(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-521419
(P2024-521419A)
(43)公表日　令和6年5月31日(2024.5.31)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）	
Ｃ１２Ｎ	*1/19 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19	ＺＮＡ	４Ｂ０６５
Ｃ０７Ｋ	*16/18 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/18		４Ｃ０８４
Ｃ０７Ｋ	*16/24 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/24		４Ｃ０８５
Ｃ０７Ｋ	*16/10 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/10		４Ｃ０８７
Ｃ０７Ｋ	*19/00 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		４Ｈ０４５

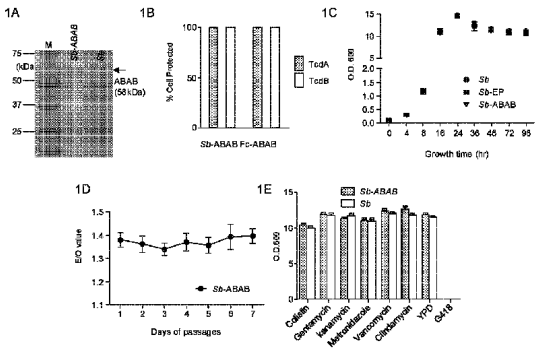
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全179頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-575845(P2023-575845)
(86)(22)出願日　令和4年6月10日(2022.6.10)
(85)翻訳文提出日　令和6年2月8日(2024.2.8)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/033037
(87)国際公開番号　WO2022/261455
(87)国際公開日　令和4年12月15日(2022.12.15)
(31)優先権主張番号　63/209,651
(32)優先日　令和3年6月11日(2021.6.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/299,693
(32)優先日　令和4年1月14日(2022.1.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/317,385
最終頁に続く

(71)出願人　521525310
フザタ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　２１２２７　メリーランド州，ハレソープ，エス．ローリング　ロード　１４５０，スイート　４１０１
(74)代理人　110002572
弁理士法人平木国際特許事務所
(72)発明者　ユー，ホワ
アメリカ合衆国　２１２２７　メリーランド州，ハレソープ，エス．ローリング　ロード　１４５０，スイート　４１０１
(72)発明者　ニャサエ，リディア
アメリカ合衆国　２１２２７　メリーランド州，ハレソープ，エス．ローリング　ロード　１４５０，スイート　４１０１
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　予防薬及び治療剤としての遺伝子改変されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母株

(57)【要約】
本開示は、治療用ポリペプチド（複数可）を発現し、かつ／又は治療用ポリペプチド（複数可）をコードする核酸を含む酵母の操作された株、並びにそれのための方法及び使用に関する。
【選択図】図１



FIGs. 1A-1E

【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株であって、
治療用ポリペプチドをコードする核酸の少なくとも１つの部位特異的染色体挿入を含み、
前記治療用ポリペプチドが、抗原結合ドメインを含む結合タンパク質、免疫グロブリン、抗体、サイトカイン、ホルモン、及びケモカイン、又はそれらの組み合わせから選択される、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項２】
前記酵母が、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｂｏｕｌａｒｄｉｉである、請求項１に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項３】
ＵＲＡ３の完全又は部分的な欠失を更に含む、請求項１又は２に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項４】
ＧＡＰ１の完全又は部分的な欠失を更に含む、請求項１～３のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項５】
前記酵母が、ｕｒａ３（－／－）及びｇａｐ１（－／－）である、請求項１～４のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項６】
前記治療用ポリペプチドをコードする核酸が、前記酵母のゲノム内の少なくとも２つの異なる位置、又は前記酵母のゲノム内の少なくとも１つのホットスポットに組み込まれる、請求項１～５のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項７】
前記治療用ポリペプチドをコードする核酸が、少なくとも２つの異なる染色体に組み込まれる、請求項１～６のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項８】
前記少なくとも２つの異なる染色体が、染色体ＶＩＩ及びＸＶＩを含む、請求項７に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項９】
前記酵母のゲノムに組み込まれるジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）をコードする核酸配列を更に含み、前記ＤＨＦＲが、任意選択的に哺乳動物ＤＦＨＲである、請求項１～８のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項１０】
酵母ＤＦＲ１をコードする１つ以上の外因性核酸を更に含む、請求項１～９のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項１１】
前記治療用ポリペプチドが、ＶＨＨ、Ｆｃ－ＶＨＨ、ＶＨＨ－Ｆｃ、ＶＨＨ－ＶＨＨ、ＶＨＨ－ＶＨＨ－ＶＨＨ－ＶＨＨ、Ｆｃ－ＶＨＨ－ＶＨＨ、ＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨ、及びＶＨＨ－ＶＨＨ－Ｆｃから選択される構造を含む結合タンパク質であり、前記ＶＨＨ又はＦｃドメインのうちの各々又はいずれかが、任意選択的なリンカー配列を介して別のＶＨＨ又はＦｃドメインに接続している、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項１２】
前記治療用ポリペプチドが、ＴｃｄＡ、ＴｃｄＢ、又はそれらの組み合わせに結合する結合タンパク質である、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。

【請求項１３】
前記治療用ポリペプチドが、配列番号５のアミノ酸配列を含む、請求項１２に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項１４】
前記治療用ポリペプチドが、ＴＮＦ－αに結合する結合タンパク質である、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項１５】
前記結合タンパク質が、ＩｇＧであるか、又は少なくとも１つのＶＨＨドメインを含む、請求項１４に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項１６】
治療用タンパク質が、配列番号６、７、１９、及び２０のうちのいずれか１つから選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１４又は１５に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項１７】
前記治療用ポリペプチドが、ＩＬ－１７Ａに結合する結合タンパク質である、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項１８】
前記結合タンパク質が、ＩｇＧであるか、又は少なくとも１つのＶＨＨドメインを含む、請求項１７に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項１９】
治療用タンパク質が、配列番号２５のアミノ酸配列を含む、請求項１７又は１８に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項２０】
前記治療用ポリペプチドが、ＴＮＦ－α及びＩＬ－１７Ａに結合する二重特異性結合タンパク質である、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項２１】
前記結合タンパク質が、ＩｇＧであるか、又は少なくとも２つのＶＨＨドメインを含む、請求項２０に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項２２】
治療用タンパク質が、配列番号８、９、及び１０のうちのいずれか１つから選択されるアミノ酸配列を含む、請求項２０又は２１に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項２３】
前記治療用ポリペプチドが、ノロウイルス又はロタウイルスに結合する結合タンパク質である、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項２４】
前記結合タンパク質が、ＩｇＧであるか、又は少なくとも１つのＶＨＨドメインを含む、請求項２３に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項２５】
治療用タンパク質が、配列番号１３、１４、１５、及び１６のうちのいずれか１つから選択されるアミノ酸配列を含む、請求項２３又は２４に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項２６】
前記治療用ポリペプチドが、ｃｗｐ８４に結合し、リジンドメインと融合するＶＨＨである、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項２７】
治療用タンパク質が、配列番号２１及び２２のうちのいずれか１つから選択されるアミ

ノ酸配列を含む、請求項２６に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項２８】
前記治療用ポリペプチドが、サイトカイン又はケモカインである、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項２９】
前記サイトカインが、ＩＬ－２２又はＩＬ－１０である、請求項２８に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項３０】
前記サイトカイン又はケモカインが、Ｆｃドメインに融合される、請求項２８又は２９に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項３１】
治療用タンパク質が、配列番号１１、１２、及び２７のうちのいずれか１つから選択されるアミノ酸配列を含む、請求項２８～３０のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項３２】
前記治療用ポリペプチドが、ＧＬＰ１である、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項３３】
治療用タンパク質が、配列番号１７、２３、及び２４のうちのいずれか１つから選択されるアミノ酸配列を含む、請求項３２に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項３４】
前記治療用ポリペプチドが、レプチンである、請求項１～１０のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項３５】
治療用タンパク質が、配列番号１８のアミノ酸配列を含む、請求項３４に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項３６】
前記酵母が、そのゲノムに組み込まれる前記治療用ポリペプチドをコードする前記核酸の少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、若しくは少なくとも１０、又はそれより多くのコピーを含む、請求項１～３５のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項３７】
第２の治療用ポリペプチドをコードする第２の核酸の少なくとも１つの部位特異的染色体挿入を更に含み、
前記第２の治療用ポリペプチドが、ＶＨＨドメインを含む結合タンパク質、免疫グロブリン、サイトカイン、及びケモカイン、又はそれらの組み合わせから選択される、請求項１～３６のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株。
【請求項３８】
対象に、請求項１～２７のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を投与することを含む、インビボで抗原に結合する方法。
【請求項３９】
前記抗原が、ＴｃｄＡ、ＴｃｄＢ、ＴｃｄＡ及びＴｃｄＢの両方、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１７Ａ、ＴＮＦ－α及びＩＬ－１７Ａの両方、ｃｗｐ８４、ロタウイルスタンパク質、又はノロウイルスタンパク質から選択される、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
疾患又は状態を治療又は予防する方法であって、それを必要とする対象に、有効量の請求項１～３７のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を投与することを含む、方法。

【請求項４１】
前記疾患又は状態が、炎症性状態である、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
前記炎症性状態が、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、腸の炎症、クローン病、及び潰瘍性大腸炎から選択される、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記疾患又は状態が、感染である、請求項４０に記載の方法。
【請求項４４】
前記感染が、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ感染、ノロウイルス感染、ロタウイルス感染、又はそれらの組み合わせである、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記対象が、更にＩＢＤを有する、請求項４３又は４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記疾患又は状態が、過敏性腸症候群（ＩＢＳ）である、請求項４０に記載の方法。
【請求項４７】
前記疾患又は状態が、神経変性疾患である、請求項４０に記載の方法
【請求項４８】
前記疾患又は状態が、糖尿病である、請求項４０に記載の方法。
【請求項４９】
前記疾患又は状態が、肥満である、請求項４０に記載の方法。
【請求項５０】
前記疾患又は状態が、脂肪肝疾患である、請求項４０に記載の方法。
【請求項５１】
前記疾患又は状態が、代謝疾患である、請求項４０に記載の方法。
【請求項５２】
前記疾患又は状態が、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）である、請求項４０に記載の方法。
【請求項５３】
前記疾患又は状態が、自己免疫疾患である、請求項４０に記載の方法。
【請求項５４】
Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を選択する方法であって、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母が、前記酵母のゲノムに組み込まれるジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）をコードする核酸配列、酵母ＤＦＲ１をコードする１つ以上の外因性核酸、又はそれらの組み合わせを含み、前記方法が、前記Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母をメトトレキサート及びスルファニルアミドと接触させることを含む、方法。
【請求項５５】
前記ＤＨＦＲが、哺乳動物ＤＨＦＲである、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記メトトレキサートが、１ｎＭ～１ｍＭの濃度である、請求項５４又は５５に記載の方法。
【請求項５７】
前記スルファニルアミドが、０．１～１０ｍｇ／ｍＬの濃度である、請求項５４～５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５８】
前記Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株が、
治療用ポリペプチドをコードする核酸の少なくとも１つの部位特異的染色体挿入を含み、
前記治療用ポリペプチドが、抗原結合ドメインを含む結合タンパク質、免疫グロブリン、抗体、サイトカイン、ホルモン、及びケモカイン、又はそれらの組み合わせから選択される、請求項５４～５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５９】

前記酵母が、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｂｏｕｌａｒｄｉｉである、請求項５４～５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０】
前記酵母が、ｕｒａ３（－／－）及びｇａｐ１（－／－）である、請求項５４～５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１】
前記治療用ポリペプチドをコードする核酸が、前記酵母のゲノム内の少なくとも２つの異なる位置に組み込まれる、請求項５８～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２】
前記酵母が、そのゲノムに組み込まれる前記治療用ポリペプチドをコードする前記核酸の少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、若しくは少なくとも１０、又はそれより多くのコピーを含む、請求項５８～６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３】
前記酵母が、第２の治療用ポリペプチドをコードする第２の核酸の少なくとも１つの部位特異的染色体挿入を更に含み、
前記第２の治療用ポリペプチドが、ＶＨＨドメインを含む結合タンパク質、免疫グロブリン、サイトカイン、及びケモカイン、又はそれらの組み合わせから選択される、請求項５８～６２のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の参照
本出願は、２０２１年６月１１日に出願された米国仮出願第６３／２０９，６５１号、２０２２年１月１４日に出願された米国仮出願第６３／２９９，６９３号、及び２０２２年３月７日に出願された米国仮出願第６３／３１７，３８５号の優先日の利益を主張し、これらの各々の内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
バイオリアクターにおける１リットルを超えるスケール（例えば、小規模、大規模、又は商業規模）での従来の治療用ポリペプチド（複数可）の製造、その後の下流の治療用ポリペプチド（複数可）の精製は、費用がかかり、時間がかかるプロセスである。米国では、注射又は注入による投入を意図した治療用ポリペプチド（複数可）は、同一性、強度、純度、及び他の品質を確立する米国ＦＤＡの現在の適正製造規範（ＣＧＭＰ）の規制に準拠していなければならない。更に、精製されたポリペプチド（例えば、治療用ポリペプチド（複数可））は、悪名高いほど壊れやすく、誤って折り畳まれたり、凝集したり、又は沈殿したりする可能性があり、その結果、有効性が失われる場合がある。したがって、製造から投与時まで治療用ポリペプチド（複数可）の有効性を維持するには、壊れやすい精製された治療用ポリペプチド（複数可）の慎重な製剤化、丁重な取り扱い、及び／又はコールドチェーン物流が必要であり得る。
【０００３】
これらの因子は、例えば、治療用ポリペプチド（複数可）を、同様に治療用に意図された小分子よりも、発生させ、製造し、流通させるのに数桁高価なものにする。加えて、治療用ポリペプチド（複数可）は、多くの場合、注射又は静脈内注入を使用して医療専門家によって投与され、患者は治療を受けるために医療施設に移動する必要がある。これにより、患者のコンプライアンスが低下し、患者の臨床的結果が低下する可能性がある。
【０００４】
いくつかの治療用ポリペプチド（複数可）は、例えば、モノクローナル抗体を含む。いくつかの例としては、限定されないが、炎症誘発性サイトカインを中和し、多くの炎症性疾患の治療に非常に成功している、アダリムマブ、インフリキシマブ、セクキヌマブ、及

びイキセキズマブが挙げられる。しかしながら、これらの治療用ポリペプチド（複数可）は、針注射を必要とし、それらの長期使用は、有効性の喪失、並びに抗薬物抗体応答及び一般的な免疫抑制に起因する深刻な副作用と関連する。加えて、胃腸（ＧＩ）管への経口経路を介して治療用ポリペプチド（複数可）（例えば、タンパク質、ポリペプチド、抗体、又はそれらの機能的断片）を送達することは、以下のいくつかの主要な障害を克服しなければならないため、他の投与経路のための代替は、現時点で限られている。１）経口送達のための大量の治療用ポリペプチド（複数可）を製造することは高価である、２）治療用ポリペプチドは、胃液の高い酸性度に対して感受性であり、治療効果を失う可能性が高い、３）治療用ポリペプチド（複数可）は、典型的には、ＧＩ酵素消化に対して感受性であり、有効性を失う。

【０００５】

例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、セリアック病、及び他の炎症性状態又は炎症に関連する状態に関する研究の進歩にもかかわらず、慢性的使用に対して強力かつ有効な治療法の希少性が依然として存在する。更に、安価であり、下流のポリペプチドの処理及び精製を必要とせずに調製することができ、免疫原性ではなく、コールドチェーン物流及び冷温保存を排除し、患者に優しい、例えば、経口剤形で自己投与することができる、治療用ポリペプチド（複数可）のための確立された商業的及び医学的必要性が存在する。

【０００６】

これらの必要性及び他の必要性は、本開示によって満たされる。

【発明の概要】

【０００７】

本開示は、腸内で治療用ポリペプチド（複数可）を合成することができる操作されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母を利用して、そのような治療用ポリペプチド（複数可）の経口送達経路のためのプラットフォームを提供する。本開示は同様に、開示されたプラットフォームを利用する治療方法、並びに追加の関連する方法及び使用を提供する。

【０００８】

一態様では、本開示は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株であって、治療用ポリペプチドをコードする核酸の少なくとも１つの部位特異的染色体挿入を含み、治療用ポリペプチドが、抗原結合ドメインを含む結合タンパク質、免疫グロブリン、抗体、サイトカイン、ホルモン、及びケモカイン、又はそれらの組み合わせから選択される、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を提供する。

【０００９】

いくつかの実施形態では、酵母は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｂｏｕｌａｒｄｉｉである。

【００１０】

いくつかの実施形態では、酵母は、ＵＲＡ３の完全又は部分的な欠失を更に含み得る。いくつかの実施形態では、酵母は、ＧＡＰ１の完全又は部分的な欠失を更に含み得る。いくつかの実施形態では、酵母は、ｕｒａ３（－／－）及びｇａｐ１（－／－）である。

【００１１】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドをコードする核酸は、酵母のゲノム内の少なくとも２つの異なる位置、又は酵母のゲノム内の少なくとも１つのホットスポットに組み込まれる。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドをコードする核酸は、少なくとも２つの異なる染色体に組み込まれる。いくつかの実施形態では、少なくとも２つの異なる染色体は、染色体ＶＩＩ及びＸＶＩを含む。

【００１２】

いくつかの実施形態では、酵母は、酵母のゲノムに組み込まれるジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）をコードする核酸配列を更に含んでもよく、ＤＨＦＲは、任意選択的に哺乳動物ＤＦＨＲである。それに加えて、又は代替的に、いくつかの実施形態では、酵母は、酵母ＤＦＲ１をコードする１つ以上の外因性核酸を更に含み得る。

【００１３】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドは、ＶＨＨ、Ｆｃ－ＶＨＨ、ＶＨＨ－Ｆｃ、ＶＨＨ－ＶＨＨ、ＶＨＨ－ＶＨＨ－ＶＨＨ－ＶＨＨ、Ｆｃ－ＶＨＨ－ＶＨＨ、ＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨ、及びＶＨＨ－ＶＨＨ－Ｆｃから選択される構造を含む結合タンパク質であり、ＶＨＨ又はＦｃドメインのうちの各々又はいずれかが、任意選択的なリンカー配列を介して別のＶＨＨ又はＦｃドメインに接続している。

【００１４】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドは、ＴｃｄＡ、ＴｃｄＢ、又はそれらの組み合わせに結合する結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドは、配列番号５のアミノ酸配列を含む。

【００１５】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドは、ＴＮＦ－αに結合する結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、結合タンパク質は、ＩｇＧであるか、又は少なくとも１つのＶＨＨドメインを含む。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、配列番号６、７、１９、及び２０のうちのいずれか１つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【００１６】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドは、ＩＬ－１７Ａに結合する結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、結合タンパク質は、ＩｇＧであるか、又は少なくとも１つのＶＨＨドメインを含む。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、配列番号２５のアミノ酸配列を含む。

【００１７】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドは、ＴＮＦ－α及びＩＬ－１７Ａに結合する二重特異性結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、結合タンパク質は、ＩｇＧであるか、又は少なくとも２つのＶＨＨドメインを含む。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、配列番号８、９、及び１０のうちのいずれか１つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【００１８】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドは、ノロウイルス又はロタウイルスに結合する結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、結合タンパク質は、ＩｇＧであるか、又は少なくとも１つのＶＨＨドメインを含む。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、配列番号１３、１４、１５、及び１６のうちのいずれか１つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【００１９】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドは、ｃｗｐ８４に結合し、リジンドメインと融合するＶＨＨである。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、配列番号２１及び２２のうちのいずれか１つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【００２０】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドは、サイトカイン又はケモカインである。いくつかの実施形態では、サイトカインは、ＩＬ－２２又はＩＬ－１０である。いくつかの実施形態では、サイトカイン又はケモカインは、Ｆｃドメインに融合される。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、配列番号１１、１２、及び２７のうちのいずれか１つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【００２１】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドは、ＧＬＰ１である。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、配列番号１７、２３、及び２４のうちのいずれか１つから選択されるアミノ酸配列を含む。

【００２２】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドは、レプチンである。いくつかの実施形態では、治療用タンパク質は、配列番号１８のアミノ酸配列を含む。

【００２３】

いくつかの実施形態では、酵母は、そのゲノムに組み込まれる治療用ポリペプチドをコ

ードする核酸の少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、若しくは少なくとも１０、又はそれより多くのコピーを含む。

【００２４】

いくつかの実施形態では、酵母は、第２の治療用ポリペプチドをコードする第２の核酸の少なくとも１つの部位特異的染色体挿入を更に含んでもよく、
第２の治療用ポリペプチドは、ＶＨＨドメインを含む結合タンパク質、免疫グロブリン、サイトカイン、及びケモカイン、又はそれらの組み合わせから選択される。

【００２５】

別の態様では、本開示は、対象に、本明細書（例えば、前述の態様及び実施形態）に開示されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を投与することを含む、インビボで抗原に結合する方法を提供する。いくつかの実施形態では、抗原は、ＴｃｄＡ、ＴｃｄＢ、ＴｃｄＡ及びＴｃｄＢの両方、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１７Ａ、ＴＮＦ－α及びＩＬ－１７Ａの両方、ｃｗｐ８４、ロタウイルスタンパク質、又はノロウイルスタンパク質から選択される。

【００２６】

別の態様では、本開示は、疾患又は状態を治療又は予防する方法であって、それを必要とする対象に、有効量の請求項１～３７のいずれか一項に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を投与することを含む、方法を提供する。

【００２７】

いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、炎症性状態である。いくつかの実施形態では、炎症性状態は、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、腸の炎症、クローン病、及び潰瘍性大腸炎から選択される。

【００２８】

いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、感染である。いくつかの実施形態では、感染は、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ感染、ノロウイルス感染、ロタウイルス感染、又はそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、対象は、更にＩＢＤを有する。

【００２９】

いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、過敏性腸症候群（ＩＢＳ）である。

【００３０】

いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、神経変性疾患である

【００３１】

いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、糖尿病である。

【００３２】

いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、肥満である。

【００３３】

いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、脂肪肝疾患である。

【００３４】

いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、代謝疾患である。

【００３５】

いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）である。

【００３６】

いくつかの実施形態では、疾患又は状態は、自己免疫疾患である。

【００３７】

別の態様では、本開示は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を選択する方法であって、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母が、酵母のゲノムに組み込まれるジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）をコードする核酸配列、酵母ＤＦＲ１をコードする１つ以上の外因性核酸、又はそれらの組み合わせを含み、本方法が、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母をメトトレキサート及びスルファニルアミドと接触させることを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、ＤＨＦＲは、哺乳動物ＤＨＦＲである。

【００３８】
いくつかの実施形態では、メトトレキサートは、１ｎＭ～１ｍＭの濃度である。いくつかの実施形態では、スルファニルアミドは、０．１～１０ｍｇ／ｍＬの濃度である。
【００３９】
いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、治療用ポリペプチドをコードする核酸の少なくとも１つの部位特異的染色体挿入を含み、治療用ポリペプチドは、抗原結合ドメインを含む結合タンパク質、免疫グロブリン、抗体、サイトカイン、ホルモン、及びケモカイン、又はそれらの組み合わせから選択される。
【００４０】
いくつかの実施形態では、酵母は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｂｏｕｌａｒｄｉｉである。
【００４１】
いくつかの実施形態では、酵母は、ｕｒａ３（－／－）及びｇａｐ１（－／－）である。
【００４２】
いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドをコードする核酸は、酵母のゲノム内の少なくとも２つの異なる位置に組み込まれる。
【００４３】
いくつかの実施形態では、酵母は、そのゲノムに組み込まれる治療用ポリペプチドをコードする核酸の少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、若しくは少なくとも１０、又はそれより多くのコピーを含む。
【００４４】
いくつかの実施形態では、酵母は、第２の治療用ポリペプチドをコードする第２の核酸の少なくとも１つの部位特異的染色体挿入を更に含み、
第２の治療用ポリペプチドは、ＶＨＨドメインを含む結合タンパク質、免疫グロブリン、サイトカイン、及びケモカイン、又はそれらの組み合わせから選択される。
【００４５】
本開示の他のシステム、方法、特徴、及び利点は、以下の図面及び詳細な説明を検討することにより、当業者には明らかであるか、又は明らかになるであろう。そのような全ての追加のシステム、方法、特徴、及び利点は、本説明に含まれ、本開示の範囲内であり、添付の特許請求の範囲によって保護されることが意図される。加えて、記載される実施形態の全ての任意選択的な好ましい特徴及び改変は、本明細書で教示される本開示の全ての態様で使用可能である。更に、従属特許請求の範囲の個々の特徴、並びに記載される実施形態の全ての任意選択的及び好ましい特徴及び改変は、互いに組み合わせ可能であり、交換可能である。
【００４６】
本開示の多くの態様は、以下の図面を参照すると、よりよく理解することができる。図面の構成要素は、必ずしも縮尺通りではなく、その代わりに、本開示の原理を明確に示すことに重点が置かれている。更に、図面中、同様の参照番号は、複数の図を通じて、対応する部分を指定する。
【図面の簡単な説明】
【００４７】
【図１】本明細書に開示されるのと同様の技術、Ｓｂ－ＡＢＡＢ（ＡＢＡＢ導入遺伝子カセット（ｐＵＲＡ３－ＡＴ－ｙＡＢＡＢ－ｃＭｙｃ）を含有するプラスミドにより形質転換されたＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ）を使用した、以前に発生した株のインビトロ特性決定を示す。図１Ａ：ｃＭｙｃタグに対して特異的な抗体を用いたウェスタンブロッティングによって検出された、Ｓｂ－ＡＢＡＢ培養上清中のＡＢＡＢ抗体。図１Ｂ：精製されたＦｃ－ＡＢＡＢと比較した、Ｓｂ－ＡＢＡＢ培養上清の毒素中和活性。図１Ｃ：Ｓｂ、Ｓｂ－ＥＰ（空のプラスミドを対照として保有するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ株）及びＳｂ－Ａ

ＢＡＢのインビトロでの成長。図１Ｄ：複数の継代にわたるＳｂ－ＡＢＡＢ培養上清中のＡＢＡＢ発現レベル。図１Ｅ：野生型Ｓｂ及びＳｂ－ＡＢＡＢの抗生物質耐性プロファイル。

【図２】インビボでの以前に発生した株Ｓｂ－ＡＢＡＢの特性決定を示す。図２Ａ：抗生物質に事前に曝露したマウスに、ＰＢＳ、Ｓｂ、Ｓｂ－ＥＰ及びＳｂ－ＡＢＡＢ（10^{10}ＣＦＵ）を７日間にわたって毎日、強制栄養摂取させた。全ての実験データは、１群当たり３匹のマウスを用いた少なくとも３つの別個の実験のうちの１つを表し、±ｓ．ｅ．ｍ．として提示される。図２Ｂ：マウスの体重を監視した。全ての実験データは、１群当たり３匹のマウスを用いた少なくとも３つの別個の実験のうちの１つを表し、±ｓ．ｅ．ｍ．として提示される。図２Ｃ：異なる群から除去された酵母を監視し、ＣＦＵは、強制栄養摂取後１日目にピークに達したが、最終投与の３日後に検出できないレベルまで急速に低下した。全ての実験データは、１群当たり３匹のマウスを用いた少なくとも３つの別個の実験のうちの１つを表し、±ｓ．ｅ．ｍ．として提示される。図２Ｄ：３日目に収集した腸管洗浄液は、Ｖｅｒｏ細胞単層上のＴｃｄＢ（１０ｐｇ／ｍＬ）を中和することができた。全ての実験データは、１群当たり３匹のマウスを用いた少なくとも３つの別個の実験のうちの１つを表し、±ｓ．ｅ．ｍ．として提示される。図２Ｅ：凍結マスターストックからの非継代株に対する、糞便試料Ｓｂ－ＡＢＡＢ（ｆ）から回収された酵母株について、インビトロでの複数の継代にわたるＳｂ－ＡＢＡＢ培養上清のＡＢＡＢ発現レベル。全ての実験データは、１群当たり３匹のマウスを用いた少なくとも３つの別個の実験のうちの１つを表し、±ｓ．ｅ．ｍ．として提示される。図２Ｆは、ＥＬＩＳＡによって決定された３日目の糞便におけるＡＢＡＢレベルを示す。全ての実験データは、１群当たり３匹のマウスを用いた少なくとも３つの別個の実験のうちの１つを表し、±ｓ．ｅ．ｍ．として提示される。

【図３】ＴＮＦ－α細胞傷害性の中和について、二価抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ－Ｆｃ融合体が、一価抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨよりも有意に強力であることを示す。Ｌ９２９細胞（図３Ａ）を、６時間又は２４時間のいずれかで処理した。細胞円形化（アポトーシスの指標であり得る）を顕微鏡で観察した。Ｌ９２９細胞を、１００ｎｇ／ｍＬのＴＮＦ－αのみを用いて（図３Ｂ）、６時間又は２４時間のいずれかで処理した。細胞円形化（アポトーシスの指標であり得る）を顕微鏡で観察した。Ｌ９２９細胞を、一価抗ＴＮＦ－αとともに用いて（図３Ｃ）、６時間又は２４時間のいずれかで処理した。細胞円形化（アポトーシスの指標であり得る）を顕微鏡で観察した。Ｌ９２９細胞を、二価抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ－Ｆｃとともに用いて（図３Ｄ）、６時間又は２４時間のいずれかで処理した。細胞円形化（アポトーシスの指標であり得る）を顕微鏡で観察した。

【図４】経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦ（ＦＺ００６ｍ）が、ＤＳＳ誘導性大腸炎、並びにＤＳＳ及びＣＤＩの併存疾患からマウスを保護したことを示す。図４Ａは、ＦＺ０００６ｍの経口投与が、軽度の大腸炎モデルであるＤＳＳ誘導性大腸炎に対するある程度の保護傾向を有していたことを示す。ＤＳＳ－大腸炎及びＣＤＩ併存疾患マウスを、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ胞子チャレンジの前の３日間及び後の７日間にわたって毎日、ＰＢＳ又は操作された酵母のいずれかとともに経口投与した。ｎ＝１０。（＊）はＰ＜０．０５を示し、（＊＊）はＰ＜０．０１、及び（＊＊＊）はＰ＜０．００１を示す。より重篤な併存疾患モデルを図４Ｂで使用した。ＤＳＳ－大腸炎及びＣＤＩ併存疾患マウスを、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ胞子チャレンジの前の３日間及び後の７日間にわたって毎日、ＰＢＳ又は操作された酵母のいずれかとともに経口投与した。経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦは、マウスを、体重減少（図４Ｂ）から保護した。ｎ＝１０。（＊）はＰ＜０．０５を示し、（＊＊）はＰ＜０．０１、及び（＊＊＊）はＰ＜０．００１を示す。より重篤な併存疾患モデルを図４Ｃで使用した。ＤＳＳ－大腸炎及びＣＤＩ併存疾患マウスを、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ胞子チャレンジの前の３日間及び後の７日間にわたって毎日、ＰＢＳ又は操作された酵母のいずれかとともに経口投与した。経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦは、マウスを、死亡（図４Ｃ）から保護した。ｎ＝１０。（＊）はＰ＜０．０５を示し、（＊＊）はＰ＜０．０１、及び（＊＊＊）はＰ＜０．００１を示す。より重篤な併存疾患モデルを図４Ｄで使用した。ＤＳＳ－大

腸炎及びＣＤＩ併存疾患マウスを、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ胞子チャレンジの前の３日間及び後の７日間にわたって毎日、ＰＢＳ又は操作された酵母のいずれかとともに経口投与した。経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦは、マウスを、炎症性サイトカインＴＮＦ－αの上方制御（図４Ｄ）から保護した。ｎ＝１０。（＊）はＰ＜０．０５を示し、（＊＊）はＰ＜０．０１、及び（＊＊＊）はＰ＜０．００１を示す。より重篤な併存疾患モデルを図４Ｅで使用した。ＤＳＳ－大腸炎及びＣＤＩ併存疾患マウスを、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ胞子チャレンジの前の３日間及び後の７日間にわたって毎日、ＰＢＳ又は操作された酵母のいずれかとともに経口投与した。経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦは、マウスを、ＩＬ－６の上方制御（図４Ｅ）から保護した。ｎ＝１０。（＊）はＰ＜０．０５を示し、（＊＊）はＰ＜０．０１、及び（＊＊＊）はＰ＜０．００１を示す。より重篤な併存疾患モデルを図４Ｆで使用した。ＤＳＳ－大腸炎及びＣＤＩ併存疾患マウスを、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ胞子チャレンジの前の３日間及び後の７日間にわたって毎日、ＰＢＳ又は操作された酵母のいずれかとともに経口投与した。経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦは、マウスを、結腸の長さの減少（図４Ｆ）から保護した。ｎ＝１０。（＊）はＰ＜０．０５を示し、（＊＊）はＰ＜０．０１、及び（＊＊＊）はＰ＜０．００１を示す。より重篤な併存疾患モデルを図４Ｇで使用した。ＤＳＳ－大腸炎及びＣＤＩ併存疾患マウスを、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ胞子チャレンジの前の３日間及び後の７日間にわたって毎日、ＰＢＳ又は操作された酵母のいずれかとともに経口投与した。経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦは、マウスを、結腸組織損傷（図４Ｇ）から保護した。ｎ＝１０。（＊）はＰ＜０．０５を示し、（＊＊）はＰ＜０．０１、及び（＊＊＊）はＰ＜０．００１を示す。

【図５】二量体抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨの活性を示す。図５Ａ：中和活性。連続希釈したＶＨＨ－Ｆｃ又はヒュミラを、Ｌ９２９細胞に適用する前に、１０ｐＭのヒトＴＮＦ－αと混合した。２４時間のインキュベーションの後、細胞傷害性の抗体媒介性阻害を測定した。連続希釈したＧ１又はヒュミラを１００ｎｇ／ｍｌのビオチン化ヒトＴＮＦ－αと混合した後、ＴＮＦＲ１コーティングされたウェルに添加した。ＴＮＦＲ１に対するＴＮＦ－α結合の抗体媒介性阻害の能力を、競合ＥＬＩＳＡによって決定した。図５Ｂ：結合親和性。ＴＮＦ－αでコーティングしたＥＬＩＳＡプレート上での連続希釈したＧ１又はヒュミラの結合。連続希釈したＧ１又はヒュミラを１００ｎｇ／ｍｌのビオチン化ヒトＴＮＦ－αと混合した後、ＴＮＦＲ１コーティングされたウェルに添加した。ＴＮＦＲ１に対するＴＮＦ－α結合の抗体媒介性阻害の能力を、競合ＥＬＩＳＡによって決定した。図５Ｃ：ＴＮＦ－α及びＴＮＦＲ１の相互作用を遮断すること。連続希釈したＧ１又はヒュミラを１００ｎｇ／ｍｌのビオチン化ヒトＴＮＦ－αと混合した後、ＴＮＦＲ１コーティングされたウェルに添加した。ＴＮＦＲ１に対するＴＮＦ－α結合の抗体媒介性阻害の能力を、競合ＥＬＩＳＡによって決定した。

【図６】Ｓｂ－ａｈＴＮＦ（ＦＺ００６）株の特性決定を示す。図６Ａ：２種類のＳｂ－ａｈＴＮＦ株の成長速度は、それらの親株と同等である。図６Ｂ：広範なインビトロ培養後のＳｂ－ａｈＴＮＦによる抗体の安定した産生。Ｓｂ－ａｈＴＮＦ又はＳｂ－ＥＰを、０．１ＯＤから開始して、ＹＰＤ培地中で８日間継代させた。２４時間培養ごとに上清を収集し、ａｈＴＮＦの発現をＥＬＩＳＡによって測定した。図６Ｃ：図６ＢのＳｂ－ａｈＴＮＦ７日間培養物からの上清中のａｈＴＮＦの中和活性。上清中の抗体の濃度をＥＬＩＳＡによって決定し、次いで連続的に希釈した後、３ｎｇ／ｍｌの組換えヒトＴＮＦ－αと混合した。３０分間のインキュベーションの後、混合物をＬ９２９単層に適用し、細胞傷害性をレザズリン生存率キットで測定した。対照群には、同じ濃度の精製Ｇ１及びＨＵＭＩＲＡ（登録商標）が含まれていた。

【図７】経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦ及びＳｂ－ＡＢＡＢが、ＣＤＩ及び養子Ｔ細胞移入大腸炎（ＴＣＣ）の併存疾患からマウスを保護したことを示す。図７Ａ：実験設計図。Ｔ細胞移入したＲＡＧ$^{-}$／$^{-}$マウス（ｎ＝４）の群を、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ胞子でチャレンジ試験し、次いで、ＰＢＳ又は酵母で処理した。マウスを安楽死させ、結腸組織を分析した。図７Ｂ：以下の異なる群からのマウスの結腸組織のＨ＆Ｅ染色：ａ）ＲＡＧ$^{-}$／$^{-}$、ｂ）ＴＣＣ、ｃ）Ｓｂ－ａｍＴＮＦで処理されたＴＣＣ、ｄ）ＴＣＣ＋ＣＤＩ、ｅ）Ｓｂ－

ＡＢＡＢで処理されたＴＣＣ＋ＣＤＩ、及びｆ）Ｓｂ－ａｍＴＮＦ及びＳｂ－ＡＢＡＢで処理されたＴＣＣ＋ＣＤＩ。図７Ｃ：図７Ｂの組織学スコア。スコアは、結腸形態、炎症性細胞の浸潤、及び細胞死の徴候に基づいて盲検的に評価した。正常対照ＲＡＧ－／－マウスのスコア０、炎症なし。ＴＣＣマウスは、中等度の炎症を示した。ＴＣＣ＋ＣＤＩマウスは、重度の炎症を示した。Ｓｂ－ａｍＴＮＦで治療されたＴＣＣマウスは、軽度の炎症を示した。Ｓｂ－ＡＢＡＢで治療された併存疾患マウスは、中等度の炎症を示し、Ｓｂ－ａｍＴＮＦで治療したときにも、軽度の炎症まで減少した。群間のＰ値を示している。図７Ｄ：示された群間のＩＦＮ－γ　ｍＲＮＡ発現の倍率変化を比較し、群間のＰ値を示している。

【図８】ＥＬＩＳＡによって測定されるような、リッチＹＰＤ培地中の親株、ｐｅｐ４変異体クローン、及び陰性対照培養物の上清内に分泌されるＡＢＡＢ抗体の濃度を示す。

【図９】子ブタにおけるＳｂ－ＡＢＡＢのコロニー形成及びＡＢＡＢの分泌の動態を示す。２匹のノトバイオート動物子ブタ（２日齢）に、10^{10}ＣＦＵのＳｂ－ＡＢＡＢを毎日１１日間（１日目から１１日目まで）にわたって給餌した。糞便スワップを、経口Ｓｂ－ＡＢＡＢの１日前から毎日収集し、最終投与の３日後まで継続した。ＥＬＩＳＡによって測定された糞便Ｓｂ－ＡＢＡＢ　ＣＦＵ（図９Ａ）を決定した。ＥＬＩＳＡによって測定されたＡＢＡＢ濃度（図９Ｂ）を決定した。

【図１０】マウスにおけるＣＤＩに対するＳｂ－ＡＢＡＢの予防有効性を示す。図１０Ａは、カプラン－マイヤー生存曲線を示す。統計分析は、対数ランク（Ｍａｎｔｅｌ－Ｃｏｘ）検定を使用して、示された群を比較することによって行った。Ｎ＝１０、＊ｐ値＜０．０５。図１０Ｂは、Ｈ＆Ｅ染色した結腸組織切片を示す。統計分析は、対数ランク（Ｍａｎｔｅｌ－Ｃｏｘ）検定を使用して、示された群を比較することによって行った。Ｎ＝１０、＊ｐ値＜０．０５。

【図１１】経口Ｓｂ－ａｈＴＮＦが、ヒト結腸組織におけるＴｃｄＢ誘導性ＴＮＦ－αの発現を低下させることを示す。新鮮なヒト結腸組織を、結腸がん患者の正常領域から得た（ＵＣＬＡ　Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ）。組織を３×３ｍｍのサイズに切断し、ＲＰＭＩ１６４０培地（１ｍｌ）に入れた。組織を、何も含まない（ブランク対照）又はＳｂ－ＥＰ若しくはＳｂ－ａｈＴＮＦ培養物からの上清（２．５μｌ）で３０分間処理し、続いて、ＰＢＳ又は毒素Ｂを添加した。次いで、組織を３７℃で４時間インキュベートした。上清中のＴＮＦ－αレベルをＥＬＩＳＡ（ＤＹ２１０，Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）によって測定した。

【図１２】経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦの反復用量が、抗薬物抗体応答を誘導しないことを示す。図１２Ａは、実験設計の図を示す。マウス群（ｎ＝５）を、ＰＢＳ、Ｓｂ－ａｍＴＮＦ（10^{9}ＣＦＵ／用量）、又は精製された抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ／ＶＨＨ－Ｆｃ（１注射当たり１０ｍｇ／Ｋｇ）で治療した。経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦは、１日３コースの治療であり、合計３６回用量であった。精製された抗マウスＶＨＨ／ＶＨＨ－Ｆｃ融合ポリペプチドを合計６回用量で、２コースでｉｐ注射した。ＥＬＩＳＡのために糞便及び血清試料を収集した。図１２Ｂは、糞便ＩｇＡ及び血清ＩｇＧ応答のＥＬＩＳＡ検出を示す。糞便試料（ＰＢＳ中１：１ｗ／ｖ）及び血清試料（ＰＢＳ中１０００倍希釈）を、精製された抗ＴＮＦ　ＶＨＨ／ＶＨＨ－ＦｃでコーティングしたＥＬＩＳＡプレートに添加し、糞便中のＩｇＡ及び血清試料中のＩｇＧのＯＤを測定した。

【図１３－１】遺伝子挿入の方法の概要を示す。

【図１３－２】図１３－１の続きである。

【図１４】操作されたＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ株の発生に使用される同種アームの例示的なＤＮＡ配列を示す。

【図１５】デルタ及びシグマ挿入部位の概略図を示す。

【図１６】シグマ及びデルタ部位における形質転換効率を示す。

【図１７】シグマ又はデルタ部位に挿入されたＧＯＩを有するクローンの２４時間培養後の平均ｙｅＧＦＰ蛍光を示す。

【図１８】目的の遺伝子がｐＴＥＦ又はｐＴＤＨ３のいずれかで挿入されたＳ．ｂｏｕｌ

ａｒｄｉｉからのＡＢＡＢ発現レベルが、デルタ部位で挿入されたものと比較して３～５倍高いことを示す。
【図１９】ＦＺ００２クローンの安定性を示す。異なるクローンを１１日間にわたって毎日継代した。２４時間培養物の上清を使用して、ＥＬＩＳＡによってＡＢＡＢ発現を測定した。
【図２０】クローンによるＡＢＡＢの早期産生を示す。示された細胞数の異なるクローンを３時間培養し、上清中のＡＢＡＢを測定した。
【図２１】異なる挿入位置（ｐＴＥＦ、ｐＴＤＨ３、及びデルタ部位）間の抗ヒトＴＮＦ－α－Ｆｃ発現の比較を示す。ＦＺ００６ｈは、抗ヒトＴＮＦ－α－Ｆｃカセットがデルタ部位（複数可）に挿入され、ＹＰＤ及びＳＤＣＡＡの両方の培地で堅牢に成長し、同じ挿入部位を有するクローン間で最高で安定した発現レベルを有する株である。ＴＥＦ及びＴＤＨ３のプロモーターに挿入された目的の遺伝子カセットを有する株からの抗ヒトＴＮＦ－α－Ｆｃの発現特性を検出するために、ｐＴＥＦ挿入株及びｐＴＤＨ３挿入株からの抗ヒトＴＮＦ－α－Ｆｃの発現レベルを、ＦＺ００６ｈのものと比較する。標準曲線（左）に基づいて、目的の遺伝子がｐＴＥＦ又はｐＴＤＨ３に挿入されたＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉからの抗ヒトＴＮＦ－α－Ｆｃ発現レベルは、デルタ部位に挿入された遺伝子と比較して、２～５倍高い。
【図２２】ウラシル栄養要求性Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ酵母株の生成を示す。Ｕｒａ３遺伝子のノックアウト（上）は、相同組換えを介してＵｒａ３遺伝子及びそのプロモーターを置き換えるために、Ｇ４１８抗生物質耐性ノックアウトカセットで化学変換された野生型Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを使用して完了した。抗生物質カセットは、ＬｏｘＰ部位に隣接している。二重対立遺伝子ノックアウト（Ｕｒａ３$^{-}$／$^{-}$：：Ｇ４１８$^{+}$／$^{+}$）クローンを単離するためのスクリーニング戦略（下）を、両方の対立遺伝子におけるＵｒａ３遺伝子の欠失に成功した形質転換されたＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉクローンによって実施し、Ｇ４１８と、Ｕｒａ３$^{+}$／$^{+}$又はＵｒａ３$^{+}$／$^{-}$である酵母に対して毒性である逆選択剤５’ＦＯＡとを含む最小完全培地上で単離した。
【図２３】Ｕｒａ３$^{-}$／$^{-}$：：Ｇ４１８$^{+}$／$^{+}$候補クローン（Ｅ３７及びＥ３８）は、（ｉ）５’ＦＯＡ又は（ｉｉ）Ｇ４１８を含有する培地上で成長することができるが、ウラシルを欠く培地上では成長することができないことを示す。
【図２４】Ｕｒａ３$^{-}$／$^{-}$：：Ｇ４１８$^{+}$／$^{+}$候補クローン（Ｅ３７及びＥ３８）のゲノムＤＮＡに対するＰＣＲにより、両方の対立遺伝子におけるＵＲＡ３遺伝子の欠損が確認され、Ｇ４１８抗生物質耐性カセットに置き換えられたことを示す。
【図２５】ＧＡＰ１遺伝子のノックアウトを示す。ウラシル栄養要求性株（Ｕｒａ３$^{-}$／$^{-}$：：Ｇ４１８$^{+}$／$^{+}$、クローンＥ３８）を、フレオマイシン抗生物質耐性ノックアウトカセットで化学変換して、相同組換えを介してＧＡＰ１遺伝子及びそのプロモーターを置き換えた。抗生物質カセットは、ＬｏｘＰ部位に隣接している。
【図２６】ＧＡＰ１（－／－）：：フレオ（＋／＋）であるノックアウトクローンのスクリーニング及び単離を示す。両方の対立遺伝子におけるＧＡＰ１遺伝子の欠失に成功した形質転換されたＳｂクローン（極めてまれな事象）を、Ｌ－プロリン（窒素源として）、及び逆選択剤Ｄ－ヒスチジン（ＧＡＰ１＋／＋又はＧＡＰ１＋／－である酵母細胞に対して毒性である）を含有する最小培地上で単離した。
【図２７】ＧＡＰ１（－／－）：：フレオ（＋／＋）候補クローン（Ａ２－１、Ａ２－６、Ａ２－７）は、（ｉ）Ｄ－Ｈｉｓを０．１６％若しくは０．５％で含む培地、又は（ｉｉ）フレオマイシンを５ｕｇ／ｍＬで含む培地上で成長することができるが、Ｌ－シトルリンが唯一の窒素源である最小培地上では成長することができないことを示す。
【図２８】ＧＡＰ１（－／－）：：フレオ（＋／＋）候補クローン（Ａ２－１）のゲノムＤＮＡに対するＰＣＲにより、両方の対立遺伝子におけるＧＡＰ１遺伝子の欠損が確認され、フレオマイシン抗生物質耐性カセットに置き換えられたことを示す。
【図２９】ＵＲＡ３及びＧＡＰ１遺伝子座における抗生物質カセットの両方の切除を示す。ＳｂクローンＡ２－７のＧ４１８抗生物質耐性カセット及びフレオマイシン抗生物質耐

性カセットの両方を除去するために、Ｃｒｅ－レコンビナーゼ酵素を担持するプラスミド（ｐＰＬ５０７１－ＴＥＦ１－Ｃｒｅ－ＵＲＡ３）で細胞を化学変換した。成功した形質転換体を、ウラシルを欠く培地上で単離した。無作為なクローンを選択し、（ｉ）両方の抗生物質カセットの損失を確認しながら、ｐＰＬ５０７１プラスミドを失うように、様々な選択培地上で３ラウンドの再ストリーク（継代）を受けた。

【図３０】両方の抗生物質カセットを首尾良く切除し、Ｃｒｅ－レコンビナーゼプラスミドを失ったクローンの同時スクリーニングを示す（ｉ）候補クローンは、リッチ培地上で十分に成長する。（ｉｉ）ＹＰＤ＋Ｇ４１８、（ｉｉｉ）ＹＰＤ＋フレオマイシン上での成長がないことは、Ｇ４１８抗生物質耐性カセット及びフレオマイシン抗生物質耐性カセットの両方の喪失を示唆している。同様に、ＧＡＰ（－／－）及びＵＲＡ３（－／－）の状態は、それぞれ、（ｉｖ）ＭＣＬ－シトルリン培地及び（ｖ）ＳＤ－ＵＲＡ上での成長の失敗によって確認される。（ｖｉ）ＳＣ＋５’ＦＯＡ上での成長は、候補クローンがいかなるＵＲＡ３遺伝子も保有せず、したがってｐＰＬ５０７１－ＴＥＦ１－Ｃｒｅ－ＵＲＡ３プラスミドを失ったことを確認する。

【図３１】ＵＲＡ３及びＧＡＰ１遺伝子座における両方の抗生物質カセットの喪失のＰＣＲによる確認を示す。

【図３２】ゲノム内の任意の場所に抗生物質カセットが存在しないことの確認を示す。

【図３３】ｍＩＬ－２２平均発現レベルが、ＤＨＦＲ選択におけるＭＴＸ濃度と相関することを示す。

【図３４】目的の遺伝子（ＧＯＩ）カセットがデルタ部位に挿入された、ＵＲＡ３又はＤＨＦＲ選択マーカーによる抗ｈＩＬ－１７Ａ－Ｆｃ発現クローンのスクリーニングを示す。デルタ挿入相同性アームに隣接するＵＲＡ３又はＤＨＦＲ選択マーカーカセットとともにＧＯＩカセットを含むＤＮＡ断片を有するＦＺＭＹＡ０６－１６（ＵＲＡ３－／－、ＧＡＰ１－／－）株で形質転換した後、陽性クローンを、以下の対応するプレートからピックアップした。ＵＲＡ３選択のためのＳＤＣＡＡ＋ＵＲＡ３プレート及びＤＨＦＲ選択のためのＹＰＤ＋ＭＴＸ。１８４個の陽性クローンを、各々、３７℃、２５０ｒｐｍで振とうしながら、６００μＬのＹＰＤで２４時間、継代培養した。培養上清を１０倍希釈し、ＥＬＩＳＡによって検出した。ＯＤ４５０ｎｍでのデータ読み出し。

【図３５】ＧＯＩカセットがｐＴＤＨ３部位を挿入した、ＵＲＡ３又はＤＨＦＲ選択マーカーによる抗ｈＴＮＦ－α－Ｆｃ発現クローンのスクリーニングを示す。ｐＴＤＨ３相同性アームに隣接するＵＲＡ３又はＤＨＦＲ選択マーカーカセットとともにＧＯＩカセットを含むＤＮＡ断片を有するＦＺＭＹＡ０６－１６（ＵＲＡ－／－、ＧＡＰ１－／－株で形質転換した後、陽性クローンを、以下の対応するプレートからピックアップした。ＵＲＡ３選択のためのウラシルを含まないＳＤＣＡＡ及びＤＨＦＲ選択のためのＹＰＤ＋ＭＴＸ。８４個の陽性クローンを、各々、３７℃、２５０ｒｐｍで振とうしながら、６００μＬのＹＰＤで２４時間、継代培養した。培養上清を２０倍希釈し、ＥＬＩＳＡによって検出した。ＯＤ４５０ｎｍでのデータ読み出し。

【図３６】Ｐｅｐ４欠失が、分泌されたポリペプチドの安定性を増強することを示す。最小培地中のｐｅｐ４変異体クローン及び親株及びＷＴ株培養物中の上清中のＡＢＡＢ抗体の濃度をＥＬＩＳＡによって決定し、６００ｎｍ波長で測定された培養物の光学密度の差である発現／ＯＤ６００（Ｅ／Ｏ）を考慮して調整した。

【図３７】潜在的なＴｈｒ１及びＴｈｒ４ヌルクローン（番号付けされたセクター）を、リッチＹＰＤ及び最小ＳＤ（スレオニンを含まない）培地上で成長させたことを示す。親（＋）及びＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ　ｔｈｒ１（－）株対照を含んでいた。

【図３８】スレオニン（ＳＤ）を含まないか、又は標準の７６ｕｇ／ｍＬのスレオニンを含む（ＳＤ＋スレオニン）かのいずれかで、Ｔｈｒ１及びＴｈｒ４ヌルクローンを、リッチＹＰＤ及び最小のＳＤ培地上で成長させたことを示す。親（＋）及びＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ　ｔｈｒ１（－）株を含んでいた。

【図３９】最小培地中で、同数の所与の酵母株及びＧＦＰ＋細胞を培養物に播種したことを示す。ここに示される１６時間時点での培養密度に対するＧＦＰ蛍光。新鮮な培地に、

競合培養物を毎日４日間にわたって播種した。値をＷＴに対して正規化した。ＧＦＰ＋は、ＧＦＰ発現細胞のみの非競合培養物である。

【図４０】抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ３を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（Ｓｂ．）を示す。形質転換されたＳｂ．は、異なる選択マーカー（灰色及び黒色、ＵＲＡ３栄養要求性選択；有色、ＦＺＥ１選択）を有する抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ３－ＨＡ（ＶＨＨ形式）を発現した。４８時間培養後に採取した１００倍希釈上清は、ヒトＴＮＦ－αに反応性であり、ＨＡタグをＨＲＰ－抗ＨＡタグによって検出した。特異的結合活性についてＯＤ４５０ｎｍを測定した。

【図４１】抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ３を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（Ｓｂ．）を示す。形質転換されたＳｂ．は、抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ３－ＨＡ（ＶＨＨ形式、橙色の線）及び抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ３ｓ－Ｆｃ（黒色の線）を発現した。４８時間培養後に採取した連続希釈上清をヒトＴＮＦ－α（３ｎｇ／ｍｌ）と混合した後、Ｌ９２９細胞に適用した。２４時間のインキュベーションの後、細胞傷害性の抗体媒介性阻害を阻害％として示した。Ｓｂ．が発現した抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ３－Ｆｃの上清は、産生された抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ３のみよりも強力である。

【図４２】抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ３発現酵母上清の中和活性を示す。形質転換されたＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉは、抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ３（ＶＨＨ形式）を発現した。７２時間誘導培養後に採取した４０倍希釈上清をヒトＴＮＦ－α（６．２５ｎｇ／ｍｌ）と混合した後、Ｌ９２９細胞に適用した。２４時間のインキュベーションの後、細胞傷害性の抗体媒介性阻害を、増殖ＦＬＩとして測定した。赤色の線は、形質転換されていないＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ培養上清の「増殖ＦＬＩ」を示す。

【図４３】Ｅｘｐｉ２９３細胞による機能的Ｓｃ－ＦＶ－Ｆｃ抗体の発現を示す。Ｅｘｐｉ２９３によるＳｃ－ＦＶ－Ｆｃの発現を、ＳＤＳゲル（上）及びＥＬＩＳＡ（下）によって測定した。以下の上清の５μｌを、定量化のためにＳＤＳゲルにロードした。レーン１：ＡＶＡ　ＬＶ－ＧＳ－ＨＶ－Ｆｃ；レーン２：ＣＡＮ　ＬＶ－ＧＳ－ＨＶ－Ｆｃ；レーン３、４：ＧＩＭ　ＬＶ－ＧＳ－ＨＶ－Ｆｃ；レーン５：１μｇＢＳＡ；レーン６、７：ＨＵＭ　ＬＶ－ＧＳ－ＨＶ－Ｆｃ；レーン８、９：ＭＡＶ－ＬＶ－ＧＳ－ＨＶ－Ｆｃ；レーン１０、１１：ＳＩＬＴ　ＬＶ－ＧＳ－ＨＶ－Ｆｃ。定量ＥＬＩＳＡを、タンパク質Ａでコーティングされたヒト抗ＥＬＩＳＡウェルと反応する上清の５０倍希釈で実施した。ＨＲＰコンジュゲートされたヤギ抗ヒトＩｇＧ（ガンマ）を、ＯＤ４５０ｎｍでの抗体結合の検出に使用した。抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ３／ＶＨＨ３－Ｆｃを標準として使用した。特異的抗原結合活性を検出するために、連続希釈した上清を、対応する抗原コーティングされたＥＬＩＳＡウェルに添加し、ＯＤ４５０ｎｍでＨＲＰコンジュゲートされたヤギ抗ヒトＩｇＧ（ガンマ）によって検出した。データを表（下）にまとめた。Ｙ、あり。

【図４４】Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（Ｓｂ．）によるＳｃ－Ｆｖ－Ｆｃ抗体の発現を示す。Ｓｂ．によるＳｃ－ＦＶ－Ｆｃの発現をＥＬＩＳＡにより測定した。Ｓｃ－ＦＶ－Ｆｃ発現Ｓｂ．上清を、ＹＰＤ中で４８時間培養した後に回収した。２倍希釈した上清を、タンパク質ＡでコーティングしたＥＬＩＳＡウェルに添加した。ＨＲＰコンジュゲートされたヤギ抗ヒトＩｇＧ（ガンマ）を、ＯＤ４５０ｎｍでの抗体結合の検出に使用した。抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ３／ＶＨＨ３－Ｆｃを標準として使用した。特異的抗原結合活性を検出するために、２倍希釈した上清を、対応する抗原コーティングされたＥＬＩＳＡウェルに添加し、ＯＤ４５０ｎｍでＨＲＰコンジュゲートされたヤギ抗ヒトＩｇＧ（ガンマ）によって検出した。ＮＤ＝決定されず。

【図４５】Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（Ｓｂ．）による機能的ＶＨＨｓ（単量体、二量体）、ＶＨＨ－Ｆｃ、ＶＨＨ－Ｓｃ－ＦＶ、ＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨ抗体の発現を示す。Ｓｂ．によるＳｃ－ＦＶ－Ｆｃの発現及び抗原特異的結合活性をＥＬＩＳＡにより測定した。Ｓｃ－ＦＶ－Ｆｃ発現Ｓｂ．上清を、ＹＰＤ中で４８時間培養した後に回収した。連続希釈した上清を、タンパク質ＡでコーティングしたＥＬＩＳＡウェルに添加した。ＨＡ又はＦｃタグを、ＨＲＰ－抗ＨＡタグ及びＨＲＰコンジュゲートされたヤギ抗ヒトＩｇＧ（ガンマ）によって、それに対応して検出した。ＯＤ４５０ｎｍを測定した。生体活性を、中和

アッセイによって検出した。ＮＤ、決定されず：ＮＡ、利用不可。
【図４６】例示的なマウスｄｂ／ｄｂ肥満モデルの実験設計を示す。
【図４７】ＦＺ０１０ｍが、ｄｂ／ｄｂマウスにおいて血糖を低下させることを示す。９週齢の雄ｄｂ／ｄｂマウス（ｎ＝４／群）に、10^9ＣＦＵのＦＺ０１０ｍ（Ｆｃ断片と融合した機能的マウスＩＬ２２を構成的に発現する操作されたＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（Ｓｂ））又はＳｂ対照のいずれかを３週間にわたって毎日、強制栄養摂取させた。０日目、５日目、１０日目、１５日目及び２１日目に、体重並びに食物及び水の消費量を測定した）。２２日目に、ＥｃｈｏＭＲＩ及び空腹時血糖レベルを測定した。Ｓｂ対照群とＦＺ０１０ｍ群との間に体重の有意差は観察されなかった。ＦＺ０１０ｍによる治療は、マウスにおける食物及び水の消費量を有意に減少させ、ｄｂ／ｄｂマウスにおける空腹時血糖レベルを有意に低下させた。
【図４８】例示的なマウス高脂肪食肥満モデルを示す。
【図４９】ＦＺ０１０ｍが、高脂肪食のマウスにおいて血糖を低下させることを示す。８週齢の雄ｃ５７ＢＬ６／Ｊマウス（ｎ＝４）に、ＨＦＤを１１日間給食させた後、ＨＦＤとともに10^9ＣＦＵのＦＺ０１０ｍ又はＳｂ対照のいずれかを毎日強制栄養摂取させた。体重を、１、７、１３、１９、及び２２日目に測定した。ＥｃｈｏＭＲＩ及び空腹時血糖レベルを２２日目に測定した。ＨＦＤ又はｓｂ対照群の両方のマウスと比較して、１２日間のＦＺ０１０ｍで治療したマウスは、有意に低い体重及び空腹時血糖値を有していた。
【図５０】ゲノム挿入のためのＶＨＨ１－Ｆｃ－ＶＨＨ２導入遺伝子構築物の例示的な生成の図を示す。酵母染色体統合のための例示的な最終統合カセット（ＦＩＣ１、ＦＩＣ２、ＦＩＣ３、ＦＩＣ４）の４つの構築物を生成するためのステップ。抗ＩＬ－１７Ａ遺伝子を、ｐＵＣプラスミドｐＵＣ－ａＩＬ１７Ａで合成した。抗ＴＮＦ－α－Ｆｃ遺伝子を保有するベクターとともに、ｐＵＣ－ａＩＬ１７Ａプラスミドを、制限酵素ＢａｍＨ１及びＮｈｅＩで消化して、４つの異なるベクター及び１つの挿入物を得た。次いで、挿入物を、コンピテントなＥ．ｃｏｌｉ細胞への形質転換のためにベクターにライゲーションした。各構築物から４つのコロニーを取り出し、プラスミドを抽出し、酵素消化を介して検証した。正しいプラスミドを使用して酵母を形質転換した。
【図５１】ゲノム挿入のためのＶＨＨ１－ＶＨＨ２－Ｆｃ導入遺伝子構築物の例示的な生成の図を示す。好適な制限酵素部位の欠如に起因して、ギブソンアセンブリを使用した。例示的な抗ＩＬ－１７Ａ　ＶＨＨ２遺伝子を、相同オーバーハングを含有するプライマーを用いてＰＣＲによって増幅させ、ギブソンアセンブリのための異なる所望のプロモーター及び選択マーカーを有する抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ２－Ｆｃを含有する４つの個々の線形ベクターと混合した。アセンブリの後、Ｅ．ｃｏｌｉの形質転換を行い、４つのベクターの各々から４つのクローンをプラスミド抽出のために取り出した。
【図５２－１】ＶＨＨ１－Ｆｃ－ＶＨＨ２及びＶＨＨ１－ＶＨＨ２－Ｆｃ遺伝子を含む最終挿入カセット（ＦＩＣ）プラスミドを、それぞれ制限酵素（ＫｐｎＩ／ＮｈｅＩ及びＤｒａｌ／ＮｃｏＩ）及び（ＮｃｏＩ／ＤｒａＩ）で診断したことを示す。
【図５２－２】図５２－１の続きである。
【図５３】Ａ～Ｂは、異なる最終挿入カセットを用いた二重特異的抗体の発現レベルを示す。
【図５４】細胞ベースの中和アッセイで上位クローンを選択したことを示す。ＶＨＨ１－ＶＨＨ２－Ｆｃの発現が最も高いＦＩＣ５クローンを、ヒト組換えＴＮＦα（左）及びＩＬ－１７Ａ（右）に対する中和活性を検証するために選択した。クローンＧ７－Ｅ１（ＦＺ００８）は、融合ポリペプチドの一貫した高い発現及びＴＮＦα及びＩＬ－１７Ａに対する中和活性を示した。
【図５５－１】ＦＺＭＹＡ０６－１６（ｕｒａ３（－／－），ｇａｐ１（－／－），Ｃｉｒ＋）発生のための例示的なプラスミドを示す。
【図５５－２】図５５－１の続きである。
【図５６】ＦＺＭＹＡ０６－１６発生のための例示的な戦略を示す。

【図５７】親ＭＹＡ７９６からＦＺＭＹＡ０６－１６への栄養要求性Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ株のための例示的なプラットフォームを示す。
【図５８】ＦＺＭＹＡ０６－１６（成長表現型）の例示的な最終的な特性決定を示す。
【図５９－１】ＦＺＭＹＡ０６－１６の例示的な最終的な特性決定（ＵＲＡ３遺伝子及び置き換えられた抗生物質カセットの両方の部位特異的欠失をＰＣＲ確認）を示す。
【図５９－２】図５９－１の続きである。
【図６０－１】ＦＺＭＹＡ０６－１６の例示的な最終的な特性決定（ＧＡＰ１遺伝子及び置き換えられた抗生物質カセットの部位特異的欠失をＰＣＲ確認）を示す。
【図６０－２】図６０－１の続きである。
【図６１】ＦＺＭＹＡ０６－１６の例示的な最終的な特性決定（ゲノム中に抗生物質遺伝子Ｇ４１８又はフレオ－Ｒがないことをを確認）を示す。
【図６２－１】ＦＺＭＹＡ０６－１６の例示的な最終的な特性決定（ゲノム中のＵＲＡ３及びＧＡＰ１遺伝子座におけるＬｏｘＰ－ｓｃａｒ）を示す。
【図６２－２】図６２－１の続きである。
【図６３】ＦＺＭＹＡ０６－１６の例示的な最終的な特性決定（異なるｐＨ条件での成長曲線）を示す。
【図６４－１】プラスミドプラットフォームを含有する例示的な目的の遺伝子（ＧＯＩ）カセットを示す。
【図６４－２】図６４－１の続きである。
【図６５】エンズイン型相同組換え法を使用した、プロモーター領域におけるＧＯＩカセットの概略的な挿入を示す。
【図６６】Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の例示的な生成を示す。
【図６７】本明細書に記載のプラットフォームを使用した、異なる形式の治療用ポリペプチドを発現するＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の発生戦略のための例示的なフローチャートを示す。
【図６８】例示的なＦＺ００２発生フローチャートを示す。
【図６９】ｐＴＥＦ－ＡＢＡＢ－ＵＲＡ３／ＤＨＦＲカセットの例示的なＰＣＲを示す。
【図７０】ＦＺＭＹＡ０６－１６の例示的な第１のエレクトロポレーションの概略図を示す。
【図７１】例示的なスクリーニング処理の概略図を示す。
【図７２】機能活性（中和）スクリーニングを示す。
【図７３】例示的なＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図７４】クローン均一性スクリーニングのための例示的なＥＬＩＳＡを示す。
【図７５】発現カセットの部位特異的挿入を示す。
【図７６】ＦＺＭＹＡ０６－１６の例示的な第２のエレクトロポレーションを示す。ＳｂｐＴＥＦ－ＡＢＡＢ－ＤＨＦＲクローンＢ２及びＢ１０を、第２のエレクトロポレーションのための適格な細胞調製のために選択した。Ｓｂ　ｐＴＥＦ－ＡＢＡＢ－ＵＲＡ３クローンＣ１１及びＤ１０を、第２のエレクトロポレーションのための適格な細胞調製のために選択した。
【図７７】ｐＴＥＦ－ＡＢＡＢ＋細胞の第２のエレクトロポレーションのためのプラスミドからの発現カセットＰＣＲを示す。
【図７８】第２のエレクトロポレーション陽性クローンスクリーニングを示す。
【図７９】第２のエレクトロポレーション陽性クローンスクリーニングを示す。
【図８０】第２のエレクトロポレーション陽性クローンスクリーニングを示す。
【図８１】各群から選択される例示的な上位クローンを示す。
【図８２】例示的な選択された上位ＡＢＡＢ発現クローンの均一性を示す。
【図８３】例示的な選択された上位ＡＢＡＢ発現クローンの均一性を示す。
【図８４】ＡＢＡＢを発現する例示的なＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（ＦＺ００２クローン）の特性決定を示す。
【図８５】例示的なＦＺ００２の特性決定（成長曲線）を示す。

【図８６】例示的なＦＺ００２の特性決定（成長曲線）を示す。
【図８７】例示的なＦＺ００２の特性決定（成長曲線、継代１）を示す。
【図８８】例示的なＦＺ００２の特性決定（成長曲線、継代１１）を示す。
【図８９】例示的なＦＺ００２の特性決定（安定性）を示す。異なるＦＺ００２クローン（２Ｅ９、６Ｇ１、デルタ＋ＨＳ＃１）及び陰性対照（野生型Ｓｂ）を、２４時間ごとに連続的に１１継代まで継代させ（ほぼ１００世代）、ＯＤ６００を０．１で播種し、２５０ｒｐｍで振とうしながら３７℃で培養した。各継代からの粗培養上清を収集し、ＴｃｄＢ捕捉を用いてＥＬＩＳＡによってアッセイし、ＨＲＰコンジュゲートされた抗Ｌｌａｍａ　ＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）によってＡＢＡＢの発現を検出した。
【図９０】例示的なＳｂ－ＡＢＡＢ特性決定（遺伝子型確認）を示す。Ｓ．Ｂｏｕｌａｒｄｉｉ対Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ　Ｆｕｎｇａｌ　ＩＴＳライブラリ：Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ　ｂｏｕｌａｒｄｉｉとの配列アラインメントの差０．０％、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅとの差０．７１％。結果は、亜種を報告しないため、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅとして報告された。
【図９１】例示的なＦＺ００２の特性決定（ゲノム挿入）を示す。
【図９２】例示的なＦＺ００２の特性決定（ゲノム挿入）を示す。
【図９３】例示的なＦＺ００２の特性決定（ゲノム挿入）を示す。
【図９４】例示的なＦＺ００２の特性決定（ゲノム挿入）を示す。
【図９５】例示的なＦＺ００２の特性決定（ＴｃｄＢに対する中和活性）を示す。
【図９６】例示的なＦＺ００２の特性決定（抗真菌感受性）を示す。
【図９７】例示的なＳｂ－ＡＢＡＢの特性決定（抗生物質感受性）を示す。Ｓｂ－ＡＢＡＢは、野生型と同様であり、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ感染治療に使用される示された濃度では、以下の抗生物質に対して感受性ではなかった。４２μｇ／ｍＬのコリスチン、３５μｇ／ｍｌのゲンタマイシン、４００μｇ／ｍｌのカナマイシン、２１５μｇ／ｍｌのメトロニダゾール、４５μｇ／ｍｌのバンコマイシン、１９．８μｇ／ｍＬのクリンダマイシン。
【図９８】例示的なＳｂ－ＡＢＡＢの特性決定（抗真菌活性）を示す。Ｓｂ－ＡＢＡＢは、示される濃度で、Ｇ４１８、クロトリマゾール、ケトコナゾール、イトラコナゾールに対して感受性であった。ＦＺ００２感受性の抗真菌感受性は、野生型と同様である。ＷＴ細胞もＦＺ００２細胞も、１０ｍＭであっても、セフメタゾール又はセフタジジムに対して感受性ではなかった。
【図９９】例示的なＳｂ－ＡＢＡＢ特性決定（ＧＩ環境耐性）を示す。Ｓｂ－ＡＢＡＢ及び野生型を、指示されたＧＩ環境培地条件で１時間治療した後、３７℃で培養した。２４時間培養後のＣＦＵカウントは、Ｓｂ－ＡＢＡＢが野生型と同様であり、最も試験条件に耐性であるが、ＨＣＬ緩衝液１．２（胃環境を模倣する）及び０．０１胆汁塩に感受性であることを示した。
【図１００】例示的なＦＺ００２の特性決定（ＰＫ（インビボ）；糞便／胃腸管（インビボ）におけるＧＯＩ発現）を示す。Ｃ５７ＢＬ／６雄マウスに、糞便試料を収集した後、Ｄ０からＤ３までの1×10^{9}／用量／日（合計４用量）のＦＺ００２を投与した。糞便試料を、Ｄ０、及び第１、第２、第３の投与の１日後、又は最終投与の１日後及び４日後に収集した。各ラインは、各マウスの糞便試料中のＡＢＡＢレベルの動態変化を示す。
【図１０１】例示的なＦＺ００２の特性決定（コロニー形成単位（ＣＦＵ））を示す。時点１　ＣＦＵ（左）：１ｍＬの試料を、１ｍＬのＦＺ００２－６Ｇ１（ロット２０２１年８月１１日、１０＾８個の細胞／ｍＬ）を播種した１００ｍＬのＳＤＣ培地から取り出し、３７℃及び２５０ｒｐｍで０時間インキュベートした　試料名：ＡＷ－ＰＲＯ－０１２３－ＦＯＳ－ＳＡＭ１０．１．４．２－０９ＤＥＣ２１　結果：約８．８３Ｅ＋０４ＣＦＵ。時点４　ＣＦＵ（右）：１ｍＬの試料を、１ｍＬのＦＺ００２－６Ｇ１（ロットＡＷ２１０２４－０１６－ＦＯＳ－ＲＣＢ－１０ＤＥＣ２０２１、１０＾８個の細胞／ｍｌ）を播種した１００ｍＬのＳＤＣ培地から取り出し、３７℃及び２５０ｒｐｍで０時間インキュベートした　試料名：ＡＷ－ＰＲＯ－０１２３－ＦＯＳ－ＳＡＭ１０．６．２－１４

ＤＥＣ２１　結果：約１．８２Ｅ＋０５ＣＦＵ。
【図１０２】ランダムに選択されたコロニーからの例示的なＡＢＡＢ発現を示す。１４個のコロニーは、１個のＯＤ６００の細胞当たり２０ｎｇ／ｍＬより大きい値を示した。３個のコロニーは、低い発現を示した（ＡＢＡＢの１個のＯＤ６００の細胞当たり１３ｎｇ／ｍｌ～２０ｎｇ／ｍｌ）。２個のコロニーは、検出可能なＡＢＡＢの発現を示さなかった。
【図１０３】例示的なＦＺ００６発生フローチャートを示す。
【図１０４】例示的なカセット含有プラスミド構築及びカセット調製を示す。
【図１０５】ＦＺＭＹＡ０６－１６のエレクトロポレーション後の例示的な第１のエレクトポレーション及びコロニー形成を示す。
【図１０６】例示的なスクリーニング処理を示す。
【図１０７】例示的なＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図１０８】クローン均一性スクリーニングのための例示的なＥＬＩＳＡを示す。
【図１０９】発現カセットの例示的な部位特異的挿入を示す。
【図１１０－１】ｐＴＥＦ－ａｈＴＮＦ－α＋細胞の第２のエレクトロポレーションを示す。ｐＴＤＨ３－ＵＲＡ３カセットを用いた形質転換クロスオーバーのために、ｐＴＥＦ－ａＴＮＦ－α－Ｆｃ－ＵＲＡ３（クローンＢ１０、Ｃ２）で形質転換された２種類の上位クローンからの単一コロニー。ｐＴＤＨ３カセットを用いた形質転換クロスオーバーのために、ｐＴＥＦ－ａＴＮＦ－α－Ｆｃ－ＤＨＦＲ（クローンＡ２、Ａ４）で形質転換された２種類の上位クローンからの単一コロニー。ｐＴＤＨ３カセットの単一形質転換又はｐＴＥＦ及びｐＴＤＨ３カセットの同時形質転換のためのＦＺＭＹＡ０６－１６。
【図１１０－２】図１１０－１の続きである。
【図１１１】ｐＴＥＦ－ａｈＴＮＦ－α＋細胞の第２のエレクトロポレーションのためのカセット調製を示す。
【図１１２】ＦＺＭＡＹ０６－１６におけるｐＴＥＦ／ｐＴＤＨ３－ａｈＴＮＦ－α－ＤＦＲ１カセットを用いた第２のエレクトロポレーションを示す。
【図１１３】例示的な第２のエレクトロポレーション陽性クローンスクリーニングを示す。
【図１１４】例示的な第２のエレクトロポレーション陽性クローンスクリーニングを示す。
【図１１５】例示的な第２のエレクトロポレーション陽性クローンスクリーニングを示す。
【図１１６】対応する選択プレート上に再ストリークされた各群からの例示的な上位クローンを示す。
【図１１７】各群から選択される例示的な上位クローンを示す。
【図１１８】例示的なＦＺ００６の特性決定を示す。
【図１１９】例示的なＦＺ００６の特性決定（急性発現レベル）を示す。
【図１２０】例示的なＦＺ００６の特性決定（継代１及び継代１１で培養された細胞の２４時間発現レベル）を示す。
【図１２１】例示的なＦＺ００６の特性決定（上位クローンの２時間急性発現及びクローン均一性）を示す。
【図１２２】例示的なＦＺ００６の特性決定（成長表現型）を示す。
【図１２３】例示的なＦＺ００６の特性決定（成長表現型）を示す。
【図１２４】例示的なＦＺ００６の特性決定（成長曲線）を示す。
【図１２５－１】例示的なＦＺ００６の特性決定（成長曲線）を示す。
【図１２５－２】図１２５－１の続きである。
【図１２６】例示的なＦＺ００６の特性決定（発現安定性）を示す。
【図１２７】例示的なＦＺ００６の特性決定（発現安定性）を示す。
【図１２８】発現カセットの部位特異的挿入の例示的な特性決定を示す。
【図１２９】発現カセットの部位特異的挿入の例示的な特性決定を示す。

【図１３０】例示的なＦＺ００６ｍ発生フローチャートを示す。
【図１３１】ＦＺ００６ｍの発生のための例示的なカセット含有プラスミド及びカセット調製を示す。
【図１３２】ＦＺＭＹＡ０６－１６の例示的なエレクトロポレーションを示す。
【図１３３】ＦＺ００６ｍの例示的なスクリーニング処理を示す。
【図１３４】ＦＺ００６ｍの例示的なＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図１３５】ＦＺ００６ｍのクローン均一性スクリーニングのためのＥＬＩＳＡを示す。
【図１３６】ｐＴＤＨ３－ａＴＮＦ－α－Ｆｃ－ａＩＬ１７Ａ－ＤＨＦＲの例示的な構築を示す。
【図１３７】ｐＴＤＨ３－ａＴＮＦ－α－Ｆｃ－ａＩＬ１７Ａ－ＤＦＲ１の例示的な構築を示す。
【図１３８】ｐＴＥＦ－ａＴＮＦ－α－Ｆｃ－ａＩＬ１７Ａ－ＤＨＦＲの例示的な構築を示す。
【図１３９】ｐＴＥＦ－ａＴＮＦ－α－Ｆｃ－ａＩＬ１７Ａ－ＤＦＲ１の例示的な構築を示す。
【図１４０】ｐＴＥＦ－ａＴＮＦ－α－ａＩＬ１７Ａ－Ｆｃ　ＤＦＲ１の例示的な構築を示す。
【図１４１】例示的なＦＺ００８発生フローチャートを示す。
【図１４２】例示的なカセット含有プラスミド構築及びカセット調製を示す。
【図１４３】例示的なカセット含有プラスミド構築及びカセット調製を示す。
【図１４４】ＦＺＭＹＡ０６－１６の例示的なエレクトロポレーションを示す。
【図１４５】ＦＺ００８クローン（ＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨ）の例示的なスクリーニングプロセスを示す。
【図１４６】ＦＺ００８＿ａｈＴＮＦ－α－Ｆｃ－ａｈＩＬ１７ＡのＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図１４７】ＦＺ００８＿ａｈＴＮＦ－α－ａｈＩＬ１７Ａ－ＦｃのＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図１４８】例示的なＳｂ－ａＴＮＦ－α－ａＩＬ１７Ａの特性決定を示す。
【図１４９】例示的な特性決定（特異的結合活性）を示す。ｈＴＮＦ－α（左）及びｈＩＬ－１７Ａ（右）に対する両方の形式は、ＦＺ００８＿ａｈＴＮＦ－α－ａｈＩＬ１７Ａ－Ｆｃとは異なり、ＦＺ００８＿ａＴＮＦ－α－Ｆｃ－ａＩＬ１７Ａと比較して、より高い発現レベルを示した。
【図１５０】例示的な特性決定（中和活性）を示す。
【図１５１】例示的な特性決定（成長表現型）を示す。
【図１５２】例示的な特性決定（発現カセットの部位特異的挿入）を示す。
【図１５３】例示的なＦＺ０１０ｍ発生フローチャートを示す。
【図１５４】例示的なカセット含有プラスミド構築及びカセット調製を示す。
【図１５５】ＦＺＭＹＡ０６－１６の例示的なエレクトロポレーションを示す。
【図１５６】ＦＺ０１０ｍクローンの例示的なスクリーニングプロセスを示す。
【図１５７】ｐＴＥＦ／ｐＴＤＨ３－ｍＩＬ２２－Ｆｃ－ＵＲＡ３カセットを用いたクローンのＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図１５８】ＦＺ０１０ｍ＿ｐＴＥＦ－ｍＩＬ２２－Ｆｃ－ＤＨＦＲのＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図１５９】ＦＺ０１０ｍ＿ｐＴＤＨ３－ｍＩＬ２２－Ｆｃ－ＵＲＡ３／ＤＨＦＲのＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図１６０】ＦＺ０１０ｍ＿ｐＴＥＦ－ＵＲＡ３＋ｐＴＤＨ３－ＤＨＦＲの同時形質転換のＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図１６１】均一性の例示的な特性決定。
【図１６２】上位発現クローン均一性の選択を示す。
【図１６３】食物及び水の消費を示す。

【図１６４】体重及び空腹時血糖レベルを示す。
【図１６５】例示的なＦＺ０１４発生フローチャートを示す。
【図１６６】ゴールデンゲート反応からの直接的な例示的なカセット調製を示す。
【図１６７】ｐＴＤＨ３－２ＫＤ１－Ｆｃ－アプロチニン－ＤＦＲ１カセット調製を示す。
【図１６８】ＦＺＭＹＡ０６－１６において、異なるカセットを用いたエレクトロポレーション後の陽性クローンを示す。
【図１６９】ＦＺ０１４クローンの例示的なスクリーニングプロセスを示す。
【図１７０】ＦＺ０１４＿２ＫＤ１－ＦｃのＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図１７１】ＦＺ０１４＿アプロチニン－２ＫＤ１－ＦｃのＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図１７２】ＦＺ０１４＿２ＫＤ１－Ｆｃ－アプロチニンのＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図１７３】２ＫＤ１－Ｆｃの３つの形式の発現比較を示す。
【図１７４】ＦＺ０２４の例示的な特性決定（成長曲線）を示す。
【図１７５】ＦＺ０１４の例示的な特性決定（成長曲線）を示す。
【図１７６】ＦＺ０１４の例示的な特性決定（発現カセットの部位特異的挿入）を示す。
【図１７７】ＦＺ０１４の例示的な特性決定（ＲＶＡ抗原への２ＫＤ１結合を検出するためのＥＬＩＳＡ）を示す。
【図１７８】ＦＺ０１４の例示的な特性決定（ウイルス中和アッセイ）を示す。ウイルス＝Ｗａ　ａｔｔ　ＨＲＶ株、作業希釈１／５００＞１／２５０　ｄｉｌ　１－２；ＭＡ１０４を金曜日から月曜日まで１６回継代する；アッセイ開発＞感染細胞を、Ａｌｅｘａ４８８で標識されたＮａｎｏｂｏｄｙ　２ＫＤ１で染色した、作業希釈：ＰＢＳ－Ｅｖａｎ　Ｂｌｕｅ中の１／５００、３７℃で４５分間。
【図１７９】例示的なＦＺ０１６発生フローチャートを示す。
【図１８０】ゴールデンゲート反応からの直接的な例示的なカセット調製を示す。
【図１８１】ＦＺＭＹＡ０６－１６の例示的なエレクトロポレーションを示す。
【図１８２】例示的なスクリーニング処理を示す。
【図１８３】ＦＺ０１６＿Ｍ６－Ｍ４－Ｆｃの例示的なＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図１８４】ＦＺ０１６＿Ｍ６－Ｍ５－Ｆｃの例示的なＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図１８５】ＦＺ０１６＿Ｍ６－Ｍ４－Ｆｃ対ＦＺ０１６＿Ｍ６－Ｍ５－Ｆｃの発現比較を示す。
【図１８６】ブタの胃ムチンに対するＮｏＶｒ　ＶＬＰ　ＧＩＩ．４／１９７４　ＶＬＰ天然抗原の接着の遮断に対する２ＫＤ１の遮断効果を検出するための例示的なＥＬＩＳＡ遮断アッセイを示す。
【図１８７】Ｈ型３炭水化物に対するＮｏＶｒ　ＶＬＰ　ＧＩＩ．４／１９７４　ＶＬＰ天然抗原の接着の遮断に対する２ＫＤ１の遮断効果を検出するための例示的なＥＬＩＳＡ遮断アッセイを示す。
【図１８８】ＦＺ０２０発生の概略的な構造を示す。
【図１８９】ＦＺ０２０の発生の例示的な概要を示す。
【図１９０】例示的なＦＺ０２０発生フローチャートを示す。
【図１９１】プラスミド構築を含有する例示的なカセットを示す。
【図１９２】ＦＺ０２０発生のための例示的なカセット調製を示す。
【図１９３】ＦＺＭＹＡ０６－１６の例示的な第１のエレクトロポレーションを示す。
【図１９４】ＦＺ００２＿ＡＢＡＢ（ｐＴＤＨ３－ＤＨＦＲ）の例示的なスクリーニング処理を示す。
【図１９５】ＦＺ００２＿ＡＢＡＢ発現（ｐＴＤＨ３－ＤＨＦＲ）のＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。

