

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-530571

(P2021-530571A)

(43) 公表日 令和3年11月11日(2021.11.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	4 C 0 7 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/69 (2017.01)	A 6 1 K 47/69	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2021-526207 (P2021-526207)	(71) 出願人	511254321
(86) (22) 出願日	令和1年7月16日 (2019.7.16)		セレクト バイオサイエンス インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	令和3年3月17日 (2021.3.17)		SELECTA BIOSCIENCES, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/042073		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(87) 国際公開番号	W02020/018587		2 4 7 2、ウォータータウン、グローブ
(87) 国際公開日	令和2年1月23日 (2020.1.23)		ストリート 65
(31) 優先権主張番号	62/839, 761		65 Grove Street, Watertown, MA 02472, United States of America
(32) 優先日	平成31年4月28日 (2019.4.28)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/698, 528		
(32) 優先日	平成30年7月16日 (2018.7.16)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 MMA コンストラクトおよびベクターの方法および組成物

(57) 【要約】

本明細書において提供されるのは、メチルマロニルCoAムターゼ(MUT)をコードする核酸、ならびに関連するベクター、例えばAAVベクターおよびAnc80ベクターに関する、方法および組成物である。また、提供されるのは、有機酸血症に関連する酵素をコードする配列および発現制御配列を含むウイルスベクターを、免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアと組み合わせて投与するための方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有機酸血症を有するか、またはこれを有することが疑われる対象に、AAVベクターまたはAnc80ベクターなどのウイルスベクターと、免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアとを、同時に投与することを含む方法であって、ウイルスベクターが、有機酸血症に関連する酵素をコードする配列および1つ以上の発現制御配列を含む、前記方法。

【請求項 2】

ウイルスベクターが、AAV2、AAV8、Anc80、AAV2/Anc80またはAAV8/Anc80ベクターである、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

有機酸血症が、メチルマロン酸血症(MMA)である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

ウイルスベクターと、免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアとが、ウイルスベクターに対する体液性および/または細胞性免疫応答を低下させるための有効量におけるものである、請求項1〜3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

対象が、小児の対象である、請求項1〜4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

対象が、ウイルスベクターと、免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアとを同時に先に投与されている、請求項1〜5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

その後の時点においてウイルスベクターを対象に投与することをさらに含む、請求項1〜6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

ウイルスベクターと、免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアとの同時投与が繰り返される、請求項1〜7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

メチルマロン酸血症(MMA)に関連する酵素が、メチルマロニルCoAムターゼ(MUT)である、請求項1〜8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

配列が、野生型MUTをコードする、請求項1〜9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

1つ以上の発現制御配列が、肝臓特異的プロモーターを含む、請求項1〜10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

1つ以上の発現制御配列が、構成的プロモーターを含む、請求項1〜10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

免疫抑制剤が、ラパマイシンを含む、請求項1〜12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

免疫抑制剤が、合成ナノキャリア中にカプセル化されている、請求項1〜13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

合成ナノキャリアが、ポリマー性ナノ粒子を含む、請求項1〜14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

ポリマー性ナノ粒子が、ポリエステルまたはポリエーテルに結合したポリエステルを含む、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

ポリエステルが、ポリ(乳酸)、ポリ(グリコール酸)、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)またはポリカプロラク톤を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

ポリマー性ナノ粒子が、ポリエステルおよびポリエーテルに結合したポリエステルを含む、請求項16または17に記載の方法。

【請求項19】

ポリエーテルが、ポリエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールを含む、請求項16～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

動的光散乱を用いて得られた合成ナノキャリアの集合の粒子サイズ分布の平均が、110nmより大きな直径である、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項21】

直径が、150nmより大きい、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

直径が、200nmより大きい、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

直径が、250nmより大きい、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

直径が、5 μ m未満である、請求項20～23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

直径が、4 μ m未満である、請求項24に記載の方法。 20

【請求項26】

直径が、3 μ m未満である、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

直径が、2 μ m未満である、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

直径が、1 μ m未満である、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

直径が、500nm未満である、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

直径が、450nm未満である、請求項29に記載の方法。 30

【請求項31】

直径が、400nm未満である、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

直径が、350nm未満である、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

直径が、300nm未満である、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

合成ナノキャリア中に含まれる免疫抑制剤のロードが、合成ナノキャリア全体での平均において、0.1%～50%(重量/重量)である、請求項1～33のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項35】

ロードが、0.1%～25%である、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

ロードが、1%～25%である、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

ロードが、2%～25%である、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

合成ナノキャリアの集合のアスペクト比が、1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7または1:10より大きい、請求項1～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項39】

対象が、肝臓または腎臓の酵素の発現を必要とする、請求項1～38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項40】

対象が、酵素をコードする配列および肝臓特異的プロモーターまたは構成的プロモーターを含む、AAV8ベクターまたはAnc80ベクターを投与される、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

対象が、酵素の腎臓での発現を必要としており、対象が、酵素および構成的プロモーターをコードするAnc80ベクターを投与される、請求項1～38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

対象が、同時投与の前に、測定可能なレベルの抗AAV抗体を有し、ウイルスベクターがAnc80ベクターである、請求項1～41のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項43】

ウイルスベクターが、本明細書において提供されるウイルスベクターのうちのいずれか1つである、請求項1～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

ウイルスベクターが、本明細書において提供される酵素および1つ以上の発現制御配列をコードする配列のうちのいずれか1つを含む、請求項1～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項45】

請求項1～44のいずれか一項に記載されるようなウイルスベクターのうちのいずれか1つの用量を含む、組成物。

20

【請求項46】

請求項1～44のいずれか一項に記載されるような合成ナノキャリアの用量をさらに含む、請求項45に記載の組成物。

【請求項47】

組成物が、キットである、請求項45または46に記載の組成物。

【請求項48】

キットが、使用のための説明をさらに含む、請求項47に記載の組成物。

【請求項49】

キットが、請求項1～44のいずれか一項に記載の方法を実施するための説明をさらに含む、請求項47に記載の組成物。

30

【請求項50】

本明細書において提供されるか、請求項1～44のいずれか一項に記載されるようなウイルスベクターのうちのいずれか1つを含む、組成物。

【請求項51】

本明細書において提供される核酸のうちのいずれか1つを含む、組成物。

【請求項52】

本明細書において提供される核酸を含むウイルスベクターを含む、組成物。

【請求項53】

本明細書において提供される酵素のうちのいずれか1つをコードする配列を、本明細書において提供されるプロモーターと共に含む、AAV2、AAV8、Anc80、AAV2/Anc80またはAAV8/Anc80ベクターを含む、組成物。

40

【請求項54】

プロモーターが、本明細書において提供される構成的プロモーターのうちのいずれか1つである、請求項53に記載の組成物。

【請求項55】

プロモーターが、本明細書において提供される肝臓特異的プロモーターのうちのいずれか1つである、請求項53に記載の組成物。

【請求項56】

50

配列が、ポリAテイルおよび/または本明細書において提供されるITRのうちのいずれか1つをさらに含む、請求項53～55のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項57】

配列が、本明細書において提供されるイントロンのうちのいずれか1つをさらに含む、請求項53～56のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項58】

配列が、本明細書において提供される転写後制御配列のうちのいずれか1つをさらに含む、請求項53～57のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項59】

本明細書において提供される方法のうちのいずれか1つにおける使用のための、請求項53～58に記載の組成物。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2018年7月16日に提出された米国仮出願シリアル番号62/698,528、および2019年4月28日に提出された米国仮出願シリアル番号62/839,761の35 U.S.C. § 119(e)下における利益を主張し、当該仮出願の各々の全内容は、本明細書において参考として援用される。

【背景技術】

20

【0002】

発明の分野

本発明は、メチルマロニルCoAムターゼ(MUT)をコードする核酸、ならびに関連するベクター、例えばAAV、Anc80およびAAV/Anc80ベクターに関する、方法および組成物に関する。また、提供されるのは、メチルマロン酸血症などの有機酸血症(organic acidemia)に関連する酵素をコードする配列および発現制御配列を含むウイルスベクターを、免疫抑制剤へ連結した(coupled to)合成ナノキャリアと組み合わせて投与方法である。

【発明の概要】

【0003】

発明の要旨

30

本明細書において提供されるのは、メチルマロニルCoAムターゼ(MUT)をコードする核酸、ならびに関連するウイルスベクターに関する、方法および組成物である。また、本明細書において提供されるのは、メチルマロン酸血症(MMA)などの有機酸血症に関連する酵素をコードする配列、および1つ以上の発現制御配列を含むウイルスベクターを、免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアと組み合わせて投与方法のための、方法および組成物である。本明細書において提供される組成物または方法のうちのいずれか1つの一態様において、ウイルスベクターは、野生型MUTをコードする。免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアと組み合わせてのウイルスベクターの投与は、本明細書において提供される目的のいずれか1つのために、本明細書において提供される方法または組成物のうちのいずれか1つにおいて、治療上の利益を有し得る。

40

【0004】

別の側面において、例のいずれか1つにおいて記載されるような方法または組成物が提供される。一態様において、組成物は、例において提供されるウイルスベクターのうちのいずれか1つを含む。

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。

【0005】

別の側面において、方法または組成物のいずれか1つは、本明細書において記載される疾患または障害のいずれか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、方法または組成物のいずれか1つは、ウイルス抗原および/またはウイルスベ

50

クターの発現生成物に対する免疫応答(すなわち、体液性および/または細胞性)を低下させること、酵素をコードする配列の発現を増大させることにおける使用のため、またはAAVベクターの繰り返し投与のためのものである。

【図面の簡単な説明】

【0006】

図の簡単な記載

【図1】図1は、例示的なmRNAコンストラクトを表す模式図である。

【図2】図2は、apoE-hAAT-synMUT4を含む肝臓特異的コンストラクトを表す。略語は、以下のとおりである：アポリポタンパク質E、ApoE；hAAT、ヒトアルファ-1-アンチトリプシン；HBB-2、ヘモグロビンサブユニットベータ-2。

【図3】図3は、EF α long-synMUT4を含む、例示的な構成的プロモーターコンストラクトを表す模式図である。下の模式図は、プロモーター(EF1 α 、伸長因子1アルファ1)と導入遺伝子(synMUT4)とが、イントロン(HBB-2、ヘモグロビンサブユニットベータ-2)により分離されている場合を示す。上の模式図は、イントロンなしの同じコンストラクトを説明する。両方のコンストラクトを、rAAV8において、およびAnc80において形成させた。

【図4】図4は、apoE-hAAT(short)-HBB2-synMUT4を含む例示的な肝臓特異的プロモーターコンストラクトを表す模式図である。各々は、イントロン(HBB-2、ヘモグロビンサブユニットベータ-2)および/または転写制御エレメント(ヒト転写後制御エレメント、HPRE)を含むか、またはこれらを含まない。

【図5】図5は、apoE-hAAT(short)-HBB2-synMUT4を含む例示的な構成的プロモーターコンストラクトを表す模式図である。各々は、イントロン(HBB-2、ヘモグロビンサブユニットベータ-2)および/または転写制御エレメント(ヒト転写後制御エレメント、HPRE)を含むか、またはこれらを含まない。

【図6】図6は、EF1 α (short)-synMUT4を含む、2つの構成的プライマーコンストラクトを表す模式図である。いずれも、プロモーターと導入遺伝子との間に合成(SYN)イントロンを有し、下の模式図は、導入遺伝子とポリAテイルとの間の制御エレメント(HPRE)を示す。

【図7】図7は、様々なコンストラクトを用いた遺伝子導入の48時間後の、Huh7細胞におけるプラスミドDNAのFACSの結果を示す：Huh7細胞対照、rAAV2-CB7-CI-eGFP-WPRE-rBG MOI 1E4、AAV2/2-CMV-EGFP-WPRE.bGH (A646) MOI 1E4、AAV2/2-CMV-EGFP-WPRE.bGH (A646) MOI 1E5、AAV2/Anc80 AAP.-CMV-EGFP-WPRE.bGH (A915) MOI 1E5、AAV2/Anc80 AAP.-CMV-EGFP-WPRE.bGH (A915) MOI 1E6およびAAV2/Anc80 AAP.-CMV-EGFP-WPRE.bGH (A915) MOI 2E6。

【図8】図8は、肝臓試料中のsynMUT4発現を表すグラフである。

【図9】図9は、腎臓試料中のsynMUT4発現を表すグラフである。

【図10】図10は、肝臓におけるsynMUT4の生体分布を示すグラフである。

【0007】

【図11】図11は、Anc80参照標準を決定するための分析的超遠心分離法のプロセスを説明する模式図である。

【図12】図12は、図11において記載されるAnc80参照標準の決定のグラフによる結果を示す。

【図13】図13は、メチルマロニルCoAムターゼ(MUT)欠損マウスにおける、300 μ gのImmTORナノ粒子の投与の後の、メチルマロン酸(MMA)およびアルカリホスファターゼ(ALK)のレベルを示す。(D0=第0日、投与；D12=第12日。D30=第30日；ns=有意ではない；* $=P<0.05$)。

【図14】図14は、メチルマロニルCoAムターゼ(MUT)欠損マウスにおける、Anc80-MUTベクター(2.5×10^{12} vg/kg)および100 μ gまたは300 μ gの免疫寛容誘導性(immune tolerance-inducing)合成ナノ粒子(ImmTOR)の投与後の、体重増加を示す。

【図15】図15は、MUT欠損マウスにおける、Anc80-ルシフェラーゼ(Anc80-Luc)ベクター(5.0×10^{10} vg/kg)の投与、またはAnc80 AAVベクターと100 μ gのImmTORナノ粒子との共投

10

20

30

40

50

与の後の、抗Anc80抗体のレベルを示す。(D0=第0日、投与または共投与；D14=第14日；D28=第28日；n=5/群)。

【図16】図16は、MUT欠損マウスにおける、Anc80-MUTベクター(2.5×10^{12} vg/kg)の投与、またはAnc80-MUTベクターと100 μ gもしくは300 μ gのImmTORナノ粒子との共投与の14および30日後の、メチルマロン酸(MMA)のレベルを示す。(第14日群についてはn=11~14マウス/群；第30日群についてはn=12~14マウス/群；*=P<0.05；**=P<0.01；***=P<0.005)。

【図17】図17は、MUT欠損マウスにおける、Anc80-MUTベクター(2.5×10^{12} vg/kg)の投与、またはAnc80-MUTベクターと100 μ gまたは300 μ gのImmTORナノ粒子との共投与の後の、細胞1つあたりのAnc80-MUTベクターゲノムの数を示す。(n=4~6マウス；M=オスマウス、F=メスマウス；*=P<0.05)。

【図18】図18は、MUT欠損マウスにおける、Anc80-MUTベクター(2.5×10^{12} vg/kg)の第2の投与、またはAnc80-MUTベクターと100 μ gのImmTORナノ粒子との共投与の後の、体重増加を示す。(Anc80のみ：n=7マウス；Anc80+ImmTOR：n=9マウス；*=P<0.05；**=P<0.001)。

【図19】図19は、MUT欠損マウスにおける、Anc80-MUTベクターの第1および第2の用量、またはAnc80-MUTベクターと100 μ gもしくは300 μ gのImmTORナノ粒子との共投与の後の、抗Anc80抗体(IgG)のレベルを示す。

【図20】図20は、MUT欠損マウスにおける、Anc80-MUTベクターの第1および第2の用量、またはAnc80-MUTベクターと100 μ gもしくは300 μ gのImmTORナノ粒子との共投与の後の、メチルマロン酸(MMA)のレベルを示す(Anc80のみ：n=13マウス；Anc80+100 μ gのImmTOR：n=15；Anc80+300 μ gのImmTOR：n=12)。

