

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-513851
(P2025-513851A)

(43)公表日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 B 0 6 3
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	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 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/5386(2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 C 0 8 7

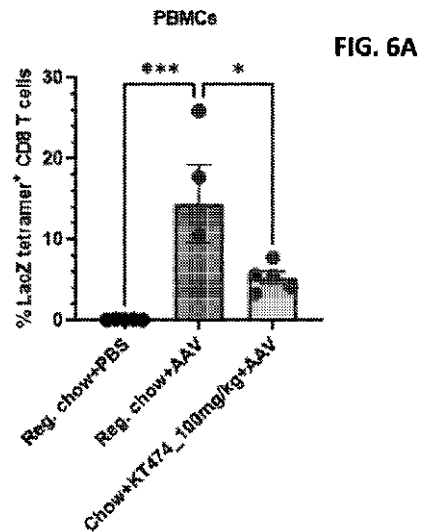
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全73頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-560405(P2024-560405)	(71)出願人	500034653 ジェンザイム・コーポレーション アメリカ合衆国02141マサチューセ ツ州ケンブリッジ・ウォーター・スト リート450
(86)(22)出願日	令和5年4月12日(2023.4.12)	(74)代理人	100127926 弁理士 結田 純次
(85)翻訳文提出日	令和6年12月5日(2024.12.5)	(74)代理人	100216105 弁理士 守安 智
(86)国際出願番号	PCT/US2023/065689	(72)発明者	ソウラブ・ロイ・チョードリー アメリカ合衆国マサチューセツ州02 141.ケンブリッジ・ウォーター・ス トリート450.サノフィ・パテント・ デパートメント
(87)国際公開番号	WO2023/201274	(72)発明者	モナ・モトワニ
(87)国際公開日	令和5年10月19日(2023.10.19)		
(31)優先権主張番号	63/330,245		
(32)優先日	令和4年4月12日(2022.4.12)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,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 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 遺伝子治療のための I R A K 4 モジュレーターの使用

(57)【要約】

遺伝子治療に対する自然免疫を抑制するために、I R A K 分解剤を遺伝子治療と共に投与することにより、個体における遺伝子治療を強化する方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、遺伝子治療は、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス(HSV)ベクター又は脂質ナノ粒子を使用する。遺伝子治療剤と組み合わせたI R A K 分解剤による治療について個体を選択する方法も本明細書で提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達する方法であって、

- a) I R A K 分解剤を前記個体に投与することと、
- b) 遺伝子治療剤を前記個体に投与することと

を含む方法。

【請求項 2】

遺伝子治療剤を用いて、治療を必要とする個体を治療する方法であって、

- a) I R A K 分解剤を前記個体に投与することと、
- b) 前記遺伝子治療剤を前記個体に投与することと

を含む方法。

10

【請求項 3】

遺伝子治療の改善を、それを必要とする個体において行う方法であって、

- a) I R A K 分解剤を前記個体に投与することと、
- b) 遺伝子治療剤を前記個体に投与することと

を含む方法。

【請求項 4】

遺伝子治療剤に対する免疫応答の抑制を、それを必要とする個体において行う方法であって、

- a) I R A K 分解剤を前記個体に投与することと、
- b) 遺伝子治療剤を前記個体に投与することと

を含む方法。

20

【請求項 5】

前記 I R A K 分解剤は、I R A K プロテインキナーゼの活性又は発現を調節する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 I R A K プロテインキナーゼは、I R A K - 1 プロテインキナーゼ、I R A K - 2 プロテインキナーゼ、I R A K - 3 プロテインキナーゼ又は I R A K - 4 プロテインキナーゼである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

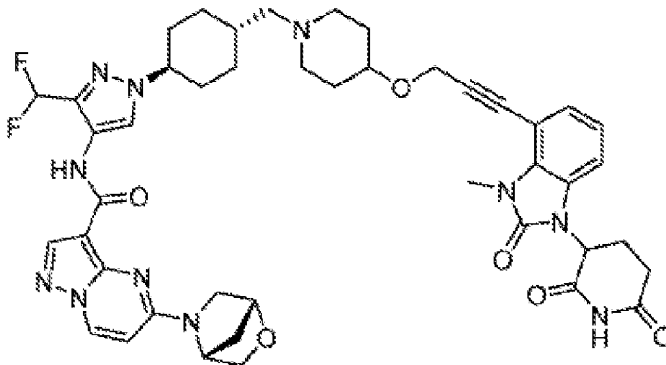
前記 I R A K 分解剤は、I R A K - 4 プロテインキナーゼの活性又は発現を調節する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記 I R A K 分解剤は、式 [I] :

【化 1】



40

[I]

の化合物又はその薬学的に許容される塩を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

50

前記遺伝子治療剤は、ウイルスベクターを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記ウイルスベクターは、AAV粒子である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記AAV粒子は、AAV1カプシド、AAV2カプシド、AAV3カプシド、AAV4カプシド、AAV5カプシド、AAV6カプシド、AAV7カプシド、AAV8カプシド、AAVrh8カプシド、AAV9カプシド、AAV10カプシド、AAVrh10カプシド、AAV11カプシド、AAV12カプシド、AAVrh32.33カプシド、AAV-XL32カプシド、AAV-XL32.1カプシド、AAV LK03カプシド、AAV2R471Aカプシド、AAV2/2-7m8カプシド、AAV DJカプシド、AAV DJ8カプシド、AAV2 N587Aカプシド、AAV2 E548Aカプシド、AAV2 N708Aカプシド、AAV V708Kカプシド、ヤギAAVカプシド、AAV1/AAV2キメラカプシド、ウシAAVカプシド、マウスAAVカプシド、rAAV2/HBoV1(キメラAAV/ヒトボカウイルスウイルス1)、AAV2HBKOカプシド、AAVPHP.Bカプシド若しくはAAVPHP.eBカプシド又はその機能的バリエーションを含む、請求項 10 に記載の方法。

10

【請求項 12】

前記AAVカプシドは、チロシン変異、ヘパリン結合変異又はHBKO変異を含む、請求項 11 に記載の方法。

20

【請求項 13】

前記AAVウイルス粒子は、1つ以上の逆位末端反復(ITR)を含むAAVゲノムを含み、前記1つ以上のITRは、AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AAV4 ITR、AAV5 ITR、AAV6 ITR、AAV7 ITR、AAV8 ITR、AAVrh8 ITR、AAV9 ITR、AAV10 ITR、AAVrh10 ITR、AAV11 ITR又はAAV12 ITRである、請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記AAV粒子の前記1つ以上のITR及び前記カプシドは、同じAAV血清型に由来する、請求項 13 に記載の方法。

30

【請求項 15】

前記AAV粒子の前記1つ以上のITR及び前記カプシドは、異なるAAV血清型に由来する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記ウイルスベクターは、アデノウイルス粒子である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 17】

前記アデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24~30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAd若しくはブタAd3型又はその機能的バリエーションからのカプシドを含む、請求項 16 に記載の方法。

40

【請求項 18】

前記ウイルスベクターは、レンチウイルス粒子である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 19】

前記組換えレンチウイルス粒子は、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリパーウイルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス、狂犬病ウイルス、RD114又はその機能的バリエーションで偽型化されている、請求項 18 に記載の方法。

50

【請求項 20】

前記ウイルスベクターは、単純ヘルペスウイルス（HSV）粒子である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 21】

前記 HSV 粒子は、HSV - 1 粒子若しくは HSV - 2 粒子又はその機能的バリエーションである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記遺伝子治療剤は、脂質ナノ粒子を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記遺伝子治療剤は、異種導入遺伝子をコードする核酸を含む、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記異種導入遺伝子は、プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記プロモーターは、構成的プロモーター、組織特異的プロモーター又は誘導性プロモーターである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記 IRAK 分解剤は、前記遺伝子治療剤の投与前、それと同時に又はその後に投与される、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記個体は、遺伝子治療による治療に適した疾患又は障害を有する、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記疾患又は障害は、単一遺伝子疾患又は障害である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記遺伝子治療剤は、静脈内、腹腔内、動脈内、筋肉内、皮下又は肝臓内に投与される、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記 IRAK 分解剤は、経口、静脈内、腹腔内、動脈内、筋肉内、皮下又は肝臓内に投与される、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

核酸を、それを必要とする個体において個体の細胞に送達する方法であって、
 a) 前記個体からの自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートすることと、
 b) 1 つ以上のサイトカインの発現について前記自然免疫細胞を分析することであって、前記遺伝子治療剤とのインキュベーション後のサイトカインシグネチャーの発現は、前記遺伝子治療剤に対する自然免疫を有する個体を特定する、分析することと、
 c) ステップ b) で特定された前記個体に IRAK 分解剤を投与することと、
 d) ステップ b) で特定された前記個体に前記遺伝子治療剤を投与することとを含む方法。

【請求項 32】

治療を必要とする個体を治療する方法であって、
 a) 前記個体からの自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートすることと、
 b) 1 つ以上のサイトカインの発現について前記自然免疫細胞を分析することであって、前記遺伝子治療剤とのインキュベーション後のサイトカインシグネチャーの発現は、前記遺伝子治療剤に対する自然免疫を有する個体を特定する、分析することと、
 c) ステップ b) で特定された前記個体に IRAK 分解剤を投与することと、
 d) ステップ b) で特定された前記個体に前記遺伝子治療剤を投与することとを含む方法。

10

20

30

40

50

【請求項 33】

遺伝子治療剤及び I R A K 分解剤による治療について個体を選択する方法であって、
 a) 前記個体からの自然免疫細胞を前記遺伝子治療剤とインキュベートすること、
 b) 1 つ以上のサイトカインの発現について前記自然免疫細胞を分析することであって、
 前記遺伝子治療剤とのインキュベーション後のサイトカインシグネチャーの発現は、遺伝子治療剤及び I R A K 分解剤による治療のための個体を特定する、分析すること、
 c) 遺伝子治療剤及び I R A K 分解剤による治療について、ステップ b) で特定された前記個体を選択すること
 を含む方法。

【請求項 34】

前記自然免疫細胞は、樹状細胞、単球、マクロファージ又はナチュラルキラー (NK) 細胞である、請求項 31 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記自然免疫細胞は、前記個体からの末梢血単核細胞から単離される、請求項 31 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記自然免疫細胞は、樹状細胞である、請求項 31 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記樹状細胞は、前記個体の単球に由来する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記個体から単球を単離することと、
 樹状細胞培養培地中で前記単球をインキュベートして、樹状細胞を前記遺伝子治療剤とインキュベートする前に前記単球から前記樹状細胞を誘導することと
 をさらに含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記単球は、CD14+ 単球である、請求項 37 又は 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記単球は、前記単球から樹状細胞を誘導するために、前記樹状細胞培養培地と約 5 ~ 約 10 日間又は約 7 ~ 約 8 日間にわたってインキュベートされる、請求項 37 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記樹状細胞は、ステップ c) の前記遺伝子治療剤との前記インキュベーション前に再播種される、請求項 31 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記樹状細胞は、マイクロウェル皿に再播種される、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

前記遺伝子治療剤は、ウイルスベクターであり、前記自然免疫細胞は、約 1×10^3 ~ 約 1×10^5 又は約 1×10^4 の MOI で前記ウイルスベクターとインキュベートされる、請求項 31 ~ 42 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

前記遺伝子治療剤は、非ウイルスベクターであり、前記自然免疫細胞は、約 1 ng / mL ~ 約 1 mg / mL の濃度で前記非ウイルスベクターとインキュベートされる、請求項 31 ~ 42 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

前記自然免疫細胞は、前記遺伝子治療剤と約 12 時間 ~ 約 36 時間又は約 24 時間にわたってインキュベートされる、請求項 31 ~ 44 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 46】

前記サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1 及び MIP-1 の 1 つ以上の発現の増加を含む、請求項 31 ~ 45 のいずれか一項に記載の方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 47】

前記サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の発現の増加を含む、請求項31～46のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 48】

前記サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF及びIL-1の発現の増加を含む、請求項31～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 49】

前記サイトカインシグネチャーにおける前記サイトカインの発現は、適切な対照と比較して増加する、請求項31～48のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 50】

前記適切な対照は、前記遺伝子治療剤とインキュベートされていない自然免疫細胞からの前記サイトカインシグネチャーにおける前記サイトカインの前記発現であるか、又は前記適切な対照は、前記遺伝子治療剤とのインキュベーション前の自然免疫細胞からの前記サイトカインシグネチャーにおける前記サイトカインの発現である、請求項49に記載の方法。

【請求項 51】

前記IRAK分解剤は、IRAKプロテインキナーゼの活性を調節する、請求項31～50のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

前記IRAKプロテインキナーゼは、IRAK-1プロテインキナーゼ、IRAK-2プロテインキナーゼ、IRAK-3プロテインキナーゼ又はIRAK-4プロテインキナーゼである、請求項51に記載の方法。

20

【請求項 53】

前記IRAK分解剤は、IRAK-4プロテインキナーゼの活性を調節する、請求項31～52のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 54】

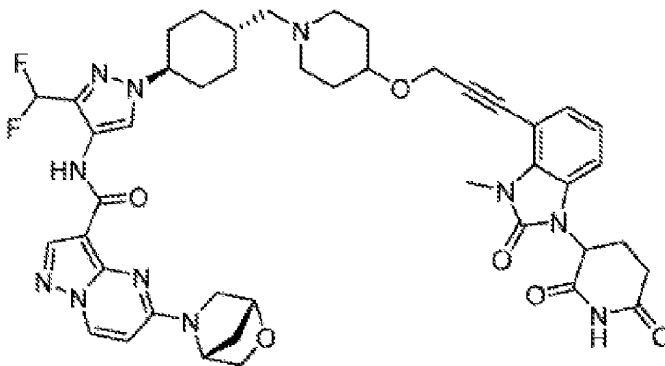
前記IRAK分解剤は、小分子である、請求項31～52のいずれか一項に記載の方法

【請求項 55】

前記IRAK分解剤は、式[I]：

30

【化 2】



40

[I]

の化合物又はその薬学的に許容される塩を含む、請求項31～54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 56】

前記IRAK分解剤は、TLR9機能を遮断する、請求項31～55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】

50

前記遺伝子治療剤は、ウイルスベクターである、請求項 31 ~ 56 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 58】

前記ウイルスベクターは、AAV粒子である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記 AAV 粒子は、AAV1 カプシド、AAV2 カプシド、AAV3 カプシド、AAV4 カプシド、AAV5 カプシド、AAV6 カプシド、AAV7 カプシド、AAV8 カプシド、AAVrh8 カプシド、AAV9 カプシド、AAV10 カプシド、AAVrh10 カプシド、AAV11 カプシド、AAV12 カプシド、AAVrh32.33 カプシド、AAV-XL32 カプシド、AAV-XL32.1 カプシド、AAV LK03 カプシド、AAV2R471A カプシド、AAV2/2-7m8 カプシド、AAV DJ カプシド、AAV DJ8 カプシド、AAV2 N587A カプシド、AAV2 E548A カプシド、AAV2 N708A カプシド、AAV V708K カプシド、ヤギ AAV カプシド、AAV1/AAV2 キメラカプシド、ウシ AAV カプシド、マウス AAV カプシド、rAAV2/HBoV1 (キメラ AAV/ヒトボカウイルスウイルス1)、AAV2 HBKO カプシド、AAV PHP.B カプシド若しくは AAV PHP.eB カプシド又はその機能的バリエーションを含む、請求項 58 に記載の方法。

10

【請求項 60】

前記 AAV カプシドは、チロシン変異、ヘパリン結合変異又は HBKO 変異を含む、請求項 59 に記載の方法。

20

【請求項 61】

前記 AAV ウイルス粒子は、1つ以上の逆位末端反復 (ITR) を含む AAV ゲノムを含み、前記 1つ以上の ITR は、AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AAV4 ITR、AAV5 ITR、AAV6 ITR、AAV7 ITR、AAV8 ITR、AAVrh8 ITR、AAV9 ITR、AAV10 ITR、AAVrh10 ITR、AAV11 ITR 又は AAV12 ITR である、請求項 58 ~ 60 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 62】

前記 AAV 粒子の前記 1つ以上の ITR 及び前記カプシドは、同じ AAV 血清型に由来する、請求項 61 に記載の方法。

30

【請求項 63】

前記 AAV 粒子の前記 1つ以上の ITR 及び前記カプシドは、異なる AAV 血清型に由来する、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 64】

前記ウイルスベクターは、アデノウイルス粒子である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 65】

前記アデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型 2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24 ~ 30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシ Ad3 型、イヌ Ad2 型、ヒツジ Ad 若しくはブタ Ad3 型又はその機能的バリエーションからのカプシドを含む、請求項 64 に記載の方法。

40

【請求項 66】

前記ウイルスベクターは、レンチウイルス粒子である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 67】

前記組換えレンチウイルス粒子は、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)、ロスリパーウイルス (RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス、狂犬病ウイルス、RD114 又はその機能的バリエーションで偽型化されている、請求項 66 に記載の方法。

50

【請求項 68】

前記ウイルスベクターは、単純ヘルペスウイルス（HSV）粒子である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 69】

前記 HSV 粒子は、HSV - 1 粒子若しくは HSV - 2 粒子又はその機能的バリエーションである、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 70】

前記遺伝子治療剤は、脂質ナノ粒子である、請求項 31 ~ 56 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 71】

前記遺伝子治療剤は、異種導入遺伝子をコードする核酸を含む、請求項 31 ~ 70 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 72】

前記異種導入遺伝子は、プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 73】

前記プロモーターは、構成的プロモーター、組織特異的プロモーター又は誘導性プロモーターである、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

前記 IRAK 分解剤は、前記遺伝子治療剤の投与前、それと同時に又はその後に投与される、請求項 31 ~ 73 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 75】

前記個体は、遺伝子治療による治療に適した疾患又は障害を有する、請求項 31 ~ 74 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 76】

前記疾患又は障害は、単一遺伝子疾患又は障害である、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 77】

前記遺伝子治療剤は、静脈内、腹腔内、動脈内、筋肉内、皮下又は肝臓内に投与される、請求項 31 ~ 76 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 78】

前記 IRAK 分解剤は、経口、静脈内、腹腔内、動脈内、筋肉内、皮下又は肝臓内に投与される、請求項 31 ~ 77 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 79】

前記 IRAK モジュレーターは、CD8 T 細胞を活性化する、請求項 1 ~ 78 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 80】

核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達するための医薬の製造における組成物の使用であって、前記組成物は、遺伝子治療剤を含み、前記組成物は、IRAK 分解剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用。

【請求項 81】

核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達するための医薬の製造における組成物の使用であって、前記組成物は、IRAK 分解剤を含み、前記組成物は、遺伝子治療剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用。

【請求項 82】

遺伝子治療を必要とする個体を治療するための医薬の製造における組成物の使用であって、前記組成物は、遺伝子治療剤を含み、前記組成物は、IRAK 分解剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用。

【請求項 83】

遺伝子治療を必要とする個体を治療するための医薬の製造における組成物の使用であって、前記組成物は、IRAK 分解剤を含み、前記組成物は、遺伝子治療剤と組み合わせた

10

20

30

40

50

使用のために製剤化される、使用。

【請求項 84】

遺伝子治療を必要とする個体における遺伝子治療に対する免疫応答を調節するための医薬の製造における組成物の使用であって、前記組成物は、遺伝子治療剤を含み、前記組成物は、I R A K分解剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用。

【請求項 85】

個体における遺伝子治療に対する免疫応答を調節するための医薬の製造における組成物の使用であって、前記組成物は、I R A K分解剤を含み、前記組成物は、遺伝子治療剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用。

【請求項 86】

前記遺伝子治療剤は、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子である、請求項 80 ~ 85 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 87】

前記I R A K分解剤は、I R A K - 4分解剤である、請求項 80 ~ 86 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 88】

核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達することにおける使用のための遺伝子治療剤を含む組成物であって、前記遺伝子治療剤は、I R A K分解剤と組み合わせて使用される、組成物。

【請求項 89】

核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達することにおける使用のためのI R A K分解剤を含む組成物であって、前記I R A K分解剤は、遺伝子治療剤と組み合わせて使用される、組成物。

【請求項 90】

遺伝子治療を必要とする個体の治療における使用のための遺伝子治療剤を含む組成物であって、前記遺伝子治療剤は、I R A K分解剤と組み合わせて使用される、組成物。

【請求項 91】

遺伝子治療を必要とする個体の治療における使用のためのI R A K分解剤を含む組成物であって、前記I R A K分解剤は、遺伝子治療剤と組み合わせて使用される、組成物。

【請求項 92】

遺伝子治療を必要とする個体における遺伝子治療に対する免疫応答を調節するためのI R A K分解剤を含む組成物であって、前記I R A K分解剤は、遺伝子治療剤と組み合わせて使用される、組成物。

【請求項 93】

遺伝子治療を必要とする個体における遺伝子治療に対する免疫応答を抑制するためのI R A K分解剤を含む組成物であって、前記I R A K分解剤は、遺伝子治療剤と組み合わせて使用される、組成物。

【請求項 94】

前記遺伝子治療剤は、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子である、請求項 88 ~ 93 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 95】

前記I R A K分解剤は、I R A K - 4分解剤である、請求項 88 ~ 94 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 96】

請求項 1 ~ 79 のいずれか一項に記載の方法における使用のためのキット。

【請求項 97】

請求項 80 ~ 87 のいずれか一項に記載の使用のためのキット。

【請求項 98】

請求項 92 ~ 97 のいずれか一項に記載の組成物を含むキット。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022年4月12日に出願された米国仮特許出願第63/330,245号明細書の優先権を主張し、その全体が参照により組み込まれる。

【0002】

配列表の参照

電子配列リスト(159792018240 SEQLIST.xml、サイズ:1,990バイト及び作成日:2023年4月12日)の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0003】

本発明は、遺伝子治療に対する自然免疫を抑制するために、IRAK分解剤を遺伝子治療と共に投与することにより、個体における遺伝子治療を強化する方法に関する。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療剤と組み合わせたIRAK分解剤による治療について個体を選択する方法を提供する。

【背景技術】

【0004】

希少な遺伝子疾患の治療のための遺伝子治療の成功は、組織特異的な指向性、静止細胞の形質導入及び改変遺伝子発現の維持を含む、多くの魅力的な特徴を提供するアデノ随伴ウイルス(AAV)ウイルスベクターに大きく依存している。しかし、AAVベクターに対する免疫応答は、臨床解釈の成功に対して大きい課題をもたらす。カプシド、ウイルスゲノム及び導入遺伝子は、免疫系の自然免疫及び適応免疫の両方の活性化を含む免疫応答を引き起こす。その後、TLR経路によって活性化された自然免疫系は、病原体に曝露されたヒトのB細胞及びT細胞で適応免疫応答を誘発する(Iawaski, A及びMedzhitov, R, Nat Immunol 2004 5(10):987-985)。いくつかのマウス研究に基づき、CpGリッチの低メチル化DNAを認識するエンドソームDNAセンサーTLR9がAAVベクターのゲノム認識で重要な役割を果たすことが示されている。TLR9によって誘発されるシグナル伝達カスケードは、適応免疫応答を活性化し、最終的にT細胞媒介性細胞傷害による導入遺伝子誘導細胞のクリアランスをもたらす。TLR9センサーを欠くマウスは、より長い導入遺伝子発現の維持及び免疫応答の低下を示す(Ashley, S Net al., Cell Immunol 2019 Dec; 346:103997及びFaust SM et al., J Clin Invest 2013 123(7):2994-3001)。このデータと一致して、血友病臨床試験では、CpG塩基の総数の減少が血友病患者で薬理的免疫抑制剤の必要性を減少させ、細胞傷害性Tリンパ球反応の低下を示すことが明らかになった一方、導入遺伝子中により多くのCpG塩基を含有するベクターを投与された患者は、免疫抑制剤の必要量がはるかに多かった(Wright, JF Mol. Ther. 2020 28(3):701-703)。広範に作用する免疫抑制剤は、臨床試験でAAV送達を改善することに成功しているが、依然として導入遺伝子発現の喪失を生じ、副作用及び日和見感染のリスクを呈する。CpG塩基を有しないベクターの開発は、コドン最適化されていないベクター(すなわちCpG含有量がないか又は低いベクター)が不十分な導入遺伝子発現を示すために課題である(Wright, JF Mol. Ther. 2020 28(3):701-703)。したがって、強化された特異性及び少ない副作用を示す、異なるクラスの免疫分解剤が必要とされている。

20

30

40

【0005】

特許出願及び刊行物を含む、本明細書で引用される全ての参照文献は、その全体が参照により組み込まれる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

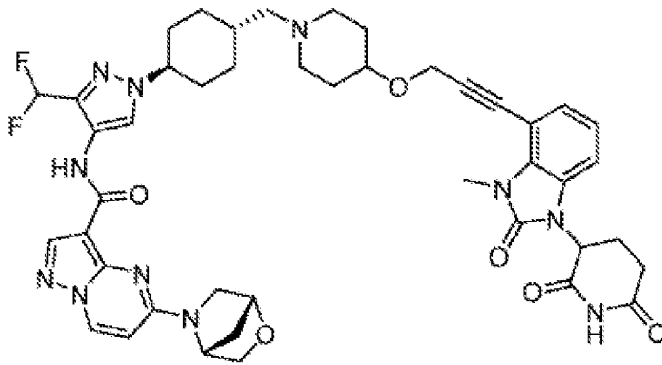
50

いくつかの態様では、本発明は、核酸を個体の細胞に送達する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することを含む。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療剤を用いて、それを必要とする個体を治療する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することを含む。いくつかの態様では、本発明は、個体における遺伝子治療を改善する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することを含む。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療剤に対する免疫応答を抑制する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することを含む。

【0007】

本発明のいくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、IRAKプロテインキナーゼの活性又は発現を調節する。いくつかの実施形態では、IRAKプロテインキナーゼは、IRAK-1プロテインキナーゼ、IRAK-2プロテインキナーゼ、IRAK-3プロテインキナーゼプロテインキナーゼ又はIRAK-4プロテインキナーゼである。いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、IRAK-4プロテインキナーゼの活性又は発現を調節する。いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、式[I]：

【化1】



[I]

の化合物又はその薬学的に許容される塩を含む。

【0008】

いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤は、ウイルスベクターを含む。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、AAV粒子である。いくつかの実施形態では、AAV粒子は、AAV1カプシド、AAV2カプシド、AAV3カプシド、AAV4カプシド、AAV5カプシド、AAV6カプシド、AAV7カプシド、AAVrh8カプシド、AAV9カプシド、AAV10カプシド、AAVrh10カプシド、AAV11カプシド、AAV12カプシド、AAVrh32.33カプシド、AAV-XL32カプシド、AAV-XL32.1カプシド、AAV-LK03カプシド、AAV2R471Aカプシド、AAV2/2-7m8カプシド、AAV-DJカプシド、AAV-DJ8カプシド、AAV2-N587Aカプシド、AAV2-E548Aカプシド、AAV2-N708Aカプシド、AAV-V708Kカプシド、ヤギAAVカプシド、AAV1/AAV2キメラカプシド、ウシAAVカプシド、マウスAAVカプシド、rAAV2/HBoV1(キメラAAV/ヒトボカウイルスウイルス1)、AAV2HBKOカプシド、AAVPHP.Bカプシド若しくはAAVPHP.eBカプシド又はその機能的バリエーションを含む。いくつかの実施形態では、AAVカプシドは、チロシン変異、ヘパリン結合変異又はHBKO変異を含む。いくつかの実施形態では、AAVウイルス粒子は、1つ以上の逆位末端反復(ITR)を含むAAVゲノムを含み、1つ以上のITRは、AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AAV4 ITR、AAV5 ITR、AAV6 ITR、AAV7 ITR、AAV8 ITR、AAVrh8 ITR、AAV

9 ITR、AAV10 ITR、AAVrh10 ITR、AAV11 ITR又はAAV12 ITRである。いくつかの実施形態では、AAV粒子の1つ以上のITR及びカプシドは、同じAAV血清型に由来する。いくつかの実施形態では、AAV粒子の1つ以上のITR及びカプシドは、異なるAAV血清型に由来する。