【図１９６】上位Ｓｂ－ＡＢＡＢ（ｐＴＤＨ３－ＤＨＦＲ）クローン均一性チェックを示す。
【図１９７】例示的なＦＺ００２＿ＡＢＡＢ－２Ｅ９（ｐＴＤＨ３－ＡＢＡＢ－ＤＨＦＲ）の特性決定（成長表現型）を示す。
【図１９８－１】例示的なＦＺ００２＿ＡＢＡＢ－２Ｅ９（ｐＴＤＨ３－ＡＢＡＢ－ＤＨＦＲ）の特性決定（成長曲線）を示す。
【図１９８－２】図１９８－１の続きである。
【図１９９】例示的なＦＺ００２＿ＡＢＡＢ－２Ｅ９（ｐＴＤＨ３－ＡＢＡＢ－ＤＨＦＲ）の特性決定（安定性）を示す。
【図２００】例示的なＡＢＡＢ－２Ｅ９（ｐＴＤＨ３－ＡＢＡＢ－ＤＨＦＲ）の特性決定（急性発現）を示す。
【図２０１】例示的なＡＢＡＢ－２Ｅ９（ｐＴＤＨ３－ＡＢＡＢ－ＤＨＦＲ）の特性決定（ゲノム特異的挿入部位）を示す。
【図２０２】ＦＺ００２－２Ｅ９Ｂ２のＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ株の例示的な生成及び特性決定を示す。
【図２０３】ＦＺＥ１増幅コピー数の概略図を示す。
【図２０４】コピー数を増幅するＦＺＥ１によるＦＺ００２－２Ｅ９－Ｂ２のＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ株の生成を示す。成長回復とは、ＦＺＥ１治療中の一晩培養物で、ＯＤ６００がＦＺＥ１によって治療されていない細胞の少なくとも半分であると定義され、これは成長回復とみなされる。細胞を回収したら、発現レベル試験のためにＹＰＤプレート上に細胞をプレーティングするか、又は次のレベルの治療に進む（ＦＺＥ１のより高い濃度）。
【図２０５】発現レベルを増幅するＦＺＥ１によるＦＺ００２－２Ｅ９Ｂ２のＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ株の生成を示す。
【図２０６】発現レベルを増幅するＦＺＥ１によるＦＺ００２－２Ｅ９－Ｂ２のＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ株の生成を示す。
【図２０７】ＦＺ０２０のＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ株の生成及び特性決定の例示的な概略図を示す。
【図２０８】ＴＮＦ－α－Ｆｃ発現カセット形質転換及び形質転換体スクリーニングを示す。
【図２０９】ａｈＴＮＦ－α＋ＡＢＡＢのＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図２１０】例示的なＦＺ０２０の特性決定（成長表現型）を示す。
【図２１１】例示的なＦＺ０２０の特性決定（ゲノム特異的挿入部位）を示す。
【図２１２】例示的なＦＺ０２０の特性決定（ゲノム特異的挿入部位）を示す。
【図２１３】例示的なＦＺ０２０の特性評価（ＴｃｄＢ及びヒトＴＮＦａの両方に対する結合活性）を示す。
【図２１４】例示的なＦＺ０２０の特性決定（ＴｃｄＢ及びヒトＴＮＦａに対する中和活性）を示す。
【図２１５】例示的なＦＺ０２４発生フローチャートを示す。
【図２１６】ＦＺ０２４発生のためのレプチン－ＨＡ－ＤＦＲ１／レプチン－Ｆｃ－ＤＦＲ１カセットのＰＣＲを示す。
【図２１７】ＦＺＭＹＡ０６－１６のエレクトロポレーションを示す。
【図２１８】ＦＺ０２４クローンの例示的なスクリーニング処理を示す。
【図２１９】ＦＺ０２４クローンの例示的なＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図２２０】マウス研究のための「レプチン－ＨＡ」株の例示的な生成を示す。ＦＺＹ１４－Ｅ６の細胞バンクからの２つの凍結バイアルを使用し（各々１ｍＬ中に約１×１０＾８個の細胞）、２×５０ｍＬのＹＰＤを播種した。
【図２２１】例示的なＦＺ０２８発生フローチャートを示す。
【図２２２】ＦＺ０２８発生のためのゴールデンゲート反応からの直接的な例示的なカセット調製を示す。

【図２２３】ＦＺＭＹＡ０６－１６のエレクトロポレーションを示す。
【図２２４】ＦＺ０２８クローンの例示的なスクリーニング処理を示す。
【図２２５】ＦＺ０２８クローンの例示的なＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図２２６】例示的なＦＺ０１０発生フローチャートを示す。
【図２２７】ＦＺ０１０発生のための例示的なカセット含有プラスミド構築及びカセット調製物を示す。
【図２２８】ＦＺＭＹＡ０６－１６の例示的なエレクトロポレーションを示す。
【図２２９】例示的なスクリーニングプロセスを示す。
【図２３０】Ｎ末端又はＣ末端でｙＦｃ（Ｎ２９７Ｑ）と融合したＦＺ０１０＿ｐＴＤＨ３－ｈＩＬ２２の第１の２時間の急性ＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図２３１】ＦＺ０１０＿ｐＴＤＨ３－ｈＩＬ２２－ＤＦＲ１の第１の２時間の急性ＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図２３２】均一性の例示的な評価を示す。
【図２３３】Ｎ末端又はＣ末端でｙＦｃ（Ｎ２９７Ｑ）と融合したＦＺ０１０＿ｐＴＤＨ３－ｈＩＬ２２の第２の２時間の急性ＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図２３４】ＦＺ０１０＿ｐＴＤＨ３－ｈＩＬ２２－ＤＦＲ１の第２の２時間の急性ＥＬＩＳＡスクリーニングを示す。
【図２３５】Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（Ｓｂ）のためのＦＺＥ１（メトトレキサート及びスルファニルアミドの組み合わせ）選択の発生のための例示的なフローチャートを示す（ＳｂにおけるＦＺＥ１有効用量を試験する）。
【図２３６】Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（Ｓｂ）におけるメトトレキサート（ＭＴＸ）有効用量の試験を示す。ｐＣＥＶ－Ｇ４－Ｋｍ－ＤＨＦＲ及びｐＣＥＶ－Ｇ４－ＫｍがＦＺＭＹＡ０６－１６を形質転換し、形質転換された単一のクローンが、ＭＴＸを用いた成長の特性評価のためにピックアップされた。細胞を、ＯＤ＝０．２で播種し、２４時間の読み取りを行った。ＭＴＸ単独では、５００ｎＭであっても成長阻害に影響を及ぼすのに十分ではなかった。
【図２３７】Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（Ｓｂ）におけるスルファニルアミド有効用量の試験を示す。スルファニルアミドをＤＭＳＯ中で調製した。担体ＤＭＳＯは、Ｓｂに対して毒性を示さなかった。スルファニルアミドは、１０ｍｇ／ｍＬ未満で使用することができる。
【図２３８】Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（Ｓｂ）におけるスルファニルアミド有効用量の試験を示す。スルファニルアミド（５ｍｇ／ｍｌ未満）を、ＭＴＸとの組み合わせに使用することができる。
【図２３９】Ｓ．ｂｏｕｌｄａｒｄｉｉ（Ｓｂ）におけるＦＺＥ１（ＭＴＸ及びスルファニルアミド（スルファ）の組み合わせ）の有効用量の試験を示す。組み合わせの場合、ＭＴＸ＞１０～１００μＭ、スルファは、１ｍｇ／ｍｌで使用することができる。
【図２４０】Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（Ｓｂ）におけるＦＺＥ１（ＭＴＸ及びスルファニルアミド（スルファ）の組み合わせ）の有効用量の試験を示す。組み合わせの場合、ＭＴＸは、５０～２５０μＭで使用することができ、スルファは、１ｍｇ／ｍｌで使用することができる。
【図２４１】Ｓｂにおける選択のためのＦＺＥ１用量の確認を示す。ＤＨＦＲ選択された形質転換体は、５０～３００μＭのＭＴＸ及び１ｍｇ／ｍｌのスルファから選択することができる。いくつかの場合では、ＤＨＦＲ選択のための最適化された用量は、明確なバックグラウンド及びスクリーニングのための相対的なより多くの形質転換体に起因して、２５０μＭのＭＴＸ及び１ｍｇ／ｍｌのスルファである。
【図２４２】マウスＤＨＦＲ及び酵母ＤＦＲ１のアミノ酸配列類似性を示す。
【図２４３】選択マーカーとしてのＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（Ｓｂ）ＤＦＲ１の発生の概略図を示す。
【図２４４】異なる位置に挿入されたＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（Ｓｂ）抗ＴＮＦ－α－Ｆｃ－ＤＦＲ１が、ＦＺＥ１（スルファ１ｍｇ／ｍＬ＋５０μＭのＭＴＸ）を示し、選択さ

れたクローンは、ＧＯＩの最高発現を示すことを示す。
【図２４５】ＤＨＦＲによる高発現クローンのスクリーニングを示す。ＧＯＩカセットがデルタ部位に挿入された、ＵＲＡ３又はＤＨＦＲ選択マーカーによる抗ｈＩＬ－１７Ａ－Ｆｃ発現クローンのスクリーニング。デルタ挿入相同性アームに隣接するＵＲＡ３又はＤＨＦＲ選択マーカーとともにＧＯＩカセットを含むＤＮＡ断片を有するＦＺＭＹＡ０６－１６（ＵＲＡ３－／－、ＧＡＰ１－／－）株で形質転換した後、陽性クローンを、以下の対応するプレートからピックアップした。ＵＲＡ３選択のためのＳＤＣＡＡ－ＵＲＡ３プレート及びＤＨＦＲ選択のためのＹＰＤ＋ＦＺＥ１。１８４個の陽性クローンを、各々、３７℃、２５０ｒｐｍで振とうしながら、６００μｌのＹＰＤで２４時間、継代培養した。培養上清を１０倍希釈し、ＥＬＩＳＡによって検出した。ＯＤ４５０ｎｍでのデータ読み出し。
【図２４６】ＤＨＦＲによる高発現クローンのスクリーニングを示す。ＧＯＩカセットがｐＴＤＨ３部位を挿入した、陽性ＵＲＡ３又はＤＨＦＲ選択マーカーによる抗ｈＴＮＦ－α－Ｆｃ発現クローンのスクリーニング。ｐＴＤＨ３相同性アームに隣接するＵＲＡ３又はＤＨＦＲ選択マーカーとともにＧＯＩカセットを含むＤＮＡ断片を有するＦＺＭＹＡ０６－１６（ＵＲＡ３－／－、ＧＡＰ１－／－株で形質転換した後、陽性クローンを、以下の対応するプレートからピックアップした。ＵＲＡ３選択のためのＳＤＣＡＡ＋ＵＲＡ３プレート及びＤＨＦＲ選択のためのＹＰＤ＋ＦＺＥ１。８４個の陽性クローンを、各々、３７℃、２５０ｒｐｍで振とうしながら、６００μｌのＹＰＤで２４時間、継代培養した。培養上清を２０倍希釈し、ＥＬＩＳＡによって検出した。ＯＤ４５０ｎｍでのデータ読み出し。
【図２４７】ＦＺＥ１によるコピー数の増幅及び遺伝子発現の増加の概略図を示す。
【図２４８】ＦＺＥ１を含む培地中でジヒドロ葉酸レダクターゼを保有する操作された酵母を培養することによる、ＧＦＰ発現カセットのコピー数の増幅を示す。
【図２４９】ＦＺＥ１によるＧＦＰ発現の増加を示す。適応のためにＦＺＥ１培地中で低発現クローン及び高発現クローンの両方を培養すると、発現レベルが上昇する。
【図２５０】ＦＺＥ１を含む培地中で酵母を培養した後のＦＺ００２によるＡＢＡＢの発現の増加を示す。ＦＺ００２クローン２Ｅ９及び６Ｇ１は、適応するまでＦＺＥ１培養培地中で培養し続けた（左パネル）。単一クローンをピックアップして、ＥＬＩＳＡによってＡＢＡＢ発現を測定し、ＯＤ４５０を示した（右パネル）。
【図２５１】ＦＺＥ１を含む培地中で酵母を培養した後のＦＺ００２によるＡＢＡＢの発現の増加を示す。
【００４８】
本発明の追加の利点は、一部には、以下の説明に記載され、一部には、説明から明白であるか、又は本発明の実施により学ぶことができる。本発明の利点は、添付の特許請求の範囲に特に指摘される要素及び組み合わせにより実現され、達せられるであろう。前述の概要及び以下の発明を実施するための形態の両方は、単に例示的及び説明的であり、特許請求される本発明を限定するものではないことを理解されたい。
【発明を実施するための形態】
【００４９】
本開示は、治療用ポリペプチド（複数可）を発現する、かつ／又は治療用ポリペプチド（複数可）をコードする核酸を含む、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株に関する技術を提供する。そのようなＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、いくつかの実施形態では、治療薬として使用する前に、バイオリアクター又は細菌発酵器を利用し、その後に下流のポリペプチド処理及び精製を行う従来のインビトロポリペプチド発現系（例えば、ＣＨＯ又はＥ．ｃｏｌｉ細胞）を必要とすることなく、治療用ポリペプチド（複数可）の安定した構成的発現を提供することができる。
【００５０】
本開示のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、例えば、経口送達又は直腸送達することができ、医療専門家ではなく、対象による自己投与を可能にする。かかる

自己投与は、改善された治療コンプライアンス、及び最終的には、疾患及び／若しくは障害の好ましい治療及び／又は予防をもたらし得る。

【００５１】

前述の説明及び関連する図面に提示された教示の利益を有する、開示される組成物及び方法が関係する当業者には、本明細書に開示された多くの修正及び他の実施形態が容易に明らかであろう。したがって、本開示が開示される特定の実施形態に限定されず、修正及び他の実施形態が添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されることを理解されたい。当業者は、本明細書に記載される態様の多くの変形及び適応を認識するであろう。これらの変形例及び適応は、本開示の教示に含まれ、本明細書の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

【００５２】

特定の用語が本明細書で採用されるが、それらは一般的かつ説明的な意味でのみ使用され、限定の目的では使用されない。

【００５３】

本開示を読むと当業者には明らかであろうように、本明細書に記載及び例示される個々の実施形態の各々は、本開示の範囲又は趣旨から逸脱することなく、他のいくつかの実施形態のいずれかの特徴から容易に分離され得る、又はそれらと組み合わされ得る個別の成分及び特徴を有する。

【００５４】

任意の列挙された方法は、列挙された事象の順序、又は論理的に可能な任意の他の順序で実行され得る。すなわち、特に明記されない限り、本明細書に示される任意の方法又は態様が、そのステップが特定の順序で実施されることを要求するものとして解釈されることは決して意図されない。したがって、方法の請求項が、特許請求の範囲又は説明において、ステップが特定の順序に限定されるべきであると具体的に記述しない場合、いかなる点においても、順序が推論されることは決して意図されない。これは、ステップ又は操作フローの配置、文法的な構成若しくは句読点に由来する明白な意味、又は明細書に記載される態様の数若しくはタイプに関する論理事項を含む、解釈のための任意の可能な非明示的根拠について保持される。

【００５５】

本明細書で言及される全ての刊行物は、引用された刊行物に関連する方法及び／又は材料を開示及び説明するために、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書で考察される刊行物は、本出願の出願日前に専らそれらの開示のために提供されている。本明細書におけるいかなるものも、本発明が先行発明によってそのような公開に先行する権利がないことを認めるものと解釈されるべきではない。更に、本明細書で提供される刊行物の日付は、実際の刊行日とは異なる場合があり、独立して確認することができる。

【００５６】

本開示の態様は、特定の法定クラス（例えば、系の特定の法定クラス）で説明及び特許請求され得るが、これは、便宜上のみのものであり、当業者は、本開示の各態様が任意の法定クラスで説明及び特許請求され得ることを理解するであろう。

【００５７】

本明細書で使用される用語は、特定の態様を説明することのみを目的とし、限定することが意図されないことも理解されるべきである。別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、開示される組成物及び方法が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同じ意味を有する。一般的に使用される辞書で定義されるような用語は、本明細書及び関連技術の文脈におけるそれらの意味と一致する意味を有すると解釈されるべきであり、本明細書で明示的に定義されない限り、理想的な又は過度に形式的な意味で解釈されるべきではないことが更に理解されるであろう。

【００５８】

本開示の様々な態様を説明する前に、以下の定義が提供され、特に指示しない限り、使用されるべきである。追加の用語は、本開示の他の場所で定義され得る。

【００５９】
定義
本明細書で使用される場合、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」は、言及されるように記載される特徴、要素、ステップ、又は構成要素の存在を意味すると解釈されるが、１つ以上の他の特徴、要素、ステップ、構成要素、又はそれらの群の存在又は追加を排除するものではない。更に、「～による（ｂｙ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」、「～で構成される（ｃｏｍｐｒｉｓｅｄ　ｏｆ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、「含まれる（ｉｎｃｌｕｄｅｄ）」、「伴う（ｉｎｖｏｌｖｉｎｇ）」、「伴う（ｉｎｖｏｌｖｅｓ）」、「伴われる（ｉｎｖｏｌｖｅｄ）、及び「例えば（ｓｕｃｈ　ａｓ）のような用語は各々、それらの開放的な非限定的な意味で使用され、互換的に使用され得る。更に、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という用語は、「～から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」及び「～からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」という用語によって包含される例及び態様を含むことを意図している。同様に、「～から本質的になる」という用語は、「～からなる」という用語によって包含される例を含むことを意図している。
【００６０】
本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形の「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、文脈上別段明らかに指示されない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株」、「遺伝子改変された酵母」、「担体」、又は「炎症性腸疾患」への言及は、限定されないが、２つ以上のそのようなＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株、遺伝子改変された酵母、担体、又は炎症性腸疾患などの混合物又は同時発生を含む。
【００６１】
比率、濃度、量、及び他の数値データは、本明細書では範囲形式で表すことができることに留意されたい。更に、範囲の各終点は、他の終点と関連して、及び他の終点とは独立して、両方とも重要であることが理解されよう。本明細書に開示されるいくつかの値が存在し、各値は、値自体に加えて、その特定の値を「約」として本明細書に開示されることも理解される。例えば、値「１０」が開示される場合、「約１０」もまた開示される。本明細書では、範囲は、「約」ある特定の値から、及び／又は「約」別の特定の値まで、のように表現され得る。同様に、値が先行詞「約」の使用により近似値として表される場合、特定の値が更なる態様を形成することを理解されたい。例えば、値「１０」が開示される場合、「１０」もまた開示される。
【００６２】
ある範囲が表される場合、更なる態様は、１つの特定の値から、及び／又は他の特定の値までを含む。例えば、記載された範囲が、境界の一方又は両方を含む場合、それらの含まれる境界のいずれか又は両方を除外する範囲も本開示に含まれ、「ｘ～ｙ」という語句は、「ｘ」から「ｙ」までの範囲、及び「ｘ」よりも大きく、かつ「ｙ」よりも小さい範囲を含む。範囲はまた、上限、例えば、「約ｘ、ｙ、ｚ、又はそれ未満」として表すことができ、「約ｘ」、「約ｙ」、及び「約ｚ」の特定の範囲並びに「ｘ未満」、「ｙ未満」、及び「ｚ未満」の範囲を含むと解釈されるべきである。同様に、「約ｘ、ｙ、ｚ、又はより大きく」という語句は、「約ｘ」、「約ｙ」、及び「約ｚ」の特定の範囲並びに「ｘより大きい」、「ｙより大きい」、及び「ｚより大きい」の範囲を含むと解釈されるべきである。加えて、「約「ｘ」～「ｙ」」という語句（「ｘ」及び「ｙ」は数値である）は、「約「ｘ」～約「ｙ」」を含む。
【００６３】
そのような範囲形式は、利便性及び簡潔性のために使用され、よって、範囲の限界として明示的に列挙された数値だけでなく、各数値及び部分範囲が明示的に列挙されているかのように、その範囲内に包含される全ての個々の数値又は部分範囲も含むように柔軟に解釈されるべきであることを理解されたい。例示するために、「約０．１％～５％」の数値

範囲は、約０．１％～約５％の明示的に列挙される値だけでなく、指示される範囲内の個々の値（例えば、約１％、約２％、約３％、及び約４％）並びに部分範囲（例えば、約０．５％～約１．１％、約５％～約２．４％、約０．５％～約３．２％、及び約０．５％～約４．４％、及び他の可能な部分範囲）も含むように解釈されるべきである。

【００６４】

本明細書で使用される場合、「約」、「およそ」、「～又は約～」、及び「実質的に」という用語は、問題の量又は値が、特許請求の範囲に記載されるか、又は本明細書で教示されるように、正確な値、又は同等の結果若しくは効果を提供する値であり得ることを意味する。すなわち、量、サイズ、配合、パラメータ、並びに他の量及び特徴は、正確ではなく、かつ正確である必要はないが、所望な場合、公差、変換係数、四捨五入、測定誤差など、及び同等の結果若しくは効果が得られるような当業者に既知の他の因子を反映して、近似値及び／又はそれより大きいか、若しくは小さい場合があることが理解される。いくつかの状況では、同等の結果又は効果を提供する値を合理的に決定することができない。そのような場合、本明細書で使用される場合、別段の指示又は推測がない限り、「約」、「およそ」及び「～又は約～」は、±１０％の変動を示す公称値であることが一般に理解される。一般に、量、サイズ、配合、パラメータ、又は他の量若しくは特徴は、そのようであると明示されているか否かにかかわらず、「約」、「およそ」、「～又は約～」である。ある定量的値の前に「約」、「およそ」、又は「～又は約～」が使用される場合、そのパラメータはまた、特に明記されない限り、特定の定量的値自体も含むことが理解される。

【００６５】

本明細書で使用される場合、「任意選択的な」又は「任意選択的に」という用語は、その後に説明される事象又は状況が生じてもよく、又は生じなくてもよいことを意味し、この説明には、当該事象又は状況が生じる場合、及び生じない場合が含まれる。

【００６６】

「糖尿病」は、高血糖症を特徴とする慢性疾患を指す。伝統的に、糖尿病症例の大部分は、１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）及び２型糖尿病（Ｔ２Ｄ）の２つの広範な発病機序カテゴリーに分類される。しかしながら、一部の対象では、この分類は、他の遺伝的経路、免疫学的経路、又は神経内因性経路が発病機序に関与しているため、適用することができない。

【００６７】

「炎症性腸疾患」（ＩＢＤ）は、胃腸管の一部の慢性非特異的炎症を特徴とする胃腸障害の一群を指す。潰瘍性大腸炎（ＵＣ）及びクローン病（ＣＤ）は、ヒトにおけるＩＢＤの最も顕著な例である。しかしながら、ＩＢＤはまた、動物、特にイヌ、ネコ及びウマにおいて生じることが知られている。ＩＢＤは、小児の成長遅滞、直腸脱、便中の血液（例えば、メレナ及び／又は血便）、消耗、鉄欠乏症、並びに貧血（例えば、鉄欠乏性貧血及び慢性疾患の貧血又は慢性炎症の貧血）を含む、多くの症状及び合併症に関連する。ＩＢＤの病因又は複数の病因は、不明である。

【００６８】

「潰瘍性大腸炎」（ＵＣ）は、主に結腸粘膜において症状を有する慢性的かつ非特異的かつ炎症性の潰瘍性疾患を指す。頻繁に、出血性下痢、腹部けいれん、便中の血液及び粘液、倦怠感、発熱、貧血、食欲不振、体重減少、白血球減少、低アルブミン血症、及び赤血球沈降速度の上昇（ＥＳＲ）を特徴とする。ＵＣの合併症は、出血、中毒性大腸炎、中毒性巨大結腸症、時折の直腸膣瘻、及び結腸がんの発症のリスクの増加を含み得る。潰瘍性大腸炎は、関節炎、強直性脊椎炎、仙腸骨炎、後部ブドウ膜炎、結節性紅斑、壊疽性膿皮症、及び上膜硬化症などの結腸から遠く離れた合併症にも関連している。治療は、疾患の重症度及び期間によってかなり異なる。例えば、脱水及び電解質不均衡を防止するための流体療法は、重症発作においてしばしば示される。加えて、特別な食事療法が時には有用である。医薬には、様々なコルチコステロイド、スルファサラジン及びその誘導体のいくつか、並びに可能な免疫抑制薬が含まれる。

【００６９】

「クローン病」（ＣＤ）は、潰瘍性大腸炎と多くの共通点を有する。クローン病は、かなりびまん性である潰瘍性大腸炎の病変とは対照的に、病変が隣接する正常な腸から鋭敏に区別される傾向があるという点で、区別可能である。加えて、クローン病は、主に回腸（回腸炎）又は回腸及び結腸（回腸結腸炎）に悩まされている。場合によっては、結腸だけが罹患しており（肉芽腫性大腸炎）であり、時には小腸全体が関与する（空回腸炎）。まれな症例では、胃、十二指腸、又は食道が関与する。病変には、約半数の臨床症例においてサルコイド型上皮肉芽腫が含まれる。クローン病の病変は、深部潰瘍、浮腫、及び線維症を含む経壁病変であってもよく、これにより、閉塞及び瘻孔形成、並びに膿瘍形成が起こる場合がある。これは、通常ははるかに浅い病変を引き起こす潰瘍性大腸炎とは対照的であるが、時には線維症、閉塞、瘻孔形成、及び膿瘍の合併症が潰瘍性大腸炎にも見られる。

【００７０】

本明細書で使用される場合、「投与すること」は、経口及び／又は直腸であり、連続的又は断続的あってもよい投与を指すことができる。様々な態様では、開示される生物、組成物、及び／又は調製物は、治療的に投与することができる、すなわち、既存の疾患又は状態を治療するために投与される。更なる様々な態様では、開示される生物、組成物、及び／又は調製物は、予防的に投与され得る、すなわち、疾患又は状態の予防のために投与される。

【００７１】

本明細書で使用される場合、「治療剤」は、生物学的に活性であり得るか、又はそれ以外の場合、それが局所的及び／又は全身的作用によって投与される対象に対して薬理学的効果、免疫原性効果、生物学的効果及び／又は生理学的効果を誘導することができる任意の物質、化合物、分子などを指すことができる。治療剤は、一次活性剤、又は言い換えれば、組成物の効果の全体又は一部が起因する組成物の成分（複数可）であり得る。治療剤は、二次治療剤、又は言い換えれば、組成物の追加の部分及び／又は他の効果が起因する組成物の構成要素（複数可）であり得る。したがって、その用語は、タンパク質、ペプチド、ホルモン、核酸、遺伝子構築物などのような巨大分子を含む、薬物、ワクチン、及びバイオ医薬品と従来からみなされている化合物又は化学物質、並びに遺伝子改変された微生物などを包含する。治療剤は、獣医学的用途を含む医学的用途で使用される生物学的に活性な薬剤であり得る。治療剤という用語はまた、限定されないが、医薬；ビタミン；ミネラルサプリメント；疾患若しくは疾病の治療、予防、診断、治癒、若しくは緩和に使用される物質；又はプロバイオティクス微生物、プレバイオティクスなどの身体の構造若しくは機能に影響を与える物質；又は所定の生理学的環境に配置された後に生物学的に活性若しくはより活性になるプロドラッグを含む。

【００７２】

本明細書で使用される場合、「治療用ポリペプチド」は、疾患又は状態の治療又は予防に関与するか、又は伴う、生物学的活性を有するタンパク質又はペプチドを指す。

【００７３】

本明細書で互換的に使用される場合、「対象」、「個体」、又は「患者」は、哺乳動物（例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ニワトリ、シチメンチョウ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウサギ）などの脊椎動物生物を指すことができる。「対象」はまた、細胞、細胞の集合体、組織、臓器、又は生物、好ましくはヒト及びその構成成分を指し得る。

【００７４】

本明細書で使用される場合、「治療すること」及び「治療」という用語は、概して、所望の薬理学的効果及び／又は生理学的効果を得ることを指すことができる。治療することができる例示的な状態として、限定されないが、クローン病、潰瘍性大腸炎、及び他の炎症性腸疾患及び／又は炎症関連状態、並びに糖尿病、肥満、及び特定の感染症が挙げられる。効果は、疾患、障害、状態、若しくはその疾患、障害、若しくは状態に起因する有害作用の部分的若しくは完全な治癒という点で、治療的であり得る。「治療」という用語は、本明細書で使用される場合、（ａ）治療される疾患又は状態の寛解を誘導すること、（

ｂ）疾患を阻害すること、すなわち、その発症を阻止すること、並びに（ｃ）疾患を緩和すること、すなわち、疾患及び／又はその症状を軽減又は改善することを含み得る。治療を必要とする者（例えば、それを必要とする対象）には、既に障害、疾患、若しくは状態を患っている者、及び／又は障害、若しくは状態を患っている疑いのある者が含まれ得る。疾患、障害、又は状態を治療することは、基礎となる病態生理学に影響を及ぼさない場合であっても、特定の疾患、障害、又は状態の少なくとも１つの症状を改善することを含み得る。

【００７５】

本明細書で使用される場合、「予防すること」、「予防すること」、又は「予防的」という用語は、対象が疾患又は状態の発症前に発症する素因があり得る疾患又は状態の発症を停止させ、除外し、回避し、排除し、予防し、止めるか、又は妨げることを指す。いくつかの実施形態では、「予防すること」又は「予防的」は、単に、対象（例えば、疾患又は状態を発症する素因を有する対象）が所与の疾患又は状態（例えば、クローン病、糖尿病、潰瘍性大腸炎など）を発症する可能性を低下させることを指し得る。これは、ほとんどの予防剤が、それを受ける全ての対象における疾患又は状態の予防に１００％有効ではないことが理解されるためである。いくつかの実施形態では、「予防すること」又は「予防的」は、対象が治療を受けている間に現在寛解している場合、疾患再燃の予防を指し得る（すなわち、「予防する」は、特定の文脈では、寛解を維持することと同義であり得る）。

【００７６】

本明細書で使用される場合、「用量」、「単位用量」、又は「投薬量」は、対象での使用に好適な物理的に別個の単位を指すことができ、各単位は、その投与に関連して所望の応答又は複数の応答がもたらされるように計算された所定の量の開示された化合物及び／又はその薬学的組成物を含有する。

【００７７】

本明細書で使用される場合、「治療薬」は、疾患、障害、若しくは状態の治療、治癒、及び／若しくは改善、又は疾患、障害、若しくは状態の進行速度の低下を指すことができる。

【００７８】

本明細書で使用される場合、「有効量」は、細胞、組織、系、動物、又はヒトの有益な又は所望の生物学的応答、感情的応答、医療的応答、又は臨床的応答をもたらすのに十分な、本明細書に提供される開示される化合物又は薬学的組成物の量を指し得る。有効量は、１回以上の投与、適用、又は投薬で投与することができる。その用語はまた、その範囲内に、実質的に正常な生理学的機能を強化するか、又はそこまで回復するのに有効な量も含み得る。

【００７９】

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、所望の治療結果を達成するか、又は望ましくない症状に対して効果を有するのに十分であるが、一般に有害な副作用を引き起こすのに不十分である量を指す。任意の特定の患者への具体的な治療有効用量レベルは、治療される疾患、障害、及び／若しくは状態、及び疾患、障害、及び／若しくは状態の重症度、使用される特定の組成物、患者の年齢、体重、全身の健康、性別及び食事、投与時期、投与経路、使用される特定の化合物の排泄率、治療期間、使用される特定の化合物と組み合わせて又は同時に使用される薬物、並びに医療実施者の知識及び活動内であり、医学分野において周知であり得る同様の因子を含む、様々な因子に依存する。特定の疾患、障害、及び／又は状態を治療する場合、いくつかの場合では、所望の応答は、疾患、障害、及び／又は状態の進行を阻害することであり得る。これは、疾患、障害、及び／又は状態の進行を一時的に遅らせることのみを伴い得る。しかしながら、他の場合では、疾患、障害、及び／又は状態の進行を永続的に停止させることが望ましい場合がある。これは、当業者に既知の日常的な診断方法によって、任意の特定の疾患、障害及び／又は状態について監視することができる。

【００８０】
本明細書で使用される場合、「予防有効量」という用語は、疾患、障害、及び／又は状態の発症又は開始を予防するのに有効な量を指す。
【００８１】
例えば、所望の治療効果を達成するために必要なレベルよりも低いレベルで化合物の用量を開始し、所望の効果が達成されるまで徐々に投与量を増加させることは、十分に当該技術分野の技術の範囲内である。所望であれば、有効な１日用量は、投与のために複数の用量に分割することができる。結果的に、単回用量組成物は、１日用量を構成するためにそのような量又はその約数を含有することができる。任意の禁忌の事象では、個々の医師によって投与量が調整され得る。一般に、本発明の薬理学的薬剤の最大用量（単独又は他の治療剤と組み合わせて）、すなわち、妥当な医学的判断による最高の安全用量が使用されることが好ましい。しかしながら、医学的理由、心理的理由、又は任意の他の理由で、患者が低用量又は耐容量を主張する場合があることは、当業者によって理解されるであろう。
【００８２】
治療有効用量の開示された化合物及び／又は薬学的組成物に対する応答は、例えば、治療又は薬理学的薬剤の投与後の疾患、障害、及び／又は状態の症状の減少又は欠如など、治療又は医薬の生理学的効果を決定することによって測定することができる。他のアッセイは、当業者に既知であり、応答のレベルを測定するために使用することができる。治療の量は、例えば、開示された化合物及び／又は薬学的組成物の量を増加又は減少させることによって、投与される開示された化合物及び／又は薬学的組成物を変更することによって、投与タイミングを変更することなどによって、変化し得る。投薬量は、異なってもよく、１日又は数日間にわたって、１日１回以上の用量投与で投与することができる。
【００８３】
本明細書で使用される場合、「プロバイオティクス微生物」又は「プロバイオティクス細菌」又は「プロバイオティクス」という用語は、有効量で投与されると、宿主に健康又は健全さの利益を与える、微生物又は細菌（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株、例えば、Ｓ．Ｂｏｕｌａｒｄｉｉの操作された株を含む）を指す。
【００８４】
本明細書で使用される場合、「プロモーター」という用語は、ＤＮＡ中のヌクレオチド配列のＲＮＡ転写産物への転写を促進するのに少なくとも十分な転写調節配列である。プロモーターから転写される転写産物は、典型的には、転写開始部位の下流のプロモーターからの配列、及びｍＲＮＡの場合にアミノ酸配列をコードする下流の配列を含む。プロモーターは、その予測可能な位置が転写開始部位のすぐ上流にあるため、最も特徴的な転写調節配列である。プロモーターとしては、ＲＮＡポリメラーゼの認識、結合、及び転写開始活性を調節する配列が挙げられる。これらの配列は、シス作用し得るか、又はトランス作用因子に応答し得る。プロモーターは、調節の性質に応じて、構成的であってもよく、又は調節されてもよい。プロモーターは、多くの場合、コア及び伸長プロモーター領域といった２つの別々のセグメントを有すると記載される。コアプロモーターは、ＲＮＡポリメラーゼ認識、結合、及び転写開始に十分な配列を含む。コアプロモーターは、転写開始部位、ＲＮＡポリメラーゼ結合部位、及び他の一般的な転写結合部位を含み、開始前複合体が形成され、一般的な転写機構が組み立てられる場所である。開始前複合体は、一般に、転写開始部位（ＴＳＳ）の５０ヌクレオチド（ｎｔ）以内にある。コアプロモーターはまた、ｍＲＮＡのポリペプチドへの翻訳に必要なリボソーム結合部位の配列を含む。伸長プロモーター領域は、転写開始部位の約２５０ヌクレオチド上流（すなわち、－２５０ｎｔ）まで伸長する、いわゆる近位プロモーターを含む。これには、特異的な転写因子結合部位などの一次調節エレメントが含まれる。多くの遺伝子は、更に上流に位置する転写調節エレメントを有することが見出されている。特に、遺伝子の転写調節エレメントの大部分を含む断片は、転写開始部位の最大７００ｎｔ以上の上流に延長することができる。（

例えば、Ｕ．Ｓ．２００７－０１６１０３１を参照されたい。）特定の遺伝子では、転写調節配列は、転写開始部位の上流の数千のヌクレオチドが見出されている。

【００８５】

本明細書で使用される場合、転写調節配列が細胞内で機能してヌクレオチド配列の転写を調節するとき、ヌクレオチド配列は、転写調節配列と「作動可能に連結されている（ｏｐｅｒａｔｉｖｅｌｙ　ｌｉｎｋｅｄ）」又は「作動可能に連結されている（ｏｐｅｒａｂｌｙ　ｌｉｎｋｅｄ）」。このことは、ポリメラーゼとプロモーターとの間の相互作用を通じて、ヌクレオチド配列の転写を促進することを含む。

【００８６】

本明細書で使用される場合、「変異」という用語は、ヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の変化を指す。変異は、１つ以上のヌクレオチドの置換（単一のヌクレオチドの置換は、「ＳＮＶ」又は「点変異」と称される）、１つ以上のヌクレオチドの付加又は１つ以上のヌクレオチドの欠失、並びにこれらのヌクレオチドの変化から生じるアミノ酸配列の変化（存在する場合）を含み得る。

【００８７】

本明細書で使用される場合、「非経口投与」は、ボーラス注射又は注入による投与、並びに静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、被膜内、眼窩内、心室内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、くも膜下被膜下、脊髄内、硬膜外、及び胸骨内注射及び／又は注入による投与を含む。

【００８８】

本明細書で使用される場合、「ベクター」は、ベクターが適切な宿主細胞に形質転換されるときに、１つ以上の異種ポリペプチドが発現され得る複製可能な核酸である。ベクターへの言及は、典型的には、制限消化及びライゲーションによって、ポリペプチド又はその断片をコードする核酸を導入することができるベクターを含む。ベクターへの言及はまた、ポリペプチドをコードする核酸を含むそれらのベクターを含む。ベクターは、核酸の増幅のために、又は核酸によってコードされるポリペプチドの発現／提示のために、ポリペプチドをコードする核酸を宿主細胞に導入するために使用される。ベクターは、典型的にはエピソームのままであるが、遺伝子又はその一部をゲノムの染色体に組み込むように設計することができる。酵母人工染色体などの人工染色体であるベクターも企図される。そのようなビヒクルの選択及び使用は、当業者に周知である。ベクターはまた、「ウイルスベクター（ｖｉｒｕｓ　ｖｅｃｔｏｒ）」又は「ウイルスベクター（ｖｉｒａｌ　ｖｅｃｔｏｒ）」を含む。ウイルスベクターは、（ビヒクル又はシャトルとして）外因性遺伝子を細胞に移すために、外因性遺伝子に作動可能に連結される操作されたウイルスである。本明細書で使用される場合、「発現ベクター」は、そのようなＤＮＡ断片の発現を行うことができるプロモーター領域などの調節配列と作動可能に連結されるＤＮＡを発現することができるベクターを含む。そのような追加のセグメントは、プロモーター及びターミネーター配列を含めることができ、任意選択的に、１つ以上の複製起点、１つ以上の選択可能なマーカー、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルなどを含み得る。発現ベクターは一般的にプラスミド又はウイルスＤＮＡに由来するか、又は両方のエレメントを含有し得る。したがって、発現ベクターは、適切な宿主細胞への導入時に、クローニングされたＤＮＡの発現をもたらす、プラスミド、ファージ、組換えウイルス、又は他のベクターなどの組換えＤＮＡ又はＲＮＡ構築物を指す。適切な発現ベクターは、当業者に周知であり、真核細胞及び／又は原核細胞で複製可能であるもの、並びにエピソームのままであるもの、又は宿主細胞ゲノムに組み込まれるものを含む。

【００８９】

「薬学的に許容される」という用語は、生物学的に又は他の方法で望ましくないものではない、すなわち、許容できないレベルの望ましくない生物学的効果を引き起こすか、又は有害な方法で相互作用することのない、材料を記載する。

【００９０】

本明細書で使用される「接触すること」という用語は、開示される化合物又は薬学的組

成物を、細胞、標的タンパク質若しくはポリペプチド、又は他の生物学的エンティティの活性に直接的に、すなわち、細胞、標的タンパク質若しくはポリペプチド、又は他の生物学的エンティティ自体と相互作用することによって、又は間接的に、すなわち、細胞、標的タンパク質若しくはポリペプチド、又は他の生物学的エンティティ自体の活性が依存する別の分子、補因子、因子、又はタンパク質若しくはポリペプチドと相互作用することによって、影響を与え得る様式で、開示される化合物又は薬学的組成物を、細胞、標的タンパク質若しくはポリペプチド、又は他の生物学的エンティティに近接させることを指す。

【００９１】

Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株

本開示は、とりわけ、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を提供する。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の１つ以上の治療用ポリペプチドを発現する。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の１つ以上の治療用ポリペプチドをコードする核酸を含む。

【００９２】

また、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の発生のための技術も開示される。一態様では、本方法は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株における異種遺伝子の安定した高発現をもたらす。別の態様では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、治療用ポリペプチド（複数可）を（例えば、対象の胃腸管において）構成的に分泌する。なお別の態様では、本方法は、複数の遺伝子挿入、完全長抗体の発現、複数の治療用ポリペプチドの発現、及び／又は特定の代謝産物の生成のための複数の酵素の発現を可能にする。

【００９３】

一態様では、本開示は、対象において１つ以上の特異的標的（例えば、疾患標的）と結合することができる少なくとも１つ（例えば、１、２、３、４つ、又はそれより多く）の治療用ポリペプチドを産生する、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株に関し、治療用ポリペプチド（複数可）は、対象においてインビボで産生される。別の態様では、少なくとも１つ（例えば、１、２、３、４つ、又はそれより多く）の治療用ポリペプチドは、哺乳動物（例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ニワトリ、シチメンチョウ、ヤギ、ヒツジ、ウシ）のサイトカイン又はケモカインを含む。例示的な非限定的なサイトカインとしては、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１７Ａ、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－１３、ＩＬ－１８、ＩＬ－２０、ＩＬ－２２、ＩＬ－２３、ＩＬ－２５、ＩＬ－２７、ＩＬ－３５、ＩＬ－３９、ＴＧＦ－β、又はそれらの任意の組み合わせが挙げられる。一態様では、炎症性サイトカインの阻害は、適切な参照標準の阻害（例えば、既存の生物製剤によって産生される炎症性サイトカインの阻害）よりも優れている。別の態様では、少なくとも１つの治療用ポリペプチドは、抗体、又はその機能的断片を含む。別の態様では、治療用ポリペプチド（複数可）は、可溶性受容体若しくは結合タンパク質、１つ以上のサイトカイン若しくはケモカイン、又はそれらの任意の組み合わせのうちの１つ以上を含む。別の態様では、治療用ポリペプチド（複数可）は、例えば、ホルモン、酵素、抗菌性ペプチド、微生物ペプチド、又は治療用代謝産物の合成のための治療用酵素の群を含む。

【００９４】

更なる態様では、治療用ポリペプチド（複数可）をコードする核酸は、「ホットスポット」において、１つ又は複数のコピーにおいて、部位特異的方法で挿入することができ、安定的かつ／又は高レベルで、又はこれらの特徴の任意の組み合わせで治療用ポリペプチド（複数可）を産生することができる。本開示の目的のために、「ホットスポット」は、高発現ゲノム遺伝子座又は複数の遺伝子座である。いくつかの実施形態では、部位特異的挿入は、治療用ポリペプチド（複数可）をコードする１つ以上の核酸を、ゲノムの複数の部位に（例えば、２、３、４、５、若しくは６個、又はそれより多くの部位に）挿入する。いくつかの実施形態では、部位特異的挿入は、ゲノム中に内因性に存在する任意の遺伝

子を破壊及び／又は置き換えない。例示的なホットスポットとしては、限定されないが、ｔｅｆ１、ｔｄｈ３、ｔｄｈ２、ｔｅｆ２、ｅｎｏ２、ｒｐｌａ１、ｒｐｌａ２、ｒｐｌａ３、ｒｐｌａ１０ｅ、ｐｄｃ１、ａｄｈ１、ａｄｈ２、ｇｐｍ１、ｆｂａ１、ｒｐｌ４７ａ、ｐｇｋ１、ｒｐｌａ４、ｓｓｍ１ａ、ｓｓｍ１ｂ、ｒｐｌ５ａ、ｒｐｌ５ｂ、ｕｐｆ１、ｒｐｌ１６ａ、ｒｐｌ１６ｂ、ｃｕｐ１ａ、ｃｕｐ１ｂ、ｒｐｓ３１ａ、ｒｐｌ２ａ、ｒｐｌ２ｂ、ｒｐｓ２８ａ、ｒｐｌ３５ｂ、ｐｙｋ１、ｒｐｌ９ａ、ｒｐｌ９ｂ、ｒｐｌ２７ａ、ｒｐｓ２１、ｒｐｌ４３ａ、ｎａｂ１ａ、ｎａｂ１ｂ、ｕｒｐ１ａ、及びｒｐｓ１８ｅｂが挙げられる。

【００９５】

いくつかの実施形態では、部位特異的挿入は、トランスポゾン指向性挿入を使用して（例えば、Ｔｙ、Ｄｅｌｔａ、Ｓｉｇｍａ、ｐＴＥＦ、及び／又はｐＴＤＨ３部位で）行われる。いくつかの実施形態では、部位特異的挿入は、破壊的部位特異的挿入である（例えば、挿入される核酸は、元々存在する核酸を破壊する）。いくつかの実施形態では、部位特異的挿入は、非破壊的部位特異的挿入である（例えば、挿入される核酸は、元々存在する核酸を置き換える）。いくつかの実施形態では、部位特異的挿入は、エンズイン型部位特異的挿入（例えば、ホットスポット内）である。いくつかの実施形態では、部位特異的挿入は、エンズアウト型部位特異的挿入（例えば、ホットスポット内）である。いくつかの実施形態では、部位特異的挿入方法は、適切な参照標準（例えば、異なる部位特異的挿入方法）に対して、非常に効率的である。

【００９６】

更なる態様では、治療用ポリペプチド（複数可）をコードする核酸は、１つ又は複数のコピーにおいて、非部位特異的方法で挿入することができ、安定的かつ／又は高レベルで、又はこれらの特徴の任意の組み合わせで治療用ポリペプチド（複数可）を産生することができる。

【００９７】

いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、治療用ポリペプチド（複数可）の発現、分泌、及び／又は安定性を増加させるために、改変（例えば、挿入、欠失、変異）を含む。

【００９８】

いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、そのような生体生物治療製品の安全性（例えば、生体封じ込め）を増加させるために、改変（例えば、挿入、欠失、変異など）を含む。

【００９９】

Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ株

いくつかの実施形態では、本開示のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ属の一種である。例えば、限定されないが、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ属としては、Ｃａｎｄｉｄａ属、Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ属、Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ属、Ｐｉｃｈｉａ属、Ｉｓｓａｃｈｅｎｋｉａ属、Ｙａｒｒｏｗｉａ属、又はＨａｎｓｅｎｕｌａ属が挙げられる。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ属として分類される種は、例えば、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、Ｓ．ｂａｙａｎｕｓ、Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ、Ｓ．ｂｕｌｄｅｒｉ、Ｓ．ｃａｒｉｏｃａｎｕｓ、Ｓ．ｃａｒｉｏｃｕｓ、Ｓ．ｃｈｅｖａｌｉｅｒｉ、Ｓ．ｄａｉｒｅｎｅｎｓｉｓ、Ｓ．ｅｌｌｉｐｓｏｉｄｅｕｓ、Ｓ．ｅｕｂａｙａｎｕｓ、Ｓ．ｅｘｉｇｕｕｓ、Ｓ．ｆｌｏｒｅｎｔｉｎｕｓ、Ｓ．ｋｌｕｙｖｅｒｉ、Ｓ．ｍａｒｔｉｎｉａｅ、Ｓ．ｍｏｎａｃｅｎｓｉｓ、Ｓ．ｎｏｒｂｅｎｓｉｓ、Ｓ．ｐａｒａｄｏｘｕｓ、Ｓ．ｐａｓｔｏｒｉａｎｕｓ、Ｓ．ｓｐｅｎｃｅｒｏｒｕｍ、Ｓ．ｔｕｒｉｃｅｎｓｉｓ、Ｓ．ｕｎｉｓｐｏｒｕｓ、Ｓ．ｕｖａｒｕｍ、又はＳ．ｚｏｎａｔｕｓであり得る。Ｃａｎｄｉｄａ属として分類される種は、例えば、Ｃ．ａｌｂｉｃａｎｓ、Ｃ．ａｓｃａｌａｐｈｉｄａｒｕｍ、Ｃ．ａｍｐｈｉｘｉａｅ、Ｃ．ａｎｔａｒｃｔｉｃａ、Ｃ．ａｒｇｅｎｔｅａ、Ｃ．ａｔｌａｎｔｉｃａ、Ｃ．ａｔｍｏｓｐｈａｅｒｉｃａ、Ｃ．ｂｌａｔｔａｅ、Ｃ．ｂｒｏｍｅｌｉａｃｅ

arum、C.carpophila、C.carvajalis、C.ceramby cidarum、C.chauliodes、C.corydali、C.dossey i、C.dubliniensis、C.ergatensis、C.fructus、C.glabrata、C.fermentati、C.guilliermondii、C.haemulonii、C.insectamens、C.insectorum、C.intermedia、C.jeffresii、C.kefyr、C.krusei、C.lusitaniae、C.lyxosophila、C.maltosa、C.marina、C.membranifaciens、C.milleri、C.oleophila、C.oregonensis、C.parapsilosis、C.quercitrusa、C.rugosa、C.sake、C.shehatea、C.temnochilae、C.tenuis、C.theae、C.tolerans、C.tropicalis、C.tsuchiyae、C.sinolaborantium、C.sojae、C.subhashii、C.viswanathii、C.utilis、又はC.ubatubensisであり得る。Schizosaccharomyces属として分類される種は、例えば、S.pombe、S.japonicus、S.octosporus、又はS.cryophilusであり得る。Kluyveromyces属として分類される種は、例えば、K.aestuarii、K.africanus、K.bacillisporus、K.blattae、K.dobzhanskii、K.hubeiensis、K.lactis、K.loddera e、K.marxianus、K.nonfermentans、K.piceae、K.sinensis、K.thermotolerans、K.waltii、K.wickerhamii、又はK.yarrowiiであり得る。Pichia属として分類される種は、例えば、P.anomala、P.heedii、P.guilliermondii、P.kluyveri、P.membranifaciens、P.norvegensis、P.ohmeri、P.pastoris、P.methanolica、又はP.subpelliculosaであり得る。Issachenkia属として分類される種は、例えば、I.orientalisであり得る。Yarrowia属として分類される種は、例えば、Y.lipolyticaであり得る。Hansenula属として分類される種は、例えば、H.subpelliculosa、H.anomala、H.polymorpha、H.holstii Wick、又はH.capsulata Wickであり得る。

【０１００】

一態様では、Saccharomyces酵母は、S.boulardiiであってもよく、プロバイオティクス使用のための安全であるとして一般的に認識されている（generally recognized as safe、GRAS）生物であり、すなわち、改変されていない形態では、腸の健康及び下痢の改善を促進するための、十分に忍容性のある市販の（ＯＴＣ）プロバイオティクスである。一態様では、S.boulardiiは、３７℃で良好に成長し、Saccharomyces酵母の他の株よりも酸性環境条件に対してより耐性がある。しかしながら、別の態様では、S.boulardiiのための分子遺伝学的ツールは、例えば、S.cerevisiaeのためのものほど十分に開発されていない。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、Saccharomyces酵母の操作された株は、選択可能なマーカー（例えば、抗生物質の選択可能なマーカー）を含まない。更なる態様では、このことは、抗生物質耐性遺伝子に関する米国食品医薬品局の規制に準拠しており、なお更なる態様では、抗生物質圧力下での微小規模の真菌進化の可能性を排除する。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、Saccharomyces酵母の操作された株は、Saccharomyces酵母の特定の操作された株（例えば、選択可能なマーカー）の選択を可能にする改変（例えば、変異、欠失、挿入など）を含む。いくつかの実施形態では、

選択を可能にする改変は、選択可能なマーカーとして利用される遺伝子の部分的な欠失を含む。いくつかの実施形態では、選択を可能にする改変は、選択可能なマーカーとして利用される遺伝子の完全な欠失を含む。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、選択可能なマーカーは、陽性及び／又は陰性の選択を可能にする。いくつかの実施形態では、選択可能なマーカーは、原栄養性マーカー、栄養要求性マーカー、薬物耐性を付与するマーカー、自動選択マーカー、及び／又は逆選択可能なマーカーを含む。選択可能なマーカーとして利用される遺伝子の非限定的な例としては、ｕｒａ３、ｇａｐ１、ｌｅｕ２、ｈｉｓ３、及びｔｒｐ１が挙げられる（例えば、ＩＭＡＤＥＡＲＴＩＫＡ，ＨＡＹＡＴＩ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｖｏｌｕｍｅ １６，Ｉｓｓｕｅ １，２００９，Ｐａｇｅｓ ４０－４２，ＩＳＳＮ １９７８－３０１９を参照されたい）。複数の選択可能なマーカーは、当該技術分野において既知である。当業者は、本開示の技術に従って、そのようなマーカーを選択し、使用する方法を容易に認識し、理解するであろう。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、選択可能なマーカーは、ＵＲＡ３遺伝子の改変又は欠失を含む。ＵＲＡ３は、ピリミジンの合成における１つの反応を触媒する必須酵素であるオロチジン５’－リン酸デカルボキシラーゼ（ＯＤＣａｓｅ）をコードする。いずれかの理論に拘束されることを望まないが、ＯＤＣａｓｅ活性の喪失は、ウラシル又はウリジンを培地に添加しない限り、細胞成長の欠如を引き起こす。対照的に、５－ＦＯＡ（５－フルオロオロチン酸）が培地に添加される場合、活性なＯＤＣａｓｅは、５－ＦＯＡを毒性化合物である５－フルオロウラシルに変換し、細胞死を引き起こす。したがって、ＵＲＡ３の欠失又は不活性化を含むＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ウラシル又はウリジンがなければ生存することができない。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＵＲＡ３欠失を有し得る［ｕｒａ３－／－又はｕｒａ３（－／－）として示される］が、他の株では、ＵＲＡ３は、非機能的（ｕｒａ３）であるように変異され得る。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＵＲＡ３の挿入を含む。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、選択可能なマーカーは、ＧＡＰ１遺伝子の改変（例えば、欠失）を含む。ＧＡＰ１は、全ての天然に存在するＬ－アミノ酸、オルニチン及びシトルリンなどの関連化合物、及びいくつかのＤ－アミノ酸、アゼチジン－２－カルボキシレートなどの毒性アミノ酸類似体、並びにポリアミンであるプトレシン及びスペルミジンの取り込みに関与する一般的なアミノ酸パーミアーゼをコードする。ＧＡＰ１はまた、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ株の侵襲的成長に関与する。したがって、ＧＡＰ１改変（例えば、欠失）を含むＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、例えば、メチオニン、グリシン、グルタミン、及び調節された窒素源の減少した取り込みを示す。加えて、ＧＡＰ１の喪失は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母株の侵襲的に成長する能力を低下させる。いずれかの理論に拘束されることを望まないが、ＧＡＰ１が改変されている（例えば、欠失している）株は、Ｌ－プロリンが毒性Ｄ－Ｈｉと組み合わせた唯一の窒素源である最小培地を使用するために選択することができる。ＧＡＰ１（－／－）である株は、唯一の窒素源としてＬ－プロリンを含む培地中で生存することができ、Ｄ－Ｈｉｓとしての逆選択（ｃｏｕｔｅｒｓｅｌｅｃｔｉｏｎ）として毒性アミノ酸Ｄ－ヒスチジンがＧＡＰ１によって取り込まれ、これは酵母細胞にとって毒性であり、ＧＡＰ１（－／－）株の選択をもたらす。ＧＡＰ１に不活性化改変を含まない株（例えば、ＧＡＰ１（＋／＋）株）は、Ｌ－シトルリンが唯一の窒素源である最小培地上で選択することができる。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＧＡＰ１内の変異を含む。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＧＡＰ１内の欠失を含む。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＧＡＰ１の挿入を含む。

【０１０６】
いくつかの実施形態では、選択可能なマーカーは、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）遺伝子の改変を含む（例えば、ＭａｃＤｏｎａｌｄ Ｃ ｅｔ ａｌ．，Ｙｅａｓｔ．２０１５；３２（５）：４２３－４３８を参照されたい）。ＤＨＦＲは、ＮＡＤＰＨを電子供与体として使用して、ジヒドロ葉酸をテトラヒドロ葉酸へと還元する酵素であり、これを１炭素化学移動で使用されるテトラヒドロ葉酸補因子へと変換することができる。ＤＨＦＲは、メトトレキサート（ＭＴＸ）に対する耐性を付与し、用量効果選択を示す。したがって、いずれかの理論に拘束されることを望まないが、ＤＨＦＲは、いくつかの実施形態では、スルファニルアミドと組み合わせて、メトトレキサートを用いた選択可能なマーカーとして使用して、高発現株をスクリーニングすることができる。いくつかのそのような実施形態では、メトトレキサートは、約１ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２０ｎＭ、５０ｎＭ、７５ｎＭ、１００ｎＭ、１５０ｎＭ、２００ｎＭ、２５０ｎＭ、５００ｎＭ、７５０ｎｍ、１μＭ、５μＭ、１０μＭ、２０μＭ、５０μＭ、７５μＭ、１００μＭ、１５０μＭ、２００μＭ、２５０μＭ、５００μＭ、７５０μＭ、若しくは１ｍＭ、又は上述の濃度の間の任意の濃度で、選択のために投与される。いくつかのそのような実施形態では、メトトレキサートは、スルファニルアミドと組み合わせて、選択のために投与される。いくつかのそのような実施形態では、スルファニルアミドは、約０．１ｍｇ／ｍＬ、０．２ｍｇ／ｍＬ、０．３ｍｇ／ｍＬ、０．４ｍｇ／ｍＬ、０．５ｍｇ／ｍＬ、０．６ｍｇ／ｍＬ、０．７ｍｇ／ｍＬ、０．８ｍｇ／ｍＬ、０．９ｍｇ／ｍＬ、１ｍｇ／ｍＬ、２ｍｇ／ｍＬ、３、ｍｇ／ｍＬ、４ｍｇ／ｍＬ、５ｍｇ／ｍＬ、６ｍｇ／ｍＬ、７ｍｇ／ｍＬ、８ｍｇ／ｍＬ、９ｍｇ／ｍＬ、若しくは１０ｍｇ／ｍＬ、又は上述の濃度の間の任意の濃度で、選択のために投与される。いくつかのそのような実施形態では、約０．８ｎＭ～２０ｎＭのメトトレキサート又は５０～２５０μＭのメトトレキサート、及び約０．１～１０ｍｇ／ｍＬ、１～１０ｍｇ／ｍＬ、又は１～５ｍｇ／ｍＬのスルファニルアミドが投与される。いくつかの実施形態では、選択可能なマーカーは、導入遺伝子の染色体挿入の選択のためのＤＨＦＲの酵母相同体であるＤＦＲ１を含む。いくつかの実施形態では、ＤＨＦＲは、ＤＦＲ１と同等のＭＴＸに対する感受性を有する。ＤＨＦＲは、全ての生物に見られ、機能的に保存されている。ＤＨＦＲ、ＤＦＲ１、及び他の相同体間の比較的低い配列同一性にもかかわらず、高い機能的類似性は、いくつかの実施形態では、本開示の技術に従って、複数のＤＨＦＲ及びＤＦＲ１相同体の使用を可能にすることができる。表１に、ＤＨＦＲ及びＤＦＲ１の例示的なアミノ酸配列を示す。哺乳動物ＤＦＨＲ及び酵母ＤＦＲ１の配列相同性を考慮すると、本発明の技術は、マウスＤＨＦＲの使用に限定されないが、むしろ、任意の相同体が、選択マーカーとしても機能することが予想される。いくつかの実施形態では、開示される操作される酵母は、哺乳動物ＤＨＦＲをコードする核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、開示される酵母は、ＤＦＲ１をコードする核酸配列の１つ以上の外因性コピーを含み得る。哺乳動物ＤＦＨＲ及び酵母ＤＦＲ１の配列相同性を考慮すると、本発明の技術は、マウスＤＨＦＲの使用に限定されないが、むしろ、任意の生物由来の相同体が、選択マーカーとしても機能することが予想される。いくつかの実施形態では、開示される操作される酵母は、哺乳動物ＤＨＦＲをコードする核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、開示される酵母は、ＤＦＲ１をコードする核酸配列の１つ以上の外因性コピーを含み得る。

【表１】

表１：例示的なＤＨＦＲ及びＤＦＲ１アミノ酸配列。

配列番号	説明	アミノ酸配列
1	sp|P00375|2-187(マウスDHFR)	VRPLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFKYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGRKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPRGAHFLAKSLDDALRLIEQPELASKVDMVWIVGGSSVYQEAMNQPGHLRLFVTRIMQEFESDTFFPEIDLGKYKLLPEYPGVLSEVQEEKGIKYKFEVYEKKD
2	>sp|P07807|DYR_YEAST ジヒドロ葉酸レダクターゼ OS=Saccharomyces cerevisiae (株 ATCC 204508/S288c) OX=559292 GN=DFR1 PE=1 SV=2	MAGGKIPIVGIVACLQPEMGIGFRGGLPWRLPSEMKYFRQVTSLTKDPNKKNALIMGRKTWESIPPKFRPLPNRMNVIISRSFKDDFVHDKERSIVQSNSLANAIMNLESNFKEHLERIYVIGGGEVYSQIFSITDHWLITKINPLDKNATPAMDTFLDAKKLEEVFSEQDPAQLKEFLPPKVELPETDCDQRYSLEEKGYCFEFTLYNRK

【０１０７】

いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、栄養要求性である。一態様では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の栄養要求性の操作された株は、適切な参照標準（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の親株）に対して、環境内で生存する可能性が低い。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、適切な参照標準（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の親株）の成長曲線と比較して、同様の成長曲線を有する。

【０１０９】

いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の培養物からの抽出物及び／又は上清は、治療標的、免疫応答に対して少なくともいくつかの活性を保持し、かつ／又は対象における代謝経路の少なくとも１つの成分を変化させる。いくつかのそのような実施形態では、少なくともいくつかの活性は、適切な参照標準に対して少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％を含む。

【０１１０】

安定した治療用ポリペプチド（複数可）の発現の増強

いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、治療用ポリペプチド（複数可）の発現、分泌、及び／又は安定性を増加させるために、１つ以上の改変（例えば、挿入、欠失、変異など）を含む。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、増加した治療用ポリペプチド（複数可）の発現、分泌、及び／又は安定性を有するＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、プロテアーゼをコードする遺伝子における改変（例えば、挿入、欠失、変異など）を含む。いくつかのそのような実施形態では、プロテアーゼコード遺伝子は、ｐｅｐ４（酵母プロテイナーゼＡ）であるか、又はそれを含む。ｐｅｐ４は、液胞中のポリペプチドを分解するだけではなく、Ｐｒｃ１（カルボキシペプチダーゼＹ）、Ｐｒｂ１（プロテイナーゼＢ）、及びＬ

ａｐ４（アミノペプチダーゼＩ）などの追加の液胞プロテアーゼを活性化する、液胞アスパルチルヒドロラーゼである。いくつかのそのような実施形態では、プロテアーゼコード遺伝子は、例えば、ＰＲＣ１、ＰＲＢ１、及びＬＡＰ４であるか、又はそれらを含む。いずれかの理論に拘束されることを望まないが、プロテアーゼの欠失及び／又は不活性化によって、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株によって産生される治療用ポリペプチド（複数可）の分解の減少をもたらし、したがって、治療用ポリペプチド（複数可）の発現、分泌、及び／又は安定性の増加をもたらす。

【０１１２】

いくつかの実施形態では、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）を使用して、治療用ポリペプチド（複数可）の発現、分泌、及び／又は安定性を増加させるための改変の効果を評価する。いくつかの実施形態では、そのような評価は、適切な参照標準（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の対応する親株における治療用ポリペプチド（複数可）の発現、分泌、及び／又は安定性）に対して、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の治療用ポリペプチド（複数可）の発現、分泌、及び／又は安定性の比較を更に含む。

【０１１３】

ポリペプチド（例えば、治療用ポリペプチド（複数可））の発現、分泌、及び／又は安定性）を評価するための複数の方法が当該技術分野で知られている。当業者は、本開示に従ってそのような方法を選択し、使用する方法を容易に認識し、理解するであろう。

【０１１４】

生物学的安全性の増強

Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉプロバイオティクスの経口投与は、免疫不全集団において、真菌血症（例えば、血液中の真菌又は酵母の存在）を引き起こしている。したがって、例えば、本明細書に記載されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を含む、プロバイオティクスの安全性を改善するための技術が必要である。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、そのような株の安全性を高めるための、特に生体生物治療製品（例えば、プロバイオティクス）として使用するための改変（例えば、挿入、欠失、変異など）を含む。いくつかの実施形態では、そのような改変は、毒性中間体の蓄積を引き起こし、（例えば、真核細胞における）細胞増殖の制御（例えば、減少）を引き起こす。

【０１１５】

いくつかの実施形態では、改善された生体安全性を有するＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、（例えば、アミノ酸及び／又は核酸の成分を産生するための）代謝経路に関連する遺伝子における改変（例えば、挿入、欠失、変異など）を含む。代謝経路に関連する複数の遺伝子が当該技術分野で既知であり、当業者は、本開示に従って改変のためにそのような遺伝子を選択する方法を容易に認識し、理解するであろう。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株に対するそのような改変は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の免疫原性を低下させ、かつ／又は治療用ポリペプチド（複数可）の発現を増加させる。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、代謝経路に関連する遺伝子の改変は、スレオニン生合成遺伝子への改変を含む。いくつかのそのような実施形態では、スレオニン生合成遺伝子は、ｔｈｒ１である。スレオニン生合成経路の上流酵素であるｔｈｒ１の改変は、免疫不全の個体がＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母に曝露されると、血清感受性を引き起こす可能性がある。いずれかの理論に拘束されることを望まないが、この感受性は、細胞が血清などの低スレオニン環境に曝露されたときの毒性中間分子ホモセリンの蓄積に起因し、細胞増殖の制御（例えば、減少）をもたらし、したがって、適切な参照標準（例えば、改変されたｔｈｒ１を含まないＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母）に対して、より安全な生物学的治療の産生をもたらすことが理解される。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ｔｈｒ１内の変異を含む。いくつかの実施形態では、Ｓａ

ｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ｔｈｒ１内の欠失を含む。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ｔｈｒ１の挿入を含む。

【０１１７】

いくつかの実施形態では、スレオニン生合成遺伝子は、ｔｈｒ４である。Ｔｈｒ４酵素は、スレオニン生合成経路におけるＴｈｒ１のすぐ下流にあり、ホモセリンをリン酸化する。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母のｔｈｒ４ヌル株は、ｔｈｒ１ヌル細胞と同様の表現型を示す。いずれかの理論に拘束されることを望まないが、同様の表現型は、毒性中間体であるホスホホモセリンの結果であることが理解される。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ｔｈｒ４内の変異を含む。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ｔｈｒ４内の欠失を含む。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ｔｈｒ４の挿入を含む。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、代謝経路に関連する遺伝子の改変は、ｕｒａ３遺伝子の改変を含む。上述のように、ｕｒａ３は、ピリミジンリボヌクレオチド（ＲＮＡの構成要素）の合成における１つの反応を触媒する酵素であるオロチジン５’－リン酸デカルボキシラーゼ（ＯＤＣａｓｅ）をコードする。いずれかの理論に拘束されることを望まないが、ＯＤＣａｓｅ活性の喪失は、ウラシル又はウリジンを培地に添加しない限り、細胞成長の欠如を引き起こす。いくつかの実施形態では、ｕｒａ３遺伝子の改変は、適切な参照標準（例えば、改変されたｕｒａ３遺伝子を伴わないＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母）に対して、細胞増殖の制御（例えば、減少）をもたらし、より安全な生物学的治療の産生をもたらす。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ｕｒａ３内の変異を含む。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ｕｒａ３内の欠失を含む。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ｕｒａ３の挿入を含む。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、代謝経路に関連する遺伝子の改変は、ｇａｐ１遺伝子の改変を含む。上述のように、ｇａｐ１は、全ての天然に存在するＬ－アミノ酸、オルニチン及びシトルリンなどの関連化合物、及びいくつかのＤ－アミノ酸、アゼチジン－２－カルボキシレートなどの毒性アミノ酸類似体、並びにポリアミンであるプトレシン及びスペルミジンの取り込みに関与する一般的なアミノ酸パーミアーゼをコードする。いずれかの理論に拘束されることを望まないが、取り込みの減少は、細胞成長の欠如を引き起こすことができる。いくつかの実施形態では、ｇａｐ１遺伝子の改変は、適切な参照標準（例えば、改変されたｇａｐ１遺伝子を伴わないＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母）に対して、細胞増殖の制御（例えば、減少）をもたらし、より安全な生物学的治療の産生をもたらす。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ｇａｐ１内の変異を含む。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ｇａｐ１内の欠失を含む。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ｇａｐ１の挿入を含む。

【０１２０】

酵母株／発現系の発生

本発明の方法を実践する際に、分子生物学、タンパク質生化学、細胞生物学、微生物学、及び組換えＤＮＡにおける多くの従来の技術が使用される。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ ｅｄｓ．（２００１）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，３ｒｄ ｅｄｉｔｉｏｎ、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．（２００７）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙシリーズ、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙシリーズ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｎ．Ｙ．）、ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９１）ＰＣＲ １：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ

（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ）、ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９５）ＰＣＲ ２：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ、Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ ｅｄｓ．（１９９９）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｆｒｅｓｈｎｅｙ（２００５）Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ，５ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ、Ｇａｉｔ ｅｄ．（１９８４）Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ、米国特許第４，６８３，１９５号、Ｈａｍｅｓ ａｎｄ Ｈｉｇｇｉｎｓ ｅｄｓ．（１９８４）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ，Ａｎｄｅｒｓｏｎ（１９９９）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ，Ｈａｍｅｓ ａｎｄ Ｈｉｇｇｉｎｓ ｅｄｓ．（１９８４）Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ、Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ Ｃｅｌｌｓ ａｎｄ Ｅｎｚｙｍｅｓ（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９８６））、Ｐｅｒｂａｌ（１９８４）Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ、Ｍｉｌｌｅｒ ａｎｄ Ｃａｌｏｓ ｅｄｓ．（１９８７）Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）、Ｍａｋｒｉｄｅｓ ｅｄ．（２００３）Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ、Ｍａｙｅｒ ａｎｄ Ｗａｌｋｅｒ ｅｄｓ．（１９８７）Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎ）、及びＨｅｒｚｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ（１９９６）Ｗｅｉｒ’ｓ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙを参照されたい。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、本開示は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株（例えば、本開示に従って産生されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株）を発生させ、及び／又は生成する技術を提供する。いくつかのそのような実施形態では、配列を増幅するためのＰＣＲの使用（例えば、ＧＯＩのＯＲＦ及び選択可能なマーカーをコードする配列）は、高コピー挿入をもたらし得る。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の発生及び／又は生成は、目的の遺伝子（ＧＯＩ）の酵母コドン最適化を含む。いくつかのそのような実施形態では、ＧＯＩは、例えば、合成及び／又はポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して産生される。いくつかの実施形態では、Ｅ．ｃｏｌｉは、ＧＯＩを用いて形質転換され、形質転換体は、例えば、診断的消化及び／又は配列決定によって評価される。いくつかの実施形態では、ＧＯＩ（例えば、プラスミド）を含む発現カセットを、ＰＣＲ及びゲル電気泳動（例えば、ＤＮＡゲル）によって評価して、サイズによって発現カセットを確認する。いくつかの実施形態では、精製された発現カセットを、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母（例えば、ＦＺＭＡＹ０６－１６）内にエレクトロポレーションし、選択のためにプレーティングする。いくつかの実施形態では、発現カセットを、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母のゲノム内に挿入する（例えば、安定性を向上させるために）。いくつかの実施形態では、陽性形質転換体からの上清を、例えば、ＥＬＩＳＡによって、上清中のＧＯＩによってコードされる治療用ポリペプチド（複数可）の急性発現について評価する。いくつかの実施形態では、クローンスクリーニングの１回以上（例えば、２回、３回、４回）のラウンドを完了して、クローンの所望の発現レベル及び純度を検証する。いくつかの実施形態では、所望のクローンから細胞バンク（ＣＢ）を生成し、ＣＢ特性決定のために更に評価する。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、本開示は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株（例えば、本開示に従って産生されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株）の評価のための技術を提供する。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を、発現レベル（例えば、ＥＬＩＳＡ、ウエスタンブロットによる）、成長表現型、成長曲線、安定性（例えば、ＥＬＩＳＡによる）、遺伝子型確認、ゲノム

部位特異的挿入（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、ＰＣＲによる）、目的のゲノム挿入遺伝子（ＧＯＩ）カセット（例えば、ＰＣＲによる）、挿入のコピー数、機能活性、抗生物質及び／又は抗真菌感受性、胃腸環境生存率、有効性（例えば、動物モデルにおける）、薬物動態（例えば、インビボで）、糞便／胃腸軌道におけるＧＯＩ発現（例えば、インビボで）、及び／又は効力（例えば、ＣＦＵ同一性、陽性発現％）のうちの１つ以上について評価する。

【０１２３】

Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の改変、発現系、及び／又は成長技術に関連する複数の方法が、当該技術分野で知られている。当業者は、本開示に従ってそのような方法を選択し、使用する方法を容易に認識し、理解するであろう。

【０１２４】

以下の表は、開示される技術の目的のために様々な方法で利用され得る酵母株の特定の実施形態の詳細を提供する。

【表２】

	S.boulardii(Sb) 酵母株	説明	遺伝子型
1	野生型	野生型株、二倍体酵母	野生型
2	Sb-EP	ABAB 導入遺伝子を含まない「空のプラスミド」(pURA3-AT-cMyc)で形質転換された Sb 酵母。	ura3(-/-), cir^0, プラスミド: URA3+
3	Sb-ABAB	ABAB 導入遺伝子カセット(pURA3-AT-yABAB-cMyc)を含むプラスミドで形質転換された Sb。ABAB は、Clostridioides difficile の TcdA 及び TcdB(AH3/5D/AA6/E3)を標的とする四重特異的抗毒素 VHH 融合タンパク質である	ura3(-/-), cir^0, プラスミド: URA3+, ABAB+
4	FZMYA06-16	バックグラウンド株 URA3 及び GAP1 遺伝子を Sb 野生型からノックアウトした。 導入遺伝子カセットのゲノム統合に好適である。	ura3(-/-), gap1(-/-), Cir^+
5	FZ002	抗毒素 ABAB 組換えタンパク質を発現する。 以下の酵母コドン最適化 ABAB 導入遺伝子カセットを含む: yABAB-URA3 及び yABAB-mDHFR これらは、それぞれ、染色体 VII 及び染色体 XVI 上の特定の部位において、バックグラウンド株 FZMYA06-16 にゲノム的に組み込まれる	URA3+, mDHFR+, ABAB+, gap1(-/-), Cir^+
Cir^+:Sb 株は、*S.boulardii* 及び他の *Saccharomyces* 種に対して天然の内因性エピソーム 2um-プラスミドを含む(Douradinha et al., 2014) Cir^0:内因性エピソーム 2um-プラスミドを欠く Sb 株。 *酵母複製機構が、これら 2 つの株において使用される外因性プラスミド(空のプラスミド又は pURA3-AT-yABAB-cMyc)の保持を有利にするように、2um-プラスミドを Sb-EP 及び Sb-ABAB において除去した* プラットフォーム株 FZMYA06-16 は、その ura3(-/-)状態に起因して、ウラシルに対して栄養要求性である。GAP1 遺伝子は、一般的なアミノ酸パーミアーゼであるため、窒素取り込みを制限し得る Gap1(-/-)でもある。 FZ002 の場合、ABAB カセットの 1 つに URA3 が含まれているため、もはやウラシルに対して栄養要求性ではない。しかしながら、まだ、その成長能力を阻害する可能性がある gap1(-/-)である。			

【０１２５】

治療用ポリペプチド（複数可）

本開示は、治療用ポリペプチド（複数可）、及びかかる治療用ポリペプチド（複数可）を発現するＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を提供する。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、１つ以上の治療用ポリペプチドをコードする１つ以上の核酸を含む。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、対象の胃腸管において合成される（例えば、１つ以上の治療用ポリペプチドをコードする核酸を含むＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株から発現される）。本開示の操作された酵母は、治療用ポリペプチドをコードする目的の遺伝子の１

つより多い（例えば、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０個、又はそれより多くの）コピーがそれらのゲノムに組み込まれてもよい。

【０１２６】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、治療効果（例えば、医学的治療の結果であり、その結果は、望ましい、及び／又は有益であると判断される）を誘発するアミノ酸のポリマー鎖であるか、又はそれを含む。

【０１２７】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、天然に存在するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、天然に存在しないアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、人の手の作用によって設計及び／又は産生されるという点で操作されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、又はその両方を含み得るか、又はそれらからなり得る。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、天然アミノ酸のみ、又は非天然アミノ酸のみを含み得るか、又はそれらからなり得る。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、Ｄ－アミノ酸、Ｌ－アミノ酸、又はそれらの両方を含み得る。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、Ｄ－アミノ酸のみを含み得る。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドは、Ｌ－アミノ酸のみを含み得る。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、１つ以上のペンダント基又は他の改変、例えば、治療用ポリペプチド（複数可）のＮ末端における、治療用ポリペプチド（複数可）のＣ末端における、改変又は１つ以上のアミノ酸側鎖への接続、又はそれらの任意の組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、そのようなペンダント基又は改変は、それらの組み合わせを含む、アセチル化、アミド化、脂質化、メチル化、ペグ化などからなる群から選択されてもよい。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、環状であってもよく、かつ／又は環状部分を含んでもよい。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、環状ではない、かつ／又は任意の環状部分を含まない。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、線形である。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、ステープル化された治療用ポリペプチド（複数可）であり得るか、又はそれを含み得る。いくつかの実施形態では、「ポリペプチド（複数可）」という用語は、参照ポリペプチド、活性、又は構造の名称に付随してもよく、そのような場合、本明細書では、関連する活性又は構造を共有するポリペプチドを指すように使用され、したがって、同じクラス又はファミリーのポリペプチドのメンバーであるとみなすことができる。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、単量体である。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、二量体である。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、多量体である。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、融合ポリペプチドである。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、受容体、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、酵素、抗菌性ペプチド、及び／又は任意の非天然機能的タンパク質（ＤＡＲＰｉｎなど）であるか、又はそれらを含む。

【０１３０】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）は、抗体若しくはその機能的断片であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体（例えば、ＩｇＡ、ＩｇＧ、ＩｇＥ、又はＩｇＭ抗体）である。いくつかの実施形態では、抗体は、二重特異的抗体であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、多重特異的抗体であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、逆キメラ抗体、重鎖上に軽鎖可変遺伝子セグメントを有する抗体、軽鎖上に重鎖可変遺伝子セグメントを有する抗体、並びに一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ

）、一本鎖抗体、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）断片、ジスルフィド結合Ｆｖ（ｓｄＦｖ）、イントラボディ、ミニボディ、ダイアボディ、及び抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体（例えば、抗原特異的ＴＣＲに対する抗Ｉｄ抗体を含む）、又は前述のいずれかのエピトープ結合断片である。したがって、抗原結合分子の「抗原結合断片」及び「抗原結合部分」及び「エピトープ結合断片」も本明細書に包含され、抗原に結合する能力を保持する断片を指す。「抗原結合タンパク質」という用語はまた、例えば、単一ドメイン抗体（例えば、ＶＨＨ抗体又は「ラクダ科動物様」抗体）、重鎖のみの抗体、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２００７／０００４９０９号に開示されるものなどの共有結合ダイアボディ、並びに例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２００９／００６０９１０号に開示されるものなどのＩｇ－ＤＡＲＴＳを含む。いくつかの特定の実施形態では、抗体は、（例えば、ジスルフィド結合によって相互に接続された）少なくとも２つの重（Ｈ）鎖及び２つの軽（Ｌ）鎖を含むカノニカル抗体である。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、抗体は、例えば、抗体模倣物を含むか、又は一本鎖抗体及びその断片を含む、抗体若しくはその特定の断片若しくは部分の構造及び／若しくは機能を模倣する抗体の一部を含む、その消化断片、特定の部分、誘導体、及び／又はバリアントを含む。抗体分子の機能活性を決定する以下の５つの主な重鎖クラス（又はアイソタイプ）が存在する。ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、及びＩｇＥ。各重鎖及び軽鎖は、定常領域及び可変領域（「ドメイン」としても知られる）を含む。組み合わせて、「Ｆａｂ領域」とも呼ばれる重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、所与の抗原に特異的に結合する。軽鎖可変領域及び重鎖可変領域は、「相補性決定領域」又は「ＣＤＲ」とも呼ばれる３つの超可変領域によって中断された「フレームワーク」領域を含む。フレームワーク領域及びＣＤＲの程度が定義されている（例えば、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，１９９１を参照されたい）。Ｋａｂａｔデータベースは、現在オンラインで維持されている。異なる軽鎖又は重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存され、フレームワーク領域は、鎖間の非共有結合性相互作用によって、ＣＤＲを正しい方向に配置するために提供される足場を形成するよう作用する。

【０１３２】

抗体ＣＤＲは、主に抗原上のエピトープに対する結合に関与する。各鎖のＣＤＲは、典型的には、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３と称され、Ｎ末端から開始して順次番号付けされ、また、典型的には、特定のＣＤＲが位置する鎖によっても特定される。したがって、ＨＣＤＲ３は、それが見出される抗体の重鎖の可変ドメイン内に位置し、一方で、ＬＣＤＲ１は、それが見出される抗体の軽鎖の可変ドメインからのＣＤＲ１である。ＩＬ－３　ＩＲＡに結合する抗体は、特定のＶＨ領域及びＶＬ領域の配列を有し、したがって、特定のＣＤＲ配列を有する。異なる特異性を有する抗体は、一般に、異なるＣＤＲを有する。抗体ごとに変化するＣＤＲであるが、抗原結合に直接関与するのは、ＣＤＲ内の限られた数のアミノ酸位置のみである。ＣＤＲ内のこれらの位置は、特異性決定残基（ＳＤＲ）と呼ばれる。

【０１３３】

抗体Ｆｃ断片領域（Ｆｃ）は、免疫細胞活性を調節する役割を果たす。Ｆｃ領域は、Ｂリンパ球、濾胞樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球などの特定の細胞上に見られる特定のクラスのタンパク質又はポリペプチドに結合することによって、各抗体が所与の抗原に対して適切な免疫応答を生成することを保証するように機能し、「Ｆｃ受容体」と呼ばれる。重鎖の定常ドメインが抗体のＦｃ領域を構成するため、抗体中の重鎖のクラスは、それらのクラスの効果を決定する。抗体中の重鎖は、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン、及びミューを含み、それぞれ抗体のアイソタイプＩｇＡ、ＩｇＧ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、及びＩｇＭに相関する。したがって、抗体の異なるアイソタイプは

、それらの異なるＦｃ領域の結合及び異なる種類の受容体の活性化に起因して、異なる種類の効果を有する。例示的なＦｃ配列を表２に示す。

【表３】

表２．例示的なＦｃアミノ酸配列

配列番号	説明	アミノ酸配列
3	wFc (野生型ヒトFc)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4	mFc (変異体ヒトFc)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０１３４】

南アメリカのラクダ科の動物（例えば、アルパカ及びラマ）は、軽鎖を欠くため、重鎖抗体又はＨＣＡｂと呼ばれる免疫グロブリンの２種類のアイソタイプＩｇＧ２及びＩｇＧ３を産生する。ＶＨＨと呼ばれるＨＣＡｂのＶＨドメインは、単一ドメインであり、最小の既知の抗原結合剤（約１５ｋＤａ）である。ＶＨＨは、酵母を含む微生物を使用した発現が容易であり、一般に、従来の抗体断片よりも安定である。ＶＨＨの多くの好ましい特性のために、ＶＨＨは、研究において広く使用されるようになり、明確な商業的可能性を示している。いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、ＶＨＨ－Ｆｃ抗体（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡなどのＦｃドメインと融合したラクダ科重鎖のみの抗体に由来する１つ以上のＶＨＨ）であるか、又はそれを含む。いくつかのそのような実施形態では、ＶＨＨ－Ｆｃ抗体は、Ｆｃ領域に融合した単一ＶＨＨであるか、又はそれを含む。いくつかのそのような実施形態では、ＶＨＨ－Ｆｃ抗体は、Ｆｃ領域に融合した２つのＶＨＨ（例えば、ＶＨＨ－ＶＨＨ－Ｆｃ、Ｆｃ－ＶＨＨ－ＶＨＨ、ＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨ）であるか、又はそれらを含む。いくつかの実施形態では、２つのＶＨＨは、Ｆｃ領域を含まずに、一緒に融合され得る。いくつかの実施形態では、２つのＶＨＨを他のＶＨＨと一緒に融合させて、三量体又は四量体を形成し得る。いくつかのそのような実施形態では、２つのＶＨＨは、同じである。いくつかのそのような実施形態では、２つのＶＨＨは、異なる。いくつかの実施形態では、ＶＨＨ－ＶＨＨ－Ｆｃ、Ｆｃ－ＶＨＨ－ＶＨＨ、及びＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨの形式間の生体活性は、類似している。いくつかの実施形態では、ＶＨＨ－ＶＨＨ－Ｆｃ、Ｆｃ－ＶＨＨ－ＶＨＨ、及びＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨの形式間の生体活性は、異なる。いくつかの実施形態では、特定の形態は、より高い発現をもたらす。いくつかの実施形態では、選択マーカーは、全体的なスクリーニングにも抗体の発現にも影響を与えない。要約すると、本開示は、ＶＨＨ、Ｆｃ－ＶＨＨ、ＶＨＨ－Ｆｃ、ＶＨＨ－ＶＨＨ、Ｆｃ－ＶＨＨ－ＶＨＨ、ＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨ、及びＶＨＨ－ＶＨＨ－Ｆｃを含むが、これらに限定されない結合タンパク質／ポリペプチド形式を提供し、ドメイン（すなわち、ＶＨＨ又はＦｃ）の各々、又はいずれかを、任意選択的なリンカー配列を介して別のドメインに接続し得る。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、タグ（例えば、ＨＡタグ、Ｈｉｓタグ、ＦＬＡＧ－タグなど）を更に含む。複数のタグが当該技術分野で知られており、当業者は、本開示に従ってそのようなタグを利用する方法を容易に認識し