【0008】

【図21】図21は、MUT欠損マウスにおける、Anc80-MUTベクターの第1および第2の用量、またはAnc80-MUTベクターと100 μ gもしくは300 μ gのImmTORナノ粒子との共投与の後の、メチルマロン酸(MMA)のパーセンテージを示す。第2の用量は、第56日に投与した。(n=4~7、*=P<0.05；**=P<0.01)。

【図22】図22は、Anc80-Luc AAVベクターの第1の用量(5.0×10^{10} vg/kg)と300 μ gのImmTORナノ粒子との共投与と、その後のAnc80 AAVベクターの第2の用量(2.5×10^{12} vg/kg)のための1つの投与スキーム、ならびに、Anc80-Luc AAVベクターの第1の用量(5.0×10^{10} vg/kg)と300 μ gのImmTORナノ粒子との共投与と、その後のAnc80 AAVベクターの第2の用量(2.5×10^{12} vg/kg)と300 μ gのImmTORナノ粒子のための第2の投与スキームを示す。第1の投与は、第0日(d0)であり、第2の投与は、第47日(d47)である。(MMA=メチルマロン酸；Abs=不在；n=6/群)。

【図23】図23は、MUT欠損マウスにおける、図22の第1または第2の投与スキームの投与の後の、抗Anc80抗体のレベルを示す。(d0=第0日、第1の用量の日；d12=第12日；d30=第30日；2-d1(第2の用量の日；第1の用量の47日後)；2-d12(第2の用量の12日後)；2-d30(第2の用量の30日後))。

【図24】図24は、図22において記載されるとおりの第2の用量の投与の後の、MUT欠損マウスにおけるメチルマロン酸(MMA)のレベルを示す。Luc-SVP+wtMUT群は、Anc80 AAVベクター(2.5×10^{12} vg/kg)のみを含む第2の用量を投与され、一方、Luc-SVP+wtMUT-ImmTOR 300 μ g群は、Anc80 AAVベクター(2.5×10^{12} vg/kg)および300 μ gのImmTORナノ粒子を含む第2の用量を投与された。(2-D0=第2の用量の日、第1の用量の47日後；2-D12=第2の用量の12日後；****=P<0.001)。

【図25】図25は、MUT欠損マウスにおける、図22の第1または第2の投与スキームの投与の後の、メチルマロン酸(MMA)のレベルを示す。(D0=第0日、第1の用量の日；D12=第1の用量の12日後；D30=第1の用量の30日後；2-D0=第2の用量の日、第1の用量の47日後；2-D12=第2の用量の12日後；*=P<0.05；**=P<0.01；****=P<0.001)。

【図26】図26は、母系伝達された抗Anc80抗体を有するMUT欠損マウスにおける、Anc80-MUTベクターの投与の前から後への、抗Anc80抗体(IgG)のレベルを示す(n=17)。

【図 2 7】図27は、母系伝達された抗Anc80抗体を有するMUT欠損マウスにおける、Anc80ベクター(5.0×10^{12} vg/kg)の投与、またはAnc80-MUTベクターと100 μ gまたは300 μ gのImmTORナノ粒子との共投与の後の、メチルマロン酸(MMA)のレベルを示す。(「X」は、死亡したマウスを指し、Anc80-MUTのみについてはn=3マウスであり、Anc80-MUT+100 μ gのImmTORについてはn=5であり、Anc80-MUT+300 μ gのImmTORについてはn=7である)。

【図 2 8】図28は、母系伝達された抗Anc80抗体を有するMUT欠損マウスにおける、Anc80-MUTベクターの第1および第2の用量、またはAnc80-MUTベクターと100 μ gもしくは300 μ gのImmTORナノ粒子との共投与の後の、メチルマロン酸(MMA)のレベルを示す。(「X」は、死亡したマウスを指し、Anc80-MUTのみについてはn=3マウスであり、Anc80-MUT+100 μ gのImmTORについてはn=5であり、Anc80-MUT+300 μ gのImmTORについてはn=7である)。

【図 2 9】図29は、母系伝達された抗Anc80抗体を有するMUT欠損マウスにおける、Anc80-MUTベクターの第1および第2の用量、またはAnc80-MUTベクターと100 μ gもしくは300 μ gのImmTORナノ粒子との共投与の後の、FGF21のレベルを示し(「X」は、死亡したマウスを指し、Anc80-MUTのみについてはn=6マウスであり、Anc80-MUT+100 μ gのImmTORについてはn=7であり、Anc80-MUT+300 μ gのImmTORについてはn=10である)、各々の群における、第21日における第2の注射まで、および第30日まで生存したマウスの数を、括弧内に示す。

【図 3 0】図30は、母系伝達された抗Anc80抗体を有するMUT欠損マウスにおける、Anc80-MUTベクターの第1および第2の用量、またはAnc80-MUTベクターと100 μ gもしくは300 μ gのImmTORナノ粒子との共投与の後の、抗Anc80抗体(IgG)のレベルを示す。

【図 3 1】図31は、MUT欠損マウスにおける、Anc80-MUTベクター(5.0×10^{12} vg/kg)の第1および第2の投与、またはAnc80-MUTベクターと100 μ gのImmTORナノ粒子との共投与の後の、体重増加を示す。(「X」は、死亡したマウスを指し、Anc80-MUTのみについてはn=3マウスであり、Anc80-MUT+100 μ gのImmTORについてはn=5であり、Anc80-MUT+300 μ gのImmTORについてはn=7である)。

【発明を実施するための形態】

【0009】

【表 A】

略語	語義
ITR-2	逆位末端反復配列 2
ApoE	アポリポタンパク質 E
hAAT long	ヒトアルファ-1-アンチトリプシン
HBB-2	ヘモグロビンサブユニットベータ-2
synMUT4	合成メチルマロニル CoA ムターゼ 4
Poly A	ポリアデニル化
Abx: Kana	カナマイシン抗体
EF1 α long	伸長因子 1 アルファ 1
HPRE	ヒト転写後制御
SYN	合成イントロン
Huh-7	ヒト肝臓細胞
CB-7	ニワトリ β アクチン
EGFP	操作された緑色蛍光タンパク質
WPRE	ウッドチャック肝炎ウイルス転写後制御エレメント
CMV	サイトメガロウイルス
MOI	感染多重度

【0010】

発明の詳細な説明

本発明を詳細に記載する前に、本発明が、特に例示される材料またはプロセスのパラメ

ーターに限定されず、当該材料またはプロセスのパラメーターは、それ自体が変化し得ることが、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専門用語は、発明の特定の態様を記載することを目的とするものであり、本発明を記載するための代替的な専門用語の使用の限定を意図するものではない。

【0011】

本明細書において、上または下のいずれであっても、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、援用される、本明細書において引用される刊行物、特許および特許出願のいずれかが、先行技術を構成することを認定することを意図しない。

10

【0012】

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、内容が明らかに他を指定しない限り、単数形「a」、「an」および「the」は、複数の指示物を含む。例えば、「a polymer」への言及は、2つ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、「a synthetic nanocarrier」への言及は、2つ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、「a DNA molecule」への言及は、2つ以上のかかるDNA分子の混合物または複数のかかるDNA分子を含み、「an immunosuppressant」への言及は、2つ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。

【0013】

本明細書において用いられる場合、用語「含む(comprise)」またはそのバリエーション、例えば「含む(comprises)」もしくは「含むこと(comprising)」は、任意の列挙される完全体(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(a feature, element, characteristic, property, method/process step or limitation))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(features, elements, characteristics, properties, methods/process steps or limitations))の包含を示すように読まれるべきであるが、任意の他の完全体または完全体の群の除外を示すように読まれるべきではない。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、列挙されない完全体または方法/プロセスステップを除外するものではない。

20

30

【0014】

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)」と置き換えることができる。句「～から本質的になる(consisting essentially of)」は、本明細書において、特定の完全体もしくはステップ、または請求される発明の特徴もしくは機能に物質的に影響を及ぼさないものを必要とするように用いられる。本明細書において用いられる場合、用語「～からなる(consisting)」は、列挙される完全体(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(a feature, element, characteristic, property, method/process step or limitation))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(features, elements, characteristics, properties, methods/process steps or limitations))のみの存在を示すように用いられる。

40

【0015】

A. 導入

有機酸血症(有機酸性尿症)は、正常なアミノ酸代謝が妨げられる代謝障害の1つのグループを説明する。当該障害は、一般に、正常では存在しないアミノ酸の蓄積をもたらし、典型的には、イソロイシン、ロイシンおよびバリンなどの分枝鎖アミノ酸の代謝の妨害により引き起こされる。4つの主な型の有機酸血症が存在する：メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症、イソ吉草酸血症、およびメーブルシロップ尿症。メチルマロン酸血症(MMA)は、メチルマロニルCoAムターゼ(MUT)の変異により頻繁に引き起こされる、一般的かつ

50

重篤な有機酸血症である。MMAは、常染色体劣性障害であり、メチルマロン酸の蓄積をもたらす。重篤に罹患した患者は、肝臓移植から恩恵を受けることができ、腎不全により、腎臓移植を必要とする場合もある。

【0016】

例として、ヒトMUT4導入遺伝子を発現する一連のAnc80およびAAVベクターコンストラクトを開発した。肝臓特異的プロモーターまたは構成的プロモーターのいずれかを用いるAnc80ベクターは、野生型マウスにおいて、類似のレベルのMUT発現を有し、一方で、構成的プロモーターを有するAnc80ベクターもまた、腎臓において顕著な発現を示すことが見出された。Anc80またはAAV8ベクターによる、 $5 \times 10^{11} \sim 6 \times 10^{12}$ GC/kgの用量における処置の後で、MMAの低形質マウスモデルは、成長の改善、循環代謝物のレベルの低下、およびMUT酵素活性の増大を示した。全てのベクターによるAAV遺伝子治療の効果は、12日間までに明らかであり、少なくとも1年間にわたり持続した。さらに、新生仔マウスに投与されたAnc80ベクター(1×10^{13} GC/kg)は、新生児期致死性の表現型を有するMMAのマウスモデルをレスキューすることにおいて有効であることが見出された。かかるコンストラクトのうちのいずれか1つを含む組成物が、本明細書においていくつかの側面において提供される。かかるコンストラクトのうちのいずれか1つを、本明細書において提供される方法および組成物のうちのいずれか1つにおいて用いることができる。

【0017】

加えて、ウイルスベクターは導入遺伝子発現などの多様な適用のための有望な治療剤である一方で、ウイルスベクターに対する細胞性および体液性の免疫応答が、特に繰り返し投与に関して、効力を減少させ、および/またはかかる治療剤を使用する能力を低下させ得ることに、留意する。実際に、ウイルス性の輸送ベクターに対する細胞性および体液性免疫応答は、当該ウイルス性の輸送ベクターの単回投与の後で生じ得る。これらの免疫応答は、抗体、B細胞およびT細胞の応答を含み、当該ウイルスベクターのウイルス抗原(ウイルスキャプシドまたはコートタンパク質またはこれらのペプチドなど)に対して特異的であり得る。ウイルス性輸送ベクターの繰り返し投与は、一般に免疫応答の増強をもたらすので、ウイルスベクター投与の後で、中和抗体の力価は増大し得、数年間にわたり高く維持され得、ウイルスベクターの投与の有効性を低下させ得る。さらに、多くの治療的適用について、ウイルスベクターの複数ラウンドの投与は、長期の利益のために必要とされるであろうこと、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なしでは、そうする能力は、再投与が必要とされる場合には特に、ひどく限定されることが予測されることが、理解される。

【0018】

提供されるのは、ラパマイシンなどの免疫抑制剤を含む生分解性合成ナノキャリアと組み合わせての投与のための、野生型MUT、MUT4遺伝子などを含むMUTをコードするアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターおよびAnc80ベクターである。かかる組み合わせは、抗体応答などの免疫応答を予防するために行い、これを用いることができる。したがって、本明細書において提供されるのは、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアと組み合わせて、野生型MUTをコードする配列または本明細書において提供されるコンストラクトのいずれか1つを含むAAVベクター、Anc80またはAAV/Anc80ベクターにより、対象を処置するための方法および組成物である。

【0019】

したがって、本発明者らは、驚くべきことに、かつ予想外に、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上記の課題および限定を解決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。

発明は、ここで、以下により詳細に記載されるであろう。

【0020】

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、対象に、薬理的

10

20

30

40

50

に有用な様式において、与えるかまたは分配することを意味する。当該用語は、「投与されることを引き起こすこと」を含むことを意図される。「投与されることを引き起こすこと」とは、直接的または間接的に、他者に、当該材料を投与させること、当該材料を投与する衝動を起こさせること、当該材料を投与するように奨励すること、当該材料を投与することを補助すること、当該材料を投与することを誘導するかまたは指示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つは、ウイルスベクターおよび免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアを同時に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む。いくつかの態様において、同時投与(concomitant administration)は、繰り返し行われる。なおさらなる態様において、同時投与は、同時の投与(simultaneous administration)である。「同時の(simultaneous)」とは、臨床家が、同じ時間または実質的に同じ時間における投与であって、所望される治療成績に対する影響に関して、投与の間の任意の時間を、実質的に無(nil)であるかまたは無視し得ると考えるものを意味する。いくつかの態様において、「同時の」とは、投与が、5、4、3、2、1分間、またはそれより短い時間の中で起こることを意味する。

【0021】

「有効量」とは、本明細書において提供されるような対象への投与のための組成物または投与形態に関して、対象において1つ以上の所望される結果、例えばウイルスベクターもしくはその発現生成物および/または効果的な導入遺伝子発現に対する免疫応答の低下または除去を提供する、組成物または投与形態の量を指す。有効量は、in vitroまたはin vivoでの目的のためのものであってよい。in vivoでの目的のために、量は、臨床家が、対象にとって临床上の利益を有し得ると考えるであろうものであってよい。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。

【0022】

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、いく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。有効量はまた、所望される治療エンドポイントまたは所望される治療結果をもたらす量であってもよい。有効量は、いくつかの態様において、対象において、ウイルスベクターのウイルス抗原および/または発現生成物などの抗原に対する免疫寛容原性免疫応答をもたらす。有効量はまた、導入遺伝子発現(ウイルスベクターにより送達される導入遺伝子)の増大をもたらし得る。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、局所的に測定しても全身で測定してもよい。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。

【0023】

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、免疫応答の低下または除去などの所望される免疫応答が、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ものである。提供される組成物および方法のいずれか1つの他の態様において、有効量は、免疫応答の低下または除去などの、測定可能な所望される免疫応答をもたらすものである。いく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、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。

【0024】

有効量は、無論、処置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、身体的条件、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(ある場合は)の性質；投与の具体的な経路、ならびに保健の実務家の知識および専門知識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。

【0025】

10

20

30

40

50

一般的に、本明細書において記載される免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアの用量は、約 $1\mu\text{g/kg}$ ～約 $100,000\mu\text{g/kg}$ の範囲であってよい。いくつかの態様において、用量は、約 0.01mg/kg ～約 100mg/kg の範囲であってよい。なお他の態様において、用量は、約 $1\mu\text{g/kg}$ ～ $100\mu\text{g/kg}$ 、約 0.01mg/kg ～約 10mg/kg 、約 25mg/kg ～約 50mg/kg 、約 50mg/kg ～約 75mg/kg または約 75mg/kg ～約 100mg/kg の範囲であってよい。一般的に、本明細書において記載されるベクターの用量は、 $1\cdot 10^8\sim 1\cdot 10^{14}\text{VG/kg}$ の範囲であってよい。いくつかの態様において、用量は、約 $1\cdot 10^9\sim 1\cdot 10^{13}\text{VG/kg}$ の範囲であってよい。なお他の態様において、用量は、約 $1\cdot 10^9\sim 1\cdot 10^{11}\text{VG/kg}$ または約 $1\cdot 10^{11}\sim 1\cdot 10^{13}\text{VG/kg}$ の範囲であってよい。

