(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2019-526262
(P2019-526262A)
(43)公表日　令和1年9月19日(2019.9.19)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	ZNA	4B065
A61K 35/744	(2015.01)	A61K	35/744		4C084
A61P 3/10	(2006.01)	A61P	3/10		4C087
C12N 15/24	(2006.01)	C12N	15/24		
C12N 15/17	(2006.01)	C12N	15/17		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 76 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-512264 (P2019-512264)
(86)(22)出願日　平成29年9月2日(2017.9.2)
(85)翻訳文提出日　平成31年4月9日(2019.4.9)
(86)国際出願番号　PCT/IB2017/055287
(87)国際公開番号　WO2018/042390
(87)国際公開日　平成30年3月8日(2018.3.8)
(31)優先権主張番号　62/383,079
(32)優先日　平成28年9月2日(2016.9.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

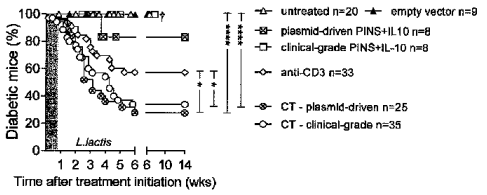
(71)出願人　507055501
イントレクソン・アクトバイオテイクス・エヌブイ
Ｉｎｔｒｅｘｏｎ　Ａｃｔｏｂｉｏｔｉｃｓ　ＮＶ
ベルギー国　９０５２　ズウェイナールデ，インダストリーパーク　ズウェイナールデ　７シー　ビルディングディー，イントレキソン　コーポレーション
(74)代理人　100092783
弁理士　小林　浩
(74)代理人　100120134
弁理士　大森　規雄
(74)代理人　100141195
弁理士　西澤　恵美子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＩＬ－１０およびインスリンを安定的に発現する遺伝子改変された細菌

(57)【要約】
本開示は、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸およびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、プロインスリン）ポリペプチドをコードする外因性核酸を含有し、両方の外因性核酸が細菌染色体に組み込まれた、乳酸菌（例えば、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis））などの微生物を提供する。そのような微生物株は、ヒトの治療のために好適である。本開示は、例えば、残留ベータ細胞機能を有する１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）などのＴ１Ｄ、例えば発症直後のＴ１Ｄを治療するために、微生物および組成物を使用する組成物（例えば、医薬組成物）方法をさらに提供する。微生物は経口投与されてよく、それによって微生物は胃腸管に送達され、そこで放出されて生物活性ポリペプチドを発現する。本開示の方法は、残留ベータ細胞機能を持つ対象、例えば発症直後のＴ１Ｄの対象にとって、特によく適する。

Figure 1A



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトインターロイキン－１０（ｈＩＬ－１０）をコードする外因性核酸、およびヒトプロインスリン（ｈＰＩＮＳ）をコードする外因性核酸を含み、ｈＩＬ－１０をコードする前記外因性核酸およびｈＰＩＮＳをコードする前記外因性核酸が、染色体に組み込まれている、乳酸菌（ＬＡＢ）。
【請求項２】
ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）である、請求項１に記載のＬＡＢ。
【請求項３】
前記ｈＩＬ－１０が、シグナルペプチドを含まない成熟ｈＩＬ－１０として分泌された時に、２位においてプロリン（Ｐｒｏ）の代わりにアラニン（Ａｌａ）を含む、請求項１に記載のＬＡＢ。
【請求項４】
前記ｈＩＬ－１０が、配列番号１に対して少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を有し、または、ＩＬ－１０をコードする前記外因性核酸が、配列番号２に対して少なくとも９５％同一のヌクレオチド配列を有する、請求項１に記載のＬＡＢ。
【請求項５】
ｈＩＬ－１０をコードする前記外因性核酸が、ｈＩＬ－１０に連結された分泌配列をさらにコードし、前記分泌配列が、未同定分泌４５ｋＤａタンパク質（Ｕｓｐ４５）（ＳＳｕｓｐ４５）である、請求項４に記載のＬＡＢ。
【請求項６】
ｈＩＬ－１０をコードする前記外因性核酸が、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）のｈｌｌＡプロモーター（ＰｈｌｌＡ）などのｈｌｌＡプロモーター（ＰｈｌＡ）の３’に位置する、請求項４に記載のＬＡＢ。
【請求項７】
ｈＩＬ－１０に連結されたＳＳｕｓｐ４５を転写するｈｌｌＡプロモーターを含む発現カセットを含み、前記発現カセットが、ｔｈｙＡ遺伝子座において染色体に組み込まれている、請求項４に記載のＬＡＢ。
【請求項８】
前記ｈＰＩＮＳが、配列番号３に対して少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を有し、または、ｈＰＩＮＳをコードする前記外因性核酸が、配列番号４に対して少なくとも９５％同一のヌクレオチド配列を有する、請求項１に記載のＬＡＢ。
【請求項９】
ｈＰＩＮＳをコードする前記外因性核酸が、ｈＰＩＮＳに連結された分泌配列をさらにコードし、前記分泌配列が、未同定分泌４５ｋＤａタンパク質（Ｕｓｐ４５）（ＳＳｕｓｐ４５）である、請求項８に記載のＬＡＢ。
【請求項１０】
ｈＰＩＮＳをコードする前記外因性核酸が、ｇａｐＢ遺伝子の５’に位置するｇａｐＢプロモーター、ｈＰＩＮＳ分泌配列、およびｈＰＩＮＳをコードする前記外因性核酸を含む第１のポリシストロン性発現カセットを含む、請求項８に記載のＬＡＢ。
【請求項１１】
前記ｇａｐＢ遺伝子と前記ＰＩＮＳ分泌配列との間の、ｒｐｍＤなどの、遺伝子間領域をさらに含む、請求項１０に記載のＬＡＢ。
【請求項１２】
前記ＳＳｕｓｐ４５が、配列番号１１または配列番号１２のヌクレオチド配列を有する、請求項５または９に記載のＬＡＢ。
【請求項１３】
前記ｈＩＬ－１０および前記ｈＰＩＮＳを構成的に発現しかつ分泌する、請求項１に記載のＬＡＢ。
【請求項１４】

大腸菌（Escherichia coli）ＯｔｓＢなどの、トレハロース－６－リン酸ホスファターゼをコードする外因性核酸をさらに含む、先行請求項のいずれか１項に記載のＬＡＢ。
【請求項１５】
トレハロース－６－リン酸ホスファターゼをコードする前記外因性核酸が、未同定分泌４５ｋＤａタンパク質遺伝子（ｕｓｐ４５）の３’において染色体に組み込まれている、請求項１４に記載のＬＡＢ。
【請求項１６】
ｕｓｐ４５プロモーター、前記ｕｓｐ４５、およびトレハロース－６－リン酸ホスファターゼをコードする外因性核酸、および任意選択で、前記ｕｓｐ４５とトレハロース－６－リン酸ホスファターゼをコードする前記外因性核酸との間の、ｒｐｍＤなどの、遺伝子間領域を含む第２のポリシストロン性発現カセットをさらに含む、請求項１４に記載のＬＡＢ。
【請求項１７】
ｌｌｍｇ＿０４５３またはｌｌｍｇ＿０４５４などの、１つまたは複数のトレハローストランスポーターをコードする１つまたは複数の遺伝子をさらに含む、請求項１に記載のＬＡＢ。
【請求項１８】
ｈｌｌＡプロモーター（ＰｈｌｌＡ）によって転写調節される、前記ＰｈｌｌＡの３’に位置する２つのトレハローストランスポーターを含み、前記トレハローストランスポーターをコードする前記遺伝子が、ｒｐｍＤなどの、遺伝子間領域によって隔てられている、請求項１７に記載のＬＡＢ。
【請求項１９】
さらに、トレハロース－６－リン酸ホスホリラーゼ遺伝子（ｔｒｅＰＰ）が、前記ＬＡＢにおいて破壊または不活性化されている、請求項１に記載のＬＡＢ。
【請求項２０】
セロビオース特異的ＰＴＳ系ＩＩＣコンポーネント遺伝子（ｐｔｃＣ）が、前記ＬＡＢにおいて破壊または不活性化されている、請求項１に記載のＬＡＢ。
【請求項２１】
染色体に挿入された、
ａ．ｈＩＬ－１０に連結されたＳＳｕｓｐ４５を転写するｈｌｌＡプロモーターを含み、ｔｈｙＡ遺伝子座において染色体に組み込まれている発現カセット、
ｂ．ｇａｐＢ遺伝子の５’に位置するｇａｐＢプロモーター、ｈＰＩＮＳ分泌配列、およびｈＰＩＮＳをコードする前記外因性核酸を含む第１のポリシストロン性発現カセット、
ｃ．大腸菌（Escherichia coli）ｏｔｓＢ、
ｄ．ｕｓｐ４５プロモーター、ｕｓｐ４５、およびトレハロース－６－リン酸ホスファターゼをコードする外因性核酸、および任意選択で、前記ｕｓｐ４５とトレハロース－６－リン酸ホスファターゼをコードする前記外因性核酸との間の、ｒｐｍＤなどの、遺伝子間領域を含む第２のポリシストロン性発現カセット、
ｅ．ｈｌｌＡプロモーター（ＰｈｌｌＡ）の３’に位置する、トレハローストランスポーターｌｌｍｇ＿０４５３およびｌｌｍｇ＿０４５４を含む第３のポリシストロン性発現カセット、
ｆ．ｔｒｅＰＰの不活性化、および
ｇ．ｐｔｃＣの不活性化
を有するラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）である、請求項１に記載のＬＡＢ。
【請求項２２】
先行請求項のいずれか１項に記載のＬＡＢを含む組成物。
【請求項２３】
１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）の治療における、請求項１から２１に記載のＬＡＢ、または、請求項２２に記載の組成物の使用。

【請求項２４】
Ｔ１Ｄの治療用の医薬を調製するための、請求項１から２１に記載のＬＡＢ、または、請求項２２に記載の組成物の使用。
【請求項２５】
それを必要とする対象においてＴ１Ｄを治療する方法であって、治療有効量の先行請求項のいずれか１項に記載のＬＡＢ、および、オテリキシズマブなどの、ＣＤ３に対する抗体を前記対象に投与することを含む方法。
【請求項２６】
前記ＬＡＢを前記投与することおよび前記抗ＣＤ３抗体を前記投与することが、
ａ．抗ＣＤ３抗体単独で治療された対応する対象と比べた時に、または前記ＬＡＢおよび前記抗ＣＤ３抗体を投与されていない対応する対象と比べた時に、正常血中グルコースレベルを維持するために前記対象が必要とするインスリンの量を低減させ、
ｂ．Ｃペプチドレベルによる測定で、少なくとも約２カ月にわたって前記対象において初期ベータ細胞機能を保存し、
ｃ．少なくとも約２カ月にわたって前記対象において正常血糖を維持し、
ｄ．少なくとも約２カ月にわたって前記対象において正常ヘモグロビンＡ１ｃ（ＨｂＡ１ｃ）レベルを維持し、または
ｅ．任意のこれらの組合せである、
請求項２５に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１６年９月２日に出願された米国仮特許出願第６２／３８３，０７９号の出願日の利益を主張する。
【０００２】
配列表の参照
本出願は、ＡＳＣＩＩ形式で電子的に提出された配列表を含有し、この配列表は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。２０１７年８月３０日に作成された前記ＡＳＣＩＩコピーは、２０５３５０＿００３２＿ＷＯ＿５６７０２０＿ＳＴ２５．ｔｘｔという名称であり、４３，０２７バイトの大きさである。
【背景技術】
【０００３】
粘膜組織に治療用分子を送達するために、遺伝子改変された微生物（例えば、細菌）が使用されてきた。例えば、Steidler, L., et al., Nat. Biotechnol. 2003, 21(7): 785-789；およびRobert S. and Steidler L., Microb. Cell Fact. 2014, 13 Suppl. 1: S11を参照。
【０００４】
インターロイキン１０（ＩＬ－１０）を産生する乳酸菌が以前に記載され、また１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）の治療のためにＩＬ－１０および／またはインスリンもしくはプロインスリンを粘膜に投与することが記載されている。例えば、国際特許出願公開第２００７／０６３０７５号パンフレット；Robert S. et al., Diabetes 2014, 63: 2876-2887；Steidler et al., Nat. Biotechnol. 2003, 21(7): 785-789；およびTakiishi T. et al., J. Clin. Invest. 2012, 122(5): 1717-1725を参照。
【０００５】
しかしながら、安定な、１つより多くの生物活性ポリペプチドを構成的に発現し、かつ、例えばＴ１Ｄの治療といった臨床的使用のために好適な、遺伝子改変された細菌株の必要性が当該技術分野において依然として存在する。本開示はこれらの必要性に応えるものである。

【発明の概要】
【０００６】
本開示は、ＩＬ－１０およびプロインスリン（ＰＩＮＳ）をコードする染色体に組み込まれた核酸を含有する遺伝子改変された微生物、そのような微生物を調製する方法、およびそのような微生物を使用する方法を提供する。これらの遺伝子改変された微生物は、糖尿病、例えばＴ１Ｄの治療を含むがこれに限定されない、ヒトの治療にとって好適であり得る。
【０００７】
微生物および組成物
本開示は、インターロイキン－１０（ＩＬ－１０）ポリペプチドをコードする外因性核酸、およびプロインスリン（ＰＩＮＳ）ポリペプチドなどのＴ１Ｄ特異的抗原をコードする外因性核酸を含有し、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸およびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳポリペプチド）をコードする外因性核酸の両方が染色体に組み込まれている、すなわち、細菌染色体に組み込まれている（または細菌染色体上に位置する）、微生物、例えば、乳酸菌（lactic acid bacterium）（ＬＡＢ）などのグラム陽性菌を提供する。
【０００８】
微生物は、ＬＡＢなどのグラム陽性菌であり得る。ＬＡＢは、ラクトコッカス（Lactococcus）種の細菌であり得る。他の実施形態では、ＬＡＢは、ラクトバチルス（Lactobacillus）種、またはビフィドバクテリウム（Bifidobacterium）種である。一部の実施形態では、ＬＡＢは、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）であり得る。ＬＡＢは、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）亜種クレモリス（cremoris）であり得る。別の例示的なＬＡＢは、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）株ＭＧ１３６３である。例えば、Gasson, M.J., J. Bacteriol. 1983, 154: 1-9を参照。
【０００９】
上記実施形態のいずれかによる一部の例では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ヒトＩＬ－１０（ｈＩＬ－１０）である。他の例では、ＩＬ－１０は、ＩＬ－１０バリアントポリペプチドであり、例えば、例えば細菌によるＩＬ－１０ポリペプチドの発現を増加させる、少なくとも１つの点変異を含むＩＬ－１０バリアントポリペプチドである。これらの実施形態による一部の例では、ＩＬ－１０は、「成熟」ヒトＩＬ－１０（ｈＩＬ－１０）であり、すなわち、そのシグナルペプチドを含まない。一部の実施形態では、ｈＩＬ－１０は、成熟ペプチド中のアミノ酸を数えた時に２位において、プロリン（Ｐｒｏ）からアラニン（Ａｌａ）への置換を含む。例えば、配列番号１を参照。そのようなポリペプチドは、例えば、Steidler et al., Nat. Biotechnol. 2003, 21(7): 785-789（その開示は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。一部の例では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、野生型ヒトＩＬ－１０である。他の例では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、それ自身のシグナルペプチドを含まず、かつ配列番号１に対して少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を有する、野生型ヒトＩＬ－１０である。他の例では、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸は、配列番号２に対して少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一のヌクレオチド配列を有する。
【００１０】
上記実施形態のいずれかによる一部の例では、Ｔ１Ｄ特異的抗原ポリペプチドは、ＰＩＮＳポリペプチドであり、例えば、野生型ヒトＰＩＮＳなどのヒトＰＩＮＳ（ｈＰＩＮＳ）である。一部の例では、ＰＩＮＳポリペプチドは、配列番号５に対して少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を有する。野生型ＰＩＮＳは、配列番号６または配列番号７に対して少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくと

も９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一のヌクレオチド配列によってコードされたものであってよい。他の例では、ＰＩＮＳポリペプチドは、そのシグナルペプチドを含まず、かつ配列番号３に対して少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を有する、ヒトＰＩＮＳである。他の例では、ＰＩＮＳポリペプチドをコードする外因性核酸は、配列番号４に対して少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一のヌクレオチド配列を有する。

【００１１】

上記実施形態のいずれかによる一部の例では、微生物（例えば、ＬＡＢ）は、ＩＬ－１０ポリペプチドを発現する（例えば、構成的に発現する）。他の例では、微生物（例えば、ＬＡＢ）は、ＩＬ－１０ポリペプチド（例えば、ｈＩＬ－１０）を構成的に発現しかつ分泌する。上記実施形態のいずれかによる他の例では、ＬＡＢは、Ｔ１Ｄ特異的抗原ポリペプチド（例えば、ＰＩＮＳポリペプチド）を構成的に発現する。他の例では、微生物（例えば、ＬＡＢ）は、Ｔ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドを構成的に発現しかつ分泌する。さらに他の例では、微生物（例えば、ＬＡＢ）は、ＩＬ－１０ポリペプチド（例えば、ｈＩＬ－１０）およびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチド（例えば、ｈＰＩＮＳ）を構成的に発現しかつ分泌する。

【００１２】

上記実施形態のいずれかによる一部の例では、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸は、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）のｈｌｌＡプロモーター（ＰｈｌｌＡ）などのＰｈｌｌＡの３’に位置する。この実施形態による一部の例では、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸は、ＰｈｌｌＡによって転写調節される。他の例では、ＬＡＢは、ＰｈｌｌＡプロモーター（例えば、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）のＰｈｌｌＡ）、ＩＬ－１０分泌配列（例えば、ＰｈｌｌＡの３’に位置する）、およびＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸（例えば、ＩＬ－１０分泌配列の３’に位置する）を含有するＩＬ－１０発現カセットを含む。一部の例では、ＩＬ－１０発現カセットは、染色体に組み込まれている。一部の例では、ＩＬ－１０発現カセットは、染色体に組み込まれており、それによって、別の遺伝子を置き換えまたは部分的に置き換えている。この実施形態による一部の例では、ＩＬ－１０発現カセットは、例えば、Steidler et al., Nat. Biotechnol. 2003, 21(7): 785-789に記載されるように、ｔｈｙＡ遺伝子座において染色体に組み込まれており、例えば、内因性ｔｈｙＡ遺伝子を置き換えている。上記実施形態のいずれかによる一部の例では、ＩＬ－１０分泌配列は、未同定分泌４５ｋＤａタンパク質（unidentified secreted 45-kDa protein）（Ｕｓｐ４５）の分泌リーダーをコードするヌクレオチド配列である。そのような分泌配列は、本明細書ではＳＳｕｓｐ４５と称される。一部の例では、ＳＳｕｓｐ４５は、配列番号１０に対して少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を有する。他の例では、ＳＳｕｓｐ４５は、配列番号１１または配列番号１２に対して少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列によってコードされる。一部の例では、ＩＬ－１０発現カセット中のＳＳｕｓｐ４５は、配列番号１１に対して少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の核酸配列によってコードされる。一部の例では、ＩＬ－１０発現カセットは、ＰｈｌｌＡ＞＞ＳＳｕｓｐ４５＞＞ｈＩＬ－１０によって表される。例示的なＩＬ－１０発現カセットのヌクレオチド配列は、図１１に示される。

【００１３】

上記実施形態のいずれかによる一部の例では、Ｔ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）

ポリペプチドをコードする外因性核酸は、ｇａｐＢプロモーター、例えば微生物（例えば、ＬＡＢ）に内因性のｇａｐＢプロモーターの３’に位置する。この実施形態による他の例では、Ｔ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドをコードする外因性核酸は、ｇａｐＢプロモーターによって転写調節される。他の例では、Ｔ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドをコードする外因性核酸は、ｇａｐＢ遺伝子（ｇａｐＢ）およびそのｇａｐＢプロモーターの３’に位置する。他の例では、ＬＡＢは、ｇａｐＢ遺伝子の５’に位置するｇａｐＢプロモーター、Ｔ１Ｄ特異的抗原分泌配列（例えば、ＰＩＮＳ分泌配列）（例えば、ｇａｐＢの３’に位置する）、およびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドをコードする外因性核酸（例えば、ＰＩＮＳ分泌配列の３’）を含む第１のポリシストロン性発現カセット（例えば、二シストロン）を含む。この実施形態による一部の例では、ポリシストロン性発現カセットは、例えばｇａｐＢとＰＩＮＳ分泌配列との間の、遺伝子間領域をさらに含む。上記実施形態のいずれかによる一部の例では、ｇａｐＢプロモーターおよびｇａｐＢ遺伝子は、微生物（例えば、ＬＡＢ）に内因性である。一部の例では、ＰＩＮＳ分泌配列は、ＳＳｕｓｐ４５である。上記実施形態による他の例では、第１のポリシストロン性発現カセットは、染色体に組み込まれている。他の例では、第１のポリシストロン性発現カセットは、ＰｇａｐＢ＞＞ｇａｐＢ＞＞遺伝子間領域＞＞ＳＳｕｓｐ４５＞＞ＰＩＮＳによって表される。上記実施形態のいずれかによる一部の例では、第１のポリシストロン性発現カセット中の遺伝子間領域は、ｒｐｍＤ遺伝子の５’の遺伝子間領域（すなわち、ｒｐｍＤに先行する領域）である。上記実施形態のいずれかによる一部の例では、ｒｐｍＤは、配列番号８（これは、第１の遺伝子の終止コドン、および第２の遺伝子の開始コドンを含む）によるヌクレオチド配列を有する。開始コドンおよび終止コドンなしでは、遺伝子間領域ｒｐｍＤは、配列番号９による核酸配列を有する。

【００１４】

上記実施形態のいずれかによる一部の例では、微生物（例えば、ＬＡＢ）は、トレハロース－６－リン酸ホスファターゼ、例えば、大腸菌（Escherichia coli）ｏｔｓＢなどのｏｔｓＢをコードする外因性核酸をさらに含む。これらの実施形態による一部の例では、トレハロース－６－リン酸ホスファターゼをコードする外因性核酸は、染色体に組み込まれている。一部の例では、トレハロース－６－リン酸ホスファターゼをコードする外因性核酸は、未同定分泌４５ｋＤａタンパク質遺伝子（ｕｓｐ４５）の３’において染色体に組み込まれている。この実施形態による一部の例では、ＬＡＢは、ｕｓｐ４５プロモーター、ｕｓｐ４５遺伝子（例えば、プロモーターの３’）、およびトレハロース－６－リン酸ホスファターゼをコードする外因性核酸（例えば、ｕｓｐ４５遺伝子の３’）を含む第２のポリシストロン性発現カセットを含む。一部の例では、第２のポリシストロン性発現カセットは、ｕｓｐ４５遺伝子とトレハロース－６－リン酸ホスファターゼをコードする外因性核酸との間の遺伝子間領域をさらに含む。一部の例では、第２のポリシストロン性発現カセットは、Ｐｕｓｐ４５＞＞ｕｓｐ４５＞＞遺伝子間領域＞＞ｏｔｓＢによって表される。これらの実施形態による一部の例では、遺伝子間領域は、本明細書に上記されるｒｐｍＤ（例えば、配列番号８または配列番号９を有する）である。したがって、第２のポリシストロン性発現カセットは、Ｐｕｓｐ４５＞＞ｕｓｐ４５＞＞ｒｐｍＤ＞＞ｏｔｓＢによって表され得る。

【００１５】

上記実施形態のいずれかによる一部の例では、トレハロース－６－リン酸ホスホリラーゼ遺伝子（ｔｒｅＰＰ）は、微生物（例えば、ＬＡＢ）において破壊または不活性化されている。例えば、ｔｒｅＰＰは、ｔｒｅＰＰ遺伝子もしくはその断片を除去することによって不活性化されているか、または、ｔｒｅＰＰは、終止コドンを挿入することによって破壊されている。したがって、これらの実施形態による一部の例では、微生物（例えば、ＬＡＢ）は、ｔｒｅＰＰ活性を欠いている。

【００１６】

上記実施形態のいずれかによる他の例では、セロビオース特異的ＰＴＳ系ＩＩＣコンポ

ーネント遺伝子（cellobiose-specific PTS system IIC component gene）（ｐｔｃＣ）は、微生物（例えば、ＬＡＢ）において破壊または不活性化されている。例えば、ｐｔｃＣは、終止コドンを挿入することによって破壊されているか、または、ｐｔｃＣは、ｐｔｃＣもしくはその断片を除去することによって不活性化されている。したがって、これらの実施形態による一部の例では、微生物（例えば、ＬＡＢ）は、ｐｔｃＣ活性を欠いている。

【００１７】

上記実施形態のいずれかによる他の例では、ＬＡＢは、１つまたは複数のトレハローストランスポーターをコードする１つまたは複数の遺伝子をさらに含む。一部の例では、１つまたは複数のトレハローストランスポーターをコードする１つまたは複数の遺伝子は、ＬＡＢに内因性である。一部の例では、ＬＡＢは、１つまたは複数のトレハローストランスポーターをコードする１つまたは複数の遺伝子を過剰発現する。これらの実施形態による一部の例では、１つまたは複数のトレハローストランスポーターをコードする１つまたは複数の遺伝子は、外因性プロモーター、例えばｈｌｌＡプロモーター（ＰｈｌｌＡ）の３’に位置する。例えば、１つまたは複数のトレハローストランスポーターをコードする１つまたは複数の遺伝子は、ＰｈｌｌＡによって転写調節される。これらの実施形態による一部の例では、１つまたは複数のトレハローストランスポーターをコードする１つまたは複数の遺伝子は、ｌｌｍｇ＿０４５３、ｌｌｍｇ＿０４５４、および任意のこれらの組合せから選択される。一部の例では、ｌｌｍｇ＿０４５３およびｌｌｍｇ＿０４５４は、ＰｈｌｌＡによって転写調節される。

【００１８】

上記実施形態のいずれかによる一部の例では、１つまたは複数のトレハローストランスポーターをコードする１つまたは複数の遺伝子は、２つのトレハローストランスポーターをコードする２つの遺伝子を含み、遺伝子間領域が該２つの遺伝子の間に配置されている。一部の例では、遺伝子間領域は、例えば配列番号８または配列番号９を有する、ｒｐｍＤである。一部の例では、微生物（例えば、ＬＡＢ）は、２つの異なるトレハローストランスポーターをコードする２つの核酸配列（例えば、遺伝子）（トランスポーター１およびトランスポーター２の配列）および該２つの異なるトレハローストランスポーターをコードする２つの核酸の間の遺伝子間領域を含むポリシストロン性発現カセットを含む。そのような発現カセットは、ＰｈｌｌＡ＞＞トランスポーター１＞＞遺伝子間領域＞＞トランスポーター２によって表され得る。これらの実施形態による一部の例では、遺伝子間領域は、本明細書に上記されるｒｐｍＤ（例えば、配列番号８または配列番号９を有する）である。したがって、ポリシストロン性発現カセットは、ＰｈｌｌＡ＞＞トランスポーター１＞＞ｒｐｍＤ＞＞トランスポーター２によって表され得る。

【００１９】

したがって、一部の実施形態では、ＬＡＢは、単一株において、いくつもの有用な特色を含む。一実施形態では、ＬＡＢは、

（Ａ）染色体に組み込まれたプロモーター＞＞分泌シグナル＞＞治療用タンパク質（インターロイキン、抗原、または酵素など）、

（Ｂ）染色体に組み込まれたプロモーター＞＞分泌シグナル＞＞任意選択で第２の治療用タンパク質、

（Ｃ）トレハロースの蓄積を促進し、胆汁塩および乾燥に対するＬＡＢの生存能力を増進させる、変異および挿入の組合せ

を含む、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）である。該変異は、

（ｉ）トレハロースの取込みのための、ｌｌｍｇ＿０４５３および／またはｌｌｍｇ＿０４５４などの、染色体に組み込まれたトレハローストランスポーター（ＰｈｌｌＡ＞＞トランスポーター１＞＞遺伝子間領域＞＞トランスポーター２など）、

（ｉｉ）トレハロース－６－リン酸のトレハロースへの変換を促進する、ｕｓｐ４５（遺伝子ＩＤ：４７９７２１８）の下流に位置する、染色体に組み込まれたトレハロース－６－リン酸ホスファターゼ遺伝子（ｏｔｓＢ；遺伝子ＩＤ：１０３６９１４）、

（ｉｉｉ）（例えば、遺伝子の欠失を通じて）不活性化されたトレハロース－６－リン酸ホスホリラーゼ遺伝子（ｔｒｅＰＰ；遺伝子ＩＤ：４７９７１４０）、および
（ｉｖ）不活性化されたセロビオース特異的ＰＴＳ系ＩＩＣコンポーネント（遺伝子ＩＤ：４７９６８９３）ｐｔｃＣ（例えば、４４６のうちコドン位置３０のｔｇａ；ｔｇａ３０）
から選択される。
ＬＡＢはまた、ｔｈｙＡなどの、生物学的封じ込めのための栄養要求性変異を含有してもよい。
【００２０】
一実施形態では、ＬＡＢは、
（Ａ）ＬＡＢから成熟ｈＩＬ－１０を分泌するための、染色体に組み込まれたプロモーター＞＞分泌シグナル＞＞ｈＩＬ－１０（ＰｈｌｌＡ＞＞ＳＳｕｓｐ４５＞＞ｈＩＬ－１０など）、
（Ｂ）ＬＡＢから成熟ＰＩＮＳを分泌するための、染色体に組み込まれたプロモーター＞＞分泌シグナル＞＞ＰＩＮＳ（ＰｇａｐＢ＞＞ｇａｐＢ＞＞遺伝子間領域＞＞ＳＳｕｓｐ４５＞＞ＰＩＮＳなど）（遺伝子間領域は、例えばｒｐｍＤであってよい）、
（Ｃ）トレハロースの蓄積を促進し、胆汁塩および乾燥に対するＬＡＢの生存能力を増進させる、変異および挿入の組合せ
を含む、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）である。該変異は、
（ｉ）トレハロースの取込みのための、ｌｌｍｇ＿０４５３および／またはｌｌｍｇ＿０４５４などの、染色体に組み込まれたトレハローストランスポーター（ＰｈｌｌＡ＞＞トランスポーター１＞＞遺伝子間領域＞＞トランスポーター２など）、
（ｉｉ）トレハロース－６－リン酸のトレハロースへの変換を促進する、ｕｓｐ４５（遺伝子ＩＤ：４７９７２１８）の下流に位置する、染色体に組み込まれたトレハロース－６－リン酸ホスファターゼ遺伝子（ｏｔｓＢ；遺伝子ＩＤ：１０３６９１４）、
（ｉｉｉ）（例えば、遺伝子の欠失を通じて）不活性化されたトレハロース－６－リン酸ホスホリラーゼ遺伝子（ｔｒｅＰＰ；遺伝子ＩＤ：４７９７１４０）、および
（ｉｖ）不活性化されたセロビオース特異的ＰＴＳ系ＩＩＣコンポーネント（遺伝子ＩＤ：４７９６８９３）ｐｔｃＣ（例えば、４４６のうちコドン位置３０のｔｇａ；ｔｇａ３０）
から選択される。
ＬＡＢはまた、ｔｈｙＡなどの、生物学的封じ込めのための栄養要求性変異を含有してもよい。
【００２１】
一実施形態では、ＬＡＢは、
（Ａ）生物学的封じ込めのための、ｔｈｙＡの変異、
（Ｂ）ＬＡＢから成熟ｈＩＬ－１０を分泌するための、染色体に組み込まれたＰｈｌｌＡ＞＞ＳＳｕｓｐ４５＞＞ｈＩＬ－１０、
（Ｃ）ＬＡＢから成熟ＰＩＮＳを分泌するための、染色体に組み込まれたＰｇａｐＢ＞＞ｇａｐＢ＞＞遺伝子間領域＞＞ＳＳｕｓｐ４５＞＞ＰＩＮＳ（遺伝子間領域は、ｒｐｍＤから選択される）、
（Ｄ）トレハロースの取込みのための、ｌｌｍｇ＿０４５３および／またはｌｌｍｇ＿０４５４などの、染色体に組み込まれたトレハローストランスポーター（ＰｈｌｌＡ＞＞トランスポーター１＞＞遺伝子間領域＞＞トランスポーター２など）、
（Ｅ）（例えば、遺伝子の欠失を通じて）不活性化されたトレハロース－６－リン酸ホスホリラーゼ遺伝子（ｔｒｅＰＰ；遺伝子ＩＤ：４７９７１４０）、
（Ｆ）トレハロース－６－リン酸のトレハロースへの変換を促進する、ｕｓｐ４５（遺伝子ＩＤ：４７９７２１８）の下流に位置する、染色体に組み込まれたトレハロース－６－リン酸ホスファターゼ遺伝子（ｏｔｓＢ；遺伝子ＩＤ：１０３６９１４）、および
（Ｇ）不活性化されたセロビオース特異的ＰＴＳ系ＩＩＣコンポーネント（遺伝子ＩＤ：

４７９６８９３）ｐｔｃＣ（例えば、４４６のうちコドン位置３０のｔｇａ；ｔｇａ３０）
を含む、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）である。
【００２２】
本開示は、本明細書に記載される微生物（例えば、ＬＡＢ）、例えば、上記実施形態のいずれかによる微生物（例えば、ＬＡＢ）を含有する組成物をさらに提供する。
【００２３】
本開示は、本明細書に記載される微生物（例えば、ＬＡＢ）、例えば、上記実施形態のいずれかによる微生物（例えば、ＬＡＢ）を含有し、かつ薬学的に許容される担体をさらに含有する医薬組成物をさらに提供する。
【００２４】
本開示は、上記実施形態のいずれかによる微生物（例えば、ＬＡＢ）を含有し、かつ溶媒、および安定化剤をさらに含有する微生物懸濁液（例えば、細菌懸濁液）をさらに提供する。この実施形態による一部の例では、溶媒は、水、油、および任意のこれらの組合せから選択される。例えば、本開示は、本開示のＬＡＢ、水性混合物（例えば、飲料）、および安定化剤を含有する細菌懸濁液を提供する。例示的な安定化剤は、タンパク質もしくはポリペプチド（例えば、糖タンパク質）、ペプチド、単糖、二糖もしくは多糖、アミノ酸、ゲル、脂肪酸、ポリオール（例えば、ソルビトール、マンニトール、もしくはイノシトール）、塩（例えば、アミノ酸塩）、または任意のこれらの組合せから選択される。
【００２５】
本開示は、１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）の治療において使用するための、本明細書に記載される微生物（例えば、上記実施形態のいずれかによるＬＡＢ）、本明細書に記載される組成物、または本明細書に記載される医薬組成物をさらに提供する。
【００２６】
本開示は、医薬、例えば、疾患（例えば、１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）などの自己免疫疾患）の治療のための医薬の調製において使用するための、本明細書に記載される微生物（例えば、上記実施形態のいずれかによるＬＡＢ）、本明細書に記載される組成物、または本明細書に記載される医薬組成物をさらに提供する。
【００２７】
方法１：疾患を治療する方法
本開示は、それを必要とする対象においてＴ１Ｄを治療する方法をさらに提供する。例示的な方法は、治療有効量の本明細書に開示される微生物（例えば、ＬＡＢ）（例えば、上記実施形態のいずれかによるＬＡＢ）、本明細書に開示される組成物、または本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与することを含む。これらの実施形態のいずれかによる一部の例では、対象は、ヒト、例えばヒト患者である。これらの実施形態のいずれかによる一部の例では、方法は、免疫調節剤（例えば、抗ＣＤ３抗体）を対象に投与することをさらに含む。例えば、免疫調節剤（例えば、抗ＣＤ３抗体）は、併用療法レジメンを使用して対象に投与され、すなわち、対象（例えば、ヒト）は、抗ＣＤ３抗体などの別の免疫調節剤を併用して治療される。したがって、一部の例では、本開示は、それを必要とするヒト対象においてＴ１Ｄを治療する方法を提供する。例示的な方法は、治療有効量の本明細書に開示されるＬＡＢ（例えば、上記実施形態のいずれかによるＬＡＢ）、本明細書に開示される組成物、または本明細書に開示される医薬組成物をヒト対象に投与することを含み、ヒト対象は、抗ＣＤ３抗体またはその断片をさらに投与される（例えば、抗ＣＤ３抗体を併用して治療される）。
【００２８】
一部の例では、抗ＣＤ３抗体は、モノクローナル抗体である。他の例では、抗ＣＤ３抗体は、ヒト化モノクローナル抗体である。他の例では、抗ＣＤ３抗体は、オテリキシズマブまたはテプリズマブである。一部の例では、ＬＡＢとの併用療法として投与される場合に、抗ＣＤ３抗体は、単剤療法のために通常使用される用量とは異なる用量で対象に投与される。併用療法において使用するための抗ＣＤ３の最適な用量は、動物モデルおよび臨

