



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119630802 A

(43) 申请公布日 2025.03.14

(21) 申请号 202380043587.1

(22) 申请日 2023.04.12

(30) 优先权数据

63/330,239 2022.04.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/065687 2023.04.12

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/201272 EN 2023.10.19

(71) 申请人 建新公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 S·R·丘杜里 M·莫特瓦尼

C·穆埃勒 J·里德

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

权利要求书17页 说明书68页

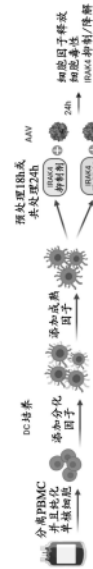
序列表(电子公布) 附图15页

(54) 发明名称

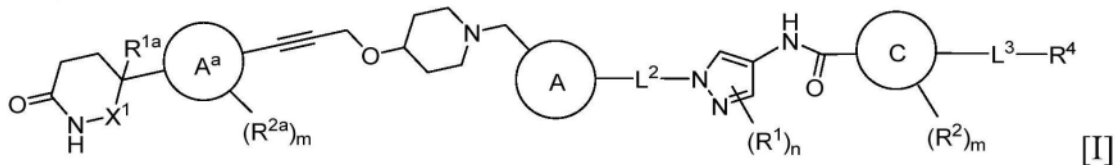
IRAK4调节剂用于基因疗法的用途

(57) 摘要

本文提供了通过施用IRAK调节剂(例如, IRAK-4降解剂)与基因疗法以抑制对该基因疗法的先天免疫来增强个体的基因疗法的方法。在一些实施例中,该基因疗法使用腺相关病毒(AAV)载体、腺病毒载体、慢病毒载体、单纯疱疹病毒(HSV)载体或脂质纳米颗粒。本文还提供了用于选择用IRAK调节剂与基因治疗剂组合治疗的个体的方法。



1. 一种用于将核酸递送至有需要的个体的细胞的方法,该方法包括
 - a) 向该个体施用IRAK调节剂,以及
 - b) 向该个体施用基因治疗剂。
2. 一种用于用基因治疗剂治疗有需要的个体的方法,该方法包括
 - a) 向该个体施用IRAK调节剂,以及
 - b) 向该个体施用该基因治疗剂。
3. 一种用于改善个体的基因疗法的方法,该方法包括
 - a) 向该个体施用IRAK调节剂,以及
 - b) 向该个体施用基因治疗剂。
4. 一种用于抑制有需要的个体对基因治疗剂的免疫应答的方法,该方法包括
 - a) 向该个体施用IRAK调节剂,以及
 - b) 向该个体施用基因治疗剂。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂调节IRAK蛋白激酶的活性或表达。
6. 如权利要求5所述的方法,其中该IRAK蛋白激酶是IRAK-1蛋白激酶、IRAK-2蛋白激酶、IRAK-3蛋白激酶或IRAK-4蛋白激酶。
7. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂调节IRAK-4蛋白激酶的活性或表达。
8. 如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂是IRAK降解剂、IRAK抑制剂或赋予IRAK功能丧失的药剂。
9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂是小分子。
10. 如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂包含式[I]的化合物:



或其药学上可接受的盐,其中:

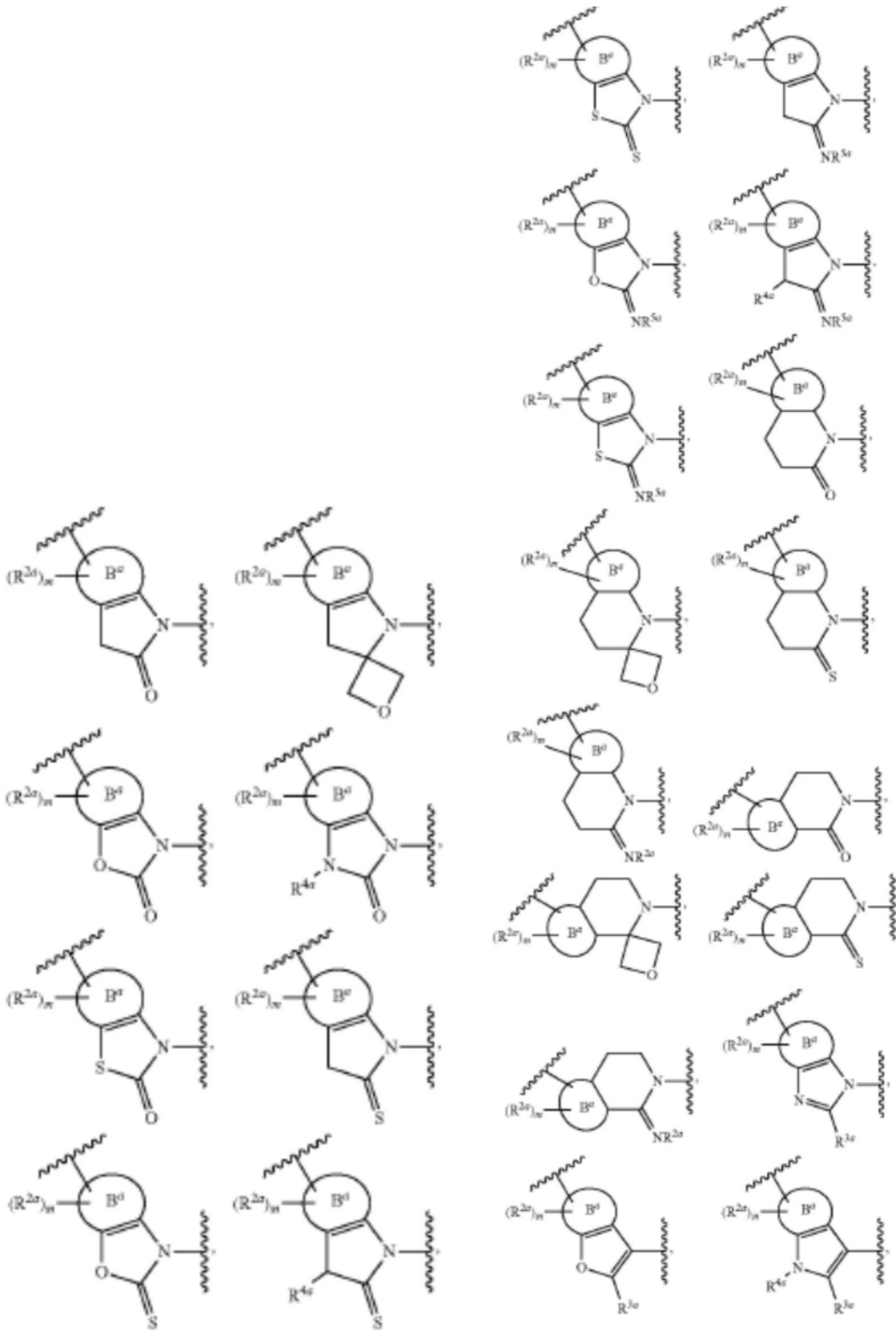
X^1 是选自共价键、 $-CH_2-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-C(S)-$ 的二价部分,并且

