

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7242180号
(P7242180)

(45)発行日 令和5年3月20日(2023.3.20)

(24)登録日 令和5年3月10日(2023.3.10)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	Z N A
A 6 1 K	31/436(2006.01)	A 6 1 K	31/436	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	47/32 (2006.01)	A 6 1 K	47/32	
A 6 1 K	47/34 (2017.01)	A 6 1 K	47/34	
請求項の数 15 (全99頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2017-513048(P2017-513048)	(73)特許権者	511254321	
(86)(22)出願日	平成27年9月7日(2015.9.7)		セレクト バイオサイエンス インコ	
(65)公表番号	特表2017-532307(P2017-532307 A)		ーポレーテッド	
(43)公表日	平成29年11月2日(2017.11.2)		S E L E C T A B I O S C I E N C E	
(86)国際出願番号	PCT/US2015/048768		S , I N C .	
(87)国際公開番号	WO2016/037162		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0	
(87)国際公開日	平成28年3月10日(2016.3.10)		2 4 7 2、ウォータータウン、グローブ	
審査請求日	平成30年8月23日(2018.8.23)		ストリート 6 5	
審判番号	不服2021-6436(P2021-6436/J1)		6 5 G r o v e S t r e e t , W a t	
審判請求日	令和3年5月19日(2021.5.19)		e r t o w n , M A 0 2 4 7 2 , U n	
(31)優先権主張番号	62/101,841		i t e d S t a t e s o f A m e r	
(32)優先日	平成27年1月9日(2015.1.9)	(74)代理人	100102842	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 葛和 清司	
	最終頁に続く	(72)発明者	キシモト、タカシ、ケイ	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗ウイルス導入ベクター免疫応答を減弱化するための方法および組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの対象への共投与により、抗ウイルス導入ベクター減弱応答を対象において確立することを含む方法における使用のための、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターを含む、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターの組み合わせ医薬であって、

ここで、対象が、ウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を有しない、

ここで、抗原提示細胞標的免疫抑制剤は、免疫抑制剤を含むポリマー合成ナノキャリアを含み、ここで、免疫抑制剤は、ラパマイシンまたはラパマイシンアナログである、

ここで、抗ウイルス導入ベクター減弱応答は、任意に、ウイルス導入ベクターに対する T 細胞応答であり、ならびに、

(a) 方法は、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与より前に、抗原提示細胞標的免疫抑制剤なしで、ウイルス導入ベクターを対象へ投与することをさらに含む；または

(b) 方法は、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与より前に、抗原提示細胞標的免疫抑制剤なしで、ウイルス導入ベクターを対象へ投与することをさらに含む、ここで、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与が、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの反復共投与である、前記組み合わせ医薬。

【請求項2】

抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの対象への共投与により、抗ウイルス導入ベクター減弱応答を対象において確立すること、ならびに、ウイルス導入ベクターの1以上の反復用量を対象へ投与することを含み、ならびに、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与およびウイルス導入ベクターの1以上の反復用量の投与の両方より前に、抗原提示細胞標的免疫抑制剤なしで、ウイルス導入ベクターを対象へ投与することをさらに含む、方法における使用のための、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターを含む、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターの組み合わせ医薬であって、

ここで、抗原提示細胞標的免疫抑制剤は、免疫抑制剤を含むポリマー合成ナノキャリアを含み、ここで、免疫抑制剤は、ラパマイシンまたはラパマイシンアナログである、任意に、ここで、抗ウイルス導入ベクター減弱応答が、ウイルス導入ベクターに対するT細胞応答である、

前記組み合わせ医薬。

【請求項3】

方法が、抗原提示細胞標的免疫抑制剤を単独で、またはウイルス導入ベクターと組み合わせて、提供または入手することをさらに含む、請求項1または2に記載の組み合わせ医薬。

【請求項4】

初めに、抗原提示細胞標的免疫抑制剤なしでウイルス導入ベクターを対象へ投与すること、およびその後、ウイルス導入ベクターと抗原提示細胞標的免疫抑制剤とを共に対象へ投与することにより、抗ウイルス導入ベクター応答を減弱化することを含む方法における使用のための、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターを含む、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターの組み合わせ医薬であって、

ここで、抗ウイルス導入ベクター応答が、T細胞応答である、

ここで、抗原提示細胞標的免疫抑制剤は、免疫抑制剤を含むポリマー合成ナノキャリアを含み、ここで、免疫抑制剤は、ラパマイシンまたはラパマイシンアナログである、

任意に、ここで、方法が、ウイルス導入ベクターと抗原提示細胞標的免疫抑制剤との対象への共投与の後に、ウイルス導入ベクターの1以上の反復用量を対象へ投与することをさらに含む、

前記組み合わせ医薬。

【請求項5】

ウイルス導入ベクターの対象への投与より前に、ウイルス導入ベクターに対する既存の免疫のレベルを対象において決定すること、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとを共に対象へ投与すること、および、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの対象への共投与よりも前に、抗原提示細胞標的免疫抑制剤なしで、ウイルス導入ベクターの用量を対象へ投与することを含む方法における使用のための、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターを含む、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターの組み合わせ医薬であって、

ここで、抗原提示細胞標的免疫抑制剤は、免疫抑制剤を含むポリマー合成ナノキャリアを含み、ここで、免疫抑制剤は、ラパマイシンまたはラパマイシンアナログである、任意に、ここで、

(a) 決定することが、ウイルス導入ベクターの対象への投与より前に、対象における抗ウイルス導入ベクター抗体のレベルを測定することを含む（例えば、決定することが、ウイルス導入ベクターの対象への投与より前に、対象におけるウイルス導入ベクターに対するT細胞応答のレベルを測定することを含む）；および／または

(b) 方法が、ウイルス導入ベクターの1以上の反復用量の投与をさらに含む；および／または

(c) 既存の免疫のレベルが、ウイルス導入ベクターのウイルス抗原に対するものである；および／または

(d) 既存の免疫のレベルが、ウイルス導入ベクターの導入遺伝子発現産物であるタンパ

10

20

30

40

50

ク質の抗原に対するものである、
前記組み合わせ医薬。

【請求項 6】

抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとを共に対象へ反復して投与することにより、対象におけるウイルス導入ベクターの導入遺伝子発現をエスカレートさせることを含む方法における使用のための、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターを含む、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターの組み合わせ医薬であって、

ここで、抗原提示細胞標的免疫抑制剤は、免疫抑制剤を含むポリマー合成ナノキャリアを含み、ここで、免疫抑制剤は、ラパマイシンまたはラパマイシンアナログである、
任意に、ここで、方法が、対象における導入遺伝子発現を増大させる、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの反復共投与の頻度および投薬を決定することをさらに含む、

前記組み合わせ医薬。

【請求項 7】

抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとを共に対象へ反復して投与すること、および、ウイルス導入ベクターの 1 以上の用量を、対象が、ウイルス導入ベクターの反復投与に起因して抗ウイルス導入ベクター免疫応答を発達させることが予測される場合に対象に選択されたであろうウイルス導入ベクターの投薬量よりも少なくなるように選択することを含む方法における使用のための、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターを含む、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターの組み合わせ医薬であって、

ここで、抗原提示細胞標的免疫抑制剤が、免疫抑制剤を含むポリマー合成ナノキャリアを含み、ここで、免疫抑制剤は、ラパマイシンまたはラパマイシンアナログである、
前記組み合わせ医薬。

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれか一項に記載の組み合わせ医薬であって、

(a) 反復用量（単数または複数）中のウイルス導入ベクターの量が、前の用量中のウイルス導入ベクターの量と少なくとも等しい；

(b) 反復用量（単数または複数）中のウイルス導入ベクターの量が、前の用量中のウイルス導入ベクターの量よりも少ない；

(c) 抗原提示細胞標的免疫抑制剤もまた、ウイルス導入ベクターの 1 以上の反復用量と共に対象へ投与される；および／または

(d) 抗原提示細胞標的免疫抑制剤はまた、ウイルス導入ベクターの 1 以上の反復用量のうちの少なくとも 1 つとも共に対象へ投与されない、

前記組み合わせ医薬。

【請求項 9】

対象が、ウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を有しない、請求項 2～8 のいずれか一項に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 10】

共投与が、同時投与である；および／または、方法が、対象におけるウイルス導入ベクターに対する既存の免疫のレベルを決定することをさらに含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 11】

抗ウイルス導入ベクター減弱応答を対象に生じさせるために、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与の頻度および投薬を決定すること、ならびに、決定された頻度および投与量に従って、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの対象への共投与を指示することを含む方法における使用のための、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターを含む、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターの組み合わせ医薬であって、

ここで、抗原提示細胞標的免疫抑制剤が、免疫抑制剤を含むポリマー合成ナノキャリアを含み、ここで、免疫抑制剤は、ラパマイシンまたはラパマイシンアナログである、任意に、ここで、共投与が、同時投与である、
前記組み合わせ医薬。

【請求項 1 2】

抗ウイルス導入ベクター減弱応答を対象に生じさせるために、ウイルス導入ベクターの 1 以上の反復用量と組み合わせた、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与の頻度および投薬を決定すること、ならびに、決定された頻度および投薬に従って、対象への、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与およびウイルス導入ベクターの 1 以上の反復用量の投与の両方を指示することを含む方法における使用のための、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターを含む、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターの組み合わせ医薬であって、

ここで、抗原提示細胞標的免疫抑制剤が、免疫抑制剤を含むポリマー合成ナノキャリアを含み、ここで、免疫抑制剤は、ラパマイシンまたはラパマイシンアナログである、任意に、ここで、

(a) 反復用量の少なくとも 1 つにおけるウイルス導入ベクターの量が、前の用量中のウイルス導入ベクターの量と少なくとも等しい、または、反復用量の少なくとも 1 つにおけるウイルス導入ベクターの量が、前の用量中のウイルス導入ベクターの量よりも少ない；および／または

(b) 抗原提示細胞標的免疫抑制剤もまた、ウイルス導入ベクターの 1 以上の反復用量と共に対象へ投与される；および／または

(c) 抗原提示細胞標的免疫抑制剤はまた、ウイルス導入ベクターの 1 以上の反復用量のうちの少なくとも 1 つとも共に対象へ投与されない；および／または

(d) 方法が、対象への、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与およびウイルス導入ベクターの 1 以上の反復用量の投与の両方の前に、ウイルス導入ベクターの用量の対象への投与を指示することをさらに含む；および／または

(e) 対象が、ウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を有しない；および／または

(f) 共投与が、同時投与である、

前記組み合わせ医薬。

【請求項 1 3】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の組み合わせ医薬であって、

(a) 対象が、以前にウイルス導入ベクターを投与されていない対象である；および／または

(b) ウイルス導入ベクターが、(i) レトロウイルス導入ベクター、アデノウイルス導入ベクター、レンチウイルス導入ベクターまたはアデノ随伴ウイルス導入ベクターである（例えば、サブグループ A、サブグループ B、サブグループ C、サブグループ D、サブグループ E またはサブグループ F のアデノウイルス導入ベクターから選択されるアデノウイルス導入ベクターであるか、または、HIV、SIV、FIV、EIAV またはヒツジレンチウイルスベクターから選択されるレンチウイルス導入ベクターであるか；または、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10 または AAV11 アデノ随伴ウイルス導入ベクターから選択されるアデノ随伴ウイルス導入ベクターである）；または (ii) キメラウイルス導入ベクターである（例えば、AAV-アデノウイルス導入ベクターである）。

前記組み合わせ医薬。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の組み合わせ医薬であって、

(a) 導入遺伝子が、遺伝子編集導入遺伝子であるとき、遺伝子編集導入遺伝子が、ガイド RNA をコードする、および／または、遺伝子編集導入遺伝子が、エンドヌクレアーゼをコードし、任意に、エンドヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、トランスクリプション・アクチベーターライク・エフェクターヌクレ

アーゼ（TALEN）、クラスタード・レギュラー・インタースペースド・ショート・パ
 リンドロミック・リピート（単数または複数）（CRISPR）エンドヌクレアーゼまたはホー
 ミングエンドヌクレアーゼであり、任意に、エンドヌクレアーゼが、クラスタード・レ
 ギュラー・インタースペースド・ショート・パ
 リンドロミック・リピート（単数または複
 数）（CRISPR）エンドヌクレアーゼであり、ならびに、クラスタード・レギュラー・
 インタースペースド・ショート・パ
 リンドロミック・リピート（単数または複
 数）（CRISPR）エンドヌクレアーゼが、Cas9エンドヌクレアーゼである（例えば、（a）Cas9エン
 ドヌクレアーゼが、野生型Cas9エンドヌクレアーゼであり、任意に、Cas9エンドヌクレ
 アーゼが、*Streptococcus pyogenes*（ⅠⅠ型）または*S. thermophilus*のものであるか
 、あるいは、（b）Cas9エンドヌクレアーゼが、Cas9エンドヌクレアーゼのバリエーション
 であり、任意に、（i）Cas9バリエーションが、野生型Cas9に対して少なくとも90%、9
 5%、または99%の配列同一性を有し、（ii）Cas9バリエーションが、Cas9二量体、Ca
 s9融合タンパク質、Cas9フラグメント、最小化されたCas9タンパク質、切断ドメインが
 ないCas9バリエーション、gRNAドメインがないCas9バリエーションまたはCas9リコンビナーゼ
 融合物であり、または、（iii）Cas9バリエーションが、fCas9またはFokI-dCas9である
 ）；あるいは、

10

（b）導入遺伝子が、遺伝子発現調節導入遺伝子であるとき、遺伝子発現調節導入遺伝子
 が、DNA結合タンパク質または治療用RNAをコードし、任意に、（i）DNA結合タンパク
 質が、人工転写因子であり、（ii）治療用RNAが、mRNA翻訳のインヒビター、RNA干
 渉（RNAi）の剤、触媒活性RNA分子（リボザイム）、トランスファーRNA（tRNA）また
 はタンパク質もしくは他の分子リガンドに結合するRNA（アプタマー）であり、任意に、
 RNAiの剤が、二本鎖RNA、一本鎖RNA、マイクロRNA、低分子干渉RNA、低分子ヘアピ
 ン型RNAまたは三重鎖形成オリゴヌクレオチドである；あるいは、

20

（c）導入遺伝子が、エクソンスキッピング導入遺伝子であるとき、エクソンスキッピン
 グ導入遺伝子が、アンチセンスオリゴヌクレオチドをコードし、任意に、アンチセンスオ
 リゴヌクレオチドが、snRNAであり；対象が、筋ジストロフィーなどのジストロフィーを
 有し；および／または、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、ジストロフィンに結合する
 ；あるいは、

（d）導入遺伝子が遺伝子治療導入遺伝子であるとき、遺伝子治療導入遺伝子が、治療
 タンパク質をコードする（例えば、（i）注入可能なまたは注射可能な治療用タンパク質
 、酵素、酵素補因子、ホルモン、血液または血液凝固因子、サイトカイン、インターフェ
 ロンまたは増殖因子をコードし、または（ii）脂質およびスフィンゴ脂質分解の障害、
 ムコ多糖分解の障害、糖タンパク質分解の障害、リソソーム蓄積性障害または白質ジスト
 ロフィーに関連するタンパク質をコードする）、

30

前記組み合わせ医薬。

【請求項15】

請求項1～14のいずれか一項に記載の組み合わせ医薬であって、

（a）ポリマー合成ナノキャリアが、ウイルス導入ベクター抗原をさらに含み、ウイルス
 導入ベクター抗原が、ウイルス抗原である；および／または

（b）免疫抑制剤および／または存在する場合は抗原が、ポリマー合成ナノキャリア中に
 封入される；および／または

40

（c）ポリマー合成ナノキャリアが、ポリマーナノ粒子を含み、ポリマーナノ粒子が、（
 I）非メトキシ末端のプルロニック（登録商標）ポリマーであるポリマーを含み；および
 ／または、（II）ポリエステル、ポリエーテルに接着したポリエステル、ポリアミノ酸
 、ポリカーボネート、ポリアセタール、ポリケタール、多糖、ポリエチルオキサゾリンま
 たはポリエチレンイミンを含み、（i）ポリエステルが、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコー
 ル酸）、ポリ（乳酸-コ-グリコール酸）またはポリカプロラクトンを含み、および／ま
 たは、（ii）ポリマーナノ粒子が、ポリエステルおよびポリエーテルに接着したポリエ
 ステルを含み、および／または、（III）ポリエーテルが、ポリエチレングリコールま
 たはポリプロピレングリコールを含む；および／または、

50

(d) ポリマー合成ナノキャリアの集団の動的光散乱を使用して得られた粒子サイズ分布の平均が、(i) 110 nm、150 nm、200 nm、または250 nmより大きい直径である；および／または、(ii) 直径が、5 μm、4 μm、3 μm、2 μm、1 μm、500 nm、450 nm、400 nm、350 nm、または300 nmより小さい；および／または

(e) ポリマー合成ナノキャリア中に含まれる免疫抑制剤の負荷量が、ポリマー合成ナノキャリア全体の平均で、0.1%と50%（重量／重量）との間、0.1%と25%との間、1%と25%との間、または2%と25%との間である；および／または

(f) ポリマー合成ナノキャリアの集団のアスペクト比が、1：1、1：1.2、1：1.5、1：2、1：3、1：5、1：7または1：10より高い、
前記組み合わせ医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2014年9月7日に出願された2/047,034；2014年9月16日に出願された62/051,255；2015年1月9日に出願された62/101,841；2014年9月7日に出願された62/047,044；2014年9月16日に出願された62/051,258；2015年1月9日に出願された62/101,861；2014年9月7日に出願された62/047,054；2014年9月16日に出願された62/051,263；2015年1月9日に出願された62/101,872；2014年9月7日に出願された62/047,051；2014年9月16日に出願された62/051,267；および2015年1月9日に出願された62/101,882の35 U.S.C. § 119下における利益を主張し、これらの各々の全内容は、本明細書において参考として援用される。

【0002】

発明の分野

本発明は、ウイルス導入ベクター(viral transfer vectors)および抗原提示細胞標的免疫抑制剤(antigen-presenting cell targeted immunosuppressants)を投与するための方法および組成物に関する。

【発明の概要】

【0003】

本明細書において提供されるのは、ウイルス導入ベクターおよび抗原提示細胞標的免疫抑制剤を投与するための方法および組成物である。ウイルス導入ベクターは、本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つにおいて、本明細書において提供される目的のいずれか1つのための治療上の利益を有し得る、タンパク質、ペプチドまたは核酸をコードする、導入遺伝子を含む。

一側面におけるものは、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの対象への共投与により、対象において抗ウイルス導入ベクター減弱応答を確立することを含む方法である。一態様において、対象は、ウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を有しない。

【0004】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、抗ウイルス導入ベクター減弱応答は、ウイルス導入ベクターに対するT細胞応答であり、方法はさらに、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与の前に、抗原提示細胞標的免疫抑制剤なしで、ウイルス導入ベクターを対象に投与することを含む。

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与は、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの反復共投与である。

【0005】

別の側面におけるものは、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの対象への共投与により、対象において抗ウイルス導入ベクター減弱応答を確立すること、な

10

20

30

40

50

らびにウイルス導入ベクターの1以上の反復用量を対象に投与することを含む方法である。

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、抗ウイルス導入ベクター減弱応答は、ウイルス導入ベクターに対するT細胞応答であり、方法はさらに、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与およびウイルス導入ベクターの1以上の反復用量の両方の前に、抗原提示細胞標的免疫抑制剤なしで、ウイルス導入ベクターを対象に投与することを含む。

【0006】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、抗原提示細胞標的免疫抑制剤を、単独でまたはウイルス導入ベクターと組み合わせて提供または入手することを含む。

別の側面におけるものは、初めに抗原提示細胞標的免疫抑制剤なしでウイルス導入ベクターを対象に投与すること、ならびにその後、対象に、ウイルス導入ベクターと抗原提示細胞標的免疫抑制剤とを共に投与することにより、抗ウイルス導入ベクター応答を減弱化することを含む方法であり、ここで、抗ウイルス導入ベクター応答はT細胞応答である。

提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、ウイルス導入ベクターの1以上の反復用量を対象に投与すること、およびその後、ウイルス導入ベクターと抗原提示細胞標的免疫抑制剤との対象への共投与を行うことを含む。

【0007】

別の側面におけるものは、ウイルス導入ベクターの対象への投与より前に、対象におけるウイルス導入ベクターに対する既存の免疫のレベルを決定すること、対象に抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとを共に投与すること、ならびにウイルス導入ベクターの用量を対象に投与することを含む方法である。

提供される方法のいずれか1つの一態様において、決定することは、ウイルス導入ベクターの対象への投与より前に、対象における抗ウイルス導入ベクター抗体のレベルを測定することを含む。提供される方法のいずれか1つの別の態様において、決定することは、ウイルス導入ベクターの対象への投与より前に、対象におけるウイルス導入ベクターに対するT細胞応答のレベルを測定することを含む。

【0008】

提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、ウイルス導入ベクターの1以上の反復用量を含む。

提供される方法のいずれか1つの一態様において、既存の免疫のレベルは、ウイルス導入ベクターのウイルス抗原に対するものである。提供される方法のいずれか1つの一態様において、既存の免疫のレベルは、ウイルス導入ベクターの導入遺伝子発現産物であるタンパク質の抗原に対するものである。

別の側面におけるものは、対象に、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとを共に反復投与することにより、対象におけるウイルス導入ベクターの導入遺伝子発現をエスカレートさせることを含む方法である。

提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、対象における導入遺伝子発現を増大させる抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの反復共投与の頻度および投薬を決定することを含む。

【0009】

別の側面におけるものは、対象に、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとを共に反復投与すること、ならびに、ウイルス導入ベクターの1以上の用量を、該対象がウイルス導入ベクターの反復投与に起因して抗ウイルス導入ベクター免疫応答を発達させることが予測される場合に該対象のために選択されたであろうウイルス導入ベクターの用量よりも少なくなるように選択することを含む方法である。

別の側面におけるものは、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与は、対象における抗ウイルス導入ベクター減弱応答をもたらすことを主体に伝達することにより、該主体を、抗原提示細胞標的免疫抑制剤を、単独でまたはウイルス導入ベクターと組み合わせて購入または入手するように誘導することを含む方法である。

10

20

30

40

50

【0010】

別の側面におけるものは、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの対象への共投与により、有効な反復ウイルス導入ベクター投薬が可能なものであることを主体に伝達することにより、該主体を、抗原提示細胞標的免疫抑制剤を、単独でまたはウイルス導入ベクターと組み合わせて購入または入手するように誘導することを含む方法である。

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、伝達することは、本明細書において記載される方法のいずれか1つを実施するための指導またはウイルス導入ベクターと抗原提示細胞標的免疫抑制剤との共投与の利益を説明する情報をさらに含む。

【0011】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、抗原提示細胞標的免疫抑制剤もしくはウイルス導入ベクターまたはその両方を主体に分配すること(distributing)を含む。

別の側面におけるものは、対象において抗ウイルス導入ベクター減弱応答を生じさせるために、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与の頻度および投薬を決定することを含む方法である。

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、決定された頻度および投薬に従って、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの対象への共投与を指示することを含む。

【0012】

別の側面におけるものは、対象において抗ウイルス導入ベクター減弱応答を生じさせるために、ウイルス導入ベクターの1以上の反復用量と組み合わせた、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与の頻度および投薬を決定することを含む方法である。

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、決定された頻度および投薬に従って、対象への、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与およびウイルス導入ベクターの1以上の反復用量の投与の両方を指示することを含む。

【0013】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、対象への、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与およびウイルス導入ベクターの1以上の反復用量の投与の両方の前に、対象へのウイルス導入ベクターの用量の投与を指示することを含む。

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、対象は、ウイルス導入ベクターが以前に投与されていない対象である。

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、対象は、ウイルス導入ベクターが前に1回より多く投与されていない対象である。

提供される方法のいずれか1つの一態様において、反復用量(単数または複数)中のウイルス導入ベクターの量は、前の用量中のウイルス導入ベクターの量と少なくとも等しい。提供される方法のいずれか1つの一態様において、反復用量(単数または複数)中のウイルス導入ベクターの量は、前の用量中のウイルス導入ベクターの量よりも少ない。

【0014】

提供される方法のいずれか1つの一態様において、抗原提示細胞標的免疫抑制剤もまた、対象に、ウイルス導入ベクターの1以上の反復用量と共に投与される。提供される方法のいずれか1つの一態様において、抗原提示細胞標的免疫抑制剤はまた、対象に、ウイルス導入ベクターの1以上の反復用量のうちの少なくとも1つとも共に投与されない。

提供される方法のいずれか1つの一態様において、対象は、ウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を有しない。

提供される方法のいずれか1つの一態様において、共投与は同時投与である。

【0015】

提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、対象におけるウイルス導入ベクターに対する既存の免疫のレベルを決定することを含む。

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、ウイルス導入ベクターは、レトロウイルス導入ベクター、アデノウイルス導入ベクター、レンチウイルス導入ベクターまたはアデノ随伴ウイルス導入ベクターである。

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、ウイルス導入ベクターはアデノウイルス導入ベクターであり、アデノウイルス導入ベクターは、サブグループA、サブグループB、サブグループC、サブグループD、サブグループE、またはサブグループFのアデノウイルス導入ベクターである。

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、ウイルス導入ベクターはレンチウイルス導入ベクターであり、レンチウイルス導入ベクターは、HIV、SIV、FIV、EIAVまたはヒツジレンチウイルスベクターである。

【0016】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、ウイルス導入ベクターはアデノ随伴ウイルス導入ベクターであり、アデノ随伴ウイルス導入ベクターは、AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10またはAAV11アデノ随伴ウイルス導入ベクターである。

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、ウイルス導入ベクターは、キメラウイルス導入ベクターである。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、キメラウイルス導入ベクターは、AAV-アデノウイルス導入ベクターである。

【0017】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、ウイルス導入ベクターの導入遺伝子は、遺伝子治療導入遺伝子、遺伝子編集導入遺伝子、エクソスキッピング導入遺伝子または遺伝子発現調節導入遺伝子を含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、導入遺伝子が遺伝子治療導入遺伝子である場合、該遺伝子治療導入遺伝子は、治療用タンパク質をコードする。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、治療用タンパク質は、注入可能なまたは注射可能な治療用タンパク質、酵素、酵素補因子、ホルモン、血液または血液凝固因子、サイトカイン、インターフェロンまたは増殖因子である。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、治療用タンパク質は、脂質およびスフィンゴ脂質分解の障害、ムコ多糖分解の障害、糖タンパク質分解の障害、リソソーム蓄積障害または白質ジストロフィーに関連するタンパク質である。

【0018】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、導入遺伝子が遺伝子編集導入遺伝子である場合、遺伝子編集導入遺伝子は、エンドヌクレアーゼをコードする。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、エンドヌクレアーゼは、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、トランスクリプション・アクチベーター・ライク・エフェクターヌクレアーゼ(transcription activator-like effector nuclease) (TALEN)、クラスタード・レギュラリー・インタースペースド・ショート・パリンドロミック・リピート(単数または複数)(clustered regularly interspaced short palindromic repeat(s)) (CRISPR) エンドヌクレアーゼ、またはホーミングエンドヌクレアーゼである。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、エンドヌクレアーゼは、CRISPRエンドヌクレアーゼであり、CRISPRエンドヌクレアーゼは、Cas9エンドヌクレアーゼである。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、Cas9エンドヌクレアーゼは、野生型Cas9エンドヌクレアーゼである。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、Cas9エンドヌクレアーゼは、*Streptococcus pyogenes* (II型) または *S. thermophilus* のものである。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、Cas9エンドヌクレアーゼは、Cas9エンドヌクレアーゼバリエーションである。本明細書において提供さ

10

20

30

40

50

れる方法のいずれか1つの一態様において、Cas9バリエーションは、野生型Cas9に対して少なくとも90%の配列同一性を有する。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、Cas9バリエーションは、少なくとも95%の同一性を有する。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、Cas9バリエーションは、少なくとも99%の同一性を有する。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、Cas9バリエーションは、Cas9二量体、Cas9融合タンパク質、Cas9フラグメント、最小化されたCas9タンパク質、切断ドメインを有しないCas9バリエーション、gRNAドメインを有しないCas9バリエーション、またはCas9リコンビナーゼ融合物である。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、Cas9バリエーションは、fCas9またはFokI-dCas9である。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、導入遺伝子が遺伝子編集導入遺伝子である場合、遺伝子編集導入遺伝子は、ガイドRNA(guide RNA)をコードする。

10

【0019】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、導入遺伝子が遺伝子発現調節導入遺伝子である場合、遺伝子発現調節導入遺伝子は、DNA結合タンパク質または治療用RNAをコードする。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、DNA結合タンパク質は、人工転写因子である。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、治療用RNAは、mRNA翻訳の阻害剤、RNA干渉(RNAi)の剤、触媒活性RNA分子(リボザイム)、トランスファーRNA(tRNA)またはタンパク質もしくは他の分子リガンドに結合するRNA(アプタマー)である。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、RNAiの剤は、二本鎖RNA、一本鎖RNA、マイクロRNA、低分子干渉RNA、低分子ヘアピン型RNAまたは三重鎖形成オリゴヌクレオチドである。

20

【0020】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、導入遺伝子がエクソスキッピング導入遺伝子である場合、該エクソスキッピング導入遺伝子は、アンチセンスオリゴヌクレオチドをコードする。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドはsnRNAである。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、対象は、ジストロフィーを有する。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、筋ジストロフィーを有する。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ジストロフィンに結合する。

30

【0021】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、抗原提示細胞標的免疫抑制剤は、赤血球結合治療剤を含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、赤血球結合治療剤は、ERY1、ERY19、ERY59、ERY64、ERY123、ERY141およびERY162を含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、赤血球結合治療剤はさらに、ウイルス導入ベクター抗原を含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、ウイルス導入ベクター抗原は、ウイルス抗原である。

40

【0022】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、抗原提示細胞標的免疫抑制剤は、負に荷電した粒子を含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、負に荷電した粒子は、ポリスチレン、PLGAまたはダイヤモンド粒子である。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、粒子のゼータ電位は負である。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、粒子のゼータ電位は、-50mVより低い。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、粒子のゼータ電位は、-100mVより低い。

【0023】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、抗原提示細胞標的

50

免疫抑制剤は、アポトーシス小体模倣物および1以上のウイルス導入ベクター抗原を含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、アポトーシス小体模倣物は、1以上のウイルス導入ベクター抗原を含む粒子である。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、1以上のウイルス導入ベクター抗原は、1以上のウイルス抗原を含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、粒子はまた、アポトーシスシグナル分子を含んでもよい。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、粒子は、ポリグリコール酸ポリマー（PGA）、ポリ乳酸ポリマー（PLA）、ポリセバシン酸ポリマー（PSA）、ポリ（乳酸-コ-グリコール酸）コポリマー（PLGA）、ポリ（乳酸-コ-セバシン酸）コポリマー（PLSA）、ポリ（グリコール酸-コ-セバシン酸）コポリマー（PGSA）、ポリラクチド-コ-グリコリド（PLG）、またはポリエチレングリコール（PEG）を含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、粒子の平均直径は、0.1と5 μm との間、0.1と4 μm との間、0.1と3 μm との間、0.1と2 μm との間、0.1と1 μm との間または0.1と500 nmとの間である。

【0024】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、抗原提示細胞標的免疫抑制剤は、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアを含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアはさらに、ウイルス導入ベクター抗原を含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、ウイルス導入ベクター抗原は、ウイルス抗原である。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、免疫抑制剤および／または存在する場合は抗原は、合成ナノキャリア中に封入される。

【0025】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアは、液体ナノ粒子、ポリマーナノ粒子、金属ナノ粒子、界面活性剤ベースのエマルション、デンドリマー、バッキーボール(buckyball)、ナノワイヤー、ウイルス様粒子またはペプチドもしくはタンパク質粒子を含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアは、ポリマーナノ粒子を含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、ポリマーナノ粒子は、非メトキシ末端のプルロニックポリマーであるポリマーを含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、ポリマーナノ粒子は、ポリエステル、ポリエーテルに接着したポリエステル、ポリアミノ酸、ポリカーボネート、ポリアセタール、ポリケタール、多糖、ポリエチルオキサゾリンまたはポリエチレンイミンを含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、ポリエステルは、ポリ（乳酸）、ポリ（グリコール酸）、ポリ（乳酸-コ-グリコール酸）またはポリカプロラクトンを含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、ポリマーナノ粒子は、ポリエステルおよびポリエーテルに接着したポリエステルを含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、ポリエーテルは、ポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールを含む。

【0026】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアの集団の動的光散乱を使用して得られた粒子サイズ分布の平均は、110 nmより大きい直径である。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、直径は、150 nmより大きい。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、直径は、200 nmより大きい。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、直径は、250 nmより大きい。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、直径は、5 μm より小さい。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、直径は、4 μm より小さい。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、直径は、3 μm より小さい。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、直径は、2 μm より小さい。

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、直径は、1 μm より小さい。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、直径は、500 nmより小さい。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、直径は、450 nmより小さい。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、直径は、400 nmより小さい。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、直径は、350 nmより小さい。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、直径は、300 nmより小さい。

【0027】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリア中に含まれる免疫抑制剤の負荷量(load)は、合成ナノキャリア全体の平均で、0.1%と50%（重量／重量）との間である。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、負荷量は、0.1%と25%との間である。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、負荷量は、1%と25%との間である。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、負荷量は、2%と25%との間である。

10

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、免疫抑制剤は、NF- κ B経路の阻害剤である。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、免疫抑制剤は、ラパマイシンである。

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、合成ナノキャリアの集合のアスペクト比は、1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7または1:10よりも大きい。

20

【0028】

本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、抗体、T細胞またはB細胞応答などの抗ウイルス導入ベクター応答を減弱化させるか、導入遺伝子発現をエスカレートさせるか、または抗ウイルス導入ベクター応答を確立するプロトコルに従う方法を行うことを含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、抗体、T細胞またはB細胞応答などの抗ウイルス導入ベクター応答を減弱化させるか、導入遺伝子発現をエスカレートさせるか、または抗ウイルス導入ベクター応答を確立するプロトコルを決定することを含む。

【0029】

提供される方法のいずれか1つの別の態様において、方法はさらに、対象に投与する前、投与中または投与後に、ウイルス導入ベクターに対する抗体免疫応答を評価することを含む。

30

一側面において、例のいずれか1つにおいて記載されるような方法または組成物が提供される。

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

別の側面において、方法のいずれか1つは、本明細書において記載される疾患または障害のいずれか1つを処置することにおける使用のためのものである。別の側面において、方法のいずれか1つは、抗ウイルス導入ベクター応答を減弱化すること、減弱化された抗ウイルス導入ベクター応答を確立すること、導入遺伝子発現をエスカレートさせることにおける使用のため、またはウイルス導入ベクターの繰り返し投与のためのものである。

40

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】図1は、プライムまたはブーストにおいて、ラパマイシンを含む合成ナノキャリアと共にまたはこれを用いずにAVVを注射したマウスの肝臓におけるGFP発現を示す。最初の「クリーン」ゲートにより除外される高い側方散乱デブリ（合計の2~3%、コラゲナーゼ処置の副生成物）を例外として、懸濁液中の全細胞をGFP発現について分析した。全ての残りの細胞を相対的GFP強度についてゲーティングした（FL-1チャネル）。示された数は、親集団全体のGFP陽性細胞のパーセンテージを表す。

50

【図2】図2は、AAVを注射されたマウスの肝臓におけるGFP発現を、ラパマイシンを含む合成ナノキャリアと共のまたはこれを用いないブーストの関数として示す。示されたデータは、図1におけるものと同じであるが、AAVブーストがラパマイシンを含む合成ナノキャリアとの共投与を用いたか否かによって群化される（群5および6からのブーストされていない試料もまた、別の「スーパーグループ」として示す）。

【0031】

【図3】図3は、ラパマイシンを含む合成ナノキャリアと共にまたはこれを用いずにAAVを注射された動物の肝臓におけるGFP高細胞の占有率を示す。GFP陽性細胞（図1において表されるとおり）をゲーティングし、次いで、親集団における平均よりも10倍高い平均GFP蛍光強度を有する集団を、再度ゲーティングした。表される数は、図1において見られるとおりの親GFP陽性集団からのパーセンテージである。