、理解するであろう。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、リンカーを更に含む。いくつかのそのような実施形態では、リンカーは、ポリペプチドリンカーである。複数のリンカーが当該技術分野で知られており、当業者は、本開示に従ってそのようなリンカーを利用する方法を容易に認識し、理解するであろう。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、アプロチニンポリペプチドを更に含む。例示的なアプロチニン配列を表３に示す。

【表４】

表３．例示的なアプロチニンアミノ酸配列。

配列番号	説明	アミノ酸配列
26	アプロチニン	RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRA KRNNFKSAEDCMRTCGGA

【０１３８】

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、組換え発現ベクターから発現される。発現ベクターは、一般に、プラスミド若しくはウイルスＤＮＡに由来するか、又は両方のエレメントを含有し得る。したがって、発現ベクターは、適切な宿主細胞への導入時に、クローニングされたＤＮＡの発現をもたらす、プラスミド、ファージ、組換えウイルス、又は他のベクターなどの組換えＤＮＡ又はＲＮＡ構築物を指す。適切な発現ベクターは、当業者に周知であり、真核細胞及び／又は原核細胞で複製可能であるもの、並びにエピソームのままであるもの、又は宿主細胞ゲノムに組み込まれるもの（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株）を含む（例えば、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ ２０２０）を参照されたい。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、発現ベクターは、所望のＤＮＡ配列（例えば、治療用ポリペプチド（複数可）をコードするＤＮＡ配列（ＧＯＩ））を含む核酸が、それが調節配列に作動可能に連結され、ＲＮＡ転写産物として発現され得るように、制限及びライゲーションによって挿入され得るものである。いくつかの実施形態では、ベクターは、ベクターで形質転換又はトランスフェクトされているか、又はされていない細胞の特定に使用するのに好適な１つ以上のマーカー配列（例えば、本明細書の他の箇所に記載されるもの）を更に含み得る。追加の例示的なマーカーとしては、例えば、抗生物質又は他の化合物に対する耐性又は感受性のいずれかを増加又は減少させるタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子、当該技術分野で知られている標準的なアッセイによって活性が検出可能である酵素（例えば、β－ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ又はアルカリホスファターゼ）をコードする遺伝子、並びに形質転換又はトランスフェクトされた細胞、宿主、コロニー又はプラークの表現型に明らかに影響を与える遺伝子（例えば、緑色蛍光タンパク質）が挙げられる。

【０１４０】

本明細書で使用される場合、コード配列及び核酸制御配列が、コード配列の発現又は転写を調節配列の影響又は制御下に置くような様式で共有結合されている場合、「作動可能に連結される」と言われる。いくつかの実施形態では、コード配列が機能的ポリペプチド（例えば、治療用ポリペプチド（複数可））に翻訳されることが望ましい場合、５’調節配列におけるプロモーターの誘導がコード配列の転写をもたらす場合、かつ２つのＤＮＡ配列間の連結の性質が、（１）フレームシフト変異の導入をもたらさない場合、（２）プロモーター領域がコード配列の転写を指令する能力を妨げる場合、又は（３）対応するＲＮＡ転写産物がポリペプチド（例えば、治療用ポリペプチド（複数可））に翻訳される能力を妨げる場合、２つのＤＮＡ配列が作動的に連結されると言われる。したがって、プロ

モーター領域がそのＤＮＡ配列の転写に影響を及ぼすことが可能であり、結果として得られる転写産物が所望のタンパク質又はポリペプチド（例えば、治療用ポリペプチド（複数可））に翻訳され得る場合、プロモーター領域はコード配列に作動的に連結されるであろう。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチドをコードする核酸が、細胞（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母）で発現される場合、様々な転写制御配列（例えば、プロモーター、エンハンサー配列）を使用して、その発現を指令することができる。プロモーターは、天然プロモーター、すなわち、遺伝子の発現の正常な調節を提供する、その内因性の文脈における遺伝子のプロモーターであってもよい。いくつかの実施形態では、プロモーターは、例えば、ｐＡＤＨ１、ｐＡＤＨ２、ｐＨＸＴ７、ｐＨＸＴ４、ｐＨＸＴ２、ｐＰＫＧ１、ｐＰＹＫ１、ｐＴＰＬ１、ｐＳＥＤ１ａ、ｐＳＥＤ１ｂ、ｐＪＥＮ１を含む構成的プロモーターであってもよく、プロモーターは、その関連する核酸（例えば、治療用ポリペプチド（複数可）をコードする核酸）の連続的な転写を可能にするように調節されていない。いくつかの実施形態では、プロモーターは、例えば、ｐＩＣＬ１、ｐＭＡＬ６２、ｐＧＵＴ１、ｐＦＢＰ１、ｐＳＵＣ２、ｐＣＵＰ１、ｐＨＧＴ９、ｐＨＧＴ１０、ｐＨＧＴ１２、ｐＨＧＴ１７、ｐＰＣＫ１を含む、誘導性プロモーターであってもよい。いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、化学物質の存在時若しくは非存在時に、又はいくつかの条件下で活性である。プロモーターの非限定的な例としては、ｐＴＤＨ３及びｐＴＥＦが挙げられる。様々な条件的プロモーター、例えば、分子の存在又は非存在によって制御されるプロモーターも使用することができる。いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド（複数可）をコードする核酸は、宿主細胞（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株）の内因性プロモーター領域に挿入される。いくつかのそのような実施形態では、内因性プロモーター領域への挿入は、適切な参照標準（例えば、外因性プロモーターが治療用ポリペプチド（複数可）をコードする核酸に含まれるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株）に対して、宿主のより良い発現及び／又はより少ないストレスをもたらす。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、遺伝子発現に必要な調節配列は、種間又は細胞型間で変化し得るが、一般に、必要に応じて、それぞれ転写及び翻訳の開始に関与する５’非転写配列及び５’非翻訳配列、例えば、ＴＡＴＡボックス、キャッピング配列、ＣＡＡＴ配列などを含まなければならない。特に、そのような５’非転写調節配列は、作動可能に連結された核酸の転写制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含む。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、調節配列は、所望な場合、エンハンサー配列又は上流のアクチベーター配列を含む。適切なベクターの選択及び設計は、当該技術分野で理解されている。当業者は、本開示の技術に従って、そのようなベクターを選択し、使用する方法を容易に認識し、理解するであろう。

【０１４４】

発現に必要な全ての要素を含有する発現ベクターは、市販されており、当業者に既知である。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｆｏｕｒｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２０１２を参照されたい。いくつかの実施形態では、細胞は、異種ＤＮＡ（ＲＮＡ）の細胞への導入によって操作される。その異種ＤＮＡ（ＲＮＡ）は、宿主細胞における異種ＤＮＡ（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株）の発現を可能にするために、転写要素の操作的制御下に置かれる。当業者であれば容易に理解するであろうように、本明細書に記載の治療用ポリペプチド（複数可）は、他の細胞型でも発現させることができる。

【０１４５】

本開示の治療用ポリペプチド（複数可）をコードする核酸分子は、当該技術分野で標準

的な方法及び技術を使用して細胞又は複数の細胞に導入することができる。例えば、核酸分子は、化学変換を含む形質転換、及びエレクトロポレーション、形質導入、粒子衝撃などの標準的なプロトコルによって導入され得る。本開示の治療用ポリペプチド（複数可）をコードする核酸分子を発現することは、核酸分子をゲノムに組み込むことによっても達成され得る。核酸（例えば、本明細書に記載される治療用ポリペプチド（複数可）をコードする）の組み込みは、酵母細胞（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株）のゲノムへの新しい核酸の組み込みによって、又はエピソーム要素としての新しい核酸の一過性若しくは安定した維持のいずれかによって達成され得る。いくつかの実施形態では、真核細胞において、永続的で遺伝可能な遺伝的変化は、一般に、核酸を細胞のゲノムに導入することによって達成される。

【０１４６】

抗毒素ＡＢＡＢ

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅによって産生される毒素Ａ（ＴｃｄＡとも称される）及び／又は毒素Ｂ（ＴｃｄＢとも称される）に対する抗毒素（抗毒素ＡＢＡＢ）であるか、又はそれを含む。

【０１４７】

いくつかの実施形態では、抗毒素ＡＢＡＢは、ＴｃｄＡ、ＴｃｄＢ、又はそれらの組み合わせに対する抗体、又はその機能的断片であるか、又はそれを含む。

【０１４８】

いくつかの実施形態では、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅの毒素Ａ及び／又は毒素Ｂに対する抗毒素は、四重特異的ＶＨＨ融合ポリペプチドであるか、又はそれを含む。いくつかのそのような実施形態では、四重特異的ＶＨＨ融合ポリペプチドは、４つの固有の毒素中和ＶＨＨを含み、２つが毒素Ａに対するものであり、２つが毒素Ｂに対するものである。いくつかのそのような実施形態では、四重特異的ＶＨＨ融合ポリペプチドは、Ｆｃ断片（例えば、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ断片）に融合する。

【０１４９】

いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、抗毒素ＡＢＡＢを発現する。

【０１５０】

例示的な抗毒素ＡＢＡＢ配列を表４にまとめている。

【表５】

表４．例示的な抗毒素ＡＢＡＢアミノ酸配列。

配列番号	説明	アミノ酸配列
5	FZ002	QVQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYSSIGWFRQA PGKEREGVSCISSSGDSTKYADSVKGRFTTSRDNAKNTVY LQMNSLKPDDTAVYYCAAFRATMCGVFPLSPYGKDDWG KGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCEASGFTLDYYGIGWFRQPPGKEREAVSYISASAR TILYADSVKGRFTISRDNAKNAVYLQMNSLKREDTAVYYC ARRRFSASSVNRWLADDYDVWGRGTQVAVSSGGGSGGG SGGGSGGGSQLQLVETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSD YVMTWVRQAPGKGPEWIATINTDGSTMRDDSTKGRFTISR DNAKNTLYLQMTSLKPEDTALYYCARGRVISASAIRGAVR GPGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQT GGSLRLSCASSGSIAGFETVTWSRQAPGKSLQWVASMTKT NNEIYSDSVKGRFIISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYFC KGPELRGQGIQVTVSS

【０１５１】

抗ＴＮＦ－α

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、ＴＮＦ－αに対する抗体であるか、又はそれを含む。ＴＮＦ－αに対する抗体の例示的な配列を、表５にまとめている。

【０１５２】

いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＴＮＦ－αに対する抗体を発現する（例えば、ＦＺ００６）。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＴＮＦ－α及び抗毒素ＡＢＡＢに対する抗体を発現する（例えば、ＦＺ０２０）。

【表６】

表５．例示的な抗ＴＮＦ－α抗体アミノ酸配列。

配列番号	説明	アミノ酸配列
6	FZ006 (Sb-ahTNF)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYAMGWFRQAPGKEREFVATVDNDGFTMHADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGQYSKFVESYAYWGQGTLVTVSS
7	FZ006m (Sb-amTNF)	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVGAVSWSGGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVGAVSWSGGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS

【０１５３】

抗ＩＬ－１７Ａ

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、ＩＬ－１７Ａに対する抗体であるか、又はそれを含む。ＩＬ－１７Ａに対する抗体の例示的な配列を、表６にまとめている。

【０１５４】

いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－１７Ａに対する抗体を発現する（例えば、ＦＺ００４）。

【表７】

表６．例示的な抗ＩＬ－１７Ａ抗体アミノ酸配列。

配列番号	説明	アミノ酸配列
25	FZ004	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKGTEFVAAISPSGGDRIYADSVKGRFTISRDNAGYFIYLQMNSLKPEDTAVYYCAVRRRFDGTSYYTGDYDSWGQGTLVTVSS

【０１５５】

ｈＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、二重特異的抗体であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の株は、機能的二重特異的中和抗体を効率的に分泌する。いくつかのそのような実施形態では、抗体の形式は、ヒトＩｇＧ１　ＦｃのＮ末端及びＣ末端の両方に、又はＮ末端のみのいずれかに、２つの融合抗サイトカイン単一ドメイン抗体、又はＶＨＨを含む（ＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨ及びＶＨＨ－ＶＨＨ－Ｆｃ）。いくつかの実施形態では、

機能的二重特異的抗体は、ＩＬ－１７及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体であるか、又はそれらを含む。いくつかの実施形態では、異なるプロモーターは、抗ＴＮＦα／ＩＬ－１７Ａ二重特異的抗体遺伝子の異なる発現を駆動する。

【０１５６】

いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現する（例えば、ＦＺ００８）。

【０１５７】

ＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体の例示的な配列を表７にまとめている。

【表８】

表７．ＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αアミノ酸配列に対する例示的な二重特異的抗体。

配列番号	説明	アミノ酸配列
8	FZ008a	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYAMGWFRQAPGKEREFVATVDNDGFTMHADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGQYSKFVESYAYWGQGTLVTVSSGQAGQGGGGSGGGGSGGGGSLQQVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKGTEFVAAISPSGGDRIYADSVKGRFTISRDNAGYFIYLQMNSLKPEDTAVYYCAVRRRFDGTSYYTGDYDSWGQGTLVTVSS
9	FZ008b-VHH1 (抗 TNF-α)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYAMGWFRQAPGKEREFVATVDNDGFTMHADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAGQYSKFVESYAYWGQGTLVTVSSGQAGP
10	FZ008b-VHH2 (抗 IL-17A)	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFATSPMGWLRQAPGKGTEFVAAISPSGGDRIYADSVKGRFTISRDNAGYFIYLQMNSLKPEDTAVYYCAVRRRFDGTSYYTGDYDSWGQGTLVTVSS

【０１５８】

ＩＬ－２２

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、ＩＬ－２２ポリペプチド（例えば、機能的ＩＬ－２２ポリペプチド）であるか、又はそれを含む。ＩＬ－２２ポリペプチドの例示的な配列を表８にまとめている。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－２２ポリペプチドを発現する（例えば、ＦＺ０１０）。いくつかのそのような実施形態では、ＩＬ－２２ポリペプチドは、Ｆｃドメインに連結される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－２２ポリペプチド、並びにＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現する（例えば、ＦＺ０１２）。

【表９】

表８．操作された酵母株によって発現される例示的なＩＬ－２２アミノ酸配列。

配列番号	説明	アミノ酸配列
11	FZ010m	LPVNTRCKLEVSNFQQPYIVNRTFMLAKEASLADNNTDVR LIGEKLFRGVSAKDQCYLMKQVLNFTLEDVLLPQSDRFQP YMQEVVPFLTKLSNQLSSCHISGDDQNIQKNVRRLKETVK KLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACV
12	FZ010	APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRL IGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPY MQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKK LGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

【０１６０】

抗ロタウイルスＶＨＨ

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、抗ロタウイルスＶＨＨ（例えば、抗ロタウイルスＶＨＨ、２ＫＤ１）であるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、抗ロタウイルスＶＨＨは、アプロチニンと融合される。アプロチニンは、抗線維素溶解活性及び抗炎症活性を有するウシ肺から単離された一本鎖ポリペプチドである。広スペクトルのセリンプロテアーゼ阻害剤として、ウシアプロチニンは、トリプシン、キモトリプシン、カリクレイン、プラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子、並びに組織及び白血球プロテイナーゼを含むいくつかの異なるエステラーゼ及びプロテアーゼの活性を競合的かつ可逆的に阻害し、全身性炎症応答（ＳＩＲ）、線維素溶解、及びトロンビン生成を弱める。この薬剤はまた、炎症促進性サイトカイン放出を阻害し、糖タンパク質の恒常性を維持する。いずれかの理論に拘束されることを望まないが、アプロチニンと抗ロタウイルスＶＨＨ（例えば、２ＫＤ１）との融合は、胃腸管における抗ロタウイルスＶＨＨ（例えば、抗ロタウイルスＶＨＨ、２ＫＤ１）の消化を減少させるか、若しくは排除し、かつ／又は炎症を減少させ得る。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、抗ロタウイルスＶＨＨを発現する（例えば、ＦＺ０１４）。

【０１６２】

抗ロタウイルスＶＨＨポリペプチドの例示的な配列を、表９にまとめている。

【表１０】

表９．例示的な抗ロタウイルスＶＨＨアミノ酸配列。

配列番号	説明	アミノ酸配列
13	FZ014	MADVQLQASGGGFVQPGDSLSLSCAASGGTFSSYSIGWFR QGPGKEREFVATISSSDSPWYGEPAKGRFTVARVNAKNTA YLHLNRLKPEDTATYYCAAGSVQHMANENEYVYWGQGT QVTVSS

【０１６３】

ノロウイルスに対する単一特異的及び二重特異的ＶＨＨ－Ｆｃ

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、ノロウイルスに対する単一特異的又は二重特異的ＶＨＨ－Ｆｃ（例えば、Ｍ６Ｍ５－Ｆｃ及びＭ６Ｍ４－Ｆｃ）であるか、又はそれを含む。いくつかのそのような実施形態では、ノロウイルスに対するＶＨＨは、タグ（例えば、ＨＡタグ）を更に含む。

【０１６４】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操

作された株は、ノロウイルスに対する二重特異的ＶＨＨ－Ｆｃ（例えば、Ｍ６Ｍ５－Ｆｃ及びＭ６Ｍ４－Ｆｃ）を発現する（例えば、ＦＺ０１６）。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ノロウイルスに対する単一特異的ＶＨＨ－Ｆｃを発現する（例えば、ＦＺ０１６ｃ）。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ノロウイルス及び抗毒素ＡＢＡＢに対する二重特異的ＶＨＨ－Ｆｃを発現する（例えば、ＦＺ０１８）。

【０１６５】

ノロウイルスに対する二重特異的又は単一特異的ＶＨＨ－Ｆｃの例示的な配列を、表１０にまとめている。

【表１１】

表１０．ノロウイルスに対する例示的な二重特異的ＶＨＨ－Ｆｃ（ＦＺ０１６ａ、ＦＺ０１６ｂ）及び単一特異的（ＦＺ０１６ｃ）アミノ酸配列。太字及び下線付き配列は、ＨＡタグ配列を示す。

配列番号	説明	アミノ酸配列
14	FZ016a	QVKLQESGGGLVQAGESLRLSCAASGSNFSINGVGWYRQAPGKQRELVAGITNGGYTSYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNANFQIHRSGADYVRNYWGQGTQVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSQVKLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAASESTISINTLGWYRQAPGNQRELVATITTGGTTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLEPGDTAVYYCNLKRRDLQSRFGGYWGQGTQVTVSS
15	FZ016b	QVKLQESGGGLVQAGESLRLSCAASGSNFSINGVGWYRQAPGKQRELVAGITNGGYTSYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNANFQIHRSGADYVRNYWGQGTQVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCVASESTVSINIMGWYRQAPGKQRELVATITTGGTTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLEPEDTAVYYCNLKRRDLQARFGGYWGQGTQVTVSS
16	FZ016c	QVKLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAASESTISINTLGWYRQAPGNQRELVATITTGGTTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLEPGDTAVYYCNLKRRDLQSRFGGYWGQGTQVTVSS**YPYDVPDYA**

【０１６６】

ＧＬＰ－１

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、ＧＬＰ－１ポリペプチド（例えば、機能的ＧＬＰ－１ポリペプチド）であるか、又はそれを含む。ＧＬＰ－１ポリペプチドの例示的な配列を表１１にまとめている。

【０１６７】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＧＬＰ－１ポリペプチド（例えば、機能的ＧＬＰ－１ポリペプチド、ヒト機能的ＧＬＰ－１ポリペプチド）を発現する（例えば、ＦＺ０２２）。

【表１２】

表１１．例示的なＧＬＰ－１アミノ酸配列

配列番号	説明	アミノ酸配列
17	FZ022a	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR
23	FZ022b	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG
24	FZ022c	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS

【０１６８】

レプチン

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、レプチンポリペプチドであるか、又はそれを含む。（例えば、機能的レプチンポリペプチド。）レプチンポリペプチドの例示的な配列を表１２にまとめている。いくつかのそのような実施形態では、レプチンポリペプチドは、タグ（例えば、ＨＡタグ）を更に含む。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、レプチンポリペプチド（例えば、機能的レプチンポリペプチド、ヒト機能的レプチンポリペプチド）を発現する（例えば、ＦＺ０２４）。

【表１３】

表１２．例示的なレプチンアミノ酸配列。太字及び下線付き配列は、ＨＡタグ配列を示す。

配列番号	説明	アミノ酸配列
18	FZ024	VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVTGLDFIP GLHPILTLSKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQISNDLENLR DLLHVLAFSKSCHLPWASGLETLDSLGGVLEASGYSTEVV ALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGC**YPYDVPDYA**

【０１７０】

抗ヒトＴＮＦ－α　ＩｇＧ１

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、抗ＴＮＦ－α　ＩｇＧ１であるか、又はそれを含む。いくつかのそのような実施形態では、抗ＴＮＦ－α　ＩｇＧ１は、ヒュミラを含む。いくつかのそのような実施形態では、抗ＴＮＦ－α　ＩｇＧ１は、アダリムマブを含む。抗ＴＮＦ－α　ＩｇＧ１の例示的な配列を、表１３にまとめている。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、抗ＴＮＦ－α　ＩｇＧ１を発現する（例えば、ＦＺ０２６）。

【表１４】

表１３．例示的な抗ＴＮＦ－α　ＩｇＧ１酸配列。

配列番号	説明	アミノ酸配列
19	FZ026-HC	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSLYLDMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	FZ026-LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０１７２】

リジンドメインと融合したｃｗｐ８４に対するＶＨＨ

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、リジンドメインと融合したｃｗｐ８４に対するＶＨＨであるか、又はそれを含む。リジンドメインと融合したｃｗｐ８４に対するＶＨＨの例示的な配列を、表１４にまとめている。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、リジンドメインと融合したｃｗｐ８４に対するＶＨＨを発現する（例えば、ＦＺ０２８）。

【表１５】

表１４．例示的なリジンドメインと融合したｃｗｐ８４に対するＶＨＨのアミノ酸配列

配列番号	説明	アミノ酸配列
21	FZ028a	MKICITVGHSILKSGACTSADGVVNEYQYNKSLAPVLADTFRK EGHKVDVIICPEKQFKTKNEEKSYKIPRVNSGGYDLLIELHLNA SNGQGKGSEVLYYSNKGLEYATRICDKLGTVFKNRGAKLDKR LYILNSSKPTAVLIESFFCDNKEDYDKAKKLGHEGIAKLIVEGV LNKNINGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CVASTSTFPINEMGWYRQAPGKQRELVAAITRVGTTNYANSV KGRFTISRDKTSNTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLFAD TGNYWGQGTLVTVSS
22	FZ028b	MKVVIIPGHTLIGKGTGAVGYINESKETRILNDLIVKWLKIGGA TVYTGRVDESSNHLADQCAIANKQETDLAVQIHFNSNATTSTP VGTETIYKTNNGKTYAERVNTRLATVFKDRGAKSDVRGLYW LNHTIAPAILIEVCFVDSKADTDYYVNNKDKVAKLIAEGILNKS GSGGGSEGGGSEGGGSEGGQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCV ASTSTFPINEMGWYRQAPGKQRELVAAITRVGTTNYANSVKG RFTISRDKTSNTKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLFADTG NYWGQGTLVTVSS

【０１７４】

ＩＬ－１０

いくつかの実施形態では、本開示の治療用ポリペプチド（複数可）は、ＩＬ－１０ポリペプチドであるか、又はそれを含む。（例えば、機能的ＩＬ－１０ポリペプチド。）ＩＬ－１０ポリペプチドの例示的な配列を表１５にまとめている。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－１０ポリペプチド（例えば、機能的ＩＬ－１０ポリペプチド、ヒト機能的レプチンポリペプチド）を発現する（例えば、ＦＺ０３０）。

【表１６】

表１５．例示的な１Ｌ－１０アミノ酸配列。

配列番号	説明	アミノ酸配列
27	FZ030	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMK DQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQA ENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKA VEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

【０１７６】

表１６は、本開示の例示的な治療用ポリペプチド（複数可）の構造及び配列をまとめたものである。

【表１７】

表１６．例示的な治療用ポリペプチド（複数可）の構造及びアミノ酸配列。

バイオリード	構造	治療用ペプチド	形式						タグ
			非融合	Fc-融合			アプロチニン(Ap)-融合		
				Fc-融合	Fc 型	Fc 位置	Ap-融合	Ap 位置	IgG
FZ002	四量体	S1_FZ002	はい						いいえ
FZ004	二量体	S2_FZ004		はい	S23_wFc	C 末端			いいえ
FZ006	二量体	S3_FZ006		はい	S23_wFc	C 末端			いいえ
FZ006m	四量体	S4_FZ006m		はい	S23_wFc	C 末端			いいえ
FZ008a	四量体	S5_FZ008a		はい	S23_wFc	C 末端			いいえ
FZ008b	四量体	S3_FZ006h(VHH1) S2_FZ004(VHH2)		はい	S23_wFc	2 つの VHH 間			
FZ010m	二量体	S6_FZ010m		はい	S23_wFc	C 末端			いいえ
FZ010a	単量体	S7_FZ010	はい						
FZ010b	二量体	S7_FZ010		はい	S24_mFc(N297Q)	N 末端			いいえ
FZ010c	二量体	S7_FZ010		はい	S24_mFc(N297Q)	C 末端			いいえ
FZ014a	二量体	S8_FZ014		はい	S23_wFc	C 末端			いいえ
FZ014b	二量体	S8_FZ014		はい	S23_wFc	C 末端	はい S25_Ap	N 末端 @S8_FZ014	いいえ
FZ014c	二量体	S8_FZ014		はい	S23_wFc	C 末端	はい S25_Ap	C 末端 @wFc	いいえ
FZ016a	四量体	S9_FZ016a		はい	S23_wFc	C 末端			いいえ
FZ016b	四量体	S10_FZ016b		はい	S23_wFc	C 末端			いいえ
FZ016c	単量体	S11_FZ016c	はい						HA
FZ020	多量体	S1_FZ002+S3_FZ006							いいえ
FZ022a		S12_FZ022a							いいえ
FZ022b		S13_FZ022b							いいえ
FZ022c		S14_FZ022c							いいえ
FZ024a	単量体	S15_FZ024	はい			C 末端			いいえ
FZ024b	二量体	S15_FZ024		はい	S23_wFc	C 末端			いいえ
FZ026		S16_FZ026-HC S17_FZ026-LC							はい いいえ
FZ028a	四量体	S18_FZ028a(LCD1-VHH)		はい	S23_wFc	C 末端			いいえ
FZ028b	四量体	S19_FZ028b (LCD2-VHH)		はい	S23_wFc	C 末端			いいえ
FZ030a	二量体	S20_FZ030	はい						
FZ030b	二量体	S20_FZ030		はい	S24_mFc(N297Q)	C 末端			いいえ
FZ030c	二量体	S20_FZ030		はい	S24_mFc(N297Q)	C 末端	はい S25_Ap	N 末端 @S8_FZ030	いいえ

M、マウス態様; wFc、野生型ヒト Fc; mFc; 変異体ヒト Fc; HC、重鎖; LC、軽鎖。太字/下線付き、HA タグ;

【０１７７】

使用

本開示は、とりわけ、治療的有用性又は臨床的有用性を有するＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株、それらを含む組成物、及びそれらを使用する様々な疾患及び状態の治療方法を提供する。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株及び／又はその組成物を、それを必要とする対象に投与する方法も本明細書に記載される。いくつかの態様では、対象は、例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、又は別の炎症性腸疾患などの炎症性腸疾患を有していてもよく、又は免疫に関連する状態、又は肝疾患、移植片対宿主病、糖尿病、肥満、神経変性疾患、疼痛、卒中、心血管疾患、感染性疾患、自己免疫疾患、結腸がん、及び他の消化管悪性腫瘍、又は皮膚、口、胃腸管、膣、若しくは別の臓器に影響を及ぼすディスバイオシスを有し得る。本開示の他の組成物、化合物、方法、特徴、及び利点は、以下の図面、詳細な説明、及び実施例を検討することにより、当業者には明らかであるか、又は明らかになるであろう。そのような全ての追加の組成物、化合物、方法、特徴、及び利点は、本説明に含まれ、本開示の範囲内であることが意図される。

【０１７８】

また、対象における炎症に関連する疾患、障害、及び／又は状態を治療する（例えば、症状を最小限に抑えるための寛解中の治療を含む）、又は予防する（例えば、再発の予防、維持治療を含む）方法が本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、治療有効量の本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株及び／又は明細書に記載の開示される薬学的組成物を、それを必要とする対象に、対象に投与する

ことを含む。いくつかの実施形態では、対象は、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、ニワトリ、又はシチメンチョウなどの脊椎動物であり得る。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。いくつかの実施形態では、疾患は、炎症に関連する。いくつかの実施形態では、疾患は、例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病、別の炎症性腸疾患、結腸がん、糖尿病、肥満、湿疹、細菌性膣炎、膣酵母感染症、アルツハイマー病、ストレス、うつ病、不安症、双極性障害、神経変性疾患、疼痛、卒中、心血管疾患、感染性疾患、自己免疫疾患、又はそれらの任意の組み合わせであり得る。

【０１７９】

いくつかの態様では、対象は、炎症に関連する疾患を有し、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株による治療は、治療的であるとみなされる。他の態様では、対象は、炎症に関連する疾患（例えば、免疫に関連する状態）のリスクがあり、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株による治療は、予防的であるとみなされる。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、例えば、Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉなどを含むＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の野生型（例えば、操作されていないか、又は親）株に関連するものなどの更なるプロバイオティクス効果を有する。いくつかの態様では、治療は、治療前の対象の症状に対して、対象の炎症に関連する疾患、障害、及び／又は状態の少なくとも１つの症状を軽減する。別の態様では、症状は、例えば、下痢、発熱、疲労、体重減少、便中の血液、腹部けいれん、腹痛、食欲減退、腸損傷、発疹、かゆみ、口内炎、又はそれらの任意の組み合わせのうちの１つ以上であり得る。

【０１８０】

また、対象における炎症に関連する疾患を治療又は予防する方法であって、本方法が、対象に治療有効量の本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を、及び／又は対象に開示される薬学的組成物を投与することを含む、方法が本明細書に開示される。別の態様では、対象は、哺乳動物であってもよく、疾患は、炎症と関連していてもよい。一態様では、疾患は、潰瘍性大腸炎、クローン病、セリアック病、過敏性腸症候群（ＩＢＳ）、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ若しくは別の細菌若しくはウイルスによって、又はＴ細胞移入によって、又はデキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ）によって誘導される大腸炎、別の炎症性腸疾患、限定されないが、ロタウイルス、ノロウイルス、サイトメガロウイルス、ヘルペスウイルス、腸内ウイルス、アデノウイルス、ヒトパピローマウイルス、急性自己限定大腸炎、細菌性腸炎、腸のクロストリジウムの疾患、ＧＩ管のマイコバクテリア感染、ＧＩ管のスピロヘータ感染、ＧＩ管の真菌感染、ＧＩ管の原生動物感染又は蠕虫感染、腸炎症（例えば、慢性腸炎症）を含む、心血管疾患、限定されないが、冠動脈疾患、末梢動脈疾患、脳血管疾患、腎動脈狭窄、大動脈瘤、心筋症、高血圧性心疾患、心不全、肺性心疾患、不整脈、心内膜炎、炎症性心肥大、心筋炎、心臓弁膜症、先天性心疾患、リウマチ性心疾患を含む、がん、例えば、食道がん、胃がん、直腸がん、小腸がん、消化管間質腫瘍、鼻咽腔がん、結腸がん、又は別の胃腸がん、糖尿病（１型又は２型）、低血糖症、高コレステロール血症、又は別の代謝疾患、肥満、脂肪肝疾患、脂肪肝炎、肝硬変、肝臓がん、湿疹、乾癬、化膿性汗腺炎、皮膚潰瘍、細菌性膣炎、膣酵母感染、ロタウイルス、ノロウイルスＨＩＶ関連炎症、関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、筋萎縮性側索硬化症、全身性エリテマトーデス、食物アレルギー、吸収不良、下痢、酸の逆流（例えば、ＧＥＲＤ）、ディスバイオシス、憩室炎、敗血症、固形腫瘍、限定されないが、乳がん、膀胱がん、頭頸部扁平上皮がん、黒色腫、神経芽腫、肺がん、卵巣がん、非小細胞肺がんを含む、液体腫瘍、限定されないが、リンパ腫、大細胞型Ｂ細胞性リンパ腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞性リンパ腫、急性骨髄性白血病、炎症に関連する老化、神経学的疾患、限定されないが、アルツハイマー病、うつ病、ストレス、不安症、双極性障害、統合失調症、多発性硬化症、パーキンソン病、卒中を含む、又はそれらの任意の組み合わせであり得る。いくつかの態様では、対象は、炎症に関連する疾患を有する。他の態様では、対象は、炎症及び自己免疫疾患に関連する疾患のリスクがある。いくつかの態様では、治療は、治療前の対象の症状に対して、対象の炎症に関連する疾患の少なくとも

１つの症状を軽減する。別の態様では、症状は、下痢、発熱、疲労、体重減少、便中の血液、腹部けいれん、腹痛、食欲減退、腸損傷、発疹、かゆみ、口内炎、又はそれらの任意の組み合わせであり得る。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、対象における炎症に関連する疾患を治療又は予防する方法は、対象に治療有効量の本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を、又はそれを含む組成物（例えば、薬学的組成物）を投与することを含む。

【０１８２】

Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　Ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ感染（ＣＤＩ）

Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ、又はＣｌｏｓｔｒｉｄｉｏｉｄｅｓ　ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ（Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ）は、グラム陽性の胞子形成性嫌気性バチルスであり、ヒト及び動物の腸管並びに環境に広く分布している。Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅの胞子は、糞口経路によって伝達され、病原体は環境中に広く存在する。Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅの潜在的なリザーバには、無症候性キャリア、感染した患者、汚染された環境、及び動物腸管（イヌ、ネコ、ブタ、トリ）が含まれる。成人のおよそ５％及び乳児の１５～７０％には、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅがコロニー形成しており、そのコロニー形成の発生率は、入院患者又は介護施設の居住者において、数倍高い（Ｃｚｅｐｉｅｌ　Ｊ　ｅｔ　ａｌ．Ｅｕｒ　Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ　Ｉｎｆｅｃｔ　Ｄｉｓ．２０１９；３８（７）：１２１１－１２２１）。

【０１８３】

Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅへの感染は、大部分は胞子伝播の結果として発生する。胞子は、熱、酸、及び抗生物質に耐性がある。Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ感染（ＣＤＩ）に対する主な保護障壁は、正常な腸内微生物叢である。胆汁酸は、腸に到達した後、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ胞子発芽の誘導において重要な役割を果たす。インビトロでは、一次胆汁酸（例えば、コール酸及びケノデオキシコール酸）は、一般に、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ胞子の発芽を刺激し、二次胆汁酸（例えば、デオキシコール酸及びリトコール酸）は、このプロセスを阻害する。

【０１８４】

腸内微生物のバランスが崩れると、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅが大腸を支配し、コロニー形成が始まる。このことは、いずれかの理論に拘束されることを望まないが、感染の最初のステップであり得る。病原体は侵襲性ではなく、毒性は主に２つの主要な毒素に起因するものと理解され、上皮細胞細胞骨格を損傷し、密着結合の破壊、液体分泌、好中球接着、及び局所炎症を引き起こし、腸管障壁の完全性の破壊及び機能の喪失を引き起こす。Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅの疾患の発病機序にとって最も重要なのは、毒素Ａ及びＢであり、これらは両方とも腸毒性及び細胞傷害性であるが、伝統的に、毒素Ａは、「内毒素Ａ」（ＴｃｄＡ）と呼ばれ、毒素Ｂは、「細胞毒性Ｂ」（ＴｃｄＢ）と呼ばれる。Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅトランスフェラーゼ（ＣＤＴ、又はバイナリー毒素）は、流行性ＰＣＲリボタイプ０２７を含むいくつかのＣ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ株によって産生される第３の毒素である。毒素は、細胞質に運ばれ、そこでＧＴＰａｓｅのＲｈｏファミリーを不活性化する。Ｒｈｏタンパク質は、アクチン重合に関与し、したがって、細胞骨格を安定させる。Ｒｈｏタンパク質の不活性化の結果として、炎症プロセスが強化される。より重度の症例では、偽膜（破壊された腸細胞、好中球、及びフィブリンで構成される）で覆われた微小細胞形成が腸粘膜表面に発生し始める。

【０１８５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＣＤＩを治療及び／又は予防するのに有用である。いくつかのそのような実施形態では、ＣＤＩの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗毒素ＡＢＡＢを発現する。いくつかのそのような実施形態では、ＣＤＩの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗毒素ＡＢＡＢを発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（例えば

、ＦＺ００２）を含む。

【０１８６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）に関連するＣＤＩを治療及び／又は予防するのに有用である。いくつかの場合には、ＣＤＩは、ＩＢＤと診断されたか、又はＩＢＤに罹患している対象において、より悪い臨床的結果と関連する。いくつかのそのような実施形態では、ＩＢＤに関連するＣＤＩの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ＴＮＦα及び抗毒素ＡＢＡＢを発現する（例えば、ＦＺ０２０）。

【０１８７】

炎症性腸疾患（ＩＢＤ）

炎症性腸疾患（ＩＢＤ）は、胃腸管の慢性炎症を特徴とし、免疫応答に影響を与える遺伝的要因と環境要因との間の相互作用から生じると理解される。潰瘍性大腸炎（ＵＣ）及びクローン病（ＣＤ）は、ＩＢＤの主要な形態であり、長期的な治療、頻繁な入院、更には手術を必要とする血性下痢及び腹部けいれんを特徴とする、慢性的かつ頻繁に再発する疾病である。これらの疾患は、粘膜免疫系の調節不全及び腸内細菌叢のディスバイオシスを特徴とする。Ｃｅｎｔｅｒｓ ｆｏｒ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ ａｎｄ Ｐｒｅｖｅｎｔｉｏｎ（ＣＤＣ）によれば、およそ３１０万人（又は１．３％）の米国成人がＩＢＤに罹患しており、直接的な治療コストは年間７０億ドルを超えている。治療薬を開発するための大幅な努力にもかかわらず、米国におけるこれらの疾患の入院率は、過去数十年で着実に増加しており、２００３年から２０１３年までの１０年間で入院率が１０万人当たり４４．２人から５９．７人に大幅に増加した。更に、総入院費用も上昇し続けており、患者、保険会社、及び雇用主に多大な経済的損失を引き起こしている。ＩＢＤの重篤な合併症は、衰弱を引き起こす場合があり、最終的に死に至る可能性がある。

【０１８８】

炎症性腸疾患の原因は不明である。ＣＤ及びＵＣの発病機序は、細菌因子などの遺伝的要因と環境的要因との間の相互作用を伴う可能性が最も高いが、これまでのところ明確な病因因子は特定されていない。主な理論は、おそらく腸内細菌叢によって促進される異常な免疫応答がＩＢＤで発生するということである。しかしながら、Ｔ細胞が発病機序において重要な役割を果たすことが理解されている。活性化されたＴ細胞は、抗炎症性サイトカイン及び炎症促進性サイトカインの両方を生成し得る。１つの既存の療法は、抗ＴＮＦモノクローナル抗体による全身治療を伴う。ｃＡ２インフリキシマブ抗体の５～２０ｍｇ／ｋｇの範囲の単回静脈内投与は、活動性クローン病の劇的な臨床的改善をもたらした。０．５～２５μｇ／ｋｇの範囲の用量を使用した７日間の処置レジメンにおける全身投与された組換えＩＬ－１０の使用は、クローン病の活動性スコアの減少及び寛解の増加を示した。しかしながら、これらの戦略は、精製されたタンパク質又はポリペプチド治療薬の注射を介した全身投与を必要とし、これは高価であり、かつ患者にとって便利なものではない。ＵＣ管理のための既存の戦略はまた、コルチコステロイドなどの抗炎症薬及び免疫抑制薬を使用することを伴い、これらは多くの場合、全身性免疫抑制に関連する。しかしながら、患者の最大４０％が、初回治療に応答しない。初期応答者のうち、１３％～４６％の患者が翌年以内に再発する。したがって、ＵＣの現在の治療の選択肢は最適ではなく、新規の治療が必要とされている。

【０１８９】

ＴＮＦ－αは、動物モデル及びヒトの両方におけるＵＣの発病機序において重要な役割を果たし、ＩＢＤなどの炎症性障害の治療標的として広く受け入れられている。インフリキシマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ、及びセルトリズマブペゴルを含む米国食品医薬品局（ＦＤＡ）が承認した抗ＴＮＦ－α生物学的製剤は、関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、ＣＤ、及びＵＣを含む様々な慢性炎症性障害に対する療法に革命をもたらした。これらの抗体治療薬は全て、非経口的に投与しなければならない。全身送達された抗ＴＮＦ－α生物製剤は非常に有効であるが、それらの長期使用は、多くの場合、抗薬物抗

体応答及び免疫抑制性副作用に起因する有効性の喪失と関連がある。ＩＬ－１７Ａは、ＩＬ－１７ファミリーの中で最も広く研究されているメンバーである。ＩＬ－１７Ａは、様々な微生物病原体及び組織の炎症に対する宿主の防御において重要な役割を果たす。ＩＬ－１７Ａを産生するＣＤ４＋Ｔヘルパー細胞（Ｔｈ１７細胞とも呼ばれる）は、過去１０年間で広く研究されており、組織炎症の強力な誘導因子であることが示されており、多くの実験的自己免疫疾患及びヒト炎症状態の発病機序に関連している。実質的な証拠は、Ｔｈ１７細胞を含むＩＬ－１７Ａ産生細胞が、ヒト乾癬、関節リウマチ、多発性硬化症、炎症性腸疾患、及び喘息に関与していることを示唆している。抗ＩＬ－１７Ａは、乾癬の治療についてＦＤＡ承認されており、この経路は、喘息、関節リウマチ、多発性硬化症、移植拒絶、及び炎症性腸疾患においても研究されている。

【０１９０】

インターロイキン－２２（ＩＬ－２２）は、多くの場合、免疫細胞によって発現されるが、非免疫細胞に排他的に作用するサイトカインとして説明される。その役割は、ＩＬ－２２ライゲーションの効果が典型的には増殖、再生、又は自然免疫機構の活性化を伴う、皮膚、肺、及び腸などのいわゆる障壁表面で最もよく理解される。ＩＬ－２２は、ＩＬ－１７及び／又はＴＮＦαと相乗的に作用することができる。腸において、ＩＬ－２２シグナル伝達は、病原体に対する宿主防御及び創傷治癒を含む重要な機能を促進する。腸組換えＩＬ－２２適用は、肝臓及び膵臓の損傷、潰瘍性大腸炎、移植片対宿主病に有益な影響を及ぼし得る。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＢＤ（例えば、ＵＣ及びＣＤ）を治療及び／又は予防するのに有用である。いくつかのそのような実施形態では、ＩＢＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ＴＮＦαを発現する。いくつかのそのような実施形態では、ＩＢＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ＴＮＦα抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ００６）。いくつかのそのような実施形態では、ＩＢＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現する。いくつかのそのような実施形態では、ＩＢＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ００８）。いくつかのそのような実施形態では、ＩＢＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－２２ポリペプチドを発現する。いくつかのそのような実施形態では、ＩＢＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－２２を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０１０）。いくつかのそのような実施形態では、ＩＢＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－２２、並びにＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現する。いくつかのそのような実施形態では、ＩＢＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－２２、並びにＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０１２）。いくつかのそのような実施形態では、ＩＢＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ヒトＴＮＦ－α　ＩｇＧ１を発現する。いくつかのそのような実施形態では、ＩＢＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、抗ヒトＴＮＦ－α　ＩｇＧ１を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０２６）。

【０１９２】

腸炎症及び神経学的疾患

腸の炎症は、ヒトの生活の質に著しく影響を及ぼし、実質的な機能喪失、罹患率、及び

更には死亡率を生じさせる代謝障害及び神経学的疾患などの多くの重篤な疾患及び障害に寄与する要因である。最近の研究は、慢性腸炎症が、例えば、うつ病、パーキンソン病、及びアルツハイマー病を含む、神経変性疾患の開始及び発症の潜在的な重要な要因であることを示している。

【０１９３】

神経変性疾患は、中枢神経系（例えば、脳及び脊髄）又は末梢神経系のニューロンが経時的に機能を失い、死滅するときに発生する。神経変性疾患にかかるリスクは、年齢とともに劇的に増加する。人間の平均寿命は毎年増加しており、このことは、今後数十年でより多くの人々が神経変性疾患に罹患することを意味する。ますます認識されるようになった神経変性疾患の潜在的な原因の１つは、腸の炎症である。腸脳軸を介した脳と腸との間の関連性が、ますます明らかになってきている。脳と腸との間のそのような接続の１つは、腸管神経系（ＥＮＳ）から始まる。ＥＮＳは、食道から直腸までの胃腸管に並ぶ数億の神経細胞の２つの層を含み、感情的な変化を引き起こす場合がある。胃腸（ＧＩ）系からの刺激により、ＥＮＳを介して、中枢神経系（ＣＮＳ）に信号を送ることができるという証拠が存在する。したがって、腸の炎症は、腸脳軸を介して気分の変化を引き起こす可能性がある。興味深いことに、不安症及び抑うつなどの心理的障害は、過敏性腸症候群（ＩＢＳ）を有する患者において広範囲に広がっている。したがって、腸の炎症の治療及び／又は予防は、神経変性疾患及び／又は神経学的疾患の治療及び／又は予防をもたらし得る。

【０１９４】

例えば、ＴＮＦ－α及びインターロイキン１７Ａ（ＩＬ－１７Ａ）などの炎症誘発性サイトカインは、多くの炎症性疾患、並びに慢性腸炎症及び免疫に関連する状態の病因に寄与する重要な免疫メディエーターである。いずれかの理論に拘束されることを望まないが、サイトカインに特異的に結合し、免疫細胞上の受容体との相互作用を遮断し、したがって下流の炎症経路を阻害する中和抗体の使用は、サイトカイン媒介性炎症を制御する手段を提供し得る。したがって、いくつかの実施形態では、腸炎症及び免疫関連疾患（例えば、神経学的疾患）の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、例えば、ＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体及び／又は本明細書に記載の抗ＴＮＦ－α　ＩｇＧ１を含む、炎症誘発性サイトカインに対する抗体を発現する。いくつかのそのような実施形態では、腸炎症及び／又は免疫に関連する状態の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ００８）。いくつかのそのような実施形態では、腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨを発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ００６）。いくつかのそのような実施形態では、腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、抗ＴＮＦ－α　ＩｇＧ１を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０２６）。いくつかの実施形態では、腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ＩＬ－１７Ａ抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ００４）。いくつかの実施形態では、腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－１０を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０３０）。

【０１９５】

糖尿病

糖尿病は、高血糖症を特徴とする慢性疾患である。耐糖能障害及び高血糖症は、糖尿病の主な臨床的かつ診断的特徴であり、絶対的又は相対的なインスリン欠乏又はその作用に対する抵抗の結果であると理解されている。糖尿病に関連する慢性高血糖症は、例えば、網膜、腎臓、神経、及び血管を含み得る末端臓器の機能不全及び欠陥を引き起こす可能性がある。

【０１９６】
伝統的に、糖尿病症例の大部分は、１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）及び２型糖尿病（Ｔ２Ｄ）の２つの広範な発病機序カテゴリーに分類される。しかしながら、一部の対象では、この分類は、他の遺伝的経路、免疫学的経路、又は神経内因性経路が発病機序に関与しているため、適用することができない。Ｔ１Ｄは、少なくとも部分的に、膵臓ベーター細胞の免疫媒介性破壊に起因するインスリンの欠如に関連する。Ｔ２Ｄは、糖尿病の最も一般的な形態であり、少なくとも部分的に、インスリン抵抗性から生じると理解されている。Ｔ１Ｄ及びＴ２Ｄの両方の病態及び関連する代謝障害における炎症の新たな役割は、Ｔ１Ｄ及びＴ２Ｄの両方の予防及び制御を改善するための炎症を標的とすることへの関心を高めている。

【０１９７】
いくつかの実施形態では、糖尿病の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＧＬＰ－１治療用ポリペプチド（複数可）を発現する。いくつかのそのような実施形態では、糖尿病の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載されるＧＬＰ－１ポリペプチド（例えば、ヒト活性ＧＬＰ－１治療用ポリペプチド（複数可））を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０２２）。

【０１９８】
いくつかの実施形態では、糖尿病の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のレプチン治療用ポリペプチド（複数可）を発現する。いくつかのそのような実施形態では、糖尿病の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、レプチンポリペプチド（例えば、本明細書に記載のヒト活性レプチン治療用ポリペプチド（複数可））を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０２４）。

【０１９９】
いくつかの実施形態では、糖尿病の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－２２治療用ポリペプチド（複数可）を発現する。いくつかのそのような実施形態では、糖尿病の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載されるＩＬ－２２治療用ポリペプチド（複数可）を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０１０）。

【０２００】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、糖尿病に関連する低グレードの慢性腸炎症を治療及び／又は予防するのに有用である。いくつかの実施形態では、糖尿病に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ＴＮＦ－αを発現する。いくつかの実施形態では、糖尿病に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ＴＮＦ－α抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ００６）。いくつかの実施形態では、糖尿病に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ＩＬ－１７Ａ抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ００４）。いくつかの実施形態では、糖尿病に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－１０を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０３０）。いくつかの実施形態では、糖尿病に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現する。いくつかの実施形態では、糖尿病に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ００８）。いくつかの実施形態では、糖尿病に関連

する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－２２ポリペプチド又はＩＬ－２２－Ｆｃ融合体を発現する。いくつかの実施形態では、糖尿病に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－２２を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０１０）。いくつかの実施形態では、糖尿病に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－２２、並びにＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現する。いくつかの実施形態では、糖尿病に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－２２、並びにＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０１２）。いくつかの実施形態では、糖尿病に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ヒトＴＮＦ－α　ＩｇＧ１を発現する。いくつかのそのような実施形態では、糖尿病に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、抗ヒトＴＮＦ－α　ＩｇＧ１を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０２６）。

【０２０１】

肥満

３０以上のボディマス指数（ＢＭＩ）によって成人で定義されるように、肥満は、世界的に増大しつつある公衆衛生問題である。世界保健機関は、１８歳を超える成人の１３％が臨床的に肥満であり、合計で６億人を超えることを報告している。肥満からの健康リスクは、高血圧、２型糖尿病、心血管疾患、変形性関節症、腎不全、肝疾患及びいくつかの種類のがんを含むいくつかの疾患のリスクの増加との関連から生じる。興味深いことに、肥満に関連する表現型である慢性炎症は、上の慢性疾患の疾患進行に寄与する主要な要因であることが知られている。

【０２０２】

肥満関連炎症は、最初に、過剰な栄養素によって引き起こされ、主に白色脂肪組織などの特殊な代謝組織に局在化し、これが主なエネルギー源として作用し、主に脂肪細胞で構成される。脂肪細胞は、アディポカインと呼ばれる、広範囲のサイトカイン、ホルモン、及び成長因子を分泌する内分泌細胞であり、細胞質脂質液滴におけるトリグリセリドとしてのエネルギーの貯蔵に特化している。過剰な栄養素は、ｃ－Ｊｕｎ　Ｎ末端キナーゼ（ＪＮＫ）、核因子κＢ（ＮＦκＢ）、及びタンパク質キナーゼＲを含む代謝シグナル伝達経路の活性化を引き起こす。いずれかの理論に拘束されることを望まないが、これらの経路の活性化が、低レベルの炎症性サイトカインの誘導を引き起こし、低グレードの炎症応答を引き起こすことが理解される。過剰な栄養素及び肥満はまた、白色脂肪組織脂肪細胞の過形成及び肥大、並びに広範囲の組織リモデリング及び遊離脂肪酸の増加を引き起こし、アディポカイン産生の変化及び低グレードの炎症応答を引き起こす。肥満はまた、未フォールディングのタンパク質応答の活性化を引き起こす小胞体ストレスの増加を引き起こし、これにより、ＮＦκＢ、ＪＮＫの活性化、及び酸化ストレスの増加、並びに炎症性サイトカインの上方制御を引き起こす。これらの経路は全て、肥満関連炎症の開始に寄与する。肥満関連炎症は、主に白色脂肪組織に局在化しているが、他の組織は、肝臓、膵臓、及び脳を含む肥満の下で炎症を増加させることが示されている。

【０２０３】

いくつかの実施形態では、肥満の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＧＬＰ－１治療用ポリペプチド（複数可）を発現する。いくつかのそのような実施形態では、肥満の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載されるヒト活性ＧＬＰ－１治療用ポリペプチド（複数可）を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０２２）。

【０２０４】

いくつかの実施形態では、肥満の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のレプチン治療用ポリペプチド（複数可）を発現する。いくつかのそのような実施形態では、肥満の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のヒト活性レプチン治療用ポリペプチド（複数可）を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０２４）。

【０２０５】

いくつかの実施形態では、肥満の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－２２治療用ポリペプチド（複数可）を発現する。いくつかのそのような実施形態では、肥満の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載されるＩＬ－２２治療用ポリペプチド（複数可）を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０１０）。

【０２０６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、肥満に関連する慢性腸炎症を治療及び／又は予防するのに有用である。いくつかの実施形態では、肥満に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ＴＮＦ－αを発現する。いくつかのそのような実施形態では、肥満に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ＴＮＦα抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ００６）。いくつかの実施形態では、肥満に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現する。いくつかのそのような実施形態では、肥満に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ００８）。いくつかの実施形態では、肥満に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－２２単独又はＩＬ－２２－Ｆｃ融合体を発現する。いくつかのそのような実施形態では、肥満に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－２２を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０１０）。いくつかの実施形態では、肥満に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－２２、並びにＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現する。いくつかのそのような実施形態では、肥満に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－２２、並びにＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０１２）。いくつかの実施形態では、肥満に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ヒトＴＮＦ－α　ＩｇＧ１を発現する。いくつかのそのような実施形態では、肥満に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、抗ヒトＴＮＦ－α　ＩｇＧ１を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０２６）。いくつかの実施形態では、肥満に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ＩＬ－１７Ａ抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ００４）。いくつかの実施形態では、肥満に関連する腸炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－１０を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０３０）。

【０２０７】

脂肪肝疾患（ＦＬＤ）及び他の肝疾患

脂肪肝疾患（ＦＬＤ、又は「脂肪肝」）は、著しいアルコール使用の非存在下での炎症（脂肪症）及び小葉炎症を伴わない大嚢変化の存在に対応する。これは、２つのサブグループに分けることができる。ＮＡＦＬ（非アルコール性脂肪肝）又は単に脂肪症及びＮＡＳＨ（非アルコール性脂肪性肝炎）。ＮＡＦＬは、肝細胞のバルーニングの形態の肝細胞損傷の証拠のない肝脂肪症の存在として定義される。ＮＡＳＨは、肝臓脂肪症及び肝細胞損傷（バルーニング）を伴う炎症、マロリーヒアリン、並びに線維症の有無にかかわらず周囲領域におけるリンパ球性炎症浸潤及び好中球性炎症浸潤の複合の存在として定義される。

【０２０８】

興味深いことに、非アルコール性肝疾患モデル及びアルコール性肝疾患モデルの両方において、サイトカインのインターロイキン－２０（ＩＬ－２０）ファミリーは、肝臓の損傷及び炎症を低減する。例えば、ＩＬ－２０サブファミリーのメンバーであるインターロイキン－２２（ＩＬ－２２）は、ＳＴＡＴ３シグナル伝達経路の活性化を介して、肝臓における脂質代謝を制御する。したがって、いくつかの実施形態では、ＦＬＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－２２治療用ポリペプチド（複数可）を発現する。いくつかのそのような実施形態では、ＦＬＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載されるＩＬ－２２治療用ポリペプチド（複数可）を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０１０）。

【０２０９】

腸肝軸は、腸と肝臓との間の生理学的相互作用を記述し、健康の維持にとって重要な意味を有する。この平衡の破壊は、多くの肝疾患の進化及び進行における重要な因子である。腸炎は、腸障壁機能の障害を引き起こし、微生物又は病原体関連分子パターン（ＭＡＭＰ／ＰＡＭＰ）と呼ばれる微生物及び微生物産物を肝臓に移動させ、肝臓の炎症を引き起こす。したがって、いくつかの実施形態では、ＦＬＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ＴＮＦα、ＩＬ－１７Ａなどの抗炎症性治療用ポリペプチド（複数可）を発現する。いくつかのそのような実施形態では、ＦＬＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ＴＮＦα、ＩＬ－１７Ａといった治療用ポリペプチド（複数可）を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ００６、ＦＺ００８、ＦＺ０２６）。

【０２１０】

移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）

移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）は、移植片の免疫細胞が宿主を外来物として認識し、レシピエントの体細胞を攻撃するときに生じる全身性障害である。「移植片」は、移植された、又は提供された組織を指し、「宿主」は、レシピエントの組織を指す。ＧＶＨＤは、同種異系細胞療法又は移植などの治療を受けている対象における罹患率の重要な原因である。宿主の免疫細胞認識は、サイトカインによって引き起こされる関連する炎症誘発反応である「サイトカインストーム」を誘導し得る。

【０２１１】

したがって、いくつかのそのような実施形態では、ＧＶＨＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－２２治療用ポリペプチド（複数可）、並びに／又はＩＬ－１７Ａ及び／若しくはＴＮＦ－αに対する単一特異性若しくは二重特異的抗体を発現する。いくつかのそのような実施形態では、ＧＶＨＤの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－１０若しくはＩＬ－２２治療用ポリペプチド（複数可）、並びに／又はＩＬ－１７Ａ及び／若しくはＴＮＦ－αに対する単一特異性若しくは二重特異的抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ００４、ＦＺ００６、ＦＺ００８、ＦＺ０１０、ＦＺ０１２、ＦＺ０３０、及びＦＺ０２６）。本明細書に記載のＩＬ－１０若しくはＩＬ－２２治療用ポリペプチド（複数可）、並びに／又はＩＬ－１

７Ａ及びＴＮＦ－αに対する単一特異性若しくは二重特異的抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（例えば、ＦＺ００４、ＦＺ００６、ＦＺ００８、ＦＺ０１０、ＦＺ０１２、ＦＺ０３０、及びＦＺ０２６）も、代謝疾患の治療に使用することができる。

【０２１２】

消化管ウイルス（ロタウイルス、ノロウイルスなど）

ウイルスは、急性感染性胃腸炎の原因物質であり、胃腸管の内側の炎症を引き起こし、それ以外は健康な人において突然始まる嘔吐、水様性下痢、又はその両方の症候群を引き起こす。２つの異なるウイルスが症例の大部分を占める。ロタウイルスは、幼い子供における散発性で重度の胃腸炎の主な因子であり、主に開発途上国で、世界中で毎日約１６００人の子供の死亡に関与している。ノロウイルスは、幼児及び成人の両方における流行性感染性胃腸炎の主な因子である。例えば、クルーズ船及び介護施設などの閉じた設定での胃腸炎のアウトブレイクは、ノロウイルス感染症の典型的な症状である。しかしながら、ノロウイルスはまた、幼い子供における散発性で重度の胃腸炎の一般的な原因でもある（例えば、Ｆｒａｎｃｏ ＭＡ ｅｔ ａｌ．，Ｇｏｌｄｍａｎ’ｓ Ｃｅｃｉｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ．２０１２；２１４４－２１４７）。

【０２１３】

Ｒｅｏｖｉｒｉｄａｅ科に属するロタウイルスは、セグメント化された二本鎖ＲＮＡゲノム及び三重層タンパク質コートを有する、大型の二十面体の非エンベロープウイルスである。ロタウイルスは、交差反応性抗原エピトープの存在及びそれらの全体的な遺伝的関連性に基づいて、Ａ～Ｇ群に分類される。Ａ群ロタウイルスは、ヒト及び他の多くの種の主な腸内病原体である。Ｂ群ウイルスは、中国での成人下痢性疾病のアウトブレイクで散発的に特定されており、より最近では、主にインドでの散発性胃腸炎の小児の研究で特定されている。Ｃ群ロタウイルスは、世界中のヒト及び動物における下痢性疾患と比較的まれに関連している。Ｄ～Ｇ群のロタウイルスは、動物、主にトリ種からのみ単離されている。ロタウイルスは、３つの同心円形のタンパク質層を有する１００ｎｍの粒子であり、コアは、ＶＰ１、ＶＰ２、及びＶＰ３、並びにセグメント化された二本鎖ＲＮＡゲノムで構成され、中間層は、最も豊富で抗原性の構造ウイルスタンパク質であるＶＰ６によって形成され、外層は、ＶＰ７及びＶＰ４で構成される。ゲノムは、ともにおよそ１８キロ塩基であり、６つの構造タンパク質及び６つの非構造タンパク質をコードする二本鎖ＲＮＡの１１のセグメントで構成される。事実上全ての他のＲＮＡウイルスの場合と同様に、ロタウイルスＲＮＡポリメラーゼは、エラーが発生しやすく、免疫の進化などの選択的圧力とともに、ウイルスの多様性を引き起こす。ロタウイルスについては、２つ以上の株によって同時感染させられた細胞における異なる親ウイルスからの遺伝子セグメントの混合である遺伝子再アソート、及びウイルスゲノムの再配列もまた、遺伝的多様性に寄与する。動物とヒトのロタウイルス株との間の遺伝子セグメントの再アソートも、特に発展途上国の自然環境で起こる。

【０２１４】

Ｃａｌｉｃｉｖｉｒｉｄａｅ科の５つの属のうちの１つであるノロウイルスは、比較的小さく、プラス鎖の一本鎖ＲＮＡゲノムを有する、非エンベロープの二十面体ウイルスである。ノロウイルス属は、５つのゲノグループ（ＧＩ～ＧＶ）に更に分類され、そのうちの３つ（ＧＩ、ＧＩＩ、及びＧＩＶ）のみがヒトに感染することが知られている。ＧＩＩＩ及びＧＶウイルスは、それぞれウシ及びマウスに感染し、これらの動物ウイルスは、今日までにヒトに感染することが示されていない。各ゲノグループのウイルスは、遺伝子型（２５を超えるものが記載されている）及びサブグループに更に分けられる。ノーウォークウイルスは、プロトタイプジェノグループＩ遺伝子型１（ＧＩ．１）ウイルスである。ノロウイルスゲノムは、サイズがおよそ７．７キロ塩基であり、３つのオープンリーディングフレームからなり、そのうちの第１のものは、ウイルス複製に不可欠な非構造タンパク質をコードする。第２のオープンリーディングフレームは、主要なカプシドタンパク質であるウイルスタンパク質１（ＶＰ１）をコードする。組換えタンパク質として発現されると、１８０個のＶＰ１分子がノロウイルス疫学及び免疫の研究にとって重要なウイルス

様粒子へと自動集合する。
【０２１５】
したがって、いくつかの実施形態では、ロタウイルスの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ロタウイルスＶＨＨを発現する。いくつかのそのような実施形態では、ロタウイルスの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ロタウイルスＶＨＨを発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０１４）。
【０２１６】
いくつかの実施形態では、ノロウイルスの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のノロウイルスに対する二重特異性ＶＨＨ－Ｆｃ（例えば、Ｍ６Ｍ５－Ｆｃ及びＭ６Ｍ４－Ｆｃ）を発現する。いくつかのそのような実施形態では、ノロウイルスの治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のノロウイルスに対する二重特異性ＶＨＨ－Ｆｃ（例えば、Ｍ５、Ｍ６Ｍ５－Ｆｃ及びＭ６Ｍ４－Ｆｃ）を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０１６）。
【０２１７】
いくつかの実施形態では、対象は、ノロウイルス及びＣ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅの両方に感染する。したがって、いくつかの実施形態では、ノロウイルス及びＣ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅの同時感染の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のノロウイルスに対する二重特異性ＶＨＨ－Ｆｃ（例えば、Ｍ６Ｍ５－Ｆｃ及びＭ６Ｍ４－Ｆｃ）並びに抗毒素ＡＢＡＢを発現する。いくつかのそのような実施形態では、ノロウイルス及びＣ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅの同時感染の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のノロウイルスに対する二重特異性ＶＨＨ－Ｆｃ（例えば、Ｍ６Ｍ５－Ｆｃ及びＭ６Ｍ４－Ｆｃ）並びに抗毒素ＡＢＡＢを発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０１８）。
【０２１８】
胃腸管感染
ＩＬ－２２は、胃腸管を含む種々の粘膜障壁で恒常性を維持するための重要なサイトカインである。腸病原体による感染中、ＩＬ－２２は大きく上方制御され、複数の抗菌因子の誘導、創傷の治癒及び障壁機能の回復につながる。腸において、ＩＬ－２２シグナル伝達は、病原体に対する宿主防御及び創傷治癒を含む重要な機能を促進する。腸組換えＩＬ－２２適用は、肝臓及び膵臓の損傷、潰瘍性大腸炎、移植片対宿主病に有益な影響を及ぼし得る。
【０２１９】
いくつかの実施形態では、腸管病原体コロニー形成及び感染の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－２２ポリペプチドを発現する。いくつかのそのような実施形態では、腸管病原体のコロニー形成及び感染の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－２２ポリペプチドを発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（例えば、ＦＺ０１０）を含む。
【０２２０】
心血管疾患
腸の炎症は、腸の障壁の完全性の低下を引き起こし、ひいては、トリメチルアミン－Ｎ－オキシド及び短鎖脂肪酸を含む細菌構造要素及び微生物代謝産物の循環レベルを増加させ、心血管疾患（ＣＶＤ）の発症を促進し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＣＶＤに関連する腸の炎症を治療及び／又は予防するのに有用である。いくつかの実施形態では、ＣＶＤに関連する腸の炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ＴＮＦ－αを発現する。いくつかのそのような実施形態では、ＣＶＤ

に関連する腸の炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ＩＬ１７Ａ又は抗ＴＮＦ－α抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ００４又はＦＺ００６）。いくつかの実施形態では、ＣＶＤに関連する腸の炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現する。いくつかのそのような実施形態では、ＣＶＤに関連する腸の炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ００８）。いくつかの実施形態では、ＣＶＤに関連する腸の炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－２２単独又はＩＬ－２２－Ｆｃ融合体を発現する。いくつかのそのような実施形態では、ＣＶＤに関連する腸の炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－２２を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０１０）。いくつかの実施形態では、ＣＶＤに関連する腸の炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載のＩＬ－２２、並びにＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現する。いくつかのそのような実施形態では、ＣＶＤに関連する腸の炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ＩＬ－２２、並びにＩＬ－１７Ａ及びＴＮＦ－αに対する二重特異的抗体を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０１２）。いくつかの実施形態では、ＣＶＤに関連する腸の炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、本明細書に記載の抗ヒトＴＮＦ－α　ＩｇＧ１を発現する。いくつかのそのような実施形態では、ＣＶＤに関連する腸の炎症の治療及び／又は予防に有用なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、抗ヒトＴＮＦ－α　ＩｇＧ１を発現するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉを含む（例えば、ＦＺ０２６）。

【０２２１】

過敏性腸症候群（ＩＢＳ）

過敏性腸症候群（ＩＢＳ）は、持続的な腹痛又は不快感として現れる消化器関連障害であり、一般的に、排便の頻度及び形態だけでなく、排便習慣の変化と相関している。ＩＢＳは、かつて西洋人に主に影響を与えると想定されていたが、アジアの発展途上国でますます普及している。ＩＢＳは、便秘優勢ＩＢＳ（ＩＢＳ－Ｃ）、下痢優勢ＩＢＳ（ＩＢＳ－Ｄ）、交互又は混合ＩＢＳ（Ａ／Ｍ－ＩＢＳ）、及び感染後ＩＢＳ（ＰＩ－ＩＢＳ）として副分類される。ＩＢＳを有する患者は、内臓過敏症、腸管膜透過性の変化、及び胃腸運動機能障害を含む、胃腸生理学の悪化などの広範囲の神経精神症状を呈することがますます増えている。腸脳軸は、ＩＢＳ関連の胃腸病理、神経病理、及び精神病理における腸内イベントと中枢イベントとの間の相互関係を関連付ける。ＩＢＳの病態生理学は、腸脳軸によるシグナル伝達の変化、生体異常、異常な内臓痛シグナル伝達、及び腸の免疫活性化に関与している。免疫活性化は、神経系と免疫系との間の双方向のコミュニケーションを通じて、ＩＢＳの発病機序において役割を果たす。腸内細菌叢は、ＩＢＳと関連しており、腸内細菌叢の組成、時間的安定性、及び代謝活性の変化が、ＩＢＳを有する患者において記載されている。

【０２２２】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、腸の炎症、障壁機能、及び腸内細菌叢に影響を与えることによってＩＢＳを治療及び／又は予防するのに有用である（例えば、ＦＺ００４、ＦＺ００６、ＦＺ００８、ＦＺ０１０、ＦＺ０１２、ＦＺ０２６、及びＦＺ０３０）。

【０２２３】

組成物（例えば、薬学的組成物）

別の態様では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の１つ以上の操作された株と、少なくとも１つの薬学的に許容される担体又は希釈剤と、を含む薬学的組成物が本明細書に開示

される。いくつかの態様では、薬学的組成物は、経口剤形、直腸剤形、膣剤形、又は局所剤形として製剤化することができる。いくつかの態様では、経口剤形は、腸溶性コーティングを含む。更に別の態様では、本明細書に開示される薬学的組成物は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体よりも製造が安価である。これらの態様のいずれかでは、薬学的組成物の投与は、抗薬物応答を誘導しない。

【０２２４】

様々な態様では、本開示は、治療有効量の本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を含む薬学的組成物に関する。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」とは、薬学的に許容される希釈剤、防腐剤、抗酸化剤、可溶化剤、乳化剤、着色剤、放出剤、コーティング剤、甘味料、香味料及び芳香剤、並びにアジュバントのうちの１つ以上を意味する。開示される薬学的組成物は、単位剤形で簡便に提供され、薬学及び製薬科学の分野で周知の方法のいずれかによって調製され得る。

【０２２５】

更なる態様では、開示される薬学的組成物は、治療有効量の少なくとも１つの開示されるＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ生物の操作された株、薬学的に許容される担体、任意選択的に１つ以上の他の治療剤、及び任意選択的に１つ以上のアジュバントを含む。開示される薬学的組成物には、経口投与に好適なものが含まれる。

【０２２６】

様々な態様では、本開示はまた、薬学的に許容される担体又は希釈剤と、有効成分として、治療有効量の１つ以上のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株と、を含む、薬学的組成物に関する。一態様では、治療有効量の薬学的組成物は、約１０億～約１００億コロニー形成単位（ＣＦＵ）のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株、又は約１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、若しくは約１００億ＣＦＵのＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株、又は前述の値のいずれかの組み合わせ、又は前述の値のいずれかを包含する範囲を含む。

【０２２７】

実際には、本開示の生物（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株）は、従来の薬学的配合技術に従って、薬学的担体と緊密な混合物中の有効成分として組み合わせることができる。担体は、投与に望ましい調製物の形態、例えば、経口又は非経口（静脈内を含む）に応じて、多種多様な形態をとることができる。したがって、本開示の薬学的組成物は、各々所定量の有効成分を含有するカプセル、カシェ若しくは錠剤などの経口投与に好適な、又は生体接着剤送達システム、相変化ポロキサマー、錠剤、坐剤、クリーム、ゲル、膣リングなどを含む膣投与に好適な、直腸投与（すなわち、坐剤及び／又は浣腸）に好適な、又は局所投与（例えば、溶液、ローション、クリーム、軟膏、ゲル、ペースト、エアロゾルフォーム、エアロゾルスプレー、粉末、固体、経皮パッチなど）に好適な、別個の単位として提示することができる。更に、組成物は、粉末、顆粒、溶液、水性液体中の懸濁液、非水性液体、水中油型エマルション、又は油中水型液体エマルションとして提示することができる。いくつかの実施形態では、組成物は、食物（例えば、ブタ又は家禽などの動物に提供される食物、ヒトのための医療用食物）と組み合わせて提示される。上述の一般的な剤形に加えて、本開示の化合物、及び／又はその薬学的に許容される塩（複数可）はまた、制御放出手段及び／又は送達デバイスによって投与され得る。これらの組成物は、薬学の方法のうちのいずれかによって調製され得る。一般に、かかる方法は、活性成分と、１つ以上の必要な成分を構成する担体とを会合させるステップを含む。一般に、組成物は、活性成分を、液体担体又は微細に分割された固体担体、又はその両方と均一かつ密接に混合することによって調製される。次に、製品は、所望の提示へと便利に成形することができる。

【０２２８】

投与の容易さ及び投与量の均一性のために、上述の薬学的組成物を単位剤形で製剤化することが特に有利である。本明細書で使用される場合、「単位剤形」という用語は、各単位が、必要な薬学的担体と関連して所望の治療効果をもたらすように計算された所定の量

の有効成分を含む、単位投薬量として好適な物理的に別個の単位を指す。すなわち、「単位剤形」とは、患者又は患者に薬物を投与する人が、その中に含まれる用量全体を有する単一の容器又はパッケージを開くことができ、２つ以上の容器又はパッケージから任意の構成要素を一緒に混合する必要がないように、全ての活性成分及び不活性成分が好適な系で組み合わされる単一の用量を意味すると解釈される。単位剤形の典型的な例は、経口投与のための錠剤（割線付きの錠剤又はコーティングされた錠剤を含む）、カプセル又は丸薬、粉末パケット、ウエハース、及びそれらの分割された倍数である。この単位剤形のリストは、決して限定することを意図するものではないが、単位剤形の典型的な例を表すことを意図するものである。

【０２２９】

本明細書に開示される薬学的組成物は、有効成分としての本開示の１つ以上のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株と、薬学的に許容される担体と、任意選択的に１つ以上の追加の治療剤と、を含む。様々な態様では、開示される薬学的組成物は、薬学的に許容される担体と、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株と、を含み得る。更なる態様では、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株はまた、１つ以上の他の治療的に活性な化合物と組み合わせて薬学的組成物に含めることができる。本組成物は、経口投与に好適な組成物を含む。薬学的組成物は、単位剤形で簡便に提供され、薬学の分野で周知の方法のいずれかによって調製され得る。

【０２３０】

本明細書に記載の材料及び方法に有用な剤形を作製するための技術及び組成物は、例えば、以下の参考文献に記載されている。Ｍｏｄｅｒｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ，Ｃｈａｐｔｅｒｓ ９ ａｎｄ １０（Ｂａｎｋｅｒ ＆ Ｒｈｏｄｅｓ，Ｅｄｉｔｏｒｓ，１９７９）、Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ：Ｔａｂｌｅｔｓ（Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９８１）、Ａｎｓｅｌ，Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ ２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ（１９７６）、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１７ｔｈ ｅｄ．（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，１９８５）、Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｄａｖｉｄ Ｇａｎｄｅｒｔｏｎ，Ｔｒｅｖｏｒ Ｊｏｎｅｓ，Ｅｄｓ．，１９９２）、Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｖｏｌ ７．（Ｄａｖｉｄ Ｇａｎｄｅｒｔｏｎ，Ｔｒｅｖｏｒ Ｊｏｎｅｓ，Ｊａｍｅｓ ＭｃＧｉｎｉｔｙ，Ｅｄｓ．，１９９５）、Ａｑｕｅｏｕｓ Ｐｏｌｙｍｅｒｉｃ Ｃｏａｔｉｎｇｓ ｆｏｒ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ（Ｄｒｕｇｓ ａｎｄ ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓｅｒｉｅｓ ３６（Ｊａｍｅｓ ＭｃＧｉｎｉｔｙ，Ｅｄ．，１９８９）、Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐａｒｔｉｃｕｌａｔｅ Ｃａｒｒｉｅｒｓ：Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ：Ｄｒｕｇｓ ａｎｄ ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｖｏｌ ６１（Ａｌａｉｎ Ｒｏｌｌａｎｄ，Ｅｄ．，１９９３）、Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｔｏ ｔｈｅ Ｇａｓｔｒｏｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ Ｔｒａｃｔ（Ｅｌｌｉｓ Ｈｏｒｗｏｏｄ Ｂｏｏｋｓ ｉｎ ｔｈｅ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ．Ｓｅｒｉｅｓ ｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｊ．Ｇ．Ｈａｒｄｙ，Ｓ．Ｓ．Ｄａｖｉｓ，Ｃｌｉｖｅ Ｇ．Ｗｉｌｓｏｎ，Ｅｄｓ．）、Ｍｏｄｅｒｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ Ｄｒｕｇｓ ａｎｄ ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｖｏｌ ４０（Ｇｉｌｂｅｒｔ Ｓ．Ｂａｎｋｅｒ，Ｃｈｒｉｓｔｏｐｈｅｒ Ｔ．Ｒｈｏｄｅｓ，Ｅｄｓ．）。

【０２３１】

本明細書に記載の化合物は、典型的には、投与の意図される形態に関して、かつ従来の薬学的慣行と一致して、好適に選択された、好適な薬学的希釈剤、賦形剤、増量剤、又は担体（本明細書において、薬学的に許容される担体、又は担体と称される）と混合した状

態で投与される。送達可能な化合物は、経口投与に好適な形態である。担体は、固体又は液体を含み、担体の種類は、使用される投与の種類に基づいて選択される。化合物は、既知の量の化合物を有する投薬量として投与することができる。

【０２３２】

投与が容易であるため、経口投与が好ましい剤形であってもよく、錠剤及びカプセルは、最も有利な経口投薬単位形態を表し、その場合、固体薬学的担体が明らかに用いられる。しかしながら、他の剤形は、臨床集団（例えば、年齢及び臨床状態の重症度）、使用される特定の開示される化合物の溶解性特性などに応じて好適であり得る。したがって、開示される化合物は、丸剤、粉末、顆粒剤、エリキシル剤、チンキ剤、懸濁液、シロップ剤、及びエマルションとして経口剤形で投与することができる。いくつかの実施形態では、開示される化合物（例えば、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株）は、カプセル化される。経口剤形のための組成物の調製において、任意の便利な薬学的媒体を用いることができる。例えば、水、グリコール、油、アルコール、香味剤、防腐剤、着色剤などは、懸濁液、エリキシル剤及び溶液などの経口液体調製物を形成するために使用することができ、一方、デンプン、糖、微結晶性セルロース、希釈剤、造粒剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤などの担体は、粉末、カプセル及び錠剤などの経口固体調製物を形成するために使用することができる。投与が容易であるため、錠剤及びカプセルが好ましい経口投与単位であり、それによって固体の薬学的担体が用いられる。任意選択的に、錠剤は、標準的な水性又は非水性技術によってコーティングされ得る。

【０２３３】

経口剤形における開示される薬学的組成物は、１つ以上の薬学的賦形剤及び／又は添加剤を含み得る。好適な賦形剤及び添加剤の非限定的な例としては、ゼラチン、生糖又はラクトースなどの天然糖、レシチン、スクロース、トレハロース、イヌリン、ＡＣＰ、アルギン酸塩、アスコルビン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、ペクチン、デンプン（例えば、トウモロコシデンプン又はアミロース）、デキストラン、アビセル（微結晶性セルロース）、マルトデキストリン、ステアリン酸マグネシウム、二酸化ケイ素、ポリビニルピロリドン、ポリ酢酸ビニル、アラビアゴム、アルギン酸、チロース、タルク、リコポジウム、シリカゲル（例えば、コロイド状）、セルロース、セルロース誘導体（例えば、セルロースヒドロキシ基が低飽和脂肪酸アルコールで部分的にエーテル化されているセルロースエーテル、及び／又は低飽和脂肪族オキシアルコール、例えば、メチルオキシプロピルセルロース、メチルセルロース、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メチルセルロースフタレート）、脂肪酸、及びマグネシウム、アスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、１２～２２個の炭素原子を有する脂肪酸のカルシウム塩若しくはアルミニウム塩、特に、飽和（例えば、ステアリン酸塩）、乳化剤、油及び脂肪、特に、植物性（例えば、ピーナッツ油、ヒマシ油、オリーブ油、ゴマ油、綿実油、トウモロコシ油、小麦胚芽油、ヒマワリシード油、タラ肝油、いずれの場合も任意選択的に水和している）；飽和脂肪酸Ｃ$_{12}$Ｈ$_{24}$Ｏ$_{2}$～Ｃ$_{18}$Ｈ$_{36}$Ｏ$_{2}$のグリセロールエステル及びポリグリセロールエステル、及びそれらの混合物、グリセロールヒドロキシ基が、全体的に、また部分的にのみエステル化されることが可能である（例えば、モノグリセリド、ジグリセリド、及びトリグリセリド）；薬学的に許容される一価又は多価のアルコール及びポリグリコール、例えば、ポリエチレングリコール及びその誘導体、一価の脂肪族アルコール（１～２０個の炭素原子）又は多価のアルコール（例えば、グリセロール、グリセロール、ジエチレングリコール、ペンタクリスリトール（ｐｅｎｔａｃｒｙｔｈｒｉｔｏｌ）、ソルビトール、マンニトールなど）を含む脂肪族の飽和若しくは不飽和の脂肪酸（２～２２個の炭素原子、特に１０～１８個の炭素原子）のエステル（また、任意選択的にエーテル化されていてもよい）、クエン酸と一級アルコールとのエステル、酢酸、尿素、安息香酸ベンジル、ジオキソラン、グリセロホルマール、テトラヒドロフルフリルアルコール、０１～０１２アルコールとのポリグリコールエーテル、ジメチルアセトアミド、ラクトアミド、ラクテート、エチルカーボネート、シリコーン（特に、中程度の粘性のポリジメチルシロキサン）、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸カルシウム、リン酸ナトリウム、

炭酸マグネシウム、硫酸マグネシウムなどが挙げられる。

【０２３４】

経口剤形の調製に有用な他の補助物質は、架橋ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルデンプンナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム又は微結晶性セルロースなどの崩壊を引き起こすもの（いわゆる崩壊剤）である。従来のコーティング物質を使用して、経口剤形を製造することもできる。例えば、考慮され得るものは、アクリル酸及び／若しくはメタクリル酸及び／若しくはそれらのエステルの重合物及び共重合物；より少ないアンモニウム基含有量を有するアクリル酸及びメタクリル酸のエステルの共重合物（例えば、Ｅｕｄｒａｇｉｔ（登録商標）ＲＳ）、アクリル酸及びメタクリル酸のエステルとトリメチルアンモニウムメタクリレートとの共重合物（例えば、Ｅｕｄｒａｇｉｔ（登録商標）ＲＬ）；ポリ酢酸ビニル；脂肪、油、ワックス、脂肪族アルコール；フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース又は酢酸コハク酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース；酢酸フタル酸セルロース、デンプン酢酸フタル酸及び酢酸フタル酸ポリビニル、カルボキシメチルセルロース；フタル酸メチルセルロース、コハク酸メチルセルロース、フタル酸コハク酸メチルセルロース及びメチルセルロースフタル酸ハーフエステル；ゼイン；エチルセルロース及びコハク酸エチルセルロース；シェラック、グルテン；エチルカルボキシエチルセルロース；エタクリレート－無水マレイン酸コポリマー；無水マレイン酸－ビニルメチルエーテルコポリマー；スチロール－マレイン酸共重合物；２－エチル－ヘキシル－アクリレートマレイン酸無水物；クロトン酸－酢酸ビニルコポリマー；グルタミン酸／グルタミン酸エステルコポリマー；カルボキシメチルエチルセルロースグリセロールモノオクタノエート；酢酸コハク酸セルロース；ポリアルギニンである。

【０２３５】

開示される経口剤形におけるコーティング物質として考慮され得る可塑剤は、クエン酸及び酒石酸のエステル（アセチル－クエン酸トリエチル、クエン酸アセチルトリブチル、クエン酸トリブチル、クエン酸トリエチル）；グリセロール及びグリセロールエステル（グリセロールジアセテート、－トリアセテート、アセチル化モノグリセリド、ヒマシ油）；フタル酸エステル（フタル酸ジブチル、フタル酸ジアミル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジメチル、フタル酸ジプロピル）、ジ－（２－メトキシ－又は２－エトキシエチル）－フタレート、エチルフタリルグリコレート、ブチルフタリルエチルグリコレート及びブチルグリコレート；アルコール（プロピレングリコール、様々な鎖長のポリエチレングリコール）、アジペート（アジピン酸ジエチル、ジ－（２－メトキシ－又は２－エトキシエチル）－アジペート；ベンゾフェノン；セバシン酸ジエチル及びセバシン酸ジブチルト、コハク酸ジブチル、酒石酸ジブチル；ジエチレングリコールジプロピオネート；エチレングリコールジアセテート、－ジブチレート、－ジプロピオネート；リン酸トリブチル、トリブチリン；ポリエチレングリコールソルビタンモノオレエート（Ｐｏｌｙｓｏｒｂａｒ５０などのポリソルベート）；ソルビタンモノオレエートである。