【0026】

「接着させる(attach)」または「接着している(attached)」または「連結させる(couple)」または「連結している(coupled)」(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。いく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、これらに限定されないが、電荷相互作用、親和性相互作用、金属配位、物理吸着、ホスト-ゲスト相互作用、疎水性相互作用、 π 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、磁気相互作用、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、カプセル化は、接着の一形態である。

【0027】

「平均」とは、本明細書において用いられる場合、別段に記述されない限り、算術平均を指す。

「同時に(concomitantly)」とは、2つ以上の材料/剤を、対象に、時間的に相関した様式において、好ましくは免疫応答の修飾をもたらすために十分に相関した時間において、投与することを意味し、およびさらにより好ましくは、2つ以上の材料/剤は、組み合わせて投与される。態様において、同時投与は、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、およびさらにより好ましくは1時間以内の、2つ以上の材料/剤の投与を包含する。態様において、材料/剤は、繰り返して同時に投与してもよい；すなわち、1回より多くの機会における同時投与である。

【0028】

「用量」とは、薬理的に、および/または免疫学的に活性な材料の、所与の時間にわたる対象への投与のための、特定の量を指す。一般的に、本発明の方法および組成物における免疫抑制剤および/またはウイルスベクターを含む合成ナノキャリアの用量とは、免疫抑制剤および/またはウイルスベクターを含む合成ナノキャリアの量を指す。あるいは、用量は、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアの用量に言及する場合には、所望される量の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、繰り返しの投与に関して用いられる場合、用量とは、繰り返される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。

【0029】

「カプセル化する」とは、物質の少なくとも一部を、合成ナノキャリア中に封入することを意味する。いくつかの態様において、物質は、合成ナノキャリア中に完全に封入される。他の態様において、カプセル化される物質のほとんどまたは全てが、合成ナノキャリアにとって外部である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。カプセル化は、吸収とは区別し得る。吸収は、物質のほとん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、合成ナノキャリアにとって外部である局所環境に暴露したままにする。

【0030】

「発現制御配列」は、発現に影響を及ぼし得る任意の配列であって、プロモーター、エンハンサーおよびオペレーターを含み得る。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、発現制御配列は、プロモーターである。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、発現制御配列は、肝臓特異的プロモーターまたは構成

10

20

30

40

50

的プロモーターである。「肝臓特異的プロモーター」とは、肝臓の細胞において、排他的にまたは優先的に発現をもたらすものである。「構成的プロモーター」とは、一般に活性であると考えられ、特定の細胞に対して排他的または優先的ではないものである。本明細書において提供される核酸またはウイルスベクターのうちのいずれか1つにおいて、プロモーターは、本明細書において提供されるプロモーターのうちのいずれか1つであってよい。

【0031】

「免疫抑制剤」とは、好ましくはAPC上でのその効果を通して、免疫寛容原性効果を引き起こし得る化合物を意味する。免疫寛容原性効果とは、一般に、全身性または局所的に、APCまたは他の免疫細胞による修飾であって、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減少させるか、これを阻害するか、またはこれを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つ以上の免疫エフェクター細胞における制御性の表現型を促進させるものである。例えば、制御性の表現型は、抗原特異的CD4+T細胞またはB細胞の産生、誘導、刺激または動員の阻害、抗原特異的抗体の産生の阻害、Treg細胞(例えばCD4+CD25highFoxP3+Treg細胞)の産生、誘導、刺激または動員などにより、特徴づけることができる。このことは、CD4+T細胞またはB細胞の、制御性の表現型への変換の結果であり得る。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の誘導の結果であり得る。一態様において、免疫抑制剤は、APCが抗原をプロセッシングした後の、APC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を妨害しないものである。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。

【0032】

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)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機能の阻害剤；P38阻害剤；6Bi o、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)；ロリプラムなどのホスホジエステラーゼ4阻害剤(PDE4)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-タンパク質共役型(coupled)受容体アゴニスト；G-タンパク質共役型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剤活性化受容体アンタゴニスト；ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体アゴニスト；ヒストンデアセチラーゼ阻害剤；カルシニューリン阻害剤；ホスファターゼ阻害剤；TGX-221などのPI3KB阻害剤；3-メチルアデニンなどのオートファジー阻害剤；アリール炭化水素受容体阻害剤；プロテアソーム阻害剤(PSI)；およびP2X受容体遮断薬などの酸化型ATP。免疫抑制剤はまた、以下を含む：IDO、ビタミンD3、レチノイン酸、シクロスポリンAなどのシクロスポリン、アリール炭化水素受容体阻害剤、レスベラトロール、アザチオプリン(Aza)、6-メルカプトプリン(6-MP)、6-チオグアニン(6-TG)、FK506、サングリフェリンA、サルメテロール、ミコフェノール酸モフェチル(MMF)、アスピリンおよび他のCOX阻害剤、ニフルミン酸、エストリオールおよびトリプトライド。他の例示的な免疫抑制剤として、限定されないが、以下が挙げられる：小分子薬、天然生成物、抗体(例えばCD20、CD3、CD4に対する抗体)、生物製剤(biologics)に基づく薬物、炭水化物に基づく薬物、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。「ラパログ」とは、本明細書において用いられる場合、ラパマイシン(シロリムス)に構造的に関連する分子(アナログ)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WO 1998/0

02441および米国特許第8,455,510号において見出すことができ、これらのラパログは、本明細書において参考として援用される。

【0033】

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。さらなる免疫抑制剤は、は、当業者に公知であり、本発明は、この側面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を含んでいてもよい。

【0034】

「ロード(load)」とは、合成ナノキャリアへ連結する場合に、合成ナノキャリア全体における材料の乾燥処方重量に基づいた、合成ナノキャリアへ連結した免疫抑制剤の量である(重量/重量)。一般に、かかるロードは、合成ナノキャリアの集合全体にわたる平均として計算される。一態様において、ロードは、合成ナノキャリア全体にわたる平均で、0.1%~99%である。別の態様において、ロードは、0.1%~50%である。別の態様において、ロードは、0.1%~20%である。さらなる態様において、ロードは、0.1%~10%である。なおさらなる態様において、ロードは、1%~10%である。なおさらなる態様において、ロードは、7%~20%である。さらに別の態様において、ロードは、合成ナノキャリアの集合全体にわたる平均で、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。さらなる態様において、ロードは、合成ナノキャリアの集合全体にわたる平均で、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、ロードは、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。さらなる態様において、ロードは、25%以下である。態様において、ロードは、例において記載され得るとおり、または当該分野において別段に公知であるように計算される。

【0035】

「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の寸法を意味する。「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の寸法を意味する。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ろう。同様に、立方状の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ろう。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て、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%の最小寸法が、100nm以上である。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て、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%の最大寸法が、5 μ m以下である。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て、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%最小寸法が、110nmより大きい、より好ましくは120nmより大きい、より好ましくは130nmより大きい、より好ましく

は150nmよりなお大きい。合成ナノキャリア最大および最小寸法のアスペクト比は、態様に依存して異なり得る。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で異なり得る。

【0036】

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て、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%の最大寸法が、3 μ m以下、より好ましくは2 μ m以下、より好ましくは1 μ m以下、より好ましくは800nm以下、より好ましくは600nm以下、およびより好ましくはなお500nm以下である。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て、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%の最小寸法が、100nm以上、より好ましくは120nm以上、より好ましくは130nm以上、より好ましくは140nm以上、およびより好ましくはなお150nm以上である。合成ナノキャリアの寸法(例えば有効直径)の測定値は、いくつかの態様において、合成ナノキャリアを液体(通常は水性の)溶媒中で懸濁することにより、動的光散乱(DLS)を用いて(例えばBrookhaven ZetaPALS装置を用いて)、得ることができる。例えば、合成ナノキャリアの懸濁液を、水性バッファーから精製水中に希釈して、約0.01~0.1mg/mの最終的な合成ナノキャリア懸濁液濃度を達成することができる。希釈された懸濁液は、DLS分析のための好適なキュベットの内側で直接調製しても、またはこれに移してもよい。キュベットを、次いでDLS中に置き、制御された温度まで平衡化させ、次いで、溶媒の粘度および試料の屈折率について適切なインプットに基づいて安定かつ再現可能な分布を得るために十分な時間にわたリスキャンする。有効直径、または分布の平均を、次いで報告する。高アスペクト比の、または非球状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加的な技術を必要とし得る。合成ナノキャリアの「寸法」または「サイズ」または「直径」とは、例えば動的光散乱を用いて得られた、粒子サイズ分布の平均を意味する。

【0037】

「有機酸血症」とは、異常なアミノ酸代謝(例えば分枝鎖アミノ酸に関するもの)が存在する任意の障害を指す。一般に、これは、対象においてかかる欠損をもたらす変異により引き起こされる。したがって、「有機酸血症に関連する酵素」とは、対象において障害を引き起こす欠損が存在する酵素である。有機酸血症の4つの主な型は、メチルマロン酸血症(MMA)、プロピオン酸血症、イソ吉草酸血症およびメーブルシロップ尿症である。

【0038】

「薬学的に受入可能な賦形剤」または「薬学的に受入可能なキャリア」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。薬学的に受入可能な賦形剤として、これらに限定されないが、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、着色料、食塩水(リン酸緩衝化食塩水など)、およびバッファーを含む、当該分野において公知の多様な材料が挙げられる。

【0039】

「反復用量」または「反復投与」または類似のものは、同じ材料の、それより前の用量または投与の後で対象に投与される、少なくとも1回のさらなる用量または投与を意味する。例えば、ウイルスベクターの反復用量は、同じ材料の先の用量の後の、ウイルスベクターの少なくとも1回のさらなる用量を意味する。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、それより前の用量とは異なってもよい。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、反復用量中のウイルスベクターの量は、それより前の用量のウイルスベクターの量よりも少なくてもよい。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、それより前の用量中のウイルスベクターの量と少なくとも等しい量であ

ってよい。反復用量は、先の用量の数週間後、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、反復用量または投与は、当該用量または投与の直前に起こる用量または投与量の、少なくとも1週間後に投与される。本明細書において提供される方法のうちのいずれか1つのいくつかの態様において、反復用量または投与は、当該反復用量または投与の直前に起こる用量または投与量の、少なくとも1か月後に投与される。反復投与は、それが、対象に対して有益な効果をもたらす場合に、効果的であると考えられる。好ましくは、効果的な反復投与は、低下した免疫応答と組み合わせて、例えばウイルスベクターに対して、有益な効果をもたらす。

【0040】

「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飼育動物または農場の動物；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。いくつかの態様において、対象は、有機酸血症を有するか、またはこれを有することが疑われる。いくつかの態様において、対象は、有機酸血症を発症するリスクがある。いくつかの態様において、有機酸血症は、メチルマロン酸血症である。いくつかの態様において、有機酸血症は、若年性メチルマロン酸血症である。いくつかの態様において、対象は、小児または若年の対象であり、例えば、18歳未満、16歳未満、15歳未満、14歳未満、13歳未満、12歳未満、11歳未満、10歳未満、9歳未満、8歳未満、7歳未満、6歳未満、5歳未満、4歳未満、3歳未満、または2歳未満である。いくつかの態様において、対象は、1～10歳である。いくつかの態様において、対象は、成人の対象である。「合成ナノキャリア」は、天然には存在しない離散物体であって、サイズが5マイクロン以下である少なくとも1つの寸法を有するものを指す。アルブミンナノ粒子が、一般に、合成ナノキャリアとして挙げられる；しかし、ある態様において、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。

【0041】

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(本明細書においてまた、脂質ナノ粒子、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言及される)、ポリマー性ナノ粒子、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、ウイルスの構造タンパク質から主に構成されるが、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(本明細書においてまた、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またはタンパク質である粒子として言及される)(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たナノ粒子であってよい。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、これらに限定されないが、球状、立方状、錐体状、長方形、円柱状、環状などを含む。本発明による合成ナノキャリアは、1つ以上の表面を含む。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第5,543,158号において開示される生分解性ナノ粒子、(2)Saltzmanらに対する公開された米国特許出願20060002852のポリマー性ナノ粒子、(3)DeSimoneらに対する公開された米国特許出願20090028910のリソグラフィ構築されたナノ粒子、(4)von Andrianらに対するW02009/051837の開示、(5)Penadesらに対する公開された米国特許出願2008/0145441において開示されるナノ粒子、(6)de los Riosらに対する公開された米国特許出願20090226525において開示されるタンパク質ナノ粒子、(7)Sebbelらに対する公開された米国特許出願20060222652において開示されるウイルス様粒子、(8)Bachmannらに対する公開された米国特

許出願20060251677において開示されるウイルス様粒子に結合した核酸、(9)W02010047839 A1もしくはW02009106999A2において開示されるウイルス様粒子、(10)P. Paolicelliら、「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、アポトーシス体、または合成もしくは半合成の模倣物、あるいは(12)Lookら、「Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice」、J. Clinical Investigation 123(4):1741-1749(2013)のもの。

【0042】

約100nm以下、好ましくは100nm以下の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、または代替的に、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以下、好ましくは100nm以下の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、または代替的に、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以下、好ましくは100nm以下の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、または代替的に、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より大きいか、または1:10より大きいアスペクト比を有していてもよい。

【0043】

「ウイルスベクター」とは、キャプシドおよび/またはコートタンパク質などのウイルスの成分を有するベクターコンストラクトであって、治療用タンパク質などの治療剤をコードする導入遺伝子または核酸材料を含みこれを送達するように適応させたものを意味し、この導入遺伝子または核酸材料は、本明細書において提供されるように発現させることができる。「発現された」または「発現」などは、導入遺伝子または核酸材料が細胞中に形質導入され、形質導入された細胞によりプロセッシングされた後の、機能的な(すなわち、所望される目的のために生理学的に活性である)生成物の合成を指す。かかる生成物はまた、本明細書において「発現生成物」として言及される。ウイルスベクターは、限定することなく、AAV8またはAAV2などのアデノ随伴ウイルスをベースにしている。ウイルスベクターはまた、Anc80をベースにしている。したがって、本明細書において提供されるAAVまたはAnc80ベクターは、それぞれ、AAV8もしくはAAV2などのAAV、またはAnc80をベースにしたウイルスベクターであり、キャプシドおよび/またはコートタンパク質などのウイルス成分を有し、これらから、それは、導入遺伝子または核酸材料を送達するために、パッケージングすることができる。いく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、これは、ウイルスベクターが、1つ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構成されることを意味する。かかるウイルスベクターは、AAV8/Anc80またはAAV2/Anc80ウイルスベクターであってよい。

【0044】

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、メチルマロン酸血症(MMA)のための決定的な処置は存在しない。加えて、また上述のとおり、ウイルスベクターに対する免疫応答は、その効力に対して有害効果を及ぼし得、またその再投与を妨害し得る。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、強力な発現を達成することおよび/またはウイルスベクターに対する免疫応答を低下させることにより、上述の障害を克服することを見出した。

