至少约98%,或至少约99%的序列相同性的多肽。野生型人PINS的示例性氨基酸序列是SEQ ID NO:5,而示例性核酸序列由SEQ ID NO:6表示(参见登录号NM_000207.2中包含的CDS)。在一些实例中,PINS多肽具有氨基酸序列SEQ ID NO:3,其由核酸序列SEQ ID NO:4编码。

[0173] 其他示例性PINS核苷酸序列由NCBI登录号AY899304(完整CDS,可选剪接;SEQ ID NO:7);NM_000207(转录物变体1);NM_001185097(转录物变体2);NM_001185098(转录物变体3);NM_001291897(转录物变体4)的编码序列及其部分序列表示。示例性PINS氨基酸序列包括由任何一种上述PINS核酸序列编码的那些。

[0174] 可以使用编码氨基酸序列SEQ ID NO:3的任何核苷酸序列,或编码其至少约20,至少约30,至少约40,至少约50,至少约60,至少约70,或至少约80个连续氨基酸的任何核苷酸序列,或编码与SEQ ID NO:3具有至少约60%,至少约70%,至少约80%,至少约90%,至少约95%,至少约96%,至少约97%,至少约98%,或至少约99%的序列相同性的多肽的任何核苷酸序列。

[0175] 另外的PINS多肽描述于例如UniProtKB-P01308和其中的链接中。在一些实例中,PINS多肽由氨基酸残基25-110表示(根据SEQ ID NO:5编号)。

[0176] 示例性GAD(例如,GAD65)多肽包括野生型人GAD65,和与这种野生型GAD65具有至少约60%,至少约70%,至少约80%,至少约90%,至少约95%,至少约95%,至少约96%,至少约97%,至少约98%,或至少约99%的序列相同性的多肽。参见例如,登录号M81882.1内包含的CDS。

[0177] 可以使用编码上述氨基酸序列的任何核苷酸序列,或编码其至少约100,至少约200,至少约300,至少约400,至少约500个连续氨基酸的任何核苷酸序列,或编码具有至少约60%,至少约70%,至少约80%,至少约90%,至少约95%,至少约96%,至少约97%,至少

约98%,或至少约99%的序列相同性的多肽的任何核苷酸序列。

[0178] 其他示例性谷氨酸脱羧酶(例如,GAD65)序列描述于例如UniProtKB-Q05329及其中的链接中。在一些实例中,GAD多肽是修剪的变体,其含有少于约500,少于约400,或少于约300个野生型氨基酸。示例性多肽片段(修剪的GAD65变体)描述于例如Robert等,Benef.Microbes 2015,6(4):591-601所述,其公开通过引用将其全部内容纳入本文。在一些实例中,修剪的GAD变体由革兰氏阳性细菌(即,乳酸乳球菌)有效表达和分泌。示例性修剪的GAD变体是GAD65₃₇₀₋₅₇₅(相对于NCBI登录号NP_000809.1的氨基酸编号)。

[0179] 其他示例性GAD核苷酸序列由NCBI登录号M81882(GAD65);M81883(GAD67);NM_000818(GAD2变体1);和NM_001134366(GAD2变体2);和其中包含的开放阅读框(CDS)表示。示例性氨基酸序列包括由登录号M81882,M81883,NM_001134366和NM_000818的上述核苷酸序列编码的序列。

[0180] 本领域普通技术人员将理解,使用本公开内容的方法递送至对象的最佳自身抗原量例如随抗原类型,表达抗原的微生物和遗传构建体而变化,例如,遗传构建体中使用的启动子的强度。通常,微生物的施用量等于表达抗原的特定量,或产生相应对象中各抗原多肽的所需PK概况的量。示例性的每日抗原剂量为每天约10fg至约100μg活性多肽。其他示例性剂量范围为每天约1pg至约100μg;或每天约1ng至约100μg。

[0181] 上述抗原剂量可以通过每天给对象施用有效量的微生物来实现,其中微生物适于表达足够量的活性多肽以实现所需的剂量,例如上述那些。分泌抗原多肽的微生物可以以约10⁴菌落形成单位(cfu)至约10¹²cfu/天,例如约10⁶cfu至约10¹²cfu/天,或者约10⁹cfu至约10¹²cfu/天的剂量递送。

[0182] 分泌抗原多肽的量可以基于cfu确定,例如根据Steidler等,Science 2000;289(5483):1352-1355中描述的方法,或通过使用ELISA。例如,特定微生物可以每10⁹cfu分泌至少约1ng至约1μg的活性多肽。基于此,技术人员可以计算在其他cfu剂量下分泌的抗原多肽的范围。

[0183] 上述剂量/剂量范围中的每一个可以与本文所述的任何给药方案一起施用。活性多肽的日剂量可以全天以1、2、3、4、5或6份给药。此外,每日剂量可以施用任何天数,在施用期之间具有任意数量的休息期。例如,可以每隔一天施用约0.01至约3.0M IU的IL-10/天/对象的剂量,总共6周。

[0184] 治疗

[0185] 本文所用的术语“治疗”、“处理”等是指改善或缓解疾病或病症(例如T1D)的特征性症状或表现。例如,T1D的治疗可导致对象中抗原特异性免疫耐受的恢复或诱导。在其他实例中,治疗意指阻止自身免疫性糖尿病或逆转自身免疫性糖尿病。如本文所用,这些术语还包括,预防或延迟疾病或病症或与疾病或病症相关的症状的发作,包括在患有所述疾病或病症之前降低疾病或病症或其相关症状的严重性。在痛苦之前的这种预防或减少是指将本发明所述的化合物或组合物给予患者,该患者在患有疾病或病症的给药时不给药。“预防”还包括预防疾病或病症或与其相关的症状的复发或复发预防,例如在一段时间的改善之后。治疗“有此需要的”对象表示对象患有疾病或病症,并以治疗具体疾病或病症的计划目的进行本发明的治疗性方法。

[0186] 患者亚群

[0187] 在一些实施方式中,使用本公开的方法治疗的对象可具有显著(例如,可测量的)残留 β 细胞功能。在这种情况下,即使在治疗中断或完全停止之后,对象也可以维持疾病缓解。新诊断的患者在诊断时通常具有一定数量的胰岛 β 细胞(β 细胞),因此这些患者能够产生一定量的内源性胰岛素。当用本公开的组合物和方法(例如,IL-10和PINS疗法)治疗时,这样的患者群体可特别好地受益。本文描述的治疗可以防止 β 细胞的进一步破坏,并因此可以诱导疾病缓解。出乎意料地是,发明人发现初始 β 细胞量对治疗的效果可以是重要的。然而,一旦对象的 β 细胞被破坏,这样的对象可能不再以相同的方式受益于所述治疗。

[0188] 未处理的T1D随时间发育并且逐渐恶化,因为胰腺中的 β 细胞被破坏。因此,由于本文所述方法可以停止疾病,有利的是在进步进展中尽可能早的治疗对象。因此,在一相关实施方式中,本发明的治疗性方法还包括在治疗前和治疗期间测量疾病的进展。

[0189] 治疗有效量

[0190] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指当根据期望的治疗方案施用时将引起期望的治疗效果或响应的非病原性微生物或本公开的组合物的量。在一些情况中,化合物或组合物以单位剂型提供,例如片剂或胶囊,当每天给药一次或多次时,其含有相当于治疗有效量的活性成分的量。

[0191] 本领域普通技术人员将理解,实现期望的治疗效果(例如,用于有效治疗T1D)所需的治疗有效量的重组微生物将变化,例如,取决于由微生物表达的IL-10多肽的性质,由微生物表达的抗原多肽的性质,给药途径,以及接受者的年龄、体重和其他特征。

[0192] 粘膜

[0193] 术语“粘膜”或“黏膜”在本文中根据其本领域公认的含义使用。“粘膜”可以是体内发现的任何粘膜,例如口腔粘膜,直肠粘膜,胃粘膜,肠粘膜,尿道粘膜,阴道粘膜,眼粘膜,颊粘膜,支气管或肺粘膜,以及鼻粘膜或嗅粘膜。

[0194] 如本文所用的术语“粘膜递”根据其本领域公认的含义使用,即,例如通过使本公开的组合物与粘膜接触而递送至粘膜。口腔粘膜递送包括口腔,舌下和牙龈递送途径。因此,在一些实施方式中,“粘膜递送”包括胃递送,肠递送,直肠递送,口腔递送,肺部递送,眼部递送,鼻腔递送,阴道递送和口服递送。

[0195] 术语“粘膜耐受”是指在对象通过粘膜途径暴露于抗原后,抑制哺乳动物对象(例如人类患者)中对抗原的特异性免疫应答。在一些情况中,粘膜耐受是全身耐受。低剂量口服耐受是由低剂量抗原诱导的口服耐受,并且通过主动免疫抑制表征,由可以转移对幼稚宿主的耐受的环磷酰胺敏感的调节性T细胞介导。高剂量口服耐受是由高剂量抗原诱导的口服耐受,对环磷酰胺治疗不敏感,并且通过抗原特异性T细胞的无反应性和/或缺失进行T细胞低反应性的诱导。对环磷酰胺的敏感性差异可用于区分低剂量和高剂量耐受(Strobel等,1983)。在一些情况中,口服耐受是低剂量口服耐受,如Mayer和Shao(2004)所述。

[0196] 免疫调节化合物

[0197] 术语“免疫调节化合物”或“免疫调节剂”在本文中根据其本领域公认的含义使用。免疫调节化合物可以是本领域技术人员已知的任何免疫调节化合物。

[0198] 在一些实施方式中,免疫调节化合物是诱导耐受的化合物。例如,通过诱导调节性T细胞,或以间接方式,例如通过激活未成熟树突细胞以耐受树突细胞和/或抑制Th2免疫应答诱导在成熟的树突状细胞上“共刺激”因子的表达,可以获得耐受性诱导。免疫调节和免

免疫抑制化合物是本领域技术人员已知的,包括但不限于细菌代谢物如精脒菌素(spergualin),真菌和链霉素代谢物如他克莫司或环孢菌素,免疫抑制细胞因子如IL-4, IL-10, IFN α , TGF β (作为调节性T细胞的选择性佐剂) Flt3L, TSLP和Rank-L (作为选择性致耐受性DC诱导剂),抗体和/或拮抗剂如抗CD40L,抗CD25,抗-CD20,抗IgE,抗CD3和蛋白质,肽或融合蛋白,例如CTL-41g或CTLA-4激动剂融合蛋白。在一些实施方式中,免疫调节化合物是免疫抑制化合物。在其他实施方式中,免疫抑制化合物是免疫抑制细胞因子或抗体。在其他实施方式中,免疫抑制细胞因子是耐受性增强细胞因子或抗体。本领域技术人员将理解,术语免疫调节化合物还包括其功能同源物。功能同系物是具有与预期目的基本相同或相似的功能的分子,但可以在结构上不同。在一些实例中,免疫调节化合物是抗CD3或其功能同源物。

[0199] 微生物

[0200] 本发明涉及使用至少一种微生物。在一些实施方式中,微生物是非病原性和非侵入性细菌。在其它实施方式中,微生物是非病原性和非侵入性酵母。

[0201] 在一些实施方式中,微生物是选自下述的酵母菌株:酵母菌属

[0202] (*Saccharomyces* sp.), 汉逊酵母属(*Hansenula* sp.), 克鲁维酵母菌属(*Kluyveromyces* sp.), 裂殖酵母(*Schizosaccharomyces* sp.), 接合酵母属(*Zygosaccharomyces* sp.), 毕赤酵母属(*Pichia* sp.), 红曲霉属(*Monascus* sp.), 地丝菌属(*Geothchum* sp) 和亚罗酵母属(*Yarrowia* sp.)。在一些实施方式中,酵母是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。在其他实施方式中,酿酒酵母是布拉氏酵母(*boulardii*) 亚种。在本发明的一实施方式中,重组酵母宿主载体系统是生物学遏制(contained)的系统。生物遏制(containment)是本领域技术人员已知的,并且可以通过引入营养缺陷型突变来实现,例如,自杀营养缺陷型突变,例如ThyA突变,或其等同物。

[0203] 在本发明的其他实施方式中,微生物是细菌,如非病原性细菌,例如,食品级细菌菌株。在一些实例中,非病原性细菌是革兰氏阳性细菌,例如,革兰氏阳性食品级细菌菌株。在一些实施方式中,革兰氏阳性食品级细菌菌株是乳酸发酵细菌菌株(即,乳酸菌(LAB)或双歧杆菌(*Bifidobacterium*))。

[0204] 在一些实施方式中,乳酸发酵细菌菌株是乳球菌(*Lactococcus*)、乳杆菌(*Lactobacillus*)或双歧杆菌(*Bifidobacterium*)物种。如本文所用,乳球菌或乳杆菌不限于特定种或亚种,而是意指包括任何乳球菌或乳杆菌种或亚种。示例性的乳球菌种包括:格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、鱼类乳球菌(*Lactococcus piscium*)、植物乳球菌(*Lactococcus plantarum*)和棉籽糖乳球菌(*Lactococcus raffinolactis*)。在一些例子中,乳酸乳球菌是乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*)、乳酸乳球菌叶蝉亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *Hordniae*)、或乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*)。

[0205] 示例性的乳杆菌种包括:耐酸乳杆菌(*Lactobacillus acetotolerans*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、活泼乳杆菌(*Lactobacillus agilis*)、双叉乳杆菌(*Lactobacillus algidus*)、食品乳杆菌(*Lactobacillus alimentarius*)、解淀粉乳杆菌(*Lactobacillus amylolyticus*)、嗜淀粉乳杆菌(*Lactobacillus amylophilus*)、食淀粉乳杆菌(*Lactobacillus amylovorus*)、动物乳杆菌(*Lactobacillus animalis*)、鸟乳杆菌

(*Lactobacillus aviaries*)、鸟乳杆菌不解棉子糖亚种(*Lactobacillus aviarius* subsp.*Araffinosus*)、鸟乳杆菌鸟亚种(*Lactobacillus aviarius* subsp.*Aviaries*)、白鲑乳杆菌(*Lactobacillus bavaricus*)、倍发酵乳杆菌(*Lactobacillus bif fermentans*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、布赫内氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)、保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)、卡尼乳杆菌(*Lactobacillus carnis*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、干酪乳杆菌不发酵乳糖亚种(*Lactobacillus casei* subsp.*Alactosus*)、干酪乳杆菌干酪亚种(*Lactobacillus casei* subsp.*Casei*)、干酪乳杆菌假植物亚种(*Lactobacillus casei* subsp.*Pseudoplan tarum*)、干酪乳杆菌鼠李糖亚种(*Lactobacillus casei* subsp.*Rhamnosus*)、干酪乳杆菌坚韧亚种(*Lactobacillus casei* subsp.*Tolerans*)、乳酪乳杆菌(*Lactobacillus cateniformis*)、纤维二糖乳杆菌(*Lactobacillus cellobiosus*)、丘状乳杆菌(*Lactobacillus collinoides*)、融合魏斯乳杆菌(*Lactobacillus confuses*)、棒状乳杆菌(*Lactobacillus coryniformis*)、棒状乳杆菌棒状亚种(*Lactobacillus coryniformis* subsp.

[0206] *Coryniformis*)、棒状乳杆菌扭曲亚种(*Lactobacillus coryniformis* subsp.

[0207] *Torquens*)、卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)、弯曲乳杆菌(*Lactobacillus curvatus*)、弯曲乳杆菌弯曲亚种(*Lactobacillus curvatus* subsp.*Curvatus*)、弯曲乳杆菌蜜二糖亚种(*Lactobacillus curvatus* subsp.*Melibiosus*)、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp.*Bulgaricus*)、德氏乳杆菌德氏亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp.*Delbrueckii*)、德氏乳杆菌乳酸亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp.*Lactis*)、:广布乳杆菌(*Lactobacillus divergens*)、香肠乳杆菌(*Lactobacillus farciminis*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、穹隆乳杆菌(*Lactobacillus fornicalis*)、食果糖乳杆菌(*Lactobacillus fructivorans*)、果糖乳杆菌(*Lactobacillus fructosus*)、鹌鸡乳杆菌(*Lactobacillus gallinarum*)、加氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)、禾谷乳杆菌(*Lactobacillus graminis*)、耐盐乳杆菌(*Lactobacillus halotolerans*)、哈氏乳杆菌(*Lactobacillus hamster*)、瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)、异型腐酒乳杆菌(*Lactobacillus heterohiochii*)、希氏乳杆菌(*Lactobacillus hilgardii*)、麦芽香乳杆菌(*Lactobacillus homohiochii*)、惰性乳杆菌(*Lactobacillus iners*)、肠乳杆菌(*Lactobacillus intestinalis*)、詹氏乳杆菌(*Lactobacillus jensenii*)、约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)、坎氏乳杆菌(*Lactobacillus kandleri*)、开菲尔乳杆菌(*Lactobacillus kefir*)、马乳酒样乳杆菌(*Lactobacillus kefirano faciens*)、偏性异发酵乳杆菌(*Lactobacillus kefirgranum*)、昆氏乳杆菌(*Lactobacillus kunkeei*)、乳酸乳杆菌(*Lactobacillus lactis*)、莱士曼氏乳酸杆菌(*Lactobacillus leichmannii*)、林氏乳杆菌(*Lactobacillus lindneri*)、坏发酵乳杆菌(*Lactobacillus malefermentans*)、马里乳杆菌(*Lactobacillus mali*)、马耳他乳杆菌(*Lactobacillus maltaromicus*)、马尼厚乳杆菌(*Lactobacillus manihotivorans*)、稍小乳杆菌(*Lactobacillus minor*)、小小乳杆菌(*Lactobacillus minutes*)、粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*)、鼠乳杆菌(*Lactobacillus murinus*)、纳氏乳杆菌(*Lactobacillus nagelii*)、口乳杆菌

[0208] (*Lactobacillus oris*)、面包乳杆菌 (*Lactobacillus panis*)、类布氏乳杆菌 (*Lactobacillus parabuchneri*)、副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*)、副干酪乳杆菌副干酪亚种 (*Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei*)、副干酪乳杆菌坚韧亚种 (*Lactobacillus paracasei subsp. Tolerans*)、类高加索乳杆菌 (*Lactobacillus parakefiri*)、类消化乳杆菌 (*Lactobacillus paralimentarius*)、类植物乳杆菌 (*Lactobacillus paraplantarum*)、戊糖乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus*)、类食品乳杆菌 (*Lactobacillus perolens*)、栖鱼乳杆菌 (*Lactobacillus piscicola*)、胚牙乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、脑桥乳杆菌 (*Lactobacillus pontis*)、罗伊乳杆菌

[0209] (*Lactobacillus reuteri*)、鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)、龈沟乳杆菌 (*Lactobacillus rimae*)、罗氏乳杆菌 (*Lactobacillus rogosa*)、瘤胃乳杆菌 (*Lactobacillus ruminis*)、米酒乳杆菌 (*Lactobacillus sakei*)、米酒乳杆菌肉花亚种 (*Lactobacillus sakei subsp. Camosus*)、米酒乳杆菌米酒亚种 (*Lactobacillus sakei subsp. Sakei*)、唾液乳杆菌 (*Lactobacillus salivarius*)、唾液乳杆菌水杨素亚种 (*Lactobacillus salivarius subsp. Salicinius*)、唾液乳杆菌唾液亚种 (*Lactobacillus salivarius subsp. Salivarius*)、旧金山乳杆菌 (*Lactobacillus sanfranciscensis*)、沙氏乳杆菌 (*Lactobacillus sharpeae*)、苏氏乳杆菌 (*Lactobacillus suebicus*)、发状乳杆菌 (*Lactobacillus trichodes*)、龈乳杆菌 (*Lactobacillus uli*)、牛痘乳杆菌 (*Lactobacillus vaccinostercus*)、阴道乳杆菌 (*Lactobacillus vaginalis*)、绿色乳杆菌 (*Lactobacillus viridescens*)、小牛乳杆菌 (*Lactobacillus vitulinus*)、木糖乳杆菌 (*Lactobacillus xylosus*)、山梨氏乳杆菌 (*Lactobacillus yamanashiensis*)、山梨氏乳杆菌马里亚种 (*Lactobacillus yamanashiensis subsp. Mali*)、山梨氏乳杆菌山梨亚种 (*Lactobacillus yamanashiensis subsp. Yamanashiensis*)、玉米乳杆菌

[0210] (*Lactobacillus zeae*)、青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*)、角双歧杆菌 (*Bifidobacterium angulatum*)、两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)、短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*)、链状双歧杆菌 (*Bifidobacterium catenulatum*)、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) 和婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*)。在一些例子中, LAB是乳酸乳球菌 (LL)。

[0211] 在其它实例中, 细菌选自下组: 阿尔氏肠球菌 (*Enterococcus alcedinis*)、阿桂氏肠球菌 (*Enterococcus aquimarinus*)、亚洲肠球菌 (*Enterococcus asini*)、鸟肠球菌 (*Enterococcus avium*)、卡氏肠球菌 (*Enterococcus caccae*)、山茶肠球菌

[0212] (*Enterococcus camelliae*)、坎氏肠球菌 (*Enterococcus canintestini*)、犬肠球菌

[0213] (*Enterococcus canis*)、酪黄肠球菌 (*Enterococcus casseliflavus*)、盲肠肠球菌

[0214] (*Enterococcus cecorum*)、鸽肠球菌 (*Enterococcus columbae*)、多样肠球菌 (*Enterococcus devriesei*)、迪埃丝肠球菌 (*Enterococcus diestrammenae*)、殊异肠球菌 (*Enterococcus dispar*)、坚韧肠球菌 (*Enterococcus durans*)、埃肯肠球菌

[0215] (*Enterococcus eurekensis*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌

[0216] (*Enterococcus faecium*)、鹌鸡肠球菌 (*Enterococcus gallinarum*)、浅黄肠球菌

(*Enterococcus gilvus*)、溶过氧化肠球菌(*Enterococcus haemoperoxidus*)、荷曼氏肠球菌(*Enterococcus hermanniensis*)、海氏肠球菌(*Enterococcus hirae*)、意大利肠球菌(*Enterococcus italicus*)、乳酸肠球菌(*Enterococcus lactis*)、乐玛尼肠球菌(*Enterococcus lemanii*)、病臭肠球菌(*Enterococcus malodoratus*)、莫拉氏肠球菌(*Enterococcus moraviensis*)、蒙氏肠球菌(*Enterococcus mundtii*)、*Enterococcus olivae*、苍白肠球菌(*Enterococcus pallens*)、铅黄肠球菌(*Enterococcus phoeniculicola*)、植物肠球菌(*Enterococcus plantarum*)、假鸟肠球菌(*Enterococcus pseudoavium*)、魁北克肠球菌(*Enterococcus quebecensis*)、棉子糖肠球菌

[0217] (*Enterococcus raffinosus*)、鼠肠球菌(*Enterococcus ratti*)、瑞氏肠球菌

[0218] (*Enterococcus rivorum*)、罗泰肠球菌(*Enterococcus rotai*)、解糖肠球菌(*Enterococcus saccharolyticus*)、西里西亚肠球菌(*Enterococcus silesiacus*)、孤立肠球菌(*Enterococcus solitaries*)、硫磺肠球菌(*Enterococcus sulfurous*)、特氏肠球菌(*Enterococcus termitis*)、泰氏肠球菌(*Enterococcus thailandicus*)、尿肠球菌(*Enterococcus ureasiticus*)、解尿肠球菌(*Enterococcus ureilyticus*)、维克肠球菌(*Enterococcus viikkiensis*)、维洛肠球菌(*Enterococcus villorum*)、和香坊肠球菌(*Enterococcus xiangfangensis*)。

[0219] 在其它实例中,细菌选自下组:无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、咽峡炎(*Streptococcus anginosus*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)、犬链球菌

[0220] (*Streptococcus canis*)、星座链球菌(*Streptococcus constellatus*)、停乳链球菌

[0221] (*Streptococcus dysgalactiae*)、马蹄足链球菌(*Streptococcus equines*)、海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)、中间链球菌(*Streptococcus intermedius*)、米勒链球菌

[0222] (*Streptococcus milleri*)、缓症链球菌(*Streptococcus mitis*)、变异链球菌

[0223] (*Streptococcus mutans*)、口腔链球菌(*Streptococcus oralis*)、副溶血链球菌

[0224] (*Streptococcus parasanguinis*)、拟链球菌(*Streptococcus peroris*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumonia*)、假肺链球菌(*Streptococcus pseudopneumoniae*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、鼠伤寒链球菌(*Streptococcus ratti*)、唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*)、牙龈链球菌(*Streptococcus tigurinus*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、血链球菌(*Streptococcus sanguinis*)、表兄链球菌(*Streptococcus sobrinus*)、猪链球菌(*Streptococcus suis*)、乳房链球菌(*Streptococcus uberis*)、前庭链球菌(*Streptococcus vestibularis*)、绿色链球菌(*Streptococcus viridians*)和兽疫链球菌(*Streptococcus zooepidemicus*)。