床試験を通じて決定することができる。好ましくは、抗ＣＤ３の用量は、抗ＣＤ３抗体を用いる効果的な単剤療法のために通常必要とされる用量より少ない、すなわち治療用量未満である。単剤療法に効果的な用量は、動物モデルおよび臨床試験を参照することによって、および当業者の実施によって、決定することができ、また、規制により認可された用量であり得る。一部の例では、ＬＡＢを用いる併用療法を受けている対象は、単剤療法における抗ＣＤ３の標準的な用量よりも少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、または少なくとも約９０％少ない用量の抗ＣＤ３を投与される。他の例では、併用療法において投与される抗ＣＤ３の用量は、単剤療法における抗ＣＤ３の用量よりも約１０～１００％、約１０～９０％、約１０～７０％、約１０～６０％、約１０～５０％、約５０～１００％、または約２０～５０％少ない。４８または６４ｍｇのオテリキシズマブの６日間の連日投与は、治療群が３６カ月時にプラセボ対照よりも８０％大きいベータ細胞機能を保持するのに充分にＴ細胞活性を抑制できることを実験は示した。しかしながら、そのような用量は、潜伏性エプスタイン・バー感染の再活性化に関連した。８日間の３．１ｍｇ／日の用量は、ベータ細胞機能を保存しなかった。したがって、４８ｍｇより少なくとも１０％少ない（すなわち、４３ｍｇ）治療は「治療未満」と考えられるであろう。

【００２９】

一部の実施形態では、上記方法における哺乳動物対象は、Ｔ１Ｄと診断された直後である（すなわち、発症直後のＴ１Ｄを有する）。これらの実施形態による一部の例では、対象は、微生物（例えば、ＬＡＢ）を投与されるよりも前の１２カ月以内、２４カ月以内、または３６カ月以内に、Ｔ１Ｄを有すると診断された対象である。

【００３０】

方法１の実施形態のいずれかによる一部の例では、方法は、対象中の、例えば対象の臓器または血液中の、臨床マーカー（例えば、免疫バイオマーカー）を測定することをさらに含む。例えば、方法は、対象の血液中のＴ１Ｄ関連抗体を測定することをさらに含んでよい。一部の例では、方法は、対象の血液中のインスリン自己抗体（ＩＡＡ）を測定することをさらに含み得る。一部の例では、対象の血液中のＩＡＡの量は、Ｔ１Ｄの疾患進行の指標となり、例えば、対象は発症直後のＴ１Ｄを有すると分類できるかどうかの指標となり、かつ、対象は治療から利益を得る可能性があるかどうかの指標となることもある。したがって、ＩＡＡを測定することは、微生物を対象に投与する前に行われ得る。一部の例では、疾患発症時のＩＡＡ陽性は、治療転帰良好の予測因子となる。しかしながら、ＩＡＡを測定することはまた、治療の転帰をモニターしかつ測定するために使用されることもあり、したがって、治療の間に（例えば、治療期間の全体を通じて間隔を置いて）治療有効性または転帰をモニターするために、かつ／または、治療期間の後に、例えば、対象が治療を中止した後に治療結果（例えば、正常血糖）を維持するかどうかをモニターするために、使用され得る。一部の例では、ＩＡＡ陽性の減少は、治療転帰良好の指標となる。他の例では、方法は、対象において制御性Ｔ細胞を測定することをさらに含む。制御性Ｔ細胞は、Ｔｒｅｇ１７、Ｔｒ１　Ｔｈ３、ＣＤ８$^{+}$ＣＤ２８$^{-}$、Ｑａ－１拘束Ｔ細胞、ＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$および／またはＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$　Ｔ細胞を含む。好ましくは、ＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$および／またはＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$　Ｔ細胞である。他の例では、方法は、対象において初期血中グルコース濃度を測定することをさらに含む。他の例では、方法は、対象においてＣペプチドレベルを測定することをさらに含む。

【００３１】

関連する実施形態では、本発明は、Ｔｒｅｇ細胞の活性を増加させて、ベータ細胞および／またはＴ１Ｄ関連抗原に対する自己免疫反応を抑制し、好ましくは、全てのＴ１Ｄ関連抗原に対する自己免疫反応を抑制する方法である。他の実施形態では、本発明は、ベータ細胞および／または任意のＴ１Ｄ関連抗原に対する自己免疫反応を実質的に減少させ、好ましくは停止させる方法である。好ましくは、自己免疫反応の実質的な減少は、疾患進

行の実質的な減少または停止に繋がる。

【００３２】

上記方法のいずれかにおける一部の実施形態では、微生物（例えば、ＬＡＢ）は、対象に経口投与される。例えば、微生物（例えば、ＬＡＢ）は、微生物（例えば、ＬＡＢ）および薬学的に許容される担体を含む経口投与用の医薬組成物の形態（例えば、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、または液剤）で対象に投与される。他の例では、微生物（例えば、ＬＡＢ）は、食品の形態で対象に投与され、または食品（例えば、飲料）に加えられる。他の例では、微生物（例えば、ＬＡＢ）は、栄養補助食品の形態で対象に投与される。さらに他の例では、微生物（例えば、ＬＡＢ）は、坐剤製品の形態で対象に投与される。一部の例では、本開示の組成物は、微生物（例えば、ＬＡＢ）によって発現されるポリペプチドの粘膜送達のために適当である。例えば、組成物は、対象の胃腸管（例えば、腸）中での効率的な放出のために配合され得る。

【００３３】

上記実施形態のいずれかによれば、本開示は、それを必要とする対象においてＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドに対する寛容を確立する方法をさらに提供する。例示的な方法は、治療有効量の本明細書に開示される微生物（例えば、ＬＡＢ）（例えば、上記実施形態のいずれかによるＬＡＢ）、本明細書に開示される組成物、または本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与することを含む。これらの実施形態のいずれかによる一部の例では、対象は、ヒト、例えばヒト患者である。

【００３４】

上記実施形態のいずれかによれば、本開示は、それを必要とする対象においてＩＡＡを減少させ、またはそれを必要とする対象においてＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞の数を増加させる方法をさらに提供する。例示的な方法は、治療有効量の本明細書に開示される微生物（例えば、ＬＡＢ）（例えば、上記実施形態のいずれかによるＬＡＢ）、本明細書に開示される組成物、または本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与することを含む。これらの実施形態のいずれかによる一部の例では、対象は、ヒト、例えばヒト患者である。

【００３５】

一部の例では、（例えば、上記方法のいずれかにしたがって）治療有効量の本開示の微生物（例えば、ＬＡＢ）および本開示の抗ＣＤ３抗体を対象に投与することは、（例えば、医師によって推奨されるように、または一般に安全であると考えられるように）血中グルコースレベルを制御しまたはある特定の血中グルコースレベルを維持するために対象に投与される（すなわち、投与されなければならない）インスリンの量を低減させる。例えば、（例えば、上記方法のいずれかにしたがって）治療有効量の本開示の微生物（例えば、ＬＡＢ）および本開示の抗ＣＤ３抗体を対象に投与することは、微生物（例えば、ＬＡＢ）および抗ＣＤ３抗体を投与されていない対応する対象によって必要とされるインスリンの量と比べた時に、または抗ＣＤ３抗体単独で治療される対応する対象によって必要とされるインスリンの量と比べた時に、対象において血中グルコースレベルを制御しまたはある特定の血中グルコースレベルを維持するために必要とされるインスリンの量を低減させる。

【００３６】

他の例では、（例えば、上記方法のいずれかにしたがって）治療有効量の本開示の微生物（例えば、ＬＡＢ）および本開示の抗ＣＤ３抗体を対象に投与することは、例えば、当該技術分野で認識される方法を使用した測定で、対象において対象におけるベータ細胞機能を保存する（例えば、治療の開始時に測定されたベータ細胞機能を保存する）。（例えば、Ｃペプチドレベルを使用して）ベータ細胞機能を測定する例示的な方法もまた、本明細書に記載される。一部の例では、対象におけるベータ細胞機能は、微生物（例えば、ＬＡＢ）および抗ＣＤ３抗体の投与の開始後、少なくとも約２カ月、少なくとも約４カ月、少なくとも約６カ月、少なくとも約８カ月、少なくとも約１０カ月、少なくとも約１２カ月、少なくとも約１４カ月、少なくとも約１６カ月、少なくとも約１８カ月、少なくとも

約２０カ月、少なくとも約２２カ月、または少なくとも約２４カ月にわたって保存される。他の例では、（例えば、上記方法のいずれかにしたがって）治療有効量の本開示の微生物（例えば、ＬＡＢ）および本開示の抗ＣＤ３抗体を対象に投与することは、微生物（例えば、ＬＡＢ）および抗ＣＤ３抗体を投与されていない対応する対象においてベータ細胞機能が保存される時間と比べた時に、または抗ＣＤ３抗体単独で治療された対応する対象と比べた時に、対象においてベータ細胞機能が保存される時間を増加させる。

【００３７】

他の例では、（例えば、上記方法のいずれかにしたがって）治療有効量の本開示の微生物（例えば、ＬＡＢ）および本開示の抗ＣＤ３抗体を対象に投与することは、例えば、当該技術分野で認識される方法を使用した測定で、対象において正常血糖を維持する。正常血糖と関係する血中グルコース範囲は本明細書に記載される。例えば、ヒト対象における正常血糖は、１２６ｍｇ／ｄＬまたはそれ未満の２回の連続的な空腹時血中グルコース測定値と関係し得る。血中グルコースレベルを測定する例示的な方法は当該技術分野において公知であり、本明細書に記載される。一部の例では、（治療を受けている）対象における正常血糖は、微生物（例えば、ＬＡＢ）および抗ＣＤ３抗体の投与の開始後、少なくとも約２カ月、少なくとも約４カ月、少なくとも約６カ月、少なくとも約８カ月、少なくとも約１０カ月、少なくとも約１２カ月、少なくとも約１４カ月、少なくとも約１６カ月、少なくとも約１８カ月、少なくとも約２０カ月、少なくとも約２２カ月、または少なくとも約２４カ月にわたって保存される。他の例では、（例えば、上記方法のいずれかにしたがって）治療有効量の本開示の微生物（例えば、ＬＡＢ）および本開示の抗ＣＤ３抗体を対象に投与することは、微生物（例えば、ＬＡＢ）および抗ＣＤ３抗体を投与されていない対応する対象において正常血糖が維持される時間と比べた時に、または抗ＣＤ３抗体単独で治療される対応する対象において正常血糖が維持される時間と比べた時に、対象において正常血糖が維持される時間を増加させる。

【００３８】

他の例では、（例えば、上記方法のいずれかにしたがって）治療有効量の本開示の微生物（例えば、ＬＡＢ）および本開示の抗ＣＤ３抗体を対象に投与することは、例えば、当該技術分野で認識される方法を使用した測定で、対象において正常ヘモグロビンＡ１ｃ（ＨｂＡ１ｃ）レベルを維持する。一部の例では、（治療を受けている）対象における正常ＨｂＡ１ｃレベルは、微生物（例えば、ＬＡＢ）および抗ＣＤ３抗体の投与後、少なくとも約２カ月、少なくとも約４カ月、少なくとも約６カ月、少なくとも約８カ月、少なくとも約１０カ月、少なくとも約１２カ月、少なくとも約１４カ月、少なくとも約１６カ月、少なくとも約１８カ月、少なくとも約２０カ月、少なくとも約２２カ月、または少なくとも約２４カ月にわたって維持される。

【００３９】

代替的な実施形態では、本発明の治療方法は、治療された対象において高血糖症の程度および頻度が治療されていない対象と比べて低減されるように、疾患を改善する。そのような低減は、治療されていない対象の１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０または９０％であり得る。

【００４０】

治療されていないＴ１Ｄは、時間をかけて発症し、膵臓中のベータ細胞が破壊されるにつれて進行的に悪化する。したがって、本発明の方法は疾患を停止させることができるので、疾患進行のできるだけ早期に対象を治療することが有利である。疾患進行のそのようなマーカーとしては、グリセミック指数、インスリン自己抗体（ＩＡＡ）レベル、Ｃ断片レベル、および膵島炎が挙げられるがこれらに限定されない。したがって、関連する実施形態では、本発明の治療方法はまた、治療の前および治療の間に疾患進行を測定することも含む。

【００４１】

例えば、ヒト対象は、該対象において以下のいずれか１つが測定された時に発症早期Ｔ１Ｄを有すると分類され得る：（１）２回の連続的な空腹時血中グルコース試験が１２６

ｍｇ／ｄＬに等しいまたはそれより大きい；（２）任意の無作為な血中グルコース測定値が２００ｍｇ／ｄＬより大きい時；（３）６．５パーセントに等しいまたはそれより大きいヘモグロビンＡ１ｃ（ＨｂＡ１ｃ）試験（ＨｂＡ１ｃは血糖の３カ月平均を与える血液試験である）；または（４）２００ｍｇ／ｄＬを上回る任意の値を有する２時間の経口耐糖能試験、あるいはこれらの組合せ。したがって、正常血糖は、以下のいずれかによって特徴付けられ得る：（１）２回の連続的な空腹時血中グルコース試験が１２６ｍｇ／ｄＬ未満、１２０ｍｇ／ｄＬ未満、または１００ｍｇ／ｄＬ未満；（２）任意の無作為な血中グルコース測定値が２００ｍｇ／ｄＬ未満、１８０ｍｇ／ｄＬ未満、１６０ｍｇ／ｄＬ未満、または１４０ｍｇ／ｄＬ未満である時；（３）６．５パーセント未満、または６％未満のヘモグロビンＡ１ｃ（ＨｂＡ１ｃ）試験；または（４）２００ｍｇ／ｄＬ未満、１８０ｍｇ／ｄＬ未満、１６０ｍｇ／ｄＬ未満、または１４０ｍｇ／ｄＬ未満の値を有する２時間の経口耐糖能試験、あるいは任意のこれらの組合せ。

【００４２】

疾患進行が実質的に減少（好ましくは中止、特に発病過程の基礎となる自己免疫に関して）したら、ベータ細胞機能を回復させる方法によって対象をさらに治療することができる。したがって、さらなる実施形態では、対象は、ベータ細胞移植片を用いて、かつ／または内因性ベータ細胞の増殖を引き起こす薬物を用いて治療され得る。方法はＴ１Ｄの基礎となる自己免疫を後退させることができるので、方法は発症早期の糖尿病に限定されない。自己免疫を破壊するベータ細胞が取り除かれたら、移植を通じて、かつ／または内因性ベータ細胞の増殖および発生を促すことによってベータ細胞機能を回復させることができる。したがって、方法は、慢性糖尿病を有する対象に適用することができる。

【００４３】

さらなる実施形態では、本発明の治療方法は、悪化の速度が、治療されていない疾患の４分の３、半分、４分の１またはそれ未満となるように、疾患進行を改善する。そのような悪化は、例えば、グリセミック指数、インスリン自己抗体（ＩＡＡ）レベル、Ｃ断片レベル、および膵島炎を通じて評価され得る。

【００４４】

さらなる実施形態では、本発明の治療方法は、いかなる臨床症状の前の投与などによって、Ｔ１Ｄを予防するために与えられる。好ましくは、対象は、家族歴、血中および尿中の上昇した（が糖尿病ではない）糖レベル、およびＴ１Ｄ関連抗原に対する抗体などのＴ１Ｄのリスク因子を有するとして、および経時的なこれらのマーカーの進行性の悪化によって、特定される。

【００４５】

方法２：Ｔ１Ｄの治療のための遺伝子改変された生物を調製する方法

本開示は、本明細書に開示される遺伝子改変された微生物（例えば、ＬＡＢを調製する方法をさらに提供する。例示的な方法は、（ｉ）微生物（例えば、ＬＡＢ）を、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸と接触させること、および（ｉｉ）微生物（例えば、ＬＡＢ）を、Ｔ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドをコードする外因性核酸と接触させることを含み、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸およびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドをコードする外因性核酸は、染色体に組み込まれている（すなわち、微生物、例えばＬＡＢの染色体に組み込まれている）。核酸が微生物（例えば、細菌）のゲノム、例えば染色体に組み込まれている場合、遺伝子改変された微生物（例えば、ＬＡＢ）が形成される。本方法の遺伝子改変に供される微生物（例えば、ＬＡＢ）は、任意の微生物株であってよく、例えば、野生型細菌株であってよく、または、それを、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸およびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドをコードする外因性核酸と接触させる前に遺伝子改変されてもよい。

【００４６】

一部の例では、上記方法は、相同組換えを用いて核酸を微生物（例えば、細菌）の染色体に組み込む。したがって、これらの実施形態による一部の例では、ＩＬ－１０ポリペプ

チドをコードする外因性核酸およびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドをコードする外因性核酸は、相同組換えを使用して（例えば、各々の核酸を含有する１つまたは複数の組込みプラスミドを用いて）染色体に組み込まれる。これらの実施形態のいずれかによる一部の例では、微生物（例えば、ＬＡＢ）を、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸（例えば、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸を含有する組込みプラスミド）と接触させることは、ＬＡＢを、Ｔ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドをコードする外因性核酸（例えば、ＰＩＮＳポリペプチドをコードする外因性核酸を含有する組込みプラスミド）と接触させる前に行われる。これらの実施形態のいずれかによる他の例では、微生物（例えば、ＬＡＢ）を、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸（例えば、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸を含有する組込みプラスミド）と接触させることは、ＬＡＢを、Ｔ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドをコードする外因性核酸（例えば、ＰＩＮＳポリペプチドをコードする外因性核酸を含有する組込みプラスミド）と接触させた後に行われる。これらの実施形態のいずれかによるさらに他の例では、微生物（例えば、ＬＡＢ）は、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸（例えば、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸を含有する組込みプラスミド）およびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドをコードする外因性核酸（例えば、ＰＩＮＳポリペプチドをコードする外因性核酸を含有する組込みプラスミド）と同時に接触させられるか、またはｈＩＬ－１０およびＰＩＮＳの両方をコードする外因性核酸と接触させられる。

【００４７】

これらの実施形態のいずれかによる一部の例では、方法は、遺伝子改変された微生物（例えば、ＬＡＢ）の培養物を少なくとも１つの安定化剤（例えば、凍結保存剤）と合わせて微生物（例えば、細菌）混合物を形成することをさらに含む。一部の例では、方法は、微生物（例えば、細菌）混合物から水を除去して乾燥組成物を形成することをさらに含む。例えば、方法は、微生物（例えば、細菌）混合物を凍結乾燥して凍結乾燥組成物を形成することをさらに含み得る。他の例では、方法は、遺伝子改変された微生物（例えば、ＬＡＢ）または乾燥組成物（例えば、凍結乾燥組成物）を薬学的に許容される担体と合わせて医薬組成物を形成することをさらに含んでもよい。方法は、乾燥組成物（例えば、凍結乾燥組成物）または医薬組成物を医薬剤形に配合することをさらに含んでもよい。

【００４８】

本開示は、本明細書に記載される方法（例えば、方法２の上記実施形態のいずれかによる方法）によって調製された遺伝子改変された微生物（例えば、遺伝子改変されたＬＡＢ）をさらに提供する。

【００４９】

方法３：医薬組成物を調製する方法

本開示は、医薬組成物を調製する方法をさらに提供する。例示的な方法は、本明細書に開示される微生物（例えば、ＬＡＢ）（例えば、上記実施形態のいずれかによるＬＡＢ）の培養物を少なくとも１つの安定化剤（例えば、凍結保存剤）と接触させ、それによって微生物（例えば、細菌）混合物を形成することを含む。一部の例では、少なくとも１つの安定化剤は、少なくとも１つの凍結保存剤を含む。一部の例では、微生物（例えば、ＬＡＢ）は、インターロイキン－１０（ＩＬ－１０）ポリペプチドをコードする外因性核酸を含有し、かつＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドをコードする外因性核酸をさらに含有し、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸およびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドをコードする外因性核酸の両方は、染色体に組み込まれており、すなわち、微生物（例えば、細菌）の染色体に組み込まれている（または該染色体上に位置する）。

【００５０】

そのような方法は、微生物（例えば、細菌）混合物から水を除去し、それによって乾燥組成物を形成することをさらに含んでもよい。例えば、方法は、微生物（例えば、細菌）混合物を凍結乾燥し、それによって凍結乾燥組成物を形成することを含んでもよい。

【００５１】
方法３の上記実施形態のいずれかによる一部の例では、方法は、乾燥組成物（例えば、凍結乾燥組成物）を薬学的に許容される担体と接触させて医薬組成物を形成することをさらに含む。方法は、乾燥組成物（例えば、凍結乾燥組成物）を、錠剤、カプセル剤、またはサシェ剤などの医薬剤形に配合することをさらに含んでもよい。
【００５２】
単位剤形
したがって、本開示は、本開示の微生物（例えば、ＬＡＢ）、本開示の乾燥組成物（例えば、本開示の凍結乾燥組成物）、または本開示の医薬組成物を含む単位剤形をさらに提供する。一部の例では、単位剤形は、錠剤、カプセル剤（例えば、粉末を含有するか、またはマイクロペレットもしくはマイクロ顆粒を含有するカプセル剤）、顆粒剤、またはサシェ剤（例えば、経口投与用に液体に懸濁するための乾燥細菌を含有する）などの、経口剤形である。一部の実施形態では、剤形中に含有される非病原微生物（例えば、ＬＡＢ）は、乾燥粉末形態またはその圧縮形態である。
【００５３】
これらの実施形態による一部の例では、単位剤形は、約１×１０^{4}～約１×１０^{12}コロニー形成単位（ｃｆｕ）の微生物（例えば、ＬＡＢ）を含有する。他の例では、単位剤形は、約１×１０^{6}～約１×１０^{12}コロニー形成単位（ｃｆｕ）の微生物（例えば、ＬＡＢ）を含有する。他の例では、単位剤形は、約１×１０^{8}～約１×１０^{11}ｃｆｕを含有する。さらに他の例では、単位剤形は、約１×１０^{9}～約１×１０^{12}ｃｆｕを含有する。
【００５４】
キット
本開示は、（１）本明細書に開示される実施形態のいずれかによる微生物（例えば、ＬＡＢ）、本明細書に記載される実施形態のいずれかによる微生物（例えば、ＬＡＢ）を含有する組成物、本明細書に記載される実施形態のいずれかによる微生物（例えば、ＬＡＢ）を含有する医薬組成物、または本明細書に記載される実施形態のいずれかによる微生物（例えば、ＬＡＢ）を含有する単位剤形、および（２）微生物（例えば、ＬＡＢ）、組成物、医薬組成物、または単位剤形を哺乳動物、例えばヒト（例えば、ヒト患者）に投与するための説明書を含有するキットをさらに提供する。
【００５５】
関連する実施形態では、キットは、疾患の進行および治療の成功を確かめるための試験（例えば、グリセミック指数、インスリン自己抗体（ＩＡＡ）レベル、Ｃ断片レベル、および膵島炎についての試験）をさらに含んでもよい。キットは、移植用のベータ細胞をさらに提供し得る。
【図面の簡単な説明】
【００５６】
【図１Ａ】図１Ａは、本開示による例示的な抗原特異的療法が、ＮＯＤマウスにおいて新規発症糖尿病を安定的に後退させることを実証するグラフである。指し示す通りに新規発症糖尿病ＮＯＤマウスを治療し、治療開始後１４週にわたって血中グルコース濃度を追跡した。治療後に糖尿病のままであったマウスのパーセンテージを示す。「†」は、死亡または瀕死のマウスを指し示す。全てのカプラン・マイヤー生存曲線において、群間の統計的有意性は、マンテル・コックスのログランク検定によって決定した；＊Ｐ＜０．０５、＊＊＊＊、Ｐ＜０．０００１。
【図１Ｂ】図１Ｂは、本開示による例示的な抗原特異的療法が、ＮＯＤマウスにおいて残留ベータ細胞機能を保存することを実証するグラフを描写する。治療終了の１～２週前にＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）治療マウス（レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方）に加えて新規発症糖尿病ＮＯＤマウスに対して腹腔内耐糖能試験（ＩＰＧＴＴ）を行った。２時間にわたる耐糖能曲線（ＡＵＣグルコース；ｍｇ／ｄｌ×１２０分）下の対応する面積を示す。レスポンダーは、治療後に正常血糖（例えば、糖

尿なしかつ血中グルコース測定値＞２００ｍｇ／ｄｌ）に戻る対象として本明細書では使用される。

【図１Ｃ】図１Ｃは、本開示による例示的な抗原特異的療法がＮＯＤマウスにおいて膵島炎の進行を停止させることを実証するグラフである。治療の終了時に、指し示す通りに、新規発症糖尿病マウスおよびＬ．ラクチス（Ｌ．lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）治療マウス（レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方）のパラフィン包埋膵臓切片に対して盲検で膵島炎スコア付けを行った。群間の統計的有意性はマン・ホイットニーｔ検定を使用して算出した；＊＊Ｐ＜０．０１。

【図２Ａ】図２Ａは、開始時血中グルコース濃度による糖尿病寛解率を示すグラフである。試験加入時の開始時血糖が３５０ｍｇ／ｄｌより低いのか、それとも高いのかに基づいて新規発症糖尿病ＮＯＤマウスを層化した。本開示の臨床グレードのＬ．ラクチス（Ｌ．lactis）株を用いる併用治療（ＣＴ）後に糖尿病のままであったマウスのパーセンテージを示す。カプラン・マイヤー生存曲線において、群間の統計的有意性をマンテル・コックスのログランク検定によって決定した；＊＊Ｐ＜０．０１。

【図２Ｂ】図２Ｂは、試験加入時のインスリン自己抗体（ＩＡＡ）陽性性に応じた糖尿病寛解率を示すグラフである。試験加入時の開始時血糖が３５０ｍｇ／ｄｌより低いのか、それとも高いのかに基づいて新規発症糖尿病ＮＯＤマウスを層化した。本開示の臨床グレードのＬ．ラクチス（Ｌ．lactis）株を用いる併用治療（ＣＴ）後に糖尿病のままであったマウスのパーセンテージを示す。

【図２Ｃ】図２Ｃは、加入時の開始時血糖およびＩＡＡ陽性性が治療の成功と関係することを示すグラフである。試験加入時の開始時血糖が３５０ｍｇ／ｄｌより低いのか、それとも高いのかおよびＩＡＡ陽性性に基づいて新規発症糖尿病ＮＯＤマウスを層化した。治療後に寛容化されたマウスのパーセンテージを示す。

【図２Ｄ】図２Ｄは、治療前後の間のＩＡＡ陽性性の変化が治療レスポンダーにおいて有意に異なったことを示すグラフを描写する。治療レスポンダー（上パネル）およびノンレスポンダー（下パネル）における糖尿病診断時およびＬ．ラクチス（Ｌ．lactis）ベースの併用治療の追跡後のＩＡＡレベルを示す。群間の統計的有意性は、マン・ホイットニーｔ検定を使用して算出した；＊＊Ｐ＜０．０１。１匹のマウスについてＩＡＡの開始レベルは１３９とｙ軸の限度外であったので、示していない。

【図３Ａ】図３Ａは、Ｌ．ラクチス（Ｌ．lactis）ベースの併用療法がより高レベルのＦｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞を誘導することを示すグラフを描写する。新規発症糖尿病マウスおよびＬ．ラクチス（Ｌ．lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）治療マウス（レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方）の末梢血中のＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞集団内のＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$細胞（左パネル）、ＣＤ２５$^{-}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$細胞（中央パネル）、および全Ｆｏｘｐ３$^{+}$細胞（右パネル）のパーセンテージ。各記号は１匹のマウスを表し、水平バーは中央値を指し示す。統計的有意性は、マン・ホイットニーｔ検定を使用して算出した；＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊、Ｐ＜０．００１；＊＊＊＊、Ｐ＜０．０００１。

【図３Ｂ】図３Ｂは、Ｌ．ラクチス（Ｌ．lactis）ベースの併用療法がより高レベルのＦｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞を誘導することを示すグラフを描写する。新規発症糖尿病マウスおよびＬ．ラクチス（Ｌ．lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）治療マウス（レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方）の膵臓の灌流リンパ節中のＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞集団内のＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$細胞（左パネル）、ＣＤ２５$^{-}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$細胞（中央パネル）、および全Ｆｏｘｐ３$^{+}$細胞（右パネル）のパーセンテージ。各記号は１匹のマウスを表し、水平バーは中央値を指し示す。統計的有意性は、マン・ホイットニーｔ検定を使用して算出した；＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊、Ｐ＜０．００１；＊＊＊＊、Ｐ＜０．０００１。

【図３Ｃ】図３Ｃは、Ｌ．ラクチス（Ｌ．lactis）ベースの併用療法がより高レベルのＦｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞を誘導することを示すグラフを描写する。新規発症糖尿病マウスおよびＬ．ラクチス（Ｌ．lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）治療マウス（レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方）の膵臓中のＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞集団内のＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３

$^{+}$細胞（左パネル）、ＣＤ２５$^{-}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$細胞（中央パネル）、および全Ｆｏｘｐ３$^{+}$細胞（右パネル）のパーセンテージ。各記号は１匹のマウスを表し、水平バーは中央値を指し示す。統計的有意性は、マン・ホイットニーｔ検定を使用して算出した；＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊、Ｐ＜０．００１；＊＊＊＊、Ｐ＜０．０００１。

【図３Ｄ】図３Ｄは、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法がより高レベルのＦｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞を誘導することを示すグラフを描写する。新規発症糖尿病マウスおよびＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）治療マウス（レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方）の末梢血中のＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞集団内のＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$ＣＴＬＡ４$^{+}$細胞（左パネル）、ＣＤ２５$^{-}$Ｆｏｘｐ３＋ＣＴＬＡ４$^{+}$細胞（中央パネル）、およびＦｏｘｐ３$^{+}$ＣＴＬＡ４$^{+}$細胞（右パネル）のパーセンテージ。各記号は１匹のマウスを表し、水平バーは中央値を指し示す。統計的有意性は、マン・ホイットニーｔ検定を使用して算出した；＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊、Ｐ＜０．００１；＊＊＊＊、Ｐ＜０．０００１。

【図３Ｅ】図３Ｅは、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法がより高レベルのＦｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞を誘導することを示すグラフを描写する。新規発症糖尿病マウスおよびＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）治療マウス（レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方）の膵臓の灌流リンパ節中のＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞集団内のＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$ＣＴＬＡ４$^{+}$細胞（左パネル）、ＣＤ２５$^{-}$Ｆｏｘｐ３＋ＣＴＬＡ４$^{+}$細胞（中央パネル）、およびＦｏｘｐ３$^{+}$ＣＴＬＡ４$^{+}$細胞（右パネル）のパーセンテージ。各記号は１匹のマウスを表し、水平バーは中央値を指し示す。統計的有意性は、マン・ホイットニーｔ検定を使用して算出した；＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊、Ｐ＜０．００１；＊＊＊＊、Ｐ＜０．０００１。

【図３Ｆ】図３Ｆは、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法がより高レベルのＦｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞を誘導することを示すグラフを描写する。新規発症糖尿病マウスおよびＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）治療マウス（レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方）の膵臓中のＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞集団内のＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$ＣＴＬＡ４$^{+}$細胞（左パネル）、ＣＤ２５$^{-}$Ｆｏｘｐ３＋ＣＴＬＡ４$^{+}$細胞（中央パネル）、およびＦｏｘｐ３$^{+}$ＣＴＬＡ４$^{+}$細胞（右パネル）のパーセンテージ。各記号は１匹のマウスを表し、水平バーは中央値を指し示す。統計的有意性は、マン・ホイットニーｔ検定を使用して算出した；＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊、Ｐ＜０．００１；＊＊＊＊、Ｐ＜０．０００１。

【図４】図４は、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法が、レスポンダーおよびノンレスポンダーにおいて抑制性ＩＬ１０分泌Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞を誘導することを示すグラフを描写する。ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのポリクローナルサプレッサーアッセイのために、ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$エフェクターＴ細胞（Ｔｅｆｆ）を正常血糖ＮＯＤマウスから単離し、色素標識し、指し示した６週の治療の終了時にＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）治療ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ｈＣＤ２マウス（レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方）から単離した、アクセサリー細胞および増加させた比のＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$またはＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）の存在下で、可溶性抗ＣＤ３を使用して７２時間刺激した。色素希釈のフローサイトメトリー解析によってＴｅｆｆ細胞の増殖を測定し、エフェクターのみの培養物に対して正規化した、２回またはそれより多く分裂したＴｅｆｆ細胞のパーセンテージとして示した。ＣＤ６９のフローサイトメトリー解析によってＴｅｆｆ細胞の活性化を測定し、エフェクターのみの培養物に対して正規化したＭＦＩとして示した。Ｔｒｅｇ：Ｔｅｆｆ培養物中のＩＦＮ－γおよびＩＬ１０濃度のＭＳＤ高感度マルチプレックスアッセイ。群間の統計的有意性は、クラスカル・ウォリス検定の後にダネットの多重検定を使用して算出した；＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊、Ｐ＜０．００１；＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１。

【図５】図５Ａは、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法で誘導されたＴｒｅｇがＣＴＬＡ４およびＴＧＦ－βに依存してＴエフェクター細胞応答を制御することを示す

グラフである。２回またはそれより多く分裂したＴエフェクター（Ｔｅｆｆ）細胞のパーセンテージとして示す、エフェクターのみの培養による増殖に対して正規化したＴｅｆｆの増殖。Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）治療ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ｈＣＤ２マウス（レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方）から単離したアクセサリー細胞およびＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$、および指し示した中和抗体（１０μｇ／ｍｌ）の存在下で抗ＣＤ３（０．５μｇ／ｍｌ）を用いて、色素標識したＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$　Ｔ細胞（Ｔｅｆｆ）を刺激した。群間の統計的有意性は、クラスカル・ウォリス検定の後にダネットの多重検定を使用して算出した；＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１。図５Ｂは、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法で誘導されたＴｒｅｇがＣＴＬＡ４およびＴＧＦ－βに依存してＴエフェクター細胞応答を制御することを示すグラフである。２回またはそれより多く分裂したＴエフェクター（Ｔｅｆｆ）細胞のパーセンテージとして示す、エフェクターのみの培養による増殖に対して正規化したＴｅｆｆの増殖。Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）治療ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ｈＣＤ２マウス（レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方）から単離したアクセサリー細胞およびＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$　細胞（Ｔｒｅｇ）、および指し示した中和抗体（１０μｇ／ｍｌ）の存在下で抗ＣＤ３（０．５μｇ／ｍｌ）を用いて、色素標識したＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$　Ｔ細胞（Ｔｅｆｆ）を刺激した。群間の統計的有意性は、クラスカル・ウォリス検定の後にダネットの多重検定を使用して算出した；＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１。図５Ｃは、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法で誘導されたＴｒｅｇがＣＴＬＡ４およびＴＧＦ－βに依存してＴエフェクター細胞応答を制御することを示すグラフである。Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法で治癒したマウスに抗ＣＴＬＡ４および抗ＴＧＦ－β抗体（ｎ＝５）を注射し、糖尿病の再発（糖尿および血中グルコース測定値＞２００ｍｇ／ｄｌ）について追跡した。

【図６Ａ】図６Ａは、新規発症糖尿病ＮＯＤマウスにおけるＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）および特異的ＦＯＸＰ３阻害剤Ｐ６０（腹腔内、５０μｇ／日）の同時投与の処理スキームである。

【図６Ｂ】図６Ｂは、Ｔｒｅｇ機能の特異的阻害が治療誘導性の寛容を損なうことを示すグラフである。治療後に糖尿病のままであったマウスのパーセンテージを示す。カプラン・マイヤー生存曲線において、群間の統計的有意性はマンテル・コックスのログランク検定によって決定した；＊Ｐ＜０．０５。

【図７Ａ】図７Ａは、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）で治癒したＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウスにおけるジフテリア毒素（ＤＴ）によるＦｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞枯渇の処理スキームである。

【図７Ｂ】図７Ｂは、Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞枯渇がＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウスにおいてＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法誘導性の寛容を破壊することを示すグラフである。Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法（ｎ＝７）の間およびＤＴ処理後の新規発症糖尿病ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウス（ｎ＝４）における血中グルコース測定値。無作為の血中グルコース濃度が２００ｍｇ／ｄｌ未満に回復した時にマウスは治癒した（白い記号）と考え、またはマウスが２００ｍｇ／ｄｌより高い血中グルコース濃度を維持した時に治癒されなかった（黒い記号）と考えた。

【図７Ｃ】図７Ｃは、治療で治癒したＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウスの膵臓におけるＤＴ処理の前後の膵島炎スコア付けを示すグラフである。