【0045】

導入遺伝子

例えば本明細書において提供されるウイルスベクターの、導入遺伝子または核酸材料は、例えば疾患または障害を有する対象にとって有益である、任意のタンパク質またはその

部分をコードし得る。一般に、対象は、当該タンパク質の対象の内在型バージョンが、欠損しているか、または限定された量で生産されるか、もしくは全く生産されない、疾患または障害を有するか、またはこれを有することが疑われる。対象は、本明細書において提供されるような疾患または障害のうちのいずれか1つを有するものであってよく、導入遺伝子または核酸材料は、本明細書において提供されるような治療用タンパク質またはその部分のうちのいずれか1つをコードするものである。本明細書において提供される導入遺伝子または核酸材料は、対象におけるその内在型バージョンにおける何らかの欠損(内在型バージョンの発現における欠損を含む)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、メチルマロン酸血症(MMA)などの有機酸血症が挙げられる。つまり、導入遺伝子または核酸材料によりコードされる治療用タンパク質は、メチルマロニルCoAムターゼ(MUT)(MMAの症例において頻繁に変異している酵素であるMUTの任意の野生型バージョンを含む)を含むということになる。

10

【0046】

導入遺伝子または核酸材料の配列もまた、発現制御配列を含んでいてもよい。発現制御配列は、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その中で利用されるべき発現系に基づいて選択される。いくつかの態様において、プロモーターおよびエンハンサーの配列は、遺伝子発現を増大させる能力のために選択され、一方、オペレーター配列は、遺伝子発現を制御する能力のために選択され得る。導入遺伝子はまた、宿主細胞における相同組み換えを亢進し、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、宿主細胞における複製のために必要とされる配列を含んでもよい。

20

【0047】

例示的な発現制御配列は、肝臓特異的プロモーター配列および構成的プロモーター配列、例えば本明細書において提供され得る任意のものを含む。一般に、プロモーターは、所望される発現生成物をコードする配列の上流(すなわち5')に動作可能なように繋がられる(operatively linked)。導入遺伝子はまた、コード配列の下流(すなわち3')に作動可能に繋がられた(operably linked)好適なポリアデニル化配列を含んでもよい。

【0048】

例示的なコンストラクトとして、図において示されるものが挙げられる。いくつかの態様において、コンストラクトは、図1において示されるとおり、逆位末端反復配列(ITR)、プロモーター(例えば、肝臓特異的プロモーターまたは構成的プロモーター)、合成メチルマロニルCoAムターゼ4(synMUT)、ポリAテイル、およびITRを含む。いくつかの態様において、プロモーターは、伸長因子1アルファ1などの構成的プロモーターである(図3、5)。他の態様において、プロモーターは、アポリポタンパク質E-ヒトアルファ-1-アンチトリプシン(apoE-hAAT)などの肝臓特異的プロモーターである(図2、4)。いくつかの態様において、プロモーターとsynMUT4セグメントとは、図2~5において説明されるとおり、イントロン、例えばヘモグロビンサブユニットベータ-2(HBB-2)により分離していてもよい。他の態様において、プロモーターとsynMUT4セグメントとは、図6にいて表されるとおり、合成(SYN)イントロンにより分離していてもよい。いくつかの態様においては、プロモーターとsynMUT4セグメントとを分離するイントロンは、存在しない。いくつかの態様においては、synMUT4の後に、ヒト転写後制御エレメントなどの転写後制御配列が続く(図4~6)。

30

40

【0049】

MUTまたはその一部をコードする核酸が、一側面において提供される。核酸は、本明細書において提供される特異的プロモーターの型のうちのいずれか1つを含んでもよく、MUTまたはその一部をコードしてもよい。提供される核酸のうちのいずれか1つは、本明細書において提供されるようなITRのうちのいずれか1つおよび/またはポリAテイルを含んでもよい。本明細書において提供される核酸のいずれか1つは、例えばプロモーターとMUTまたはその一部をコードする配列との間に、本明細書において提供されるイントロンのうちの

50

いずれか1つを含んでもよい。本明細書において提供される核酸のうちのいずれか1つは、例えばMUTまたはその一部をコードする配列の後に、本明細書において提供される転写後制御配列のうちのいずれか1つを含んでもよい。本明細書において提供される核酸のうちのいずれか1つを含むウイルスベクターが、一側面において提供される。かかるウイルスベクターは、AAV8もしくはAAV2ベクターなどのAAVベクター、またはAnc80ベクター、またはAAV8/Anc80もしくはAAV2/Anc80ベクターであってよい。本明細書において提供される核酸またはベクターのうちのいずれか1つは、本明細書において提供される方法のうちのいずれか1つにおける使用のためのものであってよい。

【0050】

ウイルスベクター

ウイルスは、それらが感染する細胞内でそれらのゲノムを輸送するための特化した機構を進化させてきた；かかるウイルスをベースにしたウイルスベクターは、特定の用途のために細胞に形質導入するために適合させることができる。本明細書において提供されるように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、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベースのベクターが挙げられる。

【0051】

本明細書において提供されるウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス(AAV)をベースにしているものであってもよい。AAVベクターは、治療的適用、例えば本明細書において記載されるものにおける使用のために、特に着目されてきた。AAVは、ヒトの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、ヘルパーウイルスによる共感染(例えばアデノウイルスまたはヘルパーウイルス)、またはヘルパー遺伝子の発現を必要とする。AAVベースのベクターの説明については、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号、ならびに米国公開番号20150065562、20140155469、20140037585、20130096182、20120100606および20070036757を参照。AAVベクターは、組み換えAAVベクターであってもよい。AAVベクターはまた、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る自己相補的(sc)AAVベクターであってよい。

【0052】

ウイルスベクターがベースとしているアデノ随伴ウイルスは、AAV8またはAAV2などの特定の血清型のものであってよい。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は、したがって、AAVベクターは、AAV8ベクターまたはAAV2である。

【0053】

いくつかの態様においては、ウイルスベクターがベースにするウイルスは、Anc80などの合成のものであってもよい。

いくつかの態様においては、ウイルスベクターは、AAV8/Anc80ベクターまたはAAV2/Anc80ベクターなどのAAV/Anc80ベクターである。

【0054】

免疫抑制剤を含む合成ナノキャリア

本明細書において提供されるウイルスベクターは、免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアと組み合わせて投与することができる。一般に、免疫抑制剤は、合成ナノキャリアの構成を構成する材料に加える要素である。例えば、合成ナノキャリアが1つ以上のポリマーからなる一態様においては、免疫抑制剤は、1つ以上のポリマーに加える化合物であり、いくつかの態様においては、これに接着している化合物である。合成ナノキャリアの材料がまた免疫寛容原性効果をもたらす態様においては、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。

【0055】

広範な他の合成ナノキャリアは、発明により、いくつかの態様においては免疫抑制剤へ

10

20

30

40

50

連結させて、用いることができる。いく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。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、扁平または板状である。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、立方体または立方状である。いく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。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、円柱、錐状体、錐体である。

【0056】

いく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相対的に均一である合成ナノキャリアの集合を用いることが望ましい。例えば、合成ナノキャリアの合計数に基づいて、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%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。

10

【0057】

合成ナノキャリアは、中実(solid)であっても中空(hollow)であってもよく、1つ以上の層を含んでもよい。いくつかの態様において、各々の層は、他の層と比較して特有の組成物および特有の特性を有する。一例ではあるが、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(例えばポリマー性のコア)であり、シェルは、第2の層(例えば脂質二重層または単層)である。合成ナノキャリアは、複数の異なる層を含んでもよい。

【0058】

いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、任意に、1つ以上の脂質を含んでもよい。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、リボソームを含んでもよい。いく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。いく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。いく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。いく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)に取り囲まれた、ポリマー性マトリックスを含むコアを含んでもよい。いく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)に取り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。

20

30

【0059】

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。いくつかの態様において、非ポリマー性の合成ナノキャリアは、非ポリマー性の構成成分の凝集体、例えば金属原子(例えば金原子)の凝集体である。

【0060】

いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、任意に、1つ以上の両親媒性の実体を含んでもよい。いくつかの態様において、両親媒性の実体は、安定性の増大、均一性の改善、または粘度の増大により、合成ナノキャリアの生成を促進することができる。いくつかの態様において、両親媒性の実体は、脂質膜(例えば脂質二重層、脂質単層など)の内部表面と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性の実体は、本発明による合成ナノキャリアを作製することにおける使用のために好適である。かかる両親媒性の実体として、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アミン(DOPE)；ジオレイルオキシプロピルトリエチルアンモニウム(DOTMA)；ジオレオイルホスファチジルコリン；コレステロール；コレステロールエステル；ジアシルグリセロール；コハク酸ジアシルグリセロール；ジホスファチジルグリセロール(DPPG)；ヘキサデカノール；ポリエチレングリコール(PEG)などの脂肪アルコール；ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル；パルミチン酸またはオレイン酸などの界面活性脂肪酸；脂肪酸；脂肪酸モノグリセリド；脂肪酸ジグリセリド；脂肪酸アミド；ソルビタントリオレート(Span(登録商標)85)グリココール酸；ソルビタンモノラウレート(Spa

40

50

n(登録商標)20)；ポリソルベート20(Tween(登録商標)20)；ポリソルベート60(Tween(登録商標)60)；ポリソルベート65(Tween(登録商標)65)；ポリソルベート80(Tween(登録商標)80)；ポリソルベート85(Tween(登録商標)85)；ポリオキシエチレンモノステアレート；サーファクチン；ポロキサマー；ソルビタントリオレートなどのソルビタン脂肪酸エステル；レシチン；リゾレシチン；ホスファチジルセリン；ホ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；ジセチルホスフェート；ジパルミトイルホスファチジルグリセロール；ステアリルアミン；ドデシルアミン；ヘキサデシル-アミン；パルミチン酸アセチル；リシノール酸グリセロール；ステアリン酸ヘキサデシル；ミリスチン酸イソプロピル；チロキサポール；ポリ(エチレングリコール)5000-ホスファチジルエタノールアミン；ポリ(エチレングリコール)400-モノステアレート；リン脂質；高界面活性特性を有する合成および/または天然の洗剤；デオキシコレート；シクロデキストリン；カオトロピック塩；イオン対形成剤；およびこれらの組み合わせ。両親媒性の実体の構成成分は、様々な両親媒性の実体の混合物であってもよい。当業者は、これが、例示的であるが網羅的ではない、界面活性を有する物質のリストである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生成において、任意の両親媒性の実体を用いることができる。

10

【0061】

いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、任意に、1つ以上の炭水化物を含んでもよい。炭水化物は、天然であっても合成であってもよい。炭水化物は、誘導体化された天然の炭水化物であってもよい。ある態様において、炭水化物は、単糖または二糖を含み、これは、これらに限定されないが、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。ある態様において、炭水化物は、多糖であり、これは、これらに限定されないが、プルラン、セルロース、微結晶性セルロース、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-カルボキシメチルキトサン、アルギン(algin)およびアルギン酸(alginic acid)、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、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(または特にこれを除外する)。ある態様において、炭水化物は、糖アルコールなどの炭水化物誘導体を含んでもよく、これは、これらに限定されないが、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、およびラクチトールを含む。

20

30

【0062】

いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、1つ以上のポリマーを含んでもよい。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、非メトキシ末端化されたプルロニック(登録商標)ポリマーである1つ以上のポリマーを含む。いく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、非メトキシ末端化されたプルロニック(登録商標)ポリマーである。いく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すべてが、非メトキシ末端化されたプルロニック(登録商標)ポリマーである。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、非メトキシ末端化ポリマーである1つ以上のポリマーを含む。いく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、非メトキシ末端化ポリマーである。いくつかの態様において、合成ナノキャリア

40

50

アを構成するポリマーのすべては、非メトキシ末端化ポリマーである。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、プルロニック(登録商標)ポリマーを含まない1つ以上のポリマーを含む。いく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(登録商標)ポリマーを含まない。いく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すべてが、プルロニック(登録商標)ポリマーを含まない。いく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)により取り囲まれていてもよい。いく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。

10

【0063】

免疫抑制剤は、多数の方法のいずれかにより合成ナノキャリアへ連結させることができる。一般に、接着は、免疫抑制剤と合成ナノキャリアとの間に結合の結果であってよい。この結合は免疫抑制剤が合成ナノキャリアの表面に接着していること、および/または合成ナノキャリア内に含まれている(カプセル化されている)ことの結果であってよい。いく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ではなく、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カプセル化される。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ようなポリマーを含み、免疫抑制剤は、当該ポリマーに接着している。

【0064】

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、連結部分を介して起こりえる。連結部分は、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。連結部分は、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)結合させる別の分子を含む。かかる分子は、リンカーまたはポリマーまたはこれらの単位を含む。例えば、連結部分は、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、連結部分は、それが共有結合するポリマーまたはその単位を含んでもよい。

20

【0065】

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ようなポリマーを含む。これらの合成ナノキャリアは、完全にポリマー性であっても、または、これらは、ポリマーと他の材料との混合物であってもよい。

30

【0066】

いくつかの態様において、合成ナノキャリアのポリマーは、会合してポリマー性マトリックスを形成する。これらの態様のうちのいくつかにおいて、免疫抑制剤などの構成成分は、ポリマー性マトリックスの1つ以上のポリマーと共有的に会合していてもよい。いく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。いくつかの態様において、構成成分は、ポリマー性マトリックスの1つ以上のポリマーと非共有的に会合していてもよい。例えば、いくつかの態様において、構成成分は、ポリマー性マトリックス内にカプセル化されていても、ポリマー性マトリックスにより囲まれていても、および/またはポリマー性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、構成成分は、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、ポリマー性マトリックスの1つ以上のポリマーと会合していてもよい。それらからポリマー性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、従来公知である。

40

【0067】

ポリマーは、天然のポリマーであっても、非天然(合成)のポリマーであってもよい。ポリマーは、ホモポリマーであっても、2つ以上のモノマーを含むコポリマーであってもよい。配列に関して、コポリマーは、ランダム、ブロックであっても、または、ランダム配列とブロック配列と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。

50

【0068】

いく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)、またはポリカプロラクトン、またはこれらの単位を含む。いくつかの態様においては、ポリマーが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は、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などのポリエーテルまたはこれらの単位を含む場合、ポリマーが生分解性となるように、ポリマーは、ポリエーテルと生分解性ポリマーとのブロック-コ-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、ポリエーテルまたはその単位、例えばポリ(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を、それのみでは含まない。

10

【0069】

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、これらに限定されないが、以下が挙げられる：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))、ポリ無水物(例えばポリ(セバシン酸無水物))、ポリプロピルマレート、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(例えばポリラクチド、ポリグリコリド、ポリラクチド-コ-グリコリド、ポリカプロラクトン、ポリヒドロキシ酸(例えばポリ(β -ヒドロキシアルカノエート)))、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、ポリ尿素、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、ならびにポリ(エチレンジイミン)、ポリ(エチレンジイミン)-PEGコポリマー。

20

【0070】

いく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、これらに限定されないが、ポリエステル(例えばポリ乳酸、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)、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。

30

【0071】

いく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、アニオン性の基(例えばリン酸基、硫酸基、カルボン酸基)；カチオン性の基(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。いくつかの態様において、親水性ポリマー性マトリックスを含む合成ナノキャリアは、合成ナノキャリア内に親水性の環境を生じる。いくつかの態様において、ポリマーは、疎水性であってよい。いくつかの態様において、疎水性ポリマー性マトリックスを含む合成ナノキャリアは、合成ナノキャリア内に疎水性の環境を生じる。ポリマーの親水性または疎水性の選択は、合成ナノキャリア内に組み込まれる材料の性質に影響を有し得る。

40

【0072】

いくつかの態様において、ポリマーは、1つ以上の部分および/または官能基により修飾されていてもよい。多様な部分または官能基を、本発明により用いることができる。いく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アクリル性ポリアセタールにより修飾してもよい(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らに対するWO公開W02009/051837の一般的教示を用いて行ってもよい。