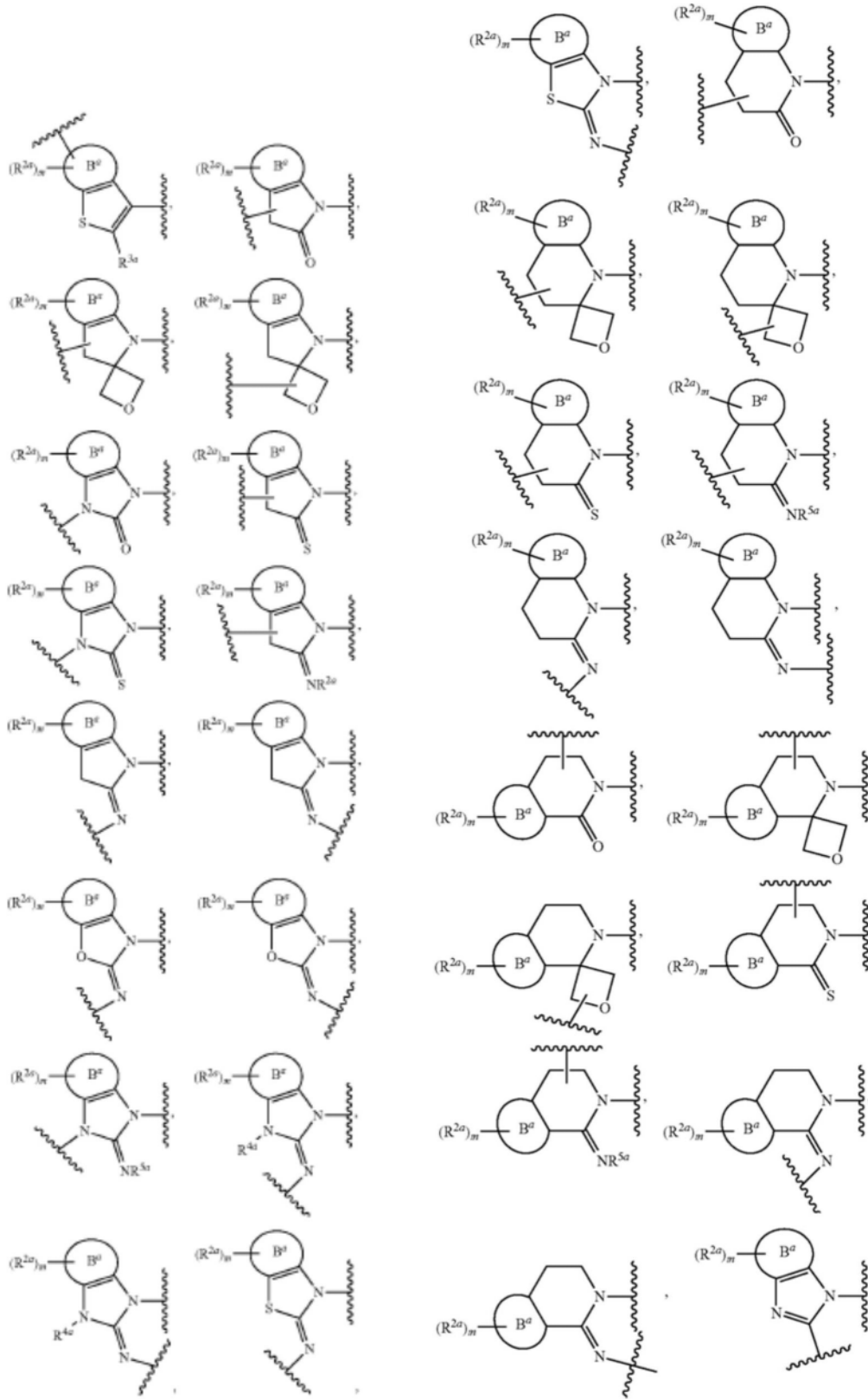


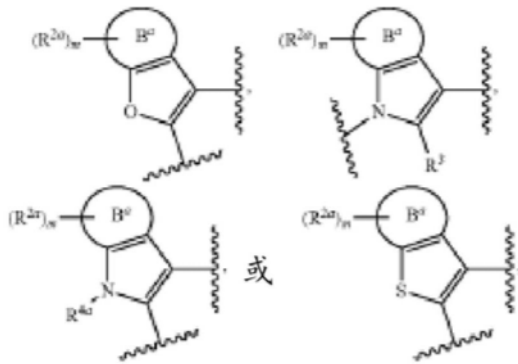
R^{1a} 是氢、卤素、 $-CN$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-S(O)R$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-Si(R)_3$ 或任选经取代的 C_{1-4} 脂族;

每个 R^{2a} 独立地是氢、 R^{6a} 、卤素、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-NR_2$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2NR_2$ 、 $-S(O)R$ 、 $-C(O)R$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-C(O)NR_2$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-OC(O)NR_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)C(O)NR_2$ 或 $-N(R)S(O)_2R$;

环 A^a 是选自以下的双环或三环:







环B^a是选自以下的稠合环:含有0-2个氮原子的6元芳基,5至7元部分饱和碳环基,具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5至7元部分饱和杂环基,或具有1-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5元杂芳基;

R^{3a}选自氢、卤素、-OR、-N(R)₂或-SR;

每个R^{4a}独立地是氢、R^{6a}、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-S(O)R、-C(O)OR、-C(O)NR₂、-C(O)N(R)OR、-OC(O)R、-OC(O)NR₂、-N(R)C(O)OR、N(R)C(O)R、-N(R)C(O)NR₂或-N(R)S(O)₂R;

R^{5a}是氢、C₁₋₄脂族或-CN;

每个R^{6a}独立地是选自以下的任选经取代的基团:C₁₋₆脂族,苯基,具有1-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的4-7元饱和或部分不饱和杂环,和具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环;

环A是4-10元饱和单环或双环碳环或具有0-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环;

环C是苯基或具有1-5个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-10元单环或双环杂芳基环;L²和L³中的每一个独立地是共价键或C₁₋₃二价直链或支链饱和或不饱和烃链,其中该链的1-3个亚甲基单元独立地且任选地被以下替代:-O-、-C(O)-、-C(S)-、-C(R)₂-、-CH(R)-、-C(F)₂-、-N(R)-、-S-、-S(O)₂-或-CR=CR-;

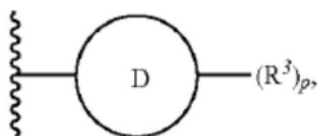
每个R¹独立地是氢、R⁵、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-S(O)(NR)R、-P(O)(OR)₂、-P(O)(NR₂)₂、-CFR₂、-CF₂(R)、-CF₃、-CR₂(OR)、-CR₂(NR₂)、-C(O)R、-C(O)OR或-C(O)NR₂;

每个R独立地是氢或选自以下的任选经取代的基团:C₁₋₆脂族,苯基,具有1-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的4-7元饱和或部分不饱和杂环,和具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环,或者:

同一原子上的两个R基团任选地与介于它们中间的原子一起形成任选经取代的4-11元饱和或部分不饱和碳环或具有除它们所附接的原子之外的0-3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环单环、双环、桥接双环、螺环、或杂芳基环;