10

【図4】図4は、マウスを、ラパマイシンを含む合成ナノキャリアの共投与によりまたはこれを用いずに、単回AAV-GFP接種を受けさせた後で、d14に出血させ、その血清を、AAVに対する抗体についてアッセイした実験からの結果を示す。1:40の血清希釈物についての最大ODを、全マウスについて示す。バックグラウンド正常マウス血清は、0.227のODを有した。

【0032】

【図5】図5は、マウスを、ラパマイシンを含む合成ナノキャリアの共投与（i.v.）を用いてまたはこれを用いずに、単回AAV-GFP接種を受けさせた後で、第14、21および33日において出血させ、その血清を、AAVに対する抗体についてアッセイした実験からの結果を示す。1:40の血清希釈物についての最大ODを、全マウスについて示す。バックグラウンド正常マウス血清活性を示す。統計学的有意性は、二要因ANOVAを用いて計算した。

20

【図6】図6は、マウスに、第0日および21日において、一方または両方の注射においてラパマイシンを含む合成ナノキャリアの共投与（i.v.）を用いてまたはこれを用いずに、AAV-GFPを注射し、次いで、第14日および33日に出血させ、その血清を、AAVに対する抗体についてアッセイした実験からの結果を示す。1:40の血清希釈物についての最大ODを、全マウスについて示す。バックグラウンド正常マウス血清活性を示す。統計学的有意性は、二要因ANOVAを用いて計算した。

【0033】

30

【図7】図7は、図6のものと同じデータを、個々のマウスについての読み取り値を示して提供する。ブースト（d21）においてラパマイシンを含む合成ナノキャリアのみで処置された群中の2個体のマウスは、d14においては陽性であったにもかかわらず（黒矢印）、第33日において検出可能な抗体を示さなかった。プライムにおいてラパマイシンを含む合成ナノキャリアで処置された両群中の5個体のマウスのうちの1個体は、d33において検出可能な抗体レベルを有し（破線矢印）、プライムおよびブーストの両方においてラパマイシンを含む合成ナノキャリアで処置された群からのマウスは、より低い抗体レベルを有した（白菱形）。

【図8】図8は、マウスを、ラパマイシンを含む合成ナノキャリアの共投与を用いてまたはこれを用いずに単回AAV-GFP接種を受けさせた後で、d14に出血させ、その血清を、AAVに対する抗体についてアッセイした実験からの結果を示す。1:40の血清希釈物についての最大ODを、全マウスについて示す。バックグラウンド正常マウス血清は、0.227のODを有した。N=15マウス/群。

40

【0034】

【図9】図9は、マウスを、ラパマイシンを含む合成ナノキャリアの共投与（i.v.）を用いてまたはこれを用いずに単回AAV-GFP接種を受けさせた後で、第14、21および33日において出血させ、その血清を、AAVに対する抗体についてアッセイした実験からの結果を示す。1:40の血清希釈物についての最大ODを、全マウスについて示す。バックグラウンド正常マウス血清レベルを示す。統計学的有意性は、二要因ANOVAを用いて計算した。第14日においてはN=15マウス/群、第21および33日においては5マ

50

ウス／群。

【図10】図10は、マウスに、第0日および21日において、示すとおり一方または両方の注射においてラパマイシンを含む合成ナノキャリアの共投与（i.v.）を用いてまたはこれを用いずに、AAV8-GFPを注射し、次いで、第14日および33日において出血させた実験からの結果を示す。血清を、AAV8に対する抗体についてELISAによりアッセイした。1:40の血清希釈物についてのODを、全マウスについて示す。正常マウス血清バックグラウンドレベルを、点線により示す。統計学的有意性は、二要因ANOVAを用いて計算した。

【0035】

【図11】図11は、プライムまたはブーストにおいて、ラパマイシンを含む合成ナノキャリアと共にまたはこれを用いずにAVVを注射したマウスの肝臓におけるGFP発現を示す。最初の「クリーン」ゲートにより除外される高い側方散乱デブリ（合計の2〜3%、コラゲナーゼ処置の副生成物）を例外として、懸濁液中の全細胞をGFP発現について分析した。全ての残りの細胞を相対的GFP強度についてゲーティングした（FL-1チャンネル）。示された数は、親集団全体のGFP陽性細胞のパーセンテージを表す。

【図12】図12は、プライムおよび／またはブーストにおいてラパマイシンを含む合成ナノキャリアと共にまたはこれを用いずにAVVを注射したマウスの肝臓におけるRFP発現を示す。高い側方散乱デブリを例外として、懸濁液中の全細胞をRFP発現について分析した。示された数は、肝細胞の親集団全体のRFP陽性細胞のパーセンテージを表す。

【0036】

【図13】図13は、AAV-GFP単独で、またはラパマイシンを含む合成ナノキャリアと組み合わせて免疫したマウスにおける細胞傷害活性を示す。動物に、第0日および21日において、ラパマイシンを含む合成ナノキャリアと共にまたはこれを用いずに、AAV8-GFP（i.v.）を注射した。AAVカプシドタンパク質からの優性な細胞傷害性ペプチドとGFP導入遺伝子との組み合わせをパルスした標的細胞を、最後の注射の7日後（第28日）に投与し、それらの生存率を、18時間後に測定し、ペプチドでパルスしていない対照細胞のものと比較した。

【図14】図14は、AAV-GFP単独でまたはラパマイシンを含む合成ナノキャリアと組み合わせて免疫したマウスにおけるAAV特異的なIFN- γ 産生を示す。動物に、第0日および17日において、NCSと共にまたはこれを用いずに、AAV-GFPを注射した（i.v.）。第25日において脾細胞を単離し、in vitroでAAVカプシドタンパク質からの優性なMHCクラスI結合ペプチドを7日間にわたり接種し、次いで、同じペプチドによるELISpotによりアッセイした。各試料を、2回の複製において流し、バックグラウンドを減算して提示した。

【0037】

【図15】図15は、AAV-GFP単独でまたはラパマイシンを含む合成ナノキャリアと組み合わせて免疫したマウスにおけるGFP特異的なIFN- γ 産生を示す。動物に、第0日および17日において、ラパマイシンを含む合成ナノキャリアと共にまたはこれを用いずに、AAV8-GFPを注射した（i.v.）。脾細胞を単離して、in vitroでGFPからのMHCクラスI結合ペプチドを7日間にわたり接種し、次いで、同じペプチドによるELISpotによりアッセイした。各試料を、2回の複製において流し、バックグラウンドを減算して提示した。

【図16】図16は、実験のためのデザインを示す。

【0038】

【図17】図17は、マウスに、第0日において、100 μ gのラパマイシンを運搬する合成ナノキャリアの共投与（i.v.）を用いてまたはこれを用いずに、rAAV2/8-ルシフェラーゼを注射し、その後、第14日においてAAV-hFIXのi.v.注射により負荷をかけた(challenged)実験からの結果を示す。示すとおりの多様な時点において血清を収集し、AAV8に対する抗体（左）について、およびヒト第IX因子タンパク質（右）のレベルについてアッセイした。

10

20

30

40

50

【図18】図18は、実験のための実験デザインを示す。

【0039】

【図19】図19は、実験からの結果を示す。オスC57BL/6マウスに、第0日において、rAAV2/8-ルシフェラーゼを、100 μ gのラパマイシンを運搬する合成ナノキャリアと共に注射し(i.v.)、次いで第21日において、rAAV2/8-hFIXを100 μ gのラパマイシンを、運搬する合成ナノキャリアと共に注射した。対照動物は、同様に、しかし、ラパマイシンを含む合成ナノキャリアの代わりに空のナノキャリアで処置した。示すと通りの多様な時点において血清を収集し、AAVに対する抗体(左)について、およびヒトFIXタンパク質(右)のレベルについてELISAによりアッセイした。肝臓におけるAAV2/8-FIXベクターのコピー数(中)を、PCRにより決定した。

10

【図20】図20は、実験のための実験デザインを示す。

【0040】

【図21】図21は、第0日におけるラパマイシンを運搬する合成ナノキャリアとrAAV2/8ベクター(AAV2/8-Luc)とのi.v.での共投与が、第21日において投与されたAAV5ベクター(AAV5-hFIX)に対する抗体応答に対して顕著な影響を有しなかったことを示す結果を提供する。対照的に、結果はまた、第0日においてラパマイシンを含む合成ナノキャリアとrAAV2/8-Lucとで共処置されたマウスが、第21日において、完全フロイントアジュバント(CFA)中の組み換えhFIXタンパク質による免疫に対して強力な応答を示すことを示した。

20

【発明を実施するための形態】

【0041】

発明の詳細な説明

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

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

30

【0042】

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

40

【0043】

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

50

【0044】

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

10

【0045】

A. 序論

抗ウイルス導入ベクターは、遺伝子治療、遺伝子編集、遺伝子発現調節およびエクソンスキッピングなどの多様な適用のための有望な治療剤である。ウイルス導入ベクターは、したがって、治療用のタンパク質または核酸をコードする導入遺伝子を含んでもよい。かかるものの例として、エンドヌクレアーゼおよび／またはガイドRNA、マイクロRNA (miRNA)、低分子干渉RNA (siRNA)、ならびにメッセンジャーRNA中の変異部位に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチド（核内低分子RNA (snRNA) など）が挙げられる。残念なことに、これらの治療剤の見込みは、当該分野においてまだ実現されていない。これは大部分、ウイルス導入ベクターに対する細胞性および体液性の免疫応答に起因する。これらの免疫応答は、抗体、B細胞およびT細胞応答を含み、ウイルス導入ベクターのウイルス抗原、例えばウイルスカプシドまたはコートタンパク質またはそのペプチドに対して特異的であり得る。

20

【0046】

現在、多くの潜在的な患者が、ウイルス導入ベクターの基礎となるウイルスに対して、何らかのレベルの既存の免疫を保有する。実際に、ウイルス抗原に対する抗体、例えばアデノ随伴ウイルスに対する抗体は、ヒト集団において高度に普及している。加えて、既存の免疫のレベルが低い場合であっても、例えばウイルス導入ベクターの低い免疫原性に起因して、かかる低レベルですら、首尾よい形質導入を妨げ得る（例えば、Jeune et al., Human Gene Therapy Methods, 24:59-67 (2013)）。したがって、低レベルの既存の免疫ですら、特定のウイルス導入ベクターの使用を妨害し得、このことが、医師に、同じようには有効ではない可能性がある異なる血清型のウイルスに基づくウイルス導入ベクターを選択するか、または、別のウイルス導入ベクター治療が利用可能でない場合、異なる型の治療を選択することすら要求する場合がある。

30

【0047】

加えて、アデノ随伴ベクターなどのウイルスベクターは、高度に免疫原性であり得、体液性および細胞媒介性免疫を惹起し得、これは、特に再投与に関する効力を損ない得る。実際に、ウイルス導入ベクターに対する細胞性および体液性の免疫応答は、ウイルス導入ベクターの単回投与の後で発生し得る。ウイルス導入ベクター投与の後で、中和抗体の力価は増大して数年間にわたり高いままであり得、ウイルス導入ベクターの再投与の有効性を低下させる可能性がある。なぜならば、ウイルス導入ベクターの反復投与は、一般に望ましくない免疫応答の増強をもたらすからである。加えて、例えばカプシドタンパク質などのウイルス抗原に対する再暴露などにより、所望される導入遺伝子産物を発現する形質導入された細胞を取り除く、ウイルス導入ベクター特異的なCD8+ T細胞が生じる場合がある。実際に、AAVカプシド抗原が、AAVウイルス導入ベクターを形質導入した肝実質細胞の、免疫により媒介される破壊を引き起こしたことが示されている（例えば、Manno et al., Nature Medicine, Vol. 12, No. 3, 2006）。多くの治療的適用のために、長期の利益のために複数のラウンドのウイルス導入ベクターの投与が必要となるであろうこと、ならびに、本明細書において提供される方法および組成物を用いなければ、そうする能力は、再投与が必要とされる場合に特に著しく限定されることが予測されるであろうことが

40

50

理解される。

【0048】

ウイルス導入ベクター抗原は、単回投与の後いくらかの時間にわたり、例えば少なくとも数週間にわたり存続し得るために、治療のためのウイルス導入ベクターの使用に関連する問題は、さらに複雑化する（例えば、Nathawani et al., N Engl J Med 365; 25, 2011; Nathawani et al., N Engl J Med 371; 21, 2014）。例として、アデノ随伴ウイルス血清型8（AAV8）ウイルス導入ベクターの単回注入を受けた患者において、持続性のカプシド特異的な体液性免疫が生じることが見出されている（例えば、Nathawani et al., N Engl J Med 371; 21, 2014）。抗原の持続性は、さらに、ウイルス導入ベクターを首尾よく用いる能力を妨げる。ウイルス導入ベクターによる治療が成功するためには、ウイルス導入ベクターに対する免疫応答を逃れることが重要である。しかし、本発明の前には、それを行い、免疫抑制剤の長期投与を必要とすることなく長期の免疫応答の減弱化を達成する方法は存在しなかった。

【0049】

本発明者らは、驚くべきことに、かつ予想外のことに、上記の問題および制限は、本明細書において開示される発明を実施することにより克服することができることを見出した。処置のためのウイルス導入ベクターの効果的な使用に対する前述の障害に対する解決方法を提供する方法および組成物が提供される。特に、予想外のことに、抗ウイルス導入ベクター免疫応答は、本明細書において提供される方法および関連する組成物により減弱化することができることを見出した。方法および組成物は、ウイルス導入ベクターによる処置の有効性を増大し、ウイルス導入ベクターの投与を反復する必要がある場合であっても、長期の免疫減弱化を提供することができる。

本発明をここで、以下により詳細に記載する。

【0050】

B. 定義

「投与すること」または「投与」または「投与する」とは、材料を、薬理学的に有用である様式において、対象に与えるかまたは分配することを意味する。当該用語は、「投与させること(causing to be administered)」を含むことを意図される。「投与させること」とは、別の当事者が材料を投与することを、直接的または間接的に、引き起こすこと、駆り立てること、奨励すること、補助すること、誘導することまたは指示することを含む。本明細書において提供される方法のいずれか1つは、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとを共に投与するステップを含むか、これをさらに含んでもよい。幾つかの態様において、共投与は、反復して行われる。なおさらなる態様において、共投与は同時投与である。

【0051】

本明細書において提供される組成物または対象への投与のための投与形態に関する「有効量」とは、対象において1以上の所望される結果、例えば、ウイルス導入ベクターに対する免疫応答の軽減もしくは除去、または抗ウイルス導入ベクター減弱応答の発生をもたらす組成物または投与形態の量を指す。有効量は、in vitroまたはin vivoでの目的のためのものであってよい。in vivoでの目的のために、量は、医師が、ウイルス導入ベクターの投与の結果として望ましくない免疫応答を経験し得る対象のための臨床的利益を有し得ると考えるものであってよい。本明細書において提供される方法のいずれか1つにおいて、投与される組成物は、本明細書において提供されるような有効量のうちのいずれか1つにおけるものであってよい。

【0052】

有効量は、望ましくない免疫応答のレベルを低下させることを含み得るが、幾つかの態様において、それは、望ましくない免疫応答を完全に予防することを含む。有効量はまた、望ましくない免疫応答の発生を遅延させることを含んでもよい。有効量は、所望される治療的エンドポイントまたは所望される治療効果をもたらす量であってもよい。有効量は、好ましくは、対象において、ウイルス導入ベクター抗原などの抗原に対して、免疫寛容

原性免疫応答をもたらす。有効量はまた、好ましくは、導入遺伝子発現の増大をもたらし得る（ウイルス導入ベクターにより送達されている導入遺伝子）。このことは、対象における多様な目的の組織または系における導入遺伝子タンパク質濃度を測定することにより、決定することができる。この発現の増大は、局所的にまたは全身で測定することができる。前述のもののいずれかの達成は、慣用的な方法によりモニタリングすることができる。

【0053】

提供される組成物および方法のいずれか1つのいくつかの態様において、有効量は、ウイルス導入ベクターに対する免疫応答の軽減もしくは除去、または抗ウイルス導入ベクター減弱応答の発生などの所望される免疫応答は、対象において、少なくとも1週間、少なくとも2週間または少なくとも1か月間にわたり持続する。提供される組成物および方法のいずれか1つの他の態様において、有効量は、ウイルス導入ベクターに対する免疫応答の軽減もしくは除去、または抗ウイルス導入ベクター減弱応答の発生などの、測定可能な所望される免疫応答をもたらすものである。幾つかの態様において、有効量は、測定可能な所望される免疫応答を（例えば特定のウイルス導入ベクター抗原に対して）、少なくとも1週間、少なくとも2週間または少なくとも1か月間にわたりもたらすものである。

【0054】

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

【0055】

「抗ウイルス導入ベクター免疫応答」または「ウイルス導入ベクターに対する免疫応答」または類似のものは、ウイルス導入ベクターに対する任意の望ましくない免疫応答を指す。幾つかの態様において、望ましくない免疫応答は、ウイルス導入ベクターまたはその抗原に対する抗原特異的免疫応答である。幾つかの態様において、免疫応答は、ウイルス導入ベクターのウイルス抗原に対して特異的である。他の態様において、免疫応答は、ウイルス導入ベクターの導入遺伝子によりコードされるタンパク質またはペプチドに対して特異的である。幾つかの態様において、免疫応答は、ウイルス導入ベクターのウイルス抗原に対して特異的であり、ウイルス導入ベクターの導入遺伝子によりコードされるタンパク質またはペプチドに対しては特異的でない。免疫応答は、抗ウイルス導入ベクター抗体応答、抗ウイルス導入ベクターT細胞免疫応答、例えばCD4+T細胞またはCD8+T細胞の免疫応答、または抗ウイルス導入ベクターB細胞免疫応答であってよい。

【0056】

抗ウイルス導入ベクター免疫応答は、それが、対象において何らかの様式において、または対象もしくは別の対象において予測もしくは測定される応答と比較して、低下するかまたは取り除かれる場合に、「抗ウイルス導入ベクター減弱応答」であるといえる。幾つかの態様において、本明細書において提供される共投与の後に対象から得られた生物学的試料を用いて測定される、当該対象における抗ウイルス導入ベクター減弱応答は、別の対象（試験対象など）から、この他方の対象への、抗原提示細胞標的免疫抑制剤の共投与なしでのウイルス導入ベクター投与の後に得られた生物学的試料を用いて測定される抗ウイルス導入ベクター免疫応答と比較して、低下した抗ウイルス導入ベクター免疫応答（T細胞、B細胞または抗体応答など）を含む。幾つかの態様において、生物学的試料は、他方の対象から、この他方の対象への、抗原提示細胞標的免疫抑制剤の投与なしでのウイルス導入ベクターの投与の後に、得られる。幾つかの態様において、抗ウイルス導入ベクター減弱応答は、本明細書において提供される共投与の後に対象から得られた生物学的試料中の、対象の生物学的試料に対して行われるその後のウイルス導入ベクターのin vitroでの負荷(challenge)により、別の対象（試験対象など）から、この他方の対象への、抗原提示細胞標的免疫抑制剤の共投与なしでのウイルス導入ベクターの投与の後に得られた生物学的試料に対して行われるウイルス導入ベクターのin vitro負荷の後で検出される、抗ウ

ウイルス導入ベクター免疫応答と比較して、低下した抗ウイルス導入ベクター免疫応答（T細胞、B細胞または抗体応答など）である。幾つかの態様において、抗ウイルス導入ベクター減弱応答は、本明細書において提供される共投与の後に、対象における、その後の対象に投与されたウイルス導入ベクター負荷により、試験対象などの別の対象における、抗原提示細胞標的免疫抑制剤の共投与なしでのこの他方の対象へのウイルス導入ベクターの投与の後に、この他方の対象に投与されたウイルス導入ベクター負荷による抗ウイルス導入ベクター免疫応答と比較して低下した、抗ウイルス導入ベクター免疫応答（T細胞、B細胞または抗体応答など）である。幾つかの態様において、ウイルス導入ベクターは、抗原提示細胞標的免疫抑制剤の投与なしで投与される。

【0057】

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

「抗原提示細胞標的免疫抑制剤」とは、免疫寛容原性効果を有する抗原提示細胞（APC）をもたらす剤を意味する。かかる免疫抑制剤は、APCへの送達および免疫寛容原性効果をもたらすキャリアとカップリングされている免疫抑制剤、ならびにその形態または特徴のおかげでAPC免疫寛容原性効果をもたらすことができる剤を含む。抗原提示細胞標的免疫抑制剤の例として、限定されないが、本明細書において記載される免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア；本明細書において記載される免疫抑制剤であって、APCを標的とする抗体またはその抗原結合フラグメント（またはAPCを標的とする他のリガンド）、赤血球結合治療剤、ならびにその特徴のおかげでAPC免疫寛容原性免疫応答をもたらす粒子などにカップリングされているものが挙げられる。

【0058】

抗原提示細胞標的免疫抑制剤が免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアである場合、幾つかの態様において、免疫抑制剤は、合成ナノキャリアの構造を構成する材料に追加する要素である。例えば、一態様において、合成ナノキャリアが1以上のポリマーからなる場合、免疫抑制剤は、追加の、および幾つかの態様においては1以上のポリマーに接着した、化合物である。別の例として、一態様において、合成ナノキャリアが、1以上の脂質からなる場合、免疫抑制剤は、やはり、追加のものであり、および幾つかの態様においては、1以上の脂質に接着している。抗原提示細胞標的免疫抑制剤が免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアである態様において、合成ナノキャリアの材料はまた、免疫寛容原性効果をもたらす、免疫抑制剤は、免疫寛容原性効果をもたらす合成ナノキャリアの材料に加えて存在する要素である。

【0059】

「抗原特異的」とは、目的の抗原の存在から生じる、または目的の抗原を特異的に認識するかもしれないこれに結合する分子を生じる免疫応答を指す。一般に、目的の抗原に対するかかる応答は測定可能であるが、他の抗原に関しては応答は低下しているかまたは無視し得る程度である。例えば、免疫応答が抗原特異的抗体産生である場合、目的の抗原に選択的に結合するが、他の抗原には結合しない抗体が産生される。別の例として、免疫応答がCD4+またはCD8+T細胞の産生を含む場合、抗原特異的CD4+またはCD8+T細胞は、それぞれMHCクラスIまたはII抗原に関して、抗原提示細胞（APC）により、またはCD8+T細胞の場合には抗原が産生される任意の他の細胞（例えばウイルスに感染した細胞）により提示される場合、目的の抗原またはその部分に結合することができる。免疫寛容の場合、抗原特異性とは、他の無関係なまたは無関連な抗原（例えば、標的抗原から時間的または空間的に転位置される抗原）と比較して、標的抗原に対する特異的な免疫応答の選択的な予防または阻害を指す。

【0060】

「免疫応答を評価すること」は、in vitroまたはin vivoでの免疫応答のレベル、存在または不在、減少、増大などの任意の測定または決定を指す。かかる測定または決定は、対

10

20

30

40

50

象から得られた1以上の試料に対して行うことができる。かかる評価は、本明細書において提供されるかまたは当該分野において公知の他の方法のいずれか1つにより行うことができる。評価は、抗体またはT細胞（例えば対象からの試料中の、例えばウイルス導入ベクターに対して特異的なもの）の数またはパーセンテージを評価することであってもよい。評価はまた、免疫応答に関連する任意の効果を評価すること、例えばサイトカインの存在または不在、細胞表現型などを測定することであってもよい。本明細書において提供される方法のいずれか1つは、ウイルス導入ベクターまたはその抗原に対する免疫応答を評価するステップを含んでもよく、またはこれをさらに含んでもよい。評価は、直接的に行われても間接的に行われてもよい。当該用語は、別の当事者が免疫応答を評価することを、引き起こすか、駆り立てるか、奨励するか、補助するか、誘導するかまたは指示する作用を含むことを意図する。

10

【0061】

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

20

「平均」とは、本明細書において用いられる場合、他に記述されないかぎり、算数的平均値を指す。

【0062】

「共に(concomitantly)」とは、対象に、時間的に相関する、好ましくは、免疫応答の調節を提供するために時間的に十分に相関する様式において、2以上の材料／剤を投与すること、およびさらに好ましくは2以上の材料／剤が組み合わせて投与されることを意味する。態様において、共投与は、2以上の材料／剤の、特定された期間内、好ましくは1か月間以内、より好ましくは1週間以内、なおより好ましくは1日以内、さらに好ましくは1時間以内の投与を包含してもよい。態様において、材料／剤は、繰り返し共投与してもよい；それは、例において提供されるような、1回より多くの機会における共投与である。

30

【0063】

「決定すること」とは、事実、関係または量などの何かを客観的に確認することを意味する。幾つかの態様において、対象がウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を有するか否かを決定することができる。当該用語は、「決定させること」を含むことを意図される。「決定させること」とは、別の当事者が本明細書において提供されるような決定するステップを行うことを、引き起こすこと、駆り立てること、奨励すること、補助すること、誘導することまたは指示することを意味する。幾つかの態様において、決定するステップは、対象がウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を有するか否かを決定することができる。本明細書において提供される方法のいずれか1つは、対象がウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を有するか否かを決定するステップを含む、本明細書において記載される決定するステップを含んでもよい、またはこれをさらに含んでもよい。

40

【0064】

「指示すること」とは、何らかの様式において、別の当事者が本明細書において提供される1以上のステップを行う様式において、他方の当事者の行動に影響を及ぼすこと、例えば何らかの行動を取ることを、例えば他方の当事者の行動を引き起こすかまたはこれを制御することを意味する。幾つかの態様において、他方の当事者は、指示することを行う当事者の代理人である。他の態様において、他方の当事者は、指示することを行う当事者の

50

代理人であるが、他方の当事者により行われるステップは、指示することに起因するかまたは指示することの結果である。したがって、指示することは、当該1以上のステップの実施を条件とする利益を受けるために、1以上のステップを行うことを指導するかまたはこれを行う指導を提供することを含む。

【0065】

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

「用量」とは、所与の時間にわたる対象への投与のための特定の量の薬理学的および／または免疫学的に活性な材料を指す。「前の用量」とは、材料のより以前の用量を指す。一般的に、本発明の方法および組成物における抗原提示細胞標的免疫抑制剤および／またはウイルス導入ベクターの用量は、抗原提示細胞標的免疫抑制剤および／またはウイルス導入ベクターの量を指す。あるいは、抗原提示細胞標的免疫抑制剤が、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアである場合、用量は、所望される量の抗原提示細胞標的免疫抑制剤を提供する合成ナノキャリアの数に基づいて投与することができる。用量が、反復投薬に関して用いられる場合、用量とは、反復用量の各々の量を指し、これらは同じであっても異なってもよい。

【0066】

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

【0067】

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

【0068】

「確立すること」または「確立する」とは、転帰もしくは結果を生じること、または何か（事実もしくは関係など）を推論することを意味する。この用語のその使用は、それが用いられる文脈に基づいて明らかであろう。転帰または結果を生じるために、確立することは、多くの方法において達成することができ、これは、限定されないが、転帰または結果を達成するステップを取ることを含む。例えば、幾つかの態様において、本明細書において提供される材料の投与は、転帰または結果を生じ得る。何か（事実もしくは関係など）を決定するために、確立することは、実験を行うこと、推定を行うことなどにより達成することができ、例えば、ウイルス導入ベクターの投与が対象において抗ウイルス導入ベクター免疫応答を生じる可能性が高いことを確立することは、対象に対する実験（対象から得られる1以上の試料に対するものを含む）の結果に基づき得る。一般に、対象において抗ウイルス導入ベクター免疫応答が生じる可能性は、本明細書において提供される抗原提示細胞標的免疫抑制剤の投与の不在下におけるウイルス導入ベクターの投与（または、いくつかの態様においては反復投与）により、かかる応答が生じる可能性である。同様に

10

20

30

40

50

、対象がウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を有することを確立することはまた、対象に対する実験（対象から得られる1以上の試料に対するものを含む）の結果に基づき得る。別の態様において、かかる確立は、対象における免疫応答を評価することにより決定することができる。投与のための用量を確立することに関して、抗原提示細胞標的免疫抑制剤またはウイルス導入ベクターの用量は、試験用量から開始して、投与のための用量を決定するための既知のスケール技術（例えば非比例的な等尺性のスケール技術）を用いることにより、決定することができる。かかるものはまた、本明細書において提供されるプロトコルを確立するためにも用いることができる。「確立すること」または「確立する」とは、「確立させること」を含む。「確立させること」は、主体が、本明細書において提供される確立するステップを行うことを、引き起こすこと、駆り立てること、奨励すること、補助すること、誘導することまたは指示すること、または該主体と協調してそのために行動することを意味する。本明細書において提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、方法は、本明細書において記載される確立するステップのいずれか1つを含んでもよく、またはこれをさらに含んでもよい。

10

【0069】

「エクソンスキッピング導入遺伝子」とは、エクソンスキッピングを発生させ得るアンチセンスオリゴヌクレオチドをコードする任意の核酸を意味する。「エクソンスキッピング」とは、タンパク質産生の間に、mRNA前駆体のレベルにおいてスキップされて取り除かれるエクソンを指す。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、スプライス部位またはエクソン内の調節エレメントと干渉し得る。これは、遺伝子変異の存在に関わらず、短縮された部分的に機能的なタンパク質をもたらす。一般に、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、変異特異的であり、メッセンジャーRNA前駆体中の変異部位に結合して、エクソンスキッピングを引き起こす。

20

【0070】

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

30

【0071】

「頻度」とは、抗原提示細胞標的免疫抑制剤、ウイルス導入ベクターまたは両方を組み合わせたもの（例えば共投与によるもの）が対象に投与される時間の間隔を指す。

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

40

【0072】

50

本明細書において提供される対象は、本明細書において提供される疾患または障害のいずれか1つであってよく、導入遺伝子は、本明細書において提供されるタンパク質のいずれか1つ、またはその内因性バージョンにおける欠損を補正するために用いることができる遺伝子編集剤をコードするものである。あるいは、いくつかの態様において、遺伝子を編集するウイルス導入ベクターはまた、本明細書において提供される治療用タンパク質またはその部分をコードする導入遺伝子を含んでもよい。幾つかの態様において、遺伝子を編集するウイルス導入ベクターは、本明細書において提供される治療用タンパク質またはその部分をコードする導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターと共に、対象に投与することができる。

【0073】

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

【0074】

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

【0075】

「遺伝子治療導入遺伝子」とは、タンパク質をコードする核酸であって、細胞中に導入された場合にタンパク質の発現を指示するものを指す。好ましくは、タンパク質は、治療用タンパク質である。本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、ウイルス導入ベクターにより遺伝子治療導入遺伝子が投与される対象は、タンパク質の対象の内因性バージョンが欠損しているか、または限定された量においてのみ産生されるか、全く産生されない疾患または障害を有する。幾つかの態様において、コードされたタンパク質は、ヒトのカウンターパートを有しないが、疾患または障害の処置において治療的に有益な効果を提供することが予測される。

【0076】

「免疫抑制剤」は、好ましくはAPCに対する効果を通して、免疫寛容原性効果を引き起こす化合物を意味する。免疫寛容原性効果は、一般に、APCまたは他の免疫細胞による、全身性および／または局所的な調節であって、耐久的な様式において抗原に対する望ましくない免疫応答を阻害または予防するものを指す。一態様において、免疫抑制剤は、APCに、1以上の免疫エフェクター細胞における調節性の表現型を促進させるものである。例えば、調節性の表現型は、抗原特異的CD4+T細胞またはB細胞の産生、誘導、刺激または動員の阻害、抗原特異的抗体の産生の阻害、Treg細胞（例えば、CD4+CD25^{high}FoxP3+Treg細胞）の産生、誘導、刺激または動員などにより特徴づけられ得る。このことは、CD4+T細胞またはB細胞の調節性の表現型への変換の結果であってもよい。このことはまた、CD8+T細胞、マクロファージおよびiNKT細胞などの他の免疫細胞におけるFoxP3の誘導の結果であってもよい。一態様において、免疫抑制剤は、APCが抗原をプロセ

10

20

30

40

50

ッシングした後の応答に影響を及ぼすものである。別の態様において、免疫抑制剤は、抗原のプロセッシングに干渉するものではない。さらなる態様において、免疫抑制剤は、アポトーシスシグナル分子ではない。別の態様において、免疫抑制剤は、リン脂質ではない。
【0077】

免疫抑制剤として、これらに限定されないが、以下が挙げられる：スタチン；ラパマイシンまたはラパマイシンアナログ（すなわち、ラパログ(rapalog)）などのmTOR阻害剤；TGF- β シグナル伝達剤；TGF- β 受容体アゴニスト；トリコスタチンAなどのヒストンデアセチラーゼ阻害剤；副腎皮質ステロイド；ロテノンなどのミトコンドリアの機能の阻害剤；P38阻害剤；6Bio、デキサメタゾン、TCPA-1、IKK VIIなどのNF- κ β 阻害剤；アデノシン受容体アゴニスト；ミソプロストールなどのプロスタグランジンE₂アゴニスト（PGE₂）；ホスホジエステラーゼ阻害剤、ロリブラムなどのホスホジエステラーゼ4阻害剤（PDE4）；プロテアソーム阻害剤；キナーゼ阻害剤；Gタンパク質共役受容体アゴニスト；Gタンパク質共役受容体アンタゴニスト；糖質コルチコイド；レチノイド；サイトカイン阻害剤；サイトカイン受容体阻害剤；サイトカイン受容体アクチベーター；ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アンタゴニスト；ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アゴニスト；ヒストンデアセチラーゼ阻害剤；カルシニューリン阻害剤；ホスファターゼ阻害剤；TGX-221などのPI3KB阻害剤；3-メチルアデニンなどのオートファジー阻害剤；アリアル炭化水素受容体阻害剤；プロテアソーム阻害剤I（PSI）；ならびにP2X受容体遮断薬などの酸化ATP。免疫抑制剤はまた、IDO、ビタミンD3、レチノイン酸、シクロスポリンAなどのシクロスポリン、アリアル炭化水素受容体阻害剤、レスベラトロール、アザチオプリン（Aza）、6-メルカプトプリン（6-MP）、6-チオグアニン（6-TG）、FK506、サングリフェリンA、サルメテロール、ミコフェノール酸モフェチル（MMF）、アスピリンおよび他のCOX阻害剤、ニフルミン酸、エストリオールならびにトリプトライドを含む。他の例示的な免疫抑制剤として、限定されないが、低分子薬、天然生成物、抗体（例えば、CD20、CD3、CD4に対する抗体）、生物製剤ベースの薬物、炭水化物ベースの薬物、RNAi、アンチセンス核酸、アプタマー、メトトレキサート、NSAID；フィンゴリモド；ナタリズマブ；アレムツズマブ；抗CD3；タクロリムス（FK506）、アバタセプト、ベラタセプトなどが挙げられる。「ラパログ」とは、ラパマイシン（シロリムス）に構造的に関連する（そのアナログである）分子を指す。ラパログの例として、限定することなく、テムシロリムス（CCI-779）、エベロリムス（RAD001）、リダフォロリムス（AP-23573）、およびゾタロリムス（ABT-578）が挙げられる。ラパログのさらなる例は、例えばWO公開WO1998/002441および米国特許第8,455,510号において見出すことができ、それらのラパログは、本明細書においてその全体において参考として援用される。

【0078】

免疫抑制剤は、APCに対して直接的に免疫寛容原性効果を提供する化合物であっても、またはそれは、間接的に（すなわち、投与の後何らかの方法において処理された後で）免疫寛容原性効果を提供する化合物であってもよい。免疫抑制剤は、したがって、本明細書において提供される化合物のいずれかのプロドラッグの形態を含むさらなる免疫抑制剤は、当業者に公知であり、本発明は、この点において限定されない。態様において、免疫抑制剤は、本明細書において提供される剤のいずれか1つを含んでもよい。

