(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111542336 A
(43)申请公布日 2020.08.14

(21)申请号 201880080695.5

(22)申请日 2018.10.12

(30)优先权数据
62/572,297 2017.10.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.06.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/055660 2018.10.12

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/075360 EN 2019.04.18

(71)申请人 西莱克塔生物科技公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 彼得·伊雷因斯基
克里斯托弗·J·罗伊
岸本·隆·慧

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 张福誉

(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
C07K 16/24(2006.01)

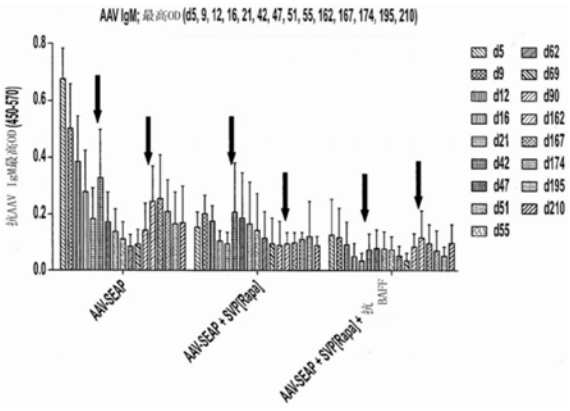
权利要求书3页 说明书48页 附图27页

(54)发明名称

用于减弱抗病毒转移载体IGM应答的方法和组合物

(57)摘要

本文中提供了用于施用与包含免疫抑制剂的合成纳米载体以及抗IgM剂组合的病毒转移载体的方法和相关组合物或药盒。



CN 111542336 A

1.组合物,其包含:

病毒转移载体、包含免疫抑制剂的合成纳米载体以及抗IgM剂。

2.权利要求1所述的组合物,其中所述抗IgM剂选自:与CD10、CD19、CD20、CD22、CD27、CD34、CD40、CD79a、CD79b、CD123、CD179b、FLT-3、ROR1、BR3、BAFF或B7RP-1特异性结合的抗体或其片段;酪氨酸激酶抑制剂,例如syk抑制剂、BTK抑制剂或SRC蛋白酪氨酸激酶抑制剂;PI3K抑制剂;PKC抑制剂;APRIL拮抗剂;咪唑立宾;托法替尼;以及四环素。

3.权利要求2所述的组合物,其中所述抗IgM剂是抗BAFF抗体或其抗原结合片段。

4.权利要求2所述的组合物,其中所述抗IgM剂是BTK抑制剂,例如依鲁替尼。

5.权利要求1至4中任一项所述的组合物,其中所述病毒转移载体是逆转录病毒转移载体、腺病毒转移载体、慢病毒转移载体或腺相关病毒转移载体。

6.权利要求5所述的组合物,其中所述病毒转移载体是腺病毒转移载体,并且所述腺病毒转移载体是亚组A、亚组B、亚组C、亚组D、亚组E或亚组F腺病毒转移载体。

7.权利要求5所述的组合物,其中所述病毒转移载体是慢病毒转移载体,并且所述慢病毒转移载体是HIV、SIV、FIV、EIAV或绵羊慢病毒载体。

8.权利要求5所述的组合物,其中所述病毒转移载体是腺相关病毒转移载体,并且所述腺相关病毒转移载体是AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10或AAV1 1腺相关病毒转移载体。

9.前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述病毒转移载体是嵌合病毒转移载体。

10.权利要求9所述的组合物,其中所述嵌合病毒转移载体是AAV-腺病毒转移载体。

11.前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述病毒转移载体的转基因包含基因治疗转基因、基因编辑转基因、外显子跳读转基因或基因表达调节转基因。

12.前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述合成纳米载体包含脂质纳米粒、聚合物纳米粒、金属纳米粒、基于表面活性剂的乳剂、树状聚合物、巴基球、纳米线、病毒样颗粒,或肽,或蛋白质颗粒。

13.权利要求12所述的组合物,其中所述合成纳米载体包含聚合物纳米粒。

14.权利要求13所述的组合物,其中所述聚合物纳米粒包含不是非甲氧基封端的普朗尼克聚合物的聚合物。

15.权利要求13或14所述的组合物,其中所述聚合物纳米粒包含聚酯、与聚醚连接的聚酯、聚氨基酸、聚碳酸酯、聚缩醛、聚缩酮、多糖、聚乙基噁唑啉或聚乙烯亚胺。

16.权利要求15所述的组合物,其中所述聚酯包含聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、聚(乳酸-乙醇酸)共聚物或聚己内酯。

17.权利要求15或16所述的组合物,其中所述聚合物纳米粒包含聚酯和与聚醚连接的聚酯。

18.权利要求15至17中任一项所述的组合物,其中所述聚醚包含聚乙二醇或聚丙二醇。

19.前述权利要求中任一项所述的组合物,其中使用动态光散射获得的合成纳米载体群体颗粒尺寸分布的平均值为直径大于110nm。

20.权利要求19所述的组合物,其中所述直径大于150nm。

21.权利要求20所述的组合物,其中所述直径大于200nm。

22.权利要求21所述的组合物,其中所述直径大于250nm。

23.权利要求19至22中任一项所述的组合物,其中所述直径小于5μm。

24.权利要求23所述的组合物,其中所述直径小于4μm。

25.权利要求24所述的组合物,其中所述直径小于3μm。

26.权利要求25所述的组合物,其中所述直径小于2μm。

27.权利要求26所述的组合物,其中所述直径小于1μm。

28.权利要求27所述的组合物,其中所述直径小于500nm。

29.权利要求28所述的组合物,其中所述直径小于450nm。

30.权利要求29所述的组合物,其中所述直径小于400nm。

31.权利要求30所述的组合物,其中所述直径小于350nm。

32.权利要求31所述的组合物,其中所述直径小于300nm。

33.前述权利要求中任一项所述的组合物,其中基于所述合成纳米载体之间的平均值,所述合成纳米载体中包含的免疫抑制剂的负载为0.1%至50%(重量/重量)。

34.权利要求33所述的组合物,其中所述负载为0.1%至25%。

35.权利要求34所述的组合物,其中所述负载为1%至25%。

36.权利要求35所述的组合物,其中所述负载为2%至25%。

37.权利要求36所述的组合物,其中所述负载为2%至20%、2%至15%、或2%至10%。

38.前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述免疫抑制剂是NF-κB途径的抑制剂。

39.权利要求1至37中任一项所述的组合物,其中所述免疫抑制剂是mTOR抑制剂。

40.权利要求1至37中任一项所述的组合物,其中所述免疫抑制剂是雷帕霉素类似物。

41.权利要求40所述的组合物,其中所述免疫抑制剂是雷帕霉素。

42.前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述合成纳米载体群体的纵横比大于1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7或1:10。

43.药盒,其包含前述权利要求中所述的任一种组合物和使用说明书。

44.药盒,其包含如前述权利要求中任一项所限定的病毒转移载体、如前述权利要求中任一项所限定的合成纳米载体、如前述权利要求中任一项所限定的抗IgM剂以及使用说明书。

45.权利要求43或44所述的药盒,其中所述使用说明书包含用于实施本文中提供的任一种方法的说明书。

46.方法,其包括:

通过向对象伴随施用病毒转移载体、包含免疫抑制剂的合成纳米载体以及抗IgM剂,在所述对象中建立抗病毒转移载体减弱应答。

47.权利要求46所述的方法,其中所述抗病毒转移载体减弱应答是针对所述病毒转移载体的IgM应答。

48.权利要求47所述的方法,其中所述抗病毒转移载体减弱应答还包含针对所述病毒转移载体的IgG应答。

49.方法,其包括:

通过向对象重复地伴随施用病毒转移载体、包含免疫抑制剂的合成纳米载体以及抗IgM剂，在所述对象中提高病毒转移载体的转基因表达。

50.权利要求46至49中任一项所述的方法，其中重复进行所述病毒转移载体、包含免疫抑制剂的合成纳米载体和/或抗IgM剂的伴随施用。

51.权利要求46至50中任一项所述的方法，其中所述病毒转移载体如前述权利要求中任一项所限定。

52.权利要求46至51中任一项所述的方法，其中所述合成纳米载体如前述权利要求中任一项所限定。

53.权利要求46至51中任一项所述的方法，其中所述抗IgM剂如前述权利要求中任一项所限定。

54.权利要求46至53中任一项所述的方法，其中所述伴随施用是同时施用。

55.权利要求46至54中任一项所述的方法，其中所述病毒转移载体和/或合成纳米载体静脉内施用。

56.权利要求46至55中任一项所述的方法，其中所述抗IgM剂经腹膜内施用。

用于减弱抗病毒转移载体IGM应答的方法和组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于向对象施用病毒转移载体以及包含免疫抑制剂的合成纳米载体和抗IgM剂的方法和相关组合物。优选地，所述方法和组合物用于降低或防止针对病毒转移载体的IgM应答。

[0002] 发明概述

[0003] 在一个方面，提供了一种方法，其包括：通过向对象伴随施用病毒转移载体、包含免疫抑制剂的合成纳米载体以及抗IgM剂，在所述对象中建立抗病毒转移载体减弱应答。

[0004] 在本文中提供的任一种方法的一个实施方案中，抗病毒转移载体减弱应答是针对病毒转移载体的IgM应答。

[0005] 在另一个方面，提供了一种方法，其包括通过向对象重复地伴随施用病毒转移载体、包含免疫抑制剂的合成纳米载体以及抗IgM剂，在所述对象中提高病毒转移载体的转基因表达。

[0006] 在本文中提供的任一种方法的一个实施方案中，重复进行病毒转移载体、包含免疫抑制剂的合成纳米载体和/或抗IgM剂的伴随施用。

[0007] 在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，病毒转移载体是本文中提供的任一种病毒转移载体，例如权利要求中任一项所限定的任一种这样的载体。

[0008] 在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，合成纳米载体是本文中提供的任一种合成纳米载体，例如权利要求中任一项所限定的任一种这样的合成纳米载体。

[0009] 在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，抗IgM剂是IgM拮抗剂抗体。IgM拮抗剂抗体或其抗原结合片段与CD10、CD19、CD20、CD22、CD27、CD34、CD40、CD79a、CD79b、CD123、CD179b、FLT-3、ROR1、BR3、BAFF或B7RP-1特异性结合。在一个实施方案中，IgM拮抗剂抗体或其抗原结合片段是本文中提供的CD10、CD19、CD20、CD22、CD27、CD34、CD40、CD79a、CD79b、CD123、CD179b、FLT-3、ROR1、BR3、BAFF或B7RP-1抗体或其抗原结合片段中的任一种，例如权利要求中任一项所限定的CD10、CD19、CD20、CD22、CD27、CD34、CD40、CD79a、CD79b、CD123、CD179b、FLT-3、ROR1、BR3，BAFF或B7RP-1抗体或其抗原结合片段中的任一种。

[0010] 在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，IgM拮抗剂抗体是抗BAFF抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中，抗BAFF抗体或其抗原结合片段是本文中提供的任一种抗BAFF抗体或其抗原结合片段，例如权利要求中任一项所限定的任一种这样的抗BAFF抗体或其抗原结合片段。

[0011] 在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，抗IgM剂是抗BAFF剂。在一个实施方案中，抗BAFF剂是本文中提供的任一种抗BAFF剂，例如权利要求中任一项所限定的任一种这样的抗BAFF剂。

[0012] 在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，抗IgM剂是IL-21调节剂，例如IL-21拮抗剂或IL-21受体拮抗剂。在一个实施方案中，IL-21调节剂是本文中提供的任一种IL-21调节剂，例如权利要求中任一项所限定的任一种这样的IL-21调节剂。

[0013] 在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，抗IgM剂是酪氨酸激酶抑制剂，例如Syk抑制剂、BTK抑制剂或SRC蛋白酪氨酸激酶抑制剂。在一个实施方案中，酪氨酸激酶抑制剂是本文中提供的任一种酪氨酸激酶抑制剂，例如权利要求中任一项所限定的任一种这样的酪氨酸激酶抑制剂。在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，酪氨酸激酶抑制剂是Syk抑制剂。在一个实施方案中，Syk激酶抑制剂是本文中提供的任一种Syk抑制剂，例如权利要求中任一项所限定的任一种这样的Syk抑制剂。在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，酪氨酸激酶抑制剂是BTK抑制剂。在一个实施方案中，BTK激酶抑制剂是本文中提供的任一种BTK抑制剂，例如权利要求中任一项所限定的任一种这样的BTK抑制剂。在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，酪氨酸激酶抑制剂是SRC蛋白酪氨酸激酶抑制剂。在一个实施方案中，SRC蛋白酪氨酸激酶抑制剂是本文中提供的任一种SRC蛋白酪氨酸激酶抑制剂，例如权利要求中任一项所限定的任一种这样的SRC蛋白酪氨酸激酶抑制剂。

[0014] 在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，抗IgM剂是PI3K抑制剂。在一个实施方案中，PI3K抑制剂是本文中提供的任一种PI3K抑制剂，例如权利要求中任一项所限定的任一种这样的PI3K抑制剂。

[0015] 在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，抗IgM剂是PKC抑制剂。在一个实施方案中，PKC抑制剂是本文中提供的任一种PKC抑制剂，例如权利要求中任一项所限定的任一种这样的PKC抑制剂。

[0016] 在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，抗IgM剂是APRIL拮抗剂。在一个实施方案中，APRIL拮抗剂是本文中提供的任一种APRIL拮抗剂，例如权利要求中任一项所限定的任一种这样的APRIL拮抗剂。

[0017] 在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，抗IgM剂是四环素。在一个实施方案中，四环素是本文中提供的任一种四环素，例如权利要求中任一项所限定的任一种这样的四环素。

[0018] 在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，抗IgM剂是咪唑立宾或托法替尼。

[0019] 在另一个方面，提供了组合物，例如药盒，其包含本文中提供的任一种病毒转移载体、本文中提供的任一种合成纳米载体和本文中提供的任一种抗IgM剂。

[0020] 在另一个方面，提供了药盒，其包含本文中提供的任一种组合物或组合物的组合。在所提供的任一种药盒的一个实施方案中，药盒还包含使用说明书。在所提供的任一种药盒的一个实施方案中，使用说明书包含用于实施本文中提供的任一种方法的说明书。

[0021] 在另一个方面，提供了如任一个实施例中所述的方法或组合物。

[0022] 在另一个方面，任一种组合物用于所提供的任一种方法中。

[0023] 在另一个方面，任一种方法或组合物用于治疗本文中所述的任一种疾病或病症。在另一个方面，任一种方法或组合物用于减弱抗病毒转移载体应答(例如，IgM应答)、建立减弱的抗病毒转移载体应答(例如，IgM应答)、提高转基因表达和/或用于重复施用病毒转移载体。

[0024] 在另一个方面，提供了施用实施例的试剂的任意组合的方法。在另一个方面，还提供了包含任一种这些试剂组合的组合物或药盒。

[0025] 在任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，除另一种免疫应答(例如IgG应答、体液或细胞免疫应答)之外，所述方法、组合物或药盒还用于减弱IgM应答。

[0026] 在任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，除提高转基因表达之外，所述方法、组合物或药盒还用于减弱IgM应答。

[0027] 在任一种方法、组合物或药盒的一个实施方案中，除另一种免疫应答(例如IgG应答、体液或细胞免疫应答)之外，所述方法、组合物或药盒还用于减弱IgM应答，以及提高转基因表达。

[0028] 附图简述

[0029] 图1示出了在施用指定处理(编码分泌性碱性磷酸酶的腺相关病毒载体(adeno-associated viral vector encoding secreted alkaline phosphatase，AAV-SEAP)单独、与包含雷帕霉素的合成纳米载体组合(AAV-SEAP+SVP[RAPA])、或与抗BAFF组合(AAV-SEAP+SVP[RAPA]+抗BAFF))之后5、9、12、16和21天小鼠中的血清抗AAV IgM水平。每个处理组包含六只小鼠。

[0030] 图2示出了在从与图1中所述相同的小鼠中，施用处理之后5、9、12和16天使用化学发光测量的SEAP表达水平。

[0031] 图3示出了BAFF和APRIL二者均支持B细胞存活和分化。使用了针对BAFF的抗体或双重BAFF/APRIL抑制剂TACI-Fc(跨膜激活剂和钙调节剂配体相互作用剂Fc融合)。该研究布局与图1、2、4至10和15至17中所示的数据相关。

[0032] 图4A至4B示出了通常的IgG水平及其被SVP[Rapa]的完全抑制(图4B)；BAFF抑制似乎具有降低IgM应答的另外的作用(图4A)。

[0033] 图5示出了IgG水平及其被SVP[Rapa]的完全早期抑制，然后是1/6加强之后突破。自加强之后18天起，用aBAFF或TACI-Fc处理的组中无突破(箭头所示)。

[0034] 图6A至6D示出了在经[Rapa]-和[Rapa]+TACI-Fc处理的组中的IgM抑制；在经[Rapa]+BAFF处理的小鼠中更明显。

[0035] 图7示出了在未经处理组(见到加强之后升高)和经SVP[Rapa]处理组(在1/6突破小鼠中高的加强之后水平)中的加强之后IgM动力学；BAFF抑制似乎具有降低IgM应答的另外的作用；Fc-TACI在初免(prime)时没有比SVP[Rapa]提高太多，但可给予另外的加强之后益处。

[0036] 图8示出了通过[Rapa]的SEAP升高；在存在抗BAFF的情况下进一步增强。

[0037] 图9A至9D示出了[Rapa]和抗BAFF的组合对于提高转基因(SEAP)表达的一致的显著作用。

[0038] 图10提供了来自d21/28加强之前并随后持续多至d37加强之后的14天的数据。[Rapa]和抗BAFF的组合为提高转基因表达提供了一致的显著作用。

[0039] 图11示出了另一个实验的布局。该研究布局与图12至14和18至20中所示的数据相关。

[0040] 图12A至12B示出了对于IgM抑制的早期IgM和IgG动力学。

[0041] 图13示出了抗BAFF和[Rapa]对于IgM抑制的协同作用。

[0042] 图14示出了SEAP水平和通过[Rapa]的增强。

[0043] 图15示出了在第0、37和155天，在用单独的AAV-SEAP、AAV-SEAP+SVP[RAPA]、或

AAV-SEAP+SVP[RAPA]+抗BAFF处理的小鼠中的AAV IgM水平。

[0044] 图16示出了在第0、37和155天，在用单独的AAV-SEAP、AAV-SEAP+SVP[RAPA]、或AAV-SEAP+SVP[RAPA]+抗BAFF处理的小鼠中的AAV IgG水平。

[0045] 图17示出了在第0、37和155天，在用单独的AAV-SEAP、AAV-SEAP+SVP[RAPA]、或AAV-SEAP+SVP[RAPA]+抗BAFF处理的小鼠中的SEAP水平。

[0046] 图18A至18C示出了在第0、32和98天，在用单独的AAV-SEAP、AAV-SEAP+SVP[RAPA]、AAV-SEAP+抗BAFF、或AAV-SEAP+SVP[RAPA]+抗BAFF处理的小鼠中的SEAP、IgM和IgG水平。图18A示出了SEAP水平。图18B示出了IgM水平。图18C示出了IgG水平。

[0047] 图19A至19F示出了在有或没有抗BAFF(仅在注射日或者还在第1次、第3次和第4次AAV施用之后的14天给予)的情况下，在第0、32、98和160天，在用单独的AAV-SEAP、AAV-SEAP+SVP[RAPA](50或150μg)、或AAV-SEAP+SVP[RAPA]处理的小鼠中的SEAP、IgM和IgG水平。图19A和19B示出了在50μg(图19A)或150μg(图19B)雷帕霉素下的SEAP水平。图19C和19E示出了IgM水平。图19D和19F示出了IgG水平。

[0048] 图20A和20B示出了在第0、32、98和160天，在用AAV-SEAP+SVP[RAPA]或AAV-SEAP+SVP[RAPA]+抗BAFF处理的小鼠中SEAP与早期d11 IgM水平之间的相关性。

[0049] 图21A至21F示出了在用单独的AAV-SEAP、AAV-SEAP+SVP[RAPA]、AAV-SEAP+抗BAFF、或AAV-SEAP+SVP[RAPA]+抗-BAFF(B,D,F)或者处理w/o AAV(即，SVP[RAPA]、抗BAFF、或SVP[RAPA]+抗BAFF(A,C,E))处理的小鼠中不同B细胞群的比例。

[0050] 图22A至22F示出了在用单独的AAV-SEAP、AAV-SEAP+SVP[RAPA]、或AAV-SEAP+SVP[RAPA]+依鲁替尼(ibritinub)处理的小鼠中的IgM水平。

[0051] 图23A至23B示出了在用单独的AAV-SEAP、AAV-SEAP+SVP[RAPA]、或AAV-SEAP+SVP[RAPA]+依鲁替尼处理的小鼠中的SEAP及其与IgM水平的相关性。SEAP水平示于图23A中。早期第6天IgM水平与晚期(d104/111)SEAP水平的相关性示于图23B中。

[0052] 图24A至24B示出了用单独的AAV-SEAP、AAV-SEAP+SVP[RAPA]、AAV-SEAP+依鲁替尼、或AAV-SEAP+SVP[RAPA]+依鲁替尼处理的小鼠中的IgM和IgG水平。IgM水平示于图24A中。IgG水平示于图24B中。

[0053] 图25示出了用单独的AAV-SEAP、AAV-SEAP+SVP[RAPA]、AAV-SEAP+依鲁替尼、或AAV-SEAP+SVP[RAPA]+依鲁替尼处理的小鼠中的SEAP水平。

[0054] 发明详述

[0055] 在详细描述本发明之前，应理解，本发明不限于特别示例的材料或工艺参数，因为其当然可以变化。还应理解，本文中使用的术语仅用于描述本发明的一些特定实施方案的目的，并且不旨在限制使用替代术语来描述本发明。

[0056] 本文(无论是上文还是下文)中引用的所有出版物、专利和专利申请，均通过引用整体并入本文以用于所有目的。通过引用的此类并入并不旨在承认本文中引用的任何并入的出版物、专利和专利申请构成现有技术。

[0057] 除非另有明确规定，否则本说明书和所附权利要求书中使用的没有数量词修饰的名词表示一个/种或更多个/种。例如，提及“聚合物”包括两种或更多种这样的分子的混合物或不同分子量的单一聚合物种类的混合物，提及“合成纳米载体”包括两种或更多种这样的合成纳米载体的混合物或多种这样的合成纳米载体，提及“DNA分子”包括两种或更多种

这样的DNA分子的混合物或多种这样的DNA分子，提及“免疫抑制剂”包括两种或更多种这样的免疫抑制剂分子的混合物或多种这样的免疫抑制剂分子等。

[0058] 本文中使用的术语“包括”或其变化形式如“包含”或“含有”应解读为表示包括任何所列举的整体(例如特征、要素、特性、属性、方法/过程步骤或限制)或整体(例如特征、要素、特性、属性、方法/过程步骤或限制)的组，但不排除任何其他的整体或整体的组。因此，本文中使用的术语“包括”是包括性的，并且不排除另外的未列举的整体或方法/过程步骤。

[0059] 在本文中提供的任一种组合物和方法的实施方案中，“包含”可以用“基本上由...组成”或“由...组成”代替。短语“基本上由...组成”在本文中用于要求指定的整体或步骤以及不会实质性影响要求保护之发明的特征或功能的那些。本文中使用的术语“由...组成”用于表示只存在列举的整体(例如特征、要素、特性、属性、方法/过程步骤或限制)或整体(例如特征、要素、特性、属性、方法/过程步骤或限制)的组。

[0060] A.介绍

[0061] 病毒转移载体是用于多种应用(例如基因处理、基因编辑、基因表达调节和外显子跳读)的有前途的治疗剂。因此，病毒转移载体可包含编码治疗性蛋白质或核酸的转基因。遗憾的是，由于针对病毒转移载体的免疫应答，这些处理剂的前景在很大程度上尚未得到完全实现。这些免疫应答包括抗体、B细胞和T细胞应答，并且可以对病毒转移载体的病毒抗原(例如病毒衣壳或外壳蛋白或其肽)具有特异性。

[0062] 出乎意料的是，已发现AAV诱导非常强和快速的IgM和IgG二者的抗体产生，其中后者被包含雷帕霉素的合成纳米载体显著阻断并且前者被其延迟。同样，出乎意料的是，病毒转移载体与包含免疫抑制剂的合成纳米载体和抑制IgM应答的试剂(例如抗IgM剂，例如抗BAFF单克隆抗体)组合的处理可对免疫应答(例如IgM应答)产生协同作用，并且在首次施用病毒转移载体之后还使得转基因表达显著提高。

[0063] 提供的方法和组合物为有效使用病毒转移载体进行处理提供了障碍的解决方案。特别地，已出乎意料地发现，可用本文中提供的方法和相关组合物减弱单独的或与其他免疫应答组合的IgM抗病毒转移载体免疫应答。即使需要重复施用病毒转移载体，所述方法和组合物也可提高用病毒转移载体处理的效力并提供免疫减弱。

[0064] 现在将在下面更详细地描述本发明。

[0065] B.定义

[0066] “施用”或其变化形式意指以药理学有用的方式向对象提供或分配物质。该术语旨在包括“导致施用(causing to be administered)”。“导致施用”意指直接或间接地导致、督促、鼓励、协助、诱导或指导另一方施用所述物质。本文中提供的任一种方法可包括或还包括伴随施用病毒转移载体、包含免疫抑制剂的合成纳米载体以及抗IgM剂的步骤。在一些实施方案中，伴随施用重复进行。在另一些实施方案中，伴随施用是同时施用。

[0067] 在如本文中提供的用于施用于对象的组合物或剂型的情况下，“有效量”是指在该对象中产生一种或更多种期望结果(例如降低或消除针对病毒转移载体的免疫应答(例如IgM应答)或者产生抗病毒转移载体减弱应答)的组合物或剂型的量。有效量可用于体外或体内目的。对于体内目的，该量可以是临床医生会认为对于可能由于施用病毒转移载体而经历不期望免疫应答的对象可能具有临床益处的量。在本文中提供的任一种方法中，所施用的组合物可以为本文中提供的任一种有效量。

[0068] 有效量可涉及降低不期望的免疫应答的水平，尽管在一些实施方案中，其涉及完全阻止不期望的免疫应答。有效量还可以涉及延迟不期望的免疫应答的发生。有效量也可以是导致期望的治疗终点或期望的治疗结果的量。有效量优选地导致在对象中针对抗原(例如病毒转移载体抗原)的致耐受性免疫应答。有效量还可优选地导致转基因表达提高(转基因由病毒转移载体递送)。这可以通过在对象中测量多种目的组织或系统中的转基因表达来确定。这种提高的表达可以局部或全身地测量。可以通过常规方法来监测前述任一项的实现。

[0069] 在所提供的任一种组合物和方法的一些实施方案中，有效量是其中期望的免疫应答(例如降低或消除针对病毒转移载体的免疫应答或产生抗病毒转移载体减弱应答)在对象中持续至少1周、至少2周或至少1个月的量。在所提供的任一种组合物和方法的另一些实施方案中，有效量是产生可测量的期望的免疫应答(例如降低或消除针对病毒转移载体的免疫应答或产生抗病毒转移载体减弱应答)的量。在一些实施方案中，有效量是在至少1周、至少2周或至少1个月内产生可测量的期望免疫应答(例如，针对特定病毒转移载体抗原)的量。

[0070] 当然，有效量将取决于所处理的特定对象；病症、疾病或障碍的严重程度；个体患者参数包括年龄、身体状况、身材大小和体重；处理的持续时间；并行治疗(如果有的话)的性质；具体施用途径以及在健康从业者的知识和专业之内的类似因素。这些因素是本领域普通技术人员公知的并且仅用常规实验就可解决。

[0071] “抗BAFF剂”是指已知降低BAFF的产生、水平或活性的任何试剂、小分子、抗体、肽或核酸。在一些实施方案中，抗BAFF剂是抗BAFF抗体。示例性的抗BAFF剂包括但不限于TACI-Ig和可溶性BAFF受体。

[0072] “抗BAFF抗体”是指与BAFF多肽特异性结合的任何抗体。例如，抗BAFF抗体可以是单克隆抗体，例如贝利木单抗(Benlysta)。在一些情况下，抗BAFF抗体可抑制BAFF的生物活性。作为替代或补充，抗BAFF抗体可以阻断BAFF与其受体(例如BAFF-R和BCMA(B细胞成熟抗原))之间的相互作用。在一些实施方案中，使用完整的抗体。在一些实施方案中，替代地使用抗BAFF抗体的抗原结合片段。

[0073] “抗IgM剂”是指已知降低IgM的产生或水平的任何试剂，包括但不限于小分子、抗体、肽或核酸，例如，IgM抗体。本领域技术人员将认识到，B细胞产生抗体。因此，在一些实施方案中，抗IgM剂是已知调节或抑制B细胞水平的任何试剂。在一些实施方案中，抗IgM剂是已知调节或抑制B细胞成熟的任何试剂。在一些实施方案中，抗IgM剂是已知调节或抑制B细胞活化的任何试剂。在一些实施方案中，抗IgM剂是已知调节或抑制T细胞非依赖性B细胞活化的任何试剂。

[0074] 抗IgM剂包括但不限于与CD10、CD19、CD20、CD22、CD27、CD34、CD40、CD79a、CD79b、CD123、CD179b、FLT-3、ROR1、BR3、BAFF或B7RP-1特异性结合的IgM拮抗剂抗体或其抗原结合片段；IL21调节剂，例如IL-21和IL-21受体拮抗剂；酪氨酸激酶抑制剂，例如Syk抑制剂、BTK抑制剂、SRC蛋白酪氨酸激酶抑制剂；PI3K抑制剂；PKC抑制剂；APRIL拮抗剂，例如TACI-Ig；咪唑立宾；托法替尼；以及四环素。

[0075] “IgM拮抗剂抗体”包括但不限于已知降低IgM的产生或水平的抗体，例如IgM抗体。在一些实施方案中，IgM拮抗剂抗体与参与IgM产生的蛋白质或肽(例如，IgM抗体)或者参与

导致IgM产生的调节或刺激免疫途径的蛋白质或肽(例如,IgM抗体)结合并抑制其活性。

[0076] 在一些实施方案中,IgM拮抗剂抗体是已知调节B细胞水平的任何抗体。在一些实施方案中,IgM拮抗剂抗体是已知调节B细胞成熟的任何抗体。在一些实施方案中,IgM拮抗剂抗体是已知调节B细胞活化的任何抗体。在一些实施方案中,IgM拮抗剂抗体是已知调节或抑制T细胞非依赖性B细胞活化的任何抗体。

[0077] 在本文中提供的任一种方法、组合物或药盒的一些实施方案中,可以使用抗体的抗原结合片段代替抗体。

[0078] 与CD10、CD19、CD20、CD22、CD27、CD34、CD40、CD79a、CD79b、CD123、CD179b、FLT-3、ROR1、BR3、BAFF或B7RP-1特异性结合的IgM拮抗剂抗体或其抗原结合片段是可用于本文中提供的任一种方法、组合物或药盒的抗IgM剂的实例。因此,这样的试剂也可以是针对B细胞标志物或与这样的标志物特异性结合的其他分子的抗体或抗原结合试剂。

[0079] “APRIL拮抗剂”包括但不限于降低或抑制APRIL的功能或产生的任何分子。诱导增殖的配体(APRIL),也称为肿瘤坏死因子配体超家族成员13(TNFSF13),是被细胞表面受体TACI识别的TNF超家族的蛋白质。APRIL是TNFRSF17/BCMA(TNF受体家族的成员)的配体。发现,该蛋白质及其受体二者对B细胞发育是重要的。APRIL拮抗剂包括APRIL的小分子抑制剂、针对APRIL的抗体以及降低APRIL表达的RNAi抑制剂和反义寡聚物。示例性的APRIL抑制剂包括但不限于BION-1301(Aduro Biotech,Inc.)。在一些实施方案中,APRIL拮抗剂是TACI-Ig。TACI-Ig是将BLyS和APRIL的结合位点与免疫球蛋白的恒定区组合在一起的重组融合蛋白。

[0080] “布鲁顿酪氨酸激酶(Bruton′s tyrosine kinase,BTK)抑制剂”包括但不限于降低或抑制BTK酪氨酸激酶家族成员的功能或产生的任何分子。BTK抑制剂通过抑制酪氨酸蛋白激酶BTK酶而发挥作用,酪氨酸蛋白激酶BTK酶在B细胞发育中发挥重要作用。BTK抑制剂包括BTK的小分子抑制剂、针对BTK的抗体以及降低BTK表达的RNAi抑制剂和反义寡聚物。示例性的BTK抑制剂包括但不限于AVL-292、CC-292、ONO-4059、ACP-196、PCI-32765、阿卡替尼(Acalabrutinib)、GS-4059、司培替尼(spebrutinib)、BGB-3111和HM71224。

[0081] “IL-21调节剂”包括但不限于降低或抑制IL-21或IL-21受体的功能或产生的任何分子。白介素21是对免疫系统的细胞(包括自然杀伤(NK)细胞和可破坏病毒感染细胞或癌细胞的细胞毒性T细胞)具有有效调节作用的细胞因子。据报道,IL-21有助于CD4+T辅助细胞协调免疫系统针对病毒感染作出应答的机制。在一些实施方案中,IL21调节剂是IL-21拮抗剂。IL-21拮抗剂包括IL-21的小分子抑制剂、针对IL-21的抗体以及降低IL-21表达的RNAi抑制剂和反义寡聚物。示例性的IL-21抑制剂包括但不限于NNC0114(NovoNordisk)。在一些实施方案中,IL-21调节剂是IL-21受体拮抗剂。IL-21受体拮抗剂包括IL-21受体的小分子抑制剂、针对IL-21受体的抗体以及降低IL-21受体表达的RNAi抑制剂和反义寡聚物。示例性的IL-21受体抑制剂包括但不限于ATR-107(Pfizer)。

[0082] “PI3K抑制剂”包括但不限于降低或抑制PI3K激酶家族成员的功能或产生的任何分子。PI3激酶包括但不限于PIK3CA、PIK3CB、PIK3CG、PIK3CD、PIK3R1、PIK3R2、PIK3R3、PIK3R4、PIK3R5、PIK3R6、PIK3C2A、PIK3C2B、PIK3C2G和PIK3C3。PI3K抑制剂包括PI3K的小分子抑制剂、针对PI3K的抗体以及降低PI3K表达的RNAi抑制剂和反义寡聚物。示例性的PI3K抑制剂包括但不限于GS-1101、艾代拉利司(idelalisib)、杜韦利西布(duvelisib)、TGR-

1202、AMG-319、库潘尼西(copanlisib)、渥曼青霉素、LY294002、IC486068和IC87114(ICOS Corporation)和GDC-0941。

[0083] “PKC抑制剂”包括但不限于降低或抑制PKC激酶家族成员的功能或产生的任何分子。蛋白激酶C是通过其他蛋白质上的丝氨酸和苏氨酸氨基酸残基的羟基磷酸化来参与控制这些蛋白质的功能的蛋白激酶酶家族或该家族的成员。PKC酶包括但不限于PKC-α(PRKCA)、PKC-β1(PRKCB)、PKC-β2(PRKCB)、PKC-γ(PRKCG)、PKC-δ(PRKCD)、PKC-ε(PRKCE)、PKC-η(PRKCH)、PKC-θ(PRKCQ)、和PKC-ι(PRKCI)、PKC-ζ(PRKCZ)。PKC抑制剂包括PKC的小分子抑制剂、针对PKC的抗体以及降低PKC表达的RNAi抑制剂和反义寡聚物。示例性的PKC抑制剂包括但不限于恩扎妥林(enzastaurin)、鲁伯斯塔(ruboxistaurin)、白屈菜红碱、宫部苔草酚C(miyabenol C)、杨梅苷(myricitrin)、棉酚、毛蕊花糖苷、BIM-1和苔藓抑素1(bryostatin 1)。

[0084] “SRC蛋白酪氨酸激酶抑制剂”包括但不限于降低或抑制SRC激酶家族成员的功能或产生的任何分子。SRC抑制剂包括小分子SRC抑制剂、针对SRC的抗体以及降低SRC表达的RNAi抑制剂和反义寡聚物。示例性的Syk抑制剂包括但不限于达沙替尼。

[0085] “Syk抑制剂”包括但不限于降低或抑制Syk酪氨酸激酶家族成员的功能或产生的任何分子。Syk参与来自B细胞受体和T细胞受体的信号传递。Syk抑制剂包括小分子Syk抑制剂、针对Syk的抗体以及降低Syk表达的RNAi抑制剂和反义寡聚物。示例性的Syk抑制剂包括但不限于福他替尼(fostamatinib)(R788)、entospletinib(GS-9973)、赛度替尼(cerdulatinib)(PRT062070)、和TAK-659、entospletinib以及尼伐地平。

[0086] “四环素”是一组具有共同基本结构的广谱抗生素化合物并且可以直接从数种链霉菌属(Streptomyces)细菌中分离出来或者至少半合成地产生。示例性四环素包括但不限于氯四环素、氧四环素、去甲基氯四环素、氢吡四环素、赖甲环素(limecycline)、氯莫环素、美他环素(methacycline)、多西环素(doxycycline)、米诺环素和叔丁基甘氨酰氨基环素(tertiary-butylglycylamidominocycline)。

[0087] “酪氨酸激酶抑制剂”包括但不限于降低或抑制一种或更多种酪氨酸激酶的功能或产生的任何分子。酪氨酸激酶抑制剂包括小分子酪氨酸激酶抑制剂、针对酪氨酸激酶的抗体以及降低酪氨酸激酶表达的RNAi抑制剂和反义寡聚物。示例性的酪氨酸激酶抑制剂包括Syk抑制剂、BTK抑制剂和SRC蛋白酪氨酸激酶抑制剂。“抗病毒转移载体免疫应答”或“针对病毒转移载体的免疫应答”等是指针对病毒转移载体的任何不期望的免疫应答,例如IgM应答。在一些实施方案中,不期望的免疫应答是针对病毒转移载体或其抗原的抗原特异性免疫应答。在一些实施方案中,免疫应答对病毒转移载体的病毒抗原具有特异性。