每个R²独立地是氢、R⁵、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-S(O)(NR)R、-P(O)(OR)₂、-P(O)(NR₂)₂、-CF₂(R)、-CF₃、-CR₂(OR)、-CR₂(NR₂)、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NR₂、-C(O)N(R)OR、-OC(O)R、-OC(O)NR₂、-N(R)C(O)OR、-N(R)C(O)R、-N(R)C(O)NR₂或-N(R)S(O)₂R;

R⁴选自



氢、或选自以下的任选经取代的基团： C_{1-6} 脂族或4-11元饱和或部分不饱和单环、双环、桥接双环或螺环碳环或具有1-3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环；

环D是苯基，4-10元饱和或部分不饱和单环或双环碳环或具有1-3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环，或具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环；

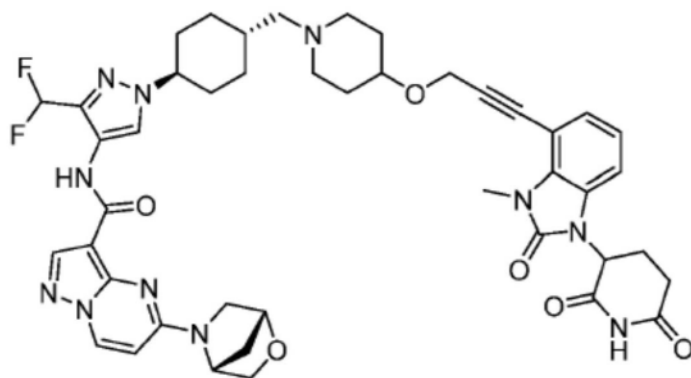
每个 R^3 独立地是氢、 R^5 、卤素、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-NR^2$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2NR_2$ 、 $-S(O)R$ 、 $-S(O)(NR)R$ 、 $-P(O)(OR)_2$ 、 $-P(O)(NR_2)_2$ 、 $-CF_2(R)$ 、 $-CF_3$ 、 $-CR_2(OR)$ 、 $-CR_2(NR_2)$ 、 $-C(O)R$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-C(O)NR_2$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-OC(O)NR_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)C(O)NR_2$ 或 $-N(R)S(O)_2R$ ；

每个 R^5 独立地是选自以下的任选经取代的基团： C_{1-6} 脂族，苯基，3-7元饱和或部分不饱和和碳环或具有1-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环，和具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环；

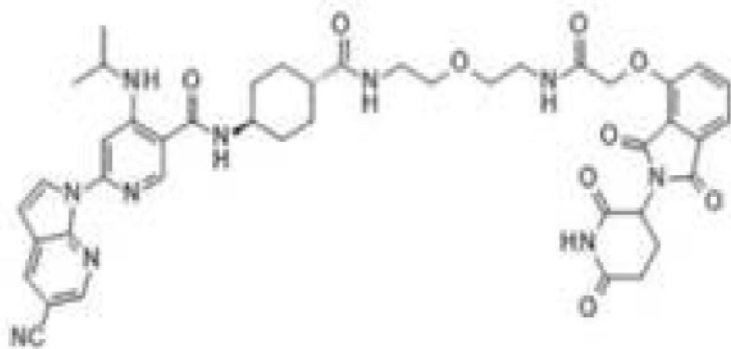
n是0、1或2；

每个m独立地是0、1、2、3或4；并且p是0、1、2、3或4。

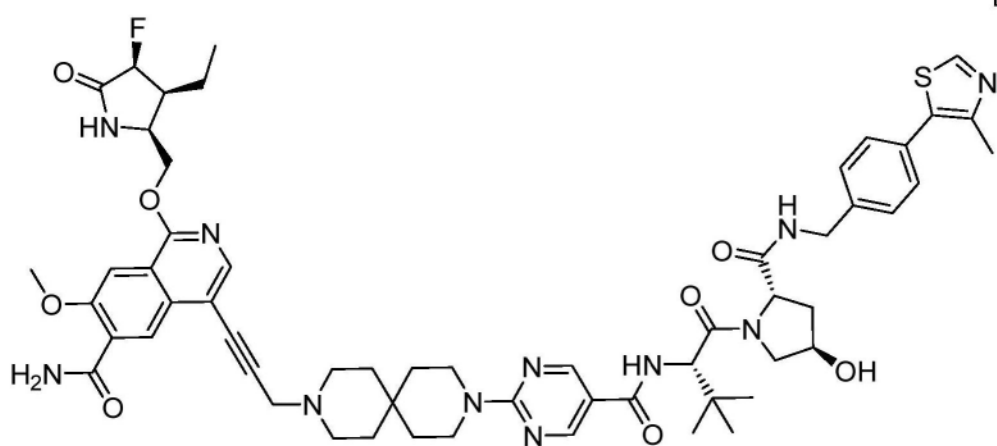
11. 如权利要求1-9中任一项所述的方法，其中该IRAK调节剂包含式[II]-[V]的化合物中的任一个：