【図７Ｄ】図７Ｄは、治療で治癒したＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウスの膵臓におけるＤＴ処理の前後の膵島内Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞の定量化を示すグラフである。併用療法寛容化マウスからの膵臓切片をインスリン（赤）、ＣＤ４（紫色）およびＦｏｘｐ３（緑）について染色し、白い矢頭は、一部インスリン陽性のランゲルハンス島内のＦｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞の存在を指し示す。囲った区画のより高倍率はＦｏｘｐ３$^{+}$細胞がＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞であることを明確に指し示す。統計的有意性は、マン・ホイットニーｔ検定を使用して算出した；＊＊＊＊、Ｐ＜０．０００１。

【図８Ａ】図８Ａは、新規発症糖尿病マウスおよびＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）治療マウス（レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方）の末梢血中のＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$（左）、ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$（中央）、およびＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$（右）Ｔ細胞集団内のＣＴＬＡ４$^{+}$細胞のパーセンテージを示すグラフを描写する。各記号は１匹のマウスを表し、水平バーは中央値を指し示す。統計的有意性は、マン・ホイットニーｔ検定を使用して算出した；＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊、Ｐ＜０．００１；＊＊＊＊、Ｐ＜０．０００１。

【図８Ｂ】図８Ｂは、新規発症糖尿病マウスおよびＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）治療マウス（レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方）の膵臓の灌流リンパ節中のＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$（左）、ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$（中央）、およびＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$（右）Ｔ細胞集団内のＣＴＬＡ４$^{+}$細胞のパーセンテージを示すグラフを描写する。各記号は１匹のマウスを表し、水平バーは中央値を指し示す。統計的有意性は、マン・ホイットニーｔ検定を使用して算出した；＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊、Ｐ＜０．００１；＊＊＊＊、Ｐ＜０．０００１。

【図８Ｃ】図８Ｃは、新規発症糖尿病マウスおよびＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法（ＣＴ）治療マウス（レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方）の膵臓中のＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$（左）、ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$（中央）、およびＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$（右）Ｔ細胞集団内のＣＴＬＡ４$^{+}$細胞のパーセンテージを示すグラフを描写する。各記号は１匹のマウスを表し、水平バーは中央値を指し示す。統計的有意性は、マン・ホイットニーｔ検定を使用して算出した；＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊、Ｐ＜０．００１；＊＊＊＊、Ｐ＜０．０００１。

【図９】図９は、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの併用療法寛容化マウスでは病的Ｔエフェクター細胞が枯渇されていないことを示すグラフである。明白に糖尿病（白の菱形）、併用療法（ＣＴ）レスポンダー（白丸）またはノンレスポンダー（クロスした丸）から単離した全脾臓細胞（１×１０^{7}）の養子移入。統計計算はマンテル・コックスのログランク検定を使用して行った；「ｎｓ」：有意でない。

【図１０Ａ】図１０Ａは、ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウスにおいてＤＴを用いてＦｏｘｐ３$^{+}$細胞を枯渇させる図式的なスキームである。４回の連続的な腹腔内ＤＴ注射（１、２、５および７日目（ｄ））（４０μｇ／ｋｇ体重／ｄ）をスキーム中に指し示す。

【図１０Ｂ】図１０Ｂは、ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウスにおけるＤＴを用いたＦｏｘｐ３$^{+}$細胞の枯渇を示すグラフを描写する。末梢血のフローサイトメトリー解析は、ＤＴ処理ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウスにおけるＦｏｘｐ３$^{+}$細胞の効率的な枯渇を実証した。膵臓切片のＦｏｘｐ３染色は、ＤＴ処理ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウスにおいて膵島内Ｆｏｘｐ３$^{+}$細胞の効果的な枯渇を示した。

【図１０Ｃ】図１０Ｃは、ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウス（左パネル）の２回の連続的なＤＴ注射の前（ｄ０）および後（ｄ３およびｄ５）のＦｏｘｐ３およびＤＴＲ－ＧＦＰ融合タンパク質について陽性のＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞のパーセンテージを示す代表的なフローサイトメトリープロファイルを描写する。

【図１０Ｄ】図１０Ｄは、ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウスにおける急性Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔｒｅｇ枯渇時の急速な糖尿病の発症を実証するグラフである。

【図１１】図１１は、ｈｌｌＡプロモーター（ＰｈｌｌＡ）、ＩＬ－１０分泌配列（ＳＳｕｓｐ４５）、およびヒトＩＬ－１０をコードする例示的な核酸配列を含む例示的なＩＬ－１０発現カセット（配列番号１３）（および対応するアミノ酸配列）を表したものであり、該配列は、その天然のシグナルペプチドなしで使用され、指し示したＩＬ－１０配列の２位において（ＰｒｏからＡｌａへの）点変異を含む（ｈＩＬ１０ａＰｘＡ）。配列番号１４は、ヒトＩＬ－１０配列に連結されたＩＬ－１０分泌配列のアミノ酸配列である。

【図１２Ａ】図１２Ａおよび図１２Ｂは合わせて、ｇａｐＢプロモーター（ＰｇａｐＢ）、ｇａｐＢ遺伝子、例示的な遺伝子間領域（ｒｐｍＤ）、ヒトＰＩＮＳをコードする例示的な核酸配列に翻訳上連結された例示的なＰＩＮＳ分泌配列（ＳＳｕｓｐ４５）を含有する例示的なＰＩＮＳポリシストロン性発現カセット（配列番号１５）を表したものである

。配列番号１６は、ｇａｐＢ遺伝子によってコードされるアミノ酸配列である。配列番号１７は、ＰＩＮＳ分泌配列によってコードされるアミノ酸配列、および翻訳上連結されたヒトＰＩＮＳ配列である。

【図１２Ｂ】図１２Ａおよび図１２Ｂは合わせて、ｇａｐＢプロモーター（ＰｇａｐＢ）、ｇａｐＢ遺伝子、例示的な遺伝子間領域（ｒｐｍＤ）、ヒトＰＩＮＳをコードする例示的な核酸配列に翻訳上連結された例示的なＰＩＮＳ分泌配列（ＳＳｕｓｐ４５）を含有する例示的なＰＩＮＳポリシストロン性発現カセット（配列番号１５）を表したものである。配列番号１６は、ｇａｐＢ遺伝子によってコードされるアミノ酸配列である。配列番号１７は、ＰＩＮＳ分泌配列によってコードされるアミノ酸配列、および翻訳上連結されたヒトＰＩＮＳ配列である。

【図１３Ａ】図１３Ａ、図１３Ｂ、および図１３Ｃ（配列番号１８）は合わせて、トレハロース－６－リン酸ホスホリラーゼ遺伝子（ｔｒｅＰＰ；遺伝子ＩＤ：４７９７１４０）の欠失、トレハロースオペロン中の推定上のホスホトランスフェラーゼ遺伝子（ｔｒｅＰＴＳ；ｌｌｍｇ＿０４５３およびｌｌｍｇ＿０４５４；ｐｔｓＩおよびｐｔｓＩＩ；それぞれ、遺伝子ＩＤ：４７９７７７８および遺伝子ＩＤ：４７９７０９３）に先行するＨＵ様ＤＮＡ結合タンパク質遺伝子の構成的プロモーター（ＰｈｌｌＡ；遺伝子ＩＤ：４７９７３５３）の挿入、ｐｔｓＩとｐｔｓＩＩとの間の高発現されるＬ．ラクチス（Ｌ．ｌａｃｔｉｓ）ＭＧ１３６３　５０Ｓリボソームタンパク質Ｌ３０遺伝子（ｒｐｍＤ；遺伝子ＩＤ：４７９７８７３）に先行する遺伝子間領域の挿入を表したものである。

【図１３Ｂ】図１３Ａ、図１３Ｂ、および図１３Ｃ（配列番号１８）は合わせて、トレハロース－６－リン酸ホスホリラーゼ遺伝子（ｔｒｅＰＰ；遺伝子ＩＤ：４７９７１４０）の欠失、トレハロースオペロン中の推定上のホスホトランスフェラーゼ遺伝子（ｔｒｅＰＴＳ；ｌｌｍｇ＿０４５３およびｌｌｍｇ＿０４５４；ｐｔｓＩおよびｐｔｓＩＩ；それぞれ、遺伝子ＩＤ：４７９７７７８および遺伝子ＩＤ：４７９７０９３）に先行するＨＵ様ＤＮＡ結合タンパク質遺伝子の構成的プロモーター（ＰｈｌｌＡ；遺伝子ＩＤ：４７９７３５３）の挿入、ｐｔｓＩとｐｔｓＩＩとの間の高発現されるＬ．ラクチス（Ｌ．ｌａｃｔｉｓ）ＭＧ１３６３　５０Ｓリボソームタンパク質Ｌ３０遺伝子（ｒｐｍＤ；遺伝子ＩＤ：４７９７８７３）に先行する遺伝子間領域の挿入を表したものである。

【図１３Ｃ】図１３Ａ、図１３Ｂ、および図１３Ｃ（配列番号１８）は合わせて、トレハロース－６－リン酸ホスホリラーゼ遺伝子（ｔｒｅＰＰ；遺伝子ＩＤ：４７９７１４０）の欠失、トレハロースオペロン中の推定上のホスホトランスフェラーゼ遺伝子（ｔｒｅＰＴＳ；ｌｌｍｇ＿０４５３およびｌｌｍｇ＿０４５４；ｐｔｓＩおよびｐｔｓＩＩ；それぞれ、遺伝子ＩＤ：４７９７７７８および遺伝子ＩＤ：４７９７０９３）に先行するＨＵ様ＤＮＡ結合タンパク質遺伝子の構成的プロモーター（ＰｈｌｌＡ；遺伝子ＩＤ：４７９７３５３）の挿入、ｐｔｓＩとｐｔｓＩＩとの間の高発現されるＬ．ラクチス（Ｌ．ｌａｃｔｉｓ）ＭＧ１３６３　５０Ｓリボソームタンパク質Ｌ３０遺伝子（ｒｐｍＤ；遺伝子ＩＤ：４７９７８７３）に先行する遺伝子間領域の挿入を表したものである。

【図１４Ａ】図１４Ａおよび図１４Ｂ（配列番号１９）は合わせて、未同定分泌４５ｋＤａタンパク質遺伝子（ｕｓｐ４５；遺伝子ＩＤ：４７９７２１８）の下流のトレハロース－６－リン酸ホスファターゼ遺伝子（ｏｔｓＢ；遺伝子ＩＤ：１０３６９１４）の挿入を表したものである。ｕｓｐ４５とｏｔｓＢとの間の高発現されるＬ．ラクチス（Ｌ．ｌａｃｔｉｓ）ＭＧ１３６３　５０Ｓリボソームタンパク質Ｌ３０遺伝子（ｒｐｍＤ；遺伝子ＩＤ：４７９７８７３）に先行する遺伝子間領域の挿入。

【図１４Ｂ】図１４Ａおよび図１４Ｂ（配列番号１９）は合わせて、未同定分泌４５ｋＤａタンパク質遺伝子（ｕｓｐ４５；遺伝子ＩＤ：４７９７２１８）の下流のトレハロース－６－リン酸ホスファターゼ遺伝子（ｏｔｓＢ；遺伝子ＩＤ：１０３６９１４）の挿入を表したものである。ｕｓｐ４５とｏｔｓＢとの間の高発現されるＬ．ラクチス（Ｌ．ｌａｃｔｉｓ）ＭＧ１３６３　５０Ｓリボソームタンパク質Ｌ３０遺伝子（ｒｐｍＤ；遺伝子ＩＤ：４７９７８７３）に先行する遺伝子間領域の挿入。

【図１５Ａ】図１５Ａおよび図１５Ｂ（配列番号２０）は合わせて、４４６のうちのコド

ン位置３０におけるｔｇａ（ｔｇａ３０）の挿入と共に、その傍らの、セロビオース特異的ＰＴＳ系ＩＩＣコンポーネントをコードする遺伝子（ｐｔｃＣ；遺伝子ＩＤ：４７９６８９３）を破壊するためのＥｃｏＲＩ制限部位の導入を表したものである。
【図１５Ｂ】図１５Ａおよび図１５Ｂ（配列番号２０）は合わせて、４４６のうちのコドン位置３０におけるｔｇａ（ｔｇａ３０）の挿入と共に、その傍らの、セロビオース特異的ＰＴＳ系ＩＩＣコンポーネントをコードする遺伝子（ｐｔｃＣ；遺伝子ＩＤ：４７９６８９３）を破壊するためのＥｃｏＲＩ制限部位の導入を表したものである。
【図１６】図１６（配列番号２２）は、高発現されるグリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（ｇａｐＢ；遺伝子ＩＤ：４７９７８７７）の下流の、ヒトプロインスリン（ＰＩＮＳ；ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｐ０１３０８、アミノ酸２５～１１０）をコードする、ｐｉｎｓ遺伝子とのｕｓｐ４５分泌リーダー（ＳＳｕｓｐ４５）の融合物をコードする遺伝子の挿入を表したものである。ｇａｐＢとｐｉｎｓとの間の高発現されるＬ．ラクチス（L. lactis）ＭＧ１３６３　５０Ｓリボソームタンパク質Ｌ３０遺伝子（ｒｐｍＤ；遺伝子ＩＤ：４７９７８７３）に先行する遺伝子間領域の挿入。
【図１７】図１７（配列番号２３）は、チミジル酸シンターゼ遺伝子（ｔｈｙＡ；遺伝子ＩＤ：４７９８３５８）の欠失を表したものである。ＨＵ様ＤＮＡ結合タンパク質遺伝子の構成的プロモーター（ＰｈｌｌＡ；遺伝子ＩＤ：４７９７３５３）の下流に、ヒトインターロイキン－１０（ｈＩＬ－１０；ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｐ２２３０１、ａａ　１９～１７８、バリアントＰ２Ａ、Steidler et al., Nat. Biotechnol. 2003, 21(7): 785-789）をコードするｈｉｌ－１０遺伝子とのＳＳｕｓｐ４５の融合物（配列番号２４）をコードする遺伝子の挿入物を挿入してｈＩＬ－１０の発現および分泌を可能にする。
【図１８】図１８は、記載された通りのｓＡＧＸ０４０７の関連する遺伝子座：ｔｒｅＰＴＳ、Δｔｒｅ ＰＰ；ｏｔｓＢ；ｐｔｃＣ－；ｇａｐＢ＞＞ｐｉｎｓおよびΔｔｈｙＡ、ｈＩＬ－１０の図式的な概要であり、関連するオリゴヌクレオチド結合部位（ｏＡＧＸｎｏ）、ＥｃｏＲＩ制限部位、（／切断／）遺伝子の特徴、遺伝子間領域（ＩＲ）、ＰＣＲ増幅産物の大きさ（ｂｐ）を指し示している。
【発明を実施するための形態】
【００５７】
詳細な説明
対象においてＴ１Ｄを治療し、かつ／またはＴ１Ｄ特異的抗原（すなわち、ＰＩＮＳ）に対する寛容を回復させるための組成物および方法が提供される。
【００５８】
定義
本明細書および実施形態において使用される場合、文脈が明らかにそうでないことを規定しない限り、単数形「ａ」、「ａｎ」および「ｔｈｅ」は、複数への言及を包含する。例えば、「細胞」（a cell）という用語は、その混合物などの、複数の細胞を包含する。同様に、本明細書に記載される治療または医薬の調製のための「化合物」（a compound）の使用は、文脈が明らかにそうでないことを規定しない限り、そのような治療または調製のために１つまたは複数の本発明の化合物を使用することを想定する。
【００５９】
本明細書で使用される場合、「～を含む」（comprising）という用語は、組成物および方法が記載された要素を含むが、他のものを除外しない意味であることを意図する。組成物および方法を定義するために使用される場合、「～から本質的になる」は、組合せに対して何らかの本質的な意義を持つ他の要素を除外することを意味する。したがって、本明細書で定義される要素から本質的になる組成物は、単離および精製方法からの微量の汚染物、および、リン酸緩衝生理食塩水、防腐剤などの薬学的に許容される担体を除外しない。「～からなる」は、他の成分の微量元素、および本発明の組成物を投与する実体的な方法ステップを超えるものを除外することを意味する。これらの移行句（transition terms）のそれぞれによって定義される実施形態は本発明の範囲内にある。
【００６０】

本明細書で使用される場合、遺伝子またはポリペプチドを「発現する」、またはポリペプチド（例えば、ＩＬ－１０ポリペプチドまたはＴ１Ｄ特異的抗原ポリペプチド）を「産生する」、またはポリペプチドを「分泌する」という用語は、それぞれ、「発現できる」および「産生できる」または「分泌できる」ことを包含する意味である。例えば、外因性核酸を含有する微生物は、充分な条件下（例えば、充分な含水および／または栄養分の存在下）で、外因性核酸によってコードされたポリペプチドを発現しかつ分泌することができる。しかしながら、微生物は、コードされたポリペプチドを必ずしも活動的に発現しなくてもよい。微生物（例えば、細菌）は、乾燥（例えば、凍結乾燥）されていてもよく、その状態では休眠している（すなわち、ポリペプチドを活動的に産生していない）と考えることができる。しかしながら、微生物が充分な条件に供されると、例えば、対象に投与されて（例えば、対象の胃腸管中で）放出されると、微生物はポリペプチドの発現および分泌を開始することがある。したがって、本開示の遺伝子またはポリペプチドを「発現し」、ポリペプチドを「産生し」、またはポリペプチドを「分泌する」微生物は、その「休眠」状態の微生物を包含する。本明細書で使用される場合、「～を分泌する」は、タンパク質が細胞外かつ培養培地／上清中または他の細胞外環境中に輸送されることを意味する。

【００６１】

本明細書で使用される場合、プロモーターの文脈での（または遺伝子発現もしくはポリペプチドの分泌に関するものに拡張された）「構成的」という用語は、それが関連する遺伝子の絶え間ない転写を可能とするプロモーターを指す。構成的プロモーターは、「誘導性」プロモーターと対比される。

【００６２】

参照数値に関する「約」という用語、およびその文法的同等物は、本明細書で使用される場合、参照数値それ自体およびその参照数値からプラスまたはマイナス１０％の値の範囲を包含できる。例えば、「約１０」という用語は、１０、および９～１１を含めて９～１１からの任意の値を包含する。一部の場合には、参照数値に関する「約」という用語は、その参照数値からプラスまたはマイナス１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、または１％の値の範囲も包含し得る。一部の実施形態では、特定の方法によって測定された数または範囲と関連する「約」は、所与の数値がその方法のばらつきによって決定される値を包含することを指し示す。

【００６３】

「ＩＬ－１０遺伝子」は、「ＩＬ－１０ポリペプチド」をコードするインターロイキン１０遺伝子を指す。「ＩＬ－１０遺伝子」という用語は、「ＩＬ－１０バリアントポリペプチド」をコードする「ＩＬ－１０バリアント遺伝子」を包含する。ＬＡＢ中のＩＬ－１０をコードするＤＮＡ配列は、ＬＡＢ中での発現を促進するように最適化されたコドンであってよく、そのため、天然生物（例えば、ヒト）中のものとは異なってよい。

【００６４】

「ＩＬ－１０」または「ＩＬ－１０ポリペプチド」という用語は、少なくとも成熟型（すなわち、その分泌シグナルを含まない）のアミノ酸配列を有する機能的なＩＬ－１０ポリペプチド（例えば、ヒトＩＬ－１０ポリペプチド）を指すが、膜結合型および可溶型の他に「ＩＬ－１０バリアントポリペプチド」も包含する。

【００６５】

「ＩＬ－１０バリアント」または「ＩＬ－１０バリアントポリペプチド」は、改変（例えば、切断または変異）されているが、機能的なＩＬ－１０ポリペプチドを指し、例えば、切断型または変異型のヒトＩＬ－１０である。「ＩＬ－１０バリアントポリペプチド」という用語は、対応する野生型ＩＬ－１０ポリペプチドと比べた時に増進された活性または減少された活性を有するＩＬ－１０ポリペプチドを包含する。「ＩＬ－１０バリアントポリペプチド」は、少なくとも一部のＩＬ－１０活性（機能的なポリペプチド）を保持する。

【００６６】

ポリペプチド配列間の「同一性パーセンテージ」は、参照配列をクエリ配列と比較する市販のアルゴリズムを使用して算出することができる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、（例えば、ＢＬＡＳＴＰもしくはＣＬＵＳＴＡＬ、または他のアライメントソフトウェアによる測定で）デフォルトのパラメーターを使用して、参照ポリペプチド、またはその断片に対して７０％、少なくとも７０％、７５％、少なくとも７５％、８０％、少なくとも８０％、８５％、少なくとも８５％、９０％、少なくとも９０％、９２％、少なくとも９２％、９５％、少なくとも９５％、９７％、少なくとも９７％、９８％、少なくとも９８％、９９％、または少なくとも９９％または１００％同一である。同様に、核酸はまた、出発核酸を参照して記載することもでき、例えば、核酸は、（例えば、デフォルトのパラメーターを使用するＢＬＡＳＴＮもしくはＣＬＵＳＴＡＬ、または他のアライメントソフトウェアによる測定で）参照核酸またはその断片に対して５０％、少なくとも５０％、６０％、少なくとも６０％、７０％、少なくとも７０％、７５％、少なくとも７５％、８０％、少なくとも８０％、８５％、少なくとも８５％、９０％、少なくとも９０％、９５％、少なくとも９５％、９７％、少なくとも９７％、９８％、少なくとも９８％、９９％、少なくとも９９％、または１００％同一であり得る。ある分子がより大きい分子とある特定のパーセンテージの配列同一性を有すると言われる場合、それは、２つの分子が最適にアライメントされた時に、２つの分子が最適にアライメントされた順序にしたがってより小さい分子中の該パーセンテージの残基がより大きい分子中の残基とマッチし、「％」（パーセント）同一性がより小さい分子の長さにしたがって算出されることを意味する。

【００６７】

「染色体に組み込まれた」もしくは「染色体中に組み込まれた」という用語またはその任意の変形は、核酸配列（例えば、遺伝子；オープンリーディングフレーム；ポリペプチドをコードする外因性核酸；プロモーター；発現カセットなど）が、微生物（例えば、細菌）の染色体上に位置すること（該染色体中に組み込まれていること）、すなわち、プラスミドなどのエピソームベクター上には位置しないことを意味する。核酸配列が染色体に組み込まれる一部の実施形態では、そのような染色体に組み込まれた核酸によってコードされたポリペプチドは、構成的に発現される。

【００６８】

「自己抗原」または「自家抗原」という用語は、本明細書において交換可能に使用される。これらの用語は、自己抗原または自家抗原の当該技術分野で認識される意味にしたがって本明細書において使用され、一般に、対象自身の身体に起因する（対象自身の身体によって産生された）ポリペプチド／タンパク質を指し、該抗原は、対象自身の免疫系によって認識され、そのような抗原に対する抗体を典型的に産生する。自己免疫疾患は、一般に、ある特定の疾患特異的な自己抗原に関連する。例えば、Ｔ１Ｄにおいて、対象の免疫系は、ベータ細胞破壊プロセスに関連する少なくとも１つの抗原に対する抗体を産生することがある。そのような自己抗原としては、プロインスリン（ＰＩＮＳ）、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（ＧＡＤ６５）、インスリノーマ関連タンパク質２（ＩＡ－２）、膵島特異的グルコース－６－ホスファターゼ触媒性サブユニット関連タンパク質（ＩＧＲＰ）および亜鉛トランスポーター（ＺｎＴ）８が挙げられる。臨床的なＴ１Ｄは、クロモグラニンＡ、（プレプロ）膵島アミロイドポリペプチド（ｐｐＩＡＰＰ）、ペリフェリンおよびシトルリン化グルコース調節タンパク質（ＧＲＰ）などのベータ細胞によって発現される追加の候補標的分子にさらに関連することがある。

【００６９】

「Ｔ１Ｄ特異的抗原遺伝子」という用語は、上記「Ｔ１Ｄ特異的抗原」をコードする遺伝子を指す。「Ｔ１Ｄ特異的抗原遺伝子」という用語は、「Ｔ１Ｄ特異的抗原バリアントポリペプチド」をコードする「Ｔ１Ｄ特異的抗原バリアント遺伝子」を包含する。ＬＡＢ中のＴ１Ｄ抗原をコードするＤＮＡ配列は、ＬＡＢ中での発現を促進するように最適化されたコドンであってよく、そのため、天然生物（例えば、ヒト）中のものとは異なってよい。

【００７０】
「Ｔ１Ｄ特異的抗原ポリペプチド」という用語は、対応する野生型ポリペプチドと比べた時に増進された活性または減少された活性を有し得る、機能的な、例えば、全長の、ポリペプチドの他に、「Ｔ１Ｄ特異的抗原バリアントポリペプチド」を指す。Ｔ１Ｄ特異的抗原はまた、真核性シグナル配列を欠くこともある。
【００７１】
「Ｔ１Ｄ特異的抗原バリアント」または「Ｔ１Ｄ特異的抗原バリアントポリペプチド」という用語は、改変（例えば、切断または変異）されているが、機能的なポリペプチドを指し、例えば、切断型または変異型のヒトＰＩＮＳを指す。「バリアントポリペプチド」という用語は、対応する野生型ポリペプチドと比べた時に増進された活性または減少された活性を有するポリペプチドを包含する。「バリアントポリペプチド」は、少なくとも一部の生物学的活性（機能的なポリペプチド）を保持する。ＧＡＤ６５およびＩＡ－２の例示的なバリアントとしては、抗原特性を保持するその切除型（例えば、ＮＣＢＩ受託番号ＮＰ＿０００８０９．１およびＮＰ＿００２８３７．１に関して、それぞれＧＡＤ６５$_{３７０～５７５}$、およびＩＡ－２$_{６３５～９７９}$が挙げられ、したがって、例えば、対象におけるＴｒｅｇの刺激および寛容の誘導において、本開示の組成物および方法において有用である。一般に、切除型または切断型のＴ１Ｄ特異的抗原は、微生物（例えば、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis））によって効率的に発現および分泌される。
【００７２】
「作動可能に連結された」という用語は、記載された複数のコンポーネントが、意図した様式で機能することを可能とする関係性で並置されていることを指す。コーディング配列に「作動可能に連結された」制御配列は、制御配列に適合性の条件下でコーディング配列の発現が達成されるようにライゲートされている。例えば、プロモーターは、連結または接続が遺伝子の転写を可能としまたはもたらす場合に、前記遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列に作動可能に連結されていると言われる。さらなる例では、５’および３’の遺伝子、シストロン、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列は、連結または接続が少なくとも３’の遺伝子の翻訳を可能としまたはもたらす場合に、ポリシストロン性発現ユニット中で作動可能に連結されていると言われる。例えば、例えばプロモーターおよびオープンリーディングフレームなどのＤＮＡ配列は、配列間の連結の性質が、（１）フレームシフト変異の導入を結果としてもたらさない、（２）オープンリーディングフレームの転写を導くプロモーターの能力に干渉しない、または（３）オープンリーディングフレームがプロモーター領域配列によって転写される能力に干渉しない場合に、作動可能に連結されていると言われる。
【００７３】
抗ＣＤ３抗体
「抗ＣＤ３抗体」は、Ｔ細胞の表面上のＣＤ３受容体に結合する任意の抗体であってよく、例えば、ＣＤ３のイプシロン鎖（ＣＤ３Ｅ）を標的化する抗体である。「抗ＣＤ３抗体」という用語は、Ｆａｂ断片、単一ドメイン抗体、ナノボディなどの、そのような抗体の任意の断片を包含する。一部の例では、抗ＣＤ３抗体またはその断片は、モノクローナル抗体である。他の例では、抗ＣＤ３抗体は、ヒト化モノクローナル抗体、例えば、キメラまたはヒト化ハイブリッド抗体である。一部の例では、抗ＣＤ３抗体は、単一ドメイン抗体またはナノボディである。他の例では、抗ＣＤ３抗体は、ムロモナブ－ＣＤ３である。他の公知のモノクローナル抗ＣＤ３抗体としては、オテリキシズマブ、テプリズマブおよびビジリズマブ、およびこれらの断片が挙げられる。これらの抗体は、クローン病、潰瘍性大腸炎および１型糖尿病のような状態の治療（例えば、Herold K.C. and Taylor L.; “Treatment of Type 1 diabetes with anti-CD3 monoclonal antibody: induction of immune regulation?”. Immunologic Research 2003, 28 (2): 141-50を参照）および免疫寛容の誘導について研究されている。例えば、Bisikirska et al. “TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs” (2005)、およびBisikirska et al., “Use of Anti-CD3 Monoclonal Antibody t

o Induce Immune Regulation in Type 1 Diabetes”. Annals of the New York Academy of Sciences 2004, 1037: 1-9を参照。一部の例では、抗ＣＤ３抗体は、エフェクターＴ細胞（例えば、インスリン産生性ベータ細胞を攻撃し、壊す）の機能を阻害し、かつ／または制御性Ｔ細胞を刺激する。したがって、一部の例では、抗ＣＤ３抗体は、エフェクターＴ細胞による損傷から対象を保護し、例えば、インスリンを産生するベータ細胞の能力を守る。一部の例では、抗ＣＤ３抗体は、ヒトへの投与のために好適であり、例えば、臨床試験の対象であるか、または規制機関によって既に認可されている。一部の例では、抗ＣＤ３抗体は、オテリキシズマブまたはテプリズマブである。

【００７４】

発症直後のＴ１Ｄ

本発明者らは、ある特定の最小量の残留ベータ細胞機能を有する対象が、本明細書に記載される治療方法に特によく反応することを発見した。残留ベータ細胞機能は、当該技術分野で認識され本明細書に記載される方法にしたがって測定することができる。しかしながら、充分な残留ベータ細胞機能は、典型的に、対象のベータ細胞を標的化する有害な自己免疫機能への長すぎる曝露を受けていない対象において見出される。したがって、一部の実施形態では、上記方法における哺乳動物対象は、Ｔ１Ｄを有すると診断された直後の対象である。例えば、そのような対象は、「発症直後のＴ１Ｄ」または「新規発症Ｔ１Ｄ」（本明細書において交換可能に使用される）を有すると称することができる。これらの実施形態による一部の例では、対象は、本開示による組成物を投与する前の１２カ月以内、１８カ月以内、または２４カ月以内にＴ１Ｄを有すると診断された対象である。他の例では、対象は、約１２週未満、約８週未満、約６週未満、または約４週未満にわたってインスリンを用いて治療された対象である。他の例では、上記実施形態のいずれかによれば、対象は、少なくとも１つの自家抗体についての試験で陽性、例えば、インスリン自己抗体（ＩＡＡ）、膵島細胞自家抗体、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（例えば、ＧＡＤ６５）自家抗体、および／またはＩＣＡ５１２抗体についての試験で陽性であった対象である。他の例では、上記実施形態のいずれかによれば、対象は、約１００ｍｇ／ｄＬより高い、または約１２０ｍｇ／ｄＬより高い、または約１２６ｍｇ／ｄＬより高い空腹時血漿グルコースレベルを有する。他の例では、上記実施形態のいずれかによれば、対象は、約１８０～約２５０ｍｇ／デシリットル（ｍｇ／ｄＬ）、または約１０ｍｍｏｌ／Ｌ～約１４ｍｍｏｌ／Ｌの空腹時血漿グルコースレベルを有する。他の例では、上記実施形態のいずれかによれば、対象は、約１００～約５００ｍｇ／ｄＬの血漿グルコースレベルを有する。他の例では、上記実施形態のいずれかによれば、対象は、約８カ月未満、約６カ月未満、または約４カ月未満にわたって多尿症であった対象である。

【００７５】

一部の例では、ヒト対象は、該対象において以下のいずれか１つが測定された時に発症早期Ｔ１Ｄを有すると分類され得る：（１）２回の連続的な空腹時血中グルコース試験が１２６ｍｇ／ｄＬに等しいまたはそれより大きい；（２）任意の無作為な血中グルコース測定値が２００ｍｇ／ｄＬより大きい時；（３）６．５パーセントに等しいまたはそれより大きいヘモグロビンＡ１ｃ（ＨｂＡ１ｃ）試験（ＨｂＡ１ｃは血糖の３カ月平均を与える血液試験である）；または（４）２００ｍｇ／ｄＬを上回る任意の値を有する２時間の経口耐糖能試験、あるいはこれらの組合せ。したがって、正常血糖は、以下のいずれかによって特徴付けられ得る：（１）２回の連続的な空腹時血中グルコース試験が１２６ｍｇ／ｄＬ未満、１２０ｍｇ／ｄＬ未満、または１００ｍｇ／ｄＬ未満；（２）任意の無作為な血中グルコース測定値が２００ｍｇ／ｄＬ未満、１８０ｍｇ／ｄＬ未満、１６０ｍｇ／ｄＬ未満、または１４０ｍｇ／ｄＬ未満である時；（３）６．５パーセント未満、または６％未満のヘモグロビンＡ１ｃ（ＨｂＡ１ｃ）試験；または（４）２００ｍｇ／ｄＬ未満、１８０ｍｇ／ｄＬ未満、１６０ｍｇ／ｄＬ未満、または１４０ｍｇ／ｄＬ未満の値を有する２時間の経口耐糖能試験、あるいは任意のこれらの組合せ。

【００７６】

治療後に正常血糖（例えば、糖尿なしかつ血中グルコース測定値＞２００ｍｇ／ｄｌ）

に戻る対象は、治療に対する「レスポンダー」と考えることができる。実質的な正常血糖に戻らない対象は「ノンレスポンダー」である。

【００７７】

対象の血液または尿中のＣペプチドの濃度を使用して対象のベータ細胞機能およびＴ１Ｄ疾患ステージを評価することができ、Ｃペプチドのより高い濃度はより高いベータ細胞機能を指し示す。一部の例では、対象（例えば、ヒト患者）は、約１ｎｍｏｌ／Ｌ未満であるが少なくとも約０．２ｎｍｏｌ／Ｌの空腹時血中Ｃペプチド濃度を有することによって特徴付けられる、発症直後のＴ１Ｄを有する。他の実施形態では、発症直後の対象（例えば、ヒト患者）は、例えば、約５ｎｍｏｌ／Ｌ未満であるが少なくとも約０．２ｎｍｏｌ／Ｌ、または約４ｎｍｏｌ／Ｌ未満であるが少なくとも約０．５ｎｍｏｌ／Ｌの、４時間の混合食負荷試験（ＭＭＴＴ）の間に刺激された血中Ｃペプチド濃度を有する。他の好適なＣペプチド範囲は、本明細書に記載される。したがって、刺激されたＣペプチドは、ＭＭＴＴ曲線下面積Ｃペプチド（ＡＵＣ　ＣＰ）を使用して測定することができ、または代替的に、９０分のＭＭＴＴで刺激されたＣＰ（ＭＭＴＴ後９０ＣＰまたは９０ＣＰ）を使用して測定することができる。

【００７８】

プロモーター

「プロモーター」は、一般に、ＲＮＡポリメラーゼが結合して転写を開始させる、核酸分子上、例えばＤＮＡ分子上の領域を意味する。プロモーターは、例えば、プロモーターが転写を制御する配列の上流、すなわち５’に位置する。プロモーターは、追加の天然調節配列または領域、例えばオペレーターに関連してもよいことを当業者は理解するであろう。発現のために必要とされる調節領域の精密な性質は生物ごとに異なることがあるが、一般に、原核生物において、（ＲＮＡ転写の開始を導く）プロモーターの他に、ＲＮＡに転写された時に、タンパク質合成の開始のシグナルを送るＤＮＡ配列の両方を含有するプロモーター領域を含む。そのような領域は、通常、プリブノーボックス（ＴＡＴＡボックスを参照）、シャイン・ダルガノ配列などの、転写および翻訳の開始に関与する５’－非コーディング配列を含む。

【００７９】

発現カセット

「発現カセット」または「発現ユニット」という用語は、当該技術分野において一般に認められる意味にしたがって使用され、１つまたは複数の遺伝子および該１つまたは複数の遺伝子の発現を制御する配列を含有する核酸を指す。例示的な発現カセットは、少なくとも１つのプロモーター配列および少なくとも１つのオープンリーディングフレームを含有する。

【００８０】

ポリシストロン性発現カセット

「ポリシストロン性発現カセット」、「ポリシストロン性発現ユニット」または「ポリシストロン性発現システム」という用語は、当該技術分野において一般に認められる意味にしたがって本明細書において交換可能に使用される。それらは、２つまたはそれより多くの遺伝子の発現が、プロモーター、オペレーターなどの共通の調節機構によって調節される核酸配列を指す。本明細書で使用されるポリシストロン性発現ユニットという用語は、マルチシストロン性発現ユニットと同義である。ポリシストロン性発現ユニットの例は、２シストロン性、３シストロン性、４シストロン性の発現ユニットであるが、これらに限定されない。タンパク質、ポリペプチドおよび／またはペプチドなどの個々の発現産物をコードする、２つまたはそれより多く（例えば、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０、またはそれより多く）のオープンリーディングフレームまたはコーディング領域を含む任意のｍＲＮＡは、ポリシストロン性という用語に包含される。ポリシストロン性発現カセットは、少なくとも１つのプロモーター、および該プロモーターによって制御された少なくとも２つのオープンリーディングフレームを含み、該２つのオープンリーディングフレームの間に遺伝子間領域が配置されてもよい。