[0088] 当抗病毒转移载体免疫应答在对象中或者与在所述对象或另一对象中的预期或测量的应答相比以某种方式被降低或消除时,其被称为是“抗病毒转移载体减弱应答”。在一些实施方案中,对象中的抗病毒转移载体减弱应答包括:相比于在没有伴随施用包含免疫抑制剂的合成纳米载体和抗IgM剂的情况下将病毒转移载体施用于另一对象(例如受试对象)之后使用获自该另一对象的生物样品所测量的抗病毒转移载体免疫应答,在如本文中提供的伴随施用之后使用获自该对象的生物样品所测量的降低的抗病毒转移载体免疫应答(例如IgM抗体应答)。在一些实施方案中,抗病毒转移载体减弱应答是:相比于在没有伴随施用包含免疫抑制剂的合成纳米载体和抗IgM剂的情况下将病毒转移载体施用于另一

对象(例如受试对象)之后对获自该另一对象的生物样品进行病毒转移载体体外攻击之后所检测的抗病毒转移载体免疫应答,在如本文中提供的伴随施用之后对该对象的生物样品进行随后的病毒转移载体体外攻击之后获自该对象的生物样品中的降低的抗病毒转移载体免疫应答(例如IgM抗体应答)。

[0089] “抗原”意指B细胞抗原或T细胞抗原。“抗原的类型”意指具有相同或基本上相同的抗原特征的分子。在一些实施方案中,抗原可以是蛋白质、多肽、肽、脂蛋白、糖脂、多核苷酸、多糖等。

[0090] “连接”或“连接的”或“偶联”或“偶联的”(等等)意指一个实体(例如部分)与另一实体化学地缔合。在一些实施方案中,该连接是共价的,意指在两个实体之间存在共价键的情况下发生连接。在一些非共价实施方案中,非共价连接由非共价相互作用介导,所述非共价相互作用包括但不限于电荷相互作用、亲和相互作用、金属配位、物理吸附、主客体相互作用(host-guest interaction)、疏水相互作用、TT堆积相互作用、氢键键合相互作用、范德华相互作用、磁性相互作用、静电相互作用、偶极-偶极相互作用、和/或其组合。在一些实施方案中,包封是连接的一种形式。

[0091] 除非另有说明,否则本文中使用的“平均”是指算术平均值。

[0092] “伴随地”意指以在时间上相关,优选地在时间上充分相关以在免疫应答中提供调节的方式向对象施用两种或更多种物质/试剂,并且甚至更优选地,组合施用所述两种或更多种物质/试剂。在一些实施方案中,伴随施用可包括在指定时间段内,优选在1个月内,更优选在1周内,还更优选在1天内,并且甚至更优选在1小时内对两种或更多种物质/试剂的施用。在一些实施方案中,物质/试剂可重复地伴随施用;即,在多于一次时机下进行伴随施用。

[0093] “剂型”意指在适合于向对象施用的介质、载体、载剂或装置中的药理和/或免疫活性物质。本文中提供的任一种组合物或剂量可以是剂型。

[0094] “包封”意指将物质的至少一部分封装在合成纳米载体内。在一些实施方案中,物质完全封装在合成纳米载体内。在另一些实施方案中,被包封的物质中的大部分或全部不暴露于合成纳米载体外部的局部环境。在另一些实施方案中,不超过50%、40%、30%、20%、10%或5%(重量/重量)暴露于局部环境。包封不同于吸收,吸收是将物质的大部分或全部置于合成纳米载体的表面上,并使物质暴露于合成纳米载体外部的局部环境。

[0095] “升高的转基因表达”是指提高对象中病毒转移载体的转基因表达产物的水平,该转基因由病毒转移载体递送。在一些实施方案中,转基因表达产物的水平可通过在对象中测量多种目的组织或系统中的转基因表达来确定。在一些实施方案中,转基因表达产物是蛋白质。在另一些实施方案中,转基因表达产物是核酸。升高的转基因表达可例如通过在获自对象的样品中测量转基因表达产物的量并将其与先前样品进行比较来确定。样品可以是组织样品。在一些实施方案中,转基因表达产物可使用流式细胞术来测量。

[0096] “外显子跳读转基因”意指编码反义寡核苷酸或可产生外显子跳读的其他试剂的任何核酸。“外显子跳读”是指在蛋白质产生期间在前mRNA水平上被跳跃和去除的外显子。反义寡核苷酸可干扰外显子内的剪接位点或调控元件。尽管存在基因突变,但这仍可导致截短的、部分功能的蛋白质。通常,反义寡核苷酸可以是突变特异性的,并与前信使RNA中的突变位点结合以诱导外显子跳读。

[0097] 对象可以是患有其中外显子跳读会有益的疾病或病症的对象。对象可患有本文中提供的其中产生外显子跳读会有益的任一种疾病或病症，例如营养不良。另外，外显子跳读转基因可编码在任何内源蛋白表达期间可产生外显子跳读的试剂，外显子跳读的结果将为其带来益处。这样的蛋白质的实例是与本文中提供的疾病或病症相关的蛋白质，例如本文中提供的任何营养不良。在一些实施方案中，蛋白质还可以是本文中提供的任一种治疗性蛋白质的内源性形式。

[0098] “基因编辑转基因”意指编码参与基因编辑过程的试剂或组分的任何核酸。“基因编辑”通常是指对基因组DNA进行的持久或永久的修饰，例如靶向DNA插入、置换、诱变或去除。基因编辑可靶向编码部分或全部表达蛋白质的DNA序列，或者靶向影响靶基因表达的DNA的非编码序列。基因编辑可包括递送编码目的DNA序列的核酸，并使用内切核酸酶将目的序列插入基因组DNA的靶位点。内切核酸酶可在基因组中的期望位置处在双链DNA中产生断裂，并使用宿主细胞的机制使用同源重组、非同源末端连接等修复断裂。可用于基因编辑的内切核酸酶种类包括但不限于：大范围核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease，TALEN)、成簇规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat，CRISPR)和归巢内切核酸酶。

[0099] 本文中提供的对象可以是患有本文中提供的任一种疾病或病症的对象，并且转基因是编码可用于纠正本文中提供的任一种蛋白质或其内源性形式中的缺陷的基因编辑剂的转基因。作为替代地，在一些实施方案中，基因编辑病毒转移载体还可包括编码如本文中提供的治疗性蛋白质或其部分或核酸的转基因。在一些实施方案中，可将基因编辑病毒转移载体与具有编码本文中提供的治疗性蛋白质或其部分或核酸的转基因的病毒转移载体一起施用于对象。

[0100] “基因表达调节转基因”是指编码基因表达调节剂的任何核酸。“基因表达调节剂”是指可增强、抑制或调节一个或更多个内源基因的表达的分子。因此，基因表达调节剂包括DNA结合蛋白质(例如，人工转录因子)以及介导RNA干扰的分子。基因表达调节剂包括RNAi分子(例如，dsRNA或ssRNA)、miRNA和三链体形成寡核苷酸(triplex-forming oligonucleotide，TFO)。基因表达调节剂还可包括经修饰的RNA，包括任何前述RNA分子的经修饰形式。

[0101] 本文中提供的对象可以是患有本文中提供的任一种疾病或病症的对象，并且转基因是编码可用于控制本文中提供的任一种蛋白质的表达的基因表达调节剂的转基因。在一些实施方案中，对象患有疾病或病症，其中对象的内源性形式的蛋白质有缺陷或以有限量产生或完全不产生，并且基因表达调节剂可控制这样的蛋白质的表达。因此，在一些实施方案中，基因表达调节剂可控制如本文中提供的任一种蛋白质或其内源性形式(例如如本文中提供的治疗性蛋白质的内源性形式)的表达。

[0102] “基因治疗转基因”是指编码表达产物例如蛋白质或核酸并且当被引入到细胞中时可以指导蛋白质或核酸的表达的核酸。当是蛋白质时，该蛋白质可以是治疗性蛋白质。在本文中提供的任一种方法或组合物的一些实施方案中，通过病毒转移载体施用基因治疗转基因的对象患有疾病或病症，其中对象的内源性形式的蛋白质有缺陷或以有限量产生或完全不产生。在一些实施方案中，编码的蛋白质没有人对应物，但是被预测在疾病或病症的治

疗中提供治疗上有益的作用。

[0103] “免疫抑制剂”意指引起致耐受性作用的化合物，优选地通过其对APC的作用。致耐受性作用通常是指由APC或其他免疫细胞全身和/或局部地进行的调节，其以持久的方式降低、抑制或防止针对抗原的不期望免疫应答。在一个实施方案中，免疫抑制剂是引起APC促进一种或更多种免疫效应细胞中的调节性表型的免疫抑制剂。例如，调节性表型的特征可以是：抑制抗原特异性CD4+T细胞或B细胞的产生、诱导、刺激或募集；抑制抗原特异性抗体的产生，Treg细胞(例如，CD4+CD25高FoxP3+Treg细胞)的产生、诱导、刺激或募集等。这可以是CD4+T细胞或B细胞转化为调节性表型的结果。这也可以诱导是其他免疫细胞(例如CD8+T细胞、巨噬细胞和iNKT细胞)中FoxP3的结果。在一个实施方案中，免疫抑制剂是在APC加工抗原之后影响APC的应答的免疫抑制剂。在另一个实施方案中，免疫抑制剂不是干扰抗原加工的免疫抑制剂。在另一个实施方案中，免疫抑制剂不是凋亡信号传导分子。在另一个实施方案中，免疫抑制剂不是磷脂。

[0104] 在一些实施方案中，免疫抑制剂是除组成合成纳米载体的结构的物质之外的要素。例如，在一个实施方案中，当合成纳米载体由一种或更多种聚合物组成时，免疫抑制剂是作为补充的且在一些实施方案中与一种或更多种聚合物连接的化合物。作为另一个实例，在一个实施方案中，当合成纳米载体由一种或更多种脂质组成时，免疫抑制剂又是一种或更多种脂质的补充，并且在一些实施方案中，与一种或更多种脂质连接。在另一些实施方案中，当合成纳米载体的物质也引起致耐受性作用时，免疫抑制剂是除引起致耐受性作用的合成纳米载体的物质之外所存在的要素。

[0105] 免疫抑制剂包括但不限于：他汀类；mTOR抑制剂，例如雷帕霉素(rapamycin)或雷帕霉素类似物(即rapalog)；TGF-β信号传导剂；TGF-β受体激动剂；组蛋白脱乙酰酶抑制剂，例如曲古抑菌素A(Trichostatin A)；皮质类固醇；线粒体功能抑制剂，例如鱼藤酮(rotenone)；P38抑制剂；NF-κβ抑制剂，例如6Bio、地塞米松(Dexamethasone)、TCPA-1、IKK VII；腺苷受体激动剂；前列腺素E2激动剂(PGE2)，例如米索前列醇(Misoprostol)；磷酸二酯酶抑制剂，例如磷酸二酯酶4抑制剂(PDE4)，例如咯利普兰(Rolipram)；蛋白酶体抑制剂；激酶抑制剂；G蛋白偶联受体激动剂；G蛋白偶联受体拮抗剂；糖皮质激素；类视黄醇；细胞因子抑制剂；细胞因子受体抑制剂；细胞因子受体激活剂；过氧化物酶体增殖物激活受体拮抗剂；过氧化物酶体增殖物激活受体激动剂；组蛋白脱乙酰酶抑制剂；钙调磷酸酶抑制剂；磷酸酶抑制剂；PI3KB抑制剂，例如TGX-221；自噬抑制剂，例如3-甲基腺嘌呤；芳烃受体抑制剂；蛋白酶体抑制剂I(PSI)；和氧化的ATP，例如P2X受体阻断剂。免疫抑制剂还包括：IDO、维生素D3、视黄酸、环孢素例如环孢素A、芳烃受体抑制剂、白藜芦醇(resveratrol)、硫唑嘌呤(Aza)、6-巯基嘌呤(6-MP)、6-硫鸟嘌呤(6-TG)、FK506、萨菲菌素A、沙美特罗、霉酚酸酯(MMF)、阿司匹林和其他COX抑制剂、尼氟酸、雌三醇和雷公藤内酯。另一些示例性免疫抑制剂包括但不限于：小分子药物、天然产物、抗体(例如抗CD20、CD3、CD4的抗体)、基于生物制剂的药物、基于碳水化合物的药物、RNAi、反义核酸、适配体、甲氨蝶呤、NSAID；芬戈莫德(fingolimod)；那他珠单抗(natalizumab)；阿仑单抗(alemtuzumab)；抗CD3；他克莫司(FK506)、阿巴西普(abatacept)、贝拉西普(belatacept)等。“雷帕霉素类似物(Rapalog)”是指在结构上与雷帕霉素(的类似物)(西罗莫司)相关的分子。雷帕霉素类似物的实例包括但不限于：坦罗莫司(CCI-779)、依维莫司(RAD001)、地磷莫司(AP-23573)和佐他莫司(ABT-

578)。雷帕霉素类似物的一些另外的实例可见于例如WO公布WO 1998/002441和美国专利No.8,455,510,其雷帕霉素类似物通过引用整体并入本文。

[0106] 另外的免疫抑制剂是本领域技术人员已知的,并且本发明不限于此方面。在一些实施方案中,免疫抑制剂可包含如本文中提供的任一种试剂。

[0107] 当与合成纳米载体偶联时,“负载”是基于整个合成纳米载体中物质的总干配方重量与合成纳米载体偶联的免疫抑制剂的量(重量/重量)。通常,这样的负载计算为合成纳米载体群体的平均值。在一个实施方案中,合成纳米载体的平均负载为0.1%至50%。在另一个实施方案中,负载为0.1%至20%。在另一个实施方案中,负载为0.1%至10%。在另一个实施方案中,负载为1%至10%。在另一个实施方案中,负载为7%至20%。在另一个实施方案中,合成纳米载体群体的平均负载为至少0.1%、至少0.2%、至少0.3%、至少0.4%、至少0.5%、至少0.6%、至少0.7%、至少0.8%、至少0.9%、至少1%、至少2%、至少3%、至少4%、至少5%、至少6%、至少7%、至少8%、至少9%、至少10%、至少11%、至少12%、至少13%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%、至少19%、至少20%或至少25%。在另一个实施方案中,合成纳米载体群体的平均负载为0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在任一个以上实施方案中的一个实施方案中,合成纳米载体群体的平均负载不超过25%。在一些实施方案中,使用本领域已知的任何方法来计算负载。合成纳米载体中包含的免疫抑制剂的负载可以是本文中提供的任一种负载。

[0108] “合成纳米载体的最大尺寸”意指沿合成纳米载体的任何轴测量的纳米载体的最大尺寸。“合成纳米载体的最小尺寸”意指沿合成纳米载体的任何轴测量的合成纳米载体的最小尺寸。例如,对于球形合成纳米载体,合成纳米载体的最大尺寸和最小尺寸将基本上相同,并且将是其直径的尺寸。类似地,对于立方形合成纳米载体,合成纳米载体的最小尺寸将是其高度、宽度或长度中的最小者,而合成纳米载体的最大尺寸将是其高度、宽度或长度中的最大者。在一个实施方案中,基于样品中合成纳米载体的总数,该样品中合成纳米载体中的至少75%、优选至少80%、更优选至少90%的最小尺寸等于或大于100nm。在一个实施方案中,基于样品中合成纳米载体的总数,该样品中合成纳米载体中的至少75%、优选至少80%、更优选至少90%的最大尺寸等于或小于5μm。优选地,基于样品中合成纳米载体的总数,该样品中合成纳米载体中的至少75%、优选至少80%、更优选至少90%的最小尺寸大于110nm、更优选大于120nm、更优选大于130nm并且更优选还大于150nm。合成纳米载体的最大尺寸与最小尺寸的纵横比可根据实施方案而变化。例如,合成纳米载体的最大尺寸与最小尺寸的纵横比可以是1:1至1,000,000:1、优选1:1至100,000:1、更优选1:1至10,000:1、更优选1:1至1000:1、还更优选1:1至100:1并且还更优选1:1至10:1不等。优选地,基于样品中合成纳米载体的总数,该样品中合成纳米载体中的至少75%、优选至少80%、更优选至少90%的最大尺寸等于或小于3μm、更优选等于或小于2μm、更优选等于或小于1μm、更优选等于或小于800nm、更优选等于或小于600nm并且更优选还等于或小于500nm。在一些优选的实施方案中,基于样品中合成纳米载体的总数,该样品中合成纳米载体中的至少75%、优选至少80%、更优选至少90%的最小尺寸等于或大于100nm、更优选等于或大于120nm、更优选等于或大于130nm、更优选等于或大于140nm,并且更优选还等于或大于150nm。在一些实施方

案中,可通过将合成纳米载体悬浮在液体(通常为水性)介质中并使用动态光散射(dynamic light scattering,DLS)(例如,使用Brookhaven ZetaPALS仪器)来获得合成纳米载体尺寸(例如,有效直径)的测量。例如,可将合成纳米载体的悬浮液从水性缓冲液稀释到纯水中,以实现约0.01至0.1mg/mL的最终合成纳米载体悬浮液浓度。经稀释的悬浮液可直接在合适的吸收池内制备或转移到合适的吸收池中用于DLS分析。然后,可以将吸收池放置在DLS中,使其平衡至受控温度,并随后基于介质黏度和样品折射率的合适输入扫描足够的时间以获得稳定且可再现的分布。然后,报告有效直径或分布的平均值。确定高纵横比或非球形合成纳米载体的有效尺寸可能需要放大技术(例如电子显微术)以获得更准确的测量。合成纳米载体的"尺寸"或"大小"或"直径"意指例如使用动态光散射获得的颗粒尺寸分布的平均值。

[0109] "非甲氧基封端的聚合物"意指至少一个末端以除甲氧基之外的部分结尾的聚合物。在一些实施方案中,聚合物的至少两个末端以除甲氧基之外的部分结尾。在另一些实施方案中,聚合物不具有以甲氧基结尾的末端。"非甲氧基封端的普朗尼克聚合物"意指除在两个末端均具有甲氧基的线性普朗尼克聚合物之外的聚合物。在一些实施方案中,如本文中提供的聚合物纳米粒可包含非甲氧基封端的聚合物或非甲氧基封端的普朗尼克聚合物。在另一些实施方案中,聚合物纳米粒不包含这样的聚合物。

[0110] "可药用赋形剂"或"可药用载体"意指与药理学活性物质一起使用以配制组合物的药理学惰性物质。可药用赋形剂包括本领域中已知的多种物质,包括但不限于糖类(例如葡萄糖、乳糖等)、防腐剂(例如抗微生物剂)、重构助剂、着色剂、盐水(例如磷酸盐缓冲盐水)和缓冲剂。

[0111] "方案"意指对对象进行的施用方式并且包括对对象进行的一种或更多种物质的任何给药方案。方案由要素(或变量)组成;因此,方案包含一个或更多个要素。方案的这样的要素可包含给药量(剂量)、给药频率、施用途径、给药持续时间、给药速率、给药之间的间隔、任意前述的组合等。在一些实施方案中,方案可用于将一种或更多种本发明组合物施用于一个或更多个受试对象。然后可以评估这些受试对象中的免疫应答以确定该方案在产生期望或期望水平的免疫应答或治疗作用方面是否有效。可以评估任何治疗和/或免疫作用。方案的一个或更多个要素可能先前已在受试对象(例如非人对象)中得到证明,并随后转换成人类方案。例如,在非人对象中证明的给药量可以使用已建立的技术(例如等量缩放(alimetric scaling)或其他缩放方法)缩放为人类方案的要素。可以使用本文中提供的或本领域已知的任何方法来确定方案是否具有期望的作用。例如,可以从已根据特定方案施用了本文中提供的组合物的对象获得样品以确定特异性免疫细胞、细胞因子、抗体等是否降低、产生、活化等。示例性的方案是先前已证明导致针对病毒转移载体抗原的耐受性免疫应答或实现本文中所述的任一种有益结果的方案。可用于检测免疫细胞的存在和/或数目的方法包括但不限于流式细胞术方法(例如,FACS)、ELISpot、增殖反应、细胞因子产生和免疫组织化学方法。用于免疫细胞标志物的特异性染色的抗体和其他结合试剂是可商购的。这样的试剂盒通常包括用于抗原的染色试剂,其允许基于FACS的检测、分离和/或定量来自异质细胞群的期望细胞群。在一些实施方案中,如果预期所选择的一种或多种要素在对象中实现期望的结果,则使用一种或更多种或所有或基本上所有构成方案的要素将本文中提供的组合物施用于对象。这样的期望可以基于在受试对象中确定的方案并且按比例缩放,如果需要的话。本文中提供的任一种方法可包括或还包括以下步骤:根据已显示减弱抗病

毒转移载体免疫应答(例如IgM应答)和/或允许重复施用病毒转移载体和/或导致针对病毒转移载体的一种或更多种其他免疫应答的减弱和/或导致转基因表达提高的方案,将一定剂量的病毒转移载体与本文中所述的包含免疫抑制剂的合成纳米载体以及抗IgM剂组合施用。本文中提供的任一种方法可包括或还包括确定实现本文中所述的任一种或更多种有益结果的这样的方案。本文中提供的任一种方法可包括或还包括根据实现本文中所述的任一种或更多种有益结果的方案进行施用的步骤。

[0112] “重复剂量”或“重复给药”等意指在相同物质的较早剂量或给药之后向对象施用的至少一个另外的剂量或给药。例如,病毒转移载体的重复剂量是在相同物质的先前剂量之后病毒转移载体的至少一个另外的剂量。虽然物质可以相同,但是重复剂量中物质的量可能与早前剂量不同。可以如本文中提供的那样,例如以实施例的间隔来施用重复剂量。如果重复给药对对象产生有益作用,则认为重复给药是有效的。优选地,有效的重复给药与减弱的抗病毒转移载体应答相结合产生有益作用,例如治疗作用。

[0113] “同时”意指在同一时间或基本上在同一时间施用,其中临床医生将考虑施用之间对期望的治疗结果的影响几乎为零或可忽略不计的任何时间。在一些实施方案中,同时意味着施用以5、4、3、2、1或更少的分钟进行。

[0114] “对象”意指动物,包括温血哺乳动物,例如人和灵长类;禽类;驯养的家养或农场动物,例如猫、狗、绵羊、山羊、牛、马和猪;实验动物,例如小鼠、大鼠和豚鼠;鱼;爬行动物;动物园动物和野生动物;等。本文中使用的对象可以是需要本文中提供的任一种方法或组合物的对象。

[0115] “合成纳米载体”意指在自然界中未发现并且至少一个维度的尺寸小于或等于5微米的离散物体。一般来说包含白蛋白纳米粒作为合成纳米载体,然而在某些实施方案中,合成纳米载体不包含白蛋白纳米粒。在一些实施方案中,合成纳米载体不包含壳聚糖。在另一些实施方案中,合成纳米载体不是基于脂质的纳米粒。在另一些实施方案中,合成纳米载体不包含磷脂。

[0116] 合成纳米载体可以是但不限于以下一种或多种:基于脂质的纳米粒(在本文中也称为脂质纳米粒,即构成其结构的大部分物质是脂质的纳米粒)、聚合物纳米粒、金属纳米粒、基于表面活性剂的乳剂、树枝状聚合物、巴基球、纳米线、病毒样颗粒(即主要由病毒结构蛋白构成但不具有感染性或感染性低的颗粒)、基于肽或蛋白质的颗粒(在本文中也称为蛋白质颗粒,即构成其结构的大部分物质是肽或蛋白质的颗粒)(例如白蛋白纳米粒)和/或使用纳米材料的组合产生的纳米粒(例如脂质-聚合物纳米粒)。合成纳米载体可以是多种不同的形状,包括但不限于球形、立方形、棱锥形、长方形、圆柱形、环形等。根据本发明的合成纳米载体包含一个或更多个表面。可适用于本发明实践的示例性合成纳米载体包括:(1)Gref等的美国专利5,543,158中公开的生物可降解纳米粒,(2)Saltzman等的公开的美国专利申请20060002852的聚合物纳米粒,(3)DeSimone等的公开的美国专利申请20090028910的光刻法构建的纳米粒,(4)von Andrian等的WO 2009/051837的公开内容,(5)Penades等的公开的美国专利申请2008/0145441中公开的纳米粒,(6)de los Rios等的公开的美国专利申请20090226525中公开的蛋白质纳米粒,(7)Sebbel等的公开的美国专利申请20060222652中公开的病毒样颗粒,(8)Bachmann等的公开的美国专利申请20060251677中公开的核酸连接的病毒样颗粒,(9)WO2010047839A1或WO2009106999A2中公开的病毒样颗

粒,(10)P.Paolicelli等,“Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles”Nanomedicine.5(6):843-853(2010)中公开的纳米沉淀纳米粒,(11)美国公布2002/0086049中公开的凋亡细胞、凋亡小体或者合成或半合成模拟物,或(12)Look等,Nanogel-based delivery of mycophenolic acid ameliorates systemic lupus erythematosus in mice”J.Clinical Investigation 123(4):1741-1749(2013)的那些。

[0117] 最小尺寸等于或小于约100nm、优选等于或小于100nm的根据本发明的合成纳米载体不包含具有激活补体之羟基的表面,或者作为替代包含基本上由不是激活补体之羟基的部分组成的表面。在一个优选的实施方案中,最小尺寸等于或小于约100nm、优选等于或小于100nm的根据本发明的合成纳米载体不包含显著激活补体的表面,或者作为替代包含基本上由不会显著激活补体的部分组成的表面。在一个更优选的实施方案中,最小尺寸等于或小于约100nm、优选等于或小于100nm的根据本发明的合成纳米载体不包含激活补体的表面,或者作为替代包含基本上由不会激活补体的部分组成的表面。在一些实施方案中,合成纳米载体排除病毒样颗粒。在一些实施方案中,合成纳米载体的纵横比可大于1:1、1:1.2、1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:7或大于1:10。

[0118] “治疗性蛋白质”意指可由如本文中提供的基因治疗转基因表达的任何蛋白质。治疗性蛋白质可以是用于蛋白质替代或蛋白质补充的蛋白质。治疗性蛋白质包括但不限于酶、酶辅因子、激素、凝血因子、细胞因子、生长因子等。其他治疗性蛋白质的实例在本文中其他地方提供。对象可以是需要用本文中提供的任一种治疗性蛋白质进行处理的对象。

[0119] “病毒转移载体的转基因”是指使用病毒转移载体转运到细胞中的核酸物质,并且一旦在细胞中,其可被表达以产生蛋白质或核酸分子,例如用于如本文中所述的治疗应用。转基因可以是基因治疗转基因、基因编辑转基因、调节基因表达的转基因或外显子跳读转基因。“表达的”或“表达”等是指在将转基因转导入细胞并由转导细胞加工之后,合成功能性(即,对于期望目的具有生理活性)基因产物。这样的基因产物在本文中也称为“转基因表达产物”。因此,表达的产物包括由转基因编码的所得蛋白质或核酸,例如反义寡核苷酸或治疗性RNA。

[0120] “病毒转移载体”意指已适于递送如本文中提供的核酸(例如转基因)的病毒载体并且包括这样的核酸。“病毒载体”是指病毒转移载体的所有病毒组分。因此,“病毒抗原”是指以下的抗原:病毒转移载体的病毒组分(例如衣壳蛋白或外壳蛋白),而不是指其递送的核酸(例如转基因)或其编码的任何产物。“病毒转移载体抗原”是指以下的任何抗原:病毒转移载体,包括其病毒组分以及递送的核酸(例如转基因)或其任何表达产物。转基因可以是基因治疗转基因、基因编辑转基因、调节基因表达的转基因或外显子跳读转基因。在一些实施方案中,转基因是编码本文中提供的蛋白质(例如治疗性蛋白质、DNA结合蛋白质或内切核酸酶)的转基因。在另一些实施方案中,转基因是编码指导RNA、反义核酸、snRNA、RNAi分子(例如,dsRNA或ssRNA)、miRNA或三链体形成寡核苷酸(TFO)等的转基因。病毒载体可以基于但不限于:逆转录病毒(例如,鼠逆转录病毒、禽逆转录病毒、莫洛尼鼠白血病病毒(MoMuLV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)和劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus,RSV))、慢病毒、疱疹病毒、腺病毒、腺相关病毒、甲病毒等。其他实例在本文中其他地方提供或是本领域中已知的。病毒载体可基于病毒的天

然变体、毒株或血清型，例如本文中所提供的那些的任一种。病毒载体也可基于通过分子进化选择的病毒。病毒载体还可以是经改造载体、重组载体、突变体载体或杂交体载体。在一些实施方案中，病毒载体是“嵌合病毒载体”。在这样的一些实施方案中，这意味着病毒载体由源自多于一种病毒或病毒载体的病毒组分构成。

[0121] C.用于本发明方法的组合物

[0122] 重要的是，已发现本文中提供的方法和组合物减弱了针对病毒转移载体的免疫应答，例如IgM应答。另外，已发现本文中提供的方法和组合物能够使转基因表达显著提高。本文中提供的方法和组合物可用于用病毒转移载体处理对象。病毒转移载体可用于递送核酸(例如转基因)用于多种目的，包括用于基因治疗、基因编辑、基因表达调节和外显子跳读，本文中提供的方法和组合物也是适用的。

[0123] 转基因

[0124] 本文中提供的病毒转移载体的转基因可以是基因治疗转基因，并且可编码对对象(例如患有疾病或病症的对象)有益的任何蛋白质或其部分。所述蛋白质可以是胞外、胞内或膜结合蛋白质。所述蛋白质可以是治疗性蛋白质，并且通过病毒转移载体施用基因治疗转基因的对象可能患有疾病或病症，其中对象的内源性形式的蛋白质有缺陷或以有限量产生或完全不产生。因此，对象可以是患有如本文中提供的任一种疾病或病症的对象，并且转基因可以是编码如本文中提供的任一种治疗性蛋白质或其部分的转基因。

[0125] 治疗性蛋白质的实例包括但不限于：可输注或可注射的治疗性蛋白质、酶、酶辅因子、激素、血液或凝血因子、细胞因子和干扰素、生长因子、脂肪因子等。

[0126] 可输注或可注射的治疗性蛋白质的实例包括：例如，托珠单抗(Roche/Actemra®)、α-1抗胰蛋白酶(Kamada/AAT)、Hematide®(Affymax和Takeda，合成肽)、白蛋白干扰素α-2b(Novartis/Zalbin™)、Rhucin®(Pharming Group，C1抑制剂替代治疗)、替莫瑞林(tesamorelin)(Theratechnologies/Egrifta，合成生长激素释放因子)、奥美珠单抗(ocrelizumab)(Genentech，Roche和Biogen)、belimumab(GlaxoSmithKline/Benlysta®)、培戈洛酶(pegloticase)(Savient Pharmaceuticals/Krystexxa™)、他利苷酶α(taliglucerase α)(Protalix/Uplyso)、阿加糖酶α(Shire/Replagal®)和维拉苷酶α(Shire)。

[0127] 酶的实例包括溶菌酶、氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶、天冬酰胺酶、尿酸酶、糖苷酶、蛋白酶、核酸酶、胶原酶、透明质酸酶、肝素酶、类肝素酶、激酶、磷酸酶、溶素和连接酶。酶的另一些实例包括用于酶替代治疗的那些，包括但不限于：伊米苷酶(imiglucerase)(例如，CEREZYME™)、α-半乳糖苷酶A(α-gal A)(例如，阿加糖酶β，FABRYZYME™)、酸性α-葡糖苷酶(GAA)(例如，葡糖苷酶α，LUMIZYME™，MYOZYME™)和芳基硫酸酯酶B(例如，拉罗尼酶(laronidase)，ALDURAZYME™，艾杜硫酶(idursulfase)，ELAPRASE™，芳基硫酸酯酶B(arylsulfatase B)，NAGLAZYME™)。

[0128] 激素的实例包括但不限于促性腺激素、促甲状腺激素、黑皮质素、垂体激素、加压素、催产素、生长激素、催乳素、食欲肽、利尿钠激素、甲状旁腺激素、降钙素、红细胞生成素和胰激素。

[0129] 血液或凝血因子的实例包括:因子I(纤维蛋白原)、因子II(凝血酶原)、组织因子、因子V(前加速素,不稳定因子)、因子VII(稳定因子,前转化素)、因子VIII(抗血友病球蛋白)、因子IX(克雷司马斯因子或血浆促凝血酶原激酶组分)、因子X(Stuart-Prower因子)、因子Xa、因子XI、因子XII(Hageman因子)、因子XIII(纤维蛋白稳定因子)、von Willebrand因子、von Heldebrant因子、前激肽释放因子(Fletcher因子)、高分子量激肽原(HMWK)(Fitzgerald因子)、纤连蛋白、纤维蛋白、凝血酶、抗凝血酶(例如抗凝血酶III)、肝素辅因子II、蛋白C、蛋白S、蛋白Z、蛋白Z相关蛋白酶抑制剂(protein Z-related protease inhibitot,ZPI)、纤溶酶原、α2-纤溶酶抑制剂、组织纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator,tPA)、尿激酶、纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1,PAI1)、纤溶酶原激活物抑制剂-2(plasminogen activator inhibitor-2,PAI2)、癌症促凝剂和依伯汀α(Epogen,Procrit)。

[0130] 细胞因子的实例包括淋巴因子、白介素和趋化因子、1型细胞因子(例如IFN-γ、TGF-β)和2型细胞因子(例如IL-4、IL-10和IL-13)。

[0131] 生长因子的实例包括:肾上腺髓质素(Adrenomedullin,AM)、血管生成素(Angiopoietin,Ang)、自分泌运动因子、骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein,BMP)、脑源性神经营养因子(Brain-derivedneurotrophic factor,BDNF)、表皮生长因子(Epidermal growth factor,EGF)、红细胞生成素(Erythropoietin,EPO)、成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor,FGF)、胶质细胞源性神经营养因子(Glial cell line-derived neurotrophic factor,GDNF)、粒细胞集落刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor,G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte macrophage colony-stimulating factor,GM-CSF)、生长分化因子-9(Growth differentiation factor-9,GDF9)、肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor,HGF)、肝癌源性生长因子(Hepatoma-derived growth factor,HDGF)、胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor,IGF)、迁移刺激因子、肌生成抑制蛋白(GDF-8)、神经生长因子(Nerve growth factor,NGF)以及其他神经营养因子、血小板源性生长因子(Platelet-derived growth factor,PDGF)、血小板生成素(Thrombopoietin,TPO)、转化生长因子α(Transforming growth factor alpha,TGF-α)、转化生长因子β(Transforming growth factor beta,TGF-β)、肿瘤坏死因子-α(Tumour necrosis factor-alpha,TNF-α)、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)、Wnt信号传导途径、胎盘生长因子(placental growth factor,PlGF)、[(胎牛促生长素)](Foetal Bovine Somatotrophin,FBS)、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6和IL-7。

[0132] 脂肪因子的实例包括瘦素和脂连蛋白。

[0133] 治疗性蛋白质的另外的实例包括但不限于:受体、信号传导蛋白、细胞骨架蛋白、支架蛋白、转录因子、结构蛋白、膜蛋白、胞质蛋白、结合蛋白、核蛋白、分泌蛋白、高尔基蛋白、内质网蛋白、线粒体蛋白和囊泡蛋白等。

[0134] 本文中提供的基因治疗病毒转移载体的转基因可编码任何蛋白质的功能形式,其通过对象中该蛋白质的内源性形式的某些缺陷(包括内源性形式的表达缺陷)在对象中导致疾病或病症。这样的疾病或病症的实例包括但不限于:溶酶体贮积病/症,例如Santavuori-Haltia病(婴儿神经元蜡样质脂褐质沉积症1型(Infantile Neuronal Ceroid

Lipofuscinosis Type 1))、詹-比二氏病(Jansky-Bielschowsky Disease)(晚期婴儿神经元蜡样质脂褐质沉积症2型)、巴藤病(Batten disease)(青少年神经元蜡样质脂褐质沉积症3型)、库夫斯病(Kufs disease)(神经元蜡样质脂褐质沉积症4型)、方基盖氏病(Von Gierke disease)(糖原贮积症Ia型)、糖原贮积症Ib型、庞贝病(Pompe disease)(糖原贮积症II型)、福布斯或科里病(Forbes or Cori disease)(糖原贮积症III型)、黏脂贮积症II(I-细胞病)、黏脂贮积症III(假性Hurler多种营养不良(Pseudo-Hurler polydystrophy))、黏脂贮积症IV(唾液脂血症(sialolipidosis))、胱氨酸病(成人非肾病型)、胱氨酸病(婴儿肾病型)、胱氨酸病(青少年或青春期肾病)、萨拉病(Salla disease)/婴儿唾液酸贮积症和saposin缺乏症;脂质和鞘脂降解病症,例如GM1神经节苷脂贮积症(婴儿、晚期婴儿/青少年和成人/慢性),泰-萨克斯病(Tay-Sachs disease),山德霍夫氏病(Sandhoff disease),GM2神经节苷脂贮积症,Ab变异型,法布里病(Fabry disease),戈谢病I、II和III型(Gaucher disease,Types I,II and III),异染性脑白质营养不良(metachromatic leukidystrophy),克拉伯病(Krabbe disease)(早期和晚期发病),尼曼-皮克病A、B、C1和C2型(Neimann-Pick disease,Types A,B,C1,and C2),Farber病和沃尔曼病(Wolman disease)(胆固醇酯贮积病(cholesteryl esther storage disease));黏多糖降解病症,例如Hurler综合征(MPSI)、Scheie综合征(MPS IS)、Hurler-Scheie综合征(MPS IH/S)、亨特综合征(Hunter syndrome)(MPS II)、Sanfillippo A综合征(MPS IIIA)、Sanfillippo B综合征(MPS IIIB)、Sanfillippo C综合征(MPS IIIC)、Sanfillippo D综合征(MPS IIID)、Morquio A综合征(MPS IVA)、Morquio B综合征(MPS IVB)、Maroteaux-Lamy综合征(MPS VI)和斯赖综合征(Sly syndrome)(MPS VII);糖蛋白降解病症,例如α甘露糖苷贮积症、β甘露糖苷贮积症、岩藻糖苷贮积症、天冬氨酰基葡糖胺尿症(asparylglucosaminuria)、黏脂贮积症I(唾液酸贮积症)、半乳糖唾液酸贮积症、辛德勒病(Schindler disease)和辛德勒病II型/Kanzaki病;以及脑白质营养不良疾病/病症,例如无β脂蛋白血症、新生儿肾上腺脑白质营养不良(neonatal adrenoleukodystrophy)、卡纳万病(Canavan disease)、脑腱黄瘤病(cerebrotendinous xanthromatosis)、佩利措伊斯-梅茨巴赫病(Pelizaeus Merzbacher disease)、丹吉尔病(Tangier disease)、婴儿Refum病(Refum disease,infantile)和经典Refum病(Refum disease,classic)。