【0073】

いくつかの態様において、ポリマーは、脂質または脂肪酸基により修飾されていてもよ

50

い。いく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うちの1つ以上であってよい。いく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-リノール酸、ガンマ-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、またはエルカ酸のうちの1つ以上であってよい。

【0074】

いく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、本明細書において集合的に「PLGA」として言及されるポリ(乳酸-コ-グリコール酸)およびポリ(ラクチド-コ-グリコリド)；ならびに本明細書において「PGA」として言及されるグリコール酸単位を含むホモポリマー、および本明細書において集合的に「PLA」として言及される乳酸単位を含むホモポリマー、例えばポリ-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-ラクチドを含む。いく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)およびこれらの誘導体が挙げられる。いく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-コ-L-リジン)、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]、およびこれらの誘導体が挙げられる。

【0075】

いくつかの態様において、ポリマーは、PLGAであってよい。PLGAは、生体適合性かつ生分解性の乳酸とグリコール酸と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整することができる。いく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：グリコール酸比により特徴づけられる。

【0076】

いくつかの態様において、ポリマーは、1つ以上のアクリル性ポリマーであってよい。ある態様において、アクリルポリマーとして、例えば、以下が挙げられる：アクリル酸およびメタクリル酸のコポリマー、メチルメタクリレートコポリマー、エトキシエチルメタクリレート、シアノエチルメタクリレート、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)、メタクリル酸アルキルアミドコポリマー、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(メタクリル酸無水物)、メチルメタクリレート、ポリメタクリレート、ポリ(メチルメタクリレート)コポリマー、ポリアクリルアミド、アミノアルキルメタクリレートコポリマー、グリシジルメタクリレートコポリマー、ポリシアノアクリレート、および前述のポリマーのうちの1つ以上を含む組み合わせ。アクリル性ポリマーは、低含有量の四級アンモニウム基を有する、アクリル酸およびメタクリル酸のエステルの完全に重合したコポリマーを含んでもよい。

【0077】

いく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、負に荷電した核酸の鎖を凝縮および/または保護することができる。ポリ(リジン)(Zauner et al., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30:97; and Kabanov et al., 1995, Bioconjugate Chem., 6:7)、ポリ(エチレンジイミン)(PEI; Boussif et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1995, 92:7297)、およびポリ(アミドアミン)デンドリマー(Kukowska-Latallo et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93:4897; Tang et al., 1996, Bioconjugate Chem., 7:703; および Haensler et al., 1993, Bioconjugate Chem., 4:372)などのアミン含有ポリマーは、生理学的pHにおいて正に荷電し、核酸とイオン対を形成する。態様において、合成ナノキャリアは、カチオン性ポリマーを含

まなくともよい(またはこれを除外してもよい)。

【0078】

いくつかの態様において、ポリマーは、カチオン性の側鎖を有する分解性ポリエステルであってよい(Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11010; Kwon et al., 1989, *Macromolecules*, 22:3250; Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633; および Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399)。これらのポリエステルの例として、ポリ(L-ラクチド-コ-L-リジン)(Barrera et al., 1993, *J. Am. Chem. Soc.*, 115:11010)、ポリ(セリンエステル)(Zhou et al., 1990, *Macromolecules*, 23:3399)、ポリ(4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル)(Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; and Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633)、およびポリ(4-ヒドロキシ-L-プロリンエステル)(Putnam et al., 1999, *Macromolecules*, 32:3658; および Lim et al., 1999, *J. Am. Chem. Soc.*, 121:5633)が挙げられる。

【0079】

これらのおよび他のポリマーの特性およびそれらを調製するための方法は、当該分野において周知である(例えば、米国特許第6,123,727号; 同第5,804,178号; 同第5,770,417号; 同第5,736,372号; 同第5,716,404号; 同第6,095,148号; 同第5,837,752号; 同第5,902,599号; 同第5,696,175号; 同第5,514,378号; 同第5,512,600号; 同第5,399,665号; 同第5,019,379号; 同第5,010,167号; 同第4,806,621号; 同第4,638,045号; および同第4,946,929号; Wang et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:9480; Lim et al., 2001, *J. Am. Chem. Soc.*, 123:2460; Langer, 2000, *Acc. Chem. Res.*, 33:94; Langer, 1999, *J. Control. Release*, 62:7; ならびに Uhrich et al., 1999, *Chem. Rev.*, 99:3181を参照)。より一般的には、好適なポリマーを合成するための多様な方法は、*Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts*, Goethals編、Pergamon Press、1980年; *Principles of Polymerization* by Odian, John Wiley & Sons、第四版、2004年; Allcockらによる *Contemporary Polymer Chemistry*, Prentice-Hall、1981年; Deming et al., 1997, *Nature*, 390:386において; ならびに米国特許第6,506,577号、同第6,632,922号、同第6,686,446号、および同第6,818,732号において記載される。

【0080】

いくつかの態様において、ポリマーは、直鎖状または分枝状ポリマーであってよい。いくつかの態様において、ポリマーは、デンドリマーであってよい。いくつかの態様において、ポリマーは、互いに実質的に架橋されていてもよい。いくつかの態様において、ポリマーは、実質的に架橋を含まなくともよい。いくつかの態様において、ポリマーは、架橋のステップを経験することなく、本発明により用いることができる。さらに、合成ナノキャリアが、前述のおよび他のポリマーのうちのいずれかのブロックコポリマー、グラフトコポリマー、ブレンド、混合物、および/または付加物を含んでもよいことが、理解されるべきである。当業者は、本明細書において列記されるポリマーが、例示的ではあるが網羅的ではない、本発明により使用することができるポリマーのリストを表すことを理解するであろう。

【0081】

いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、ポリマー性構成成分を含まない。いくつかの態様において、合成ナノキャリアは、金属粒子、量子ドット、セラミック粒子などを含んでもよい。いくつかの態様において、非ポリマー性合成ナノキャリアは、非ポリマー性構成成分の凝集体、例えば金属原子(例えば金原子)の凝集体である。

【0082】

本明細書において提供されるような任意の免疫抑制剤を、いくつかの態様において、合成ナノキャリアへ連結させることができる。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(ラパログ)などのmTOR阻害剤; TGF- β シグナル伝達剤; TGF β 受容体アゴニスト; ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤; 副腎皮質ステロイド; ロテノンなどのミトコンドリア機能の阻害剤;

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-タンパク質共役型受容体アゴニスト；G-タンパク質共役型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剤活性化受容体アンタゴニスト；ペルオキシソーム増殖剤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および酸化型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、トリプトライド、インターロイキン(例えばIL-1、IL-10)、シクロスポリンA、サイトカインを標的とするsiRNA、またはサイトカイン受容体などを含む。

10

【0083】

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。

【0084】

発明による組成物は、保存剤、バッファー、食塩水、リン酸緩衝化食塩水などの薬学的に受入可能な賦形剤を含んでもよい。組成物は、有用な投与形態に到達するために、従来の製薬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、保存剤と一緒に、無菌食塩水中に懸濁される。

20

【0085】

D. 組成物を使用および製造する方法、ならびに関連する方法

ウイルスベクターは、当業者に公知であるか、本明細書において別段に記載されるような方法により作製することができる。例えば、ウイルスベクターは、例えば、米国特許第4,797,368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。

30

【0086】

AAVベクターなどのウイルスベクターは、組み換え方法を用いて生成することができる。例えば、方法は、AAVキャプシドタンパク質またはそのフラグメント；機能的なrep遺伝子；AAV逆位末端反復配列(ITR)および導入遺伝子を含む組み換えAAVベクター；ならびに組み換えAAVベクターのAAVキャプシドタンパク質へのパッケージングを可能にするための十分なヘルパー機能をコードする核酸配列を含む宿主細胞を培養することを含んでもよい。

【0087】

ウイルスベクターをキャプシド中でパッケージングするために宿主細胞中で培養されるべき構成成分は、宿主細胞に、トランスで(in trans)提供してもよい。あるいは、必要とされる構成成分(例えば組み換えウイルスベクター、rep、cap配列、および/またはヘルパー機能)のうちのいずれか1つ以上を、当業者に公知の方法を用いて、必要とされる構成成分のうちの1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させてもよい。最も好適には、かかる安定な宿主細胞は、必要とされる構成成分を、誘導性プロモーターの制御下に含んでもよい。しかし、必要とされる構成成分は、構成的プロモーターの制御下にあってよい。ウイルスベクターを生成するために必要とされる組み換えウイルスベクター、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、宿主細胞中に送達してパッケージングすることができる。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、核酸操作の分野におけ

40

50

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ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harbor、N.Yを参照。同様に、rAAVビリオンを作製する方法は、周知であり、好適な方法の選択肢は、本発明の限定要因ではない。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。

【0088】

いくつかの態様において、組み換えAAVベクターは、三重遺伝子導入方法(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なもの；三重遺伝子導入方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)を用いて生成することができる。典型的には、組み換えAAVは、宿主細胞を、組み換えAAVベクター(導入遺伝子を含むもの)で遺伝子導入して、AAV粒子、AAVヘルパー機能ベクター、およびアクセサリ機能ベクターをパッケージングすることにより、生成することができる。一般に、AAVヘルパー機能ベクターは、増殖性AAVの複製およびカプセル化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ビリオン(すなわち、機能的なrepおよびcap遺伝子を含むAAVビリオン)を生成することなく、効率的なAAVベクター生成を支持する。アクセサリ機能ベクターは、非AAV由来ウイルスのための、および/または複製のためにAAVが依存する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。アクセサリ機能は、AAVの複製のために必要とされるそれらの機能を含み、これは、限定することなく、AAVの遺伝子転写の活性化、ステージ特異的なAAV mRNAスプライシング、AAV DNA複製、cap発現生成物の合成、およびAAVキャプシドアセンブリーに関与する部分を含む。ウイルスベースのアクセサリ機能は、アデノウィルス、ヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルス1型以外)、およびワクシニアウイルスなどの公知のヘルパーウイルスのいずれかから誘導することができる。

ウイルスベクターを生成するための他の方法は、当該分野において公知である。さらに、ウイルスベクターは、市販されている。

【0089】

免疫抑制剤へ連結した合成ナノキャリアに関して、構成成分を合成ナノキャリアに接着するための方法は、有用であり得る。

ある態様において、接着は、共有性リンカーを介するものであってよい。態様において、本発明による免疫抑制剤は、アルキン基を含む免疫抑制剤によるアジド基の1,3-二極性環付加反応により、またはアジド基を含む免疫抑制剤によるアルキンの1,3-二極性環付加反応により形成される、1,2,3-トリアゾールリンカーを介して、外部表面に共有的に接着されていてもよい。かかる環付加反応は、好ましくは、Cu(I)触媒と共に好適な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の存在下において、行われる。このCu(I)により触媒されるアジド-アルキン環付加(CuAAC)はまた、クリック反応としても言及され得る。

【0090】

加えて、共有的連結は、アミドリリンカー、ジスルフィドリリンカー、チオエーテルリンカー、ヒドラゾンリンカー、ヒドラジドリリンカー、イミンもしくはオキシムリンカー、ウレアもしく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、またはスルホンアミドリリンカーを含む、共有性リンカーを含んでもよい。

【0091】

アミドリリンカーは、免疫抑制剤などの1つの構成成分上のアミンと、ナノキャリアなどの第2の構成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、好適に保護されたアミノ酸および活性化されたカルボン酸(N-ヒドロキシサクシニミド活性化エステルなど)による反応を形成する従来のアミド結合のうちのいずれかを用いて行うことができる。

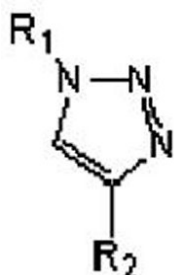
【0092】

ジスルフィドリリンカーは、例えば $R_1-S-S-R_2$ 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行われる。ジスルフィド結合は、チオール/メルカプタン基(-SH)を含む構成成分の、別の活性型チオール基との、またはチオール/メルカプタン基を含む構成成分の、活性型チオール基を含む構成成分との、チオール交換により形成することができる。

【0093】

トリアゾールリンカー、特に、
【化1】



10

式中R₁およびR₂は、任意の化学実体であってよい、
の形態の1,2,3-トリアゾールは、第1の構成成分に接着しているアジドの、免疫抑制剤などの第2の構成成分に接着している末端アルキンによる1,3-二極性環付加反応により、生成することができる。1,3-二極性環付加反応は、触媒を用いるかまたはこれを用いずに、好ましくはCu(I)-触媒を用いて行われ、これは、1,2,3-トリアゾール官能基を通して2つの構成成分を繋げる。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により詳細に記載され、しばしば、「クリック」反応またはCuAACとして言及される。

20

【0094】

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、生成することができる。チオエーテルは、1つの構成成分上のチオール/メルカプタン(-SH)基の、第2の構成成分上のハライドまたはエポキシドなどのアルキル化剤によるアルキルにより、生成することができる。チオエーテルリンカーは、1つの構成成分上のチオール/メルカプタン基の、マイケルアクセプターとしてのマレイミド基またはビニルスルホン基を含む第2の構成成分上の電子不足のアルケン基に対するマイケル付加により、形成することができる。別の方法において、チオエーテルリンカーは、1つの構成成分上のチオール/メルカプタン基の、第2の構成成分上のアルケン基による、ラジカルチオール-エン反応により調製することができる。

30

【0095】

ヒドラゾンリンカーは、1つの構成成分上のヒドラジド基の、第2の構成成分上のアルデヒド/ケトン基との反応により生成される。

ヒドラジドリンカーは、1つの構成成分上のヒドラジン基の、第2の構成成分上のカルボン酸基との反応により形成される。かかる反応は、一般に、活性化試薬によりカルボン酸が活性化されるアミド結合の形成と類似の化学を用いて行われる。

40

【0096】

イミンまたはオキシムリンカーは、1つの構成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の構成成分上のアルデヒドまたはケトン基との反応により、形成される。

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

【0097】

アミジンリンカーは、1つの構成成分上のアミン基の、第2の構成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つの構成成分上のアミン基の、第2の構成成分上のハライド、エポ

50

キシドまたはスルホネートエステル基などのアルキル化性の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、1つの構成成分上のアミン基の、第2の構成成分上のアルデヒドまたはケトン基による、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酸化ホウ素ナトリウムなどの好適な還元剤による還元性アミン化により、生成することができる。

【0098】

スルホンアミドリリンカーは、1つの構成成分上のアミン基の、第2の構成成分上のスルホニルハライド(スルホニル塩化物など)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っても、構成成分に接着していてもよい。

10

【0099】

構成成分はまた、非共有的な抱合方法を介して抱合させることができる。例えば、負に荷電した免疫抑制剤は、静電的吸着を通して正に荷電した構成成分に報告させることができる。金属リガンドを含む構成成分は、金属-リガンド錯体を介して金属錯体に抱合させることができる。

【0100】

態様において、構成成分は、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-ブロック-ポリエチレングリコールに接着していてもよい。合成ナノキャリアを、その表面上で、反応性の基または活性化可能な基により形成させてもよい。後者の場合、構成成分は、合成ナノキャリアの表面により提示される接着化学と適合性の基により調製してもよい。他の態様において、ペプチド構成成分は、好適なリンカーを用いて、VLPまたはリポソームに接着していてもよい。リンカーとは、2つの分子を一緒に連結させ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、表面上にカルボキシ基を含む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、ADHリンカーにより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により結びつけら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、酸性基を含むペプチド構成成分と抱合させて、対応するVLPまたはリポソームペプチドの抱合体を生成する。

