

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-501284
(P2024-501284A)

(43)公表日 令和6年1月11日(2024.1.11)

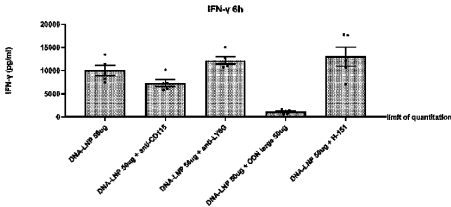
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	4 C 0 7 6	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	4 C 0 8 4	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	4 C 0 8 5	
A 6 1 K	9/51 (2006.01)	A 6 1 K	9/51	4 C 0 8 6	
A 6 1 K	9/14 (2006.01)	A 6 1 K	9/14		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全70頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-538718(P2023-538718)	(71)出願人	518138077	スパーク セラピューティクス インコーポレイテッド SPARK THERAPEUTICS, INC. アメリカ合衆国, ペンシルベニア州, フィラデルフィア, スイート 1300, マーケット ストリート 3737 110000109 弁理士法人特許事務所サイクス ナヴィ アリ アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19312 バーウィン ボーモント ロード 1053 アンゲラ ザビエル 最終頁に続く	
(86)(22)出願日	令和3年12月22日(2021.12.22)				
(85)翻訳文提出日	令和5年8月21日(2023.8.21)				
(86)国際出願番号	PCT/US2021/073084				
(87)国際公開番号	WO2022/140788				
(87)国際公開日	令和4年6月30日(2022.6.30)				
(31)優先権主張番号	63/130,105				
(32)優先日	令和2年12月23日(2020.12.23)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人			
(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,	(72)発明者		最終頁に続く	
	最終頁に続く	(72)発明者			

(54)【発明の名称】 非ウイルス遺伝子治療を強化する方法

(57)【要約】

導入遺伝子を、それを必要とする対象に送達する方法が記載される。特に、本方法は、（i）食細胞除去剤、および（ii）導入遺伝子を含む非ウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を対象に投与することを含む。本方法は、タンパク質の機能もしくは活性の損失によって引き起こされる疾患の治療を必要とする対象を治療するために、またはタンパク質の機能活性もしくは発現の獲得によって引き起こされる疾患の治療を必要とする対象を治療するために使用することができる。

FIG. 1A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a. 食細胞除去剤を対象に投与すること；ならびに
b. 導入遺伝子を含む非ウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を対象に投与すること
を含む、導入遺伝子を、それを必要とする対象に送達する方法。

【請求項 2】

導入遺伝子を対象において発現されるものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

導入遺伝子が、プロモーターまたはプロモーター／エンハンサーに作動可能に連結されている、請求項 1～2 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 4】

導入遺伝子が、肝臓特異的プロモーターまたは肝臓特異的プロモーター／エンハンサーに作動可能に連結されている、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

肝臓特異的プロモーターまたは肝臓特異的プロモーター／エンハンサーが、トランスサイレチン (TTR) 遺伝子プロモーターおよびその変異体、ヒト $\alpha 1$ -アンチトリプシン (hAAT) プロモーター、アポリポタンパク質 A-I プロモーター、アルブミンプロモーター、B 型肝炎ウイルスコアプロモーター、 α フェトプロテイン (AFP)、ヒト第 IX 因子プロモーター、チロキシン結合グロブリン (TBG) プロモーター、およびアポリポタンパク質 E (ApoE) / hAAT からなる群から選択される、請求項 4 に記載の方法。 20

【請求項 6】

非ウイルスベクターが、非ウイルス送達ナノ粒子である、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

非ウイルスベクターおよび食細胞除去剤が共投与される、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

食細胞除去剤が、非ウイルスベクターが投与される少なくとも 1 日前に投与される、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 9】

食細胞除去剤が、CD115 インヒビターである、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

CD115 インヒビターが、CD115 に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

抗体またはその抗原結合断片が、エマクツズマブ、AMG820、もしくはカビラリズマブまたはこれらの抗原結合断片である、請求項 10 に記載の方法。 40

【請求項 12】

ビスホスホネートを対象に投与することをさらに含む、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

ビスホスホネートが、クロドロン酸、パミドロン酸、イバンドロン酸、またはゾレドロン酸である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

ビスホスホネートが、クロドロン酸である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

対象に免疫抑制剤を投与することをさらに含む、請求項 1～14 のいずれか一項に記載 50

の方法。

【請求項 16】

免疫抑制剤がステロイドである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

ステロイドがコルチコステロイドである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

コルチコステロイドがデキサメタゾンである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

対象が、非ウイルスベクターによって誘導される望ましくない免疫応答を、最小限で有するか、または有しない、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 20】

非ウイルス送達粒子が、脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、タンパク質ベースのナノ粒子、およびペプチドケージからなる群から選択される、請求項 6～19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

非ウイルスベクターが dsDNA 分子であり、かつ dsDNA 分子が、ミニサークル、プラスミド、開放直鎖二本鎖 DNA、および閉鎖末端直鎖二本鎖 DNA (CELID / ceDNA / doggy bone DNA) からなる群から選択される、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

非ウイルスベクターが ssDNA 分子であり、かつ ssDNA 分子が、閉鎖環状 DNA および開放直鎖 DNA からなる群から選択される、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 23】

導入遺伝子が、治療用または予防用のタンパク質またはペプチドをコードする、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

導入遺伝子が、治療用または予防用の核酸をコードする、請求項 1～22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

非ウイルス送達ナノ粒子が、表 1 に提供される 1 以上の脂質またはその薬学的に許容される塩を含む脂質ナノ粒子 (LNP) である、請求項 6～24 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 26】

1 以上の脂質が、約 20%～約 65% のモル%にて LNP 中に存在する、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

a. 導入遺伝子を含む非ウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物；および

b. 食細胞除去剤

40

を含むキット。

【請求項 28】

非ウイルスベクターが非ウイルス送達ナノ粒子であり、導入遺伝子がプロモーターまたはプロモーター／エンハンサーに作動可能に連結されている、請求項 27 記載のキット。

【請求項 29】

ビスホスホネート、コルチコステロイド、および免疫抑制剤の少なくとも 1 つをさらに含む、請求項 27 または 28 に記載のキット。

【請求項 30】

食細胞除去剤が CD115 インヒビターであり、キットが：

a. 非ウイルス送達ナノ粒子および非ウイルスベクターを含む医薬組成物；

50

b. CD115 インヒビター；ならびに

c. クロドロン酸、デキサメタゾン、および JAK インヒビターの少なくとも 1 つを含む、請求項 28 または 29 に記載のキット。

【請求項 31】

CD115 インヒビターが、エマクツズマブ、AMG820、もしくはカビラリズマブまたはこれらの抗原結合断片である、請求項 30 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2020年12月23日に提出された米国仮特許出願第63/130,105号の優先権を主張し、その全内容は、すべてのテキスト、表、および図面を含めて、参照により本明細書に組み込まれる。

【技術分野】

【0002】

本発明は遺伝子治療の分野に関する。特に、本発明は非ウイルス遺伝子治療を強化する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

遺伝子治療は、治療的利益を提供するために外因性核酸を細胞に送達することを含む。原因となる異常が知られている遺伝性疾患は、遺伝子治療を用いて、誤発現または過剰発現されている遺伝子を遮断することによって、または機能不全遺伝子のワーキングコピーを提供することによって、治療できる可能性がある。このような遺伝子治療アプローチは、現在、遺伝子異常から生じる多くの疾患を治療または治療するために開発されている。

【0004】

遺伝子治療を成功させるためには、治療用遺伝物質のための有効な送達システムが必要である。遺伝物質の送達の成功は、例えば、遺伝子送達系が対象に送達可能であり、遺伝物質を酵素分解から保護することができ、身体において長い寿命を有し、必要とされる身体内の部位に到達することができ、生体適合性および生分解性であり、または毒性が許容でき、細胞膜を通過し、サイトゾルを通過し、および／または核膜を通過して所望の作用点で遺伝物質を放出できることを必要とする。

【0005】

遺伝子治療は、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターによって送達され得る。ウイルスベクターは、高い形質導入効率を示し、組換えDNAがエピソームのままであるか、または染色体に組み込まれている場合、外来遺伝子の安定した長期発現を示す。しかしながら、それらのin vivoでの有効性は、毒性、遺伝物質のゲノムへのランダムな組み込み、適切な遺伝子機能の破壊、癌形成、潜在的複製、細胞分裂依存性希釈、限られたDNA運搬能力、ベクターカプシドに対する体液性免疫反応および細胞媒介性免疫反応に一部起因する重度の免疫反応および炎症応答、ならびに対象のサブセットにおけるベクターカプシドに対する既存の抗体の存在に起因する対象の再投与不能の懸念により制限され得る。

【0006】

ウイルスベクターの欠損を克服するために、非ウイルス遺伝子送達アプローチが開発されている。ウイルスベクターと比較して、特定のタイプの非ウイルスベクターは、作製が容易であり、複製を必要とせず、タンパク質ベースのベクターカプシドの欠如に起因する適応免疫応答を生じる可能性がより低い。さらに、非ウイルスベクターは、ウイルスベクターに関連する導入遺伝子サイズ制限の欠如、ベクターカプシドに対する既存の抗体を有する対象に投与する能力、および対象に再投与する能力を含む、いくつかの貴重な利点を提供する。しかしながら、非ウイルス送達アプローチは、毒性、トランスフェクション効率、核酸分解、および自然免疫等の課題に悩まされる。さらに、非ウイルスアプローチは

10

20

30

40

50

体細胞標的への遺伝子送達の効率が低く、ウイルスアプローチよりもin vivo遺伝子発現レベルが低いことが実証されている。

【0007】

肝臓は、代謝の中心的臓器であり、先天性代謝異常や血友病、ならびに肝癌や肝炎等の後天性疾患を含む多くの遺伝性代謝疾患や障害の遺伝子治療の標的となっている。肝臓指向性遺伝子治療のための特定の細胞標的は、肝実質細胞、または肝細胞である。しかしながら、ナノ粒子は、クッパー細胞（～50%）および肝類洞内皮細胞（～30%）を含む非実質細胞によって主に取り込まれ、肝細胞指向性遺伝子治療の有効性を制限する（Shi et al., J Histochem Cytochem. 2011 59(8) : 727-40; Jacobs et al., Pharmaceuticals 2012, 5(12) : 1372-1392）。常在マクロファージとも呼ばれる他の組織特異的マクロファージの例としては、腸内の腸管マクロファージ、脳内のミクログリア細胞、肺内の肺胞マクロファージ、常在腎マクロファージ、皮膚マクロファージ、脾臓内の赤脾髄マクロファージ、および骨内の破骨細胞が挙げられる。遺伝子治療の部位特異的な改善された効率は、標的細胞への非ウイルスベクターの侵入を増強し、非標的細胞によるベクターの取り込みを減少させることによって達成された。

10

【0008】

治療用遺伝物質を目的の標的に、効果的、特異的、かつ安全に送達する方法が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0009】

本明細書には、それを必要とする対象に導入遺伝子を送達するための方法が開示される。本発明による方法は、タンパク質の機能もしくは活性の損失によって引き起こされる疾患の治療を必要とする対象を治療するために、またはタンパク質の機能活性もしくは発現の獲得によって引き起こされる疾患の治療を必要とする対象を治療するために使用することができる。

20

【0010】

いかなる理論または特定の機構にも拘束されることを望まないが、食細胞除去剤の投与による食免疫細胞の除去は、非標的細胞による非ウイルスベクターの非生産的取り込みを減少させ、非ウイルスベクターの標的細胞への侵入の増強を可能にし、改善された導入遺伝子発現をもたらすと考えられる。

30

【0011】

ある実施形態では、本発明は：

a. 対象に食細胞除去剤を投与すること；ならびに

b. 導入遺伝子を含む非ウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を対象に投与すること

を含む、導入遺伝子を、それを必要とする対象に送達する方法に関する。

【0012】

ある実施形態では、医薬組成物は：

a. 非ウイルス送達ナノ粒子；および

b. プロモーターに作動可能に連結された導入遺伝子を含む非ウイルスベクターを含む。

40

【0013】

ある実施形態では、食細胞除去剤は、単球および／またはマクロファージ除去剤である。

【0014】

ある実施形態では、単球および／またはマクロファージ除去剤は、CD115インヒビターである。

【0015】

ある実施形態では、CD115インヒビターは、CD115に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である。

50

【0016】

ある実施形態では、抗CD115抗体またはその抗原結合断片は、エマクツズマブ、AMG820、またはカビラリズマブである。

【0017】

ある実施形態では、CD115インヒビターは、CD115の低分子阻害剤である。

【0018】

ある実施形態では、CD115の低分子阻害剤はペキシダルチニブである。

【0019】

ある実施形態では、単球および／もしくはマクロファージ除去剤は、クロドロン酸ではなく、または単球および／もしくはマクロファージ除去剤は、クロドロン酸と、CD115インヒビターまたはCD177、CD14、CD15、CD11b、CD16、CD32、CD33、CD44、CD45、CD66b、CD18、もしくはCD62Lインヒビター等の1以上のさらなる食細胞除去剤とを含む。

10

【0020】

ある実施形態では、食細胞除去剤は好中球除去剤である。

【0021】

ある実施形態では、好中球除去剤は、CD177、CD14、CD15、CD11b、CD16、CD32、CD33、CD44、CD45、CD66b、CD18、もしくはCD62Lインヒビター、または対応するもしくは同等のヒトタンパク質および／もしくは機能的細胞型のインヒビターである。

20

【0022】

ある実施形態では、CD177、CD14、CD15、CD11b、CD16、CD32、CD33、CD44、CD45、CD66b、CD18、またはCD62Lインヒビターは、CD177、CD14、CD15、CD11b、CD16、CD32、CD33、CD44、CD45、CD66b、CD18、またはCD62Lに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片である。

【0023】

ある実施形態では、CD177、CD14、CD15、CD11b、CD16、CD32、CD33、CD44、CD45、CD66b、CD18、またはCD62Lインヒビターは、CD177、CD14、CD15、CD11b、CD16、CD32、CD33、CD44、CD45、CD66b、CD18、またはCD62Lの低分子阻害剤である。

30

【0024】

ある実施形態では、食細胞除去剤は樹状細胞除去剤である。

【0025】

ある実施形態では、非ウイルスベクターおよび食細胞除去剤は、共投与される。

【0026】

ある実施形態では、非ウイルスベクターが投与される少なくとも1日前に、場合により非ウイルスベクターが投与される前1年以内に、食細胞除去剤が投与される。

【0027】

ある実施形態では、本方法は、対象にビスホスホネートを、好ましくは1以上の他の食細胞除去剤と一緒に投与することをさらに含む。

40

【0028】

ある実施形態では、ビスホスホネートは、クロドロン酸、パミドロン酸、イバンドロン酸、またはゾレドロン酸であり、場合によりクロドロン酸である。

【0029】

ある実施形態では、本方法は、対象に免疫抑制剤を投与することをさらに含む。

【0030】

ある実施形態では、免疫抑制剤はステロイドである。

【0031】

50

ある実施態様では、ステロイドは、コルチコステロイドであり、場合によりデキサメタゾンである。

【0032】

ある実施形態では、本方法は、対象において導入遺伝子の発現をもたらす。

【0033】

ある実施形態では、対象は、非ウイルスベクターによって誘導される望ましくない免疫応答を、最小限で有するか、または有しない。

【0034】

ある実施形態では、非ウイルス送達粒子は、脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、タンパク質ベースのナノ粒子、およびペプチドケージからなる群から選択される。

10

【0035】

ある実施形態では、非ウイルスベクターは dsDNA 分子であり、dsDNA 分子は、ミニサークル、プラスミド、開放直鎖二本鎖 DNA、および閉鎖末端直鎖二本鎖 DNA (CELID / ceDNA / doggy bone DNA) からなる群より選択される。

【0036】

ある実施形態では、非ウイルスベクターは ssDNA 分子であり、ssDNA 分子は閉鎖環状 DNA または開放直鎖 DNA である。

【0037】

ある実施形態では、導入遺伝子は、治療用または予防用のタンパク質またはペプチドをコードする。

20

【0038】

ある実施形態では、導入遺伝子は、治療用または予防用の核酸をコードする。

【0039】

また、本明細書には、例えば、これに限定されないが、本発明による方法を実施するために使用され得る成分を有する、パッケージおよびキット等の組み合わせまたは組成物も開示される。ある実施形態では、パッケージまたはキットは：(a) 導入遺伝子を含む非ウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物；(b) 食細胞除去剤；ならびに (c) 本明細書に開示される方法を実施するための指示を有するラベルをその中に配置する。ある実施形態では、(a) および (b) は、別個のまたは同じ容器中に存在する。ある実施形態では、組み合わせ、パッケージまたはキットは、免疫抑制剤をさらに含み得る。

30

【図面の簡単な説明】

【0040】

前述の概要、ならびに以下の本発明の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むことでより理解される。本発明は、図面に示される正確な実施形態に限定されないことを理解されたい。図面には以下が含まれる：

【図1】図1は、実施例1に記載された試験の免疫応答結果を示す。具体的には、図1Aは、抗CD115もしくは抗Ly6G抗体もしくはラージODNもしくはH-151と、またはこれらなしで、50 μgのDNA-LNPを投与した6時間後の動物の血漿中のIFN-γサイトカイン産生のレベルを示すグラフであり；図1Bは、抗CD115もしくは抗Ly6G抗体もしくはラージODNもしくはH-151と、またはこれらなしで、10 μgのDNA-LNPを投与した6時間後の動物の血漿中のIFN-γサイトカイン産生のレベルを示すグラフである。

40

【図2】図2は、実施例1に記載の試験の有効性結果を示す。具体的には、図2Aは、抗CD115もしくは抗Ly6G抗体もしくはラージODNもしくはH-151と、またはこれらなしで、50 μgのDNA-LNP投与1、8、14、28、63、84、および98日後の動物の血漿中のFIX導入遺伝子の発現レベルを示すグラフであり；図2Bは、抗CD115もしくは抗Ly6G抗体もしくはラージODNもしくはH-151と、またはこれらなしで、10 μgのDNA-LNP投与1、8、14、28、63、84、および98日後の動物の血漿中のFIX導入遺伝子の発現レベルを示すグラフである。

【図3】図3は、実施例2に記載される試験の免疫応答結果を示す。具体的には、図3A

50

は、抗CD115および／もしくはクロドロン酸と、またはこれらなしで、50 μgのDNA-LNPを投与した6時間後の動物の血漿中のIFN-γサイトカイン産生のレベルを示すグラフであり；図3Bは、抗CD115および／もしくはクロドロン酸と、またはこれらなしで、50 μgのDNA-LNPを投与した6時間後の動物の血漿中のIL-6サイトカイン産生のレベルを示すグラフである。

【図4】図4は、実施例2に記載の試験の有効性結果を示し、具体的には、抗CD115および／またはクロドロン酸の有無にかかわらず、50 μgのDNA-LNP投与1週間後の動物の血漿中のFIX導入遺伝子の発現レベルを示すグラフである。

【図5】図5は、クロドロン酸、抗CD115、およびペキシダルチニブを用いた処置による除去効果を示す。図5Aは、CLEC4F+細胞を測定した結果を提供する。図5Bは、CD68+細胞を測定した結果を提供する。

【図6】図6は、飼料と混合されたペキシダルチニブによる処置から生じる除去効果を示す。図6Aは、CD68+細胞を測定した結果を提供する。図6Bは、CLEC4F+細胞を測定した結果を提供する。

【図7】図7は、ペキシダルチニブで処置し、DNA-LNP-5を投与したマウスにおけるhFIX発現を示す。マウスをペキシダルチニブで7日間または21日間、前処置した。投与1、2、3または4週間後にELISAを用いてマウス血漿中のhFIXレベルを定量した。

【図8】図8は、抗CD-115抗体で処置し、DNA-LNP-5を投与したマウスにおけるhFIX発現を示す。DNA-LNP-5投与前にマウスを抗CD-115抗体で3回（-5、-3、および-1日目）前処置した。投与1、2、4、または12週間後にELISAを用いてマウス血漿中のhFIXレベルを定量した。図8において、「ns」はt検定で有意ではなく、*P<0.05は有意を示し、LLOQは定量下限を示す。

【図9】図9は、抗CD-115抗体で処置し、DNA-LNP-3を投与したマウスにおけるhFIX発現を示す。DNA-LNP-3投与前にマウスを抗CD-115抗体で4回（-10日目、-8日目、-6日目、および-2日目）前処置した。投与1、2、4、または12週後にELISAを用いてマウス血漿中のhFIXレベルを定量した。図9において、「ns」はt検定で有意でなく、*P<0.05、および**P<0.01は有意を示し、LLOQは定量下限を示す。

【図10】図10は、抗CD-115抗体で処置し、DNA-LNP-4を投与したマウスにおけるhFIX発現を示す。DNA-LNP-4投与前にマウスを抗CD-115抗体で4回（-10日目、-8日目、-6日目、および-2日目）前処理した。投与1、2、4、または12週後にELISAを用いてマウス血漿中のhFIXレベルを定量した。図10において、「ns」はt検定で有意でなく、*P<0.05、および***P<0.001は有意を示し、LLOQは定量下限を示す。

【発明の詳細な説明】

【0041】

様々な刊行物、論文、および特許が背景技術の項および本明細書全体を通して引用または記載されており、これらの参考文献の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に含まれる文献、行為、材料、装置、物品等の記述は、本発明の文脈を提供するためのものである。そのような記述は、これらの事項のいずれかまたはすべてが、開示またはクレームされる発明に関する先行技術の一部を形成することを認めるものではない。

【0042】

別途定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。他の点では、本明細書に引用される特定の用語は、本明細書に記載される意味を有する。本明細書に引用されるすべての特許、公開された特許出願および公報はあたかも本明細書に完全に記載されているかのように、参照により本明細書に組み込まれる。

【0043】

本明細書および添付の特許請求の範囲で 사용되는場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明らかに別段の指示をしない限り、複数の参照を含むことに留意されたい。

10

20

30

40

50

【0044】

本明細書および以下の特許請求の範囲を通して、文脈が別途必要としない限り、「含む (comprise)」という単語、および「含む (comprises)」および「含む (comprising)」等の変形は、記載された整数もしくはステップまたは整数もしくはステップのグループを含み、任意の他の整数もしくはステップまたは整数もしくはステップのグループを除外しないことを意味すると理解される。本明細書で使用される場合、用語「含む (comprising)」は、用語「含む (containing)」もしくは「含む (including)」で置換され得るか、または用語「有する (having)」と共に使用される場合がある。

【0045】

本明細書で使用される場合、「～からなる (consisting of)」は、特許請求の範囲の要素に特定されていない任意の要素、ステップ、または成分を除外する。本明細書で使用される場合、「から本質的になる (consisting essentially of)」は、特許請求の範囲の基本的かつ新規な特徴に実質的に影響を及ぼさない材料またはステップを排除しない。上述した「含む (comprising)」、「含む (containing)」、「含む (including)」、および「有する (having)」の語のいずれも、本発明の態様または実施形態の文脈において本明細書で使用される場合は常に、開示の範囲を変更するために、「構成する」または「本質的に構成する」という用語に置き換えることができる。

【0046】

本明細書で使用されるように、複数の列挙された要素の間の接続用語「および／または」は、個々の選択肢および組み合わされた選択肢の両方を包含するものとして理解される。例えば、2つの要素が「および／または」によって結合される場合、第1の選択肢は、第2の要素を伴わない第1の要素の適用可能性を指す。第2の選択肢は、第1の要素を含まない第2の要素の適用可能性を指す。第3の選択肢は、第1および第2の要素と一緒に適用可能であることを指す。これらの選択肢のうちのいずれか1つは、その意味の範囲内にあると理解され、したがって、本明細書で使用される「および／または」という用語の要件を満たす。2つ以上の選択肢の同時適用可能性もまた、その意味の範囲内にあると理解され、したがって、用語「および／または」の要件を満たす。

【0047】

本明細書に開示される機能の全ては、任意の組み合わせで組み合わせることができる。本明細書に開示される各特徴は、同じ、同等、または類似の目的を果たす代替的な特徴によって置き換えられ得る。したがって、特に明記しない限り、開示される特徴は、同等または類似の特徴の属の一例である。

【0048】

本明細書で使用される「約」という語は、基礎となるパラメータの10%以内（すなわち±10%）の値を指す。例えば、「約1:10」は、1.1:10、1または0.9:9.9を意味し、約5時間は、4.5時間または5.5時間を意味する、等である。値の文字列の先頭の「約」という用語は、値の各々を10%だけ変更する。

【0049】

全ての数値または数値範囲は、文脈上明らかに沿わないことが示されない限り、そのような範囲内の整数およびの範囲内の値または整数の端数を含む。したがって、例示すると、95%以上の低減への言及は、95%、96%、97%、98%、99%、100%等、ならびに95.1%、95.2%、95.3%、95.4%、95.5%等、96.1%、96.2%、96.3%、96.4%、96.5%等を含む。したがって、また例示すると、「1~4」等の数値範囲への言及は、2、3、ならびに1.1、1.2、1.3、1.4等を含む。例えば、「1~4週」は、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、または28日を含む。

【0050】

さらに、「0.01～10」等の数値範囲への言及は、0.011、0.012、0.013等、ならびに9.5、9.6、9.7、9.8、9.9等を含む。例えば、対象の体重当たり約「0.01mg/kg～約10mg/kg」の用量は、0.011mg/kg、0.012mg/kg、0.013mg/kg、0.014mg/kg、0.015mg/kg等、ならびに9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg等を含む。

【0051】

より大きい（より大きい）またはより小さい整数への言及は、それぞれ、言及する数より大きいまたは小さい任意の数を含む。したがって、例えば、2超への言及は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15等を含む。例えば、非ウイルスベクターおよび／または食細胞除去剤「2回以上」の投与は、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回、12回、13回、14回、15回、またはそれ以上の回数を含む。

【0052】

さらに、「1～90」等の数値範囲への言及は、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5等、ならびに81、82、83、84、85等を含む。例えば、「約1分～約90日の間」は、1.1分、1.2分、1.3分、1.4分、1.5分等、ならびに1日、2日、3日、4日、5日、・・・、81日、82日、83日、84日、85日等を含む。

【0053】

本出願の読み手を助ける試みにおいて、説明は、様々な段落もしくはセクションに分けられるか、または本出願の特定の実施形態を対象とする。これらの別離は、段落またはセクションまたは実施形態の要旨を別の段落またはセクション又は実施形態の要旨から切り離すものと見なすべきではない。反対に、説明は、広範な応用を有し、企図され得る様々なセクション、段落、および文の全ての組合せを包含することを当業者は理解するのであろう。任意の実施形態の議論は、例示的なものにすぎず、特許請求の範囲を含む本開示の範囲がこれらの実施例に限定されることを示唆することを意図するものではない。

【0054】

本明細書では、免疫細胞を調節する薬剤の投与を含む遺伝子治療を改善する方法が提供される。本発明による方法は、タンパク質の機能もしくは活性の損失によって引き起こされるもの等の疾患の治療を必要とする対象を治療するために、またはタンパク質の機能活性もしくは発現の獲得によって引き起こされる疾患の治療を必要とする対象を治療するために使用され得る。

【0055】

一般的な態様では、本明細書で提供されるのは、以下を含む、導入遺伝子を、それを必要とする対象に送達する方法である：

- a. 食細胞除去剤を対象に投与すること；ならびに
- b. 導入遺伝子を含む非ウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を対象に投与すること。

【0056】

ある実施形態では、医薬組成物は以下を含む：

- a. 非ウイルス性送達ナノ粒子；および
- b. プロモーターに作動可能に連結された導入遺伝子を含む非ウイルスベクター。

【0057】

遺伝子導入システム

本明細書で使用される「ベクター」または「遺伝子導入ベクター」という用語は、目的の遺伝子を含む核酸分子を指す。ベクターの例としては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルス粒子またはウイルス粒子に類似するが非感染性であるウイルス様粒子（VLP）、およびレンチウイルス粒子またはVLPによって送達されるウイルスベクター；ならびにマイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リポソーム、高分子天然ポリマー、高分子合成ポリマー、ならびに天然成分および合成成分

10

20

30

40

50

の両方から構成されるポリマー等の非ウイルス遺伝子導入システムによって送達される非ウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

【0058】

本明細書で使用される場合、「非ウイルスベクター」は、ウイルス粒子またはウイルス様粒子（VLP）によって送達されないベクターを指す。ある実施形態によれば、非ウイルスベクターは、カプシドによって送達されないベクターである。ベクターは、非ウイルス送達ナノ粒子に封入、混合、または他の方法で会合させることができる。

【0059】

本明細書で使用される場合、「遺伝子導入システム」という語は、細胞または組織に核酸配列（例えば導入遺伝子）を含む組成物を送達する任意の手段を指す。例えば、遺伝子導入システムは、所望の細胞または組織へのウイルスベクターの送達を促進するためのウイルス遺伝子導入システム、例えばインタクトウイルス、改変されたウイルスおよびVLPであり得る。遺伝子導入システムはまた、ウイルスコートタンパク質を含まない、またはウイルス粒子もしくはVLPを形成しない非ウイルス送達システム、例えば、リポソームベースのシステム、ポリマーベースのシステム、タンパク質ベースのシステム、金属粒子ベースのシステム、ペプチドケージ系等であり得る。

【0060】

本開示に照らして、当業者に公知の任意の適切な非ウイルス送達システムを本発明において使用することができる。非ウイルス送達ナノ粒子は、例えば、脂質ベースのナノ粒子、ポリマーベースのナノ粒子、タンパク質ベースのナノ粒子、微粒子、マイクロカプセル、金属粒子ベースのナノ粒子、ペプチドケージナノ粒子等であり得る。

