(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115968302 A
(43)申请公布日 2023.04.14

(21)申请号 202180050281.X
(22)申请日 2021.06.16
(30)优先权数据
63/040381 2020.06.17 US
63/135998 2021.01.11 US
63/152085 2021.02.22 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.02.15
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/037575 2021.06.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/257668 EN 2021.12.23
(71)申请人 宾夕法尼亚州大学信托人
地址 美国宾夕法尼亚州
(72)发明人 C·欣德尔 堀内真
J·M·威尔逊
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 黄登高 梅黎
(51)Int.Cl.
A61K 45/06(2006.01)

权利要求书3页 说明书45页 附图17页

(54)发明名称

用于治疗基因疗法患者的组合物和方法

(57)摘要

本文提供了组合物,所述组合物可用于与基因疗法载体共施用于对基因疗法载体衣壳的病毒源具有预先存在的中和抗体的患者。所述组合物包括抑制FcRn与IgG之间的特异性结合的FcRn配体。

CN 115968302 A

1.一种用于治疗患者的组合方案,所述患者对所选AAV衣壳或对所述所选衣壳具有血清学交叉反应性的AAV衣壳具有免疫球蛋白G(IgG)中和抗体,所述方案包括:(a)施用AAV病毒载体,所述AAV病毒载体包括所述所选AAV衣壳和载体基因组,所述载体基因组包括编码基因产物的与指导所述基因产物在靶细胞中的表达的调控序列可操作地连接的核酸序列,以及(b)共施用配体,所述配体特异性地阻止人新生儿Fc受体(FcRn)与所述中和抗体之间的结合,而不干扰白蛋白与FcRn结合。

2.根据权利要求1所述的组合方案,其中所述配体选自肽、蛋白质、RNAi序列或小分子。

3.根据权利要求1或2所述的组合方案,其中所述配体是针对FcRn的单克隆抗体、免疫粘附素、骆驼科动物抗体、Fab片段、Fv片段或scFv片段。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的组合方案,其中所述配体是选自以下的单克隆抗体:尼卡利单抗(nipocalimab,M281)、洛利昔珠单抗(rozanolixizumab);IMVT-1401、RVT-1401、HL161、HBM916、艾加莫德(efgartigimod)、奥诺利单抗(orilanolimab,SYNT001)、SYNT002、ABY-039、DX-2507、其衍生物或组合。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的组合方案,其中所述配体是尼卡利单抗(M281)或包括其三个或更多个CDR的免疫球蛋白构建体,所述CDR选自:

(a)以下的重链CDR:(i)CDR H1,即SEQ ID NO:16或与其至少99%相同的序列;(ii)CDR H2,即SEQ ID NO:18或与其至少99%相同的序列;以及(iii)CDRH3,即SEQ ID NO:20或与其至少99%相同的序列;或

(b)以下的轻链CDR:CDR L1,即SEQ ID NO:10或与其至少99%相同的序列;

CDR L2,即SEQ ID NO:12或与其至少99%相同的序列;CDR L3,即SEQ ID NO:14或与其至少99%相同的序列。

6.根据权利要求5所述的组合方案,其中尼卡利单抗或所述免疫球蛋白构建体包括:

(a)以下的重链CDR:(i)CDR H1,即SEQ ID NO:16;(ii)CDR H2,即SEQID NO:18;以及(iii)CDR H3,即SEQ ID NO:20;或

(b)以下的轻链CDR:CDR L1,即SEQ ID NO:10;CDR L2,即SEQ ID NO:12;

CDR L3,即SEQ ID NO:14。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的组合方案,其中在递送包括编码所述配体的与指导所述配体的表达的调控序列可操作地连接的序列的载体之后,所述配体在体内表达。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的组合方案,其中编码所述基因产物的rAAV具有选自以下的衣壳:AAV1、AAV2、AAV3、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAVrh91、AAVhu37或AAVhu68。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的组合方案,其中在递送所述组合方案之前,所述患者对rAAV衣壳或血清学交叉反应性衣壳具有大于1:5的中和效价,如在体外测定中所测定的。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的组合方案,其中所述配体在递送所述rAAV之前一至七天递送。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的组合方案,其中所述配体每天递送。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的组合方案,其中所述配体在递送所述rAAV的同一天递送。

13.根据权利要求1至9中任一项所述的组合方案,其中所述配体在rAAV递送后递送,持续一天至四周和/或持续四周至6个月。

14.根据权利要求1至14中任一项所述的组合方案,其中所述配体口服递送。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的组合方案,其中所述rAAV全身递送,任选地通过腹膜内、静脉内、肌内、或鼻内或鞘内递送。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的组合方案,其中在递送所述病毒载体与所述抑制性配体的组合之前,所述患者先前未接受过使用AAV进行的基因疗法治疗或基因递送,使得所述患者的预先存在的中和抗体是野生型病毒载体感染的结果。

17.根据权利要求1至16中任一项所述的组合方案,其中所述方案进一步包括共施用以下中的一者或多者:(a)类固醇或类固醇组合;和/或(b)IgG切割酶;以及(c)Fc-IgE结合的抑制剂;(d)Fc-IgM结合的抑制剂;(e)Fc-IgA结合的抑制剂;和/或(f)γ干扰素。

18.一种抗FcRn抗体在制造用于根据根据权利要求1至17中任一项所述的组合方案中以用有效量的所述基因产物治疗有需要的患者的药物中的用途。

19.一种包括用于递送至细胞的转基因的rAAV载体在制造用于根据权利要求1至17中任一项所述的组合方案中的药物中的用途,所述组合方案包括共施用所述rAAV载体和抗FcRn抗体。

20.一种用于增加rAAV介导的基因疗法有效的患者群体的方法,

所述方法包括向来自对所选AAV病毒衣壳或血清学交叉反应性衣壳具有阻止转基因产物的有效转移和表达水平的中和抗体效价的群体的患者共施用以下:

(a)重组rAAV,所述重组rAAV具有所选AAV衣壳和包装在所选衣壳中的载体基因组;以及

(b)配体,所述配体在递送基因疗法载体之前特异性地结合新生儿Fc受体(FcRn),而基本上不干扰FcRn-白蛋白结合,

其中所述配体阻断所述FcRN与免疫球蛋白G(IgG)的结合,并允许有效量的基因疗法产物在所述患者体内表达。

21.根据权利要求20所述的方法,其中免疫球蛋白构建体选自单克隆抗体、免疫粘附素、骆驼科动物抗体、Fab片段、Fv片段或scFv片段。

22.根据权利要求20所述的方法,其中所述rAAV全身递送。

23.根据权利要求20所述的方法,其中所述rAAV静脉内、腹膜内、鼻内或通过吸入递送。

24.根据权利要求20所述的方法,其中所述rAAV具有选自以下的衣壳:AAV1、AAV2、AAV3、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAVrh91、AAVhu37、AAVhu68。

25.根据权利要求20所述的方法,其中免疫球蛋白构建体是单克隆抗体尼卡利单抗(M281)或包括其三个或更多个CDR的免疫球蛋白构建体。

26.根据权利要求25所述的方法,其中所述免疫球蛋白构建体包括:

(a)以下的重链CDR:(i)CDR H1,即SEQ ID NO:16或与其至少99%相同的序列;(ii)CDR H2,即SEQ ID NO:18或与其至少99%相同的序列;以及(iii)CDRH3,即SEQ ID NO:20或与其至少99%相同的序列被选择;或

(b)以下的轻链CDR:CDR L1,即SEQ ID NO:10或与其至少99%相同的序列;

CDR L2,即SEQ ID NO:12或与其至少99%相同的序列;CDR L3,即SEQ ID NO:14或与其

至少99％相同的序列。

27.根据权利要求20所述的方法，其中免疫球蛋白构建体选自洛利昔珠单抗(UCB7665)、IMVT-1401、RVT-1401、HL161、HBM916、ARGX-113(艾加莫德)、SYNT001、SYNT002、ABY-039或DX-2507、或所述免疫球蛋白构建体的衍生物、或所述免疫球蛋白构建体和/或其衍生物的组合。

28.根据权利要求20所述的方法，其中免疫球蛋白构建体在递送所述rAAV之前一至七天递送。

29.根据权利要求20所述的方法，其中免疫球蛋白构建体每天递送。

30.根据权利要求20所述的方法，其中免疫球蛋白构建体在递送所述rAAV的同一天递送。

31.根据权利要求20所述的方法，其中免疫球蛋白构建体在rAAV递送后至少一天至四周递送。

32.根据权利要求30所述的方法，其中免疫球蛋白构建体在rAAV递送后递送，持续四周至6个月。

33.根据权利要求20所述的方法，其中免疫球蛋白构建体通过与递送所述rAAV的途径不同的途径递送。

34.根据权利要求20所述的方法，其中免疫球蛋白构建体口服递送。

35.根据权利要求20所述的方法，其中所述患者被预先测定为具有大于1:5的中和效价，如在体外测定中所测定的。

36.根据权利要求20所述的方法，其中所述方法是进一步包括共施用以下中的一者或多者的方案的一部分：(a)类固醇或类固醇组合；和/或(b)IgG切割酶；(c)Fc-IgE结合的抑制剂；(d)Fc-IgM结合的抑制剂；(e)Fc-IgA结合的抑制剂；和/或(f)γ干扰素。

用于治疗基因疗法患者的组合物和方法

背景技术

[0001] 重组腺相关病毒(AAV)载体源自野生型(WT)AAV,其是细小病毒科家族中的小的、无包膜的、4.7kb DNA依赖病毒。这些rAAV已经证明了在包含眼、肝脏、骨骼肌和中枢神经系统等多种组织中成为有用的基因递送系统的能力。WT AAV在人群中高度流行,因为其已在许多不同的人体组织中被检测到[Smith-Arica JR等人,使用腺病毒和腺相关病毒载体的人和小鼠胚胎干细胞的感染效率(Infection efficiency of human and mouse embryonic stem cells using adenoviral and adeno-associated viral vectors.)《克隆干细胞(Cloning Stem Cells)》2003;5:51-62;Friedman-Einat M等人,人生殖道中腺相关病毒2型序列的检测(Detection of adeno-associated virus type 2sequences in the human genital tract.)《临床微生物学杂志(J Clin Microbiol)》1997;35:71-8;以及Auricchio A,Rolling F.用于视网膜基因转移和视网膜疾病治疗的腺相关病毒载体(Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer and treatment of retinal diseases.)《当前基因疗法(Curr Gene Ther)》2005;5:339-48]。例如,在多达15%至30%的群体中描述了自然AAV感染的患病率(>1:20,AAV8)。

[0002] 虽然暴露于WT AAV与任何临床病理学或疾病无关,但已经证明存在对某些AAV的预先存在的中和抗体并且可以阻止具有相同或血清学交叉反应性衣壳的rAAV,可以阻止载体施用后的组织转导。因此,大于1:5的中和抗体效价的存在是基于AAV的全身基因疗法的常见排除标准。HC Verdera等人,《分子疗法(Molecular Therapy)》,第28卷,第3期,第723-746页(2020年3月)。静脉内AAV施用后,大于1:5的NAb效价显著降低转基因的表达。特别是全身型/静脉内施用AAV,NAb在效价>1:10时完全阻断基因转导。

[0003] 目前,患者因其AAV中和抗体效价而被排除在临床试验之外,并且预计至多30%的患者因其中和抗体效价而没有资格接受经批准的AAV药物。

[0004] 已经尝试了各种尝试来降低对所选AAV衣壳的预先存在的中和抗体对有效治疗具有所述衣壳的rAAV患者的能力的影响。这些方法包含使用与rAAV递送相结合的各种免疫抑制方案。

[0005] 新生儿Fc受体(FcRn)是由独特的跨膜普通β2-微球蛋白(β2m)组成的非经典的主要组织相容性(MHC)I类分子。(Burmeister,W.P.Huber,A.H.&Bjorkman,P.J.大鼠新生儿Fc受体与Fc的复合物的晶体结构(Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc.)《自然(Nature)》372,379-383(1994),Burmeister,W.P.Gastinel,L.N.Simister,N.E.,Blum,M.L.&Bjorkman,P.J.MHC相关新生儿Fc受体分辨率为2.2 Å的晶体结构(Crystal structure at2.2 Åresolution of the MHC-related neonatal Fc receptor.)《自然》372,336-343(1994);West,A.P.Jr.&Bjorkman,P.J.人主要组织相容性复合体相关Fc受体的晶体结构和免疫球蛋白G(IgG)结合特性(Crystal structure and immunoglobulin G(IgG)binding properties of the human major histocompatibility complex-related Fc receptor.)《生物化学(Biochemistry)》39,9698-9708(2000))。FcRn已被描述为在哺乳动物的IgG和血清(SA)白蛋白水平的调控中发挥作用。人FcRn的三维结

构已有描述[V Oganesyan等人,《生物化学杂志(J Biol Chem.)》,第289卷,第11期,第2812-78124页(2014年3月)。FcRn的抑制剂被认为在治疗体液介导的自身免疫性病症中发挥作用。参见X Li和RP Kimberly,《关于治疗靶点的专家意见(Expert Opin Ther Targets)》,2014年3月;18(3):335-350。

[0006] 本领域需要存在用于对AAV病毒衣壳具有中和抗体的患者进行基因疗法治疗的组合物和方法。

发明内容

[0007] 本文所提供的组合物和方案通过消除对所选病毒载体衣壳的中和抗体的作用,增加了可以用基因疗法载体治疗的患者群体,并且由此允许有效递送具有携带所期望的基因产物的AAV衣壳的rAAV。

[0008] 一种用于治疗患者的组合方案,所述患者对病毒载体具有中和抗体,所述方案包括施用包括表达盒的病毒载体,所述表达盒包括编码用于在靶细胞中表达的基因产物的核酸序列和指导其与抑制人新生儿Fc受体(FcRn)和免疫球蛋白G(IgG)结合的配体组合表达的调控序列。在某些实施例中,病毒载体全身递送。在某些实施例中,配体是肽、蛋白质、RNAi序列或小分子。在某些实施例中,蛋白质是单克隆抗体、免疫粘附素、骆驼科动物抗体、Fab片段、Fv片段或scFv片段。在某些实施例中,重组病毒载体是重组腺相关病毒、重组腺病毒、重组单纯性疱疹病毒或重组慢病毒。在某些实施例中配体是特异性地抑制FcRn-IgG结合而不干扰FcRn-白蛋白结合的单克隆抗体。在某些实施例中,单克隆抗体是尼卡利单抗(nipocalimab,M281)、洛利昔珠单抗(rozanolixizumab,UCB7665)、IMVT-1401、RVT-1401、HL161、HBM916、ARGX-113(艾加莫德(efgartigimod))、SYNT001、SYNT002、ABY-039或DX-2507,其衍生物或组合。在某些实施例中,配体在施用所述病毒载体之前一至七天递送。在某些实施例中,配体每天递送。在某些实施例中,配体在施用病毒载体的同一天给药或施用。在某些实施例中,配体在载体施用后一天至四周给药。在某些实施例中,配体通过与载体的施用途径不同的施用途径给药。在某些实施例中,配体口服给药。在某些实施例中,病毒载体通过腹膜内、静脉内、肌内、鼻内或鞘内给药。在某些实施例中,预先确定患者对载体衣壳具有大于1:5的中和抗体效价,如在体外测定中所测定的。在某些实施例中,在递送病毒载体与抑制性配体的组合之前,患者先前未接受过基因疗法,使得所述患者的预先存在的中和抗体是野生型感染的结果。在某些实施例中,在递送病毒载体与抑制性免疫球蛋白构建体的组合之前,患者先前已接受了基因疗法治疗。在某些实施例中,方案进一步包括共施用以下中的一者或多者:(a)类固醇或类固醇组合;和/或(b)IgG切割酶;(c)Fc-IgE结合的抑制剂;(d)Fc-IgM结合的抑制剂;(e)Fc-IgA结合的抑制剂;和/或(f)γ干扰素。

[0009] 在另外的方面,提供了一种用于增加基因疗法有效的患者群体的方法。所述方法包括向来自对所选病毒衣壳或血清学交叉反应性衣壳具有大于1:5的中和抗体效价的群体的患者共施用以下:(a)重组病毒,所述重组病毒具有所选病毒衣壳和包装在其中的基因疗法表达盒;以及(b)配体,所述配体在递送基因疗法载体之前特异性地结合新生儿Fc受体(FcRN),其中所述配体阻断FcRn与免疫球蛋白G(IgG)的结合并允许有效量的基因疗法产物在患者体内表达。

[0010] 在某些实施例中,提供了一种用于治疗患者的方法,所述患者对重组腺相关病毒

(rAAV)衣壳具有中和抗体。所述方法包括将rAAV与抗新生儿Fc受体(FcRn)免疫球蛋白构建体组合施用,其中所述免疫球蛋白构建体特异性地抑制FcRn-免疫球蛋白G(IgG)结合。在某些实施例中,所述免疫球蛋白构建体选自单克隆抗体、免疫粘附素、骆驼科动物抗体、Fab片段、Fv片段或scFv片段。在某些实施例中,所述免疫球蛋白构建体特异性地抑制人FcRn-IgG结合,而不干扰FcRn-白蛋白结合。在某些实施例中,rAAV全身递送,例如,通过静脉内、腹膜内、鼻内或通过吸入递送。在某些实施例中,rAAV具有选自以下的衣壳:AAV1、AAV2、AAV3、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAVhu37。在某些实施例中,免疫球蛋白构建体包括尼卡利单抗(M281)的重链和/或轻链的CDR。在某些实施例中,免疫球蛋白构建体是单克隆抗体尼卡利单抗(M281)。在某些实施例中,免疫球蛋白构建体在施用rAAV的同一天递送。在某些实施例中,免疫球蛋白构建体在rAAV施用后至少一天至四周递送。在某些实施例中,免疫球蛋白构建体在rAAV施用后递送,持续四周至6个月。

[0011] 根据本发明的以下详细描述,本发明的其它方面和优点将变得显而易见。

附图说明

[0012] 图1A和1B示出了在用IVIG处理的hFcRn小鼠中,M281 mAb降低了hIgG并改善了AAV-TT1(测试转基因1)转导。图1A示出了IVIG处理后第1天至第16天的血清人IgG的水平。图1B示出了AAV8载体递送后血清中转基因活性的水平,以单位(U)表示。正方形表示接受M281静脉内注射的小鼠。实心正方形表示观察到IgG水平降低的小鼠。空心正方形表示未观察到IgG水平降低的小鼠。

[0013] 图2A和2B示出了M281还原型IVIG源性NAb与总hIgG一起抑制FcRn,并允许在静脉内递送AAV8载体之后进行肝脏转导。图2A示出了用IVIG预处理后第0天至第5天的血清人IgG(hIgG)的水平。箭头指示M281和AAV载体的施用。图2B示出了研究第0天至第33天的血清中的TT1水平。

[0014] 图3示出了用于评估阻断性FcRn对非人灵长类动物(NHP)中NAb效价和AAV-TT2(测试转基因2)转导的影响的研究设计(研究1和研究2)。

[0015] 图4A至4D示出M281输注降低了NHP中预先存在的NAb效价以及IgG(研究1)。图4A示出了以第-5天的百分比绘制的血清恒河猴IgG(rhIgG)的水平,其中M281施用通过图上的箭头指示。图4B示出了AAVhu68非中和结合抗体(BAb)效价,其中M281施用通过图上的箭头指示。图4C示出了AAVhu68中和结合抗体(NAb)效价,其中M281施用通过图上的箭头指示。图4D示出了以第-5天的百分比绘制的血清白蛋白的水平,其中M281施用通过图上的箭头指示。

[0016] 图5A至5B示出M281输注降低了NHP中预先存在的NAb效价以及IgG(研究2)。图5A示出了以第-5天的百分比绘制的血清恒河猴IgG(rhIgG)的水平,其中M281的施用(第-5天、第-4天和第-3天)和AAV的施用(第0天)通过图上的箭头指示。图5B示出了以第-5天的百分比绘制的血清白蛋白的水平,其中M281施用通过图上的箭头指示。

[0017] 图6A至6B示出了AAV结合抗体效价(研究2)。图6A示出了研究第-15天至第0天期间的AAVhu68非中和结合抗体(BAb)效价,其中M281的施用(第-5天、第-4天和第-3天)和AAV的施用(第0天)。图6B示出了研究第0天至第30天期间的AAVhu68非中和结合抗体(BAb)效价。

[0018] 图7A至7E示出了以每微克(μg)DNA的基因组拷贝(GC)绘制的载体基因组在从研究2收获的各种组织中的生物分布。图7A示出了载体基因组在心脏中的生物分布。图7B示出了

载体基因组在骨骼肌中的生物分布。图7C示出了载体基因组在肝脏的右叶中的生物分布。图7D示出了载体基因组在肝脏的左叶中的生物分布。图7E示出了载体基因组在脾脏中的生物分布。

[0019] 图8A和8B示出了以阳性面积比率绘制的原位杂交定量检查从研究2收获的心脏和肝脏组织中TT2 mRNA表达水平的结果。图8A示出了原位杂交检查从研究2收获的肝脏组织(左叶和右叶)中TT2 mRNA表达水平的结果。图8B示出了原位杂交检查从研究2收获的心脏组织(左心室、右心室和中隔)中TT2 mRNA表达水平的结果。

[0020] 图9示出了用于评估以1x1013GC/kg的剂量再次施用AAV8.TT3(测试转基因3)后，阻断性预先存在的FcRn NAb效价的影响的研究设计。

[0021] 图10A和10B示出了AAV8.TT3再次施用研究的结果，其中M281施用降低了NHP中预先存在的NAb效价(AAV8)以及IgG(先前施用AAV8.TT3)。图10A示出了以第-5天的百分比绘制的恒河猴IgG(rhIgG)的血清水平，其中NHP在第-5天、第-4天、第-3天和第-2天施用M281，在第0天施用AAV8.TT3。图10B示出了以mg/mL绘制的M281的测量的血清水平。

[0022] 图11A和11B示出了另一项AAV8.TT3研究的结果，其中M281施用通过自然感染降低了具有预先存在的NAb+(1:20)的NHP中预先存在的NAb效价(AAV8)和IgG。图11A示出了以第-5天的百分比绘制的总恒河猴IgG水平(rhIgG)，其中NHP在第-5天、第-4天、第-3天和第-2天施用M281，在第0天施用AAV8.TT3。图11B示出了以mg/mL绘制的血清M281水平(hIgG)并使用ELISA进行测量。

[0023] 图12示出了AAV8.TT1载体施用时用IVIG共处理的小鼠中TT1活性水平降低的结果。

具体实施方式

[0024] 提供了可用于治疗对病毒载体的衣壳具有中和抗体的患者的方案和组合物，所述病毒载体被选择用于将基因产物递送至患者的靶细胞/组织。在某些实施例中，患者可能对用所选病毒载体进行的任何治疗性治疗是不了解的，并且可能由于先前感染过野生型病毒而具有预先存在的免疫力。在其它实施例中，患者可能由于先前的治疗或疫苗而具有中和抗体。在某些实施例中，患者可以具有1:1至1:20，或超过1:2、超过1:5、超过1:10、超过1:20、超过1:50、超过1:100、超过1:200、超过1:300或更高的中和抗体。在某些实施例中，患者具有1:1至1:200，或1:5至1:100、或1:2至1:20、或1:5到1:50或1:5至1:20范围内的中和抗体。在某些实施例中，患者接受了作为调节FcRn-IgG结合并允许有效载体递送的唯一药剂的单个抗FcRn配体(例如，抗FcRn抗体)。在其它实施例中，患者可以接受一种或多种抗FcRn配体和第二组分(例如，Fc受体下调因子(例如，干扰素γ)、IgG酶或其它合适的组分)的组合。对于具有特别高的中和抗体水平(例如，超过1:200)的患者来说，此类组合可能是特别理想的。在某些实施例中，在病毒载体的全身递送期间利用包括抗FcRn配体的组合物以及方案和共施用。然而，本发明不限于此，如本文更详细地描述的。

[0025] 如本文所使用的，术语“FcRn”是指与免疫球蛋白(IgG)抗体的Fc区结合的新生儿Fc受体。示例性FcRn是具有UniProt ID号P55899(SEQ ID NO:45)的人FcRn。据信，人FcRn通过将组成型内化的IgG结合并转运回细胞表面以用于回收IgG来负责维持IgG的半衰期。除非另有说明，否则“FcRn”是指患者的天然FcRn。

[0026] 如本文所使用的,术语“免疫球蛋白G”或“IgG”是指由命名为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的IgG分子的四种不同亚型或亚类构成的一类抗体的任何成员。除非另有说明,否则选择用于本文所提供的组合物、方案和组合的抗FcRn配体可以结合患者的IgG中和抗体(NAb)的任何亚型。在某些实施例中,可以选择结合NAb IgG亚类的子集,例如,仅结合IgG1,或IgG1、IgG2,或IgG3或IgG4,仅结合IgG4,或其它组合的抗Fc配体。虽然目前认为针对病毒载体的所选外衣壳(对于非包膜载体)或包膜蛋白(例如,AAV的衣壳蛋白)的预先存在的中和抗体主要是IgG类(或其亚类),但在某些实施例中,本文所提供的含有抑制性配体的组合物和组合可用于抑制其它免疫球蛋白类的中和抗体,例如针对AAV衣壳或血清学交叉反应性衣壳的预先存在的中和抗体。

[0027] 在某些实施例中,本文所提供的组合物特别适合于当病毒载体(例如,基因疗法载体)全身递送时使用。如本文所使用的,“全身递送”涵盖任何合适的递送途径,包含但不限于腹膜内、肌内、皮下、静脉内、口服、直接施用于器官(例如,心脏、肝脏),不包括眼(例如,玻璃体内、视网膜下)、脑和中枢神经系统的其它部分(例如,鞘内)。然而,在某些实施例中,如本文所提供的FcRn阻断性配体组合物的递送期望与基于非全身载体的基因疗法结合使用,例如,直接施用于眼(例如,视网膜下、玻璃体内)、脑或CNS的另一部分的载体。

[0028] 如本文所使用的,术语“载体”是指转运、转导或以其它方式充当如多核苷酸等异源分子的载体的任何分子或部分。“病毒载体”是包括一个或多个编码或包括所关注的分子的多核苷酸区的载体,例如转基因、编码多肽或多-多肽的多核苷酸或调节性核酸。病毒载体可以重组产生。本文的实例证明了用于与所选患者具有中和抗体的重组腺相关病毒(AAV)衣壳共施用抗FcRN配体的方法。

[0029] 然而,所述方法和组合物可以用于对腺病毒衣壳蛋白(用于用重组腺病毒治疗)、单纯性疱疹病毒(用于用重组单纯性疱疹病毒载体治疗)或慢病毒(用于用重组慢病毒治疗)具有中和抗体的患者。在这些载体类别的每个载体类别中,中和抗体可以是血清学特异性的,但是在此特异性内可以是具有相同衣壳源或与衣壳血清学交叉反应性的不同衣壳源的病毒。病毒类型中的每种病毒类型内的不同病毒衣壳:AAV、腺病毒、HSV或慢病毒可能在血清学上是不同的或者是血清学交叉反应性的。例如,将对待施用携带所期望转基因的rAAV8的患者筛选针对AAV8的中和抗体。

[0030] 如本文所使用的,“中和抗体”或“NAb”与病毒衣壳或包膜特异性地结合,并干扰病毒或具有病毒衣壳或包膜的重组病毒载体的传染性,从而阻止重组病毒载体递送有效量的由其载体基因组中的表达盒编码的基因产物。可以利用各种方法评估患者血清中的中和抗体。术语方法和测定可以互换地使用。如本文所使用的,术语“中和测定”和“血清病毒中和测定”是指用于检测可以阻止病毒的传染性的全身抗体的存在的血清学测试。此类测定还可以定性地或定量地辨别抗体中和靶标的结合能力(例如,量级)或效率。免疫学测定可以包含酶免疫测定(EIA)、使用放射性同位素的放射免疫测定(RIA)、使用荧光材料的荧光免疫测定(FIA)、使用化学发光材料的化学发光免疫测定(CLIA)和采用颗粒计数技术的计数免疫测定(CIA)、其它改良的测定,如蛋白质印迹、免疫组织化学(IHC)和凝集。最常见的酶免疫测定之一是酶联免疫吸附(ELISA)。

[0031] 合适方法的实例包含如在以下所描述的:例如,R Calcedo等人,《传染病杂志(Journal Infectious Diseases)》,2009,199:381-290;GUO等人,“用细胞结合测定快速确

定AAV中和抗体(Rapid AAV_Neutralizing Antibody Determination with a Cell-Binding Assay)”,《分子疗法:方法与临床开发(Molecular Therapy:Methods&Clinical Development)》第13卷2019年6月,T.Ito等人,“一种用于快速筛选抗腺相关病毒中和抗体的简便酶联免疫吸附测定(A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of anti-adeno-associated virus neutralizing antibodies)”,《临床生物化学年鉴(Ann Clin Biochem)》2009;46:508-510;US 2018/0356394A2(航行者治疗学(Voyager Therapeutics))。此外,还存在商业试剂盒(例如参见,雅典娜诊断公司(Athena Diagnostics)、英杰公司(Invitrogen)、ThermoFisher.com;科文斯公司(Covance))。

[0032] 抗体的中和能力通常通过如荧光素酶或GFP等报道基因的表达测量。为了确定和比较中和抗体的活性,在本文所描述的中和测定之一中,测试的抗体应显示50%或更高的中和活性。在一些实施例中,通过测量报道基因产物(例如,荧光素酶、GFP)的活性来确定中和能力。抗体对特异性病毒载体的中和能力可以为至少50%,例如至少55%、60%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少99%。

[0033] 目前,许多临床试验需要测试潜在患者是否存在针对被测病毒载体的衣壳(或包膜)的NAb。某些临床试验目前使用1:20或更高、1:10或更高、或1:5或更高的NAb效价作为试验中治疗的排除条件。这在病毒载体将全身递送的情况下尤其重要。然而,本文所提供的组合物和方法可以允许符合这些排除标准中的一个、两个或全部的患者接受有效的基因疗法(或疫苗)治疗。可以使用为不具有预选的NAb效价的患者群体选择的标准来确定有效的基因转移。例如,有效的基因转移可以通过测量转基因表达、疾病生物标志物、疾病症状的减轻、疾病进展的减缓和/或改善的临床后遗症的其它预选决定因素来确定。