【0079】

「購入するように誘導する」とは、主体に、本明細書において記載される有益な効果を達成するために、または本明細書において提供される方法のいずれか1つを実施するために、抗原提示細胞標的免疫抑制剤、ウイルス導入ベクター、または両方を購入することを示唆する任意の行動を指す。かかる行動は、抗ウイルス導入ベクター応答を減弱化するため、導入遺伝子発現をエスカレートさせるため、またはウイルス導入ベクターの反復投与を可能にするための、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与の利益を記載して、抗原提示細胞標的免疫抑制剤、ウイルス導入ベクター、または両方をパッケージングすることを含む。あるいは、パッケージングは、本明細書において提供され

る方法のいずれか1つの性能を記載または示唆してもよい。主体を購入するように誘導する行動はまた、抗原提示細胞標的免疫抑制剤、ウイルス導入ベクター、または抗原提示細胞標的免疫抑制剤およびウイルス導入ベクターの製品を、本明細書において記載される有益な効果のいずれか1つまたは本明細書において提供される方法のいずれか1つを実施するための、かかる製品の使用を記載または示唆する情報と共に上市することを含む。あるいは、上市することは、抗ウイルス導入ベクター応答を減弱化するため、導入遺伝子発現をエスカレートさせるため、またはウイルス導入ベクターの反復投与のための、かかる製品の使用を記載または示唆する材料を含む。さらなる例として、誘導する行動はまた、前述のもののいずれかを記載または示唆する情報を伝達する行動を含んでもよい。伝達することは、書面、口頭などに関わらず任意の形態において行うことができる行動である。書面の形態におけるものである場合、伝達することは、電子または紙ベースの媒体を含む任意の媒体を介して行うことができる。さらに、誘導する行動はまた、抗原提示細胞標的免疫抑制剤、ウイルス導入ベクターまたは両方を分配する行動を含む。分配する行動は、抗原提示細胞標的免疫抑制剤、ウイルス導入ベクターまたは両方を、本明細書において記載される利益、または本明細書において提供される方法のステップのいずれか1つ、または抗ウイルス導入ベクター応答を減弱化するか、導入遺伝子発現を増大させるか、もしくはウイルス導入ベクターの反復投与を可能にする能力のいずれかを、記載するか、指示するか、または伝達する情報、パッケージング、上市用の材料などと共に、主体にとって利用可能とする任意の行動を含む。分配する行動は、販売すること、販売を提案すること、および販売のために輸送すること（例えば、薬局、病院などに輸送すること）を含む。

【0080】

「負荷量(load)」とは、合成ナノキャリアと共役する場合、合成ナノキャリア全体における材料の乾燥処方重量（重量／重量）に基づいた、合成ナノキャリアと共役する免疫抑制剤の量である。一般に、かかる負荷量は、合成ナノキャリアの集団全体の平均として計算される。一態様において、負荷量は、合成ナノキャリア全体の平均で0.1%と99%との間である。別の態様において、負荷量は、0.1%と50%との間である。別の態様において、負荷量は、0.1%と20%との間である。さらなる態様において、負荷量は、0.1%と10%との間である。なおさらなる態様において、負荷量は、1%と10%との間である。なおさらなる態様において、負荷量は、7%と20%との間である。さらに別の態様において、負荷量は、合成ナノキャリアの集団全体の平均で少なくとも0.1%、少なくとも0.2%、少なくとも0.3%、少なくとも0.4%、少なくとも0.5%、少なくとも0.6%、少なくとも0.7%、少なくとも0.8%、少なくとも0.9%、少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも6%、少なくとも7%、少なくとも8%、少なくとも9%、少なくとも10%、少なくとも11%、少なくとも12%、少なくとも13%、少なくとも14%、少なくとも15%、少なくとも16%、少なくとも17%、少なくとも18%、少なくとも19%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%である。さらに別の態様において、負荷量は、合成ナノキャリアの集団全体の平均で、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%または20%である。上の態様のうちのいくつかの態様において、負荷量は、合成ナノキャリアの集団全体の平均で、25%以下である。態様において、負荷量は、例において記載され得るか、または当該分野において公知であり得るように、計算される。幾つかの態様において、ナノ結晶性免疫抑制剤のように、免疫抑制剤の形態自体が粒子または粒子様である場合、免疫抑制剤の負荷量は、粒子または類似のものにおける免疫抑制剤の量（重量／重量）である。かかる態様において、負荷量は、97%、98%、99%またはそれより高くに近づき得る。

【0081】

「合成ナノキャリアの最大寸法」とは、合成ナノキャリアの任意の軸に沿って測定されるナノキャリアの最大寸法を意味する。「合成ナノキャリアの最小寸法」とは、合成ナノキャリアの任意の軸に沿って測定される合成ナノキャリアの最小寸法を意味する。例えば、球体の合成ナノキャリアについて、合成ナノキャリアの最大および最小寸法は、実質的に同一であり、その直径のサイズである。同様に、立方状合成ナノキャリアについて、合成ナノキャリアの最小寸法は、その高さ、幅または長さのうちの最小のものであり、一方、合成ナノキャリアの最大寸法は、その高さ、幅または長さのうちの最大のものである。一態様において、試料中の合成ナノキャリアの合計数に基づいた、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最小寸法は、100nmと等しいか、またはこれより大きい。一態様において、試料中の合成ナノキャリアの合計数に基づいた、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最大寸法は、5μmと等しいか、またはこれより小さい。好ましくは、試料中の合成ナノキャリアの合計数に基づいた、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最小寸法は、110nmより大きく、より好ましくは120nmより大きく、より好ましくは130nmより大きく、より好ましくはなお、150nmより大きい。合成ナノキャリアの最大および最小寸法のアスペクト比は、態様に依存して変化し得る。例えば、合成ナノキャリアの最小寸法に対する最大寸法のアスペクト比は、1:1~1,000,000:1、好ましくは1:1~100,000:1、より好ましくは1:1~10,000:1、より好ましくは1:1~1000:1、なおより好ましくは1:1~100:1、およびさらにより好ましくは1:1~10:1の間で変化し得る。好ましくは、試料中の合成ナノキャリアの合計数に基づいた、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最大寸法は、3μmと等しいか、またはこれより小さく、より好ましくは2μmと等しいか、またはこれより小さく、より好ましくは1μmと等しいか、またはこれより小さく、より好ましくは800nmと等しいか、またはこれより小さく、より好ましくは600nmと等しいか、またはこれより小さく、およびより好ましくはなお、500nmと等しいか、またはこれより小さい。好ましい態様において、試料中の合成ナノキャリアの合計数に基づいた、試料中の合成ナノキャリアの少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%の最小寸法は、100nmと等しいか、またはこれより大きく、より好ましくは120nmと等しいか、またはこれより大きく、より好ましくは130nmと等しいか、またはこれより大きく、より好ましくは140nmと等しいか、またはこれより大きく、およびより好ましくはなお、150nmと等しいか、またはこれより大きい。合成ナノキャリアの寸法（例えば有効直径）の測定は、幾つかの態様において、合成ナノキャリアを液体（通常は水性）媒体中に懸濁して、動的光散乱（DLS）を用いること（例えばBrookhaven ZetaPALS装置を用いること）により、得ることができる。例えば、合成ナノキャリアの懸濁液を、約0.01~0.1mg/mLの最終合成ナノキャリア懸濁液濃度を達成するために、水性バッファーから精製水中で希釈することができる。希釈された懸濁液は、DLS分析のために好適なキュベット中で直接調製しても、またはこれに移してもよい。キュベットを、次いで、DLS内に置き、制御された温度まで平衡化させて、次いで、媒体の粘度および試料の屈折率のための適切なインプットに基づいて、安定で再現性のある分布を得るために十分な時間にわたりスキャンすることができる。有効直径、または分布の平均を、次いで報告させる。高アスペクト比または非球形の合成ナノキャリアの有効サイズを決定することは、より正確な測定値を得るために、電子顕微鏡法などの増強技術を必要とする場合がある。合成ナノキャリアの「寸法」または「サイズ」または「直径」は、例えば動的光散乱を用いて得られる粒子サイズ分布の平均を意味する。

【0082】

「測定可能なレベル」とは、陰性対照のレベルより高いか、バックグラウンドまたはシ

10

20

30

40

50

グナルノイズより高いと考えられる任意のレベルを指す。測定可能なレベルは、測定されている分子の存在を示すレベルであると考えられるものである。

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

【0083】

「入手すること」とは、材料を、任意の手段により獲得する行動を意味する。材料は、それを生成すること、それを購入すること、それを受け取ることなどにより獲得することができる。この用語は、「入手させること」を含むことを意図される。「入手させること」とは、主体が、本明細書において提供される材料を入手することを、引き起こすこと、駆り立てること、奨励すること、補助すること、誘導することまたは指示すること、または該主体と協調してそのために行動することを意味する。本明細書において提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、方法は、本明細書において記載される入手するステップのいずれか1つを含んでもよい、またはこれをさらに含んでもよい。

「薬学的に許容し得る賦形剤」または「薬学的に許容し得るキャリア」とは、組成物を処方するために薬理学的に活性な材料と一緒に用いられる薬理学的に不活性な材料を意味する。薬学的に許容し得る賦形剤は、当該分野において公知の多様な材料を含み、これは、限定されないが、糖（例えばグルコース、ラクトースなど）、抗菌剤などの保存剤、再構成補助剤、色素、食塩水（例えばリン酸緩衝化食塩水）およびバッファーを含む。

【0084】

「ウイルス導入ベクターに対する既存の免疫」とは、対象における、ウイルス導入ベクターの抗原に対する、または交差反応性抗原（他のウイルスを含むがこれに限定されない）に対する以前の暴露により、以前にプライミングされている、抗体、T細胞および／またはB細胞の存在を指す。幾つかの態様において、この既存の免疫は、ウイルス導入ベクターの有効性を損なう抗ウイルス導入ベクター免疫応答をもたらすことが予測されるレベルである。幾つかの態様において、この既存の免疫は、ウイルス導入ベクターに対するその後の暴露により、抗ウイルス導入ベクター免疫応答をもたらすことが予測されるレベルである。既存の免疫は、対象からの血液試料などの試料中に存在するウイルス導入ベクターに対する中和抗体などの抗体のレベルを決定することにより評価することができる。中和抗体などの抗体のレベルを評価するためのアッセイは、本明細書において少なくとも例において記載され、また、当業者には公知である。かかるアッセイは、ELISAアッセイである。既存の免疫はまた、*in vivo* または *in vitro* で、APCにより提示されたウイルス導入ベクター抗原またはMHCクラスIもしくはMHCクラスII分子上に提示されたウイルス抗原エピトープで刺激した、BまたはT細胞などの免疫細胞の抗原リコール応答を決定することにより、評価することができる。抗原特異的リコール応答のためのアッセイとして、これらに限定されないが、ELISpot、細胞内サイトカイン染色、細胞増殖、およびサイトカイン産生アッセイが挙げられる。一般に、これらのおよび他のアッセイは、当業者に公知である。幾つかの態様において、ウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を示さない対象は、中和抗体、またはメモリーBもしくはT細胞などの抗ウイルス導入ベクター抗体のレベルが陰性であると考えられるものである。他の態様において、ウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を示さない対象は、抗ウイルス導入ベクター応答のレベルが、陰性対照の平均値 + 3 × 標準偏差以下であるものである。

【0085】

「生成すること」とは、作られている材料をもたらす任意の行動を指す。生成する行動は、材料を調製すること、またはそれを何らかの様式において処理することを含む。幾つかの態様において、生成する行動は、材料を他者による使用のために利用可能にする任意

10

20

30

40

50

の行動を含む。この用語は、「生成させること」を含むことを意図される。「生成させること」とは、主体が、本明細書において提供される材料を作ること、引き起こすこと、駆り立てること、奨励すること、補助すること、誘導することまたは指示すること、または該主体と協調してそのために行動することを意味する。本明細書において提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、方法は、本明細書において記載される生成するステップのいずれか1つを含んでもよい、またはこれをさらに含んでもよい。

【0086】

「プロトコル」とは、対象に投与するパターンを意味し、1以上の物質の対象への任意の投薬レジメンを含む。プロトコルは、要素（または変数）からなり；したがって、プロトコルは、1以上の要素を含む。プロトコルにかかる要素は、投薬量（用量）、投薬頻度、投与の経路、投薬期間、投薬速度、投薬の間隔、前述のもののいずれかの組み合わせなどを含んでもよい。幾つかの態様において、プロトコルは、1以上の本発明の組成物を、1以上の試験対象に投与するために用いることができる。これらの試験対象における免疫応答を、次いで、所望される、または所望されるレベルの、免疫応答または治療効果を生じることにおいてプロトコルが有効であったか否かを決定するために評価することができる。任意の治療効果および／または免疫性効果を評価することができる。プロトコルのエレメントの1以上は、非ヒト対象などの試験対象において前に実証されていてもよく、次いでヒトプロトコルに翻訳してもよい。例えば、相対成長率または他の尺度法などの確立された技術を用いて、非ヒト対象において実証された投薬量を、トプロトコルのエレメントとしてスケールリングしてもよい。プロトコルが所望される効果を有したか否かは、本明細書において提供されるかまたは他の当該分野において公知の方法のうちのいずれかを用いて決定することができる。例えば、試料は、特定の免疫細胞、サイトカイン、抗体などが、減少、産生または活性化されたか否かなどを決定するために、本明細書において提供される組成物が特定のプロトコルに従って投与された対象から得ることができる。例示的なプロトコルは、ウイルス導入ベクター抗原に対する免疫寛容原性免疫応答をもたらすこと、または本明細書において記載される有益な結果のいずれか1つを達成することが、以前に示されているものである。免疫細胞の存在および／または数検出するために有用な方法として、これらに限定されないが、フローサイトメトリー法（例えば、FACS）、ELISpot、増殖応答、サイトカイン産生、および免疫組織化学法が挙げられる。免疫細胞マーカーの特異的染色のための抗体および他の結合剤は、市販されている。かかるキットは、典型的には、FACSベースの検出、不均一な細胞の集団からの所望される細胞集団の精製および／または定量化を可能にする、抗原についての染色試薬を含む。態様において、本明細書において提供される組成物は、選択された要素が対象において所望される結果を達成すると予測されることを前提として、プロトコルを構成する要素の1もしくは2以上、または全てもしくは実質的に全てを用いて、対象に投与される。かかる予測は、試験対象において決定されたプロトコルおよび必要とされる場合にはスケールリングに基づくものであってよい。本明細書において提供される方法のいずれか1つは、抗ウイルス導入ベクター免疫応答を減弱化するか、またはウイルス導入ベクターの反復投与を可能にすることが示されているプロトコルに従って、単独で、または本明細書において記載されるようにウイルス導入ベクターの1以上の用量と組み合わせて、抗原提示細胞標的免疫抑制剤の用量を投与するステップを含んでもよい、またはこれをさらに含んでもよい。本明細書において提供される方法のいずれか1つは、本明細書において記載される有益な結果のいずれか1つを達成するかかるプロトコルを決定することを含んでもよい、またはこれをさらに含んでもよい。

【0087】

「提供すること」とは、個人が行う、本発明を実施するための材料を供給する行動または行動のセットを意味する。提供することは、材料を、生成する、分配する、販売する、譲渡する、利用可能にする、処方するまたは投与する行動を含んでもよい。行動または行動のセットは、個人が直接行っても、間接的に行ってもよい。したがって、この用語は、「提供させること」を含むことを意図される。「提供させること」とは、主体が、本発明

10

20

30

40

50

の実施のための材料を供給することを、引き起こすこと、駆り立てること、奨励すること、補助すること、誘導することまたは指示すること、または該主体と協調してそのために行動することを意味する。本明細書において提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、方法は、本明細書において記載される提供するステップのいずれか1つを含んでもよい、またはこれをさらに含んでもよい。

【0088】

「反復用量」または「反復投薬」または類似のものは、同じ材料の以前の用量または投薬の後に対象に投与される、少なくとも1回のさらなる用量または投薬を意味する。例えば、ウイルス導入ベクターの反復用量は、同じ材料の以前の用量の後の、ウイルス導入ベクターの少なくとも1回のさらなる用量である。材料は同じであってよいが、一方で、反復用量中の材料の量は、以前の用量と異なってもよい。例えば、本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つの一態様において、反復投薬中のウイルス導入ベクターの量は、以前の用量のウイルス導入ベクターの量より少なくてもよい。あるいは、本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つの一態様において、反復用量は、以前の用量中のウイルス導入ベクターの量と少なくとも同等の量であってよい。反復用量は、前の用量の数週間後、数か月後、または数年後に投与してもよい。本明細書において提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、反復用量または投薬は、反復用量または投薬の直前に起きた用量または投薬の少なくとも1週間後に投与される。反復投薬は、それが対象のために有益な効果をもたらす場合、有効であると考えられる。好ましくは、有効な反復投薬は、減弱化された抗ウイルス導入ベクター応答と組み合わせられた有益な効果をもたらす。

【0089】

「ウイルス導入ベクターの用量を、～より少なくなるように選択する」とは、対象が、ウイルス導入ベクターの反復投薬に起因して、ウイルス導入ベクターに対する抗ウイルス導入ベクター免疫応答を発達させるであろう場合に、対象への投与のために選択されたであろうウイルス導入ベクターの量よりも少ない、ウイルス導入ベクターの用量の選択を指す。この用語は、「選択させること」を含むことを意図される。「選択させること」とは、主体が、前述のより少ない投与量を選択することを、引き起こすこと、駆り立てること、奨励すること、補助すること、誘導することまたは指示すること、または該主体と協調してそのために行動することを意味する。本明細書において提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、方法は、本明細書において記載される選択するステップのいずれか1つを含んでもよい、またはこれをさらに含んでもよい。

【0090】

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

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

【0091】

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

ノキャリアは、リン脂質を含まない。

【0092】

合成ナノキャリアは、これらに限定されないが、1つまたは複数の脂質ベースのナノ粒子（また本明細書において液体ナノ粒子、すなわち、それらの構造を構成する材料の大部分が脂質であるナノ粒子としても言及される）、ポリマーナノ粒子、金属ナノ粒子、界面活性剤ベースのエマルジョン、デンドリマー、バッキーボール、ナノワイヤー、ウイルス様粒子（すなわち、主にウイルスの構造タンパク質からなるが、感染性ではないか、低い感染性を有する粒子）、ペプチドまたはタンパク質ベースの粒子（また本明細書において、タンパク質粒子、すなわち、それらの構造を構成する材料の大部分がペプチドもしくはタンパク質である粒子としても言及される）（アルブミンナノ粒子など）および／または脂質-ポリマーナノ粒子などのナノ材料の組み合わせを用いて開発されるナノ粒子であってもよい。合成ナノキャリアは、多様な異なる形状であってよく、これは、限定されないが、球体、立方状、錐体、長方形、円柱状、ドーナツ型などを含む。本発明による合成ナノキャリアは、1以上の表面を含む。本発明の実施における使用のために適応させることができる例示的な合成ナノキャリアは、以下を含む：（1）Grefらに対する米国特許5,543,158において開示される生分解性ナノ粒子、（2）Saltzmanらに対する米国特許出願公開20060002852のポリマーナノ粒子、（3）DeSimoneらに対する米国特許出願公開20090028910のリソグラフィーにより構築されるナノ粒子、（4）von Andrianらに対するWO 2009/051837の開示、（5）Penadesらに対する米国特許出願公開2008/0145441において開示されるナノ粒子、（6）de los Riosらに対する米国特許出願公開20090226525において開示されるタンパク質ナノ粒子、（7）Sebbelらに対する米国特許出願公開20060222652において開示されるウイルス様粒子、（8）Bachmannらに対する米国特許出願公開20060251677において開示される核酸結合ウイルス様粒子、（9）WO2010047839A1またはWO2009106999A2において開示されるウイルス様粒子、

（10）P. Paolicelli et al., 「Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles」 *Nanomedicine*. 5(6):843-853 (2010)において開示されるナノ沈殿させたナノ粒子、（11）米国公開2002/0086049において開示されるアポトーシス細胞、アポトーシス小体または合成もしくは半合成模倣物、あるいは（12）Look et al., 「Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice」 *J. Clinical Investigation* 123(4):1741-1749 (2013)のもの。

【0093】

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

【0094】

「治療用タンパク質」とは、本明細書において提供される遺伝子治療導入遺伝子から発現され得る任意のタンパク質を意味する。治療用タンパク質は、タンパク質の置き換えまたはタンパク質の補充のために用いられるものであってよい。治療用タンパク質として、これらに限定されないが、酵素、酵素補因子、ホルモン、血液凝固因子、サイトカイン、

増殖因子などが挙げられる。他の治療用タンパク質の例は、本明細書において他の場所で提供される。対象は、本明細書において提供される治療用タンパク質のいずれかによる処置を必要とするものであってよい。

【0095】

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

【0096】

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

【0097】

C. 本発明の方法における使用のための組成物

上述のとおり、ウイルス導入ベクターに対する細胞性および体液性の免疫応答は、ウイルス導入ベクター治療剤の有効性に有害効果を与え得、それらの再投与を妨害し得、これが多い患者について長期の処置を不可能にする。当該分野において証明されているとおり、ウイルス導入ベクターによる処置は、ウイルスによる導入の基礎となるウイルスへの以前の暴露に起因して、一部の患者については成功しないことが予測される。加えて、患

者がウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を有していなかったとしても、ウイルス導入ベクターの単回投与は、中和抗体の力価および／またはメモリーT細胞の活性化などの細胞性および体液性の免疫応答をもたらす可能性が高く、これが、再投与を不可能にするであろう。これらの問題をさらに複雑化するのは、ウイルス導入ベクター抗原の長期の持続性である。

【0098】

重要なことに、本明細書において提供される方法および組成物が、ウイルス導入ベクターに対する免疫応答を減弱化することにより、前述の障害を克服することを見出した。本明細書において提供される方法および組成物はまた、長期の免疫抑制を必要とすることなく、ウイルス導入ベクターの再投与を可能にし、ウイルス導入ベクターに対する持続性の寛容を提供することを見出した。したがって、本明細書において提供される方法および組成物は、ウイルス導入ベクターによる対象の処置のために有用である。ウイルス導入ベクターは、遺伝子治療、遺伝子編集、遺伝子発現調節およびエクソンスキッピングのためのものを含む多様な目的のために導入遺伝子を送達するために用いることができ、本明細書において提供される方法および組成物もまた、そのように適用可能である。

【0099】

導入遺伝子

本明細書において提供されるウイルス導入ベクターの導入遺伝子は、遺伝子治療導入遺伝子であってよく、疾患または障害によるものなどの、対象にとって有益な任意のタンパク質またはその部分をコードしている。タンパク質は、細胞外、細胞内、または膜結合タンパク質であってよい。一般に、タンパク質は、治療用タンパク質であり、ウイルス導入ベクターにより遺伝子治療導入遺伝子が投与される対象は、当該タンパク質の対象の内因性バージョンが欠損しているか、限定された量で産生されるか、または全く産生されない疾患または障害を有する。したがって、対象は、本明細書において提供される疾患または障害のいずれか1つを有するものであってよく、導入遺伝子は、本明細書において提供される治療用タンパク質またはその部分のいずれか1つをコードするものである。

【0100】

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

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

【0101】

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

スルファーズ、ELAPRASE（商標）、アリアルスルファターゼB、NAGLAZYME（商標）を含む。

【0102】

ホルモンの例として、メラトニン（N-アセチル-5-メトキシトリプタミン）、セロトニン、チロキシン（またはテトラヨードチロニン）（甲状腺ホルモン）、トリヨードチロニン（甲状腺ホルモン）、エピネフリン（またはアドレナリン）、ノルエピネフリン（またはノルアドレナリン）、ドパミン（またはプロラクチン阻害ホルモン）、ミューラー管阻害(antimullerian)ホルモン（またはミューラー管阻害因子(mullerian inhibiting factor)もしくはホルモン）、アディポネクチン、副腎皮質刺激ホルモン（またはコルチコトリピン）、アンギオテンシノーゲンおよびアンギオテンシン、抗利尿ホルモン（またはバソプレシン、アルギニンバソプレシン）、心房性ナトリウム利尿ペプチド（またはアトリオペプチン）、カルシトニン、コレシストキニン、コルチコトリピン放出ホルモン、エリスロポエチン、卵胞刺激ホルモン、ガストリン、グレリン、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド（GLP-1）、GIP、ゴナドトロピン放出ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、ヒト胎盤性ラクトゲン、成長ホルモン、インヒビン、インスリン、インスリン様増殖因子（またはソマトメジン）、レプチン、黄体化ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、オレキシン、オキシトシン、副甲状腺ホルモン、プロラクチン、レラキシン、セクレチン、ソマトスタチン、トロンボポエチン、甲状腺刺激ホルモン（またはチロトロピン）、チロトロピン放出ホルモン、コルチゾール、アルドステロン、テストステロン、ジヒドロエピアンドステロンエピアンドロステロン、アンドロステンジオン、ジヒドロテストステロン、エストラジオール、エストロン、エストリオール、プロゲステロン、カルシトリオール（1, 25-ジヒドロキシビタミンD3）、カルシジオール（25-ヒドロキシビタミンD3）、プロスタグランジン、ロイコトリエン、プロスタサイクリン、トロンボキサン、プロラクチン放出ホルモン、リポトロピン、脳性ナトリウム利尿ペプチド、ニューロペプチドY、ヒスタミン、エンドセリン、膵臓ポリペプチド、レニンおよびエンケファリンが挙げられる。

【0103】

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

サイトカインの例として、リンホカイン、インターロイキン、ならびにケモカイン、IFN- γ 、TGF- β などの1型サイトカイン、ならびにIL-4、IL-10およびIL-13などの2型サイトカインが挙げられる。

【0104】

増殖因子の例として、アドレノメデュリン（AM）、アンギオポエチン（Ang）、自己分泌型細胞運動刺激因子、骨形成タンパク質（BMP）、脳由来神経栄養因子（BDNF）、上皮増殖因子（EGF）、エリスロポエチン（EPO）、線維芽細胞増殖因子（FGF）、グリア細胞由来神経栄養因子受容体（GDNF）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、増殖分化因子-9（GDF9）、肝細胞増殖因

10

20

30

40

50

子（HGF）、肝細胞腫由来増殖因子（HDGF）、インスリン様増殖因子（IGF）、遊走刺激因子、ミオスタチン（GDF-8）、神経増殖因子（NGF）および他のニューロトロフィン、血小板由来増殖因子（PDGF）、トロンボポエチン（TPO）、トランスフォーミング増殖因子アルファ（TGF- α ）、トランスフォーミング増殖因子ベータ（TGF- β ）、腫瘍壊死因子-アルファ（TNF- α ）、血管内皮増殖因子（VEGF）、Wntシグナル伝達経路、胎盤増殖因子（PlGF）、〔（ウシ胎仔ソマトトロフィン）〕（FBS）、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6およびIL-7が挙げられる。

アディポカインの例として、レプチンおよびアディポネクチンが挙げられる。

【0105】

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

【0106】

本明細書において提供される遺伝子治療用ウイルス導入ベクターの導入遺伝子は、対象におけるその内因性バージョンの何らかの欠損（内因性バージョン発現の欠損を含む）を通して、対象において疾患または障害をもたらす、任意のタンパク質の機能的なバージョンをコードしていてもよい。かかる疾患または障害の例として、これらに限定されないが、以下が挙げられる：リソソーム蓄積性疾患／障害、例えばSantavuori-Haltia病（小児性神経セロイドリポフスチン沈着症1型）、Jansky-Bielschowsky病（遅発型小児性神経セロイドリポフスチン沈着症、2型）、バッテン病（若年性神経セロイドリポフスチン症、3型）、クーフス病（神経セロイドリポフスチン症、4型）、フォン・ギールケ病（糖原病、I a型）、糖原病、I b型、ポンペ病（糖原病、II型）、フォブス病またはコリ病（糖原病、III型）、ムコリピドーシスII（I-細胞病）、ムコリピドーシスIII（偽性ハーラー・ポリジストロフィー）、ムコリピドーシスIV（シアロリピドーシス(sialolipidosis)）、シスチン症（成人非腎症性型）、シスチン症（小児性腎症性型）、シスチン症（若年性または青年性腎症性型）、サラ病／小児型シアル酸蓄積障害、およびサポシン欠損；脂質およびスフィンゴ脂質分解の障害、例えばGM1ガングリオシドーシス（小児性、遅発型小児性／若年性、および成人型／慢性）、テイ・サックス病、サンドホフ病、GM2ガングリオシドーシス、A bバリエーション、ファブリー病、ゴーシェ病、I、IIおよびIII型、異染性白質ジストロフィー、クラッペ病（早発型および遅発型）、ニーマン・ピック病、A、B、C 1およびC 2型、ファバー病およびウォルマン病（コレステリルエステル蓄積症）；ムコ多糖分解の障害、例えばハーラー症候群（MPS I）、シャイエ症候群（MPS IS）、ハーラー・シャイエ症候群（MPS IH/S）、ハンター症候群（MPS II）、サンフィリポA症候群（MPS IIIA）、サンフィリポB症候群（MPS IIIB）、サンフィリポC症候群（MPS IIIC）、サンフィリポD症候群（MPS IIID）、モルキオA症候群（MPS IVA）、モルキオB症候群（MPS IVB）、マロトー・ラミー症候群（MPS VI）、およびスライ症候群（MPS VII）；糖タンパク質分解の障害、例えばアルファマンノース症、ベータマンノース症、フコシドーシス、アスパルチルグルコサミン尿症、ムコリピドーシスI（シアリドーシス）、ガラクトシアリドーシス、シンドラー病、およびII型シンドラー病／神崎病；ならびに白質ジストロフィー疾患／障害、例えば、無ベータリポ蛋白血症、新生児副腎白質ジストロフィー、カナバン病、脳髄黄色腫症、ペリツェウス・メルツバッヘル病、タンジール病、小児性レフサム病、および古典的レフサム病。

【0107】

本明細書において提供される対象のかかる疾患／障害のさらなる例として、これらに限定されないが、以下が挙げられる：酸性マルターゼ欠損症（例えば、ポンペ病、糖原病2型、リソソーム蓄積症）；カルニチン欠損症；カルニチンパルミチルトランスフェラーゼ欠損症；脱分枝酵素欠損症（例えば、コリ病またはフォブス病、糖原病3型）；乳酸デヒドロゲナーゼ欠損症（例えば、糖原病11型）；ミオアデニル酸デアミナーゼ欠損症；

10

20

30

40

50

ホスホフルクトキナーゼ欠損症（例えば、垂井病、糖原病 7 型）；ホスホグリセリン酸キナーゼ欠損症（例えば、糖原病 9 型）；ホスホグリセリン酸ムターゼ欠損症（例えば、糖原病 10 型）；ホスホリラーゼ欠損症（例えば、マッカードル病、筋ホスホリラーゼ欠損症、糖原病 5 型）；ゴーシェ病（例えば、染色体 1、酵素グルコセレブロシダーゼが影響を受ける）；軟骨無形成症（例えば、染色体 4、線維芽細胞増殖因子受容体 3 が影響を受ける）；ハンチントン病（例えば、染色体 4、ハンチンチン）；ヘモクロマトーシス（例えば、染色体 6、HFE タンパク質）；嚢胞性線維症（例えば、染色体 7、CFTR）；フリートライヒ運動失調症（染色体 9、フラタキシン）；ベスト病（染色体 11、VMD2）；鎌状赤血球症（染色体 11、ヘモグロビン）；フェニルケトン尿症（染色体 12、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ）；マルファン症候群（染色体 15、フィブリリン）；筋緊張性ジストロフィー（染色体 19、筋緊張性ジストロフィータンパク質キナーゼ）；副腎白質ジストロフィー（X 染色体、ペルオキシソーム中のリグノセロイル-C o A リガーゼ）；デュシェンヌ筋ジストロフィー（X 染色体、ジストロフィン）；レット症候群（X 染色体、メチル C p G 結合タンパク質 2）；レーベル遺伝性視神経症（ミトコンドリア、呼吸器タンパク質）；ミトコンドリア脳症、乳酸アシドーシスおよび脳卒中（MELAS）（ミトコンドリア、トランスファー RNA）；ならびに尿素回路の酵素欠損。

【0108】

かかる疾患または障害のなおさらなる例として、これらに限定されないが、鎌状赤血球貧血、筋細管ミオパチー、血友病 B、リポタンパク質リパーゼ欠損症、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、クリグラー・ナジャー症候群、ムコリピドーシス IV、ニーマン・ピック病 A、サンフィリポ A、サンフィリポ B、サンフィリポ C、サンフィリポ D、 β -地中海貧血症およびデュシェンヌ型筋ジストロフィーが挙げられる。疾患または障害のなおさらなる例として、脂質およびスフィンゴ脂質分解、ムコ多糖分解、糖タンパク質分解における欠損の結果であるもの、白質ジストロフィーなどが挙げられる。

【0109】

本明細書において提供される疾患または障害のいずれか 1 つの欠損タンパク質の機能的バージョンは、遺伝子治療用ウイルス導入ベクターの導入遺伝子によりコードされていてもよく、また治療用タンパク質と考えられる。治療用タンパク質もまた、筋ホスホリラーゼ、グルコセレブロシダーゼ、線維芽細胞増殖因子受容体 3、ハンチンチン、HFE タンパク質、CFTR、フラタキシン、VMD2、ヘモグロビン、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、フィブリリン、筋強直性ジストロフィータンパク質キナーゼ、リグノセロイル-C o A リガーゼ、ジストロフィン、メチル C p G 結合タンパク質 2、ベータヘモグロビン、ミオチューブラリン、カテプシン A、第 I X 因子、リポタンパク質リパーゼ、ベータガラクトシダーゼ、オルニチントランスカルバミラーゼ、イズロン酸-2-スルファターゼ、酸性アルファグルコシダーゼ、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ 1-1、GlcNAc-1-ホスホトランスフェラーゼ、GlcNAc-1-ホスホトランスフェラーゼ、ムコリピン (Mucolipin)-1、ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質、スフィンゴミエリナーゼ、酸性セラミダーゼ、ライソゾーム酸性リパーゼ、アルファ-L-イズロニダーゼ、ヘパラン N-スルファターゼ、アルファ-N-アセチルグルコサミニダーゼ、アセチル-C o A アルファ-グルコサミニドアセチルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン 6-スルファターゼ、N-アセチルガラクトサミン-6-スルファターゼ、アルファマンノシダーゼ、アルファガラクトシダーゼ A、嚢胞性線維症膜コンダクタンズ制御因子および呼吸器タンパク質を含むということになる。

【0110】

さらなる例として、治療用タンパク質はまた、以下に関連するタンパク質の機能的バージョンを含む：脂質およびスフィンゴ脂質分解の障害（例えば、 β -ガラクトシダーゼ-1、 β -ヘキソサミニダーゼ A、 β -ヘキソサミニダーゼ A および B、GM2 アクチベータータンパク質、8-ガラクトシダーゼ A、グルコセレブロシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、グルコセレブロシダーゼ、アリールスルファターゼ A、ガラクトシルセラミダーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、NPC1、HE1 タンパク質（コレス

10

20

30

40

50

テロール輸送の欠陥)、酸性セラミダーゼ、ライソゾーム酸性リパーゼ);ムコ多糖分解の障害(例えば、L-イズロニダーゼ、L-イズロニダーゼ、L-イズロニダーゼ、イズロン酸スルファターゼ、ヘパランN-スルファターゼ、N-アセチルグルコサミニダーゼ、アセチル-C6A-グルコサミニダーゼ、アセチルトランスフェラーゼ、アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ、ガラクトサミン-6-スルファターゼ、アリアルスルファターゼB、グルクロニダーゼ);糖タンパク質分解の障害(例えば、マンノシダーゼ、マンノシダーゼ、L-フコシダーゼ、アスパルチルグルコサミニダーゼ、ノイラミニダーゼ、リソソーム保護タンパク質、リソソーム8-N-アセチルガラクトサミニダーゼ、リソソーム8-N-アセチルガラクトサミニダーゼ);リソソーム蓄積障害(例えば、パルミトイル-タンパク質チオエステラーゼ、少なくとも4種のサブタイプ、リソソーム膜タンパク質、未知、グルコース-6-ホスファターゼ、グルコース-6-ホスファートトランスロカーゼ、酸性マルターゼ、脱分枝酵素アミロ-1, 6グルコシダーゼ、N-アセチルグルコサミン-1-ホスホトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン-1-ホスホトランスフェラーゼ、ガングリオシドシアリダーゼ(ノイラミニダーゼ)、リソソームシステイン輸送タンパク質、リソソームシステイン輸送タンパク質、リソソームシステイン輸送タンパク質、シアル酸輸送タンパク質サポニンA、B、C、D)および白質ジストロフィー(例えば、ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質/アポリポタンパク質B、ペルオキシソーム膜輸送タンパク質、ペルオキシシン、アスパルトアシラーゼ、ステロール-27-ヒドロキシラーゼ、プロテオリピドタンパク質、ABC1トランスポーター、ペルオキシソーム膜タンパク質3またはペルオキシソーム新生因子1、フィタン酸オキシダーゼ)。