【0061】

本発明の非ウイルス送達ナノ粒子は、当技術分野で公知の任意の方法によって構成することができ、非ウイルス送達ナノ粒子と、治療的導入遺伝子を含む核酸分子とを含む本発明の非ウイルスベクターは、当技術分野で公知の任意の方法によって構成することができる。

【0062】

脂質ベースの送達システム

脂質ベースの送達システムは当技術分野において周知であり、本開示に照らして当業者に公知の任意の適切な脂質ベースの送達システムを本発明において使用することができる。脂質ベースの送達システムの例としては、例えば、リポソーム、脂質ナノ粒子、ミセル、または細胞外小胞が挙げられる。

【0063】

「脂質ナノ粒子」または「LNP」は、核酸分子の送達に有用であり、ナノスケール、すなわち、約10nm～約1000nm、または約50nm～約500nm、または約50nm～約200nmの大きさを有する脂質ベースの小胞を指す。

【0064】

DNAは負に荷電している。したがって、例えば、LNPがアミノ脂質等のカチオン性脂質を含むことが有益であり得る。例示的なアミノ脂質は、米国特許第9,352,042号、第9,220,683号、第9,186,325号、第9,139,554号、第9,126,966号、第9,018,187号、第8,999,351号、第8,722,082号、第8,642,076号、第8,569,256号、第8,466,122号、および第7,745,651号ならびに米国特許公報第2016/0213785号、第2016/0199485号、第2015/0265708号、第2014/0288146号、第2013/0123338号、第2013/0116307号、第2013/0064894号、第2012/0172411号、および第2010/0117125号に記載されており、その全体が本明細書に組み込まれる。特定の実施形態では、LNPは、その全体が本明細書に組み込まれるWO2013/063468に記載のもののいずれか等のアミノ脂質を含む。

【0065】

「カチオン性脂質」および「アミノ脂質」という語は、本明細書において互換的に使用され、1、2、3、またはそれ以上の脂肪酸または脂肪アルキル鎖およびpH滴定可能な

10

20

30

40

50

アミノ基（例えば、アルキルアミノまたはジアルキルアミノ基）を有する脂質およびその塩を含む。カチオン性脂質は、典型的には、カチオン性脂質の pK_a 未満の pH でプロトン化（すなわち正に帯電）され、 pK_a を超える pH で実質的に中性である。カチオン性脂質は、滴定可能なカチオン性脂質であってもよい。ある実施形態では、カチオン性脂質は、プロトン化可能な第三級アミノ基（例えば pH 滴定可能な）； C_{18} アルキル鎖（各アルキル鎖が独立して、0～3個（例えば0、1、2、または3個）の二重結合を有する）；および頭部基とアルキル鎖との間のエーテル、エステル、またはケタール結合を含む。

【0066】

カチオン性脂質は、1, 2-ジリノレイルオキシ-N, N-ジメチルアミノプロパン (DLinDMA)、1, 2-ジリノレニルオキシ-N, N-ジメチルアミノプロパン (DLenDMA)、1, 2-γ-リノレニルオキシ-N, N-ジメチルアミノプロパン (γ-DLenDMA)、2, 2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1, 3]-ジオキソラン (DLin-K-C2-DMA, DLin-C2K-DMA, XTC2、およびC2Kとしても知られる)、2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1, 3]-ジオキソラン (DLin-K-DMA)、ジリノレイルメチル-3-ジメチルアミノプロピオネート (DLin-M-C2-DMA, MC2としても知られる)、(6Z, 9Z, 28Z, 31)-ヘプタトリアコンタ-6, 9, 28, 31-テトラエン-19-イル 4-(ジメチルアミノ)ブタノエート (DLin-M-C3-DMA, MC3としても知られる)、これらの塩、およびこれらの混合物を含み得るが、これらに限定されない。その他のカチオン性脂質としては、1, 2-ジステアリルキシ-N, N-ジメチル-3-アミノプロパン (DSDMA)、1, 2-ジオレイルオキシ-N, N-ジメチル-3-アミノプロパン (DODMA)、2, 2-ジリノレイル-4-(3-ジメチルアミノプロピル)-[1, 3]-ジオキソラン (DLin-K-C3-DMA)、2, 2-ジリノレイル-4-(3-ジメチルアミノブチル)-[1, 3]-ジオキソラン (DLin-K-C4-DMA)、DLen-C2K-DMA、γ-DLen-C2K-DMA、および (DLin-MP-DMA) (1-B11としても知られる) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0067】

さらに別のカチオン性脂質としては、2, 2-ジリノレイル-5-ジメチルアミノメチル-[1, 3]-ジオキササン (DLin-K6-DMA)、2, 2-ジリノレイル-4-N-メチルペピアジノ-[1, 3]-ジオキソラン (DLin-K-MPZ)、1, 2-ジリノレイルカルバモイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-C-DAP)、1, 2-ジリノレイルオキシ-3-(ジメチルアミノ)アセトキシプロパン (DLin-DAC)、1-リノレイル-2-リノレイルオキシ-3-モルフォリノプロパン (DLin-MA)、1, 2-ジリノレイル-3-ジメトキシアミノプロパン (DLinDAP)、1, 2-ジリノレイルチオ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-S-DMA)、1-リノレイル-2-リノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン (DLin-2-DMAP)、1, 2-ジリノレイルオキシ-3-トリメチルアミノプロパン塩化物塩 (DLin-TMA.Cl)、1, 2-ジリノレイル-3-トリメチルアミノプロパン塩化物塩 (DLin-TAP.Cl)、1, 2-ジリノレイルオキシ-3-(N-メチルペピアジノ)プロパン (DLin-MPZ)、3-(N, N-ジリノレイルアミノ)-1, 2-プロパンジオール (DLinAP)、-(N, N-ジオレイルアミノ)-1, 2-プロパンジオール (DOAP)、1, 2-ジリノレイルオキシ-3-(2-N, N-ジメチルアミノ)エトキシプロパン (DLin-EG-DMA)、N, N-ジステアリル-N, N-ジメチルアンモニウム塩化物 (DODAC)、N-(1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N, N, N-トリメチルアンモニウム塩化物 (DOTMA)、N, N-ジステアリル-N, N-ジメチルアンモニウム臭化物 (DDAB)、N-(1-(2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル)-N, N, N-トリメチルアンモニウム塩化物 (DOTAP)、3-(N-(N', N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル) コレス

10

20

30

40

50

テロール (DC-Chol)、N-(1,2-ジミリスチルオキシプロパー3-イル)-N,N-ジメチル-N-ヒドロキシエチルアンモニウム臭化物 (DMRIE)、2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スベルミン-カルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-1-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA)、ジオクタデシルアミドグリシルスベルミン (DOGS)、3-ジメチルアミノ-2-(コレスト-5-エン-β-オキシブタン-4-オキシ)-1-(シス,シス-9,12-オクタデカジエノキシ)プロパン (CLiNDMA)、2-[5'-(コレスト-5-エン-3-β-オキシ)-3'-オキサペントキシ)-3-ジメチル-1-(シス,シス-9',1-2'-オクタデカジエノキシ)プロパン (CpLiNDMA)、N,N-ジメチル-3,4-ジオレイルオキシベンジルアミン (DMOBA)、1,2-N,N'-ジオレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DOcarbDAP)、1,2-N,N'-ジリノレイルカルバミル-3-ジメチルアミノプロパン (DLincarbDAP)、デキサメタゾンスペリミン (DS) および二置換スベルミン (D2S) またはこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0068】

LIPOFECTIN (登録商標) (GIBCO/BRLから入手可能なDOTMAおよびDOPEを含む) およびLIPOFECTAMINE (登録商標) (GIBCO/BRLから入手可能なDOSPAおよびDOPEを含む) 等の、カチオン性脂質の多くの市販の調製物を使用することができる。

【0069】

20

使用することができる他の市販のイオン化可能な脂質としては、例えば、SS-OP (NOF American Corporation)、C12-200 (Kauffman et al, Nano Lett.2015、15、11、7300-7306に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる)、3060i10、CKK-E12、MC3、Branched-CKK-E12、Lipid 5、Lipid 9、ATX-002およびATX-003 (PayneおよびChivukula、国際公開第W02015074085号に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる)、SM-102 (Cayman Chemicals)、ALC-315 (Selleck Chemicals) およびMerck-32が挙げられる。

【0070】

30

ある実施形態では、カチオン性脂質は、LNPのモル比で約10%から脂質ナノ粒子のモル比で約85%、またはLNPのモル比で約50%からLNPのモル比で約75%の量で存在し得る。

【0071】

ステロールは、LNPに流動性を与え得る。本明細書で使用される場合、「ステロール」は植物(フィトステロール)または動物(ズーステロール)起源の任意の天然に存在するステロール、ならびに非天然に存在する合成ステロールを指し、これらは全て、ステロイドA環の3位におけるヒドロキシル基の存在を特徴とする。ステロールは、リポソーム、脂質小胞または脂質粒子調製物の分野で従来使用されている任意のステロールであり得、最も一般的にはコレステロールであり得る。フィトステロールは、カンペステロール、シトステロール、およびスチグマステロールを含み得る。ステロールはまた、米国特許出願公開第2011/0177156号に記載されているもの等のステロール修飾脂質を含む。ある実施形態において、ステロールは、LNPの約5重量%~脂質ナノ粒子の約50重量%、またはLNPの約10重量%~LNPの約25重量%の量で存在し得る。

40

【0072】

LNPは中性脂質を含み得る。中性脂質は、生理学的pHで非荷電または中性双性イオン形態のいずれかで存在する任意の脂質種を含み得る。そのような脂質としては、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、セファリン、およびセレブロシドが挙げられるが、これらに限定されない。中性脂質の選択は、一般に、とりわけ、粒径および必要

50

な安定性を考慮することによって導かれる。ある実施形態では、中性脂質成分は、2つのアシル基を有する脂質（例えば、ジアシルホスファチジルコリンおよびジアシルホスファチジリエタノールアミン）であり得る。

【0073】

様々な鎖長および飽和度の様々なアシル鎖基を有する脂質が利用可能であるか、または周知の技術によって単離もしくは合成され得る。ある実施形態では、C14～C22の範囲の炭素鎖長を有する飽和脂肪酸を含有する脂質が使用され得る。ある実施形態では、C14～C22の範囲の炭素鎖長を有するモノまたはジ不飽和脂肪酸を有する脂質が使用される。さらに、飽和および不飽和脂肪酸鎖の混合を有する脂質を使用することができる。例示的な中性脂質としては、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジル-エタノールアミン(DOPE)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(POPC)、または任意の関連ホスファチジルコリンが挙げられるが、これらに限定されない。中性脂質はまた、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、またはセリンおよびイノシトール等の他の頭部基を有するリン脂質から構成され得る。

10

【0074】

ある実施形態では、中性脂質は、脂質ナノ粒子の重量で約0.1%～LNPの重量で約99%、またはLNPの重量で約5%～LNPの重量で約15%、例えば、約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約6%、約7%、約8%、約9%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、または約99%の量で存在し得る。

20

【0075】

LNP封入核酸分子は、医薬組成物、例えば薬学的に許容される担体または賦形剤に組み込むことができる。このような医薬組成物は、とりわけ、LNP封入核酸分子の*in vivo*または*ex vivo*での対象への投与および送達に有用である。

【0076】

LNPの調製物は、例えば、限定するものではないが、ポリエチレングリコール(PEG)およびステロールを含み得る追加の成分と組み合わせることができる。

【0077】

「PEG」という語は、2つの末端ヒドロキシル基を有するエチレンPEG繰り返しユニットの直鎖状水溶性ポリマーであるポリエチレングリコールを指す。PEGは分子量によって分類され、例えば、PEG 2,000は約2,000ダルトンの平均分子量を有し、PEG 5,000は約5,000ダルトンの平均分子量を有する。PEGは、Sigma Chemical Co. および他の会社から入手可能であり、例えば、以下の官能基化PEG：モノメトキシポリエチレングリコール(MePEG-OH)、モノメトキシポリエチレングリコールスクシネート(MePEG-S)、モノメトキシポリエチレングリコールスクシンイミジルスクシネート(MePEG-S-NHS)、モノメトキシポリエチレングリコールアミン(MePEG-NH₂)、モノメトキシポリエチレングリコールトレシレート(MePEG-TRES)、およびモノメトキシポリエチレングリコールイミダゾリルカルボニル(MePEG-IM)を含む。

30

40

【0078】

ある実施形態では、PEGは、約550～約10,000ダルトンの平均分子量を有するポリエチレングリコールであり得、アルキル、アルコキシ、アシルまたはアリアルで任意に置換されていてよい。ある実施形態では、PEGは末端ヒドロキシル位置にてメチルで置換され得る。ある実施形態では、PEGは、約750～約5,000ダルトン、または約1,000～約5,000ダルトン、または約1,500～約3,000ダルトン、または約2,000ダルトン、または約750ダルトンの平均分子量を有し得る。PEGは、アルキル、アルコキシ基、アシルまたはアリアルで任意に置換されていてもよい。ある実施形態において、末端ヒドロキシル基は、メトキシまたはメチル基で置換され得る。

50

【0079】

PEG修飾脂質は、米国特許第8,936,942号および第7,803,397号に記載されているPEG-ジアルキルオキシプロピルコンジュゲート(PEG-DAA)を含む。有用なPEG修飾脂質(または脂質ポリオキシエチレンコンジュゲート)は、PEG部分を脂質小胞の表面に固定するための様々な「アンカー」脂質部分を有し得る。適切なPEG修飾脂質の例としては、米国特許第5,820,873号に記載されているPEG修飾ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジン酸、PEG-セラミドコンジュゲート(例えば、PEG-CerC14またはPEG-CerC20)、PEG修飾ジアルキルアミンおよびPEG修飾1,2-ジアルキルオキシプロパン-3-アミンが挙げられる。ある実施形態では、PEG修飾脂質は、PEG修飾ジアルグリセロールおよびジアルキルグリセロールであり得る。ある実施形態では、PEGは、LNPの約0.5重量%~LNPの約20重量%、またはLNPの約5重量%~LNPの約15重量%の量であり得る。

10

【0080】

さらに、LNPは、PEG修飾および/またはステロール修飾LNPであり得る。LNPは、さらなる成分と組み合わせられて、同じまたは別個のLNPであり得る。言い換えると、同じLNPをPEG修飾し、ステロール修飾することができ、あるいは、第1のLNPをPEG修飾し、第2のLNPをステロール修飾することができる。任意に、第1および第2の修飾LNPを組み合わせることができる。

【0081】

ある実施形態では、封入前のLNPは、約10nm~500nm、または約50nm~約200nm、または75nm~約125nmの範囲のサイズを有し得る。

20

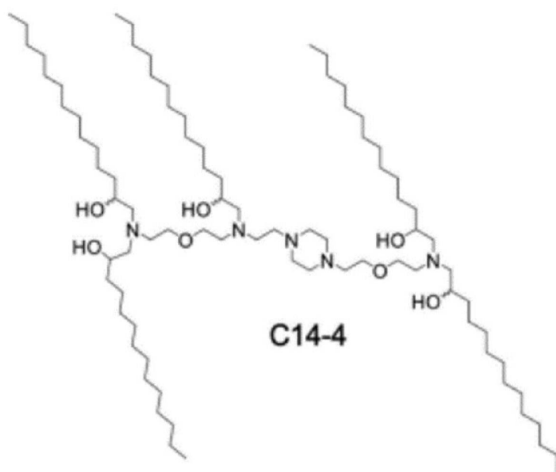
【0082】

LNPに関する特定の実施形態では、LNPはBillingsley et al., Nano Lett. 2020, 20, 1578または国際公開第2021/077066号パンフレット(両方とも、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるものである。Billingsley et al. およびWO 2021/077066は、脂質固定PEG、コレステロール、リン脂質およびイオン化可能脂質を含有するLNPを記載する。ある実施形態では、LNPは、C14-4ポリアミンコアを含有し、かつ/または約70nmの粒径を有する。C14-4は、以下の構造を有する。

30

【0083】

【化1】



40

【0084】

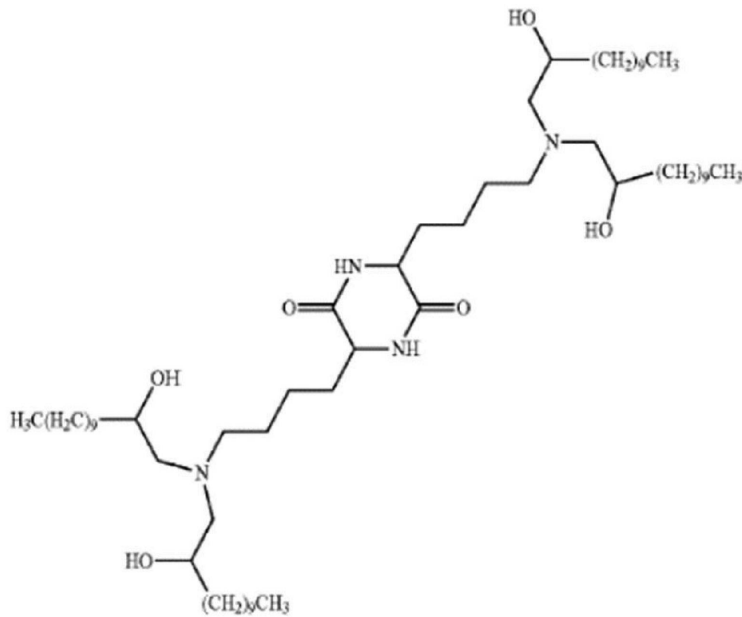
LNPに関するある実施形態では、LNPは、米国特許第10,493,031号、米国特許第10,682,374号または国際公開第2021/077066号(それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるカチオン性脂質またはリポペプチドから構成される。ある実施形態では、LNPは、カチオン性脂質、コレステロールベースの脂質、お

50

よび／または1つ以上のPEG修飾脂質を含有する。ある実施形態では、LNPはcKK-E12を含む(Dong et al., PNAS 2014, 111 (11), 3955)：

【0085】

【化2】



10

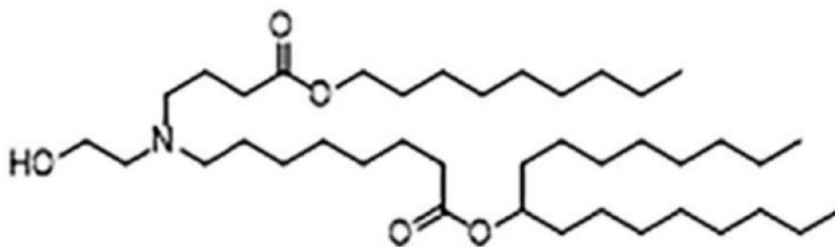
20

【0086】

LNPに関するある実施形態では、LNPは、Sabnis et al., Molecular Therapy 2018, vol. 26, No. 6, 1509-1519 (その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているように、脂質1、2、3、4、5、6、7、8、9または10を含む。ある実施形態では、LNPはSabnis et al.に記載されている脂質5、8、9、10、または11を含む。脂質9は次の構造を有する：

【0087】

【化3】



30

【0088】

利用され得るさらなる脂質は、Roces et al., Pharmaceutics 2020, 12, 1095; Jayaraman et al.; Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 8529-8533; および Maier et al., www.moleculartherapy.org Vol. 21, No. 8, 1570-1578, 2013; Liu et al., Adv. Mater. 2019, 31, 1902575、例えばBAMEA-O16B; Cheng et al., Adv. 2018, 30, 1805308、例えば5A2-SC8; Hajj and Ball, Small 2019, 15, 1805097、例えば3060i10 (これらの各々はその全体が参照により本明細書に組み込まれる); ならびに Du et al., 特許出願公開第US2016/0376224号、例えば下表1に示される化合物1~46に記載されるものを含み有用である。

40

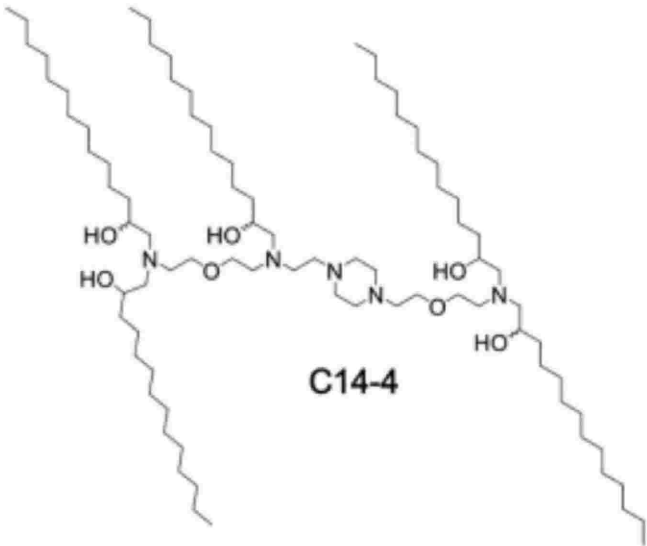
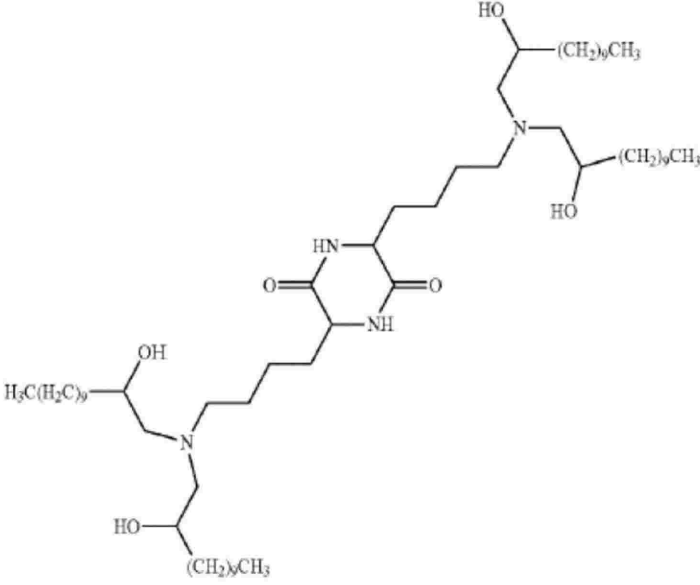
【0089】

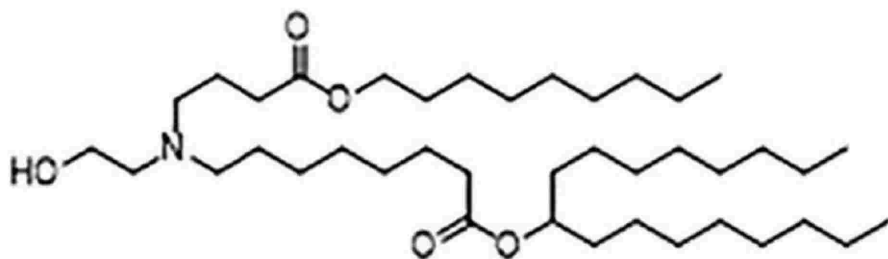
ある実施形態では、LNPは、表1に記載される1つ以上の脂質またはその薬学的に許容される塩を含有する。

50

【 0 0 9 0 】

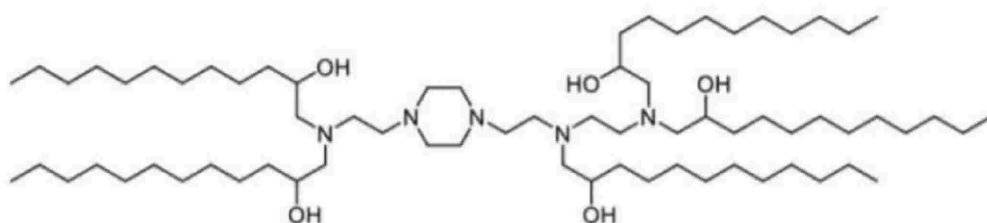
【 表 1 】

 C14-4	10
 cKK-E12	20
(6Z,9Z,28Z,31Z)-ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル 4-(ジメチルアミノ)ブタノエート (DLin-M-C3-DMA、MC3 としても知られる)	40