【0009】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、アデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24~30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAd若しくはブタAd3型又はその機能的バリエーションからのカプシドを含む。

10

【0010】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、レンチウイルス粒子は、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリパーウイルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス、狂犬病ウイルス、RD114又はその機能的バリエーションで偽型化されている。

【0011】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、単純ヘルペスウイルス(HSV)粒子である。いくつかの実施形態では、HSV粒子は、HSV-1粒子若しくはHSV-2粒子又はその機能的バリエーションである。

20

【0012】

いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤は、脂質ナノ粒子を含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤は、異種導入遺伝子をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、異種導入遺伝子は、プロモーターに作動可能に連結されている。いくつかの実施形態では、プロモーターは、構成的プロモーター、組織特異的プロモーター又は誘導性プロモーターである。

30

【0014】

いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、遺伝子治療剤の投与前、それと同時に又はその後投与される。いくつかの実施形態では、個体は、遺伝子治療による治療に適した疾患又は障害を有する。いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、単一遺伝子疾患又は障害である。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤は、静脈内、腹腔内、動脈内、筋肉内、皮下又は肝臓内に投与される。いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、経口、静脈内、腹腔内、動脈内、筋肉内、皮下又は肝臓内に投与される。

【0015】

いくつかの態様では、本発明は、核酸を個体の細胞に送達する方法を提供し、方法は、a) 個体からの自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートすることと、b) 1つ以上のサイトカインの発現について自然免疫細胞を分析することと、c) ステップb) で特定された個体にIRAK分解剤を投与することと、d) ステップb) で特定された個体に遺伝子治療剤を投与することとを含む。いくつかの態様では、本発明は、治療を必要とする個体を治療する方法を提供し、方法は、a) 個体からの自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートすることと、b) 1つ以上のサイトカインの発現について自然免疫細胞を分析することと、c) ステップb) で特定された個体にIRAK分解剤を投与することと、d) ステップb) で特定された

40

50

個体に遺伝子治療剤を投与することを含む。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療剤及びI R A K分解剤による治療について個体を選択する方法を提供し、方法は、a) 個体からの自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートすることと、b) 1つ以上のサイトカインの発現について自然免疫細胞を分析することと、c) 遺伝子治療剤とのインキュベーション後のサイトカインシグネチャーの発現は、遺伝子治療剤及びI R A K分解剤による治療のための個体を特定する、分析することと、c) 遺伝子治療剤及びI R A K分解剤による治療について、ステップb)で特定された個体を選択することを含む。

【0016】

いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、樹状細胞、単球、マクロファージ又はナチュラルキラー(NK)細胞である。いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、個体からの末梢血単核細胞から単離される。いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、樹状細胞である。いくつかの実施形態では、樹状細胞は、個体の単球に由来する。

10

【0017】

いくつかの実施形態では、本方法は、個体から単球を単離することと、樹状細胞培養培地中で単球をインキュベートして、樹状細胞を遺伝子治療剤とインキュベートする前に単球から樹状細胞を誘導することとをさらに含む。いくつかの実施形態では、単球は、CD14+単球である。いくつかの実施形態では、単球は、単球から樹状細胞を誘導するために、樹状細胞培養培地と約5~約10日間又は約7~約8日間にわたってインキュベートされる。いくつかの実施形態では、樹状細胞は、ステップc)の遺伝子治療剤とのインキュベーション前に再播種される。いくつかの実施形態では、樹状細胞は、マイクロウェル皿に再播種される。

20

【0018】

いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤は、ウイルスベクターであり、自然免疫細胞は、約 1×10^3 ~約 1×10^5 又は約 1×10^4 のMOIでウイルスベクターとインキュベートされる。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤は、非ウイルスベクターであり、自然免疫細胞は、約1ng/mL~約1mg/mLの濃度で非ウイルスベクターとインキュベートされる。いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、遺伝子治療剤と約12時間~約36時間又は約24時間にわたってインキュベートされる。

【0019】

いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の1つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF及びIL-1の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーにおけるサイトカインの発現は、適切な対照と比較して増加する。いくつかの実施形態では、適切な対照は、遺伝子治療剤とインキュベートされていない自然免疫細胞からのサイトカインシグネチャーにおけるサイトカインの発現であるか、又は適切な対照は、遺伝子治療剤とのインキュベーション前の自然免疫細胞からのサイトカインシグネチャーにおけるサイトカインの発現である。

30

【0020】

いくつかの態様では、本発明は、核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達するための医薬の製造における組成物の使用であって、組成物は、遺伝子治療剤を含み、組成物は、I R A K分解剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用を提供する。いくつかの態様では、本発明は、核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達するための医薬の製造における組成物の使用であって、組成物は、I R A K分解剤を含み、組成物は、遺伝子治療剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用を提供する。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療を必要とする個体を治療するための医薬の製造における組成物の使用であって、組成物は、遺伝子治療剤を含み、組成物は、I R A K分解剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用を提供する。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療を必要とする個体を治療するための医薬の製造における組成物の使用であって、組成

40

50

物は、I R A K分解剤を含み、組成物は、遺伝子治療剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用を提供する。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療を必要とする個体における遺伝子治療に対する免疫応答を調節するための医薬の製造における組成物の使用であって、組成物は、遺伝子治療剤を含み、組成物は、I R A K分解剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用を提供する。いくつかの態様では、本発明は、個体における遺伝子治療に対する免疫応答を調節するための医薬の製造における組成物の使用であって、組成物は、I R A K分解剤を含み、組成物は、遺伝子治療剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用を提供する。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤は、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子である。いくつかの実施形態では、I R A K分解剤は、I R A K - 4分解剤である。

10

【0021】

いくつかの態様では、本発明は、核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達することにおける使用のための遺伝子治療剤を含む組成物であって、遺伝子治療剤は、I R A K分解剤と組み合わせて使用される、組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達することにおける使用のためのI R A K分解剤を含む組成物であって、I R A K分解剤は、遺伝子治療剤と組み合わせて使用される、組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療を必要とする個体の治療における使用のための遺伝子治療剤を含む組成物であって、遺伝子治療剤は、I R A K分解剤と組み合わせて使用される、組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療を必要とする個体の治療における使用のためのI R A K分解剤を含む組成物であって、I R A K分解剤は、遺伝子治療剤と組み合わせて使用される、組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療を必要とする個体における遺伝子治療に対する免疫応答を調節するためのI R A K分解剤を含む組成物であって、I R A K分解剤は、遺伝子治療剤と組み合わせて使用される、組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療を必要とする個体における遺伝子治療に対する免疫応答を抑制するためのI R A K分解剤を含む組成物であって、I R A K分解剤は、遺伝子治療剤と組み合わせて使用される、組成物を提供する。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤は、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子である。いくつかの実施形態では、I R A K分解剤は、I R A K - 4分解剤である。

20

【0022】

いくつかの実施形態では、本発明は、本発明の方法における使用のためのキットを提供する。

30

【図面の簡単な説明】**【0023】**

【図1】A A Vで処置されたヒト樹状細胞に対するI R A K 4分解剤K T - 4 7 4の効果の評価するための一般的なスキームを示す。

【図2 A - 2 B】A A VとK T - 4 7 4との共処置がサイトカイン放出の減衰をもたらすことを示す。図2 Aは、単独で又は様々な濃度のK T - 4 7 4と共に投与された、A A Vによって誘導されたサイトカインI L 1 bの放出を示す。図2 Bは、単独で又は様々な濃度のK T - 4 7 4と共に投与された、A A Vによって誘導されたサイトカインI L 6の放出を示す。

40

【図2 C】A A VとK T - 4 7 4との共処置がサイトカイン放出の減衰をもたらすことを示す。図2 Cは、単独で又は様々な濃度のK T - 4 7 4と共に投与された、A A Vによって誘導されたサイトカインT N F Aの放出を示す。

【図3】K T - 4 7 4による処置が初代ヒト単球樹状細胞で細胞毒性を引き起こさないことを示す。

【図4】K T - 4 7 4による処置が初代ヒト単球樹状細胞中でI R A K 4タンパク質の分解を引き起こすことを示す。

【図5】A A Vによって誘導される免疫応答に対するI R A K 4分解剤K T - 4 7 4の効果の評価するために使用されるインビボマウス実験の概略図を示す。

50

【図6A - 6B】KT - 474による処置が導入遺伝子LacZ特異的CD8⁺T細胞を減少させることを示す。図6Aは、AAV注射の14日後の末梢血に由来するPBMCにおける導入遺伝子LacZ特異的CD8⁺T細胞の減少を示す。図6Bは、AAV注射の21日後の脾臓における導入遺伝子LacZ特異的CD8⁺T細胞の減少を示す。

【図7】AAVによって誘導される免疫応答に対するIRAK4分解剤KT - 474の経口投与の効果の評価するためのインビボマウスモデルの一般的な概略図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

いくつかの態様では、本発明は、核酸を個体の細胞に送達する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤(例えば、IRAK-4分解剤)を個体に投与することと、b) 核酸を含む遺伝子治療剤を投与することとを含む。本明細書で使用される場合、「遺伝子治療剤」は、個体に投与される遺伝子治療剤(例えば、核酸(例えば、末端閉鎖型DNA)、ウイルスベクター(例えば、AAVベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、HSVベクター)、脂質ナノ粒子、抗体の全部又は一部(例えば、ナノボディ、Fc領域、その他)の治療成分及び/又は担体成分であり得る。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療剤を含む組成物を用いて、治療を必要とする個体を治療する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することとを含む。いくつかの態様では、本発明は、個体における遺伝子治療を改善する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することとを含む。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療剤に対する免疫応答を調節する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することとを含む。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療剤に対する免疫応答を抑制する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することとを含む。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療剤に対する耐性を誘導する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することとを含む。

10

20

【0025】

いくつかの態様では、本発明は、核酸を個体の細胞に送達する方法を提供し、方法は、a) 個体からの自然免疫細胞を遺伝子治療剤(例えば、AAV粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子)とインキュベートすることと、b) 1つ以上のサイトカインの発現について自然免疫細胞を分析することと、c) ステップb)で特定された個体にIRAK分解剤(例えば、IRAK-4分解剤)を投与することと、d) ステップb)で特定された個体に遺伝子治療剤を投与することとを含む。いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、樹状細胞、単球、マクロファージ又はナチュラルキラー(NK)細胞である。いくつかの実施形態では、方法は、自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートする前に個体から自然免疫細胞を単離するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、個体から単球を単離するステップと、樹状細胞培養培地中で単球をインキュベートして、樹状細胞を遺伝子治療剤とインキュベートする前に単球から樹状細胞を誘導するステップとをさらに含む。本明細書で使用される場合、「誘導する」という用語は、樹状細胞を産生するための細胞(例えば、単球)の分化を含む。

30

40

【0026】

いくつかの態様では、本発明は、治療を必要とする個体を治療する方法を提供し、方法は、a) 個体からの自然免疫細胞を遺伝子治療剤(例えば、AAV粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子)とインキュベートすることと、b) 1つ以上のサイトカインの発現について自然免疫細胞を分析することと、c) ステップb)で特定された個体にIRAK分解剤(例えば、IRAK-4分解剤)を投与することと、d) ステップb)で特定された個体に遺伝子治療剤を投与することとを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、個体から単球を単離するステップと、樹状細胞培養培地中で単球をインキュベートして、樹状細胞を遺伝子治療剤とインキュベートする前に単球から樹状細胞を誘導するステップとをさらに含む。本明細書で使用される場合、「誘導する」という用語は、樹状細胞を産生するための細胞(例えば、単球)の分化を含む。

50

剤に対する免疫（例えば、自然免疫、適応免疫）を有する個体を特定する、分析することと、c)ステップb)で特定された個体にIRA K分解剤（例えば、IRA K-4分解剤）を投与することと、d)ステップb)で特定された個体に遺伝子治療剤を投与することを含む。いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、樹状細胞、単球、マクロファージ又はナチュラルキラー（NK）細胞である。いくつかの実施形態では、方法は、自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートする前に個体から自然免疫細胞を単離するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、個体から単球を単離するステップと、樹状細胞培養培地中で単球をインキュベートして、樹状細胞を遺伝子治療剤とインキュベートする前に単球から樹状細胞を誘導するステップとをさらに含む。

【0027】

いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療剤（例えば、AAV粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子）及びIRA K分解剤（例えば、IRA K-4分解剤）による治療について個体を選択する方法を提供し、方法は、a)個体からの自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートすることと、b)1つ以上のサイトカインの発現について自然免疫細胞を分析することと、c)遺伝子治療剤及びIRA K分解剤による治療のための個体を特定する、分析することと、d)遺伝子治療剤及びIRA K分解剤による治療について、ステップb)で特定された個体を選択することとを含む。いくつかの実施形態では、方法は、d)ステップb)で特定された個体にIRA K分解剤を投与するステップと、e)ステップb)で特定された個体に遺伝子治療剤を投与するステップとをさらに含む。いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、樹状細胞、単球、マクロファージ又はナチュラルキラー（NK）細胞である。いくつかの実施形態では、方法は、自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートする前に個体から自然免疫細胞を単離するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、個体から単球を単離するステップと、樹状細胞培養培地中で単球をインキュベートして、樹状細胞を遺伝子治療剤とインキュベートする前に単球から樹状細胞を誘導するステップとをさらに含む。

【0028】

一般的技術

本明細書に記載又は参照される技術及び手順は、当業者に一般的によく理解されており、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., 2003); Methods in Enzymologyシリーズ (Academic Press, Inc.); PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames及びG.R. Taylor eds., 1995); Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow及びLane, eds., 1988); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I. Freshney, 6th ed., J. Wiley and Sons, 2010); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather及びP.E. Roberts, Plenum Press, 1998); Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, 及びD.G. Newell, eds., J. Wiley and

10

20

30

40

50

Sons, 1993 - 8); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir 及び C. C. Blackwell, eds., 1996); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller 及び M. P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., J. Wiley and Sons, 2002); Immunobiology (C. A. Janeway et al., 2004); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988 - 1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd 及び C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow 及び D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti 及び J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); 並びに Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds., J. B. Lippincott Company, 2011) に記載される、広く使用されている方法論などの従来の方法論を使用して一般的に使用されている。

【0029】

定義

本明細書で使用される場合、「分解剤」という用語は、IRAKキナーゼ及び測定可能な親和性を有するE3リガーゼの両方に結合及び/又はそれを阻害し、その結果、IRAKキナーゼのユビキチン化及びその後の分解がもたらすヘテロ二機能性化合物である。特定の実施形態では、分解剤は、約50µm未満、約1µm未満、約500nM未満、約100nM未満、約10nM未満又は約1nM未満のDC50を有する。本明細書で使用される場合、「一価」という用語は、付加されたE3リガーゼ結合部分を有しない分解剤化合物を指す。

【0030】

本明細書で使用される場合、IRAKに関する「阻害剤」という用語は、測定可能な親和性でIRAKキナーゼに結合し、且つ/又はIRAKキナーゼを阻害する化合物である。特定の実施形態では、阻害剤は、約50µm未満、約1µm未満、約500nM未満、約100nM未満、約10nM未満又は約1nM未満のIC50及び/又は結合定数を有する。

【0031】

本明細書で使用される場合、IRAKに関する「モジュレーター」という用語は、IRAKキナーゼの活性を刺激、遅延、阻害及び/又は抑制する(完全に又は部分的に)化合物である。

【0032】

本明細書で使用される場合、「遺伝子治療剤」という用語は、生細胞の生物学的特性を変更するために、個体又は細胞内の1つ以上の核酸(例えば、遺伝子、mRNA)の発現を改変又は操作するための、核酸(例えば、発現構築物、miRNA、アンチセンス、shRNA、siRNA)又は個体若しくは細胞に核酸を送達するために使用される薬剤と組み合わせた核酸を指す。遺伝子治療剤の例としては、ウイルスベクター(例えば、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス、バキュロウイルス)、細菌ベクター及び非ウイルスベクター(例えば、治療用核酸を含み、且つ/又

は治療用ポリペプチドをコードする、治療用核酸又はプラスミドDNA（例えば、末端閉鎖型DNA）を封入する脂質ナノ粒子）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0033】

本明細書で使用される場合、「遺伝子治療剤」という用語は、生細胞の生物学的特性を変更するために、個体又は細胞内の1つ以上の遺伝子の発現を改変又は操作するための、個体又は細胞に核酸を送達するために使用される薬剤を指す。遺伝子治療剤の例としては、ウイルスベクター（例えば、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス、パキユロウイルス）、細菌ベクター及び非ウイルスベクター（例えば、治療用核酸を含み、且つ/又は治療用ポリペプチドをコードする、治療用核酸又はプラスミドDNAを封入する脂質ナノ粒子）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0034】

本明細書で使用される場合、「ベクター」は、インビトロ又はインビボのいずれかで宿主細胞に送達される核酸を含む組換えプラスミド又はウイルスを指す。

【0035】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」という用語は、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのいずれかの任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。したがって、この用語は、一本鎖、二本鎖若しくは多鎖DNA若しくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、又はプリン及びピリミジン塩基を含むポリマー、又は他の天然、化学的若しくは生化学的に改変された、非天然若しくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むが、これらに限定されない。核酸の骨格は、糖及びリン酸基（RNA若しくはDNAに典型的に見られ得る）又は修飾若しくは置換された糖若しくはリン酸基を含み得る。代わりに、核酸の骨格は、ホスホラミデートなどの合成サブユニットのポリマーを含むことができ、したがってオリゴデオキシヌクレオシドホスホラミデート（P-NH₂）又は混合ホスホラミデート-ホスホジエステルオリゴマーであり得る。さらに、相補鎖を合成し、適切な条件下で鎖をアニーリングするか、又は適切なプライマーを有するDNAポリメラーゼを使用して相補鎖新規合成することにより、化学合成の一本鎖ポリヌクレオチド産物から二本鎖核酸を得ることができる。

20

【0036】

「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用され、最小長に限定されない。そのようなアミノ酸残基のポリマーは、天然又は非天然のアミノ酸残基を含み得、アミノ酸残基のペプチド、オリゴペプチド、二量体、三量体及び多量体が挙げられるが、これらに限定されない。全長タンパク質及びその断片の両方が定義に包含される。この用語は、ポリペプチドの翻訳後修飾、例えばグリコシル化、シアリル化、アセチル化、リン酸化なども含む。さらに、本発明の目的のために、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持する限り、天然配列に対する欠失、付加及び置換（一般に本質的に保存的）などの改変を含むタンパク質を指す。これらの修飾は、部位特異的突然変異誘発などによる意図的なものであり得るか、又はタンパク質を産生する宿主の変異若しくはPCR増幅によるエラーなどによる偶発的なものであり得る。

30

【0037】

「組換えウイルスベクター」は、1つ以上の異種配列（すなわちウイルス起源ではない核酸配列）を含む組換えポリヌクレオチドベクターを指す。組換えAAVベクターの場合、組換え核酸は、少なくとも1つ、例えば2つの逆位末端反復配列（ITR）に隣接する。

40

【0038】

「組換えAAVベクター（rAAVベクター）」は、少なくとも1つ、例えば2つのAAV逆位末端反復配列（ITR）に隣接する1つ以上の異種配列（すなわちAAV起源ではない核酸配列）を含むポリヌクレオチドベクターを指す。このようなrAAVベクターは、適切なヘルパーウイルスに感染し（又は適切なヘルパー機能を発現している）、AAVrep及びcap遺伝子産物（すなわちAAVrep及びCapタンパク質）を発現し

50

ている、宿主細胞中に存在する場合、複製され、感染性ウイルス粒子中にパッケージングされ得る。r A A Vベクターがより大きいポリヌクレオチド（例えば、染色体中又はクローニング若しくはトランスフェクションに使用されるプラスミドなどの別のベクター中）に組み込まれる場合、r A A Vベクターは、A A Vパッケージング機能及び適切なヘルパー機能の存在下で複製及びカプシド形成によって「レスキュー」され得る「プロベクター」と称され得る。r A A Vベクターは、プラスミド、直鎖人工染色体、脂質と複合したものの、リボソーム内に封入されたもの及び実施形態ではウイルス粒子、特にA A V粒子内に封入されたものを含むが、これらに限定されない、様々な形態であり得る。r A A VベクターをA A Vウイルスカプシドにパッケージングして、「組換えアデノ随伴ウイルス粒子（r A A V粒子）」を生成することができる。

10

【0039】

「r A A Vウイルス」又は「r A A Vウイルス粒子」は、少なくとも1つのA A Vカプシドタンパク質と、カプシド化されたr A A Vベクターゲノムとから構成される、ウイルス粒子を指す。

【0040】

「組換えアデノウイルスベクター」は、少なくとも1つのアデノウイルス逆位末端反復配列（I T R）に隣接する1つ以上の異種配列（すなわちアデノウイルス起源ではない核酸配列）を含むポリヌクレオチドベクターを指す。いくつかの実施形態では、組換え核酸は、2つの逆位末端反復配列（I T R）に隣接している。このような組換えウイルスベクターは、組換えウイルスゲノムから欠失した必須アデノウイルス遺伝子（例えば、E 1 遺伝子、E 2 遺伝子、E 4 遺伝子など）を発現している宿主細胞中に存在する場合、複製され、感染性ウイルス粒子中にパッケージングされ得る。組換えウイルスベクターがより大きいポリヌクレオチド（例えば、染色体中又はクローニング若しくはトランスフェクションに使用されるプラスミドなどの別のベクター中）に組み込まれる場合、組換えウイルスベクターは、アデノウイルスパッケージング機能の存在下で複製及びカプシド形成によって「レスキュー」され得る「プロベクター」と称され得る。組換えウイルスベクターは、プラスミド、直鎖人工染色体、脂質と複合したものの、リボソーム内に封入されたもの及びウイルス粒子、例えばアデノウイルス粒子内に封入されたものを含むが、これらに限定されない、様々な形態であり得る。組換えウイルスベクターをアデノウイルスカプシドにパッケージングして、「組換えアデノウイルス粒子」を生成することができる。

20

30

【0041】

「組換えレンチウイルスベクター」は、少なくとも1つのレンチウイルス末端反復配列（L T R）に隣接する1つ以上の異種配列（すなわちレンチウイルス起源ではない核酸配列）を含むポリヌクレオチドベクターを指す。いくつかの実施形態では、組換え核酸は、2つのレンチウイルス末端反復配列（L T R）に隣接している。このような組換えウイルスベクターは、適切なヘルパー機能に感染した宿主細胞中に存在する場合、複製され、感染性ウイルス粒子中にパッケージングされ得る。組換えレンチウイルスベクターをレンチウイルスカプシドにパッケージングして、「組換えレンチウイルス粒子」を生成することができる。

【0042】

「組換え単純ヘルペスベクター（組換えH S Vベクター）」は、H S V末端反復配列に隣接する1つ以上の異種配列（すなわちH S V起源ではない核酸配列）を含むポリヌクレオチドベクターを指す。このような組換えウイルスベクターは、適切なヘルパー機能に感染した宿主細胞中に存在する場合、複製され、感染性ウイルス粒子中にパッケージングされ得る。組換えウイルスベクターがより大きいポリヌクレオチド（例えば、染色体中又はクローニング若しくはトランスフェクションに使用されるプラスミドなどの別のベクター中）に組み込まれる場合、組換えウイルスベクターは、H S Vパッケージング機能の存在下で複製及びカプシド形成によって「レスキュー」され得る「プロベクター」と称され得る。組換えウイルスベクターは、プラスミド、直鎖人工染色体、脂質と複合したものの、リボソーム内に封入されたもの及びウイルス粒子、例えばH S V粒子内に封入されたものを

40

50

含むが、これらに限定されない、様々な形態であり得る。組換えウイルスベクターをHSVカプシドにパッケージングして、「組換え単純ヘルペスウイルス粒子」を生成することができる。

【0043】

本明細書で使用される「固体脂質ナノ粒子」(SLNS、sLNP)又は「脂質ナノ粒子」(LNP)は、脂質から構成されるナノ粒子を指す。いくつかの例では、1つのリン脂質層のみが存在し、粒子内部の大部分は親油性物質から構成される。核酸などのペイロードは、内部に埋め込むことができる。いくつかの例では、脂質ナノ粒子は、脂質二重層を含むリポソームである。

【0044】

本明細書で使用される場合、遺伝子治療に関する「改善する」という用語は、遺伝子治療剤の治療用遺伝子ペイロードの発現をブースト、上昇、延長又はその他の方法で増加させる行為を指し得る。いくつかの実施形態では、改善された遺伝子治療は、IRAKモジュレーターと共に投与される遺伝子治療剤の治療用遺伝子ペイロードの発現がIRAKモジュレーターなしで投与される遺伝子治療と比較して約10%、25%、50%、75%又は100%のいずれかを超過して増加するものである。いくつかの実施形態では、改善された遺伝子治療は、IRAK分解剤と共に投与される遺伝子治療剤の治療用遺伝子ペイロードの発現時間がIRAK分解剤なしで投与される遺伝子治療と比較して約10%、25%、50%、75%又は100%のいずれかを超過して延長されるものである。いくつかの例では、遺伝子治療は、遺伝子治療剤に対する免疫応答(例えば、自然免疫応答)を低下させることによって改善される。いくつかの実施形態では、改善された遺伝子治療は、IRAK分解剤と共に投与される遺伝子治療剤に対する免疫応答がIRAK分解剤なしで投与される遺伝子治療と比較して約10%、25%、50%、75%又は100%のいずれかを超過して低下するものである。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤に対する免疫応答の低下は、IRAK分解剤の非存在下での遺伝子治療剤の免疫細胞への曝露と比較した、IRAK分解剤の存在下での遺伝子治療剤の免疫細胞への曝露後のサイトカインシグネチャーの減少として測定される。

【0045】

本明細書で使用される場合、遺伝子治療に言及するときの「調節する」という用語は、遺伝子治療剤の存在又は活性を変更、変化、変動、改善又は他の方法で改変する行為を指し得る。例えば、遺伝子治療剤に対する免疫応答の調節は、遺伝子治療剤に対する免疫応答を変更、変化、変動、改善又は他の方法で改変(例えば、遺伝子治療剤に対する免疫応答(例えば、自然免疫応答)の減少、遅延及び/又は排除)することをもたらず任意の行為を指し得る。

【0046】

本明細書で使用される場合、「サイトカインシグネチャー」という用語は、遺伝子治療剤に対する免疫応答(例えば、自然免疫応答)に関する場合、遺伝子治療剤への自然免疫細胞の曝露後の1つ以上のサイトカインの発現の増加を指す。いくつかの例では、サイトカインシグネチャーのサイトカインは、TLR経路(例えば、TLR2、TLR3、TLR4又はTLR9経路)に特異的である。

【0047】

自然免疫細胞は、自然免疫を媒介する白血球であり、好塩基球、樹状細胞、好酸球、ランゲルハンス細胞、肥満細胞、単球及びマクロファージ、好中球及びNK細胞が含まれる。異なるAAVカプシドは、多くの場合形質導入効率と呼ばれる異なる効率でこれらの自然免疫細胞に侵入することができる。AAV1などのいくつかの血清型は、単球などの特定の免疫細胞の形質導入に効率的である一方、AAV6などの他のAAVは、樹状細胞などの細胞の形質導入に効率的である(Grimm, D et al., J. Virol., 2008, 82(12): 5887-5911)。AAVは、細胞に侵入すると免疫応答を誘発し得る。この免疫応答の強さは、AAV血清型及び細胞型に依存する。AAVが宿主免疫細胞に形質導入されると、それらは、TLR(例えば、TLR9)などの免疫受

10

20

30

40

50

容体と会合することができる。マウスモデルを使用したいいくつかの研究は、TLR9がAAV免疫原性に寄与する重要なDNAセンサーであることを明らかにした(Zhu, Jet al., J Clin Invest. 2009; 119(8): 2388 - 2398; Ashley SN et al., Cell Immunol. 2019, 346: 103997)。これらのTLRがウイルスによって活性化されると、感染細胞内に抗ウイルス状態を確立し、隣接する細胞に警告する、サイトカインを分泌する。(Carty, M及びBowie, AG, Clin Exp Immunol, 2010, 161(3): 397 - 406; Lester, SN and Li, K, J Mol Biol. 2014; 426(6): 1246 - 1264; Fitzgerald, KA及びKagan, JC, Cell, 2020 180(6): 1044 - 1066)。