【００８１】
一部の例では、「ポリシストロン性発現カセット」は、微生物（例えば、ＬＡＢ）に内因性のプロモーターによって転写制御される１つまたは複数の内因性遺伝子および１つまたは複数の外因性遺伝子を含む。本明細書に記載されるポリシストロン性発現ユニットまたはシステムは、微生物（例えば、ＬＡＢ）に外因性のプロモーターによって転写制御され得る。さらなる実施形態では、本明細書に記載される翻訳上または転写上連結された１つまたは複数の内因性遺伝子および１つまたは複数の外因性遺伝子は、前記１つまたは複数の内因性遺伝子（の１つ）の天然プロモーターによって転写制御される。別の実施形態では、ポリシストロン性発現ユニットは、前記ポリシストロン性発現ユニットに含まれる前記１つまたは複数の内因性遺伝子（の１つ）の天然プロモーターによって転写制御される。別の実施形態では、ポリシストロン性発現ユニットは、グラム陽性内因性プロモーターに作動可能に連結されている。例示的な実施形態では、プロモーターは、それが作動可能に連結されるオープンリーディングフレームの上流、すなわち、５’に位置し得る。さらなる実施形態では、プロモーターは、ポリシストロン性発現ユニット中の内因性遺伝子の最も５’、すなわち最も上流の天然プロモーターである。したがって、一部の例では、ポリシストロン性発現ユニットは、前記１つまたは複数の内因性遺伝子の３’末端に転写上連結された内因性遺伝子および１つまたは複数の外因性遺伝子を含有し、例えば、前記１つまたは複数の外因性遺伝子は、ポリシストロン性発現ユニットの最も３’の遺伝子である。

【００８２】
本明細書で使用される場合、「翻訳上連結された」（translationally coupled）という用語は、「翻訳上連結された」（translationally linked）または「翻訳上接続された」と同義である。これらの用語は、本質的に、ポリシストロン性発現カセットまたはユニットに関する。２つまたはそれより多くの遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列は、共通の調節エレメント（特に、共通のプロモーター中にあるものなど）が、前記２つまたはそれより多くの遺伝子、オープンリーディングフレームまたはコーディング配列をコードする１つのｍＲＮＡとして前記２つまたはそれより多くの遺伝子の転写をもたらし、それをその後に２つまたはそれより多くの個々のポリペプチド配列に翻訳できる時に、翻訳上連結されていると言われる。細菌オペロンは、２つまたはそれより多くの遺伝子が翻訳上または転写上連結された天然に存在するポリシストロン性発現システムまたはユニットであることを当業者は理解するであろう。

【００８３】
遺伝子間領域
本明細書で使用される場合、「遺伝子間領域」という用語は、「遺伝子間リンカー」または「遺伝子間スペーサー」と同義である。遺伝子間領域は、隣接する（すなわち、同じポリ核酸配列上に位置する）遺伝子、オープンリーディングフレーム、シストロンまたはコーディング配列の間のポリ核酸配列として定義される。拡張により、遺伝子間領域は、前記遺伝子間領域によって連結された５’の遺伝子の終止コドンおよび／または３’の遺伝子の開始コドンを含み得る。本明細書で定義される通り、遺伝子間領域という用語は、ポリシストロン性発現ユニット中の隣接する遺伝子間の遺伝子間領域に特に関する。例えば、本明細書で定義される遺伝子間領域は、オペロン中の隣接する遺伝子間に見出すことができる。したがって、一実施形態では、本明細書で定義される遺伝子間領域は、オペロンの遺伝子間領域である。

【００８４】
一部の例では、遺伝子間領域、リンカーまたはスペーサーは、グラム陽性菌のｒｐ／Ｗ、ｒｐｆ　Ｐ、ｒｐｍＤ、ｒｐ／８、ｒｐｓＧ、ｒｐｓＥまたはｒｐ／Ｎに先行する、すなわち５’の、より具体的にはすぐ５’の、遺伝子間領域から選択される。一実施形態では、前記グラム陽性菌は、乳酸菌、例えばラクトコッカス（Lactococcus）種、例えば、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）、およびその任意の亜種または株である。一実施形態では、前記遺伝子間領域は、ｒｐ／Ｗ、ｒｐ／Ｐ、ｒｐｍＤ、ｒｐ／８、

ｒｐｓＧ、ｒｐｓＥもしくはｒｐ／Ｎの開始コドンおよび／または先行する、すなわち５’の、遺伝子の終止コドンを包含する。好ましい実施形態では、本発明は、本明細書に記載されるグラム陽性菌または組換え核酸に関し、内因性遺伝子および１つまたは複数の外因性遺伝子は、グラム陽性菌中で活性の遺伝子間領域（単数または複数）によって転写上連結されており、例えば、遺伝子間領域（単数または複数）は前記グラム陽性菌に対して内因性であり、例えば、内因性遺伝子間領域は、ｒｐ／Ｗ、ｒｐｆ　Ｐ、ｒｐｍＤ、ｒｐ／８、ｒｐｓＧ、ｒｐｓＥ、ｒｐ／Ｎ、ｒｐｌＭ、ｒｐｌＥ、およびｒｐｌＦに先行する遺伝子間領域から選択される。

【００８５】

遺伝子間領域が５’の終止コドンおよび／または３’の開始コドンを包含する場合、正しい翻訳の開始および／または終結に影響することがある二重の開始および／または終止コドンを回避するために、これらの各々のコドンは、一部の場合には、前記遺伝子間領域によって連結された遺伝子中に存在しないことを当業者は理解するであろう。遺伝子間領域を同定する方法は当該技術分野において公知である。さらなるガイダンスによって、遺伝子間領域は、例えば、ソフトウェアが当該技術分野において公知かつ利用可能な、オペロン、および関連するプロモーターおよびオープンリーディングフレームの予測に基づいて同定することができる。例示的な遺伝子間領域は、国際特許出願公開第２０１２／１６４０８３号パンフレット（その開示は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【００８６】

対象

「対象」は、例えば本開示の方法にしたがって、本開示の組成物を投与されることから利益を得る可能性がある生物である。対象は、哺乳動物（「哺乳動物対象」）であり得る。例示的な哺乳動物対象としては、ヒト、農用動物（ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギなど）、愛玩動物または家畜動物（イヌ、ネコ、およびウサギなど）、および、マウス、ラット、および霊長目動物などの他の動物が挙げられる。一部の例では、哺乳動物対象は、ヒト患者である。

【００８７】

「国際単位」（ＩＵ）という用語は、その当該技術分野で認識される意味にしたがって本明細書で使用され、物質（例えば、ポリペプチド）の量を表す。ある国際単位を構成する質量または体積は、いずれの物質が測定されているかに基づいて変化する。世界保健機関（ＷＨＯ）は、生物活性ポリペプチドについての単位の特徴付けを提供している。

【００８８】

Ｔ１Ｄ特異的抗原

本開示の少なくとも１つの微生物は、少なくとも１つの疾患特異的（すなわち、Ｔ１Ｄ特異的）自己抗原遺伝子をコードする外因性核酸を含有し、発現のために充分な条件下でそのような遺伝子を発現することができる。例示的なＴ１Ｄ特異的自己抗原としては、ベータ細胞破壊プロセスに関連する膵島抗原が挙げられる。一部の実施形態では、上記組成物および方法のいずれかにおいて、Ｔ１Ｄ特異的抗原は、Ｔ１Ｄに関連する公知の自家抗原から選択され、プロインスリン（ＰＩＮＳ）；インスリン（ＩＮＳ）；グルタミン酸デカルボキシラーゼ（ＧＡＤ）（例えば、ＧＡＤ６５、ＧＡＤ６７、またはＧＡＤ２）；インスリノーマ関連タンパク質２（膵島抗原－２；ＩＡ－２）（タンパク質チロシンホスファターゼ受容体型Ｎ（protein tyrosine phosphatase, receptor type, N）（ＰＴＰＲＮ）、チロシンホスファターゼ様タンパク質、またはＩＣＡ５１２とも称される）、（例えば、Long et al., Diabetes 2013, 62 (6), 2067-2071を参照）；膵島特異的グルコース－６－ホスファターゼ触媒性サブユニット関連タンパク質（ＩＧＲＰ）、亜鉛トランスポーター８（ＺｎＴ８）が挙げられる。他の例としては、クロモグラニンＡ、（プレプロ）膵島アミロイドポリペプチド（ｐｐＩＡＰＰ）、ペリフェリン、シトルリン化グルコース調節タンパク質（例えば、ＧＲＰ７８）などの、ベータ細胞によって発現される分子（例えば、Rondas et al., Diabetes 2015; 64(2):573-586、およびYe et al., Diabetes 201

0，59(1):6-16を参照）、およびこれらの抗原の２つまたはそれより多くの組合せが挙げられる。他の実施形態では、上記組成物および方法において、Ｔ１Ｄ特異的抗原は、ＰＩＮＳ、ＧＡＤ６５、またはＩＡ－２である。他の実施形態では、上記組成物および方法において、Ｔ１Ｄ特異的抗原は、ＰＩＮＳである。様々な実施形態では、Ｔ１Ｄ特異的抗原は、全長（例えば、野生型）遺伝子より短いバリアント核酸配列によってコードされ、そのため、「切除」型は、多くの場合に、使用される微生物（例えば、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis））によってより効率的に発現および／または分泌される。分泌はより効率的であるが、多くの「切除」型は、それらの生物学的活性の全て（または実質的部分）を保持し、例えば、充分なＴｒｅｇ刺激および／または寛容誘導能力を保持する。

【００８９】

ＰＩＮＳポリペプチドの例としては、野生型ヒトＰＩＮＳ、およびそのような野生型ヒトＰＩＮＳと少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列同一性を有するポリペプチドが挙げられる。野生型ヒトＰＩＮＳの例示的なアミノ酸配列は配列番号５であり、例示的な核酸配列は配列番号６によって表される（受託番号ＮＭ＿０００２０７．２に含有されるＣＤＳを参照）。一部の例では、ＰＩＮＳポリペプチドは、配列番号４の核酸配列によってコードされる、配列番号３のアミノ酸配列を有する。

【００９０】

追加の例示的なＰＩＮＳヌクレオチド配列は、ＮＣＢＩ受託番号ＡＹ８９９３０４（完全なＣＤＳ、選択的にスプライスされる；配列番号７）；ＮＭ＿０００２０７（転写物バリアント１）；ＮＭ＿００１１８５０９７（転写物バリアント２）；ＮＭ＿００１１８５０９８（転写物バリアント３）；ＮＭ＿００１２９１８９７（転写物バリアント４）のコーディング配列、およびこれらの部分配列によって表される。例示的なＰＩＮＳアミノ酸配列としては、上記ＰＩＮＳ核酸配列のいずれか１つによってコードされる配列が挙げられる。

【００９１】

配列番号３のアミノ酸配列をコードする任意のヌクレオチド配列、またはその少なくとも約２０個、少なくとも約３０個、少なくとも約４０個、少なくとも約５０個、少なくとも約６０個、少なくとも約７０個、または少なくとも約８０個の連続的なアミノ酸をコードする任意のヌクレオチド配列、または配列番号３と少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列同一性を有するポリペプチドをコードする任意のヌクレオチド配列を使用することができる。

【００９２】

追加のＰＩＮＳポリペプチドは、例えば、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ － Ｐ０１３０８およびそのリンクに記載されている。一部の例では、ＰＩＮＳポリペプチドは、アミノ酸残基２５～１１０（配列番号５にしたがった番号付け）によって表される。

【００９３】

例示的なＧＡＤ（例えば、ＧＡＤ６５）ポリペプチドとしては、野生型ヒトＧＡＤ６５、およびそのような野生型ＧＡＤ６５と少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列同一性を有するポリペプチドが挙げられる。例えば、受託番号Ｍ８１８８２．１に含有されるＣＤＳを参照。

【００９４】

上記アミノ酸配列をコードする任意のヌクレオチド配列、またはその少なくとも約１００個、少なくとも約２００個、少なくとも約３００個、少なくとも約４００個、または少

なくとも約５００個の連続的なアミノ酸をコードする任意のヌクレオチド配列、または少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、または少なくとも約９９％の配列同一性を有するポリペプチドをコードする任意のヌクレオチド配列を使用することができる。

【００９５】

他の例示的なグルタミン酸デカルボキシラーゼ（例えば、ＧＡＤ６５）配列は、例えば、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ － Ｑ０５３２９およびそのリンクに記載されている。一部の例では、ＧＡＤポリペプチドは、野生型アミノ酸の約５００未満、約４００未満、または約３００未満を含有する切除されたバリアントである。例示的なポリペプチド断片（切除されたＧＡＤ６５バリアント）は、例えば、Robert et al., Benef. Microbes 2015, 6(4): 591-601（その開示は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。一部の例では、切除されたＧＡＤバリアントは、グラム陽性菌（すなわち、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis））によって効率的に発現および分泌される。例示的な切除されたＧＡＤバリアントは、$GAD65_{370\sim575}$（アミノ酸の番号付けはＮＣＢＩ受託番号ＮＰ＿０００８０９．１に関する）である。

【００９６】

他の例示的なＧＡＤヌクレオチド配列は、ＮＣＢＩ受託番号Ｍ８１８８２（ＧＡＤ６５）；Ｍ８１８８３（ＧＡＤ６７）；ＮＭ＿０００８１８（ＧＡＤ２バリアント１）；およびＮＭ＿００１１３４３６６（ＧＡＤ２バリアント２）；ならびにそれらに含有されるオープンリーディングフレーム（ＣＤＳ）によって表される。例示的なアミノ酸配列としては、受託番号Ｍ８１８８２、Ｍ８１８８３、ＮＭ＿００１１３４３６６、およびＮＭ＿０００８１８の上記ヌクレオチド配列によってコードされる配列が挙げられる。

【００９７】

本開示の方法を使用して対象に送達される自己抗原の最適な量は、例えば、抗原の種類、抗原を発現する微生物、および遺伝子構築物（例えば、遺伝子構築物において使用されたプロモーターの強度）と共に変化することを当業者は理解するであろう。典型的に、微生物は、発現される抗原の具体的な量に相当する量で、または各々の対象において各々の抗原ポリペプチドについて所望されるＰＫプロファイルを生成する量で、投与される。例示的な１日の抗原用量は、１日あたり約１０ｆｇ～約１００μｇの活性ポリペプチドである。他の例示的な用量範囲は、１日あたり約１ｐｇ～約１００μｇ、または１日あたり約１ｎｇ～約１００μｇである。

【００９８】

上記抗原用量は、１日あたりの有効量の微生物を対象に投与することによって実現することができ、該微生物は、上記したものなどの、所望の用量を実現するために充分な量の生物活性ポリペプチドを発現するように構成されている。抗原ポリペプチドを分泌する微生物は、１日あたり約10^{4}コロニー形成単位（ｃｆｕ）～約10^{12}ｃｆｕ、例えば、１日あたり約10^{6}ｃｆｕ～約10^{12}ｃｆｕ、または１日あたり約10^{9}ｃｆｕ～約10^{12}ｃｆｕの用量で送達され得る。

【００９９】

分泌された抗原ポリペプチドの量は、例えば、Steidler et al., Science 2000; 289(5483):1352-1355に記載の方法にしたがって、またはＥＬＩＳＡを使用することによって、ｃｆｕに基づいて決定することができる。例えば、特定の微生物は、10^{9}ｃｆｕあたり少なくとも約１ｎｇ～約１μｇの活性ポリペプチドを分泌し得る。それに基づいて、当業者は、他のｃｆｕ用量で分泌される抗原ポリペプチドの範囲を算出することができる。

【０１００】

上記用量／用量範囲のそれぞれは、本明細書に記載される任意の投薬レジメンとの関連で投与することができる。活性ポリペプチドの１日の用量は、１日全体を通じて１、２、３、４、５、または６の部分で投与されてもよい。さらに、１日の用量は、投与期間の間の任意の回数の休息期間と共に、任意の日数にわたって投与されてもよい。例えば、約０

．０１～約３．０Ｍ　ＩＵのＩＬ－１０／日／対象の用量は、２日毎に計６週にわたって投与され得る。

【０１０１】

治療

本明細書で使用される「治療」、「治療する」などの用語は、疾患または状態、例えばＴ１Ｄの特徴的な症状または外徴を改善しまたは軽減することを意味する。例えば、Ｔ１Ｄの治療は、対象において抗原特異的免疫寛容の回復または誘導を結果としてもたらし得る。他の例では、治療は、自己免疫糖尿病を阻止すること、または自己免疫糖尿病を後退させることを意味する。本明細書で使用される場合、これらの用語はまた、疾患もしくは状態または疾患もしくは状態に関連する症状の発症を予防しまたは遅延させることを包含し、これには、疾患もしくは状態の重篤度または前記疾患もしくは状態に罹患する前にそれに関連する症状を低減させることが含まれる。罹患前のそのような予防または低減は、投与時において疾患または状態に罹患していない患者に本発明の化合物または組成物を投与することを指す。「予防する」はまた、例えば、改善期間後の、疾患もしくは状態またはそれに関連する症状の再発を予防することまたはぶり返しの防止を包含する。「それを必要とする」対象の治療は、対象が疾患または状態を有し、本発明の治療方法が特定の疾患または状態を治療する意図的な目的で行われることを表す。

【０１０２】

患者部分集団

一部の実施形態では、本開示の方法を使用して治療される対象は、有意な（例えば、測定可能な）残留ベータ細胞機能を有する。そのような状況下、対象は、治療が中断または完全に中止された後でさえ、疾患の寛解を維持し得る。新規に診断された患者は、多くの場合、診断時に残留するある特定の最小数の膵島ベータ細胞（ベータ細胞）を有するため、そのような患者は、ある特定の最小量の内因性のインスリンを産生することができる。そのような患者集団は、本開示の組成物および方法（例えば、ＩＬ－１０およびＰＩＮＳ療法）で治療された時に特によく利益を得ることができる。本明細書に記載される治療は、ベータ細胞のさらなる破壊を予防することができ、したがって、疾患の寛解を誘導することがある。予想外なことに、本発明者らは、初期ベータ細胞量が治療の有効性にとって重要であり得ることを見出した。しかしながら、対象のベータ細胞が一旦破壊されると、そのような対象は、記載された治療から同じようにはもはや利益を得ることができない可能性がある。

【０１０３】

治療されていないＴ１Ｄは、時間をかけて発症し、膵臓中のベータ細胞が破壊されるにつれて進行的に悪化する。したがって、本発明の方法は疾患を停止させることができるので、疾患進行のできるだけ早期に対象を治療することが有利である。したがって、関連する実施形態では、本発明の治療方法はまた、治療の前および治療の間に疾患進行を測定することも含む。

【０１０４】

治療有効量

本明細書で使用される場合、「治療有効量」という用語は、望ましい治療レジメンにしたがって投与された時に所望の治療効果または反応を誘発する本開示の非病原微生物または組成物の量を指す。一部の場合には、化合物または組成物は、１日あたり１回または複数回投与された時に治療有効量と同等の活性成分の量を含有する単位剤形、例えば錠剤またはカプセル剤として提供される。

【０１０５】

所望の治療効果（例えば、Ｔ１Ｄの効果的な治療のため）を達成するために必要とされる組換え微生物の治療有効量は、例えば、微生物によって発現されるＩＬ－１０ポリペプチドの性質、微生物によって発現される抗原ポリペプチドの性質、投与経路、ならびにレシピエントの年齢、体重、および他の特徴に応じて変化することを当業者は理解するであろう。

【０１０６】
粘膜
「粘膜」（mucosa）または「粘膜」（mucous membrane）という用語は、その当該技術分野で認識される意味にしたがって本明細書で使用される。「粘膜」は、口腔粘膜、直腸粘膜、胃粘膜、腸粘膜、尿道粘膜、膣粘膜、眼粘膜、頬粘膜、気管支または肺粘膜、および鼻または嗅覚粘膜などの、身体中に見られる任意の粘膜であり得る。
【０１０７】
本明細書で使用される「粘膜送達」という用語は、その当該技術分野で認識される意味にしたがって使用され、すなわち、例えば、粘膜との本開示の組成物の接触を介した、粘膜への送達である。口腔粘膜送達としては、頬側、舌下および歯肉経路の送達が挙げられる。したがって、一部の実施形態では、「粘膜送達」としては、経胃送達、経腸送達、経直腸送達、経頬送達、経肺送達、経眼送達、経鼻送達、経膣送達および経口送達が挙げられる。
【０１０８】
「粘膜寛容」という用語は、哺乳動物対象（例えば、ヒト患者）が粘膜経路を介して抗原に曝露された後の、該対象における抗原への特異的免疫反応性の阻害を指す。一部の場合には、粘膜寛容は、全身寛容である。低用量経口寛容は、低用量の抗原によって誘導される経口寛容であり、ナイーブ宿主に寛容を与えることができるシクロホスファミド感受性制御性Ｔ細胞によって媒介される活性の免疫抑制によって特徴付けられる。高用量経口寛容は、高用量の抗原によって誘導される経口寛容であり、シクロホスファミド治療に対して非感受性であり、かつ抗原特異的Ｔ細胞のアネルギーおよび／または欠失を介してＴ細胞低応答性の誘導に進む。シクロホスファミドへの感受性の違いを使用して、低用量寛容と高用量寛容とを区別することができる（Strobel et al., 1983）。一部の場合には、経口寛容は、Mayer and Shao (2004)によって記載される低用量経口寛容である。
【０１０９】
免疫調節化合物
「免疫調節化合物」または免疫モジュレーター」という用語は、それらの当該技術分野で認識される意味にしたがって本明細書で使用される。免疫調節化合物は、当業者に公知の任意の免疫調節化合物であり得る。
【０１１０】
一部の実施形態では、免疫調節化合物は、寛容誘導化合物である。寛容誘導は、例えば、制御性Ｔ細胞を誘導することによって、または非直接的な方法、例えば、寛容樹状細胞への未熟樹状細胞の活性化および／または成熟樹状細胞上の「共刺激」因子の発現を誘導するＴｈ２免疫反応の阻害によって、得ることができる。免疫調節化合物および免疫抑制化合物は当業者に公知であり、スペルグアリンなどの細菌代謝物、タクロリムスまたはシクロスポリンなどの真菌およびストレプトミセス（Streptomyces）属細菌代謝物、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＦＮα、ＴＧＦβ（制御性Ｔ細胞の選択的なアジュバントとして）Ｆｌｔ３Ｌ、ＴＳＬＰおよびＲａｎｋ－Ｌ（選択的な寛容原性ＤＣの誘導剤として）などの免疫抑制性サイトカイン、抗ＣＤ４０Ｌ、抗ＣＤ２５、抗ＣＤ２０、抗ＩｇＥ、抗ＣＤ３などの抗体および／またはアンタゴニスト、ＣＴＬ－４１　ｇまたはＣＴＬＡ－４アゴニスト融合タンパク質などのタンパク質、ペプチドまたは融合タンパク質が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、免疫調節化合物は、免疫抑制化合物である。他の実施形態では、免疫抑制化合物は、免疫抑制性サイトカインまたは抗体である。他の実施形態では、免疫抑制性サイトカインは、寛容増強性サイトカインまたは抗体である。「免疫調節化合物」という用語はまた、これらの機能的なホモログも含むことが当業者によって理解されるであろう。機能的なホモログは、意図する目的のために本質的に同じまたは類似の機能を有する分子であるが、構造的に異なることがある。一部の例では、免疫調節化合物は、抗ＣＤ３、またはその機能的なホモログである。
【０１１１】
微生物

本発明は、少なくとも１つの微生物の使用に関する。一部の実施形態では、微生物は、非病原性かつ非浸潤性の細菌である。他の実施形態では、微生物は、非病原性かつ非浸潤性の酵母である。

【０１１２】

一部の実施形態では、微生物は、サッカロミセス（Saccharomyces）種、ハンセヌラ（Hansenula）種、クルイベロミセス（Kluyveromyces）種、シゾサッカロミセス（Schizzosaccharomyces）種、ジゴサッカロミセス（Zygosaccharomyces）種、ピキア（Pichia）種、モナスカス（Monascus）種、ゲオトリクム（Geothchum）種およびヤロウィア（Yarrowia）種からなる群から選択される酵母株である。一部の実施形態では、酵母は、サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）である。他の実施形態では、Ｓ．セレビシエ（S. cerevisiae）は、亜種ブラウディ（boulardii）である。本発明の一実施形態では、組換え酵母宿主ベクター系は、生物学的に封じ込められた系である。生物学的封じ込めは当業者に公知であり、例えば、ＴｈｙＡ変異などの自殺性の栄養要求性変異、またはその同等物といった、栄養要求性変異の導入により実現することができる。

【０１１３】

本発明の他の実施形態では、微生物は、非病原性細菌（例えば、食品グレードの細菌株）などの細菌である。一部の例では、非病原性細菌は、グラム陽性菌、例えば、グラム陽性の食品グレードの細菌株である。一部の実施形態では、グラム陽性の食品グレードの細菌株は、乳酸発酵性の細菌株（すなわち、乳酸菌（ＬＡＢ）またはビフィドバクテリウム（Bifidobacterium））である。

【０１１４】

一部の実施形態では、乳酸発酵性の細菌株は、ラクトコッカス（Lactococcus）、ラクトバチルス（Lactobacillus）またはビフィドバクテリウム（Bifidobacterium）の種である。本明細書で使用される場合、ラクトコッカス（Lactococcus）またはラクトバチルス（Lactobacillus）は、特定の種または亜種に限定されないが、ラクトコッカス（Lactococcus）またはラクトバチルス（Lactobacillus）の種または亜種のいずれかを含むことを意図する。例示的なラクトコッカス（Lactococcus）種としては、ラクトコッカス・ガルビエ（Lactococcus garvieae）、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）、ラクトコッカス・ピスシウム（Lactococcus piscium）、ラクトコッカス・プランタルム（Lactococcus plantarum）、およびラクトコッカス・ラフィノラクチス（Lactococcus raffinolactis）が挙げられる。一部の例では、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）は、ラクトコッカス・ラクチス亜種クレモリス（Lactococcus lactis subsp. cremoris）、ラクトコッカス・ラクチス亜種ホルドニエ（Lactococcus lactis subsp. hordniae）、またはラクトコッカス・ラクチス亜種ラクチス（Lactococcus lactis subsp. lactis）である。

【０１１５】

例示的なラクトバチルス（Lactobacillus）種としては、ラクトバチルス・アセトトレランス（Lactobacillus acetotolerans）、ラクトバチルス・アシドフィルス（Lactobacillus acidophilus）、ラクトバチルス・アジリス（Lactobacillus agilis）、ラクトバチルス・アルジダス（Lactobacillus algidus）、ラクトバチルス・アリメンタリウス（Lactobacillus alimentarius）、ラクトバチルス・アミロリチカス（Lactobacillus amylolyticus）、ラクトバチルス・アミロフィラス（Lactobacillus amylophilus）、ラクトバチルス・アミロボラス（Lactobacillus amylovorus）、ラクトバチルス・アニマリス（Lactobacillus animalis）、ラクトバチルス・アビアリウス（Lactobacillus aviarius）、ラクトバチルス・アビアリウス亜種ラフィノサス（Lactobacillus aviarius subsp. araffinosus）、ラクトバチルス・アビアリウス亜種アビアリウス（Lactobacillus aviarius subsp. aviarius）、ラクトバチルス・ババリカス（Lactobacillus bavaricus）、ラクトバチルス・ビフェルメンタンス（Lactobacillus bifermentans）、ラクトバチルス・ブレビス（Lactobacillus brevis）、ラクトバチルス・ブクネリ（Lactobacillus buchneri）、ラクトバチルス・ブルガリカス（Lactobacillus bulgaricus）、ラクトバチルス・カルニ

ス（Lactobacillus carnis）、ラクトバチルス・カゼイ（Lactobacillus casei）、ラクトバチルス・カゼイ亜種アラクトサス（Lactobacillus casei subsp. alactosus）、ラクトバチルス・カゼイ亜種カゼイ（Lactobacillus casei subsp. casei）、ラクトバチルス・カゼイ亜種シュードプランタラム（Lactobacillus casei subsp. pseudoplantarum）、ラクトバチルス・カゼイ亜種ラムノサス（Lactobacillus casei subsp. rhamnosus）、ラクトバチルス・カゼイ亜種トレランス（Lactobacillus casei subsp. tolerans）、ラクトバチルス・カテナフォルミス（Lactobacillus catenaformis）、ラクトバチルス・セロビオサス（Lactobacillus cellobiosus）、ラクトバチルス・コリノイデス（Lactobacillus collinoides）、ラクトバチルス・コンフサス（Lactobacillus confusus）、ラクトバチルス・コリニフォルミス（Lactobacillus coryniformis）、ラクトバチルス・コリニフォルミス亜種コリニフォルミス（Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis）、ラクトバチルス・コリニフォルミス亜種トルクエンス（Lactobacillus coryniformis subsp. torquens）、ラクトバチルス・クリスパタス（Lactobacillus crispatus）、ラクトバチルス・クルバタス（Lactobacillus curvatus）、ラクトバチルス・クルバタス亜種クルバタス（Lactobacillus curvatus subsp. curvatus）、ラクトバチルス・クルバタス亜種メリビオサス（Lactobacillus curvatus subsp. melibiosus）、ラクトバチルス・デルブルエッキー（Lactobacillus delbrueckii）、ラクトバチルス・デルブルエッキー亜種ブルガリカス（Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus）、ラクトバチルス・デルブルエッキー亜種デルブルエッキー（Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii）、ラクトバチルス・デルブルエッキー亜種ラクチス（Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis）、ラクトバチルス・ジベルゲンス（Lactobacillus divergens）、ラクトバチルス・ファルシミニス（Lactobacillus farciminis）、ラクトバチルス・フェルメンタム（Lactobacillus fermentum）、ラクトバチルス・フォルニカリス（Lactobacillus fornicalis）、ラクトバチルス・フルクチボランス（Lactobacillus fructivorans）、ラクトバチルス・フルクトサス（Lactobacillus fructosus）、ラクトバチルス・ガリナラム（Lactobacillus gallinarum）、ラクトバチルス・ガセリ（Lactobacillus gasseri）、ラクトバチルス・グラミニス（Lactobacillus graminis）、ラクトバチルス・ハロトレランス（Lactobacillus halotolerans）、ラクトバチルス・ハムステリ（Lactobacillus hamsteri）、ラクトバチルス・ヘルベチカス（Lactobacillus helveticus）、ラクトバチルス・ヘテロヒオキー（Lactobacillus heterohiochii）、ラクトバチルス・ヒルガルジー（Lactobacillus hilgardii）、ラクトバチルス・ホモヒオキー（Lactobacillus homohiochii）、ラクトバチルス・イネルス（Lactobacillus iners）、ラクトバチルス・インテスチナリス（Lactobacillus intestinalis）、ラクトバチルス・ジェンセニー（Lactobacillus jensenii）、ラクトバチルス・ジョンソニー（Lactobacillus johnsonii）、ラクトバチルス・カンドレリ（Lactobacillus kandleri）、ラクトバチルス・ケフィリ（Lactobacillus kefiri）、ラクトバチルス・ケフィラノファシエンス（Lactobacillus kefiranofaciens）、ラクトバチルス・ケフィルグラナム（Lactobacillus kefirgranum）、ラクトバチルス・クンキー（Lactobacillus kunkeei）、ラクトバチルス・ラクチス（Lactobacillus lactis）、ラクトバチルス・ライヒマンニー（Lactobacillus leichmannii）、ラクトバチルス・リンドネリ（Lactobacillus lindneri）、ラクトバチルス・マレフェルメンタンス（Lactobacillus malefermentans）、ラクトバチルス・マリ（Lactobacillus mali）、ラクトバチルス・マルタロミカス（Lactobacillus maltaromicus）、ラクトバチルス・マニホチボランス（Lactobacillus manihotivorans）、ラクトバチルス・ミノル（Lactobacillus minor）、ラクトバチルス・ミヌタス（Lactobacillus minutus）、ラクトバチルス・ムコサエ（Lactobacillus mucosae）、ラクトバチルス・ムリナス（Lactobacillus murinus）、ラクトバチルス・ナゲリー（Lactobacillus nagelii）、ラクトバチルス・オリス（Lactobacillus oris）、ラクトバチルス・パニス（Lactobacillus panis）、ラクトバチルス・パラブクネリ（Lactobacillus parabuchneri）、ラクトバチルス・パラカゼイ（Lactobacillus paracasei）、ラクトバチルス・パラカゼイ亜種パラカゼイ（Lactobacillus paracasei subsp. paracasei）、ラクトバチルス・パラカゼイ亜種トレランス（L

actobacillus paracasei subsp. tolerans）、ラクトバチルス・パラケフィリ（Lactobacillus parakefiri）、ラクトバチルス・パラリメンタリウス（Lactobacillus paralimentarius）、ラクトバチルス・パラプランタルム（Lactobacillus paraplantarum）、ラクトバチルス・ペントサス（Lactobacillus pentosus）、ラクトバチルス・ペロレンス（Lactobacillus perolens）、ラクトバチルス・ピスシコラ（Lactobacillus piscicola）、ラクトバチルス・プランタルム（Lactobacillus plantarum）、ラクトバチルス・ポンチス（Lactobacillus pontis）、ラクトバチルス・ロイテリ（Lactobacillus reuteri）、ラクトバチルス・ラムノサス（Lactobacillus rhamnosus）、ラクトバチルス・リマエ（Lactobacillus rimae）、ラクトバチルス・ロゴサエ（Lactobacillus rogosae）、ラクトバチルス・ルミニス（Lactobacillus ruminis）、ラクトバチルス・サケイ（Lactobacillus sakei）、ラクトバチルス・サケイ亜種カモサス（Lactobacillus sakei subsp. camosus）、ラクトバチルス・サケイ亜種サケイ（Lactobacillus sakei subsp. sakei）、ラクトバチルス・サリバリウス（Lactobacillus salivarius）、ラクトバチルス・サリバリウス亜種サリシニウス（Lactobacillus salivarius subsp. salicinius）、ラクトバチルス・サリバリウス亜種サリバリウス（Lactobacillus salivarius subsp. salivarius）、ラクトバチルス・サンフランシスセンシス（Lactobacillus sanfranciscensis）、ラクトバチルス・シャルペエ（Lactobacillus sharpeae）、ラクトバチルス・スエビカス（Lactobacillus suebicus）、ラクトバチルス・トリコデス（Lactobacillus trichodes）、ラクトバチルス・ウリ（Lactobacillus uli）、ラクトバチルス・バクシノステルカス（Lactobacillus vaccinostercus）、ラクトバチルス・バギナリス（Lactobacillus vaginalis）、ラクトバチルス・ビリデスセンス（Lactobacillus viridescens）、ラクトバチルス・ビツリナス（Lactobacillus vitulinus）、ラクトバチルス・キシロサス（Lactobacillus xylosus）、ラクトバチルス・ヤマナシエンシス（Lactobacillus yamanashiensis）、ラクトバチルス・ヤマナシエンシス亜種マリ（Lactobacillus yamanashiensis subsp. mali）、ラクトバチルス・ヤマナシエンシス亜種ヤマナシエンシス（Lactobacillus yamanashiensis subsp. yamanashiensis）、ラクトバチルス・ゼアエ（Lactobacillus zeae）、ビフィドバクテリウム・アドレスセンチス（Bifidobacterium adolescentis）、ビフィドバクテリウム・アングラタム（Bifidobacterium angulatum）、ビフィドバクテリウム・ビフィダム（Bifidobacterium bifidum）、ビフィドバクテリウム・ブレベ（Bifidobacterium breve）、ビフィドバクテリウム・カテヌラタム（Bifidobacterium catenulatum）、ビフィドバクテリウム・ロンガム（Bifidobacterium longum）、およびビフィドバクテリウム・インファンチス（Bifidobacterium infantis）が挙げられる。一部の例では、ＬＡＢは、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）（ＬＬ）である。