[0225] 在本发明的特定方面中,革兰氏阳性食品级细菌菌株是乳酸乳球菌或其亚种中的任一种,包括乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* subsp.*Cremoris*)、乳酸乳球菌叶蝉亚种(*Lactococcus lactis* subsp.*Hordniae*)、和乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp.*Lactis*)。在本发明的另一方面,重组革兰氏阳性细菌菌株是生物学遏制的系统,如无质粒乳酸乳球菌菌株MG1363,其丧失了正常生长和在乳中产酸的能力,(Gasson, M.J. (1983) J.Bacterid.154:1-9);或苏氨酸-和嘧啶-营养缺陷型衍生物乳酸乳球菌菌株(Sorensen等, (2000) Appl.Environ.Microbiol.66:1253-1258;和Glenting等(2002) 68:

5051-5056)。

[0226] 在本发明的一实施方式中,重组细菌宿主载体系统是生物学遏制的系统。生物遏制是本领域技术人员已知的,并且可以通过引入营养缺陷型突变来实现,例如,自杀营养缺陷型突变,例如ThyA突变,或其等同物,削弱DNA合成。营养缺陷型突变的其他实例可以削弱RNA、细胞壁或蛋白质合成。或者,生物遏制可以在携带编码IL-10多肽或IL-10变体的基因的质粒水平上实现,例如,通过使用不稳定的附加体构建体,其在几代后丢失。如果需要,几种水平的遏制可以组合,例如质粒不稳定性和营养缺陷型,以确保高水平的遏制。

[0227] 构建体

[0228] 在本发明中,微生物(例如,非病原性革兰氏阳性细菌)在目标位点,即粘膜递送IL-10多肽和T1D特异性抗原(例如,PINS)。例如,微生物(例如,LAB)表达IL-10多肽,在这之后分泌IL-10多肽(如果使用了IL-10的分泌型)。因此,在一个具体实施方式中,微生物(例如,LAB)如乳酸乳球菌在(例如,在胃肠道中的)目标粘膜的位点表达IL-10和PINS。

[0229] 使用操纵子能够协调IL-10多肽和T1D特异性抗原多肽(例如,PINS)的表达。细菌宿主细胞中的多顺反子表达系统描述于例如属于Vanden-Broucke等的美国专利申请号2014/0105863中,其通过引用将其全部内容纳入本文。

[0230] 在一实施方式中,本发明涉及稳定转染的微生物,即,其中用于编码IL-10多肽和T1D特异性抗原(例如,PINS)基因的基因已经被整合到宿主细胞的基因组中的微生物。用于建立稳定转染的微生物的技术是本领域已知的。例如,可以通过同源重组将IL-10多肽和T1D特异性抗原(例如,PINS)基因克隆到宿主的基因组中,例如,染色体中。在一些实施方式中,宿主的必需基因被同源重组事件破坏,例如基因的缺失、导致由必需基因编码的蛋白质的无活性形式的一个或多个氨基酸取代、或导致由必需基因编码的蛋白质的截短形式的移码突变。在一个实施方式中,必需基因是thyA基因。在例如,WO 02/090551中描述了优选的技术,通用引用将其全部内容纳入本文。质粒可以是自我复制的,例如,携带1个或多个感兴趣的基因和1个或多个抗性标志物。然后,转化质粒可以是任何质粒,只要其不能补充破坏的必需基因,例如,thyA基因。或者,质粒是整合型质粒。在后一种情况中,通过在必需基因的基因座(例如,thyA位点)处引起整合,整合型质粒自身可以用于破坏必需基因,因为破坏了必需基因(例如,thyA基因)的功能。在一些情况中,必需基因(如thyA基因)被双重同源重组取代,通过包含1个或多个感兴趣基因的盒,侧接靶向对必需基因的插入的靶序列,如thyA靶位点。应理解的是,这些靶序列足够长并且足够同源,能够将感兴趣基因整合到靶位点中。在一些实例中,本公开的IL-10表达盒在thyA基因座处整合。

[0231] 编码IL-10多肽和T1D特异性抗原(例如,PINS)的遗传构建体可以整合到微生物基因组DNA中,例如,细菌或酵母染色体中,例如,乳球菌染色体中。在后一种情况中,可以整合核酸的单个或多个拷贝;整合可以发生在染色体的随机位点,或如上所述,在其预定位点,例如,如在非限制的实例中,在乳球菌(例如,乳酸乳球菌)的thyA基因座中的预定位点。

[0232] 因此,在一实施方式中,编码IL-10多肽和T1D特异性抗原(例如,PINS)的遗传构建体可以进一步包含配置成实现将遗传构建体插入宿主细胞的基因组(例如染色体)中的序列。

[0233] 在一些实例中,可以通过同源重组促进遗传构建体插入宿主细胞的基因组(例如染色体)内的特定位点。例如,发明的遗传构建体可包含与宿主细胞基因组(例如染色体)内

的所述整合位点同源的一个或多个区域。所述基因组(例如染色体)位点处的序列可以是天然的,即天然存在的序列,或者可以是先前遗传工程引入的外源序列。例如,1个或多个同源区域可以是至少50bp,100bp,200bp,300bp,400bp,500bp,600bp,700bp,800bp,900bp,1000bp或更多。

[0234] 在一个实例中,可以包括两个同源区域,侧接本发明的遗传构建体中存在的相关表达单元的各侧。这样的构型可以有利地在宿主细胞中插入相关序列,即至少编码和影响感兴趣抗原表达的序列。进行同源重组(特别是在细菌宿主中)以及选择重组体的方法是本领域公知的。

[0235] 本领域技术人员已知微生物的转化方法,例如原生质体转化和电穿孔。

[0236] 通过对微生物(例如,乳酸乳球菌)中存在的表达载体使用同源表达和/或分泌信号可以实现高度表达。表达信号对于本领域技术人员而言是显而易见的。可以根据纳入的微生物(例如乳酸乳球菌)优化用于表达的表达载体。例如,已知在乳球菌,乳酸乳杆菌,干酪乳杆菌和植物乳杆菌中提供足够水平表达的特异性表达载体。此外,已知开发用于在非病原性性、非定植、非侵入性食品级细菌乳酸乳球菌中表达异源抗原的系统(参见英国专利GB2278358B,其通过引入纳入本文)。根据本发明特别优选的构建体包含PCT/NL95/00135(WO-A-96/32487)中所述多拷贝的表达载体,其中已经纳入了编码IL-10多肽和/或T1D特异性抗原(例如,PINS)的核苷酸序列。这种构建体特别适合于以高表达水平在乳酸菌中(特别是在乳杆菌中)表达所需抗原,并且还可以有利地用于将表达的产物导向细菌细胞的表面。构建体(例如,PCT/NL95/00135)的特征在于编码IL-10多肽和/或T1D特异性抗原(例如,PINS)的核酸序列之前是5'非翻译核酸序列,其至少包含核糖体识别和RNA稳定化所需的最小序列。其后可以是翻译起始密码子,其可以接着(紧接)乳酸菌基因翻译的核酸序列的5'末端部分至少5个密码子的片段或片段的结构或功能等同物。片段也可以由启动子控制。PCT/NL95/00135的内容,包括其中所公开的不同实施方式和本说明书中所提及的所有其他文件通过引用纳入本文。本发明的一个方面提供了这样的方法,其允许宿主中异源基因的高水平调节表达和表达与分泌的偶联。在另一个实施方式中,根据WO 93/17117,采用T7噬菌体RNA聚合酶及其同源启动子开发强大的表达系统,其通过引用纳入本文。在一个实施方式中,表达质粒衍生自pT1 NX(GenBank:HM585371.1)。

[0237] 在一些情况中,根据本发明采用的启动子在细菌中被组成型表达。组成型启动子的使用避免了提供诱导物或其他调节信号以进行表达的需要。在一些情况中,启动子将表达介导在细菌宿主细胞保持存活水平,即保留一些代谢活性,即使不维持生长。然后有利地,这种表达可以处于低水平。例如,当表达产物在细胞内积累时,表达水平可导致表达产物在小于约10%的细胞蛋白质中累积,约或小于约5%,例如约1-3%。启动子可以与所用的细菌同源,即在自然界中在该细菌中发现的细菌。例如,乳球菌启动子可用于乳球菌。用于乳酸乳球菌(或其他乳球菌)的优选启动子是衍生自乳酸乳球菌染色体的“P1”

[0238] (Waterfield,N R,Lepage,R W F,Wilson,P W,等(1995).“乳球菌启动子的分离和其在研究乳酸乳球菌中细菌荧光素酶合成的用途(The isolation of lactococcal promoters and their use in investigating bacterial luciferase synthesis in *Lactococcus lactis*)”Gene 165(1):9-15)。启动子的其他实例包括,usp45启动子,gapB启动子和h11A启动子。其他有用的启动子述于Steidler等的美国专利8,759,088,以及

Vanden-Broucke等的美国专利申请号2014/0105863中,其公开内容通过引用其全部内容纳入本文。在一些实例中,编码IL-10多肽的核酸置于h11A启动子之下。

[0239] 一个或多个核酸构建体可包含编码分泌信号序列的核酸。因此,在一些实施方式中,编码IL-10和/或T1D特异性抗原(例如,PINS)的核酸可以提供多肽的分泌,例如,通过将编码信号序列的核酸序列与编码多肽的核酸序列适当地偶联。含核酸细菌分泌抗原的能力可以在维持生物体活力的培养条件下体外测试。优选的分泌信号序列包括在革兰氏阳性生物体(如芽孢杆菌(*Bacillus*)、梭菌(*Clostridium*)和乳杆菌(*Lactobacillus*))中具有活性的那些中任一个。这些序列可包括解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的 α -淀粉酶分泌前导序列或由一些葡萄球菌(*Staphylococcus*)菌株分泌的葡萄球菌激酶的分泌前导序列,已知其在革兰氏阳性和革兰氏阴性宿主中起作用(参见“使用芽孢杆菌的基因表达(Gene Expression Using *Bacillus*)”,Rapoport(1990) *Current Opinion in Biotechnology* 1:21-27),或来自许多其他芽孢杆菌酶或S-层蛋白质的前导序列(参见Harwood和Cutting,芽孢杆菌的分子生物学方法(*Molecular Biological Methods for Bacillus*),John Wiley&Co.1990的第341-344页)。在一个实施方案中,所述分泌信号源自usp45(Van Asseldonk等人(1993)

[0240] *Mol.Gen.Genet.*240:428-434)。这类分泌前导序列在本文中称之为例如SSusp45。在一些实施方式中,使用SSusp45组成型分泌IL-10多肽。在其他实例中,使用SSusp45分泌PINS多肽。在另一实例中,使用SSusp45分泌IL-10多肽和PINS多肽。

[0241] 本领域普通技术人员将理解,使用本公开的方法递送至对象的IL-10和PINS的最佳量因例如表达IL-10多肽的PINS多肽的微生物和遗传构建体而变化,例如,用于遗传构建体中的启动子强度。通常,微生物将以等于特定量的表达的IL-10多肽和PINS多肽的量给予,或以在相应对象中产生相应IL-10多肽或PINS多肽的所需PK概况的量给予。示例性的每日IL-10多肽或PINS多肽剂量为每天约10fg至约100 μ g活性多肽。其他示例性剂量范围为每天约1pg至约100 μ g;或每天约1ng至约100 μ g。

[0242] 上述剂量可以通过每天给予对象有效量的微生物来实现,其中微生物适于表达足够量的IL-10和T1D特异性抗原(例如,PINS)以实现所需的剂量,例如上述那些。分泌IL-10多肽和T1D特异性抗原(例如,PINS多肽)的微生物可以约 10^4 菌落形成单位(cfu)至约 10^{12} cfu/天的剂量递送,具体是约 10^6 cfu至约 10^{12} cfu/天,更具体是约 10^9 cfu至约 10^{12} cfu/天。分泌的IL-10多肽和T1D特异性抗原(例如,PINS多肽)的量可以基于cfu确定,例如根据Steidler等,*Science* 2000;289(5483):1352-1355中描述的方法,或通过使用ELISA。例如,特定微生物可以每 10^9 cfu分泌至少约1ng至约1 μ g的IL-10。基于此,技术人员可以计算在其他cfu剂量下分泌的IL-10多肽的范围。

[0243] 上述剂量/剂量范围中的每一个可以与本文所述的任何给药方案一起施用。日剂量可以全天以1,2,3,4,5或6份给药。此外,每日剂量可以施用任何天数,在施用期之间具有任意数量的休息期。例如,可以相当于约0.01至约3M IU的IL-10/天或每隔一天的剂量给予对象微生物,持续至少约1周,至少约2周,至少约3周,至少约4周,至少约5周,或至少约6周的时间。在一些实例中,以相当于约0.1至约5MIU/天,或约0.3至约3MIU,例如持续约5天,约7天或约14天的剂量给予对象微生物。示例性的剂量述于,例如Hartemann等,*Lancet Diabetes Endocrinol.*2013,1(4):295-305中,其公开内容通过引用其全部内容纳入本文。

[0244] 制剂和方案

[0245] 在本公开的一些方法中,使用产生IL-10多肽和T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽的微生物(例如,LAB)向对象(例如,人T1D患者)给予(递送)IL-10多肽和T1D特异性抗原(例如,PINS)。

[0246] 在一些实施方式中,将微生物(例如,LAB)每天1、2、3、4、5或6次给予,例如使用口服制剂,所述微生物任选地包含在本公开的组合物(例如,药物组合物)或本公开的单位剂形中。在一些实施方式中,每天,每隔一天,每周一次,每周两次,每周三次或每周四次给予微生物。在其他实施方案中,治疗每两周进行一次。在其他实施方案中,治疗每三周进行一次。在其他实施方案中,治疗每月进行一次。

[0247] 例如,治疗周期的持续时间是7天至对象的一生,如治疗或逆转T1D,或防止复发所需。在一些实施方式中,治疗周期可持续约30天至约2年。在其他实施方案中,对象将具有持续30天至1.5年的治疗周期。在其他实施方案中,对象将具有持续30天至1年的治疗周期。在其他实施方案中,对象将具有持续30天至11个月的治疗周期。在其他实施方案中,对象将具有持续30天至10个月的治疗周期。在其他实施方案中,对象将具有持续30天至9个月的治疗周期。在其他实施方案中,对象将具有持续30天至8个月的治疗周期。在其他实施方案中,对象将具有持续30天至7个月的治疗周期。在其他实施方案中,对象将具有持续30天至6个月的治疗周期。在其他实施方案中,对象将具有持续30天至5个月的治疗周期。在其他实施方案中,对象将具有持续30天至4个月的治疗周期。在其他实施方案中,对象将具有持续30天至3个月的治疗周期。在其他实施方案中,对象将具有持续30天至2个月的治疗周期。

[0248] 在其他实施方式中,治疗周期将基于追踪疾病进展的标志物的水平包括血糖指标、胰岛素自身抗体(IAA)水平、片段C水平和胰岛炎。优选地,对象处于早期发生的糖尿病。还可以评估对象的Treg细胞的水平,所述Treg细胞抑制对 β 细胞的免疫响应。在示例性的实施方式中,治疗对象至少直到不存在进一步的疾病进展,优选直到出现返回正常血糖。可以治疗对象额外的一段时间以保证抑制并逆转疾病的Treg细胞群。还可以监测对象并在再次出现疾病的任何标记首次出现时治疗对象。

[0249] 可以在对象中临床需要的时间内给予每日维持剂量,例如从1天到几年(例如持续对象的整个剩余寿命);例如从大约(2,3或5天,1或2周,或1个月)向上和/或例如最长达大约(5年,1年,6个月,1个月,1周,或3或5天)。通常给予每日维持剂量持续约3至约5天或持续约1周至约1年。然而,例如,单位剂量应当每天两次至每两周一次给予,直至观察到治疗效果。

[0250] 产生IL-10多肽和T1D特异性抗原(例如,PINS)多肽的微生物可以单一或组合疗法(例如,使用共治疗剂方案)给予对象用于治疗T1D。述于“共疗法”、“共治疗剂”或其变体表示这样的治疗方案,其中,给予对象至少一个其他治疗活性剂,如其他免疫调节化合物。因此,在一些实施方式中,本公开的组合物包含其他治疗活性剂。在一些实施方式中,本公开的组合物包含至少一种其他免疫调节物质,如抗体(例如,抗-CD3抗体)。在一些实例中,本公开的方法还包括向对象(例如,人患者)给予其他免疫调节物质,如抗体(例如,抗-CD3抗体)。

[0251] 药物组合物和运载体

[0252] 微生物(例如,细菌,如本文所述LAB)可以纯的形式,与其他活性成分组合,和/或

与药学上可接受的(即,无毒的)赋形剂或运载体组合给予。术语“药学上可接受的”在本文中根据其本领域公认的含义使用,并且是指与药物组合物的其他成分相容并且对其受体无害的运载体。

[0253] 本公开的组合物可以任何已知的或有效的剂量或产品形式制备,适用于递送微生物(例如,细菌)至粘膜,其可以包括药物组合物和剂型以及营养产品形式。

[0254] 在一些实施方式中,药物组合物(例如,制剂)是口服药物组合物。在根据该实施方案的一些实例中,制剂或药物组合物包含干燥形式(例如,干粉形式;例如,冷冻干燥的形式)的非病原性微生物或其压实形式,任选地与其他干燥运载体组合。口服制剂通常包括惰性稀释剂运载体或可食用运载体。

[0255] 在一些实例中,口服制剂包含包衣或利用包封策略,其促进制剂递送到肠道中,和/或允许微生物在肠道(例如,回肠,小肠,或结肠)中释放和水合。一旦微生物从制剂中释放并充分水合,它就开始表达生物活性多肽,其随后释放到周围环境中,或在微生物表面上表达。这种包衣和包封策略(即延迟释放策略)是本领域技术人员已知的。参见例如,U.S.5,972,685;WO 2000/18377;和WO 2000/22909,其各自公开内容通过引用其全部内容纳入本文。

[0256] 在一些实施方式中,本公开提供了一种药物组合物,其可包含冻干或冷冻干燥形式的微生物(例如,非病原性细菌),任选地结合其他组分,如葡聚糖,谷氨酸钠和多元醇。示例性的冷冻干燥的组合物述于例如Corveleyn等的美国专利申请号2012/0039853中,其公开内容通过引用其全部内容纳入本文。示例性的制剂包含冷冻干燥的细菌(例如,治疗有效量的细菌)和药学上可接受的运载体。冷冻干燥的细菌可以胶囊,片剂,颗粒和粉末的形式制备,其各自可以口服给药。或者,可以在合适的培养基中将冷冻干燥的细菌制备成含水悬浮液,或者可以在使用前将冻干的细菌悬浮在合适的培养基例如饮品中。这类组合物可以额外地包含能够用于维持稳定的悬浮液的稳定剂,例如,不存在细菌生物质的沉淀、聚集或漂浮。

[0257] 对于口服给药,制剂可以是胃耐受的口服剂型。例如,口服剂型(例如,胶囊,片剂,丸剂,微丸,颗粒等)用抵抗在胃中溶解或破坏但不抵抗在肠中溶解或破坏的赋形剂薄层(通常是聚合物,纤维素衍生物和/或亲脂性物质)包衣,从而允许转移通过胃,有利于在肠(例如,小肠或结肠)中崩解、溶解和吸收。

[0258] 在一些实例中,口服制剂可包括提供微生物的受控释放,持续释放或延长释放的化合物,从而提供其中编码的所需蛋白质的受控释放。这些剂型(例如,片剂或胶囊剂)通常含有常规和众所周知的赋形剂,例如亲脂性、聚合性、纤维素、不溶性和/或可溶胀的赋形剂。控释制剂也可用于任何其他递送部位,包括肠,结肠,生物粘附或舌下递送(即,牙粘膜递送)和支气管递送。当发明的组合物待给予直肠或阴道时,药物制剂可包括栓剂和乳膏。在这种情况下,宿主细胞悬浮在也包括脂质的常见赋形剂的混合物中。上述制剂中的每一种都是本领域熟知的,并且例如在以下参考文献中描述:Hansel等,(1990,药物剂型和药物递送系统(Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems),第5版,William和Wilkins);Chien 1992,新型药物递送系统(Novel drug delivery system),第2版,M.Dekker);Prescott等,(1989,新型药物递送(ORAL DRUG DELIVERY),J.Wiley&Sons);Gazzaniga等.,(1994,用于结肠特异性递送的口服缓释系统(Oral delayed release

system for colonic specific delivery), Int. J. Pharm. 108:77-83)。

[0259] 在一些实施方式中,口服制剂包括可增强微生物表达的生物活性多肽的粘膜递送和/或粘膜摄取的化合物。在其他实例中,制剂包括增强制剂内和/或释放后微生物活力的化合物。

[0260] 本发明的细菌可以悬浮在药物制剂中,用于给予患有待治疗疾病的人或动物。此类药物制剂包括但不限于活的革兰氏阳性细菌和适于给药的培养基。细菌可以在常见赋形剂存在的情况下经冻,所述赋形剂例如乳糖,其他糖,碱和/或碱土金属硬脂酸盐,碳酸盐和/或硫酸盐(例如硬脂酸镁,碳酸钠和硫酸钠),高岭土,二氧化硅,芳香剂和香料。如此冻干的细菌可以胶囊,片剂,颗粒和粉末(例如漱口水粉末)的形式制备,各种形式可以通过口服途径给药。或者,可以在合适的培养基中将革兰氏阳性细菌制备为水性悬浮液,或者可以在使用前将冻干的细菌悬浮在合适的培养基中,这种培养基包括本文提及的赋形剂和其他赋形剂,例如葡萄糖、甘氨酸和糖精钠。

[0261] 在一些实例中,使用任何合适的方法将微生物局部递送至对象的胃肠道。例如,可以使用微球递送系统来增强向肠道的递送。微球递送系统包括具有包衣的微粒,所述包衣提供局部释放到对象的胃肠道中(例如,控释制剂,例如肠溶包衣制剂和结肠制剂)。

[0262] 对于口服给药,可以配制胃肠道口服剂型,该剂型还可以包括提供受控释放革兰氏阳性细菌的化合物,从而提供其中编码的所需蛋白质(例如IL-10)的受控释放。例如,口服剂型(包括胶囊,片剂,丸剂,颗粒,粉末)可以用抵抗在胃中溶解或破坏但不抵抗在肠中溶解或破坏的赋形剂薄层(例如,聚合物,纤维素衍生物和/或亲脂性物质)包衣,因而允许转移通过胃,有利于在肠中崩解、溶解和吸收。

[0263] 口服剂型可以设计成允许革兰氏阳性细菌和产生的外源蛋白质的缓慢释放,例如受控释放,持续释放,延长释放,持续作用片剂或胶囊。这些剂型通常含有常规和众所周知的赋形剂,例如亲脂性、聚合性、纤维素、不溶性和可溶胀的赋形剂。本领域熟知这类制剂,并且述于例如下述参考文献中:Hansel等,药物剂型和药物递送系统(Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems),第5版,William和Wilkins,1990;Chien 1992,新型药物递送系统(Novel drug delivery system),第2版,M.Dekker;Prescott等,新型药物递送(Novel drug delivery),J.Wiley&Sons,1989;和Gazzaniga等, Int. J. Pharm. 108:77-83(1994)。

[0264] 药物剂型(例如胶囊)可以用pH依赖性Eudragit聚合物包衣以获得胃液抗性和在回肠末端和结肠处的预期递送,其中聚合物在pH6.5溶解。通过使用其他Eudragit聚合物或聚合物之间的不同比例,可以调节延迟释放曲线,以释放细菌,例如在十二指肠或空肠中。

[0265] 药物组合物含有至少一种药学上可接受的运载体。合适的赋形剂、稀释剂和运载体的非限制性实例包括:防腐剂,无机盐,酸,碱,缓冲剂,营养素,维生素,填充剂和增量剂,例如淀粉,糖,甘露糖醇和硅酸衍生物;粘合剂如羧甲基纤维素和其它纤维素衍生物,藻酸盐,明胶和聚乙烯吡咯烷酮;保湿剂如甘油/崩解剂如碳酸钙和碳酸氢钠;用于延缓溶解的试剂,如石蜡;再吸收促进剂,如季铵化合物;表面活性剂如乙酰醇,甘油单硬脂酸酯;吸附载体如高岭土和膨润土;载体如丙二醇和乙醇,和润滑剂如滑石,硬脂酸钙和硬脂酸镁,以及固体聚乙二醇。

[0266] 可以包含药学上相容的粘合剂和/或佐剂材料作为组合物的一部分。片剂、丸剂、

胶囊、锭剂等可含有任何以下成分或具有相似特性的化合物：粘合剂例如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶；赋形剂例如淀粉或乳糖，分散剂例如海藻酸、羧甲基淀粉 (Primogel) 或玉米淀粉；润滑剂例如硬脂酸镁；助流剂例如二氧化硅胶体；甜味剂例如蔗糖或糖精；或调味剂例如薄荷、水杨酸甲酯、橙调味剂。当剂量单位形式是胶囊时，除了上述类型的材料以外，它可以包含液体运载体（如脂肪油）。此外，剂量单位形式可含有多种其他材料，其修饰剂量单位的物理形式，例如糖、虫胶和其他肠溶试剂的包衣。此外，除活性化合物之外，糖浆剂还可含有作为调味剂的蔗糖和其他防腐剂、染料和着色剂和调味剂。应理解，药学上可接受的载体的形式和特征取决于与其组合的活性成分的量、给药途径和其它众所周知的变量。所述运载体必须是“可接受的”，这意味着它与该制剂的其它成分相容，并且对受体无害。

