

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-510766  
(P2016-510766A)

(43) 公表日 平成28年4月11日(2016.4.11)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)	
<b>A61K 45/06</b> (2006.01)	A 61 K 45/06	Z N A	4 C 076
<b>A61P 3/10</b> (2006.01)	A 61 P 3/10		4 C 084
<b>A61K 35/545</b> (2015.01)	A 61 K 35/545		4 C 085
<b>A61P 43/00</b> (2006.01)	A 61 P 43/00	1 2 1	4 C 087
<b>A61K 35/15</b> (2015.01)	A 61 K 35/15	Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-561751 (P2015-561751)	(71) 出願人	515245642 ザ キュレイターズ オブ ザ ユニバ シティ オブ ミズーリ アメリカ合衆国 ミズーリ州 65211 コロンビア ユニバーシティ ホール 316
(86) (22) 出願日	平成26年3月10日 (2014.3.10)	(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月6日 (2015.11.6)	(72) 発明者	ハビブ ザグホウアニ アメリカ合衆国 ミズーリ州 65203 コロンビア ブルックフィールド マノ ル 1608
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/022321	F ターム (参考)	4C076 AA95 CC21 EE41 FF31 4C084 AA20 NA13 ZC351 ZC352 ZC751 ZC752
(87) 國際公開番号	W02014/138725		
(87) 國際公開日	平成26年9月12日 (2014.9.12)		
(31) 優先権主張番号	61/775,115		
(32) 優先日	平成25年3月8日 (2013.3.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1型糖尿病の処置及び／又は予防のための方法及び組成物

## (57) 【要約】

本開示は一般に、ある量の幹細胞及び／又は前駆細胞と、少なくとも1種の抗原特異性治療薬と、を含む組成物を、対象に投与することにより糖尿病を処置又は予防する方法及び組成物に関する。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

対象における糖尿病を処置又は予防する方法であって、ある量の1種以上の幹細胞及び／又は前駆細胞と、ある量の少なくとも1種の抗原特異性治療薬と、を含む組成物を、前記対象に投与することを含む、方法。

**【請求項 2】**

前記糖尿病が、1型糖尿病である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記対象が、哺乳動物である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項3に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記幹細胞及び／又は前駆細胞が、全能性、多能性、複能性又は単能性である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記幹細胞及び／又は前駆細胞が、骨髄から単離される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記幹細胞及び／又は前駆細胞が、精製された骨髄内皮前駆細胞である、請求項6に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記幹細胞及び／又は前駆細胞が、同種異系細胞である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記幹細胞及び／又は前駆細胞が、自家細胞である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記少なくとも1種の抗原特異性治療薬が、免疫グロブリン・ポリペプチドキメラである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記免疫グロブリン・ポリペプチドキメラが、可溶性である、請求項10に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記免疫グロブリン・ポリペプチドキメラが、凝集されている、請求項10に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記免疫グロブリン・ポリペプチドキメラが、CDR3領域を有する免疫グロブリンを含み、催糖尿病性エピトープが、前記CDR3領域内に挿入されている、請求項10に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記催糖尿病性エピトープが、GAD2 (SEQ ID NO: 1)、GAD1 (SEQ ID NO: 2)又はINS (SEQ ID NO: 3)を含む、請求項13に記載の方法。

**【請求項 15】**

ある量の1種以上の幹細胞及び／又は前駆細胞と、ある量の少なくとも1種の抗原特異性治療薬と、を含む組成物。

**【請求項 16】**

前記幹細胞及び／又は前駆細胞が、全能性、多能性、複能性又は単能性である、請求項15に記載の組成物。

**【請求項 17】**

前記幹細胞及び／又は前駆細胞が、骨髄から単離される、請求項15に記載の組成物。

**【請求項 18】**

前記幹細胞及び／又は前駆細胞が、精製された骨髄内皮前駆細胞である、請求項15に

10

20

30

40

50

記載の組成物。

【請求項 19】

前記幹細胞及び／又は前駆細胞が、同種異系細胞である、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記幹細胞及び／又は前駆細胞が、自家細胞である、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記少なくとも 1 種の抗原特異性治療薬が、免疫グロブリン - ポリペプチドキメラである、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記免疫グロブリン - ポリペプチドキメラが、可溶性である、請求項 21 に記載の組成物。 10

【請求項 23】

前記免疫グロブリン - ポリペプチドキメラが、凝集されている、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 24】

前記免疫グロブリン - ポリペプチドキメラが、CDR3 領域を有する免疫グロブリンを含み、催糖尿病性エピトープが、前記 CDR3 領域内に挿入されている、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 25】

前記催糖尿病性エピトープが、GAD2 (SEQ ID NO: 1)、GAD1 (SEQ ID NO: 2) 又は INS (SEQ ID NO: 3) を含む、請求項 24 に記載の組成物。 20

【請求項 26】

対象における糖尿病を処置又は予防する方法であって、ある量の精製された骨髓内皮前駆細胞と、免疫グロブリン Ig - GAD2 と、を含む組成物を、前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 27】

対象における糖尿病を処置又は予防する方法であって、ある量の 1 種以上の幹細胞及び／又は前駆細胞を含む組成物を、前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項 28】

前記前駆細胞が、ある量の精製された骨髓内皮前駆細胞を含む、請求項 27 に記載の方法。 30

【請求項 29】

前記幹細胞及び／又は前駆細胞が、前記対象の臍臓に直接送達される、請求項 27 又は 28 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権の主張

本出願は、2013年3月8日出願の米国特許仮出願第 61/775,115 号への優先権を主張するものであり、該仮出願の内容全体は参照により本明細書に取り込まれ、依存される。 40

【0002】

米国政府後援による研究の表明

本特許は、米国国立衛生研究所を通した資金援助により米国政府のグラント番号 R56-AI-095235 として支援された。米国政府は、本発明において特定の権利を有する。

【0003】

分野

本発明は、一般に、1型糖尿病（「T1D」）を処置又は予防するための方法及び組成

50

物に関する。

【背景技術】

【0004】

1型糖尿病（T1D）は、かつては若年型糖尿病として知られており、膵細胞を特異的に標的化する自己免疫を介した疾患である（Castano et al., Ann. Rev. Immunol. 8:647-680 (1990)）。疾患の病原は、膵島へのT細胞浸潤を含み、それに続いてインスリンを産生する細胞が破壊される（Bach, Endroc. Rev. 15:516-542 (1994)）。インスリンがなければ、血糖（グルコース）を貯蔵して、後にエネルギーに利用することができない（Bach, Endroc. Rev. 15:516-542 (1994)）。T1Dの早期症状には、多尿、極度の疲労感及び過敏性がある（Van Belle et al., Physiol. Rev. 91:79-118 (2011)）。血流の高レベルのグルコースに長時間暴露されると、体全体の臓器系に重篤な損傷が誘発される可能性がある（Bach, Endroc. Rev. 15:516-542 (1994)）。T1Dの厳密な原因は知られていないが、自己免疫、遺伝的要因、及び環境要因が疑われている（Tisch et al., Cell. 85:291-297 (1996)）。世界全体でほぼ3000,000人、アメリカ人の1000,000人がT1Dに罹患しており、報告された増加は年間で3～5%の範囲内の増加率である（Melmed et al., Williams Textbook of Endocrinology: 12th Edition (2011)）。高い疾患発症率にもかかわらず、糖尿病は治癒されることはない。T1Dに見舞われた人々は、食事の改善、血糖値の一定した観察、及びインスリン注射又はポンプによる持続インスリン輸液のいずれかに頼らなければならない（Freeborn et al., J. Clin. Nurs. doi: 10.1111/jocn.12046 (2013)）。血中グルコースレベルの管理を誤ると、それが短時間であっても、腎不全、視野変化、心不全、卒中、又は死亡など重篤な結果に陥る可能性がある（Simone et al., Diabetes Care. 22 (Suppl. 2):B7-B15 (1999); Livingstone et al., PLoS Med. 9(10):e1001321 (2012); Secrest et al., Diabetes Care. 33:2573-2579 (2010)）。

10

20

30

30

40

【0005】

T1Dは、多くの自己免疫疾患と同様に、複数の自己抗原及び多様なT細胞特異性に関与する可能性がある（Bach, Endroc. Rev. 15:516-542 (1994); Tisch et al., Cell. 85:291-297 (1996)）。自己ペプチド及び改変された自己ペプチドを発現するように遺伝子修飾された免疫グロブリン（「Ig」）（Ig-キメラ）を用いて、病的免疫応答を抑制することができる（Miller et al., Nat. Rev. Immunol. 7:665-677 (2007)）。これらのIg-キメラは、Ig-キメラの内在化、エンドソームコンパートメント内でのプロセシング、及び新たに合成されたMHC分子へのペプチドの非限定的アクセスにより、T細胞への提示を遊離ペプチドの100倍増加させることができた（Zaghouti et al., Science. 259:224-227 (1993); Legge et al., J. Exp. Med. 185:1043-1053 (1997); Brumeau et al., J. Exp. Med. 178:1795-1799 (1993)）。Igは、自己分子であるため、反復注射が必要な場合であっても副作用が微細であり、このため連続治療の一助となる。Ig-キメラは、体内免疫系による外来抗原の浄化能力を維持しながら、自己反応性免疫細胞の有害作用を特異的に遮断することができる（Miller et al., Nat. Rev. Immunol. 7:665-677 (2007)）。それゆえ、催糖尿病性ペプチドを発現するIg-キメラは、T1Dの処置又は予防のための魅力的な抗原特異性治療アプローチである。

30

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本開示は、必要とする対象において1型糖尿病（「T1D」）を処置又は予防するための方法及び組成物を提供する。一態様において、本開示は、催糖尿病性T細胞のダウンリギュレーション（免疫調整）のための抗原特異性治療薬の送達方法、及びT1Dを処置又は予防するための膵島における内皮細胞の再生のための幹細胞及び/又は前駆細胞の同時投与の方法を提供する。

【0007】

本開示は、必要とする対象における糖尿病を処置又は予防する方法であって、ある量の

50

1種以上の幹細胞及び／又は前駆細胞と、ある量の少なくとも1種の抗原特異性治療薬と、を含む治療有効量の組成物を、該対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0008】

本開示は、ある量の1種以上の幹細胞及び／又は前駆細胞と、ある量の少なくとも1種の抗原特異性治療薬と、を含む治療有効量の組成物も提供する。

【0009】

本開示は、細胞及び内皮細胞形成を持続して糖尿病を改善するために、ある量の1種以上の幹細胞及び／又は前駆細胞と、ある量の少なくとも1種の抗原特異性治療薬と、を含む治療有効量の組成物も提供する。

【0010】

本開示は、必要とする対象における糖尿病を処置又は予防する方法であって、ある量の精製された骨髓内皮前駆細胞と、免疫グロブリンIg-GAD2と、を含む治療有効量の組成物を、該対象に投与することを含む、方法も提供する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

先に記載された方法又は組成物のいずれかの実施形態において、糖尿病は、1型糖尿病である。

【0012】

先に記載された方法又は組成物のいずれかの実施形態において、対象は、例えばヒトなどの哺乳動物である。

【0013】

先に記載された方法又は組成物のいずれかの実施形態において、幹細胞及び／又は前駆細胞は、全能性、多能性、複能性又は単能性である。

【0014】

先に記載された方法又は組成物のいずれかの実施形態において、幹細胞及び／又は前駆細胞は、骨髓から単離される。

【0015】

先に記載された方法又は組成物のいずれかの実施形態において、幹細胞及び／又は前駆細胞は、精製された骨髓内皮前駆細胞である。

【0016】

先に記載された方法又は組成物のいずれかの実施形態において、幹細胞及び／又は前駆細胞は、同種異系細胞である。

【0017】

先に記載された方法又は組成物のいずれかの実施形態において、幹細胞及び／又は前駆細胞は、自家細胞である。

【0018】

先に記載された方法又は組成物のいずれかの実施形態において、少なくとも1種の抗原特異性治療薬は、免疫グロブリン-ポリペプチドキメラである。

【0019】

先に記載された方法又は組成物のいずれかの実施形態において、免疫グロブリン-ポリペプチドキメラは、可溶性である。

【0020】

先に記載された方法又は組成物のいずれかの実施形態において、免疫グロブリン-ポリペプチドキメラは、凝集されている。

【0021】

先に記載された方法又は組成物のいずれかの実施形態において、免疫グロブリン-ポリペプチドキメラは、CDR3領域を有する免疫グロブリンを含み、催糖尿病性エピトープが、CDR3領域内に挿入されている。

【0022】

先に記載された方法又は組成物のいずれかの実施形態において、催糖尿病性エピトープ

10

20

30

40

50

は、GADに由来し、例えばGAD2 (SEQ ID NO: 1) 又はGAD1 (SEQ ID NO: 2) を含む。

【0023】

先に記載された方法又は組成物のいずれかの実施形態において、催糖尿病性エピトープは、INSに由来し、例えばINS (SEQ ID NO: 3) を含む。

【0024】

本開示の前述の概要、及び以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むことで、よりよく理解されよう。本開示を例示する目的で、目下好ましい実施形態を図に示している。しかし、本開示が示された正確な配列、実施例及び手段に限定されないことが、理解されなければならない。

10

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1A～Dは、Ig-GAD2処置単独では免疫寛容の導入にもかかわらず顕性T1Dを克服できなかったことを示している。図1Aは、Ig-GAD2で処置された顕性糖尿病のマウスにおいて正常血糖を復帰しなかったことを示している。下の図は、Ig-GAD2が正常血糖を復帰し得なかったにもかかわらず、Ig-GAD2処置された糖尿病マウスにおいて、処置により脾臓のTh17細胞の絶滅及びTh1細胞の保持、並びにIFN及び/又はIL-10の増加に示される通り、免疫寛容の誘導がもたらされたことを示している(図1B～D)。

20

【0026】

【図2】図2A～Eは、Ig-GAD2及び骨髄(BM)移植で処置された顕性糖尿病マウスにおける正常血糖の復帰を示している。図2Aは、処置レジメンの略図を示している。図2Bは、BM又はIg-GAD2を単独で受けたマウスに比較した、Ig-GAD2+BMの併用処置を受けた後に正常血糖を持続しているマウスの割合の増加を示している。図2Cは、Ig-GAD2+BMを受けたマウスの脾臓及び臍臓細胞におけるサイトカイン産生の増加を示している。図2Dは、脾臓及び臍臓の両方のIL-17産生細胞の減少を示している。図2Eは、Th1及びTh17細胞のシグネチャー転写因子の減少を示している。

20

【0027】

【図3】図3A～Gは、Ig-GAD2+BMレシピエントマウスにおける臍臓細胞の再生を示している。図3A～Dは、Ig-GAD2+BM処置のマウスレシピエントが、Ig-GAD2又はBM処置単独に比較して正常血糖が持続的に復帰したことを示している。Ig-GAD2+BM処置のレシピエントマウスは、臍島炎をほとんど含まない臍島をより多く有し、浸潤が極わずかであり、インスリン陽性細胞が豊富で細胞はより多く存在する(図3B～C)。さらにIg-GAD2+BMでの処置は、インスリン産生細胞及び細胞塊の数を復帰させた(図3E～G)。

30

【0028】

【図4】図4A～Dは、健常から高血糖へ、そして糖尿病へ進行する間の末梢血及び臍臓の両方のPECAM1発現内皮細胞の減少を示している。

40

【0029】

【図5】図5A～Cは、細胞の再生と並行した内皮細胞の復帰を示している。図5Aは、Ig-GAD2又はBMを単独で受けたマウスに比較した、Ig-GAD2+BMで処置されたマウスからの臍島切片のPECAM1及びインスリン染色の増加を示している。図5Bは、非処置糖尿病マウスに比較した、Ig-GAD2+BMを受けたマウスの内皮細胞に関する機能的マーカーの増加を示している。Ig-GAD2+BM処置マウスの臍島切片は、インスリン<sup>+</sup>ki-67<sup>+</sup>臍臓細胞数の増加を示している(図5C)。

【0030】

【図6】図6A～Bは、新たな臍臓内皮細胞がドナー骨髄に由来することを示している。

【0031】

【図7】図7A～Dは、Ig-GAD2での処置の間の内皮細胞前駆体移植が細胞再生

50

を持続させ、正常血糖を復帰させることを示している。図 7 A ~ B は、内皮前駆細胞 (EPC) マーカ c - kit 及び FLK - 1 を発現する BM 細胞が、週齢の適合する健常マウスに比較して糖尿病マウスで有意に減少したことを示している。健常ドナーから EPC を受けた糖尿病マウスは、全 BM レシピエントマウスに比較して高い回復率を示した (図 7 C)。糖尿病 NOD - GFP マウスから単離された EPC は、疾患回復率及び胰島への GFP 細胞生着率も非常に低かった (図 7 C ~ D)。

## 【0032】

【図 8】図 8 は、 Ig - GAD2 + BM による糖尿病マウスの処置が、糖尿病の発病に伴うインスリン抵抗性の排除をもたらすことを示している。

## 【0033】

【図 9】図 9 は、 Ig - GAD2 + BM 処置の間の 30 、 60 又は 120 日目にドナー BM 由来細胞及びインスリン産生細胞の共局在がないことを示している (左図)。ドナー BM 由来細胞は、糖尿病のないマウスでは多数存在したが、糖尿病が残る同じレジメンのレシピエントでは極わずかであった (右図)。

## 【0034】

【図 10】図 10 は、 Ig - GAD2 + BM で処置された糖尿病のないマウスの胰臓における、 VEGFa 、アンギオポエチン 1 及びアンギオポエチン 2 をはじめとする血管形成因子をコードする遺伝子のアップレギュレーションを示している (図 10 A)。図 10 B は、新たに形成されたインスリン産生 細胞もまた VEGFa を産生したことを示している。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0035】