[II],



[III] 或



[IV],

或其药学上可接受的盐。

12. 如权利要求1-9中任一项所述的方法, 其中该IRAK调节剂是式[II]的化合物、PROTAC IRAK-4降解剂1或PF 06650833。

13. 如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂是CRISPR、siRNA、shRNA、miRNA、RNAi、反义RNA、核酶或脱氧核酶。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂阻断TLR9功能。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中该基因治疗剂包含病毒载体。

16. 如权利要求15所述的方法,其中该病毒载体是AAV颗粒。

17. 如权利要求16所述的方法,其中该AAV颗粒包含AAV1衣壳、AAV2衣壳、AAV3衣壳、AAV4衣壳、AAV5衣壳、AAV6衣壳、AAV7衣壳、AAV8衣壳、AAVrh8衣壳、AAV9衣壳、AAV10衣壳、AAVrh10衣壳、AAV11衣壳、AAV12衣壳、AAVrh32.33衣壳、AAV-XL32衣壳、AAV-XL32.1衣壳、AAV LK03衣壳、AAV2R471A衣壳、AAV2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳、AAV DJ8衣壳、AAV2 N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、山羊AAV衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳、牛AAV衣壳、小鼠AAV衣壳、rAAV2/HBoV1(嵌合AAV/人博卡病毒1型)、AAV2HBKO衣壳、AAVPHP.B衣壳或AAVPHP.eB衣壳或其功能变体。

18. 如权利要求17所述的方法,其中该AAV衣壳包含酪氨酸突变、肝素结合突变或HBKO突变。

19. 如权利要求16-18中任一项所述的方法,其中该AAV病毒颗粒包含含有一个或多个反向末端重复(ITR)的AAV基因组,其中该一个或多个ITR是AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AAV4 ITR、AAV5 ITR、AAV6ITR、AAV7 ITR、AAV8 ITR、AAVrh8 ITR、AAV9 ITR、AAV10 ITR、AAVrh10ITR、AAV11 ITR或AAV12 ITR。

20. 如权利要求19所述的方法,其中该AAV颗粒的该一个或多个ITR和该衣壳衍生自相同的AAV血清型。

21. 如权利要求19所述的方法,其中该AAV颗粒的该一个或多个ITR和该衣壳衍生自不同的AAV血清型。

22. 如权利要求15所述的方法,其中病毒载体是腺病毒颗粒。

23. 如权利要求22所述的方法,其中该腺病毒颗粒包含来自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu 3、AdHu4、、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型或其功能变体的衣壳。

24. 如权利要求15所述的方法,其中该病毒载体是慢病毒颗粒。

25. 如权利要求24所述的方法,其中该重组慢病毒颗粒用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫科拉病毒、狂犬病病毒、RD114或其功能变体假型化。