【０２３６】

更に、好適な結合剤、滑沢剤、崩壊剤、着色剤、香味剤、流動誘導剤、及び溶融剤を担体として含み得る。使用される薬学的担体は、例えば、固体又は液体であり得る。固体担体の例としては、限定されないが、ラクトース、白土、スクロース、グルコース、メチルセルロース、リン酸二カルシウム、硫酸カルシウム、マンニトール、ソルビトールタルク、デンプン、ゼラチン、寒天、ペクチン、アカシア、アビセル（微結晶性セルロース）、マルトデキストリン、ステアリン酸マグネシウム、二酸化ケイ素、及びステアリン酸が挙げられる。液体担体の例は、シュガーシロップ、ピーナッツ油、オリーブ油、及び水である。

【０２３７】

様々な態様では、結合剤としては、例えば、デンプン、ゼラチン、グルコース又はベータ－ラクトースなどの天然糖、トウモロコシ甘味剤、アカシア、トラガント、アルギン酸塩又はアルギン酸ナトリウムなどの天然及び合成ガム、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコール、ワックスなどを挙げることができる。これらの剤形で使用される

滑沢剤としては、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどが挙げられる。更なる態様では、崩壊剤としては、例えば、デンプン、メチルセルロース、寒天、ベントナイト、キサンタンガムなどを挙げることができる。

【０２３８】

様々な態様では、固体剤形などの経口剤形は、１つ以上の生分解性ポリマーと接触した状態で、開示される微生物を含み得る。薬物の制御放出を達成するのに有用な好適な生分解性ポリマーとしては、例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ乳酸及びポリグリコール酸のコポリマー、カプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロピラン、ポリシアノアシレート、及びヒドロゲル、好ましくは共有結合架橋ヒドロゲルが挙げられる。

【０２３９】

錠剤は、錠剤の製造に好適な非毒性の薬学的に許容される賦形剤と混合した状態で、活性成分を含有し得る。これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム又はリン酸ナトリウム；造粒剤及び崩壊剤、例えば、トウモロコシデンプン又はアルギン酸；結合剤、例えば、デンプン、ゼラチン又はアカシア、並びに滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸又はタルクであり得る。錠剤は、コーティングされていなくてもよく、又は胃腸管内の崩壊及び吸収を遅延させ、それによってより長い期間にわたって持続的活性を提供するための既知の技術によってコーティングされてもよい。

【０２４０】

開示される微生物を含む錠剤は、任意選択的に１つ以上の副次成分又はアジュバントとともに、圧縮又は成形することによって調製することができる。圧縮錠剤は、好適な機械で、粉末又は顆粒などの自由流動形態の活性成分を、任意選択的に結合剤、滑沢剤、不活性希釈剤、界面活性剤又は分散剤と混合して圧縮することによって調製することができる。成形錠剤は、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末化合物の混合物を好適な機械で成形することによって作製することができる。

【０２４１】

別の態様では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、薬学的組成物中で凍結乾燥され得る。いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を凍結保護剤と混合して、凍結乾燥中の生存率を向上させることができる。いくつかの態様では、薬学的組成物は、経口剤形として製剤化することができる。一態様では、経口剤形は、カプセル、錠剤、カプレット、ゲルキャップ、粉末、液体溶液、懸濁液、又はそれらの任意の組み合わせであり得る。いくつかの態様では、経口剤形は、腸溶性コーティングを含む。

【０２４２】

一態様では、経口剤形は、炎症性サイトカインを標的とする療法を投与する他の方法よりも好ましい。いくつかの態様では、例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎などの標準療法は、注射又は注入による生物学的製剤及び／又は他の治療剤の投与を含み得る。いくつかの態様では、そのような薬物投与は、治療部位への移動が準備されなければならず、医療要員が注射又は注入によって治療を施すように訓練される必要があるため、患者のコンプライアンスを低下させる。他の態様では、注射又は注入によって投与される治療剤は、無菌性を必要とし、及び／又は対象における免疫応答を誘発し得る。したがって、一態様では、開示される薬学的組成物及び経口剤形は、それらを自宅で患者によって自己投与することができ、免疫応答を誘発しないため、現在の療法よりも有意な改善を表す。更に別の態様では、本明細書に開示される薬学的組成物は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体よりも製造が安価である。

【０２４３】

様々な態様では、錠剤又はカプセルなどの固体経口剤形は、胃内での速やかな分解を防止するために、腸溶性コーティングでコーティングすることができる。様々な態様では、

腸溶性コーティング剤としては、限定されないが、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メタクリル酸－メタクリル酸エステルコポリマー、ポリアセテート－フタレート、及び酢酸フタル酸セルロースが挙げられる。Ａｋｉｈｉｋｏ Ｈａｓｅｇａｗａ“Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ ｓｏｌｉｄ ｄｉｓｐｅｒｓｉｏｎｓ ｏｆ Ｎｉｆｅｄｉｐｉｎｅ ｗｉｔｈ ｅｎｔｅｒｉｃ ｃｏａｔｉｎｇ ａｇｅｎｔ ｔｏ ｐｒｅｐａｒｅ ａ ｓｕｓｔａｉｎｅｄ－ｒｅｌｅａｓｅ ｄｏｓａｇｅ ｆｏｒｍ”Ｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．３３：１６１５－１６１９（１９８５）。様々な腸溶性コーティング材料を試験に基づいて選択して、溶解時間、コーティング厚さ及び直径圧縮強度の好ましい組み合わせを有するように最初から設計された腸溶性コーティング剤形を達成し得る（例えば、Ｓ．Ｃ．Ｐｏｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．“Ｔｈｅ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ Ｅｎｔｅｒｉｃ Ｔａｂｌｅｔ Ｃｏａｔｉｎｇｓ Ｍａｄｅ Ｆｒｏｍ Ｐｏｌｙｖｉｎｙｌ Ａｃｅｔａｔｅ－ｐｈｔｈａｌａｔｅ ａｎｄ Ｃｅｌｌｕｌｏｓｅ ａｃｅｔａｔｅ Ｐｈｔｈａｌａｔｅ”，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．２２：４２ｐ（１９７０）を参照されたい）。更なる態様では、腸溶性コーティングは、ヒドロキシプロピル－メチルセルロースフタレート、メタクリル酸－メタクリル酸エステルコポリマー、ポリアセテート－フタレート、及び酢酸フタル酸セルロースを含んでもよい。

【０２４４】

様々な態様では、経口剤形は、水溶性担体又は水不溶性担体を有する固体分散液であり得る。水溶性担体又は水不溶性担体の例としては、限定されないが、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ホスファチジルコリン、ポリオキシエチレン水素化ヒマシ油、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、カルボキシメチルエチルセルロース、又はヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、又はステアリン酸が挙げられる。

【０２４５】

様々な態様では、経口剤形は、摂取されるもの、又は代替的に、口腔洗浄剤又はうがい剤として投与されるものを含む、液体剤形であり得る。例えば、液体剤形は、水性懸濁液の製造に好適な賦形剤と混合して活性物質を含有する水性懸濁液を含み得る。加えて、油性懸濁液は、植物油、例えば、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油、若しくはココナツ油、又は液体パラフィンなどの鉱物油中に活性成分を懸濁させることによって製剤化することができる。油性懸濁液はまた、様々な賦形剤を含み得る。本開示の薬学的組成物はまた、水中油型エマルションの形態であってもよく、これはまた、甘味料及び香味料などの賦形剤を含み得る。

【０２４６】

溶液又は懸濁液の調製のために、例えば、水、特に滅菌水、又はアルコール（エタノール、プロパノール、イソプロパノール、１，２－プロピレングリコール、ポリグリコール及びそれらの誘導体、脂肪族アルコール、グリセロールの部分エステル）、油（例えば、ピーナッツ油、オリーブ油、ゴマ油、アーモンド油、ヒマワリ油、大豆油、ヒマシ油、ウシ蹄油）、パラフィン、ジメチルスルホキシド、トリグリセリドなどの生理学的に許容される有機溶媒を使用することができる。

【０２４７】

飲料可能な溶液などの液体剤形の場合、以下の物質を安定剤又は可溶化剤として使用してもよい。２～４個の炭素原子を有する低級脂肪族一価及び多価アルコール、例えば、エタノール、ｎ－プロパノール、グリセロール、２００～６００個の分子量を有するポリエチレングリコール（例えば、１～４０％の水溶液）、ジエチレングリコールモノエチルエーテル、１，２－プロピレングリコール、有機アミド、例えば、アンモニア又は一級、二級若しくは三級Ｃ１～Ｃ４－アミンを有する脂肪族Ｃ１～Ｃ６－カルボン酸のアミド、又はＣ１～Ｃ４ヒドロキシアミン、例えば、尿素、ウレタン、アセトアミド、Ｎ－メチルアセトアミド、Ｎ，Ｎ－ジエチルアセトアミド、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、２～６個の炭素原子を有する低級脂肪族アミン及びジアミン、例えば、エチレンジアミン、ヒドキシエチルテオフィリン、トロメタミン（例えば、０．１～２０％の水溶液）、脂肪族アミ

ノ酸。

【０２４８】

開示される液体剤形の調製には、可溶化剤及び乳化剤を含んでもよく、例えば、以下の非限定的な例を使用することができる。ポリビニルピロリドン、ソルビタントリオレエートなどのソルビタン脂肪酸エステル、レシチン、アカシア、トラガカントなどのホスファチド、ポリオキシエチル化ソルビタンモノオレエート及びソルビタンの他のエトキシル化脂肪酸エステル、ポリオキシエチル化脂肪、ポリオキシエチル化オレオトリグリセリド、リノリゼート化オレオトリグリセリド、脂肪族アルコール、アルキルフェノール又は脂肪酸のポリエチレンオキシド縮合生成物、又は１－メチル－３－（２－ヒドロキシエチル）イミダゾリドン－（２）。この文脈で、ポリオキシエチル化とは、問題の物質がポリオキシエチレン鎖を含有し、その重合度が一般に２～４０、特に１０～２０の間にあることを意味する。この種のポリオキシエチル化物質は、例えば、ヒドロキシル基含有化合物（例えば、モノグリセリド若しくはジグリセリド、又はオレイン酸基を含有するものなどの不飽和化合物）とエチレンオキシド（例えば、１モルのグリセリド当たり４０モルのエチレンオキシド）との反応によって得られ得る。オレオトリグリセリドの例は、オリーブ油、ピーナッツ油、ヒマシ油、ゴマ油、綿実油、トウモロコシ油である。また、Ｄｒ．Ｈ．Ｐ．Ｆｉｅｄｌｅｒ“Ｌｅｘｉｋｏｎ ｄｅｒ Ｈｉｌｌｓｓｔｏｆｆｅ ｆｕｅｒ Ｐｈａｒｍａｚｉｅ，Ｋｏｓｔｎｅｔｉｋ ｕｎｄ ａｎｇｒｅｎｚｅｎｄｅ Ｇｅｂｉｅｔｅ”１９７１，ｐａｇｅｓ １９１－１９５も参照されたい。

【０２４９】

様々な態様では、液体剤形は、防腐剤、安定剤、緩衝物質（例えば、リン酸緩衝食塩水、ＰＢＳ）、香味補正剤、甘味料、着色剤、抗酸化剤、複合体形成剤などを更に含み得る。例えば、考慮され得る複合体形成剤は、エチレンジアミン四酢酸、ニトリロ三酢酸、ジエチレントリアミン五酢酸及びそれらの塩などのキレート形成剤である。

【０２５０】

任意選択的に、生理学的に許容される塩基又は緩衝液を有する液体剤形を、約６～９のｐＨ範囲に安定化させることが必要な場合がある。可能な限り中性又は弱塩基性のｐＨ値（最大ｐＨ８）を優先し得る。

【０２５１】

開示された液体剤形における開示された微生物の溶解性及び／又は安定性を高めるために、α－、β－若しくはγ－シクロデキストリン又はそれらの誘導体、特にヒドロキシアルキル置換シクロデキストリン、例えば、２－ヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン又はスルホブチル－β－シクロデキストリンを使用することが有利であり得る。また、アルコールなどの共溶媒は、薬学的組成物における本開示による化合物の溶解性及び／又は安定性を改善し得る。

【０２５２】

本開示の薬学的組成物は、担体が固体である、直腸投与に好適な形態であり得る。混合物は、単位用量坐剤を形成することが好ましい。好適な担体としては、カカオバター及び当該技術分野で一般的に使用される他の材料が挙げられる。坐剤は、最初に組成物を軟化又は融解した担体（複数可）と混合し、続いて冷却し、成形することによって便利に形成することができる。

【０２５３】

本開示の薬学的組成物は、局所投与に好適な形態であり得る。本明細書で使用される場合、「局所適用」という語句は、生物学的表面への投与を意味し、生物学的表面は、例えば、皮膚領域（例えば、手、前腕、肘、脚、顔、爪、肛門及び性器領域）又は粘膜を含む。本明細書で以下に詳述するように、組成物に含まれ得る適切な担体及び任意選択的な他の成分を選択することによって、本発明の組成物は、典型的には局所適用に使用される任意の形態に製剤化することができる。局所薬学的組成物は、クリーム、軟膏、ペースト、ゲル、ローション、ミルク、懸濁液、エアロゾル、スプレー、フォーム、ダスティングパウダー、パッド、及びパッチの形態であり得る。更に、組成物は、経皮デバイスでの使用

に好適な形態であり得る。これらの製剤は、従来の処理方法を介して、本開示の化合物、又はその薬学的に許容される塩を利用して調製することができる。一例として、クリーム又は軟膏は、親水性材料及び水と、約５重量％～約１０重量％の化合物とを混合して、所望の一貫性を有するクリーム又は軟膏を生成することによって調製される。

【０２５４】

経皮投与に好適な組成物では、担体は、任意選択的に、貫通促進剤及び／又は好適な湿潤剤を、任意選択的に、少ない割合の任意の性質の好適な添加剤と組み合わせて含み、添加剤は、皮膚に著しい有害な影響を導入しない。上述の添加剤は、皮膚への投与を容易にしてもよく、かつ／又は所望の組成物を調製するのに有用であり得る。これらの組成物は、様々な方法で、例えば、経皮パッチとして、スポットオンとして、軟膏として投与され得る。

【０２５５】

軟膏は、典型的にはワセリン又は石油誘導体に基づいた半固体調製物である。使用される特定の軟膏基剤は、所与の製剤に対して選択された活性剤の最適な送達を提供するものであり、好ましくは、他の所望の特性（例えば、軟化性）も提供する。他の担体又はビヒクルと同様に、軟膏基剤は、不活性であり、安定であり、非刺激性であり、非感作性でなければならない。Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，１９ｔｈ Ｅｄ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．：Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．（１９９５），ｐｐ．１３９９－１４０４で説明されるように、軟膏基剤は、油性基剤、乳化性基剤、エマルション基剤、及び水溶性基剤の４つの種類に分類され得る。油性軟膏塩基としては、例えば、植物油、動物から得られる脂肪、及び石油から得られる半固体炭化水素が挙げられる。吸収性軟膏基剤としても知られる乳化性軟膏基剤は、水をほとんど含まないか、又は全く含まず、例えば、硫酸ヒドロキシステアリン、無水ラノリン、及び親水性ワセリンを含む。エマルション軟膏基剤は、油中水（Ｗ／Ｏ）エマルション又は水中油（Ｏ／Ｗ）エマルションのいずれかであり、例えば、セチルアルコール、モノステアリン酸グリセリル、ラノリン、及びステアリン酸を含む。好ましい水溶性軟膏基剤は、様々な分子量のポリエチレングリコールから調製される。

【０２５６】

ローションは、摩擦なく皮膚表面に適用される調製物である。ローションは、典型的には、活性剤を含む固体粒子が水又はアルコール基剤中に存在する液体又は半液体調製物である。より流動性の組成物を塗布することが容易であるため、ローションは、典型的には、大きな身体領域を治療するために好ましい。ローションは、典型的には固体の懸濁液であり、多くの場合、水中油型の液体油性エマルションを含む。一般に、ローション中の不溶性物質を細かく分割する必要がある。ローションは、典型的には、より良い分散液を生成するための懸濁剤、並びにメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなどの活性剤を皮膚と接触させて局在化させ、保持するのに有用な化合物を含有する。

【０２５７】

クリームは、水中油又は油中水のいずれかの粘性液体又は半固体エマルションである。クリーム基剤は、典型的には水洗い可能であり、油相、乳化剤、及び水相を含有する。「内部」相とも呼ばれる油相は、一般に、ワセリン及び／又はセチルアルコール又はステアリルアルコールなどの脂肪アルコールから構成される。水相は、典型的には、必ずしもそうではないが、体積が油相より大きく、一般に、保湿剤を含有する。クリーム製剤中の乳化剤は、一般に、非イオン性、アニオン性、カチオン性、又は両性界面活性剤である。更なる情報のために、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ（前出）を参照してもよい。

【０２５８】

ペーストは、生体活性剤が好適な基剤に懸濁された、半固体剤形である。基剤の性質に応じて、ペーストは、脂肪ペースト又は単相水性ゲルから作られたものに分けられる。脂肪ペースト中の基剤は、一般的に、ワセリン、親水性ワセリンなどである。単相水性ゲルから作製されるペーストは、一般に、基剤としてカルボキシメチルセルロースなどを組み

込む。更なる情報のために、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙを更に参照してもよい。

【０２５９】

ゲル製剤は、半固体の懸濁型の系である。単相ゲルは、典型的には水性であるが、好ましくはアルコール及び任意選択的に油を含む、担体液体全体に実質的に均一に分布する有機巨大分子を含む。好ましい有機巨大分子、すなわち、ゲル化剤は、カルボマーポリマーのファミリー、例えば、商標Ｃａｒｂｏｐｏｌ（商標）で商業的に入手し得るカルボキシポリアルキレンなどの架橋アクリル酸ポリマーである。この文脈における他の種類の好ましいポリマーは、ポリエチレンオキシド、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンコポリマー及びポリビニルアルコールなどの親水性ポリマー；改変セルロース、例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、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メチルセルロースフタレート、及びメチルセルロース；トラガカント及びキサンタンガムなどのゴム；アルギン酸ナトリウム；並びにゼラチンである。均一なゲルを調製するために、アルコール又はグリセリンなどの分散剤を添加することができ、又はゲル化剤を粉砕、機械的混合若しくは撹拌、又はそれらの組み合わせによって分散させることができる。

【０２６０】

スプレーは、一般に、送達のために皮膚上で霧状にすることができる水性及び／又はアルコール溶液中の活性剤を提供する。かかるスプレーには、送達後の投与部位における活性剤溶液の濃度を提供するように製剤化されたものが含まれ、例えば、スプレー溶液は、主に、活性剤が溶解することができるアルコール又は他の同様の揮発性液体から構成され得る。皮膚への送達時に、担体は蒸発し、濃縮された活性剤を投与部位に残す。

【０２６１】

フォーム組成物は、典型的には、単相又は多相の液体形態で製剤化され、任意選択的に、組成物を容器から排出することを容易にする推進剤とともに、好適な容器に収容され、したがって、適用時にそれを泡に変換する。他のフォーム形成技術としては、例えば、「バッグ・イン・ア・カン（Ｂａｇ－ｉｎ－ａ－ｃａｎ）」製剤化技術が挙げられる。このように配合される組成物は、典型的には、低沸点の炭化水素、例えば、イソプロパンを含有する。そのような組成物を体温で適用し、撹拌すると、加圧エアロゾル発泡システムと同様の方法で、イソプロパンが気化して泡を生成する。フォームは、水性又は水性アルカノールであり得るが、典型的には、高いアルコール含有量で製剤化され、使用者の皮膚に適用するとすぐに蒸発し、活性成分を上部皮膚層を通って治療部位へと促進する。

【０２６２】

皮膚パッチは、典型的には、活性剤を含むリザーバが付着しているバッキングを含む。リザーバは、例えば、活性剤又は組成物が分散又は浸漬されているパッド、又は液体リザーバであり得る。パッチは、典型的には、デバイスを治療領域に接着し、固定する、前面水透過性接着剤を更に含む。自己接着性を有するシリコーンゴムを代替的に使用することができる。どちらの場合も、使用前にパッチの接着側を保護するために保護透過性層を使用することができる。皮膚パッチは、保管時にそれを保護するのに役立つ取り外し可能なカバーを更に含み得る。

【０２６３】

本発明とともに利用することができるパッチ構成の例としては、皮膚接触接着剤内に薬物を直接含有することを特徴とする単層又は多層の薬物接着剤システムが挙げられる。そのような経皮パッチ設計では、接着剤は、パッチを皮膚に固定するのに役立つだけでなく、単一のバッキングフィルムの下に薬物及び全ての賦形剤を含む製剤基礎としても役立つ。多層薬物接着剤パッチでは、膜は、２つの異なる薬物接着剤層の間に配置されるか、又は複数の薬物接着剤層が単一のバッキングフィルムの下に組み込まれる。

【０２６４】

局所適用のための薬学的組成物に好適な薬学的に許容される担体の例としては、組成物の最終形態に応じて、例えば、エマルション、クリーム、水溶液、油、軟膏、ペースト、

ゲル、ローション、ミルク、フォーム、懸濁液、エアロゾルなどのための基剤として化粧品及び医療分野での使用が周知である担体材料が含まれる。したがって、本発明による好適な担体の代表的な例としては、限定されないが、水、液体アルコール、液体グリコール、液体ポリアルキレングリコール、液体エステル、液体アミド、液体タンパク質加水分解物、液体アルキル化タンパク質加水分解物、液体ラノリン及びラノリン誘導体、並びに化粧品及び医薬組成物に一般的に使用される同様の材料が挙げられる。本発明による他の好適な担体としては、限定されないが、アルコール、例えば、一価及び多価アルコール、例えば、エタノール、イソプロパノール、グリセロール、ソルビトール、２－メトキシエタノール、ジエチレングリコール、エチレングリコール、ヘキシレングリコール、マンニトール、及びプロピレングリコール；ジエチル又はジプロピルエーテルなどのエーテル；ポリエチレングリコール及びメトキシポリオキシエチレン（２００～２０，０００の範囲の分子量を有するカルボワックス）；ポリオキシエチレングリセロール、ポリオキシエチレンソルビトール、ステアロイルジアセチンなどが挙げられる。

【０２６５】

本開示の局所組成物は、所望な場合、活性成分を含有する１つ以上の単位剤形を含み得るパック又はディスペンサーデバイス（例えば、ＦＤＡ承認されたキット）で提示されてもよい。ディスペンサーデバイスは、例えば、チューブを含み得る。パック又はディスペンサーデバイスは、投与のための説明書を伴ってもよい。パック又はディスペンサーデバイスはまた、医薬品の製造、使用、又は販売を規制する政府機関によって規定された形態での通知が添付されていてもよく、通知は、ヒト又は獣医学的投与のための組成物の形態の機関による承認を反映している。かかる通知は、例えば、処方薬の米国食品医薬品局によって承認されたラベル、又は承認された添付文書を含み得る。また、薬学的に許容された担体に製剤化された局所組成物を含む組成物を、調製し、適切な容器に入れ、適応状態の治療のためにラベル付けしてもよい。

【０２６６】

本発明によって使用することができる別のパッチシステム構成は、半透過性膜及び接着剤によって剥離ライナーから分離された薬物溶液又は懸濁液を含む液体コンパートメントを含むことを特徴とするリザーバ経皮システム設計である。このパッチシステムの接着剤構成要素は、膜と剥離ライナーとの間の連続層として、又は膜の周りの同心円状の構成のいずれかで組み込むことができる。本発明によって使用することができる更に別のパッチシステム構成は、剥離ライナーと直接接触している薬物溶液又は懸濁液を含む半固体マトリックスを含むことを特徴とするマトリックスシステム設計である。皮膚接着を担う構成要素は、オーバーレイに組み込まれ、半固体マトリックスの周りに同心円状の構成を形成する。

【０２６７】

薬学的組成物（又は製剤）は、様々な方法で包装され得る。概して、流通のための物品は、適切な形態の薬学的組成物を含む容器を含む。好適な容器は、当業者には周知であり、例えば、ボトル（プラスチック及びガラス）、サシェ、ホイルブリスターパックなどの材料を含む。容器はまた、パッケージの内容物への不注意なアクセスを防止するために不正開封防止集合体を含んでもよい。加えて、容器は、典型的には、容器の内容物及び任意の適切な警告又は指示を記載するラベルがその上に貼付される。

【０２６８】

開示される薬学的組成物は、所望な場合、活性成分を含有する１つ以上の単位剤形を含み得るパック又はディスペンサー装置で提示されてもよい。パックは、例えば、金属箔又はプラスチック箔、例えば、ブリスターパックを含んでもよい。パック又はディスペンサーデバイスは、投与のための説明書を伴ってもよい。パック又はディスペンサーはまた、医薬品の製造、使用、又は販売を規制する政府機関によって規定された形式の容器に関連する注意書きを添付してもよく、注意書きは、ヒト又は獣医学的投与のための薬剤の形態の機関による承認を反映している。かかる注意書きは、例えば、処方薬の米国食品医薬品局によって承認されたラベル、又は承認された製品インサートであり得る。また、適合性

の薬学的担体に製剤化された開示された化合物を含む薬学的組成物を調製し、適切な容器に入れ、適応状態の治療のためにラベルが付けられてもよい。

【０２６９】

投与の正確な投薬量及び頻度は、当業者に周知であるように、開示された特定の生物又は生物の混合物、治療される特定の状態及び治療される状態の重症度、投薬量が投与される対象の病歴に特定の様々な因子、例えば、特定の対象の年齢、体重、性別、障害の程度、及び一般的な身体状態、並びに個体が服用している可能性がある他の薬物に依存する。更に、上述の有効１日量が、治療された対象の応答に応じて、及び／又は本開示の化合物を処方する医師の評価に応じて、減少又は増加され得ることは明らかである。

【０２７０】

投与様式に応じて、薬学的組成物は、０．０５～９９重量％、好ましくは０．１～７０重量％、より好ましくは０．１～５０重量％の活性成分と、１～９９．９５重量％、好ましくは３０～９９．９重量％、より好ましくは５０～９９．９重量％の薬学的に許容される担体と、を含み、全ての割合は、組成物の総重量に基づいている。

【０２７１】

例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、又は他の形態の炎症性腸疾患などの状態の治療において、適切な投薬レベルは、一般に、単位投薬量当たり約１０億～約１００億ＣＦＵであり、単一用量又は複数用量で投与することができる。この範囲内で、投薬量は、１日当たり約１０、５０、１００、１５０、２００、２５０、又は約３００億ＣＦＵの遺伝子改変されたＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉであり得る。化合物は、１日当たり１～４回、好ましくは１日当たり１回又は２回のレジメンで投与され得る。例示的な態様では、経口剤形は、２５０ｍｇのカプセル中に５０億ＣＦＵを含んでいてもよく、２つのカプセルが、１日当たり２回投与され得る。この投薬レジメンは、最適な治療応答を提供するように調整することができる。

【０２７２】

一態様では、薬学的組成物中で、経口剤形は、単位用量当たり約１０億コロニー形成単位（ＣＦＵ）～約１００億ＣＦＵ、又は単位用量当たり約１０、５０、６０、７０、８０、９０、若しくは約１００億ＣＦＵ、又は前述の値のいずれかの組み合わせ、又は前述の値のいずれかを包含する範囲のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を含む。いくつかの態様では、薬学的組成物は、酸耐性である。

【０２７３】

別の態様では、本方法は、約３日～約４週間、複数月、又は複数年、又は約３、４、５、６、若しくは７日間、又は２、３、若しくは４週間、又は約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、若しくは１１ヶ月間、又は約１、２、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０年間、又はそれより長い年間、又は前述の値のいずれかの組み合わせ、又は前述の値のいずれかを包含する範囲の期間にわたって、薬学的組成物を投与することを含む。別の態様では、薬学的組成物は、１日に１回～１日に４回、又は１日に１、２、３、若しくは４回投与される。

【０２７４】

本明細書で上及び下に記載されるこのような単位用量は、１日に１回より多く、例えば、１日に２、３、４、５、又は６回投与することができる。様々な態様では、かかる療法は、数週間又は数ヶ月間、いくつかの場合には、数年間、又は患者の症状が持続する限り、延長することができる。一態様では、炎症性腸疾患の場合、症状が持続する限り、経口剤形を投与することができる。一態様では、炎症性腸疾患の一例では、経口剤形を投与して、疾患の寛解を数年又は生涯にわたって維持することができる。しかしながら、任意の特定の患者の特定の用量レベルは、当業者によって十分に理解されるように、用いられる特定の化合物の活性、治療される個体の年齢、体重、一般的な健康、性別、及び食生活、投与時間及び経路、排泄速度、以前に投与された他の薬物、並びに療法を受ける特定の疾患の重症度を含む様々な因子に依存するであろうことが理解されるであろう。

【０２７５】

典型的な投薬量は、１日１回、又は１日に複数回服用される１ｍｇ～約１００ｍｇの錠剤又は１ｍｇ～約３００ｍｇの錠剤、又は１日１回服用され、比例してより高い含有量の活性成分を含有する１つの時間放出カプセル又は錠剤であり得る。時間放出効果は、異なるｐＨ値で溶解するカプセル材料によって、浸透圧によってゆっくりと放出するカプセルによって、又は任意の他の既知の制御放出手段によって得ることができる。

【０２７６】

当業者には明白であろうように、いくつかの場合において、これらの範囲外の投薬量を用いることが必要であり得る。更に、臨床医又は治療を行う医師は、個々の患者の応答と併せて、いつ、どのようにして、療法を開始、中断、調整、又は終了するかを知っていることに留意されたい。

【０２７７】

開示される薬学的組成物は、通常、上述の病理学的状態又は臨床状態の治療に適用される他の治療的に活性な化合物を更に含み得る。

【０２７８】

投与

本開示の技術（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株及びそれを含む薬学的組成物）の投与は、１回の用量で、連続的に、又は断続的に行うことができる。投与の最も有効な手段及び投薬量を決定する方法は、当業者に既知であり、使用される組成物、療法の目的などによって変動するであろう。単回又は複数回の投与は、治療する医師によって選択される用量レベル及びパターンで実施され得る。いくつかの実施形態では、本開示の技術は、一定期間にわたって１日１回投与される。いくつかの実施形態では、本開示の技術は、一定期間にわたって１日２回投与される。いくつかのそのような実施形態では、期間は、例えば、日（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１４、２１、若しくは３０日間）、月（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、若しくは１２ヶ月）、又は年（例えば、１、２、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０年、若しくはそれより長い年数）を含む。

【０２７９】

本開示の好適な投薬製剤及び技術を行う方法は、当該技術分野で既知である。投与経路も決定することができ、最も効果的な投与経路を決定する方法は当業者に既知であり、治療に使用される組成物、治療の目的、治療される対象の健康状態又は疾患段階、及び標的細胞又は組織によって異なるであろう。投与経路の非限定的な例としては、経口投与、膣、鼻投与、注射、局所適用、及び坐剤によるものが挙げられる。

【０２８０】

これらの態様のうちのいずれかでは、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、薬学的組成物の経口送達の約３日後～約５日後に対象の腸を占有する。一態様では、腸のこの一時的な占有に起因して、本明細書に開示される薬学的組成物の投薬量、並びに治療期間は、開示される経口送達機構を使用して慎重に制御され得る。

【０２８１】

併用療法

また、疾患、障害、及び／又は状態を治療及び／又は予防することを必要とする対象においてそれを行う方法であって、対象に、有効量の本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株、又はそれと治療有効量の抗生物質と含む薬学的組成物を投与することを含む、方法も本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、抗生物質は、本明細書に記載されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株、又はそれを含む薬学的組成物と同時に投与される。いくつかの実施形態では、抗生物質は、本明細書に記載されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株、又はそれを含む薬学的組成物の前に投与される。いくつかの実施形態では、抗生物質は、本明細書に記載されるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株、又はそれを含む薬学的組成物の後に投与される。

【０２８２】
いくつかの実施形態では、抗生物質は、例えば、メトロニダゾール、シプロフロキサシン、リファキシミン、アンピシリン、テトラサイクリン、アモキシシリン、ドキシサイクリン、レボフロキサシン、クラブラン酸カリウム、バンコマイシン、スルファメトサゾール、トリメトプリム、クリンダマイシン、チニダゾール、チロシン、又はそれらの任意の組み合わせから選択され得る。一態様では、本明細書に開示される薬学的組成物は、必要に応じて抗生物質を同時投与する能力に起因して、細菌のみを含むプロバイオティクス組成物よりも優れている。更に、この態様では、細菌プロバイオティクスとは異なり、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、抗生物質に対して感受性ではない。
【０２８３】
いくつかの実施形態では、非経口で使用される薬物の有効性は、腸機能を調節することによって高めることができる。腸内微生物が、がん治療に影響を及ぼし得ることは周知である。いずれかの理論に拘束されることを望まないが、腸の炎症は、腸内微生物の豊富さ及び組成に影響を及ぼし、ひいては抗がん治療に影響を及ぼし、したがって、いくつかの実施形態では、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を抗がん剤とともに投与して、治療の有効性を高めることができる。
【０２８４】
ここで、本開示の態様を説明したが、一般的に、以下の実施例は、本開示のいくつかの追加の態様を説明する。本開示の態様は、以下の実施例及び対応する本文及び図面に関連して説明されるが、本開示をこれらの説明の態様に限定する意図はない。それとは反対に、その意図は、本開示の趣旨及び範囲内に含まれる全ての代替物、修正、及び等価物を網羅することである。
【実施例】
【０２８５】
以下の実施例は、本明細書に特許請求される化合物、組成物、物品、デバイス及び／又は方法がどのように作製され、評価されるかについての完全な開示及び記載を当業者に提供するために提示され、純粋に本発明の例示であることを意図しており、発明者らが自分達の開示とみなすものの範囲を限定することを意図していない。数値（例えば、量、温度など）に関して精度を保証するように努力がなされてはいるが、いくらかの誤差及び偏差が考慮されるべきである。特に指定しない限り、部は重量部であり、温度は℃であるか、又は周囲温度であり、圧力は、大気圧又はその付近である。
【０２８６】
実施例１：Ｓｂ－ｍＳｄＡｂ（ＢｉｏＰＹＭ（商標））技術のプラットフォーム
本明細書に記載される作業は、プロバイオティクス酵母Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｂｏｕｌａｒｄｉｉを操作して、例えば、多重特異性単一ドメイン（ＶＨＨ）抗体（Ｓｂ－ｍＳｄＡｂ）を分泌させ、主要な腸疾患バイオマーカーを直接中和することによって、例えば、腸内病原体に対する新規なプラットフォーム技術を構築する。このプラットフォームは、Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ Ｐｒｏｂｉｏｔｉｃ Ｙｅａｓｔ Ｍｅｄｉｃｉｎｅｓ（ＢｉｏＰＹＭ（商標））とも称される。
【０２８７】
この革新的な技術を使用して、２つの主要なＣ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅエンテロトキシンであるＴｃｄＡ及びＴｃｄＢを強力かつ広範囲に中和する４つの非重複ＶＨＨからなるｍＳｄＡｂ融合ポリペプチドとして四重特異的単一ドメイン抗体ＡＢＡＢを構成的に分泌する、ＦＺ００２と命名されるＳｂ－ＡＢＡＢの例示的な治療用リードを生成した。機能的ＡＢＡＢの分泌は、インビトロ及びインビボの両方で確認された。インビトロでの特性決定のために、ＡＢＡＢの分泌は、ウェスタンイムノブロッティングによって確認され（図１Ａ）、精製されたＦｃ－ＡＢＡＢ融合ポリペプチドと同様に、ＴｃｄＡ及びＴｃｄＢの両方に対する分泌されたＡＢＡＢの予想された中和活性も確認された（図１Ｂ）。最終的なＳｂ－ＡＢＡＢクローンは、野生型Ｓｂ及び空のプラスミドで形質転換されたＳｂ（Ｓｂ－ＥＰ）対照と同等の成長を有しており（図１Ｃ）、また、７日間の継代にわたって安

定してＡＢＡＢを分泌する成長を有していた（図１Ｄ）。Ｓｂ－ＡＢＡＢは、野生型と比較して、抗生物質のパネルに対して同様に耐性であったが、真核細胞に対して毒性である抗真菌性Ｇ４１８に対しては同様の耐性ではなかった（図１Ｅ）。

【０２８８】

Ｓｂ－ＡＢＡＢのインビボでの特性及び達成可能な最高用量のマウス忍容性を調べるために、10^{10}コロニー形成単位（ＣＦＵ）の操作された酵母をマウスに経口的に強制栄養摂取させた（図２Ａ）。Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（Ｓｂ）、Ｓｂ－ＥＰ（ＡＢＡＢ導入遺伝子を含まない「空のプラスミド」（ｐＵＲＡ３－ＡＴ－ｃＭｙｃ）で形質転換されたＳｂ酵母）、又はＳｂ－ＡＢＡＢを強制栄養摂取させたマウスは、プラセボ（ＰＢＳ）と同様の体重を獲得し（図２Ｂ）、これらの株は、これらのマウスにおいて、同等の持続性パターンを共有していた（図２Ｃ）。更に、Ｓｂ－ＡＢＡＢは、Ｓｂ－ＥＰとは異なり、経口強制栄養摂取後に、マウスの回腸、盲腸及び結腸内で機能的ＡＢＡＢを分泌した（図２Ｄ）。最後に、マウスの糞便から回収されたＳｂ－ＡＢＡＢは、ＡＢＡＢを安定して分泌し続けた（図２Ｅ）。３日目の糞便におけるＡＢＡＢレベルをＥＬＩＳＡによって決定した（図２Ｆ）。更に、経口ＦＺ００２が、マウスにおける原発性及び再発性のＣ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ感染の両方に対して有意な保護を与えたことを示した。

【０２８９】

図９Ａ～９Ｂは、Ｓｂ－ＡＢＡＢを投与された子ブタが、生存酵母及びＡＢＡＢを糞便中に除去したことを示す。図１０Ａ～１０Ｂは、Ｓｂ－ＡＢＡＢを強制栄養摂取されたマウスが、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅによって誘導される死及び腸の炎症から保護されることを示す。細菌チャレンジ試験の前に、マウスにＰＢＳ、Ｓｂ－ＥＰ、又はＳｂ－ＡＢＡＢ（10^{9}ＣＦＵ／用量／日）を３日間強制栄養摂取させ、細菌チャレンジ試験の後に更に３日間継続した。マウスに10^{4}ＣＦＵのＣ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ胞子をチャレンジ試験した。マウスの生存及び腸組織学を示している。

【０２９０】

実施例２：Ｓｂ－ａｍＴＮＦの構築

抗マウスＴＮＦ－α　ＶＨＨを分泌するプロトタイプ酵母Ｓｂ－ａｍＴＮＦ（ＦＺ００６ｍ）を構築し、これにより、従来のマウスにおける腸炎症性疾患に対する操作された酵母の治療可能性を評価することを可能にした。抗マウスＴＮＦ－α　ＶＨＨのホモ二量体が、Ｆｃと融合すると、最も高い中和活性を示すことを示した（図３Ａ～３Ｄ）。したがって、栄養要求性Ｓｂ株のｐＴＥＦ又はｐＴＤＨ遺伝子座内にＶＨＨ／ＶＨＨ－Ｆｃカセットを挿入することによって、Ｓｂ－ａｍＴＮＦ株を操作した。Ｓｂ－ａｍＴＮＦは、ＥＬＩＳＡ及び細胞培養アッセイによって検出されるように、機能的抗マウスＴＮＦ－α　ＶＨＨ／ＶＨＨ－Ｆｃを安定的に分泌した（図３Ａ～３Ｄ）。

【０２９１】

実施例３：経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦは、腸炎症性疾患の重症度を低下させる

まず、強力なＴＮＦ－ａ中和抗体の腸管送達が、デキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ）－大腸炎の症状を改善するかどうかを試験した。マウスは、前述のように、２％ＤＳＳを含む水を８日間飲み続けた。３日目に開始して、マウスに10^{9}ＣＦＵのＳｂ－ａｍＴＮＦを１１日間にわたって毎日強制栄養摂取させた。対照群には、同量のＳｂ－ＥＰ対照又はＰＢＳを強制栄養摂取させた。図４Ａは、経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦで治療されたこれらのマウスはいずれも死亡しなかったが、対照群ではマウスの２０％が死亡したことを示す。ＤＳＳ－大腸炎単独では、マウスにおいて有意な死亡という臨床的結果を誘導しなかったため、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ感染と併存するＤＳＳ－大腸炎の顕著に重篤な腸内炎症モデルを利用した。この併存疾患モデルでは、マウスが重度の腸内炎症、組織損傷を発症し、マウスの８０％が死亡した。ＴＮＦ－αが有意に上方制御されたため、操作されたＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉによって腸に送達された抗ＴＮＦ－α抗体が、疾患の重症度を改善し、腸の炎症を軽減するかどうかを調査した。併存疾患マウス群に、ＰＢＳ、Ｓｂ－ＥＰ、又はＳｂ－ａｍＴＮＦを10^{9}ＣＦＵ／用量で、－３日目から７日目まで毎日経口投与した（合計１１用量）。ＰＢＳ及びＳｂ－ＥＰ対照群では、顕著な体重減少が明らかであ

り、マウスの約８０％がこの疾患により死亡していたが、経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦは、体重減少が有意に低く、実質的な保護を与え（図４Ｂ）、マウスの４０％が死亡した（図４Ｃ）。結腸炎症誘発性サイトカインＴＮＦ－α（図４Ｄ）及びＩＬ－６（図４Ｅ）の上方制御もまた有意に減少した。その後、経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦで治療されたマウスにおいて、結腸の長さの減少及び組織損傷もまた有意に改善された（図４Ｆ～４Ｇ）。まとめると、本願発明者らの概念実証データは、操作されたＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦ）を介した抗ＴＮＦ－α中和抗体の腸内送達が、腸内炎症及び組織損傷を低減することによって疾患の重症度を有意に改善することを示した。

【０２９２】

実施例４：抗ヒトＴＮＦ－α中和抗体Ｓｂ－ａｈＴＮＦを分泌する酵母株の構築（ＦＺ００６）

免疫ＶＨＨ酵母ディスプレイライブラリから、ヒトＴＮＦ－αタンパク質又はポリペプチドに結合し、Ｌ９２９細胞に対するその細胞傷害活性を中和する８種類のＶＨＨが特定されている。次いで、これらのＶＨＨを無作為に対合して、単量体ＶＨＨ－Ｆｃ及び二量体ＶＨＨ／ＶＨＨ－Ｆｃを形成し、最良の中和活性を示す１４種類の候補を特定した（図５Ａ）。アダリムマブ（ＨＵＭＩＲＡ（登録商標）としての商品名）と比較して、ヘテロ二量体Ｇ１は、Ｌ９２９細胞のヒトＴＮＦ－α媒介性細胞傷害性を中和することにおいて２４倍強力であった（図５Ａ）。Ｇ１は、ＥＬＩＳＡ（図５Ｂ）において、ＴＮＦ－αに対する結合親和性がヒュミラよりも高く、競合ＥＬＩＳＡによって決定されるように、ＴＮＦＲ１に対するＴＮＦ－αの結合を遮断することにおいて、より強力であった（図５Ｃ）。

【０２９３】

抗ヒトＴＮＦ－α抗体を分泌する操作された酵母を構築するために、ａｈＴＮＦ（ＶＨＨ－Ｆｃ融合体）の発現カセットを最適化し、他の治療用リードを生成したのと同じ戦略を使用して酵母ゲノムに挿入した。得られた酵母Ｓｂ－ａｈＴＮＦ株（ＦＺ００６と命名される）は、親株と同じ成長速度を有しており（図６Ａ）、ほぼ１００世代（８日間）の培養にわたってａｈＴＮＦを安定して発現した（図６Ｂ）。７日目の継代について収集した代表的な２４時間培養上清は、１．２ｕｇ／ｍｌのａｈＴＮＦを有した。酵母上清中のａｈＴＮＦは、ＨＥＫ２９３培養物から精製されたＧ１抗体と同様の中和活性を有し、培養されたＬ９２９細胞に対するヒトＴＮＦ－αの細胞傷害性を中和することにおいて、ヒュミラよりも有意に強力であった（図６Ｃ）。これらのデータは、ＦＺ００６が、完全に機能する抗ヒトＴＮＦ－α抗体を安定して発現することを示した。

【０２９４】

実施例５：実験方法

配列決定

全ゲノム配列決定は、ＰａｃＢｉｏ　Ｐ６Ｃ４化学及びＩｌｌｕｍｉｎａ　ＨｉＳｅｑ－１０００ハイスループット配列決定技術を使用して、続いて標準的なアセンブリ及びアノテーション手順を使用して、特にカセット、例えばａｈＴＮＦカセットが挿入された、又は部位特異的挿入の配列決定が完了し得る遺伝子座に注目して実施され得る。

【０２９５】

Ｓｂ株の成長

ＦＺ００６及び関連する株（例えば、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株）の成長動態、並びに安定性、均一性、及び耐熱性を特性決定することができる。これらの因子の知識は、開示された製品の商業的調製を行うための上流の規模拡大プロセスに使用することができる。培地は、化学的に定義され、動物由来の内容物を含んでいなかった。グルコース及び酵母合成ドロップアウト培地の補充剤を有する合成酵母窒素ベース（ＹＮＢ）を使用した。例えば、Ｓｂ－ａｍＴＮＦ及びＳｂ－ａｈＴＮＦの両方が、野生型酵母としてこの培地中で良好に成長する。

【０２９６】

例えば、ＹＮＢ培地中のＦＺ００６を含む、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃ

ｅｓ酵母の操作された株の毎日の継代を、１０日間にわたって、又は例えば、ＦＺ００６を含む、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の約１００～１２０世代にわたって実施し、酵母の培養物の光学密度及び生存率を測定することによって成長を監視した。耐熱性実験は、例えば、ＦＺ００６、及び親株を含む、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株を、異なる温度（３０、３７、４０、及び４５℃）で４時間培養することによって実施した。培養条件が最適化された後、ＢｉｏＦｌｏ　３２０中の高密度培養が実施され、必要に応じてプロセス開発のスケーリングが可能になる。例えば、ＦＺ００６を含む、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、発酵中に異なる培養密度でサンプリングされ、無作為に選ばれたクローンの成長及び分泌（例えば、ａｈＴＮＦ分泌）を測定することによって、安定性及び均質性について監視される。

【０２９７】

胃、腸、胆汁塩のストレス状態

腸内環境に対するストレス耐性を、ＦＺ００２及びＦＺ００６などのいくつかのリードについて、前述のプロトコルに従って評価した。操作された酵母又は野生型のいずれかの酵母細胞の培養物（ＯＤ＝０．８～１．２）を遠心分離によって採取し、蒸留水で洗浄した後、以下の中で、３７℃で１時間インキュベートした。１）３ｇ／ＬのペプシンＨＣＬ（３２００～４５００Ｕ／ｍｇ）及び５ｇ／ＬのＮａＣＩ（ｐＨ２．０）を含有する水溶液によって構築された、模擬胃環境、２）１ｇ／Ｌのパンクレアチン（９０３Ｕ／ｍｇ）及び５ｇ／ＬのＮａＣＩ（ｐＨ８．０）を含有する模擬腸内環境水溶液、並びに３）０．１％の胆汁塩の混合物（５０％のコール酸ナトリウム及び５０％のデオキシコール酸ナトリウム）を添加したＹＰＤ（酵母抽出物、ペプトン、デキストロース）液体培地。固体培地上での実験のために、液体ＹＰＤ（４％）中で指数関数的に成長した細胞をＯＤが１．０になるまで希釈し、この希釈液５μＬを使用して、異なる濃度の胆汁塩を補充した固体ＹＰＤ培地（４％）を播種する。コロニーを３７℃で４８時間後に可視化した。ここで生成されるパラメータは、将来のＣＭＣ開発における操作されたリード酵母株の成長を検証するのに有用であろう。

【０２９８】

抗菌薬感受性

例示的なＳｂ－ＡＢＡＢ及びＦＺ００２を、前述のように、抗真菌剤及び抗菌剤のパネルに対する感受性について試験した（図９６～９９）。この重要なＱＣアッセイは、例えば、ＦＺ００６及びＦＺ００２を含む操作された酵母株の同一性を確認するのに有用であるだけでなく、潜在的な細菌汚染を決定するためにも役立つ。４つの抗真菌剤（クロトリマゾール、フルコナゾール、イトラコナゾール、及びケトコナゾール）を試験した（図９６）。抗菌剤のパネルは、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅに対する別の例示的な治療用リードＦＺ００２及びＳｂ－ＡＢＡＢについて試験されている（図１Ｅ及び図９７）。ＳｉｇｍａＡｌｄｒｉｃｈ製のアモキシシリン、アンピシリン、バシトラシン、セフトリアキソン、クロラムフェニコール、クロキサシリン、エンロフロキサシン、エリスロマイシン、メチシリン、ペニシリンＧ、ストレプトマイシン、及びテトラサイクリンを含む追加の薬剤を評価することができる。親株を並行して試験し、以前に報告されたように（図１Ｅ）、抗生物質耐性プロファイルの変化は特定されなかった。

【０２９９】

実施例６：分析方法の開発

ＦＺ００６及び追加の例示的な操作されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母株の同一性

本明細書に記載のＦＺ００６及び他の例示的なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の全ゲノム配列は、その同一性の基礎を設定する。加えて、生化学的／表現型の特性を使用して、ＦＺ００６と、本明細書に記載の他の例示的なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の同一性を検証することができる。プロセス開発及び製造中に、本明細書に記載の操作されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母株（例えば、ＦＺ００６を含む）の同一性を保証するための分析方法を開発するために、ｒＤＮＡ内部転写スペーサ

ー領域（ＩＴＳ）を増幅するために使用されるプライマーを使用した（図９０）。加えて、１８Ｓ及び２６ＳリボソームＲＮＡ遺伝子を増幅するためのプライマー（ＡＴＣＣ製品シート上）、並びにａｈＴＮＦカセット及び隣接配列も合成することができる。これらのプライマーを使用して、配列決定のために対応する遺伝子を増幅することができる。配列情報、形態及び成長動態に加えて、上述のストレス耐性パターン及び抗生物質／抗真菌耐性プロファイルを使用して、例えば、ＦＺ００６を含む操作されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母株の同一性を決定することができる。

【０３００】

ＦＺ００６及び追加の例示的な操作されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母株の強度

例えば、ＦＺ００６を含む、本明細書に記載の例示的な操作されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母株の強度は、例えば、生存酵母の数及びそのＧＯＩ（例えばａｈＴＮＦをコードする核酸など）の産生という２つの因子によって決定される。例えば、ＦＺ００６を含む、本明細書に記載の例示的な操作されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母株の生存率は、自動細胞カウンタの下で生体染色色素により染色し、観点プレート上のコロニー形成単位（ＣＦＵ）をカウントすることによって決定される。治療用ポリペプチド（複数可）（例えば、ａｈＴＮＦ）の産生は、所与の培養条件下での２４時間における１つの酵母によるピコグラム単位での抗体分泌の量（１日当たりの細胞当たりのピコグラム数、ＰＣＤ）によって測定される。合成ＹＮＢ培養培地を使用し、一晩培養の０．１ＯＤを５０ｍＬの新鮮な培地に移し、例えば、ＦＺ００６を含む、本明細書に記載の例示的な操作されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母株を、ＯＤ１０の後期対数相まで培養する。培養上清を２４時間にわたって３時間ごとに収集することができ、例えば、ａｈＴＮＦを含む治療用ポリペプチド（複数可）産生の量をＥＬＩＳＡによって決定することができる。

【０３０１】

質及び純度

質及び純度は、主に製造プロセス中に決定することができる。使用され得るパラメータとしては、例えば、無菌性、物理的外観、培養物のｐＨ、内毒素レベル、生体負荷、生存率、純度、及び同一性が挙げられる。例えば、ＦＺ００６を含む、本明細書に記載の例示的な操作されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母株の質及び純度を確保するために、培養に使用される全ての化学物質は、細胞バンクを生成するための米国薬局方（ＵＳＰ）グレード又は食品グレードであり得る。細胞バンクは、例えば、ＣＶＤ標準プロトコルに従って開発され得る。例えば、ＦＺ００６を含む、本明細書に記載の例示的な操作されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母株は、非選択的な化学的に定義された培地を有する寒天プレート上で成長させることができる。培養物を調べて、採取及び２０％のグリセロールを補充した培地中での再懸濁前のコロニー型の均一性及び形態を確保することができる。凍結バイアル（１００）を調製し、専用の－８０℃の冷凍庫に保管することができる。ＵＳＰに記載されている試験に基づいて、純度について３つのバイアルを試験することができる。いずれかの微生物汚染が特定された場合、そのバンクを破棄することができ、新しい細胞バンクを生成することができる。

【０３０２】

実施例７：例えば、ＦＺ００６及びＦＺ００２を含む、例示的な操作されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母株の薬物動態及び安全性プロファイル

経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦは、マウスを腸組織損傷及び炎症関連ＤＳＳ－大腸炎から予防し、生存Ｓｂ－ａｍＴＮＦが結腸に分布し、治療レベルのａｍＴＮＦを産生したことを示唆している。ＦＺ００６、Ｓｂ－ＡＢＡＢ、及びＦＺ００２の薬物動態（ＰＫ）特性は、酵母の胃腸分布、付着若しくは排泄、ａｈＴＮＦ若しくはＡＢＡＢの分泌、並びに酵母及び抗体、又はＡＢＡＢの除去を決定することによって評価された（図２Ａ～２Ｆ、Ｃｈｅｎｅｔ ａｌ，Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ ２０２０）。潜在的な抗薬物応答を、経口の長期間続くＦＺ００６ｍ投与後の宿主抗ａｍＴＮＦ ＩｇＡ及びＩｇＧを評価することによって決定した（図１２Ａ～１２Ｂ）。更に、例えば、腸内ＦＺ００６が循環に移動する能力は、免疫抑制マウスにおいて決定することができる。

【０３０３】
例えば、ＦＺ００６及びＦＺ００２を含む、例示的な操作されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母株の薬物動態
予備ＰＫ研究は、ＦＺ００２の経口強制栄養摂取が、マウス腸におけるマウスの生存酵母の除去及びＡＢＡＢの分泌をもたらしたことを示した（図２Ａ～２Ｅ）。また、経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦは、腸の炎症を改善することによって、大腸炎症状の有意な低減をもたらした（図４Ａ～４Ｇ）。これらのデータは、生存酵母が経口投与後にマウス下部腸に到達し、治療用量の中和抗体を分泌したことを示した。酵母の腸内分布は、抗体の産生及び排泄と並行して体系的に調査することができる。マウスに、10^8、10^9、及び10^{10}ＣＦＵ／用量／日で７日間投与することができる。10^{10}ＣＦＵの用量を含むことにより、経口ＦＺ００６のマウス忍容性を、強制栄養摂取針を通じて達成することが可能な最高用量で評価することができる。糞便は、経口酵母投与前に各マウスから収集することができ（バックグラウンド用）、次いで酵母治療の中止後７日間まで毎日収集することができる）。各群において、０日目、１日目、３日目、６日目、９日目、及び１４日目に、６匹のマウス（３匹の雄及び３匹の雌）を安楽死させてもよく、以下の組織／臓器を収集することができる。小腸及び大腸（回腸、盲腸、及び結腸からの異なるセグメント及び洗浄液）、腸間膜リンパ節（ＭＬＮ）、肝臓、脾臓、及び血液試料。全ての試料を、前述のアッセイに基づいて分析することができる。マウスの糞便及び腸管洗浄液は、ＰＢＳ中で希釈し、前述のように、Ｓｂの成長のために選択して、群間のＣＦＵを決定することができるサブロー寒天プレート上にプレーティングすることができる。安定した抗体産生を検証するための分泌（例えば、ａｈＴＮＦの分泌）を測定するために、Ｓｂコロニーを無作為にピックアップして液体培養物に入れることができる。生存酵母の吸収及び潜在的な全身播種を評価するために、ＭＬＮ、脾臓、及び肝臓組織を秤量し、均質化し、濾過してもよい。次いで、血液試料とともに、これらの組織をサブロー寒天上に配置してコロニーを特定することができ、いずれかのコロニーが観察される場合、酵母は、前述のように、ａｈＴＮＦ遺伝子についてＰＣＲで分析することができる。ａｈＴＮＦの吸収、分布、及び排泄を評価するために、糞便、腸内容物、腸組織のセグメント、ＭＬＮ、肝臓組織溶解物、及び血液試料を、プロテアーゼ含有ＰＢＳ中で希釈することができ、例えば、ａｈＴＮＦの量は、標準ＥＬＩＳＡを介して定量化することができる。
【０３０４】
例示的な経口ＦＺ００６投与後の宿主抗ａｈＴＮＦ応答
経口ＦＺ００６が、複数のＦＺ００６治療の経過中に、分泌されたａｈＴＮＦに対して粘膜ＩｇＡ及び全身ＩｇＧを誘導するかどうかを決定することができる。ＰＫ試験でａｈＴＮＦの最高の腸内分泌を示し、合計２１回投与する経口ＦＺ００６の用量を選択し、その結果、ＦＺ００６の治療可能性を低下させる可能性のある潜在的な抗薬物応答を、長期間続く経口ＦＺ００６が誘導するかどうかを評価することができる。マウス群（ｎ＝１０、５匹の雄及び５匹の雌）は、７日間（１回の経口ＦＺ００６治療サイクルとみなされる）にわたって毎日ＦＺ００６を経口投与し、続いて１４日間の休息期間とすることができる。これを、３回の経口ＦＺ００６サイクルで３回繰り返すことができる（合計２１用量のＦＺ００６）。対照群は、同じ量のＳｂ－ＥＰを投与されてもよい。全身注射された精製ａｈＴＮＦ（１０ｍｇ／ｋｇのａｈＴＮＦのｉ．ｖ．注射）の対照も含まれ得る。マウスの糞便及び血液試料は、酵母の最初の経口投与の前の０日目に、次いで各経口ＦＺ００６サイクルの後の７日目に収集することができる。最終的なＦＺ００６投与の１０日後に、マウスを安楽死させ、腸管洗浄液を収集し得る。糞便及び腸管洗浄液からの特異的ＩｇＡ、並びにａｈＴＮＦに対する血清ＩｇＧを、精製された抗ヒトＴＮＦ抗体でコーティングされたプレートを使用してＥＬＩＳＡによって測定することができる。抗ａｈＴＮＦ抗体応答が検出された場合、宿主の抗ａｈＴＮＦ抗体によるａｈＴＮＦ活性の中和を、細胞ベースのバイオアッセイを用いて決定した（図５Ａ）。
【０３０５】
例示的な経口ＦＺ００６投与後の免疫抑制個体におけるＳｂ全身移動の決定

Ｓｂは、１９５０年代からプロバイオティクスとして使用されており、優れた安全性プロファイルを有する臨床治験において広く研究されている。しかしながら、真菌血症のまれな症例が特定され、大部分は重度の併存疾患を有し、集中治療室での中心静脈カテーテルを有する個人であった。動物では、何ら副作用を観察することなく、操作された酵母の強制栄養摂取針を介して達成された可能な最高用量である10^{10}ＣＦＵが投与されている。例えば、経口ＦＺ００６が免疫抑制マウスの全身循環に漏れるかどうかを決定することができる。マウス（ｎ＝１０、５匹の雄及び５匹の雌）に、隔日（０、２、４、６、及び８）に、１００ｍｇ／ｋｇのシクロホスファミドをｉｐ注射して、合計５回の注射を行い、免疫抑制を誘導することができる。３日目に、マウスに１日当たり10^{10}ＣＦＵのＦＺ００６を７日間連続で強制栄養摂取させる。マウスの対照群には、ＰＢＳ又はＳｂ－ＥＰを与えることができる。マウスを１０日目に安楽死させ、血液、ＭＬＮ、脾臓、及び肝臓組織を収集することができ、生存酵母の存在を決定する。加えて、試料をＢＨＩ寒天プレートにプレーティングし、細菌数を決定することで、例えば、ＦＺ００６又はＳｂ－ＥＰ治療が細菌の移動に影響を与えるかどうかを決定することができる。以前の研究では、プロバイオティクスＳｂ酵母が腸の障壁機能を維持し、腸管内腔から血液循環への細菌の移動を低減するのに役立つことが見出された。本明細書に記載の経口ＦＺ００６、及び他の例示的なＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株は、ヒトに投与されたときに、治療用ポリペプチド（複数可）（例えば、抗ヒトＴＮＦ－α）の分泌を介して腸の炎症を低減することによって、腸の障壁機能に対する追加の有益な効果を示し得る。

【０３０６】

更なる実験及び予想される結果

他の製品（例えば、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株、例えばＦＺ００６）の特性決定を実施することができる。ＰＫ結果を分析するときに、以下を監視することができる。１）マウスが、経口投与後に例えばＦＺ００６を除去し始めるとき、マウスが最終投薬後に酵母の除去をどのくらい長く継続するか、２）酵母の除去が安定するとき、３）生存酵母の腸の位置、４）経口用量と腸治療用ポリペプチド（複数可）（例えば、ａｈＴＮＦ）産生との関係、並びに５）治療用ポリペプチド（複数可）（例えば、ａｈＴＮＦ）の腸内分布及びその全身播種。これらの研究は、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株（例えば、ＦＺ００６）の腸内の動態、並びに治療用ポリペプチド（複数可）（例えば、ａｈＴＮＦ）の分泌及び分布に関する有用な情報をもたらすことができる。生存酵母の検出不可能な全身播種及び正常マウスにおける治療用ポリペプチド（複数可）（例えば、ａｈＴＮＦ）の吸収が存在し得ることが予想される。いずれかの理論に拘束されることを望まないが、複雑な腸内環境及びＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株（例えば、ＦＺ００６）による治療用ポリペプチド（複数可）（例えば、ａｈＴＮＦ）の構成的産生に起因して、治療用ポリペプチド（複数可）（例えば、ａｈＴＮＦ）の腸内代謝を正確に測定することは困難な場合がある。しかしながら、ＰＫ試験は、経口酵母投与中の治療用ポリペプチド（複数可）（例えば、ａｈＴＮＦ）の安定した腸内レベルの評価を可能にし得る。腸治療用ポリペプチド（複数可）（例えば、ａｈＴＮＦ）のレベルは、異なる病態生理学的条件で変動し得るが、ＡＤＭＥ／ＰＫ研究及び動物有効性研究は、腸治療用ポリペプチド（複数可）（例えば、抗ＴＮＦ抗体）の治療レベルにつながるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株（例えば、ＦＺ００６）の経口用量に関する知識を提供することができる。この情報は、臨床試験におけるＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株（例えば、ＦＺ００６）の経口治療のための将来の用量及びスケジュールを決定するために重要であり得る。

【０３０７】

ＶＨＨは、全身注射であっても、一般に非免疫原性である。プロバイオティクス酵母を介して腸に送達される例示的な治療用ポリペプチド（複数可）であるａｈＴＮＦは、抗薬物応答を誘導するリスクが更に低いはずである。例えば、ａｈＴＮＦに対する検出可能なレベルのＩｇＡ又はＩｇＧが、例えば、ＦＺ００６の２１回の用量で８週間にわたって誘導される場合、抗ＶＨＨｓ応答の大きさが用量依存的及び時間依存的であるかどうかを決

定することができるので、ＦＺ００６を含むＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の投与及びスケジュールを最適化することによって、抗薬物応答の程度を最小限に抑えることができる。Ｓｂは、免疫抑制されたマウスにおいて保護効果を示し、細菌及び病原体の循環への移動を防止した。高用量のＳｂが投与されるとき、免疫抑制されたマウスにおいて低カウントのＳｂが全身的に検出される可能性がある。この場合、マウスは有害作用を経験する場合があり、これは、ＦＺ００６又はＳｂ－ＥＰを含む、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の投与中に密接に監視される。何らかの悪影響が、循環中のＳｂの数と相関し得る。そのような相関が確立され、有意な悪影響が生じる場合、実験を繰り返して、全身性フルコナゾールが血流から酵母を効率的に除去し、症状を軽減することができるかどうかを評価することができる。このような場合、血清感受性酵母は、操作された酵母が血流中に播種すると急速に死滅するように、治療用株のために操作され得る。

【０３０８】

実施例８：ヒトＴＮＦ－αトランスジェニックマウスにおけるＦＺ００６の前臨床有効性評価

ＦＺ００６は、ヒトＴＮＦ－αのみを中和するａｈＴＮＦ（ＶＨＨ－Ｆｃ融合体）を分泌するため、その治療有効性は、ヒトＴＮＦ－αトランスジェニックマウスを使用して検証することができる。ＩＢＤは、複雑な疾患であり、単一の動物疾患モデルでは、ヒトにおける疾患の発病機序を再現することができない。したがって、ＤＳＳ誘導性大腸炎及び養子縁組Ｔ細胞移入誘導性大腸炎は、ヒトＵＣの発病機序のいくつかの態様を模倣するために最も広く使用されている２つの動物大腸炎モデルであるため、これらの大腸炎の両方をモデルとして使用することができる。

【０３０９】

ＤＳＳ誘導性大腸炎モデルは、その比較的単純なプロトコルに起因して、前臨床研究において最も広く使用されているモデル型の１つである。大腸炎は、負に帯電した硫酸化多糖であるＤＳＳが上皮細胞に及ぼす損傷効果から生じる。結腸に限定される炎症は、主に、先天性免疫細胞によって産生される炎症誘発性サイトカイン、すなわち、ＴＮＦ－αによって誘導され、主に、潰瘍及び顆粒球浸潤によって特性決定される。養子Ｔ細胞移入モデルは、ヒトＩＢＤのいくつかの重要な態様に類似する慢性結腸炎症を誘導するために使用される。このモデルは、ドナーマウスから同系免疫不全レシピエントへのナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（すなわち、ＣＤ４＋ＣＤ４５ＲＢ^{hi}）の養子移入後に発生し、これは、細胞移入の約１０週間後に主に結腸炎症を引き起こす。この炎症は、ナイーブＴ細胞集団におけるＴｒｅｇｓ細胞の欠如に起因しており、対照患者と比較して、ＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＢ^{low}Ｔ細胞よりも少ないＩＬ－１０、ＩＬ－４、及びより多くのＴＮＦ－αなどの炎症誘発性サイトカインを産生するＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５ＲＢ^{hi}Ｔ細胞の流入を伴う腸組織を示すＩＢＤ患者における観察と一致する。ＤＳＳ及び養子縁組Ｔ細胞移行モデルの両方は、炎症が主に結腸に局在化し、ＴＮＦ－αが大腸炎の免疫病理において主要な役割を果たすため、ＵＣに対する抗ＴＮＦ－α剤の治療有効性を評価するために広く使用されてきた。したがって、これら２つのモデルを使用して、ＦＺ００６の治療有効性を評価することができる。

【０３１０】

ヒトＴＮＦ－αトランスジェニックマウスにおけるＤＳＳ誘導性大腸炎に対する経口ＦＺ００６の有効性

ＦＺ００６は、ヒトＴＮＦ－αのみを中和する抗ヒトＴＮＦ－α　ＶＨＨ－Ｆｃを分泌するため、ヒトＴＮＦ－αトランスジェニックＴｇ１００６マウスを使用して、その治療有効性を検証することができる。ヒトＴＮＦ－αのみを発現するＴｇ１００６　ｍＴＮＦＫＯマウス（ｍＴＮＦα：－／－，ｈＴＮＦα：＋／－；Ｔａｃｏｎｉｃから）は、ヒトＴＮＦ－αの過剰発現に起因して、約２０週齢で前足及び後足の両方で重度の関節炎を自発的に発症する可能性がある。以前に公開されたプロトコルに従って、Ｔｇ１００６マウスにおけるＤＳＳ急性大腸炎及び慢性大腸炎の両方を誘導することができる。急性大腸炎

モデルでは、マウスに飲料水中の３％（重量／体積）のＤＳＳを７日間給食する。長期間続く慢性大腸炎は、２％ＤＳＳの３サイクル（８日間のＤＳＳ誘導、１４日間の水）によって誘導され得る。これらのＴｇマウスは、ヒトＴＮＦ－αを過剰発現するため、それらが、急性モデル及び慢性モデルの両方において、通常の従来のマウスよりも重篤な大腸炎症状を発症し得ることを予想する。

【０３１１】

急性大腸炎に対するＦＺ００６の治療有効性を評価するために、マウスは、ＤＳＳ処理の３日目から開始して、１１日間にわたって毎日ＦＺ００６（10^7、10^8、又は10^9ＣＦＵ）を経口投与することができる。対照マウスには、水又は10^9ＣＦＵのＳｂ－ＥＰを強制栄養摂取させることができる。体重、下痢、体温、生存率などの臨床症状を監視することができる。臨床症状に加えて、実験は、マウス腸組織損傷及び炎症に対する経口ＦＺ００６の保護を評価するように設計され得る。最終酵母投与後の当日及び最終投与の７日後に、４匹のマウス（２匹の雄及び２匹の雌）を安楽死させ、これらのマウスから結腸組織を収集して、組織学を介して組織損傷及び炎症を評価する。加えて、血液及び結腸組織中のサイトカインレベルは、前述のように多重ＥＬＩＳＡを使用して評価することができる。疾患の症状を監視することに加えて、糞便試料及び腸洗浄液を収集して、生存酵母の腸内分布及び除去、並びにａｈＴＮＦの分泌を監視することができる。

【０３１２】

慢性大腸炎に対するＦＺ００６の治療有効性を評価するために、マウスに、水、Ｓｂ－ＥＰ、又はＦＺ００６（10^7、10^8、又は10^9ＣＦＵ）を、３日目から１４日目まで、２４日目から３５日目まで、及び４５日目から５６日目まで、いくつかのＤＳＳ処理及び処理後期間を網羅する範囲で毎日強制栄養摂取させることができる。マウスは、体重、下痢、体温、及びマウス生存率などの臨床症状について監視することができる。臨床症状に加えて、実験は、マウス腸組織損傷及び炎症に対する経口ＦＺ００６の保護を評価するように設計され得る。各群からの４匹のマウス（２匹の雄及び２匹の雌）を除く全てマウスについて同じ投薬スケジュールを実施することができ、各サイクルの最後の経口酵母投与の日に安楽死させることができる。これらのマウスからの結腸組織を、長さ測定及び肉眼検査のために収集し得る。腸上皮損傷及び炎症は、組織学を介して調べることができる。腸組織及び血液循環における炎症誘発性サイトカイン及びケモカインは、前述したように、多重ＥＬＩＳＡを使用して評価され得る。疾患の症状を監視することに加えて、糞便試料及び腸洗浄液を収集して、生存酵母の腸内分布及び除去、並びにａｈＴＮＦの分泌を監視することができる。以前に提案されたように、抗薬物応答についての糞便試料及び血液試料を評価することによって、抗ａｈＴＮＦ　ＩｇＧ及びＩｇＡが誘導されるかどうかを調べることができる。これらの結果は、宿主の腸炎症性疾患がＦＺ００６のＰＫ及び抗薬物応答を変化させるかどうかを理解するために、以前の実験から生成されたデータと比較することができる。

【０３１３】

Ｒａｇマウスを用いた免疫Ｔ細胞移行モデルにおけるＦＺ００６の治療有効性

このモデルでは、最初に、公表されたプロトコルを使用して、８週間齢のＴｇ１００６マウスから$CD4^+CD45Rb^{hi}$Ｔ細胞を調製することができる。要するに、ドナー脾細胞を、７０μｍの細胞ストレーナーを介して穏やかに細断された脾臓から単離する。Ｔ細胞を、Ｔ細胞ＥａｓｙＳｅｐキット（ＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して、他の細胞から分離する。$CD4^+CD45Rb^{hi}$Ｔ細胞を、細胞選別機を使用して単離し、性別が一致した$RAG^{-/-}$レシピエントマウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）に移す。慢性大腸炎は、１０週間後に移植されたレシピエントマウスで、完全に発症させることができる。対照群は、大腸炎を発症しないＴ細胞移入のない$RAG^{-/-}$マウスである。

【０３１４】

以前の観察に基づいて、炎症性疾患は、主に、Ｔ細胞移入の約１０週間後に生じる。Ｔ細胞注射の約１０週間後に下痢が生じる場合、マウスにＦＺ００６を１４日間にわたって

毎日経口強制栄養摂取してもよい。以前に決定された、ＤＳＳ大腸炎モデルにおいて最良の保護を示すＦＺ００６の用量を使用することができる。対照群には、ＰＢＳ又は同じ用量のＳｂ－ＥＰを強制栄養摂取させることができる。経口酵母治療中及び経口酵母治療後に、疾患症状を綿密に監視する。ＦＺ００６治療の停止後に下痢が再発した場合、別の一連の経口ＦＺ００６治療を開始することができる。対照治療と比較した場合に、経口ＦＺ００６がＴ細胞移入マウスにおける大腸炎の重症度及び持続時間を低減することができるかどうかを評価するために、慢性ＤＳＳ－大腸炎について、最大３つのエピソードの一連の治療を実施することができる。疾患症状を監視することに加えて、各群からの４匹のマウスを、ＦＺ００６治療の第１のエピソードの終了時に安楽死させてもよく、腸組織を収集して、前述のように粘膜保護を評価することができる。

【０３１５】

予想された結果

ＳｂｍＴＮＦは、従来のマウスをＤＳＳ及びＣ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅによって誘導される重症大腸炎から保護し、このことは、酵母株が腸内で治療用量の抗マウスＴＮＦ－αを発現したことを示唆している。経口ＦＺ００６は、ＳｂｍＴＮＦと同様のＰＫ特性を示すことができ、マウス腸内で抗ヒトＴＮＦ－αを発現することが予想される。したがって、ヒト特異的ＦＺ００６は、ヒトＴＮＦを発現するＴｇ１００６トランスジェニックマウスにおけるＤＳＳ－大腸炎を有意に低減するはずである。また、経口ＦＺ００６は、養子Ｔ細胞移行モデルにおいて、大腸炎からマウスを保護することができることが予想される。トランスジェニックマウスは、ヒトＴＮＦ－αのみを発現するため、ＴＮＦ－αの過剰発現は、従来のマウスよりも著しく重度の大腸炎を引き起こす可能性がある。このような場合、経口ＳｂｍＴＮＦは、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅとともにＤＳＳによって誘導される重度の大腸炎に対して有意な保護を提供したため、有意な保護が観察された（図４Ａ～４Ｇ）。Ｇ１の高い親和性と強力な中和活性を考慮すると、10^{7}又は10^{8}ＣＦＵの低用量での経口ＦＺ００６の有意な有効性が、対照群と比較して腸の炎症に対して観察され、臨床症状、腸組織損傷、及び炎症を軽減する場合さえあり得る。１つの潜在的な問題は、$CD4^{+}CD45Rb^{hi}$Ｔ細胞を過剰発現するヒトＴＮＦ－αを養子移入されたＲＡＧ$^{-}$／$^{-}$マウスが、通常観察されるよりもはるかに早く腸内炎症及び疾患症状の発症を経験し得ることである。マウスの疾患症状は、早ければＴ細胞移入の６週間後に監視することができる。しかしながら、典型的には、養子Ｔ細胞移入モデルは、再現性が高く、疾患発症の時間ウィンドウは、容易に特定されるはずである。これらの実験に基づいて、ＦＺ００６の治療有効性を試験するための経口酵母投与スケジュールを設計することができる。

【０３１６】

治療有効性を試験する際に、１日当たり最大10^{9}ＣＦＵの酵母の経口用量を使用することができる。ヒト研究では、１日当たり最大２ｇの乾燥Ｓｂが１日当たりのカプセル（4×10^{10}）で投与されている。マウスとヒトとの間の身体サイズの差を考えると、マウスにおける１日10^{9}ＣＦＵの経口酵母は、有意に高い用量である。図２Ｃに示されるように、マウスは、10^{10}ＣＦＵの酵母を毎日経口強制栄養摂取させた後に、約10^{6}～10^{7}ＣＦＵの生存酵母／ｇ糞便のみを除去しており、このことは、溶液中の強制栄養摂取された酵母の大部分が生存しておらず、おそらく胃の酸性度によって死滅したことを示唆している。したがって、これらの実験では、マウスにおいて高い経口用量が使用されているが、結腸に到達する生存酵母の量は、比較的低い。この問題は、乾燥粉末中の生存酵母を腸溶性コーティングカプセルでカプセル化し、生存酵母を胃の酸性度から保護し、治療可能性を実質的に改善し得る将来の製剤開発によって軽減することができる。

【０３１７】

統計分析

Ｓｂ除去及び抗ＴＮＦ－α抗体レベルの差は、フィッシャーの正確確率検定を使用して評価することができる。カプランマイヤー法、ウィルコクソン及びログランク検定を使用して、生存時間及び生存率を比較することができる。臨床症状である体重減少及び下痢の

比較は、分散及び共分散の分析及びダンカン多重比較法を使用して行うことができる。データは、平均±ＳＥＭ又はＳＤとして表される。ＦＺ００６の保護効果は、両側マンホイットニー検定又は対応なしｔ検定のいずれかで分析することができる。全ての統計分析は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　ｖ．６を使用して実行することができ、データは、０．０５未満のＰ値で有意とみなすことができる。

【０３１８】

動物の選択

大腸炎における操作された酵母に対する応答に関する性別の影響は不明である。生物学的変数を減らすために、雄及び雌の両方の動物を使用することができる。マウスについては、１６～２２ｇの体重を有する６～１０週齢のＣ５７ＢＬ／６Ｊを使用することができる。Ｃ５７ＢＬのバックグラウンドを有するＴｇ１００６のブリーダーは、Ｔａｃｏｎｉｃからのものである。各群は、マウス間の差からの実験誤差を最小限に抑えるために、１０～２４匹の動物を有していてもよい。動物の使用、手順、及び力の説明並びに統計分析は、上で提供されている。

【０３１９】

実施例９：養子Ｔ細胞移入大腸炎を伴うＣＤＩの追加の併存疾患モデル

Ｔ細胞移入大腸炎（ＴＣＣ）の方法は、以前に記載した。８週齢の雌Ｃ５７ＢＬ／６ドナーマウス由来のＣＤ４$^{+}$ＣＤ４５Ｒｂ^{hi}Ｔ細胞を調製し、０日目に雌ＲＡＧ$^{-/-}$レシピエントマウスに注射した（図７Ａ）。中等度の大腸炎が、Ｔ細胞注射の３週間後に発症した（ＴＣＣ単独群、図７Ｂ～７Ｄ）。ＣＤＩは、抗生物質カクテル処理に続いてＣ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ胞子の経口強制栄養摂取（ＶＰ１１０４６３、１０^{4}／マウス、図７Ａ）によって誘導され、併存疾患マウスは、重度の大腸炎を発症した（ＴＣＣ＋ＣＤＩ群、図７Ｂ～７Ｄ）。酵母治療のために、マウス群に、Ｓｂ－ａｍＴＮＦ（１０^{9}ＣＦＵ／日／マウス）、Ｓｂ－ＡＢＡＢ（１０^{9}ＣＦＵ／日／マウス）、又はＦＺ００６ｐ（Ｓｂ－ａｍＴＮＦ＋Ｓｂ－ＡＢＡＢ、各々５×１０^{8}ＣＦＵ／日／マウス）を、１９日目から２２日目まで経口投与した（図７Ａ）。マウスを２２日目に安楽死させ、組織学及びインターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）ｍＲＮＡ発現の定量的リアルタイムＲＴ－ＰＣＲ分析のために結腸組織を収集した。切片は、Ｈ＆Ｅ染色され、複数の位置で顕微鏡写真を記録し、２名の治験担当医師によって盲検的に採点された。

【０３２０】

これらの新しい予備データは、経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦが、ＴＣＣマウスにおける結腸組織損傷（図７Ｂ～７Ｃ）及び炎症（図７Ａ）を低減したことを示す。経口Ｓｂ－ＡＢＡＢ単独では、結腸組織におけるＩＦＮ－ｙ　ｍＲＮＡの発現は有意に低減しなかったが（図７Ｄ）、Ｓｂ－ａｍＴＮＦとのその組み合わせは、併存疾患マウスにおける結腸炎症及び組織損傷を実質的に低減し（図７Ｂ～７Ｄ）、併用療法の相乗効果を示している。これらのデータは、経口ＦＺ００６ｐがＣＤＩ及びＤＳＳ大腸炎の併存疾患に対してマウスを有意に保護した図６Ａ～６Ｃに示すものと一致する。

【０３２１】

実施例１０：酵母株の発生及び応用

本実施例は、酵母株の発生のための例示的な方法を示す。^{c}ＭＹＡ－７９６は、ＡＴＣＣ由来の親二倍体株であり、正式にはＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ　Ｍｅｙｅｎ　ｅｘ．Ｅ．Ｃ．Ｈａｎｓｅｎ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｂｏｕｌａｒｄｉｉ又はＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ　ｖａｒ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉとしても知られる）として命名される全ゲノム配列決定株である。ゲノム情報は、ＧｅｎＢａｎｋ　ＪＲＨＹ００００００００　Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｓｐ．「ｂｏｕｌａｒｄｉｉ」株ＡＴＣＣ　ＭＹＡ－７９６の全ゲノムショットガン配列決定プロジェクトから抽出することができる。

【０３２２】

^{d}ＭＹＡ－７９６（ｕｒａ３－／－）は、機能的ｕｒａ３遺伝子の不存在に起因して、^{c}ＭＹＡ－７９６親株上で生成されるウラシル栄養要求性株である。Ｕｒａ３は、ＭＹＡ－

７９６の染色体Ｖ上の遺伝子である。Ｕｒａ３は、ピリミジンリボヌクレオチド（ＲＮＡの構成要素）の合成における１つの反応を触媒する酵素であるオロチジン５’－リン酸デカルボキシラーゼ（ＯＤＣａｓｅ）をコードする。Ｕｒａ３は、陽性及び陰性の両方の選択を可能にし、ｄＭＹＡ－７９６（ｕｒａ３－／－）をゲノム操作のための強力なツールにする。この株を、相同組換えを使用して遺伝子改変し、ｌｏｘｐ－ループアウト戦略と組み合わせた。Ｕｒａ３遺伝子からの二重ノックアウトは、外側で５－ＨＡＬ－ｕｒａ３（４０ｂｐ）及び６－ＨＡＬ－ｕｒａ３（４０ｂｐ）と隣接し、内側でＬｏｘＰ部位と隣接し、ＵＲＡ３遺伝子を置き換える、２つの異なる抗生物質カセットとの相同組換えの１つ又は２つのステップによって生成することができる。両方の抗生物質耐性を有する二重陽性株をスクリーニングし、次いで、ＵＲＡ３二重ノックアウト表現型についての５’－ＦＯＡによる更なるＵＲＡ３逆選択（陰性選択）を完了した。ゲノムＵｒａ３遺伝子のＰＣＲベースの部位特異的欠失及び抗生物質マーカーカセットの挿入を、Ｃｒｅ－ＬｏｘＰを使用して完了し、両方の抗生物質カセットを欠失させた。ＬｏｘＰ（Ｐ１におけるＸ（クロス）オーバーの遺伝子座）部位は、８ｂｐの長さの非対称コアスペーサー配列によって分離された２つの１３ｂｐ長の回文反復からなる３４塩基対長の認識配列（ＡＴＡＡＣＴＴＣＧＴＡＴＡＧＣＡＴＡＣＡＴＴＡＴＡＣＧＡＡＧＴＴＡＴ、配列番号２３）である。Ｃｒｅプラスミドで首尾よく形質転換した後、ＬｏｘＰ部位に隣接する抗生物質マーカーカセットのループアウトを誘導した。Ｃｒｅプラスミド陽性クローンを選択し、その後、選択ストレスなしでクローンを培養することによって、Ｃｒｅプラスミドを自然に失った。元の抗生物質耐性を失い、Ｃｒｅプラスミド選択マーカーを失うが、５’－ＦＯＡ逆選択について陽性のクローンのスクリーニングを行った。抗生物質カセット及びＬｏｘＰｓｃａｒの欠失を確認するために、ＰＣＲ及び配列決定を行った。ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ９はまた、遺伝子を指し示し、所望のバリアントを作製するために使用された。例示的なバリアントとしては、^{e}ＭＹＡ－７９６（ｕｒａ３－／－，ｇａｐ１－／－）、^{f}ＭＹＡ－７９６（ｕｒａ３－／－，ｇａｐ１－／－，ｐｅｐ４－／－）、^{g}ＭＹＡ－７９６（ｕｒａ３－／－，ｇａｐ１－／－，ｐｒｂ１－／－）、^{h}ＭＹＡ－７９６（ｕｒａ３－／－，ｇａｐ１－／－，ｔｈｒ１－／－）、^{i}ＭＹＡ－７９６（ｕｒａ３－／－，ｇａｐ１－／－，ｔｈｒ４－／－）が挙げられる。