[0135] 如本文中提供的对象的这样的疾病/病症的另外的实例包括但不限于:酸性麦芽糖酶缺乏症(例如,庞贝病、糖原贮积病2型、溶酶体贮积病);肉碱缺乏症;肉碱棕榈酰基转移酶缺乏症;脱支酶缺乏症(例如,科里或福布斯病(Cori or Forbes disease),糖原贮积病3型);乳酸脱氢酶缺乏症(例如,糖原贮积病11型);肌腺苷酸脱氨酶缺乏症;磷酸果糖激酶缺乏症(例如,Tarui病,糖原贮积病7型);磷酸甘油酸激酶缺乏症(例如,糖原贮积病9型);磷酸甘油酸变位酶缺乏症(例如,糖原贮积病10型);磷酸化酶缺乏症(例如,麦卡德尔病(McArdle disease)、肌磷酸化酶缺乏症、糖原贮积病5型);戈谢病(Gaucher's Disease)(例如,1号染色体,酶葡糖脑苷脂酶受影响);软骨发育不全(例如,4号染色体,成纤维细胞生长因子受体3受影响);亨廷顿病(Huntington's Disease)(例如,4号染色体,亨廷顿蛋白);血色素沉着症(例如,6号染色体,HFE蛋白);囊性纤维化(例如,7号染色体,CFTR);弗里德赖希共济失调(Friedreich's Ataxia)(染色体9,共济蛋白);贝斯特病(Best Disease)(11号染色体,VMD2);镰状细胞病(11号染色体,血红蛋白);苯丙酮尿症(染色体12,苯丙氨

酸羟化酶)；马凡综合征(Marfan's Syndrome)(15号染色体，原纤蛋白)；强直性肌营养不良(Myotonic Dystophy)(19号染色体，肌营养不良性肌强直蛋白激酶(dystophia myotonica protein kinase))；肾上腺脑白质营养不良(x染色体，过氧化物酶体中的木质素酰辅酶A连接酶)；迪谢内肌营养不良(Duchene's Muscular Dystrophy)(x染色体，肌养蛋白)；雷特综合征(Rett Syndrome)(x染色体，甲基CpG结合蛋白2)；莱伯遗传性视神经病变(Leber's Hereditary Optic Neuropathy)(线粒体，呼吸蛋白质)；线粒体脑病、乳酸性酸中毒和中风(Mitochondria Encephalopathy，Lactic Acidosis and Stroke，MELAS)(线粒体，转移RNA)；以及尿素循环的酶缺乏。

[0136] 这样的疾病或病症的另外的实例包括但不限于：镰状细胞性贫血、肌管性肌病(Myotubular Myopathy)、血友病B、脂蛋白脂酶缺乏、鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏症(Omithine Transcarbamylase Deficiency)、克里格勒-纳贾尔综合征(Crigler-Najjar Syndrome)、黏脂贮积症IV、尼曼-皮克A(Niemann-Pick A)、Sanfilippo A、Sanfilippo B、Sanfilippo C、Sanfilippo D、b-地中海贫血和迪谢内肌营养不良。疾病或病症的另一些实例包括为以下中缺陷的结果的那些：脂质和鞘脂降解、黏多糖降解、糖蛋白降解、脑白质营养不良等。

[0137] 本文中提供的任一种疾病或病症的缺陷蛋白的功能形式都可由基因治疗病毒转移载体的转基因编码并且也被认为是治疗性蛋白质。因此，治疗性蛋白质还包括：肌磷酸化酶、葡糖脑苷脂酶、成纤维细胞生长因子受体3、亨廷顿蛋白、HFE蛋白、CFTR、共济蛋白、VMD2、血红蛋白、苯丙氨酸羟化酶、原纤蛋白、肌营养不良性肌强直蛋白激酶、木质素酰辅酶A连接酶、肌养蛋白、甲基CpG结合蛋白2、β血红蛋白、肌微管蛋白、组织蛋白酶A、因子IX、脂蛋白脂肪酶、β半乳糖苷酶、鸟氨酸转氨甲酰酶、艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶、酸-α葡糖苷酶、UDP-葡糖醛酸基转移酶1-1、GlcNAc-1-磷酸转移酶、GlcNAc-1-磷酸转移酶、黏脂蛋白-1(Mucolipin-1)、微粒体甘油三酯转移蛋白、鞘磷脂酶、酸性神经酰胺酶、溶酶体酸性脂肪酶、α-L-艾杜糖醛酸酶、乙酰肝素N-硫酸酯酶、α-N-乙酰葡糖胺糖苷酶、乙酰辅酶A α-氨基葡萄糖苷乙酰转移酶(acetyl-CoA alpha-glucosaminide acetyltransferase)、N-乙酰氨基葡萄糖6-硫酸酯酶、N-乙酰半乳糖胺-6硫酸酯酶、α-甘露糖苷酶、α-半乳糖苷酶A、囊性纤维化传导跨膜调节剂、和呼吸道蛋白质。

[0138] 作为另一些实例，治疗性蛋白质还包括与以下相关的蛋白质的功能形式：脂质和鞘脂降解障碍(例如，β-半乳糖苷酶-1、β-氨基己糖苷酶A、β-氨基己糖苷酶A和B、GM2激活蛋白、8-半乳糖苷酶A、葡糖脑苷脂酶、葡糖脑苷脂酶、葡糖脑苷脂酶、芳基硫酸酯酶A、半乳糖神经酰胺酶、鞘磷脂酶、鞘磷脂酶、NPC1、HE1蛋白(胆固醇运输缺陷)、酸性神经酰胺酶、溶酶体酸性脂肪酶)；黏多糖降解障碍(例如，L-艾杜糖醛酸酶、L-艾杜糖醛酸酶、L-艾杜糖醛酸酶、艾杜糖醛酸硫酸酯酶、乙酰肝素N-硫酸酯酶、N-乙酰葡糖胺糖苷酶、乙酰辅酶A-葡萄糖苷酶、乙酰转移酶、乙酰氨基葡萄糖6-硫酸酯酶、半乳糖胺-6硫酸酯酶、芳基硫酸酯酶B、葡糖醛酸酶)；糖蛋白降解障碍(例如，甘露糖苷酶、甘露糖苷酶、l-岩藻糖苷酶、天冬氨酰氨基葡糖苷酶、神经氨酸酶、溶酶体保护蛋白、溶酶体8-N-乙酰氨基半乳糖苷酶、溶酶体8-N-乙酰氨基半乳糖苷酶)；溶酶体贮积障碍(例如，棕榈酰蛋白硫酯酶(至少4个亚型)、溶酶体膜蛋白(未知)、葡萄糖6磷酸酶、葡萄糖6磷酸转位酶、酸性麦芽糖酶、脱支酶淀粉-1，6葡糖苷酶、N-乙酰氨基葡萄糖-1-磷酸转移酶、N-乙酰氨基葡萄糖-1-磷酸转移酶、神经节苷脂唾液酸酶(神经氨酸酶)、溶酶体胱氨酸转运蛋白、溶酶体胱氨酸转运蛋白、溶酶体胱氨酸转运蛋

白、唾液酸转运蛋白SaposinA、B、C、D)以及脑白质营养不良(例如,微粒体甘油三酯转移蛋白/载脂蛋白B、过氧化物酶体膜转移蛋白、Peroxin、天冬氨酸酰化酶、甾醇-27-羟化酶、蛋白脂质蛋白、ABC1转运蛋白、过氧化物酶体膜蛋白3或过氧化物酶体生物发生因子1、植酸氧化酶)。

[0139] 本文中提供的病毒转移载体可用于基因编辑。在这样的一些实施方案中,病毒转移载体的转基因是基因编辑转基因。这样的转基因编码基因编辑过程中涉及的试剂或组分。通常,这样的过程导致对基因组DNA的持久或永久修饰,例如靶向DNA插入、置换、诱变或去除。基因编辑可包括递送编码目的DNA序列的核酸,并使用内切核酸酶将目的序列插入基因组DNA的靶位点。因此,基因编辑转基因可包含编码用于插入的目的DNA序列的这些核酸。在一些实施方案中,用于插入的DNA序列是编码本文中提供的任一种治疗性蛋白质的DNA序列。作为替代或补充,基因编辑转基因可包含编码可单独或与其他组分组合进行基因编辑过程的一种或更多种组分的核酸。本文中提供的基因编辑转基因可编码内切核酸酶和/或指导RNA等。

[0140] 内切核酸酶可在基因组中的期望位置处在双链DNA中产生断裂,并使用宿主细胞的机制使用同源重组、非同源末端连接等修复断裂。可用于基因编辑的内切核酸酶种类包括不限于:大范围核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)、成簇规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)和归巢内切核酸酶。本文中提供的病毒转移载体的基因编辑转基因可编码本文中提供的任一种内切核酸酶。

[0141] 大范围核酸酶通常以其识别和切割DNA序列(约14至40个碱基对)的能力为特征。另外,可使用已知技术(例如诱变和高通量筛选和组合装配)来创建定制的大范围核酸酶,在此可将蛋白质亚基缔合或融合。大范围核酸酶的实例可见于美国专利No.8,802,437、8,445,251和8,338,157;以及美国公布No.20130224863、20110113509和20110033935,其大范围核酸酶通过引用并入本文。

[0142] 锌指核酸酶通常包含锌指结构域,其结合核酸分子内的特定靶位点;和核酸切割结构域,其在通过结合域结合的靶位点内或附近切割核酸分子。典型的经改造锌指核酸酶包含具有3至6个单独的锌指基序的结合域,和长度为9个碱基对至18个碱基对的结合靶位点。锌指核酸酶可设计成靶向给定核酸分子中的几乎任何期望序列以进行切割。例如,可以通过将已知特异性的单独的锌指基序组合来设计具有期望特异性的锌指结合域。与DNA结合的锌指蛋白Zif268的结构已为该领域的许多工作提供了信息,并且为64个可能的碱基对三联体中的每一个获取锌指并随后将这些模块化锌指进行混合和匹配以设计具有任何期望的序列特异性的蛋白质,这一构思已被描述(Pavletich NP,Pabo CO(1991年5月)."Zinc finger-DNA recognition:crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1A".Science 252(5007):809-17,其全部内容并入本文)。在一些实施方案中,采用细菌或噬菌体展示来开发识别期望的核酸序列(例如,期望的内切核酸酶靶位点)的锌指结构域。在一些实施方案中,锌指核酸酶包含通过接头(例如,多肽接头)彼此融合或以其他方式缀合的锌指结合域和切割结构域。接头的长度可确定切割与被锌指结构域结合的核酸序列的距离。锌指核酸酶的实例可见于美国专利No.8,956,828、8,921,112、8,846,578、8,569,253,其锌指核酸酶通过引用并入本文。

[0143] 转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)是通过将特定的DNA结合域与通用的DNA切

割结构域融合而产生的人工限制性酶。可设计成结合任何期望DNA序列的DNA结合域来自转录激活因子样(TAL)效应物,由感染植物的某些细菌分泌的DNA结合蛋白。转录激活因子样效应物(TALE)可改造成结合几乎任何DNA序列,或与DNA切割结构域组合在一起形成阵列。TALEN可类似地用于设计锌指核酸酶。TALENS的实例可见于美国专利No.8,697,853以及美国公布No.20150118216、20150079064和20140087426,其TALENS通过引用并入本文。

[0144] CRISPR(成簇规律间隔的短回文重复序列)/Cas系统也可用于基因编辑。在CRISPR/Cas系统中,指导RNA(gRNA)是基因组或游离基因编码的(例如在质粒上)。转录之后,gRNA与内切核酸酶(例如Cas9内切核酸酶)形成复合物。然后,通过gRNA的特异性确定序列(specificity determining sequence,SDS)将复合物引导至通常位于细胞基因组中的DNA靶序列。Cas9或Cas9内切核酸酶是指包含Cas9蛋白或其片段(例如,包含Cas9的活性或无活性DNA切割结构域或部分无活性DNA切割结构域(例如,Cas9切口酶)和/或Cas9的gRNA结合域的蛋白质)的RNA引导的内切核酸酶。Cas9识别CRISPR重复序列中的短基序(PAM或前间区序列邻近基序(protospacer adjacent motif))以帮助区分自身与非自身。Cas9内切核酸酶序列和结构是本领域技术人员公知的(参见,例如,"Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes."Ferretti J.J.,McShan W.M.,Ajdic D.J.,Savic D.J.,Savic G.,Lyon K.,Primeaux C.,Sezate S.,Suvorov A.N.,Kenton S.,Lai H.S.,Lin S.P.,Qian Y.,Jia H.G.,Najar F.Z.,Ren Q.,Zhu H.,Song L.展开/折叠作者列表McLaughlin R.E.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.98:4658-4663(2001);"CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III."Deltcheva E.,Chylinski K.,Sharma C.M.,Gonzales K.,Chao Y.,Pirzada Z.A.,Eckert M.R.,Vogel J.,Charpentier E.,Nature 471:602-607(2011);以及"A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity."Jinek M.,Chylinski K.,Fonfara I.,Hauer M.,Doudna J.A.,Charpentier E.Science 337:816-821(2012))。可对单指导RNA("sgRNA"或简称为"gNRA")进行改造以便将crRNA和tracrRNA二者的多个方面并入到单个RNA物种中。参见例如Jinek M.,Chylinski K.,Fonfara I.,Hauer M.,Doudna J.A.,Charpentier E.Science 337:816-821(2012)。

[0145] 已经在多个物种(包括但不限于酿脓链球菌(S.pyogenes)和嗜热链球菌(S.thermophilus))中描述了Cas9直系同源物。另外的合适的Cas9内切核酸酶和序列对本领域技术人员会是显而易见的,并且这样的Cas9内切核酸酶和序列包括来自Chylinski、Rhun和Charpentier,"The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems"(2013)RNA Biology 10:5,726-737中公开的生物体和基因座的Cas9序列。在一些实施方案中,基因编辑转基因编码野生型Cas9、片段或Cas9变体。"Cas9变体"是具有Cas9功能的任何蛋白质,其与自然界中存在的Cas9野生型内切核酸酶不同。在一些实施方案中,Cas9变体与野生型Cas9或其片段具有同源性。在一些实施方案中,Cas9变体与酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)或嗜热链球菌(S.thermophilus)Cas9蛋白具有至少40%序列同一性并保留Cas9功能性。优选地,序列同一性为至少90%、95%或更高。更优选地,序列同一性为至少98%或99%序列同一性。在用于本文中提供的任一种方法中的任一种Cas9变体的一些实施方案中,序列同一性是氨基酸序列同一性。Cas9变体还包括Cas9二聚体、Cas9融合蛋白、Cas9片段、最小化Cas9蛋白、没有切割结构域的Cas9变体、没有gRNA结

构域的Cas9变体、Cas9重组酶融合体、fCas9、FokI-dCas9等。这样的Cas9变体的实例可见于例如美国公布No.20150071898和20150071899，其对于Cas9蛋白和Cas9变体的描述通过引用并入本文。Cas9变体还包括Cas9切口酶，其包含使Cas9中的单个内切核酸酶结构域失活的突变。与双链断裂相反，这样的切口酶可诱导靶核酸中的单链断裂。Cas9变体还包括Cas9无效核酸酶，其中一个核酸酶结构域被突变灭活的一种Cas9变体。另外的Cas9变体和/或鉴别另外的Cas9变体的方法的实例可见于美国公布No.20140357523、20150165054和20150166980，其与Cas9蛋白、Cas9变体及其鉴定方法相关的内容通过引用并入本文。

[0146] Cas9变体的另一些实例包括仅具有切口酶活性的突变体形式，称为Cas9D10A。当基因座被成对的Cas9复合物(其设计成产生相邻DNA切口)靶向时，Cas9D10A在靶标特异性方面很有吸引力。Cas9变体的另一个实例是核酸酶缺陷型Cas9(dCas9)。HNH结构域中的H840A突变和RuvC结构域中的D10A突变使切割活性失活，但不阻止DNA结合。因此，该变体可用于序列特异性靶向基因组的任何区域而无需切割。相反，通过与多种效应物结构域融合，可将dCas9用作基因沉默或激活工具。在一些实施方案中，基因编辑转基因可编码本文中提供的任一种Cas9变体。

[0147] 使用RNA可编程内切核酸酶(例如Cas9)进行位点特异性切割(例如，以修饰基因组)的方法是本领域已知的(参见例如Cong,L.等Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.Science 339.819-823(2013);Mali,P.等RNA-guided human genome engineering via Cas9.Science 339,823-826(2013);Hwang,W.Y.等Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system.Nature biotechnology 31,227-229(2013);Jinek,M.等RNA-programmed genome editing in human cells.eLife 2,e00471(2013);Dicarlo,J.E.等Genome engineering in Saccharomyces cerevisiae using CRISPR-Cas systems.Nucleic acids research(2013);Jiang,W.等RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems.Nature biotechnology 31,233-239(2013))。

[0148] 归巢内切核酸酶可在数个或单个位置处催化用于合成它们的基因组DNA的水解，从而在宿主内水平传递其基因，提高其等位基因频率。归巢内切核酸酶通常具有长的识别序列，因此它们具有低的随机切割可能性。一个等位基因在传递之前携带该基因(归巢内切核酸酶基因+,HEG+)，而另一个则不携带(HEG-)，并且容易被酶切割。该酶一旦合成，就会破坏HEG-等位基因中的染色体，并利用包含内切核酸酶的基因的重组的、未受损的DNA等位基因HEG+引发细胞DNA修复系统的响应，该系统采取相反的模式。因此，该基因被复制到最初没有该基因的另一个等位基因，并连续传播。归巢内切核酸酶的实例可见于例如美国公布No.20150166969和美国专利No.9,005,973，其归巢内切核酸酶通过引用并入本文。

[0149] 本文中提供的病毒转移载体可用于基因表达调节。在这样的一些实施方案中，病毒转移载体的转基因是调节基因表达的转基因。这样的转基因编码可增强、抑制或调节一个或更多个内源基因的表达的基因表达调节剂。内源基因可编码本文中提供的任一种蛋白质，前提是该蛋白质是对象的内源性蛋白质。因此，该对象可以是患有本文中提供的任一种疾病或病症的对象，在该疾病或病症中通过基因表达调节将提供益处。

[0150] 基因表达调节剂包括DNA结合蛋白(例如，人工转录因子，例如美国公布No.20140296129的那些，其人工转录因子通过引用并入本文；以及美国公布

No.20030125286的转录沉默子蛋白NRF,其转录沉默子蛋白NRF通过引用并入本文)以及治疗性RNA。治疗性RNA包括但不限于:mRNA翻译抑制剂(反义)、RNA干扰剂(RNAi)、催化活性RNA分子(核酶)、转移RNA(tRNA)以及结合蛋白质和其他分子配体的RNA(适配体)。基因表达调节剂包括前述任何试剂并且包括反义核酸、RNAi分子(例如,双链RNA(dsRNA)、单链RNA(ssRNA)、微RNA(miRNA)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA))和三链体形成寡核苷酸(TFO)。基因表达调节剂还可包括任何前述RNA分子的经修饰形式,并因此包括经修饰mRNA,例如合成的经化学修饰RNA。

[0151] 基因表达调节剂可以是反义核酸。反义核酸可提供基因表达(例如,突变蛋白、显性活性基因产物、与毒性相关的蛋白质或被传染因子(例如病毒)引入到细胞中的基因产物的表达)的靶向抑制。因此,调节基因表达的病毒转移载体可用于治疗与显性负或功能获得性致病机制相关的疾病或病症、癌症或感染。本文中提供的任一种方法的对象可以是患有病毒感染、炎性病症、心血管疾病、癌症、遗传疾病或自身免疫病的对象。反义核酸还可干扰mRNA剪接机制并破坏正常细胞mRNA加工。因此,调节基因表达的转基因可编码与剪接体蛋白相互作用的元件。反义核酸(和相关构建体)的实例可见于例如美国公布No.20050020529和20050271733,其反义核酸和构建体通过引用并入本文。

[0152] 基因表达调节剂还可以是核酶(即,可切割其他RNA例如单链RNA的RNA分子)。这样的分子可改造成识别RNA分子中的特定核苷酸序列并对其进行切割(Cech,J.Amer.Med.Assn.,260:3030,1988)。例如,核酶可改造成使得仅使具有与包含核酶的构建体互补的序列的mRNA失活。核酶的类型以及如何制备相关构建体是本领域已知的(Hasselhoff等,Nature,334:585,1988;和美国公布No.20050020529,其与这样的核酶和方法相关的教导通过引用并入本文)。

[0153] 基因表达调节剂可以是干扰RNA(RNAi)。RNA干扰是指由干扰RNA介导的序列特异性转录后基因沉默的过程。通常,dsRNA的存在可触发RNAi响应。已经在多种系统中研究了RNAi。Fire等,1998,Nature,391,806,RNAi in C.elegans;Bahramian和Zarbl,1999,Molecular and Cellular Biology,19,274-283以及Wianny和Goetz,1999,Nature Cell Biol.,2,70,RNAi mediated by dsRNA in mammalian systems;Hammond等,2000,Nature,404,293,RNAi in Drosophila cells;Elbashir等,2001,Nature,411,494,RNAi induced by introduction of duplexes of synthetic 21-nucleotide RNAs in cultured mammalian cells。这样的工作以及其他工作已经提供了有关在RNAi分子构建中有用以介导RNAi活性的长度、结构、化学组成和序列的指导。多个出版物提供了可用作基因表达调节剂的RNAi分子的实例。这样的出版物包括美国专利No.8,993,530、8,877,917、8,293,719、7,947,659、7,919,473、7,790,878、7,737,265、7,592,322;以及美国公布No.20150197746、20140350071、20140315835、20130156845和20100267805,与RNAi分子类型及其产生相关的教导通过引用并入本文。

[0154] 适配体可结合多种蛋白质靶标并破坏那些蛋白质与其他蛋白质的相互作用。因此,基因表达调节剂可以是适配体,并且调节基因表达的转基因可编码这样的适配体。适配体可根据其通过特异性结合调节蛋白质的DNA结合位点来阻止基因转录的能力进行选择。PCT公布No.WO 98/29430和WO 00/20040提供了用于调节基因表达的适配体的实例;并且美国公布No.20060128649也提供了这样的适配体的实例,其各自的适配体均通过引用并入本

文。

[0155] 作为另一个实例,基因表达调节剂可以是三链体寡聚物。这样的分子可以使转录停滞。通常,这被称为三链体策略,因为寡聚物围绕双螺旋DNA缠绕,形成三链螺旋。这样的分子可设计成识别所选基因上的独特位点(Maher等,Antisense Res.and Dev.,1(3):227,1991;Helene,C.,Anticancer Drug Design,6(6):569,1991)。

[0156] 本文中提供的病毒转移载体也可用于外显子跳读。在这样的一些实施方案中,病毒转移载体的转基因是外显子跳读转基因。这样的转基因编码可产生外显子跳读的反义寡核苷酸或其他试剂。尽管存在基因突变,反义寡核苷酸仍可干扰外显子内的剪接位点或调控元件,导致截短的、部分功能的蛋白质。另外,反义寡核苷酸可以是突变特异性的,并与前信使RNA中的突变位点结合以诱导外显子跳读。用于外显子跳读的反义寡核苷酸在本领域中是已知的并且通常称为AON。这样的AON包括snRNA。反义寡核苷酸、其设计方法和相关制备方法的实例可见于例如美国公布No.20150225718、20150152415、20150140639、20150057330、20150045415、20140350076、20140350067和20140329762,其AON以及所描述的相关方法,例如设计和产生AON的方法,通过引用整体并入本文。

[0157] 本文中提供的任一种方法可用于在有此需要的对象的细胞中得到外显子跳读。该对象可患有其中外显子跳读会提供益处的任何疾病或病症,并且反义寡核苷酸可基于与这样的疾病或病症相关的适当蛋白质(其中在其表达过程中外显子跳读会是有益的)来设计。本文中提供了疾病和病症以及相关蛋白质的实例。在本文中提供的任一种方法或组合物的一些实施方案中,对象患有本文中所述的任一种营养不良,例如肌营养不良症(例如,迪谢内肌营养不良)。因此,在本文中提供的任一种方法或组合物的一些实施方案中,外显子跳读转基因编码反义寡核苷酸或其他试剂,其可导致与本文中还提供的任一种营养不良相关的本文中提供的任一种蛋白质中的外显子跳读。在本文中提供的任一种方法或组合物的一些实施方案中,反义寡核苷酸或其他试剂可导致肌养蛋白中的外显子跳读。

[0158] 转基因的序列还可包含表达控制序列。表达控制DNA序列包含启动子、增强子和操纵子,并且一般基于其中利用表达构建体的表达系统进行选择。在一些实施方案中,选择启动子和增强子序列用于提高基因表达的能力,同时可选择操纵子序列用于调节基因表达的能力。转基因还可包含有助于并优选地促进宿主细胞中同源重组的序列。转基因还可包含在宿主细胞中复制所必需的序列。

[0159] 示例性表达控制序列包括启动子序列,例如巨细胞病毒启动子;劳斯肉瘤病毒启动子;和猿猴病毒40启动子;以及在本文中其他地方公开或本领域中已知的任何其他类型的启动子。通常来说,启动子有效地连接编码期望表达产物的序列的上游(即,5′)。转基因还可包含可操作地连接编码序列的下游(即,3′)的合适的多腺苷酸化序列(例如,SV40或人生长激素基因多腺苷酸化序列)。

[0160] 病毒载体

[0161] 病毒已经进化出了专门的机制以将它们的基因组转运到它们所感染的细胞内;基于这样的病毒的病毒载体可以定制以转导用于特定应用的细胞。本文中提供的可使用的病毒载体的实例是本领域中已知的或记载于本文中。合适的病毒载体包括例如:逆转录病毒载体、慢病毒载体、基于单纯疱疹病毒(herpes simplex virus,HSV)的载体、基于腺病毒的载体、基于腺相关病毒(AAV)的载体和AAV-腺病毒嵌合载体。

[0162] 本文中提供的病毒转移载体可以基于逆转录病毒。逆转录病毒是能够感染多种宿主细胞的单链正义RNA病毒。感染之后，逆转录病毒基因组整合到其宿主细胞的基因组中，利用其自身的逆转录酶从其RNA基因组产生DNA。然后，病毒DNA与宿主细胞DNA一起复制，后者翻译并转录病毒和宿主基因。可以操作逆转录病毒载体以使病毒不能复制。因此，认为逆转录病毒载体特别可用于体内稳定的基因转移。逆转录病毒载体的实例可见于例如美国公布No.20120009161、20090118212和20090017543，病毒载体及其制备方法通过引用整体并入本文。

[0163] 慢病毒载体是可用于产生如本文中提供的病毒转移载体的逆转录病毒载体的实例。慢病毒具有感染非分裂细胞的能力，这是构成基因递送载体的更有效方法的一种特性(参见例如Durand等，Viruses.2011年2月;3(2):132-159)。慢病毒的实例包括:HIV(人)、猿猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency virus，SIV)、猫免疫缺陷病毒(feline immunodeficiency virus，FIV)、马感染性贫血病毒(equine infectious anemia virus，EIAV)和绵羊髓鞘脱落病毒(visna virus)(绵羊慢病毒)。与其他逆转录病毒不同，已知基于HIV的载体将其乘客基因(passenger gene)并入到非分裂细胞中。慢病毒载体的实例可见于例如美国公布No.20150224209、20150203870、20140335607、20140248306、20090148936和20080254008，病毒载体及其制备方法通过引用整体并入本文。

[0164] 基于单纯疱疹病毒(HSV)的病毒载体也适合于本文中提供的用途。许多复制缺陷型HSV载体包含缺失，以去除一个或更多个立即早期基因以阻止复制。疱疹载体的优势在于其进入潜伏期(可导致长期DNA表达)的能力，以及其大病毒DNA基因组(可容纳高至25kb的外源DNA)。对于基于HSV的载体的描述，参见例如美国专利No.5,837,532、5,846,782、5,849,572和5,804,413，以及国际专利申请WO 91/02788、WO 96/04394、WO 98/15637和WO 99/06583，其对病毒载体及其制备方法的描述通过引用整体并入。

[0165] 腺病毒(Ad)是非包膜病毒，其可将DNA在体内转移至多种不同的靶细胞类型。通过使病毒复制所需的选择基因缺失可以使病毒成为复制缺陷型。还经常使消耗性的非复制必需E3区缺失以允许为更大的DNA插入留出另外的空间。病毒转移载体可以基于腺病毒。腺病毒转移载体可以高滴度产生并且可将DNA有效地转移至复制和非复制细胞。与慢病毒不同，腺病毒DNA不会整合到基因组中，并因此不会在细胞分裂过程中复制，而是利用宿主的复制机制在宿主细胞的核中复制。

[0166] 可作为病毒转移载体基础的腺病毒可以来自任何来源、任何亚组、任何亚型、亚型混合物或任何血清型。例如，腺病毒可以是亚组A(例如，血清型12、18和31)、亚组B(例如，血清型3、7、11、14、16、21、34、35和50)、亚组C(例如，血清型1、2、5和6)、亚组D(例如，血清型8、9、10、13、15、17、19、20、22-30、32、33、36-39和42-48)、亚组E(例如，血清型4)、亚组F(例如，血清型40和41)、未分类的血清组(例如，血清型49和51)或任何其他腺病毒血清型。腺病毒血清型1至51可从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC，Manassas，Va.)获得。非组C腺病毒以及甚至非人腺病毒可用于制备复制缺陷型腺病毒载体。非组C腺病毒载体、产生非组C腺病毒载体的方法和使用非组C腺病毒载体的方法公开于例如，美国专利No.5,801,030、5,837,511和5,849,561，以及国际专利申请WO 97/12986和WO 98/53087。任何腺病毒、甚至嵌合腺病毒可以用作腺病毒载体的病毒基因组的来源。例如，人腺病毒可以用作复制缺陷型腺病毒载体的病毒基因组的来源。腺病毒载体的另一些

实例可见于美国公布No.20150093831、20140248305、20120283318、20100008889、20090175897和20090088398，其对病毒载体及其制备方法的描述通过引用整体并入。

[0167] 本文中提供的病毒转移载体还可以基于腺相关病毒(AAV)。AAV载体对于用于治疗应用(例如本文所述的那些)特别令人感兴趣。AAV是DNA病毒，已知其不会导致人疾病。通常，AAV需要与辅助病毒(例如，腺病毒或疱疹病毒)共感染，或表达辅助基因以用于有效复制。AAV具有在特定位点稳定感染宿主细胞基因组的能力，使其比逆转录病毒更容易预测；然而，一般来说，载体的克隆能力为4.9kb。已用于基因治疗应用的AAV载体通常已缺失了约96％的亲本基因组，因此仅保留了包含DNA复制和包装识别信号的末端重复序列(ITR)。对于基于AAV的载体的描述，参见例如美国专利No.8,679,837、8,637,255、8,409,842、7,803,622和7,790,449，以及美国公布No.20150065562、20140155469、20140037585、20130096182、20120100606和20070036757，其病毒载体和制备方法通过引用整体并入本文。AAV载体可以是重组AAV载体。AAV载体还可以是自互补(self-complementary，sc)AAV载体，其描述于例如美国专利公布2007/01110724和2004/0029106以及美国专利No.7,465,583和7,186,699，其载体和制备方法通过引入并入本文。

[0168] 作为病毒转移载体基础的腺相关病毒可以是任何血清型或血清型混合物。AAV血清型包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10和AAV11。例如，当病毒转移载体基于血清型的混合物时，病毒转移载体可包含取自一种AAV血清型(例如选自AAV血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10和11中的任一种)的衣壳信号序列和来自不同血清型(例如选自AAV血清型1、2、3、4、5、6、7、8、9、10和11中的任一种)的包装序列。因此，在本文中提供的任一种方法或组合物的一些实施方案中，AAV载体是AAV 2/8载体。在本文中提供的任一种方法或组合物的另一些实施方案中，AAV载体是AAV 2/5载体。

[0169] 本文中提供的病毒转移载体也可以基于甲病毒。甲病毒包括：辛德毕斯(Sindbis)(和VEEV)病毒、奥拉病毒(Aura virus)、巴班肯病毒(Babanki virus)、巴马森林病毒(Barmah Forest virus)、贝巴鲁病毒(Bebaru virus)、卡巴斯欧病毒(Cabassou virus)、基孔肯雅病毒(Chikungunya virus)、东部马脑炎病毒(Eastern equine encephalitis virus)、沼泽地病毒(Everglades virus)、摩根堡病毒(Fort Morgan virus)、盖塔病毒(Getah virus)、高地J病毒(Highlands J virus)、孜拉加奇病毒(Kyzylagach virus)、马亚罗病毒病毒(Mayaro virus)、Me Tri病毒(Me Tri virus)、米德尔堡病毒(Middelburg virus)、莫斯达斯佩德拉斯病毒(Mosso das Pedras virus)、穆坎布病毒(Mucambo virus)、恩杜穆病毒(Ndumu virus)、奥尼永尼永病毒(O′nyong-nyong virus)、那皮舒纳病毒(Pixuna virus)、里奥内格罗病毒(Rio Negro virus)、罗斯河病毒(Ross River virus)、鲑鱼胰腺病病毒(Salmon pancreas disease virus)、塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus)、南方象海豹病毒(Southern elephant seal virus)、图那特病毒(Tonate virus)、特罗卡拉病毒(Trocara virus)、乌纳病毒(Una virus)、委内瑞拉马脑炎病毒(Venezuelan equine encephalitis virus)、西部马脑炎病毒(Western equine encephalitis virus)和瓦塔罗阿病毒(Whataroa virus)。通常，这样的病毒的基因组编码可在宿主细胞的细胞质中翻译的非结构性(例如，复制子)和结构性蛋白质(例如，衣壳和包膜)。罗斯河病毒、辛德毕斯病毒(Sindbis virus)、塞姆利基森林病毒(SFV)和委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)已全部用于开发病毒转移载体以用于转基因递送。假型病毒(Pseudotyped

virus)可通过将甲病毒包膜糖蛋白和逆转录病毒衣壳组合而形成。甲病毒载体的实例可见于美国公布No.20150050243、20090305344和20060177819;载体及其制备方法通过引用整体并入本文。

[0170] 抗IgM剂

[0171] 抗IgM剂是减少IgM产生的任何试剂,例如IgM抗体。IgM抗体由B细胞产生。IgG抗体主要是响应于T细胞依赖性B细胞激活而产生,而IgM抗体主要是响应于T细胞非依赖性B细胞激活而产生,例如响应于病毒载体感染而产生。

[0172] 抗IgM剂包括但不限于与CD10、CD19、CD20、CD22、CD27、CD34、CD40、CD79a、CD79b、CD123、CD179b、FLT-3、ROR1、BR3、BAFF或B7RP-1特异性结合的IgM拮抗剂抗体或其抗原结合片段;IL21调节剂,例如IL-21和IL-21受体拮抗剂;酪氨酸激酶抑制剂,例如Syk抑制剂、BTK抑制剂、SRC蛋白酪氨酸激酶抑制剂;PI3K抑制剂;PKC抑制剂;APRIL拮抗剂,例如TACI-Ig;咪唑立宾;托法替尼;以及四环素。

[0173] IgM拮抗剂抗体

[0174] 在一些实施方案中,抗IgM剂是IgM拮抗剂抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗体靶向B细胞上的细胞表面分子,并且抗体的结合募集对象的免疫系统攻击并杀死B细胞。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与CD10、CD19、CD20、CD22、CD27、CD34、CD40、CD79a、CD79b、CD123、CD179b、FLT-3、ROR1、BR3、BAFF或B7RP-1特异性结合。

[0175] 在一些实施方案中,抗体是抗CD10抗体,例如特异性结合CD10的抗体。示例性的抗CD10抗体包括但不限于J5。在一些实施方案中,抗体是抗CD27抗体,例如特异性结合CD27的抗体。CD27是TNF受体超家族的成员。在一些实施方案中,抗体是抗CD34抗体,例如特异性结合CD34的抗体。在一些实施方案中,抗体是抗CD79a抗体,例如特异性结合CD79a的抗体。在一些实施方案中,抗体是抗CD79b抗体,例如特异性结合CD79b的抗体。示例性的抗CD79b抗体包括但不限于polatuzumab vedotin。在一些实施方案中,抗体是抗CD123抗体,例如特异性结合CD123的抗体。示例性的抗CD123抗体包括但不限于KHK2823和CSL362。在一些实施方案中,抗体是抗CD179b抗体,例如,特异性结合CD179b的抗体。在一些实施方案中,抗体是抗FLT-3抗体,例如特异性结合FLT-3的抗体。示例性的抗FLT-3抗体包括但不限于索拉非尼和奎扎替尼(quizartinib)。在一些实施方案中,抗体是抗ROR1抗体,例如特异性结合ROR1的抗体。示例性的抗ROR1抗体包括但不限于cirmtuzumab。在一些实施方案中,抗体是抗BR3抗体,例如特异性结合BR3的抗体。在一些实施方案中,抗体是抗B7RP-1抗体,例如,特异性结合B7RP-1的抗体。示例性的抗B7RP-1抗体包括但不限于普瑞鲁单抗(prezalumab)。