[0034] 如本文所使用的,术语“NAb效价”是产生多少中和抗体(例如,抗AAV Nab)的量度,所述中和抗体中和其靶向的表位(例如,AAV)的生理作用。抗AAV NAb效价可以如在例如Calcedo,R等人,“针对腺相关病毒的中和抗体的世界范围的流行病(Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses.)”《传染病杂志》,2009.199(3):第381-390页中所描述的那样进行测量,所述文献通过引用并入本文。

[0035] 所述方法包括向受试者施用如本文所描述的载体的悬浮液。在一个实施例中,所述方法包括向受试者施用含如本文所描述的rAAV的悬浮液的调配物缓冲液。

[0036] 所述组合物和方法允许用载体治疗有需要的受试者(人类患者)。在特别期望的实施例中,

[0037] 1.FcRn配体

[0038] 如本文所使用的,“FcRn配体”是阻断或显著降低人新生儿Fc受体(FcRn)与和患者的中和抗体之间的结合的任何部分(例如,但不限于肽、蛋白质、抗体、shRNA、RNAi、编码肽、蛋白质或抗体的核酸、或小分子药物)。在所期望的实施例中,配体在本文中可以被称为“抗FcRn”。在某些实施例中,FcRn配体阻断FcRn与患者的NAb结合,而不阻断FcRn与白蛋白结合。这在本文中可以称为FcRn-IgG阻断性配体、FcRn-NAb阻断性配体或抗FcRn配体。

[0039] 如本文所使用的,术语“抑制IgG与FcRn结合”是指配体阻断或抑制IgG(例如,

IgG1)与患者的天然FcRn(例如,人类患者中的人FcRn)结合的能力。在一些实施例中,配体例如在与IgG结合的人FcRn上的位点处结合FcRn。因此,配体抑制患者的IgG自身抗体与FcRn的结合。在一些实施例中,配体基本上或完全抑制与IgG的结合。在一些实施例中,IgG的结合减少了10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%或甚至100%。

[0040] 如本文所使用的,特异性地抑制FcRn而不阻断或干扰白蛋白水平是指所选抗FcRn配体的特征和其特异性地减少抗AAV中和抗体与FcR的结合的能力。"具体地"意指用本文所提供的抗FcRn抗体方案进行后处理后,患者至少保留了必需的最低水平的血清白蛋白。

[0041] 优选地,患者白蛋白水平保持在正常范围内,例如,约3.4g/dL至约5.5g/dL(34至54g/L),但可以以轻度耗竭(例如,2.8至3.4g/dL)至中度白蛋白耗竭(2g/dL至2.7g/dL)为表征。具有白蛋白轻度、中度或重度耗竭(如低于3g/dl)的患者仍然可以作为治疗方案的候选者。在某些实施例中,白蛋白替代疗法(例如,以静脉内输注递送)可以进一步与本文所提供的方案共施用。

[0042] 抗FcRn免疫球蛋白

[0043] 在某些实施例中,具有重(H)链CDR H1,即[SEQ ID NO:16]或与其至少99%相同的序列、CDR H2,即[SEQ ID NO:18]或与其至少99%相同的序列、CDR H3,即[SEQ ID NO:20]或与其至少99%相同的序列的互补决定区(CDR)的单克隆抗体被选择。在某些实施例中,提供了WO 2016/124521的N027的全长重链。参见例如,SEQ ID NO:8,或与其至少95%相同的序列。在某些实施例中,任何CDR H1、H2和/或H3中不存在多于1个的氨基酸变化。在某些实施例中,重链中不存在多于1至4个的氨基酸变化。在某些实施例中,选择使用重链的CDR,但将其工程化到不同的抗体支架中并选择不同的重链恒定区。在某些实施例中,具有CDR L1,即[SEQ ID NO:10]或与其至少99%相同的序列、CDR L2,即[SEQ ID NO:12]或与其至少99%相同的序列、CDR L3,即[SEQ ID NO:14]或与其至少99%相同的序列的轻链CDR的单克隆抗体被选择。在某些实施例中,提供了WO 2016/124521的N027的全长轻链。参见例如,SEQ ID NO:7,或与其至少95%相同的序列。在某些实施例中,任何CDR L1、L2和/或L3中不存在多于1个的氨基酸变化。在某些实施例中,轻链中不存在多于1至4个的氨基酸变化。在某些实施例中,选择使用轻链的CDR,但将其工程化到不同的抗体支架中并选择不同的轻链恒定区。在某些实施例中,单克隆抗体具有SEQ ID NO:4或8的重链和SEQ ID NO:2或7的轻链,或与其至少95%相同、与其至少97%相同或与其至少99%相同的序列。在某些实施例中,轻链的CDR进一步选自SEQ ID NO:41的CDR L3变体和/或SEQ ID NO:42的CDR L2变体,或与其至少99%相同的序列。在某些实施例中,重链的CDR进一步选自SEQ ID NO:21、22和43的CDR H1变体或与其至少99%相同的序列,SEQ ID NO:23、24、25和44的CDR H2变体或与其至少99%相同的序列。

[0044] 如本文所使用的,术语"互补决定区"和"CDR"是指序列高变和/或形成结构限定环的抗体可变结构域的区域。CDR也称为高变区。轻链和重链可变区各自具有三个CDR。轻链可变区含有CDR L1、CDR L2和CDR L3。重链可变区含有CDR H1、CDR H2和CDR H3。每个CDR可以包含来自Kabat所定义的互补决定区的氨基酸残基(即,轻链可变区中的约残基24至约34(CDR L1)、约50至约56(CDR L2)和约89至约97(CDR L3),以及重链可变区中的约残基31至约35(CDR H1)、约50至约65(CDR H2)和约95至约102(CDR H3)。

[0045] 如本文所使用的,术语"可变区"和"可变结构域"是指包含互补决定区(CDR,例如

CDR L1、CDR L2、CDR L3、CDR H1、CDR H2和CDR H3)和框架区(FR)的氨基酸序列的抗体的轻链和重链部分。分配给CDR和FR的氨基酸位置根据Kabat(《具有免疫学意义的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,第5版,马里兰州贝塞斯达国立卫生研究院的公共卫生署(Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.)(1991))。使用此编号系统,实际的线性氨基酸序列可以含有与可变区的CDR(本文进一步所定义的)或FR(本文进一步所定义的)的缩短或插入到所述CDR和FR中相对应的更少或另外的氨基酸。例如,重链可变结构域可以在重链FR的残基82之后的CDR H2的残基52和插入的残基(即,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)之后包含单个插入的残基(根据Kabat的残基52a)。对于给定的抗体,残基的Kabat编号可以通过将抗体序列的同源区与"标准"Kabat编号序列进行比对来确定。

[0046] 本文中所使用的术语"免疫球蛋白"包含抗体、其功能片段和免疫粘附素。在某些实施例中,这些在本文中也称为"免疫球蛋白构建体"或"抗体构建体"。抗体可以以多种形式存在,包含例如多克隆抗体、单克隆抗体、骆驼化单结构域抗体、细胞内抗体("胞内抗体")、重组抗体、多特异性抗体、抗体片段,如Fv、Fab、$F(ab)_2$、$F(ab)_3$、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$、单链可变片段抗体(scFv)、串联/双scFv、Fc、pFc'、scFvFc(或scFv-Fc)、二硫键Fv(dsfv)、双特异性抗体(bc-scFv),如BiTE抗体;骆驼科动物抗体、表面重塑抗体、人源化抗体、全人抗体、单结构域抗体(sdAb,也称为NANOBODY®)、多结构域抗体(mdAb)、嵌合抗体、包括至少一个人类恒定区的嵌合抗体等。

[0047] 本文所描述的抗FcRn免疫球蛋白构建体可以在任何合适的体外生产系统中产生、纯化并调配成如本文所描述的递送至患者的合适的组合物。任选地,这些构建体可以含有一个或多个免疫球蛋白构建体。任选地,这些构建体(例如,单克隆抗体)可以与病毒载体单独调配。在其它实施例中,构建体可以与病毒载体一起调配和递送。

[0048] 在其它实施例中,可以选择另一种单克隆抗体,或将其组合使用。此类抗体的实例可以包含例如洛利昔珠单抗(UCB7665)(UCB SA公司(UCB SA));IMVT-1401、RVT-1401(HL161)、HBM9161(全都来自HanAll生物制药有限公司(HanAll BioPhrma Co.Ltd))、尼卡利单抗(M281)(Momenta制药公司(Momenta Pharmaceuticals Inc))、ARGX-113(艾加莫德)(Argenx S.E.公司(Argenx S.E.))、奥诺利单抗(ALXN 1830,SYNT001,亚力兄制药公司(Alexion Pharmaceuticals Inc))、SYNT002、ABY-039(Affibody公司(Affibody AB))或DX-2507(武田制药有限公司(Takeda Pharmaceutical Co.Ltd))、或其组合或这些抗体之一与另一配体的组合。可替代地,其它抗体构建体可以源自这些抗体等。

[0049] 含有一种或多种作为治疗蛋白的抗FcRn抗体构建体的本发明的药物组合物可以被调配成用于静脉内施用、胃肠外施用、皮下施用、肌内施用、动脉内施用、鞘内施用或腹膜内施用。特别地,优选静脉内施用。药物组合物还可以被调配成用于口服、经鼻、喷雾剂、气雾剂、直肠或阴道施用,或通过口服、经鼻、喷雾剂、气雾剂、直肠或阴道施用。对于可注射调配物,各种有效的药物载体是本领域中已知的。本发明的药物组合物的剂量取决于包含施用途径和受试者的身体特征,例如年龄、体重、一般健康状况等因素。药物组合物可以包含0.01至500mg/kg(例如,0.01、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450或500mg/kg)的抗FcRn抗体构建体的剂量,并且在更具体的实施例中,剂量为约1至约100mg/kg,并且在更具体的实施例中,剂量为约1至约

50mg/kg,在更具体的实施例中,剂量为约15至约30mg/kg。剂量可以由医师根据如疾病的程度和受试者的不同参数等常规因素进行适应。以与剂量调配物相容的方式施用药物组合物。药物组合物以多种剂型施用,例如静脉内剂型、皮下剂型和口服剂型(例如,可摄取溶液、药物释放胶囊)。通常,治疗蛋白的剂量为1至100mg/kg,例如1至50mg/kg。在某些实施例中,这些组合物可以以递增或递减的剂量给药持续预定的天数(例如,3至7天)或在另一个预选的时间段内给药。任选地,配体(例如,抗FcRn抗体)可以被工程化到合适的递送载体(例如,rAAV或另一种病毒载体)中,并以合适的量递送以表达上述量的蛋白质水平。

[0050] 含有抗-FcRn抗体构建体的药物组合物可以向有需要的受试者施用,例如,每日、每周、每月、每半年、每年一次或根据医学需要施用一次或多次(例如,1-10次或更多次)。剂量可以以单剂量方案或多剂量方案提供。

[0051] 抗FcRn肽和蛋白质

[0052] 任选地,除了上述FcRn抗体构建体之外或作为上述FcRn抗体构建体的替代方案,合适的抗FcRn配体可以是结合人FcRn的肽或蛋白构建体,从而抑制IgG结合。实例可以包含例如,SYN1436(渤健公司(Biogen),即与FcRn结合以阻断其与IgG相互作用的26-氨基酸肽,其为SYN 1327的二聚体(SEQ ID NO:30),或其经修饰的变体(SEQ ID NO:31),或其未截短且未二聚的肽变体SYN746(SEQ ID NO:29)。还参见,美国专利9,527,890。此外,实例可以包含FcRN亲和结合分子,例如,具有58个氨基酸和折叠的反平行三螺旋束结构的Z_{FcRn},或Z_{FcRn}融合蛋白,如Z_{FcRn-}白蛋白结合结构域(ABD)融合蛋白。其中,ZFcRn肽可以包括具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的ZFcRn-2、具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的ZFcRn-4,和/或具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的ZFcRn-16(Seijsing,J.等人,2014,《美国国家科学院院刊(PNAS)》,111(48):1710-17115)。其它合适的抗FcRn配体可以包含例如,QRFCTGHFGGLYPCNGP(SEQ ID NO:32)、GGGCVTGHFGGIYCNYQ(SEQ ID NO:33)、KIICSPGHFGGMYCQGK(SEQ ID NO:34)、PSYCIEGHIDGIYCFNA(SEQ ID NO:35)和/或NSFCRGRPGHFGGCYLF(SEQ ID NO:36)。参见例如,WO 2007/098420 A2。此外,合适的蛋白构建体的实例可以包含DX-2504轻链(SEQ ID NO:37)、DX-2504重链(SEQ ID NO:38)、DX-2507轻链(SEQ ID NO:39)和/或DX-2507重链(SEQ ID NO:40)。还参见US 9,359.438B2。

[0053] 药物组合物可以包含0.01至500mg/kg(例如,0.01、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450或500mg/kg)的抗FcRn肽或蛋白质的剂量,并且在更具体的实施例中,剂量为约1至约100mg/kg,并且在更具体的实施例中,剂量为约1至约50mg/kg。

[0054] 蛋白质和肽产生

[0055] 编码抗FcRn蛋白或肽(例如,免疫球蛋白、免疫球蛋白构建体、抗体、抗体构建体)的氨基酸序列的核酸序列可以通过本领域已知的各种方法制备。序列列表提供了用于表达体外表达的抗体的轻链和重链并用于实例中的核酸序列。这些序列包含例如,SEQ ID NO:5或与其至少90%相同的编码具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的M281轻链的序列,SEQ ID NO:6或与其至少90%相同的编码SEQ ID NO:8的M281重链氨基酸序列的序列,SEQ ID NO:9或与其至少90%相同的编码具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的M281 CDR-L1的序列,SEQ ID NO:11或与其90%相同的编码具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的M281 CDR-L2的序列,SEQ ID NO:13或与其至少90%相同的编码具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的M281 CDR-L3

的序列,SEQ ID NO:15或与其至少90％相同的编码具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的M281 CDR-H1的序列,SEQ ID NO:17或与其90％相同的编码具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的M281 CDR-H2的序列,SEQ ID NO:19或与其90％相同的编码具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的M281 CDR-H3的序列。其它核酸序列可以包含编码具有SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22的氨基酸序列的M281 CDR-H1变体、具有SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:25的氨基酸序列的M281 CDR-H2变体中的一个或多个的那些。

[0056] 其它核酸序列可以包含编码具有SEQ ID NO:26(Z FcRn2)、SEQ ID NO:27(Z FcRn-4);SEQ ID NO:28(Z FcRn-16)、SYN746(SEQ ID:29)、SEQ ID NO:30(SYN1327)、经修饰的SYN1327(SEQ ID NO:31)、98420-p1(SEQ ID NO:32)、98420-p2(SEQ ID NO:33)、98420-p3(SEQ ID NO:34)、98420-p4(SEQ ID NO:35)、98420-p5(SEQ ID NO:36)、DX-2504-LC(SEQ ID NO:37)、DX-2504-HC(SEQ ID NO:38)、DX-2507-LC(SEQ ID NO:39)、DX-2507-HC(SEQ ID NO:40)、DX-CDR-L3(SEQ ID NO:41)、DX-CDR-L2(SEQ ID NO:42)、DX-CDR-H1(SEQ ID NO:43)或DX-CDR-H2(SEQ ID NO:44)的氨基酸序列的蛋白质和肽中的一个或多个的那些。

[0057] 编码抗FcRn配体的核酸分子可以使用标准技术,例如基因合成获得。可替代地,编码野生型抗FcRn配体(例如,抗体)的核酸分子可以使用本领域的标准技术,例如QuikChange™突变发生突变以包含具体的氨基酸取代。核酸分子可以使用核苷酸合成仪或PCR技术合成。编码抗FcRn抗体或其它配体的核酸序列可以插入到能够在原核宿主细胞或真核宿主细胞中复制和表达核酸分子的载体中。许多适合于体外蛋白质或肽产生的载体在本领域中可获得并且可以使用。每个载体可以含有可以被调整和优化以与特定宿主细胞相容的各种组分。例如,载体组分可以包含但不限于复制的起源、选择标志物基因、启动子、核糖体结合位点、信号序列、编码所关注的蛋白质的核酸序列和转录终止序列。在其它实施例中,载体可以被设计用于体内产生配体,如抗FcRn抗体。此类载体可以选自任何合适的载体,例如rAAV或其它病毒载体如与编码基因产物的rAAV结合的所描述的那些。

[0058] 在一些实施例中,用于产生抗FcRn抗体的载体是包括SEQ ID NO:1的核酸序列的质粒,其编码SEQ ID NO:2的抗FcFn蛋白M281-LC的氨基酸序列。在一些实施例中,包括用于产生抗FcRn蛋白或肽的载体的质粒包含SEQ ID NO:3的核酸序列或与其至少90％相同的序列,其编码SEQ ID NO:4的抗FcFn蛋白M281-HC的氨基酸序列。

[0059] 在一些实施例中,哺乳动物细胞用作宿主细胞。哺乳动物细胞类型的实例包含但不限于人胎肾(HEK)(例如,HEK293、HEK 293F)、中国仓鼠卵巢(CHO)、HeLa、COS、PC3、Vero、MC3T3、NSO、Sp2/0、VERY、BHK、MDCK、W 138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、T47D、NSO(不内源性地产生任何免疫球蛋白链的小鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030和HsS78Bst细胞。在其它实施例中,大肠杆菌(E.coli)细胞用作本发明的宿主细胞。不同的宿主细胞具有用于对蛋白质产物进行翻译后处理和修饰的特征和特异性机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统以确保所表达的抗FcRn抗体(或其它配体)的正确修饰和处理。可以使用本领域的常规技术,例如转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀和直接显微注射,将上述表达载体引入到适当的宿主细胞中。

[0060] 一旦载体被引入到宿主细胞中用于蛋白质产生,宿主细胞就在常规营养培养基中培养,所述常规营养培养基经适当修饰以用于诱导启动子、选择转化体或扩增编码所期望

的序列的基因。用于表达治疗性蛋白的方法是本领域已知的，参见例如Paulina Balbas, Argelia Lorence(编辑)《重组基因表达:综述和方案(Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols)》(分子生物学方法)，胡玛纳出版社(Humana Press)；第2版2004(2004年7月20日)以及Vladimir Voynov和Justin A.Caravella(编辑)《治疗性蛋白:方法和方案(Therapeutic Proteins:Methods and Protocols)》(分子生物学方法)胡玛纳出版社;第2版.201 2(2012年6月28日)。

[0061] 用于产生抗FcRn配体(例如，抗体或其它肽或蛋白质)的宿主细胞可以在本领域已知的培养基中生长并且适用于培养所选宿主细胞。用于哺乳动物宿主细胞的合适的培养基可以包含例如，最低必需培养基(MEM)、Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)、Expi293™表达培养基、具有补充胎牛血清(FBS)的DMEM和RPMI-1640。用于细菌宿主细胞的合适的培养基的实例包含Luria肉汤(LB)加上必要的补充剂，如选择剂，例如氨苄青霉素(ampicillin)。将宿主细胞在合适的温度，如约20℃至约39℃，例如25℃至约37℃，优选地37℃和CO_2水平下培养。培养基的pH通常为约6.8至7.4，例如7，主要取决于寄助物。如果本发明的表达载体中使用诱导型启动子，那么在适合启动子激活的条件下诱导蛋白质表达。蛋白质回收通常涉及破坏宿主细胞，通常通过如渗透休克、声波处理或溶解等手段。一旦破坏细胞，可以通过离心或过滤来去除细胞碎片。蛋白质可以进一步纯化。抗FcRn抗体可以通过蛋白质纯化领域已知的任何方法纯化，例如，通过蛋白质A亲和、其它色谱法(例如，离子交换、亲和以及尺寸排阻柱色谱法)、离心、差示溶解度或通过任何其它用于蛋白质纯化的标准技术(参见抗体的工艺规模纯化(Process Scale Purification of Antibodies),Uwe Gottschalk(编辑)约翰威利父子出版社(John Wiley&Sons,Inc.),2009)。在一些情况下，抗FcRn抗体(或其它配体)可以与标志物序列如肽缀合以促进纯化。标志物氨基酸序列的实例是六组氨酸肽(His标签)，其以微摩尔亲和力与镍官能化琼脂糖亲和柱结合。可用于纯化的其它肽标签包含但不限于血凝素“HA”标签，其与源自流感血凝素蛋白的表位相对应。

[0062] 抗FcRn蛋白或肽的体内表达

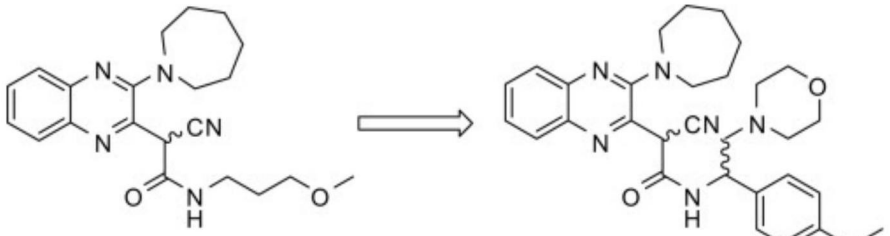
[0063] 在某些实施例中，将编码抗FcRn免疫球蛋白、肽和/或蛋白质的核酸序列递送至受试者(例如，人类患者)，从而允许受试者产生抗FcRn免疫球蛋白、肽和/或蛋白质(例如，抗FcRn抗体)。在疗法背景下，这可以通过施用携带这些核酸序列的病毒或非病毒载体来实现。此类载体可以是在指导其在宿主细胞中表达的调控序列的控制下含有编码抗FcRn配体的核酸分子的复制缺陷型腺相关病毒(AAV)或另一种病毒载体，例如逆转录病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体(例如痘苗病毒载体，如经修饰的安卡拉痘苗(MVA))或α病毒载体)。任选地，调控序列可以包含允许通过给药药理学部分(例如，雷帕霉素类似物(rapalog)或雷帕霉素(rapamycin))来控制抗FcRn配体的表达的可调控的启动子。在其他实施例中，调控序列可以是另一种合适的启动子，例如组成型启动子、组织特异性启动子或另一种所期望类型的启动子。在某些实施例中，抗FcRn配体通过与递送治疗性产物或疫苗基因产物的编码序列相同的载体来递送。一旦载体进入受试者的细胞内(例如，通过转化、转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、直接显微注射、感染等)，将促进抗FcRn配体(例如，抗体构建体)的表达，然后从细胞中分泌。

[0064] 在某些实施例中，在指导其在宿主细胞中表达的调控序列控制下编码抗FcRn配体(例如，抗FcRn抗体)的核酸分子是表达盒中的核酸序列。

[0065] 在某些实施例中,可以使用靶向受体的纳米颗粒,其中所述纳米颗粒包括在指导其在宿主细胞中表达的调控序列控制下编码抗FcRn配体(例如,抗FcRn抗体)的包封的核酸序列。例如,靶向受体的纳米颗粒可以用于递送mRNA或包含肽的其它活性剂。例如,在US2018/0021455A1中提供了此类纳米颗粒的实例。

[0066] 小分子抑制剂

[0067] 在某些实施例中,可以选择FcRn-IgG结合的小分子抑制剂。参见例如,Z Wang等人,"阻断人免疫球蛋白G-人新生儿Fc受体(hIgG-hFcRn)蛋白间相互作用的小分子的发现和结构-活性关系(Discovery and structure-activity relationships of small molecules that block the human immunoglobulin G-human neonatal Fc receptor (hIgG-hFcRn) protein-protein interaction)",《生物有机化学与医药化学通讯(Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters)》,第23卷,第5期,2013年3月1日,第1253-1256页。

[0068] 

[0069] 任选地,针对另一种Fc受体的抗体或其它配体可以与本文所提供的FcRn配体组合使用。此类其它受体可以包含,例如,IgA的受体(例如,Fcα(CD89),IgE的受体(FcεRI),IgM的受体(FCμR)。参见例如,X Li和RP Kimberly,《关于治疗靶点的专家意见(Expert Opin Ther Targets)》,2014年3月;18(3):335-350,所述参考文献通过引用并入本文。

[0070] 2.表达盒

[0071] 用于治疗患者的方案和方法涉及施用病毒载体和抗FcRn-IgG配体,所述患者对病毒载体具有中和抗体。所述病毒载体包括包含核酸序列和调控序列的表达盒,所述核酸序列编码用于在靶细胞中表达的基因产物,所述调控序列在向患者施用没有针对病毒载体的中和抗体时或用本文所提供的方法施用时指导其在靶细胞中表达。

[0072] 如本文所使用的,"表达盒"是指包括生物学上有用的核酸序列(例如,编码蛋白质、酶或其它有用的基因产物的基因cDNA、mRNA等)的核酸分子和与其可操作连接的调控序列,所述调控序列指导或调节核酸序列和其基因产物的转录、翻译和/或表达。如本文所使用的,"可操作地连接的"序列包含与核酸序列连续或不连续的调控序列,以及在反式或顺式核酸序列中起作用的调控序列两者。此类调控序列通常包含例如启动子、增强子、内含子、Kozak序列、聚腺苷酸化序列和TATA信号中的一种或多种。表达盒可以含有基因序列上游(5'处)的调控序列,例如启动子、增强子、内含子等中的一者或多者以及增强子中的一个或多个,或基因序列下游(3'处)的调控序列,例如包括聚腺苷酸化位点的3'非翻译区(3'UTR),以及其它元件。在某些实施例中,调控序列与基因产物的核酸序列可操作地连接,其中所述调控序列通过插入的核酸序列,即5'-非翻译区(5'UTR)与基因产物的核酸序列分离。在某些实施例中,表达盒包括一种或多种基因产物的核酸序列。在一些实施例中,表达

盒可以是单顺反子表达盒或双顺反子表达盒。在其它实施例中，术语“转基因”是指来自外源的一个或多个插入到靶细胞中的DNA序列。

[0073] 通常，此类表达盒可以用于产生病毒载体的载体基因组，并且含有本文所描述的基因产物的编码序列，所述编码序列侧接有病毒基因组的包装信号和其它表达控制序列，如本文描述的序列。在某些实施例中，载体基因组可以含有两个或更多个表达盒。任选地，表达盒(和载体基因组)可以在UTR包括一个或多个背根神经节(drg)-miRNA靶向序列，例如以减少DRG-毒性和/或轴突病变。参见例如，于2019年12月20日提交的PCT/US2019/67872，并且现已公布为WO 2020/132455、于2020年5月12日提交的美国临时专利申请第63/023593号以及于2020年6月12日提交的美国临时专利申请第63/038488号，所有文献的标题均为“用于Drg特异性减少转基因表达的组合物(Compositions for Drg-Specific Reduction of Transgene Expression)”，所述文献以其整体并入本文。

[0074] 如本文所使用的，“载体基因组”是指包装在形成病毒颗粒的细小病毒(例如，rAAV)衣壳内部的核酸序列。此类核酸序列含有AAV反向末端重复序列(ITR)。在本文的实例中，载体基因组至少含有从5’至3’的AAV 5’ITR、编码序列(即，转基因)和AAV 3’ITR。可以选择来自AAV2(与所述衣壳来源不同的AAV)的ITR或非全长ITR。在某些实施例中，ITR来自与在产生或反式补充AAV期间提供rep功能的AAV来源相同的AAV。进一步地，可以使用其它ITR，例如自互补(scAAV)ITR。单链AAV和自互补(sc)AAV两者都涵盖在rAAV内。转基因是与载体序列异源的核酸编码序列，所述核酸编码序列编码多肽、蛋白质、功能性RNA分子(例如，miRNA、miRNA抑制剂)或其它所关注的基因产物。核酸编码序列以允许转基因在靶组织的细胞中转录、翻译和/或表达的方式与调控组分可操作地连接。在本文中更详细地讨论了载体基因组的合适组分。在一个实例中，“载体基因组”至少含有从5’至3’的载体特异性序列、编码抗FcRn抗体的核酸序列，所述核酸序列与调控控制序列(指导其在靶细胞中表达)可操作地连接，其中载体特异性序列可以是特异性地将载体基因组包装到病毒载体衣壳或包膜蛋白中的末端重复序列。例如，AAV反向末端重复序列用于包装到AAV和某些其它细小病毒衣壳中。

[0075] 在一个方面，提供了包括编码编码所期望基因产物的核酸序列(转基因)的工程化核酸序列，以及指导其表达的调控序列的表达盒。在一个实施例路中，提供了包括如本文所描述的编码功能性基因产物的工程化核酸序列，以及指导其表达的调控序列的表达盒。

[0076] 表达盒可以含有用于向患者递送的任何合适的转基因。特别合适的是通过病毒载体全身递送的表达盒。有用的基因、编码序列和基因产物的实例在下文与使用方法相关的部分提供。

[0077] 如本文所使用的，术语“表达”或“基因表达”是指将来自基因的信息用于功能性基因产物的合成的过程。基因产物可以是蛋白质、肽或核酸聚合物(如RNA、DNA或PNA)。

[0078] 如本文所使用的，术语“调控序列”或“表达控制序列”是指核酸序列，如起始子序列、增强子序列和启动子序列，所述核酸序列诱导、抑制或以其它方式控制与其可操作地连接的蛋白质编码核酸序列的转录。

[0079] 如用于描述核酸序列或蛋白质的术语“外源性”意指核酸或蛋白质并非天然存在于其在染色体或宿主细胞中的存在位置中。外源性核酸序列还指源自相同宿主细胞或受试者并插入到所述相同宿主细胞或受试者中的序列，但其以非天然状态存在，例如，不同的拷

贝数或在不同调控元件的控制下。

[0080] 如用于描述核酸序列或蛋白质的术语“异源性”意指核酸或蛋白质源自与在其中表达所述核酸或蛋白质的宿主细胞或受试者不同的生物体或相同的生物体的不同物种。术语“异源性”当参考质粒、表达盒或载体(例如,rAAV)中的蛋白质或核酸使用时表明蛋白质或核酸与另一序列或子序列一起存在,在自然界中未发现所讨论蛋白质或核酸与所述蛋白质或核酸彼此间的相同关系。

[0081] 在一个实施例中,表达盒被设计用于在人类受试者中表达和分泌。在一个实施例中,表达盒被被设计用于在肌肉中表达。在一个实施例中,表达盒被设计用于在肝脏中表达。