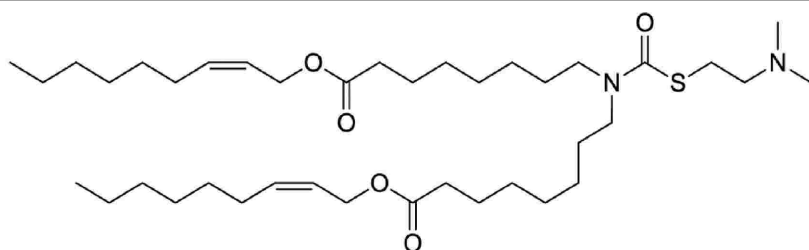
Lipid 9

10



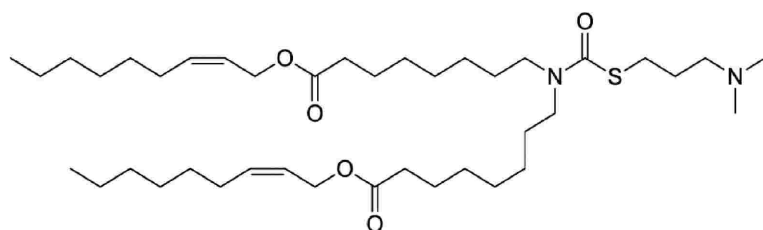
C12-200

20



ATX-002

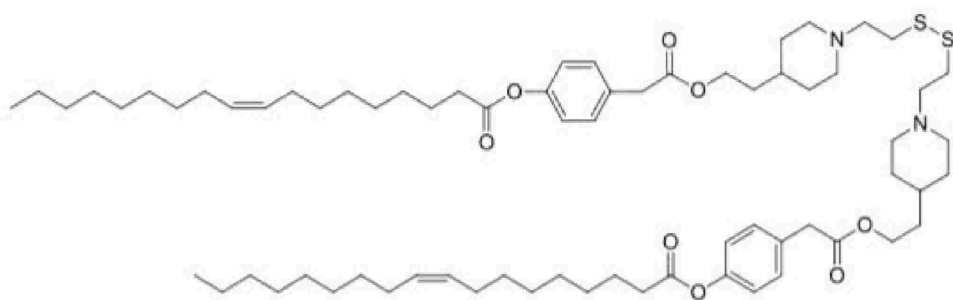
30



ATX-003

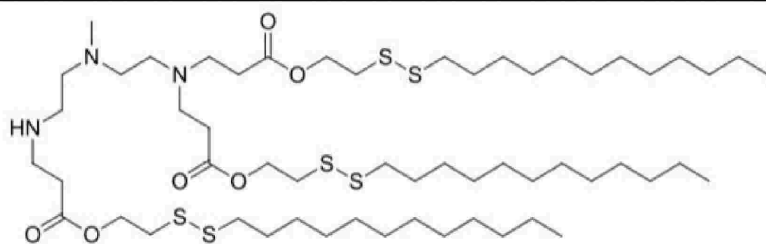
40

50



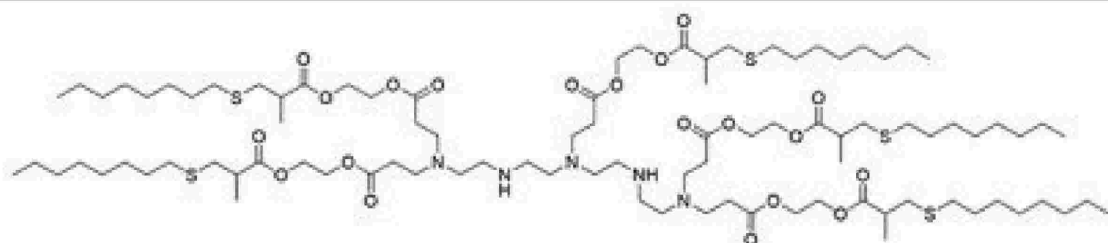
10

SS-OP



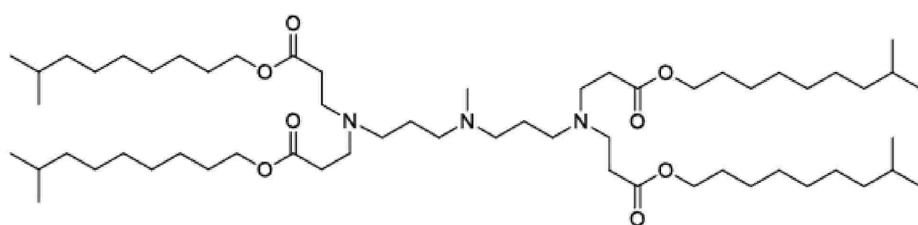
20

BAMAE-O16B



30

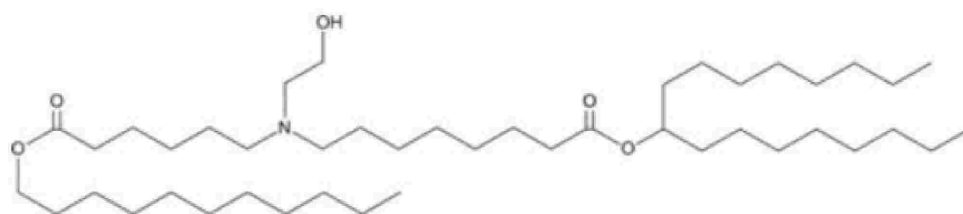
5A2-SC8



306Oi10

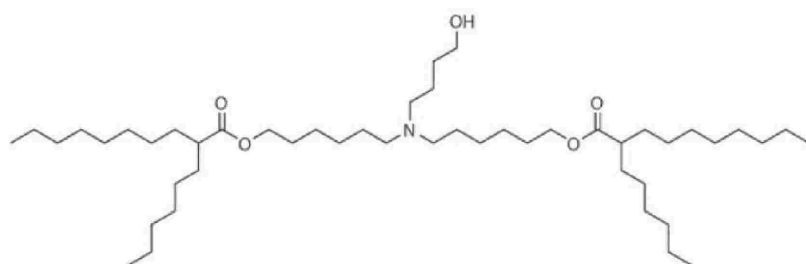
40

50



SM-102

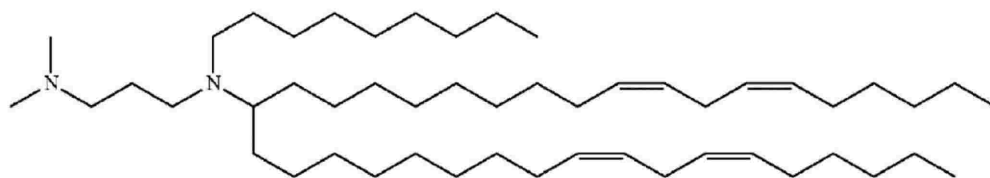
10



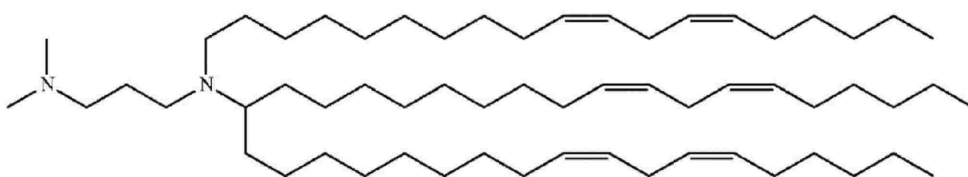
ALC-0315

20

1



2

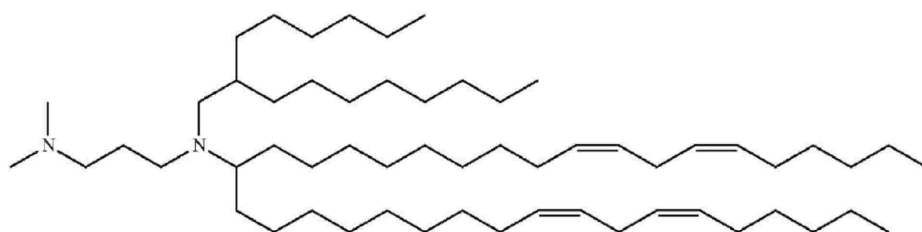


30

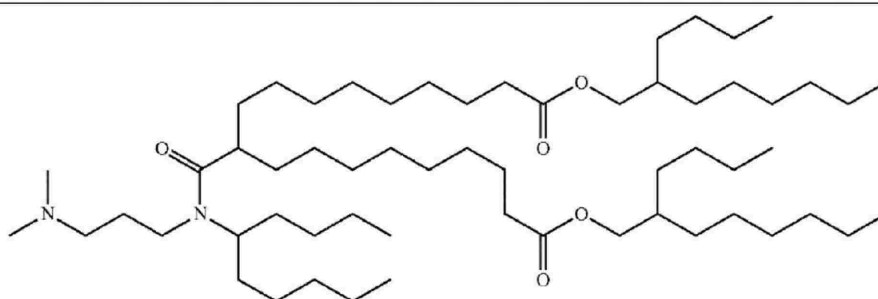
40

50

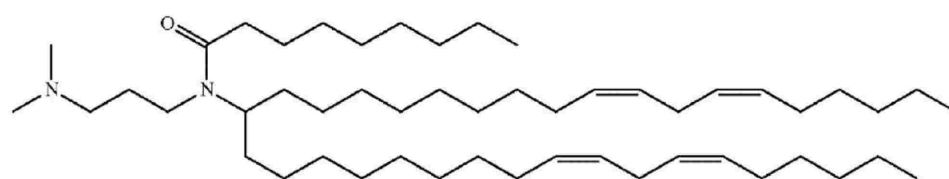
3



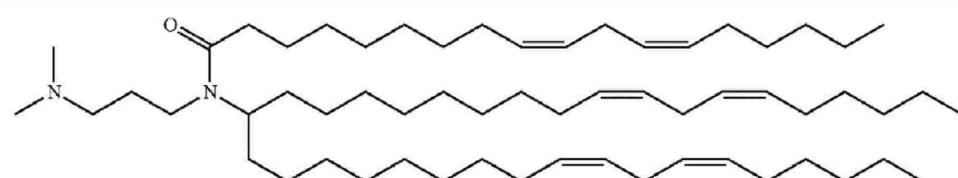
4



5



6



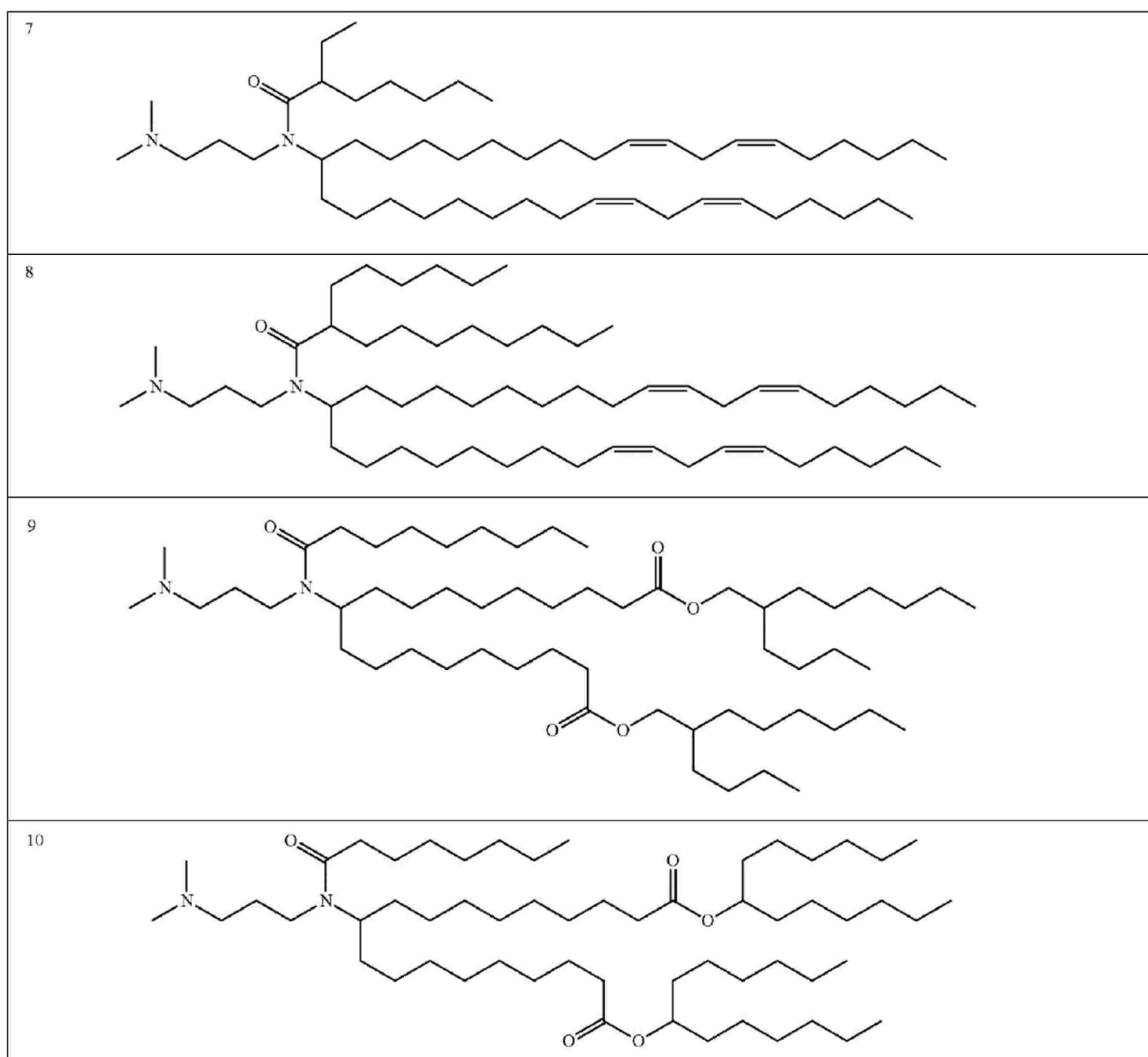
10

20

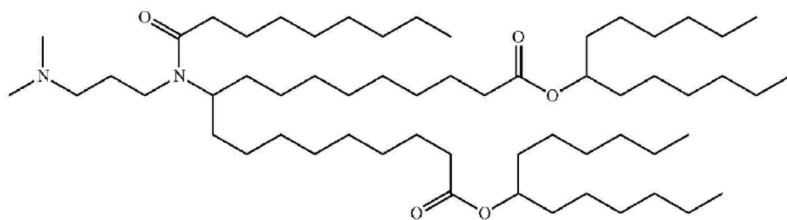
30

40

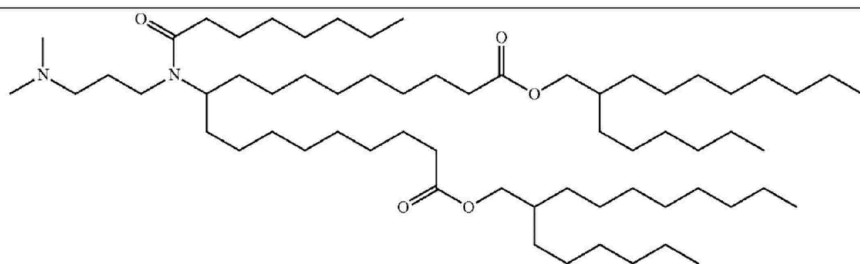
50



11

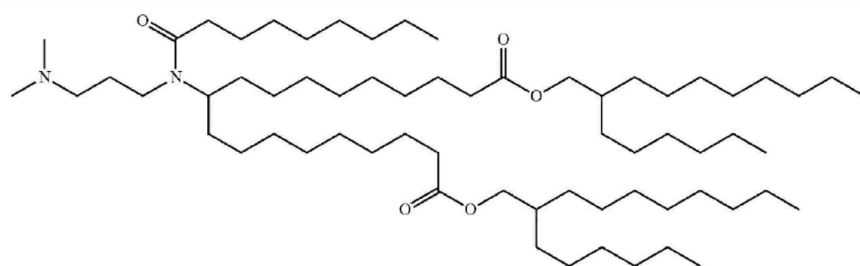


12



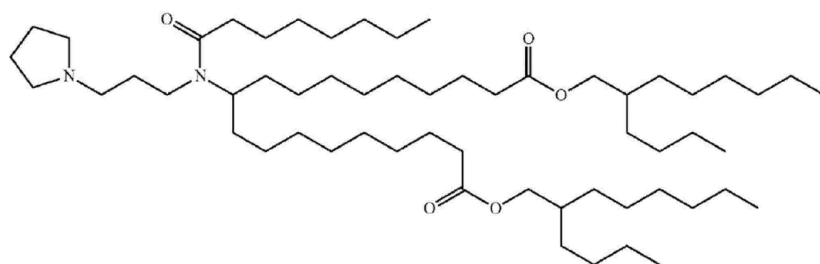
10

13



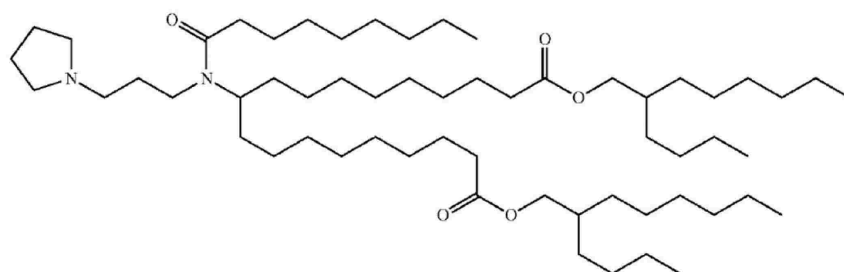
20

14



30

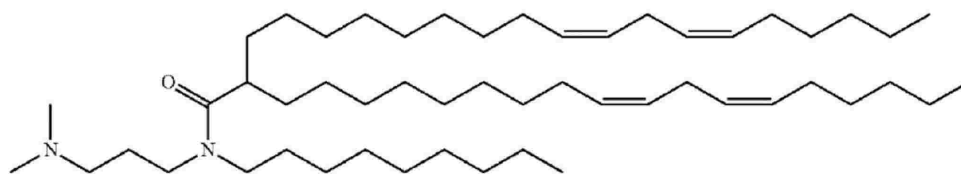
15



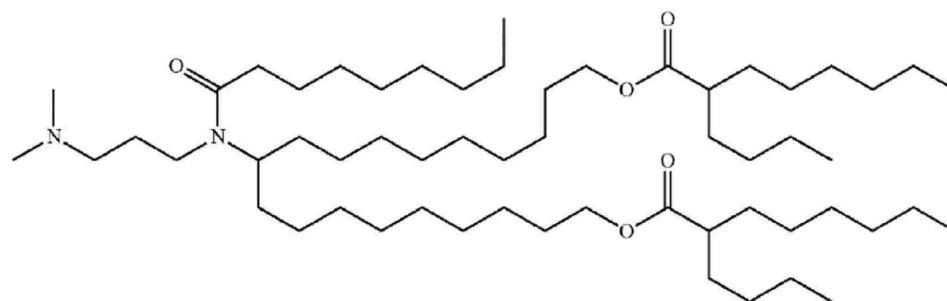
40

50

16

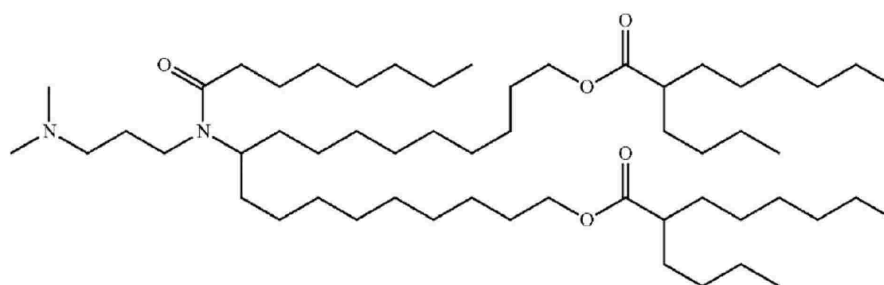


17



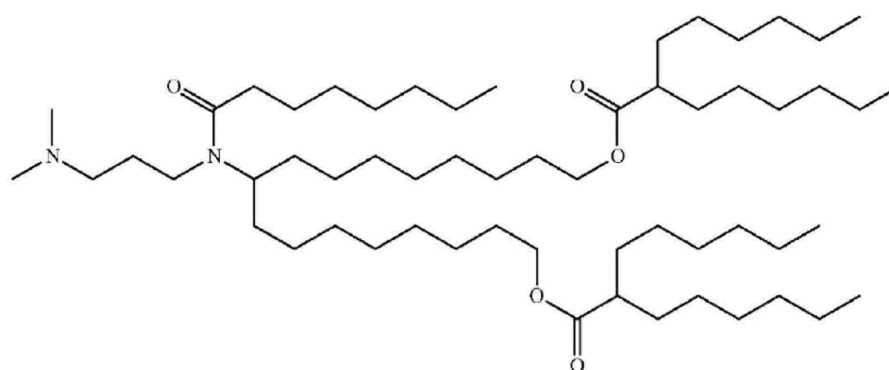
10

18



20

19

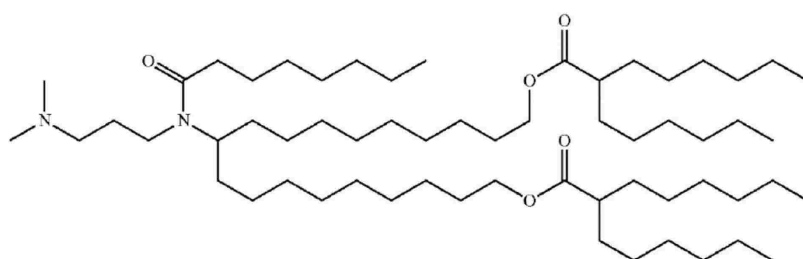


30

40

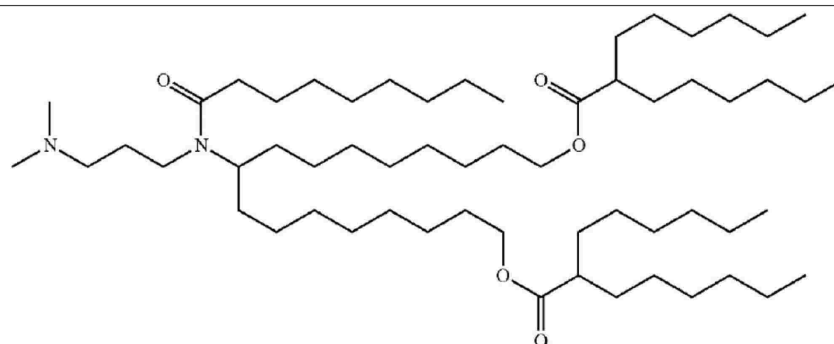
50

20



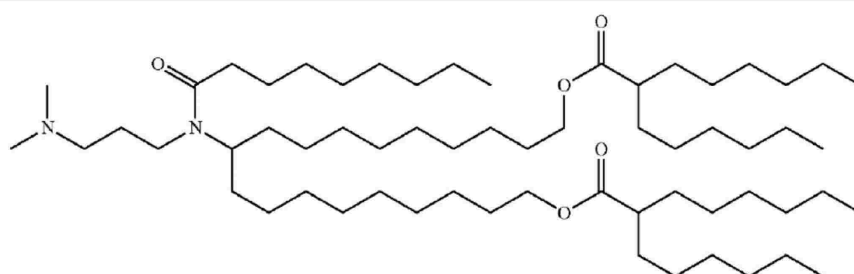
10

21

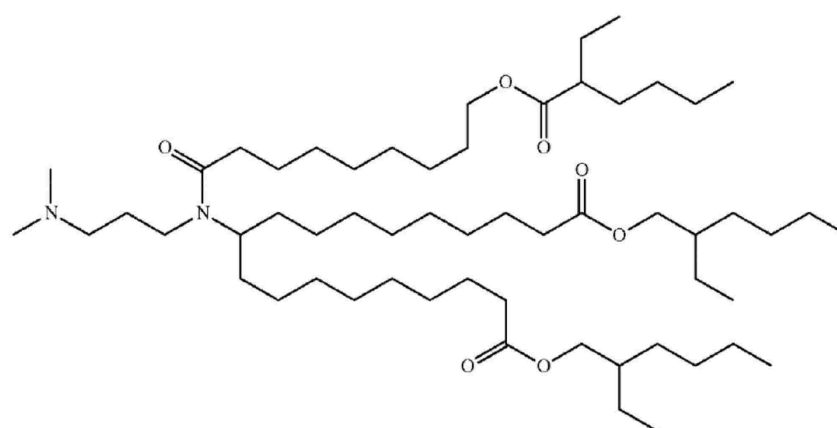


20

22



23

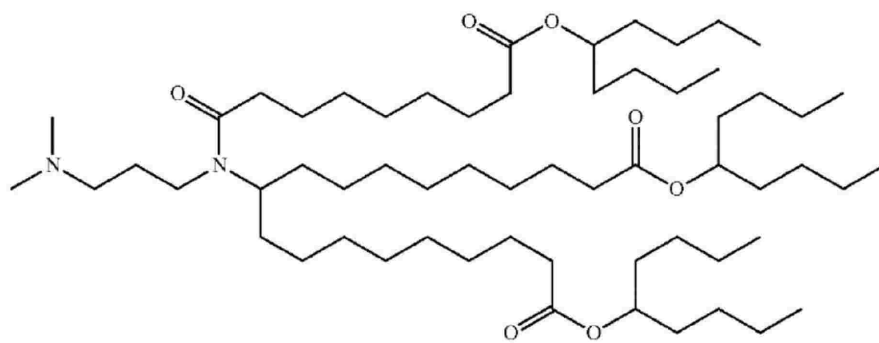


30

40

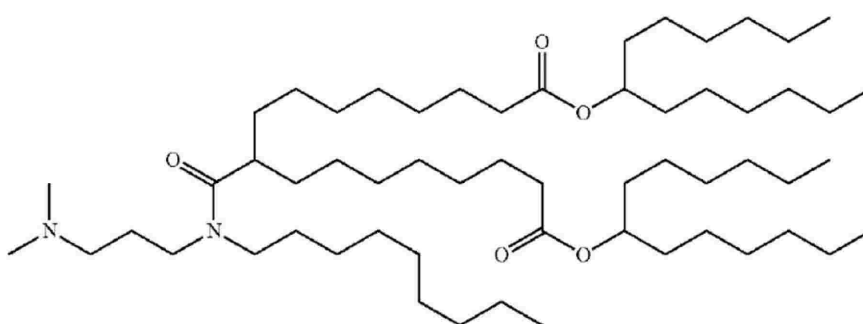
50

24



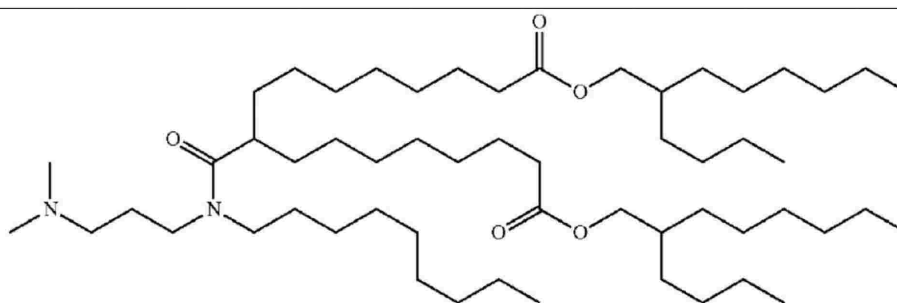
10

25

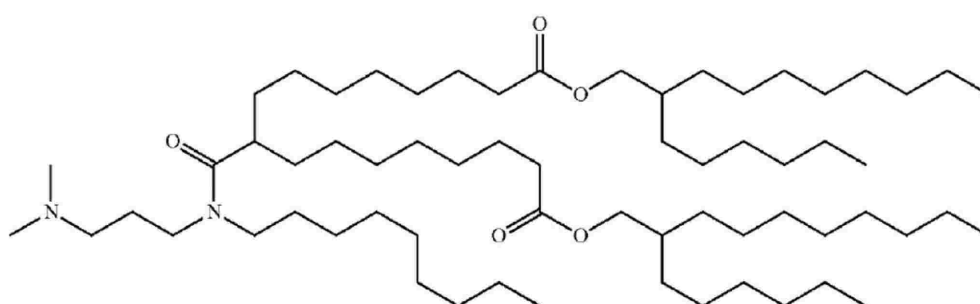


20

26



27

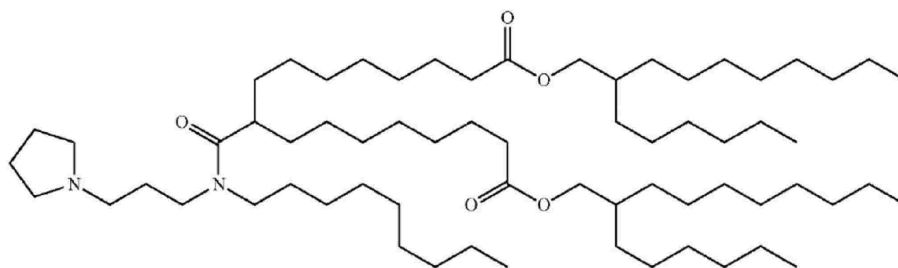


30

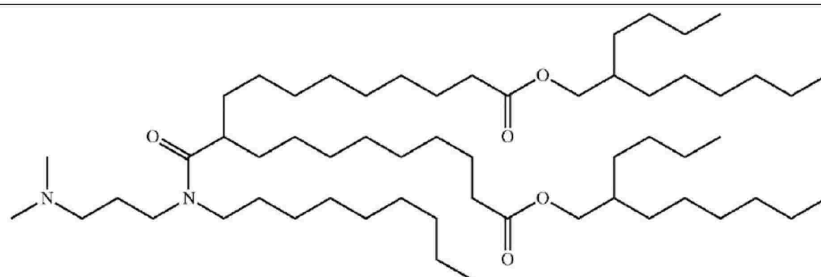
40

50

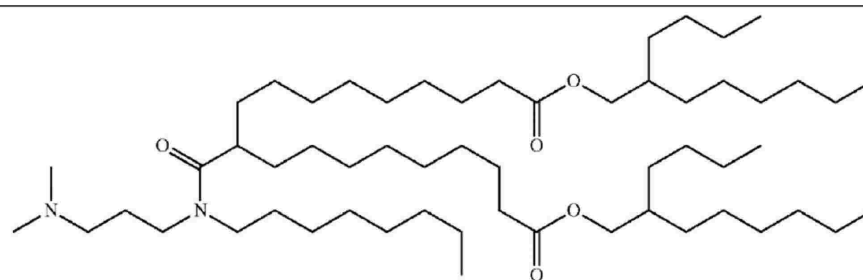
28



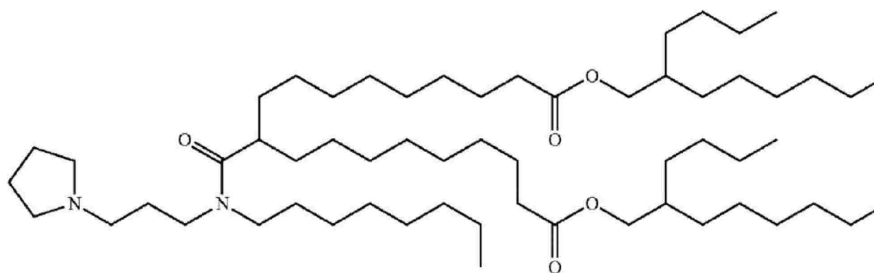
29



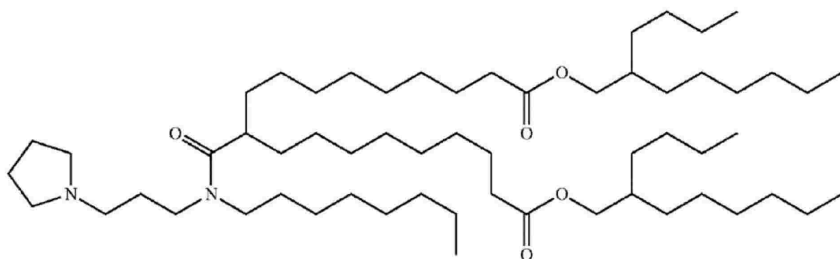
30



31



32



10

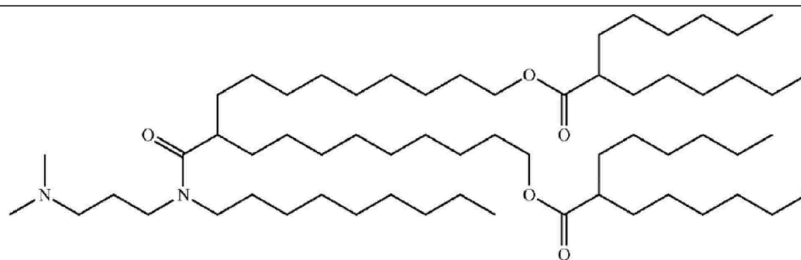
20

30

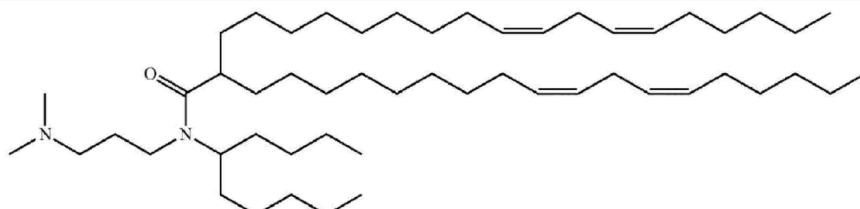
40

50

33

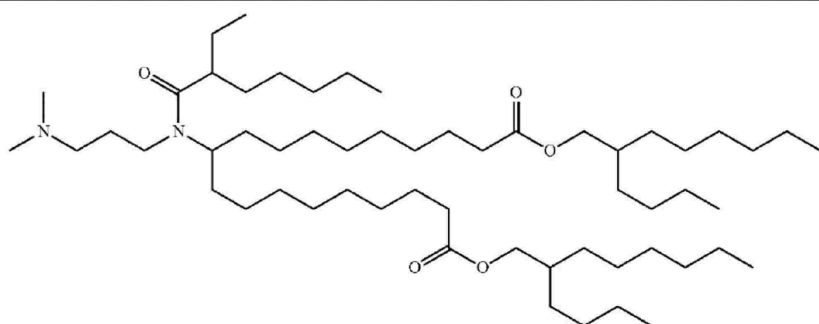


34



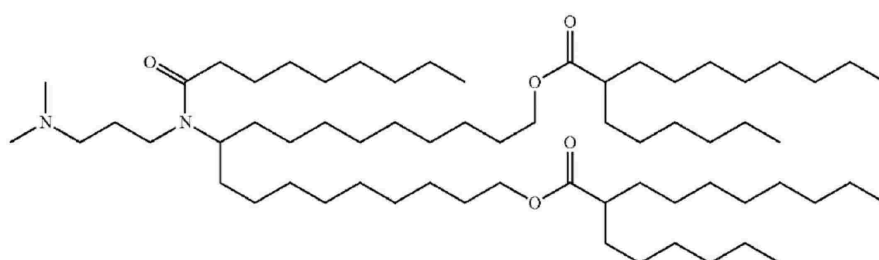
10

35



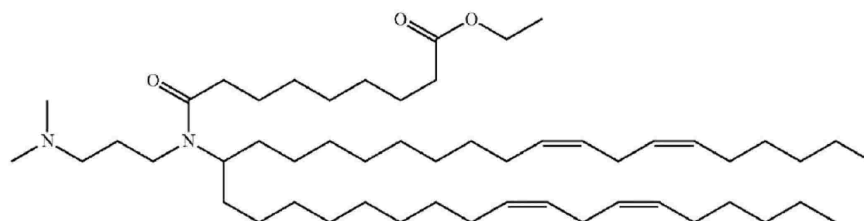
20

36



30

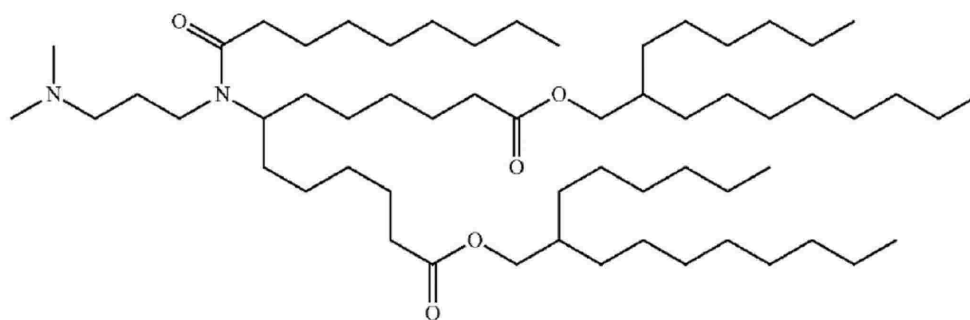
37



40

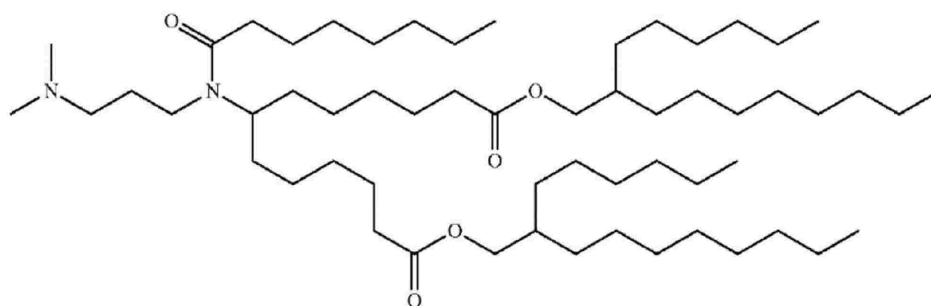
50

38



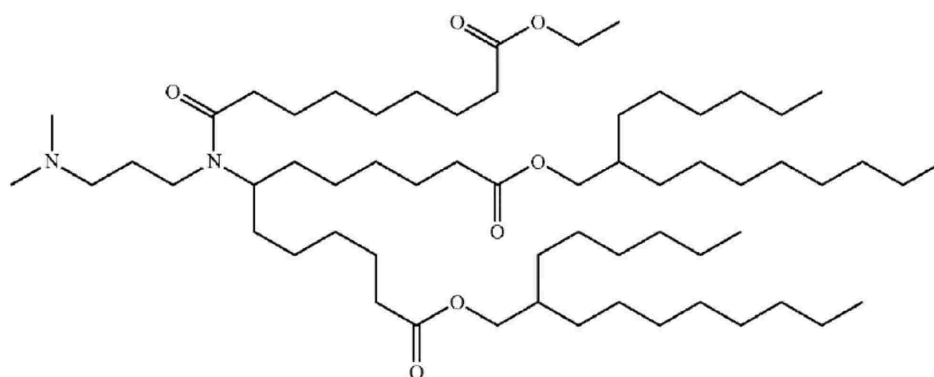
10

39



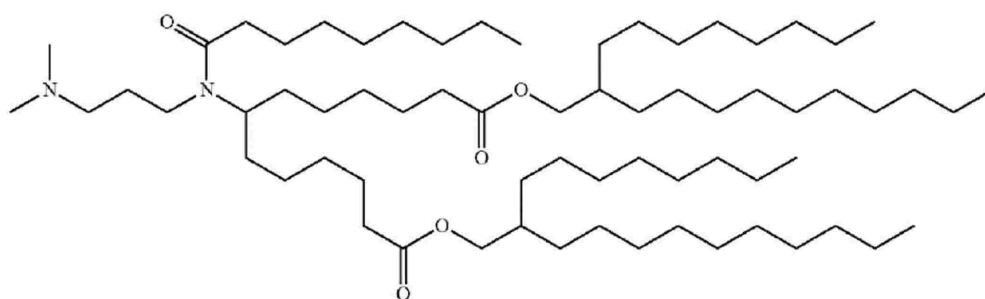
20

40



30

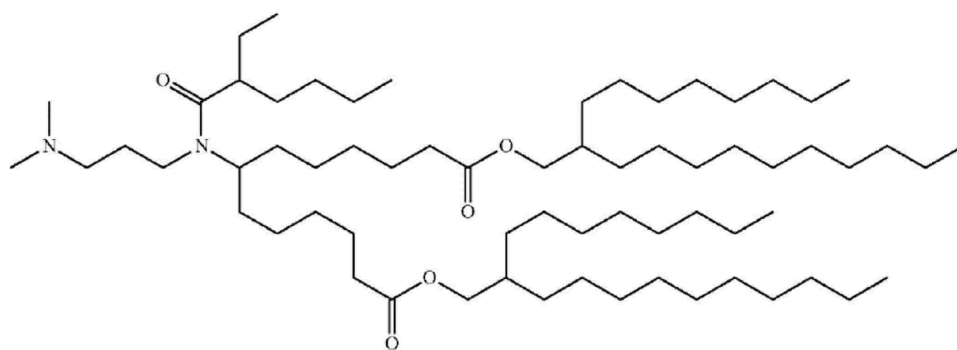
41



40

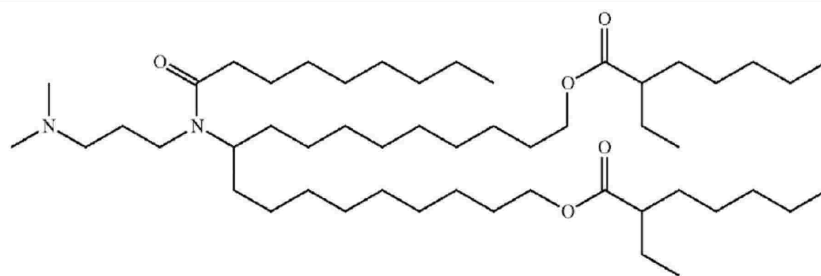
50

42



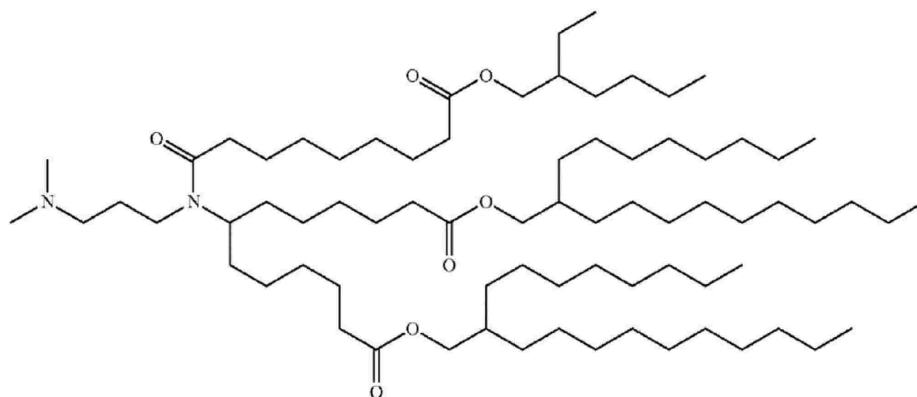
10

43



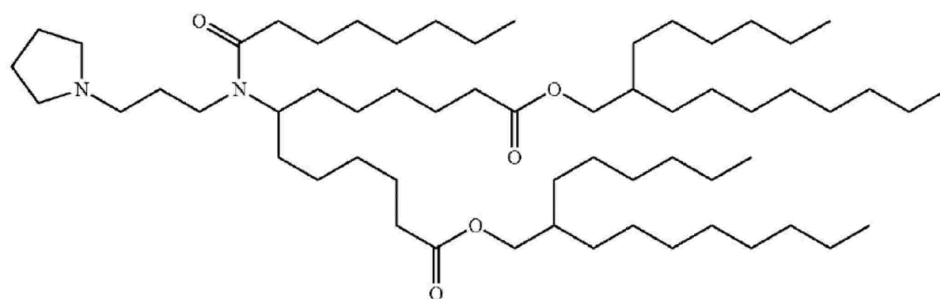
20

44



30

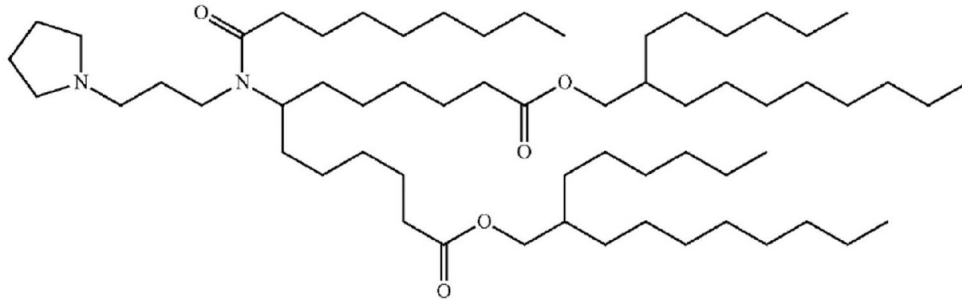
45



40

50

46



10

【0091】

ある実施形態では、LNPは、次のモル%の成分を含む：約20%～65%の1以上のカチオン性脂質、約1%～約50%の1以上のリン脂質、約0.1%～10%の1以上のPEGコンジュゲート脂質、および約0%～約70%のコレステロール；約20%～50%の1以上のカチオン性脂質、約5%～約20%の1以上のリン脂質、約0.1%～5%の1以上のPEGコンジュゲート脂質、および約20%～約60%のコレステロール；さらなる実施形態では、リン脂質は中性脂質であり；かつリン脂質はDOPEまたはDSPCである。

20

【0092】

ポリマーベースシステム

ポリマーベースの送達システムは当技術分野において周知であり、本開示を考慮して当業者に公知の任意の適切なポリマーベースの送達システムまたはポリマーナノ粒子を本発明において使用することができる。DNAは、ポリマーナノ粒子のポリマーマトリックス中に捕捉され得るか、またはナノ粒子の表面上に吸着もしくはコンジュゲートされ得る。遺伝子送達のために一般に使用されるポリマーの例としては、例えば、ポリ（乳酸-α-グリコール酸）（PLGA）、ポリ乳酸（PLA）、ポリ（エチレンイミン）（PEI）、キトサン、デンドリマー、ポリ無水物、ポリカプロラクトン、およびポリメタクリレートが挙げられる。

30

【0093】

ポリマーベースの非ウイルスベクターは、約1nm～約1000nm、場合により約10nm～約500nm、場合により約50nm～約200nm、場合により約100nm～約150nm、場合により約150nm以下の範囲の様々なサイズを有し得る。

【0094】

タンパク質ベースのシステム

タンパク質ベースの送達システムは当技術分野において周知であり、本開示に照らして、当業者に公知の任意の適切なタンパク質ベースの送達システムまたは細胞透過性ペプチド（CPP）を本発明において使用することができる。

【0095】

CPPは、治療用分子を送達するための細胞内浸透が可能である可能性がある短いペプチド（6～30アミノ酸残基）である。CPPの大部分は主にアルギニンおよびリシン残基からなり、それらをカチオン性および親水性にするが、CPPは両親媒性、アニオン性、または疎水性でもあり得る。CPPは天然の生体分子（例えば、Tat、HIV-1タンパク質）に由来するか、または合成法（例えば、ポリ-L-リシン、ポリアルギニン）によって得ることができる（Singh et al., Drug Deliv. 2018; 25(1):1996-2006）。CPPの例としては、例えば、カチオン性CPP（高度に正に荷電）（例えば、Tatペプチド、ペネトラチン、プロタミン、ポリ-L-リシン、ポリアルギニン等）；両親媒性CPP（正および負の両方に荷電したアミノ酸配列を含む、種々の供給源から構築された、キメラまたは融合ペプチド）（例えば、トランスポータン、VT5、バクテネシン-7（Bac7）、プロリンリッチペプチド（PPR）、SAP（VRLLPP）3、TP

40

50

10、pep-1、MPG等）；膜親和性CPP（疎水性および両親媒性の両方を同時に示し、大きな芳香族残基および小さな残基の両方を含む）（例えば、gH625、SPION-PEG-CPPNP等）；および疎水性CPP（非極性のモチーフまたは残基のみを含む）（例えば、SG3、PFVYLI、pep-7、線維芽細胞増殖因子（FGF）等）が挙げられる。

【0096】

タンパク質ベースの非ウイルスベクターは、約1nm～約1000nm、場合により約10nm～約500nm、場合により約50nm～約200nm、場合により約100nm～約150nm、場合により約150nm以下の範囲の異なるサイズを有し得る。

【0097】

ペプチドケージシステム

ペプチドケージベースの送達システムは当技術分野で周知であり、本開示に照らして、当業者に公知の任意の適切なペプチドケージベースの送達システムを本発明で使うことができる。一般に、拘束された内部環境を形成するケージ様構造に組み立てることができる任意のタンパク質性材料を使用することができる。いくつかの異なる種類のタンパク質「シェル」を組み立て、様々な種類の材料を装填することができる。例えば、非ウイルス性材料を封入するウイルス性コートタンパク質（例えば、Cowpea Chlorotic Mottle Virus（CCMV）タンパク質コート由来）のシェルを含むタンパク質ケージ、ならびに非ウイルス性タンパク質から形成されるタンパク質ケージが記載されている（例えば、米国特許第6,180,389号および第6,984,386号、米国特許出願第20040028694号、ならびに米国特許出願第20090035389号を参照、これらの実体において本明細書に組み込まれる）。ペプチドケージは、タンパク質ケージ（例えば、溶媒に自然に接近可能であるか、または溶媒の濃度、pH、平衡比を変更することによってそのようにすることができる内部空洞を有する構造）を形成するように自己集合するタンパク質性シェルを含み得る。

【0098】

非ウイルスタンパク質に由来するタンパク質ケージの例としては、例えば、真核生物種および原核生物種の両方に由来するフェリチンおよびアポフェリチン、例えば、12および24サブユニットフェリチン；ならびに熱ショックタンパク質（HSP）、例えば、内部コア空間を形成する24サブユニット熱ショックタンパク質のクラス、メタンコッカス・ヤナンスキイ（*Methanococcus jannaschii*）の小HSP、大腸菌のドデカメリックDspHSP、MrgAタンパク質等から形成されるタンパク質ケージが挙げられる。当業者によって理解されるように、タンパク質ケージのモノマーは天然に存在するか、または作製することができるアミノ酸置換、挿入、および欠失を含む変異体（例えば断片）であり得る。

【0099】

タンパク質ケージは、約1nm～約1000nm、場合により約10nm～約500nm、場合により約50nm～約200nm、場合により約100nm～約150nm、場合により約150nm以下の範囲の様々なコアサイズを有し得る。

【0100】

治療用核酸

用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、本明細書において互換的に使用され、デオキシリボ核酸（DNA）およびリボ核酸（RNA）を含む、核酸、オリゴヌクレオチドのすべての形態を指す。核酸には、ゲノムDNA、cDNA、アンチセンスDNA/RNA、プラスミドDNA、直鎖DNA、（ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド）、染色体DNA、スプライシングまたは非スプライシングmRNA、rRNA、tRNA阻害DNAまたはRNA（RNAi、例えば、低分子または短鎖ヘアピン（sh）RNA、マイクロRNA（miRNA）、低分子または短鎖干渉（si）RNA、トランススプライシングRNA、またはアンチセンスRNA）、ロックド核酸アナログ（LNA）、一本鎖および二本鎖オリゴヌクレオチドDNA（ODN）、免疫刺激配列（ISS）、リボス

10

20

30

40

50

イチおよびリボザインが含まれる。

【0101】

核酸には、天然に存在する、合成の、および意図的に修飾または改変されたポリヌクレオチドが含まれる。核酸は、単鎖、二本鎖、または三本鎖、鎖状または環状であり得、任意の長さであり得る。核酸のついて述べる際に、特定のポリヌクレオチドの配列または構造は、5'から3'方向に配列を提供する慣例に従って本明細書に記載され得る。

【0102】

ある実施形態では、核酸薬剤は一本鎖DNA (ssDNA) または二本鎖DNA (dsDNA) 分子である。ある実施形態では、核酸薬は、治療的使用のためのもの、例えば、治療的導入遺伝子をコードするssDNAまたはdsDNAである。特定の実施形態では、dsDNA分子は、ミニサークル、ナノプラスミド、開放直鎖二重鎖DNA、または閉鎖末端直鎖二重鎖DNA (CELID / ceDNA / doggy bone DNA) である。特定の実施形態では、ssDNA分子は閉鎖環状DNAまたは開放直鎖DNAである。

10

【0103】

本発明によれば、治療的導入遺伝子を含むssDNAおよびdsDNA分子は、当業者に周知の従来の技術によって生産され得る。

【0104】

