

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2022-534741
(P2022-534741A)

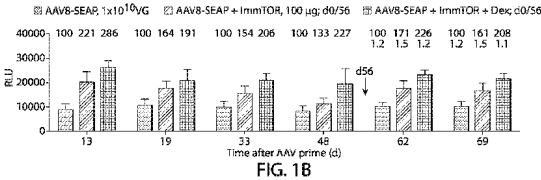
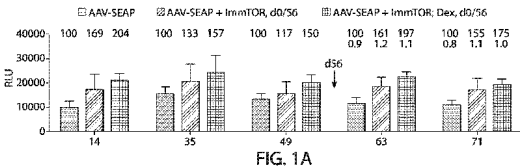
(43)公表日 令和4年8月3日(2022.8.3)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	4 C 0 7 6	
A 6 1 K	31/573 (2006.01)	A 6 1 K	31/573	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	31/58 (2006.01)	A 6 1 K	31/58	4 C 0 8 6	
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761	4 C 0 8 7	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全64頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-570779(P2021-570779)				
(86)(22)出願日	令和2年5月28日(2020.5.28)				
(85)翻訳文提出日	令和4年1月28日(2022.1.28)				
(86)国際出願番号	PCT/US2020/034865				
(87)国際公開番号	WO2020/243261				
(87)国際公開日	令和2年12月3日(2020.12.3)				
(31)優先権主張番号	62/853,647				
(32)優先日	令和1年5月28日(2019.5.28)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR, GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く				
(71)出願人	511254321 セレクト バイオサイエンス インコーポレーテッド SELECTA BIOSCIENCE S, INC. アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02472、ウォータータウン、グローブストリート 65 65 Grove Street, Watertown, MA 02472, United States of America				
(74)代理人	100102842 弁理士 葛和 清司				
(72)発明者	キシモト、タカシ、ケイ 最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 減弱化された抗ウイルス導入ベクター免疫応答のための方法および組成物

(57)【要約】

免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアとコルチコステロイドとを組み合わせるウイルス導入ベクターを投与するための方法および関連する組成物またはキットが、本明細書に提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ウイルス導入ベクター、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、およびナノキャリアに連結されていないコルチコステロイドを含む、組成物。

【請求項 2】

コルチコステロイドが、ベサメタゾン、コーチゾン、デキサメタゾン、ベサメタゾン、ハイドロコーチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、プレドニゾロン、およびトリアムシノロンから成る群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

コルチコステロイドが、デキサメタゾンである、請求項 2 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

ウイルス導入ベクターが、レトロウイルス導入ベクター、アデノウイルス導入ベクター、レンチウイルス導入ベクターまたはアデノ随伴ウイルス導入ベクターである、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

ウイルス導入ベクターが、アデノウイルス導入ベクターであり、ならびに、アデノウイルス導入ベクターが、サブグループ A、サブグループ B、サブグループ C、サブグループ D、サブグループ E またはサブグループ F のアデノウイルス導入ベクターである、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

ウイルス導入ベクターが、レンチウイルス導入ベクターであり、ならびに、レンチウイルス導入ベクターが、HIV、SIV、FIV、EIAV またはヒツジレンチウイルスベクターである、請求項 4 に記載の組成物。

20

【請求項 7】

ウイルス導入ベクターが、アデノ随伴ウイルス導入ベクターであり、ならびに、アデノ随伴ウイルス導入ベクターが、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10 または AAV11 アデノ随伴ウイルス導入ベクターである、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 8】

ウイルス導入ベクターが、キメラウイルス導入ベクターである、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 9】

キメラウイルス導入ベクターが、AAV アデノウイルス導入ベクターである、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

ウイルス導入ベクターの導入遺伝子が、遺伝子治療導入遺伝子、遺伝子編集導入遺伝子、エクソスキッピング導入遺伝子または遺伝子発現調節導入遺伝子を含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

合成ナノキャリアが、脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、金属ナノ粒子、界面活性剤ベースのエマルション、デンドリマー、バッキーボール、ナノワイヤー、ウイルス様粒子またはペプチドもしくはタンパク質粒子を含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 12】

合成ナノキャリアが、ポリマー性ナノ粒子を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

ポリマーナノ粒子が、非メトキシ末端のプルロニックポリマーではないポリマーを含む、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

ポリマーナノ粒子が、ポリエステル、ポリエーテルに接着したポリエステル、ポリアミ

50

ノ酸、ポリカーボネート、ポリアセタール、ポリケタール、多糖、ポリエチルオキサゾリンまたはポリエチレンイミンを含む、請求項 1 2 または 1 3 に記載の組成物。

【請求項 1 5】

ポリエステルが、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸－コ－グリコール酸）またはポリカプロラク톤を含む、請求項 1 4 に記載の組成物。

【請求項 1 6】

ポリマーナノ粒子が、ポリエステルおよびポリエーテルに接着したポリエステルを含む、請求項 1 4 または 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

ポリエーテルが、ポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールを含む、請求項 1 4 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 8】

合成ナノキャリアの集団の動的光散乱を使用して得られた粒子サイズ分布の平均が、110 nm より大きい直径である、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 9】

直径が、150 nm より大きい、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 0】

直径が、200 nm より大きい、請求項 1 9 に記載の組成物。

【請求項 2 1】

直径が、250 nm より大きい、請求項 2 0 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

直径が、5 μ m より小さい、請求項 1 8 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 3】

直径が、4 μ m より小さい、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

直径が、3 μ m より小さい、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

直径が、2 μ m より小さい、請求項 2 4 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

直径が、1 μ m より小さい、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

直径が、500 nm より小さい、請求項 2 6 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

直径が、450 nm より小さい、請求項 2 7 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

直径が、400 nm より小さい、請求項 2 8 に記載の組成物。

【請求項 3 0】

直径が、350 nm より小さい、請求項 2 9 に記載の組成物。

【請求項 3 1】

直径が、300 nm より小さい、請求項 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

合成ナノキャリア中に含まれる免疫抑制剤の負荷量が、合成ナノキャリア全体の平均で、0.1%と50%（重量／重量）との間である、請求項 1 ～ 3 1 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 3 3】

負荷量が、0.1%と、40%、35%、30%、または25%との間にある、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

負荷量が、1%と40%、35%、30%または25%との間にある、請求項 3 3 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 35】

負荷量が、2%、4%または8%と、40%、35%、30%、または25%との間にある、請求項34に記載の組成物。

【請求項 36】

負荷量が、2%、4%、または8%と、20%との間、2%、4%、または8%と、15%との間、または、2%、4%、または8%と、10%との間にある、請求項35に記載の組成物。

【請求項 37】

免疫抑制剤が、NF-κB経路のインヒビターである、請求項1～36のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 38】

免疫抑制剤が、mTOR阻害剤である、請求項1～36のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 39】

免疫抑制剤が、ラパログである、請求項1～36のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 40】

免疫抑制剤が、ラパマイシンである、請求項39に記載の組成物。

【請求項 41】

合成ナノキャリアの集団のアスペクト比が、1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7、または1:10より大きいまたは等しい、請求項1～40のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 42】

以下を含む方法：

免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、ウイルス導入ベクター、およびナノキャリアに連結されていないコルチコステロイドの、対象への随伴投与によって、対象における抗ウイルス導入ベクターの減弱された応答を確立すること。

【請求項 43】

抗ウイルス導入ベクター減弱化応答が、ウイルス導入ベクターに対するIgGまたはIgM応答である、請求項42に記載の方法。

【請求項 44】

方法が、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、ウイルス導入ベクター、およびコルチコステロイドの少なくとも1つの反復用量をさらに含む、請求項42または43に記載の方法。

30

【請求項 45】

方法が、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、ウイルス導入ベクター、およびコルチコステロイドの少なくとも2つの反復用量をさらに含む、請求項42または43に記載の方法。

【請求項 46】

抗ウイルスベクター減弱化応答が、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、ウイルス導入ベクター、およびコルチコステロイドの少なくとも反復用量のために維持される、請求項42～45のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 47】

以下を含む方法：

免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、ウイルスベクター、およびナノキャリアに連結されていないコルチコステロイドを、対象に、反復して、随伴投与することによって、対象におけるウイルス導入ベクターの導入遺伝子発現をエスカレートさせること。

【請求項 48】

方法が、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、ウイルス導入ベクター、およびコルチコステロイドの少なくとも1つ、2つ、または3つの随伴する投与を含む、請求項47に記載の方法。

50

【請求項 49】

ウイルス導入ベクターのエスカレートされた導入遺伝子発現が、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、ウイルス導入ベクター、およびコルチコステロイドの少なくとも1つ、2つ、または3つの随伴する投与のために維持される、請求項 47 または 48 に記載の方法。

【請求項 50】

コルチコステロイドがデキサメタゾンである、請求項 42 ～ 49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

ウイルス導入ベクターが、請求項 1、4 ～ 10、42 ～ 47、および 49 のいずれか一項に記載のとおりである、請求項 42 ～ 50 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 52】

合成ナノキャリアが、請求項 1、11、12、18、32、41、42、および 44 ～ 49 のいずれか一項に記載のとおりである、請求項 42 ～ 51 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 53】

随伴投与が、同時投与である、請求項 42 ～ 52 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 54】

ウイルス導入ベクターおよび／または合成ナノキャリアが、静脈内に投与される、請求項 42 ～ 53 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 55】

コルチコステロイドが、静脈内に、または、経口的に投与される、請求項 42 ～ 54 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 56】

請求項 1 ～ 41 に記載のいずれか1つの組成物、および使用のための説明書を含む、キット。

【請求項 57】

請求項 1、4 ～ 10、42 ～ 47、49、51、および 54 のいずれか一項に記載のウイルス導入ベクター、請求項 1、11、12、18、32、41、42、44 ～ 49、52、および 54 のいずれか一項に記載の合成ナノキャリア、請求項 1 ～ 3、42、44 ～ 50、および 55 のいずれか一項に記載のコルチコステロイド、および使用のための説明書を含む、キット。

30

【請求項 58】

使用のための説明書が、請求項 42 ～ 55 に記載のいずれか1つの方法を実行するための説明書を含む、請求項 56 または 57 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願についての相互参照

【0002】

本出願は、2019年5月28日に出願の米国仮出願第62／853,647号の米国特許法§119の下で、利益を主張し、その全体の開示は、参照により、ここで組み込まれる。

40

【背景技術】

【0003】

発明の分野

本発明は、対象に、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアおよびコルチコステロイドを伴うウイルス導入ベクターを投与するための方法、および関連する組成物に関する。好ましくは、該方法および組成物は、増加した導入遺伝子発現を達成し、および／またはウイルス導入ベクターに対する免疫応答を減弱化し、およびより好ましくは、増加した導入遺伝

50

子発現、および／またはウイルスの導入ベクターに対する減弱化された免疫応答が、ウイルス導入ベクター、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、およびコルチコステロイドの複数回、例として、2回、3回、またはそれ以上の投与にわたって、維持される。

【発明の概要】

【0004】

一側面において、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、ウイルス導入ベクター、およびナノキャリアに連結されていないコルチコステロイドの、対象への随伴投与によって、対象における抗ウイルス導入ベクターの減弱された応答を確立することを含む方法が、提供される。

【0005】

本明細書に提供される方法のいずれか1つの一態様において、抗ウイルス導入ベクターの減弱化された応答は、ウイルス導入ベクターに対するIgGおよび／またはIgM応答である。

【0006】

別の側面において、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、ウイルスベクター、およびナノキャリアに連結されていないコルチコステロイドを、対象に、反復して、随伴投与することによって、対象におけるウイルス導入ベクターの導入遺伝子発現をエスカレートさせることを含む方法が、提供される。

【0007】

本明細書に提供される方法のいずれか1つの一態様において、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、ウイルス導入ベクター、およびナノキャリアに連結されていないコルチコステロイドの随伴投与は、反復される（例として、1、2、3、4、または5回）。

【0008】

提供される方法、組成物、またはキットのいずれか1つの一態様において、該ウイルス導入ベクターは、本請求項のいずれか1つにおいて定義されたかかるベクターのいずれか1つなどの、本明細書に提供されるウイルス導入ベクターのいずれか1つである。

【0009】

提供される方法、組成物、またはキットのいずれか1つの一態様において、該合成ナノキャリアは、本請求項のいずれか1つにおいて定義されたかかる合成ナノキャリアのいずれか1つなどの、本明細書に提供される合成ナノキャリアのいずれか1つである。

【0010】

提供される方法、組成物、またはキットのいずれか1つの一態様において、コルチコステロイドは、以下から成る群から選択される：ベサメタゾン、コーチゾン、デキサメタゾン、ベサメタゾン(ethamethasone)、ハイドロコーチゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、プレドニゾン、およびトリアムシノロン。

提供される方法、組成物、またはキットのいずれか1つの一態様において、コルチコステロイドは、全身投与されるか、または全身送達のために製剤化される。

【0011】

別の側面において、本明細書に提供される組成物または組成物の組み合わせのいずれか1つを含むキットが、提供される。提供されるキットのいずれか1つの一態様において、キットは、使用のための説明書をさらに含む。提供されるキットのいずれか1つの一態様において、使用のための説明書は、本明細書に提供される方法のいずれか1つを実行するための説明書を、含む。

別の側面において、例のいずれか1つにおいて記載されるような方法または組成物が提供される。

別の側面において、組成物のいずれか1つは、提供される方法のいずれか1つにおける使用のためのものである。

【0012】

別の側面において、方法または組成物のいずれか1つは、本明細書において記載される疾患または状態のいずれか1つを処置することにおける使用のためのものである。

10

20

30

40

50

【0013】

別の側面において、方法または組成物のいずれか1つは、抗ウイルス導入ベクター応答（例として、IgGおよび／またはIgM応答）を減弱化させること、減弱化された抗ウイルス導入ベクター応答（例として、IgGおよび／またはIgM応答）を確立すること、導入遺伝子発現をエスカレートさせることにおける、および／またはウイルス導入ベクターの反復投与に関する使用のために、ある。

【0014】

別の側面において、例の剤のいずれかの組み合わせを投与する方法が、提供される。別の側面において、剤のこれらの組み合わせのいずれか1つを含む組成物またはキットも、提供される。

10

【0015】

方法、組成物、またはキットのいずれか1つの一態様において、該方法、組成物またはキットは、体液、または細胞免疫応答などの、別の免疫応答に加えてIgMおよび／またはIgM応答を減弱化するために、ある。

【0016】

方法、組成物、またはキットのいずれか1つの一態様において、該方法、組成物またはキットは、導入遺伝子発現を増加させることに加えて、IgGおよび／またはIgM応答を減弱化させるために、ある。

【0017】

方法、組成物、またはキットのいずれか1つの一態様において、該方法、組成物またはキットは、体液、または細胞免疫応答などの、別の免疫応答に加えてIgMおよび／またはIgM応答を減弱化するために、ある。

20

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1A～1Bは、血清SEAP発現を示す。同じAAV、ImmTOR（商標）およびデキサメタゾン（Dex）注入スケジュールおよび同様のブリードスケジュールによる、2つの同様の試験が、図1Aおよび図1Bにおいて示される。各時点に関する発現のレベル対100とした未処置のマウスにおけるそれが（上段）、プレブーストに対するポストブースト比率であるとして（下段）、指し示される。

30

【図2】図2A～2Bは、血清SEAP発現を示す。同じAAV、ImmTOR（商標）およびデキサメタゾン（Dex）注入スケジュールおよび同様のブリードスケジュールによる、2つの同様の試験が、図2Aおよび図2Bにおいて示される。各時点に関する発現のレベル対100とした未処置のマウスにおけるそれが（上段）、プレに対するポストブースト比率であるとして（下段）、指し示される。ブーストは、矢印によって示され、そして、d20でのすべての群における相対的なSEAP発現は、図2Aにおいて点線によって指し示される。

【図3】図3は、AAVに対するIgM応答の変遷を示す。同じAAV、ImmTOR（商標）およびデキサメタゾン（Dex）注入スケジュール、および同様のブリードスケジュールを伴う2つの同様の試験が、実行され、そして、それらのIgM分析のデータは、統合された。ブーストは、矢印によって示される。

40

【図4】図4は、AAVに対するIgG応答の変遷を示す。図1Bにおいて示される同じ試験からの試料は、ELISAにおいて、それらのAAVに対するIgGのレベルに関して、分析された。ブーストは、矢印によって示される。104日目までにImmTOR（商標）単独で、またはデキサメタゾンによって組み合わせられて処置された群における、IgG陽性マウスの数（全てのうち）が、示される。

【0019】

【図5A】図5Aは、TopODに関するAAV IgMを示す（D6、13、20、34、49、62、69、76、90、104、142、154、161、168、182、196、および231）。

【図5B】図5Bは、TopODに関するAAV IgMを示す（d231）。

50

【図6】図6は、AAV-SEAP、AAV-SEAP+ImmTOR、AAV-SEAP+ImmTOR/Dex、およびAAV-SEAP/Dexに関する抗AVV IgG TopOD (450~570)を示す。

【0020】

発明の詳細な説明

本発明を詳細に記載する前に、本発明は特に例示された材料またはプロセスに限定されず、そうであるからパラメーターは無論変化し得ることが理解されるべきである。また、本明細書において用いられる用語は、本発明の特定の態様のみを記載することを目的とし、本発明を記載する代替的用語の使用を限定することを意図しないことが理解されるべきである。

10

【0021】

上記または下記のいずれであっても、本明細書において引用される全ての刊行物、特許および特許出願は、その全体において全ての目的のために本明細書により参考として援用される。かかる参考としての援用は、本明細書において引用される援用された刊行物、特許および特許出願のいずれかが先行技術を構成するという承認であることを意図しない。

【0022】

本明細書および添付の請求の範囲において用いられる場合、単数形「a」、「an」および「the」は、内容が明らかに他を支持しない限り、複数の参照対象を含む。例えば、「ポリマー (a polymer)」についての言及は、2以上のかかる分子の混和物または異なる分子量の単一のポリマー種の混和物を含み、「合成ナノキャリア (a synthetic nanocarrier)」についての参照は、2以上のかかる合成ナノキャリアの混和物または複数のかかる合成ナノキャリアを含み、「DNA分子 (a DNA molecule)」についての参照は、2以上のかかるDNA分子の混合物または複数のかかるDNA分子を含み、「免疫抑制剤 (an immunosuppressant)」についての言及は、2以上のかかる免疫抑制剤分子の混和物または複数のかかる免疫抑制剤分子などを含む。

20

【0023】

本明細書において用いられる場合、用語「含む (comprise)」または「含む (comprises)」もしくは「含むこと (comprising)」などのそのバリエーションは、任意の列記される完全体 (integer) (例えば、特色、要素、特徴、特性、方法/プロセスステップもしくは限定) または完全体の群 (例えば特色、要素、特徴、特性、方法/プロセスステップもしくは限定) の包含を示すが、任意の他の完全体または完全体の群の除外を示すものではないと読まれるべきである。したがって、本明細書において用いられる場合、用語「含むこと (comprising)」は、包括的であり、さらなる列記されていない完全体または方法/プロセスステップを除外しない。

30

【0024】

本明細書において提供される組成物および方法のいずれかの態様において、「含むこと (comprising)」は、「から本質的になる (consisting essentially of)」または「からなる (consisting of)」で置き換えることができる。句「から本質的になる」は、本明細書において、特定された完全体 (単数または複数) またはステップ、ならびに請求される発明の特徴または機能に実質的には影響を及ぼさないものを要求するために用いられる。本明細書において用いられる場合、用語「からなる」は、列記される完全体 (例えば特色、要素、特徴、特性、方法/プロセスステップもしくは限定) または完全体の群 (例えば特色、要素、特徴、特性、方法/プロセスステップもしくは限定) 単独での存在を示すために用いられる。

40

【0025】

A. 序論

ウイルス導入ベクターは、遺伝子治療、遺伝子編集、遺伝子発現調節およびエクソスキッピングなどの多様な適用のための有望な治療剤である。ウイルス導入ベクターは、したがって、治療用のタンパク質または核酸をコードする導入遺伝子を含んでもよい。残念

50

ながら、これらの治療法の見込みは、ウイルス導入ベクターに対する免疫応答のため、大部分においてまだ完全には実現されていなかった。

【0026】

しかしながら、遺伝子治療および他の応用におけるウイルスベクターの使用は、ウイルス導入ベクターに対する免疫応答、例として、IgGおよびIgM抗体応答のために、限定されてきた。その上、かかる免疫応答は、例として、減少された導入遺伝子発現によって示されるように、ウイルスベクターの減少された有効性に結果としてなることが、できる。ウイルスベクターに対する細胞性および液性免疫応答の両方は、有効性を減弱させ、および／またはかかる治療法を使用する能力を減少させることができる。これらの免疫応答は、抗体応答を含み、ウイルスカプシドまたはコートタンパク質、またはそれらのペプチドなどの、ウイルスベクターのウイルス抗原に、特異的であることができる。

10

【0027】

本発明者らは、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアと、コルチコステロイド、例として、ナノキャリアに連結されていないコルチコステロイドとの随伴投与が、例として、ウイルス導入ベクターを単独で投与された対象と比較して、減弱化された免疫応答、例として、減少されたIgGおよび／またはIgM抗体応答、および／または、改善された導入遺伝子発現を達成することができることを、驚くべきことに、発見した。重要なことに、この効果は、ウイルス導入ベクター、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、およびコルチコステロイドの、複数回、例として、2、3回またはそれ以上の投与にわたって、維持される。

20

【0028】

処置のためのウイルス導入ベクターの効果的な使用に対する障害に対する解決方法を提供する方法および組成物が、本明細書において提供される。とりわけ、抗ウイルス導入ベクター免疫応答単独、または他の免疫応答と組み合わせにおいて、本明細書に提供される方法および関連した組成物によって減弱化されることができることが、予想外に発見された。該方法および組成物は、そして、とりわけ、ウイルス導入ベクター、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、およびコルチコステロイドの投与が、反復される、例として、2、3回またはそれ以上投与される場合に、ウイルス導入ベクターによる処置の有効性を増大させ、および免疫減弱化に備えることができる。

本発明をここで、以下により詳細に記載する。

30

【0029】

B. 定義

「投与すること」または「投与」または「投与する」とは、材料を、薬理学的に有用である様式において、対象に与えるかまたは分配することを意味する。

当該用語は、「投与させること (causing to be administered)」を含むことを意図される。「投与させること」とは、別の当事者が材料を投与することを、直接的または間接的に、引き起こすこと、駆り立てること、奨励すること、補助すること、誘導することまたは指示することを含む。本明細書に提供される方法のいずれか1つは、ウイルス導入ベクター、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、およびコルチコステロイドを共投与するステップを、含んでもよいまたはさらに含んでもよい。幾つかの態様において、共投与は、反復して行われる。本発明のまたさらなる態様において、共投与は、同時投与である。

40

【0030】

本明細書において提供される対象への投与のための組成物または投与形態に関する「有効量」とは、対象において1以上の所望される結果、例えば、IgGまたはIgM応答などのウイルス導入ベクターに対する免疫応答の軽減もしくは除去、または抗ウイルス導入ベクター減弱化応答の発生を生成する、組成物または投与形態の量を指す。有効量は、in vitroまたはin vivoでの目的のためのものであってよい。in vivoでの目的のために、量は、医師が、ウイルス導入ベクターの投与の結果として望ましくない免疫応答を経験し得る対象のための臨床的利益を有し得ると考えるものであってよい

50

。

【0031】

本明細書において提供される方法のいずれか1つにおいて、投与される組成物は、本明細書において提供されるような有効量のうちのいずれか1つにおけるものであってよい。

【0032】

有効量は、望ましくない免疫応答のレベルを低下させることを含み得るが、幾つかの態様において、それは、望ましくない免疫応答を完全に予防することを含む。有効量はまた、望ましくない免疫応答の発生を遅延させることを含んでもよい。有効量は、所望される治療的エンドポイントまたは所望される治療効果をもたらす量であってもよい。有効量は、好ましくは、対象において、ウイルス導入ベクター抗原などの抗原に対して、免疫寛容原性免疫応答をもたらす。有効量はまた、好ましくは、導入遺伝子発現の増大をもたらし得る（ウイルス導入ベクターにより送達されている導入遺伝子）。このことは、対象における多様な目的の組織または系において、導入遺伝子発現を測定することにより、決定することができる。この発現の増大は、局所的にまたは全身で測定することができる。有効量は、本明細書に記載の結果の1以上を達成する量であることも、できる。有効量は、対象のための治療の有効性に利益を与えるいかなる所望の結果にも、結果としてなる量であることもできる。前述のもののいずれかの達成は、慣用的な方法によりモニタリングすることができる。提供される組成物および方法のいずれか1つのいくつかの態様において、有効量は、ウイルス導入ベクターに対する免疫応答の軽減もしくは除去、または抗ウイルス導入ベクター減弱応答の発生などの所望される免疫応答は、対象において、少なくとも1週間、少なくとも2週間または少なくとも1か月間にわたり持続する。提供される組成物および方法のいずれ1つのいくつかの態様において、有効量は、所望の免疫応答が、組成物または投与形態の少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回の投与に関して、対象中に残存するものである。提供される組成物および方法のいずれか1つの他の態様において、有効量は、ウイルス導入ベクターに対する免疫応答の軽減もしくは除去、または抗ウイルス導入ベクター減弱応答の発生などの、測定可能な所望される免疫応答をもたらすものである。幾つかの態様において、有効量は、測定可能な所望される免疫応答を（例えば特定のウイルス導入ベクター抗原に対して）、少なくとも1週間、少なくとも2週間または少なくとも1か月間にわたりもたらすものである。いくつかの態様において、有効量は、組成物または投与形態の少なくとも2回、少なくとも3回、少なくとも4回、少なくとも5回の投与に関する、測定可能な所望の免疫応答を、生成するものである。

【0033】

有効量は、無論、処置された特定の対象；状態、疾患または障害の重篤度；年齢、身体条件、サイズおよび体重を含む個々の患者のパラメーター；処置の期間；併用治療の性質（あれば）；投与の特定の経路、ならびに保健実施者の知識および経験の範囲内の類似の要因に依存するであろう。これらの要因は、当業者に周知であり、慣用的な実験のみを用いて取り組むことができる。