【0111】

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

【0112】

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

【0113】

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

10

20

30

40

50

445,251号および同第8,338,157号；ならびに米国公開番号20130224863、20110113509および20110033935において見出すことができ、これらのメガヌクレアーゼは、本明細書において参考として援用される。

【0114】

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

【0115】

TALエフェクターヌクレアーゼ（TALEN）は、特異的DNA結合ドメインを一般的なDNA切断ドメインに融合させることにより作製された、人工制限酵素である。任意の所望されるDNA配列に結合するように設計することができるDNA結合ドメインは、植物に感染する特定の細菌により排出されるDNA結合タンパク質であるトランスクリプション・アクチベーター・ライク（transcription activator-like）（TAL）エフェクターに由来する。TALエフェクター（TALE）は、実際に任意のDNA配列に結合するように設計するか、または一緒に結合させてDNA切断ドメインと組み合わせてアレイにすることができる。TALENは、ジンクフィンガーヌクレアーゼを設計するために同様に用いることができる。TALENの例は、米国特許第8,697,853号；ならびに米国公開番号20150118216、20150079064および20140087426において見出すことができ、そのTALENSは、本明細書において参考として援用される。

【0116】

CRISPR/Casシステムもまた、遺伝子編集のためのツールとして用いることができる。CRISPR/Casシステムにおいて、ガイドRNA（gRNA）は、ゲノムにより、またはエピソームにより（例えば、プラスミド上で）コードされる。gRNAは、転写に続いて、Cas9エンドヌクレアーゼなどのエンドヌクレアーゼと複合体を形成する。複合体は、次いで、gRNAの特異性決定配列（SDS）により、典型的には細胞のゲノム中に位置するDNA標的配列にガイドされる。Cas9またはCas9エンドヌクレアーゼとは、RNAによりガイドされる、Cas9タンパク質、またはそのフラグメント（例えば、Cas9の活性もしくは不活性なDNA切断ドメインまたは部分的に不活性なDNA切断ドメイン（例えば、Cas9ニッカーゼ(nickase)）、および／あるいはCas9のgRNA結合ドメインを含むタンパク質）を含む、エンド

ヌクレアーゼを指す。Cas9は、CRISPR反復配列中の短いモチーフ（PAMまたはプロトスペーサー(protospacer)隣接モチーフ）を認識して、自己と非自己を区別することを助ける。Cas9エンドヌクレアーゼの配列および構造は、当業者に周知である（例えば「Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*.」 Ferretti J. J., McShan W.M., Ajdic D.J., Savic D.J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A.N., Kenton S., Lai H.S., Lin S.P., Qian Y., Jia H.G., Najar F.Z., Ren Q., Zhu H., Song L. expand/collapse author list McLaughlin R.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4658-4663(2001)；「CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III.」 Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E., Nature 471:602-607(2011)；および「A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.」 Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012) を参照）。sgRNA (single guide RNA：「sgRNA」または単に「gRNA」) は、crRNAとtracrRNAとの両方の側面を単一のRNA種中に組み込むように操作することができる。例えば、Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821(2012) を参照。

【0117】

Cas9のオルトログは、多様な種において記載されており、これは、これらに限定されないが、*S. pyogenes*および*S. thermophilus*を含む。さらなる好適なCas9エンドヌクレアーゼおよび配列は、当業者には明らかであり、かかるCas9エンドヌクレアーゼおよび配列は、Chylinski, RhunおよびCharpentier, 「The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems」 (2013) RNA Biology 10:5, 726-737において開示される生物および遺伝子座からのCas9配列を含む。幾つかの態様において、遺伝子編集導入遺伝子は、野生型Cas9、フラグメントまたはCas9バリエーションをコードする。「Cas9バリエーション」は、Cas9の機能を有する任意のタンパク質であって、天然に存在するCas9野生型エンドヌクレアーゼと同一ではないものである。幾つかの態様において、Cas9バリエーションは、野生型Cas9またはそのフラグメントに対して相同性を共有する。Cas9バリエーションは、いくつかの態様において、*Streptococcus pyogenes*または*S. thermophilus*のCas9タンパク質に対して少なくとも40%の配列同一性を有し、Cas9の機能性を保持する。好ましくは、配列同一性は、少なくとも90%、95%であるかまたはそれより高い。より好ましくは、配列同一性は、少なくとも98%または99%の配列同一性である。本明細書において提供される方法のいずれか1つにおける使用のためのCas9バリエーションのいずれか1つのいくつかの態様において、配列同一性は、アミノ酸配列同一性である。Cas9バリエーションはまた、Cas9二量体、Cas9融合タンパク質、Cas9フラグメント、最小化されたCas9タンパク質、切断ドメインを有しないCas9バリエーション、gRNAドメインを有しないCas9バリエーション、Cas9リコンビナーゼ融合物、fCas9、FokI-dCas9などを含む。かかるCas9バリエーションの例は、例えば、米国公開番号20150071898および20150071899において見出すことができ、そのCas9タンパク質およびCas9バリエーションの記載は、本明細書において参考として援用される。Cas9バリエーションはまた、Cas9ニッカーゼを含み、これは、Cas9中の単一のエンドヌクレアーゼドメインを不活化する変異を含む。かかるニッカーゼは、標的核酸において、二本鎖切断とは対照的に、一本鎖の切断を誘導することができる。Cas9バリエーションはまた、1つのヌクレアーゼドメインが変異により不活化されているCas9バリエーションであるCas9ヌルヌクレアーゼを含む。さらなるCas9バリエーションおよびさらなるCas9バリエーションを同定する方法の例は、米国公開番号20140357523、20150165054および20150166980において見出すことができ、Cas9タンパク質、Cas9バリエーションおよびそれらの同定の方法に関するこれらの内容は、本明細書において参考として援用される。

【0118】

Cas9バリエーションのなお他の例は、Cas9D10Aとして知られるニッカーゼ活性のみを有

する変異形態を含む。Cas9D10Aは、遺伝子座が、隣接するDNAニックを生じるように設計された一対のCas9複合体により標的とされる場合に、標的特異性に関して魅力的である。Cas9バリエーションの別の例は、ヌクレアーゼ欠損Cas9 (dCas9) である。HNHドメインにおける変異H840AおよびRuvCドメインにおける変異D10Aは、切断活性を不活化するが、DNA結合を妨げない。したがって、このバリエーションは、切断を伴うことなくゲノムの任意の領域を配列特異的にターゲティングするために、用いることができる。実際に、多様なエフェクタードメインと融合させることにより、dCas9は、遺伝子サイレンシングまたは活性化のいずれかのツールとして用いることができる。遺伝子編集導入遺伝子は、幾つかの態様において、本明細書において提供されるCas9バリエーションのいずれか1つをコードしていてもよい。

10

【0119】

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

20

【0120】

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

30

【0121】

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

40

【0122】

遺伝子発現モジュレーターは、DNA結合タンパク質（例えば、人工転写因子、例えば米国公開番号20140296129のもの（その人工転写因子は、本明細書において参考として援用される）；および米国公開番号20030125286の転写サイレンサータンパク質（そのNRF転写サイレンサータンパク質NRFは、本明細書において参考として援用される））、な

50

らびに治療用RNAを含む。治療用RNAとして、これらに限定されないが、mRNA翻訳の阻害剤（アンチセンス）、RNA干渉の剤（RNAi）、触媒活性RNA分子（リボザイム）、トランスファーRNA（tRNA）、ならびにタンパク質および他の分子リガンドに結合するRNA（アプタマー）が挙げられる。遺伝子発現モジュレーターは、前述のうちのいずれかの剤であり、アンチセンス核酸、RNAi分子（例えば、二本鎖RNA（dsRNA）、一本鎖RNA（ssRNA）、マイクロRNA（miRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、低分子ヘアピンRNA（shRNA））および三重鎖形成オリゴヌクレオチド（TFO）を含む。遺伝子発現モジュレーターはまた、前述のRNA分子のいずれかの改変されたバージョンを含んでもよく、したがって、改変されたmRNA、例えば合成化学的に改変されたRNAを含む。

【0123】

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

【0124】

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

【0125】

遺伝子発現モジュレーターは、干渉RNA（RNAi）であってよい。RNA干渉は、干渉RNAにより媒介される配列特異的な転写後の遺伝子サイレンシングのプロセスを指す。一般に、dsRNAの存在は、RNAi応答を引き起こし得る。RNAiは、多様な系において研究されてきた。Fire et al., 1998, Nature, 391, 806、C. elegansにおけるRNAi; Bahrami an and Zarbl, 1999, Molecular and Cellular Biology, 19, 274-283およびWianny and Goetz, 1999, Nature Cell Biol., 2, 70、哺乳動物系においてdsRNAにより媒介されるRNAi; Hammond et al., 2000, Nature, 404, 293、ショウジョウバエ細胞におけるRNAi in Drosophila cells; Elbashir et al., 2001, Nature, 411, 494、培養哺乳動物細胞において合成の21ヌクレオチドのRNAの二本鎖の導入により誘導されるRNAi。かかる研究は、他のものと共に、RNAi活性を媒介するためにRNAi分子の構築において役立つ、長さ、構造、化学組成および配列に関するガイダンスを提供してきた。多様な刊行物が、遺伝子発現モジュレーターとして用いることができるRNAi分子の例を提供する。かかる刊行物として、米国特許第8,993,530号、同第8,877,917号、同第8,293,719号、同第7,947,659号、同第7,919,473号、同第7,790,878号、同第7,737,265号、同第7,592,322号; ならびに米国公開番号20150197746、20140350071、201403158

10

20

30

40

50

35、20130156845および20100267805が開挙げられ、RNAi分子の型ならびにそれらの作製に関する教示は、本明細書において参考として援用される。

【0126】

アプタマーは、多様なタンパク質標的に結合して、それらのタンパク質の他のタンパク質との相互作用を妨害することができる。したがって、遺伝子発現モジュレーターは、アプタマーであってもよく、遺伝子発現調節導入遺伝子は、かかるアプタマーをコードしていてもよい。アプタマーは、それらが、調節性タンパク質のDNA結合部位に特異的に結合することにより遺伝子の転写を妨げる能力のために選択され得る。PCT公開番号WO 98/29430およびWO 00/20040は、遺伝子発現を調節するために用いられたアプタマーの例を提供し；米国公開番号20060128649もまた、かかるアプタマーの例を提供する；これらの各々のアプタマーは、本明細書において参考として援用される。

10

【0127】

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

【0128】

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

20

30

【0129】

本明細書において提供される方法のいずれか1つは、それを必要とする対象の細胞においてエクソンスキッピングをもたらすために用いることができる。対象は、エクソンスキッピングが利益をもたらすであろう任意の疾患または障害を有してよく、かかる疾患または障害に関連する適切な（その発現の間のエクソンスキッピングが有益であろう）タンパク質に基づいて、アンチセンスオリゴヌクレオチドを設計することができる。疾患および障害ならびに関連するタンパク質の例は、本明細書において提供される。本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、対象は、筋ジストロフィー（例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィー）などの本明細書において記載されるジストロフィーのいずれか1つを有する。したがって、本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、エクソンスキッピング導入遺伝子は、本明細書において提供されるジストロフィーのいずれか1つと関連する本明細書において提供されるタンパク質のいずれか1つにおいてエクソンスキッピングをもたらすことができる、アンチセンスオリゴヌクレオチドをコードする。本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ジストロフィンにおいてエクソンスキッピングをもたらすことがで

40

50

きる。

【0130】

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

【0131】

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

【0132】

ウイルスベクター

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

【0133】

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

【0134】

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

10

20

30

40

50

出すことができ、そのウイルスベクターおよびそれらの作製の方法は、本明細書においてその全体において参考として援用される。

【0135】

単純ヘルペスウイルス（HSV）に基づくウイルスベクターもまた、本明細書において提供される使用のために好適である。多くの複製欠損HSVベクターは、複製を防止するために、1以上のintermediate-early遺伝子を取り除く欠失を含む。ヘルペスベクターの利点は、潜伏期に入る能力により長期のDNA発現をもたらすことができること、および大きなウイルスDNAゲノムにより25 kbまでの外来DNAを収容することができることである。HSVに基づくベクターの記載については、例えば、米国特許第5,837,532号、同第5,846,782号、同第5,849,572号および同第5,804,413号、ならびに国際特許出願WO 91/02788、WO 96/04394、WO 98/15637およびWO 99/06583を参照；そのウイルスベクターおよびそれらの作製の方法の記載は、その全体において参考として援用される。

【0136】

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

【0137】

ウイルス導入ベクターの基礎となるアデノウイルスは、任意の起源、任意のサブグループ、任意のサブタイプ、サブタイプの混合物、または任意の血清型からのものであってよい。例えば、アデノウイルスは、サブグループA（例えば、血清型12、18および31）、サブグループB（例えば、血清型3、7、11、14、16、21、34、35および50）、サブグループC（例えば、血清型1、2、5および6）、サブグループD（例えば、血清型8、9、10、13、15、17、19、20、22～30、32、33、36～39および42～48）、サブグループE（例えば、血清型4）、サブグループF（例えば、血清型40および41）、未分類の血清群（例えば、血清型49および51）、または任意の他のアデノウイルス血清型のものであってよい。アデノウイルス血清型1～51は、American Type Culture Collection（ATCC、Manassas, Va.）から入手可能である。非C群アデノウイルス、および非ヒトアデノウイルスですら、複製欠損アデノウイルスベクターを調製するために用いることができる。非C群アデノウイルスベクター、非C群アデノウイルスベクターを作製する方法、および非C群アデノウイルスベクターを用いる方法は、例えば、米国特許第5,801,030号、同第5,837,511号および同第5,849,561号、ならびに国際特許出願WO 97/12986およびWO 98/53087において開示される。任意のアデノウイルス、キメラアデノウイルスですら、アデノウイルスベクターのためのウイルスゲノムのソースとして用いることができる。例えば、ヒトアデノウイルスを、複製欠損アデノウイルスベクターのためのウイルスゲノムのソースとして用いることができる。アデノウイルスベクターのさらなる例は、米国公開番号20150093831、20140248305、20120283318、20100008889、20090175897および20090088398において見出すことができ、そのウイルスベクターおよびそれらの作製の方法の記載は、その全体において参考として援用される。

【0138】

本明細書において提供されるウイルス導入ベクターはまた、アデノ随伴ウイルス（AAV）に基づいてもよい。AAVベクターは、本明細書において記載されるもののような治療的適用における使用のために、特に関心を集めて来た。AAVは、ヒト疾患を引き起こす

ことは知られていないDNAウイルスである。一般に、AAVは、効率的な複製のために、ヘルパーウイルス（例えば、アデノウイルスまたはヘルペスウイルス）との共感染またはヘルパー遺伝子の発現を必要とする。AAVは、宿主細胞ゲノムに特定の部位において安定に感染する能力を有し、それにより、レトロウイルスより予測可能である；しかし、一般に、ベクターのクローニング能力は4.9 kbである。遺伝子治療の適用において用いられてきたAAVベクターは、一般に、DNA複製およびパッケージングのための認識シグナルを含む末端反復（ITR）のみが残るように、親ゲノムの約96%を欠失している。AAVに基づくベクターの記載については、例えば、米国特許第8,679,837号、同第8,637,255号、同第8,409,842号、同第7,803,622号および同第7,790,449、ならびに米国公開番号20150065562、20140155469、20140037585、20130096182、20120100606および20070036757を参照；そのウイルスベクターおよびそれらの作製の方法は、本明細書においてその全体において参考として援用される。AAVベクターは、組み換えAAVベクターであってよい。AAVベクターはまた、自己相補的（sc）AAVベクターであってよく、これは、例えば、米国特許公開2007/01110724および2004/0029106、ならびに米国特許第7,465,583号および同第7,186,699号において記載され、ベクターおよびその作製の方法は、本明細書において参考として援用される。

【0139】

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

【0140】

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

いて参考として援用される。

【0141】

抗原提示細胞標的免疫抑制剤

抗原提示細胞標的免疫抑制剤は、それらの形態および特徴のおかげでAPC免疫寛容原性効果をもたらすことができる剤を含んでもよい。抗原提示細胞標的免疫抑制剤はまた、免疫抑制剤が共役するキャリアを含む剤を含む。

【0142】

抗原提示細胞標的免疫抑制剤は、米国公開番号20150010631において記載されるもののような特定のサイズおよびゼータ電位の、ポリスチレン、PLGAまたはダイヤモンド粒子などの、負に荷電した粒子を含み、かかる粒子およびそれらの生成のための方法の記載は、本明細書において参考として援用される。かかる粒子は、任意の粒子の形状または立体構造を有してよい。しかし、いくつかの態様においては、*in vivo*で凝集する可能性が低い粒子を使用することが好ましい。一態様において、これらの粒子は、球状の形状を有する。一般に、かかる粒子は、サイズについて均質である必要はないが、かかる粒子は、一般に、抗原提示細胞または他のMPS細胞における食作用を引き起こすために十分なサイズのものでなければならない。好ましくは、これらの粒子は、可溶性を増強し、*in vivo*での凝集により引き起こされる複雑化を回避し、飲作用を促進するために、マイクロスケールまたはナノスケールのサイズである。

【0143】

これらの粒子は、約0.1 μm ～約10 μm 、約0.2 μm ～約2 μm 、約0.3 μm ～約5 μm 、または約0.5 μm ～約3 μm の平均直径であってよい。幾つかの態様において、これらの粒子は、約0.1 μm 、約0.2 μm 、約0.3 μm 、約0.4 μm 、約0.5 μm 、約1.0 μm 、約1.5 μm 、約2.0 μm 、約2.5 μm 、約3.0 μm 、約3.5 μm 、約4.0 μm 、約4.5 μm 、または約5.0 μm の平均直径を有してよい。これらの粒子は、均一な直径のものである必要はなく、医薬処方物は、粒子サイズの混合物を有する複数の粒子を含んでもよい。

【0144】

幾つかの態様において、これらの粒子は、非金属である。これらの態様において、これらの粒子は、ポリマーから形成されていてもよい。好ましい態様において、これらの粒子は、生分解性である。好適な粒子の例として、ポリスチレン粒子、PLGA粒子、PLURONICS安定化硫化ポリプロピレン粒子、およびダイヤモンド粒子が挙げられる。加えて、これらの粒子は、広範な他の材料から形成させることができる。例えば、これらの粒子は、ガラス、シリカ、ヒドロキシカルボン酸のポリエステル、ジカルボン酸のポリ無水物、またはヒドロキシカルボン酸とジカルボン酸のコポリマーからなってもよい。より一般的に、これらの粒子は、米国公開番号20150010631において記載されるような他の材料からなってもよい。

【0145】

粒子は、一般に、特定のゼータ電位を有する。態様において、ゼータ電位は負である。ゼータ電位は、約-100 mVより低いかまたは約-50 mVより低くてもよい。態様において、粒子は、-100 mVと0 mVとの間、-75 mVと0 mVとの間、-60 mVと0 mVとの間、-50 mVと0 mVとの間、-40 mVと0 mVとの間、-30 mVと0 mVとの間、-20 mVと+0 mVとの間、-10 mVと-0 mVとの間、-100 mVと-50 mVとの間、-75 mVと-50 mVとの間、または-50 mVと-40 mVとの間のゼータ電位を有する。

別の態様において、これらの粒子はまた、本明細書において提供される1以上の抗原を含む。これらの態様のいくつかにおいて、1以上の抗原は、粒子中に封入されている。

【0146】

抗原提示細胞標的免疫抑制剤の別の例は、ナノ結晶性形態の免疫抑制剤であり、これにより、免疫抑制剤の形態自体が、粒子または粒子様となる。これらの態様において、かかる形態は、ウイルスまたは他の外来病原体を模倣する。多くの薬物が、ナノサイズ化され

10

20

30

40

50

てきており、かかる薬物形態を製造する適切な方法は、当業者には公知であろう。ナノ結晶性ラパマイシンなどの薬物ナノ結晶は、当業者には公知である (Katteboinaa et al., 2009, International Journal of PharmTech Resesarch; 第1巻、第3号; pp682-694)。本明細書において用いられる場合、「薬物ナノ結晶」とは、キャリアまたはマトリックス材料を含まない薬物 (例えば免疫抑制剤) の形態を指す。幾つかの態様において、薬物ナノ結晶は、90%、95%、98%または99%またはそれより多い薬物を含む。薬物ナノ結晶を製造するための方法として、限定することなく、製粉、高圧均質化、沈殿、スプレー乾燥、超臨界溶液の急速膨張 (rapid expansion of supercritical solution) (RESS)、Nanoedge (登録商標) 技術 (Baxter Healthcare)、および Nanocrystal Technology (商標) (Elan Corporation) が挙げられる。幾つかの態様において、薬物ナノ結晶の立体的または静電的安定性のために界面活性剤または安定化剤を用いてもよい。幾つかの態様において、免疫抑制剤のナノ結晶またはナノ結晶性形態は、免疫抑制剤、特に不溶性または不安定な免疫抑制剤の、可溶性、安定性、および／またはバイオアベイラビリティを増大するために用いることができる。

【0147】

抗原提示細胞標的免疫抑制剤はまた、アポトーシス小体模倣物であってもよく、関連する抗原の寛容化を引き起こしてもよい。かかる模倣物は、米国公開番号20120076831において記載され、その模倣物およびその製造の方法は、本明細書において参考として援用される。アポトーシス小体模倣物は、粒子、ビーズ、分枝ポリマー、デンドリマーまたはリポソームであってもよい。好ましくは、模倣物は粒子状であり、一般に、球状(spherical)、楕円体状、桿状、球状(globular)または多角体状の形状である。あるいは、しかし、模倣物は、不規則または分枝状の形状のものであってもよい。好ましい態様において、模倣物は、生分解性の材料からなる。一般に正味の負の電荷を帯びている細胞表面への非特異的結合を軽減するために、模倣物が、正味の中性または陰性の電荷を有することが、さらに好ましい。好ましくは、模倣物の表面は、非特異的な、または望ましくない生物学的相互作用を最少化する材料からなる。粒子である場合、模倣物の表面を、非特異的な相互作用を防止または軽減する材料でコーティングしてもよい。粒子を、ポリ(エチレングリコール)(PEG)、およびそのコポリマー、例えばPLURONICS(ポリ(エチレングリコール)-b-ポリ(プロピレングリコール)-b-ポリ(エチレングリコール)のコポリマーを含む)などの親水層でコーティングすることによる立体安定化により、間質のタンパク質との非特異的相互作用を軽減することができる。

【0148】

粒子である場合、模倣物は、ガラス、シリカ、ヒドロキシカルボン酸のポリエステル、ジカルボン酸のポリ無水物、またはヒドロキシカルボン酸とジカルボン酸とのコポリマーからなる粒子であってもよい。これらの模倣物は、量子ドットであっても、または量子ドットポリスチレン粒子などの量子ドットからなるものであってもよい。これらの模倣物は、ポリグリコール酸ポリマー(PGA)、ポリ乳酸ポリマー(PLA)、ポリセバシン酸ポリマー(PSA)、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)コポリマー(PLGA)、ポリ(乳酸-コ-セバシン酸)コポリマー(PLSA)、ポリ(グリコール酸-コ-セバシン酸)コポリマー(PGSA)などを含む材料を含んでもよい。模倣物はまた、ポリスチレンビーズであってもよい。

【0149】

これらの模倣物は、1以上の抗原を含んでもよい。模倣物は、直接的または間接的に、寛容が所望される1以上の抗原と共役することができてよい。いくつかの例において、模倣物は、複数のコピーの暴露される抗原を有し、免疫寛容原性応答の可能性を増大するために、複数の結合部位を有するであろう。模倣物は、その表面上に1つの抗原を有していても、表面上に複数の異なる抗原を有していてもよい。あるいは、しかし、模倣物は、共役部分が、化学結合を形成することなく吸着することができる表面を有していてもよい。

【0150】

幾つかの態様において、模倣物はまた、アポトーシスシグナル分子を含んでもよいが、

これは、ポリスチレンビーズを用いる場合などには、必ずしも必要ではない。アポトーシスシグナル分子として、これらに限定されないが、米国公開番号20050113297において記載されるアポトーシスシグナル分子が挙げられ、このアポトーシスシグナル分子は、本明細書において参考として援用される。これらの粒子における使用のために好適な分子として、貪食細胞を標的とする分子が挙げられ、これは、マクロファージ、樹状細胞、単球および好中球を含む。かかる分子は、トロンボスポンジンまたはアネキシンIであってよい。

【0151】

抗原提示細胞標的免疫抑制剤はまた、米国公開番号20120039989において記載されるもののような赤血球結合治療剤であってもよく、この治療剤およびその製造の方法は、本明細書において参考として援用される。記載されるように、赤血球(erythrocytes) (赤血球(red blood cells)としても知られる) に特異的に結合するペプチドが発見されている。これらのペプチドは、血液中に存在する他の因子の存在下においてすら、赤血球に特異的に結合し、免疫寛容をもたらすために用いることができる。したがって、赤血球結合治療剤は、寛容が所望される1以上の抗原、および赤血球アフィニティーリガンドを含む。1以上の抗原は、1以上のウイルス抗原(例えば、1以上のウイルスカプシドタンパク質のもの)などの、本明細書において記載されるウイルス導入ベクター抗原であってもよい。また、1以上の抗原はまた、提供されるような発現された導入遺伝子の1以上の抗原であっても、またはこれを含んでもよい。抗原は、混合物を形成してもよく、これに対して寛容が所望される。

【0152】

赤血球に特異的に結合するペプチドの例として、ERY1、ERY19、ERY59、ERY64、ERY123、ERY141およびERY162が挙げられる。赤血球に結合するペプチドに加えて、抗体、例えば単鎖抗体、およびその抗原結合フラグメントなどのタンパク質もまた、アフィニティーリガンドとして用いることができる。アフィニティーリガンドはまた、赤血球表面成分に対するヌクレオチドアプタマーリガンドを含んでもよい。したがって、他の赤血球アフィニティーリガンドの代わりにアプタマーを作製して用いてもよい。DNAおよびRNAアプタマーは、非共有赤血球結合を提供するために用いることができる。アプタマーは、DNAアプタマー、RNAアプタマーまたはペプチドアプタマーとして分類することができる。加えて、アフィニティーリガンドは、赤血球結合ペプチドなどの、2以上のアフィニティーリガンドの融合物であってもよい。さらに、赤血球結合治療剤の成分は、ポリマーソーム(polymersome)、リボソームまたはミセルまたはいくつかの型のナノ粒子などのキャリアと結合していてもよい。幾つかの態様において、成分は、かかるキャリア中に封入される。幾つかの態様において、キャリアは、本明細書において記載されるアフィニティーリガンド、および1以上の抗原を含む。かかる態様において、アフィニティーリガンドおよび1以上の抗原は、必ずしも互いに共役している必要はない。

【0153】

抗原提示細胞標的免疫抑制剤はまた、APCを標的とするキャリアと共役した、本明細書において提供される免疫抑制剤のいずれか1つを含む。キャリアは、いくつかの態様において、APCマーカーに特異的な抗体またはその抗原結合フラグメント(または何らかの他のリガンド)であってよい。かかるマーカーとして、これらに限定されないが、以下が挙げられる: CD1a (R4、T6、HTA-1) ; CD1b (R1) ; CD1c (M241、R7) ; CD1d (R3) ; CD1e (R2) ; CD11b (α Mインテグリン鎖、CR3、Mo1、C3niR、Mac-1) ; CD11c (α Xインテグリン、p150、95、AXb2) ; CDw117 (ラクトシルセラミド、LacCer) ; CD19 (B4) ; CD33 (gp67) ; CD35 (CR1、C3b/C4b受容体) ; CD36 (GPIIb、GPIV、PASIV) ; CD39 (ATPデヒドロゲナーゼ、NTPデヒドロゲナーゼ-1) ; CD40 (Bp50) ; CD45 (LCA、T200、B220、Ly5) ; CD45RA ; CD45RB ; CD45RC ; CD45RO (UCHL-1) ; CD49d (VLA-4 α 、 α 4インテグリン) ; CD49e (VLA-5 α 、 α 5インテグリン) ; CD58 (LFA-3) ; CD64 (Fc γ RI) ; CD72 (Ly-19.2、Ly-32.2、Lyb-2) ; CD73 (Ecto-5'ヌクレオチダーゼ) ; CD74 (Ii、不変鎖) ; CD80 (

B7、B7-1、BB1) ; CD81 (TAPA-1) ; CD83 (HB15) ; CD85a (ILT5、LIR3、HL9) ; CD85d (ILT4、LIR2、MIR10) ; CD85j (ILT2、LIR1、MIR7) ; CD85k (ILT3、LIR5、HM18) ; CD86 (B7-2/B70) ; CD88 (C5aB) ; CD97 (BL-KDD/F12) ; CD101 (IGSF2、P126、V7) ; CD116 (GM-CSFR α) ; CD120a (TMFRI、p55) ; CD120b (TNFR II 、p75、TNFR p80) ; CD123 (IL-3R α) ; CD139 ; CD148 (HPTP- η 、p260、DEP-1) ; CD150 (SLAM、IPO-3) ; CD156b (TACE、ADAM17、cSVP) ; CD157 (Mo5、BST-1) ; CD167a (DDR1、trkE、cak) ; CD168 (RHAMM、IHABP、HMMR) ; CD169 (シアロアドヘシン、Siglec-1) ; CD170 (Siglec-5) ; CD171 (L1CAM、NILE) ; CD172 (SIRP-1 α 、MyD-1) ; CD172b (SIRP β) ; CD180 (RP105、Bgp95、Ly64) ; CD184 (CXCR4、NPY3R) ; CD193 (CCR3) ; CD196 (CCR6) ; CD197 (CCR7 (ws CDw197)) ; CDw197 (CCR7、EBI1、BLR2) ; CD200 (OX2) ; CD205 (DEC-205) ; CD206 (MMR) ; CD207 (ランゲリン (Langerin)) ; CD208 (DC-LAMP) ; CD209 (DC-SIGN) ; CDw218a (IL18R α) ; CDw218b (IL8R β) ; CD227 (MUC1、PUM、PEM、EMA) ; CD230 (プリオンタンパク質 (PrP)) ; CD252 (OX40L、TNF (リガンド) スーパーファミリー、メンバー4) ; CD258 (LIGHT、TNF (リガンド) スーパーファミリー、メンバー14) ; CD265 (TRANCE-R、TNF-Rスーパーファミリー、メンバー11a) ; CD271 (NGFR、p75、TNFRスーパーファミリー、メンバー16) ; CD273 (B7DC、PDL2) ; CD274 (B7H1、PDL1) ; CD275 (B7H2、ICOSL) ; CD276 (B7H3) ; CD277 (BT3.1、B7ファミリー：ブチロフィリン3) ; CD283 (TLR3、TOLL様受容体3) ; CD289 (TLR9、TOLL様受容体9) ; CD295 (LEPR) ; CD298 (ATP1B3、Na K ATPase β 3サブユニット) ; CD300a (CMRF-35H) ; CD300c (CMRF-35A) ; CD301 (MGL1、CLECSF14) ; CD302 (DCL1) ; CD303 (BDCA2) ; CD304 (BDCA4) ; CD312 (EMR2) ; CD317 (BST2) ; CD319 (CRACC、SLAMF7) ; CD320 (8D6) ; およびCD68 (gp110、マクロシアリン) ; MHCクラスII ; BDCA-1 ; およびSiglec-H。抗体-薬物コンジュゲートを調製するための方法は、米国公開番号20150231241において見出すことができ、その方法は、本明細書において参考として援用される。他の方法は、当業者に公知である。

【0154】

抗原提示細胞標的免疫抑制剤はまた、本明細書において記載される免疫抑制剤のいずれか1つを含む合成ナノキャリアであってもよい。かかる合成ナノキャリアは、米国公開番号20100151000のものを含み、その合成ナノキャリアおよびそれらの作製の方法は、本明細書において参考として援用される。記載されるとおり、NF- κ B阻害剤と抗原との両方を含む粒子（例えばリポソームまたはポリマー粒子）を投与することにより、*in vivo*で免疫寛容原性応答をもたらすことができることが見出された。したがって、NF- κ B経路の阻害剤と1以上のウイルス導入ベクター抗原とを含む粒子は、本明細書において提供されるような抗原提示細胞標的免疫抑制剤として用いることができる。幾つかの態様において、粒子は、リポソームのものである。他の態様において、粒子は、金属粒子（例えば、タングステン、金、白金またはイリジウム粒子）などのキャリア粒子を含む。なお他の態様において、粒子は、ポリマーマトリックスまたはキャリアを含み、その代表的な例は、生分解性ポリマー粒子（例えばポリ（ラクチド-コグリコリド）から製造される粒子）を含む。なお他の態様において、粒子は、セラミックまたは無機のマトリックスまたはキャリアを含む。

【0155】

NF- κ B経路の阻害剤は、NF- κ B経路のメンバーのレベルまたは機能的活性を低下させることができ、BTK、LYN、BCR Igアルファ、BCR Igベータ、Syk、Blnk、PLCガンマ2、PKCベータ、DAG、CARMA1、BCL10、MALT1、PI3K、PIPS、AKT、p38 MAPK、ERK、COT、IKKアルファ、IKKベータ、IKKガンマ、NIK、RelA/p65、P105/p50、c-Rel、RelB、p52、NIK、Leu13、CD81、CD19、CD21ならびに補体および凝血カスケードにおけるそのリガンド、TRAF6、ユビキチンリガーゼ、Tab2、TAK1、NEMO、

NOD2、RIP2、Lck、fyn、Zap70、LAT、GRB2、SOS、CD3ゼータ、Slp-76、GADS、ITK、PLCガンマ1、PKCシータ、ICOS、CD28、SHP2、SAP、SLAMおよび2B4から選択することができる。幾つかの態様において、NF- κ B経路阻害剤は、RelA/p65、P105/p50、c-Rel、RelBまたはp52のうちの任意の1以上のレベルまたは機能的活性を低下させる。

【0156】

本発明により、幾つかの態様において、広範な他の合成ナノキャリアを免疫抑制剤とカップリングさせて、なお他の抗原提示細胞標的免疫抑制剤を提供するために用いることができる。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、球体または球状体である。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、扁平または平板状である。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、立方体または立方である。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、卵円または楕円である。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、円柱、円錐または錐体である。

【0157】

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

【0158】

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

【0159】

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

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

【0160】

幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、1以上の両親媒体を任意に含んでもよい。幾つかの態様において、両親媒体は、増大した安定性、改善した均一性または増大した粘性により、合成ナノキャリアの製造を促進することができる。幾つかの態様において、両親媒体は、脂質膜（例えば、脂質二重層、脂質単層など）の内部表面に関連していてもよい。当該分野において公知の多くの両親媒体が、本発明による合成ナノキャリアを作製するために好適である。かかる両親媒体として、これらに限定されないが、以下が挙げられる：ホスホグリセリド；ホスファチジルコリン；ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）；ジオレイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）；ジオレイルオキシプロピルトリエチルアンモニウム（DOTMA）；ジオレオイルホスファチジルコリン；コレ