10

【0048】

これらのサイトカインは、それぞれ抗体を産生し、細胞毒性を生成してウイルス感染細胞を死滅させるB細胞及びT細胞を含む適応免疫系を活性化する役割もある。本明細書で使用される場合、サイトカインの特定のサブセットの上方制御又は下方制御は、「サイトカインシグネチャー」と称される。3つ以上のサイトカインを含むこれらのサイトカインシグネチャーは、疾患及び治療の成功の予測マーカーとして使用することができる。サイトカインシグネチャーの例は、Zuniga, Jet al., Int. J. Infect. Diseases, 2020, 94: 4 - 11、Bergamaschi, Cet al., Cell Reports, 2021, 36: 109504; Del Valle, DM et al., Nat. Med. 2020, 26: 1636 - 1643に見出される。

20

【0049】

「異種」は、それが比較されるか、又はそれが導入されるか若しくは組み込まれる実体の残りの部分とは、遺伝子型が異なる実体に由来することを意味する。例えば、遺伝子工学技術によって異なる細胞型に導入された核酸は、異種核酸である(発現されると、異種ポリペプチドをコードすることができる)。同様に、ウイルスベクターに組み込まれる細胞配列(例えば、遺伝子又はその一部)は、ベクターに対する異種ヌクレオチド配列である。

【0050】

「導入遺伝子」という用語は、細胞に導入され、RNAに転写され、任意選択により適切な条件下で翻訳及び/又は発現され得る核酸を指す。態様では、これは、それが導入された細胞に所望の特性を付与するか、又はそうでなければ所望の治療的若しくは診断的転帰をもたらす。別の態様では、これは、siRNAなどのRNA干渉を媒介する分子に転写され得る。

30

【0051】

ウイルス力価に関して使用される「ゲノム粒子(gp)」、「ゲノム当量」又は「ゲノムコピー」という用語は、感染性又は機能性にかかわらず、組換えAAV DNAゲノムを含有するビリオンの数を指す。特定のベクター調製物中のゲノム粒子の数は、本明細書の実施例又は例えばClark et al. (1999) Hum. Gene Ther., 10: 1031 - 1039; Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther., 6: 272 - 278に記載されるものなどの手順によって測定することができる。

40

【0052】

「感染単位(iu)」、「感染性粒子」又は「複製単位」という用語は、ウイルス力価に関して使用される場合、感染中心アッセイ(複製中心アッセイとしても知られる)によって測定された感染性及び複製適格の組換えAAVベクター粒子の数を指し、例えば、McLaughlin et al. (1988) J. Virol., 62: 1963 - 1973に記載されるとおりである。

【0053】

「トランスデュースングユニット(tu)」という用語は、ウイルス力価に関して使用

50

される場合、本明細書の実施例又は例えば Xiao et al. (1997) Exp. Neurobiol., 144: 113 - 124; 若しくは Fisher et al. (1996) J. Virol., 70: 520 - 532 (LFUアッセイ) に記載されるような機能アッセイで測定される、機能的導入遺伝子産物の産生をもたらす感染性組換え AAV ベクター粒子の数を指す。

【0054】

「逆位末端反復」又は「ITR」配列は、当技術分野でよく理解されている用語であり、逆向きのウイルスゲノムの末端で見られる比較的短い配列を指す。

【0055】

当技術分野でよく理解されている用語である「AAV 逆位末端反復 (ITR)」配列は、天然の一本鎖 AAV ゲノムの両末端に存在するおよそ 145 ヌクレオチドの配列である。ITR の最も外側の 125 ヌクレオチドは、2 つの異なる配向のいずれかで存在することができ、異なる AAV ゲノム間及び単一の AAV ゲノムの両端間に不均一性をもたらす。最も外側の 125 ヌクレオチドは、いくつかの短い自己相補性領域 (A、A'、B、B'、C、C' 及び D 領域) も含み、ITR のこの部分内で鎖内塩基対形成が可能になる。

【0056】

「末端分解能配列」又は「TRS」は、ウイルス DNA 複製中に AAV rep タンパク質によって切断される、AAV ITR の D 領域の配列である。変異末端解離配列は、AAV rep タンパク質による切断に対して抵抗性である。「AAV ヘルパー機能」は、AAV を宿主細胞によって複製及びパッケージングすることを可能にする機能を指す。AAV ヘルパー機能は、AAV 複製及びパッケージングを促進するヘルパーウイルス又はヘルパーウイルス遺伝子を含むが、これらに限定されない、いくつかの形態のいずれかで提供され得る。他の AAV ヘルパー機能は、遺伝毒性剤など、当技術分野で公知である。

【0057】

「AAV ヘルパー機能」は、AAV を宿主細胞によって複製及びパッケージングすることを可能にする機能を指す。AAV ヘルパー機能は、AAV 複製及びパッケージングを促進するヘルパーウイルス又はヘルパーウイルス遺伝子を含むが、これらに限定されない、いくつかの形態のいずれかで提供され得る。他の AAV ヘルパー機能は、遺伝毒性剤など、当技術分野で公知である。

【0058】

AAV の「ヘルパーウイルス」は、AAV (欠陥パルボウイルスである) を宿主細胞によって複製及びパッケージングすることを可能にするウイルスを指す。アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルスなどのポックスウイルス及びバキュロウイルスを含む、多くのそのようなヘルパーウイルスが同定されている。アデノウイルスは、いくつかの異なるサブグループを包含するが、サブグループ C のアデノウイルス 5 型 (Ad5) が最も一般的に使用される。ヒト、非ヒト哺乳動物及び鳥類起源の多数のアデノウイルスが知られており、ATCC などの寄託機関から入手可能である。ATCC などの寄託機関からも入手可能なヘルペスファミリーのウイルスとしては、例えば、単純ヘルペスウイルス (HSV)、エプスタインバーウイルス (EBV)、サイトメガロウイルス (CMV) 及び偽性狂犬病ウイルス (PRV) が挙げられる。寄託機関から入手可能なバキュロウイルスには、Autographa californica 核多角体病ウイルスが含まれる。

【0059】

参照ポリペプチド又は核酸の配列に関する「配列同一性パーセント (%)」は、配列をアラインさせ、必要であれば、最大の配列同一性 % を達成するためにギャップを導入した後の、配列同一性の一部として保存的置換を考慮しない、参照ポリペプチド又は核酸の配列中のアミノ酸残基又はヌクレオチドと同一である候補配列中のアミノ酸残基又はヌクレオチドのパーセンテージとして定義される。アミノ酸又は核酸の配列同一性パーセントを決定する目的のためのアライメントは、例えば、公開されているコンピュータソフトウェアプログラム、例えば、Current Protocols in Molecula

r Biology (Ausubel et al., eds., 1987), Supp. 30, セクション 7.7.18, 表 7.7.1 に記載されている、BLAST、BLAST-2、ALIGN 又は Megalign (DNASTAR) ソフトウェアを含むものを使用するなど、当技術分野の技術範囲内の様々な方法で達成することができる。可能なアライメントプログラムは、ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pennsylvania) である。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアライメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アライメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。本明細書の目的のために、所与のアミノ酸配列 A の、所与のアミノ酸配列 B に対するアミノ酸配列同一性 (これは代替的に、所与のアミノ酸配列 B に対し特定のアミノ酸配列同一性 % を有する所与のアミノ酸配列 A として表現することもできる) は、以下のように計算される: $\frac{X}{Y} \times 100$ (式中、X は、配列アライメントプログラムによってそのプログラムの A と B のアライメントで同一一致としてスコア付けされたアミノ酸残基数の数であり、Y は、B 中のアミノ酸残基数の総数である)。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さとは等しくない場合、A の B に対するアミノ酸配列同一性 % は、B の A に対するアミノ酸配列同一性 % とは等しくないことが理解されるであろう。本明細書の目的のために、所与の核酸配列 C の、所与の核酸配列 D に対する核酸配列同一性 (これは代替的に、所与の核酸配列 D に対し特定の核酸配列同一性 % を有する所与の核酸配列 C として表現することもできる) は、以下のように計算される: $\frac{W}{Z} \times 100$ (式中、W は、配列アライメントプログラムによってそのプログラムの C と D のアライメントで同一一致としてスコア付けされたヌクレオチドの数であり、Z は、D 中のヌクレオチドの総数である)。核酸配列 C の長さが核酸配列 D の長さとは等しくない場合、C の D に対する核酸配列同一性 % は、D の C に対する核酸配列同一性 % とは等しくないことが理解されるであろう。

10

20

【0060】

薬剤の「有効量」は、所望の治療効果を達成するために必要な投与量及び期間で有効な量を指す。例えば、遺伝子治療剤の「有効量」は、所望の遺伝子治療効果を達成するために必要な投与量及び期間で有効な量を指す。別の例では、有効量の IRAK 分解剤は、遺伝子治療の改善という所望の結果を達成するために、必要な投与量及び期間での有効量を指し得る。

30

【0061】

本発明の物質 / 分子 (例えば、遺伝子治療剤及び / 又は IRAK 分解剤) の「治療有効量」は、個体の疾患状態、年齢、性別及び体重並びに個体で所望の応答を誘発する物質 / 分子、アゴニスト又はアンタゴニストの能力などの要因に応じて変化し得る。治療有効量は、治療上有益な効果が物質 / 分子の何らかの毒性又は有害な影響にまさる量でもある。

【0062】

「適切な対照」という用語は、それがサイトカインシグネチャーに言及する場合、遺伝子治療剤とインキュベートされていない自然免疫細胞からのサイトカインシグネチャーにおけるサイトカインの発現であるか、又は遺伝子治療剤とのインキュベーション前の自然免疫細胞からのサイトカインシグネチャーにおけるサイトカインの発現である。

40

【0063】

「～と組み合わせた」投与は、それが遺伝子治療剤及び IRAK 分解剤に関連する場合、遺伝子治療剤及び IRAK 分解剤の任意の順序での同時 (simultaneous) (同時 (concurrent)) 及び連続的又は逐次的投与を含む。

【0064】

「同時に」という用語は、本明細書では、投与の少なくとも一部が時間的に重複する、遺伝子治療剤及び IRAK 分解剤の投与を指すために使用される。したがって、同時投与は、他の薬剤 / 分解剤の投与を中止した後に遺伝子治療剤又は IRAK 分解剤の投与が継続される場合の投与レジメンを含む。

【0065】

50

本明細書で使用される場合、「～と組み合わせる」は、1つの治療法を別の治療法に加えて施行することを指す。そのため、「～と組み合わせる」は、一方の治療モダリティ（遺伝子治療剤又はIRAK分解剤）の、他方の治療モダリティの個体への投与前、投与中又は投与後の投与を指す。

【0066】

「単離された」分子（例えば、核酸又はタンパク質）又は細胞は、それが同定され、その自然環境の構成要素から分離及び/又は回収されたことを意味する。

【0067】

本明細書での「約」値又はパラメータへの言及は、この値又はパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（及び説明する）。例えば、「約X」に言及する記載には、「X」の記載が含まれる。

10

【0068】

本明細書で使用される場合、単数形の冠詞「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その」は、別段の指示がない限り、複数の参照を含む。

【0069】

本明細書に記載される本発明の態様及び実施形態は、「含む」、「からなる」及び/又は「から本質的になる」態様及び実施形態を含むことが理解される。

【0070】

治療方法

いくつかの態様では、本発明は、核酸を個体の細胞に送達する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することとを含む。いくつかの態様では、本発明は、治療を必要とする個体を治療する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することとを含む。いくつかの態様では、本発明は、個体における遺伝子治療を改善する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することとを含む。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療剤に対する免疫応答を調節する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することとを含む。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療剤に対する免疫応答を抑制する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することとを含む。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療剤に対する耐性を誘導する方法を提供し、方法は、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することとを含む。いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、IRAKプロテインキナーゼの活性を調節する。いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、IRAK-4プロテインキナーゼの活性を調節する。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤は、ウイルス遺伝子治療剤（例えば、ウイルスベクター）又は非ウイルス遺伝子治療剤（例えば、非ウイルス遺伝子治療剤を含む脂質ナノ粒子）である。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤は、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター又は単純ヘルペスウイルス(HSV)ベクターである。

20

30

【0071】

本発明のいくつかの実施形態では、遺伝子治療剤（例えば、AAV粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子）は、目的の特定組織に投与され得るか又は全身的に投与され得る。いくつかの実施形態では、有効量の遺伝子治療剤が対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、有効量の遺伝子治療剤は、非経口投与され得る。非経口投与経路としては、静脈内、腹腔内、骨内、動脈内、脳内、筋肉内、髄腔内、皮下、脳室内、肝臓内などが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、有効量の遺伝子治療剤は、1つの投与経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、有効量の遺伝子治療剤は、複数の投与経路（例えば、2つ、3つなど）の組み合わせによって投与され得る。いくつかの実施形態では、有効量の遺伝子治療剤は、1ヶ所に投与される。他の実施形態では、有効量の遺伝子治療剤は、複数箇所に投与さ

40

50

れ得る。

【0072】

有効量の遺伝子治療剤（例えば、AAV粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子）は、治療の目的に応じて投与される。例えば、低いパーセンテージの形質導入又はトランスフェクションが所望の治療効果を達成することができる場合、治療の目的は通常、このレベルの形質導入又はトランスフェクションを満たすか又はそれを超えることである。いくつかの場合、このレベルの形質導入又はトランスフェクションは、所望の組織タイプの標的細胞の約1～5%のみ、いくつかの実施形態では所望の組織タイプの細胞の少なくとも約20%、いくつかの実施形態では少なくとも約50%、いくつかの実施形態では少なくとも約80%、いくつかの実施形態では少なくとも約95%、いくつかの実施形態では所望の組織タイプの細胞の少なくとも約99%の形質導入又はトランスフェクションによって達成することができる。遺伝子治療剤は、同じ手順中又は数日、数週、数ヶ月若しくは数年の間隔を空けて、1回以上の投与によって投与され得る。本明細書に記載の投与経路のいずれか1つ以上が使用され得る。いくつかの実施形態では、ヒトを治療するために、複数の遺伝子治療剤、例えば、AAVベクター及びレンチウイルスベクターが使用され得る。

10

【0073】

遺伝子治療剤によって形質導入又はトランスフェクトされた細胞を同定する方法は、当技術分野で公知である。例えば、免疫組織化学又は強化緑色蛍光タンパク質などのマーカーを使用して、遺伝子治療剤による形質導入又はトランスフェクション細胞を検出することができる。

20

【0074】

いくつかの実施形態では、有効量の遺伝子治療剤（例えば、AAV粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子）は、同時に又は連続的に複数箇所に投与される。他の実施形態では、有効量の遺伝子治療剤は、単一箇所に複数回（例えば、反復して）投与される。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤の複数回注射は、1時間以内、2時間以内、3時間以内、4時間以内、5時間以内、6時間以内、9時間以内、12時間以内又は24時間以内の間隔で行われる。

【0075】

いくつかの実施形態では、方法は、遺伝子治療を必要とする個体を治療するために、遺伝子治療剤を含む有効量の医薬組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のウイルス力価は、少なくとも約 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 10×10^{12} 、 11×10^{12} 、 15×10^{12} 、 20×10^{12} 、 25×10^{12} 、 30×10^{12} 又は 50×10^{12} ゲノムコピー/mLのいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のウイルス力価は、約 $5 \times 10^{12} \sim 6 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12} \sim 7 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12} \sim 8 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12} \sim 9 \times 10^{12}$ 、 $9 \times 10^{12} \sim 10 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12} \sim 11 \times 10^{12}$ 、 $11 \times 10^{12} \sim 15 \times 10^{12}$ 、 $15 \times 10^{12} \sim 20 \times 10^{12}$ 、 $20 \times 10^{12} \sim 25 \times 10^{12}$ 、 $25 \times 10^{12} \sim 30 \times 10^{12}$ 、 $30 \times 10^{12} \sim 50 \times 10^{12}$ 又は $50 \times 10^{12} \sim 100 \times 10^{12}$ ゲノムコピー/mLのいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のウイルス力価は、約 $5 \times 10^{12} \sim 10 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12} \sim 25 \times 10^{12}$ 又は $25 \times 10^{12} \sim 50 \times 10^{12}$ ゲノムコピー/mLのいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のウイルス力価は、少なくとも約 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 10×10^9 、 11×10^9 、 15×10^9 、 20×10^9 、 25×10^9 、 30×10^9 又は 50×10^9 トランスデュースングユニット/mLのいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、rAAV粒子）のウイルス力価は、約 $5 \times 10^9 \sim 6 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9 \sim 7 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9 \sim 8 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9 \sim 9 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9 \sim 10 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9 \sim 11 \times 10^9$ 、 $11 \times 10^9 \sim 15 \times 10^9$

30

40

50

9 、 $1.5 \times 10^9 \sim 2.0 \times 10^9$ 、 $2.0 \times 10^9 \sim 2.5 \times 10^9$ 、 $2.5 \times 10^9 \sim 3.0 \times 10^9$ 、 $3.0 \times 10^9 \sim 5.0 \times 10^9$ 又は $5.0 \times 10^9 \sim 100 \times 10^9$ トランスデュースングユニット/mL のいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、rAAV 粒子）のウイルス力価は、約 $5 \times 10^9 \sim 10 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^9$ 、 $1.5 \times 10^9 \sim 2.5 \times 10^9$ 又は $2.5 \times 10^9 \sim 50 \times 10^9$ トランスデュースングユニット/mL のいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、rAAV 粒子）のウイルス力価は、少なくとも約 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 10×10^{10} 、 11×10^{10} 、 15×10^{10} 、 20×10^{10} 、 25×10^{10} 、 30×10^{10} 、 40×10^{10} 又は 50×10^{10} 感染単位/mL のいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、rAAV 粒子）のウイルス力価は、少なくとも約 $5 \times 10^{10} \sim 6 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10} \sim 7 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10} \sim 8 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10} \sim 9 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10} \sim 10 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10} \sim 11 \times 10^{10}$ 、 $11 \times 10^{10} \sim 15 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10} \sim 20 \times 10^{10}$ 、 $20 \times 10^{10} \sim 25 \times 10^{10}$ 、 $25 \times 10^{10} \sim 30 \times 10^{10}$ 、 $30 \times 10^{10} \sim 40 \times 10^{10}$ 、 $40 \times 10^{10} \sim 50 \times 10^{10}$ 又は $50 \times 10^{10} \sim 100 \times 10^{10}$ 感染単位/mL のいずれかである。いくつかの実施形態では、ウイルス粒子（例えば、rAAV 粒子）のウイルス力価は、少なくとも約 $5 \times 10^{10} \sim 10 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10} \sim 15 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10} \sim 25 \times 10^{10}$ 又は $25 \times 10^{10} \sim 50 \times 10^{10}$ 感染単位/mL のいずれかである。

10

【0076】

いくつかの実施形態では、個体に投与される遺伝子治療剤（例えば、AAV 粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV 粒子又は脂質ナノ粒子）の用量は、少なくとも約 $1 \times 10^8 \sim 約 6 \times 10^{13}$ ゲノムコピー/kg 体重のいずれかである。いくつかの実施形態では、個体に投与される遺伝子治療剤の用量は、約 $1 \times 10^8 \sim 約 6 \times 10^{13}$ ゲノムコピー/kg 体重のいずれかである。

20

【0077】

いくつかの実施形態では、個体に投与される遺伝子治療剤（例えば、AAV 粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV 粒子又は脂質ナノ粒子）の総量は、少なくとも約 $1 \times 10^9 \sim 約 1 \times 10^{14}$ ゲノムコピーのいずれかである。いくつかの実施形態では、個体に投与される遺伝子治療剤の総量は、約 $1 \times 10^9 \sim 約 1 \times 10^{14}$ ゲノムコピーのいずれかである。

30

【0078】

遺伝子治療剤を含む本発明の組成物（例えば、AAV 粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV 粒子又は脂質ナノ粒子）は、単独で又は IRAK 分解剤に加えて 1 つ以上の追加の治療剤と組み合わせて使用することができる。逐次投与間の間隔は、少なくとも、分、時間又は日（代わりに又はそれ未満）であり得る。

【0079】

本発明のいくつかの実施形態では、IRAK 分解剤（例えば、IRAK-4 分解剤）を含む組成物は、経口、非経口、吸入スプレー、局所、直腸、鼻腔、口腔、膣又は埋め込み型リザーバを介して、投与され得る。本明細書で使用される「非経口」という用語には、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑膜内、胸骨内、髄腔内、肝臓内、病変内及び頭蓋内注射又は注入技術が含まれる。いくつかの実施形態では、組成物は、経口、腹腔内又は静脈内に投与される。本発明の組成物の滅菌注射形態は、水性又は油性懸濁液であり得る。これらの懸濁液は、適切な分散剤又は湿潤剤及び懸濁剤を使用して、当技術分野で公知の技術に従って製剤化され得る。滅菌注射用調製物は、非毒性の非経口的に許容される希釈剤又は溶媒中の滅菌注射用溶液又は懸濁液、例えば 1, 3 - ブタンジオール溶液でもあり得る。許容されるビヒクル及び使用され得る溶媒の中には、水、リンゲル溶液及び等張塩化ナトリウム溶液がある。加えて、無菌の固定油は、従来、溶媒又は懸濁媒体として使用されている。

40

【0080】

50

I R A K分解剤（例えば、I R A K - 4分解剤）の量は、担体材料と組み合わせて、単一剤形で組成物（例えば、医薬組成物）が産生され得るが、個体及び特定の投与様式に応じて異なる。いくつかの実施形態では、I R A K分解剤を含む組成物は、I R A K分解剤の約0.01mg/kg～約100mg/kg体重の投与量が個体に投与されるように製剤化される。いくつかの実施形態では、I R A K分解剤は、個体につき約0.01mg/kg～約100mg/kg、約0.01mg/kg～約75mg/kg、約0.01mg/kg～約500mg/kg、約0.01mg/kg～約25mg/kg、約0.01mg/kg～約10mg/kg、約0.01mg/kg～約5mg/kg、約0.01mg/kg～約1.0mg/kg、約1.0mg/kg～約100mg/kg、約1.0mg/kg～約75mg/kg、約1.0mg/kg～約50mg/kg、約1.0mg/kg～約25mg/kg、約1.0mg/kg～約10mg/kg、約1.0mg/kg～約5mg/kg、約10mg/kg～約100mg/kg、約10mg/kg～約75mg/kg、約10mg/kg～約50mg/kg、約10mg/kg～約25mg/kg、約25mg/kg～約100mg/kg、約25mg/kg～約75mg/kg、約25mg/kg～約50mg/kg、約50mg/kg～約100mg/kg、約50mg/kg～約75mg/kg又は約75mg/kg～約100mg/kg体重のいずれかの投与量レベルで、経口的又は非経口的に投与される。いくつかの実施形態では、I R A K分解剤は、個体につき約0.01mg/kg、1.0mg/kg、5mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg体重、200mg/kg体重、300mg/kg体重、400mg/kg体重又は500mg/kg体重のいずれかを超える投与量レベルで、経口的又は非経口的に投与される。

【0081】

I R A K分解剤（例えば、I R A K - 4分解剤）の経口投与のための液体剤形としては、薬学的に許容されるエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ及びエリキシルが挙げられるが、これらに限定されない。活性化合物に加えて、液体剤形は、当技術分野で一般的に使用される不活性希釈剤、例えば水又は他の溶媒、可溶化剤及び乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（特に、綿実油、落花生油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油及びゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコール及びソルビタンの脂肪酸エステル並びにそれらの混合物を含有し得る。不活性希釈剤に加えて、経口組成物は、湿潤剤、乳化剤及び懸濁化剤、甘味剤、香味剤及び芳香剤などのアジュバントも含むことができる。

【0082】

注射用調製物、例えば、滅菌注射用水性若しくは油性懸濁液又はI R A K - 4分解剤は、適切な分散剤又は湿潤剤及び懸濁剤を使用して、公知の技術に従って製剤化され得る。滅菌注射用調製物は、非毒性の非経口的に許容される希釈剤又は溶媒中の滅菌注射用溶液、懸濁液又はエマルジョン、例えば1,3-ブタンジオール溶液でもあり得る。許容されるビヒクル及び使用され得る溶媒の中には、水、リンゲル溶液、U.S.P.及び等張塩化ナトリウム溶液がある。加えて、無菌の固定油は、従来、溶媒又は懸濁媒体として使用されている。この目的のために、合成モノ又はジグリセリドを含む、任意の無刺激固定油を使用することができる。さらに、オレイン酸などの脂肪酸は、注射剤の調製に使用される。

【0083】

注射用製剤又はI R A K - 4分解剤は、例えば、細菌保持フィルターによる濾過又は使用前に滅菌水若しくは他の滅菌注射用媒体に溶解又は分散することができる滅菌固体組成物の形態の滅菌剤を組み込むことによって滅菌することができる。

【0084】

I R A K - 4分解剤の経口投与のための固体剤形としては、カプセル、錠剤、丸薬、粉末及び顆粒が挙げられる。そのような固形剤形では、活性化合物は、少なくとも1つの不

活性で薬学的に許容される賦形剤又は担体、例えばクエン酸ナトリウム若しくはリン酸二カルシウム、及び/又は a) デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール及びケイ酸などのフィラー又は増量剤、b) 例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース及びアカシアなどの結合剤、c) グリセロールなどの保湿剤、d) 寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモ又はタピオカデンプン、アルギン酸、特定のケイ酸塩、炭酸ナトリウムなどの崩壊剤、e) パラフィンなどの溶解遅延剤、f) 第四級アンモニウム化合物などの吸収促進剤、g) 例えば、セチルアルコール、グリセロールモノステアレートなどの湿潤剤、h) カオリン及びベントナイト粘土などの吸収剤、並びに i) タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム及びそれらの混合物などの滑沢剤と混合される。カプセル剤、錠剤及び丸剤の場合、剤形は、緩衝剤も含み得る。

10

【0085】

同様のタイプの固体組成物は、ラクトース又は乳糖並びに高分子量ポリエチレングリコールなどのような賦形剤を使用して、軟質及び硬質充填ゼラチンカプセル中の充填剤としても使用され得る。錠剤、糖衣錠、カプセル、丸薬及び顆粒の固体剤形は、腸溶性コーティング及び医薬製剤技術で周知の他のコーティングなどのコーティング及びシェルで調製することができる。これらは、任意選択により乳白剤を含有し得、腸管の特定の部分において、任意選択により遅延様式で活性成分のみ又は活性成分を優先的に放出する組成物であることもできる。使用され得る包埋組成物の例としては、ポリマー物質及びワックスが挙げられる。同様のタイプの固体組成物は、ラクトース又は乳糖並びに高分子量ポリエチレングリコールなどのような賦形剤を使用して、軟質及び硬質充填ゼラチンカプセル中の充填剤としても使用され得る。

20

【0086】

IRAK-4 分解剤は、上記のように1つ以上の賦形剤を伴うマイクロカプセル化形態でもあり得る。錠剤、糖衣錠、カプセル、丸薬及び顆粒の固体剤形は、腸溶性コーティング、放出制御コーティング及び医薬製剤技術で周知の他のコーティングなどのコーティング及びシェルで調製することができる。このような固体剤形では、活性化化合物は、スクロース、ラクトース又はデンプンなどの少なくとも1つの不活性希釈剤と混合され得る。そのような剤形は、通常の慣行どおり、不活性希釈剤以外の追加物質、例えば、錠剤成形滑沢剤及びステアリン酸マグネシウム及び微結晶セルロースなどの他の錠剤成形助剤も含み得る。カプセル剤、錠剤及び丸剤の場合、剤形は緩衝剤も含み得る。これらは、任意選択により乳白剤を含有し得、腸管の特定の部分において、任意選択により遅延様式で活性成分のみ又は活性成分を優先的に放出する組成物であることもできる。使用され得る包埋組成物の例としては、ポリマー物質及びワックスが挙げられる。