「導入遺伝子」は、本明細書において、細胞または生物に導入される、または導入された核酸を便宜的に指すために使用される。導入遺伝子には、例えば、ヘテロポリヌクレオチド配列、またはタンパク質もしくはペプチドをコードするヘテロ核酸、または核酸 (例えばmiRNA等) 等の任意の核酸が含まれる。導入遺伝子およびヘテロ核酸 / ポリヌクレオチド配列という用語は、本明細書において互換的に使用される。

20

【0105】

典型的には、本発明の「治療的導入遺伝子」は発現カセットを含む。「発現カセット」という語は、本明細書で使用される場合、本発明の核酸分子の発現に十分な核酸要素を含む核酸コンストラクトを指す。典型的には、発現カセットは、プロモーター配列に作動可能に連結された本発明の核酸分子を含む。「作動可能に連結」という語は、一方の機能が他方の機能によって影響されるように、単一の核酸断片上の2つ以上の核酸断片の会合を指す。例えば、プロモーターはそのコード配列の発現に影響を及ぼし得る場合、コード配列と作動可能に連結される (例えば、コード配列は、プロモーターの転写制御下にある)。コード配列は、センスまたはアンチセンス配向で調節配列に作動可能に連結され得る。ある実施形態では、プロモーターはヘテロプロモーターである。「ヘテロプロモーター」という語は、本明細書で使用される場合、天然の所与のコード配列に作動可能に連結されていることが見出されないプロモーターを指す。

30

【0106】

本明細書で使用される「作動可能に連結」という語は、導入遺伝子の発現に影響を及ぼすように、導入遺伝子の発現に影響を及ぼす調節配列が配列に対して適切な位置に配置されることを意味する。この同じ定義は、発現ベクター中の導入遺伝子および転写制御エレメント (例えば、プロモーター、エンハンサー、プロモーター / エンハンサー、および終結エレメント) の配置に適用されることがある。導入遺伝子は、センスまたはアンチセンス配向で調節配列に作動可能に連結され得る。導入遺伝子と作動可能に連結され得る多種多様な調節配列は当技術分野において公知であり、本発明の方法において使用することができる。特定の実施形態では、作動可能に連結された調節配列は、肝臓特異的プロモーター等のプロモーター、またはApoe / hAAT等のプロモーター / エンハンサーである。

40

【0107】

特定の実施形態では、発現カセットは、さらなるエレメント、例えば、イントロン、エンハンサー、ポリアデニル化部位、ウッドチャック応答エレメント (WRE)、および / またはコード配列の発現レベルに影響を及ぼすことが知られる他のエレメントを含み得る

50

。本明細書で使用される場合、「プロモーター」という語は、コード配列または機能的 RNA の発現を制御し得るヌクレオチド配列を指す。一般に、本発明の核酸分子は、プロモーター配列の 3' 位に位置する。ある実施形態では、プロモーター配列は、近位およびより遠位の上流エレメントからなり、エンハンサーエレメントを含み得る。「エンハンサー」は、プロモーター活性を刺激し得るヌクレオチド配列である。エンハンサーエレメントは、典型的には、プロモーターエレメントの上流に位置するが、下流またはプロモーター内に位置することもでき、例えば、プロモーターの自然生来のエレメント、またはプロモーターのレベルもしくは組織特異性を増強するために挿入されたヘテロエレメントであり得る。ある実施形態では、発現カセットは組織特異的エンハンサーを含む。ある実施形態では、プロモーターはその全体が天然遺伝子に由来する。ある実施形態では、プロモーターは、様々な天然に存在するプロモーターに由来する異なるエレメントから構成される。ある実施形態では、プロモーターは合成ヌクレオチド配列を含む。異なるプロモーターが異なる組織もしくは細胞型において、または異なる発生段階において、または異なる環境条件に応答して、または薬物もしくは転写補助因子の存在もしくは非存在に応答して、遺伝子の発現を指令することは、当業者によって理解されるだろう。ユビキタス、細胞型特異的、組織特異的、発生段階特異的、および条件的プロモーター、例えば、薬物応答性プロモーター（例えば、テトラサイクリン応答性プロモーター）は、当業者に周知である。プロモーターの例としては、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PKG）プロモーター、CAG（CMV エンハンサー、ニワトリβアクチンプロモーター（CBA）およびウサギβグロビンイントロンの複合体）、NSE（ニューロン特異的エノラーゼ）、シナプシンまたは NeuN プロモーター、SV40 初期プロモーター、マウス乳癌ウイルスLTR プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター（Ad MLP）、単純ヘルペスウイルス（HSV）プロモーター、CMV 前初期プロモーター領域（CMV IE）等のサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、SFFV プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、合成プロモーター、等が挙げられるが、これらに限定されない。他のプロモーターは、ヒト起源のもの、またはマウスを含む他の種由来のものであり得る。一般的なプロモーターとしては、例えば、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）前初期遺伝子プロモーター、SV40 初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス末端反復配列、βアクチンプロモーター、ラットインスリンプロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、ヒトα-1アンチトリプシン（hAAT）プロモーター、トランスサイレチンプロモーター、チロキシン結合グロブリン（TBG）プロモーターおよび他の肝臓特異的プロモーター、デスミンプロモーターおよび類似の筋特異的プロモーター、EF1-αプロモーター、CAGプロモーターおよび他の構成的プロモーター、多組織特異性を有するハイブリッドプロモーター、シナプシンおよびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターのようなニューロンに特異的なプロモーターが挙げられ、これらは全て、当業者に周知なプロモーターであり、当業者にとって容易に入手可能であり、目的のコード配列の高レベル発現を得るために使用され得る。さらに、マウスメタロチオネイン遺伝子等の非ウイルス遺伝子に由来する配列も、本明細書で使用される。このようなプロモーター配列は、例えばStratagene（San Diego, CA）から市販されている。

【0108】

導入遺伝子を組織特異的調節エレメントに作動可能に連結することは、導入遺伝子発現のための少なくとも部分的な組織向性を提供する。ある実施形態では、導入遺伝子は、肝臓特異的プロモーターおよび／または肝臓特異的エンハンサーに作動可能に連結される。

「肝臓特異的」とは、肝臓における導入遺伝子発現のための少なくとも部分的な組織向性を示す。「プロモーター／エンハンサー」とは、エンハンサーおよびプロモーターに作動可能に連結されていることを示す。肝臓で活性なプロモーターの例としては、トランスサイレチン（TTR）遺伝子プロモーターおよびその変異体（Anguela and Shen, 米国特許第11,168,124号、Anguela and Shen, 国際公開第WO2017/075619号；Costa et al., 1991, Nucleic Acids Research, Vol. 19, No. 15 4139-4145）；ヒトα1-アンチトリプシン（hAAT）プロモーター（Hafenrichter et al., Blood.

1994, Vol 84, No. 10. 3394-3404) ; アポリポタンパク質 A-I プロモーター ; アルブミン (Miyatake et al., J. Virol., 1997, 71: 5124-32) ; B型肝炎ウイルスコアプロモーター (Sandig et al., Gene Ther. 1996, 3: 1002-9) ; α フェトプロテイン (AFP) (Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther., 1996, 7: 1503-14) ; ヒト第IX因子プロモーター ; およびチロキシン結合グロブリン (TBG) プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。肝臓において活性なエンハンサーの例としては、アポリポタンパク質 E (apoE) HCR-1 および HCR-2 が挙げられる (Allan et al., J. Biol. Chem., 1997, 272: 29113-19)。ある実施形態では、プロモーター／エンハンサーは、ApoE／hAAT である (Okuyama et al., 1996, Human Gene Therapy 7: 637-645、および Miao et al., 2000, Molecular Therapy Vol. 1, No. 6)。(本段落の参考文献の各々は参照により本明細書に組み込まれる。)

10

【0109】

ある実施形態では、発現カセットは、本発明の核酸分子によってコードされるポリペプチドの分泌を可能にする適切な分泌シグナル配列を含む。本明細書で使用される場合、用語「分泌シグナル配列」またはその変異体は、天然ポリペプチドで見られる分泌レベルと比較して、作動可能に連結されたポリペプチドの細胞からの分泌を増強するように（上記で定義されたように）機能するアミノ酸配列を指すことが意図される。「増強された」分泌とは、細胞によって合成され、細胞から分泌されるポリペプチドの相対的割合が増加することを意味し；分泌されるタンパク質の絶対量も増加することは必須ではない。ある実施形態では、ポリペプチドの本質的に全て（すなわち、少なくとも95%、97%、98%、99%またはそれ以上）が分泌される。しかし、分泌レベルが天然のポリペプチドと比較して増強される限り、ポリペプチドの本質的に全てまたは大部分が分泌されることは必須ではない。一般に、分泌シグナル配列は小胞体内で切断され、特定の実施形態では、分泌シグナル配列は分泌前に切断される。しかし、細胞からのポリペプチドの分泌が増強され、かつポリペプチドが機能的である限り、分泌シグナル配列が切断されることは必須ではない。したがって、ある実施形態では、分泌シグナル配列は部分的にまたは完全に保持される。分泌シグナル配列は、分泌ポリペプチドの分泌シグナルから（すなわち前駆体から）全体的もしくは部分的に誘導することができ、および／または全体的もしくは部分的に合成され得る。分泌シグナル配列の長さは厳格ではなく、一般に、公知の分泌シグナル配列は、約10～15アミノ酸長から50～60アミノ酸長である。さらに、分泌されたポリペプチドからの公知の分泌シグナルは、得られる分泌シグナル配列が作動可能に連結されたポリペプチドの分泌を増強するように機能する限り、改変または修飾され得る（例えば、アミノ酸の置換、欠失、切断または挿入によって）。本発明の分泌シグナル配列は、天然に存在する分泌シグナル配列またはその変異体（上記のような）を含む、本質的にそれからなる、またはそれからなるものであり得る。細胞からの分泌を指令する多数の分泌タンパク質および配列は、当技術分野で公知である。本発明の分泌シグナル配列はさらに、全体的にまたは部分的に合成物または人工物であり得る。合成または人工の分泌シグナルペプチドは当技術分野で公知であり、例えば、Barash et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 294:835-42 (2002).を参照してよい。

20

30

40

【0110】

ある実施形態では、本発明は、治療的導入遺伝子を使用する遺伝子療法によって疾患を治療する方法を含む。

【0111】

ある態様において、ヘテロポリヌクレオチドは、ポンペ病または別の糖原病の治療のためのGAA（酸性 α グルコシダーゼ）；ウィルソン病の治療のためのATP7B（ATPase 2を輸送する銅）；ファブリー病の治療のための α ガラクトシダーゼA；シトルリン血症1型の治療のためのASS1（アルギノコハク酸シンターゼ）；ゴーシェ病1型の治療のための β グルコセレブロシダーゼ；テイ・サックス病の治療のための β ヘキソサミニダーゼA；C1インヒビター欠損症I型およびII型としても知られる遺伝性血管浮腫

50

(H A E) の治療のための S E R P I N G 1 (C 1 プロテアーゼインヒビターまたは C 1 エステラーゼインヒビター) ; または糖原病 1 型 (G S D I) の治療のためのグルコース-6-ホスファターゼをコードする。

【0112】

ある実施形態では、ヘテロポリヌクレオチドは、インスリン、グルカゴン、成長ホルモン (G H)、副甲状腺ホルモン (P T H)、成長ホルモン放出因子 (G R F)、卵胞刺激ホルモン (F S H)、黄体形成ホルモン (L H)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (h C G)、血管内皮成長因子 (V E G F)、アンジオポエチン、アンジオスタチン、顆粒球コロニー刺激因子 (G C S F)、エリスロポエチン (E P O)、結合組織成長因子 (C T G F)、塩基性線維芽細胞成長因子 (b F G F)、上皮成長因子 (E G F)、形質転換増殖因子 α (T G F α)、血小板由来成長因子 (P D G F)、インスリン増殖因子 I または I I (I G F-I もしくは I G F-I I)、T G F β 、アクチビン、インヒビン、骨形成タンパク質 (B M P)、神経成長因子 (N G F)、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、ニューロトロフィン N T-3 もしくは N T 4 / 5、毛様体神経栄養因子 (C N T F)、グリア細胞株由来神経栄養因子 (G D N F)、ニューロツリン、アグリニン、ネトリン-1 もしくはネトリン-2、肝細胞増殖因子 (H G F)、エフリン、ノギン、ソニック・ヘッジホッグまたはチロシンヒドロキシラーゼをコードする。