【０３２３】

増強され、安定したタンパク質又はポリペプチド（複数可）の発現及び分泌のためのプロテアーゼ遺伝子における変異

酵母ゲノムの高度に発現された領域をこれらの遺伝子座の細胞機構を利用するカセットと統合することによって治療用ポリペプチド（複数可）の発現を最大化することに加えて、タンパク質又はポリペプチド（例えば、治療用ポリペプチド（複数可））の発現、分泌、及び安定性も、プロテアーゼをコードする遺伝子を欠失させることによって増加させた。ｐｅｐ４（酵母プロテイナーゼＡ　Ｐｅｐ４）は、液胞中のタンパク質又はポリペプチドを分解するだけではなく、Ｐｒｃ１（カルボキシペプチダーゼＹ）、Ｐｒｂ１（プロテイナーゼＢ）、及びＬａｐ４（アミノペプチダーゼＩ）などの追加の液胞プロテアーゼを活性化する、液胞アスパルチルヒドロラーゼである）を標的とした。いずれかの理論に拘束されることを望まないが、ｐｅｐ４を欠失させることによって、これらの分解酵素の全てを除去又は成熟を防止することによって目的のタンパク質又はポリペプチド（例えば、治療用ポリペプチド（複数可））の分泌を増加させると仮定した。

【０３２４】

このアプローチの有効性を試験するために、ｐｅｐ４を、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ毒素Ａ及びＢの中和抗体を分泌するＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ株（Ｓｂ－ＡＢＡＢ）から欠失させた。化学変換プロトコルを使用して、Ｓｂ－ＡＢＡＢ細胞を、ジェネティシン又はフレオマイシンのいずれかに対する耐性を付与したＰＣＲ増幅カセットによって形質転換した。これらのカセットの相同性配列は、開始コドンの近くでｐｅｐ４オープンリーディングフレーム及び遺伝子プロモーターの短い配列を完全に除去するように設計された。各耐性遺伝子は、Ｃｒｅレコンビナーゼプラスミドの形質転換による後の除去を可能にするため

に、２つのＬｏｘＰ部位によって囲まれた。例示されたＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株がｇａｐ１変異体であるため、選択可能かつ逆選択可能な遺伝子ｇａｐ１を含むＣｒｅレコンビナーゼプラスミドを設計した。成功したｐｅｐ４標的化組み込みを有する細胞を、ジェネティシン又はフレオマイシンを含むリッチな培地上で選択し、ｐｅｐ４変異体クローンを、コロニーＰＣＲによって確認した。Ｓｂ－ＡＢＡＢ　ｐｅｐ４クローン１０及び６ｂは、ｐｅｐ４変異体であると確認された。

【０３２５】

これらのプロテアーゼヌルクローンを、親Ｓｂ－ＡＢＡＢ細胞、並びにＡＢＡＢ抗体を分泌しない野生型（ＷＴ）酵母及び陰性対照として未播種の培地と並行して、リッチＹＰＤ培地で２４時間培養した。各培養物から上清を収集し、設計されたＥＬＩＳＡプロトコルを使用して試料中のＡＢＡＢの濃度を決定し、続いてＥＬＩＳＡプレートに含まれる濃度参照標準と比較した。設計されたＥＬＩＳＡは、プレートにＣ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ毒素Ｂをコーティングし、ミルクで遮断し、プレートをミルクで希釈した上清でインキュベートし、治療用ポリペプチド（複数可）を標的とするＨＲＰコンジュゲートされた抗体で治療することを含む。結果は、ｐｅｐ４の欠失が、上清中のＡＢＡＢの濃度のおよそ４２％の増加をもたらしたことを示した（図８）。

【０３２６】

細胞内プロテアーゼは、細胞死の後の分泌又は放出のいずれかに起因して、細胞外環境におけるタンパク質又はポリペプチド（例えば、治療用ポリペプチド（複数可））を分解することができるため、ｐｅｐ４の喪失及びそれが活性化する酵素の阻害を試験して、より長い期間にわたって目的のタンパク質又はポリペプチドの安定性の増加が観察されたかどうかを決定した。Ｓｂ－ＡＢＡＢ　ｐｅｐ４ヌルクローンを、酵母の成長中に酸性化した緩衝化されていない最小培地中で対照株と並行して培養した。以前に、２４時間を超えるタンパク質又はポリペプチドの安定性が、緩衝化されていない培地中で低いことが観察された。上清試料を各培養物から２４時間ごとに５日間にわたって収集し、上に概説したＥＬＩＳＡプロトコルを使用してＡＢＡＢ抗体の濃度を決定した。データは、ＡＢＡＢの濃度が、ｐｅｐ４変異体からの試料においてより高く、かつより安定であることを示した（図３６）。治療中に腸内に放出された治療用ポリペプチド（複数可）の分解を最小限に抑えることに加えて、このアプローチは、分泌された目的のタンパク質又はポリペプチドの高く、安定した発現及び精製のためのＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ細胞の使用を可能にする。このアプローチの成功に起因して、そのようなパイプラインによる他の生体治療用酵母株（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株）へのｐｅｐ４変異の導入、及び他のプロテアーゼを個別に、又は他のプロテアーゼ欠失との組み合わせで標的化するための同様の戦略が追求される。これらには、例えば、Ｐｅｐ４の非存在下で阻害されるＰｒｃ１、Ｐｒｂ１、及びＬａｐ４、並びに形質膜局在化プロテアーゼＹｐｓ１の直接的な標的化が含まれる。

【０３２７】

より安全な生物製剤のための主要遺伝子における変異

本実施例は、とりわけ、より安全な生物学的製剤を生成するための重要な遺伝子における変異の使用を示している。経口投与されたＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉプロバイオティクスが、免疫不全集団において真菌血症を引き起こした症例が文書化されている。より安全な生体生物治療製品を作製するために、スレオニン生合成遺伝子に変異を導入した。スレオニン合成経路の上流酵素であるｔｈｒ１の変異は、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅにおいて血清感受性をもたらす可能性がある（Ｋｉｎｇｓｂｕｒｙ　＆　Ｍｃｃｕｓｋｅｒ，２０１０）。いずれかの理論に拘束されることを望まないが、この感受性は、細胞が血清などの低スレオニン環境に曝露されるときの毒性中間分子ホモセリンの蓄積に起因するものであると理解される。Ｔｈｒ４酵素は、この経路でＴｈｒ１のすぐ下流にあり、ホモセリンをリン酸化する。ホスホホモセリンも毒性中間体であるため、ｔｈｒ４ヌル株は、ｔｈｒ１欠失細胞と非常に類似した表現型を示す。

【０３２８】

上述のプロテアーゼ遺伝子の変異について記載したのと同じ戦略を使用して、より安全な酵母治療薬を構築するために、例示的な生体治療用酵母において、ｔｈｒ１又はｔｈｒ４のいずれかを欠失させた。スレオニン栄養要求性クローンをスクリーニングするために、細胞を、リッチ培地（ＹＰＤ）及びスレオニンを欠く最小培地（ＳＤ）の両方でクローンから成長させた。リッチ培地上では成長したが、スレオニンを含まない培地上では成長しなかった複数のクローンを特定し、このことは、スレオニン合成遺伝子が首尾良く欠失していることを示している（図３７）。これらの株はまた、７６ｕｇ／ｍｌのスレオニンを含む、標準濃度で補充されたアミノ酸を含む最小培地上で成長することができなかった（図３８）。ＳＰＥ－ＬＣ－ＭＳ／ＭＳによる分析後のヒト血漿中のスレオニンの濃度は、後で約１６．７μｇ／ｍｌであると報告されており（Ｃａｌｄｅｒｏｎ－Ｓａｎｔｉａｇｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２）、本願発明者らの治療用Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ細胞の成長にとっては不十分である７６μｇ／ｍｌよりもはるかに低いことが報告された。したがって、スレオニン栄養要求性変異体は、真菌血症を引き起こす可能性が低く、より安全な生体生物製剤を作製する。

【０３２９】

患者のための治療薬（例えば、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株）の生体安定性を高めることに加えて、ｔｈｒ１、ｔｈｒ４の栄養要求性変異、及び酵母プラットフォームにおけるｕｒａ３の欠失などもまた、強化された生体封じ込めのための戦略である。患者の腸から排泄されると、治療用酵母（例えば、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株）が成長のために環境から特定のアミノ酸を獲得するため必要性は、それらを環境的により安全にする（図３７）。成長に必要な栄養素が存在する場合であっても、本明細書に記載の操作された酵母は、野生型（ＷＴ）親株ＭＹＡ－７９６と比較して、競合的に適合性が低い。

【０３３０】

適合性のこの低下を示すために、治療用細胞を培養し、２４ウェルプレート中で、それ以外はＷＴバックグラウンドを有するＧＦＰ発現株と競合して継代させる競合アッセイを開発した。密度の違いを考慮した後、プレートリーダーを用いて励起後に培養物から放出されるＧＦＰ蛍光の量を測定した。適合性がより大きい細胞の培養物は、ＧＦＰ＋細胞の割合が減少するにつれて、経時的により少ない蛍光を発するであろう。対照的に、適合性がより小さい酵母の培養物は、ＧＦＰ発現細胞の割合が増加するにつれて、経時的により多くの蛍光を発するであろう。次いで、共培養物の試料を使用して、４日間にわたって毎日新鮮な培地を播種した。

【０３３１】

抗ＴＮＦ－アルファ抗体（Ｓｂ－抗ＴＮＦ－アルファ）を両方とも分泌する２種類の酵母株をＧＦＰ＋酵母と共培養した。両方のＳｂ－抗ＴＮＦ－アルファ株もまた、ｕｒａ３変異体であった。一方の株において、抗体カセットの組み込みは、マーカーとしてｕｒａ３を使用するために選択され、一方、ＤＨＦＲ遺伝子は、第２の株において選択のために使用された。ウラシル原栄養性株からの蛍光は、一連の実験にわたって、ＷＴ及びＧＦＰ＋細胞の対照共培養物と同様のままであった（ＧＦＰ＋、図３９）。しかしながら、ＤＨＦＲ競合からの蛍光は、１日目のＷＴ対照より高く、ＧＦＰ発現細胞のみを含有したＧＦＰ＋対照培養物のレベルまで増加した。ＤＨＦＲ遺伝子の存在が、観察された適合性の低下に寄与するかどうかは調査中であるが、これらのデータは、ｕｒａ３変異体がウラシル原栄養性株よりも競争的に適合性が低いことを示唆している。

【０３３２】

ｕｒａ３、ｔｈｒ１、及びｔｈｒ４を含む導入された栄養要求性変異は、環境に対する本願発明者らの治療用株の安全性を高める効果的な生体封じ込め戦略であるように思われる。ウラシル及びスレオニン生合成経路並びに他の経路の両方において、他の栄養要求性遺伝子も試験することが想定される。一般的に利用される酵母遺伝子マーカーは、ｔｒｐ１（トリプトファン）、ｌｙｓ２（リジン）、ｈｉｓ３（ヒスチジン）、ｌｅｕ２（ロイシン）、及びこれらのアミノ酸の合成に関与する酵素をコードする他の遺伝子などを標的

とする。

【０３３３】

実施例１１：ＤＳＳ及び細菌性大腸炎

本実施例は、操作されたＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ（経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦ又はＦＺ００６ｍ）を介した抗ＴＮＦ－α中和抗体の腸内送達が、腸内炎症及び組織損傷を低減することによって疾患の重症度を有意に改善することを示す。抗マウスＴＮＦ－αを発現する操作されたＳｂは、ＤＳＳ及びＣｌｏｓｔｒｉｄｉｏｉｄｅｓ ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ感染によって引き起こされるＤＳＳ大腸炎又は大腸炎からマウスを保護するのに有効である。まず、ＴＮＦ－α中和抗体の腸管送達が、デキストラン硫酸ナトリウム（ＤＳＳ）－大腸炎の症状を改善するかどうかを試験した。マウスは、前述のように、２％ＤＳＳを含む水を８日間飲み続けた（例えば、Ｗｉｒｔｚ，Ｓ．，ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｐｒｏｔｏｃ １２，１２９５－１３０９（２０１７）を参照されたい）。３日目に開始して、マウスに10^9ＣＦＵのＳｂ－ａｍＴＮＦを１１日間にわたって毎日強制栄養摂取させた。対照群には、同量のＳｂ－ＥＰ対照又はＰＢＳを強制栄養摂取させた。図４Ａは、経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦで治療されたこれらのマウスはいずれも死亡しなかったが、対照群ではマウスの２０％が死亡したことを示す。ＤＳＳ－大腸炎単独では、マウスにおいて有意な死亡という臨床的結果を誘導しなかったため、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ感染と併存するＤＳＳ大腸炎の顕著に重篤な腸内炎症モデルを利用した（例えば、Ｚｈｏｕ，Ｆ．，ｅｔ ａｌ．Ｉｎｆｌａｍｍ Ｂｏｗｅｌ Ｄｉｓ ２４，５７３－５８２（２０１８）を参照されたい）。この併存疾患モデルでは、マウスが重度の腸内炎症、組織損傷を発症し、マウスの８０％が死亡した。ＴＮＦ－αが有意に上方制御されたため、操作されたＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉによって腸に送達された抗ＴＮＦ－α抗体が、疾患の重症度を改善し、腸の炎症を軽減するかどうかを試験した。併存疾患マウス群に、ＰＢＳ、Ｓｂ－ＥＰ、又はＳｂ－ａｍＴＮＦを10^9ＣＦＵ／用量で、－３日目から７日目まで毎日経口投与した（合計１１用量）。ＰＢＳ及びＳｂ－ＥＰ対照群では、顕著な体重減少が明らかであり、マウスの約８０％がこの疾患により死亡していたが、経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦは、体重減少が有意に低く、実質的な保護を与え（図４Ｂ）、マウスの４０％が死亡した（図４Ｃ）。結腸炎症誘発性サイトカインＴＮＦ－α（図４Ｄ）及びＩＬ－６（図４Ｅ）の上方制御もまた有意に減少した。その後、経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦで治療されたマウスにおいて、結腸の長さの減少及び組織損傷もまた有意に改善された（図４Ｆ及び４Ｇ）。

【０３３４】

実施例１３：ヒト結腸組織

Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ毒素は、炎症誘発性であり、動物及びヒトの両方で大腸炎を誘導する（例えば、Ｙｕ，Ｈ．，ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ Ｖａｃｃｉｎｅ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２４（２０１７）、Ｚｈａｎｇ，Ｙ．，ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ Ｍｏｌ Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ Ｈｅｐａｔｏｌ ５，６１１－６２５（２０１８）を参照されたい）。経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦは、マウスにおける結腸炎症を減少させる（図４Ａ～４Ｇ及び図７Ａ～７Ｄ）。Ｓｂ－ａｈＴＮＦ（ＦＺ００６）は、ヒトＴＮＦ－αに対する抗体を発現するため、Ｓｂ－ａｈＴＮＦがヒト結腸組織における炎症誘発性サイトカインのＣ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ毒素によって誘導される発現を低下させたかどうかを評価した。図１１の結果は、対照Ｓｂ－ＥＰ培養物からの上清が、ヒト結腸組織におけるＴＮＦ－αのＴｃｄＢによって誘導される上方制御を有意に低下させたことを示し、これは、本明細書に提示される結果及びこのプロバイオティクス酵母の抗炎症特性の他の報告と一致する（例えば、Ｓｏｕｇｉｏｕｌｔｚｉｓ，Ｓ．，ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ ３４３，６９－７６（２００６）、Ｃａｓｔａｇｌｉｕｏｌｏ，Ｉ．ｅｔ ａｌ．Ｉｎｆｅｃｔ Ｉｍｍｕｎ ６４，５２２５－５２３２（１９９６）、Ｐｏｔｈｏｕｌａｋｉｓ，Ｃ．Ａｌｉｍｅｎｔ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ Ｔｈｅｒ ３０，８２６－８３３（２００９）を参照されたい）。Ｓｂ－ａｈＴＮＦ培養物からの上清は、ＴＮＦ－αの上方制御を更に低下させ（図１１、Ｓｂ－ＥＰ対Ｓｂ－ａｈＴＮＦ、Ｐ＝０．００１）、このことは、ＳｂによるＴＮＦ－αに対する中和抗体の分泌が、ヒト結腸組織における

ＴｃｄＢの炎症誘発活性を減少させることを示している。

【０３３５】

経口Ｓｂ－ａｍＴＮＦ投与は、抗薬物応答を誘導しない。ＳｂａｍＴＮＦは、ヒトＦｅと融合した二価ＶＨＨを構成的に発現する。Ｓｂ－ａｍＴＮＦの長期の繰り返し経口投与が、薬物活性を潜在的に低下させる可能性のある抗抗体応答を誘導するかどうかを決定するために実験を行った。８週間にわたるＳｂ－ａｍＴＮＦの３６回の経口投与（10^9ＣＦＵ／用量）の後、マウスは、糞便において検出可能な抗体ＩｇＡを産生せず、又は血清においてＩｇＧを産生することができなかったが、一方で、精製されたＶＨＨ／ＶＨＨ－Ｆｃを注射されたそれらのマウスは、強力な抗体ＩｇＧ応答を誘導した（図１２Ａ～１２Ｂ）。

【０３３６】

実施例１４：例示的な目的の遺伝子（ＧＯＩ）

本実施例は、治療用ポリペプチド（複数可）をコードする例示的な核酸（目的の遺伝子（ＧＯＩ））の概要を示す。表１４．１は、例示的なＧＯＩをまとめている。

【表１８－１】

表１４．１：例示的なＧＯＩ

GOI	概要
ABAB	ABAB は、Clostridioides difficile(*C.difficile*)の毒素 A 及び毒素 B を強力かつ広範に中和する四重特異的抗体である。ABAB は、4 つの単一ドメイン抗体(VHH)、毒素 A の 2 つの異なるエピトープに対する 2 つの結合、及び毒素 B の 2 つの異なるエピトープに対する 2 つの結合の融合体である。ABAB は、*C.difficile* 感染(CDI)及び CDI との併存疾患を治療するように設計されている。
抗 TNF-α (抗腫瘍壊死因子α)	抗 TNF-α は、重要な炎症性サイトカイン TNF-α を中和する抗体である。TNF-α は、腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリーに属する多機能性炎症誘発性サイトカインである。このサイトカインは、主にマクロファージによって分泌され、その受容体 TNFRSF1A/TNFR1 及び TNFRSF1 B/TNFBR への結合を介してその機能を示す。TNF-アルファ発現の調節障害は、炎症性腸疾患(IBD)、関節リウマチ(RA)、及び強直性脊椎炎(AS)を含む多くの自己免疫疾患における重要な病原性機構であると考えられている。抗 TNF-α 抗体は、IBD などの GI 炎症を治療するように設計される。
抗 mTNF-α	抗マウス TNF-α (抗 mTNF-α)、マウス TNF-α に特異的に結合する Fc 断片と融合した VHH のホモ二量体、及び L929 細胞に対するマウス TNF-α によって誘導される細胞傷害性の遮断。
抗ヒト TNF-α VHH (抗 hTNF-α)	hTNF-α に特異的であり、L929 細胞に対する hTNF-α によって誘導される細胞傷害性を中和する、ヒト化 VHH モノマー。
抗ヒト TNF-α-VHH、G1 (抗 hTNF-α)	hTNF-α に高度に特異的であるが、高濃度で mTNF-α への結合は非常に弱い、ヘテロ二量体 VHH 抗体。特異的結合の EC50 は、0.112nM であり、ヒュミラの特異的結合の EC50 よりも 3 倍以上少ない(ヒュミラの EC50 は 0.390nM である)。抗ヒト TNF-α VHHs の IC50 は、1.2pM であり、hTNF-α によって誘導される細胞傷害性を遮断するのに、ヒュミラの細胞傷害性と比較して 20 倍強力である(IC50:28pM)。それは、その受容体 TNFR1 及び TNFR2 の両方に対する hTNF-α 結合を阻害する。動態パラメータは、9.725E-10(M)の KD、3.110E+5(1/ms)の Ka、3.107E-4(1/ms)の Kd である。
抗ヒト TNF-α-VHH-Fc, A3 (抗 hTNF-α-Fc)	hTNF-α に高度に特異的であり、mTNF-α にほとんど結合しない、抗ヒト TNF-α-VHH の Fc 融合ヒト化 VHH 単量体。特異的結合の EC50 は、0.141nM であり、ヒュミラの特異的結合の EC50 よりも約 3 倍少ない(ヒュミラの EC50 は 0.390nM である)。抗ヒト TNF-α-VHH は、ヒュミラと比較して、中和活性において 4 倍高い効力を有する(IC50:28pM)、IC50 は 7pM である。それは、その受容体 TNFR1 及び TNFR2 の両方に対する hTNF-α 結合を阻害する。動態パラメータは、2.999E-10(M)の KD、6.257E+5(1/ms)の Ka、1.877E-4(1/ms)の Kd である。

【表１８－２】

マウス-IL-22 (mIL-22)	IL-22 は、炎症部位での免疫細胞のいくつかの集団によって産生される IL-10 ファミリーサイトカインである。これは、非造血細胞(主に間質細胞及び上皮細胞)に効果を発揮する。これは、炎症中の組織応答の調節にとって重要である。Stat3 シグナル伝達カスケードの活性化を通じて、サイトカインは、上皮の完全性を維持し、組織損傷を防止し、その修復を助けるのに役立つ、抗微生物分子だけでなく、増殖性及び抗アポトーシス経路を誘導する。
抗ヒト IL-17A-Fc (抗 hIL-17A-Fc)	抗 hIL-17A-Fc は、hIL-17 に対する Fc 融合 VHH 単量体である。この抗体は、hIL-17 に特異的に結合し、hIL-17A の受容体を安定的に発現したヒト IL-17 レポーターHEK293 細胞の IL-17A によって誘導された細胞増殖の阻害を媒介する。その標的である hIL-17 は、IL-17 ファミリーのメンバーである。IL-17A は、様々な炎症誘発性サイトカイン及びケモカインを誘導し、好中球を動員し、抗体産生を増強し、T 細胞を活性化させることによって炎症を促進する。IL-17A の発現は、多発性硬化症及び関節リウマチなどの自己免疫疾患においても強化される。
カナキヌマブ (抗 IL1 ベータ) (yCAN-sc-FV-Fc)	yCAN-sc-FV-Fc は、Fc 断片と融合した sc-FV 形成抗体である。sc-FV 部分は、カナキヌマブの重鎖及び軽鎖で構成される。それは、hIL-1 ベータを標的とする。IL-1βを中和することによって、予備的証拠は、カナキヌマブが、1)抗腫瘍免疫応答を増強し、2)腫瘍細胞の増殖、生存及び侵襲性を低下させ、3)血管新生を損なうように、腫瘍促進炎症(PTI)を阻害することを示唆する。腫瘍促進炎症は、がんを引き起こすプロセスを促進し、抗腫瘍免疫応答を抑制することによって、腫瘍発生を可能にする。
ギムシルマブ (抗 GM-CSF) (yGIM-sc-FV-Fc)	yGIM-sc-FV-Fc は、Fc 断片と融合した sc-FV 形式の抗体である。sc-FV 部分は、ギムシルマブの重鎖及び軽鎖で構成される。それは、骨髄細胞成長因子であり、かつ炎症促進性サイトカインである、コロニー刺激因子 2(CSF2)としても知られているヒト顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)である。「サイトカインストーム」及び組織に浸潤及び損傷を与える炎症性骨髄細胞の過剰活性化を特徴とする急性かつ重度の段階では、GM-CSF の阻害は、この病態を逆転させることができる可能性がある。GMCSF は、大腸炎モデルにおいて慢性炎症の主要なメディエーターとして特定されている。GM-CSF 欠損マウスは、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)によって誘導される大腸炎においてより重度の大腸炎を発症したことを報告した。GM-CSF は、マクロファージ表現型を調節して腸線維症を予防する。IBD における GM-CSF の潜在的な有益な役割に沿って、GM-CSF 投与により、一部の患者において IBD を改善することができる。高レベルの循環抗 GM-CSF 自己抗体が、より悪いクローン病(CD)の予後と相関することが見出されている。

【表１８－３】

ヒュミラ (抗 TNF-アルファ) (yHUM-sc-FV-Fc)	yHUM-sc-FV-Fc は、Fc 断片と融合した sc-FV 形式の抗体である。sc-FV 部分は、ヒュミラの重鎖及び軽鎖で構成される。HUMIRA は、TNF 遮断剤である。HUMIRA は、成人の中等度から重度の関節リウマチ(RA)、成人の乾癬性関節炎(PsA)、2 歳以上の子供の中等度から重度の多関節若年性特発性関節炎(JIA)、成人の強直性脊椎炎(AS)、12 歳以上の人々の中等度から重度の化膿性汗腺炎(HS)の徴候及び症状を軽減するためのものである。ヒュミラは、IBD の症状を軽減するだけでなく、炎症を起こした腸の治癒をもたらすことも示されている。ヒュミラはまた、成人及び 5 歳以上の子供において中等度から重度の潰瘍性大腸炎を治療するために使用される処方薬である。また、成人及び 6 歳以上の子供において中等度から重度のクローン病(CD)を治療するためにも使用される。
アバスチン (抗 VEGF) (yAVA-sc-FV-Fc)	yAVA-sc-FV-Fc は、Fc 断片と融合した sc-FV 形式の抗体である。sc-FV 部分は、アバスチンの重鎖及び軽鎖で構成される。アバスチンは、新しい血管の成長を防止することが示される血管内皮成長因子(VEGF)阻害剤である。それは、結腸がんを含む異なる持続性がん、再発性がん、又は転移性がんを治療するために、他の抗がん薬又はサイトカインと併用することが承認されている。
マブリリムマブ (抗 GM-CSF 受容体) (yMAV-sc-FV-Fc)	yMAV-sc-FV-Fc は、Fc 断片と融合した sc-FV 形式の抗体である。sc-FV 部分は、マブリリムマブの重鎖及び軽鎖から構成される。マブリリムマブは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体アルファ(GM-CSFRa)を標的とする治験用の完全ヒトモノクローナル抗体である。現在、GM-CSF 受容体に対するモノクローナル抗体であるマブリリムマブが、COVID-19 肺炎及び全身性高炎症を有する患者の臨床的結果を改善するかどうかの評価に関する Lancet からの報告が発表されている。残念ながら、14 日目の酸素療法の生存患者と非生存患者の割合に有意差はなかったが、この患者集団におけるマブリリムマブ療法の有益性又は有害性は、広い信頼区間を考慮すると依然として可能であるが、より大きな試験を完了すべきである。
シルツキシマブ (抗 IL6) (ySIL T-sc-FV-Fc)	ySIL T-sc-FV-Fc は、Fc 断片と融合した sc-FV 形式の抗体である。sc-FV 部分は、シルツキシマブの重鎖及び軽鎖から構成される。シルツキシマブは、キメラ(ヒト-マウス)モノクローナル免疫グロブリン G1-カッパ抗体である。シルツキシマブは、ヒトインターロイキン-6(IL-6)との高親和性複合体を形成することによって、可溶性かつ膜結合型 IL-6 受容体に対する IL-6 の結合を防止する。その使用は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)陰性及びヒトヘルペスウイルス 8(HHV-8)陰性の多中心性キャッスルマン病(MCD)を有する成人患者の治療のために示される。MCD は、IL-6 産生の調節不全、リンパ球の増殖、及びその後のリンパ節の拡大によって引き起こされるまれな血液疾患である。
yeGFP	酵母における遺伝子発現の定量的レポーターである yeFGP(酵母強化緑色蛍光タンパク質)yeFGP は、発現レベルを観察するための迅速なツールである。

【０３３７】

遺伝子挿入の方法の概要を図１３に示し、操作されたＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ株の発生に使用される相同性アームの例示的なＤＮＡ配列を図１４に示す。

【０３３８】

実施例１５：破壊的な部位特異的及びＴｎベースの挿入

本実施例は、破壊的な部位特異的及びＴｎベースの挿入を示す。Ｓｂ株（ｕｒａ３－／－及びｇａｐ１－／－）を、従来の（エンズアウト型）相同組換えを介してゲノムへと統合するために、１０μｇの異なるサイズの線状ＤＮＡによりエレクトロポレーションした。デルタ部位における形質転換効率は、それぞれ、約２ｋｂカセット及び約３ｋｂカセッ

トについて、シグマ部位よりも４．３倍及び５．９倍高かった（図１６）。興味深いことに、統合のためのＣＲＩＳＰＲの使用は、デルタ部位での形質転換効率の３倍の低下（約２ｋｂカセット）及び１００倍以上の低下（約３ｋｂカセット）をもたらしたが、シグマ部位の形質転換効率を改善又は低下させなかった。シグマ部位については、線状ＤＮＡの量を約３ｋｂカセットについて２０μｇまで増加させることにより、形質転換効率が４．１倍増加したが、一方で、デルタ部位は、同じものにおいて６４．５倍劇的に増加した。

【０３３９】

Ｓｂ株（ｕｒａ３－／－及びｇａｐ１－／－）を、シグマ部位又はデルタ部位での組み込みを標的としたｙｅＧＦＰ発現カセットでエレクトロポレーションした。単一コロニーをリッチ培地（ＹＰＤ）又は最小培地で２４時間培養し、続いてＦＡＣＳ分析を行い、ｙｅＧＦＰ蛍光を測定した。一般に、デルタ部位にｙｅＧＦＰを有するクローンは、シグマクローンよりも２８％～３６％高い蛍光を有しており、デルタクローンにおいてより高いｙｅＧＦＰ発現を暗示している。シグマ群及びデルタ群からの代表的なクローンを示している。比較のために、ｕｒａ３－遺伝子座にｙｅＧＦＰカセットを有するＳｂ－Ｃｈ－ｙｅＧＦＰは、シグマ又はデルタクローンよりも３６％～５６％少ないｙｅＧＦＰ蛍光強度を示し、ｕｒａ－遺伝子座からの全体的な低いｙｅＧＦＰ発現を示唆している（図１７）。

【０３４０】

実施例１６：例示的な最終構築物（ＦＩＣ）の生成及びその評価

本実施例は、プロバイオティクス酵母形質転換のための抗体遺伝子形式、プロモーター、及び選択マーカーの異なる組み合わせを有する例示的な最終構築物（ＦＩＣ）の生成（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の生成）を示す。まず、得られたプラスミドを、制限消化（図５７）及びＤＮＡ配列決定によって診断した。選択マーカーとともに導入遺伝子カセットを、コンピテントなＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉにエレクトロポレーションし、酵母を寒天プレート上にプレーティングした。選択プレートからの単一コロニーを収集し、導入遺伝子カセットの補正ゲノム挿入を伴って、それらのクローンの選択のための特定の化学物質を含有する合成培地で培養した。２ラウンドのスクリーニングを実施した。第１ラウンドでは、各ＦＩＣ構築物からの合計およそ２００個のクローンを、ＥＬＩＳＡによって、二重特異的抗体の発現について評価した（図５３Ａ）。具体的には、上清中のＦｃ融合ポリペプチドを、９６ウェルプレート中でコーティングされたストレプトアビジンによって捕捉し、ＨＲＰコンジュゲートされた抗ヒトＩｇＧ１重鎖抗体を使用して検出した。このアッセイは、高発現株を同定するための異なるクローン間の総Ｆｃ融合ポリペプチドの評価を可能にした（図５３Ａ）。その後のスクリーニングラウンドにおいて、最も高いタンパク質又はポリペプチド（例えば、治療用ポリペプチド（複数可））発現を有するおよそ６～１０個のクローンを、組換えＴＮＦ－α（図５３Ｂ、左）及び組換えＩＬ－１７Ａ（図５３Ｂ、右）に対して、ＥＬＩＳＡによって更に評価した。これらのデータは、ＶＨＨ１－ＶＨＨ２－Ｆｃ形式を有するカセットが、ＴＮＦ－α及びＩＬ－１７Ａの両方に対してＥＬＩＳＡによって最も高い発現レベルを示したことを示し（図５３Ｂ）、したがって、ＦＩＣ番号５（ＦＩＣ５）からのこれらのクローンを機能アッセイのために選択した。

【０３４１】

ＦＩＣ５クローンを更に評価するために、細胞ベースの中和アッセイを使用した。酵母クローンによって分泌される二重特異的抗体の抗ＴＮＦ－α中和活性を測定するために、連続的に希釈した上清を、Ｌ９２９細胞に適用する前に、ヒトＴＮＦ－α（１０ｐＭ）と混合した。２４時間のインキュベーションの後、ＴＮＦ－α媒介性細胞傷害性の抗体媒介性阻害を測定した（図５４、左）。酵母クローンによって分泌される二重特異的抗体の抗ＩＬ－１７Ａ中和活性を評価するために、連続的に希釈した上清を、ＨＥＫ２９３レポーター細胞に適用する前に、ヒト組換えＩＬ－１７Ａ（１０ｎｇ／ｍＬ）と混合した。ヒトＩＬ－１７Ａの生体活性は、レポーターＨＥＫ２９３細胞によって測定することができるため、ＩＬ－１７Ａの生体活性の抗体媒介阻害を測定した（図５４、右）。クローンＧ７

－Ｅ１（ＦＺ００８とも称される）からの上清は、ＴＮＦ－α及びＩＬ－１７Ａの両方に対する高い中和活性を示した。

【０３４２】

したがって、プロモーターＰ２が、例示的な抗ＴＮＦ－α／ＩＬ－１７Ａ二重特異的抗体のより高い分泌を促進したことが決定された。２つの例示的な形式であるＶＨＨ－ＶＨＨ－ＦｃとＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨとの間の生物活性は同等であったが、前者の形式は、プロバイオティクス酵母において、より高い発現をもたらした。選択マーカーは、抗体の全体的なスクリーニング又は発現に特に影響を与えなかった。

【０３４３】

実施例１７：Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の例示的な生成及び特性決定

本実施例は、本明細書に記載のＳａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の例示的な生成及び特性決定を示す。

【０３４４】

図１５～１７は、破壊的な部位特異的及びＴｎベースの挿入を示す。

【０３４５】

図５０～５２は、酵母染色体の統合及びその診断的消化のための最終的な統合カセットを生成するためのステップを示す。

【０３４６】

図１８～２０は、異なる挿入された位置（例えば、ｐＴＥＦ、ｐＴＤＨ３、及びデルタ部位）間の抗毒素ＡＢＡＢの発現及びクローンの安定性を示す。

【０３４７】

図２１は、異なる挿入された位置（例えば、ｐＴＥＦ、ｐＴＤＨ３、及びデルタ部位）間のｈＴＮＦα－Ｆｃの発現の比較を示す。

【０３４８】

図２２～３２は、栄養要求性Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ酵母株の例示的な生成及び検証を示す。

【０３４９】

図３３～図３５は、ＤＨＦＲ／ＤＦＲ１系を示す。

【０３５０】

図２３５～２５１は、Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉに対するＦＺＥ１（メトトレキサート及びスルファニルアミド）選択の発生を示す。

【０３５１】

図３６は、ポリペプチド安定性を増加させるためのプロテアーゼ遺伝子を欠失する使用を示す。

【０３５２】

図３７～３９、５５～５７は、例示的な栄養要求性株の生成を示す。

【０３５３】

図４０～４２は、抗ＴＮＦ－α　ＶＨＨ３を発現するための例示的なＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉの操作された株及びその特性決定を示す。

【０３５４】

図４３～４５は、Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉによる機能的Ｓｃ－ＦＶ－Ｆｃ抗体の発現、並びにＳ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉによる機能的なＶＨＨ、ＶＨＨ－Ｆｃ、ＶＨＨ－Ｓｃ－ＦＶ、ＶＨＨ－Ｆｃ－ＶＨＨ抗体の発現を示す。

【０３５５】

図４６～４９は、マウス肥満モデルにおけるＦＺ０１０ｍの例示的な使用を示す。

【０３５６】

図５３～５４は、ゲノム挿入（発現及び細胞ベースの中和）のための構築物の例示的な評価を示す。

【０３５７】

図５８～６３は、ＦＺＭＹＡ０６－１６の例示的な特性決定を示す。例示的な特性決定としては、成長表現型の評価、抗生物質カセットの部位特異的欠失のＰＣＲ確認、ｕｒａ３及びｇａｐ１遺伝子座におけるＬｏｘＰ－ｓｃａｒの配列決定、成長曲線、及び抗生物質耐性が挙げられる。

【０３５８】

図６４～６５は、例示的な核酸（例えば、ＧＯＩカセットを含むプラスミド）及びＧＯＩカセットの挿入の概略図を示す。

【０３５９】

図６１～６２は、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ酵母の操作された株の例示的な生成を示す。

【０３６０】

図６８～１０２は、Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉ発現四重特異的抗毒素ＡＢＡＢの操作された株（例えば、ＦＺ００２）の例示的な生成及び特性決定を示す。

【０３６１】

図１０３～１２９は、酵母提示免疫ライブラリからスクリーニングされ、Ｆｃ断片と融合した単一のＶＨＨを構成的に発現し、ｈＴＮＦα、ブタＴＮＦα、及びサルＴＮＦαを中和する、Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉの操作された株（例えば、ＦＺ００６ｈ）の例示的な生成及び特性決定を示す。

【０３６２】

図１３０～１３５は、ｍＴＮＦαを中和するＶＨＨ二量体を構成的に発現し、Ｆｃ断片と融合した、Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉの操作された株（例えば、ＦＺ００６ｍ）の例示的な生成及び特性決定を示す。

【０３６３】

図１３６～１５２は、ｈＴＮＦα及びｈＩＬ－１７Ａを中和する、Ｆｃ断片と融合した二重特異的ＶＨＨを構成的に発現する、Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉの操作された株（例えば、ＦＺ００８）の例示的な生成及び特性決定を示す。

【０３６４】

図１５３～１６４は、Ｆｃ断片と融合した機能的マウスＩＬ－２２を構成的に発現する、Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉの操作された株（例えば、ＦＺ０１０ｍ）の例示的な生成及び特性決定を示す。

【０３６５】

図１６５～１７８は、Ｆｃ断片及びアプロチニンと融合した抗ロタウイルスＶＨＨ（２ＫＤ１）を構成的に発現する、Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉの操作された株（例えば、ＦＺ０１４）の例示的な生成及び特性決定を示す。

【０３６６】

図１７９～１８７は、ノロウイルスに対するＦｃ断片（Ｍ６Ｍ５－Ｆｃ及びＭ６Ｍ４－Ｆｃ）と融合した抗ノロウイルス二重特異的ＶＨＨを構成的に発現する、Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉの操作された株（例えば、ＦＺ０１６）の例示的な生成及び特性決定を示す。

【０３６７】

図１８８～２１４は、抗ｈＴＮＦα及び抗毒素ＡＢＡＢを構成的に発現する、Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉの操作された株（例えば、ＦＺ０２０）の例示的な生成及び特性決定を示す。

【０３６８】

図２１５～２２０は、レプチンポリペプチド（例えば、ヒト活性レプチン）を構成的に発現する、Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉの操作された株（例えば、ＦＺ０２４）の例示的な生成及び特性決定を示す。

【０３６９】

図２２１～２２５は、ｃｗｐ８４に対してＶＨＨを構成的に発現し、Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅを特異的に溶解することができるＣＤＩのリジンドメインと融合した、Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉの操作された株（例えば、ＦＺ０２８）の例示的な生成及び特性決定を示す

。

【０３７０】

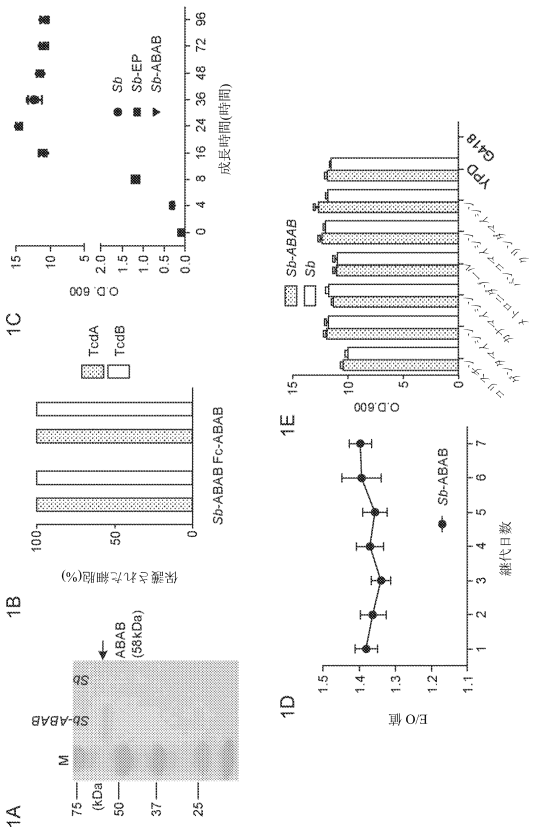
図２２６～２３４は、Ｎ末端又はＣ末端で変異体Ｆｃ断片と融合していないか、又は融合したＩＬ－２２ポリペプチド（例えば、機能的ヒトＩＬ－２２）を構成的に発現する、Ｓ．ｂｏｕｌａｒｄｉｉの操作された株（例えば、ＦＺ０１０ｈ）の例示的な生成及び特性決定を示す。

【０３７１】

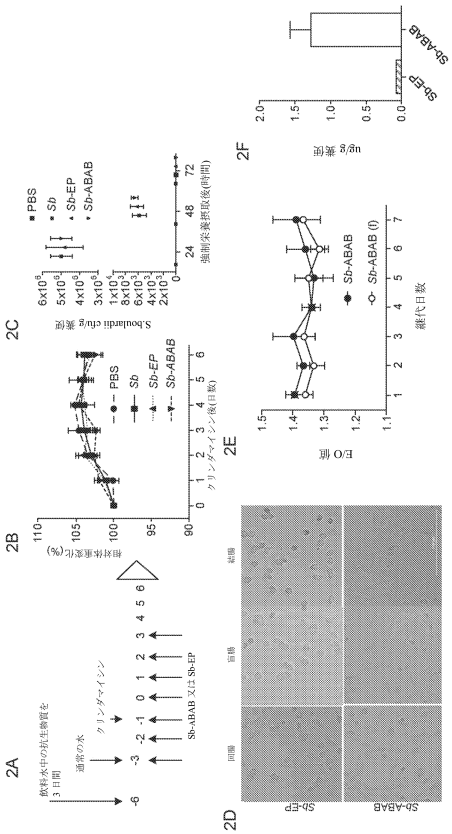
本開示の上述の実施形態が、本開示の原理の明確な理解のために記載された実装例の単なる可能な例であることを強調すべきである。本開示の趣旨及び原理から実質的に逸脱することなく、上述の実施形態（複数可）に対して多くの変形及び修正を行うことができる。かかる修正及び変形は全て、本開示の範囲内に本明細書に含まれ、以下の特許請求の範囲によって保護されることが意図される。

【図面】

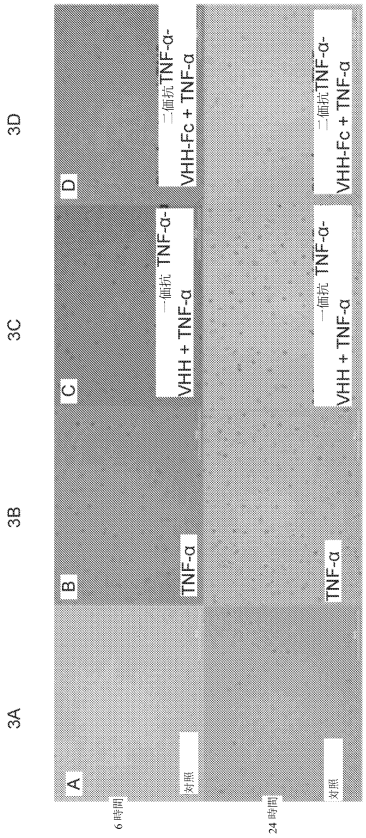
【図１】



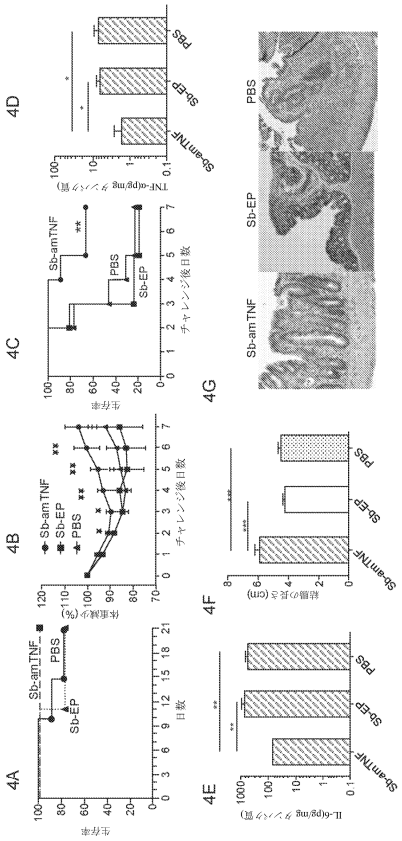
【図２】



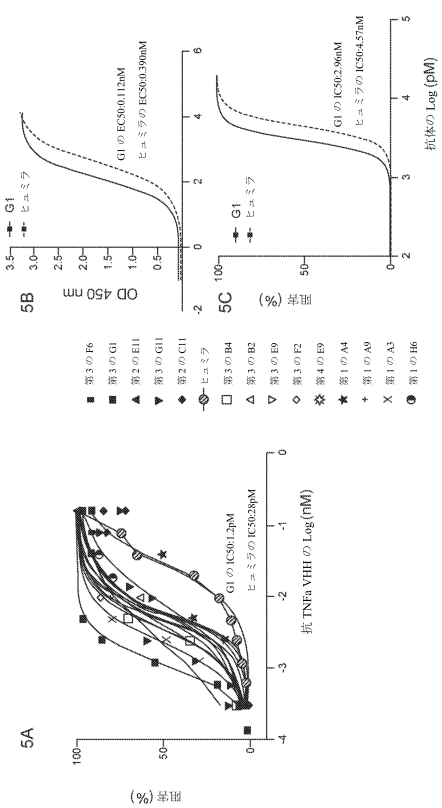
【図３】


3A
3B
3C
3D
A
B
C
D
6 時間
24 時間
対照
TNF-α
一価抗 TNF-α+ VHH + TNF-α
二価抗TNF-α- VHH-Fc + TNF-α
対照
TNF-α
一価抗 TNF-α- VHH + TNF-α
二価抗TNF-α- VHH-Fc + TNF-α

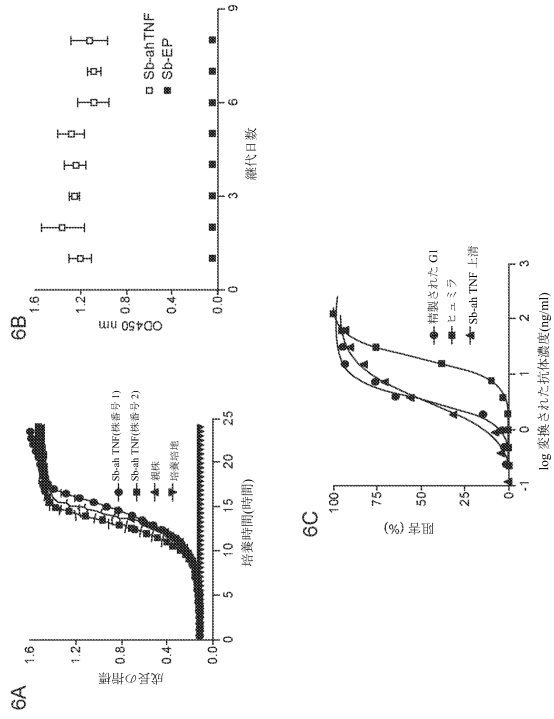
【図４】


4A
生存率
日数
Sb-amTNF
PBS
Sb-EP
4B
体重減少(%)
チャレンジ後日数
4C
生存率
チャレンジ後日数
4D
TNF-α(pg/mg タンパク質)
4E
IL-6(pg/mg タンパク質)
4F
結腸の長さ(cm)
4G
Sb-amTNF
Sb-EP
PBS

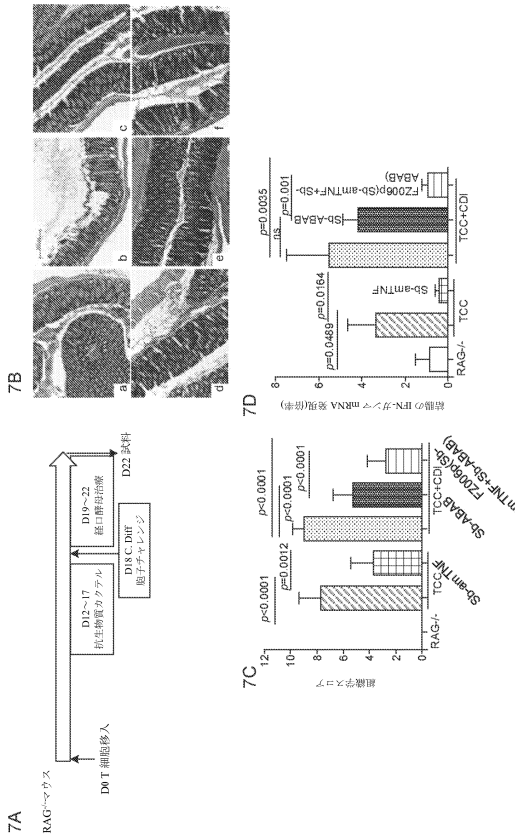
【図５】


5A
阻害(%)
G1 の IC50:1.2pM
ヒュミラの IC50:28pM
抗 TNFa VHH の Log (nM)
第3の F6
第3の G1
第2の E11
第3の G11
第2の C11
ヒュミラ
第3の B4
第3の B2
第3の E9
第3の F2
第4の E9
第1の A4
第1の A9
第1の A3
第1の H6
5B
OD 450 nm
G1
ヒュミラ
G1 の EC50:0.112nM
ヒュミラの EC50:0.390nM
5C
阻害(%)
G1
ヒュミラ
G1 の IC50:2.96nM
ヒュミラの IC50:4.57nM
抗体の Log (pM)

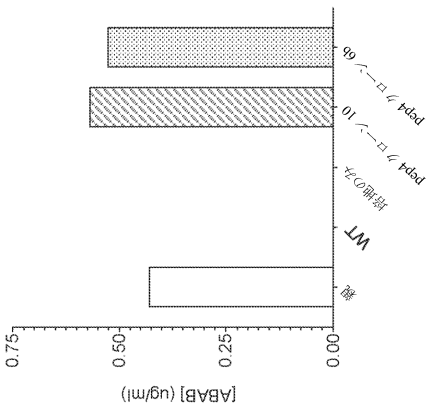
【図６】


6A
抗原の指標
Sb-ah TNF(供給号 1)
Sb-ah TNF(供給号 2)
親株
培養培地
培養時間(時間)
6B
OD450 nm
Sb-ah TNF
Sb-EP
継代日数
6C
阻害(%)
精製された G1
ヒュミラ
Sb-ah TNF 上清
log 変換された抗体濃度(ng/ml)

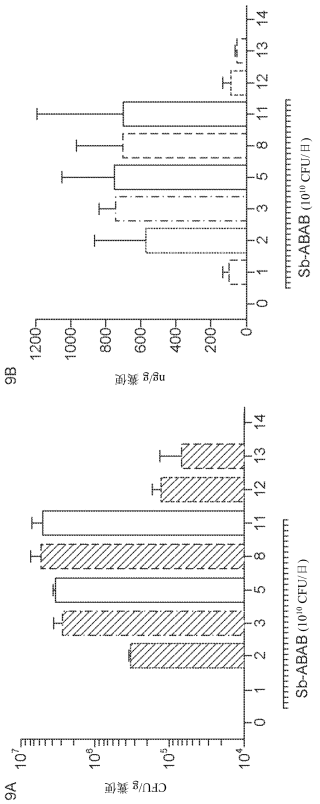
【図７】


7A
RAG-/-マウス
D0 T 細胞移入
D12～17 抗生物質カクテル
D18 C. Diff 感染チャレンジ
D19～22 経口酢酸溶液
D22 試料
7B
a
b
c
d
e
f
7C
組織学スコア
RAG-/-
TCC
Sb-amTNF
Sb-ABAB
FZ006p(Sb-amTNF+Sb-ABAB)
TCC+CDI
p<0.0001
p=0.0012
p<0.0001
p<0.0001
7D
前臨の IFN-ガンマ mRNA 発現(倍率)
RAG-/-
TCC
Sb-amTNF
Sb-ABAB
FZ006p(Sb-amTNF+Sb-ABAB)
TCC+CDI
p=0.0489
p=0.0164
p=0.0035
ns
p=0.001

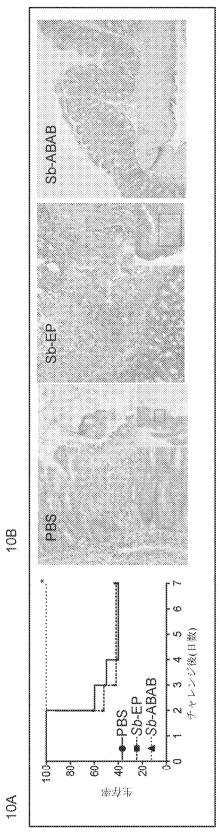
【図８】


[ABAB] (ug/ml)
0.75
0.50
0.25
0.00
酸
WT
感染の支
PP4 ノックイン 10
PP4 ノックイン 6b

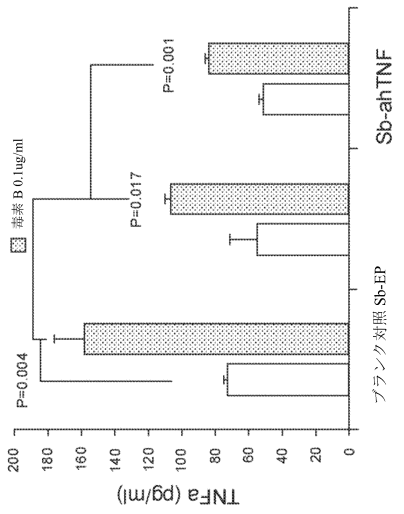
【図９】


9A
CFU/g 糞便
Sb-ABAB (10^10 CFU/日)
9B
ng/g 糞便
Sb-ABAB (10^10 CFU/日)

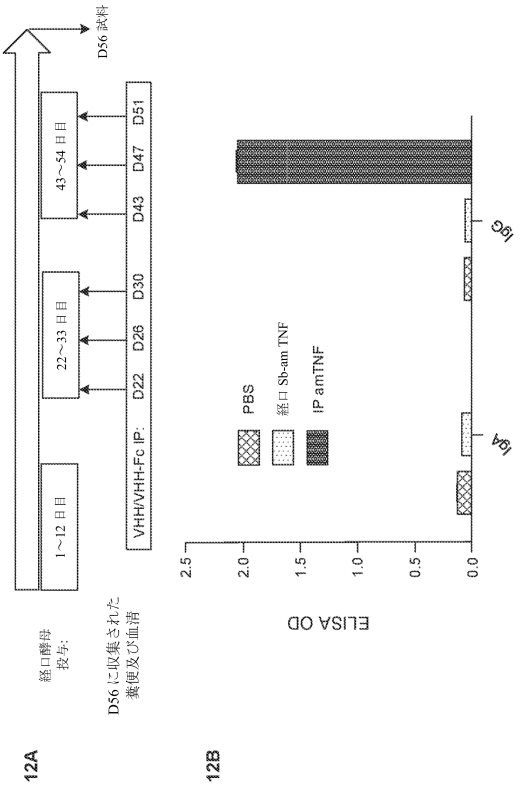
【図１０】


10A
生存率
チャレンジ後(日数)
PBS
Sb-EP
Sb-ABAB
10B
PBS
Sb-EP
Sb-ABAB

【図１１】



【図１２】



【図１３－１】

	プラスミドベースの	Tn⁷-ベースの挿入			組換的部位特異的	非組換的マルチコピー挿入転写ホットスポット（又は「高転写遺伝子座」）	誘導されたプロモーター
		デルタ挿入(Ty1、Ty2)	シアノ挿入(Ty3)	Tau挿入(Ty4)			
使用	概念・実証	デルタ挿入、GOIの安定した発現でなければならない	デルタ挿入、GOIの安定した発現でなければならない	デルタ挿入、GOIの安定した発現でなければならない	デルタ挿入、GOIの安定した発現でなければならない	デルタ挿入、GOIの安定した発現でなければならない	デルタ挿入、GOIの安定した発現でなければならない
利点	実現可能性の評価、最適化	会社な発現レベル、GOIの安定した発現	相対的に保存的、相対的により高い発現レベル	デルタ挿入、GOIの安定した発現でなければならない	GOIを挿入し、発現要求性マーカーを欠失させるための1ステップ、安定な	より高い発現、特異的な部位挿入、安定な	オンオフ制御、上り高い発現、特異的な部位挿入、安定な
欠点	安定性を保持するための選択マーカー依存性	挿入部位を発見することの不便性	非発現又は遺伝的に不安定なことに起因する単一性、発現を下げることの不便性	高い可変性、高いコピー数、低い発現レベル、ターゲティングするのGOI発現レベル	低コピー数、より低い	NA	NA
HR	NA	あり	あり	あり	あり	あり	あり
挿入方法	NA	エンゲイクト型	エンゲイクト型	エンゲイクト型	エンゲイクト型	エンゲイクト型	エンゲイクト型
*部位の数	NA	36	52	6	2	少なくとも2*	少なくとも2*
*挿入のための HA	NA	1-HAL: (250bp) 2-HAR: (250bp)	3-HAL: (72bp) 4-HAR: (93bp)		5-HAL-ura3: (40bp) 6-HAR-ura3: (38bp) 7-HAL-trp1: (bp) 8-HAR-trp1: (bp)	9-HAL-pTEF1: (193bp) 10-HAR-pTEF1: (214bp) 11-HAL-pTDH3: (413bp) 12-HAR-pTDH3: (321bp)	
バックグラウンド株	*Mya-796, *Mya796 (ura3-/-)	*Mya-796 (ura3-/-, gap1-/-) *Mya-796 (ura3-/-, gap1-/-, pep4-/-) *Mya-796 (ura3-/-, gap1-/-, prb1-/-) *Mya-796 (ura3-/-, gap1-/-, thr1-/-) *Mya-796 (ura3-/-, gap1-/-, thr4-/-)	*Mya-796 (ura3-/-, gap1-/-) *Mya796 (gap1-/-)		*Mya-796?	*Mya-796 (ura3-/-, gap1-/-) *Mya-796 (ura3-/-, gap1-/-, pep4-/-) *Mya-796 (ura3-/-, gap1-/-, prb1-/-) *Mya-796 (ura3-/-, gap1-/-, thr1-/-) *Mya-796 (ura3-/-, gap1-/-, thr4-/-)	
例示ドデータ*	抗mTNFa	ABAB* (B, G, N, S, A-A-CDI, A-TCC, A-DSS, A-	yeGFP* (FL) 抗TNFa(B, S)	ABAB	ABAB*	抗hTNF-Fc(B) ABAB* (B, N)	

HA: 相同性アーム
HAL: 左側の相同性アーム
HAR: 右側の相同性アーム
*部位の数(>)を超える一致した HR を有する部位の数
データ参考文献、動物実験、A-mCDI、マウス CDI モデル-mTCC、マウス T 細胞挿入(抵抗モデル-A-mDSS、マウス DSS-人類炎(A-mDSS、マウス DSS-人類炎(A-mDKT-DSS、DSS モデルと組み合わせたマウス CDI(A-mCDI-TCC(TCC モデルと組み合わせたマウス CDI(A-mCDI、ヘルス-CDI モデル
B. 前庁 ELISA、機能アッセイ(FL、フローサイトメトリー(N、顕微レーザの中断アッセイ(S、安定性アッセイ(I、コアスピの移植動物レーンのデータ(G、成長曲線
a. 挿入部位は、GOI の挿入点として、より多くの挿入部位を使用する
b. 挿入部位は、GOI の挿入点として、より多くの挿入部位を使用する
S. Hsu, pre スライドデータ(S)の説明

【図１３－２】

	プラスミドベースの	Tn⁷-ベースの挿入			組換的部位特異的	非組換的マルチコピー挿入転写ホットスポット（又は「高転写遺伝子座」）	誘導されたプロモーター
		デルタ挿入(Ty1、Ty2)	シアノ挿入(Ty3)	Tau挿入(Ty4)			
	mIL-22[d] (B, F)	CDI+DSS, A-CDI+TCC, A-hCDI) S1 ABAB*[d] (B) 抗mTNFa(B, N, A, A-TCC, A-DSS, A-DSS, A-CDI+DSS, A-CDI+TCC) S2-3 抗hTNFa(B, G, N, T, S) 抗hTNFa(F[e], B) mIL-22[d] (B, A, A-DSS, A-CDI+DSS) 抗 IL-17A-Fc(B) sc-FV 形式 pCAN-sc-FV-Fc (ヒトキメラ)[e] (B) pGIM-sc-FV-Fc (マウスシングル)[e] (B) pHUMira-sc-FV-Fc (ヒュミラ)[e] (B) pAVA-sc-FV-Fc (アバスチン(Humira))[e] (B) pMAV-sc-FV-Fc (マブリリムンダ)[e] (B) pSIL-T-sc-FV-Fc (シルトゥクシマブ)[e] (B)			mIL-22[d] (B) 抗mTNFa(B) IgG1 形式 ヒュミラ - (B)	

HA: 相同性アーム
HAL: 左側の相同性アーム
HAR: 右側の相同性アーム
*部位の数(>)を超える一致した HR を有する部位の数
データ参考文献、動物実験、A-mCDI、マウス CDI モデル-mTCC、マウス T 細胞挿入(抵抗モデル-A-mDSS、マウス DSS-人類炎(A-mDKT-DSS、DSS モデルと組み合わせたマウス CDI(A-mCDI-TCC(TCC モデルと組み合わせたマウス CDI(A-mCDI、ヘルス-CDI モデル
B. 前庁 ELISA、機能アッセイ(FL、フローサイトメトリー(N、顕微レーザの中断アッセイ(S、安定性アッセイ(I、コアスピの移植動物レーンのデータ(G、成長曲線
a. 挿入部位は、GOI の挿入点として、より多くの挿入部位を使用する
b. 挿入部位は、GOI の挿入点として、より多くの挿入部位を使用する
S. Hsu, pre スライドデータ(S)の説明

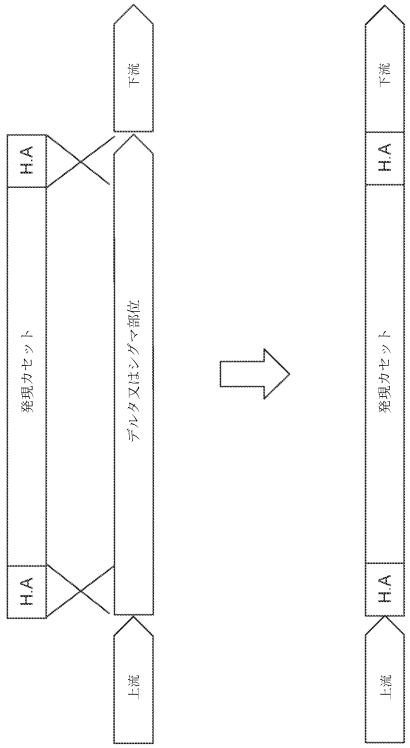
転写ホットスポット（又は「高転写遺伝子座」）のリスト：　TDH2, TEF2, ENO2, RPLA1, RPLA2, RPLA3, RPLA10E, PDC1, ADH1, ADH2, GPM1, FBA1, RPL47A, PGK1, RPL44, SSM1A, SSM1B, RPL5A, RPL5B, UPF1, RPL16A, RPL16B, CUP1A, CUP1B, RPS31A, RPL2A, RPL28, RPS28A, RPL39B, PYK1, RPL6A, RPL39B, RPL27A, RPS21, RPL43A, NAB1A, NAB1B, URP1A, RPS18EB

【図１４】

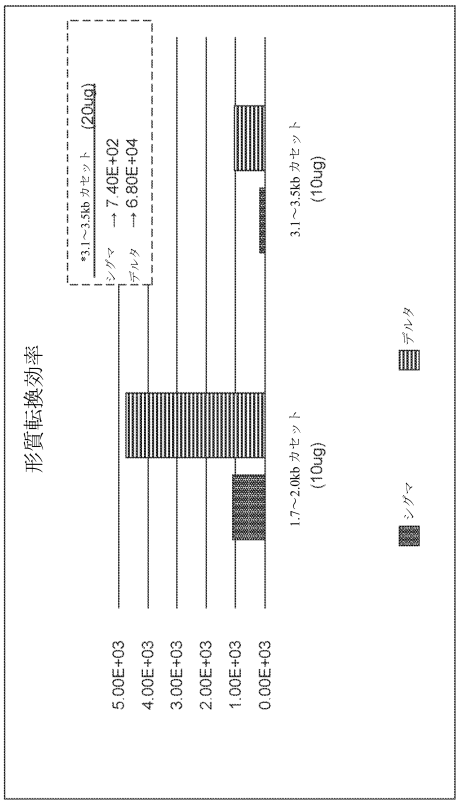
相同性アーム	DNA 配列
1-HAL- (257 bp)	ATGGGGGTTCTCTGGAACAGCTGATGTCCCAGGTGTTGTCTTGTTGAGAATTAACCTTAGTGGAATCTCTATCAAATTCC GGTAAATTGGAAGCTGAAACGGCTAACGGATCTTGATTTGATGGGACTTCCTTAGAAGTAACCGAAGCATAGGCGCTACC ATGATGGAAATGTGGATTTTGATGTAATTGTTGGGATTCCATTGTGATTAAGGCTATAATATTAGGTATGTAGATATACTAG AAGTTCTCCTCGA
2-HAR- (242bp)	TCGAGGATTTAGGAATCCATAAAGGGAATCTGCAATTCTACACAATTCTATAAATATTATTATCATCGTTTTATATGTTAAT ATTCCATTGATCCTATTACATTATCAATCCTTGCGTTTCAGCTTCCACTAATTTAGATGACTATTTCTCATCATTTGCGTCATCTT CTAACACCGTATATATGATAATATACTAGTAATACTACTAGTTAGATGATAGTTGATTTCTATTCCAACA
3-HAR- (72bp)	GTATGACAATACGTCATCCTAAACGTTCATAAAACACATATGAAACACCTTATAACAAACGAACAACATG
4-HAR- (93bp)	TATTATATAAAATATGAATCATACTAAGTGGTGGAAGCGCGGAATCTCGGATCTAAACTAATTGTTCAGGCATTTATACTTT TGGGTAGTTTCA
5-HAL-ura3- (40bp)	gaaggttaatgtggcgtgtggtttcagggtccataaagctt
6-HAR-ura3- (38bp)	gagtttagtatacatgcatttactaatacagtttt
7-HAL-trp1- (bp)	
8-HAR-trp1- (bp)	
9-HAL-pTEF1- (193bp)	AAAAATTTTTATCACGTTTCTTTTTCTTGAAAATTTTTTTTTTTGATTTTTTTCTCTTTCGATGACCTCCCATTGATATTTAAGTT AATAAAcGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCATTTTTCTTGTTCTATTACAACTTTTTTTACTTCTTGCTCATTAGAAAGA AAGCATAGCAATCTAATCTAAG
10-HAR-pTEF1 (214bp):	CACACACCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTTTTTTACTCTTCGAGATTTTCTCGGAGCTCGGGATGGCGTACCACTTCA AAACACCCAAGGACAGGATACTAAATTtCCCCTCTTTCTTCGTCGGTATCTTACCCGTACTAAAGGTTTGGAAAA GAAAAAAGAGACCGCCTCGTTTCTTTTTCTTCGTCGAAAAAGGCAAT
11-HAL-pTDH3- (413bp)	ATTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCGCAACTACACAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAA ACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAACCTGCTTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATTGACCTACGCATGTATCTAT CTCATTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTGATTTGGAAAAAAGCTGAAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCCTGA AATTATTCCCCTATTTGTACTAATAAATGATATAATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTGTAAATCTATTTCTTAAACTTCTTA AATTCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTAAAACACTAAGAACTTAGTTTCGAATAAACACACATAAACAAACAAA
12-HAR-pTDH3- (321 bp)	GACATTCAGATGACCCAGTCTCCTTCCAGCCTGTCTGCATCCTGTAGGAGACGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAGCCAG GGCATTAGAAACTACTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCCGCCTCCAGCCTTG CAGAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGCGGATCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGA GGATGTGGCAACTTATTACTGCCAACGGGTACAACCGGGGCCCTTACACTTTTGGCCAGGGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 参照図 13

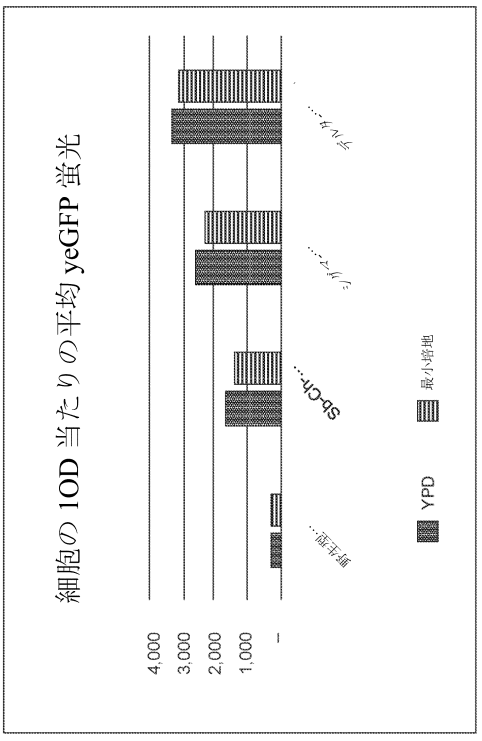
【図１５】



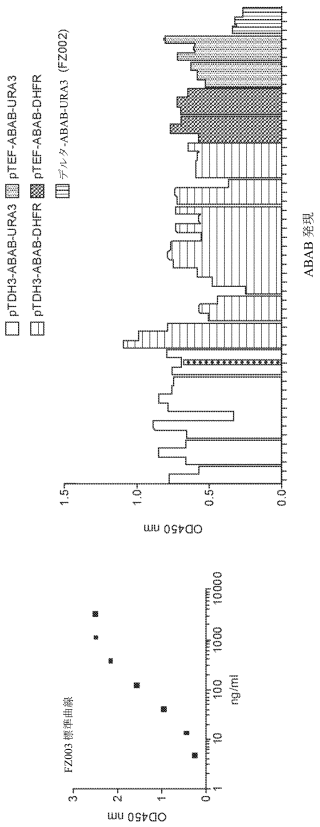
【図１６】



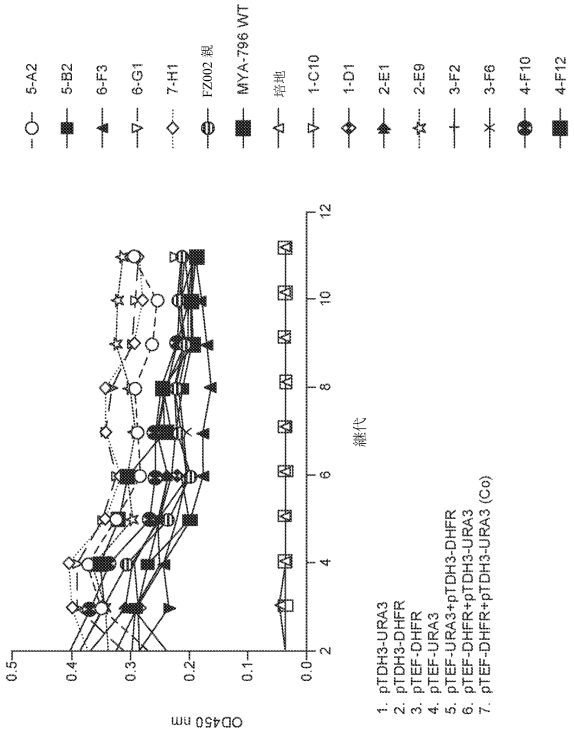
【図１７】



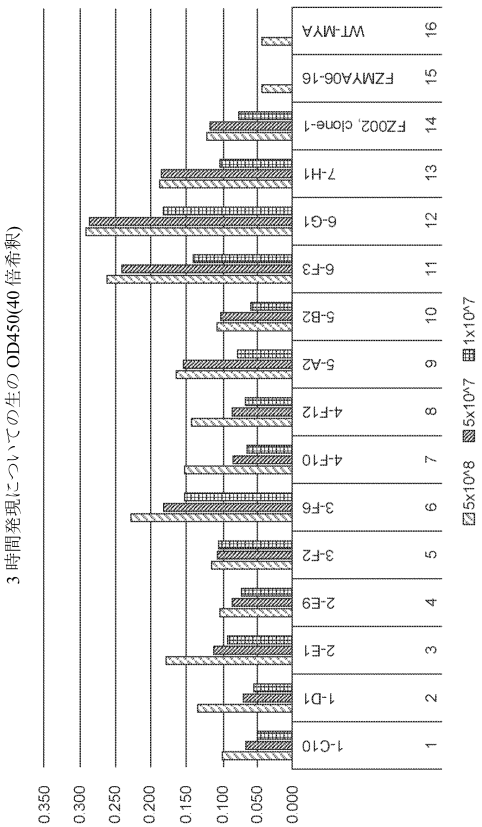
【図１８】



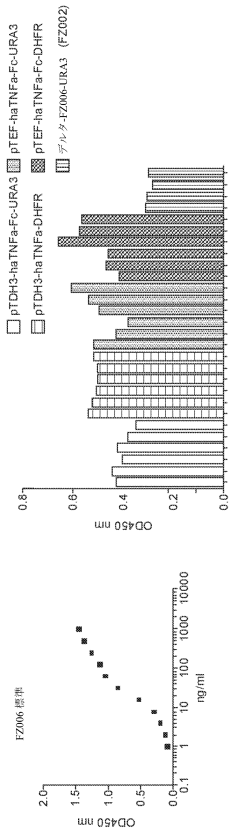
【図１９】



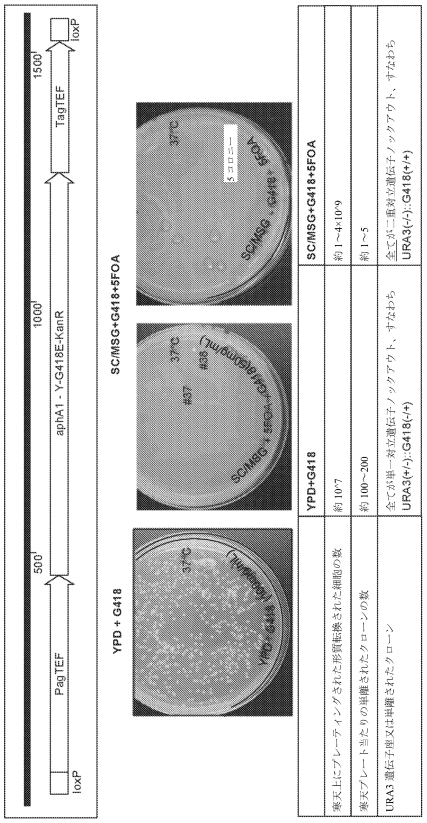
【図２０】



【図２１】

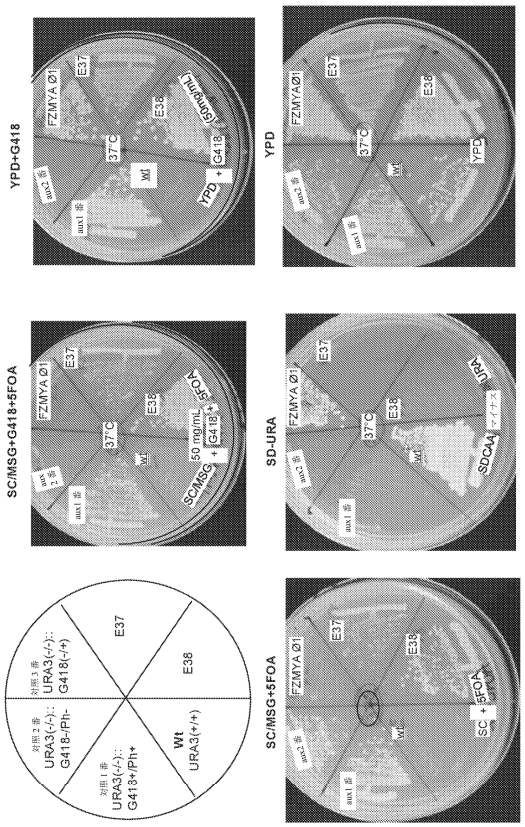


【図２２】

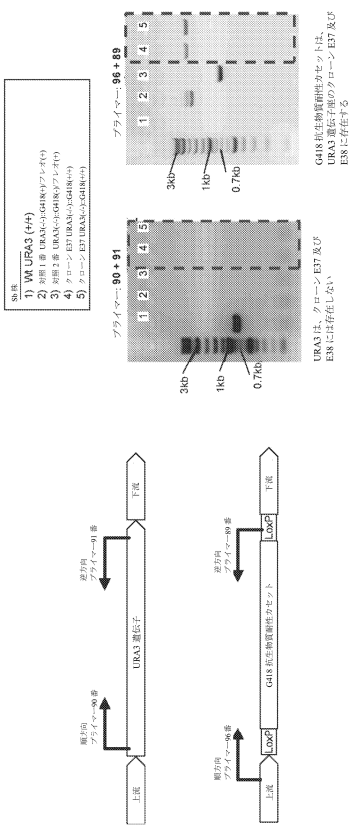


	YPD+G418	SC/MSG+G418+5FOA
寒天上にプレーティングされた形質転換された細胞の数	約 10^7	約 $1\sim4\cdot10^9$
寒天プレート当たりの単離されたクローンの数	約 100~200	約 1~5
URA3 遺伝子座又は単離されたクローン	全てが単一対立遺伝子ノックアウト、すなわち URA3(-/-):G418(-/+)	全てが二重対立遺伝子ノックアウト、すなわち URA3(-/-):G418(+/+)

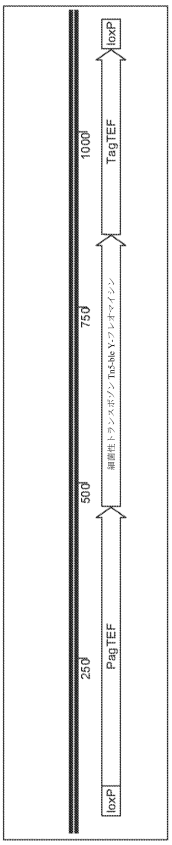
【図２３】



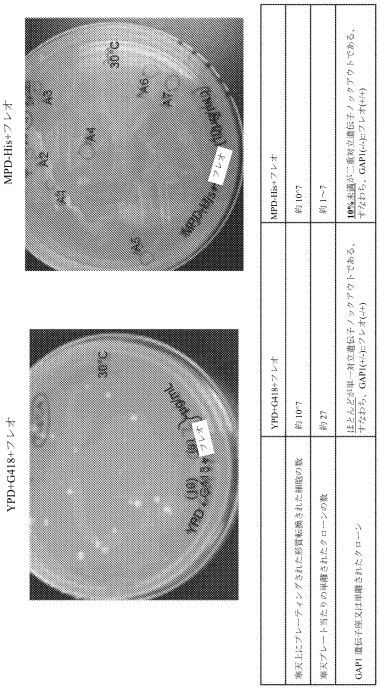
【図２４】



【図２５】

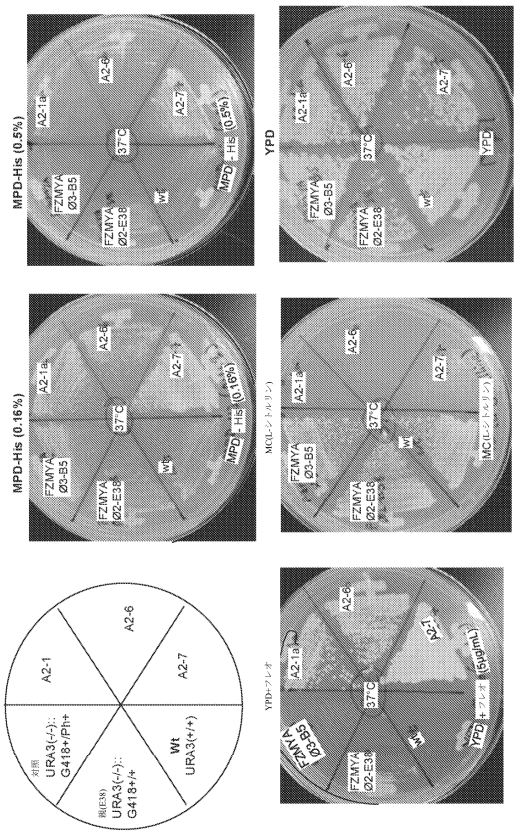


【図２６】

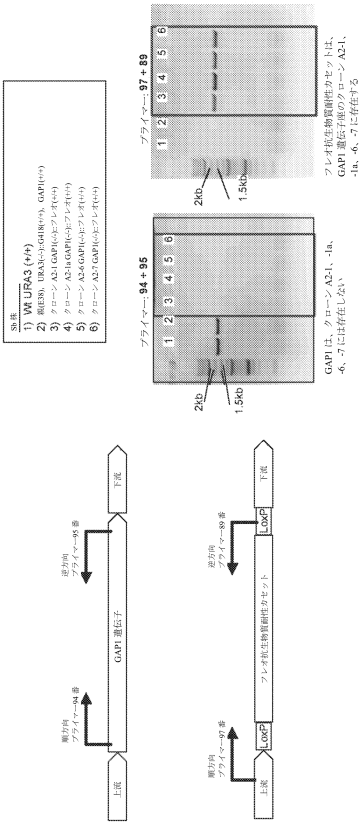


	YPD-G418+プレオ	MPD-His+プレオ
滅菌上にプレーティングされた形質転換された細胞の数	約 10^7	約 10^7
滅菌プレート当たりの単離されたクローンの数	約27	約 1~7
GAP1 遺伝子座又は単離されたクローン	ほとんどが単一対立遺伝子ノックアウトである。下記より、GAP1(-/-)クローンがない	MPS選択に一貫性は遺伝子ノックアウトである。下記より、GAP1(-/-)クローンがない

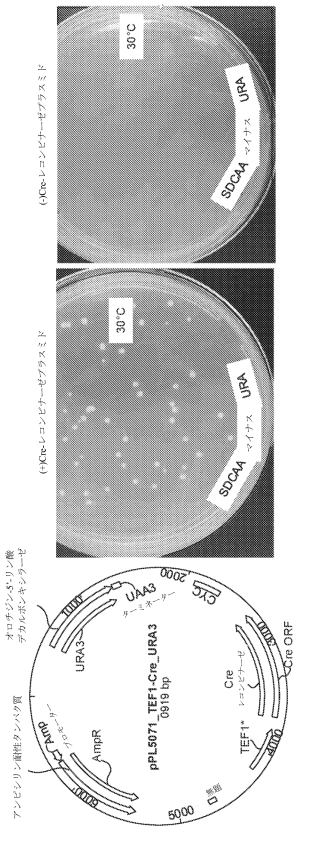
【図２７】



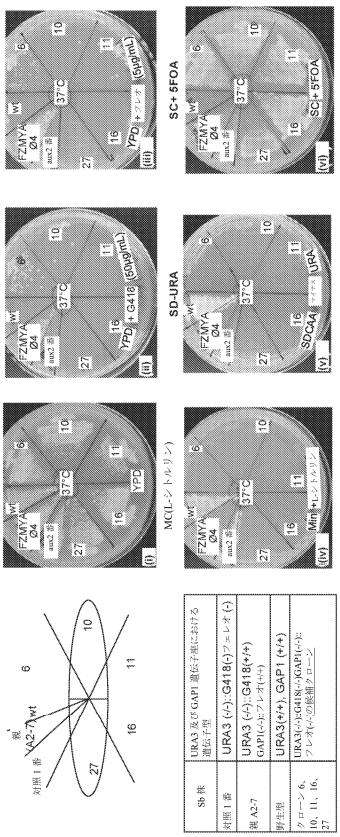
【図２８】



【図２９】

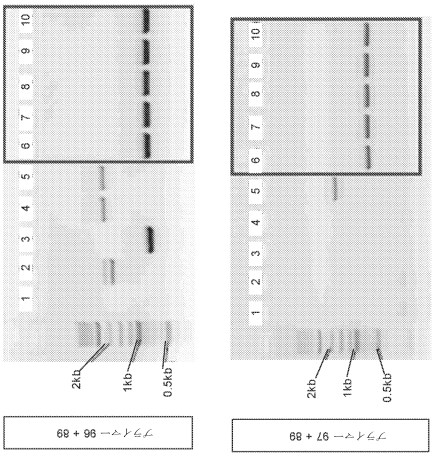


【図３０】



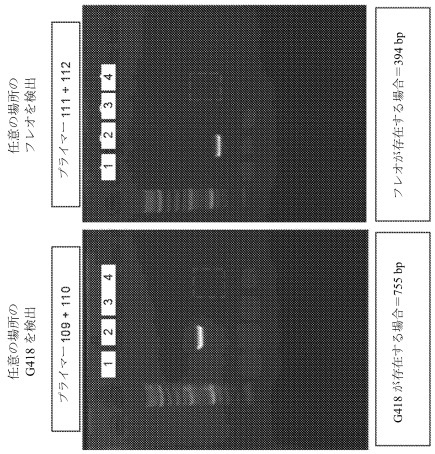
Sb 株	URA3 及び GAP1 遺伝子座における遺伝子型
対照 1 番	URA3 (-/-); G418(-)フレオ (-)
親 A2-7	URA3 (-/-);G418(+/+) GAP1(-/-);フレオ(+/+)
野生型	URA3(+/+), GAP1 (+/+)
クローン 6、10、11、16、27	URA3(+/-);G418(+/-);GAP1(+/-); フレオ(+/-)の底補クローン