30

【0087】

いくつかの実施形態では、IRAK分解剤(例えば、IRAK-4分解剤)は、遺伝子治療剤(例えば、AAV粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子)の投与前に投与される。いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、遺伝子治療剤の投与の約1時間前、2時間前、3時間前、4時間前、5時間前、6時間前、12時間前、18時間前、24時間前、36時間前、48時間前、3日前、4日前、5日前、6日前、1週間前又は1週間より前のいずれかで個体に投与される。いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、遺伝子治療剤の投与の約1時間前、2時間前、3時間前、4時間前、5時間前、6時間前、12時間前、18時間前、24時間前、36時間前、48時間前、3日前、4日前、5日前、6日前又は1週間前未満のいずれかで個体に投与される。いくつかの実施形態では、IRAK分解剤及び遺伝子治療剤は、ほぼ同時に(例えば、約1時間以内)投与される。いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、遺伝子治療剤の投与後に投与される。いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、遺伝子治療剤の投与の約1時間後、2時間後、3時間後、4時間後、5時間後、6時間後、12時間後、18時間後、24時間後、36時間後、48時間後、3日後、4日後、5日後、6日

40

50

後、1週間後又は1週間より後のいずれかで個体に投与される。いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、遺伝子治療剤の投与の約1時間後、2時間後、3時間後、4時間後、5時間後、6時間後、12時間後、18時間後、24時間後、36時間後、48時間後、3日後、4日後、5日後、6日後又は1週間後未満のいずれかで個体に投与される。

【0088】

いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤（例えば、AAV粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子）は、遺伝子治療による治療に適した疾患又は障害を治療するために、IRAK分解剤（例えば、IRAK-4分解剤）と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、単一遺伝子疾患又は障害である。

10

【0089】

いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤（例えば、AAV粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子）は、CNSの障害を治療するために、IRAK分解剤（例えば、IRAK-4分解剤）と組み合わせて使用される。非限定的なCNSの障害としては、脳卒中、ハンチントン病、てんかん、パーキンソン病、ルー・ゲーリッグ病（筋萎縮性側索硬化症としても知られる）、アルツハイマー病、皮質基底核変性又はCBD、皮質神経節変性又はCBGD、前頭側頭型認知症又はFTD、進行性核上性麻痺又はPSP、多系統萎縮症又はMSA、脳の癌及びリソソーム蓄積症（LSD）が挙げられる。IRAK分解剤と組み合わせて遺伝子治療によって治療され得る本発明の障害の他の非限定的な例としては、外傷性脳損傷、酵素機能不全障害、精神障害（心的外傷後ストレス症候群を含む）、神経変性疾患及び認知障害（認知症、自閉症及びうつ病を含む）が挙げられ、酵素的機能不全障害としては、白質ジストロフィー（カナバン病を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0090】

いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤（例えば、AAV粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子）は、リソソーム蓄積症を治療するために、IRAK分解剤（例えば、IRAK-4分解剤）と組み合わせて使用される。当技術分野で一般的に知られているように、リソソーム蓄積症は、リソソーム機能の欠陥を特徴とする希少な遺伝性代謝障害である。そのような障害は、多くの場合、適切なムコ多糖、糖タンパク質及び/又は脂質代謝に必要な酵素の欠乏によって引き起こされ、リソソームで蓄積された細胞物質の病理学的蓄積をもたらす。本発明の治療用ポリペプチド又は治療用核酸によって治療され得る本発明のリソソーム蓄積症の非限定的な例としては、ゴーシェ病2型又は3型、GM1ガングリオシドーシス、ハンター病、クラッペ病、マンノシドーシス病、マンノシドーシス病、異染性白質ジストロフィー病、ムコリピドーシスII/I病、ニーマン-ピックA病、ニーマン-ピックC病、ポンペ病、サンドホフ病、サンフィリップA病、サンフィリップB病、サンフィリップC病、サンフィリップD病、シンドラー病、スライ病、テイ・サックス病及びウォルマン病が挙げられる。

30

【0091】

いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤（例えば、AAV粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子）は、血友病A、血友病B、加齢黄斑変性症、糖尿病性網膜症、緑内障、筋ジストロフィー、X連鎖性筋細管ミオパチー、脊髄筋萎縮症、レーバー先天性黒内障、脈絡膜欠如、レーバー先天性視神経症、オルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）欠損症、シトルリン血症1型、フェニルケトン尿症（PKU）、副腎白質ジストロフィー、鎌状赤血球症状、筋ジストロフィー又はベータサラセミアを治療するために、IRAK分解剤（例えば、IRAK-4分解剤）と組み合わせて使用される。

40

【0092】

いくつかの態様では、本発明は、核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達するための医薬の製造における使用のための組成物であって、遺伝子治療剤（例えば、AAV粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子）を含み、I

50

R A K分解剤（例えば、I R A K - 4分解剤）と組み合わせた使用のために製剤化される組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達するための医薬の製造における使用のための組成物であって、I R A K分解剤（例えば、I R A K - 4分解剤）を含み、遺伝子治療剤（例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子）と組み合わせた使用のために製剤化される組成物を提供する。

【0093】

いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療を必要とする個体を治療するための医薬の製造における使用のための組成物であって、遺伝子治療剤（例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子）を含み、I R A K分解剤（例えば、I R A K - 4分解剤）と組み合わせた使用のために製剤化される組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、核酸を、遺伝子治療を必要とする個体を治療するための医薬の製造における使用のための組成物であって、I R A K分解剤（例えば、I R A K - 4分解剤）を含み、遺伝子治療剤（例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子）と組み合わせた使用のために製剤化される組成物を提供する。

10

【0094】

いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療を必要とする個体における遺伝子治療に対する免疫応答を調節するための医薬の製造における使用のための組成物であって、遺伝子治療剤（例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子）を含み、I R A K分解剤（例えば、I R A K - 4分解剤）と組み合わせた使用のために製剤化される組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、核酸を、個体における遺伝子治療に対する免疫応答を調節するための医薬の製造における使用のための組成物であって、I R A K分解剤（例えば、I R A K - 4分解剤）を含み、遺伝子治療剤（例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子）と組み合わせた使用のために製剤化される組成物を提供する。

20

【0095】

いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療を必要とする個体における遺伝子治療に対する免疫応答を抑制するための医薬の製造における使用のための組成物であって、遺伝子治療剤（例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子）を含み、I R A K分解剤（例えば、I R A K - 4分解剤）と組み合わせた使用のために製剤化される組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、核酸を、個体における遺伝子治療に対する免疫応答を抑制するための医薬の製造における使用のための組成物であって、I R A K分解剤（例えば、I R A K - 4分解剤）を含み、遺伝子治療剤（例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子）と組み合わせた使用のために製剤化される組成物を提供する。

30

【0096】

いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療を必要とする個体における遺伝子治療を改善するための医薬の製造における使用のための組成物であって、遺伝子治療剤（例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子）を含み、I R A K分解剤（例えば、I R A K - 4分解剤）と組み合わせた使用のために製剤化される組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、核酸を、個体における遺伝子治療を改善するための医薬の製造における使用のための組成物であって、I R A K分解剤（例えば、I R A K - 4分解剤）を含み、遺伝子治療剤（例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子）と組み合わせた使用のために製剤化される組成物を提供する。

40

【0097】

いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療を必要とする個体における遺伝子治療に対する耐性を誘導するための医薬の製造における使用のための組成物であって、遺伝子治療剤（例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂

50

質ナノ粒子)を含み、I R A K分解剤(例えば、I R A K - 4分解剤)と組み合わせた使用のために製剤化される組成物を提供する。いくつかの態様では、本発明は、核酸を、個体における遺伝子治療に対する耐性を誘導するための医薬の製造における使用のための組成物であって、I R A K分解剤(例えば、I R A K - 4分解剤)を含み、遺伝子治療剤(例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子)と組み合わせた使用のために製剤化される組成物を提供する。

【0098】

いくつかの態様では、本発明は、核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達することにおける使用のための遺伝子治療剤(例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子)であって、I R A K分解剤(例えば、I R A K - 4分解剤)と組み合わせて使用される、遺伝子治療剤を提供する。いくつかの態様では、本発明は、核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達することにおける使用のためのI R A K分解剤(例えば、I R A K - 4分解剤)であって、遺伝子治療剤(例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子)と組み合わせて使用される、I R A K分解剤を提供する。

10

【0099】

いくつかの態様では、本発明は、核酸を、遺伝子治療を必要とする個体を治療することにおける使用のための遺伝子治療剤(例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子)であって、I R A K分解剤(例えば、I R A K - 4分解剤)と組み合わせて使用される、遺伝子治療剤を提供する。いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療を必要とする個体の治療における使用のためのI R A K分解剤(例えば、I R A K - 4分解剤)であって、遺伝子治療剤(例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子)と組み合わせて使用される、I R A K分解剤を提供する。

20

【0100】

いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療を必要とする個体における遺伝子治療に対する免疫応答を調節するためのI R A K分解剤(例えば、I R A K - 4分解剤)であって、遺伝子治療剤(例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子)と組み合わせて使用される、I R A K分解剤を提供する。

【0101】

いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療を必要とする個体における遺伝子治療に対する免疫応答を抑制するためのI R A K分解剤(例えば、I R A K - 4分解剤)であって、遺伝子治療剤(例えば、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子)と組み合わせて使用される、I R A K分解剤を提供する。

30

【0102】

I R A K分解剤

いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療剤に対する免疫応答(例えば、自然免疫応答、適応免疫応答)を阻害することにより、改善された遺伝子治療のために、I R A K分解剤を遺伝子治療剤と共に使用する方法を提供する。I R A Kは、急性炎症を誘発し、続いてさらなる適応免疫応答を引き起こすことにより、人体に導入される病原体に対する防御反応で中心的な役割を果たす。I R A Kは、インターロイキン - 1受容体シグナル伝達経路及びいくつかのT o l l様受容体シグナル伝達経路の必須構成要素である。T o l l様受容体(T L R)は、特異的病原体関連分子パターン(P A M P)を認識することによって微生物を検出し、I L - 1 Rファミリーメンバーは、インターロイキン - 1(I L - 1)ファミリーサイトカインに応答する。これらの受容体は、アダプタータンパク質、主に、M y D 8 8を介して、細胞内シグナル伝達カスケードを開始する。

40

【0103】

I R A Kファミリーは、様々なヒト免疫細胞型で発現されるI R A K - 1、I R A K - 2及びI R A K - 4と、発現が主に単球及びマクロファージに限定されるI R A K - M (I R A K - 3とも呼ばれる)から構成される。4つのI R A Kファミリータンパク質は全

50

て、N末端死ドメイン（DD）、ProSTドメイン及び中央に位置するキナーゼドメインを含有する。IRAK-1、IRAK-2及びIRAK-Mは、C末端ドメインも含む。DDは、他のDD含有タンパク質とのタンパク質間相互作用を可能にするプラットフォームとして機能し、その中で最も重要なのは、アダプタータンパク質骨髄分化因子88（MyD88）である。本発明者らは、IRAK機能を遮断することにより、TLR9経路の特異的な遮断がもたらされ、特異的な免疫調節がもたらされるという仮説を立てている。いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、TLR9経路を遮断するために使用される。いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、TLR9機能を遮断する。

【0104】

いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、分解のためにIRAKキナーゼをE3ユビキチンリガーゼに動員するように機能する二機能性化合物である。いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、IRAKキナーゼの標的ユビキチン化のモジュレーターである。

10

【0105】

タンパク質分解剤は、3つの成分：目的の標的タンパク質のE3ユビキチンリガーゼリガンド、リンカー及びリガンドを含む、二機能性化合物である。これらは、E3リガーゼ及び標的タンパク質の両方に同時に結合することにより、三元複合体の形成を誘導する。三元複合体形成は、目的の標的をポリユビキチン化するためにE3リガーゼを効果的に動員し、プロテアソームによるその後の分解を誘導する。分解剤は、可逆的且つ調整可能な方法で選択的タンパク質ノックダウンを誘導するための使用について魅力的なツールである。いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、タンパク質分解標的キメラ（PROTAC）である。

20

【0106】

いくつかの実施形態では、IRAK分解剤は、IRAK-1分解剤、IRAK-2分解剤、IRAK-M分解剤（又はIRAK-3分解剤）又はIRAK-4分解剤である。

【0107】

本発明の方法における使用のための適切なIRAK4分解剤化合物は、国際公開第2019/133531号パンフレット、国際公開第2020/113233号パンフレット、国際公開第2020/264490号パンフレット、国際公開第2021/127283号パンフレット又は国際公開第2021/011868号パンフレットに記載されている。

30

【0108】

いくつかの実施形態では、IRAK-4分解剤は、国際公開第2021/247899号パンフレットに記載されている、5-((1R,4R)-2-オキサ-5-アザビシクロ[2.2.1]ヘプタン-5-イル)-N-(3-(ジフルオロメチル)-1-((1R,4R)-4-(4-(3-(1-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-3-メチル-2-オキソ-2,3-ジヒドロ-1Hベンゾ[d]イミダゾール-4-イル)プロパ-2-イン-1-イル)オキシ)ピペリジン-1-イル)メチル)シクロヘキシル)-1H-ピラゾール-4-イル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-カルボキサミド及びその薬学的に許容される塩を含む。いくつかの実施形態では、IRAK-4分解剤は、5-((1R,4R)-2-オキサ-5-アザビシクロ[2.2.1]ヘプタン-5-イル)-N-(3-(ジフルオロメチル)-1-((1r,4R)-4-(4-(3-(1-(2,6-ジオキソピペリジン-3-イル)-3-メチル-2-オキソ-2,3-ジヒドロ-1Hベンゾ[d]イミダゾール-4-イル)プロパ-2-イン-1-イル)オキシ)ピペリジン-1-イル)メチル)シクロヘキシル)-1H-ピラゾール-4-イル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-カルボキサミド及びその薬学的に許容される塩の結晶形態を含む。

40

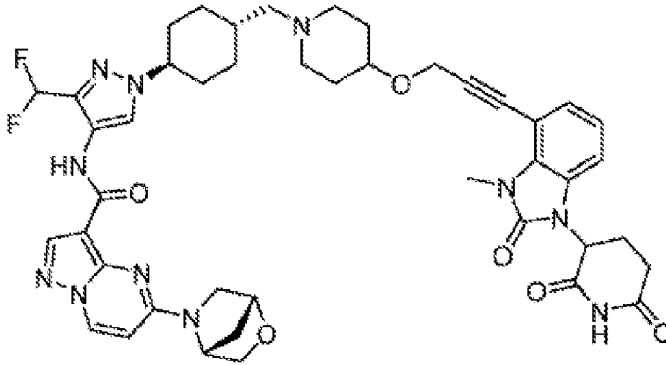
【0109】

いくつかの実施形態では、IRAK-4分解剤は、式[I]の化合物若しくは式[I]の化合物の重水素化形態又はその薬学的に許容される塩（国際公開第2021/2478

50

97号パンフレットに記載)を含む。

【化2】



10

[I]

【0110】

式 [I] の化合物は、5 - ((1 R , 4 R) - 2 - オキサ - 5 - アザピシクロ [2 . 2 . 1] ヘプタン - 5 - イル) - N - (3 - (ジフルオロメチル) - 1 - ((1 R , 4 R) - 4 - ((4 - ((3 - (1 - (2 , 6 - ジオキソピペリジン - 3 - イル) - 3 - メチル - 2 - オキソ - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 H ベンゾ [d] イミダゾール - 4 - イル) プロパ - 2 - イン - 1 - イル) オキシ) ピペリジン - 1 - イル) メチル) シクロヘキシル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) ピラゾロ [1 , 5 - a] ピリミジン - 3 - カルボキサミドである。

20

【0111】

遺伝子治療剤

いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療剤に対する自然免疫応答を阻害することにより、改善された遺伝子治療のために、I R A K 分解剤を遺伝子治療剤と共に使用する方法を提供する。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤は、ウイルス粒子又は脂質ナノ粒子である。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤は、アデノ随伴ウイルス (A A V) 粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子又は単純ヘルペスウイルス (H A V) 粒子である。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤は、脂質ナノ粒子又はリポソームである。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤に対する免疫応答は、ウイルス粒子 (例えば、ウイルスカプシドタンパク質、ウイルスエンベロープなど) に対する免疫応答である。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤に対する免疫応答は、L N P (例えば、L N P を産生するために使用される1つ以上の脂質) に対する免疫応答である。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤に対する免疫応答は、遺伝子治療ペイロード例えば、治療用導入遺伝子をコードする核酸 (ウイルスゲノム、プラスミド、末端閉鎖型 D N A 、 m R N A 、 アンチセンス核酸、s i R N A 、 s h R N A など) に対する免疫応答である。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤に対する免疫応答は、導入遺伝子産物 (例えば、治療用ポリペプチド又は治療用核酸) に対する免疫応答である。

30

【0112】

A A V

いくつかの実施形態では、本発明は、改善された遺伝子治療のために、I R A K 分解剤を A A V 粒子と共に使用する方法を提供する。遺伝子治療用の A A V 粒子では、異種核酸 (例えば、治療用導入遺伝子) をコードする組換え A A V (r A A V) ゲノムは、A A V カプシドに封入される。いくつかの実施形態では、ウイルスゲノムは、転写の方向に動作可能に連結された異種核酸及び/又は以下の成分の1つ以上、転写開始配列及び終了配列を含む制御配列を含み、それによって発現カセットを形成する。

40

【0113】

いくつかの実施形態では、r A A V ゲノムは、1つ以上の A A V 逆位末端反復 (I T R) 配列 (典型的には2つの A A V I T R 配列) を含む。例えば、発現カセットは、少な

50

くとも1つの機能的AAV ITR配列が5'及び3'末端に隣接し得る。「機能的AAV ITR配列」とは、ITR配列がAAVピリオンのレスキュー、複製及びパッケージングのために意図されたように機能することを意味する。Davidson et al., PNAS, 2000, 97(7)3428-32; Passini et al., J. Virol., 2003, 77(12):7034-40;及びPechan et al., Gene Ther., 2009, 16:10-16を参照されたい(これらは、全て参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。本発明のいくつかの態様を実施するために、組換えウイルスゲノムは、AAVカプシドへの封入に必須のAAVの配列の少なくとも全て及びAAV粒子による感染のための物理的構造を含む。本発明のベクターにおける使用のためのAAV ITRは、野生型ヌクレオチド配列(例えば、Kotkin, Hum. Gene Ther., 1994, 5:793-801)に記載される)を有する必要はなく、ヌクレオチドの挿入、欠失又は置換によって改変され得るか、又はAAV ITRは、いくつかのAAV血清型のいずれかに由来し得る。現在、40を超えるAAVの血清型が知られており、新しい血清型及び既存の血清型のバリエーションが引き続き特定されている。Gao et al., PNAS, 2002, 99(18):11854-6; Gao et al., PNAS, 2003, 100(10):6081-6;及びBossis et al., J. Virol., 2003, 77(12):6799-810を参照されたい。任意のAAV血清型の使用は、本発明の範囲内であると考えられる。いくつかの実施形態では、rAAVベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV LK03、AAV2R471A、AAV DJ、AAV DJ8、ヤギAAV、ウシAAV又はマウスAAV ITRなどを含むが、これらに限定されないAAV血清型に由来するベクターである。いくつかの実施形態では、AAV核酸(例えば、rAAVベクター)は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV LK03、AAV2R471A、AAV DJ、AAV DJ8、ヤギAAV、ウシAAV又はマウスAAV ITRなどの1つ以上(例えば、いくつかの態様では2つ)のITRを含む。いくつかの実施形態では、AAV粒子は、1つ以上のAAV ITRに隣接する異種導入遺伝子をコードするAAVベクターを含む。

【0114】

いくつかの実施形態では、AAV粒子は、AAV1カプシド、AAV2カプシド、AAV3カプシド、AAV4カプシド、AAV5カプシド、AAV6カプシド、AAV7カプシド、AAV8カプシド、AAVrh8カプシド、AAV9カプシド、AAV10カプシド、AAVrh10カプシド、AAV11カプシド、AAV12カプシド、AAVrh32.33カプシド、AAV-XL32カプシド、AAV-XL32.1カプシド、AAV LK03カプシド、AAV2R471Aカプシド、AAV2/2-7m8カプシド、AAV DJカプシド、AAV DJ8カプシド、AAV2 N587Aカプシド、AAV2 E548Aカプシド、AAV2 N708Aカプシド、AAV V708Kカプシド、ヤギAAVカプシド、AAV1/AAV2キメラカプシド、ウシAAVカプシド、マウスAAVカプシド、rAAV2/HBoV1(キメラAAV/ヒトボカウイルスウイルス1)、AAV2HBKOカプシド、AAV PHP.Bカプシド若しくはAAV PHP.eBカプシド又はその機能的バリエーションから選択されるカプシドタンパク質を含む。AAVカプシドの「機能的バリエーション」とは、バリエーションカプシドがAAVゲノムをパッケージングして感染性AAVピリオンを生成できることを意味する。さらなる実施形態では、AAV粒子は、クレードA~FからのAAV血清型のカプシドタンパク質を含む。

【0115】

いくつかの態様では、本発明は、組換え自己相補性ゲノム(例えば、自己相補的又は自己相補性AAVベクター)を含むAAV粒子を提供する。自己相補性ベクターゲノムを有するAAVウイルス粒子及び自己相補性rAAVゲノムの使用方法は、米国特許第6,5

96, 535号、第7, 125, 717号、第7, 465, 583号、第7, 785, 888号、第7, 790, 154号、第7, 846, 729号、第8, 093, 054号及び第8, 361, 457号明細書並びにWang Z., et al., (2003) Gene Ther 10: 2105-2111に記載され、これらは、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。自己相補性ゲノムを含むAAV粒子は、その部分相補性配列（例えば、異種核酸の相補性コード鎖及び非コード鎖）により、二本鎖DNA分子を迅速に形成する。いくつかの実施形態では、ベクターは、異種核酸をコードする第1の核酸配列と、核酸の相補体をコードする第2の核酸配列とを含み、第1の核酸配列は、その長さの大部分又は全てにわたって第2の核酸配列と鎖内塩基対を形成することができる。

10

【0116】

いくつかの実施形態では、第1の異種核酸配列及び第2の異種核酸配列は、変異ITR（例えば、右ITR）によって連結される。いくつかの実施形態では、ITRは、ポリヌクレオチド配列5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACGTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCACGCGCCGGGGCTTTGCCCGGGCG-3'（配列番号1）を含む。変異ITRは、末端解離配列を含むD領域の欠失を含む。その結果、rAAVゲノムの複製では、repタンパク質は変異したITRでウイルスゲノムを切断せず、そのため、5'から3'の順序で以下を含む組換えウイルスゲノムがウイルスカプシドにパッケージングされる：AAV ITR、調節配列を含む第1の異種ポリヌクレオチド配列、変異AAV ITR、第1の異種ポリヌクレオチドと逆向きの第2の異種ポリヌクレオチド及び第3のAAV ITR。

20

【0117】

異なるAAV血清型を使用して、特定の標的細胞の導入を最適化するか、又は特定の標的組織（例えば、病変組織）内の特定の細胞型を標的化する。AAV粒子は、同じ血清型又は混合血清型のウイルスタンパク質及びウイルス核酸を含み得る。例えば、AAV粒子は、同じAAV血清型に由来する1つ以上のITR及びカプシドを含有し得るか、又はAAV粒子は、AAV粒子のカプシドと異なるAAV血清型に由来する1つ以上のITRを含有し得る。

【0118】

いくつかの実施形態では、AAVカプシドは変異を含み、例えば、カプシドは変異カプシドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、変異は、チロシン変異又はヘパリン結合変異である。いくつかの実施形態では、変異カプシドタンパク質は、AAVカプシドを形成する能力を維持する。いくつかの実施形態では、AAV粒子は、Y444又はY730（AAV2に従う番号付け）の変異などのAAV2又はAAV5チロシン変異体カプシド（例えば、Zhong L. et al., (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105(22): 7827-7832を参照されたい）を含む。さらなる実施形態では、AAV粒子は、クレードA~FからのAAV血清型のカプシドタンパク質を含む（Gao, et al., J. Virol. 2004, 78(12): 6381）。

30

【0119】

遺伝子治療用のAAV粒子の産生について多数の方法が当技術分野で公知であり、これには、トランスフェクション、安定な細胞株の産生及びアデノウイルス-AAVハイブリッド、ヘルペスウイルス-AAVハイブリッドを含む感染性ハイブリッドウイルス産生系が含まれる（Conway, JE et al., (1997) J. Virology 71(11): 8780-8789）及びバキュロウイルス-AAVハイブリッド（Urabe, M. et al., (2002) Human Gene Therapy 13(16): 1935-1943; Kotin, R. (2011) Hum Mol Genet. 20(R1): R2-R6）。AAV粒子の産生のためのAAV産生培養物は全て、1) 適切な宿主細胞、2) 適切なヘルパーウイルス機能、3) AAV rep及びcap遺伝子並びに遺伝子産物；4) 少なくとも1つのAAV ITR配列に隣接した核酸（治

40

50

療用核酸など)、並びに5) AAV産生をサポートする適切な培地及び培地成分を必要とする。いくつかの実施形態では、適切な宿主細胞は、霊長類宿主細胞である。いくつかの実施形態では、適切な宿主細胞は、HeLa、A549、293又はPERC.6細胞などのヒト由来細胞株である。いくつかの実施形態では、適切なヘルパーウイルス機能は、野生型又は変異型アデノウイルス(温度感受性アデノウイルスなど)、ヘルペスウイルス(HSV)、バキュロウイルス又はヘルパー機能を提供するプラスミド構築物によって提供される。いくつかの実施形態では、AAVrep及びcap遺伝子産物は、任意のAAV血清型からのものであり得る。一般に、AAVrep遺伝子産物は、必須ではないが、rep遺伝子産物がrAAVゲノムを複製し、パッケージングするように機能し得る限り、rAAVゲノムのITRと同じ血清型である。当技術分野で公知の適切な培地は、AAV粒子の産生に使用され得る。いくつかの実施形態では、AAVヘルパー機能は、アデノウイルス又はHSVによって提供される。いくつかの実施形態では、AAVヘルパー機能はバキュロウイルスによって提供され、宿主細胞は昆虫細胞(例えば、ツマジロクサヨトウ(Spodoptera frugiperda)(Sf9)細胞)である。

10

【0120】

AAV粒子を産生するための1つの方法は、トリプルトランスフェクション法である。簡単に説明すると、rep遺伝子及びカプシド遺伝子を含むプラスミドは、ヘルパーアデノウイルスプラスミドと共に、(例えば、リン酸カルシウム法を使用して)細胞株(例えば、HEK-293細胞)にトランスフェクトされ得、ウイルスが回収され、任意選択により精製され得る。そのため、いくつかの実施形態では、AAV粒子は、AAVベクターをコードする核酸、AAVrep及びcapをコードする核酸並びにAAVヘルパーウイルス機能をコードする核酸の宿主細胞へのトリプルトランスフェクションによって産生され、宿主細胞への核酸のトランスフェクションにより、AAV粒子を産生できる宿主細胞が生成される。

20

【0121】

いくつかの実施形態では、AAV粒子は、産生細胞株法によって産生され得る(Martin et al., (2013) Human Gene Therapy Methods 24:253-269; 米国特許出願公開第2004/0224411号明細書; 及びLiu, X. L. et al. (1999) Gene Ther. 6:293-299を参照されたい)。簡単に説明すると、細胞株(例えば、HeLa、293、A549又はPerC.6細胞株)は、rep遺伝子、カプシド遺伝子及びプロモーター異種核酸配列を含むベクターゲノムを含有するプラスミドで安定的にトランスフェクトされ得る。細胞株をスクリーニングしてAAV産生のためのリードクローンを選択し得、次いで、これを生産バイオリアクターに拡大し、ヘルパーウイルス(例えば、アデノウイルス又はHSV)に感染させてAAV産生を開始し得る。その後、ウイルスを回収し得、アデノウイルスを不活性化(例えば、熱によって)及び/又は除去し得、AAV粒子を精製し得る。したがって、いくつかの実施形態では、AAV粒子は、rAAVゲノムをコードする核酸、AAVrep及びCAPをコードする核酸並びにAAVヘルパーウイルス機能をコードする核酸の1つ以上を含む産生細胞株によって産生された。