1 型糖尿病 (T1D) をはじめとする糖尿病を処置する際に使用される効果的治療は、依然として重要な医療ニーズである。近年になり、抗原特異性治療薬 (例えば、 Ig - GAD ) が、高血糖の対象において免疫調整を誘導し、胰臓炎症をコントロールして 細胞の再生を刺激し、 T1D 進行を予防し得ることが見出された。しかし、同じ抗原特異性治療薬を顕性 T1D の対象に与えた場合、高血糖対象の処置で認められたものと類似の免疫調整があるにもかかわらず、疾患経過を改善することができなかった。意外にも、本発明者は、骨髄 (BM) 細胞 (例えば、前駆細胞) 移植を伴った場合に、抗原特異性治療薬が顕性 T1D からの持続的回復を可能にすることを発見した。そのため本開示は、 T1D を処置又は予防するための組成物及び方法を提供する。そのような方法は、 T1D の対象を選択すること、並びにある量 (例えば、有効量) の 1 種以上の幹細胞及び / 又は前駆細胞と、ある量 (例えば、有効量) の少なくとも 1 種の抗原特異性治療薬と、を含む有効量の組成物を、該対象に投与すること、を含み得る。開示された組成物及び方法を用いて、 T1D の処置及び / 又は予防に用いられる他の医学的アプローチと置き換えるても、又はそれを補ってもよい。

## 【0036】

本開示は、必要とする対象における糖尿病を処置又は予防する方法であって、ある量の 1 種以上の幹細胞及び / 又は前駆細胞と、ある量の少なくとも 1 種の抗原特異性治療薬と、を含む治療有効量の組成物を、該対象に投与することを含む、方法を提供する。

## 【0037】

本開示は、ある量の 1 種以上の幹細胞及び / 又は前駆細胞と、ある量の少なくとも 1 種の抗原特異性治療薬と、を含む治療有効量の組成物も提供する。

## 【0038】

本開示は、 細胞及び内皮細胞形成を持続して糖尿病を改善するために、ある量の 1 種以上の幹細胞及び / 又は前駆細胞と、ある量の少なくとも 1 種の抗原特異性治療薬と、を含む治療有効量の組成物も提供する。

## 【0039】

本開示の一実施形態において、糖尿病は、 1 型糖尿病である。 1 型糖尿病 (T1D) は、胰臓ランゲルハンス島のインスリン産生 細胞 ( 細胞 ) への自己免疫攻撃及び該細胞

10

20

30

40

50

の損失を特徴とする。該疾患は、当該分野で概して臍島炎前症 (pre-insulitis)、臍島炎、高血糖、及び顕性糖尿病と称される複数の段階を通して進行する。疾患段階の診断は、血中グルコースレベル、臍細胞へのリンパ球浸潤の程度、及び臍細胞塊により決定され得る。本明細書で用いられる用語「臍島炎」は、罹患した臍島が細胞塊のほとんどを損失する（約 80 % を損失する）ような臍浸潤の発生を指す。本明細書で用いられる用語「臍島炎前症」は、細胞塊のより低い程度の損失（約 0 % ~ 40 % の損失）をきたすような臍浸潤のより早期段階を指す。本明細書で用いられる用語「高血糖」は、正常な空腹時血糖値を超えるレベル、通常、約 126 mg / dL を超えるレベルの発生を指す。本明細書で用いられる用語「顕性糖尿病」は、通常は約 300 mg / dL 以上の血漿グルコースレベル、臍浸潤、及び細胞塊の大きな減少に基づく、対象の最も悪化した糖尿病の診断を指す。

10

## 【0040】

一実施形態において、該組成物は、T1D の臍島炎前症の段階にある対象に投与される。さらに別の実施形態において、該組成物は、対象が IAA セロトコンバージョンを受ける前に、対象に投与される。さらに別の実施形態において、該組成物は、対象がセロトコンバートされて 1 種以上の細胞関連抗原への自己抗体を產生する前に、対象に投与される。さらに別の実施形態において、該組成物は、IAA 陽性の対象に投与される。別の実施形態において、該組成物は、T1D の臍島炎段階の対象に投与される。さらに別の実施形態において、該組成物は、対象が高血糖を発症する前に対象に投与される。本発明の別の実施形態において、該対象は、処置が開始された時には、高血糖を発症している。さらに別の実施形態において、該対象は、顕性糖尿病と診断されている。

20

## 【0041】

先に記載された方法又は組成物のいずれかの実施形態において、該対象は、例えばヒトをはじめとする哺乳動物である。

## 【0042】

本明細書に記載された方法に関して本明細書で用いられる用語「処置」、「処置する」及び「処置すること」は、T1D の臨床症状、症状発現又は進行（例えば、事象、疾患又は病状の診断された症状、症状発現又は進行）を、一時的又は永続的のいずれか、そして部分的又は完全のいずれかの程度に排除、低減、抑制又は寛解することを指す。追加又は代わりとして、記載された方法に関して本明細書で用いられる用語「処置」、「処置する」及び「処置すること」は、T1D の臨床症状又は症状発現を一時的又は永続的のいずれか、そして部分的又は完全のいずれかで阻害、遅延、抑制、低減、処置、排除又は寛解することを指す。幾つかの実施形態において、処置することは、処置前に行なわれた症状、兆候及び／又は病状のベースライン測定への比較を含み、対象における T1D の症状、兆候及び／又は病状を少なくとも約 10 % ( 例えば、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、又は 100 % ) 低減するのに効果的である。幾つかの実施形態において、処置することは、処置前に行なわれたベースライン評価への比較を含み、対象における T1D を診断するのに用いられる評価を改善するのに効果的である。本明細書で提供されたような処置することは、有用であることが絶対である必要はない。

30

## 【0043】

本明細書で用いられる用語「予防」、「予防する」、又は「予防すること」は、得られた測定の非存在下で起こった場合に比較して、本明細書に記載された T1D の発症又は発病を排除又は低減することを指す。

40

## 【0044】

本明細書で用いられる用語「処置を必要とする」は、介助者によりなされる、患者が処置を必要としているか、又は処置により利益を受けるという判断を指す。この判断は、様々な因子に基づいてなされ、その因子は、介助者の専門技術の範囲内であるが、患者が T1D の臨床症状又は症状発現を示すという認識を含む。

## 【0045】

50

本明細書で用いられる用語「有効量」は、対象に投与されると（例えば、1種以上の用量として）、疾患の状況又は状態の任意の症状、態様、パラメータ又は特徴に任意の検出可能な正の影響を有することが可能な単独の、又は医学組成物の一部としての組成物（例えば、ある量の1種以上の幹細胞及び／又は前駆細胞と、ある量の少なくとも1種の抗原特異性治療薬と、を含む組成物）の量を指す。そのような効果は、有益であることが絶対である必要はない。

【0046】

幹細胞 & 前駆細胞及び抗原特異性治療薬

任意の幹細胞及び／又は前駆細胞、並びに抗原特異性治療薬が、本開示により企図される。

10

【0047】

幹細胞及び／又は前駆細胞は、身体の数多くの組織から単離することができる。本明細書で用いられる用語「幹細胞」は、自己再生が可能な未分化細胞を指し、各細胞分化により少なくとも1つの娘細胞も幹細胞になることを意味する。幹細胞は、より成熟した細胞型（例えば、外胚葉、中胚葉、及び／又は内胚葉細胞系譜）に分化することも可能である。本明細書で用いられる用語「前駆細胞」は、自己再生及び分化が可能であるが、典型的には幹細胞に比較してより限定された発生能力を有する、幹細胞由来の未分化細胞を指す。

【0048】

一実施形態において、幹細胞及び／又は前駆細胞は、全能性、多能性、複能性又は単能性である。本明細書で用いられる用語「全能性」は、身体の任意の細胞型及び全ての胚体外細胞型を生成するための非限定的能力を有することを意味する。本明細書で用いられる用語「多能性」は、身体の任意の細胞を生成するための非限定的能力を有することを意味する。本明細書で用いられる用語「複能性」は、身体の全てではなく1種を超える細胞型を生成するための非限定的能力を有することを意味する。本明細書で用いられる用語「単能性」1種のみの細胞型を生成する能力を有することを意味する。

20

【0049】

本明細書において細胞に関連して用いられる用語「単離された」は、細胞が自然に生じた（例えば、細胞が生物体内で自然に発生した）環境とは異なる環境にある、自然環境から取り出された細胞を指す。幹細胞は、胚組織、胎児組織、出生後組織、若年組織、又は成体組織から単離することができる。幹細胞は、当業者に公知の任意の手段及び方法（例えば、ウイルス-、RNA-、タンパク質、mRNA-、化学-を介した再プログラミング方法）を通して、体細胞から単離して、幹細胞に似た状態に導入することもできる。前駆細胞は、典型的には出生後動物において見出され、細胞修復又は交換を必要とする組織及び臓器に存在する（例えば、筋肉内に見出される衛星細胞、脳の複数の領域に見出される神経前駆体、骨髄中に見出される内皮前駆細胞）。

30

【0050】

一実施形態において、幹細胞及び／又は前駆細胞は、骨髄（BM）から単離される。BM試料は、典型的には対象の腸骨稜、大腿骨、脛骨、脊柱、肋骨、又は他の骨髄腔から得てもよい。骨髄細胞は、当該技術分野で公知の方法を利用して容易に単離することができる。例えば骨髄細胞は、骨髄穿刺により単離することができる。米国特許第4,481,946号には、意図する採取部位に一対の穿刺針を挿入することによりドナーからの十分な骨髄採取が実現され得る、骨髄穿刺法及び装置が記載されている。一対のシリンジとの連結を通して圧力を調節し、穿刺針の一方から骨髄及び類洞内血を選択的に取出し、他方の穿刺針で静脈内溶液を正に押出して、該部位から取り出された骨髄と交換することができる。骨髄及び類洞内血を、別の静脈内溶液と混合するためにチャンバーに吸引し、その後、回収袋に押出すことができる。

40

【0051】

米国特許第4,486,188号には、一連のラインがチャンバー区分から静脈内溶液の供給源、穿刺針、静脈内溶液の第二の供給源及び適切な分離又は回収源に流れる、骨髄

50

穿刺方法及び装置が記載されている。チャンバー区分は、ラインをプライミングしてラインから任意の空気を一掃するために、静脈内溶液源から誘導される溶液ラインに陰圧を同時に加えることができる。その後、溶液ラインは閉鎖し、陽圧が加えられるとドナーに静脈内溶液が再導入され、陽圧が加えられて静脈内溶液と骨髄材料との混合物を分離又は回収源に移動させた後、陰圧が加えられて骨髄材料が静脈内溶液との混合のためにチャンバーに引き込まれる。

【0052】

別の実施形態において、幹細胞及び／又は前駆細胞は、末梢血から単離される。末梢血を採取する方法は、当該技術分野で公知であり、任意の公知方法を利用して末梢血を採取することができる。

10

【0053】

一実施形態において、幹細胞及び／又は前駆細胞は、精製された骨髄内皮前駆細胞である。内皮前駆細胞（EPC）は、系譜細胞ディプリーションキットを用いて系譜<sup>+</sup>（Lin<sup>+</sup>）細胞の全骨髄（BM）又は末梢血をディプリーションすることにより精製される。その後、Lin<sup>+</sup>細胞を抗c-Ki t、抗F L K - 1又は当業者に知られるEPCの他の任意マーカ、例えばCD34で染色する。細胞は、生存細胞と死亡細胞を識別するために、7-アミノアクチノマイシンD（7-AAD）でも標識される。c-Ki t<sup>+</sup>7-AAD<sup>+</sup>F lk - 1<sup>+</sup>集団は、精製された生存EPCを表す。細胞の選別は、細胞の選別のために当該技術分野で公知の任意方法により実施することができる。好ましい選別手順は、蛍光活性化細胞選別（FACS）による。内皮前駆体の磁気ビーズ細胞選別（MACS）が、好ましい。従来のMACS手順は、Miltenyi et al., Cytometry. 11:231-238 (1990)に記載されている。特に好ましい選別手順は、ラベルフリー選別法による。EPCは、当業者に周知の技術を利用して単離及び精製することができる。

20

【0054】

本明細書で提供された幹細胞及び／又は前駆細胞は、当該技術分野で公知の細胞培養プロトコルを用いて個体に投与される前に一定期間、インビトロで増殖されてもよい。EPCをインビトロで生育及び増殖させるために用いられる方法は、例えばEggermann et al., Cardiovascular Research. 58:478-486 (2003)に記載されるものであってもよい。幾つかの方法において、細胞を、当該技術分野で公知の分化プロトコルを利用して内皮細胞系譜の細胞にインビトロで分化させてもよい。幹細胞を内皮細胞に増殖及び分化するために用いられる方法は、例えばLi et al., Stem Cells and Development. 20:1701-1710 (2011)に記載されるものであってもよい。

30

【0055】

一実施形態において、幹細胞及び／又は前駆細胞は、同種異系細胞である。本明細書で用いられる用語「同種異系」は、細胞を受け取る対象と同じ種の、遺伝子的に非同一のドナーから得られた細胞を示す。同種異系細胞は、対象の親類でない供給源により供与され得るが、好ましくは非常に近い親類であり、最も好ましくは対象の家族の一員、例えば対象の親又は兄弟であろう。

【0056】

一実施形態において、幹細胞及び／又は前駆細胞は、自家細胞である。本明細書で用いられる用語「自家」は、糖尿病の処置及び／又は予防の必要がある同じ対象から得られた細胞を示す。自家細胞の使用は、免疫抑制剤の必要性の排除、及び／又は別の個体からの感染物質の偶発的伝染の回避など、特定の利点をもたらし得る。

40

【0057】

一実施形態において、インビトロでの細胞の回収及び／又は増殖の際に、細胞は、簡単な遠心分離により濃縮される。細胞は、さらに洗浄され、最終的な臨床使用可能溶液、例えば生理食塩水、緩衝生理食塩水に再懸濁されてもよく、又は培地+ジメチルスルホキシド、若しくは任意の他の適切な凍結保護物質中に再懸濁され、貯蔵のために凍結されてもよい。

【0058】

50

本開示は、遺伝子修飾された幹細胞及び／又は前駆細胞も提供する。幾つかの実施形態において、幹細胞及び／又は前駆細胞は、1)外因性VEGF核酸；2)外因性ANG-2核酸；3)外因性VCAM核酸；4)外因性HGF核酸；5)外因性カドヘリン核酸；又は6)前述の核酸の任意組み合わせで遺伝子修飾されている。用語「遺伝子修飾」は、外因性核酸配列の導入後に、細胞内に誘導された永続的又は一過性の遺伝子改変を指す。「外因性核酸配列」は、通常、又は自然には細胞中で見出されず、そして／又は本質的に細胞により產生されない該配列である。幾つかの実施形態において、細胞は、インビトロで遺伝子修飾される。核酸を細胞に導入する方法は、当該技術分野で公知であり、任意の公知方法を用いて、核酸を細胞に導入することができる。適切な方法としては、例えば感染、リポフェクション、電気穿孔法、顕微注入、リン酸カルシウム沈降法、DEAE-デキストランを介したトランスフェクション、リポソームを介したトランスフェクションなどが挙げられる。

10

## 【0059】

本開示により、幹細胞及び／又は前駆細胞を用いた、又は用いない抗原特異性治療薬も企図される。

## 【0060】

先に記載された方法又は組成物のいずれかの実施形態において、少なくとも1種の抗原特異性治療薬は、免疫グロブリン・ポリペプチドキメラである。

## 【0061】

本明細書で用いられる用語「抗原特異性治療薬」は、免疫グロブリン(Ig)を用いて、病的免疫反応の抑制のために自己ペプチド又は改変された自己ペプチドを送達する処置に関係する。疾患に特異的なペプチドを発現するように遺伝子修飾されたIgは、本明細書において「免疫グロブリン・ポリペプチドキメラ」又は「Ig-キメラ」と称する。疾患特異性T細胞又はB細胞エピトープに対応するペプチドをIg内に遺伝子修飾して、病的免疫応答のダウンレギュレーションを誘発し、T1Dのような自己免疫疾患を処置することができる。Ig-キメラの送達は、遊離ペプチドに関してT細胞への提示を有意に増加させる(Legge et al., J. Exp. Med. 191:2039-2051 (2011); Zaghouani et al., Science. 259:224-227 (1993))。

20

## 【0062】

本開示のさらに別の実施形態において、免疫グロブリン又はその一部は、ヒトであっても、又はヒト化されていてもよく、例えばIgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3及び／又はIgG4などのヒトIgGであってもよい。

30

## 【0063】

幾つかの実施形態において、該ペプチドは、免疫グロブリン又はその一部の可変領域内に挿入され、免疫グロブリン又はその一部は、ヒトIgG又はヒト化IgGを含む。

## 【0064】

さらに別の実施形態において、該ペプチドは、相補性決定領域(CDR)CDR1、CDR2及び／又はCDR3領域を含む免疫グロブリン又はその一部の可変領域の少なくとも1つの内部に挿入される。例示として、該ペプチドは、Dセグメントを欠失して該ペプチドを挿入することにより、免疫グロブリン又はその一部のCDR3領域内に挿入される(Legge et al., J. Exp. Med., 191:2039-2052 (2000); Legge et al., J. Exp. Med., 196:217-227 (2002); Gregg et al., J. Immunol., 173:7308-7316 (2004); Gregg et al., J. Immunol., 174:662-670 (2005))。当業者は、即座に、大規模トランスフェクトーマを調製して、Ig-キメラをカラム分離により精製することができる(Jain et al., J. Exp. Med., 205:207-218 (2008))。

40

## 【0065】

一実施形態において、催糖尿病性T細胞のダウンレギュレーションのための抗原特異性治療薬は、タンパク質フラグメント又はペプチドに連結された免疫グロブリン又はその一部を含む。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン又はその一部は、Fc受容体に結合することができるか、又は結合する能力がある。