10

【0113】

ある実施形態では、ヘテロポリヌクレオチドは、トロンボポエチン (T P O)、インターロイキン (I L-1 ~ 36 等)、単球走化性タンパク質、白血病阻止因子、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、F a s リガンド、腫瘍壊死因子 α もしくは β 、インターフェロン α 、 β もしくは γ 、幹細胞因子、f l k-2 / f l t 3 リガンド、I g G、I g M、I g A、I g D もしくは I g E、キメラ免疫グロブリン、ヒト化抗体、一本鎖抗体、T 細胞受容体、キメラ T 細胞受容体、単鎖 T 細胞受容体、クラス I もしくはクラス I I M H C 分子。

20

【0114】

ある実施形態では、ヘテロポリヌクレオチドは、C F T R (嚢胞性線維症膜貫通制御タンパク質)、血液凝固 (凝固) 因子 (第 X I I I 因子、第 I X 因子 (F I X)、第 V I I I 因子 (F V I I I)、第 X 因子、第 V I I 因子、第 V I I a 因子、プロテイン C 等)、機能血液凝固因子、抗体、網膜色素上皮特異的 65 k D a タンパク質 (R P E 65)、エリスロポエチン、L D L 受容体、リポタンパク質リパーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、 β グロビン、 α グロビン、スペクトリン、 α アンチトリプシン、アデノシンデアミナーゼ (A D A)、金属トランスポーター (A T P 7 A または A T P 7)、スルファミダーゼ、リソソーム蓄積症関連酵素 (A R S A)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、 β -25 グルコセレブロシダーゼ、リソソームヘキササミニダーゼ、分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ、ホルモン、増殖因子、インスリン様増殖因子 1 もしくは 2、血小板由来成長因子、上皮成長因子、神経成長因子、神経栄養因子-3 および-4、脳由来神経栄養因子、グリア由来成長因子、形質転換増殖因子 α もしくは β 、サイトカイン、 α インターフェロン、 β インターフェロン、インターフェロン γ 、インターロイキン 2、インターロイキン 4、インターロイキン 12、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、リンホトキシン、自殺遺伝子産物、単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ジフテリア毒素、シトクロム P 450、デオキシシチジンキナーゼ、腫瘍壊死因子、薬物耐性タンパク質、腫瘍抑制タンパク質 (例えば、p 53、R b、W t-1、N F1、V o n H i p p e l - L i n d a u (V H L)、大腸ポリポーシス (A P C))、免疫調節特性を有するペプチド、免疫寛容原性もしくは免疫原性のペプチドもしくはタンパク質トレプトームもしくは h C D R 1、インスリン、グルコキナーゼ、グアニル酸シクラーゼ 2 D (L C A - G U C Y 2 D)、R a b エスコートタンパク質 (コロイデレミア)、L C A 5 (L C A - レベルシリン)、オルニチンケト酸アミノトランスフェラーゼ (脳回転状萎縮)、レチノスカイシン 1 (X 染色体連鎖性網膜分離症)、U S H 1 C (アッシャー症候群 1 C)、X 染色体劣性網膜色素変性 G T P アーゼ (X L R

30

40

50

P)、MERTK(網膜色素変性症(RP)の常染色体劣性(AR):網膜色素変性症)、DFNB1(コネキシン26難聴)、ACHM2、3および4(色覚異常)、PKD-1もしくはPKD-2(多発性嚢胞腎)、TPP1、CLN2、スルファターゼ、N-アセチルグルコサミン-1-リン酸トランスフェラーゼ(Link)、カテプシンA、GM2-AP、NPC1、VPC2、スフィンゴ脂質活性化タンパク質、ゲノム編集のための1以上のジンクフィンガーヌクレアーゼ、またはゲノム編集のための修復鋳型として使用される1つ以上のドナー配列をコードする。

【0115】

ある実施形態では、ヘテロポリヌクレオチドは、貧血の治療のためのエリスロポエチン(EPO);種々の免疫障害、ウイルス感染および癌の治療のためのインターフェロン α 、インターフェロン β およびインターフェロン γ ;様々な炎症性疾患もしくは免疫不全の治療のための、IL-1~IL-36、および対応する受容体のいずれか1つを含むインターロイキン(IL);免疫障害の治療のためのケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド5(CXCL5)を含むケモカイン;クローン病等の免疫障害の治療のための顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF);様々なヒト炎症性疾患の治療のための顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF);様々なヒト炎症性疾患の治療のためのマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF);上皮組織損傷の治療のための表皮細胞増殖因子(KGF);不育症、HIV関連合併症、およびインスリン抵抗性治療のための単球走化性促進因子-1(MCP-1)等のケモカイン;様々な免疫障害の治療のための腫瘍壊死因子(TNF)および受容体;肺気腫または慢性閉塞性肺疾患(COPD)の治療のための α 1-アンチトリプシン;ムコ多糖症I型(MPS I)の治療のための α -L-イズロニダーゼ;OTC欠損症の治療のためのオルニチントランスカルバミラーゼ(OTC);フェニルケトン尿症(PKU)の治療のためのフェニルアラニンヒドロキシラーゼ(PAH)もしくはフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL);リポタンパク質リパーゼ欠損症の治療のためのリポタンパク質リパーゼ;アポリポタンパク質(Apo)A-I欠損症の治療のためのアポリポタンパク質;家族性高コレステロール血症(FH)の治療のための低密度リポタンパク質受容体(LDL-R);低アルブミン血症の治療のためのアルブミン;レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT);カルバモイルシンセターゼI;アルギニノコハク酸シンセターゼ;アルギニノコハク酸リアーゼ;アルギナーゼ;フマリルアセトアセターゼヒドロラーゼ;ポルフォビリノーゲンデアミナーゼ;ホモシスチン尿症の治療のためのシスタチオニン β シンターゼ;分岐鎖ケト酸デカルボキシラーゼ;イソバレリルCoAデヒドロゲナーゼ;プロピオニルCoAカルボキシラーゼ;メチルマロニルCoAムターゼ;グルタリルCoAデヒドロゲナーゼ;インスリン;ビルビン酸カルボキシラーゼ;肝ホスホリラーゼ;ホスホリラーゼキナーゼ;グリシンデカルボキシラーゼ;Hタンパク質;Tタンパク質;嚢胞性線維症膜貫通調節因子(CFTR);シュタルガルト病の治療のためのATP結合カセット、サブファミリーA(ABC1)、メンバー4(ABCA4);またはジストロフィンをコードする。

【0116】

ある実施形態では、ヘテロポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質は、遺伝子編集ヌクレアーゼを含む。特定の実施形態では、遺伝子編集ヌクレアーゼは、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)または転写活性因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)を含む。特定の実施形態では、遺伝子編集ヌクレアーゼは、機能的II型CRISPR-Cas9を含む。

【0117】

用語「ポリペプチド」、「タンパク質」および「ペプチド」は、本明細書において互換的に使用される。「ポリヌクレオチド配列」によってコードされる「ポリペプチド」、「タンパク質」および「ペプチド」は、修飾形態または変異体が天然の完全長タンパク質のある程度の機能性を保持する限り、天然に存在するタンパク質と同様に、完全長の天然配列、ならびに部分配列、機能的部分配列、修飾形態または配列変異体を含む。本発明において、ポリヌクレオチド配列によってコードされるそのようなポリペプチド、タンパク質

、およびペプチドは、処置された哺乳動物において欠損しているか、またはその発現が不十分であるか、または欠損している内因性タンパク質と同一であり得るが、必ずしもそうである必要はない。

【0118】

ある実施形態では、ヘテロポリヌクレオチドは、s i R N A、アンチセンス分子、m i R N A、R N A i、リボザイムおよびs h R N Aからなる群から選択されるインヒビター核酸をコードする。

【0119】

ある実施形態では、インヒビター核酸は、遺伝子、遺伝子の転写物、またはハンチンチン (H T T) 遺伝子、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症に関連する遺伝子 (アトロフィン1、A T N 1)、球脊髄性筋萎縮症におけるX染色体上のアンドロゲン受容体、ヒトアタキシン1、2、3、および7、C a v 2 . 1 P 電位依存性カルシウムチャネル (C A C N A 1 A)、T A T A 結合タンパク質、アタキシン8 反対鎖 (A T X N 8 O S)、脊髄小脳失調症におけるセリン／トレオニンプロテインホスファターゼ2 A 5 5 k D a βアイソフォーム (1型、2型、3型、7型、8型、12型、17型)、脆弱X症候群におけるF M R 1 (脆弱X精神遅滞1)、脆弱X随伴振戦／運動失調症候群におけるF M R 1 (脆弱X精神遅滞1)、脆弱X E 精神遅滞におけるF M R 1 (脆弱X精神遅滞2) またはA F 4 / F M R 2 ファミリーメンバー2；筋強直性ジストロフィー症におけるミオトニンプロテインキナーゼキナーゼ (M T - P K)；フリードライヒ運動失調症におけるフラタキシン；筋萎縮性側索硬化症におけるスーパーオキシドジスムターゼ1 (S O D 1) 遺伝子の変異体；パーキンソン病および／またはアルツハイマー病の病因に関与する遺伝子；アポリポタンパク質B (A P O B) および前駆体タンパク質転換酵素サブチリシン／ケキシン9 (P C S K 9)、高コレステロール血症；H I V 感染における転写遺伝子のヒト免疫不全ウイルストランス活性化因子であるH I V T a t；H I V 感染におけるヒト免疫不全ウイルストランス活性化因子応答エレメント遺伝子であるH I V T A R、H I V T A R；H I V 感染におけるC - C ケモカイン受容体 (C C R 5)；ラウス肉腫ウイルス (R S V) 感染におけるR S V ヌクレオカプシドタンパク質、C型肝炎ウイルス感染における肝特異的マイクロRNA (m i R - 1 2 2)；p 5 3、急性腎障害、移植腎機能発現遅延腎移植または腎障害、急性腎不全；進行再発悪性腫瘍または転移性固形悪性腫瘍におけるプロテインキナーゼN 3 (P K N 3)；プロテアソームサブユニットβ型9 (P S M B 9) としても知られるL M P 2、転移性黒色腫；プロテアソームサブユニットβ型8 (P S M B 8) としても知られるL M P 7、転移性黒色腫；プロテアソームサブユニットβ型10 (P S M B 1 0) としても知られるM E C L 1、転移性黒色腫；固形腫瘍における血管内皮増殖因子 (V E G F)；固形腫瘍におけるキネシンスピンドルタンパク質、慢性骨髄性白血病におけるアポトーシスリプレッサーB細胞C L L / リンパ腫 (B C L - 2)；固形腫瘍におけるリボヌクレオチドレダクターゼM 2 (R R M 2)；固形腫瘍におけるフォーリン；肝腫瘍におけるp o l o 様キナーゼ1 (P L K 1)、C型肝炎感染におけるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ1 (D G A T 1)、家族性大腸腺腫症におけるβカテニン；β2 アドレナリン受容体、緑内障；糖尿病性黄斑浮腫 (D M E) または加齢性黄斑変性症における、D A N 損傷誘導性転写産物4 タンパク質としても知られるR T P 8 0 1 / R e d d 1；加齢黄斑変性または脈絡膜血管新生における血管内皮増殖因子受容体I (V E G F R 1)、非動脈炎性前部虚血性視神経症におけるカスパーゼ2；先天性爪甲厚硬症におけるケラチン6 A N 1 7 K 変異タンパク質；インフルエンザ感染におけるA型インフルエンザウイルスのゲノム／遺伝子配列；重症急性呼吸器症候群 (S A R S) 感染におけるS A R S コロナウイルスゲノム／遺伝子配列；R S ウイルス感染におけるR S ウイルスゲノム／遺伝子配列；エボラ感染におけるエボラフィロウイルスゲノム／遺伝子配列；B型およびC型肝炎感染におけるB型およびC型肝炎ウイルスゲノム／遺伝子配列；単純ヘルペスウイルス (H S V) 感染におけるH S V ゲノム／遺伝子配列、コクサッキーウイルスB 3 感染におけるコクサッキーウイルスB 3 ゲノム／遺伝子配列；一次性ジストニア、汎クラスI および移植に特異的なH L A 対立遺伝子におけるトルシンA (T O R

10

20

30

40

50

1 A) 様遺伝子の病原性対立遺伝子のサイレンシング (対立遺伝子特異的サイレンシング) ; ならびに常染色体優性網膜色素変性症 (a d R P) における変異ロドプシン遺伝子 (R H O) からなる群から選択されるポリヌクレオチド反復疾患に関連する遺伝子に結合する。

【0120】

免疫細胞モジュレーター

ある実施形態では、本発明は、少なくとも1つの免疫細胞モジュレーター、例えば、少なくとも1つの食細胞除去剤、または少なくとも1つの免疫抑制剤の対象への投与を含む、対象において治療上有効な非ウイルス遺伝子療法を生み出す方法に関する。

【0121】

本明細書で使用される場合、「食細胞除去剤」という語は、対象における食細胞を枯渇もしくは破壊し、かつ／または1以上の食細胞機能を妨害する任意の薬剤を指す。食細胞除去剤は、任意の食細胞を標的とすることができる。食細胞 (P h a g o c y t e) は、本明細書では、食細胞 (p h a g o c y t i c c e l l) 、貪食免疫細胞 (p h a g o c y t i c i m m u n e c e l l) 、食細胞 (p h a g o c y t e c e l l) 、または貪食免疫細胞 (p h a g o c y t e i m m u n e c e l l) とも称され、例えば、マクロファージ、単球、好中球、および樹状細胞を含む。ランゲルハンス細胞は、皮膚に見られる樹状細胞である。例えば、肺または皮膚を含む多くの組織に見出される肥満細胞は、食細胞としても作用し得る。

【0122】

本明細書で使用される場合、「単球および／またはマクロファージ除去剤」という語は、対象における単球および／もしくはマクロファージを枯渇もしくは破壊し、かつ／または単球および／もしくはマクロファージの1以上の機能を妨害する任意の薬剤を指す。単球および／またはマクロファージ除去剤は、任意の単球および／またはマクロファージを標的とすることができる。マクロファージは、分化した単球である単核食細胞である。異なる組織において、マクロファージは、異なる名称によって言及される。組織特異的な、または常在するマクロファージの例としては、例えば、肝臓内のクッパー細胞、腸内の腸マクロファージ、脳内のミクログリア細胞、肺内の肺泡マクロファージ、常在型腎マクロファージ、皮膚マクロファージ、脾臓内の赤脾髄マクロファージ、および骨中の破骨細胞が挙げられる。単球および／またはマクロファージ除去剤の例としては、例えば、貪食免疫細胞マーカーを標的とする薬剤、限定されないが、例えば、抗 C D 1 1 5 抗体または C D 1 1 5 低分子阻害剤を含む C D 1 1 5 インヒビター；限定されないが、抗 F 4 / 8 0 抗体または F 4 / 8 0 低分子阻害剤を含む F 4 / 8 0 インヒビター；限定されないが、抗 C D 6 8 抗体または C D 6 8 低分子阻害剤を含む C D 6 8 インヒビター；限定されないが、抗 C D 1 1 b 抗体または C D 1 1 b 低分子阻害剤を含む C D 1 1 b インヒビター；化学療法剤トラベクテジン；イントラリピド；空のリボソーム；および限定されないが、クロドロン酸を含むビスホスホネートが挙げられる。ある実施形態では、単球および／またはマクロファージ除去剤は、クロドロン酸ではない。ある実施形態において、クロドロン酸および少なくとも1つのさらなる単球および／またはマクロファージ除去剤は、本発明の方法において一緒に使用される。

【0123】

本明細書で使用される場合、「好中球除去剤」という語は、対象における好中球を枯渇もしくは破壊し、かつ／または1以上の好中球機能を妨害する任意の薬剤を指す。好中球除去剤は、任意の好中球を標的とすることができる。好中球除去剤の例としては、例えば貪食免疫細胞マーカーを標的とする薬剤、限定されないが、例えば、抗 L y 6 g 抗体または L y 6 g 低分子阻害剤を含む L y 6 g インヒビター；限定されないが、抗 C D 1 7 7 抗体または C D 1 7 7 低分子阻害剤を含む C D 1 7 7 インヒビター；限定されないが、抗 C D 1 4 抗体または C D 1 4 低分子阻害剤を含む C D 1 4 インヒビター；限定されないが、抗 C D 1 5 抗体または C D 1 5 低分子阻害剤を含む C D 1 5 インヒビター；限定されないが、抗 C D 1 1 b 抗体または C D 1 1 b 低分子阻害剤を含む C D 1 1 b インヒビター；限

定されないが、抗CD16抗体またはCD16低分子阻害剤を含むCD16インヒビター；限定されないが、抗CD32抗体またはCD32低分子阻害剤を含むCD32阻害剤；限定されないが、抗CD33抗体またはCD33低分子阻害剤を含むCD33インヒビター；限定されないが、抗CD44抗体またはCD44低分子阻害剤を含むCD44インヒビター；限定されないが、抗CD45抗体またはCD45低分子阻害剤を含むCD45インヒビター；限定されないが、抗CD66b抗体またはCD66b低分子阻害剤を含むCD66bインヒビター；限定されないが、抗CD18抗体またはCD18低分子阻害剤を含むCD18インヒビター；限定されないが、抗CD62L抗体またはCD62L低分子阻害剤を含むCD62Lインヒビター；および、限定されないが、抗Gr-1抗体またはGr-1低分子阻害剤を含むGr-1インヒビターが挙げられる。

10

【0124】

本明細書で使用される場合、「樹状細胞除去剤」という用語は、対象における樹状細胞を枯渇もしくは破壊し、かつ／または1以上の樹状細胞の機能を妨害する任意の薬剤を指す。樹状細胞除去剤は、任意の樹状細胞を標的とすることができる。樹状細胞除去剤の例としては、例えば、貪食免疫細胞マーカーを標的とする薬剤、例えば、限定されないが、抗PDCA1抗体またはPDCA1低分子阻害剤を含むPDCA1インヒビター；および、限定されないが、抗CD11c抗体またはCD11c低分子阻害剤を含むCD11cインヒビターが挙げられる。

【0125】

本明細書で使用される場合、「インヒビター」という用語は、標的タンパク質の量および／または活性を下方制御、減少、低減、抑制、または不活性化することができる任意の化合物を指す。インヒビターは、タンパク質、オリゴおよびポリペプチド、核酸、遺伝子、または化学分子であり得る。適切なタンパク質インヒビターは、例えば、標的タンパク質に結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体であり得る。

20

【0126】

本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切なCD115インヒビターを本発明において使用することができる。CD115低分子阻害剤の例としては、例えば、ペキシダルチニブ(PLX-3397)、BLZ-945、リニファニブ(ABT-869)、JNJ-28312141(Johnson & Johnson)、JNJ-40346527(Johnson & Johnson)、PLX7486(Plexxikon)、およびARRY-382(Array BioPharma)が挙げられる。

30

【0127】

本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切な抗CD115抗体を本発明において使用することができる。市販の抗CD115抗体の例としては、例えば、AFS98(InvitrogenまたはBioCell)、12-3A3-1B10(Invitrogen)、6C7(Bioss)、カビラリズマブ(FPA008)、25949-1-AP(Proteintech)、1G4(Abnova)、3G12(Abnova)、604B5 2E11(Invitrogen)、エマクツツマブ(RG-7155; Roche)、AMG 820(Amgen)、IMC-CS4、およびROS8G11(Invitrogen)が挙げられる。ある実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、AFS98(例えば、BioCell BE213)である。Oncogene, 1995;11(12):2469-2476.も参照されたい。

40

【0128】

本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切なLy6Gインヒビターを本発明において使用することができる。

【0129】

本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切な抗Ly6G抗体を本発明において使用することができる。市販の抗Ly6g抗体の例としては、例えば、1A8(BioCell BP0075-1)およびRB6-8C5(ab25377)が挙げられる。

50

【0130】

本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切な抗CD177抗体またはCD177低分子阻害剤を本発明において使用することができる。本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切な抗CD14抗体またはCD14低分子阻害剤を本発明において使用することができる。本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切な抗CD15抗体またはCD15低分子阻害剤を本発明において使用することができる。本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切な抗CD11b抗体またはCD11b低分子阻害剤を本発明において使用することができる。本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切な抗CD16抗体またはCD16低分子阻害剤を本発明において使用することができる。本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切な抗CD32抗体またはCD32低分子阻害剤を本発明において使用することができる。本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切な抗CD33抗体またはCD33低分子阻害剤を本発明において使用することができる。本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切な抗CD44抗体またはCD44低分子阻害剤を本発明において使用することができる。本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切な抗CD45抗体またはCD45低分子阻害剤を本発明において使用することができる。本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切な抗CD66b抗体またはCD66b低分子阻害剤を本発明において使用することができる。本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切な抗CD18抗体またはCD18低分子阻害剤を本発明において使用することができる。本開示に照らして、当業者に公知のものを含む、任意の適切な抗CD62L抗体またはCD62L低分子阻害剤を本発明において使用することができる。

10

20

【0131】

イントラリピッドリポソームおよび空のリポソームは、単球および／またはマクロファージの1以上の機能を妨害することが示されている。例えば、Liu et al., Biochim Biophys Acta. 2013 Jun;1830(6):3447-53およびSaunders et al., Nano Lett. 2020 Jun 10;20(6):4264-4269.を参照。イントラリピッドリポソームまたは空のリポソームによる前処理は、単球／マクロファージ細胞を効果的に飽和させ、非ウイルス治療剤の食作用を防止することができる。本開示を考慮して当業者に公知の任意の適切なイントラリピッドリポソームまたは空のリポソームを本発明において使用することができる。イントラリピッドおよび空のリポソームの例としては、例えば、I141-100ML (Sigma Aldrich)、2B6063 (Baxter)、ならびにLiu et al., Biochim Biophys Acta. 2013 Jun;1830(6):3447-53およびSaunders et al., Nano Lett. 2020 Jun 10;20(6):4264-4269.に記載されるものが挙げられる。

30

【0132】

本開示を考慮して当業者に公知の任意の適切なビスホスホネートを本発明において使用することができる。ビスホスホネートの例としては、例えば、クロドロロン酸、パミドロロン酸、イバンドロン酸、アレンドロン酸、およびゾレドロン酸が挙げられる。

【0133】

「食細胞除去剤」の他の例としては、例えば、パルボシクリブ（イブランス（登録商標）；Pfizer）、クロモリナトリウム（Nasalcrom（登録商標）；Bausch & Lomb）が挙げられ、これらは肥満細胞を阻害することが知られている。

40

【0134】

本明細書で使用される場合、用語「免疫抑制剤」は、対象における免疫系の活性を遅延または停止させることができる任意の化合物を指す。免疫抑制剤の例としては、シクロスポリン、ISA(TX)247、タクロリムスまたはカルシニューリン等のカルシニューリン阻害剤（これらに限定されない）、シロリムス、エベロリムス、FK778またはTAF93等のラパマイシンの標的（これらに限定されない）、バシリキシマブおよびダクリズマブ等のインターロイキン2 α鎖ブロッカー（これらに限定されない）、ミコフェノール酸モフェチル等のイノシンーリン酸デヒドロゲナーゼの阻害剤、メトトレキサ

50

ート等のジヒドロ葉酸レダクターゼの阻害剤（これらに限定されない）、アザチオプリン等の代謝拮抗型免疫抑制剤（これらに限定されない）、ルキソリチニブ等のJAK阻害剤抗（これらに限定されない）、シルツキシマブ等の（これらに限定されない）サイトカイン抗体等のサイトカイン阻害剤（これらに限定されない）、H-151等のcGAS-SITING阻害剤（これらに限定されない）、またはステロイドが挙げられる。

【0135】

本明細書で使用される場合、用語「ステロイド」は、コルチコステロイドおよびグルココルチコステロイドの両方を包含するために使用される。ある実施形態では、ステロイドはコルチコステロイドであり得る。本開示に照らして、当業者に公知の任意の適切なコルチコステロイドを本発明において使用することができる。本明細書で使用される場合、用語「ステロイド」は、3つのシクロヘキサン環およびシクロペンタン環を含む化学物質を指す。環は、四環シクロペンタフェナントレン、すなわちゴナンを形成するように配置される。本明細書で使用される場合、「コルチコステロイド」という語は、副腎皮質において産生されるか、または合成的に産生されるステロイドホルモンのクラスを指す。コルチコステロイドは、ストレス応答、免疫応答および炎症の調節、炭水化物代謝、タンパク質異化、血中電解質レベル、ならびに行動等の広範な生理学的システムに関与する。コルチコステロイドは一般に、化学構造に基づいて4つのクラスに分類される。A群コルチコステロイド（短～中作用型グルココルチコイド）には、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、酢酸コルチゾン、ピバリン酸チキソコルトール、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、およびプレドニゾンが含まれる。B群コルチコステロイドには、トリウムシノロンアセトニド、トリウムシノロンアルコール、モメタゾン、アムシノニド、ブデソニド、デソニド、フルオシノニド、フルオシノロンアセトニド、およびハルシノニドが含まれる。C群コルチコステロイドには、ベタメタゾン、ベタメタゾンリン酸エステルナトリウム、デキサメタゾン、デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム、およびフルオコルトロンが含まれる。D群のコルチコステロイドには、17-酪酸ヒドロコルチゾン、17-吉草酸ヒドロコルチゾン、アルクロメタゾンプロピオン酸エステル、ベタメタゾン吉草酸エステル、ベタメタゾンジプロピオン酸エステル、プレドニカルバート、17-クロベタゾン酪酸エステル、17-クロベタゾンプロピオン酸エステル、カプロン酸フルオコルトロン、フルオコルトロンピバレート、およびフルプレドニデン酢酸エステルが含まれる。コルチコステロイドの非限定的な例としては、アルドステロン、ベクロメタゾン、ジプロピオン酸ベクロメタゾン、ベタメタゾン、ベタメタゾン 21-リン酸二ナトリウム、ベタメタゾン吉草酸エステル、ブデソニド、クロベタゾール、クロベタゾールプロピオン酸エステル、クロベタゾン酪酸エステル、ピバル酸クロコルトロン、コルチゾール、コルチコステロン、コルチゾン、デフラザコート、デキサメタゾン、酢酸デキサメタゾン、デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム、ジフロラゾン酢酸エステル、ジヒドロキシコルチゾン、フルシノニド、フルドコルチゾン酢酸エステル、フルメタゾン、フルニソリド、フルシノロンアセトニド、フルチカゾンフランカルボン酸エステル、フルチカゾンプロピオン酸エステル、ハルシノニド、ハルプメタゾン、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン酢酸エステル、ヒドロコルチゾンコハク酸エステル、16 α ヒドロキシプレドニゾロン、酢酸イソフルプレドン、メドリソン、メチルプレドニゾロン、デソニド、プレドニカルバート、プレドニゾロン、プレドニゾロン酢酸エステル、プレドニゾロンコハク酸エステルナトリウム、プレドニゾン、トリウムシノロン、および酢酸トリウムシノロンが挙げられる。本明細書で使用される場合、用語「コルチコステロイド」は以下の一般名および商品名のコルチコステロイドを含み得るが、これらに限定されない：コルチゾン（CORTONETM、MACETATETM、ADRESONTM、ALTESONATTM、CORTELANTTM、CORTISTABTM、CORTISYLTM、CORTOGENTM、CORTONETM、SCHEROSONTM）；経口デキサメタゾン（DECADRONORALTM、DEXAMETHTM、DEXONETM、HEXADROL-ORALTM、DEXAMETHASONETM INTENSOLTM、DEXONE 0.5TM、DEXONE 0.75TM、DEXONE 1.5TM、DEXONE 4TM）；経口ヒド

10

20

30

40

50

ロコルチゾン (CORTEFTM、HYDROCORTONETM) ; ヒドロコルチゾン
シピオナート (CORTEF ORAL SUSPENSIONTM)、経口メチルプレド
ニゾロン (MEDROL-ORALTM) ; 経口プレドニゾロン (PRELONETM、
DELTA-CORTEFTM、PEDIAPREDTM、ADNISOLONETM、
CORTALONETM、DELTACORTRILTM、DELTASOLONETM
、DELTASTABTM、DI-ADRESON FTM、ENCORTOLONETM
、HYDROCORTANCYLTM、MEDISOLONETM、METICORTE
LONETM、OPREDSONETM、PANAAF CORTELONETM、PRE
CORTISYLTM、PRENISOLONATM、SCHERISOLONATM、
SCHERISOLONETM) ; プレドニゾン (DELTASONETM、LIQUI
D PREDTM、METICORTENTTM、ORASONE 1TM、ORASONE
5TM、ORASONE 10TM、ORASONE 20TM、ORASONE 50TM
、PREDNICEN-MTM、PREDNISONE INTENSOLTM、STER
APREDTM、STERAPRED DSTM、ADASONETM、CARTANCY
LTM、COLISONETM、CORDROLTM、CORTANTTM、DACORTI
NTM、DECORTINTTM、DECORTISYLTM、DELCORTINTTM、D
ELLACORTTM、DELTADOMETM、DELTACORTENETTM、DE
LTISONATM、DIADRESONTM、ECONOSONETM、ENCORT
ONTM、FERNISONETM、NISONATM、NOVOPREDNISONE
TM、PANAF CORTTM、PANASOLTM、PARACORTTM、PARME
NISONTM、PEHACORTTM、PREDELTINTTM、PREDNICOR
TTM、PREDNICOTTM、PREDNIDIBTM、PREDNIMENTTM、
RECTODELTTM、ULTRACORTENTTM、WINPREDTM) ; 経口ト
リアムシノロン (KENACORTTM、ARISTOCORTTM、ATOLONE^T
M、SHOLOG ATM、TRAMACORT-DTM、TRI-MEDTM、TRIA
MCOTTM、TRISTOPLEXTM、TRYLONE DTM、U-TRI-LON
ETM)。ある実施形態では、コルチコステロイドは、デキサメタゾン、プレドニゾン、
プレドニゾロン、トリアムシノロン、プロピオン酸クロベタゾール、吉草酸ベタメタゾン
、ジプロピオン酸ベタメタゾン、またはモメタゾンフランカルボン酸エステルであり得る
。ステロイドおよびコルチコステロイドを合成する方法は当技術分野で周知であり、その
ような化合物も市販されており、例えば、デキサメタゾン (Cat. No. D4902,
Sigma-Aldrich; St. Louis, Mo.) およびプレドニゾン (Cat
. No. P6254, Sigma-Aldrich; St. Louis, Mo) である。
【0136】

