



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0004738  
(43) 공개일자 2025년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/5386 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)  
C12N 15/86 (2006.01) C12N 15/88 (2017.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 31/5386 (2013.01)  
A61K 48/0025 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2024-7037272  
(22) 출원일자(국제) 2023년04월12일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2024년11월08일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/065689  
(87) 국제공개번호 WO 2023/201274  
국제공개일자 2023년10월19일  
(30) 우선권주장  
63/330,245 2022년04월12일 미국(US)

(71) 출원인  
젠자임 코포레이션  
미국 메사추세츠주 02141 캠브리지 워터 스트리트 450  
(72) 발명자  
초우두리, 소우라브, 로이  
미국 02141 매사추세츠 캠브리지 워터 스트리트 450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내  
모트와니, 모나  
미국 02141 매사추세츠 캠브리지 워터 스트리트 450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
양영준, 임근실

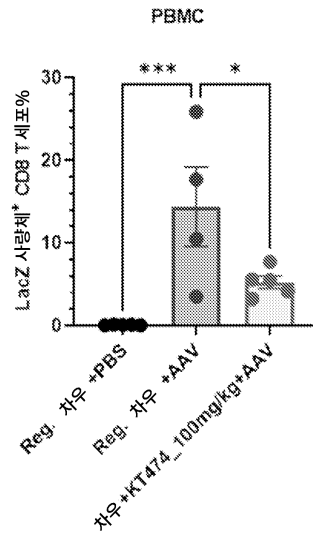
전체 청구항 수 : 총 98 항

(54) 발명의 명칭 유전자 요법을 위한 IRAK4 조절제의 용도

(57) 요약

유전자 요법에 대한 선천성 면역을 억제하기 위한 유전자 요법과 함께 IRAK4 분해제를 투여함으로써 개체에서 유전자 요법을 향상시키는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 유전자 요법은 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 벡터 또는 지질 나노입자를 사용한다. 또한, 유전자 요법제와 조합하여 IRAK4 분해제를 사용하는 치료를 위한 개체를 선택하는 방법이 본원에 제공된다.

대표도 - 도6a



(52) CPC특허분류

*A61K 48/005* (2013.01)

*C12N 15/86* (2013.01)

*C12N 15/88* (2013.01)

*A61K 2300/00* (2023.05)

*C12N 2710/10343* (2013.01)

*C12N 2710/16043* (2013.01)

*C12N 2740/15043* (2013.01)

*C12N 2750/14143* (2013.01)

(72) 발명자

**필러, 크리스티안**

미국 02141 매사추세츠 캠브리지 워터 스트리트  
450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내

**리드, 존**

미국 02141 매사추세츠 캠브리지 워터 스트리트  
450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하는 방법으로서,

- a) 개체에 IRAC 분해제를 투여하는 단계, 및
- b) 개체에 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 2

치료를 필요로 하는 개체를 유전자 요법제로 치료하는 방법으로서,

- a) 개체에 IRAC 분해제를 투여하는 단계, 및
- b) 개체에 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 3

유전자 요법의 개선을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법을 개선하는 방법으로서,

- a) 개체에 IRAC 분해제를 투여하는 단계, 및
- b) 개체에 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 4

유전자 요법제에 대한 면역 반응의 억제를 필요로 하는 개체에서 유전자 요법제에 대한 면역 반응을 억제하는 방법으로서,

- a) 개체에 IRAC 분해제를 투여하는 단계, 및
- b) 개체에 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, IRAC 분해제는 IRAC 단백질 키나제의 활성 또는 발현을 조절하는, 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, IRAC 단백질 키나제는 IRAC-1 단백질 키나제, IRAC-2 단백질 키나제, IRAC-3 단백질 키나제, 또는 IRAC-4 단백질 키나제인, 방법.

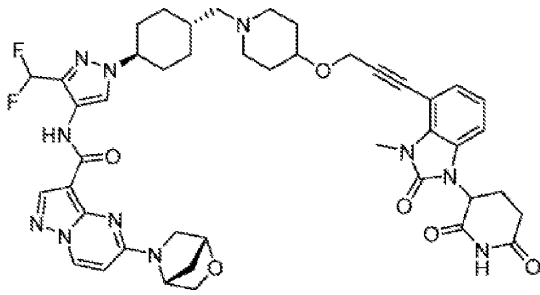
#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, IRAC 분해제는 IRAC-4 단백질 키나제의 활성 또는 발현을 조절하는, 방법.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, IRAC 분해제는 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, 방법:

[화학식 I]



**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 요법제는 바이러스 벡터를 포함하는, 방법.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 바이러스 벡터는 AAV 입자인, 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서, AAV 입자는 AAV1 캡시드, AAV2 캡시드, AAV3 캡시드, AAV4 캡시드, AAV5 캡시드, AAV6 캡시드, AAV7 캡시드, AAV8 캡시드, AAVrh8 캡시드, AAV9 캡시드, AAV10 캡시드, AAVrh10 캡시드, AAV11 캡시드, AAV12 캡시드, AAVrh32.33 캡시드, AAV-XL32 캡시드, AAV-XL32.1 캡시드, AAV LK03 캡시드, AAV2R471A 캡시드, AAV2/2-7m8 캡시드, AAV DJ 캡시드, AAV DJ8 캡시드, AAV2 N587A 캡시드, AAV2 E548A 캡시드, AAV2 N708A 캡시드, AAV V708K 캡시드, 염소 AAV 캡시드, AAV1/AAV2 키메라 캡시드, 소 AAV 캡시드, 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1(키메라 AAV/인간 보카바이러스 바이러스 1), AAV2HBKO 캡시드, AAVPHP.B 캡시드 또는 AAVPHP.eB 캡시드, 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는, 방법.

**청구항 12**

제11항에 있어서, AAV 캡시드는 티로신 돌연변이, 헤파린 결합 돌연변이, 또는 HBKO 돌연변이를 포함하는, 방법.

**청구항 13**

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, AAV 바이러스 입자는 하나 이상의 역 말단 반복부(ITR)를 포함하는 AAV 계통을 포함하고, 하나 이상의 ITR은 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, 또는 AAV12 ITR인, 방법.

**청구항 14**

제13항에 있어서, AAV 입자의 캡시드 및 하나 이상의 ITR은 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, 방법.

**청구항 15**

제13항에 있어서, AAV 입자의 캡시드 및 하나 이상의 ITR은 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, 방법.

**청구항 16**

제9항에 있어서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 입자인, 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 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 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad, 또는 돼지 Ad 3형, 또는 이의 기능적 변이체로부터의 캡시드를 포함하는, 방법.

**청구항 18**

제9항에 있어서, 바이러스 백터는 렌티바이러스 입자인, 방법.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 재조합 렌티바이러스 입자는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스, 모칼라(Mokala) 바이러스, 광견병 바이러스, RD114, 또는 이의 기능적 변이체로 위형화되는(pseudotyped), 방법.

**청구항 20**

제9항에 있어서, 바이러스 백터는 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 입자인, 방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서, HSV 입자는 HSV-1 입자 또는 HSV-2 입자, 또는 이의 기능적 변이체인, 방법.

**청구항 22**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 요법체는 지질 나노입자를 포함하는, 방법.

**청구항 23**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 요법체는 이중성 트랜스진을 인코딩하는 핵산을 포함하는, 방법.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 이중성 트랜스진은 프로모터에 작동 가능하게 연결되는, 방법.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 프로모터는 구성적 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 유도성 프로모터인, 방법.

**청구항 26**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, IRAK 분해제는 유전자 요법체의 투여 전에, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 투여되는, 방법.

**청구항 27**

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 개체는 유전자 요법에 의한 치료에 적합한 질환 또는 장애를 갖는, 방법.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 질환 또는 장애는 단일유전자성 질환 또는 장애인, 방법.

**청구항 29**

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 요법체는 정맥내, 복강내, 동맥내, 근육내, 피하, 또는 간내 투여되는, 방법.

**청구항 30**

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, IRAK 분해제는 경구, 정맥내, 복강내, 동맥내, 근육내, 피하, 또는 간내 투여되는, 방법.

**청구항 31**

핵산의 전달을 필요로 하는 개체에서 개체의 세포로 핵산을 전달하는 방법으로서,

a) 개체로부터의 선천성 면역 세포를 유전자 요법체와 함께 인큐베이션시키는 단계,

b) 하나 이상의 사이토카인의 발현에 대해 선천성 면역 세포를 분석하는 단계로서, 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킨 후 사이토카인 시그니처의 발현에 의해 유전자 요법제에 대한 선천성 면역을 갖는 개체를 확인하는, 단계,

c) 단계 b)에서 확인된 개체에 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및

d) 단계 b)에서 확인된 개체에 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 32

치료를 필요로 하는 개체를 치료하는 방법으로서,

a) 개체로부터의 선천성 면역 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계,

b) 하나 이상의 사이토카인의 발현에 대해 선천성 면역 세포를 분석하는 단계로서, 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킨 후 사이토카인 시그니처의 발현에 의해 유전자 요법제에 대한 선천성 면역을 갖는 개체를 확인하는, 단계,

c) 단계 b)에서 확인된 개체에 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및

d) 단계 b)에서 확인된 개체에 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 33

유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 개체를 선택하는 방법으로서,

a) 개체로부터의 선천성 면역 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계,

b) 하나 이상의 사이토카인의 발현에 대해 선천성 면역 세포를 분석하는 단계로서, 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킨 후 사이토카인 시그니처의 발현에 의해 유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 개체를 확인하는, 단계.

c) 유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 단계 b)에서 확인된 개체를 선택하는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 34

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포, 단핵구, 대식세포 또는 자연 살해(NK) 세포인, 방법.

### 청구항 35

제31항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 선천성 면역 세포는 개체로부터의 말초 혈액 단핵 세포로부터 단리되는, 방법.

### 청구항 36

제31항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포인, 방법.

### 청구항 37

제36항에 있어서, 수지상 세포는 개체의 단핵구로부터 유래되는, 방법.

### 청구항 38

제37항에 있어서,

개체로부터 단핵구를 단리하는 단계 및

단핵구를 수지상 세포 배양 배지에서 인큐베이션시켜 단핵구로부터 수지상 세포를 유도한 후 수지상 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

### 청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 단핵구는 CD14+ 단핵구인, 방법.

**청구항 40**

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 단핵구는 약 5일 내지 약 10일 또는 약 7일 내지 약 8일 동안 수지상 세포 배양 배지와 함께 인큐베이션되어 단핵구로부터 수지상 세포를 유도하는, 방법.

**청구항 41**

제31항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 수지상 세포는 단계 c)의 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킴기 전에 재플레이팅되는, 방법.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 수지상 세포는 마이크로웰 접시 내로 재플레이팅되는, 방법.

**청구항 43**

제31항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 요법제는 바이러스 벡터이고, 선천성 면역 세포는 약  $1 \times 10^3$  내지 약  $1 \times 10^5$  또는 약  $1 \times 10^4$ 의 MOI로 바이러스 벡터와 함께 인큐베이션되는, 방법.

**청구항 44**

제31항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 요법제는 비-바이러스 벡터이고, 선천성 면역 세포는 약 1 ng/mL 내지 약 1 mg/mL의 농도로 비-바이러스 벡터와 함께 인큐베이션되는, 방법.

**청구항 45**

제31항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 선천성 면역 세포는 유전자 요법제와 함께 약 12시간 내지 약 36 시간 또는 약 24시간 동안 인큐베이션되는, 방법.

**청구항 46**

제31항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP1 및 MIP-1  $\alpha$  중 하나 이상의 증가된 발현을 포함하는, 방법.

**청구항 47**

제31항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP1 및 MIP-1  $\alpha$ 의 증가된 발현을 포함하는, 방법.

**청구항 48**

제31항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF  $\alpha$ , 및 IL-1 $\beta$ 의 증가된 발현을 포함하는, 방법.

**청구항 49**

제31항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 사이토카인 시그니처에서의 사이토카인의 발현은 적합한 대조군과 비교하여 증가되는, 방법.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 적합한 대조군은 유전자 요법제와 함께 인큐베이션되지 않은 선천성 면역 세포로부터의 사이토카인 시그니처에서의 사이토카인의 발현이거나, 적합한 대조군은 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킴기 전에 선천성 면역 세포로부터의 사이토카인 시그니처에서의 사이토카인의 발현인, 방법.

**청구항 51**

제31항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, IRAK 분해제는 IRAK 단백질 키나제의 활성을 조절하는, 방법.

**청구항 52**

제51항에 있어서, IRAK 단백질 키나제는 IRAK-1 단백질 키나제, IRAK-2 단백질 키나제, IRAK-3 단백질 키나제, 또는 IRAK-4 단백질 키나제인, 방법.

**청구항 53**

제31항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, IRAK 분해제는 IRAK-4 단백질 키나제의 활성을 조절하는, 방법.

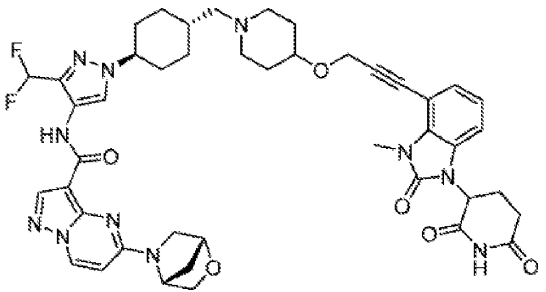
**청구항 54**

제31항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, IRAK 분해제는 소분자인, 방법.

**청구항 55**

제31항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, IRAK 분해제는 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, 방법:

[화학식 I]



**청구항 56**

제31항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, IRAK 분해제는 TLR9 기능을 차단하는, 방법.

**청구항 57**

제31항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 요법제는 바이러스 벡터인, 방법.

**청구항 58**

제57항에 있어서, 바이러스 벡터는 AAV 입자인, 방법.

**청구항 59**

제58항에 있어서, AAV 입자는 AAV1 캡시드, AAV2 캡시드, AAV3 캡시드, AAV4 캡시드, AAV5 캡시드, AAV6 캡시드, AAV7 캡시드, AAV8 캡시드, AAVrh8 캡시드, AAV9 캡시드, AAV10 캡시드, AAVrh10 캡시드, AAV11 캡시드, AAV12 캡시드, AAVrh32.33 캡시드, AAV-XL32 캡시드, AAV-XL32.1 캡시드, AAV LK03 캡시드, AAV2R471A 캡시드, AAV2/2-7m8 캡시드, AAV DJ 캡시드, AAV DJ8 캡시드, AAV2 N587A 캡시드, AAV2 E548A 캡시드, AAV2 N708A 캡시드, AAV V708K 캡시드, 염소 AAV 캡시드, AAV1/AAV2 키메라 캡시드, 소 AAV 캡시드, 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1(키메라 AAV/인간 보카바이러스 바이러스 1), AAV2HBKO 캡시드, AAVPHP.B 캡시드 또는 AAVPHP.eB 캡시드, 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는, 방법.

**청구항 60**

제59항에 있어서, AAV 캡시드는 티로신 돌연변이, 헤파린 결합 돌연변이, 또는 HBKO 돌연변이를 포함하는, 방법.

**청구항 61**

제58항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, AAV 바이러스 입자는 하나 이상의 역 말단 반복부(ITR)를 포함하는 AAV 게놈을 포함하고, 하나 이상의 ITR은 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, 또는 AAV12 ITR인, 방법.

**청구항 62**

제61항에 있어서, AAV 입자의 캡시드 및 하나 이상의 ITR은 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, 방법.

**청구항 63**

제61항에 있어서, AAV 입자의 캡시드 및 하나 이상의 ITR은 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, 방법.

**청구항 64**

제57항에 있어서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 입자인, 방법.

**청구항 65**

제64항에 있어서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 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 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad, 또는 돼지 Ad 3형, 또는 이의 기능적 변이체로부터의 캡시드를 포함하는, 방법.

**청구항 66**

제57항에 있어서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 입자인, 방법.

**청구항 67**

제66항에 있어서, 재조합 렌티바이러스 입자는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114, 또는 이의 기능적 변이체로 위형화되는, 방법.

**청구항 68**

제57항에 있어서, 바이러스 벡터는 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 입자인, 방법.

**청구항 69**

제68항에 있어서, HSV 입자는 HSV-1 입자 또는 HSV-2 입자, 또는 이의 기능적 변이체인, 방법.

**청구항 70**

제31항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 요법제는 지질 나노입자인, 방법.

**청구항 71**

제31항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 요법제는 이중성 트랜스진을 인코딩하는 핵산을 포함하는, 방법.

**청구항 72**

제71항에 있어서, 이중성 트랜스진은 프로모터에 작동 가능하게 연결되는, 방법.

**청구항 73**

제72항에 있어서, 프로모터는 구성적 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 유도성 프로모터인, 방법.

**청구항 74**

제31항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, IRAK 분해제는 유전자 요법제의 투여 전에, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 투여되는, 방법.

**청구항 75**

제31항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 개체는 유전자 요법에 의한 치료에 적합한 질환 또는 장애를 갖는, 방법.

**청구항 76**

제75항에 있어서, 질환 또는 장애는 단일유전자성 질환 또는 장애인, 방법.

**청구항 77**

제31항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 요법체는 정맥내, 복강내, 동맥내, 근육내, 피하, 또는 간내 투여되는, 방법.

**청구항 78**

제31항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, IRAK 분해제는 경구, 정맥내, 복강내, 동맥내, 근육내, 피하, 또는 간내 투여되는, 방법.

**청구항 79**

제1항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, IRAK 조절제는 CD8 T 세포를 활성화시키는, 방법.

**청구항 80**

핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도로서, 조성물은 유전자 요법체를 포함하고, 조성물은 IRAK 분해제와 조합하여 사용하기 위해 제형화되는, 용도.

**청구항 81**

핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도로서, 조성물은 IRAK 분해제를 포함하고, 조성물은 유전자 요법체와 조합하여 사용하기 위해 제형화되는, 용도.

**청구항 82**

유전자 요법을 필요로 하는 개체를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도로서, 조성물은 유전자 요법체를 포함하고, 조성물은 IRAK 분해제와 조합하여 사용하기 위해 제형화되는, 용도.

**청구항 83**

유전자 요법을 필요로 하는 개체를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도로서, 조성물은 IRAK 분해제를 포함하고, 조성물은 유전자 요법체와 조합하여 사용하기 위해 제형화되는, 용도.

**청구항 84**

유전자 요법을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 조절하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도로서, 조성물은 유전자 요법체를 포함하고, 조성물은 IRAK 분해제와 조합하여 사용하기 위해 제형화되는, 용도.

**청구항 85**

개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 조절하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도로서, 조성물은 IRAK 분해제를 포함하고, 조성물은 유전자 요법체와 조합하여 사용하기 위해 제형화되는, 용도.

**청구항 86**

제80항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 요법체는 AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자인, 용도.

**청구항 87**

제80항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, IRAK 분해제는 IRAK-4 분해제인, 용도.

**청구항 88**

핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하는 데 사용하기 위한 유전자 요법제를 포함하는 조성물로서, 유전자 요법제는 IRAK 분해제와 조합하여 사용되는, 조성물.

**청구항 89**

핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하는 데 사용하기 위한 IRAK 분해제를 포함하는 조성물로서, IRAK 분해제는 유전자 요법제와 조합하여 사용되는, 조성물.

**청구항 90**

유전자 요법을 필요로 하는 개체를 치료하는 데 사용하기 위한 유전자 요법제를 포함하는 조성물로서, 유전자 요법제는 IRAK 분해제와 조합하여 사용되는, 조성물.

**청구항 91**

유전자 요법을 필요로 하는 개체를 치료하는 데 사용하기 위한 IRAK 분해제를 포함하는 조성물로서, IRAK 분해제는 유전자 요법제와 조합하여 사용되는, 조성물.

**청구항 92**

유전자 요법을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 조절하기 위한 IRAK 분해제를 포함하는 조성물로서, IRAK 분해제는 유전자 요법제와 조합하여 사용되는, 조성물.

**청구항 93**

유전자 요법을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 억제하기 위한 IRAK 분해제를 포함하는 조성물로서, IRAK 분해제는 유전자 요법제와 조합하여 사용되는, 조성물.

**청구항 94**

제88항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 요법제는 AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자인, 조성물.

**청구항 95**

제88항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, IRAK 분해제는 IRAK-4 분해제인, 조성물.

**청구항 96**

제1항 내지 제79항 중 어느 한 항의 방법에서 사용하기 위한 키트.

**청구항 97**

제80항 내지 제87항 중 어느 한 항의 용도를 위한 키트.

**청구항 98**

제92항 내지 제97항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 키트.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2022년 4월 12일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 제63/330,245호의 우선권 이익을 주장하며, 이는 그 전체가 참조로 포함된다.

[0003] 전자 서열 목록에 대한 참조

[0004] 전자 서열 목록의 내용(159792018240SEQLIST.xml; 크기: 1,990 바이트; 및 생성 날짜: 2023년 4월 12일)은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0005] 분야

[0006] 본 발명은 유전자 요법에 대한 선천성 면역을 억제하기 위한 유전자 요법과 함께 IRAK 분해제를 투여함으로써 개체에서 유전자 요법을 향상시키는 방법에 관한 것이다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법제와 조합하여 IRAK 분해제를 사용하는 치료를 위한 개체를 선택하는 방법을 제공한다.

### 배경 기술

[0007] 희귀 유전 질환의 치료를 위한 유전자 요법의 성공은 조직-특이적 친화성, 정지 세포의 형질도입 및 변형된 유전자 발현의 유지를 포함하는 많은 매력적인 특징을 제공하는 아데노-관련 바이러스(AAV) 바이러스 벡터에 크게 의존한다. 그러나, AAV 벡터에 대한 면역 반응은 성공적인 임상 번역에 대한 주요한 난제를 야기한다. 캡시드, 바이러스 게놈, 뿐만 아니라 트랜스진은 면역계의 선천적 아암과 적응 아암 둘 모두의 활성화를 수반하는 면역 반응을 촉발시킨다. TLR 경로에 의해 활성화된 선천성 면역계는 후속적으로 병원체에 노출된 인간의 B 세포 및 T 세포에서 적응 면역 반응을 유발한다(Iawaski, A 및 Medzhitov, R, *Nat Immunol* 2004 5(10):987-985). 여러 마우스 연구에 기반하여, CpG 풍부 저메틸화 DNA를 인식하는 엔도솜 DNA 센서 TLR9가 AAV 벡터의 게놈 인식에 중요한 역할을 한다는 것이 나타났다. TLR9 촉발된 신호전달 캐스케이드는 T 세포 매개 세포 세포독성에 의해 궁극적으로 트랜스진 유도 세포의 제거를 초래하는 적응 면역 반응을 활성화시킨다. TLR9 센서가 결여된 마우스는 더 긴 트랜스진 발현 유지 및 줄어든 면역 반응을 나타낸다(문헌[Ashley, SN *et al.*, *Cell Immunol* 2019 Dec; 346:103997], 및 문헌[Faust SM *et al.*, *J Clin Invest* 2013 123(7):2994-3001]). 이러한 데이터 형태와 일관되게, 혈우병 임상 시험은 CpG 염기의 총 수의 감소가 약리학적 면역억제제에 대한 필요성을 감소시키고 혈우병 환자에서 감소된 세포독성 T 림프구 반응을 나타내는 반면, 이들의 트랜스진에 더 많은 CpG 염기를 함유한 벡터를 제공받은 환자는 면역 억제제에 대한 요구가 훨씬 더 컸음을 드러냈다(Wright, JF *Mol. Ther.* 2020 28(3):701-703). 광범위하게 작용하는 면역 억제제는 임상 시험에서 AAV 전달을 개선하는 데 성공적이었지만, 이들은 여전히 트랜스진 발현의 손실을 초래하고 부작용 및 기회 감염의 위험을 나타낸다. CpG 염기가 없는 벡터를 개발하는 것은 코돈 최적화가 되지 않은 벡터(즉, CpG 함량이 없거나 낮은 벡터)이기 때문에 불량한 트랜스진 발현을 나타내기 때문에 난제이다(Wright, JF *Mol. Ther.* 2020 28(3):701-703). 따라서, 향상된 특이성 및 낮은 부작용을 나타내는 상이한 부류의 면역 분해제가 필요하다.

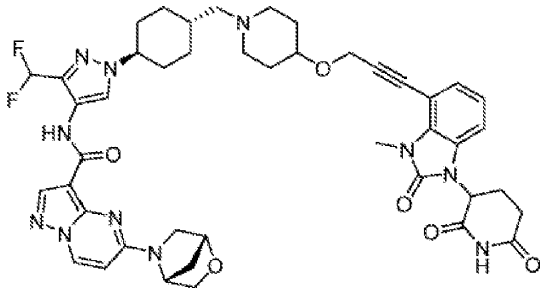
[0008] 특허 출원 및 공보를 포함하여 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그 전체가 참조로 포함된다.

### 발명의 내용

[0009] 일부 양태에서, 본 발명은 개체의 세포로 핵산을 전달하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 개체를 유전자 요법제로 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 개체에서 유전자 요법을 개선하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법제에 대한 면역 반응을 억제하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다.

[0010] 본 발명의 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 IRAK 단백질 키나제의 활성 또는 발현을 조절한다. 일부 구현예에서, IRAK 단백질 키나제는 IRAK-1 단백질 키나제, IRAK-2 단백질 키나제, IRAK-3 단백질 키나제 단백질 키나제, 또는 IRAK-4 단백질 키나제이다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 IRAK-4 단백질 키나제의 활성 또는 발현을 조절한다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다:

[0011] [화학식 I]



[0012]

[0013]

일부 구현예에서, 유전자 요법제는 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 AAV 입자이다. 일부 구현예에서, AAV 입자는 AAV1 캡시드, AAV2 캡시드, AAV3 캡시드, AAV4 캡시드, AAV5 캡시드, AAV6 캡시드, AAV7 캡시드, AAV8 캡시드, AAVrh8 캡시드, AAV9 캡시드, AAV10 캡시드, AAVrh10 캡시드, AAV11 캡시드, AAV12 캡시드, AAVrh32.33 캡시드, AAV-XL32 캡시드, AAV-XL32.1 캡시드, AAV LK03 캡시드, AAV2R471A 캡시드, AAV2/2-7m8 캡시드, AAV DJ 캡시드, AAV DJ8 캡시드, AAV2 N587A 캡시드, AAV2 E548A 캡시드, AAV2 N708A 캡시드, AAV V708K 캡시드, 염소 AAV 캡시드, AAV1/AAV2 키메라 캡시드, 소 AAV 캡시드, 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1(키메라 AAV/인간 보카바이러스 바이러스 1), AAV2HBKO 캡시드, AAVPHP.B 캡시드 또는 AAVPHP.eB 캡시드, 또는 이의 기능적 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 캡시드는 티로신 돌연변이, 헤파린 결합 돌연변이, 또는 HBKO 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 바이러스 입자는 하나 이상의 역말단 반복부(ITR)를 포함하는 AAV 게놈을 포함하고, 여기서 하나 이상의 ITR은 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, 또는 AAV12 ITR이다. 일부 구현예에서, AAV 입자의 캡시드 및 하나 이상의 ITR은 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, AAV 입자의 캡시드 및 하나 이상의 ITR은 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된다.

[0014]

일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 입자이다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 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 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad, 또는 돼지 Ad 3형, 또는 이의 기능적 변이체로부터의 캡시드를 포함한다.

[0015]

일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 입자이다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 입자는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스, 모칼라(Mokala) 바이러스, 광견병 바이러스, RD114, 또는 이의 기능적 변이체로 위형화된다 (pseudotyped).

[0016]

일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 입자이다. 일부 구현예에서, HSV 입자는 HSV-1 입자 또는 HSV-2 입자, 또는 이의 기능적 변이체이다.

[0017]

일부 구현예에서, 유전자 요법제는 지질 나노입자를 포함한다.

[0018]

일부 구현예에서, 유전자 요법제는 이중성 트랜스진을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 이중성 트랜스진은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 구성적 프로모터, 조직-특이적 프로모터 또는 유도성 프로모터이다.

[0019]

일부 구현예에서, IRAK 분해제는 유전자 요법제의 투여 전에, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 개체는 유전자 요법에 의한 치료에 적합한 질환 또는 장애를 갖는다. 일부 구현예에서, 질환 또는 장애는 단일유전자성 질환 또는 장애이다. 일부 구현예에서, 유전자 요법제는 정맥내, 복강내, 동맥내, 근육내, 피하, 또는 간내 투여된다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 경구, 정맥내, 복강내, 동맥내, 근육내, 피하, 또는 간내 투여된다.

[0020]

일부 양태에서, 본 발명은 개체의 세포로 핵산을 전달하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체로부터의 선천성 면역 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계, b) 하나 이상의 사이토카인의 발현에 대해 선천성 면역 세포를 분석하는 단계로서, 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킨 후 사이토카인 시그니처의 발현에 의해 유전자 요법제에 대한 선천성 면역을 갖는 개체를 확인하는, 단계, c) 단계 b)에서 확인된 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 d) 단계 b)에서 확인된 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 개체를 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체로부터의 선천성 면역

세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계, b) 하나 이상의 사이토카인의 발현에 대해 선천성 면역 세포를 분석하는 단계로서, 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킨 후 사이토카인 시그니처의 발현에 의해 유전자 요법제에 대한 선천성 면역을 갖는 개체를 확인하는, 단계, c) 단계 b)에서 확인된 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 d) 단계 b)에서 확인된 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 개체를 선택하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체로부터의 선천성 면역 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계, b) 하나 이상의 사이토카인의 발현에 대해 선천성 면역 세포를 분석하는 단계로서, 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킨 후 사이토카인 시그니처의 발현에 의해 유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 개체를 확인하는, 단계, c) 유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 단계 b)에서 확인된 개체를 선택하는 단계를 포함한다.