【0034】

「抗ウイルス導入ベクター免疫応答」または「ウイルス導入ベクターに対する免疫応答」または類似のものは、ウイルス導入ベクターに対する任意の望ましくない免疫応答を指す。幾つかの態様において、望ましくない免疫応答は、ウイルス導入ベクターまたはその抗原に対する抗原特異的免疫応答である。

【0035】

幾つかの態様において、免疫応答は、ウイルス導入ベクターのウイルス抗原に対して特異的である。免疫応答は、IgGまたはIgM応答などの、抗ウイルス導入ベクター抗体応答でもよい。抗ウイルス導入ベクター免疫応答は、それが、対象において何らかの様式において、または対象もしくは別の対象において予測もしくは測定される応答と比較して、低下するかまたは取り除かれる場合に、「抗ウイルス導入ベクター減弱応答」といえる。いくつかの態様において、本明細書において提供される共投与の後に対象から得

られた生物学的試料を用いて測定される、当該対象における抗ウイルス導入ベクター減弱化応答は、別の対象（試験対象など）から、この他の対象への、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアとコルチコステロイドの共投与なしでのウイルス導入ベクター投与の後に得られた生物学的試料を用いて測定される抗ウイルス導入ベクター免疫応答と比較して、減少した抗ウイルス導入ベクター免疫応答（例として、IgGまたはIgM抗体応答）を含む。幾つかの態様において、抗ウイルス導入ベクター減弱化応答は、本明細書において提供される共投与の後に対象から得られた生物学的試料中の、対象の生物学的試料に対して行われるその後のウイルス導入ベクターの*in vitro*での負荷（challenge）により、別の対象（試験対象など）から、この他方の対象への、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアおよびコルチコステロイドの共投与なしでのウイルス導入ベクターの投与の後に得られた生物学的試料に対して行われるウイルス導入ベクターの*in vitro*負荷の後で検出される、抗ウイルス導入ベクター免疫応答と比較して、減少した抗ウイルス導入ベクター免疫応答（抗IgM抗体など）である。

10

【0036】

「抗原」とは、B細胞抗原またはT細胞抗原を意味する。抗原の型」とは、同じまたは実質的に同じ抗原性の特徴を共有する分子である。幾つかの態様において、抗原は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、リポタンパク質、糖脂質、ポリヌクレオチド、多糖などであってよい。

【0037】

「接着する（attach）」または「接着された（attached）」または「カップリングする」または「カップリングされた」（など）は、1つの実体（例えば部分）を別のものに化学的に会合させることを意味する。幾つかの態様において、接着は共有的であり、これは、接着が2つの実体の間の共有結合の存在に関して起こることを意味する。非共有的態様において、非共有的接着は、限定されないが以下を含む非共有的相互作用により媒介される：電荷相互作用、アフィニティー相互作用、金属配位、物理的吸着、主客相互作用、疎水性相互作用、TTスタッキング相互作用、水素結合相互作用、ファン・デル・ワールス相互作用、磁性相互作用、静電相互作用、双極子-双極子相互作用、および／またはこれらの組み合わせを含む。態様において、封入は、接着の形態である。

20

【0038】

「平均」とは、本明細書において用いられる場合、他に記述されないかぎり、算数的平均値を指す。「コルチコステロイド」は、本明細書に使用されるとき、脊椎動物の副腎皮質において生成されるなどのステロイドホルモン、ならびにこれらのホルモンの合成類似体を、指す。コルチコステロイドは、体のすべての組織に影響することができて、様々な細胞の効果を生成することができる。たとえば、これらのステロイドは、炭水化物、脂質、タンパク質生合成および代謝、ならびに水および電解質バランスを、規制することができる。細胞の生合成または代謝に影響するコルチコステロイドは、糖質コルチコイドとして称され、一方水および電解質バランスに影響を及ぼすものは、鉱質コルチコイドである。糖質コルチコイドおよび鉱質コルチコイドは、副腎皮質から放出される。コルチコステロイドは、例えば、感染、移植拒絶反応、および自己免疫不全から結果として起こるものを含む、炎症性状態の処置において有用な治療剤のクラスである。コルチコステロイドは、たとえば、コレステロール、ジヒドロキシコレステロール、スチグマステロール、およびラノステロール構造中に見いだされるように、4つの縮合環のステロイド核の存在によって、一般に特徴づけられる。コルチコステロイドに対するいかなる言及も、起源において、天然に存在するか、合成であるか、半合成であるものを含む。本明細書に使用されるとき、「コルチコステロイド」は、コルチコステロイドから形成されてもよい、それらの塩または誘導体への言及を、含む。可能な塩または誘導体の例は、以下を含む：ナトリウム塩、スルホベンゾアート、ホスファート、イソニコチナート、アセタート、プロピオナート、二水素ホスファート、パルミタート、ピバラート、ファルネシラート、アセポナート、スレブタナート、プレドニカルバート、フロアート、またはアセトニド。いくつかのケースにおいて、コルチコステロイドは、それらの水和物の形で発生してもよい。

30

40

50

【0039】

「随伴して (concomitantly)」とは、対象に、時間的に相関する、好ましくは、免疫応答の調節を提供するために時間的に十分に相関する様式において、2以上の材料／剤を投与すること、およびさらにより好ましくは2以上の材料／剤が組み合わせて投与されることを意味する。態様において、共投与は、2以上の材料／剤の、特定された期間内、好ましくは1か月間以内、より好ましくは1週間以内、なおより好ましくは1日以内、さらにより好ましくは1時間以内の投与を包含してもよい。態様において、材料／剤は、繰り返し共投与してもよい；すなわち2以上の場合の共投与である。

【0040】

「投与形態」とは、培地、対象への投与のために好適なキャリア、ビヒクルまたはデバイス中の薬理的におよび／または免疫学的に活性な材料を意味する。本明細書において提供される組成物または用量のいずれか1つは、投与形態におけるものであってもよい。

【0041】

「封入する」とは、合成ナノキャリア内の物質の少なくとも一部を囲い込むことを意味する。幾つかの態様において、物質は、合成ナノキャリア内に完全に囲い込まれる。他の態様において、封入される物質の殆どまたは全てが、合成ナノキャリアの外の局所環境に暴露されない。他の態様において、物質の50%、40%、30%、20%、10%、または5%（重量／重量）以下が、局所環境に暴露される。封入は、吸収とは別のものであり、吸収は、物質の殆どまたは全てを合成ナノキャリアの表面上に配置し、物質を合成ナノキャリアの外部の局所環境に暴露させる。

【0042】

「導入遺伝子発現をエスカレートさせること」とは、対象におけるウイルス導入ベクターの導入遺伝子発現産物のレベルを増大させることを指し、導入遺伝子は、ウイルス導入ベクターにより送達されるものである。幾つかの態様において、導入遺伝子発現産物のレベルは、対象における目的の多様な組織または系における導入遺伝子発現を測定することにより決定することができる。いくつかの態様において、導入遺伝子発現産物は、タンパク質である。他の態様において、導入遺伝子発現産物は、核酸である。導入遺伝子発現をエスカレートさせることは、例えば、対象から得られた試料中の導入遺伝子発現産物の量を測定すること、およびそれを前の試料と比較することにより決定することができる。試料は、組織試料であってよい。幾つかの態様において、導入遺伝子発現産物は、フローサイトメトリーを用いて決定することができる。

【0043】

「エクソンスキッピング導入遺伝子」とは、エクソンスキッピングを発生させ得るアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは他の剤をコードする任意の核酸を意味する。「エクソンスキッピング」とは、タンパク質産生の間に、mRNA前駆体のレベルにおいてスキップされて取り除かれるエクソンを指す。

【0044】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、スプライス部位またはエクソン内の調節エレメントと干渉し得る。これは、遺伝子変異の存在に関わらず、短縮された部分的に機能的なタンパク質をもたらす。一般に、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、変異特異的であり、メッセンジャーRNA前駆体中の変異部位に結合して、エクソンスキッピングを引き起こす。

【0045】

対象は、エクソンスキッピングが有益であろう疾患または障害を有するものであってよい。対象は、本明細書において提供される、ジストロフィーなどの、エクソンスキッピングの発生が有益となるであろう疾患または障害のいずれか1つを有していてもよい。加えて、エクソンスキッピング導入遺伝子は、エクソンスキッピングの結果が利益を与えるであろう任意の内因性タンパク質の発現の間にエクソンスキッピングを発生させることができる剤をコードしていてもよい。かかるタンパク質の例は、本明細書において提供される疾患または障害、例えば本明細書において提供されるジストロフィーのいずれかに関連する

10

20

30

40

50

タンパク質である。タンパク質は、いくつかの態様においては、本明細書において提供される治療用タンパク質のいずれかの内因性のバージョンであってもよい。

【0046】

「遺伝子編集導入遺伝子」とは、遺伝子編集プロセスに関与する剤または成分をコードする任意の核酸を意味する。「遺伝子編集」とは、一般に、ターゲティングされたDNAの挿入、置き換え、変異誘発または除去などの、ゲノムDNAに対する持続的または恒久的な改変を指す。遺伝子を編集は、発現されたタンパク質の部分もしくは全てをコードするDNA配列を標的としても、または標的遺伝子の発現に影響を及ぼすDNAの非コード配列を標的としてもよい。遺伝子編集は、目的のDNA配列をコードする核酸の送達、およびエンドヌクレアーゼを用いて目的の配列をゲノムDNA中の標的部位に挿入することを含む。エンドヌクレアーゼは、ゲノム中の所望される位置において二本鎖DNAの切断部を作り出し、宿主細胞の機構を使用して、相同組み換え、非相同末端結合などを用いて切断部を修復することができる。遺伝子を編集するために用いることができるエンドヌクレアーゼのクラスとして、これらに限定されないが、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TALEエフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、CRISPRおよびホーミングエンドヌクレアーゼが挙げられる。

10

【0047】

本明細書において提供される対象は、本明細書において提供される疾患または障害のいずれか1つであってよく、導入遺伝子は、本明細書において提供されるタンパク質のいずれか1つ、またはその内因性バージョンにおける欠損を補正するために用いることができる遺伝子編集剤をコードするものである。

20

【0048】

あるいは、いくつかの態様において、遺伝子を編集するウイルス導入ベクターはまた、本明細書において提供される治療用タンパク質またはその部分または核酸をコードする導入遺伝子を含んでもよい。いくつかの態様において、遺伝子を編集するウイルス導入ベクターは、本明細書において提供される治療用タンパク質またはその部分または核酸をコードする導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターと共に、対象に投与することができる。

【0049】

「遺伝子発現調節導入遺伝子」は、遺伝子発現モジュレーターをコードする任意の核酸を指す。「遺伝子発現モジュレーター」とは、1以上の内在遺伝子の発現を、増強、阻害または調節することができる分子を指す。遺伝子発現モジュレーターは、したがって、DNA結合タンパク質（例えば、人工転写因子）ならびにRNA干渉を媒介する分子を含む。遺伝子発現モジュレーターは、RNAi分子（例えば、dsRNAまたはssRNA）、miRNA、および三重鎖形成オリゴヌクレオチド（TFO）を含む。遺伝子発現モジュレーターはまた、前述のRNA分子のいずれかの改変されたバージョンを含む、改変されたRNAを含んでもよい。

30

【0050】

本明細書において提供される対象は、本明細書において提供される疾患または障害のいずれか1つであってよく、導入遺伝子は、本明細書において提供されるタンパク質のいずれか1つの発現を制御するために用いることができる遺伝子発現モジュレーターをコードするものである。幾つかの態様において、対象は、タンパク質の対象の内因性バージョンが欠損しているか、または限定された量においてのみ産生されるか、全く産生されない疾患または障害を有し、遺伝子発現モジュレーターは、かかるタンパク質の発現を制御することができる。したがって、遺伝子発現モジュレーターは、幾つかの態様において、本明細書において提供されるタンパク質のいずれか1つまたはその内因性バージョン（例えば本明細書において提供される治療用タンパク質の内因性バージョン）の発現を制御することができる。

40

【0051】

「遺伝子治療導入遺伝子」は、タンパク質または核酸などの発現産物をコードし、細胞に導入される場合に、タンパク質または核酸の発現を導く核酸を、指す。いくつかの態様

50

において、タンパク質は、治療タンパク質であることができる。本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、ウイルス導入ベクターにより遺伝子治療導入遺伝子が投与される対象は、タンパク質の対象の内因性バージョンが欠損しているか、または限定された量においてのみ産生されるか、全く産生されない疾患または障害を有する。幾つかの態様において、コードされたタンパク質は、ヒトのカウンターパートを有しないが、疾患または障害の処置において治療的に有益な効果を提供することが予測される。

【0052】

「免疫抑制剤」は、好ましくはAPCに対する効果を通して、免疫寛容原性効果を引き起こす化合物を意味する。免疫寛容原性効果は、一般に、APCまたは他の免疫細胞による、全身性および／または局所的な調節であって、耐久的な様式において抗原に対する望ましくない免疫応答を阻害または予防するものを指す。一態様において、免疫抑制剤は、APCに、1以上の免疫エフェクター細胞における調節性の表現型を促進させるものである。例えば、調節性の表現型は、抗原特異的CD4+T細胞またはB細胞の産生、誘導、刺激または動員の阻害、抗原特異的抗体の産生の阻害、Treg細胞（例えば、CD4+CD25highFoxP3+Treg細胞）の産生、誘導、刺激または動員などにより特徴づけられ得る。このことは、CD4+T細胞またはB細胞の調節性の表現型への変換の結果であってもよい。このことはまた、CD8+T細胞、マクロファージおよびiNKT細胞などの他の免疫細胞におけるFoxP3の誘導の結果であってもよい。一態様において、免疫抑制剤は、APCが抗原をプロセッシングした後の応答に影響を及ぼすものである。別の態様において、免疫抑制剤は、抗原のプロセッシングに干渉するものではない。さらなる態様において、免疫抑制剤は、アポトーシスシグナル分子ではない。別の態様において、免疫抑制剤は、リン脂質ではない。

【0053】

いくつかの態様において、免疫抑制剤は、合成ナノキャリアの構造を構成する材料に加える要素である。例えば、一態様において、合成ナノキャリアが1以上のポリマーからなる場合、免疫抑制剤は、追加の、および幾つかの態様においては1以上のポリマーに接着した、化合物である。別の例として、一態様において、合成ナノキャリアが、1以上の脂質からなる場合、免疫抑制剤は、やはり、1以上の脂質に加えるものであり、およびは幾つかの態様においては、接着している。他の実施態様において、合成ナノキャリアの材料も免疫寛容原性効果に結果としてなる場合に、免疫抑制剤は、免疫寛容原性効果に結果としてなる合成ナノキャリアの材料に加えて存在する要素である。

【0054】

免疫抑制剤は、スタチンを含むが、これに限定されるものではない；ラパマイシンまたはラパマイシンアナログ（すなわち、ラパログ（rapalog））などのmTOR阻害剤；TGF-βシグナル伝達剤；TGF-β受容体アゴニスト；トリコスタチンAなどのヒストンデアセチラーゼ阻害剤；ロテノンなどのミトコンドリアの機能の阻害剤；P38阻害剤；6Bio、TCPA-1、IKK VEEなどのNF-κβ阻害剤；アデノシン受容体アゴニスト；ミソプロストールなどのプロスタグランジンE2アゴニスト（PGE2）；ホスホジエステラーゼ阻害剤、ロリプラムなどのホスホジエステラーゼ4阻害剤（PDE4）；プロテアソーム阻害剤；キナーゼ阻害剤；Gタンパク質共役受容体アゴニスト；Gタンパク質共役受容体アンタゴニスト；レチノイド；サイトカイン阻害剤；サイトカイン受容体阻害剤；サイトカイン受容体アクチベーター；ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アンタゴニスト；ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アゴニスト；ヒストンデアセチラーゼ阻害剤；カルシニューリン阻害剤；ホスファターゼ阻害剤；TGX-221などのPI3KB阻害剤；3-メチルアデニンなどのオートファジー阻害剤；アリール炭化水素受容体阻害剤；プロテアソーム阻害剤I（PSI）；ならびにP2X受容体遮断薬などの酸化ATP。免疫抑制剤はまた、IDO、ビタミンD3、レチノイン酸、シクロスポリンAなどのシクロスポリン、アリール炭化水素受容体阻害剤、レスベラトロール、アザチオプリン（Aza）、6-メルカプトプリン（6-MP）、6-チオグアニン（

6-TG)、FK506、サングリフェリンA、サルメテロール、ミコフェノール酸モフェチル(MMF)、アスピリンおよび他のCOX阻害剤、ニフルミン酸、エストリオールならびにトリプトライドを含む。他の例示的な免疫抑制剤として、限定されないが、低分子薬、天然生成物、抗体(例えば、CD20、CD3、CD4に対する抗体)、生物製剤ベースの薬物、炭水化物ベースの薬物、RNAi、アンチセンス核酸、アプタマー、メトトレキサート、NSAID;フィンゴリモド;ナタリズマブ;アレムツズマブ;抗CD3;タクロリムス(FK506)、アバタセプト、ベラタセプトなどが挙げられる。「ラパログ」とは、ラパマイシン(シロリムス)に構造的に関連する(そのアナログである)分子を指す。ラパログの例として、限定することなく、テムシロリムス(CCI-779)、エベロリムス(RAD001)、リダフォロリムス(AP-23573)、およびゾタロリムス(ABT-578)が挙げられる。ラパログのさらなる例は、例えばWO公開WO1998/002441および米国特許第8,455,510号において見出すことができ、それらのラパログは、本明細書においてその全体において参考として援用される。

10

【0055】

さらなる免疫抑制剤は、当業者に公知であり、本発明は、この点において限定されない。態様において、免疫抑制剤は、本明細書に提供される剤のいずれか1つを含んでもよい。

【0056】

「負荷量(load)」とは、合成ナノキャリアと共役する場合、合成ナノキャリア全体における材料の乾燥処方重量(重量/重量)に基づいた、合成ナノキャリアと共役する免疫抑制剤の量である。一般に、かかる負荷量は、合成ナノキャリアの集団全体の平均として計算される。一態様において、負荷量は、合成ナノキャリア全体の平均で0.1%と50%との間である。別の態様において、負荷量は、0.1%と20%との間である。さらなる態様において、負荷量は、0.1%と10%との間である。なおさらなる態様において、負荷量は、1%と10%との間である。なおさらなる態様において、負荷量は、7%と20%との間である。さらに別の態様において、負荷量は、合成ナノキャリアの集団全体の平均で、少なくとも0.1%、少なくとも0.2%、少なくとも0.3%、少なくとも0.4%、少なくとも0.5%、少なくとも0.6%、少なくとも0.7%、少なくとも0.8%、少なくとも0.9%、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも6%、少なくとも少なくとも7%、少なくとも8%、少なくとも9%、少なくとも10%、少なくとも11%、少なくとも12%、少なくとも13%、少なくとも14%、少なくとも15%、少なくとも16%、少なくとも17%、少なくとも18%、少なくとも19%、少なくとも20%、または少なくとも25%である。そのうえさらなる態様において、負荷量は、合成ナノキャリアの集団全体の平均で、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、または20%である。上記態様のいずれか1つの態様において、負荷量は、合成ナノキャリアの集団全体の平均において、25%、30%、35%、または40%以下である。態様において、負荷量は、当該技術分野において公知のいかなる方法も使用して算出される。免合成ナノキャリア中に含まれる疫抑制剤の負荷量は、本明細書に提供される負荷量のいずれか1つであってもよい。

20

30

40

【0057】

「合成ナノキャリアの最大寸法」とは、合成ナノキャリアの任意の軸に沿って測定されるナノキャリアの最大寸法を意味する。「合成ナノキャリアの最小寸法」とは、合成ナノキャリアの任意の軸に沿って測定される合成ナノキャリアの最小寸法を意味する。例えば、球体の合成ナノキャリアについて、合成ナノキャリアの最大および最小寸法は、実質的に同一であり、その直径のサイズである。同様に、立方状合成ナノキャリアについて、合成ナノキャリアの最小寸法は、その高さ、幅または長さのうちの最小のものであり、一方、合成ナノキャリアの最大寸法は、その高さ、幅または長さのうちの最大のものである。

50

【0058】

一態様において、試料中の合成ナノキャリアの合計数に基づいた、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最小寸法は、100nmと等しいか、またはこれより大きい。一態様において、試料中の合成ナノキャリアの合計数に基づいた、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最大寸法は、5μmと等しいか、またはこれより小さい。好ましくは、試料中の合成ナノキャリアの合計数に基づいた、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最小寸法は、110nmより大きく、より好ましくは120nmより大きく、より好ましくは130nmより大きく、より好ましくはなお、150nmより大きい。合成ナノキャリアの最大および最小寸法のアスペクト比は、態様に依存して変化し得る。例えば、合成ナノキャリアの最小寸法に対する最大寸法のアスペクト比は、1:1~1,000,000:1、好ましくは1:1~100,000:1、より好ましくは1:1~10,000:1、より好ましくは1:1~1,000:1、なおより好ましくは1:1~100:1、およびさらにより好ましくは1:1~10:1の間で変化し得る。好ましくは、試料中の合成ナノキャリアの合計数に基づいた、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最大寸法は、3μmと等しいか、またはこれより小さく、より好ましくは2μmと等しいか、またはこれより小さく、より好ましくは1μmと等しいか、またはこれより小さく、より好ましくは800nmと等しいか、またはこれより小さく、より好ましくは600nmと等しいか、またはこれより小さく、およびより好ましくはなお、500nmと等しいか、またはこれより小さい。好ましい態様において、試料中の合成ナノキャリアの合計数に基づいた、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最小寸法は、100nmと等しいか、またはこれより大きく、より好ましくは120nmと等しいか、またはこれより大きく、より好ましくは130nmと等しいか、またはこれより大きく、より好ましくは140nmと等しいか、またはこれより大きく、およびより好ましくはなお、150nmと等しいか、またはこれより大きい。合成ナノキャリアの寸法（例えば有効直径）の測定は、幾つかの態様において、合成ナノキャリアを液体（通常は水性）媒体中に懸濁して、動的光散乱（DLS）を用いること（例えばBrookhaven ZetaPALS装置を用いること）により、得ることができる。例えば、合成ナノキャリアの懸濁液を、約0.01~0.1mg/mLの最終合成ナノキャリア懸濁液濃度を達成するために、水性バッファーから精製水中で希釈することができる。希釈された懸濁液は、DLS分析のために好適なキュベット中で直接調製しても、またはこれに移してもよい。キュベットを、次いで、DLS内に置き、制御された温度まで平衡化させて、次いで、媒体の粘度および試料の屈折率のための適切なインプットに基づいて、安定で再現性のある分布を得るために十分な時間にわたりスキャンすることができる。有効直径、または分布の平均を、次いで報告させる。高アスペクト比または非球形の合成ナノキャリアの有効サイズを決定することは、より正確な測定値を得るために、電子顕微鏡法などの増強技術を必要とする場合がある。合成ナノキャリアの「次元」または「寸法」または「直径」は、例えば動的光散乱を用いて得られる粒子サイズ分布の平均を意味する。

【0059】

「非メトキシ末端のポリマー」とは、メトキシ以外の部分で終了する少なくとも1つの末端を有するポリマーを意味する。幾つかの態様において、ポリマーは、メトキシ以外の部分で終了する少なくとも2つの末端を有する。他の態様において、ポリマーは、メトキシで終了する末端を有しない。「非メトキシ末端のプルロニックポリマー」とは、両端にメトキシを有する直鎖状プルロニックポリマー以外のポリマーを意味する。本明細書において提供されるポリマーナノ粒子は、いくつかの態様において、非メトキシ末端のポリマーまたは非メトキシ末端のプルロニックポリマーを含むことができる。他の態様において、ポリマーナノ粒子は、かかるポリマーを含まない。

【0060】

薬学的に許容し得る賦形剤は、当該分野において公知の多様な材料を含み、これは、限定されないが、糖（例えばグルコース、ラクトースなど）、抗菌剤などの保存剤、再構成補助剤、色素、食塩水（例えばリン酸緩衝化食塩水）およびバッファーを含む。

【0061】

「プロトコル」とは、対象に投与するパターンを意味し、1以上の物質の対象への任意の投薬レジメンを含む。プロトコルは、要素（または変数）からなり；したがって、プロトコルは、1以上の要素を含む。プロトコルのかかる要素は、投薬量（用量）、投薬頻度、投与の経路、投薬期間、投薬速度、投薬の間隔、前述のもののいずれかの組み合わせなどを含んでもよい。幾つかの態様において、プロトコルは、1以上の本発明の組成物を、1以上の試験対象に投与するために用いることができる。これらの試験対象における免疫応答を、次いで、所望される、または所望されるレベルの、免疫応答または治療効果を生じることにおいてプロトコルが有効であったか否かを決定するために評価することができる。任意の治療効果および／または免疫性効果を評価することができる。プロトコルのエレメントの1以上は、非ヒト対象などの試験対象において前に実証されていてもよく、次いでヒトプロトコルに翻訳してもよい。