[0176] 在一些实施方案中,抗体是抗CD19抗体,例如特异性结合CD19的抗体。示例性的抗CD19抗体包括但不限于MOR00208(MorphoSysAG)。

[0177] 在一些实施方案中,抗体是抗CD20抗体,例如特异性结合CD20的抗体。示例性的抗CD20抗体包括但不限于利妥昔单抗、奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)、奥美珠单抗、奥法木单抗(ofatumumab)、碘131托西莫单抗(iodine 131 tositumomab)(Bexxar)、替伊莫单抗(ibritumomab)、透明质酸酶/利妥昔单抗和替伊莫单抗。

[0178] 在一些实施方案中,抗体是抗CD22抗体,例如特异性结合CD22的抗体。示例性的抗CD22抗体包括但不限于依帕珠单抗(epratuzumab)和moxetumomab。

[0179] 在一些实施方案中,抗体是抗CD40抗体,例如特异性结合CD40的抗体。示例性的抗

CD40抗体包括但不限于ABBV-927(Abbvie)和APX005M(Apexigen)。

[0180] 在一些实施方案中,抗体是抗BAFF抗体或其抗原结合片段。BAFF,B细胞活化因子(B淋巴细胞刺激物),是B细胞产生和维持的重要细胞因子。BAFF具有多种受体,这些受体在向不同种类B细胞传递信号中发挥作用,例如BAFF-R,其在早期B细胞稳态和T-reg功能以及B细胞成熟抗原(BCMA)中具有选择性并且是重要的,B细胞成熟抗原(BCMA)限于产生抗体的细胞并且对于浆细胞寿命是重要的。抗BAFF抗体(例如Belimumab)可包括特异性结合BAFF的试剂。抗BAFF抗体可干扰BAFF与其受体(例如BAFF-R和BCMA(B细胞成熟抗原))之间的相互作用。抗BAFF抗体可商购获得,并且本领域技术人员将能够确定某种试剂是否为抗BAFF抗体。本文中所述的或以其他方式已知的任一种抗BAFF抗体或其抗原结合片段可用于所提供的任一种方法中,或包含在所提供的任一种组合物或药盒中。

[0181] 在一些实施方案中,本文中所述的抗体或其抗原结合片段可结合其靶标并抑制至少50%(例如,60%、70%、80%、90%、95%或更高)的其靶标活性。本文中所述的任一种抗体或其抗原结合片段的抑制活性可通过本领域已知的常规方法,例如用ELISA来确定。此外,可通过多种方法包括平衡透析、平衡结合、凝胶过滤、ELISA、表面等离子体共振、或光谱学(例如,使用荧光测定)来确定结合亲和力(或结合特异性)。

[0182] 本文中使用的“抗体”是指包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。每条重链由重链可变区(本文中缩写为HCVR或VH)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3构成。每条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域CL构成。VH和VL区可进一步细分为被称为互补决定区(complementarity determining region,CDR)的高变区,其散布有被称为框架区(framework region,FR)的更保守的区域。每个VH和VL由从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0183] 本文中使用的抗体的“抗原结合片段”是指抗体的一个或更多个部分,其保留与抗原特异性结合的能力。抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段进行。包含在术语抗体的“抗原结合片段”内的结合片段的实例包括:(i)Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii)F(ab′)2片段,包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v)dAb片段(Ward等,(1989)Nature 341:544-546),其由VH结构域组成;以及(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域V和VH由独立的基因编码,但是其可使用重组方法通过合成接头连接,使得其能够作为单个蛋白质链制成,其中VL和VH区配对形成单价分子(称为单链Fv(single chain Fv,scFv);参见例如,Bird等(1988)Science 242:423-426;和Huston等(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。这样的单链抗体也旨在涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内。这些抗体片段是使用常规方法(例如蛋白水解片段化方法,如J.Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,第98-118页(N.Y.Academic Press 1983)中所述,其通过引用在此并入)以及通过本领域技术人员已知的其他技术获得的。可以以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。

[0184] 在本文中提供的任一种方法或组合物或药盒的一些实施方案中，抗体或其抗原结合片段可以是通过基于抗体或其抗原结合片段的经改造序列产生的那些。

[0185] 本文中所述的抗体的实例可商购获得，并且本领域技术人员将能够确定某种试剂是否是CD10、CD19、CD20、CD22、CD27、CD34、CD40、CD79a、CD79b、CD123、CD179b、FLT-3、ROR1、BR3、BAFF或B7RP-1抗体。本文中所述或以其他方式已知的任一种抗体或其抗原结合片段可用于所提供的任一种方法中，或包含在所提供的任一种组合物或药盒中。

[0186] 酪氨酸激酶抑制剂

[0187] 在一些实施方案中，抗IgM剂是酪氨酸激酶抑制剂，例如，syk抑制剂、BTK抑制剂、或SRC蛋白酪氨酸激酶抑制剂。

[0188] 在一些实施方案中，抗IgM剂是syk抑制剂。示例性的syk抑制剂包括但不限于：福他替尼(R788)、entospletinib(GS-9973)、赛度替尼(PRT062070)、TAK-659、entospletinib和尼伐地平。

[0189] 在一些实施方案中，抗IgM剂是BTK抑制剂。BTK抑制剂包括小分子BTK抑制剂、针对BTK的抗体以及降低BTK表达的RNAi抑制剂和反义寡聚物。示例性的BTK抑制剂包括但不限于依鲁替尼、AVL-292、CC-292、ONO-4059、ACP-196、PCI-32765、阿卡替尼、GS-4059、司培替尼、BGB-3111和HM71224。

[0190] 在一些实施方案中，抗IgM剂是SRC蛋白酪氨酸激酶抑制剂。SRC抑制剂包括小分子SRC抑制剂、针对SRC的抗体以及降低SRC表达的RNAi抑制剂和反义寡聚物。示例性的SRC蛋白酪氨酸激酶抑制剂包括但不限于达沙替尼。

[0191] 在一些实施方案中，抗IgM剂是抗BAFF剂。抗BAFF剂是指已知降低BAFF的产生、水平或活性的任何试剂、小分子、抗体、肽或核酸。在一些实施方案中，抗BAFF剂是本文中所述的抗BAFF抗体。示例性的抗BAFF剂包括但不限于TACI-Ig和可溶性BAFF受体。

[0192] 在一些实施方案中，抗IgM剂是PI3K抑制剂。PI3激酶包括但不限于：PIK3CA、PIK3CB、PIK3CG、PIK3CD、PIK3R1、PIK3R2、PIK3R3、PIK3R4、PIK3R5、PIK3R6、PIK3C2A、PIK3C2B、PIK3C2G和PIK3C3。PI3K抑制剂包括小分子PI3K抑制剂、针对PI3K的抗体以及降低PI3K表达的RNAi抑制剂和反义寡聚物。示例性的PI3K抑制剂包括但不限于：GS-1101、艾代拉利司、杜韦利西布、TGR-1202、AMG-319、库潘尼西、渥曼青霉素、LY294002、IC486068和IC87114(ICOS Corporation)和GDC-0941。

[0193] 在一些实施方案中，抗IgM剂是PKC抑制剂。PKC抑制剂包括小分子PKC抑制剂、针对PKC的抗体以及降低PKC表达的RNAi抑制剂和反义寡聚物。示例性的PKC抑制剂包括但不限于恩扎妥林。

[0194] 在一些实施方案中，抗IgM剂是APRIL拮抗剂。APRIL拮抗剂包括小分子APRIL抑制剂、针对APRIL的抗体以及降低APRIL表达的RNAi抑制剂和反义寡聚物。在一些实施方案中，APRIL拮抗剂是抗体。示例性的抗APRIL抗体包括但不限于BION-1301(Aduro Biotech，Inc.)。在一些实施方案中，抗IgM剂是TACI-Ig，阿塞西普(Atacicept)。

[0195] 在一些实施方案中，抗IgM剂是IL-21调节剂。示例性的IL-21抑制剂包括但不限于NNC0114(NovoNordisk)。在一些实施方案中，IL-21调节剂是IL-21受体拮抗剂。IL-21受体拮抗剂包括小分子IL-21受体抑制剂、针对IL-21受体的抗体以及降低IL-21受体表达的RNAi抑制剂和反义寡聚物。示例性的IL-21受体抑制剂包括但不限于ATR-107(Pfizer)。示

例性的IL-21拮抗剂包括但不限于NNC0114(NovoNordisk)。在一些实施方案中,抗IgM剂是IL-21受体拮抗剂。示例性的IL-21受体拮抗剂包括但不限于ATR-107(Pfizer)。

[0196] 在一些实施方案中,抗IgM剂是咪唑立宾。

[0197] 在一些实施方案中,抗IgM剂是托法替尼。

[0198] 在一些实施方案中,抗IgM剂是四环素。示例性的四环素包括但不限于:氯四环素、氧四环素、去甲基氯四环素、氢吡四环素、赖甲环素(limecycline)、氯莫环素、美他环素、多西环素、米诺环素和叔丁基甘氨酰氨基环素。

[0199] 包含免疫抑制剂的合成纳米载体

[0200] 根据本发明,可以使用广泛多种的其他合成纳米载体。在一些实施方案中,合成纳米载体是球体或球状体。在一些实施方案中,合成纳米载体是平的或片状的。在一些实施方案中,合成纳米载体是立方体或立方体的。在一些实施方案中,合成纳米载体是卵形体或椭圆形体。在一些实施方案中,合成纳米载体是圆柱体、锥体或棱锥形体。

[0201] 在一些实施方案中,期望使用在大小或形状方面相对均匀的合成纳米载体群体,使得每个合成纳米载体具有相似的特性。例如,基于合成纳米载体的总数,所提供的任一种组合物或方法的合成纳米载体的至少80%、至少90%或至少95%的最小尺寸或最大尺寸落在合成纳米载体的平均直径或平均尺寸的5%、10%或20%内。

[0202] 合成纳米载体可以是实心的或中空的,并且可包含一个或更多个层。在一些实施方案中,每个层相对于另外的层具有独特的组成和独特的特性。仅给出一个实例,合成纳米载体可具有核/壳结构,其中核是一个层(例如聚合物核),并且壳是第二层(例如脂质双层或单层)。合成纳米载体可包含多个不同的层。

[0203] 在一些实施方案中,合成纳米载体可任选地包含一种或更多种脂质。在一些实施方案中,合成纳米载体可包含脂质体。在一些实施方案中,合成纳米载体可包含脂质双层。在一些实施方案中,合成纳米载体可包含脂质单层。在一些实施方案中,合成纳米载体可包含胶束。在一些实施方案中,合成纳米载体可包含由脂质层(例如脂质双层、脂质单层等)包围的包含聚合物基质的核。在一些实施方案中,合成纳米载体可包含由脂质层(例如,脂质双层、脂质单层等)包围的非聚合物的核(例如,金属颗粒、量子点、陶瓷颗粒、骨颗粒、病毒颗粒、蛋白质、核酸、碳水化合物等)。

[0204] 在另一些实施方案中,合成纳米载体可包含金属颗粒、量子点、陶瓷颗粒等。在一些实施方案中,非聚合物合成纳米载体是非聚合物组分的聚集体,例如金属原子(例如金原子)的聚集体。

[0205] 在一些实施方案中,合成纳米载体可任选地包含一种或更多种两亲性实体。在一些实施方案中,两亲性实体可以促进具有提高的稳定性、改善的均一性或提高的黏度的合成纳米载体的产生。在一些实施方案中,两亲性实体可以与脂质膜(例如,脂质双层、脂质单层等)的内表面缔合。本领域中已知的许多两亲性实体适合用于制备根据本发明的合成纳米载体。这样的两亲性实体包括但不限于:磷酸甘油酯;磷脂酰胆碱;二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC);二油基磷脂酰乙醇胺(DOPE);二油基丙基三乙基铵(DOTMA);二油酰磷脂酰胆碱;胆固醇;胆固醇酯;二酰基甘油;琥珀酸二酰基甘油酯;二磷脂酰甘油(DPPG);己烷癸醇;脂肪醇例如聚乙二醇(PEG);聚氧乙烯-9-月桂醚;表面活性脂肪酸,例如棕榈酸或油酸;脂肪酸;脂肪酸单甘油酯;脂肪酸甘油二酯;脂肪酸酰胺;脱水山梨糖醇三油酸酯(Span®85)甘

胆酸盐;脱水山梨糖醇单月桂酸酯(Span®20);聚山梨酯20(Tween®20);聚山梨酯60(Tween®60);聚山梨酯65(Tween®65);聚山梨酯80(Tween®80);聚山梨酯85(Tween®85);聚氧乙烯单硬脂酸酯;表面活性素;泊洛沙姆;脱水山梨糖醇脂肪酸酯,例如脱水山梨醇三油酸酯;卵磷脂;溶血卵磷脂;磷脂酰丝氨酸;磷脂酰肌醇;鞘磷脂;磷脂酰乙醇胺(脑磷脂);心磷脂;磷脂酸;脑苷脂;磷酸二鲸蜡酯;二棕榈酰磷脂酰甘油;硬脂胺;十二烷基胺;十六烷基胺;乙酰棕榈酸酯;甘油蓖麻油酸酯;硬脂酸十六烷基酯;豆蔻酸异丙酯;泰洛沙泊;聚(乙二醇)5000-磷脂酰乙醇胺;聚(乙二醇)400单硬脂酸酯;磷脂;具有高表面活性剂性质的合成和/或天然洗涤剂;脱氧胆酸盐;环糊精;离液盐;离子配对剂;及其组合。两亲性实体组分可以是不同的两亲性实体的混合物。本领域技术人员将认识到,这是具有表面活性剂活性的物质的示例性而非全面的列举。任何两亲性实体均可用于产生根据本发明使用的合成纳米载体。

[0206] 在一些实施方案中,合成纳米载体可任选地包含一种或更多种碳水化合物。碳水化合物可以是天然的或合成的。碳水化合物可以是衍生化的天然碳水化合物。在某些实施方案中,碳水化合物包括单糖或二糖,其包括但不限于:葡萄糖、果糖、半乳糖、核糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、海藻糖、纤维二糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖、葡糖醛酸、半乳糖醛酸、甘露糖醛酸、葡糖胺、半乳糖胺和神经氨酸。在某些实施方案中,碳水化合物是多糖,其包括但不限于:短梗霉聚糖(pullulan)、纤维素、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟基纤维素(HC)、甲基纤维素(MC)、葡聚糖、环葡聚糖、糖原、羟乙基淀粉、角叉菜胶、糖基(glycon)、直链淀粉(amylose)、壳聚糖、N,O-羧甲基壳聚糖、藻胶和藻酸、淀粉、壳多糖、菊粉、魔芋、葡甘露聚糖、石耳葡聚糖、肝素、透明质酸、凝胶多糖和黄原胶。在一些实施方案中,合成纳米载体不包含(或特别排除)碳水化合物,例如多糖。在某些实施方案中,碳水化合物可包括碳水化合物衍生物,例如糖醇,其包括但不限于:甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇和乳糖醇。

[0207] 在一些实施方案中,合成纳米载体可包含一种或更多种聚合物。在一些实施方案中,合成纳米载体包含为非甲氧基封端的普朗尼克聚合物的一种或更多种聚合物。在一些实施方案中,构成合成纳米载体的聚合物的至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或99%(重量/重量)是非甲氧基封端的普朗尼克聚合物。在一些实施方案中,构成合成纳米载体的所有聚合物是非甲氧基封端的普朗尼克聚合物。在一些实施方案中,合成纳米载体包含为非甲氧基封端的聚合物的一种或更多种聚合物。在一些实施方案中,构成合成纳米载体的聚合物的至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或99%(重量/重量)是非甲氧基封端的聚合物。在一些实施方案中,构成合成纳米载体的所有聚合物是非甲氧基封端的聚合物。在一些实施方案中,合成纳米载体包含不含普朗尼克聚合物的一种或更多种聚合物。在一些实施方案中,构成合成纳米载体的聚合物的至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或99%(重量/重量)不包含普朗尼克聚合物。在一些实施方案中,构成合成纳米载体的所有聚合物不包含普朗尼克聚合物。在一些实施方案中,这样的聚

合物可以被涂层(例如脂质体、脂质单层、胶束等)包围。在一些实施方案中,合成纳米载体的要素可以与聚合物连接。

[0208] 可以通过多种方法中的任一种将免疫抑制剂与合成纳米载体偶联。通常来说,连接可以是免疫抑制剂与合成纳米载体之间结合的结果。这种结合可导致免疫抑制剂与合成纳米载体的表面连接和/或被包含(包封)在合成纳米载体内。然而,在一些实施方案中,由于合成纳米载体的结构,免疫抑制剂被合成纳米载体包封,而不是与合成纳米载体结合。在一些优选的实施方案中,合成纳米载体包含本文中提供的聚合物,并且免疫抑制剂与聚合物连接。

[0209] 当由于免疫抑制剂和合成纳米载体之间的结合而发生连接时,连接可通过偶联部分来发生。偶联部分可以是免疫抑制剂通过其与合成纳米载体结合的任何部分。这样的部分包括使免疫抑制剂与合成纳米载体(共价或非共价地)结合的共价键(例如酰胺键或酯键)以及单独分子。这样的分子包括接头或聚合物或其单元。例如,偶联部分可以包含免疫抑制剂与其静电结合的带电聚合物。作为另一个实例,偶联部分可以包含与其共价结合的聚合物或其单元。

[0210] 在一些优选的实施方案中,合成纳米载体包含本文中提供的聚合物。这些合成纳米载体可以是完全聚合物,或者其可以是聚合物与其他物质的混合物。

[0211] 在一些实施方案中,合成纳米载体的聚合物缔合以形成聚合物基质。在这些实施方案的一些中,组分(例如免疫抑制剂)可以与聚合物基质的一种或更多种聚合物共价缔合。在一些实施方案中,共价缔合由接头介导。在一些实施方案中,组分可以与聚合物基质的一种或更多种聚合物非共价缔合。例如,在一些实施方案中,组分可以包封在聚合物基质内、被聚合物基质包围和/或分散在整个聚合物基质中。作为替代或补充,组分可通过疏水相互作用、电荷相互作用、范德华力等与聚合物基质中的一种或更多种聚合物缔合。用于由此形成聚合物基质的广泛多种的聚合物和方法是常规已知的。

[0212] 聚合物可以是天然或非天然(合成)聚合物。聚合物可以是均聚物或包含两种或更多种单体的共聚物。就序列而言,共聚物可以是随机的、嵌段的、或包含随机和嵌段序列的组合。通常来说,根据本发明的聚合物是有机聚合物。

[0213] 在一些实施方案中,聚合物包含聚酯、聚碳酸酯、聚酰胺、或聚醚、或其单元。在另一些实施方案中,聚合物包含聚(乙二醇)(PEG)、聚丙二醇、聚(乳酸)、聚(乙醇酸)、聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、或聚己内酯、或其单元。在一些实施方案中,优选地,聚合物是生物可降解的。因此,在这些实施方案中,优选地,如果聚合物包含聚醚,例如聚(乙二醇)或聚丙二醇或其单元,则聚合物包含聚醚和生物可降解聚合物的嵌段共聚物,使得聚合物是生物可降解的。在另一些实施方案中,聚合物不仅仅包含聚醚或其单元,例如聚(乙二醇)或聚丙二醇或其单元。

[0214] 适用于本发明的聚合物的其他实例包括但不限于:聚乙烯、聚碳酸酯(例如聚(1,3-二氧六环-2酮))、聚酸酐(例如聚(癸二酸酐))、聚富马酸丙酯(polypropylfumerate)、聚酰胺(例如聚己内酰胺)、聚缩醛、聚醚、聚酯(例如,聚丙交酯、聚乙交酯、聚丙交酯-乙交酯共聚物、聚己内酯、聚羟基酸(例如聚(β-羟基链烷酸酯)))、聚(原酸酯)、聚氰基丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯、和聚胺、聚赖氨酸、聚赖氨酸-PEG共聚物和聚(乙烯亚胺)、聚(乙烯亚胺)-PEG共聚物。

[0215] 在一些实施方案中，根据本发明的聚合物包含已由美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration，FDA)根据21C.F.R.§177.2600批准用于人的聚合物，包括但不限于：聚酯(例如，聚乳酸、聚(乳酸-乙醇酸)共聚物、聚己内酯、聚戊内酯、聚(1，3-二氧六环-2酮))；聚酸酐(例如，聚(癸二酸酐))；聚醚(例如，聚乙二醇)；聚氨酯；聚甲基丙烯酸酯；聚丙烯酸酯；和聚氰基丙烯酸酯。

[0216] 在一些实施方案中，聚合物可以是亲水的。例如，聚合物可包含阴离子基团(例如磷酸根基团、硫酸根基团、羧酸根基团)；阳离子基团(例如季铵基团)；或极性基团(例如，羟基、巯基、胺基)。在一些实施方案中，包含亲水性聚合物基质的合成纳米载体在合成纳米载体内产生亲水性环境。在一些实施方案中，聚合物可以是疏水性的。在一些实施方案中，包含疏水性聚合物基质的合成纳米载体在合成纳米载体内产生疏水性环境。聚合物的亲水性或疏水性的选择可对并入合成纳米载体内的物质的性质产生影响。

[0217] 在一些实施方案中，聚合物可用一个或更多个部分和/或官能团进行修饰。根据本发明可使用多种部分或官能团。在一些实施方案中，聚合物可用聚乙二醇(PEG)、用碳水化合物和/或用衍生自多糖的非环状聚缩醛进行修饰(Papisov，2001，ACS Symposium Series，786:301)。某些实施方案可使用Gref等的美国专利No.5543158或von Andrian等的WO公布WO 2009/051837的一般教导来进行。

[0218] 在一些实施方案中，聚合物可以用脂质或脂肪酸基团修饰。在一些实施方案中，脂肪酸基团可以是丁酸、己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山嵛酸或木蜡酸中的一种或更多种。在一些实施方案中，脂肪酸基团可以是棕榈油酸、油酸、反型异油酸、亚油酸、α-亚油酸、γ-亚油酸、花生四烯酸、鳕油酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸或芥酸中的一种或更多种。

[0219] 在一些实施方案中，聚合物可以是聚酯，包括：包含乳酸和乙醇酸单元的共聚物，例如聚(乳酸-乙醇酸)共聚物和聚(丙交酯-乙交酯)共聚物，在本文中统称为“PLGA”；和包含乙醇酸单元的均聚物，在本文中称为“PGA”，以及包含乳酸单元的均聚物，例如聚-L-乳酸、聚-D-乳酸、聚-D，L-乳酸、聚-L-丙交酯、聚-D-丙交酯和聚-D，L-丙交酯，在本文中统称为“PLA”。在一些实施方案中，示例性聚酯包括例如：聚羟基酸；PEG共聚物以及丙交酯和乙交酯的共聚物(例如PLA-PEG共聚物、PGA-PEG共聚物、PLGA-PEG共聚物)及其衍生物。在一些实施方案中，聚酯包括例如：聚(己内酯)、聚(己内酯)-PEG共聚物、聚(L-丙交酯-L-赖氨酸)共聚物、聚(丝氨酸酯)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)、聚[α-(4-氨基丁基)-L-乙醇酸]及其衍生物。

[0220] 在一些实施方案中，聚酯可以是PLGA。PLGA是乳酸和乙醇酸的生物相容性和生物可降解的共聚物，并且多种形式的PLGA特征在于乳酸：乙醇酸的比例。乳酸可以是L-乳酸、D-乳酸或D，L-乳酸。PLGA的降解速率可以通过改变乳酸：乙醇酸的比例来调节。在一些实施方案中，根据本发明待使用的PLGA特征在于约85:15、约75:25、约60:40、约50:50、约40:60、约25:75或约15:85的乳酸：乙醇酸比例。

[0221] 在一些实施方案中，聚合物可以是一种或更多种丙烯酸类聚合物。在某些实施方案中，丙烯酸类聚合物包括例如：丙烯酸和甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯共聚物、甲基丙烯酸乙氧基乙酯、甲基丙烯酸氰基乙酯、甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、甲基丙烯酸烷基酰胺共聚物、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸酐)、

甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸酯、聚(甲基丙烯酸甲酯)共聚物、聚丙烯酰胺、甲基丙烯酸氨基烷基酯共聚物、甲基丙烯酸缩水甘油酯共聚物、聚氰基丙烯酸酯,以及包含一种或更多种前述聚合物的组合。丙烯酸聚合物可以包括具有低含量的季铵基团的丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯的完全聚合的共聚物。

[0222] 在一些实施方案中,聚合物可以是阳离子聚合物。通常来说,阳离子聚合物能够缩合和/或保护核酸的带负电荷的链。含胺聚合物例如聚(赖氨酸)(Zauner等,1998,Adv.Drug Del.Rev.,30:97;和Kabanov等,1995,Bioconjugate Chem.,6:7)、聚(乙烯亚胺)(PEI;Boussif等,1995,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,1995,92:7297)和聚(酰氨基胺)树枝状聚合物(Kukowska-Latallo等,1996,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,93:4897;Tang等,1996,Bioconjugate Chem.,7:703;和Haensler等,1993,Bioconjugate Chem.,4:372)在生理pH下带正电荷,与核酸形成离子对。在一些实施方案中,合成纳米载体可不包含(或可排除)阳离子聚合物。

[0223] 在一些实施方案中,聚合物可以是带有阳离子侧链的可降解聚酯(Putnam等,1999,Macromolecules,32:3658;Barrera等,1993,J.Am.Chem.Soc.,115:11010;Kwon等,1989,Macromolecules,22:3250;Lim等,1999,J.Am.Chem.Soc.,121:5633;和Zhou等,1990,Macromolecules,23:3399)。这些聚酯的实例包括:聚(L-丙交酯-L-赖氨酸)共聚物(Barrera等,1993,J.Am.Chem.Soc.,115:11010)、聚(丝氨酸酯)(Zhou等,1990,Macromolecules,23:3399)、聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(Putnam等,1999,Macromolecules,32:3658;和Lim等,1999,J.Am.Chem.Soc.,121:5633)和聚(4-羟基-L-脯氨酸酯)(Putnam等,1999,Macromolecules,32:3658;和Lim等,1999,J.Am.Chem.Soc.,121:5633)。

[0224] 这些和其他聚合物的特性及其制备方法是本领域中公知的(参见例如美国专利6,123,727;5,804,178;5,770,417;5,736,372;5,716,404;6,095,148;5,837,752;5,902,599;5,696,175;5,514,378;5,512,600;5,399,665;5,019,379;5,010,167;4,806,621;4,638,045和4,946,929;Wang等,2001,J.Am.Chem.Soc.,123:9480;Lim等,2001,J.Am.Chem.Soc.,123:2460;Langer,2000,Acc.Chem.Res.,33:94;Langer,1999,J.Control.Release,62:7;和Uhrich等,1999,Chem.Rev.,99:3181)。更一般地,用于合成某些合适聚合物的多种方法描述于Concise Encyclopedia of Polymer Science and Polymeric Amines and Ammonium Salts,由Goethals编辑,Pergamon Press,1980;Odian,John Wiley&Sons的Principles of Polymerization,第四版,2004;Allcock等的Contemporary Polymer Chemistry,Prentice-Hall,1981;Deming等,1997,Nature,390:386;以及美国专利6,506,577、6,632,922、6,686,446和6,818,732中。

[0225] 在一些实施方案中,聚合物可以是直链或支链聚合物。在一些实施方案中,聚合物可以是树枝状聚合物。在一些实施方案中,聚合物可以基本上彼此交联。在一些实施方案中,聚合物可以基本上不交联。在一些实施方案中,聚合物可以无需进行交联步骤来根据本发明使用。还应理解,合成纳米载体可包含前述任一种嵌段共聚物、接枝共聚物、共混物、混合物和/或加合物以及其他聚合物。本领域技术人员将认识到,本文中列出的聚合物代表可根据本发明使用的聚合物的示例性而非全面的列举。

[0226] 在一些实施方案中,合成纳米载体不包含聚合物组分。在一些实施方案中,合成纳米载体可包含金属颗粒、量子点、陶瓷颗粒等。在一些实施方案中,非聚合物合成纳米载体

是非聚合物组分的聚集体,例如金属原子(例如金原子)的聚集体。

[0227] 在一些实施方案中,如本文中提供的任何免疫抑制剂可与合成纳米载体偶联。免疫抑制剂包括但不限于:他汀类;mTOR抑制剂,例如雷帕霉素或雷帕霉素类似物("rapalog");TGF-β信号传导剂;TGF-β受体激动剂;组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂;皮质类固醇;线粒体功能抑制剂,例如鱼藤酮;P38抑制剂;NF-κB抑制剂;腺苷受体激动剂;前列腺素E2激动剂;磷酸二酯酶抑制剂,例如磷酸二酯酶4抑制剂;蛋白酶体抑制剂;激酶抑制剂;G蛋白偶联受体激动剂;G蛋白偶联受体拮抗剂;糖皮质激素;类视黄醇;细胞因子抑制剂;细胞因子受体抑制剂;细胞因子受体激活剂;过氧化物酶体增殖物激活受体拮抗剂;过氧化物酶体增殖物激活受体激动剂;组蛋白脱乙酰酶抑制剂;钙调磷酸酶抑制剂;磷酸酶抑制剂和氧化的ATP。免疫抑制剂还包括:IDO、维生素D3、环孢素A、芳烃受体抑制剂、白藜芦醇、硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、阿司匹林、尼氟酸、雌三醇、雷公藤甲素(tripolide)、白介素(例如IL-1、IL-10)、环孢素A、靶向细胞因子或细胞因子受体的siRNA等。

[0228] mTOR抑制剂的实例包括:雷帕霉素及其类似物(例如,CCL-779、RAD001、AP23573、C20-甲代烯丙基雷帕霉素(C20-Marap)、C16-(S)-丁基磺酰氨基雷帕霉素(C16-BSrap)、C16-(S)-3-甲基吲哚雷帕霉素(C16-iRap)(Bayle等Chemistry&Biology 2006,13:99-107))、AZD8055、BEZ235(NVP-BEZ235)、大黄根酸(大黄酚)、地磷莫司(MK-8669)、依维莫司(RAD0001)、KU-0063794、PI-103、PP242、替西罗莫司和WYE-354(可从Selleck,Houston,TX,USA获得)。

[0229] NF(例如NK-κβ)抑制剂的实例包括:IFRD1、2-(1,8-萘啶-2-基)-苯酚、5-氨基水杨酸、BAY 11-7082、BAY 11-7085、CAPE(咖啡酸苯乙酯)、马来酸二乙酯、IKK-2抑制剂IV、IMD0354、乳胞素、MG-132[Z-Leu-Leu-Leu-CHO]、NFκB激活抑制剂III、NF-κB激活抑制剂II、JSH-23、小白菊内酯(parthenolide)、苯基胂氧化物(PAO)、PPM-18、吡咯烷二硫代氨基甲酸铵盐、QNZ、RO 106-9920、楝酰胺(rocaglamide)、楝酰胺AL、楝酰胺C、楝酰胺I、楝酰胺J、洛克米兰醇(rocaglaol)、(R)-MG-132、水杨酸钠、雷公藤内酯(PG490)和蟛蜞菊内酯(vedelolactone)。

[0230] 本文中使用的"雷帕霉素类似物"是指在结构上与雷帕霉素(西罗莫司)(的类似物)相关的分子。雷帕霉素类似物的实例包括但不限于:坦罗莫司(CCI-779)、依维莫司(RAD001)、地磷莫司(AP-23573)和佐他莫司(ABT-578)。雷帕霉素类似物的一些另外的实例可见于例如WO公布WO 1998/002441和美国专利No.8,455,510,其雷帕霉素类似物通过引用整体并入本文。

[0231] 另外的免疫抑制剂是本领域技术人员已知的,并且本发明不限于此方面。在所提供的任一种方法、组合物或药盒的一些实施方案中,免疫抑制剂可包含如本文中提供的任一种试剂。

[0232] 根据本发明的组合物可包含可药用赋形剂,例如防腐剂、缓冲剂、盐水或磷酸缓冲盐水。可使用常规药物制造和复配技术制备组合物以获得可用的剂型。在一个实施方案中,将组合物与防腐剂一起悬浮在无菌注射用盐水溶液中。

[0233] D.使用和制备组合物的方法

[0234] 可以用本领域普通技术人员已知或本文中其他地方描述的方法制备病毒转移载体。例如,可以使用例如在美国专利No.4,797,368和Laughlin等,Gene,23,65-73(1983)中

所述的方法来构建和/或纯化病毒转移载体。

[0235] 例如,可以在补充细胞系(complementing cell line)中以适当的水平产生复制缺陷型腺病毒载体,所述补充细胞系提供不存在于复制缺陷型腺病毒载体中但为病毒繁殖所需的基因功能,从而产生高滴度的病毒转移载体储液。补充细胞系可补充由早期区、晚期区、病毒包装区、病毒相关RNA区或其组合编码的至少一种复制必需基因功能的缺陷,包括所有腺病毒功能(例如,以使腺病毒扩增子能够增殖)。补充细胞系的构建涉及标准分子生物学和细胞培养技术,例如以下中所述的那些:Sambrook等,Molecular Cloning,a Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989),和Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons,New York,N.Y.(1994)。

[0236] 用于产生腺病毒载体的补充细胞系包括但不限于:293细胞(描述于例如Graham等,J.Gen.Virol.,36,59-72(1977))、PER.C6细胞(描述于例如国际专利申请WO 97/00326以及美国专利No.5,994,128和6,033,908)和293-ORF6细胞(描述于例如国际专利申请WO 95/34671和Brough等,J.Virol.,71,9206-9213(1997))。在一些情况下,补充细胞不会补充所有需要的腺病毒基因功能。可使用辅助病毒以提供不由细胞或腺病毒基因组编码的反式基因功能,以使得能够复制腺病毒载体。可以使用由例如以下中所述的材料和方法来构建、扩增和/或纯化腺病毒载体:美国专利No.5,965,358、5,994,128、6,033,908、6,168,941、6,329,200、6,383,795、6,440,728、6,447,995和6,475,757,美国专利申请公布No.2002/0034735 A1,以及国际专利申请WO 98/53087、WO 98/56937、WO 99/15686、WO 99/54441、WO 00/12765、WO 01/77304和WO 02/29388,以及本文中确定的其他参考文献。可以使用例如美国专利No.5,837,511和5,849,561以及国际专利申请WO 97/12986和WO 98/53087中所述的方法来产生非组C腺病毒载体(包括腺病毒血清型35载体)。

[0237] 可以使用重组方法产生AAV载体。通常来说,该方法包括培养宿主细胞,该宿主细胞包含编码AAV衣壳蛋白或其片段的核酸序列;功能性rep基因;由AAV末端反向重复序列(ITR)和转基因构成的重组AAV载体;和足够的辅助功能,以允许将重组AAV载体包装到AAV衣壳蛋白中。在一些实施方案中,病毒转移载体可以包含选自以下的AAV血清型的末端反向重复序列(ITR):AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV6.2、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11及其变体。

[0238] 待在宿主细胞中培养以在AAV衣壳中包装rAAV载体的组分可以反式提供给宿主细胞。或者,可以由稳定的宿主细胞提供任一种或更多种所需的组分(例如,重组AAV载体、rep序列、cap序列和/或辅助功能),所述稳定宿主细胞已使用本领域技术人员已知的方法被工程化以包含一种或更多种所需组分。最合适地,这样的稳定的宿主细胞可包含在诱导型启动子的控制下的所需组分。然而,所需组分也可以在组成型启动子的控制下。可以使用任何合适的遗传元件来将产生本发明的rAAV所需的重组AAV载体、rep序列、cap序列和辅助功能递送到包装宿主细胞。所选择的遗传元件可以通过任何合适的方法(包括本文中所述的那些)递送。用来构建本发明任何实施方案的方法对于核酸操作技术人员是已知的,并且包括遗传工程、重组工程和合成技术。参见例如,Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y。类似地,产生rAAV病毒粒子的方法是公知的,并且合适方法的选择不是对本发明的限制。参见例如,K.Fisher等,J.Virol.,70:520-532(1993)和美国专利No.5,478,745。

[0239] 在一些实施方案中，可以使用三重转染方法(例如，如美国专利No.6,001,650中详细描述的，其涉及三重转染方法的内容通过引用并入本文)来产生重组AAV载体。通常来说，通过用待包装入AAV颗粒的重组AAV载体(包含转基因)、AAV辅助功能载体和附属功能载体转染宿主细胞来产生重组AAV。一般来说，AAV辅助功能载体编码AAV辅助功能序列(rep和cap)，其反式地作用于多产的AAV复制和衣壳化。优选地，AAV辅助功能载体支持高效的AAV载体产生，而不产生任何可检出的野生型AAV病毒粒子(即，包含功能rep和cap基因的AAV病毒粒子)。附属功能载体可以编码用于非AAV来源的病毒和/或细胞功能的核苷酸序列，AAV依赖于所述功能进行复制。附属功能包括AAV复制所需的那些功能，包括但不限于参与AAV基因转录激活、阶段特异性AAV mRNA剪接、AAV DNA复制、cap表达产物的合成和AAV衣壳组装的那些部分。基于病毒的附属功能可以来源于任何已知的辅助病毒，例如腺病毒、疱疹病毒(除了单纯疱疹病毒1型)和痘苗病毒。