[0021] 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포, 단핵구, 대식세포 또는 자연 살해(NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 개체로부터의 말초 혈액 단핵 세포로부터 단리된다. 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포이다. 일부 구현예에서, 수지상 세포는 개체의 단핵구로부터 유래된다.

[0022] 일부 구현예에서, 방법은 개체로부터 단핵구를 단리하는 단계 및 단핵구를 수지상 세포 배양 배지에서 인큐베이션시켜 단핵구로부터 수지상 세포를 유도한 후 수지상 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 단핵구는 CD14<sup>+</sup> 단핵구이다. 일부 구현예에서, 단핵구는 약 5일 내지 약 10일 또는 약 7일 내지 약 8일 동안 수지상 세포 배양 배지와 함께 인큐베이션되어 단핵구로부터 수지상 세포를 유도한다. 일부 구현예에서, 수지상 세포는 단계 c)의 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키기 전에 재플레이팅된다. 일부 구현예에서, 수지상 세포는 마이크로웰 접시 내로 재플레이팅된다.

[0023] 일부 구현예에서, 유전자 요법제는 바이러스 벡터이고, 여기서 선천성 면역 세포는 약  $1 \times 10^3$  내지 약  $1 \times 10^5$  또는 약  $1 \times 10^4$ 의 MOI로 바이러스 벡터와 함께 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 유전자 요법제는 비-바이러스 벡터이고, 여기서 선천성 면역 세포는 약 1 ng/mL 내지 약 1 mg/mL의 농도로 비-바이러스 벡터와 함께 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 유전자 요법제와 함께 약 12시간 내지 약 36시간 또는 약 24시간 동안 인큐베이션된다.

[0024] 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP1 및 MIP-1 $\alpha$  중 하나 이상의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP1 및 MIP-1 $\alpha$ 의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처에서의 사이토카인의 발현은 적합한 대조군과 비교하여 증가된다. 일부 구현예에서, 적합한 대조군은 유전자 요법제와 함께 인큐베이션되지 않은 선천성 면역 세포로부터의 사이토카인 시그니처에서의 사이토카인의 발현이거나, 적합한 대조군은 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키기 전에 선천성 면역 세포로부터의 사이토카인 시그니처에서의 사이토카인의 발현이다.

[0025] 일부 양태에서, 본 발명은 핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도를 제공하며, 여기서 조성물은 유전자 요법제를 포함하고, 조성물은 IRAK 분해제와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다. 일부 양태에서, 본 발명은 핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도를 제공하며, 여기서 조성물은 IRAK 분해제를 포함하고, 조성물은 유전자 요법제와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도를 제공하며, 여기서 조성물은 유전자 요법제를 포함하고, 조성물은 IRAK 분해제와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도를 제공하며, 여기서 조성물은 IRAK 분해제를 포함하고, 조성물은 유전자 요법제와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 조절하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도를 제공하며, 여기서 조성물은 유전자 요법제를 포함하고, 조성물은 IRAK 분해제와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다. 일부 양태에서, 본 발명은 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 조절하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도를 제공하며, 여기서 조성물은 IRAK 분해제를 포함하고, 조성물은 유전자 요법제와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다. 일부 구현예에서, 유전자 요법제는 AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자이다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 IRAK-4 분해제이다.

[0026] 일부 양태에서, 본 발명은 핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하는 데 사용하기 위한 유전자 요법제를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 유전자 요법제는 IRAK 분해제와 조합하여 사용된다. 일부 양태에서, 본 발명은 핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하는 데 사용하기 위한 IRAK 분해제를 포

합하는 조성물을 제공하며, 여기서 IRAK 분해제는 유전자 요법제와 조합하여 사용된다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체를 치료하는 데 사용하기 위한 유전자 요법제를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 유전자 요법제는 IRAK 분해제와 조합하여 사용된다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체를 치료하는 데 사용하기 위한 IRAK 분해제를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 IRAK 분해제는 유전자 요법제와 조합하여 사용된다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 조절하기 위한 IRAK 분해제를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 IRAK 분해제는 유전자 요법제와 조합하여 사용된다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 억제하기 위한 IRAK 분해제를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 IRAK 분해제는 유전자 요법제와 조합하여 사용된다. 일부 구현예에서, 유전자 요법제는 AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자이다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 IRAK-4 분해제이다.

[0027] 일부 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 사용하기 위한 키트를 제공한다.

**도면의 간단한 설명**

[0028] **도 1**은 AAV로 처리된 인간 수지상 세포에 대한 IRAK4 분해제 KT-474의 효과를 평가하기 위한 일반적인 스키마를 보여준다.

**도 2a 내지 도 2c**는 AAV와 KT-474의 공동처리가 사이토카인 방출의 감쇠를 초래한다는 것을 보여준다. **도 2a**는 단독으로 또는 다양한 농도의 KT-474가 투여된 AAV에 의해 유도된 사이토카인 IL1b의 방출을 보여준다. **도 2b**는 단독으로 또는 다양한 농도의 KT-474가 투여된 AAV에 의해 유도된 사이토카인 IL6의 방출을 보여준다. **도 2c**는 단독으로 또는 다양한 농도의 KT-474가 투여된 AAV에 의해 유도된 사이토카인 TNFA의 방출을 보여준다.

**도 3**은 KT-474를 사용한 처리가 1차 인간 단핵구 수지상 세포에서 세포 독성을 야기하지 않는다는 것을 보여준다.

**도 4**는 KT-474를 사용한 처리가 1차 인간 단핵구 수지상 세포에서 IRAK4 단백질의 분해를 야기한다는 것을 보여준다.

**도 5**는 AAV에 의해 유도된 면역 반응에 대한 IRAK4 분해제 KT-474의 효과를 평가하기 위해 사용된 생체내 마우스 실험의 개략도를 보여준다.

**도 6a 및 도 6b**는 KT-474를 사용한 처리가 트랜스진 LacZ 특이적 CD8 T 세포를 감소시킨다는 것을 보여준다. **도 6a**는 AAV 주사 후 14일째의 말초 혈액으로부터 유래된 PBMC에서의 트랜스진 LacZ 특이적 CD8 T 세포의 감소를 보여준다. **도 6b**는 AAV 주사 후 21일째의 비장에서 트랜스진 LacZ 특이적 CD8 T 세포의 감소를 보여준다.

**도 7**은 AAV에 의해 유도된 면역 반응에 대한 IRAK4 분해제 KT-474에 대한 경구 투여의 효과를 평가하기 위한 생체내 마우스 모델의 일반적인 개략도를 보여준다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0029] 일부 양태에서, 본 발명은 개체의 세포로 핵산을 전달하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제 (예를 들어, IRAK-4 분해제)를 투여하는 단계, 및 b) 핵산을 포함하는 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "유전자 요법제"는 개체에게 투여될 유전자 요법의 치료 성분 및/또는 담체 성분(예를 들어, 핵산(예를 들어, 폐쇄 말단 DNA), 바이러스 벡터(예를 들어, AAV 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, HSV 벡터), 지질 나노입자, 항체의 전부 또는 일부(예를 들어, 나노바디, Fc 영역, 기타 등등))일 수 있다. 일부 양태에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 개체를 유전자 요법제를 포함하는 조성물로 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 개체에서 유전자 요법을 개선하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법제에 대한 면역 반응을 조절하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법제에 대한 면역 반응을 억제하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법제에 대한 관용을 유도하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다.

[0030] 일부 양태에서, 본 발명은 개체의 세포로 핵산을 전달하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체로부터의 선천성 면역 세포를 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)와 함께 인큐베이션시키는 단계, b) 하나 이상의 사이토카인의 발현에 대해 선천성 면역 세포를 분석하는 단계로서, 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킨 후 사이토카인 시그니처의 발현에 의해 유전자 요법제에 대한 면역(예를 들어, 선천성 면역, 적응 면역)을 갖는 개체를 확인하는, 단계, c) 단계 b)에서 확인된 개체에 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 투여하는 단계, 및 d) 단계 b)에서 확인된 개체에 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, 또는 자연 살해(NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 방법은 선천성 면역 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키기 전에 개체로부터 선천성 면역 세포를 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 개체로부터 단핵구를 단리하는 단계, 및 단핵구를 수지상 세포 배양 배지에서 인큐베이션시켜 단핵구로부터 수지상 세포를 유도한 후 수지상 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계를 추가로 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 수지상 세포를 "유도하는"이라는 용어는 수지상 세포를 생성하기 위한 세포(예를 들어, 단핵구)의 분화를 포함한다.

[0031] 일부 양태에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 개체를 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체로부터의 선천성 면역 세포를 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)와 함께 인큐베이션시키는 단계, b) 하나 이상의 사이토카인의 발현에 대해 선천성 면역 세포를 분석하는 단계로서, 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킨 후 사이토카인 시그니처의 발현에 의해 유전자 요법제에 대한 면역(예를 들어, 선천성 면역, 적응 면역)을 갖는 개체를 확인하는, 단계, c) 단계 b)에서 확인된 개체에 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 투여하는 단계, 및 d) 단계 b)에서 확인된 개체에 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, 또는 자연 살해(NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 방법은 선천성 면역 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키기 전에 개체로부터 선천성 면역 세포를 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 개체로부터 단핵구를 단리하는 단계, 및 단핵구를 수지상 세포 배양 배지에서 인큐베이션시켜 단핵구로부터 수지상 세포를 유도한 후 수지상 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0032] 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자) 및 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 사용한 치료를 위한 개체를 선택하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체로부터의 선천성 면역 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계, b) 하나 이상의 사이토카인의 발현에 대해 선천성 면역 세포를 분석하는 단계로서, 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킨 후 사이토카인 시그니처의 발현에 의해 유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 개체를 확인하는, 단계, c) 유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 단계 b)에서 확인된 개체를 선택하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 d) 단계 b)에서 확인된 개체에 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 e) 단계 b)에서 확인된 개체에 유전자 요법제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, 또는 자연 살해(NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 방법은 선천성 면역 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키기 전에 개체로부터 선천성 면역 세포를 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 개체로부터 단핵구를 단리하는 단계, 및 단핵구를 수지상 세포 배양 배지에서 인큐베이션시켜 단핵구로부터 수지상 세포를 유도한 후 수지상 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0033] **일반 기법**

[0034] 본원에 기재되거나 참조된 기법 및 절차는, 예를 들어, 문헌[*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 4<sup>th</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, *et al.* eds., 2003)]; 시리즈인 문헌[*Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.)]; *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., 1995)]; 문헌[*Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow and Lane, eds., 1988)]; 문헌[*Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6<sup>th</sup> ed., J. Wiley and Sons, 2010)]; 문헌[*Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984)]; 문헌[*Methods in Molecular Biology*, Humana Press]; 문헌[*Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998)]; 문헌[*Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, Plenum Press, 1998)]; 문헌[*Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G.

Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8)]; 문헌[*Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1996)]; 문헌[*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987)]; 문헌[*PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994)]; 문헌[*Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991)]; 문헌[*Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., J. Wiley and Sons, 2002)]; 문헌[*Immunobiology* (C.A. Janeway et al., 2004)]; 문헌[*Antibodies* (P. Finch, 1997)]; 문헌[*Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989)]; 문헌[*Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)]; 문헌[*Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)]; 문헌[*The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)]; 및 문헌[*Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 2011)]에 기재된 널리 이용되는 방법론과 같이 당업자에 의해 통상적인 방법론을 이용하여 일반적으로 잘 이해되고 흔히 사용된다.

[0035] 정의

[0036] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "분해제"는 측정 가능한 친화도로 IRAK 키나제와 E3 리가제 둘 모두에 결합하고/하거나 이를 저해하여 IRAK 키나제의 편재화 및 후속 분해를 초래하는 이중작용성 화합물이다. 특정 구현예에서, 분해제는 약 50  $\mu\text{M}$  미만, 약 1  $\mu\text{M}$  미만, 약 500 nM 미만, 약 100 nM 미만, 약 10 nM 미만, 또는 약 1 nM 미만의  $\text{DC}_{50}$ 을 갖는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "1가"는 첨부된 E3 리가제 결합 모이어티가 없는 분해제 화합물을 지칭한다.

[0037] 본원에서 사용되는 바와 같이, IRAK과 관련하여 용어 "저해제"는 측정 가능한 친화도로 IRAK 키나제에 결합하고/하거나 이를 저해하는 화합물이다. 특정 구현예에서, 저해제는 약 50  $\mu\text{M}$  미만, 약 1  $\mu\text{M}$  미만, 약 500 nM 미만, 약 100 nM 미만, 약 10 nM 미만, 또는 약 1 nM 미만의  $\text{IC}_{50}$  및/또는 결합 상수를 갖는다.

[0038] 본원에서 사용되는 바와 같이, IRAK과 관련하여 용어 "조절제"는 IRAK 키나제의 활성을 자극하고/하거나, 지연시키고/시키거나, 저해하고/하거나, 억제하는(완전히 또는 부분적으로) 화합물이다.

[0039] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유전자 요법제"는 핵산(예를 들어 발현 작제물, miRNA, 안티센스, shRNA, siRNA) 또는 개체 또는 세포에서 하나 이상의 핵산(예를 들어, 유전자, mRNA)의 발현을 변형 또는 조작하여 살아있는 세포의 생물학적 성질을 변경하기 위해 핵산을 개체 또는 세포로 전달하는 데 사용되는 제제와 조합된 핵산을 지칭한다. 유전자 요법제의 예는 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노-관련 바이러스, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 단순 헤르페스 바이러스, 배콜로바이러스), 박테리아 벡터, 및 비-바이러스 벡터(예를 들어, 치료용 핵산을 포함하고/하거나 치료용 폴리펩티드를 인코딩하는 치료용 핵산 또는 플라스미드 DNA(예를 들어, 폐쇄 말단 DNA)를 캡슐화하는 지질 나노입자)를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0040] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유전자 요법제"는 개체 또는 세포에서 하나 이상의 유전자의 발현을 변형시키거나 조작하여 살아있는 세포의 생물학적 성질을 변경하기 위해 핵산을 개체 또는 세포로 전달하는 데 사용되는 제제를 지칭한다. 유전자 요법제의 예는 바이러스 벡터(예를 들어, 아데노-관련 바이러스, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 단순 헤르페스 바이러스, 배콜로바이러스), 박테리아 벡터, 및 비-바이러스 벡터(예를 들어, 치료용 핵산을 포함하고/하거나 치료용 폴리펩티드를 인코딩하는 치료용 핵산 또는 플라스미드 DNA를 캡슐화하는 지질 나노입자)를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0041] 본원에서 사용되는 "벡터"는 시험관내 또는 생체내에서 숙주 세포 내로 전달될 핵산을 포함하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스를 지칭한다.

[0042] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 폴리머 형태의 뉴클레오티드(리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드)를 지칭한다. 따라서, 이 용어는 단일-, 이중-, 또는 다중-가닥의 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 또는 푸린 및 피리미딘 염기를 포함하는 폴리머, 또는 기타 천연의, 화학적, 또는 생화학적으로 변형된, 비천연적인, 또는 유도체화된 뉴클레오티드 염기를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 핵산의 백분은 당 및 인산기(전형적으로 RNA 또는 DNA에서 발견될 수 있음), 또는 변형되거나 치환된 당 또는 인산기를 포함할 수 있다. 대안적으로, 핵산의 백분은 포스포라미데이트와 같은 합성 서브유닛의 폴리머를 포함할 수 있고, 따라서 올리고데옥시뉴클레오티드 포스포라미데이트( $\text{P-NH}_2$ ) 또는 혼합된 포스포라미데이트-포스포디에스테르 올리고머일 수 있다. 또한, 이중-가닥 핵산은, 상보적인 가닥을 합성하고 이러한 가닥을 적절한 조건 하에서 어닐링하거나, 적절한 프라이머와 함께 DNA 중합효소를 사용하여 새롭

게(de novo) 상보적인 가닥을 합성함으로써, 화학적 합성의 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 산물로부터 얻을 수 있다.

[0043] 용어 "폴리펩티드"와 "단백질"은 아미노산 잔기의 폴리머를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용되며, 최소 길이로 제한되지 않는다. 이러한 아미노산 잔기의 폴리머는 천연 또는 비천연 아미노산 잔기를 함유할 수 있고, 아미노산 잔기의 펩티드, 올리고펩티드, 이량체, 삼량체, 및 다량체를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 전장 단백질과 이의 단편 둘 모두가 상기 정의에 포함된다. 이 용어는 또한 폴리펩티드의 변형 후 변형, 예를 들어, 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화, 인산화 등을 포함한다. 또한, 본 발명의 목적상, "폴리펩티드"는 단백질이 요구되는 활성을 유지하는 한, 네이티브 서열에 대한 결실, 부가, 및 치환(일반적으로 자연적으로 보존적)과 같은 변형을 포함하는 단백질을 지칭한다. 이러한 변형은 부위-지정 돌연변이유발을 통해 이루어지는 것과 같이 의도적일 수 있거나, 단백질을 생성하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭으로 인한 오류를 통해 이루어지는 것과 같이 우연적일 수 있다.

[0044] "재조합 바이러스 벡터"는 하나 이상의 이중성 서열(즉, 바이러스 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 재조합 AAV 벡터의 경우, 재조합 핵산에는 적어도 하나, 예를 들어, 두 개의, 역 말단 반복부 서열(ITR)이 축적된다.

[0045] "재조합 AAV 벡터(rAAV 벡터)"는 적어도 하나, 예를 들어, 두 개의, AAV 역 말단 반복부 서열(ITR)이 축적되는, 하나 이상의 이중성 서열(즉, AAV 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 이러한 rAAV 벡터는 적절한 헬퍼 바이러스로 감염되고(또는 적절한 헬퍼 기능을 발현하고), AAV rep 및 cap 유전자 산물(즉, AAV Rep 및 Cap 단백질)을 발현하는 숙주 세포에 존재할 때 복제될 수 있고, 감염성 바이러스 입자로 패키징될 수 있다. rAAV 벡터가 더 큰 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 염색체, 또는 클로닝이나 형질감염에 사용되는 플라스미드와 같은 다른 벡터)에 통합될 때, 이러한 rAAV 벡터는 AAV 패키징 기능 및 적절한 헬퍼 기능의 존재하에서 복제 및 캡시드화에 의해 "회수"될 수 있는 "프로-벡터(pro-vector)"로 지칭될 수 있다. rAAV 벡터는 지질과 복합된, 리포솜 내에 캡슐화된, 그리고, 구현예에서, 바이러스 입자, 특히 AAV 입자 내에 캡시드화된, 선형의 인공 염색체, 플라스미드를 포함하지만, 이로 제한되지 않는 여러 형태 중 임의의 것일 수 있다. rAAV 벡터는 AAV 바이러스 캡시드에 패키징되어 "재조합 아데노-관련 바이러스 입자(rAAV 입자)"를 생성할 수 있다.

[0046] "rAAV 바이러스" 또는 "rAAV 바이러스 입자"는 적어도 하나의 AAV 캡시드 단백질 및 캡시드화된 rAAV 벡터 계층으로 구성되는 바이러스 입자를 지칭한다.

[0047] "재조합 아데노바이러스 벡터"는 적어도 하나의 아데노바이러스 역 말단 반복부 서열(ITR)이 축적되는 하나 이상의 이중성 서열(즉, 아데노바이러스 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 일부 구현예에서, 재조합 핵산에는 2개의 역 말단 반복부 서열(ITR)이 축적된다. 이러한 재조합 바이러스 벡터는 재조합 바이러스 계층으로부터 결실된 필수 아데노바이러스 유전자(예를 들어, E1 유전자, E2 유전자, E4 유전자 등)를 발현하는 숙주 세포에 존재하는 경우, 복제되고 감염성 바이러스 입자 내로 패키징될 수 있다. 재조합 바이러스 벡터가 더 큰 폴리뉴클레오티드 내로(예를 들어, 염색체 내로 또는 또 다른 벡터, 예컨대 클로닝 또는 형질감염을 위해 사용되는 플라스미드 내로) 혼입되는 경우, 재조합 바이러스 벡터는 아데노바이러스 패키징 기능의 존재 하에 복제 및 캡시드화에 의해 "구제"될 수 있는 "프로-벡터"로 지칭될 수 있다. 재조합 바이러스 벡터는 비제한적으로 지질과 복합체화된, 리포솜 내에 캡시드화된, 그리고 바이러스 입자, 예를 들어, 아데노바이러스 입자에 캡시드화된, 플라스미드, 선형 인공 염색체를 포함하는 여러 형태 중 임의의 것일 수 있다. 재조합 바이러스 벡터는 "재조합 아데노바이러스 입자"를 생성하기 위해 아데노바이러스 캡시드 내로 패키징될 수 있다.

[0048] "재조합 렌티바이러스 벡터"는 적어도 하나의 렌티바이러스 말단 반복부 서열(LTR)이 축적되는 하나 이상의 이중성 서열(즉, 렌티바이러스 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 일부 구현예에서, 재조합 핵산에는 2개의 렌티바이러스 말단 반복부 서열(LTR)이 축적된다. 이러한 재조합 바이러스 벡터는 적합한 헬퍼 기능으로 감염된 숙주 세포에 존재하는 경우 복제되고 감염성 바이러스 입자 내로 패키징될 수 있다. 재조합 렌티바이러스 벡터는 "재조합 렌티바이러스 입자"를 생성하기 위해 렌티바이러스 캡시드 내로 패키징될 수 있다.

[0049] "재조합 단순 헤르페스 벡터(재조합 HSV 벡터)"는 HSV 말단 반복부 서열이 축적되는 하나 이상의 이중성 서열(즉, HSV 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 이러한 재조합 바이러스 벡터는 적합한 헬퍼 기능으로 감염된 숙주 세포에 존재하는 경우 복제되고 감염성 바이러스 입자 내로 패키징될 수

있다. 재조합 바이러스 벡터가 더 큰 폴리뉴클레오티드 내로(예를 들어, 염색체 내로 또는 또 다른 벡터, 예컨대 클로닝 또는 형질감염을 위해 사용되는 플라스미드 내로) 혼입되는 경우, 재조합 바이러스 벡터는 HSV 패키징 기능의 존재 하에 복제 및 캡시드화에 의해 "구제"될 수 있는 "프로-벡터"로 지칭될 수 있다. 재조합 바이러스 벡터는 비제한적으로 지질과 복합체화된, 리포솜 내에 캡시드화된, 그리고 바이러스 입자, 예를 들어, HSV 입자에 캡시드화된 플라스미드, 선형 인공 염색체를 포함하는 여러 형태 중 임의의 것일 수 있다. 재조합 바이러스 벡터는 "재조합 단순 헤르페스 바이러스 입자"를 생성하기 위해 HSV 캡시드 내로 패키징될 수 있다.

[0050] 본원에서 사용되는 "고체 지질 나노입자"(SLN, sLNP), 또는 "지질 나노입자"(LNP)는 지질로 구성된 나노입자를 지칭한다. 일부 예에서, 인지질 층은 오직 하나이며, 입자의 내부의 벌크는 친유성 물질로 구성된다. 핵산과 같은 페이로드의 내부에 포매될(embedded) 수 있다. 일부 예에서, 지질 나노입자는 지질 이중층을 포함하는 리포솜이다.

[0051] 본원에서 사용되는 바와 같이, 유전자 요법과 관련하여 용어 "개선"은 유전자 요법제의 치료용 유전자 페이로드의 발현을 부스팅, 증진, 연장시키거나 달리 증가시키는 행위를 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, 개선된 유전자 요법은 IRAK 조절제와 함께 투여되는 유전자 요법제의 치료용 유전자 페이로드의 발현이 IRAK 조절제 없이 투여되는 유전자 요법과 비교하여 약 10%, 25%, 50%, 75%, 또는 100% 중 임의의 것보다 크게 증가되는 것이다. 일부 구현예에서, 개선된 유전자 요법은 IRAK 분해제가 투여된 유전자 요법제의 치료용 유전자 페이로드의 발현 시간이 IRAK 분해제 없이 투여된 유전자 요법과 비교하여 약 10%, 25%, 50%, 75%, 또는 100% 중 임의의 것보다 크게 연장되는 것이다. 일부 예에서, 유전자 요법은 유전자 요법제에 대한 면역 반응(예를 들어, 선천성 면역 반응)을 감소시킴으로써 개선된다. 일부 구현예에서, 개선된 유전자 요법은 IRAK 분해제와 함께 투여되는 유전자 요법에 대한 면역 반응이 IRAK 분해제 없이 투여되는 유전자 요법과 비교하여 약 10%, 25%, 50%, 75%, 또는 100% 중 임의의 것보다 더 많이 감소되는 것이다. 일부 구현예에서, 유전자 요법제에 대한 면역 반응의 감소는 IRAK 분해제의 부재 하에 면역 세포에 대한 유전자 요법제의 노출과 비교하여 IRAK 분해제의 존재 하에 면역 세포에 대한 유전자 요법제의 노출 후 사이토카인 시그니처의 감소로서 측정된다.

[0052] 본원에서 사용되는 바와 같이, 유전자 요법을 지칭하는 용어 "조절"은 유전자 요법제의 존재 또는 활성을 수정, 변경, 변화, 개선 또는 달리 변형하는 행위를 지칭할 수 있다. 예를 들어, 유전자 요법제에 대한 면역 반응을 조절하는 것은 유전자 요법제에 대한 면역 반응을 수정, 변경, 변화, 개선 또는 달리 변형하는(예를 들어, 유전자 요법제에 대한 면역 반응(예를 들어, 선천성 면역 반응)을 감소시키고/시키거나, 지연시키고/시키거나, 제거하는) 임의의 행위를 지칭할 수 있다.

[0053] 본원에서 사용되는 바와 같이, 유전자 요법제에 대한 면역 반응(예를 들어, 선천성 면역 반응)과 관련되는 용어 "사이토카인 시그니처"는 선천성 면역 세포를 유전자 요법제에 노출시킨 후 하나 이상의 사이토카인의 증가된 발현을 지칭한다. 일부 예에서, 사이토카인 시그니처의 사이토카인은 TLR 경로(예를 들어, TLR2, TLR3, TLR4 또는 TLR9 경로)에 특이적이다.

[0054] 선천성 면역 세포는 선천성 면역을 매개하는 백혈구이며, 호염기구, 수지상 세포, 호산구, 랑게르한스 세포, 비만 세포, 단핵구 및 대식세포, 호중구 및 NK 세포를 포함한다. 상이한 AAV 캡시드는 대개 형질도입 효율로 지칭되는 상이한 효율로 이들 선천성 면역 세포에 진입할 수 있다. AAV1과 같은 일부 혈청형은 단핵구와 같은 특정 면역 세포를 형질도입시키는 데 효율적이며, 반면에 AAV6과 같은 다른 AAV는 수지상 세포와 같은 세포를 형질도입하는 데 효율적이다(Grimm, D *et al.*, *J. Virol.*, 2008, 82(12):5887-5911). 세포 진입 시 AAV는 면역 반응을 유발할 수 있다. 이러한 면역 반응의 크기는 AAV 혈청형 및 세포 유형에 따라 달라진다. 일단 AAV가 숙주 면역 세포를 형질도입하면, 이들은 면역 수용체, 예컨대 TLR(예를 들어, TLR9)에 관여할 수 있다. 마우스 모델을 사용한 여러 연구는 TLR9가 AAV 면역원성에 기여하는 핵심 DNA 센서임을 드러냈다(Zhu, J *et al.*, *J Clin Invest.* 2009;119(8):2388-2398; Ashley SN *et al.*, *Cell. Immunol.* 2019, 346:103997). 일단 이들 TLR이 바이러스에 의해 활성화되면, 이들은 감염된 세포 내에 항-바이러스 상태를 확립하고 이웃하는 세포에 경고를 주는 사이토카인을 분비한다. (Carty, M and 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 and Kagan, JC, *Cell*, 2020 180(6):1044-1066).

[0055] 이들 사이토카인은 또한 항체를 생성하고 바이러스 감염 세포를 각각 사멸시키기 위한 세포독성을 생성하는 B 세포 및 T 세포를 포함하는 적응 면역계를 활성화시키는 역할을 한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 사이토카인의 특정 서브세트의 상향 조절 또는 하향 조절은 "사이토카인 시그니처"로 지칭된다. 3개 이상의 사이토카인을 포함하는 이들 사이토카인 시그니처는 질환 및 요법의 성공에 대한 예측 마커로서 사용될 수 있다. 사이토카

인 시그니처의 예는 문헌[Zuniga, J *et al.*, *Int. J. Infect. Diseases*, 2020, 94:4-11, Bergamaschi, C *et al.*, *Cell Reports*, 2021, 36:109504; Del Valle, DM *et al.*, *Nat. Med.* 2020, 26:1636-1643]에서 확인된다.