【図３１】



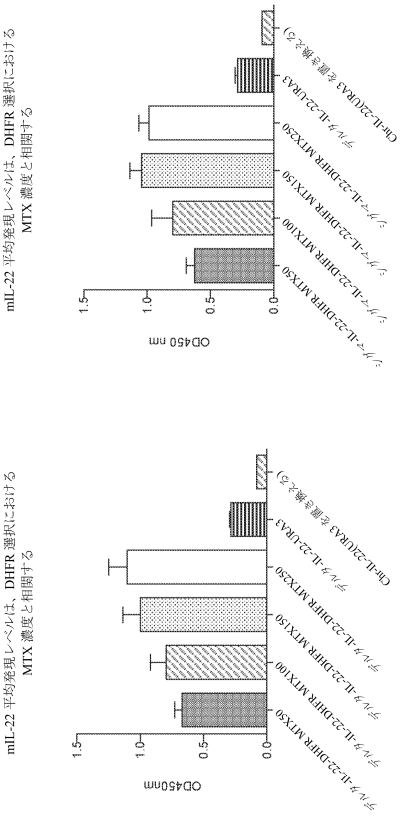
レーン	Sb 株	URA3 及び GAP1 遺伝子座における遺伝子型
1	野生型	URA3 (+/+), GAP1 (+/+)
2	対照 1 番	URA3(+/+);G418(+/+)フレオ-GAP1(+/+)
3	対照 2 番	URA3(+/-);G418(+/-)フレオ-GAP1(+/+)
4	クローン E38	URA3 (-/-);G418(+/+) GAP1 (+/+)
5	クローン A2-7	URA3 (-/-); G418(+/+) GAP1(+/-);フレオ(+/+)
6	クローン 6	URA3(+/-);G418(+/-);GAP1(+/-); フレオ(+/-)の底補クローン
7	クローン 10	
8	クローン 11	
9	クローン 16	
10	クローン 27	

【図３２】



レーン	Sb 株	URA3 及び GAP1 遺伝子座における遺伝子型
1	野生型	URA3 (+/+), GAP1 (+/+)
2	対照 1 番	URA3(+/+);G418(+/+)フレオ-GAP1(+/+)
3	対照 2 番	URA3(+/-);G418(+/-)フレオ-GAP1(+/+)
4	クローン 16	URA3 (-/-);G418(-/-) GAP1(+/-);フレオ(+/-)

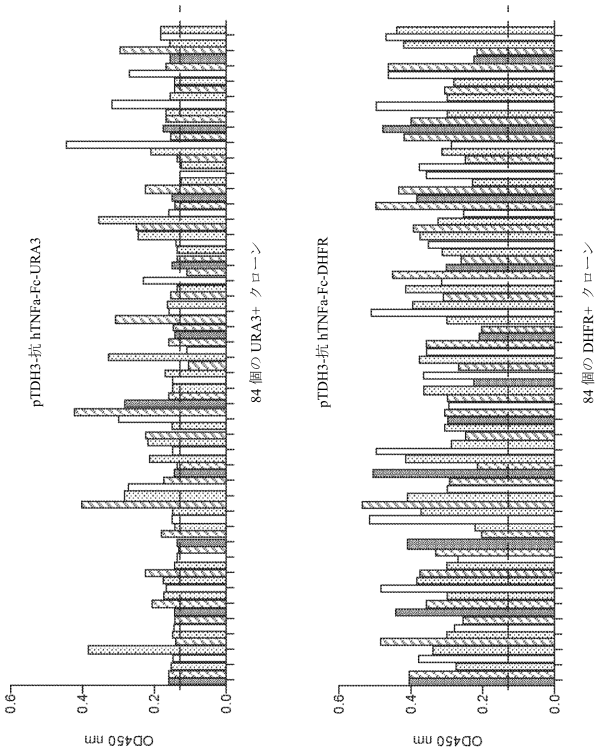
【図３３】



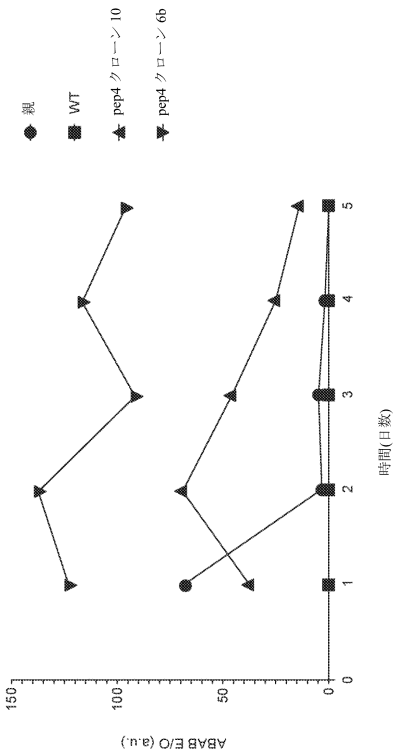
【図３４】



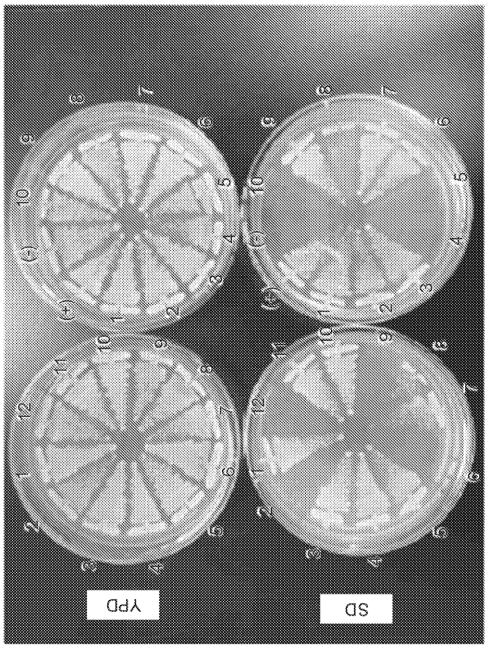
【図３５】



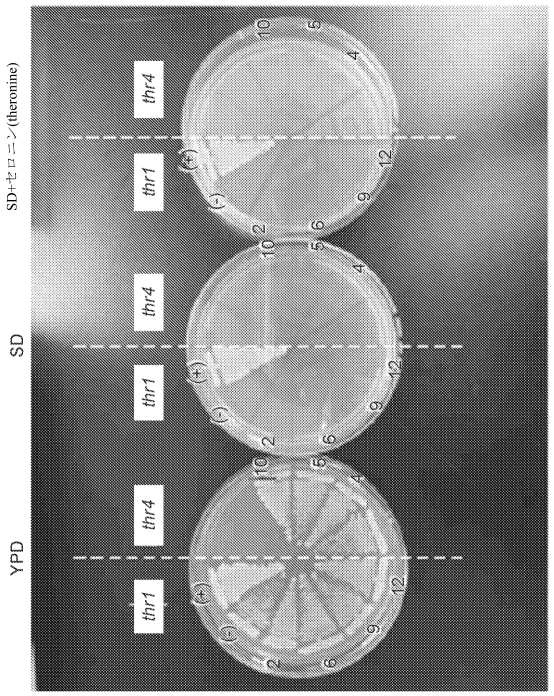
【図３６】



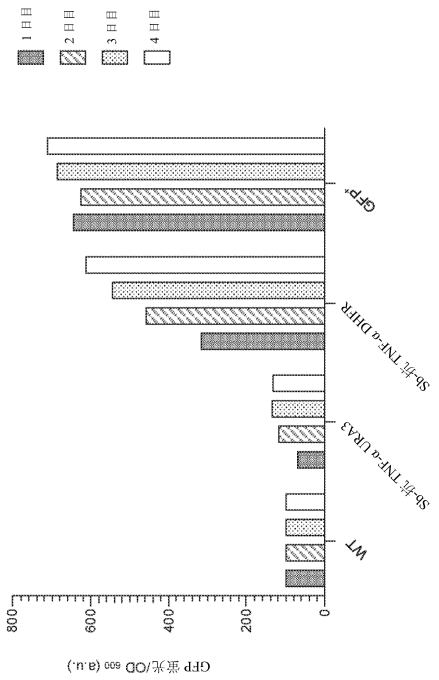
【図３７】



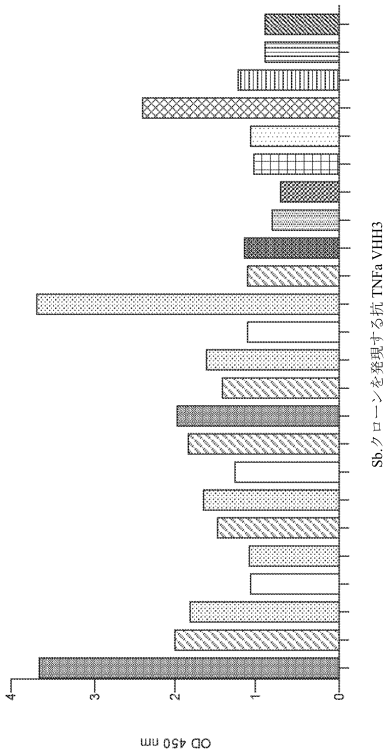
【図３８】



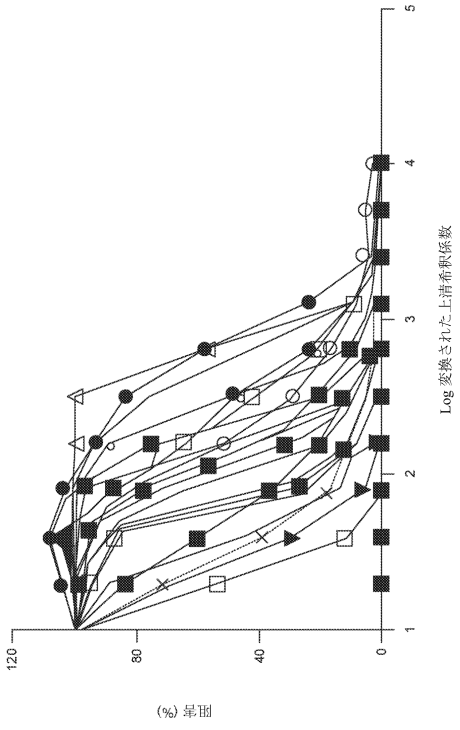
【図３９】



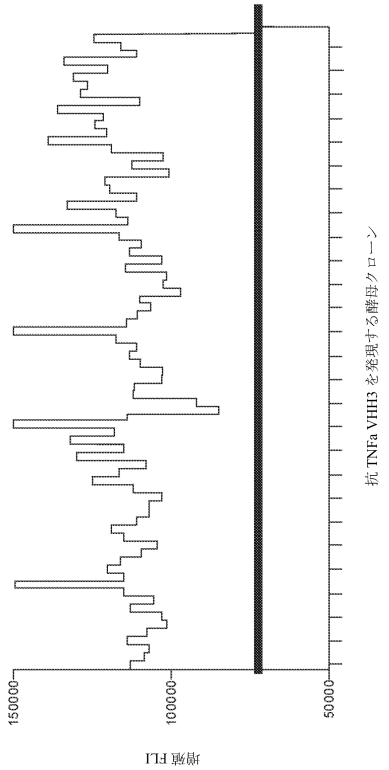
【図４０】



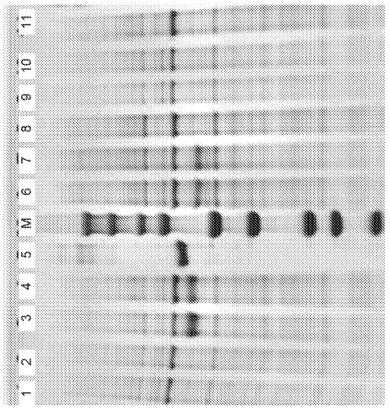
【図４１】



【図４２】



【図４３】



Sc-FV-Fc 抗体	抗原特異性	発現(Expression)レベル (ug/ml)	抗原特異的結合
CAN LV-GS-HV-Fc	IL-1b	TNFa 0.16	Y
GIM LV-GS-HV-Fc	GM-CSF	4.5	Y
HUM LV-GS-HV-Fc	ヒュミラ	100	Y
AVA LV-GS-HV-Fc	VEGF	0.7	Y
MAV LV-GS-HV-Fc	GM-CSFR	200	Y
SILT LV-GS-HV-Fc	IL-6	0.12	Y

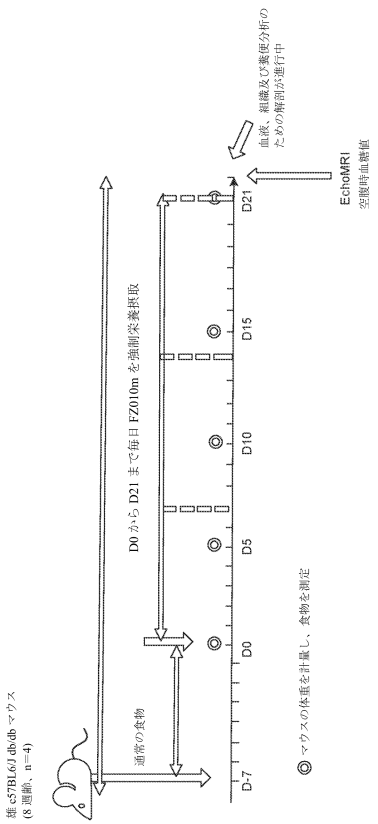
【図４４】

Sc-FV-Fc 抗体	抗原特異性	発現(Expression)レベル (ng/ml)	抗原特異的結合
CAN LV-GS-HV-Fc	IL-1b	10	ND
GIM LV-GS-HV-Fc	GM-CSF	15	ND
HUM LV-GS-HV-Fc	ヒュミラ	30	ND
AVA LV-GS-HV-Fc	VEGF	15	ND
MAV LV-GS-HV-Fc	GM-CSFR	100	Y
SILT LV-GS-HV-Fc	IL-6	15	ND

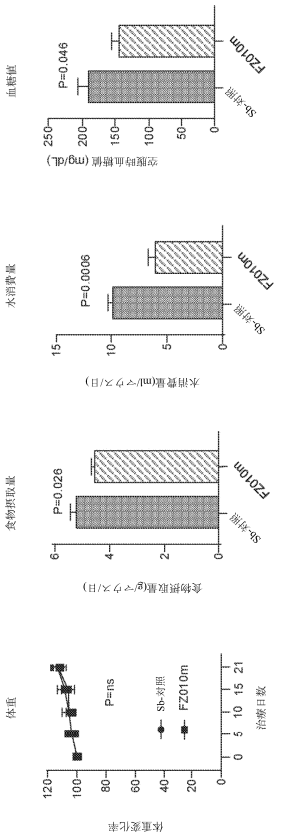
【図４５】

抗原抗体	抗原特異性	発現(Expression)レベル (ng/ml)	抗原特異的結合	生物活性
IL-22	m IL-22	NA	Y	NA
抗 TNFA(単量体)	h TNFa	200	Y	Y
抗 TNFA(二量体)	h TNFa	100	Y	Y
抗 TNFA-Fc	h TNFa	200-300	Y	Y
抗 IL17A	h IL-17A	300	Y	NA
yCAN-sc-FV-Fc	h IL-1b	10	ND	NA
yGIM-sc-FV-Fc	h GM-CSF	15	ND	NA
yHUM-sc-FV-Fc	h TNFa	30	ND	NA
yAVA-sc-FV-Fc	h VEGF	15	ND	NA
yMAV-sc-FV-Fc	h GM-CSFR	100	Y	NA
ySILT-sc-FV-Fc	h IL-6	15	ND	NA

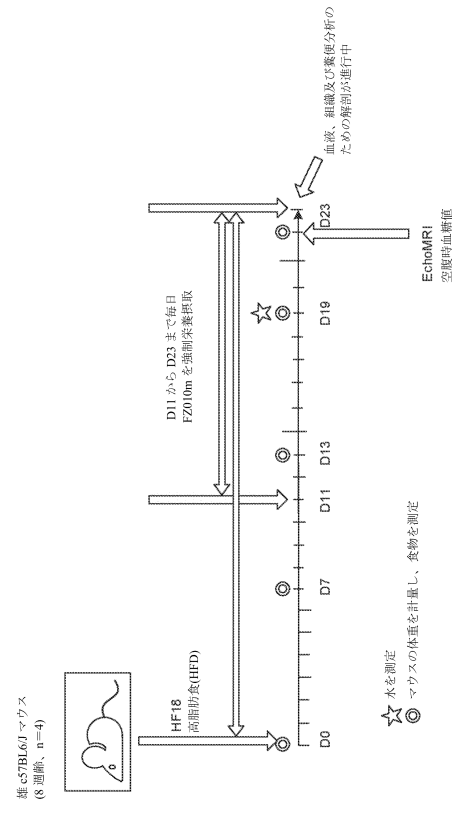
【図４６】



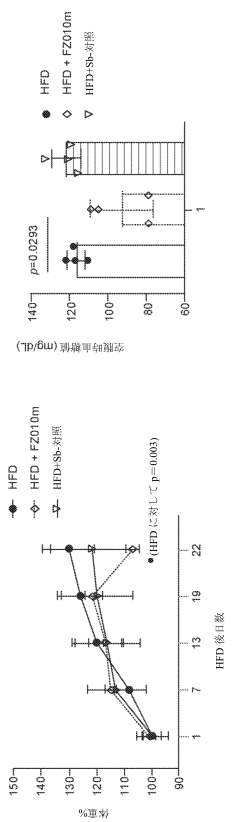
【図４７】



【図４８】



【図４９】



【図５０】

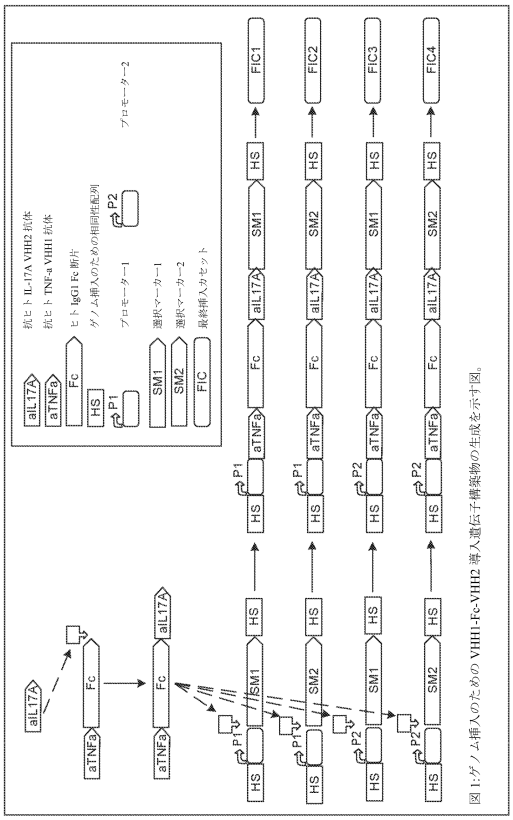


図1:ゲノム挿入のための VHH1-Fc-VHH2 導入遺伝子構築物の生成を示す図。

【図５１】

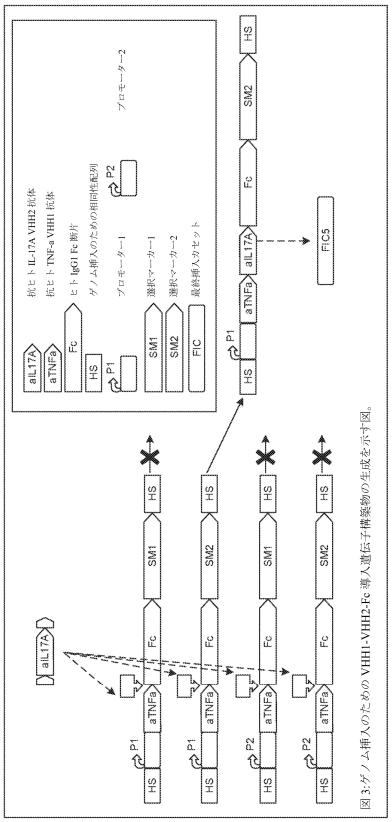
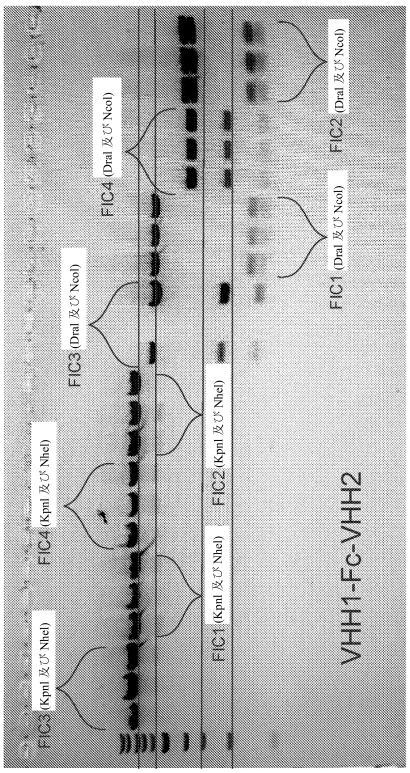
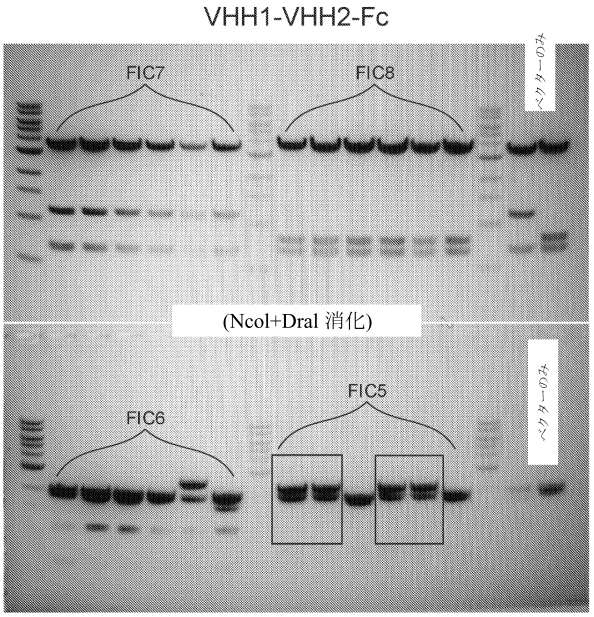


図3:ゲノム挿入のための VHH1-VHH2-Fc 導入遺伝子構築物の生成を示す図。

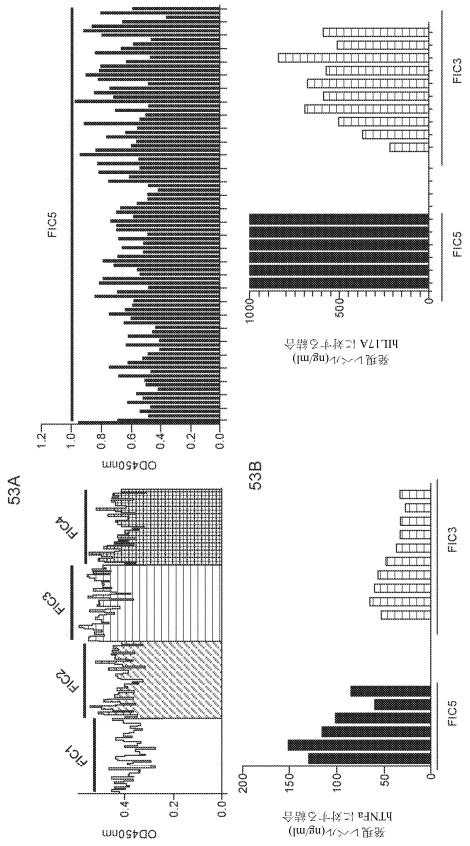
【図５２－１】



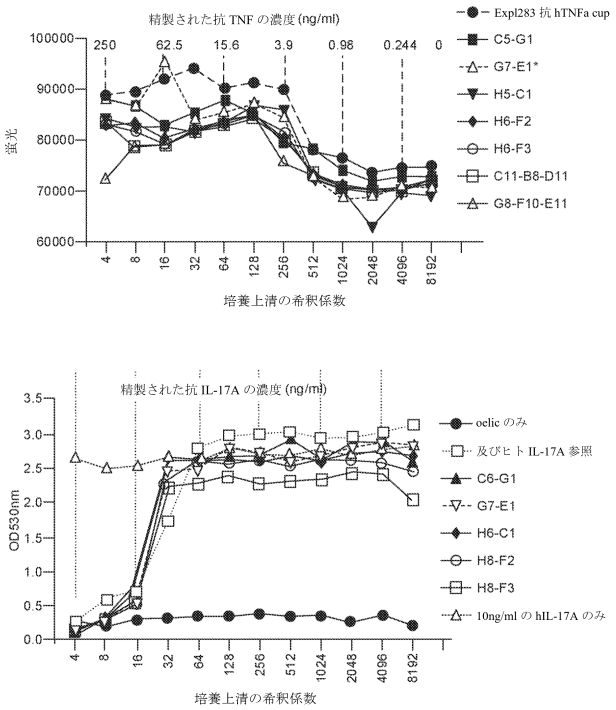
【図５２－２】



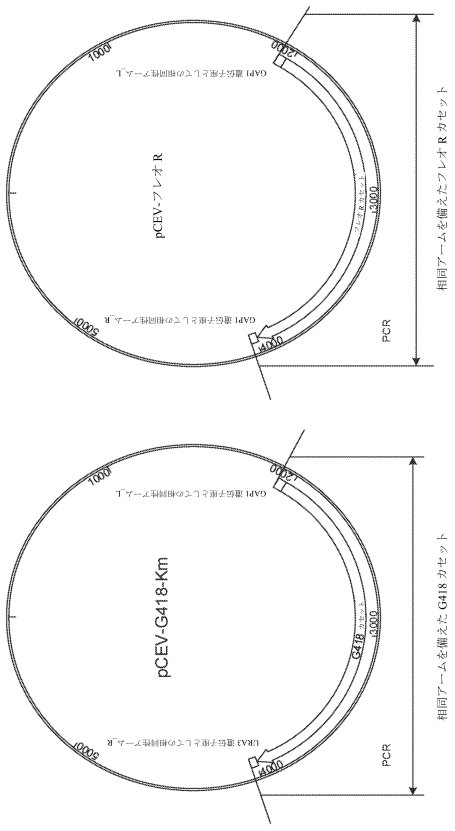
【図５３】



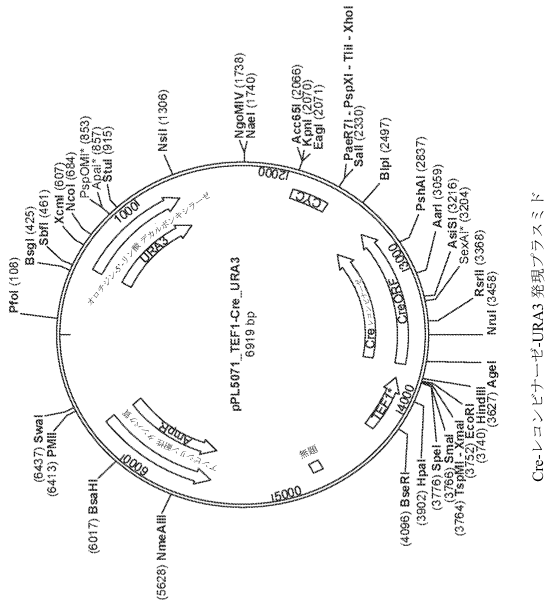
【図５４】



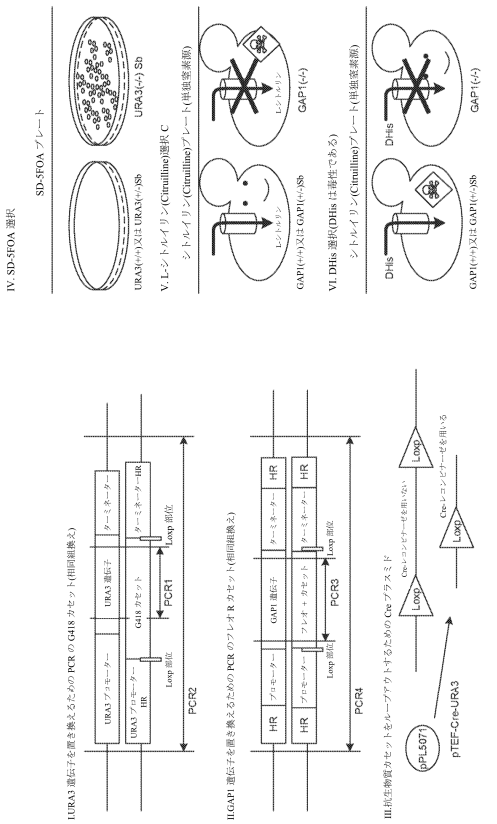
【図５５－１】



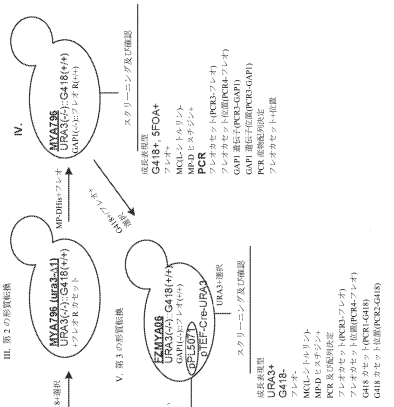
【図５５－２】



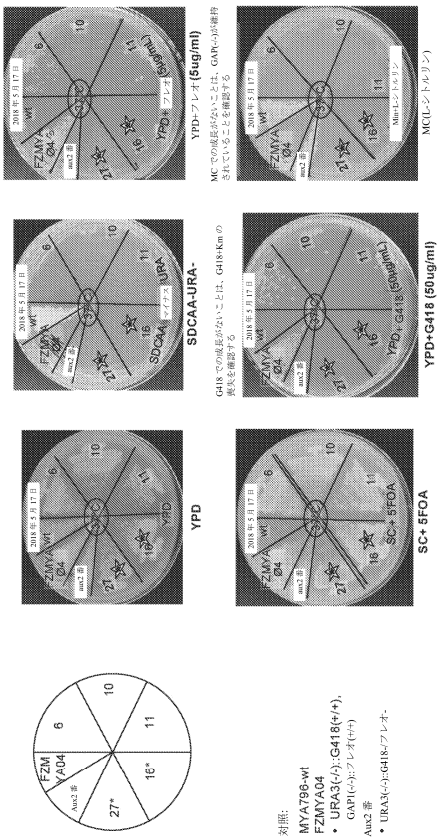
【図５６】



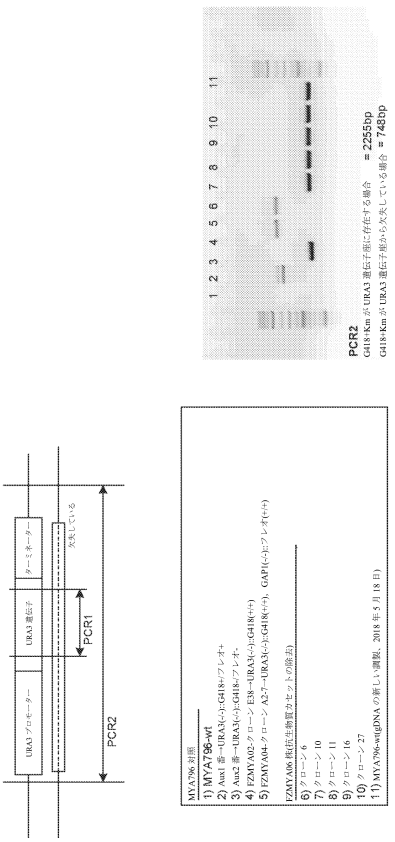
【図５７】



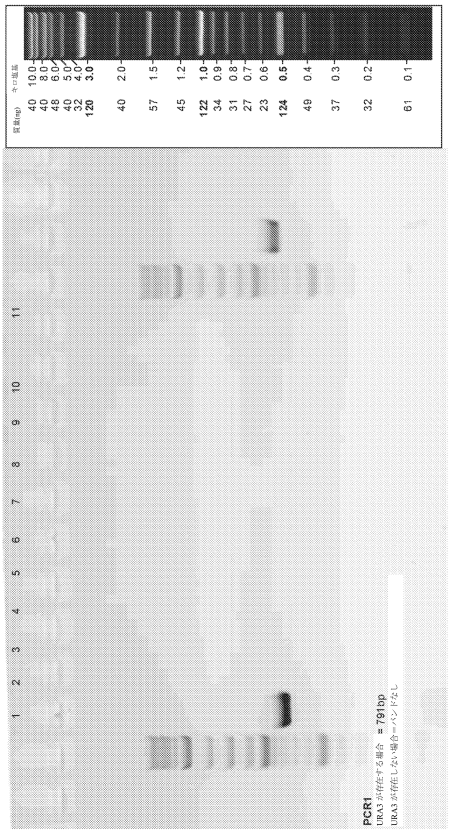
【図５８】



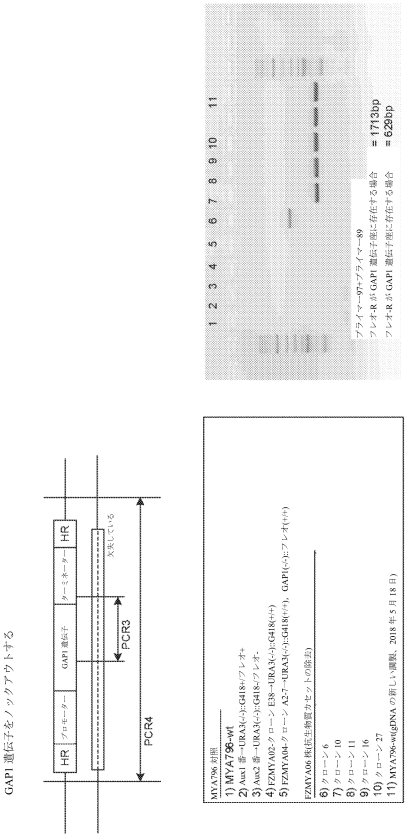
【図５９－１】



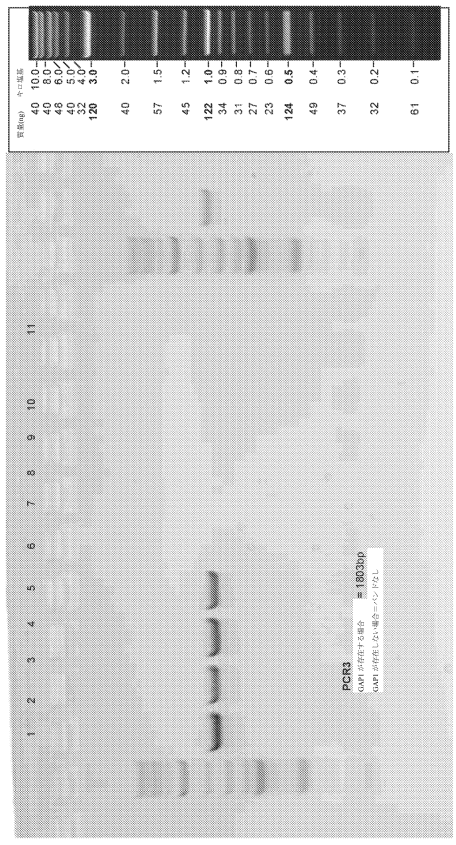
【図５９－２】



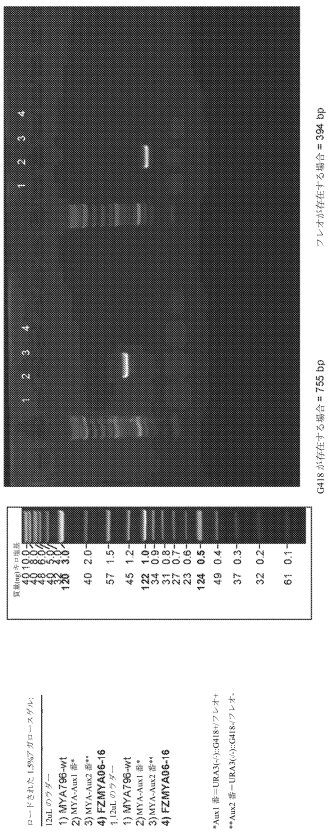
【図６０－１】



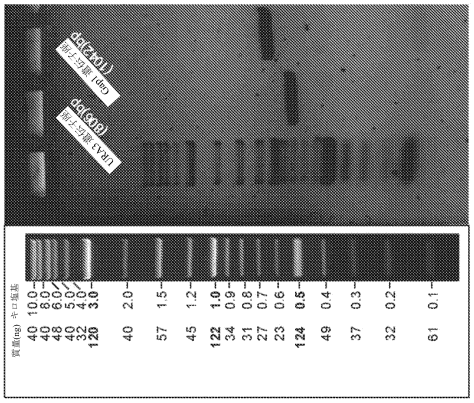
【図６０－２】



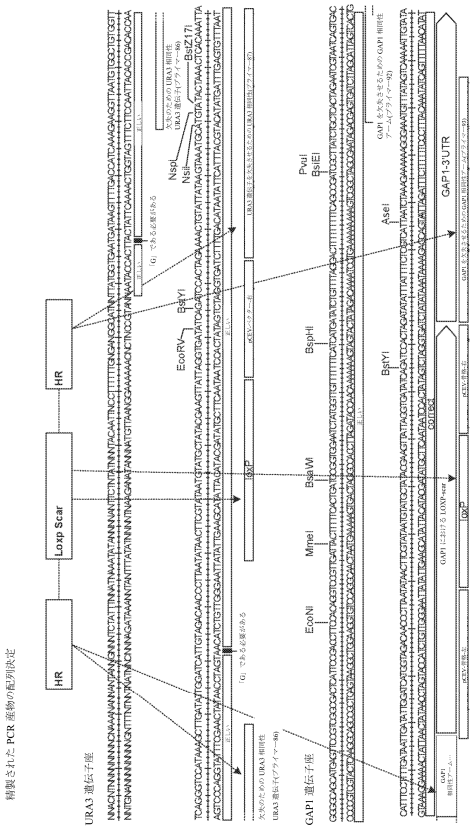
【図６１】



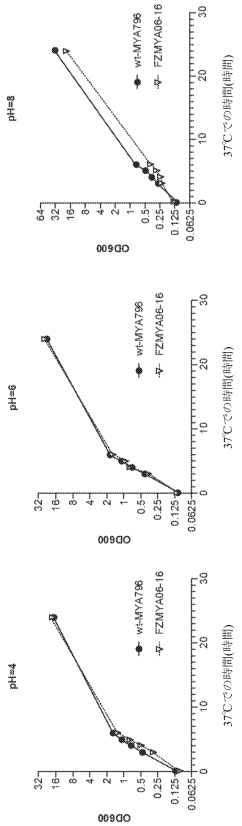
【図６２－１】



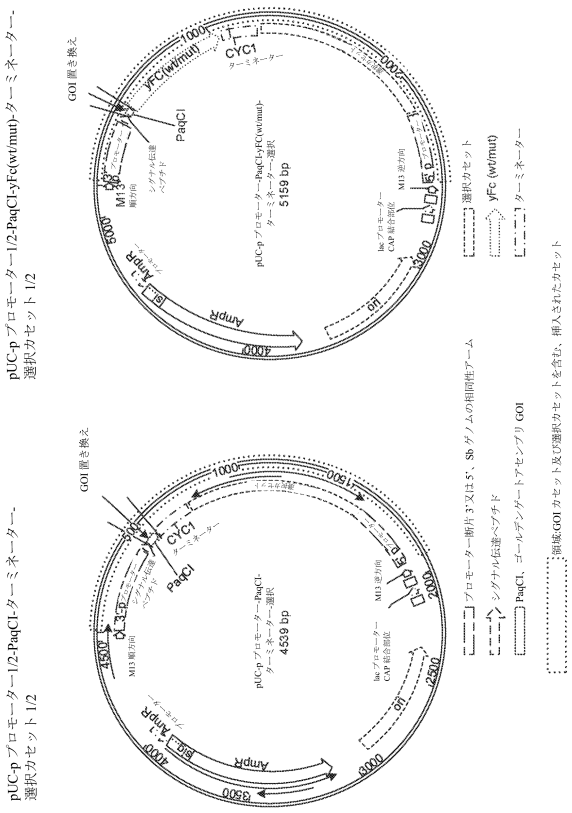
【図６２－２】



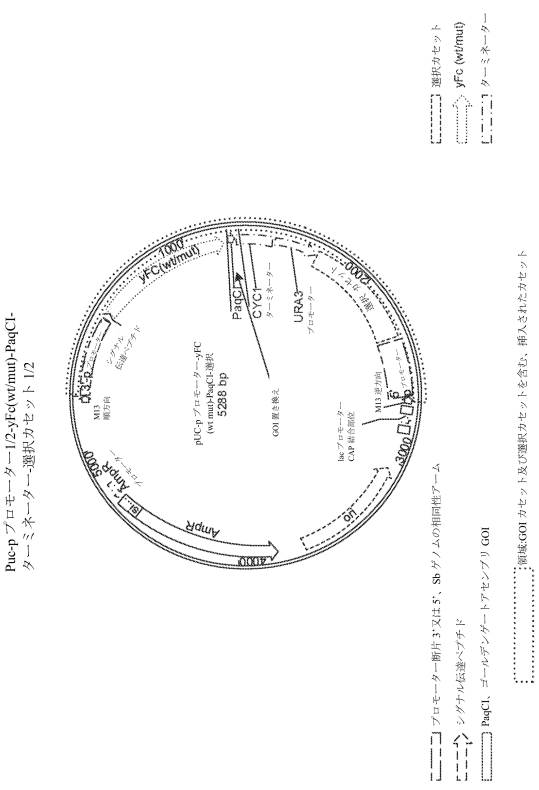
【図６３】



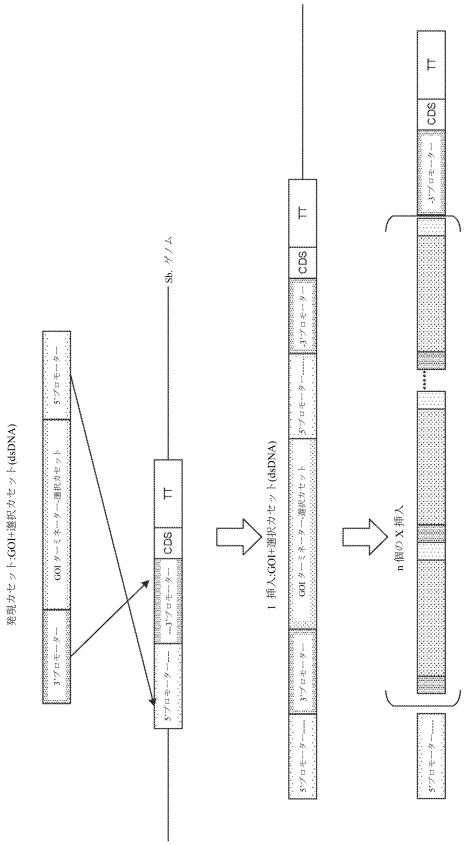
【図６４－１】



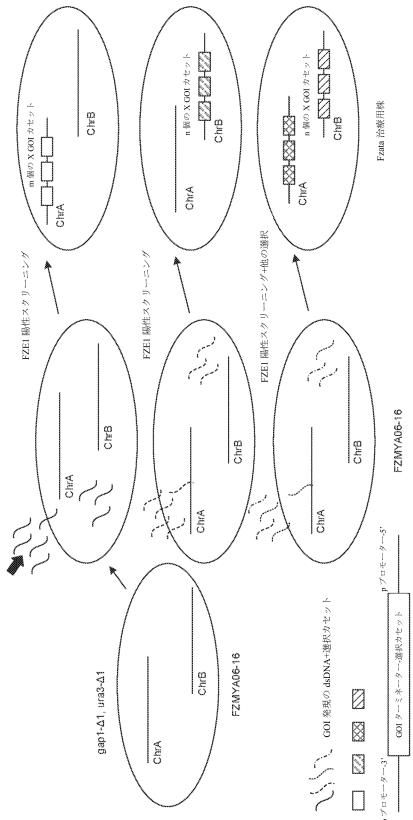
【図６４－２】



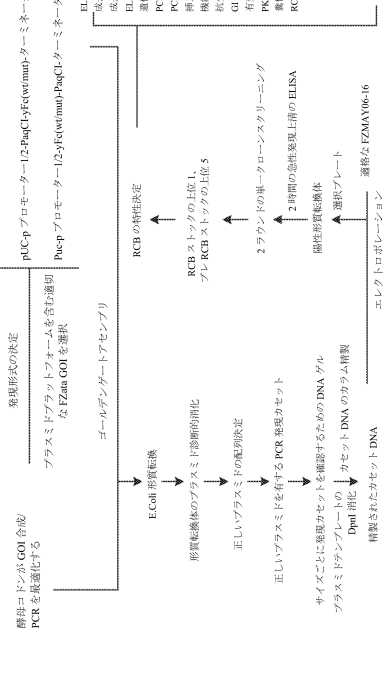
【図６５】



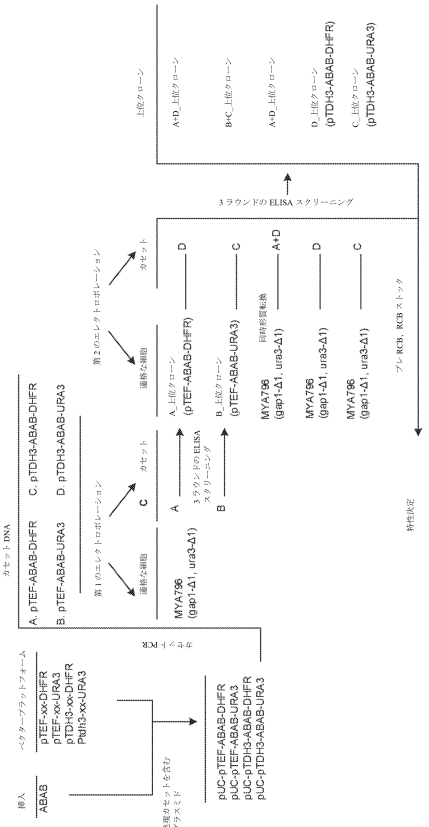
【図６６】



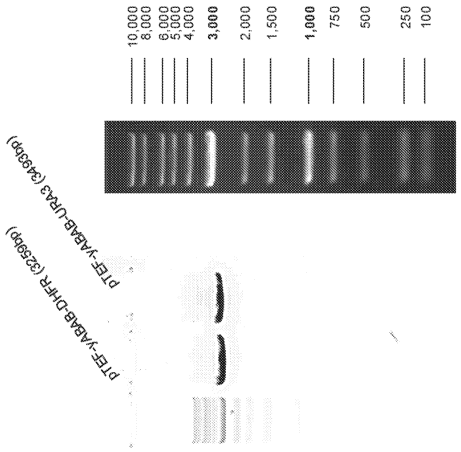
【図６７】



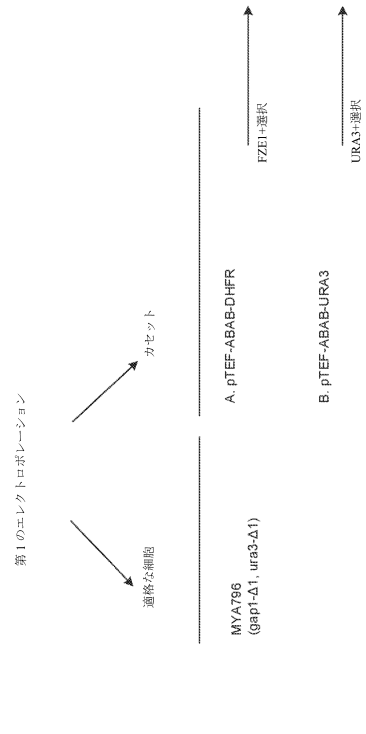
【図６８】



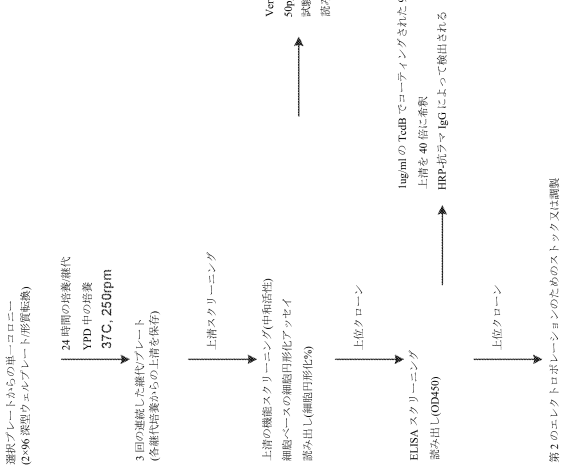
【図６９】



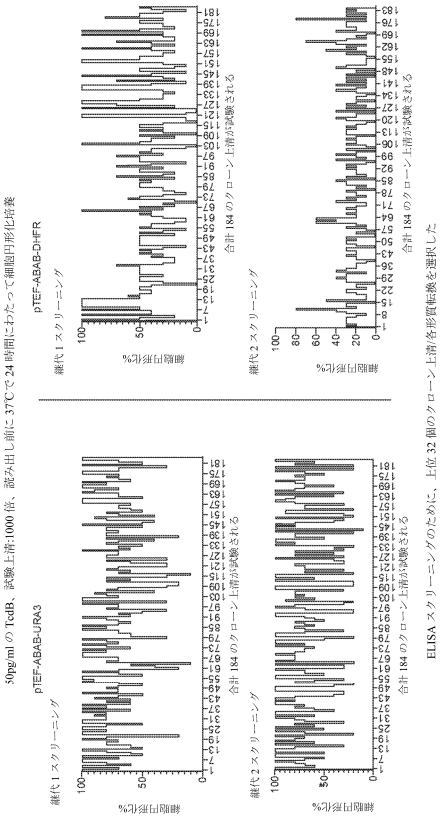
【図７０】



【図７１】

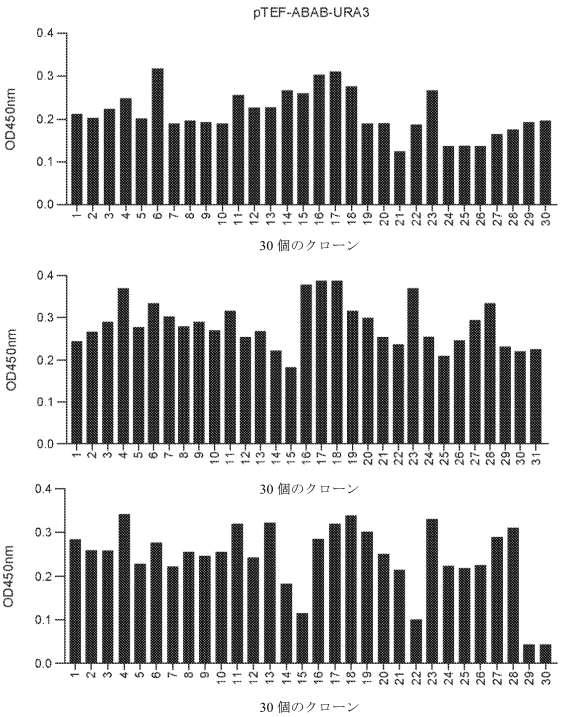


【図７２】

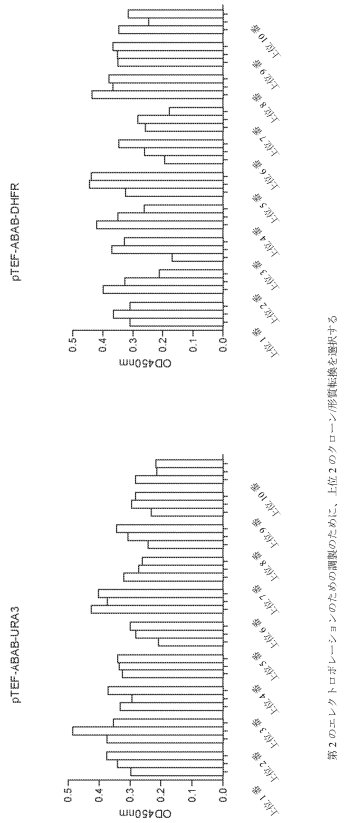


ELISA スクリーニングのために、上位 32 個のクローン上清/各形質転換を選択した

【図７３】

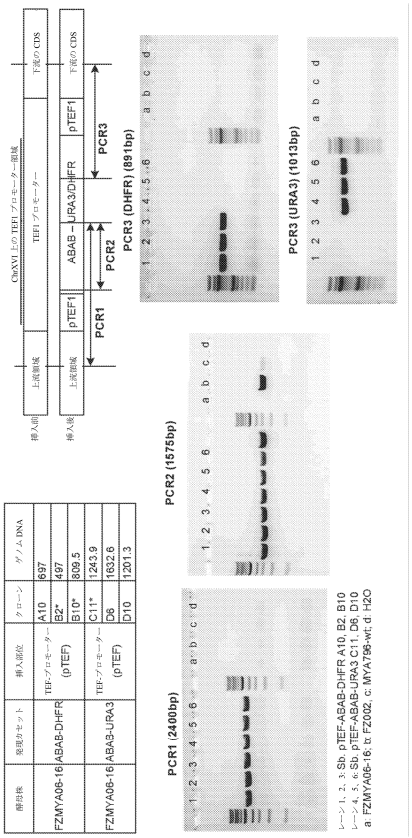


【図７４】



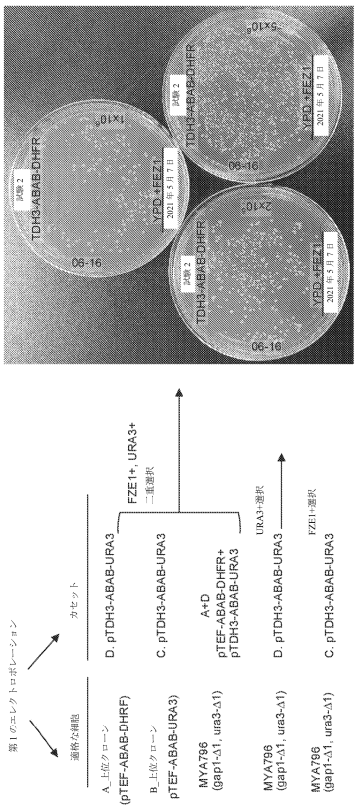
第 2 のエレクトロポレーションのための調製のために、上位 2 のクローン/形質転換を選択する

【図７５】

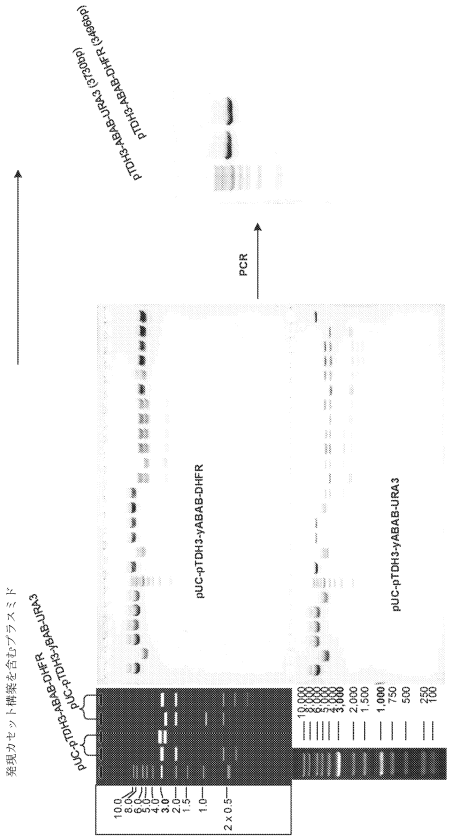


菌株	発現セット	挿入部位	クローン	ゲノム DNA
FZMYA06-16	ABAB-DHFR	TEF プロモーター (pTEF)	A10	697
			B2*	497
			B10*	809.5
FZMYA06-16	ABA3-URA3	TEF プロモーター (pTEF)	C11*	1243.9
			D6	1632.6
			D10	1201.3

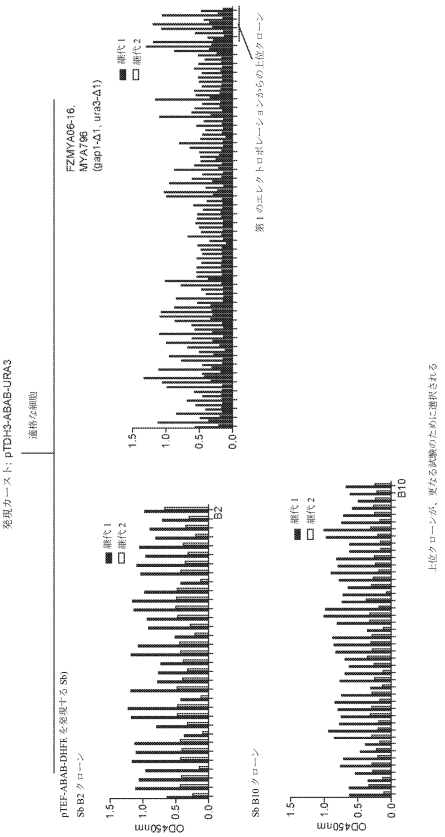
【図７６】



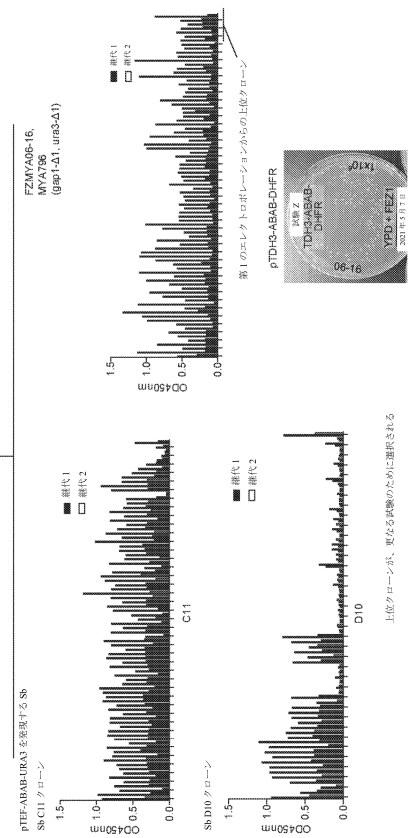
【図７７】



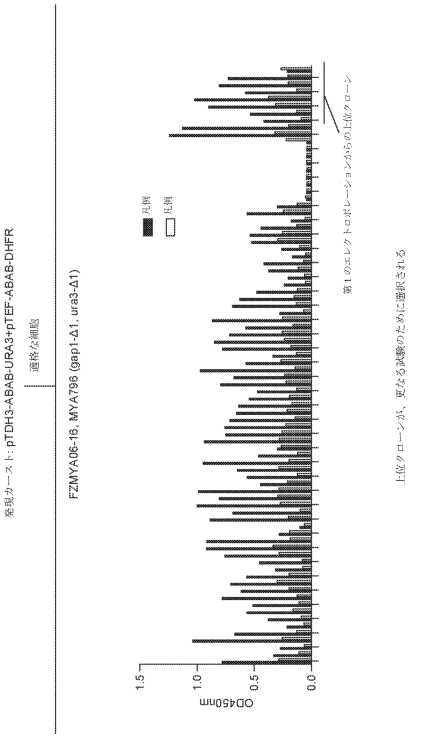
【図７８】



【図７９】



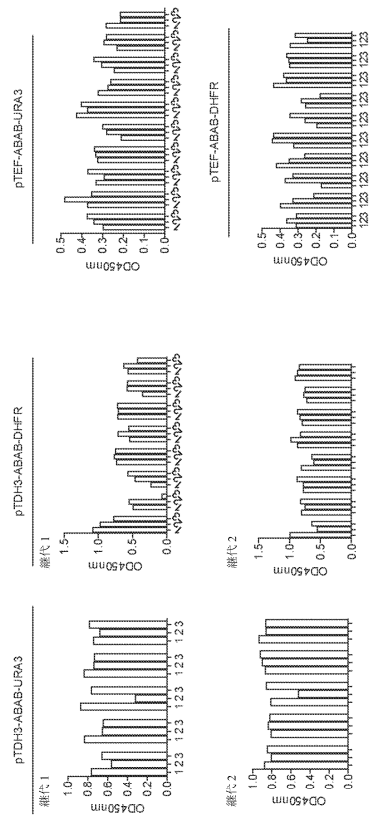
【図８０】



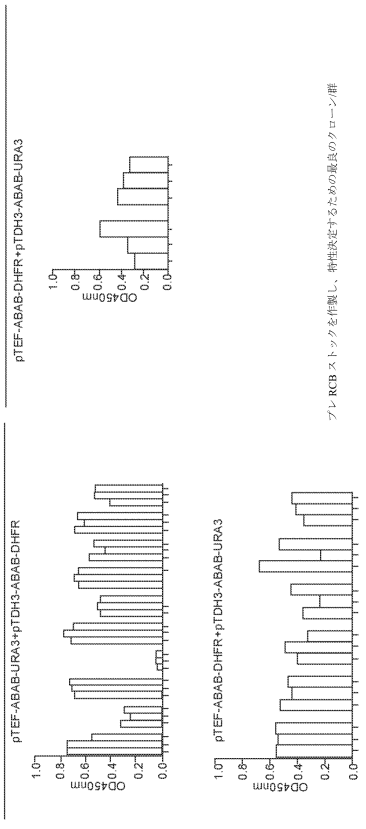
【図８１】



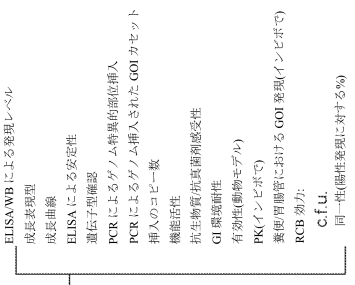
【図８２】



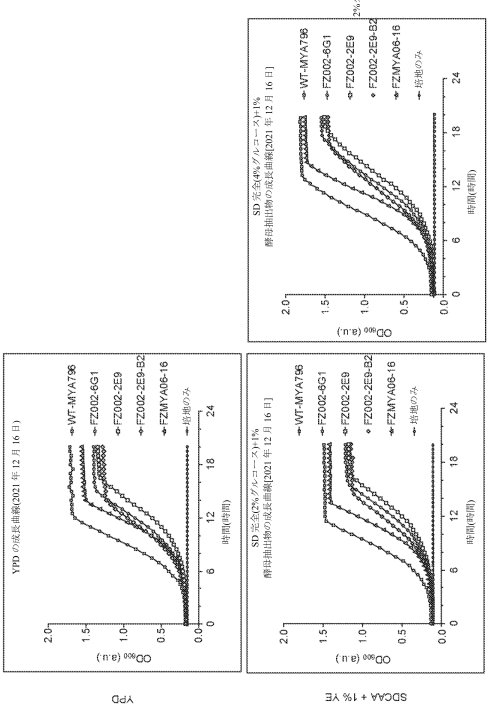
【図８３】



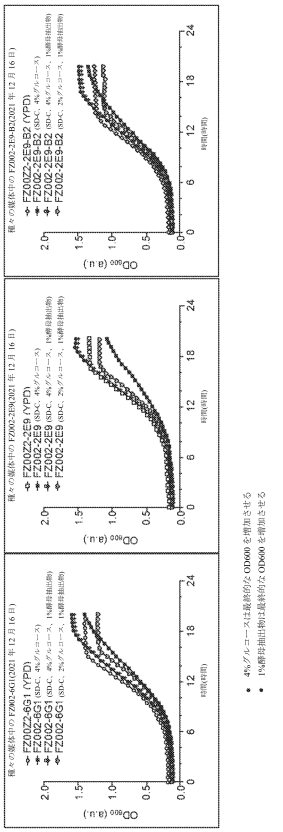
【図８４】



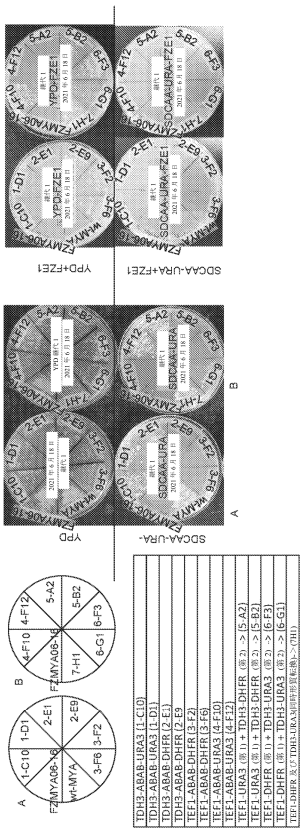
【図８５】



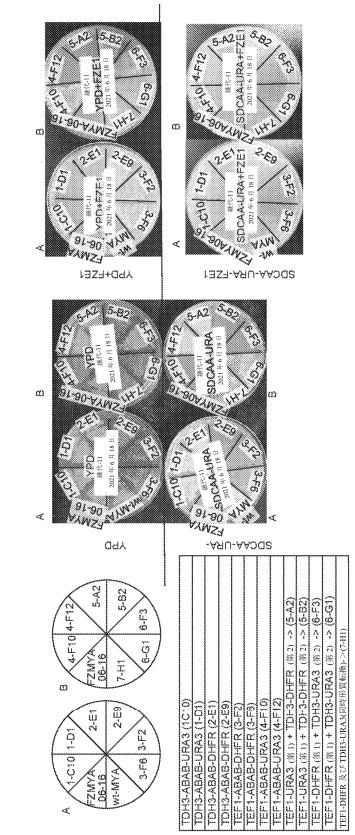
【図８６】



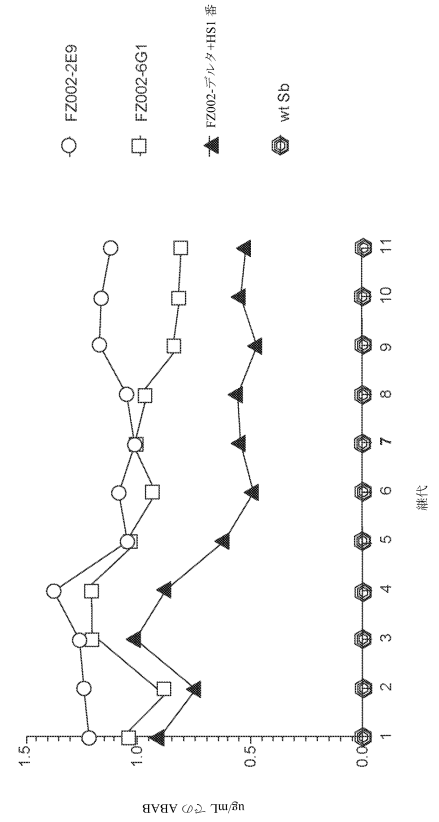
【図８７】



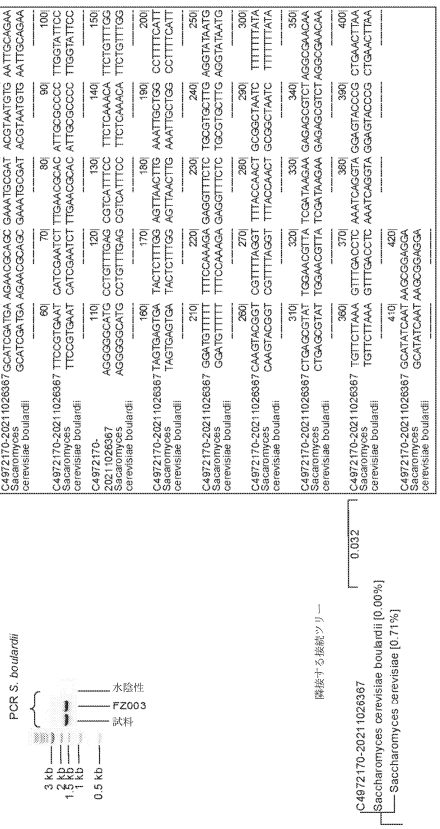
【図８８】



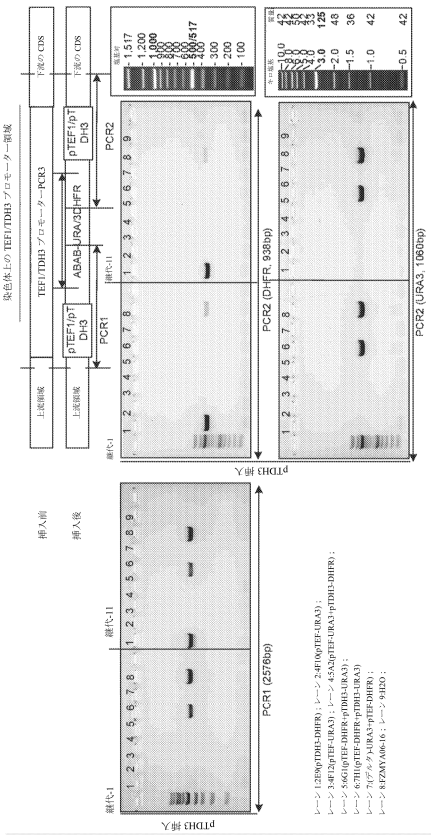
【図８９】



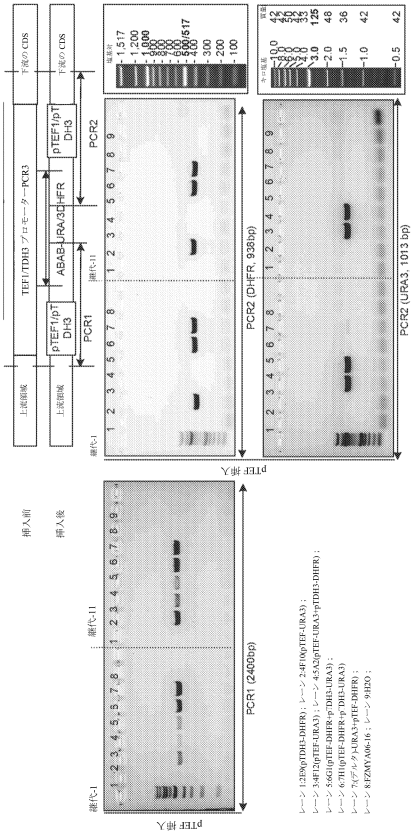
【図９０】



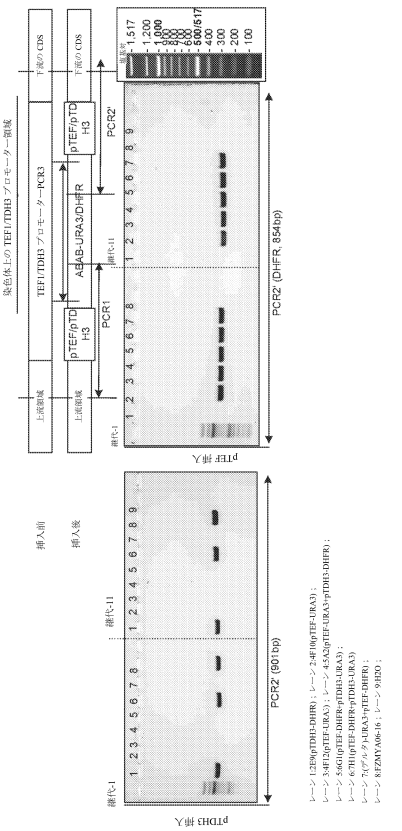
【図９１】



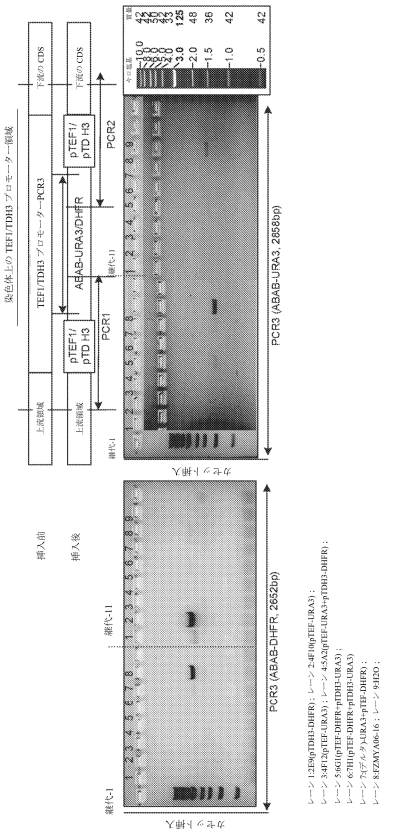
【図９２】



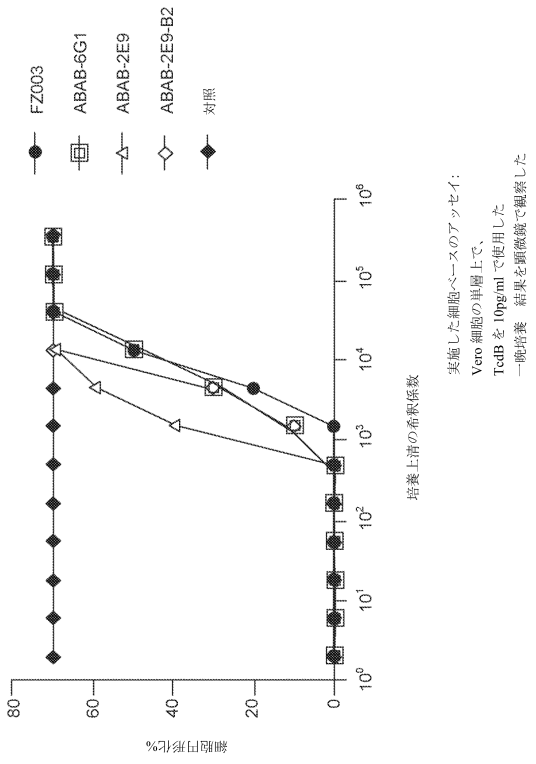
【図９３】



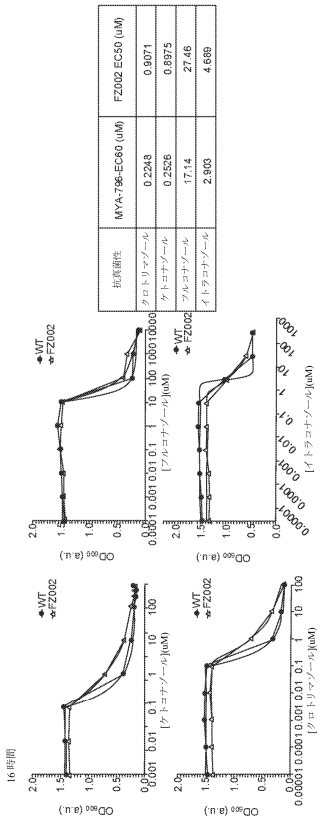
【図９４】



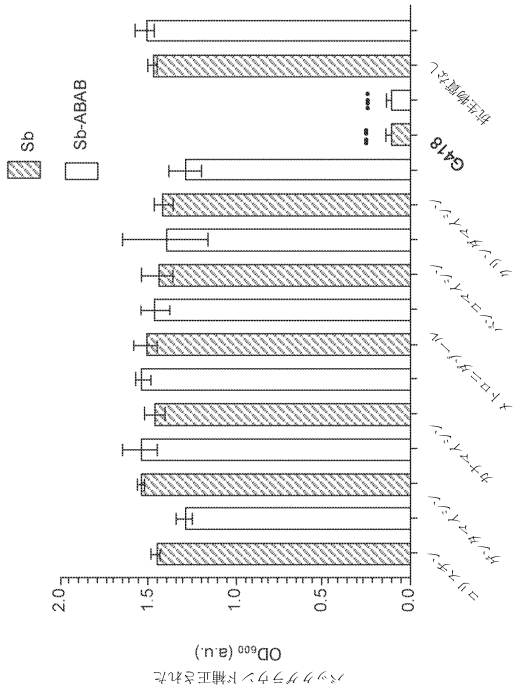
【図９５】



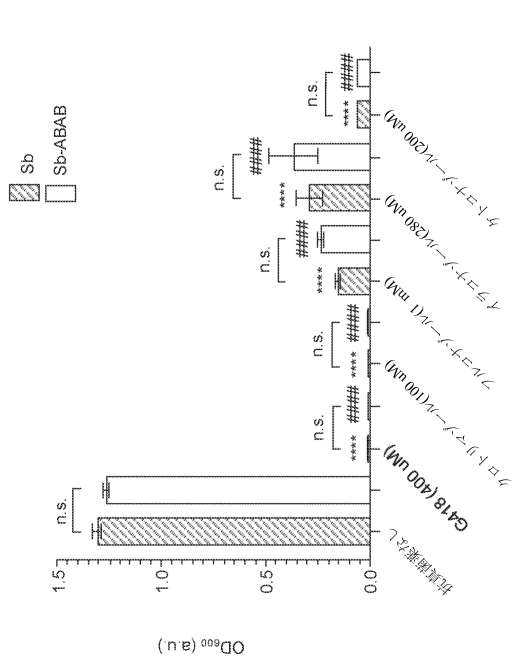
【図９６】



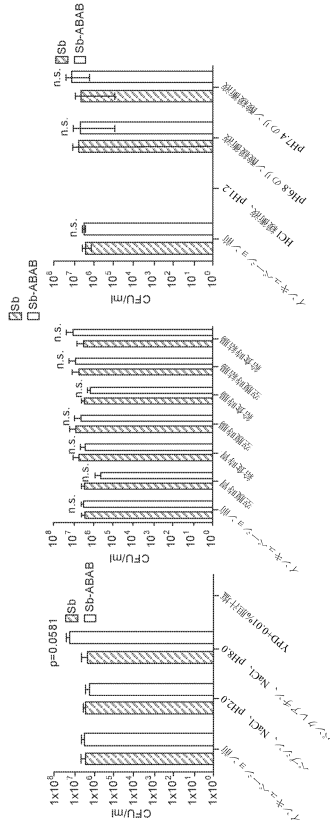
【図９７】



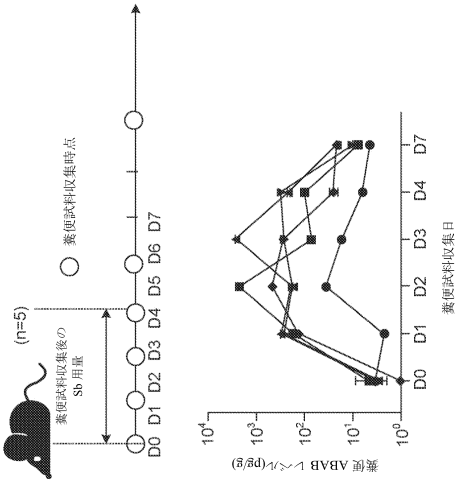
【図９８】



【図９９】


Sb
Sb-ABAB
n.s.
p=0.0581
CFU/ml
インキュベーション前
NaCl, pH5.0
NaCl, pH8.0
YPD+0.01%過酸化水素
pH7.4のリン酸緩衝液
pH5.8のリン酸緩衝液
HCl 緩衝液, pH1.2
浸漬時間
経管栄養
浸漬時間
経管栄養
浸漬時間
経管栄養