26. 如权利要求15所述的方法,其中该病毒载体是单纯疱疹病毒(HSV)颗粒。

27. 如权利要求26所述的方法,其中该HSV颗粒是HSV-1颗粒或HSV-2颗粒或其功能变体。

28. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中该基因治疗剂包含脂质纳米颗粒。

29. 如权利要求1-28中任一项所述的方法,其中该基因治疗剂包含编码异源转基因的核酸。

30. 如权利要求29所述的方法,其中该异源转基因与启动子可操作地连接。

31. 如权利要求30所述的方法,其中该启动子是组成型启动子、组织特异性启动子或诱

导型启动子。

32. 如权利要求1-31中任一项所述的方法,其中在施用该基因治疗剂之前、同时或之后施用该IRAK调节剂。

33. 如权利要求1-32中任一项所述的方法,其中该个体患有适合于通过基因疗法治疗的疾病或障碍。

34. 如权利要求33所述的方法,其中该疾病或障碍是单基因病或障碍。

35. 如权利要求1-34中任一项所述的方法,其中将该基因治疗剂静脉内、腹膜内、动脉内、肌内、皮下或肝内施用。

36. 如权利要求1-35中任一项所述的方法,其中将该IRAK调节剂口服、静脉内、腹膜内、动脉内、肌内、皮下或肝内施用。

37. 一种用于将基因治疗剂递送至有需要的个体的细胞的方法,该方法包括

a) 将来自该个体的先天免疫细胞与该基因治疗剂一起孵育,

b) 分析这些先天免疫细胞的一种或多种细胞因子的表达,其中在与该基因治疗剂一起孵育之后细胞因子特征的表达鉴定出对该基因治疗剂具有先天免疫的个体,

c) 向步骤b)中鉴定出的个体施用IRAK调节剂,以及

d) 向步骤b)中鉴定出的个体施用该基因治疗剂。

38. 一种用于用基因治疗剂治疗有需要的方法,该方法包括

a) 将来自该个体的先天免疫细胞与该基因治疗剂一起孵育,

b) 分析这些先天免疫细胞的一种或多种细胞因子的表达,其中在与该基因治疗剂一起孵育之后细胞因子特征的表达鉴定出对该基因治疗剂具有先天免疫的个体,

c) 向步骤b)中鉴定出的个体施用IRAK调节剂,以及

d) 向步骤b)中鉴定出的个体施用该基因治疗剂。

39. 一种用于选择用基因治疗剂和IRAK调节剂治疗的个体的方法,该方法包括

a) 将来自该个体的先天免疫细胞与该基因治疗剂一起孵育,

b) 分析这些先天免疫细胞的一种或多种细胞因子的表达,其中在与该基因治疗剂一起孵育之后细胞因子特征的表达鉴定出用基因治疗剂和IRAK调节剂治疗的个体,

c) 选择在步骤b)中鉴定出的个体用基因治疗剂和IRAK调节剂治疗。

40. 如权利要求39所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:

d) 向步骤b)中鉴定出的个体施用IRAK调节剂,以及

e) 向步骤b)中鉴定出的个体施用该基因治疗剂。

41. 如权利要求37-40中任一项所述的方法,其中该先天免疫细胞是树突细胞、单核细胞、巨噬细胞或自然杀伤(NK)细胞。

42. 如权利要求37-41中任一项所述的方法,其中从来自该个体的外周血单个核细胞中分离这些先天免疫细胞。

43. 如权利要求38-42中任一项所述的方法,其中该先天免疫细胞是树突细胞。

44. 如权利要求43所述的方法,其中该树突细胞衍生自该个体的单核细胞。

45. 如权利要求44所述的方法,该方法进一步包括

从该个体中分离单核细胞,以及

将这些单核细胞在树突细胞培养基中孵育以从这些单核细胞中衍生出树突细胞,然后

将这些树突细胞与该基因治疗剂一起孵育。

46. 如权利要求44或45所述的方法,其中这些单核细胞是CD14+单核细胞。

47. 如权利要求44-46中任一项所述的方法,其中将这些单核细胞用该树突细胞培养基孵育约5至约10天或约7至约8天,以从这些单核细胞衍生出树突细胞。

48. 如权利要求37-47中任一项所述的方法,其中在与步骤c)的基因治疗剂一起孵育之前将这些先天免疫细胞重新铺板。

49. 如权利要求48所述的方法,其中将这些先天免疫细胞重新铺板到微孔皿中。

50. 如权利要求37-49中任一项所述的方法,其中该基因治疗剂是病毒载体,并且其中将这些先天免疫细胞与该病毒载体以约 1×10^3 至约 1×10^5 或约 1×10^4 的MOI一起孵育。

51. 如权利要求37-49中任一项所述的方法,其中该基因治疗剂是非病毒载体,并且其中将这些先天免疫细胞与浓度为约1ng/mL至约1mg/mL的非病毒载体一起孵育。

52. 如权利要求37-51中任一项所述的方法,其中将这些先天免疫细胞与该基因治疗剂一起孵育约12小时至约36小时或约24小时。

53. 如权利要求37-52中任一项所述的方法,其中该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的一种或多种的增加的表达。

54. 如权利要求37-53中任一项所述的方法,其中该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 的增加的表达。

55. 如权利要求37-53中任一项所述的方法,其中该细胞因子特征包括IL6、TNF α 和IL-1 β 的增加的表达。

56. 如权利要求37-55中任一项所述的方法,其中与合适的对照相比,该细胞因子特征中这些细胞因子的表达增加。

57. 如权利要求56所述的方法,其中该合适的对照是来自未与该基因治疗剂一起孵育的先天免疫细胞的细胞因子特征中的这些细胞因子的表达,或者其中该合适的对照是来自与该基因治疗剂一起孵育之前的先天免疫细胞的细胞因子特征中的这些细胞因子的表达。

58. 如权利要求37-57中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂调节IRAK蛋白激酶的活性。

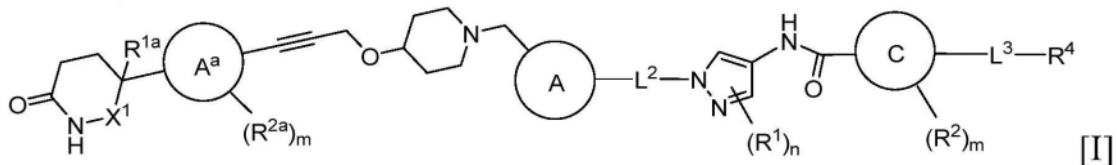
59. 如权利要求58所述的方法,其中该IRAK蛋白激酶是IRAK-1蛋白激酶、IRAK-2蛋白激酶、IRAK-3蛋白激酶或IRAK-4蛋白激酶。

60. 如权利要求37-59中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂调节IRAK-4蛋白激酶的活性。

61. 如权利要求37-60中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂是IRAK降解剂、IRAK抑制剂或赋予IRAK功能丧失的药剂。