- [0056] "이중성"은 비교 대상이 되거나 내부에 도입 또는 통합되는 실체의 나머지와는 유전자형으로 구분되는 실체로부터 유래된 것을 의미한다. 예를 들어, 유전자 조작 기법에 의해 상이한 세포 유형으로 도입된 핵산은 이중성 핵산이다(그리고 발현될 때, 이중성 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다). 마찬가지로, 바이러스 벡터에 통합되는 세포 서열(예를 들어, 유전자 또는 이의 부분)은 벡터에 대해 이중성 뉴클레오티드 서열이다.
- [0057] 용어 "트랜스진"은 세포 내로 도입되고, RNA로 전사될 수 있고, 선택적으로 적절한 조건 하에서 번역되고/되거나 발현될 수 있는 핵산을 지칭한다. 양태들에서, 이는 도입된 세포에 요구되는 성질을 제공하거나, 달리 요구되는 치료적 또는 진단적 결과를 유도한다. 또 다른 양태에서, 이는 siRNA와 같이, RNA 간섭을 매개하는 분자로 전사될 수 있다.
- [0058] 바이러스 역가와 관련하여 사용된 용어 "게놈 입자(gp)", "게놈 당량", 또는 "게놈 카피"는 감염성 또는 기능성과 무관하게, 재조합 AAV DNA 게놈을 함유하는 비리온의 수를 지칭한다. 특정 벡터 체제 내의 게놈 입자의 수는 본원의 실시예, 또는, 예를 들어, 문헌[Clark *et al.* (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039]; 문헌[Veldwijk *et al.* (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278]에 기재된 바와 같은 절차에 의해 측정될 수 있다.
- [0059] 바이러스 역가와 관련하여 사용된 용어 "감염 단위(iu)", "감염성 입자", 또는 "복제 단위"는 예를 들어, 문헌[McLaughlin *et al.* (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973]에 기재된 바와 같이, 복제 중심 검정으로도 알려져 있는, 감염 중심 검정으로 측정된, 감염성 및 복제 능력이 있는 재조합 AAV 벡터 입자들의 수를 지칭한다.
- [0060] 바이러스 역가와 관련하여 사용되는 용어 "형질도입 단위(tu)"는 본원의 실시예에 기재되거나, 예를 들어, 문헌[Xiao *et al.* (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124]; 또는 문헌[Fisher *et al.* (1996) *J. Virol.*, 70:520-532](LFU 검정)에 기술된 것과 같은 기능적 검정으로 측정된, 기능적 트랜스진 산물의 생성을 초래하는 감염성 재조합 AAV 벡터 입자의 수를 지칭한다.
- [0061] "역 말단 반복부" 또는 "ITR" 서열은 당업계에서 널리 이해되는 용어로, 반대 배향의 바이러스 게놈의 말단에서 발견되는 상대적으로 짧은 서열을 지칭한다.
- [0062] 당업계에서 널리 이해되는 용어인 "AAV 역 말단 반복부(ITR)" 서열은 네이티브 단일가닥 AAV 게놈의 양 말단에 존재하는 대략 145-뉴클레오티드 서열이다. ITR의 가장 바깥쪽 125개 뉴클레오티드는 두 가지 대안적인 방향 중 하나로 존재할 수 있고, 이는 상이한 AAV 게놈들 사이에, 그리고 단일 AAV 게놈의 양 말단 사이에 이질성을 초래한다. 가장 바깥쪽의 125개의 뉴클레오티드는 또한 자기-상보성의 여러 짧은 영역(A, A', B, B', C, C' 및 D 영역으로 명명됨)을 포함하며, 이는 가닥내 염기쌍 형성이 ITR의 상기 부분 내에서 발생하는 것을 가능하게 한다.
- [0063] "말단 분해 서열" 또는 "trs"는 바이러스 DNA 복제 중에 AAV rep 단백질에 의해 절단되는 AAV ITR의 D 영역 내의 서열이다. 돌연변이 말단 분해 서열은 AAV rep 단백질에 의한 절단에 불응한다. "AAV 헬퍼 기능"은 AAV가 숙주 세포에 의해 복제되고 패키징될 수 있도록 하는 기능을 지칭한다. AAV 헬퍼 기능은 비제한적으로 AAV 복제 및 패키징을 보조하는 헬퍼 바이러스 또는 헬퍼 바이러스 유전자를 포함하는 여러 형태 중 임의의 것으로 제공될 수 있다. 유전자독성제와 같은 다른 AAV 헬퍼 기능은 당업계에 알려져 있다.
- [0064] "AAV 헬퍼 기능"은 AAV가 숙주 세포에 의해 복제되고 패키징될 수 있도록 하는 기능을 지칭한다. AAV 헬퍼 기능은 비제한적으로 AAV 복제 및 패키징을 보조하는 헬퍼 바이러스 또는 헬퍼 바이러스 유전자를 포함하는 여러 형태 중 임의의 것으로 제공될 수 있다. 유전자독성제와 같은 다른 AAV 헬퍼 기능은 당업계에 알려져 있다.
- [0065] AAV에 대한 "헬퍼 바이러스"는 (결함이 있는 파보바이러스인) AAV가 숙주 세포에 의해 복제되어 패키징될 수 있게 하는 바이러스를 지칭한다. 아데노바이러스, 헤르페스바이러스, 백시니아와 같은 폭스바이러스, 및 배큘로바이러스를 포함하는 다수의 이러한 헬퍼 바이러스가 확인되었다. 아데노바이러스는 많은 상이한 서브그룹을 포함하지만, 서브그룹 C의 아데노바이러스 5형(Ad5)이 가장 흔히 사용된다. 인간, 비인간 포유류, 및 조류 기원의 여러 아데노바이러스가 알려져 있으며, ATCC와 같은 기탁기관으로부터 입수 가능하다. ATCC와 같은 기탁기관으로부터 또한 입수 가능한 헤르페스 패밀리의 바이러스는, 예를 들어 단순 헤르페스 바이러스(HSV), 엡스타인 바 바이러스(EBV), 사이토메갈로바이러스(CMV), 및 가성 광견병 바이러스(PRV)를 포함한다. 기탁기관으로부터 입수 가능한 배큘로바이러스는 *아우토그라파 칼리포르니카*(*Autographa californica*) 핵 다면체형성 바이러스를 포함한다.

- [0066] 참조 폴리펩티드 또는 핵산 서열과 관련된 "서열 동일성 백분율(%)"은 서열을 정렬하고, 최대 백분율의 서열 동일성을 달성하기 위해, 필요한 경우 갭을 도입한 후, 참조 폴리펩티드 또는 핵산 서열 내의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드와 동일한, 후보 서열 내의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 백분율로서 정의되며, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부분으로 고려하지 않는다. 아미노산 또는 핵산 서열 동일성 백분율 결정의 목적을 위한 정렬은, 예를 들어 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어 프로그램, 예를 들어, 문헌[Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds., 1987), Supp. 30, 섹션 7.7.18, 표 7.7.1]에 기재된 것과 같고 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 포함하는 공적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어 프로그램을 이용하여 당업계의 기술 범위 내인 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 정렬 프로그램의 하나의 예는 ALIGN Plus(Scientificand Educational Software, Pennsylvania)이다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 대해 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 정렬 측정을 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 본원의 목적상, 주어진 아미노산 서열 B에 비해, 이와, 또는 이와 비교하여, 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 % (이는 대안적으로는 주어진 아미노산 서열 B에 비해, 이와, 또는 이와 비교하여, 특정 %의 아미노산 서열 동일성을 가지거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A라고 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:  $100 \times \frac{X}{Y}$  (X는 A 및 B의 서열 정렬 프로그램에 의한 프로그램 정렬시, 동일한 매칭으로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이며, Y는 B의 총 아미노산 잔기수임). 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, A 대 B의 아미노산 서열 동일성%는 B 대 A의 아미노산 서열 동일성%와 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다. 본원의 목적상, 주어진 핵산 서열 D에 대해, 이에 의해, 또는 이와 관련하여, 주어진 핵산 서열 C의 핵산 서열 동일성% (대안적으로는, 주어진 핵산 서열 D에 대해, 이에 의해, 또는 이와 관련하여, 특정 핵산 서열 동일성%를 가지거나 이를 포함하는 주어진 핵산 서열 C로서 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:  $100 \times \frac{W}{Z}$  (W는 C 및 D의 서열 정렬 프로그램에 의한 프로그램 정렬시, 동일한 매칭으로 스코어링된 뉴클레오티드의 수이며, Z는 D의 총 뉴클레오티드 수임). 핵산 서열 C의 길이가 핵산 서열 D의 길이와 동일하지 않은 경우, C 대 D의 핵산 서열 동일성%는 D 대 C의 핵산 서열 동일성%와 동일하지 않을 것임이 이해될 것이다.
- [0067] 제제의 "유효량"은 필요한 기간 동안 및 투여량에서, 요망되는 치료적 결과를 달성하기에 효과적인 양을 지칭한다. 예를 들어, 유전제 요법제의 유효량은 필요한 기간 동안 및 투여량에서, 요망되는 유전자 치료적 결과를 달성하기에 효과적인 양을 지칭한다. 또 다른 예에서, IRAK 분해제의 유효량은 개선된 유전자 요법의 요망되는 결과를 달성하기 위해 필요한 기간 및 투여량에 효과적인 양을 지칭할 수 있다.
- [0068] 본 발명의 물질/분자의 "치료적 유효량" (예를 들어, 유전자 요법제 및/또는 IRAK 분해제)은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 요망되는 반응을 유발하는 물질/분자, 작용제 또는 길항제의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 치료적 유효량은 또한 치료적으로 유익한 효과가 물질/분자의 임의의 독성 또는 유해 효과보다 큰 양이다.
- [0069] 사이토카인 시그니처를 지칭하는 용어 "적합한 대조군"은 유전자 요법제와 함께 인큐베이션되지 않은 선천성 면역 세포로부터의 사이토카인 시그니처에서의 사이토카인의 발현 또는 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키기 전에 선천성 면역 세포로부터의 사이토카인 시그니처에서의 사이토카인의 발현이다.
- [0070] 유전자 요법제 및 IRAK 분해제와 관련되는 바와 같이 "조합" 투여는 유전자 요법제 및 IRAK 분해제의 임의의 순서로 동시발생(동시), 및 연속 또는 순차적 투여를 포함한다.
- [0071] 용어 "동시에"는 투여의 적어도 일부가 시간에 따라 중첩되는, 유전자 요법제 및 IRAK 분해제의 투여를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 따라서, 동시 투여는 유전자 요법제 또는 IRAK 분해제의 투여가 다른 제제/분해제의 투여를 중단한 후 계속되는 경우의 투여 방식을 포함한다.
- [0072] 본원에서 사용된 바와 같이, "~와 함께"는 또 다른 치료 양식 이외의 하나의 치료 양식의 투여를 지칭한다. 이와 같이, "와 함께"는 개체에 대한 다른 치료 양식의 투여 전, 투여 동안 또는 투여 후에 하나의 치료 양식(유전자 요법제 또는 IRAK 분해제)의 투여를 지칭한다.
- [0073] "단리된" 분자(예를 들어, 핵산 또는 단백질) 또는 세포는 이의 천연 환경 성분으로부터 확인되고, 분리되고/분리되거나 회수되었음을 의미한다.
- [0074] 본원에서 "약"이 붙은 값 또는 매개변수에 대한 언급은 그 값 또는 매개변수 자체에 관한 구현예를 포함(및 설명)한다. 예를 들어, "약 X"에 대한 설명은 "X"의 설명을 포함한다.
- [0075] 본원에 사용된 단수형은 달리 표시되지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함한다.

[0076] 본원에 기술된 본 발명의 양태 및 구현예는, 양태 및 구현예를 "포함하는", 이들로 "이루어지는" 및/또는 이들로 "필수적으로 이루어지는" 것을 포함하는 것으로 이해된다.

[0077] **치료 방법**

[0078] 일부 양태에서, 본 발명은 개체의 세포로 핵산을 전달하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 개체를 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 개체에서 유전자 요법을 개선하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법제에 대한 면역 반응을 조절하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법제에 대한 면역 반응을 억제하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법제에 대한 관용을 유도하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 IRAK 단백질 키나제의 활성을 조절한다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 IRAK-4 단백질 키나제의 활성을 조절한다. 일부 구현예에서, 유전자 요법제는 바이러스 유전자 요법제(예를 들어, 바이러스 벡터) 또는 비-바이러스 유전자 요법제(예를 들어, 비-바이러스 유전자 요법제를 포함하는 지질 나노입자)이다. 일부 구현예에서, 유전자 요법제는 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 또는 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 벡터이다.

[0079] 본 발명의 일부 구현예에서, 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)는 특정 관심 조직에 투여될 수 있거나, 이는 전신 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 유효량의 유전자 요법제는 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 유효량의 유전자 요법제는 비경구 투여될 수 있다. 비경구 투여 경로는 정맥내, 복강내, 골내, 동맥내, 뇌내, 근육내, 척수강내, 피하, 뇌실내, 간내 등을 제한 없이 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유효량의 유전자 요법제는 하나의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 유효량의 유전자 요법제는 조합 또는 다중의 투여 경로(예를 들어, 2개, 3개 등)를 통해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 유효량의 유전자 요법제는 하나의 위치에 투여된다. 다른 구현예에서, 유효량의 유전자 요법제는 2개 이상의 위치에 투여될 수 있다.

[0080] 유효량의 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)를 치료의 목적에 따라 투여한다. 예를 들어, 낮은 백분율의 형질도입 또는 형질감염이 요망되는 치료 효과를 달성할 수 있는 경우, 치료의 목적은 일반적으로 이러한 수준의 형질도입 또는 형질감염을 충족시키거나 초과하는 것이다. 일부 경우에, 이러한 수준의 형질도입 또는 형질감염은 요망되는 조직 유형의 표적 세포의 약 1 내지 5%만을, 일부 구현예에서는 요망되는 조직 유형의 세포의 약 20% 이상을, 일부 구현예에서는 약 50% 이상을, 일부 구현예에서는 약 80% 이상을, 일부 구현예에서는 약 95% 이상을, 일부 구현예에서는 요망되는 조직 유형의 세포의 약 99% 이상을 형질도입 또는 형질감염시켜 달성될 수 있다. 유전자 요법제는 동일한 절차 동안, 또는 수일, 수주, 수개월, 또는 수년의 간격으로, 1회 이상의 투여에 의해 투여될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 투여 경로 중 하나 이상이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 인간; 예를 들어, AAV 벡터 및 렌티바이러스 벡터를 치료하기 위해 다중 유전자 요법제가 사용될 수 있다.

[0081] 유전자 요법제에 의해 형질도입 또는 형질감염된 세포의 확인 방법은 당업계에 공지되어 있으며; 예를 들어, 면역조직화학 또는 마커, 예컨대 증강된 녹색 형광 단백질의 사용이 유전자 요법제에 의한 형질도입 또는 형질감염 세포를 검출하는 데 사용될 수 있다.

[0082] 일부 구현예에서, 유효량의 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)는 하나 초과 위치에서 동시에 또는 순차적으로 투여된다. 다른 구현예에서, 유효량의 유전자 요법제는 단일 위치에 2회 이상(예를 들어, 반복하여) 투여된다. 일부 구현예에서, 유전자 요법제의 다수의 주사는 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 9시간, 12시간 또는 24시간 이하의 간격으로 주사된다.

[0083] 일부 구현예에서, 방법은 유전자 요법 치료를 필요로 하는 개체를 치료하기 위해 유전자 요법제를 포함하는 유효량의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의

바이러스 역가는 적어도 약  $5 \times 10^{12}$ 개,  $6 \times 10^{12}$ 개,  $7 \times 10^{12}$ 개,  $8 \times 10^{12}$ 개,  $9 \times 10^{12}$ 개,  $10 \times 10^{12}$ 개,  $11 \times 10^{12}$ 개,  $15 \times 10^{12}$ 개,  $20 \times 10^{12}$ 개,  $25 \times 10^{12}$ 개,  $30 \times 10^{12}$ 개, 또는  $50 \times 10^{12}$ 개의 게놈 카피/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 약  $5 \times 10^{12}$ 개 내지  $6 \times 10^{12}$ 개,  $6 \times 10^{12}$ 개 내지  $7 \times 10^{12}$ 개,  $7 \times 10^{12}$ 개 내지  $8 \times 10^{12}$ 개,  $8 \times 10^{12}$ 개 내지  $9 \times 10^{12}$ 개,  $9 \times 10^{12}$ 개 내지  $10 \times 10^{12}$ 개,  $10 \times 10^{12}$ 개 내지  $11 \times 10^{12}$ 개,  $11 \times 10^{12}$ 개 내지  $15 \times 10^{12}$ 개,  $15 \times 10^{12}$ 개 내지  $20 \times 10^{12}$ 개,  $20 \times 10^{12}$ 개 내지  $25 \times 10^{12}$ 개,  $25 \times 10^{12}$ 개 내지  $30 \times 10^{12}$ 개,  $30 \times 10^{12}$ 개 내지  $50 \times 10^{12}$ 개, 또는  $50 \times 10^{12}$ 개 내지  $100 \times 10^{12}$ 개의 게놈 카피/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 약  $5 \times 10^{12}$ 개 내지  $10 \times 10^{12}$ 개,  $10 \times 10^{12}$ 개 내지  $25 \times 10^{12}$ 개, 또는  $25 \times 10^{12}$ 개 내지  $50 \times 10^{12}$ 개의 게놈 카피/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 적어도 약  $5 \times 10^9$ 개,  $6 \times 10^9$ 개,  $7 \times 10^9$ 개,  $8 \times 10^9$ 개,  $9 \times 10^9$ 개,  $10 \times 10^9$ 개,  $11 \times 10^9$ 개,  $15 \times 10^9$ 개,  $20 \times 10^9$ 개,  $25 \times 10^9$ 개,  $30 \times 10^9$ 개, 또는  $50 \times 10^9$ 개의 형질도입 단위/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 약  $5 \times 10^9$ 개 내지  $6 \times 10^9$ 개,  $6 \times 10^9$ 개 내지  $7 \times 10^9$ 개,  $7 \times 10^9$ 개 내지  $8 \times 10^9$ 개,  $8 \times 10^9$ 개 내지  $9 \times 10^9$ 개,  $9 \times 10^9$ 개 내지  $10 \times 10^9$ 개,  $10 \times 10^9$ 개 내지  $11 \times 10^9$ 개,  $11 \times 10^9$ 개 내지  $15 \times 10^9$ 개,  $15 \times 10^9$ 개 내지  $20 \times 10^9$ 개,  $20 \times 10^9$ 개 내지  $25 \times 10^9$ 개,  $25 \times 10^9$ 개 내지  $30 \times 10^9$ 개,  $30 \times 10^9$ 개 내지  $50 \times 10^9$ 개, 또는  $50 \times 10^9$ 개 내지  $100 \times 10^9$ 개의 형질도입 단위/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 약  $5 \times 10^9$ 개 내지  $10 \times 10^9$ 개,  $10 \times 10^9$ 개 내지  $15 \times 10^9$ 개,  $15 \times 10^9$ 개 내지  $25 \times 10^9$ 개, 또는  $25 \times 10^9$ 개 내지  $50 \times 10^9$ 개의 형질도입 단위/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 적어도 약  $5 \times 10^{10}$ 개,  $6 \times 10^{10}$ 개,  $7 \times 10^{10}$ 개,  $8 \times 10^{10}$ 개,  $9 \times 10^{10}$ 개,  $10 \times 10^{10}$ 개,  $11 \times 10^{10}$ 개,  $15 \times 10^{10}$ 개,  $20 \times 10^{10}$ 개,  $25 \times 10^{10}$ 개,  $30 \times 10^{10}$ 개,  $40 \times 10^{10}$ 개, 또는  $50 \times 10^{10}$ 개의 감염 단위/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 적어도 약  $5 \times 10^{10}$ 개 내지  $6 \times 10^{10}$ 개,  $6 \times 10^{10}$ 개 내지  $7 \times 10^{10}$ 개,  $7 \times 10^{10}$ 개 내지  $8 \times 10^{10}$ 개,  $8 \times 10^{10}$ 개 내지  $9 \times 10^{10}$ 개,  $9 \times 10^{10}$ 개 내지  $10 \times 10^{10}$ 개,  $10 \times 10^{10}$ 개 내지  $11 \times 10^{10}$ 개,  $11 \times 10^{10}$ 개 내지  $15 \times 10^{10}$ 개,  $15 \times 10^{10}$ 개 내지  $20 \times 10^{10}$ 개,  $20 \times 10^{10}$ 개 내지  $25 \times 10^{10}$ 개,  $25 \times 10^{10}$ 개 내지  $30 \times 10^{10}$ 개,  $30 \times 10^{10}$ 개 내지  $40 \times 10^{10}$ 개,  $40 \times 10^{10}$ 개 내지  $50 \times 10^{10}$ 개, 또는  $50 \times 10^{10}$ 개 내지  $100 \times 10^{10}$ 개의 감염 단위/mL 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 적어도 약  $5 \times 10^{10}$ 개 내지  $10 \times 10^{10}$ 개,  $10 \times 10^{10}$ 개 내지  $15 \times 10^{10}$ 개,  $15 \times 10^{10}$ 개 내지  $25 \times 10^{10}$ 개, 또는  $25 \times 10^{10}$ 개 내지  $50 \times 10^{10}$ 개의 감염 단위/mL 중 임의의 것이다.

[0084] 일부 구현예에서, 개체에게 투여되는 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)의 용량은 체중 1 kg 당 적어도 약  $1 \times 10^8$ 개 내지 약  $6 \times 10^{13}$ 개의 게놈 카피 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 개체에게 투여되는 유전자 요법제의 용량은 체중 1 kg 당 약  $1 \times 10^8$ 개 내지 약  $6 \times 10^{13}$ 개의 게놈 카피 중 임의의 것이다.

[0085] 일부 구현예에서, 개체에게 투여되는 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)의 총량은 적어도 약  $1 \times 10^9$ 개 내지 약  $1 \times 10^{14}$ 개 게놈 카피 중 임의의 것이다. 일부 구현예에서, 개체에게 투여되는 유전자 요법제의 총량은 약  $1 \times 10^9$ 개 내지 약  $1 \times 10^{14}$ 개의 게놈 카피 중 임의의 것이다.

[0086] 유전자 요법을 포함하는 본 발명의 조성물(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV

입자, 또는 지질 나노입자)는 단독으로 또는 IRAK 분해제에 더하여 하나 이상의 추가 치료제와 조합하여 사용될 수 있다. 순차적 투여의 간격은 수분, 수시간, 또는 수일 이상(또는 대안적으로, 미만)의 단위일 수 있다.

[0087] 본 발명의 일부 구현예에서, IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 포함하는 조성물은 경구로, 비경구로, 흡입 스프레이에 의해, 국소로, 직장으로, 비강으로, 협측으로, 질로 또는 이식된 저장소를 통해 투여될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "비경구"는 피하, 정맥내, 근육내, 관절내, 활막내, 흉골내, 척추강내, 간내, 병변내, 및 두개내 주사 또는 주입 기법을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 경구로, 복강내로, 또는 정맥내로 투여된다. 본 발명의 조성물의 멸균 주사 가능 형태는 수성 또는 유성 현탁액일 수 있다. 이들 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 당업계에 공지된 기법에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사 가능 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 가능 용액 또는 현탁액, 예를 들어, 1,3-부탄디올 중의 용액일 수 있다. 사용할 수 있는 허용되는 비히클 및 용매 중에는 물, 링거액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균된 고정유가 통상적으로 용매 또는 현탁 매질로 사용된다.

[0088] IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)의 양은 담체 물질과 조합되어 단일 투여형의 조성물(예를 들어, 약학적 조성물)을 생성할 수 있으며, 이는 개체와 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제를 포함하는 조성물은 체중 1 kg 당 약 0.01 mg 내지 약 100 mg의 투여량의 IRAK 분해제가 개체에게 투여되도록 제형화된다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 개체의 체중 1 kg 당 약 0.01 mg 내지 약 100 mg, 약 0.01 mg 내지 약 75 mg, 약 0.01 mg 내지 약 500 mg, 약 0.01 mg 내지 약 25 mg, 약 0.01 mg 내지 약 10 mg, 약 0.01 mg 내지 약 5 mg, 약 0.01 mg 내지 약 1.0 mg, 약 1.0 mg 내지 약 100 mg, 약 1.0 mg 내지 약 75 mg, 약 1.0 mg 내지 약 50 mg, 약 1.0 mg 내지 약 25 mg, 약 1.0 mg 내지 약 10 mg, 약 1.0 mg 내지 약 5 mg, 약 10 mg 내지 약 100 mg, 약 10 mg 내지 약 75 mg, 약 10 mg 내지 약 50 mg, 약 10 mg 내지 약 25 mg, 약 25 mg 내지 약 100 mg, 약 25 mg 내지 약 75 mg, 약 25 mg 내지 약 50 mg, 약 50 mg 내지 약 100 mg, 약 50 mg 내지 약 75 mg, 또는 약 75 mg 내지 약 100 mg 중 임의의 것의 투여량 수준으로 경구 또는 비경구 투여된다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 약 0.01 mg/kg, 1.0 mg/kg, 5 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, 100 mg/체중 1 kg, 200 mg/체중 1 kg, 300 mg/체중 1 kg, 400 mg/체중 1 kg, 또는 500 mg/개체의 체중 1 kg 중 임의의 것보다 큰 투여량 수준으로 경구 또는 비경구 투여된다.

[0089] IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)의 경구 투여를 위한 액체 투여형은 약학적으로 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭서를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 활성 화합물에 더하여, 액체 투여형은 당업계에서 일반적으로 사용되는 불활성 희석제, 예를 들어, 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일(구체적으로, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글리세롤, 테트라히드로푸르푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 함유할 수 있다. 비활성 희석제 외에, 경구 조성물은 또한 애주번트, 예컨대, 습윤제, 유화제 및 현탁제, 감미제, 착향제, 및 방향제를 포함할 수 있다.

[0090] 주사 가능 제제, 예를 들어 멸균 주사 가능한 수성 또는 비농성 현탁액 또는 IRAK-4 분해제는 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 공지된 분야에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사 가능 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 가능 용액 또는 현탁액, 예를 들어, 1,3-부탄디올 중의 용액일 수 있다. 사용할 수 있는 허용되는 비히클 및 용매 중에는 물, 링거액, U.S.P. 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균된 고정유가 통상적으로 용매 또는 현탁 매질로 사용된다. 이를 위해, 합성 모노- 또는 디글리세리드를 포함하는 임의의 블랜드 고정유가 사용될 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산이 주사제의 제조에 사용된다.

[0091] 주사용 제형 또는 IRAK 분해제는, 예를 들어, 박테리아-유지 필터를 통한 여과에 의해, 또는 사용 전에 멸균수 또는 다른 멸균 주사용 매질에 용해되거나 분산될 수 있는 멸균 고체 조성물의 형태로 멸균제를 혼입함으로써 멸균될 수 있다.

[0092] IRAK-4 분해제의 경구 투여용 고체 투여형은 캡슐제, 정제, 환제, 분말제 및 과립제를 포함한다. 이러한 고체 투여형에서, 활성 화합물은 적어도 하나의 불활성의 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체, 예컨대, 소듐 시트레이트 또는 디칼슘 포스페이트, 및/또는 a) 충전제 또는 증량제, 예컨대, 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨, 및 규산, b) 결합제, 예를 들어, 카르복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로스 및 아카시아, c) 보습제, 예컨대, 글리세롤, d) 붕해제, 예컨대, 당-당, 칼슘 카르보네이트, 감자 또는 타

피오카 전분, 알긴산, 특정 실리케이트, 및 소듐 카르보네이트, e) 용해지연제, 예컨대, 파라핀, f) 흡수 촉진제, 예를 들어, 사차 암모늄 화합물, g) 습윤제, 예를 들어, 세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테아레이트, h) 흡수제, 예컨대, 카올린 및 벤토나이트 점토, 및 i) 윤활제, 예컨대, 툤크(talc), 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 설페이트, 및 이들의 혼합물과 혼합된다. 캡슐, 정제 및 환제의 경우, 투여형은 또한 완충제를 포함할 수 있다.

[0093] 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 락토스 또는 유당뿐만 아니라 고분자량의 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 사용하여 연질 및 경질-충진 젤라틴 캡슐에서 충전제로서 이용될 수 있다. 정제, 당의정, 캡슐, 환제, 및 과립의 고체 투여형은 코팅 및 껍질, 예컨대, 장용 코팅 및 약학적 제형 분야에 널리 공지된 다른 코팅과 함께 제조될 수 있다. 이들은 선택적으로 불투명화제를 함유할 수 있고, 또한 활성 성분(들)만을 또는 이를 우선적으로 장관의 특정 부분에서, 선택적으로 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 포매 조성물의 예는 폴리머 물질 및 왁스를 포함한다. 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 락토스 또는 유당뿐만 아니라 고분자량의 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 사용하여 연질 및 경질-충진 젤라틴 캡슐에서 충전제로서 이용될 수 있다.

[0094] IRAK-4 분해제는 또한 상기 언급된 바와 같이 하나 이상의 부형제를 갖는 미세-캡슐화된 형태일 수 있다. 정제, 당의정, 캡슐, 환제 및 과립의 고체 투여형은 코팅 및 셸, 예컨대, 장용 코팅, 방출 제어 코팅 및 약학적 제형 분야에 잘 알려진 기타 코팅으로 제조될 수 있다. 이러한 고체 투여형에서 활성 화합물은 수크로스, 락토스 또는 전분과 같은 적어도 하나의 불활성 희석제와 혼합될 수 있다. 이러한 투여형은 또한 통상적인 관행과 같이, 불활성 희석제 이외의 추가 물질, 예를 들어, 정제화 윤활제 및 기타 정제화 보조제, 예컨대, 스테아르산마그네슘 및 미정질 셀룰로스를 포함할 수 있다. 캡슐, 정제 및 환제의 경우, 투여형은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 이들은 선택적으로 불투명화제를 함유할 수 있고, 활성 성분(들)만을 또는 이를 우선적으로 장관의 특정 부분에서, 필요에 따라 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 포매 조성물의 예는 폴리머 물질 및 왁스를 포함한다.