[0082] 在某些实施例中,可以选择组成型启动子。在一个实施例中,启动子是人巨细胞病毒(CMV)或鸡β-肌动蛋白启动子。多种鸡β-肌动蛋白启动子已单独描述,或与各种增强子元件(例如,CB7是具有巨细胞病毒增强子元件的鸡β-肌动蛋白启动子;CAG启动子,其包含启动子、鸡β肌动蛋白的第一外显子和第一内含子以及兔β珠蛋白基因的剪接受体;CBh启动子,SJ Gray等人,《人类基因疗法(Hu Gene Ther)》,2011年9月;22(9):1143-1153)。可替代地,可以选择其它组成型启动子。

[0083] 其它合适的启动子可以包含例如,组织特异性启动子或诱导型/调控型启动子。优选地,这种启动子是人源的。

[0084] 肝脏特异性启动子的实例可以包含例如,甲状腺激素结合球蛋白(TBG),白蛋白,Miyatake等人,(1997)《病毒学杂志(J.Virol.)》,71:5124-32;乙型肝炎病毒核心启动子,Sandig等人,(1996)《基因疗法(Gene Ther.)》,3:1002-9;或人α1-抗胰蛋白酶、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PECK)或甲胎蛋白(AFP),Arbuthnot等人,(1996)《人类基因疗法》,7:1503-14)。肌肉特异性启动子的实例可以包含例如,肌肉肌酸激酶(MCK)启动子和其截短形式。参见例如,B.Wang等人,《基因疗法》第15卷,第1489-1499页(2008)。还参见肌肉特异性转录顺式调控模块(CRM),如在S.Sarcare等人,(2019年1月)《自然通讯(Nat Commun.)》2019;10:492中所描述的。

[0085] 可替代地,可以选择可调控的启动子。参见例如,WO 2017/106244,其描述了不同的可调控的表达系统和例如WO 2007/126798、US 6,506,379以及WO 2011/126808B2中所描述的雷帕霉素/雷帕霉素类似物诱导系统,所述文献通过引用并入本文。

[0086] 在一个实施例中,调控序列进一步包括增强子。在一个实施例中,调控序列包括一个增强子。在另一个实施例中,调控序列含有两个或更多个表达增强子。这些增强子可以相同或者可以不同。例如,增强子可以包含αmic/bik增强子或CMV增强子。这种增强子可以存在于彼此相邻定位的两个拷贝中。可替代地,增强子的双拷贝可以被一个或多个序列分开。

[0087] 在一个实施例中,调控序列进一步包括内含子。在另外的实施例中,内含子是鸡β-肌动蛋白内含子。其它合适的内含子包含本领域已知的内含子,所述内含子可以是人β-球蛋白内含子和/或可商购获得的Promega®内含子以及WO 2011/126808中所描述的内含子。

[0088] 在一个实施例中,调控序列进一步包括聚腺苷酸化信号(polyA)。在另外的实施例中,polyA是兔珠蛋白polyA。参见例如WO 2014/151341。可替代地,另一种polyA,例如,人生长激素(hGH)聚腺苷酸化序列、SV40 polyA、胸苷激酶(TK)或合成polyA可以包含在表达盒

中。

[0089] 应当理解,本文所描述的表达盒中的组合物旨在应用于本说明书中描述的其它组合物、方案、方面、实施例和方法。

[0090] 3.载体

[0091] 在一个方面,本文提供了一种载体,其包括编码功能性人类基因产物的工程化核酸序列和指导所述工程化核酸序列在靶细胞中表达的调控序列。在某些实施例中,使用这些载体的组合。

[0092] 如本文所使用的,“载体”是包括核酸序列的生物或化学部分,所述生物或化学部分可以被引入到合适的靶细胞中以复制或表达所述核酸序列。载体的实例包含但不限于重组病毒、质粒、脂质体、聚合物体、复合物、树状聚合物、细胞穿透肽(CPP)缀合物、磁性颗粒或纳米颗粒。在一个实施例中,载体是编码功能性基因产物的外源性或异源性或工程化核酸可插入其中的核酸分子,然后可以将所述核酸分子引入到适当的靶细胞中。此类载体优选地具有一个或多个复制起点以及重组DNA可以插入到的一个或多个位点。载体通常具有装置,通过所述装置,可以从没有载体的细胞中选择具有载体的细胞,例如,所述载体编码耐药基因。常见的载体包含质粒、病毒基因组和“人工染色体”。载体的产生、生产、表征或定量的常规方法对于本领域技术人员是可用的。

[0093] 在一个实施例中,载体是非病毒质粒,所述非病毒质粒包括其描述的表达盒,例如,“裸DNA”、“裸质粒DNA”、RNA和mRNA;与各种组合物和纳米颗粒偶联,包含例如胶束、脂质体、阳离子脂质-核酸组合物、多聚糖组合物和其它聚合物、基于脂质和/或胆固醇的核酸缀合物以及如本文所描述的其它构建体。参见例如,X.Su等人,《分子制药学(Mol.Pharmaceutics)》,2011,8(3),第774-787页;网络出版物:2011年3月21日;WO2013/182683、WO 2010/053572和WO 2012/170930,所有所述文献均通过引用并入本文。

[0094] 在某些实施例中,本文所描述的载体是“复制缺陷型病毒”或“病毒载体”,其是指其中含有编码功能性基因产物的核酸序列的表达盒包装在病毒衣壳或包膜中的合成或人工病毒颗粒,其中也包装在病毒衣壳或包膜内的任何病毒基因组序列均是复制缺陷型的;即,其不能产生子代病毒粒子,但保留了感染靶细胞的能力。在一个实施例中,病毒载体的基因组不包含编码复制所需的酶的基因(基因组可以被工程化成“无肠的(gutless)”-仅含有编码侧接扩增和包装人工基因组所需的信号的基因产物的核酸序列),但是这些基因可以在产生期间供应。因此,这被认为可以安全地用于基因疗法,因为除非存在复制所需的病毒酶,否则不会发生通过子代病毒粒子进行的复制和感染。

[0095] 合适的病毒载体可以包含任何合适的递送载体,例如重组腺病毒、重组慢病毒、重组博卡病毒、重组腺相关病毒(rAAV)或另一种重组细小病毒(例如博卡病毒或杂交AAV/博卡病毒)、逆转录病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体(例如痘苗病毒载体,如经修饰的安卡拉痘苗(MVA)或α病毒载体)。在某些实施例中,病毒载体是用于向有需要的患者递送基因产物的重组AAV。

[0096] 如本文所使用的,包装细胞系用于生产载体(例如,重组AAV)。宿主细胞可以是原核或真核细胞(例如,人、昆虫或酵母),所述原核或真核细胞含有通过任何方式(例如,电穿孔、磷酸钙沉淀、显微注射、转化、病毒感染、转染、脂质体递送、膜融合技术、高速DNA包被的团粒、病毒感染和原生质体融合)引入到细胞中的外源性或异源性DNA。宿主细胞的实例可

以包含但不限于分离的细胞、细胞培养物、大肠杆菌细胞、酵母细胞、人细胞、非人细胞、哺乳动物细胞、非哺乳动物细胞、昆虫细胞、HEK-293细胞、肝细胞、肾细胞、中枢神经系统的细胞、神经元、神经胶质细胞或干细胞。

[0097] 如本文所使用的，术语“靶细胞”是指其中期望功能性基因产物的表达的任何靶细胞。在某些实施例中，术语“靶细胞”旨在指代接受治疗的受试者的细胞。靶细胞的实例可以包含但不限于肝细胞、骨骼肌细胞、心脏细胞等。本文描述了靶细胞的其它实例。

[0098] 应当理解，本文所描述的载体中的组合物旨在应用于跨本说明书描述的其它组合物、方案、方面、实施例和方法。

[0099] 腺相关病毒(AAV)

[0100] 在一个方面，本文提供了一种重组AAV(rAAV)，所述rAAV包括AAV衣壳和包装在其中的载体基因组。在某些实施例中，载体基因组包括AAV 5’反向末端重复序列(ITR)、编码如本文所描述的基因产物的工程化核酸序列、指导基因产物在靶细胞中表达的调控序列和AAV 3’ITR。载体基因组包括AAV 5’反向末端重复序列(ITR)、编码如本文所描述的基因产物的工程化核酸序列、指导基因产物靶细胞表达的调控序列和AAV 3’ITR。在某些实施例中，调控序列包括组织特异性启动子(例如，肌肉或肝脏)。在某些实施例中，调控序列进一步包括增强子。在一个实施例中，调控序列进一步包括内含子。在一个实施例中，调控序列进一步包括poly A。在一个实施例中，AAV衣壳是AAV1衣壳。在某些实施例中，AAV衣壳是AAV8衣壳。在某些实施例中，AAV衣壳是AAV9衣壳。在某些实施例中，AAV衣壳是AAVhu68衣壳。在某些实施例中，AAV衣壳是AAVrh91衣壳。

[0101] 在一个实施例中，调控序列如上文所描述。在一个实施例中，载体基因组包括AAV 5’反向末端重复序列(ITR)、如本文所描述的表达盒和AAV 3’ITR。

[0102] ITR是在载体生产期间负责基因组的复制和包装的基因元件，并且是产生rAAV所需的唯一病毒顺式元件。在一个实施例中，ITR来自与供应衣壳的AAV不同的AAV。在一优选的实施例中，来自AAV2的ITR序列或其缺失版本(ΔITR)可以为了方便而使用和加速调控批准。然而，可以选择来自其它AAV来源的ITR。在ITR的来源来自AAV2并且AAV衣壳来自另一个AAV来源的情况下，所得载体可以被称为假型的。通常，AAV载体基因组包括AAV 5’ITR，编码基因产物和任何调控序列的核酸序列，以及AAV 3’ITR。然而，这些元件的其它构型可以是合适的。在一个实施例中，提供了自互补AAV。已经描述了被称为ΔITR的5’ITR的缩短版本，其中缺失了D序列和末端解析位点(trs)。在某些实施例中，载体基因组包含130个碱基对的缩短的AAV2 ITR，其中缺失了外部“a”元件。在使用内部A元件作为模板的载体DNA扩增期间，缩短的ITR恢复到145个碱基对的野生型长度。在其它实施例中，使用了全长AAV 5’和3’ITR。

[0103] 如本文所使用的，术语“AAV”是指天然存在的腺相关病毒、本领域技术人员可获得的和/或根据本文所描述的组合物和方法可获得的腺相关病毒以及人工AAV。腺相关病毒(AAV)病毒载体是具有AAV蛋白衣壳的AAV Dnase抗性颗粒，其中包装有侧接AAV反向末端重复序列(ITR)的用于递送至靶细胞的表达盒。AAV衣壳由60个衣壳(cap)蛋白亚基VP1、VP2和VP3构成，其以二十面体对称布置，比率为大约1:1:10至1:1:20，取决于所选AAV。可以选择各种AAV作为如上文所鉴定的AAV病毒载体的衣壳的来源。在一个实施例中，AAV衣壳是AAV9衣壳或其变体。在某些实施例中，衣壳蛋白由rAAV载体名称中的术语“AAV”之后的数字或数

字和字母的组合指定。除非另有说明，否则本文所描述的AAV衣壳、ITR和其它所选AAV组分可以容易地选自任何AAV，包含但不限于被鉴定为以下的AAV：AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAVhu37、AAVrh32.33、AAV8bp、AAV7M8 and AAVAnc80、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9.47、AAV9(hu14)、AAV10、AAV11、AAV12、AAVrh8、AAVrh74、AAV-DJ8、AAV-DJ、AAVhu68，但不限于参见例如，WO2019/168961和WO 2019/169004(AAV载体；脱酰胺作用)；WO 2019/169004(新型AAV衣壳)；美国公开专利申请第2007-0036760-A1号；美国公开专利申请第2009-0197338-A1号；EP 1310571。还参见WO 2003/042397(AAV7和其它猿猴类AAV)、美国专利7790449和美国专利7282199(AAV8)、WO 2005/033321和US 7,906,111(AAV9)和WO 2006/110689和WO 2003/042397(rh.10)以及WO 2005/033321，所述文献通过引用并入本文。其它合适的AAVs可以包含但不限于AAVrh90、AAVrh91、AAVrh92、AAVrh93、AAVrh91.93。参见例如，WO 2020/223232 A1(AAV rh.90)、WO 2020/223231 A1(AAV rh.91)以及WO 2020/223236 A1(AAV rh.92、AAV rh.93、AAV rh.91.93)，所述文献通过引用以其整体并入本文。其它合适的AAV包含于2020年10月20日提交的PCT/US20/56511(要求于2020年1月31日提交的美国临时专利申请第62/924,112号和于2020年5月18日提交的美国临时专利申请第63/025,753号的权益)中所描述的AAV3B变体，其描述了AAV3B.AR2.01、AAV3B.AR2.02、AAV3B.AR2.03、AAV3B.AR2.04(SEQ ID NO:8)、AAV3B.AR2.05、AAV3B.AR2.06、AAV3B.AR2.07、AAV3B.AR2.08、AAV3B.AR2.10、AAV3B.AR2.11、AAV3B.AR2.12、AAV3B.AR2.13、AAV3B.AR2.14、AAV3B.AR2.15、AAV3B.AR2.16或AAV3B.AR2.17，所述文献通过引用并入本文。这些文档还描述了可以选择用于产生AAV的其它AAV，并且通过引用并入。在从人或非人灵长类动物(NHP)中分离或工程化以及良好表征的AAV中，人AAV2是第一个被开发为基因转移载体的AAV；其已被广泛用于不同靶组织和动物模型中的高效基因转移实验。

[0104] 如本文所使用的，关于AAV，术语“变体”意指源自已知AAV序列的任何AAV序列，包含具有保守氨基酸置换的AAV序列以及与氨基酸或核酸序列共享至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少97％、至少99％或更高的序列同一性的AAV序列。在另一个实施例中，所述AAV衣壳包含变体，所述变体可以包含与任何描所述或已知的AAV衣壳序列至多约10％变化。换句话说，所述AAV衣壳与本文所提供的和/或本领域已知的AAV衣壳共享约90％同一性至约99.9％同一性、约95％至约99％同一性或约97％至约98％同一性。在一个实施例中，所述AAV衣壳与AAV衣壳共享至少95％同一性。当确定AAV衣壳的同一性百分比时，可以对任何可变蛋白质(例如，vp1、vp2或vp3)进行比较。

[0105] ITR或其它AAV组分可以使用本领域技术人员可用的技术从AAV中容易地分离出来或进行工程化。此类AAV可以从学术、商业或公共来源分离、工程化或获得(例如，维吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,Manassas,VA))。可替代地，AAV序列可以通过合成或其它适合的方式通过参考公开的序列(如在文献中或在如GenBank、PubMed等数据库中可获得的公开的序列)进行工程化。AAV病毒可以通过常规的分子生物学技术进行工程化，从而可以优化这些颗粒以用于核酸序列的细胞特异性递送、用于最小化免疫原性、用于调节稳定性和颗粒寿命、用于高效降解、用于准确递送至细胞核等。

[0106] 如本文所使用的，可互换使用的术语“rAAV”和“人工AAV”意指但不限于包括衣壳

蛋白和包装在其中的载体基因组的AAV,其中载体基因组包括与AAV异源的核酸在一个实施例中,衣壳蛋白是非天然存在的衣壳。此类人工衣壳可以通过任何合适的技术使用所选AAV序列(例如,vp1衣壳蛋白的片段)与异源序列的组合产生,所述异源序列可以从不同的所选AAV、同一AAV的非连续部分、从非AAV病毒来源或从非病毒来源获得。人工AAV可以是但不限于假型AAV、嵌合AAV衣壳、重组AAV衣壳或"人源化"AAV衣壳。假型载体可用于本发明,其中一种AAV的衣壳被异源衣壳蛋白取代。在一个实施例中,AAV2/5和AAV2/8是示例性假型载体。所选基因元件可以通过任何合适的方法,包含转染、电穿孔、脂质体递送、膜融合技术、高速DNA包被的团粒、病毒感染和原生质体融合递送。用于制备此类构建体的方法对核酸操纵技术人员而言是已知的并且包含基因工程、重组工程以及合成技术。参见例如,Green和Sambrook,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,纽约市冷泉港的冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY)(2012)。

[0107] 因此已经描述了产生衣壳的方法、编码序列以及用于产生rAAV病毒载体的方法。参见例如,Gao等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.)》,100(10),6081-6086(2003)和US 2013/0045186A1。

[0108] 在一个实施例中,如本文所描述的rAAV是自互补AAV。"自互补AAV"是指其中由重组AAV核酸序列所携带的编码区已经被设计成形成分子内双链DNA模板的构建体。感染后,未等待细胞介导的第二条链合成,而是两条互补的半scAAV将缔合以形成易于立即复制和转录的一条双链DNA(dsDNA)。参见例如,D M McCarty等人,"自互补重组腺相关病毒(scAAV)载体独立于DNA合成而促进高效转导(Self-complementary recombinant adeno-associated virus(scAAV)vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis)",《基因疗法》,(2001年8月),第8卷,第16期,第1248-1254页。自互补AAV在例如美国专利第6,596,535号;第7,125,717号;和第7,456,683号中描述,这些美国专利中的每个美国专利通过引用以其整体并入本文。

[0109] 在某些实施例中,本文所描述的rAAV是抗核酸酶的。此类核酸酶可以是单个核酸酶或核酸酶的混合物,并且可以是核酸内切酶或核酸外切酶。抗核酸酶rAAV指示AAV衣壳已经完全组装并保护这些包装的基因组序列在被设计成去除产生过程中可能存在的污染性核酸的核酸酶温育步骤期间免于降解(消化)。在许多情况下,本文所描述的rAAV是DNase抗性的。

[0110] 可以使用已知的技术产生本文所描述的重组腺相关病毒(AAV)。参见例如,WO 2003/042397;WO 2005/033321、WO 2006/110689;US 7588772 B2。此类方法涉及培养宿主细胞,所述宿主细胞含有编码AAV衣壳的核酸序列;功能性rep基因;如本文所描述的侧接AAV反向末端重复序列(ITR)的表达盒;以及足够的辅助功能以允许将表达盒包装到AAV衣壳蛋白中。本文还提供了宿主细胞,所述宿主细胞含有编码AAV衣壳的核酸序列;功能性rep基因;如所描述的载体基因组;以及足够的辅助功能以允许将载体基因组包装到AAV衣壳蛋白中。在一个实施例中,宿主细胞是HEK 293细胞。在WO2017160360 A2中更详细地描述了这些方法,其通过引用并入本文。

[0111] 可以利用本领域技术人员可用的其它产生rAAV的方法。合适的方法可以包含但不限于杆状病毒表达系统或通过酵母生产。参见例如,Robert M.Kotin等人,大规模重组腺相

关病毒产生(Large-scale recombinant adeno-associated virus production).《人类分子遗传学(Hum Mol Genet.)》2011年4月15日;20(R1):R2-R6。于2011年4月29日在线公开.doi:10.1093/hmg/ddr141;Aucoin MG等人,使用三重感染在昆虫细胞中产生腺相关病毒载体:杆状病毒浓度比率的优化(Production of adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection:optimization of baculovirus concentration ratios.)《生物技术与生物工程(Biotechnol Bioeng.)》2006年12月20日;95(6):1081-92;SAMI S.THAKUR,在酵母中产生重组腺相关病毒载体(Production of Recombinant Adeno-associated viral vectors in yeast.)提交给佛罗里达大学研究生院的论文,2012;Kondratov O等人,在人类对昆虫细胞中制造的重组腺相关病毒载体的直接头对头评估(Direct Head-to-Head Evaluation of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors Manufactured in Human versus Insect Cells),《分子疗法》2017年8月10日.pii:S1525-0016(17)30362-3.doi:10.1016/J.ymthe.2017.08.003.[电子版先于印刷版];Mietzsch M等人,OneBac 2.0:用于产生使外源DNA的衣壳化最小化的AAV1、AAV2和AAV8载体的Sf9细胞系(OneBac 2.0:Sf9 Cell Lines for Production of AAV1,AAV2,and AAV8 Vectors with Minimal Encapsidation of Foreign DNA.)《人类基因疗法方法(Hum Gene Ther Methods.)》2017年2月;28(1):15-22.doi:10.1089/hgtb.2016.164.;Li L等人,新型重组腺相关病毒复制型基因组的生产和表征:用于基因转移的真核DNA来源(Production and characterization of novel recombinant adeno-associated virus replicative-form genomes:a eukaryotic source of DNA for gene transfer.)《公共科学图书馆期刊(pLoS One.)》2013年8月1日;8(8):e69879.doi:10.1371/Journal.pone.0069879.于2013年印刷;Galibert L等人,在昆虫细胞中大规模生产腺相关病毒载体以趋向治疗神经肌肉疾病的最新进展(Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases.)《无脊椎病理学杂志(J Invertebr Pathol.)》2011年7月;107增刊:S80-93.doi:10.1016/j.jip.2011.05.008;以及Kotin RM,大规模重组腺相关病毒生产(Large-scale recombinant adeno-associated virus production.)《人类分子遗传学》2011年4月15日;20(R1):R2-6.doi:10.1093/Hmg/ddr141.电子版2011年4月29日。

[0112] 在高盐浓度下进行两步亲和色谱法纯化,然后使用阴离子交换树脂色谱法来纯化载体药物产物并去除空衣壳。在题为“AAV9的可分级纯化方法(Scalable Purification Method for AAV9)”的WO 2017/160360中更详细地描述了这些方法,所述文献通过引用并入本文。简而言之,用于从基因组缺陷型AAV9中间体中分离具有包装的基因组序列的rAAV9颗粒的方法涉及使包括重组AAV9病毒颗粒和AAV9衣壳中间体的悬浮液经受高效液相色谱法,其中AAV9病毒颗粒和AAV9中间体与在10.2的pH下平衡的强阴离子交换树脂结合并经受盐梯度,同时监测洗脱液在约260和约280下的紫外线吸光度。尽管对于rAAV9不是最佳的,但是pH的范围可以为约10.0至10.4。在此方法中,当A260/A280的比率达到拐点时,从洗脱的级分中收集AAV9完整衣壳。在一个实例中,对于亲和色谱法步骤,可以将经过渗滤的产物应用于有效捕获AAV2/9血清型的Capture Select™ Poros-AAV2/9亲和树脂(生命科技公司(Life Technologies))上。在这些离子条件下,显著百分比的残留的细胞DNA和蛋白质流过柱,而AAV颗粒则被有效捕获。

[0113] 用于表征或定量rAAV的常规方法对于本领域技术人员是可用的。为了计算空颗粒和完整颗粒的含量，将所选样品(例如，在本文的实例中经过碘克沙醇(iodixanol)梯度纯化的制剂，其中GC#＝颗粒#)的VP3带体积相对于加载的GC颗粒进行作图。所得线性等式(y＝mx+c)用于计算测试品峰的带状体积中的颗粒的数量。然后将加载的每20μL颗粒数量(pt)乘以50，以得到颗粒(pt)/mL。将Pt/mL除以GC/mL得到颗粒与基因组拷贝的比率(pt/GC)。Pt/mL-GC/mL得到空pt/mL。空pt/mL除以pt/mL并且x100得到空颗粒的百分比。通常，用于测定具有包装的基因组的空衣壳和AAV载体颗粒的方法是本领域已知的。参见例如Grimm等人，《基因疗法》(1999)6:1322-1330;Sommer等人，《分子疗法》(2003)7:122-128。为了测试变性的衣壳，所述方法包含使经处理的AAV原液经受SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(由能够分离三种衣壳蛋白的任何凝胶组成，例如在缓冲液中含有3-8％三乙酸盐的梯度凝胶)，然后运行凝胶直到分离出样品材料，并且将凝胶印迹到尼龙或硝酸纤维素膜(优选地是尼龙)上。然后，将抗AAV衣壳抗体用作与变性的衣壳蛋白结合的初级抗体，优选地抗AAV衣壳单克隆抗体，最优选地B1抗AAV2单克隆抗体(Wobus等人，《病毒学杂志》(2000)74:9281-9293)。然后使用次级抗体，所述次级抗体与初级抗体结合并且含有一种用于检测与初级抗体的结合的装置，更优选地是含有与其共价结合的检测分子的抗IgG抗体，最优选地是与辣根过氧化物酶共价连接的绵羊抗小鼠IgG抗体。一种用于检测结合的方法用于半定量地确定初级抗体与次级抗体之间的结合，优选地是能够检测放射性同位素发射、电磁辐射或比色变化的检测方法，最优选地是化学发光检测试剂盒。例如，对于SDS-PAGE，可以从柱级分中提取样品并在含有还原剂(例如，DTT)的SDS-PAGE上样缓冲液中加热，并且在预制的梯度聚丙烯酰胺凝胶(例如，Novex)上解析衣壳蛋白。可以根据制造商的说明使用SilverXpress(加利福尼亚州英杰公司(Invitrogen,CA))或其它合适的染色方法(即，SYPRO染色)进行银染色。在一个实施例中，可以通过定量实时PCR(Q-PCR)测量柱级分中的AAV载体基因组(vg)的浓度。将样品稀释并用dNase I(或另一种合适的核酸酶)消化以去除外源性DNA。在核酸酶失活后，使用引物和对引物之间的DNA序列具有特异性的TaqMan™荧光探针进一步稀释和扩增样品。在Applied Biosystems Prism 7700序列检测系统上测量每种样品达到定义的荧光水平所需的周期的数量(阈值周期，Ct)。含有与AAV载体中所含序列相同的序列的质粒DNA用于在Q-PCR反应中产生标准曲线。从样品获得的周期阈值(Ct)的值用于通过相对于质粒标准曲线的Ct值对其进行归一化来确定载体基因组效价。也可以使用基于数字PCR的端点测定。

[0114] 一方面，使用了经优化的q-PCR方法，所述方法利用了广谱丝氨酸蛋白酶，例如蛋白酶K(如可从凯杰公司(Qiagen)商购获得)。更具体地，经优化的qPCR基因组效价测定与标准测定类似，不同之处在于在dNase I消化之后，将样品用蛋白酶K缓冲液稀释并用蛋白酶K处理，然后进行热失活。合适地，以等于样品大小的量用蛋白酶K缓冲液稀释样品。蛋白酶K缓冲液可以浓缩2倍或更多倍。通常，蛋白酶K处理为约0.2mg/mL，但是可以在0.1g/mL至约1mg/mL之间变化。处理步骤通常在约55℃下进行持续约15分钟，但是可以在较低温度(例如，约37℃至约50℃)下进行持续较长的时间段(例如，约20分钟至约30分钟)，或者在较高的温度(例如，至多约60℃)下进行持续较短的时间段(例如，约5至10分钟)。类似地，热失活通常在约95℃下持续约15分钟，但是温度可以降低(例如，约70℃至约90℃)并且时间延长(例如，约20分钟至约30分钟)。然后将样品稀释(例如，1000倍)，并如标准测定中所描述的

进行TaqMan分析。

[0115] 另外地或可替代地,可以使用液滴数字PCR(ddPCR)。例如,已经描述了用于通过ddPCR确定单链和自互补AAV载体基因组效价的方法。参见例如,M.Lock等人,《人类基因疗法方法》2014年4月;25(2):115-25.doi:10.1089/Hgtb.2013.131.电子版2014年2月14日。

[0116] 用于确定衣壳蛋白的vp1、vp2与vp3之间的比率的方法也是可用的。参见例如,Vamseedhar Rayaprolu等人,腺相关病毒衣壳稳定性和动力学的比较分析(Comparative Analysis of Adeno-Associated Virus Capsid Stability and Dynamics),《病毒学杂志》2013年12月;87(24):13150-13160;Buller RM、Rose JA.1978。KB细胞中腺病毒相关病毒诱导多肽的表征(Characterization of adenovirus-associated virus-induced polypeptides in KB cells.)《病毒学杂志》25:331-338;以及Rose JA、Maizel JV、Inman JK、Shatkin AJ.1971.腺病毒相关病毒的结构蛋白(Structural proteins of adenovirus-associated viruses.)《病毒学杂志》8:766-770。

[0117] 如本文所使用的,rAAV的"原液"是指rAAV的群体。尽管由于脱酰胺作用,其衣壳蛋白具有异质性,但是rAAV在原液中被预期共享相同的载体基因组。原液可以包含具有衣壳的rAAV,所述衣壳具有例如所选AAV衣壳蛋白和所选产生系统的异质脱酰胺模式。原液可以从单个生产系统中生产或者从生产系统的多次运行中池化。可以选择各种生产系统,包含但不限于本文所描述的生产系统。

[0118] 应当理解,本文所描述的rAAV中的组合物旨在应用于跨本说明书描述的其它组合物、方案、方面、实施例和方法。

[0119] 5.药物组合物

[0120] 在一个方面,本文提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括含如本文所描述的载体的调配物缓冲液。在某些实施例中,包括载体的药物组合物进一步包括抗FcRn配体,例如,如本文所描述的抗FcRn抗体。在某些实施例中,一种或多种抗FcRn配体与载体单独调配和递送。在一个实施例中,提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括含如本文所描述的rAAV的调配物缓冲液。在某些实施例中,提供了包括靶向受体的纳米颗粒的药物组合物,所述受体靶向纳米颗粒包括编码含如本文所描述的抗-FcRn配体(例如,抗FcRn抗体)的调配物缓冲液的包封的核酸序列。

[0121] 在一个实施例中,调配物进一步包括溶解于水性悬浮液中的表面活性剂、防腐剂、赋形剂和/或缓冲液。在一个实施例中,缓冲液是PBS。合适地,将调配物调节到生理上可接受的pH,例如在pH 6至8的范围内;对于静脉内递送,可能期望6.8至约7.2的pH。然而,可以选择最宽范围和这些子范围内的其它pH用于其它递送途径。