50

## 【0066】

本開示の実施形態において、免疫グロブリン - ポリペプチドキメラは、CDR3領域を有する免疫グロブリンを含み、ペプチドが、該CDR3領域内に挿入されている。

## 【0067】

一実施形態において、該ペプチドは、催糖尿病性T細胞エピトープを含む。別の実施形態において、該ペプチドは、糖尿病の増悪期で検出されるエピトープである後期エピトープを含む。他の実施形態において、該ペプチドは、GAD65に由来する。他の実施形態において、該ペプチドは、インスリンに由来する。他の実施形態において、該ペプチドは、IA-2に由来する。他の実施形態において、該ペプチドは、ZnT8に由来する。他の実施形態において、該ペプチドは、IGRPに由来する。

10

## 【0068】

一実施形態において、催糖尿病性エピトープは、GAD2 (SEQ ID NO: 1)を含む。

## 【0069】

一実施形態において、催糖尿病性エピトープは、GAD1 (SEQ ID NO: 2)を含む。

## 【0070】

一実施形態において、催糖尿病性エピトープは、INS (SEQ ID NO: 3)を含む。

20

## 【0071】

幾つかの実施形態において、免疫グロブリンは、可溶性であり、例えば可溶化されたIg-GAD2、可溶化されたIg-GAD1又は可溶化されたIg-INSである。

## 【0072】

本開示のさらに別の実施形態において、免疫グロブリン - ポリペプチドキメラは、凝集されている。該キメラは、過去にChase et al., *Methods in Immunology and Immunochimistry*. 2: 249-341 (1968)に記載された通り、又は当業者に公知の他の技術を用いて、50%飽和( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub> $\text{SO}_4$ での沈降により凝集することができる。

20

## 【0073】

## 処置の方法

対象における糖尿病を処置又は予防する方法であって、ある量の1種以上の幹細胞及び/又は前駆細胞と、ある量の少なくとも1種の抗原特異性治療薬と、を含む組成物を、該対象に投与することを含む、方法も、本開示により企図される。

30

## 【0074】

一実施形態において、細胞は、細胞の投与のための細胞密度と同一であり得る又は異なり得る適切な密度に濃縮又は希釈される。細胞は、許容し得る医薬担体を用いて濃縮又は希釈することができる。本明細書で用いられる用語「医薬的に許容し得る担体」は、本開示の幹細胞及び/又は前駆細胞と一緒に投与され、連邦若しくは州政府の規制当局に認可されているか、又は米国薬局方若しくは動物、より特別にはヒトにおける使用のための他の一般に認識された薬局方に列挙されている、希釈剤、佐剤、賦形剤、又はビヒクルを指す。そのような医薬担体は、ピーナッツ油、大豆油、鉱物油、ゴマ油などの石油、動物系、植物系、又は合成の起源のものをはじめとする水及び油などの液体であってもよい。該医薬担体は、生理食塩水、アカシアゴム、ゼラチン、デンプンペースト、タルク、ケラチン、コロイド状シリカ、尿素などであってもよい。患者に投与する場合、幹細胞及び/又は前駆細胞、並びに医薬的に許容し得る担体は、滅菌されていてもよい。幹細胞及び/又は前駆細胞を静脈内に投与する場合、水が有用な担体となる。生理食塩液、並びに水性のデキストロース及びグリセロール溶液もまた、特に注射可能な溶液の場合に、液状担体として用いることができる。適切な医薬担体として、グルコース、ラクトース、スクロース、モノステアリン酸グリセロール、塩化ナトリウム、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなども挙げられる。所望なら、本発明の組成物は、微量の湿潤若しくは乳化剤、又はpH緩衝剤も含有することができる。本発明の組成物は、有利には溶液

40

50

、エマルジョン、持続放出配合剤の形態、又は使用に適した任意の他の形態をとっていてもよい。適切な担体の選択は、当業者の技術範囲内である。

【0075】

一実施形態において、該細胞は、約1,000～約200,000細胞/μLの密度に濃縮される。一実施形態において、約5,000～約50,000細胞/μLの密度が、利用される。別の実施形態において、約10,000～約30,000細胞/μLの密度が、利用される。

【0076】

一般に幹細胞及び/又は前駆細胞を含む組成物は、投与あたり $10^5$ ～ $10^8$ 細胞/kg体重の範囲内、好ましくは $10^6$ ～ $10^7$ 細胞/kg体重の範囲内で投与することができる。細胞の投与量は、注射部位、投与経路、疾患の状況、有益効果に必要な最小用量、及び毒性副作用への考慮などの因子に依存する。好ましい投与計画は、当業者により患者ごとに即座に決定することができる。

10

【0077】

幹細胞及び/又は前駆細胞を処置エリアへの送達用に懸濁させる溶液（例えば、医薬的に許容し得る担体）の容量は、本明細書において注射容量と称する場合がある。注射容量は、注射部位、投与される細胞数、及び疾患の状況をはじめとする数多くの因子に依存する。より詳細には注射容量の下限は、細胞密度の高い粘性懸濁液の実務でのリキッドハンドリング、及び細胞のクラスター化傾向により決定することができる。注射容量の上限は、宿主組織の損傷を回避するのに必要となる注射容量により加えられる圧縮力、及び実際の手術時間の限界により決定することができる。

20

【0078】

一実施形態において、ある量の幹細胞及び/又は前駆細胞を含む組成物が、静脈内投与などの公知の方法により、例えばボーラス若しくは一定時間をかける持続輸液により、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、関節滑液嚢内、髄腔内、経口、局所、又は吸入経路により、対象に投与されてもよい。細胞の静脈内、腹腔内、又は皮下投与が好ましく、静脈内又は腹腔内経路が特に好ましい。幹細胞及び/又は前駆細胞は、門脈への注射により投与されてもよいが、当該技術分野で周知の他の細胞投与パラダイムを用いることができる。

30

【0079】

一実施形態において、本発明の幹細胞及び/又は前駆細胞の組成物は、注射可能配合剤として配合され、例えば静脈内送達に適した有効成分の水性溶液又は懸濁液を含む。注射用、特に静脈内送達用の組成物を調製する際、約7未満又は約6未満、例えば約2～約7、約3～約6又は約3～約5のpHに緩衝された張性調整剤の水性溶液を含む連続相が、存在し得る。張性調整剤は、例えば塩化ナトリウム、グルコース、マンニトール、トレハロース、グリセロール、又は配合剤の浸透圧を血液と等張にする他の医薬剤を含むことができる。あるいは多量の張性調整剤が、配合剤中で用いられる場合、注射の前に医薬的に許容し得る希釈剤で希釈して、混合物を血液と等張にすることができる。

【0080】

別の実施形態において、本発明の組成物は、静脈内（IV）輸液又は動脈内投与により所望の期間（例えば、ボーラス注射、5分、15分、30分、1時間、2時間、3時間、6時間、24時間、48時間、72時間又は96時間の輸液）、投与される。本発明の一実施形態において、投与期間は、約3時間以下である。

40

【0081】

一実施形態において、同種異系細胞移植による本開示の処置は、幹細胞及び/又は前駆細胞の拒絶を制御するための1種以上の免疫抑制剤を含む組成物の投与を含む。好ましい免疫抑制剤としては、プレドニゾン、メチルプレドニゾロン、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスルホリン、バシリキシマブ、タクロリムス、マイコフェノレートモフェチル、又はシロリムスが挙げられるが、これらに限定されない。そのような免疫抑制剤のための調製及び投与計画は、製造業者の使用説明書に従って利用されてもよく、又は熟

50

練の専門家により経験的に決定されてもよい。

【0082】

本発明の一実施形態において、細胞は、一回投与される。別の実施形態において、細胞は、1日1回(又は1日に1~5回)、1週に1回、又は1ヶ月に1回投与される。例示として、細胞は、1週間に1回ずつ3週間投与され、そのような投与は、例えばT1Dの抑制を実現する。しかし他の投与計画が、本明細書において実行可能である。好ましい投与計画は、処置される特定の対象、疾患状況、投与される幹細胞及び/又は前駆細胞の型、並びに熟練の専門家に周知の他の因子に依存する。

【0083】

前述の方法のいずれかの幾つかの実施形態において、ある量の幹細胞及び/又はその前駆細胞を含む組成物が、一回投与される。前述の方法のいずれかの幾つかの実施形態において、ある量の幹細胞及び/又はその前駆細胞を含む組成物の初回用量の投与に続いて、1種以上の次の用量が投与される。本開示の方法で用いられ得る投与レジメン(例えば、最初の投与と1回以上の次の投与との間隔)の例としては、1週ごとに約1回~12ヶ月ごとに約1回の間隔、2週ごとに約1回~6ヶ月ごとに約1回の間隔、1ヶ月ごとに約1回~6ヶ月ごとに約1回の間隔、1ヶ月ごとに約1回~3ヶ月ごとに約1回の間隔、又は3ヶ月ごとに約1回~6ヶ月ごとに約1回の間隔が挙げられる。幾つかの実施形態において、投与は、1ヶ月に1回、2ヶ月ごと、3ヶ月ごと、4ヶ月ごと、5ヶ月ごと、6ヶ月ごと、又はT1Dの再発時である。

【0084】

本発明は、抗原特異性治療薬での処置が適応される、T1Dを処置又は予防する治療方法も対象とする。

【0085】

本開示の一実施形態において、抗原特異性治療薬は、1日1回(又は1日に1~5回)、1週間に1回、又は1ヶ月に1回投与される。例示として、該組成物は、1週間に3回ずつ5週間投与され、その後、1週間に1回ずつさらに5週間投与され、そのような投与が、例えばT1Dの抑制を実現する。

【0086】

投与量及び投与レジメンが、最適な所望の応答(例えば、治療応答)をもたらすように投与されてもよい。抗原特異性治療薬の用量は、mg/kg患者体重の単位で測定されてもよい。あるいは抗原特異性治療薬の用量は、mg/kg患者除脂肪体重(例えば、体重-体脂肪量)の単位、mg/m<sup>2</sup>患者体表面積の単位、又はmg/kg患者への投与用量(例えば、固定用量)の単位で測定される。用量の任意の測定を、本発明の組成物及び方法と協同的に利用することができ、投与量単位は、当該技術分野で標準的な手段により変換することができる。

【0087】

該方法は、必要とする対象への本発明の抗原特異性治療薬の投与を含む。一実施形態において、T1Dを予防、緩和又は寛解するための投与レジメンは、1日1回又は1日2回の投与量に相当し、例えば約0.0001mg/kg、約0.0005mg/kg、約0.001mg/kg、約0.01mg/kg、約0.05mg/kg、約0.1mg/kg、約0.5mg/kg、約1mg/kg、約2mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、約30mg/kg、約40mg/kg、約50mg/kg、約60mg/kg、約70mg/kg、約80mg/kg、約90mg/kg、約100mg/kg、約110mg/kg、約120mg/kg、約130mg/kg、約140mg/kg、約150mg/kg、約160mg/kg、約170mg/kg、約180mg/kg、約190mg/kg、約200mg/kg、約220mg/kg、約240mg/kg、約250mg/kg、約500mg/kg、約750mg/kg、又は約1,000mg/kg(対象の体重)の用量の本発明の抗原特異性治療薬を含むことができ、様々な因子により改良することができる。これらの具体的なmg/kg量は、適用例及び所望の治療結果に応じて、例えば約0.01%~約20%又は

10

20

30

40

50

それ以上で変動させることができる。他の因子としては、対象のタイプ、対象の年齢、体重、性別、食事及び医療的状態、並びに疾患の重症度が挙げられる。つまり実際に用いられる投与レジメンは、大きく変動させることができ、それゆえ先に示された投与レジメンから逸脱することができる。

【0088】

前述の方法のいずれかにおいて用いられる抗原特異性治療薬は、1種以上の用量で（例えば、初回用量の後、場合により1種以上の次の用量で）投与されてもよい。当業者は、投与量が、一般には維持レジメン（maintenance regimens）と比較して初回処置で高く、そして／又はより多い投与回数であることを認識するであろう。特定の実施形態において、2種以上、3種以上、4種以上、5種以上、6種以上、7種以上、8種以上、9種以上、10種以上、又は11種以上の次の用量の抗体が、投与される。前述の投与量は、mg（抗原特異性治療薬）/kg（処置される個体の体重）を指す。

10

【0089】

前述の方法のいずれかにおいて用いられるその抗原特異性治療薬は、対象の体重あたりの用量の比とは独立に、固定用量で投与されてもよい。

【0090】

幾つかの実施形態において、該抗原特異性治療薬は、抗原特異性治療薬約1000mg以下、500mg以下、又は250mg以下、100mg以下、90mg以下、80mg以下、70mg以下、60mg以下、50mg以下、40mg以下、30mg以下、20mg以下、又は10mg以下うちの1種以上の固定用量で投与される。幾つかの実施形態において、抗原特異性治療薬は、少なくとも0.5mgの抗原特異性治療薬、少なくとも1mgの抗原特異性治療薬、又は少なくとも10mgの抗原特異性治療薬のうちの1種以上の用量で投与される。幾つかの実施形態において、その抗原特異性治療薬は、抗原特異性治療薬1mg～100mgのうちの1種以上の用量で投与される。

20

【0091】

特定の実施形態において、固定用量の抗原特異性治療薬は、約1mg～約10mg、約1mg～約25mg、約10mg～約25mg、約10mg～約50mg、約10mg～約100mg、約25mg～約50mg、約25mg～約100mg、約50mg～約150mg、約100mg～約150mg、約100mg～約200mg、約150mg～約200mg、約150mg～約250mg、約200mg～約250mg、約200mg～約300mg、約250mg～約300mg、約250mg～約500mg、約300mg～約400mg、約400mg～約500mg、約400mg～約600mg、約500mg～約750mg、約600mg～約750mg、約700mg～約800mg、又は約750mg～約1000mgである。幾つかの実施形態において、抗原特異性治療薬の固定用量は、100mg未満である。

30

【0092】

様々な実施形態において、本発明の投与単位は、例えば約1ng～約2000mg、約0.001mg～約750mg、約0.01mg～約500mg、約0.1mg～約300mg又は約1mg～約100mgの本発明の抗原特異性治療薬を含有する。例示として、そのような単位投与剤型は、約0.001mg、又は約0.01mg、又は約0.1mg、又は約1mg、又は約2mg、又は約5mg、又は約10mg、又は約15mg、又は約20mg、又は約30mg、又は約40mg、又は約50mg、又は約60mg、又は約70mg、又は約80mg、又は約90mg、又は約100mg、又は約110mg、又は約120mg、又は約130mg、又は約140mg、又は約150mg、又は約160mg、又は約170mg、又は約180mg、又は約190mg、又は約200mg、又は約300mg、又は約400mg、又は約500mg、又は約750mg、又は約1,000mgの本発明の抗原特異性治療薬を含有し得る。

40

【0093】

例示として、投与単位はそれぞれ、約0.1mg、約1mg、約5mg、約10mg、約15mg、約20mg、約40mg、約80mg、約100mg、約250mg、約5

50

0.0 mg、又は約 1 0 0 0 mg の本発明の抗原特異性治療薬を含有する。該単位投与剤型は、特定の日用量を実現するのに用いられる所望の投与回数を収容するようを選択することができる。一実施形態において、本発明の組成物は、活性剤、例えば Ig - GAD 2、Ig - GAD 1 などが約 0.1 ~ 約 1.5 mg、約 0.5 ~ 約 1.0 mg、及び / 又は約 1 ~ 約 5 mg となるのに十分な量で対象に投与されよう。

#### 【 0 0 9 4 】

前述の方法のいずれかの幾つかの実施形態において、抗原特異性治療薬は、T 1 D を処置又は予防するために 1 回投与される。前述の方法のいずれかの幾つかの実施形態において、抗原特異性治療薬の初回用量の投与に続いて、1 種以上の次の用量が投与される。本開示の方法で用いられ得る投与レジメン（例えば、最初の投与と 1 回以上の次の投与との間隔）の例としては、1 週ごとに約 1 回 ~ 12 ヶ月ごとに約 1 回の間隔、2 週ごとに約 1 回 ~ 6 ヶ月ごとに約 1 回の間隔、1 ヶ月ごとに約 1 回 ~ 6 ヶ月ごとに約 1 回の間隔、1 ヶ月ごとに約 1 回 ~ 3 ヶ月ごとに約 1 回の間隔、又は 3 ヶ月ごとに約 1 回 ~ 6 ヶ月ごとに約 1 回の間隔が挙げられる。幾つかの実施形態において、投与は、1 ヶ月に 1 回、2 ヶ月ごと、3 ヶ月ごと、4 ヶ月ごと、5 ヶ月ごと、6 ヶ月ごと、又は T 1 D の再発時である。

10

#### 【 0 0 9 5 】

本開示は、抗原特異性治療薬の投与のために 1 つを超える投与間隔を含む、前述の方法のいずれかにおいて使用される投与レジメンも提供する。幾つかの実施形態において、投与レジメンは、抗原特異性治療薬の投与のために少なくとも 2 つ（例えば、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ）の異なる投与間隔を含む。幾つかの実施形態において、投与レジメンは、抗原特異性治療薬の投与のために 2 つの異なる投与間隔を含む。幾つかの実施形態において、投与レジメンは、抗原特異性治療薬の投与のために 2 つの異なる投与間隔を含み、第一の投与間隔は、その抗原特異性治療薬の 1 つ以上の用量の投与を含み、第二の投与間隔は、その抗原特異性治療薬の 1 つ以上の用量の投与を含み、第一の投与間隔は、第二の投与間隔よりも短い。例えば、第一の投与間隔は、数日又は数週間であってもよく、第二の投与間隔は、数ヶ月であってもよい。幾つかの実施形態において、第一の投与間隔は、約 5 日 ~ 約 28 日、約 7 日 ~ 約 21 日、約 12 日 ~ 約 16 日、又は約 14 日である。幾つかの実施形態において、第二の投与間隔は、約 1 ヶ月 ~ 約 3 ヶ月、約 1 ヶ月 ~ 約 2 ヶ月、又は約 1 ヶ月である。