【０１１６】

さらなる例では、細菌は、エンテロコッカス・アルセジニス（Enterococcus alcedinis）、エンテロコッカス・アクイマリナス（Enterococcus aquimarinus）、エンテロコッカス・アシニ（Enterococcus asini）、エンテロコッカス・アビウム（Enterococcus avium）、エンテロコッカス・カッカエ（Enterococcus caccae）、エンテロコッカス・カメリエ（Enterococcus camelliae）、エンテロコッカス・カニンテスチニ（Enterococcus canintestini）、エンテロコッカス・カニス（Enterococcus canis）、エンテロコッカス・カセリフラバス（Enterococcus casseliflavus）、エンテロコッカス・セコラム（Enterococcus cecorum）、エンテロコッカス・コランバエ（Enterococcus columbae）、エンテロコッカス・デブリエセイ（Enterococcus devriesei）、エンテロコッカス・ジエストラムメナエ（Enterococcus diestrammenae）、エンテロコッカス・ジスパル（Enterococcus dispar）、エンテロコッカス・デュランス（Enterococcus durans）、エンテロコッカス・エウレケンシス（Enterococcus eurekensis）、エンテロコッカス・フェカリス（Enterococcus faecalis）、エンテロコッカス・フェシウム（Enterococcus faecium）、エンテロコッカス・ガリナラム（Enterococcus gallinarum）、エンテロコッカス・ギルバス（Enterococcus gilvus）、エンテロコッカス・ヘモペロキシダス（Enterococcus haemoperoxidus）、エンテロコッカス・ヘルマニエンシス（Enterococcus hermanniensis）、エン

テロコッカス・ヒラエ（Enterococcus hirae）、エンテロコッカス・イタリカス（Enterococcus italicus）、エンテロコッカス・ラクチス（Enterococcus lactis）、エンテロコッカス・レマニー（Enterococcus lemanii）、エンテロコッカス・マロドラタス（Enterococcus malodoratus）、エンテロコッカス・モラビエンシス（Enterococcus moraviensis）、エンテロコッカス・ムンドチー（Enterococcus mundtii）、エンテロコッカス・オリバエ（Enterococcus olivae）、エンテロコッカス・パレンス（Enterococcus pallens）、エンテロコッカス・フォエニクリコラ（Enterococcus phoeniculicola）、エンテロコッカス・プランタルム（Enterococcus plantarum）、エンテロコッカス・シュードアビウム（Enterococcus pseudoavium）、エンテロコッカス・クエベセンシス（Enterococcus quebecensis）、エンテロコッカス・ラフィノサス（Enterococcus raffinosus）、エンテロコッカス・ラッティ（Enterococcus ratti）、エンテロコッカス・リボラム（Enterococcus rivorum）、エンテロコッカス・ロタイ（Enterococcus rotai）、エンテロコッカス・サッカロリチカス（Enterococcus saccharolyticus）、エンテロコッカス・シレシアカス（Enterococcus silesiacus）、エンテロコッカス・ソリタリウス（Enterococcus solitarius）、エンテロコッカス・スルフレウス（Enterococcus sulfureus）、エンテロコッカス・テルミチス（Enterococcus termitis）、エンテロコッカス・タイランジカス（Enterococcus thailandicus）、エンテロコッカス・ウレアシチカス（Enterococcus ureasiticus）、エンテロコッカス・ウレイリチカス（Enterococcus ureilyticus）、エンテロコッカス・ビーキエンシス（Enterococcus viikkiensis）、エンテロコッカス・ビロラム（Enterococcus villorum）、およびエンテロコッカス・シャンファンゲンシス（Enterococcus xiangfangensis）からなる群から選択される。

【０１１７】

さらなる例では、細菌は、ストレプトコッカス・アガラクチエ（Streptococcus agalactiae）、ストレプトコッカス・アンギノサス（Streptococcus anginosus）、ストレプトコッカス・ボビス（Streptococcus bovis）、ストレプトコッカス・カニス（Streptococcus canis）、ストレプトコッカス・コンステラタス（Streptococcus constellatus）、ストレプトコッカス・ジスガラクチエ（Streptococcus dysgalactiae）、ストレプトコッカス・エクイナス（Streptococcus equinus）、ストレプトコッカス・イニエ（Streptococcus iniae）、ストレプトコッカス・インテルメジウス（Streptococcus intermedius）、ストレプトコッカス・ミレリ（Streptococcus milleri）、ストレプトコッカス・ミチス（Streptococcus mitis）、ストレプトコッカス・ムタンス（Streptococcus mutans）、ストレプトコッカス・オラリス（Streptococcus oralis）、ストレプトコッカス・パラサングイニス（Streptococcus parasanguinis）、ストレプトコッカス・ペロリス（Streptococcus peroris）、ストレプトコッカス・ニューモニエ（Streptococcus pneumoniae）、ストレプトコッカス・シュードニューモニエ（Streptococcus pseudopneumoniae）、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Streptococcus pyogenes）、ストレプトコッカス・ラッティ（Streptococcus ratti）、ストレプトコッカス・サリバリウス（Streptococcus salivarius）、ストレプトコッカス・チグリナス（Streptococcus tigurinus）、ストレプトコッカス・サーモフィラス（Streptococcus thermophilus）、ストレプトコッカス・サングイニス（Streptococcus sanguinis）、ストレプトコッカス・ソブリナス（Streptococcus sobrinus）、ストレプトコッカス・スイス（Streptococcus suis）、ストレプトコッカス・ウベリス（Streptococcus uberis）、ストレプトコッカス・ベスチブラリス（Streptococcus vestibularis）、ストレプトコッカス・ビリダンス（Streptococcus viridans）、およびストレプトコッカス・ズーエピデミカス（Streptococcus zooepidemicus）からなる群から選択される。

【０１１８】

本発明の特定の態様では、グラム陽性の食品グレードの細菌株は、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）、または、ラクトコッカス・ラクチス亜種クレモリス（Lactococcus lactis subsp. cremoris）、ラクトコッカス・ラクチス亜種ホルドニエ（Lactococcus lactis subsp. hordniae）、およびラクトコッカス・ラクチス亜種ラクチス（La

ctococcus lactis subsp. lactis）などのその亜種のいずれかである。本発明の別の態様では、組換えグラム陽性菌株は、乳中での正常な増殖および酸産生の能力を喪失した、プラスミドなしのラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）株ＭＧ１３６３などの、生物学的に封じ込められた系（Gasson, M.J. (1983) J. Bacteriol. 154:1-9）；またはスレオニンおよびピリミジン栄養要求株誘導Ｌ．ラクチス（L. lactis）株（Sorensen et al. (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66:1253-1258、Glenting et al. (2002) 68: 5051-5056）である。

【０１１９】

本発明の一実施形態では、組換え細菌宿主ベクター系は、生物学的に封じ込められた系である。生物学的封じ込めは当業者に公知であり、ＤＮＡ合成を弱くする、栄養要求性変異、例えばＴｈｙＡ変異などの自殺性の栄養要求性変異、またはその同等物の導入によって実現することができる。栄養要求性変異の他の例は、ＲＮＡ、細胞壁またはタンパク質の合成を弱くすることができる。あるいは、生物学的封じ込めは、例えば、数世代後に失われる不安定なエピソーム構築物を使用することなどによって、ＩＬ－１０ポリペプチドまたはＩＬ－１０バリアントをコードする遺伝子を持つプラスミドのレベルで実現することができる。所望の場合、プラスミドの不安定性および栄養要求性などのいくつものレベルの封じ込めを組み合わせて、高レベルの封じ込めを確実にすることができる。

【０１２０】

構築物

本発明では、微生物（例えば、非病原性グラム陽性菌）は、意図する部位、すなわち粘膜にＩＬ－１０ポリペプチドおよびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）を送達する。例えば、微生物（例えば、ＬＡＢ）はＩＬ－１０ポリペプチドを発現し、（分泌形態のＩＬ－１０が使用された場合）その後にＩＬ－１０ポリペプチドは分泌される。したがって、具体的な実施形態では、Ｌ．ラクチス（L. lactis）などの微生物（例えば、ＬＡＢ）は、意図する粘膜の部位、例えば胃腸管中でＩＬ－１０およびＰＩＮＳを発現する。

【０１２１】

オペロンの使用により、ＩＬ－１０ポリペプチドおよびＴ１Ｄ特異的抗原ポリペプチド（例えば、ＰＩＮＳ）の発現を調和させることが可能となる。細菌宿主細胞中のポリシストロン性発現システムは、例えば、Ｖａｎｄｅｎ－Ｂｒｏｕｃｋｅらの米国特許出願第２０１４／０１０５８６３号明細書（参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０１２２】

一実施形態では、本発明は、安定的にトランスフェクトされた微生物、すなわち、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする遺伝子およびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）遺伝子が宿主細胞のゲノム中に組み込まれている微生物に関する。安定的にトランスフェクトされた微生物を確立するための技術は当該技術分野において公知である。例えば、ＩＬ－１０ポリペプチドおよびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）遺伝子を、相同組換えを介して宿主のゲノム中、例えば染色体中にクローニングすることができる。一部の実施形態では、宿主の必須遺伝子は、遺伝子の欠失などの相同組換え事象、必須遺伝子によってコードされたタンパク質の不活性型を生じるか、または必須遺伝子によってコードされたタンパク質の切断型を結果としてもたらすフレームシフト変異を生じる１つまたは複数のアミノ酸置換によって破壊される。一実施形態では、必須遺伝子は、ｔｈｙＡ遺伝子である。好ましい技術は、例えば、国際公開第０２／０９０５５１号パンフレット（参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。プラスミドは、自己複製性であってよく、例えば、１つまたは複数の目的の遺伝子および１つまたは複数の抵抗性マーカーを持つ。したがって、形質転換用プラスミドは、破壊される必須遺伝子、例えばｔｈｙＡ遺伝子を補完できないものである限り、任意のプラスミドであってよい。あるいは、プラスミドは、組込みプラスミドである。後者の場合、組込みプラスミドそれ自体を使用して、必須遺伝子の遺伝子座、例えばｔｈｙＡ部位での組込みを引き起こし、それによって必須遺伝子、例えばｔｈｙＡ遺伝子の機能を破壊することによって、必須遺

伝子を破壊することができる。一部の場合には、ｔｈｙＡ遺伝子などの必須遺伝子は、ｔｈｙＡ標的部位などの必須遺伝子への挿入を標的化する標的化配列が隣接した、目的の遺伝子（単数または複数）を含むカセットによる二重相同組換えによって置換される。これらの標的化配列は、標的部位中への目的の遺伝子の組込みを可能とするために充分に長くかつ充分に相同的であることが理解されるであろう。一部の例では、本開示のＩＬ－１０発現カセットは、ｔｈｙＡ遺伝子座に組み込まれる。

【０１２３】

ＩＬ－１０ポリペプチドおよびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）をコードする遺伝子構築物は、微生物のゲノムＤＮＡ中、例えば細菌または酵母の染色体中、例えばラクトコッカス（Lactococcus）の染色体中に組み込まれ得る。後者の場合、核酸の単一または複数コピーを組み込むことができ、組込みは、染色体のランダムな部位において、または、上記の通り、その予め定められた部位、例えば、非限定的な例では、ラクトコッカス（Lactococcus）（例えば、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis））のｔｈｙＡ遺伝子座中などの、予め定められた部位で起こり得る。

【０１２４】

したがって、一実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドおよびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）をコードする遺伝子構築物は、宿主細胞のゲノム中、例えば染色体中への遺伝子構築物の挿入をもたらすように構成された配列をさらに含むことができる。

【０１２５】

一部の例では、宿主細胞のゲノム内、例えば染色体内の特定の部位への遺伝子構築物の挿入は、相同組換えによって促進され得る。例えば、本発明の遺伝子構築物（genetic construct the invention）は、宿主細胞のゲノム内、例えば染色体内の前記組込み部位に相同な１つまたは複数の領域を含み得る。前記ゲノム（例えば、染色体）の部位の配列は、天然のもの、すなわち、天然に存在するものであってもよいし、または、先行する遺伝子操作によって導入された外因性配列であってもよい。例えば、相同性の領域は、少なくとも５０ｂｐ、１００ｂｐ、２００ｂｐ、３００ｂｐ、４００ｂｐ、５００ｂｐ、６００ｂｐ　７００ｂｐ、８００ｂｐ、９００ｂｐ、１０００ｂｐ、またはそれより大きいものであり得る。

【０１２６】

一例では、本発明の遺伝子構築物中に存在する関連する発現ユニットのそれぞれの端部に隣接した、相同な２つの領域を含めることができる。そのような構成は、有利なことに、関連配列、すなわち少なくとも、目的の抗原をコードし、宿主細胞中でのその発現をもたらすものを、挿入し得る。特に細菌宿主中で、相同組換えを行い、かつ組換え体を選択する方法は、当該技術分野において一般に公知である。

【０１２７】

例えばプロトプラスト形質転換およびエレクトロポレーションなどの、微生物の形質転換法は当業者に公知である。

【０１２８】

高度な発現は、相同的発現および／または微生物、例えばＬ．ラクチス（L. lactis）中に存在する発現ベクター上の分泌シグナルを使用することによって達成することができる。発現シグナルは当業者に明らかであろう。発現ベクターは、それが組み込まれる微生物（例えばＬ．ラクチス（L. lactis））に応じて発現について最適化することができる。例えば、ラクトコッカス（Lactococcus）、ラクトバチルス・ラクチス（Lactobacillus lactis）、カゼイ（casei）およびプランタルム（plantarum）において充分なレベルの発現を与えた特定の発現ベクターが公知である。さらに、非病原性、非定着性、非浸潤性の食品グレードの細菌ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）における異種抗原の発現用に開発されたシステムが公知である（英国特許第２２７８３５８号明細書（参照することにより本明細書に組み込まれる）を参照）。本発明にしたがって特に好ましい構築物は、ＩＬ－１０ポリペプチドおよび／またはＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）をコードするヌクレオチド配列が組み込まれた、ＰＣＴ／ＮＬ９５／００１３５（国際

公開第９６／３２４８７号パンフレット）に記載された複数コピーの発現ベクターを含む。そのような構築物は、高レベルの発現での乳酸菌、特にラクトバチルス（Lactobacillus）における所望の抗原の発現のために特に好適であり、そしてまた、発現産物を細菌細胞の表面に導くためにも有利に使用することができる。（例えば、ＰＣＴ／ＮＬ９５／００１３５の）構築物は、ＩＬ－１０ポリペプチドおよび／またはＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）をコードする核酸配列に先行して、リボソーム認識およびＲＮＡ安定化のために必要とされる最小配列を少なくとも含む５’非翻訳核酸配列が存在することを特徴とし得る。これに翻訳開始コドンが後続することができ、該翻訳開始コドンに（直ちに）、乳酸菌の遺伝子の翻訳される核酸配列の５’末端部分の少なくとも５つのコドンの断片または該断片の構造的もしくは機能的同等物が後続してもよい。断片はまた、プロモーターによって制御されてもよい。ＰＣＴ／ＮＬ９５／００１３５（それに開示された様々な実施形態を含む）および本明細書で言及された全ての他の文献の内容は、参照することにより本明細書に組み込まれる。本発明の一態様は、宿主における異種遺伝子の高レベルの調節された発現および発現の分泌への連結を可能とする方法を提供する。別の実施形態では、国際公開第９３／１７１１７号パンフレット（参照することにより本明細書に組み込まれる）にしたがって強力な発現システムを開発するためにＴ７バクテリオファージＲＮＡポリメラーゼおよびその同族プロモーターが使用される。一実施形態では、発現プラスミドは、ｐＴ１　ＮＸ（ＧｅｎＢａｎｋ：ＨＭ５８５３７１．１）に由来する。

【０１２９】

本発明にしたがって用いられるプロモーターは、一部の場合には、細菌中で構成的に発現される。構成的プロモーターの使用は、発現を起こすために誘導剤または他の調節シグナルを供給する必要性を回避する。一部の場合には、プロモーターは、たとえ増殖が維持されなくても、細菌宿主細胞が生存可能なままである、すなわち、一部の代謝活性を保持するレベルでの発現を導く。したがって、有利なことに、そのような発現は低いレベルであってもよい。例えば、発現産物が細胞内に蓄積する場合、発現のレベルは、細胞内タンパク質の約１０％未満、約５％または約５％未満、例えば約１～３％での発現産物の蓄積に繋がり得る。プロモーターは、用いられる細菌に同属的、すなわち、天然でその細菌中に見られるものであり得る。例えば、ラクトコッカス（Lactococcus）のプロモーターをラクトコッカス（Lactococcus）において使用することができる。ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）（または他のラクトコッカス（Lactococcus）属細菌）において使用するための好ましいプロモーターは、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）の染色体に由来する「Ｐ１」である（Waterfield, Ｎ R, Lepage, Ｒ Ｗ F, Wilson, Ｐ Ｗ, et al. (1995). “The isolation of lactococcal promoters and their use in investigating bacterial luciferase synthesis in Lactococcus lactis” Gene 165(1):9-15）。プロモーターの他の例としては、ｕｓｐ４５プロモーター、ｇａｐＢプロモーター、およびｈｌｌＡプロモーターが挙げられる。他の有用なプロモーターは、Ｓｔｅｉｄｌｅｒらの米国特許第８，７５９，０８８号明細書、およびＶａｎｄｅｎ－Ｂｒｏｕｃｋｅらの米国特許出願第２０１４／０１０５８６３号明細書（これらの開示は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。一部の例では、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする核酸は、ｈｌｌＡプロモーター下に配置される。

【０１３０】

核酸構築物（単数または複数）は、分泌シグナル配列をコードする核酸を含み得る。したがって、一部の実施形態では、ＩＬ－１０および／またはＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）をコードする核酸は、例えば、シグナル配列をコードする核酸配列をポリペプチドをコードする核酸配列に適切に連結することによって、ポリペプチドの分泌を提供し得る。抗原を分泌するための核酸を宿す細菌の能力は、該生物の生存能力を維持する培養条件においてｉｎ　ｖｉｔｒｏで試験することができる。好ましい分泌シグナル配列としては、バチルス（Bacillus）、クロストリジウム（Clostridium）およびラクトバチルス（Lactobacillus）などのグラム陽性生物中で活性を有する任意の分泌シグナル配列が挙げられる。そのような配列は、バチルス・アミロリケファシエンス（Bacillus amyloliqu

etaciens）のα－アミラーゼ分泌リーダー、またはスタフィロコッカス（Staphylococcus）の一部の株によって分泌され、グラム陽性およびグラム陰性の両方の宿主において機能することが公知のスタフィロキナーゼ酵素の分泌リーダー（“Gene Expression Using Bacillus,” Rapoport (1990) Current Opinion in Biotechnology 1:21-27を参照）、あるいは多数の他のバチルス（Bacillus）酵素またはＳ層タンパク質からのリーダー配列（pp 341-344 of Harwood and Cutting, “Molecular Biological Methods for Bacillus,” John Wiley & Co. 1990を参照）を含み得る。一実施形態では、前記分泌シグナルは、ｕｓｐ４５に由来する（Van Asseldonk et al. (1993) Mol. Gen. Genet. 240:428-434）。そのような分泌リーダーは、本明細書では例えばＳＳｕｓｐ４５と称される。一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＳＳｕｓｐ４５を使用して構成的に分泌される。他の例では、ＰＩＮＳポリペプチドは、ＳＳｕｓｐ４５を使用して分泌される。さらに他の例では、ＩＬ－１０ポリペプチドおよびＰＩＮＳポリペプチドの両方が、ＳＳｕｓｐ４５を使用して分泌される。

【０１３１】

本開示の方法を使用して対象に送達されるＩＬ－１０およびＰＩＮＳの最適な量は、例えば、ＩＬ－１０ポリペプチドおよびＰＩＮＳポリペプチドを発現する微生物、および遺伝子構築物、例えば、遺伝子構築物において使用されたプロモーターの強度と共に、変化することを当業者は理解するであろう。典型的に、微生物は、発現されるＩＬ－１０ポリペプチドおよびＰＩＮＳポリペプチドの具体的な量に相当する量で、または各々の対象において各々のＩＬ－１０ポリペプチドまたはＰＩＮＳポリペプチドについて所望されるＰＫプロファイルを生成する量で、投与される。例示的な１日のＩＬ－１０ポリペプチドまたはＰＩＮＳポリペプチドの用量は、１日あたり約１０ｆｇ～約１００μｇの活性ポリペプチドである。他の例示的な用量範囲は、１日あたり約１ｐｇ～約１００μｇ、または１日あたり約１ｎｇ～約１００μｇである。

【０１３２】

上記用量は、１日あたりの有効量の微生物を対象に投与することによって実現することができ、該微生物は、上記したものなどの、所望の用量を実現するために充分な量のＩＬ－１０およびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）を発現するように構成されている。ＩＬ－１０ポリペプチドおよびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳポリペプチド）を分泌する微生物は、１日あたり約10^4コロニー形成単位（ｃｆｕ）～約10^{12}ｃｆｕ、具体的には、１日あたり約10^6ｃｆｕ～約10^{12}ｃｆｕ、より具体的には、１日あたり約10^9ｃｆｕ～約10^{12}ｃｆｕの用量で送達され得る。分泌されたＩＬ－１０およびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳポリペプチド）の量は、例えば、Steidler et al., Science 2000; 289(5483):1352-1355に記載の方法にしたがって、またはＥＬＩＳＡを使用することによって、ｃｆｕに基づいて決定することができる。例えば、特定の微生物は、10^9ｃｆｕあたり少なくとも約１ｎｇ～約１μｇのＩＬ－１０を分泌し得る。それに基づいて、当業者は、他のｃｆｕ用量で分泌されるＩＬ－１０ポリペプチドの範囲を算出することができる。

【０１３３】

上記用量／用量範囲のそれぞれは、本明細書に記載される任意の投薬レジメンとの関連で投与することができる。１日の用量は、１日全体を通じて１、２、３、４、５、または６の部分で投与されてもよい。さらに、１日の用量は、投与期間の間の任意の回数の休息期間と共に、任意の日数にわたって投与されてもよい。例えば、対象は、少なくとも約１週、少なくとも約２週、少なくとも約３週、少なくとも約４週、少なくとも約５週、または少なくとも約６週の期間にわたって、１日あたりまたは２日毎に約０．０１～約３ＭＩＵのＩＬ－１０に相当する用量で微生物を投与され得る。一部の例では、対象は、例えば、約５日、約７日、または約１４日にわたって、約０．１～約５ＭＩＵ／日、または約０．３～約３ＭＩＵに相当する用量で微生物を投与される。例示的な用量は、例えば、Hartemann et al., Lancet Diabetes Endocrinol. 2013, 1(4): 295-305（その開示は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０１３４】
配合物およびレジメン
本開示の一部の方法では、ＩＬ－１０ポリペプチドおよびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）は、ＩＬ－１０ポリペプチドおよびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドの両方を産生する微生物（例えば、ＬＡＢ）を使用して対象（例えば、ヒトＴ１Ｄ患者）に投与（送達）される。
【０１３５】
一部の実施形態では、本開示の組成物（例えば、医薬組成物）中または本開示の単位剤形中に含有されていてもよい微生物（例えば、ＬＡＢ）は、例えば、経口配合物を使用して１日に１回、２回、３回、４回、５回、または６回投与される。一部の実施形態では、微生物は、毎日、２日毎、週に１回、週に２回、週に３回、または週に４回投与される。他の実施形態では、治療は、２週毎に１回行われる。他の実施形態では、治療は、３週毎に１回行われる。他の実施形態では、治療は、月に１回行われる。
【０１３６】
治療サイクルの継続時間は、例えば、Ｔ１Ｄの治療もしくは後退、または再発の予防のための必要に応じて、７日から対象の生涯までである。一部の実施形態では、治療サイクルは、約３０日から約２年にわたって続く。他の実施形態では、対象は、３０日から１．５年続く治療サイクルを有する。他の実施形態では、対象は、３０日から１年続く治療サイクルを有する。他の実施形態では、対象は、３０日から１１カ月続く治療サイクルを有する。他の実施形態では、対象は、３０日から１０カ月続く治療サイクルを有する。他の実施形態では、対象は、３０日から９カ月続く治療サイクルを有する。他の実施形態では、対象は、３０日から８カ月続く治療サイクルを有する。他の実施形態では、対象は、３０日から７カ月続く治療サイクルを有する。他の実施形態では、対象は、３０日から６カ月続く治療サイクルを有する。他の実施形態では、対象は、３０日から５カ月続く治療サイクルを有する。他の実施形態では、対象は、３０日から４カ月続く治療サイクルを有する。他の実施形態では、対象は、３０日から３カ月続く治療サイクルを有する。他の実施形態では、対象は、３０日から２カ月続く治療サイクルを有する。
【０１３７】
さらなる実施形態では、治療サイクルは、グリセミック指数、インスリン自己抗体（ＩＡＡ）レベル、Ｃ断片レベル、および膵島炎などの、疾患の進行を追跡するマーカーのレベルに基づく。好ましくは、対象は、発症早期の糖尿病である。対象はまた、ベータ細胞に対する免疫反応を抑制するＴｒｅｇ細胞のレベルも評価されてよい。例示的な実施形態では、対象は、少なくともさらなる疾患進行がなくなるまで、好ましくは正常血糖の回復があるまで、治療される。患者は、Ｔｒｅｇ細胞の集団が疾患を抑制しかつ後退させることを確実にするために追加の期間にわたって治療されてもよい。対象はまた、モニターされ、再出現した疾患の任意の徴候が最初に現れた時に治療されてもよい。
【０１３８】
連日の維持投与を対象において臨床的に望ましい期間にわたって与えてもよく、該期間は、例えば、１日から数年まで（例えば、対象の残りの生涯全体にわたって）、例えば約（２、３もしくは５日、１もしくは２週、または１カ月）以上かつ／または例えば約（５年、１年、６カ月、１カ月、１週、または３もしくは５日）までである。約３日～約５日または約１週～約１年にわたる連日の維持用量の投与が典型的である。とはいえ、治療効果が観察されるまで、単位用量を例えば１日２回から２週毎に１回まで投与するべきである。
【０１３９】
ＩＬ－１０ポリペプチドおよびＴ１Ｄ特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）ポリペプチドを産生する微生物は、Ｔ１Ｄの治療のための単剤または（例えば、併用療法レジメンを使用する）併用療法で対象に投与され得る。「併用療法」、「併用療法的」という用語またはこれらの変形は、追加の免疫調節化合物などの少なくとも１つの追加の治療活性剤が対象に投与される治療レジメンを指す。したがって、一部の実施形態では、本開示の組成物は

、追加の治療活性剤を含む。一部の実施形態では、本開示の組成物は、抗体（例えば、抗ＣＤ３抗体）などの少なくとも１つの追加の免疫調節物質を含有する。一部の例では、本開示の方法は、抗体（例えば、抗ＣＤ３抗体）などの追加の免疫調節物質を対象（例えば、ヒト患者）に投与することをさらに含む。

【０１４０】

医薬組成物および担体

微生物（例えば、本明細書に記載されるＬＡＢなどの細菌）は、純粋形態、他の活性成分との組合せ、および／または薬学的に許容される（すなわち、非毒性の）添加剤または担体との組合せで投与することができる。「薬学的に許容される」という用語は、その当該技術分野で認識される意味にしたがって本明細書で使用され、医薬組成物の他の成分と適合し、かつそのレシピエントにとって有害でない担体を指す。

【０１４１】

本開示の組成物は、粘膜への微生物（例えば、細菌）の送達のために好適な任意の公知またはその他の効果的な投与量または製品形態に調製することができ、該製品形態には医薬組成物および剤形の他に栄養製品形態が含まれる。

【０１４２】

一部の実施形態では、医薬組成物（すなわち、配合物）は、経口医薬組成物である。この実施形態による一部の例では、配合物または医薬組成物は、任意選択で他の乾燥担体と組み合わせて、乾燥形態（例えば、乾燥粉末形態；例えば、凍結乾燥形態）またはその圧縮形態で非病原微生物を含む。経口配合物は、通常、不活性希釈担体または食用担体を含む。

【０１４３】

一部の例では、経口配合物は、コーティングを含むか、またはカプセル化戦略を利用し、これは腸管中への配合物の送達を促進し、かつ／または微生物が腸管（例えば、回腸、小腸、または結腸）中で放出および含水されることを可能とする。微生物が配合物から放出され、充分に含水すると、微生物は、生物活性ポリペプチドの発現を開始し、それはその後に周囲環境中に放出されるか、または微生物の表面上に発現される。そのようなコーティングおよびカプセル化戦略（すなわち、遅延放出戦略）は当業者に公知である。例えば、米国特許第５，９７２，６８５号明細書、国際公開第２０００／１８３７７号パンフレット、および国際公開第２０００／２２９０９号パンフレット（これらの開示は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照。

【０１４４】

一部の実施形態では、本開示は、デキストラン、グルタミン酸ナトリウム、およびポリオールなどの他の成分との組合せであってもよい、凍結乾燥（lyophilized）または凍結乾燥（freeze dried）形態の微生物（例えば、非病原性細菌）を含む医薬組成物を提供する。例示的な凍結乾燥組成物は、例えば、Ｃｏｒｖｅｌｅｙｎらの米国特許出願第２０１２／００３９８５３号明細書（その開示は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。例示的な配合物は、凍結乾燥された細菌（例えば、治療有効量の細菌）および薬学的に許容される担体を含む。凍結乾燥された細菌は、カプセル剤、錠剤、顆粒剤および散剤の形態に調製することができ、これらのそれぞれは経口的に投与され得る。あるいは、凍結乾燥された細菌は、好適な媒体中の水性懸濁液として調製されてもよいし、または凍結乾燥された細菌は、使用の直前に飲料などの好適な媒体中に懸濁されてもよい。そのような組成物は、例えば、細菌バイオマスの沈殿、凝集、または浮遊がない、安定な懸濁液を維持するために有用な安定化剤を追加的に含有してもよい。

【０１４５】

経口投与の場合、配合物は、胃耐性経口剤形であり得る。例えば、経口剤形（例えば、カプセル剤、錠剤、ペレット、マイクロペレット、顆粒剤など）は、胃での溶解または破壊に耐性であるが腸内では耐性でないことによって、胃を通過して腸（例えば、小腸または結腸）での分解、溶解および吸収に有利に働くことを可能とする添加剤（通常、ポリマー、セルロース誘導体および／または親油性材料）の薄層でコーティングすることができ

る。
【０１４６】
一部の例では、経口配合物は、微生物の制御放出、持続放出、または長期放出を提供することによって、微生物中でコードされた所望のタンパク質の制御放出を提供する化合物を含み得る。これらの剤形（例えば、錠剤またはカプセル剤）は、典型的に、親油性、ポリマー性、セルロース系、不溶性、かつ／または膨潤性の添加剤などの、従来周知の添加剤を含有する。制御放出性配合物はまた、腸、結腸などの任意の他の送達部位、生体接着または舌下送達（すなわち、歯科粘膜送達）および気管支送達のために使用することもできる。本発明の組成物が直腸内または経膣的に投与される場合、医薬配合物は、坐剤およびクリームを含み得る。この場合、宿主細胞は、脂質も含む一般的な添加剤の混合物中に懸濁される。上述の配合物のそれぞれは当該技術分野において周知であり、例えば以下の参照文献に記載されている：Hansel et al. (1990, Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems, 5th edition, William and Wilkins); Chien 1992, Novel drug delivery system, 2nd edition, M. Dekker); Prescott et al. (1989, Novel drug delivery, J. Wiley & Sons); Gazzaniga et al., (1994, Oral delayed release system for colonic specific delivery, Int. J. Pharm. 108:77-83)。
【０１４７】
一部の実施形態では、経口配合物は、微生物によって発現される生物活性ポリペプチドの粘膜送達および／または粘膜吸収を増進できる化合物を含む。他の例では、配合物は、配合物内、かつ／または放出されてからの微生物の生存能力を増進させる化合物を含む。
【０１４８】
本発明の細菌は、治療すべき疾患を有するヒトまたは動物に投与するための医薬配合物中に懸濁することができる。そのような医薬配合物は、生きたグラム陽性菌および投与のために好適な媒体を含むがこれらに限定されない。細菌は、ラクトース、他の糖、ステアリン酸、炭酸および／または硫酸のアルカリおよび／またはアルカリ土類塩（例えば、ステアリン酸マグネシウム、炭酸ナトリウムおよび硫酸ナトリウム）、カオリン、シリカ、香料および芳香剤などの一般的な添加剤の存在下で凍結乾燥することができる。そのように凍結乾燥された細菌は、カプセル剤、錠剤、顆粒剤および散剤（例えば、マウスウォッシュ粉末）の形態に調製することができ、これらのそれぞれを経口経路で投与することができる。あるいは、一部のグラム陽性菌は、好適な媒体中の水性懸濁液として調製されてもよいし、または凍結乾燥された細菌は、本明細書で言及される添加剤およびグルコース、グリシンおよびサッカリン酸ナトリウムなどの他の添加剤を含む媒体などの、好適な媒体中に使用の直前に懸濁されてもよい。
【０１４９】
一部の例では、微生物は、任意の好適な方法を使用して対象の胃腸管に局所的に送達される。例えば、ミクロスフェア送達システムを用いて腸への送達を増進させることができる。ミクロスフェア送達システムは、対象の胃腸管での局所放出を提供するコーティングを有するマイクロ粒子を含む（例えば、腸溶性コーティング配合物および結腸用配合物などの制御放出性配合物）。
【０１５０】
経口投与の場合、胃耐性経口剤形を配合することができ、該剤形はまた、グラム陽性菌の制御放出を提供することによって該細菌中でコードされた所望のタンパク質（例えば、ＩＬ－１０）の制御放出を提供する化合物も含むことができる。例えば、経口剤形（カプセル剤、錠剤、ペレット、顆粒剤、散剤など）は、胃での溶解または破壊に耐性であるが腸内では耐性でないことによって、胃を通過して腸での分解、溶解および吸収に有利に働くことを可能とする添加剤（例えば、ポリマー、セルロース誘導体および／または親油性材料）の薄層でコーティングすることができる。
【０１５１】
経口剤形は、グラム陽性菌および産生される外因性タンパク質の徐放を可能とするように、例えば、制御放出、持続放出、長期放出、持効性の錠剤またはカプセル剤として設計

することができる。これらの剤形は、通常、親油性、ポリマー性、セルロース系、不溶性、かつ／または膨潤性の添加剤などの、従来周知の添加剤を含有する。そのような配合物は当該技術分野において周知であり、例えば以下の参照文献に記載されている：Hansel et al., Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems, 5th edition, William and Wilkins, 1990; Chien 1992, Novel drug delivery system, 2nd edition, M. Dekker; Prescott et al., Novel drug delivery, J.Wiley & Sons, 1989; and Gazzaniga et al., Int. J. Pharm. 108: 77-83 (1994)。

【０１５２】

医薬剤形（例えば、カプセル剤）は、胃液耐性を得るためならびに回腸終末部および結腸での意図する送達（そこでポリマーはｐＨ　６．５で溶解する）のために、ｐＨ依存性のオイドラギットポリマーでコーティングすることができる。他のオイドラギットポリマーまたはポリマー間の異なる比を使用することによって、遅延放出プロファイルを調整し、例えば十二指腸または空腸（jejenum）で細菌を放出することができる。

【０１５３】

医薬組成物は、少なくとも１つの薬学的に許容される担体を含有する。好適な添加剤、希釈剤、および担体の非限定的な例としては、防腐剤、無機塩、酸、塩基、緩衝剤、栄養分、ビタミン、デンプン、糖、マンニトール、およびケイ酸誘導体などの充填剤および増量剤；カルボキシメチルセルロースおよび他のセルロース誘導体、アルギネート、ゼラチン、およびポリビニルピロリドン（polyvinyl pyrolidone）などの結合剤；グリセロールなどの保湿剤／炭酸カルシウムおよび重炭酸ナトリウムなどの崩壊剤；パラフィンなどの溶解遅延剤；第４級アンモニウム化合物などの再吸収促進剤；アセチルアルコール、モノステアリン酸グリセロールなどの表面活性剤；カオリンおよびベントナイトなどの吸着性担体；プロピレングリコールおよびエチルアルコールなどの担体、ならびにタルク、カルシウムおよびステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、および固体ポリエチルグリコールが挙げられる。

【０１５４】

薬学的に適合性の結合剤、および／またはアジュバント材料を組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の成分のいずれか、または類似の性質の化合物を含有することができる：微結晶性セルロース、トラガカントゴムまたはゼラチンなどの結合剤；デンプンまたはラクトースなどの添加剤、アルギン酸、プリモゲル、またはコーンスターチなどの分散剤；ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤；コロイド状二酸化ケイ素などの滑剤；スクロースまたはサッカリンなどの甘味剤；あるいはペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジの香味物質などの香味剤。投薬単位形態がカプセル剤である場合、投薬単位形態は、上記種類の材料に加えて、脂肪油などの液体担体を含有することができる。加えて、投薬単位形態は、投薬単位の物理形態を修飾する様々な他の材料、例えば、糖衣、シェラック、または腸溶剤を含有することができる。さらに、シロップ剤は、活性化合物に加えて、甘味剤としてスクロースおよびある特定の防腐剤、色素、着色剤、および香味物質を含有してもよい。薬学的に許容される担体の形態および特徴は、それと組み合わせる活性成分の量、投与経路および他の周知の変数によって定められることが理解されるであろう。担体は、配合物の他の成分と適合し、かつそのレシピエントにとって有害でないという意味で「許容される」ものでなければならない。