[0240] 可以使用本领域已知的许多方法中的任一种来产生慢病毒载体。慢病毒载体和/或其制备方法的实例可见于例如美国公布No.20150224209、20150203870、20140335607、20140248306、20090148936和20080254008，这样的慢病毒载体和制备方法通过引用并入本文。例如，当慢病毒载体不具有整合能力时，慢病毒基因组还包含复制起点(ori)，其序列取决于在其中必须表达慢病毒基因组的细胞的性质。所述复制起点可以来自真核起源，优选哺乳动物起源，最优选人起源。由于慢病毒基因组没有整合到细胞宿主基因组中(由于整合酶缺陷)，因此慢病毒基因组可能会在经历频繁细胞分裂的细胞中丢失；在免疫细胞(例如B或T细胞)中尤其如此。在一些情况下，复制起点的存在可能是有益的。在通过所述质粒或通过其他方法转染合适的细胞(例如293T细胞)之后，可以产生载体颗粒。在用于表达慢病毒颗粒的细胞中，所有或一些质粒可用于稳定表达其编码多核苷酸，或瞬时或半稳定表达其编码多核苷酸。

[0241] 用于产生如本文中提供的其他病毒载体的方法是本领域已知的，并且可与以上示例性方法相似。此外，病毒载体可商购获得。

[0242] 在一些实施方案中，当制备包含免疫抑制剂的某些合成纳米载体时，用于将免疫抑制剂连接至合成纳米载体的方法可能是有用的。

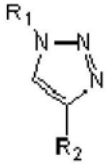
[0243] 在某些实施方案中，连接可以是共价接头。在一些实施方案中，根据本发明的免疫抑制剂可以通过由叠氮化物基团与包含炔基团的免疫抑制剂的1,3-偶极环加成反应或通过炔与包含叠氮化物基团的免疫抑制剂的1,3-偶极环加成反应所形成的1,2,3-三唑接头共价连接至外表面。这样的环加成反应优选在Cu(I)催化剂以及合适的Cu(I)-配体和还原剂的存在下进行以将Cu(II)化合物还原为催化活性Cu(I)化合物。这种Cu(I)催化的叠氮化物-炔环加成(Cu(I)-catalyzed azide-alkVne cycloaddition,CuAAC)也可以称为点击反应。

[0244] 另外，共价偶联可包含共价接头，包括酰胺接头、二硫接头、硫醚接头、腙接头、酰肼接头、亚胺或肟接头、脲或硫脲接头、脒接头、胺接头和磺酰胺接头。

[0245] 酰胺接头通过一种组分(例如免疫抑制剂)上的胺与第二组分(例如纳米载体)上的羧酸基团之间的酰胺键来形成。接头中的酰胺键可以使用任何常规的酰胺键形成反应用适当保护的氨基酸和活化羧酸(例如N-羟基琥珀酰亚胺活化的酯)来制备。

[0246] 二硫接头通过在例如R1-S-S-R2形式的两个硫原子之间形成二硫(S-S)键来制备。

二硫键可以通过包含巯基/硫醇基团(-SH)的组分与另一活化的巯基或者包含巯基/硫醇基团的组分与包含活化巯基的组分的巯基交换而形成。

[0247] 三唑接头(特别是其中R1和R2可以是任何化学实体的形式的1,2,3-三唑)通过连接到第一组分的叠氮化物与连接到第二组分(例如免疫抑制剂)的末端炔的1,3-偶极环加成反应来制备。1,3-偶极环加成反应在具有或不具有催化剂下(优选具有Cu(I)-催化剂下)进行,其通过1,2,3-三唑官能团连接两种组分。该化学由Sharpless等,Angew.Chem.Int.Ed.41(14),2596,(2002)和Meldal等,Chem.Rev.,2008,108(8),2952-3015详细描述,并且通常被称为“点击”反应或CuAAC。

[0248] 硫醚接头通过形成例如R1-S-R2形式的硫-碳(硫醚)键来制备。硫醚可以通过用第二组分上的烷基化基团(例如卤化物或环氧化物)使一种组分上的巯基/硫醇(-SH)基团烷基化来制备。硫醚接头也可以通过一种组分上的巯基/硫醇基团与包含作为迈克尔受体的马来酰亚胺基团或乙烯基砜基团的第二组分上的缺电子烯基团的迈克尔加成(Michael addition)形成。在另一种方式中,硫醚接头可以通过一种组分上的巯基/硫醇基团与第二组分上的烯基的自由基巯基-烯反应来制备。

[0249] 腙接头通过一种组分上的酰肼基团与第二组分上的醛/酮基团的反应来制备。

[0250] 酰肼接头通过一种组分上的肼基团与第二组分上的羧酸基团的反应形成。这样的反应通常使用类似于形成酰胺键的化学进行,其中羧酸用活化试剂活化。

[0251] 亚胺或肟接头通过一种组分上的胺或N-烷氧基胺(或氨氧基)基团与第二组分上的醛基或酮基的反应形成。

[0252] 脲或硫脲接头通过一种组分上的胺基与第二组分上的异氰酸酯或硫代异氰酸酯基团的反应来制备。

[0253] 肼接头通过一种组分上的胺基与第二组分上的酰亚胺酯基团的反应来制备。

[0254] 胺接头通过一种组分上的胺基与第二组分上的烷基化基团(例如卤化物、环氧化物或磺酸酯基)的烷基化反应来制备。或者,胺接头也可以通过用合适的还原剂(例如氰基硼氢化钠或三乙酰氧基硼氢化钠)将一种组分上的胺基与第二组分上的醛基或酮基还原胺化来制备。

[0255] 磺酰胺接头通过一种组分上的胺基与第二组分上的磺酰卤(例如磺酰氯)基团的反应来制备。

[0256] 砜接头通过亲核试剂与乙烯基砜的迈克尔加成制备。乙烯基砜或亲核试剂可以在纳米载体的表面上或与组分连接。

[0257] 组分也可以通过非共价缀合方法缀合。例如,带负电荷的免疫抑制剂可以通过静电吸附与带正电荷的组分缀合。包含金属配体的组分也可以通过金属-配体配合物与金属配合物缀合。

[0258] 在一些实施方案中,在组装合成纳米载体之前,组分可以与聚合物(例如聚乳酸-嵌段-聚乙二醇)连接,或者合成纳米载体可以在其表面上形成具有反应性或可活化基团。在后一种情况下,组分可以制备有与合成纳米载体的表面所呈递的连接化学物质相容的基

团。在另一些实施方案中，可以使用合适的接头使肽组分与VLP或脂质体连接。接头是能够使两个分子偶联在一起的化合物或试剂。在一个实施方案中，接头可以是如Hermanson2008中所述的同双官能或异双官能试剂。例如，可以在EDC的存在下用同双官能接头己二酸二酰肼(ADH)处理表面上包含羧基的VLP或脂质体合成纳米载体，以形成具有ADH接头的相应合成纳米载体。然后使所得的ADH连接的合成纳米载体通过纳米载体上的ADH接头的另一端与包含酸基团的肽组分缀合，以产生相应的VLP或脂质体肽缀合物。

[0259] 在一些实施方案中，制备了在聚合物链末端包含叠氮化物或炔基团的聚合物。然后以多个炔或叠氮化物基团位于纳米载体表面的方式用该聚合物制备合成纳米载体。或者，合成纳米载体可以通过其他途径制备，并且随后用炔或叠氮化物基团官能化。在炔(如果聚合物包含叠氮化物)或叠氮化物(如果聚合物包含炔)基团的存在下制备组分。然后使组分在有或者没有催化剂的情况下通过1,3-偶极环加成反应与纳米载体反应，所述催化剂通过1,4-二取代的1,2,3-三唑接头使组分与颗粒共价连接。

[0260] 如果组分是小分子，则在组装合成纳米载体之前使组分与聚合物连接可能是有利的。在一些实施方案中，还可能有利的是制备具有表面基团的合成纳米载体，其用于通过使用这些表面基团使组分与合成纳米载体连接，而不是使组分与聚合物连接然后在合成纳米载体的构建中使用该聚合物缀合物。

[0261] 对于可用的缀合方法的详细描述，参见Hermanson G T“Bioconjugate Techniques”，第二版，Academic Press，Inc.出版，2008。除了共价连接之外，组分可以通过吸附连接至预先形成的合成纳米载体，或者其可以在形成合成纳米载体期间通过包封连接。

[0262] 可使用本领域中已知的广泛多种方法制备合成纳米载体。例如，合成纳米载体可通过例如以下的方法形成：纳米沉淀、使用流体通道的流聚焦、喷雾干燥、单和双乳液溶剂蒸发、溶剂萃取、相分离、研磨、微乳化操作、微米制造、纳米制造、牺牲层、简单和复杂的凝聚、以及本领域普通技术人员公知的其他方法。作为替代或补充，已经描述了用于单分散半导体、传导性、磁性、有机和其他纳米材料的水性和有机溶剂合成(Pellegrino等，2005，Small，1:48；Murray等，2000，Ann.Rev.Mat.Sci.，30:545；和Trindade等，2001，Chem.Mat.，13:3843)。文献中已经描述了另外的方法(参见例如Doubrow编辑，“Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Phannacy，”CRC Press，Boca Raton，1992；Mathiowitz等，1987，J.Control.Release，5:13；Mathiowitz等，1987，Reactive Polymers，6:275；和Mathiowitz等，1988，J.Appl.Polymer Sci.，35:755；美国专利5578325和6007845；P.Paolicelli等，“Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles”Nanomedicine.5(6):843-853(2010))。

[0263] 可使用多种方法如所期望地将物质包封到合成纳米载体中，所述方法包括但不限于：C.Astete等，“Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles”J.Biomater.Sci.Polymer Edn，第17卷，第3期，第247-289页(2006)；K.Avgoustakis“Pegylated Poly(Lactide)and Poly(Lactide-Co-Glycolide)Nanoparticles：Preparation，Properties and Possible Applications in Drug Delivery”Current Drug Delivery 1:321-333(2004)；C.Reis等，“Nanoencapsulation I.Methods for

preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles"Nanomedicine 2:8-21(2006)；P.Paolicelli等，"Surface-modified PLGA-based Nanoparticles that can Efficiently Associate and Deliver Virus-like Particles"Nanomedicine.5(6):843-853(2010)。可使用适合于将物质包封到合成纳米载体中的其他方法，包括但不限于2003年10月14日授予Unger的美国专利6,632,671中公开的方法。

[0264] 在某些实施方案中，合成纳米载体通过纳米沉淀法或喷雾干燥制备。可改变用于制备合成纳米载体的条件以产生期望尺寸或特性(例如，疏水性、亲水性、外部形态、"黏性"、形状等)的颗粒。制备合成纳米载体的方法和使用的条件(例如，溶剂、温度、浓度、空气流量等)可取决于待与合成纳米载体连接的物质和/或聚合物基质的组成。

[0265] 如果通过任何上述方法制备的合成纳米载体的尺寸范围在所期望范围之外，则可以例如使用筛子对合成纳米载体的尺寸进行调整。

[0266] 合成纳米载体的要素可以例如通过一个或更多个共价键与整个合成纳米载体连接，或者可以通过一个或更多个接头连接。合成纳米载体官能化的其他方法可以修改自Saltzman等的公开的美国专利申请2006/0002852、DeSimone等的公开的美国专利申请2009/0028910或Murthy等的公开的国际专利申请WO/2008/127532A1。

[0267] 作为替代或补充，合成纳米载体可以通过非共价相互作用直接或间接地连接至组分。在一些非共价实施方案中，非共价连接由非共价相互作用介导，所述非共价相互作用包括但不限于电荷相互作用、亲和相互作用、金属配位、物理吸附、主客体相互作用、疏水相互作用、TT堆积相互作用、氢键键合相互作用、范德华相互作用、磁性相互作用、静电相互作用、偶极-偶极相互作用、和/或其组合。这样的连接可布置在合成纳米载体的外表面或内表面上。在一些实施方案中，包封和/或吸收是连接形式。

[0268] 本文中提供的组合物可包含无机或有机缓冲剂(例如，磷酸、碳酸、乙酸或柠檬酸的钠盐或钾盐)和pH调节剂(例如，盐酸、氢氧化钠或氢氧化钾、柠檬酸盐或乙酸盐、氨基酸及其盐)、抗氧化剂(例如，抗坏血酸、α-生育酚)、表面活性剂(例如，聚山梨酯20、聚山梨酯80、聚氧乙烯9-10壬基酚、脱氧胆酸钠)、溶液和/或冷冻/冻干稳定剂(例如，蔗糖、乳糖、甘露糖醇、海藻糖)、渗透调节剂(例如，盐或糖)、抗菌剂(例如，苯甲酸、酚、庆大霉素)、消泡剂(例如，聚二甲基硅氧烷(polydimethylsilozone))、防腐剂(例如，硫柳汞、2-苯氧基乙醇、EDTA)、聚合物稳定剂和黏度调节剂(例如，聚乙烯吡咯烷酮、泊洛沙姆488、羧甲基纤维素)和共溶剂(例如，甘油、聚乙二醇、乙醇)。

[0269] 根据本发明的组合物可以包含可药用赋形剂。可使用常规药物制造和复配技术制备组合物以获得可用的剂型。适用于实施本发明的技术可见于Handbook of Industrial Mixing:Science and Practice,Edward L.Paul编辑，Victor A.Atiemo-Obeng和Suzanne M.Kresta,2004John Wiley&Sons,Inc.;和Pharmaceutics:The Science of Dosage Form Design，第2版.M.E.Auten编辑，2001,Churchill Livingstone。在一个实施方案中，将组合物与防腐剂悬浮在无菌注射用盐水溶液中。

[0270] 应理解，本发明的组合物可以以任何合适的方式制备，并且本发明决不限于可以使用本文中所述的方法产生的组合物。选择合适的制造方法可能需要注意相关的特定部分的特性。

[0271] 在一些实施方案中，组合物在无菌条件下制备或者在最终进行灭菌。这可以确保

所得组合物是无菌且非感染性的，因此当与非无菌组合物相比时提高安全性。这提供了有价值的安全措施，尤其是当接受组合物的对象具有免疫缺陷、患有感染和/或易感于感染时。

[0272] 根据本发明的施用可以通过多种途径，包括但不限于静脉内和腹膜内途径。本文中提及的组合物可以制造和制备以用于使用常规方法施用，在一些实施方案中伴随施用。

[0273] 本发明的组合物可以以有效量(例如本文中其他地方描述的有效量)施用。在一些实施方案中，病毒转移载体和/或包含免疫抑制剂的合成纳米载体和/或抗IgM剂以有效减弱抗病毒转移载体免疫应答(例如IgM应答)和/或允许将病毒转移载体再施用于对象和/或提高病毒转移载体的转基因表达的量的剂型存在。剂型可以以多种频率施用。在一些实施方案中，将病毒转移载体与包含免疫抑制剂的合成纳米载体以及抗IgM剂一起重复施用。

[0274] 本发明的一些方面涉及确定用于本文中提供的施用方法的方案。可以通过至少改变病毒转移载体、包含免疫抑制剂的合成纳米载体和/或抗IgM剂的频率、剂量并随后评估期望或不期望的免疫应答来确定方案。用于实施本发明的优选方案减弱针对病毒转移载体的免疫应答(例如IgM应答)和/或减弱针对病毒转移载体的另一种不期望的免疫应答和/或提高转基因表达。在一些实施方案中，所述方案可至少包括病毒转移载体、包含免疫抑制剂的合成纳米载体以及抗IgM剂的施用频率和剂量。

[0275] 本公开内容的另一个方面涉及药盒。在一些实施方案中，药盒包含本文中提供的任一种或更多种组合物或本文中提供的组合物的任一种组合。在一些实施方案中，药盒包含含有病毒转移载体的一种或更多种组合物和/或含有包含免疫抑制剂的合成纳米载体的一种或更多种组合物和/或含有抗IgM剂的一种或更多种组合物。优选地，组合物是提供本文中提供的任一种或更多种剂量的量。组合物可在药盒中的一个容器中或多于一个容器中。在所提供的任一种药盒的一些实施方案中，容器是小瓶或安瓿。在所提供的任一种药盒的一些实施方案中，组合物各自以冻干形式在单独的容器中或在同一容器中，使得其可在随后的时间重构。在所提供的任一种药盒的一些实施方案中，药盒还包含用于重构、混合、施用等的说明书。在所提供的任一种药盒的一些实施方案中，说明书包含本文中所述的任一种方法的描述。说明书可以是任何合适的形式，例如印刷插页或标签。在本文中提供的任一种药盒的一些实施方案中，药盒还包含一个或更多个注射器或者可将组合物体内递送至对象的其他装置。

实施例

[0276] 实施例1：包含免疫抑制剂的合成纳米载体

[0277] 包含免疫抑制剂(例如雷帕霉素)的合成纳米载体可以使用本领域普通技术人员已知的任何方法来制备。优选地，在本文中提供的任一种方法、组合物或药盒的一些实施方案中，包含免疫抑制剂的合成纳米载体通过美国公布No.US 2016/0128986 A1和美国公布No.US 2016/0128987 A1中的任一种方法制备，所描述的这种制备方法和所得合成纳米载体通过引用整体并入本文。在本文中提供的任一种方法、组合物或药盒中，包含免疫抑制剂的合成纳米载体是这样并入的合成纳米载体。包含雷帕霉素的合成纳米载体用至少类似于这些并入方法的方法制备并用于以下实施例中。

[0278] 实施例2：腺相关病毒(AAV)与包含免疫抑制剂的合成纳米载体和抗BAFF抗体的组

合递送

[0279] 检查了将腺相关病毒载体与包含免疫抑制剂(雷帕霉素)的合成纳米载体和抗BAFF抗体一起施用的作用。测试了三种处理:单独的编码分泌性碱性磷酸酶的腺相关病毒载体(AAV-SEAP)、与包含雷帕霉素的合成纳米载体组合(AAV-SEAP+SVP[RAPA]),以及与抗BAFF抗体组合(AAV-SEAP+SVP[RAPA]+抗BAFF])。三个六只小鼠的组用相同量的上述三种处理之一注射一次。静脉内(i.v.)注射施用AAV-SEAP和SVP[RAPA],并且腹膜内(i.p.)注射施用抗BAFF。在注射之后第5、9、12、16和21天时,从每个对象收集全血并加工以分离血清。使用ELISA确定针对板结合AAV的血清IgM。初始(Naïve)血清用作阴性基线水平。如图1中所示,与其他两组相比,AAV-SEAP与包含雷帕霉素的合成纳米载体和抗BAFF抗体组合的施用导致血清抗AAV IgM水平降低。截止第16和21天,在接受AAV载体和包含雷帕霉素的合成纳米载体和抗BAFF抗体的组合的许多小鼠中,抗AAV免疫力几乎被消除。

[0280] 还分析了来自上述小鼠的血清以确定SEAP表达水平。如图2中所示,在第5、9、12和16天时,与其他两组相比,AAV-SEAP与包含雷帕霉素的合成纳米载体和抗BAFF抗体组合的施用产生更高的SEAP表达水平。另外,在每个时间点SEAP表达的量度都增强,表明该组合导致最初和随时间二者的靶转基因表达均提高。

[0281] 实施例3:通过合成纳米载体包封的雷帕霉素和全身性抗BAFF的组合,针对AAV的体内IgM免疫应答的协同降低

[0282] 在第0、37和155天时,将三组C57BL/6雌性小鼠(每组6只小鼠)用1×10^{10}VG的无任何纳米载体的AAV8-SEAP(一组)或用150μg的SVP[Rapa](两组)注射(i.v.,尾静脉)3次。在后两组中,一组在第0、15、37、155和169天(即,在每次AAV8注射时以及在初免和第2次加强之后14天)时用全身性抗BAFF(i.p.100μg)(来自Adipogen Corp.,San Diego,CA,USA的克隆Sandy-2)另外进行处理。

[0283] 在指定的时间(第5、9、12、16、21、42、47、51、55、162、167、174、195和210天)将小鼠放血,将血清从全血中分离并储存在-20±5℃下直至分析。然后在ELISA中测量针对AAV的IgM抗体:96孔板用AAV包被o/n,在第二天洗涤并封闭,然后将稀释的血清样品(1:40)添加至板并孵育;洗涤板,添加驴抗小鼠IgM特异性-HRP,并在再一次孵育和洗涤之后,通过添加TMB底物并以570nm的参比波长测量450nm的吸光度来检测针对AAV的IgM抗体的存在(表示为最高光密度(optical density,OD)的信号强度与样品中IgM抗体的量成正比)。

[0284] 如图15中所示,与AAV共施用的SVP[Rapa]抑制AAV IgM的早期诱导并延迟其出现,尤其是在初免之后。然而,在加强之后(由箭头指示),这一点不太明显,尤其是在d37时它们的第一次之后,导致在d42-55间隔内在仅用SVP[Rapa]处理的组中IgM升高明显。同时,在用SVP[Rapa]和全身性抗BAFF处理的组中IgM产生显示出对IgM应答的甚至更强且统计学上更显著的抑制,这比在前两次注射(d0和37)之后仅用SVP[Rapa]处理的组中更低,并且在第3次注射(d155)之后没有在统计学上超过它。

[0285] 实施例4:通过纳米载体包封的雷帕霉素和全身性抗BAFF的组合诱导较低的AAV IgG突破水平

[0286] 除使用山羊抗小鼠IgG特异性-HRP之外,还沿与IgM相同的路线测试了来自实施例3的相同血清样品的AAV IgG,其通过ELISA测量。如先前所示,图16显示在大多数实验动物中,与AAV共施用的SVP[Rapa]抑制了AAV IgG的诱导,尽管其中一些在实验后期开始产生

IgG(这与该组中IgM动力学延迟相关)。值得注意的是,在用SVP[Rapa]和抗BAFF的组合处理的组中没有IgG突破,这也与更低的IgM水平和更明显的产生延迟相关。

[0287] 实施例5:在每次AAV再施用之后,看到通过纳米载体包封的雷帕霉素和全身性抗BAFF的组合,体内AAV驱动的转基因表达的协同长期增强在与实施例3和4相同的研究中,使用来自ThermoFisher Scientific(Waltham,MA,USA)的测定试剂盒测量了血清中的SEAP水平。将血清样品和阳性对照在稀释缓冲液中稀释,在65℃下孵育30分钟,然后冷却至室温,平板接种到96孔格式中,添加测定缓冲液(5分钟)并随后添加底物(20分钟),并将板在光度计(477nm)上读取。

[0288] 如图17中所示,在用SVP[Rapa]处理的组中转基因表达立即提高。其中,与用仅SVP[Rapa]处理所产生的水平相比,在用SVP[Rapa]和抗BAFF的组合处理的组中血清SEAP升高更高并且具有统计学差异(在相对于未经处理组中的水平(其被分配为一百(100)的评分)计算的图中示出了每个时间点的相对表达水平)。此外,在每次后续AAV施用(d37和155,由图17中的箭头所示)时,施用SVP[Rapa]和抗BAFF组合的组显示出SEAP表达的进一步加强,这绝不逊于在仅用SVP[Rapa]处理的组中看到的一种并且在大多数情况下更高,尤其是在第2次加强之后(如前所述,在未经处理的小鼠中没有加强;在相对表达水平上方的第一行中,显示了所有加强后时间点的加强之后至之前的表达水平)。这实现了在研究中看到的稳定且最高的SEAP表达水平。注意,在超过半年的研究期间,在用SVP[Rapa]和抗BAFF组合处理的组中SEAP表达多次超过了初期在第16天时看到的水平,而在仅用SVP[Rapa]处理或不予处理的组中从未超过这些。总体而言,在多个时间点,在用SVP[Rapa]和抗BAFF组合处理的组中SEAP表达水平是仅用AAV处理的组中的3倍或更高。

[0289] 实施例6:如果使用单独的无SVP[Rapa]的抗BAFF,则未看到通过纳米载体包封的雷帕霉素和全身性抗BAFF的组合,AAV驱动的转基因表达协同提高以及针对AAV的IgM和IgG免疫应答降低

[0290] 在第0、32和98天时,将四组C57BL/6雌性小鼠(每组6只小鼠)用1×10^{10} VG的无任何纳米载体的AAV8-SEAP(两组)或用150μg的SVP[Rapa](两组)注射(i.v.,尾静脉)3次。在两个分支中,一组不进行任何另外的干预(即,一组完全不经处理并且一组仅用SVP[Rapa]处理),并且另一组则在AAV施用的当日(d0、32和98)用全身性抗BAFF(i.p.100μg)另外进行处理。

[0291] 在指定的时间(第5、11、21、28、38、42、49、63、91、108、112、118、125、139和153天)将小鼠放血,将血清从全血中分离并用于确定SEAP水平(图18A)以及如上所述的针对AAV的IgM和IgG抗体(图18B至18C)。

[0292] 如图18A中所示,尽管单独的SVP[Rapa]为转基因表达提供了一定的益处,但是在用SVP[Rapa]和抗BAFF的组合处理的组中SEAP活性提高要高得多并且具有统计学差异,尤其是在第98天的第2次加强之后(在相对于未经处理组中的水平(分配了“100”的评分)计算的图中示出了每个时间点的相对表达水平;在相对表达水平下方显示了所有加强后时间点的加强之后至之前的表达水平)。与未经处理的小鼠相比,在用SVP[Rapa]和抗BAFF的组合处理的组中,这共同导致SEAP表达升高3.5至4倍。重要的是,在单独用抗BAFF处理的组中未看到转基因表达的统计学显著升高,尤其是在第2次加强之后(第3次AAV-SEAP施用)。

[0293] 相反,与其他组相比,在用SVP[Rapa]和抗BAFF的组合处理的组中看到最低的AAV

IgM水平(并且没有IgG突破)。在第1次和第3次AAV施用之后,该组中的IgM应答尤其低,并且在多个时间点上与所有其他组(包括仅用SVP[Rapa]处理的组)具有统计学差异(图18B)。

[0294] 虽然在仅用抗BAFF处理的组中IgM水平最初略有延迟并降低,但它们总是高于用SVP[Rapa]处理的两组,尤其是用SVP[Rapa]和抗BAFF组合处理的组(图18B)。类似地,该组中的IgG动力学仅略微延迟,截止第21天大多数小鼠变为血清反应阳性并且截止第38天所有小鼠都发生了转化(截止第21天未经处理的小鼠完全转化),而直到第91天在用SVP[Rapa]处理的组中没有小鼠发生转化并且在研究期间在用SVP[Rapa]和抗BAFF的组合处理的组中没有小鼠变为IgG阳性(图18C)。

[0295] 总体而言,虽然单独的SVP[Rapa]显示出对AAV驱动的转基因表达和IgM/IgG抑制的益处并且单独的抗BAFF表现出一定的延迟AAV特异性IgM和IgG产生的能力,但是两种处理的组合在提高SEAP表达以及在AAV特异性IgM/IgG抑制方面要优异得多,尤其是在重复AAV施用之后。

[0296] 实施例7:在多次AAV施用之后,看到通过纳米载体包封的雷帕霉素和全身性抗BAFF的组合,AAV驱动的转基因表达的协同提高以及针对AAV的IgM和IgG免疫应答的持续抑制

[0297] 在第0、32、98和160天,在有或没有用全身性抗BAFF(i.p.,100μg)另外进行处理的情况下,将六组C57BL/6雌性小鼠(每组6只小鼠)用单独或与不同剂量的SVP[Rapa](50或150μg)组合的1×10^{10}VG的AAV8-SEAP注射(i.v.,尾静脉)4次,施用仅在注射日(因此等于总共四次处理,并且定义为“低”)进行或者还在第1次、第3次和第4次AAV施用之后的第14天(即研究的第14、112和174天,因此等于总共七次处理,并且定义为“中”)给予。在指定的时间(第28、38、91、108、153、167、172、179、186和214天)将小鼠放血,将血清从全血中分离并用于确定SEAP水平(图19A至19B)以及如上所述的针对AAV的IgM和IgG抗体(图19C至19F)。

[0298] 值得注意的是,在两种SVP[Rapa]剂量下,施用抗BAFF提供SEAP表达的显著后期加强,这在第160天与以下一起进行最后一次AAV注射之后得到很好的表现:抗BAFF和50μg SVP[Rapa]组合(其表现出在注射之后将近三周相当大的升高(图19A))以及与150μg SVP[Rapa]一起的相同组合(表现出注射之后直至8周持续转基因升高(图19B)),与单独使用SVP[Rapa]所获得的益处相比,这两种情况均明显的多并且具有统计学差异(在相对于未经处理组中的水平(分配了“100”的评分)计算的图中示出了每个时间点的相对表达水平;在相对表达水平下方显示了所有加强之后时间点的加强之后至之前的表达水平)。在用SVP[Rapa]并且尤其是用SVP[Rapa]和抗BAFF组合处理的每个后续注射组中均显示转基因活性提高,而未经处理的小鼠则没有(见图19A中用虚线标记的第28天每个组的SEAP活性水平)并因此总体上在数个时间点上,与用AAV-SEAP注射4次未进行任何其他处理的组相比,SVP[Rapa]和抗BAFF的累积作用接近或超过7倍(图19B)。

[0299] IgM和IgG二者对AAV在用IgM对AAV进行研究期间继续被深深地抑制,尤其是在用150μg SVP[Rapa]和中等抗BAFF的组合处理的组中得到了很好的抑制(图19C和图19E)。直到研究的第214天,该组大多数小鼠的IgM应答停留在基线(图19E),这与所有其他组具有统计学差异(定义为最高OD>0.1的每组中IgM和IgG突破的数目示于图19C和图19D中)。直到研究结束,用与抗BAFF组合的150μg SVP[Rapa]处理的两组均未显示出IgG突破(图19D和图19F)。

[0300] 实施例8:在有或没有抗BAFF的情况下施用SVP[Rapa]的小鼠中早期和晚期IgM水平与AAV驱动的转基因的长期表达呈负相关

[0301] 在第0、32、98和160天,在有或没有用全身性抗BAFF(i.p.,100μg)另外进行处理的情况下,将五组C57BL/6雌性小鼠(每组6只小鼠)用与不同剂量的SVP[Rapa](50或150μg)组合的1×10^{10}VG的AAV8-SEAP注射(i.v.,尾静脉)4次。如图20中所示,所有这些小鼠均表现出AAV IgM形成延迟,这在第11天被显著抑制(截止第5天,未用SVP[Rapa]处理的小鼠一致地呈IgM阳性,参见先前的实施例),尽管那时有数只小鼠已发生了血清转化。当将第11天的IgM值相对于在第32、98和160天施用的三次后续AAV加强之前和之后确定的血清SEAP水平绘图时,所有这些数据集均显示出统计学上显著的负相关,其随时间增强(从第38天时的p=0.043到第179天时的p=0.0001,参见图20A),因此表明早期IgM应答可决定AAV转导和随后的长期转基因表达。

[0302] 类似地,当将在有或没有抗BAFF的情况下用150μg SVP[Rapa]处理的小鼠中看到的在d153(第4次AAV接种之前一周=第三次加强)时的IgM水平相对于加强后SEAP升高(作为加强后与加强前表达水平的比率)绘图时,看到类似的强的负相关(图20B)。

[0303] 总体而言,这表明针对AAV的早期和长期IgM应答二者均可决定AAV驱动的转基因表达水平,尤其是在重复AAV施用之后,并且如通过SVP[Rapa]和抗-BAFF的组合获得的抗原特异性IgM应答可以是有益的并且可实现体内长期且稳定的转基因表达。

[0304] 实施例9:SVP[Rapa]与抗BAFF的组合降低了初始和AAV注射小鼠中的一般和特异性脾B细胞群抑制

[0305] 将七组C57BL/6雌性小鼠(每组9只小鼠,每个时间点3只小鼠)用1×10^{10}VG的AAV8-SEAP(四组)注射(i.v.,尾静脉)或对其未注射病毒(virus-naive)(三组)。在前者中,一组未进行进一步处理,一组与150μg的SVP[Rapa]共同注射,一组用抗BAFF(i.p.,100μg)另外进行处理并且最后一组用SVP[Rapa]和全身性抗BAFF的组合进行处理。类似地,将未注射AAV的三组用150μg的SVP[Rapa]、抗BAFF(i.p.,100μg)以及用其组合进行处理。未接受注射的小鼠用作基线对照(第0天)。

[0306] 在指定的时间(注射之后1、4和7天)处死小鼠,取脾,筛至单细胞悬液并随后用针对B细胞表面标志物CD19、CD138和CD127的抗体进行染色。如在图21A和图21B中看到的,用或未用SVP[Rapa]处理的AAV注射小鼠没有经历B细胞来源的脾细胞(限定为$CD19^+$)总数的任何减少。类似地,用SVP[Rapa]处理的未注射病毒的小鼠仅显示$CD19^+$细胞数目的轻微减少。相反,用抗BAFF处理的小鼠(无论是AAV注射还是未注射病毒)显示出$CD19^+$脾细胞的深度且时间依赖性下降(至少下降了2倍),如果还使用了SVP[Rapa],则会甚至更明显(下降了3至4倍)。

[0307] 如果评价成浆细胞(限定为CD19+CD138+)(分泌抗体的长寿浆细胞的直接前体)的分数,则该作用甚至更为显著(图21C和图21D)。在这种情况下,SVP[Rapa]处理导致时间依赖性的脾成浆细胞减少,抗BAFF处理也一样(减少2至3倍;在未经处理的AAV注射小鼠中几乎没有变化)。然而,用SVP[Rapa]和抗BAFF组合处理的累积作用甚至更强,导致成浆细胞分数降低超过7倍,表明该组合可特异性地针对B细胞谱系的产生抗体的细胞。

[0308] 如图21E和图21F中所示,这相反地反映在前/原B细胞分数(即,未成熟B细胞的直接前体,限定为CD19+CD127+)的相对提高上。在这种情况下,未经处理和经SVP[Rapa]处理

的AAV注射小鼠显示出在前/原B细胞动态上没有变化，并且SVP[Rapa]对未注射病毒的小鼠的作用小于2倍并且仅在第7天之前看到。抗BAFF表现出更强的作用，这见于未注射病毒的小鼠和AAV注射小鼠二者中，在前者中显然不那么明显。值得注意的是，用SVP[Rapa]和抗BAFF进行组合处理再次表现出协同作用(高于用SVP[Rapa]和抗BAFF的单处理之作用的算术和)，未成熟B细胞前体的分数在AAV注射小鼠中升高了几乎4倍，并且在未注射病毒的小鼠中甚至更高。总体而言，显示出用SVP[Rapa]和抗BAFF进行组合处理导致在未注射病毒小鼠中以及更重要的，甚至在AAV感染的情况下二者的B细胞成熟的特异性和早期阻滞，这也与通过该组合处理实现的病毒特异性IgM和IgG的产生的明显抑制相关。

[0309] 实施例10:通过纳米载体包封的雷帕霉素和全身施用布鲁顿酪氨酸激酶抑制剂PCI-32765(依鲁替尼)的组合，针对AAV的体内IgM免疫应答的协同降低

[0310] 在第0和93天，将五组C57BL/6雌性小鼠(每组6只)用1×10^{10}VG的无任何纳米载体的AAV8-SEAP(一组)或用100μg的SVP[Rapa](四组)注射(i.v.，尾静脉)两次。在后者中，将三组从AAV-SEAP和SVP[Rapa]注射之前的2天开始(第-2至14天和第91至107天)每天用全身性依鲁替尼(i.p.200μL)以以下剂量连续17天进行处理:20、100或500μg/小鼠。

[0311] 在指定的时间(第6、9、14、21、28、49、63、91、97、100、104和111天)将小鼠放血，将血清从全血中分离并储存在-20±5℃下直至分析。然后在ELISA中测量针对AAV的IgM抗体:96孔板用AAV包被o/n，在第二天洗涤并封闭，然后将稀释的血清样品(1:40)添加至板并孵育;洗涤板，添加驴抗小鼠IgM特异性-HRP，并在再一次孵育和洗涤之后，通过添加TMB底物并以570nm的参比波长测量450nm的吸光度来检测针对AAV的IgM抗体的存在(表示为最高光密度OD的信号强度与样品中IgM抗体的量成正比)。

[0312] 如图22中所示，与AAV共施用的SVP[Rapa]抑制了AAV IgM的早期诱导并延迟了其出现(图22A)。然而，在仅用SVP[Rapa]IgM处理的组中，通常可检测到并且在d93重复AAV注射之后也显示出一定的加强(图22A中的箭头所示)。同时，与SVP[Rapa]和全身性依鲁替尼共处理的所有组显示出对早期IgM应答的抑制作用甚至更强且在统计学上更显著，这在500μg的高依鲁替尼剂量时与直到第14天仅用SVP[Rapa]处理的组具有统计学差异(图22B至22D)。此外，在第93天重复AAV注射之后不久，与仅用SVP[Rapa]处理的组相比，用SVP[Rapa]和全身性依鲁替尼的组合处理的所有组均显示出统计学上较低的IgM水平(图22E至22F)。

[0313] 实施例11:通过与早期AAV IgM负相关的全身性依鲁替尼和纳米载体包封的雷帕霉素的组合，体内AAV驱动的转基因表达的协同加强后增强

[0314] 在与实施例10相同的研究中，如上所述使用来自ThermoFisher Scientific(Waltham,MA,USA)的测定试剂盒测量血清中的SEAP水平:将样品在稀释缓冲液中稀释，在65℃下孵育30分钟，然后冷却至室温，平板接种到96孔格式中，添加测定缓冲液(5分钟)并随后添加底物(20分钟)，并将板在光度计(477nm)上读取。

[0315] 与依鲁替尼施用无关，在用SVP[Rapa]处理的所有组中，初始SEAP表达水平均无明显差异，尽管与未用SVP[Rapa]处理的组相比，所有这些组均显示出较高的血清SEAP水平(参见图23A中的第14天数据;在接受AAV-SEAP没有任何其他处理的小鼠中SEAP水平在所有时间点均分配为数字“100”，并据此计算所有其他组中的相对表达)。当在稍后的时间点(第91天，即重复AAV施用之前的两天;图23A)测量时，所有测试组均显示出大约相同的SEAP表达水平。