[0122] 可以从无毒的非离子型表面活性剂中选择合适的表面活性剂或表面活性剂的组合。在一个实施例中,选择终止于伯羟基的双官能嵌段共聚物表面活性剂,例如Pluronic® F68[BASF],也被称为泊洛沙姆(Poloxamer)188,其具有中性pH,平均分子量为8400。可以选择其它表面活性剂和其它泊洛沙姆,即非离子型三嵌段共聚物,所述非离子型三嵌段共聚物由与聚氧乙烯(聚(环氧乙烷))的两个亲水链侧接的聚氧丙烯(聚(环氧丙烷))的中心疏水链、SOLUTOL HS 15(聚乙二醇-15羟基硬脂酸酯)、LABRASOL(辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯)、聚氧10油醚、TWEEN(聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯)、乙醇和聚乙二醇构成。在一个实施例中,调配物含有泊洛沙姆。这些共聚物通常以字母"P"(对于泊洛沙姆)命名,后跟三个数字:前

两位数字x100给出了聚氧丙烯核的近似分子量，并且最后一位数字x10给出了聚氧乙烯含量的百分比。在一个实施例中，选择了泊洛沙姆188。表面活性剂可以以悬浮液的至多约0.0005％到约0.001％的量存在。

[0123] 另外地提供了一种药物组合物，所述药物组合物包括药学上可接受的载体和包括如本文所描述的编码功能性基因产物的核酸序列的载体。如本文所使用的，“载体”包含任何和所有溶剂、分散介质、媒剂、涂层、稀释剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲液、载体溶液、悬浮液、胶质物等。将此类培养基和药剂用于药物活性物质在本领域中是众所周知的。还可以将补充性活性成分并入到组合物中。如脂质体、纳米胶囊、微颗粒、微球、脂质颗粒、囊泡等递送媒剂可以用于将本发明的组合物引入到合适的宿主细胞中。具体地，rAAV载体基可以被调配成用于递送或包封在脂质颗粒、脂质体、囊泡、纳米球或纳米颗粒等中。在一个实施例中，治疗有效量的所述载体包含在药物组合物中。载体的选择不是对本发明的限制。其它常规的药学上可接受的载体，如防腐剂或化学稳定剂。合适的示例性防腐剂包含氯丁醇、山梨酸钾、山梨酸、二氧化硫、没食子酸丙酯、对羟基苯甲酸甲酯、乙基香草醛、甘油、苯酚和对氯苯酚。合适的化学稳定剂包含明胶和白蛋白。

[0124] 短语“药学上可接受的”是指当向宿主施用时不会产生过敏或类似不良反应的分子实体和组合物。

[0125] 如本文所使用的，术语“剂量”或“量”可以指在治疗过程中向受试者递送的总剂量或量或以单一单位(或多单位或分剂量)施用递送的剂量或量。

[0126] 同样地，可以以剂量单位调配复制缺陷型病毒组合物，以使含有的复制缺陷型病毒的量在约$1.0x10^{9}$GC至约$1.0x10^{16}$GC的范围内(以治疗平均体重为70kg的受试者)，包含所述范围内的所有整数或分数量，并且对于人类患者而言，优选地为$1.0x10^{12}$GC至$1.0x10^{14}$GC。在一个实施例中，将组合物调配成每剂量含有至少$1x10^{9}$、$2x10^{9}$、$3x10^{9}$、$4x10^{9}$、$5x10^{9}$、$6x10^{9}$、$7x10^{9}$、$8x10^{9}$或$9x10^{9}$GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。在另一个实施例中，将组合物调配成每剂量含有至少$1x10^{10}$、$2x10^{10}$、$3x10^{10}$、$4x10^{10}$、$5x10^{10}$、$6x10^{10}$、$7x10^{10}$、$8x10^{10}$或$9x10^{10}$GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。在另一个实施例中，将组合物调配成每剂量含有至少$1x10^{11}$、$2x10^{11}$、$3x10^{11}$、$4x10^{11}$、$5x10^{11}$、$6x10^{11}$、$7x10^{11}$、$8x10^{11}$或$9x10^{11}$GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。在另一个实施例中，将组合物调配成每剂量含有至少$1x10^{12}$、$2x10^{12}$、$3x10^{12}$、$4x10^{12}$、$5x10^{12}$、$6x10^{12}$、$7x10^{12}$、$8x10^{12}$或$9x10^{12}$GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。在另一个实施例中，将组合物调配成每剂量含有至少$1x10^{13}$、$2x10^{13}$、$3x10^{13}$、$4x10^{13}$、$5x10^{13}$、$6x10^{13}$、$7x10^{13}$、$8x10^{13}$或$9x10^{13}$GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。在另一个实施例中，将组合物调配成每剂量含有至少$1x10^{14}$、$2x10^{14}$、$3x10^{14}$、$4x10^{14}$、$5x10^{14}$、$6x10^{14}$、$7x10^{14}$、$8x10^{14}$或$9x10^{14}$GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。在另一个实施例中，将组合物调配成每剂量含有至少$1x10^{15}$、$2x10^{15}$、$3x10^{15}$、$4x10^{15}$、$5x10^{15}$、$6x10^{15}$、$7x10^{15}$、$8x10^{15}$或$9x10^{15}$GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。在一个实施例中，对于人类应用，剂量的范围可以为每剂量$1x10^{10}$至约$1x10^{12}$GC，包含所述范围内的所有整数或分数量。

[0127] 在一个实施例中，包括如本文所描述的rAAV的药物组合物以每克脑质量约$1x10^{9}$GC至每克脑质量约$1x10^{14}$GC的剂量施用。

[0128] 本文所描述的水性悬浮液或药物组合物被设计成用于通过任何合适的途径或不

同途径的组合递送到有需要的受试者。在一个实施例中，药物组合物被调配用于通过脑室内(ICV)、鞘内(IT)或脑池内注射递送。在一个实施例中，本文所描述的组合物被设计成用于通过静脉内注射递送到有需要的受试者。可替代地，可以选择其它施用途径(例如，口服、吸入、鼻内、气管内、动脉内、眼内、肌内和其它肠胃外途径)。

[0129] 在某些实施例中，水性悬浮液或药物组合物用于制备药物。在某些实施例中，提供了其用于降低有需要的患者的针对载体(例如，亲本AAV衣壳源)的中和抗体水平的用途。

[0130] 应当理解，本文所描述的药物组合物中的组合物旨在应用于跨本说明书描述的其它组合物、方案、方面、实施例和方法。

[0131] 6.治疗方法

[0132] 在一个实施例中，提供了一种用于治疗患者的组合方案，所述患者对病毒载体具有中和抗体。所述方案包括施用与配体组合的载体，所述配体抑制人FcRn与预先存在的患者中和抗体(例如，IgG)的结合。FcRn配体(即，抗FcRn)如本文所描述的。在某些实施例中，配体是抗FcRn抗体构建体，并且载体是重组病毒载体。载体可以是重组腺相关病毒(rAAV)或如本文所描述的另一种病毒载体(例如，重组腺病毒、重组单纯性疱疹病毒或重组慢病毒、重组逆转录病毒载体、重组痘病毒载体(例如，痘苗病毒载体，如经修饰的安卡拉痘苗(MVA)或α病毒载体)并且所选患者可以对载体具有中和抗体(例如，亲本AAV衣壳源)。在某些实施例中，患者具有预先存在的抗AAV8抗体，并且组合包括抗FcRn配体和rAAV8载体或交叉反应性载体的共施用。在某些实施例中，患者具有预先存在的抗AAV2抗体，并且组合包括抗FcRn配体和rAAV2载体或交叉反应性载体(例如，具有来自AAV2变体或不同的AAV Clade B AAV的衣壳)的共施用。在某些实施例中，患者具有预先存在的5型抗腺病毒，并共施用抗FcRn配体和具有5型衣壳的重组腺病毒。根据本说明书的教导，可以选择其它病毒类型和亚型。

[0133] 在某些实施例中，患者可能对用所选病毒载体进行的任何治疗性治疗是不了解的，并且可能由于先前感染过野生型病毒而具有预先存在的免疫力。在其它实施例中，患者可能由于先前的治疗或疫苗而具有中和抗体。在某些实施例中，患者可以具有约1:1至约1:20，或超过1:2、超过1:5、超过1:10、超过1:20、超过1:50、超过1:100、超过1:200、超过1:300或更高的中和抗体。在某些实施例中，患者具有1:1至1:200，或1:5至1:100、或1:2至1:20、或1:5到1:50或1:5至1:20范围内的中和抗体。在某些实施例中，患者具有大于1至约5范围内的中和抗体。在某些实施例中，患者具有约1至约20范围内的中和抗体。在某些实施例中，患者具有约1至约40范围内的中和抗体。在某些实施例中，患者具有约1至约80范围内的中和抗体。在某些实施例中，患者接受了作为调节FcRn-IgG结合并允许有效载体递送的唯一药剂的单个抗FcRn配体(例如，抗FcRn抗体)。在其它实施例中，患者可以接受一种或多种抗FcRn配体和第二组分(例如，Fc受体下调因子(例如，干扰素γ)、IgG酶或其它合适的组分)的组合。对于具有特别高的中和抗体水平(例如，超过1:200)的患者来说，此类组合可能是特别理想的。在某些实施例中，在病毒载体的全身递送期间利用包括抗FcRn配体的组合物以及方案和共施用。然而，本发明不限于此，如本文更详细地描述的。

[0134] 在某些实施例中，将抗FcRn配体(例如，抗体)在所选病毒载体之前向具有中和抗体的患者施用，并且任选地与所选病毒载体同时施用。在某些实施例中，可能期望在短期(瞬时基础上)在基因疗法载体施用后持续表达抗FcRn配体，例如，直到病毒载体从患者体

内清除。在某些实施例中，可能期望持续表达抗FcRn配体。任选地，在此实施例中，配体可以通过包含例如在表达治疗性转基因的病毒载体中的病毒载体递送。然而，当被递送的治疗基因是抗体或抗体构建体或包括IgG链的另一个构建体时，此实施例是不期望的。在此类实施例中，当通过病毒载体将具有IgG链的抗体构建体递送至具有预先存在的免疫的患者时，瞬时递送或给药抗FcRn配体，使得在表达有效水平的载体介导的转基因产物之前从血清中清除循环中的抗FcRn配体的量。

[0135] 在某些实施例中，FcRn配体在施用载体(例如rAAV)之前一至七天递送。在某些实施例中，FcRn配体每天递送。在某些实施例中，FcRn配体(例如，免疫球蛋白构建体)在施用载体的同一天递送。在某些实施例中，FcRn配体(例如，免疫球蛋白构建体)在rAAV施用后至少一天至四周递送。在某些实施例中，配体在rAAV施用后递送，持续四周至6个月。在某些实施例中，配体通过与rAAV的施用途径不同的施用途径给药。在某些实施例中，配体口服、静脉内或腹膜内给药。

[0136] 在某些实施例中，患者由于WT感染(例如，具有WT AAV)而具有预先存在的中和抗体，并且在递送载体与抗FcRn免疫球蛋白构建体组合之前先前未接受过基于载体的基因疗法治疗。在某些实施例中，患者具有大于1:5的中和效价，如在体外测定中所测定的。在某些实施例中，在递送载体(例如，rAAV)与抗FcRn免疫球蛋白构建体的组合之前，患者先前已经接受了基因疗法。

[0137] 在某些实施例中，所述方法是方案的一部分，所述方案进一步包括共施用以下中的一者或多者：(a)类固醇或类固醇组合；和/或(b)IgG切割酶；(c)Fc-IgE结合的抑制剂；(d)Fc-IgM结合的抑制剂；(e)Fc-IgA结合的抑制剂；和/或(f)γ干扰素。

[0138] 本文提供的组合物和方案的功效可以例如通过测量NAb效价来确定。另外地或可替代地，组合物和方案的功效可以使用用于检测载体介导的递送后转基因表达的测定来确定。此类测定可以与用于检测未检测阳性中和抗体或中和抗体的预定阈值的患者中转基因表达的测定相同。

[0139] 适合用于递送的转基因的实例包含例如与家族性高胆固醇血症(例如，VLDLr、LDLr、ApoE、PCSK9)、肌营养不良、囊性纤维化以及罕见或孤儿疾病相关的转基因。此类罕见病的实例可以包含脊髓性肌萎缩症(SMA)、亨廷顿氏病、雷特综合征(Rett Syndrome)(例如，甲基CpG结合蛋白2(MeCP2)；UniProtKB-P51608)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、杜氏肌营养不良、弗里德里希共济失调(Friedrichs Ataxia)(例如，共济蛋白)、颗粒蛋白前体(PRGN)(与非阿尔茨海默氏病的大脑变性相关，包含额颞叶痴呆(FTD)、进行性非流利性失语症(PNFA)和语义性痴呆)等等。其它有用的基因产物包含氨基甲酰合成酶I、鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)、精氨酸琥珀酸合成酶、用于治疗精氨琥珀酸裂解酶缺乏症的精氨琥珀酸裂解酶(ASL)、精氨酸酶、延胡索酰乙酰乙酸水解酶、苯丙氨酸羟化酶、α-1抗胰蛋白酶、恒河猴甲胎蛋白(AFP)、恒河猴绒毛膜促性腺激素(CG)、葡萄糖-6-磷酸酶、胆色素原脱氨酶、胱硫醚β合酶、支链酮酸脱羧酶、白蛋白、异戊酰辅酶A脱氢酶、丙酰辅酶A羧化酶、甲基丙二酰辅酶A变位酶、戊二酰辅酶A脱氢酶、胰岛素、β-葡糖苷酶、丙酮酸羧酸盐、肝磷酸化酶、磷酸化酶激酶、甘氨酸脱羧酶、H蛋白、T蛋白、囊性纤维化跨膜调节子(CFTR)序列和肌营养不良蛋白基因产物[例如，迷你或微小肌营养不良蛋白]。仍其它有用的基因产物包含如可以用于酶替代疗法的酶，所述酶替代疗法可用于由于酶活性不足而导致的多种病状。例如，可以将含有

甘露糖-6-磷酸的酶用于溶酶体贮积病的疗法中(例如,合适的基因包含编码β-葡糖醛酸酶(GUSB)的基因)。用于递送的合适的转基因的实例可以包含在AAV载体中递送的人共济蛋白,如例如在2020年12月18日的PCT/US20/66167、于2019年12月19日提交的美国临时专利申请第62/950,834号和于2021年1月11日提交的美国临时申请第63/136,059号中所描述的,所述文献均通过引用并入本文。用于递送的合适的转基因的另一个实例可以包含在AAV载体中递送的人酸-α-葡萄糖苷酶(GAA),如例如在2020年4月30日的PCT/US20/30493,现在公开为WO2020/223362A1、2020年4月20日的PCT/US20/30484,现在公开为WO 2020/223356A1、于2019年4月30日提交的美国临时专利申请第62/840,911号、于2019年10月10日提交的美国临时申请第62.913,401号、于2020年5月14日提交的美国临时专利申请第63/024,941号和于2020年11月4日提交的美国临时专利申请第第63/109,677号中所描述的,所述文献均通过引用并入本文。同样地,用于递送的合适的转基因的另一个实例可以包含在AAV载体中递送的人α-L-艾杜糖醛酸酶(IDUA),如例如在2014年3月13日的PCT/US2014/025509,现在公开为WO 2014/151341,以及于2013年3月15日提交的美国临时专利申请第61/788,724号中所描述的,所述文献均通过引用并入本文。

[0140] 可以通过载体递送的另外的示例性基因(例如,rAAV)包含但不限于与糖原贮积病或1A型缺乏症(GSD1)相关的葡萄糖-6-磷酸酶,与PEPCK缺乏症相关的磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK);细胞周期蛋白依赖性激酶样5(CDKL5),也被称为与癫痫发作和严重的神经发育障碍相关的丝氨酸/苏氨酸激酶9(STK9);与半乳糖血症相关的半乳糖-1磷酸尿嘧啶转移酶;与苯丙酮尿症(PKU)相关的苯丙氨酸羟化酶;与枫糖尿病相关的支链α-酮酸脱氢酶;与1型酪氨酸血症相关的延胡索酰乙酰乙酸水解酶;与甲基丙二酸血症相关的甲基丙二酰辅酶A变位酶;与中链乙酰辅酶A缺乏症相关的中链酰基辅酶A脱氢酶;与鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏症相关的鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC);与瓜氨酸血症相关的精氨酸琥珀酸合成酶(ASS1);卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)缺乏症;甲基丙二酸血症(MMA);尼曼-皮克病(Niemann-Pick disease)(C1型);丙酸血症(PA);与家族性高胆固醇血症(FH)相关的低密度脂蛋白受体(LDLR)蛋白;与克里格勒-纳贾尔病(Crigler-Najjar disease)相关的UDP-葡萄糖醛糖基转移酶;与严重联合免疫缺陷病相关的腺苷脱氨酶;与痛风和莱施-奈恩综合征(Lesch-Nyhan syndrome)相关的次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶;与生物素酶缺乏症相关的生物素酶;与法布里病(Fabry disease)相关的α-半乳糖苷酶A(α-Gal A);与威尔逊氏病(Wilson's Disease)相关的ATP7B;与戈谢病(Gaucher disease)2和3型相关的β-葡糖脑苷脂酶;与泽尔韦格氏综合征(Zellweger syndrome)相关的过氧化物酶体膜蛋白70kDa;与变质性脑白质营养不良相关的芳基硫酸酯酶A(ARSA);与克拉伯病(Krabbe disease)相关的半乳糖脑苷脂酶(GALC);与庞贝病(Pompe disease)相关的α-葡糖苷酶(GAA);与尼曼-皮克病A型相关的鞘磷脂酶(SMPD1)基因;与成人II型瓜氨酸血症(CTLN2)相关的精氨琥珀酸合酶;与脲循环病症相关的氨基甲酰磷酸合酶1(CPS1);与脊髓性肌萎缩症相关的存活运动神经元(SMN)蛋白;与法伯脂肪肉芽肿病(Farber lipogranulomatosis)相关的神经酰胺酶;与GM2神经节苷脂病和泰伊-萨克斯二氏病和山霍夫氏病(Tay-Sachs and Sandhoff diseases)相关的b-己糖胺酶;与天冬氨酰葡糖尿症相关的天冬氨酰葡糖胺酶;与岩藻糖苷贮积症相关的a岩藻糖苷酶;与α甘露糖苷贮积症相关的α-甘露糖苷酶;与急性间歇性卟啉症(AIP)相关的胆色素原脱氨酶;用于治疗α-1抗胰蛋白酶缺乏症(肺气肿)的α-1抗胰蛋白

酶;用于治疗因地中海贫血或肾衰竭引起的贫血的促红细胞生成素;用于治疗缺血性疾病的血管内皮生长因子、血管生成素-1和成纤维细胞生长因子;用于治疗如例如在动脉粥样硬化、血栓形成或栓塞中所看见的阻塞的血管的血栓调节蛋白和组织因子途径抑制剂;用于治疗帕金森氏病的芳香族氨基酸脱羧酶(AADC)和酪氨酸羟化酶(TH);与受磷蛋白、肌浆(内质)网腺苷三磷酸酶2(SERCA2)呈反义或为其突变体形式的β肾上腺素能受体;用于治疗充血性心力衰竭的心脏腺苷酸环化酶;用于治疗各种癌症的肿瘤抑制基因,如p53;用于治疗炎症和免疫病症以及癌症的细胞因子,如各种白细胞介素之一;用于治疗肌营养不良的肌营养不良蛋白或迷你肌营养不良蛋白以及肌萎缩相关蛋白或迷你肌萎缩相关蛋白;以及用于治疗糖尿病的胰岛素或GLP-1。另外的所关注的基因和疾病包含例如肌张力异常蛋白基因相关的疾病,如遗传性感觉和自主神经病VI型(DST基因编码肌张力异常蛋白);由于蛋白质的大小(约7570aa)可能需要双重AAV载体;SCN9A相关疾病,其中功能突变体的丧失导致无法感觉疼痛,并且功能突变体的获得引起疼痛病状,如红斑性肢痛症。由于NEFL基因(神经丝轻链)发生突变,另一种病状是腓骨肌萎缩症1F和2E型,其由具有可变临床和电生理表达的进行性周围运动和感觉神经病表征。在某些实施例中,本文所描述的载体可以用于治疗黏多糖贮积症(MPS)病症。此类载体可以含有携带编码用于治疗MPS I(贺勒、贺勒-施艾氏和施艾氏综合征(Hurler,Hurler-Scheie and Scheie syndromes))的α-L-艾杜糖苷酸酶(IDUA)的核酸序列;编码用于治疗MPS II(亨特氏综合征(Hunter syndrome))的艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶(IDS)的核酸序列;编码用于治疗MPSIII A、B、C和D(沙费利波综合征(Sanfilippo syndrome))的磺酰胺酶(SGSH)的核酸序列;编码用于治疗MPS IV A和B(莫基奥综合征(Morquio syndrome))的N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸硫酸酯酶(GALNS)的核酸序列;编码用于治疗MPS VI(马罗托-拉米氏综合征(Maroteaux-Lamy syndrome))的芳基硫酸酯酶B(ARSB)的核酸序列;编码用于治疗MPSI IX(透明质酸酶缺乏症)的透明质酸酶的核酸序列;以及编码用于治疗MPS VII(斯赖综合征(Sly syndrome))的β-葡糖醛酸苷酶的核酸序列。参见例如,www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_List.php;rarediseases.info.nih.gov/diseases。

[0141] 也可以选择编码用于胆固醇调节和/或脂质调节的受体的核酸序列,所述受体包含低密度脂蛋白(LDL)受体、高密度脂蛋白(HDL)受体、极低密度脂蛋白(VLDL)受体和清道夫受体。其它合适的基因产物可以包含如类固醇激素受体超家族的成员,包含糖皮质激素受体和雌激素受体、维生素D受体和其它核受体。另外,有用的基因产物包含转录因子,如jun、fos、max、mad、血清应答因子(SRF)、AP-1、AP2、myb、MyoD和肌生成素、含ETS盒的蛋白质、TFE3、E2F、ATF1、ATF2、ATF3、ATF4、ZF5、NFAT、CREB、HNF-4、C/EBP、SP1、CCAAT盒结合蛋白、干扰素调控因子(IRF-1)、威尔姆斯肿瘤蛋白、ETS结合蛋白、STAT、GATA盒结合蛋白(例如,GATA-3)和带翼螺旋蛋白的叉头家族。

[0142] 其它合适的基因的实例可以包含例如激素以及生长和分化因子,包含但不限于胰岛素、胰高血糖素、胰高血糖素样肽-1(GLP1)、生长激素(GH)、甲状旁腺激素(PTH)、生长激素释放因子(GRF)、促卵泡激素(FSH)、促黄体激素(LH)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素、血管抑素、粒细胞集落刺激因子(GCSF)、促红细胞产生素(EPO)(包含例如人、犬或猫epo)、结缔组织生长因子(CTGF)、神经营养因子包含例如碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)、表皮生长因子(EGF)、血小板

衍生生长因子(PDGF)、胰岛素生长因子I和II(IGF-I和IGF-II)、转化生长因子α超家族(包含TGFα、激活素、抑制素)中的任一种、或骨形态发生蛋白(BMP)BMP 1-15中的任一种、生长因子的调蛋白/神经调节蛋白/ARIA/neu分化因子(NDF)家族、神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子NT-3和NT-4/5、睫状神经营养因子(CNTF)、神经胶质细胞系源性神经营养因子(GDNF)、神经秩蛋白、集聚蛋白中的任一种、信号素/脑衰蛋白、纺锤蛋白-1和纺锤蛋白-2、肝细胞生长因子(HGF)、肝配蛋白、头蛋白、音猬因子和酪氨酸羟化酶的家族中的任一种。

[0143] 其它有用的转基因产物包含调控免疫系统的蛋白质,包含但不限于细胞因子和淋巴因子,如血小板生成素(TPO)、白细胞介素(IL)IL-1到IL-36(包含例如人白细胞介素IL-1、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、IL-12、IL-11、IL-12、IL-13、IL-18、IL-31、IL-35)、单核细胞趋化蛋白、白血病抑制因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、Fas配体、肿瘤坏死因子α和β、干扰素α、β和γ、干细胞因子、flk-2/flt3配体。由免疫系统产生的基因产物也可用于本发明。这些包含但不限于免疫球蛋白IgG、IgM、IgA、IgD和IgE、嵌合免疫球蛋白、人源化抗体、单链抗体、T细胞受体、嵌合T细胞受体、单链T细胞受体、MHC I类和II类分子以及工程化免疫球蛋白和MHC分子。例如,在某些实施例中,可以将rAAV抗体设计成递送犬或猫抗体,例如抗IgE、抗IL31、抗CD20、抗NGF、抗GnRH。有用的基因产物还包含补体调控蛋白,如补体调控蛋白、膜辅因子蛋白(MCP)、衰变加速因子(DAF)、CR1、CF2、CD59和C1酯酶抑制剂(C1-INH)。仍其它有用的基因产物包含用于激素、生长因子、细胞因子、淋巴因子、调控蛋白和免疫系统蛋白的受体中的任一种。

[0144] 合适转基因的实例可用于治疗一种或多种神经退行性病症。此类病症可以包含但不限于可传播性海绵状脑病(例如,克罗伊茨费尔德-雅各布病(Creutzfeld-Jacob disease))、杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy,DMD)、肌管肌病和其它肌病、帕金森氏病(Parkinson's disease)、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、多发性硬化症、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's Disease)、亨廷顿氏病(Huntington disease)、卡纳万氏病(Canavan's disease)、创伤性脑损伤、脊髓损伤(ATI335,诺华公司(Novartis)的抗nogo1)、偏头痛(阿尔德生物制药公司(Alder Biopharmaceuticals)的ALD403;Eli的LY2951742;Labrys生物制剂公司(Labrys Biologics)的RN307)、溶酶体贮积病、中风和影响中枢神经系统的感染性疾病。溶酶体贮积病的实例包含例如戈谢病、法布里病、尼曼-皮克病、亨特氏综合征、糖原贮积病II(庞贝病)或泰-萨克斯病(Tay-Sachs disease)。对于这些病状中的某些病状,例如DMD和肌病,本文所提供的组合物可用于减少或消除与用于骨骼肌和心肌的转导或发明的高剂量表达盒(例如,由病毒载体携带)相关的轴突病。

[0145] 合适的转基因也可以包含体内表达的抗体。某些实施例允许抗FcRn配体(例如,抗体)与通过病毒载体递送的治疗基因一起持续递送(或表达)。然而,当被递送的治疗基因是抗体或抗体构建体或包括IgG链的另一个构建体时,此实施例是不期望的。在此类实施例中,当通过病毒载体将具有IgG链的抗体构建体递送至具有预先存在的免疫的患者时,瞬时递送或给药抗FcRn配体,使得在表达有效水平的载体介导的转基因产物之前从血清中清除循环中的抗FcRn配体的量。

[0146] 仍其它核酸可以编码针对富含亮氨酸重复序列和含免疫球蛋白样结构域的蛋白1(LINGO-1)的免疫球蛋白,所述免疫球蛋白是Nogo受体的功能性组分并且与患有多发性硬

化症、帕金森氏病或特发性震颤的患者的特发性震颤相关。一种此类可商购获得的抗体是奥美珠单抗(ocrelizumab)(百健公司(Biogen),BIIB033)。参见例如美国专利8,425,910。在一个实施例中,核酸构建体编码免疫球蛋白构建体,所述免疫球蛋白构建体对患有ALS的患者有用。合适抗体的实例包含:针对ALS超氧化物歧化酶1(SOD1)的抗体及其变体(例如,ALS变体G93A、C4F6 SOD1抗体);针对Derlin-1结合区的MS785;针对神经突生长抑制剂(NOGO-A或网状蛋白4)的抗体,例如,GSK1223249、奥扎尼珠单抗(ozanezumab)(人源化,GSK,也被描述为对多发性硬化症有用)。编码免疫球蛋白的核酸序列可以被设计或被选择用于患有阿尔茨海默氏病的患者。此类抗体构建体包含例如:阿杜马努卡布单抗(adumanucab)(百健公司);巴匹珠单抗(Bapineuzumab)(义隆公司(Elan),针对Aβ的氨基端的人源化mAb);礼来公司(Eli Lilly)的索拉珠单抗(Solanezumab),针对可溶性Aβ的中心部分的人源化mAb;甘特鲁单抗(Gantenerumab)(Chugai和Hoffmann-La Roche,其是针对Aβ的氨基端和中心部分两者的全人mAb);克伦珠单抗(Crenezumab)(基因泰克公司(Genentech),人源化mAb,其作用于单体和构象表位,包含Aβ的寡聚和原纤维形式);BAN2401(亿赛有限公司(Esai Co.,Ltd),人源化免疫球蛋白G1(IgG1)mAb,其选择性地与Aβ原纤维结合,并且被认为可以增强Aβ原纤维的清除率和/或中和其对脑神经元的毒性作用);GSK 933776(针对Aβ的氨基端的人源化IgG1单克隆抗体);AAB-001、AAB-002、AAB-003(Fc工程化的巴匹珠单抗);SAR228810(针对原纤维和低分子量Aβ的人源化mAb);BIIB037/BART(针对不溶性纤维状人Aβ的全人IgG1,百健艾迪公司(Biogen Idec));抗Aβ抗体,如m266、tg2576(对Aβ寡聚体的相对特异性)[Brody和Holtzman,《神经科学年度评论(Annu Rev Neurosci)》,2008;31:175-193]。其它抗体可以靶向β-淀粉样蛋白、Aβ、β分泌酶和/或τ蛋白。在仍其它实施例中,抗β-淀粉样蛋白抗体源自IgG4单克隆抗体以靶向β-淀粉样蛋白以便使效应子功能最小化,或选择除了缺乏Fc区的scFv之外的构建体以避免淀粉样蛋白相关成像异常(ARIA)和炎性应答。在这些实施例中的某些实施例中,scFv构建体中的一个或多个scFv构建体的重链可变区和/或轻链可变区在如本文所提供的另一种合适的免疫球蛋白构建体中使用。与含有Fc区的免疫球蛋白相比,这些scFV和其它工程化免疫球蛋白可能缩短血清中免疫球蛋白的半衰期。降低抗淀粉样蛋白分子的血清浓度可以进一步降低ARIA的风险,因为血清中极高水平的抗淀粉样蛋白抗体可能会使具有高负荷淀粉样蛋白斑块的脑血管不稳定,从而导致血管通透性。编码用于治疗患有帕金森氏病的患者的其它免疫球蛋白构建体的核酸可以被工程化或被设计成表达构建体,包含例如富含亮氨酸重复激酶2、达尔达林(dardarin)(LRRK2)抗体;抗突触核蛋白和α-突触核蛋白抗体和DJ-1(PARK7)抗体。其它抗体可以包含PRX002(普罗西娜公司(Prothena)和罗氏公司(Roche))帕金森氏病和相关的突触核蛋白病。这些抗体(特别是抗突触核蛋白抗体)也可以用于治疗一种或多种溶酶体贮积病。