30

【0122】

いくつかの実施形態では、AAVrep遺伝子及びcap遺伝子及び/又はAAVウイルスゲノムをコードする核酸は、産生細胞株で安定的に維持される。いくつかの実施形態では、AAVrep遺伝子及びcap遺伝子及び/又はrAAVゲノムをコードする核酸は、1つ以上のプラスミド上で細胞株に導入されて、産生細胞株を産生する。いくつかの実施形態では、AAVrep、AAVcap及びAAVゲノムは、同じプラスミド上の細胞に導入される。他の実施形態では、AAVrep、AAVcap及びrAAVゲノムは、異なるプラスミド上の細胞に導入される。いくつかの実施形態では、プラスミドで安定的にトランスフェクトされた細胞株は、細胞株の複数回の継代(例えば、5、10、20、30、40、50又は50超の継代)にわたってプラスミドを維持する。例えば、プラスミドは、細胞が複製するときに複製し得るか、又はプラスミドは、細胞ゲノムに組み込ま

40

50

れ得る。プラスミドが細胞（例えば、ヒト細胞）内で自律的に複製できるようにする様々な配列が同定されている（例えば、Krysan, P. J. et al. (1989) Mol. Cell Biol. 9: 1026 - 1033を参照されたい）。いくつかの実施形態では、プラスミドは、プラスミドを維持する細胞の選択を可能にする選択マーカー（例えば、抗生物質耐性マーカー）を含有し得る。哺乳動物細胞で一般的に使用される選択マーカーとしては、プラスチジン、G418、ハイグロマイシンB、ゼオシン、ピューロマイシン及びその誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。細胞に核酸を導入する方法は、当技術分野で公知であり、ウイルス形質導入、カチオン性トランスフェクション（例えば、DEAE-デキストランなどのカチオン性ポリマー又はリポフェクタミンなどのカチオン性脂質を使用）、リン酸カルシウムトランスフェクション、マイクロインジェクション、粒子衝撃、エレクトロポレーション及びナノ粒子トランスフェクションを含むが、これらに限定されない（さらなる詳細については、例えば、Kim, T. K. 及び Eberwine, J. H. (2010) Anal. Bioanal. Chem. 397: 3173 - 3178を参照されたい）。

10

【0123】

いくつかの実施形態では、産生細胞株は、霊長類細胞株（例えば、Vero又はFRhL-2細胞株などの非ヒト霊長類細胞株）に由来する。いくつかの実施形態では、細胞株は、ヒト細胞株に由来する。いくつかの実施形態では、産生細胞株は、HeLa、293、A549又はPERC.6（登録商標）（Crucel）細胞に由来する。例えば、AAVrep及びcap遺伝子及び/又はrAAVゲノムをコードする核酸を細胞株に導入及び/又は安定的に維持/統合して産生細胞株を生成する前に、細胞株は、HeLa、293、A549若しくはPERC.6（登録商標）（Crucel）細胞株又はその誘導体である。

20

【0124】

いくつかの実施形態では、産生細胞株は、懸濁液中での増殖に適合される。当技術分野で知られているように、足場依存性細胞は、典型的には、マイクロキャリアビーズなどの基質なしに懸濁液中で増殖することができない。懸濁液中で増殖するように細胞株を適合させることは、例えば、攪拌パドルを用いてスピナー培養で細胞株を増殖させることと、凝集を防止するためにカルシウムイオン及びマグネシウムイオンを欠く培養培地（及び任意選択により消泡剤）を使用することと、シリコン化合物で被覆された培養容器を使用することと、各継代で（大きい塊又は容器の側面ではなく）培養物中の細胞を選択することとを含み得る。

30

【0125】

本発明のAAV粒子は、産生培養物の宿主細胞の溶解又は産生培養物からの使用済み培地の回収により、AAV産生培養物から回収することができる。ただし、細胞は、米国特許第6,566,118号明細書にさらに詳細に記載されているように、インタクトな細胞から培地にAAV粒子を放出させる当技術分野で公知の条件下で培養される。細胞を溶解する適切な方法も当技術分野で公知であり、例えば複数の凍結/解凍サイクル、超音波処理、微小流動化及び洗剤及び/又はプロテアーゼなどの化学物質による処置が含まれる。

40

【0126】

さらなる実施形態では、AAV粒子が精製される。本明細書で使用される「精製された」という用語は、AAV粒子が天然に存在するか又は最初に調製される場合にも存在し得る他の成分の少なくとも一部を欠くAAV粒子の調製を含む。したがって、例えば、単離されたAAV粒子は、培養溶解物又は産生培養上清などのソース混合物からそれを濃縮するための精製技術を使用して調製され得る。濃縮は、例えば、溶液中に存在するDNase耐性粒子（DRP）若しくはゲノムコピー（GC）の割合又は感染性などによる様々な方法で測定することができるか、又はこれは、生産培養汚染物質若しくはヘルパーウイルス、培地成分などのプロセス内汚染物質を含む汚染物質など、ソース混合物中に存在する第2の潜在的に干渉する物質との関係で測定できる。

50

【0127】

いくつかの実施形態では、AAV産生培養回収物を清澄化して、宿主細胞デブリを除去する。いくつかの実施形態では、産生培養回収物は、例えば、グレードDOHC Millipore Millistak+HC Pod Filter、グレードA1HC Millipore Millistak+HC Pod Filter及び0.2µm Filter Opticap XL10 Millipore Express SHC Hydrophilic Membraneフィルターを含む一連のデプスフィルターによる濾過によって清澄化される。清澄化は、遠心分離又は当技術分野で公知の0.2µm以上の孔径の任意の酢酸セルロースアセテートフィルターを介した濾過など、当技術分野で公知の様々な他の標準的技術によっても達成され得る。

10

【0128】

いくつかの実施形態では、AAV産生培養回収物を、Benzonase（登録商標）でさらに処置して、産生培養物中に存在する任意の高分子量DNAを消化する。いくつかの実施形態では、Benzonase（登録商標）消化は、例えば、1~2.5単位/mlのBenzonase（登録商標）の最終濃度で、周囲温度~37の範囲の温度で、30分~数時間にわたり実施されるなど、当技術分野で公知の標準的な条件下で実施される。

【0129】

AAV粒子は、以下の精製ステップの1つ以上を使用して単離又は精製され得る：平衡遠心分離、フロースルーアニオン交換濾過、AAV粒子を濃縮するための接線流濾過（TFF）、アパタイトクロマトグラフィーによるAAV捕捉、ヘルパーウイルスの熱不活性化、疎水性相互作用クロマトグラフィーによるAAV捕捉、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によるバッファー交換、ナノ濾過及びアニオン交換クロマトグラフィー、カチオン交換クロマトグラフィー又はアフィニティークロマトグラフィーによるAAV捕捉。これらのステップは、単独で、様々な組み合わせで又は異なる順序で使用され得る。いくつかの実施形態では、方法は、以下に記載される順序で全てのステップを含む。AAV粒子を精製する方法は、例えば、Xiao et al., (1998) Journal of Virology 72: 2224-2232; 米国特許第6,989,264号及び第8,137,948号明細書; 並びに国際公開第2010/148143号パンフレットに見出される。

20

30

【0130】

アデノウイルス

いくつかの実施形態では、本発明は、改善された遺伝子治療のために、IRAK分解剤をアデノウイルス粒子と共に使用方法を提供する。遺伝子治療のためのアデノウイルスベクターは、典型的には、アデノウイルスカプシド中に封入された2つのアデノウイルスITR間の1つ以上の異種配列（すなわちアデノウイルス起源ではない核酸配列）を含む組換えアデノウイルス（RAD）ゲノムを有するアデノウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、異種配列は、治療用導入遺伝子をコードする。いくつかの実施形態では、radゲノムは、1つ以上のE1遺伝子の欠陥コピーを欠くか又はそれを含み、これによりアデノウイルス複製が欠陥となる。アデノウイルスは、大きい（約950）非エンペローブ二十面体カプシド内に線状二本鎖DNAゲノムを含む。アデノウイルスは、（例えば、E1及び/又はE3領域の代わりに）30kbを超える異種配列を組み込むことができる大きいゲノムを有し、それにより、より大きい異種遺伝子での使用に特に適している。それらは、分裂細胞及び非分裂細胞に感染し、宿主ゲノムに自然に組み込まれないことも知られている（ただし、ハイブリッドバリエーションは、この能力を有し得る）。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは、E1の代わりに異種配列を有する第1世代アデノウイルスベクターであり得る。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは、E2A、E2B及び/又はE4にさらなる変異又は欠失を有する第2世代アデノウイルスベクターであり得る。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターは、全てのウイルスコード遺伝子を欠き、ITR及びパッケージングシグナルのみを保持し、複製

40

50

及びパッケージングのためにトランスでヘルパーアデノウイルスを必要とする、第3世代又はguttedアデノウイルスベクターであり得る。アデノウイルス粒子は、哺乳動物細胞の一過性トランスフェクションのためのベクター及び遺伝子治療ベクターとしての使用について研究されている。さらなる説明については、例えば、Danthinne, X. 及び Imperiale, M. J. (2000) Gene Ther. 7: 1707-14 並びに Tatsis, N. 及び Ertl, H. C. (2004) Mol. Ther. 10: 616-29 を参照されたい。

【0131】

いくつかの実施形態では、アデノウイルス粒子は、治療用導入遺伝子を含む rAdゲノムを含む。任意のアデノウイルス血清型の使用は、本発明の範囲内であると考えられる。いくつかの実施形態では、アデノウイルス粒子は、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu5、AdHu7、AdHu11、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAd及びブタAd3型を含むが、これらに限定されないアデノウイルス血清型に由来する。アデノウイルス粒子は、カプシドタンパク質も含む。いくつかの実施形態では、アデノウイルス粒子は、1つ以上の外来ウイルスカプシドタンパク質を含む。そのような組み合わせは、偽型アデノウイルス粒子と呼ばれ得る。いくつかの実施形態では、偽型アデノウイルス粒子で使用される外来ウイルスカプシドタンパク質は、外来ウイルス又は別のアデノウイルス血清型に由来する。いくつかの実施形態では、外来ウイルスカプシドタンパク質は、レオウイルス3型を含むが、これらに限定されないウイルスに由来する。偽型アデノウイルス粒子で使用されるベクター及びカプシドタンパク質の組み合わせの例は、以下の参考文献に見出すことができる (Tatsis, N. et al. (2004) Mol. Ther. 10(4): 616-629 及び Ahi, Y. et al. (2011) Curr. Gene Ther. 11(4): 307-320)。異なるアデノウイルス血清型を使用して、特定の標的細胞の導入を最適化するか、又は特定の標的組織 (例えば、病変組織) 内の特定の細胞型を標的化することができる。特定のアデノウイルス血清型によって標的とされる組織又は細胞には、肺 (例えば、HuAD3)、脾臓及び肝臓 (例えば、HuAD37)、平滑筋、滑膜細胞、樹状細胞、心血管細胞、腫瘍細胞株 (例えば、HuAD11) 及び樹状細胞 (例えば、レオウイルス3型、HuAD30又はHuAD35で偽型化されたHuAD5) が含まれるが、これらに限定されない。さらなる説明については、Ahi, Y. et al. (2011) Curr. Gene Ther. 11(4): 307-320、Kay, M. et al. (2001) Nat. Med. 7(1): 33-40 及び Tatsis, N. et al. (2004) Mol. Ther. 10(4): 616-629 を参照されたい。

【0132】

アデノウイルス粒子の産生のための多数の方法が当技術分野で公知である。例えば、guttedアデノウイルスベクターの場合、アデノウイルスベクターゲノム及びヘルパーアデノウイルスゲノムは、パッケージング細胞株 (例えば、293細胞株) にトランスフェクトされ得る。いくつかの実施形態では、ヘルパーアデノウイルスゲノムは、そのパッケージングシグナルに隣接する組換え部位を含み得、両方のゲノムは、リコンビナーゼを発現するパッケージング細胞株にトランスフェクトされ得 (例えば、Cre/LoxP系が使用され得る)、その結果、目的のアデノウイルスベクターがヘルパーアデノウイルスよりも効率的にパッケージングされる (例えば、Alba, R. et al. (2005) Gene Ther. 12 Suppl 1: S18-27 を参照されたい)。アデノウイルスベクターは、本明細書に記載されているもののような標準的な方法を使用して回収及び精製され得る。

【0133】

レンチウイルス

いくつかの実施形態では、本発明は、改善された遺伝子治療のために、IRAK分解剤

10

20

30

40

50

をレンチウイルス粒子と共に使用する方法を提供する。遺伝子治療のためのレンチウイルスベクターは、典型的には、2つの長い末端反復（LTR）間に1つ以上の異種配列（すなわちレンチウイルス起源ではない核酸配列）を含む組換えレンチウイルスゲノムを有するレンチウイルス粒子である。いくつかの実施形態では、異種配列は、治療用導入遺伝子をコードする。レンチウイルスは、およそ10 kbのゲノムを有するプラス鎖のssRNAレトロウイルスである。レンチウイルスは、分裂及び非分裂細胞のゲノムに組み込まれる。レンチウイルス粒子は、例えば、複数のプラスミド（典型的には、レンチウイルスゲノムと複製及び/又はパッケージングに必要な遺伝子は、ウイルス複製を防止するために分離されている）をパッケージング細胞株にトランスフェクトすることによって産生され得、これにより、改変レンチウイルスゲノムがレンチウイルス粒子にパッケージングされる。いくつかの実施形態では、レンチウイルス粒子は、エンベロープタンパク質を欠く第1世代ベクターを指し得る。いくつかの実施形態では、レンチウイルス粒子は、gag/pol及びtat/rev領域を除く全ての遺伝子を欠く第2世代ベクターを指し得る。いくつかの実施形態では、レンチウイルス粒子は、内因性rev、gag及びpol遺伝子のみを含み、tat遺伝子なしでの形質導入用のキメラLTRを有する第3世代ベクターを指し得る（Dull, T. et al. (1998) J. Virol. 72: 8463-71を参照されたい）。さらなる説明については、Durand, S.及びCimarrelli, A. (2011) Viruses 3: 132-59を参照されたい。

10

【0134】

任意のレンチウイルスベクターの使用は、本発明の範囲内であると考えられる。いくつかの実施形態では、レンチウイルスベクターは、ヒト免疫不全ウイルス-1（HIV-1）、ヒト免疫不全ウイルス-2（HIV-2）、サル免疫不全ウイルス（SIV）、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、ウマ感染性貧血ウイルス（EIAV）、ウシ免疫不全ウイルス（BIV）、ジェンプラナ病ウイルス（JDV）、ピスナウイルス（VV）及びヤギ関節炎脳炎ウイルス（CAEV）を含むが、これらに限定されないレンチウイルスに由来する。レンチウイルス粒子は、カプシドタンパク質も含む。いくつかの実施形態では、レンチウイルス粒子は、1つ以上の外来ウイルスカプシドタンパク質を含む。そのような組み合わせは、偽型レンチウイルス粒子と呼ばれ得る。いくつかの実施形態では、偽型レンチウイルス粒子で使用される外来ウイルスカプシドタンパク質は、外来ウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、偽型レンチウイルス粒子で使用される外来ウイルスカプシドタンパク質は、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質（VSV-GP）である。VSV-GPは、遍在性細胞受容体と相互作用し、偽型レンチウイルス粒子に対する広範な組織指向性を提供する。加えて、VSV-GPは、偽型レンチウイルス粒子に、より高い安定性を提供すると考えられる。他の実施形態では、外来ウイルスカプシドタンパク質は、チャンドイブラウイルス、狂犬病ウイルス、モコラウイルス、リンパ球性脈絡膜炎ウイルス（LCMV）、ロスリバーウイルス（RRRV）、シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス（SFV）、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、エボラウイルスレストン、エボラウイルスザール、マールブルグウイルス、ラッサウイルス、烏白血病ウイルス（ALV）、ヤークジークテヒツジレトロウイルス（JSRV）、モロニーマウス白血病ウイルス（MLV）、テナガザル白血病ウイルス（GALV1）、ネコ内因性レトロウイルス（RD114）、ヒトTリンパ性ウイルス（HTLV-1）、ヒト泡状ウイルス、マエディ・ピスナウイルス（MV）、SARS-CoV、センダイウイルス、呼吸器合胞体ウイルス（RSV）、ヒトパラインフルエンザウイルス3型、C型肝炎ウイルス（HCV）、インフルエンザウイルス、トリペストウイルス（FPV）又はAutographa californica核多角体ウイルス（AcMNPV）を含むが、これらに限定されないウイルスに由来する。偽型レンチウイルス粒子で使用されるベクター及びカプシドタンパク質の組み合わせの例は、例えば、Cronin, J. et al. (2005). Curr. Gene Ther. 5(4): 387-398に見出される。異なる偽型レンチウイルス粒子を使用して、特定の標的細胞の導入を最適化するか、又は特定の標的組織（例えば、病変組織）内の特定の細胞型を標的化することができる。例えば、特定の偽型レンチウ

20

30

40

50

ルス粒子によって標的とされる組織には、肝臓（例えば、VSV-G、LCMV、RRV又はSEVタンパク質で偽型化）、肺（例えば、エボラ、マールブルグ、SeV及びHN又はJSRVタンパク質で偽型化）、膵島細胞（例えば、LCMVタンパク質で偽型化）、中枢神経系（例えば、VSV-G、LCMV、狂犬病又はモコラタンパク質で偽型化）、網膜（例えば、VSV-G又はモコラタンパク質で偽型化）、単球若しくは筋肉（例えば、モコラ又はエボラタンパク質で偽型化）、造血系（例えば、RD114又はGALVタンパク質で偽型化）又は癌細胞（例えば、GALV又はLCMVタンパク質で偽型化）が含まれるが、これらに限定されない。さらなる説明については、Cronin, J. et al. (2005). *Curr. Gene Ther.* 5 (4): 387 - 398 及び Kay, M. et al. (2001) *Nat. Med.* 7 (1): 33 - 40 を参照されたい。

10

【0135】

レンチウイルス粒子の産生のための多数の方法が当技術分野で公知である。例えば、第3世代レンチウイルスベクターの場合、gag及びpol遺伝子と目的の組換えレンチウイルスゲノムを含有するベクターは、rev遺伝子を含有するベクターと共にパッケージング細胞株（例えば、293細胞株）に共トランスフェクトされ得る。目的の組換えレンチウイルスゲノムは、Tat非存在下で転写を促進するキメラLTRも含有する（Dul, T. et al. (1998) *J. Virol.* 72: 8463 - 71を参照されたい）。レンチウイルスベクターは、本明細書に記載される方法（Segura MM, et al., (2013) *Expert Opin Biol Ther.* 13 (7): 987 - 1011）を使用して、回収及び精製され得る。

20

【0136】

HSV

いくつかの実施形態では、本発明は、改善された遺伝子治療のために、IRAK分解剤をHSV粒子と共に使用する方法を提供する。遺伝子治療のためのHSVベクターは、典型的には、2つの末端反復（TR）間に1つ以上の異種配列（すなわちHSV起源ではない核酸配列）を含む組換えHSVゲノムを有するHSV粒子である。いくつかの実施形態では、異種配列は、治療用導入遺伝子をコードする。HSVは、およそ152kbのゲノムを有する、エンベロープ二本鎖DNAウイルスである。有利な点として、その遺伝子のおよそ半分は非必須であり、異種配列に対応するために欠失され得る。HSV粒子は、非分裂細胞に感染する。さらに、それらは、ニューロン内で自然に潜伏状態を確立し、逆行輸送によって移動し、シナプスを越えて転移することができるため、神経系に関するニューロンのトランスフェクション及び/又は遺伝子治療アプローチに有利である。いくつかの実施形態では、HSV粒子は、複製欠陥又は複製適格（例えば、1つ以上の後期遺伝子の不活性化による単一の複製サイクルに対して適格）であり得る。さらなる説明については、Manservigi, R. et al. (2010) *Open Virol. J.* 4: 123 - 56を参照されたい。

30

【0137】

いくつかの実施形態では、HSV粒子は、導入遺伝子を含む組換えHSVゲノムを含む。任意のHSVベクターの使用は、本発明の範囲内であると考えられる。いくつかの実施形態では、HSVベクターは、HSV-1及びHSV-2を含むが、これらに限定されないHSV血清型に由来する。HSV粒子は、カプシドタンパク質も含む。いくつかの実施形態では、HSV粒子は、1つ以上の外来ウイルスカプシドタンパク質を含む。そのような組み合わせは、偽型HSV粒子と呼ばれ得る。いくつかの実施形態では、偽型HSV粒子で使用される外来ウイルスカプシドタンパク質は、外来ウイルス又は別のHSV血清型に由来する。いくつかの実施形態では、偽型HSV粒子で使用される外来ウイルスカプシドタンパク質は、水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質（VSV-GP）である。VSV-GPは、遍在性細胞受容体と相互作用し、偽型HSV粒子に対する広範な組織指向性を提供する。加えて、VSV-GPは、偽型HSV粒子に、より高い安定性を提供すると考えられる。他の実施形態では、外来ウイルスカプシドタンパク質は、異なるHSV血清型か

40

50

らのものであり得る。例えば、HSV-1ベクターは、1つ以上のHSV-2カプシドタンパク質を含有し得る。異なるHSV血清型を使用して、特定の標的細胞の導入を最適化するか、又は特定の標的組織（例えば、病変組織）内の特定の細胞型を標的化することができる。特定のアデノウイルス血清型によって標的とされる組織又は細胞には、中枢神経系及びニューロン（例えば、HSV-1）が含まれるが、これらに限定されない。さらなる説明については、Manservigi, R. et al. (2010) *Open Virol J* 4:123-156, Kay, M. et al. (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40及びMeignier, B. et al. (1987) *J. Infect. Dis.* 155(5):921-930を参照されたい。

【0138】

HSV粒子の産生のための多数の方法が当技術分野で公知である。HSVベクターは、本明細書に記載されているもののような標準的な方法を使用して回収及び精製され得る。例えば、複製欠陥HSVベクターの場合、全ての最初期(IE)遺伝子を欠く目的のHSVゲノムは、ICP4、ICP27及びICP0などのウイルス産生に必要な遺伝子を提供する相補性細胞株にトランスフェクトされ得る（例えば、Samaniego, L. A. et al. (1998) *J. Virol.* 72:3307-20を参照されたい）。HSVベクターは、記載された方法（例えば、Goins, WF et al., (2014) *Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology* 1144:63-79）を使用して回収及び精製され得る。

【0139】

非ウイルス遺伝子治療剤

いくつかの実施形態では、本発明は、遺伝子治療のための非ウイルス遺伝子導入方法と共にIRAK分解剤を使用する方法を提供する。非ウイルスベクター送達系には、DNAプラスミド、ネイキッド核酸及び送達系に複合体化された核酸が含まれる。例えば、ベクターは、脂質（例えば、カチオン性又は中性脂質）、リポソーム、ポリカチオン、脂質ナノ粒子又は核酸の細胞取り込みを強化する薬剤と複合体化され得る。核酸は、本明細書に記載の送達方法のいずれかに適切な薬剤に複合体化され得る。いくつかの実施形態では、核酸は、治療用導入遺伝子をコードする。

【0140】

遺伝子治療のための脂質ナノ粒子は、典型的には、脂質粒子に封入されたベクターゲノム又は脂質と複合したベクターゲノムを含む。いくつかの実施形態では、異種配列は、治療用導入遺伝子をコードする。いくつかの実施形態では、ベクターゲノムは、リポブレンクスナノ粒子又はリポソーム中で製剤化される。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤のリポブレンクスナノ粒子製剤は、合成カチオン性脂質(R)-N,N,N,N-トリメチル-2,3-ジオレイルオキシ-1-プロパンアミニウムクロリド(DOTMA)及びリン脂質1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)を含む。いくつかの実施形態では、DOTMA/DOPEリポソーム成分は、個体における細胞の送達及び標的化について最適化される。

【0141】

いくつかの実施形態では、ベクターゲノムを含む核酸は、例えば、(R)-N,N,N,N-トリメチル-2,3-ジオレイルオキシ-1-プロパンアミニウムクロリド(DOTMA)及びリン脂質1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)を含む1つ以上のカチオン性脂質を含む医薬組成物と混合される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、少なくとも1つの脂質を含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、少なくとも1つのカチオン性脂質を含む。カチオン性脂質は、モノカチオン性又はポリカチオン性であり得る。任意のカチオン性両親媒性分子、例えば少なくとも1つの親水性部分及び親油性部分を含む分子は、本発明の意味の範囲内でカチオン性脂質である。いくつかの実施形態では、正電荷は、少なくとも1つのカチオン性脂質によって寄与され、負電荷は、核酸によって寄与される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、少なくとも1つのヘルパー脂質を含む。ヘルパー脂質は、中性又はアニオン性脂

10

20

30

40

50

質であり得る。ヘルパー脂質は、リン脂質若しくは天然脂質の類似体などの天然脂質又は天然脂質と類似性がない完全合成脂質若しくは脂質様分子であり得る。一実施形態では、カチオン性脂質及び/又はヘルパー脂質は、二層形成脂質である。ヘルパー脂質の例としては、1, 2 - ジ - (9 Z - オクタデシノイル) - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (D O P E) 又はその類似体若しくは誘導体、コレステロール (C h o l) 又はその類似体若しくは誘導体及び/又は1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D O P C) 又はその類似体若しくは誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 4 2 】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのカチオン性脂質と少なくとも1つのヘルパー脂質とのモル比は、10 : 0 ~ 3 : 7、好ましくは9 : 1 ~ 3 : 7、4 : 1 ~ 1 : 2、4 : 1 ~ 2 : 3、7 : 3 ~ 1 : 1又は2 : 1 ~ 1 : 1、好ましくは約1 : 1である。いくつかの実施形態では、この比では、カチオン性脂質のモル量は、カチオン性脂質のモル量にカチオン性脂質中の正電荷の数を乗じたものから得られる。

10

【 0 1 4 3 】

いくつかの実施形態では、脂質は、ベクターゲノムを封入する小胞に含まれる。小胞は、多層小胞、単層小胞又はそれらの混合物であり得る。小胞は、リポソームであり得る。

【 0 1 4 4 】

ベクターゲノム

いくつかの実施形態では、本発明は、治療用導入遺伝子を個体の所望の標的に送達するために、I R A K分解剤を遺伝子治療剤と共に使用する方法を提供する。いくつかの実施形態では、遺伝子治療剤は、個体の所望の標的における治療導入遺伝子の送達及び発現のためのベクターゲノムを含む。

20

【 0 1 4 5 】

本発明は、ウイルス粒子 (ウイルス遺伝子治療剤用) 中にパッケージングするための治療用ポリペプチド及び/又は核酸をコードする1つ以上の核酸配列の導入のための遺伝子治療剤の使用を企図している。ベクターゲノムは、治療用ポリペプチド及び/又は核酸の発現を確立するための任意の要素、例えば、プロモーター、本開示のI T R、リポソーム結合要素、ターミネーター、エンハンサー、選択マーカー、イントロン、ポリAシグナル及び/又は複製起点を含み得る。

30

【 0 1 4 6 】

いくつかの実施形態では、治療用導入遺伝子は、治療用ポリペプチドをコードする。治療用ポリペプチドは、例えば、細胞又は生物に存在しないか又は低下したレベルで存在するポリペプチド及び/又は酵素活性を供給し得る。代わりに、治療用ポリペプチドは、細胞又は生物における不均衡を間接的に打ち消すポリペプチド及び/又は酵素活性を供給し得る。例えば、代謝酵素又は活性の欠乏によって引き起こされる代謝産物の蓄積に関連する障害の治療用ポリペプチドは、欠損している代謝酵素又は活性を供給し得るか、又は代謝産物の減少をもたらす代替の代謝酵素又は活性を供給し得る。治療用ポリペプチドは、例えば、ドミナントネガティブポリペプチドとして作用することにより、ポリペプチド (例えば、過剰発現されているもの、機能獲得変異によって活性化されているもの又は活性が他の方法で誤調節されているもの) の活性を低下させるために使用され得る。