【0062】

例えば、相対成長率または他の尺度法などの確立された技術を用いて、非ヒト対象において実証された投薬量を、プロトコルのエレメントとしてスケールリングしてもよい。プロトコルが所望される効果を有したか否かは、本明細書において提供されるかまたは他の当該分野において公知の方法のうちのいずれかを用いて決定することができる。例えば、試料は、特定の免疫細胞、サイトカイン、抗体などが、減少、産生または活性化されたか否かなどを決定するために、本明細書において提供される組成物が特定のプロトコルに従って投与された対象から得ることができる。例示的なプロトコルは、ウイルス導入ベクター抗原に対する免疫寛容原性免疫応答をもたらすこと、または本明細書において記載される有益な結果のいずれか1つを達成することが、以前に示されているものである。免疫細胞の存在および／または数検出するために有用な方法として、これらに限定されないが、フローサイトメトリー法（例えば、FACS）、ELISpot、増殖応答、サイトカイン産生、および免疫組織化学法が挙げられる。免疫細胞マーカーの特異的染色のための抗体および他の結合剤は、市販されている。かかるキットは、典型的には、FACSベースの検出、不均一な細胞の集団からの所望される細胞集団の精製および／または定量化を可能にする、抗原についての染色試薬を含む。態様において、本明細書において提供される組成物は、選択された要素が対象において所望される結果を達成すると予測されることを前提として、プロトコルを構成する要素の1もしくは2以上、または全てもしくは実質的に全てを用いて、対象に投与される。かかる予測は、試験対象において決定されたプロトコルおよび必要とされる場合にはスケールリングに基づくものであってよい。本明細書に提供される方法のいずれか1つは、抗ウイルス導入ベクター免疫応答を減弱化し、および／またはウイルス導入ベクターの反復投与をゆるす、および／またはウイルス導入ベクターに対する1以上の免疫応答の減弱化に結果としてなる、および／または増加した導入遺伝子発現に結果としてなるために示されたプロトコルに従って本明細書に記載された、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアとコルチコステロイドと組み合わせて、ウイルス導入ベクターの用量を投与するステップを、含んでもよいさらにもよい。本明細書において提供される方法のいずれか1つは、本明細書において記載される有益な結果のいずれか1つを達成するかかるプロトコルを決定することを含んでもよい、またはこれをさらに含んでもよい。

【0063】

本明細書において提供される方法のいずれか1つは、本明細書において記載される有益な結果のいずれか1つを達成するプロトコルに従い投与することを含んでもよい、またはこれをさらに含んでもよい。

【0064】

「反復用量」または「反復投薬」または類似のものは、同じ材料の以前の用量または投薬の後に対象に投与される、少なくとも1回のさらなる用量または投薬を意味する。例えば、ウイルス導入ベクターの反復用量は、同じ材料の以前の用量の後の、ウイルス導入ベクターの少なくとも1回のさらなる用量である。材料は同じであってよいが、一方で、反復用量中の材料の量は、以前の用量と異なってもよい。本明細書に提供されるように、反復用量は、例の間隔などで、投与されてもよい。反復投薬は、それが対象のために有益な効果をもたらす場合、有効であると考えられる。好ましくは、有効な反復投与は、減弱化された抗ウイルス導入ベクター応答と連動して、治療効果などの、有益な効果に結果としてなる。

【0065】

「同時の (s i m u l t a n e o u s) 」とは、医師が、投与の間の任意の時間を、所望される治療成績に対して影響を及ぼすためには実質的に無または無視し得ると考えられるであろう場合に、同じ時間または実質的に同じ時間における投与を意味する。幾つかの態様において、同時とは、投与が、5、4、3、2、1分間またはそれより短い時間内に起きることを意味する。

【0066】

「対象」とは、ヒトおよび霊長類などの温血哺乳動物；鳥類；ネコ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマおよびブタなどの家庭内または家畜動物；マウス、ラットおよびモルモットなどの実験動物；魚類；爬虫類；動物園のおよび野生の動物；など。本明細書において用いられる場合、対象は、本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つを必要とするものであってよい。

【0067】

「合成ナノキャリア（単数または複数）」とは、天然では見出されない個別の物体であって、サイズが5マイクロメートルより小さいか、またはこれと等しい、少なくとも1つの寸法を有するものを意味する。アルブミンナノ粒子は、一般に合成ナノキャリアとして含まれるが、しかし、ある態様においては、合成ナノキャリアは、アルブミンナノ粒子を含まない。態様において、合成ナノキャリアは、キトサンを含まない。他の態様において、合成ナノキャリアは、脂質ベースのナノ粒子ではない。さらなる態様において、合成ナノキャリアは、リン脂質を含まない。

【0068】

合成ナノキャリアは、これらに限定されないが、1つまたは複数の脂質ベースのナノ粒子（また本明細書において液体ナノ粒子、すなわち、それらの構造を構成する材料の大部分が脂質であるナノ粒子としても言及される）、ポリマーナノ粒子、金属ナノ粒子、界面活性剤ベースのエマルション、デンドリマー、バッキーボール、ナノワイヤー、ウイルス様粒子（すなわち、主にウイルスの構造タンパク質からなるが、感染性ではないか、低い感染性を有する粒子）、ペプチドまたはタンパク質ベースの粒子（また本明細書において、タンパク質粒子、すなわち、それらの構造を構成する材料の大部分がペプチドもしくはタンパク質である粒子としても言及される）（アルブミンナノ粒子など）および／または脂質-ポリマーナノ粒子などのナノ材料の組み合わせを用いて開発されるナノ粒子であってもよい。合成ナノキャリアは、多様な異なる形状であってよく、これは、限定されないが、球体、立方状、錐体、長方形、円柱状、ドーナツ型などを含む。本発明による合成ナノキャリアは、1以上の表面を含む。本発明の実施における使用のために適応させることができる例示的な合成ナノキャリアは、以下を含む：（1）G r e fらに対する米国特許5,543,158において開示される生分解性ナノ粒子、（2）S a l t z m a nらに対する米国特許出願公開20060002852のポリマーナノ粒子、（3）D e S i m o n eらに対する米国特許出願公開20090028910のリソグラフィーにより構築されるナノ粒子、（4）v o n A n d r i a nらに対するWO 2009/051837の開示、（5）P e n a d e sらに対する米国特許出願公開2008/0145441において開示されるナノ粒子、（6）d e l o s R i o sらに対する米国特許出願公開20090226525において開示されるタンパク質ナノ粒子、（7）S e b b e l

10

20

30

40

50

らに対する米国特許出願公開20060222652において開示されるウイルス様粒子、(8) Bachmannらに対する米国特許出願公開20060251677において開示される核酸結合ウイルス様粒子、(9) WO2010047839A1またはWO2009106999A2において開示されるウイルス様粒子、(10) P. Paolice et al., 「Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles」 *Nanomedicine*. 5(6): 843-853 (2010)において開示されるナノ沈殿させたナノ粒子、(11) 米国公開2002/0086049において開示されるアポトーシス細胞、アポトーシス小体または合成もしくは半合成模倣物、あるいは(12) Look et al., 「Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice」 *J. Clinical Investigation* 123(4): 1741-1749 (2013)のもの。

10

20

30

40

50

【0069】

約100nmと等しいかこれより小さい、好ましくは100nmと等しいかこれより小さい最小寸法を有する、本発明による合成ナノキャリアは、補体を活性化するヒドロキシル基を有する表面を含まないか、あるいは、補体を活性化するヒドロキシル基ではない部分から本質的になる表面を含む。好ましい態様において、約100nmと等しいかこれより小さい、好ましくは100nmと等しいかこれより小さい最小寸法を有する、本発明による合成ナノキャリアは、補体を実質的に活性化する表面を含まないか、あるいは、補体を実質的に活性化しない部分から本質的になる表面を含む。より好ましい態様において、約100nmと等しいかこれより小さい、好ましくは100nmと等しいかこれより小さい最小寸法を有する、本発明による合成ナノキャリアは、補体を活性化する表面を含まないか、あるいは、補体を活性化しない部分から本質的になる表面を含む。態様において、合成ナノキャリアは、ウイルス様粒子を除外する。態様において、合成ナノキャリアは、1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7より高いか等しい、または1:10より高いか等しいアスペクト比を有してもよい。

【0070】

「治療用タンパク質」とは、本明細書において提供される遺伝子治療導入遺伝子から発現され得る任意のタンパク質を意味する。治療用タンパク質は、タンパク質の置き換えまたはタンパク質の補充のために用いられるものであってよい。治療用タンパク質として、これらに限定されないが、酵素、酵素補因子、ホルモン、血液凝固因子、サイトカイン、増殖因子などが挙げられる。他の治療用タンパク質の例は、本明細書において他の場所で提供される。対象は、本明細書において提供される治療用タンパク質のいずれかによる処置を必要とするものであってよい。

【0071】

「ウイルス導入ベクターの導入遺伝子」とは、細胞中に輸送するためにウイルス導入ベクターが用いられる核酸材料であって、一旦細胞中に入ると、発現して、本明細書において記載されるような治療的適用のためのタンパク質または核酸分子を産生するものを指す。導入遺伝子は、遺伝子治療導入遺伝子、遺伝子編集導入遺伝子、遺伝子発現調節導入遺伝子またはエクソスキッピング導入遺伝子であってよい。「発現される」または「発現」または類似のものは、導入遺伝子が細胞中に形質導入されて、形質導入された細胞によりプロセッシングされた後の、機能的（すなわち、所望される目的のために生理学的に活性な）遺伝子産物の合成を指す。かかる遺伝子産物はまた、本明細書において「導入遺伝子発現産物」としても言及される。発現された産物は、したがって、導入遺伝子によりコードされた結果としてのタンパク質または核酸、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは治療用RNAを含む。

【0072】

「ウイルス導入ベクター」は、本明細書に提供されるように、導入遺伝子などの、核酸を送達するのに適していたウイルスのベクターを意味し、かかる核酸を含む。「ウイルスベクター」とは、ウイルス導入ベクターのウイルス成分の全てを、指す。従って、「ウイルス抗原」は、それが送達する導入遺伝子などの核酸ではなく、カプシドまたはコートタンパク質などの、ウイルス導入ベクターのウイルス成分の抗原を、またはそれがコードするいずれかの生成物を、指す。「ウイルス導入ベクター抗原」は、導入遺伝子などの送達された核酸と同様に、そのウイルス成分を含むウイルス導入ベクターのいずれかの抗原、またはそれらのいずれかの発現生成物を、指す。導入遺伝子は、遺伝子治療導入遺伝子、遺伝子編集導入遺伝子、遺伝子発現調節導入遺伝子またはエクソンスキッピング導入遺伝子であってよい。幾つかの態様において、導入遺伝子は、治療用タンパク質、DNA結合タンパク質またはエンドヌクレアーゼなどの本明細書において提供されるタンパク質をコードするものである。他の態様において、導入遺伝子は、ガイドRNA、アンチセンス核酸、snRNA、RNAi分子（例えば、dsRNAもしくはssRNA）、miRNA、または三重鎖形成オリゴヌクレオチド（TFO）などをコードするものである。ウイルスベクターは、限定することなく、レトロウイルス（例えば、マウスレトロウイルス、トリレトロウイルス、モロニー Maus 白血病ウイルス（MoMuLV）、ハーヴェイマウス肉腫ウイルス（HaMuSV）、マウス乳房腫瘍ウイルス（MuMTV）、テナガザル白血病ウイルス（GaLV）およびラウス肉腫ウイルス（RSV））、レンチウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、アルファウイルスなどに基づくものであってよい。他の例は、本明細書において他の場所において提供されるか、当該分野において公知である。ウイルスベクターは、ウイルスの天然のバリエーション、株、または血清型、例えば本明細書において提供されるもののいずれか1つに基づくものであってよい。ウイルスベクターはまた、分子進化を通して選択されるウイルスに基づくものであってよい。ウイルスベクターはまた、操作されたベクター、組み換えベクター、変異体ベクター、またはハイブリッドベクターであってよい。幾つかの態様において、ウイルスベクターは、「キメラウイルスベクター」である。かかる態様において、このことは、ウイルスベクターが、1種より多くのウイルスまたはウイルスベクターに由来するウイルス成分からなることを意味する。

10

20

30

40

50

【0073】

C. 本発明の方法における使用のための組成物

重要なことに、明細書に提供される方法および組成物が、ウイルス導入ベクターに対して、IgGおよび／またはIgM応答などの、本免疫応答を減弱化することが、わかった。加えて、本明細書に提供される方法および組成物が、導入遺伝子発現を改善するとわかった。重要なことに、かかる効果は、反復した、例として、2回、3回以上の、請求された組成物の投与を通して、維持される。本明細書において提供される方法および組成物は、ウイルス導入ベクターによる対象の処置のために有用である。ウイルス導入ベクターは、遺伝子治療、遺伝子編集、遺伝子発現調節およびエクソンスキッピングのためのものを含む多様な目的のために導入遺伝子を送達するために用いることができ、本明細書において提供される方法および組成物もまた、そのように適用可能である。

【0074】

導入遺伝子

本明細書において提供されるウイルス導入ベクターの導入遺伝子は、遺伝子治療導入遺伝子であってよく、疾患または障害によるものなどの、対象にとって有益ないずれかのタンパク質またはその部分をコードしてもよい。タンパク質は、細胞外、細胞内、または膜結合タンパク質であってよい。該タンパク質は、治療用タンパク質であり、ウイルス導入ベクターにより遺伝子治療導入遺伝子が投与される対象は、当該タンパク質の対象の内因性バリエーションが欠損しているか、限定された量で産生されるか、または全く産生されない疾患または障害を有する。したがって、対象は、本明細書において提供される疾患または障害のいずれか1つを有するものであってよく、導入遺伝子は、本明細書において提供される治療用タンパク質またはその部分のいずれか1つをコードするものであってもよい。

【0075】

治療用タンパク質の例として、これらに限定されないが、注入可能なまたは注射可能な治療用タンパク質、酵素、酵素補因子、ホルモン、血液または血液凝固因子、サイトカインおよびインターフェロン、増殖因子、アディポカインなどが挙げられる。

【0076】

注入可能なまたは注射可能な治療用タンパク質の例として、例えば、トシリズマブ（Roche／Actemra（登録商標））、アルファ-1アンチトリプシン（Kamada／AAT）、Hematide（登録商標）（AffymaxおよびTakeda、合成ペプチド）、アルブインターフェロンアルファ-2b（Novartis／Zalbin（商標））、Rhucin（登録商標）（Pharming Group、C1阻害剤補充療法）、テサモレリン（Theratechnologies／Egripta、合成成長ホルモン放出因子）、オクレリズマブ（Genentech、RocheおよびBiogen）、ベリムマブ（GlaxoSmithKline／Benlysta（登録商標））、ペグロチカーゼ（Savient Pharmaceuticals／Krystexxa（商標））、タリグルセラーゼアルファ（Protalix／Uplyso）、アガルシダーゼアルファ（Shire／Replagal（登録商標））、ならびにベラグルセラーゼアルファ（Shire）が挙げられる。

【0077】

酵素の例として、リゾチーム、オキシドレダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼ、アスパラギナーゼ、ウリカーゼ、グリコシダーゼ、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、ヘパリナーゼ、ヘパラナーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、溶解素およびリガーゼが挙げられる。酵素の他の例は、酵素補充療法のために用いられるものを含み、これは、限定されないが、イミグルセラーゼ（例えば、CEREZYME（商標））、 α -ガラクトシダーゼA（ α -gal A）（例えば、アガルシダーゼベータ、FABRYZYME（商標））、酸 α -グルコシダーゼ（GAA）（例えば、アルグルコシダーゼアルファ、LUMIZYME（商標）、MYOZYME（商標））、およびアリアルスルファターゼB（例えば、ラロニダーゼ、ALDURAZYME（商標）、イデュルスルファターゼ、ELAPRASE（商標）、アリアルスルファターゼB、NAGLAZYME（商標））を含む。

【0078】

ホルモンの例は、性腺刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、メラノコルチン、脳下垂体ホルモン、バソプレシン、オキシトシン、成長ホルモン、プロラクチン、オレキシン、ナトリウム排泄増加ホルモン、副甲状腺ホルモン、カルシトニン、エリスロポイエチン、および膵臓ホルモンを含むが、これに限定されない。

【0079】

血液または血液凝固因子の例として、第I因子（フィブリノーゲン）、第II因子（プロトロンビン）、組織因子、第V因子（プロアクセレリン、不安定因子）、第VII因子（安定因子、プロコンバーチン）、第VII因子（抗血友病性グロブリン）、第IX因子（クリスマス因子または血漿トロンボプラスチン成分）、第X因子（スチュアート・プロワー因子）、第Xa因子、第XI因子、第XII因子（ハーゲマン因子）、第XIII因子（フィブリン安定化因子）、フォン・ヴィルブラント因子、フォンヘルデブランド因子、プレカリクレイン（フレッチャー因子）、高分子キニノーゲン（HMWK）（フィッツジェラルド因子）、フィブロネクチン、フィブリン、トロンビン、アンチトロンビンIIなどのアンチトロンビン、ヘパリンコファクターII、プロテインC、プロテインS、プロテインZ、プロテインZ関連プロテアーゼ阻害剤（ZPI）、プラスミノーゲン、アルファ2-アンチプラスミン、組織プラスミノーゲンアクチベーター（tPA）、ウロキナーゼ、プラスミノーゲンアクチベーター阻害剤-1（PAI1）、プラスミノーゲンアクチベーター阻害剤-2（PAI2）、癌凝血原（cancer procoagulant）、およびエポエチンアルファ（Epogen、Procrit）が挙げられる。

【0080】

10

20

30

40

50

サイトカインの例として、リンホカイン、インターロイキン、ならびにケモカイン、 $IFN-\gamma$ 、 $TGF-\beta$ などの1型サイトカイン、ならびに $IL-4$ 、 $IL-10$ および $IL-13$ などの2型サイトカインが挙げられる。増殖因子の例として、アドレノメデュリン(AM)、アングリオポエチン(Ang)、自己分泌型細胞運動刺激因子、骨形成タンパク質(BMP)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、上皮増殖因子(EGF)、エリスロポエチン(EPO)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、グリア細胞由来神経栄養因子受容体(GDNF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、増殖分化因子-9(GDF9)、肝細胞増殖因子(HGF)、肝細胞腫由来増殖因子(HDGF)、インスリン様増殖因子(IGF)、遊走刺激因子、ミオスタチン(GDF-8)、神経増殖因子(NGF)および他のニューロトロフィン、血小板由来増殖因子(PDGF)、トロンボポエチン(TPO)、トランスフォーミング増殖因子アルファ($TGF-\alpha$)、トランスフォーミング増殖因子ベータ($TGF-\beta$)、腫瘍壊死因子-アルファ($TNF-\alpha$)、血管内皮増殖因子(VEGF)、Wntシグナル伝達経路、胎盤増殖因子(PLGF)、[(ウシ胎仔ソマトトロフィン)](FBS)、 $IL-1$ 、 $IL-2$ 、 $IL-3$ 、 $IL-4$ 、 $IL-5$ 、 $IL-6$ および $IL-7$ が挙げられる。

10

アディポカインの例として、レプチンおよびアディポネクチンが挙げられる。

【0081】

治療用タンパク質のさらなる例として、これらに限定されないが、受容体、シグナル伝達タンパク質、細胞骨格タンパク質、足場タンパク質、転写因子、構造タンパク質、膜タンパク質、細胞質タンパク質、結合タンパク質、核タンパク質、分泌型タンパク質、ゴルジ体タンパク質、小胞体タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、および小胞タンパク質などが挙げられる。

20

【0082】

本明細書において提供される遺伝子治療用ウイルス導入ベクターの導入遺伝子は、対象におけるその内因性バージョンの何らかの欠損(内因性バージョン発現の欠損を含む)を通して、対象において疾患または障害をもたらす、任意のタンパク質の機能的なバージョンをコードしていてもよい。

【0083】

かかる疾患または障害の例として、これらに限定されないが、以下が挙げられる：リソソーム蓄積性疾患／障害、例えばSantavuori-Haltia病(小児性神経セロイドリポフスチン沈着症1型)、Jansky-Bielschowsky病(遅発型小児性神経セロイドリポフスチン沈着症、2型)、バッテン病(若年性神経セロイドリポフスチン症、3型)、クーフス病(神経セロイドリポフスチン症、4型)、フォン・ギールケ病(糖原病、Ia型)、糖原病、Ib型、ポンペ病(糖原病、II型)、フォーブス病またはコリ病(糖原病、III型)、ムコリピドーシスII(Ⅰ細胞病)、ムコリピドーシスIII(偽性ハーラー・ポリジストロフィー)、ムコリピドーシスIV(シアロリピドーシス(sialolipidosi))、シスチン症(成人非腎症性型)、シスチン症(小児性腎症性型)、シスチン症(若年性または青年性腎症性型)、サラ病／小児型シアル酸蓄積障害、およびサポシン欠損；脂質およびスフィンゴ脂質分解の障害、例えばGM1ガングリオシドーシス(小児性、遅発型小児性／若年性、および成人型／慢性)、テイ・サックス病、サンドホフ病、GM2ガングリオシドーシス、Abバリエーション、ファブリー病、ゴーシェ病、I、IIおよびIII型、異染性白質ジストロフィー、クラッペ病(早発型および遅発型)、ニーマン・ピック病、A、B、C1およびC2型、ファバー病およびウォルマン病(コレステリルエステル蓄積症)；ムコ多糖分解の障害、例えばハーラー症候群(MPS I)、シャイエ症候群(MPS IS)、ハーラー・シャイエ症候群(MPS IH/S)、ハンター症候群(MPS II)、サンフィリポA症候群(MPS IIIA)、サンフィリポB症候群(MPS IIIB)、サンフィリポC症候群(MPS IIIC)、サンフィリポD症候群(MPS IIID)、モルキオA症候群(MPS IVA)、モルキオB症候群(MPS IVB)、マロトー・ラミー症候

30

40

50

群（MPS VI）、およびスライ症候群（MPS VII）；糖タンパク質分解の障害、例えばアルファマンノース症、ベータマンノース症、フコシドーシス、アスパルチルグルコサミン尿症、ムコリビドーシスⅠ（シアリドーシス）、ガラクトシアリドーシス、シンドラー病、およびⅡ型シンドラー病／神崎病；ならびに白質ジストロフィー疾患／障害、例えば、無ベータリポ蛋白血症、新生児副腎白質ジストロフィー、カナバン病、脳髄黄色腫症、ペリツェウス・メルツバッヘル病、タンジール病、小児性レフサム病、および古典的レフサム病。

【0084】

本明細書において提供される対象のかかる疾患／障害のさらなる例として、これらに限定されないが、以下が挙げられる：酸性マルターゼ欠損症（例えば、ポンペ病、糖原病2型、リソソーム蓄積症）；カルニチン欠損症；カルニチンパルミチルトランスフェラーゼ欠損症；脱分枝酵素欠損症（例えば、コリ病またはフォーブス病、糖原病3型）；乳酸デヒドロゲナーゼ欠損症（例えば、糖原病11型）；ミオアデニル酸デアミナーゼ欠損症；ホスホフルクトキナーゼ欠損症（例えば、垂井病、糖原病7型）；ホスホグリセリン酸キナーゼ欠損症（例えば、糖原病9型）；ホスホグリセリン酸ムターゼ欠損症（例えば、糖原病10型）；ホスホリラーゼ欠損症（例えば、マッカードル病、筋ホスホリラーゼ欠損症、糖原病5型）；ゴーシェ病（例えば、染色体1、酵素グルコセレブロシダーゼが影響を受ける）；軟骨無形成症（例えば、染色体4、線維芽細胞増殖因子受容体3が影響を受ける）；ハンチントン病（例えば、染色体4、ハンチンチン）；ヘモクロマトーシス（例えば、染色体6、HFEタンパク質）；嚢胞性線維症（例えば、染色体7、CFTR）；フリートライヒ運動失調症（染色体9、フラタキシン）；ベスト病（染色体11、VMD2）；鎌状赤血球症（染色体11、ヘモグロビン）；フェニルケトン尿症（染色体12、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ）；マルファン症候群（染色体15、フィブリリン）；筋緊張性ジストロフィー（染色体19、筋緊張性ジストロフィータンパク質キナーゼ）；副腎白質ジストロフィー（X染色体、ペルオキシソーム中のリグノセロイル-CoAリガーゼ）；デュシェンヌ筋ジストロフィー（X染色体、ジストロフィン）；レット症候群（X染色体、メチルCpG結合タンパク質2）；レーベル遺伝性視神経症（ミトコンドリア、呼吸器タンパク質）；ミトコンドリア脳症、乳酸アシドーシスおよび脳卒中（MELAS）（ミトコンドリア、トランスファーRNA）；ならびに尿素回路の酵素欠損。

【0085】

かかる疾患または障害のなお追加の例として、これらに限定されないが、鎌状赤血球貧血、筋細管ミオパチー、血友病B、リポタンパク質リパーゼ欠損症、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、クリグラー・ナジャー症候群、ムコリビドーシスⅤ、ニーマン・ピック病A、サンフィリポA、サンフィリポB、サンフィリポC、サンフィリポD、b-地中海貧血症およびデュシェンヌ型筋ジストロフィーが挙げられる。疾患または障害のなおさらなる例は、脂質およびスフィンゴ脂質分解、ムコ多糖分解、グリコプロテイン分解、ロイコジストロフィー等々における、欠陥の結果であるものを、含む。

【0086】

本明細書に提供される疾患または障害のいずれか1つの不完全なタンパク質の機能的なバージョンは、遺伝子治療ウイルス導入ベクターの導入遺伝子によってコードされてもよく、そして、考えられた治療タンパク質でもある。

【0087】

治療用タンパク質もまた、筋ホスホリラーゼ、グルコセレブロシダーゼ、線維芽細胞増殖因子受容体3、ハンチンチン、HFEタンパク質、CFTR、フラタキシン、VMD2、ヘモグロビン、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、フィブリリン、筋強直性ジストロフィータンパク質キナーゼ、リグノセロイル-CoAリガーゼ、ジストロフィン、メチルCpG結合タンパク質2、ベータヘモグロビン、ミオチューブラリン、カテプシンA、第IX因子、リポタンパク質リパーゼ、ベータガラクトシダーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、イズロン酸-2-スルファターゼ、酸性アルファグルコシダーゼ、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ1-1、GlcNAc-1-ホスホトランスフェラー

ゼ、G l c N A c - 1 - ホスホトランスフェラーゼ、ムコリピン (M u c o l i p i n) - 1、ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質、スフィンゴミエリナーゼ、酸性セラミダーゼ、ライソソーム酸性リパーゼ、アルファー- L - イズロニダーゼ、ヘパランN-スルファターゼ、アルファー-N-アセチルグルコサミニダーゼ、アセチル- C o A アルファー-グルコサミニドアセチルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン6-スルファターゼ、N-アセチルガラクトサミン-6-スルファターゼ、アルファーマンノシダーゼ、アルファ-ガラクトシダーゼA、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子および呼吸器タンパク質を含むということになる。