62. 如权利要求37-61中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂是小分子。

63. 如权利要求37-62中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂包含式[I]的化合物:



或其药学上可接受的盐,其中:

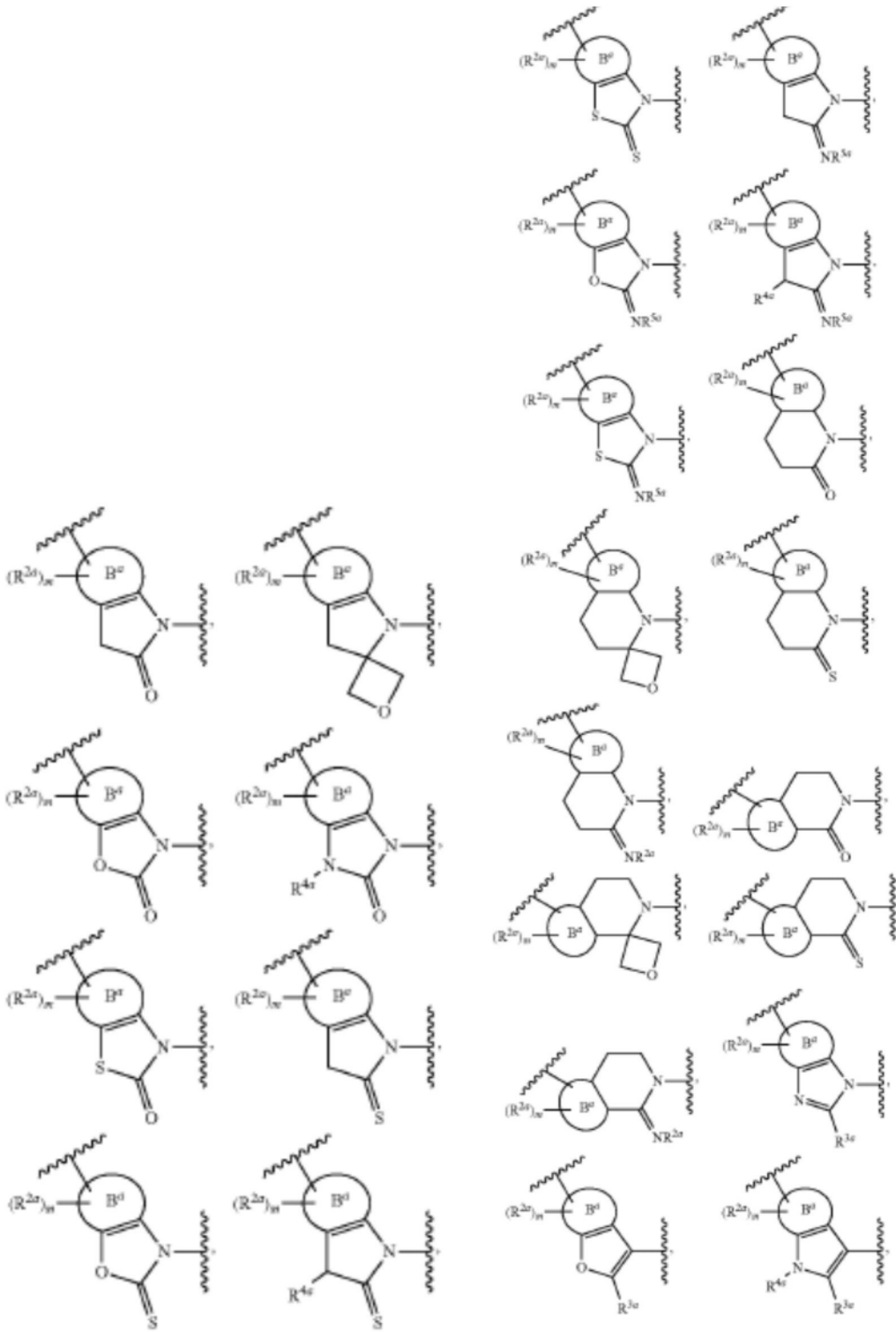
X^1 是选自共价键、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{C}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{S})-$ 的二价部分,并且