[0316] 在第93天重复施用AAV-SEAP之后即刻，用SVP[Rapa]处理的所有组均显示出转基因表达升高(图23A)。虽然仅用SVP[Rapa]处理的小鼠组的SEAP水平比未经处理的小鼠高63％至75％(图23A，第97至100天，即加强之后4至7天)，但是在用SVP[Rapa]和游离依鲁替尼的组合处理的所有小鼠中看到更高的升高(在第100天，与未经处理的小鼠相比多于2倍)，尽管在那个点看到的作用不依赖于依鲁替尼的剂量。这种情况在截止第104天(AAV加强之后的11天)时开始改变，用SVP[Rapa]和依鲁替尼组合处理的小鼠组继续表现出SEAP水平升高的差异相对于未经处理的小鼠超过5倍(最高依鲁替尼剂量为100和500μg)，并且比仅用SVP[Rapa]处理的小鼠中的高两倍以上(图23A)。在该实施例中从第104天开始看，显示出存在剂量依赖性，与使用20μg依鲁替尼的组相比，在用与100至500μg依鲁替尼组合的SVP[Rapa]处理的小鼠中看到最高的表达水平。值得注意的是，在经SVP[Rapa]处理的小鼠中早期(初免之后第6天)AAV IgM水平与加强后血清SEAP水平呈负相关(图23B)，表明早期IgM抑制(在用与依鲁替尼组合的SVP[Rapa]处理的小鼠中更明显)可导致对AAV的免疫记忆水平降低，并且作为结果，在重复AAV施用之后降低回忆应答并且在加强之后转基因表达更加持久和升高。

[0317] 实施例12:通过纳米载体包封的雷帕霉素和全身性依鲁替尼的组合，针对AAV的IgM和IgG免疫应答的协同降低比通过单独使用的雷帕霉素或依鲁替尼获得的更强

[0318] 在第0、51和105天，将四组C57BL/6雌性小鼠(每组8至10只小鼠)用1×10^{10}VG的无任何纳米载体的AAV8-SEAP(两组)或用100μg的SVP[Rapa](两组)注射(i.v.，尾静脉)3次。在两对组中，一组从在每次AAV8注射之后第14天结束之前的2天开始(第-2至14天，第49到65天和第103至119天，其中将AAV-SEAP注射日期视为实验时间轴的第0天)每天用全身性依鲁替尼(i.p.500μg)持续17天另外进行处理。

[0319] 在指定的时间(第6、9、15、22、29、36、43、49、58、65、72和79天)将小鼠放血，将血清从全血中分离并储存在-20±5℃下直至分析。然后在ELISA中测量针对AAV的IgM抗体:96孔板用AAV包被o/n，在第二天洗涤并封闭，然后将稀释的血清样品(1:40)添加至板并孵育;洗涤板，添加驴抗小鼠IgM特异性-HRP，并在再一次孵育和洗涤之后，通过添加TMB底物并以570nm的参比波长测量450nm的吸光度来检测针对AAV的IgM抗体的存在(表示为最高光密度OD的信号强度与样品中IgM抗体的量成正比)。

[0320] 如图24中所示，与AAV共施用的SVP[Rapa]抑制了AAV IgM的早期诱导并延迟了其出现，特别是在初免之后(图24A，第2组)。然而，在d51加强之后(由箭头指示)这不太明显，导致在d58-79间隔期间在仅用SVP[Rapa]处理的组中IgM升高明显。同时，在用SVP[Rapa]和全身性依鲁替尼处理的组(图24A，第3组)中的IgM产生显示出甚至更强的和统计学上更显著的IgM应答抑制，这比在前两次注射(d0和51)之后仅用SVP[Rapa]处理的组中更低。重要的是，单独的全身性依鲁替尼(图24A，第4组)在IgM抑制方面完全无效，显示出与未经处理的组1相同的其诱导动力学(图24A)。

[0321] 这也可以转化为IgG动力学(图24B)，其中未经处理和经仅依鲁替尼处理的小鼠(相应地为第1和4组)产生基本相似且稳健的应答，其中截止d22所有动物(8/8和10/10)都发生转化，而经SVP[Rapa]处理的小鼠(第2组)显示出延迟的和抑制的IgG动力学，其中截止d22，2/10的动物发生转化并且仅4/10的动物显示出在加强之前(d49)可检测的IgG水平。这种抑制在d51加强之后持续存在，其中截止d79(加强之后28天)，只有5/10动物变为AAV IgG

阳性。尽管如此，SVP[Rapa]和全身性依鲁替尼的组合仍优于单独使用的SVP[Rapa]（并且截止d79，与其具有统计学差异），在加强之前即刻（d49）没有转化（0/9）并且在d79只有1/9在加强之后转化。

[0322] 实施例13：通过纳米载体包封的雷帕霉素和全身性依鲁替尼的组合的重复AAV免疫接种之后，转基因表达的协同升高比通过单独使用的雷帕霉素或依鲁替尼获得的更高

[0323] 在与实施例12相同的研究中，如上所述使用来自ThermoFisher Scientific的测定试剂盒测量血清中的SEAP水平。

[0324] 如图25中所示，在用SVP[Rapa]处理的组中，转基因表达有即时的、尽管是微小的提高。其中，在用SVP[Rapa]和依鲁替尼的组合处理的组中血清SEAP升高较高，尽管与仅用SVP[Rapa]处理产生的水平没有统计学差异（在相对于未经处理组中的水平（其被分配为一百（100）的评分）计算的图25中示出了每个时间点的相对表达水平），而相对于未经处理的小鼠，单独使用的依鲁替尼显示出无作用。此外，在每次后续AAV施用（d51和105，如箭头所示）时，施用SVP[Rapa]和依鲁替尼组合的组显示出最高的SEAP表达加强，这绝不逊于在仅用SVP[Rapa]处理的组中看到的一种并且在大多数情况下更高，尤其是在初次加强之后（在相对表达水平下方的底线中，显示了所有加强后时间点的加强之后至之前的表达水平）。如图所示，与用单独的依鲁替尼处理的组类似，在未经处理的小鼠中没有加强。这导致在用SVP[Rapa]和全身性依鲁替尼的组合处理的第3组中所示的研究中看到的稳定且最高的SEAP表达水平。总体而言，在多个时间点，在用SVP[Rapa]和依鲁替尼组合处理的AAV注射组中的SEAP表达水平比仅用AAV或用AAV+依鲁替尼处理的组高2倍。

[0325] 实施例14：用纳米载体包封的雷帕霉素和利妥昔单抗进行的AAV免疫接种（预防的）

[0326] 在第0、37和155天，将三组C57BL/6雌性小鼠用无任何纳米载体的AAV8-SEAP（一组）或用150μg的SVP[Rapa]（两组）注射（i.v.，尾静脉）3次。在后两组中，一组在第0、15、37、155和169天（即，在每次AAV注射时以及在初免和第2次加强之后14天）时用利妥昔单抗另外进行处理。

[0327] 在指定的时间（第5、9、12、16、21、42、47、51、55、162、167、174、195和210天）将小鼠放血，并将血清从全血中分离并储存在-20±5℃下直至分析。然后在ELISA中测量针对Ad的IgM和IgG抗体。使用来自ThermoFisher Scientific（Waltham，MA，USA）的测定试剂盒测量血清中的SEAP水平。

[0328] 实施例15：用包含GSK1059615的合成纳米载体和抗BAFF抗体进行的AAV免疫接种（预防的）

[0329] 在第0、37和155天，将三组C57BL/6雌性小鼠用无任何纳米载体的AAV8-SEAP（一组）或用包含GSK1059615的合成纳米载体（两组）注射（i.v.，尾静脉）3次。在后两组中，一组在第0、15、37、155和169天（即，每次AAV8注射时以及在初免和第2次加强之后14天）时用全身性抗BAFF（i.p.100μg）另外进行处理。

[0330] 在指定的时间（第5、9、12、16、21、42、47、51、55、162、167、174、195和210天）将小鼠放血，并将血清从全血中分离并储存在-20±5℃下直至分析。然后在ELISA中测量针对Ad的IgM和IgG抗体。使用来自ThermoFisher Scientific（Waltham，MA，USA）的测定试剂盒测量血清中的SEAP水平。

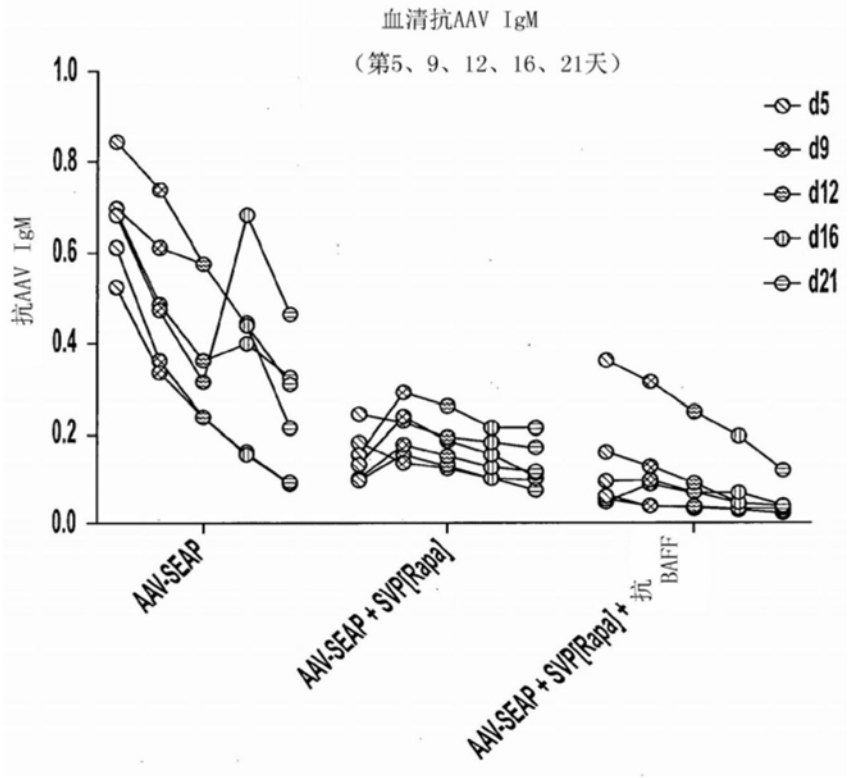

血清抗AAV IgM
（第5、9、12、16、21天）
抗AAV IgM
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
d5
d9
d12
d16
d21
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗 BAFF

图1

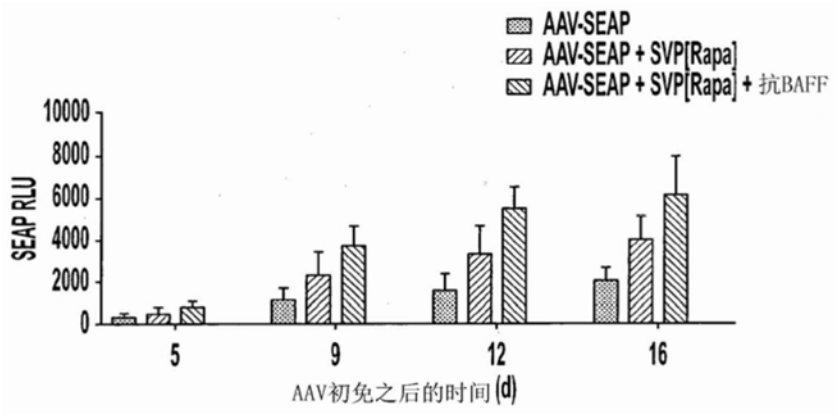

AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗BAFF
SEAP RLU
10000
8000
6000
4000
2000
0
5
9
12
16
AAV初免之后的时间 (d)

图2

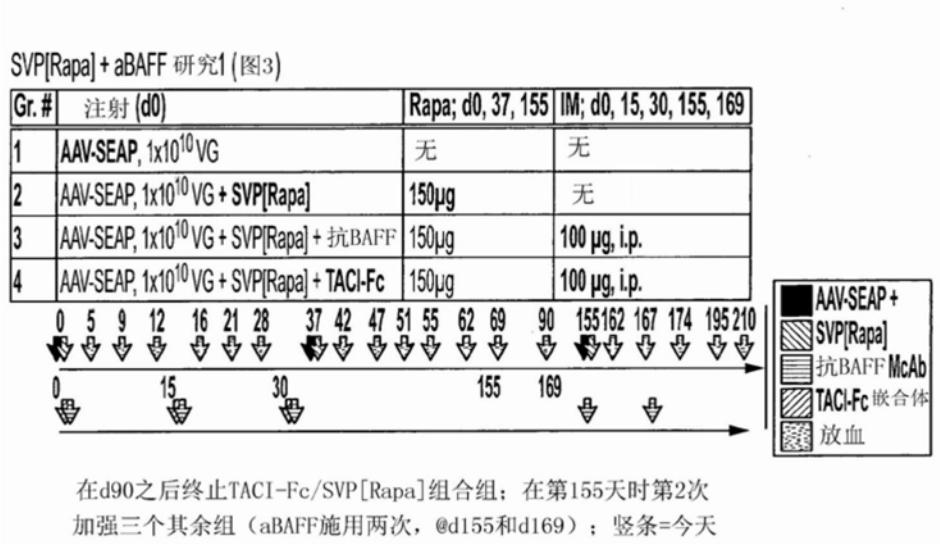

SVP[Rapa] + aBAFF 研究1 (图3)
Gr. # 注射 (d0) Rapa; d0, 37, 155 IM; d0, 15, 30, 155, 169
1 AAV-SEAP, 1x10^10 VG 无 无
2 AAV-SEAP, 1x10^10 VG + SVP[Rapa] 150μg 无
3 AAV-SEAP, 1x10^10 VG + SVP[Rapa] + 抗BAFF 150μg 100 μg, i.p.
4 AAV-SEAP, 1x10^10 VG + SVP[Rapa] + TACI-Fc 150μg 100 μg, i.p.
0 5 9 12 16 21 28 37 42 47 51 55 62 69 90 155 162 167 174 195 210
0 15 30 155 169
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
抗BAFF McAb
TACI-Fc 嵌合体
放血
在d90之后终止TACI-Fc/SVP[Rapa]组合组；在第155天时第2次
加强三个其余组（aBAFF施用两次，@d155和d169）；竖条=今天

图3

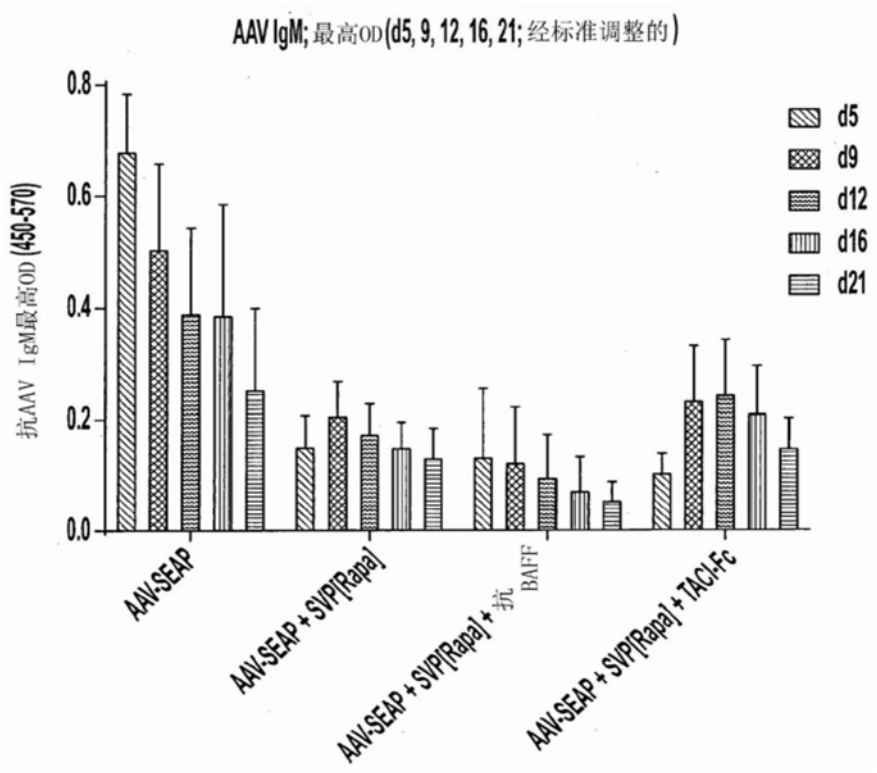

AAV IgM; 最高OD(d5, 9, 12, 16, 21; 经标准调整的)
抗AAV IgM最高OD (450-570)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
d5
d9
d12
d16
d21
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗 BAFF
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + TACI-Fc

图4A

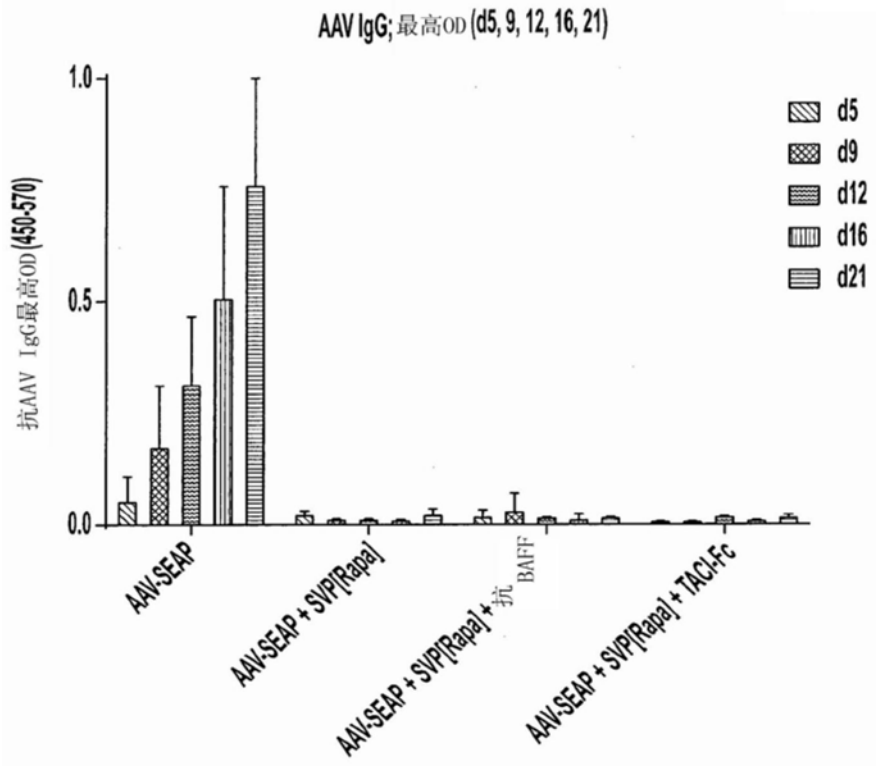

AAV IgG; 最高OD (d5, 9, 12, 16, 21)
抗AAV IgG最高OD (450-570)
1.0
0.5
0.0
d5
d9
d12
d16
d21
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗 BAFF
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + TACI-Fc

图4B

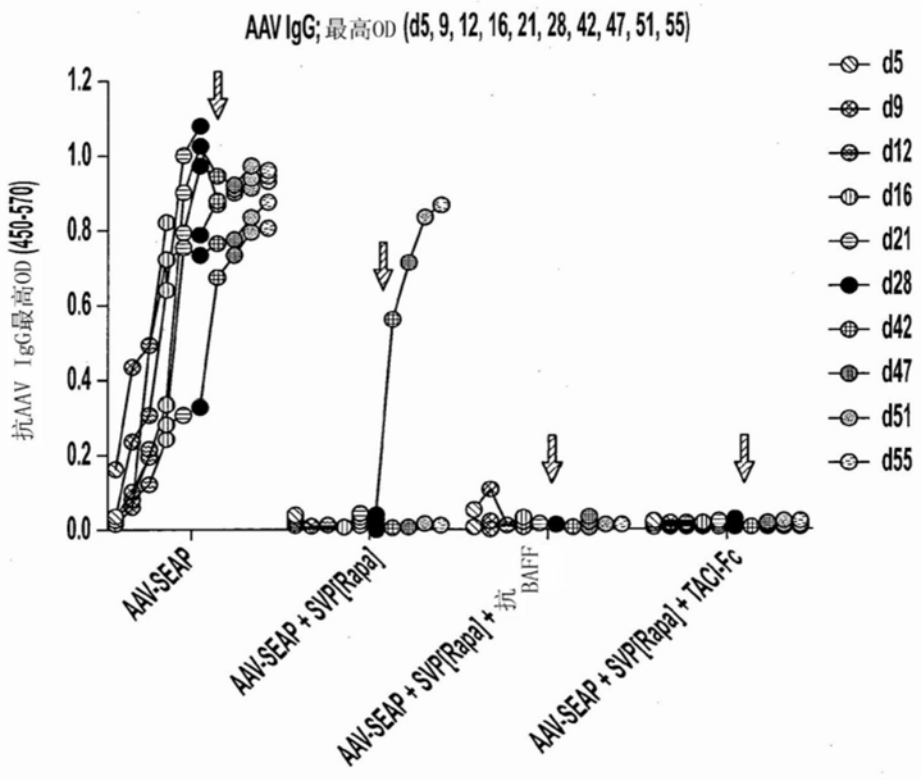

AAV IgG; 最高OD (d5, 9, 12, 16, 21, 28, 42, 47, 51, 55)
抗AAV IgG最高OD (450-570)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
d5
d9
d12
d16
d21
d28
d42
d47
d51
d55
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗 BAFF
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + TACI-Fc

图5

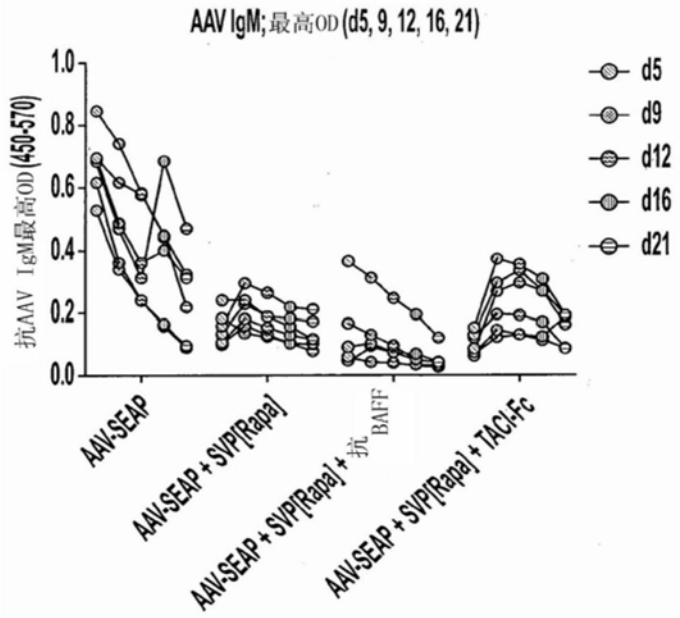

AAV IgM;最高OD(d5, 9, 12, 16, 21)
抗AAV IgM最高OD(450-570)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
d5
d9
d12
d16
d21
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗BAFF
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + TACI-Fc

图6A

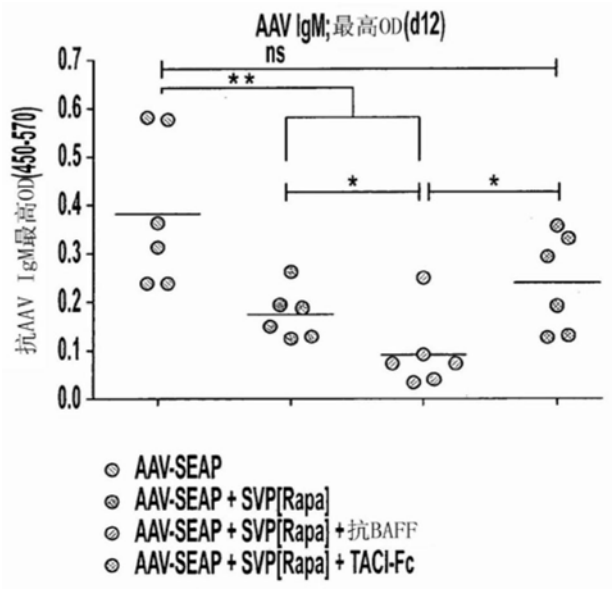

AAV IgM;最高OD(d12)
抗AAV IgM最高OD(450-570)
ns
**
*
*
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] +抗BAFF
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + TACI-Fc

图6B

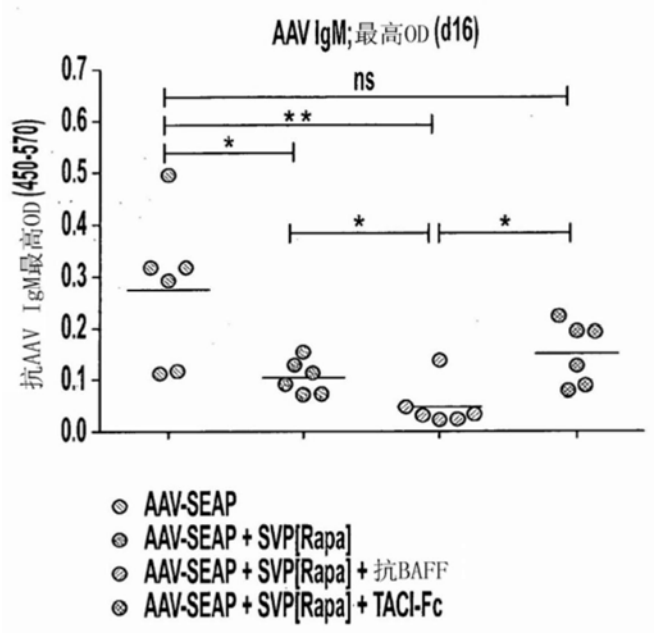

AAV IgM;最高OD (d16)
抗AAV IgM最高OD (450-570)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
ns
**
*
*
*
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗BAFF
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + TACI-Fc

图6C

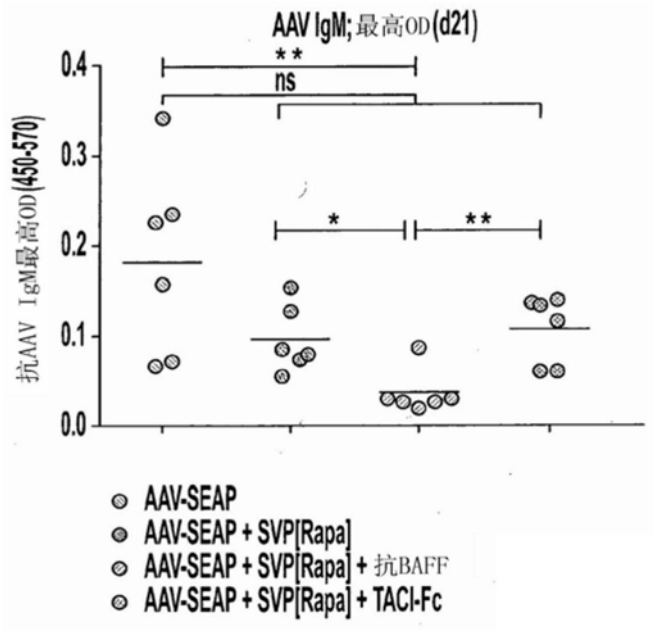

AAV IgM;最高OD (d21)
抗AAV IgM最高OD (450-570)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
ns
*
**
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗BAFF
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + TACI-Fc

图6D

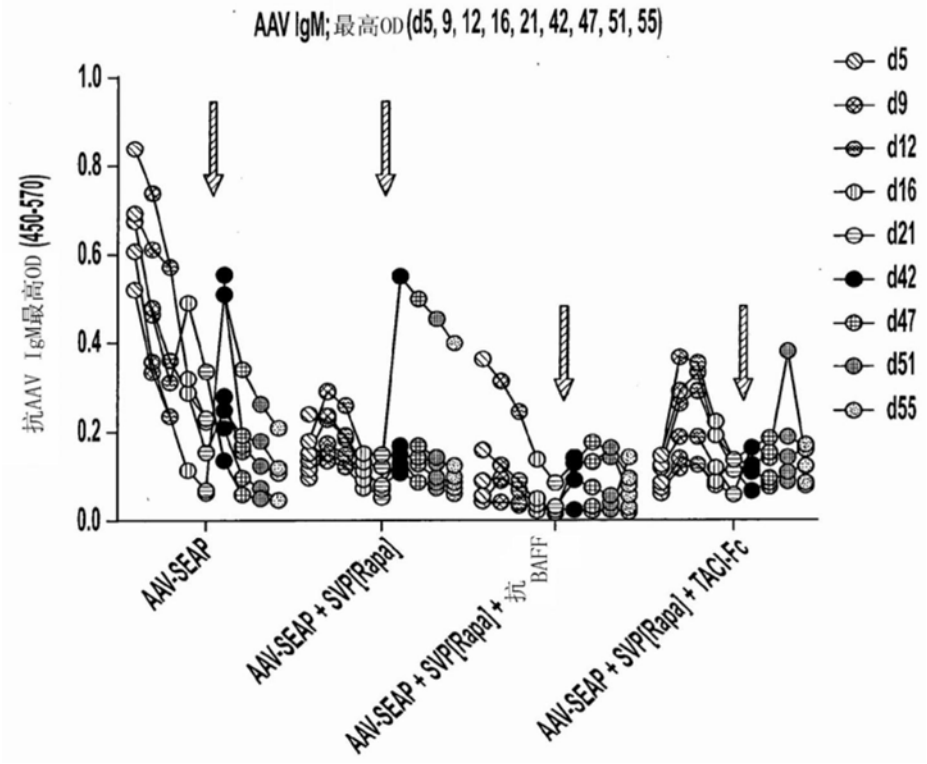

AAV IgM;最高OD(d5, 9, 12, 16, 21, 42, 47, 51, 55)
抗AAV IgM最高OD (450-570)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
d5
d9
d12
d16
d21
d42
d47
d51
d55
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗 BAFF
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + TACI-Fc

图7

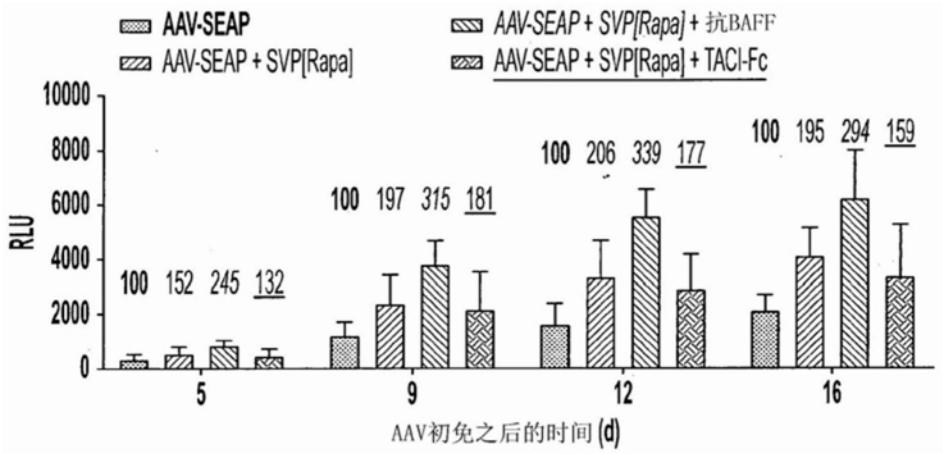

AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗BAFF
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + TACI-Fc
RLU
10000
8000
6000
4000
2000
0
100 152 245 132
100 197 315 181
100 206 339 177
100 195 294 159
5
9
12
16
AAV初免之后的时间 (d)

图8

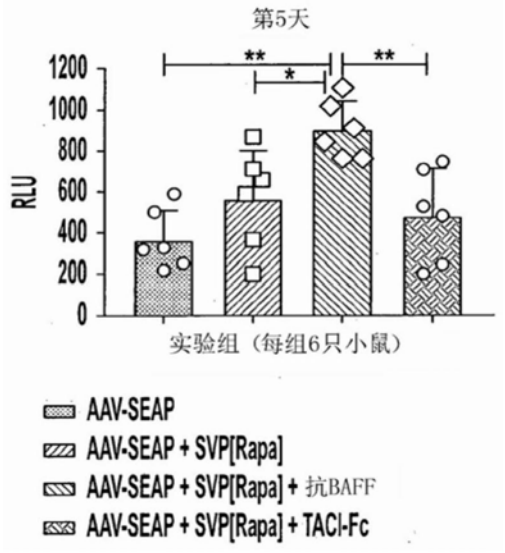

第5天
**
*
**
1200
1000
800
600
400
200
0
RLU
实验组（每组6只小鼠）
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗BAFF
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + TACI-Fc

图9A

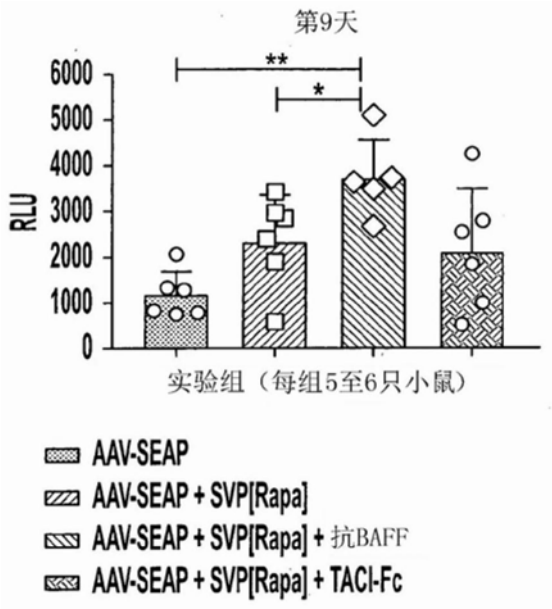

第9天
**
*
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
RLU
实验组（每组5至6只小鼠）
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗BAFF
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + TACI-Fc

图9B

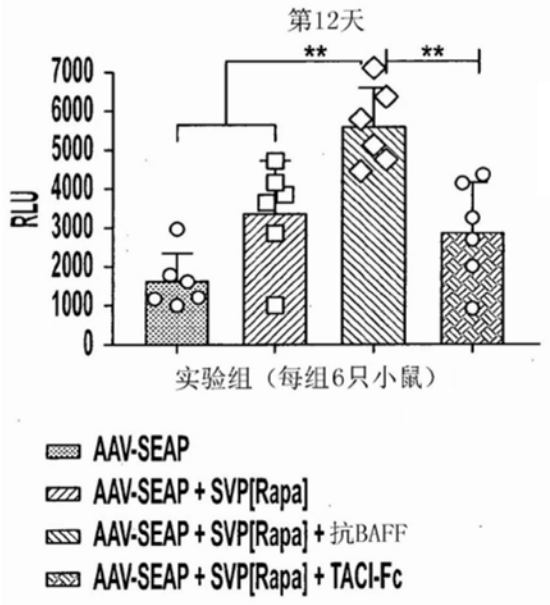

第12天
**
**
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
RLU
实验组（每组6只小鼠）
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗BAFF
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + TACI-Fc

图9C

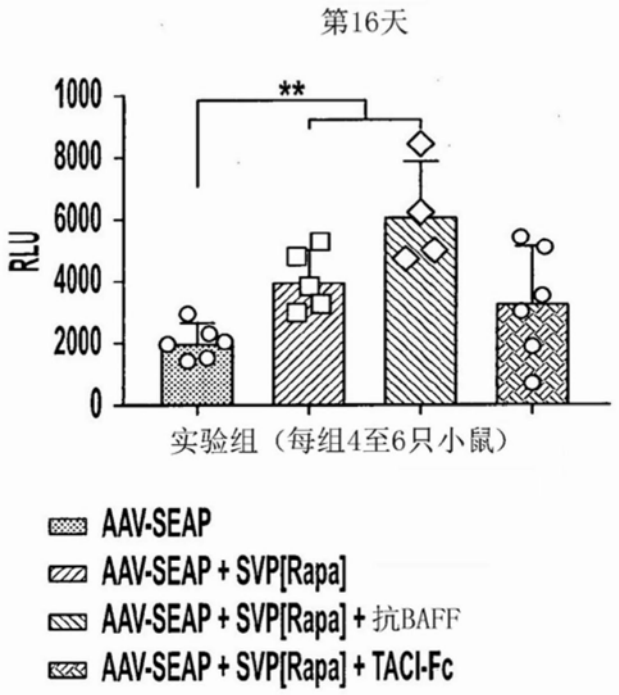

第16天
**
1000
8000
6000
4000
2000
0
RLU
实验组（每组4至6只小鼠）
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗BAFF
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + TACI-Fc