【0088】

さらなる例として、治療用タンパク質はまた、以下に関連するタンパク質の機能的バージョンを含む：脂質およびスフィンゴ脂質分解の障害（例えば、 β -ガラクトシダーゼ-1、 β -ヘキソサミニダーゼA、 β -ヘキソサミニダーゼAおよびB、GM2アクチベータータンパク質、8-ガラクトシダーゼA、グルコセレブロシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、アリアルスルファターゼA、ガラクトシルセラミダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、NPC1、HE1タンパク質（コレステロール輸送の欠陥）、酸性セラミダーゼ、ライソソーム酸性リパーゼ）；ムコ多糖分解の障害（例えば、L-イズロニダーゼ、L-イズロニダーゼ、L-イズロニダーゼ、イズロン酸スルファターゼ、ヘパランN-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミニダーゼ、アセチル- C o A -グルコサミニダーゼ、アセチルトランスフェラーゼ、アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ、ガラクトサミン-6-スルファターゼ、アリアルスルファターゼB、グルクロニダーゼ）；糖タンパク質分解の障害（例えば、マンノシダーゼ、マンノシダーゼ、L-フコシダーゼ、アスパルチルグルコサミニダーゼ、ノイラミニダーゼ、リソソーム保護タンパク質、リソソーム8-N-アセチルガラクトサミニダーゼ、リソソーム8-N-アセチルガラクトサミニダーゼ）；リソソーム蓄積障害（例えば、パルミトイル-タンパク質チオエステラーゼ、少なくとも4種のサブタイプ、リソソーム膜タンパク質、未知、グルコース-6-ホスファターゼ、グルコース-6-ホスファートトランスロカーゼ、酸性マルターゼ、脱分枝酵素アミロ-1，6グルコシダーゼ、N-アセチルグルコサミン-1-ホスホトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン-1-ホスホトランスフェラーゼ、ガングリオシドシアリダーゼ（ノイラミニダーゼ）、リソソームシステイン輸送タンパク質、リソソームシステイン輸送タンパク質、リソソームシステイン輸送タンパク質、シアル酸輸送タンパク質サポニンA、B、C、D）および白質ジストロフィー（例えば、ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質／アポリポタンパク質B、ペルオキシソーム膜輸送タンパク質、ペルオキシシン、アスパルトアシラーゼ、ステロール-27-ヒドロキシラーゼ、プロテオリピドタンパク質、ABC1トランスポーター、ペルオキシソーム膜タンパク質3またはペルオキシソーム新生因子1、フィタン酸オキシダーゼ）。

【0089】

本明細書において提供されるウイルス導入ベクターは、遺伝子編集のために用いることができる。かかる態様において、ウイルス導入ベクターの導入遺伝子は、遺伝子編集導入遺伝子である。かかる導入遺伝子は、遺伝子編集プロセスに関与する剤または成分をコードする。一般に、かかるプロセスは、ゲノムDNAに対する、ターゲティングされたDNAの挿入、置き換え、変異誘発または除去などの、持続性のまたは恒久的な改変をもたらす。遺伝子編集は、目的のDNA配列をコードする核酸の送達、およびエンドヌクレアーゼを用いて目的の配列をゲノムDNA中の標的部位に挿入することを含む。したがって、遺伝子編集導入遺伝子は、挿入のための目的のDNA配列をコードするこれらの核酸を含んでもよい。幾つかの態様において、挿入のためのDNA配列は、本明細書において提供される治療用タンパク質のいずれかをコードするDNA配列である。あるいは、またはこれに加えて、遺伝子編集導入遺伝子は、単独で、または他の成分と組み合わせて遺伝子編集プロセスを行う1以上の成分をコードする核酸を、含んでもよい。本明細書において提供される遺伝子編集導入遺伝子は、エンドヌクレアーゼおよび／またはガイドRNAなど

10

20

30

40

50

をコードしていてもよい。

【0090】

エンドヌクレアーゼは、ゲノム中の所望される位置において二本鎖DNA中に切断部を作り出し、宿主細胞の機構を用いて、相同組み換え、非相同末端結合などを用いて切断部を修復する。遺伝子を編集するために用いることができるエンドヌクレアーゼのクラスとして、これらに限定されないが、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TALEヌクレアーゼ（TALEN）、CRISPRおよびホーミングエンドヌクレアーゼが挙げられる。本明細書において提供されるウイルス導入ベクターの遺伝子編集導入遺伝子は、本明細書において提供されるエンドヌクレアーゼのいずれか1つをコードしていてもよい。

10

【0091】

メガヌクレアーゼは、一般に、それらがDNA配列を認識して切断する能力により特徴づけられる（約14～40塩基対）。加えて、変異誘発およびハイスループットスクリーニングおよびコンビナトリアルアセンブリなどの公知の技術を用いて、カスタマイズされたメガヌクレアーゼを作り出すことができ、ここで、タンパク質のサブユニットを会合または融合させることができる。メガヌクレアーゼの例は、米国特許第8,802,437号、同第8,445,251号および同第8,338,157号；ならびに米国公開番号20130224863、20110113509および20110033935において見出すことができ、これらのメガヌクレアーゼは、本明細書において参考として援用される。

20

【0092】

ジンクフィンガーヌクレアーゼは、典型的には、核酸分子内の特異的な標的部位に結合するジンクフィンガードメイン、および結合ドメインに結合した標的部位内またはその近傍において核酸分子を切断する核酸切断ドメインを含む。典型的な操作されたジンクフィンガーヌクレアーゼは、3～6の個別のジンクフィンガーモチーフを有し、9塩基対～18塩基対の範囲の長さの標的部位に結合する、結合ドメインを含む。ジンクフィンガーヌクレアーゼは、所与の核酸分子中の実質的にあらゆる所望される配列を、切断のための標的とするように設計することができる。例えば、既知の特異性の個々のジンクフィンガーモチーフを組み合わせることにより、所望される特異性を有するジンクフィンガー結合ドメインを設計することができる。DNAに結合したジンクフィンガータンパク質Zif268の構造は、この分野における研究の多くの情報をもたらし、64の可能な塩基対トリプレットの各々についてジンクフィンガーを得て、次いでこれらのモジュラージンクフィンガーを混合およびマッチングして、任意の所望される配列特異性を有するタンパク質を設計するというコンセプトが記載されている（Pavletich NP, Pabo CO（1991年5月）、「Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å」、Science 252（5007）：809-17；この全内容は、本明細書において参考として援用される）。幾つかの態様において、細菌またはファージディスプレイを用いて、所望される核酸配列、例えば所望されるエンドヌクレアーゼ標的部位を認識するジンクフィンガードメインを開発する。ジンクフィンガーヌクレアーゼは、幾つかの態様において、リンカー、例えばポリペプチドリンカーを介して互いに融合または他の方法で共役した、ジンクフィンガー結合ドメインと切断ドメインとを含む。リンカーの長さにより、ジンクフィンガードメインに結合した核酸配列からの切断部の距離を決定することができる。ジンクフィンガーヌクレアーゼの例は、米国特許第8,956,828；8,921,112；8,846,578；8,569,253号で見つけられることができ、それらのジンクフィンガーヌクレアーゼは、本明細書に参照によって組み込まれる。

30

40

【0093】

TALEヌクレアーゼ（TALEN）は、特異的DNA結合ドメインを一般的なDNA切断ドメインに融合させることにより作製された、人工制限酵素である。任意

50

の所望されるDNA配列に結合するように設計することができるDNA結合ドメインは、植物に感染する特定の細菌により排出されるDNA結合タンパク質であるトランスクリプション・アクチベーターライク(transcription activator-like)(TAL)エフェクターに由来する。TALエフェクター(TALE)は、実際に任意のDNA配列に結合するように設計するか、または一緒に結合させてDNA切断ドメインと組み合わせてアレイにすることができる。TALENは、ジンクフィンガーヌクレアーゼを設計するために同様に用いることができる。

【0094】

TALENの例は、米国特許第8,697,853号；ならびに米国公開番号20150118216、20150079064および20140087426において見出すことができ、そのTALENSは、本明細書において参考として援用される。

10

【0095】

CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)／Casシステムもまた、遺伝子編集のためのツールとして用いることができる。

【0096】

CRISPR／Casシステムにおいて、ガイドRNA(gRNA)は、ゲノムにより、またはエピソームにより(例えば、プラスミド上で)コードされる。gRNAは、転写に続いて、Cas9エンドヌクレアーゼなどのエンドヌクレアーゼと複合体を形成する。複合体は、次いで、gRNAの特異性決定配列(SSID)により、典型的には細胞のゲノム中に位置するDNA標的配列にガイドされる。Cas9またはCas9エンドヌクレアーゼとは、RNAによりガイドされる、Cas9タンパク質、またはそのフラグメント(例えば、Cas9の活性もしくは不活性なDNA切断ドメインまたは部分的に不活性なDNA切断ドメイン(例えば、Cas9ニッカーゼ(nickase))、および／あるいはCas9のgRNA結合ドメインを含むタンパク質)を含む、エンドヌクレアーゼを指す。Cas9は、CRISPR反復配列中の短いモチーフ(PAMまたはプロト Spacer(proto spacer)隣接モチーフ)を認識して、自己と非自己を区別することを助ける。Cas9エンドヌクレアーゼの配列および構造は、当業者に周知である(例えば「Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes.」Ferretti J. J., McShan W. M., Ajdic D. J., Savic D. J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A. N., Kenton S., Lai H. S., Lin S. P., Qian Y., Jia H. G., Najar F. Z., Ren Q., Zhu H., Song L. expand/collapse author list McLaughlin R. E., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:4658-4663(2001)；「CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III.」Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C. M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z. A., Eckert M. R., Vogel J., Charpentier E., Nature 471:602-607(2011)；および「A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.」Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012)を参照)。sgRNA(single guide RNA:「sgRNA」または単に「gRNA」)は、crRNAとtracrRNAとの両方の側面を単一のRNA種中に組み込むように操作することができる。例えば、Jinek M., Chylinski K.,

20

30

40

50

Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. Science 337: 816-821 (2012) を参照)。
【0097】

Cas9 のオルトログは、多様な種において記載されており、これは、これらに限定されないが、*S. pyogenes* および *S. thermophilus* を含む。さらなる好適な Cas9 エンドヌクレアーゼおよび配列は、当業者には明らかであり、かかる Cas9 エンドヌクレアーゼおよび配列は、Chylinski、Rhn および Charpentier、「The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems」(2013) RNA Biology 10: 5, 726-737 において開示される生物および遺伝子座からの Cas9 配列を含む。幾つかの態様において、遺伝子編集導入遺伝子は、野生型 Cas9、フラグメントまたは Cas9 バリエーションをコードする。「Cas9 バリエーション」は、Cas9 の機能を有する任意のタンパク質であって、天然に存在する Cas9 野生型エンドヌクレアーゼと同一ではないものである。幾つかの態様において、Cas9 バリエーションは、野生型 Cas9 またはそのフラグメントに対して相溶性を共有する。Cas9 バリエーションは、いくつかの態様において、*Streptococcus pyogenes* または *S. thermophilus* の Cas9 タンパク質に対して少なくとも 40% の配列同一性を有し、Cas9 の機能性を保持する。好ましくは、配列同一性は、少なくとも 90%、95% であるかまたはそれより高い。より好ましくは、配列同一性は、少なくとも 98% または 99% の配列同一性である。本明細書において提供される方法のいずれか 1 つにおける使用のための Cas9 バリエーションのいずれか 1 つのいくつかの態様において、配列同一性は、アミノ酸配列同一性である。Cas9 バリエーションはまた、Cas9 二量体、Cas9 融合タンパク質、Cas9 フラグメント、最小化された Cas9 タンパク質、切断ドメインを有しない Cas9 バリエーション、gRNA ドメインを有しない Cas9 バリエーション、Cas9 リコンビナーゼ融合物、fCas9、FokI-*id* Cas9 などを含む。かかる Cas9 バリエーションの例は、例えば、米国公開番号 20150071898 および 20150071899 において見出すことができ、その Cas9 タンパク質および Cas9 バリエーションの記載は、本明細書において参考として援用される。Cas9 バリエーションはまた、Cas9 ニッカーゼを含み、これは、Cas9 中の単一のエンドヌクレアーゼドメインを不活化する変異を含む。かかるニッカーゼは、標的核酸において、二本鎖切断とは対照的に、一本鎖の切断を誘導することができる。Cas9 バリエーションはまた、1 つのヌクレアーゼドメインが変異により不活化されている Cas9 バリエーションである Cas9 ヌルヌクレアーゼを含む。さらなる Cas9 バリエーションおよびさらなる Cas9 バリエーションを同定する方法の例は、米国公開番号 20140357523、20150165054 および 20150166980 において見出すことができ、Cas9 タンパク質、Cas9 バリエーションおよびそれらの同定の方法に関するこれらの内容は、本明細書において参考として援用される。

【0098】

Cas9 バリエーションのなお他の例は、Cas9 D10A として知られるニッカーゼ活性のみを有する変異形態を含む。Cas9 D10A は、遺伝子座が、隣接する DNA ニックを生じるように設計された一対の Cas9 複合体により標的とされる場合に、標的特異性に関して魅力的である。Cas9 バリエーションの別の例は、ヌクレアーゼ欠損 Cas9 (dCas9) である。HNH ドメインにおける変異 H840A および RuvC ドメインにおける変異 D10A は、切断活性を不活化するが、DNA 結合を妨げない。したがって、このバリエーションは、切断をとまなくことなくゲノムの任意の領域を配列特異的にターゲティングするために、用いることができる。実際に、多様なエフェクタードメインと融合させることにより、dCas9 は、遺伝子サイレンシングまたは活性化のいずれかのツールとして用いることができる。遺伝子編集導入遺伝子は、幾つかの態様において、本明細書において提供される Cas9 バリエーションのいずれか 1 つをコードしていてもよい。

【0099】

Cas9などのRNAによりプログラム可能なエンドヌクレアーゼを部位特異的な切断のために（例えばゲノムを改変するために）用いる方法は、当該分野において公知である（例えば、Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339, 819-823 (2013); Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339, 823-826 (2013); Hwang, W. Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nature biotechnology 31, 227-229 (2013); Jinek, M. et al. RNA-programmed genome editing in human cells. eLife 2, e00471 (2013); Dicarlo, J. E. et al. Genome engineering in Saccharomyces cerevisiae using CRISPR-Cas systems. Nucleic acids research (2013); Jiang, W. et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nature biotechnology 31, 233-239 (2013)を参照）。

10

20

【0100】

ホーミングエンドヌクレアーゼは、数個または単一の位置において、それらを合成するために用いられたゲノムDNAの加水分解を触媒することができ、それにより、それらの遺伝子を宿主中で水平方向に伝達して、それらの対立遺伝子頻度を増大することができる。ホーミングエンドヌクレアーゼは、一般に、長い認識配列を有し、それにより、それらは、低い確率の無作為切断を有する。1つの対立遺伝子は、伝達の前に遺伝子を担持し（ホーミングエンドヌクレアーゼ遺伝子+、HEG+）、一方、他方はこれを担持せず（HEG-）、酵素切断されやすい。酵素は、合成された後、HEG-の対立遺伝子において染色体を破壊し、細胞のDNA修復システムからの応答を開始させ、これが、組み換えを用いて、エンドヌクレアーゼのための遺伝子を含む、損傷を受けていないDNA対立遺伝子HEG+の逆のパターンを取る。したがって、遺伝子は、初めはそれを有しなかった別の対立遺伝子にコピーされ、首尾よく伝播される。ホーミングエンドヌクレアーゼの例は、例えば、米国公開番号20150166969；および米国特許第9,005,973号において見出すことができ、そのホーミングエンドヌクレアーゼは、本明細書において参考として援用される。

30

40

【0101】

本明細書において提供されるウイルス導入ベクターは、遺伝子発現調節のために用いることができる。かかる態様において、ウイルス導入ベクターの導入遺伝子は、遺伝子発現調節導入遺伝子である。かかる導入遺伝子は、1以上の内在遺伝子の発現を増強するか、阻害するか、または調節することができる、遺伝子発現モジュレーターをコードする。内在遺伝子は、本明細書において提供されるタンパク質のいずれか1つをコードしていてもよい（当該タンパク質が対象の内因性タンパク質であることを前提とする）。したがって、対象は、遺伝子発現調節により提供される利益が存在するであろう、本明細書において提供される疾患または障害のいずれか1つを有するものであってよい。

【0102】

遺伝子発現モジュレーターは、DNA結合タンパク質（例えば、人工転写因子、例えば米国公開番号20140296129のもの（その人工転写因子は、本明細書において参考として援用される）；および米国公開番号20030125286の転写サイレンサータンパク質（そのNRF転写サイレンサータンパク質NRFは、本明細書において参考として援用される））、ならびに治療用RNAを含む。治療用RNAとして、これらに限定されないが、mRNA翻訳の阻害剤（アンチセンス）、RNA干渉の剤（RNAi）、触

50

媒活性RNA分子（リボザイム）、トランスファーRNA（tRNA）、ならびにタンパク質および他の分子リガンドに結合するRNA（アプタマー）が挙げられる。

【0103】

遺伝子発現モジュレーターは、前述のうちのいずれかの剤を含み、アンチセンス核酸、RNAi分子（例えば、二本鎖RNA（dsRNA）、一本鎖RNA（ssRNA）、マイクロRNA（miRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、低分子ヘアピンRNA（shRNA））および三重鎖形成オリゴヌクレオチド（TFO）を含む。遺伝子発現モジュレーターはまた、前述のRNA分子のいずれかの改変されたバージョンを含んでもよく、したがって、改変されたmRNA、例えば合成化学的に改変されたRNAを含む。

【0104】

遺伝子発現モジュレーターは、アンチセンス核酸であってもよい。アンチセンス核酸は、遺伝子発現（例えば、変異体タンパク質、優性的に活性な遺伝子産物、毒性に関連するタンパク質、またはウイルスなどの感染性の剤により細胞中に導入される遺伝子産物の発現）の、ターゲティングされた阻害を提供することができる。したがって、遺伝子発現調節ウイルス導入ベクターは、ドミナント・ネガティブまたは機能獲得型の病原機構に関連する疾患もしくは障害、がんまたは感染症を処置するために用いることができる。本明細書において提供される方法のいずれか1つの対象は、ウイルス感染、炎症性障害、心血管疾患、がん、遺伝子障害または自己免疫性疾患を有する対象であってよい。アンチセンス核酸はまた、mRNAスプライシング機構に干渉して、正常な細胞によるmRNAプロセッシングを妨害することができる。したがって、遺伝子発現調節導入遺伝子は、スプライソソームと相互作用する要素をコードしていてもよい。アンチセンス核酸（および関連するコンストラクト）の例は、例えば、米国公開番号20050020529および20050271733において見出すことができ、そのアンチセンス核酸およびコンストラクトは、本明細書において参考として援用される。

【0105】

遺伝子発現モジュレーターはまた、リボザイム（すなわち、一本鎖RNAなどの他のRNAを切断することができるRNA分子）であってもよい。かかる分子は、RNA分子中の特異的なヌクレオチド配列を認識して、それを切断するように操作することができる（Cech, J. Amer. Med. Assn., 260:3030, 1988）。例えば、リボザイムは、そのリボザイムを含むコンストラクトに相補的な配列を有するmRNAのみが不活化されるように、操作することができる。リボザイムの型および関連するコンストラクトを調製する方法は、当該分野において公知である（Hasselhoff et al., Nature, 334:585, 1988; and 米国公開番号20050020529; かかるリボザイムおよび方法に関するその教示は、本明細書において参考として援用される）。

【0106】

遺伝子発現モジュレーターは、干渉RNA（RNAi）であってよい。RNA干渉は、干渉RNAにより媒介される配列特異的な転写後の遺伝子サイレンシングのプロセスを指す。一般に、dsRNAの存在は、RNAi応答を引き起こし得る。RNAiは、多様な系において研究されてきた。Fire et al., 1998, Nature, 391, 806、C. elegansにおけるRNAi; Bahramian and Zarbl, 1999, Molecular and Cellular Biology, 19, 274-283およびWianny and Goetz, 1999, Nature Cell Biol., 2, 70、哺乳動物系においてdsRNAにより媒介されるRNAi; Hammond et al., 2000, Nature, 404, 293、ショウジョウバエ細胞におけるRNAi in Drosophila cells; Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494、培養哺乳動物細胞において合成の21ヌクレオチドのRNAの二本鎖の導入により誘導されるRNAi。かかる研究は、他のものと共に、RNAi活性を媒介するためにRNAi分子の構築において役立つ、長さ、構造、化学組成およ

10

20

30

40

50

び配列に関するガイダンスを提供してきた。多様な刊行物が、遺伝子発現モジュレーターとして用いることができるRNAi分子の例を提供する。かかる刊行物として、米国特許第8,993,530号、同第8,877,917号、同第8,293,719号、同第7,947,659号、同第7,919,473号、同第7,790,878号、同第7,737,265号、同第7,592,322号；ならびに米国公開番号20150197746、20140350071、20140315835、20130156845および20100267805が挙げられ、RNAi分子の型ならびにそれらの作製に関する教示は、本明細書において参考として援用される。

【0107】

アプタマーは、多様なタンパク質標的に結合して、それらのタンパク質の他のタンパク質との相互作用を妨害することができる。したがって、遺伝子発現モジュレーターは、アプタマーであってもよく、遺伝子発現調節導入遺伝子は、かかるアプタマーをコードしていてもよい。アプタマーは、それらが、調節性タンパク質のDNA結合部位に特異的に結合することにより遺伝子の転写を妨げる能力のために選択され得る。PCT公開番号WO98/29430およびWO 00/20040は、遺伝子発現を調節するために用いられたアプタマーの例を提供し；米国公開番号20060128649もまた、かかるアプタマーの例を提供する；これらの各々のアプタマーは、本明細書において参考として援用される。

10

【0108】

さらなる例として、遺伝子発現の調節剤は、三重鎖オリゴマーであってもよい。かかる分子は、転写を停止させることができる。一般に、これは、オリゴマーが二重らせんDNAの周りを取り巻き、三重鎖らせんを形成するので、三重鎖戦略として知られる。かかる分子は、選択された遺伝子上のユニークな部位を認識するように設計することができる(Maher et al., Antisense Res. and Dev., 1(3):227, 1991; Helene, C., Anticancer Drug Design, 6(6):569, 1991)。

20

【0109】

本明細書において提供されるウイルス導入ベクターはまた、エクソンスキッピングのために用いることができる。かかる態様において、ウイルス導入ベクターの導入遺伝子は、エクソンスキッピング導入遺伝子である。かかる導入遺伝子は、エクソンスキッピングを生じることができるアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは他の剤をコードする。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、エクソン内のスプライス部位または調節エレメントに干渉して、遺伝子変異の存在に関わらず部分的に機能的な、短縮されたタンパク質をもたらすことができる。加えて、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、変異特異的であってもよく、メッセンジャーRNA前駆体中の変異部位に結合してエクソンスキッピングを誘導することができる。エクソンスキッピングのためのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、当該分野において公知であり、一般に、AONと称される。かかるAONは、snRNAを含む。アンチセンスオリゴヌクレオチド、それらを設計する方法および関連する作製方法の例は、例えば、米国公開番号20150225718、20150152415、20150140639、20150057330、20150045415、20140350076、20140350067および20140329762において見出すことができ、それらのAON、ならびに記載される関連する方法、例えばAONを設計および作製する方法は、その全体において本明細書において参考として援用される。

30

40

【0110】

本明細書において提供される方法のいずれか1つは、それを必要とする対象の細胞においてエクソンスキッピングをもたらすために用いることができる。対象は、エクソンスキッピングが利益をもたらすであろう任意の疾患または障害を有していてもよく、かかる疾患または障害に関連する適切な（その発現の間のエクソンスキッピングが有益であろう）タンパク質に基づいて、アンチセンスオリゴヌクレオチドを設計することができる。疾患および障害ならびに関連するタンパク質の例は、本明細書において提供される。本明細書に

50

において提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、対象は、筋ジストロフィー（例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィー）などの本明細書において記載されるジストロフィーのいずれか1つを有する。したがって、本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、エクソスキッピング導入遺伝子は、本明細書において提供されるジストロフィーのいずれか1つと関連する本明細書において提供されるタンパク質のいずれか1つにおいてエクソスキッピングをもたらすことができる、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは他の剤をコードする。本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは他の剤は、ジストロフィンにおいてエクソスキッピングをもたらすことができる。

10

【0111】

導入遺伝子の配列はまた、発現制御配列を含んでもよい。発現制御DNA配列は、プロモーター、エンハンサーおよびオペレーターを含み、一般に、発現コンストラクトが利用されるべき発現系に基づいて選択される。幾つかの態様において、プロモーターおよびエンハンサー配列は、遺伝子発現を増大する能力のために選択され、一方、オペレーター配列は、遺伝子発現を調節する能力のために選択され得る。導入遺伝子はまた、宿主細胞中での相同組み換えを容易にする、および好ましくは促進する、配列を含んでもよい。導入遺伝子はまた、宿主細胞中での複製のために必要である配列を含んでもよい。

【0112】

例示的な発現制御配列は、プロモーター配列、例えば、サイトメガロウイルスプロモーター；ラウス肉腫ウイルスプロモーター；およびサルウイルス40プロモーター；ならびに本明細書において他の場所で開示されるか当該分野において他に公知の任意の他の型のプロモーターを含む。一般に、プロモーターは、所望される発現産物をコードする配列の上流（すなわち5'）で作動的に連結される。導入遺伝子はまた、コード配列の下流で作動的に連結された（すなわち3'）好適なポリアデニル化配列（例えば、SV40またはヒト成長ホルモン遺伝子ポリアデニル化配列）を含んでもよい。

20

【0113】

ウイルスベクター

ウイルスは、それらが感染する細胞の内部でそれらのゲノムを輸送するために特化した機構を進化させてきた；かかるウイルスに基づくウイルスベクターは、特別な用途のために細胞に形質移入するように仕立てることができる。本明細書において提供されるとおり用いることができるウイルスベクターの例は、当該分野において公知であるか、本明細書において記載される。好適なウイルスベクターとして、例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス（HSV）に基づくベクター、アデノウイルスに基づくベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）に基づくベクター、およびAAV-アデノウイルスキメラベクターが挙げられる。