20

30

【0101】

態様において、ポリマー鎖の末端にアジドまたはアルキン基を含むポリマーを調製する。次いで、このポリマーを用いて、複数のアルキンまたはアジド基がそのナノキャリアの表面上に配置されるような様式において、合成ナノキャリアを調製する。あるいは、別の経路により合成ナノキャリアを調製して、その後、アルキンまたはアジド基により官能化してもよい。構成成分は、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により、調製される。次いで、構成成分を、1,4-二置換1,2,3-トリアゾールリンカーを通して構成成分を粒子に共有的に接着する触媒を用いて、またはこれを用いずに、1,3-二極性環付加反応を介してナノキャリアと反応させる。

40

【0102】

構成成分が小分子である場合、合成ナノキャリアのアセンブリーの前に構成成分をポリマーに接着することは、有利であり得。態様において、構成成分をポリマーに接着して、次いで、このポリマー抱合体を合成ナノキャリアの構築において用いるのではなく、むしろ、構成成分を合成ナノキャリアに接着するために用いられる表面の基により、それらの表面基の使用を通して合成ナノキャリアを調製することは、有利であり得る。

【0103】

利用可能な抱合方法の詳細な説明については、Hermanson G T「Bioconjugate Techniques」、第2版、Academic Press, Inc.により出版(2008年)を参照。共有的接着に加えて、

50

構成成分は、予め形成された合成ナノキャリアの吸着により接着しても、または、合成ナノキャリアの形成の間のカプセル化により接着してもよい。

【0104】

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、流路(fluidic channel)を用いるフローフォーカシング(flow focusing)、スプレー乾燥、シングルまたはダブルエマルジョン溶媒蒸発、溶媒抽出、相分離、ミリング(milling)、マイクロエマルジョンの手法、マイクロ加工(microfabrication)、ナノ加工(nanofabrication)、犠牲層(sacrificial layers)、単一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、形成させることができる。あるいはまたは加えて、単分散半導体、伝導性、磁性、有機性、および他のナノ材料のための水性および有機性溶媒合成が、記載されている(Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; および 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; および 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ら、「Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles」、Nanomedicine. 5(6): 843-853 (2010)を参照)。

【0105】

材料は、これらに限定されないが、以下を含む多様な方法を用いて、所望されたとおり合成ナノキャリア中にカプセル化することができる:C. Astete et al., 「Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles」 J. Biomater. Sci. Polymer Edn, Vol. 17, No. 3, pp. 247-289 (2006); K. Avgoustakis 「Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticle: 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カプセル化するために好適な他の方法を用いてもよく、これは、限定することなく、Ungerに対して2003年10月14日に発行された米国特許第6,632,671号において開示される方法を含む。

【0106】

ある態様において、合成ナノキャリアは、ナノ沈殿のプロセ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ために用いられる条件は、所望されるサイズまたは特性(例えば疎水性、親水性、外部の形態学、「粘着性(stickiness)」、形状など)の粒子を得るために、改変してもよい。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、気流の速度など)は、合成ナノキャリアに接着されるべき材料、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。

【0107】

上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。

【0108】

合成ナノキャリアの要素は、例えば1つ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、または、1つ以上のリンカーを用いること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らへの公開された米国特許出願2006/0002852、DeSimone へへの公開された米国特許出願2009/0028910、またはMurthyらへの公開された国際特許出願WO/2008/127532A1から適応させてもよい。

【0109】

あるいはまたは加えて、合成ナノキャリアは、非共有の相互作用を介して直接的にまたは間接的に構成成分に接着させてもよい。非共有の態様において、非共有の接着は、これらに限定されないが、電荷相互作用、親和性相互作用、金属配位、物理的吸着、ホスト-ゲスト相互作用、疎水性相互作用、 π -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、磁気相互作用、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、非共有の相互作用により媒介される。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。態様において、カプセル化および/または吸着は、接着の一形態である。

【0110】

本明細書において提供される組成物は、以下を含んでもよい：無機または有機のバッファー(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、 α -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、デソキシコール酸ナトリウム(sodium desoxycholate))、溶液および/またはクライオ(cryo)/リオ(lyo)安定剤(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)、浸透圧調整剤(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ゾン(polydimethylsiloxane))、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整剤(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)。

【0111】

発明による組成物は、薬学的に受入可能な賦形剤を含んでもよい。組成物は、有用な投与形態に到達するために、従来の製薬および配合の技術を用いて製造することができる。本発明を実施すること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.;および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。一態様において、組成物は、注射のために、保存剤と共に、無菌食塩水中に懸濁される。

【0112】

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、本発明は決して、本明細書において記載される方法を用いて生成することができる組成物に限定されないことが、理解されるべきである。適切な製造の方法の選択は、会合している特定の部分の特性への配慮を必要とする場合がある。

【0113】

いくつかの態様において、組成物は、無菌条件下において製造されるか、最後に滅菌される。このことは、結果として生じる組成物が無菌かつ非感染性であることを確実にし、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、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は特に、価値ある安全性の尺度を提供する。

【0114】

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

【0115】

本発明の組成物は、有効量、例えば本明細書において別の箇所で記載される有効量において、投与することができる。いくつかの態様において、免疫抑制剤および/またはウイ

10

20

30

40

50

ルスベクターを含む合成ナノキャリアは、投与形態中で、免疫応答を低下させるか、および/またはウイルスベクターの対象への再投与を可能にするための有効量において存在する。いくつかの態様において、免疫抑制剤および/またはウイルスベクターを含む合成ナノキャリアは、投与形態中で、対象において効果的な導入遺伝子発現を増大させるかまたはこれを達成するための有効量において存在する。投与形態は、多様な頻度において投与することができる。いくつかの態様において、ウイルスベクターによる免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアの繰り返し投与が行われる。

【0116】

本発明の側面は、本明細書において提供されるような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、少なくともウイルスベクターおよび免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアの頻度、投与量を変化させること、およびその後所望される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、ウイルスベクターに対する免疫応答および/もしくは発現される生成物を低下させ、ならびに/または導入遺伝子発現を促進する。プロトコルは、少なくとも、ウイルスベクターおよび免疫抑制剤を含む合成ナノキャリアの投与の頻度および用量を含む。

10

【0117】

本開示の別の側面は、キットに関する。いくつかの態様において、キットは、本明細書において提供される組成物のいずれか1つ以上を含む。好ましくは、組成物は、本明細書において提供されるようないずれか1つ以上の用量を提供する量におけるものである。組成物は、キットにおいて、1つの容器中にあっても、1つより多くの容器中にあってもよい。提供されるキットのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、容器は、バイアルまたはアンプルである。提供されるキットのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、組成物は、それらを後の時点で再構成できるように、各々凍結乾燥形態において、別々の容器中、または同じ容器中にある。提供されるキットのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、キットは、再構成、混合、投与などのための指示を、さらに含む。提供されるキットのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、指示は、本明細書において記載される方法のうちのいずれか1つの説明を含む。指示は、例えば印刷された挿入物またはラベルのような、任意の好適な形態におけるものであってよい。提供されるキットのうちのいずれか1つのいくつかの態様において、キットは、組成物をin vivoで対象に送達することができる1つ以上のシリンジまたは他のデバイスを、さらに含む。

20

30

【0118】

例

例1：Huh7研究

遺伝子導入研究を用いて、AAV2とAnc80レポーターとの間の差異を調べた。Huh7細胞に、操作されたGFP(eGFP)を含む様々なコンストラクトに感染させることにより形質導入し、結果として生じるGFPを、AAV感染の48時間後にFACSを用いて測定した。結果を、表1において提示する。

【0119】

表1. FACS分析の結果(Huh-7研究)

40

【表 1】

	GFP+(%)	GFP 幾何平均
Huh7 細胞対照、感染なし	0.74	6
rAAV2-CB7-CI-eGFP-WPRE-rBG MOI 1E4	88.7	221
AAV2/2-CMV-eGFP-WPRE.bGH (A646) MOI 1E4	90.3	297
AAV2/2-CMV-eGFP-WPRE.bGH (A646) MOI 1E5	90.5	264
AAV2/Anc80 AAP.-CMV-eGFP-WPRE.bGH (A915) MOI 1E5	90.2	177
AAV2/Anc80 AAP.-CMV-eGFP-WPRE.bGH (A915) MOI 1E6	90.4	385
AAV2/Anc80 AAP.-CMV-eGFP-WPRE.bGH (A915) MOI 2E6	92.5	491

注：CB7、ニワトリ β アクチン；eGFP、操作された緑色蛍光タンパク質；
WPRE、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後制御エレメント；MOI、感染多重度；CMV、サイトメガロウイルス

10

【0120】

図7は、Lipo2000とAutogene Huh7キットとを比較する実験を示す。細胞を、24ウェルプレート中で増殖させ(1ウェルあたり1E4)、500ngのDNA EF1s-eGFP-WPRE/ウェルで遺伝子導入した。遺伝子導入の48時間後、細胞を、FACSを用いてアッセイした。リポフェクタミン遺伝子導入は、47~61%のGFP⁺細胞をもたらした。

【0121】

例2：synMUT4発現研究

合成メチルマロニルCoAムターゼ4(synMUT4)を発現する一連のAnc80ベクターコンストラクトを開発し、これは、Anc80.CB7.synMUT4.RBG、Anc80.hAAT.synMUT4.RBG、Anc80.EF1s.synMUT4.HPREおよびAnc80.EF1s.synMUT4を含んだ。8~10週齢のC57BL6(野生型)マウスは、コンストラクト(5E+10)の後眼窩注射(全身性)を受け、21日後に安楽死させた。実験は、1群あたり5個体のマウスにより行い、Anc80.CB7.synMUT4.RBG群を例外とし、この群は、麻酔中の死亡に起因して4個体のマウスを有した。対照群は、注射を受けなかった。全ての主要な臓器を採取した。

synMUT4のための特異的プライマーおよびプローブを用いるqPCRを用いて、発現(mRNA)を決定した。GAPDHを内部対照として用い、レベルを、ddPCR(BioRad)を用いて測定した。

発現を、肝臓(図8)および腎臓(図9)において調べた。synMUT4の相対的レベルは、コンストラクトの全てにおいて、未処置群と比較して増大した。さらに、肝臓において生体分布を調べた(図10)。細胞1つあたりのベクターゲノムは、処置群において、未処置の対照群と比較して、より高かった、

20

30

【0122】

例3：分析的超遠心分離分析

分析的超遠心分離法(AUC)を用いて、Anc80についての参照標準を決定した。図11において示されるとおり、Hek293細胞に、ベクター(AAV2/Anc80 AAP.hAAT.synMUT4.RBG)により、三重遺伝子導入を行い、これを収集し、次いでろ過を用いて前処理した。結果として生じるろ過物を、次いで、2回遠心分離し、これは2つの層の形成をもたらし、一方は空のキャプシドを含み、他方は、ベクターを含む。結果を、Sedfitで分析し、データを図12において提示する。

40

【0123】

例4：ImmTOR粒子はMMAのマウスモデルにおいて良好に耐容される

Mut^{-/-} ; Tg^{INS-MCK-Mut} マウスモデル(MUT)を用いて、ラパマイシンを含む合成ナノキャリア(ImmTORナノ粒子)の効果を研究した(Kishimoto, et al., 2016, Nat Nanotechnol, 11(10): 890-899; Maldonado, et al., 2015, PNAS, 112(2): E156-165)。MUTマウスは、肝臓においてメチルマロニルCoAムターゼを欠損し、これは、筋クレアチンキナーゼ(MCK)プロモーターの制御下における骨格筋におけるMut遺伝子の発現により、新生児期の致死性からレスキューされる。MUTマウスは、重篤な若年性形態のMMAのマウスモデルであり、発達遅滞、食餌性および環境性のストレスに対する感受性、高度に上昇した血清メチルマ

50

ロン酸、および上昇した線維芽細胞増殖因子21(FGF21)を含む、メチルマロン酸血症(MMA)の重要な臨床的および生化学的特徴を呈する(Manoli, et al., 2018, JCI Insight, 3(23): e124351)。MUTマウスは、肝臓のAAV遺伝子治療に対して応答する。

【0124】

MUTマウスは、野生型マウスと比較して、上昇したアルカリホスファターゼレベルを含む低下した肝機能を有する。MUTマウスに、300 μ gのImmTORナノ粒子を投与し、MMAおよびアルカリホスファターゼのレベルを測定し、ImmTORナノ粒子が、肝機能に対して何らかの負の影響を有するか否かを決定した。MMAおよびアルカリホスファターゼのレベルは安定であり、このことは、MUTマウスが、高用量のImmTORを耐容することを示す(図13)。

【0125】

MUTマウスに、Anc80-MUTベクター(2.5×10^{12} vg/kg)を投与するか、または、Anc80-MUTベクターと100もしくは300 μ gのImmTORナノ粒子とを共投与し、ImmTORによる処置が、Anc80-MUTベクターにより処置されているマウスにおいて、体重に対して何らかの負の影響を有するか否かを決定した。Anc80-MUTベクター、Anc80-MUTベクターおよび100 μ gのImmTORナノ粒子、またはAnc80-MUTベクターおよび300 μ gのImmTORナノ粒子により処置されたMUTマウスにおいて、体重増加に著しい差異は存在しなかった(図14)。したがって、ImmTORナノ粒子は、MUTマウスにおいて、良好に耐容される。

【0126】

例5：MMAのマウスモデルにおいてImmTOR粒子はAnc80ベクターに対する免疫応答を低下させる

MUTマウスにおける、Anc80ベクターに対する免疫応答に対するImmTORナノ粒子の効果を調べた。Anc80ベクターを投与されたMUT欠損マウスは、Anc80に対する抗体を生じる。これらの抗体は、Anc80ベクターの治療効果を中和し得る。MUTマウスに、Anc80-CB-ルシフェラーゼベクター(5.0×10^{10} vg/kg)を投与するか、またはAnc80-ルシフェラーゼベクター(5.0×10^{10} vg/kg)と300 μ gのImmTORナノ粒子とを共投与した。投与の14および28日後に、抗Anc80抗体レベルを測定した。両方の時点において、Anc80-ルシフェラーゼベクター(5.0×10^{10} vg/kg)と300 μ gのImmTORナノ粒子とを共投与されたマウスにおいて、Anc80-ルシフェラーゼベクターのみを投与されたマウスと比較して、抗Anc80抗体の減少が観察された(図15)。ここで提示される結果は、Anc80ベクターで処置されたマウスにおいて、ImmTORナノ粒子の同時投与が、抗Anc80抗体の形成を阻害することを示す。

【0127】

例6：MMAのマウスモデルにおいてImmTOR粒子はAnc80-MUTベクターの効力を増大する

MUTマウスに、Anc80-MUTベクター(2.5×10^{12} vg/kg)を投与するか、または、Anc80-MUTベクターと100もしくは300 μ gのImmTORナノ粒子とを共投与し、ImmTORナノ粒子とAnc80-MUTベクターとの共投与が、血清メチルマロン酸(MMA)を低下させるか否かを決定した。Anc80-MUTベクターまたはAnc80-MUTベクターおよびImmTORナノ粒子の投与の14日後、Anc80-MUTベクターとImmTORナノ粒子(100 μ gおよび300 μ gのいずれでも)とを共投与されたMUTマウスにおいて、Anc80-MUTベクターのみを投与されたMUTマウスと比較して、著しいMMAレベルの低下が存在した(図16)。Anc80-MUTベクターまたはAnc80-MUTベクターおよびImmTORナノ粒子の投与の30日後、Anc80-MUTベクターと300 μ gのImmTORナノ粒子とを共投与されたMUTマウスにおいて、Anc80-MUTベクターのみを投与されたMUTマウスと比較して、著しいMMAレベルの低下が存在した(図16)。ここで提示される結果は、ImmTORナノ粒子の同時投与が、Anc80-MUTベクターで処置されたマウスにおいて、MMAの発現を低下させることを示す。