图9D

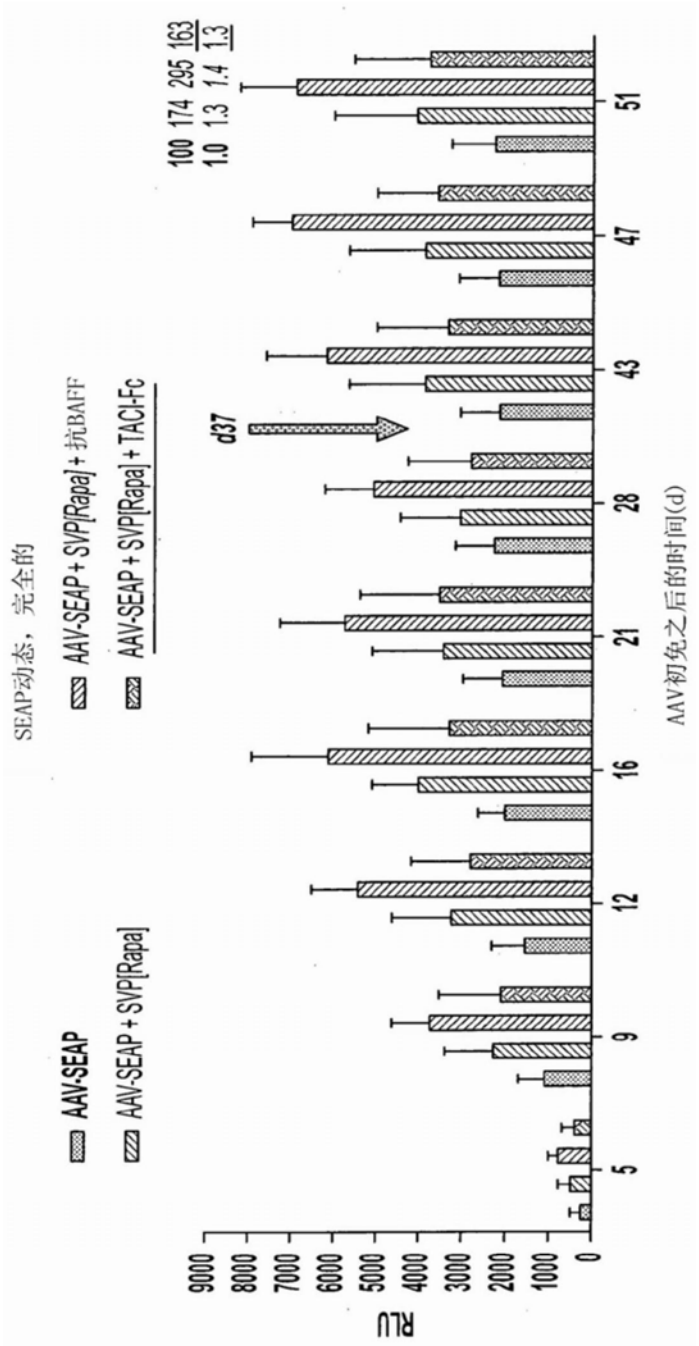
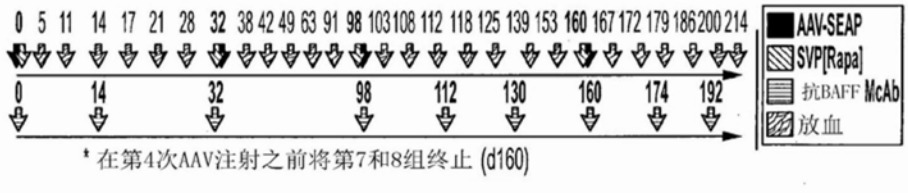

SEAP动态，完全的
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗BAFF
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + TACI-Fc
d37
100 174 295 163
1.0 1.3 1.4 1.3
RLU
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
5
9
12
16
21
28
43
47
51
AAV初免之后的时间(d)

图10

SVP[Rapa] + aBAFF研究2 (图11)

Gr. #	注射 (d0, 32, 98, 160)	Rapa共同注射的	aBAFF (i.p.)
1	AAV-SEAP, 1x10^{10} VG	无	无
2	AAV-SEAP + SVP[Rapa]	50 µg	无
3	AAV-SEAP + SVP[Rapa] + a-BAFF	50 µg	100 µg, d0,14, 32, 98, 112, 130, 160, 174, 192
4	AAV-SEAP+ SVP[Rapa], 高	150 µg	无
5	AAV-SEAP+ SVP[Rapa] + 抗BAFF, 低	150 µg	100 µg; d0, 32, 98, 130, 160, 192
6	AAV-SEAP+ SVP[Rapa] + a-BAFF, 中	150 µg	100 µg, d0, 14, 31, 98, 112, 130, 160, 174, 192
7	AAV-SEAP+ SVP[Rapa] + a-BAFF, 高*	150 µg*	与第6组中相同, 200µg
8	AAV-SEAP+仅抗BAFF*	无*	与第6组中相同, 100µg



* 在第4次AAV注射之前将第7和8组终止 (d160)

图11

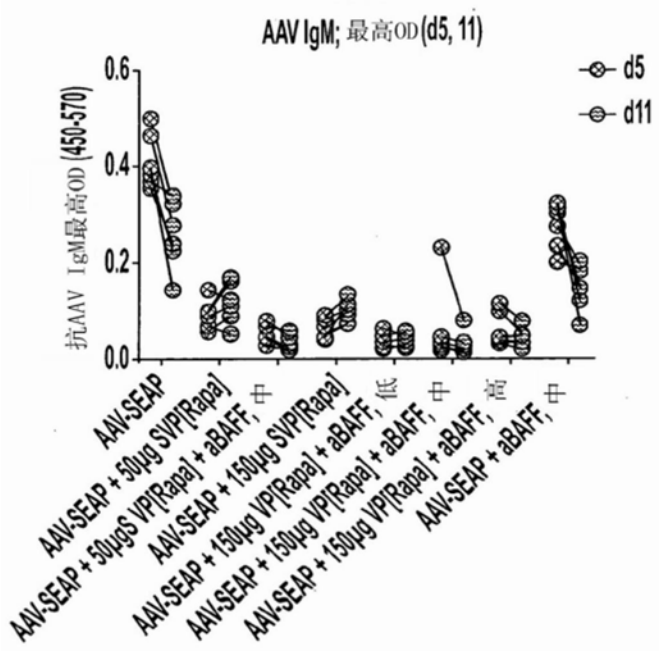


图12A

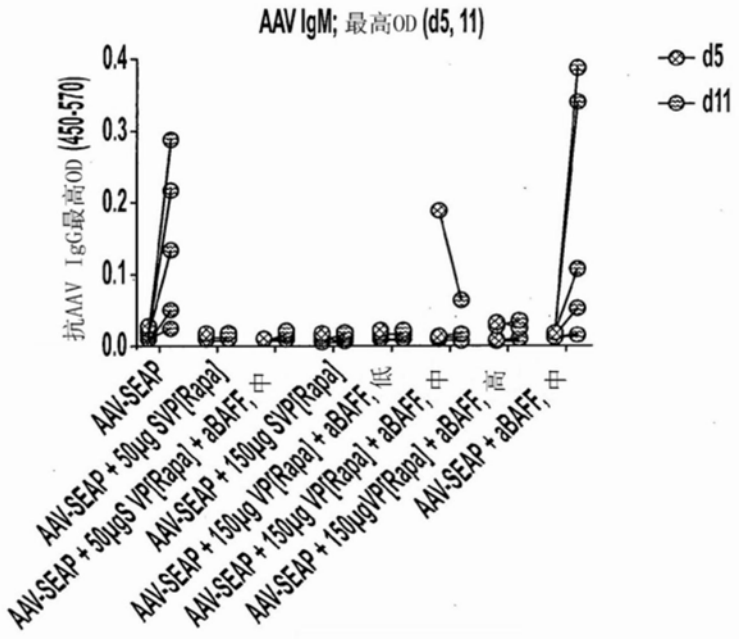

AAV IgM; 最高OD (d5, 11)
抗AAV IgG最高OD (450-570)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
d5
d11
AAV-SEAP
AAV-SEAP + 50μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 50μgS VP[Rapa] + aBAFF, 中
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 150μg VP[Rapa] + aBAFF, 低
AAV-SEAP + 150μg VP[Rapa] + aBAFF, 中
AAV-SEAP + 150μg VP[Rapa] + aBAFF, 高
AAV-SEAP + 150μgVP[Rapa] + aBAFF, 中
AAV-SEAP + aBAFF, 中

图12B

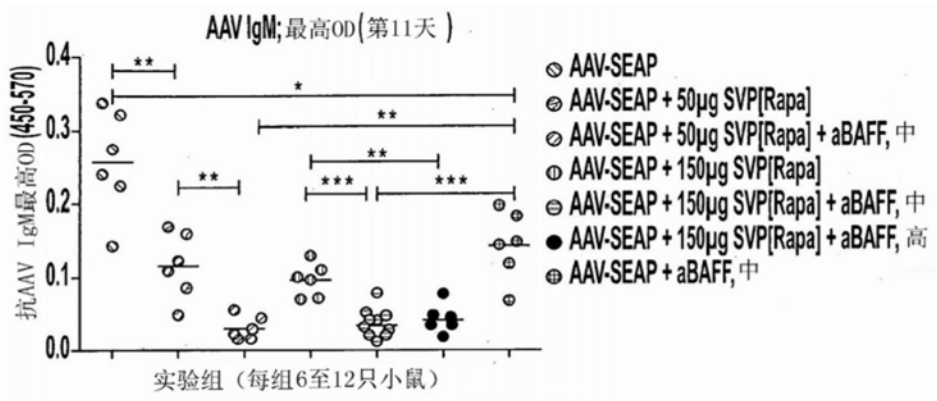

AAV IgM; 最高OD (第11天)
抗AAV IgM最高OD (450-570)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
*
**
**
***
***
AAV-SEAP
AAV-SEAP + 50μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 50μg SVP[Rapa] + aBAFF, 中
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa] + aBAFF, 中
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa] + aBAFF, 高
AAV-SEAP + aBAFF, 中
实验组（每组6至12只小鼠）

图13

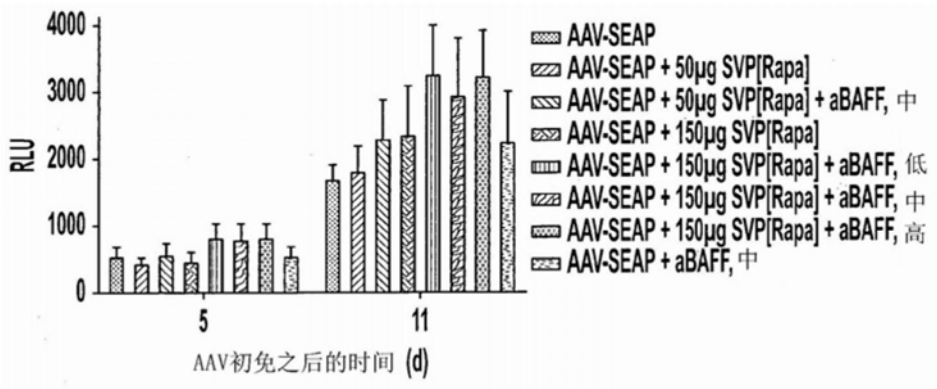

RLU
4000
3000
2000
1000
0
5
11
AAV初免之后的时间 (d)
AAV-SEAP
AAV-SEAP + 50μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 50μg SVP[Rapa] + aBAFF, 中
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa] + aBAFF, 低
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa] + aBAFF, 中
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa] + aBAFF, 高
AAV-SEAP + aBAFF, 中

图14

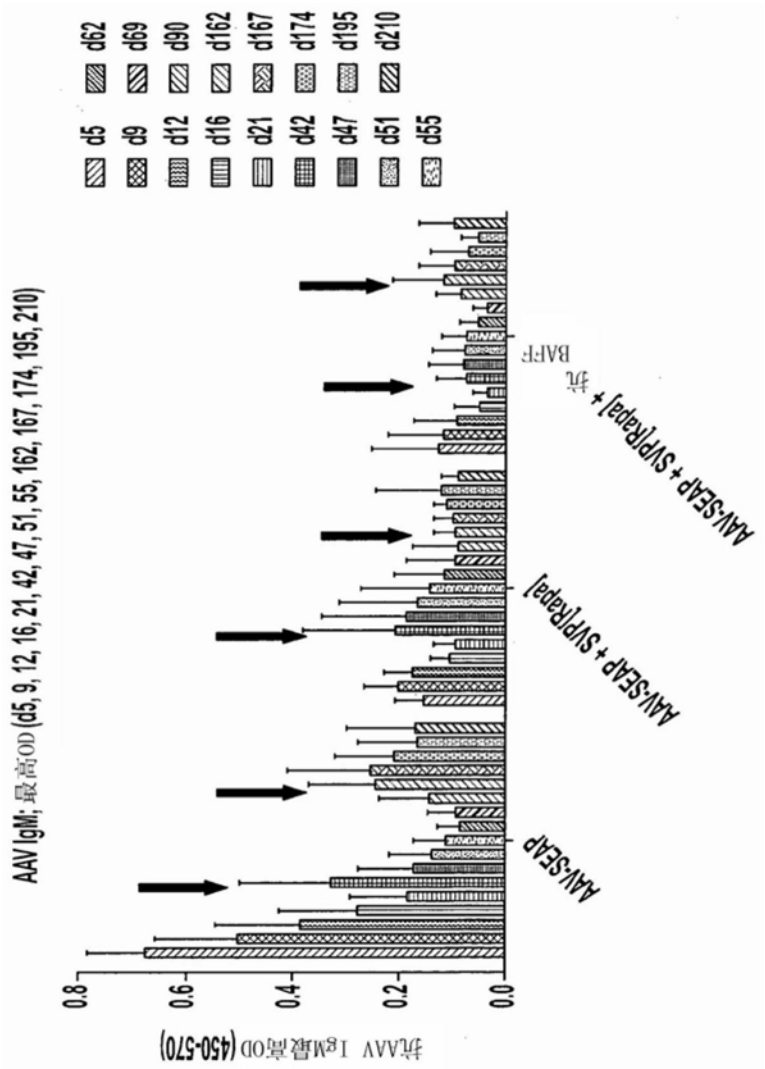

d62
d69
d90
d162
d167
d174
d195
d210
d5
d9
d12
d16
d21
d42
d47
d51
d55
AAV IgM; 最高OD (d5, 9, 12, 16, 21, 42, 47, 51, 55, 162, 167, 174, 195, 210)
抗AAV IgM最高OD (450-570)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP(Rapa)
AAV-SEAP + SVP(Rapa) + 抗BAFF

图15

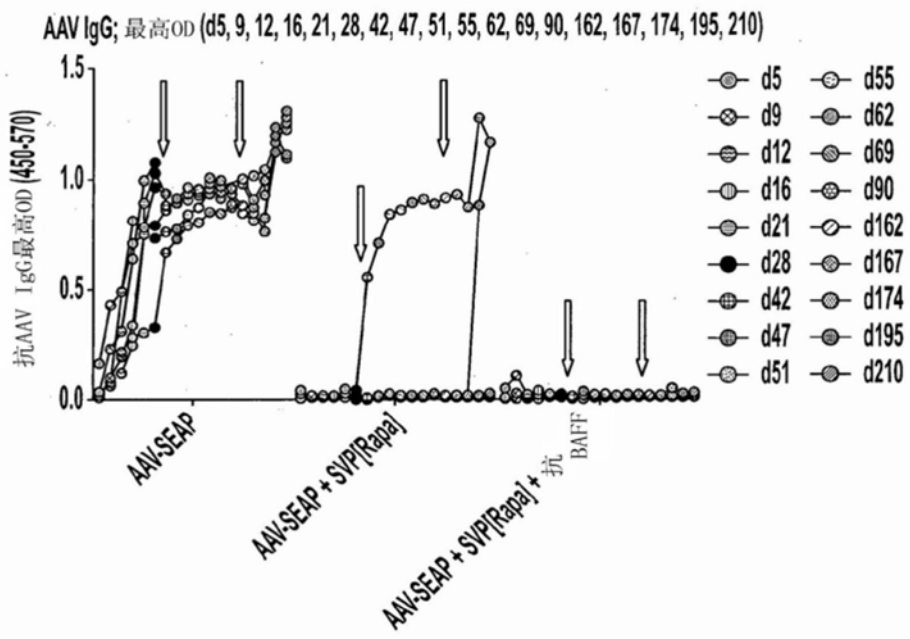

AAV IgG; 最高OD (d5, 9, 12, 16, 21, 28, 42, 47, 51, 55, 62, 69, 90, 162, 167, 174, 195, 210)
抗AAV IgG最高OD (450-570)
1.5
1.0
0.5
0.0
d5
d9
d12
d16
d21
d28
d42
d47
d51
d55
d62
d69
d90
d162
d167
d174
d195
d210
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 抗 BAFF

图16

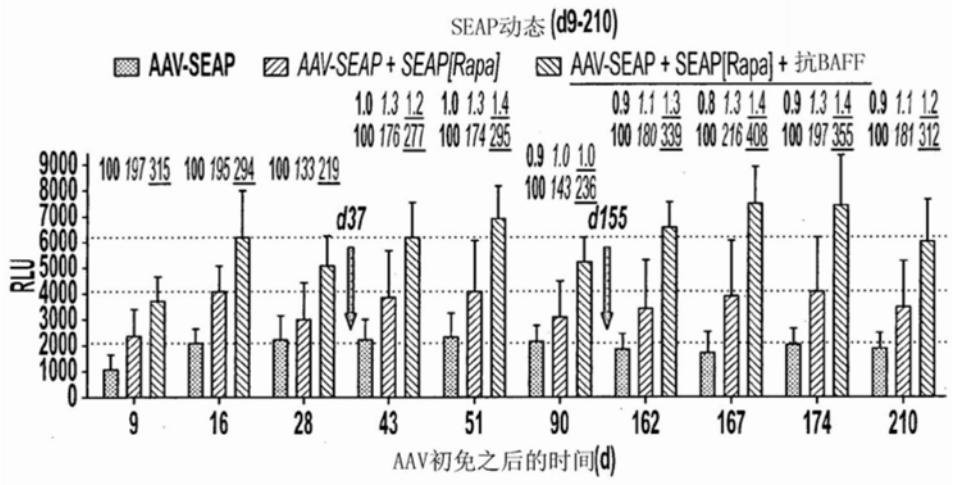

SEAP动态 (d9-210)
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SEAP[Rapa]
AAV-SEAP + SEAP[Rapa] + 抗BAFF
RLU
d37
d155
AAV初免之后的时间(d)

图17

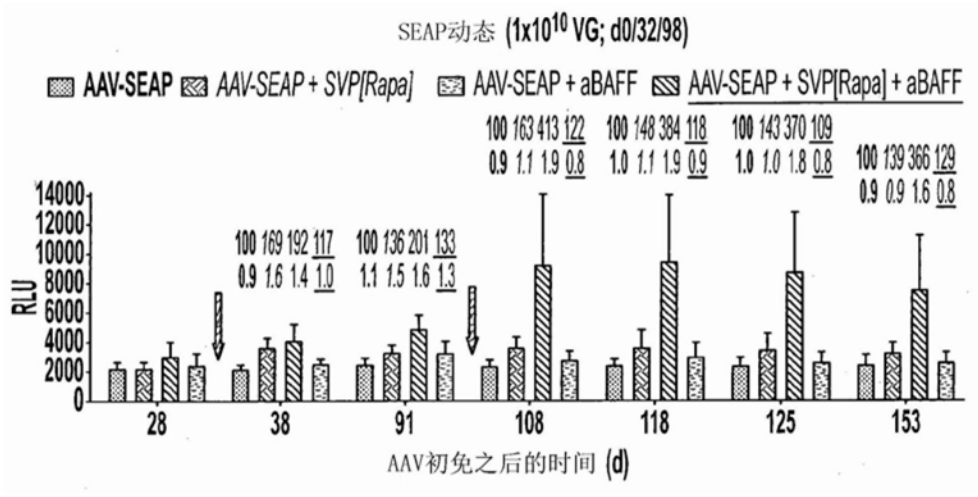

SEAP动态 (1x10^10 VG; d0/32/98)
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + aBAFF
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + aBAFF
RLU
AAV初免之后的时间 (d)

图18A

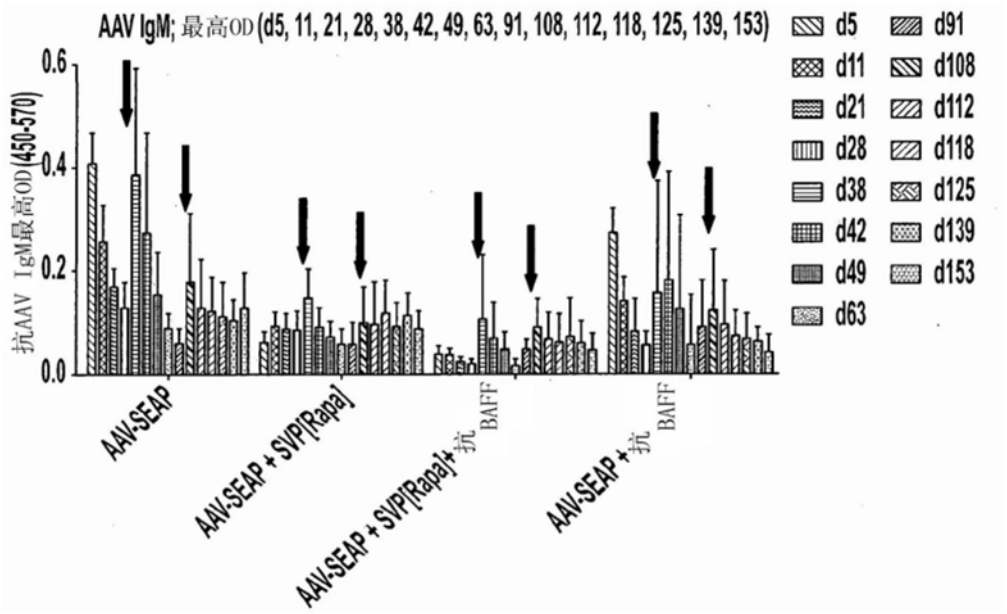

AAV IgM; 最高OD (d5, 11, 21, 28, 38, 42, 49, 63, 91, 108, 112, 118, 125, 139, 153)
抗AAV IgM最高OD (450-570)
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa]+抗BAFF
AAV-SEAP +抗BAFF

图18B

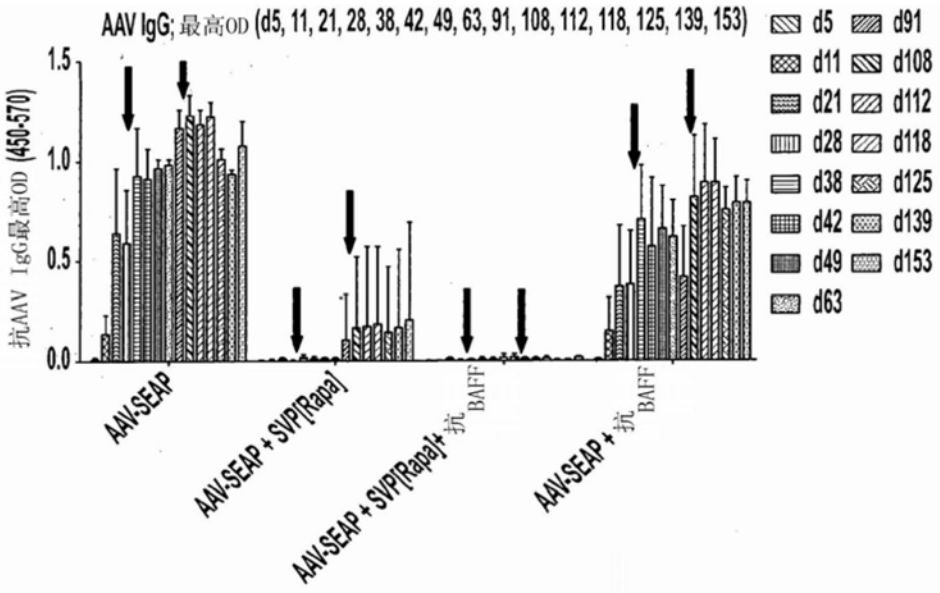

AAV IgG; 最高OD (d5, 11, 21, 28, 38, 42, 49, 63, 91, 108, 112, 118, 125, 139, 153)
抗AAV IgG最高OD (450-570)
1.5
1.0
0.5
0.0
d5
d11
d21
d28
d38
d42
d49
d63
d91
d108
d112
d118
d125
d139
d153
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa]+ 抗 BAFF
AAV-SEAP + 抗 BAFF

图18C

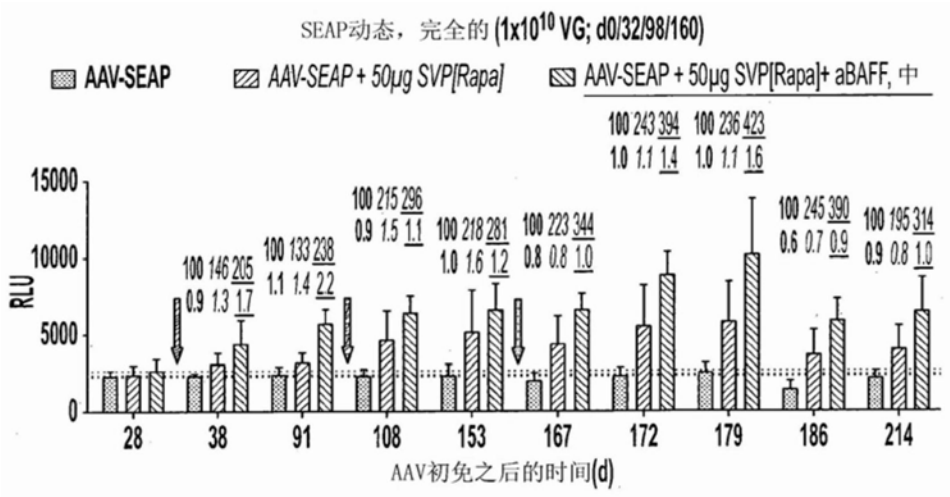

SEAP动态，完全的 (1x10^10 VG; d0/32/98/160)
AAV-SEAP
AAV-SEAP + 50μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 50μg SVP[Rapa]+ aBAFF, 中
RLU
15000
10000
5000
0
100 146 205
0.9 1.3 1.7
100 133 238
1.1 1.4 2.2
100 215 296
0.9 1.5 1.1
100 218 281
1.0 1.6 1.2
100 223 344
0.8 0.8 1.0
100 243 394
1.0 1.1 1.4
100 236 423
1.0 1.1 1.6
100 245 390
0.6 0.7 0.9
100 195 314
0.9 0.8 1.0
28
38
91
108
153
167
172
179
186
214
AAV初免之后的时间(d)

图19A

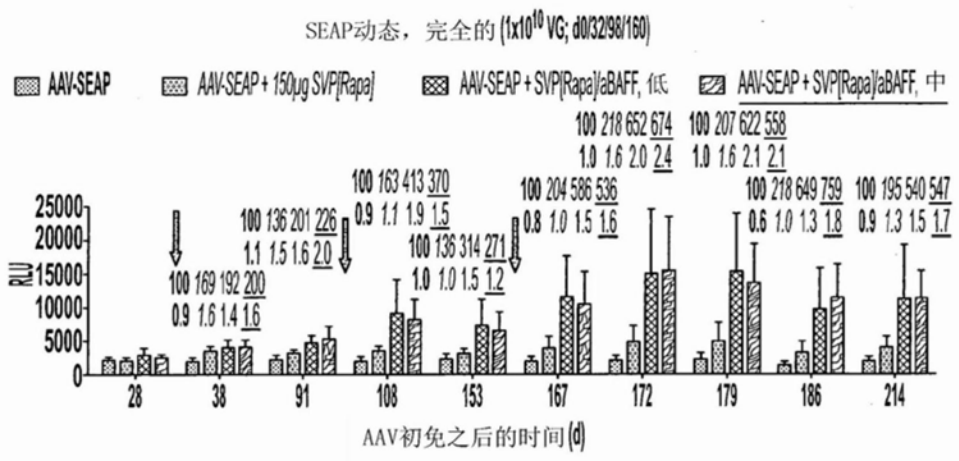

SEAP动态，完全的 (1x10^10 VG; d0/32/98/160)
AAV-SEAP
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa]/aBAFF, 低
AAV-SEAP + SVP[Rapa]/aBAFF, 中
RLU
25000
20000
15000
10000
5000
0
100 169 192 200
0.9 1.6 1.4 1.6
100 136 201 226
1.1 1.5 1.6 2.0
100 163 413 370
0.9 1.1 1.9 1.5
100 136 314 271
1.0 1.0 1.5 1.2
100 204 586 536
0.8 1.0 1.5 1.6
100 218 652 674
1.0 1.6 2.0 2.4
100 207 622 558
1.0 1.6 2.1 2.1
100 218 649 759
0.6 1.0 1.3 1.8
100 195 540 547
0.9 1.3 1.5 1.7
28
38
91
108
153
167
172
179
186
214
AAV初免之后的时间 (d)

图19B

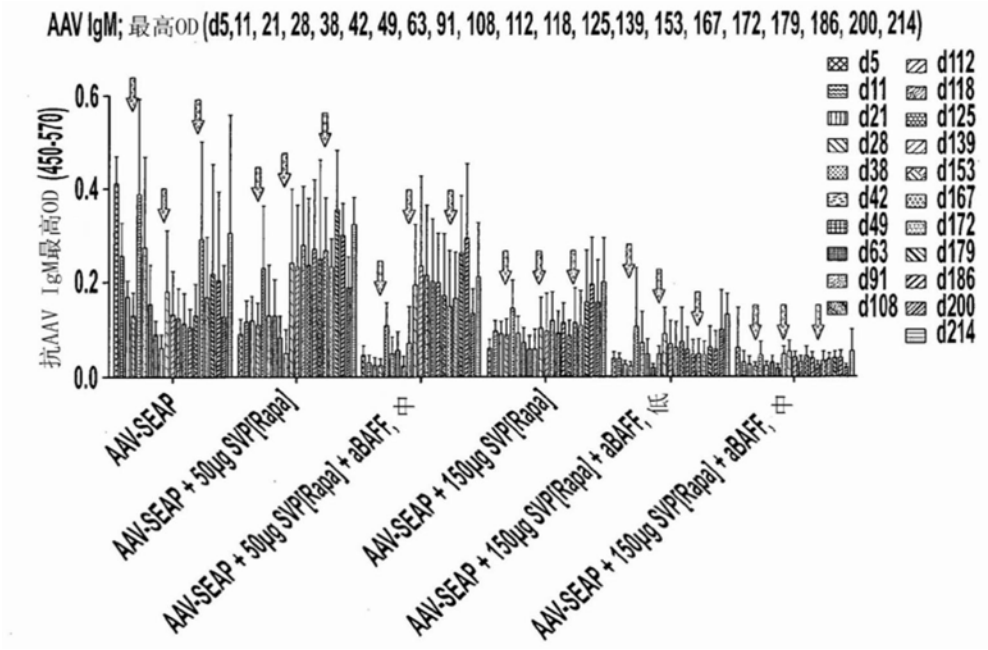

AAV IgM; 最高OD (d5,11, 21, 28, 38, 42, 49, 63, 91, 108, 112, 118, 125,139, 153, 167, 172, 179, 186, 200, 214)
抗AAV IgM最高OD (450-570)
0.6
0.4
0.2
0.0
d5
d11
d21
d28
d38
d42
d49
d63
d91
d108
d112
d118
d125
d139
d153
d167
d172
d179
d186
d200
d214
AAV-SEAP
AAV-SEAP + 50μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 50μg SVP[Rapa] + aBAFF, 中
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa] + aBAFF, 低
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa] + aBAFF, 中

图19C

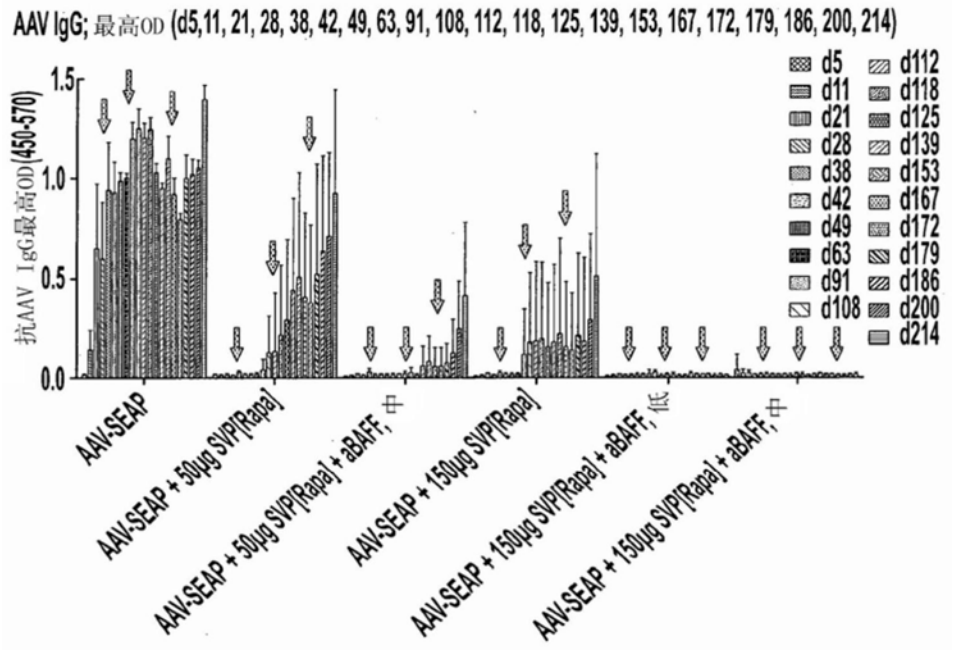

AAV IgG; 最高OD (d5,11, 21, 28, 38, 42, 49, 63, 91, 108, 112, 118, 125, 139, 153, 167, 172, 179, 186, 200, 214)
抗AAV IgG最高OD(450-570)
1.5
1.0
0.5
0.0
d5
d11
d21
d28
d38
d42
d49
d63
d91
d108
d112
d118
d125
d139
d153
d167
d172
d179
d186
d200
d214
AAV-SEAP
AAV-SEAP + 50μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 50μg SVP[Rapa] + aBAFF, 中
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa] + aBAFF, 低
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa] + aBAFF, 中

图19D

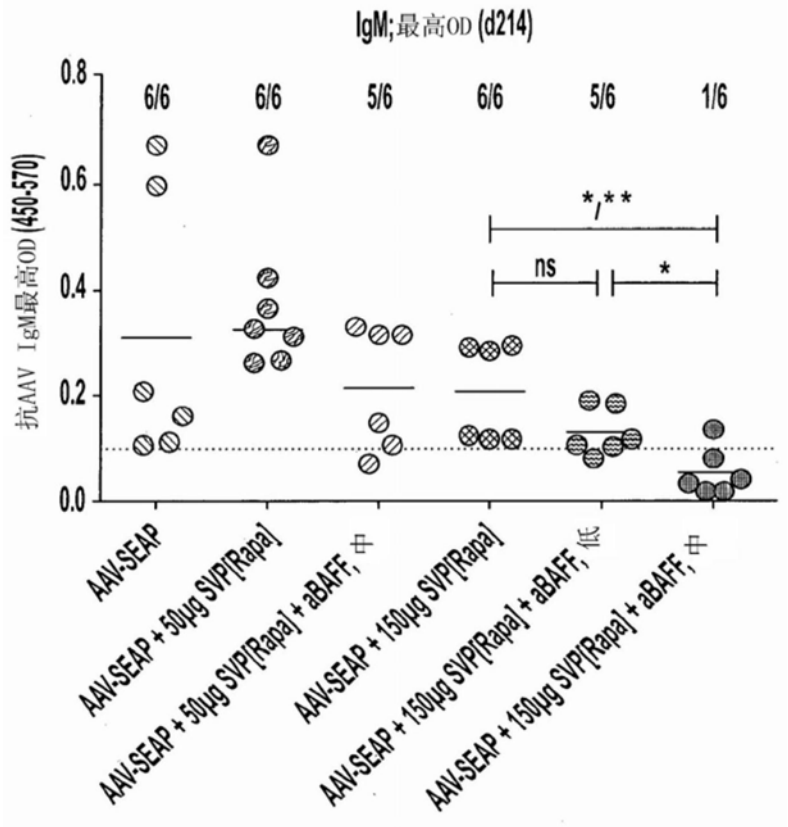

IgM; 最高OD (d214)
抗AAV IgM最高OD (450-570)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
6/6
6/6
5/6
6/6
5/6
1/6
*/**
ns
*
AAV-SEAP
AAV-SEAP + 50μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 50μg SVP[Rapa] + aBAFF, 中
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa] + aBAFF, 低
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa] + aBAFF, 中

图19E

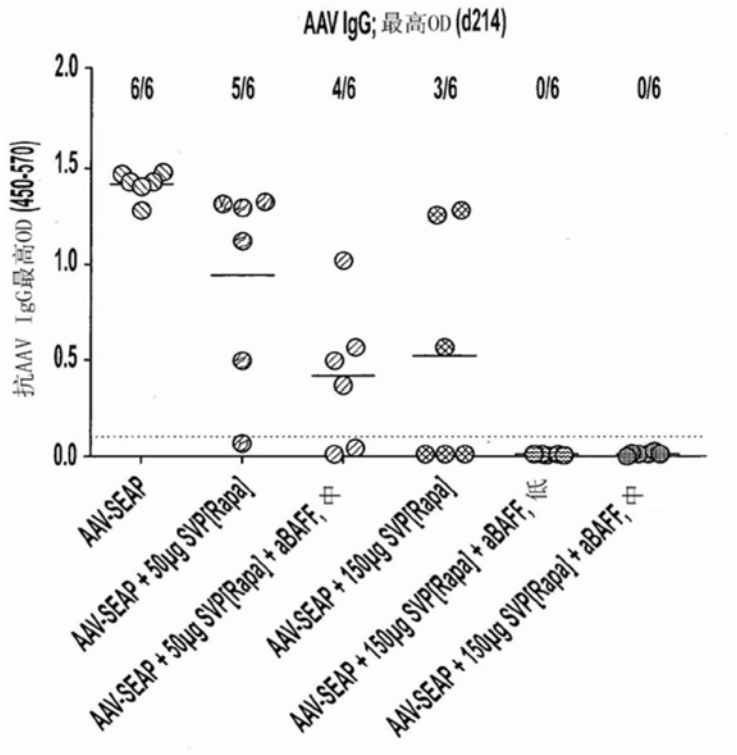

AAV IgG; 最高OD (d214)
抗AAV IgG最高OD (450-570)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
6/6
5/6
4/6
3/6
0/6
0/6
AAV-SEAP
AAV-SEAP + 50μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 50μg SVP[Rapa] + aBAFF, 中
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa] + aBAFF, 低
AAV-SEAP + 150μg SVP[Rapa] + aBAFF, 中