30

【0114】

本明細書において提供されるウイルス導入ベクターは、レトロウイルスに基づくものであってもよい。レトロウイルスは、広範な宿主細胞に感染することができる一本鎖ポジティブ・センスRNAウイルスである。感染すると、レトロウイルスゲノムは、そのRNAゲノムからDNAを生成するためにそれ自身の転写酵素を用いて、その宿主細胞のゲノム中に組み込まれる。ウイルスDNAが、次いで、ウイルスおよび宿主の遺伝子を翻訳および転写する宿主細胞DNAと共に複製される。レトロウイルスベクターは、ウイルス複製能力を失うように操作することができる。したがって、レトロウイルスベクターは、in vivoでの安定な遺伝子導入のために特に有用であると考えられる。レトロウイルスベクターの例は、例えば、米国公開番号20120009161、20090118212および20090017543において見出すことができ、そのウイルスベクターおよびそれらの作製の方法は、本明細書においてその全体において参考として援用される。

40

【0115】

レンチウイルスベクターは、本明細書において提供されるウイルス導入ベクターの作製

50

のために用いることができるレトロウイルスベクターの例である。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染する能力を有し、これは、遺伝子送達ベクターのより効率的な方法を構成する特性である（例えば、Durand et al., Viruses, 2011 Feb; 3(2):132-159を参照）。レンチウイルスの例として、HIV（ヒト）、サル免疫不全ウイルス（SIV）、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）およびビスナウイルス（ヒツジレンチウイルス）が挙げられる。他のレトロウイルスとは異なり、HIVに基づくベクターは、それらのパッセンジャー遺伝子を非分裂細胞中に組み込むことが知られている。レンチウイルスベクターの例は、例えば、米国公開番号20150224209、20150203870、20140335607、20140248306、20090148936および20080254008において見出すことができ、そのウイルスベクターおよびそれらの作製の方法は、本明細書においてその全体において参考として援用される。

10

【0116】

単純ヘルペスウイルス（HSV）に基づくウイルスベクターもまた、本明細書において提供される使用のために好適である。多くの複製欠損HSVベクターは、複製を防止するために、1以上のintermediate-early遺伝子を取り除く欠失を含む。ヘルペスベクターの利点は、潜伏期に入る能力により長期のDNA発現をもたらすことができること、および大きなウイルスDNAゲノムにより25kbまでの外来DNAを収容することができることである。HSVに基づくベクターの記載については、例えば、米国特許第5,837,532号、同第5,846,782号、同第5,849,572号および同第5,804,413号、ならびに国際特許出願WO91/02788、WO96/04394、WO98/15637およびWO99/06583を参照；そのウイルスベクターおよびそれらの作製の方法の記載は、その全体において参考として援用される。

20

【0117】

アデノウイルス（Ad）は、多様な異なる標的細胞型にin vivoでDNAを導入することができる無エンベロープウイルスである。ウイルスは、ウイルス複製のために必要とされる選択遺伝子を欠失させることにより、複製欠損にすることができる。より大きなDNAインサートのためのさらなる余地を可能にするために、犠牲にしてもよい複製に必須でないE3領域もまた頻繁に欠失させられる。ウイルス導入ベクターは、アデノウイルスに基づいていてもよい。アデノウイルス導入ベクターは、高い力価において作製することができ、DNAを複製中および非複製中の細胞に効率的に導入することができる。レンチウイルスとは異なり、アデノウイルスDNAは、ゲノム中には組み込まれず、したがって、細胞分裂の間には複製せず、その代わりに、それらは宿主細胞の核内で、宿主の複製機構を用いて複製する。

30

【0118】

ウイルス導入ベクターの基礎となるアデノウイルスは、任意の起源、任意のサブグループ、任意のサブタイプ、サブタイプの混合物、または任意の血清型からのものであってよい。例えば、アデノウイルスは、サブグループA（例えば、血清型12、18および31）、サブグループB（例えば、血清型3、7、11、14、16、21、34、35および50）、サブグループC（例えば、血清型1、2、5および6）、サブグループD（例えば、血清型8、9、10、13、15、17、19、20、22~30、32、33、36~39および42~48）、サブグループE（例えば、血清型4）、サブグループF（例えば、血清型40および41）、未分類の血清群（例えば、血清型49および51）、または任意の他のアデノウイルス血清型のものであってよい。アデノウイルス血清型1~51は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Va.) から入手可能である。非C群アデノウイルス、および非ヒトアデノウイルスですら、複製欠損アデノウイルスベクターを調製するために用いることができる。非C群アデノウイルスベクター、非C群アデノウイルスベクターを作製する方法、および非C群アデノウイルスベクターを用いる方法は、例えば、米国特許第5,801,030号、同第5,837,511号および同第5,849,561号、なら

40

50

びに国際特許出願WO97/12986およびWO98/53087において開示される。任意のアデノウイルス、キメラアデノウイルスですら、アデノウイルスベクターのためのウイルスゲノムのソースとして用いることができる。例えば、ヒトアデノウイルスを、複製欠損アデノウイルスベクターのためのウイルスゲノムのソースとして用いることができる。アデノウイルスベクターのさらなる例は、米国公開番号20150093831、20140248305、20120283318、20100008889、20090175897および20090088398において見出すことができ、そのウイルスベクターおよびそれらの作製の方法の記載は、その全体において参考として援用される。

【0119】

本明細書において提供されるウイルス導入ベクターはまた、アデノ随伴ウイルス(AAV)に基づいていてもよい。AAVベクターは、本明細書において記載されるもののよう
10
な治療的適用における使用のために、特に関心を集めて来た。AAVは、ヒト疾患を引き起こすことは知られていないDNAウイルスである。一般に、AAVは、効率的な複製のために、ヘルパーウイルス(例えば、アデノウイルスまたはヘルペスウイルス)との共感染またはヘルパー遺伝子の発現を必要とする。AAVは、宿主細胞ゲノムに特定の部位において安定に感染する能力を有し、それにより、レトロウイルスより予測可能である；しかし、一般に、ベクターのクローニング能力は4.9kbである。遺伝子治療の適用において用いられてきたAAVベクターは、一般に、DNA複製およびパッケージングのための認識シグナルを含む末端反復(ITER)のみが残るように、親ゲノムの約96%を欠失している。AAVに基づくベクターの記載については、例えば、米国特許第8,679,
20
837号、同第8,637,255号、同第8,409,842号、同第7,803,622号および同第7,790,449、ならびに米国公開番号20150065562、20140155469、20140037585、20130096182、20120100606および20070036757を参照；そのウイルスベクターおよびそれらの作製の方法は、は、本明細書においてその全体において参考として援用される。AAVベクターは、組み換えAAVベクターであってよい。

【0120】

AAVベクターはまた、自己相補的(sc)AAVベクターであってよく、これは、例えば、米国特許公開2007/01110724および2004/0029106、ならび
30
に米国特許第7,465,583号および同第7,186,699号において記載され、ベクターおよびその作製の方法は、本明細書において参考として援用される。

【0121】

ウイルス導入ベクターの基礎となるアデノ随伴ウイルスは、任意の血清型または血清型の混合物のものであってよい。AAV血清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10およびAAV11を含む。例えば、ウイルス導入ベクターが血清型の混合物に基づく場合、ウイルス導入ベクターは、AAV血清型の1つ(例えばAAV血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10および11のいずれか1つから選択される)から取得されるカプシドシグナル配列、ならびに異なる血清型(例えばAAV血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10および11のいずれか1つから選択される)からのパッケージング配列を含んでもよい。したがって、本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、AAVベクターは、AAV 2/8ベクターである。本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つの他の態様において、AAVベクターは、AAV 2/5ベクターである。

【0122】

本明細書において提供されるウイルス導入ベクターはまた、アルファウイルスに基づいていてもよい。アルファウイルスとして、シンドビス(およびVEEV)ウイルス、アウラ(Aura)ウイルス、ババンキ(Babanki)ウイルス、バーマフォレストウイルス、ベバル(Bebaru)ウイルス、カバソウ(Cabassou)ウイルス、チク
50
ングニアウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、エバーグレード(Everglades)ウ

イルス、フォートモーガン (Fort Morgan) ウイルス、ゲタウイルス、ハイランド J (Highlands J) ウイルス、キジラガチ (Kyzylgach) ウイルス、マヤロウイルス、メトリ (Me Tri) ウイルス、ミデルバーグ (Middelburg) ウイルス、モッソダスペドラス (Mosso das Pedras) ウイルス、ムカンボウイルス、ヌドゥムウイルス、オニョンニョンウイルス、ピクスナウイルス、リオネグロウイルス、ロスリバーウイルス、サケ膀胱病ウイルス、セムリキ森林ウイルス、南部ゾウアザラシ (Southern elephant seal) ウイルス、トナテ (Tonate) ウイルス、トロカラ (Trocara) ウイルス、ウナウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、およびワタロアウイルスが挙げられる。一般に、かかるウイルスのゲノムは、宿主細胞の細胞質中で翻訳されることができる、非構造タンパク質 (例えばレプリコン) および構造タンパク質 (例えば、カプシドおよびエンベロープ) をコードする。ロスリバーウイルス、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス (SFV)、およびベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV) は全て、導入遺伝子送達のためのウイルス導入ベクターを開発するために用いられてきた。シュードタイプウイルスは、アルファウイルスのエンベロープ糖タンパク質とレトロウイルスのカプシドとを組み合わせることにより形成させることができる。アルファウイルスベクターの例は、米国公開番号 20150050243、20090305344 および 20060177819 において見出すことができ；ベクターおよびそれらの作製の方法は、その全体において本明細書において参考として援用される。

10

コルチコステロイド

20

【0123】

「コルチコステロイド」は、脊椎動物の副腎皮質において生成されるなどのステロイドホルモン、ならびにこれらのホルモンの合成類似体である。コルチコステロイドは、糖質コルチコイドおよび鉱質コルチコイドを含む。

【0124】

コルチコステロイドの例は、以下を含むが、これらに限定されない：アルクロメタゾン、アムシノニド、ベクロメタゾン、ベタメサゾン、ブデソニド、シクレソニド、クロベタゾール、クロベタゾン、クロコルトロン、クロプレドノール、コルチバゾール、デフラザコルト、デオキシコルチコステロン、デソニドデスオキシメタゾン、デキサメタゾン、ジフロラゾン、ジフルコルトロン、ジフルプレドナート、フルクロロン、フルドロコルチゾン、フルドロキシコルチド、フルメタゾン、フルニソリド、フルオシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルオコルチン、フルオコルトロン、フルオロメトロン、フルペロロン、フルチカゾン、フルチカゾンプロピオナート、フルプレドニデン、ホルモコルタール、ハルシノニド、ハロメタゾン、ハイドロコーチゾンアセポナート、ハイドロコーチゾン・ブテプラート、酪酸ヒドロコルチゾン、ロテプレドノール、メドリゾン、メプレドニゾン、メチルプレドニゾロン、メチルプレドニゾロンアセポナート、モメタゾンフロアート、パラメサゾン、プレドニカルバート、プレドノゾン、プレドニゾロン、プレドニリデン、リメキシロン、チキシコルトール、トリウムシノロン、およびウロベタゾール、またはそれらの組み合わせ、任意にそれらのラセミ体、それらの鏡像異性体、それらのジアステレオマー、およびそれらの混和物、および任意にそれらの薬理学的に互換性の酸の付加塩の形におけるそれら。好ましい態様において、コルチコステロイドは、デキサメタゾン (Dex)、メチルプレドニゾロン、またはそれらの誘導体である。メチルプレドニゾロンの誘導体は、たとえば、琥珀酸メチルプレドニゾロンナトリウム、および酢酸メチルプレドニゾロンを含む。デキサメタゾンの誘導体は、たとえば、デキサメタゾンナトリウムホスファートおよび酢酸デキサメタゾンを含む。

30

40

【0125】

コルチコステロイドのなお他の例は、天然であるもの (例として、11-デヒドロコルチコステロン (11-オキシコルチコステロン、17-デオキシコルチゾン) = 21-ヒドロキシプレグナ-4-エン-3, 11, 20-トリオン；11-デオキシコルチコステロン (デオキシコルチコステロン、デスオキシコルトン；21-ヒドロキシプロゲステロ

50

ン) = 21-ヒドロキシプレグナ-4-エン-3, 20-ジオン; 11-デオキシコルチ
 ザール(コルトドキソン、コルテキソロン) = 17 α , 21-ジヒドロキシプレグナ-4
 -エン-3, 20-ジオン; 11-ケトプロゲステロン(11-オキソプロゲステロン;
 ケトゲスチン) = プレグナ-4-エン-3, 11, 20-トリオン; 11 β -ヒドロキシ
 プレグネノロン = 3 β , 11 β -ジヒドロキシプレグナ-5-エン-20-オン; 11 β -
 ヒドロキシプロゲステロン(21-デオキシコルチコステロン) = 11 β -ヒドロキシ
 プレグナ-4-エン-3, 20-ジオン; 11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシプレグ
 ネノロン = 3 β , 11 β , 17 α , 21-テトラヒドロキシプレグナ-5-エン-20-
 オン; 17 α , 21-ジヒドロキシプレグネノロン = 3 β , 17 α , 21-トリヒドロキ
 シプレグナ-5-エン-20-オン; 17 α -ヒドロキシプレグネノロン = 3 β , 17 α 10
 -ジヒドロキシプレグナ-5-エヌ-20-オン; 17 α -ヒドロキシプロゲステロン =
 17 α -ヒドロキシプレグナ-4-エン-3, 11, 20-トリオン; 18-ヒドロキシ
 -11-デオキシコルチコステロン = 18, 21-ジヒドロキシプレグナ-4-エン-3
 , 20-ジオン; 18-ヒドロキシコルチコステロン = 11 β , 18, 21-トリヒドロ
 キシプレグナ-4-エン-3, 20-ジオン; 18-ヒドロキシプロゲステロン = 18-
 ヒドロキシプレグナ-4-エン-3, 20-ジオン; 21-デオキシコルチザール = 11
 β , 17 α -ジヒドロキシプレグナ-4-エン-3, 20-ジオン; 21-デオキシコル
 チゾン = 17 α -ヒドロキシプレグナ-4-エン-3, 11, 20-トリオン; 21-ヒ
 ドロキシプレグネノロン(プレベジオロン) = 3 β , 21-ジヒドロキシプレグナ-5-
 エン-20-オン; アルドステロン = 11 β , 21-ジヒドロキシプレグナ-4-エン- 20
 3, 18, 20-トリオン; コルチコステロン(17-デオキシコルチザール) = 11 β
 , 21-ジヒドロキシプレグナ-4-エン-3, 20-ジオン; コルチザール(ハイドロ
 コーチゾン) = 11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシプレグナ-4-エン-3, 20-
 ジオン; コーチゾン = 17 α , 21-ジヒドロキシプレグナ-4-エン-3, 11, 20-
 ートリオン; プレグネノロン = プレグナ-5-エヌ-3 β -オール-20-オン; そして
 、プロゲステロン = プレグナ-4-エン-3, 20-ジオン); プロゲステロン-タイプ
 (例として、フルゲストン(フルロゲストン) = 9 α -フルオロ-11 β , 17 α -ジヒ
 ドロキシプレグナ-4-エン-3, 20-ジオン; フルオロメトロン = 6 α -メチル-9
 α -フルオロ-11 β , 17 α -ジヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジ
 オン; メドリゾン(ヒドロキシメチルプロゲステロン) = 6 α -メチル-11 β -ヒドロ
 キシプレグナ-4-エン-3, 20-ジオン; そして、プレベジオロンアセタート(21
 -アセトキシプレグネノロン) = 3 β , 21-ジヒドロキシプレグナ-5-エヌ-20-
 オン21-アセタート)およびプロゲステロン誘導体女性ホルモン(例として、酢酸クロ
 ルマジノン、シプロテロンアセタート、メドロゲストン、メドロキシプロゲステロンアセ
 テート、メゲストロールアセテートおよびセゲステロン・アセタート); ハイドロコチ
 ザン-タイプ(例として、クロロプレドニゾン = 6 α -クロロ-17 α , 21-ジヒドロ
 キシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 11, 20-トリオン; クロプレドノール = 6-ク
 ロロ-11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシプレグナ-1, 4, 6-トリエン-3, 2
 0-ジオン; ジフルプレドナート = 6 α , 9 α -ジフルオロ-11 β , 17 α , 21-トリ
 ヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン17 α -ブチラート21-ア
 セタート; フルドロコルチゾン = 9 α -フルオロ-11 β , 17 α , 21-トリヒドロキ
 シプレグナ-4-エン-3, 20-ジオン; フルオシノロン = 6 α , 9 α -ジフルオロ-
 11 β , 16 α , 17 α , 21-テトラヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-
 ジオン; フルペロロン = 9 α -フルオロ-11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシ-2
 1-メチルプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン; フルプレドニゾロン = 6 α -
 フルオロ-11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-
 ジオン; ロテプレドノール = 11 β , 17 α , ジヒドロキシ-21-オキサ-21-ク
 ロロメチルプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン; メチルプレドニゾロン = 6 α -
 -メチル-11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-
 ジオン; プレドニカルバート = 11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシプレグナ-1, 50

4-ジエン-3, 20-ジオン17 α -エチルカルボナート21-プロピオナート; プレ
 ドニゾロン=11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 2
 0-ジオン; プレドノゾン=17 α , 21-ジヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3
 , 11, 20-トリオン; チキソコルトール=11 β , 17 α -ジヒドロキシ-21-ス
 ルファニルプレグナ-4-エン-3, 20-ジオン; そして、トリアムシノロン=9 α -
 フルオロ-11 β , 16 α , 17 α , 21-テトラヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン
 -3, 20-ジオン); メタゾン-タイプ(16をメチル化された)(例として、メタゾ
 ン; アルクロメタゾン=7 α -クロロ-11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシ-16 α -
 -メチルプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン; ベクロメタゾン=9 α -クロロ
 -11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシ-16 β -メチルプレグナ-1, 4-ジエン-
 3, 20-ジオン; ベタメサゾン=9 α -フルオロ-11 β , 17 α , 21-トリヒドロ
 キシ-16 β -メチルプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン; クロベタゾール=
 9 α -フルオロ-11 β , 17 α -ジヒドロキシ-16 β -メチル-21-クロロプレグ
 ナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン; クロベタゾン=9 α -フルオロ-16 β -メチ
 ル-17 α -ヒドロキシ-21-クロロプレグナ-1, 4-ジエン-3, 11, 20-トリ
 リオン; クロコルトロン=6 α -フルオロ-9 α -クロロ-11 β , 21-ジヒドロキシ
 -16 α -メチルプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン; デスオキシメタゾン=
 9 α -フルオロ-11 β , 21-ジヒドロキシ-16 α -メチルプレグナ-1, 4-ジエ
 ン-3, 20-ジオン; デキサメタゾン=9 α -フルオロ-11 β , 17 α , 21-トリ
 ヒドロキシ-16 α -メチルプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン; ジフロラゾ
 ン=6 α , 9 α -ジフルオロ-11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシ-16 β -メチル
 プレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン; ジフルオコルトロン=6 α , 9 α -ジフ
 ルオロ-11 β , 21-ジヒドロキシ-16 α -メチルプレグナ-1, 4-ジエン-3,
 20-ジオン; フルクロロン=6 α -フルオロ-9 α , 11 β -ジクロロ-16 α , 17
 α , 21-トリヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン; フルメタゾン
 =6 α , 9 α -ジフルオロ-11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシ-16 α -メチルプ
 レグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン; フルオコルチン=6 α -フルオロ-11 β
 , 21-ジヒドロキシ-16 α -メチルプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20, 21-トリ
 リオン; フルオコルトロン=6 α -フルオロ-11 β , 21-ジヒドロキシ-16 α -メ
 チルプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン; フルプレドニデン=9 α -フルオロ
 -11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシ-16-メチレンプレグナ-1, 4-ジエン-
 3, 20-ジオン; フルチカゾン=6 α , 9 α -ジフルオロ-11 β , 17 α -ジヒドロ
 キシ-16 α -メチル-21-チア-21-フルオロメチルプレグナ-1, 4-ジエン-
 3, 20-ジオン; フルチカゾン・フロアート=6 α , 9 α -ジフルオロ-11 β , 17
 α -ジヒドロキシ-16 α -メチル-21-チア-21-フルオロメチルプレグナ-1,
 4-ジエン-3, 20-ジオン17 α -(2-フロアート); ハロメタゾン=2-クロロ
 -6 α , 9 α -ジフルオロ-11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシ-16 α -メチルプ
 レグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン; メプレドニゾン=16 β -メチル-17 α
 , 21-ジヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 11, 20-トリオン; モメタゾ
 ン=9 α , 21-ジクロロ-11 β , 17 α -ジヒドロキシ-16 α -メチルプレグナ-
 1, 4-ジエン-3, 20-ジオン; モメタゾンフロアート=9 α , 21-ジクロロ-1
 1 β , 17 α -ジヒドロキシ-16 α -メチルプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジ
 オン17 α -(2-フロアート); パラメサゾン=6 α -フルオロ-11 β , 17 α , 2
 1-トリヒドロキシ-16 α -メチルプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン; プ
 レドニリデン=11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシ-16-メチレンプレグナ-1,
 4-ジエン-3, 20-ジオン; リメキシロン=11 β -ヒドロキシ-16 α , 17 α ,
 21-トリメチルプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン; そして、ウロベタゾー
 ル(ハロベタゾール)=6 α , 9 α -ジフルオロ-11 β , 17 α -ジヒドロキシ-16
 β -メチル-21-クロロプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオン);

10

20

30

40

50

【0126】

アセトニドおよび関連（例として、アムシノニド＝シクロペンタノンに伴う 9 α -フルオロ-11 β , 16 α , 17 α , 21-テトラヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオンサイクリック 16 α , 17 α -アセタール、21-アセタート；ブデソニド＝ブチルアルデヒドに伴う 11 β , 16 α , 17 α , 21-テトラヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオンサイクリック 16 α , 17 α -アセタール；シクレソニド＝(R)-シクロヘキサカルボキサルデヒドに伴う 11 β , 16 α , 17 α , 21-テトラヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオンサイクリック 16 α , 17 α -アセタール、21-イソブチラート；デフラザコルト＝11 β , 21-ジヒドロキシ-2'-メチル-5'-H-プレグナ-1, 4-ジエノ [17, 16-d] オキサゾール-3, 20-ジオン、21-アセタート；デソニド＝アセトンに伴う 11 β , 16 α , 17 α , 21-テトラヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオンサイクリック 16 α , 17 α -アセタール；ホルモコルタール（フルオロホルミロン）＝アセトンに伴う 3-(2-クロロエトキシ)-9 α -フルオロ-11 β , 16 α , 17 α , 21-テトラヒドロキシ-20-オキソプレグナ-3, 5-ジエン-6-カルボキサルデヒドサイクリック 16 α , 17 α -アセタール、21-アセタート；フルクロロンアセトニド（フルコロニド）＝アセトンに伴う 6 α -フルオロ-9 α , 11 β -ジクロロ-16 α , 17 α , 21-トリヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオンサイクリック 16 α , 17 α -アセタール；

10

【0127】

フルドロキシコルチド（フルランドレノロン、フルランドレノリド）＝アセトンに伴う 6 α -フルオロ-11 β , 16 α , 17 α , 21-テトラヒドロキシプレグナ-4-エン-3, 20-ジオンサイクリック 16 α , 17 α -アセタール；フルニソリド＝アセトンに伴う 6 α -フルオロ-11 β , 16 α , 17 α , 21-テトラヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオンサイクリック 16 α , 17 α -アセタール；フルオシノロンアセトニド＝アセトンに伴う 6 α , 9 α -ジフルオロ-11 β , 16 α , 17 α , 21-テトラヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオンサイクリック 16 α , 17 α -アセタール；フルオシノニド＝アセトンに伴う 6 α , 9 α -ジフルオロ-11 β , 16 α , 17 α , 21-テトラヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオンサイクリック 16 α , 17 α -アセタール、21-アセタート；ハルシノニド＝アセトンに伴う 9 α -フルオロ-11 β , 16 α , 17 α -トリヒドロキシ-21-クロロプレグナ-4-エン-3, 20-ジオンサイクリック 16 α , 17 α -アセタール；およびトリアムシノロンアセトニド＝アセトンに伴う 9 α -フルオロ-11 β , 16 α , 17 α , 21-テトラヒドロキシプレグナ-1, 4-ジエン-3, 20-ジオンサイクリック 16 α , 17 α -アセタール）；および、なお他のもの（例として、コルチバゾール＝6, 16 α -ジメチル-11 β , 17 α , 21-トリヒドロキシ-2'-フェニル [3, 2-c] ピラゾロプレグナ-4, 6-ジエン-21-オン-21-アセタート；および、Ru-28362＝6-メチル-11 β , 17 β -ジヒドロキシ-17 α -(1-プロピニル)アンドロスタ-1, 4, 6-トリエン-3-オン）などを含むが、これらに限定されない。

20

30

本明細書に提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、コルチコステロイドは、合成ナノキャリアに連結されない。

40

【0128】

免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア

多種多様な合成ナノキャリアは、本発明に従って使用されることができる。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、球体または球状体である。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、扁平または平板状である。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、立方体または立方である。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、卵円または楕円である。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、円柱、円錐または錐体である。

【0129】

50

幾つかの態様において、各々の合成ナノキャリアが類似の特性を有するように、サイズまたは形状に関して比較的均一である合成ナノキャリアの集団の使用が望ましい。例えば、提供される組成物または方法のいずれか1つの合成ナノキャリアの、合成ナノキャリアの合計数に基づいて、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%は、合成ナノキャリアの平均直径または平均寸法の5%、10%、または20%以内に該当する最小寸法または最大寸法を有していてもよい。