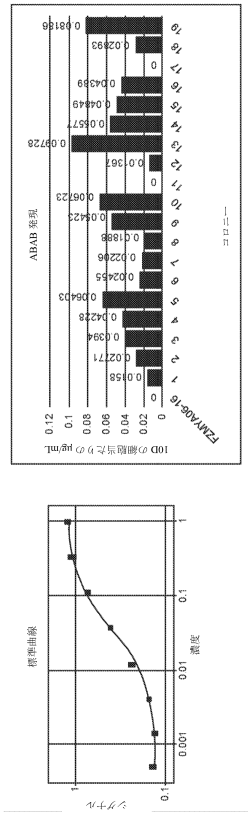
【図１００】



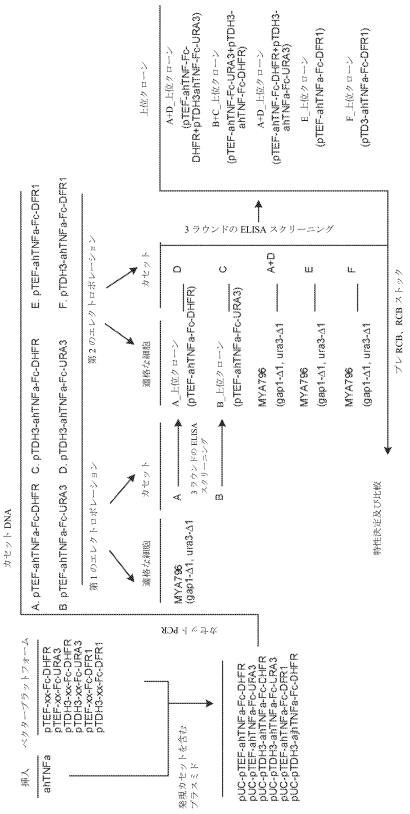
【図１０１】



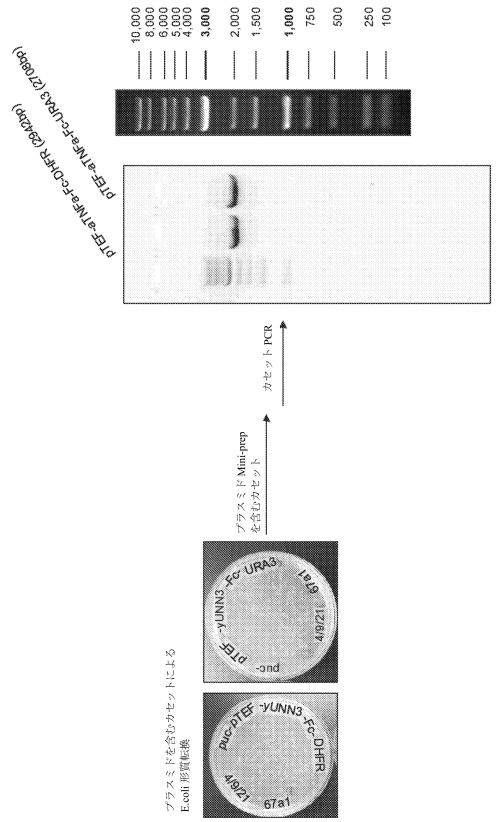
【図１０２】



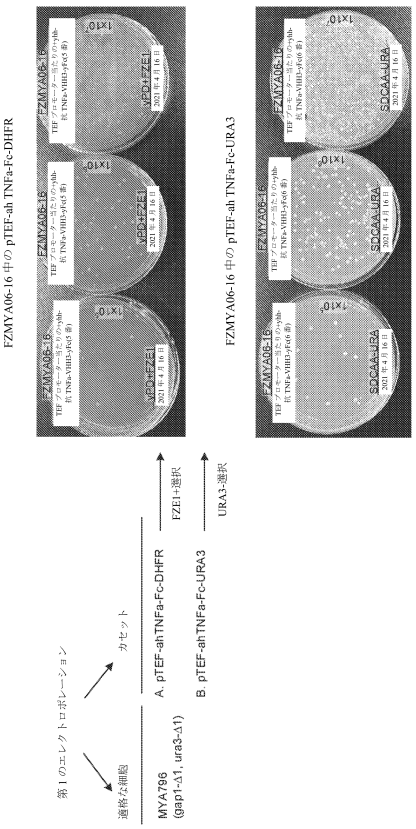
【図１０３】



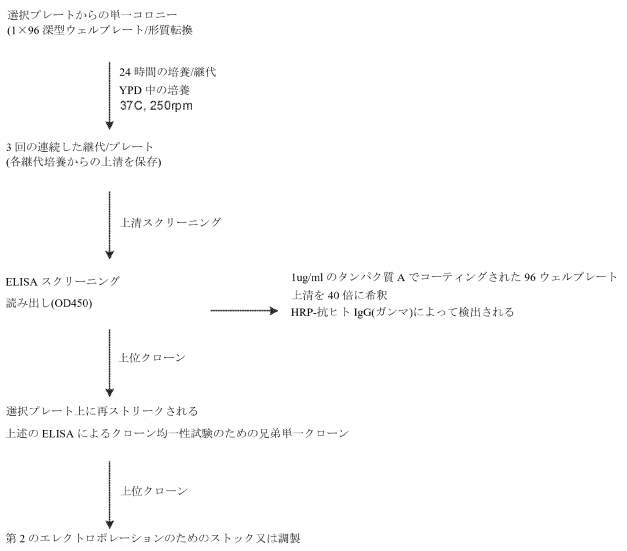
【図１０４】



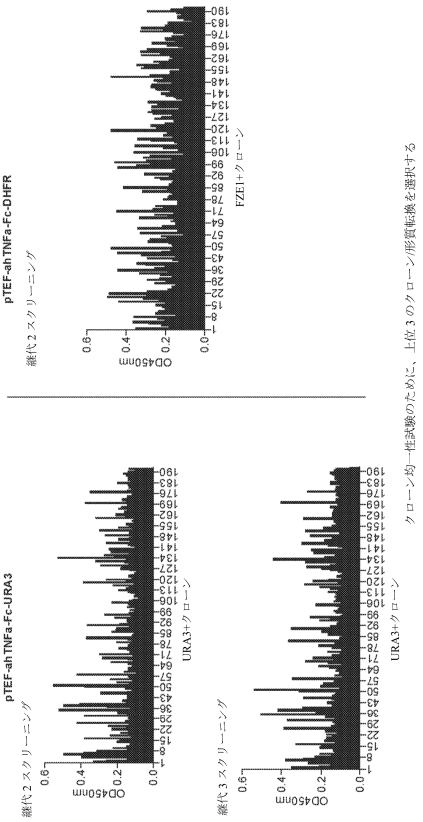
【図１０５】



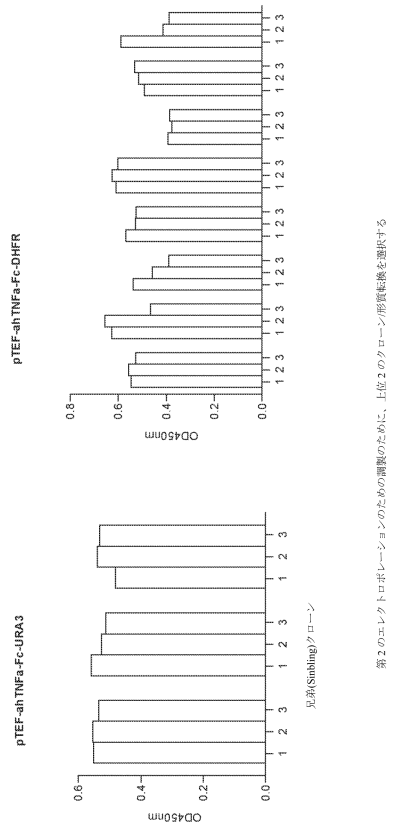
【図１０６】



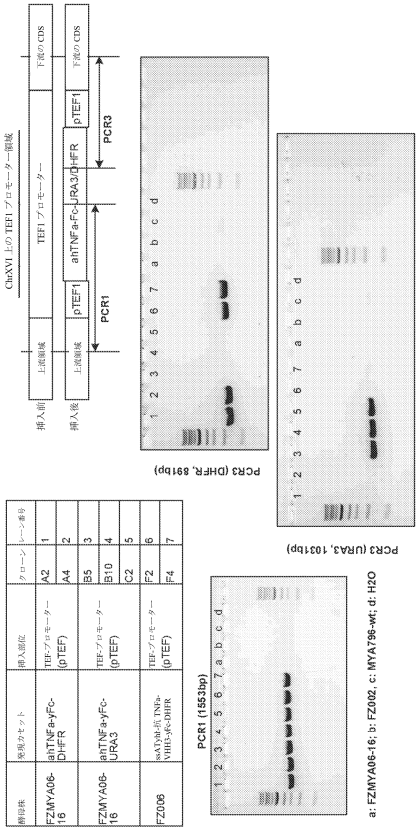
【図１０７】



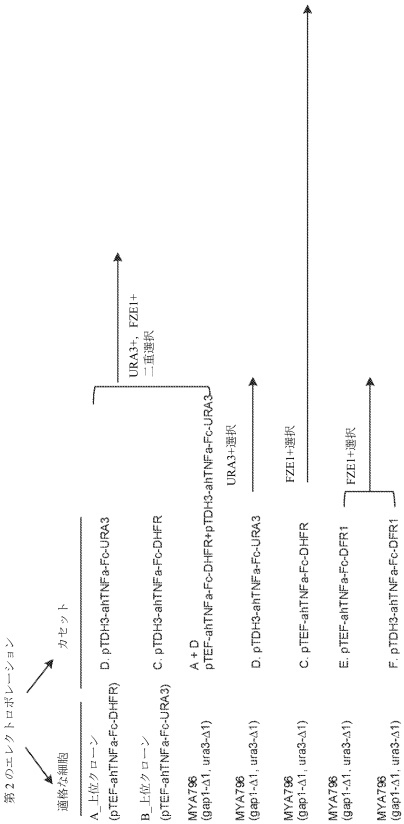
【図１０８】



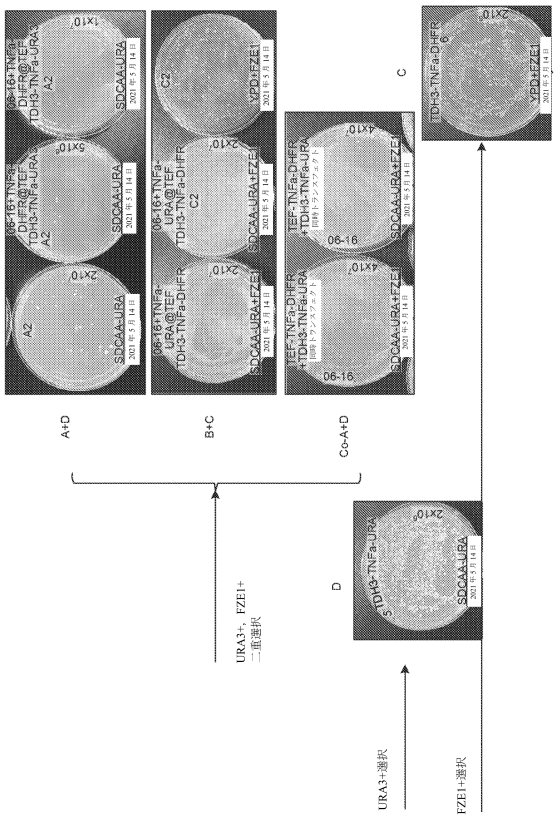
【図１０９】



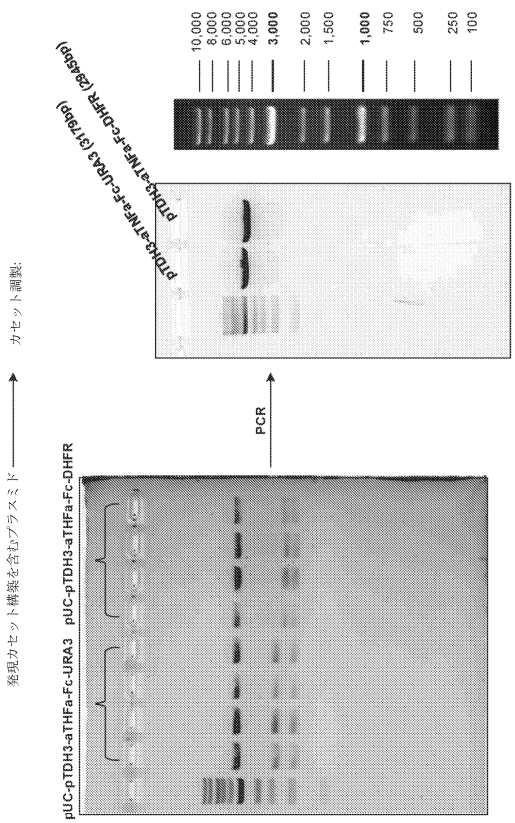
【図１１０－１】



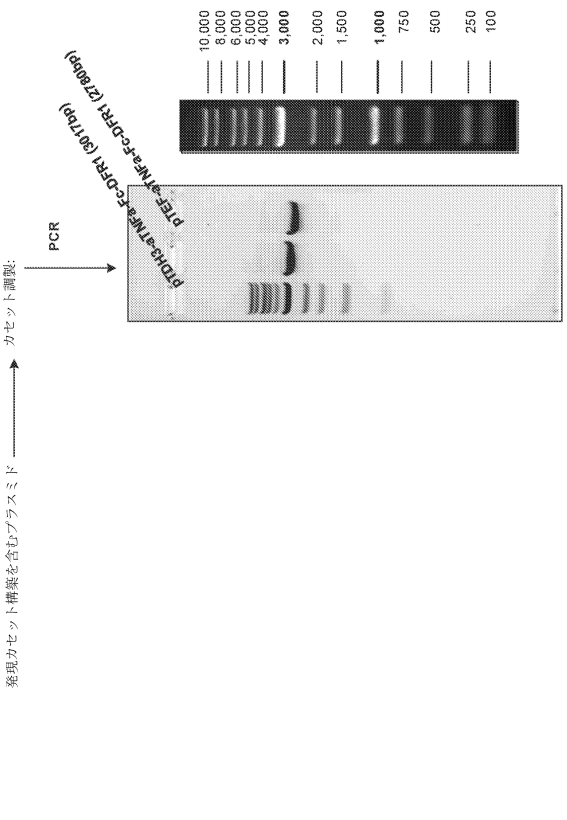
【図１１０－２】



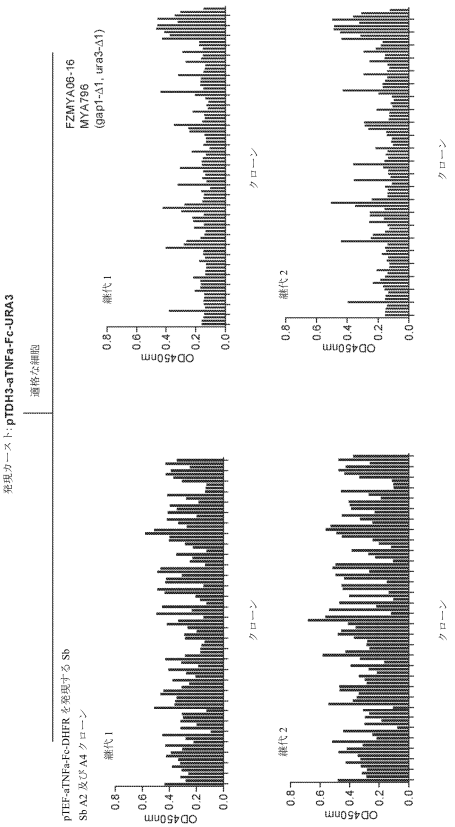
【図１１１】



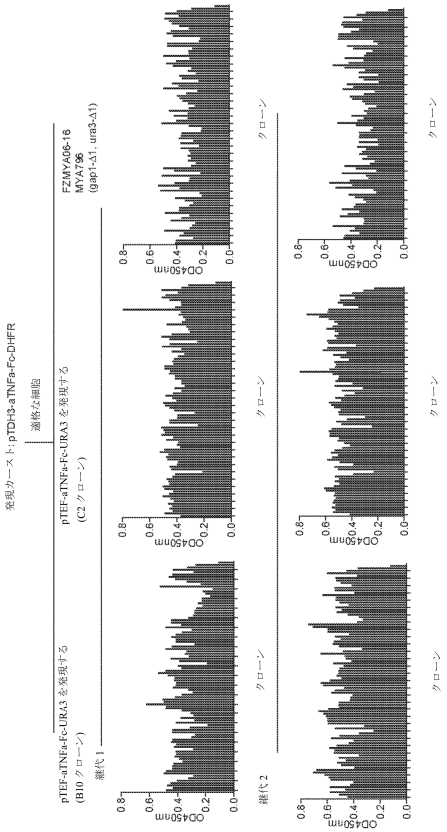
【図１１２】



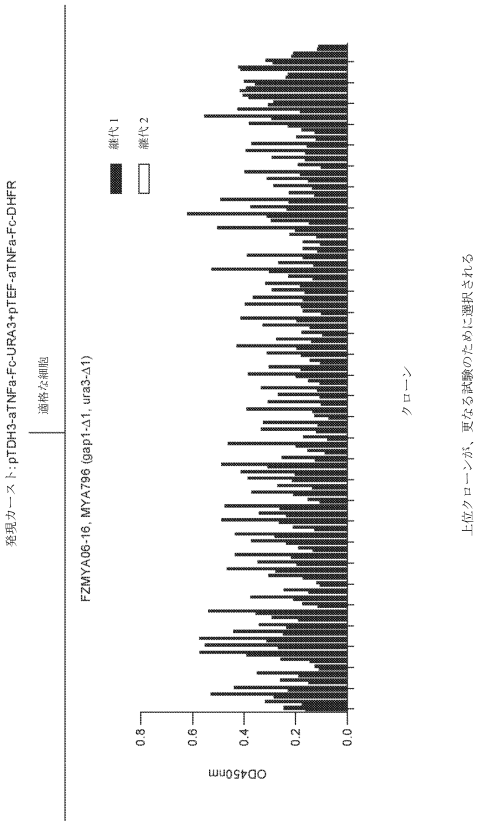
【図１１３】



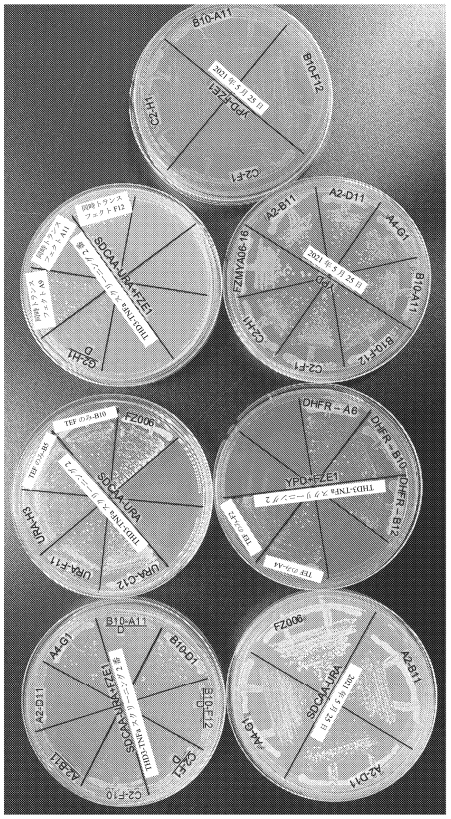
【図１１４】



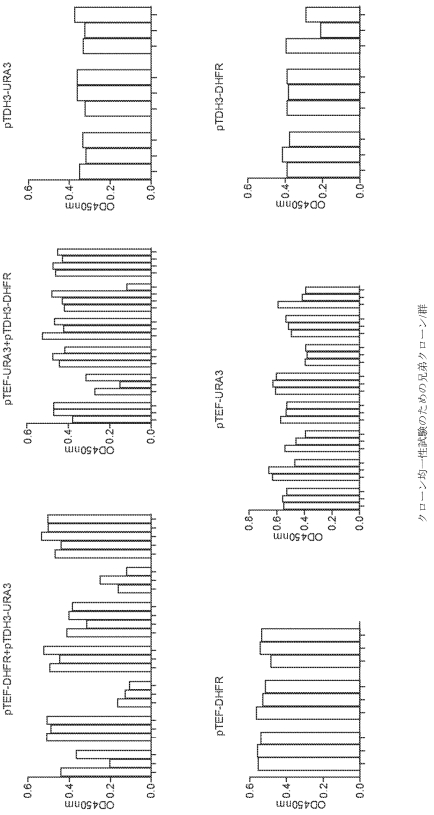
【図１１５】



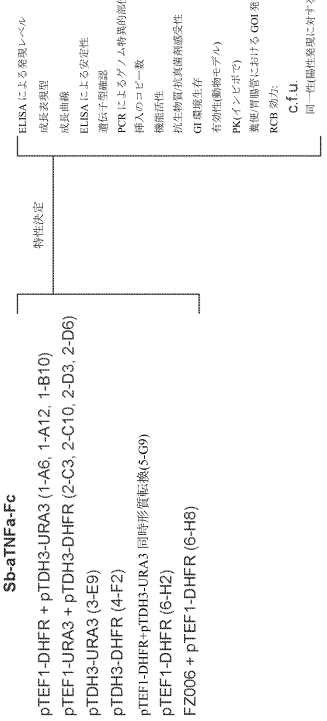
【図１１６】



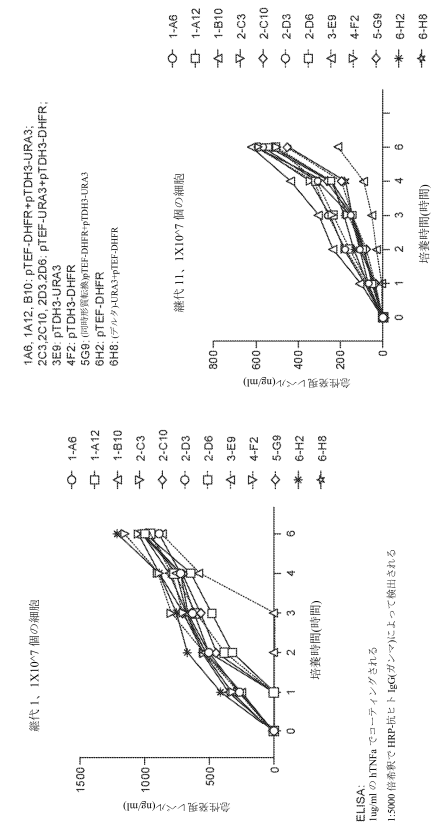
【図１１７】



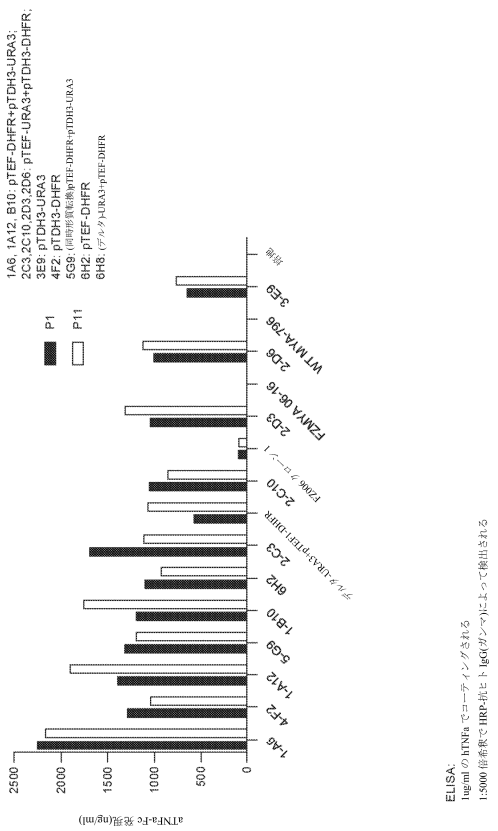
【図１１８】



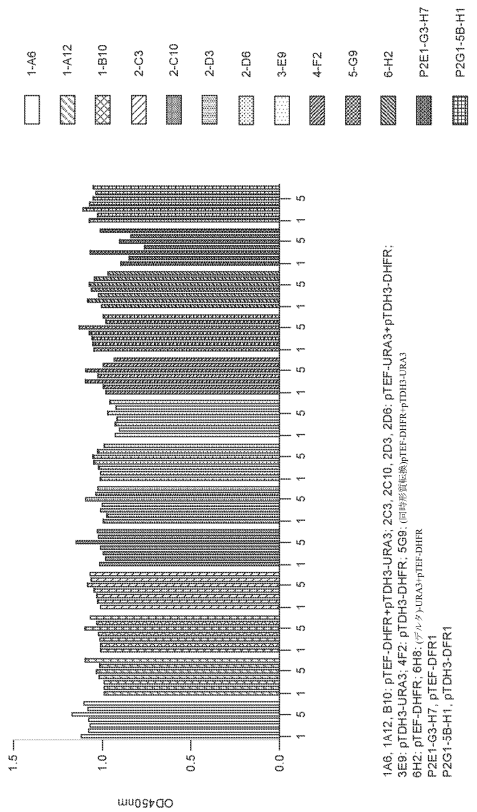
【図１１９】



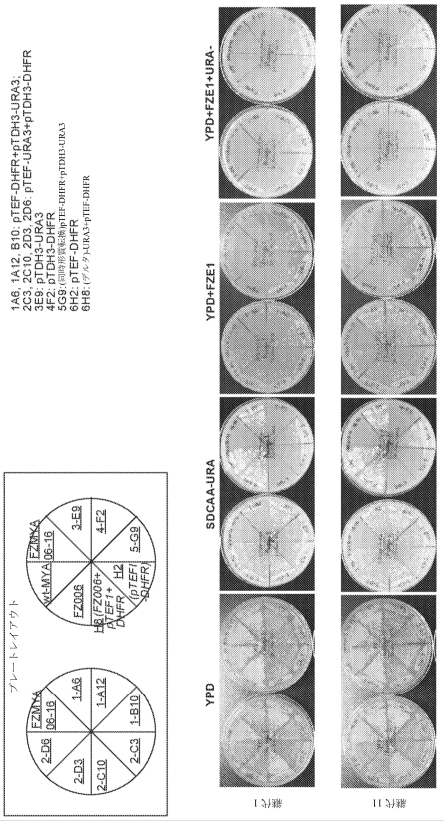
【図１２０】



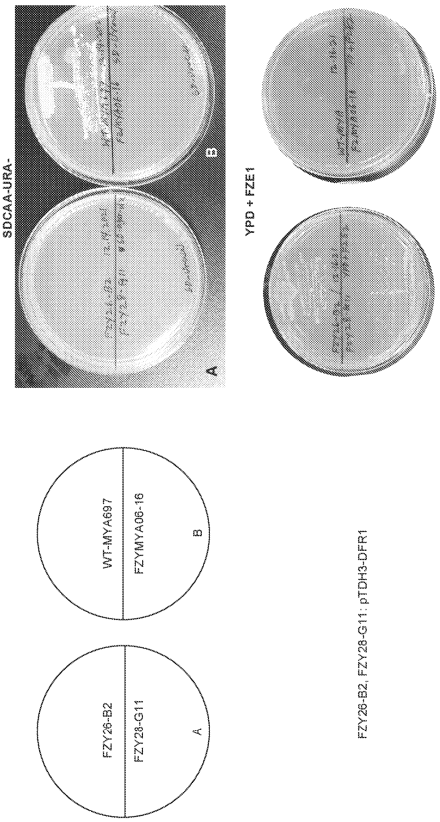
【図１２１】



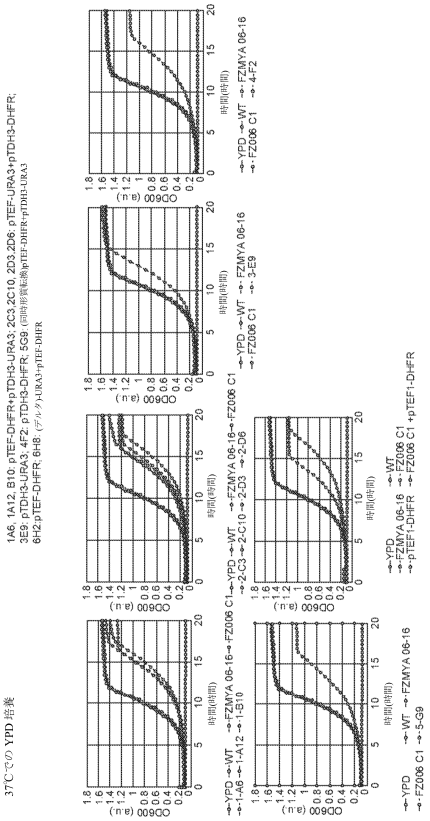
【図１２２】



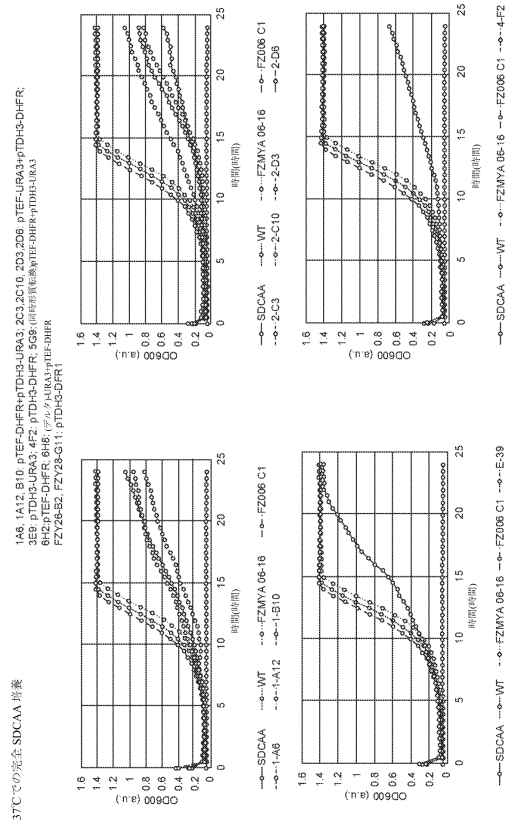
【図１２３】



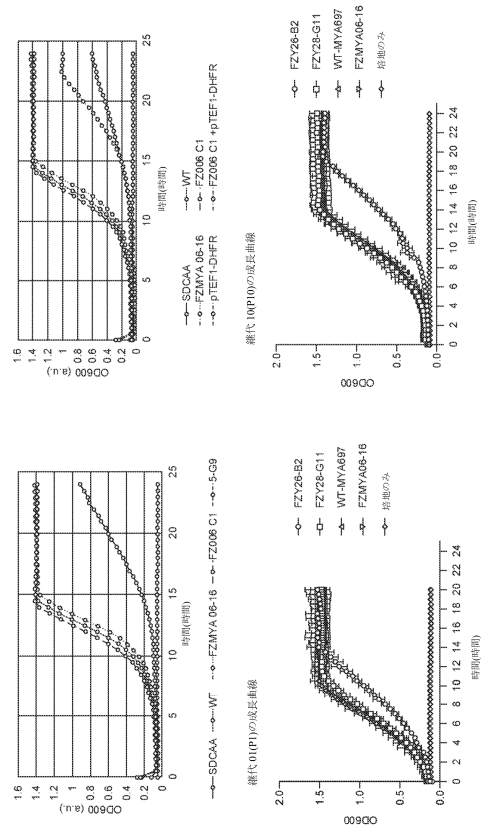
【図１２４】



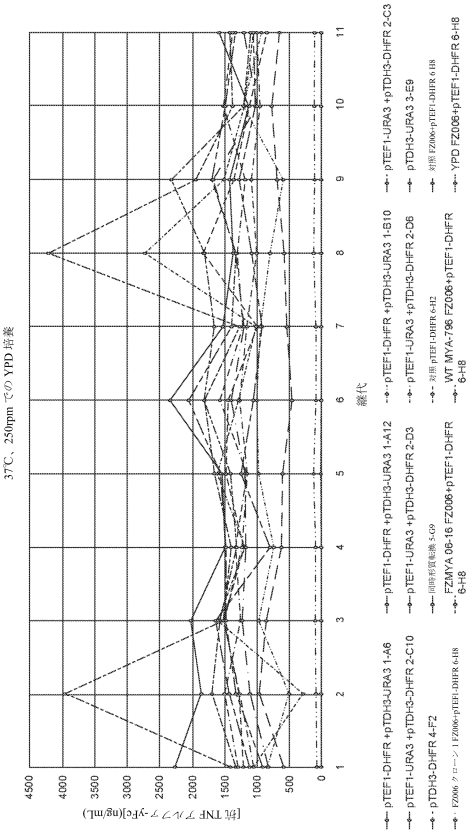
【図１２５－１】



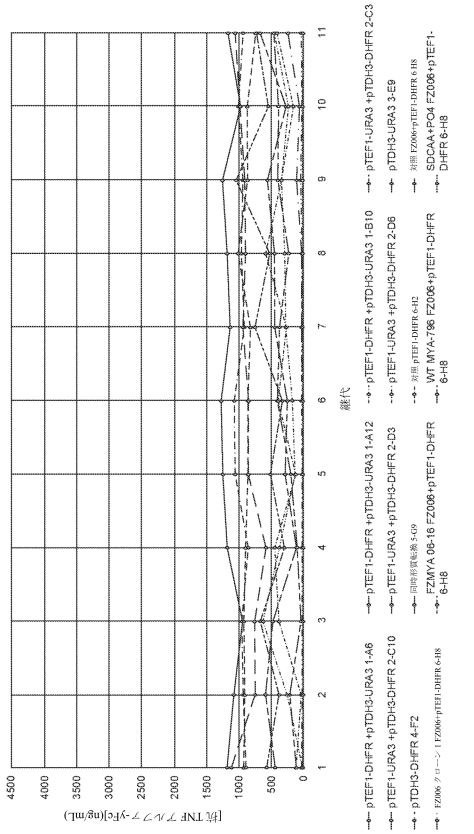
【図１２５－２】



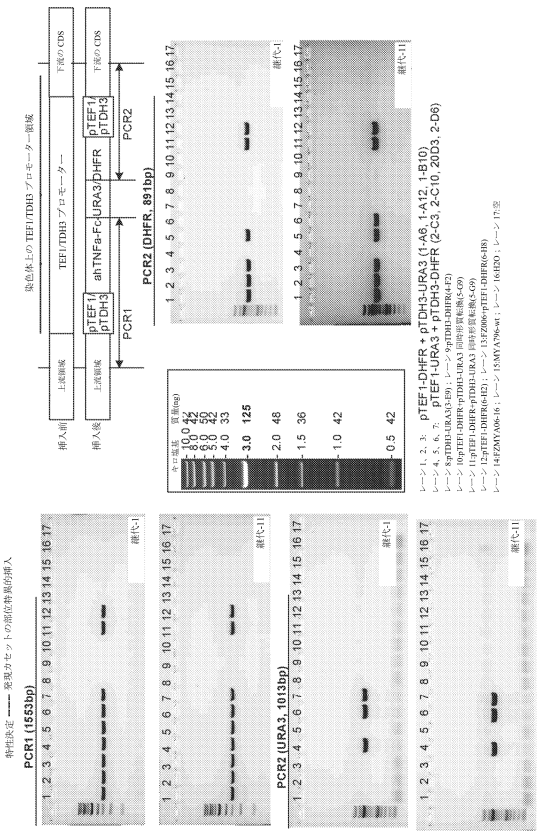
【図１２６】



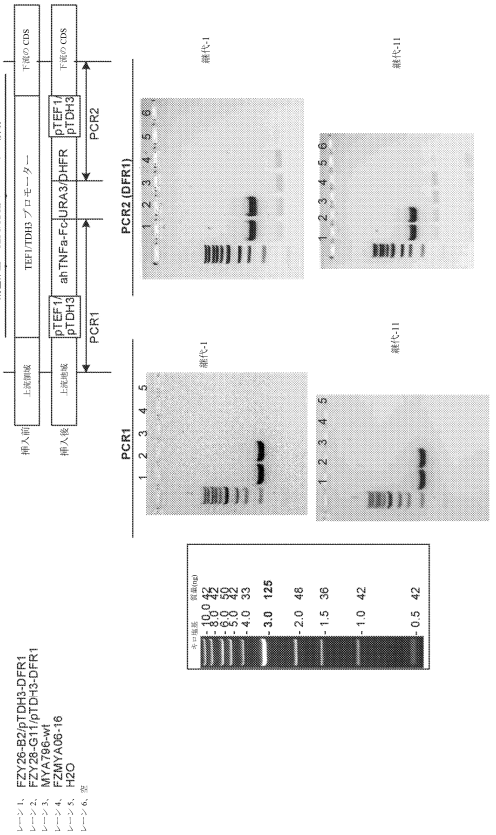
【図１２７】



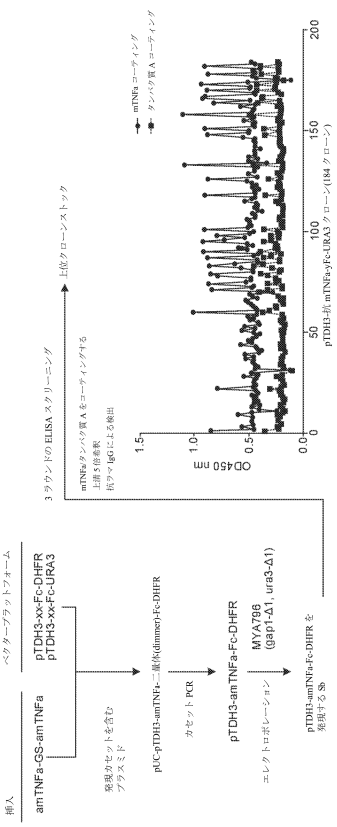
【図１２８】



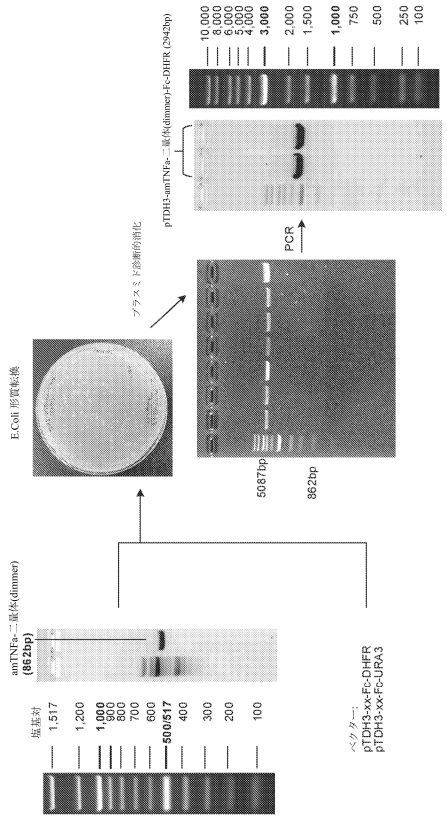
【図１２９】



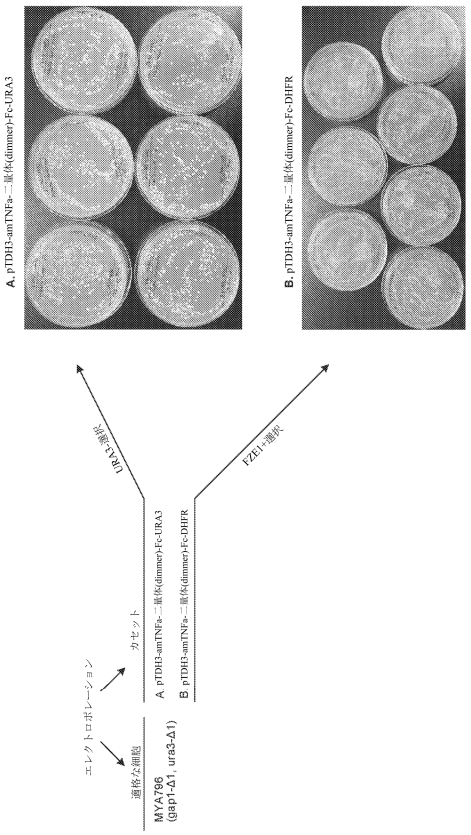
【図１３０】



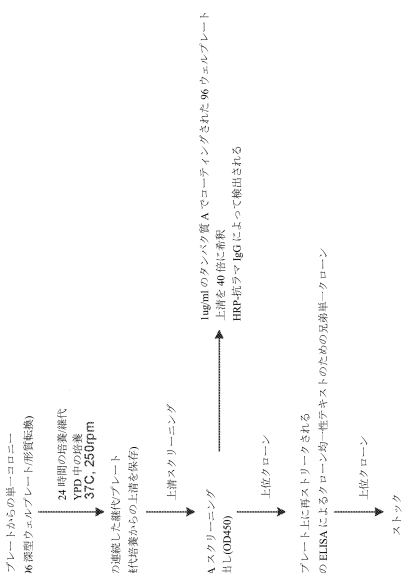
【図１３１】



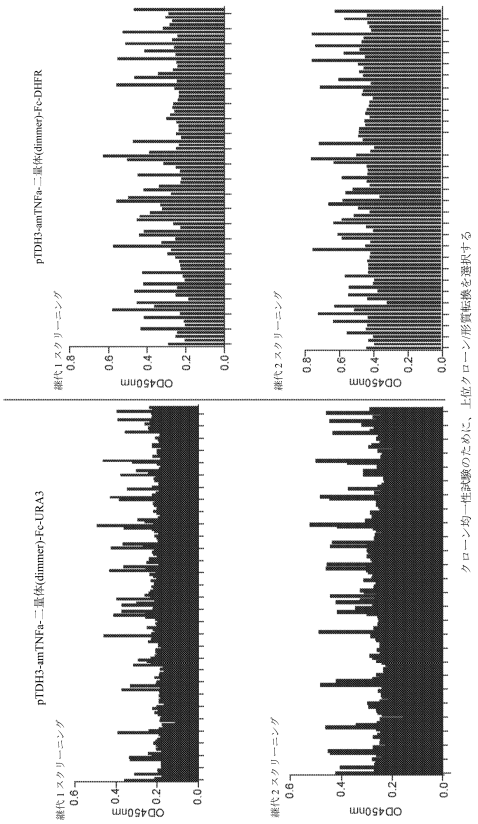
【図１３２】



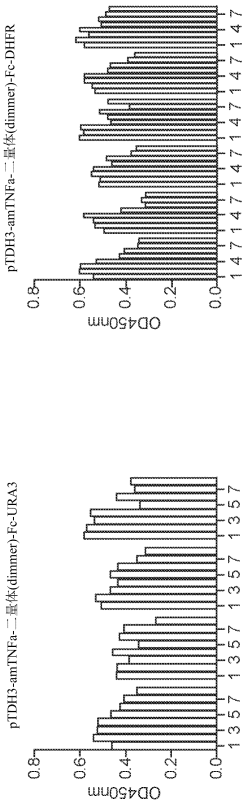
【図１３３】



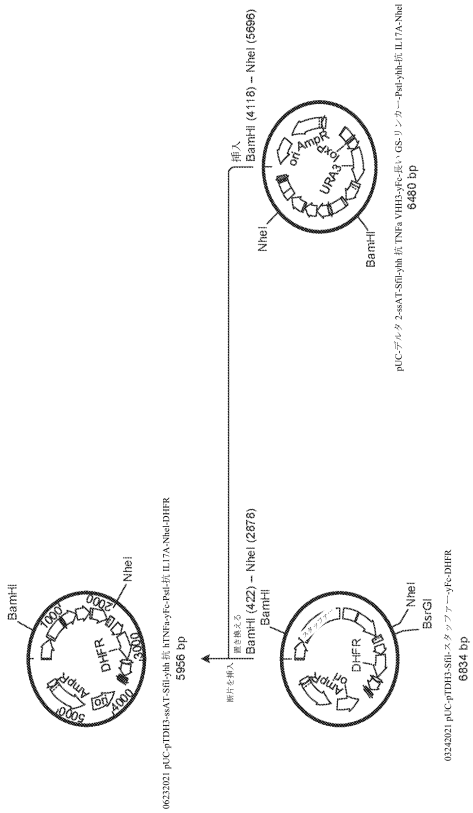
【図１３４】



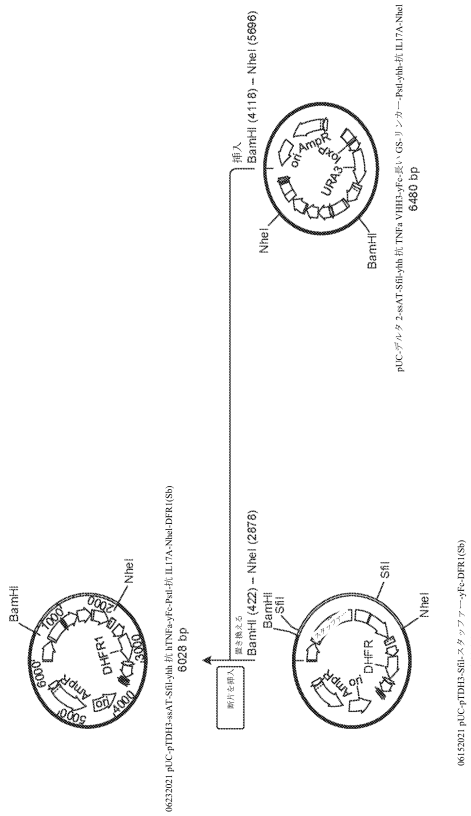
【図１３５】



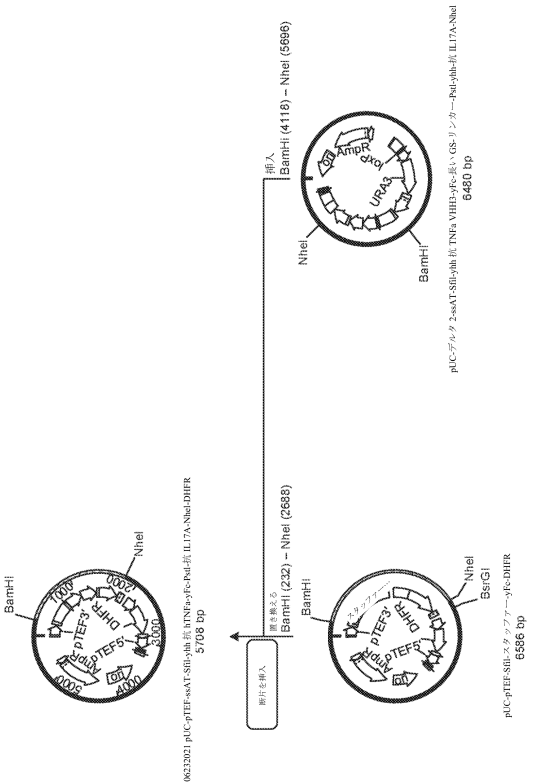
【図１３６】



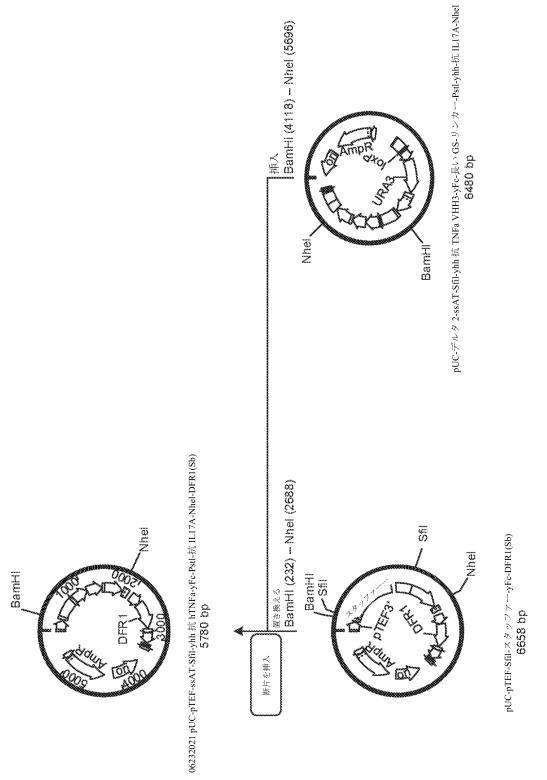
【図１３７】



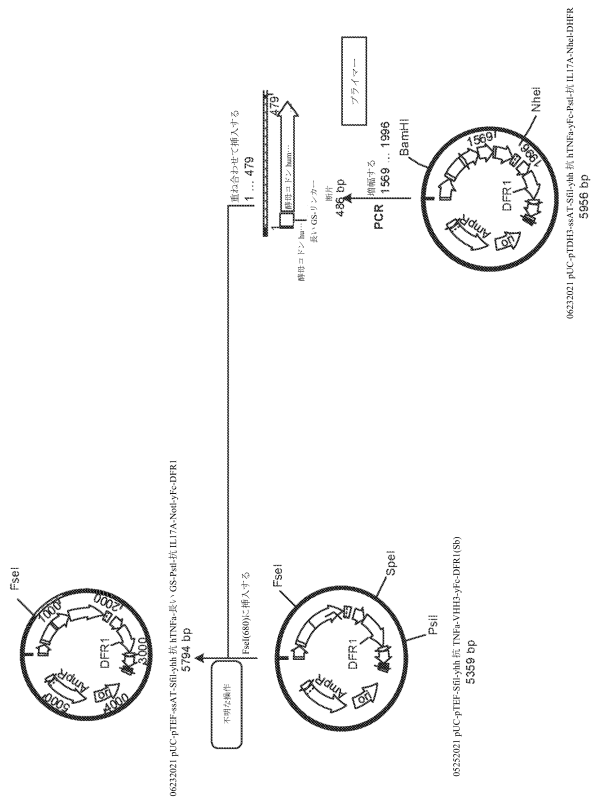
【図１３８】



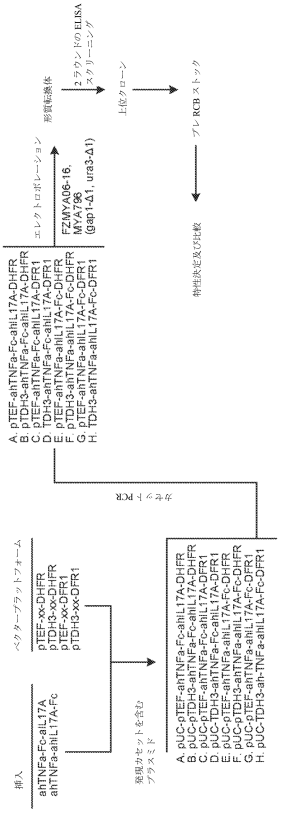
【図１３９】



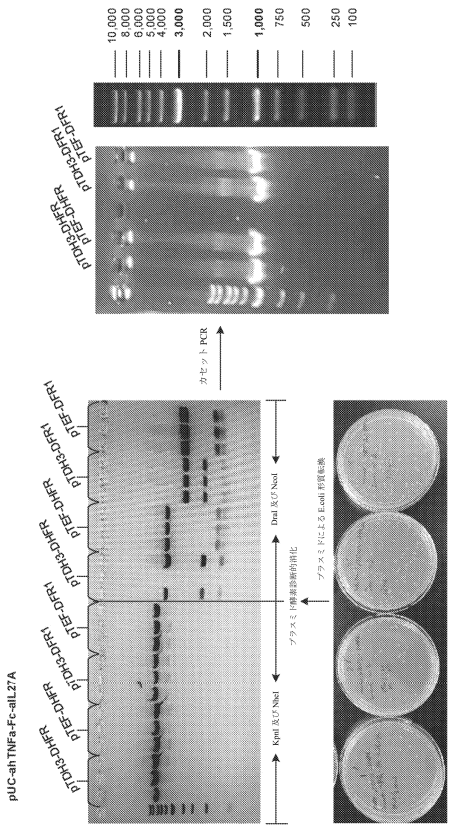
【図１４０】



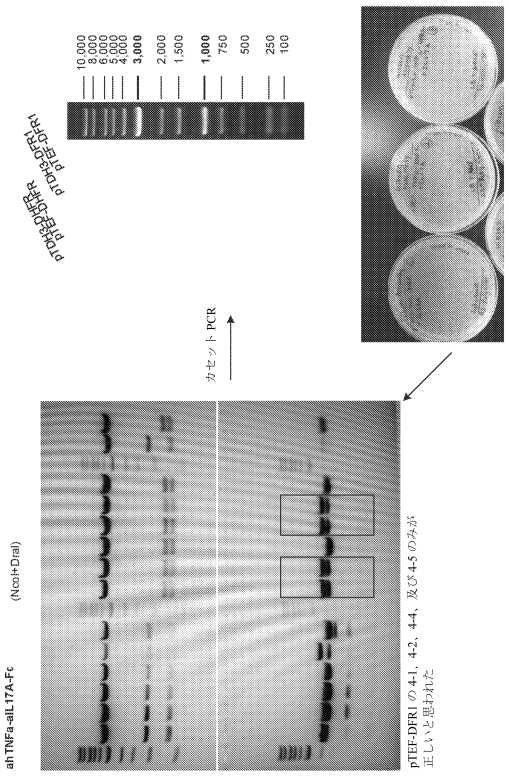
【図１４１】



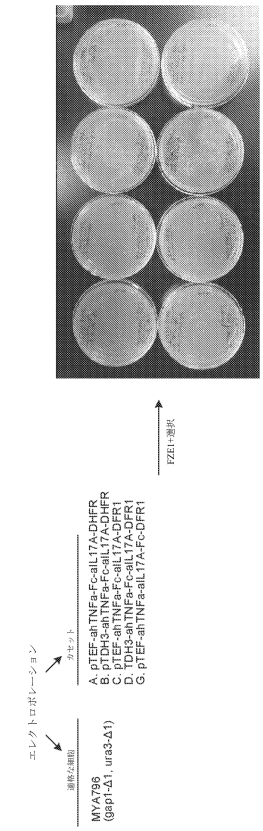
【図１４２】



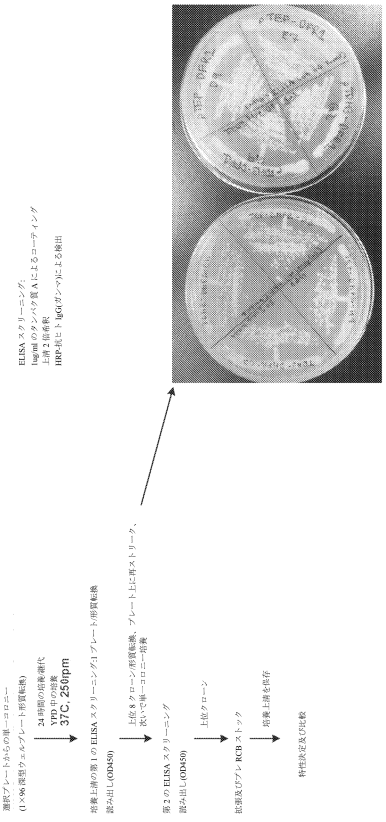
【図１４３】



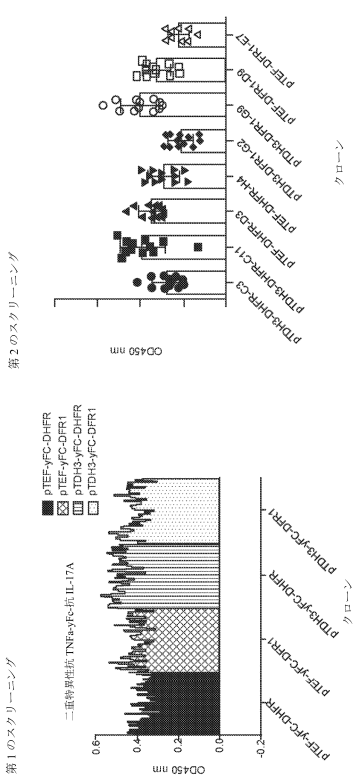
【図１４４】



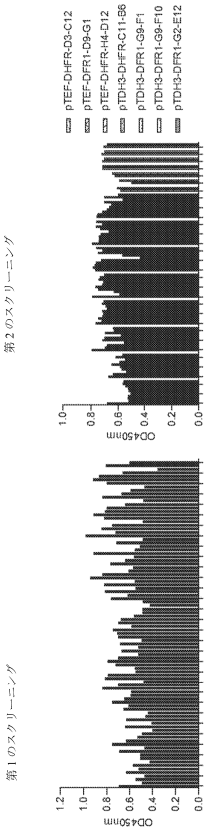
【図１４５】



【図１４６】



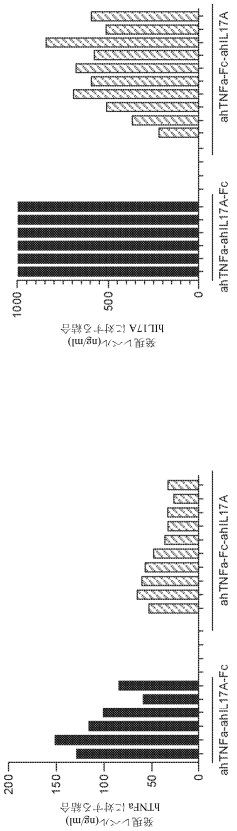
【図１４７】



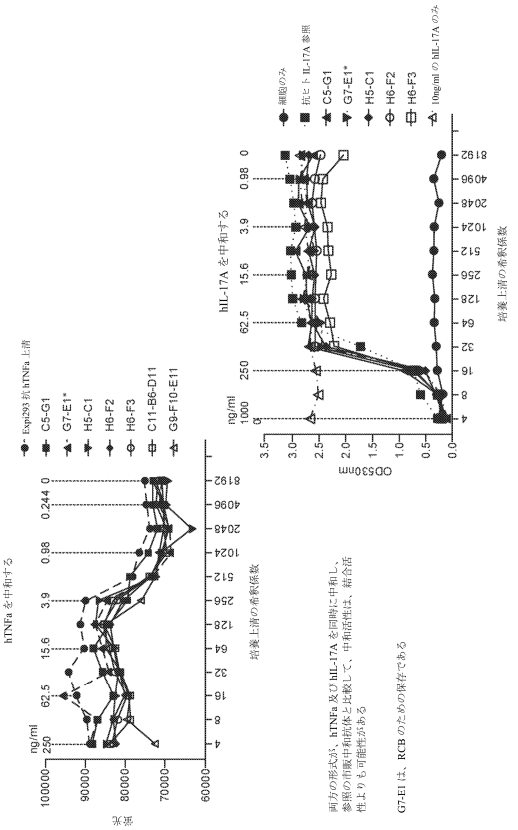
【図１４８】



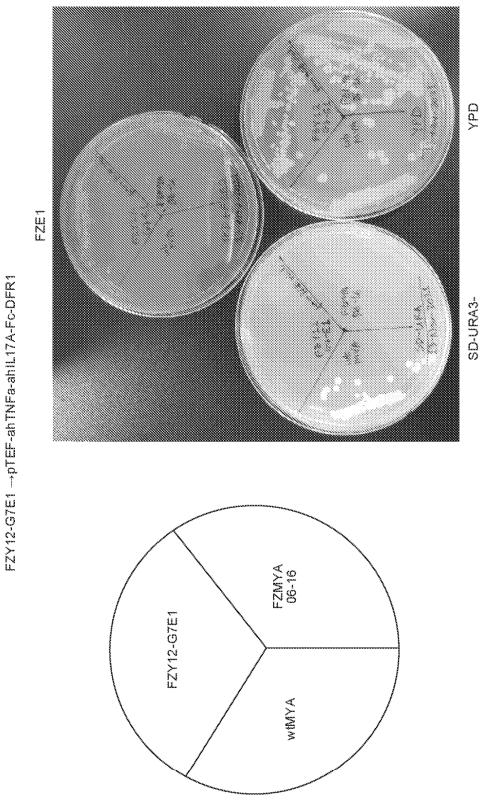
【図１４９】



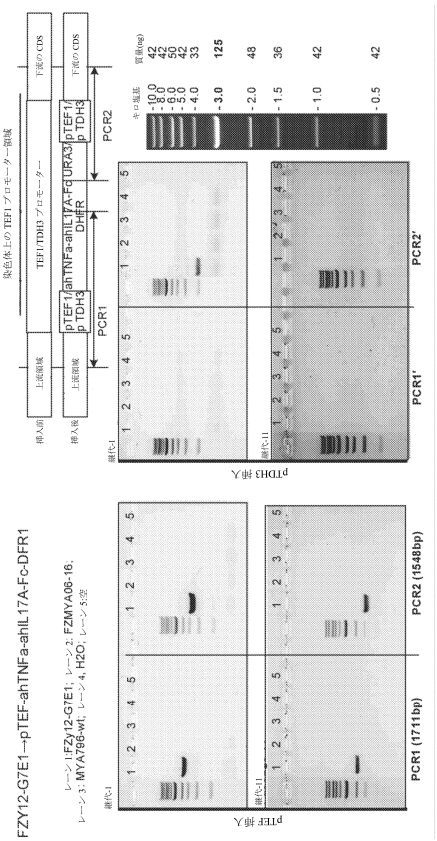
【図１５０】



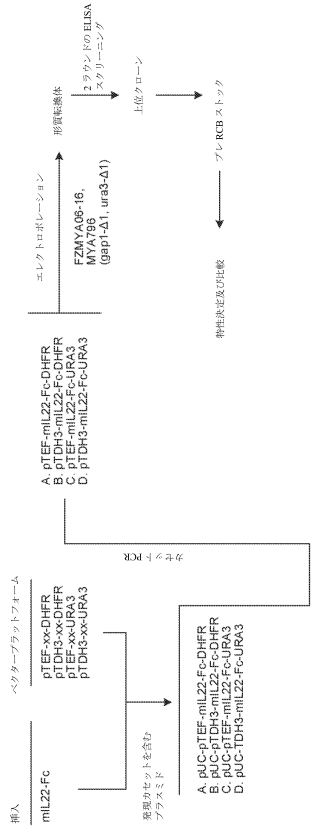
【図１５１】



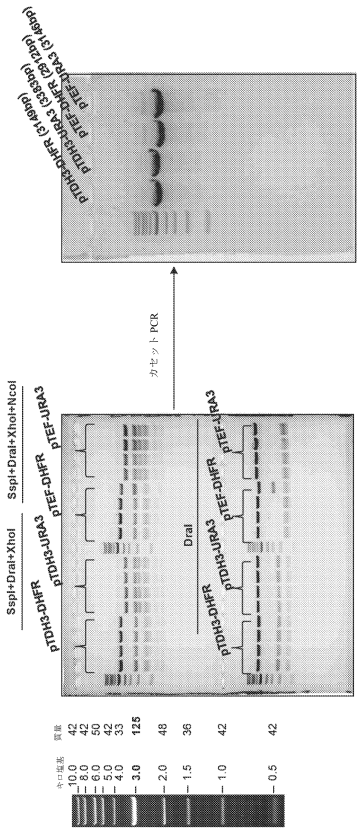
【図１５２】



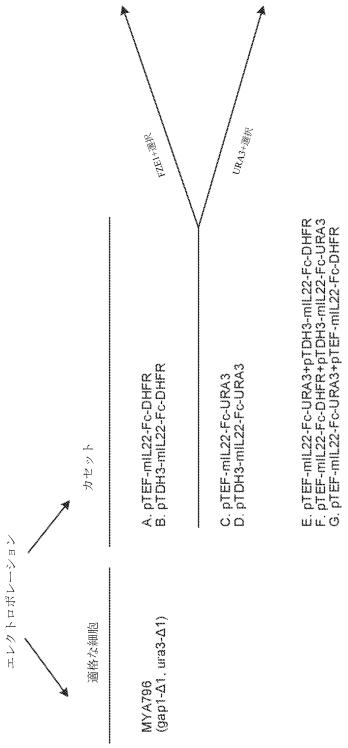
【図１５３】



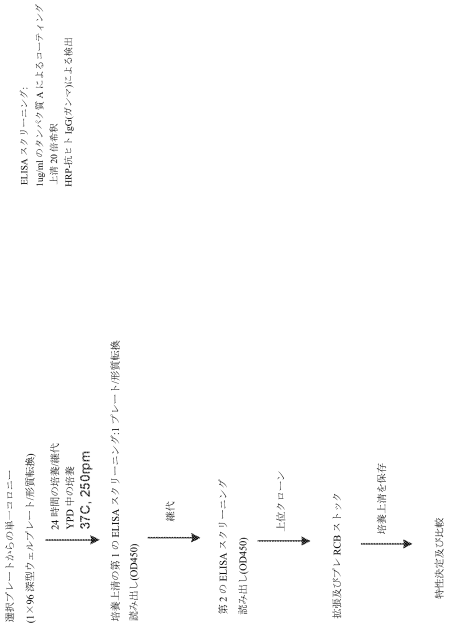
【図１５４】



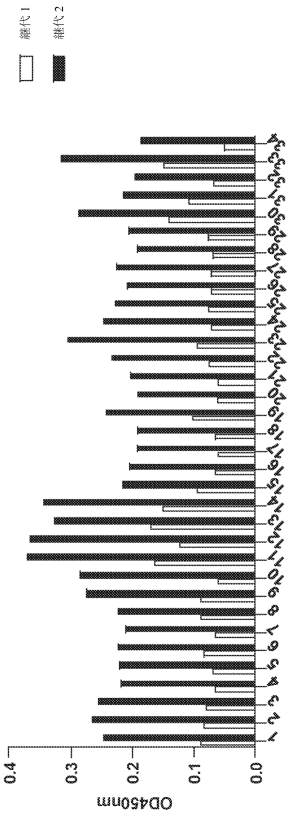
【図１５５】



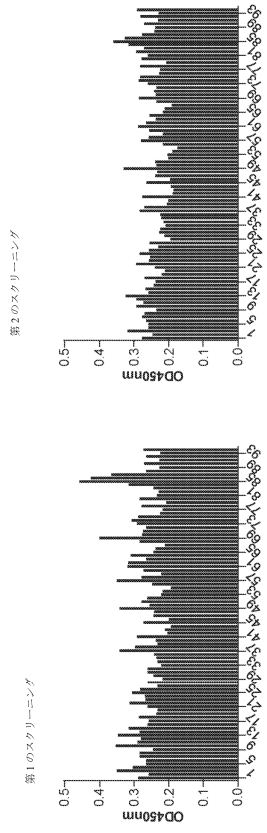
【図１５６】



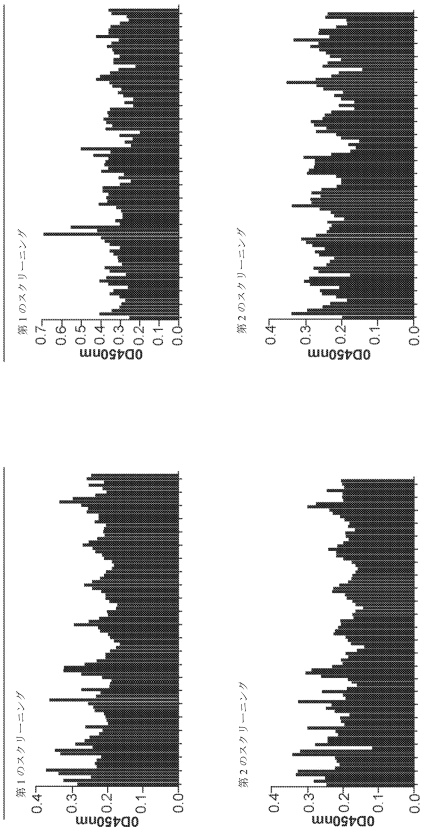
【図１５７】



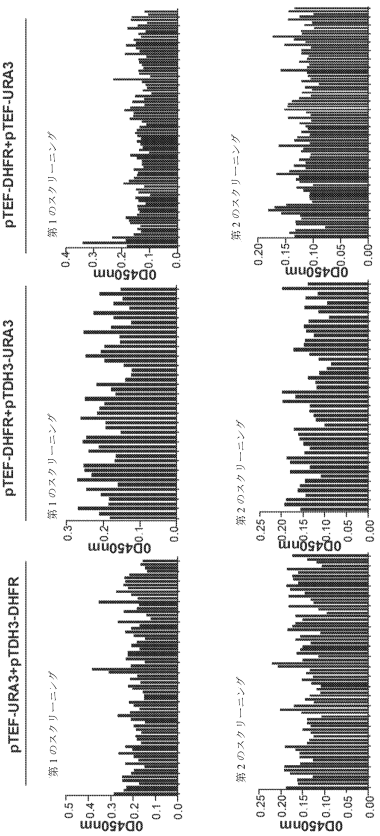
【図１５８】



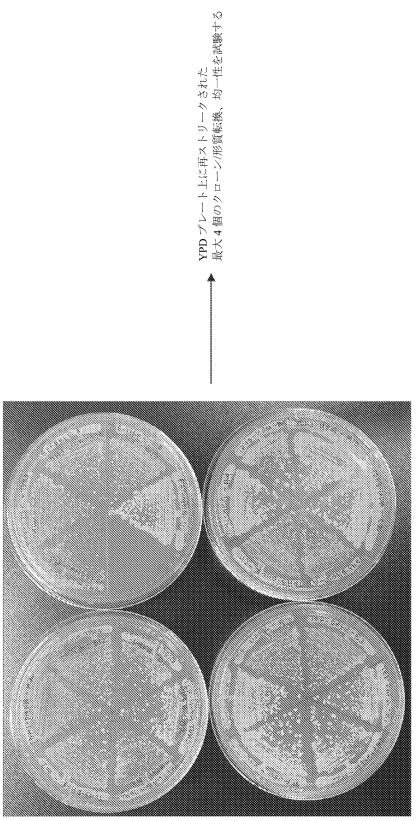
【図１５９】



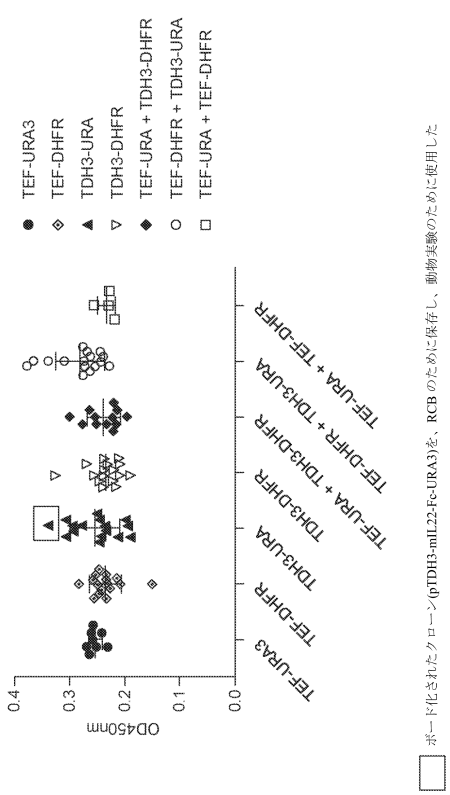
【図１６０】



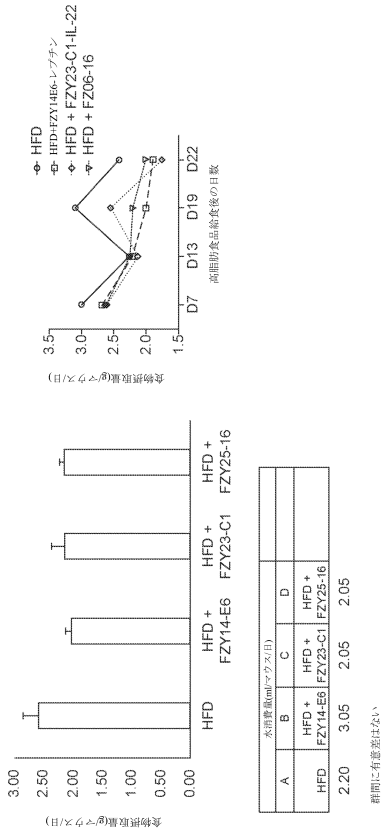
【図１６１】



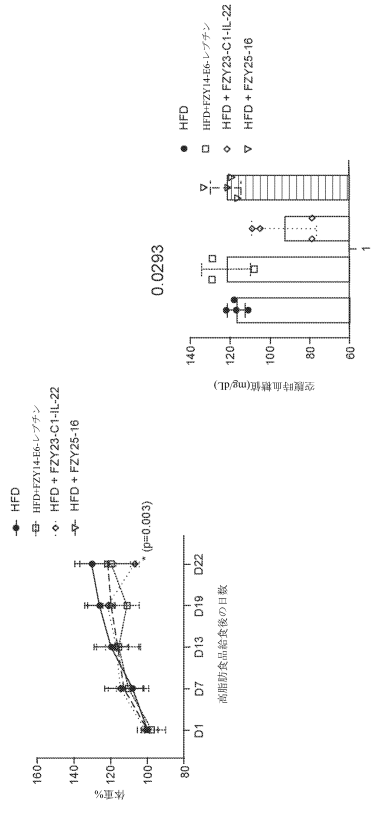
【図１６２】



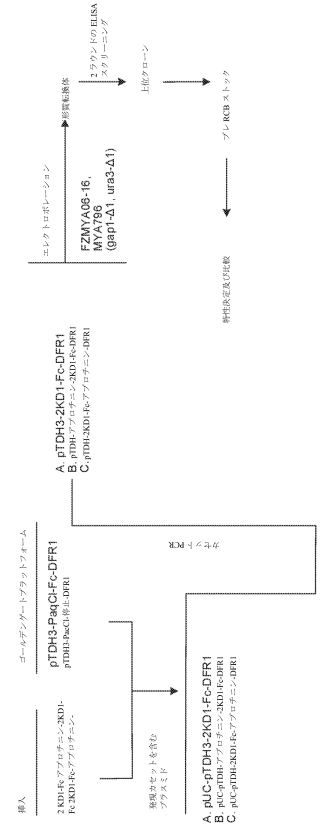
【図１６３】



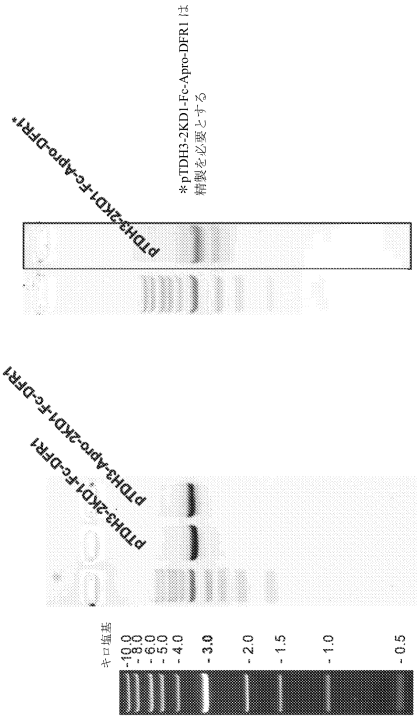
【図１６４】



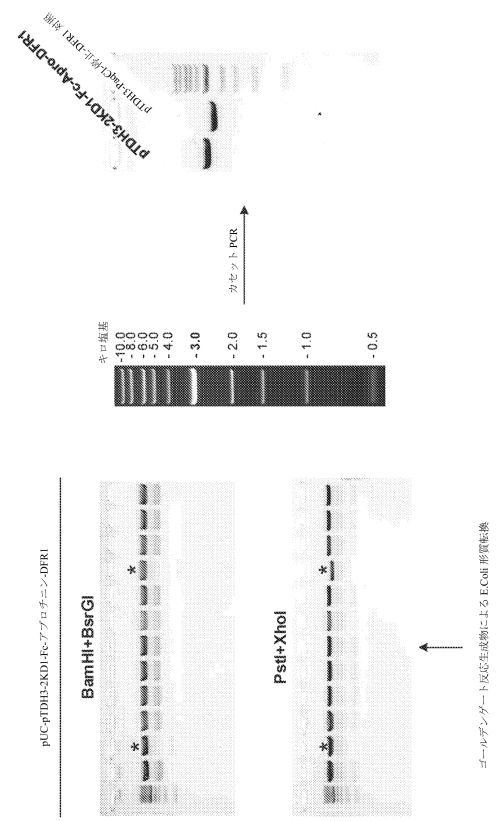
【図１６５】



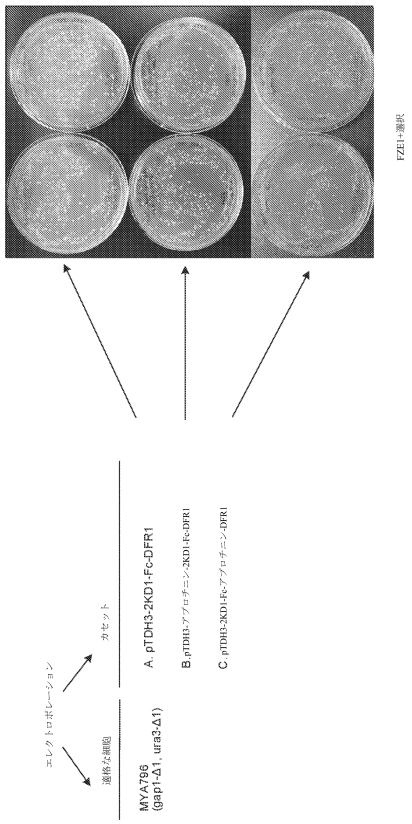
【図１６６】



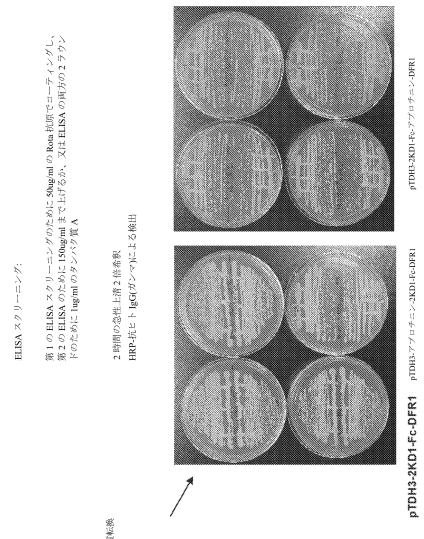
【図１６７】



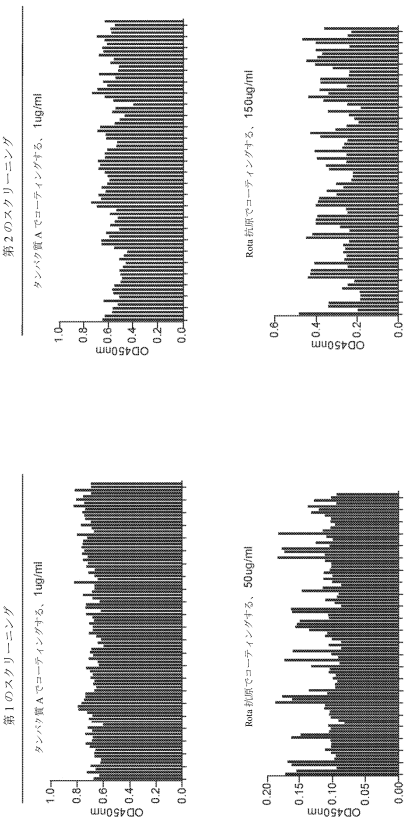
【図１６８】



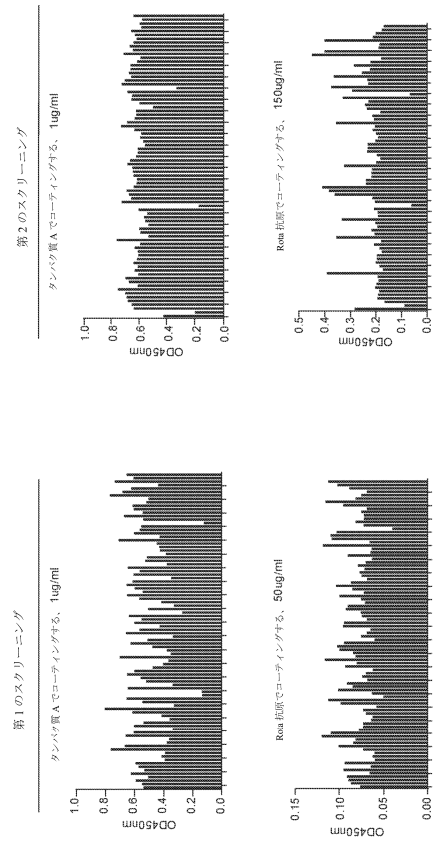
【図１６９】



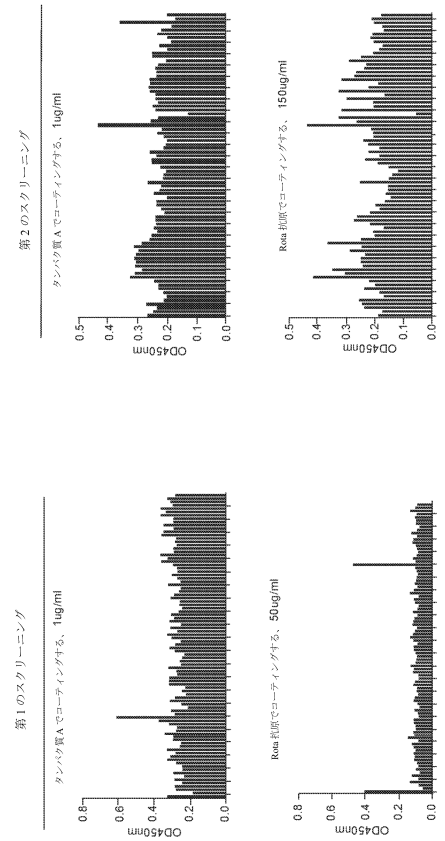
【図１７０】



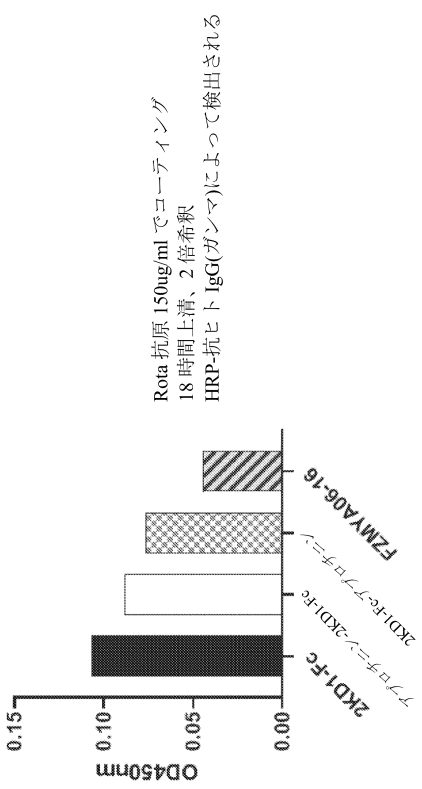
【図１７１】



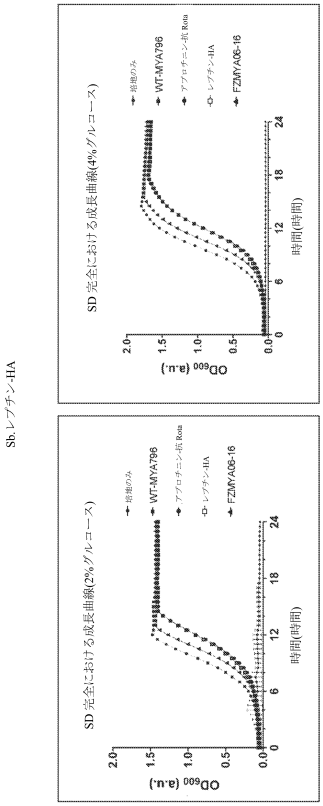
【図１７２】



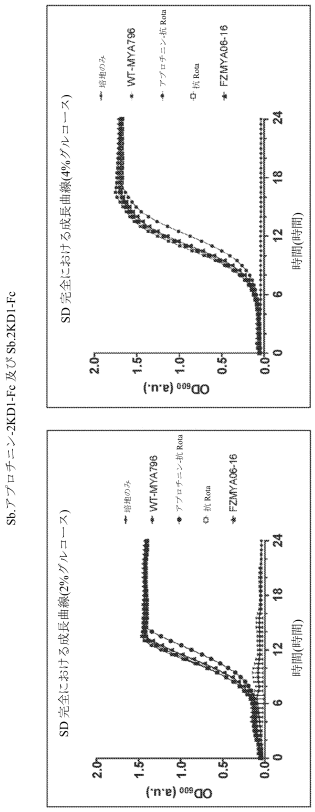
【図１７３】



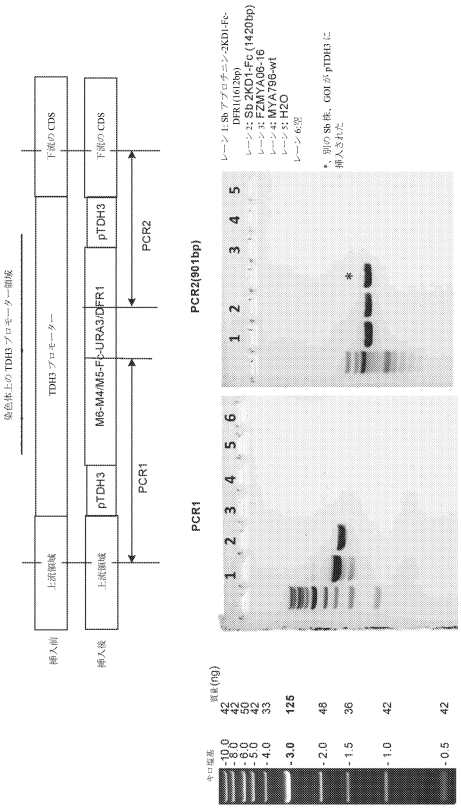
【図１７４】



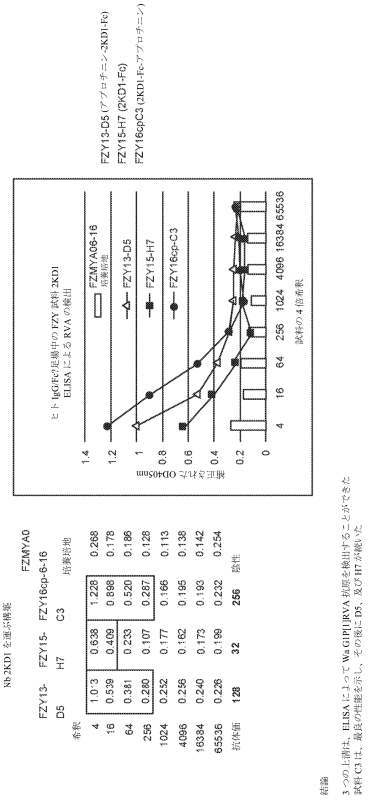
【図１７５】



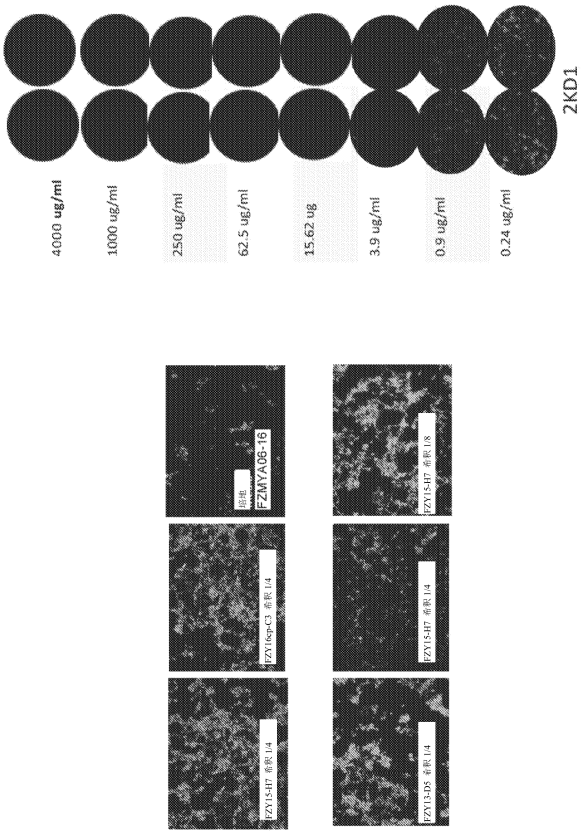
【図１７６】



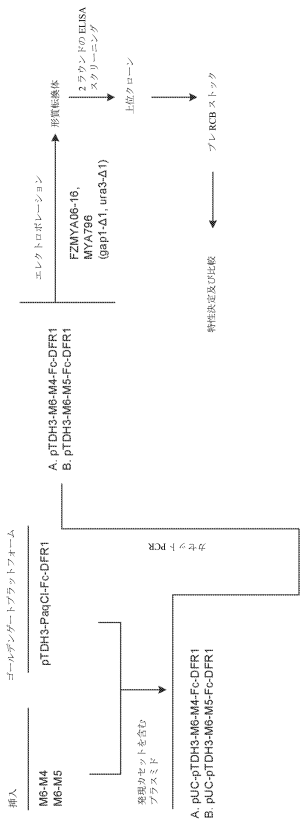
【図１７７】



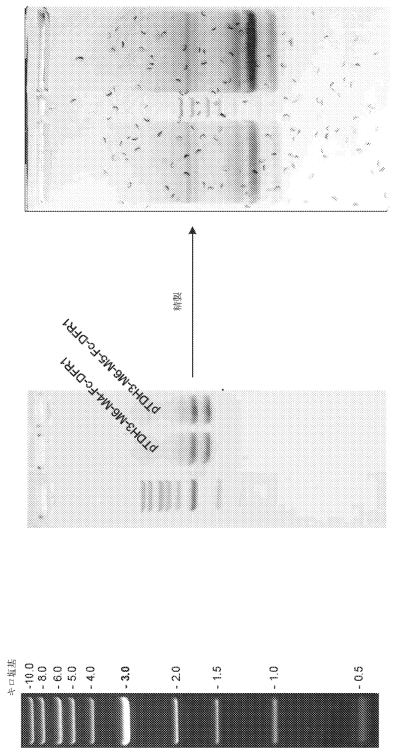
【図１７８】



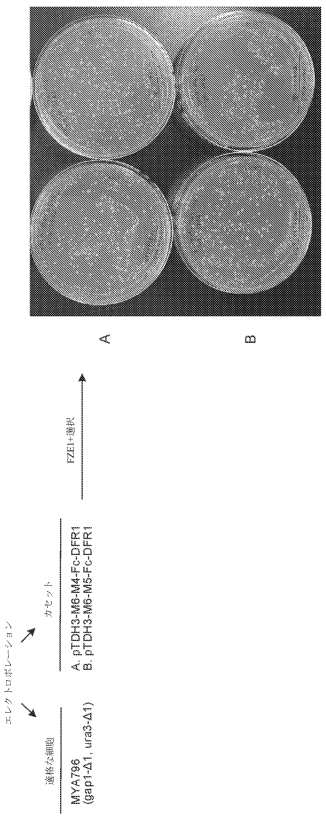
【図１７９】



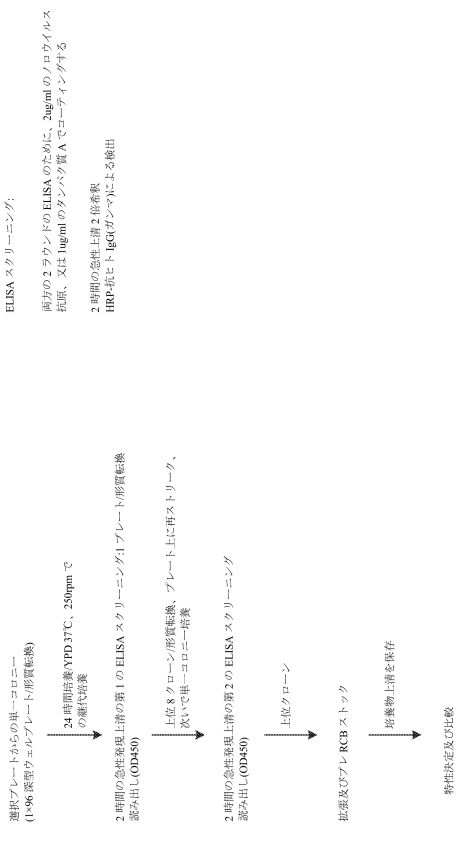
【図１８０】



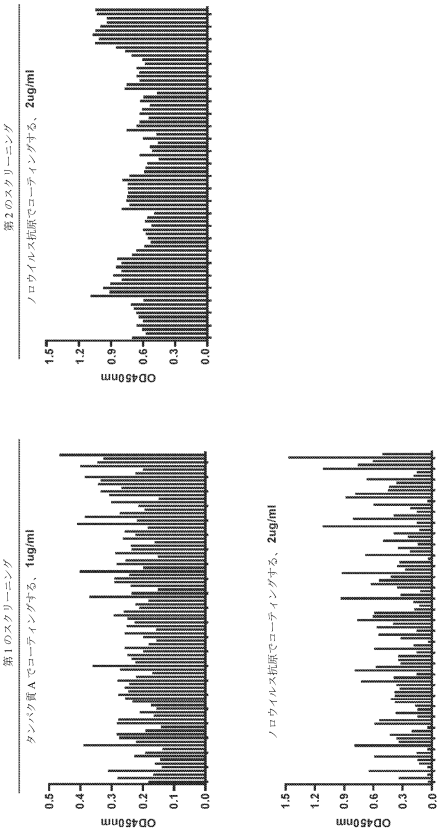
【図１８１】



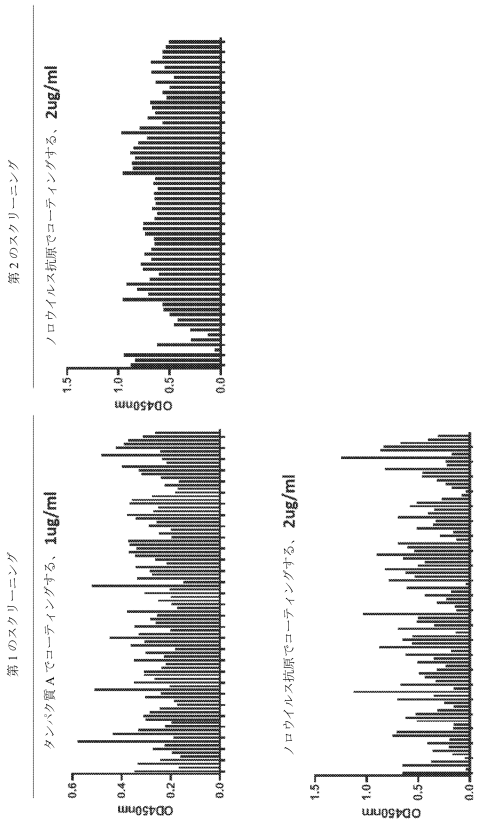
【図１８２】



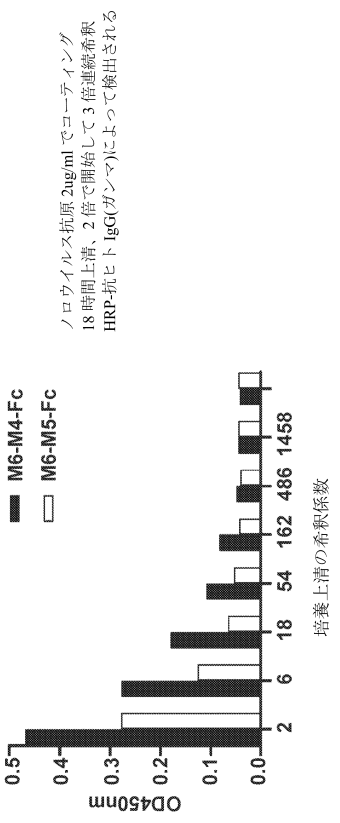
【図１８３】



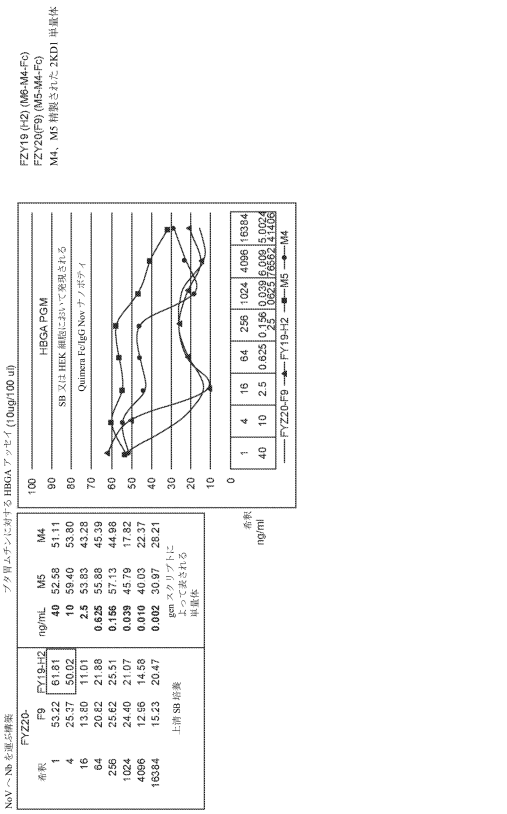
【図１８４】



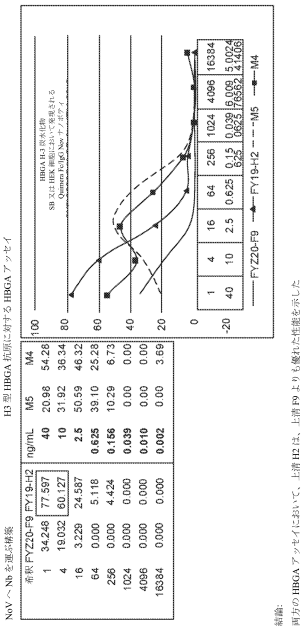
【図１８５】



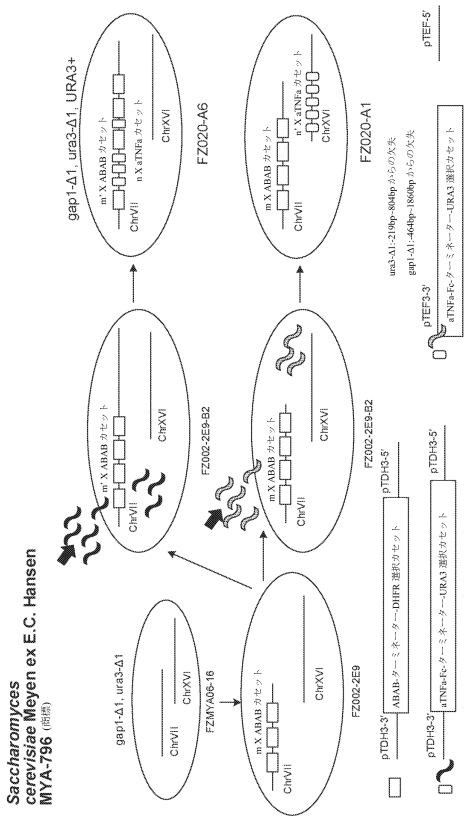
【図１８６】



【図１８７】



【図１８８】



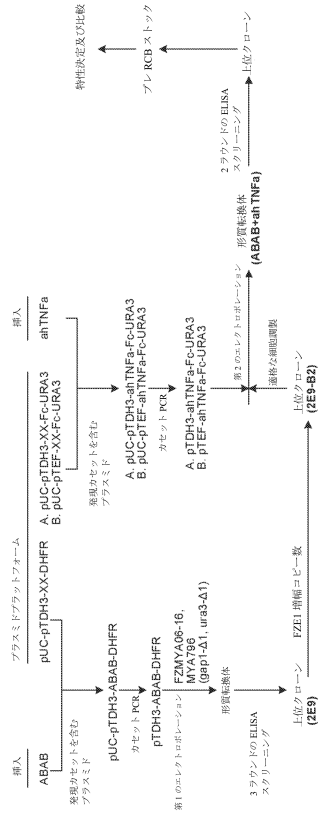
【図１８９】

I.ABAB 発現カセット DNA の FZMYA06-16 株への形質転換(ura3-Δ1 及び gap1-Δ1 を有する MYA796)、及び特性決定(発現、ゲノム挿入、成長曲線、安定性、コピー数)によって、Sb FZ002-2E9 を生成する