【０１５５】

投与用の代替的な調製物としては、滅菌された水性または非水性溶液、懸濁液、およびエマルションが挙げられる。非水性溶媒の例は、ジメチルスルホキシド、アルコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルである。水性担体としては、アルコールと水との混合物、緩衝化媒体、および食塩水が挙げられる。静脈内賦形剤としては、リンゲルのデキストロースに基づくものなどの、液体および栄養補充液、電解質補充液が挙げられる。例えば、抗菌物質、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガスなどの防腐剤および他の添加物も存在

することができる。食塩水、アルコール、ＤＭＳＯ、および水性溶液などの様々な液体配合物がこれらの送達方法のために可能である。

【０１５６】

経口水性配合物は、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム（sodium saccharine）、セルロース、および／または炭酸マグネシウムなどの添加剤を含む。これらの組成物は、マウスウォッシュおよびマウスリンスなどの溶液の形態をとり、例えば、水、アルコール／水溶液、食塩水溶液、塩化ナトリウム、リンゲルのデキストロースなどの非経口賦形剤などの水性担体をさらに含む。

【０１５７】

水性マウスウォッシュ配合物は当業者に周知である。マウスウォッシュおよび経口リンスに関する配合物は、例えば、米国特許第６，３８７，３５２号明細書、米国特許第６，３４８，１８７号明細書、米国特許第６，１７１，６１１号明細書、米国特許第６，１６５，４９４号明細書、米国特許第６，１１７，４１７号明細書、米国特許第５，９９３，７８５号明細書、米国特許第５，６９５，７４６号明細書、米国特許第５，４７０，５６１号明細書、米国特許第４，９１９，９１８号明細書、米国特許出願第２００４／００７６５９０号明細書、米国特許出願第２００３／０１５２５３０号明細書、および米国特許出願第２００２／００４４９１０号明細書（これらのそれぞれは、参照することにより本明細書のこのセクションおよび本明細書の全ての他のセクションに具体的に組み込まれる）に詳細に論じられている。

【０１５８】

香味物質、甘味剤もしくは着色剤、または防腐剤などの他の添加物が本開示の配合物中に存在してもよい。ペパーミントまたはミドリハッカなどのミント、シナモン、ユーカリ、柑橘類、カシア、アニスおよびメントールは好適な香味剤の例である。香味剤は、例えば、０～３％の範囲、最大２％、最大０．５％など、例えば液体組成物の場合に約０．２％といった量で、経口組成物中に存在する。

【０１５９】

甘味剤としては、サッカリンナトリウム、スクロース、グルコース、サッカリン、デキストロース、レブロース、ラクトース、マンニトール、ソルビトール、フルクトース、マルトース、キシリトール、ソーマチン、アスパルテーム、Ｄ－トリプトファン、ジヒドロカルコン、アセスルファム、および任意のこれらの組合せなどの人工または天然甘味剤が挙げられ、これらは、経口組成物の０～２％の範囲、例えば、最大１％ｗ／ｗ、０．０５～０．３％ｗ／ｗなどの量で存在することができる。

【０１６０】

着色剤は、二酸化チタンもしくはＣＩ　４２０９０、またはこれらの混合物などの、好適な天然または合成色素である。着色剤は、好ましくは、０～３％の範囲、例えば最大０．１％、最大０．０５％など、例えば液体組成物の場合に約０．００５～０．０００５％の量で組成物中に存在する。通常の防腐剤のうち、組成物のｐＨを変化させるために実質的に不充分な濃度の安息香酸ナトリウムが好ましく、そうでなければ所望のｐＨに到達するために緩衝剤の量の調整が必要なことがある。

【０１６１】

他の任意選択の成分としては、保湿剤、界面活性剤（非イオン性、陽イオン性または両性）、増粘剤、ゴムおよび結合剤が挙げられる。保湿剤は配合物に形を与え、歯磨き剤組成物中の水分を保持する。加えて、保湿剤は、配合物の貯蔵の間の微生物の劣化の防止を助ける。保湿剤はまた、相安定性の維持を補助し、かつ透明または半透明の歯磨き剤を配合する方法を提供する。

【０１６２】

好適な保湿剤としては、グリセリン、キシリトール、グリセロール、およびプロピレングリコールなどのグリコールが挙げられ、これらは、例えば、それぞれ最大５０％ｗ／ｗの量で存在することができるが、一部の場合には、保湿剤全体は組成物の約６０～８０％

ｗ／ｗより多くない。例えば、液体組成物は、最大約３０％のグリセリンおよび最大約５％、例えば約２％ｗ／ｗのキシリトールを含み得る。界面活性剤は、陰イオン性でないことが好ましく、組成物の最大約６％、例えば約１．５～３％ｗ／ｗの量でポリソルベート２０またはココアミドベタインなどを含み得る。

【０１６３】

本発明の経口組成物が液体形態である場合、経口組成物の最大約３％ｗ／ｗ、０～０．１％などの範囲内、例えば、経口組成物の約０．００１～０．０１％、約０．００５％ｗ／ｗなどの膜形成剤を含むことが好ましい。好適な膜形成剤としては、（ヒアルロン酸ナトリウムに加えて）Ｇａｎｔｒｅｚという商標名の下で販売されているものが挙げられる。

【０１６４】

経口または経腸投与用の液体栄養配合物は、脂質、炭水化物、タンパク質、ビタミン、および鉱物などの１つまたは複数の栄養分を含み得る。多くの異なる供給源および種類の炭水化物、脂質、タンパク質、鉱物およびビタミンが公知であり、そのような栄養分が選択された配合物中に加えられる成分と適合性であり、安全かつ意図する使用に効果的であり、かつ製品の性能を過度に損なわない限り、本発明の栄養液の実施形態において使用することができる。

【０１６５】

これらの栄養液は、例えば、充分な粘性、流動性、または他の物理的もしくは化学的特徴を有するように配合されて、栄養液の飲用または投与の間の粘膜のより効果的かつ鎮静的なコーティングを提供する。これらの栄養分の実施形態はまた、一部の場合には、個体の単独の、主要な、または補助的な栄養分の必要性を満たすために好適な均衡の取れた栄養供給源となる。

【０１６６】

好適な栄養液の非限定的な例は、米国特許第５，７００，７８２号明細書（Ｈｗａｎｇら）、米国特許第５，８６９，１１８号明細書（Ｍｏｒｒｉｓら）、および米国特許第５，２２３，２８５号明細書（ＤｅＭｉｃｈｅｌｅら）（これらの記載は、参照することによりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【０１６７】

本明細書での使用のために好適な栄養タンパク質は、加水分解されていてもよいし、部分的に加水分解されていてもよいし、または加水分解されていなくてもよく、乳汁（例えば、カゼイン、乳清）、動物（例えば、肉、魚）、穀物（例えば、米、麦）、野菜（例えば、大豆）、または任意のこれらの組合せなどの任意の公知またはその他の好適な供給源に由来し得る。

【０１６８】

栄養液において使用するために好適な脂肪または脂質としては、ココナッツ油、大豆油、コーン油、オリーブ油、サフラワー油、高オレイン酸サフラワー油、ＭＣＴ油（中鎖トリグリセリド）、ヒマワリ油、高オレイン酸ヒマワリ油、構造化トリグリセリド、パーム油およびパーム核油、パームオレイン、キャノーラ油、海洋油、綿実油、および任意のこれらの組合せが挙げられるがこれらに限定されない。栄養液において使用するために好適な炭水化物は、単純または複合、ラクトース含有またはラクトース非含有、または任意のこれらの組合せであってよい。好適な炭水化物の非限定的な例としては、加水分解されたコーンスターチ、マルトデキストリン、グルコースポリマー、スクロース、コーンシロップ、コーンシロップ固形物、米由来炭水化物、グルコース、フルクトース、ラクトース、高フルクトースコーンシロップ、およびフラクトオリゴ糖（ＦＯＳ）などの難消化性オリゴサッカリド、ならびに任意のこれらの組合せが挙げられる。

【０１６９】

栄養液は、様々なビタミンのいずれかをさらに含んでよく、その非限定的な例としては、ビタミンＡ、ビタミンＤ、ビタミンＥ、ビタミンＫ、チアミン、リボフラビン、ピリドキシン、ビタミンＢ１２、ナイアシン、葉酸、パントテン酸、ビオチン、ビタミンＣ、コ

リン、イノシトール、その塩および誘導体、ならびに任意のこれらの組合せが挙げられる。

【０１７０】

栄養液は、Ｔ１ＤのリスクがあるまたはＴ１Ｄを患った患者における使用（us）のための公知またはそれ以外に好適な様々な鉱物のいずれかをさらに含んでよく、その非限定的な例としては、カルシウム、リン、マグネシウム　鉄、セレニウム、マンガン、銅、ヨウ素、ナトリウム、カリウム、塩化物、および任意のこれらの組合せが挙げられる。

【０１７１】

本発明の微生物、特に酵母および細菌はまた、簡便な経口または直腸投与用のエリキシルまたは溶液として、あるいは非経口投与、例えば、筋肉内、皮下または静脈内経路による非経口投与のために適切な溶液として配合されてもよい。さらに、ヌクレオシド誘導体はまた、活性成分のみを放出し、または、一部の場合には、腸管の特定の部分において、例えば持続的または長期間にわたって、放出して効果をさらに増進させる剤形などの、持続または長期放出剤形としての配合物のために特によく適する。そのような剤形におけるコーティング、エンベロープ、および保護マトリックスは、例えば、製薬の技術分野において周知のポリマー物質またはワックスから作ることができる。

【０１７２】

本発明の組成物は、ロゼンジ剤、トローチ剤またはパステル剤などの医薬剤形を含む。これらは、通常、好適な香味の基剤中に活性成分を含有する円盤形状の固体である。基剤は、硬質の氷砂糖、グリセリンゼラチン、または形態を与える充分な粘質物との砂糖の組合せであってよい。トローチ剤は口の中に入れられるとゆっくりと分解し、粘膜との直接的な接触のために活性成分を解放する。

【０１７３】

本発明のトローチ剤の実施形態は、例えば、柔軟な塊が形成されるまで粉末状の活性物質、粉末状の砂糖、およびゴムの混合物に水をゆっくり加えることによって調製することができる。７％のアカシア粉末を使用して塊に充分な粘着性を提供することができる。塊を転がし、トローチ片を扁平状の塊から切り出し、または塊を転がして円柱状にし、分割することができる。切り出されまたは分割された各片を成形し、乾燥させることによってトローチ剤形を形成する。

【０１７４】

活性成分が熱に不安定な場合、圧縮によってロゼンジ剤調製物にしてもよい。例えば、調製中の造粒ステップは、任意の圧縮錠剤のために使用される方法と類似の方法で行われる。ロゼンジ剤は、剤形が口中でゆっくり溶けまたは崩壊するのに望ましくなるように通常よりも硬い錠剤を与えるために、強い圧縮の設備を使用して作られる。成分は、一部の場合には、遅延溶解性の特徴を促進するように選択される。

【０１７５】

本発明の特定の配合物では、微生物は、アルファデンプンおよび架橋ポリ（アクリル酸）を含有する生体接着性担体中に組み込まれて、頬側塗布のために好適（すなわち、長期の生体接着および持続的な薬物送達を有する）な生体接着性の錠剤および生体接着性のゲルを形成する。

【０１７６】

代替的な実施形態では、本発明による非病原性かつ非浸潤性の細菌の粉末混合物、生体接着性ポリマー（噴霧乾燥を介して一緒に加工されたアルファデンプンおよび架橋ポリ（アクリル酸））、フマル酸ステアリルナトリウム（滑沢剤）、および二酸化ケイ素（滑剤）を加工して錠剤（重量：１００ｍｇ；直径：７ｍｍ）にする。これらの錠剤の製造方法は当業者に周知であり、様々な薬物（ミコナゾール、テストステロン、フッ化物、シプロフロキサシン）を含有する生体接着性の錠剤の開発の成功について以前に記載されている（Bruschi M. L. and de Freitas O., Drug Development and Industrial Pharmacy, 2005 31:293-310）。全ての添加剤材料は医薬品グレードで市販されている。

【０１７７】

配合物を最適化するために、錠剤中の薬物含有量およびデンプンとポリ（アクリル酸）との比は様々である。先行する研究に基づいて、一緒に加工された生体接着性担体中の最大の薬物含有量は約６０％（ｗ／ｗ）であり、デンプン／ポリ（アクリル酸）の比は７５／２５から９５／５（ｗ／ｗ）の間で変化させることができる。最適化の研究において、錠剤の生体接着特性および錠剤からの薬物放出が主要な評価パラメーターであり、標準的な錠剤特性（硬度、破砕性）が二次的な評価基準である。

【０１７８】

細菌は、アルファデンプンおよび架橋されたポリ（アクリル酸）の水性分散液中に組み込まれる。このポリマー分散液は、高せん断ミキサーを使用して標準的な手順を介して調製される。

【０１７９】

錠剤と同様に、食道粘膜への最適な接着を有するゲルを得るために、ゲルの薬物含有量およびデンプン／ポリ（アクリル酸）の比を最適化する必要がある。ゲルの場合、分散液中のポリマーの濃度は、ゲルの粘度、したがってその粘膜付着特性を決定するので、追加の変数である。

【０１８０】

食道の粘膜へのポリマー分散液の生体接着特性をスクリーニングするモデルは、Batchelor et al. (Int. J. Pharm., 238:123- 132, 2002)によって詳細に記載されている。

【０１８１】

投与の他の経路および形態としては、生きた微生物を含有する食品調製物が挙げられる。一部の例では、生物活性ポリペプチド発現微生物は、乳製品中に含めることができる。

【０１８２】

本発明の医薬組成物は、選択された剤形を配合または製造するための任意の公知またはその他の効果的な方法によって調製することができる。例えば、微生物を、添加剤および希釈剤などの、一般的な、例えば、薬学的に許容される担体と共に配合し、経口の錠剤、カプセル剤、噴霧剤、ロゼンジ剤、処理された基材（例えば、経口または外用スワブ、パッド、または本発明の組成物で処理された使い捨ての非消化性の基材）；経口液（例えば、懸濁液、溶液、エマルション）、粉末、坐剤、または任意の他の好適な剤形を形成することができる。一部の実施形態では、本開示は、医薬組成物を製造する方法を提供する。例示的な方法は、ＩＬ－１０遺伝子およびＴ１Ｄ特異的抗原遺伝子を含有する（またはＩＬ－１０およびＴ１Ｄ特異的抗原を発現できる）微生物（例えば、非病原性細菌）を薬学的に許容される担体と接触させ、それによって医薬組成物を形成することを含む。一部の例では、方法は、培地中で微生物を増殖させることをさらに含む。方法は、微生物を含有する液体を凍結乾燥することをさらに含んでもよく、該液体は、薬学的に許容される担体を含む。

【０１８３】

単位剤形

本開示は、食品グレードのまたは薬学的に許容される担体との組合せであってもよいある特定の量の非病原微生物を含む単位剤形をさらに提供し、前記非病原微生物（例えば、非病原性グラム陽性菌）は、ＩＬ－１０ポリペプチドをコードする外因性核酸、および１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）特異的抗原（例えば、ＰＩＮＳ）をコードする外因性核酸を含む。例示的な単位剤形は、約1×10^{3}～約1×10^{14}コロニー形成単位（ｃｆｕ）の非病原微生物（例えば、非病原性グラム陽性菌）を含有する。他の例示的な単位剤形は、約1×10^{4}～約1×10^{13}コロニー形成単位（ｃｆｕ）の非病原微生物（例えば、非病原性グラム陽性菌）、または約1×10^{4}～約1×10^{12}コロニー形成単位（ｃｆｕ）の非病原微生物（例えば、非病原性グラム陽性菌）を含有する。他の実施形態では、単位剤形は、約1×10^{5}～約1×10^{12}コロニー形成単位（ｃｆｕ）、または約1×10^{6}～約1×10^{12}コロニー形成単位（ｃｆｕ）の非病原微生物（例えば、非病原性グラム陽性菌）を含む。他の実施形態では、単位剤形は、約1×10^{8}～約1×10^{12}コロニー形成単位（ｃｆｕ）、または約1×10^{9}～約1×10^{12}コロニー形成単位（ｃｆｕ）

の非病原微生物（例えば、非病原性グラム陽性菌）を含む。さらに他の実施形態では、単位剤形は、約１×１０^{9}～約１×１０^{11}コロニー形成単位（ｃｆｕ）、または約１×１０^{9}～約１×１０^{10}コロニー形成単位（ｃｆｕ）の非病原微生物（例えば、非病原性グラム陽性菌）を含む。さらに他の実施形態では、単位剤形は、約１×１０^{7}～約１×１０^{11}コロニー形成単位（ｃｆｕ）、または約１×１０^{8}～約１×１０^{10}コロニー形成単位（ｃｆｕ）の非病原微生物（例えば、非病原性グラム陽性菌）を含む。

【０１８４】

さらに他の実施形態では、単位剤形は、約１×１０^{9}～約１×１０^{10}コロニー形成単位（ｃｆｕ）、または約１×１０^{9}～約１００×１０^{9}コロニー形成単位（ｃｆｕ）の非病原微生物（例えば、非病原性グラム陽性菌）を含む。

【０１８５】

単位剤形は、任意の物理形態または形状を有し得る。一部の実施形態では、単位剤形は、経口投与のために適当である。これらの実施形態による一部の例では、単位剤形は、カプセル剤、錠剤、または顆粒剤の形態である。例示的なカプセル剤としては、マイクロ顆粒を充填したカプセル剤が挙げられる。一部の実施形態では、剤形中に含有される非病原微生物（例えば、非病原性グラム陽性菌）は、乾燥粉末形態である。例えば、微生物は、凍結乾燥粉末形態であり、これは圧縮およびコーティングされていてもよい。

【０１８６】

この組成物および方法は、以下の実施例を参照することによってよりよく理解することができるが、これらは、列挙された実施形態および後述の特許請求の範囲においてより完全に記載される本発明の例示に過ぎないことを当業者は理解するであろう。さらに、本出願の全体を通じて、様々な刊行物が参照される。これらの刊行物の開示は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【０１８７】

[実施例１]

ｈＰＩＮＳおよびｈＩＬ１０を分泌する臨床グレードのラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）の構築

ヒトＰＩＮＳおよびヒトＩＬ１０を分泌するラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）株（ｓＡＧＸ０４０７）は、以前に記載された方法を使用してＭＧ１３６３親株中の染色体に位置するチミジル酸シンターゼ（ｔｈｙＡ）遺伝子をヒトＰＩＮＳおよびＩＬ１０用の発現カセットと置換することによって生成した。例えば、Steidler L. et al., Nat. Biotechnol. 2003; 21:785-789、およびSteidler L, Rottiers P; Annals of the New York Academy of Sciences 2006; 1072:176-186を参照。Ｌ．ラクチス（L. lactis）染色体に変化を導入する方法は、二重相同組換えを使用する。ｐＯＲＩ１９に由来し、エリスロマイシン選択マーカーを含有する条件複製型キャリアープラスミドは、ｒｅｐＡ＋　Ｌ．ラクチス（L. lactis）株ＬＬ１０８中で構築した。細菌染色体上の野生型配列に隣接するものと同一の最大１ｋｂの交差（ＸＯ）区画の間に目的のカーゴがクローニングされるように、キャリアープラスミドを設計した。このプラスミドをＭＧ１３６３またはいずれかのその誘導株（ｒｅｐＡ－）中に導入した。エリスロマイシンを含有する寒天プレート上で耐性コロニーを選択し、５’標的部位または３’標的部位のいずれかにおける第１の相同組換えをＰＣＲスクリーニングによって検証した。エリスロマイシン選択の解放は、５’標的部位または３’標的部位のいずれかにおける、第２の相同組換えによる細菌染色体からのキャリアープラスミドの除去を可能とした。臨床グレード株の最終遺伝子構造をＳａｎｇｅｒおよびＩｌｌｕｍｉｎａの両方の全ゲノムシークエンシングによって大規模に記録した。最終臨床株中にはプラスミドまたは残留エリスロマイシン抵抗性は存在しない。例えば、Steidler, L., et al., Nat. Biotechnol. 2003, 21(7): 785-789を参照。

【０１８８】

ｓＡＧＸ０４０７は、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）（Ｌ．ラクチ

ス（L. lactis））ＭＧ１３６３の誘導株である。ｓＡＧＸ０４０７では、
・チミジル酸シンターゼ遺伝子（ｔｈｙＡ；遺伝子ＩＤ：４７９８３５８）が存在せず、環境的封じ込めを保証する（Steidler, L., et al., Nat. Biotechnol. 2003, 21(7): 785-789）。
・ｔｈｙＡが欠失された、ＨＵ様ＤＮＡ結合タンパク質遺伝子の構成的プロモーター（ＰｈｌｌＡ；遺伝子ＩＤ：４７９７３５３）の下流の位置において、ヒトインターロイキン－１０（ｈＩＬ－１０；ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｐ２２３０１、ａａ　１９～１７８、バリアントＰ２Ａ；Steidler, L., et al., Nat. Biotechnol. 2003, 21(7): 785-789）をコードするｈｉｌ－１０遺伝子に融合させた未同定分泌４５ｋＤａタンパク質遺伝子（ｕｓｐ４５；遺伝子ＩＤ：４７９７２１８；ＳＳｕｓｐ４５）の分泌リーダーをコードする遺伝子が挿入されて、ｈＩＬ－１０の発現および分泌を可能としている。
・トレハロース－６－リン酸ホスホリラーゼ遺伝子（ｔｒｅＰＰ；遺伝子ＩＤ：４７９７１４０）が存在せず、外因的に加えられたトレハロースの蓄積を可能とする。
・トレハロース－６－リン酸ホスファターゼ遺伝子（ｏｔｓＢ；遺伝子ＩＤ：１０３６９１４）がｕｓｐ４５（遺伝子ＩＤ：４７９７２１８）の下流に位置して、トレハロース－６－リン酸のトレハロースへの変換を促進する。高発現されるＬ．ラクチス（L. lactis）ＭＧ１３６３の５０Ｓリボソームタンパク質Ｌ３０遺伝子（ｒｐｍＤ；遺伝子ＩＤ：４７９７８７３）に先行する遺伝子間領域（ＩＲ）の使用によって、ｏｔｓＢ発現ユニットがｕｓｐ４５に転写上および翻訳上連結された。
・ＨＵ様ＤＮＡ結合タンパク質遺伝子の構成的プロモーター（ＰｈｌｌＡ；遺伝子ＩＤ：４７９７３５３）がトレハロースオペロン中の推定上のホスホトランスフェラーゼ遺伝子（ｔｒｅＰＴＳ；ｌｌｍｇ＿０４５３およびｌｌｍｇ＿０４５４；それぞれ、遺伝子ＩＤ：４７９７７７８および遺伝子ＩＤ：４７９７０９３）に先行して、トレハロースの取込みを増強する。
・セロビオース特異的ＰＴＳ系ＩＩＣコンポーネントをコードする遺伝子（遺伝子ＩＤ：４７９６８９３）ｐｔｃＣが破壊されていた（４４６のうちのコドン位置３０のｔｇａ；ｔｇａ３０）。この変異は蓄積後のトレハロースの保持を確実にする。
・ヒトプロインスリン（ＰＩＮＳ；ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｐ０１３０８、アミノ酸２５～１１０）をコードするｐｉｎｓ遺伝子とのｕｓｐ４５分泌リーダー（ＳＳｕｓｐ４５）の融合物をコードする遺伝子がグリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（ｇａｐＢ；遺伝子ＩＤ：４７９７８７７）の下流に位置して、ＰＩＮＳの発現および分泌を可能とする。ｐｉｎｓ発現ユニットは、ＩＲｒｐｍＤの使用によってｇａｐＢに転写上および翻訳上連結された。

【０１８９】

ｓＡＧＸ０４０７の全ての遺伝形質は細菌染色体上に存在する。ｓＡＧＸ０４０７の遺伝学的背景は以下を提供する：
・ＰＩＮＳおよびｈＩＬ－１０の構成的な分泌。
・増殖および生存のための、外因的に加えられたチミジンに対する厳格な依存性。
・トレハロースを蓄積および保持する能力、およびしたがって胆汁酸の毒性に抵抗する能力を獲得する。

【０１９０】

図１８は、記載された通りのｓＡＧＸ０４０７の関連する遺伝子座：ｔｒｅＰＴＳ、Δｔｒｅ
ＰＰ；ｏｔｓＢ；ｐｔｃＣ－；ｇａｐＢ＞＞ｐｉｎｓおよびΔｔｈｙＡ、ｈＩＬ－１０の図式的な概要を示し、関連するオリゴヌクレオチド結合部位（ｏＡＧＸｎｏ）、ＥｃｏＲＩ制限部位、（／切断／）遺伝子の特徴、遺伝子間領域（ＩＲ）、ＰＣＲ増幅産物の大きさ（ｂｐ）を指し示している。

【０１９１】

ｔｒｅＰＴＳ、Δｔｒｅ
ＰＰ

トレハロース－６－リン酸ホスホリラーゼ遺伝子（ｔｒｅＰＰ；遺伝子ＩＤ：４７９７１４０）の欠失；トレハロースオペロン中の推定上のホスホトランスフェラーゼ遺伝子（

ｔｒｅＰＴＳ；ｌｌｍｇ＿０４５３およびｌｌｍｇ＿０４５４；ｐｔｓＩおよびｐｔｓＩＩ；それぞれ、遺伝子ＩＤ：４７９７７７８および遺伝子ＩＤ：４７９７０９３）に先行するＨＵ様ＤＮＡ結合タンパク質遺伝子の構成的プロモーター（ＰｈｌｌＡ；遺伝子ＩＤ：４７９７３５３）の挿入、ｐｔｓＩとｐｔｓＩＩとの間の高発現されるＬ．ラクチス（L. lactis）ＭＧ１３６３　５０Ｓリボソームタンパク質Ｌ３０遺伝子（ｒｐｍＤ；遺伝子ＩＤ：４７９７８７３）に先行する遺伝子間領域の挿入（図１３Ａ、図１３Ｂ、および図１３Ｃ）。

【０１９２】

ｏｔｓＢ

未同定分泌４５ｋＤａタンパク質遺伝子（ｕｓｐ４５；遺伝子ＩＤ：４７９７２１８）の下流のトレハロース－６－リン酸ホスファターゼ遺伝子（ｏｔｓＢ；遺伝子ＩＤ：１０３６９１４）の挿入。ｕｓｐ４５とｏｔｓＢとの間の高発現されるＬ．ラクチス（L. lactis）ＭＧ１３６３　５０Ｓリボソームタンパク質Ｌ３０遺伝子（ｒｐｍＤ；遺伝子ＩＤ：４７９７８７３）に先行する遺伝子間領域の挿入。（図１４Ａおよび図１４Ｂ）。

【０１９３】

ｐｔｃＣ－

４４６のうちのコドン位置３０におけるｔｇａ（ｔｇａ３０）の挿入と共に、その傍らの、セロビオース特異的ＰＴＳ系ＩＩＣコンポーネントをコードする遺伝子（ｐｔｃＣ；遺伝子ＩＤ：４７９６８９３）を破壊するためのＥｃｏＲＩ制限部位の導入（図１５Ａおよび図１５Ｂ）。

【０１９４】

ｇａｐＢ＞＞ｐｉｎｓ

高発現されるグリセルアルデヒド３－リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（ｇａｐＢ；遺伝子ＩＤ：４７９７８７７）の下流の、ヒトプロインスリン（ＰＩＮＳ；ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｐ０１３０８、アミノ酸２５～１１０）をコードする、ｐｉｎｓ遺伝子とのｕｓｐ４５分泌リーダー（ＳＳｕｓｐ４５）の融合物をコードする遺伝子の挿入。ｇａｐＢとｐｉｎｓとの間の高発現されるＬ．ラクチス（L. lactis）ＭＧ１３６３　５０Ｓリボソームタンパク質Ｌ３０遺伝子（ｒｐｍＤ；遺伝子ＩＤ：４７９７８７３）に先行する遺伝子間領域の挿入（図１２Ａ、図１２Ｂ、および図１６）。

【０１９５】

ΔｔｈｙＡ、ｈＩＬ－１０

チミジル酸シンターゼ遺伝子（ｔｈｙＡ；遺伝子ＩＤ：４７９８３５８）の欠失。ＨＵ様ＤＮＡ結合タンパク質遺伝子の構成的プロモーター（ＰｈｌｌＡ；遺伝子ＩＤ：４７９７３５３）の下流に、ヒトインターロイキン－１０（ｈＩＬ－１０；ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｐ２２３０１、ａａ　１９～１７８、バリアントＰ２Ａ、Steidler et al., Nat. Biotechnol. 2003, 21(7): 785-789）をコードするｈｉｌ－１０遺伝子とのＳＳｕｓｐ４５の融合物をコードする遺伝子の挿入物を挿入してｈＩＬ－１０の発現および分泌を可能にする（図１７）。

【０１９６】

[実施例２]

マウスにおける糖尿病の治療

尿中のグルコースレベル（Ｄｉａｓｔｉｘ（登録商標）試薬ストリップ、Ｂａｙｅｒ、Ｌｅｖｅｒｋｕｓｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）および静脈血（ＡｃｃｕＣｈｅｃｋ（登録商標）、Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、Ｖｉｌｖｏｏｒｄｅ、Ｂｅｌｇｉｕｍ）を評価することによって糖尿病の発症についてＮＯＤマウスをスクリーニングした。糖尿を有しかつ２回の連続的な血中グルコース測定値が２００ｍｇ／ｄｌを超えている時にマウスを糖尿病と診断した。糖尿病と判定したら、ＮＯＤまたはＮＯＤトランスジェニックマウスをハムスター抗マウスＣＤ３抗体（クローン１４５－２Ｃ１１、ＢｉｏＸＣｅｌｌ、Ｗｅｓｔ　Ｌｅｂａｎｏｎ、ＮＨ）を用いて５日連続で静脈内（ｉ．ｖ．）（０～４日目；２．５μｇ／マウス）処置した。この治療は、６週間の週に５回のプラスミド駆動または

臨床グレードのＬ．ラクチス（L. lactis）株（２×１０^{9}ｃｆｕ）のいずれかの経口投与と組み合わせて与えた。対照マウスは未処置のままとした。治療の開始時の個々の血中グルコース濃度を記録した。体重および血中グルコース状態について週に３回マウスを試験した。寛解は、糖尿がなくかつ正常な血中グルコース濃度への復帰として定義した。実験動物を治療の中止後に直ちにまたは長い時間の後に屠殺した（治療開始の６または１４週後）。末梢血、リンパ器官および膵臓を回収し、Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｄｅｓｉｇｎ ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓに記載された表現型解析について単一細胞を評価した。血中グルコース濃度が２回の連続的な測定において６００ｍｇ／ｄｌを超えた時にマウスを１４週のエンドポイント以前に試験から除外した。

【０１９７】

耐糖能試験

屠殺の１または２週間前に腹腔内耐糖能試験（ＩＰＧＴＴ）を行った。マウスを１６時間絶食させ、グルコース（２ｇ／ｋｇ）を腹腔内（ｉ．ｐ．）注射し、０、１５、３０、６０、９０および１２０分時に血中グルコース濃度を測定した。

【０１９８】

ＩＡＡ測定

治療無作為化の前および治療中止時に新規発症糖尿病ＮＯＤマウスからヘパリン化血漿を回収し、Robert S. et al., Diabetes 2014, 63: 2876-2887に記載の通りにＵＦ Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、Ｃｏｌｌｅｇｅ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、Ｇａｉｎｅｓｖｉｌｌｅ、ＦｌｏｒｉｄａにおいてＩＡＡを解析した。

【０１９９】

ＣＴＬＡ４およびＴＧＦ－βのｉｎ ｖｉｖｏでの阻害

Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療によって寛容化されたマウスに治療停止後に以下の投与レジメンでＣＴＬＡ４（クローンＵＣ１０－４Ｆ１０、Ｂｉｏｃｅｒｏｓ）およびＴＧＦ－β（クローン１Ｄ１１．１６．８、ＢｉｏＸＣｅｌｌ）に対するブロッキング抗体を腹腔内（ｉ．ｐ．）注射した：ＣＴＬＡ４について１および３日目に２５０μｇ、次いで６、８、１０、１３および１８日目に１００μｇ；ＴＧＦ－βについて３週間にわたって週に３回２００μｇ。最初の注射後に２５日まで連日血中グルコース濃度を測定した。

【０２００】

糖尿病の養子移入

Ｔｅｆｆ細胞の糖尿病誘発能力を評価するために、新規発症糖尿病対照、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療のレスポンダーおよびノンレスポンダーの脾臓からの全Ｔ細胞（１×１０^{7}細胞）を６～８週齢の免疫不全ＮＯＤ－ｓｃｉｄマウスの尾静脈にｉ．ｖ．（静脈内）移入した。細胞移入の１００日後まで糖尿病の発症についてレシピエントマウスを週に２回モニターした。

【０２０１】

ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウスにおけるＦｏｘｐ３$^{+}$ Ｔ細胞のＤＴ媒介性の枯渇

ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウス（Ｆｏｘｐ３転写制御エレメントの制御下でヒトジフテリア毒素受容体（ＤＴＲ）を発現する）は、ＤＴ（ジフテリア毒素）投与によるＦｏｘｐ３$^{+}$ Ｔ細胞の枯渇を可能とする。例えば、Feuerer M. et al., How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets. Immunity 2009; 31:654-664を参照。Ｔｒｅｇ枯渇のために、ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウス（Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療の中止後に未処理または寛容化）に１、２、４、および７日目に４０μｇ／ｋｇ体重のＤＴ（Ｓｉｇｍａ）を腹腔内注射し、８日目に調べた。ＤＴ注射後に、マウスの体重、尿および血中グルコース状態をモニターした。記載された通りに、フローサイトメトリーおよび組織学によってそれぞれ末梢血および膵臓中のＦｏｘｐ３$^{+}$ Ｔ細胞をモニターした。例えば、Tian L. et al., Foxp3(+) regulatory T cells exert asymmetric control over murine helper response

s by inducing Th2 cell apoptosis. Blood 2011; 118:1845-1853を参照。

【０２０２】

Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療と組み合わせたＦＯＸＰ３阻害ペプチドＰ６０

Ｐ６０（ＦＯＸＰ３に結合してそれを阻害できる１５－ｍｅｒの合成ペプチド、腹腔内に１日あたり５０μｇ／投与、１４回までの投与）を以前に記載された通りにＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療の開始時に与えた。例えば、Casares N. et al., A peptide inhibitor of FOXP3 impairs regulatory T cell activity and improves vaccine efficacy in mice. Journal of Immunology 2010, 185:5150-5159を参照。

【０２０３】

膵臓の組織学および膵島炎のグレード付け

ホルマリン固定のパラフィン包埋膵臓組織からの６μｍの切片を切断し、１００μｍの間隔で回収した後、ヘマトキシリン・エオシンで染色した。膵島を光顕微鏡法で２０×または４０×で観察し、独立した研究者により盲検で数え上げ、グレード付けした。膵臓試料あたり少なくとも２５個の膵島を膵島浸潤について以下の通りにスコア付けした：０、浸潤なし；１、膵島周囲炎；２、５０％未満の面積にリンパ球浸潤を伴う膵島、３、５０％より多くの面積にリンパ球浸潤を伴う、または完全に破壊された膵島。

【０２０４】

膵島内Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞の検出

膵臓組織を９９％の２－メチル－ブタン中でスナップ冷却し、１２μｍの組織切片に切断した。Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞の検出は記載された通りに行った。例えば、Takiishi T. et al., Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified Lactococcus lactis in mice. J. Clin. Invest. 2012, 122:1717-1725を参照。

【０２０５】

統計

全てのデータはＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　６（Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍ、Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）を使用して解析した。カプラン・マイヤー検定を用いて生存曲線を算出し、ログランク検定と比較した。ダンの多重比較またはマン・ホイットニーのＵ検定を適宜用いてＡＮＯＶＡ（ノンパラメトリックなクラスカル・ウォリス検定）によって群を解析した。エラーバーはＳＥＭを表す。別に指し示さない限り、差は有意でない（ｎｓ）。＊Ｐ＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１、＊＊＊Ｐ＜０．００１、＊＊＊＊Ｐ＜０．０００１。