[0147] 可以工程化或选择编码免疫球蛋白构建体的核酸构建体以治疗多发性硬化症。此类免疫球蛋白可以包含或源自抗体,如那他珠单抗(natalizumab)(人源化抗a4-整联蛋白、iNATA、Tysabri,百健艾迪公司和义隆制药公司(Elan Pharmaceuticals)),其于2006年获得批准;阿仑单抗(alemtuzumab)(Campath-1H,人源化抗CD52);利妥昔单抗(rituximab)(rituzin,嵌合抗CD20);达克珠单抗(daclizumab)(赛尼哌(Zenepax),人源化抗CD25);奥美珠单抗(人源化、抗CD20,罗氏公司);优特克单抗(ustekinumab)(CNTO-1275,人抗IL12

p40+IL23p40)；抗LINGO-1；和ch5D12(嵌合抗CD40)和rHIgM22(髓鞘再生化单克隆抗体；阿索尔达和梅奥医学教育和研究基金会(Acorda and the Mayo Foundation for Medical Education and Research))。仍其它抗a4-整联蛋白抗体、抗CD20抗体、抗CD52抗体、抗IL17、抗CD19、抗SEMA4D和抗CD40抗体可以通过如本文所描述的AAV载体递送。

[0148] 本发明还设想了针对中枢神经系统的各种感染的抗体。此类感染性疾病可以包含：真菌疾病，如隐球菌性脑膜炎、脑脓肿、脊髓硬膜外感染，其由例如新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)、粗球孢子菌(Coccidioides immitis)、毛霉目(order Mucorales)、曲霉属(Aspergillus spp)和念珠菌属(Candida spp)引起；原生动物，如弓形虫病、疟疾和原发性阿米巴脑膜脑炎，其由例如弓形虫(Toxoplasma gondii)、猪带绦虫(Taenia solium)、恶性疟原虫(Plasmodium falciparus)、曼森裂头绦虫(Spirometra mansonoides)(裂头蚴病(sparaganoisis))、棘球绦虫属(Echinococcus spp，引起神经包囊病)和脑阿米巴病引起；细菌，例如结核病、麻风病、神经梅毒、细菌性脑膜炎、莱姆病(伯氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi))、落基山斑疹热(Rocky Mountain spotted fever)(立克次体立克次体(Rickettsia rickettsia))、CNS诺卡氏菌病(诺卡氏菌属(Nocardia spp))、CNS结核(结核分枝杆菌)、CNS李斯特菌病(单核细胞增多性李斯特氏菌(Listeria monocytogenes))、脑脓肿和神经疏螺旋体病；病毒感染，例如病毒性脑膜炎、东部马脑炎(EEE)、圣路易斯脑炎(St Louis encepthalitis)、西尼罗河病毒(West Nile virus)和/或脑炎、狂犬病、加利福尼亚脑炎病毒(California encephalitis virus)、拉克罗斯脑炎(La Crosse encepthalitis)、麻疹脑炎、脊髓灰质炎，其可能由以下引起：例如疱疹家族病毒(HSV)、HSV-1、HSV-2(新生儿单纯疱疹脑炎)、水痘带状疱疹病毒(VZV)、比克斯塔夫脑炎(Bickerstaff encephalitis)、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus，EBV)、巨细胞病毒(CMV，如TCN-202由Theraclone科学公司研发)、人疱疹病毒6(HHV-6)、B病毒(猴疱疹病毒)、黄病毒脑炎、日本脑炎、默里谷热、JC病毒(进行性多灶性白质脑病)、尼帕病毒(Nipah Virus，NiV)、麻疹(亚急性硬化性全脑炎)；以及其它感染，例如亚急性硬化性全脑炎、进行性多灶性白质脑病；人免疫缺陷病毒(获得性免疫缺陷综合征(AIDS))；酿脓链球菌(streptococcus pyogenes)和其它β-溶血性链球菌(例如，与链球菌感染相关的小儿自身免疫性神经精神病症，PANDAS)和/或西登哈姆氏舞蹈病(Syndenham's chorea)以及格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome)和朊病毒。

[0149] 合适的抗体构建体的实例可以包含例如在2015年1月29日的WO 2007/012924A2中描述的抗体构建体，所述文献通过引用并入本文。

[0150] 例如，其它核酸序列可以编码抗朊病毒免疫球蛋白构建体。此类免疫球蛋白可以针对主要朊病毒蛋白(PrP，朊病毒蛋白或蛋白酶抗性蛋白，也被称为CD230(分化簇230))。提供了PrP的氨基酸序列，例如ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000302，其通过引用并入本文。蛋白质可以存在于多种同种型、正常的PrPC、引起疾病的PrPSc和定位在线粒体中的同种型中。错误折叠版本的PrPSc与多种认知障碍和神经退行性疾病相关，所述认知障碍和神经退行性疾病如克罗伊茨费尔德-雅各布病(Creutzfeldt-Jakob disease)、牛海绵状脑病、格斯特曼-斯特劳斯勒-舍因克综合征(Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome)、致命性家族性失眠症和库鲁病。

[0151] 在某些实施例中，提供了一种用于增加基因疗法有效的患者群体的方法。所述方

法包括向来自对所选病毒衣壳或血清学交叉反应性衣壳具有大于1:5的中和抗体效价的群体的患者共施用以下:(a)重组病毒,所述重组病毒具有所选病毒衣壳和包装在其中的基因疗法表达盒;以及(b)配体,所述配体在递送基因疗法载体之前特异性地结合新生儿Fc受体(FcRN),其中所述配体阻断FcRn与免疫球蛋白G(IgG)的结合并允许有效量的基因疗法产物在所述患者体内表达。

[0152] 在某些实施例中,提供了一种用于治疗患者的方法,所述患者对重组腺相关病毒(rAAV)衣壳具有中和抗体。所述方法包括将rAAV与如本文所定义的抗新生儿Fc受体(FcRn)免疫球蛋白构建体组合施用,其中所述免疫球蛋白构建体特异性地抑制FcRn与免疫球蛋白G(IgG)结合,合适地不干扰FcRn-白蛋白结合。

[0153] 在某些实施例中,病毒载体(例如,rAAV)全身递送。在某些实施例中,rAAV通过静脉内、腹膜内、鼻内或通过吸入递送。在某些实施例中,rAAV具有选自以下的衣壳:AAV1、AAV2、AAV3、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAVhu37。在某些实施例中,rAAV具有AAVhu68衣壳。在某些实施例中,rAAV具有AAVrh91衣壳。在某些实施例中,免疫球蛋白构建体是单克隆抗体尼卡利单抗(M281)或包括其三个或更多个CDR的免疫球蛋白构建体,或其组合。在某些实施例中,免疫球蛋白构建体选自洛利昔珠单抗(UCB7665)、IMVT-1401、RVT-1401、HL161、HBM916、ARGX-113(艾加莫德)、SYNT001、SYNT002、ABY-039或DX-2507,或所述免疫球蛋白构建体的衍生物、或所述免疫球蛋白构建体和/或其衍生物的组合。

[0154] 在一个实施例中,向受试者递送治疗有效量的本文所描述的载体。如本文所使用的,“治疗有效量”是指包括编码功能性基因的核酸序列的组合物的量,所述功能性基因在靶细胞中递送和表达足以实现功效的酶的量。在一个实施例中,载体的剂量为每剂量约$1x10^{9}$GC至约$1x10^{13}$基因组拷贝(GC)。在具体实施例中,向患者施用的载体的剂量为至少约$1.0x10^{9}$GC/kg、约$1.5x10^{9}$GC/kg、约$2.0x10^{9}$GC/g,about$2.5x10^{9}$GC/kg、约$3.0x10^{9}$GC/kg、约$3.5x10^{9}$GC/kg、约$4.0x10^{9}$GC/kg、约$4.5x10^{9}$GC/kg、约$5.0x10^{9}$GC/kg、约$5.5x10^{9}$GC/kg、约$6.0x10^{9}$GC/kg、约$6.5x10^{9}$GC/kg、约$7.0x10^{9}$GC/kg、约$7.5x10^{9}$GC/kg、约$8.0x10^{9}$GC/kg、约$8.5x10^{9}$GC/kg、约$9.0x10^{9}$GC/kg、约$9.5x10^{9}$GC/kg、约$1.0x10^{10}$GC/kg、约$1.5x10^{10}$GC/kg、约$2.0x10^{10}$GC/kg、约$2.5x10^{10}$GC/kg、约$3.0x10^{10}$GC/kg、约$3.5x10^{10}$GC/kg、约$4.0x10^{10}$GC/kg、约$4.5x10^{10}$GC/kg、约$5.0x10^{10}$GC/kg、约$5.5x10^{10}$GC/kg、约$6.0x10^{10}$GC/kg、约$6.5x10^{10}$GC/kg、约$7.0x10^{10}$GC/kg、约$7.5x10^{10}$GC/kg、约$8.0x10^{10}$GC/kg、约$8.5x10^{10}$GC/kg、约$9.0x10^{10}$GC/kg、约$9.5x10^{10}$GC/kg、约$1.0x10^{11}$GC/kg、约$1.5x10^{11}$GC/kg、约$2.0x10^{11}$GC/kg、约$2.5x10^{11}$GC/kg、约$3.0x10^{11}$GC/kg、约$3.5x10^{11}$GC/kg、约$4.0x10^{11}$GC/kg、约$4.5x10^{11}$GC/kg、约$5.0x10^{11}$GC/kg、约$5.5x10^{11}$GC/kg、约$6.0x10^{11}$GC/kg、约$6.5x10^{11}$GC/kg、约$7.0x10^{11}$GC/kg、约$7.5x10^{11}$GC/kg、约$8.0x10^{11}$GC/kg、约$8.5x10^{11}$GC/kg、约$9.0x10^{11}$GC/kg、约$9.5x10^{11}$GC/kg、约$1.0x10^{12}$GC/kg、约$1.5x10^{12}$GC/kg、约$2.0x10^{12}$GC/kg、约$2.5x10^{12}$GC/kg、约$3.0x10^{12}$GC/kg、约$3.5x10^{12}$GC/kg、约$4.0x10^{12}$GC/kg、约$4.5x10^{12}$GC/kg、约$5.0x10^{12}$GC/kg、约$5.5x10^{12}$GC/kg、约$6.0x10^{12}$GC/kg、约$6.5x10^{12}$GC/kg、约$7.0x10^{12}$GC/kg、约$7.5x10^{12}$GC/kg、约$8.0x10^{12}$GC/kg、约$8.5x10^{12}$GC/kg、约$9.0x10^{12}$GC/kg、约$9.5x10^{12}$GC/kg、约$1.0x10^{13}$GC/kg、约$1.5x10^{13}$GC/kg、约$2.0x10^{13}$GC/kg、约$2.5x10^{13}$GC/kg、约$3.0x10^{13}$GC/kg、约$3.5x10^{13}$GC/kg、约$4.0x10^{13}$GC/kg、约$4.5x10^{13}$GC/kg、约$5.0x10^{13}$GC/kg、约$5.5x10^{13}$GC/kg、约$6.0x10^{13}$GC/kg、约$6.5x10^{13}$GC/kg、约$7.0x10^{13}$GC/kg、约$7.5x10^{13}$GC/kg、约$8.0x10^{13}$GC/kg、约$8.5x10^{13}$GC/kg、约$9.0x10^{13}$GC/kg、约$9.5x10^{13}$GC/kg或

约$1.0x10^{14}$GC/kg。

[0155] 在一个实施例中,所述方法进一步包括受试者接受免疫抑制共疗法。用于此类共疗法的免疫抑制剂包含但不限于糖皮质激素、类固醇、抗代谢药、T细胞抑制剂、大环内酯类(例如,雷帕霉素或雷帕霉素类似物)以及细胞生长抑制剂,包含烷化剂、抗代谢药、细胞毒性抗生素、抗体或对免疫亲和素具有活性的药剂。免疫抑制剂可以包含氮芥(nitrogen mustard)、亚硝基脲(nitrosourea)、铂化合物、甲氨蝶呤(methotrexate)、硫唑嘌呤(azathioprine)、巯嘌呤(mercaptopurine)、氟尿嘧啶(fluorouracil)、更生霉素(dactinomycin)、蒽环霉素(anthracycline)、丝裂霉素C(mitomycin C)、博来霉素(bleomycin)、光神霉素(mithramycin)、IL-2受体(CD25)或CD3定向抗体、抗IL-2抗体、环孢素(ciclosporin)、他克莫司(tacrolimus)、西罗莫司(sirolimus)、IFN-β、IFN-γ、阿片类或TNF-α(肿瘤坏死因子-α)结合剂。

[0156] 在某些实施例中,可以在施用基因疗法之前的第0天、第1天、第2天、第7天或更多天开始免疫抑制疗法。此类疗法可以涉及在同一天内共施用两种或更多种药物(例如,强的松、霉酚酸(MMF)和/或西罗莫司(即,雷帕霉素))。可以在基因疗法施用之后以相同的剂量或经过调整的剂量继续使用这些药物中的一种或多种药物。根据需要,此类疗法可以持续约1周(7天)、约60天或更长时间。在某些实施例中,选择无他克莫司的方案。在一个实施例中,将如本文所描述的rAAV施用于有需要的受试者一次。在一个实施例中,将rAAV施用于有需要的受试者一次。

[0157] 应当理解,本文所描述的方法中的组合物旨在应用于跨本说明书描述的其它组合物、方案、方面、实施例和方法。

[0158] 7.试剂盒

[0159] 在某些实施例中,提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含悬浮于调配物(任选地冷冻)中的浓缩载体、任选的稀释缓冲液以及施用所需的装置和组件。在一个实施例中,试剂盒提供足够的缓冲液以允许注射。在某些实施例中,试剂盒提供足够的缓冲液以允许鼻内或雾化施用。此类缓冲液可以允许浓缩载体的稀释度为约1:1到1:5或更多。在其它实施例中,包含更高或更低量的缓冲液或无菌水以允许治疗临床医生进行剂量滴定和其它调整。在仍其它实施例中,装置的一个或多个组件包含在试剂盒中。合适的稀释缓冲液,如盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)或甘油/PBS是可用的。

[0160] 任选地,试剂盒进一步包括用于递送的包括抗FcRn配体(例如,免疫球蛋白、抗体构建体)的组合物。

[0161] 应当理解,本文所描述的试剂盒中的组合物旨在应用于跨本说明书描述的其它组合物、方案、方面、实施例和方法。

[0162] 如本文所使用的,短语“减轻症状”、“改善症状”或其任何语法变体是指逆转症状、症状或阻止与所递送的基因产物相关的症状的进展。在一个实施例中,所述减轻或改善是指施用所描述的组合物或使用所描述的方法后患者的症状总数,与施用或使用之前相比减少了约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%。在另一个实施例中,所述减轻或改善是指施用所描述的组合物或使用所描述的方法后症状的严重程度或进展,与施用或使用之前相比减少了约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%。

[0163] 除非另有说明，否则“患者”是指男性或女性，并且“受试者”是指用于临床研究的男性或女性、狗和动物模型。

[0164] 在某些实施例中，用于治疗基因疗法患者的组合方案，所述基因疗法患者对所期望病毒载体的外衣壳或包膜蛋白具有中和抗体。所述方案包括以与抑制人新生儿Fc受体(FcRn)和针对病毒载体的外衣壳或包膜蛋白的免疫球蛋白G(IgG)的结合的配体的治疗性组合共施用携带表达盒的病毒载体，所述表达盒包括编码基因产物的与指导所述基因产物在靶细胞中的表达的调控序列可操作地连接的核酸序列。合适地，配体针对FcRn-IgG结合，而不干扰FcRn-白蛋白结合。配体可以选自肽、蛋白质、RNAi序列或小分子。在某些实施例中，配体蛋白是单克隆抗体、免疫粘附素、骆驼科动物抗体、Fab片段、Fv片段或scFv片段。病毒载体可以是但不限于重组腺相关病毒、重组腺病毒、重组单纯性疱疹病毒或重组慢病毒。

[0165] 在某些实施例中，所述方案包括治疗具有选自以下的单克隆抗体的患者：尼卡利单抗(M281)、洛利昔珠单抗(UCB7665)、IMVT-1401、RVT-1401、HL161、HBM916、ARGX-113(艾加莫德(efgartigimod))、奥诺利单抗(SYNT001)、SYNT002、ABY-039或DX-2507，其衍生物或组合。

[0166] 在某些实施例中，配体是尼卡利单抗(M281)或包括其三个或更多个CDR的免疫球蛋白构建体，所述CDR选自：(a)以下的重链CDR：(i)CDR H1，即SEQ ID NO:16或与其至少99％相同的序列；(ii)CDR H2，即SEQ ID NO:18或与其至少99％相同的序列；以及(iii)CDR H3，即SEQ ID NO:20或与其至少99％相同的序列；或(b)以下的轻链CDR：CDR L1，即SEQ ID NO:10或与其至少99％相同的序列；CDR L2，即SEQ ID NO:12或与其至少99％相同的序列；CDR L3，即SEQ ID NO:14或与其至少99％相同的序列。在某些实施例中，尼卡利单抗或免疫球蛋白构建体包括：(a)以下的重链CDR：(i)CDR H1，即SEQ ID NO:16；(ii)CDR H2，即SEQ ID NO:18；以及(iii)CDR H3，即SEQ ID NO:20；或(b)以下的轻链CDR：CDR L1，即SEQ ID NO:10；CDR L2，即SEQ ID NO:12；CDR L3，即SEQ ID NO:14。

[0167] 在某些实施例中，编码这些配体或另一种所选配体的核酸序列涵盖在本文所提供的方法和组合物中。配体(例如，抗FcRn抗体)可以在施用包括编码配体(例如，抗FcRn抗体)的核酸序列的载体后在体内表达，所述核酸序列与指导配体表达的调控序列可操作地连接。

[0168] 在某些实施例中，在给药所述组合方案之前，所述患者对rAAV衣壳或血清学交叉反应性衣壳具有大于1:5的中和效价，如在体外测定中所测定的。

[0169] 在某些实施例中，患者可以在施用或递送病毒载体前一至七天、与病毒载体的同一天、和/或在递送病毒载体后的一天、几天、几周或几个月(例如，10天至6个月，或更长时间，约2周至12周，或更长时间)用配体(即，递送的配体)治疗。任选地，配体每天递送。在某些实施例中，配体通过与病毒载体的施用途径不同的施用途径递送。配体可以口服递送。病毒载体可以腹膜内、静脉内、肌内、鼻内或鞘内递送。

[0170] 在某些实施例中，在治疗之前，预先确定患者对载体衣壳具有大于1:5的中和抗体效价，如在体外测定中所测定的。在某些实施例中，在递送病毒载体与抑制性配体的组合之前，患者先前未接受过使用病毒载体的基因疗法治疗或基因递送，使得所述患者的预先存在的中和抗体是野生型病毒载体感染的结果。在某些实施例中，在递送病毒载体与抑制性配体的组合之前，患者先前已接受了基因疗法治疗。

[0171] 在某些实施例中，本文所提供的组合方案进一步包括共施用以下中的一者或多者：(a)类固醇或类固醇组合；和/或(b)IgG切割酶；以及(c)Fc-IgE结合的抑制剂；(d)Fc-IgM结合的抑制剂；(e)Fc-IgA结合的抑制剂；和/或(f)γ干扰素。

[0172] 在某些实施例中，本文所描述的方法对于扩大(增加)基因疗法有效的患者群体是有效的。例如，此类方法可以包括向来自对所选病毒衣壳或血清学交叉反应性衣壳具有大于1:5的中和抗体效价的群体的患者共施用以下：(a)重组病毒，所述重组病毒具有所选病毒衣壳和包装在所选病毒衣壳中的基因疗法表达盒；以及(b)配体，所述配体在递送基因疗法载体之前特异性地结合新生儿Fc受体(FcRN)，其中所述配体阻断FcRn与免疫球蛋白G(IgG)的结合并允许有效量的基因疗法产物在所述患者体内表达。在某些实施例中，提供了一种用于治疗患者的方法，所述患者对重组腺相关病毒(rAAV)的衣壳具有中和抗体，所述方法包括将rAAV与抗新生儿Fc受体(FcRn)免疫球蛋白构建体组合施用，其中所述免疫球蛋白构建体特异性地抑制FcRn-免疫球蛋白G(IgG)结合。在某些实施例中，rAAV全身递送，例如，通过静脉内、腹膜内、鼻内或通过吸入递送。可以选择合适的衣壳，但在某些实施例中，rAAV具有选自以下的衣壳：AAV1、AAV2、AAV3、AAV5、AAV7、AAV8、AAV9、AAVrh10、AAVrh91、AAVhu37、AAVhu68。

[0173] 关于这些发明的描述，在另一个实施例中，预期本文所描述的组合物中的每种组合物均在本发明的方法中是有用的。另外，还预期在另一个实施例中，本文所描述的用于所述方法中的组合物中的每种组合物本身也是本发明的实施例。

[0174] 除非本说明书中另有定义，否则本文所使用的技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员和参照公开文本所通常理解的相同含义，这为本领域的技术人员提供了本申请中使用的许多术语的通用指南。

[0175] 核酸是指核苷酸的聚合形式并且包含RNA、mRNA、cDNA、基因组DNA、肽核酸(PNA)以及上述的合成形式和混合的聚合物。核苷酸是指核糖核苷酸、脱氧核苷酸或任一类型的核苷酸的经修饰的形式(例如，肽核酸寡聚物)。所述术语还包含DNA的单链和双链形式。本领域技术人员将理解，这些核酸分子的功能变体也旨在成为本发明的一部分。功能变体是可以使用标准遗传密码直接翻译的核酸序列，以提供与从亲本核酸分子翻译的氨基酸序列相同的氨基酸序列。

[0176] 方法是已知的，并且之前已有描述(例如，WO 96/09378)。如果与野生型序列相比，至少一个非优选密码子被更优选的密码子取代，则序列被认为是工程化的。本文中，非优选密码子是在生物体中比编码相同氨基酸的另一密码子更少频率使用的密码子，并且更优选的密码子是在生物体中比非优选密码子更频繁使用的密码子。具体生物体的密码子使用的频率可以在密码子频率表，如www.kazusa.jp/codon中找到。优选多于一个的非优选密码子，优选地大多数或所有非优选密码子被更优选的密码子取代。优选地，生物体中最常用的密码子用于工程化序列。优选密码子的取代通常导致更高的表达。本领域技术人员还应理解，由于遗传密码的简并性，许多不同的核酸分子可以编码相同的多肽。还应理解，技术人员可以使用常规技术进行不影响核酸分子编码的氨基酸序列的核苷酸取代，以反映多肽将在其中表达的任何特定宿主生物体的密码子使用。因此，除非另有说明，否则“编码氨基酸序列的核酸序列”包含彼此的简并版本以及编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。核酸序列可以使用常规分子生物学技术进行克隆，或通过DNA合成从头产生，这可以由在DNA合

成和/或分子克隆领域拥有业务的服务公司(例如,GeneArt公司(GeneArt)、金斯瑞公司(GenScript)、生命技术公司(Life Technologies)、欧陆集团(Eurofins))使用常规程序进行。

[0177] 在核酸序列的上下文中,术语“百分比(%)同一性”、“序列同一性”、“百分比序列同一性”或“百分比相同的”是指两个序列中的残基在比对以获得对应性时是相同的。期望序列同一性比较的长度可以超过基因组的全长、基因编码序列的全长或至少约500至5000个核苷酸的片段。然而,也可能期望较小片段之间的同一性,例如,至少约九个核苷酸,通常至少约20至24个核苷酸、至少约28至32个核苷酸、至少约36个或更多个核苷酸。

[0178] 多个序列比对程序也可用于核酸序列。此类程序的实例包含“Clustal Omega”、“Clustal W”、“CAP Sequence Assembly”、“BLAST”、“MAP”和“MEME”,所述程序可通过因特网上的Web服务器进行访问。此类程序的其它来源是本领域技术人员已知的。可替代地,也使用了载体NTI实用程序。本领域已知的许多算法可以用于测量核苷酸序列同一性,包含上述程序中包含的那些算法。作为另一个实例,可以使用GCG 6.1版本的程序Fasta™比较多核苷酸序列。Fasta™提供了查询序列与搜索序列之间最佳重叠区的比对和序列同一性百分比。例如,核酸序列之间的序列同一性百分比可以是使用如GCG 6.1版本中所提供的采用其默认参数(字号6和评分矩阵的NOPAM系数)的Fasta™所确定的,所述程序通过引用并入本文。

[0179] 可以容易地确定蛋白质全长、多肽、约32个氨基酸、约330个氨基酸或其肽片段或对应核酸序列编码序列上的氨基酸序列的百分比同一性。合适的氨基酸片段的长度可以是至少约8个氨基酸并且可以是至多约700个氨基酸。通常,当提及两种不同序列之间的“同一性”、“同源性”或“类似性”时,参考“比对”序列来确定“同一性”、“同源性”或“类似性”。“比对”序列或“比对”是指与参考序列相比,通常含有对丢失的或另外的碱基或氨基酸的校正的多个核酸序列或蛋白质(氨基酸)序列。

[0180] 除非由较高范围另行规定,否则应当理解,同一性百分比是同一性的最低水平,并且涵盖同一性的所有较高水平,直至与参考序列的100%同一性。除非另行说明,否则应当理解,同一性百分比是同一性的最低水平,并且涵盖同一性的所有较高水平,直至与参考序列的100%同一性。例如,“95%同一性”和“至少95%同一性”可以互换地使用,并且包含与参考序列的95%、96%、97%、98%、99%直至100%同一性,以及其间的所有级分。

[0181] 除非另有说明,数值将被理解为服从传统的数学舍入规则。

[0182] 同一性可以通过制备序列的比对并通过使用本领域已知的或可商购获得的各种算法和/或计算机程序(例如,BLAST,ExPASy;Clustal Omega;FASTA;使用例如Needleman-Wunsch算法、Smith-Waterman算法)确定。使用多种公开或可商购获得的多序列比对程序中的任一种进行比对。序列比对程序可用于氨基酸序列,所述程序例如“Clustal Omega”、“Clustal X”、“MAP”、“PIMA”、“MSA”、“BLOCKMAKER”、“MEME”以及“Match-Box”程序。通常,以默认设置使用这些程序中的任何程序,尽管本领域技术人员可以根据需要改变这些设置。可替代地,本领域技术人员可以利用另一种算法或计算机程序,所述算法或程序提供至少与通过参考算法和程序所提供的一样水平的同一性或比对。参见例如,J.D.Thomson等人,《核酸研究(Nucl.Acids.Res.)》,“多个序列比对的全面比较(A comprehensive comparison of multiple sequence alignments)”,27(13):2682-2690(1999)。

[0183] 本文所描述的水性悬浮液或药物组合物被设计成用于通过任何合适的途径或不同途径的组合递送到有需要的受试者。

[0184] 如本文所使用的,术语“鞘内递送”或“鞘内施用”是指通过注射到椎管中,更具体地注射到蛛网膜下腔中使得其到达脑脊液(CSF)的药物施用途径。鞘内递送可以包含腰椎穿刺、心室内、枕骨下/脑池内和/或C1-2穿刺。例如,可以通过腰椎穿刺引入材料以在整个蛛网膜下腔扩散。在另一个实例中,可以向小脑延髓池中注射。脑池内递送可以增加载体扩散和/或减少施用引起的毒性和炎症。参见例如,Christian Hinderer等人,在将AAV9递送到小脑延髓池中之后食蟹猴的中枢神经系统中的广泛基因转移(Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna).《分子疗法方法临床发展(Mol Ther Methods Clin Dev.)》2014;1:14051。于2014年12月10日在线公开.doi:10.1038/mtm.2014.51。

[0185] 如本文所使用的,术语“脑池内递送”或“脑池内施用”是指药物直接进入到脑室或小脑延髓池(cisterna magna cerebellomedularis)的脑脊液中,更具体地是通过枕骨下穿刺或通过直接注射到小脑延髓池(cisterna magna)中或通过永久定位的管的施用途径。

[0186] “包括”是意指包含其它组分或方法步骤的术语。当使用“包括”时,应当理解,相关实施例包含:使用“由…组成”术语的描述,其不包括其它组成或方法步骤;以及使用“基本上由…组成”术语的描述,其不包括基本上改变实施例或本发明的性质的任何组成或方法步骤。应当理解,虽然说明书中的各个实施例是使用“包括”语言来呈现的,但是在各种情况下,也使用“由…组成”或“基本上由…组成”语言来描述相关实施例。

[0187] 应当注意,术语“一个/一种(a/an)”是指一个或多个/一种或多种,例如,“一种载体”应被理解为表示一种或多种rAAV或另一种特定的载体。如此,术语“一个”(或“一种”)、“一个或多个/一种或多种”和“至少一个/种”在本文中可互换地使用。

[0188] 如本文所使用的,除非另有说明,否则术语“约”意指相对于给定参考的正或负10%的变化性。

[0189] 在某些情况下,术语“E+#”或术语“e+#”用于指代指数。例如,“5E10”或“5e10”是$5x10^{10}$。这些术语可以互换地使用。

[0190] 8.实例

[0191] 提供这些实例仅为了说明目的,并且本发明绝不应理解为限制于这些实例,而是应理解为涵盖由于本文所提供的教导而变得明显的任何和所有变化。

[0192] 本发明人开发了一种策略,所述策略用AAV载体治疗具有预先存在的中和抗体的受试者。使用单剂量靶向新生儿Fc受体(FcRn)的单克隆抗体,预先存在的中和抗体会暂时减少至多10倍,从而允许有效的AAV施用。

[0193] 在用人IgG处理的小鼠中,单个FcRN mAb剂量导致抗体效价降低10倍,并允许AAV介导的肝脏转导成功。

[0194] 实例1.阻断性FcRn对小鼠的NAb效价和AAV转导的影响

[0195] 在此项研究中,测试了在对小鼠静脉内(intravenous或i.v.)施用AAV后,抗FcRn抗体是否可以降低抗AAV NAb的水平并且由此增强AAV介导的基因转导。在此项研究中,观察到在用池化人IgG预处理的人源化FcRn转基因小鼠中,静脉内载体给药后,施用M281单克

隆抗体(mAb)可以恢复人NAb介导的肝脏靶向基因转导的阻断。图12示出了AAV8.TT1载体施用时用IVIG共处理的小鼠中TT1活性水平降低的结果。

[0196] 下表1示出了用于检查阻断性FcRn对小鼠NAb效价和AAV转导的影响的研究设计概要。在此项研究中,使用了人FcRn转基因小鼠(即,SCID-hFcRnTg32小鼠(JAX:018441)),其通过表达人FcRn(M281抗体的靶标)提供了更长的人免疫球蛋白G(hIgG)的血清半衰期。M281是hIgG1抗体,其包括SEQ ID NO:8的重链M281-HC和SEQ ID NO:7的轻链。研究开始时,在第0天,以0.5g/kg的剂量静脉注射Privigen(IVIG)。Privigen的AAV8中和抗体(NAb)在0.1g/ml溶液中的比率为1:320。在第1天,向小鼠腹腔内注射剂量为30mg/kg的M281(第2组)或对照组的PBS(第1组)。在第16天,以$4x10^{12}$GC/kg的剂量向小鼠施用AAV8.TBG.TT1。AAV8.TBG.TT1是具有AAV8衣壳和编码测试转基因1(即,TT1)转基因的载体基因组的载体。测量hIgG/Nab效价的血清水平作为研究的读数。

[0197] 表1.