ステロール；コレステロールエステル；ジアシルグリセロール；コハク酸ジアシルグリセロール；ジホスファチジルグリセロール（DPPG）；ヘキサンデカノール；ポリエチレングリコール（PEG）などの脂肪アルコール；ポリオキシエチレンー9ー라우リルエーテル；パルミチン酸またはオレイン酸などの界面活性脂肪酸；脂肪酸；脂肪酸モノグリセリド；脂肪酸ジグリセリド；脂肪酸アミド；ソルビタントリオレアート（Span（登録商標）85）グリココーレート；ソルビタンモノラウレート（Span（登録商標）20）；ポリソルベート20（Tween（登録商標）20）；ポリソルベート60（Tween（登録商標）60）；ポリソルベート65（Tween（登録商標）65）；ポリソルベート80（Tween（登録商標）80）；ポリソルベート85（Tween（登録商標）85）；ポリオキシエチレンモノステアレート；サーファクチン；ポロキサマー；ソルビタントリオレアートなどのソルビタン脂肪酸エステル；レシチン；リゾレシチン；ホスファチジルセリン；ホスファチジルイノシトール；スフィンゴミエリン；ホスファチジルエタノールアミン（セファリン）；カルジオリピン；ホスファチジン酸；セレブロシド；リン酸ジセチル；ジパルミトイルホスファチジルグリセロール；ステアリアルアミン；ドデシルアミン；ヘキサデシルアミン；パルミチン酸アセチル；グリセロールリシノレート；ヘキサデシルステアレート；ミリスチン酸イソプロピル；チロキサポール；ポリ（エチレングリコール）5000ーホスファチジルエタノールアミン；ポリ（エチレングリコール）400ーモノステアレート；リン脂質；高い界面活性剤特性を有する合成および／または天然の洗剤；デオキシコラート；シクロデキストリン；カオトロピックな塩；イオン対化剤（ion pairing agent）；およびこれらの組み合わせ。両親媒体成分は、異なる両親媒体の混合物であってもよい。当業者は、これは例示的な界面活性剤効果を有する物質のリストであって、包括的なものではないことを理解するであろう。本発明により用いられるべき合成ナノキャリアの製造において、任意の両親媒体を用いることができる。

【0161】

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

【0162】

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

合成ナノキャリアは、非メトキシ末端のポリマーである1以上のポリマーを含む。幾つかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%または99%（重量／重量）は、非メトキシ末端のポリマーである。幾つかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの全ては、非メトキシ末端のポリマーである。幾つかの態様において、合成ナノキャリアは、プルロニックポリマーを含まない1以上のポリマーを含む。幾つかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%または99%（重量／重量）は、プルロニックポリマーを含まない。幾つかの態様において、合成ナノキャリアを構成するポリマーの全ては、プルロニックポリマーを含まない。幾つかの態様において、かかるポリマーは、コーティング層（例えば、リポソーム、脂質単層、ミセルなど）により囲まれていてもよい。幾つかの態様において、合成ナノキャリアの要素は、ポリマーに接着していてもよい。

【0163】

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

【0164】

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

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

【0165】

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

【0166】

ポリマーは、天然または非天然の（合成の）ポリマーであってよい。ポリマーは、ホモ

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

【0167】

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

【0168】

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

【0169】

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

【0170】

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

【0171】

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

米国特許第5543158号またはVon AndrianらによるWO公開WO2009/051837の一般的教示を用いて行ってもよい。

【0172】

幾つかの態様において、ポリマーを、脂質または脂肪酸基により修飾してもよい。幾つかの態様において、脂肪酸基は、酪酸、カプロン酸、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸またはリグノセリン酸の1以上であってよい。幾つかの態様において、脂肪酸基は、パルミトレイン酸、オレイン酸、バクセン酸、リノール酸、アルファーリノール酸、ガンマーリノール酸、アラキドン酸、ガドレイン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸またはエルカ酸の1以上であってよい。

10

【0173】

幾つかの態様において、ポリマーは、ポリエステルであってよく、これは、乳酸およびグリコール酸の単位を含むコポリマー、例えばポリ（乳酸-コグリコール酸）およびポリ（ラクチド-コグリコリド）（本明細書において集合的に「PLGA」として言及される）；ならびにグリコール酸単位を含むホモポリマー（本明細書において「PGA」として言及される）、ならびにポリ-L-乳酸、ポリ-D-乳酸、ポリ-D, L-乳酸、ポリ-L-ラクチド、ポリ-D-ラクチド、およびポリ-D, L-ラクチド乳酸単位を含むホモポリマー（本明細書において集合的に「PLA」として言及される）を含む。幾つかの態様において、例示的なポリエステルとして、例えば、ポリヒドロキシ酸；PEGコポリマーおよびラクチドとグリコリドとのコポリマー（例えば、PLA-PEGコポリマー、PGA-PEGコポリマー、PLGA-PEGコポリマー）およびそれらの誘導体が挙げられる。幾つかの態様において、ポリエステルとして、例えば、ポリ（カプロラクトン）、ポリ（カプロラクトン）-PEGコポリマー、ポリ（L-ラクチド-L-リジン）コポリマー、ポリ（セリンエステル）、ポリ（4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル）、ポリ[α-（4-アミノブチル）-L-グリコール酸]およびそれらの誘導体が挙げられる。

20

【0174】

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

30

【0175】

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

40

【0176】

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

50

本明細書において提供される任意の免疫抑制剤は、幾つかの態様においては、合成ナノキャリア、抗体またはその抗原結合フラグメント（またはAPCを標的とする他のリガンド）、赤血球結合ペプチドなどにカップリングされていてもよい。免疫抑制剤として、これらに限定されないが、以下が挙げられる：スタチン；ラパマイシンまたはラパマイシンアナログなどのmTOR阻害剤；TGF- β シグナル伝達剤；TGF- β 受容体アゴニスト；ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤；副腎皮質ステロイド；ロテノンなどのミトコンドリアの機能の阻害剤；P38阻害剤；NF- κ B阻害剤；アデノシン受容体アゴニスト；プロスタグランジンE₂アゴニスト；ホスホジエステラーゼ4阻害剤などのホスホジエステラーゼ阻害剤；プロテアソーム阻害剤；キナーゼ阻害剤；Gタンパク質共役受容体アゴニスト；Gタンパク質共役受容体アンタゴニスト；糖質コルチコイド；レチノイド；サイトカイン阻害剤；サイトカイン受容体阻害剤；サイトカイン受容体アクチベーター；ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アンタゴニスト；ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アゴニスト；ヒストンデアセチラーゼ阻害剤；カルシニューリン阻害剤；ホスファターゼ阻害剤ならびに酸化ATP。免疫抑制剤はまた、IDO、ビタミンD₃、シクロスポリンA、アリール炭化水素受容体阻害剤、レスベラトロール、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アスピリン、ニフルミン酸、エストリオール、トリポリド（tripolide）、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-10）、シクロスポリンA、サイトカインまたはサイトカイン受容体などを標的とするsiRNAを含む。

【0182】

スタチンの例として、アトロバスタチン（LIPITOR（登録商標）、TORVAST（登録商標））、セリバスタチン、フルバスタチン（LESCOL（登録商標）、LESCOL（登録商標）XL）、ロバスタチン（MEVACOR（登録商標）、ALTOCOR（登録商標）、ALTOPREV（登録商標））、メバスタチン（COMPACTIN（登録商標））、ピタバスタチン（LIVALO（登録商標）、PIAVA（登録商標））、ロスバスタチン（PRAVACHOL（登録商標）、SELEKTINE（登録商標）、LIPOSTAT（登録商標））、ロスバスタチン（CRESTOR（登録商標））、およびシンバスタチン（ZOCOR（登録商標）、LIPEX（登録商標））が挙げられる。

mTOR阻害剤の例として、ラパマイシンおよびそのアナログ（例えば、CCL-779、RAD001、AP23573、C20-メタリルラパマイシン（C20-Marap）、C16-（S）-ブチルスルホンアミドラパマイシン（C16-BSrap）、C16-（S）-3-メチルインドールラパマイシン（C16-iRap）（Bayle et al. Chemistry & Biology 2006、13:99-107）、AZD8055、BEZ235（NVP-BEZ235）、クリソファン酸（クリソファノール）、デフォロリムス（MK-8669）、エベロリムス（RAD0001）、KU-0063794、PI-103、PP242、テムシロリムス、およびWYE-354（Selleck、Houston、TX、USAから入手可能）が挙げられる。

【0183】

TGF- β シグナル伝達剤の例として、TGF- β リガンド（例えば、アクチビンA、GDF1、GDF11、骨形態形成タンパク質、nodal、TGF- β ）およびそれらの受容体（例えば、ACVR1B、ACVR1C、ACVR2A、ACVR2B、BMPR2、BMPR1A、BMPR1B、TGF β RI、TGF β RII）、R-SMADS/co-SMADS（例えば、SMAD1、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD5、SMAD8）、ならびにリガンド阻害剤（例えば、フォリスタチン、ノギン、コーディン、DAN、レフティー、LTBP1、THBS1、デコリン）が挙げられる。

ミトコンドリアの機能の阻害剤の例として、アトラクチロシド（二カリウム塩）、ボンクレキン酸（三アンモニウム塩）、カルボニルシアニドm-クロロフェニルヒドラゾン、カルボキシアトラクチロシド（例えばAtractylis gummifera由来のもの）、CGP-37157、（-）-デグエリン（例えばMundulea sericea由来のもの）、F16、ヘキソキナーゼII/HDAC結合ドメインペプチド、オリゴマイシン、ロテノン、Ru360、SFK1、およびバリノマイシン（例えばStreptomyces fulvissimus由来のもの）（EMD4Biosciences、USA）が挙げられる。

【0184】

P38阻害剤の例として、SB-203580（4-（4-フルオロフェニル）-2-（4-メチルスルフィニルフェニル）-5-（4-ピリジル）1H-イミダゾール）、SB-239063（トランス-1-（4-ヒドロキシシクロヘキシル）-4-（フルオロフェニル）-5-（2-メトキシ-ピリミジン-4-イル）イミダゾール）、SB-220025（5-（2-アミノ-4-ピリミジニル）-4-（4-フルオロフェニル）-1-（4-ピペリジニル）イミダゾール）、およびARRY-797が挙げられる。

NF（例えば、NK- κ β ）阻害剤の例として、IFRD1、2-（1, 8-ナフチリジン-2-イル）-フェノール、5-アミノサリチル酸、BAY 11-7082、BAY 11-7085、CAPE（Caffeic Acid Phenethylエステル）、マレイン酸ジエチル、IKK-2阻害剤I V、IMD 0354、ラクタシスチン、MG-132 [Z-Leu-Leu-Leu-CHO]、NF κ B活性化阻害剤I I I、NF- κ B活性化阻害剤I I、JSH-23、パルテノライド、フェニルアルシンオキシド（PAO）、PPM-18、ピロリジンジチオカルバミン酸アンモニウム塩、QNZ、RO 106-9920、ロカグラミド、ロカグラミドAL、ロカグラミドC、ロカグラミドI、ロカグラミドJ、ロカグラオール、(R)-MG-132、サリチル酸ナトリウム、トリプトライド（PG490）、およびウェデロラクトンが挙げられる。

【0185】

アデノシン受容体アゴニストの例として、CGS-21680およびATL-146eが挙げられる。

プロスタグランジンE2アゴニストの例として、E-プロスタノイド2およびE-プロスタノイド4が挙げられる。

ホスホジエステラーゼ阻害剤（非選択的および選択的阻害剤）の例として、カフェイン、アミノフィリン、IBMX（3-イソブチル-1-メチルキサンチン）、パラキサンチン、ペントキシフィリン、テオブロミン、テオフィリン、メチル化キサンチン、ビンボセチン、EHNA（エリスロ-9-（2-ヒドロキシ-3-ノニル）アデニン）、アナグレリド、エノキシモン（PERFAN（商標））、ミルリノン、レボシメンダン、メセンブリン、イブジラスト、ピクラミラスト、ルテオリン、ドロタベリン、ロフルミラスト（DAXAS（商標））、DALIRESP（商標）、シルデナフィル（REVATION（登録商標））、VIAGRA（登録商標）、タダラフィル（ADCIRCA（登録商標））、CIALIS（登録商標）、バルデナフィル（LEVITRA（登録商標））、STAXYN（登録商標）、ウデナフィル、アバナフィル、イカリイン、4-メチルピペラジンおよびピラゾロピリミジン-7-1が挙げられる。

プロテアソーム阻害剤の例として、ボルテゾミブ、ジスルフィラム、エピガロカテキン-3-ガラートおよびサリノスポラミドAが挙げられる。

【0186】

キナーゼ阻害剤の例として、ベバシズマブ、BIBW 2992、セツキシマブ（ERBITUX（登録商標））、イマチニブ（GLEEVEC（登録商標））、トラスツズマブ（HERCEPTIN（登録商標））、ゲフィチニブ（IRESSA（登録商標））、ラニビズマブ（LUCENTIS（登録商標））、ペガブタニブ、ソラフェニブ、ダサチニブ、スニチニブ、エルロチニブ、ニロチニブ、ラパチニブ、パニツムマブ、バンデタニブ、E7080、パゾパニブおよびムブリチニブが挙げられる。

糖質コルチコイドの例として、ヒドロコルチゾン（コルチゾール）、酢酸コルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン、ベタメタゾン、トリアムシノロン、ベクロメタゾン、酢酸フルドロコルチゾン、酢酸デオキシコルチコステロン（DOCA）およびアルドステロンが挙げられる。

【0187】

レチノイドの例として、レチノール、レチナール、トレチノイン（レチノイン酸、RETIN-A（登録商標））、イソトレチノイン（ACUTANE（登録商標））、AMNESTEEM（登録商標）、CLARAVIS（登録商標）、SOTRET（登録商標）、アイトレチノイン（PAN RETIN（登録商標））、エトレチナート（TEGISON（商標））およびその代謝物であるアシトレチン（SORIATANE（登録商標））、タザロテン（TAZORAC（登録商標））、AV AGE（登録商標）、ZORAC（登録商標）、ベキサロテン（TARGRETIN（登録商標））およびアダパレン（DIFFERIN（登録商標））が挙げられる。

サイトカイン阻害剤の例として、IL1ra、IL1受容体アンタゴニスト、IGFBP、TNF-BF、ウロモジュリン、アルファー 2 – マクログロブリン、シクロスポリン A、ペンタミジンおよびペントキシフィリン（PENTOPAK（登録商標）、PENTOXIL（登録商標）、TREN TAL（登録商標））が挙げられる。

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アンタゴニストの例として、GW9662、PPAR γ アンタゴニスト I I I、G335およびT0070907（EMD4Biosciences、USA）が挙げられる。

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体アゴニストの例として、ピオグリタゾン、シグリタゾン、クロフィブラート、GW1929、GW7647、L-165,041、LY 171883、PPAR γ アクチベーター、Fmoc-Leu、トログリタゾンおよびWY-14643（EMD4Biosciences、USA）が挙げられる。

【0188】

ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の例として、トリコスタチン A、環状テトラペプチド（トラポキシニン B など）およびデプシペプチドなどのヒドロキサム酸（またはヒドロキサマート）、ベンズアミド、求電子性ケトン、酪酸フェニルおよびバルプロ酸などの脂肪酸酸性化合物、ポリノスタット（SAHA）、ベリノスタット（PXD101）、LAQ824およびパノビノスタット（LBH589）などのヒドロキサム酸、エンチノスタット（MS-275）、CI 994およびモセチノスタット（MGCD0103）などのベンズアミド、ニコチンアミド、NAD の誘導体、ジヒドロクマリン、ナフトピラノン、ならびに 2 – ヒドロキシナフアルデヒドが挙げられる。

カルシニューリン阻害剤の例として、シクロスポリン、ピメクロリムス、ボクロスポリンおよびタクロリムスが挙げられる。

ホスファターゼ阻害剤の例として、BN82002塩酸塩、CP-91149、カリクリン A、カンタリジン酸、カンタリジン、シペルメトリン、エチル – 3, 4 – デホスタチン、フォストリエシンナトリウム塩、MAZ51、メチル – 3, 4 – デホスタチン、NSC 95397、ノルカンタリジン(norcantharidin)、Prorocentrum concavum由来のオカダ酸アンモニウム塩、オカダ酸、オカダ酸カリウム塩、オカダ酸ナトリウム塩、フェニルアルシンオキシド、多様なホスファターゼ阻害剤カクテル、タンパク質ホスファターゼ 1 C、タンパク質ホスファターゼ 2 A 阻害剤タンパク質、タンパク質ホスファターゼ 2 A 1、タンパク質ホスファターゼ 2 A 2、およびオルトバナジン酸ナトリウムが挙げられる。

【0189】

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

【0190】

D. 組成物を使用および作製する方法

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

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

10

20

30

40

50

よびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994年) により記載されるような標準的な分子生物学および細胞培養技術を伴う。

【0191】

アデノウイルスベクターを作製するための補完細胞株として、これらに限定されないが、293細胞（例えばGraham et al., J. Gen. Virol., 36, 59-72 (1977)において記載される）、PER.C6細胞（例えば国際特許出願WO 97/00326、ならびに米国特許第5,994,128号および同第6,033,908号において記載される）、ならびに293-ORF6細胞（例えば国際特許出願WO 95/34671およびBrough et al., J. Virol., 71, 9206-9213 (1997)において記載される）が挙げられる。いくつかの例において、補完細胞は、全ての必要とされるアデノウイルス遺伝子機能を補完しない。ヘルパーウイルスは、アデノウイルスベクターの複製を可能にするために、細胞またはアデノウイルスのゲノムによりコードされていない遺伝子機能を、トランスに提供するために使用することができる。アデノウイルスベクターは、例えば、米国特許第5,965,358号、同第5,994,128号、同第6,033,908号、同第6,168,941号、同第6,329,200号、同第6,383,795号、同第6,440,728号、同第6,447,995号および同第6,475,757号、米国特許出願公開番号2002/0034735 A1、ならびに国際特許出願WO 98/53087、WO 98/56937、WO 99/15686、WO 99/54441、WO 00/12765、WO 01/77304およびWO 02/29388、ならびに本明細書において同定される他の参考文献において記載される材料および方法を用いて、構築するか、伝播させるか、および／または精製することができる。アデノウイルス血清型35ベクターを含む非C群アデノウイルスベクターは、例えば、米国特許第5,837,511号および同第5,849,561号、ならびに国際特許出願WO 97/12986およびWO 98/53087において記載される方法を用いて作製することができる。

【0192】

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

【0193】

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

【0194】

幾つかの態様において、組み換えAAVベクターは、三重トランスフェクション法(triple transfection method)を用いて作製することができる(例えば、米国特許第6,001,650号において詳細に記載されるように; 三重トランスフェクション法に関するその内容は、本明細書において参考として援用される)。典型的には、組み換えAAVは、宿主細胞を、AAV粒子中にパッケージングされるべき組み換えAAVベクター(導入遺伝子を含む)、AAVヘルパー機能ベクター、および補助機能ベクターでトランスフェクションすることにより作製する。一般に、AAVヘルパー機能ベクターは、増殖性AAVの複製およびカプシド形成のためにトランスで機能する、AAVヘルパー機能配列(repおよびcap)をコードする。好ましくは、AAVヘルパー機能ベクターは、任意の検出可能な野生型AAVウイルス粒子(すなわち、機能的なrepおよびcap遺伝子を含むAAVウイルス粒子)を作製することなく、効率的なAAVベクター作製を支持する。補助機能ベクターは、AAVが複製のために依存する、非AAV由来のウイルスおよび/または細胞の機能のためのヌクレオチド配列をコードしていてもよい。補助機能は、AAV複製のために必要とされる機能を含み、これは、限定することなく、AAV遺伝子転写、ステージ特異的なAAVのmRNAのスプライシング、AAVのDNAの複製、cap発現産物の合成、およびAAVカプシドアセンブリの活性化に關与する部分を含む。ウイルスに基づく補助機能は、アデノウイルス、ヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルス1型以外のもの)、およびワクシニアウイルスなどの既知のヘルパーウイルスのいずれかに由来してよい。

10

【0195】

レンチウイルスベクターは、当該分野において公知の多数の方法のいずれかを用いて作製することができる。レンチウイルスベクターおよび/またはそれらの作製の方法の例は、例えば、米国公開番号20150224209、20150203870、20140335607、20140248306、20090148936および20080254008において見出すことができ、かかるレンチウイルスベクターおよび作製の方法は、本明細書において参考として援用される。例として、レンチウイルスベクターが組み込み不能である場合、レンチウイルスゲノムはさらに複製起点(ori)を含み、その配列は、レンチウイルスゲノムを発現させなければならない細胞の性質に依存する。前記複製起点は、真核生物由来、好ましくは哺乳動物起源のもの、最も好ましくはヒト起源のものであってよい。レンチウイルスゲノムは細胞宿主のゲノム中に組み込まれない(不完全なインテグラーゼのため)ので、レンチウイルスゲノムは、頻繁な細胞分裂を経験している細胞においては失われ得る; このことは、BまたはT細胞などの免疫細胞における場合はことさらである。複製起点の存在は、いくつかの場合において有益であり得る。ベクター粒子は、293T細胞などの適切な細胞のトランスフェクションの後で、前記プラスミドにより、または他のプロセスにより、産生させることができる。レンチウイルス粒子の発現のために用いられる細胞において、プラスミドの全てまたは一部を、それらがコードしているポリヌクレオチドを安定に発現させるために、またはそれらがコードしているポリヌクレオチドを一過性にもしくは半安定して(semi-stably)発現させるために用いることができる。

20

30

【0196】

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

40

態様において、特定の抗原提示細胞標的免疫抑制剤を調製する場合、成分を、例えば赤血球結合ペプチド、抗体もしくはその抗原結合フラグメント(もしくはAPCを標的とする他のリガンド)、または合成ナノキャリアに接着させるための方法が有用であり得る。

【0197】

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

50

接着していてもよい。かかる環化付加反応は、好ましくは、好適な Cu (I) リガンドおよび Cu (II) 化合物を触媒活性 Cu (I) 化合物に還元するための還元剤と共に、Cu (I) 触媒の存在下において行う。この Cu (I) により触媒されたアジド-アルキン環化付加 (CuAAC) はまた、クリック反応としても言及される。

【0198】

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

【0199】

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

【0200】

ジスルフィドリンカーは、例えば R1-S-S-R2 の形態の 2 つの硫黄原子の間のジスルフィド (S-S) 結合の形成を介して、生成することができる。ジスルフィド結合は、チオール／メルカプタン基 (-SH) を含む成分の、別の活性化されたチオール基との、またはチオール／メルカプタン基を含む成分の、活性化されたチオール基を含む成分とのチオール交換により、形成させることができる。

【0201】

トリアゾールリンカー、特に、

【化 1】



ここで、R1 および R2 は、任意の化学成分である、
の形態の 1, 2, 3-トリアゾールは、第 1 の成分に接着したアジドの、免疫抑制剤などの第 2 の成分に接着した末端アルキンによる 1, 3-双極性環化付加反応により生成することができる。1, 3-双極性環化付加反応は、触媒を用いてまたはこれを用いずに、好ましくは 1, 2, 3-トリアゾール官能基を通して 2 つの成分を連結する Cu (I) 触媒を用いて行う。この化学は、Sharpless et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41(14), 2596, (2002) および Meldal, et al, Chem. Rev., 2008, 108(8), 2952-3015 において詳細に記載され、しばしば、「クリック」反応または CuAAC として言及される。

【0202】

チオエーテルリンカーは、例えば R1-S-R2 の形態における硫黄-炭素 (チオエーテル) 結合の形成により生成される。チオエーテルは、1 つの成分上でのチオール／メルカプタン (-SH) 基の、第 2 の成分上のハライドまたはエポキシドなどのアルキル化基によるアルキル化により、生成することができる。チオエーテルリンカーはまた、1 つの成分上のチオール／メルカプタン基の、マイケルアクセプターとしてマレイミド基またはビニルスルホン基を含む第 2 の成分上の電子欠乏アルケン基に対するマイケル付加により、形成させることができる。別の方法において、1 つの成分上のチオール／メルカプタン基の、第 2 の成分上のアルケン基によるラジカルチオール-エン反応により、チオエーテルリンカーを調製することができる。

【0203】

ヒドラゾンリンカーは、1 つの成分上のヒドラジド基の、第 2 の成分上のアルデヒド／ケトン基との反応により生成することができる。

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

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

【0204】

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

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

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

【0205】

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

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

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

【0206】

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

【0207】

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

10

20

30

40

50

せる。

【0208】

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

【0209】

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

【0210】

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

【0211】

材料を、望ましい場合には、限定されないが以下を含む多様な方法を用いて、合成ナノキャリア中に封入してもよい:C. Astete et al., 「Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles」 J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 第17巻、第3号、pp. 247-289 (2006); K. Avgoustakis 「Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery」 Current Drug Delivery 1:321-333 (2004); C. Reis et al., 「Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles」 Nanomedicine 2:8-21 (2006); P. Paolicelli et al., 「Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles」 Nanomedicine. 5(6):843-853 (2010)。材料を合成ナノキャリア中に封入するために好適な他の方法を用いてもよく、これらは、限定することなく、2003年10月14日に発行されたUngerに対する米国特許第6,632,671号において開示される方法を含む。

【0212】

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

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

【0213】

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

【0214】

あるいはまたは加えて、合成ナノキャリアは、直接的または間接的に、非共有相互作用を介して、成分に接着させることができる。非共有状態において、非共有接着は、限定されないが以下を含む非共有相互作用により媒介される：電荷相互作用、アフィニティー相互作用、金属配位、物理的吸着、主客相互作用、疎水性相互作用、TTスタッキング相互作用、水素結合相互作用、ファン・デル・ワールス相互作用、磁性相互作用、静電相互作用、双極子-双極子相互作用、および／またはこれらの組み合わせを含む。かかる接着は、合成ナノキャリアの外部表面または内部表面上にあるように配置することができる。状態において、封入および／または吸収は、接着の形態である。

【0215】

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

【0216】

本発明による組成物は、薬学的に許容し得る賦形剤を含んでもよい。組成物は、有用な投与形態を達成するために、慣用的な医薬の製造および配合技術を用いて製造することができる。本発明の実施における使用のために好適な技術は、Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice、Edward L. Paul, Victor A. Atiemo-ObengおよびSuzanne M. Kresta編、2004年、John Wiley & Sons, Inc.; ならびにPharmaceutics: The Science of Dosage Form Design、第2版M. E. Auten編、2001年、Churchill Livingstoneにおいて見出すことができる。一状態において、組成物を、注射のために、保存剤と共に、無菌の食塩水溶液中に懸濁する。

【0217】

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

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

10

20

30

40

50

本発明による投与は、多様な経路によるものであってよく、これは、限定されないが、皮下、静脈内、筋肉内および腹腔内経路を含む。本明細書において言及される組成物は、投与、いくつかの態様においては共投与のために、従来の方法を用いて製造および調製することができる。

【0218】

本発明の組成物は、有効量、例えば本明細書において他の場所で記載される有効量で投与することができる。幾つかの態様において、抗原提示細胞標的免疫抑制剤および／またはウイルス導入ベクターは、抗ウイルス導入ベクター免疫応答を減弱化するか、または再ウイルス導入ベクターの対象への投与を可能にするために有効な量で、投与形態中に存在する。幾つかの態様において、抗原提示細胞標的免疫抑制剤および／またはウイルス導入ベクターは、対象における導入遺伝子発現を増大させるために有効な量で、投与形態中に存在する。好ましい態様において、抗原提示細胞標的免疫抑制剤および／またはウイルス導入ベクターは、例えば対象に共投与された場合にウイルス導入ベクターに対する免疫応答を低下させるために有効な量で、投与形態中に存在する。投与形態は、多様な頻度において投与することができる。幾つかの態様において、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの反復投与を行う。

【0219】

本発明の側面は、本明細書において提供される投与の方法のためのプロトコルを決定することに関する。プロトコルは、ウイルス導入ベクターおよび抗原提示細胞標的免疫抑制剤の少なくとも頻度、投与量を変化させ、その後、に所望されるかまたは望ましくない免疫応答を評価することにより、決定することができる。本発明の実施のための好ましいプロトコルは、ウイルス導入ベクターに対する免疫応答を低下させ、抗ウイルス導入ベクター免疫応答を減弱化し、および／または導入遺伝子発現を増大させる。プロトコルは、少なくとも投与の頻度およびウイルス導入ベクターおよび抗原提示細胞標的免疫抑制剤の用量を含む。

【0220】

例

例1：ポリマー-ラパマイシンコンジュゲートを含むポリマーナノキャリア（仮想）

PLGA-ラパマイシンコンジュゲートの調製：

酸末端基を有するPLGAポリマー（7525 DLG1A、酸価0.46 mmol/g、Lakeshore Biomaterials；5 g、2.3 mmol、1.0当量）を、30 mLのジクロロメタン（DCM）中で溶解する。N，N-ジシクロヘキシルカルボジイミド（1.2当量、2.8 mmol、0.57 g）を添加し、その後、ラパマイシン（1.0当量、2.3 mmol、2.1 g）および4-ジメチルアミノピリジン（DMAP）（2.0当量、4.6 mmol、0.56 g）を添加する。混合物をrtで2日間攪拌する。混合物を、次いで濾過して、不溶性ジシクロヘキシルウレアを取り除く。濾過物を約10 mLの容積まで濃縮し、100 mLのイソプロピルアルコール（IPA）を添加して、PLGA-ラパマイシンコンジュゲートを沈殿させる。IPA層を取り除き、ポリマーを、次いで50 mLのIPAおよび50 mLのメチルtertブチルエーテル（MTBE）で洗浄する。ポリマーを、次いで35℃で2日間にわたり真空中で乾燥させて、PLGA-ラパマイシンを白色固体として得る（約6.5 g）。

【0221】

PLGA-ラパマイシンを含むナノキャリアを、以下のとおり調製する：

ナノキャリア形成のための溶液を、以下のとおり調製する：

溶液1：PLGA-ラパマイシン@100 mg/mL。PLGA-ラパマイシンを純粋な塩化メチレン中で溶解することにより溶液を調製する。溶液2：PLA-PEG@塩化メチレン中100 mg/mL。PLA-PEGを純粋な塩化メチレン中で溶解することにより溶液を調製する。溶液3：ポリビニルアルコール@100 mMのpH 8のリン酸バッファー中50 mg/mL。

【0222】

第1の油中水型エマルジョンを初めに調製する。W1/O1は、小さい圧力管中で溶液1（0.75 mL）と溶液2（0.25 mL）とを組み合わせ、Branson Digital Sonifier 250を用いて、50%の振幅で40秒間超音波処理することにより調製する。第2のエマルジョン（W1/O1/W2）を、次いで、溶液3（3.0 mL）を第1のW1/O1エマルジョンと組み合わせ、10秒間ボルテックスし、Branson Digital Sonifier 250を用いて30%の振幅で60秒間超音波処理することにより調製する。W1/O1/W2エマルジョンを、70 mMのpH 8のリン酸バッファー溶液（30 mL）を含むビーカーに添加し、室温で2時間にわたり攪拌して塩化メチレンを蒸発させて、ナノキャリアを形成させる。ナノキャリアの一部を、ナノキャリア懸濁液を遠心管に移して、75,600×gおよび4℃で35分間遠心分離し、上清を取り除き、ペレットをリン酸緩衝化食塩水中で再懸濁することにより、洗浄する。洗浄の手順を繰り返し、ペレットを、約10 mg/mLの最終ナノキャリア分散のためにリン酸緩衝化食塩水中で再懸濁する。

【0223】

例2：ラパマイシンを含む金ナノキャリア（AuNC）の調製（仮想）

HS-PEG-ラパマイシンの調製：

乾燥DMF中のPEG酸ジスルフィド（1.0当量）、ラパマイシン（2.0～2.5当量）、DCC（2.5当量）およびDMAP（3.0当量）の溶液を、rtで一晩攪拌する。不溶性ジシクロヘキシルウレアを濾過により取り除き、濾過物をイソプロピルアルコール（IPA）に添加して、PEG-ジスルフィド-ジラパマイシンエステルを沈殿させ、IPAで洗浄して乾燥させる。ポリマーを、次いで、DMF中の塩酸トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィンで処置して、PEGジスルフィドをチオールPEGラパマイシンエステル（HS-PEG-ラパマイシン）に還元する。結果として生じるポリマーを、IPAからの沈殿により回収し、以前に記載されるように乾燥させ、¹H NMRおよびGPCにより分析する。

【0224】

金NC（AuNC）の形成：

冷却器を備えた1 Lの丸底フラスコ中で、500 mLの1 mMのHAuCl₄の水溶液を、加熱して、激しく攪拌しながら10分間にわたり還流する。50 mLの40 mMのクエン酸三ナトリウム溶液を、次いで、攪拌している溶液に速やかに添加する。結果として生じる深いワインレッドの溶液を、25～30分間還流し続け、熱を下げ、溶液を室温まで冷却する。溶液を、次いで、0.8 μmのメンブレンフィルターを通して濾過し、AuNC溶液を得る。AuNCは、可視光の分光分析および透過型電子顕微鏡法を用いて特徴づけられる。AuNCは、直径約20 nmであり、クエン酸によりキャッピングされており、520 nmにおけるピーク吸収を有する。

【0225】

HS-PEG-ラパマイシンとのAuNCコンジュゲート：

150 μLのHS-PEG-ラパマイシンの溶液（10 mMのpH 9.0の炭酸バッファー中10 μM）を、1 mLの直径20 nmのクエン酸でキャッピングされた金ナノキャリア（1.16 nM）に添加して、2500：1のチオールの金に対するモル比をもたらす。混合物を室温でアルゴン下において1時間にわたり攪拌して、金ナノキャリア上のクエン酸によるチオールの完全な交換を可能にする。PEG-ラパマイシンを表面上に有するAuNCを、次いで12,000 gで30分間にわたり遠心分離することにより精製する。上清をデカントし、AuNC-S-PEG-ラパマイシンを含むペレットを、次いで1×PBSバッファーでペレット洗浄する。精製された金-PEG-ラパマイシンナノキャリアを、次いでさらなる分析およびバイオアッセイのための好適なバッファー中で再懸濁する。

【0226】

例3：イブプロフェンが接着したメソポーラスなシリカナノ粒子（仮想）

ゾル-ゲルプロセスを通してメソポーラスなSiO₂ナノ粒子コアを作製する。ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド（CTAB）（0.5 g）を、脱イオン水（500 mL）中で溶解し、次いで、2 MのNaOH水溶液（3.5 mL）をCTAB溶液に添加する。溶液を30分間にわたり攪拌し、次いで、テトラエトキシシラン（TEOS）（2.5 mL

10

20

30

40

50

）を溶液に添加する。結果として生じるゲルを、3 時間にわたり 80℃の温度で攪拌する。形成する白色沈殿を、濾過により捕獲し、その後脱イオン水で洗浄して室温で乾燥させる。残りの界面活性剤を、次いで HCl のエタノール溶液中での一晚の懸濁により粒子から抽出する。粒子をエタノールで洗浄し、遠心分離し、超音波処理により再分散させる。この洗浄の手順をさらに 2 回繰り返す。

【0227】

SiO₂ ナノ粒子を、次いで、(3-アミノプロピル) トリエトキシシラン (APTMS) を用いて、アミノ基で官能化する。これを行うために、粒子をエタノール (30 mL) 中で再懸濁し、APTMS (50 μL) を懸濁液に添加する。懸濁液を、室温で 2 時間にわたり静置し、次いで、周期的にエタノールを添加することにより容積を一定に保ちながら、4 時間にわたり沸騰させる。遠心分離による 5 回の洗浄のサイクル、および純粋なエタノール中で再懸濁することにより、残りの反応物を取り除く。

【0228】

別の反応において、直径 1~4 nm の金の種(seed) を作製する。この反応において用いられる全ての水は、初めに脱イオンされ、次いでガラスから蒸留される。水 (45.5 mL) を、100 mL の丸底フラスコに加える。攪拌しながら、0.2 M の水性 NaOH (1.5 mL)、およびその後にはテトラキス(ヒドロキシメチル)ホスホニウムクロリド (THPC) の 1% 水溶液 (1.0 mL) を添加する。THPC 溶液の添加の 2 分後、少なくとも 15 分間熟成させた 10 mg/mL の塩化金酸の水溶液 (2 mL) を添加する。水に対する透析を通して、金の種を精製する。