20

#### 【 0 0 9 6 】

前述の方法のいずれかの幾つかの実施形態において、用量は、血液又は非限定的に臍臍などの組織中で一定用量を維持するように上昇又は低下させることができる。関係する実施形態において、用量は、抗原特異性治療薬の所望のレベルを維持するために、約 2 %、5 %、8 %、10 %、15 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、及び 95 % 上昇又は低下させる。

30

#### 【 0 0 9 7 】

前述の方法のいずれかの幾つかの実施形態において、投与間隔が対象の前記抗原特異性治療薬の血漿濃度を少なくとも約 0.1  $\mu$ g / mL、少なくとも約 0.3  $\mu$ g / mL、少なくとも約 1  $\mu$ g / mL、又は少なくとも約 2  $\mu$ g / mL のレベルに維持するのに十分な時間になるように、抗原特異性治療薬が対象に投与される。幾つかの実施形態において、これらの血漿濃度値は、本明細書の開示に従って抗原特異性治療薬で処置される個体について得られる値を指す。

40

#### 【 0 0 9 8 】

前述の方法のいずれかの幾つかの実施形態において、抗原特異性治療薬の初回用量の投与に続いて、1 種以上の次の用量が投与され、前記 1 種以上の次の用量は、初回用量とほぼ同じ、又はそれよりも少ない量である。

#### 【 0 0 9 9 】

前述の方法のいずれかの幾つかの実施形態において、抗原特異性治療薬の初回用量の投与に続いて、1 種以上の次の用量が投与され、次の用量の少なくとも 1 種は、初回用量よりも多い量である。

50

## 【0100】

前述の方法のいずれかの幾つかの実施形態において、抗原特異性治療薬が、投与され、抗原特異性治療薬の初回用量の投与に続いて、1種以上の次の用量が投与され、ヒトにおける前記抗原特異性治療薬の血漿濃度を、前記初回用量による処置過程での投与と1種以上の次の用量による処置過程での投与の間の約1週間より長く約6ヶ月より短い期間に、約0.1μg/mL、約0.07μg/mL、約0.05μg/mL、約0.03μg/mL、又は約0.01μg/mLのレベル未満に低下させることが可能である。幾つかの実施形態において、該血漿濃度の値は、本明細書の開示に従って抗原特異性治療薬で処置された個体に関して得られる値を指す。

## 【0101】

治療効果を誘起するのに必要な抗原特異性治療薬の量は、例えば血清への抗原特異性治療薬の吸収速度、抗原特異性治療薬の生物学的利用度、並びに1g-キメラのペプチドの内在化及び提示の程度に基づいて実験的に決定することができる。しかし、任意の特定の対象に関する本発明の抗原特異性治療薬の特定の用量レベルが用いられる特定の化合物の活性、対象の年齢、体重、一般的な健康状態、性別、及び食事（例えば、対象が空腹状態か、又は摂食状態か、など）、投与時間、排泄率、薬物の組み合わせ、糖尿病の重症度、並びに投与形態をはじめとし、様々な因子に依存することが理解されたい。処置用量は、一般に安全性及び有効性が最適化されるように設定され得る。典型的にはインピトロ及び/又はインピボテストからの用量効果の関連性が、最初、対象への投与のための適正な用量に関する有用なガイドラインを提供する可能性がある。一般に、動物モデルにおける試験が、本発明による糖尿病性障害又は疾患の処置に有効な投与量に関するガイドラインに用いられ得る。処置プロトコルに関して、投与される用量が、投与される特定の抗原特異性治療薬、投与経路、特定の対象の病状など、複数の因子に依存することは、認識されるはずである。概して言えば、ある量の抗原特異性治療薬を、所望の治療効果、例えば許容し得るレベルまでの血糖レベルの低下、又は症状の改善若しくは排除、及び当業者により適切な測定として選択された他の指示項目を誘発する期間、投与することが望まれるであろう。これらのパラメータの決定は、当該技術分野の技能で十分に行われる。

10

20

30

40

## 【0102】

幾つかの実施形態において、抗原特異性治療薬を含む組成物は、静脈内投与などの公知の方法により、例えばボーラス若しくは一定時間をかける持続輸液により、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、関節滑液囊内、髄腔内、経口、局所、又は吸入経路により、対象に投与されてもよい。細胞の静脈内、腹腔内、又は皮下投与が好ましく、静脈内又は腹腔内経路が特に好ましい。

## 【0103】

一実施形態において、本発明の抗原特異性治療薬は、注射可能配合剤として配合され、例えば静脈内送達に適した有効成分の水性溶液又は懸濁液を含む。注射用、特に静脈内送達用の抗原特異性治療薬を調製する際、約7未満又は約6未満、例えば約2～約7、約3～約6又は約3～約5に緩衝された張性調整剤の水性溶液を含む連続相が、存在し得る。張性調整剤は、例えば塩化ナトリウム、グルコース、マンニトール、トレハロース、グリセロール、又は配合剤の浸透圧を血液と等張にする他の医薬剤を含むことができる。あるいは多量の張性調整剤が、配合剤中で用いられる場合、注射の前に医薬的に許容し得る希釈剤で希釈して、混合物を血液と等張にすることができる。

30

40

## 【0104】

別の実施形態において、本発明の抗原特異性治療薬は、静脈内（IV）輸液又は動脈内投与により所望の期間（例えば、ボーラス注射、5分、15分、30分、1時間、2時間、3時間、6時間、24時間、48時間、72時間又は96時間の輸液）、投与される。本発明の一実施形態において、投与期間は、約3時間以下である。

## 【0105】

本発明の別の実施形態において、本発明の抗原特異性治療薬は、固体投与剤型、例えば錠剤（非限定的に、嚥下可能錠（swallowable tablets）、チュワブル錠、懸濁錠（suspe

50

nsion tablets) など)、カプセル、カプレット、トローチ、ドロップ、粉末、顆粒などの形態である。固体組成物は、例示としては、治療剤を医薬賦形剤と混合して、治療剤と賦形剤との均質混合物を含有する固体予備配合組成物を形成させることにより調製される。これらの予備配合化合物を均質物と称する場合、該薬剤が該組成物全体に実質的に均一に分布して、組成物が錠剤、丸薬及びカプセルなどの等しく効果的な単位投与剤型に即座に細分され得ることを意味する。この固体予備配合剤は、その後、本明細書に記載されたタイプの単位投与剤型に細分される。

【0106】

圧縮錠は、抗原特異性治療薬と、プロセシングを補助して該製品の特性を改善するために選択される賦形剤と、を含有する配合剤を圧縮することにより調製される固体投与剤型である。用語「圧縮錠」は、一般に、一回の圧縮で調製されるか、又はプレコンパクションタッピング後の最終的な圧縮により調製される、経口摂取用の簡素な非コーティング錠を指す。

【0107】

本発明の固体投与剤型は、改善された取扱い又は貯蔵特性の利益を付与する投与剤型を提供するようにコーティング又は調合されていてもよい。例えば錠剤又は丸薬は、内部投与成分及び外部投与成分を含むことができ、後者は前者の外被の形態である。

【0108】

本発明の抗原特異性治療薬は、1種以上の医薬的に許容し得る賦形剤をさらに含み得る。適切な賦形剤は、医薬中で一般に用いられる賦形剤のいずれかであり、医薬剤との適合性、及び所望の投与剤型の放出プロファイル特性に基づいて選択されなければならない。任意の適切な賦形剤が、本発明の組成物中に、約1重量%～約80%、約2重量%～約70%、約3重量%～約60%、約4重量%～約50%、又は約5重量%～約40重量%の量で存在し得る。

【0109】

医薬賦形剤の例示的な分類としては、結合剤、ディスインテグラント、充填剤、界面活性剤、可溶化剤、安定化剤、防腐剤、滑沢剤、湿潤剤、希釈剤、錠剤形成剤、流動促進剤などが挙げられる。

【0110】

一実施形態において、本発明の組成物は、防腐剤を含む。例示的な防腐剤としては、塩化ベンザルコニウム、プロピルパラベン、ブチルパラベン、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェノール、安息香酸ナトリウム、又はEDTAを含む。

【0111】

例示的結合剤としては、アカシア、アルギン酸及びその塩、セルロース誘導体、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキプロピルセルロース、ケイ酸マグネシウムアルミニウム、ポリエチレングリコール、ガム、多糖酸、ベントナイト、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ポリビニルピロリドン/酢酸ビニルコポリマー、クロスポビドン、ポビドン、ポリメタクリラート、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、プレゼラチン化デンプン、エチルセルロース、トラガカント、デキストリン、微結晶セルロース、スクロース、又はグルコースなどが挙げられる。

【0112】

例示的なディスインテグラント(崩壊剤とも称される)としては、デンプン、プレゼラチン化コーンスター、プレゼラチン化デンプン、セルロース、架橋カルボキシメチルセルロース、デンブングリコール酸ナトリウム、クロスポビドン、架橋ポリビニルピロリドン、クロスカメロースナトリウム、カルシウム、アルギン酸ナトリウム複合体、粘土、アルギン酸塩、ガム、又はデンブングリコール酸ナトリウム、及び固体調製に用いられる任意の崩壊剤が挙げられる。

【0113】

例示的な充填剤としては、ラクトース、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、二塩基性

10

20

30

40

50

リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、微結晶セルロース、セルロース粉末、デキストロース、デキストラート、デキストラン、デンプン、プレゼラチン化デンプン、スクロース、キシリトール、ラクチトール、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウム、ポリエチレングリコールなどが挙げられる。

## 【0114】

例示的な界面活性剤としては、ラウリル硫酸ナトリウム、モノオレイン酸ソルビタン、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ポリソルベート、ポラキソマー (polaxomers)、胆汁酸塩、モノステアリン酸グリセリル、Pluronic (商標) 類 (BASF) などが挙げられる。

## 【0115】

例示的な可溶化剤としては、クエン酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、マレイン酸、グルタル酸、重炭酸ナトリウム及び炭酸ナトリウムなどが挙げられる。

## 【0116】

抗酸化剤、緩衝剤、又は酸などの例示的な安定化剤を、用いることもできる。

## 【0117】

例示的な滑沢剤としては、ステアリン酸マグネシウム、水酸化カルシウム、タルク、フマル酸ステアリルナトリウム、水素化植物油、ステアリン酸、ベヘン酸グリセリル、ステアリン酸マグネシウム、カルシウム及びナトリウム、ステアリン酸、タルク、ワックス、Stearowet、ホウ酸、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、DL-ロイシン、ポリエチレングリコール、オレイン酸ナトリウム、又はラウリル硫酸ナトリウムなどが挙げられる。

## 【0118】

例示的な湿潤剤としては、オレイン酸、モノステアリン酸グリセリル、モノオレイン酸ソルビタン、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、オレイン酸ナトリウム、又はラウリル硫酸ナトリウムなどが挙げられる。

## 【0119】

例示的な希釈剤としては、ラクトース、デンプン、マンニトール、ソルビトール、デキストロース、微結晶セルロース、二塩基性リン酸カルシウム、スクロース系希釈剤、粉砂糖、一塩基性硫酸カルシウム一水和物、硫酸カルシウム二水和物、乳酸カルシウム三水和物、デキストラート、イノシトール、加水分解穀類固体 (hydrolyzed cereal solids)、アミロース、粉末セルロース、炭酸カルシウム、グリシン、又はベントナイトなどが挙げられる。

## 【0120】

例示的な粘着防止剤又は流動促進剤としては、タルク、コーンスター、DL-ロイシン、ラウリル硫酸ナトリウム、及びステアリン酸マグネシウム、カルシウム又はナトリウムなどが挙げられる。

## 【0121】

例示的な医薬的適合性担体としては、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、グリセロリン酸カルシウム、乳酸カルシウム、マルトデキストリン、グリセリン、ケイ酸マグネシウム、カゼイン酸ナトリウム、大豆レシチン、塩化ナトリウム、リン酸三カルシウム、リン酸二カリウム、ステアロイル乳酸ナトリウム、カラギーナン、モノグリセリド、ジグリセリド、又はプレゼラチン化デンプンなどが挙げられる。

## 【0122】

加えて、薬物配合は、例えば、Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975に議論されている。薬物配合の別の議論は、Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1980に見出すことができる。

## 【0123】

本発明の組成物を作製する際に、個々の成分を医薬的に許容し得る賦形剤と混合するか

10

20

30

40

50

、賦形剤で希釈するか、又はカプセル、サシェー、ペーパー若しくは他の容器に封入することができる。

【0124】

賦形剤が希釈剤として作用する場合、賦形剤は、有効成分のビヒクル、担体又は媒体として作用する固体、半固体又は液体材料であってもよい。つまり該組成物は、錠剤、丸薬、粉末、ドロップ、サシェー、カシェー、エリキシル、トローチ、懸濁液、エマルジョン、溶液、シロップ、エアロゾル（固体として、又は液体媒体中の）、軟及び硬ゼラチンカプセル、滅菌包装粉末、分配可能な粉末、顆粒、又は液体の形態であってもよい。

【0125】

本発明の一実施形態において、製造工程は、方法：（1）乾式混合、（2）直接打錠、（3）粉碎、（4）乾式若しくは非水性造粒、（5）湿式造粒、又は（6）融合、のうちの1つ又は組み合わせを用いてもよい。Lachman et al., The Theory and Practice of Industrial Pharmacy (1986)。そのような錠剤は、経口摂取又は希釈剤との接触により崩壊するフィルムコーティングも含み得る。

10

【0126】

抗原特異性治療薬での処置が適応された、糖尿病に罹患した対象の初回処置は、先に示された投与量で開始することができる。処置は一般に、病状又は障害が制御又は排除されるまで、必要に応じて数時間、数日間、数週間～数ヶ月間、又は数年間にわたり継続される。一実施形態において、本発明の組成物は、複数の投与量で対象に投与することができる。例示として、そのような投与は、該組成物の連続の（例えば、浸透圧ポンプ、パッチ、ゲル、クリーム、又は輸液デバイスによる投与により）、1時間に1回、1日に1回、1週間に1回、1週間に2回、又は1ヶ月に1回ずつ約1週間、約2週間、約1ヶ月以上、約3ヶ月以上、約6ヶ月以上、約9ヶ月以上、約1年以上、約3年以上、約5年以上の期間の、又は対象の生涯を通した投与を含み得る。

20

【0127】

本明細書に開示された抗原特異性治療薬での処置を受ける対象は、治療の有効性を決定するために、当該技術分野で周知の方法のいずれかにより日常的にモニタリングされ得る。そのようなデータの連続解析により、治療の間の処置レジメンの改良が可能になり、それにより本発明の抗原特異性治療薬の最適な有効量が任意の時点に投与され、処置期間も決定することができる。このようして、処置レジメン／投与計画は、治療経過の間に合理的に改良することができ、それにより十分な有効性を示す抗原特異性治療薬の最小量が投与され、投与により病状又は障害の処置が成功するのに必要な期間だけ投与が継続される。

30

【0128】

幾つかの実施形態において、幹細胞及び／又は前駆細胞、並びに抗原特異性治療薬は、共投与されてもよい。治療薬を構成する幹細胞及び／又は前駆細胞、並びに抗原特異性治療薬を、混和された投与剤型、又は実質的な同時投与を意図した別個の投与剤型であってもよい。幹細胞及び／又は前駆細胞、並びに抗原特異性治療薬は、連続で投与されてもよく、幹細胞及び／又は前駆細胞、並びに抗原特異性治療薬のいずれかが、多段階投与を必要とするレジメンにより投与されてもよい。つまりレジメンは、別個の有効成分を間隔を空けて投与する幹細胞及び／又は前駆細胞、並びに抗原特異性治療薬の連続投与を必要とする場合がある。反復投与ステップの間隔は、治療化合物の効能、溶解度、生物学的利用度、血漿半減期及び反応速度プロファイルなどの幹細胞及び／又は前駆細胞、並びに抗原特異性治療薬の特性に応じて、そして食物摂取の効果並びに対象の年齢及び病状に応じて、例えば数分間～数時間～数日間の範囲内になり得る。目的分子濃度の概日リズム変動もまた、最適な投与間隔を決定し得る。同時に投与されるか、実質的に同時に投与されるか、又は連続で投与されるかにかかわらず、幹細胞及び／又は前駆細胞、並びに抗原特異性治療薬は、例えば、静脈内経路による幹細胞及び／又は前駆細胞の投与と、経口経路、経皮経路、静脈内経路、筋肉内経路又は粘膜組織への直接吸収による抗原特異性治療薬の投与と、を必要とするレジメンを含み得る。幹細胞及び／又は前駆細胞、並びに抗原特異性

40

50

治療薬が、経口、吸入スプレー、経直腸、局所、口腔（例えば、舌下）、又は非経口（例えば、皮下、筋肉内、静脈内及び皮内注射、又は輸液技術）により別個に又は一緒に投与されるかどうかにかかわらず、そのような各治療化合物は、医薬的に許容し得る賦形剤、希釈剤、又は他の配合成分の適切な医薬配合剤中に含有されよう。

【0129】

併用

本発明の方法は、T1Dの発病を処置、予防、抑制又は遅延するために適応される別の医薬剤、例えばこの障害に関係する症状及び/又は合併症を処置するために一般に投与されるインスリン、-グルコシダーゼ阻害剤、インスリン増感剤、抗体、又は血糖上昇剤などと併用することができる（「併用療法」）。T1Dの発病を処置、予防、抑制又は遅延するための抗体との併用療法としては、例えば短期抗CD3モノクローナル抗体療法が挙げられる。これらの薬物は、それらの使用に関連する特定の欠点を有する。これらの薬物の幾つかは、前述の病状の処置に完全に効果的にはならず、そして/又は低血糖、微小血管疾患、及び大血管疾患など、有害な副作用を生じる。しかし本発明と協同的に用いられる、即ち併用療法では、これらの望ましくない副作用の全てではないとしても多くが、低減又は排除される場合がある。これらの薬物の副作用プロファイルの低減は、一般に、例えば投与の組み合わせにより治療効果を実現するのに必要な用量が減少することに起因する。