[0267] 用于给药的替代制剂包括无菌水溶液或非水溶液，悬浮液和乳液。非水性溶剂的示例是二甲基亚砷、醇、丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油，和可注射有机酯如油酸乙酯。含水载体包括醇和水的混合物，缓冲介质和盐水。静脉内载剂包括液体和营养补充剂、电解质补充剂，例如基于林格右旋糖的那些物质等。也可存在防腐剂和其添加剂，例如，抗菌生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。这些递送方法可以有各种液体制剂，包括盐水，醇，DMSO和水基溶液。

[0268] 口服含水制剂包括赋形剂，例如药物级甘露醇，乳糖，淀粉，硬脂酸镁，糖精钠，纤维素，碳酸镁和/或类似物。这些组合物采取溶液形式，例如漱口水，还包含含水载体，例如水，醇/水溶液，盐水溶液，肠胃外载剂如氯化钠，林氏葡萄糖等。

[0269] 水性漱口水制剂是本领域技术人员熟知的。关于漱口水和口腔冲洗剂的制剂详见以下文献，例如美国专利6,387,352，美国专利6,348,187，美国专利6,171,611，美国专利6,165,494，美国专利6,117,417，美国专利5,993,785，美国专利5,695,746，美国专利5,470,561，美国专利4,919,918，美国专利申请2004/0076590，美国专利申请2003/0152530和美国专利申请2002/0044910，其各自通过引用说明书的该部分以及说明书的所有其他部分具体纳入本文。

[0270] 其他添加剂可以存在于本公开的制剂中，例如调味剂，甜味剂或着色剂，或防腐剂。薄荷，例如来自薄荷或留兰香，肉桂，桉树，柑橘，决明子，茴香和薄荷醇，是合适的调味剂的实例。例如，调味剂以0至3%，上至2%如上至0.5%，的量存在于口腔组合物中，例如，约0.2%，在液体组合物的情况中。

[0271] 甜味剂包括人造或天然甜味剂，例如糖精钠，蔗糖，葡萄糖，糖精，右旋糖，左旋糖，乳糖，甘露醇，山梨糖醇，果糖，麦芽糖，木糖醇，奇异果甜蛋白，阿斯巴甜，D-色氨酸，二氢查尔酮，乙酰磺胺酸及其任意组合，其可以口腔组合物的0至2%，例如至多1%w/w，如0.05至0.3%w/w的量存在。

[0272] 着色剂是合适的天然或合成颜色，例如二氧化钛或CI 42090，或其混合物。着色剂优选以0-3%范围的量存在于组合物中；例如，上至0.1%，如上至0.05%，例如，约0.005-0.0005%，在液体组合物的情况中。在常用的防腐剂中，优选苯甲酸钠处于基本上不足以改变组合物pH的浓度，否则可能需要调节缓冲剂的量以达到所需的pH。

[0273] 其他任选成分包括保湿剂，表面活性剂（非离子，阳离子或两性），增稠剂，树胶和粘合剂。保湿剂增加制剂体积并在洁齿剂组合物中保留水分。此外，保湿剂有助于防止制剂储存期间的微生物变质。它还有助于保持相稳定性，并提供配制透明或半透明洁齿剂的方

法。

[0274] 合适的保湿剂包括甘油,木糖醇,甘油和二醇如丙二醇,例如,其各自可以最高达50%w/w的量存在,但是在一些情况中,总保湿剂不超过约60-80%w/w的组合物。例如,液体组合物可包含至多约30%的甘油加至多约5%,例如,约2%w/w的木糖醇。表面活性剂优选不是阴离子,并且可以包括聚山梨醇酯20或椰油酰胺基甜菜碱等,用量最高达组合物的约6%,例如,约1.5-3%w/w。

[0275] 当本发明的口腔组合物为液体形式时,优选其包含占口腔组合物至多约3%w/w的成膜剂,如在0至0.1%的范围内,例如,占口腔组合物约0.001-0.01%,例如约0.005%w/w。合适的成膜剂包括(除透明质酸钠外)以商品名Gantrez销售的那些。

[0276] 用于口服或肠内给药的液体营养制剂可包含一种或多种营养素,例如脂肪,碳水化合物,蛋白质,维生素和矿物质。许多不同来源和类型的碳水化合物,脂质,蛋白质,矿物质和维生素是已知的并且可以用于本发明所述的营养液实施方案中,只要这些营养素与所选制剂中的添加成分相容,对于它们的指定用途是安全有效的,不得以其他方式过度损害产品性能。

[0277] 例如,将这些营养液配制成具有足够的粘度,流动或其他物理或化学特性,以在饮用或施用营养液时提供更有效和舒缓的粘膜涂层。在一些情况中,这些营养实施方案还代表适合于满足个体的唯一,主要或补充营养需求的平衡营养源。

[0278] 合适的营养液的非限制性实例述于美国专利5,700,782 (Hwang等);美国专利5,869,118 (Morris等);和美国专利5,223,285 (DeMichele等),通过引用其全部内容将其说明书纳入本文。

[0279] 适用于本文的营养蛋白质可以是水解的,部分水解的或非水解的,并且可以衍生自任何已知的或其他合适的来源,例如牛奶(例如酪蛋白,乳清),动物(例如肉,鱼),谷类(例如,大米,玉米),蔬菜(例如大豆)或其任何组合。

[0280] 适用于营养液的脂肪或脂质包括但不限于椰子油,大豆油,玉米油,橄榄油,红花油,高油酸红花油,MCT油(中链甘油三酯),葵花籽油,高油酸葵花籽油,结构化甘油三酯,棕榈和棕榈仁油,棕榈油精,菜籽油,海洋油,棉籽油及其任何组合。适用于营养液的碳水化合物可以是简单的或复合的,含乳糖的或不含乳糖的,或其任何组合。合适的碳水化合物的非限制性实例包括:水解玉米淀粉,麦芽糖糊精,葡萄糖聚合物,蔗糖,玉米糖浆,玉米糖浆固体,稻衍生的碳水化合物,葡萄糖,果糖,乳糖,高果糖玉米糖浆和难消化的低聚糖如低聚果糖(FOS)及其任何组合。

[0281] 营养液可以进一步包含多种维生素中的任何一种,其非限制性实例包括:维生素A,维生素D,维生素E,维生素K,硫胺素,核黄素,吡哆醇,维生素B12,烟酸,叶酸,泛酸。酸,生物素,维生素C,胆碱,肌醇,其盐和衍生物,以及其任何组合。

[0282] 营养液可以进一步包含已知或以其他方式适合于患有T1D风险或患有T1D的患者的任意多种矿物质,其非限制性实例包括:钙,磷,镁铁,硒,锰,铜,碘,钠,钾,氯化物及其任何组合。

[0283] 本发明的微生物和具体的酵母和细菌还可以配制成酞剂或溶液以便于口服或直肠给药,或者配制成适合肠胃外给药的溶液,例如通过肌肉内,皮下或静脉内途径。此外,核苷衍生物也非常适合作为持续或延长释放剂型的制剂,包括在肠道的特定部分仅释放或在

一些情况中释放活性成分的剂型,例如,在延伸或延长的时间段内进一步提高效率。这种剂型中的包衣,包膜和保护基质可以由例如制药领域熟知的聚合物物质或蜡制成。

[0284] 本发明的组合物包括药物剂型,如扁囊剂(lozenge),锭剂或软锭剂。这些通常是盘状固体,在适当调味的基质中含有活性成分。基质可以是硬糖,甘油明胶,或具有足够粘液以使其形成的糖的组合。可将锭剂置于口腔中,它们缓慢溶解,释放活性成分用于与粘膜直接接触。

[0285] 例如,可以通过将水缓慢加入粉末状活性粉末,粉末状糖和树胶的混合物中直至形成柔韧物质来制备本发明的锭剂。7%的阿拉伯胶粉末可用于为物质提供足够的粘合性。将块状物展开并从扁平物料上切下锭块,或者将块体卷成圆筒并分开。将各切割或分开的片成形并使其干燥,从而形成锭剂剂型。

[0286] 如果活性成分是热不稳定的,可以通过压缩将其制成扁囊剂。例如,制备中的造粒步骤以与用于任何压缩片剂的方式类似的方式进行。使用重压缩设备制备锭剂以得到比平时更硬的片剂,因为期望剂型在口中缓慢溶解或崩解。在一些情况中,选择成分以促进缓慢溶解特性。

[0287] 在本发明的特定制剂中,将微生物纳入含有预胶化淀粉和交联聚(丙烯酸)的生物粘附运载体中以形成生物粘附片剂和适于口腔施用的生物粘附凝胶(即,具有延长的生物粘附和持续的药物递送)。

[0288] 在另一实施方式中,将根据本发明的非病原性和非侵入性细菌,生物粘附聚合物(预胶化淀粉和通过喷雾干燥共加工的交联聚(丙烯酸)),硬脂酰富马酸钠(润滑剂)和二氧化硅(助流剂)的粉末混合物加工成片剂(重量:100mg;直径:7mm)。制备这些片剂的方法是本领域技术人员熟知的,并且之前已经描述了成功开发含有各种药物(咪康唑,睾酮,氟化物,环丙沙星)的生物粘附片剂(Bruschi M.L.和de Freitas O.,药物开发和工业药学(Drug Development and Industrial Pharmacy),2005 31:293-310)所有赋形剂材料在药品级是市售可得的。

[0289] 为了优化制剂,将改变片剂中的药物负荷和淀粉与聚(丙烯酸)间的比例。基于先前的研究,共处理的生物粘附载体中的最大药物载量为约60% (w/w),淀粉/聚(丙烯酸)比率可在75/25和95/5 (w/w)之间变化。在优化研究期间,片剂的生物粘附性质和片剂中的药物释放是主要评价参数,标准片剂性质(硬度,脆性)作为次要评价标准。

[0290] 将细菌纳入预胶化淀粉和交联聚(丙烯酸)的水分散体中。使用高剪切混合器通过标准程序制备该聚合物分散体。

[0291] 与片剂类似,可能需要优化凝胶的药物负荷和淀粉/聚(丙烯酸)比例,以获得对食道粘膜具有最佳粘附性的凝胶。对于凝胶,分散体中聚合物的浓度是另外的变量,因为它决定了凝胶的粘度,因此它具有粘膜粘附性能。

[0292] Batchelor等已详细描述了筛选聚合物分散体对食道粘膜的生物粘附性质的模型(Int.J.Pharm.,238:123-132,2002)。

[0293] 其他途径和给药形式包括含有活微生物食品制备物。在一些实例中,可以将表达生物活性多肽的微生物包含在乳制品中。

[0294] 本发明的药物组合物可以通过任何已知的或有效的方法制备,以配制或制造所选择的剂型。例如,微生物可以与常见的,例如药学上可接受的载体(例如赋形剂和稀释剂)一

起配制,形成口服片剂,胶囊,喷雾剂,锭剂,处理过的基质(例如用本发明所述的组合物处理过的口服或局部拭子,垫,或一次性不可消化的基质);口服液体(例如悬浮液,溶液,乳液),粉末,栓剂或任何其它合适的剂型。在一些实施方案中,本公开提供了制备药物组合物的方法。示例性方法包括:使含有IL-10基因和T1D特异性抗原基因的微生物(或其能够表达IL-10和T1D特异性抗原)(例如,非病原性的细菌)与药学上可接受的运载体接触,从而形成药物组合物。在一些实例中,方法进一步包括:在培养基中培养微生物。方法可以进一步包括冷冻干燥含有微生物的液体,其中液体任选地包括药学上可接受的运载体。

[0295] 单位剂型

[0296] 本公开进一步提供了单位剂型,其包含特定量的非病原性微生物,任选地与食品级或药学上可接受的运载体组合,其中所述非病原性微生物(例如,非病原性革兰氏阳性细菌)包含:编码IL-10的外源性核酸;和编码1型糖尿病(T1D)特异性抗原(例如,PINS)的外源性核酸。示例性的单位剂型包含约 1×10^3 至约 1×10^{14} 菌落形成单位(cfu)的非病原性微生物(例如,非病原性革兰氏阳性细菌)。其它示例性的单位剂型包含约 1×10^4 至约 1×10^{13} 菌落形成单位(cfu)的非病原性微生物(例如,非病原性革兰氏阳性细菌),或约 1×10^4 至约 1×10^{12} 菌落形成单位(cfu)的非病原性微生物(例如,非病原性革兰氏阳性细菌)。在其它实施方式中,单位剂型包含约 1×10^5 至约 1×10^{12} 菌落形成单位(cfu),约 1×10^6 至约 1×10^{12} 菌落形成单位(cfu)的非病原性微生物(例如,非病原性革兰氏阳性细菌)。在其它实施方式中,单位剂型包含约 1×10^8 至约 1×10^{12} 菌落形成单位(cfu),约 1×10^9 至约 1×10^{12} 菌落形成单位(cfu)的非病原性微生物(例如,非病原性革兰氏阳性细菌)。在其它实施方式中,单位剂型包含约 1×10^9 至约 1×10^{11} 菌落形成单位(cfu),约 1×10^9 至约 1×10^{10} 菌落形成单位(cfu)的非病原性微生物(例如,非病原性革兰氏阳性细菌)。在其它实施方式中,单位剂型包含约 1×10^7 至约 1×10^{11} 菌落形成单位(cfu),约 1×10^8 至约 1×10^{10} 菌落形成单位(cfu)的非病原性微生物(例如,非病原性革兰氏阳性细菌)。

[0297] 在其它实施方式中,单位剂型包含约 1×10^9 至约 1×10^{11} 菌落形成单位(cfu),约 1×10^9 至约 100×10^{10} 菌落形成单位(cfu)的非病原性微生物(例如,非病原性革兰氏阳性细菌)。

[0298] 单位剂型可具有任何物理形式或形状。在一些实施方案中,单位剂型适合口服给药。在根据这些实施方案的一些实例中,单位剂型是胶囊,片剂或颗粒的形式。示例性胶囊包括填充有微粒的胶囊。在一些实施方案中,剂量形式中含有的非病原性微生物(例如,非病原性革兰氏阳性细菌)是干粉形式。例如,微生物是冷冻干燥的粉末形式,其任选地被压实和涂覆。

[0299] 通过参照下述实施例可以更好的理解该组合物和方法,但是本领域技术人员将理解的是,它们仅仅是对本发明的说明,如下面编号的实施方式和权利要求将更全面地描述。此外,通过本申请,引用了多份出版物。这些出版物的公开内容都各自通过引用全文纳入本文。

[0300] 实施例

[0301] 实施例1

[0302] 构建分泌hPINS和hIL10的临床级乳酸乳球菌

[0303] 这样构建分泌hPINS和hIL10的乳酸乳球菌菌株(sAGX0407),通过使用之前所述的

方法通过用人PINS和IL10的表达盒替换MG1363亲本菌株中的位于染色体的胸苷酸合成酶(thyA)基因。参见例如,Steidler L.等,Nat.Biotechnol.2003;21:785-789;和Steidler L,Rottiers P;Annals of the New York Academy of Sciences 2006;1072:176-186。将变化导入乳酸乳球菌染色体的方法利用双同源重组。在repA+乳酸乳球菌菌株LL108中构建源自pORI19并含有红霉素选择标志物的条件型复制运载体质粒。这样设计运载体质粒,从而将感兴趣的载物克隆到与细菌染色体上野生型序列侧接区域相同的最高达1kb交叉(XO)区域之间。将质粒导入MG1363或其衍生物中的任一个中(repA-)。在含有红霉素的琼脂平板上选择抗性菌落,并通过PCR筛选验证在5'或3'靶位点的第一次同源重组。红霉素选择的释放使得能够通过第二次同源重组在5'或3'靶位点从细菌染色体上切除运载体质粒。通过Sanger和Illumina全基因组测序广泛地记录了临床级菌株的最终遗传结构。在最终临床菌株中没有质粒或残留的红霉素抗性。参见例如,Steidler,L.,等,Nat.Biotechnol.2003,21(7):785-789。

[0304] sAGX0407是乳酸乳球菌(L.lactis)MG1363的衍生物。在sAGX0407中:

[0305] • 不存在胸苷酸合成酶基因(thyA;Gene ID:4798358),以保证环境遏制(Steidler,L.,等,Nat.Biotechnol.2003,21(7):785-789)。

[0306] • 在thyA已经缺失的位置,以及HU样DNA结合蛋白基因组成型启动子(Ph11A;Gene ID:4797353)的下游,将编码与hil-10基因融合的未鉴定的分泌的45kDa蛋白质基因(usp45;Gene ID:4797218;SSusp45)的前导序列的基因插入以允许表达和分泌hIL-10,所述hil-10基因编码人白介素-10(hIL-10;UniProt:P22301,aa 19-178,变体P2A,Steidler等,Nat.Biotechnol.2003,21(7):785-789)。

[0307] • 不存在海藻糖-6-磷酸磷酸化酶基因(trePP;Gene ID:4797140),以允许积累外源性添加的海藻糖。

[0308] • 海藻糖-6-磷酸磷酸酶基因(otsB;Gene ID:1036914)位于usp45(Gene ID:4797218)下游以促进海藻糖-6-磷酸转化为海藻糖。通过使用高表达的乳酸乳球菌MG1363 50S核糖体蛋白L30基因之前的基因间区域(IR)(rpmD;基因ID:4797873),将otsB表达单元转录和翻译偶联于usp45。

[0309] • HU样DNA结合蛋白基因的组成型启动子(Ph11A;Gene ID:4797353)在海藻糖操纵子中推定的磷酸转移酶基因(trePTS;llmg_0453和llmg_0454;分别为Gene ID:4797778和Gene ID:4797093)之前,以增强海藻糖摄取。

[0310] • 将编码纤维二糖特异性PTS系统IIC组分(Gene ID:4796893)的基因ptcC破坏(446的密码子位置30处的tga;tga30)。该突变确定了积累后的海藻糖保留。

[0311] • 编码usp45分泌前导序列(SSusp45)与编码人胰岛素原的PIN基因(PINS;UniProt:P01308,氨基酸25-110)融合体的基因位于甘油醛3-磷酸脱氢酶基因(gapB;Gene ID:4797877)的下游,以允许胰岛素原的表达和分泌。将pins表达单元转录和翻译通过使用IRrpmD偶联于gapB。

[0312] sAGX0407的所有遗传性状都位于细菌染色体上。sAGX0407的遗传背景提供了:

[0313] • 组成型分泌PINS和hIL-10。

[0314] • 严格依赖外源性添加的胸苷用于生长和存活。

[0315] • 积累和保留海藻糖的能力并以此获得抵抗胆汁酸毒性的能力。

[0316] 图18显示了sAGX0407的相关遗传基因座的示意图:trePTS, Δ trePP;otsB;ptcC-; gapB>>pins和 Δ thyA,hIL-10具有相关寡核苷酸结合位点(oAGXno),EcoRI限制位点,(/短截的/)遗传特征,基因间区域(IR),PCR扩增产物大小(bp)的指示。

[0317] trePTS、 Δ trePP

[0318] 海藻糖-6-磷酸磷酸酶基因(trePP;Gene ID:4797140)的缺失;插入HU样DNA结合蛋白基因的组成型启动子(Ph11A;Gene ID:4797353)以在海藻糖操纵子中先于推定的磷酸磷酸酶基因(trePTS;llmg_0453和llmg_0454;ptsI和ptsII;分别为Gene ID:4797778和Gene ID:4797093),先于高度表达的乳酸乳球菌MG1363 50S核糖体蛋白L30基因在ptsI和ptsII之间插入基因间区域,(rpmD;Gene ID:4797873)(图13A、13B和13C)。

[0319] otsB

[0320] 将海藻糖-6-磷酸磷酸酶基因(otsB;Gene ID:1036914)插入未鉴定的分泌的45-kDa蛋白基因(usp45;Gene ID:4797218)的下游。先于高度表达的乳酸乳球菌MG1363 50S核糖体蛋白L30基因(rpmD;Gene ID:4797873)在usp45和otsB之间插入基因间区域(图14A和14B)。

[0321] ptcC-

[0322] 与导入EcoRI限制性位点一起在446的密码子位置30(tga30)插入tga,以破坏编码纤维二糖特异性PTS系统IIC组分(ptcC;Gene ID:4796893)的基因(图15A和15B)。

[0323] gapB>>pins

[0324] 将编码usp45分泌前导序列(SSusp45)与编码人胰岛素原的pin基因(PINS;UniProt:P01308,氨基酸25-110)融合体的基因插入高度表达的甘油醛3-磷酸脱氢酶基因(gapB;Gene ID:4797877)的下游。先于高度表达的乳酸乳球菌MG1363 50S核糖体蛋白L30基因(rpmD;Gene ID:4797873)在gapB和pins之间插入基因间区域(图12A、12B和16)。

[0325] Δ thyA,hIL-10

[0326] 胸苷酸合成酶基因(thyA;Gene ID:4798358)的缺失在HU样DNA结合蛋白基因组成型启动子(Ph11A;Gene ID:4797353)的下游,插入编码SSusp45与hIL-10基因的融合体的基因以允许表达和分泌hIL-10,hIL-10基因编码人白介素-10(hIL-10;UniProt:P22301,aa 19-178,变体P2A,Steidler等,Nat.Biotechnol.2003,21(7):785-789)(图17)。

[0327] 实施例2

[0328] 在小鼠中治疗糖尿病

[0329] 通过评估尿液(Diastix®试剂条,德国勒沃库森拜耳公司(Bayer))和静脉血(AccuCheck®,罗氏诊断公司(Roche Diagnostics))中的葡萄糖水平筛选糖尿病发生的NOD小鼠。当具有糖尿和两次连续血糖测量超过200mg/dl时,将小鼠诊断为糖尿病。糖尿病确定后,NOD或NOD转基因小鼠用仓鼠抗-小鼠CD3抗体(克隆145-2C11,新罕布什尔州莱巴嫩的BioXCell公司)静脉内(i.v.)治疗连续5天(第0-4天;2.5 μ g/小鼠)。该疗法与口服给予质粒驱动的或临床级的乳酸乳球菌菌株(2×10^9 cfu)在6周内组合给予每周5次。对照小鼠未经处理。记录治疗开始时个体的血糖浓度。每周对小鼠进行3次体重和血糖状态测试。缓解定义为不存在糖尿和恢复正常血液葡萄糖浓度。停止治疗后立即或长时间后处死实验动物(治疗开始后6或14周)。收获外周血、淋巴器官和胰腺,并如补充研究设计和方法中所述评估单细胞的表型分型。当在连续两次测量中血液葡萄糖浓度超过600mg/dl时,在14周终点

之前将小鼠从研究中去除。

[0330] 葡萄糖耐受测试

[0331] 在处死前一周或两周进行腹膜内葡萄糖耐量试验 (IPGTT)。将小鼠禁食16小时,腹膜内 (i.p.) 注射葡萄糖 (2g/kg), 并在0、15、30、60、90和120分钟测量血液葡萄糖浓度。

[0332] IAA测量

[0333] 在处理随机化前和在治疗中止时从新发生的糖尿病NOD小鼠收集肝素化的血浆, 并如Robert S.等, Diabetes 2014, 63:2876-2887中所述在佛罗里达州盖恩斯维尔市医学院的病理学、免疫学和实验医学UF系分析IAA。

[0334] 体内阻断CTLA4和TGF- β

[0335] 在用针对CTLA4 (克隆UC10-4F10, Bioceros公司) 和TGF- β (克隆1D11.16.8, BioXCell公司) 以下述剂量方案的阻断抗体撤回疗法后, 耐受基于乳酸乳球菌的治疗的小鼠被腹腔内 (i.p.) 注射: 对CTLA4, 第1和3天为250 μ g, 然后第6、8、10、13和18天为100 μ g; 对TGF- β , 在3周内每周3次200 μ g。每天测量血液葡萄糖浓度直至第一次注射后25天。

[0336] 过继转移糖尿病

[0337] 为了评估效应T细胞致糖尿病潜力, 将来自基于乳酸乳球菌的疗法新发生的糖尿病对照, 响应者和非响应者的脾脏的所有T细胞i.v. (静脉注射) 转移到6周龄至8周龄免疫缺陷NOD-scid小鼠的尾静脉中。每周2次监测受体小鼠糖尿病的发展直至细胞转移后100天。