【0229】

コア-シェルナノキャリアを形成させるために、上で形成されたアミノ官能化 SiO₂ ナノ粒子を、初めに、2 時間にわたり室温で金の種と混合する。金で装飾された SiO₂ 粒子を、遠心分離を通して回収し、塩化金酸および炭酸水素カリウムの水溶液と混合して、金のシェルを形成させる。粒子を、次いで、遠心分離により洗浄し、水中で再分散させる。イブプロフェンナトリウムの溶液 (1 mg/L) 中で 72 時間にわたり粒子を懸濁することにより、イブプロフェンをロードする。遊離イブプロフェンを次いで遠心分離および水中で再分散させることによりにより粒子から洗浄する。

【0230】

例 4：シクロスポリン A を含有するリポソーム (仮想)

リポソームは、薄いフィルムの水和を用いて形成させる。1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC) (32 μmol)、コレステロール (32 μmol)、およびシクロスポリン A (6.4 μmol) を、純粋なクロロホルム (3 mL) 中で溶解する。この脂質溶液を 50 mL の丸底フラスコに加え、回転蒸発装置において 60℃の温度で溶媒を蒸発させる。フラスコを、次いで、窒素ガスでフラッシュして、残りの溶媒を取り除く。リン酸緩衝化食塩水 (2 mL) および 5 個のガラスビーズをフラスコに加え、60℃で 1 時間にわたり振盪することにより脂質フィルムを水和して、懸濁液を形成させる。懸濁液を、小さな圧力管に移し、60℃で、30 秒のパルスのサイクルを 4 回、各パルスの間を 30 秒間遅らせて、遠心分離する。懸濁液を、次いで、室温で 2 時間にわたり静置して、完全に水和させる。リポソームを遠心分離により洗浄し、その後、フレッシュなリン酸緩衝化食塩水中で再懸濁する。

【0231】

例 5：ラパマイシンを含む合成ナノキャリア

材料

ラパマイシンは、TSZ CHEM から購入した (185 Wilson Street, Framingham, MA 01702; 製品カタログ #R1017)。76%ラクチドおよび 24%グリコリドを含有し、0.69 dL/g の固有粘度を有する PLGA は、SurModics Pharmaceuticals から購入した (756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211. 製品コード 7525 DLG 7A)。約 5,000 Da の PEG ブロックおよび約 40,000 Da の PLA ブロックを有する PLA-PEG ブロックコポリマーは、SurModics Pharmaceuticals から購入した (756 To

10

20

30

40

50

m Martin Drive, Birmingham, AL 35211；製品コード100 DL mPEG 5000 5CE)。ポリビニルアルコール（85～89%加水分解物）は、EMD Chemicalsから購入した（製品番号1.41350.1001）。

【0232】

方法

溶液は、以下のとおり調製した：

溶液1：塩化メチレン中、75 mg/mLのPLGAおよび25 mg/mLのPLA-PEG。PLGAおよびPLA-PEGを純粋な塩化メチレン中で溶解することにより、溶液を調製した。

溶液2：塩化メチレン中100 mg/mLのラパマイシン。ラパマイシンを純粋な塩化メチレン中で溶解することにより、溶液を調製した。

溶液3：100 mMのpH 8のリン酸バッファー中50 mg/mLのポリビニルアルコール。

【0233】

水中油型エマルションを用いて、ナノキャリアを調製した。溶液1（1 mL）、溶液2（0.1 mL）および溶液3（3 mL）を、小さい圧力管中で組み合わせて、Branson Digital Sonifier 250を用いて30%の振幅で60秒間超音波処理することにより、O/Wエマルションを調製した。O/Wエマルションを、70 mMのpH 8のリン酸バッファー溶液（30 mL）を含むビーカーに添加し、室温で2時間にわたり攪拌して塩化メチレンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し、75,000 × gおよび4℃で35分間遠心分離し、上清を取り除き、ペレットをリン酸緩衝化食塩水中で再懸濁することにより、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄の手順を繰り返し、ペレットを、約10 mg/mLの最終ナノキャリア分散のためにリン酸緩衝化食塩水中で再懸濁した。

【0234】

ナノキャリアサイズは、動的光散乱により決定した。ナノキャリア中のラパマイシンの量は、HPLC分析により決定した。1 mLの懸濁液あたりの乾燥ナノキャリアの総質量は、重量測定法により決定した。

【表 a】

有効直径 (nm)	ラパマイシン含有量 (% w/w)
227	6.4

【0235】

例6：GSK1059615を含む合成ナノキャリア

材料

GSK1059615は、MedChem Expressから購入した（11 Deer Park Drive, Suite 102D Monmouth Junction, NJ 08852）、製品コードHY-12036。1：1のラクチド：グリコリド比、および0.24 dL/gの固有粘度を有するPLGAは、Lakeshore Biomaterialsから購入した（756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211）、製品コード5050 DLG 2.5A。約5,000 Daのメチルエーテル末端PEGブロックおよび0.26 dL/gの全体的な固有粘度を有するPLA-PEG-OMeブロックコポリマーは、Lakeshore Biomaterialsから購入した（756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211；製品コード100 DL mPEG 5000 5K-E）。Cellgroリン酸緩衝化食塩水（1×）pH 7.4（PBS（1×））は、Corningから購入した（9345 Discovery Blvd. Manassas, VA 20109）、製品コード21-040-CV。

【0236】

方法

溶液は、以下のとおり調製した：

溶液 1：PLGA（125 mg）およびPLA-PEG-OMe（125 mg）を10 mLのアセトン中で溶解した。

溶液 2：GSK1059615を、1 mLのN-メチル-2-ピロリドン（NMP）中で10 mgで調製した。

ナノキャリアは、溶液 1（4 mL）および溶液 2（0.25 mL）を小さなガラス圧力管中で組み合わせて、混合物を、20 mLの超純水を含む250 mLの丸底フラスコに、攪拌しながら滴加することにより、調製した。フラスコを、回転式蒸発デバイスに乗せて、減圧下においてアセトンを取り除いた。ナノキャリア懸濁液を遠心管に移し、75,600 rcfおよび4℃で50分間にわたり遠心分離し、上清を取り除き、ペレットを1×PBS中で再懸濁することにより、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄の手順を繰り返し、ペレットを1×PBS中で再懸濁して、ポリマーに基づいて10 mg/mLの名目濃度を有するナノキャリア懸濁液を達成した。洗浄したナノキャリア溶液を、次いで、Pall製の1.2 μmのPESメンブレンシリンジフィルター（パーツ番号4656）を用いて濾過した。同一のナノキャリア溶液を上記のとおり調製し、濾過のステップの後で最初のものと共にプールした。均質な懸濁液を、-20℃で凍結保存した。

【0237】

ナノキャリアサイズは、動的光散乱により決定した。ナノキャリア中のGSK1059615の量は、351 nmでのUV吸収により決定した。1 mLの懸濁液あたりの乾燥ナノキャリアの総質量は、重量測定法により決定した。

【表 b】

有効直径 (nm)	GSK1059615 含有量 (% w/w)
143	1.02

【0238】

例 7：ウイルス導入ベクター抗原を有する赤血球結合治療剤（仮想）

米国公開番号20120039989の教示に基づいて赤血球結合治療剤を調製し、抗原提示細胞標的免疫抑制剤として用いる。赤血球結合治療剤は、ERY1、ERY19、ERY59、ERY64、ERY123、ERY141およびERY162のいずれか1つ、ならびに本明細書において記載されるウイルス導入ベクター抗原、例えば、カプシドタンパク質（もしくはそれから誘導されるペプチド抗原）、またはタンパク質（もしくはそれから誘導されるペプチド抗原）、例えば、本明細書において記載される導入遺伝子によりコードされる治療用タンパク質（もしくはそれから誘導されるペプチド抗原）のいずれか1つを含んでもよい。

【0239】

例 8：NF-κB経路の阻害剤を含む粒子（仮想）

米国公開番号20100151000の教示に従って、抗原提示細胞標的免疫抑制剤を調製する。粒子は、リポソームまたはポリマー粒子であってよく、本明細書において提供される免疫抑制剤のいずれか1つまたは米国公開番号20100151000において提供されるNF-κB経路の阻害剤のいずれか1つを含み、この阻害剤は、その全体において本明細書において参考として援用される。加えて、リポソームまたはポリマー粒子は、本明細書において記載されるウイルス導入ベクター抗原、例えばウイルスベクター抗原、例えばカプシドタンパク質（もしくはそれから誘導されるペプチド抗原）またはタンパク質（もしくはそれから誘導されるペプチド抗原）、例えば本明細書において記載される導入遺伝子によりコードされる治療用タンパク質（もしくはそれから誘導されるペプチド抗原）のいずれか1つをさらに含んでもよい。

【0240】

例 9：遺伝子治療導入遺伝子を有するアデノウイルス導入ベクター（仮想）

アデノウイルス導入ベクターは、米国特許公開2004/0005293において提供される方法に従って作製する。かかるベクターは、本明細書において提供される導入遺伝子のいずれか1つを含んでもよい。例えば、ヒトアルファ1-アンチトリプシンプロモーター (AAT) からのヒトB-ドメイン欠損FVIIIのcDNAを発現するAd-AAT-hFVIIIベクターを調製する。ベクターサイズを最適化するため、およびベクターの再配列を回避するために、HPRTスタッパーフラグメントを使用する (Parks R J, Graham F L. A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. J Virol. 1997, 71:3293-3298)。Cre66パッケージング細胞株を用いる。

【0241】

例10：遺伝子治療導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターと免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアとの共投与（仮想）

例9などの例のいずれか1つのウイルス導入ベクターを、共に、例えば本明細書において提供される抗原提示細胞標的免疫抑制剤のいずれか1つ、例えば例1～8または12におけるものと同じ日に、臨床試験のために集められた対象に投与する。ウイルス導入ベクターに対する1以上の免疫応答を評価する。ウイルス導入ベクターに対する1以上の免疫応答のレベルは、抗原提示細胞標的免疫抑制剤の不在下（例えばウイルス導入ベクターが単独で投与される場合）においてウイルス導入ベクターを投与された対象、または対象の別の群における1以上の免疫応答のレベルとの比較により、評価することができる。態様において、反復共投与を、同様の様式において評価する。

【0242】

かかる試験の間に確立された情報の適用において、ウイルス導入ベクターを必要とする対象に、かかる対象が、抗原提示細胞標的免疫抑制剤と共投与されなかった場合にウイルス導入ベクターに対する望ましくない免疫応答を有することが予測される場合に、ウイルス導入ベクターと抗原提示細胞標的免疫抑制剤とを共に投与することができる。さらなる態様において、ウイルス導入ベクターによる処置を必要とし、ウイルス導入ベクターに対する望ましくない免疫応答を有するか、抗原提示細胞標的免疫抑制剤の利益なしではこれを有することが予測される対象の、ウイルス導入ベクターおよび合成ナノキャリアの共投薬をガイドするために、試験の間に確立された情報を用いるプロトコルを準備することができる。このようにして準備されたプロトコルを、次いで、対象、特にヒト対象を処置するために用いることができる。

【0243】

例11：遺伝子治療導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターの、免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアとの投与

組み換え緑色蛍光タンパク質を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV-GFP) の、2回の連続した静脈内 (i.v.) 接種は、ブーストステージにおいてナノキャリア封入免疫抑制剤 (NC) が共注射された場合に、肝細胞においてin vivoでより高いGFP発現をもたらした。

実験方法

オスC57BL/6マウスを用いた（5マウス／群）。動物に、200 μ LのAAV-GFPまたはAAV-GFP+ラパマイシンを含む合成ナノキャリア (NC) の混合物を、21日間の間隔にわたり、異なる反復で、1回または2回注射した（以下の表1を参照）。第1の注射後のd33において、（＝2回注射した群については、第2の注射後のd12）、動物を安楽死させ、その肝臓をコラゲナーゼ4 (Worthington, Lakewood, NJ) で処置し、メッシュを通し、細胞懸濁液全体をFACSによりGFP発現について分析した。簡単に述べると、最初に組織にコラゲナーゼ（100 U）を灌流し、37℃でインキュベートし（30分間）、コラゲナーゼ上清を取り除き2%FBSでクエンチした。組織試料を、次いで、約2 mm平方に切断し、繰り返し攪拌しながら消化し（コラゲナーゼ、400 U）、濾過し（ナイロンメッシュ）、スピンドウンし（1,500 rpm）、ペレットを氷冷2%FBS中で再懸濁した。

【0244】

第1の注射後の第14日において、全ての動物を出血させ、その血清を、以下のとおり AAVに対する抗体についてELISAで分析した。96ウェルプレートに、炭酸バッファー中で92時間にわたり、50 μ LのAAVで、 2×10^9 v g / mLでコートし、次いで、2時間にわたり300 μ Lのカゼインでブロッキングした。試料を、50 μ Lのカゼイン中で1:40希釈で添加し、2時間にわたりRTでインキュベートした。ウサギ抗マウスIgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, 315-035-008) を二次抗体として用い (0.5 μ g / mL、1時間)、次いで、TMB基質を添加し (10分間)、その後停止溶液を添加した。プレートを450 nmの波長で読み取り、570 nmでのバックグラウンドを減算した。マウスモノクローナル抗AAV8抗体 (Fitzgerald, Acton, MA, 10 R-2136) を、陽性対照として役立てた。

【0245】

AAV-GFPの量：d0プライムにおいては 1×10^{10} ウイルスゲノム (VG)、d21ブーストにおいては 5×10^{10} VG。

用いられたナノキャリア封入免疫抑制剤 (ラパマイシンまたはRapa) の量：プライム (群2、3および5) またはブースト (群3および4) のいずれにおいても、50 μ gのナノキャリアに封入されたRapa。

【表1】

表1. 実験群

群#	免疫、i.v.	NC (i.v., 第0日)	ブースト、d. 21
1	AAV-GFP (1×10^{10} VG)	なし	AAV-GFP; 5×10^{10} VG
2	同じ	50 μ g の Rapa	同じ
3	同じ	同じ	AAV-GFP、 5×10^{10} VG + NCs
4	同じ	なし	AAV-GFP、 5×10^{10} VG + NCs
5	同じ	50 μ g の Rapa	なし
6	同じ	なし	なし

【0246】

結果

AAVを注射されたマウスの肝臓において、AAV-GFPのみでプライムした後のブーストステージにおいてNCを利用した場合に、プライムおよびブーストの両方がAAV-GFPのみによるものであった場合と比較して、統計学的により高いレベルのGFP発現が見られた (図1)。また、プライムおよびブーストの両方においてAAV-GFPをNCと共注射した場合にもより高いGFP発現に対する傾向が存在したが、単一の外れ値のために、それは、AAV-GFPのみによるプライム-ブーストに対する明確な統計学的優位性を示さなかった。プライム注射のみにおけるNCの利用は、GFP発現の上昇をもたらさなかった (図1、群1対群2、および群5対群6)。集合的に、ブーストにおけるAAV-GFPとNCとの共投与が、現在のレジメンによる2回の組み換えAAVの注射を受けた動物において、より高いGFP発現を引き起こすと考えられる。このことは、AAV-GFPのみでブーストされた全ての動物 (初回においてNCで処置されているか否かに関わらず) を、AAV-GFP+NCでブーストされた全ての動物に対してプロットすると顕著であり (図2)、NCの存在下においてブーストされた9/10の動物は、全ての (10/10) NCなしでブーストされた動物より高いGFP発現を示した (前者における平均の発現の増大は>50%であった)。同様に、高度にGFP陽性の肝細胞のみを考慮した場合、ブーストの間のNCの利用は、プライムステージにおいてNCを利用したか否かに関わらず、NCなしでのAAV-GFPによる追加免疫よりも統計学的により高い数をもたらした (図3)。また、NCなしでのAAV-GFPのブーストは、単回プライム免疫と比較しても低下したGFP発現をもたらしたことが明らかであった。

【0247】

別に、マウスを、d 1 4に出血させ、その血清を、AAVに対する抗体の存在について試験した。この時点で、全マウスは、AAV-GFPで1回、NCの共投与ありまたはなしで注射を受けていた（各15マウスの2群を生じた）。図4において見られるとおり、NCなしで単回AAV-GFP注射を受けた全ての15 / 15マウスは、AAVに対する抗体反応性を示し、正常血清対照（OD = 0.227）より高い最大ODをもたらしたが、一方、NCと共投与されたAAVを投与されていたマウスには、検出可能なレベルのAAVに対する抗体を示したものはなかった。単回のみAAV免疫を使用した場合、NCがAAVと共投与されたマウスにおいて、抗AAV抗体のレベルはd 21における基線よりも低いままであったが、一方、NCなしでAAVを投与されたマウスにおいては、これは上昇した（図5）。単回注射後の33日において、未処置のマウスにおけるこれらのレベルは、なお中程度に上昇していたが、一方、NC処置群においては、5個体のうち4個体のマウスは、検出可能なAAVに対する抗体を有しなかった（図5）。

【0248】

マウスに第21日にAAV-GFPでブーストした場合、未処置のマウスにおける抗体レベルは、著しく増大し続けたが、一方、ブーストにおいてNCのみを投与されたマウスにおいては、これは鈍化した（図6および7）。興味深いことに、この後者の群における2個体のマウスは、d 14（プライムにおける処置なし）においては陽性であったが、それらのAAVに対する抗体のレベルはd 33までにバックグラウンドより下に低下した（図7）。同時に、プライムにおいてNCで処置された8 / 10のマウスは、d 21のブーストの後ですら、d 33において検出可能な抗体を有しなかった（図6および7）。AAVブーストにおけるNCの適用が、AAVに対する抗体の生成を遮断することにおいて僅かな影響を有していた可能性があるが、この点において、それは、ブーストにおけるNC処置なしと比較して統計学的に有意ではなかった（図6および7）。したがって、プライムにおけるNC処置は、AAVに対する抗体の発生を遮断するために重要であると考えられ、後の時点におけるその投与もまた有益である。

【0249】

結果は、ウイルス導入ベクターに対する抗体応答を軽減するために、免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアをウイルス導入ベクターと組み合わせて投与することの利益を示す。かかる利益は、発現のためのタンパク質をコードするウイルス導入ベクターと組み合わせた免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアの共投与により見られた。したがって、抗ウイルス導入ベクター抗体応答を軽減するためのプロトコルは、本明細書において上に例示される。

【0250】

例12：ラパマイシンを含む合成ナノキャリア

材料

0.41dL/gの固有粘度を有するPLAを、Lakeshore Biomaterialsから購入した（756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211）、製品コード100 DL 4A。

約5,000Daのメチルエーテル末端PEGブロックおよび全体で0.50DL/gの固有粘度を有するPLA-PEG-OMeブロックコポリマーを、Lakeshore Biomaterialsから購入した（756 Tom Martin Drive, Birmingham, AL 35211）、製品コード100 DL mPEG 5000 5CE。

ラパマイシンは、Concord Biotech Limitedから購入した（1482-1486 Trasad Road, Dholka 382225, Ahmedabad India）、製品コードSIROLIMUS。

ソルビタンモノパルミテートは、Sigma-Aldrichから購入した（3050 Spruce St., St. Louis, MO 63103）、製品コード388920。

EMPROVE（登録商標）ポリビニルアルコール（PVA）4-88、USP（85～89%加水分解されたもの、3.4～4.6mPa・sの粘度）は、EMD Chemicals Inc.から購入した（480 South Democrat Road Gibbstown, NJ 08027）、製品コード1.41350。

ダルベッコリン酸緩衝化食塩水1X（DPBS）は、Lonzaから購入した（Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002 Basel, Switzerland）、製品コード17-512Q。

【0251】

方法

溶液は、以下のとおり調製した：

溶液1：ポリマー、ラパマイシンおよびソルビタンモノパルミテートの混合物は、PLAを37.5 mg/mLで、PLA-PEG-Omeを12.5 mg/mLで、ラパマイシンを8 mg/mLで、およびソルビタンモノパルミテートを2.5で、ジクロロメタン中に溶解することにより調製した。

溶液2：ポリビニルアルコールを、100 mMのpH 8のリン酸バッファー中50 mg/mLで調製した。

【0252】

O/Wエマルションは、溶液1（1.0 mL）と溶液2（3 mL）とを小さいガラス圧力管中で組み合わせ、10秒間ボルテックスすることにより調製した。処方物を、次いで、30%の振幅で1分間にわたる超音波処理によりホモジェナイズした。エマルションを、次いで、DPBS（30 mL）を含むオープンビーカーに加えた。第2のO/Wエマルションを、上と同じ材料および方法を用いて調製し、次いで第1のエマルションおよびDPBSを含む同じビーカーに加えた。組み合わせたエマルションを、次いで室温で2時間にわたり攪拌して、ジクロロメタンを蒸発させ、ナノキャリアを形成させた。ナノキャリア懸濁液を遠心管に移して、75,600×gおよび4℃で50分間にわたり遠心分離し、上清を取り除き、ペレットを0.25% w/vのPVAを含むDPBS中で再懸濁することにより、ナノキャリアの一部を洗浄した。洗浄の手順を繰り返し、次いで、ペレットを0.25% w/vのPVAを含むDPBS中で再懸濁して、ポリマーに基づいて10 mg/mLの名目濃度を有するナノキャリア懸濁液を達成した。ナノキャリア懸濁液を、次いで、0.22 μmのPESメンブレンシリンジフィルター（Milliporeパーツ番号SLGP033RB）を用いて濾過した。濾過したナノキャリア懸濁液を、次いで-20℃で保存した。

【0253】

ナノキャリアサイズは、動的光散乱により決定した。ナノキャリア中のラパマイシンの量は、HPLC分析により決定した。1 mLの懸濁液あたりの乾燥ナノキャリアの総質量は、重量測定法により決定した。

【表 c】

有効直径 (nm)	ラパマイシン含有量 (% w/w)	ナノキャリア濃度 (mg/mL)
150	11.5	11.1

【0254】

例13：遺伝子治療導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターの単回投与は、抗ベクター抗体応答を誘導し、これは免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアとの共投与により阻害することができる

CMVプロモーター下において組み換え緑色蛍光タンパク質をコードするアデノ随伴ウイルス（AAV-GFP）（Virovek, Hayward, CA）の単回静脈内（i.v.）投与は、抗AAV抗体応答をもたらし、これは、ナノキャリア封入免疫抑制剤（例12により生成されたもの）との共投与により阻害された。

【0255】

実験方法

オスC57BL/6マウスを用いた（5～15マウス/群）。動物に、i.v.で、200 μLのAAV8-GFP、または、AAV8-GFP+NC、ラパマイシンを含むPLGANanoキャリアの混合物を注射した（以下の表2）。処置後の第14日において、全ての動物を出血させ、その血清を、ELISAによりAAV8に対する抗体について分析した。簡単に述べると、96ウェルプレートを、50 μLのAAV8で、炭酸バッファー中で2×10⁹ベクターゲノム（

v g) / mL でコートし、次いで、2 時間にわたり 300 μ L のカゼインでブロッキングした。試料を、50 μ L のカゼイン中 1 : 40 希釈で添加し、2 時間にわたり室温 (RT) でインキュベートした。セイヨウワサビペルオキシダーゼ共役ウサギ抗マウス IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, 315-035-008) を二次抗体として用い (0.5 μ g / mL、1 時間)、次いで TMB 基質を添加し (10 分間)、その後停止溶液を添加した。プレートに、次いで 450 nm の波長で読み出し、570 nm のバックグラウンドを減算した。マウスモノクローナル抗 AAV8 抗体 (Fitzgerald, Acton, MA, 10R-2136) を、陽性対照として役立てた。

【0256】

AAV-GFP の量：第 0 日 (プライム) においては 1×10^{10} ウイルスゲノム (v g)、第 21 日 (ブースト) においては 5×10^{10} v g。

用いられたナノキャリア封入ラパマイシン (Rapa) の量：50 μ g のナノキャリアに封入されたラパマイシン。

【表 2】

表 2. 実験群

群 #	免疫、i. v. 第 0 日	NCs (i. v. 第 0 日)
1	AAV-GFP (1×10^{10} VG)	なし
2	AAV-GFP (1×10^{10} VG)	50 μ g の Rapa

【0257】

マウスを、d 14 に出血させ、その血清を、AAV8 に対する抗体の存在について試験した。この時点で、全マウスは、AAV8-GFP による注射を 1 回、ナノキャリアの共投与ありまたはなしで受けていた (各 15 マウス)。図 8 において見られるように、ナノキャリアなしで単回 AAV-GFP 注射を受けた全マウスが、AAV8 に対する抗体反応性を示し、正常血清対照 (OD = 0.227) より高い抗体レベルをもたらしたが、一方で、NC と共投与された AAV8 を投与されたマウスは、検出可能なレベルの AAV8 に対する抗体を、殆どまたはまったく示さなかった。抗 AAV8 抗体のレベルは、NC 処置群 (n = 5) においては、d 21 において基線またはそれより低くあり続けたが、一方で、これは、NC なしで AAV8-GFP を投与されたマウスにおいては上昇した (図 9)。AAV8-GFP の単回注射後の第 33 日において、抗 AAV8 未処置のマウスにおける抗体レベルは中程度に増大し続けたが、一方で、NC 処置群においては、5 個体中 4 個体のマウスは、検出可能な AAV に対する抗体を有しなかった (図 9)。

【0258】

結果は、ウイルス導入ベクターに対する抗体応答を軽減するために、免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアを、ウイルス導入ベクターと組み合わせて投与することの利益を示す。かかる利益は、発現のためのタンパク質をコードする導入遺伝子を含むウイルス導入ベクターと組み合わせた、免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアの共投与により見られた。したがって、抗ウイルス導入ベクター抗体応答を軽減するためのプロトコルが、本明細書において例示される。

【0259】

例 14：遺伝子治療導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターと免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアとの共投与は、抗 AAV 抗体応答を阻害する

実験方法

オス C57BL/6 マウスを用いた (5 マウス / 群)。動物に、表 3 において示されるとおり、第 0 日および / または第 21 日において、200 μ L の AAV8-GFP (Virovek, Hayward, CA)、または AAV8-GFP + NC の混合物 (例 12 において生成されたもの) を注射した。第 0 日および 33 日に血清を収集し、上記のとおり ELISA により抗 AAV8 抗体レベルについて分析した。

AAV-GFPの量：d 0プライムにおいては 1×10^{10} ウイルスゲノム (vg)、d 2 1ブーストにおいては 5×10^{10} vg。

用いられたナノキャリア封入免疫抑制剤（ラパマイシンまたはRapa）の量：プライム（群2および4）またはブースト（群3および4）のいずれにおいても、 $50 \mu\text{g}$ のナノキャリアに封入されたRapa。

【0260】

【表3】

表3. 実験群

	第0日		第21日	
群 #	ウイルス導入ベクター(i. v.)	NCs(i. v.)	ウイルス導入ベクター(i. v.)	NCs(i. v.)
1	AAV-GFP (1×10^{10} vg)	なし	AAV-GFP (5×10^{10} vg)	なし
2	AAV-GFP (1×10^{10} vg)	なし	AAV-GFP (5×10^{10} vg)	$50 \mu\text{g}$ の Rapa
3	AAV-GFP (1×10^{10} vg)	$50 \mu\text{g}$ の Rapa	AAV-GFP (5×10^{10} vg)	なし
4	AAV-GFP (1×10^{10} vg)	$50 \mu\text{g}$ の Rapa	AAV-GFP (5×10^{10} vg)	$50 \mu\text{g}$ の Rapa

【0261】

結果

第0日にNCの不在下においてAAV8-GFPを注射されたマウスは、強力な抗AAV8抗体応答を示し、これは、第21日におけるAAV8-GFPの第2の注射の後で著しく増大した（図10）。しかし、第21日にNCをAAV8-GFPと共投与した場合、平均の抗体応答は、著しく鈍化した。興味深いことに、この後者の群における、d 14においては抗体陽性であった2個体のマウスは、d 33においては検出可能なレベルのAAV8に対する抗体を有しなかった（図10）。しかし、抗AAV8抗体価は、2個体の他のマウスにおいては増大した。対照的に、第1のAAV8-GFP注射の時点（第0日）において共投与されたNCは、第14日において抗AAV8抗体応答を完全に阻害した。抗AAV8抗体はまた、第21日におけるAAV8-GFP単独の第2の投与の後で、第33日において5個体のうちの4個体のマウスにおいて阻害された。第0日および21日の両方におけるNCの共投与は、同様の傾向を示した。したがって、AAVの第1の投与の時点におけるNC処置は、AAVに対する抗体の発生を遮断するために重要である。AAVの反復投薬の際のNCのさらなる投与は、潜在的に有益であり得る。

【0262】

結果は、ウイルス導入ベクターに対する抗体応答を軽減するために、免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアを、ウイルス導入ベクターと組み合わせて投与することの利益を示す。かかる利益は、発現のためのタンパク質をコードするウイルス導入ベクターと組み合わせた免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアの共投与により見られた。したがって、抗ウイルス導入ベクター抗体応答を軽減するためのプロトコルが、本明細書において例示される。

【0263】

例15：免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアの治療的投与は、ウイルス導入ベクターの反復投薬の際の導入遺伝子発現の維持を増強する

組み換え緑色蛍光タンパク質をコードするアデノ随伴ウイルス（AAV8-GFP）（Virovek, Hayward, CA）の2回の連続した静脈内（i.v.）接種は、発現のためのタンパク質をコ

ードするウイルス導入ベクターの反復投与の時点においてナノキャリア封入免疫抑制剤（NC）（例 1 2 において生成されたもの）を共注射した場合に、肝細胞において *in vivo* で、より高い GFP 発現をもたらした。

【0264】

実験方法

オス C57BL/6 マウスを用いた（5 マウス／群）。動物に、第 0 日に、200 μ L の AAV8-GFP を NC の不在下において注射した。1 群の動物には、さらなる処置を与えなかったが、一方で、他の群には、第 21 日において、50 μ g のラパマイシンを運搬する NC の共投与ありまたはなしで、AAV8-GFP の第 2 の用量を投与した（以下の表 4 を参照）。第 1 の注射後の d 33（2 回注射した群については第 2 の注射後の第 12 日）において、動物を安楽死させ、それらの肝臓を、コラゲナーゼ 4（Worthington, Lakewood, NJ）で処置し、メッシュを通して、細胞懸濁液全体を、フローサイトメトリーにより GFP 発現について分析した。簡単に述べると、組織を、初めに、コラゲナーゼ（100 U）で灌流し、37℃で 30 分間にわたりインキュベートした。コラゲナーゼ上清を取り除き、2% FBS でクエンチした。組織試料を、次いで、約 2 mm 平方に切断し、繰り返し攪拌しながら消化させ（コラゲナーゼ、400 U）、濾過し（ナイロンメッシュ）、スピンドウンし（1,500 rpm）、ペレットを氷冷 2% FBS 中で再懸濁した。

【0265】

AAV-GFP の量：d 0 においては 1×10^{10} ウイルスゲノム（vg）、d 21 においては 5×10^{10} vg（群 2 および 3 のみ）。

用いられたナノキャリア封入免疫抑制剤（ラパマイシンまたは Rapa）の量：第 21 日において、50 μ g のナノキャリアに封入された Rapa（群 3）。

【表 4】

表 4. 実験群

	第 0 日	第 21 日	
群 #	ウイルス導入ベクター (i. v.)	ウイルス導入ベクター (i. v.)	NCs (i. v.)
1	AAV-GFP (1×10^{10} vg)	なし	なし
2	AAV-GFP (1×10^{10} vg)	AAV-GFP (5×10^{10} vg)	なし
3	AAV-GFP (1×10^{10} vg)	AAV-GFP (5×10^{10} vg)	50 μ g の Rapa

【0266】

結果

AAV8-GFP 処置マウスの肝臓において、NC を d 21 に AAV8-GFP の第 2 の注射と共投与した場合に、NC の不在下において AAV8-GFP の第 2 の注射を受けた動物と比較して、統計学的により高いレベルの GFP 発現が見られた（図 11）。AAV8-GFP の第 2 の注射に加えて NC を投与されたマウスにおいて観察された GFP 発現のレベルは、第 0 日に AAV8-GFP の単用量のみを投与されたマウスにおいて観察されたものと同様であった。これらの結果は、AAV8-GFP の第 2 の用量の時点における NC の共投与が、恐らくは形質導入された GFP 発現肝細胞を除去することができる細胞溶解性 T 細胞を阻害することにより、GFP の発現を維持するために重要であったことを示す。

【0267】

結果は、ベクター導入遺伝子の発現を維持するために、免疫抑制剤にカップリングされ

た合成ナノキャリアを、ウイルス導入ベクターと組み合わせて投与することの利益を示す。かかる利益は、発現のためのタンパク質をコードする導入遺伝子を含むウイルス導入ベクターと組み合わせた、免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアの共投与により見られた。

【0268】

例16：免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアの共投与は導入遺伝子発現を増強する

実験方法

オスC57BL/6マウスを用いた（5マウス／群）。動物に、第0日（群1～5）および／または第21日（群1～4、6）に、200 μ LのAAV-赤色蛍光タンパク質（RFP）（Virovek, Hayward, CA）注射した（以下の表5を参照）。50 μ gのラパマイシンを運搬するNCを、第0日（群2、4）および／または第21日（群3、4）に共投与した。第1の注射後のd33（2回注射した群については第2の注射後の第12日）において、動物を安楽死させ、それらの肝臓を、コラゲナーゼ4（Worthington, Lakewood, NJ）で処置し、メッシュを通して、細胞懸濁液全体を、フローサイトメトリーによりRFP発現について分析した。簡単に述べると、組織を、初めに、コラゲナーゼ（100 U）で灌流し、37℃で30分間にわたりインキュベートした。コラゲナーゼ上清を取り除き、2%FBSでクエンチした。組織試料を、次いで、約2mm平方に切断し、繰り返し攪拌しながら消化させ（コラゲナーゼ、400 U）、濾過し（ナイロンメッシュ）、スピンドウンし（1,500 rpm）、ペレットを氷冷2%FBS中で再懸濁した。

【0269】

【表5】

表5. 実験群

	第0日		第21日	
群 #	ウイルス導入ベクター(i. v.)	NCs(i. v.)	ウイルス導入ベクター(i. v.)	NCs(i. v.)
1	AAV-RFP	なし	AAV-RFP	なし
2	AAV-RFP	50 μ g の Rapa	AAV-RFP	なし
3	AAV-RFP	なし	AAV-RFP	50 μ g の Rapa
4	AAV-RFP	50 μ g の Rapa	AAV-RFP	50 μ g の Rapa
5	AAV-RFP	なし	なし	なし
6	なし	なし	AAV-RFP	なし

【0270】

結果

NCの不在下において1回または2回のAAV8-RFPの注射を投与された動物は、第33日において同様に低いレベルのRFP発現を示した（図12）。AAV8-RFPの第1の注射の時点においてNCで共処置されたマウスは、RFPの発現が増大する傾向を示したが、これは統計学的に有意ではなかった。対照的に、AAV8-RFPの第2の注射の時点（第21日）においてNCで共処置されたマウスは、統計学的に有意なRFP発現の増大を示した。第0日および第21日の両方においてNCで処置されたマウスもまた、第0日および21日においてNCの不在下においてAAV8-RFPを投与された対照動物と比較して、RFP発現の有意な増大を示した。

【0271】

結果は、ベクター導入遺伝子の発現を増強するために、免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアを、ウイルス導入ベクターと組み合わせて投与することの利益を示す。かかる利益は、発現のためのタンパク質をコードする導入遺伝子を含むウイルス導入ベクターと組み合わせた、免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアの共投与により見られた。

【0272】

例17：遺伝子治療導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターと免疫抑制剤にカップリングされた合成ナノキャリアとの投与は、CD8+T細胞の活性化を阻害する

組み換え緑色蛍光タンパク質を発現するアデノ随伴ウイルス（AAV-GFP）（Virovek, Hayward, CA）の2回の連続した静脈内（i.v.）接種は、in vivoで、ナノキャリア封入免疫抑制剤（NC）をAAV8-GFP注射と共注射した場合に、AAVカプシドタンパク質およびGFPに対してより低い細胞溶解性T細胞（CTL）の活性をもたらした。