[0095] 일부 구현예에서, IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)는 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)의 투여 전에 투여된다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 개체에게 유전자 요법제의 투여 전 약 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 48시간, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주 또는 1주 초과 중 임의의 시간에 투여된다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 개체에게 유전자 요법제의 투여 전 약 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 48시간, 3일, 4일, 5일, 6일, 또는 1주 이내 중 임의의 시간에 투여된다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제 및 유전자 요법제는 대략 동시에(예를 들어, 약 1시간 이내에) 투여된다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 유전자 요법제의 투여 후에 투여된다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 개체에게 유전자 요법제의 투여 후 약 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 48시간, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주 또는 1주 초과 중 임의의 시간에 투여된다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 개체에게 유전자 요법제의 투여 후 약 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간 미만, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 48시간, 3일, 4일, 5일, 6일, 또는 1주 이내 중 임의의 시간에 투여된다.

[0096] 일부 구현예에서, 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)는 유전자 요법에 의한 치료에 적합한 질환 또는 장애를 치료하기 위해 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)와 함께 사용된다. 일부 구현예에서, 질환 또는 장애는 단일유전자성 질환 또는 장애이다.

[0097] 일부 구현예에서, 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)는 CNS 장애를 치료하기 위해 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)와 함께 사용된다. CNS의 비제한적 장애는 뇌졸중, 헌팅턴병, 간질, 파킨슨병, 루게릭병(근위축성 측삭 경화증으로도 알려짐), 알츠하이머병, 피질기저핵 변성 또는 CBD, 피질기저핵 신경절 변성 또는 CBGD, 전두측두엽 치매 또는 FTD, 진행성 핵상 마비 또는 PSP, 다발성 시스템 위축증, 또는 MSA, 뇌암, 및 리소좀 저장 질환(LSD)을 포함한다. IRAK 분해제와 함께 유전자 요법에 의해 치료될 수 있는 본 발명의 장애의 다른 비제한적 예는 외상성 뇌 손상, 효소 기능 장애, 정신 장애(외상후 스트레스 증후군 포함), 신경퇴행성 질환, 및 인지 장애(치매, 자폐증 및 우울증 포함), 및 효소 기능이상 장애(비제한적으로 백혈이영양증(카나반병 포함)을 포함함)를 포함한다.

[0098] 일부 구현예에서, 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)는 리소좀 저장 질환을 치료하기 위해 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)와 함께 사용된다. 당업계에 일반적으로 공지된 바와 같이, 리소좀 저장 질환은 리소좀 기능에서의 결함을 특징으로 하는 희귀

한 유전 대사 장애이다. 상기 장애는 리소좀 저장된 세포 물질의 병리학적 축적을 초래하는 적절한 점액다당류, 당단백질, 및/또는 지질 대사에 필요한 효소의 결핍에 의해 대개 야기된다. 본 발명의 치료용 폴리펩티드 또는 치료용 핵산에 의해 치료될 수 있는 본 발명의 리소좀 저장 질환의 비제한적 예는 2형 또는 3형 고체병, GM1 강 글리오시드증, 헌터병, 크라브병, 만노시드증 질환,  $\beta$  만노시드증 질환, 중이성 백혈병이영양증 질환, 뮤코지질증II/III 질환, 니만-픽 A 질환, 니만-픽 C 질환, 폼페병, 샌드호프병, 산필리포 A 질환, 산필리포 B 질환, 산필리포 C 질환, 산필리포 D 질환, 쉰들러병(Schindler disease), 슬라이병(sly disease), 테이-삭스병(Tay-Sachs disease), 및 월만병(Wolman disease)을 포함한다.

[0099] 일부 구현예에서, 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)는 A형 혈우병(hemophilia A), B형 혈우병(hemophilia B), 연령 관련 황반 변성(age related macular degeneration), 당뇨병성 망막병증(diabetic retinopathy), 녹내장(glaucoma), 근이영양증(muscular dystrophy), X-연관 근세관성 근육병증(X-Linked Myotubular Myopathy), 척수성 근위축증(spinal muscular atrophy), 레베르 선천성 흑암시(Leber's congenital amaurosis), 맥락막혈증(choroideremia), 레베르 유전성 시신경병증(Leber hereditary optic neuropathy), 오르니틴 트랜스카바밀라제(ornithine transcarbamylase; OTC) 결핍, 1형 시트룰린혈증(citrullinemia type 1), 페닐케톤뇨증(phenylketonuria; PKU), 부신진성 이영양증(adrenoleukodystrophy), 겸상적혈구병(sickle cell disease), 근이영양증(muscular dystrophy), 또는 베타 지중해빈혈(beta thalassemia)을 치료하기 위해 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)와 함께 사용된다.

[0100] 일부 양태에서, 본 발명은 핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)를 포함하고, 조성물은 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다. 일부 양태에서, 본 발명은 핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 포함하고, 조성물은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다.

[0101] 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체를 치료하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)를 포함하고, 조성물은 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체를 치료하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 포함하고, 조성물은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다.

[0102] 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 조절하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)를 포함하고, 조성물은 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다. 일부 양태에서, 본 발명은 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 조절하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 포함하고, 조성물은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다.

[0103] 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 억제하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)를 포함하고, 조성물은 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다. 일부 양태에서, 본 발명은 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 억제하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 포함하고, 조성물은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다.

[0104] 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법을 개선하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)를 포함하고, 조성물은 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다. 일부 양태에서, 본 발명은 개체에서 유전자 요법을 개선하기 위한

의약의 제조에 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 포함하고, 조성물은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다.

[0105] 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법에 대한 관용을 유도하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)를 포함하고, 조성물은 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다. 일부 양태에서, 본 발명은 개체에서 유전자 요법에 대한 관용을 유도하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 포함하고, 조성물은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)와 조합하여 사용하기 위해 제형화된다.

[0106] 일부 양태에서, 본 발명은 핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하는 데 사용하기 위한 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)를 제공하며, 여기서 유전자 요법제는 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)와 조합하여 사용된다. 일부 양태에서, 본 발명은 핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하는 데 사용하기 위한 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 제공하며, 여기서 IRAK 분해제는 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)와 조합하여 사용된다.

[0107] 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법제를 필요로 하는 개체를 치료하는 데 사용하기 위한 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)를 제공하며, 여기서 유전자 요법제는 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)와 조합하여 사용된다. 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체를 치료하는 데 사용하기 위한 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 제공하며, 여기서 IRAK 분해제는 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)와 조합하여 사용된다.

[0108] 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 조절하기 위한 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 제공하며, 여기서 IRAK 분해제는 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)와 조합하여 사용된다.

[0109] 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 억제하기 위한 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 제공하며, 여기서 IRAK 분해제는 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)와 조합하여 사용된다.

[0110] **IRAK 분해제**

[0111] 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법제에 대한 면역 반응(예를 들어, 선천성 면역 반응, 적응 면역 반응)을 저해함으로써 개선된 유전자 요법을 위한 유전자 요법제와 함께 IRAK 분해제를 사용하는 방법을 제공한다. IRAK는 급성 염증 유도에 이어 추가 적응 면역 반응을 유발함으로써 인체에 도입된 병원체에 대한 보호 반응에서 중심적인 역할을 한다. IRAK는 인터류킨-1 수용체 신호전달 경로 및 일부 톨-유사 수용체 신호전달 경로의 필수 구성요소이다. 톨-유사 수용체(TLR)는 특정 병원체-관련 분자 패턴(PAMP)을 인식함으로써 미생물을 검출하고 IL-1R 패밀리 구성원은 인터류킨-1(IL-1) 패밀리 사이토카인에 반응한다. 이들 수용체는 어댑터 단백질, 주로 MyD88을 통해 세포내 신호전달 캐스케이드를 개시한다.

[0112] IRAK 패밀리는 다양한 인간 면역 세포 유형에서 발견되는 IRAK-1, IRAK-2, 및 IRAK-4로 구성되며, IRAK-M(IRAK-3으로도 알려짐)은 발현이 단핵구 및 대식세포로 크게 제한된다. 모든 4개의 IRAK 패밀리 단백질은 N-말단 사멸 도메인(DD), ProST 도메인, 및 중앙에 위치한 키나제 도메인을 함유한다. IRAK-1, IRAK-2, 및 IRAK-M은 또한 C-말단 도메인을 포함한다. DD는 다른 DD-함유 단백질과 단백질-단백질 상호작용을 허용하는 플랫폼으로서 역할을 하며, 그 중 가장 중요한 것은 어댑터 단백질 골수 분화 인자 88(MyD88)이다. 본 발명자들은 IRAK 기능을 차단하는 것이 특정 면역 조절을 초래하는 TLR9 경로의 특정 차단을 초래해야 한다는 가설을 세웠다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 TLR9 경로를 차단하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 TLR9 기능을 차단한다.

[0113] 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 분해를 위해 IRAK 키나제를 E3 유티퀴틴 리가제로 동원하는 기능을 하는 이작용성 화합물이다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 IRAK 키나제의 표적화된 유티퀴틴화의 조절제이다.

[0114] 단백질 분해제는 3가지 성분을 포함하는 이작용성 화합물이다: 관심 표적 단백질에 대한 E3 유티퀴틴 리간드,

링커, 및 리간드. 이들은 E3 리가제와 표적 단백질 둘 모두에 동시에 결합함으로써 삼원 복합체의 형성을 유도한다. 삼원 복합체 형성은 E3 리가제를 효과적으로 동원하여 관심 표적을 폴리우비퀴틴화하여 프로테아좀에 의한 후속 분해를 유도한다. 분해제는 가역적이고 조정 가능한 방식으로 선택적 단백질 녹다운을 유도하는 데 사용하기 위한 매력적인 도구이다. 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 단백질 가수분해 표적화 키메라(PROTAC)이다.

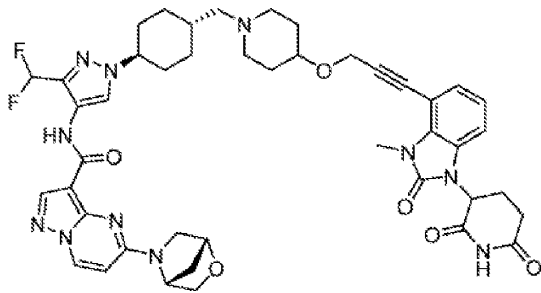
[0115] 일부 구현예에서, IRAK 분해제는 IRAK-1 분해제, IRAK-2 분해제, IRAK-M 분해제(또는 IRAK-3 분해제), 또는 IRAK-4 분해제이다.

[0116] 본 발명의 방법에 사용하기 위한 적합한 IRAK4 분해제 화합물은 특허 출원 WO2019/133531, WO2020/113233, WO2020/264490, WO 2021/127283, 또는 WO2021/011868에 기재되어 있다.

[0117] 일부 구현예에서, IRAK-4 분해제는 WO 2021/247899에 기재되어 있는, 5-((1R, 4R)-2-옥사-5-아자비사이클로[2.2.1]헵탄-5-일)-N-(3-(디플루오로메틸)-1-((1R, 4R)-4-((4-((3-(1-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-3-메틸-2-옥소-2,3-디하이드로-1H벤조[d]이미다졸-4-일)프로프-2-인-1-일)옥시)피페리딘-1-일)메틸)사이클로헥실)-1H-피라졸-4-일)피라졸로[1,5-a]피리미딘-3-카르복사미드 및 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다. 일부 구현예에서, IRAK-4 분해제는 결정질 형태의 5-((1R, 4R)-2-옥사-5-아자비사이클로[2.2.1]헵탄-5-일)-N-(3-(디플루오로메틸)-1-((1R, 4R)-4-((4-((3-(1-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-3-메틸-2-옥소-2,3-디하이드로-1H벤조[d]이미다졸-4-일)프로프-2-인-1-일)옥시)피페리딘-1-일)메틸)사이클로헥실)-1H-피라졸-4-일)피라졸로[1,5-a]피리미딘-3-카르복사미드 및 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다.

[0118] 일부 구현예에서, IRAK-4 분해제는 화학식 I의 화합물 또는 중수소화된 형태의 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염(WO 2021/247897에 기재됨)을 포함한다.

[0119] [화학식 I]



[0120] 화학식 I의 화합물은 5-((1R, 4R)-2-옥사-5-아자비사이클로[2.2.1]헵탄-5-일)-N-(3-(디플루오로메틸)-1-((1R, 4R)-4-((4-((3-(1-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-3-메틸-2-옥소-2,3-디하이드로-1H벤조[d]이미다졸-4-일)프로프-2-인-1-일)옥시)피페리딘-1-일)메틸)사이클로헥실)-1H-피라졸-4-일)피라졸로[1,5-a]피리미딘-3-카르복사미드이다.

[0122] **유전자 요법제**

[0123] 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법제에 대한 선천성 면역 반응을 저해함으로써 개선된 유전자 요법을 위해 유전자 요법제와 IRAK 분해제를 사용하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 유전자 요법제는 바이러스 입자 또는 지질 나노입자이다. 일부 구현예에서, 유전자 요법제는 아데노-연관 바이러스(AAV) 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, 또는 단순 헤르페스 바이러스(HAV) 입자이다. 일부 구현예에서, 유전자 요법제는 지질 나노입자 또는 리포솜이다. 일부 구현예에서, 유전자 요법제에 대한 면역 반응은 바이러스 입자에 대한 면역 반응이다(예를 들어, 바이러스 캡시드 단백질, 바이러스 외피 등). 일부 구현예에서, 유전자 요법제에 대한 면역 반응은 LNP에 대한 면역 반응이다(예를 들어, LNP를 생성하는 데 사용되는 하나 이상의 지질). 일부 구현예에서, 유전자 요법제에 대한 면역 반응은 유전자 요법 페이로드; 예를 들어, 치료용 트랜스진을 인코딩하는 핵산(바이러스 게놈, 플라스미드, 폐쇄 말단 DNA, mRNA, 안티센스 핵산, siRNA, shRNA 등)에 대한 면역 반응이다. 일부 구현예에서, 유전자 요법제에 대한 면역 반응은 트랜스진 산물(예를 들어, 치료용 폴리펩티드 또는 치료용 핵산)에 대한 면역 반응이다.

[0124] AAV

[0125] 일부 구현예에서, 본 발명은 개선된 유전자 요법을 위해 AAV 입자와 함께 IRAK 분해제를 사용하는 방법을 제공한다. 유전자 요법을 위한 AAV 입자에서, 이중성 핵산(예를 들어, 치료용 트랜스진)을 인코딩하는 제조합

AAV(rAAV) 계놈은 AAV 캡시드에 캡시드화된다. 일부 구현예에서, 바이러스 계놈은 이중성 핵산 및/또는 전사 방향으로 작동 가능하게 연결된 하기 성분들, 전사 개시 및 종결 서열을 포함하는 제어 서열 중 하나 이상을 포함하고, 이에 의해 발현 카세트를 형성한다.

[0126] 일부 구현예에서, rAAV 계놈은 하나 이상의 AAV 역 말단 반복부(ITR) 서열(전형적으로 2개의 AAV ITR 서열)을 포함한다. 예를 들어, 발현 카세트에는 5' 말단 및 3' 말단에서 적어도 하나의 기능적 AAV ITR 서열이 축적될 수 있다. "기능적 AAV ITR 서열"은 ITR 서열이 AAV 비리온의 회수, 복제, 및 패키징을 위해 의도된 바와 같이 기능함을 의미한다. 전체가 본원에 참조로 포함되는 문헌[Davidson *et al.*, *PNAS*, 2000, 97(7):3428-32]; 문헌[Passini *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):7034-40]; 및 문헌[Pechan *et al.*, *Gene Ther.*, 2009, 16:10-16]을 참조한다. 본 발명의 일부 양태를 실시하기 위해, 재조합 바이러스 계놈은 AAV 입자에 의한 감염을 위한 물리적 구조 및 AAV 캡시드화에 필수적인 AAV의 적어도 모든 서열을 포함한다. 본 발명의 벡터에서 사용하기 위한 AAV ITR은 야생형 뉴클레오티드 서열을 가질 필요가 없으며(예를 들어, 문헌[Kotin, *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5:793-801]에 기재된 바와 같음), 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 변경될 수 있거나, AAV ITR은 여러 AAV 혈청형 중 임의의 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 현재 40개가 넘는 AAV 혈청형이 알려져 있고, 새로운 혈청형 및 기존 혈청형의 변이체가 계속 확인되고 있다. 문헌[Gao *et al.*, *PNAS*, 2002, 99(18):11854-6; Gao *et al.*, *PNAS*, 2003, 100(10):6081-6]; 및 문헌[Bossis *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810]을 참조한다. 임의의 AAV 혈청형의 사용은 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV LK03, AAV2R471A, AAV DJ, AAV DJ8, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV ITR 등을 비제한적으로 포함하는 AAV 혈청형으로부터 유래되는 벡터이다. 일부 구현예에서, AAV 핵산(예를 들어, rAAV 벡터)은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV LK03, AAV2R471A, AAV DJ, AAV DJ8, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV ITR 등의 하나 이상(예를 들어, 일부 양태에서 2개)의 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 입자는 하나 이상의 AAV ITR이 축적된 이중성 트랜스진을 인코딩하는 AAV 벡터를 포함한다.

[0127] 일부 구현예에서, AAV 입자는 AAV1 캡시드, AAV2 캡시드, AAV3 캡시드, AAV4 캡시드, AAV5 캡시드, AAV6 캡시드, AAV7 캡시드, AAV8 캡시드, AAVrh8 캡시드, AAV9 캡시드, AAV10 캡시드, AAVrh10 캡시드, AAV11 캡시드, AAV12 캡시드, AAVrh32.33 캡시드, AAV-XL32 캡시드, AAV-XL32.1 캡시드, AAV LK03 캡시드, AAV2R471A 캡시드, AAV2/2-7m8 캡시드, AAV DJ 캡시드, AAV DJ8, AAV2 N587A 캡시드, AAV2 E548A 캡시드, AAV2 N708A 캡시드, AAV V708K 캡시드, 염소 AAV 캡시드, AAV1/AAV2 키메라 캡시드, 소 AAV 캡시드, 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1(키메라 AAV/인간 보카바이러스 바이러스 1), AAV2HBKO 캡시드, AAVPHP.B 캡시드 또는 AAVPHP.eB 캡시드, 또는 이의 기능적 변이체로부터 선택된 캡시드 단백질을 포함한다. AAV 캡시드의 "기능적 변이체"는 변이체 캡시드가 AAV 계놈을 패키징하여 감염성 AAV 비리온을 생성할 수 있음을 의미한다. 추가 구현예에서, rAAV 입자는 계통군 A 내지 F로부터의 AAV 혈청형의 캡시드 단백질을 포함한다.

[0128] 일부 양태에서, 본 발명은 재조합 자가 상보성 계놈(예를 들어, 자가-상보성 또는 자가-상보성 AAV 벡터)을 포함하는 AAV 입자를 제공한다. 자가-상보성 벡터 계놈을 갖는 AAV 바이러스 입자 및 자가-상보성 rAAV 계놈의 사용 방법은 각각 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 6,596,535; 7,125,717; 7,465,583; 7,785,888; 7,790,154; 7,846,729; 8,093,054; 및 8,361,457; 및 문헌[Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111]에 기재되어 있다. 자가-상보성 계놈을 포함하는 AAV 입자는 이의 부분적으로 상보성인 서열(예를 들어, 이중성 핵산의 상보성 코딩 및 비코딩 가닥)에 의해 이중 가닥 DNA 분자를 신속히 형성할 것이다. 일부 구현예에서, 벡터는 이중성 핵산을 인코딩하는 제1 핵산 서열 및 핵산의 상보체를 인코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하며, 제1 핵산 서열은 이의 길이 대부분 또는 전부를 따라 제2 핵산 서열과 가닥내 염기쌍을 형성할 수 있다.

[0129] 일부 구현예에서, 제1 이중성 핵산 서열과 제2 이중성 핵산 서열은 돌연변이 ITR(예컨대, 우측 ITR)에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, ITR은 폴리뉴클레오티드 서열 5'-CACTCCCTCTCTGCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAGTTCGCCACGCCGGGCTTTGCCGGGCG-3'(SEQ ID NO:1)를 포함한다. 돌연변이 ITR은 말단 분해 서열을 포함하는 D 영역의 결실을 포함한다. 결과적으로, rAAV 계놈의 복제 시, rep 단백질은 돌연변이 ITR에서 바이러스 계놈을 절단하지 못할 것이고, 따라서, 5'에서 3'의 순서로 다음을 포함하는 재조합 바이러스 계놈이 바이러스 캡시드에 패키징될 것이다: AAV ITR, 조절 서열을 포함하는 제1 이중성 폴리뉴클레오티드 서열, 돌연변이 AAV ITR, 제1 이중성 폴리뉴클레오티드에 대해 역방향의 제2 이중성 폴리뉴클레오티드, 및 제3 AAV ITR.

[0130] 특정 표적 세포의 형질도입을 최적화하거나 특정 표적 조직(예를 들어, 이환된 조직) 내의 특이적 세포 유형을

표적화하기 위해 상이한 AAV 혈청형이 사용된다. AAV 입자는 동일 혈청형 또는 혼합 혈청형의 바이러스 단백질 및 바이러스 핵산을 포함할 수 있다. 예를 들어, AAV 입자는 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된 캡시드 및 하나 이상의 ITR을 함유할 수 있거나, AAV 입자는 AAV 입자의 캡시드와 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된 하나 이상의 ITR을 함유할 수 있다.

[0131] 일부 구현예에서, AAV 캡시드는 돌연변이를 포함하며, 예를 들어, 캡시드는 돌연변이체 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 돌연변이는 티로신 돌연변이 또는 헤파린 결합 돌연변이이다. 일부 구현예에서, 돌연변이 캡시드 단백질은 AAV 캡시드를 형성하는 능력을 유지한다. 일부 구현예에서, AAV 입자는 AAV2 또는 AAV5 티로신 돌연변이 캡시드(예를 들어, 문헌[Zhong L. *et al.*, (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(22):7827-7832] 참조), 예컨대, Y444 또는 Y730에서의 돌연변이(AAV2에 따른 넘버링)를 포함한다. 추가 구현예에서, AAV 입자는 계통군 A 내지 F로부터의 AAV 혈청형의 캡시드 단백질을 포함한다(Gao, *et al.*, *J. Virol.* 2004, 78(12):6381).

[0132] 형질감염, 안정적인 세포주 생성, 및 아데노바이러스-AAV 하이브리드, 헤르페스바이러스-AAV 하이브리드 (Conway, JE *et al.*, (1997) *J. Virology* 71(11):8780-8789), 및 배콜로바이러스-AAV 하이브리드(Urabe, M. *et al.*, (2002) *Human Gene Therapy* 13(16):1935-1943; Kotin, R. (2011) *Hum Mol Genet.* 20(R1): R2-R6)를 포함한 감염성 하이브리드 바이러스 생성 시스템을 비롯해, 유전자 요법을 위한 AAV 입자의 생성을 위한 다수의 방법이 당업계에 알려져 있다. AAV 입자 생성을 위한 AAV 생성 배양은 1) 적합한 숙주 세포, 2) 적합한 헬퍼 바이러스 기능, 3) AAV rep 및 cap 유전자 및 유전자 산물, 4) 적어도 하나의 AAV ITR 서열이 측점된 핵산(예컨대, 치료용 핵산), 및 5) AAV 생성을 지원하기에 적합한 배지 및 배지 성분을 모두 필요로 한다. 일부 구현예에서, 적합한 숙주 세포는 영양류 숙주 세포이다. 일부 구현예에서, 적합한 숙주 세포는 인간 유래 세포주, 예컨대 HeLa, A549, 293, 또는 Perc.6 세포이다. 일부 구현예에서, 적합한 헬퍼 바이러스 기능은 야생형 또는 돌연변이 아데노바이러스(예컨대, 감온성 아데노바이러스), 헤르페스 바이러스(HSV), 배콜로바이러스, 또는 헬퍼 기능을 제공하는 플라스미드 작제물에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, AAV rep 및 cap 유전자 산물은 임의의 AAV 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 절대적이진 않지만, 일반적으로 AAV rep 유전자 산물은 rep 유전자 산물이 rAAV 계놈의 복제 및 패키징 기능을 할 수 있는 한, rAAV 벡터 계놈의 ITR과 동일한 혈청형을 갖는다. 당업계에 알려진 적합한 배지를 AAV 입자의 생성에 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 기능은 아데노바이러스 또는 HSV에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 기능은 배콜로바이러스에 의해 제공되며, 숙주 세포는 곤충 세포(예를 들어, 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)(Sf9) 세포)이다.

[0133] AAV 입자를 생성하는 한 가지 방법은 삼중 형질감염 방법이다. 간략히, 헬퍼 아데노바이러스 플라스미드와 함께, rep 유전자 및 캡시드 유전자를 함유하는 플라스미드가 (예를 들어, 인산칼슘 방법을 사용하여) 세포주(예를 들어, HEK-293 세포)에 형질감염될 수 있고, 바이러스가 수집되고 선택적으로 정제될 수 있다. 이와 같이, 일부 구현예에서, AAV 입자는 AAV 벡터를 인코딩하는 핵산, AAV rep 및 cap을 인코딩하는 핵산, 및 AAV 헬퍼 바이러스 기능을 인코딩하는 핵산을 숙주 세포에 삼중 형질감염시켜 생성되었으며, 핵산을 숙주 세포에 형질감염시키면 AAV 입자를 생성할 수 있는 숙주 세포가 생성된다.

[0134] 일부 구현예에서, AAV 입자는 생산자 세포주 방법에 의해 생성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Martin *et al.*, (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269]; 미국 PG 공개 번호 US2004/0224411; 및 문헌[Liu, X.L. *et al.* (1999) *Gene Ther.* 6:293-299] 참조). 간략히, 세포주(예를 들어, HeLa, 293, A549, 또는 Perc.6 세포주)는 rep 유전자, 캡시드 유전자, 및 프로모터-이종성 핵산 서열을 포함하는 벡터 계놈을 함유하는 플라스미드로 안정적으로 형질감염될 수 있다. 세포주는 AAV 생성을 위한 선도 클론을 선택하기 위해 스크리닝될 수 있고, 이어서 생성 생물반응기로 확장되고 헬퍼 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 또는 HSV)로 감염되어 AAV 생성을 개시할 수 있다. 이후 바이러스는 수확될 수 있고, 아데노바이러스가 (예를 들어, 열에 의해) 불활성화되고/불활성화되거나 제거될 수 있고, AAV 입자가 정제될 수 있다. 이와 같이, 일부 구현예에서, rAAV 계놈을 인코딩하는 핵산, AAV rep 및 cap을 인코딩하는 핵산, 및 AAV 헬퍼 바이러스 기능을 인코딩하는 핵산 중 하나 이상을 포함하는 생산자 세포주에 의해 AAV 입자를 생성하였다.

[0135] 일부 구현예에서, AAV rep 및 cap 유전자를 인코딩하는 핵산 및/또는 AAV 바이러스 계놈은 생산자 세포주에서 안정적으로 유지된다. 일부 구현예에서, AAV rep 및 cap 유전자를 인코딩하는 핵산 및/또는 rAAV 계놈은 하나 이상의 플라스미드 상에서 세포주에 도입되어 생산자 세포주를 생성한다. 일부 구현예에서, AAV rep, AAV cap, 및 AAV 계놈은 동일한 플라스미드 상에서 세포에 도입된다. 다른 구현예에서, AAV rep, AAV cap, 및 rAAV 계놈은 상이한 플라스미드 상에서 세포에 도입된다. 일부 구현예에서, 플라스미드를 사용하여 안정적으로 형질감염된 세포주는 세포주의 다회 계대(예를 들어, 세포의 5, 10, 20, 30, 40, 50회, 또는 50회 초과 계대)를 위해 플

라스미드를 유지한다. 예를 들어, 플라스미드(들)는 세포가 복제함에 따라 복제될 수 있거나, 플라스미드(들)는 세포 계능에 통합될 수 있다. 플라스미드가 세포(예를 들어, 인간 세포)에서 자체적으로 복제할 수 있도록 하는 다양한 서열이 확인되었다(예를 들어, 문헌[Krysan, P.J. *et al.* (1989) *Mol. Cell Biol.* 9:1026-1033] 참조). 일부 구현예에서, 플라스미드(들)는 플라스미드를 유지하는 세포의 선택을 가능하게 하는 선별 마커(예를 들어, 항생제 내성 마커)를 포함할 수 있다. 포유류 세포에서 일반적으로 사용되는 선별 마커는 블라스티딘, G418, 하이그로마이신 B, 제오신, 퓨로마이신, 및 이들의 유도체를 제한 없이 포함한다. 세포에 핵산을 도입하는 방법은 당업계에 알려져 있으며, 바이러스 형질도입, 양이온성 형질감염(예를 들어, DEAE-텍스트란과 같은 양이온성 폴리머, 또는 리포펙타민과 같은 양이온성 지질을 사용), 인산칼슘 형질감염, 미량주사, 입자 폭격, 전기천공, 및 나노입자 형질감염을 제한 없이 포함한다(더 자세한 내용에 대해, 예를 들어, 문헌[Kim, T.K. and Eberwine, J.H. (2010) *Anal. Bioanal. Chem.* 397:3173-3178] 참조).

[0136] 일부 구현예에서, 생산자 세포주는 영장류 세포주(예를 들어, Vero 또는 FRhL-2 세포주와 같은 비인간 영장류 세포주)로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 세포주는 인간 세포주로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 생산자 세포주는 HeLa, 293, A549, 또는 PERC.6®(Cruce11) 세포주로부터 유래된다. 예를 들어, 생산자 세포주를 생성하기 위해 AAV rep 및 cap 유전자를 인코딩하는 핵산 및/또는 rAAV 계능을 세포주에 도입하고/하거나 안정적으로 유지/통합하기 전에, 세포주는 HeLa, 293, A549, 또는 PERC.6®(Cruce11) 세포주, 또는 이들의 유도체이다.