【０２０６】

細菌および培地

Ｌ．ラクチス（L. lactis）－ｐＴ１ＮＸは、エンプティベクターｐＴ１ＮＸを含有するＭＧ１３６３株であり、対照として働く。プラスミド駆動Ｌ．ラクチス（L. lactis）株（プラスミドにコードされたヒトＰＩＮＳおよび染色体に組み込まれたＩＬ１０を分泌するｓＡＧＸ０３２８）を以前に記載された通りに培養した。例えば、Takiishi T. et al., J. Clin. Invest. 2012, 122:1717-17253を参照。ｔｈｙＡ－欠損Ｌ．ラクチス（L. lactis）株の増殖および生存は増殖培地中のチミジンの存在に依存するので、臨床グレードのＬ．ラクチス（L. lactis）（染色体に組み込まれたヒトＰＩＮＳおよびＩＬ１０を分泌する）をＧＭ１７Ｔ、すなわち、０．５％のグルコース（Ｍｅｒｃｋ　ＫＧａＡ、Ｄａｒｍｓｔａｄｔ、Ｇｅｒｍａｎｙ）および２００μＭのチミジン（Ｓｉｇｍａ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を添加したＭ１７ブロス（ＢＤ、Ｆｒａｎｋｌｉｎ　Ｌａｋｅｓ、ＮＪ）中で培養した。胃内接種のために、ストック懸濁液を増殖培地で１０００倍に希釈し、３０℃で１６時間インキュベートして２×１０^{9}ｃｆｕ／ｍｌの飽和密度とした。細菌を遠心分離によって回収し、ＢＭ９培地で１０倍に濃縮した。治療用量は１００μｌのこの細菌懸濁液からなるものであった。胃内接種のために、ストック懸濁液を増殖培地で１０００倍に希釈し、３０℃で１６時間インキュベートして２×１０^{9}ｃｆｕ／ｍｌの飽和密度とした。細菌を遠心分離によって回収し、ＢＭ９培地で１０倍に濃縮した。治療用

量は１００μｌのこの細菌懸濁液からなるものであった。
【０２０７】
フローサイトメトリー
末梢血および特定の器官を治療開始の６週後に回収し、加工し、フローサイトメトリー解析のための蛍光色素標識抗体またはマッチングアイソタイプ対照と共にインキュベートした。Ｔｒｅｇを２０分間氷上で抗マウスＣＤ３（１４５－２Ｃ１１）、ＣＤ４（ＧＫ１．５）、ＣＤ８ａ（５３－６．７）、ＣＤ２５（ＰＣ６１．５または７Ｄ４（ＢＤ、Ｅｒｅｍｂｏｄｅｇｅｍ、Ｂｅｌｇｉｕｍ））、およびＦＲ４（ｅＢｉｏ１２Ａ５）（記載がなければ全てｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡより）で染色した。Ｆｏｘｐ３（ＦＪＫ－１６ｓ）およびＣＴＬＡ４（ＵＣ１０－４Ｂ９）に対する細胞内染色抗体はｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅのものであり、製造者の説明書にしたがって使用した。抗マウスＣＤ３（１４５－２Ｃ１１）、ＣＤ４（ＧＫ１．５）、ＣＤ８ａ（５３－６．７）、ＣＤ４４（ＩＭ７）、ＣＤ６２Ｌ（ＭＥＬ－１４）、ＣＤ６９（Ｈ１．２Ｆ３）、およびＣＣＲ７（４Ｂ１２）で染色することによってナイーブ、エフェクターメモリーおよびセントラルメモリーＴ細胞を決定した。Ｋａｌｕｚａ（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ、Ｓｕａｒｌｅｅ、Ｂｅｌｇｉｕｍ）またはＦｌｏｗＪｏソフトウェア（Ｔｒｅｅｓｔａｒ、Ａｓｈｌａｎｄ、ＯＲ）を用いてＧａｌｌｉｏｓ（商標）フローサイトメーターで細胞を解析した。
【０２０８】
ｉｎ ｖｉｔｒｏでのサプレッサーアッセイ
ＣＤ２５、ＣＤ８α、Ｂ２２０、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１１ｂ、ＭＨＣクラスＩＩ、およびヒツジ抗ラットＩｇＧ Ｄｙｎａｂｅａｄｓに対する抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｍｅｒｅｌｂｅｋｅ、Ｂｅｌｇｉｕｍ）を使用して陰性選択によって１０週齢ＮＯＤマウスの脾臓細胞から病原性ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$ Ｔｅｆｆ細胞を単離した。ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ｈＣＤ２マウスのプールされたリンパ節および脾臓細胞（内因性ｆｏｘｐ３遺伝子座の３’非翻訳領域中に、内部リボソーム進入部位と共にヒトＣＤ２－ＣＤ５２融合タンパク質を宿す）からＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$およびＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$ Ｔｒｅｇを単離した。例えば、Culina S. et al., Clin. Dev. Immunol. 2011; 2011:286248を参照。簡潔に述べれば、細胞試料を７０μｍの細胞ストレイナーに通し、ＲＰＭＩ１６４０培地中に懸濁し、１，５００ｒｐｍで５分間遠心分離し、ＲＰＭＩ１６４０培地中に懸濁した。結果として得られた細胞懸濁液を数え、洗浄し、最初にＣＤ８α^{+}、Ｂ２２０$^{+}$、ＣＤ１１ｃ$^{+}$、ＣＤ１１ｂ$^{+}$およびＭＨＣクラス$^{+}$、および接着細胞をパニングによって枯渇させ、ビオチンコンジュゲート化抗ＣＤ４および抗ｈＣＤ２抗体で染色した。次いで、細胞を抗ビオチンマイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ Ｂ．Ｖ．、Ｌｅｉｄｅｎ、Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）と共にインキュベートし、ＬＳまたはＭＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ）で分離した。結果として得られたｈＣＤ２$^{+}$またはｈＣＤ２$^{-}$細胞を、抗ＣＤ２５抗体を用いてさらに精製した。ｉｎ ｖｉｔｒｏでのポリクローナルサプレッサーアッセイを実行した。無細胞上清中のサイトカイン（ＩＦＮ－γ、ＩＬ１０およびＴＧＦ－β）を記載された通りにマルチプレックスイムノアッセイ（Ｍｅｓｏｓｃａｌｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＡ）またはフローサイトメトリービーズアレイ（Ｂｅｎｄｅｒ ＭｅｄＳｙｓｔｅｍｓ ＦｌｏｗＣｙｔｏｍｉｘ（商標）、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）によって測定した。例えば、Ludvigsson J. et al., GAD65 antigen therapy in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 2012, 366:433-442を参照。
【０２０９】
ＣＴＬＡ４（ＵＣ１０－４Ｆ１０）、ＩＬ１０（クローンＪＥＳ５－２Ａ５、ＢｉｏＸＣｅｌｌ）、およびＴＧＦ－β（クローン１Ｄ１１．１６．８、３つ全ての哺乳動物のＴＧＦ－βアイソフォーム（β１、β２、およびβ３）を中和する、ＢｉｏＸＣｅｌｌ）に対するブロッキング抗体を１０μｇ／ｍｌの濃度で培養物に加えた。
【０２１０】

結果
低用量の抗ＣＤ３と組み合わせた臨床グレードの自制型（self-contained）Ｌ．ラクチス（L. lactis）ワクチンはＮＯＤマウスにおいて新規発症糖尿病を安定的に後退させ、残留ベータ細胞機能を保存し、膵島炎の進行を停止させた
治療用量未満の抗ＣＤ３抗体と組み合わせてＩＬ１０と共にヒトＰＩＮＳを分泌する臨床グレードの自制型Ｌ．ラクチス（L. lactis）株を使用して、疾患発症後少なくとも１４週にわたって６６％（３５匹のうちの２３匹）のマウスが正常血糖に戻り、これは抗ＣＤ３単独で治療されたマウスでの４３％よりも統計的に有意に優れていた（図１Ａ）。未処置のままとした動物（ｎ＝２０）またはエンプティベクターの細菌株Ｌ．ラクチス（L. lactis）－ｐＴ１ＮＸで処置した動物（ｎ＝９）は高血糖のままであり、それらの開始時の体重の２０％が失われた時に屠殺した。ＰＩＮＳおよびＩＬ－１０を分泌する臨床グレードまたはプラスミド駆動Ｌ．ラクチス（L. lactis）株での単剤療法は、抗ＣＤ３との組合せよりも有意に効果が低かった（それぞれ０％（ｎ＝８）および１７％（ｎ＝８））（図１Ａ）。
【０２１１】
追跡の間、新規発症糖尿病対照、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療によって保護されたマウス、およびそのような治療によって保護されなかったマウスをＩＰＧＴＴに供し、治療開始の６週後に屠殺し、その時点での膵臓組織を組織学によって評価した。治療が成功した動物においてのみ、残留ベータ細胞機能（すなわち、耐糖能曲線下の面積（ＡＵＣグルコース）として評価した）が保存され、重篤な膵島炎を有する膵島の比率がより小さかった（図１Ｂ）。興味深いことに、併用療法の終了時にレスポンダーとノンレスポンダーとの間で膵島炎の重篤度の差異は観察されなかった（図１Ｃ）。
【０２１２】
開始時血糖およびＩＡＡ陽性性はＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療についての治療の成功を予測する
Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療についての治療の成功に対してマウスの年齢または性別の影響は観察されなかった。しかしながら、治療の開始時の血糖濃度は成功を予測し、開始時血糖が３５０ｍｇ／ｄｌより高いマウス（ｎ＝１３）での３８％と比べて、３５０ｍｇ／ｄｌより低い血糖で開始したマウスの８２％が治癒された（ｎ＝２２）（図２Ａ）。加えて、加入時のＩＡＡの陽性性は治療の成功と相関しているようであった（図２Ｂ）。興味深いことに、治療開始時に血中グルコース濃度＜３５０ｍｇ／ｄｌかつＩＡＡ陽性のマウスは、血中グルコースレベル＞３５０ｍｇ／ｄｌかつＩＡＡ陰性のマウス（３３％；ｎ＝５；Ｐ＝０．０７）よりも糖尿病寛解率が明確に優れていた（８９％、ｎ＝８）（図２Ｃ）。さらに、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療は、特に治療に対して反応性のマウスにおいて、ＩＡＡレベルを有意に減少させた（図２Ｄ）。
【０２１３】
Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療は調節的な能力を有するより高レベルのＦｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞を誘導するがＴｅｆｆ細胞の変化を誘導しない
介入に対して反応性または非反応性のマウスにおける治療的な免疫効果を分けることによって、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療によって誘導される疾患寛解の基礎となる機序を調べた。末梢血（図３Ａ）、膵臓の灌流リンパ節（図３Ｂ）、および膵臓（図３Ｃ）において観察されたＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$（ＣＤ２５$^{+}$およびＣＤ２５$^{-}$の両方）Ｔ細胞のパーセンテージは、非治療対照と比較してＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療で治療されたマウスにおいて有意に高いことが分かった。興味深いことに、ＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞の増加頻度は、膵臓の灌流リンパ節および膵臓では、ノンレスポンダーよりもレスポンダーにおいて著明でなかったが、末梢血ではそうではなかった。多色フローサイトメトリーを使用して、ほとんどのＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$　ＴｒｅｇはＣＴＬＡ４陽性であること、およびこの阻害性マーカーの発現は非治療対照と比べて治療マウスの膵臓の灌流リンパ節（レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方）および膵臓（レスポンダーのみ）において有意に高いことを特定した（図８Ｂおよび図８Ｃ）。興味深いこ

とに、非治療対照と比べて治療マウスの末梢血ではＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$ＣＴＬＡ４$^{+}$Ｔ細胞のパーセンテージの差異は観察されなかった（図３Ｄ）。ナイーブ（ＣＤ４４$^{-}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$）、エフェクターメモリー（ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{-}$ＣＣＲ７$^{-}$）およびセントラルメモリー（ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＣＲ７$^{+}$）ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞のパーセンテージは、治療の成功または失敗に関していずれのレシピエント群においても変化しなかった。Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療のレスポンダーおよびノンレスポンダーからの脾臓細胞の移入は、非治療の新規発症糖尿病対照から単離された脾臓細胞の移入と類似の疾患動態を伴う糖尿病をＮＯＤ－ｓｃｉｄレシピエントにおいて引き起こし、これは、循環性の糖尿病誘発細胞が治療マウスから枯渇されなかったことを示唆する（図９）。

【０２１４】

Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療によって誘導された糖尿病の後退は機能的なＦｏｘｐ３$^{+}$　Ｔｒｅｇの生成を伴いかつそれに依存する

Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療によって治療されたＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ｈＣＤ２マウスを使用して、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの機能的な研究のためのＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞を単離することができ、該研究において、該細胞は病原性ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$　Ｔｅｆｆ細胞の増殖、ＣＤ６９活性化およびＩＦＮ－γ産生を抑制した。これらのＴｒｅｇは、ＮＯＤ－ｓｃｉｄ　γｃ　－／－　マウスから単離された脾臓抗原提示細胞（ＡＰＣ）の存在下で抗ＣＤ３抗体と共培養して刺激された時に、ＩＬ－１０（およびＴＧＦ－β）を産生した（図４）。治療レスポンダーとノンレスポンダーとの間でＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞の調節能力において差異は見られなかった。

【０２１５】

抗ＣＴＬＡ４　Ｉｇ（クローンＵＣ１０－４Ｆ１０）またはＴＧＦ－β中和抗体（クローン１Ｄ１１．１６．８）の追加は、ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞による抑制を有意に低減させ（図５Ａ）、治癒マウスのＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔｒｅｇはｉｎ　ｖｉｔｒｏでＣＴＬＡ４およびＴＧＦ－β依存的にＴｅｆｆ増殖を阻害することを示唆する。抗ＩＬ１０（クローンＪＥＳ５－２Ａ５）の追加は、Ｔｒｅｇの直接的な抑制効果を変化させなかった。他方、これらの調節的な機序は、治療レスポンダーおよびノンレスポンダーからのＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞画分では実証されなかった（図５Ｂ）。抗ＣＴＬＡ４　Ｉｇ（クローンＵＣ１０－４Ｆ１０）と抗ＴＧＦ－β（クローン１Ｄ１１．１６．８）との組合せを用いたｉｎ　ｖｉｖｏでの安定的に治癒されたマウスの処置は、５匹のうち２匹のマウスにおいて糖尿病の再発に繋がった（図５Ｃ）。

【０２１６】

最後に、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療についての治療の成功がＦｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞の存在および機能性に依存するかどうかを調べた。このために、新規発症糖尿病ＮＯＤマウスを１４日の期間にわたってＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療およびＦＯＸＰ３阻害ペプチドＰ６０で同時に処置した（図６Ａ）。興味深いことに、マウス（ｎ＝６）のいずれも正常血糖とならなかった一方で、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療および賦形剤で処置したマウス（ｎ＝１１）は糖尿病寛解率が６０％であった。これは、Ｔｒｅｇが治療誘導性の寛容の誘導にとって決定的に重要であることを指し示す（図６Ｂ）。

【０２１７】

新規発症（自然発生）糖尿病ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウスをＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療で処置し、安定な糖尿病の後退が観察された後、図７Ａに描写したスキームに記載された通りにＤＴを使用してＦｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞を除去した。最初に、非処理のＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウスにおいて、最初のＤＴ注射後３日以内に末梢血において、選択されたＤＴレジメンは９０％を超えるＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞を除去し、残りのＴｒｅｇはＣＤ２５の発現が低いかまたは発現しないことを確立した（図１０Ａ～Ｃ）。これらの細胞の進行性の再増殖は、いくつものＦｏｘｐ３．ＤＴＲ株につ

いて報告された通り、最初のＤＴ注射後５日目から始まった。例えば、Kim J.M. et al., Nat. Immunol. 2007, 8:191-197; Suffner J. et al., J. Immunol. 2010, 184:1810-1820、およびMayer C.T. et al., Immun. Inflamm. Dis. 2014, 2:162-165を参照。このＤＴレジメンはまた、膵臓中に存在するＦｏｘｐ３$^+$　Ｔ細胞の量を劇的に減少させ、結果的に自己免疫糖尿病の発症に繋がった（図１０Ｂおよび図１０Ｄ）。次に、野生型ＮＯＤマウスと同等に、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療は、ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウスの５７％（７匹のうち４匹のマウス）において自己免疫糖尿病の寛解を誘導した（図７Ａおよび図７Ｂ）。一過性のＦｏｘｐ３$^+$　Ｔ細胞枯渇は、最初のＤＴ注射後２日目に始まる重篤な高血糖症と共に糖尿の再出現によって実証される通り、治療によって最初に治癒された全てのマウス（ｎ＝４）において糖尿病状態への完全な後退を結果としてもたらした（図７Ｂ）。インスリン産生性ベータ細胞に対する免疫寛容のこの破棄は、重篤な膵島炎の誘導（図７Ｃ）および膵島内Ｆｏｘｐ３$^+$　Ｔｒｅｇプールの除去も伴った（図７Ｄ）。合わせると、これらのデータは、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの介入からの治療効果はＦｏｘｐ３$^+$　Ｔｒｅｇの存在および機能性に依存することを実証した。

【０２１８】

考察

疾患を阻む介入の手段としての経口寛容は、Ｔ１Ｄを含む自己免疫疾患の動物モデルにおいて調べられている。例えば、Commins SP, Pediatr. Clin. North. Am. 2015; 62:1523-1529を参照。

【０２１９】

この実施例では、染色体に組み込まれたヒトＰＩＮＳおよびヒトＩＬ－１０を分泌する経口の臨床グレードの自制型Ｌ．ラクチス（L. lactis）株を調製した。短期間の治療用量未満の抗ＣＤ３と組み合わせた場合、介入は新規発症糖尿病マウスにおいて安全かつ長期間の正常血糖の誘導に効果的であった。疾患発症時のＩＡＡ陽性性に加えて初期血中グルコース濃度（＜３５０ｍｇ／ｄｌ）は治療転帰の予測因子であった一方で、残留ベータ細胞機能の保存およびＩＡＡ陽性性の低下は治療の成功のマーカーであった。

【０２２０】

したがって、糖尿病診断時に介入する場合、すなわち血糖代謝異常が存在する場合、ある程度の残留ベータ細胞量が治療の成功のために必要であろう。

【０２２１】

治療に対して反応性または非反応性のマウスにおけるＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの介入の免疫効果を分けることによって、治療に付随する免疫プロセスの性質および役割をさらに特徴付けた。Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療は、レスポンダーおよびそれにも増してノンレスポンダーの膵臓の灌流リンパ節および膵臓において抑制性ＩＬ－１０分泌ＣＤ４$^+$Ｆｏｘｐ３$^+$（ＣＤ２５$^+$およびＣＤ２５$^-$の両方）Ｔ細胞を誘導し、炎症を起こした標的組織へのＴｒｅｇの誘引の増進を示唆した。末梢でも、ＣＤ４$^+$Ｆｏｘｐ３$^+$　Ｔ細胞の頻度が非治療対照と比べて治療マウスで増加し、免疫マーカーとしてのこの細胞集団の使用が可能であることを示唆する。興味深いことに、様々なＴｒｅｇ部分集団の間のＣＴＬＡ４$^+$　Ｔ細胞の頻度は、新規発症糖尿病マウスと比べて、そして併用療法で治療されたノンレスポンダーマウスとは対照的に、併用療法で治療されたレスポンダーマウスの膵臓で有意に高かった。レスポンダーマウスとノンレスポンダーマウスとの間で膵島炎の程度に差異は見られず、Ｔｒｅｇ以外のリンパ球部分集団における変化を示唆した。

【０２２２】

末梢Ｔｒｅｇは、環境的状況および刺激条件にしたがって異なる調節機構を使用することができる。例えば、Liston A. et al., Nature Reviews Immunology 2014; 14:154-165を参照。これらの実験では、治療増幅性のＣＤ４$^+$ＣＤ２５$^+$Ｆｏｘｐ３$^+$　Ｔ細胞の調節活性にとってｉｎ　ｖｉｔｒｏおよび部分的にｉｎ　ｖｉｖｏでＣＴＬＡ４およびＴＧＦ－βが重要であったが、ＩＬ－１０は重要ではなかった。

【０２２３】
ＩＬ－１０は本発明者らのＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療誘導性Ｔｒｅｇの同定のための良好なマーカーであるようであったが、抗ＩＬ－１０抗体は確立された寛容をｉｎ　ｖｉｖｏで妨げなかったことを他の者が実証している。例えば、Fowler S. and Powrie F, European Journal of Immunology 2002, 32:2997-3006を参照。
【０２２４】
マウスと同様、ヒトＴｒｅｇは、転写因子Ｆｏｘｐ３の持続的な高発現を伴う抑制性の表現型を有することによって定義され（例えば、Hori S. et al., Science 2003; 299:1057-1061を参照）、Ｆｏｘｐ３遺伝子の機能喪失／変異は、重篤な致死性の自己免疫障害に繋がる（例えば、Kim J.M., et al., Nature Immunology 2007; 8:191-197、およびMayer C.T. et al., European Journal of Immunology 2014, 44:2990-3002を参照）。
【０２２５】
Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療開始時のＰ６０ペプチドによるＴｒｅｇ機能の特異的阻害（例えば、Casares N. et al., Journal of Immunology 2010; 185:5150-5159を参照）は、治療誘導性の寛容の誘導を損なった。さらに、治療寛容化ＮＯＤ．Ｆｏｘｐ３．ＤＴＲマウスからのＦｏｘｐ３$^{+}$　Ｔｒｅｇの一過性の枯渇は、全ての動物において完全な疾患再発を誘導するために充分であり、これは、治療的な寛容を維持し、かつＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療に反応性のマウス中にまだ存在する病原性Ｔｅｆｆ細胞を制御するために、Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞の存在が重要であることを実証した。
【０２２６】
本データは、低用量の抗ＣＤ３とのヒトＰＩＮＳおよびヒトＩＬ－１０を分泌する臨床グレードの自制型Ｌ．ラクチス（L. lactis）の組合せは、抗ＣＤ３単剤療法と比べて糖尿病の後退頻度を増加させたことを実証する。治療レスポンダーおよびノンレスポンダーの両方は、ＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞の頻度を増加させ、これは、Ｌ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療によって誘導された免疫効果が各個体レシピエントにおいて起こったが、治療の成功（安定な正常血糖に戻ることとして定義される）は、疾患発症時にまだ存在する機能的なベータ細胞量などの、他のパラメーターに依存することを示唆した。治療の成功は、開始時血糖とさらに関係した。加入時の初期血中グルコース濃度の次に、ＩＡＡレベルも抗原としてＰＩＮＳを使用するこのＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療の転帰を予測した。本データは、活性の寛容を誘導および維持し、かつ寛容化マウスにおいて糖尿病誘発性の免疫反応を制御するためにＦｏｘｐ３$^{+}$　Ｔｒｅｇが必須であったことを実証する。これらの発見は、ヒトにおける介入を試験するためのツール：膵島抗原を分泌する臨床グレードの自制型Ｌ．ラクチス（L. lactis）、治療の成功を予測するためのバイオマーカー、およびＦｏｘｐ３$^{+}$　Ｔ細胞の誘導がＬ．ラクチス（L. lactis）ベースの治療の基礎となることの実証を提供する。
【０２２７】
一部の実施形態を本明細書に示して記載したが、そのような実施形態は単に例として与えるものである。本発明から離れることなく、多数の変形、変更、および置換が当業者に想起されるであろう。本明細書に記載される発明の実施形態に対して様々な代替手段が本発明の実施において用いられることが理解されるべきである。
【０２２８】
例示的な実施形態
１．インターロイキン－１０（ＩＬ－１０）をコードする外因性核酸、およびプロインスリン（ＰＩＮＳ）をコードする外因性核酸を含み、ＩＬ－１０をコードする前記外因性核酸およびＰＩＮＳをコードする前記外因性核酸が、染色体に組み込まれている、乳酸菌（ＬＡＢ）。
２．ラクトコッカス（Lactococcus）種の細菌である、実施形態１のＬＡＢ。
３．ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）である、実施形態２のＬＡＢ。
４．ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）亜種クレモリス（cremoris）である、実施形態３のＬＡＢ。

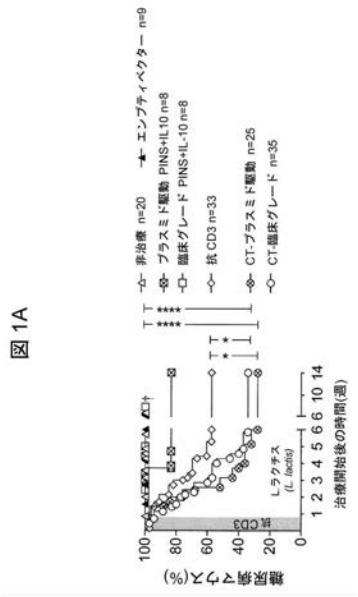
５．ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）株ＭＧ１３６３である、実施形態４のＬＡＢ。
６．前記ＩＬ－１０が、ヒトＩＬ－１０（ｈＩＬ－１０）である、実施形態１～５のいずれか１つのＬＡＢ。
７．前記ｈＩＬ－１０が、シグナルペプチドを含まない成熟ｈＩＬ－１０として分泌された時に、２位においてプロリン（Ｐｒｏ）の代わりにアラニン（Ａｌａ）を含む、実施形態６のＬＡＢ。
８．前記ＩＬ－１０が、配列番号１に対して少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を有する、実施形態１～７のいずれか１つのＬＡＢ。
９．ＩＬ－１０をコードする前記外因性核酸が、配列番号２に対して少なくとも９５％同一のヌクレオチド配列を有する、実施形態１～８のいずれか１つのＬＡＢ。
１０．前記ＰＩＮＳが、ヒトＰＩＮＳ（ｈＰＩＮＳ）である、先行する実施形態のいずれか１つのＬＡＢ。
１１．前記ＰＩＮＳが、配列番号３に対して少なくとも９５％同一のアミノ酸配列を有する、先行する実施形態のいずれか１つのＬＡＢ。
１２．ＰＩＮＳをコードする前記外因性核酸が、配列番号４に対して少なくとも９５％同一のヌクレオチド配列を有する、先行する実施形態のいずれか１つのＬＡＢ。
１３．前記ＩＬ－１０を構成的に発現する、先行する実施形態のいずれか１つのＬＡＢ。
１４．前記ＩＬ－１０を分泌する、実施形態１３のＬＡＢ。
１５．前記ＰＩＮＳを構成的に発現する、先行する実施形態のいずれか１つのＬＡＢ。
１６．前記ＰＩＮＳを分泌する、実施形態１５のＬＡＢ。
１７．前記ＩＬ－１０および前記ＰＩＮＳを構成的に発現しかつ分泌する、先行する実施形態のいずれか１つのＬＡＢ。
１８．ＩＬ－１０をコードする前記外因性核酸が、ｈｌｌＡプロモーター（ＰｈｌｌＡ）の３’に位置する、先行する実施形態のいずれか１つのＬＡＢ。
１９．前記ＰｈｌｌＡが、ラクトコッカス・ラクチス（Lactococcus lactis）のＰｈｌｌＡである、実施形態１８のＬＡＢ。
２０．ＩＬ－１０をコードする前記外因性核酸が、前記ＰｈｌｌＡによって転写調節される、実施形態１８のＬＡＢ。
２１．ｈｌｌＡプロモーター、ＩＬ－１０分泌配列、およびＩＬ－１０をコードする前記外因性核酸を含む発現カセットを含む、先行する実施形態のいずれか１つのＬＡＢ。
２２．前記発現カセットが、染色体に組み込まれている、実施形態２１のＬＡＢ。
２３．前記発現カセットが、ｔｈｙＡ遺伝子座において染色体に組み込まれている、実施形態２２のＬＡＢ。
２４．前記ＩＬ－１０分泌配列が、未同定分泌４５ｋＤａタンパク質（Ｕｓｐ４５）の分泌リーダー（ＳＳｕｓｐ４５）をコードするヌクレオチド配列である、実施形態２１～２３のいずれか１つのＬＡＢ。
２５．ＰＩＮＳをコードする前記外因性核酸が、ｇａｐＢプロモーターの３’に位置する、先行する実施形態のいずれか１つのＬＡＢ。
２６．ＰＩＮＳをコードする前記外因性核酸が、前記ｇａｐＢプロモーターによって転写調節される、実施形態２５のＬＡＢ。
２７．ｇａｐＢ遺伝子の５’に位置するｇａｐＢプロモーター、ＰＩＮＳ分泌配列、およびＰＩＮＳをコードする前記外因性核酸を含む第１のポリシストロン性発現カセットを含む、実施形態２５または２６のＬＡＢ。
２８．前記ｇａｐＢ遺伝子と前記ＰＩＮＳ分泌配列との間の遺伝子間領域をさらに含む、実施形態２７のＬＡＢ。
２９．前記遺伝子間領域が、配列番号８または配列番号９を有するｒｐｍＤである、実施形態２８のＬＡＢ。
３０．前記ｇａｐＢプロモーターおよび前記ｇａｐＢ遺伝子が、前記ＬＡＢに対して内因性である、実施形態２７～２９のいずれか１つのＬＡＢ。

３１．前記第１のポリシストロン性発現カセットが、染色体に組み込まれている、実施形態２７～３０のいずれか１つのＬＡＢ。
３２．前記ＰＩＮＳ分泌配列が、ＳＳｕｓｐ４５をコードするヌクレオチド配列である、実施形態２７～３１のいずれか１つのＬＡＢ。
３３．前記ＳＳｕｓｐ４５が、配列番号１１または配列番号１２のヌクレオチド配列を有する、実施形態３２のＬＡＢ。
３４．トレハロース－６－リン酸ホスファターゼをコードする外因性核酸をさらに含む、先行する実施形態のいずれか１つのＬＡＢ。
３５．前記トレハロース－６－リン酸ホスファターゼが、大腸菌（Escherichia coli）ＯｔｓＢである、実施形態３４のＬＡＢ。
３６．トレハロース－６－リン酸ホスファターゼをコードする前記外因性核酸が、染色体に組み込まれている、実施形態３４または３５のＬＡＢ。
３７．トレハロース－６－リン酸ホスファターゼをコードする前記外因性核酸が、未同定分泌４５ｋＤａタンパク質遺伝子（ｕｓｐ４５）の３’において染色体に組み込まれている、実施形態３６のＬＡＢ。
３８．ｕｓｐ４５プロモーター、前記ｕｓｐ４５、およびトレハロース－６－リン酸ホスファターゼをコードする前記外因性核酸を含む第２のポリシストロン性発現カセットを含む、実施形態３７のＬＡＢ。
３９．前記第２のポリシストロン性発現カセットが、前記ｕｓｐ４５とトレハロース－６－リン酸ホスファターゼをコードする前記外因性核酸との間の遺伝子間領域をさらに含む、実施形態３８のＬＡＢ。
４０．前記遺伝子間領域が、配列番号８または配列番号９を有するｒｐｍＤである、実施形態３９のＬＡＢ。
４１．トレハロース－６－リン酸ホスホリラーゼ遺伝子（ｔｒｅＰＰ）が、前記ＬＡＢにおいて破壊または不活性化されている、先行する実施形態のいずれか１つのＬＡＢ。
４２．前記ｔｒｅＰＰが、前記ｔｒｅＰＰまたはその断片を除去することによって不活性化されている、実施形態４１のＬＡＢ。
４３．前記ｔｒｅＰＰが、終止コドンの挿入によって破壊されている、実施形態４１のＬＡＢ。
４４．ｔｒｅＰＰ活性を欠いている、実施形態４１～４３のいずれか１つのＬＡＢ。
４５．セロビオース特異的ＰＴＳ系ＩＩＣコンポーネント遺伝子（ｐｔｃＣ）が、前記ＬＡＢにおいて破壊または不活性化されている、先行する実施形態のいずれか１つのＬＡＢ。
４６．前記ｐｔｃＣが、終止コドンを挿入することによって破壊されている、実施形態４５のＬＡＢ。
４７．前記ｐｔｃＣが、前記ｐｔｃＣまたはその断片を除去することによって不活性化されている、実施形態４５のＬＡＢ。
４８．ｐｔｃＣ活性を欠いている、実施形態４５～４７のいずれか１つのＬＡＢ。
４９．１つまたは複数のトレハローストランスポーターをコードする１つまたは複数の遺伝子をさらに含む、先行する実施形態のいずれかのＬＡＢ。
５０．１つまたは複数のトレハローストランスポーターをコードする前記１つまたは複数の遺伝子が、前記ＬＡＢに対して内因性である、実施形態４９のＬＡＢ。
５１．前記１つまたは複数のトレハローストランスポーターを過剰発現する、実施形態４９または５０のＬＡＢ。
５２．１つまたは複数のトレハローストランスポーターをコードする前記１つまたは複数の遺伝子が、ｈｌｌＡプロモーター（ＰｈｌｌＡ）の３’に位置する、実施形態４９～５１のいずれか１つに記載のＬＡＢ。
５３．１つまたは複数のトレハローストランスポーターをコードする前記１つまたは複数の遺伝子が、前記ＰｈｌｌＡによって転写調節される、実施形態５２のＬＡＢ。
５４．１つまたは複数のトレハローストランスポーターをコードする前記１つまたは複数

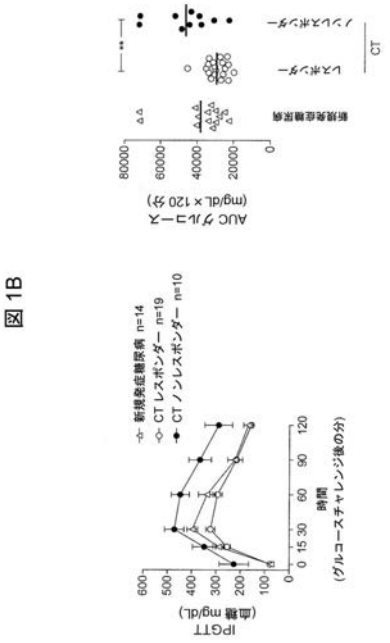
の遺伝子が、ｌｌｍｇ＿０４５３、ｌｌｍｇ＿０４５４、および任意のこれらの組合せからなる群から選択される、実施形態４７～５１のいずれか１つのＬＡＢ。
５５．１つまたは複数のトレハローストランスポーターをコードする前記１つまたは複数の遺伝子が、２つのトレハローストランスポーターをコードする２つの遺伝子を含み、遺伝子間領域が、前記２つの遺伝子の間に位置する、実施形態５４のＬＡＢ。
５６．前記遺伝子間領域が、配列番号８または配列番号９を有するｒｐｍＤである、実施形態５５のＬＡＢ。
５７．先行する実施形態のいずれか１つのＬＡＢを含む組成物。
５８．実施形態１～５６のいずれか１つのＬＡＢ、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。
５９．１型糖尿病（Ｔ１Ｄ）の治療において使用するための、実施形態１～５６のいずれか１つのＬＡＢ、実施形態５７の組成物、または実施形態５８の医薬組成物。
６０．Ｔ１Ｄの治療用の医薬の調製において使用するための、実施形態１～５６のいずれか１つのＬＡＢ、実施形態５７の組成物、または実施形態５８の医薬組成物。
６１．前記Ｔ１Ｄが、発症直後のＴ１Ｄである、実施形態６０のＬＡＢ、組成物、または医薬組成物。
６２．それを必要とする対象においてＴ１Ｄを治療する方法であって、治療有効量の実施形態１～５６のいずれか１つのＬＡＢ、実施形態５７の組成物、または実施形態５８の医薬組成物を前記対象に投与することを含む方法。
６３．前記Ｔ１Ｄが、発症直後のＴ１Ｄである、実施形態６２の方法。
６４．前記対象が、ヒトである、実施形態６２または６３の方法。
６５．治療有効量の抗ＣＤ３抗体を前記対象に投与することをさらに含む、実施形態６２～６４のいずれか１つの方法。
６６．前記抗ＣＤ３抗体が、モノクローナル抗体である、実施形態６５の方法。
６７．前記抗ＣＤ３抗体が、オテリキシズマブまたはテプリズマブである、実施形態６５または６６の方法。
６８．前記抗体が、併用療法レジメンを使用して前記対象に投与される、実施形態６５～６７のいずれか１つの方法。
６９．前記ＬＡＢを前記投与することおよび前記抗ＣＤ３抗体を前記投与することが、
（ｉ）抗ＣＤ３抗体単独で治療された対応する対象と比べた時に、または前記ＬＡＢおよび前記抗ＣＤ３抗体を投与されていない対応する対象と比べた時に、正常血中グルコースレベルを維持するために前記対象が必要とするインスリンの量を低減させ、
（ｉｉ）Ｃペプチドレベルによる測定で、少なくとも約２カ月にわたって前記対象において初期ベータ細胞機能を保存し、
（ｉｉｉ）少なくとも約２カ月にわたって対象において正常血糖を維持し、
（ｉｖ）少なくとも約２カ月にわたって前記対象において正常ヘモグロビンＡ１ｃ（ＨｂＡ１ｃ）レベルを維持し、または
（ｖ）任意のこれらの組合せである、
実施形態６５～６８のいずれか１つの方法。
７０．前記対象におけるインスリン自己抗体（ＩＡＡ）を測定することをさらに含む、実施形態６２～６９のいずれか１つの方法。
７１．（ｉ）ＬＡＢを、ＩＬ－１０をコードする外因性核酸と接触させること、および（ｉｉ）前記ＬＡＢを、ＰＩＮＳをコードする外因性核酸と接触させることを含み、ＩＬ－１０をコードする前記外因性核酸、およびＰＩＮＳをコードする前記外因性核酸が、染色体に組み込まれる、遺伝子改変されたＬＡＢを調製する方法。
７２．ＩＬ－１０をコードする前記外因性核酸およびＰＩＮＳをコードする前記外因性核酸が、相同組換えを使用して染色体に組み込まれる、実施形態７１の方法。
７３．前記ＬＡＢを、ＩＬ－１０をコードする外因性核酸と前記接触させることが、前記ＬＡＢを、ＰＩＮＳをコードする外因性核酸と前記接触させることの前に行われる、実施形態７１または７２の方法。