10

20

30

コルチコステロイド、例えばデキサメタゾンは、遊離デキサメタゾンとして送達され得る。あるいは、コルチコステロイド、例えば、デキサメタゾンは、別個のLNP組成物として、または治療的導入遺伝子と同じLNP組成物の一部として、LNPによって送達され得る。

【0137】

治療用組成物

40

ある実施形態では、本発明は、本発明による、食細胞除去剤を含む治療用組成物であって、それを必要とする患者において、本発明による、導入遺伝子および薬学的に許容される担体を含む非ウイルスベクターを含む医薬組成物を使用する遺伝子療法によって治療される疾患の治療における使用のための治療用組成物に関する。

【0138】

本発明の任意の治療剤または医薬組成物は、治療用組成物を形成するために、薬学的に許容される賦形剤、および任意に、生分解性ポリマー等の徐放性マトリックスと組み合わせることができる。

【0139】

「薬学的に」または「薬学的に許容される」とは、必要に応じて、哺乳動物、特にヒト

50

に投与された場合に、有害な、アレルギー性のまたは他の有害な反応を生じない分子実体および組成物を指す。薬学的に許容される担体または賦形剤は、任意のタイプの非毒性の固体、半固体または液体フィラー、希釈剤、封入材料または製剤補助剤を指す。

【0140】

医薬組成の形態、投与経路、用量およびレジメンは、治療される状態、疾患の重症度、患者の年齢、重量および性別等に当然のように依存する。

【0141】

本発明の医薬組成物は、局所投与、経口投与、鼻腔内投与、非経口投与、眼内投与、静脈内投与、筋肉内投与または皮下投与等のために製剤化され得る。

【0142】

本発明の医薬組成物は、注射することができる製剤のために薬学的に許容されるビヒクルを含有し得る。これらは特に、等張の、無菌の、生理食塩水溶液（リン酸ナトリウムもしくはリン酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムもしくは塩化マグネシウム等、またはこれらのような塩の混合物）、または乾燥された、特に凍結乾燥された組成物であり得、これは場合に応じて、滅菌水または生理食塩水の添加により、注射用溶液の構成を可能にする。投与のために使用される用量は、様々なパラメータの関数として、特に、使用される投与様式の関数として、関連する病状の関数として、または代替的に、所望の治療期間の関数として適合させることができる。

【0143】

薬学的に許容される塩への言及は、提供される量での塩が、哺乳動物、好ましくはヒトへの投与に適していることを示す。

【0144】

さらに、他の薬学的に許容される形態としては、例えば、経口投与のための錠剤または他の固体；徐放性カプセル；および現在使用され得る任意の他の形態が挙げられる。

【0145】

本発明の医薬組成物は、さらなる治療活性剤を含み得る。

【0146】

非ウイルス送達ナノ粒子と、プロモーターに作動可能に連結される、治療用導入遺伝子を含む非ウイルスベクターとを含む医薬組成物は、任意の適切な投与量で対象に投与することができる。例えば、適切な投与量は、対象の体重1 kgあたり約0.01 mg/ml～約10 mg/mlの非ウイルスベクターであり得る。

【0147】

貪食免疫細胞マーカーを標的とする抗体は、任意の適切な用量で対象に投与することができる。例えば、適切な投与量は対象の体重1 kgあたり約0.01 mg～約5 mgであり得、この投与量はトータル1回～10回の注射にて投与される。

【0148】

抗CD115抗体は、任意の適切な投与量で対象に投与することができる。例えば、適切な投与量は、対象の体重1 kgあたり約0.01 mg～約5 mgであり得、この投与量はトータル1～10回の注射にて投与される。ある実施形態では、投与量は、約0.01 mg/kg～約0.1 mg/kg、約0.1 mg/kg～約0.2 mg/kg、約0.2 mg/kg～約0.3 mg/kg、約0.3 mg/kg～約0.4 mg/kg、約0.4 mg/kg～約0.5 mg/kg、約0.5 mg/kg～約0.6 mg/kg、約0.6 mg/kg～約0.7 mg/kg、約0.7 mg/kg～約0.8 mg/kg、約0.8 mg/kg～約0.9 mg/kg、約0.9 mg/kg～約1 mg/kg、約1 mg/kg～約1.5 mg/kg、約1.5 mg/kg～約2 mg/kg、約2 mg/kg～約2.5 mg/kg、約2.5 mg/kg～約3 mg/kg、約3 mg/kg～約3.5 mg/kg、約3.5 mg/kg～約4 mg/kg、約4 mg/kg～約4.5 mg/kg、約4.5 mg/kg～約5 mg/kgであり得る。ある実施形態では、投与量は、次の用量（mg/kg）のいずれか未満である：5、4.9、4.8、4.7、4.6、4.5、4.4、4.3、4.2、4.1、4、3.9、3.8、3.7、3.6、3.5、3

10

20

30

40

50

. 4、3、3、3、2、3、1、3、2、9、2、8、2、7、2、6、2、5、2、4
 、2、3、2、2、2、1、2、1、9、1、8、1、7、1、6、1、5、1、4、1
 . 3、1、2、1、1、1、0、9、0、8、0、7、0、6、0、5、0、4、0、3
 、0、2、0、1、0、09、0、08、0、07、0、06、0、05、0、04、0
 . 03、または0、02。ある実施形態では、投与量は、次の投与量 (mg / kg) を超
 えるものである：0、01、0、02、0、03、0、04、0、05、0、06、0、
 07、0、08、0、09、0、1、0、2、0、3、0、4、0、5、0、6、0、7
 、0、8、0、9、1、1、1、1、2、1、3、1、4、1、5、1、6、1、7、1
 . 8、1、9、2、2、1、2、2、2、3、2、4、2、5、2、6、2、7、2、8
 、2、9、3、3、1、3、2、3、3、3、4、3、5、3、6、3、7、3、8、3
 . 9、4、4、1、4、2、4、3、4、4、4、5、4、6、4、7、4、8、または
 4、9。つまり、投与量は、5、4、9、4、8、4、7、4、6、4、5、4、4、4
 . 3、4、2、4、1、4、3、9、3、8、3、7、3、6、3、5、3、4、3、3
 、3、2、3、1、3、2、9、2、8、2、7、2、6、2、5、2、4、2、3、2
 . 2、2、1、2、1、9、1、8、1、7、1、6、1、5、1、4、1、3、1、2
 、1、1、1、0、9、0、8、0、7、0、6、0、5、0、4、0、3、0、2、0
 . 1、0、09、0、08、0、07、0、06、0、05、0、04、0、03、また
 は0、02の上限、および独立して選択される、0、01、0、02、0、03、0、0
 4、0、05、0、06、0、07、0、08、0、09、0、1、0、2、0、3、0
 . 4、0、5、0、6、0、7、0、8、0、9、1、1、1、1、2、1、3、1、4
 、1、5、1、6、1、7、1、8、1、9、2、2、1、2、2、2、3、2、4、2
 . 5、2、6、2、7、2、8、2、9、3、3、1、3、2、3、3、3、4、3、5
 、3、6、3、7、3、8、3、9、4、4、1、4、2、4、3、4、4、4、5、4
 . 6、4、7、4、8、または4、9の下限を有する投与量 (mg / ml) の範囲のい
 ずれかであり得る。ここで、下限は上限未満である。

10

20

30

40

50

【0149】

抗Ly6G抗体、抗CD177抗体、抗CD14抗体、抗CD15抗体、抗CD11b
 抗体、抗CD16抗体、抗CD32抗体、抗CD33抗体、抗CD44抗体、抗CD45
 抗体、抗CD66b抗体、抗CD18抗体、または抗CD62L抗体は、任意の適切な用
 量で対象に投与することができる。例えば、適切な投与量は、対象の体重1kgあたり約
 0、01mg～約5mgであり得、投与量はトータル1～10回の注射にて投与される。
 ある実施形態では、投与量は、約0、01mg / kg～約0、1mg / kg、約0、1m
 g / kg～約0、2mg / kg、約0、2mg / kg～約0、3mg / kg、約0、3m
 g / kg～約0、4mg / kg、約0、4mg / kg～約0、5mg / kg、約0、5m
 g / kg～約0、6mg / kg、約0、6mg / kg～約0、7mg / kg、約0、7m
 g / kg～約0、8mg / kg、約0、8mg / kg～約0、9mg / kg、約0、9m
 g / kg～約1mg / kg、約1mg / kg～約1、5mg / kg、約1、5mg / kg
 ～約2mg / kg、約2mg / kg～約2、5mg / kg、約2、5mg / kg～約3m
 g / kg、約3mg / kg～約3、5mg / kg、約3、5mg / kg～約4mg / kg
 、約4mg / kg～約4、5mg / kg、約4、5mg / kg～約5mg / kgであり得
 る。ある実施形態では、投与量は、次の投与量 (mg / kg) のいずれか未満である：5
 、4、9、4、8、4、7、4、6、4、5、4、4、4、3、4、2、4、1、4、3
 . 9、3、8、3、7、3、6、3、5、3、4、3、3、3、2、3、1、3、2、9
 、2、8、2、7、2、6、2、5、2、4、2、3、2、2、2、1、2、1、9、1
 . 8、1、7、1、6、1、5、1、4、1、3、1、2、1、1、1、0、9、0、8
 、0、7、0、6、0、5、0、4、0、3、0、2、0、1、0、09、0、08、0
 . 07、0、06、0、05、0、04、0、03、または0、02。ある実施形態では
 、投与量は、次の投与量 (mg / kg) のいずれかを超えるものである：0、01、0、
 02、0、03、0、04、0、05、0、06、0、07、0、08、0、09、0、
 1、0、2、0、3、0、4、0、5、0、6、0、7、0、8、0、9、1、1、1、

1. 2、1. 3、1. 4、1. 5、1. 6、1. 7、1. 8、1. 9、2. 2. 1、2. 2. 2、2. 3. 3、2. 4. 4、2. 5. 5、2. 6. 6、2. 7. 7、2. 8. 8、2. 9. 9、3. 3. 1、3. 3. 2、3. 3. 3、3. 4. 4、3. 5. 5、3. 6. 6、3. 7. 7、3. 8. 8、3. 9. 9、4. 4. 1、4. 4. 2、4. 3. 4、4. 4. 4、4. 5. 5、4. 6. 6、4. 7. 7、4. 8. 8、または4. 9. 9。つまり、投与量は、5. 4. 9、4. 4. 8、4. 4. 7、4. 4. 6、4. 4. 5、4. 4. 4、4. 4. 3、4. 4. 2、4. 4. 1、4. 3. 9、3. 3. 8、3. 3. 7、3. 3. 6、3. 3. 5、3. 3. 4、3. 3. 3、3. 3. 2、3. 3. 1、3. 2. 9、2. 2. 8、2. 2. 7、2. 2. 6、2. 2. 5、2. 2. 4、2. 2. 3、2. 2. 2、2. 2. 1、2. 1. 9、1. 1. 8、1. 1. 7、1. 1. 6、1. 1. 5、1. 1. 4、1. 1. 3、1. 1. 2、1. 1. 1、1. 0. 9、0. 0. 8、0. 0. 7、0. 0. 6、0. 0. 5、0. 0. 4、0. 0. 3、0. 0. 2、0. 0. 1、0. 0. 09、0. 0. 08、0. 0. 07、0. 0. 06、0. 0. 05、0. 0. 04、0. 0. 03、または0. 0. 02の上限、および独立して選択される、0. 0. 01、0. 0. 02、0. 0. 03、0. 0. 04、0. 0. 05、0. 0. 06、0. 0. 07、0. 0. 08、0. 0. 09、0. 1. 1、0. 2. 2、0. 3. 3、0. 4. 4、0. 5. 5、0. 6. 6、0. 7. 7、0. 8. 8、0. 9. 9、1. 1. 1、1. 1. 2、1. 1. 3、1. 1. 4、1. 1. 5、1. 1. 6、1. 1. 7、1. 1. 8、1. 1. 9、2. 2. 1、2. 2. 2、2. 2. 3、2. 2. 4、2. 2. 5、2. 2. 6、2. 2. 7、2. 2. 8、2. 2. 9、3. 3. 1、3. 3. 2、3. 3. 3、3. 3. 4、3. 3. 5、3. 3. 6、3. 3. 7、3. 3. 8、3. 3. 9、4. 4. 1、4. 4. 2、4. 4. 3、4. 4. 4、4. 4. 5、4. 4. 6、4. 4. 7、4. 4. 8、または4. 4. 9の下限を有する投与量 (mg/ml) の範囲のいずれかであり得る。ここで、下限は上限未満である。

10

【0150】

貪食免疫細胞マーカーを標的とする低分子阻害剤は、任意の適切な投与量で目標に投与され得る。例えば、適切な投与量は、対象の体重1kgあたり約0.1mg～約15mgであり得る。ある実施形態では、投与量は、約0.1mg/kg～約1mg/kg、約1mg/kg～約2mg/kg、約2mg/kg～約3mg/kg、約3mg/kg～約4mg/kg、約4mg/kg～約5mg/kg、約5mg/kg～約6mg/kg、約6mg/kg～約7mg/kg、約7mg/kg～約8mg/kg、約8mg/kg～約9mg/kg、約9mg/kg～約10mg/kg、約10mg/kg～約11mg/kg、約11mg/kg～約12mg/kg、約12mg/kg～約13mg/kg、約13mg/kg～約14mg/kg、約14mg/kg～約15mg/kgであり得る。ある実施形態では、投与量が約以下の投与量 (mg/kg) のいずれか未満である：15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、または0.2。ある実施形態では、投与量は、次の投与量 (mg/kg) のいずれかを超えるである：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、または15。つまり、投与量は、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、または0.2の上限、および独立して選択される、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、または15の下限を有する投与量 (mg/ml) の範囲のいずれかであり得る。ここで、下限は上限未満である。

20

30

【0151】

ペキシダルチニブ等のCD115インヒビターは、任意の適切な投与量で対象に投与することができる。例えば、適切な投与量は、対象の体重1gあたり約0.1mg/kg～約15mg/kgであり得る。ある実施形態では、投与量は、約0.1mg/kg～約1mg/kg、約1mg/kg～約2mg/kg、約2mg/kg～約3mg/kg、約3mg/kg～約4mg/kg、約4mg/kg～約5mg/kg、約5mg/kg～約6mg/kg、約6mg/kg～約7mg/kg、約7mg/kg～約8mg/kg、約8mg/kg～約9mg/kg、約9mg/kg～約10mg/kg、約10mg/kg～約11mg/kg、約11mg/kg～約12mg/kg、約12mg/kg～約13mg/kg、約13mg/kg～約14mg/kg、約14mg/kg～約15mg/kgであり得る。ある実施形態では、用量は、次の投与量 (mg/kg) のいずれか未満である：15、1

40

50

4、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、または0.2。ある実施形態では、投与量は、次の投与量（mg/kg単位）のいずれかを超えるものであり得る：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、または15。つまり、投与量は、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、または0.2の上限、および独立して選択される、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、または15の下限を有する投与量（mg/ml）の範囲のいずれかであり得る。ここで、下限は上限未満である。

10

【0152】

ビスホスホネート、例えばクロドロン酸は、任意の適切な投与量で対象に投与することができる。例えば、適切な投与量は、対象の体重1kgあたり約0.1mg～約15mgであり得る。ある実施形態では、投与量は、約0.1mg/kg～約1mg/kg、約1mg/kg～約2mg/kg、約2mg/kg～約3mg/kg、約3mg/kg～約4mg/kg、約4mg/kg～約5mg/kg、約5mg/kg～約6mg/kg、約6mg/kg～約7mg/kg、約7mg/kg～約8mg/kg、約8mg/kg～約9mg/kg、約9mg/kg～約10mg/kg、約10mg/kg～約11mg/kg、約11mg/kg～約12mg/kg、約12mg/kg～約13mg/kg、約13mg/kg～約14mg/kg、約14mg/kg～約15mg/kgであり得る。ある実施形態では、投与量は、次の投与量（mg/kg）のいずれか未満である：15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、または0.2。ある実施形態では、投与量は、次の投与量（mg/kg）のいずれかを超えるものである：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、または15。つまり、投与量は、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、または0.2の上限、および独立して選択される、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、または15の下限を有する投与量（mg/ml）の範囲のいずれかであり得る。ここで、下限は上限未満である。

20

30

【0153】

コルチコステロイド、例えばデキサメタゾン、任意の適切な投与量で対象に投与することができる。例えば、適切な投与量は、対象の体重1kgあたり約0.1mg～約15mgであり得る。ある実施形態では、投与量は、約0.1mg/kg～約1mg/kg、約1mg/kg～約2mg/kg、約2mg/kg～約3mg/kg、約3mg/kg～約4mg/kg、約4mg/kg～約5mg/kg、約5mg/kg～約6mg/kg、約6mg/kg～約7mg/kg、約7mg/kg～約8mg/kg、約8mg/kg～約9mg/kg、約9mg/kg～約10mg/kg、約10mg/kg～約11mg/kg、約11mg/kg～約12mg/kg、約12mg/kg～約13mg/kg、約13mg/kg～約14mg/kg、約14mg/kg～約15mg/kgであり得る。ある実施形態では、投与量は、次の投与量（mg/kg）のいずれか未満である：15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、または0.2。ある実施形態では、投与量は、次の投与量（mg/kg）のいずれかを超えるものである：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、または15。つまり、投与量は、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、または0.2の上限、および独立して選択される、0.1

40

50

、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、または15の下限を有する投与量 (mg/ml) の範囲のいずれかであり得る。ここで、下限は上限未満である。

【0154】

方法

ある実施形態では、本発明は、(a) 単球および／またはマクロファージ除去剤を対象に投与すること；ならびに (b) 導入遺伝子を含む非ウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を対象に投与することを含む、導入遺伝子を、それを必要とする対象に送達する方法に関する。

【0155】

本明細書で使用される場合、用語「非ウイルスベクターを使用する遺伝子治療によって治療される疾患」は、ポリヌクレオチド（少なくとも1つのポリペプチドまたはインヒビター核酸をコードする）が前記疾患を治療（遺伝子治療）するための薬物として患者の細胞に送達される疾患を意味する。

【0156】

ある実施形態では、ベクターは、疾患を治療するのに有用な少なくとも1つの特異的ポリペプチドまたはインヒビター核酸をコードする。ある実施形態では、ベクターは、疾患を治療するのに適した治療用ポリヌクレオチドをコードする／含む。

【0157】

ある実施形態では、ベクターは、遺伝子治療を使用して疾患を治療するのに適した治療用ポリヌクレオチドをコードする／含む。

【0158】

本明細書で使用される場合、「患者」および「対象」という語は、互換的に、動物、典型的には、げっ歯類、ネコ、イヌ、および霊長類等の哺乳動物を指す。本発明による対象または患者は、特にヒトである。

【0159】

本明細書で使用される場合、用語「治療」または「治療する」は、遺伝子療法のような予防的または予防的治療、ならびに治療的治療または疾患修飾療法の両方を指し、これらは、疾患に罹患するリスクがあるか、または疾患に罹患していると疑われる対象、ならびに罹患しているか、または疾患または医学的状态に罹患していると診断された対象の治療を含み、臨床的再発の抑制を含む。治療は、医学的障害を有するか、または障害を最終的に得る可能性のある対象に、障害または再発性障害の1以上の症状を予防、治療、発症の遅延、重症度の低減、または改善するために、またはそのような治療の非存在下で予想される生存率を超えて対象の生存率を延長するために、施され得る。

【0160】

本明細書に別段の指示がない限り、本発明による方法は任意の適切な順序で実施することができる。ある実施形態では、この方法は、まず (a) 食細胞除去剤を対象に投与し、次いで (b) 導入遺伝子を含む非ウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を対象に投与することを含み得る。ある実施形態では、(b) 導入遺伝子を含む非ウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を対象に投与することは、(a) 食細胞除去剤を対象に投与した後約1分～約1年の間に実施される。ある実施形態において、(a) 食細胞除去剤を対象に投与すること、および (b) 導入遺伝子を含む非ウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を対象に投与することは、ほぼ同時に行われる。

【0161】

ある実施形態では、この方法は、まず (a) 導入遺伝子を含む非ウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を対象に投与し、次いで (b) 食細胞除去剤を対象に投与することを含み得る。ある実施形態では、(b) 食細胞除去剤を対象に投与することは、(a) 導入遺伝子を含む非ウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を対象に投与した後約1分～約1年の間に行われる。ある実施形態では

10

20

30

40

50

、（a）導入遺伝子を含む非ウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を対象に投与すること、および（b）食細胞除去剤を対象に投与することは、ほぼ同時に行われる。

【0162】

ある実施形態では、食細胞除去剤は、導入遺伝子およびを含む非ウイルスベクター薬学的に許容される担体が投与される約1分～約1時間前、約1分～2時間前、約1分～3時間前、または約1分～4時間前に投与される。

【0163】

ある実施形態では、導入遺伝子を含む非ウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体は、食細胞除去剤が投与される約1分～約1時間前、約1分～2時間前、約1分～3時間前、または約1分～4時間前に投与される。

10

【0164】

ある実施形態では、食細胞除去剤は、非ウイルスベクターが投与される少なくとも1日前に投与され、場合により、非ウイルスベクターが投与される少なくとも1年前に投与され、例えば、非ウイルスベクターが投与される少なくとも52週間前、51週間前、50週間前、49週間前、48週間前、47週間前、46週間前、45週間前、44週間前、43週間前、42週間前、41週間前、40週間前、39週間前、38週間前、37週間前、36週間前、35週間前、34週間前、33週間前、32週間前、31週間前、30週間前、29週間前、28週間前、27週間前、26週間前、25週間前、24週間前、23週間前、22週間前、21週間前、20週間前、19週間前、18週間前、17週間前、16週間前、15週間前、14週間前、13週間前、12週間前、11週間前、10週間前、9週間前、8週間前、7週間前、6週間前、5週間前、4週間前、3週間前、2週間前、1週間前、6日前、5日前、4日前、3日前、または2日前に投与される。

20

【0165】

ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターは、任意の回数、対象に投与することができる。例えば、ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターは、対象に1回、2～15回投与することができる。ある実施形態では、非ウイルスベクターは、複数回、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10回投与される。時間の間の間隔は、例えば、1時間、6時間、24時間、1～7日、または2～10週間毎に、またはそれらの組み合わせに変化し得る。

30

【0166】

ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターは、連日、または隔日などの規則的な基準で、または不規則な基準で、任意の期間、対象に投与することができる。ある実施形態では、ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターは、免疫細胞モジュレーターの投与の約1～52週間後に投与される。

【0167】

食細胞除去剤は、任意の回数、対象に投与することができる。例えば、食細胞除去剤は、ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターの各投与につき、1回、2～5回、2～10回、2～15回、対象に投与することができる。

40

【0168】

抗CD115抗体は、任意の回数、対象に投与することができる。例えば、抗CD115抗体は、ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターの各投与につき、1回、2～5回、2～10回、2～15回、対象に投与することができる。

【0169】

抗CD115抗体は、連日、または隔日等の定期的な基準で、または不規則な基準で、任意の期間、対象に投与することができる。ある実施形態では、抗CD115抗体は、非ウイルスベクターの投与の約1～52週間前に投与される。

【0170】

低分子CD115阻害剤は、任意の回数、対象に投与することができる。例えば、低分

50

子CD115阻害剤は、ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターの各投与につき、1回、2～5回、2～10回、2～15回、対象に投与することができる。

【0171】

低分子CD115阻害剤は、連日、または隔日等の定期的な基準で、または不規則な基準で、任意の期間、対象に投与することができる。ある実施形態では、低分子CD115阻害剤は、非ウイルスベクターの投与の約1～52週間前に投与される。

【0172】

抗Ly6G抗体、抗CD177抗体、抗CD14抗体、抗CD15抗体、抗CD11b抗体、抗CD16抗体、抗CD32抗体、抗CD33抗体、抗CD44抗体、抗CD45抗体、抗CD66b抗体、抗CD18抗体、または抗CD62L抗体は、任意の回数、対象に投与することができる。例えば、抗Ly6G抗体、抗CD177抗体、抗CD14抗体、抗CD15抗体、抗CD11b抗体、抗CD16抗体、抗CD32抗体、抗CD33抗体、抗CD44抗体、抗CD45抗体、抗CD66b抗体、抗CD18抗体、または抗CD62L抗体は、ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターの各投与につき、1回、2～5回、2～10回、2～15回、対象に投与することができる。

【0173】

抗Ly6G抗体、抗CD177抗体、抗CD14抗体、抗CD15抗体、抗CD11b抗体、抗CD16抗体、抗CD32抗体、抗CD33抗体、抗CD44抗体、抗CD45抗体、抗CD66b抗体、抗CD18抗体、または抗CD62L抗体は、連日、または隔日等の定期的な基準で、または不規則な基準で、任意の期間、対象に投与することができる。ある実施形態では、抗Ly6G抗体、抗CD177抗体、抗CD14抗体、抗CD15抗体、抗CD11b抗体、抗CD16抗体、抗CD32抗体、抗CD33抗体、抗CD44抗体、抗CD45抗体、抗CD66b抗体、抗CD18抗体、または抗CD62L抗体は、非ウイルスベクターの投与の約1～52週間前に投与される。

【0174】

ビスホスホネート、例えばクロドロン酸は、任意の回数、対象に投与することができる。例えば、ビスホスホネート、例えばクロドロン酸は、ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターの各投与につき、1回、2～5回、2～10回、2～15回、対象に投与することができる。

【0175】

ビスホスホネート、例えばクロドロン酸は、連日、または隔日等の定期的な基準で、または不規則な基準で、任意の期間、対象に投与することができる。ある実施形態では、ビスホスホネート、例えばクロドロン酸は、非ウイルスベクターの投与の約1～52週間前に投与される。

【0176】

コルチコステロイド、例えばデキサメタゾン、任意の回数、対象に投与することができる。例えば、コルチコステロイド、例えばデキサメタゾンは、ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターの各投与につき、1回、2～5回、2～10回、2～15回、対象に投与することができる。

【0177】

コルチコステロイド、例えばデキサメタゾンは、連日、または隔日等の定期的な基準で、または不規則な基準で、任意の期間、対象に投与することができる。ある実施形態では、コルチコステロイド、例えばデキサメタゾンは、非ウイルスベクターの投与の約1～52週間前に投与される。

【0178】

ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターは、単独で、または組み合わせて投与することができる。ある実施形態では、非ウイルスベクターは、少なくとも1つの免疫細胞モジュレーター、例えば食細胞除去剤、ビスホスホネート；および／または免疫抑制剤とは別に対象に投与される。ある実施形態では、非ウイルスベクターは、少なくとも1つの免疫細胞モジュレーター、例えば食細胞除去剤、ビスホスホネート、および／または

10

20

30

40

50

免疫抑制剤と組み合わせて対象に投与される。ある実施形態では、ビスホスホネートおよび／または免疫抑制剤は、非ウイルス送達粒子内に含まれ、例えば、非ウイルスベクターとともに、脂質ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、タンパク質ベースのナノ粒子、またはペプチドケージ内に封入される。

【0179】

ある実施形態では、少なくとも1つの免疫細胞モジュレーター、例えば食細胞除去剤、ビスホスホネート、および／または免疫抑制剤の混合物は、1回または複数回、対象に投与される。ある実施形態では、2つ以上の免疫細胞モジュレーターは、1回または複数回、対象に投与される。

【0180】

ある実施形態では、少なくとも1つの免疫細胞モジュレーターの対象への投与は、対象の治療に有効であることが必要とされるヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターの投与量を低減させる。ある実施形態では、少なくとも1つの免疫細胞モジュレーターの対象への投与は、ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターの増加した投与量での投与を可能にする。

【0181】

投与量は、様々であり得、治療が向けられる疾患のタイプ、発症、進行、重症度、頻度、期間、または確率、所望の臨床的エンドポイント、以前のもしくは同時の治療、対象の一般的な健康、年齢、性別、人種または免疫学的能力、および当業者によって理解される他の因子に依存する。投与量、回数、頻度、または期間は、治療または療法の任意の有害な副作用、合併症、または他の危険因子、および対象の状態によって示されるように、比例的に増加または減少させることができる。当業者は、治療的または予防的利益を提供するのに十分な量を提供するために必要とされる投与量およびタイミングに影響を及ぼし得るファクターを理解するだろう。