[0338] NOD.Foxp3.DTR小鼠中DT介导的Foxp3⁺T细胞的消耗

[0339] NOD.Foxp3.DTR小鼠 (在Foxp3转录控制元件的控制下表达人白喉毒素受体 (DTR)) 允许DT (白喉毒素) 给予后消耗Foxp3⁺T细胞。参见例如, Feuerer M. 等, 如何准确消除调节性T细胞释放胰岛内的自身免疫病变 (How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets). Immunity 2009; 31:654-664。对于Treg消耗, NOD.Foxp3.DTR小鼠 (停止基于乳酸乳球菌的疗法后未经处理或耐受) 在第1、2、4和7天被i.p. 注射40 μ g/kg体重的DT (西格玛公司 (Sigma)) 并在第8天检测。DT注射后, 监测小鼠的体重、尿液和血糖状态。分别通过如所述的流式细胞术和组织学在外周血和胰腺中监测Foxp3⁺T细胞。参见例如, Tian L. 等, Foxp3 (+) 调节性T细胞通过诱导Th2细胞凋亡对小鼠辅助响应施加不对称的控制 (Foxp3 (+) regulatory T cells exert asymmetric control over murine helper responses by inducing Th2 cell apoptosis). Blood 2011; 118:1845-1853。

[0340] FOXP3-抑制肽P60与基于乳酸乳球菌的疗法组合

[0341] 在基于乳酸乳球菌的疗法起始时给予P60 (15聚体合成肽, 其可以结合并阻断FOXP3, i.p. 50 μ g/剂量每天, 上至14个剂量), 如先前所描述。参见例如, Casares N. 等, FOXP3的肽抑制剂损害调节性T细胞活性并改善小鼠的疫苗效力 (A peptide inhibitor of FOXP3 impairs regulatory T cell activity and improves vaccine efficacy in mice). Journal of Immunology 2010, 185:5150-5159。

[0342] 胰岛炎分级和胰腺的组织学

[0343] 将来自福尔马林固定的石蜡包埋的胰腺组织的6- μ m切片切割并收集100- μ m部分, 然后用苏木精伊红染色。在光学显微镜下以20 $\times$ 或40 $\times$ 观察胰岛, 通过以盲测方式的独立

研究者计数和分级。如下对每个胰腺样品的至少25个胰岛进行胰岛浸润评分:0,没有渗透;1,旁胰岛炎(peri-insulitis);2,具有淋巴细胞浸润小于50%区域的胰岛;3,具有淋巴细胞浸润超过50%区域或完全破坏的胰岛。

[0344] 胰岛驻留的Foxp3⁺T细胞检测

[0345] 将胰腺组织快速冷冻在99%的2-甲基-丁烷中并切割成12 μ m的组织切片。如所述进行Foxp3⁺T检测。参见例如,Takiishi T.等.,通过使用遗传修饰的乳酸乳球菌恢复抗原特异性耐受在小鼠中逆转自身免疫性糖尿病(Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified *Lactococcus lactis* in mice). *J.Clin.Invest.*2012,122:1717-1725。

[0346] 统计

[0347] 所有数据使用GraphPad Prism 6(Graphpad Prism,加利福尼亚州拉由拉市)分析。存活曲线用Kaplan-Meier检验计算并用对数秩检验比较。通过ANOVA(非参数Kruskal-Wallis检验)以邓氏多重比较或以适当的Mann-Whitney U检验分析组,视情况而定。误差线表示SEM。除非另有说明,差异是不显著的(ns)。*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,****P<0.0001。

[0348] 细菌和培养基

[0349] 乳酸乳球菌-pT1NX是含有空载体pT1NX的MG1363菌株,并作为对照。质粒驱动的乳酸乳球菌菌株(sAGX0328分泌质粒编码的人PINS和染色体整合的IL10)如先前所述进行培养。参见例如,Takiishi T.等,*J.Clin.Invest.*2012,122:1717-17253。因为thyA缺陷型乳酸乳球菌菌株的生长和存活依赖于生长培养基中胸苷的存在,临床级的乳酸乳球菌(分泌染色体整合的人PINS和IL10)在GM17T中培养,即M17肉汤(BD公司,新泽西州富兰克林湖市),补充有0.5%葡萄糖(默克公司(Merck KGaA),德国达姆施塔特)和200 μ M胸苷(西格玛公司,密苏里州圣路易斯)。对于胃内接种,将储备悬浮液在生长培养基中稀释1000倍,并在30 $^{\circ}$ C孵育16小时,达到 2×10^9 cfu/ml的饱和密度。通过离心收获细菌并在BM9培养基中浓缩10倍。治疗剂量由100 μ L该细菌悬浮液组成。对于胃内接种,将储备悬浮液在生长培养基中稀释1000倍,并在30 $^{\circ}$ C孵育16小时,达到 2×10^9 cfu/ml的饱和密度。通过离心收获细菌并在BM9培养基中浓缩10倍。治疗剂量由100 μ L该细菌悬浮液组成。

[0350] 流式细胞术

[0351] 在治疗开始后6周收获外周血和特定器官,处理并用荧光染料标记的抗体或匹配的同种型对照孵育,用于流式细胞术分析。用抗-小鼠CD3(145-2C11),CD4(GK1.5),CD8a(53-6.7),CD25(PC61.5或7D4(BD公司,比利时埃尔博登革)),和FR4(eBio12A5)(除非特定指出全部来自加利福尼亚州圣地亚哥市的eBioscience公司)在冰上对Treg染色20分钟。针对Foxp3(FJK-16s)和CTLA4(UC10-4B9)的细胞内染色抗体来自eBioscience公司,并按照供应商的说明书使用。通过用抗-小鼠CD3(145-2C11),CD4(GK1.5),CD8a(53-6.7),CD44(IM7),CD62L(MEL-14),CD69(H1.2F3)和CCR7(4B12)染色确定原初,效应记忆和中心记忆T细胞。在GalliosTM流式细胞仪中用Kaluza(Beckman Coulter公司,比利时叙阿尔莱)或FlowJo软件(Treestar公司,俄勒冈州阿什兰)分析细胞。

[0352] 体外抑制物试验。

[0353] 通过使用对CD25,CD8 α ,B220,CD11c,CD11b,MHC II型和羊抗-鼠IgG Dynabeads

(英杰公司(Invitrogen),比利时梅勒尔贝克)的抗体的阴性选择,病原性CD4⁺CD25⁻Teff细胞分离自10周龄NOD小鼠的脾脏细胞。CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺和CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺Treg分离自NOD.Foxp3.hCD2小鼠汇集的淋巴结和脾脏细胞(具有人CD2-CD52融合蛋白,以及核糖体内进入位点,进入内源性foxp3基因座3'未转录的区域)。参见例如,Culina S.等, Clin.Dev.Immunol.2011;2011:286248。简言之,细胞样品通过70μm的细胞过滤器并悬浮于RPMI1640培养基中,以1,500rpm离心5分钟并悬浮于RPMI1640培养基中。对生成的细胞悬浮液进行计数,洗涤并首先耗尽CD8α⁺、B220⁺、CD11c⁺、CD11b⁺和MHC型⁺,并通过淘选和用生物素偶联的抗-CD4和抗-hCD2抗体染色来粘附细胞。然后用抗-生物素微珠(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec B.V.),荷兰莱顿市)孵育细胞,并在LS或MS柱(美天旎生物技术公司)上分离。将所得hCD2⁺或hCD2⁻细胞用抗-CD25抗体进一步纯化。进行体外多克隆抑制物试验。通过如所述的多重免疫试验(Mesoscale Discovery,马萨诸塞州罗克维尔市)或流式细胞术珠阵列(Bender MedSystems FlowCytomixTM,eBioscience)在无细胞的上清液中测量细胞因子(IFN-γ、IL10和TGF-β)。参见例如,Ludvigsson J.等,最近诊断的1型糖尿病中的GAD65抗原疗法(GAD65 antigen therapy in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus).N.Engl.J.Med.2012,366:433-442。

[0354] 将针对CTLA4(UC10-4F10)、IL10(克隆JES5-2A5,BioXCell公司)和TGF-β(克隆1D11.16.8,其中和所有3种哺乳动物TGF-β亚型(β1、β2和β3),BioXCell公司)的阻断抗体以10μg/ml的浓度加入培养基。

[0355] 结果

[0356] 与低剂量抗CD3组合的临床级自给的乳酸乳球菌疫苗在NOD小鼠中稳定地逆转了新发生的糖尿病,保留了残留的β细胞功能,并停止了胰岛炎进展。

[0357] 使用分泌人PINS与IL10的临床级自给的乳酸乳球菌菌株联合亚治疗剂量的抗-CD3抗体,66%(35个中的23个)的小鼠在疾病发生后至少14周后恢复到正常血糖,这在统计学上显著地优于通过抗-CD3单独治疗的小鼠的43%(图1A)。未处理的动物(n=20)或用空载体细菌菌株乳酸乳球菌-pT1NX(n=9)处理的动物保持高血糖并且当它们的起始体重丧失20%时被处死。用临床级或质粒驱动分泌PINS和IL-10的乳酸乳球菌菌株的单一疗法的效力显著地低于其与抗-CD3的组合(分别为0%(n=8)和17%(n=8))(图1A)。

[0358] 在随访期间,新发生的糖尿病对照,通过基于乳酸乳球菌的疗法保护的小鼠,和没有通过这类疗法保护的小鼠进行IPGTT,并在治疗开始后6周后处死,此时通过组织学评估其胰腺组织。仅在成功治疗的动物中,残留的β细胞功能(即,评估为葡萄糖耐量曲线下面积(AUC葡萄糖))得以保留,较小比例的胰岛具有严重的胰岛炎(图1B)。有趣的是,在组合疗法结束时,在应答者和非应答者之间没有观察到胰岛炎严重程度的差异(图1C)。

[0359] 起始血糖和IAA阳性预测基于乳酸乳球菌的疗法的治疗成功。

[0360] 并未观测到小鼠年龄或性别对在基于乳酸乳球菌的疗法的治疗成功的影响。然而,治疗开始时的血糖浓度预测82%的以低于350mg/dl的血糖为起始的小鼠被成功治愈(n=22),相比之下38%的以高于350mg/dl的血糖为起始的小鼠被成功治愈(n=13)(图2A)。此外,进入时IAA的阳性似乎与治疗成功相关(图2B)。有趣的是,在治疗开始时具有血糖浓度<350mg/dl和IAA阳性的小鼠具有明显优于具有血糖水平>350mg/dl和为IAA阴性的小鼠(33%;n=5;P=0.07)的糖尿病缓解率(89%,n=8)(图2C)。此外,基于乳酸乳球菌的治疗

显著地降低IAA水平,特别是在对疗法响应的小鼠中(图2D)。

[0361] 基于乳酸乳球菌的疗法诱导较高水平的具有调节能力的F_{oxp3}⁺T细胞,但是在Teff细胞中没有改变。

[0362] 通过将对于干预响应或不响应的小鼠中的治疗性免疫效应之间分离来研究基于乳酸乳球菌的疗法诱导的疾病缓解的机制。我们发现,与未处理的对照相比,用基于乳酸乳球菌的疗法治疗的小鼠中外周血(图3A)、胰腺引流淋巴结(图3B)和胰腺(图3C)中观察到的CD4⁺F_{oxp3}⁺(CD25⁺和CD25⁻)T细胞的百分比明显更高。有趣的是,在胰腺引流淋巴结和胰腺中,而不是在外周血中,CD4⁺F_{oxp3}⁺T细胞的频率的增加在应答者中比非应答者更不明显。使用多色流式细胞仪,我们发现了大多数CD4⁺F_{oxp3}⁺Treg对CTLA4呈阳性,并且与未处理的对照相比,该抑制性标志物的表达在处理的小鼠的胰腺引流淋巴结(对于响应者和非响应者)和胰腺(仅对于响应者)中显著地更高(图8B和8C)。有趣的是,与未处理的对照相比,在处理的小鼠的外周血中没有观察到CD4⁺F_{oxp3}⁺CTLA4⁺T细胞百分比的差异(图3D)。在治疗成功或失败方面,原初(CD44⁻CD62L⁺CCR7⁺),效应记忆(CD44⁺CD62L⁻CCR7⁻)和中心记忆(CD44⁺CD62L⁺CCR7⁺)CD4⁺T细胞的百分比在任何受体组中均未改变。转移来自基于乳酸乳球菌的治疗的响应者和非响应者的脾细胞在NOD-scid受体中导致糖尿病,其具有与转移分离自未处理的新发生的糖尿病对照的脾细胞相似的疾病动力学,这表明没有从治疗过的小鼠消耗循环的致糖尿病细胞(图9)。

[0363] 由乳酸乳球菌疗法诱导的糖尿病逆转伴随并依赖于功能性F_{oxp3}⁺Treg的产生。

[0364] 使用通过基于乳酸乳球菌的疗法治疗的NOD.F_{oxp3}.hCD2小鼠,我们可以分离CD4⁺CD25⁺F_{oxp3}⁺T细胞用于功能性体外研究,其中它们抑制病原性CD4⁺CD25⁻Teff细胞的IFN- γ 产生,增殖,和CD69活化。当这些Treg与分离自NOD-scid γ c^{-/-}小鼠的抗-CD3抗体在脾脏抗原呈递细胞(APC)存在的情况下共培养并刺激时,它们产生IL-10(和TGF- β) (图4)。疗法响应者和非响应者之间并未观察到CD4⁺CD25⁺F_{oxp3}⁺T细胞调节能力的差异。

[0365] 添加抗-CTLA4 Ig(克隆UC10-4F10)或TGF- β 中和抗体(克隆1D11.16.8)显著地降低CD4⁺CD25⁺F_{oxp3}⁺T细胞的抑制(图5A),这表明治愈的小鼠的CD4⁺CD25⁺F_{oxp3}⁺Treg通过CTLA4-和TGF- β -依赖性方式体外抑制Teff增殖。添加抗-IL10(克隆JES5-2A5)并没有改变Treg的直接抑制效应。另一方面,这些调节机制并未用来自响应者和非响应者的CD4⁺CD25⁺F_{oxp3}⁺T细胞部分验证(图5B)。用抗-CTLA4 Ig(克隆UC10-4F10)和抗-TGF- β (克隆1D11.16.8)的组合体内处理稳定治愈的小鼠导致在5个小鼠中的2个糖尿病复发(图5C)。

[0366] 最后,我们研究了基于乳酸乳球菌的疗法的治疗成功是否依赖于F_{oxp3}⁺T细胞的存在和功能。对此,同时用基于乳酸乳球菌的疗法和FOXP3-抑制肽P60处理新发生的糖尿病NOD小鼠持续14天的周期(图6A)。有趣的是,没有一个小鼠(n=6)发展出正常血糖,同时用基于乳酸乳球菌的疗法和载剂(n=11)处理的小鼠具有60%的糖尿病缓解率,这表明Treg细胞对诱导疗法诱导的耐受性是至关重要的(图6B)。

[0367] 新发生的(自发的)糖尿病NOD.F_{oxp3}.DTR小鼠用基于乳酸乳球菌的疗法处理和观察到稳定的糖尿病逆转后,使用图7A所述示意图中所述的DT消除F_{oxp3}⁺T细胞。首先,我们在未处理的NOD.F_{oxp3}.DTR小鼠中建立了选定的DT方案在第一次DT注射后3天内消除外周血中超过90%的CD4⁺F_{oxp3}⁺T细胞,而剩余的Treg表达低或无CD25(图10A-C)。这些细胞从第一次DT注射后第5天开始逐渐(progressive)再增殖,如已报道的几种F_{oxp3}.DTR菌株。参

见例如, Kim J.M.等, *Nat. Immunol.* 2007, 8:191-197; Suffner J.等, *J. Immunol.* 2010, 184:1810-1820; 和 Mayer C.T.等, *Immun. Inflamm. Dis.* 2014, 2:162-165。该DT方案还显著地降低了留存在胰腺中的Foxp3⁺T细胞量, 从而导致自身免疫性糖尿病的发展(图10B和10D)。其次, 相较于野生型NOD小鼠, 基于乳酸乳球菌的治疗在57%的NOD.Foxp3.DTR小鼠中诱导自身免疫性糖尿病缓解(7个小鼠中的4个)(图7A和7B)。瞬时Foxp3⁺T细胞消耗导致在最初通过治疗治愈的所有小鼠(n=4)中完全逆转至糖尿病状态, 通过第一次DT注射后第2天开始出现的糖尿以及再次出现的严重高血糖证明(图7B)。这种对产生胰岛素的 β 细胞的免疫耐受性的破坏也伴随着诱导严重的胰岛炎(图7C)和胰岛驻留Foxp3⁺Treg库的消融(图7D)。总之, 这些数据证明, 来自基于乳酸乳球菌的干预的治疗效果依赖于Foxp3⁺Treg的存在和功能性。

[0368] 讨论

[0369] 已经在包括T1D在内的自身免疫疾病的动物模型中研究了口服耐受作为阻滞疾病的干预手段。参见例如, Commins SP, *Pediatr. Clin. North. Am.* 2015; 62:1523-1529。

[0370] 在该实例中, 制备了分泌染色体整合的人PINS和人IL-10的口服临床级自给的乳酸乳球菌。当与短疗程的亚治疗剂量的抗-CD3组合时, 该干预在新发生的糖尿病小鼠中诱导长期正常血糖上是安全有效的。除了疾病发作时的IAA阳性之外, 初始血糖浓度(<350mg/dl)是治疗结果的预测因子, 而残留的 β 细胞功能的保留和IAA阳性的下降是治疗成功的标志物。

[0371] 因此, 当在糖尿病诊断时进行干预时, 即当存在血糖异常时, 一定程度的残留的 β 细胞量对于治疗成功是必需的。

[0372] 通过分离对疗法响应或不响应的小鼠中基于乳酸乳球菌的干预的免疫效果, 进一步表征伴随治疗的免疫过程的性质和作用。基于乳酸乳球菌的疗法在响应者的胰腺引流淋巴结和胰腺甚至是非响应者的胰腺引流淋巴结和胰腺中诱导分泌抑制性IL-10的CD4⁺Foxp3⁺(CD25⁺和CD25⁻两者)T细胞, 这表明Treg对到发炎的靶组织的招募增强。在外周中, 相较于未处理的对照, 处理的小鼠中CD4⁺Foxp3⁺T细胞的频率也增加, 指向可能使用该细胞群作为免疫标志物。有趣的是, 相较于新发生的糖尿病小鼠, 组合疗法治疗的响应者小鼠的胰腺中各种Treg亚组之中CTLA4⁺T细胞的频率显著地较高, 并且与组合疗法治疗的非响应者小鼠不同。响应者和非响应者小鼠之间的胰岛炎的程度没有差异, 这表明除了Treg之外的淋巴细胞亚群中的改变。

[0373] 外周Treg可根据其环境环境和刺激条件使用不同的调节机制。参见例如, Liston A.等, *Nature Reviews Immunology* 2014; 14:154-165。在这些实验中, CTLA4和TGF- β 对疗法扩增的CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞体外和部分体内调节活性十分重要, 而IL-10并不如此。

[0374] 虽然IL-10似乎是鉴定基于乳酸乳球菌的疗法诱导的Treg的良好标记物, 但是其他人已经证实了抗-IL-10抗体没有消除建立的体内耐受。参见例如, Fowler S.和Powrie F, *European Journal of Immunology* 2002, 32:2997-3006。

[0375] 如在小鼠中, 通过具有由转录因子Foxp3(参见例如, Hori S.等, *Science* 2003; 299:1057-1061)的高且持续表达赋予的抑制性表型来定义人Treg, 而Foxp3基因中功能/突变的缺失导致严重的致命性自身免疫紊乱(参见例如, Kim J.M., 等, *Nature Immunology* 2007; 8:191-197; 和 Mayer C.T.等, *European Journal of Immunology* 2014, 44:2990-

3002)。

[0376] 在基于乳酸乳球菌的疗法开始时通过P60肽特异性抑制Treg功能性(参见例如, Casares N.等, Journal of Immunology 2010;185:5150-5159) 损害疗法诱导的耐受的诱导。此外, 瞬时消耗由来自疗法耐受的NOD.Foxp3.DTR小鼠的Foxp3⁺Treg足以在所有动物中诱导完全疾病复发, 这证明了Foxp3⁺T细胞的存在对于维持治疗耐受性和控制病原性Teff细胞是十分重要的, 所述Teff细胞将继续存在于对基于乳酸乳球菌的疗法响应的小鼠中。

[0377] 当前的数据证明, 相较于抗-CD3单一疗法, 将分泌人PINS和人IL-10的临床级自给的乳酸乳球菌与低剂量的抗-CD3组合增加了糖尿病逆转的频率。疗法响应者和非响应者两者的CD4⁺Foxp3⁺T细胞频率增加, 这表明由基于乳酸乳球菌的疗法诱导的免疫效果在每个单独受体中发生, 但是治疗成功(定义为返回稳定的血糖量正常)取决于其他参数, 如在疾病发生时仍然存在的功能性β细胞团。治疗成功还进一步与起始血糖相关。紧接进入时的起始血液葡萄糖浓度, IAA水平使用PINS作为抗原预测基于乳酸乳球菌的疗法的结果。当前的数据证明, Foxp3⁺Treg在耐受的小鼠中对诱导和维持活性耐受和控制致糖尿病免疫应答至关重要。这些发现提供了用于测试人中干预的工具: 分泌一个或多个胰岛抗原的临床级自给的乳酸乳球菌, 用于预测治疗成功的生物标志物, 以及证明了Foxp3⁺T细胞的诱导是基于乳酸乳球菌的疗法的基础。

[0378] 虽然本文已经示出并描述了一些实施方式, 但是这些实施方式仅作为示例提供。本领域技术人员在不背离本发明的情况下可以作出多种改变、变化和替代。应理解, 本文所述的本发明实施方式的各种替代形式可用于实施本发明。

[0379] 示例性实施方式

[0380] 1. 一种乳酸菌(LAB), 其包含编码白介素-10(IL-10)的外源性核酸和编码胰岛素原(PINS)的外源性核酸, 其中所述编码IL-10的外源性核酸和编码PINS的外源性核酸经染色体整合。

[0381] 2. 如实施方式1所述的LAB, 其中, 所述LAB是乳球菌(Lactococcus)种细菌。

[0382] 3. 如实施方式2所述的LAB, 其中, 所述LAB是乳酸乳球菌(Lactococcus lactis)。

[0383] 4. 如实施方式3所述的LAB, 其中, 所述LAB是乳酸乳球菌乳脂亚种(Lactococcus lactis subspecies cremoris)。

[0384] 5. 如实施方式4所述的LAB, 其中, 所述LAB是乳酸乳球菌菌株MG1363。

[0385] 6. 如实施方式1-5中任一项所述的LAB, 其中所述IL-10是人IL-10(hIL-10)。

[0386] 7. 如实施方式6所述的LAB, 其中, 所述hIL-10当以不存在信号肽的成熟hIL-10分泌时, 其在位置2处包含丙氨酸(Ala)而非脯氨酸(Pro)。

[0387] 8. 如实施方式1-7中任一项所述的LAB, 其中, 所述IL-10具有与SEQ ID NO:1至少95%相同性的氨基酸序列。

[0388] 9. 如实施方式1-8中任一项所述的LAB, 其中, 所述编码IL-10的外源性核酸具有与SEQ ID NO:2至少95%相同性的核苷酸序列。

[0389] 10. 如前述实施方式中任一项所述的LAB, 其中, 所述PINS是人PINS(hPINS)。

[0390] 11. 如前述实施方式中任一项所述的LAB, 其中, 所述PINS具有与SEQ ID NO:3至少95%相同性的氨基酸序列。

[0391] 12. 如前述实施方式中任一项所述的LAB, 其中, 所述编码PINS的外源性核酸具有

与SEQ ID NO:4至少95%相同性的核苷酸序列。

[0392] 13.如前述实施方式中任一项所述的LAB,其中,所述LAB组成型表达所述IL-10。

[0393] 14.如实施方式13所述的LAB,其中,所述LAB分泌所述IL-10。

[0394] 15.如前述实施方式中任一项所述的LAB,其中,所述LAB组成型表达所述PINS。

[0395] 16.如实施方式15所述的LAB,其中,所述LAB分泌所述PINS。

[0396] 17.如前述实施方式中任一项所述的LAB,其中,所述LAB组成型表达并分泌所述IL-10和所述PINS。

[0397] 18.如前述实施方式中任一项所述的LAB,其中,所述编码hIL-10的外源性核酸位于h11A启动子(Ph11A)的3'处。

[0398] 19.如实施方式18所述的LAB,其中,所述Ph11A是乳酸乳球菌Ph11A。

[0399] 20.如实施方式18所述的LAB,其中,所述编码IL-10的外源性核酸受所述Ph11A转录调节。

[0400] 21.如前述实施方式中任一项所述的LAB,其中,所述LAB包含表达盒,其包含h11A启动子,IL-10分泌序列和所述编码IL-10的外源性核酸。

[0401] 22.如实施方式21所述的LAB,其中,所述表达盒经染色体整合。

[0402] 23.如实施方式22所述的LAB,其中,所述表达盒在thyA基因座处经染色体整合。

[0403] 24.在实施方式21-23中任一项所述的LAB,其中,所述IL-10分泌序列是编码未鉴定的分泌的45-kDa蛋白质(Usp45)的分泌前导序列(SSusp45)的核苷酸序列。