[0137] 일부 구현예에서, 생산자 세포주는 현탁액에서의 성장에 적합하다. 당업계에 알려진 바와 같이, 부착-의존적 세포는 일반적으로 마이크로캐리어 비드와 같은 기질 없이는 현탁액에서 성장할 수 없다. 세포주가 현탁액에서 성장하도록 설계하는 것은, 예를 들어 교반 패들을 갖춘 회전 배양에서의 세포주 성장, 응집을 방지하기 위해 칼슘 및 마그네슘 이온이 없는 배양 배지(및 선택적으로 소포제)의 사용, 실리콘화 화합물로 코팅된 배양 용기의 사용, 및 각 계대에서 (큰 덩어리나 용기 측면이 아닌) 배양물에서의 세포 선택을 포함할 수 있다.

[0138] 본 발명의 AAV 입자는 생성 배양물의 숙주 세포의 용해 또는 생성 배양물로부터 소모된 배지의 수확에 의해 AAV 생성 배양물로부터 수확될 수 있으나, 단, 상기 세포는 미국 특허 번호 제6,566,118호에 더욱 충분히 기재된 바와 같이 온전한 세포로부터 배지로 AAV 입자를 방출시키도록 하는 당업계에 알려진 조건에서 배양된다. 또한, 세포를 용해하는 적합한 방법은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, 다수의 동결/해동 사이클, 초음파처리, 미세유체화, 및 화학물질, 예컨대 세제 및/또는 프로테아제를 이용한 처리를 포함한다.

[0139] 추가 구현예에서, AAV 입자는 정제된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "정제"는 AAV 입자가 자연 발생하는 장소나 최초 제조된 장소에 또한 존재할 수 있는 다른 성분 중 적어도 일부가 없는 AAV 입자의 제제를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 단리된 AAV 입자는 배양 용해물 또는 생성 배양 상청액과 같은 공급원 혼합물로부터 상기 입자를 농축시키는 정제 기법을 이용하여 제조될 수 있다. 농축은, 예를 들어, 용액 내에 존재하는 DNase-저항성 입자(DRP) 또는 계능 카피(gc)의 비율, 또는 감염력에 의해서와 같이 다양한 방법으로 측정될 수 있거나, 생성 배양 오염물 또는, 헬퍼 바이러스, 배지 성분 등을 비롯한 공정 중 오염물을 포함하는 오염물과 같은, 공급원 혼합물에 존재하는 제2의 잠재적 간섭 물질과 관련하여 측정될 수 있다.

[0140] 일부 구현예에서, AAV 생성 배양 수확물은 숙주 세포 파편을 제거하기 위해 정화된다. 일부 구현예에서, 생성 배양 수확물은, 예를 들어 등급 DOHC Millipore Millistak+ HC Pod 필터, 등급 A1HC Millipore Millistak+ HC Pod 필터, 및 0.2 μm Filter Opticap XL10 Millipore Express SHC 친수성 막 필터를 포함하는 일련의 심층 필터를 통한 여과에 의해 정화된다. 정화는 또한 당업계에 공지된 다양한 다른 표준 기법, 예를 들어, 원심분리 또는 당업계에 공지된 0.2 μm 이상의 포어 크기의 임의의 셀룰로스 아세테이트 필터를 통한 여과에 의해 달성될 수 있다.

[0141] 일부 구현예에서, AAV 생성 배양물 수확물은 생성 배양물에 존재하는 임의의 고분자량 DNA를 분해하기 위해 Benzonase® 로 추가로 처리된다. 일부 구현예에서, Benzonase® 분해는, 예를 들어, 30분 내지 수시간의 기간 동안 주위 온도 내지 37°C의 온도에서 1 내지 2.5 단위/ml의 최종 농도의 Benzonase®을 포함하는 당업계에 공지된 표준 조건 하에서 수행된다.

[0142] AAV 입자는 다음 정제 단계 중 하나 이상을 이용하여 단리되거나 정제될 수 있다: 평형 원심분리; 플로우-쓰루 음이온 교환 여과; AAV 입자의 농축을 위한 접선류 여과(TFF); 아파타이트 크로마토그래피에 의한 AAV 포획; 헬퍼 바이러스의 열 불활성화; 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의한 AAV 포획; 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 완충액 교환; 나노여과; 및 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 또는 친화성 크로마토그래피에 의한 AAV 포획. 이들 단계는 단독으로, 다양한 조합으로, 또는 다양한 순서로 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 하기 기술된 순서대로 모든 단계를 포함한다. AAV 입자의 정제 방법은, 예

를 들어 문헌[Xiao *et al.*, (1998) *Journal of Virology* 72:2224-2232]; 미국 특허 제6,989,264호 및 미국 특허 제8,137,948호; 및 WO 2010/148143에서 발견된다.

[0143] 아데노바이러스

[0144] 일부 구현예에서, 본 발명은 개선된 유전자 요법을 위해 아데노바이러스 입자와 함께 IRAK 분해제를 사용하는 방법을 제공한다. 유전자 요법을 위한 아데노바이러스 벡터는 전형적으로 아데노바이러스 캡시드 내로 캡시드화된 2개의 아데노바이러스 ITR 사이에 하나 이상의 이중성 서열(즉, 아데노바이러스 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 재조합 아데노바이러스(rAd) 게놈을 갖는 아데노바이러스 입자이다. 일부 구현예에서, 이중성 서열은 치료용 트랜스진을 인코딩한다. 일부 구현예에서, rAd 게놈에는 하나 이상의 E1 유전자가 없거나 결함이 있는 카피를 함유하며, 이는 아데노바이러스를 복제-결손으로 만든다. 아데노바이러스는 큰(약 950 Å), 외피 비보유 정20면체 캡시드 내에 선형, 이중 가닥 DNA 게놈을 포함한다. 아데노바이러스는 30 kb 초과인 이중성 서열(예를 들어, E1 및/또는 E3 영역 대신) 혼입할 수 있는 큰 게놈을 가져서, 이들을 더 큰 이중성 유전자의 이용에 독특하게 적합하도록 만든다. 이들은 또한 분열 및 비-분열 세포를 감염시키는 것으로 알려져 있으며, 숙주 게놈 내로 자연 통합되지 않는다(그러나 하이브리드 변이체는 상기 능력을 보유할 수 있음). 일부 구현예에서, 아데노바이러스 벡터는 E1 대신 이중성 서열을 가지는 1세대 아데노바이러스 벡터일 수 있다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 벡터는 E2A, E2B, 및/또는 E4에 추가 돌연변이 또는 결실을 가지는 2세대 아데노바이러스 벡터일 수 있다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 벡터는 모든 바이러스 코딩 유전자가 결여되고 ITR 및 패키징 신호만 보유하고 복제 및 패키징을 위해 트랜스로 헬퍼 아데노바이러스를 필요로 하는 제3 세대 또는 gut화(gutted) 아데노바이러스 벡터일 수 있다. 아데노바이러스 입자는 포유류 세포의 일시적 형질감염을 위한 벡터뿐만 아니라 유전자 요법 벡터로서의 사용을 위해 연구되었다. 추가 설명에 대해서는, 예를 들어, 문헌 [Danthinne, X. and Imperiale, M.J. (2000) *Gene Ther.* 7:1707-14 and Tatsis, N. and Ertl, H.C. (2004) *Mol. Ther.* 10:616-29]을 참조한다.

[0145] 일부 구현예에서, 아데노바이러스 입자는 치료용 트랜스진을 포함하는 rAd 게놈을 포함한다. 임의의 아데노바이러스 혈청형의 사용은 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 입자는 비제한적으로 AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu5, AdHu7, AdHu11, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad, 및 돼지 Ad 3형을 포함하는 아데노바이러스 혈청형으로부터 유래된다. 아데노바이러스 입자는 또한 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 아데노바이러스 입자는 하나 이상의 외래 바이러스 캡시드 단백질을 포함한다. 이러한 조합은 위형화 아데노바이러스 입자로 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, 위형화 아데노바이러스 입자에서 사용되는 외래 바이러스 캡시드 단백질은 외래 바이러스로부터 또는 또 다른 아데노바이러스 혈청형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 외래 바이러스 캡시드 단백질은 비제한적으로 레오바이러스 3형을 포함하는 바이러스로부터 유래된다. 위형화 아데노바이러스 입자에 사용되는 벡터와 캡시드 단백질 조합의 예는 다음 참고문헌(문헌[Tatsis, N. *et al.* (2004) *Mol. Ther.* 10(4):616-629] 및 문헌[Ahi, Y. *et al.* (2011) *Curr. Gene Ther.* 11(4):307-320]에서 찾아볼 수 있다. 상이한 아데노바이러스 혈청형이 특정한 표적 세포의 형질도입을 최적화하거나 특정한 표적 조직(예를 들어, 이환된 조직) 내에서 특정 세포 유형을 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 특정한 아데노바이러스 혈청형에 의해 표적화되는 조직 또는 세포는 비제한적으로, 폐(예를 들어, HuAd3), 비장 및 간(예를 들어, HuAd37), 평활근, 활막세포, 수지상세포, 심혈관 세포, 종양 세포주(예를 들어, HuAd11) 및 수지상세포(예를 들어, 레오바이러스 3형으로 위형화된 HuAd5, HuAd30, 또는 HuAd35)를 포함한다. 추가 설명에 대해서는, 문헌 [Ahi, Y. *et al.* (2011) *Curr. Gene Ther.* 11(4):307-320, Kay, M. *et al.* (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40], 및 문헌[Tatsis, N. *et al.* (2004) *Mol. Ther.* 10(4):616-629]을 참조한다.

[0146] 아데노바이러스 벡터 입자의 생성을 위해 여러 방법이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, gut화 아데노바이러스 벡터에 있어서, 아데노바이러스 벡터 게놈 및 헬퍼 아데노바이러스 게놈이 패키징 세포주(예를 들어, 293 세포주)로 형질감염될 수 있다. 일부 구현예에서, 헬퍼 아데노바이러스 게놈은 이의 패키징 신호에 특화된 재조합 부위를 함유할 수 있고, 두 게놈 모두는 재조합효소(예를 들어, Cre/loxP 시스템이 사용될 수 있음)를 발현하는 패키징 세포주 내로 형질감염될 수 있어서, 관심 아데노바이러스 벡터는 헬퍼 아데노바이러스보다 더 효율적으로 패키징된다(예를 들어, 문헌[Alba, R. *et al.* (2005) *Gene Ther.* 12 Suppl 1:S18-27] 참조). 아데노바이러스 벡터는, 본원에 기재된 바와 같은, 표준 방법을 사용해서 수확되고 정제될 수 있다.

[0147] 렌티바이러스

[0148] 일부 구현예에서, 본 발명은 개선된 유전자 요법을 위해 렌티바이러스 입자와 함께 IRAK 분해제를 사용하는 방

법을 제공한다. 유전자 요법을 위한 렌티바이러스 벡터는 전형적으로 2개의 긴 말단 반복부(LTR) 사이에 하나 이상의 이중성 서열(즉, 렌티바이러스 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 재조합 렌티바이러스 게놈을 갖는 렌티바이러스 입자이다. 일부 구현예에서, 이중성 서열은 치료용 트랜스젠을 인코딩한다. 렌티바이러스는 약 10 kb의 게놈을 가지는 포지티브-센스, ssRNA 레트로바이러스이다. 렌티바이러스는 분열 및 비-분열 세포의 게놈 내로 통합한다. 렌티바이러스 입자는, 예를 들어, 패키징 세포주 내로 여러 플라스미드(전형적으로 렌티바이러스 게놈 및 복제 및/또는 패키징을 위해 요구되는 유전자는 바이러스 복제를 방지하기 위해 분리됨)를 형질감염 시킴으로써, 변형된 렌티바이러스 게놈을 렌티바이러스 입자 내로 패키징하여 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 입자는 외피 단백질이 없는 1세대 벡터를 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 입자는 gag/pol 및 tat/rev 영역을 제외한 모든 유전자가 없는 2세대 벡터를 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 입자는 내인성 rev, gag, 및 pol 유전자만을 함유하며 tat 유전자 없이 형질도입을 위한 키메라 LTR을 가지는 3세대 벡터를 지칭할 수 있다(문헌[Dull, T. *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:8463-71] 참조). 추가의 설명에 대해서는, 문헌[Durand, S. and Cimarelli, A. (2011) *Viruses* 3:132-59]을 참조한다.

[0149] 임의의 렌티바이러스 벡터의 사용은 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 비제한적으로 인간 면역결핍 바이러스-1(HIV-1), 인간 면역결핍 바이러스-2(HIV-2), 시미안 면역결핍 바이러스(SIV), 고양이 면역결핍 바이러스(FIV), 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV), 소 면역결핍 바이러스(BIV), 켈브라나(Jembrana)병 바이러스(JDV), 비스나 바이러스(VV), 및 염소 관절염 뇌염 바이러스(CAEV)를 포함하는 렌티바이러스로부터 유래된다. 렌티바이러스 입자는 또한 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 입자는 하나 이상의 외래 바이러스 캡시드 단백질을 포함한다. 이러한 조합은 위형화 렌티바이러스 입자로 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, 위형화 렌티바이러스 입자에서 사용되는 외래 바이러스 캡시드 단백질은 외래 바이러스로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 위형화 렌티바이러스 입자에서 사용되는 외래 바이러스 캡시드 단백질은 수포성 구내염 바이러스 당단백질(VSV-GP)이다. VSV-GP는 도처의 세포 수용체와 상호작용하여, 위형화 렌티바이러스 입자에 대해 광범위 조직 친화성을 제공한다. 또한, VSV-GP는 위형화 렌티바이러스 입자에 더 높은 안정성을 제공하는 것으로 여겨진다. 다른 구현예에서, 외래 바이러스 캡시드 단백질은 비제한적으로 찬디푸라(Chandipura) 바이러스, 광견병 바이러스, 모콜라(Mokola) 바이러스, 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 신드비스 바이러스, 샘리키 포레스트 바이러스(SFV), 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 에볼라 바이러스 레스톤(Reston), 에볼라 바이러스 자이레(Zaire), 마르부르크 바이러스, 라싸 바이러스, 조류 백혈증 바이러스(ALV), 야그지엑테(Jaagsiekte) 양 레트로바이러스(JSRV), 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MLV), 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스(GALV), 고양이 내인성 레트로바이러스(RD114), 인간 T-림프친화 바이러스 1(HTLV-1), 인간 거품형성 바이러스, 매디-비스나(Maedi-visna) 바이러스(MVV), SARS-CoV, 센다이(Sendai) 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스(RSV), 인간 파라인플루엔자 바이러스 3형, C형 간염 바이러스(HCV), 인플루엔자 바이러스, 조류 흑사병 바이러스(FPV), 또는 오토그라파 캘리포니카 다중 핵다면체 바이러스(AcmNPV)를 포함하는 것으로부터 유래된다. 위형화 렌티바이러스 입자에 사용되는 벡터와 캡시드 단백질 조합의 예는, 예를 들어, 문헌[Cronin, J. *et al.* (2005). *Curr. Gene Ther.* 5(4):387-398]에서 찾아볼 수 있다. 상이한 위형화 렌티바이러스 입자가 특정한 표적 세포의 형질도입을 최적화하거나 특정한 표적 조직(예를 들어, 이환된 조직) 내에서 특정 세포 유형을 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 특이적 위형화 렌티바이러스 입자에 의해 표적화되는 조직은 비제한적으로 간(예를 들어, VSV-G, LCMV, RRV, 또는 SeV F 단백질로 위형화됨), 폐(예를 들어, 에볼라, 마르부르크, SeV F 및 HN, 또는 JSRV 단백질로 위형화됨), 췌장 섬 세포(예를 들어, LCMV 단백질로 위형화됨), 중추 신경계(예를 들어, VSV-G, LCMV, 광견병 또는 모콜라 단백질로 위형화됨), 망막(예를 들어, VSV-G 또는 모콜라 단백질로 위형화됨), 단핵구 또는 근육(예를 들어, 모콜라 또는 에볼라 단백질로 위형화됨), 조혈계(예를 들어, RD114 또는 GALV 단백질로 위형화됨), 또는 암 세포(예를 들어, GALV 또는 LCMV 단백질로 위형화됨)를 포함한다. 추가 설명에 대해서는, 문헌[Cronin, J. *et al.* (2005). *Curr. Gene Ther.* 5(4):387-398] 및 문헌[Kay, M. *et al.* (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40]을 참조한다.

[0150] 렌티바이러스 입자의 생성을 위해 여러 방법이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 3세대 렌티바이러스 벡터에 있어서, gag 및 pol 유전자와 함께 관심 재조합 렌티바이러스 게놈을 함유하는 벡터가 rev 유전자를 함유하는 벡터와 함께 패키징 세포주(예를 들어, 293 세포주)로 공동-형질감염될 수 있다. 관심 재조합 렌티바이러스 게놈은 또한 Tat의 부재 하에 전사를 촉진하는 키메라 LTR을 함유한다(문헌[Dull, T. *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:8463-71] 참조). 렌티바이러스 벡터는 본원에 기재되는 방법(예를 들어, 문헌[Segura MM, *et al.*, (2013) *Expert Opin Biol Ther.* 13(7):987-1011]을 이용하여 수확되고 정제될 수 있다.

[0151] HSV

- [0152] 일부 구현예에서, 본 발명은 개선된 유전자 요법을 위해 HSV 입자와 함께 IRAK 분해제를 사용하는 방법을 제공한다. 유전자 요법을 위한 HSV 벡터는 전형적으로 2개의 말단 반복부(TR) 사이에 하나 이상의 이중성 서열(즉, HSV 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 재조합 HSV 게놈을 갖는 HSV 입자이다. 일부 구현예에서, 이중 서열은 치료용 트랜스진을 인코딩한다. HSV는 약 152 kb의 게놈을 갖는, 외피보유, 이중 가닥 DNA 바이러스이다. 유리하게는, 유전자의 약 절반이 비필수적이며, 이중성 서열을 수용하기 위해 결실될 수 있다. HSV 입자는 비분열 세포를 감염시킨다. 또한, 이들은 자연적으로 뉴런에서 잠복기를 확립하며, 역행 수송에 의해 이동하고, 시냅스를 통과해서 전달될 수 있어서, 이들을 뉴런의 형질감염 및/또는 신경계가 관여되는 유전자 요법 접근에 유리하게 만든다. 일부 구현예에서, HSV 입자는 복제-결합될 수 있거나 복제-적격(예를 들어, 하나 이상의 후기 유전자의 불활성화를 통해 단회 복제 사이클에 적격)일 수 있다. 추가의 설명에 대해서는, 문헌[Manservigi, R. *et al.* (2010) *Open Virol. J.* 4:123-56]을 참조한다.
- [0153] 일부 구현예에서, HSV 입자는 트랜스진을 포함하는 재조합 HSV 게놈을 포함한다. 임의의 HSV 벡터의 사용은 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, HSV 벡터는 비제한적으로, HSV-1 및 HSV-2를 포함하는 HSV 혈청형으로부터 유래된다. HSV 입자는 또한 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, HSV 입자는 하나 이상의 외래 바이러스 캡시드 단백질을 포함한다. 이러한 조합은 위형화 HSV 입자로 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, 위형화 HSV 입자에서 사용되는 외래 바이러스 캡시드 단백질은 외래 바이러스로부터 또는 또 다른 HSV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 위형화 HSV 입자에서 사용되는 외래 바이러스 캡시드 단백질은 수포성 구내염 바이러스 당단백질(VSV-GP)이다. VSV-GP는 도처의 세포 수용체와 상호작용하여, 위형화 HSV 입자에 대해 광범위 조직 친화성을 제공한다. 또한, VSV-GP는 위형화 HSV 입자에 더 높은 안정성을 제공하는 것으로 여겨진다. 다른 구현예에서, 외래 바이러스 캡시드 단백질은 상이한 HSV 혈청형에서 유래될 수 있다. 예를 들어, HSV-1 벡터는 하나 이상의 HSV-2 캡시드 단백질을 함유할 수 있다. 상이한 HSV 혈청형이 특정한 표적 세포의 형질도입을 최적화하거나 특정한 표적 조직(예를 들어, 이환된 조직) 내에서 특정 세포 유형을 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 특정 아데노바이러스 혈청형에 의해 표적화되는 조직 또는 세포는 비제한적으로 중추 신경계 및 뉴런(예를 들어, HSV-1)을 포함한다. 추가의 설명에 대해서는, 문헌[Manservigi, R. *et al.* (2010) *Open Virol J* 4:123-156], 문헌[Kay, M. *et al.* (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40], 및 문헌[Meignier, B. *et al.* (1987) *J. Infect. Dis.* 155(5):921-930]을 참조한다.
- [0154] HSV 입자의 생성을 위해 여러 방법이 당업계에 알려져 있다. HSV 벡터는 본원에 기재되는 것들과 같은, 표준 방법을 사용해서 수확되고 정제될 수 있다. 예를 들어, 복제-결합성 HSV 벡터의 경우, 최조기(IE) 유전자가 모두 결여된 관심 HSV 게놈이, 바이러스 생성에 필요한 유전자, 예컨대 ICP4, ICP27 및 ICP0을 제공하는 상보적 세포주 내에 형질감염될 수 있다(예를 들어, 문헌[Samaniego, L.A. *et al.* (1998) *J. Virol.* 72:3307-20] 참조). HSV 벡터는 기재된 방법(예를 들어, 문헌[Goins, WF *et al.*, (2014) *Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology* 1144:63-79])을 사용하여 수확되고 정제될 수 있다.
- [0155] *비바이러스 유전자 요법제*
- [0156] 일부 구현예에서, 본 발명은 유전자 요법을 위한 비-바이러스 유전자 전달 방법과 함께 IRAK 분해제를 사용하는 방법을 제공한다. 비바이러스 벡터 전달 시스템은 DNA 플라스미드, 조작되지 않은 핵산, 및 전달 시스템에 복합된 핵산을 포함한다. 예를 들어, 벡터는 지질(예를 들어, 양이온성 또는 중성 지질), 리포솜, 다가양이온, 지질 나노입자, 또는 핵산의 세포내 흡수 향상시키는 제제와 복합체화될 수 있다. 핵산은 본원에 기재된 전달 방법 중 임의의 방법에 적합한 제제와 복합체화될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산은 치료용 트랜스진을 인코딩한다.
- [0157] 유전자 요법을 위한 지질 나노입자는 전형적으로 지질 입자에 캡슐화된 벡터 게놈 또는 지질과 복합체화된 벡터 게놈을 포함한다. 일부 구현예에서, 이중성 서열은 치료용 트랜스진을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 벡터 게놈은 리포플렉스 나노입자 또는 리포솜으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 유전자 요법제를 위한 리포플렉스 나노입자 제형은 합성 양이온성 지질 (R)-N,N,N-트리메틸-2,3-디올레옥시-1-염화프로판아미늄(DOTMA) 및 인지질 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE)을 포함한다. 일부 구현예에서, DOTMA/DOPE 리포솜 성분은 개체에서 세포의 전달 및 표적화에 최적화된다.
- [0158] 일부 구현예에서, 벡터 게놈을 포함하는 핵산은, 예를 들어, (R)-N,N,N-트리메틸-2,3-디올레옥시-1-프로판아미늄 클로라이드(DOTMA) 및 인지질 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE)을 포함하는 하나 이상의 양이온성 지질을 포함하는 약학적 조성물과 혼합된다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 적어도 하나의 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 적어도 하나의 양이온성 지질을 포함한다. 양이온성 지질은 단일양이온성 또는 다양이온성일 수 있다. 임의의 양이온성 양친유성 분자, 예를 들어, 적어도 하나의 친수성

및 친유성 모이어티를 포함하는 분자는 본 발명의 의미 내의 양이온성 지질이다. 일부 구현예에서, 양전하는 적어도 하나의 양이온성 지질에 의해 기여되고, 음전하는 핵산에 의해 기여된다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 적어도 하나의 헬퍼 지질을 포함한다. 헬퍼 지질은 중성 또는 음이온성 지질일 수 있다. 헬퍼 지질은 천연 지질, 예컨대, 인지질 또는 천연 지질의 유사체, 또는 완전 합성 지질, 또는 천연 지질과 유사성이 없는 지질-유사 분자일 수 있다. 일 구현예에서, 양이온성 지질 및/또는 헬퍼 지질은 이중층 형성 지질이다. 헬퍼 지질의 예는 1,2-디-(9Z-옥타데세노일)-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE) 또는 이의 유사체 또는 유도체, 콜레스테롤(Chol) 또는 이의 유사체 또는 유도체 및/또는 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DOPC) 또는 이의 유사체 또는 유도체를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0159] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 양이온성 지질 대 적어도 하나의 헬퍼 지질의 몰비는 10:0 내지 3:7, 바람직하게는 9:1 내지 3:7, 4:1 내지 1:2, 4:1 내지 2:3, 7:3 내지 1:1, 또는 2:1 내지 1:1, 바람직하게는 약 1:1이다. 일부 구현예에서, 이 비율에서, 양이온성 지질의 몰량은 양이온성 지질의 몰량에 양이온성 지질 내 양전하의 수를 곱한 결과이다.

[0160] 일부 구현예에서, 지질은 벡터 계능을 캡슐화하는 소포에 포함된다. 소포는 다층 소포, 단층 소포, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 소포는 리포솜일 수 있다.

[0161] 벡터 계능

[0162] 일부 구현예에서, 본 발명은 개체에서 요망되는 표적으로의 치료용 트랜스진의 전달을 위해 유전자 요법제와 함께 IRAK 분해제를 사용하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 유전자 요법제는 개체의 요망되는 표적에서 치료용 트랜스진의 전달 및 발현을 위한 벡터 계능을 포함한다.

[0163] 본 발명은 바이러스 입자(바이러스 유전자 요법제를 위한)로 패키징하기 위해 치료용 폴리펩티드 및/또는 핵산을 인코딩하는 하나 이상의 핵산 서열의 도입을 위한 유전자 요법제의 용도를 고려한다. 벡터 계능은 치료용 폴리펩티드 및/또는 핵산의 발현을 확립하기 위한 임의의 요소, 예를 들어 프로모터, 본 개시의 ITR, 리보솜 결합 요소, 종결부위, 인핸서, 선택 마커, 인트론, polyA 신호, 및/또는 복제의 개시점을 포함할 수 있다.

[0164] 일부 구현예에서, 치료용 트랜스진은 치료용 폴리펩티드를 인코딩한다. 치료용 폴리펩티드는, 예를 들어, 세포 또는 유기체에 부재하거나 감소된 수준으로 존재하는 폴리펩티드 및/또는 효소 활성을 공급할 수 있다. 대안적으로, 치료용 폴리펩티드는 세포 또는 유기체에서 불균형을 간접적으로 반대 작용하는 폴리펩티드 및/또는 효소 활성을 공급할 수 있다. 예를 들어, 대사 효소 또는 활성의 결핍에 의해 야기된 대사물의 형성과 관련된 장애에 대한 치료용 폴리펩티드는 결손 대사 효소 또는 활성을 공급할 수 있거나, 이는 대사물의 감소를 발생시키는 대안적 대사 효소 또는 활성을 공급할 수 있다. 치료용 폴리펩티드는 또한, 예를 들어, 양성-음성 폴리펩티드로서 작용함으로써 폴리펩티드(예를 들어, 과발현되거나, 기능획득 돌연변이에 의해 활성화되거나, 활성이 달리 잘못 조절되는 폴리펩티드)의 활성을 감소시키는 데 이용될 수 있다.

[0165] 본 발명의 벡터 계능은 세포내 단백질이거나, 세포 멤브레인에 고정되거나, 세포 내에 남아 있거나, 본 발명의 벡터로 형질도입된 세포에 의해 분비되는 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다. 벡터를 수용한 세포에 의해 분비되는 폴리펩티드에 있어서, 폴리펩티드는 가용성(즉, 세포에 부착되지 않음)일 수 있다. 예를 들어, 가용성 폴리펩티드는 막횡단 영역이 없고 세포로부터 분비된다. 막횡단 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 확인 및 제거하기 위한 기법은 당업계에 알려져 있다.

[0166] 일부 구현예에서, 본 발명의 벡터 계능은 개체에서 질환 또는 장애를 치료하는 데 사용되는 폴리펩티드를 인코딩한다. 본 발명의 유전자 요법제에 의해 치료되는 질환 및 장애는 헌팅턴병(HD), 진행성 핵상 마비(PSP), 다계통 위축(MSA), 중족쇄성 백혈병증(MLD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 연령-관련 황반 변성(AMD), 선천성 근육이영양증(CMD), 페닐케톤뇨증(PKU), 근육이영양증(MD), A1AT 결핍증, 국소성 분절성 사구체경화증(FSGS), 시스템성 노증, A형 혈우병, B형 혈우병, 고쇄병(GBA), 파킨슨병(PD), 및 폐폐병을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0167] 일부 구현예에서, 치료용 폴리펩티드는 헌팅틴(HTT), 타우, 아밀로이드 전구체 단백질, 알파-시누클레인, 슈도아릴설파타제(ARSA), 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 1(SOD1), 페닐알라닌 하이드록실라제(PAH), 디스트로핀, 알파-1-안티트립신(A1AT), 시스템인 수송체, 인자 VIII(FVIII), 인자 IX(FIX), 산 베타-글루코시다제, 아교세포-유래 성장 인자(GDNF), 뇌-유래 성장 인자(BDNF), 티로신 하이드록실라제(TH), GTP-사이클로하이드롤라제(GTPCH), 및/또는 아미노산 데카복실라제(AADC), 또는 알파 글루코시다제이다.