【0130】

合成ナノキャリアは、中実であっても中空であってもよく、1以上の層を含んでもよい。幾つかの態様において、各層は、他の層と比較してユニークな組成およびユニークな特性を有する。一例のみを挙げると、合成ナノキャリアは、コア／シェル構造を有していてもよく、ここで、コアは1つの層であり（例えばポリマーのコア）、シェルは第2の層である（例えば脂質二重層または単層）。

合成ナノキャリアは、複数の異なる層を含んでもよい。

【0131】

幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、1以上の脂質を任意に含んでもよい。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、リポソームを含んでもよい。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、脂質二重層を含んでもよい。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、脂質単層を含んでもよい。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、ミセルを含んでもよい。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、脂質層（例えば、脂質二重層、脂質単層など）に囲まれたポリマーマトリックスを含むコアを含んでもよい。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、脂質層（例えば、脂質二重層、脂質単層など）に囲まれた非ポリマー性のコア（例えば、金属粒子、量子ドット、セラミック粒子、骨粒子、ウイルス粒子、タンパク質、核酸、炭水化物など）を含んでもよい。

【0132】

他の態様において、合成ナノキャリアは、金属粒子、量子ドット、セラミック粒子などを含んでもよい。幾つかの態様において、非ポリマー性合成ナノキャリアは、金属原子（例えばとして金原子）の凝集物などの、非ポリマー性成分の凝集物である。

【0133】

幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、1以上の両親媒体を任意に含んでもよい。幾つかの態様において、両親媒体は、増大した安定性、改善した均一性または増大した粘性により、合成ナノキャリアの製造を促進することができる。幾つかの態様において、両親媒体は、脂質膜（例えば、脂質二重層、脂質単層など）の内部表面に関連していてもよい。当該分野において公知の多くの両親媒体が、本発明による合成ナノキャリアを作製するために好適である。

【0134】

かかる両親媒体性の実体は、ホスホグリセリドを含むが、これに限定されない；ホスファチジルコリン；ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）；ジオレイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）；ジオレイルオキシプロピルトリエチルアンモニウム（DOTMA）；ジオレオイルホスファチジルコリン；コレステロール；コレステロールエステル；ジアシルグリセロール；コハク酸ジアシルグリセロール；ジホスファチジルグリセロール（DPPG）；ヘキサデカノール；ポリエチレングリコール（PEG）などの脂肪アルコール；ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル；パルミチン酸またはオレイン酸などの界面活性脂肪酸；脂肪酸；脂肪酸モノグリセリド；脂肪酸ジグリセリド；脂肪酸アミド；ソルビタントリオレート（Span（登録商標）85）グリココレート；ソルビタンモノラウレート（Span（登録商標）20）；ポリソルベート20（Tween（登録商標）20）；ポリソルベート60（Tween（登録商標）60）；ポリソルベート65（Tween（登録商標）65）；ポリソルベート80（Tween（登録商標）80）；ポリソルベート85（Tween（登録商標）85）；ポリオキシエチレンモノステアレート；サーファクチン；ポロキサマー；ソルビタントリオレートなどのソルビタン脂肪酸エステル；レシチン；リゾレシチン；ホスファチジルセリン；ホ

10

20

30

40

50

スファチジルイノシトール；スフィンゴミエリン；ホスファチジルエタノールアミン（セファリン）；カルジオリピン；ホスファチジン酸；セレブロシド；リン酸ジセチル；ジパルミトイルホスファチジルグリセロール；ステアリルアミン；ドデシルアミン；ヘキサデシルアミン；パルミチン酸アセチル；グリセロールリシノレート；ヘキサデシルステアレート；ミリスチン酸イソプロピル；チロキサポール；ポリ（エチレングリコール）5000-ホスファチジルエタノールアミン；ポリ（エチレングリコール）400-モノステアレート；リン脂質；高い界面活性剤特性を有する合成および／または天然の洗剤；デオキシコラート；シクロデキストリン；カオトロピックな塩；イオン対化剤（ion pairing agent）；およびこれらの組み合わせ。両親媒体成分は、異なる両親媒体の混合物であってもよい。当業者は、これは例示的な界面活性剤効果を有する物質のリストであって、包括的なものではないことを理解するであろう。本発明により用いられるべき合成ナノキャリアの製造において、任意の両親媒体を用いることができる。

10

【0135】

幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、1以上の炭水化物を任意に含んでもよい。炭水化物は、天然であっても合成であってもよい。炭水化物は、誘導体化された天然の炭水化物であってもよい。ある態様において、炭水化物は、単糖または二糖を含み、これは、限定されないが、グルコース、フルクトース、ガラクトース、リボース、ラクトース、スクロース、マルトース、トレハロース、セロビオース、マンノース、キシロース、アラビノース、グルクロン酸、ガラクトン酸、マンヌロン酸、グルコサミン、ガラクトサミンおよびノイラミン酸を含む。ある態様において、炭水化物は多糖であり、これは、限定されないが、プルラン、セルロース、微晶質セルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、ヒドロキシセルロース（HC）、メチルセルロース（MC）、デキストラン、シクロデキストラン、グリコーゲン、ヒドロキシエチルデンプン、カラギナン、グリコン（glycon）、アミロース、キトサン、N，O-カルボキシルメチルキトサン、アルギン酸およびアルギニン酸、デンプン、キチン、イヌリン、コンニャク、グルコマンナン、プスツラン（pustulan）、ヘパリン、ヒアルロン酸、カードランおよびキサンタンを含む。態様において、合成ナノキャリアは、多糖などの炭水化物を含まない（または特に除外する）。ある態様において、炭水化物は、糖アルコールなどの炭水化物誘導体を含んでもよく、これは、限定されないが、マンニトール、ソルビトールキシリトール、エリスリトール、マルチトールおよびラクチトールを含む。

20

30

【0136】

幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、1以上のポリマーを含んでもよい。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、非メトキシ末端のプルロニックポリマーである1以上のポリマーを含む。幾つかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%または99%（重量／重量）は、非メトキシ末端のプルロニックポリマーである。幾つかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの全てが、非メトキシ末端のプルロニックポリマーである。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、非メトキシ末端のポリマーである1以上のポリマーを含む。幾つかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%または99%（重量／重量）は、非メトキシ末端のポリマーである。幾つかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの全ては、非メトキシ末端のポリマーである。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、プルロニックポリマーを含まない1以上のポリマーを含む。幾つかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%または99%（重量／重量）は、は、プルロニックポリ

40

50

マーを含まない。

【0137】

幾つかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの全ては、プルロニックポリマーを含まない。幾つかの態様において、かかるポリマーは、コーティング層（例えば、リポソーム、脂質単層、ミセルなど）により囲まれていてもよい。幾つかの態様において、合成ナノキャリアの要素は、ポリマーに接着していてもよい。

【0138】

免疫抑制剤は、多数の方法のうちのいずれかにより合成ナノキャリアにカップリングすることができる。一般に、接着は、免疫抑制剤と合成ナノキャリアとの間の接着の結果である。この結合により、免疫抑制剤の合成ナノキャリアの表面への接着、および／または合成ナノキャリア中での包含（封入）をもたらすことができる。幾つかの態様において、しかし、免疫抑制剤は、合成ナノキャリアへの結合よりもむしろ合成ナノキャリアの構造の結果として、合成ナノキャリアにより封入される。好ましい態様において、合成ナノキャリアは、本明細書において提供されるポリマーを含み、免疫抑制剤はポリマーに接着している。

【0139】

接着が、免疫抑制剤と合成ナノキャリアとの間の結合の結果として生じる場合、接着は、カップリング部分を介して生じてもよい。カップリング部分は、それを通して免疫抑制剤が合成ナノキャリアに結合する任意の部分であってよい。かかる部分は、アミド結合またはエステル結合などの共有結合、ならびに免疫抑制剤を合成ナノキャリアに（共有的または非共有的に）結合する別の分子を含む。かかる分子は、リンカーまたはポリマーまたはその単位を含む。例えば、カップリング部分は、免疫抑制剤が静電的に結合する荷電したポリマーを含んでもよい。別の例として、カップリング部分は、それが共有結合しているポリマーまたはその単位を含んでもよい。

【0140】

好ましい態様において、合成ナノキャリアは、本明細書において提供されるポリマーを含む。これらの合成ナノキャリアは、完全にポリマー性のものであっても、ポリマーと他の材料との混合物であってもよい。

【0141】

幾つかの態様において、合成ナノキャリアのポリマーは、会合してポリマーマトリックスを形成する。これらの態様のいくつかにおいて、免疫抑制剤などの成分は、ポリマーマトリックスの1以上のポリマーと共有的に会合することができる。幾つかの態様において、共有的会合は、リンカーにより媒介される。幾つかの態様において、成分は、ポリマーマトリックスの1以上のポリマーに、非共有的に会合していてもよい。例えば、幾つかの態様において、成分は、ポリマーマトリックス中に封入されていても、ポリマーマトリックスにより囲まれていても、および／またはポリマーマトリックス全体に分散していてもよい。あるいはまたは加えて、成分は、疎水性相互作用、電荷相互作用、ファン・デル・ワールス力などにより、ポリマーマトリックスの1以上のポリマーに会合することができる。それらからポリマーマトリックスを形成するための広範なポリマーおよび方法が、慣習的に知られている。

【0142】

ポリマーは、天然または非天然の（合成の）ポリマーであってよい。ポリマーは、ホモポリマーであっても、2以上のモノマーを含むコポリマーであってよい。配列に関して、コポリマーは、ランダムであっても、ブロックであっても、またはランダムおよびブロック配列の組み合わせを含んでもよい。典型的には、本発明によるポリマーは、有機ポリマーである。

【0143】

幾つかの態様において、ポリマーは、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアミドまたはポリエーテル、またはこれらの単位を含む。他の態様において、ポリマーは、ポリ（エチレングリコール）（PEG）、ポリプロピレングリコール、ポリ（乳酸）、ポリ（グ

10

20

30

40

50

リコール酸)、ポリ(乳酸-コグリコール酸)コポリマー、またはポリカプロラクトン、またはこれらの単位を含む。幾つかの態様において、ポリマーは、生分解性であることが好ましい。したがって、これらの態様において、ポリマーが、ポリ(エチレングリコール)またはポリプロピレングリコールまたはこれらの単位などのポリエーテルを含む場合、ポリマーが生分解性となるように、ポリマーが、ポリエーテルのブロックコポリマーおよび生分解性ポリマーを含むことが好ましい。他の態様において、ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)またはポリプロピレングリコールまたはその単位などのポリエーテルまたはその単位を単独では含まない。

【0144】

本発明における使用のために好適なポリマーの他の例として、限定されないが、ポリエチレン、ポリカーボネート(例えばポリ(1,3-ジオキサン-2オン))、ポリ酸無水物(例えばポリ(セバシン酸無水物))、フマル酸ポリプロピル、ポリアミド(例えばポリカプロラクタム)、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリエステル(例えば、ポリ乳酸、ポリグリコリド、ポリラクチド-グリコリドコポリマー、ポリカプロラクトン、ポリヒドロキシ酸(polyhydroxy acid)(例えばポリ(β-ヒドロキシアルカノアート)))、ポリ(オルトエステル)、ポリシアノアクリラート、ポリビニルアルコール、ポリウレタン、ポリホスファゼン、ポリアクリラート、ポリメタクリラート、ポリウレア、ポリスチレンおよびポリアミン、ポリリジン、ポリリジン-PEGコポリマー、およびポリ(エチレンイミン)、ポリ(エチレンイミン)-PEGコポリマーが挙げられる。

【0145】

幾つかの態様において、本発明によるポリマーは、米国食品医薬品局(FDA)により21C.F.R. §177.2600下においてヒトにおける使用について承認されているポリマーを含み、これは、限定されないが、ポリエステル(例えば、ポリ乳酸、ポリ(乳酸-コグリコール酸)コポリマー、ポリカプロラクトン、ポリバレロラクトン、ポリ(1,3-ジオキサン-2オン))；ポリ酸無水物(例えばポリ(セバシン酸無水物))；ポリエーテル(例えば、ポリエチレングリコール)；ポリウレタン；ポリメタクリラート；ポリアクリラート；およびポリシアノアクリラートを含む。

【0146】

幾つかの態様において、ポリマーは、親水性であってよい。例えば、ポリマーは、アニオン基(例えば、リン酸基、硫酸基、カルボン酸基)；カチオン基(例えば、四級アミン基)；または極性基(例えば、ヒドロキシル基、チオール基、アミン基)を含んでもよい。幾つかの態様において、親水性ポリマーマトリックスを含む合成ナノキャリアは、合成ナノキャリア中に親水性環境を生じる。幾つかの態様において、ポリマーは、疎水性であってもよい。幾つかの態様において、疎水性ポリマーマトリックスを含む合成ナノキャリアは、合成ナノキャリア中に疎水性環境を生じる。ポリマーの親水性または疎水性の選択は、合成ナノキャリア中に組み込まれる材料の性質に対して影響を有し得る。

【0147】

幾つかの態様において、ポリマーは、1以上の部分および／または官能基により修飾されていてもよい。本発明により多様な部分または官能基を用いることができる。幾つかの態様において、ポリマーは、ポリエチレングリコール(PEG)により、炭水化物により、および／または多糖から誘導される非環式ポリアセタールにより修飾することができる(Papisov, 2001, ACS Symposium Series, 786:301)。ある態様は、Grefらに対する米国特許第5543158号またはVon AndrianらによるWO公開WO2009/051837の一般的教示を用いて行ってもよい。

【0148】

幾つかの態様において、ポリマーを、脂質または脂肪酸基により修飾されてもよい。いくつかの態様において、脂肪酸群は、酪酸、カプロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、または

リグノセリン酸の1以上であってもよい。幾つかの態様において、脂肪酸基は、パルミトレイン酸、オレイン酸、バクセン酸、リノール酸、アルファーリノール酸、ガンマーリノール酸、アラキドン酸、ガドレイン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸またはエルカ酸の1以上であってもよい。

【0149】

幾つかの態様において、ポリマーは、ポリエステルであってよく、これは、乳酸およびグリコール酸の単位を含むコポリマー、例えばポリ（乳酸－コ－グリコール酸）およびポリ（ラクチド－コ－グリコリド）（本明細書において集合的に「PLGA」として言及される）；ならびにグリコール酸単位を含むホモポリマー（本明細書において「PGA」として言及される）、ならびにポリ－L－乳酸、ポリ－D－乳酸、ポリ－D，L－乳酸、ポリ－L－ラクチド、ポリ－D－ラクチド、およびポリ－D，L－ラクチド乳酸単位を含むホモポリマー（本明細書において集合的に「PLA」として言及される）を含む。幾つかの態様において、例示的なポリエステルとして、例えば、ポリヒドロキシ酸；

10

【0150】

PEGコポリマーおよびラクチドとグリコリドとのコポリマー（例えば、PLA－PEGコポリマー、PGA－PEGコポリマー、PLGA－PEGコポリマー）およびそれらの誘導体が挙げられる。幾つかの態様において、ポリエステルとして、例えば、ポリ（カプロラクトン）、ポリ（カプロラクトン）－PEGコポリマー、ポリ（L－ラクチド－L－リジン）コポリマー、ポリ（セリンエステル）、ポリ（4－ヒドロキシ－L－プロリンエステル）、ポリ〔 α －（4－アミノブチル）－L－グリコール酸〕およびそれらの誘導体が挙げられる。

20

【0151】

幾つかの態様において、ポリマーは、PLGAであってよい。PLGAは、乳酸とグリコール酸との生体適合性かつ生分解性のコポリマーであり、PLGAの多様な形態は、乳酸：グリコール酸の比により特徴づけられる。乳酸は、L－乳酸、D－乳酸またはD，L－乳酸であってよい。PLGAの分解速度は、乳酸：グリコール酸比を変更することにより調節することができる。幾つかの態様において、本発明により用いられるべきPLGAは、約85：15、約75：25、約60：40、約50：50、約40：60、約25：75または約15：85の乳酸：グリコール酸の比により特徴づけられる。

【0152】

幾つかの態様において、ポリマーは、1以上のアクリル酸ポリマーであってよい。態様において、アクリル酸ポリマーとして、例えば、アクリル酸とメタクリル酸とのコポリマー、メチルメタクリレートコポリマー、エトキシエチルメタクリレート、シアノエチルメタクリレート、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ（アクリル酸）、ポリ（メタクリル酸）、メタクリル酸アルキルアミドコポリマー、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（メタクリル酸無水物）、メチルメタクリレート、ポリメタクリレート、ポリ（メチルメタクリレート）コポリマー、ポリアクリルアミド、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、グリシジルメタクリレートコポリマー、ポリシアノアクリレート、および前述のポリマーの1以上を含む組み合わせが挙げられる。アクリル酸ポリマーは、低い含有量の四級アンモニウム基と共に、アクリル酸とメタクリル酸エステルとの完全に重合したコポリマーを含んでもよい。

30

40

【0153】

幾つかの態様において、ポリマーは、カチオン性ポリマーであってよい。一般的に、カチオン性ポリマーは、核酸の負に荷電した鎖を縮合および／または保護することができる。ポリ（リジン）などのアミン含有ポリマー（Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97；およびKabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7）、ポリ（エチレンジアミン）（PEI；Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297）、およびポリ（アミドアミン）デンドリマー（Kukowska-Latallo et

50

t al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703; および Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372) は、生理学的 pH において正に荷電しており、核酸とイオン対を形成する。態様において、合成ナノキャリアは、カチオン性ポリマーを含まなくともよい（またはこれを除外してもよい）。

【0154】

幾つかの態様において、ポリマーは、カチオン性側鎖を有する分解性ポリエステルであってもよい (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010; Kwon et al., 1989, Macromolecules, 22:3250; Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633; および Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399)。

10

【0155】

これらのポリエステルの例として、ポリ(L-ラクチド-L-リジン)コポリマー (Barrera et al., 1993, J. Am. Chem. Soc., 115:11010)、ポリ(セリンエステル) (Zhou et al., 1990, Macromolecules, 23:3399)、ポリ(4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; および Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633)、ならびにポリ(4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル) (Putnam et al., 1999, Macromolecules, 32:3658; and Lim et al., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121:5633) が挙げられる。

20

【0156】

これらおよび他のポリマーの特性およびそれらを調製する方法は、当該技術分野において周知である (たとえば、米国特許第 6, 123, 727 号; 5, 804, 178 号; 5, 770, 417 号; 5, 736, 372 号; 5, 716, 404 号; 6, 095, 148 号; 5, 837, 752 号; 5, 902, 599 号; 5, 696, 175 号; 5, 514, 378 号; 5, 512, 600 号; 5, 399, 665 号; 5, 019, 379 号; 5, 010, 167 号; 4, 806, 621 号; 4, 638, 045 号; および 4, 946, 929 号; Wang et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:9480; Lim et al., 2001, J. Am. Chem. Soc., 123:2460; Langer, 2000, Acc. Chem. Res., 33:94; Langer, 1999, J. Control. Release, 62:7; および Uhrich et al., 1999, Chem. Rev., 99:3181 参照)。より一般的には、特定の好適なポリマーを合成するための多様な方法は、Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts、Goethals 編、Pergamon Press, 1980; Odian による Principles of Polymerization、John Wiley & Sons、第 4 版、2004; Allcock らによる Contemporary Polymer Chemistry、Prentice-Hall、1981; Deming et al., 1997, Nature, 390:386 において; および米国特許第 6, 506, 577 号、同第 6, 632, 922 号、同第 6, 686, 446 号および同第 6, 818, 732 号において記載される。

30

40

【0157】

幾つかの態様において、ポリマーは、直鎖状または分枝状ポリマーであってよい。幾つ

50

かの態様において、ポリマーは、デンドリマーであってよい。幾つかの態様において、ポリマーは、互いに実質的に架橋されていてもよい。幾つかの態様において、ポリマーは、実質的に架橋を含まなくてもよい。幾つかの態様において、ポリマーは、架橋するステップを経ることなく用いることができる。さらに、合成ナノキャリアは、前述のおよび他のポリマーのいずれかのブロックコポリマー、グラフトコポリマー、ブレンド、混合物および／または付加物を含んでもよいことが、理解されるべきである。当業者は、本明細書において列記されるポリマーは、本発明による使用のものである例示的なポリマーのリストを代表するが、包括的なものではないことを認識するであろう。

【0158】

幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、ポリマー成分を含まない。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、金属粒子、量子ドット、セラミック粒子などを含んでもよい。幾つかの態様において、非ポリマー性合成ナノキャリアは、金属原子（例えばとして金原子）の凝集物などの、非ポリマー性成分の凝集物である。

【0159】

本明細書に提供されるいかなる免疫抑制剤も、いくつかの実施形態において、合成ナノキャリアに連結することができる。免疫抑制剤は、スタチンを含むが、これに限定されるものではない；ラパマイシンまたはラパマイシンアナログ（「ラパログ」）などのmTOR阻害剤；TGF- β シグナル伝達剤；TGF- β 受容体アゴニスト；ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤；ロテノンなどのミトコンドリアの機能の阻害剤；P38阻害剤；NF- κ B阻害剤；アデノシン受容体アゴニスト；プロスタグランジンE2アゴニスト；ホスホジエステラーゼ4阻害剤などのホスホジエステラーゼ阻害剤；プロテアソーム阻害剤；キナーゼ阻害剤；Gタンパク質共役受容体アゴニスト；Gタンパク質共役受容体アンタゴニスト；レチノイド；サイトカイン阻害剤；サイトカイン受容体阻害剤；サイトカイン受容体アクチベーター；ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アンタゴニスト；ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アゴニスト；ヒストンデアセチラーゼ阻害剤；カルシニューリン阻害剤；ホスファターゼ阻害剤ならびに酸化ATP。免疫抑制剤はまた、IDO、ビタミンD3、シクロスポリンA、アリール炭化水素受容体阻害剤、レスベラトロール、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アスピリン、ニフルミン酸、エストリオール、トリポリド（tripolide）、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-10）、シクロスポリンA、サイトカインまたはサイトカイン受容体などを標的とするsiRNAを含む。

【0160】

mTOR阻害剤の例として、ラパマイシンおよびそのアナログ（例えば、CC-779、RAD001、AP23573、C20-メタリルラパマイシン（C20-Marap）、C16-（S）-ブチルスルホンアミドラパマイシン（C16-BSrap）、C16-（S）-3-メチルインドールラパマイシン（C16-iRap）（Bayle et al. Chemistry & Biology 2006、13:99-107）、AZD8055、BEZ235（NVP-BEZ235）、クリソファン酸（クリソファノール）、デフォロリムス（MK-8669）、エベロリムス（RAD0001）、KU-0063794、PI-103、PP242、テムシロリムス、およびWYE-354（Selleck, Houston, TX, USAから入手可能）が挙げられる。NF（例えば、NK- κ B）阻害剤の例として、IFRD1、2-（1,8-ナフチリジン-2-イル）-フェノール、5-アミノサリチル酸、BAY 11-7082、BAY 11-7085、CAPE（Caffeic Acid Phenethylエステル）、マレイン酸ジエチル、IKK-2阻害剤IV、IMD 0354、ラクタシスチン、MG-132 [Z-Leu-Leu-Leu-CHO]、NF κ B活性化阻害剤III、NF- κ B活性化阻害剤II、JSH-23、パルテノライド、フェニルアルシンオキシド（PAO）、PPM-18、ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム塩、QNZ、RO 106-9920、ロカグラミド、ロカグラミドAL、ロカグラミドC、ロカグラミドI、ロカグラミドJ、ロカグラオール、（R）-MG-132、サリチル酸ナトリウ

10

20

30

40

50

ム、トリプトライド（PG490）、およびウェデロラクトンが挙げられる。

【0161】

「ラパログ」は、本明細書に使用されているように、構造的にラパマイシン（シロリムス）の（類似体）に関する分子を、指す。ラパログの例として、限定することなく、テムシロリムス（CCE-779）、エベロリムス（RAD001）、リダフォロリムス（AP-23573）、およびゾタロリムス（ABT-578）が挙げられる。ラパログのさらなる例は、例えばWO公開WO1998/002441および米国特許第8,455,510号において見出すことができ、それらのラパログは、本明細書においてその全体において参考として援用される。

【0162】

さらなる免疫抑制剤は、当業者に公知であり、本発明は、この点において限定されない。提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つの態様において、免疫抑制剤は、本明細書に提供される剤のいずれか1つを含んでもよい。

【0163】

本発明による組成物は、保存剤、バッファー、食塩水またはリン酸緩衝化食塩水などの薬学的に許容し得る賦形剤を含んでもよい。組成物は、有用な投与形態を達成するために、慣用的な医薬の製造および配合技術を用いて製造することができる。一態様において、組成物は、注射のために、無菌の食塩水溶液中で保存剤と一緒に懸濁される。

【0164】

D. 組成物を使用および作製する方法

ウイルス導入ベクターは、当業者に公知の、または本明細書において他の場所で記載される方法により作製することができる。例えば、ウイルス導入ベクターは、例えば、米国特許第4,797,368号およびLaughlin et al., Gene, 23, 65-73 (1983)において記載される方法を用いて構築および／または精製することができる。

【0165】

例として、複製欠損アデノウイルスベクターは、複製欠損アデノウイルスベクターにおいては存在しないが、ウイルスの伝播のために必要とされる遺伝子の機能を提供する補完細胞株において、高力価のウイルス導入ベクターストックをもたらすために適切なレベルにおいて、作製することができる。補完細胞株は、全てのアデノウイルス機能を含む、early領域、late領域、ウイルスパッケージング領域、ウイルス関連RNA領域、またはそれらの組み合わせによりコードされる、少なくとも1つの複製必須遺伝子の機能の欠損を補完することができる（例えば、アデノウイルスアンプリコンの伝播を可能にするために）。補完細胞株の構築は、Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harbor、N.Y. (1989年)、およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons、New York、N.Y. (1994年)により記載されるような標準的な分子生物学および細胞培養技術を伴う。

【0166】

アデノウイルスベクターを作製するための補完細胞株として、これらに限定されないが、293細胞（例えばGraham et al., J. Gen. Virol., 36, 59-72 (1977)において記載される）、PER.C6細胞（例えば国際特許出願WO 97/00326、ならびに米国特許第5,994,128号および同第6,033,908号において記載される）、ならびに293-ORF6細胞（例えば国際特許出願WO 95/34671およびBrough et al., J. Virol., 71, 9206-9213 (1997)において記載される）が挙げられる。いくつかの例において、補完細胞は、全ての必要とされるアデノウイルス遺伝子機