[0404] 25.如前述实施方式中任一项所述的LAB,其中,所述编码PINS的外源性核酸位于gap启动子的3'处。

[0405] 26.如实施方式25所述的LAB,其中,所述编码PINS的外源性核酸受所述gapB启动子转录调节。

[0406] 27.如实施方式25或26所述的LAB,其中,所述LAB包含第一多顺反子表达盒,其包含位于gapB基因5'处的gapB启动子,PINS分泌序列,和所述编码PINS的外源性核酸。

[0407] 28.如实施方式27所述的LAB,其中,所述LAB还包含介于所述gapB基因和所述PINS分泌序列之间的基因间区域。

[0408] 29.如实施方式28所述的LAB,其中,所述基因间区域是具有SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的rpmD。

[0409] 30.如实施方式27-29中任一项所述的LAB,其中,所述gapB启动子和所述gapB基因对所述LAB为内源性的。

[0410] 31.如实施方式27-30中任一项所述的LAB,其中,所述第一多顺反子表达盒经染色体整合。

[0411] 32.如实施方式27-31中任一项所述的LAB,其中,所述PINS分泌序列是编码SSusp45的核苷酸序列。

[0412] 33.如实施方式32所述的LAB,其中,所述SSusp45具有SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:12的核苷酸序列。

[0413] 34.如前述实施方式中任一项所述的LAB,其中,所述LAB还包含编码海藻糖-6-磷酸磷酸酶的外源性核酸。

[0414] 35.如实施方式34所述的LAB,其中,所述海藻糖-6-磷酸磷酸酶是大肠杆菌OtsB。

[0415] 36.如实施方式34或35所述的LAB,其中,所述编码海藻糖-6-磷酸磷酸酶的外源性核酸经染色体整合。

[0416] 37.如实施方式36所述的LAB,其中,所述编码海藻糖-6-磷酸磷酸酶的外源性核酸经染色体整合未鉴定分泌的45-kDa蛋白质基因(usp45)的3'。

[0417] 38.如实施方式37所述的LAB,其中,所述LAB包含第二多顺反子表达盒,其包含usp45启动子,所述usp45,和所述编码海藻糖-6-磷酸磷酸酶的外源性核酸。

[0418] 39.如实施方式38所述的LAB,其中,所述第二多顺反子表达盒还包含介于所述usp45和所述编码海藻糖-6-磷酸磷酸酶的外源性核酸之间的基因间区域。

[0419] 40.如实施方式39所述的LAB,其中,所述基因间区域是具有SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的rpmD。

[0420] 41.如前述实施方式中任一项所述的LAB,其中,在所述LAB中海藻糖-6-磷酸磷酸酶基因(trePP)被破坏或失活。

[0421] 42.如实施方式41所述的LAB,其中,所述trePP通过去除所述trePP或其片段失活。

[0422] 43.如实施方式41所述的LAB,其中,所述trePP通过插入终止密码子被破坏。

[0423] 44.如实施方式41-43中任一项所述的LAB,其中所述LAB缺少trePP活性。

[0424] 45.如前述实施方式中任一项所述的LAB,其中,在所述LAB中纤维二糖特异性PTS系统IIC组分基因(ptcC)被破坏或失活。

[0425] 46.如实施方式45所述的LAB,其中,所述ptcC通过插入终止密码子被破坏。

[0426] 47.如实施方式45所述的LAB,其中,所述ptcC通过去除所述ptcC或其片段失活。

[0427] 48.如实施方式45-47中任一项所述的LAB,其中所述LAB缺少ptcC活性。

[0428] 49.如前述实施方式中任一项所述的LAB,其中,所述LAB还包含编码一个或多个海藻糖转运体的一个或多个基因。

[0429] 50.如实施方式49所述的LAB,其中,所述编码一个或多个海藻糖转运体的一个或多个基因对所述LAB为内源性的。

[0430] 51.如实施方式49或50所述的LAB,其中,所述LAB过表达所述一个或多个海藻糖转运体。

[0431] 52.如实施方式49-51中任一项所述的LAB,其中,所述编码一个或多个海藻糖转运体的一个或多个基因位于h11A启动子(Ph11A)的3'处。

[0432] 53.如实施方式52所述的LAB,其中,所述编码一个或多个海藻糖转运体的一个或多个基因被所述Ph11A转录调节。

[0433] 54.如实施方式47-51中任一项所述的LAB,其中,所述编码一个或多个海藻糖转运体的一个或多个基因选自:11mg_0453、11mg_0454和其任何组合。

[0434] 55.如实施方式54所述的LAB,其中,所述编码一个或多个海藻糖转运体的一个或多个基因包含编码2个海藻糖转运体的2个基因,其中基因间区域位于所述2个基因之间。

[0435] 56.如实施方式55所述的LAB,其中,所述基因间区域是具有SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:9的rpmD。

[0436] 57.一种组合物,其包含前述实施方式中任一项所述的LAB。

[0437] 58.一种包含实施方式1-56中任一项所述的LAB和药学上可接受运载体的药物组合物。

[0438] 59.实施方式1-56中任一项所述的LAB,实施方式57所述的组合物,或实施方式58所述的药物组合物在治疗1型糖尿病(T1D)中的用途。

[0439] 60.实施方式1-56中任一项所述的LAB,实施方式57所述的组合物,或实施方式58所述的药物组合物在制备用于治疗1型糖尿病(T1D)的药物中的用途。

[0440] 61.如实施方式60所述的LAB、组合物或药物组合物,其中,所述T1D是最近发生的T1D。

[0441] 62.一种用于在有此需要的对象中治疗T1D的方法,其包括向所述对象给予治疗有效量的实施方式1-56中任一项所述的LAB,实施方式57所述的组合物,或实施方式58所述的药物组合物。

[0442] 63.如实施方式62所述的方法,其中,所述T1D是最近发生的T1D。

[0443] 64.如实施方式62或63所述的方法,其中,所述对象是人。

[0444] 65.如实施方式62-64中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括向所述对象给予治疗有效量的抗-CD3抗体。

[0445] 66.如实施方式65所述的方法,其中,所述抗-CD3抗体是单克隆抗体。

[0446] 67.如实施方式65或66所述的方法,其中,所述抗-CD3抗体是奥特力昔珠单抗(otelixizumab)或特普利珠单抗(teplizumab)。

[0447] 68.如实施方式65-67中任一项所述的方法,其中,所述抗体使用共治疗方案给予所述对象。

[0448] 69.如实施方式65-68中任一项所述的方法,其中,所述给予所述LAB和所述给予所述抗-CD3抗体:

[0449] (i) 当与用抗-CD3抗体单独处理的对应对象相比,或与未给予所述LAB和所述抗-CD3抗体的对应对象相比时,降低所述对象维持正常血液葡萄糖水平所需的胰岛素的量;

[0450] (ii) 通过C-肽水平测量,在所述对象中保留初始 β 细胞功能至少约2个月;

[0451] (iii) 在所述对象中维持正常血糖至少约2个月;

[0452] (iv) 在所述对象中维持正常血红蛋白A1c(HbA1c)水平至少约2个月;或

[0453] (v) 它们的任意组合。

[0454] 70.如实施方式62-69中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括测量所述对象中的胰岛素自身抗体(IAA)。

[0455] 71.一种用于制备遗传修饰的LAB的方法,其包括(i)将LAB与编码IL-10的外源性核酸接触;和(ii)将所述LAB与编码PINS的外源性核酸接触,其中所述编码IL-10的外源性核酸和编码PINS的外源性核酸经染色体整合。

[0456] 72.如实施方式71所述的方法,其中,所述编码IL-10的外源性核酸和所述编码PINS的外源性核酸使用同源重组经染色体整合。

[0457] 73.如实施方式71或72所述的方法,其中,所述将所述LAB与编码IL-10的外源性核酸接触发生在所述将LAB与编码PINS的外源性核酸接触之前。

[0458] 74.如实施方式71或72所述的方法,其中,所述将所述LAB与编码IL-10的外源性核酸接触发生在所述将LAB与编码PINS的外源性核酸接触之后。

[0459] 75.如实施方式71-74中任一项所述的方法,其还包括将所述遗传修饰的LAB的培养物与至少一种稳定剂组合以形成细菌混合物。

- [0460] 76.如实施方式75所述的方法,其还包括从所述细菌混合物去除水,形成干燥的组合物。
- [0461] 77.如实施方式76所述的方法,其还包括冷冻干燥所述细菌混合物以形成冷冻干燥的组合物。
- [0462] 78.如实施方式77所述的方法,其中,所述至少一种稳定剂包括至少一种冷冻保存剂。
- [0463] 79.如实施方式71-78中任一项所述的方法,其还包括将所述遗传修饰的LAB,所述干燥的组合物,或所述冷冻干燥的组合物与药学上可接受的运载体组合以形成药物组合物。
- [0464] 80.如实施方式76-79中任一项所述的方法,其还包括配制所述干组合物,所述冷冻干燥的组合物或所述药物组合物成药学剂量形式。
- [0465] 81.一种通过实施方式71-80中任一项所述的方法制备的遗传修饰的细菌。
- [0466] 82.一种制备药物组合物的方法,其包括将实施方式1-56中任一项所述的LAB的培养物与至少一种稳定剂接触,形成细菌混合物。
- [0467] 83.如实施方式82所述的方法,其还包括从所述细菌混合物去除水,从而形成干燥的组合物。
- [0468] 84.如实施方式82或83所述的方法,其还包括冷冻干燥所述细菌混合物,从而形成冷冻干燥的组合物。
- [0469] 85.如实施方式82-84中任一项所述的方法,其中,所述至少一种稳定剂包括至少一种冷冻保存剂。
- [0470] 86.如实施方式84或85所述的方法,其还包括将所述冷冻干燥的组合物与药学上可接受的运载体接触,形成药物组合物。
- [0471] 87.如实施方式84-86中任一项所述的方法,其还包括配制所述冷冻干燥的组合物成药学剂量形式。
- [0472] 88.如实施方式87所述的方法,其中,所述药学剂量形式选自:片剂,胶囊,颗粒和囊剂。
- [0473] 89.一种单位剂型,其包含实施方式1-56中任一项所述的LAB,实施方式57所述的组合物,或实施方式58所述的药物组合物。
- [0474] 90.如实施方式89所述的单位剂型,其中,所述单位剂型是口服剂型。
- [0475] 91.如实施方式90所述的单位剂型,其中,所述口服剂型形式选自:片剂,胶囊,颗粒和囊剂。
- [0476] 92.如实施方式89-91中任一项所述的单位剂型,其中,所述单位剂型包含约 1×10^6 至约 1×10^{12} 集落形成单位(cfu)的所述LAB。
- [0477] 93.如实施方式92所述的单位剂型,其包含约 1×10^8 至约 1×10^{11} cfu。
- [0478] 94.一种试剂盒,其包括(1)根据实施方式1-56中任一项所述的LAB,根据实施方式57所述的组合物,根据实施方式58所述的药物组合物,根据如实施方式89-93中任一项所述的单位剂型,和(2)用于向哺乳动物给予所述所述LAB,所述组合物,所述药物组合物,或所述单位剂型的说明书。
- [0479] 95.如实施方式94所述的试剂盒,其中,所述哺乳动物是人。

- [0480] 96. 一种包含实施方式1-56中任一项所述的LAB、溶剂和稳定剂的细菌悬浮液。
- [0481] 97. 如实施方式96所述的细菌悬浮液, 其中, 所述溶剂选自水、油及其任意组合。