【0182】

治療効果を達成するための投与量、例えば、体重1キログラムあたりのdsDNA (mg/kg)での投与量は、投与経路、治療効果を達成するのに必要なヘテロポリヌクレオチド発現のレベル、治療される特定の疾患、非ウイルスベクターに対する任意の宿主免疫応答、ヘテロポリヌクレオチドまたは発現産物に対する任意の宿主免疫応答、および発現されるタンパク質、ペプチド、または核酸の安定性を含むが、これらに限定されない、いくつかの因子に基づいて変動し得る。当業者は、前述の因子ならびに他の因子に基づいて、特定の疾患または障害を有する患者を治療するための非ウイルスベクターゲノム投与量範囲を決定することができる。

【0183】

「有効量」または「十分量」は、単回または複数回の投与量で、単独でまたは1つもしくは複数の他の組成物、処置、プロトコール、もしくは治療レジメンと組み合わせて、任意の期間（長期または短期）の検出可能な応答、任意の測定可能または検出可能な程度の対象における予測されるまたは所望の結果、または任意の期間（例えば、数分間、数時間、数日、数ヶ月、数年、または治療される）の利益を提供する量を指す。疾患の進行または悪化を減少させる、低減させる、阻害する、抑制する、制限する、または制御することは満足 of いく結果であるが、処置のための「有効量」または「十分量」の投与量（例えば、治療上の利益または改善を改善または提供するための）は、典型的には疾患の1つ、複数、またはすべての有害な症状、結果または合併症、例えば、疾患によって引き起こされるか、または疾患に関連する1つ以上の有害な症状、障害、疾患、病状、または合併症に対する応答を測定可能な程度に提供するのに有効である。

【0184】

ある実施形態では、本発明の方法は、治療的に有効な非ウイルス遺伝子療法を、それを必要とする対象において生み出し、ここで、治療的に有効な非ウイルス遺伝子療法は、治療用タンパク質もしくは核酸の発現、および／または、非ウイルスベクターによって誘導される望ましくない免疫応答を、最小化で有するか、もしくは有しないことによって特徴

10

20

30

40

50

付けられる。

【0185】

ある実施形態では、「治療用タンパク質または核酸の発現」は、本明細書で述べられるように、治療効果をもたらすのに十分なレベルのタンパク質または核酸を指す。

【0186】

ある実施形態では、本発明による方法は、対象における導入遺伝子の発現をもたらす。

【0187】

ある実施形態では、本発明による方法は、治療的に有効なレベルで治療用タンパク質の発現または活性をもたらすことができる。

【0188】

ある実施形態では、本発明による方法は、ヘテロタンパク質の通常の発現の少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%のレベルで、治療用タンパク質の発現または活性をもたらし得る。

【0189】

ある実施形態では、本発明による方法は、治療用核酸によって標的化されるタンパク質の発現または活性の低下をもたらし得る。

【0190】

ある実施形態では、本発明による方法は、標的タンパク質の正常な発現の少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%まで、治療用核酸によって標的化されるタンパク質の発現または活性の低下をもたらし得る。

【0191】

分析され得る対象由来の生物学的サンプルの非限定的な例としては、全血、血清、血漿等、およびこれらの組み合わせが挙げられる。生物学的サンプルは、細胞を除いたものであってよく、または細胞（例えば、赤血球、血小板および/またはリンパ球）を含むものであってもよい。

【0192】

本開示に照らして、当業者に公知の治療用タンパク質または核酸の発現を測定するための任意の適切な方法を、本発明において使用することができる。生物学的サンプル中のヘテロタンパク質または核酸発現レベルを分析および測定するための例示的な方法としては、例えば、ELISAが挙げられる。

【0193】

本明細書で使用される場合、「免疫応答」という用語は、対象の免疫系による応答を指す。例えば、免疫応答には、T_H1受容体活性化、リンホカイン（例えば、サイトカイン（例えば、T_H1型またはT_H2型サイトカイン）またはケモカイン）発現および/または分泌、マクロファージ活性化、樹状細胞活性化、T細胞（例えば、CD4+またはCD8+ T細胞）活性化、NK細胞活性化、および/またはB細胞活性化（例えば、抗体の産生および/または分泌）の検出可能な変化（例えば増加）が含まれるが、これらに限定されない。免疫応答のさらなる例としては、MHC分子への免疫原（例えば抗原（例えば免疫原性ポリペプチド））の結合、および細胞傷害性Tリンパ球（「CTL」）応答の誘導、B細胞反応（例えば抗体産生）の誘導、および/またはTヘルパーリンパ球応答、および/または免疫原性ポリペプチドが由来する抗原に対する遅延型過敏（DTH）反応、免疫系の細胞（例えば、T細胞、B細胞（例えば、任意の発達段階（例えば形質細胞）

10

20

30

40

50

))の拡大(例えば、細胞の集団の増殖)、ならびに抗原提示細胞による抗原のプロセッシングおよび提示の増加が挙げられる。免疫応答は、対象の免疫系が外因性として認識する免疫原(例えば、微生物(例えば病原体)由来の非自己抗原、または外因性として認識される自己抗原)に対するものであり得る。よって、本明細書で使用される場合、「免疫応答」には、任意のタイプの免疫応答を指し、これには自然免疫応答(例えば、T_H1受容体シグナル伝達カスケードの活性化)細胞性免疫応答(例えば、T細胞(例えば抗原特異的T細胞)および免疫系の非特異的細胞によって媒介される応答)および体液性免疫応答(例えば、B細胞によって媒介される応答(例えば、血漿、リンパ、および/または組織液中への抗体の生成および分泌を介する)が含まれるが、これらに限定されない。「免疫応答」という語は、抗原および/または免疫原に応答する対象の免疫系の能力のすべての態様を包含することを意味する。

10

【0194】

本明細書で使用される場合、非ウイルスベクターによって誘導される「望ましくない免疫応答を、最小限で有するか、または有しない」とは、ヒト対象内の安全なまたは治療的に許容される免疫応答を指す。ベクターによって誘導される望ましくない免疫応答は、非ウイルスベクターによってコードされる抗原によって誘導される、対象における望ましい免疫応答とは異なる。

【0195】

ある実施形態では、安全なまたは治療的に許容される免疫応答は、ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターの投与に伴う対象におけるサイトカイン放出レベルに関する。

20

【0196】

ある実施形態では、本明細書に記載の方法は、対象において起こり得る毒性サイトカイン放出または「サイトカイン放出症候群」(CRS)または「重度サイトカイン放出症候群」(sCRS)または「サイトカインストーム」の発生率を低下させる。

【0197】

当業者は、毒性サイトカイン放出または毒性サイトカインレベルを減少させることが、対象における毒性サイトカインレベルの産生を減少または阻害すること、または対象におけるサイトカイン放出症候群またはサイトカインストームの発生を阻害または低減することを含むことを理解するだろう。ある実施形態では、毒性サイトカインは、炎症誘発性サイトカインを含む。ある実施形態では、炎症誘発性サイトカインは、IL-6、IFN- γ 、IL-1 β 、もしくはTNF- α 、またはこれらの任意の組み合わせを含む。

30

【0198】

ある実施形態では、サイトカイン放出症候群は、低血圧、高熱および震え等の、対象におけるいくつかの炎症性サイトカインおよび有害な身体反応のレベルの上昇を特徴とする。ある実施形態では、CRSは、IL-6、IFN- γ 、IL-1 β 、もしくはTNF- α 、またはこれらの任意の組み合わせのレベルの上昇を特徴とする。

【0199】

ある実施形態では、サイトカインストームの指標としてのサイトカインレベルまたは濃度の測定は、サイトカインレベルまたは濃度の増加倍率、パーセント(%)増加、正味の増加または変化率として表すことができる。ある実施形態では、特定のレベルまたは濃度を超える絶対サイトカインレベルまたは濃度は、サイトカインストームを経験しているまたは経験しかかっている対象の指標であり得る。ある実施形態では、特定のレベルまたは濃度、例えば、非ウイルス遺伝子治療を受けていないコントロール対象において通常見られるレベルまたは濃度での絶対サイトカインレベルまたは濃度は、非ウイルス遺伝子治療を受けている対象におけるサイトカインストームの発生を阻害または低減するための方法の指標であり得る。

40

【0200】

当業者は、「サイトカインレベル」という用語が、濃度の測定、倍率変化の測定、パーセント(%)変化の測定、または割合変化の測定を包含し得ることを理解するだろう。さ

50

らに、血液、唾液、血清、尿、および血漿中のサイトカインを測定するための方法は、当技術分野において周知である。

【0201】

ある実施形態では、サイトカインストームはいくつかの炎症性サイトカインの上昇と関連するという認識にもかかわらず、 $\text{INF-}\gamma$ レベルは、サイトカインストームの一般的な基準として、かつ／またはサイトカインストームの治療の有効性の一般的な基準として使用され得る。ある実施形態では、サイトカインストームはいくつかの炎症性サイトカインの上昇と関連するという認識にもかかわらず、 IL-6 レベルは、サイトカインストームの一般的な基準として、かつ／またはサイトカインストームの治療の有効性の一般的な基準として使用され得る。当業者は、他のサイトカイン、例えば、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\alpha$ 、 IL-8 、または IL-13 はサイトカインストームのマーカーとして使用され得ることを理解するだろう。

10

【0202】

対象におけるサイトカインのレベルは、ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターの投与の前および／または後に分析、測定または決定することができる。対象におけるサイトカインのレベルはまた、免疫細胞モジュレーターの投与の前および／または後に分析、測定または決定することができる。対象におけるサイトカインのレベルはまた、ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターの投与の前および／または後、ならびに免疫細胞モジュレーターの投与の前および／または後に、複数回分析または測定することができる。

20

【0203】

本開示に照らして、当業者に公知のサイトカインのレベルを測定するための任意の適切な方法を本発明において使用することができる。生物学的サンプル中のサイトカインレベルを分析および測定するための例示的な方法としては、例えば、メソスケールデリバリープラットフォーム (MSD) が挙げられる。

【0204】

有効量または十分量は、単回投与で提供することができるが、必須ではなく、複数回投与を必要とすることができ、単独で、または別の組成物 (例えば薬剤)、処置、プロトコールもしくは治療レジメンと組み合わせて投与することができるが、そうである必要はない。例えば、量は、対象の必要性、治療される疾患の種類、状態および重症度、または治療の副作用 (ある場合) によって示されるように、比例的に増加させることができる。加えて、第2の組成物 (例えば、別の薬物または薬剤) を伴わずに単回または複数回用量で与えられる場合、そのような投与量より多く、およびそれを超える追加の投与量、量または持続時間、または追加の組成物 (例えば、薬物または薬剤)、処置、プロトコールまたは治療レジメンが、所与の対象において有効または十分であると考えられるために含まれるので、有効量または十分な量は、有効または十分である必要はない。有効であると考えられる量はまた、リソソーム蓄積症 (例えばポンペ病) の処置のための組換えGAAの投与、または凝固障害 (例えば、血友病A (HemA) もしくは血友病B (HemB)) の処置のための組換え凝固因子タンパク質 (例えば、FVIIIIもしくはFIX) の投与等の、別の処置、治療レジメンまたはプロトコールの使用の低減をもたらす量を含む。

30

40

【0205】

ポンペ病については、有効量は、例えば、グリコーゲン産生もしくは蓄積を阻害もしくは減少させる、グリコーゲン分解もしくは除去を増強もしくは増加させる、対象の身体の組織におけるリソソーム改変を減少させる、または対象における筋緊張および／もしくは筋力および／もしくは呼吸機能を改善する量のGAAであろう。有効量は、例えば、血漿からの筋芽細胞によるGAA取り込みの動態を確認することによって決定することができる。約141~147 nMの筋芽細胞GAA取り込み速度 (K取り込み) が有効であるように見える (例えば、Maga et al., J. Biol. Chem. 2012を参照) 動物モデルにおいて、約1,000 nmol/hr/mLを超える、例えば、約1,000~約2,000 nmol/hr/mLの血漿中のGAA活性レベルは、治療的に有効であることが観察さ

50

れている。

【0206】

HemAおよびHemBについては、一般的に言えば、治療効果を達成するには、重度の疾患表現型を中程度のものに変化させるために、正常な個体において見出される因子濃度の1%を超える血液凝固因子濃度が必要とされることが考えられる。重度の表現型は、関節損傷および生命を脅かす出血を特徴とする。中等度の疾患表現型を軽度の疾患表現型に変換するためには、正常の5%を超える血液凝固因子濃度が必要であると考えられる。

【0207】

正常ヒトにおけるFVIIおよびFIXレベルは約150~200 ng/mL血漿であるが、例えば、活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)一段凝固アッセイによって決定される機能的凝固に起因して、より少ない(例えば、約100~150 ng/mLの範囲)またはより多い(例えば、約200~300 ng/mLの範囲)ものであり得、依然として正常であるとみなされ得る。したがって、対象/ヒトにおけるFVIIまたはFIXの総量が、正常な対象/ヒトに存在するFVIIまたはFIXの1%超、例えば100~300 ng/mLの1%となるように、治療効果を達成することができる。

【0208】

組成物は、組み合わせ組成物として対象に投与することができ、またはヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターの送達もしくは投与の同時もしくは一連のもしくは連続的(前もしくは後)等、別々に投与することができる。本発明は、本発明の方法または使用が、本明細書に記載されている、または当業者に知られている任意の化合物、薬剤、薬物、治療レジメン、治療プロトコル、プロセス、治療薬または組成物との組合せである組合せを提供する。化合物、薬剤、薬物、治療レジメン、治療プロトコル、プロセス、治療薬または組成物は、ヘテロポリヌクレオチドを含む非ウイルスベクターを対象に投与する前、投与と実質的に同時に、または投与後に投与または実施することができる。

【0209】

したがって、本発明は、別の化合物、薬剤、薬物、治療レジメン、治療プロトコル、プロセス、または治療薬の必要性または使用の低減をもたらす方法および使用を含む。例えば、血液凝固疾患について、本発明による治療方法は、所与の対象において、対象において欠損したまたは欠陥(異常または変異)の内因性凝固因子を補うための組換え凝固因子タンパク質の用量のより少ない頻度または低減された用量または排除である場合、治療的利益を有する。別の例では、ポンペ病等のリソソーム蓄積症の場合、GAAを含む組換えウイルスベクターの投与頻度が低いか、または減少した用量が以前に投与された場合であっても、または対象に投与され続けても、本発明による治療方法は治療上の利益を有する。したがって、別の治療または療法の必要性または使用を低減することが、本発明に含まれる。

【0210】

有効量または十分量は、処置される各対象および全ての対象において有効である必要はなく、また、所定の群または集団において処置される対象の大多数において有効である必要もない。有効量または十分量は、群または一般集団ではなく、特定の対象における有効性または十分性を意味する。そのような方法に典型的であるように、一部の対象は、所与の治療方法または使用に対して、より大きな反応を示すか、またはほとんどもしくは全く反応を示さない。

【0211】

「改善する」という語は、対象の疾患もしくはその症状の、または根底にある細胞反応の検出可能なまたは測定可能な改善を意味する。検出可能なまたは測定可能な改善には、疾患の発生、頻度、重症度、進行、もしくは持続における主観的なもしくは客観的な低減、減少、阻害、抑制、限定、もしくは制御、または疾患によって引き起こされるもしくは疾患に関連する合併症、または疾患の症状もしくは根本的原因もしくは結果の改善、または疾患の回復が含まれる。ポンペについては、有効量は、例えば、グリコーゲン産生または蓄積を阻害または低減し、グリコーゲン分解または除去を増加または増強させ、筋緊張お

10

20

30

40

50

よび／または筋力および／または呼吸機能を改善する量であろう。Hem AまたはHem Bについては、有効量は、例えば、対象における急性出血エピソードの頻度または重症度を低減する量、または例えば、凝固アッセイによって測定される凝固時間を低減させる量であろう。

【0212】

したがって、本発明の医薬組成物は、意図される治療目的を達成するのに有効な量で活性成分が含まれる組成物を含む。治療上有効な用量を決定することは、当技術分野で公知の技術およびガイダンスを使用し、本明細書に提供される教示を使用すると、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0213】

治療的用量は、他の因子の中でも、対象の年齢および全身状態、異常な表現型の重症度、ならびに発現レベルを調節する制御配列の強度に依存する。したがって、ヒトにおける治療の有効量は、ベクターに基づく治療に対する個々の患者の応答に基づいて医師によって決定され得る比較的広い範囲に入る。

【0214】

医薬組成等の組成物は、導入遺伝子発現および場合によりコードされたタンパク質の産生を可能にするように、対象に送達することができる。ある実施形態では、対象が治療の有効量の治療用タンパク質または核酸を産生することを可能にするのに十分な遺伝物質を含む医薬組成物。

【0215】

ある実施形態では、対象における治療効果は、所望の期間持続される。したがって、ある実施形態では、非ウイルスベクターは、治療効果を提供する。

【0216】

組成物は、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、および水を含むが、これらに限定されない、任意の無菌の生体適合性医薬担体で投与することができる。組成物は、単独で、または投薬量、投与頻度および／または治療効果に影響を及ぼす他の薬剤と組み合わせ、患者に投与することができる。

【0217】

本発明の方法および使用は、全身的、局所的もしくは局所的に、または任意の経路、例えば、注射もしくは注入による送達および投与を含む。in vivoでの組成物の送達は、一般に、従来のシリンジを用いた注射によって達成され得るが、対流増強送達等の他の送達方法も想定される（例えば、米国特許第5,720,720号を参照）。例えば、組成物は、皮下、表皮、皮内、髄腔内、眼窩内、粘膜内、腹腔内（IP）、静脈内（IV）、胸膜内、動脈内、経口、肝内、門脈を介して、または筋肉内に、送達することができる。他の投与様式には、経口投与および肺投与、坐剤、および経皮適用が含まれる。患者の治療を専門とする臨床医は、患者の条件および治療の目的を含むがこれらに限定されない多くの基準に基づいて、組成物の投与のための最適な経路を決定することができる。

【0218】

化合物、薬剤、薬物、治療または他の治療レジメンもしくはプロトコールは、組み合わせ組成物として投与することができ、または非ウイルスベクターの送達もしくは投与の同時のもしくは一連のもしくは連続的（前にもしくは後に）等、別々に投与することができる。したがって、本発明は、本発明による治療方法が、本明細書に記載されているかまたは当業者に知られている任意の化合物、薬剤、薬物、治療レジメン、治療プロトコール、プロセス、治療薬または組成物との組合せである組合せを提供する。化合物、薬剤、薬物、治療レジメン、治療プロトコール、プロセス、治療薬または組成物は、本発明による患者への非ウイルスベクターの投与の前に、実質的に同時に、または後に投与または実施することができる。

【0219】

本発明による方法は、機能の喪失および獲得ならびに機能の遺伝的欠損の両方に適用可能である。本明細書で使用される、遺伝子欠損に関する「機能喪失」という語は、該遺伝

10

20

30

40

50

子によってコードされるタンパク質（すなわち変異タンパク質）が、野生型タンパク質と通常関連する機能の部分的または完全な喪失のいずれかを示す、遺伝子における任意の変異を指す。本明細書で使用される、遺伝的欠陥に関する「機能の獲得」という語は、該遺伝子によってコードされるタンパク質（すなわち変異タンパク質）がタンパク質（すなわち野生型タンパク質）と通常は関連しない機能を獲得する、遺伝子における任意の変異を指し、疾患または障害を引き起こすか、またはこれらに寄与する。機能獲得変異は、コードされるタンパク質の機能の変化を生じさせる、遺伝子中の1以上のヌクレオチドの欠失、付加、または置換であり得る。ある実施形態では、機能獲得変異は、変異タンパク質の機能を変えるか、または他のタンパク質との相互作用を引き起こす。ある実施形態では、機能獲得変異は、例えば、改変された変異タンパク質と正常な野生型タンパク質との相互作用によって、前記正常な野生型タンパク質の減少または除去を引き起こす。

10

【0220】

本発明による方法によって治療することができる疾患および障害には、例えば、肺疾患（例えば、嚢胞性線維症）、出血性障害（例えば、インヒビターを伴うまたは伴わない血友病Aまたは血友病B）、サラセミア、血液障害（例えば貧血）、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、てんかん、リソソーム蓄積症（例えば、アスパルチルグルコサミン尿症、バッテン病、乳児期遅発型神経セロイドリポフスチン症2型（CLN2）、シスチン症、ファブリー病、ゴーシェ病I型、II型、およびIII型、グリコーゲン蓄積症II型（ポンペ病）、GM2ガングリオシドーシスII型（テイサックス病）、GM2ガングリオシドーシスII型（サンドホフ病）、ムコリピドーシスII型（シアリドーシスII型およびIII型）、II型（アイセル病）、III型（偽ハーラー病）およびIV型、ムコ多糖類蓄積症（ハーラー病および変異型、ハンター症候群、サンフィリポ型A、B、C、D、モルキオ型AおよびB、マロトー・ラミー症候群およびスライ症候群）、ニーマン・ピック病A/B型、C1型およびC2型、およびシンドラー病I型およびII型）、遺伝性血管浮腫（HAE）、銅または鉄蓄積障害（例えば、ウィルソン病またはメンケス病）、ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症、神経傷害もしくは神経変性障害、癌、1型もしくは2型糖尿病、アデノシンデアミナーゼ欠損症、代謝障害（例えばグリコーゲン蓄積症）、固形臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓、心臓）の疾患、または感染性ウイルス（例えば、B型およびC型肝炎、HIV等）、細菌性もしくは真菌性の疾患が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0221】

ポンペ病とも呼ばれるグリコーゲン蓄積症II型は、本発明による方法によって治療され得る。ポンペ病は、グリコーゲンの分解を触媒するリソソーム酵素である酸性 α グルコシダーゼ（GAA）をコードする遺伝子の変異によって引き起こされる常染色体劣性疾患である。結果として生じる酵素欠損は、身体のすべての組織におけるグリコーゲンの病的蓄積およびリソソームの変化をもたらし、心臓、呼吸器、および骨格筋機能不全をもたらす（van der Ploeg & Reuser, 2008）。

【0222】

本発明による方法によって治療され得る血液凝固障害としては、例えば、血友病A、阻害抗体を伴う血友病A、血友病B、阻害抗体を伴う血友病B、任意の凝固因子の欠乏（第VII因子、第VII因子、第IX因子、第X因子、第XI因子、第V因子、第XII因子、第II因子、von Willebrand因子、またはFV/FVIIII複合の欠乏）、サラセミア、ビタミンKエポキシドレダクターゼC1欠乏または γ カルボキシラーゼ欠乏が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0223】

本発明による方法によって治療され得る他の疾患および障害としては、例えば、外傷、傷害、血栓症、血小板減少症、脳卒中、凝固障害、播種性血管内凝固（DIC）に関連する貧血、出血；ヘパリン、低分子量ヘパリン、五糖、ワルファリン、低分子抗血栓薬（すなわちFXa阻害剤）に関連する過剰抗凝固、またはベルナル・スーリエ症候群、グラントマン血栓無力症、もしくは貯蔵プール欠乏症等の血小板障害が挙げられるが、これら

50

に限定されない。

【0224】

本発明による方法によって治療され得る他の疾患および障害としては、例えば、以下が挙げられるが、これらに限定されない：増殖性疾患（癌、腫瘍、異形成、等）、クリグラ・ナジャー症候群および肝臓の代謝性疾患等の代謝性疾患、フリードライヒ運動失調症、感染症、ウイルス性疾患（例えば、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、HIV、ヘルペス、レトロウイルス等によって引き起こされる）、遺伝性疾患（囊胞性線維症、ジストログリカノパチー、デュシェンヌ型筋ミオパチーもしくはジストロフィー等のミオパチー、ミオチューブラーミオパチー、鎌状赤血球症、鎌状赤血球貧血、ファンコニ貧血、糖尿病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ミオチューブラーミオパチー、筋管症、脊髄性筋萎縮症（SMA）、球脊髄性筋萎縮症、もしくはシャルコー・マリー・トゥース病等の運動ニューロン疾患、関節炎、重症複合免疫不全症（例えば、RS-SCID、ADA-SCIDもしくはX-SCID）、ウィスコット・アルドリッチ症候群、X連鎖血小板減少症、X連鎖先天性好中球減少症、慢性肉芽腫性疾患等）、凝固因子欠乏症、心血管疾患（再狭窄、虚血、脂質異常症、ホモ接合性家族性高コレステロール血症等）、網膜色素変性症、レーバー先天性黒内障、レーベル遺伝性視神経症、およびシュタルガルト病等の眼疾患；サンフィリポ症候群等のリソソーム蓄積症；CN型IもしくはIIまたはギルバート症候群等の高ビリルビン血症；GSD I、GSD II（ポンペ病）、GSD III、GSD IV、GSD V、GSD VI、GSD VII、GSD VIII等のグリコーゲン蓄積症、または心臓の致死性先天性グリコーゲン蓄積症。

10

20

【0225】

ある実施形態では、対象は、中枢神経系（CNS）に影響を及ぼすか、または中枢神経系（CNS）に由来する疾患を有する。ある実施形態では、疾患は神経変性疾患である。CNSまたは神経変性疾患の非限定的な例としては、アルツハイマー病、ハンチントン病、ALS、遺伝性痙攣性片麻痺、原発性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症、ケネディ病、ポリグルタミン反復疾患、またはパーキンソン病が挙げられる。ある実施形態では、疾患は、精神疾患、依存症（例えば、タバコ、アルコール、または薬物への）、てんかん、カナバン病、または副腎白質ジストロフィーである。ある実施形態では、CNSまたは神経変性疾患は、例えば、脊髄小脳失調症（SCA1、SCA2、SCA3、SCA6、SCA7、またはSCA17）等のポリグルタミン反復疾患であるが、これらに限定されない。

30

【0226】

本発明は、ヒトおよび獣医学的用途において使用することができる。したがって、適切な対象には、ヒト等の哺乳動物、ならびに非ヒト哺乳動物が含まれる。「対象」という語は、動物、典型的には、ヒト、非ヒト霊長類（類人猿、テナガザル、ゴリラ、チンパンジー、オランウータン、マカク）、飼育動物（イヌおよびネコ）、家畜（ニワトリおよびアヒル等の家禽、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ）、および実験動物（マウス、ラット、ウサギ、モルモット）等の哺乳動物を指す。ヒト対象には、胎児、新生児、乳児、若年および成人対象が含まれる。対象はまた、動物疾患モデル、例えば、ポンペ病（GAAの損失）、およびグリコーゲン蓄積症（GSD）等のタンパク質／酵素欠損のマウスおよび他の動物モデル、ならびに当業者に公知の他のものを含む。

40

【0227】

キット

本明細書ではさらに、（a）導入遺伝子を含む非ウイルスベクターおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物；（b）食細胞除去剤；および（c）本明細書に記載の方法を実施するための指示を有するラベルを有する、例えばパッケージまたはキットとしての組成物または組合せが提供され、ここで、（a）および（b）は別個のまたは同じ容器中にある。CD115に特異的に結合する抗体もしくはその抗原結合断片、またはCD115の低分子阻害剤等のCD115インヒビター；抗Ly6G抗体または抗Ly6G低分子阻害剤が挙げられるが、これらに限定されないLy6Gインヒビター；抗CD177抗体またはCD177低分子阻害剤が挙げられるが、これらに限定されないCD177インヒ

50

ビター；抗CD14抗体またはCD14低分子阻害剤が挙げられるが、これらに限定されないCD14インヒビター；抗CD15抗体またはCD15低分子阻害剤が挙げられるが、これらに限定されないCD15インヒビター；抗CD11b抗体またはCD11b低分子阻害剤が挙げられるが、これらに限定されないCD11bインヒビター；抗CD16抗体またはCD16低分子阻害剤が挙げられるが、これらに限定されないCD16インヒビター；抗CD32抗体またはCD32低分子阻害剤が挙げられるが、これらに限定されないCD32インヒビター；抗CD33抗体またはCD33低分子阻害剤が挙げられるが、これらに限定されないCD33インヒビター；抗CD44抗体またはCD44低分子阻害剤が挙げられるが、これらに限定されないCD44インヒビター；抗CD45抗体またはCD45低分子阻害剤が挙げられるが、これらに限定されないCD45インヒビター；抗CD66b抗体またはCD66b低分子阻害剤が挙げられるが、これらに限定されないCD66bインヒビター；CD18、または、抗CD18抗体もしくはCD18低分子阻害剤が挙げられるが、これらに限定されないインヒビター；抗CD62L抗体またはCD62L低分子阻害剤が挙げられるが、これらに限定されないCD62Lインヒビター；イントラリピド；空のリボソーム；およびビスホスホネートを含むが、これらに限定されない任意の好適な食細胞除去剤を組み合わせまたはキットに含めることができる。

10

【0228】

ある実施形態では、医薬組成物は（a）非ウイルス送達ナノ粒子；および（b）非ウイルスベクターを含み、非ウイルスベクターはプロモーターに作動可能に連結された導入遺伝子を含む。

20

【0229】

本発明のある実施形態を説明してきた。それにもかかわらず、当業者は、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本発明の種々の変更および修正を行って、それらを種々の使用および条件に適合させることができる。したがって、以下の実施例は、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を例示することを意図しているが、いかなる方法でも限定することを意図していない。

【実施例】

【0230】

実施例1－抗CD115による免疫細胞除去は、導入遺伝子発現を改善した

単球およびマクロファージを標的とする抗CD115抗体（BioXcell、clone AFS98）を用いて；骨髓由来細胞を標的とする抗Ly6g抗体（BioXcell、clone 1A8）を用いて；TLR-9、AIM2、および他の自然免疫センサーを阻害する、ラージODN、例えば、～200 nmのサイズを有するLNP中に製剤化されたODNオリゴを用いて；またはインターフェロン遺伝子の低分子刺激因子（STING）インヒビターであるH-151を用いて、サイトカイン放出および導入遺伝子発現に対する免疫除去の効果を研究した。