【0128】

加えて、MUTマウスに、Anc80-MUTベクター(2.5×10^{12} vg/kg)を投与するか、または、Anc80-MUTベクターと100もしくは300 μ gのImmTORナノ粒子とを共投与し、ImmTORナノ粒子の共投与が、肝臓におけるAnc80-MUTベクターゲノムを増大させるか否かを決定した。投与または共投与の30日後に、MUT特異的プライマーを用いた定量的PCRにより、Anc80-MUT DNAレベルを測定した。Anc80-MUTベクターのみの投与と比較して、Anc80-MUTベクターとImm

10

20

30

40

50

TORナノ粒子との共投与による、用量依存的なベクターゲノムコピー数の増大が存在した(図17)。この実験の結果は、ImmTORナノ粒子の同時投与が、Anc80-MUTベクターで処置されたマウスにおいて、肝臓におけるAnc80-MUTゲノム数を増大させることを示す。

【0129】

まとめると、この例からの結果は、MMAのマウスモデルにおいて、ImmTORとAnc80-MUTベクターとの単回の同時投与は、Anc80-MUTベクターの効力を増大させることを示す。

【0130】

例7：MMAのマウスモデルにおいてImmTOR粒子の繰り返し投与はAnc80-MUTベクターの効力を増大させる

Anc80-MUTベクターまたはAnc80-MUTベクターの第1の用量、およびImmTORナノ粒子を投与されたMUTマウスに、Anc80-MUTベクターの第2の用量を投与するか、または、Anc80-MUTベクターとImmTORナノ粒子とを共投与して、第2の用量の耐容性および効力を調べた。

【0131】

第1に、Anc80-MUTベクターまたはAnc80ベクターの第1の用量およびImmTORナノ粒子を第0日において投与されたMUTマウスに、第56日において、Anc80-MUTベクターの第2の用量を投与するか、またはAnc80-MUTベクターと100 μ gのImmTORナノ粒子とを共投与し、第2の投与の後、マウスの体重を追跡調査した。ImmTORナノ粒子およびAnc80-MUTベクターの第2の用量を共投与されたMUTマウスは、Anc80-MUTベクターのみを投与されたMITマウスと比較して、著しい早期の体重増加の利益を有した(図18)。

【0132】

Anc80-MUTベクターまたはAnc80ベクターの第1の用量およびImmTORナノ粒子を第0日において投与されたMUTマウスに、第57日において、Anc80-MUTベクターの第2の用量を投与するか、またはAnc80-MUTベクターと100もしくは300 μ gのImmTORナノ粒子とを共投与し、抗Anc80抗体レベルを測定して、ImmTORとAnc80-MUTとの繰り返し共投与が、抗Anc80抗体の形成を阻害するか否かを決定した。Anc80-MUTベクターを投与されたMUTマウスは、第0日における単回投与の後で、および第56日における第2の投与の後で、Anc80に対する抗体を生じる。Anc80-MUTベクターと100または300 μ gのImmTORナノ粒子とを共投与したMUTにおいて、抗Anc80抗体のレベルは、第1の用量の後で増大しなかった。300 μ gの群について、抗Anc80抗体のレベルはまた、第2の用量の後で増大しなかった。100 μ gの群について、抗Anc80抗体レベルは、Anc80-MUT処置されたマウスと比較して、87日間まで低下したままであった(図19)。ここで提示される結果は、Anc80-MUTベクターで処置されたマウスにおいて、ImmTORナノ粒子の同時投与が、第1および第2の用量の後で、抗Anc80抗体の形成を阻害することを示す。

【0133】

また、MUTマウスに、第0日においてAnc80-MUTベクターまたはAnc80ベクターの第1の用量およびImmTORナノ粒子を投与し、第56日においてAnc80-MUTベクターの第2の用量(2.5×10^{12} vg/kg)を投与するか、またはAnc80-MUTベクターと100もしくは300 μ gのImmTORナノ粒子とを共投与した後で、血清MMAレベルを測定した。第1の用量の後の、第56日におけるImmTORナノ粒子の第2の用量のAnc80-MUTベクターとの共投与は、Anc80-MUTベクターのみの投与と比較して、用量依存的な、血清MMAレベルのさらなる低下をもたらす(図20、21)。ここで提示される結果は、第1および第2の用量の後で、Anc80-MUTベクターで処置されたマウスにおいて、ImmTORナノ粒子の同時投与がMMA発現を阻害することを示す。

【0134】

例8：MMAのマウスモデルにおいてImmTOR粒子の繰り返し投与はAnc80-MUTベクターの効力を増大させる

Anc80-CB-LucベクターまたはAnc80-CB-Lucベクターの用量およびImmTORナノ粒子を投与されたMUTマウスに、後で、Anc80-MUTベクターの用量を投与するか、またはAnc80-MUTベクターとImmTORナノ粒子とを共投与し、異なるAnc80ベクターによる第2の用量の耐容性および効力を調べた。

【0135】

10

20

30

40

50

MUTマウスに、第0日に、Anc80-CB-Luc 5E10の第1の用量および300 μ gのImmTORナノ粒子を投与し、次いで、第47日に、Anc80-MUTベクターを投与するか、またはAnc80-MUTベクターおよび300 μ gのImmTORナノ粒子を共投与した(図22)。抗Anc80抗体レベルを測定し、Anc80-CB-LucとImmTORナノ粒子との第1の投与の後の、ImmTORとAnc80-MUTとの共投与が、抗Anc80抗体の形成を阻害するか否かを決定した。抗Anc80抗体のレベルは、Anc80-MUTベクターとImmTORナノ粒子とを共投与されたMUTマウスにおいて、第2の用量の投与の少なくとも30日後まで、減少した(図23)。したがって、ImmTORナノ粒子および異なるAnc80ベクターの第1の投与の後で、ImmTORナノ粒子とAnc80-MUTベクターとの投与は、抗Anc80抗体の形成を阻害する。また、同じプロトコルにより処置されたMUTマウスにおいて、MMAレベルを測定した。MMAのレベルは、Anc80-MUTベクターとImmTORナノ粒子とを共投与されたMUTマウスにおいて、Anc80-CB-Luc 5E10およびImmTORナノ粒子の投与の後で、著しく減少した(図24、25)。したがって、ImmTORナノ粒子および異なるAnc80ベクターの第1の投与の後で、ImmTORナノ粒子とAnc80-MUTとの投与は、MMAの血清レベルを減少させる。

【0136】

例9：繰り返しの高用量のImmTOR粒子は治療効力を提供する

オスおよびメスのMUTマウスに、Anc80-MUTベクターを投与して、抗Anc80抗体を生成させた。抗Anc80抗体を有するマウスを交配して、母系伝達された抗Anc80抗体を有するMUTマウスを作製した(図26)。

【0137】

母系伝達された抗Anc80抗体を有するMUTマウスに、高用量のAnc80-MUTベクター(5.0×10^{12} vg/kg)を投与するか、または、Anc80-MUTベクター(5.0×10^{12} vg/kg)と100もしくは300 μ gのImmTORナノ粒子とを共投与して、ImmTORナノ粒子とAnc80-MUTベクターとの共投与が、MMAレベルに対する抗Anc80抗体の効果を軽減するか否かを調べた(図27)。MUTマウスにおいて、血清MMAレベルについて、臨床的に意味のある低下は存在しなかったが、300 μ gのImmTORナノ粒子を投与された7個体のMUTマウスのうちの7個体は、投与の14日後まで生存したが、一方で、100 μ gのImmTORナノ粒子を投与された5個体のMUTマウスのうちの2個体のみ、Anc80 AAVベクターのみを投与された3個体のMUTマウスのうち2個体が、投与の後14日まで生存した(図21)。マウスに、Anc80-MUTベクター(5.0×10^{12} vg/kg)またはAnc80-MUTベクター(5.0×10^{12} vg/kg)の第2の用量、および100または300 μ gのImmTORナノ粒子を投与した場合、Anc80-MUTベクターの第2の用量および300 μ gのImmTORナノ粒子を投与されたMUTマウスのうちの5/7の生存したマウスが、低下した血清MMAレベルを示した(図28、30)。MMAの重篤度と相関が示されている炎症性サイトカインである線維芽細胞増殖因子21(FGF21)(Manoli et al., JCI Insight. 2018; 3(23):e124351)のレベルに関して、類似の効果が見られ、300 μ gのImmTORと組み合わせたAnc80-MUTの第1および第2の両方の用量が、MUTマウスにおいて、低下したFGF21レベルをもたらした(図29)。

【0138】

加えて、Anc80-MUTベクター(5.0×10^{12} vg/kg)の第2の用量を投与するか、またはAnc80-MUTベクターと100もしくは300 μ gのImmTORナノ粒子とを共投与した、母系伝達された抗Anc80抗体を有するMUTマウスにおいて、体重増加を調べた。Anc80-MUTベクターを投与された3個体のMUTマウスのうちの2個体が、第2の投与を受けるまで生存したが、これらのマウスのうちの1個体は、その後すぐに死亡した(図31)。Anc80-MUTベクターおよび100 μ gのImmTORナノ粒子を投与された5個体のMUTマウスのうちの2個体のみが、第2の投与を受けるまで生存し、2個体の生存したマウスのうちの1個体のみが、第2の投与の後で体重を増加した(図31)。対照的に、Anc80-MUTベクターおよび300 μ gのImmTORナノ粒子を投与された7個体のMUTマウスのうちの7個体が、第2の投与を受けるまで生存し、当該7個体のマウスのうちの6個体が、第2の投与の後で体重を増加した(図31)。

【0139】

したがって、母系伝達された抗Anc80抗体を有するMUTマウスにおいて予め存在した体液性免疫は、第1の投与の後で、Anc80-MUTベクターの最適以下の治療成績をもたらす。高用量のAnc80-MUTベクターと同時に投与される高用量(300 μ g)のImmTORナノ粒子は、第1の投

与の後の生存率を増大させ、繰り返し投与の後で、治療効力を提供する。

【0140】

例10：MMA患者におけるAnc80に対する抗体の発生率

年齢2～23歳のMMA患者における抗Anc80抗体のレベルを測定した。結果を、下の表2において提示する。ここで提示される結果は、MMA患者は、Anc80に対して低い抗体の発生率を有することを示す。

【0141】

表2：MMA患者におけるAnc80に対する抗体の発生率

【表2】

MMA MUT患者	年齢範囲	移植ステータス	Anc-80血清陽性*	Anc-80血清陰性*
合計 N=33	2～32歳	移植していない N=27	2/27	25/27
		移植している N=6	3/6	3/6

10

【図1】

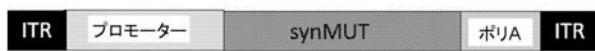


図1

【図2】

肝臓特異的 - ApoE-HAAT-HBB2-synMUT4

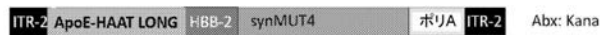
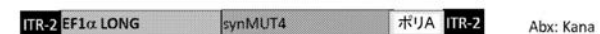


図2

【図3】

構成的 EF1α LONG-synMUT4-rAAV8 および Anc80



構成的 EF1α LONG-HBB2-synMUT4-rAAV8 および Anc80

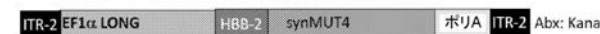


図3

【図4】

肝臓特異的 - ApoE-HAAT SHORT-HBB2-synMUT4-rAAV



図4

【図5】

構成的 EF1α SHORT-synMUT4



図5

【図 6】

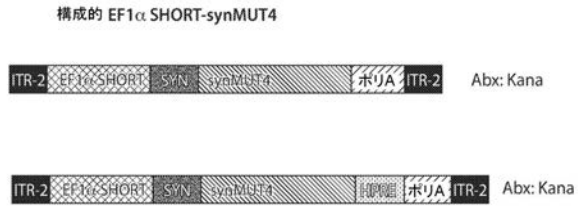


図 6

【図 7】

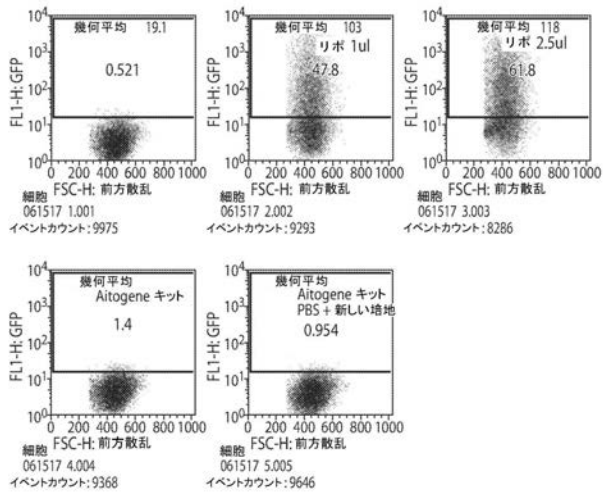


図 7

【図 9】

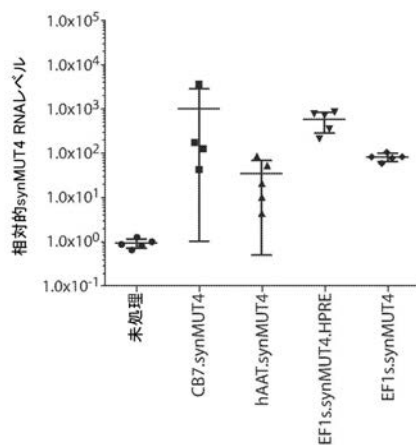


図 9

【図 8】

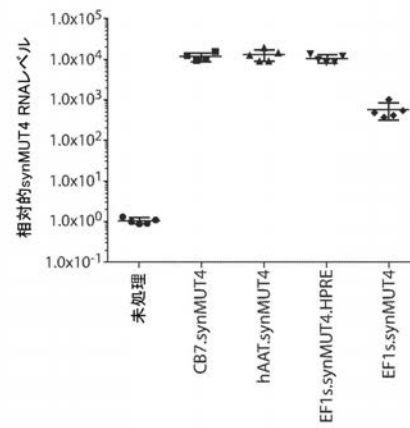


図 8

【図 10】

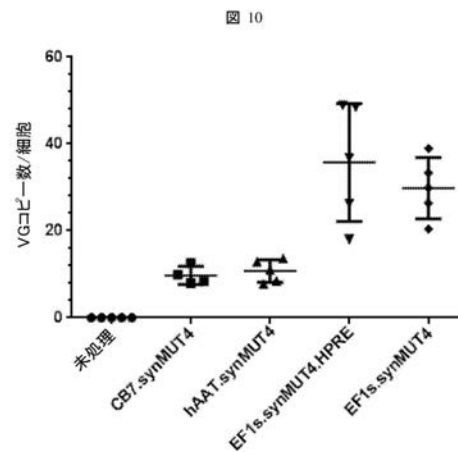
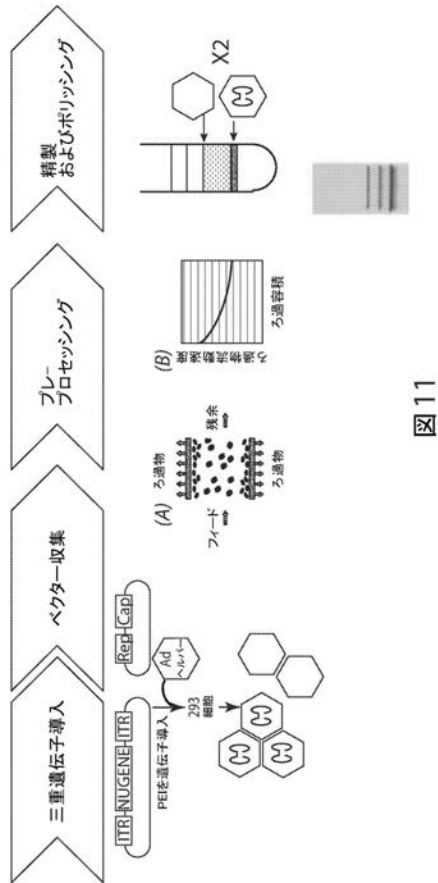
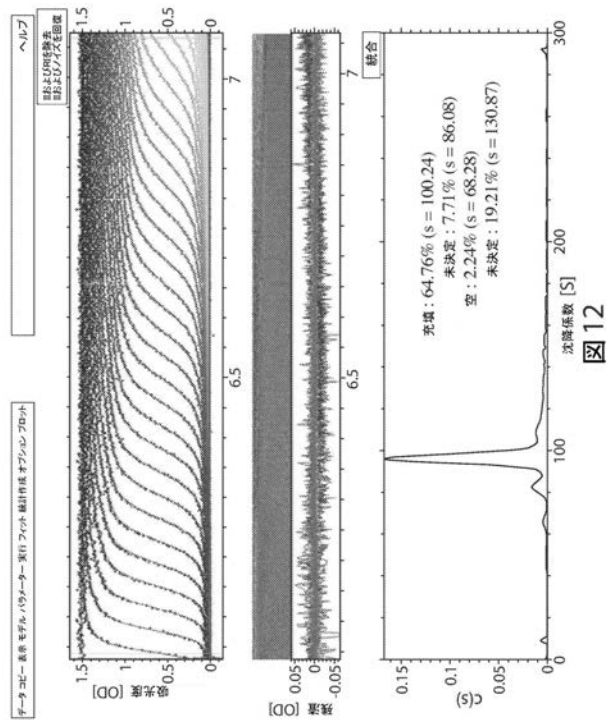