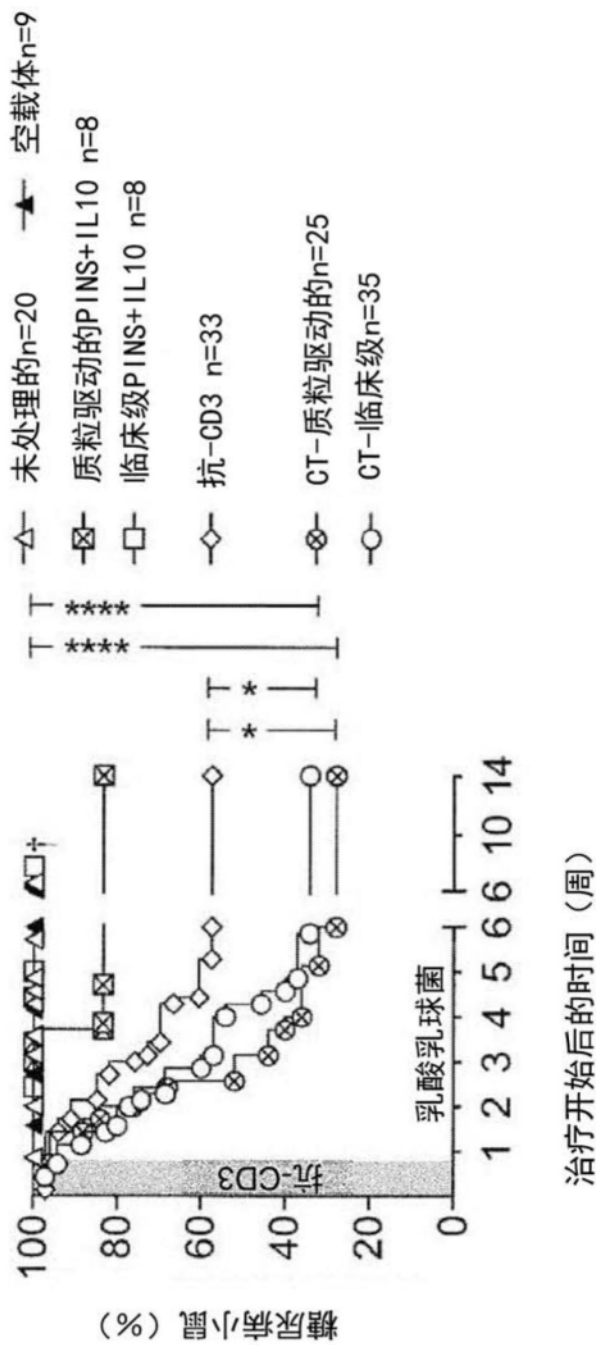


图1A

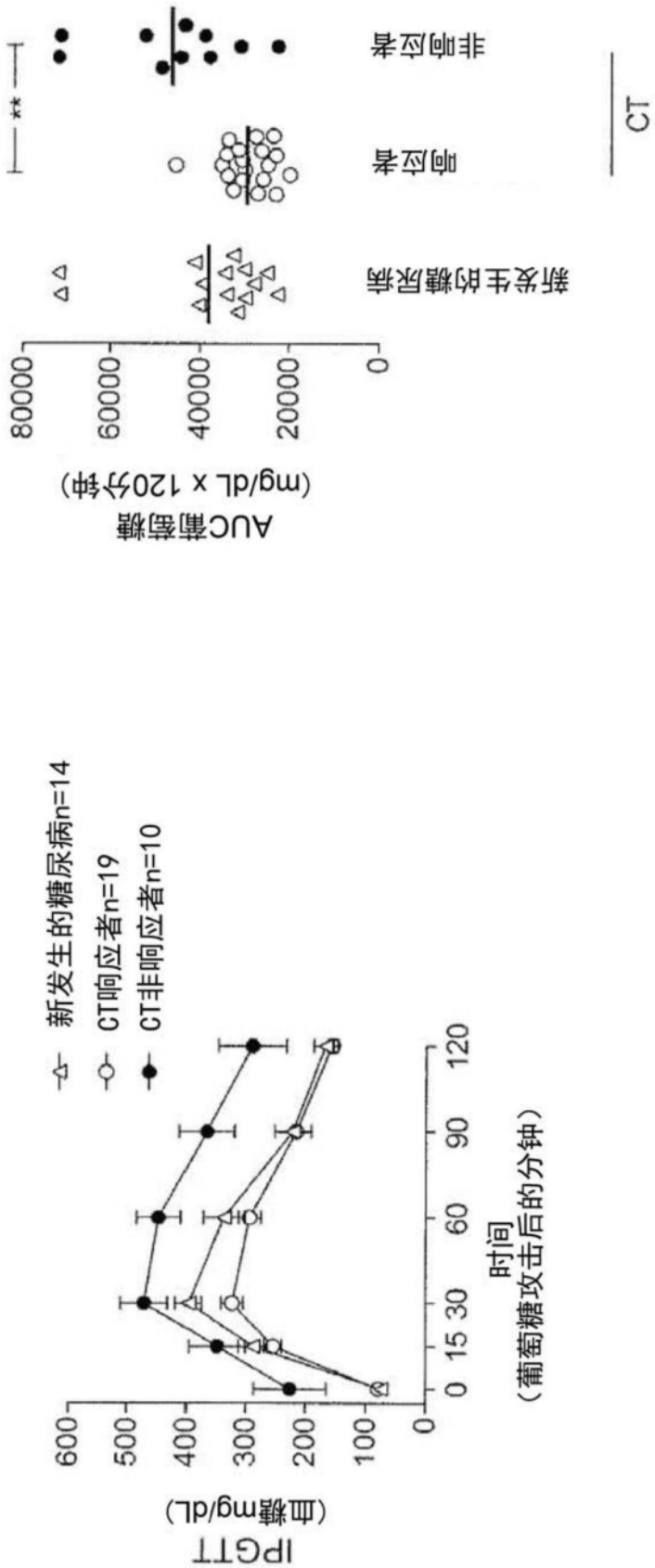


图1B

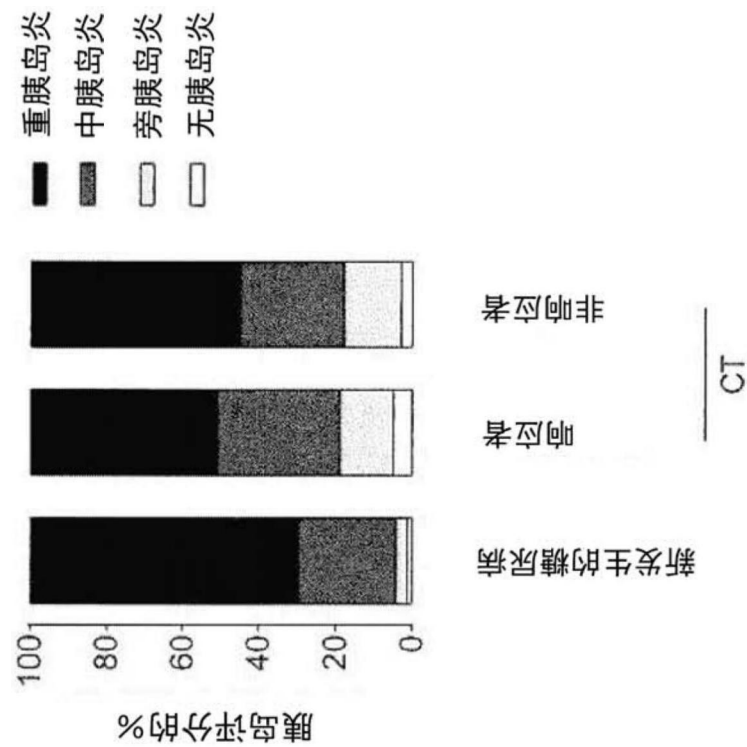


图1C

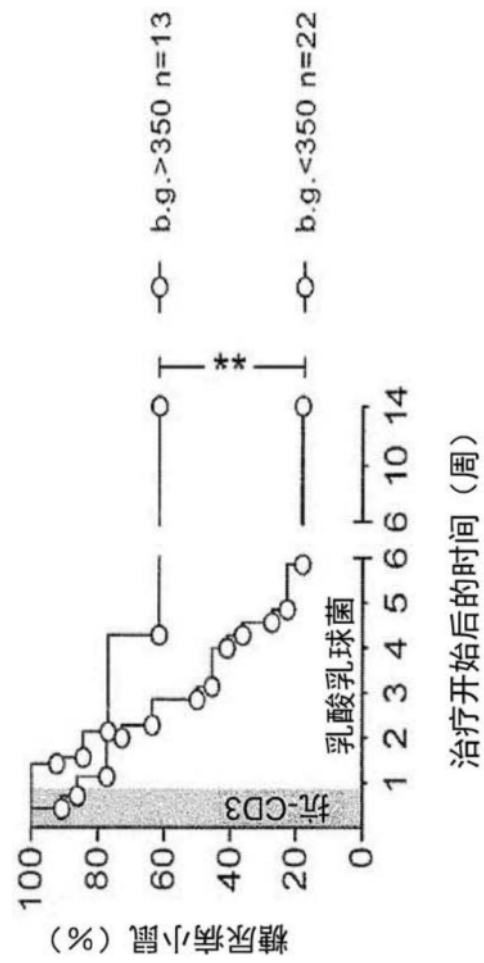


图2A

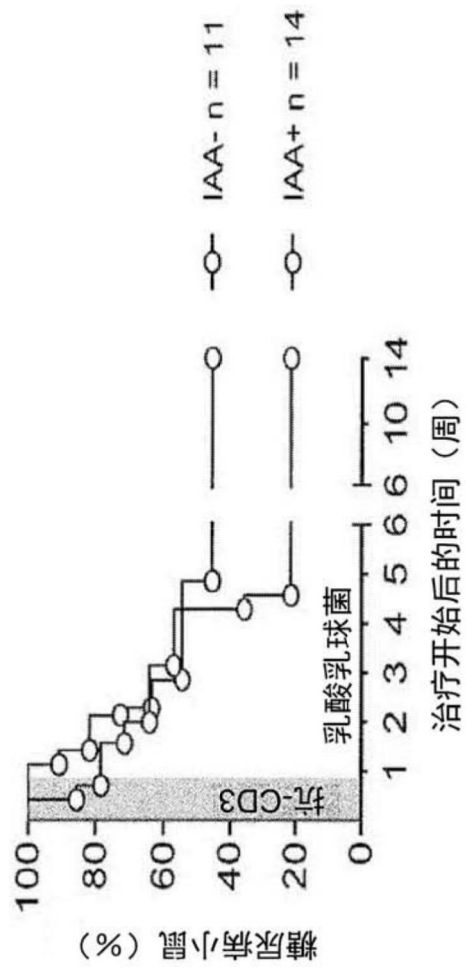


图2B

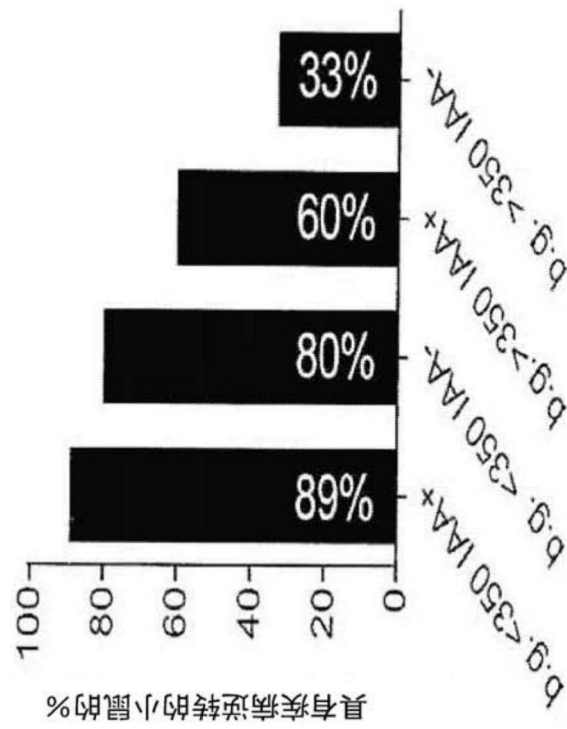


图2C

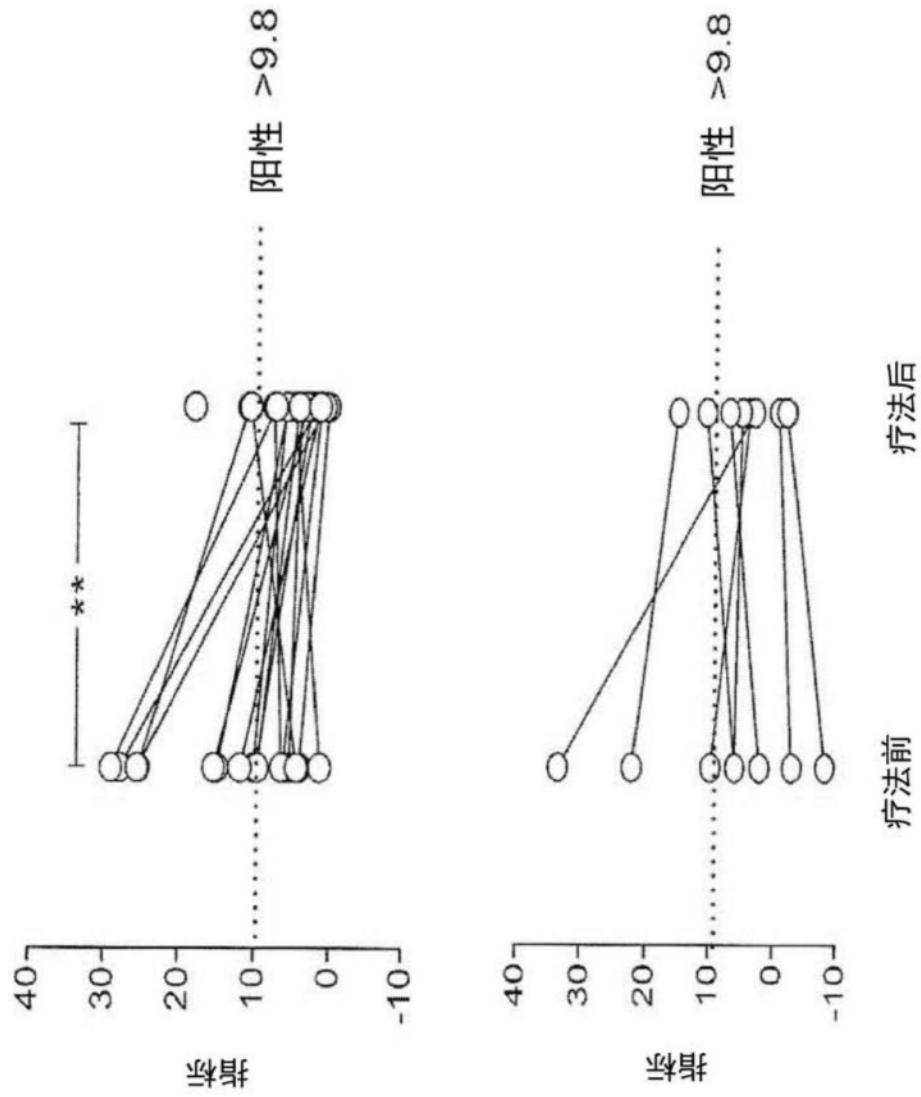


图2D

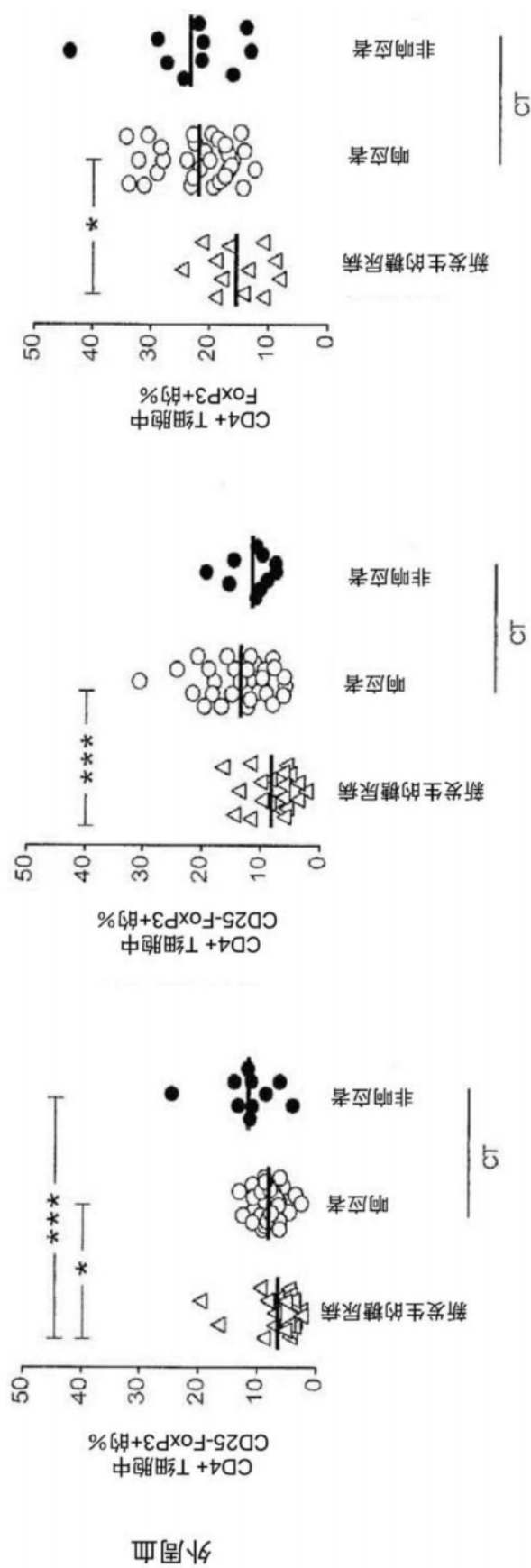


图3A

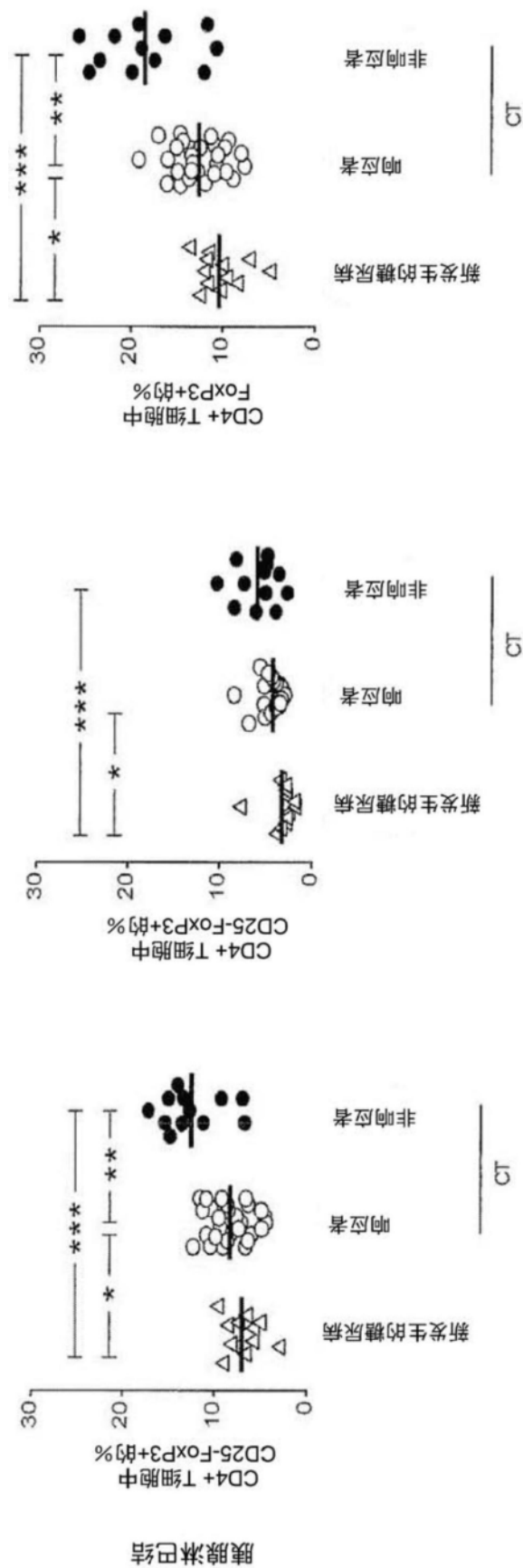


图3B

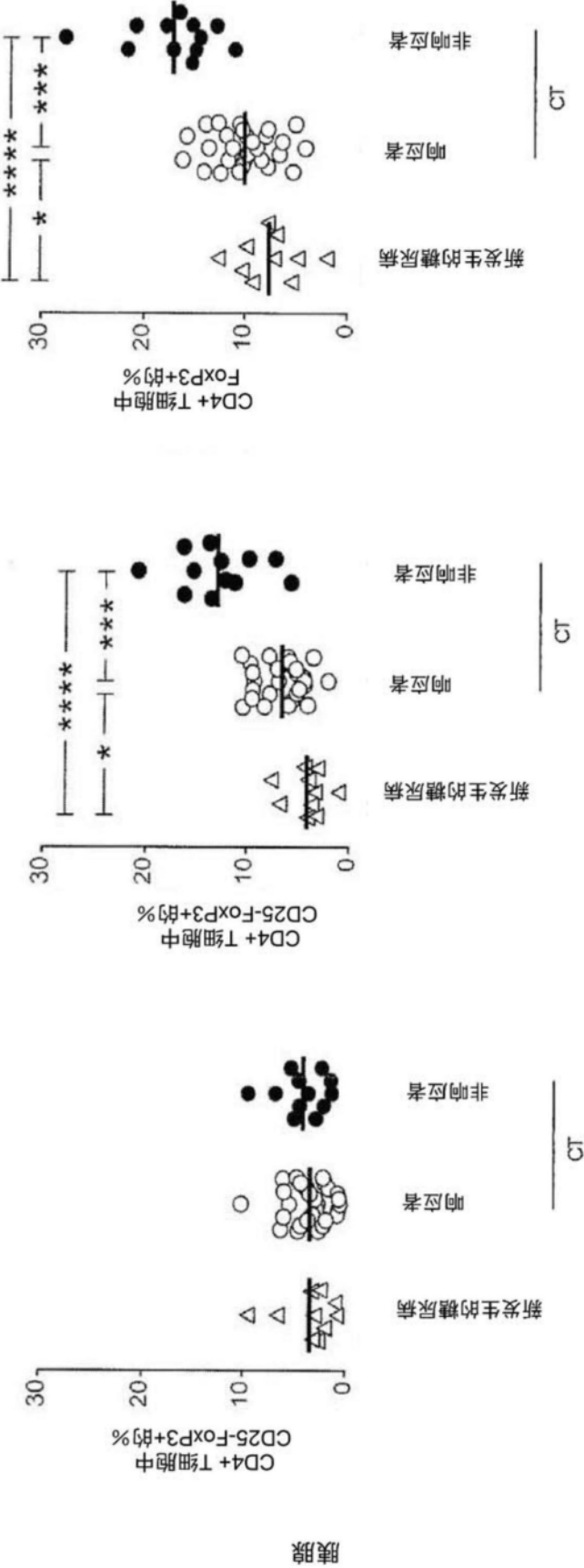


图3C

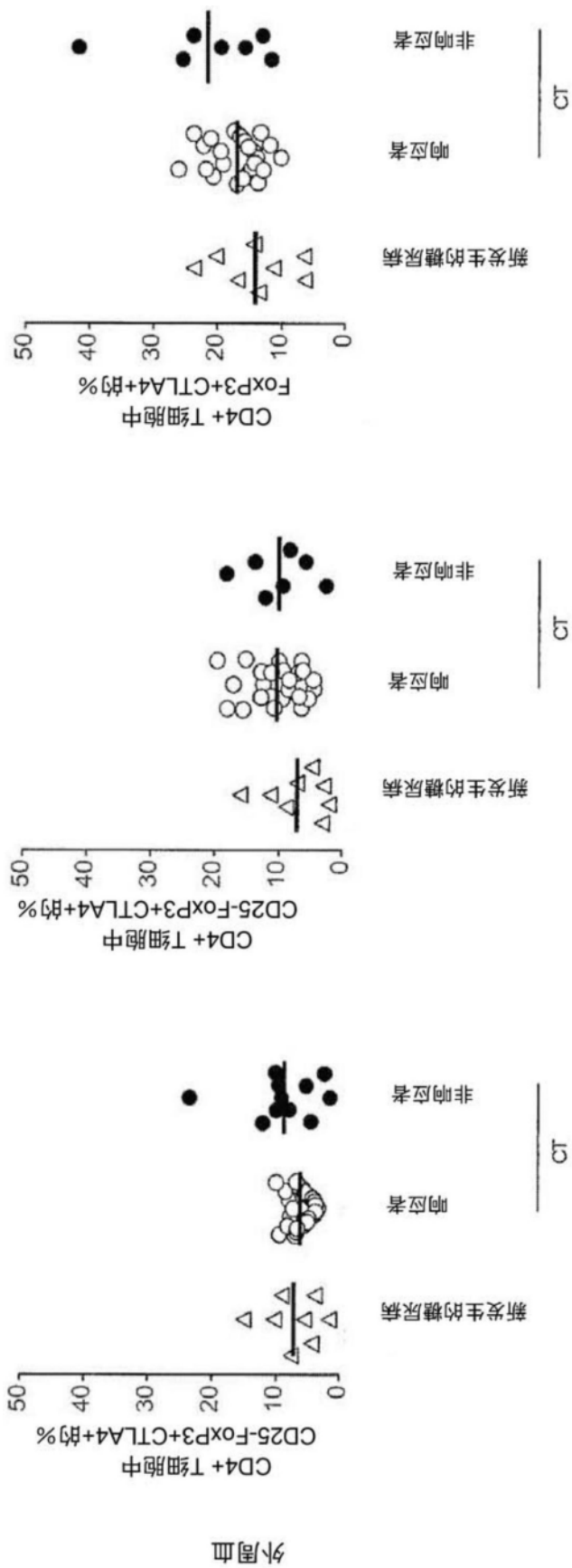


图3D

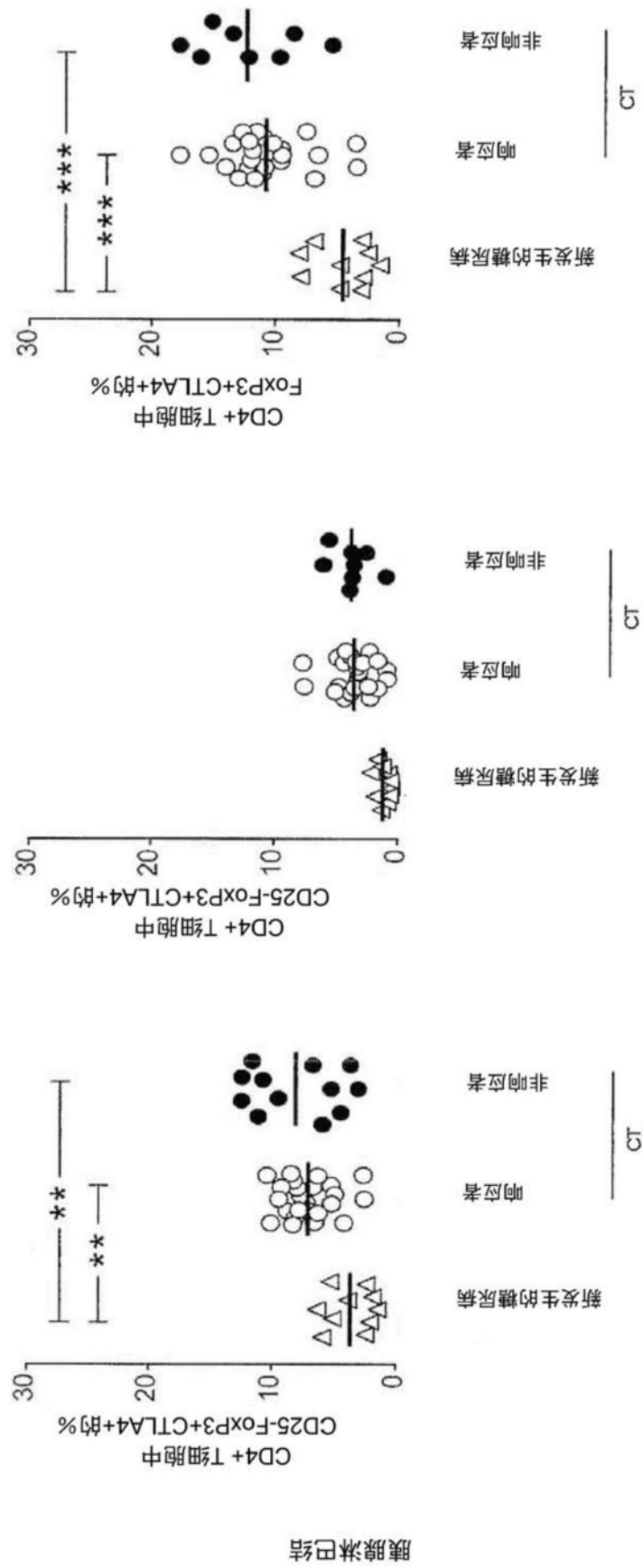


图3E

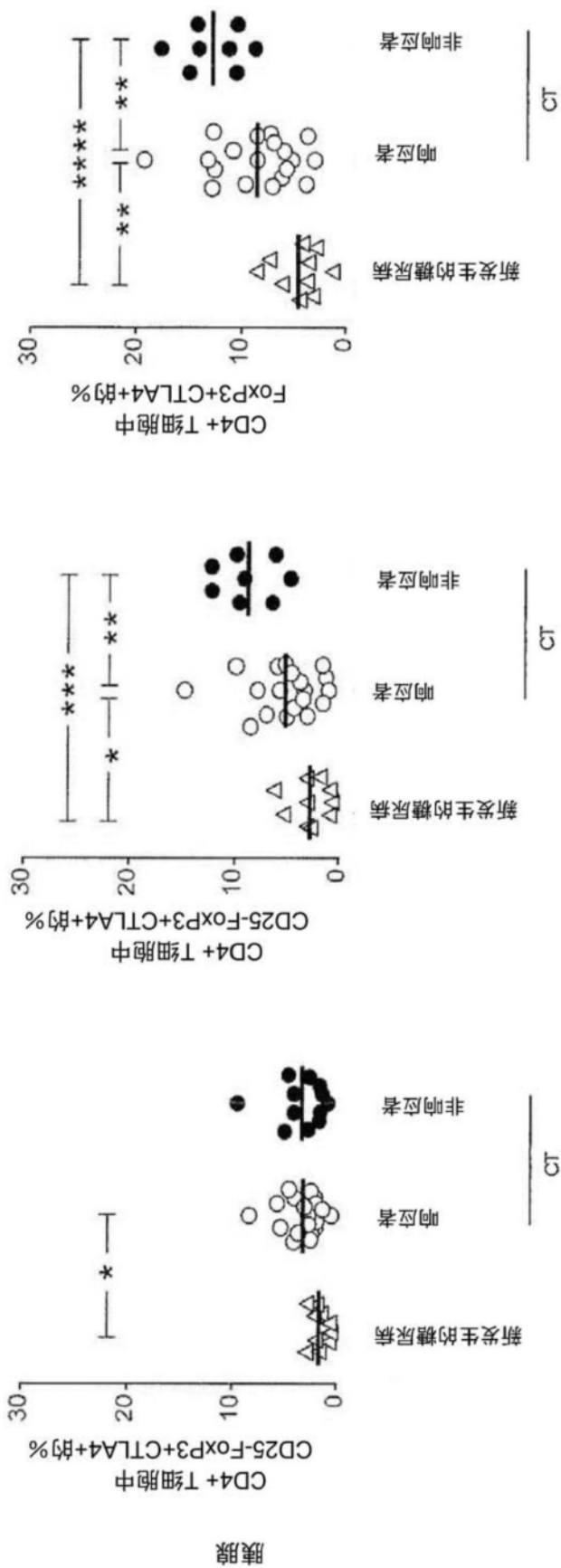


图3F

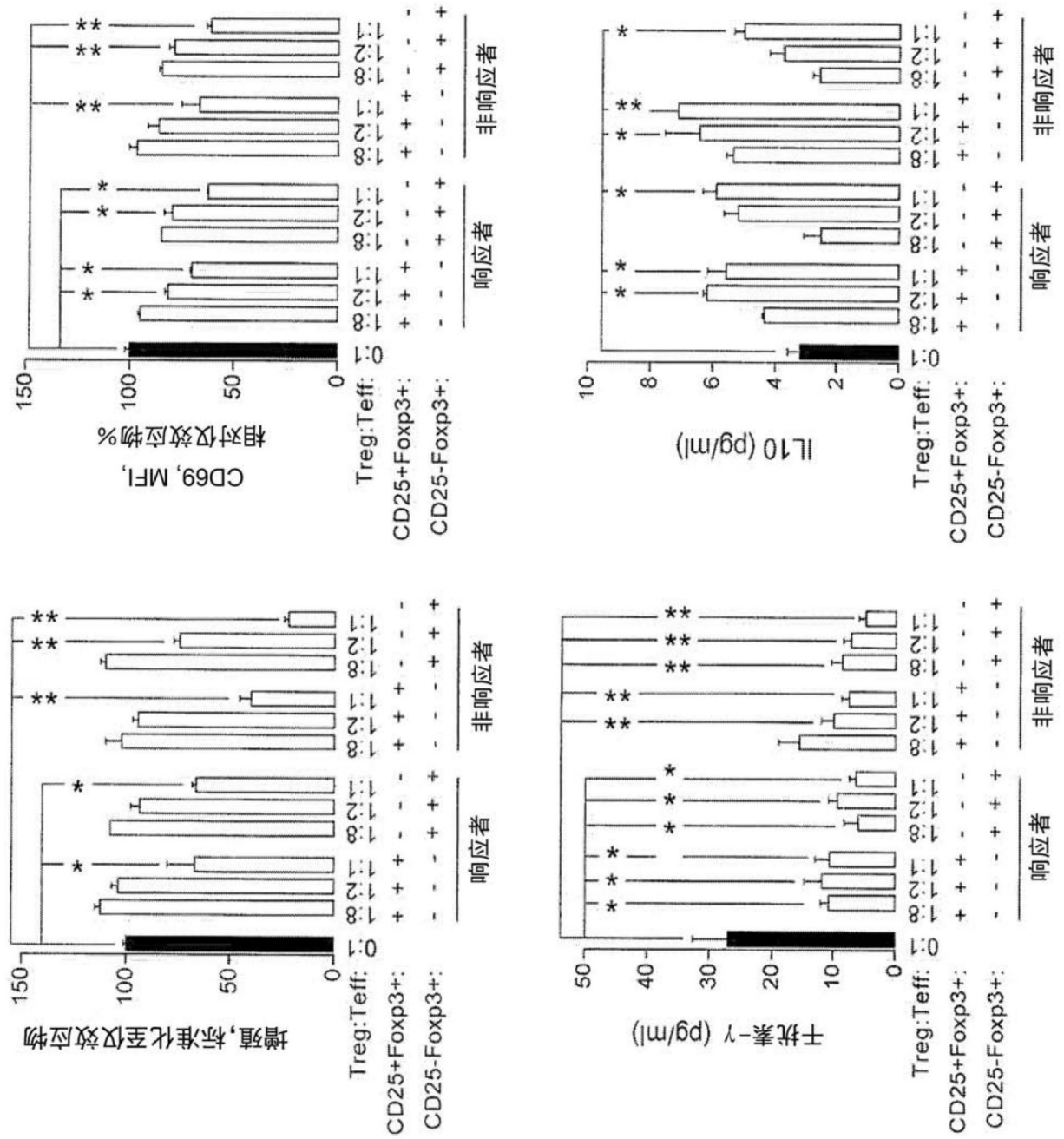


图4

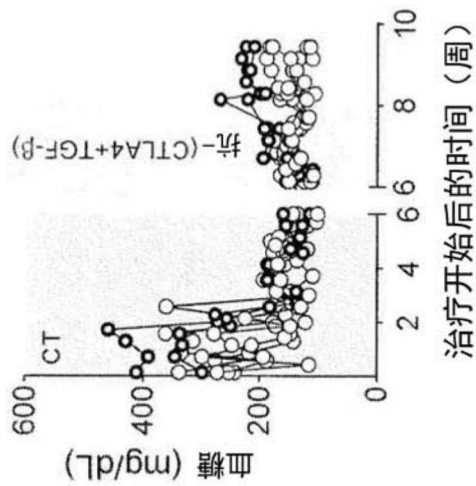


图5C



图6A

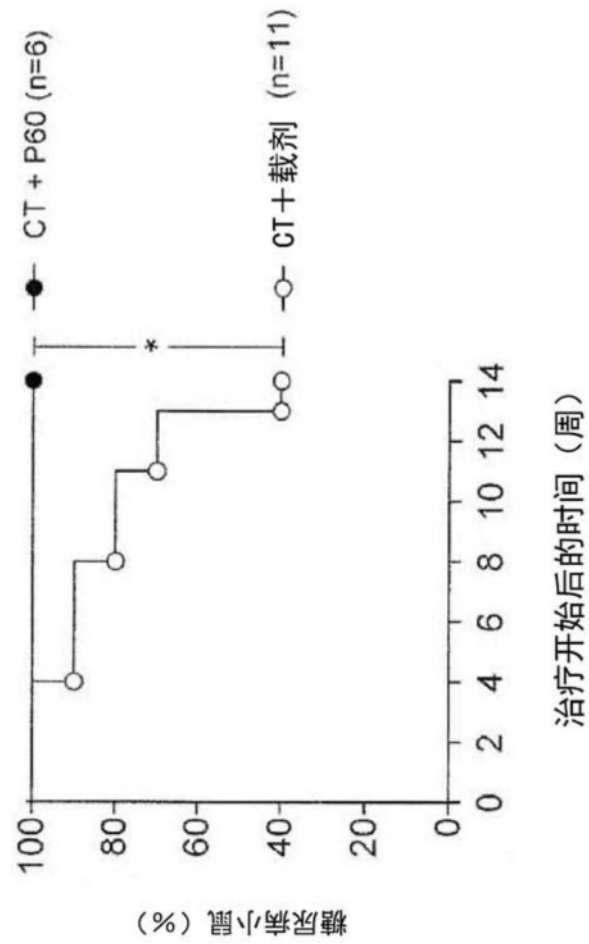


图6B



图7A

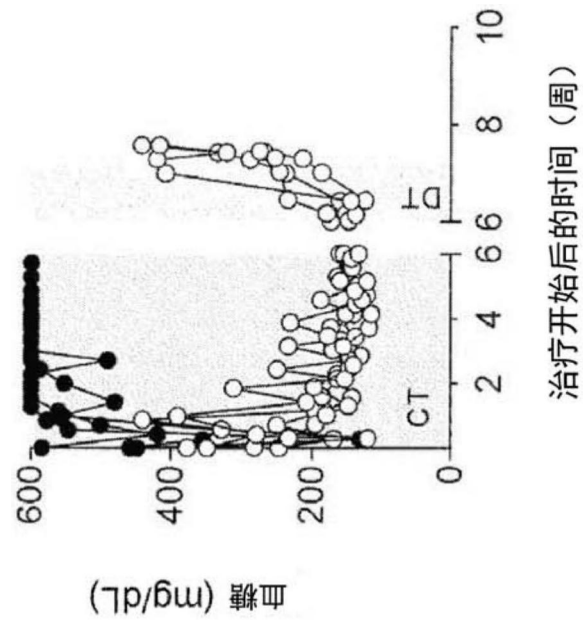


图7B

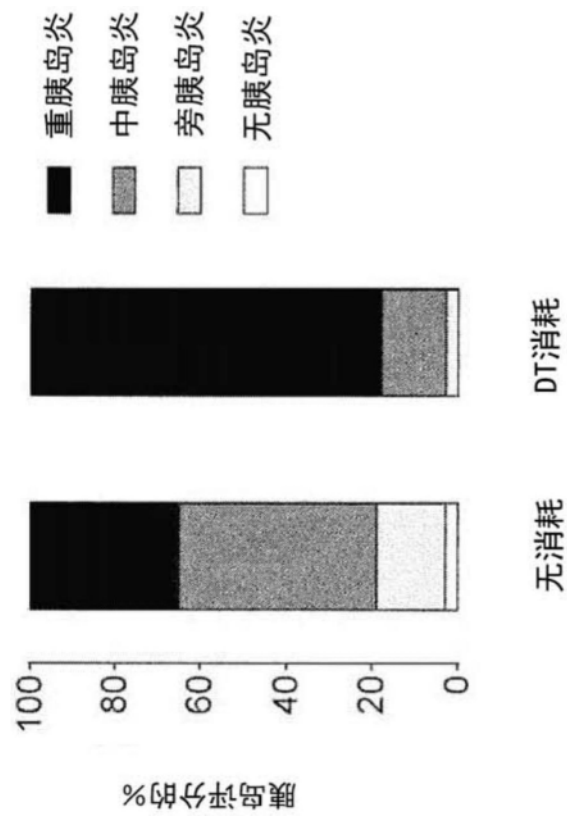


图7C

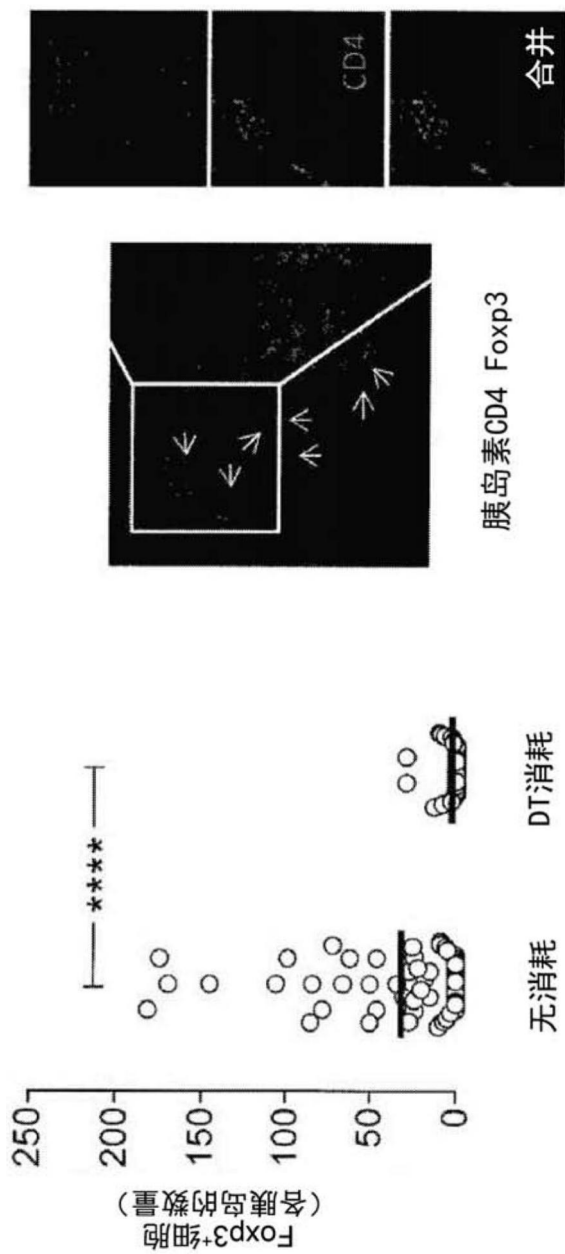


图7D

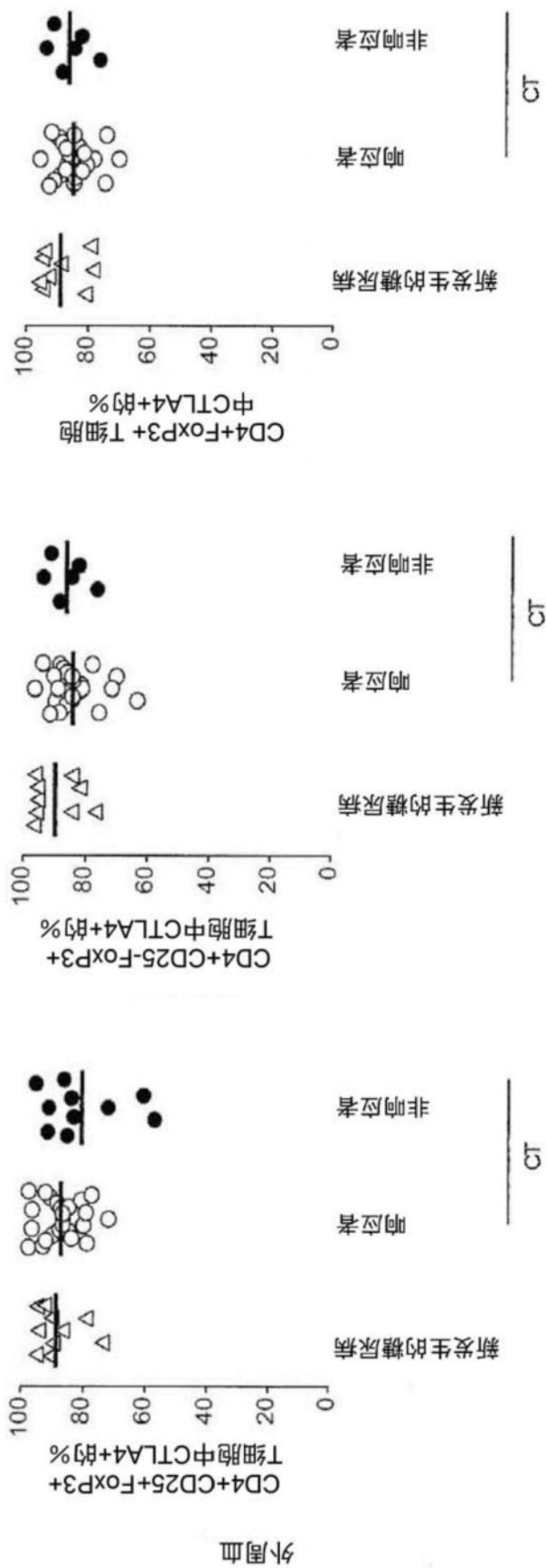


图8A

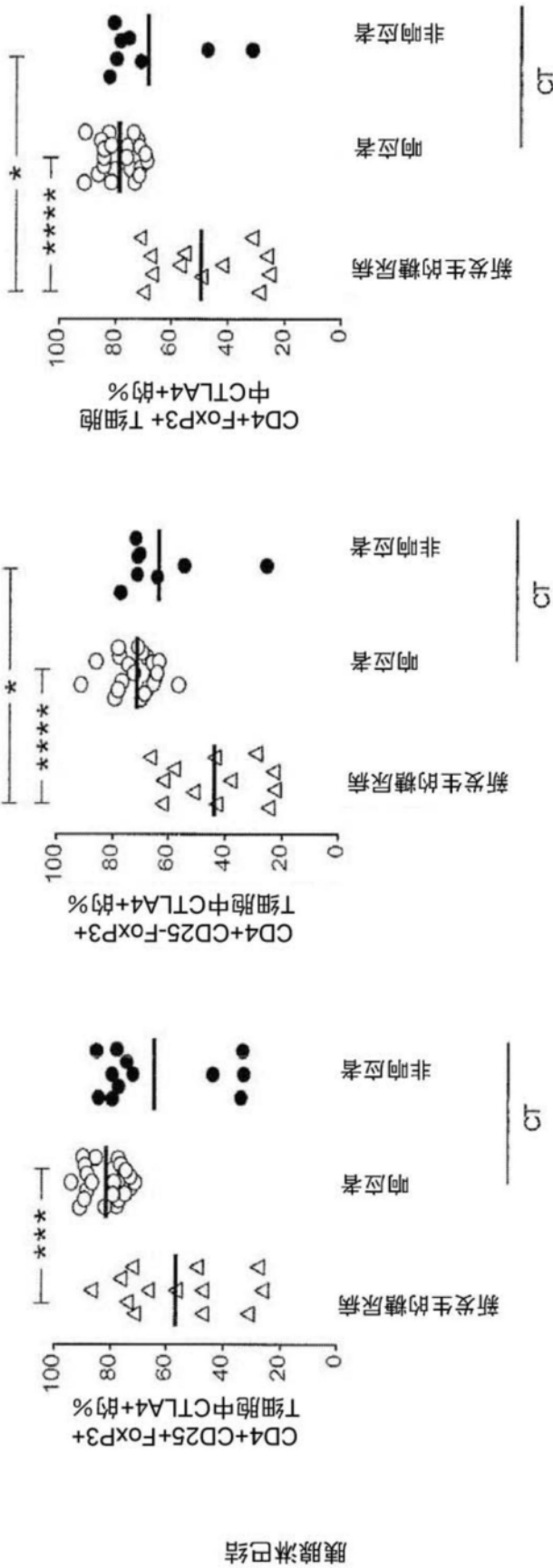


图8B

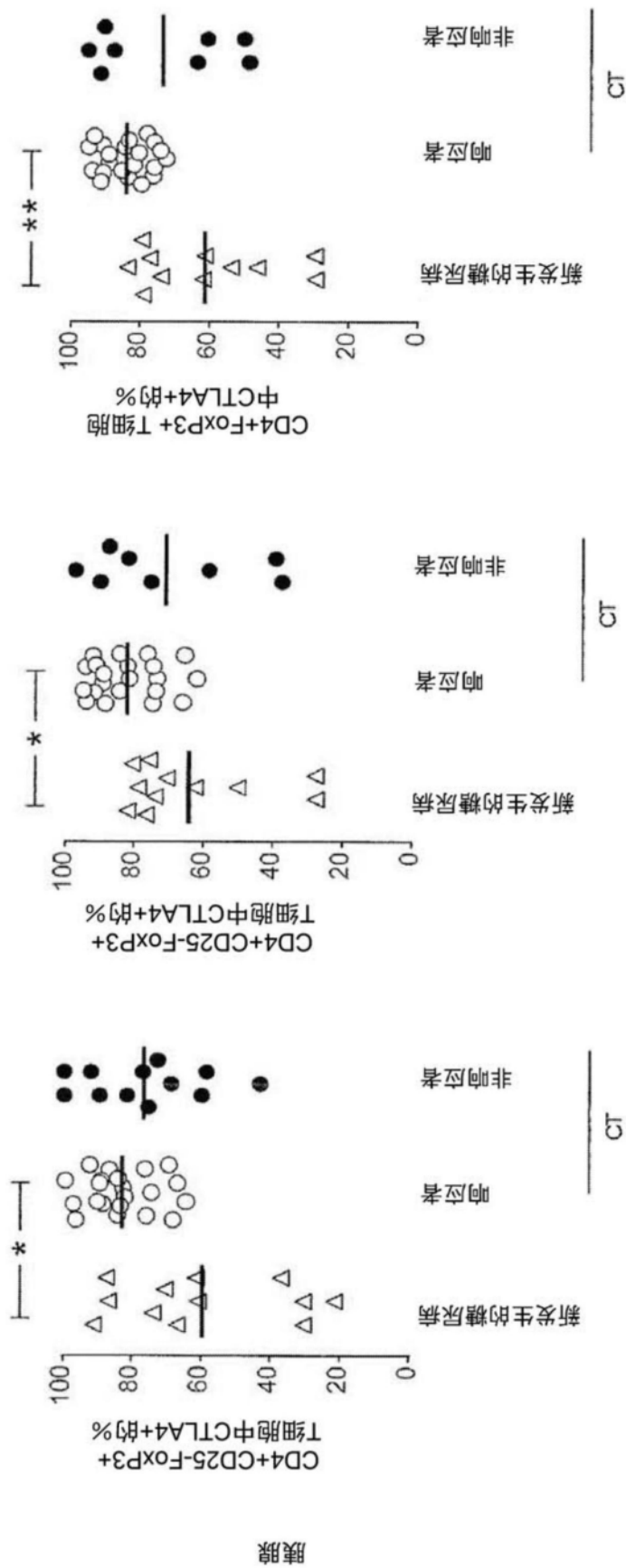


图8C

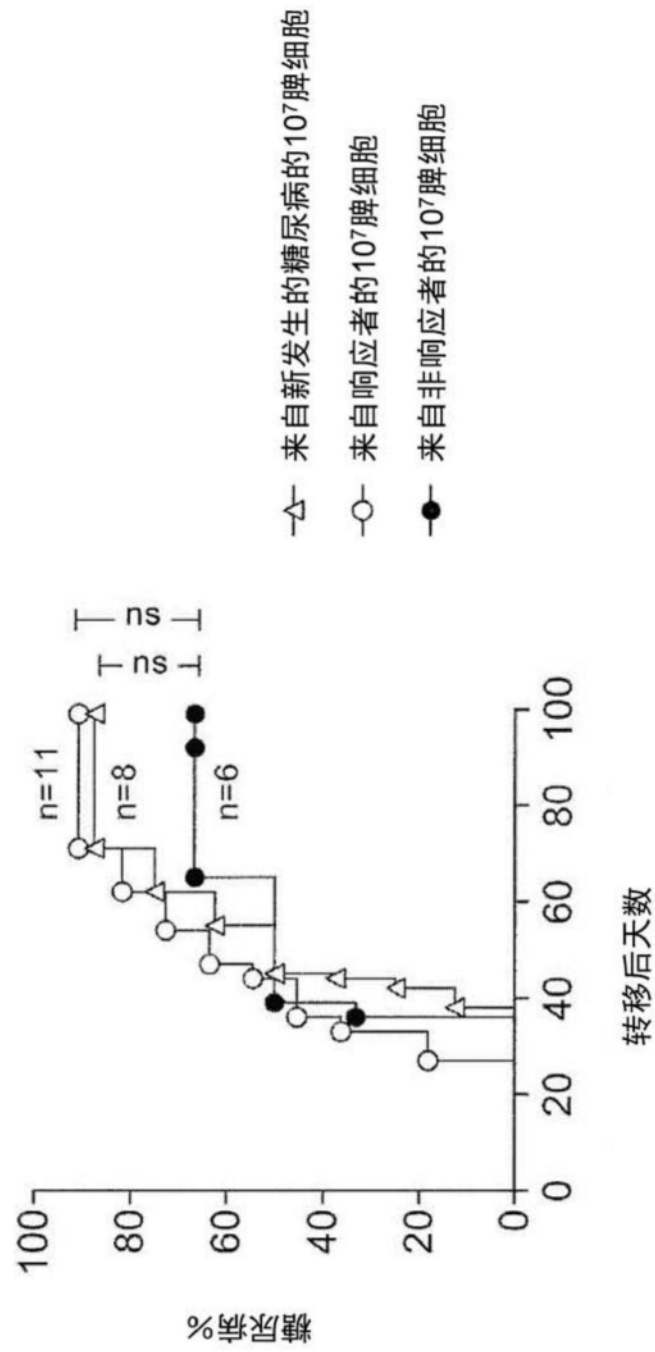


图9

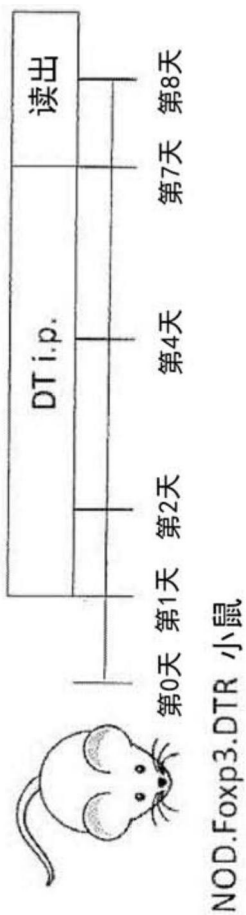


图10A

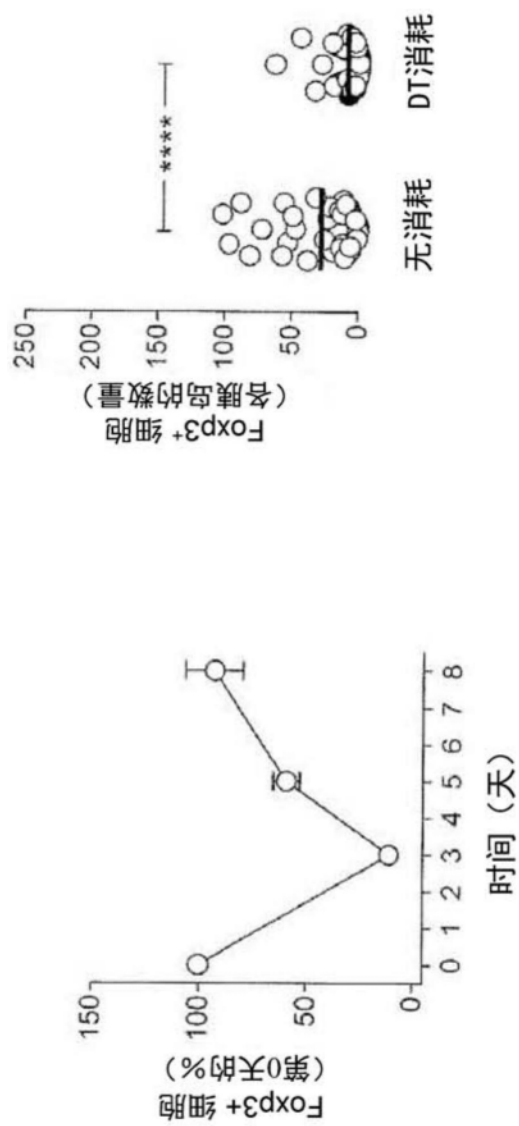


图10B

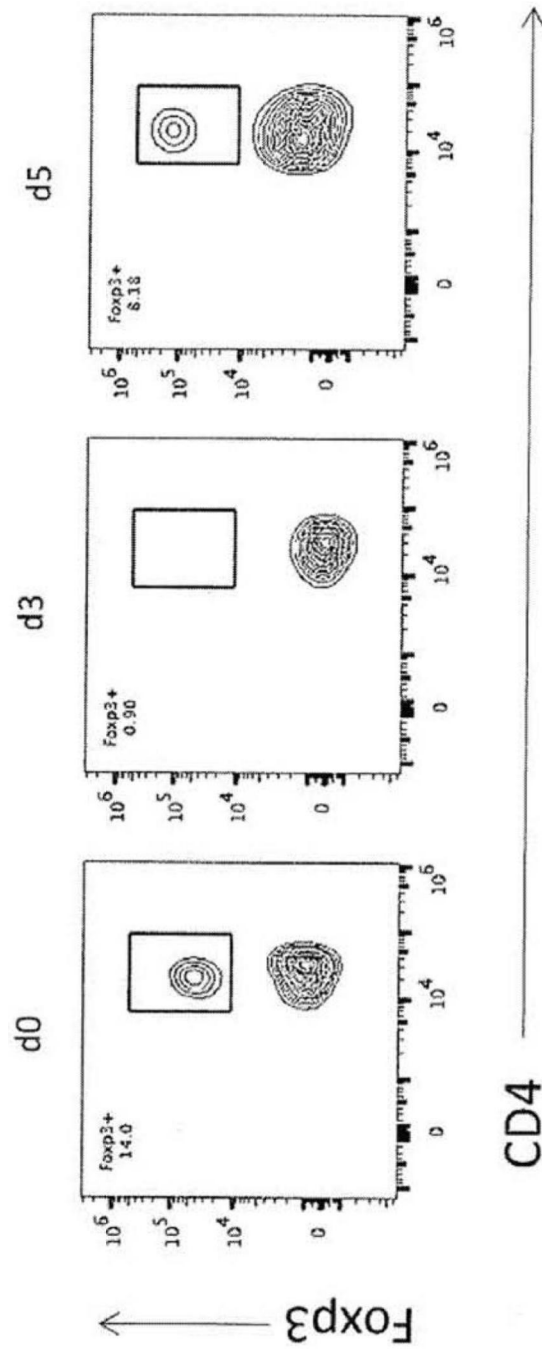


图10C

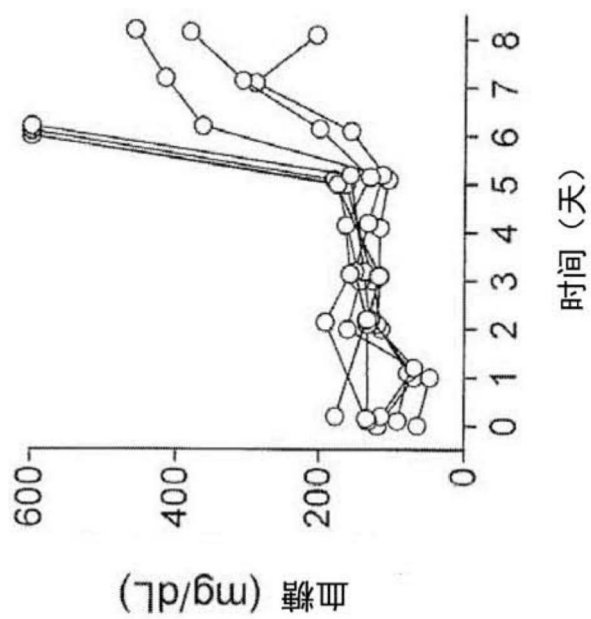


图10D

```

1   aaaacgcctt aaaatggcat ttgacttgc aaactgggct aagatttgct aaaatgaaaa
   >>.....Phl1A.....>

61  atgcctatgt ttaaggtaaa aaacaaatgg aggacatttc taaaatgaaa aaaaagatta
   >.....Phl1A.....>>