[0198]

第几天	处理	第 1 组 N = 8	第 2 组 N = 5	样品
-7				血清
0	IVIG（静脉内）0.5 g/kg	x	x	血清
1	M281（腹膜内）30 mg/kg	PBS	PBS	血清
8				血清
16	AAV8.TBG.TT1（静脉内，4e12 GC/kg）	x	x	血清
44				血清
72				尸检（血清，肝脏，心脏）

[0199] 到第16天,包含NAb的hIgG的水平降至约50％。图1A和1B示出了当用IVIG预处理时,M281 mAb的施用降低了hIgG的水平并改善了hFcRn小鼠肝脏中的AAV转导。图1A示出了IVIG预处理后第1天至第16天的血清人IgG的水平。图1B示出了AAV转导后第28天的转基因活性的水平,以单位(U)表示。正方形表示接受M281静脉内注射的小鼠。实心正方形表示观察到IgG水平降低的小鼠。空心正方形表示相比之下IgG的血清水平较高的小鼠,并且与经PBS处理的组相关。用M281处理的两只小鼠(空心正方形)未表现出hIgG减少可能是由于腹膜内注射失败所致。

[0200] 接下来,通过在用IVIG预处理的hFcRn Tg小鼠中以更高剂量静脉施用AAV,检查了M281对转基因转导的影响。下表2示出了用于检查每只小鼠在$1x10^{11}$GC的较高剂量下阻断性FcRn的影响以及NAb效价与AAV8.TBG.TT1转导之间的相关性的研究设计概要。

[0201] 表2.

[0202]

组名称	1	2	3
N/组	5	5	5
描述	无 IVIG	IVIG + PBS	IVIG + M281
基因型	hFcRnTg32	hFcRnTg32	hFcRnTg32
IVIG（静脉内）-第 0 天	媒剂对照	1 g/kg	1 g/kg
M281（腹膜内）-6 小时和 24 小时	-	媒剂对照	30 mg/kg
载体剂量（静脉内）	1e11 GC/小鼠	1e11 GC/小鼠	1e11 GC/小鼠
持续时间，读数	35 天研究 尸检后血清 NAb、BAb 和 IgG（活体）和载体基因组生物分布		

[0203] 在此实验中，使用人源化FcRn转基因scid小鼠。对于实验组，在第0天以1g/kg用静脉内池化人IgG处理的小鼠在人IgG后的第6小时和第24小时接受腹膜内M281注射(每个时间点30mg/kg)。一对照组不接受人IgG或M281，而另一对照组接受人IgG，但不接受M281 mAb。在第5天，所有小鼠接受静脉内AAV8.TBG.TT1载体($1x10^{11}$GC/小鼠)，以通过血清TT1活性检查第19天、第26天和第33天的肝脏靶向基因转导。测量NAb(中和结合抗体)、BAb(非中和结合抗体)和hIgG(人IgG)的血清水平以及载体基因组生物分布，作为研究的读数。人IgG ELISA示出，在人IgG后第5天，用M281 mAb处理的小鼠中的人IgG显著减少，减少到用人IgG处理但未用M281 mAb处理的小鼠的10％以下(图2A)。当不施用M281 mAb时，人IgG完全降低血清TT1活性。相反，没有人IgG的小鼠示出了血清TT1活性的显著增加，从而表明源自池化人IgG的NAb阻断了IV载体的肝脏靶向基因转导。M281 mAb对人IgG的>90％的降低使肝脏转导恢复到未用人IgG处理的小鼠的60％以上。这些结果证明，抗AAV NAb的长血清半衰期取决于体内FcRn受体，并且M281 mAb对受体的阻断减少了具有NAb的循环IgG。图2A示出了用IVIG预处理后血清人IgG(hIgG)的水平。箭头指示M281和AAV的施用。在研究的第5天，用M281处理的小鼠(第3组)的血清hIgG水平降低，其结果在下表3中总结。图2B示出了研究第0天至第35天的血清中的载体生物分布水平。血清中的TT1活性水平与未用IVIG预处理的对照组1的小鼠相似。M281还原型IVIG源性NAb与总hIgG一起抑制FcRn，并允许用静脉内AAV8进行肝脏基因转导。

[0204] 表3.

[0205]

分组	第5天的AAV8 NAb
无IVIG	＜1:5
IVIG+PBS	1:10
IVIG+M281	＜1:5

[0206] 已经证实了在人FcRn转基因小鼠模型中，当输注池化人IgG(IVIG)时，抗FcRn抗体M281对于降低人IgG水平和增强AAV介导的基因递送的功效。

[0207] 实例2.阻断性FcRn对非人灵长类动物(NHP)的NAb效价和AAV信号转导的影响

[0208] 在此项研究中，测试了在静脉内递送AAVhu68载体(AAVhu68衣壳和具有CB7启动子的载体基因组和测试转基因2转基因(即，TT2))后，M281对NHP中预先存在的NAb和心脏基因转导的影响。在此项研究中，观察到在具有内源性预先存在的NAb的非人灵长类动物中，M281 mAb的施用瞬时降低了预先存在的NAb效价，并通过静脉内载体施用增强了基因转导。

[0209] 图3示出了用于检查阻断性FcRn对NHP的NAb效价和AAV转导的影响的研究设计。在研究中，使用了测量的预先存在的NAb效价为1:80、1:40、1:20和/或＜1:5的恒河猴(NHP)。在AAV注射前(第0天)的第5天、第4天和第3天(第-5天、第-4天和第-3天)，以8mg/kg的剂量向NHP静脉内给药M281。在第0天，以$3x10^{13}$GC/kg的剂量向NHP静脉内注射AAVhu68载体。在初始研究1中(如在图3中所指示的)，分别用8mg/kg的静脉内M281 mAb处理预先存在的AAVhu68 NAb效价为1:20和1:40的两只恒河猴，持续连续3天(第-5天、第-4天和第-3天)以检查M281阻断FcRn对非人灵长类动物中预先存在NAb效价的影响。如在图4B中所示出的，两种动物的AAVhu68 NAb效价在第-3天降低到一半，并且然后在第0天达到1:5。在第2天，NAb效价示出小幅增加至1:10，并保持在1:10直到第9天。这些结果清楚地表明，M281 mAb与恒河猴FcRn交叉反应，并与NAb一起减少内源性恒河猴IgG。M281给药方案表明，对于预先存在

NAb效价高达1:40的NHP,将NAb效价降低至1:5是有效的。图4A至4D示出M281输注降低了NHP中预先存在的NAb效价和IgG。图4A示出了以第-5天的百分比绘制的血清恒河猴IgG(rhIgG)的水平,其中M281的施用天数通过图上的箭头指示。图4B示出了AAVhu68非中和结合抗体(BAb)效价,其中M281的施用天数通过图上的箭头指示。图4C示出了AAVhu68中和结合抗体(NAb)效价,其中M281的施用天数通过图上的箭头指示。图4D示出了以第-5天的百分比绘制的血清白蛋白的水平,其中M281施用通过图上的箭头指示。

[0210] 接下来,在研究2中(如在图3中所指示的),用M281 mAb分别以AAVhu68 NAb效价1:40和1:80处理2只恒河猴,并且然后静脉内给药载体,以测试M281 mAb的引起的NAb减少是否对静脉内AAV基因疗法背景下的基因转导有积极影响。在此项研究中,表达TT2($3x10^{13}$GC/kg)的AAVhu68载体在第-5天、第-4天和第-3天静脉内注射8mg/kg M281 3天后的第0天静脉内施用。将NAb＜1:5的1个NHP和NAb 1:40的另一个NHP分别用作NAb阴性对照和NAb阳性对照,所述NAb阴性对照和NAb阳性对照仅接受IV载体,但不接受M281 mAb预处理。在用M281连同血清总IgG和AAV结合抗体处理的NHP中,NAb降低并在第0天达到1:5。载体注射后,这些动物的NAb效价显著增加,在AAV后7天内达到1:1280。虽然所述增加比NAb阳性对照猴(第7天示出为1:2560)低1倍稀释,但与NAb阴性对照猴(在第7天示出为1:160)相比高得多。在第30天尸检后,分析了心脏、肝脏、脾脏和骨骼肌中的载体基因组生物分布。与NAb阴性猴相比,来自NAb阳性对照猴的心脏、肝脏和骨骼肌中的载体基因组拷贝数减少。这在来自经M281处理的猴的肝脏和骨骼肌中有所改善。对于心脏,在基线处具有1:40 NAb的经M281处理的猴之一的拷贝数略有改善。在NAb阳性猴中,由于抗体介导的免疫应答,载体基因组倾向于累积到脾脏。

[0211] 图5A至5B示出M281输注降低了NHP中预先存在的NAb效价以及IgG(研究2)。图5A示出了以第-5天的百分比绘制的血清恒河猴IgG(rhIgG)的水平,其中M281的施用(第-5天、第-4天和第-3天)和AAV的施用(第0天)通过图上的箭头指示。图5B示出了以第-5天的百分比绘制的血清白蛋白的水平,其中M281施用通过图上的箭头指示。图6A至6B示出了AAV结合抗体效价(研究2)。图6A示出了研究第-15天至第0天期间的AAVhu68非中和结合抗体(BAb)效价,其中M281的施用(第-5天、第-4天和第-3天)和AAV的施用(第0天)。图6B示出了研究第0天至第30天期间的AAVhu68非中和结合抗体(BAb)效价。

[0212] AAVhu68-NAb效价在下表4中总结。

[0213] 表4.

[0214]

	M281	BSL	第-5天	第-4天	第-3天	第0天	第7天	第14天	第21天	第30天
NHP3	-	＜1:5				＜1:5	1:160	1:640	1:640	1:640
NHP4	-	1:40				1:40	1:2560	1:1280	1:2560	1:1280
NHP5	+	1:40	1:20	1:20	＜1:5	1:5	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280
NHP6	+	1:80	1:40	1:40	1:20	1:5	1:1280	1:640	1:320	1:320

[0215] 图7A至7E示出了以每微克(μg)DNA的基因组拷贝(GC)绘制的载体基因组在从研究2收获的各种组织中的生物分布。图7A示出了载体基因组在心脏中的生物分布。图7B示出了载体基因组在骨骼肌中的生物分布。图7C示出了载体基因组在肝脏的右叶中的生物分布。图7D示出了载体基因组在肝脏的左叶中的生物分布。图7E示出了载体基因组在脾脏中的生物分布。

[0216] 在另一项研究中，在有或没有FcRn阻断的情况下，将测试预先存在的NAb在NHP中IV施用AAV-TT3(测试转基因3)后对转导效率的影响。简而言之，基于预先存在的NAb的评估水平和确认的效价水平，将纳入的动物分成两组。测量NAb(中和结合抗体)的血清水平、基线生物标志物以及血浆、心脏、肌肉和肝脏中的转基因表达，作为研究的读数。预期TT2原位杂交示出来自用M281处理的猴的肝脏和心脏中TT2mRNA的表达提高。

[0217] 图8A和8B示出了以阳性面积比率绘制的原位杂交检查从研究2收获的心脏和肝脏组织中TT2 mRNA表达水平的结果。图8A示出了原位杂交检查从研究2收获的肝脏组织(左叶和右叶)中TT2 mRNA表达水平的结果。图8B示出了原位杂交检查从研究2收获的心脏组织(左心室、右心室和中隔)中TT2 mRNA表达水平的结果。

[0218] 实例3.用于静脉内递送的M281抗体生产、纯化和调配物。

[0219] 本文所提供的实例描述了免疫球蛋白构建体的体外生产。

[0220] 编码包括M281-LC(轻链)和M281-HC(重链)的M281的核酸分子是使用标准技术，即赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Life Technologies)的基因合成服务获得的。将编码M281-LC或M281-HC的另外的核酸序列克隆到适合于在生产宿主细胞系中表达的携带载体基因组的合适质粒中。携带载体基因组的质粒包括CMV启动子(SEQ ID NO:1的核苷酸47至726)、编码如下所述的M281构建体的核酸序列、WRPE元件(SEQ ID NO:1的核苷酸1514至2111)和胸苷激酶(TK)poly A信号(SEQ ID NO:1的核苷酸2115至2386)：

[0221] (a)M281-LC核酸序列(SEQ ID NO:1的核苷酸754和1467)，其编码SEQ ID NO:2的M281-LC蛋白，和/或

[0222] (b)M281-HC核酸序列(SEQ ID NO:3的核苷酸754至2154)，其编码SEQ ID NO:4的M281-HC蛋白。

[0223] 将抗体构建体克隆到合适的质粒中，然后用于在宿主细胞中表达，从生产宿主细胞系中纯化并调配用于静脉内递送。

[0224] 实例4.用预先存在的中和抗体处理非人类灵长类动物的抗FcRN抗体

[0225] 在此项研究中，我们可替代的M281方案测试了M281对NHP中预先存在的AAV8NAb的影响。NHP之前于2015年通过静脉施用与AAV8一起施用。使用历史AAV8对照作为参考。测量的NHP研究受试者的基线AAV8 NAb水平为1:40，并且历史对照的基线AAV8 Nab水平<1:5。M281以至多13mg/kg的剂量施用。图9示出了用于评估以$1x10^{13}$GC/kg的剂量再次施用AAV8.TT3(测试转基因3)后，阻断性预先存在的FcRn NAb效价的影响的研究设计。在第14天，测量TT3表达的血清水平。在第14天，对NHP研究受试者进行尸检，并对历史对照受试者进行肝脏活检。收集的组织用于分析TT3表达(ISH/IHC)。还分析了从研究受试者收集的组织和样品的血清TT3表达水平和载体生物分布。

[0226] 图10A和10B示出了AAV8.TT3再次施用研究的结果，其中M281施用降低了NHP中预先存在的NAb效价(AAV8)以及IgG(先前施用AAV8.TT3)。图10A示出了以第-5天的百分比绘制的恒河猴IgG(rhIgG)的血清水平，其中NHP在第-5天、第-4天、第-3天和第-2天施用M281，在第0天施用AAV8.TT3。图10B示出了以mg/mL绘制的M281的测量的血清水平。

[0227] 下表5示出了如上文所检查的AAV8 NAb水平的总结。下表6示出了AAV8结合ELISA测定的结果的总结。

[0228] 表5.

[0229]

动物 ID	研究天数	HEK293 细胞中的 AAV8 NAb				
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	RLU/s 的平均值
RA1476	预筛选	40	不适用	不适用	不适用	40
	基线	80	40	40	40	80
	第-5 天	40	40	40	40	40
	第-4 天	80	40	40	40	40
	第-3 天	40	40	40	20	40
	第-2 天	40	20	20	40	40
	第 0 天	10	10	10	10	10

[0230] 表6.

[0231]

动物 ID	研究天数	AAV8 结合 Elisa	
		Rep 1	Rep 2
RA1476	预筛选	不适用	不适用
	基线	400	400
	第-5 天	400	400
	第-4 天	200	200
	第-3 天	200	200
	第-2 天	200	200
	第 0 天	100	100

[0232] 图11A和11B示出了另一项AAV8.TT3研究的结果，其中M281施用通过自然感染降低了具有预先存在的NAb+(1:20)的NHP中预先存在的NAb效价(AAV8)和IgG。图11A示出了以第-5天的百分比绘制的总恒河猴IgG水平(rhIgG)，其中NHP在第-5天、第-4天、第-3天和第-2天施用M281，在第0天施用AAV8.TT3。图11B示出了以mg/mL绘制的血清M281水平(hIgG)并使用ELISA进行测量。表7示出了如上文所检查的AAV8 NAb水平的总结。下表8示出了AAV8结合ELISA测定的结果的总结。

[0233] 表7.

[0234]

动物 ID	研究天数	HEK293 细胞中的 AAV8 NAb				
		Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	RLU/s 的平均值
181262	预筛选	10	20	不适用	不适用	20
	基线	10	20	20	10	20
	第-5 天	10	10	10	10	10
	第-4 天	5	10	5	5	5
	第-3 天	10	10	10	10	10
	第-2 天	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
	第 0 天					< 5

[0235] 表8.

[0236]

动物 ID	研究天数	AAV8 结合 Elisa	
		Rep 1	Rep 2
181262	预筛选	不适用	不适用
	基线	不适用	不适用
	第-5 天	20	20
	第-4 天	20	20
	第-3 天	10	10
	第-2 天	< 10	< 10

[0237] 表(序列表自由文本)

[0238] 对于在数字标识符<223>下含有自由文本的序列，提供了以下信息。

[0239]

SEQ ID NO: （含有自由文本）	<223>下的自由文本
1	<220> <223> M281-LC 表达质粒 <220> <221> promoter <222> (47)..(726) <223> CMV 启动子 <220> <221> CDS <222> (754)..(1467) <223> M281_LC

[0240]

SEQ ID NO: （含有自由文本）	<223>下的自由文本
	<220> <221> misc_feature <222> (1514)..(2111) <223> WRPE <220> <221> misc_feature <222> (2115)..(2386) <223> TK pA 信号 <220> <221> promoter <222> (2855)..(3224) <223> SV40 早期启动子 <220> <221> misc_feature <222> (3260)..(4054) <223> Neo-R <220> <221> polyA_signal <222> (4230)..(4360) <223> SV40 pA 信号 <220> <221> rep_origin <222> (4743)..(5416) <223> pUC ori <220> <221> misc_feature <222> (5561)..(6421) <223> Amp-R <220> <221> promoter <222> (6422)..(6520) <223> bla 启动子
2	<220> <223> 合成构建体
3	<220> <223> M281-HC 表达质粒 <220> <221> promoter <222> (47)..(726) <223> CMV 启动子 <220> <221> CDS <222> (754)..(2154) <223> M281_HC <220> <221> misc_feature <222> (2201)..(2798) <223> WRPE <220>

[0241]

SEQ ID NO: （含有自由文本）	<223>下的自由文本
	<221> misc_feature <222> (2802)..(3073) <223> TK pA 信号 <220> <221> promoter <222> (3542)..(3911) <223> SV40 早期启动子 <220> <221> misc_feature <222> (3947)..(4741) <223> Neo-R <220> <221> polyA_signal <222> (4917)..(5047) <223> SV40 pA 信号 <220> <221> rep_origin <222> (5430)..(6103) <223> pUC ori <220> <221> misc_feature <222> (6248)..(7108) <223> Amp-R <220> <221> promoter <222> (7109)..(7207) <223> bla 启动子
4	<220> <223> 合成构建体
5	<220> <223> M281_LC 核酸序列
6	<220> <223> M281_HC 核酸序列
7	<220> <223> M281_LC 氨基酸序列
8	<220> <223> M281_HC 氨基酸序列
9	<220> <223> CDR-L1 核酸序列
10	<220> <223> CDR-L1 氨基酸序列
11	<220> <223> CDR-L2 核酸序列
12	<220> <223> CDR-L2 氨基酸序列
13	<220>

[0242]

SEQ ID NO: （含有自由文本）	<223>下的自由文本
	<223> CDR-L3 核酸序列
14	<220> <223> CDR-L3 氨基酸序列
15	<220> <223> CDR-H1 核酸序列
16	<220> <223> CDR-H1 氨基酸序列
17	<220> <223> CDR-H2 核酸序列
18	<220> <223> CDR-H2 氨基酸序列
19	<220> <223> CDR-H3 核酸序列
20	<220> <223> CDR-H3 氨基酸序列
21	<220> <223> CDR-H1 变体 1
22	<220> <223> CDR-H1 变体 2
23	<220> <223> CDR-H2 变体 1
24	<220> <223> CDR-H2 变体 2
25	<220> <223> CDR-H2 变体 3
26	<220> <223> Z_FcRn-2
27	<220> <223> Z_FcRn-4
28	<220> <223> Z_FcRn-16
29	<220> <223> SYN746
30	<220> <223> SYN1327
31	<220> <223> SYN1327-经修饰的 <220> <221> MOD_RES <222> (3)..(3) <223> Pen <220> <221> MOD_RES <222> (9)..(9)

[0243]

SEQ ID NO: （含有自由文本）	<223>下的自由文本
	<223> Sar <220> <221> MOD_RES <222> (10)..(10) <223> NMeLeu
32	<220> <223> 98420-1 氨基酸序列
33	<220> <223> 98420-2
34	<220> <223> 98420-3
35	<220> <223> 98420-4
36	<220> <223> 98420-5
37	<220> <223> DX2504LC
38	<220> <223> DX2504HC
39	<220> <223> DX2507LC
40	<220> <223> DX2507HC
41	<220> <223> DX-CDR-L3
42	<220> <223> DX-CDR-L2
43	<220> <223> DX-CDR-H1
44	<220> <223> DX-CDR-H2
45	<220> <223> hFcRN 氨基酸序列

[0244] 本说明书中所引用的所有出版物以全文引用的方式并入本文。于2020年6月17日提交的美国临时专利申请第63/040,381号、于2021年1月11日提交的美国临时专利申请第63/135,998号以及于2021年2月22日提交的美国临时专利申请第63/152,085号，所述美国临时专利申请通过引用并入本文。标记为“UPN-20-9394PCT_ST25”的所附序列表通过引用并入本文。虽然已经参考特定实施例描述了本发明，但是应当理解，可以在不脱离本发明的精神的情况下进行修改。此类修改旨在落入所附权利要求的范围内。

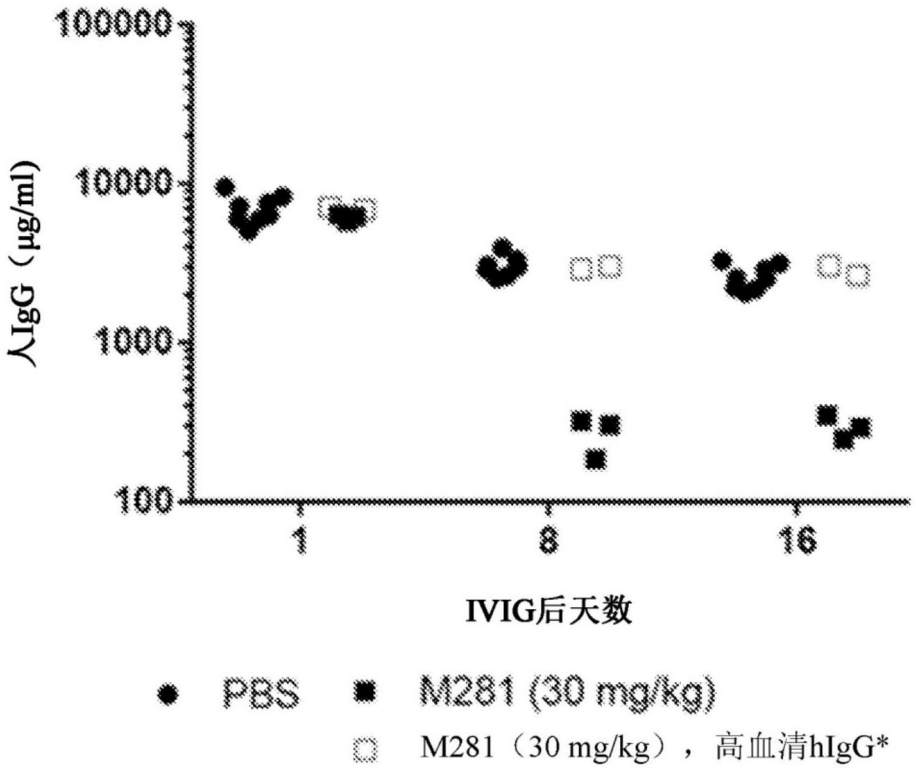
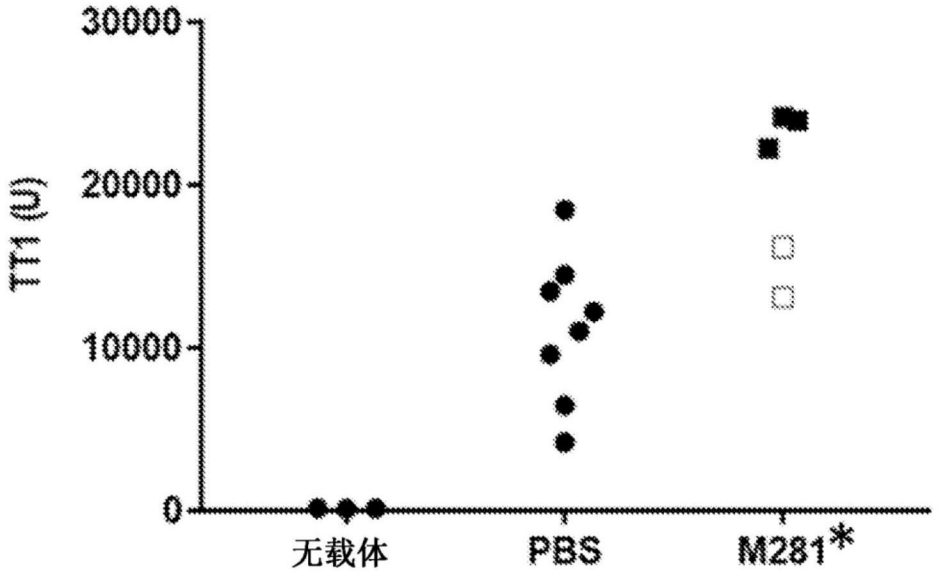


图1A



*用M281处理的两只小鼠未表现出hIgG减少，这可能是由于腹腔内注射失败所致（空心正方形）

图1B

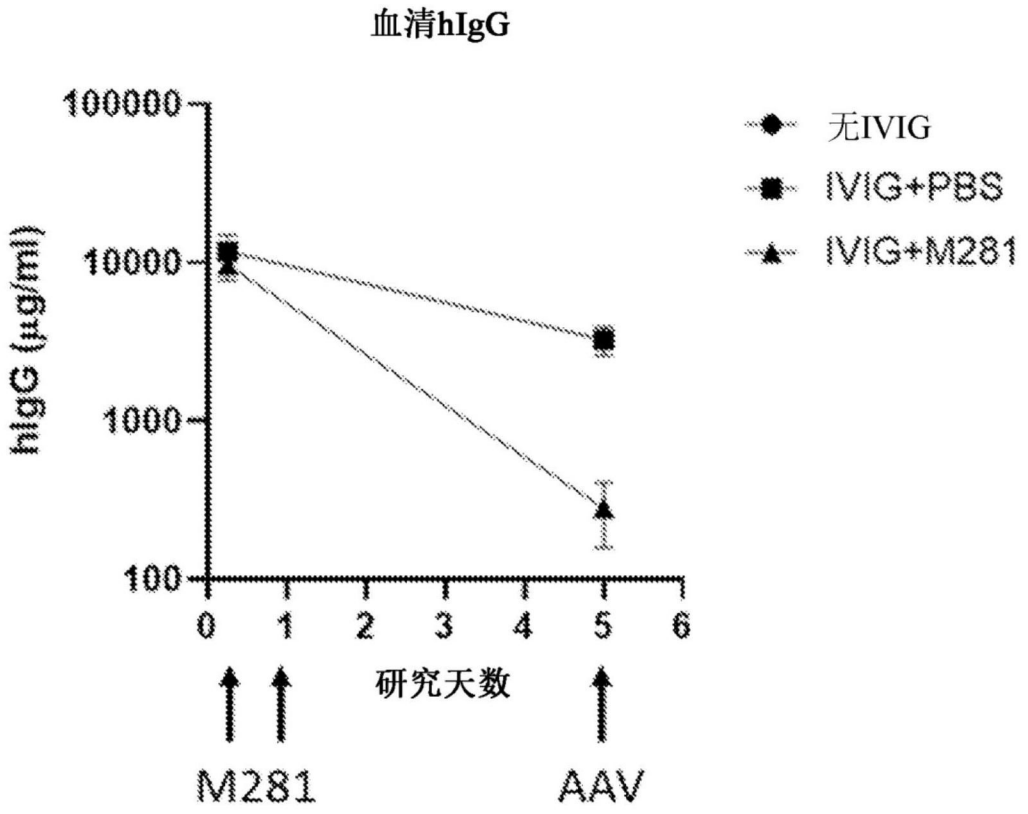

血清hIgG
100000
10000
1000
100
hIgG (μg/ml)
0
1
2
3
4
5
6
研究天数
M281
AAV
无IVIG
IVIG+PBS
IVIG+M281