図 10

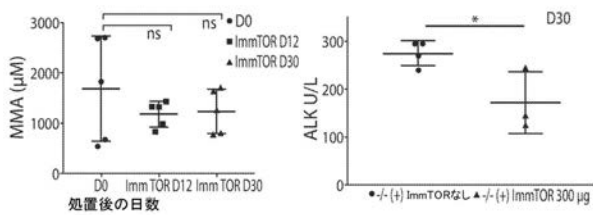
【図 1 1】



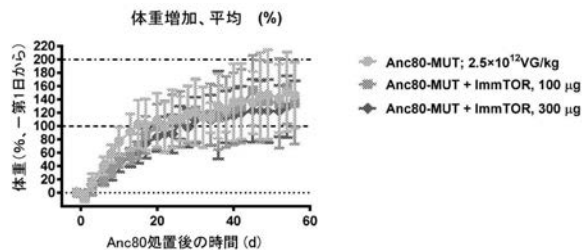
【図 1 2】



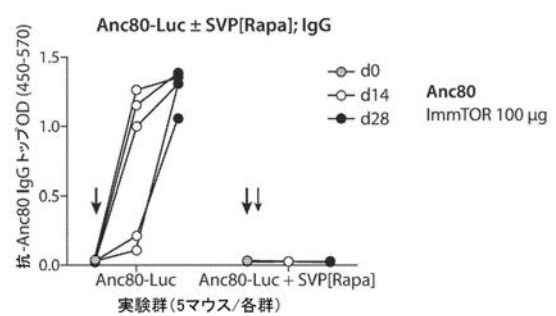
【図 1 3】



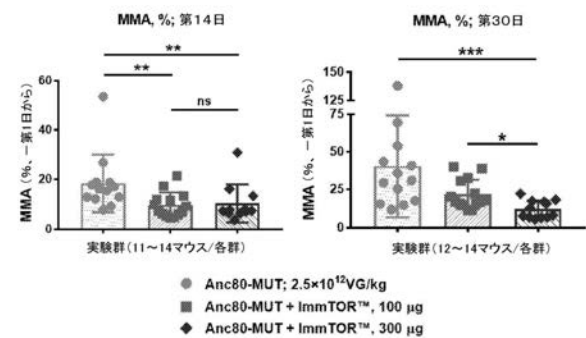
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



【図 17】

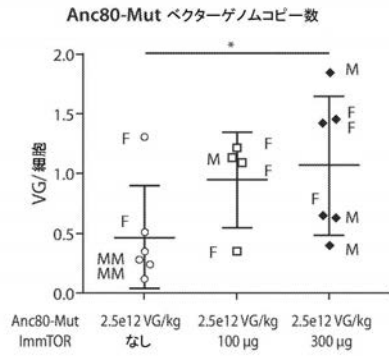


図 17

【図 18】

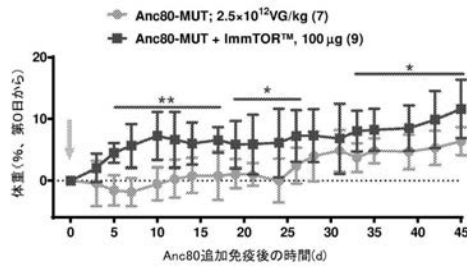


図 18

【図 19】

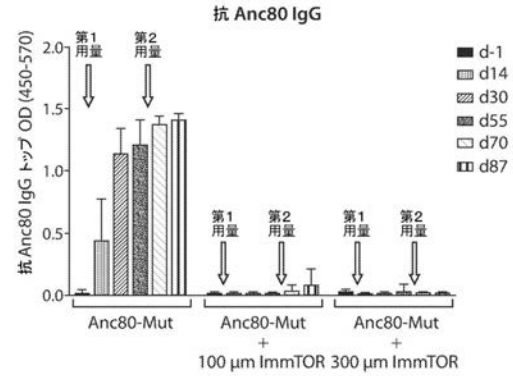


図 19

【図 20】

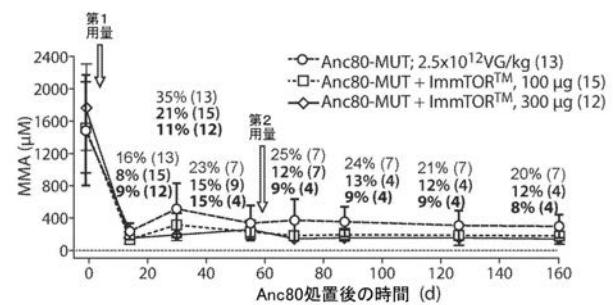


図 20

【図 21】

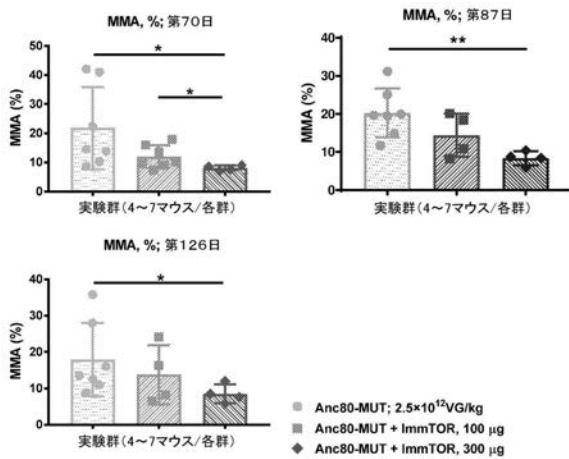


図 21

【図 22】

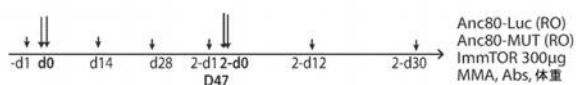


図 22

【図 23】

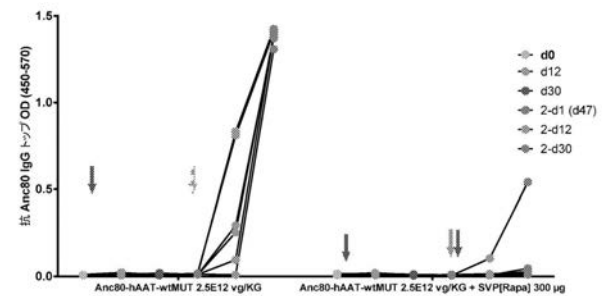


図 23

【図 24】

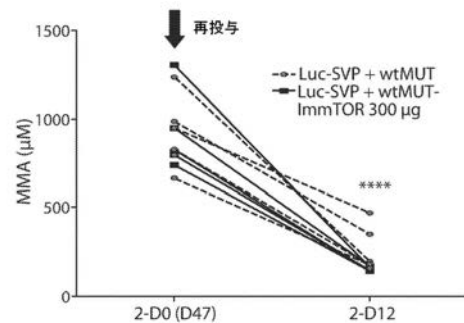


図 24

图 25

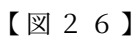


图 29

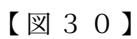


Figure 1 is a line graph showing the change in serum MMA concentration (μM) over time (days) after the first AAV injection. The y-axis represents MMA concentration in μM, ranging from 0 to 4000. The x-axis represents time in days after the first AAV injection, ranging from 0 to 30. An arrow labeled '第1用量' (First dose) points to day 0. Three data series are plotted: Anc80-MUT, 5.0x10E12 VG/kg (3/1) represented by open circles; Anc80-MUT + 100 μg ImmTOT™ (5/2) represented by solid squares; and Anc80-MUT + 300 μg ImmTOT™ (7/7) represented by open diamonds. The 5.0x10E12 VG/kg group shows a sharp decrease in MMA concentration from approximately 4000 μM at day 0 to around 1000 μM by day 10. The other two groups show a more gradual decrease, with the 300 μg ImmTOT™ group maintaining the highest MMA concentration throughout the period.

【图 28】

图 28

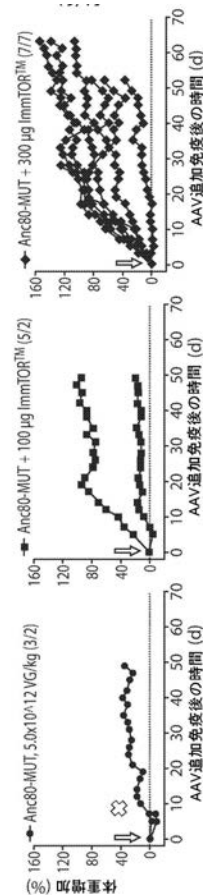
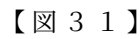


图 31

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/042073

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K48/00 C12N15/86 C12N15/864
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHANDLER R J ET AL: "Anc80 and SVP Rapamycin: A novel approach to AAV gene therapy for methylmalonic acidemia", HUMAN GENE THERAPY 2017 MARY ANN LIEBERT INC. NLD, vol. 28, no. 12, 2017, XP9516168, ISSN: 1557-7422 the whole document ----- -/--	1-59

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 September 2019

Date of mailing of the international search report

02/10/2019

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chavanne, Franz

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/042073

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TAKASHI K. KISHIMOTO ET AL: "Improving the efficacy and safety of biologic drugs with tolerogenic nanoparticles", NATURE NANOTECHNOLOGY, vol. 11, no. 10, 1 August 2016 (2016-08-01), pages 890-899, XP55371105, London ISSN: 1748-3387, DOI: 10.1038/nnano.2016.135 the whole document -----	14-38
A	ROBERTO A MALDONADO ET AL: "Polymeric synthetic nanoparticles for the induction of antigen-specific immunological tolerance", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (PNAS), US, [Online] vol. 112, no. 2, 13 January 2015 (2015-01-13), pages E156-E165, XP002764343, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.1408686111 Retrieved from the Internet: URL:http://www.pnas.org/content/112/2/E156.full.pdf> [retrieved on 2014-12-29] the whole document -----	14-38
X,P	ILYINSKII P O ET AL: "Combination of an engineered AAV vector Anc80 and tolerogenic nanoparticles encapsulating rapamycin enables efficient transgene expression in mice with pre-existing neutralizing antibodies and provides a therapeutic benefit in a mouse model of methylmalonic acidemia", HUMAN GENE THERAPY; CONFERENCE ON CHANGING THE FACE OF MODERN MEDICINE - STEM CELL AND GENE THERAPY; OCTOBER 16 -19, 2018, LIEBERT, US; LAUSANNE, SWITZERLAND, [Online] vol. 29, no. 12, 1 December 2018 (2018-12-01), page A168, XP009516174, ISSN: 1043-0342 Retrieved from the Internet: URL:http://online.liebertpub.com/loi/hum> the whole document ----- -/--	1-59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/042073

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	LI LINA ET AL: "The Combination Therapy of ImmTOR (TM) with AAV Anc80 is Therapeutic, Safe, and Repeatable in Mice with Methylmalonic Acidemia, and Compatible with the Low Seroprevalence of Anc80 Nabs in the Patient Population", MOLECULAR THERAPY, vol. 27, no. 4, Suppl. 1, 22 April 2019 (2019-04-22), page 202, XP9516172, & 22ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-GENE-AND-CELL-THERAPY (ASGCT); WASHINGTON, DC, USA; APRIL 29 -MAY 02, 2019 the whole document -----	1-59

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 13/02 (2006.01)	A 6 1 P 13/02	
A 6 1 K 31/436 (2006.01)	A 6 1 K 31/436	
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 47/60	
A 6 1 K 47/59 (2017.01)	A 6 1 K 47/59	
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	
A 6 1 K 9/16 (2006.01)	A 6 1 K 9/16	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N 15/61 (2006.01)	C 1 2 N 15/61	

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

(71)出願人 521025717

ナショナル インスティテューツ オブ ヘルス、ア コンポーネント オブ ザ ユナイテッド
ステイツ デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービスズ
NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, A COMPONENT OF
THE UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND
HUMAN SERVICES
アメリカ合衆国 メリーランド州 20892、ロックビル、エグゼクティブ ブールバード 6
011、エムエスシー 7660、スイート 325
6011 Executive Boulevard, Suite 325, MSC 766
0, Rockville, MD 20892, United States of Ame
rica

(74)代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(72)発明者 ケラー, ペーター

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01915、ビバリー、ベリーウッド レーン 3

(72)発明者 キシモト, タカシ ケイ

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 アベニュー 4
6

(72)発明者 ベンディッティ, チャールズ ピー.

アメリカ合衆国 メリーランド州 20892-4472、ベセスダ、ロックビル パイク 90
00、ビルディング 10、ルーム 7エヌ248エー、ナショナル インスティテューツ オブ
ヘルス ナショナル ヒューマン ゲノム リサーチ インスティテュート

(72)発明者 シャンドラー, ランディー ジェイ.

アメリカ合衆国 メリーランド州 20892-4472、ベセスダ、ロックビル パイク 90
00、ビルディング 10、ルーム 5ビー39、ナショナル インスティテューツ オブ ヘル
ス ナショナル ヒューマン ゲノム リサーチ インスティテュート

Fターム(参考) 4C076 AA31 AA65 BB11 CC17 CC41 EE23A EE24A EE59 FF02 FF32
FF68

4C084 AA13 AA19 MA02 MA05 MA66 NA05 NA10 NA14 ZA811 ZA812

ZB082 ZC751
4C086 AA01 AA02 CB22 MA02 MA05 NA05 NA10 NA14 ZA81 ZB08
ZC75
4C087 AA01 AA02 BC83 MA02 MA05 MA66 NA05 NA10 NA14 ZA81
ZC75