40

【 0 1 4 7 】

本発明のベクターゲノムは、細胞内タンパク質であるか、細胞膜に固定されているか、細胞内に留まるか、又は本発明のベクターで形質導入された細胞によって分泌されるポリペプチドをコードし得る。ベクターを受容する細胞によって分泌されるポリペプチドの場合、ポリペプチドは可溶性 (すなわち細胞に付着しない) であり得る。例えば、可溶性ポリペプチドは、膜貫通領域を欠き、細胞から分泌される。膜貫通ドメインをコードする核酸配列を同定及び除去する技術は、当技術分野で公知である。

【 0 1 4 8 】

いくつかの実施形態では、本発明のベクターゲノムは、個体における疾患又は障害を治

50

療するために使用されるポリペプチドをコードする。本発明の遺伝子治療剤によって治療される疾患及び障害としては、ハンチントン病（H D）、進行性核上性麻痺（P S P）、多系統萎縮症（M S A）、異染性白質ジストロフィー（M L D）、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、加齢黄斑変性症（A M D）、先天性筋ジストロフィー（C M D）、フェニルケトン尿症（P K U）、筋ジストロフィー（M D）、A 1 A T 欠乏症、巣状分節性糸球体硬化症（F S G S）、シスチン尿症、血友病 A、血友病 B、ゴーシェ病（G B A）、パーキンソン病（P D）及びボンペ病が挙げられるが、これらに限定されない。

【0149】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドは、ハンチンチン（H T T）、T A U、アミロイド前駆体タンパク質、アルファ - シヌクレイン、偽型アリアルスルファターゼ（A R S A）、スーパーオキシドジスムターゼ 1（S O D 1）、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ（P A H）、ジストロフィン、アルファ - 1 - アンチトリプシン（A 1 A T）、システイントランスポーター、第 V I I I 因子（F V I I I）、第 I X 因子（F I X）、酸性ベータ - グルコシダーゼ、グリア由来成長因子（G D N F）、脳由来成長因子（B D N F）、チロシンヒドロキシラーゼ（T H）、G T P - シクロヒドロラーゼ（G T P C H）及び / 又はアミノ酸デカルボキシラーゼ（A A D C）又はアルファグルコシダーゼである。

10

【0150】

いくつかの実施形態では、異種核酸は、例えば、1つ以上の欠陥遺伝子を置換又はノックダウンするために使用することができる、治療用核酸をコードする。いくつかの実施形態では、治療用核酸は、D N A、s i R N A、s h R N A、R N A i、m i R N A、アンチセンス R N A、リボザイム又は D N A ザイムを含み得るが、これらに限定されない。そのため、治療用核酸は、ベクターの核酸から転写されると、本発明の障害に関連する異常タンパク質又は過剰タンパク質の翻訳又は転写に干渉することによって障害を治療することができる R N A をコードし得る。例えば、本発明の核酸は、異常タンパク質及び / 又は過剰タンパク質をコードする m R N A を高度に特異的に除去又は減少させることによって障害を治療する R N A をコードし得る。治療用 R N A 配列としては、異常タンパク質及び / 又は過剰タンパク質をコードする m R N A の高度に特異的な除去又は減少によって障害を治療することができる、R N A i、低阻害性 R N A（s i R N A）、マイクロ R N A（m i R N A）及び / 又はリボザイム（ハンマーヘッド及びヘアピンリボザイムなど）が挙げられる。

20

30

【0151】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド又は治療用核酸は、C N S の障害を治療するために使用される。理論に拘束されることを望むものではないが、治療用ポリペプチド又は治療用核酸は、変異遺伝子を野生型又は改良遺伝子で置換するため、機能獲得が疾患と関連しているポリペプチドの発現及び / 又は活性を低減若しくは除去するか、又は障害（例えば、発現が類似又は関連する活性を示す遺伝子の変異）に関連している欠損を補完するためにポリペプチドの発現及び / 又は活性を強化するために使用され得る。本発明の治療用ポリペプチド又は治療用核酸によって治療され得る障害の非限定的な例（標的とされ得るか又は供給され得る例示的な遺伝子は、各障害の括弧内に提供される）としては、脳卒中（例えば、カスパーゼ - 3、B e c l i n 1、A s k 1、P A R 1、H I F 1、P U M A 及び / 又は F u k u d a , A . M . a n d B a d a u t , J . (2 0 1 3) G e n e s (B a s e l) 4 : 4 3 5 - 4 5 6 に記載されている遺伝子のいずれか）、ハンチントン病（変異 H T T）、てんかん（例えば、S C N 1 A、N M D A R、A D K 及び / 又は B o i s o n , D . (2 0 1 0) E p i l e p s i a 5 1 : 1 6 5 9 - 1 6 6 8 に記載されている遺伝子のいずれか）、パーキンソン病（アルファ - シヌクレイン）、ルー・ゲーリック病（筋萎縮性側索硬化症としても知られる；S O D 1）、アルツハイマー病（タウ、アミロイド前駆体タンパク質）、皮質基底核変性症又は C B D（タウ）、皮質神経節変性症又は C B G D（タウ）、前頭側頭型認知症又は F T D（タウ）、進行性核上性麻痺又は P S P（タウ）、多系統萎縮症又は M S A（アルファ - シヌクレイン）、脳の

40

50

癌（例えば、脳癌に關与する変異又は過剰発現した癌遺伝子）及びリソソーム蓄積症（LSD）が挙げられる。本発明の障害には、皮質の大きい領域、例えば、皮質の複数の機能領域、皮質の複数の葉及び／又は皮質全体に關与する障害が含まれ得る。本発明の治療用ポリペプチド又は治療用核酸によって治療され得る本発明の障害の他の非限定的な例としては、外傷性脳損傷、酵素機能不全障害、精神障害（心的外傷後ストレス症候群を含む）、神経変性疾患及び認知障害（認知症、自閉症及びうつ病を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。酵素的機能不全障害としては、白質ジストロフィー（カナバン病を含む）及び以下に記載されるリソソーム蓄積症のいずれかが挙げられるが、これらに限定されない。

【0152】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチド又は治療用核酸は、リソソーム蓄積症を治療するために使用される。当技術分野で一般的に知られているように、リソソーム蓄積症は、リソソーム機能の欠陥を特徴とする希少な遺伝性代謝障害である。そのような障害は、多くの場合、適切なムコ多糖、糖タンパク質及び／又は脂質代謝に必要な酵素の欠乏によって引き起こされ、リソソームで蓄積された細胞物質の病理学的蓄積をもたらす。本発明の治療用ポリペプチド又は治療用核酸によって治療され得るリソソーム蓄積症の非限定的な例（標的とされ得るか又は供給され得る例示的な遺伝子は、各障害の括弧内に提供される）としては、ゴーシェ病2型又は3型（酸性ベータグルコシダーゼ、GBA）、GM1ガングリオシドーシス（ベータガラクトシダーゼ-1、GLB1）、ハンター病（イズロン酸2-スルファターゼ、IDS）、クラッペ病（ガラクトシルセラミダーゼ、GALC）、マンノシドーシス病（マンノシダーゼ、例えばアルファ-D-マンノシダーゼ、MAN2B1）、マンノシドーシス病（ベータ-マンノシダーゼ、MANBA）、異染性白質ジストロフィー病（偽型アリアルスルファターゼA、ARSA）、ムコリピドーシスII/III病（N-アセチルグルコサミン-1-ホスホトランスフェラーゼ、GNPTAB）、ニーマンピックA病（酸性スフィンゴミエリナーゼ、ASM）、ニーマンピックC病（ニーマンピックCタンパク質、NPC1）、ポンベ病（酸性アルファ-1,4-グルコシダーゼ、GAA）、サンドホフ病（ヘキソサミニダーゼベータサブユニット、HEXB）、サンフィリップA病（N-スルホグルコサミンスルホヒドロラーゼ、MPS3A）、サンフィリップB病（N-アルファ-アセチルグルコサミニダーゼ、NAGLU）、サンフィリップC病（ヘパリンアセチル-CoA：アルファ-グルコサミニダーゼN-アセチルトランスフェラーゼ、MPS3C）、サンフィリップD病（N-アセチルグルコサミン-6-スルファターゼ、GNS）、シンドラー病（アルファ-N-アセチルガラクトサミニダーゼ、NAGA）、スライ病（ベータ-グルクロニダーゼ、GUSB）、テイ・サックス病（ヘキソサミニダーゼアルファサブユニット、HEXA）及びウォルマン病（リソソーム酸性リパーゼ、LIPA）が挙げられる。

【0153】

いくつかの実施形態では、治療用ポリペプチドは、第VII因子、第IX因子、ミオチューブラリン、生存運動ニューロンタンパク質（SMN）、レチノイドイソメロヒドロラーゼ（RPE65）、NADH-ユビキノンオキシドレダクターゼ鎖4、コロイデレミアタンパク質（CHM）、オルニチントランスカルボミラーゼ、アルギニンコハク酸合成酵素、 α -グロビン、 β -グロビン、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、副腎白質ジストロフィータンパク質（ALD）、ジストロフィン、切断型ジストロフィン、抗VEGF剤又はその機能的バリエーションをコードする。

【0154】

いくつかの実施形態では、異種核酸は、プロモーターに作動可能に連結されている。例示的なプロモーターとしては、サイトメガロウイルス（CMV）最初期プロモーター、RSV LTR、MoMLV LTR、ホスホグリセリン酸キナーゼ-1（PGK）プロモーター、シミアンウイルス40（SV40）プロモーター及びCK6プロモーター、トランスサイレチンプロモーター（TTR）、TKプロモーター、テトラサイクリン応答プロモーター（TRE）、HBVプロモーター、hAATプロモーター、LSPプロモーター

10

20

30

40

50

、キメラ肝臓特異的プロモーター（LSP）、E2Fプロモーター、テロメラーゼ（hTERT）プロモーター；サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリアクチン/ウサギ-グロビンプロモーター（CAGプロモーター、Niwa et al., Gene, 1991, 108(2):193-9）及び伸長因子1-アルファプロモーター（EF1-アルファ）プロモーター（Kim et al., Gene, 1990, 91(2):217-23及びGuo et al., Genether., 1996, 3(9):802-10）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、プロモーターは、ヒト-グルクロニダーゼプロモーター又はニワトリ-アクチン（CBA）プロモーターに連結されたサイトメガロウイルスエンハンサーを含む。プロモーターは、構成的、誘導性又は抑制性プロモーターであり得る。いくつかの実施形態では、本発明は、CBAプロモーターに作動可能に連結された本開示の異種導入遺伝子をコードする核酸を含む組換えベクターを提供する。例示的なプロモーター及び説明は、例えば、米国特許出願公開第20140335054号明細書に記載されている。

10

【0155】

構成的プロモーターの例としては、レトロウイルスのラウス肉腫ウイルス（RSV）LTRプロモーター（任意選択によりRSVエンハンサーを伴う）、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター（任意選択によりCMVエンハンサーを伴う）[例えば、Boshart et al., Cell, 41:521-530(1985)を参照されたい]、SV40プロモーター、ジヒドロ葉酸リダクターゼプロモーター、13-アクチンプロモーター、ホスホグリセロールキナーゼ（PGK）プロモーター及びEF1aプロモーター[Invitrogen]が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0156】

誘導性プロモーターは遺伝子発現の調節を可能にし、外因的に供給される化合物、温度などの環境要因又は特定の生理学的状態（急性期、細胞の特定の分化状態又は複製細胞のみ）の存在によって調節することができる。誘導性プロモーター及び誘導性システムは、Invitrogen、Clontech及びAriadを含むが、これらに限定されない様々な市販源から入手可能である。他の多くのシステムが説明されており、当業者であれば容易に選択することができる。外因性に供給されるプロモーターによって調節される誘導性プロモーターの例としては、亜鉛誘導性ヒツジメタロチオン（MT）プロモーター、デキサメタゾン（Dex）誘導性マウス乳腺腫瘍ウイルス（MMTV）プロモーター、T7ポリメラーゼプロモーター系（国際公開第98/10088号パンフレット）；エクジソン昆虫プロモーター（No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351(1996))、テトラサイクリン抑制系（Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551(1992))、テトラサイクリン誘導性系（Gossen et al., Science, 268:1766-1769(1995)、Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518(1998)も参照されたい）、RU486誘導性系（Wang et al., Nat. Biotech., 15:239-243(1997)及びWang et al., Gene Ther., 4:432-441(1997)）及びラパマイシン誘導性系（Magari et al., J. Clin. Invest., 100:2865-2872(1997)）が挙げられる。これに関連して有用であり得る誘導性プロモーターのさらに他のタイプは、特定の生理学的状態、例えば、温度、急性期、細胞の特定の分化状態又は複製細胞のみによって調節されるものである。

30

40

【0157】

別の実施形態では、導入遺伝子のためのネイティブプロモーター又はその断片が使用される。ネイティブプロモーターは、導入遺伝子の発現がネイティブ発現を模倣することができる。ネイティブプロモーターは、導入遺伝子の発現を時間的若しくは発生的に、又は組織特異的な方法において、又は特定の転写刺激にตอบสนองして調節する必要がある場合に使用され得る。さらなる実施形態では、エンハンサーエレ

50

メント、ポリアデニル化部位又はコザックコンセンサス配列など、他のネイティブ発現制御要素もネイティブ発現を模倣するために使用され得る。

【0158】

いくつかの実施形態では、調節配列は、組織特異的遺伝子発現能力を付与する。いくつかの場合、組織特異的調節配列は、組織特異的な方法で転写を誘導する組織特異的転写因子に結合する。このような組織特異的調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）は、当技術分野で周知である。

【0159】

いくつかの実施形態では、ベクターは、イントロンを含む。例えば、いくつかの実施形態では、イントロンは、ニワトリベータ-アクチン及びウサギベータ-グロビンに由来するキメライントロンである。いくつかの実施形態では、イントロンは、マウス微小ウイルス(MVM)イントロンである。

【0160】

いくつかの実施形態では、ベクターは、ポリアデニル化(ポリA)配列を含む。ポリアデニル化配列の多数の例が当技術分野で公知であり、例えば、ウシ成長ホルモン(BGH)ポリ(A)配列(例えば、アクセッション番号EF592533を参照されたい)、SV40ポリアデニル化配列及びHSV TK pAポリアデニル化配列などがある。

【0161】

遺伝子治療剤及びIRAK分解剤による治療について患者を選択する方法

いくつかの態様では、本発明は、核酸を個体の細胞に送達する方法を提供し、方法は、
 a) 個体からの自然免疫細胞を遺伝子治療剤(例えば、AAV粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子)とインキュベートすることと、
 b) 1つ以上のサイトカインの発現について自然免疫細胞を分析することと、
 c) ステップb)で特定された個体にIRAK分解剤(例えば、IRAK-4分解剤)を投与することと、
 d) ステップb)で特定された個体に遺伝子治療剤を投与することとを含む。いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、樹状細胞、単球、マクロファージ又はナチュラルキラー(NK)細胞である。いくつかの実施形態では、方法は、自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートする前に個体から自然免疫細胞を単離するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、個体から単球を単離ステップと、樹状細胞培養培地中で単球をインキュベートして、樹状細胞を遺伝子治療剤とインキュベートする前に単球から樹状細胞を誘導するステップとをさらに含む。

【0162】

いくつかの態様では、本発明は、治療を必要とする個体を治療する方法を提供し、方法は、
 a) 自然免疫細胞を遺伝子治療剤(例えば、AAV粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子)とインキュベートすることと、
 b) 1つ以上のサイトカインの発現について自然免疫細胞を分析することと、
 c) ステップb)で特定された個体にIRAK分解剤(例えば、IRAK-4分解剤)を投与することと、
 d) ステップb)で特定された個体に遺伝子治療剤を投与することとを含む。いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、樹状細胞、単球、マクロファージ又はナチュラルキラー(NK)細胞である。いくつかの実施形態では、方法は、自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートする前に個体から自然免疫細胞を単離するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、個体から単球を単離するステップと、樹状細胞培養培地中で単球をインキュベートして、樹状細胞を遺伝子治療剤とインキュベートする前に単球から樹状細胞を誘導するステップとをさらに含む。

【0163】

いくつかの態様では、本発明は、遺伝子治療剤(例えば、AAV粒子、アデノウイルス

粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子)及びIRAK分解剤(例えば、IRAK-4分解剤)による治療について個体を選択する方法を提供し、方法は、a)自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートすることと、b)1つ以上のサイトカインの発現について自然免疫細胞を分析することと、c)遺伝子治療剤とのインキュベーション後のサイトカインシグネチャーの発現は、遺伝子治療剤及びIRAK分解剤による治療のための個体を特定する、分析することと、d)ステップb)で特定された個体を選択することとを含む。いくつかの実施形態では、方法は、d)ステップb)で特定された個体にIRAK分解剤を投与するステップと、e)ステップb)で特定された個体に遺伝子治療剤を投与するステップとをさらに含む。いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、樹状細胞、単球、マクロファージ又はナチュラルキラー(NK)細胞である。いくつかの実施形態では、方法は、自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートする前に個体から自然免疫細胞を単離するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、個体から単球を単離ステップと、樹状細胞培養培地中で単球をインキュベートして、樹状細胞を遺伝子治療剤とインキュベートする前に単球から樹状細胞を誘導するステップとをさらに含む。

10

【0164】

いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、個体からの末梢血単核細胞から単離される。いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、樹状細胞である。いくつかの実施形態では、樹状細胞は、個体の単球に由来する(例えば、分化される)。いくつかの実施形態では、単球は、個体からの末梢血単核細胞から単離される。いくつかの実施形態では、単球は、CD14+単球である。いくつかの実施形態では、単球は、単球から樹状細胞を誘導するために、樹状細胞培養培地と約5~約10日間又は約7~約8日間にわたってインキュベートされる。いくつかの実施形態では、単球は、単球から樹状細胞を誘導するために、樹状細胞培養培地と約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12日間又は12日間を超えてインキュベートされる。いくつかの実施形態では、樹状細胞は、ステップc)の遺伝子治療剤とのインキュベーション前に再播種される。いくつかの実施形態では、樹状細胞は、遺伝子治療剤とインキュベーションする前にマイクロウェル皿に再播種される。

20

【0165】

いくつかの実施形態では、樹状細胞は、約 1×10^3 ~約 1×10^5 又は約 1×10^4 のMOIでウイルス遺伝子治療剤とインキュベートされる。いくつかの実施形態では、樹状細胞は、約 1×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 又は 5×10^5 のいずれかよりも小さいMOIで遺伝子治療剤とインキュベートされる。

30

【0166】

いくつかの実施形態では、樹状細胞は、約 1 ng/mL ~約 1 mg/mL の濃度で非ウイルス遺伝子治療剤とインキュベートされる。いくつかの実施形態では、樹状細胞は、約 1 ng/mL ~約 10 ng/mL 、約 10 ng/mL ~約 100 ng/mL 、約 100 ng/mL ~約 $1 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 、約 $1 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ~約 $10 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 、約 $10 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ~約 $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 又は約 $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ~約 1 mg/mL の濃度で非ウイルス遺伝子治療剤とインキュベートされる。

40

【0167】

いくつかの実施形態では、樹状細胞は、遺伝子治療剤と約12時間~約36時間又は約24時間にわたってインキュベートされる。いくつかの実施形態では、樹状細胞は、遺伝子治療剤と約6時間~約48時間、約6時間~約36時間、約6時間~約24時間、約6時間~約18時間、約6時間~約12時間、約12時間~約48時間、約12時間~約36時間、約12時間~約24時間、約12時間~約18時間、約18時間~約48時間、約18時間~約36時間、約18時間~約24時間、約24時間~約48時間、約24時間~約36時間又は約36時間~約48時間にわたってインキュベートされる。

【0168】

いくつかの実施形態では、複数の個体からの特定の免疫細胞を遺伝子治療剤と接触させ、自然免疫応答に関連する1つ以上のサイトカインの発現の変化を決定することにより、

50

特定の免疫細胞（例えば、樹状細胞、単球、マクロファージ、NK細胞など）における遺伝子治療剤について、サイトカインシグネチャーが決定され、1つ以上のサイトカインにおける発現の変化（例えば、発現の増加又は減少）の共通性は、サイトカインシグネチャーの存在を示す。いくつかの実施形態では、自然免疫応答に関連するサイトカインは、Toll様受容体（TLR）経路（例えば、TLR2、TLR3、TLR4又はTLR9経路）に関連する。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のいずれかを超えるサイトカインにおいて発現の変化を含む。いくつかの実施形態では、複数の個体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10のいずれかを超える個体を含む。いくつかの実施形態では、発現の変化の共通性は、複数の個体の約25%、50%、75%又は90%を超える個体における自然免疫細胞中のサイトカインの発現レベルの同様の变化を含む。

10

【0169】

いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の1つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の2つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の3つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の4つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF及びIL-1の発現の増加を含む。

20

【0170】

いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、樹状細胞であり、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の1つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、樹状細胞であり、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の2つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、樹状細胞であり、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の3つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、樹状細胞であり、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の4つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、自然免疫細胞は、樹状細胞であり、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF及びIL-1の発現の増加を含む。

30

【0171】

いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーにおけるサイトカインの発現は、適切な対照におけるサイトカインの発現と比較して増加する。適切な対照の例としては、遺伝子治療剤とインキュベートされない（不存在下での）自然免疫細胞からのサイトカインシグネチャー及び遺伝子治療剤とのインキュベーションする前の同じ又は類似の自然免疫細胞からのサイトカインシグネチャーにおけるサイトカインの発現（例えば、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の1つ以上の発現の増加を含む）が挙げられる。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の2つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の3つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の4つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF

40

50

及び I L - 1 の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、約 10%、約 20%、約 25%、約 50%、約 75%、約 100% 又は 100% 超のいずれか 1 つの発現の増加は、遺伝子治療剤及び I R A K 分解剤による治療のための個体を特定する。

【 0 1 7 2 】

いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーにおけるサイトカインの発現は、遺伝子治療剤の非存在下でインキュベートされた樹状細胞からのサイトカインシグネチャーにおけるサイトカインの発現と比較して又は遺伝子治療剤とのインキュベーション前の樹状細胞からのサイトカインシグネチャーにおけるサイトカインの発現と比較して増加し、サイトカインシグネチャーは、I L 6、T N F、I L - 1、M C P 1 及び M I P - 1 の 1 つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、I L 6、T N F、I L - 1、M C P 1 及び M I P - 1 の 2 つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、I L 6、T N F、I L - 1、M C P 1 及び M I P - 1 の 3 つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、I L 6、T N F、I L - 1、M C P 1 及び M I P - 1 の 4 つ以上の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、I L 6、T N F、I L - 1、M C P 1 及び M I P - 1 の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインシグネチャーは、I L 6、T N F 及び I L - 1 の発現の増加を含む。いくつかの実施形態では、約 10%、約 20%、約 25%、約 50%、約 75%、約 100% 又は 100% 超のいずれか 1 つの発現の増加は、遺伝子治療剤及び I R A K 分解剤による治療のための個体を特定する。

10

20

【 0 1 7 3 】

医薬組成物

いくつかの態様では、本発明は、本明細書に記載の遺伝子治療剤（例えば、A A V 粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V 粒子又は脂質ナノ粒子）及び / 又は I R A K 分解剤（例えば、I R A K - 4 分解剤）を含む、医薬組成物に関する。医薬組成物は、本明細書に記載されるか又は当技術分野で公知の任意の投与様式に適し得る。

【 0 1 7 4 】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される賦形剤を含む。当技術分野で周知のように、薬学的に許容される賦形剤は、薬学的に有効な物質の投与を容易にする比較的不活性な物質であり、液体溶液若しくは懸濁液として、エマルジョンとして又は使用前の液体中での溶解若しくは懸濁に適した固体形態として供給することができる。例えば、賦形剤は、形状若しくは一貫性を与え得るか又は希釈剤として作用し得る。適切な賦形剤としては、安定剤、湿潤剤及び乳化剤、浸透圧を変化させる塩、カプセル化剤、p H 緩衝物質及び緩衝剤が挙げられるが、これらに限定されない。このような賦形剤は、過度の毒性なしに投与され得る、眼への直接送達に適した任意の薬剤を含む。薬学的に許容される賦形剤としては、ソルビトール、様々な T W E E N 化合物のいずれか並びに水、生理食塩水、グリセロール及びエタノールなどの液体が挙げられるが、これらに限定されない。薬学的に許容される塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などの鉱酸塩及び酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などの有機酸塩が含まれ得る。薬学的に許容される賦形剤の完全な議論は、R E M I N G T O N ' S P H A R M A C E U T I C A L S C I E N C E S (M a c k P u b . C o . , N . J . 1 9 9 1) に記載されている。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の r A A V 粒子と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物は、ヒトへの投与に適している。そのような担体は、当技術分野で周知である（例えば、R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s , 第 1 5 版 , p p . 1 0 3 5 - 1 0 3 8 及び 1 5 7 0 - 1 5 8 0 を参照されたい）。

30

40

【 0 1 7 5 】

このような薬学的に許容される担体は、水及び油などの滅菌液、例えば石油、動物、植物又は合成起源のもの、例えばピーナッツ油、ダイズ油、鉱油などであり得る。生理食塩水並びにデキストロス水溶液、ポリエチレングリコール (P E G) 及びグリセロール水

50

溶液も液体担体、特に注射液用の液体担体として利用することができる。医薬組成物は、追加の成分、例えば保存剤、緩衝剤、等張化剤、抗酸化剤及び安定剤、非イオン性湿潤剤又は清澄化剤、粘度増加剤などをさらに含み得る。本明細書に記載の医薬組成物は、単一単位用量又は複数用量の形態でパッケージングすることができる。組成物は、一般に、滅菌且つ実質的に等張性の溶液として製剤化される。

【0176】

キット及び製品

本明細書に記載の遺伝子治療剤（例えば、AAV粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、HSV粒子又は脂質ナノ粒子）及び/又はIRAK分解剤（例えば、IRAK-4分解剤）は、例えば、本明細書に記載される本発明の方法の1つにおける使用のために設計された、キット又は製品内に含まれ得る。 10

【0177】

いくつかの実施形態では、キット又は製品は、IRAK分解剤及び/又は遺伝子治療剤の投与に関する説明書をさらに含む。本明細書に記載のキット又は製品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ及び本明細書に記載の任意の方法を実行するための説明書を含む添付文書など、商業的及びユーザーの観点から望ましい他のものをさらに含み得る。適切な包装材料も含まれ得、これは、当技術分野で公知の任意の包装材料であり得、例えば、バイアル（密封バイアルなど）、容器、アンプル、ボトル、ジャー、フレキシブル包装（例えば、密封マイラー又はプラスチックバッグ）などが挙げられる。これらの製品は、さらに滅菌及び/又は密封され得る。 20

【0178】

いくつかの実施形態では、キット又は製品は、本明細書に記載の緩衝液及び/又は薬学的に許容される賦形剤の1つ以上をさらに含有する（例えば、REMIINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N. J. 1991)に記載されるとおり）。いくつかの実施形態では、キット又は製品は、本明細書に記載の1つ以上の薬学的に許容される賦形剤、担体、溶液及び/又は追加の成分を含む。本明細書に記載のキット又は製品は、単一単位用量又は複数用量の形態でパッケージングすることができる。キット又は製品の内容物は、通常、無菌状態で製剤化され、凍結乾燥することができるか、又は実質的に等張溶液として提供することができる。 30

【0179】

例示的实施形態

本発明は、以下に列挙される実施形態を含む。

【0180】

1. 核酸を個体の細胞に送達する方法であって、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することを含む方法。

【0181】

2. 遺伝子治療剤を用いて、治療を必要とする個体を治療する方法であって、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することを含む方法。

【0182】

3. 個体における遺伝子治療を改善する方法であって、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することを含む方法。 40