10

20

30

40

50

能を補完しない。ヘルパーウイルスは、アデノウイルスベクターの複製を可能にするために、細胞またはアデノウイルスのゲノムによりコードされていない遺伝子機能を、トランスに提供するために使用することができる。

【0167】

アデノウイルスベクターは、例えば、米国特許第5,965,358号、同第5,994,128号、同第6,033,908号、同第6,168,941号、同第6,329,200号、同第6,383,795号、同第6,440,728号、同第6,447,995号および同第6,475,757号、米国特許出願公開番号2002/0034735A1、ならびに国際特許出願WO98/53087、WO98/56937、WO99/15686、WO99/54441、WO00/12765、WO01/77304 およびWO02/29388、ならびに本明細書において同定される他の参考文献において記載される材料および方法を用いて、構築するか、伝播させるか、および／または精製することができる。アデノウイルス血清型35ベクターを含む非C群アデノウイルスベクターは、例えば、米国特許第5,837,511号および同第5,849,561号、ならびに国際特許出願WO97/12986およびWO98/53087において記載される方法を用いて作製することができる。

10

【0168】

AAVベクターは、組み換え方法を用いて作製することができる。典型的には、方法は、AAVカプシドタンパク質またはそのフラグメントをコードする核酸配列；機能的rep遺伝子；AAV末端逆位反復配列（ITR）および導入遺伝子からなる組み換えAAVベクター；ならびに組み換えAAVベクターのAAVカプシドタンパク質中へのパッケージングを可能にするために十分なヘルパー機能を含む宿主細胞を培養することを含む。いくつかの態様において、ウイルスの導入ベクターは、以下からなる群から選択されるAAV血清型の反転末端反復（ITR）を含んでもよい：AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、およびそれらのバリエーション。

20

【0169】

rAAVベクターをAAVカプシド中にパッケージングするために宿主細胞において培養されるべき成分を、宿主細胞にトランスに提供してもよい。あるいは、必要とされる成分のいずれか1つまたは2つ以上（例えば、組み換えAAVベクター、rep配列、cap配列および／またはヘルパー機能）を、当業者に公知の方法を用いて、必要とされる成分のいずれか1つまたは2つ以上を含むように操作された安定な宿主細胞により、提供してもよい。最も好適には、かかる安定な宿主細胞は、誘導性プロモーターの制御下において、必要とされる成分を含むことができる。しかし、必要とされる成分は、構成的プロモーターの制御下にあってもよい。本発明のrAAVを作製するために必要とされる組み換えAAVベクター、rep配列、cap配列、およびヘルパー機能は、任意の適切な遺伝子エレメントを用いてパッケージング宿主細胞に送達することができる。選択される遺伝子エレメントは、本明細書において記載されるものを含む任意の好適な方法により送達することができる。本発明の任意の態様を構築するために用いられる方法は、核酸操作において技術を有する当業者に公知であり、遺伝子工学、組み換え工学および合成技術を含む。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.を参照。同様に、rAAVウイルス粒子を作製する方法は、周知であり、好適な方法の選択は、本発明に対する限定ではない。例えば、K. Fisher et al., J. Virol., 70: 520-532 (1993) および米国特許第5,478,745号を参照。

30

40

【0170】

幾つかの態様において、組み換えAAVベクターは、三重トランスフェクション法（triple transfection method）を用いて作製することができる（例えば、米国特許第6,001,650号において詳細に記載されるように；三重トラ

50

ンスフェクション法に関するその内容は、本明細書において参考として援用される)。典型的には、組み換え A A V は、宿主細胞を、A A V 粒子中にパッケージングされるべき組み換え A A V ベクター (導入遺伝子を含む)、A A V ヘルパー機能ベクター、および補助機能ベクターでトランスフェクションすることにより作製する。一般に、A A V ヘルパー機能ベクターは、増殖性 A A V の複製およびカプシド形成のためにトランスで機能する、A A V ヘルパー機能配列 (rep および cap) をコードする。

【0171】

好ましくは、A A V ヘルパー機能ベクターは、任意の検出可能な野生型 A A V ウイルス粒子 (すなわち、機能的な rep および cap 遺伝子を含む A A V ウイルス粒子) を作製することなく、効率的な A A V ベクター作製を支持する。補助機能ベクターは、A A V が複製のために依存する、非 A A V 由来のウイルスおよび/または細胞の機能のためのヌクレオチド配列をコードしていてもよい。補助機能は、A A V 複製のために必要とされる機能を含み、これは、限定することなく、A A V 遺伝子転写、ステージ特異的な A A V の mRNA のスプライシング、A A V の DNA の複製、cap 発現産物の合成、および A A V カプシドアセンブリーの活性化に関与する部分を含む。ウイルスに基づく補助機能は、アデノウイルス、ヘルペスウイルス (単純ヘルペスウイルス 1 型以外のもの)、およびワクシニアウイルスなどの既知のヘルパーウイルスのいずれかに由来してよい。

【0172】

レンチウイルスベクターは、当該分野において公知の多数の方法のいずれかを用いて作製することができる。レンチウイルスベクターおよび/またはそれらの作製の方法の例は、例えば、米国公開番号 20150224209、20150203870、20140335607、20140248306、20090148936 および 20080254008 において見出すことができ、かかるレンチウイルスベクターおよび作製の方法は、本明細書において参考として援用される。例として、レンチウイルスベクターが組み込み不能である場合、レンチウイルスゲノムはさらに複製起点 (ori) を含み、その配列は、レンチウイルスゲノムを発現させなければならない細胞の性質に依存する。

【0173】

前記複製起点は、真核生物由来、好ましくは哺乳動物起源のもの、最も好ましくヒト起源のものであってよい。レンチウイルスゲノムは細胞宿主のゲノム中に組み込まれない (不完全なインテグラーゼのため) ので、レンチウイルスゲノムは、頻繁な細胞分裂を経験している細胞においては失われ得る; このことは、B または T 細胞などの免疫細胞における場合はことさらである。複製起点の存在は、いくつかの場合において有益であり得る。ベクター粒子は、293T 細胞などの適切な細胞のトランスフェクションの後で、前記プラスミドにより、または他のプロセスにより、産生させることができる。レンチウイルス粒子の発現のために用いられる細胞において、プラスミドの全てまたは一部を、それらがコードしているポリヌクレオチドを安定に発現させるために、またはそれらがコードしているポリヌクレオチドを一過性にもしくは半安定して (semi-stably) 発現させるために用いることができる。

【0174】

本明細書において提供される他のウイルスベクターを作製するための方法は、当該分野において公知であり、上の例示的な方法と同様である。さらに、ウイルスベクターは市販されている。

態様において、免疫抑制剤を含む一定の合成ナノキャリアを調製する場合、免疫抑制剤を合成ナノキャリアに付着させるための方法は、有用かもしれない。

【0175】

ある態様において、接着は、共有的リンカーであってよい。態様において、本発明による免疫抑制剤は、外側表面に、アルキン基を含む免疫抑制剤とのアジド基の 1, 3-双極性環化付加反応により、またはアジド基を含む免疫抑制剤とのアルキンの 1, 3-双極性環化付加反応により形成された、1, 2, 3-トリアゾールリンカーを介して、共有的に接着していてもよい。かかる環化付加反応は、好ましくは、好適な Cu (I) -リガンド

10

20

30

40

50

および Cu (II) 化合物を触媒活性 Cu (I) 化合物に還元するための還元剤と共に、Cu (I) 触媒の存在下において行う。この Cu (I) により触媒されたアジド-アルキン環化付加 (CuAAC) はまた、クリック反応としても言及される。

【0176】

加えて、共有的カップリングは、共有的リンカーを含んでもよく、これは、アミドリンカー、ジスルフィドリンカー、チオエーテルリンカー、ヒドラゾンリンカー、ヒドラジドリンカー、イミンまたはオキシムリンカー、ウレアまたはチオウレアリンカー、アミジンリンカー、アミンリンカー、およびスルホンアミドリンカーを含む。

【0177】

アミドリンカーは、免疫抑制剤などの 1 つの成分上のアミンと、ナノキャリアなどの第 2 の成分のカルボン酸基との間のアミド結合を介して形成される。リンカー中のアミド結合は、N-ヒドロキシサクシニミドにより活性化されたエステルなどの好適に保護されたアミノ酸との慣用的なアミド結合形成反応のいずれかを用いて生成することができる。

ジスルフィドリンカーは、例えば R1-S-S-R2 の形態の 2 つの硫黄原子の間のジスルフィド (S-S) 結合の形成を介して、生成することができる。

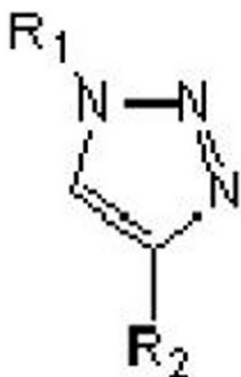
【0178】

ジスルフィド結合は、チオール／メルカプタン基 (-SH) を含む成分の、別の活性化されたチオール基との、またはチオール／メルカプタン基を含む成分の、活性化されたチオール基を含む成分とのチオール交換により、形成させることができる。

【0179】

トリアゾールリンカー、特に形態

【化 1】



式中、R1 および R2 は、任意の化学成分である、

の 1, 2, 3-トリアゾールは、第 1 の成分に接着したアジドの、免疫抑制剤などの第 2 の成分に接着した末端アルキンによる 1, 3-双極性環化付加反応により生成することができる。1, 3-双極性環化付加反応は、触媒を用いてまたはこれを用いずに、好ましくは 1, 2, 3-トリアゾール官能基を通して 2 つの成分を連結する Cu (I) 触媒を用いて行う。この化学は、Sharplless et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41 (14), 2596, (2002) および Meldal, et al., Chem. Rev., 2008, 108 (8), 2952-3015 において詳細に記載され、しばしば、「クリック」反応または CuAAC として言及される。

【0180】

チオエーテルリンカーは、例えば R1-S-R2 の形態における硫黄-炭素 (チオエーテル) 結合の形成により生成される。チオエーテルは、1 つの成分上でのチオール／メルカプタン (-SH) 基の、第 2 の成分上のハライドまたはエポキシドなどのアルキル化基によるアルキル化により、生成することができる。チオエーテルリンカーはまた、1 つの成分上のチオール／メルカプタン基の、マイケルアクセプターとしてマレイミド基または

ビニルスルホン基を含む第2の成分上の電子欠乏アルケン基に対するマイケル付加により、形成させることができる。別の方法において、1つの成分上のチオール／メルカプタン基の、第2の成分上のアルケン基によるラジカルチオール－エン反応により、チオエーテルリンカーを調製することができる。

【0181】

ヒドラゾンリンカーは、1つの成分上のヒドラジド基の、第2の成分上のアルデヒド／ケトン基との反応により生成することができる。ヒドラジドリンカーは、1つの成分上のヒドラジン基の、第2の成分上のカルボン酸基との反応により生成することができる。かかる反応は、一般に、カルボン酸が活性化試薬により活性化される、アミド結合の形成に類似する化学を用いて行う。

【0182】

イミンまたはオキシムリンカーは、1つの成分上のアミンまたはN－アルコキシアミン（またはアミノオキシ）基の、第2の成分上のアルデヒドまたはケトン基との反応により形成される。

ウレアまたはチオウレアリンカーは、1つの成分上のアミン基の、第2の成分上のイソシアナートまたはチオイソシアナート基との反応により調製される。

アミジンリンカーは、1つの成分上のアミン基の、第2の成分上のイミドエステル基との反応により調製される。

【0183】

アミンリンカーは、1つの成分上のアミン基の、第2の成分上のハライド、エポキシドまたはスルホナートエステル基などのアルキル化基によるアルキル化反応により生成される。あるいは、アミンリンカーはまた、シアノ水素化ホウ素ナトリウムまたはトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウムなどの好適な還元試薬による、1つの成分上のアミン基の、第2の成分上のアルデヒドまたはケトン基による還元性アミノ化により生成することができる。

スルホンアミドリンカーは、1つの成分上のアミン基の、第2の成分上のスルホニルハライド（スルホニルクロリドなどの）基との反応により生成される。

【0184】

スルホンリンカーは、ビニルスルホンへの求核試薬のマイケル付加により生成される。ビニルスルホンまたは求核試薬のいずれかは、ナノキャリアの表面上にあるか、成分に接着していてもよい。

成分はまた、非共有共役方法を介して共役させることができる。

【0185】

例えば、静電吸着を通して、負に荷電した免疫抑制剤を、正に荷電した成分に共役させることができる。金属配位子を含む成分はまた、金属－配位子錯体を介して金属錯体に共役させることができる。

【0186】

態様において、成分は、合成ナノキャリアのアセンブリーの前に、ポリマー、例えばポリ乳酸－ブロッカーポリエチレングリコールに接着していてもよく、合成ナノキャリアは、反応性または活性化可能な基により形成させることができる。後者の場合において、成分は、合成ナノキャリアの表面により提示される接着化学に適合性である基を用いて調製することができる。他の態様において、ペプチド成分は、好適なリンカーを用いてVLPまたはリポソームに接着させることができる。リンカーは、2つの分子と一緒にカップリングすることができる化合物または試薬である。一態様において、リンカーは、Hermanson 2008において記載されるようなホモ二官能性またはヘテロ二官能性の試薬であってよい。例えば、表面上にカルボン酸基を含むVLPまたはリポソーム合成ナノキャリアを、EDCの存在下において、ホモ二官能性リンカーであるアジピン酸ジヒドラジド（ADH）で処置して、ADHリンカーを有する対応する合成ナノキャリアを形成させることができる。結果として生じるADHと連結された合成ナノキャリアを、次いで、ナノキャリア上のADHリンカーの他方の末端を介して、酸基を含むペプチド成分と共役

10

20

30

40

50

させて、対応するVLPまたはリポソームペプチドコンジュゲートを生成する。

【0187】

態様において、ポリマー鎖の末端側にまたはアルキン基を含むポリマーを調製する。このポリマーを、次いで、複数のアルキンまたはアジド基がナノキャリアの表面上に位置するような様式において合成ナノキャリアを調製するために用いる。あるいは、合成ナノキャリアを、別の経路により調製して、その後、アルキンまたはアジド基で官能化してもよい。成分は、アルキン（ポリマーがアジドを含む場合）またはアジド（ポリマーがアルキンを含む場合）基のいずれかの存在と共に調製される。成分を、次いで、1, 3-双極性環化付加反応を介して、1, 4-二置換1, 2, 3-トリアゾールリンカーを通して成分を粒子に共有的に接着させる触媒を用いてまたはこれを用いずに、ナノキャリアと反応させる。

10

【0188】

成分が低分子である場合、合成ナノキャリアのアセンブリーの前に成分をポリマーに接着させることは、有利であり得る。態様において、成分を合成ナノキャリアに接着させるために用いられる表面基を用いて、成分をポリマーに接着させるというよりはむしろこれらの表面基の使用を通して、合成ナノキャリアを調製し、次いで、このポリマーコンジュゲートを合成ナノキャリアの構築において用いることもまた、有利であり得る。

【0189】

利用可能な共役方法の詳細な記載については、Hermanson G T「Bioconjugate Techniques」、第2版、Academic Press, Inc. 刊行、2008年を参照。共有的接着に加えて、成分は、予め形成された合成ナノキャリアに吸着させることにより接着させても、または合成ナノキャリアの形成の間の封入により接着させてもよい。

20

【0190】

合成ナノキャリアは、当該分野において公知の広範な方法を用いて調製することができる。例えば、合成ナノキャリアは、ナノ沈殿、流体チャネルを用いるフローフォーカシング（flow focusing）、スプレー乾燥、シングルおよびダブルエマルジョン溶媒蒸発、溶媒抽出、相分離、製粉、マイクロエマルジョン法、微細加工（microfabrication）、ナノ加工（nanofabrication）、犠牲層、単純および複合コアセルベーションなどの方法、ならびに当業者に周知の他の方法により形成することができる。あるいはまたは加えて、単分散半導体のための水性および有機性の溶媒合成、伝導性、磁性、有機および他のナノ材料が記載されている（Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; and Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843）。さらなる方法は、文献において記載されている（例えば、Doubrow編、「Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy」、CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 6:275; ならびにMathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755; 米国特許第5578325号および同第6007845号; P. Paolice lli et al., 「Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles」Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)を参照）。

30

40

【0191】

材料を、望ましい場合には、限定されないが以下を含む多様な方法を用いて、合成ナノキャリア中に封入してもよい：C. Astete et al., 「Synthes

50

is and characterization of PLGA nanoparticles」J. Biomater. Sci. Polymer Edn、第17巻、第3号、pp. 247-289 (2006); K. Avgoustakis「Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery」Current Drug Delivery 1:321-333 (2004); C. Reis et al., 「Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles」Nanomedicine 2:8-21 (2006); P. Paolicelli et al., 「Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles」Nanomedicine. 5 (6): 843-853 (2010)。

10

【0192】

材料を合成ナノキャリア中に封入するために好適な他の方法を用いてもよく、これらは、限定することなく、2003年10月14日に発行されたUngerに対する米国特許第6,632,671号において開示される方法を含む。

【0193】

ある態様において、合成ナノキャリアは、ナノ沈殿法またはスプレー乾燥により調製される。合成ナノキャリアを調製することにおいて用いられる条件は、所望されるサイズおよび特性（例えば、疎水性、親水性、外側の形態、「粘着性」、形状など）の粒子を得るために改変することができる。合成ナノキャリアを調製する方法および用いられる条件（例えば、溶媒、温度、濃度、気体の流速など）は、合成ナノキャリアに結合させるべき材料および／またはポリマーマトリックスの組成に依存し得る。

20

【0194】

上記の方法のいずれかにより調製される合成ナノキャリアが、所望される範囲の外のサイズ範囲を有する場合、合成ナノキャリアを、例えば篩を用いて、サイズ分類することができる。

30

【0195】

合成ナノキャリアの要素は、例えば1以上の共有結合により合成ナノキャリア全体に接合させても、1以上のリンカーにより接合させてもよい。合成ナノキャリアを官能化するさらなる方法は、Saltzmanらに対する米国特許出願公開2006/0002852、DeSimoneらに対する米国特許出願公開2009/0028910、またはMurthyらに対する国際特許出願公開WO/2008/127532 A1から適応させることができる。

【0196】

あるいはまたは加えて、合成ナノキャリアは、直接的または間接的に、非共有的相互作用を介して、成分に接合させることができる。非共有的態様において、非共有的接合は、限定されないが以下を含む非共有的相互作用により媒介される：電荷相互作用、アフィニティー相互作用、金属配位、物理的吸着、主客相互作用、疎水性相互作用、TTスタッキング相互作用、水素結合相互作用、ファン・デル・ワールス相互作用、磁性相互作用、静電相互作用、双極子-双極子相互作用、および／またはこれらの組み合わせを含む。

40

【0197】

かかる接合は、合成ナノキャリアの外部表面または内部表面上にあるように配置することができる。態様において、封入および／または吸収は、接合の形態である。

【0198】

本明細書において提供される組成物は、無機または有機の緩衝化剤（例えば、リン酸、炭酸、酢酸またはクエン酸のナトリウムまたはカリウム塩）およびpH調整剤（例えば、

50

塩酸、水酸化ナトリウムまたはカリウム、クエン酸または酢酸の塩、アミノ酸およびそれらの塩）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、アルファートコフェロール）、界面活性剤（例えば、ポリソルベート 20、ポリソルベート 80、ポリオキシエチレン 9-10 ノニルフェノール、デオキシコール酸ナトリウム）、溶液および／または低温（cryo）／凍結安定化剤（例えば、スクロース、ラクトース、マンニトール、トレハロース）、浸透圧調節剤（例えば、塩または糖）、抗菌剤（例えば、安息香酸、フェノール、ゲンタマイシン）、消泡剤（例えば、ポリジメチルシロキサン、保存剤（例えば、チメロサル、2-フェノキシエタノール、EDTA）、ポリマー性安定化剤および粘度調節剤（例えば、ポリビニルピロリドン、ポロキサマー 488、カルボキシメチルセルロース）および共溶媒（例えば、グリセロール、ポリエチレングリコール、エタノール）を含んでもよい。

10

【0199】

本発明による組成物は、薬学的に許容し得る賦形剤を含んでもよい。組成物は、有用な投与形態を達成するために、慣用的な医薬の製造および配合技術を用いて製造することができる。本発明の実施における使用のために好適な技術は、Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice、Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-Obeng および Suzanne M. Kresta 編、2004 年、John Wiley & Sons, Inc.; ならびに Pharmaceuticals: The Science of Dosage Form Design、第 2 版 M. E. Auten 編、2001 年、Churchill Livingstone において見出すことができる。一態様において、組成物を、注射のために、保存剤と共に、無菌の食塩水溶液中に懸濁する。

20

【0200】

本発明の組成物は任意の好適な様式において製造することができることが、理解されるべきであり、本発明は、本明細書において記載される方法を用いて製造することができる組成物に決して限定されない。適切な製造の方法の選択は、関連する特定の部分の特性に対する注意を必要とする場合がある。

【0201】

幾つかの態様において、組成物は、無菌条件下において製造されるか、最終的に無菌化される。このことにより、結果として生じる組成物が無菌であり、非感染性であることを確実にすることができ、それにより、非無菌の組成物と比較して安全性を改善する。このことは、特に組成物を投与されている対象が免疫欠損を有するか、感染症を罹患しているか、および／または感染に対して感受性である場合に、有益な安全性の指標を提供する。

30

【0202】

本発明に従う投与は、皮下、鼻腔内、経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、経粘膜、経粘膜、舌下、直腸の、眼科の、肺の、皮内、経皮、経皮的、皮内、または、これらの経路の組み合わせを含むがこれに限定されない、様々な経路によって、であってもよい。投与の経路は、吸入または肺エアロゾルによる投与も、含む。エアロゾル送達システムを調製するための技法は、当業者に公知である（例えば、参照によって組み込まれる Sciarra and Cutie, "Aerosols," in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, 1990, pp. 1694-1712 を参照）。いくつかの態様において、ウイルス転送ベクター、免疫抑制剤を含むナノキャリア、およびコルチコステロイドは、同じ経路（例として、静脈内に）を介して、投与される。別の態様において、ウイルス転送ベクター、および免疫抑制剤を含むナノキャリアは、コルチコステロイドとは異なる経路を介して、投与される。たとえば、ウイルス転送ベクターおよび免疫抑制剤を含むナノキャリアは、静脈内に投与されてもよく、その一方で、コルチコステロイドは、経口的に投与されてもよい。本明細書において言及される組成物は、投与、例として共投与のために、従来の方法を用いて製造および調製されてもよい。

40

【0203】

本発明の組成物は、有効量、例えば本明細書において他の場所で記載される有効量で投

50

与することができる。いくつかの態様において、ウイルス転送ベクターおよび／または免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアおよび／またはコルチコステロイドは、IgGおよび／またはIgM応答などの、抗ウイルス導入ベクター免疫応答を減弱化し、および／またはウ対象へのウイルス導入ベクターの再投与を許し、および／またはウイルス導入ベクターの導入遺伝子発現を増大させるための有効量の投与形態において存在する。投与形態は、多様な頻度において投与することができる。いくつかの態様において、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアおよびコルチコステロイドを伴うウイルス導入ベクターの反復投与が、行われる。より好ましい態様において、本発明の組成物（例として、ウイルス導入ベクター、免疫抑制剤を含むナノキャリア、およびコルチコステロイド）の少なくとも2回の投与、少なくとも3回の投与、少なくとも4回の投与、または少なくとも5回の投与が、利用される。いくつかの態様において、コルチコステロイドは、ウイルス導入ベクターおよび免疫抑制剤を含むナノキャリアと同時に投与される。

10

【0204】

本発明の側面は、本明細書において提供される投与の方法のためのプロトコルを決定することに関する。プロトコルは、ウイルス導入ベクターの、免疫抑制剤および／またはコルチコステロイドを含む合成ナノキャリアの、少なくとも頻度、投与量を変化させることにより、続いて所望されるまたは所望されない免疫応答を評価することによって、決定されることができる。発明の実施のための好ましいプロトコルは、IgGおよび／またはIgM応答などのウイルス導入ベクターに対する免疫応答を減弱化し、および／またはウイルス導入ベクターに対する所望されない別の免疫応答を減弱化し、および／または導入遺伝子発現をエスカレートする。プロトコルは、いくつかの態様において、ウイルス導入ベクター、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア、およびコルチコステロイドの、少なくとも投与頻度および用量を、含むことができる。

20

【0205】

開示の別の側面は、キットに関する。いくつかの態様において、キットは、本明細書に提供される組成物のいずれか1以上の、または本明細書に提供される組成物の組み合わせのいずれか1つを、含む。いくつかの態様において、キットは、ウイルス導入ベクターを含む1以上の組成物、および／または免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアを含む1以上の組成物、および／またはコルチコステロイドを含む1以上の組成物を、含む。好ましくは、組成物は、量において、本明細書に提供されるいずれか1以上の用量を、提供する。組成物は、1つの容器において、または、キットにおいて複数の容器中に、あることができる。提供されるキットのいずれか1つのいくつかの態様において、容器は、バイアルまたはアンプルである。提供されるキットのいずれか1つのいくつかの態様において、組成物は、引き続き再構成されてもよいように、各々別々の容器中で、または同じ容器中で、凍結乾燥型で、ある。提供されるキットのいずれか1つのいくつかの態様において、キットは、再構成、混合、投与等々のための説明書をさらに備える。提供されるキットのいずれか1つのいくつかの態様において、説明書は、本明細書に記載される方法のいずれか1つの記載を、含む。説明書は、例として、印刷された挿入または標識として、いずれかの好適な形であることが、できる。本明細書に提供されるキットのいずれか1つのいくつかの態様において、キットは、対象にin vivoで、組成物を送達することができる1以上のシリンジ、または他の装置を、さらに含む。