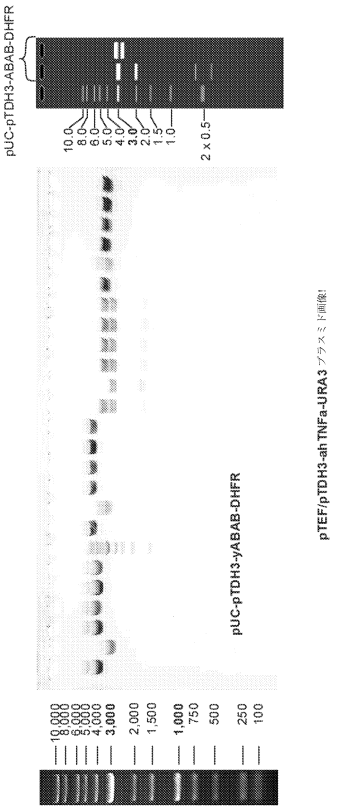
II.FZE1 増幅及び特性決定(発現、ゲノム挿入、コピー数)によって、SbFZ002-2E9-B2 を生成する

III.抗 TNFa 発現カセット DNA の FZ002-2E9-B2 への形質転換、及び株の特性決定(発現、ゲノム挿入、結合効力及び中和活性、コピー数)によって、Sb FZ020 を生成する

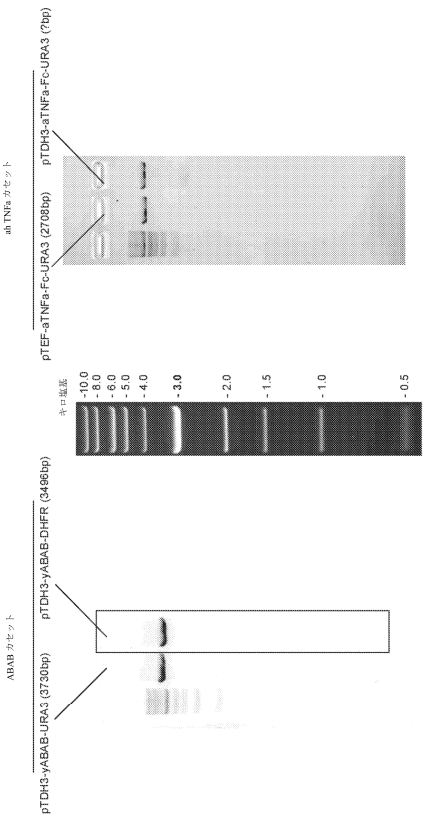
【図１９０】



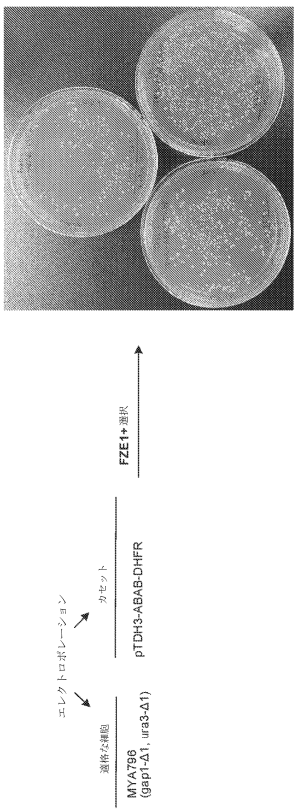
【図１９１】



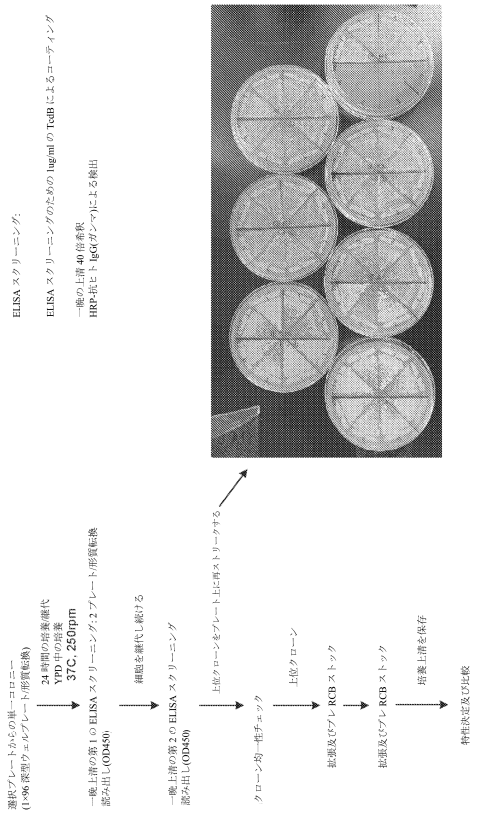
【図１９２】



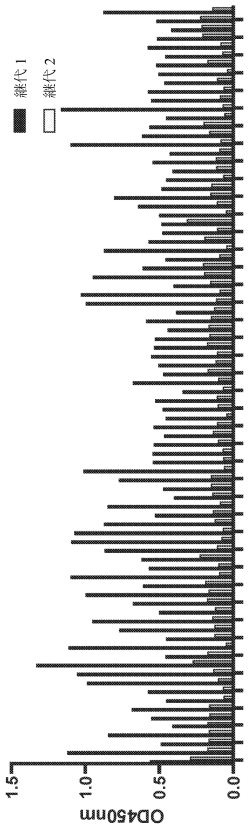
【図１９３】



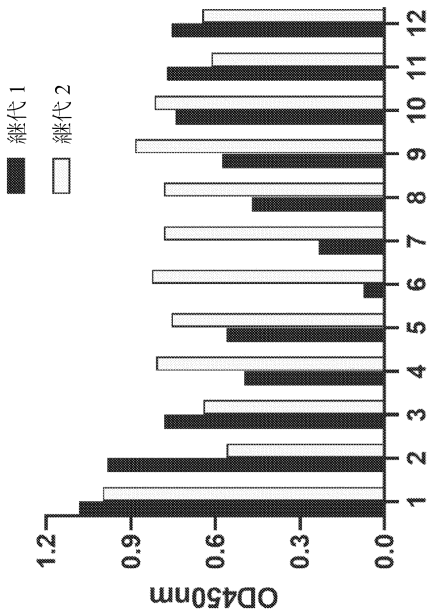
【図１９４】



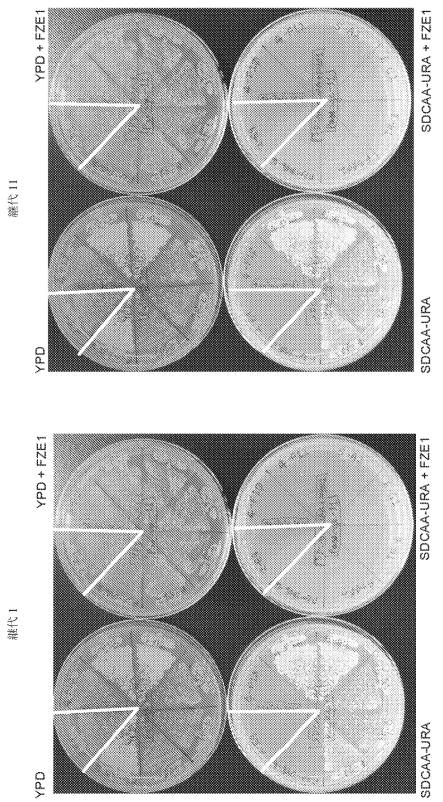
【図１９５】



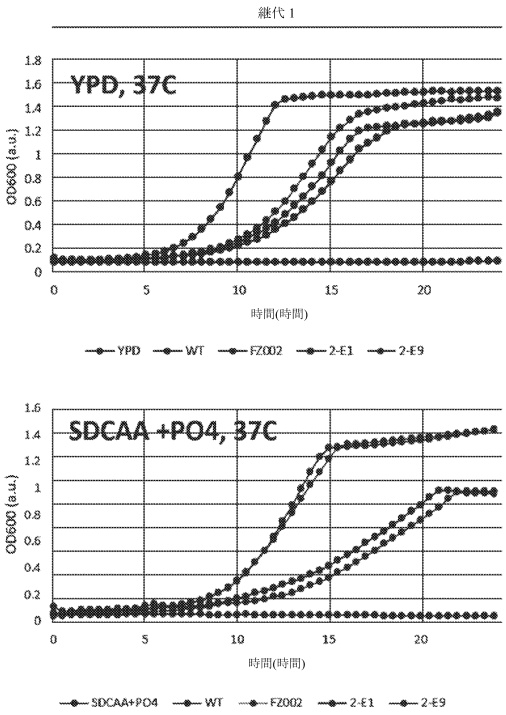
【図１９６】



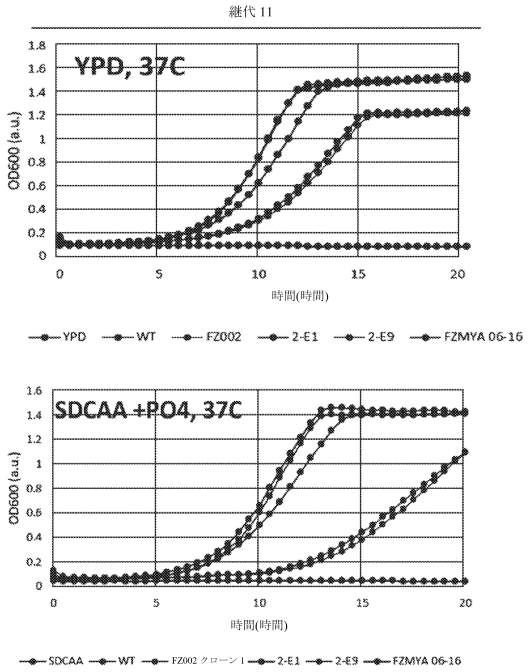
【図１９７】



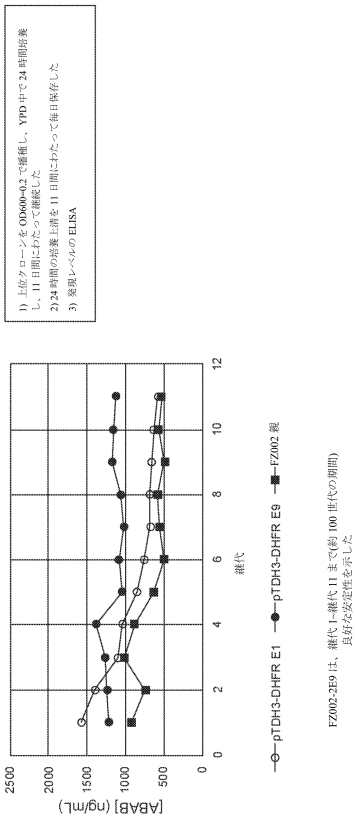
【図１９８－１】



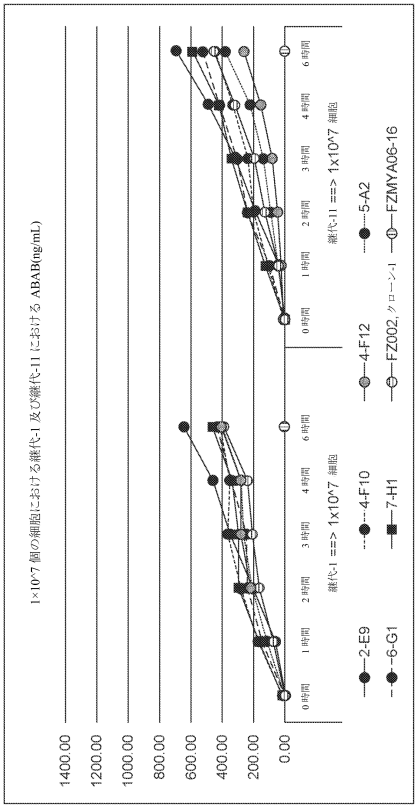
【図１９８－２】



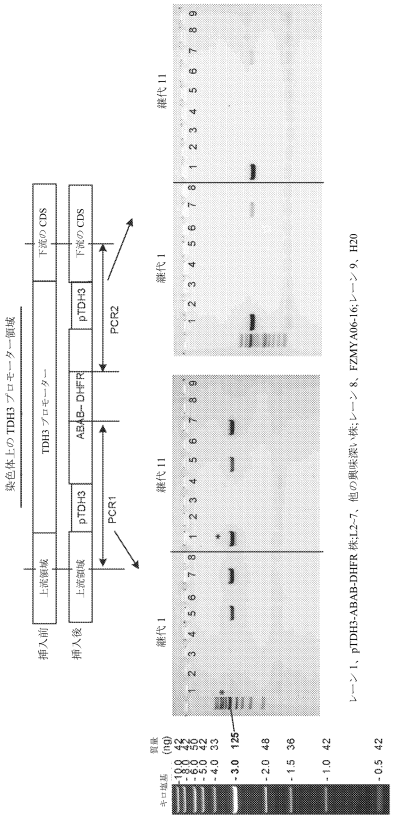
【図１９９】



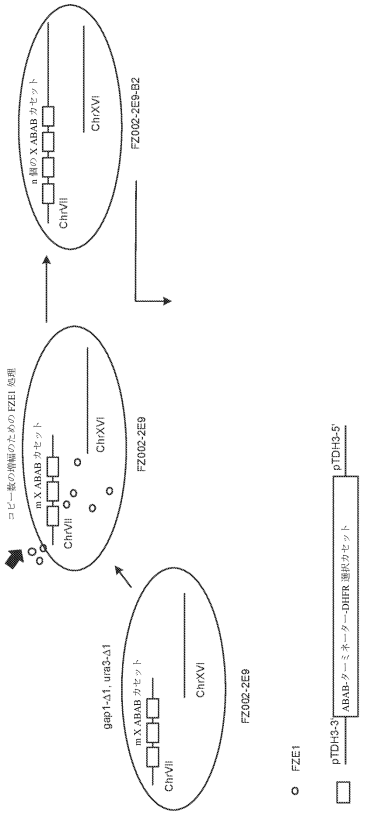
【図２００】



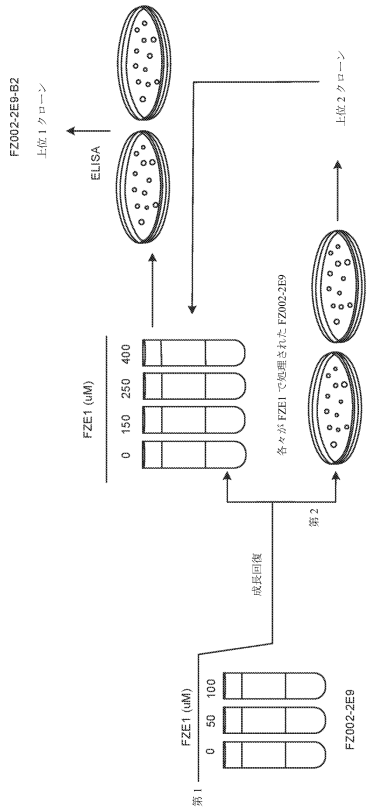
【図２０１】



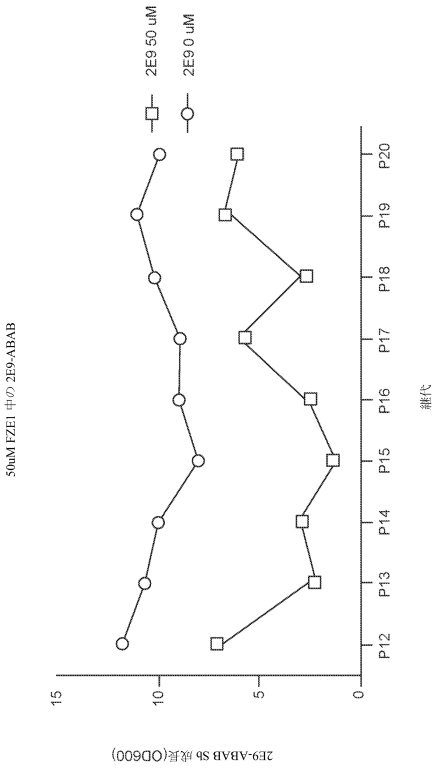
【図２０２】



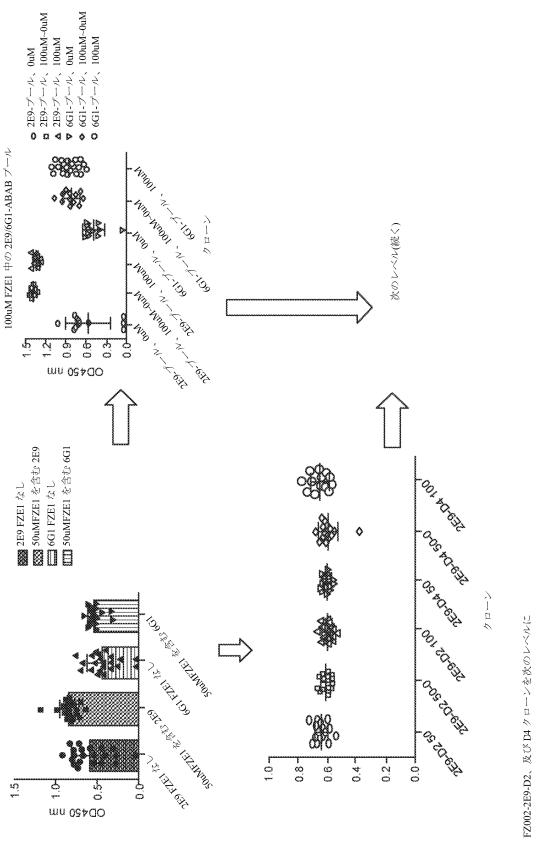
【図２０３】



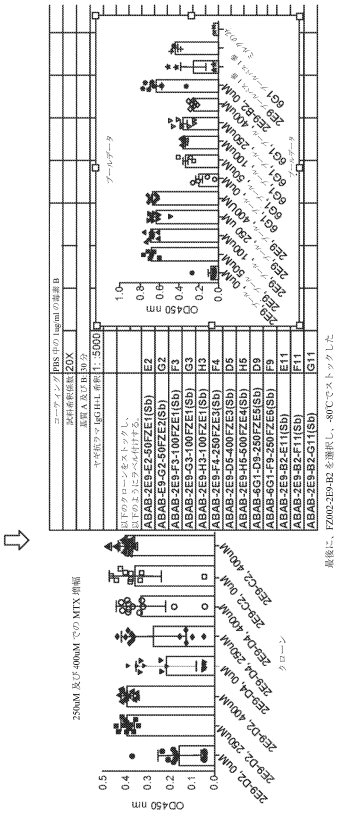
【図２０４】



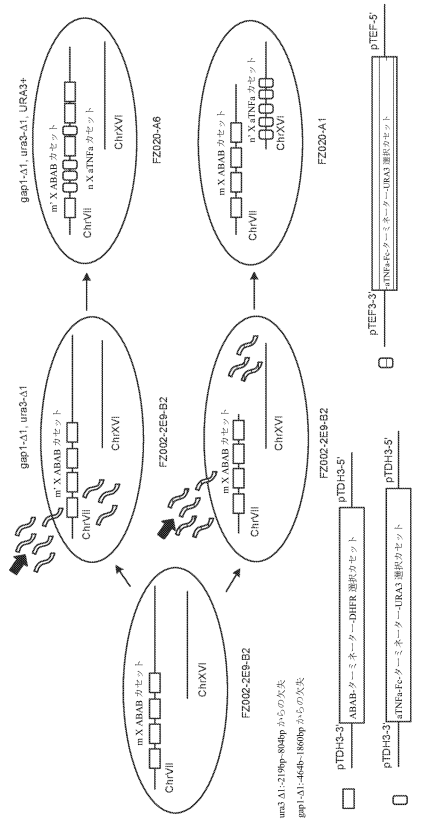
【図２０５】



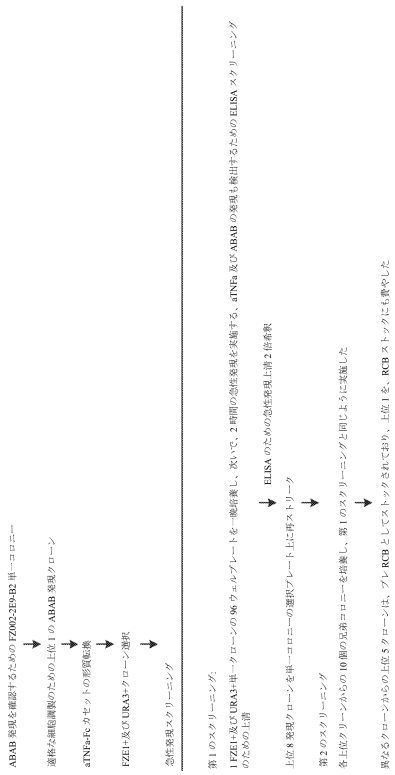
【図２０６】



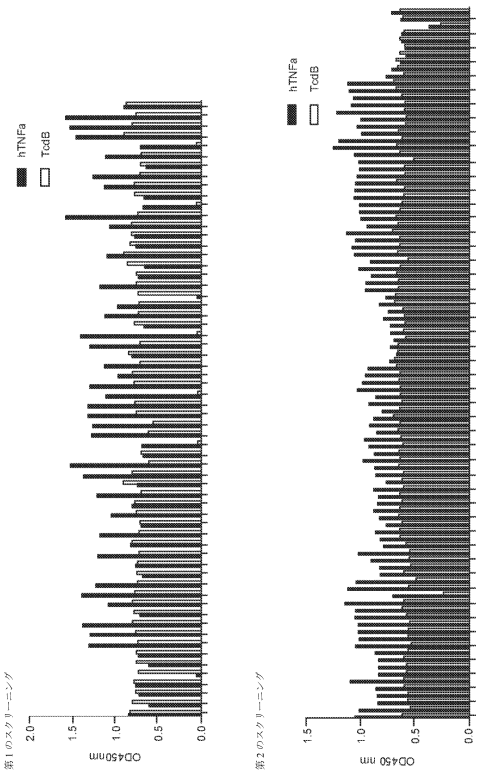
【図２０７】



【図２０８】

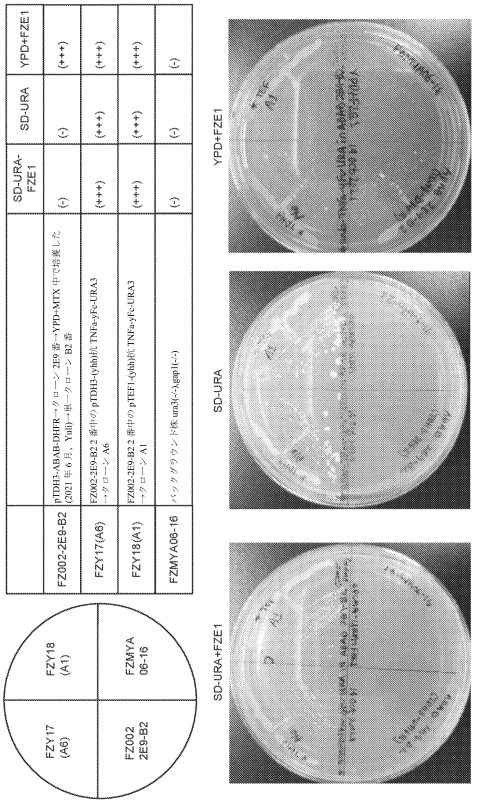


【図２０９】

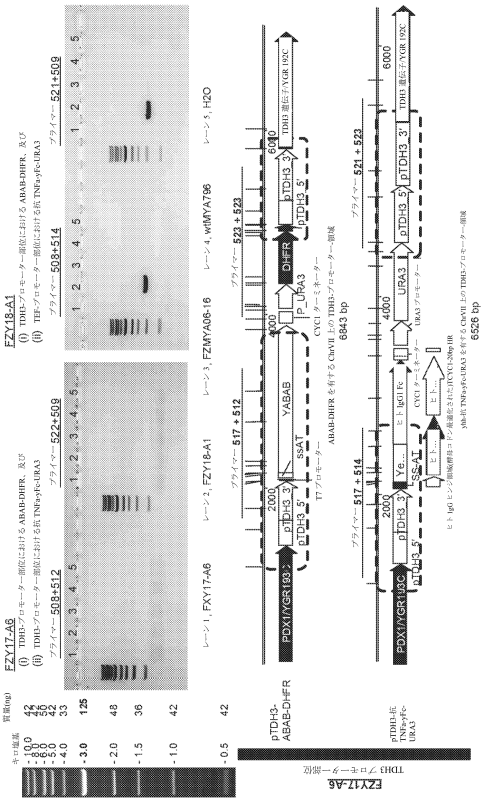


【図２１０】

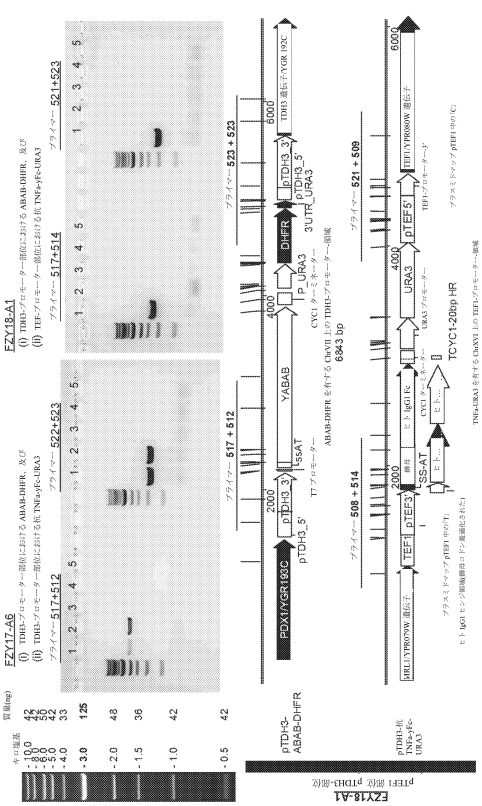
		SD-URA-FZE1	SD-URA	YPD+FZE1
FZ002-2E9-B2	pTDH3-ABAB-DHFR→クローン 2E9 番→YPD-MTX 中で培養した（2021 年 6 月、Yulb→単一クローン B2 番	(-)	(-)	(+++)
FZY17(A6)	FZ002-2E9-B2 2 番中の pTDH3-cybb 的 TNFa-yFc-URA3 →クローン A6	(+++)	(+++)	(+++)
FZY18(A1)	FZ002-2E9-B2 2 番中の pTEF1-cybb 的 TNFa-yFc-URA3 →クローン A1	(+++)	(+++)	(+++)
FZMYA06-16	バックグラウンド株 ura3(-/-),gap1(-/-)	(-)	(-)	(-)



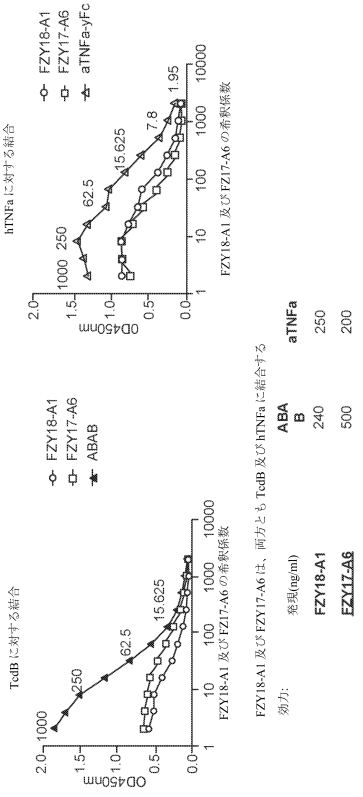
【図２１１】



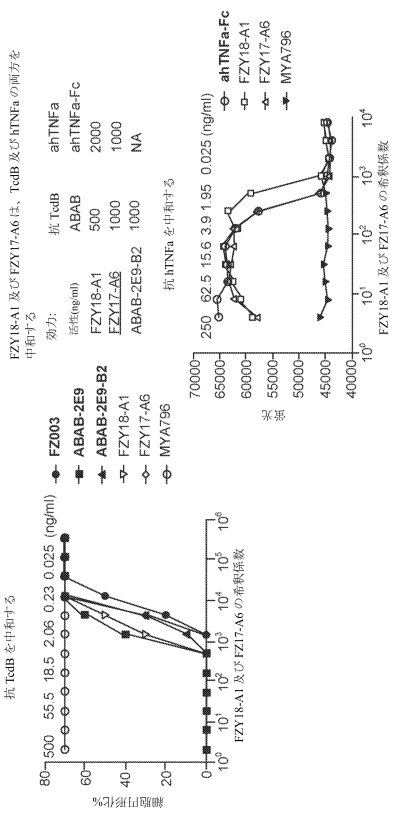
【図２１２】



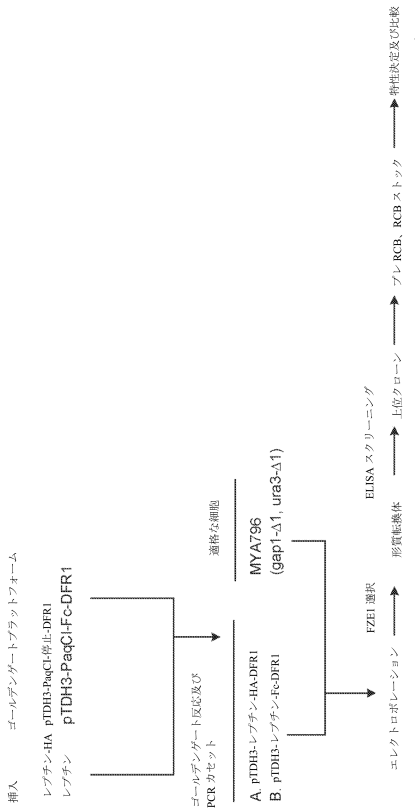
【図２１３】



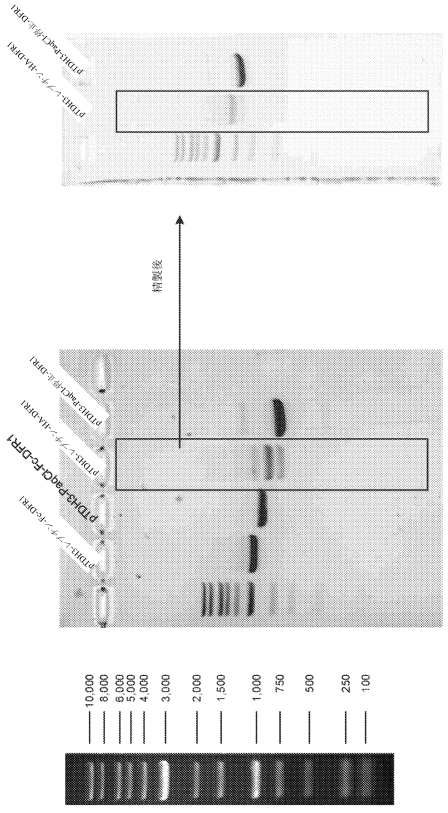
【図２１４】



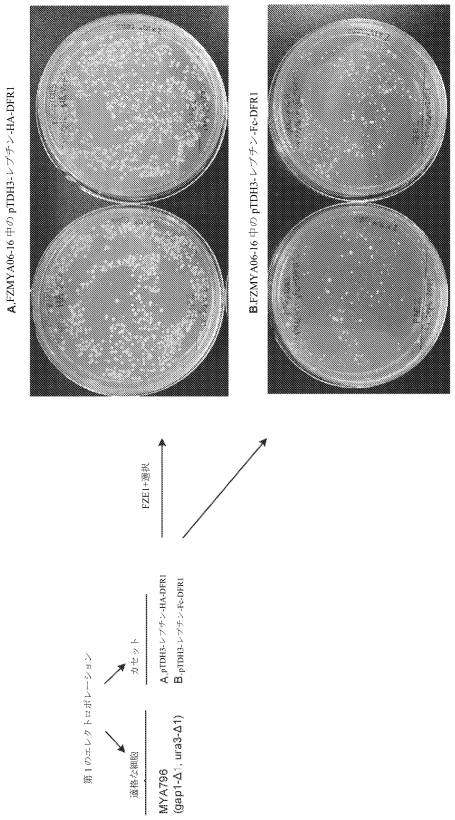
【図２１５】



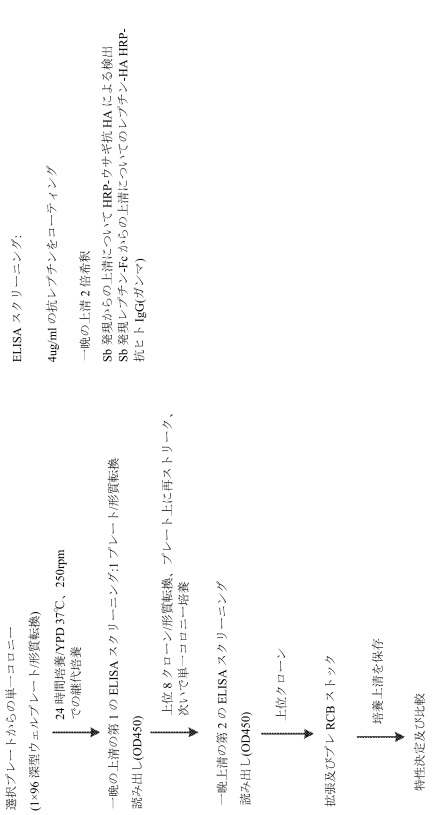
【図２１６】



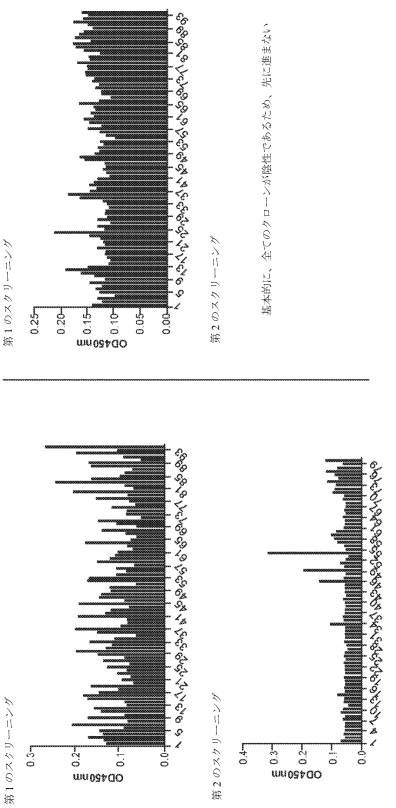
【図２１７】



【図２１８】



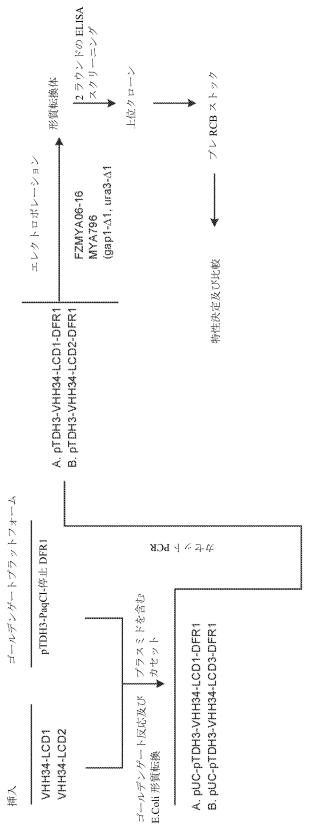
【図２１９】



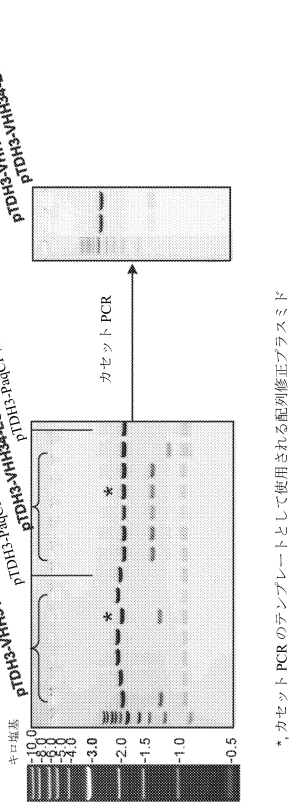
【図２２０】

	FZY14(E6)
開始時の培養物 → **50mL x 2** 37℃-250rpm での YPD 培地	OD600=8 時間培養後に 4.56×10^7 個の細胞/mL
より大きな培養物 → **1000mL** 37℃-250rpm での YPD 培地	開始 OD600=0.474×10^7 個の細胞/mL 停止 OD600=15.2×10^7 個の細胞/mL 合計時間=10 時間
培養物中の細胞の総数	15.2×10^7 個(細胞/mL)×1000mL=152×10^9 個の細胞
マウス試験のためのバイアル数	各バイアル=5×10^9 個の細胞(500uL 中) 29.5 バイアル

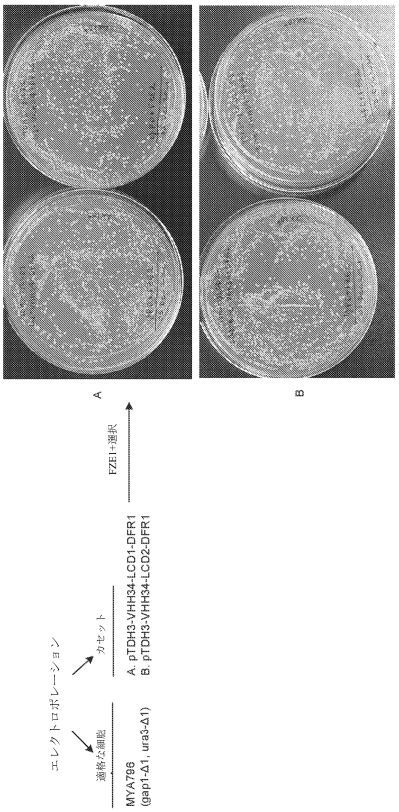
【図２２１】



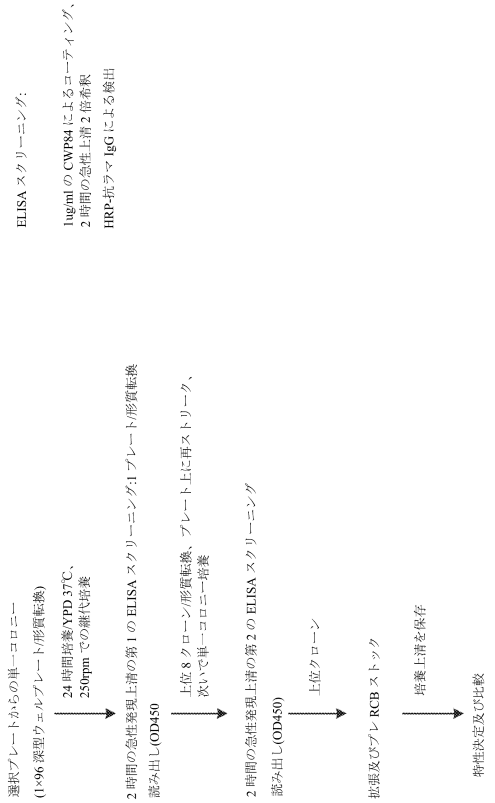
【図２２２】



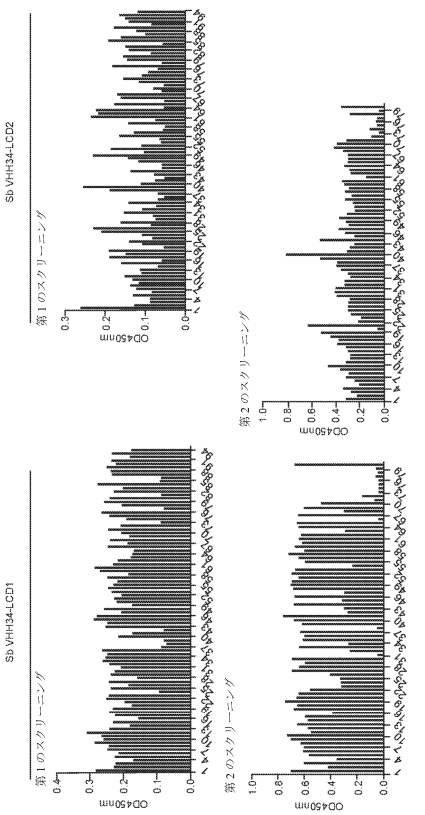
【図２２３】



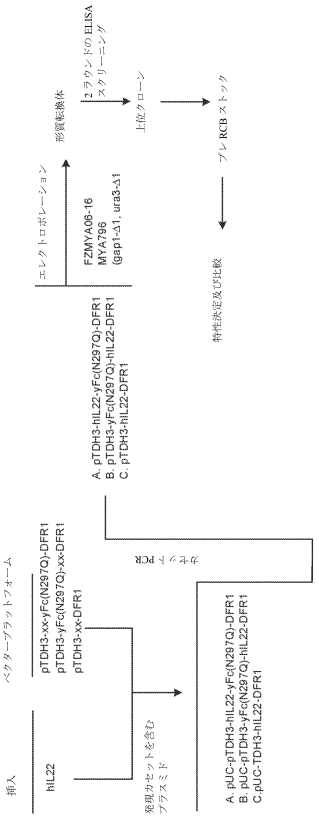
【図２２４】



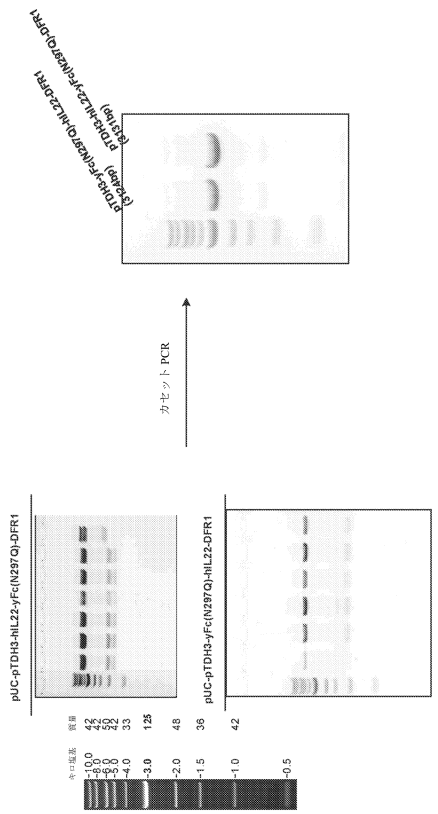
【図２２５】



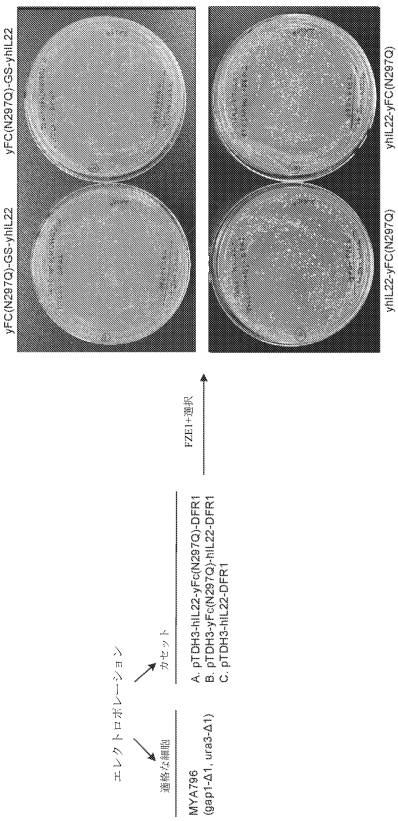
【図２２６】



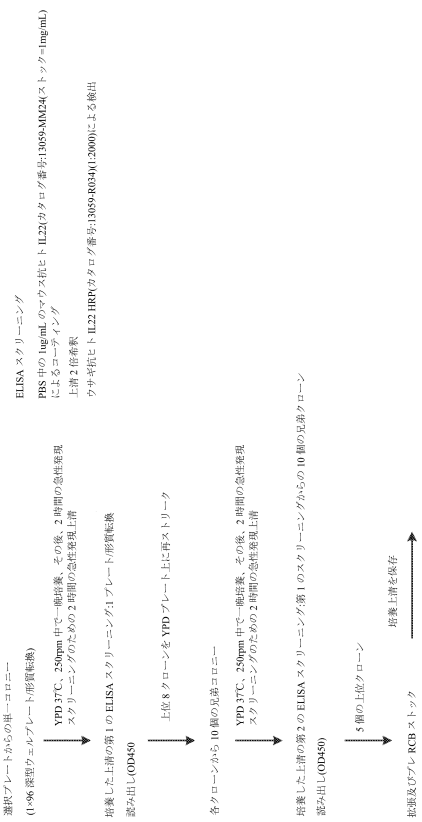
【図２２７】



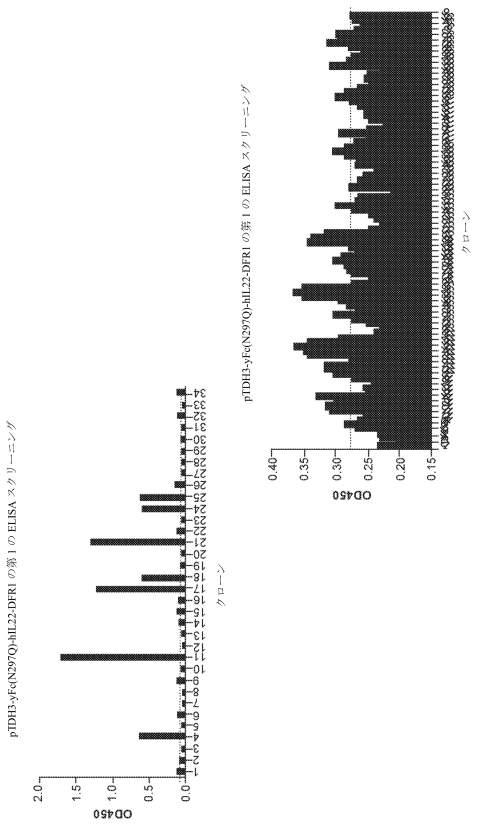
【図２２８】



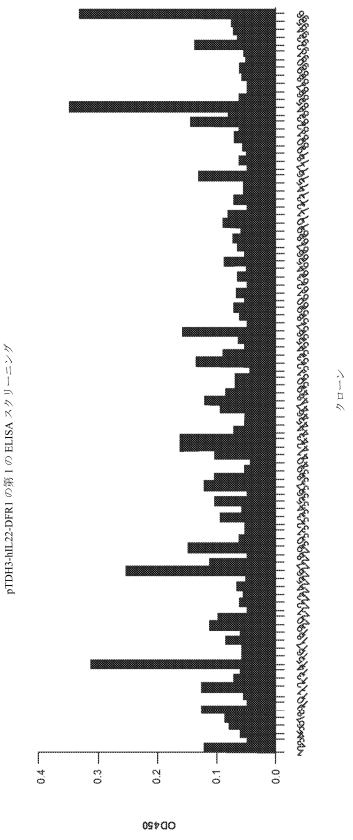
【図２２９】



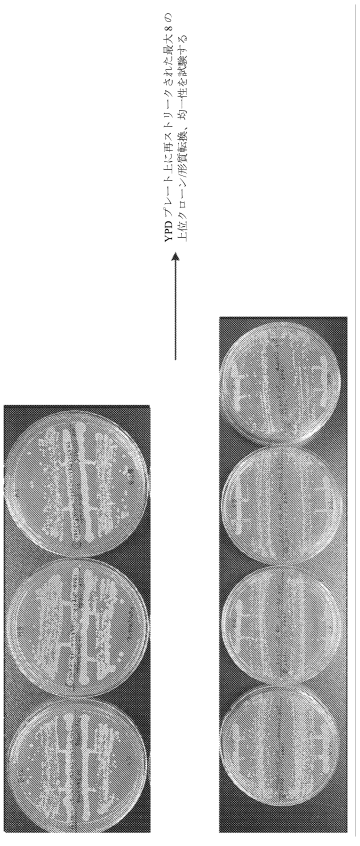
【図２３０】



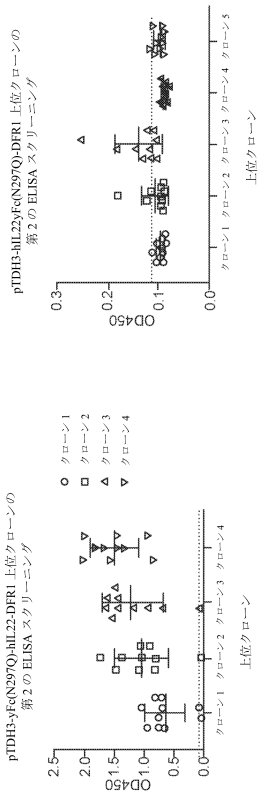
【図２３１】



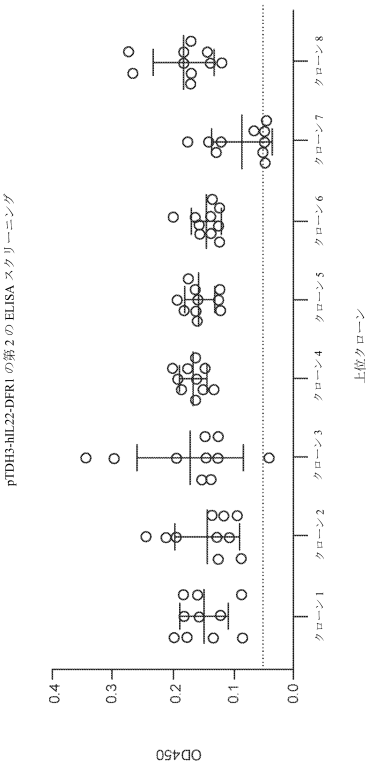
【図２３２】



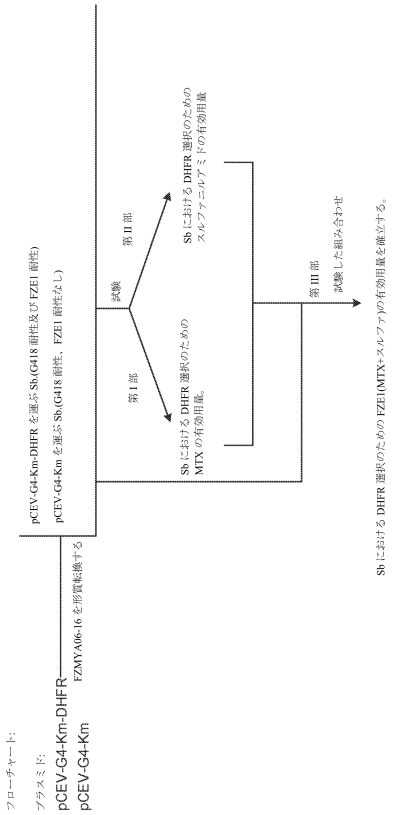
【図２３３】



【図２３４】



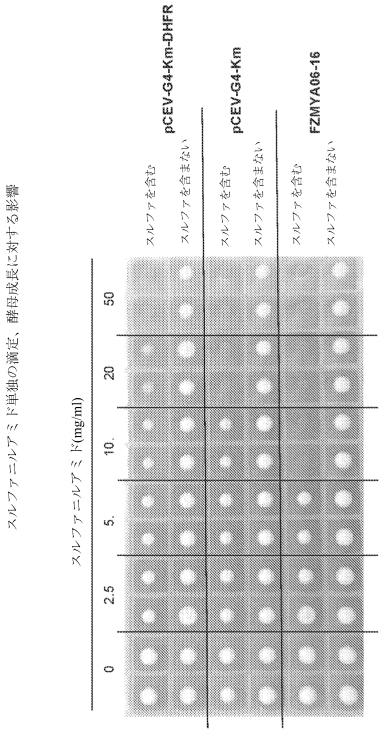
【図２３５】



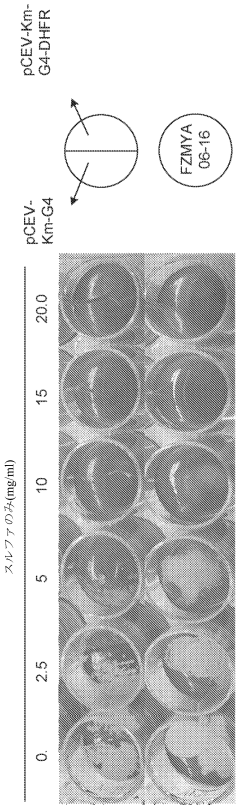
【図２３６】

株	培養培地	MTX (nM)						
		0	20	50	100	200	500	
pCEV-G4-Km-DHFR	YPD+G418(100ug/ml)	++++	++++	++++	++++	++++	++++	
pCEV-G4-Km	YPD+G418(100ug/ml)	++++	++++	++++	++++	++++	++++	
MYA016	YPD	++++	++++	++++	++++	++++	++++	
MYA016	YPD+G418(100ug/ml)	–						

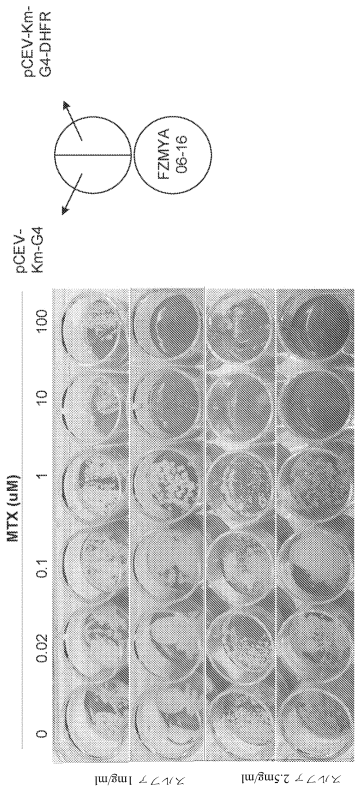
【図２３７】



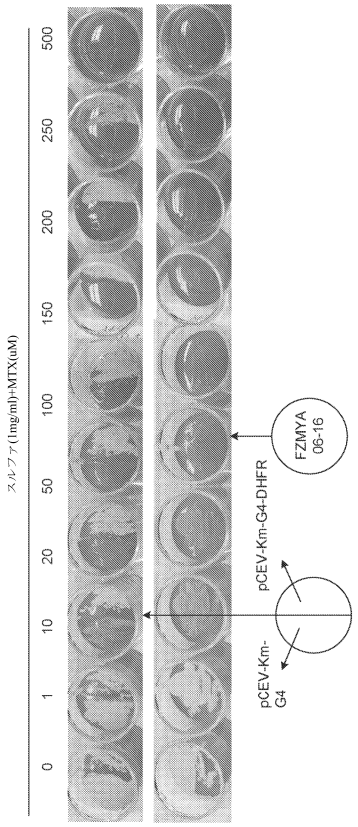
【図２３８】



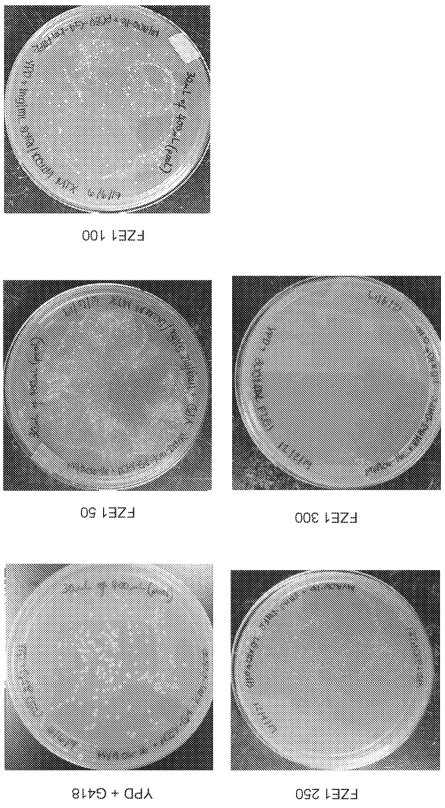
【図２３９】



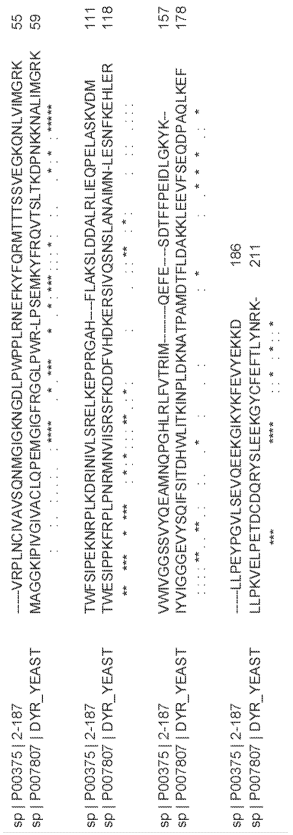
【図２４０】



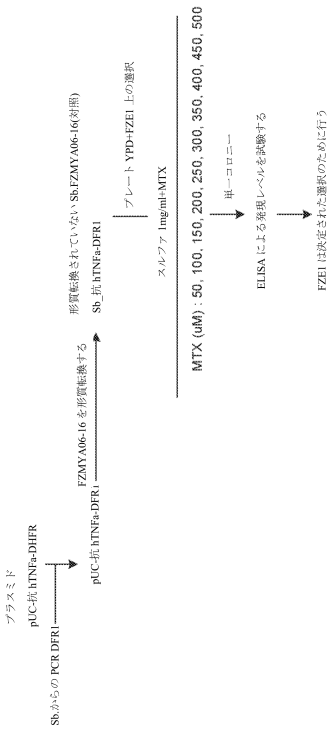
【図２４１】



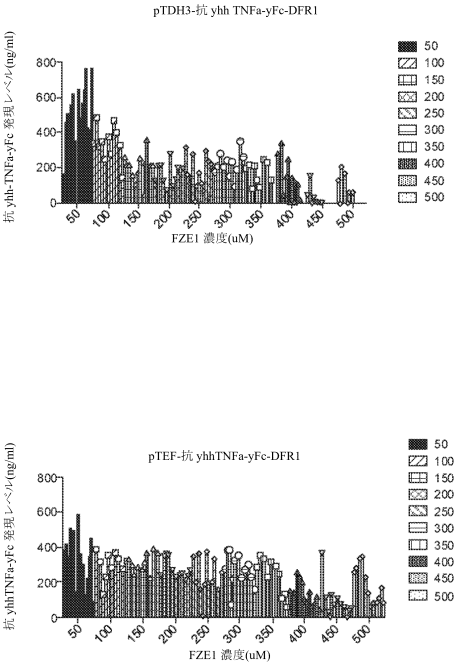
【図２４２】



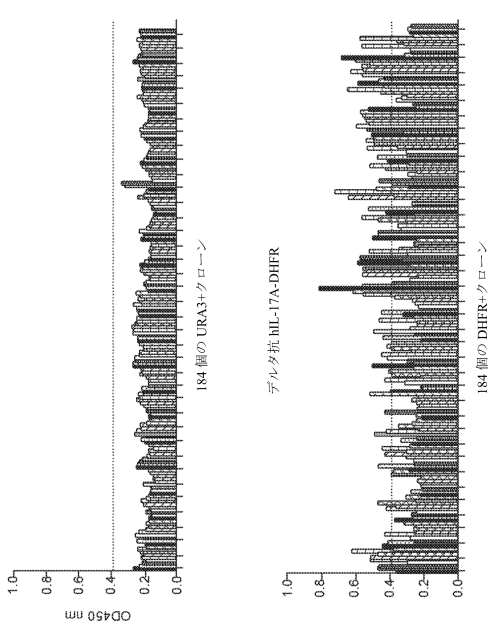
【図２４３】



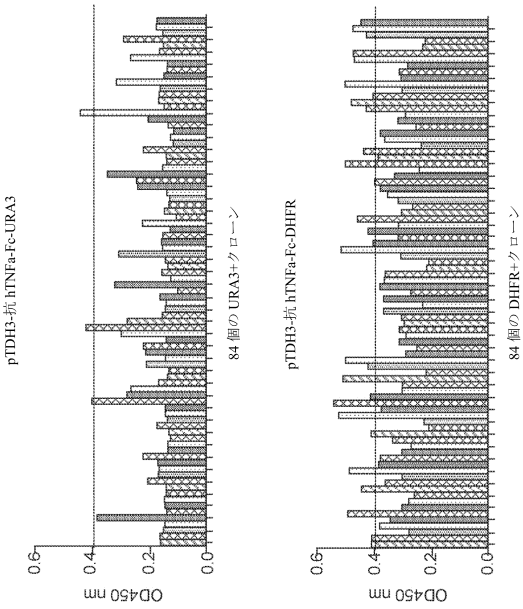
【図２４４】



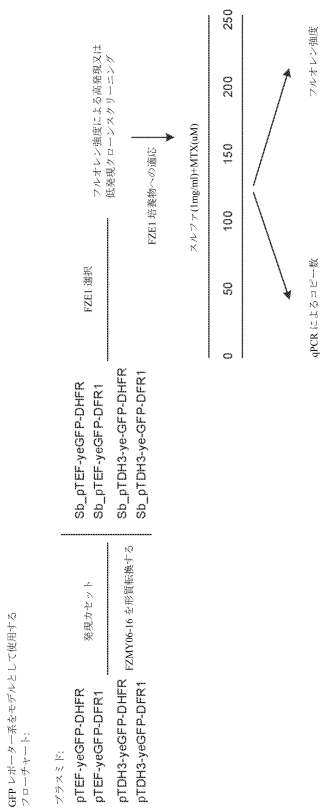
【図２４５】



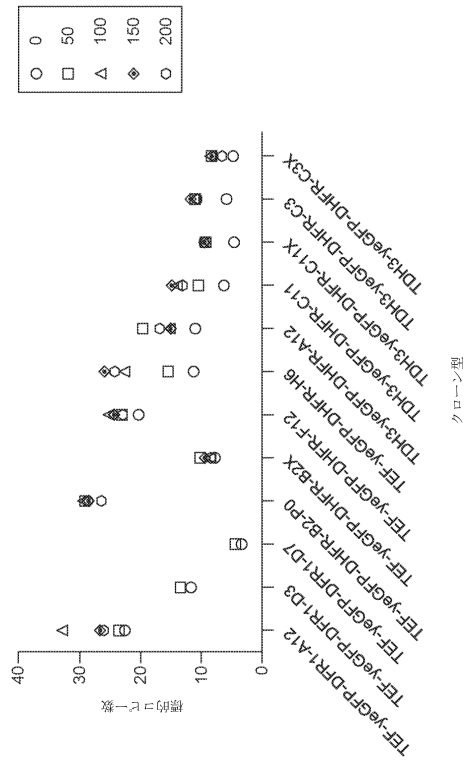
【図２４６】



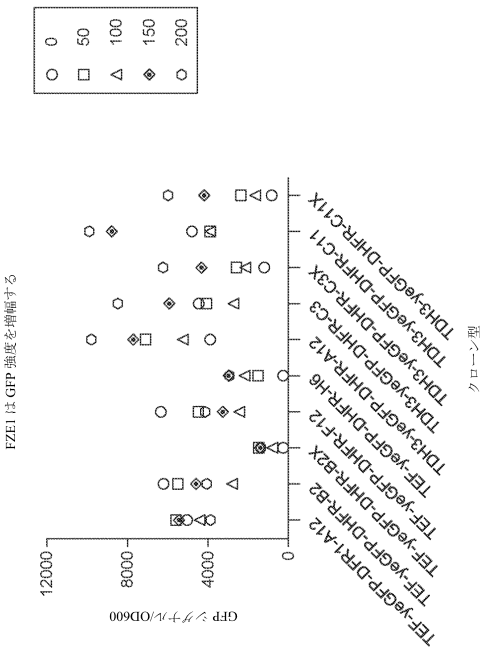
【図２４７】



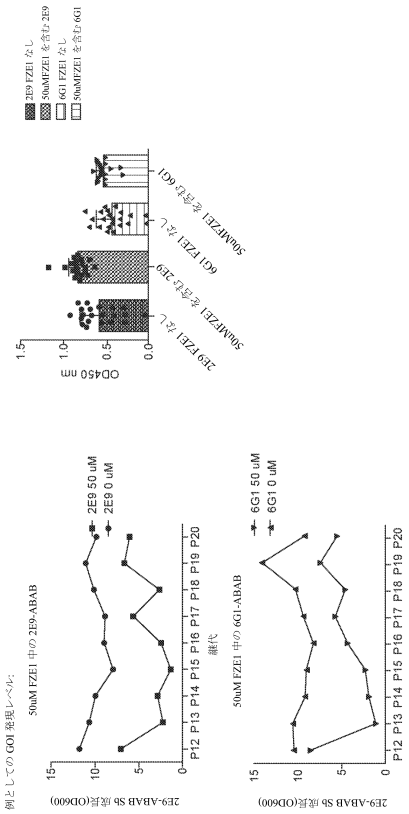
【図２４８】



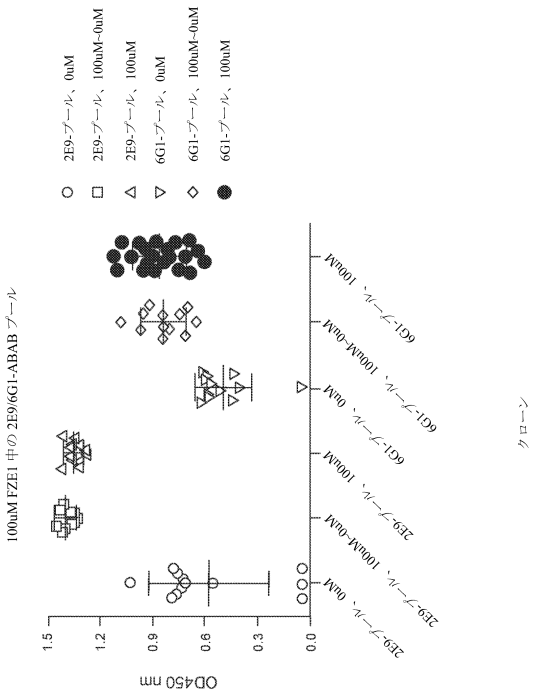
【図２４９】



【図２５０】



【図２５１】



【配列表】

<u>202452141900000001.app</u>

【国際調査報告】

International application No.
PCT/US2022/033037

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/033037

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
12, 13(completely); 1-11, 36-53(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/033037

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61P31/04 C07K16/12
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61P C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/066468 A1 (UNIV MARYLAND [US]; FENG HANPING [US] ET AL.) 20 April 2017 (2017-04-20)	1-3,6,7, 12,13
Y	claims 1-67; sequence 19 the whole document	4,5,36, 37
Y	CHEN KEVIN ET AL: "A probiotic yeast-based immunotherapy against Clostridioides difficile infection", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 12, no. 567, 28 October 2020 (2020-10-28), XP055965175, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.aax4905 page 4, "Construction of a clinically relevant strain for ABAB delivery" the whole document	1-13,36, 37

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C. [x] See patent family annex.

* 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

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 September 2022	08/12/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Marchesini, Patrizia

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/033037

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DURMUSOGLU DENIZ ET AL: "In Situ Biomanufacturing of Small Molecules in the Mammalian Gut by Probiotic Saccharomyces boulardii", ACS SYNTHETIC BIOLOGY, vol. 10, no. 5, 12 April 2021 (2021-04-12), pages 1039-1052, XP055964707, Washington DC ,USA ISSN: 2161-5063, DOI: 10.1021/acssynbio.0c00562 abstract -----	1-13,36, 37
Y	ROOHVAND FARZIN ET AL: "Biomedical applications of yeasts - a patent view, part two: era of humanized yeasts and expanded applications", EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS, vol. 30, no. 8, 2 August 2020 (2020-08-02), pages 609-631, XP055964963, GB ISSN: 1354-3776, DOI: 10.1080/13543776.2020.1781816 Retrieved from the Internet: URL:http://dx.doi.org/10.1080/13543776.2020.1781816> pages 614-616, 3. Production of recombinant antibodies (Abs) by native and humanized yeasts"; table 1 page 619, "5.2. Genetic engineering and heterologous protein expression in S. boulardii" -----	1-13,36, 37
X	LIU CHENG-HAO ET AL: "Treatment of murine colitis by Saccharomyces boulardii secreting atrial natriuretic peptide +supplementary", JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, vol. 98, no. 12, 6 October 2020 (2020-10-06), pages 1675-1687, XP055964746, Berlin/Heidelberg ISSN: 0946-2716, DOI: 10.1007/s00109-020-01987-8 Retrieved from the Internet: URL:https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-020-01987-8/fulltext.html>	1-3
Y	the whole document -----	1-13,36, 37

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/033037

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BAI FLAGFELDT DONGMEI ET AL: "Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in Saccharomyces cerevisiae", YEAST, vol. 26, no. 10, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 545-551, XP055965448, Hoboken, USA ISSN: 0749-503X, DOI: 10.1002/yea.1705 table 2 the whole document	1-13,36, 37
Y	SHI SHUOBO ET AL: "A highly efficient single-step, markerless strategy for multi-copy chromosomal integration of large biochemical pathways inSaccharomyces cerevisiae", METABOLIC ENGINEERING, vol. 33, January 2016 (2016-01), pages 19-27, XP029375522, ISSN: 1096-7176, DOI: 10.1016/J.YMBEN.2015.10.011 pages 26-27, "5. conclusion" the whole document	1-13,36, 37

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/033037

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017066468 A1	20-04-2017	AU 2016339975 A1	10-05-2018
		CA 3001863 A1	20-04-2017
		CN 108495685 A	04-09-2018
		HK 1252818 A1	06-06-2019
		JP 2018536396 A	13-12-2018
		US 2018319872 A1	08-11-2018
		WO 2017066468 A1	20-04-2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/US2022/033037

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 12, 13(completely); 1-11, 36-53(partially)

Relates to an engineered strain of Saccharomyces yeast comprising at least one site-specific chromosomal insertion of a nucleic acid encoding a therapeutic polypeptide depicted by SEQ ID No. 5

2-5. claims: 14-16(completely); 1-11, 36-53(partially)

Relates to an engineered strain of Saccharomyces yeast comprising at least one site-specific chromosomal insertion of a nucleic acid encoding a therapeutic polypeptide, wherein the therapeutic polypeptide is a binding protein that binds to TNF-a. depicted by SEQ ID No. 6 (Inv. 2), 7 (Inv. 3), 19 (Inv. 4), 20 (Inv. 5).

---

6. claims: 17-19(completely); 1-11, 36-53(partially)

Relates to an engineered strain of Saccharomyces yeast comprising at least one site-specific chromosomal insertion of a nucleic acid encoding a therapeutic polypeptide,wherein the therapeutic polypeptide is a binding protein that binds to IL-17A depicted by SEQ ID No.25 (Inv. 6).

7-9. claims: 20-22(completely); 1-11, 36-53(partially)

Relates to an engineered strain of Saccharomyces yeast comprising at least one site-specific chromosomal insertion of a nucleic acid encoding a therapeutic polypeptide, wherein the therapeutic polypeptide is a bi-specific binding protein that binds to TNF-a and IL-17A depicted by SEQ ID No. 8 (Inv. 7), 9 (Inv. 8), 10 (Inv. 9).

10-13. claims: 23-25(completely); 1-11, 36, 37(partially)

Relates to an engineered strain of Saccharomyces yeast comprising at least one site-specific chromosomal insertion of a nucleic acid encoding a therapeutic polypeptide,wherein the therapeutic polypeptide is a binding protein that binds to a norovirus or a rotavirus depicted by SEQ ID No. 13 (Inv. 10), 14 (Inv. 11), 15 (Inv. 12), 16 (Inv. 13).

14-15. claims: 26, 27(completely); 1-11, 36-53(partially)

Relates to an engineered strain of Saccharomyces yeast comprising at least one site-specific chromosomal insertion of a nucleic acid encoding a therapeutic polypeptide,wherein

International Application No. PCT/US2022/033037

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

the therapeutic polypeptide is a VHH that binds to cwp84 and is fused with a lysin domain depicted by SEQ ID No. 21 (Inv. 14), 22 (Inv. 15).

16-18. claims: 28-31(completely); 1-11, 36-53(partially)

Relates to an engineered strain of Saccharomyces yeast comprising at least one site-specific chromosomal insertion of a nucleic acid encoding a therapeutic polypeptide,wherein the therapeutic polypeptide is a cytokine or chemokine depicted by SEQ ID No. 11 (Inv. 16), 12 (Inv. 17), 27 (Inv. 18).

19-21. claims: 32, 33(completely); 1-11, 36-53(partially)

Relates to an engineered strain of Saccharomyces yeast comprising at least one site-specific chromosomal insertion of a nucleic acid encoding a therapeutic polypeptide,wherein the therapeutic polypeptide is GLP1 depicted by SEQ ID No. 17 (Inv. 19), 23 (Inv. 20), 24 (Inv. 21).

---

22. claims: 34, 35(completely); 1-11, 36-53(partially)

Relates to an engineered strain of Saccharomyces yeast comprising at least one site-specific chromosomal insertion of a nucleic acid encoding a therapeutic polypeptide, wherein the therapeutic polypeptide is leptin depicted by SEQ ID No.: 18 (Inv. 22).

---

23. claims: 54-63

Relates to a method of selecting an engineered stain of Saccharomyces yeast, wherein the Saccharomyces yeast comprises a nucleic acid sequence encoding a dihydrofolate reductase (DHFR)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 14/54	*(2006.01)*	C07K	14/54		
C07K 14/605	*(2006.01)*	C07K	14/605		
C07K 14/575	*(2006.01)*	C07K	14/575		
A61K 38/17	*(2006.01)*	A61K	38/17	100	
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395	N	
A61K 38/19	*(2006.01)*	A61K	39/395	D	
A61K 38/22	*(2006.01)*	A61K	38/19		
A61K 38/26	*(2006.01)*	A61K	38/22		
A61P 29/00	*(2006.01)*	A61K	38/26		
A61P 1/00	*(2006.01)*	A61K	39/395	A	
A61P 1/04	*(2006.01)*	A61K	39/395	H	
A61P 31/04	*(2006.01)*	A61P	29/00		
A61P 31/14	*(2006.01)*	A61P	1/00		
A61P 25/28	*(2006.01)*	A61P	1/04		
A61P 3/10	*(2006.01)*	A61P	31/04		
A61P 3/04	*(2006.01)*	A61P	31/14		
A61P 1/16	*(2006.01)*	A61P	25/28		
A61P 3/00	*(2006.01)*	A61P	3/10		
A61P 37/06	*(2006.01)*	A61P	3/04		
A61P 37/02	*(2006.01)*	A61P	1/16		
A61K 36/064	*(2006.01)*	A61P	3/00		
A61K 48/00	*(2006.01)*	A61P	37/06		
C12N 15/53	*(2006.01)*	A61P	37/02		
C12N 15/13	*(2006.01)*	A61K	36/064		
C12N 15/16	*(2006.01)*	A61K	48/00		
C12N 15/24	*(2006.01)*	C12N	15/53		
C12N 9/06	*(2006.01)*	C12N	15/13		
		C12N	15/16		
		C12N	15/24		
		C12N	9/06	Z	

(32)優先日 令和4年3月7日(2022.3.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ホーバン，カイル
アメリカ合衆国 ２１２２７ メリーランド州，ハレソープ，エス．ローリング ロード １４５０，スイート ４１０１
(72)発明者 ヤン，ジーヨン
アメリカ合衆国 ２１２２７ メリーランド州，ハレソープ，エス．ローリング ロード １４５０，スイート ４１０１

Ｆターム（参考） 4B065 AA79X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA01 CA24 CA25 CA44
4C084 AA02 AA13 BA01 BA03 BA08 BA22 BA23 BA44 CA53 DA01
DA39 DB01 DB35 MA13 MA17 MA23 MA28 MA31 MA32 MA35 MA41
MA43 MA52 MA56 MA60 MA66 NA10 NA14 ZA02 ZA66 ZA68 ZA70
ZA75 ZB07 ZB08 ZB11 ZB33 ZB35 ZC21 ZC33

Fターム（参考） 3
4C085 AA13 AA14 BB31 BB36 CC07 CC22 CC23 DD62 EE01 GG02
GG08
4C087 AA01 AA02 AA03 BC12 CA12 CA44 MA13 MA17 MA23 MA28
MA31 MA32 MA35 MA41 MA43 MA52 MA56 MA60 MA66 NA10 NA14
ZA02 ZA66 ZA68 ZA70 ZA75 ZB07 ZB08 ZB11 ZB33 ZB35 ZC21
ZC35
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA02 DA14 DA30 DA75
EA20 FA74