【0273】

実験方法

オスC57BL/6マウスを用いた（3または6マウス／群）。動物に、第0日および第17または21日に、200 μ LのAAV-GFPまたはAAV-GFP+NCの混合物を注射した（以下の表6を参照）。第0日および21日に注射された群（n=3マウス／群）を、第1の注射後の第28日（第2の注射後の第7日）に、抗原特異的CTL活性についてアッセイした。簡単に述べると、シンジェニックなナイーブなマウスからの脾細胞を、0.5 μ Mまたは5 μ MのCFSEで標識し、それぞれCFSE^低およびCFSE^高細胞集団を生じた。CFSE^{high}細胞を、AAVカプシドからの1 μ g/mLの優性なMHCクラスI結合ペプチド（配列NSLANPGIA、アミノ酸517～525）、およびGFPからの優性なMHCクラスIペプチド（HYLSTQSAI、aa200～208）と共に、37℃で1時間にわたりインキュベートし、一方、CFSE^低細胞は、培地のみにおいてインキュベートした。対照CFSE^定細胞およびペプチドでパルスしたCFSE^高標的細胞を、1：1の比において混合し（合計2.0 $\times 10^7$ 細胞）i.v.で注射した。標識細胞の注射の18時間後に、脾臓を採取し、処理して、フローサイトメトリーにより分析した。ナイーブマウスにおける対照の回復速度（RR）に基づいて、特異的な細胞傷害性を計算した：（CFSE^低細胞のパーセンテージ）／（CFSE^高細胞のパーセンテージ）。特異的溶解率（%）=100 $\times$ [1-（ナイーブマウスからの細胞のRR／免疫されたマウスからの細胞のRR）または100 $\times$ [1-（RR_{naive}／RR_{imm}）]]。

【0274】

第0日および17日に注射された群（n=6マウス／群）を、第1の注射後のd25（第2の注射後の第7日）に、抗原特異的IFN- γ 産生についてアッセイした。簡単に述べると、脾細胞を単離し、予め抗IFN- γ 抗体が吸収されたウェルにおいて播種し、in vitroで7日間にわたりAAVカプシドまたはGFPペプチド（1 μ g/mL）で再刺激した。ビオチン化抗IFN- γ 抗体およびストレプトアビジン-HRPによりELISpotsを現像させて、スポットを計数した。非特異的バックグラウンドを減算した。

【0275】

AAV-GFPの量：d0プライムにおいては1 $\times 10^{10}$ ウイルスゲノム（vg）、d21ブーストにおいては5 $\times 10^{10}$ vg。

用いられたナノキャリア封入免疫抑制剤（ラパマイシンまたはRapa）の量：プライムおよびブーストの両方において、50 μ gのナノキャリアに封入されたRapa（群2）。

10

20

30

40

50

【表 6】

表6. 実験群

群#	第1の注射 i.v.(第0日)		第2の注射 i.v.(第 17 または 21 日)	
	AAV8-GFP	NC	負荷	NC
1	1×10^{10} vg	なし	5×10^{10} vg	なし
2	1×10^{10} vg	50 μ g ラパマイシン	5×10^{10} vg	50 μ g ラパマイシン

【0276】

結果

NCで共処置された動物は、in vivoで、AAVカプシドとGFPとの優性なMHCクラスIペプチドの組み合わせでパルスされた細胞を標的とするCTL活性を、より低いレベルで示した(図13)。同様に、NCで共処置されたマウスは、非NC処置群と比較して、抗原特異的IFN- γ 産生細胞の著しい減少を示した(図14および15)。特に、4/6のマウスが、250,000細胞/ウェルの密度で、AAVカプシドタンパク質に対するリコール応答を示したが、一方、NC処置群においてこのペプチドに対して応答したマウスは存在しなかった(0/6)(図14、 $p < 0.05$)。さらに、AAV8-GFP免疫群における3/6のマウスが、免疫優性なGFPペプチドに対して応答を示したが、一方、NC処置群においてこのペプチドに対して応答したマウスは存在しなかった(0/6)(図15、 $p = 0.01$)。

集成的に、プライムおよびブーストにおけるAAV-GFPおよびNCの共投与が、ウイルスカプシドおよびトランスジェニックタンパク質に対する細胞傷害性T細胞応答の抑制をもたらすと考えられる。

【0277】

例18：遺伝子治療導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターと免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアとの投与

実験方法

オスC57BL/6マウスを用いた(5マウス/群)。動物に、第0日に、i.v.で、 10^{10} vgのrAAV2/8-ルシフェラーゼ(rAAV2/8-Luc)(本明細書において、例えば例21または22において提供される方法と同様の様式において生成されたもの)またはrAAV2/8-Luc+100 μ gのラパマイシンを含む合成ナノキャリア(NC)を注射した(以下の表7を参照)。第14日において、全ての動物が、ヒト第IX因子(hFIX)をコードする 10^{10} vgのrAAV2/8(rAAV2/8-hFIX)のi.v.注射を受けた(本明細書において、例えば例21または22において提供される方法と同様の様式において生成されたもの)。多様な時点において血清を収集し、抗AAV抗体レベルおよびhFIXタンパク質レベルについてELISAによりアッセイした。

【0278】

図16は、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアの投与のプロトコルおよびタイミングを説明する。100 μ gのラパマイシンを含む合成PLGANanoキャリア(NC)または対照の空のナノ粒子(空NP)を、第0日に、i.v.でrAAV2/8-Lucベクター(10^{10} vg)と共投与した(N=5/群)。全ての群に、第14日に、ヒト第IX凝固因子(hFIX)をコードするrAAV2/8ベクターの注射(i.v.)を行った。データは、AAV8-Lucと共投与された免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアの単回投与により、抗AAV8抗体の発生を予防するかまたは遅延させることができることを示す(図17)。重要なことに、rAAV2/8-ルシフェラーゼとのNCの共投与は、第14日に投与されたrAAV2/8-hFIXからのhFIXの効率的な発現を可能にするために十分に、抗AAV8抗体形成を阻害した。対照的に、空NPで処置された動物は、抗AAV8抗体を発生させ、これが、第14日に投与されたrAAV2/8-hFIXベクターからのhFIXの効率的な発現を妨げた。これらのデータは、AAVの第1の適用の時点における免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアの共投与が、同じ血清型のAAVの

10

20

30

40

50

有効な反復投薬を可能にすることを示す。

【表 7】

表 7: 処置群

群	ナノキャリア	rAAV2/8-Luc	rAAV2/8-FIX	N
1	NC、D0	D0	D14	5
2	空 NP、D0	D0	D14	5

10

【0279】

例 19: 遺伝子治療導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターと免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアとの複数の投与

実験デザインを、図 18 において示す。オス C57BL/6 マウスを用いた (5 マウス/群)。第 0 日に、ラパマイシンを含む合成ナノキャリア (NC) ($100 \mu\text{g}$ のラパマイシン) を、i. v. で rAAV2/8-Luc ベクター (本明細書において、例えば例 21 または 22 において提供される方法と同様の様式において生成されたもの) ($1 \times 10^{11} \text{vg}$) と共投与した ($N=5$ / 群) (表 8)。マウスに、次いで、第 21 日において、rAAV2/8-hFIX (本明細書において、例えば例 21 または 22 において提供される方法と同様の様式において生成されたもの) をラパマイシンを含む合成ナノキャリア ($100 \mu\text{g}$ のラパマイシン) と共に投与することにより、負荷をかけた。対照群に、第 0 日および 21 日において、NC の代わりに空 NP を投与した。

20

【表 8】

表 8: 処置群

群	ナノ粒子	rAAV2/8-Luc (10^{11}vg)	rAAV2/8-FIX (10^{11}vg)	N
1	NC、d 0, 21	d0	d21	5
2	空 NP、d0、21	d0	d21	5

30

【0280】

結果は、合成ナノキャリア注射と、第 1 (rAAV2/8-Luc) および第 2 (rAAV2/8-hFIX) の両方のウイルス導入ベクターの注射との共投与が、抗 AAV8 抗体応答を阻害し (図 19、左パネル)、AAV8 に対する中和抗体の力価を低下させることを示した (表 9)。抗 AAV8 抗体の阻害は、より高いレベルの AAV2/8-hFIX ベクターのコピー数を可能にし (図 19、中央のパネル)、これが、次いで、hFIX 導入遺伝子の強力な発現を提供した (図 19、右パネル)。空のナノ粒子で処置された対照群において、第 20 日において、数個体の動物が、低レベルの抗体を有したことに注意する。これらの動物のうちの 2 個体は、中間レベルのベクターのコピー数、および第 21 日における rAAV2/8-hFIX の投与にตอบสนองして、いくらかの hFIX の発現を有した。しかし、対照動物のうちの 3 個体は、非常に低いベクターコピー数を示し、検出可能なレベルの FIX 発現を示さなかった。

40

【0281】

したがって、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアの複数の投与により、抗原特異的抗 AAV8 抗体の誘導を完全に予防することができ、第 2 の AAV の注射による高レベルの導入遺伝子発現を可能にすることができることが示された。

50

【表 9】

表9. 中和抗 AAV 抗体力価

AAV8中和抗体力価

動物#	NC		空NP	
	第20日	第41日	第20日	第41日
1	1:3.16	1:31.6	1:31.6	1:1000
2	<1:1	1:31.6	1:31.6	1:316
3	<1:1	1:31.6	1:31.6	1:316
4	<1:1	1:31.6	1:31.6	1:1000
5	<1:1	1:31.6	1:31.6	1:1000

10

【0282】

例20：抗原特異性

実験デザインを、図20において示す。第0日に、免疫抑制剤（100 μ gのラパマイシン）を含む合成ナノキャリアまたは対照の空のナノ粒子を、i.v.で、rAAV2/8-Lucベクター（本明細書において、例えば例21または22において提供される方法と同様の様式において生成されたもの）（ 1×10^{11} vg/マウス）と同時に投与した。第21日に、マウスに、rAAV5-hFIXのi.v.注射（本明細書において、例えば例21または22において提供される方法と同様の様式において生成されたもの）（ 1×10^{11} vg/マウス）または完全フロイントアジュバント（CFA）中で乳化したヒト第IX因子（hFIX）タンパク質のi.m.注射のいずれかを行った（表10）。

20

【表10】

表10: 処置群

群	ナノ粒子	rAAV2/8-Luc (10^{11} vg)	rAAV5-hFIX (10^{11} vg)	FIX タンパク質 CFA	N
1	NC、d0	d0	d21	—	5
2	空 NP、d0	d0	d21	—	5
3	NC、d0	d0	—	d21	5
4	空 NP、d0	d0	—	d21	5

30

【0283】

結果は、第0日におけるi.v.でのラパマイシンを運搬する合成ナノキャリアとrAAV2/8ベクター（AAV2/8-Luc）との共投与が、第21日に投与されたAAV5ベクター（AAV5-hFIX）に対する抗体応答に対して顕著な影響を有しなかったことを示した（図21、左パネル）。ラパマイシンを含むNCで処置された動物は、空NPで処置されたマウスと比較して抗AAV5抗体応答の短期の遅延を有した。これはおそらくは、AAV8に対してブライムされ、AAV5に対して交差反応性であった、空NP処置マウスにおけるB細胞の存在に起因する。しかし、NC処置マウスの抗AAV5抗体応答は、すぐに、空NP処置群の抗AAV5抗体応答に並ぶ。

40

【0284】

対照的に、第21日にAAV2/8-FIXを投与された動物は、抗AAV8抗体を殆どまたは全く示さなかった。これらのデータは、抗AAV抗体応答を阻害することに対するNC処置の効果が、それが共投与されたAAV血清型（すなわちAAV8）に対して特異的であったこと、

50

およびマウスを慢性的に免疫抑制された状態にはしないことを示す。同様に、第0日にNCとrAAV2/8-Lucとで共処置されたマウスは、第21日において、完全フロイントアジュバント（CFA）中の組み換えhFIXタンパク質による免疫化に対して強力な応答を示した（図21、右パネル）。抗hFIX抗体応答は、第0日においてNCの代わりに空NPで処置されたマウスのもものと区別不能であった。したがって、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアとAAVとの共投与は、慢性的な免疫抑制をもたらさないことが示された。

【0285】

例21：遺伝子治療導入遺伝子を有するAAV5導入ベクター（仮想）

ART-102は、以前に記載されるとおり作製する（Matsushita T, et al. Gene Ther. 1998; 5: 938-945）。プラスミドは、本明細書において提供される導入遺伝子のいずれか1つを、NF- κ Bプロモーターおよびヒト成長ホルモンポリアデニル化シグナルの制御下においてコードする。目的の遺伝子はまた、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターの制御下にあってもよい。Gao GP, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99: 11854-11859において記載されるように、導入遺伝子カセットは、AAV-2末端逆位反復配列に隣接し、AAV5からのカプシド中にパッケージングされる。ベクターを、クロマトグラフィーと塩化セシウム密度勾配遠心分離との組み合わせにより精製することにより、空カプシドを含まない画分を生じる。ベクターの力価は、特異的プライマーおよびプローブを用いるqPCRにより、決定することができる。同様に、例として、ホタルルシフェラーゼをコードするrAAV5ベクターを作製することができる。

【0286】

例22：遺伝子治療導入遺伝子を有するAAV2/8およびAAV2/5導入ベクター（仮想）

AAV2-HCR-hAAT-FIXからのMscIBsaIおよびBsaITsp45Iフラグメントを、サルウイルス40のlateポリA（SV40 LpA）にライゲーションすることにより、scAAV骨格プラスミドを構築する。結果として生じるプラスミドは、完全な5'末端分解部位（terminal resolution site）（trs）を有し、3' trsが欠失した、改変されたAAV2骨格を含む。標準的なポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いて、ヒトアポリポタンパク質の肝調節領域（hepatic control region）（HCR）、5' 非翻訳領域を含むヒトアルファ1アンチトリプシン（hAAT）遺伝子プロモーターの連続したセグメントの増幅により、LP1エンハンサー／プロモーターを構築し、位置4582（gからcへ）、4580（gからcへ）、4578（aからcへ）、および4561（aからtへ）において改変された、改変SV40 small t抗原イントロン（SV40イントロン）の上流で、改変されたAAV2骨格中にクローニングすることができる。野生型hFIXのcDNA、または3' 非翻訳領域（UTR）を有しない他の目的のcDNAを、AAV-HCR-hAAT-hFIXからPCR増幅し、改変されたSV40イントロンの下流に挿入して、scAAV-LP1-hFIXを作製する。高度に発現される真核生物遺伝子において最も頻繁に見出されるコドンを用いて、コドン最適化されたhFIXを作製し、オリゴヌクレオチドとして合成し、その後、ライゲーションにより組み立てて、PCR増幅し、配列決定し、その後、AAVLP1骨格中にクローニングして、sc-AAV-LP1-hFIXcoを作製する。ssおよびscAAVベクターは、アデノウイルスフリー過性トランスフェクション（adenovirus-free transient transfection）法により作製する。

【0287】

XX2およびpAAV5-2に基づくpLT-RCO3と称されるキメラAAV2 Rep-5Capパッケージングプラスミドを用いて、AAV5-シュードタイプベクター粒子を作製する。加えて、パッケージングプラスミドpAAV8-2を用いて、AAV8-シュードタイプベクターを作製する。AAV2/5および2/8ベクターを、イオン交換クロマトグラフィー法により精製する。ベクターゲノム（vg）の力価は、スーパーコイルプラスミドDNAを標準物として用いる定量的スロットブロット（slotblot）により、決定することができる。かかるウイルスベクターは、本明細書において提供される導入遺伝子のいずれか1つを含んでもよい。

【0288】

例23：遺伝子治療導入遺伝子を有するAAV8導入ベクター（仮想）

マウスゲノムAlbセグメント（NCBI参照配列：NC_000071.6中の90474003-90476

10

20

30

40

50

720) を、PCRで増幅して、AAV2末端逆位反復配列の間で、改変されたpTRUF骨格中のBsrGIおよびSpeI制限部位に挿入することができる。リンカーコード配列(グリシン-セリン-グリシン)に先行され、後にanNheI制限部位が続く、最適化されたP2Aコード配列は、Bpu10I制限部位中にある。コドン最適化されたF9コード配列を、NheI部位中に挿入して、rAAV8ベクターの構築において役立ち得るpAB269を得ることができる。逆方向の対照(inverse control)を構築するために、BsiWI制限部位からNheI制限部位までの内部セグメントを、適切なPCRプライマーを用いて増幅することができる。最終的なrAAV産生プラスミドは、EndoFree Plasmid Megaprep Kit (Qiagen) を用いて作製することができる。

【0289】

rAAV8ベクターは、Grimm et al., J. Virol. 80, 426-439 (2006)において記載されるように、Ca₃(PO₄)₂トランスフェクションプロトコルと、その後のCsCl勾配精製を用いて、作製することができる。定量的ドットプロットにより、ベクターを力価決定することができる。

Barzel et al., 364, Nature, Vol. 517, 2015において記載されるとおり、上記のようなベクターを用いて、血友病Bマウスにおける出血の素因の寛解が示された。特に、ベクターは、肝細胞において、アルブミン対立遺伝子中への組み込みを達成した。F9は、オン・ターゲット(on-target)な組み込みから産生され、リボソームによるスキッピングは高度に効率的であった。安定なF9血漿レベルが得られ、処置されたF9欠損マウスは、正常な凝血時間を有した。

【0290】

例24：遺伝子治療導入遺伝子を有するAAV9導入ベクター（仮想）

「第1世代」のE1/E3を欠失した複製欠損アデノウイルスアデノウイルスコンストラクトは、Kypson, et al. J Thorac Cardiovasc Surg. 1998およびAkhter, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94: 12100 -12105において記載されるように作製することができる。b₂ARコンストラクト(Adeno-b₂AR)および導入遺伝子は、適切なプロモーターにより駆動され得る。アデノウイルスのラージスケール調製は、感染したエプスタイン・バーの核抗原をトランスフェクトされた293細胞から精製することができる。

Shah et al., Circulation. 2000;101:408-414において記載されるとおり、左または右いずれかの冠動脈の経皮のサブセレクトティブ(subselective)カテーテル法、および上記のように作製されたマーカー導入遺伝子を含むアデノウイルスベクターの注入を受けたウサギは、チャンバー特異的な様式において導入遺伝子を発現した。加えて、皮下アデノウイルスにより媒介される治療用導入遺伝子の冠内送達が可能であること、および急性の全体的左心室機能を増強することができることが結論付けられた。

【0291】

例25：遺伝子治療導入遺伝子を有するレンチウイルス導入ベクター（仮想）

以下を調製することができる：標的細胞の組み込みを可能にするための、レンチウイルスLTRの間に挿入されたパッケージング配列および導入遺伝子を含む、レンチウイルス発現プラスミド；pol、gag、revおよびtatウイルス遺伝子をコードし、rev-応答エレメントを含む、パッケージングプラスミド；ならびに、ウイルスエンベロープ遺伝子のタンパク質をコードする、シュードタイピングプラスミド。HEK 293T細胞を、前述のものによりトランスフェクトすることができる。HEK 293T細胞のトランスフェクションの後で、組み換えレンチウイルスベクターを含む細胞上清から、レンチウイルスベクターを得ることができる。

【0292】

例26：遺伝子治療導入遺伝子を有するHIVレンチウイルス導入ベクター（仮想）

HIVレンチウイルス導入ベクターは、米国公開番号20150056696の方法に従って調製する。hPEDF CDSフラグメントは、適切なプライマーを用いて、鋳型としてヒト網膜色素上皮細胞株ARPE-19 (American Type Culture Collection, ATCC) のcDNAからP

10

20

30

40

50

CR増幅する。本明細書において記載されるタンパク質のいずれか1つについての代替フラグメントを、同様に得ることができる。hPEDFフラグメントを、ゲル回収により得、TAクローニング法により、製造者の指示に従って、pLenti6.3/V5-TOPO.RTM.ベクター (Invitrogen) 中にライゲーションする。ライゲーションされたhPEDFフラグメントの配列を、シーケンシングにより検証する。

【0293】

例27：遺伝子治療導入遺伝子を有するSIVレンチウイルス導入ベクター（仮想）

SIVレンチウイルス導入ベクターは、米国公開番号20150056696の方法に従って調製する。SIV遺伝子導入ベクター、パッケージングベクター、rev発現ベクター、およびVSV-G発現ベクターを入手し、hPEDFフラグメントを遺伝子導入ベクター中に導入する。遺伝子導入ベクター中への導入のための、本明細書において記載されるタンパク質のいずれか1つについての代替フラグメントを、同様に得ることができる。

ヒト胎児腎臓細胞由来の細胞株293T細胞を、15cmの直径を有するプラスチックのペトリ皿1枚当たり約 1×10^7 細胞の細胞密度で播種し（翌日には70～80%の細胞密度）、10%ウシ胎仔血清を補充した20mlのD-MEM培養培地（Gibco BRL）中で24時間にわたり培養する。24時間の培養の後、培養培地を、10mlのOPTI-MEM培養培地（Gibco BRL）で交換する。

【0294】

1枚のペトリ皿について、10μgの遺伝子導入ベクター、5μgのパッケージングベクター、2μgのrev発現ベクターおよび2μgのVSV-G発現ベクターを、1.5mlのOPTI-MEM培地中に溶解し、40μlのPLUS Reagent試薬（Invitro Co.）を添加する。結果として生じる混合物を、攪拌し、室温で15分間にわたり静置する。60μlのLIPOFECT AMINE試薬を1.5mlのOPTI-MEM培地で希釈することにより希釈溶液を得る；結果として生じる混合物を、攪拌し、室温で15分間にわたり静置する。結果として生じるDNA複合体を、上記のペトリ皿中の細胞上に滴加する。ペトリ皿を、均一な混合物に達するまで慎重に振盪して、次いでインキュベートする。20%のウシ胎仔血清を含む13mlのD-MEM培地を添加する。上清を回収する。

【0295】

例28：遺伝子治療導入遺伝子を有するHSV導入ベクター（仮想）

HSV導入ベクターは、米国公開番号20090186003の方法に従って調製する。HSV-1 (F) 株は、継代数が低い臨床分離株であり、プロトタイプHSV-1株として用いられる。マウス初期増殖応答-1プロモーター (Egr-1) の転写制御下においてマウスインターロイキン12 (mIL-12) を発現するM002を、構築する。あるいは、本明細書において記載されるタンパク質のいずれか1つを、適切なプロモーターの制御下においてコードする、類似のコンストラクトを調製することができる。pBluescript-SK+ (Stratagene) 中にmIL-12のp40およびp35サブユニットを含むプラスミドを入手する。HindIII (5' 末端) およびBamHI (3' 末端) による消化によりp40サブユニットを取り除き、NcoI (5' 末端) およびEcoRI (3' 末端) による消化によりp35サブユニットを取り除く。配列内リボソーム進入部位またはIRESの配列を、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) および適切なプライマーを用いて、ベクターpCITE-4a+ (Novagen, Madison, Wis.) から増幅する。マウスp40、マウスp35およびIRES配列を、IRES配列がp40とp35とのコード配列を分離するように、pBS-SK+のHindIIIおよびEcoRI部位中に三方ライゲーションすることにより、プラスミドpBS-IL12を構築する。

【0296】

HSVシャトルプラスミドpRB4878は、以前に記載されたとおり調製することができる (Andreansky et al. (1998) Gene Ther. 5, 121-130)。プラスミド4878-IL12は、以下のとおり構築する：pBS-mIL-12を、XhoIおよびSpeIで消化して、IRESを含むIL-12サブユニットコード領域全体を含む2.2kbのフラグメントを取り除き、Klenowフラグメントを用いて末端を充填し、pRB4878中のEgr-1プロモーターとB型肝炎ウイルスポリA配列との間に位置する平滑化したKpnI部位中にライゲーションする。M001 (tk-)

10

20

30

40

50

およびM002（ネイティブの遺伝子座において修復されたtk）を、以前に記載されたとおりにより相同組み換えを介して構築する（Andreansky et al. (1998) Gene Ther. 5, 121-130）。2つのtkが修復されたウイルスM002.29およびM002.211を、制限酵素により消化されたウイルスDNAのサザンブロットハイブリダイゼーションにより確認し、これを、1%アガロース、1×TPEゲル上で電気泳動分離して、Zeta-Probe膜（Bio-Rad）に導入する。ブロットを、Gene Images AlkPhos Direct DNA標識システム（Amersham-Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.）を用いて、アルカリホスファターゼで標識された適切なDNAプローブとハイブリダイズする。酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）により、IL-12産生を実証する。

【0297】

例29：CRISPR/Cas-9導入遺伝子を有するウイルス導入ベクター（仮想）

本明細書において、例えば上の例において記載されるウイルスベクターのいずれか1つは、遺伝子編集導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターを作製するために用いることができる。あるいは、および例として、以下に、Cas9、例えばCas9野生型（II型）をコードする遺伝子編集導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターを作製するための方法を提供する。

【0298】

HEK293T細胞は、10%ウシ胎仔血清（Sigma, Steinheim, Germany）、100 U/mLのペニシリンおよび100 μg/mLのストレプトマイシン（Life Technologies）を含むDMEM培地（Life Technologies, Darmstadt, Germany）中で培養することができる。Huh7およびHep56D細胞培地は、さらに、1%の非必須アミノ酸を含み得る（Life Technologies）。Jurkat細胞は、10%ウシ胎仔血清（Sigma）、100 U/mLのペニシリン、100 μg/mLのストレプトマイシン、および2 mMのL-グルタミン（全てLife Technologies）を含むRPMI 1640培地（GE Healthcare, Pasching, Austria）中で培養することができる。全ての細胞株は、37℃および5%CO₂で培養することができる。ラージスケールのAAVベクター生成のために、HEK293T細胞は、10枚の15 cm²のディッシュ中に播種することができる（4×10⁶細胞/ディッシュ）。2日後、それらを、（i）AAVベクタープラスミド（gRNAおよび/またはCas9をコードする）、（ii）AAVのrepおよびcap遺伝子を運搬するAAVヘルパープラスミド、ならびに（iii）AAV産生のためのヘルパー機能を提供するアデノウイルスプラスミドで、三重トランスフェクトすることができる。

【0299】

AAVのcap遺伝子は、合成単離株AAV-DJから（Grimm et al., J. Virol. 2008, 82, 5887-5911）、または新たなバリエーションAAVrh10A2から、誘導することができる。簡単に述べると、AAVrh10A2は、AAV血清型rh10のカプシドの暴露領域中への7アミノ酸長のペプチドの挿入を通して作製することができる。AAV産生プラスミドおよびプロトコルについてのさらなる詳細は、Boerner et al., Nucleic Acids Res. 2013, 41, e199およびGrimm, Methods 2002, 28, 146-157において報告されたとおりに行うことができる。スモールスケールのAAVストックを作製するために、2×10⁵のHEK293T細胞/ウェルを、6ウェルプレート中に播種して、翌日に前述のプラスミドで三重トランスフェクトすることができる。3日後、細胞を培地中に掻き取り、10分間の1500 rpmにおける遠心分離を介して回収し、300 μLの1×PBS（Life Technologies）中に再懸濁し、3回の液体窒素中および37℃での凍結融解サイクルに供することができる。10分間の13,200 rpmでの遠心分離を行って、細胞デブリを取り除くことができ、ウイルス導入ベクター粒子を含む上清を、形質導入実験において直接用いるか、または-20℃で凍結することができる。

【0300】

スモールスケールのトランスフェクションおよびその後のT7アッセイのために、96ウェルプレートにおいて1ウェルあたり2.8×10⁴のHEK293Tまたは1.2×10⁴のHuh7細胞を播種し、翌日に、リポフェクタミン2000（Life Technologies）を、この形

10

20

30

40

50

式についての製造者の推奨に従って用いて（各々25 µLの無血清培地中の200 ngのDNAおよび0.5 µLのリポフェクタミン2000）、トランスフェクトすることができる。200 ngのDNAは、オールインワンのCas9/gRNAベクターからなるか、または別々のCas9およびgRNAコンストラクトの場合は、100 ngの各々からなってもよい。ウェスタンブロットのためのライセートを得るために、HEK293T細胞を、24ウェルプレート（ライセートごとに1ウェル）において、リポフェクタミン2000を、この形式についての製造者の推奨に従って用いて、トランスフェクトすることができる。形質導入実験において、細胞を96ウェルプレート中で増殖させて、播種の1日後に、10 µLの精製されていないAAVで、または精製されたベクターで、形質導入することができる。3日間（トランスフェクション）～5日間（形質導入）のインキュベーションの後で、細胞を、0.2 µg/mLのプロテイナーゼK（Roche, Mannheim, Germany）を補充したDirect PCR Lysis Reagent Cell（PeqLab, Erlangen, Germany）で、製造者のプロトコルに従って、溶解することができる。

【0301】

Senis, et al. Biotechnol. J. 2014, 9, 1402-1412において記載されるとおり、上記のようなプラスミドおよびベクターは、CRISPR成分Cas9およびキメラg（guide）RNAの送達を達成することができる。加えて、Cas9発現は、それぞれ肝臓特異的なプロモーターまたは肝臓miRNA結合部位を用いて、肝細胞に対して、または肝細胞から離れて行うことができることが示された。かかるベクターをin vivoでの遺伝子工学のために用いることができるという、さらなる証左が提供された。このことは、成体マウスの例証された肝臓において達成された。

【0302】

例30：Cas9バリエーション導入遺伝子を有するウイルス導入ベクター（仮想）

例30における方法はまた、遺伝子編集導入遺伝子（例えばCas9バリエーション、例えば本明細書において記載されるCas9バリエーションのいずれか1つをコードする導入遺伝子）を有するウイルス導入ベクターを生成するために用いることができる。あるいは、かかるウイルス導入ベクターを生成するために、本明細書において記載される他のウイルスベクターのいずれか1つを代わりに用いてもよい。提供されるCas9バリエーションのいずれか1つは、本明細書において提供される遺伝子編集導入遺伝子のいずれか1つによりコードされている。

Cas9バリエーションを作製するために、NLSおよび3×FLAGタグを有する、ヒトコドン最適化された化膿性連鎖球菌(streptococcus pyogenes)のCas9ヌクレアーゼ（Addgene プラスミド43861）を、野生型Cas9発現プラスミドとして用いることができる。Cas9_Expプライマーによる鋳型としての野生型Cas9発現プラスミドのPCR産物を、Gibson Assembly Cloning Kit（New England Biolabs）で組み立てて、Cas9およびFokI-dCas9バリエーションを構築することができる。単一のgRNAコンストラクト（gRNA G1～G13）をコードする発現プラスミドもまた、クローニングすることができる。

【0303】

例31：ジnkフィンガーヌクレアーゼ導入遺伝子を有するウイルス導入ベクター（仮想）

本明細書において、例えば上の例において記載されるウイルスベクターのいずれか1つは、ジnkフィンガーヌクレアーゼをコードする遺伝子編集導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターを作製するために用いることができる。あるいは、および例として、以下に、かかる遺伝子編集導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターを作製するための方法を提供する。

【0304】

TRBC-およびTRAC-ZFNを、Urnov, et al. Nature 435, 646-651 (2005)において記載されるとおりに、設計して、組み立てることができる。用いられる認識用らせんは、Provati et al., Nature Medicine、第18巻第5号（2012年5月）により提供されるとおりであってよい。TRBC-およびTRAC-ZFNをコードするレンチウイルスベクターは、HIV由来の自己失活性導入コンストラクトpCCLsin.cPPT.SFFV.eGFP.Wpreから生成するこ

10

20

30

40

50

とができ、これは、HIVインテグラーゼ中にD64V変異を有するインテグラーゼ欠損第3世代パッケージングコンストラクトによりパッケージングして、VSVエンベロープによりシュードタイプ化することができる。Ad5/F35アデノウイルスベクターは、E1-E3を欠失した骨格上で作製することができる。TRBCまたはTRAC遺伝子のいずれかを標的とするZFNは、2Aペプチド配列を用いて連結し、適切なプロモーターの制御下においてpAdEasy-1/F35ベクター中にクローニングすることができ、各コンストラクトのためのAd5/F35ウイルスは、TReX 293T細胞を用いて作製することができる。二方向自己失活性導入ベクターpCCLsin.cPPT.ΔLNGFR.minCMV.hPGK.eGFP.Wpreから、およびpCCLsin.cPPT.hPGK.eGFP.Wpreからの、WT1特異的なTCR鎖と、単一のα21またはβ21 WT1特異的なTCR鎖の両方をコードするレンチウイルスベクターを作製して、インテグラーゼコンピ

10

【0305】

上記のもののような、およびProvasi et al., Nature Medicine、第18巻第5号（2012年5月）において記載されるようなベクターを用いて、ZFNが、内在TCRのβおよびα鎖遺伝子の破壊を促進したことが示された。ZFNで処置されたリンパ球は、CD3-TCRの表面発現を欠失しており、インターロイキン-7（IL-7）およびIL-15の添加により増殖した。さらに、レンチウイルスによる、ウィルムス腫瘍1（WT1）抗原に特異的なTCRの導入の後で、TCRが編集された細胞は、新たなTCRを高レベルで発現した（またProvasi et al., Nature Medicine、第18巻第5号（2012年5月）において記載されるとおりである）。

20

【0306】

例32：ジンクフィンガーヌクレアーゼ導入遺伝子を有するウイルス導入ベクター（仮想）

hF9mut遺伝子座を標的とするジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）およびF9を標的とするベクターは、Li, et al. Nature. 2011;475(7355):217-221において記載されるとおり調製することができる。かかるベクターは、in vivoでの遺伝子ターゲティングのために首尾よく用いられることが、血友病B（HB）の新生仔マウスモデルにおいて示されている。ヒトF9遺伝子を標的とするZFNのペアをコードするAAVベクターと、修正cDNAカセットに隣接するホモロジーアーム(arms of homology)を有する遺伝子ターゲティングベクターとの全身性共送達、かかるマウスの肝臓において、マウスゲノム中に設計された欠損hF9遺伝子の修正をもたらした。さらに、凝血時間を正常化するために十分な安定なレベルのヒト第Ⅹ因子の発現が達成された。

30

【0307】

例33：メガヌクレアーゼ導入遺伝子を有するウイルス導入ベクター（仮想）

本明細書において、例えば上の例において記載されるウイルスベクターのいずれか1つは、メガヌクレアーゼをコードする遺伝子編集導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターを作製するために用いることができる。あるいは、および例として、以下に、かかる遺伝子編集導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターを作製するための一般的方法を記載する。メガヌクレアーゼは、米国公開番号20110033935および20130224863において提供されるメガヌクレアーゼのいずれか1つであってよい。

【0308】

幾つかの態様において、ウイルスの複製を防止するために、特定のウイルス遺伝子が不活化される。好ましくは、幾つかの態様において、ウイルスは、標的細胞内での送達および維持のみを行うことができるが、標的細胞または組織内で複製する能力を保持しないように改変される。ベクターのように作用するウイルスゲノムを作製するために、メガヌクレアーゼをコードする1以上のDNA配列を、改変されたウイルスゲノムに導入することができる。幾つかの態様において、ウイルスベクターは、限定されないが、MFGまたはpLJベクターなどのレトロウイルスベクターである。MFGベクターは、単純化されたモロニーマウス白血病ウイルスベクター（MoMLV）であって、ここで、それを複製欠損にするためにpolおよびenvタンパク質をコードするDNA配列が削除されている。pLJレトロウイルスベクターもまた、MoMLVの一形態である（例えば、Korman et al. (1987), Proc. N

40

50

at'l Acad. Sci., 84:2150-2154を参照)。他の態様において、組み換えアデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスを、ウイルスベクターを作製するために用いることができる。

【0309】

例34：エクソスキッピング導入遺伝子を有するウイルス導入ベクター（仮想）

本明細書において、例えば上の例において記載されるウイルスベクターのいずれか1つは、エクソスキッピング導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターを作製するために用いることができる。あるいは、および例として、以下に、特異的エクソスキッピング導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターを作製するための方法を提供する。