７４．前記ＬＡＢを、ＩＬ－１０をコードする外因性核酸と前記接触させることが、前記ＬＡＢを、ＰＩＮＳをコードする外因性核酸と前記接触させることの後に行われる、実施形態７１または７２の方法。
７５．前記遺伝子改変されたＬＡＢの培養物を少なくとも１つの安定化剤と合わせて細菌混合物を形成することをさらに含む、実施形態７１～７４のいずれか１つの方法。
７６．前記細菌混合物から水を除去して乾燥組成物を形成することをさらに含む、実施形態７５の方法。
７７．前記細菌混合物を凍結乾燥して凍結乾燥組成物を形成することを含む、実施形態７６の方法。
７８．前記少なくとも１つの安定化剤が、少なくとも１つの凍結保存剤を含む、実施形態７７の方法。
７９．前記遺伝子改変されたＬＡＢ、前記乾燥組成物、または前記凍結乾燥組成物を薬学的に許容される担体と合わせて医薬組成物を形成することをさらに含む、実施形態７１～７８のいずれか１つの方法。
８０．前記乾燥組成物、前記凍結乾燥組成物または前記医薬組成物を医薬剤形に配合することをさらに含む、実施形態７６～７９のいずれか１つの方法。
８１．実施形態７１～８０のいずれか１つの方法によって調製された、遺伝子改変された細菌。
８２．実施形態１～５６のいずれか１つのＬＡＢの培養物を少なくとも１つの安定化剤と接触させて細菌混合物を形成することを含む、医薬組成物を調製する方法。
８３．前記細菌混合物から水を除去し、それによって乾燥組成物を形成することをさらに含む、実施形態８２の方法。
８４．前記細菌混合物を凍結乾燥し、それによって凍結乾燥組成物を形成することを含む、実施形態８２または８３の方法。
８５．前記少なくとも１つの安定化剤が、少なくとも１つの凍結保存剤を含む、実施形態８２～８４のいずれか１つの方法。
８６．前記凍結乾燥組成物を薬学的に許容される担体と接触させて医薬組成物を形成することをさらに含む、実施形態８４または８５の方法。
８７．前記凍結乾燥組成物を医薬剤形に配合することをさらに含む、実施形態８４～８６のいずれか１つの方法。
８８．前記医薬剤形が、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、およびサシェ剤からなる群から選択される、実施形態８７の方法。
８９．実施形態１～５６のいずれか１つのＬＡＢ、実施形態５７の組成物、または実施形態５８の医薬組成物を含む単位剤形。
９０．経口剤形である、実施形態８９の単位剤形。
９１．前記経口剤形が、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、およびサシェ剤からなる群から選択される、実施形態９０の単位剤形。
９２．約1×10^{6}～約1×10^{12}コロニー形成単位（ｃｆｕ）の前記ＬＡＢを含む、実施形態８９～９１のいずれか１つの単位剤形。
９３．約1×10^{8}～約1×10^{11}ｃｆｕを含む、実施形態９２の単位剤形。
９４．（１）実施形態１～５６のいずれか１つに記載のＬＡＢ、実施形態５７に記載の組成物、実施形態５８の医薬組成物、または実施形態８９～９３のいずれか１つの単位剤形、および（２）前記ＬＡＢ、前記組成物、前記医薬組成物、または前記単位剤形を哺乳動物に投与するための説明書を含むキット。
９５．前記哺乳動物が、ヒトである、実施形態９４のキット。
９６．実施形態１～５６のいずれか１つのＬＡＢ、溶媒、および安定化剤を含む細菌懸濁液。
９７．前記溶媒が、水、油、および任意のこれらの組合せから選択される、実施形態９６の細菌懸濁液。

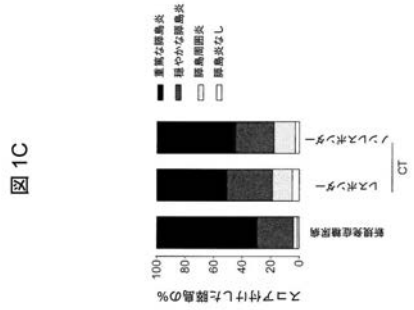
【図１Ａ】



【図１Ｂ】



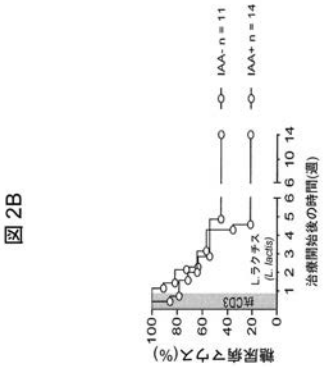
【図１Ｃ】



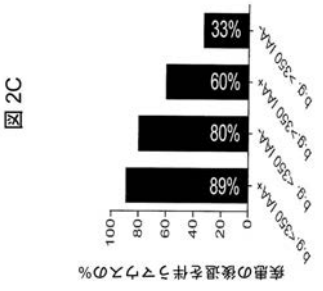
【図２Ａ】



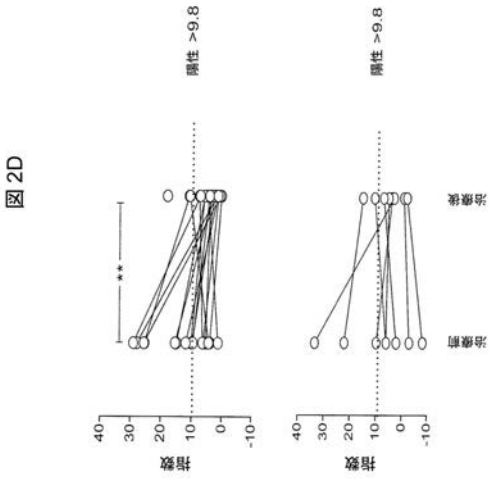
【図２Ｂ】



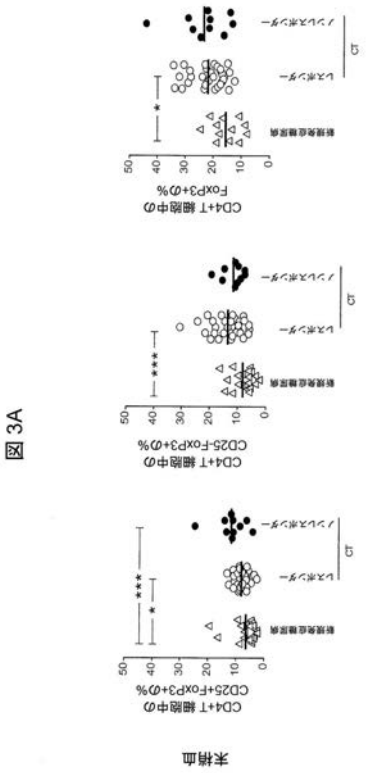
【図２Ｃ】



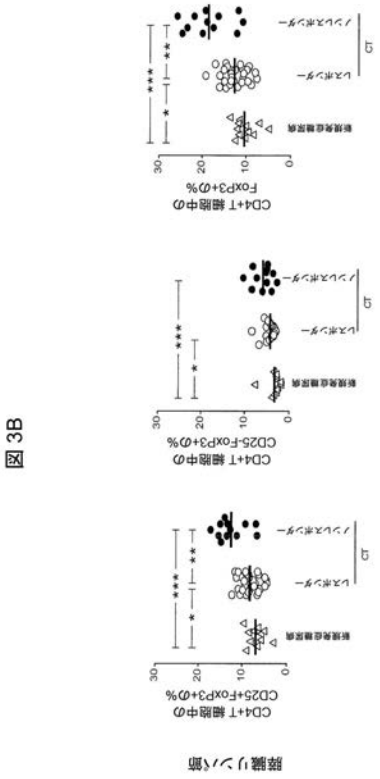
【図２Ｄ】



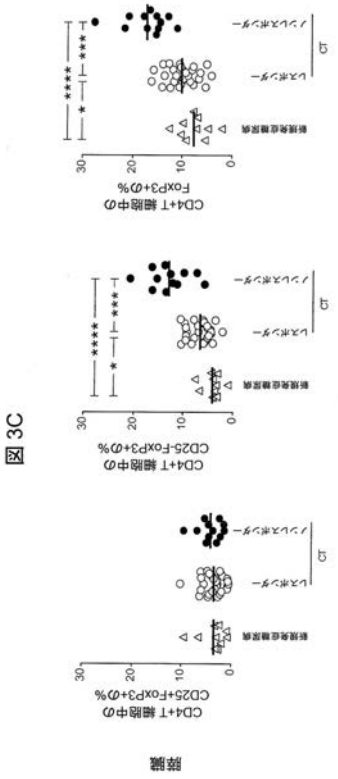
【図３Ａ】



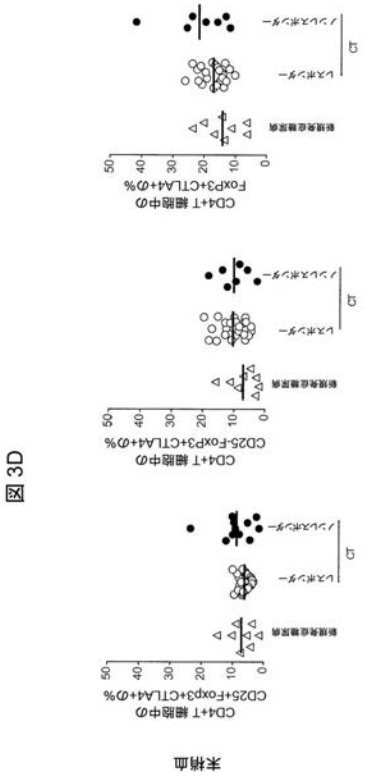
【図３Ｂ】



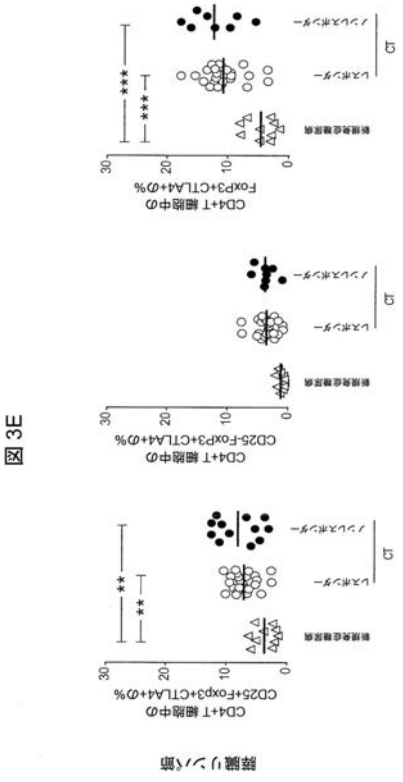
【図３Ｃ】



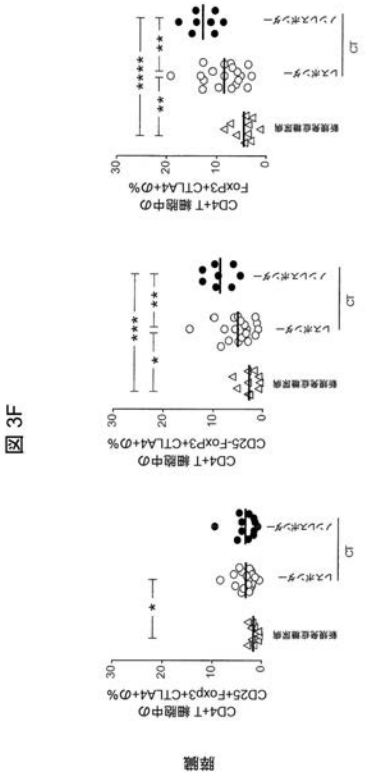
【図３Ｄ】



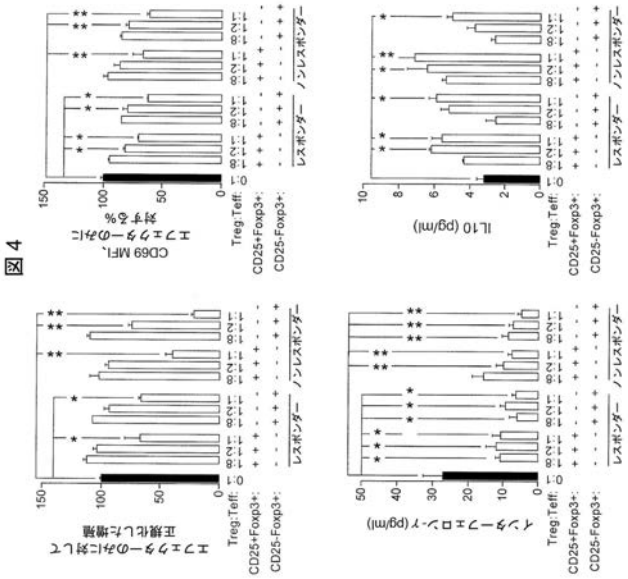
【図３Ｅ】



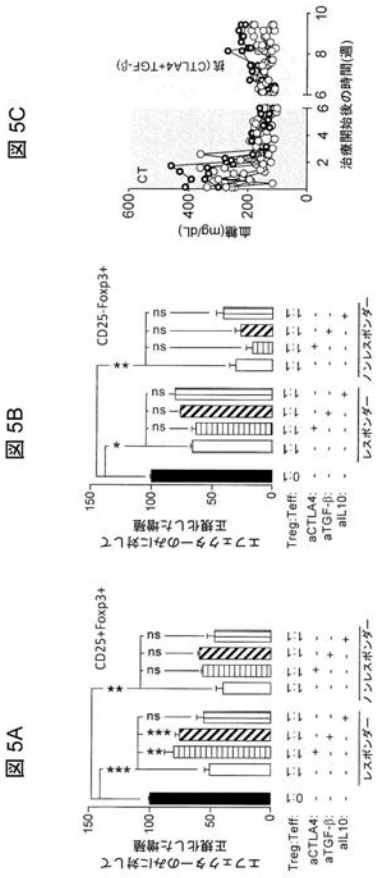
【図３Ｆ】



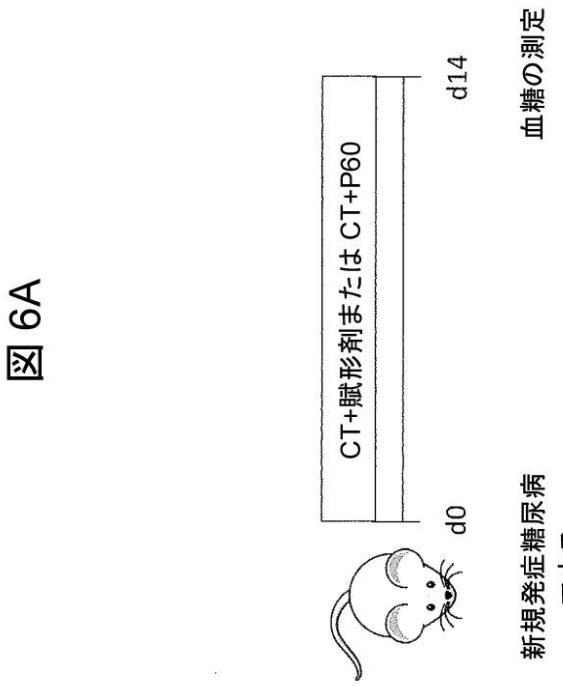
【図４】



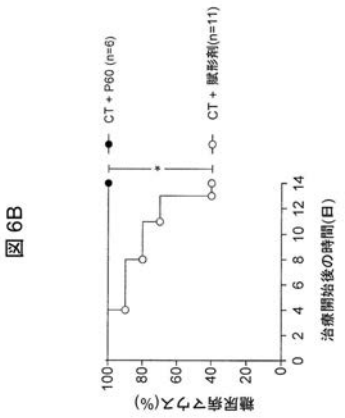
【図５】



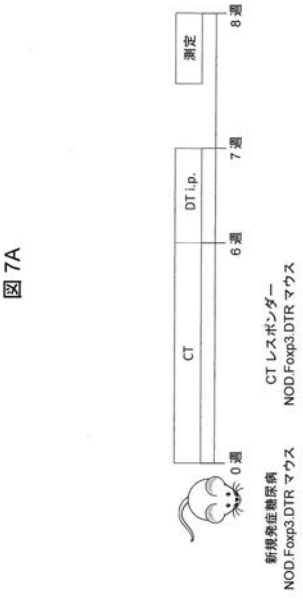
【図６Ａ】



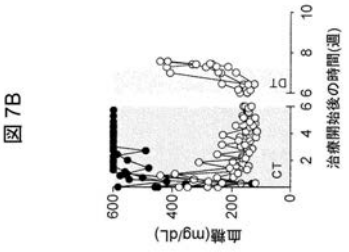
【図６Ｂ】



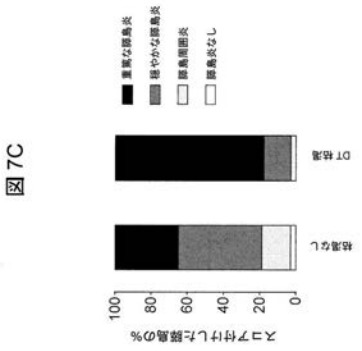
【図７Ａ】



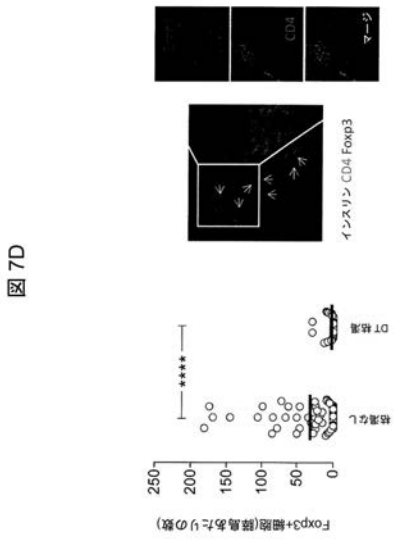
【図７Ｂ】



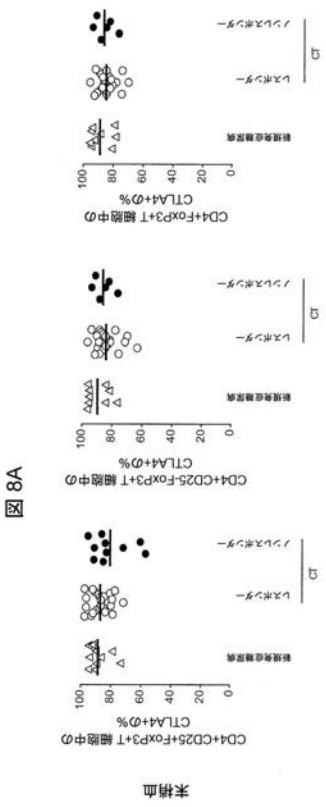
【図７Ｃ】



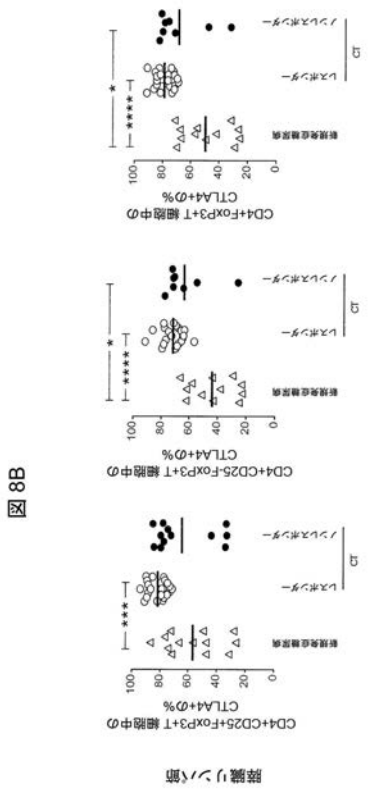
【図７Ｄ】



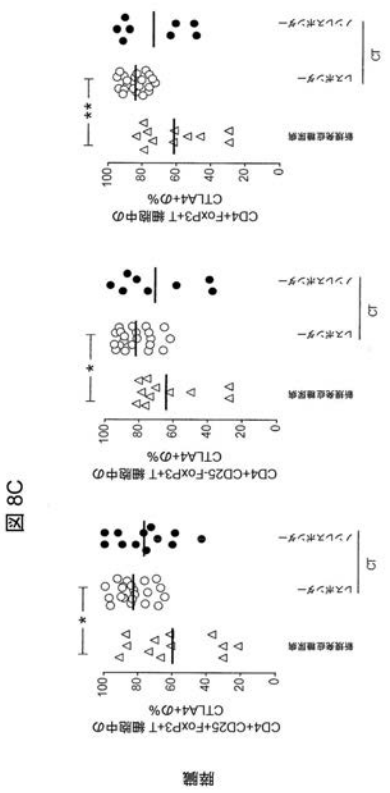
【図８Ａ】



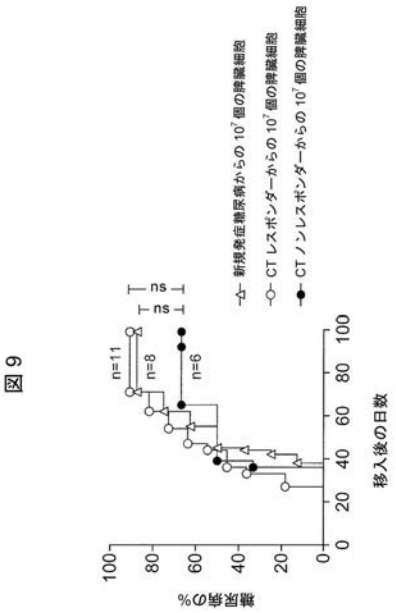
【図８Ｂ】



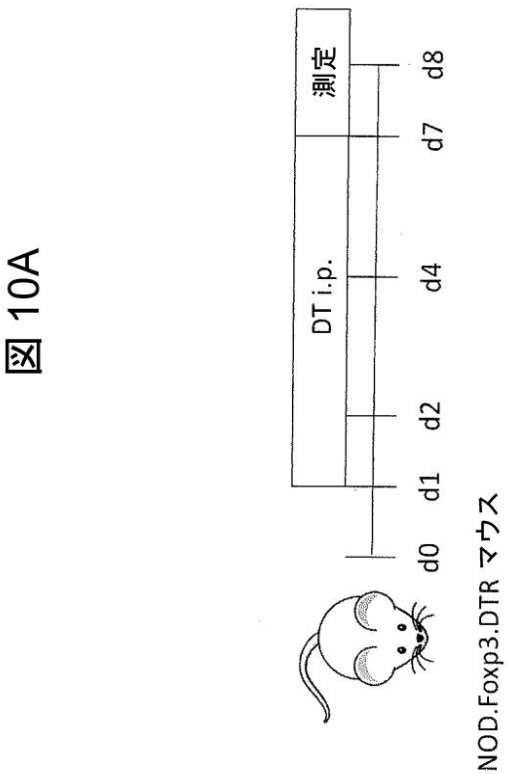
【図８Ｃ】



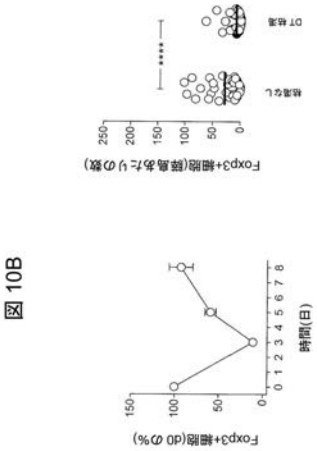
【図９】



【図１０Ａ】

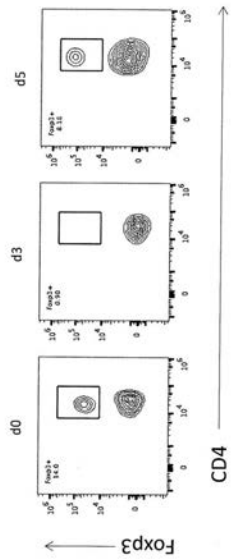


【図１０Ｂ】



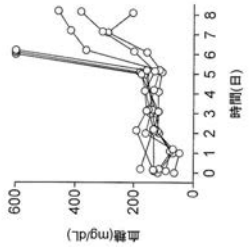
【図１０Ｃ】

図 10C



【図１０Ｄ】

図 10D



【図１１】

図 11

```
1   aaaacgcctt aaaatggcat tttgacttgc aaactgggct aagatttgct aaaatgaaaa
    >>.............................PhllA.............................>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【図１２Ａ】

図 12a

```
1   aataaaaatt actgacagcc tgctcagtaa ttttttttagt cataattttt aggtggaaag

61  tcaaagatta ttgccaaaag tattagcttt tttaatgtta accgctttca gaagaagggg

121 agttcatttg cttttgtaga gcgctttcta aggtagttta tgtttgcaaa ttttaaaaaa
                                                        PgapB >>.>
                                                                k

181 agtgttaaaa taaaagagta agttaaattg ttaacttagt caatttaaaa ggtttgcctt
    >..............................PgapB..............................>

241 ttataaaatc taatccctat aaggaggaaa ctactaatgg tagttaaagt tggtattaac
    >................PgapB..............>>
                                        >>.........gapB.........>
                                          m  v  v  k  v  g  i  n

301 ggtttcggtc gtatcggtcg tcttgctttc cgtcgtattc aaaatgttga aggtgttgaa
    >..............................gapB..............................>
      g  f  g  r  i  g  r  l  a  f  r  r  i  q  n  v  e  g  v  e

361 gttgttgcaa tcaacgactt gacagatcca gcaatgcttg ctcacttgct taaatacgat
    >..............................gapB..............................>
      v  v  a  i  n  d  l  t  d  p  a  m  l  a  h  l  l  k  y  d

421 acaactcaag gtcgttttga tggtaaagtt gaagttaaag atggtggttt tgaagttaac
    >..............................gapB..............................>
      t  t  q  g  r  f  d  g  k  v  e  v  k  d  g  g  f  e  v  n

481 ggtaaattcg ttaaagttac tgctgaatct aacccagcta acatcaactg ggctgaagtt
    >..............................gapB..............................>
      g  k  f  v  k  v  t  a  e  s  n  p  a  n  i  n  w  a  e  v

541 ggtgcagaaa tcgttcttga agcaactggt ttcttcgcaa ctaaagaaaa agctgaacaa
    >..............................gapB..............................>
      g  a  e  i  v  l  e  a  t  g  f  f  a  t  k  e  k  a  e  q

601 cacttgcacg ctaatggtgc taagaaagtt gttatcactg cacctggtgg atcagatgtt
    >..............................gapB..............................>
      h  l  h  a  n  g  a  k  k  v  v  i  t  a  p  g  g  s  d  v

661 aaaacaatcg ttttcaacac taaccacgaa gtacttgatg gaactgaaac agtaatttca
    >..............................gapB..............................>
      k  t  i  v  f  n  t  n  h  e  v  l  d  g  t  e  t  v  i  s

721 gctggttcat gtacaaccaa ctgtcttgct ccaatggctg atactttgaa caaacaattc
    >..............................gapB..............................>
      a  g  s  c  t  t  n  c  l  a  p  m  a  d  t  l  n  k  q  f

781 ggtatcaaag ttggtacaat gactacagtt cacggttaca ctggtgacca aatgactctt
    >..............................gapB..............................>
      g  i  k  v  g  t  m  t  t  v  h  g  y  t  g  d  q  m  t  l

841 gatggcccac accgtggtgg agatttccgt cgcgcacgtg ctgcagctga aaacatcgta
    >..............................gapB..............................>
      d  g  p  h  r  g  g  d  f  r  r  a  r  a  a  a  e  n  i  v

901 cctaactcaa caggtgctgc taaagccatc ggtcttgtat tgccagaact tcaaggtaaa
    >..............................gapB..............................>
      p  n  s  t  g  a  a  k  a  i  g  l  v  l  p  e  l  q  g  k
```

【図１２Ｂ】

図 12B

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

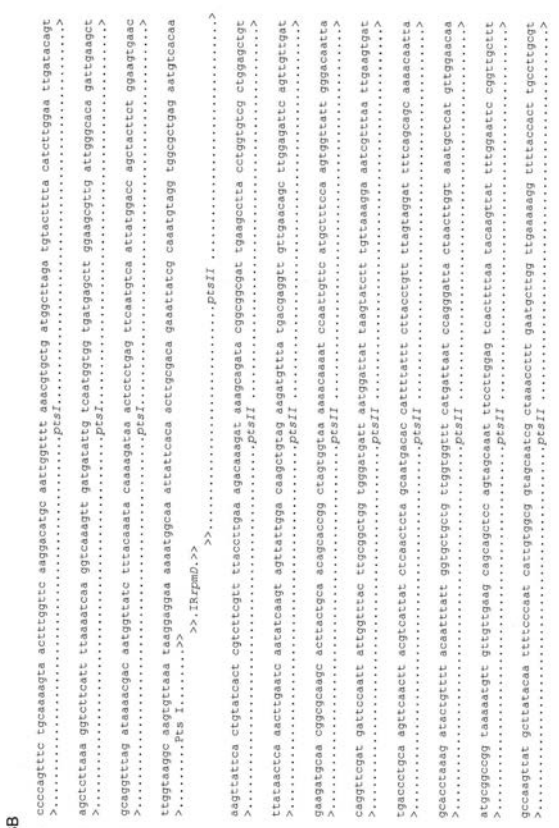
1561 cctgcagaag cgtggcattg tggaacaatg ctgtaccagc atctgctccc tctaccagct
     >..............................pins..............................>
     s  l  q  k  r  g  i  v  e  q  c  c  t  s  i  c  s  l  y  q

1621 ggagaactac tgcaactaat tttccgattt taacggtata aaaaccagtc ttcgggctgg
     >.......pins.....>>
     l  e  n  y  c  n  -
```

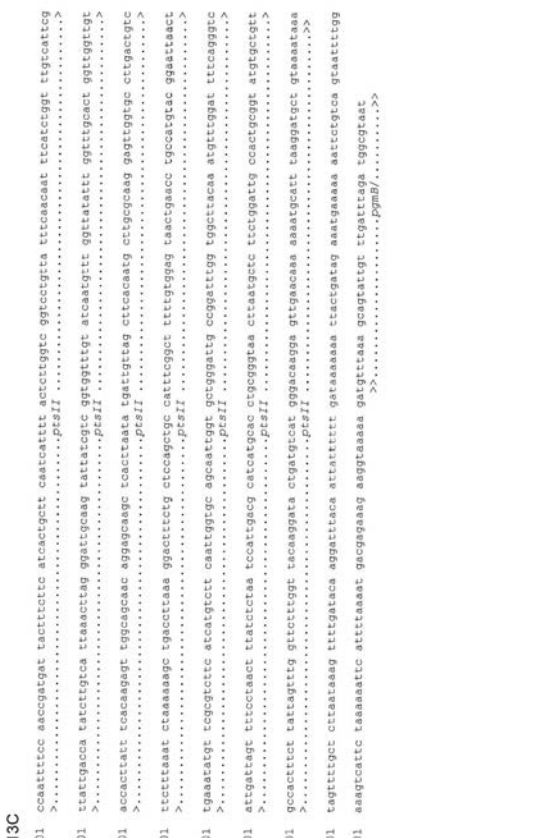
【図１３Ａ】



【図１３Ｂ】



【図１３Ｃ】



【図１４Ａ】



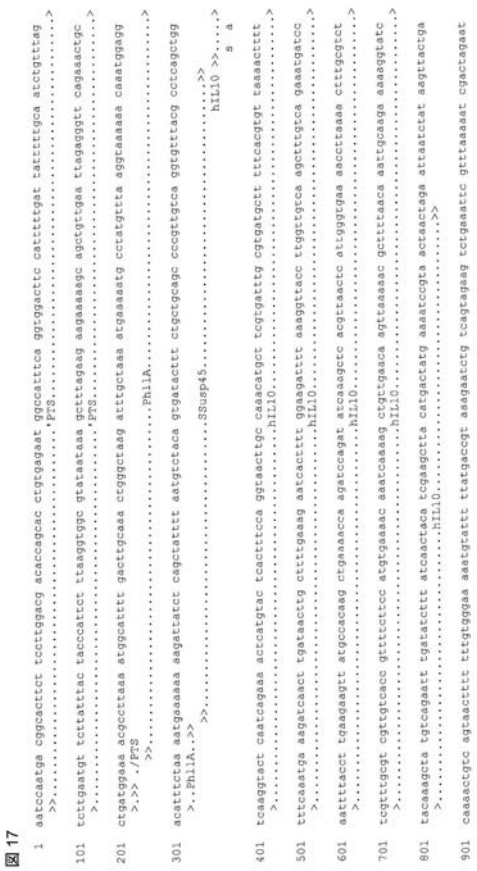
【図１４Ｂ】

【図１５Ａ】

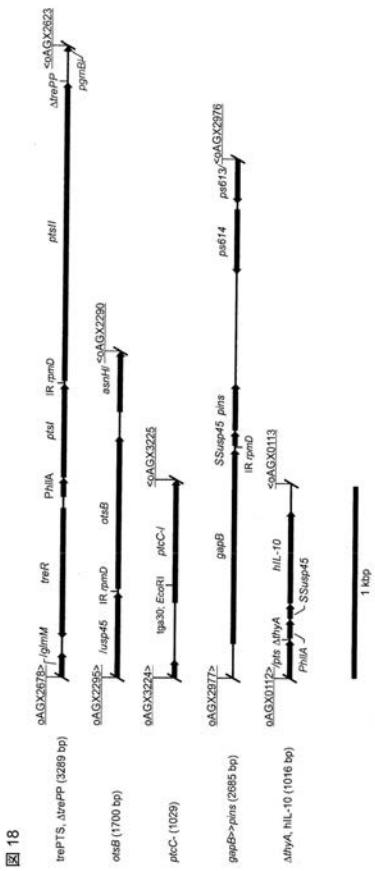
【図１５Ｂ】

【図１６】

【図１７】



【図１８】



【配列表】

2019526262000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2017/055287

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/008 A61K35/744 C12N15/74
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)
A61K C12N

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, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/064607 A2 (SYMBIGENE INC [US]; CHEN WEI [US]; FU XIAOLI [US]; NOURAINI SHERRY [US]) 7 August 2003 (2003-08-07)	1-26
Y	abstract; claims 1,4-9,11,13,20 paragraphs [0106], [0109]	1-26
X	TATIANA TAKIISHI ET AL: "Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified Lactococcus lactis in mice", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 122, no. 5, 1 May 2012 (2012-05-01), pages 1717-1725, XP55308282, US ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI60530	1-26
Y	abstract page 1724, column 2, paragraph Methods	1-26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ 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
5 December 2017	13/12/2017

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	Celler, Jakub

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2017/055287

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03064607 A2	07-08-2003	AU 2003210687 A1	02-09-2003
		AU 2003210689 A1	02-09-2003
		CN 1642579 A	20-07-2005
		CN 1642967 A	20-07-2005
		TW 200400829 A	16-01-2004
		TW 200404564 A	01-04-2004
		TW 200408410 A	01-06-2004
		US 2004043003 A1	04-03-2004
		WO 03063785 A2	07-08-2003
		WO 03064607 A2	07-08-2003

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/62	
C12N	*15/55*	*(2006.01)*	C12N	15/55	
A61K	*38/20*	*(2006.01)*	A61K	38/20	
A61K	*38/28*	*(2006.01)*	A61K	38/28	

(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,IR,IS,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(74)代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁
(72)発明者 ロティエ, ピーター
ベルギー国 ベー－９８４０ デ ピント, ツィー ドリーブン ３７
(72)発明者 ステイドラー, ロタール
ベルギー国 ベー－９１６０ ローケレン, ボクスラールストラート ４１

Ｆターム(参考) 4B065 AA01X AA26Y AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44
4C084 AA13 NA13 NA14 ZC35
4C087 AA01 AA02 BC56 NA14 ZC35