图19F

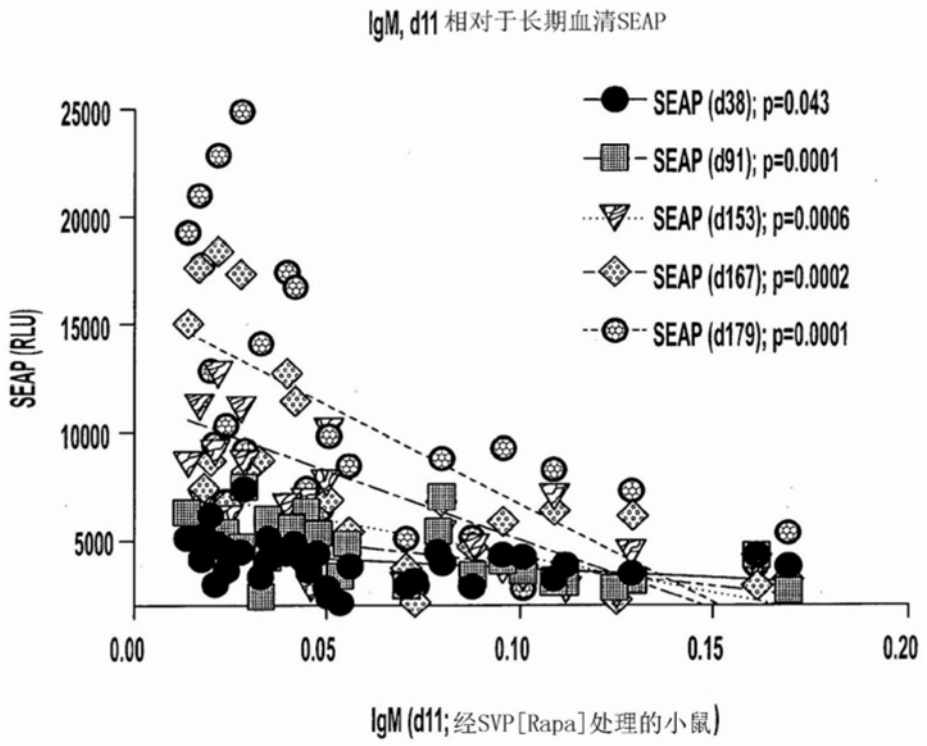

IgM, d11 相对于长期血清SEAP
SEAP (RLU)
25000
20000
15000
10000
5000
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
SEAP (d38); p=0.043
SEAP (d91); p=0.0001
SEAP (d153); p=0.0006
SEAP (d167); p=0.0002
SEAP (d179); p=0.0001
IgM (d11; 经SVP[Rapa]处理的小鼠)

图20A

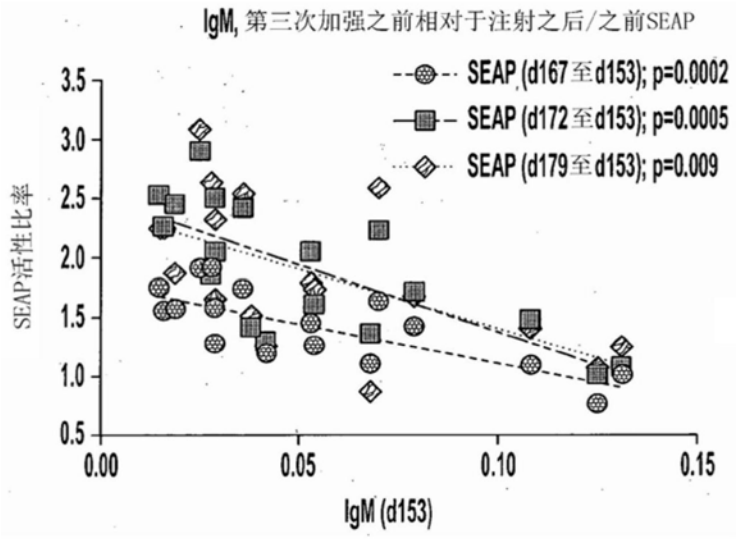

IgM, 第三次加强之前相对于注射之后/之前SEAP
SEAP (d167至d153); p=0.0002
SEAP (d172至d153); p=0.0005
SEAP (d179至d153); p=0.009
SEAP活性比率
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.00
0.05
0.10
0.15
IgM (d153)

图20B

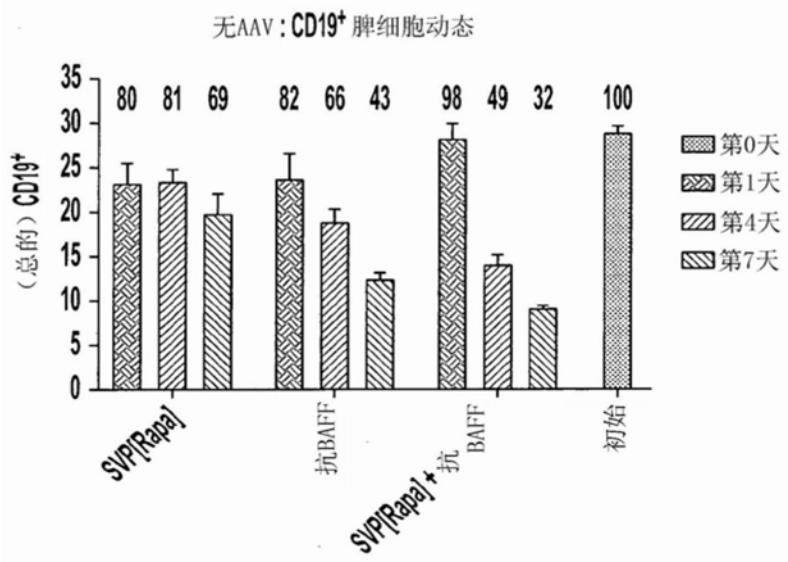

无AAV : CD19+ 脾细胞动态
(总的) CD19+
35
30
25
20
15
10
5
0
80
81
69
82
66
43
98
49
32
100
第0天
第1天
第4天
第7天
SVP[Rapa]
抗BAFF
SVP[Rapa]+抗BAFF
初始

图21A

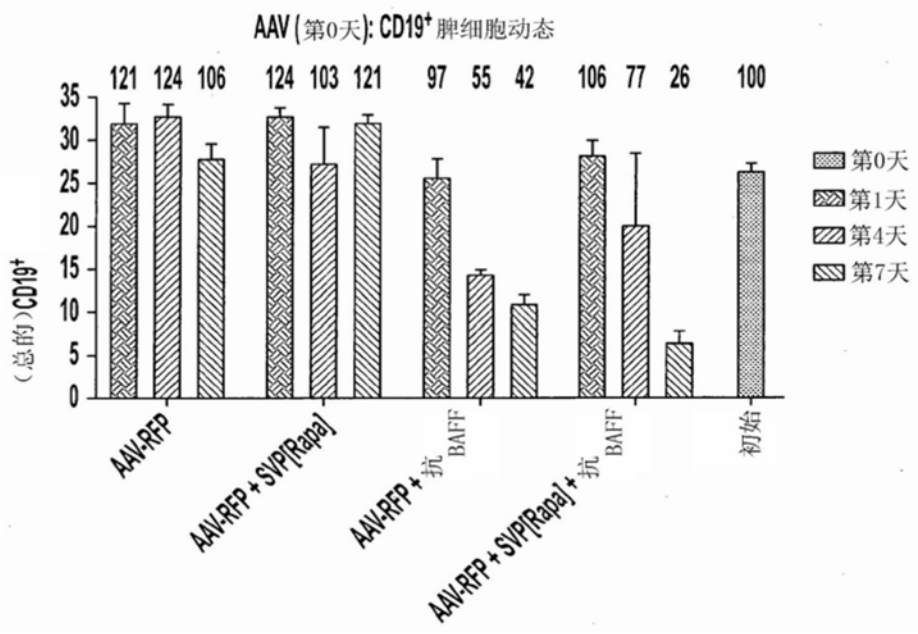

AAV(第0天): CD19+脾细胞动态
121 124 106 124 103 121 97 55 42 106 77 26 100
35
30
25
20
15
10
5
0
(总的)CD19+
第0天
第1天
第4天
第7天
AAV-RFP
AAV-RFP + SVP[Rapa]
AAV-RFP + 抗BAFF
AAV-RFP + SVP[Rapa] + 抗BAFF
初始

图21B

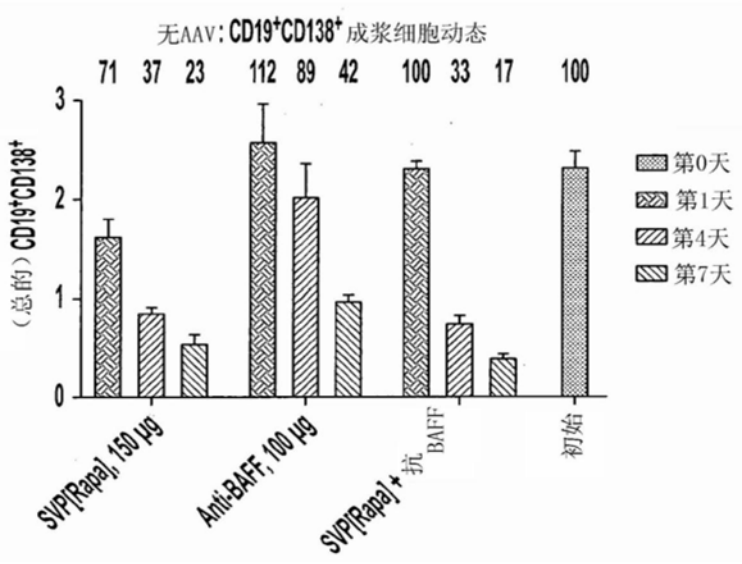

无AAV: CD19+CD138+成浆细胞动态
71 37 23 112 89 42 100 33 17 100
3
2
1
0
(总的) CD19+CD138+
第0天
第1天
第4天
第7天
SVP[Rapa], 150 μg
Anti-BAFF, 100 μg
SVP[Rapa] + 抗BAFF
初始

图21C

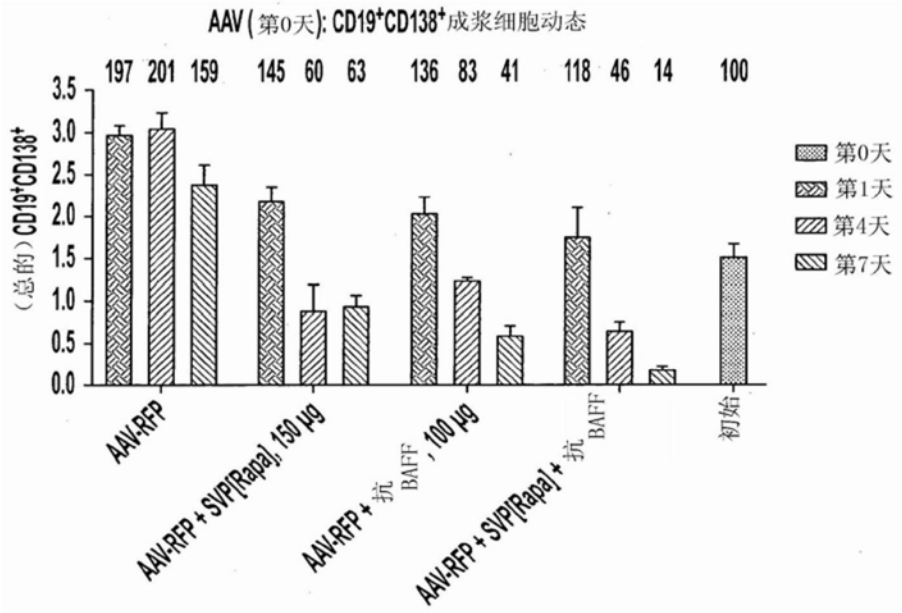

AAV(第0天):CD19+CD138+成浆细胞动态
197 201 159 145 60 63 136 83 41 118 46 14 100
(总的)CD19+CD138+
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
第0天
第1天
第4天
第7天
AAV-RFP
AAV-RFP+SVP[Rapa],150 μg
AAV-RFP+抗BAFF,100 μg
AAV-RFP+SVP[Rapa]+抗BAFF
初始

图21D

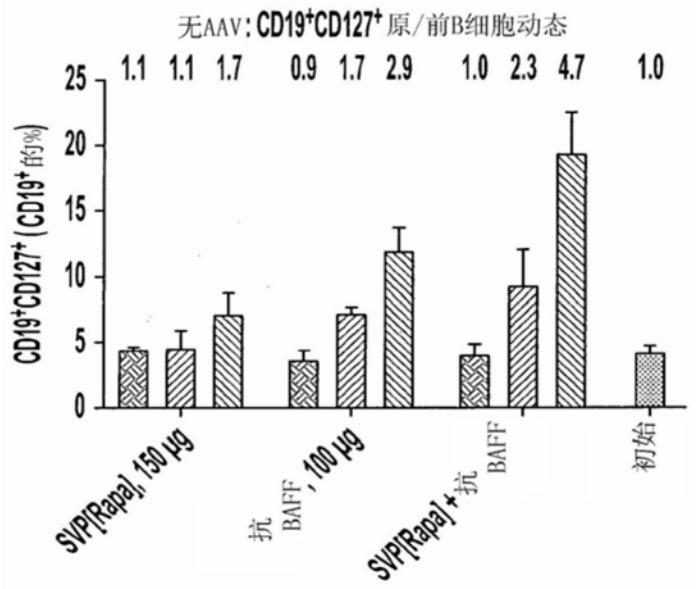

无AAV:CD19+CD127+原/前B细胞动态
1.1 1.1 1.7 0.9 1.7 2.9 1.0 2.3 4.7 1.0
CD19+CD127+(CD19+的%)
25
20
15
10
5
0
SVP[Rapa],150 μg
抗BAFF,100 μg
SVP[Rapa]+抗BAFF
初始

图21E

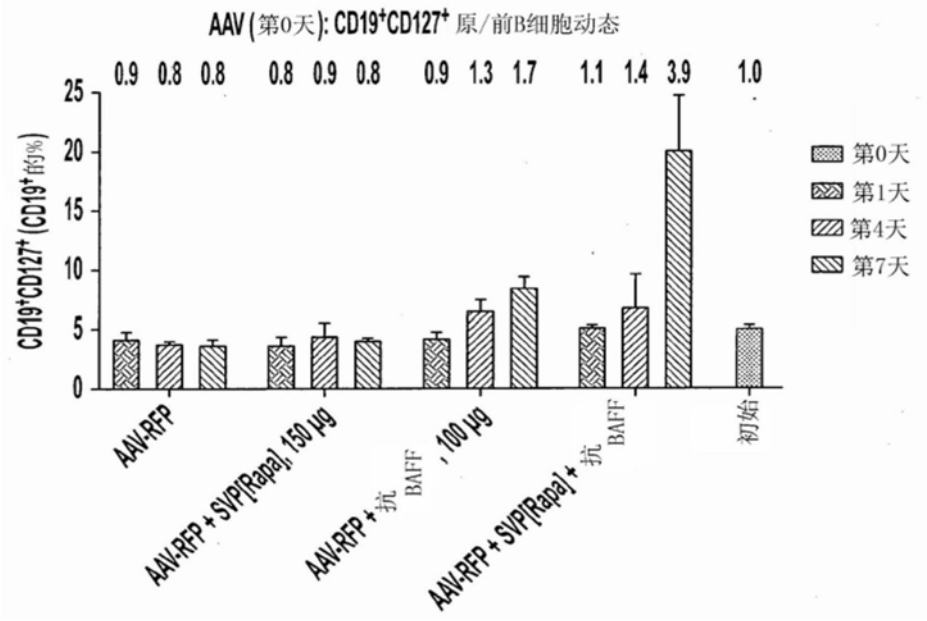

AAV (第0天): CD19+CD127+ 原/前B细胞动态
0.9 0.8 0.8 0.8 0.9 0.8 0.9 1.3 1.7 1.1 1.4 3.9 1.0
CD19+CD127+ (CD19+的%)
第0天
第1天
第4天
第7天
AAV-RFP
AAV-RFP + SVP[Rapa], 150 μg
AAV-RFP + 抗 BAFF, 100 μg
AAV-RFP + SVP[Rapa] + 抗 BAFF
初始

图21F

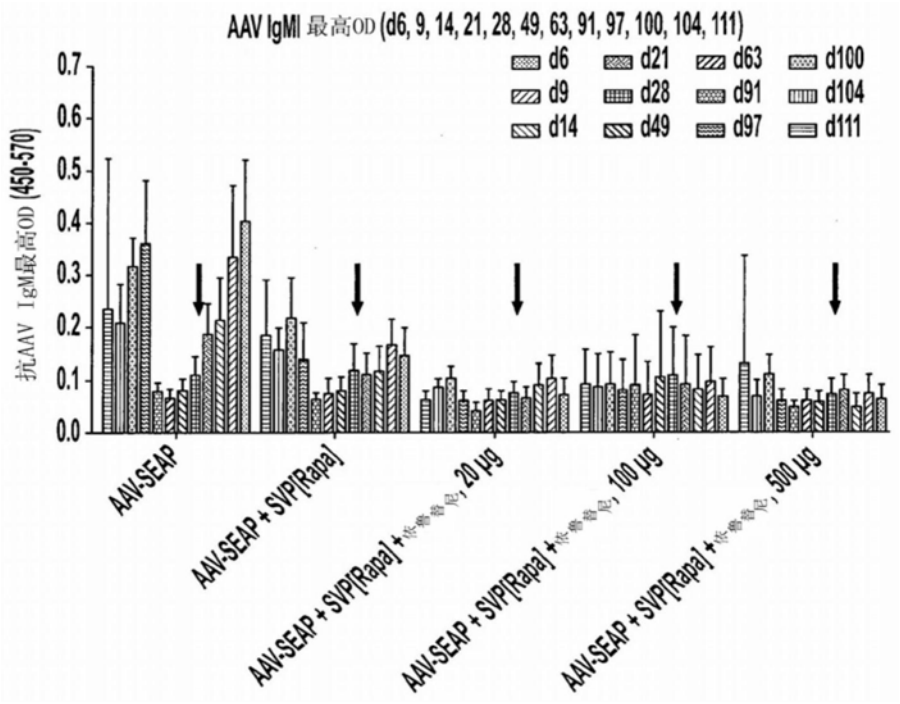

AAV IgMl 最高OD (d6, 9, 14, 21, 28, 49, 63, 91, 97, 100, 104, 111)
d6 d21 d63 d100
d9 d28 d91 d104
d14 d49 d97 d111
抗AAV IgM最高OD (450-570)
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 注射鼻尾, 20 μg
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 注射鼻尾, 100 μg
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 注射鼻尾, 500 μg

图22A

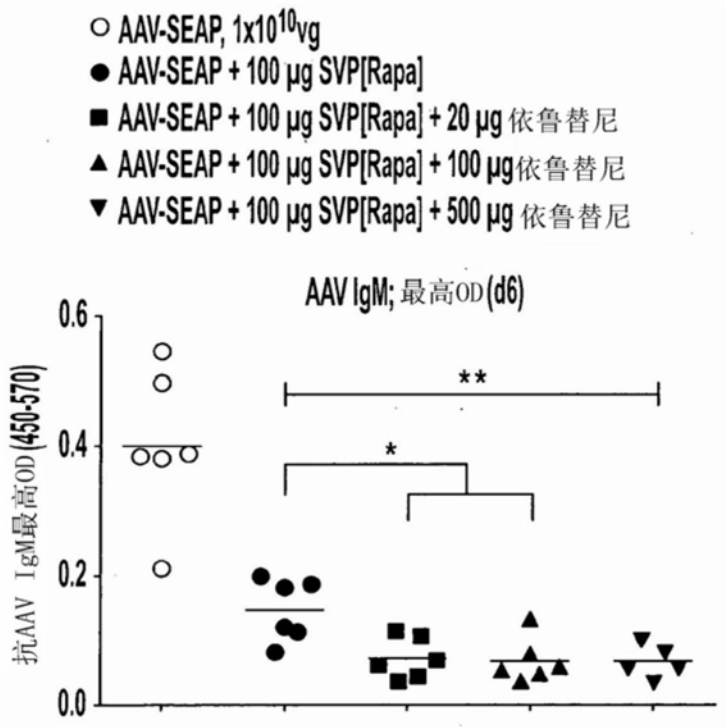

AAV-SEAP, 1x10^10vg
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa] + 20 μg 依鲁替尼
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa] + 100 μg依鲁替尼
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa] + 500 μg 依鲁替尼
AAV IgM; 最高OD(d6)
抗AAV IgM最高OD(450-570)
0.6
0.4
0.2
0.0
**
*

图22B

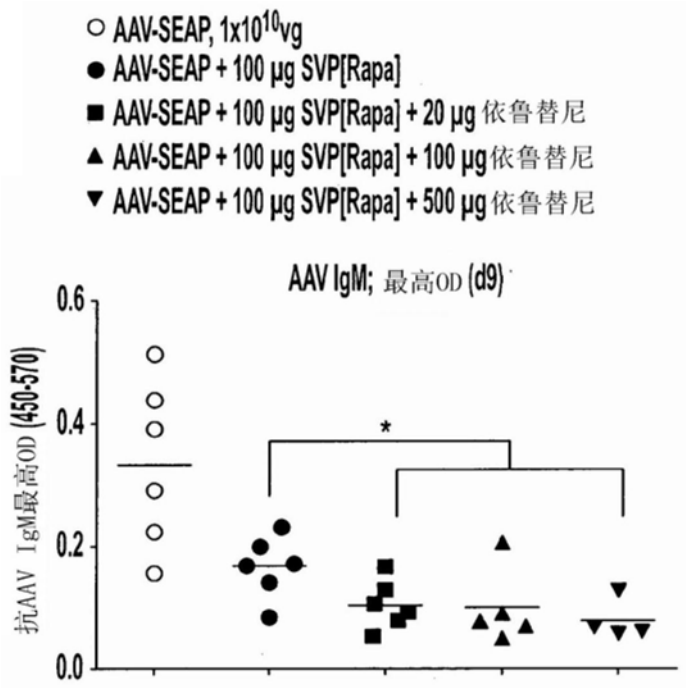

AAV-SEAP, 1x10^10vg
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa] + 20 μg 依鲁替尼
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa] + 100 μg依鲁替尼
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa] + 500 μg依鲁替尼
AAV IgM; 最高OD (d9)
抗AAV IgM最高OD (450-570)
0.6
0.4
0.2
0.0
*

图22C

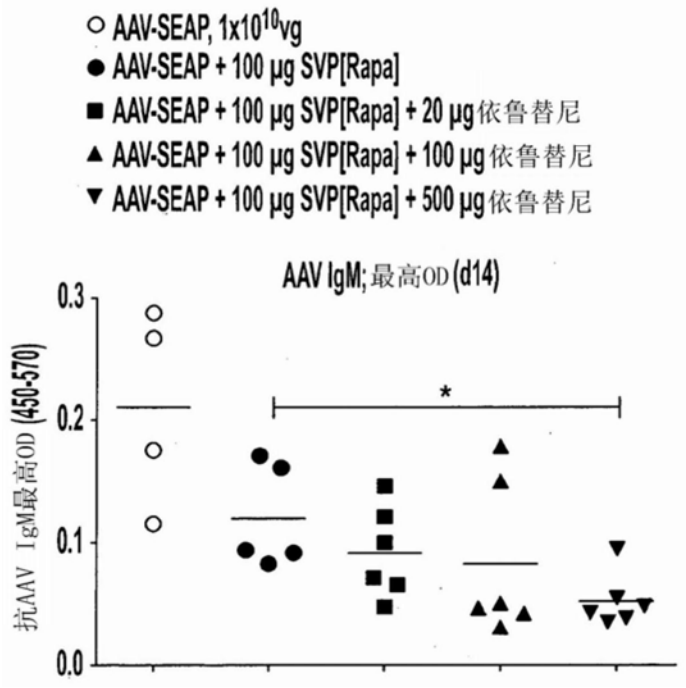

AAV-SEAP, 1x10^10vg
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa] + 20 μg依鲁替尼
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa] + 100 μg依鲁替尼
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa] + 500 μg依鲁替尼
AAV IgM; 最高OD (d14)
抗AAV IgM最高OD (450-570)
0.3
0.2
0.1
0.0
*

图22D

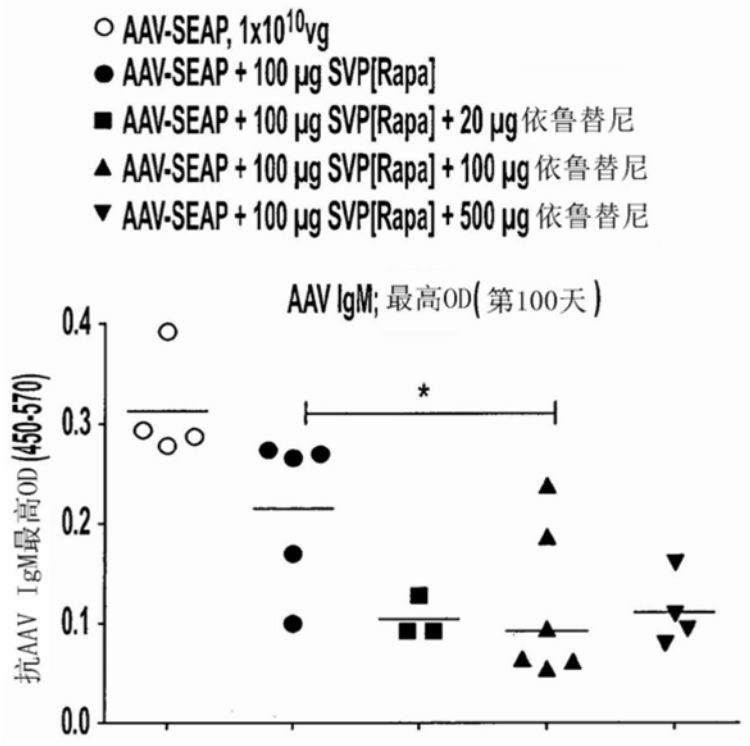

AAV-SEAP, 1x10^10vg
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa] + 20 μg依鲁替尼
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa] + 100 μg依鲁替尼
AAV-SEAP + 100 μg SVP[Rapa] + 500 μg依鲁替尼
AAV IgM; 最高OD(第100天)
抗AAV IgM最高OD (450-570)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*

图22E

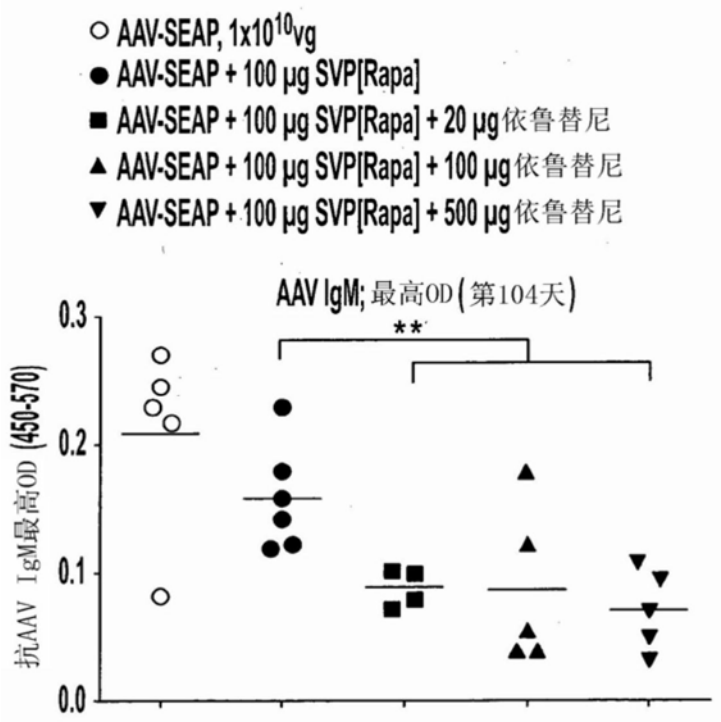

AAV-SEAP, 1x10^10vg
AAV-SEAP + 100 µg SVP[Rapa]
AAV-SEAP + 100 µg SVP[Rapa] + 20 µg依鲁替尼
AAV-SEAP + 100 µg SVP[Rapa] + 100 µg依鲁替尼
AAV-SEAP + 100 µg SVP[Rapa] + 500 µg依鲁替尼
AAV IgM; 最高OD (第104天)
**
抗AAV IgM最高OD (450-570)
0.3
0.2
0.1
0.0

图22F

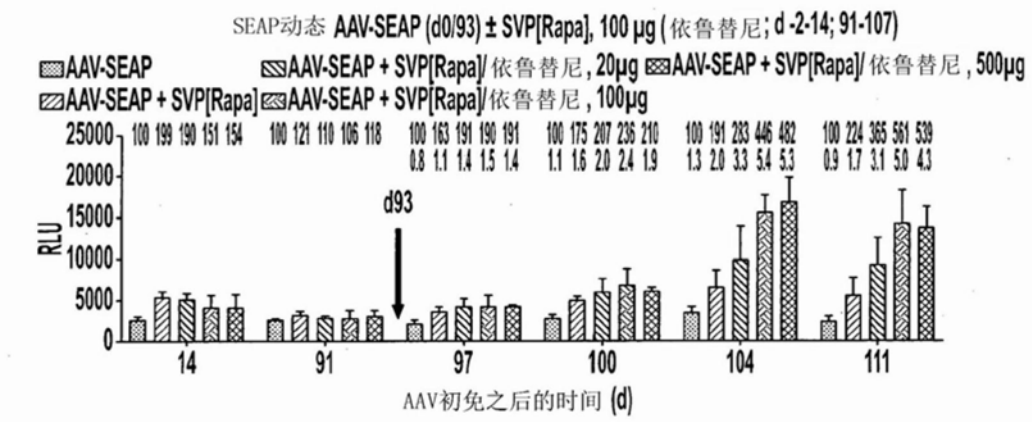

SEAP动态 AAV-SEAP (d0/93) ± SVP[Rapa], 100 µg (依鲁替尼; d -2-14; 91-107)
AAV-SEAP
AAV-SEAP + SVP[Rapa]/依鲁替尼, 20µg
AAV-SEAP + SVP[Rapa]/依鲁替尼, 500µg
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa]/依鲁替尼, 100µg
100 199 190 151 154
100 121 110 106 118
100 163 191 190 191
0.8 1.1 1.4 1.5 1.4
100 175 207 236 210
1.1 1.6 2.0 2.4 1.9
100 191 283 446 482
1.3 2.0 3.3 5.4 5.3
100 224 365 561 539
0.9 1.7 3.1 5.0 4.3
d93
RLU
25000
20000
15000
10000
5000
0
14
91
97
100
104
111
AAV初免之后的时间 (d)

图23A

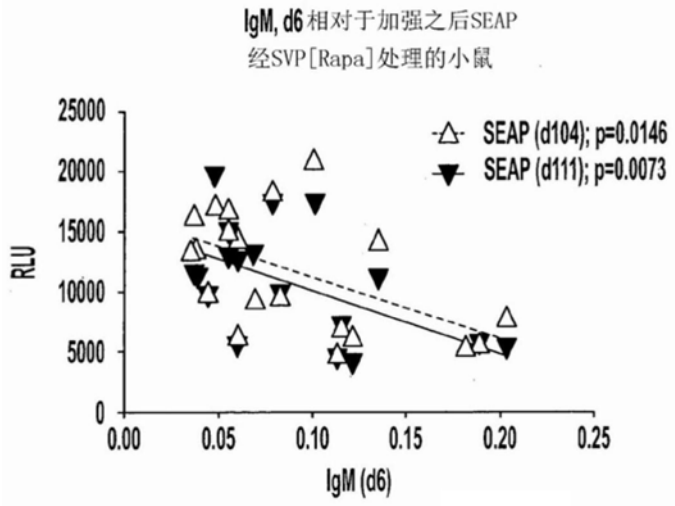

IgM, d6相对于加强之后SEAP
经SVP[Rapa]处理的小鼠
SEAP (d104); p=0.0146
SEAP (d111); p=0.0073
RLU
IgM (d6)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25

图23B

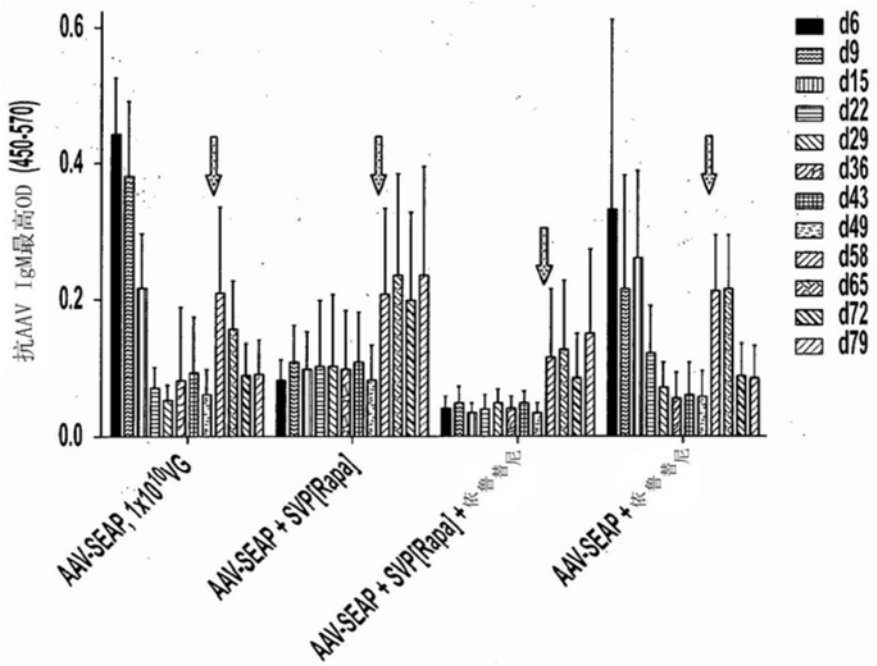

抗AAV IgM最高OD (450-570)
0.6
0.4
0.2
0.0
d6
d9
d15
d22
d29
d36
d43
d49
d58
d65
d72
d79
AAV-SEAP, 1x10^10VG
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 依鲁替尼
AAV-SEAP + 依鲁替尼

图24A

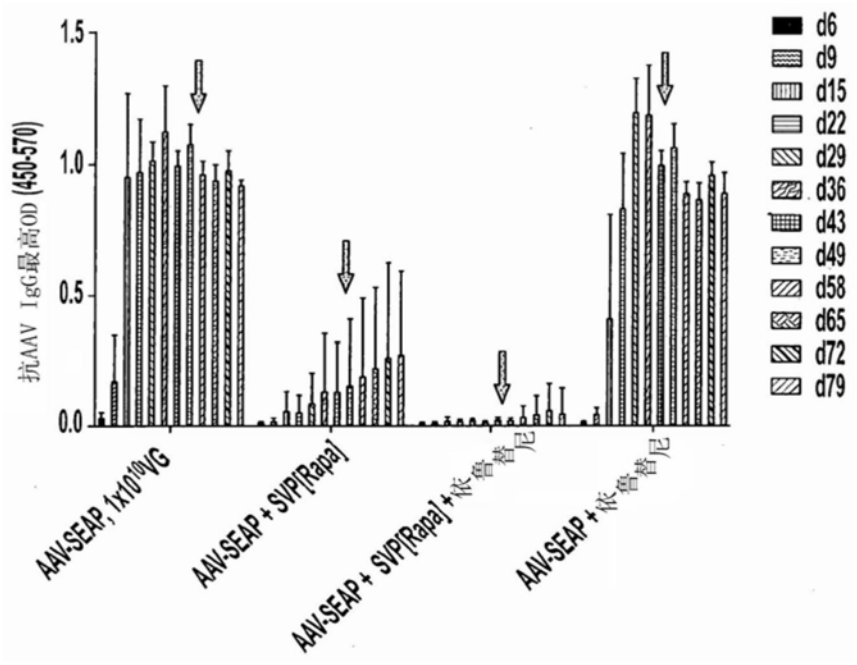

抗AAV IgG最高OD (450-570)
1.5
1.0
0.5
0.0
d6
d9
d15
d22
d29
d36
d43
d49
d58
d65
d72
d79
AAV-SEAP, 1x10^10VG
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa] + 依鲁替尼
AAV-SEAP + 依鲁替尼

图24B

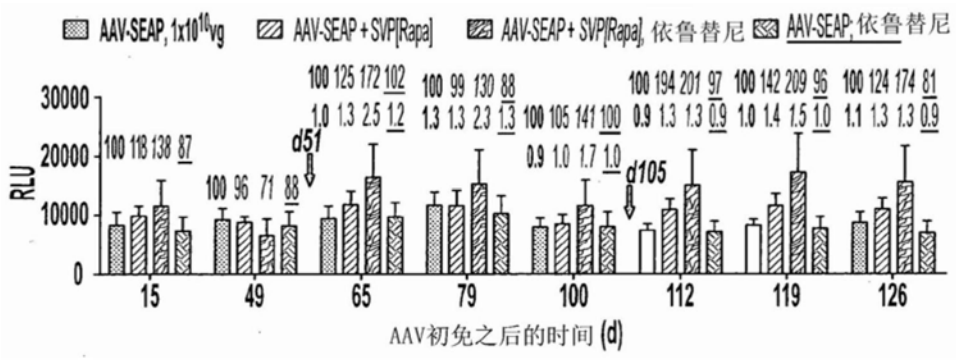

AAV-SEAP, 1x10^10vg
AAV-SEAP + SVP[Rapa]
AAV-SEAP + SVP[Rapa], 依鲁替尼
AAV-SEAP, 依鲁替尼
RLU
30000
20000
10000
0
d51
d105
15
49
65
79
100
112
119
126
AAV初免之后的时间 (d)

图25