[0168] 일부 구현예에서, 이중성 핵산은, 예를 들어, 하나 이상의 결합 유전자를 대체하거나 녹다운하는 데 사용될 수 있는 치료용 핵산을 인코딩한다. 일부 구현예에서, 치료용 핵산은 비제한적인 예로 DNA, siRNA, shRNA, RNAi,

miRNA, 안티센스 RNA, 리보자임 또는 DNA자임을 포함할 수 있다. 이와 같이, 치료용 핵산은 벡터의 핵산으로부터 전사되는 경우 본 발명의 장애와 연관된 비정상 또는 과도한 단백질 번역 또는 전사를 방해함으로써 장애를 치료할 수 있는 RNA를 인코딩할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 핵산은 이상 및/또는 과량의 단백질을 인코딩하는 mRNA의 고도로 특이적인 제거 또는 감소에 의해 장애를 치료하는 RNA를 인코딩할 수 있다. 치료용 RNA 서열은 이상 및/또는 과량의 단백질을 인코딩하는 mRNA의 고도로 특이적인 제거 또는 감소에 의해 장애를 치료할 수 있는 RNAi, 작은 저해성 RNA(siRNA), 마이크로 RNA(miRNA), 및/또는 리보자임(예컨대, 망치머리형 및 머리핀형 리보자임)을 포함한다.

[0169] 일부 구현예에서, 치료용 폴리펩티드 또는 치료용 핵산은 CNS의 장애를 치료하기 위해 이용된다. 이론으로 국한시키려는 것은 아니지만, 돌연변이된 유전자를 야생형 또는 개선된 유전자로 대체하기 위해, 기능 획득이 장애와 관련된 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성을 감소시키거나 제거하거나, 장애와 관련된 결핍(예를 들어, 발현이 유사하거나 관련된 활성을 나타내는 유전자에서의 돌연변이)을 보충하는 폴리펩티드의 발현 및/또는 활성을 향상시키기 위해 치료용 폴리펩티드 또는 치료용 핵산이 이용될 수 있는 것으로 사료된다. 본 발명의 치료용 폴리펩티드 또는 치료용 핵산(표적화되거나 공급될 수 있는 예시적인 유전자는 각각의 장애에 대해 괄호 안에 제공됨)에 의해 치료될 수 있는 본 발명의 장애의 비제한적 예는 뇌졸중(예를 들어, *카스파제-3*, *베클린1*, *Ask1*, *PAR1*, 및 *HIF1a*, *PUMA*, 및/또는 문헌[Fukuda, A.M. and Badaut, J. (2013) *Genes (Basel)* 4:435-456]에 기재된 유전자들 중 임의의 것), 헌팅턴병(돌연변이체 *HTT*), 간질(예를 들어, *SCN1A*, *NMDAR*, *ADK*, 및/또는 문헌[Boison, D. (2010) *Epilepsia* 51:1659-1668]에 기재된 유전자들 중 임의의 것), 파킨슨병(알파-시누클레인), 루게릭병(측부 신경성 경화증; *SOD1*로도 알려짐), 알츠하이머병(타우, 아밀로이드 전구체 단백질), 피질기저핵 변성 또는 CBD(타우), 피질기저핵 신경절 변성 또는 CBGD(타우), 전두측두엽 치매 또는 FTD(타우), 진행성 핵상 마비 또는 PSP(타우), 다계통 위축 또는 MSA(알파-시누클레인), 뇌암(예를 들어, 뇌암에 연루된 돌연변이체 또는 과발현된 종양유전자), 및 리포솜 저장 질환(LSD)을 포함한다. 본 발명의 장애는 피질의 큰 영역, 예를 들어, 피질의 하나 초과 기능성 영역, 피질의 하나 초과 엽, 및/또는 전체 피질을 포함하는 장애를 포함할 수 있다. 본 발명의 치료용 폴리펩티드 또는 치료용 핵산에 의해 치료될 수 있는 본 발명의 장애의 다른 비제한적인 예는 외상성 뇌 손상, 효소 기능이상 장애, 정신 장애(외상후 스트레스 증후군을 포함함), 신경변성 질병, 및 인지 장애(치매, 자폐증, 및 우울증을 포함함)를 포함한다. 효소 기능이상 장애는 백색질형성장애(카나반병을 포함함) 및 하기에 기재되는 리소솜 저장 질환 중 임의의 리소솜 저장 질환을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0170] 일부 구현예에서, 치료용 폴리펩티드 또는 치료용 핵산은 리소솜 저장 질환을 치료하기 위해 이용된다. 당업계에 일반적으로 공지된 바와 같이, 리소솜 저장 질환은 리소솜 기능에서의 결함을 특징으로 하는 희귀성 유전 대사 장애이다. 상기 장애는 리소솜 저장된 세포 물질의 병리학적 축적을 초래하는 적절한 점액다당류, 당단백질, 및/또는 지질 대사에 필요한 효소의 결핍에 의해 대개 야기된다. 본 발명의 치료용 폴리펩티드 또는 치료용 핵산(표적화되거나 공급될 수 있는 예시적인 유전자는 각각의 장애에 대해 괄호 안에 제공됨)에 의해 치료될 수 있는 본 발명의 리소솜 저장 질환의 비제한적 예는 2형 또는 3형 고체병(산 베타-글루코시다제, *GBA*), GM1 강글리오시드증(베타-갈락토시다제-1, *GLB1*), 헌터병(이두로네이트 2-설파타제, *IDS*), 크라베병(갈라미다제, *GALC*), 만노시드증 질환(만노시다제, 예컨대, 알파-D-만노시다제, *MAN2B1*), β 만노시드증 질환(베타-만노시다제, *MANBA*), 중족성 백혈병증(슈도아릴설파타제 A, *ARSA*), 점액지질증 II/III 질환(N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라제, *GNPTAB*), 니만-픽 A 질환(산 스펅고미엘리나제, *ASM*), 니만-픽 C 질환(니만-픽 C 단백질, *NPCI*), 폼페병(산 알파-1,4-글루코시다제, *GAA*), 산드호프 질환(핵소사미니다제 베타 서브유닛, *HEXB*), 산필리포 A 질환(N-설포글루코사민 설포히드로라제, *MPS3A*), 산필리포 B 질환(N-알파-아세틸글루코사미니다제, *NAGLU*), 산필리포 C 질환(헤파린 아세틸-CoA:알파-글루코사미니다제 N-아세틸트랜스퍼라제, *MPS3C*), 산필리포 D 질환(N-아세틸글루코사민-6-설파타제, *GNS*), 선들러병(알파-N-아세틸갈락토사미니다제, *NAGA*), 슬라이병(베타-글루쿠로니다제, *GUSB*), 테이-삭스병(핵소사미니다제 알파 서브유닛, *HEXA*), 및 울만병(리소솜 산 리파제, *LIPA*)을 포함한다.

[0171] 일부 구현예에서, 치료용 폴리펩티드는 인자 VIII, 인자 IX, 마이오투블라린, 생존 운동 뉴런 단백질(SMN), 레티노이드 이소메로하이드로라제(RPE65), NADH-유비퀴논 산화환원효소 사슬 4, 맥락막혈증 단백질(CHM), 오르니틴 트랜스카보밀라제, 아르기노석시네이트 합성효소, β-글로빈, γ-글로빈, 페닐알라닌 하이드록실라제, 아드레날루코디스트로피 단백질(ALD), 디스트로핀, 트렁케이션된 디스트로핀, 항-VEGF 작용제 또는 이의 기능적 변이체를 인코딩한다.

[0172] 일부 구현예에서, 이중성 핵산은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 예시적인 프로모터는 사이토메갈로바이러스

스(CMV) 극초기 프로모터, RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 시미안 바이러스 40(SV40) 프로모터 및 CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간 특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, 텔로머라제(hTERT) 프로모터; 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 베타-액틴/토끼 β-글로빈 프로모터(CAG 프로모터; 문헌[Niwa *et al.*, *Gene*, 1991, 108(2):193-9]) 및 신장 인자 1-알파 프로모터(EF1-알파) 프로모터(문헌[Kim *et al.*, *Gene*, 1990, 91(2):217-23] 및 문헌[Guo *et al.*, *Gene Ther.*, 1996, 3(9):802-10])를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 프로모터는 인간 β-글루쿠로니다제 프로모터 또는 닭 β-액틴(CBA) 프로모터에 연결된 사이토메갈로바이러스 인핸서를 포함한다. 프로모터는 구성적, 유도성 또는 억제성 프로모터일 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명은 CBA 프로모터에 작동 가능하게 연결된 본 발명의 개시의 이중성 트랜스진을 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 예시적 프로모터 및 설명은, 예를 들어, 미국 PG 공개 제 20140335054호에서 찾아볼 수 있다.

[0173] 구성적 프로모터의 예는 제한 없이 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스(RSV) LTR 프로모터(선택적으로 RSV 인핸서를 가짐), 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터(선택적으로 CMV 인핸서를 가짐)[예를 들어, 문헌[Boshart *et al.*, *Cell*, 41:521-530 (1985)] 참조], SV40 프로모터, 디히드로폴레이트 리덕타제 프로모터, 13-액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나제(PGK) 프로모터 및 EF1α 프로모터[Invitrogen]를 포함한다.

[0174] 유도성 프로모터는 유전자 발현의 조절을 가능하게 하며, 외인적으로 공급된 화합물, 환경 요인, 예컨대, 온도, 또는 특정 생리학적 상태의 존재, 예를 들어, 급성기, 세포의 특정 분화 상태에 의해, 또는 복제하는 세포에서만 조절될 수 있다. 유도성 프로모터 및 유도성 시스템은, 제한 없이 Invitrogen, Clontech 및 Ariad를 포함하는 다양한 상업적 공급처로부터 입수 가능하다. 많은 다른 시스템이 기술되었으며 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있다. 외인성으로 공급되는 프로모터에 의해 조절되는 유도성 프로모터의 예는 아연-유도성 양 메탈로티오닌(MT) 프로모터, 텍사메타손(Dex)-유도성 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, T7 중합효소 프로모터 시스템(WO 98/10088); 에다이슨 곤충 프로모터(No *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3346-3351 (1996)), 테트라사이클린-억제성 시스템(Gossen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992)), 테트라사이클린-유도성 시스템(문헌[Gossen *et al.*, *Science*, 268:1766-1769 (1995)], 또한 문헌[Harvey *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518 (1998)] 참조), RU486-유도성 시스템(문헌[Wang *et al.*, *Nat. Biotech.*, 15:239-243 (1997)] 및 문헌[Wang *et al.*, *Gene Ther.*, 4:432-441 (1997)] 참조) 및 라파마이신-유도성 시스템(문헌[Magari *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872 (1997)])을 포함한다. 이러한 맥락에서 유용할 수 있는 유도성 프로모터의 또 다른 유형은 특정 생리학적 상태, 예를 들어, 온도, 급성기, 세포의 특정 분화 상태에 의하거나, 복제하는 세포에서만 조절되는 유도성 프로모터이다.

[0175] 또 다른 구현예에서, 트랜스진에 대해 네이티브 프로모터, 또는 이의 단편이 이용될 것이다. 네이티브 프로모터는 트랜스진의 발현이 네이티브 발현을 모방해야 하는 것이 요망되는 경우에 이용될 수 있다. 네이티브 프로모터는 트랜스진의 발현이 시간적 또는 발달적으로, 또는 조직-특이적 방식으로, 또는 특정 전사 자극에 반응하여 조절되어야 하는 경우에 이용될 수 있다. 추가의 구현예에서, 다른 네이티브 발현 제어 요소, 예를 들어, 인핸서 요소, 폴리아데닐화 부위 또는 코작(Kozak) 컨센서스 서열이 또한 네이티브 발현을 모방하기 위해 사용될 수 있다.

[0176] 일부 구현예에서, 조절 서열은 조직-특이적 유전자 발현 능력을 부여한다. 일부 경우에서, 조직-특이적 조절 서열은 조직 특이적 방식으로 전사를 유도하는 조직-특이적 전사 인자에 결합한다. 이러한 조직 특이적 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서 등) 당업계에 잘 알려져 있다.

[0177] 일부 구현예에서, 벡터는 인트론을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 인트론은 닭 베타-액틴 및 토끼 베타-글로빈으로부터 유래된 키메라 인트론이다. 일부 구현예에서, 인트론은 마우스 미소 바이러스(Minute virus of mice; MVM) 인트론이다.

[0178] 일부 구현예에서, 벡터는 폴리아데닐화(polyA) 서열을 포함한다. 소 성장 호르몬(BGH) poly(A) 서열(예를 들어, 수탁 번호 EF592533 참조), SV40 폴리아데닐화 서열, 및 HSV TK pA 폴리아데닐화 서열과 같은, 폴리아데닐화 서열의 다수의 예가 당업계에 공지되어 있다.

[0179] **유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 환자를 선택하는 방법**

[0180] 일부 양태에서, 본 발명은 개체의 세포로 핵산을 전달하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 개체로부터의 선천성 면역 세포를 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질

나노입자)와 함께 인큐베이션시키는 단계, b) 하나 이상의 사이토카인의 발현에 대해 선천성 면역세포를 분석하는 단계로서, 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킨 후 사이토카인 시그니처의 발현에 의해 유전자 요법제에 대한 선천성 면역을 갖는 개체를 확인하는, 단계, c) 단계 b)에서 확인된 개체에게 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 투여하는 단계, 및 d) 단계 b)에서 확인된 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, 또는 자연 살해(NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 방법은 선천성 면역 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키기 전에 개체로부터 선천성 면역 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 개체로부터 단핵구를 분리하는 단계, 및 단핵구를 수지상 세포 배양 배지에서 인큐베이션시켜 단핵구로부터 수지상 세포를 유도한 후 수지상 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0181] 일부 양태에서, 본 발명은 치료를 필요로 하는 개체를 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 선천성 면역 세포를 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자)와 함께 인큐베이션시키는 단계, b) 하나 이상의 사이토카인의 발현에 대해 선천성 면역 세포를 분석하는 단계로서, 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킨 후 사이토카인 시그니처의 발현에 의해 유전자 요법제에 대한 선천성 면역을 갖는 개체를 확인하는, 단계, c) 단계 b)에서 확인된 개체에게 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 투여하는 단계, 및 d) 단계 b)에서 확인된 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함한다. ). 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, 또는 자연 살해(NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 방법은 선천성 면역 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키기 전에 개체로부터 선천성 면역 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 개체로부터 단핵구를 분리하는 단계, 및 단핵구를 수지상 세포 배양 배지에서 인큐베이션시켜 단핵구로부터 수지상 세포를 유도한 후 수지상 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0182] 일부 양태에서, 본 발명은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자) 및 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 사용한 치료를 위한 개체를 선택하는 방법을 제공하며, 방법은 a) 선천성 면역 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계, b) 하나 이상의 사이토카인의 발현에 대해 선천성 면역 세포를 분석하는 단계로서, 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킨 후 사이토카인 시그니처의 발현에 의해 유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 개체를 확인하는, 단계, c) 유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 단계 b)에서 확인된 개체를 선택하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 d) 단계 b)에서 확인된 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 e) 단계 b)에서 확인된 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, 또는 자연 살해(NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 방법은 선천성 면역 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키기 전에 개체로부터 선천성 면역 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 개체로부터 단핵구를 분리하는 단계, 및 단핵구를 수지상 세포 배양 배지에서 인큐베이션시켜 단핵구로부터 수지상 세포를 유도한 후 수지상 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0183] 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 개체로부터의 말초 혈액 단핵 세포로부터 분리된다. 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포이다. 일부 구현예에서, 수지상 세포는 개체의 단핵구로부터 유래된다(예를 들어, 분화된다). 일부 구현예에서, 단핵구는 개체로부터의 말초 혈액 단핵 세포로부터 분리된다. 일부 구현예에서, 단핵구는 CD14<sup>+</sup> 단핵구이다. 일부 구현예에서, 단핵구는 약 5일 내지 약 10일 또는 약 7일 내지 약 8일 동안 수지상 세포 배양 배지와 함께 인큐베이션되어 단핵구로부터 수지상 세포를 유도한다. 일부 구현예에서, 단핵구는 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12일, 또는 12일 초과 중 임의의 시간 동안 수지상 세포 배양 배지와 함께 인큐베이션되어 단핵구로부터 수지상 세포를 유도한다. 일부 구현예에서, 수지상 세포는 단계 c)의 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키기 전에 재플레이팅된다. 일부 구현예에서, 수지상 세포는 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키기 전에 마이크로웰 접시 내로 재플레이팅된다.

[0184] 일부 구현예에서, 수지상 세포는 약  $1 \times 10^3$  내지 약  $1 \times 10^5$  또는 약  $1 \times 10^4$ 의 MOI로 바이러스 유전자 요법제와 함께 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 수지상 세포는 약  $1 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ , 또는  $5 \times 10^5$  중 임의의 것 미만의 MOI로 유전자 요법제와 함께 인큐베이션된다.

[0185] 일부 구현예에서, 수지상 세포는 약 1 ng/mL 내지 약 1 mg/mL의 농도로 비-바이러스 유전자 요법제와 함께 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 수지상 세포는 약 1 ng/mL 내지 약 10 ng/mL, 약 10 ng/mL 내지 약 100 ng/mL, 약 100 ng/mL 내지 약 1 μg/mL, 약 1 μg/mL 내지 약 10 μg/mL, 약 10 μg/mL 내지 약 100 μg/mL, 또는 약

100 µg/mL 내지 약 1 mg/mL의 농도로 비-바이러스 유전자 요법제와 함께 인큐베이션된다.

- [0186] 일부 구현예에서, 수지상 세포는 유전자 요법제와 함께 약 12시간 내지 약 36시간 또는 약 24시간 동안 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 수지상 세포는 약 6시간 내지 약 48시간, 약 6시간 내지 약 36시간, 약 6시간 내지 약 24시간, 약 6시간 내지 약 18시간, 약 6시간 내지 약 12시간, 약 12시간 내지 약 48시간, 약 12시간 내지 약 36시간, 약 12시간 내지 약 24시간, 약 12시간 내지 약 18시간, 약 18시간 내지 약 48시간, 약 18시간 내지 약 36시간, 약 18시간 내지 약 24시간, 약 24시간 내지 약 48시간, 약 24시간 내지 약 36시간, 또는 약 36시간 내지 약 48시간 동안 유전자 요법제와 함께 인큐베이션된다.
- [0187] 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 복수의 개체로부터의 특정 면역 세포를 유전자 요법제와 접촉시키고, 선천성 면역 반응과 관련된 하나 이상의 사이토카인의 발현 변화를 결정함으로써 특정 면역 세포(예를 들어, 수지상 세포, 단핵구, 대식세포, NK 세포 등)에서 유전자 요법제에 대해 결정되고, 여기서 하나 이상의 사이토카인에서 발현 변화(예를 들어, 발현 증가 또는 감소)의 공통성은 사이토카인 시그니처의 존재를 나타낸다. 일부 구현예에서, 선천성 면역 반응과 관련된 사이토카인은 톨-유사 수용체(TLR) 경로(예를 들어, TLR2, TLR3, TLR4 또는 TLR9 경로)와 연관된다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 중 임의의 것 초과와 사이토카인에서 발현의 변화를 포함한다. 일부 구현예에서, 복수의 개체는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 중 임의의 것 초과와 개체를 포함한다. 일부 구현예에서, 발현 변화의 공통성은 복수의 개체에서 개체의 약 25%, 50%, 75% 또는 90% 초과와 선천성 면역 세포에서 사이토카인의 발현 수준의 유사한 변화를 포함한다.
- [0188] 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α, IL-1β, MCP1 및 MIP-1α 중 하나 이상의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α, IL-1β, MCP1 및 MIP-1α 중 2개 이상의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α, IL-1β, MCP1 및 MIP-1α 중 3개 이상의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α, IL-1β, MCP1 및 MIP-1α 중 4개 이상의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α 및 IL-1β의 증가된 발현을 포함한다.
- [0189] 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포이고, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α, IL-1β, MCP1 및 MIP-1α 중 하나 이상의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포이고, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α, IL-1β, MCP1 및 MIP-1α 중 2개 이상의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포이고, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α, IL-1β, MCP1 및 MIP-1α 중 3개 이상의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α, IL-1β, MCP1 및 MIP-1α 중 4개 이상의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포이고, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α 및 IL-1β의 증가된 발현을 포함한다.
- [0190] 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처에서의 사이토카인의 발현은 적합한 대조군에서의 사이토카인의 발현과 비교하여 증가된다. 적합한 대조군의 예는 유전자 요법제와 함께 인큐베이션되지 않은(그의 부재 하에) 선천성 면역 세포로부터의 사이토카인 시그니처 및 유전자 요법제와의 인큐베이션 전 동일하거나 유사한 선천성 면역 세포로부터의 사이토카인 시그니처에서 사이토카인의 발현(예를 들어, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α, IL-1β, MCP1 및 MIP-1α 중 하나 이상의 증가된 발현을 포함함)을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α, IL-1β, MCP1 및 MIP-1α 중 2개 이상의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α, IL-1β, MCP1 및 MIP-1α 중 3개 이상의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α, IL-1β, MCP1 및 MIP-1α 중 4개 이상의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α, IL-1β, MCP1 및 MIP-1α의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α 및 IL-1β의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 약 10%, 약 20%, 약 25%, 약 50%, 약 75%, 약 100% 또는 100% 초과 중 임의의 하나의 발현의 증가는 유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 개체를 확인한다.
- [0191] 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처에서의 사이토카인의 발현은 유전자 요법제의 부재 하에 인큐베이션된 수지상 세포로부터의 사이토카인 시그니처에서의 사이토카인의 발현과 비교하여, 또는 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키기 전에 수지상 세포로부터의 사이토카인 시그니처에서의 사이토카인의 발현과 비교하여 증가되며, 여기서 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF α, IL-1β, MCP1 및 MIP-1α 중 하나 이상의 증가된 발현을 포함한다.

일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP1 및 MIP-1 $\alpha$  중 2개 이상의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP1 및 MIP-1 $\alpha$  중 3개 이상의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP1 및 MIP-1 $\alpha$  중 4개 이상의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP1 및 MIP-1 $\alpha$ 의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF  $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 증가된 발현을 포함한다. 일부 구현예에서, 약 10%, 약 20%, 약 25%, 약 50%, 약 75%, 약 100% 또는 100% 초과 중 임의의 하나의 발현의 증가는 유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 개체를 확인한다.

**[0192] 약학적 조성물**

**[0193]** 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자) 및/또는 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 약학적 조성물은 본원에 기재되거나 당업계에 공지된 임의의 투여 방식에 적절할 수 있다.

**[0194]** 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 당업계에 잘 알려져 있듯이, 약학적으로 허용되는 부형제는 약물학적으로 유효한 물질의 투여를 용이하게 하고 액체 용액 또는 현탁액으로서, 유액으로서, 또는 사용 전 액체 중에 현탁 또는 용해시키기 적절한 고체 형태로서 공급될 수 있는 상대적으로 불활성인 물질이다. 예를 들어, 부형제는 형태 또는 밀도를 부여하거나 희석제로서 작용할 수 있다. 적절한 부형제로는 안정화제, 습윤 및 유화제, 삼투압을 변화시키기 위한 염, 캡슐화제, pH 완충 물질, 및 완충액이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 부형제는 과도한 독성 없이 투여될 수 있는, 눈으로의 직접적 투여에 적절한 임의의 약학적 물질을 포함한다. 약학적으로 허용되는 부형제는 소르비톨, 임의의 다양한 TWEEN 화합물, 그리고 물, 염수, 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 약학적으로 허용되는 염은, 예를 들어 염화수소산, 브롬화수소산, 인산염, 황산염 등과 같은 광산염; 그리고 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조에이트 등과 같은 유기산의 염이 그 안에 포함될 수 있다. 약학적으로 허용되는 부형제의 충분한 논의는 문헌[REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991)]에서 이용 가능하다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 rAAV 입자와 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물은 인간으로의 투여에 적합하다. 이러한 담체는 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, pp. 1035-1038 및 1570-1580] 참조).

**[0195]** 이러한 약학적으로 허용되는 담체는 물 그리고, 낙화생유, 대두유, 팥유 등과 같은, 석유, 동물, 식물, 또는 합성 유래의 것들을 포함하는 오일과 같은 살균 액체일 수 있다. 식염수 및 수성 텍스트로스, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 글리세롤 용액이 또한 액체 담체로서, 특히 주사 가능한 용액을 위한 액체 담체로서 이용될 수 있다. 약학적 조성물은 추가적인 성분, 예를 들어, 보존제, 완충액, 등장화제, 항산화제 및 안정화제, 비이온성 습윤 또는 정화제, 증점제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 기재된 약학적 조성물은 단회 단위 투여형 또는 다회 투여형으로 패키징될 수 있다. 조성물은 일반적으로 살균되고 실질적으로 등장성인 용액으로 제형화된다.

**[0196] 키트 및 제조 물품**

**[0197]** 본원에 기재된 바와 같은 유전자 요법제(예를 들어, AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자) 및/또는 IRAK 분해제(예를 들어, IRAK-4 분해제)는, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 방법 중 하나에서 사용하기 위해 설계된 키트 또는 제조 물품 내에 함유될 수 있다.

**[0198]** 일부 구현예에서, 키트 또는 제조 물품은 IRAK 분해제 및/또는 유전자 요법제의 투여를 위한 설명서를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 키트 및 제조 물품은 본원에 기재된 임의의 방법을 수행하기 위한 지침과 함께 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 패키지 삽입물을 포함하는 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 패키징 물질이 또한 포함될 수 있으며, 이는, 예를 들어, 바이알(예컨대, 밀봉된 바이알), 용기, 앰플, 병, 단지, 가요성 패키징(예를 들어, 밀봉된 Mylar 또는 플라스틱 백) 등을 포함하는 당업계에 공지된 임의의 패키징 물질일 수 있다. 이들 제조 물품은 추가로 살균되고/되거나 밀봉될 수 있다.

**[0199]** 일부 구현예에서, 키트 또는 제조 물품은 하나 이상의 본원에 기재된 완충액 및/또는 약학적으로 허용되는 부형제(예를 들어, 문헌[REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991)]에 기재된 바와 같은)를 추가로 함유한다. 일부 구현예에서, 키트 또는 제조 물품은 본원에 기재된 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제, 담체, 용액 및/또는 추가의 성분을 포함한다. 본원에 기재된 키트 또는 제조 물품은 단회 단위 투여형

또는 다회투여형으로 패키징될 수 있다. 키트 또는 제조 물품의 내용물은 일반적으로 무균 상태로 제형화되며, 동결 건조되거나 실질적으로 등장성인 용액으로 제공될 수 있다.

[0200] 예시적인 구현예

[0201] 본 발명은 하기 열거된 구현예를 포함한다.

[0202] 1. 개체의 세포로 핵산을 전달하는 방법으로서, a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0203] 2. 치료를 필요로 하는 개체를 유전자 요법제로 치료하는 방법으로서, a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0204] 3. 개체에서 유전자 요법을 개선하는 방법으로서, a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0205] 4. 유전자 요법제에 대한 면역 반응을 억제하는 방법으로서, a) 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 b) 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

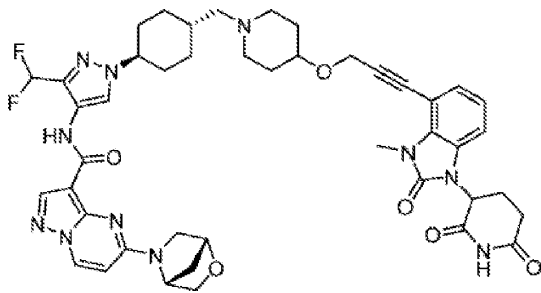
[0206] 5. 구현예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, IRAK 분해제는 IRAK 단백질 키나제의 활성 또는 발현을 조절하는, 방법.

[0207] 6. 구현예 5에 있어서, IRAK 단백질 키나제는 IRAK-1 단백질 키나제, IRAK-2 단백질 키나제, IRAK-3 단백질 키나제, 또는 IRAK-4 단백질 키나제인, 방법.

[0208] 7. 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, IRAK 분해제는 IRAK-4 단백질 키나제의 활성 또는 발현을 조절하는, 방법.

[0209] 8. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, IRAK 분해제는 화학식 I 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, 방법:

[0210] [화학식 I]



[0211]

[0212] 9. 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 유전자 요법제는 바이러스 벡터를 포함하는, 방법.

[0213] 10. 구현예 9에 있어서, 바이러스 벡터는 AAV 입자인, 방법.

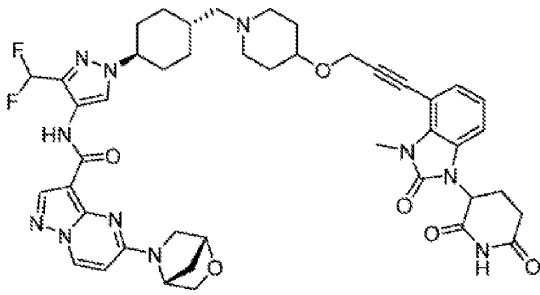
[0214] 11. 구현예 10에 있어서, AAV 입자는 AAV1 캡시드, AAV2 캡시드, AAV3 캡시드, AAV4 캡시드, AAV5 캡시드, AAV6 캡시드, AAV7 캡시드, AAV8 캡시드, AAVrh8 캡시드, AAV9 캡시드, AAV10 캡시드, AAVrh10 캡시드, AAV11 캡시드, AAV12 캡시드, AAVrh32.33 캡시드, AAV-XL32 캡시드, AAV-XL32.1 캡시드, AAV LK03 캡시드, AAV2R471A 캡시드, AAV2/2-7m8 캡시드, AAV DJ 캡시드, AAV DJ8 캡시드, AAV2 N587A 캡시드, AAV2 E548A 캡시드, AAV2 N708A 캡시드, AAV V708K 캡시드, 염소 AAV 캡시드, AAV1/AAV2 키메라 캡시드, 소 AAV 캡시드, 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1(키메라 AAV/인간 보카바이러스 바이러스 1), AAV2HBKO 캡시드, AAVPHP.B 캡시드 또는 AAVPHP.eB 캡시드, 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는, 방법.