                                     >>...SSusp45....>
                                     m k k k i

121 tctcagctat tttaatgtct acagtgatac tttctgctgc agccccgttg tcaggtgttt
   >.....SSusp45.....>
   i s a i l m s t v i l s a a a p l s g v

181 acgcctcagc tgggtcaaggc actcaatcag aaaactcatg tactcacttt ccaggttaact
   >..>> SSusp45
   y a
       >>.....hIL10aPxA.....>
       s a g q g t q s e n s c t h f p g n

241 tgccaaacat gcttcgtgat ttgctgatg ctttttcacg tgttaaaact ttttttcaaa
   >.....hIL10aPxA.....>
   l p n m l r d l r d a f s r v k t f f q

301 tgaaagatca acttgataac ttgcttttga aagaatcact tttggaagat tttaaaggtt
   >.....hIL10aPxA.....>
   m k d q l d n l l l k e s l l e d f k g

361 accttggttg tcaagctttg tcagaaatga tccaatttta ccttgaagaa gttatgccac
   >.....hIL10aPxA.....>
   y l g c q a l s e m i q f y l e e v m p

421 aagctgaaaa ccaagatcca gatatcaaag ctcacgttaa ctcatgggt gaaaacctta
   >.....hIL10aPxA.....>
   q a e n q d p d i k a h v n s l g e n l

481 aaactttgcg tcttcgtttg cgtcgttgc accgttttct tccatgtgaa aacaaatcaa
   >.....hIL10aPxA.....>
   k t l r l r l r r c h r f l p c e n k s

541 aagctgttga acaagttaaa aacgctttta acaaattgca agaaaaaggt atctacaaag
   >.....hIL10aPxA.....>
   k a v e q v k n a f n k l q e k g i y k

601 ctatgtcaga atttgatata ttatcaact acatcgaagc ttacatgact atgaaaatcc
   >.....hIL10aPxA.....>
   a m s e f d i f i n y i e a y m t m k i

661 gtaactaact agaattaatc tataagttac tgacaaaact gtcagtaact ttttttgtgg
   >.....>> hIL10aPxA
   r n -