【0183】

4. 遺伝子治療剤に対する免疫応答を抑制する方法であって、a) IRAK分解剤を個体に投与することと、b) 遺伝子治療剤を個体に投与することを含む方法。

【0184】

5. IRAK分解剤は、IRAKプロテインキナーゼの活性又は発現を調節する、実施形態1~5のいずれか1つに記載の方法。

【0185】

6. IRAKプロテインキナーゼは、IRAK-1プロテインキナーゼ、IRAK-2 50

プロテインキナーゼ、IRAK-3プロテインキナーゼ又はIRAK-4プロテインキナーゼである、実施形態5に記載の方法。

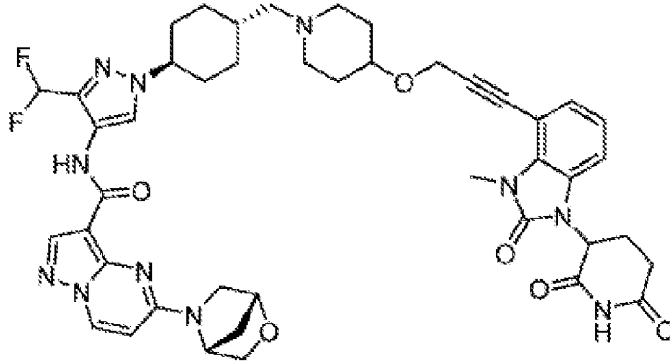
【0186】

7. IRAK分解剤は、IRAK-4プロテインキナーゼの活性又は発現を調節する、実施形態1～6のいずれか1つに記載の方法。

【0187】

8. IRAK分解剤は、式[I]：

【化3】



[I]

の化合物又はその薬学的に許容される塩を含む、実施形態1～10のいずれか1つに記載の方法。

【0188】

9. 遺伝子治療剤は、ウイルスベクターを含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の方法。

【0189】

10. ウイルスベクターは、AAV粒子である、実施形態9に記載の方法。

【0190】

11. AAV粒子は、AAV1カプシド、AAV2カプシド、AAV3カプシド、AAV4カプシド、AAV5カプシド、AAV6カプシド、AAV7カプシド、AAV8カプシド、AAVrh8カプシド、AAV9カプシド、AAV10カプシド、AAVrh10カプシド、AAV11カプシド、AAV12カプシド、AAVrh32.33カプシド、AAV-XL32カプシド、AAV-XL32.1カプシド、AAV-LK03カプシド、AAV2R471Aカプシド、AAV2/2-7m8カプシド、AAV-DJカプシド、AAV-DJ8カプシド、AAV2-N587Aカプシド、AAV2-E548Aカプシド、AAV2-N708Aカプシド、AAV-V708Kカプシド、ヤギAAVカプシド、AAV1/AAV2キメラカプシド、ウシAAVカプシド、マウスAAVカプシド、rAAV2/HBoV1(キメラAAV/ヒトボカウイルスウイルス1)、AAV2HBKOカプシド、AAVPHP.Bカプシド若しくはAAVPHP.eBカプシド又はその機能的バリエーションを含む、実施形態10に記載の方法。

【0191】

12. AAVカプシドは、チロシン変異、ヘパリン結合変異又はHBKO変異を含む、実施形態11に記載の方法。

【0192】

13. AAVウイルス粒子は、1つ以上の逆位末端反復(ITR)を含むAAVゲノムを含み、1つ以上のITRは、AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AAV4 ITR、AAV5 ITR、AAV6 ITR、AAV7 ITR、AAV8 ITR、AAVrh8 ITR、AAV9 ITR、AAV10 ITR、AAVrh10 ITR、AAV11 ITR又はAAV12 ITRである、実施形態10～1

10

20

30

40

50

2のいずれか1つに記載の方法。

【0193】

14．AAV粒子の1つ以上のITR及びカプシドは、同じAAV血清型に由来する、実施形態13に記載の方法。

【0194】

15．AAV粒子の1つ以上のITR及びカプシドは、異なるAAV血清型に由来する、実施形態13に記載の方法。

【0195】

16．ウイルスベクターは、アデノウイルス粒子である、実施形態9に記載の方法。

【0196】

17．アデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24～30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAd若しくはブタAd3型又はその機能的バリエーションからのカプシドを含む、実施形態16に記載の方法。

【0197】

18．ウイルスベクターは、レンチウイルス粒子である、実施形態9に記載の方法。

【0198】

19．レンチウイルス粒子は、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリバーウイルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス、狂犬病ウイルス、RD114又はその機能的バリエーションで偽型化されている、実施形態18に記載の方法。

【0199】

20．ウイルスベクターは、単純ヘルペスウイルス(HSV)粒子である、実施形態9に記載の方法。

【0200】

21．HSV粒子は、HSV-1粒子若しくはHSV-2粒子又はその機能的バリエーションである、実施形態20に記載の方法。

【0201】

22．遺伝子治療剤は、脂質ナノ粒子を含む、実施形態1～8のいずれか1つに記載の方法。

【0202】

23．遺伝子治療剤は、異種導入遺伝子をコードする核酸を含む、実施形態1～22のいずれか1つに記載の方法。

【0203】

24．異種導入遺伝子は、プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態23に記載の方法。

【0204】

25．プロモーターは、構成的プロモーター、組織特異的プロモーター又は誘導性プロモーターである、実施形態24に記載の方法。

【0205】

26．IRAK分解剤は、遺伝子治療剤の投与前、それと同時又はその後に投与される、実施形態1～25のいずれか1つに記載の方法。

【0206】

27．個体は、遺伝子治療による治療に適した疾患又は障害を有する、実施形態1～26のいずれか1つに記載の方法。

【0207】

28．疾患又は障害は、単一遺伝子疾患又は障害である、実施形態27に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0208】

29. 遺伝子治療剤は、静脈内、腹腔内、動脈内、筋肉内、皮下又は肝臓内に投与される、実施形態1～28のいずれか1つに記載の方法。

【0209】

30. IRAK分解剤は、経口、静脈内、腹腔内、動脈内、筋肉内、皮下又は肝臓内に投与される、実施形態1～29のいずれか1つに記載の方法。

【0210】

31. 核酸を個体の細胞に送達する方法であって、a) 個体からの自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートすることと、b) 1つ以上のサイトカインの発現について自然免疫細胞を分析することであって、遺伝子治療剤とのインキュベーション後のサイトカインシグネチャーの発現は、遺伝子治療剤に対する自然免疫を有する個体を特定する、分析することと、c) ステップb) で特定された個体にIRAK分解剤を投与することと、d) ステップb) で特定された個体に遺伝子治療剤を投与することを含む方法。

10

【0211】

32. 治療を必要とする個体を治療する方法であって、a) 個体からの自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートすることと、b) 1つ以上のサイトカインの発現について自然免疫細胞を分析することであって、遺伝子治療剤とのインキュベーション後のサイトカインシグネチャーの発現は、遺伝子治療剤に対する自然免疫を有する個体を特定する、分析することと、c) ステップb) で特定された個体にIRAK分解剤を投与することと、d) ステップb) で特定された個体に遺伝子治療剤を投与することを含む方法。

20

【0212】

33. 遺伝子治療剤及びIRAK分解剤による治療について個体を選択する方法であって、a) 個体からの自然免疫細胞を遺伝子治療剤とインキュベートすること、b) 1つ以上のサイトカインの発現について自然免疫細胞を分析することであって、遺伝子治療剤とのインキュベーション後のサイトカインシグネチャーの発現は、遺伝子治療剤及びIRAK分解剤による治療のための個体を特定する、分析すること、c) 遺伝子治療剤及びIRAK分解剤による治療について、ステップb) で特定された個体を選択することを含む方法。

【0213】

34. 自然免疫細胞は、樹状細胞、単球、マクロファージ又はナチュラルキラー(NK)細胞である、実施形態31～33のいずれか1つに記載の方法。

30

【0214】

35. 自然免疫細胞は、個体からの末梢血単核細胞から単離される、実施形態31～34のいずれか1つに記載の方法。

【0215】

36. 自然免疫細胞は、樹状細胞である、実施形態31～35のいずれか1つに記載の方法。

【0216】

37. 樹状細胞は、個体の単球に由来する、実施形態36に記載の方法。

【0217】

38. 個体から単球を単離することと、樹状細胞培養培地中で単球をインキュベートして、樹状細胞を遺伝子治療剤とインキュベートする前に単球から樹状細胞を誘導することとをさらに含む、実施形態37に記載の方法。

40

【0218】

39. 単球は、CD14+単球である、実施形態37又は38に記載の方法。

【0219】

40. 単球は、単球から樹状細胞を誘導するために、樹状細胞培養培地と約5～約10日間又は約7～約8日間にわたってインキュベートされる、実施形態37～39のいずれか1つに記載の方法。

【0220】

50

41. 樹状細胞は、ステップc)の遺伝子治療剤とのインキュベーション前に再播種される、実施形態31~40のいずれか1つに記載の方法。

【0221】

42. 樹状細胞は、マイクロウェル皿に再播種される、実施形態41に記載の方法。

【0222】

43. 遺伝子治療剤は、ウイルスベクターであり、自然免疫細胞は、約 1×10^3 ~約 1×10^5 又は約 1×10^4 のMOIでウイルスベクターとインキュベートされる、実施形態31~42のいずれか1つに記載の方法。

【0223】

44. 遺伝子治療剤は、非ウイルスベクターであり、自然免疫細胞は、約 1 ng/mL ~約 1 mg/mL の濃度で非ウイルスベクターとインキュベートされる、実施形態31~42のいずれか1つに記載の方法。

【0224】

45. 自然免疫細胞は、遺伝子治療剤と約12時間~約36時間又は約24時間にわたってインキュベートされる、実施形態31~44のいずれか1つに記載の方法。

【0225】

46. サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の1つ以上の発現の増加を含む、実施形態31~45のいずれか1つに記載の方法。

【0226】

47. サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF、IL-1、MCP1及びMIP-1の発現の増加を含む、実施形態31~46のいずれか1つに記載の方法。

【0227】

48. サイトカインシグネチャーは、IL6、TNF及びIL-1の発現の増加を含む、実施形態31~47のいずれか1つに記載の方法。

【0228】

49. サイトカインシグネチャーにおけるサイトカインの発現は、適切な対照と比較して増加する、実施形態331~48のいずれか1つに記載の方法。

【0229】

50. 適切な対照は、遺伝子治療剤とインキュベートされていない自然免疫細胞からのサイトカインシグネチャーにおけるサイトカインの発現であるか、又は適切な対照は、遺伝子治療剤とのインキュベーション前の自然免疫細胞からのサイトカインシグネチャーにおけるサイトカインの発現である、実施形態49に記載の方法。

【0230】

51. IRAK分解剤は、IRAKプロテインキナーゼの活性を調節する、実施形態31~50のいずれか1つに記載の方法。

【0231】

52. IRAKプロテインキナーゼは、IRAK-1プロテインキナーゼ、IRAK-2プロテインキナーゼ、IRAK-3プロテインキナーゼ又はIRAK-4プロテインキナーゼである、実施形態51に記載の方法。

【0232】

53. IRAK分解剤は、IRAK-4プロテインキナーゼの活性を調節する、実施形態31~52のいずれか1つに記載の方法。

【0233】

54. IRAK分解剤は、小分子である、実施形態31~52のいずれか1つに記載の方法。

【0234】

55. IRAK分解剤は、式[I]：

10

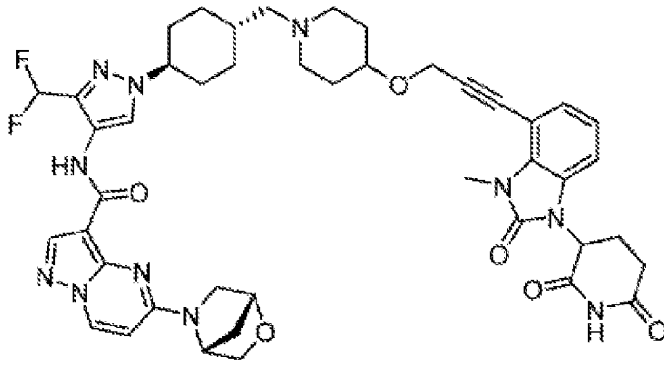
20

30

40

50

【化 4】



[I]

10

の化合物又はその薬学的に許容される塩を含む、実施形態 31 ~ 54 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0235】

56. IRAK 分解剤は、TLR9 機能を遮断する、実施形態 31 ~ 55 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0236】

57. 遺伝子治療剤は、ウイルスベクターである、実施形態 31 ~ 56 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0237】

58. ウイルスベクターは、AAV 粒子である、実施形態 57 に記載の方法。

【0238】

59. AAV 粒子は、AAV1 カプシド、AAV2 カプシド、AAV3 カプシド、AAV4 カプシド、AAV5 カプシド、AAV6 カプシド、AAV7 カプシド、AAV8 カプシド、AAVrh8 カプシド、AAV9 カプシド、AAV10 カプシド、AAVrh10 カプシド、AAV11 カプシド、AAV12 カプシド、AAVrh32.33 カプシド、AAV-XL32 カプシド、AAV-XL32.1 カプシド、AAV LK03 カプシド、AAV2R471A カプシド、AAV2/2-7m8 カプシド、AAV DJ カプシド、AAV DJ8 カプシド、AAV2 N587A カプシド、AAV2 E548A カプシド、AAV2 N708A カプシド、AAV V708K カプシド、ヤギ AAV カプシド、AAV1/AAV2 キメラカプシド、ウシ AAV カプシド、マウス AAV カプシド、rAAV2/HBoV1 (キメラ AAV/ヒトボカウイルスウイルス1)、AAV2 HBKO カプシド、AAV PHP.B カプシド若しくは AAV PHP.eB カプシド又はその機能的バリエーションを含む、実施形態 58 に記載の方法。

30

【0239】

60. AAV カプシドは、チロシン変異、ヘパリン結合変異又は HBKO 変異を含む、実施形態 59 に記載の方法。

40

【0240】

61. AAV ウイルス粒子は、1 つ以上の逆位末端反復 (ITR) を含む AAV ゲノムを含み、1 つ以上の ITR は、AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AAV4 ITR、AAV5 ITR、AAV6 ITR、AAV7 ITR、AAV8 ITR、AAVrh8 ITR、AAV9 ITR、AAV10 ITR、AAVrh10 ITR、AAV11 ITR 又は AAV12 ITR である、実施形態 58 ~ 60 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0241】

62. AAV 粒子の 1 つ以上の ITR 及びカプシドは、同じ AAV 血清型に由来する、実施形態 61 に記載の方法。

50

【0242】

63. AAV粒子の1つ以上のITR及びカプシドは、異なるAAV血清型に由来する、実施形態61に記載の方法。

【0243】

64. ウイルスベクターは、アデノウイルス粒子である、実施形態57に記載の方法。

【0244】

65. アデノウイルス粒子は、アデノウイルス血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24~30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、ウシAd3型、イヌAd2型、ヒツジAd若しくはブタAd3型又はその機能的バリエーションからのカプシドを含む、実施形態64に記載の方法。

10

【0245】

66. ウイルスベクターは、レンチウイルス粒子である、実施形態57に記載の方法。

【0246】

67. 組換えレンチウイルス粒子は、水疱性口内炎ウイルス(VSV)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)、ロスリバーウイルス(RRV)、エボラウイルス、マールブルグウイルス、モカラウイルス、狂犬病ウイルス、RD114又はその機能的バリエーションで偽型化されている、実施形態66に記載の方法。

20

【0247】

68. ウイルスベクターは、単純ヘルペスウイルス(HSV)粒子である、実施形態57に記載の方法。

【0248】

69. HSV粒子は、HSV-1粒子若しくはHSV-2粒子又はその機能的バリエーションである、実施形態68に記載の方法。

【0249】

70. 遺伝子治療剤は、脂質ナノ粒子である、実施形態31~565のいずれか1つに記載の方法。

【0250】

71. 遺伝子治療剤は、異種導入遺伝子をコードする核酸を含む、実施形態31~70のいずれか1つに記載の方法。

30

【0251】

72. 異種導入遺伝子は、プロモーターに作動可能に連結されている、実施形態71に記載の方法。

【0252】

73. プロモーターは、構成的プロモーター、組織特異的プロモーター又は誘導性プロモーターである、実施形態72に記載の方法。

【0253】

74. IRAK分解剤は、遺伝子治療剤の投与前、それと同時又はその後に投与される、実施形態31~73のいずれか1つに記載の方法。

40

【0254】

75. 個体は、遺伝子治療による治療に適した疾患又は障害を有する、実施形態31~74のいずれか1つに記載の方法。

【0255】

76. 疾患又は障害は、単一遺伝子疾患又は障害である、実施形態75に記載の方法。

【0256】

77. 遺伝子治療剤は、静脈内、腹腔内、動脈内、筋肉内、皮下又は肝臓内に投与される、実施形態31~76のいずれか1つに記載の方法。

【0257】

50

78. I R A K分解剤は、経口、静脈内、腹腔内、動脈内、筋肉内、皮下又は肝臓内に投与される、実施形態31～77のいずれか1つに記載の方法。

【0258】

79. 核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達するための医薬の製造における組成物の使用であって、前記組成物は、遺伝子治療剤を含み、前記組成物は、I R A K分解剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用。

【0259】

80. 核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達するための医薬の製造における組成物の使用であって、前記組成物は、I R A K分解剤を含み、前記組成物は、遺伝子治療剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用。

10

【0260】

81. 遺伝子治療を必要とする個体を治療するための医薬の製造における組成物の使用であって、前記組成物は、遺伝子治療剤を含み、前記組成物は、I R A K分解剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用。

【0261】

82. 遺伝子治療を必要とする個体を治療するための医薬の製造における組成物の使用であって、前記組成物は、I R A K分解剤を含み、前記組成物は、遺伝子治療剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用。

【0262】

83. 遺伝子治療を必要とする個体における遺伝子治療に対する免疫応答を調節するための医薬の製造における組成物の使用であって、前記組成物は、遺伝子治療剤を含み、前記組成物は、I R A K分解剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用。

20

【0263】

84. 個体における遺伝子治療に対する免疫応答を調節するための医薬の製造における組成物の使用であって、前記組成物は、I R A K分解剤を含み、前記組成物は、遺伝子治療剤と組み合わせた使用のために製剤化される、使用。

【0264】

85. 遺伝子治療剤は、A A V粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V粒子又は脂質ナノ粒子である、実施形態79～84のいずれか1つに記載の使用。

【0265】

30

86. I R A K分解剤は、I R A K - 4分解剤である、実施形態79～85のいずれか1つに記載の使用。

【0266】

87. 核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達することにおける使用のための遺伝子治療剤を含む組成物であって、前記遺伝子治療剤は、I R A K分解剤と組み合わせて使用される、組成物。

【0267】

88. 核酸を、それを必要とする個体の細胞に送達することにおける使用のためのI R A K分解剤を含む組成物であって、前記I R A K分解剤は、遺伝子治療剤と組み合わせて使用される、組成物。

40

【0268】

89. 遺伝子治療を必要とする個体の治療における使用のための遺伝子治療剤を含む組成物であって、前記遺伝子治療剤は、I R A K分解剤と組み合わせて使用される、組成物。

【0269】

90. 遺伝子治療を必要とする個体の治療における使用のためのI R A K分解剤を含む組成物であって、前記I R A K分解剤は、遺伝子治療剤と組み合わせて使用される、組成物。

【0270】

91. 遺伝子治療を必要とする個体における遺伝子治療に対する免疫応答を調節するた

50

めの I R A K 分解剤を含む組成物であって、前記 I R A K 分解剤は、遺伝子治療剤と組み合わせて使用される、組成物。

【0271】

92. 遺伝子治療を必要とする個体における遺伝子治療に対する免疫応答を抑制するための I R A K 分解剤を含む組成物であって、前記 I R A K 分解剤は、遺伝子治療剤と組み合わせて使用される、組成物。

【0272】

93. 遺伝子治療剤は、A A V 粒子、アデノウイルス粒子、レンチウイルス粒子、H S V 粒子又は脂質ナノ粒子である、実施形態 87 ~ 92 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【0273】

94. I R A K 分解剤は、I R A K - 4 分解剤である、実施形態 87 ~ 93 のいずれか 1 つに記載の組成物。

【0274】

95. 実施形態 1 ~ 78 のいずれか 1 つに記載の方法における使用のためのキット。

【0275】

96. 実施形態 78 ~ 86 のいずれか 1 つに記載の使用のためのキット。

【0276】

97. 実施形態 87 ~ 94 のいずれか 1 つに記載の組成物を含むキット。

【実施例】

【0277】

本発明は、下記の実施例を参照することにより、より詳細に理解されるであろう。しかし、それらは、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書に記載された例及び実施形態は、例示のみを目的とし、それに照らして様々な修正形態又は変形態が当業者に示唆され、本出願の趣旨及び範囲並びに添付の特許請求の範囲内に含まれるべきであることが理解される。

【0278】

実施例 1 : A A V で処置されたヒト細胞に対する I R A K 4 分解剤の効果を評価するためのエクスピボプロトコル

この実施例は、A A V にさらされたリンパ球及び樹状細胞に対する I R A K 4 阻害の効果を調べるための戦略を提供する。

【0279】

A A V は、自然免疫系及び適応免疫系の両方の活性化を含む免疫応答を誘発する。A A V に対する適応免疫応答は、比較的よく特徴付けられているが、A A V による自然免疫活性化は、あまり理解されていない。

【0280】

I R A K 4 は、自然免疫応答を活性化する T L R 経路内のキナーゼである。広範に作用する免疫抑制剤は、A A V 送達を改善するが、これは、導入遺伝子発現の喪失、副作用及び日和見感染のリスクをもたらす。したがって、I R A K 4 を阻害することにより、A A V 治療に好都合な、より特異的な免疫調節がもたらされ得る。

【0281】

末梢血単核細胞 (P B M C) を調製するために、l e u k o p a k からの血液を 50 m L チューブにデカントし、D P B S を 1 : 1 の比率で加える。血液を、15 m L の F i c o l l (G E 17 - 5442 - 02) を含有する別個の 50 m L チューブに、血液層とフィコール層が混ざらないようにピペットで穏やかに移す。混合物を室温で 25 分間、2000 R P M で遠心分離する (9 加速、ブレーキなし) 。白血球及び血小板を含有するパフイーコート回収し、新しいチューブに移し、400 R C F で 5 分間遠心分離する。細胞を、1% F B S 又は F C S を含有する P B S で 3 回洗浄し、計数する。

【0282】

C D 14 + 単球は、オンラインで入手可能な製造元のプロトコル (worldwideweibmiltenyibiotec.com/upload/assets/IM0001)

10

20

30

40

50

260.PDF; Miltenyi Biotech, Germany、注文番号130-050-201)に従い、CD14マイクロビーズを使用してPBMCから単離される。簡単に説明すると、細胞を 10^7 個の総細胞あたり $20\mu\text{L}$ のCD14マイクロビーズと共に2~8で15分間インキュベートする。細胞を磁気カラムに適用し、非標識細胞を通過させる。カラムを3回洗浄した後、カラムを磁気分離器から取り外し、収集チューブに入れ、プランジャーをカラムに押し込むことで磁気標識された細胞をフラッシュする。

【0283】

単球は、オンラインで入手可能な製造元のプロトコルに従い、ImmunoCult-ACF樹状細胞培地、分化サプリメント及び成熟サプリメントを使用して樹状細胞に分化される(cdn.stemcell.com/media/Files/pis/DX20521-PI_S_1_2_0.pdf?_ga=2.81451927.1035383195.16421057001174975582.1603298321;StemCellTechnologies、カタログ番号10986、10988及び10989)。簡単に説明すると、精製された単球を、分化サプリメントを含有する樹状細胞培地に加え、37で3日間インキュベートする。3日目に、培地を交換し、細胞をさらに2日間インキュベートする。成熟サプリメントは、5日目に、1:100の希釈度で添加される(例えば、5mLの培養物あたり $50\mu\text{L}$ のサプリメント)。

10

【0284】

分化した細胞は、7日目に回収される。T細胞は、解凍したPBMCに4mLのImmunoCult-XF T細胞増殖培地(StemCellTechnologies、カタログ番号10981)を加えることによって刺激される。細胞を400gで5分間スピンド、培地を吸引し、細胞を10mLの新鮮な増殖培地中で一晩放置する。

20

【0285】

回収及び計数後、休止細胞を400gで5分間スピンドさせ、再懸濁する。細胞刺激は、T細胞完全培地中、96ウェルプレートで実施される。培地中のサイトカインの最終濃度は、 100IU IL-2 、 5ng/mL IL-7 及び 25ng/mL IL-15 である。AAV刺激は、 $1e5\text{MOI}$ で実施され、 $10\mu\text{g}$ のPHA-pが陽性対照として使用される。半枯渇は、3日ごとに行われる。PBMCを解凍してから10日後、単純T細胞培地中のAAVで細胞を再び刺激する。24時間の刺激後に培地を回収する。

30

【0286】

rAAVベクター(例えば、AAV1、AAV2及び/又はAAVrh32.33)は、標準的なトリプルトランスフェクション法(Sena-Esteves及びGao, Cold Spring Harb Protoc; doi:10.1101/pdb.top095513, 2020)を使用して産生される。ウイルスを塩化セシウム超遠心分離によって精製し、銀染色及び定量的ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)の両方を使用して滴定する。

【0287】

リンパ球及び樹状細胞は、AAVベクターとインキュベートされ、IRAK4分解剤で前処置、後処置又は共処置される。IRAK4分解剤による前処置及び後処置は、AAVインキュベーションの3、6、12、24又は48時間前又は後に実施される。細胞を、6、12、24、48又は72時間にわたり、 $1e5\text{MOI}$ でAAVとインキュベートする。細胞は、式[I]の化合物(Kymera Therapeutics)で、 1nM ~ 1M の範囲の用量で処置される。LPS(300ng/mL 、24時間、Sigma L2630100MG)及びR848($1\mu\text{g/mL}$ 、24時間、Invitrogen tlrl-r948-5)を対照として使用する。追加の試験群には、AAV単独、IRAK4阻害剤単独又はIRAK4阻害剤とLPS若しくはR848のいずれかによる処置が挙げられる。

40

【0288】

IRAK4分解剤で処置された細胞でTLR9経路が阻害される程度を決定するために

50

、細胞培地を収集し、Meso Scale Discovery (MSD) アッセイを使用して分析してサイトカイン放出のレベルを決定する。V-PLEX Human Biomarker 54-Plex Kitを使用し、アッセイを製造元のプロトコル (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) に従って実施する。

【0289】

実施例2：AAV又はLNPで処置されたマウスにおけるIRAK4分解剤のインビボ分析

この実施例は、動物をIRAK4分解剤で処置するとAAV免疫原性が減衰するかどうかを調べるためのインビボ戦略を提供する。

10

【0290】

全ての動物の飼育、維持、治療及び実験は、Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) のガイドラインに基づいて実施される。

【0291】

動物は、AAV又はLNP注射のいずれかを受け、IRAK4阻害剤で前処置、後処置又は共処置される。IRAK4分解剤による前処置及び後処置は、AAV又はLNP注入の6時間、一晚、24又は48時間前又は後に実施される。筋肉内AAV注射は 5×10^{11} vg/kgの用量で実施され、7、14、21、28、35、42及び63日間モニタリングされる。LNP注射は、1mg/kg、10mg/kg又は100mg/kgの用量で静脈内、皮下又は腹腔内に行われる。さらに、動物は、1mg/kg、10mg/kg又は100mg/kgの式[I]の化合物 (Kymera Therapeutics) を皮下、腹腔内又は経口投与して前処置、後処置又は共処置される。追加の試験群には、AAV単独、IRAK4阻害剤単独又はIRAK4阻害剤とLPS若しくはR848のいずれかによる処置が挙げられる。