图2A

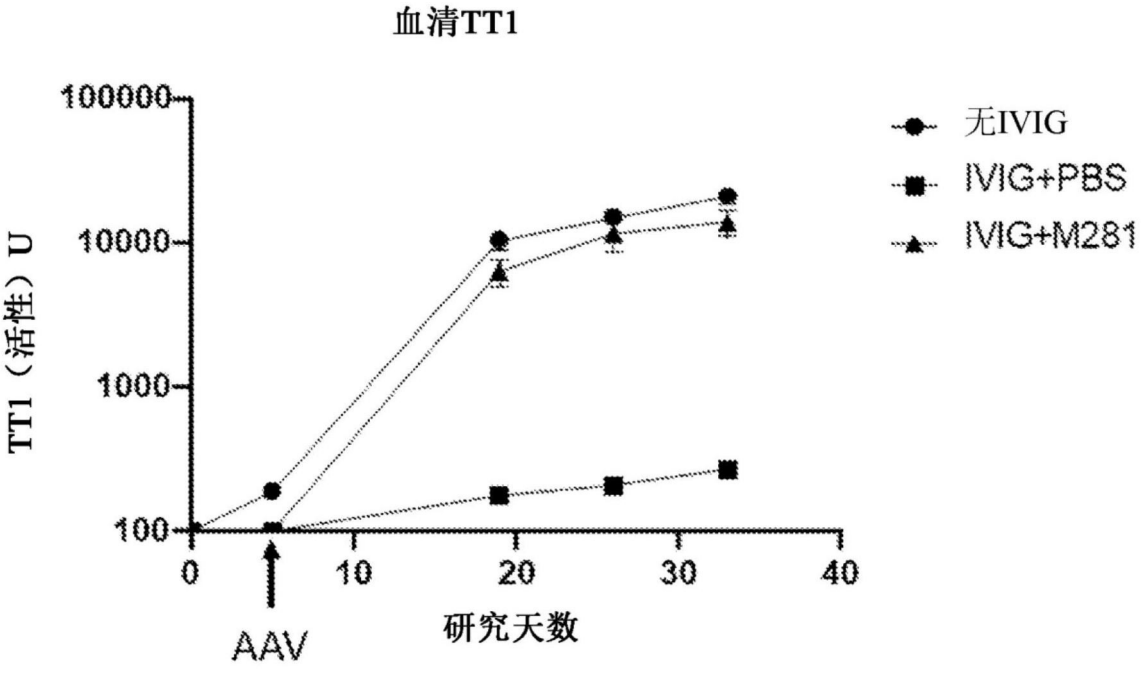

血清TT1
100000
10000
1000
100
TT1（活性）U
0
10
20
30
40
研究天数
AAV
无IVIG
IVIG+PBS
IVIG+M281

图2B

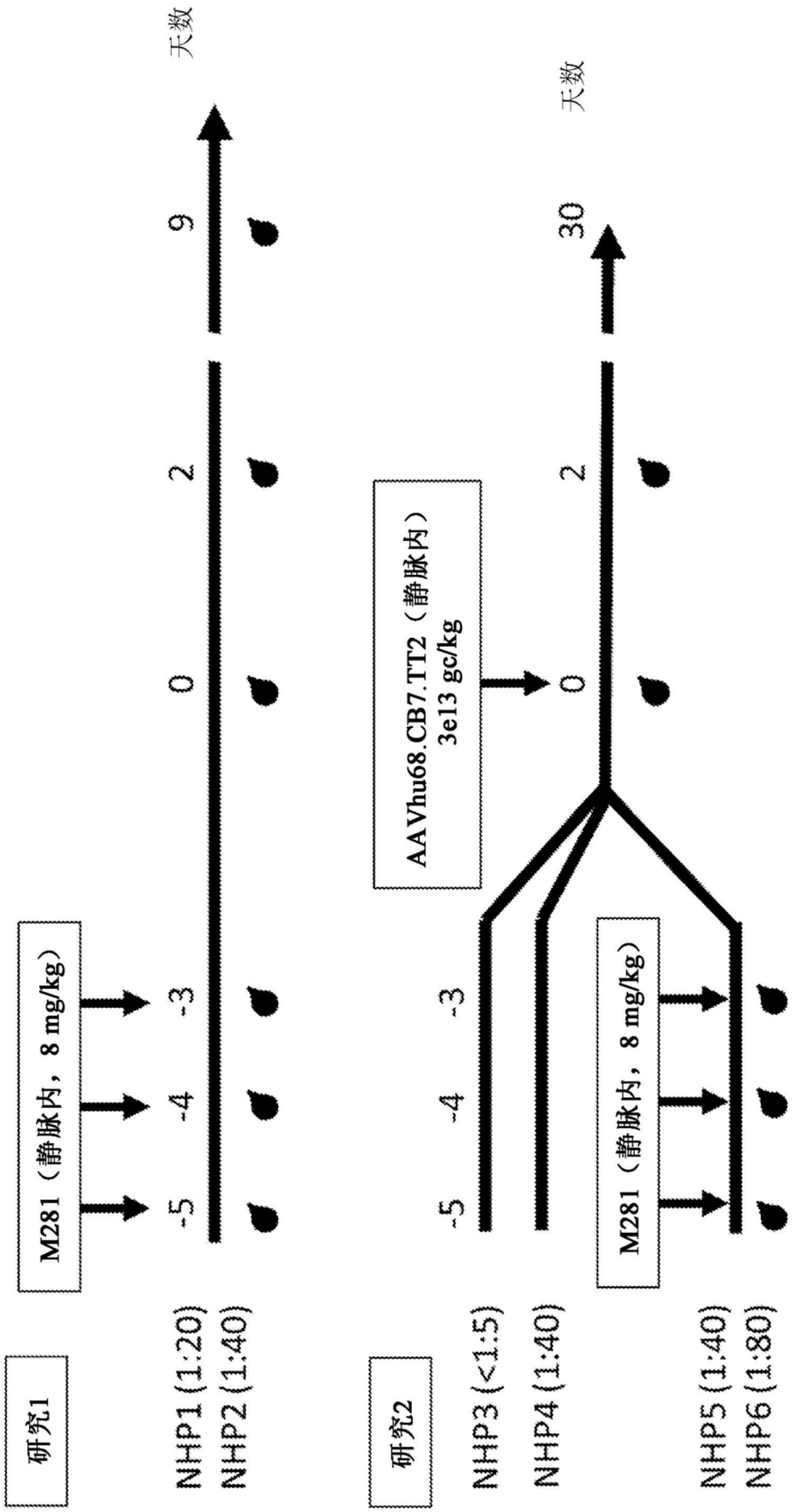

研究1
M281（静脉内，8 mg/kg）
-5
-4
-3
0
2
9
天数
NHP1 (1:20)
NHP2 (1:40)
研究2
AAVhu68.CB7.TT2（静脉内）
3e13 gc/kg
-5
-4
-3
0
2
30
天数
M281（静脉内，8 mg/kg）
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
NHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)

图3

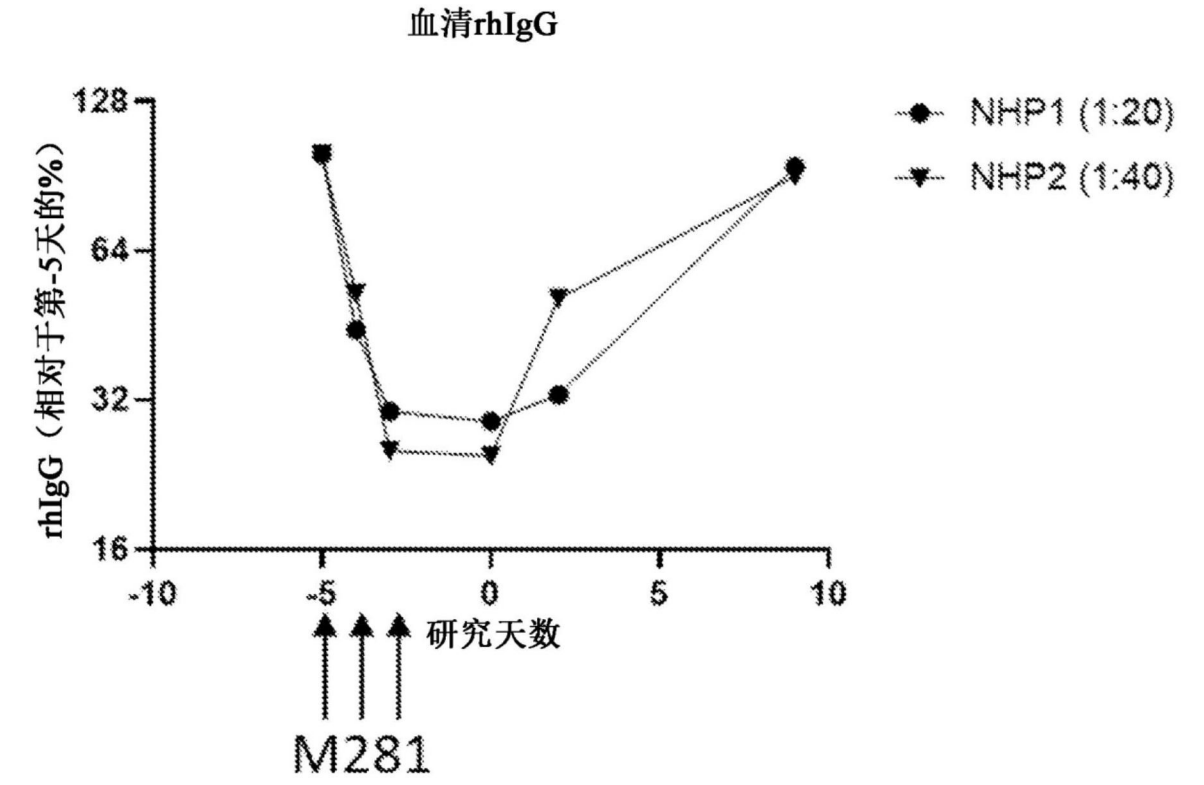

血清rhIgG
128
64
32
16
rhIgG（相对于第-5天的%）
-10
-5
0
5
10
研究天数
M281
NHP1 (1:20)
NHP2 (1:40)

图4A

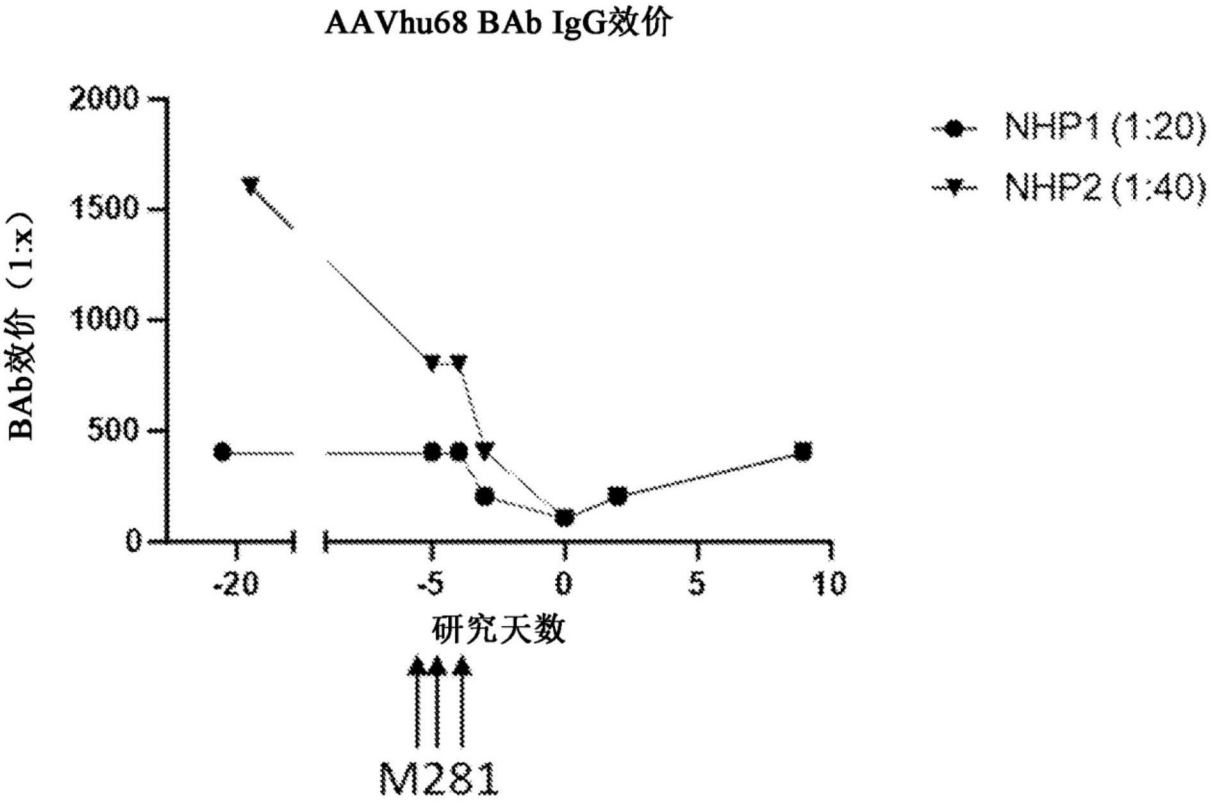

AAVhu68 BAb IgG效价
2000
1500
1000
500
0
BAb效价（1:x）
-20
-5
0
5
10
研究天数
M281
NHP1 (1:20)
NHP2 (1:40)

图4B

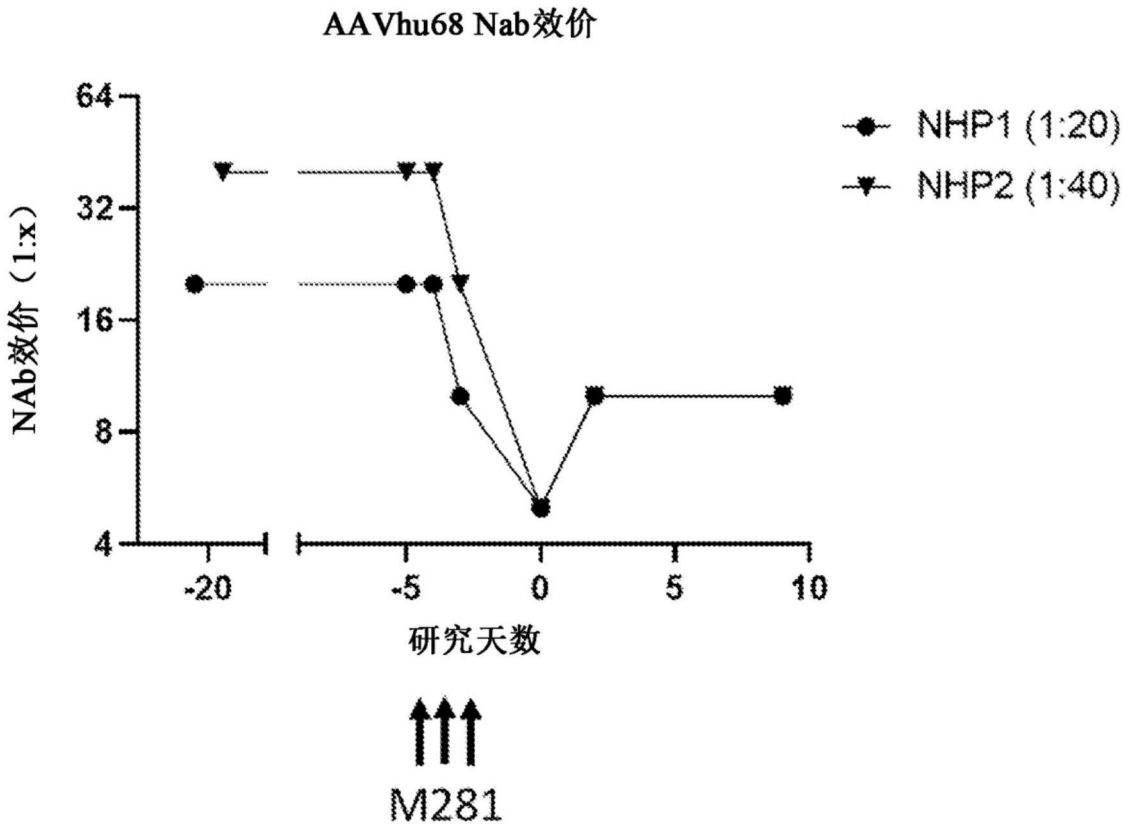

AAVhu68 Nab效价
NAb效价（1:x）
64
32
16
8
4
-20
-5
0
5
10
研究天数
NHP1 (1:20)
NHP2 (1:40)
M281

图4C

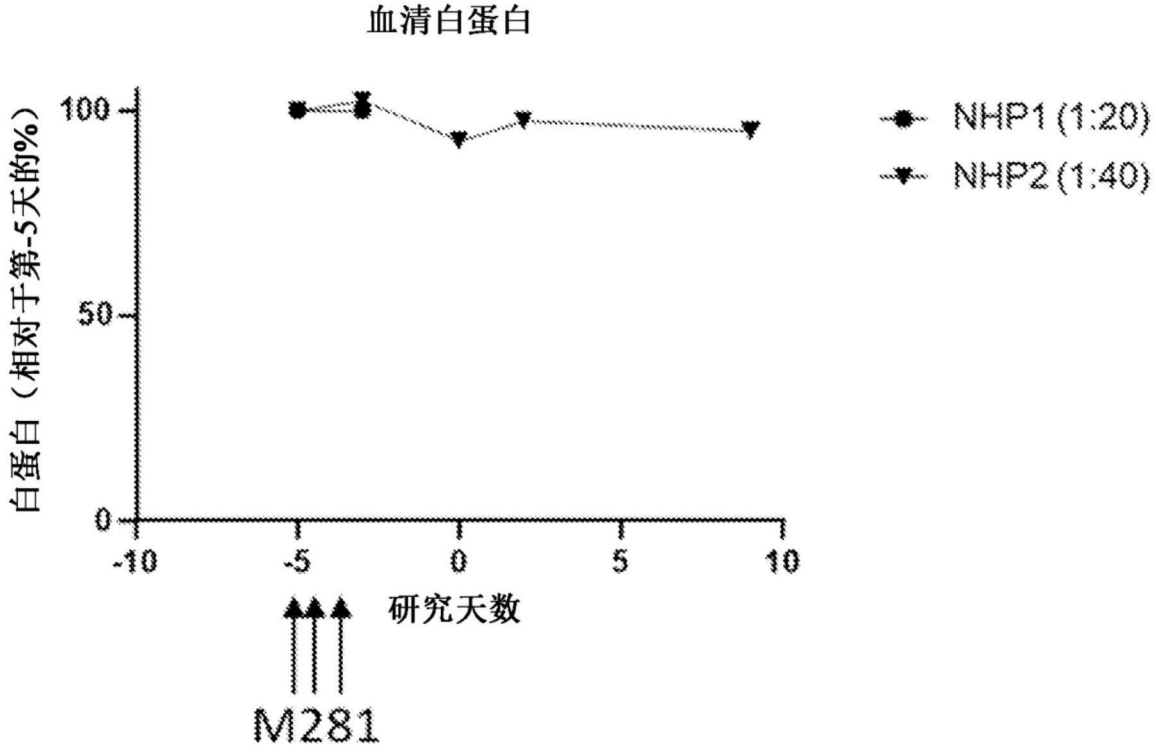

血清白蛋白
白蛋白（相对于第-5天的%）
100
50
0
-10
-5
0
5
10
研究天数
NHP1 (1:20)
NHP2 (1:40)
M281

图4D

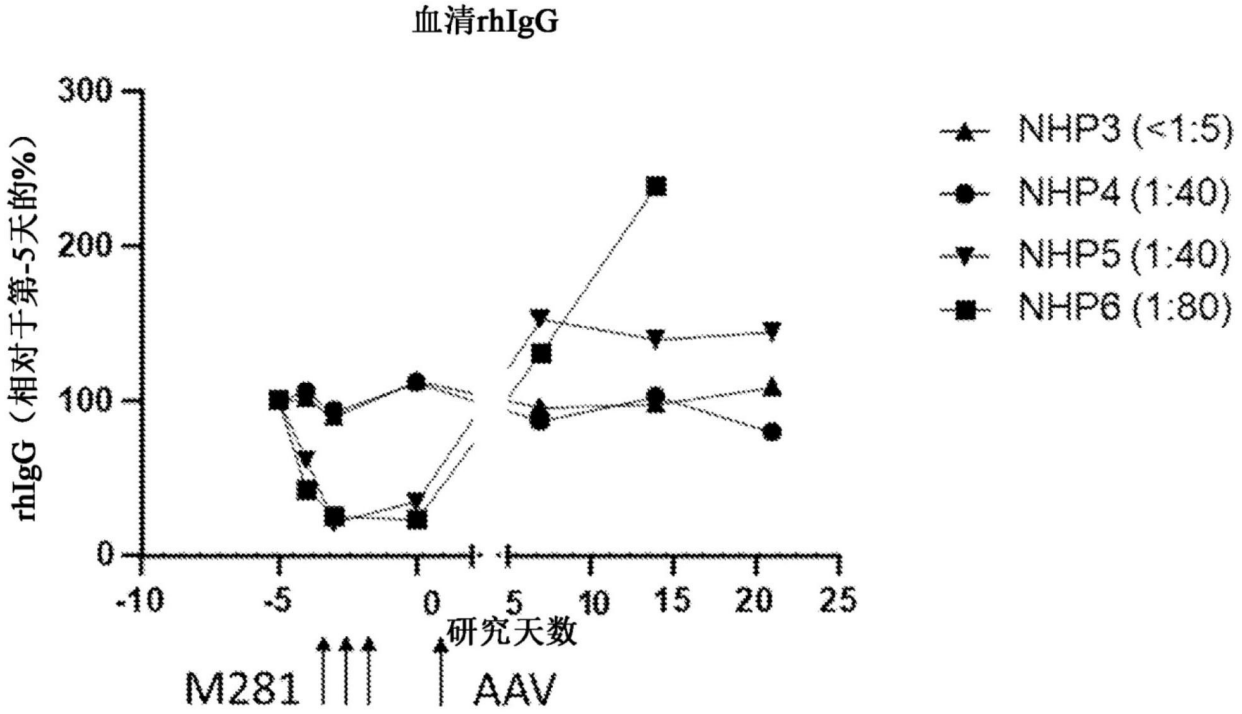

血清rhIgG
rhIgG（相对于第-5天的%）
300
200
100
0
-10
-5
0
5
10
15
20
25
研究天数
M281
AAV
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
NHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)

图5A

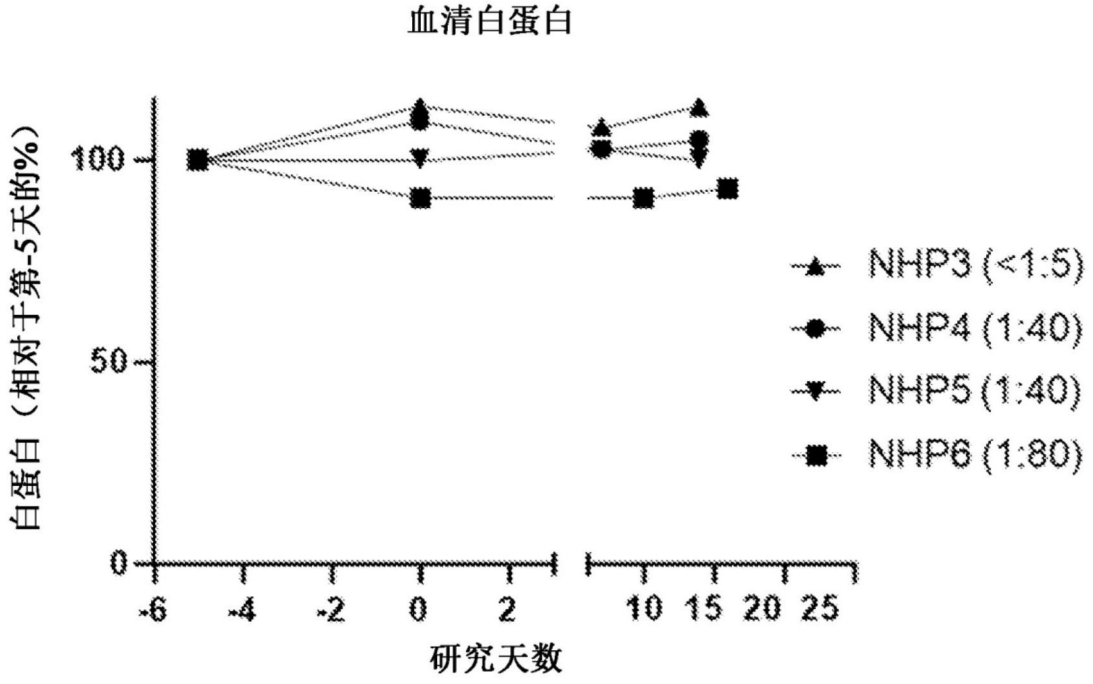

血清白蛋白
白蛋白（相对于第-5天的%）
100
50
0
-6
-4
-2
0
2
10
15
20
25
研究天数
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
NHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)

图5B

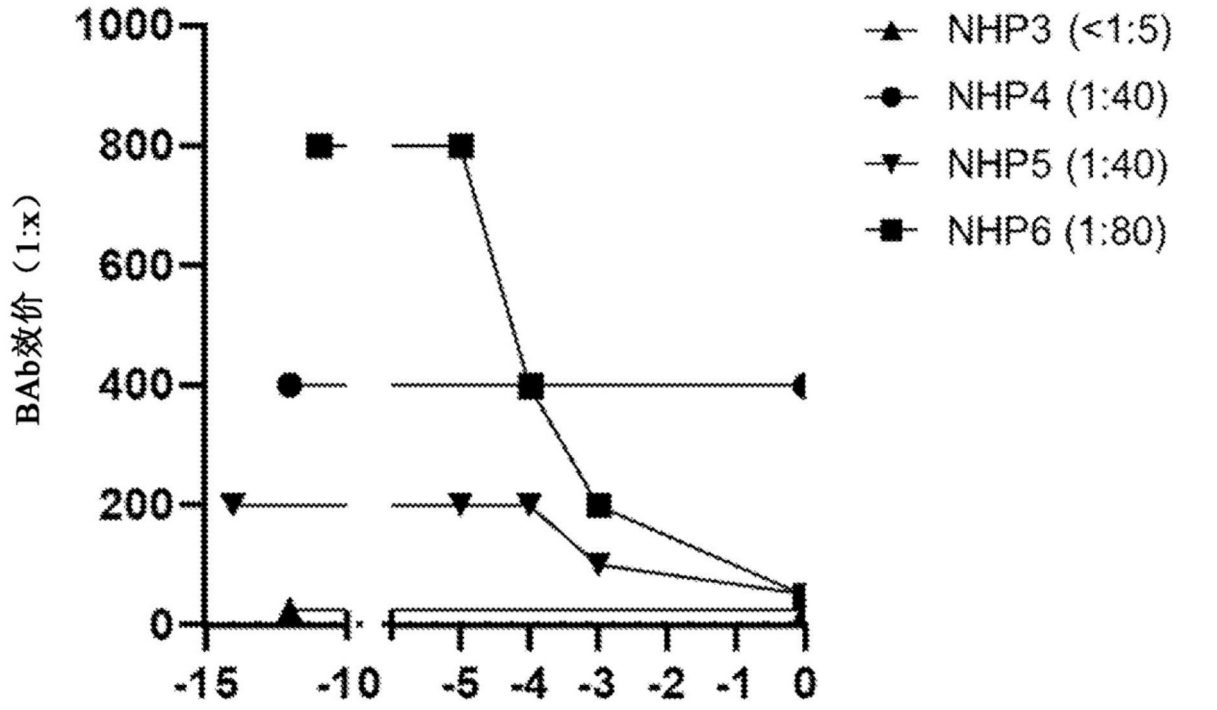

1000
800
600
400
200
0
BAb效价（1:x）
-15
-10
-5
-4
-3
-2
-1
0
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
NHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)

图6A

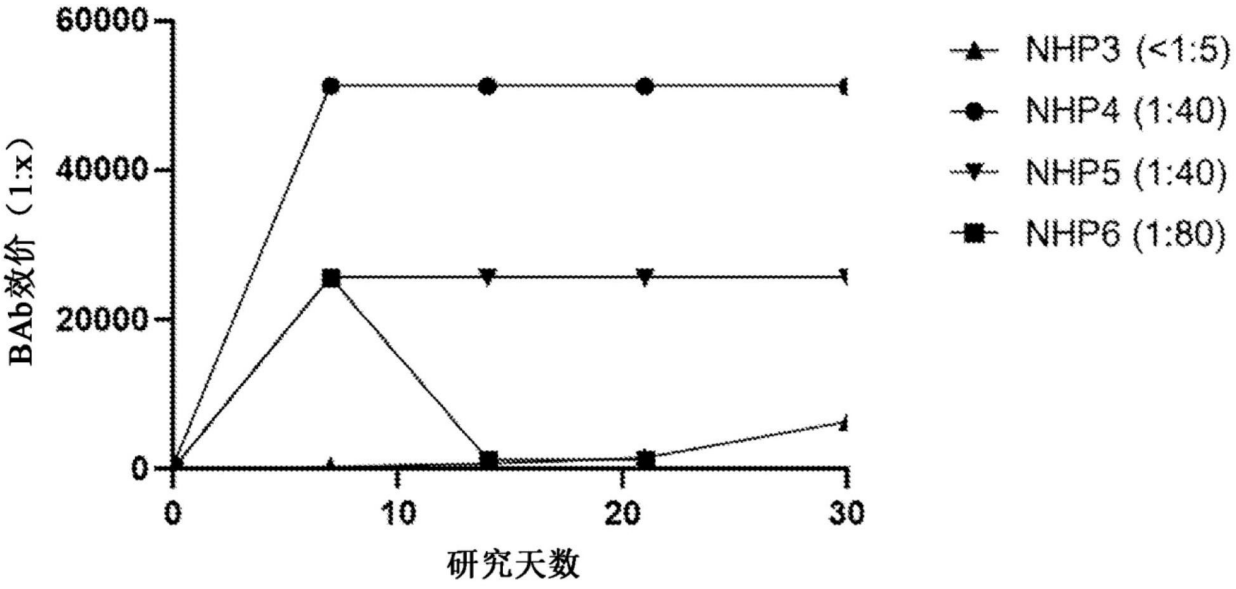

60000
40000
20000
0
BAb效价（1:x）
0
10
20
30
研究天数
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
NHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)