一本鎖AAV1-U7ex235およびAAV1-U7scrの作製のためのpAAV (U7smOPT-SD23/BP22) およびpAAV (U7smOPT-scr) プラスミド；ならびに自己相補的scAAV9-U7ex239のためのscAAV-U7ex23プラスミドによる、3プラスミドのトランスフェクションプロトコルを用いることができる。pAAV (U7smOPT-scr) プラスミドは、いかなるマウスcDNAにもマッチしない非特異配列G G T G T A T T G C A T G A T A T G Tを含んでもよい。

【0310】

上記に従って作製されたウイルス導入ベクターの使用は、Le Hir et al., Molecular Therapy, 第21巻第8号、1551-1558 (2013年8月)において記載されるとおり、ジストロフィンを修復するためにかかるベクターを用いることができることを示した。しかし、修復は、3～12か月の間に著しく低下し、これは、ウイルスゲノムの喪失と関連した。したがって、本明細書において提供される組成物および方法は、かかる処置の効果を維持することに役立ち得る。

【0311】

例35：エクソスキッピング導入遺伝子を有するウイルス導入ベクター（仮想）

クローンU1#23は、オリゴmU1anti5 (5' - C G A A A T T T C A G G T A A G C C G A G G T T A T G A G A T C T T G G G C C T C T G C - 3' およびmU1anti3 (5' - G A A C T T T G C A G A G C C T C A A A A T T A A A T A G G G C A G G G G A G A T A C C A T G A T C - 3') を用いて、ヒトU1 snRNA遺伝子に対する逆PCRにより得ることができる。アンチセンス含有インサートは、オリゴU1cas-up-NheI (5' - C T A G C T A G C G G T A A G G A C C A G C T T C T T T G - 3') およびU1cas-down-NheI (5' - C T A G C T A G C G G T T A G C G T A C A G T C T A C - 3') を用いて、対応するプラスミドから増幅することができる。結果として生じるフラグメントを、NheIで消化して、pAAV2.1-CMV-EGFPプラスミドのフォワード方向にクローニングすることができる。

【0312】

AAV-U1#23ベクターは、293細胞の三重トランスフェクションにより作製して、CsCl₂超遠心により精製し、リアルタイムPCRベースのアッセイおよびドットブロットアッセイの両方を用いて力価を決定することができる。緑色形成単位の数、293細胞に対する連続希釈により評価することができる。AAVベクターは、AAV TIGEM Vector Coreにより作製することができる。

6週齢のmdxマウスに、尾静脈から、 $3 \sim 4 \times 10^{12}$ のゲノムコピーのAAVベクターを投与することができる。ウイルス投与の6週間および12週間後に、動物を安楽死させて、異なる領域からの筋肉を採取することができる。EGFP分析および精査は、蛍光立体顕微鏡下において行うことができる (Leica MZ16FA)。

【0313】

上記に従って作成されたウイルス導入ベクターの使用は、Denti et al., 3758-3763, PNAS (2006年3月7日) 第103巻第10号において記載されるとおり、mdxマウスにおいて、尾静脈注射により、持続的なエクソスキッピングをもたらした。ベクターの全身性送達、有効な全身にわたる定着、in vivoでの機能的特性の著しい回復、およびより低いクレアチンキナーゼ血清レベルをもたらした。結果は、筋消耗の減少が存在したことを示唆する。

10

20

30

40

50

【0314】

例36：エクソンスキッピング導入遺伝子を有するウイルス導入ベクター（仮想）

U7smOPT-SD23/BP22（改変されたマウスU7snRNA遺伝子）からのものなどの特定のエクソンに対して特異的な、異なるU7snRNAコンストラクトを設計することができる。特定のエクソンを標的とするアンチセンス配列を、ジストロフィンmRNAのエクソンを標的とするアンチセンス配列により置き換えることができ、これは、アンチセンスオリゴヌクレオチドとしてエクソンスキッピングを誘導する。配列を、U7snRNAコンストラクト中に挿入することができる。結果として生じるU7snRNAフラグメントを、次いで、さらなるレンチウイルス産生のためのレンチウイルスベクターコンストラクト中、またはAAV産生のためのAAVベクターコンストラクト中に導入することができる。

10

【0315】

レンチウイルスベクターは、hPGK-GFPカセットが取り除かれてU7snRNAコンストラクトで置き換えられているpRRLcPPT-hPGK-eGFP-WPREコンストラクトに基づいてよい。レンチウイルスベクターは、以前に記載されるとおり、パッケージングコンストラクトpCMVΔR8.74、水疱性口内炎ウイルス-Gエンベロープを産生するプラスミド（pMD.G）、およびベクターそのものの、293T細胞中へのトランスフェクションにより作製することができる。ウイルス力価（感染性粒子）は、12ウェルプレート中でのベクター調製物の連続希釈を用いるNIH3T3細胞の形質導入により決定することができる。72時間後に、形質導入された細胞からのゲノムDNAを、ゲノムDNA精製キット（Qiagen, Crawley, UK）を用いて抽出することができる。感染性粒子の力価（感染性粒子/mL）は、他

20

【0316】

その後のAAVベクター産生のために、pSMD2 AAV2ベクターのXbaI部位において、異なるU7snRNAフラグメントを導入することができる。AAV2/1シュードタイプ化ベクターは、293細胞における、pAAV2-U7snRNA、アデノウイルスヘルパー機能をコードするpXX6、ならびにAAV2のrepおよびAAV1のcap遺伝子を含むpAAV1pITRC02のコトランスフェクションにより調製することができ、ベクター粒子は、トランスフェクションの48時間後に得られた細胞ライセートから、イオジキサノール勾配に対して精製することができ、力価は、定量リアルタイムPCRにより測定することができる。

Goyenvalle, et al. The American Society of Gene & Cell Therapy, 第20巻第6号、1212-1221（2012年6月）において記載されるとおり、上記の方法により作製されたU7低分子核RNAをコードするウイルス導入ベクターは、in vitroおよびin vivoの両方で、効率的なエクソンスキッピングを誘導することができる。

30

【0317】

例37：エクソンスキッピング導入遺伝子を有するウイルス導入ベクター（仮想）

HSV導入ベクターは、米国公開番号20090186003および上の例28の方法に従って（導入遺伝子がエクソンスキッピング導入遺伝子ではないように方法が改変されてもよいことを除く）、調製することができる。エクソンスキッピング導入遺伝子は、本明細書において記載されるか、当該分野において他に公知な導入遺伝子のいずれか1つであってよい。

【0318】

例38：エクソンスキッピング導入遺伝子を有するウイルス導入ベクター（仮想）

HIVレンチウイルス導入ベクターは、米国公開番号20150056696および上の例26の方法に従って（導入遺伝子がエクソンスキッピング導入遺伝子ではないように方法が改変されてもよいことを除く）、調製することができる。エクソンスキッピング導入遺伝子は、本明細書において記載されるか、当該分野において他に公知な導入遺伝子のいずれか1つであってよい。

40

【0319】

例39：遺伝子発現調節導入遺伝子を有するウイルス導入ベクター（仮想）

本明細書において、例えば上の例において記載されるウイルスベクターのいずれか1つは、遺伝子発現調節導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターを作製するために用いるこ

50

とができる。あるいは、および例として、以下に、特異的遺伝子発現調節導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターを作製するための方法を提供する。

ウイルス導入ベクターは、Brown et al., Nat Med. (2006年5月);12(5):585-91において記載される方法に従って作製する。簡単に述べると、RNAの逆転写、mRNAの濃度を定量するための定量PCR分析、および正規化のためのGAPDH発現を用いて、プラスミドを構築する。VSV-シュードタイプ化第3世代レンチウイルスベクター (LV) を、293T細胞中への一過性の4プラスミドのコトランスフェクションにより作製し、超遠心により精製する。HIV-1 gag p24抗原免疫捕獲により、ベクター粒子を測定することができる。

【0320】

Brown et al., Nat Med. (2006年5月);12(5):585-91において記載されるとおり、内在miRNAの標的配列をコードするかかるレンチウイルスベクターは、異なる組織において遺伝子発現を隔離し得るmiRNAの産生をもたらすことが示された。miRNA制御の証左が提供され、これは、かかるベクターを治療的適用において用いることができることを示す。

【0321】

例40：遺伝子発現調節導入遺伝子を有するウイルス導入ベクター（仮想）

ある遺伝子に対するmiRNAに基づくヘアピン（例えば、ハンチンチン遺伝子；AAV2/1-miRNA-Htt）をコードするAAV2/1血清型ベクターを作製するために、特異的遺伝子（例えば、ヒトHTT）についてのcDNAを、AAV2末端逆位反復配列（ITR）および1.6 kbのサイトメガロウイルスエンハンサー／ニワトリb-アクチン（CBA）プロモーターを含むシャトルプラスミド中にクローニングすることができる。対照ベクターもまた生成することができ、これは、空のベクター骨格を含む（例えば、AAV2/1-Null）か、または同じプロモーターの制御下において高感度緑色蛍光タンパク質などのレポーターを発現する（AAV2/1-eGFP）。ウイルス導入ベクターは、ヒト293細胞などの細胞株の3プラスミドのコトランスフェクションにより生成することができ、組み換えウイルス粒子を、次いで、Stanek et al., Human Gene Therapy. 2014;25:461-474において以前に記載されるように、カラム精製することができる。結果として生じるAAV2/1-miRNA-Httの力価を、次いで、定量PCRを用いて決定することができる。

【0322】

かかるウイルス導入ベクターを用いて生じたデータは、Stanek et al., Human Gene Therapy. 2014;25:461-474において記載されるとおり、AAVにより媒介されるRNAiは、線条体における細胞を形質導入することにおいて有効であり得、この領域における野生型および変異体の両方のHttのレベルを部分的に低下させ得ることを示した。

【0323】

例41：遺伝子発現調節導入遺伝子を有するウイルス導入ベクター（仮想）

CD81遺伝子は、逆転写により増幅することができる。cDNAは、適切なプライマーを用いてPCR増幅することができる。フォワードプライマーは、BamHI (Biolabs, Allschwil, Switzerland) 制限部位と、それに続く5'のCD81のcDNAに特異的な配列を含み得る；リバースプライマーは、3'のCD81のcDNAに特異的な配列、6 His-tag、停止コドンおよびXho I (Biolabs) 制限部位を含み得る。PCR産物を消化して、pTK431中の類似の部位中にクローニングすることができる。pTK431は、完全なtet-off-誘導系、セントラルポリプリントラクト(central polypurine tract) cPPTおよびウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメントを含む自己失活性HIV-1ベクターである。プラスミドは、CsCl₂で精製することができる。

【0324】

標的は、CD81のmRNA配列に従って、Hannonの設計基準 (katahdin.cshl.org:9331/RNAi/html/rnai.html) に基づいて設計することができる。鑄型としてpSilencer 1.0-U6 (Ambion)、制限部位を含むU6プロモーターに特異的なフォワードプライマーを用いて、各shRNA標的を、PCRによりマウスU6プロモーターに付加することができる。PCR産物を消化し、pTK431中の類似の部位にクローニングして、各コンストラクトの完全

10

20

30

40

50

性を検証するためにシーケンシングすることができる。

ベクタープラスミドは、パッケージングコンストラクトプラスミドp Δ NRFおよびエンベローププラスミドpMDG-VSVGと一緒に、HEK293T細胞中にコトランスフェクトして、ウイルス粒子を産生することができる。ウイルス力価は、p24抗原測定により決定することができる (KPL, Lausanne, Switzerland)。

Bahi, et al. J. Neurochem. (2005) 92, 1243-1255において示されるとおり、CD81を標的とする低分子ヘアピン型RNA (shRNA) を発現するレンチウイルス (Lenti-CD81-shRNA) は、in vitroでのHEK293T細胞の後で遺伝子サイレンシングをもたらした。加えて、in vivoでのLenti-CD81-shRNAの送達は、内在CD81のサイレンシングをもたらした。

【0325】

例42：遺伝子発現調節導入遺伝子を有するウイルス導入ベクター（仮想）

本明細書において、例えば上の例において記載されるウイルスベクターのいずれか1つは、RNAi剤をコードする遺伝子発現調節導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターを作製するために用いることができる。本明細書において提供される遺伝子発現調節導入遺伝子によりコードされ得るRNAi剤の一例を、以下に記載する。

【0326】

発現コンストラクトは、3または4以上の個別のshRNA種の発現を駆動するプロモーターを含むことができる。低分子核RNAおよびトランスファーRNAの合成は、RNAポリメラーゼIII (pol III) により、pol III特異的なプロモーターの制御下において指示することができる。これらの調節エレメントにより指示される比較的高い存在量の転写物のために、U6およびH1遺伝子から誘導されるものを含むpol IIIプロモーターを、1-x RNAiの発現を駆動するために用いることができる (例えば、Domitrovich and Kunkel, Nucl. Acids Res. 31(9): 2344-52 (2003); Boden, et al. Nucl. Acids Res. 31(17): 5033-38 (2003a); およびKawasaki, et al. Nucleic Acids Res. 31(2): 700-7 (2003)を参照)。U6プロモーターを用いるRNAi発現コンストラクトは、HCVゲノムの3つの異なる領域を標的とする3つのRNAi剤を含み得る。遺伝子発現調節導入遺伝子によりコードされ得るRNAi剤のさらなる例は、本明細書において記載されるRNAi剤のいずれか1つを含む。

【0327】

例43：遺伝子発現調節導入遺伝子を有するウイルス導入ベクター（仮想）

本明細書において、例えば上の例において記載されるウイルスベクターのいずれか1つは、Serpina1 RNAi (例えば米国特許公開番号20140350071において記載される剤のうちの1つ) をコードする遺伝子発現調節導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターを作製するために用いることができる。かかる導入遺伝子を有するウイルス導入ベクターは、本明細書において提供されるか当該分野において他に公知のものと類似の方法に従って作製することができる。

【0328】

例えば、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いることができる (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); 米国特許第5,436,146号)。iRNAを、例えばU6もしくはH1 RNAプロモーターのいずれか、またはサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターを有する組み換えAAVベクターからの、2つの別々の相補的な一本鎖RNA分子として発現させることができる。本発明において注目されるdsRNAを発現させるために好適なAAVベクター、組み換えAVベクターを構築するための方法、およびベクターを標的細胞中に送達するための方法は、以下において記載される: Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol. 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; 米国特許第5,252,479号; 米国特許第5,139,941号; 国際特許出願番号WO 94/13788; および国際特許出願番号WO 93/24641: かかる情報の全開示は、本明細書において参考として援用される。

【0329】

例 4 4：対象における抗ウイルス導入ベクター減弱応答の確立（仮想）

本明細書において提供されるウイルス導入ベクターのいずれか 1 つ、例えば例のいずれか 1 つは、i . v .、i . m .、s . c . または i . p . で、本明細書において提供される抗原提示細胞標的免疫抑制剤のいずれか 1 つ、例えば例のいずれか 1 つ（これもまた、それぞれ i . v .、i . m .、s . c . または i . p . で投与される）と共に、例えばこれと同時に、投与される。投与は、少なくともウイルス導入ベクターおよび抗原提示細胞標的免疫抑制剤の頻度および用量を含む対象において抗ウイルス導入ベクター減弱応答を確立するプロトコルに従って行われる。対象は、本明細書において記載される対象のいずれか、例えばウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を有しない対象、またはウイルス導入ベクターの反復投与が所望される対象であってよい。

10

【 0 3 3 0 】

幾つかの態様において、抗ウイルス導入ベクター減弱応答が、ウイルス導入ベクターに対する T 細胞応答である場合、ウイルス導入ベクターは、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとの共投与の前に、抗原提示細胞標的免疫抑制剤なしで対象に投与される。かかる態様において、ウイルス導入ベクターの 1 以上の反復投薬が、共投与、およびその前のウイルス導入ベクターの投与の両方の後で、対象に投与される。

幾つかの態様において、抗ウイルス導入ベクター減弱応答が、ウイルス導入ベクターに対する B 細胞応答である場合、対象は、ウイルス導入ベクターと抗原提示細胞標的免疫抑制剤との共投与の前に、ウイルス導入ベクターを投与されない。かかる態様において、ウイルス導入ベクターの 1 以上の反復投薬が対象に投与され、各反復投薬は、抗原提示細胞標的免疫抑制剤と共に投与される。

20

【 0 3 3 1 】

他の態様において、抗ウイルス導入ベクター減弱応答が、抗ウイルス導入ベクター抗体応答である場合、対象は、ウイルス導入ベクターと抗原提示細胞標的免疫抑制剤との共投与の前にウイルス導入ベクターを投与されない。かかる態様において、ウイルス導入ベクターの 1 以上の反復投薬が対象に投与され、各反復投薬は、抗原提示細胞標的免疫抑制剤と共に投与される。

【 0 3 3 2 】

抗体のレベルを決定するための方法は、ELISA アッセイの使用によるものであってよい。抗原特異的な B 細胞または T 細胞のリコール応答についてのアッセイとして、これらに限定されないが、ELISpot、細胞内サイトカイン染色、細胞増殖、およびサイトカイン産生アッセイが挙げられる。

30

態様のいずれか 1 つにおいて、ウイルス導入ベクターと抗原提示細胞標的免疫抑制剤との共投与の後で、抗ウイルス導入ベクター減弱応答を評価する。

態様のいずれか 1 つにおいて、抗ウイルス導入ベクター減弱応答を確立するためのプロトコルを決定することができる。かかる態様において、プロトコルは、別の対象、例えば試験対象において決定する。そのようにして決定されたプロトコルを、ウイルス導入ベクターによる処置を必要とする他の対象を処置するために用いることができる。

【 0 3 3 3 】**例 4 5：ウイルス導入ベクターの投与前の対象における既存の免疫のレベルの決定（仮想）**

40

血液試料などの試料は、本明細書において提供されるようなウイルス導入ベクター（例えば、本明細書において提供されるウイルス導入ベクターのいずれか 1 つのウイルス導入ベクター、例えば例のいずれか 1 つにおけるもの）による処置を必要とする対象から、得ることができる。

対象からの試料により、中和抗体などの抗体のレベル、または T 細胞もしくは B 細胞などの免疫細胞の抗原リコール応答を決定することができる。抗体のレベルを決定するための方法は、ELISA アッセイの使用によるものであってよい。抗原特異的な B 細胞または T 細胞のリコール応答についてのアッセイとして、これらに限定されないが、ELISpot、細胞内サイトカイン染色、細胞増殖、およびサイトカイン産生アッセイが挙げられる。リコール応答は、試料を、ウイルス導入ベクターまたはその抗原と接触させることにより、評

50

価することができる。あるいは、リコール応答はまた、対象へのウイルス導入ベクターまたはその抗原の投与の後で対象から試料を採取して、次いで、生じた抗体のレベルまたはB細胞もしくはT細胞リコール応答を決定することによっても、評価することができる。

【0334】

幾つかの態様において、対象が、ウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を有しないことが、対象における抗ウイルス導入ベクター抗体のレベル（またはB細胞応答）の測定により決定される場合、対象は、i.v.、i.m.、s.c.またはi.p.で、本明細書において提供されるウイルス導入ベクターのいずれか1つ（例えば例のいずれか1つにおけるもの）を、本明細書において提供される抗原提示細胞標的免疫抑制剤のいずれか1つ（例えば例のいずれか1つにおけるもの）と共に、例えば同時に、投与される。抗原提示細胞標的免疫抑制剤は、同じ経路により投与される。

10

【0335】

他の態様において、対象が、ウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を有しないことが、対象におけるウイルス導入ベクターに対するT細胞応答のレベルにより決定される場合、抗原提示細胞標的免疫抑制剤とウイルス導入ベクターとを、i.v.、i.m.、s.c.またはi.p.で、対象に、対象がウイルス導入ベクターの用量を、抗原提示細胞標的免疫抑制剤の共投与なしで投与された後で、共に、例えば同時に、投与する。

態様のいずれか1つにおいて、ウイルス導入ベクターの1以上の反復投薬を、対象に投与する。これらの反復投薬は、抗原提示細胞標的免疫抑制剤と共投与されてもよい。

【0336】

20

例46：対象におけるウイルス導入ベクターの導入遺伝子発現の増大（仮想）

本明細書において提供されるウイルス導入ベクターのいずれか1つ（例えば例のいずれか1つにおけるもの）を、i.v.、i.m.、s.c.またはi.p.で、導入遺伝子発現（ウイルス導入ベクターにより送達されている導入遺伝子）を増大させる頻度および投薬に従って、本明細書において提供される抗原提示細胞標的免疫抑制剤のいずれか1つ（例えば例のいずれか1つにおけるもの）と、共に、例えば同時に、投与する。このことは、対象における多様な目的の組織または系において、導入遺伝子タンパク質濃度を測定することにより、決定することができる。導入遺伝子発現が増大するか否かは、上の例において記載されるものなどの方法に従って決定することができる。投与は、対象において導入遺伝子発現を増大するウイルス導入ベクターおよび抗原提示細胞標的免疫抑制剤の頻度および用量に従って行う。対象は、本明細書において記載される対象のいずれか、例えばウイルス導入ベクターに対する既存の免疫を有しない対象、またはウイルス導入ベクターの繰り返し投与が所望される対象であってよい。

30

【0337】

態様のいずれか1つにおいて、導入遺伝子発現の増大を達成する頻度および用量を、別の対象、例えば試験対象において決定する。このことはまた、上記の方法などにより、当該他の対象の多様な組織または系における導入遺伝子タンパク質の濃度を測定することにより決定することができる。頻度および用量が導入遺伝子発現の増大を達成することが、測定された導入遺伝子タンパク質の濃度により決定される場合、当該頻度および用量に従うウイルス導入ベクターおよび抗原提示細胞標的免疫抑制剤の共投与、例えば同時投与を、ウイルス導入ベクターによる処置を必要とする他の対象を処置するために用いることができる。

40

【0338】

例47：より低い用量での反復共投与（仮想）

本明細書において提供されるとおり、対象を、本明細書において提供されるウイルス導入ベクターのいずれか1つ（例えば例のいずれか1つのウイルス導入ベクターのいずれか1つ）に対する既存の免疫のレベルについて評価してもよい。あるいは、医師は、対象を評価して、ウイルス導入ベクターを対象に反復投与した場合に、ウイルス導入ベクターを投与した場合に、対象が抗ウイルス導入ベクター免疫応答を生じることが予測されるか否かを決定してもよい。この決定は、ウイルス導入ベクターがかかる結果をもたらすである

50

う可能性に基づいていてもよく、他の対象、例えば試験対象におけるかかる結果、ウイルス導入ベクターを作製するために用いられるウイルスについての情報、対象についての情報などに基づいていてもよい。一般に、予測が、抗ウイルス導入ベクター免疫応答が起こる可能性が高いというものである場合、医師は、予測の結果として、ウイルス導入ベクターの特定の用量を選択する。しかし、本発明者の知見を考慮すると、医師は、今や、対象について選択されたであろうものよりも低い用量のウイルス導入ベクターを選択して使用することができる。より低い用量の利益として、ウイルス導入ベクターの投薬に関連する毒性の軽減、およびオフ・ターゲット効果の減少が挙げられ得る。

【0339】

したがって、本明細書において提供される対象のいずれかを、本明細書において提供されるウイルス導入ベクターのいずれか1つと、本明細書において提供される抗原提示細胞標的免疫抑制剤のいずれか1つとの、反復共投与、例えば同時投与で処置することができ、ここで、ウイルス導入ベクターの用量は、対象がウイルス導入ベクターの反復投薬に起因して抗ウイルス導入ベクター免疫応答を生じることが予測された場合に対象について選択されたであろうウイルス導入ベクターの用量よりも低くなるように選択される。反復共投与のウイルス導入ベクターの各用量は、他で選択されたであろうものより低くてもよい。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

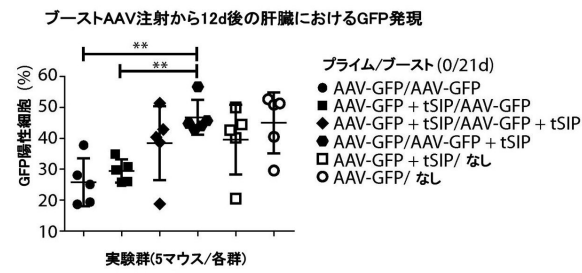


図 1

【図 2】

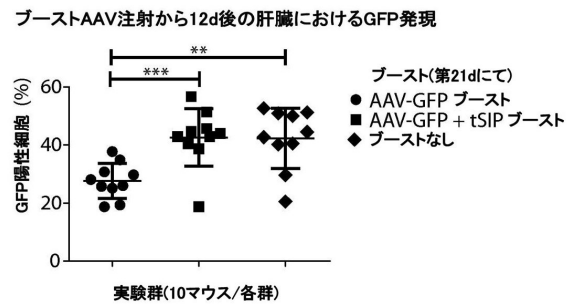


図 2

【図 3】

AAV-GFPによるブーストから12d後の高GFP発現の肝細胞

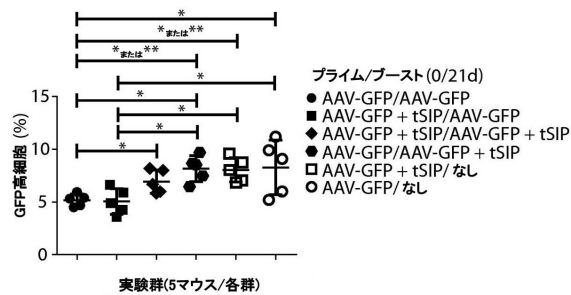


図 3

【図 4】

AAV Ab; 最大OD (d14)

AAV (1×10^{10} vg) $\pm$ tSIP (i.v.)による単回免疫

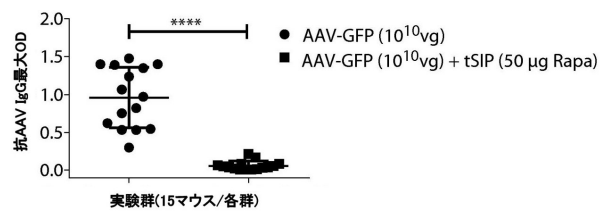


図 4

【図 5】

tSIPありまたはなしの単回注射(i.v.)後のAAVに対する抗体の誘導

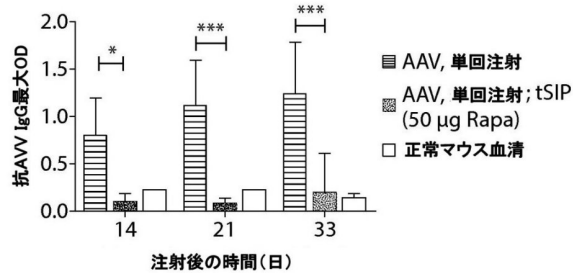


図 5

【図 6】

プライム-ブースト免疫±tSIP後のAAVに対する抗体

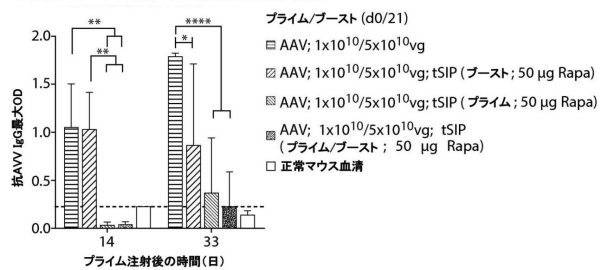


図 6

10

20

30

40

50

【図 7】

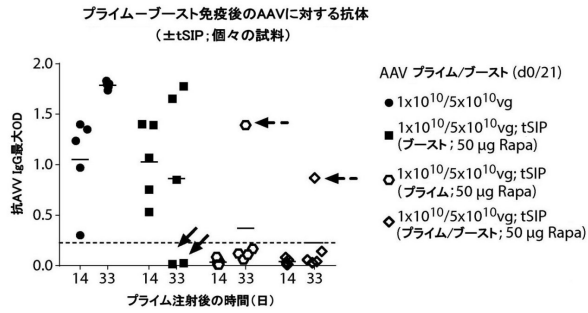


図 7

【図 8】

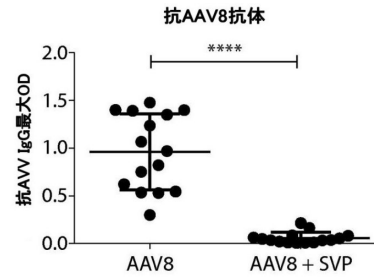


図 8

10

【図 9】

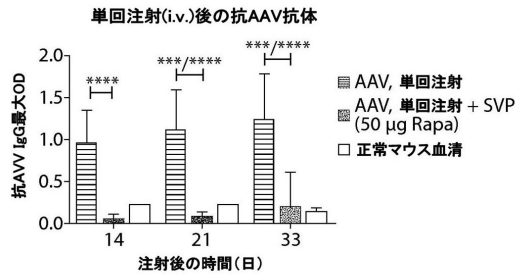


図 9

【図 10】

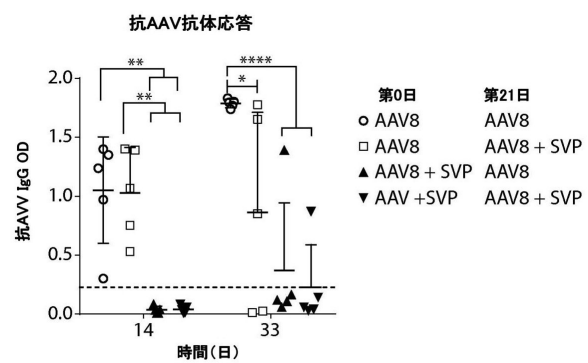


図 10

20

【図 11】

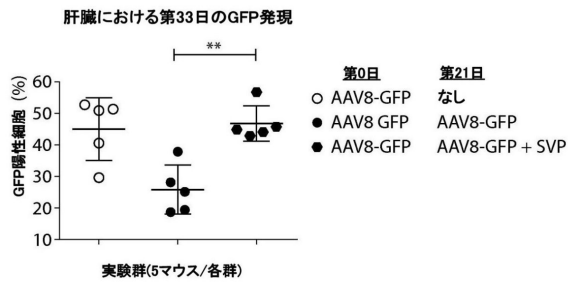


図 11

【図 12】

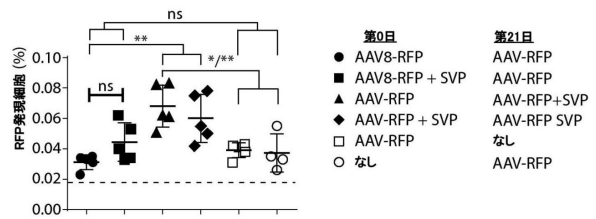


図 12

30

40

50

【図 13】

AAVおよびGFPからのMHC-Iエピトープに対するCTL活性

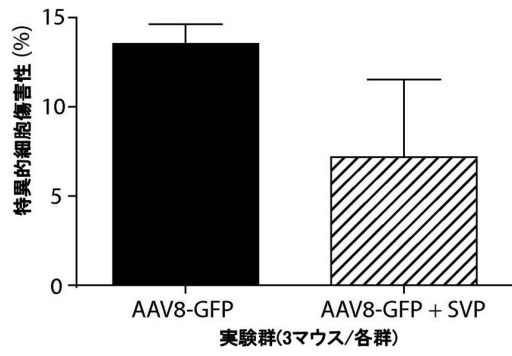


図 13

【図 14】

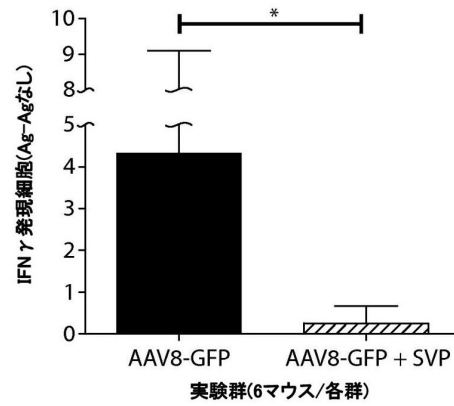
AAVカプシドMHCクラスIペプチドに対するT細胞リコール応答
(7dのin vitro刺激; 250,000細胞/ウェル)

図 14

【図 15】

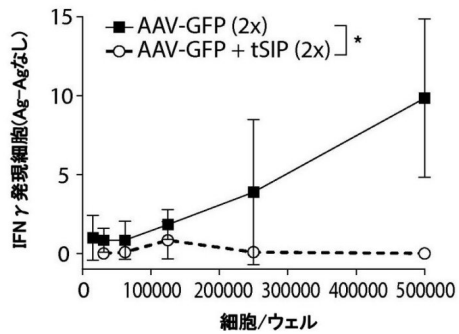
Elispot; GFP優勢ペプチド
(7dのin vitro刺激)

図 15

【図 16】

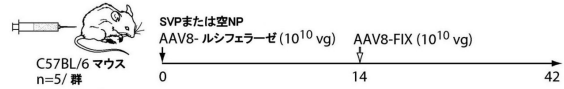


図 16

10

20

30

40

50

【図 17】

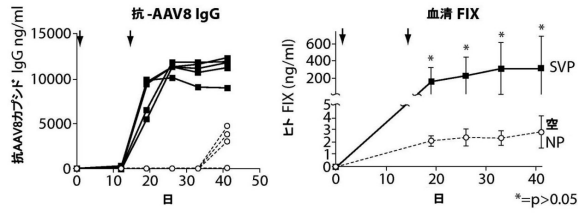


図 17

【図 18】



図 18

【図 19】

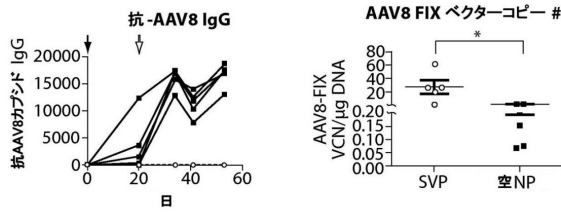


図 19

【図 20】

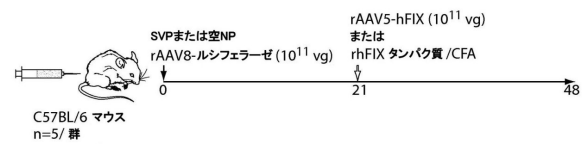


図 20

【図 21】

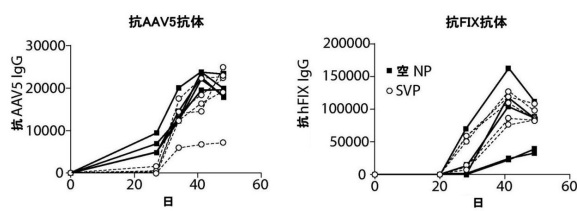


図 21

【配列表】

0007242180000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I
A 6 1 P 37/06 (2006.01) A 6 1 P 37/06

(31)優先権主張番号 62/051,267

(32)優先日 平成26年9月16日(2014.9.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/051,263

(32)優先日 平成26年9月16日(2014.9.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/047,051

(32)優先日 平成26年9月7日(2014.9.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/051,255

(32)優先日 平成26年9月16日(2014.9.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/047,054

(32)優先日 平成26年9月7日(2014.9.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/047,034

(32)優先日 平成26年9月7日(2014.9.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/047,044

(32)優先日 平成26年9月7日(2014.9.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/101,861

(32)優先日 平成27年1月9日(2015.1.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/101,882

(32)優先日 平成27年1月9日(2015.1.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/051,258

(32)優先日 平成26年9月16日(2014.9.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/101,872

(32)優先日 平成27年1月9日(2015.1.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02420、レキシントン、クーリッジ アヴェニュー 46

合議体

審判長 岡崎 美穂

審判官 富永 みどり

審判官 馬場 亮人

(56)参考文献 国際公開第02/09770 (WO, A1)

特表2013-541504 (JP, A)

特表2012-515722 (JP, A)

特表2014-513092 (JP, A)

特表平10-507758 (JP, A)

特表2012-512175 (JP, A)

特表2017-527571 (JP, A)

特表2017-529342 (JP, A)

特表2017-527565 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K48/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Caplus/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE (STN)