30

40

【0206】

例

本明細書に記載の発明が、より完全に理解されてもよいために、以下の例が、規定される。この出願で記載の例は、本明細書に提供されるシステムおよび方法を図示するために提示され、どんな形であれ、それらの範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

例1：免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア

ラパマイシンまたはラパマイシン類似体などの免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアは、当業者に公知のいずれかの方法を使用して、産生することができる。

50

【0207】

好ましくは、本明細書に提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアは、US Publication No. US 2016/0128986 A1およびUS Publication No. US 2016/0128987 A1の方法のいずれか1つによって産生され、かかる産生および結果として生じる合成ナノキャリアの記載された方法は、本明細書においてその全体において参考として援用される。本明細書に提供される方法、組成物、またはキットのいずれか1つにおいて、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアは、かかる援用された合成ナノキャリアである。

本明細書に提供される方法、または組成物のいずれか1つにおいて、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアは、かかる援用された合成ナノキャリアである。

10

【0208】

ImmTOR、ラパマイシンを封入している生物分解可能なPLA+PLA-PEGナノ粒子は、かかる合成ナノキャリアの例を指す(Kishimoto TK, Maldonado RA. Nanoparticles for the induction of antigen-specific immunological tolerance. Front Immunol. 2018; 9: 230. Sands E, Kivitz AJ, DeHaan W, et al. Update of SEL-212 phase 2 clinical data in symptomatic gout patients: SVP-rapamycin combined with pegadricase mitigates immunogenicity and enables sustained reduction of serum uric acid levels, low rate of gout flares and monthly dosing. Poster presentation at: 2018 American College of Rheumatology/Association of Reproductive Health Professionals (ACR/ARHP) Annual Meeting; October 19-24, 2018; Chicago, IL. Poster #2254)。

20

【0209】

ラパマイシンまたはラパマイシン類似体を含む合成ナノキャリアは、これらの組み込まれた方法と少なくとも同様の方法によって生成し、以下の例において使用した。

30

【0210】

例2：ナノ粒子封入ラパマイシンおよび全身性のデキサメタゾンの組み合わせの単一または複数の注入による、in vivoのAAV促進導入遺伝子発現の相乗的増強。

C57BL/6の雌のマウス(各々6匹のマウス)の3つの群に、いかなるナノ粒子も伴わないAAV8-SEAPの 1×10^{10} VGを(1つの群)、またはラパマイシンの $100 \mu\text{g}$ でのImmTOR(商標)(例1において生成されたものなどの、ラパマイシンを含む合成ナノキャリア; 2つの群)を、0および56日目に注入した(r.o.)。前の2つの群の中で、1つの群は未処置のままにし、そして、1つは、注入0および56日目に、全身性のデキサメタゾン(i.p.、注入当たり $100 \mu\text{L}$ 中 $200 \mu\text{g}$)で、追加で処置した。

40

【0211】

図1Aおよび1Bに示された時(14、35、49、63、および71日目、または13、19、33、48、62、および69日目)に、マウスから採血し、そして、血清を全血から分離して、 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ で、分析まで保存した。

【0212】

血清のSEAPレベルを、ThermoFisher Scientific(Waltham, MA, USA)からのアッセイキットを使用して、測定した。簡潔には、血清試料およびポジティブコントロールを、希釈緩衝液中で希釈し、 65°C で30分間インキ

50

ュベートし、次いで室温に冷却し、96ウェルフォーマットに塗布した。次いで、アッセイ緩衝液（5分）および基質（20分）を加え、そして、プレートを、照度計（477nm）で読みとった。

【0213】

この実験を、同様の結果によって、二回に繰り返した（図1Aおよび1B）。即時の違いが、未処置群とImmTOR（商標）（ラパマイシンを含む合成ナノキャリア）のみで処置した群との間の最初のSEAP発現レベル（それぞれ、図1Aおよび1B中のd13およびd14）にあった。しかしながら、きわめてより強い違いが、ImmTOR（商標）単独の効果が鎮静した場合に、特に、後で述べられるが、デキサメタゾン（それぞれ、図1Aおよび1B中のd48およびd49）で、追加で処置した群において、観察された。全身性のデキサメタゾンと組み合わせたImmTOR（商標）で処置したマウスのSEAP発現レベルが、未処置のマウスより、およそ2倍高いSEAP発現を示したように、同様の効果は、56日目のブーストの後に見られ、一方で、ImmTOR（商標）単独の効果は、より穏当だった（50～70%）。

10

【0214】

これは、C57BL/6の雌のマウス（各々6匹のマウス）の4つの群に、いかなるナノ粒子も伴わないAAV8-SEAPの1×10¹⁰VGを（2つの群）、またはラパマイシンの100μgでのImmTOR（商標）（ラパマイシンを含む合成ナノキャリア；2つの群）を、0、56、および140または147日目に注入した（r.o.）一連のさらなる試験を、正当化した。両アームにおいて（未処置のまたはImmTOR（商標）により処置した）、1つの群は、いかなる追加の処置も受けず、もう一方は、注入0、56、および140または147日目に、全身性のデキサメタゾン（i.p.、注入当たり100μL中200μg）で、追加で処置した。図2Aおよび2B中に表示されたとき（13、20、49、62、69、76、142、154、161、182、および196日目、または13、20、48、62、69、77、104、146、153、および174日目）に、マウスを採血し、そして、血清を、SEAP発現のために、上記の通りに分析した。

20

この実験を、同様の結果によって、二回に繰り返した（図2Aおよび2B）。

【0215】

また、即時の違いが、未処置群と、ImmTOR（商標）単独の効果が鎮静した場合の、後でより述べられるが、デキサメタゾン（d48/d49）で、追加で処置した群において観察される、より強い違いを伴う、ImmTOR（商標）で処置した群との間の、最初のSEAP発現レベル（d13）が、あった。

30

【0216】

同様の効果は、56日目のブーストの後、観察された。デキサメタゾン単独は、改善されたSEAP発現も提供し、しかし、それは、ImmTOR（商標）単独に対して、より少ないか等しく、そして、ImmTOR（商標）とデキサメタゾンとの組み合わせによって提供されるそれに対して、劣った。これは、d140（図2A）またはd147（図2B）での第2のブーストの後さらにいっそう明白になり、デキサメタゾン単独によるその位置での中程度の利益が、見られ（対未処置10～80%）、そして、より強い効果が、ImmTOR（商標）単独によって呈された（対未処置40～110%）。驚くべきことに、この位置で、ImmTOR（商標）とデキサメタゾンとの組み合わせは、きわめて高いSEAP発現レベル提供し、およびこの効果は、一般に相乗的だった：全身性のデキサメタゾンと組み合わせたImmTOR（商標）で処置した群におけるSEAPレベル上昇は、個別のImmTOR（登録商標）およびデキサメタゾンにより到達された上昇の合計より、高かった。例として、図2A中のd196での115%対53%、図2B中の231%対176%。

40

【0217】

まとめると、2.1～3.3倍より高いSEAP発現は、未処置のマウスと比較して、第2のブーストの後ImmTOR（商標）とデキサメタゾンとの組み合わせで処置した群

50

において、見られた。

【0218】

例3：ナノ粒子封入ラパマイシン（ImmTOR（商標））および全身性のデキサメタゾンの組み合わせによる、AAVに対するIgMおよびIgGの相乗的減少。

例2と同じ試験のシリーズにおいて、ELISAを使用して、以下の通りにAAVに対するIgMおよびIgG抗体を、測定した：96ウェルプレートを、終夜AAVでコートし、洗浄し、翌日にブロックした。次いで、希釈した血清試料（1：40）をプレートに加え、インキュベートした；プレートを洗浄し、そして、ロバ抗マウスIgMまたはヤギ抗マウスIgG特異的HRPを、加えた。別のインキュベーションおよび洗浄の後、AVに対するIgMまたはIgG抗体の存在を、TMB基質を加え570nmのレファレンス波長により450nmの吸光度で測定することにより、検出した（最上部光学密度（OD）として提示されるシグナルの強度は、試料中のIgM/IgG抗体の量と、直接比例する）。

10

【0219】

以前に示されたように、AAVと共投与したImmTOR（商標）は、AAV IgMの初期の誘導を抑制し、そして、特にプライムの後、その出現を遅延させた（図3）。しかしながら、これは、d56ブーストの後よりも顕著でなく、d63～d106間にImmTOR（商標）だけで処置した群における顕著なIgM上昇に、結果としてなった。同時に、ImmTOR（商標）および全身性のデキサメタゾンで処置した群のIgM生成は、IgM応答のさらにより強いおよび統計学的により顕著な抑制を示し、それは、d56ブーストより前でさえ、ImmTOR（商標）だけで処置した群においてより、低かった（図3）。

20

【0220】

これは、同様にきわめて低いIgG変換速度に変換した（図4）。また、以前に示されるとおり、AAVと共投与したImmTOR（商標）は、d56ブーストの前に、および特にその後遅れていくつかのブレイクスルーが見られ、d104までにIgG陽性になっているこの群において、6匹のマウスのうち4匹において結果として生じたが、AAV IgGの初期の誘導を抑制し、その出現を遅延させた。同時に、d104まで、ImmTOR（商標）と全身性のデキサメタゾンで処置した群における単一のIgG変換は、なかった（図4）。

30

【0221】

例4：全身性のデキサメタゾンと組み合わせたナノ粒子封入ラパマイシン（ImmTOR（商標））の相乗作用による、AAVベクターの複数の投与に対する長期のIgM免疫応答の減少。

C57BL/6の雌のマウス（各々6匹のマウス）の4つの群に、ImmTOR（商標）ナノ粒子を伴わないAAV8-SEAPの1×10¹⁰ VG（d0および56）または2×10¹⁰ VG（d147）、またはラパマイシンの100 μg（d0および56）または200 μg（d147）でのImmTOR（商標）（2つの群）を、0、56、および147日目に、3回注入した（i.v. 後眼窩神経叢）。群の対のうち、1つの群を、AAVおよびImmTORの注入の時に（0、56、147日目）、全身性のデキサメタゾンで、追加で処置した（i.p. 200 μg）。まとめると、試験の1つの群は、AAV8単独で処置し、1つは、ImmTOR（商標）と組み合わせたAAV8で処置し、1つは、全身性のデキサメタゾンと組み合わせたAAV8で処置し、そして、1つは、ImmTOR（商標）および全身性のデキサメタゾン（Dex）両方と組み合わせたAAV8で、処置した。

40

【0222】

図5A中に示された時（6、13、20、34、49、62、69、76、90、104、142、154、161、168、182、196、および231日目）に、マウスを採血し、そして、血清を、全血から分離し、-20±5℃で分析まで保存した。次いで、AAVに対するIgM抗体を、ELISAによって以下の通りに測定した：96ウェル

50

プレートに、A A Vで終夜コートし、次いで洗浄し、そして翌日ブロックした。希釈した血清試料（1：40）を、プレートに加え、インキュベートし、プレートを洗浄し、ロバ抗マウスI g M特異的H R Pを加え、別のインキュベーションおよび洗浄の後、A Vに対するI g M抗体の存在を、T M B基質を加え570nmのレファレンス波長により450nmの吸光度で測定することにより、検出した（最上部光学密度（O D）として提示されるシグナルの強度は、試料のI g M抗体の量と、直接比例する）。

【0223】

以前に示されたように、A A Vと共投与したI m m T O R（商標）ナノ粒子は、A A V I g Mの初期の誘導を抑制し、そして、特にプライムの後、その出現を遅延させた。しかしながら、これは、d 5 6およびd 1 4 7のブースト（矢印によって示された）の後、特に第3のA A V投与（d 1 4 7）の後に、より目立たず、I m m T O R（商標）ナノ粒子だけで処置した群の顕著なI g M上昇に結果としてなった（図5 A）。同時に、I m m T O R（商標）ナノ粒子および全身性のデキサメタゾンで処置した群のI g M生成は、I g M応答のより強いおよび統計学的により顕著な抑制を示し、それはI m m T O Rナノ粒子だけによって処置した群においてよりも低く、5 6および1 4 7日目の反復したA A V投与の後で、統計的に有意になり、注目すべきことに、最後のA A V投与の後8 4日間、すなわち2 3 1日目に、統計学的に差があるままであった（図5 B）。

10

【0224】

d 2 3 1までに、I m m T O R（商標）で処置していない群のI g Mレベルは、これらの群が、最初のA A V投与の後、早くピークが来たので（d 6および1 3）、比較的低く、それは、例5に示されるように、これらの群における抗A A V I g G生成への効率的な移行につながったことに、注意すべきである。

20

【0225】

例5：A A V I g Gブレイクスルーのより低いレベルが、ナノ粒子封入ラパマイシン（I m m T O R（商標））と全身性のデキサメタゾンの組み合わせによって誘導される。

例4に記載の試験からの血清試料は、E L I S Aによって測定したA A V I g Gの存在のためにも、試験された。E L I S Aは、ヤギ抗マウスI g G特異的H R Pが、使用された以外は、I g Mレベルを決定するために使用したものと同様だった。以前に示されたように、A A Vと共投与したI m m T O R（商標）は、いくつかは、該実験において、のちにI g Gを開発するために開始したが（それは、この群の遅延I g M速度論と相関する）、実験動物の大多数のA A V I g Gの誘導を抑制した。特に、この群の6匹のうち2匹の動物は、5 6日目の第1のブーストの後、検出可能なI g Gを示し、6のうち3が、9 0日目までに（第1のブーストの後の3 4日間）I g G陽性であり、6のうち5が、1 4 7日目に（すなわち、1 5 4日目までに）、第2のブーストの後直ちに（7日間）転換し、そして、この群の動物の全てが、1 9 6日目までに（第2のブーストまたは第3のA A V投与の後の5 1日間）、A A Vに対するI g Gの存在を、立証した。2 3 1日目まで、I m m T O R（商標）およびデキサメタゾンの組み合わせで処置した群における確認されたI g Gブレイクスルーがなく、それは、例3に示すとおり、その速度論における、I g Mおよびのより顕著な遅れの低いレベルおよび一時的な生成と、相関した。デキサメタゾンと組み合わせたI m m T O R（商標）の存在下でのA A Vの反復した投与の後に見られたA A Vに対するI g Gの極めて低いこれらのレベルは、試験の後のステージ、すなわち1 4 2～2 3 1日目を通して、I m m T O R（商標）だけと組み合わせてA A Vで処置した群において見られたそれらと、統計学的に差があった（ $0.001 < p < 0.05$ ）。A A Vだけで処置した群のように、デキサメタゾン単独で処置した群において、I g G抑制または遅れは、なかった。

30

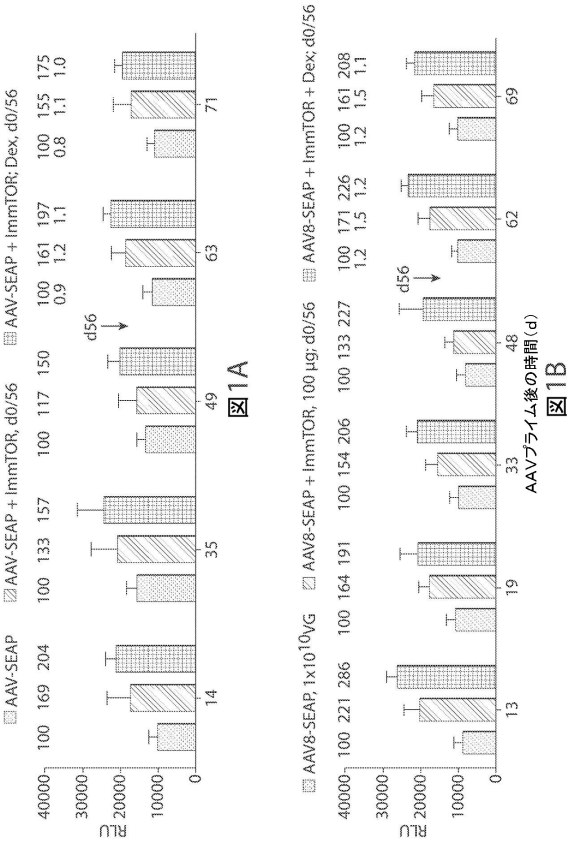
40

【0226】

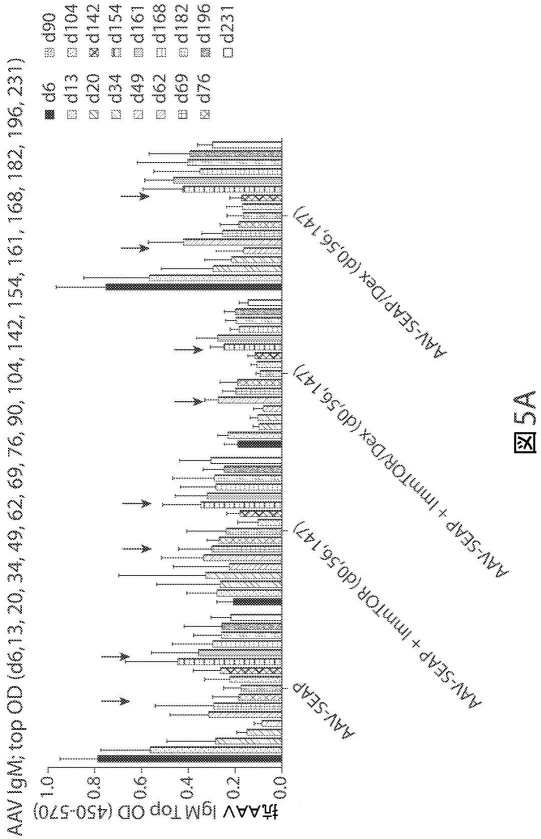
まとめると、I m m T O R（商標）単独が、A A V I g M／I g G遅延および抑制のための利益を示し、デキサメタゾン単独が、各々のいずれも示さない一方で、両方の処置の組み合わせは、A A V特異的I g M／I g G抑制において、特に反復したA A V投与の後に、はるかに優れていた。

50

【図面】
【図 1】



【図 5 A】



【図 5 B】

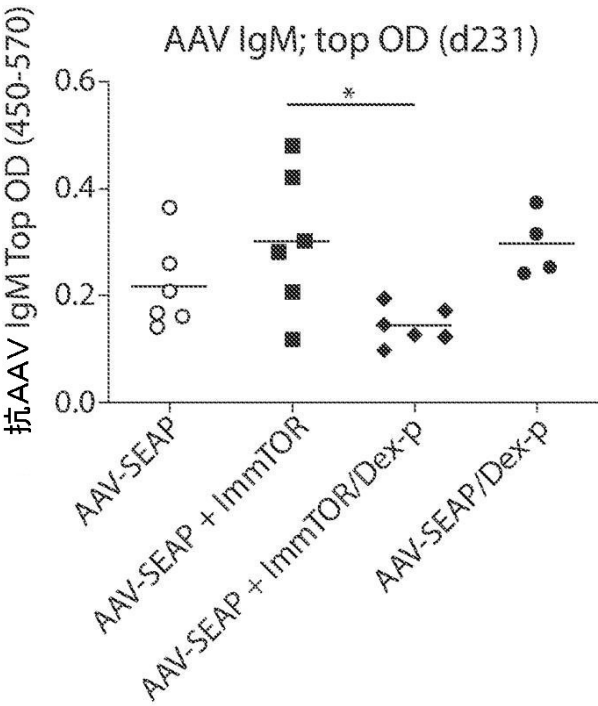


図 5B

【図 6】

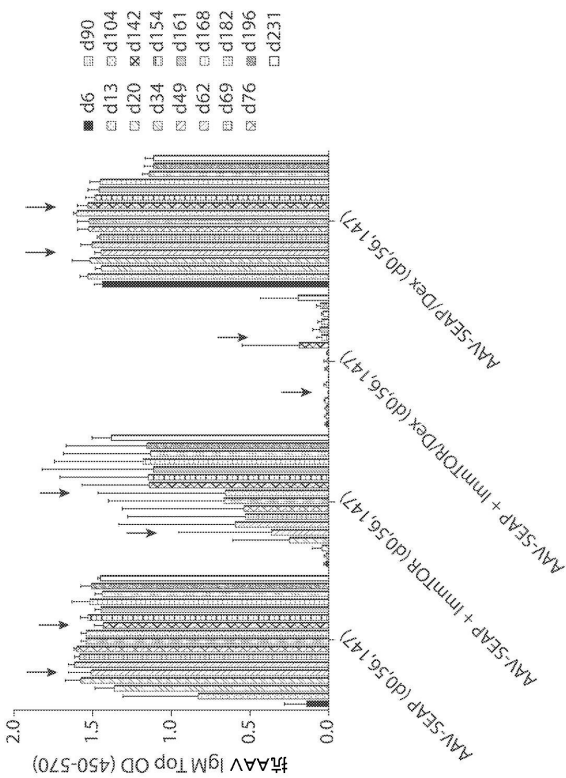


図 6

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/034865

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/86 A61K47/00 A61K48/00 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) C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AMINE MELIANI ET AL: "Antigen-selective modulation of AAV immunogenicity with tolerogenic rapamycin nanoparticles enables successful vector re-administration", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 9, no. 1, 5 October 2018 (2018-10-05), XP055574640, DOI: 10.1038/s41467-018-06621-3 the whole document	1-58
Y	WO 2019/075360 A1 (SELECTA BIOSCIENCES INC [US]) 18 April 2019 (2019-04-18) claims 1,2,13-32,41	1-58
	----- -/--	
☒ 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
21 September 2020		25/09/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mauhin, Viviane

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/034865

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2018/193482 A1 (ILYINSKII PETR [US] ET AL) 12 July 2018 (2018-07-12) paragraphs [0002], [0005], [0007], [0025] - [0027], [0071] examples 1,3,5-8 -----	1-58
Y	US 2016/067228 A1 (KISHIMOTO TAKASHI KEI [US]) 10 March 2016 (2016-03-10) example 11 -----	1-58
Y	WO 2008/069942 A2 (BIOGEN IDEC INC [US]; WANG XINZHONG [US]; PARR MICHAEL [CA]) 12 June 2008 (2008-06-12) paragraphs [0001], [0008], [0048], [0054] paragraphs [0062], [0064] - [0067], [0072] - [0074] claim 1 -----	1-58

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/034865

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019075360 A1	18-04-2019	AU 2018347583 A1	21-05-2020	
		CA 3078705 A1	18-04-2019	
		CN 111542336 A	14-08-2020	
		EP 3694543 A1	19-08-2020	
		KR 20200086670 A	17-07-2020	
		US 2019142974 A1	16-05-2019	
		WO 2019075360 A1	18-04-2019	

US 2018193482 A1	12-07-2018	AU 2018205496 A1	25-07-2019	
		BR 112019013862 A2	14-04-2020	
		CA 3049384 A1	12-07-2018	
		CN 110325203 A	11-10-2019	
		EP 3565572 A1	13-11-2019	
		JP 2020506890 A	05-03-2020	
		KR 20190104194 A	06-09-2019	
		US 2018193482 A1	12-07-2018	
		WO 2018129268 A1	12-07-2018	

US 2016067228 A1	10-03-2016	AU 2015311704 A1	02-02-2017	
		AU 2015311705 A1	02-02-2017	
		AU 2015311706 A1	02-02-2017	
		AU 2015311707 A1	02-02-2017	
		AU 2015311708 A1	02-02-2017	
		BR 112017001245 A2	05-12-2017	
		BR 112017001311 A2	14-11-2017	
		BR 112017001359 A2	21-11-2017	
		BR 112017001470 A2	20-02-2018	
		BR 112017001601 A2	21-11-2017	
		CA 2957737 A1	10-03-2016	
		CA 2957793 A1	10-03-2016	
		CA 2957800 A1	10-03-2016	
		CA 2957802 A1	10-03-2016	
		CA 2957808 A1	10-03-2016	
		CN 106714826 A	24-05-2017	
		CN 106715699 A	24-05-2017	
		CN 107073050 A	18-08-2017	
		CN 107073091 A	18-08-2017	
		CN 107075499 A	18-08-2017	
		EP 3188742 A1	12-07-2017	
		EP 3189138 A2	12-07-2017	
		EP 3189146 A1	12-07-2017	
		EP 3189147 A1	12-07-2017	
		EP 3193896 A1	26-07-2017	
		JP 2017527565 A	21-09-2017	
		JP 2017527571 A	21-09-2017	
		JP 2017529342 A	05-10-2017	
		JP 2017532304 A	02-11-2017	
		JP 2017532307 A	02-11-2017	
		KR 20170045344 A	26-04-2017	
		KR 20170045345 A	26-04-2017	
		KR 20170045346 A	26-04-2017	
		KR 20170045347 A	26-04-2017	
		KR 20170054434 A	17-05-2017	
		US 2016067228 A1	10-03-2016	
		US 2016074372 A1	17-03-2016	
		US 2016074427 A1	17-03-2016	
		US 2016074531 A1	17-03-2016	
		US 2016074532 A1	17-03-2016	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/034865

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2019076458 A1	14-03-2019
		WO 2016037161 A2	10-03-2016
		WO 2016037162 A1	10-03-2016
		WO 2016037163 A1	10-03-2016
		WO 2016037164 A1	10-03-2016
		WO 2016037165 A1	10-03-2016

WO 2008069942	A2	12-06-2008	NONE

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 9/16 (2006.01)	A 6 1 K 9/16	
A 6 1 K 47/34 (2017.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 K 47/30 (2006.01)	A 6 1 K 47/30	
A 6 1 K 47/36 (2006.01)	A 6 1 K 47/36	
A 6 1 K 31/436 (2006.01)	A 6 1 K 31/436	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	A 6 1 P 43/00	1 2 1

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,N
E,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,K
G,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,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. プルロニック

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 2 0、レキシントン、クーリッジ アベニュー 4 6

(72)発明者 イリンスキー、ピョートル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 4 0、ケンブリッジ、ペンバートン ストリート 1

7 7、ユニット 1 3

F ターム (参考) 4C076 AA31 BB13 DD21 EE24 EE30 EE41
4C084 AA13 AA22 NA05 NA06 NA13 ZB082 ZC41 ZC75
4C086 AA01 AA02 CB22 DA10 DA12 MA03 MA04 MA52 MA66 NA05
NA06 ZB08 ZC41 ZC75
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA66 NA13 ZC41 ZC75