【0130】

本明細書で用いられる語句「併用療法」は、ある量の1種以上の幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにある量の少なくとも1種の抗原特異性治療薬を、別の医薬剤と協同的に投与することを指す。

【0131】

語句「併用療法」は、T1D処置用の治療薬の共同作用により有益効果をもたらすことを意図した特定の処置レジメンの一部として、本発明の組成物を、対象のT1Dを処置又は予防するために適応される別の医薬剤と協同的に投与することを包含する。併用の有益効果としては、治療薬の併用により得られる薬物動態的又は薬力学的共同作用が挙げられるが、これらに限定されない。これらの治療薬の併用での投与は、典型的には定義された期間（通常は、選択された組み合わせに応じて、実質的に同時に、数分間、数時間、数日、数週間、数ヶ月、又は数年間）、実施される。「併用療法」は、一般に、偶発的又は恣意的に本発明の組み合わせをもたらす別々の単剤療法の一部としてこれらの薬剤の2種以上の投与を包含するものではない。「併用療法」は、連続的手法による、即ち各治療薬が異なる時間に投与されるこれらの治療薬の投与、及び実質的に同時のこれらの治療薬又は該治療薬の少なくとも2種の投与を包含するものとする。実質的な同時投与は、例えば固定比率で各治療薬を有する単一の注射、錠剤若しくはカプセルを対象に投与すること、又は治療薬それぞれの単一注射、カプセル若しくは錠剤を対象に複数回投与することにより遂行することができる。各治療薬の連続投与又は実質的な同時投与は、適切な経路により実行することができる。例えば本発明の組成物を、経口投与、経皮投与、静脈内投与、筋肉内投与すること、及び/又は粘膜を通して直接吸収させて、併用される他の治療薬又は複数の治療薬を、特定の薬剤又は複数の薬剤のための任意の適切な経路、例えば非限定的に経口経路、経皮経路、静脈内経路、筋肉内経路により、又は粘膜を通して直接吸収させることにより投与することができる。治療薬が投与される順序は、厳密に重要ではない。「併用療法」は、非限定的に（1）抗炎症薬、例えばステロイド若しくは非ステロイド系抗炎症薬、及び/又は5-リポキシゲナーゼ阻害剤；又は（2）心臓血管疾患若しくは障害を処置する薬剤、例えばアンギオテンシン変換酵素阻害剤（ACE阻害剤）、-アドレナリン作動性アゴニスト、-アドレナリン作動性アゴニスト、-アドレナリン作動性ブロッカー、アンギオテンシンII受容体アンタゴニストなどの抗高血圧薬；例えばアルドステロンアンタゴニスト、ベンゾチアジアジン誘導体、有機水銀、プリン、ステロイド（例えば、カンレノン、オレアンドリン、スピロノラクトン）、スルホンアミド誘導体、若しくはウラシルなどの利尿薬；抗狭心症薬；抗不整脈薬；抗動脈硬化症薬；抗高リ

10

20

30

40

50

ポタンパク質血症薬；抗胆石症薬；抗コレステロール薬；高コレステロール血症抑制薬；抗高脂血症薬；抗高血圧薬；抗低血圧薬；抗脂質異常症薬；カルシウムチャネルプロッカー；心抑制薬；ドーパミン受容体アゴニスト；ドーパミン受容体アンタゴニスト；HMG Co A レダクターゼ阻害剤；血中コレステロール低下薬；血中脂質低下薬；降圧剤；モノアミンオキシダーゼ阻害剤；筋弛緩剤；カリウムチャネル活性化剤；昇圧剤；セロトニン取込みアンタゴニスト；血栓溶解薬；血管弛緩剤；昇圧薬；又は血管保護薬などの他の生物学的有効成分と（一部は、参照により本明細書に取り込まれる The Merck Index, Merck & Co. Rahway, N.J. (2001)において提供されたリストに基づく）、非限定的に手術などの非薬物療法をさらに併用した、先に記載された治療薬の投与も包含し得る。

## 【0132】

併用療法を構成する治療化合物は、混和された投与剤型、又は実質的な同時投与を意図した別個の投与剤型であってもよい。併用療法を構成する治療化合物は、連続で投与されてもよく、治療化合物のいずれかが、二段階投与を必要とするレジメンにより投与されてもよい。つまりレジメンは、別個の有効成分を間隔を空けて投与する治療化合物の連続投与を必要とする場合がある。反復投与ステップの間隔は、治療化合物の効能、溶解度、生物学的利用度、血漿半減期及び反応速度プロファイルなどの各治療化合物の特性に応じて、そして食物摂取の効果並びに対象の年齢及び病状に応じて、例えば数分間～数時間～数日間の範囲内になり得る。目的分子濃度の概日リズム変動もまた、最適な投与間隔を決定し得る。同時に投与されるか、実質的に同時に投与されるか、又は連続で投与されるかにかかわらず、併用療法の治療化合物は、例えば、経口経路による一方の治療化合物の投与と、経口経路、経皮経路、静脈内経路、筋肉内経路又は粘膜組織への直接吸収による別の治療化合物の投与と、を必要とするレジメンを含み得る。併用療法の治療化合物が、経口、吸入スプレー、経直腸、局所、口腔（例えば、舌下）、又は非経口（例えば、皮下、筋肉内、静脈内及び皮内注射、又は輸液技術）により別個に又は一緒に投与されるかどうかにかかわらず、そのような各治療化合物は、医薬的に許容し得る賦形剤、希釈剤、又は他の配合成分の適切な医薬配合剤中に含有されよう。

## 【0133】

ある量の1種以上の幹細胞及び／又は前駆細胞と、ある量の少なくとも1種の抗原特異性治療薬と、を含む組成物が、本開示により企図される。

## 【0134】

本明細書で用いられる用語「組成物」又は「複数の組成物」は、幹細胞及び／又は前駆細胞の単独、抗原特異性治療薬の単独、又は幹細胞及び／又は前駆細胞と抗原特異性治療薬との組み合わせを指す。

## 【0135】

幹細胞及び／又は前駆細胞、並びに抗原特異性治療薬は、本明細書に開示された方法で使用するために組成物、特に医薬組成物に配合することができる。そのような組成物は、ある量（例えば、治療的又は予防的有効量）の幹細胞及び／又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬を、適切な担体、例えば医薬的に許容し得る薬剤との混合物中に含む。典型的には幹細胞及び／又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬は、医薬組成物に配合する前に、動物（例えば、ヒト）への投与のために十分に精製される。

## 【0136】

医薬的に許容し得る薬剤としては、例えば担体、賦形剤、希釈剤、抗酸化剤、防腐剤、着色剤、香味及び希釈剤、乳化剤、懸濁剤、溶媒、充填剤、バルキング剤、緩衝剤、送達ビヒクル、張性調整剤、共溶媒、湿润剤、錯化剤、緩衝剤、抗菌薬、及び界面活性剤が挙げられる。

## 【0137】

中性に緩衝された生理食塩水又はアルブミンと混合された生理食塩水は、適切な模範的担体である。該医薬組成物は、アスコルビン酸などの抗酸化剤；低分子量ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン若しく

10

20

30

40

50

はリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、若しくはデキストリンなどの单糖類、二糖類、及びその他の炭水化物；EDTAなどのキレート化剤；マンニトール若しくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；並びに／又はTween、Pluronic若しくはポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン性界面活性剤を含み得る。同じく例として、適切な張度上昇剤には、アルカリ金属ハロゲン化物(好ましくは塩化ナトリウム又はカリウム)、マンニトール、ソルビトールなどが挙げられる。適切な防腐剤としては、塩化ベンザルコニウム、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸などが挙げられる。過酸化水素を、防腐剤として使用することもできる。適切な共溶媒としては、グリセリン、プロピレングリコール、及びPEGが挙げられる。適切な錯化剤としては、カフェイン、ポリビニルピロリドン、-シクロデキストリン又はヒドロキシプロピル-シクロデキストリンが挙げられる。適切な界面活性剤又は湿润剤としては、ソルビタンエステル、ポリソルベート80などのポリソルベート、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサパール(tyloxapal)などが挙げられる。緩衝剤は、酢酸塩、ホウ酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、重炭酸塩、トリス-HClなどの従来の緩衝剤であってもよい。酢酸塩緩衝剤は、約pH4～5.5であってもよく、トリス緩衝剤は、約pH7～8.5であってもよい。さらなる医薬剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990に示されている。

## 【0138】

該組成物は、液体形態であっても、又は凍結乾燥若しくはフリーズドライ形態であってもよく、1種以上のリオプロテクタント、賦形剤、界面活性剤、高分子量構造添加剤、及び／又はバルキング剤を含み得る(例えば、米国特許第6,685,940号、同第6,566,329号及び同第6,372,716号参照)。一実施形態において、非還元糖、例えばスクロース、ラクトース又はトレハロースであるリオプロテクタントが、含まれる。一般に含まれるリオプロテクタントの量は、再構成の際に得られる配合剤が等張になるようとするが、高張性又はわずかに低張性が適する場合もある。加えて、リオプロテクタントの量は、凍結乾燥時に許容し得ない量のタンパク質の変性及び／又は凝集を防止するのに十分でなければならない。凍結乾燥前の配合物中の糖(例えば、スクロース、ラクトース、トレハロース)の模範的リオプロテクタント濃度は、約10mM～約400mMである。別の実施形態において、界面活性剤、例えば非イオン性界面活性剤及びイオン性界面活性剤、例えばポリソルベート(例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート80)；ポロキサマー(例えば、ポロキサマー188)；ポリ(エチレングリコール)フェニルエーテル(例えば、Triton)；ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)；ラウリル硫酸ナトリウム；ナトリウムオクチルグリコシド；ラウリル-、ミリスチル-、リノレイル-、又はステアリル-スルホベタイン；ラウリル-、ミリスチル-、リノレイル-、又はステアリル-サルコシン；リノレイル-、ミリスチル-又はセチル-ベタイン；ラウロアミドプロピル-、コカミドプロピル-、リノレアミドプロピル-、ミリスタミドプロピル-、パルミドプロピル-、又はイソステアラミドプロピル-ベタイン(例えば、ラウロアミドプロピル)；ミリスタルニドプロピル-(myristarnidopropyl-)、パルミドプロピル-、又はイソステアラミドプロピル-ジメチルアミン；ナトリウムメチルココイル-又はニナトリウムメチルオフェイルタウラート(disodium methyl oleyl-taurate)；及びMONAQUA T(商標)シリーズ(Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.)、ポリエチレングリコール、ポリプロピルグリコール、並びにエチレンとプロピレングリコールとの共重合体(例えば、Pluronic、PF68など)が含まれる。凍結乾燥前の配合物中に存在し得る界面活性剤の模範的量は、約0.001～0.5%である。高分子量構造添加剤(例えば、充填剤、結合剤)としては、例えばアカシア、アルブミン、アルギン酸、リン酸カルシウム(二塩基性)、セルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、微結晶セルロース、デキストラン、デキストリン、デキストラート、スクロース、チロース、ブレゼラチン化デンプン、硫酸カルシウム、アミロース、グリ

10

20

30

40

50

シン、ベントナイト、マルトース、ソルビトール、エチルセルロース、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二ナトリウム、ピロ亜硫酸二ナトリウム、ポリビニルアルコール、ゼラチン、グルコース、グーガム、液体グルコース、圧縮糖、ケイ酸マグネシウムアルミニウム、マルトデキストリン、ポリエチレンオキシド、ポリメタクリラート、ポビドン、アルギン酸ナトリウム、トラガカント、微結晶セルロース、デンプン、及びゼインが挙げることができる。高分子量構造添加剤の模範的濃度は、0.1重量%～10重量%である。別の実施形態において、バルキング剤（例えば、マンニトール、グリシン）が、含まれてもよい。

#### 【0139】

組成物は、非経口投与に適し得る。模範的な組成物は、当業者に利用可能な任意の経路、例えば関節内、皮下、静脈内、筋肉内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、病変内、結腸内、経皮、経口、及び吸入経路による動物への注射又は輸液に適する。非経口配合剤は、典型的には、場合により医薬的に許容し得る防腐剤を含有する、滅菌パイロジエンフリー等張水性溶液であろう。

10

#### 【0140】

水性担体としては、水、アルコール性／水性溶液、エマルジョン又は懸濁液、例えば生理食塩水及び緩衝媒体が挙げられる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸化リンガー液、又は不揮発性油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、流体及び栄養補充液、電解質補充液、例えばリンガーデキストロースに基づくものなどが挙げられる。防腐剤及び他の添加剤、例えば抗菌薬、抗酸化剤、キレート化剤、不活性ガスなどが存在してもよい。一般には、参照により本明細書に取り込まれるRemington's Pharmaceutical Science, 16th Ed., Mack Eds., 1980を参照されたい。

20

#### 【0141】

本明細書に記載された医薬組成物は、特定の局所環境において製品の局所濃度を持続放出させ（例えば、ボーラス、デポ効果）、そして／又は安定性若しくは半減期を増加させる手法で、制御的又は持続的送達のために配合することができる。本発明により、特定の実施形態においてそのような組成物が有意に多量の幹細胞及び／又は前駆細胞、並びに抗原特異性治療薬を含むことができ、任意の時点で実際に放出されて利用可能になる幹細胞及び／又は前駆細胞、並びに抗原特異性治療薬の有効量が、本開示により初回移植量（initial deposit）よりもかなり少量になることが、企図される。該組成物は、幹細胞及び／又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬と、ポリ乳酸、ポリグリコール酸などのポリマー化合物、並びに活性剤の制御又は持続放出をもたらし、その後デポ注射として送達され得る、生分解性マトリックス、注射可能なマイクロスフェア、マイクロカプセル粒子、マイクロカプセル、生物侵食性粒子ビーズ、リポソーム、及びインプラント可能な送達デバイスなどの薬剤との配合剤を含むことができる。そのような持続送達又は制御送達手段を配合する技術は公知であり、様々なポリマーが開発され、薬物の制御放出及び送達に用いられている。そのようなポリマーは、典型的には生分解性及び生体適合性である。鏡像異性体ポリマー又はポリペプチドセグメントの複合体化により形成されるものなどのポリマーヒドロゲル、及び温度特性又はpH感受性を有するヒドロゲルは、生物活性タンパク質剤（例えば、抗体）の捕捉に関与する穏やかな水性条件であることから薬物デポ効果をもたらすのに望ましい場合がある。例えば、PCT出願公開WO 93/15722号にある医薬組成物の送達のための制御放出性多孔質ポリマー微粒子の記載を参照されたい。

30

#### 【0142】

この目的に適した材料としては、ポリラクチド（例えば米国特許第3,773,919号参照）、ポリ-(a-ヒドロキシカルボン酸)のポリマー、例えばポリ-D-( - )-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許出願公開第133,988号）、L-グルタミン酸と -エチル-L-グルタミン酸塩との共重合体（Sidman et al., Biopolymers, 22: 547-556

40

50

(1983) )、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリラート) (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981)、及びLanger, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982) )、エチレン酢酸ビニル、又はポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。他の生分解性ポリマーとしては、ポリ(ラクトン)、ポリ(アセタール)、ポリ(オルトエステル)、及びポリ(オルトカルボナート)が挙げられる。持続放出性組成物としては、当該技術分野で公知の複数の方法のいずれかにより調製され得るリポソームも挙げができる(例えば、Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-92 (1985) 参照)。担体そのもの、又はその分解産物は、標的組織において非毒性でなければならず、病状をさらに増悪させてはならない。これは、標的障害の動物モデルにおいて、又はそのようなモデルが入手できない場合には正常な動物において、日常的にスクリーニングすることにより決定することができる。

10

## 【0143】

幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬を含有する特定の配合剤は、経口投与することができる。この方式で投与される配合剤は、錠剤及びカプセルなどの固体投与剤型の調合において慣用されるそれらの担体を用いて、又は用いずに配合することができる。例えば、生物学的利用度が最大でプレシステミック分解が最小の場合には、カプセルを胃腸管内の部位で配合剤の活性部分を放出するように設計することができる。さらなる薬剤を包含させて、選択的活性剤の吸収を促進させることができる。希釈剤、香味剤、低融点ワックス、植物油、滑沢剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、及び結合剤も、用いることができる。

20

## 【0144】

別の調製物は、錠剤の製造に適した非毒性賦形剤との混合物中に幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬の有効量を含むことができる。滅菌水又は他の適切なビヒクルに該錠剤を溶解することにより、溶液を単位用量形態で調製することができる。適切な賦形剤としては、炭酸カルシウム、炭酸若しくは重炭酸ナトリウム、ラクトース、又はリン酸カルシウムなどの不活性希釈剤;あるいはデンプン、ゼラチン又はアカシアなどの結合剤;あるいはステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、又はタルクなどの滑沢剤が挙げられるが、これらに限定されない。

30

## 【0145】

適切であり、そして/又は好ましい医薬配合剤は、意図する投与経路、送達形式、及び所望の投与量に応じて、本開示の見地及び配合技術の一般的知識から決定することができる。投与の手法にかかわらず、有効な用量は、患者の体重、体表面積、又は臓器サイズに従って計算することができる。本明細書に記載された配合剤それぞれを含む処置のための適切な投与量を決定する計算のさらなる精密化は、当該技術分野で日常的に行われており、当該技術分野で日常的に実施される業務の範囲内である。適切な投与量は、適切な用量-反応データを使用することにより確認することができる。