[0215] 12. 구현예 11에 있어서, AAV 캡시드는 티로신 돌연변이, 헤파린 결합 돌연변이, 또는 HBKO 돌연변이를 포함하는, 방법.

[0216] 13. 구현예 10 내지 12 중 어느 하나에 있어서, AAV 바이러스 입자는 하나 이상의 역 말단 반복부(ITR)를 포함하는 AAV 게놈을 포함하고, 하나 이상의 ITR은 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, 또는 AAV12 ITR인, 방법.

- [0217] 14. 구현예 13에 있어서, AAV 입자의 캡시드 및 하나 이상의 ITR은 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, 방법.
- [0218] 15. 구현예 13에 있어서, AAV 입자의 캡시드 및 하나 이상의 ITR은 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, 방법.
- [0219] 16. 구현예 9에 있어서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 입자인, 방법.
- [0220] 17. 구현예 16에 있어서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 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 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad, 또는 돼지 Ad 3형, 또는 이의 기능적 변이체로부터의 캡시드를 포함하는, 방법.
- [0221] 18. 구현예 9에 있어서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 입자인, 방법.
- [0222] 19. 구현예 18에 있어서, 렌티바이러스 입자는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스, 모칼라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114, 또는 이의 기능적 변이체로 위형화되는, 방법.
- [0223] 20. 구현예 9에 있어서, 바이러스 벡터는 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 입자인, 방법.
- [0224] 21. 구현예 20에 있어서, HSV 입자는 HSV-1 입자 또는 HSV-2 입자, 또는 이의 기능적 변이체인, 방법.
- [0225] 22. 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 유전자 요법제는 지질 나노입자를 포함하는, 방법.
- [0226] 23. 구현예 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 유전자 요법제는 이중성 트랜스진을 인코딩하는 핵산을 포함하는, 방법.
- [0227] 24. 구현예 23에 있어서, 이중성 트랜스진은 프로모터에 작동 가능하게 연결되는, 방법.
- [0228] 25. 구현예 24에 있어서, 프로모터는 구성적 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 유도성 프로모터인, 방법.
- [0229] 26. 구현예 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, IRAK 분해제는 유전자 요법제의 투여 전에, 투여와 동시에, 또는 투여 후에 투여되는, 방법.
- [0230] 27. 구현예 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 개체는 유전자 요법에 의한 치료에 적합한 질환 또는 장애를 갖는, 방법.
- [0231] 28. 구현예 27에 있어서, 질환 또는 장애는 단일유전자성 질환 또는 장애인, 방법.
- [0232] 29. 구현예 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 유전자 요법제는 정맥내, 복강내, 동맥내, 근육내, 피하, 또는 간내 투여되는, 방법.
- [0233] 30. 구현예 1 내지 29 중 어느 하나에 있어서, IRAK 분해제는 경구, 정맥내, 복강내, 동맥내, 근육내, 피하, 또는 간내 투여되는, 방법.
- [0234] 31. 개체의 세포로 핵산을 전달하는 방법으로서, a) 개체로부터의 선천성 면역 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계, b) 하나 이상의 사이토카인의 발현에 대해 선천성 면역 세포를 분석하는 단계로서, 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킨 후 사이토카인 시그니처의 발현에 의해 유전자 요법제에 대한 선천성 면역을 갖는 개체를 확인하는, 단계, c) 단계 b)에서 확인된 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 d) 단계 b)에서 확인된 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0235] 32. 치료를 필요로 하는 개체를 치료하는 방법으로서, a) 개체로부터의 선천성 면역 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계, b) 하나 이상의 사이토카인의 발현에 대해 선천성 면역 세포를 분석하는 단계로서, 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킨 후 사이토카인 시그니처의 발현에 의해 유전자 요법제에 대한 선천성 면역을 갖는 개체를 확인하는, 단계, c) 단계 b)에서 확인된 개체에게 IRAK 분해제를 투여하는 단계, 및 d) 단계 b)에서 확인된 개체에게 유전자 요법제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0236] 33. 유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 개체를 선택하는 방법으로서, a) 개체로부터의 선천성 면역 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계, b) 하나 이상의 사이토카인의 발현에 대해 선천성 면역 세포를 분석하는 단계로서, 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시킨 후 사이토카인 시그니처의 발현에 의해 유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 개체를 확인하는, 단계, c) 유전자 요법제 및 IRAK 분해제를 사용한 치료를 위한 단계 b)에서 확인된 개체를 선택하는 단계를 포함하는, 방법.

- [0237] 34. 구현예 31 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포, 단핵구, 대식세포 또는 자연 살해(NK) 세포인, 방법.
- [0238] 35. 구현예 31 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 선천성 면역 세포는 개체로부터의 말초 혈액 단핵 세포로부터 분리되는, 방법.
- [0239] 36. 구현예 31 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 선천성 면역 세포는 수지상 세포인, 방법.
- [0240] 37. 구현예 36에 있어서, 수지상 세포는 개체의 단핵구로부터 유래되는, 방법.
- [0241] 38. 구현예 37에 있어서, 개체로부터 단핵구를 분리하는 단계 및 단핵구를 수지상 세포 배양 배지에서 인큐베이션시켜 단핵구로부터 수지상 세포를 유도한 후 수지상 세포를 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0242] 39. 구현예 37 또는 38에 있어서, 단핵구는 CD14+ 단핵구인, 방법.
- [0243] 40. 구현예 37 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 단핵구는 약 5일 내지 약 10일 또는 약 7일 내지 약 8일 동안 수지상 세포 배양 배지와 함께 인큐베이션되어 단핵구로부터 수지상 세포를 유도하는, 방법.
- [0244] 41. 구현예 31 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 수지상 세포는 단계 c)의 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키기 전에 재플레이팅되는, 방법.
- [0245] 42. 구현예 41에 있어서, 수지상 세포는 마이크로웰 접시 내로 재플레이팅되는, 방법.
- [0246] 43. 구현예 31 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 유전자 요법제는 바이러스 벡터이고, 선천성 면역 세포는 약  $1 \times 10^3$  내지 약  $1 \times 10^5$  또는 약  $1 \times 10^4$ 의 MOI로 바이러스 벡터와 함께 인큐베이션되는, 방법.
- [0247] 44. 구현예 31 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 유전자 요법제는 비-바이러스 벡터이고, 선천성 면역 세포는 약 1 ng/mL 내지 약 1 mg/mL의 농도로 비-바이러스 벡터와 함께 인큐베이션되는, 방법.
- [0248] 45. 구현예 31 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 선천성 면역 세포는 유전자 요법제와 함께 약 12시간 내지 약 36시간 또는 약 24시간 동안 인큐베이션되는, 방법.
- [0249] 46. 구현예 31 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP1 및 MIP-1  $\alpha$  중 하나 이상의 증가된 발현을 포함하는, 방법.
- [0250] 47. 구현예 31 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MCP1 및 MIP-1  $\alpha$ 의 증가된 발현을 포함하는, 방법.
- [0251] 48. 구현예 31 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 사이토카인 시그니처는 IL6, TNF  $\alpha$ , 및 IL-1 $\beta$ 의 증가된 발현을 포함하는, 방법.
- [0252] 49. 구현예 331 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 사이토카인 시그니처에서의 사이토카인의 발현은 적합한 대조군과 비교하여 증가되는, 방법.
- [0253] 50. 구현예 49에 있어서, 적합한 대조군은 유전자 요법제와 함께 인큐베이션되지 않은 선천성 면역 세포로부터의 사이토카인 시그니처에서의 사이토카인의 발현이거나, 적합한 대조군은 유전자 요법제와 함께 인큐베이션시키기 전에 선천성 면역 세포로부터의 사이토카인 시그니처에서의 사이토카인의 발현인, 방법.
- [0254] 51. 구현예 31 내지 50 중 어느 하나에 있어서, IRAK 분해제는 IRAK 단백질 키나제의 활성을 조절하는, 방법.
- [0255] 52. 구현예 51에 있어서, IRAK 단백질 키나제는 IRAK-1 단백질 키나제, IRAK-2 단백질 키나제, IRAK-3 단백질 키나제, 또는 IRAK-4 단백질 키나제인, 방법.
- [0256] 53. 구현예 31 내지 52 중 어느 하나에 있어서, IRAK 분해제는 IRAK-4 단백질 키나제의 활성을 조절하는, 방법.
- [0257] 54. 구현예 31 내지 52 중 어느 하나에 있어서, IRAK 분해제는 소분자인, 방법.
- [0258] 55. 구현예 31 내지 54 중 어느 하나에 있어서, IRAK 분해제는 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, 방법:
- [0259] [화학식 I]



- [0260]
- [0261] 56. 구현예 31 내지 55 중 어느 하나에 있어서, IRAK 분해제는 TLR9 기능을 차단하는, 방법.
- [0262] 57. 구현예 37 내지 56 중 어느 하나에 있어서, 유전자 요법제는 바이러스 벡터인, 방법.
- [0263] 58. 구현예 57에 있어서, 바이러스 벡터는 AAV 입자인, 방법.
- [0264] 59. 구현예 58에 있어서, AAV 입자는 AAV1 캡시드, AAV2 캡시드, AAV3 캡시드, AAV4 캡시드, AAV5 캡시드, AAV6 캡시드, AAV7 캡시드, AAV8 캡시드, AAVrh8 캡시드, AAV9 캡시드, AAV10 캡시드, AAVrh10 캡시드, AAV11 캡시드, AAV12 캡시드, AAVrh32.33 캡시드, AAV-XL32 캡시드, AAV-XL32.1 캡시드, AAV LK03 캡시드, AAV2R471A 캡시드, AAV2/2-7m8 캡시드, AAV DJ 캡시드, AAV DJ8 캡시드, AAV2 N587A 캡시드, AAV2 E548A 캡시드, AAV2 N708A 캡시드, AAV V708K 캡시드, 염소 AAV 캡시드, AAV1/AAV2 키메라 캡시드, 소 AAV 캡시드, 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1(키메라 AAV/인간 보카바이러스 바이러스 1), AAV2HBKO 캡시드, AAVPHP.B 캡시드 또는 AAVPHP.eB 캡시드, 또는 이의 기능적 변이체를 포함하는, 방법.
- [0265] 60. 구현예 59에 있어서, AAV 캡시드는 티로신 돌연변이, 헤파린 결합 돌연변이, 또는 HBKO 돌연변이를 포함하는, 방법.
- [0266] 61. 구현예 58 내지 60 중 어느 하나에 있어서, AAV 바이러스 입자는 하나 이상의 역 말단 반복부(ITR)를 포함하는 AAV 계통을 포함하고, 하나 이상의 ITR은 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, 또는 AAV12 ITR인, 방법.
- [0267] 62. 구현예 61에 있어서, AAV 입자의 캡시드 및 하나 이상의 ITR은 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, 방법.
- [0268] 63. 구현예 61에 있어서, AAV 입자의 캡시드 및 하나 이상의 ITR은 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래되는, 방법.
- [0269] 64. 구현예 57에 있어서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 입자인, 방법.
- [0270] 65. 구현예 64에 있어서, 아데노바이러스 입자는 아데노바이러스 혈청형 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 내지 30, 37, 40, 41, AdHu2, AdHu 3, AdHu4, AdHu24, AdHu26, AdHu34, AdHu35, AdHu36, AdHu37, AdHu41, AdHu48, AdHu49, AdHu50, AdC6, AdC7, AdC69, 소 Ad 3형, 개 Ad 2형, 양 Ad, 또는 돼지 Ad 3형, 또는 이의 기능적 변이체로부터의 캡시드를 포함하는, 방법.
- [0271] 66. 구현예 57에 있어서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 입자인, 방법.
- [0272] 67. 구현예 66에 있어서, 재조합 렌티바이러스 입자는 수포성 구내염 바이러스(VSV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 로스 리버 바이러스(RRV), 에볼라 바이러스, 마르부르크 바이러스, 모갈라 바이러스, 광견병 바이러스, RD114, 또는 이의 기능적 변이체로 위형화되는, 방법.
- [0273] 68. 구현예 57에 있어서, 바이러스 벡터는 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 입자인, 방법.
- [0274] 69. 구현예 68에 있어서, HSV 입자는 HSV-1 입자 또는 HSV-2 입자, 또는 이의 기능적 변이체인, 방법.
- [0275] 70. 구현예 31 내지 565 중 어느 하나에 있어서, 유전자 요법제는 지질 나노입자인, 방법.
- [0276] 71. 구현예 31 내지 70 중 어느 하나에 있어서, 유전자 요법제는 이중성 트랜스진을 인코딩하는 핵산을 포함하는, 방법.
- [0277] 72. 구현예 71에 있어서, 이중성 트랜스진은 프로모터에 작동 가능하게 연결되는, 방법.
- [0278] 73. 구현예 72에 있어서, 프로모터는 구성적 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 유도성 프로모터인, 방법.
- [0279] 74. 구현예 31 내지 73 중 어느 하나에 있어서, IRAK 분해제는 유전자 요법제의 투여 전에, 투여와 동시에, 또

는 투여 후에 투여되는, 방법.

- [0280] 75. 구현예 31 내지 74 중 어느 하나에 있어서, 개체는 유전자 요법에 의한 치료에 적합한 질환 또는 장애를 갖는, 방법.
- [0281] 76. 구현예 75에 있어서, 질환 또는 장애는 단일유전자성 질환 또는 장애인, 방법.
- [0282] 77. 구현예 31 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 유전자 요법제는 정맥내, 복강내, 동맥내, 근육내, 피하, 또는 간내 투여되는, 방법.
- [0283] 78. 구현예 31 내지 77 중 어느 하나에 있어서, IRAK 분해제는 경구, 정맥내, 복강내, 동맥내, 근육내, 피하, 또는 간내 투여되는, 방법.
- [0284] 79. 핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도로서, 조성물은 유전자 요법제를 포함하고, 조성물은 IRAK 분해제와 조합하여 사용하기 위해 제형화되는, 용도.
- [0285] 80. 핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도로서, 조성물은 IRAK 분해제를 포함하고, 조성물은 유전자 요법제와 조합하여 사용하기 위해 제형화되는, 용도.
- [0286] 81. 유전자 요법을 필요로 하는 개체를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도로서, 조성물은 유전자 요법제를 포함하고, 조성물은 IRAK 분해제와 조합하여 사용하기 위해 제형화되는, 용도.
- [0287] 82. 유전자 요법을 필요로 하는 개체를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도로서, 조성물은 IRAK 분해제를 포함하고, 조성물은 유전자 요법제와 조합하여 사용하기 위해 제형화되는, 용도.
- [0288] 83. 유전자 요법을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 조절하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도로서, 조성물은 유전자 요법제를 포함하고, 조성물은 IRAK 분해제와 조합하여 사용하기 위해 제형화되는, 용도.
- [0289] 84. 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 조절하기 위한 의약의 제조에서의 조성물의 용도로서, 조성물은 IRAK 분해제를 포함하고, 조성물은 유전자 요법제와 조합하여 사용하기 위해 제형화되는, 용도.
- [0290] 85. 구현예 79 내지 84 중 어느 하나에 있어서, 유전자 요법제는 AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자인, 용도.
- [0291] 86. 구현예 79 내지 85 중 어느 하나에 있어서, IRAK 분해제는 IRAK-4 분해제인, 용도.
- [0292] 87. 핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하는 데 사용하기 위한 유전자 요법제를 포함하는 조성물로서, 유전자 요법제는 IRAK 분해제와 조합하여 사용되는, 조성물.
- [0293] 88. 핵산의 전달을 필요로 하는 개체의 세포로 핵산을 전달하는 데 사용하기 위한 IRAK 분해제를 포함하는 조성물로서, IRAK 분해제는 유전자 요법제와 조합하여 사용되는, 조성물.
- [0294] 89. 유전자 요법을 필요로 하는 개체를 치료하는 데 사용하기 위한 유전자 요법제를 포함하는 조성물로서, 유전자 요법제는 IRAK 분해제와 조합하여 사용되는, 조성물.
- [0295] 90. 유전자 요법을 필요로 하는 개체를 치료하는 데 사용하기 위한 IRAK 분해제를 포함하는 조성물로서, IRAK 분해제는 유전자 요법제와 조합하여 사용되는, 조성물.
- [0296] 91. 유전자 요법을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 조절하기 위한 IRAK 분해제를 포함하는 조성물로서, IRAK 분해제는 유전자 요법제와 조합하여 사용되는, 조성물.
- [0297] 92. 유전자 요법을 필요로 하는 개체에서 유전자 요법에 대한 면역 반응을 억제하기 위한 IRAK 분해제를 포함하는 조성물로서, IRAK 분해제는 유전자 요법제와 조합하여 사용되는, 조성물.
- [0298] 93. 구현예 87 내지 92 중 어느 하나에 있어서, 유전자 요법제는 AAV 입자, 아데노바이러스 입자, 렌티바이러스 입자, HSV 입자, 또는 지질 나노입자인, 조성물.
- [0299] 94. 구현예 87 내지 93 중 어느 하나에 있어서, IRAK 분해제는 IRAK-4 분해제인, 조성물.
- [0300] 95. 구현예 1 내지 78 중 어느 하나의 방법에서 사용하기 위한 키트.
- [0301] 96. 구현예 78 내지 86 중 어느 하나의 용도를 위한 키트.

- [0302] 97. 구현에 87 내지 94 중 어느 하나의 구성물을 포함하는, 키트.
- [0303] **실시예**
- [0304] 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 더욱 완전히 이해될 것이다. 그러나, 이들은 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원에서 기재된 실시예 및 구현에는 단지 예시적 목적을 위한 것이며 이에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 제시될 것이고 본 출원의 정신 및 관점 그리고 첨부된 청구범위의 범주 내에 포함될 것임이 이해된다.
- [0305] **실시예 1: AAV로 처리된 인간 세포에 대한 IRAK4 분해제의 효과를 평가하기 위한 생체 외 프로토콜**
- [0306] 본 실시예는 AAV에 노출된 림프구 및 수지상 세포에 대한 IRAK4 저해의 효과를 조사하기 위한 전략을 제공한다.
- [0307] AAV는 선천성 면역계와 적응 면역계 둘 모두의 활성화를 수반하는 면역 반응을 촉발시킨다. AAV에 대한 적응 면역 반응은 상대적으로 잘 특징규명되어 있지만, AAV에 의한 선천성 면역 활성화는 잘 이해되지 않는다.
- [0308] IRAK4는 선천성 면역 반응을 활성화시키는 TLR 경로 내의 키나제이다. 광범위 작용 면역 억제제는 AAV 전달을 개선하지만, 이는 트랜스진 발현의 손실, 부작용 및 기회 감염의 위험을 초래한다. 따라서 IRAK4를 저해하면 AAV 치료에 유리한 보다 특이적인 면역 조절을 초래할 수 있다.
- [0309] 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 제조하기 위해, 류코팩(leukopak)으로부터의 혈액을 50 mL 튜브로 디캔팅하고 DPBS를 1:1 비율로 첨가한다. 15 mL 피콜(GE17-5442-02)을 함유하는 별도의 50 mL 튜브에 혈액을 조심스럽게 피펫팅하여 혈액과 피콜(Ficoll) 층이 혼합되지 않도록 보장한다. 혼합물을 실온에서 25분 동안 2000 RPM으로 원심분리한다(9회 가속 및 제동 없음). 백혈구 및 혈소판을 함유하는 버피 코트를 수집하고, 새로운 튜브로 옮기고, 400 RCF로 5분 동안 원심분리한다. 세포를 1% FBS 또는 FCS를 함유하는 PBS로 3회 세척하고 계수한다.
- [0310] 온라인으로 이용 가능한 제조업체의 프로토콜(월드 와이드 웹 [miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0001260.PDF](https://miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0001260.PDF); Miltenyi Biotech, 독일, 주문 번호 130-050-201)에 따라 CD14 마이크로비드를 사용하여 PBMC로부터 CD14+ 단핵구를 단리한다. 간략히, 세포를 2°C 내지 8°C에서 15분 동안 총 10<sup>7</sup>개 세포 당 20 µL의 CD14 마이크로비드와 함께 인큐베이션시킨다. 세포를 자기 컬럼 상에 적용하고, 표지되지 않은 세포를 통과시키도록 한다. 컬럼을 3회 세척한 후, 컬럼을 자기 분리기로부터 제거하고, 수집 튜브 상에 배치하고, 플런저를 컬럼 내로 밀어 내어 자기 표지된 세포를 플러싱한다.
- [0311] 단핵구는 온라인으로 이용 가능한 제조업체의 프로토콜에 따라 ImmunoCult-ACF 수지상 세포 배지, 분화 보충제, 및 성숙 보충제([cdn.stemcell.com/media/Files/pis/DX20521-PIS\\_1\\_2\\_0.pdf?\\_ga=2.81451927.1035383195.16421057001174975582.1603298321](https://cdn.stemcell.com/media/Files/pis/DX20521-PIS_1_2_0.pdf?_ga=2.81451927.1035383195.16421057001174975582.1603298321); Stem Cell Technologies, 카탈로그 #10986, #10988, 및 #10989)를 사용하여 수지상 세포로 분화시킨다. 간략히, 정제된 단핵구를 분화 보충제를 함유하는 수지상 세포 배지에 첨가하고, 37°C에서 3일 동안 인큐베이션시킨다. 3일차에, 배지를 교체하고 세포를 2일 더 인큐베이션시킨다. 성숙 보충제를 5일차에 1 대 100 희석으로 첨가한다(예를 들어, 5 mL 배양물 당 50 µL 보충제).
- [0312] 분화된 세포를 7일차에 수확한다. 해동된 PBMC에 4 mL ImmunoCult XF T 세포 확장 배지(Stem Cell Technologies, 카탈로그 #10981)를 첨가함으로써 T 세포를 자극한다. 세포를 400 g에서 5분 동안 회전시키고, 배지를 흡입하고, 세포를 10 mL의 신선한 확장 배지에서 밤새 휴지시킨다.
- [0313] 수집 및 계수 후, 휴지된 세포를 400 g에서 5분 동안 회전시키고 재현탁시킨다. 세포 자극을 T 세포 완전 배지의 96 웰 플레이트에서 수행한다. 배지 내 사이토카인의 최종 농도는 100IU IL-2, 5 ng/mL IL-7 및 25 ng/mL IL-15이다. AAV 자극을 양성 대조군으로서 사용된 10 µg PHA-p를 사용하여 1e5 MOI에서 수행한다. 반-고갈을 3일마다 수행한다. PBMC를 해동한 지 10일 후, 세포를 일반 T 세포 배지에서 AAV로 다시 자극한다. 배지를 24시간 자극 후에 수집한다.
- [0314] rAAV 벡터(예를 들어, AAV1, AAV2, 및/또는 AAVrh32.33)를 표준 삼중 형질감염 방법(Sena-Esteves and Gao, *Cold Spring Harb Protoc*; doi:10.1101/pdb.top095513, 2020)을 이용하여 생성한다. 바이러스를 염화세슘 초원심분리에 의해 정제하고 은 염색과 정량적 중합효소 연쇄 반응(qPCR) 둘 모두를 사용하여 적정한다.
- [0315] 림프구 및 수지상 세포를 AAV 벡터와 함께 인큐베이션시키고, IRAK4 분해제로 전처리하거나, 후처리하거나, 공동처리한다. IRAK4 분해제를 이용한 전처리 및 후처리를 AAV 인큐베이션 전 또는 후 3, 6, 12, 24, 또는 48시간 쯤에 수행한다. 세포를 1e5 MOI에서 6, 12, 24, 48, 또는 72시간 동안 AAV와 함께 인큐베이션시킨다. 세포를 1

nM 내지 1 M 범위의 용량으로 화학식 I의 화합물(Kymera Therapeutics)로 처리한다. LPS(24시간 동안 300 ng/mL, Sigma L2630100MG) 및 R848(24시간 동안 1 µg/mL, Invitrogen tlrl-r948-5)을 대조군으로서 사용한다. 추가 시험군은 AAV 단독, IRAK4 저해제 단독, 또는 LPS 또는 R848과 함께 IRAK4 저해제를 사용한 처리를 포함한다.

- [0316] IRAK4 분해제로 처리한 세포에서 TLR9 경로가 저해되는 정도를 결정하기 위해, 세포 배지를 수집하고, Meso Scale Discovery(MSD) 검정을 사용해 분석하여 사이토카인 방출 수준을 결정한다. V-PLEX 인간 바이오마커 54-플렉스 키트를 사용하고, 제조업체의 프로토콜(Meso Scale Discovery, 록빌, MD)에 따라 검정을 수행한다.
- [0317] **실시예 2: AAV 또는 LNP로 처리된 마우스에서 IRAK4 분해제의 생체내 분석**
- [0318] 본 실시예는 동물이 IRAK4 분해제로 처리될 때 AAV 면역원성이 감쇠되는지 여부를 조사하기 위한 생체내 전략을 제공한다.
- [0319] 모든 동물 하우스키핑, 유지, 치료 및 실험을 기관 동물 관리 및 사용 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC) 가이드라인에 따라 수행한다.
- [0320] 동물은 AAV 또는 LNP 주사를 제공받고, IRAK4 저해제로 전처리, 후처리, 또는 공동처리된다. IRAK4 분해제를 사용한 전처리 및 후처리를 AAV 또는 LNP 주사 전 또는 후 6시간째, 밤새, 24시간째 또는 48시간째에 수행한다. 근육내 AAV 주사를  $5 \times 10^{11}$  vg/kg의 용량으로 수행하고, 7, 14, 21, 28, 35, 42 및 63일 동안 모니터링한다. LNP 주사는 1 mg/kg, 10 mg/kg, 또는 100 mg/kg의 용량으로 정맥내, 피하, 또는 복강내 주사이다. 또한, 동물을 피하, 복강내, 또는 경구로 주어진 1 mg/kg, 10 mg/kg 또는 100 mg/kg의 화학식 I의 화합물(Kymera Therapeutics)로 전처리, 후처리, 또는 공동처리한다. 추가 시험군은 AAV 단독, IRAK4 저해제 단독, 또는 LPS 또는 R848과 함께 IRAK4 저해제를 사용한 처리를 포함한다.
- [0321] 동물을 처리 후 7, 14, 21, 28, 35, 42, 또는 63일째에 희생시키고, 근육, 간, 골수, 비장, 혈액, 및 흉선을 단리한다. 조직 샘플을 드라이아이스에서 즉시 냉동시킨다. DNA 및 RNA 샘플을 추출하고, 벡터 게놈 카피 및 트랜스진 발현을 실시간 정량적 PCR(qPCR)을 사용하여 정량화한다.
- [0322] 처리된 동물에서의 조직 염증을 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색을 사용하여 검정한다. 염색을 당업계에 잘 알려진 방법에 따라 포르말린 고정 및 파라핀 포매된 근육 및 간 조직에서 수행한다. (Gernoux, G *et al.*, *Mol Ther*, 2020, 28(3):747-757).
- [0323] 면역조직화학을 당업계에 잘 알려진 방법에 따라 근육, 간 및 비장 동결절편에 대해 수행한다(Gernoux, G *et al.*, *Mol Ther*, 2020, 28(3):747-757). 샘플을 슬라이드에 수집하고, 공기 건조시키고, 3% 파라포름알데히드로 고정한다. T 세포(항-CD3, CD4, 및 MHC II 사용) 및 대식세포(항-F4/80 및 MHC II 사용)와 같은 활성화된 면역 세포, 및 AAV 트랜스진 발현에 대해 샘플을 분석한다. 핵 및 세포질 β-Gal을 표준 X-Gal 프로토콜을 사용하여 평가한다.
- [0324] 처리된 동물에서 사이토카인 수준을 분석하기 위해, 이들 대상체로부터의 혈청을 수집하고 Meso Scale Discovery(MSD) 검정에 사용한다. V-PLEX 인간 바이오마커 54-플렉스 키트를 사용하고, 제조업체의 프로토콜(Meso Scale Discovery, 록빌, MD)에 따라 검정을 수행한다.
- [0325] 처리된 동물에서 IFN-γ 분비를 측정하기 위해, ELISpot 검정을 주사 후 단리된 비장세포에서 수행한다(Gernoux, G *et al.*, *Mol Ther*, 2020, 28(3):747-757). 단리된 세포를 AAV를 사용하여 48시간 동안 시험관내에서 자극한다. 스폿 수를 iSpot ELISpot Reader ELR068IFL(AID)을 사용하여 결정하고 AID ELISpot 리더 소프트웨어 v.6.0을 사용하여 분석한다. 반응은 스폿-형성 단위가 1e6 세포 당 50개를 초과하고 대조군 조건에서보다 적어도 3배 더 높은 경우 양성으로 간주한다. 자극되지 않은 세포를 음성 대조군으로 사용하고, CEFT 및 CD3/CD28 자극을 양성 대조군으로 사용한다.
- [0326] 단일 세포 현탁액을 비장 및 골수 샘플로부터 수득한다. 세포를 CD16/32(Fc Block; BD Biosciences)에서 인큐베이션시키고 항체로 염색한다. 세포를 LSR II(BD Biosciences)에서 획득하고 FlowJo 소프트웨어(Tree Star)를 사용하여 분석한다.
- [0327] 처리된 동물에서 사이토카인 발현을 분석하기 위해, 세포내 사이토카인 염색을 사용하여 단리된 비장세포를 IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, 및 IL-6에 대해 염색한다. 비장세포를 문헌[Mays, *J Immunol* 2009 182(1) 6051-6060]에 기재된 바와 같이 제조한다. 비장세포를 1 µg/mL 브레펠딘 A(GolgiPlug, BD Pharmigen) 및 20 ng/mL

마우스 IL-2(BD Pharmingen)가 보충된 T 세포 검정 배지에 플레이팅한다. 염색 전에, 세포를 10% CO<sub>2</sub>에서 37°C에서 5시간 동안 IRAK4 분해제의 존재 또는 부재 하에 AAV를 사용하여 자극한다. 자극 후, 세포를 세척하고, 항체로 염색하고, 유세포 분석을 사용하여 검사한다. 샘플을 LSR II에서 획득하고 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석한다.