图6B

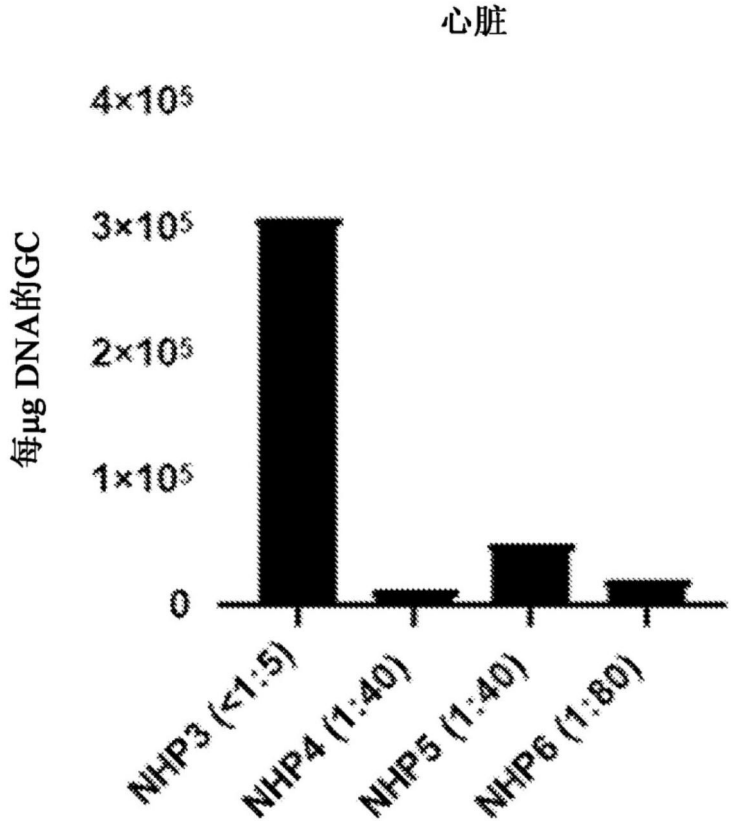

心脏
4×10⁵
3×10⁵
2×10⁵
1×10⁵
0
每μg DNA的GC
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
NHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)

图7A

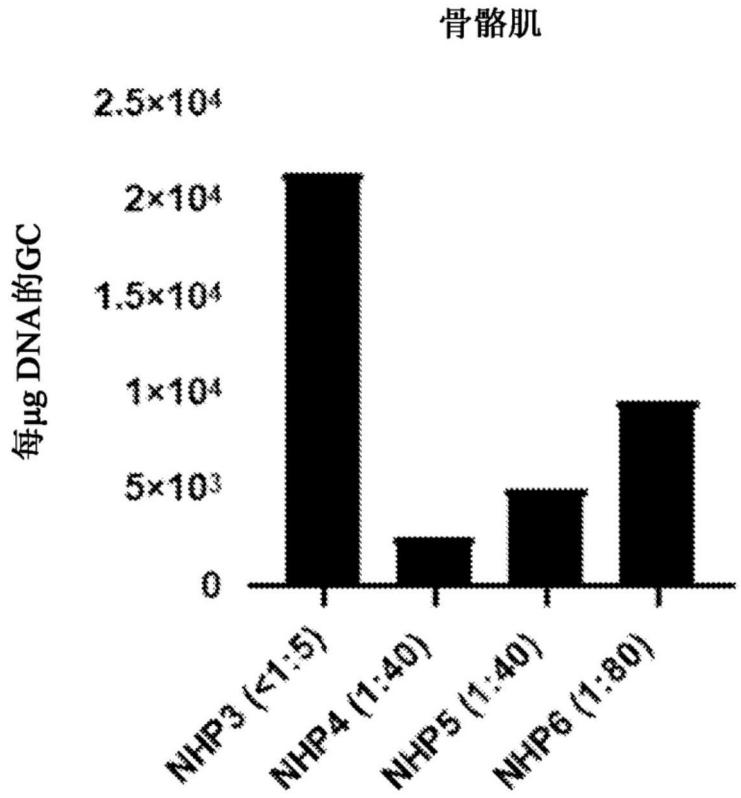

骨骼肌
每μg DNA的GC
2.5×10⁴
2×10⁴
1.5×10⁴
1×10⁴
5×10³
0
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
NHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)

图7B

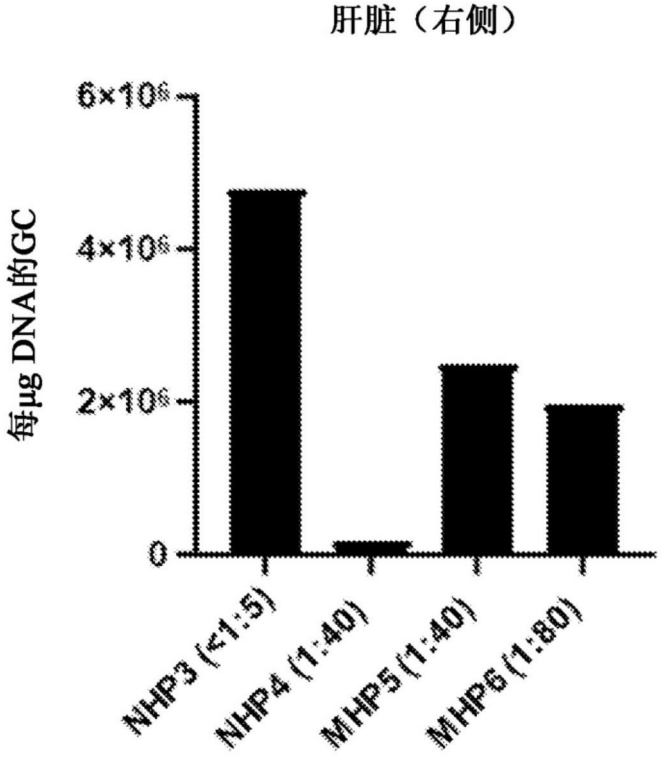

肝脏（右侧）
每μg DNA的GC
6×10⁶
4×10⁶
2×10⁶
0
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
MHP5 (1:40)
MHP6 (1:80)

图7C

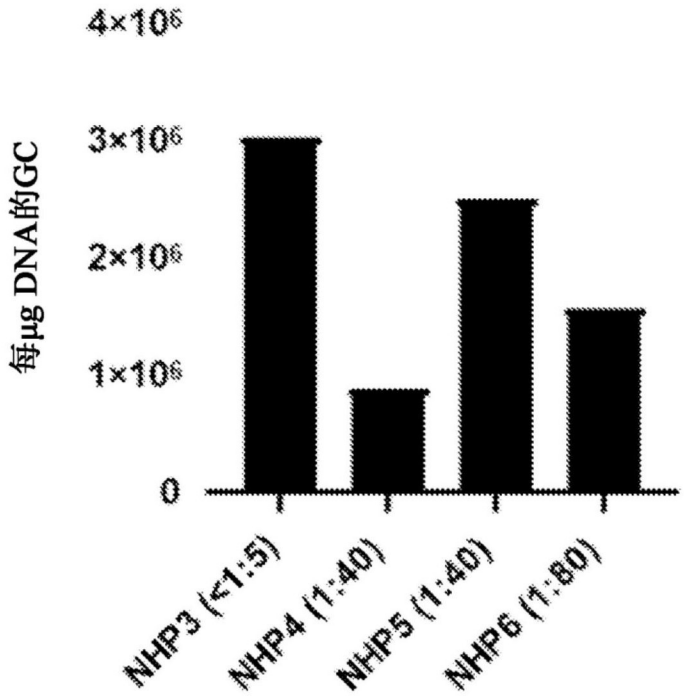

肝脏（左侧）
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
每μg DNA的GC
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
NHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)

图7D

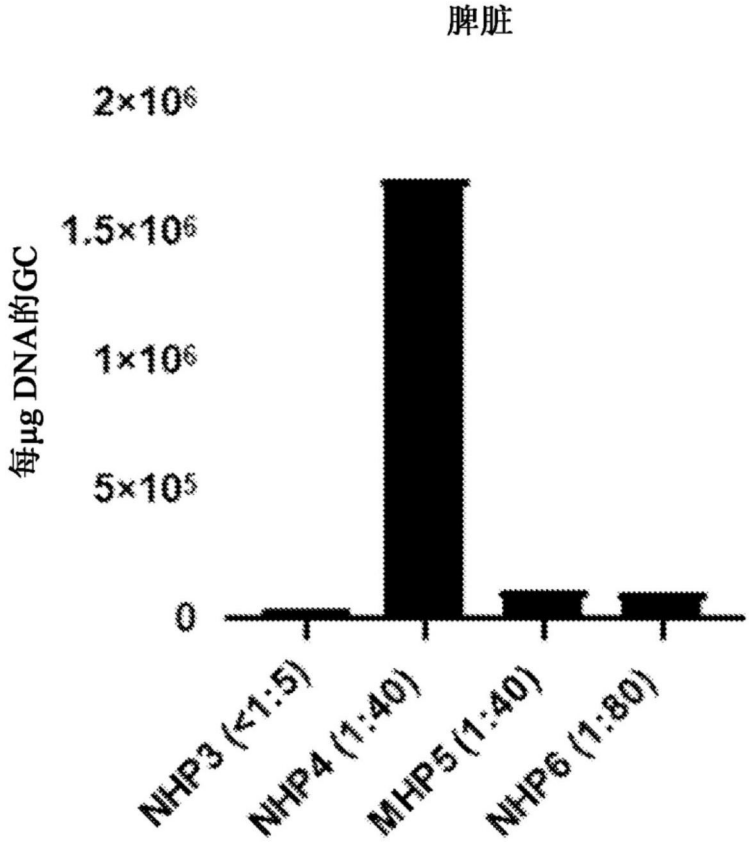

脾脏
2×10⁶
1.5×10⁶
1×10⁶
5×10⁵
0
每μg DNA的GC
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
MHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)

图7E

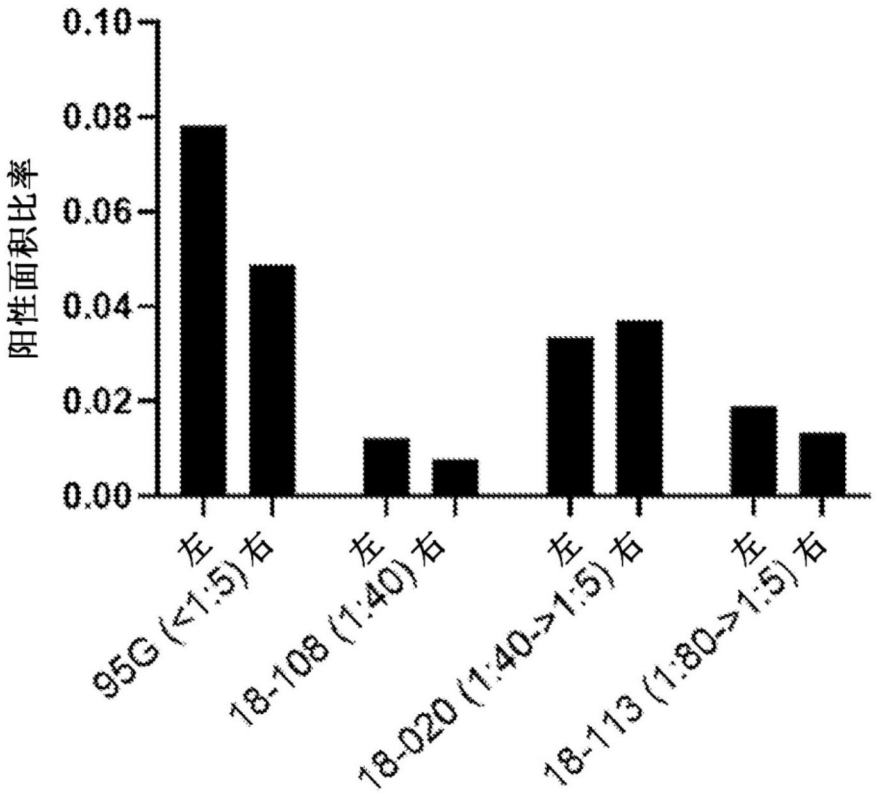

0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
阳性面积比率
左
右
95G (<1:5)
18-108 (1:40)
18-020 (1:40->1:5)
18-113 (1:80->1:5)

图8A

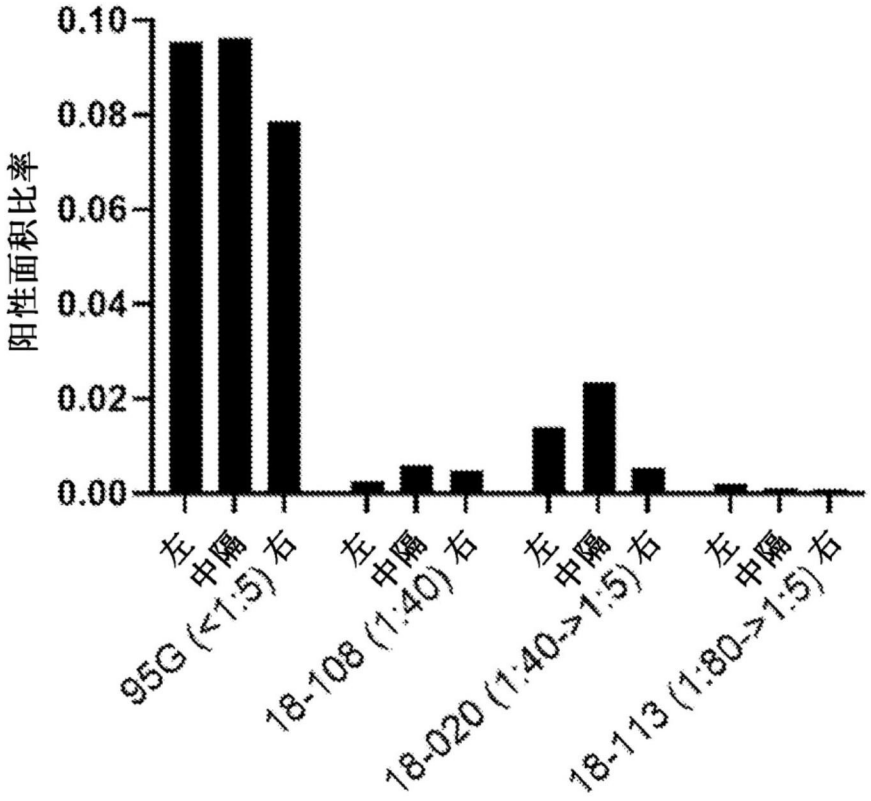

阳性面积比率
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
左
中隔
右
95G (<1:5)
18-108 (1:40)
18-020 (1:40->1:5)
18-113 (1:80->1:5)

图8B

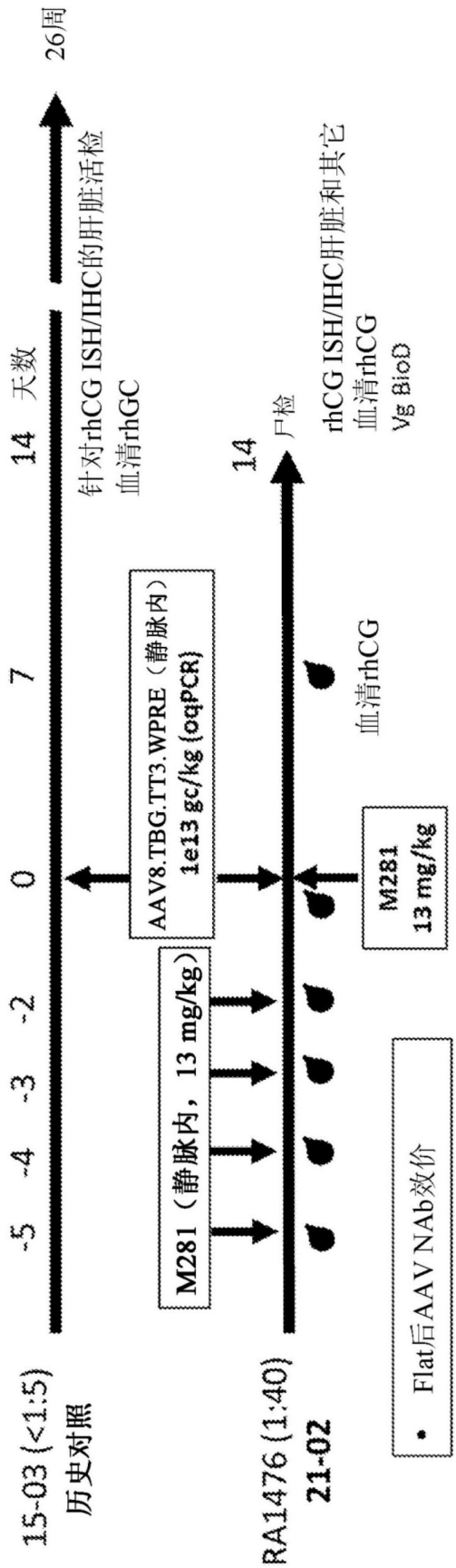

15-03 (<1:5)
历史对照
RA1476 (1:40)
21-02
-5
-4
-3
-2
0
7
14
26周
天数
针对rhCG ISH/IHC的肝脏活检
血清rhGC
M281（静脉内，13 mg/kg）
AAV8.TBG.TT3.WPRE（静脉内）
1e13 gc/kg (oqPCR)
M281
13 mg/kg
14
尸检
rhCG ISH/IHC肝脏和其它
血清rhCG
Vg BioD
血清rhCG
• Flat后AAV NAb效价

图9

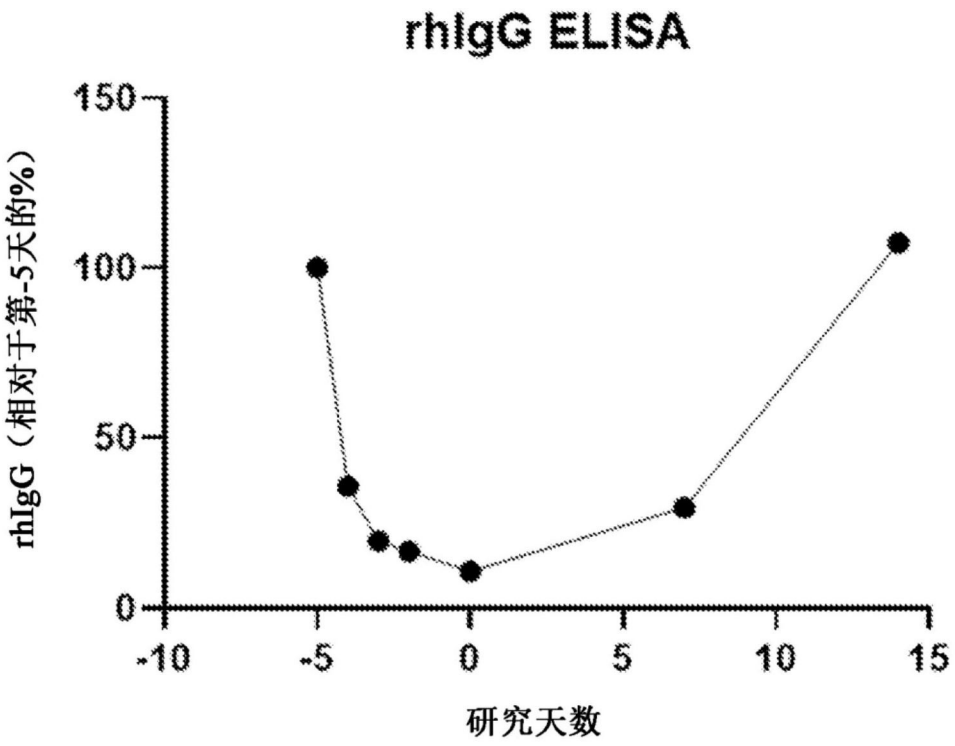

rhIgG ELISA
rhIgG（相对于第-5天的%）
150
100
50
0
-10
-5
0
5
10
15
研究天数

图10A

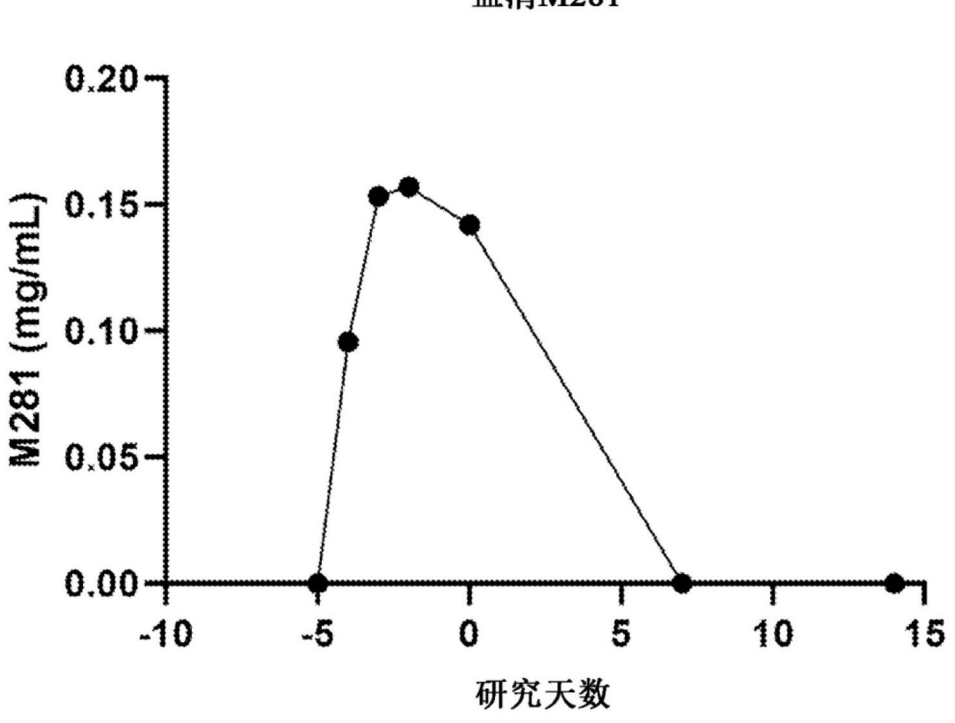

血清M281
M281 (mg/mL)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-10
-5
0
5
10
15
研究天数

图10B

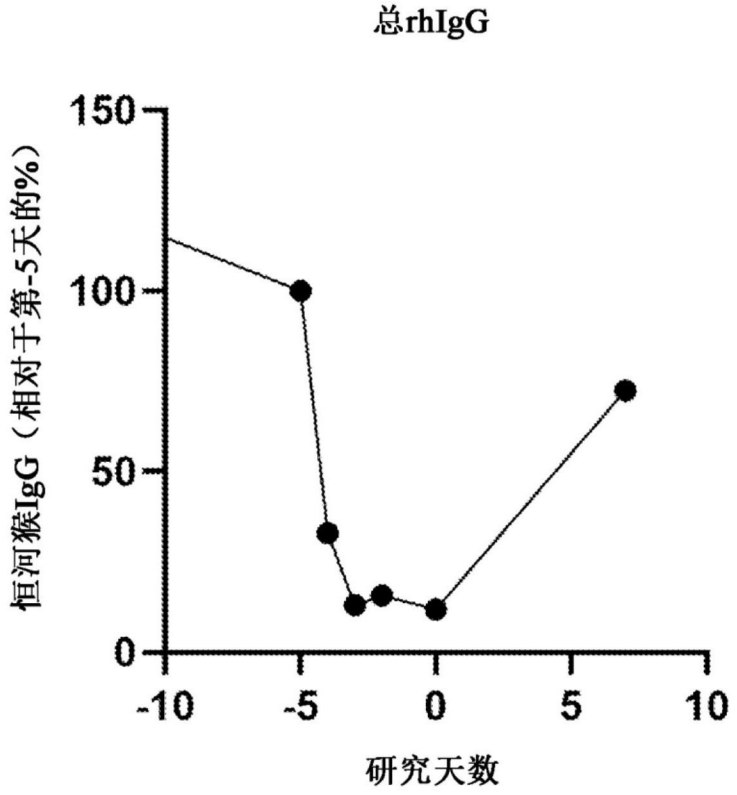

总rhIgG
恒河猴IgG（相对于第-5天的%）
150
100
50
0
-10
-5
0
5
10
研究天数

图11A

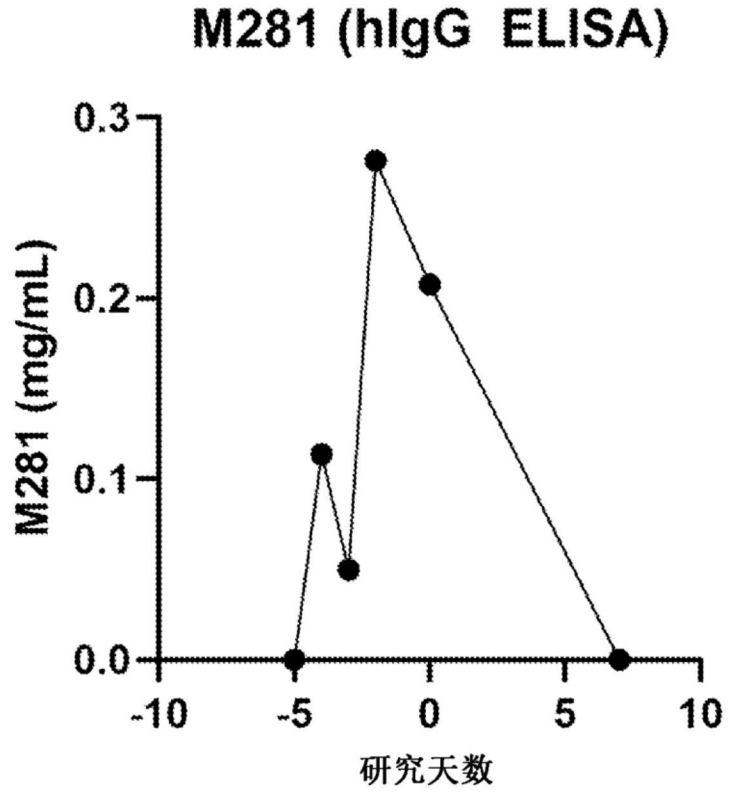

M281 (hIgG ELISA)
M281 (mg/mL)
0.3
0.2
0.1
0.0
-10
-5
0
5
10
研究天数

图11B

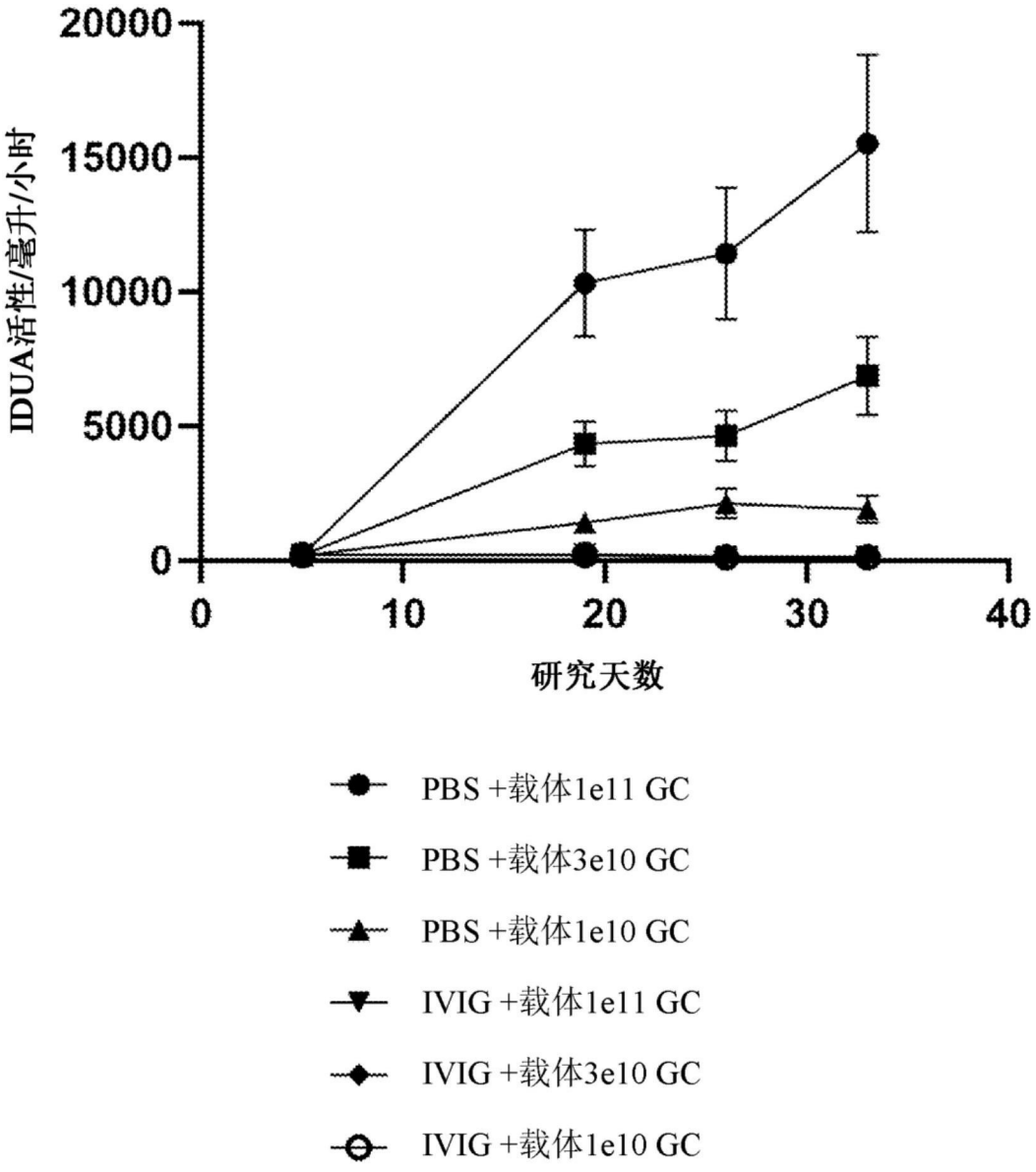

20000
15000
10000
5000
0
IDUA活性/毫升/小时
0
10
20
30
40
研究天数
PBS +载体1e11 GC
PBS +载体3e10 GC
PBS +载体1e10 GC
IVIG +载体1e11 GC
IVIG +载体3e10 GC
IVIG +载体1e10 GC

图12