40

## 【0146】

該医薬組成物は、幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬を別の活性剤(例えば、幹細胞及び/又は前駆細胞並びにその抗原特異性治療薬以外のもの)と共に含むことができる。あるいは該医薬組成物は、幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬を、別の医薬組成物、例えば1種以上の活性剤(例えば、幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬以外のもの)を含む医薬組成物と共に含むことができる。そのような併用は、意図する目的に有用なものである。本発明の一部である併用は、例えば本明細書に記載されたような幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬と、少なくとも1種のさらなる薬剤であってもよい。以下に示される併用で用いられ得る活性剤の例は、例示を目的としており、限定を意図するものではない。形成された組成物が意図する機能を実施し得るように併用するのであれば、該併用が1種を超えるさらなる薬剤(例えば、2種又は3種のさらなる薬剤)を含むこともできる。

## 【0147】

本開示により、さらに、1種以上の他の活性剤を含むさらなる医薬組成物が幹細胞及び

50

/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬と別個に投与され得ること（例えば、同時処置レジメン、対象が同時処置を受けること）、そしてそのような別個の投与が同時に又は異なる時間に、例えば同一若しくは異なる日に、又は同日の異なる時間に実施され得ることが企図される。別の医薬組成物及び/若しくは活性剤の投与は、当該技術分野で公知の標準的医療業務に従っていてもよく、又は本明細書に開示されるような幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬の投与と併用される場合には、投与が改良されてもよい（例えば、より長い投与間隔、より低い投与レベル、開始の遅延）。

#### 【0148】

幾つかの実施形態において、活性剤としては、抗菌薬、例えばペニシリン（例えば、ペニシリン、アモキシシリン、ベンジルペニシリン、アンピシリン、オーゲメンチン）などの抗生物質、ポリケチド系抗生物質（例えば、マクロリド、アジスロマイシン、エリスロマイシン、クラリスロマイシン）、セファドスボリン（例えば、セファドロキシル、セファキシム、セファレキシン）、リンコサミド（例えば、クリンダマイシン）、キノロン（例えば、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、モキシフロキサシン）、葉酸合成阻害剤（例えば、ジヒドロ葉酸レダクター阻害剤、トリメトプリム、ダプソン、コトリモキサゾール）、テトラサイクリン（例えば、テトラサイクリン、ミノサイクリン、ドキシサイクリン、デメクロサイクリン、オキシテトラサイクリン）、リファマイシン（例えば、リファンピシン、リファブチン、リファベンチン）、スルホンアミド（例えば、スルファメトキサゾール、スルファセタミド）、アミノグリコシド（例えば、ネオマイシン、アミカシン、トプラマイシン）、フジン酸、ポリペプチド系抗生物質（例えば、バシトラシン、ポリミキシンB）、リポペプチド系抗生物質（例えば、ダプトマイシン）、クロラムフェニコール及びムピロシンを挙げることができる。

10

20

30

40

#### 【0149】

さらに、本開示に従って対象に投与される幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬が、少なくとも1種のさらなる医薬組成物（例えば、活性剤を含む）、例えば前述の活性剤のいずれかでの処置と一緒に（同時に）投与され得ることが企図される。一実施形態において、少なくとも1種の活性剤での処置が、維持される。別の実施形態において、少なくとも1種の活性剤での処置は、処置経過の間に低減（例えば、漸減）又は中断される（例えば、対象が安定している場合）（例えば、幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬を一定投与レジメンに維持しながら）。別の実施形態において、少なくとも1種の活性剤での処置は、低減（例えば、漸減）又は中断され（例えば、対象が安定している場合）、幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬での処置は、低減される（例えば、より低い用量、より少ない投与回数、より短時間の処置レジメン）。別の実施形態において、少なくとも1種の活性剤での処置は、低減（例えば、漸減）又は中断され（例えば、対象が安定している場合）、幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬での処置は、増加される（例えば、より高い用量、より多い投与回数、より長時間の処置レジメン）。さらに別の実施形態において、少なくとも1種の活性剤での処置は、維持され、幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬での処置は、低減又は中断される（例えば、より低い用量、より少ない投与回数、より短時間の処置レジメン）。さらに別の実施形態において、少なくとも1種の活性剤での処置と、幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬での処置が、低減又は中断される（例えば、より低い用量、より少ない投与回数、より短時間の処置レジメン）。

#### 【0150】

幾つかの実施形態において、少なくとも1種の活性剤（例えば、幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬以外のもの）での処置を低減させることは、処置経過の間に投与される活性剤の累積量の減少である。幾つかの実施形態において、少なくとも1種の活性剤（例えば、幹細胞及び/又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬以外のもの）での処置を低減させることは、投与される活性剤の実際の用量の減少である。幾つかの実施形態において、少なくとも1種の活性剤での処置を低減させることは、全身免疫

50

抑制の低減をもたらす。

【0151】

本開示において用いられる医薬組成物は、治療有効量又は予防有効量の幹細胞及び／又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬を含み得る。治療有効量は、所望の治療結果を実現するのに必要な投与量及び期間で有効な量を指す。幹細胞及び／又は前駆細胞、並びに抗原特異性治療薬の治療有効量は、個体の疾患状態、個体の年齢、性別、及び体重、並びに個体において所望の応答を誘発する抗体又は抗体部分の能力などの因子により変動し得る。治療有効量は、幹細胞及び／又は前駆細胞、並びに抗原特異性治療薬の任意の毒性又は有害作用を上回る治療有益効果でもある。予防有効量は、所望の予防結果を実現するのに必要な投与量及び期間で有効な量を指す。

10

【0152】

幹細胞及び／又は前駆細胞、並びにその抗原特異性治療薬の治療又は予防有効量は、例えば該組成物が用いられる適応症、投与経路、及び対象の病状など、治療対象に依存する。医薬組成物は、糖尿病を処置又は予防するための治療又は予防有効量で投与される。

【0153】

さらなる説明がなくとも、当業者は前述の説明及び以下の例示的な実施例を用いて本開示の薬剤を作製及び使用し、請求された方法を実践し得ると考えらえる。以下の実施例は、本開示の実践を容易にするために提供されており、本開示の残りの部分を限定するものと解釈してはならない。

20

【実施例】

【0154】

本発明は、以下の実施例によりさらに例示されるが、実施例を限定と解釈してはならない。次の実験的例で用いられる材料及び方法を、以下に記載する。

【0155】

実施例1：材料及び方法

次の材料及び方法が、以下に示される実施例で用いられた。適切なその材料及び方法を他の公知材料及び方法で置き換えて、同じ目的及び／又は結果を実現し得ることは、明白であろう。

【0156】

動物モデル

30

NOD及びNOD-GFP（-アクチンプロモータの下で緑色蛍光タンパク質を発現する）マウスは、過去にWallet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 106:24810-4815 (2009)に記載されている。全てのマウスは、実験期間の間、動物施設で管理され、これらの動物で実施された実験手順は、Institutional Animal Care and Use Committeeのガイドラインに従って実施される。

【0157】

糖尿病の評価

マウスの尾静脈から1週間に1回採血し、血液試料を用いてグルコース量及び抗インスリン抗体の両方を評価する。グルコースの評価では、1滴の血液を直接テスト片に載せて、グルコース量をAccu-Chek Advantageモニタリングシステム(Roche Diagnostics, India napolis, IN)を用いて読み取る。抗インスリン抗体の検出では、血液を室温で1時間凝固させ、血清を分離してELISAに使用する。血中グルコースレベル(BGL)のモニタリングは、10週齢で開始する。血中グルコースの300mg/dLを超える値が2週間続ければ、そのマウスは、糖尿病とみなされる。

40

【0158】

ペプチド及びIg-キメラ

全てのペプチドを、HPLCにより90%を超える純度に精製する。GAD2ペプチド(SEQ ID NO:1)は、グルタミン酸デカルボキシラーゼ-65(GAD)のアミノ酸残基206～220に対応する。GAD2ペプチド配列を91A3 IgG2b

Igの重鎖可変領域のCDR3領域の可変領域内に挿入することにより、Ig-GAD

50

2キメラを作製する。融合重鎖遺伝子を、その後、完全な自己 Ig 分子として発現するための親 軽鎖遺伝子と共にトランスフェクトする (Legge et al., J. Exp. Med., 191:20 39-2052 (2000); Legge et al., J. Exp. Med., 196:217-227 (2002); Gregg et al., J. Immunol., 173:7308-7316 (2004); Gregg et al., J. Immunol., 174:662-670 (2005) )。トランスフェクトマ細胞の大規模培養を D M E 培地で実施して、セファロースビーズで精製する (Jain et al., J. Exp. Med., 205:207-218 (2008) )。G A D 又はヒトイインスリンタンパク質由来の他のペプチド ( 及び 鎖 ) は、本発明の範囲内である。

### 【 0 1 5 9 】

#### I g - G A D 2 及びドナー B M 又はドナー E P C での処置

糖尿病と決定されたマウスは、最初、腹部に皮下挿入される 2 種の持続放出性インスリンインプラント (LinShin, Toronto, Ontario, Canada) を与えられ、正常血糖を一時的に 2 ~ 3 週間維持させる。その後、マウスに I g - G A D 2 3 0 0  $\mu$  g を 1 週間に 3 回ずつ 5 週間、そしてその後、1 週間に 1 回ずつさらに 5 週間、腹腔内 ( i . p . ) 投与する。ドナー B M 細胞を、健常な ( 非糖尿病 ) N O D マウスの大腿骨及び脛骨から単離し、1 0  $\times$  1 0  $^6$  細胞を診断後 2 、 3 、及び 4 週目に 1 週間に 1 回、静脈内に ( i . v . ) 移植する。マウスを、1 2 0 日目まで B G L でモニタリングする。F L K - 1  $^+$  内皮前駆細胞 ( E P C ) は 5  $\times$  1 0  $^4$  細胞 / 注射を与え、F L K - 1  $^+$  E P C は 3  $\times$  1 0  $^6$  細胞 / 注射を与えること以外では同じ処置レジメンを、E P C 処置マウスに与える。E P C を単離するために、B M を健常マウス又は糖尿病マウスから採取し、系譜細胞ディプリーシヨンキットを用い、製造業者の使用説明書 (Mitenyi Biotec) に従って、L i n  $^+$  細胞を単離する。L i n  $^+$  細胞を、抗 c - K i t 、抗 F L K - 1 及び 7 - A D D で染色して、適宜、選別する。

### 【 0 1 6 0 】

#### フローサイトメトリー分析

試料を細胞表面マーカ P E C A M 1 ( P E - c y 7 - コンジュゲート化抗 P E C A M 1 ; eBiosciences ) 、 F L K - 1 ( A P C - コンジュゲート化抗 F L K 1 ; eBiosciences ) 、 c - K i t ( P E - c y 7 - コンジュゲート化抗 c - K i t ; BD Biosciences ) 及び C D 4 5 ( A P C - コンジュゲート化抗 C D 4 5 ; BD Biosciences ) の検出のために染色する。アポトーシス細胞の検出のために、細胞を 7 - A A D ( EMD Biosciences ) で染色する。C D 4  $^+$  T 細胞の細胞内 I F N 、 I L - 1 0 、及び I L - 1 7 の検出のために、プレフェルジン A ( 1 0  $\mu$  g / m L ) の存在下、細胞を P M A ( 5 0 n g / m L ) 及びイオノマイシン ( 5 0 0 n g / m L ) で 4 時間刺激し、その後、ペリジニン - クロロフィル - タンパク質 ( P e r C P ) - c y c 5 . 5 コンジュゲート化抗 C D 4 、 P E コンジュゲート化抗 V 8 . 1 / 8 . 2 及び F I T C コンジュゲート化抗 C D 8 抗体 (BD Biosciences) で染色する。

### 【 0 1 6 1 】

細胞内マーカのために、次に細胞を 2 % ホルムアルデヒドで固定し、0 . 2 % サポニンで透過処理して、P E - c y 7 - コンジュゲート化抗 I F N 、 A P C - コンジュゲート化抗 I L - 1 0 又は A P C - コンジュゲート化抗 I L - 1 7 抗体 (eBiosciences) で染色する。Beckman Coulter CyAn ADP を用いて試料を読み取り、Summit V4.3 (Dako) を用いてデータを解析する。Beckman Coulter MoFlo XDP ソーダを用いて、細胞選別 ( > 9 8 % 純度 ) を実施する。

### 【 0 1 6 2 】

#### 組織学的分析のための組織試料調製

膵臓を組織凍結培地 (Triangle Biomedical Sciences) 中で凍結し、不連続の 8  $\mu$  m 厚切片を 1 5 0  $\mu$  m 離して切り出す。組織学的手順の前に、切片を 4 % ホルムアルデヒド中で 1 0 分間固定する。組織における e G F P 発現の検出のために、膵臓を 4 % ホルムアルデヒド中、4 で 4 時間固定し、凍結前に 3 0 % スクロース中に一晩浸漬する。その後、H & E 染色を実施して、膵島炎を分析する。

### 【 0 1 6 3 】

10

20

30

40

50

### 免疫組織化学的検査

細胞の検出のために、臍臓切片をH R P コンジュゲート化抗インスリンアフィボディー抗体 (Abcam) と共にインキュベートして、スライドをD A B クロモゲン及び基質 (Scy Tek) と共に5分間インキュベートすることにより、インスリン<sup>+</sup>細胞を同定する。核をヘマトキシリソで対比染色する。

#### 【0164】

### 免疫蛍光

臍臓切片を、1% B S A、10% ヤギ又はロバ血清、及び0.2% Triton X-100を含有するP B S 溶液で処置する。その後、切片を一次抗体 (ウサギ抗インスリン (Santa Cruz) 、モルモット抗インスリン (Abcam) 、ウサギ抗P E C A M 1 (Santa Cruz) 、ウサギ抗K i 6 7 (Abcam) 、ヤギ抗V E G F (Santa Cruz) ) 中、4で一晩インキュベートする。スライドをP B S 中のTriton X-100で3回洗浄し、その後、対応する二次抗体 (テキサスレッドコンジュゲート化ヤギ抗ウサギI g G、F I T C コンジュゲート化ヤギ抗モルモットI g G、F I T C コンジュゲート化ロバ抗ヤギI g G ; Santa Cruz) ; DyLight 405コンジュゲート化ロバ抗ウサギI g G 又はDyLight 549コンジュゲート化ロバ抗ヤギI g G (Jackson ImmunoResearch) により室温で1時間染色する。幾つかの実験において、細胞核をD A P I (Santa Cruz) で対比染色する。

#### 【0165】

### レーザキャプチャマイクロダイセクション

臍臓切片を、インスリン又はP E C A M 1について染色して、Arcturus脱水成分で完全に脱水する。インスリン<sup>+</sup>又はP E C A M 1<sup>+</sup>細胞をCapSure HS LCMキャップ及びAutopix 100レーザキャプチャマイクロダイセクションシステムで、製造業者の使用説明書に従って切り出す。個々のマウスについて、細胞を3~10の不連続切片から切り出す。Pico Pure DNA抽出キット (Applied Biosystems) を用いて、ゲノムD N Aを切り出された細胞から抽出する。

#### 【0166】

### P C R によるY染色体の検出

Y染色体及び-アクチンの検出は、20ng D N Aテンプレート及びMaxima q P C RマスターMix (Fermentas) を用いて実施する。

#### 【0167】

### 定量P C R 分析

TRI R N A 単離試薬 (Sigma) を用いて、総R N Aを臍島から抽出する。Power SYBR Greenキット及びStepOnePlus装置 (Applied Biosciences) を用いて、定量P C Rを実施する。内部制御18SリボソームR N A発現での標準化の後、相対量 (R Q) を、C Tに基づいて計算する。

#### 【0168】

本明細書に記載された目下好ましい実施形態への様々な変更及び改良が当業者に明白であることは、理解されるはずである。そのような変更及び改良は、開示された方法の主旨及び範囲を逸脱せずに、そして意図する利点を損なうことなく実行され得る。それゆえ、そのような変更及び改良は、添付の特許請求の範囲に含まれるものとする。

#### 【0169】

### 実施例2：I g - G A D 2による免疫調整は顕性I型糖尿病を克服するのに十分でない

抗原特異性療法を、顕性T 1 Dの対象においてテストした。模範的方法において、G A D 2ヌクレオチド配列を、P C R 突然変異誘発により91A 3重鎖のC D R 3可変領域に挿入して、得られたキメラ重鎖遺伝子を、D N A配列決定により分析した (実施例1参照)。

#### 【0170】

意外にも、I g - G A D 2処置は高血糖マウス全匹において正常血糖を復帰させたが、顕性糖尿病マウスのいずれも、糖尿病から回復しなかった (図1A)。より興味深いこととして、罹患した動物は、過去に高血糖マウスの処置で観察された免疫調整と同様に、脾

10

20

30

40

50

臓において Th17 細胞の絶滅及び Th1 細胞の保持を示した(図 1 B ~ D) (Jain et al., J. Exp. Med. 205:207-218 (2008))。実際に、Ig-GAD2 処置された糖尿病マウスは、非処置の罹患マウスに比較して、IFN- $\gamma$  及び / 又は IL-10 を産生する CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ V8.1 / 8.2 $^{+}$  T 細胞の頻度を上昇させたが(図 1 B)、脾臓又は臍臓における Th17 細胞を減少させた(図 1 C)。さらに、シグネチャ-転写因子 T-bet 及び ROR $\gamma$ t それぞれの mRNA が有意に減少したことから、臍臓内の Th1 又は Th17 細胞が減少している(図 1 D)。総括すると、Ig-GAD2 による免疫調整は、顕性糖尿病マウスにおいて正常血糖を復帰させるのに十分でない。