```

图11

```

1  aataaaaatt actgacagcc tgctcagtaa tttttttagt cataattttt aggtggaaag
61  tcaaagatta ttgccaaaag tattagcttt tttaatgtta accgctttca gaagaagggg
121 agttcatttg cttttgtaga gcgctttcta aggtagttta tgtttgcaaa ttttaaaaaa
                                     PgapB >>.>
                                     k
181 agtgttaaaa taaaagagta agttaaatg ttaacttagt caatttaaaa ggtttgcctt
>.....PgapB.....>
241 ttataaaatc taatccctat aaggaggaaa ctactaatgg tagttaagt tggatttaac
>.....PgapB.....>>
                                     >>.....gapB.....>
                                     m v v k v g i n
301 ggtttcggtc gtatcggtcg tcttgctttc cgtcgtattc aaaatgttga aggtgttgaa
>.....gapB.....>
    g f g r i g r l a f r r i q n v e g v e
361 gttgttgcaa tcaacgactt gacagatcca gcaatgcttg ctcacttget taaatacgat
>.....gapB.....>
    v v a i n d l t d p a m l a h l l k y d
421 acaactcaag gtcgttttga tggtaaagtt gaagttaaag atggtggttt tgaagttaac
>.....gapB.....>
    t t q g r f d g k v e v k d g g f e v n
481 ggtaaattcg ttaaagttac tgctgaatct aaccagcta acatcaactg ggctgaagtt
>.....gapB.....>
    g k f v k v t a e s n p a n i n w a e v
541 ggtgcagaaa tcgttcttga agcaactggt ttcttcgcaa ctaaagaaaa agctgaacaa
>.....gapB.....>
    g a e i v l e a t g f f a t k e k a e q
601 cacttgcacg ctaatggtgc taagaaagtt gttatcactg cacctggtgg atcagatggt
>.....gapB.....>
    h l h a n g a k k v v i t a p g g s d v
661 aaaacaatcg ttttcaacac taaccacgaa gtacttgatg gaactgaaac agtaatttca
>.....gapB.....>
    k t i v f n t n h e v l d g t e t v i s
721 gctggttcat gtacaaccaa ctgtcttgct ccaatggctg atactttgaa caaacaattc
>.....gapB.....>
    a g s c t t n c l a p m a d t l n k q f
781 ggtatcaaag ttggtacaat gactacagtt cacggttaca ctggtgacca aatgactctt
>.....gapB.....>
    g i k v g t m t t v h g y t g d q m t l
841 gatggcccac accgtggtgg agatttccgt cgcgcacgtg ctgcagctga aaacatcgta
>.....gapB.....>
    d g p h r g g d f r r a r a a a e n i v
901 cctaactcaa caggtgctgc taaagccatc ggtcttgat tgccagaact tcaaggtaaa
>.....gapB.....>
    p n s t g a a k a i g l v l p e l q g k

```

图12A

```

961  cttcaaggac atgctcaacg tgtaccagtt ccaactgggt cattgactga acttgttact
>.....gapB.....>
   l  q  g  h  a  q  r  v  p  v  p  t  g  s  l  t  e  l  v  t

1021  atccttgata aagaagttac agttgacgaa atcaacgcag ctatgaaagc tgcttcaaatt
>.....gapB.....>
   i  l  d  k  e  v  t  v  d  e  i  n  a  a  m  k  a  a  s  n

1081  gaatcatttg gttacaacga agaccaaata gtttcatctg atatcgttgg tatctcaaac
>.....gapB.....>
   e  s  f  g  y  n  e  d  q  i  v  s  s  d  i  v  g  i  s  n

1141  tcttcactct ttgatgctac tcaaactgaa gttacttcag ctaacggagc tcaacttgtt
>.....gapB.....>
   s  s  l  f  d  a  t  q  t  e  v  t  s  a  n  g  a  q  l  v

1201  aaaactgtat cttggtacga taacgaaatg tcatacactt caaaccttgt tcgtacactt
>.....gapB.....>
   k  t  v  s  w  y  d  n  e  m  s  y  t  s  n  l  v  r  t  l

1261  gcatacttcg ctaaaatcgc taaataagga ggaaaaaatg aagaagaaaa tcattagtgc
>.....gapB.....>>
   a  y  f  a  k  i  a  k
                                   >>..IRrpmD...>>
                                   >>.....SSusp45.....>
                                   m  k  k  k  i  i  s

1321  catcttaatg tctacagtga ttctttcagc tgcagctcct ttatcaggcg tttatgcatt
>.....SSusp45.....>>
   a  i  l  m  s  t  v  i  l  s  a  a  a  p  l  s  g  v  y  a
                                   pins >>

1381  tgtgaaccaa cacctgtgcg gctcacacct ggtggaagct ctctacctag tgtgcgggga
>.....pins.....>
   f  v  n  q  h  l  c  g  s  h  l  v  e  a  l  y  l  v  c  g

1441  acgaggcttc ttctacacac ccaagacccg ccgggaggca gaggacctgc aggtggggca
>.....pins.....>
   e  r  g  f  f  y  t  p  k  t  r  r  e  a  e  d  l  q  v  g

1501  ggtggagctg ggcgggggcc ctggtgcagg cagcctgcag cccttggccc tggaggggtc
>.....pins.....>
   q  v  e  l  g  g  g  p  g  a  g  s  l  q  p  l  a  l  e  g

1561  cctgcagaag cgtggcattg tggaacaatg ctgtaccagc atctgctccc tctaccagct
>.....pins.....>
   s  l  q  k  r  g  i  v  e  q  c  c  t  s  i  c  s  l  y  q

1621  ggagaactac tgcaactaat ttccgattt taacggtata aaaaccagtc ttccgggctgg
>.....pins.....>>
   l  e  n  y  c  n  -

```

图12B

```

1  gatggctgaa gctccaactc atgaacaagt tgaccatggt gtggatacaa ttgttgaagt tgttgaagag gaaattgggtg tgaataaaag aaaagacaag
>>...../femD.....>>

101  gagaatattc ttcttgttct ttttcatact accaaactct accactgtg gtagagtgtt tttatctttt ttggcgtcta gcaaactctg taaaacgaaa
<<.....treR.....<<

201  acggtcaacc tgatgtcgtg attcagtata ctggaaaagt gtatiatcgg caagatagac atgagatttc acggaacaa catgatgggtc cttcggattt
<.....treR.....<

301  aaatcaagat atgtaaaatc atcttcacaa gcaaaatcaa tggtaacttc tttttgggca taggcaatat caagtcccaa agcccttct aaataatcgt
<.....treR.....<

401  aagtagaatt ttggggcatgt gcgggggtca aaccatcagc gtatttttct aaaaaataat cccaatccaa aatggaaaat ttaccatcta cttttcttct
<.....treR.....<

501  tctaagaata ctaagggtt ggtcgccgat ggcgaatcca gtagttcttg aaagagctgg ggtaattttt atactttcaa attttattac ttcagtttca
<.....treR.....<

601  ctgtgaaaac ccattgaagt ttgcaattct ttatatgaag ttaagccgga aatagggaaa aggagccgat cgtgagcag gacaatgctg ccatagccat
<.....treR.....<

701  gtcttctttg gatgagccct ttttcttcta aaatttttaa agcttgtctg acggttgaac ggctacttcc ataactaata gaaagtctcat tctcgtctgg
<.....treR.....<

801  aagaatatcg ttcgttttat agatatcatt aaaaatcttt ttctctaaat cttgcaaaat cacttcatat ttcttcatac ttatatattt atcataaaaa
<.....treR.....<<

901  taattgttaa cgcttgctga aaacgttttt atgaaaacgc cttaaaatgg cattttgact tgcaaaactgg gctaagattt gctaaaaatga aaaatgccta
>>.....PhIA.....>>

1001  tgtttaagggt aaaaaacaaa tggaggacat ttctaaaatg tttggaatag gaaaaagaa agaattgaga gatgataaaa gcctttatgc tccagtttct
>>.....PhIA.....>>

1101  ggggaagtta tcaaccttcc aacagtcaac gaccccgat ttccaacaaa gataatggga gacgggttcg cggttgagcc aaaagaaaat aaaatttttg
>>.....ptSI.....>>

```

图13A

```

1201 cccagtttc tgcaaaagta actttgggtc aaggacatgc aattggtttt aaacgtgctg atggcttaga tgtactttta catcttgga ttgatacagt
>.....>
>.....ptsI.....>
1301 agctcttaaa ggtcttcatt ttaaaataca ggtcaaaagt gatgatattg tcaatgggtg tgatgagctt ggaagcgttg attgggcaca gattgaagct
>.....>
>.....ptsI.....>
1401 gcagggttag ataaaacgac aatgggttacc tttaacaata caaaagataa actctctgag tccaatgtca attatggacc agctacttct ggaagtgaac
>.....>
>.....ptsI.....>
1501 ttggtaaggc aagtgttaaa taaggaggaa aaaatggcaa attattcaca acttgcgaca gaaattatcg caaatgtagg tggcgcctgag aatgtcacaa
>.....Pts I.....>
>>.IRrpmD.>>
>>.....ptsII.....>
1601 aagttattca ctgtatcact cgtcttcggt ttaccttgaa agacaaagat aaagcagata cggcggcgat tgaagcctta cctggtgtcg ctggagctgt
>.....>
>.....ptsII.....>
1701 ttataactca aacttgaatc aatatcaagt agttattgga caagctgtag aagatgttta tgacgaggtt gtgaacagc ttggagattc agttgttgat
>.....>
>.....ptsII.....>
1801 gaagatgcaa cggcgcaagc acttactgca acagcacagg ctagtggtaa aaaacaaaat ccaattgttc atgctttcca agtggttatt gggacaatta
>.....>
>.....ptsII.....>
1901 caggttcgat gatcccaatt attgggttac ttgcggctgg tgggatgatt aatggattat taagtatctt tgtaaaagga aatogtttaa ttgaagtgtat
>.....>
>.....ptsII.....>
2001 tgaccctgca agttcaactt acgtcattat ctcaactcta gcaatgacac catttttatt ttacctgtt ttagtaggat ttacgcagc aaaacaatta
>.....>
>.....ptsII.....>
2101 gcaccctaaag atactgtttt acaatttatt ggtgctgctg ttggtgggtt catgattaat ccagggatta ctaacttggg aaatgctcat gttggaacaa
>.....>
>.....ptsII.....>
2201 atgcggccgg taaaaatgtt gttgttgaag cagcagctcc agtagcaaat ttcccttgag tcacttttaa tacaagttaa ttggaattc cggttgcttt
>.....>
>.....ptsII.....>
2301 gccaaagtta gottatacaa ttttcccaat cattgtggcg gtacgaatcg ctaaaacctt gaatgcttgg ttgaaaaagg ttttaccact tgccttgcgt
>.....>
>.....ptsII.....>

```

图13B

```

2401 ccaattttcc aaccgatgat tactttcttc atcactgctt caatcatttt actcttggtc ggtcctgtta tttcaacaat ttcactcggg ttgtcattcg
>.....ptsII .....>
2501 ttattgacca tatcttgtca ttaaaacttag ggattgcaag tattatcgtc ggtggtttgt atcaatggtt ggtttgcaact ggttggttgt
>.....ptsII .....>
2601 accacttatt tcacaagagt tggcagcaac aggagcaagc tcaacttaata tgattgttag cttcacaaatg cttgcgcaag gagttggtgc cttgactgtc
>.....ptsII .....>
2701 ttctttaaat ctaaaaaagc tgaccttaaa ggactttctg ctccagctgc catttcggct ttttgtggag taaactgaacc tgccatgtac ggaattaaact
>.....ptsII .....>
2801 tgaaatatgt tcgcgtcttc atcatgtctt caattgggtc agcaattggg gctgggattg ccggatttgg tggcttaca atgtttggat ttccagggtc
>.....ptsII .....>
2901 attgattagt tttcotaact ttatctctaa tccattgacg catcatgcac ctgcgggtaa cttaatgctc ttctggattg ccactgcggg atgtgtgtgt
>.....ptsII .....>
3001 gccactttct tattagtttg gttcttttgg tacaaggata ctgatgtcat gggacaagga gttgaacaaa aaaatgcatt taaggatgct gtaaaataaa
>.....ptsII .....>
3101 tagtttttgc cttaataaag ttttgataca aggatttaca attatttttt gataaaaaaa ttactgatag aaatgaaaaa aattctgtca gtaattttgg
3201 aaagtcattc taaaaaattc attttaaat gacgagaaaag aaggtaaaaa gatgtttaaa gcagtattgt ttgattttaga tggcgtaaat
>>.....pgmB/.....>>

```

图13C

```

1  gtaattctaa tgctggtggg aatacaaat caggcactag tactggaaat actggaggaa caactactgg tggtagcgtg ataaatagtt caccaattgg
>>...../usp45.....>
101 aaatccttat gctggtggtg gatgtactga ctatgtatgg caatactttg ctgcacaagg aatttatatc agaaatatca tgcotggtaa tggtgacaa
>...../usp45.....>
201 tgggcttcta atggacctgc ccaaggcgtg ctccatgttg taggagctgc tcctgtgtgt atcgcatcaa gcttctcagc tgattttgtt ggatatgcaa
>...../usp45.....>
301 actcacctta cggtcacgta gctattgtta aatcagttaa ttcagatggt acaattacta tcaaagaagg cggatatggt acaacttggg ggggacatga
>...../usp45.....>
401 acgtactgta agtgcgtctg gtgttacttt cttgatgcca aactaaggag gaaaaaatga cagaaccgtt aaccgaaacc cctgaactat ccgcgaaata
>...../usp45.....>
>>.IRrpdM.>>
>>.....otsB.....>
501 tgcctggttt tttgatottg atggaacgct ggcggaaatc aaaccgcac cgcatacgtt cgtcgtgctt gacaatatc tgcaggact acagctactg
>.....otsB.....>
601 gcaaccgcaa gtgatggtgc attggcattg atatcagggc gctcaatggt ggagcttgac gcaactggcaa aaccttatcg ctccccgtta gcgggcgtgc
>.....otsB.....>
701 atggggcgga gcgccgtgac atcaatggtg aaacacatat cgttcactctg ccggatgcga ttgcgcgtga tattagcgtg caactgcata cagtcactgc
>.....otsB.....>
801 tcagtatccc ggcgcggagc tggaggcgaa agggatggt tttgcgtgc attatcgtca ggctccgcag catgaagacg cattaatgac attagcgcaa
>.....otsB.....>
901 cgtattactc agatctggcc acaaatggcg ttacagcagg gaaagtgtgt tgctcgagatc aaaccgagag gtaccagtaa aggtgaggca attgcagctt
>.....otsB.....>
1001 ttatgcagga agctcccttt atcggggcgaa cgcccgattt tctgggcgat gatttaaccg atgaatcttg cttcgcagtc gtttaaccgac tgggcggaat
>.....otsB.....>
1101 gtcagtaaaa attggcacag gtgcaactca ggcacatggt cgactggcgg gtgtgcccga tgtctggagc tggcttgaaa tgataaccac cgcattacaa
>.....otsB.....>

```

图14A

```

1201 caaaaaagag aaaataacag gagtgatgac tatgagtcgt ttagtcgtag tatctaataa aaagtcttaa taaataaaaa atagtgggtt gatagtgggg
>.....OtsB.....>>
1301 aataatttc ctctgtcaa atcatTTTT attattgtg tataataata aggaataatg ataaggggat agatacaaat gtgtggaatt gtccggcttta
>>.....asnH/.....>
1401 ttgaccggat cgatcaaaat gataaatcaa aaacttttaga agaaatgatg gatacaatcg ctccaccgagg tccaagtagt tcaggtgaat ttattgacga
>.....asnH/.....>
1501 aggagcagca attggtttcc gtccgctgag tattattgac cttgagggtg gagatcaacc tatctttaat gaagataaaa ctaaaacttat aacctttaat
>.....asnH/.....>
1601 ggcgaaattt ataatttccg tgaattgcgt gaagacccta tctctaaagg tcatgatttt actactcatg ctgatacaga agtgccttta catggttacg
>.....asnH/.....>>

```

图14B

```

1  caccgaatta acacgcatta tgacttaacg aggcaattac ctacgggtcta ttugacagaa cgtttaacag atctcgttta tcaacgttcc aactaataaa
>>...../transcriptional.....>>

101 gccaatctgg cttttttcta tgotctgtcg ttctaatggg ttlgatatct aaaagtaaaa aagttaaat gagataacaa atataattat caaggctgaa

201 cctgcgaagc ttaaaggaaa cttatatgac aattttggta caggagtctt caaaagtggc acagaaccaa agtgatggaa aaataagaaa ctgcttttctt

301 tactttgcct attaatgcta taatgaaaat gtagaaaaga tggacgtgaa accagttcat caaaaaaagt aaaggagact gtccaacctt gaacaatttt
>>..ptcC/...>
m n n f

401 attcaaaaaa aaatcatgcc tccaatgatg aaatttttga ataccctgtc agtcacggca atcaaaaatg gtatgtgaat toctatccca ttatcatta
>.....ptcC/.....>
tga30
          EcoRI
          i q n k i m p p m k f l n t r a v t a i k n g m - i p i p f i i
501 ttgggttcagt attcttgatt cttgggtcaac tgccattcca agcaggacaa gacttcata acaaaatcaa attgggcccc ctctttttac aaattaataa
>.....ptcC/.....>
i g s v f l i l g q l p f q a g q d f m n k i k l g p l f l q i n
601 tgccttcattt ggtattatgg ctttgcttgc cgtgttcggt attgcttaacg cttgggttcg agatgcaggt tatgaaggag taccgctgg tttaacaggt
>.....ptcC/.....>
n a s f g i m a l l a v f g i a y a w v r d a g y e g v p a g l t g
701 gtcattgttc acatcttgtt gcaaccagac acaatccatc aagtaacaag tgttactgac ccaactaaaa catcaacagc atttcaagta ggtgggtgtca
>.....ptcC/.....>
v i v h i l l q p d t i h q v t s v t d p t k t s t a f q v g g v
801 ttgaccgagc ttggttaggt gggaaaggga tggttctctc aatcatcggt ggactcttag taggttggat ttacactggc ttatgcgctc ggaacatcac
>.....ptcC/.....>
i d r a w l g g k g m v l s i i v g l l v g w i y t g f m r r n i
901 aatcaaaaatg ccagaaacaag ttccagaaaa cgttgccgca tcatttacct cacttgtacc tgcaggagca atcattacaa tggctggtgt ggttcattgga
>.....ptcC/.....>
t i k m p e q v p e n v a a s f t s l v p a g a i i t m a g v v h g

```

图15A

```
1001 atcacaacga ttggcttcaa cacaacttt  
>.....ptcC/.....>>  
i t t i g f n t t
```

图15B

```

1   tcagctaacg gagctcaact tggtaaaact gtatcttggt acgataacga aatgtcatac acttcaaac ttgttcgtac acttgcatatc ttcgctaaaa
>...../gapB.....>
101  tcgctaaata aggaggaaaa aatgaagaag aaaatcatta gtgccatctt aatgtctaca gtgattcttt cagctgcagc tcctttatca ggcgtttatg
>..//gapB..>>
    >>.IRpmd.>>
    >>.....SSusp45.....>
201  catttgtgaa ccaacacctg tgcgggctc acctgggtgga agctctctac ctagtgtgcg gggaaacgagg ctctctctac acaccaaga cccgccggga
>> SSusp45
    >>.....pins.....>
301  ggcagaggac ctgcaggtgg ggcaggtgga gctgggcggg ggccctggtg caggcagcct gcagcccttg gccctggagg ggtccctgca gaagcgtggc
>.....pins.....>
401  attgtggaac aatgctgtac cagcatctgc tcctctacc agctggagaa ctactgcaac taattttccg attttaacgg tataaaaaac agtcttcggg
>.....pins.....>>

```

图16

```

1  aatccaatga cggcaattct tccttggacg acaccagcac ctgtgagaat ggccaatttca ggtggacttc catttttgat tatttttgca atctgtttag
>>.....'PTS'.....>
101 tcttgaatgt tcttatttac taccattctt ttaagggtgc gtataataaa gctttagaag aagaaaaagc agctgttgaa ttagagggtt cagaaactgc
>.....'PTS'.....>
201 ctgatggaaa acgccttaaa atggcatttt gacttgcaaa ctgggctaag atttgctaaa atgaaaaatg cctatgttta agttaaaaaa caaatggagg
>>> ./PTS
>>.....PhlA.....>
301 acatttctaa aatgaaaaaa aagatttatct cagetatttt aatgtctaca gtgatacttt ctgtgcagc cccgttgtca ggtgtttacg cctcagctgg
>..PhlA..>>
>>.....SSusp45.....>
hIL10 >>.....>
s a
401 tcaaggtact caatcagaaa actcatgtac tcaactttcca ggtaacttgc caaacatgct tcgtgatttg cgtgatgctt ttacacgtgt taaaactttt
>.....hIL10.....>
501 ttccaatga aagatcaact tgataacttg cttttgaaag aatcactttt ggaagatttt aaaggttacc ttggttgtca agctttgtca gaaatgatcc
>.....hIL10.....>
601 aattttacct tgaagaagtt atgccacaag ctgaaaaacca agatccagat atcaaagctc acgttaactc attgggtgaa aaacttaaaa ctttgcgtct
>.....hIL10.....>
701 tcgtttgcgt cgttgtcacc gttttcttcc atgtgaaaac aaatcaaaaag ctgttgaaca agttaaaaac gcttttaaca aattgcaaga aaaaggtatc
>.....hIL10.....>
801 tacaaagcta tgtcagaatt tgatatcttt atcaactaca tcgaagctta catgactatg aaaatccgta actaactaga attaacttat aagttactga
>.....hIL10.....>>
901 caaaactgct agtaactttt ttgtgtggaa aaatgtattt ttatgaccgt aaagaatctg tcagtagaag tctgaaaatc gtttaaaaat cgactagaat

```

图17

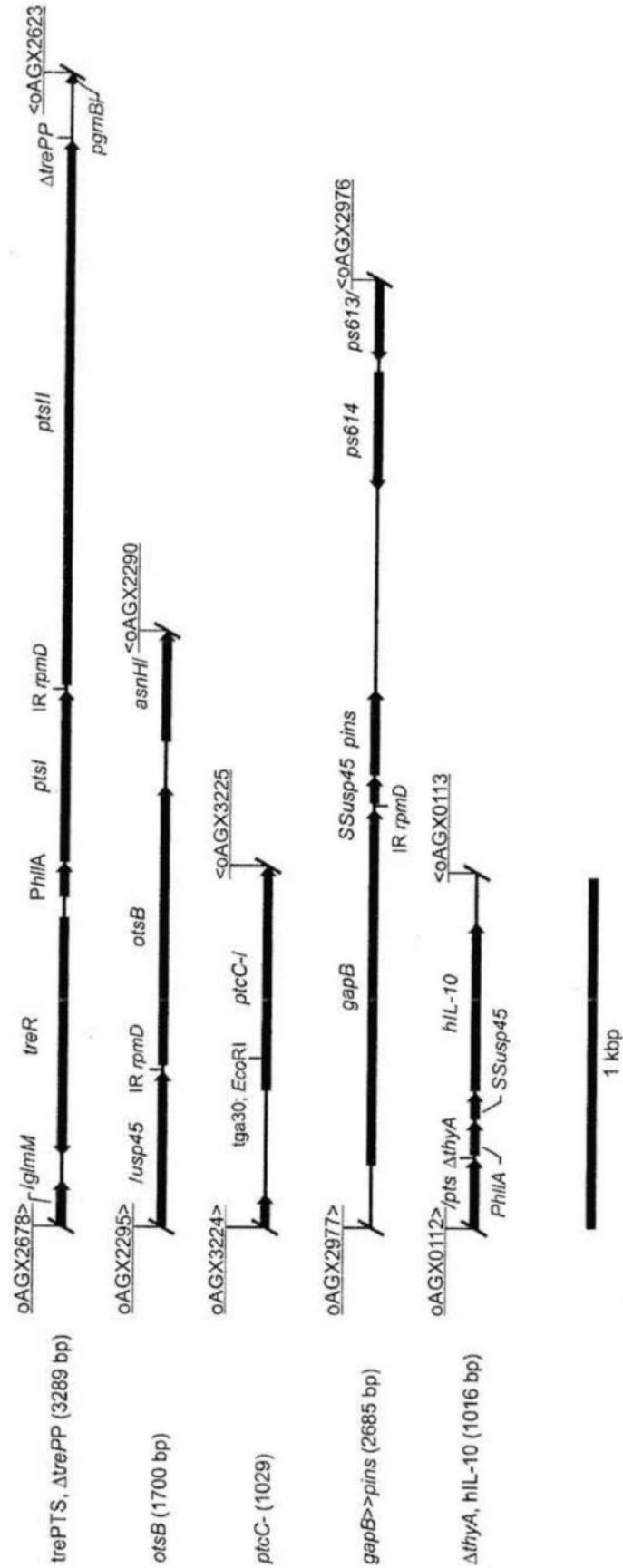


图18