20

【0292】

動物は治療から7、14、21、28、35、42又は63日後に殺され、筋肉、肝臓、骨髄、脾臓、血液及び胸腺が分離される。組織サンプルは、ドライアイス上で直ちに凍結される。DNA及びRNAサンプルを抽出し、ベクターゲノムコピー及び導入遺伝子発現を、リアルタイム定量PCR (qPCR) を使用して定量する。

30

【0293】

処置された動物における組織炎症は、ヘマトキシリン及びエオシン (H&E) 染色を使用してアッセイされる。染色は、当技術分野で周知の方法に従い、ホルマリン固定され、パラフィン包埋された筋肉組織及び肝臓組織に対して実施される。(Gernoux, Get al., Mol Ther, 2020, 28(3): 747-757)。

【0294】

免疫組織化学は、当技術分野で周知の方法 (Gernoux, Get al., Mol Ther, 2020, 28(3): 747-757) に従い、筋肉、肝臓及び脾臓の凍結切片に対して実施される。サンプルをスライド上に採取し、空気乾燥させ、3%パラホルムアルデヒドで固定する。サンプルは、T細胞 (抗CD3、CD4及びMHC I Iを使用) 及びマクロファージ (抗F4/80及びMHC I Iを使用) などの活性化免疫細胞並びにAAV導入遺伝子発現について分析される。核及び細胞質 - galは、標準的なX-galプロトコルを使用して評価される。

40

【0295】

処置された動物におけるサイトカインレベルを分析するために、これらの対象から血清を採取し、Meso Scale Discovery (MSD) アッセイに使用する。V-PLEX Human Biomarker 54-Plex Kitを使用し、アッセイを製造元のプロトコル (Meso Scale Discovery, Rockville, MD) に従って実施する。

【0296】

50

処置された動物におけるIFN-分泌を測定するために、注射後に単離された脾臓細胞に対してELISpotアッセイが実施される(Gernux, Get al., Mol Ther, 2020, 28(3): 747-757)。単離された細胞は、AAVを使用してインビトロで48時間刺激される。スポット番号は、iSpot ELISpot Reader ELR068IFL(AID)を使用して決定され、AID ELISpot Readerソフトウェアv.6.0を使用して分析される。スポット形成単位が1e6細胞あたり50を超え、対照条件よりも少なくとも3倍高い場合、応答は陽性とみなされる。未刺激細胞を陰性対照として使用し、CEFT及びCD3/CD28刺激を陽性対照として使用する。

【0297】

単一細胞懸濁液は、脾臓及び骨髄サンプルから得られる。細胞をCD16/32(FC Block; BD Biosciences)中でインキュベートし、抗体で染色する。細胞をLSRII(BD Biosciences)で取得し、FlowJoソフトウェア(Tree Star)で分析する。

【0298】

処置された動物におけるサイトカイン発現を分析するために、単離された脾臓細胞を、細胞内サイトカイン染色を使用して、IFN-、TNF-、IL-2、IL-4及びIL-6について染色する。脾臓細胞は、Mays, J Immunol 2009 182(1)6051-6060に記載されるように調製される。脾臓細胞は、1µg/mLのプレフェルジンA(Golgi Plug, BD Pharmingen)及び20ng/mLのマウスIL-2(BD Pharmingen)を補充したT細胞アッセイ培地に播種される。染色前に、IRAK4分解剤の存在下又は非存在下、細胞を10%CO₂中、37で5時間、AAVで刺激する。刺激後、細胞を洗浄し、抗体で染色し、フローサイトメトリーを使用して検査する。サンプルをLSRIIで取得し、FlowJoソフトウェアを使用して分析する。

【0299】

AAV及びIRAK4分解剤で処置した動物のT細胞応答は、Mays, J Immunol 2009 182(1)6051-6060に記載されているプロトコルに従い、に従い、PE結合MHCクラスII H2-Kb-ICPMYARV四量体複合体(Beckman Coulter)を使用したMHCクラスII四量体染色によって決定される。AAV及びIRAK4分解剤による処置後の様々な時点で、後眼窩採血によって単離されたヘパリン化全血細胞に対して四量体染色を実施する。細胞は、PE結合四量体及びFITC結合抗CD8(Ly-2)抗体(BD Pharmingen)で、室温で30分間共染色され、固定溶液(Beckman Coulter)を添加したiTag MHC四量体溶解溶液で、室温で15分間固定される。細胞をPBSで3回洗浄し、0.01%BD Cytotfix(BD Biosciences)に再懸濁する。サンプルをLSRIIで取得し、FlowJoソフトウェアを使用して分析する。

【0300】

実施例3：AAVで処置されたヒト細胞に対するIRAK4分解剤KT-474の効果のエキスポ分析

材料及び方法

末梢血単核細胞の調製。異なるドナーからのleukopak(Stem cell technologies)からの血液を、50mLチューブにデカントし、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(DPBS)を1:1の比率で加えた。血液+DBP混合物を、15mLのFicoll(GE17-5442-02)を含有する別個の50mLチューブに、血液相とフィコール相が混ざらないようにピペットで穏やかに移す。混合物を室温で25分間、2000RPMで遠心分離した(9加速、ブレーキなし)。末梢血単核細胞(PBMC)を含有するパフィーコート回収し、新しいチューブに移し、400mmRCFで5分間遠心分離した。PBMCを、1%ウシ胎児血清(FBS)又はウシ胎児血清(FCS)を含有するリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で3回洗浄し、計数した。

10

20

30

40

50

【0301】

単球の単離。CD14+単球を、製造元のプロトコル(Miltenyi Biotech, Germany、注文番号130-050-201、オンラインで入手可能なプロトコル、ワールドワイドウェブmiltenyibiotech.com/upload/assets/IM0001260.PDF)に従い、CD14マイクロビーズを使用してPBMCから単離した。簡単に説明すると、PBMCを 10^7 個の総細胞あたり $20\mu\text{L}$ のCD14マイクロビーズと共に2~8で15分間インキュベートした。PBMCを磁気カラム(Miltenyi;ワールドワイドウェブmiltenyibiotech.com/US-en/products/ls-columns.html#130-042-401)に適用し、非標識細胞を通過させた。カラムを3回洗浄した後、カラムを磁気分離器から取り外し(Miltenyi;ワールドワイドウェブmiltenyibiotech.com/US-en/products/quadromacs-separator-and-starting-kits.html#130-091-051)、収集チューブに入れ、プランジャーをカラムに押し込むことで磁気標識されたCD14+単球をフラッシュした。

【0302】

単球の分化。CD14+単球は、オンラインで入手可能な製造元のプロトコルに従い、ImmunoCult-ACF樹状細胞培地、分化サプリメント及び成熟サプリメントを使用して樹状細胞に分化される(Stem Cell Technologies、カタログ番号10986、10988及び10989;ワールドワイドウェブcdn.stemcell.com/media/Files/pis/DX20521-PIS__1__2__0.pdf?__ga=2.81451927.1035383195.16421057001174975582.1603298321)。簡単に説明すると、精製されたCD14+単球を、分化サプリメントを含有する樹状細胞培地に加え、37で3日間インキュベートした。3日目に、培地を、分化サプリメントを含有する新鮮な樹状細胞培地に交換し、細胞をさらに2日間インキュベートした。5日目に、成熟サプリメントを、1:100の希釈度で細胞に加えた(例えば、5mLの培養物あたり $50\mu\text{L}$ のサプリメント)。分化した樹状細胞を7日目に回収した。

【0303】

rAAVの産生及び滴定。rAAVベクターは、標準的なトリプルトランスフェクション法(Sena-Esteves及びGao, Cold Spring Harb Protoc; doi:10.1101/pdb.top095513, 2020)を使用して産生される。評価された全ての血清型は、同じGFP導入遺伝子をコードする。ウイルスを塩化セシウム超遠心分離によって精製し、銀染色及び定量的ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)の両方を使用して滴定した。

【0304】

AAV、KT474処置及びサイトカイン測定

ヒト単球樹状細胞を96ウェル形式で播種し、 $1e5$ MOIの示された用量のAAV及びKT474で処置し、24時間後に回収し、フローサイトメトリーによる細胞毒性及び標的遺伝子発現などの下流分析に使用する。サイトカイン分析のために培地を回収した。細胞を2,000rpmで5分間遠心分離し、上清を回収してサイトカインを分析した。サイトカインは、製造元のプロトコルに従い、MILLIPLEX(登録商標)ヒトサイトカイン/ケモカイン/成長因子パネルA38Plex Premixed Magnetic Bead Panel(Immunology Multiplex Assayカタログ番号HCYTA-60K-PX38)を使用して、ルミネックスで測定した。

【0305】

細胞生存率評価及びIRAK4発現:樹状細胞(DC)をFACS緩衝液に再懸濁し、U底96ウェルプレートに移した。細胞を2,000rpmで5分間遠心分離し、上清を捨てた。細胞生存率を分析するために、Live/Dead陰性染色細胞をゲーティング

し、パーセンテージを細胞生存率として決定した。インビトロゲンのLIVE/DEAD (商標) Fixable 近赤外線死細胞染色キット (633又は635 nm励起用、カタログ番号L34975)を、細胞染色に使用した。IRAK4染色のために、樹状細胞を、1X BD PhosphoFlow (商標) Lyse/Fix Bufferを用いて37で10分間、溶解及び固定した。次いで、樹状細胞を、BD PhosphoFlow (商標) Perm Buffer IIIを用いて4で30分間、透過処理した。次いで、樹状細胞を、PEマウス抗ヒトIRAK4抗体を用いて4で30分間染色し、洗浄し、フローサイトメトリーにかけた。PEマウス抗ヒトIRAK4 (BD Biosciences、カタログ番号560303) BD PhosphoFlow (商標) Lyse/Fix Buffer (カタログ番号558049) BD PhosphoFlow (商標) Perm Buffer III、カタログ番号558050)。

10

【0306】

図1は、AAVで処置されたヒト樹状細胞に対するIRAK4分解剤KT-474の効果の評価するためのスキームを示す。図1では、末梢血単核細胞(PBMC)を、leukopakから単離した。(PBMC)からCD14+単球を精製し、分化因子カクテルを単球に加えて樹状細胞への分化を可能にし、最後に成熟因子を加えて成熟樹状細胞を得た。処置後24時間で、成熟樹状細胞を、KT-474及びAAVと一緒に処置(共処置)した。サイトカイン放出などの下流分析のために培地上清を回収した。細胞を使用して、IRAK4分解のレベルを測定し、細胞生存率を評価した。

【0307】

20

結果

ヒト単球樹状細胞を、示されるように異なる用量のKT-474で共処置し、同じ細胞を1e5のMOIで24時間、AAVに同時に感染させ、培地上清を、サイトカイン放出について分析した。図2は、KT-474とAAVの共処置はサイトカイン放出の減衰をもたらすことを示す。AAVによる処置は、樹状細胞からのIL1B(図2A)、IL6(図2B)及びTNFa(図2C)サイトカインの分泌を誘導し、この分泌は、全ての用量でKT-474によって遮断される。棒グラフ上の各点は、代表的なドナーの技術的反復を表す。実験を3人のドナーに対して実施し、一元配置分散分析を使用して統計的有意性を決定した。サイトカイン分泌は、全てのドナーにわたるパーセンテージとして表される。

30

【0308】

ヒト単球樹状細胞を、示されるように異なる用量の薬物で処置し、同じ細胞を1e5のMOIで24時間、AAVに感染させた。処置済み(AAV及びKT474で共処置)と比較して、対照(未処置/未感染細胞)間に有意差は観察されず、AAV感染細胞は、試験した用量ではKT-474が細胞毒性を有しなかったことを示す(図3)。棒グラフ上の各点はドナーを表し、実験は3人のドナーに対して実施され、一元配置分散分析を使用して統計的有意性を決定した。したがって、KT-474による処置は、初代ヒト単球樹状細胞で細胞毒性を引き起こさない。

【0309】

ヒト単球樹状細胞を、示されるように異なる用量のKT-474で処置し、同じ細胞を1e5のMOIで24時間、AAVに感染させた。フローサイトメトリーを用いて、細胞をIRAK4分解について分析した。KT-474は、全ての用量でIRAK4レベルの低下を引き起こす(図4)。棒グラフ上の各点は代表的なドナーの技術的な繰り返しを表し、実験は3人のドナーに対して実施され、一元配置分散分析を使用して統計的有意性を決定した。

40

【0310】

実施例4：インビボマウスモデルにおけるAAVによって誘導される免疫応答に対するIRAK4分解剤KT-474の効果の分析

材料及び方法

インビボマウス実験：C57BL/6Jマウスは、Jackson Laboratory

50

ries から購入した。6 ~ 8 週齢の雄マウスを、3つの群 (PBS 群、AAV 群及び AAV + KT 474 群) に分け、全ての群にはそれぞれ 6 匹のマウスを入れた。式 (I) の化合物 (KT - 474) を、マウス飼料 (カタログ番号 2016、Teklad Global 16% Protein Rodent Diets、<https://www.inotivco.com/rodent-natural-ingredient-2016-diets>) と 100mg/kg の用量で混合した。AAV + KT - 474 群には、AAV 注射の 15 日前に KT 474 を含む飼料を与えたのに対し、PBS 及び AAV 群には、マウス飼料 (カタログ番号 2016、Teklad Global 16% Protein Rodent Diets、<https://www.inotivco.com/rodent-natural-ingredient-2016-diets>) を含む飼料を与えた。PBS 群のマウスに 100 μ L の PBS を筋肉内注射し、AAV 群に、両脚の四頭筋当たり 1E11vg、体積 100 μ L を筋肉内注射した。本研究で使用した AAV カプシドは、LacZ 導入遺伝子を有していた。全ての動物実験は、Sanofi, Framingham の Institutional Animal Care and Use Committees の規定に従って実施した。顎下採血を毎週実施し、AAV 注射の 3 週間後に剖検を実施した。

10

【0311】

図 5 は、インビボマウス実験の概略図を示す。示されるマウスは、AAV + KT - 474 群を示し、KT - 474 混合飼料が AAV 注射の 15 日前にマウスに与えられ、その後 14 日目に PBMC 分析のために血液が採取され、マウスの剖検は、脾臓を採取するために、21 日目に実施した。PBS 及び AAV のみの群には、通常の飼料を与え、14 日目に採血し、21 日目に剖検した。

20

【0312】

PBMC 単離 120 μ L の血液を、K2EDTA 被覆チューブ中に採取した。血液を DBP と 1 : 1 の比率で混合し、Ficoll (GE17-5442-02) を含有する別個のチューブに、血液相とフィコール相が混ざらないようにピペットで移した。混合物を室温で 25 分間、2000 RPM で遠心分離した (9 加速、ブレーキなし)。末梢血単核細胞 (PBMC) を含有するパフィーコート回収し、新しいチューブに移し、400 mm RCF で 5 分間遠心分離した。PBMC を、1% ウシ胎児血清 (FBS) 又はウシ胎児血清 (FCS) を含有するリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄し、計数した。

30

【0313】

LacZ 四量体染色 PBMC を約 120 μ L のマウス血液から単離し、96 ウェル U 底プレートに移した。PBMC を 200 μ L の FACS 緩衝液で、2,000 rpm で 5 分間遠心分離することにより、1 回洗浄し、フロー抗体カクテル (1 : 100 抗 CD4 PE-Cy7、1 : 50 抗 CD8a FITC、1 : 100 抗 CD62L APC、1 : 100 抗 CD44 パシフィックブルー、1 : 100 Live/Dead Dead 細胞染色キット及び 1 : 20 H-2Kb - ガラクトシダーゼ四量体) で、4 で 30 分間染色した。インキュベーション後、細胞を FACS 緩衝液で 2 回洗浄し、BD Cyt ofix / Cytoperm Fixation / Permeabilization Solution Kit 100 μ L で、4 で 15 分間固定した。細胞を FACS 緩衝液で 2 回洗浄し、サンプルをフローサイトメーター (Novocyte Penton Flow Cytometer Systems 5 Lasers, Agilent Technology) で分析した。

40

【0314】

結果

AAV 注射後 14 日目にマウスから採血し、PBMC を単離した。脾臓細胞は、AAV 注射後 21 日目に採取された。PBMC 及び脾臓細胞を異なる抗体で染色して、LacZ 四量体陽性細胞を定量した。これらの細胞集団は、PBS 対照と比較して、AAV 投与時

50

に上方制御され、次いでKT-474処置時に有意に減少した(図6)。図6Aは、AAV注射の14日後の末梢血に由来するPBMCにおける導入遺伝子LacZ特異的CD8T細胞の減少を示す。図6Bは、AAV注射の21日後の脾臓における導入遺伝子LacZ特異的CD8T細胞の減少を示す。ROUT外れ値法及び一元配置分散分析法を使用して統計的有意性を決定した。ROUT法は、非線形回帰から外れ値を特定する。

【0315】

実施例5：AAVによって誘導される免疫応答に対するIRAK4分解剤KT-474の経口投与の効果を評価するためのインビボマウスモデル

図7は、AAVによって誘導される免疫応答に対するIRAK4分解剤KT-474の経口投与の効果を評価するためのインビボマウスモデルの一般的な概略図を示す。C57BL/6Jマウスは、Jackson Laboratoriesから購入する。6~8週齢の雄マウスを、3つの群(PBS群、AAV群及びAAV+KT474群)に分ける。KT-474は、前処置及び共処置戦略として、100mg/kg用量で1日2回治療される経口投与経路によって試験されている。KT-474の経口投与は、他の疾患について臨床で試験されており(<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04772885>)、したがって、IRAK4タンパク質を遮断するのに有効であるはずである。Kymeratherapeuticsは、ヒト細胞及びマウス組織でKT474を使用してIRAK4タンパク質が完全に分解されるというエビデンスも示している(https://www.kymeratx.com/wp-content/uploads/2021/09/Euro-Prot-Deg-Summit-Sept-21-Final_Anthony-Slavin.pdf)。

【図面】

【図1】

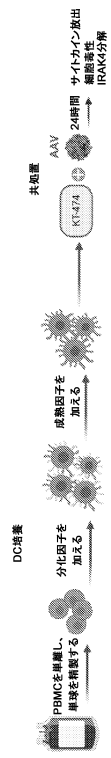


図1

【図2A - 2B】

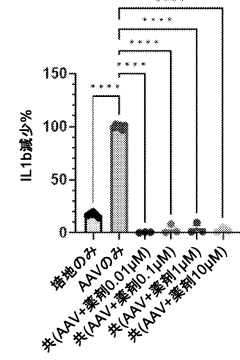


図2A

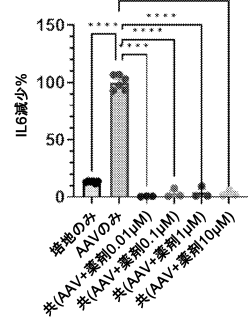


図2B

10

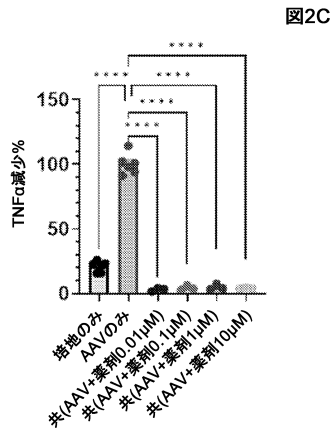
20

30

40

50

【 図 2 C 】



【 図 3 】

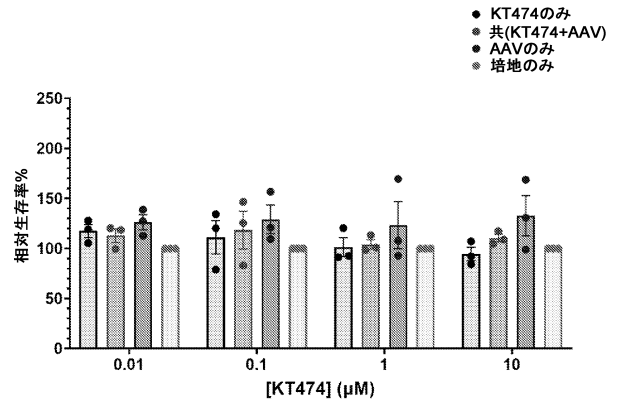


図3

10

【 図 4 】

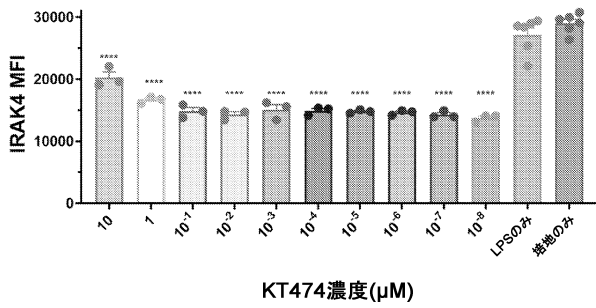


図4

【 図 5 】

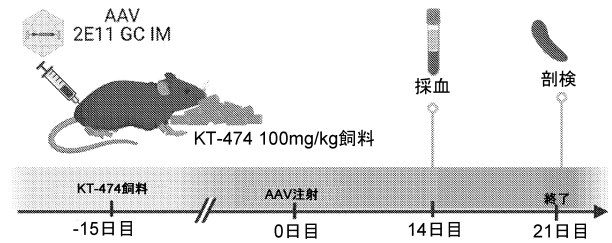


図5

20

30

40

50

【 図 6 A - 6 B 】

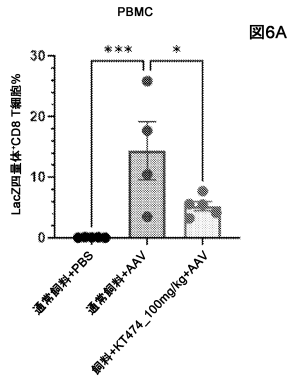


図6A

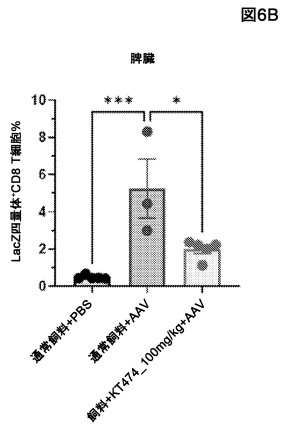


図6B

【 図 7 】

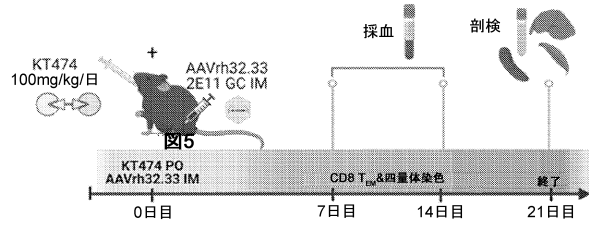


図7

10

20

【 配列表 】

2025513851000001.xml

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/065689

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/86 C12N15/90 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021/231575 A1 (MYOGENE BIO LLC [US]) 18 November 2021 (2021-11-18) paragraphs [0879], [0035], [0036], [0084], [0116]; example 4 -----	1-98
Y	US 2011/070241 A1 (YANG YIPING [US]) 24 March 2011 (2011-03-24) paragraphs [0078] - [0079], [0107] - [0109]; figure 13 paragraphs [0046], [0048]; examples 1-14 ----- -/--	1-98
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> 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 19 July 2023	Date of mailing of the international search report 01/08/2023	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Petri, Bernhard	

10

20

30

40

2

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2023/065689

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ERTL HILDEGUND C: "T Cell-Mediated Immune Responses to AAV and AAV Vectors", FRONT. IMMUNOL., vol. 12, no. Article 666666, 13 April 2021 (2021-04-13), pages 1-11, XP093024373, DOI: 10.3389/fimmu.2021.666666 page 3, right-hand column, lines 12-19 page 6, right-hand column, paragraph 2</p> <p>-----</p>	1-98
A	<p>MUHURI MANISH ET AL: "Overcoming innate immune barriers that impede AAV gene therapy vectors", THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 131, no. 1, 4 January 2021 (2021-01-04), XP093064041, GB ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI143780 figures 1-3; table 4</p> <p>-----</p>	1-98
Y	<p>WO 2019/133531 A1 (KYMERA THERAPEUTICS INC [US]) 4 July 2019 (2019-07-04) cited in the application paragraphs [0503], [0504] paragraphs [0423] - [0427]</p> <p>-----</p>	1-98
Y	<p>WO 2017/004133 A1 (NIMBUS IRIS INC [US]) 5 January 2017 (2017-01-05) paragraphs [0189] - [0190]</p> <p>-----</p>	1-98
Y	<p>WO 2020/264490 A1 (KYMERA THERAPEUTICS INC [US]) 30 December 2020 (2020-12-30) cited in the application paragraphs [0536] - [0545]</p> <p>-----</p>	1-98
Y	<p>WO 2021/247897 A1 (KYMERA THERAPEUTICS INC [US]) 9 December 2021 (2021-12-09) cited in the application example 1</p> <p>-----</p>	1-98
Y	<p>NUNES JOAO ET AL: "Targeting IRAK4 for Degradation with PROTACs", ACS MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS , vol. 10, no. 7 14 June 2019 (2019-06-14), pages 1081-1085, XP055785428, US ISSN: 1948-5875, DOI: 10.1021/acsmchemlett.9b00219 Retrieved from the Internet: URL:https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsmchemlett.9b00219 the whole document</p> <p>-----</p>	1-98

2

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

page 2 of 2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/065689

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
a.	<input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed.
b.	<input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
	<input type="checkbox"/> accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.	<input type="checkbox"/> With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3.	Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/065689

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021231575 A1	18-11-2021	CA 3178591 A1	18-11-2021
		EP 4149622 A1	22-03-2023
		US 2023175015 A1	08-06-2023
		WO 2021231575 A1	18-11-2021

US 2011070241 A1	24-03-2011	NONE	

WO 2019133531 A1	04-07-2019	AU 2018396142 A1	16-07-2020
		BR 112020012997 A2	01-12-2020
		CA 3086763 A1	04-07-2019
		CN 112105385 A	18-12-2020
		EP 3731869 A1	04-11-2020
		IL 275649 A	31-08-2020
		JP 2021508703 A	11-03-2021
		SG 11202005912P A	29-07-2020
		US 11318205 B1	03-05-2022
		US 2019192668 A1	27-06-2019
		US 2023106066 A1	06-04-2023
WO 2019133531 A1	04-07-2019		

WO 2017004133 A1	05-01-2017	NONE	

WO 2020264490 A1	30-12-2020	US 2023089916 A1	23-03-2023
		WO 2020264490 A1	30-12-2020

WO 2021247897 A1	09-12-2021	EP 4161521 A1	12-04-2023
		WO 2021247897 A1	09-12-2021

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 31/5386	
A 6 1 K 35/763 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 9/16 (2006.01)	A 6 1 K 35/761	
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 35/763	
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K 9/16	
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
C 1 2 N 15/86 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 15/87 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	P
C 1 2 N 9/99 (2006.01)	C 1 2 N 15/86	Z
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/87	Z
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 9/99	
	C 1 2 N 15/113	Z
	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z

,MC,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 4 1 . ケンブリッジ . ウォーター・ストリート 4 5 0 .
サノフィ . パテント・デパートメント

(72)発明者

クリスティアン・ミュラー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 4 1 . ケンブリッジ . ウォーター・ストリート 4 5 0 .
サノフィ . パテント・デパートメント

(72)発明者

ジョン・リード

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 4 1 . ケンブリッジ . ウォーター・ストリート 4 5 0 .
サノフィ . パテント・デパートメント

F ターム (参考)

4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ13 QR41 QR48 QR59 QS05 QS10 QS38

4C076 AA12 AA31 AA65 BB01 BB11 BB13 BB14 BB15 BB16 BB21

CC07

4C084 AA13 AA20 MA17 MA38 MA41 MA52 MA56 MA65 MA66 NA05

NA07 ZB08 ZC20 ZC75 ZC80

4C086 AA01 AA02 BC73 EA16 MA02 MA04 MA17 MA38 MA41 MA52

MA56 MA65 MA66 NA05 NA07 ZB08 ZC20 ZC75 ZC80

4C087 AA01 AA02 BC83 MA02 MA17 MA38 MA41 MA52 MA56 MA65

MA66 NA05 NA07 ZB08 ZC20 ZC75 ZC80