### 【0171】

#### 実施例 3 : BM 細胞移植と Ig-GAD2 処置の併用が顕性 T1D を克服する

骨髄(BM)移植を実施して、Ig-GAD2 の同時処置及び細胞交換療法が、顕性糖尿病からの持続的回復をもたらすかどうかを検証した。したがって健常ドナーからの BM 細胞移植を、70 日 Ig-GAD2 処置と併用し、正常血糖の復帰について評価した(図 2 A に示された処置の略図)。Ig-GAD2 及び BM 移植の両方(Ig-GAD2 + BM)を与えたマウスの大部分は、BM が雄ドナー由来か、又は雌ドナー由来かにかかわらず疾患を防御したが、Ig-GAD2 又は BM を単独で与えられたマウスでは、防御が観察されなかった(図 2 B)。処置は、糖尿病の発病に伴うインスリン抵抗性を排除した(図 8)。Ig-GAD2 + BM レジメンで処置された糖尿病マウスは、Ig-GAD2 単独のレシピエントと同様に、IFN- $\gamma$  及び / 又は IL-10 を産生する CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ V8.1 / 8.2 $^{+}$  T 細胞の頻度を上昇させたが(図 2 C)、脾臓及び臍臓内の Th17 細胞は減少させた(図 2 D)。対照的に、BM 単独の糖尿病マウスレシピエントは、罹患したままであり、IFN- $\gamma$  及び / 若しくは IL-10 を産生する細胞の増加、又は Th17 細胞の減少をもたらさなかった(図 2 C ~ D)。その上、Ig-GAD2 + BM 群の臍臓において、T-bet 及び ROR $\gamma$ t の mRNA は、BM 単独の動物レシピエントに比較して有意に減少しており(図 2 E)、Th1 及び Th17 細胞の両者ともこの部位では極わずかであったことが示された。つまり、Ig-GAD2 レジメンに BM 移植を追加することで、免疫調整に影響を及ぼさずに糖尿病から持続的に回復させた。

### 【0172】

#### 実施例 4 : BM 移植は Ig-GAD2 と相乗作用して健常な臍島の形成を誘導する

Ig-GAD2 + BM は、Ig-GAD2 単独とは異なり、正常血糖を復帰させたため、BM 移植の追加が、Ig-GAD2 により縮小された極わずかの炎症の下で発達し得る細胞の再生を持続させた可能性がある。これらの前提を試すために、BM 単独の Ig-GAD2 のレシピエントに比較して、正常血清への一貫した回復を示した Ig-GAD2 + BM 処置マウス(図 3 A)を、臍臓浸潤の減少及び健常な臍島の形成について検証した。Ig-GAD2 + BM 処置のマウスレシピエントは、臍島炎がほとんどない臍島又は臍島周囲炎の形態で最小の浸潤を有する臍島を有した(図 3 B ~ C)。糖尿病から回復することができた Ig-GAD2 単独のマウスレシピエントは、臍島周囲炎を含まない臍島を有し、効果的な免疫調整を示した。対照的に、BM 単独の動物レシピエントは、ほとんどが重度の臍島炎を有した(図 3 B ~ C)。その上、Ig-GAD2 + BM で処置されたマウスは、インスリン陽性細胞が多数存在する構成された臍島を有したが、Ig-GAD2 又は BM を単独で与えられたマウスは、非処置の最近診断された糖尿病マウスと同様に臍島が小さく、細胞が少なかった(図 3 D)。編集された結果から、Ig-GAD2 + BM 処置マウスにおいては、Ig-GAD2 又は BM 単独の動物レシピエントでは明らかでなかった、インスリン産生 細胞の数、臍島の数、及び 細胞塊の数の有意な増加が示される(図 3 E ~ G)。つまり BM 細胞の増加が、Ig-GAD2 による免疫調整と相乗作用して、発達及び正常血糖の維持が可能な 細胞数の増加を持続させた。

### 【0173】

#### 実施例 5 : BM 移植及び Ig-GAD2 処置のマウスレシピエントは臍島内の内皮細胞数增加を示す

Ig-GAD2 + BM で処置されたマウスにおいて新たに形成された 細胞の起源を決

10

20

30

40

50

定するために、NOD-GFPマウスをBMの供給源として用い、インスリン産生 細胞を処置後のGFP発現について評価した。結果から、Ig-GAD2+BM処置間の任意の時点でGFP/インスリン共局在化が存在しないことが示される(図9)。さらに、糖尿病のないマウスに豊富なGFP<sup>+</sup>細胞が、同じレジメンを受けながらも糖尿病が残ったそれらのレシピエントでは極わずかであった(図9)。つまりBM移植は、インスリン産生 細胞の供給源として働くとは考えられず、むしろ回復したマウスの膵島においてGFP<sup>+</sup>細胞の生着をもたらした。つまりBM移植は、インスリン産生 細胞の供給源として働くとは考えられず、回復したマウスの膵島においてGFP<sup>+</sup>細胞の生着をもたらした。それゆえ、細胞は、意外にも、他のモデルにおいて観察されたようにドナー細胞から発生することはなかった(Hess et al., Nat. Biotechnol., 21:763-770 (2003); Mathews et al., Diabetes, 53:91-98 (2004); Choi et al., Diabetologia, 105:16242-16247 (2003); Lechner et al., Diabetes, 53:616-623 (2004))。

10

#### 【0174】

次の問題は、GFP<sup>+</sup>生着が、宿主のBMにより提供され得ず内在性 細胞の維持に必要とされる細胞を表しているかどうかであった。その結果は、健常マウスに比較して糖尿病マウスでは、循環するPECAM1<sup>+</sup>ECと膵島内PECAM1<sup>+</sup>ECの両方の頻度の有意な低下を示している(図4)。事実、マウスが顕性糖尿病に進行するにつれ、末梢血ECの頻度は劇的に低下した(図4A~B)。同様に、マウスが糖尿病になるにつれ、膵島におけるECの頻度が低下し、それは 細胞の損失と相関する現象であった(図4C~D)。これは、ECの頻度が糖尿病マウスの末梢血及び膵臓の両方で低下することを示している。

20

#### 【0175】

興味深いこととして、Ig-GAD2+BMのマウスレシピエントは、Ig-GAD2又はBMを単独で与えられたマウスとは異なり、膵島におけるPECAM1<sup>+</sup>内皮細胞(EC)を復帰させた(図5A)。さらに、ECの機能的マーカーを代表するVE-カドヘリン(Cdh5)、アンギオポエチン受容体(Tie1)及びVEGF受容体1(Flt1)をコードする遺伝子の発現を分析すると、非処置糖尿病動物に比較してIg-GAD2+BMのマウスレシピエントではこれらの遺伝子でのmRNAが有意に増加していた(図5B)。Ig-GAD2又はBMを単独で与えられたマウスは、該遺伝子発現の同様な増加を示さなかった(図5B)。ECの増加は、より良好な膵島血管分布と 細胞の発達のために血管新生を促進すると考えられる。事実、Ig-GAD2+BMで処置された糖尿病のないマウスの膵臓において、VEGFA(vegfa)、アンギオポエチン1(angpt1)、及びアンギオポエチン2(angpt2)をはじめとする血管形成因子をコードする遺伝子が、強くアップレギュレートした(図10A)。さらに、新たに形成された 細胞は、内皮細胞の発達及び膵島血管分布に不可欠なVEGFAを産生した(図10B)(Brissova et al., Diabetes, 55:2974-2985 (2006); Lammert et al., Curr. Biol., 13:1070-1074 (2003))。内皮細胞と 細胞の間の共生的関連性は、さらにIg-GAD2+BM細胞移植マウスにおける 細胞分裂の並行した復帰によっても示される(図5C)。事実、 細胞は、正常マウスの非刺激の 細胞又は非処置糖尿病マウスの残りの細胞と比較して、増殖マーカーki-67についての有意な染色を示した(図5C)。これらの結果から、Ig-GAD2での処置の間のBM移植が内皮ネットワークの修復を持続させ、 細胞の効率的再生を導くことが示唆される。後者により、極めて重要な血管新生因子VEGFAを産生して共生及び膵島の健康を維持することができた。

30

#### 【0176】

##### 実施例6：ドナーBM移植は膵島内皮細胞を生成する

生着されたドナーBM由来GFP<sup>+</sup>細胞がECを表すかどうかをテストするために、本発明者らは内皮マーカーPECAM1の発現及びインスリン産生 細胞に関する局在化についてGFP<sup>+</sup>細胞を検証した。結果から、糖尿病のないマウスにおいては、処置30及び60日目の両方で2種のマーカーの共局在化に示される通り、PECAM1を発現する膵島内にGFP<sup>+</sup>細胞が存在したことが示される(図6A)。そのような共局在化は、糖尿病

40

50

の残る同じレジメンのマウスレシピエントでは観察されなかった。同じく、GFP<sup>+</sup>PECAM1<sup>+</sup>細胞は、インスリン染色と共に共局在化せず、BM移植がT1D防御の間にECを生成することが示された。これらの観察は、BM移植が雄ドナーからなされた場合に、細胞ではなく内皮細胞内のY染色体が検出されたことにより裏づけられる。事実、Ig-GAD2+BMのマウスレシピエントのかさ高いの臍臓細胞からDNAが抽出された場合に、Y染色体が検出可能であった(図6B)。より具体的には、PECAM1<sup>+</sup>細胞及びインスリン<sup>+</sup>細胞をレーザキャプチャシステムを用いてマイクロダイセクトし、ゲノムDNAをPCRにより分析した場合に、Y染色体がPECAM1<sup>+</sup>細胞で検出され、インスリン<sup>+</sup>細胞では検出されず、これはIg-GAD2+BM移植を受けた糖尿病のないマウスに限定された(図6C~D)。これらの結果から、ドナーBMが糖尿病の回復に必要なECを生成することが示される。

10

## 【0177】

実施例7: 内皮前駆細胞はBM移植物の代用となり、T1Dの改善のためにIg-GAD2を支援する

Ig-GAD2処置を伴うドナーEPCの移植が成熟ECを生成し、細胞の生存及び機能、並びに正常血糖の復帰を支援し得るかをテストするために、EPCを健常NOD-GFPマウスのBMから精製して、全BMの代用とした。特に、EPCマーカc-Kit及びFLK-1を発現するBM系譜陰性(Lin<sup>-</sup>)集団は、週齢の適合する健常マウスに比較して糖尿病マウスで有意に減少した(図7A~B)。

20

## 【0178】

健常ドナーからの精製GFP<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>FLK-1<sup>+</sup>(hFLK-1<sup>+</sup>)細胞を移植して、Ig-GAD2での処置の間に全BM移植物を置き換えると、マウスのほとんどで疾患の回復が得られたが、Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>FLK-1<sup>+</sup>(hFLK-1<sup>+</sup>)細胞を与えられた対照群は、60倍多い細胞数を受けたにもかかわらず、かなり低い回復率を有した(図7C)。加えて、Ig-GAD2を用いずにhFLK-1<sup>+</sup>細胞を移植した場合には、疾患からの有意な回復が観察されなかった(図7C)。FLK-1<sup>+</sup>細胞が罹患したNOD-GFPマウス(sFLK-1<sup>+</sup>)に由来する場合、疾患からの回復率が非常に低くなつた(図7C)。その上、これらのマウスの臍島において明らかなGFP<sup>+</sup>細胞が存在せず、このことからPECAM1<sup>+</sup>細胞が増加しなかつたことが説明される(図7Dの右図と左図を比較)。事実、Ig-GAD2+FLK-1<sup>+</sup>細胞又はIg-GAD2を受けていないFLK-1<sup>+</sup>細胞の下で糖尿病から回復しなかつたマウスで、類似の結果が観察された(図7D)。これらの結果から、EPCがBM移植の代用になり得、成熟ECを生成して細胞の発達及び正常血糖の復帰を支援し得ることが示される。さらに、EPCの成熟及びECの増加は、EPCが健常ドナーから生成された場合のみで起こっており、このことから臍臓内皮ネットワークの修復のために自身のEPCを利用することができないことが説明される。

30

## 【0179】

実施例8: 1型糖尿病対象の処置

T1D対象において、ある量の1種以上の幹細胞及び/又は前駆細胞と、ある量の少なくとも1種の抗原特異性治療薬と、を含む組成物の効果を決定する試験を実施する。例えば、T1Dと診断されたヒト対象において、ある量の1種以上の幹細胞及び/又は前駆細胞と、ある量の少なくとも1種の抗原特異性治療薬と、を含む組成物の体重に基づく用量又は固定用量での処置を評価するために、多施設無作為二重盲検プラセボ対照試験を実施した。より具体的には、ある量の1種以上の幹細胞及び/又は前駆細胞と、ある量の少なくとも1種の抗原特異性治療薬と、を含む組成物の有効性及び安全性を検証するために、臨床試験を実施した。該組成物は、T1Dの予防を含む処置に有効である。

40

## 【0180】

他に断りがなければ、特許明細書及び特許請求の範囲で用いられる成分の量、分子量、反応条件などの特性を表す数値は全て、用語「約」により全ての例で改良されることが理解されなければならない。したがって、反することが記載されない限り、特許明細書及び

50

添付の特許請求の範囲に示された数値パラメータは、近似値であり、本開示により得られるよう探求された所望の特性に応じて変動し得る。各数値パラメータは、いずれにしても特許請求の範囲と同等の教理の適用を限定する試みとしてではなく、少なくとも報告された有効数字の数を考慮して、そして通常の丸め方法を適用することにより解釈されなければならない。

【0181】

本開示の広範囲を示す数値の範囲及びパラメータは近似値であるが、具体的な例で示された数値は、可能な限り正確に報告されている。しかし任意の数値は、本来、各テスト測定で見出される標準偏差から必然的に生じる特定の誤差を含む。

【0182】

本開示を記載する文脈（特に、以下の特許請求の範囲の文脈）において用いられる用語「a」、「a n」、「t h e」及び同様の指示対象は、本明細書で他に断りがなければ、又は文脈に明白な矛盾がなければ、単数及び複数の両方を含むと解釈されなければならない。本明細書の値範囲の列举は、その範囲に含まれる各別個の値を個別に参照する省略表現法に過ぎない。本明細書で他に断りがなければ、個々の値は、本明細書で個別に引用されるのと同様に、本明細書に取り込まれる。本明細書に記載された方法は全て、本明細書に他に示されない限り、又は文脈に明らかな矛盾がない限り、任意の適切な順序で実施することができる。本明細書に示されたあらゆる例、又は例示的言語（例えば、「などの」）の使用は、本開示をよりうまく例示しているに過ぎず、請求された本開示の範囲に限定を設けているのではない。本明細書内の言語は、本開示の実践に不可欠な任意の非請求要素を示していると解釈すべきではない。

10

【0183】

本明細書に開示された開示の別の要素又は実施形態のグループ化を、限定とみなすべきではない。各群の構成要素は、個別に、又は群の他の構成要素若しくは本明細書に見出された他の構成要素との任意の組み合わせで参照及び請求され得る。群の1つ以上の構成要素が簡便性及び／又は特許要件の理由で群に含まれ得る、又は群から削除され得ることが、予測される。任意のそのような包含又は削除が行われれば、本明細書が改良された群を含み、これにより添付の特許請求の範囲で用いられる全てのマーカッシュ群の記述を満たすと思われる。

20

【0184】

本開示を実施するための本発明者らに知られる最良の態様をはじめとする本開示の特定の実施形態が、本明細書に記載されている。もちろん、これらの記載された実施形態への変更は、前述の記載を読むことで当業者に自明となろう。本発明者は、当業者がそのような変更を適宜利用するものと期待しており、本発明者らは、本明細書が本明細書に具体的に記載された以外の方法で実践されることを意図している。したがってこの開示は、適用可能な法律により許容される、本明細書に添付された特許請求の範囲内に引用された主題の全ての改良及び均等物を含む。その上、全ての可能な変更における先に記載された構成要素の任意の組み合わせは、本明細書に他に示されない限り、又は文脈に明らかな矛盾がない限り、本開示に包含される

30

【0185】

本明細書に開示された具体的実施形態は、言語「からなる」又は／及び「本質的に～からなる」ことをを利用して特許請求の範囲においてさらに限定され得る。出願されるか、又は修正案で追加されるかにかかわらず、特許請求の範囲で用いられる場合に、移行句「からなる」は、特許請求の範囲内で特定されていない任意の要素、ステップ又は原料を除外する。移行句「本質的に～からなる」は、特許請求の範囲を、特定された材料又はステップと、基本的及び新規な特徴に著しく影響を及ぼさない材料又はステップに限定するものである。そのように請求された開示の実施形態が、本明細書に本質的又は明示的に記載され、資格を与えられている。

40

【0186】

本明細書に開示された開示の実施形態が、本開示の原理の例示であることが、理解され

50

なければならない。用いられ得る他の改良は、本開示の範囲に含まれる。つまり限定ではなく例として、本開示の別の形態を、本明細書内の技術に従って利用することができる。したがって本開示は、図示及び記載されたまさにそれに限定されない。

## 【0187】

本開示を、様々な具体的な材料、手順及び実施例を参考することで本明細書に記載及び例示したが、本開示がその目的で選択された材料及び手順の特別な組み合わせに制限されないことを理解されたい。当業者に認識される通り、そのような詳細の数多くの変形例が暗示され得る。本明細書及び実施例が単に模範に過ぎず、本開示の真の範囲及び主旨は、以下の特許請求の範囲に示されるものとする。本出願で参照される全ての参考資料、特許、及び特許出願は、全体として参考により本明細書に取り込まれる。