30

【0231】

表2に概説されるように、脂質ナノ粒子（LNP、Precision Nanosystemsから購入）送達ビヒクル（DNA-LNP）（DNAはNature Techから購入）中に製剤化された10または50 μgの導入遺伝子DNAプラスミド（ヒト凝固因子IX（hFIX）をコードするナノプラスミド）（DNAはNature Techから購入）を、マウス（n=5、Jackson Laboratoryからbalb/c）に単独で、または抗CD115抗体、抗Ly6G抗体、もしくはH-151（InvivoGenから購入）、または50 μgのラージODN（InvivoGenから購入）の腹腔内（IP）投与とともに静脈内（IV）した。

40

【0232】

50

【表 2】

表 2. 実験デザイン

群	群名	Day -2	Day -1	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3
1	DNA-LNP 50 µg			50 µg DNA-LNP (IV)			
2	DNA-LNP 50 µg + 抗 CD115	300 µg CD115 (IP)		300 µg CD115 (IP) + 50 µg DNA-LNP (IV)		300 µg CD115 IP)	
3	DNA-LNP 50 µg + 抗 LY6G	400 µg Ly6G (IP)		400 µg LY6G (IP) + 50 µg DNA-LNP (IV)			
4	DNA-LNP 50 µg + ODN ラージ 50 µg			50 µg ODN ラージ (IV) + 50 µg DNA- LNP (IV)			
5	DNA-LNP 50 µg + H151	200 µg H151 (IP)	200 µg H151 (IP)	200 µg H151 (IP) + 50 µg DNA-LNP (IV)	200 µg H151 (IP)	200 µg H151 (IP)	200 µg H151 (IP)
6	DNA-LNP 10 µg			10 µg DNA-LNP (IV)			
7	DNA-LNP 10 µg + 抗 CD115	300 µg CD115 (IP)		300 µg CD115 (IP) + 10 µg DNA-LNP (IV)		300 µg CD115 IP)	
8	DNA-LNP 10 µg + 抗 LY6G	400 µg Ly6G (IP)		400 µg LY6G (IP) + 10 µg DNA-LNP (IV)			
9	DNA-LNP 10 µg + ODN ラージ 10 µg			10 µg ODN ラージ (IV) + 10 µg DNA- LNP (IV)			
10	DNA-LNP 10 µg + H151	200 µg H151 (IP)	200 µg H151 (IP)	200 µg H151 (IP)+ 10 µg DNA-LNP (IV)	200 µg H151 (IP)	200 µg H151 (IP)	200 µg H151 (IP)

10

20

【0233】

30

免疫応答

投与6時間後の血漿サンプルを、MSD：IL-6、IFN- γ 、TNF- α およびIL-1 β を用いて炎症誘発性サイトカインのパネルについて分析した。結果を図1Aおよび図1Bに示す。

【0234】

図1Aに示すように、50 µgのDNA-LNP単独での投与の場合と比較して、50 µgのDNA-LNPを50 µgのラージODNと共に投与した6時間後の動物の血漿において、IFN- γ の誘導の減少が認められた。

【0235】

図1Bに示すように、10 µgのDNA-LNPを投与した後の動物性のいずれにおいても、IFN- γ の誘導の減少は認められなかった。

40

【0236】

導入遺伝子発現

1日目、8日目、14日目、28日目、63日目、84日目、および98日目に、ELISAを用いて循環hFIXレベルについて血漿サンプルを分析した。

【0237】

図2Aに示すように、50 µgのDNA-LNPを投与した動物の血漿において、抗CD115抗体または抗Ly6G抗体なしで、本質的にFIX発現は検出されず、一方、50 µgのDNA-LNPを抗CD115抗体と組み合わせて投与した後、14週間にわたって、約250 ng/mL (正常発現レベルの約5%以上)のFIX発現が観察され、50 µgのDNA-LNPを抗Ly6G抗

50

体と組み合わせて投与した後、14週間にわたって、血漿において、約100～200 ng/mL（正常発現レベルの5%未満）のFIX発現が観察された。

【0238】

図2Bに示すように、抗CD115または抗Ly6G抗体なしで、10 µgのDNA-LNPを投与した動物性の血漿中では、本質的にFIX発現は検出されず、一方、抗CD115抗体と組み合わせて10 µgのDNA-LNPを投与した後、14週間にわたって、約250 ng/mL（正常発現レベルの約5%以上）のFIX発現が動物性の血漿中で観察され、抗Ly6G抗体と組み合わせて10 µgのDNA-LNPを投与した後、14週間にわたって、約100～300 ng/mLのFIX発現が血漿中で観察された。

【0239】

まとめると、結果は、抗CD115による免疫細胞除去が減少する免疫応答を伴って導入遺伝子発現を改善したことを示す。

【0240】

実施例2－抗CD115および別の免疫抑制剤による免疫細胞除去は導入遺伝子発現を改善し、サイトカイン産生を減少させた

単球／マクロファージアポトーシスを誘導するためにリポソームに封入された毒性剤であるクロドロン酸と組み合わせた抗CD115抗体を用いて、サイトカイン放出および導入遺伝子発現に対する免疫細胞除去の効果を研究した。

【0241】

脂質ナノ粒子（LNP）送達ビヒクル（SPK-LNP1）中に製剤化されたFIX導入遺伝子DNAプラスミド（50 µg）を、表3に概説されるように、単独で、または抗CD115抗体および／もしくはクロドロン酸（Liposomaから購入）と組み合わせて静脈内投与によりマウス（n=5；Balb/c；Jackson Laboratory）に投与した。SPK-LNP-1は、次の組成を有していた：C12-200脂質35%；DOPE16%；コレステロール46.5%；およびC14-PEG2000（Avanti（登録商標）Polar Lipids）2.5%。DNAおよび抗CD115抗体は、実施例1に記載の通りであった。

【0242】

【表3】

表3. 実験デザイン

群	群名	Day -5	Day -2	Day -1	Hour 0	Day 2
1	SPK-LNP1 (50 µg)				SPK-LNP1 (50 µg)	
2	SPK-LNP1 (50 µg) + 1250 µg クロドロン酸(IV)			1250 µg クロドロン酸 (IV)	SPK-LNP1 (50 µg)	
3	SPK-LNP1 (50 µg) + 300 µg 抗 CD115 (IP)	300 µg 抗 CD115 (IP)	300 µg 抗 CD115 (IP)		SPK-LNP1 (50 µg) + 300 µg 抗 CD115 (IP)	300 µg 抗 CD115 (IP)
4	SPK-LNP1 (50 µg) + 1250 µg クロドロン酸(IV) + 300 µg 抗 CD115 (IP)	300 µg 抗 CD115 (IP)	300 µg 抗 CD115 (IP)	1250 µg クロドロン酸 (IV)	SPK-LNP1 (50 µg) + 300 µg 抗 CD115 (IP)	300 µg 抗 CD115 (IP)

【0243】

免疫応答

投与6時間後の血漿サンプルを、MSD：IL-6、IFN-γ、TNF-αおよびIL-1βを用いて炎症誘発性サイトカインのパネルについて分析した。図3Aおよび3Bに示すように、抗CD115抗体またはクロドロン酸単独での免疫細胞除去はDNA-LNP投与後のサイトカイン（INF-γおよび／またはIL-6）レベルを中程度に低下させ、抗CD115抗体およびクロドロン酸処置を組み合わせることはサイトカイン誘導をほぼ抑制した。

【0244】

導入遺伝子発現

1週目に、循環hFIXレベルについてELISAを用いて血漿サンプルを分析した。図4に示されるように、抗CD115抗体およびクロドロン酸と組み合わせて50 μgのSPK-LNP1を投与した後1週間、約500 ng/mL（正常発現レベルの約10%）のFIX発現が動物の血漿において観察され、これは、SPK-LNP1を単独で、または抗CD115抗体およびクロドロン酸のうちの1つのみと組み合わせて投与した場合よりも有意に高い。

【0245】

まとめると、結果は、抗CD115抗体およびクロドロン酸の二重レジメンが導入遺伝子発現を改善しつつ、免疫応答をほぼ抑止したことを実証する。

【0246】

実施例3—クロドロン酸、抗CD115およびペキシダルチニブによる免疫細胞除去

Balb/Cマウスを、免疫細胞除去剤であるクロドロン酸、抗CD115抗体（実施例1に記載の通り）、またはペキシダルチニブで処置した。クロドロン酸は50 mpk（1.25 mg）または17 mpk（425 μg）でIV投与され、抗CD115抗体は12 mpk（300 μg）1ドーズ vs 4ドーズでIP投与された。抗CD115抗体は、実施例1に記載の通りであった。ペキシダルチニブは、100 mpk（2.5 mg）の4ドーズで経口胃管投与された。無処置マウス群をコントロールとして用いた。各群は、5匹の雄性BALB/cマウスを含んだ。

【0247】

処置後、マウスを安楽死させ、組織学のために肝臓サンプルを採取した。肝臓サンプルを抗CLEC4Fまたは抗CD68マウス抗体のいずれかで染色した。処置群の個々のスコアを無処置群によって正規化して、除去効果を計算した。具体的な処置用量レベルおよびスケジュールを表4に示す：

【0248】

【表4】

群番号	群名	day -8	day -6	day -4	day -2	day -1	day 0
1	無処置						組織学
2	50 mpk クロドロン酸					クロドロン酸 (50 mpk)	組織学
3	17 mpk クロドロン酸					クロドロン酸 (17 mpk)	組織学
4	抗CD115 (1ドーズ)				抗CD115		組織学
5	抗CD115 (4ドーズ)	抗CD115	抗CD115	抗CD115	抗CD115		組織学
6	ペキシダルチ ニブ	ペキシダ ルチニブ	ペキシダ ルチニブ	ペキシダ ルチニブ	ペキシダ ルチニブ		組織学

【0249】

結果を図5Aおよび5Bに示す。クロドロン酸および抗CD115抗体は、クッパーおよびマクロファージの除去に対して有意な効果を有した。ペキシダルチニブは、クッパー細胞除去（CLEC4F+染色）にわずかな影響を及ぼし、CD68+マクロファージ除去には影響を及ぼさなかった。ペキシダルチニブの結果は、投与様式に因るものであった。

【0250】

マウス固形飼料と混合したペキシダルチニブの投与は、CLEC4F+クッパー細胞およびCD68+マクロファージの有意な除去をもたらした。ペキシダルチニブを400 mg Pex/

kg飼料でマウス飼料と混合した。マウスにPex-飼料を7日間または21日間与えた後、肝臓組織を採取した。結果を図6Aおよび図6Bに示す。

【0251】

実施例4－ペキシダルチニブ治療後の導入遺伝子発現DNA-LNP-5

ペキシダルチニブを400 mg Pex/kg飼料でマウス飼料と混合した。第2群および第3群では、DNA-LNP-5投与の21日前および7日前に、マウス固形飼料をPex固形飼料に置き換えた。実験デザインを表5に示す。

【0252】

【表5】

群#	群名	LNP	day -21	day -7	0 hr	wks 1-4
1	除去なし	DNA-LNP-5	-	-	DNA-LNP-5 投与	Bleed
2	21-day ペキシダルチニブ処置		ペキシダルチニブ飼料開始		DNA-LNP-5 投与	Bleed
3	7-day ペキシダルチニブ処置		-	ペキシダルチニブ飼料開始	DNA-LNP-5 投与	Bleed

10

【0253】

第1群のマウスには、研究の間中、通常の飼料を与え、コントロールとして供した。マウスにDNA-LNP-5 (10 µg/マウス) を投与した。LNP-5 (GenVoy™ LNP) は、Precision NanoSystems Inc.から入手し、以下を含有していた：イオン化可能な脂質50%；DSPC10%；コレステロール37.5%；および安定剤 (PEG-Lipid) 2.5% (Roces et al., Pharmaceuticals, 2020 12, 1095.参照。) DNAは、実施例1に記載された通りであった。マウス血漿中のhFIXレベルを投与1～4週間後にELISAを用いて定量した。結果を図7に示す。DNA-LNP-5投与後、Pex処置群の数匹のマウスが検出可能な発現を示した。対照的に、通常の飼料を与えたマウスでは検出可能なhFIXレベルは観察されなかった。

20

【0254】

実施例5－抗CD115処置後の導入遺伝子発現DNA-LNP-5

マウスを、DNA-LNP-5投与 (マウスあたり10 µg) の前に、抗CD115抗体 (注射あたり300 µgの抗CD115) で3回 (-5日目、-3日目、および-1日目) 処置した。コントロール群のマウスはDNA-LNP-5のみで処置した。DNAおよび抗CD115抗体は、実施例1に記載の通りであった。実験デザインを表6に示す。

30

【0255】

【表6】

群#	群名	LNP	day -5	day -3	day -1	day 0	wks 1,2,4,12
1	DNA-LNP-5	DNA-LNP-5	-	-	-	DNA-LNP-5 投与	Bleed
2	DNA-LNP-5 + 抗CD115		抗CD115	抗CD115	抗CD115	DNA-LNP-5 投与	Bleed

40

【0256】

DNA-LNP-5投与後、マウス血漿中のhFIXレベルをELISAを用いて定量した。結果を図8に示す。ここで、「ns」は有意ではないことを示し、*P<0.05はt検定によるものである。

【0257】

実施例6－抗CD115処理後の導入遺伝子発現DNA-LNP-3

マウスを、DNA-LNP-3投与 (マウスあたり25 µg) の前に、抗CD115抗体 (注射あ

50

たり300 μgの抗CD115)で4回(-10日目、-8日目、-6日目、および-2日目)処置した。コントロール群のマウスをDNA-LNP-3のみで処置した。DNA-LNP-3は、次の組成を有していた：cKK-E12 35%；DOPE 16%；コレステロール46.5%；およびPEG化脂質C14-PEG2000 2.5%。DNAおよび抗CD115抗体は、実施例1に記載の通りであった。実験デザインを表7に示す。

【0258】

【表7】

群#	群名	LNP	day -10	day -8	day -6	day -2	day 0	wks 1,2,4,12
1	DNA-LNP-3	DNA-LNP-3 + 抗 CD115	-	-	-	-	DNA-LNP-3 投与	Bleed
2	DNA-LNP-3 + 抗 CD115		抗 CD115	抗 CD115	抗 CD115	抗 CD115	DNA-LNP-3 投与	Bleed

10

【0259】

DNA-LNP-3投与後、マウス血漿中のhFIXレベルをELISAを用いて定量した。結果を図9に示す。ここで、"ns"は有意ではないことを示し、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、および*** $P < 0.001$ はt検定によるものである。

【0260】

抗CD115治療後の導入遺伝子発現DNA-LNP-4

マウスを、DNA-LNP-4投与の前に4回(-10日目、-8日目、-6日目、および-2日目)の抗CD115抗体(注射あたり300 μgの抗CD115)で処置した。コントロール群のマウスをDNA-LNP-4のみで処置した。LNP-4は次の組成を有していた：脂質9(Sabnis et al., Molecular Therapy 2018, vol. 26, No. 6, 1509-1519)50%；DSPC 10%；コレステロール38.5%；およびC-14-PEG2000 1.5%。実験デザインを表8に示す。

【0261】

【表8】

群#	群名	LNP	day -10	day -8	day -6	day -2	day 0	wks 1,2,4,12
1	DNA-LNP-4	DNA-LNP-4 + 抗 CD115	-	-	-	-	DNA-LNP-4 投与	Bleed
2	DNA-LNP-4 + 抗 CD115		抗 CD115	抗 CD115	抗 CD115	抗 CD115	DNA-LNP-4 投与	Bleed

30

【0262】

DNA-LNP-4投与後、マウス血漿中のhFIXレベルをELISAを用いて定量した。結果を図表10に示す。ここで、"ns"は有意ではなく、* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ はt検定によるものである。

【0263】

本発明は、本明細書において、本発明の多数の実施形態を説明するために肯定的な言葉を用いて一般的に開示される。本発明はまた、具体的には、特定の主題が、物質または材料、方法ステップおよび条件、プロトコル、または手順等の、完全にまたは部分的に除外される実施形態を含む。例えば、本発明の特定の実施形態では、材料および／または方法のステップは除外される。したがって、本発明は一般に、本発明が含まないものに関して本明細書では表現されないが、本発明において明確に除外されない態様はそれにもかかわらず、本明細書で開示される。

40

50

【図面】
【図 1 A】

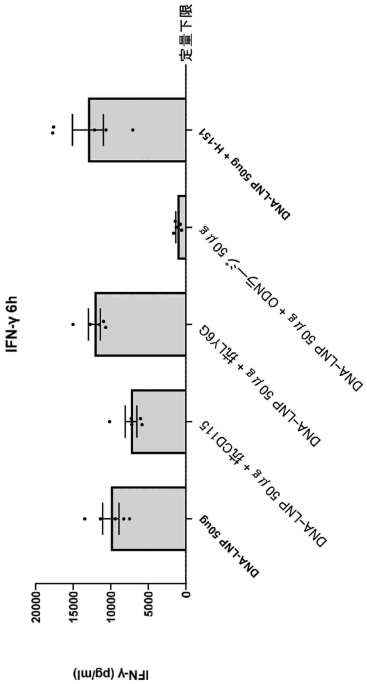


図1A

【図 1 B】

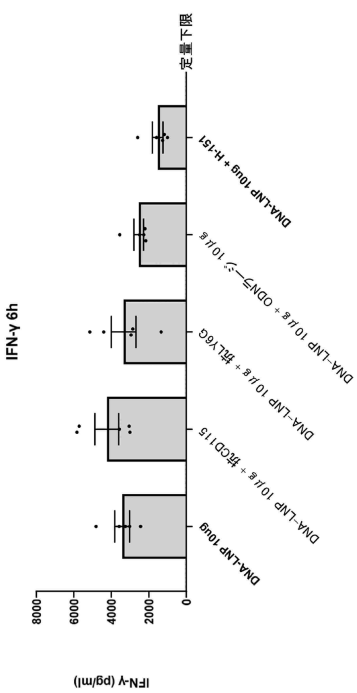


図1B

【図 2 A】

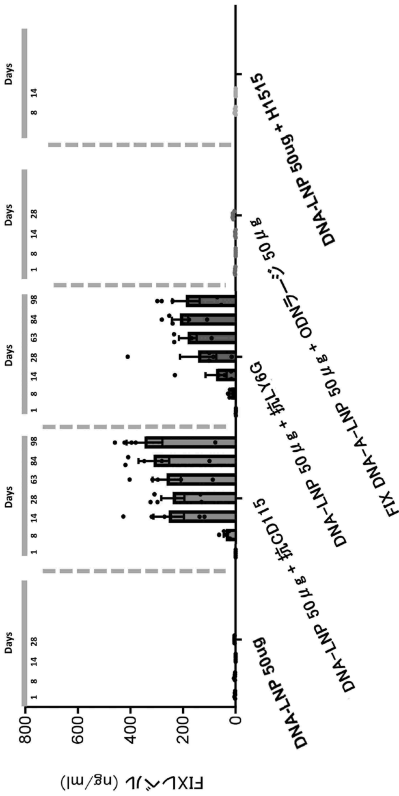


図2A

【図 2 B】

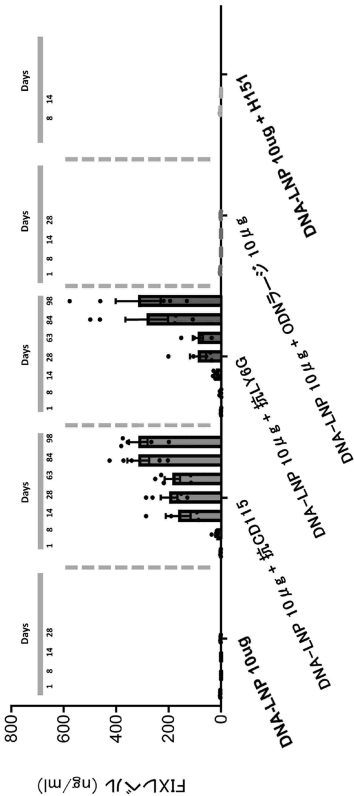


図2B

10

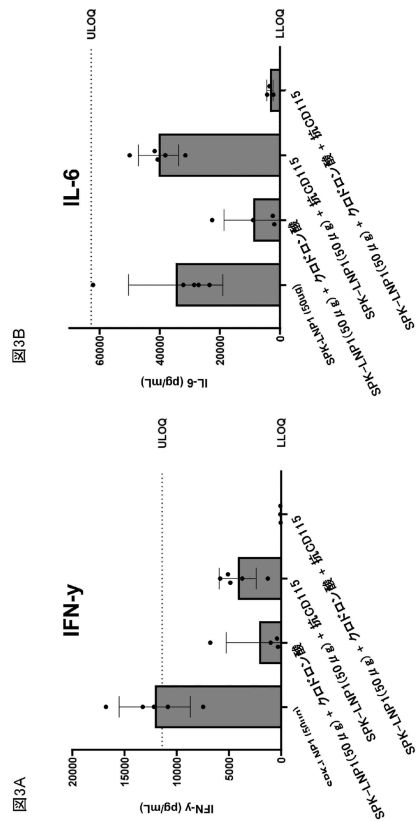
20

30

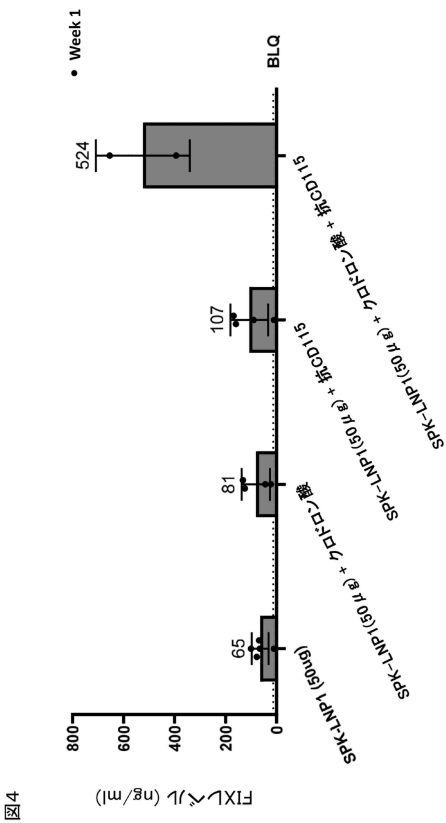
40

50

【図 3】



【図 4】



【図 5】

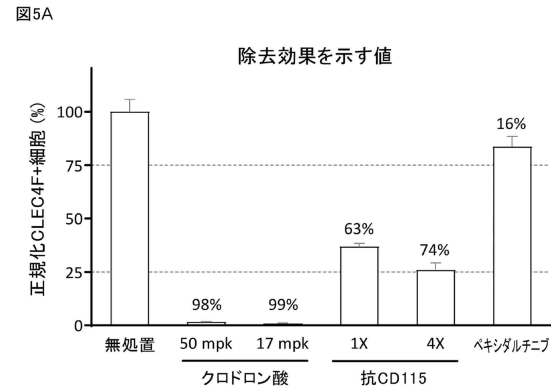
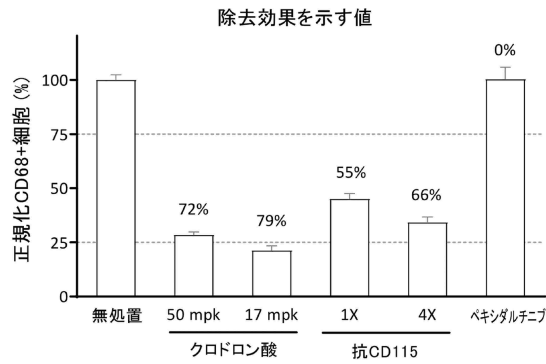


図5B



【図 6】

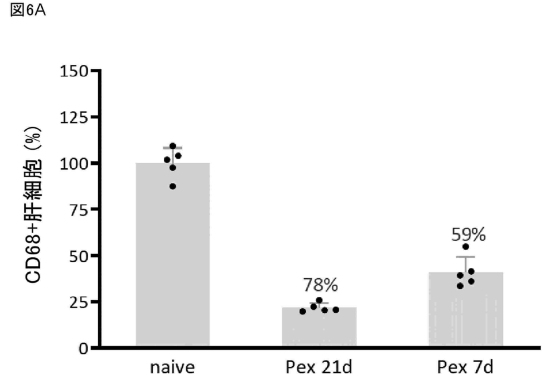
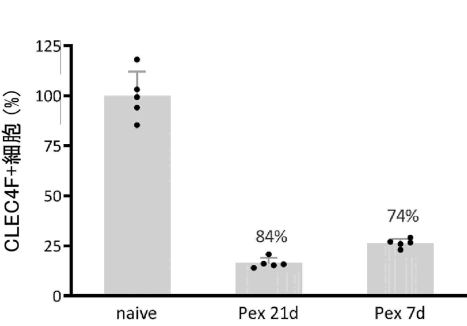


図6B



10

20

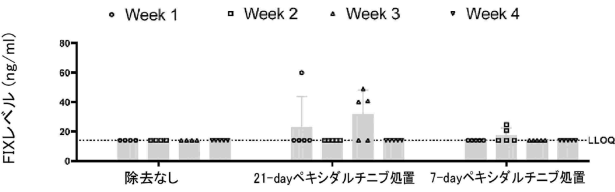
30

40

50

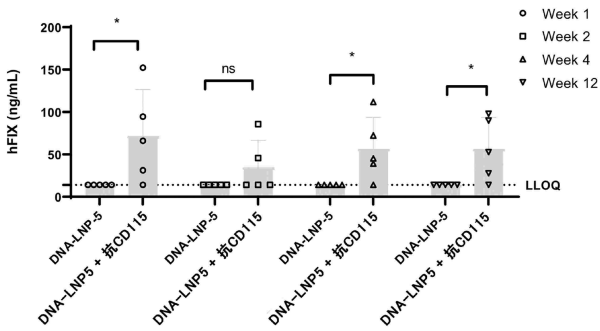
【図 7】

図7



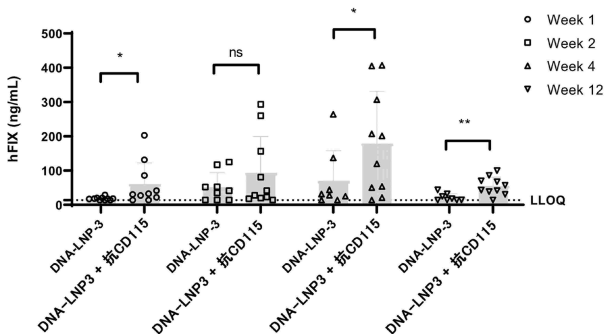
【図 8】

図8



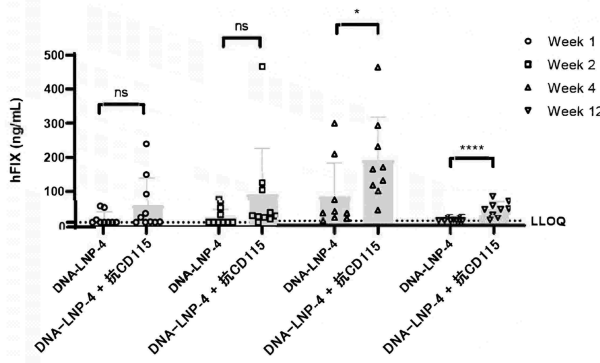
【図 9】

図9



【図 10】

図10



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US21/73084
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61P 37/02; A61P 37/04; C12N 15/88; C12N 15/79; C12N 15/74 (2021.01) CPC - C12N 15/8509; C12N 15/63; A61K 2039/5156; C12N 2830/008; A61P 37/06		
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) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	WO 2019/018640 A1 (NOVARTIS AG) 24 January 2019; page 2, lines 17-19; page 148, lines 14-15; page 284, lines 1-3; claims 27, 42	1-3, 27 --- 28-31
Y	WO 2020/181168 A8 (GENERATION BIO CO) 01 October 2020; paragraphs [0013], [0026]; claims 1, 114	28-31
☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 28 February 2022 (28.02.2022)		Date of mailing of the international search report APR 21 2022
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US21/73084
Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2.	☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3.	☒ Claims Nos.: 4-26, because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2.	☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.	
3.	☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4.	☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

10

20

30

40

50

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 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	31/663 (2006.01)	A 6 1 K	31/663	
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00	
A 6 1 K	31/573 (2006.01)	A 6 1 K	31/573	
A 6 1 K	31/713 (2006.01)	A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K	31/711 (2006.01)	A 6 1 K	31/711	
A 6 1 K	47/22 (2006.01)	A 6 1 K	47/22	
A 6 1 K	47/16 (2006.01)	A 6 1 K	47/16	
A 6 1 K	47/20 (2006.01)	A 6 1 K	47/20	
A 6 1 K	47/18 (2017.01)	A 6 1 K	47/18	

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,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

スペイン 0 8 0 3 4 バルセロナ パセイジ レイナ エリセンダ デ モントカナ 2 アティク

(72)発明者 ツァン ルイ

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 1 0 4 フィラデルフィア チェスナット ストリート 3
7 3 7 アpartment 1 2 0 4

F ターム (参考) 4C076 AA29 AA65 AA95 CC16 DD48 DD52 DD55 DD60 FF70
4C084 AA13 AA19 MA02 MA05 MA38 MA43 NA05 NA06 NA13 NA14
ZA751 ZA752 ZB082 ZC211 ZC212 ZC412 ZC751 ZC752
4C085 AA14 CC23 EE03 EE05
4C086 AA01 AA02 DA10 DA34 EA16 MA03 MA05 MA38 MA43 NA05
NA06 ZA75 ZB08 ZC21 ZC75