[0328] AAV 및 IRAK4 분해제로 처리된 동물의 T 세포 반응을 문헌[Mays, *J Immunol* 2009 182(1) 6051-6060]에 기재된 프로토콜에 따라 PE-접합된 MHC 클래스 I H2-Kb-ICPMYARV 사량체 복합체(Beckman Coulter)를 사용한 MHC 클래스 I 사량체 염색에 의해 결정한다. AAV 및 IRAK4 분해제로 처리한 후 다양한 시점에, 안와후출혈에 의해 단리된 헤파린화 전혈구에 대해 사량체 염색을 수행한다. 세포를 PE-접합 사량체 및 FITC-접합 항-CD8 α (Ly-2) 항체(BD Pharmingen)로 실온에서 30분 동안 공동 염색하고, 고정액(Beckman Coulter)이 보충된 iTag MHC 사량체 용해액으로 실온에서 15분 동안 고정한다. 세포를 PBS에서 3회 세척하고 0.01% BD CytoFix(BD Biosciences)에 재현탁시킨다. 샘플을 LSR II에서 획득하고 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석한다.

[0329] **실시예 3: AAV로 처리된 인간 세포에 대한 IRAK4 분해제 KT-474의 효과의 생체 외 분석**

[0330] **재료 및 방법**

[0331] **말초 혈액 단핵 세포의 제조.** 상이한 공여자로부터의 류코팩(Stem cell technologies)으로부터의 혈액을 50 mL 튜브로 디캔팅하고 돌베코 인산염 완충 식염수(DPBS)를 1:1 비율로 첨가하였다. 15 mL 피콜(GE17-5442-02)을 함유하는 별도의 50 mL 튜브에 혈액 + DBPS 혼합물을 조심스럽게 피펫팅하여 혈액과 피콜 상이 혼합되지 않도록 보장하였다. 혼합물을 실온에서 25분 동안 2000 RPM으로 원심분리하였다(9회 가속 및 제동 없음). 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 함유하는 버피 코트를 수집하고, 새로운 튜브로 옮기고, 400 RCF로 5분 동안 원심분리하였다. PBMC를 1% 소 태아 혈청(FBS) 또는 송아지 태아 혈청(FCS)을 함유하는 인산염 완충 식염수(PBS)로 3회 세척하고 계수하였다.

[0332] **단핵구의 단리.** 제조업체의 프로토콜(Miltenyi Biotech, 독일, 주문 번호 130-050-201, 온라인 월드 와이드 웹 miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0001260.PDF에서 이용 가능한 프로토콜)에 따라 CD14 마이크로비드를 사용하여 PBMC로부터 CD14+ 단핵구를 단리하였다. 간략히, PBMC를 2°C 내지 8°C에서 15분 동안 총 10<sup>7</sup>개 세포 당 20 μL의 CD14 마이크로비드와 함께 인큐베이션시켰다. PBMC를 자기 컬럼(Miltenyi; 월드 와이드 웹 miltenyibiotec.com/US-en/products/ls-columns.html#130-042-401) 상에 적용하고, 비표지 세포를 통과시켰다. 컬럼을 3회 세척한 후, 컬럼을 자기 분리기(Miltenyi; 월드 와이드 웹 miltenyibiotec.com/US-en/products/quadromacs-separator-and-starting-kits.html#130-091-051)로부터 제거하고, 수집 튜브 상에 배치하고, 플런저를 컬럼 내로 밀어서 자기 표지된 CD14+ 단핵구를 플러싱하였다.

[0333] **단핵구의 분화.** 온라인에서 이용 가능한 제조업체의 프로토콜에 따라 ImmunoCult-ACF 수지상 세포 배지, 분화 보충제, 및 성숙 보충제(Stem Cell Technologies, 카탈로그 #10986, #10988, 및 #10989; 월드 와이드 웹 cdn.stemcell.com/media/Files/pis/DX20521-PIS\_1\_2\_0.pdf?\_ga=2.81451927.1035383195.1642105700-1174975582.1603298321)를 사용하여 CD14+ 단핵구를 수지상 세포로 분화시켰다. 간략히, 정제된 CD14+ 단핵구를 분화 보충제를 함유하는 수지상 세포 배지에 첨가하고, 37°C에서 3일 동안 인큐베이션시켰다. 3일차에, 배지를 분화 보충제를 함유하는 신선한 수지상 세포 배지로 교체하고, 세포를 2일 더 인큐베이션시켰다. 5일차에, 성숙 보충제를 1 대 100 희석으로 세포에 첨가하였다(예를 들어, 5 mL 배양당 50 μL 보충제). 분화된 수지상 세포를 7일차에 수확하였다.

[0334] **rAAV 생성 및 적정.** rAAV 벡터를 표준 삼중 형질감염 방법(Sena-Esteves and Gao, *Cold Spring Harb Protoc*; doi:10.1101/pdb.top095513, 2020)을 이용하여 생성하였다. 평가된 모든 혈청형은 동일한 GFP 트랜스진을 인코딩한다. 바이러스를 염화세슘 초원심분리에 의해 정제하고 은 염색과 정량적 중합효소 연쇄 반응(qPCR) 둘 모두를 사용하여 적정하였다.

[0335] **AAV, KT 474 처리 및 사이토카인 측정.** 인간 단핵구 수지상 세포를 96 웰 형식으로 플레이팅하고, 지시된 용량에서 1e5 MOI의 AAV 및 KT 474로 처리하고, 유세포 분석을 통한 세포 독성 및 표적 유전자 발현과 같은 하류 분석을 위해 24시간 후에 수확하였다. 사이토카인 분석을 위해 배지를 수집하였다. 세포를 2,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 수집하여 사이토카인을 분석하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 MILLIPLEX® 인간 사이토카인/케모카인/성장 인자 패널 A 38 플렉스 예비혼합된 자성 비드 패널 - 면역학 멀티플렉스 검정 카탈로그 # HCYTA-60K-PX38을 사용하는 루미넥스를 사용하여 사이토카인을 측정하였다.

- [0336] **세포 생존력 평가 및 IRAK4 발현:** 수지상 세포(DC)를 FACS 완충액에 재현탁시키고 U자형 바닥 96 웰 플레이트로 옮겼다. 세포를 2,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 폐기하였다. 세포 생존력을 분석하기 위해, 라이브/데드 음성 염색 세포를 게이팅하고, 백분율을 세포 생존력인 것으로 결정하였다. Invitrogen으로부터의 633 nm 또는 635 nm 여기 카탈로그 # L34975를 위한 Live/DEAD™ 고정식 근적외선 데드 셀 염색 키트를 세포 염색에 사용하였다. IRAK4 염색을 위해, 수지상 세포를 용해시키고, 1X BD Phosphoflow™ Lyse/Fix 완충액으로 37°C에서 10분 동안 고정시켰다. 그 후에, 수지상 세포를 4°C에서 30분 동안 BD Phosphoflow™ Perm 완충액 III로 투과시켰다. 이어서, 수지상 세포를 PE 마우스 항-인간 IRAK4 항체로 4°C에서 30분 동안 염색하고, 세척하고, 유세포 분석을 위해 실행하였다. PE 마우스 항-인간 IRAK4(BD Biosciences, Cat. No. 560303) BD Phosphoflow™ Lyse/Fix 완충액(Cat. No. 558049) BD Phosphoflow™ Perm 완충액III, Cat. No. 558050).
- [0337] **도 1**은 AAV로 처리된 인간 수지상 세포에 대한 IRAK4 분해제 KT-474의 효과를 평가하기 위한 스키마를 보여준다. **도 1**에서는 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)가 류코팩으로부터 단리되었다. CD14+ 단핵구를 (PBMC)로부터 정제하고, 분화 인자 콕테일을 단핵구에 첨가하여 수지상 세포로의 분화를 허용하고, 마지막으로 성숙 인자를 첨가하여 성숙 수지상 세포를 수득하였다. 성숙 수지상 세포를 처리 24시간 후 KT-474 및 AAV를 사용하여 함께 처리하였다(공동처리). 사이토카인 방출과 같은 하류 분석을 위해 배지 상청액을 수집하였다. 세포를 사용하여 IRAK4 분해 수준을 측정하고 세포 생존력을 평가하였다.
- [0338] **결과**
- [0339] 인간 단핵구 수지상 세포를 지시된 바와 같이 상이한 용량의 KT-474로 공동처리하고, 동일한 세포를 1e5의 MOI에서 24시간 동안 동시에 AAV로 감염시키고, 배지 상청액을 사이토카인 방출에 대해 분석하였다. **도 2**는 AAV와 함께 Kt-474로 공동처리하는 것이 사이토카인 방출의 감소를 초래한다는 것을 보여준다. AAV를 사용한 처리는 수지상 세포로부터 IL1b(**도 2a**), IL6(**도 2b**) 및 TNFa(**도 2c**) 사이토카인의 분비를 유도하고, 이러한 분비는 모든 용량에서 KT-474에 의해 차단된다. 막대 그래프 상의 각각의 점은 대표적인 공여자의 기술적 반복을 나타낸다. 실험을 3명의 공여자에 대해 수행하였고, 일원 ANOVA를 이용하여 통계적 유의성을 결정하였다. 사이토카인 분비는 모든 공여자에 걸쳐 백분율로 표현한다.
- [0340] 인간 단핵구 수지상 세포를 지시된 바와 같이 상이한 용량의 약물로 처리하고, 동일한 세포를 24시간 동안 1e5의 MOI에서 AAV로 감염시켰다. 처리된(AAV 및 KT474 공동처리된) 및 AAV 감염된 세포와 비교하여 대조군(비처리/비감염 세포) 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않았는데, 이는 KT-474가 시험된 용량에서 세포 독성을 갖지 않았음을 나타낸다(**도 3**). 막대 그래프 상의 각각의 점은 하나의 공여자를 나타내고, 실험을 3명의 공여자에 대해 수행하였고, 일원 ANOVA를 이용하여 통계적 유의성을 결정하였다. 이에 따르면, KT-474를 사용한 처리는 1차 인간 단핵구 수지상 세포에서 세포 독성을 야기하지 않는다.
- [0341] 인간 단핵구 수지상 세포를 지시된 바와 같이 상이한 용량의 KT-474로 처리하고, 동일한 세포를 24시간 동안 1e5의 MOI에서 AAV로 감염시켰다. 유세포 분석을 사용하여 IRAK4 분해에 대해 세포를 분석하였다. KT-474는 모든 용량에서 IRAK4 수준의 감소를 야기한다(**도 4**). 막대 그래프 상의 각 점은 대표적인 공여자의 기술적 반복을 나타내고, 실험을 3명의 공여자에 대해 수행하였고, 일원 ANOVA를 이용하여 통계적 유의성을 결정하였다.
- [0342] **실시예 4: 생체내 마우스 모델에서 AAV에 의해 유도된 면역 반응에 대한 IRAK4 분해제 KT-474의 효과의 분석**
- [0343] **재료 및 방법**
- [0344] **생체내 마우스 실험:** C57BL/6J 마우스를 Jackson Laboratories로부터 구입하였다. 6주령 내지 8주령 수컷 마우스를 3개의 군(PBS 군, AAV 군 및 AAV+KT474 군)으로 나누었으며, 모든 군에는 각각 6마리의 마우스가 있었다. 화학식 I의 화합물(KT-474)을 마우스 차우 카탈로그 # 2016, Teklad Global 16% 단백질 설치류 식이(<https://www.inotivco.com/rodent-natural-ingredient-2016-diets>)와 100 mg/kg의 용량으로 혼합하였다. AAV+KT-474 군에는 AAV 주사 15일 전에 KT474를 갖는 차우를 공급한 반면, PBS 및 AAV 군에는 마우스 차우 카탈로그 # 2016, Teklad Global 16% 단백질 설치류 식이(<https://www.inotivco.com/rodent-natural-ingredient-2016-diets>)를 공급하였다. PBS 군 마우스에는 100 uL PBS를 근육내 주사하였고, AAV 군에는 양 다리의 사두근 당 1 e11 vg, 100 ul 부피를 근육내 주사하였다. 연구에 사용된 AAV 캡시드는 LacZ 트랜스젠을 가졌다. 모든 동물 실험은 Sanofi(프레이밍햄)에서 기관 동물 관리 및 사용 위원회에 따라 수행하였다. 하악골하 출혈을 매주 수행하고, AAV 주사 3주 후에 부검을 수행하였다.
- [0345] **도 5**는 생체 내 마우스 실험의 개략도를 보여준다. 도시된 마우스는 AAV 주사 15일 전에 KT-474 혼합 차우를 마우스에 공급한 후 14일차에 PBMC 분석을 위해 혈액을 수집하고, 비장을 수확하기 위해 21일차에 마우스 부검을

수행한 군 AAV+KT-474 군을 보여준다. PBS 및 AAV 단독 군에 일반 차우를 공급하고, 14일차에 채혈하고, 21일차에 부검하였다.

[0346] **PBMC 단리.** 120  $\mu$ l의 혈액을 K2EDTA 코팅 튜브에 수집하였다. 혈액을 1:1 비율로 DBPS와 혼합하고, 피콜(GE17-5442-02)을 함유하는 별도의 튜브에 피펫팅하여 혈액과 피콜 상이 혼합되지 않도록 보장하였다. 혼합물을 실온에서 25분 동안 2000 RPM으로 원심분리하였다(9회 가속 및 제동 없음). 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 함유하는 버피 코트를 수집하고, 새로운 튜브로 옮기고, 400 RCF로 5분 동안 원심분리하였다. PBMC를 1% 소 태아 혈청(FBS) 또는 송아지 태아 혈청(FCS)을 함유하는 인산염 완충 식염수(PBS)로 3회 세척하고 계수하였다. 이에 따라 수득된 PBMC 세포를 상이한 항체로 염색하여 말초 혈액 중 상이한 면역 세포 서브세트의 백분율을 정량화하였다.

[0347] **LacZ 사랑체 염색.** PBMC를 약 120  $\mu$ l의 마우스 혈액으로부터 단리하고, 이를 96 웰 U자형 바닥 플레이트로 옮겼다. PBMC를 2,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 200  $\mu$ l의 FACS 완충액으로 1회 세척하고, PBMC를 4°C에서 30분 동안 유동 항체 각테일(1:100 항-CD4 PE-Cy7, 1:50 항-CD8a FITC, 1:100 항-CD62L APC, 1:100 항-CD44 Pacific Blue, 1:100 라이브/데드 테드 셀 염색 키트, 및 1:20 H-2Kb  $\beta$ -갈락토시다제 사랑체)로 염색하였다. 인큐베이션 후, 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척한 다음, 4°C에서 15분 동안 100  $\mu$ l의 BD Cytotfix/Cytoperm 고정/투과 용액 키트로 고정하였다. 세포를 FACS 완충액으로 2회 세척한 다음, 샘플을 유세포 분석기(Novocyte Penton Flow Cytometer Systems 5 Lasers, Agilent Technology)에서 실행하였다.

[0348] **결과**

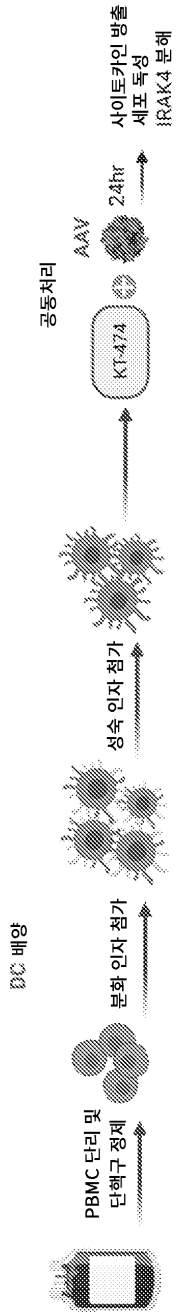
[0349] 마우스를 AAV 주사 후 14일차에 채혈하고, PBMC를 단리하였다. 비장세포를 AAV 주사 후 21일차에 수확하였다. PBMC 및 비장세포를 상이한 항체로 염색하여 LacZ 사랑체 양성 세포를 정량화하였다. 이들 세포 집단은 PBS 대조군과 비교하여 AAV 투여에 대해 상향조절된 후 KT-474 처리 시 유의하게 감소되었다(도 6). 도 6a는 AAV 주사 후 14일째의 말초 혈액으로부터 유래된 PBMC에서의 트랜스진 LacZ 특이적 CD8 T 세포의 감소를 보여준다. 도 6b는 AAV 주사 후 21일차에 비장에서 트랜스진 LacZ 특이적 CD8 T 세포의 감소를 보여준다. ROUT 이상값 방법 및 일원 ANOV 방법을 이용하여 통계적 유의성을 결정하였다. ROUT 방법은 비선형 회귀로부터의 이상값을 확인한다.

[0350] **실시예 5: AAV에 의해 유도된 면역 반응에 대한 IRAK4 분해제 KT-474에 대한 경구 투여의 효과를 평가하기 위한 생체내 마우스 모델**

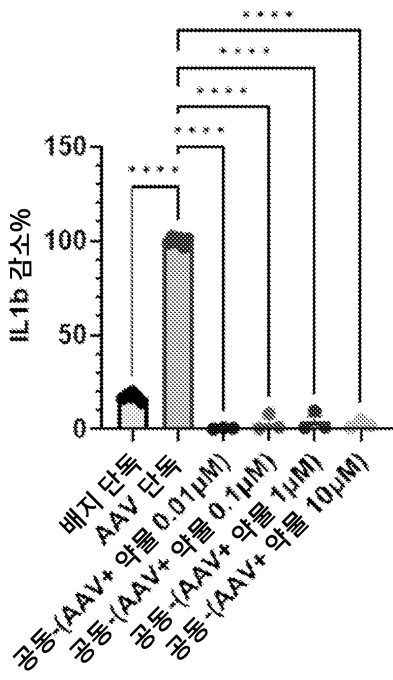
[0351] 도 7은 AAV에 의해 유도된 면역 반응에 대한 IRAK4 분해제 KT-474에 대한 경구 투여의 효과를 평가하기 위한 생체내 마우스 모델의 일반적인 개략도를 보여준다. C57BL/6J 마우스는 Jackson Laboratories로부터 구입한다. 6 내지 8주 수컷 마우스는 3개의 군, 즉, PBS 군, AAV 군 및 AAV+ KT474로 나누어진다. KT-474는 처리 전 및 공동처리 전략으로서 100 mg/kg 용량으로 1일 2회 치료되는 경구 투여 경로를 통해 시험되고 있다. KT-474의 경구 투여는 다른 질환에 대해 진료소에서 시험되고 있으며(<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04772885>), 따라서 IRAK4 단백질을 차단하는 데 효과적이어야 한다. 키메라 치료제는 또한 인간 세포 및 마우스 조직에서 KT474를 사용한 IRAK4 단백질의 완전한 분해의 증거를 나타낸다([https://www.kymeratx.com/wp-content/uploads/2021/09/Euro-Prot-Deg-Summit-Sept-21-Final\\_Anthony-Slavin.pdf](https://www.kymeratx.com/wp-content/uploads/2021/09/Euro-Prot-Deg-Summit-Sept-21-Final_Anthony-Slavin.pdf)).

도면

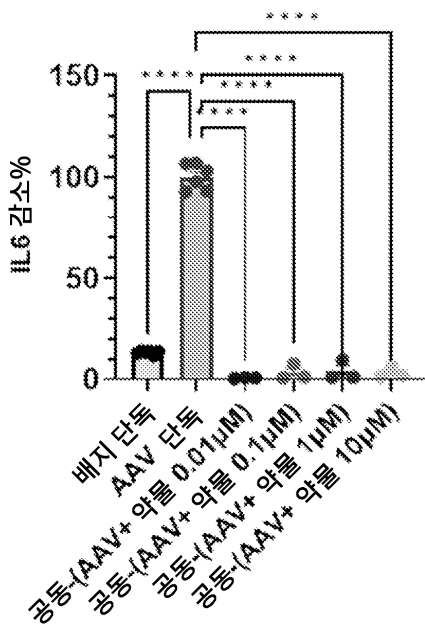
도면1



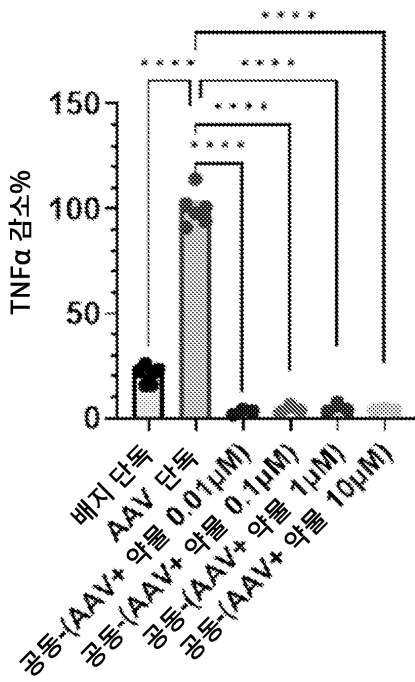
도면2a



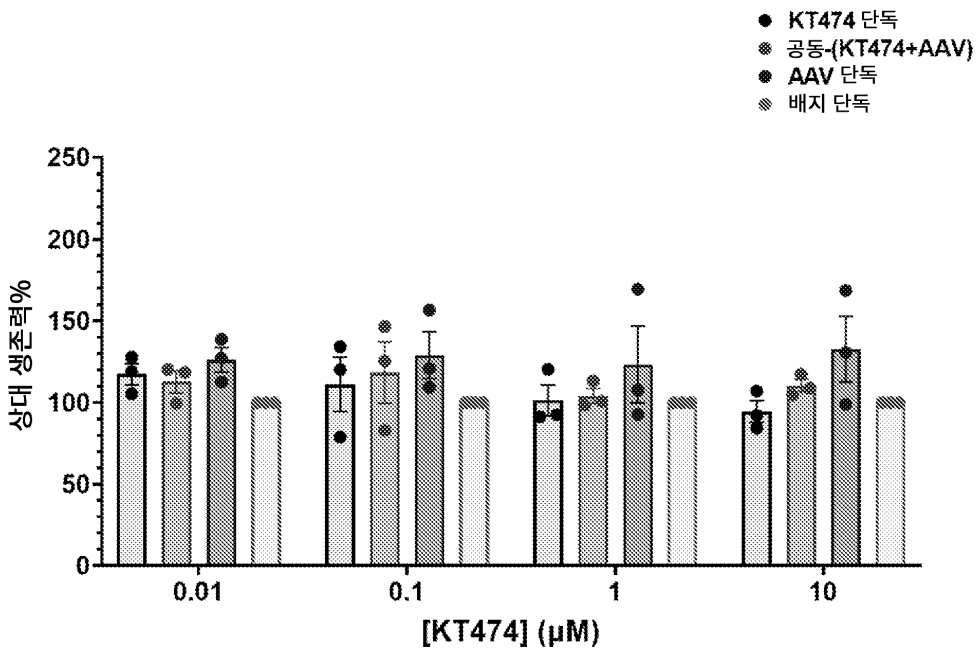
도면2b



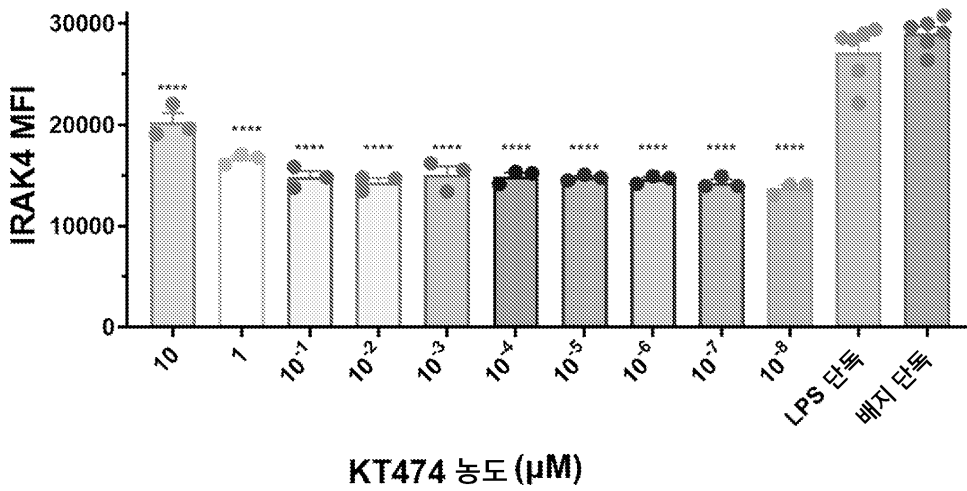
도면2c



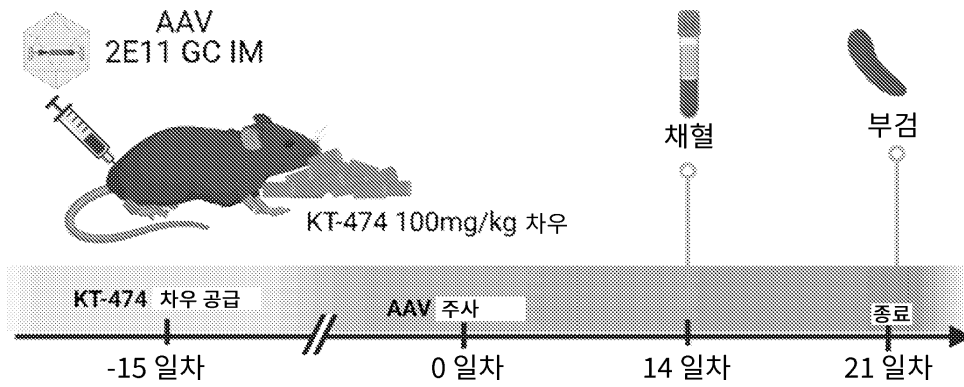
도면3



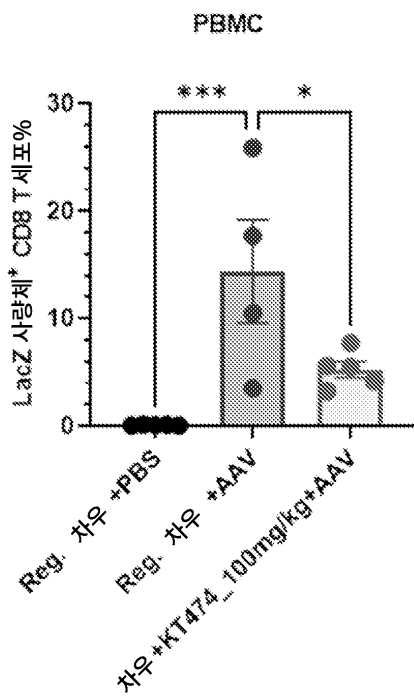
도면4



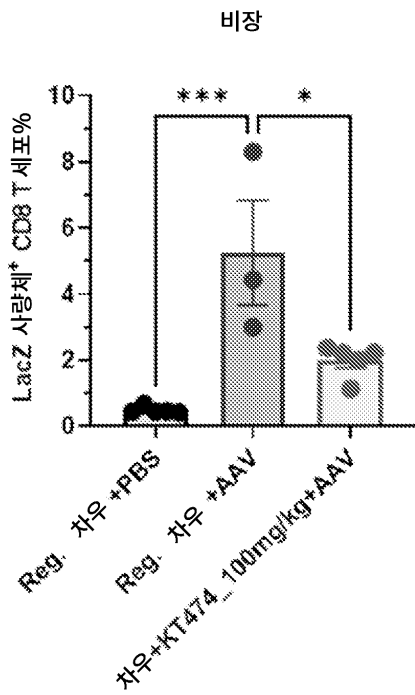
도면5



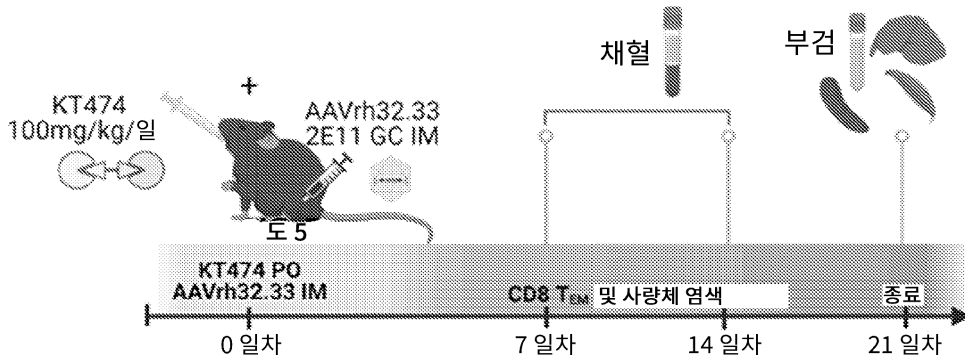
도면6a



도면6b



도면7



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.