10

## 【表1】

配列表

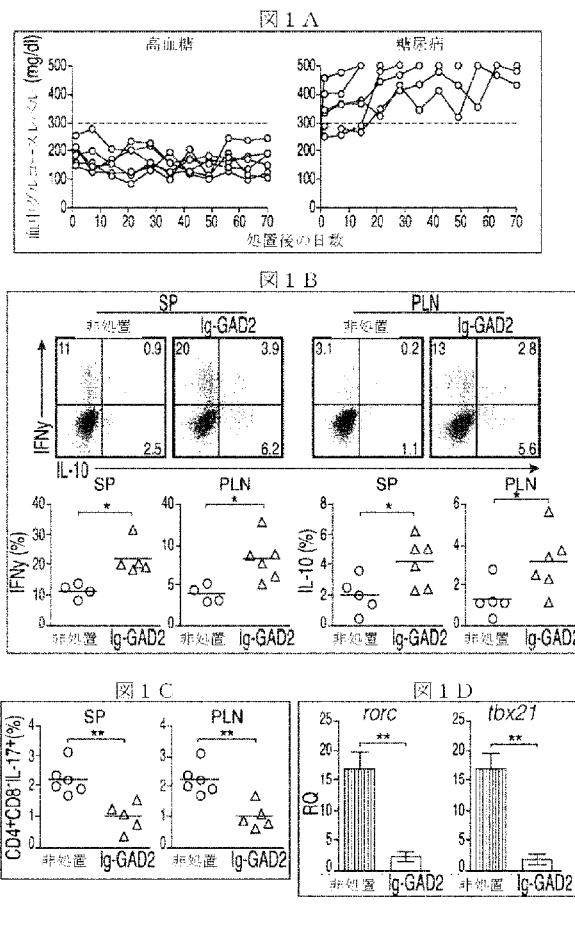
SEQ ID No.	種類	配列
1	GAD2	TYEIAPIVFLLEYVT
2	GAD1	SRLSKVAPVIKARMMEYGT
3	INS $\beta$	SHLVEALYLVCGERG
4	Y染色体 フォワード	GGT GAG AGGCACAAGTTGG
5	Y染色体 リバース	ATCTCTGTGCCTCCTGGAAA
6	$\beta$ -アクチン フォワード	GCTTCTTGAGCTCCTCGTTGC
7	$\beta$ -アクチン リバース	GTGTCCGTTCTGAGTGATCCTCAG
8	<i>angpt1</i> フォワード	AGCATCTGGAGCATGTGATGGA
9	<i>angpt1</i> リバース	TATCTCAAGCATGGTGGCCGT
10	<i>angpt2</i> フォワード	AACACCGAGAAGATGGCAGTGT
11	<i>angpt2</i> リバース	AGACAAACTCATTGCCAGCCA
12	<i>cdh5</i> フォワード	TTCGCACCAAGGTATTCAACGCA
13	<i>cdh5</i> リバース	TCATCTGCATCCACTGCTGTCA
14	<i>fli1</i> フォワード	TGCAGGAAACCACAGCAGGAA
15	<i>fli1</i> リバース	TTCAATGTTGCAGGCAGCCAT
16	<i>tiel</i> フォワード	CAGCATGAAACTTCGCAAGCCA
17	<i>tiel</i> リバース	TGGGCACCTCAAACCTCTGCTGT
18	<i>vegfa</i> フォワード	TGCAGGCTGCTGTAACGATGAA
19	<i>vegfa</i> リバース	TGCTGTGCTGTAGGAAGCTCAT
20	<i>tbx21</i> フォワード	TCCAAGTTCAACCAGCACCAGA
21	<i>tbx21</i> リバース	TCCACCAAGACCACATCCACAA
22	<i>rorc</i> フォワード	ACAGCCACTGCATTCCCAGTTT
23	<i>rorc</i> リバース	TCTCGGAAGGACTTGCAGACAT

20

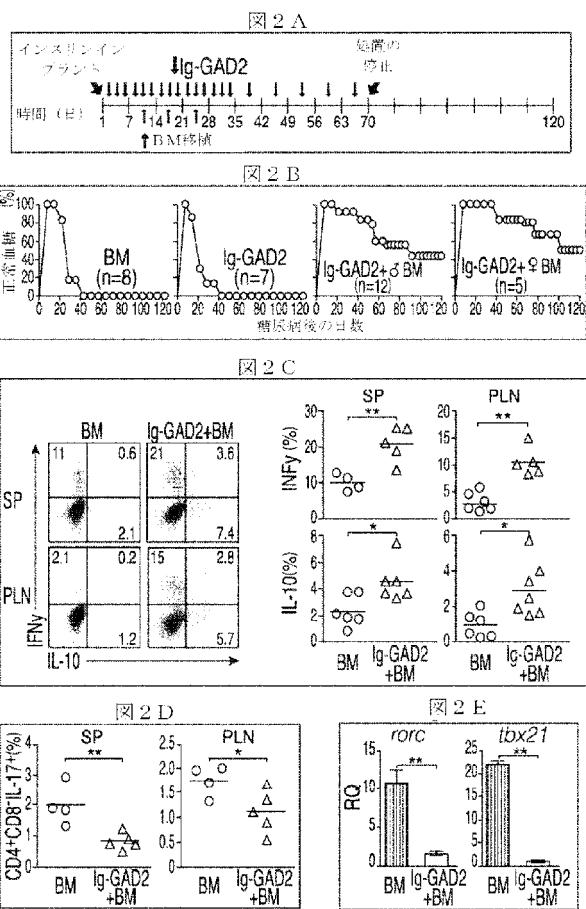
30

40

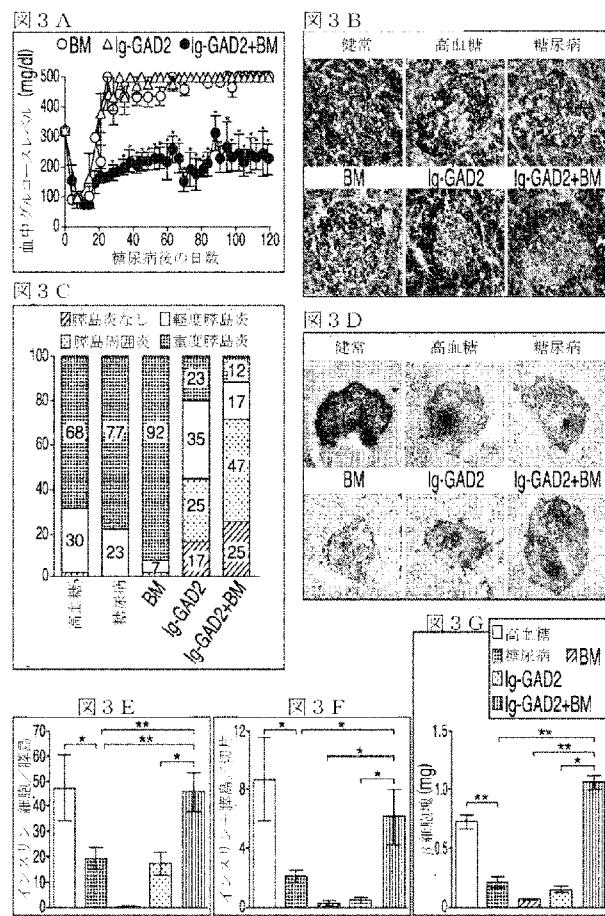
【図1】



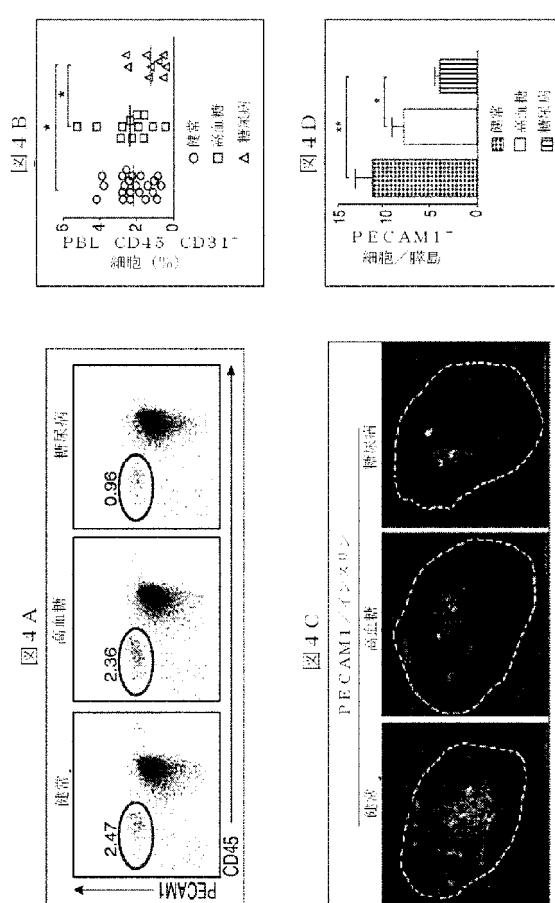
【図2】



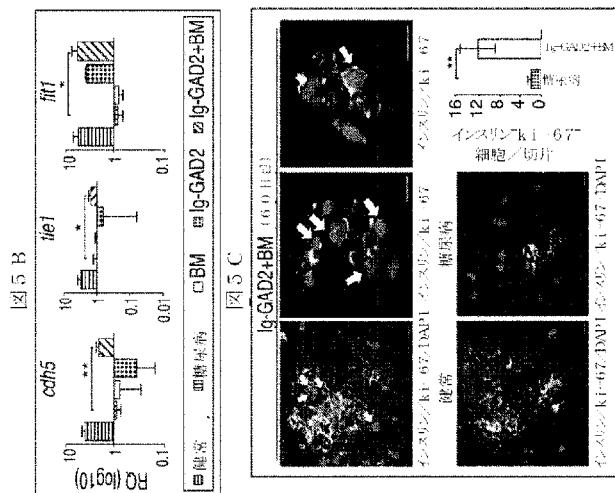
【図3】



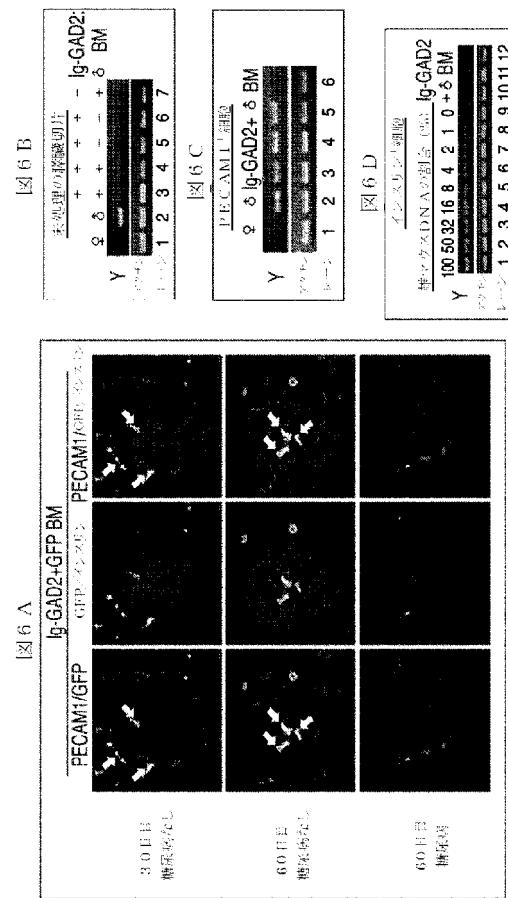
【図4】



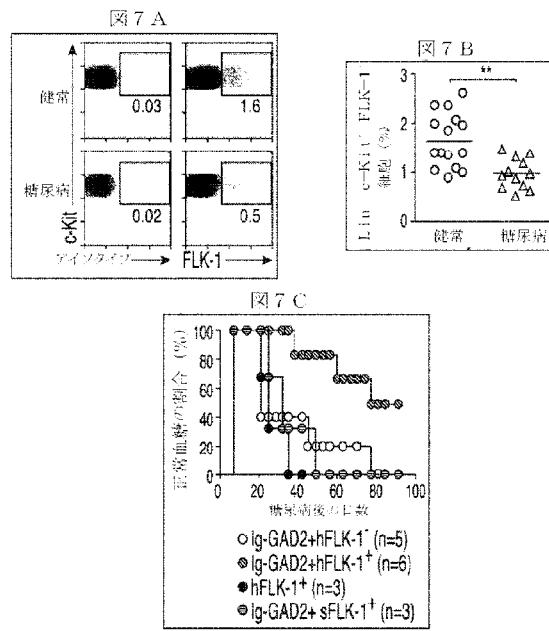
【図5】



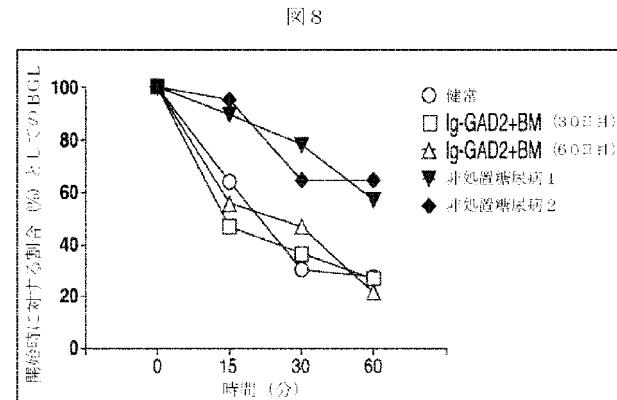
【図6】



【図7】

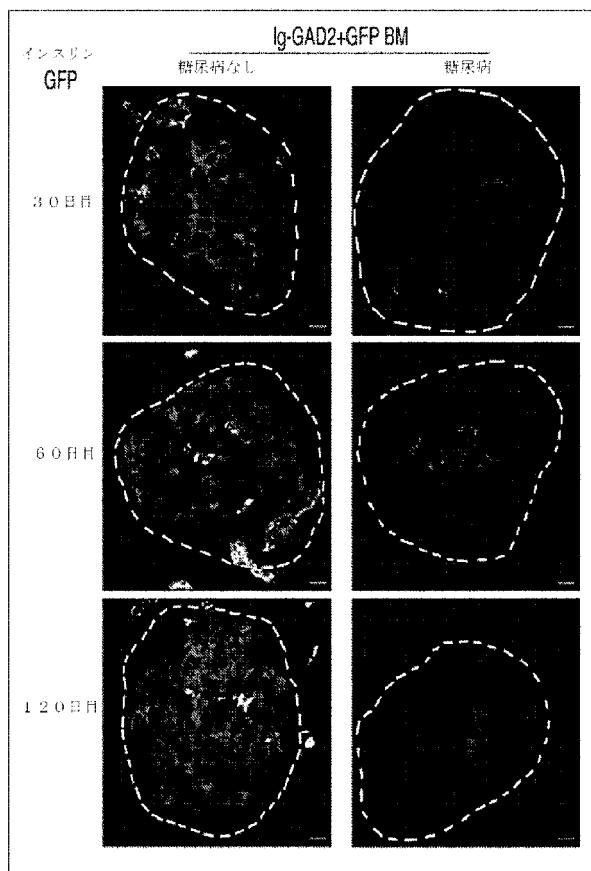


【図8】



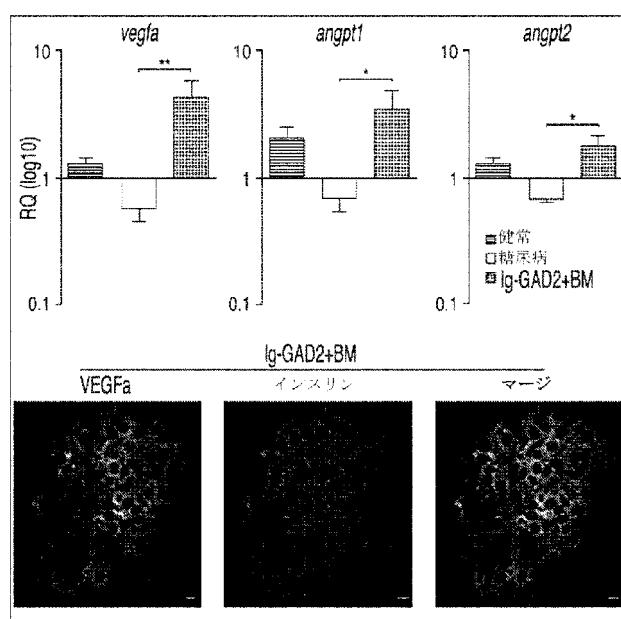
【図9】

図9



【図10】

図10



【配列表】

2016510766000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成27年12月9日(2015.12.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2016510766000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 14/22321
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12N 5/07, C12N 5/16, A61K 38/00 (2014.01) USPC - 435/328, 435/331, 514/6.9, 435/326, 435/336 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12N 5/07, C12N 5/16, A61K 38/00 (2014.01) USPC: 435/328, 435/331, 514/6.9, 435/326, 435/336		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/325, 435/327, 530/326		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, PubWest, Google Scholar, Google Patents: Diabet*, stem'cell\$, progenitor cell\$, totipotent, pluripotent, multipotent, unipotent, endothelial, bone marrow endothelial, allogenic, autologous, bone marrow, allogenic autologous, Immunoglobulin, antibody, himer*, fusion, fused, hybrid, GAD2, CDR3, INS beta, GAD1		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/0058105 A1 (NG et al.) 08 March 2012 (08.03.2012) abstract, para [0058], [0064], [0082], [0086], [0115], [0128], [0159], [0266]	1-9, 15-20, 27-28
Y	US 7,744,876 B2 (ZAGHOUANI et al.) 29 June 2010 (29.06.2010); abstract; SEQ ID NOs: 1, 3, 4, col 9, ln 17-20 and 54-62; col 10, ln 8-14	10-14, 21-26, 29
Y	US 2008/0241106 A1 (AUSTEN et al.) 02 October 2008 (02.10.2008); abstract; para [0071]	10-14, 21-26
		29
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 13 May 2014 (12.05.2014)		Date of mailing of the international search report <b>02 JUN 2014</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: <b>Lee W. Young</b> PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	

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

F ターム(参考) 4C085 AA34

4C087 AA01 AA02 BB44 BB64 CA04 MA02 NA13 ZC35 ZC75