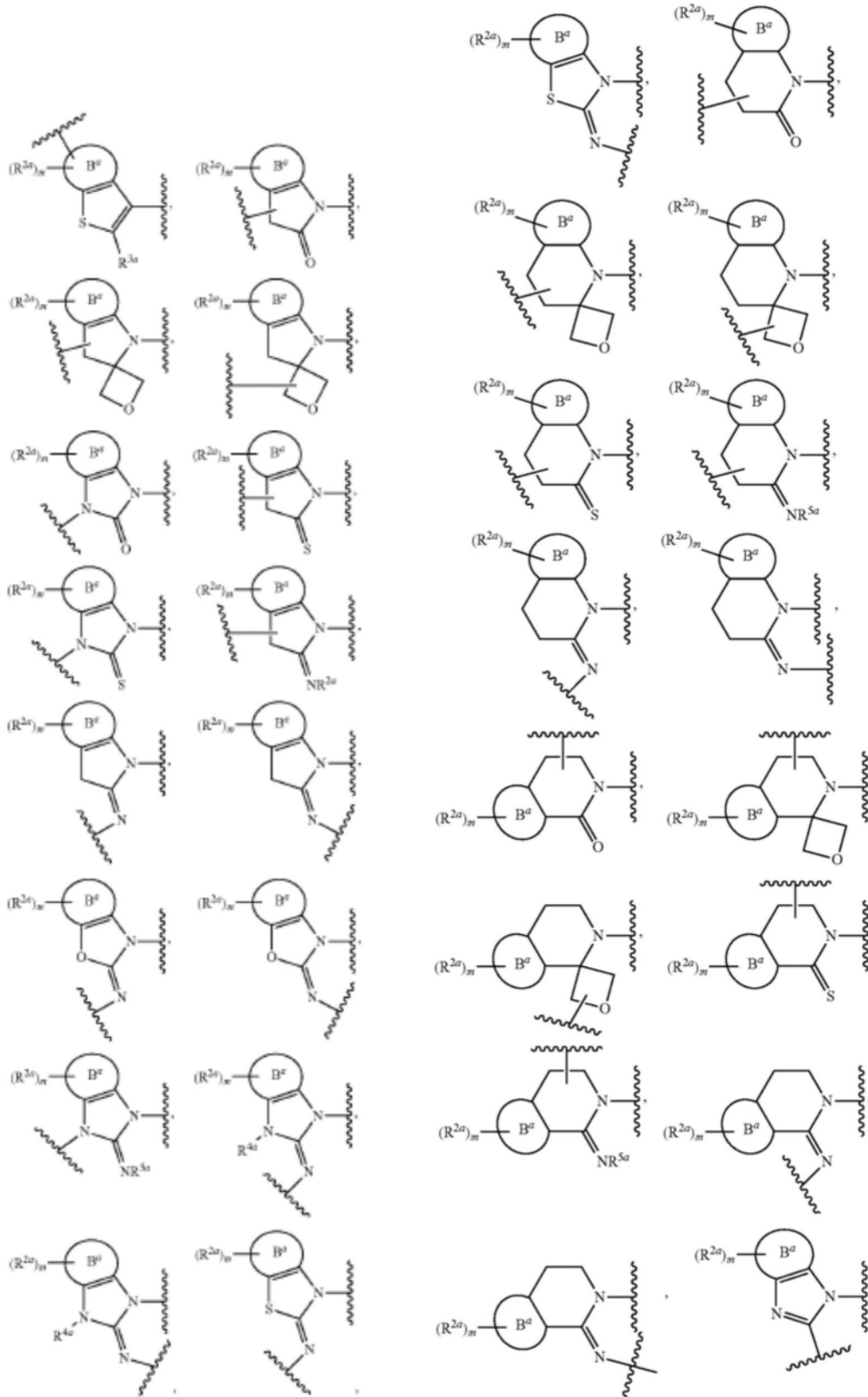


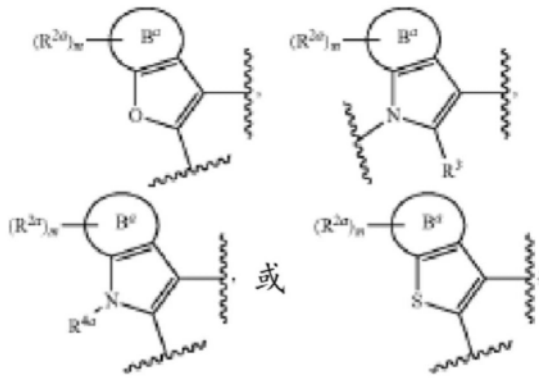
R^{1a} 是氢、卤素、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{SR}$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}$ 、 $-\text{N}(\text{R})_2$ 、 $-\text{Si}(\text{R})_3$ 或任选经取代的 C_{1-4} 脂族;

每个 R^{2a} 独立地是氢、 R^{6a} 、卤素、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{OR}$ 、 $-\text{SR}$ 、 $-\text{NR}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})\text{OR}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}_2$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{OR}$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{R}$ 、 $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})\text{NR}_2$ 或 $-\text{N}(\text{R})\text{S}(\text{O})_2\text{R}$;

环 A^a 是选自以下的双环或三环:







环 B^a 是选自以下的稠合环:含有0-2个氮原子的6元芳基,5至7元部分饱和碳环基,具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5至7元部分饱和杂环基,或具有1-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5元杂芳基;

R^{3a} 选自氢、卤素、-OR、-N(R)₂或-SR;

每个 R^{4a} 独立地是氢、 R^{6a} 、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NR₂、-C(O)N(R)OR、-OC(O)R、-OC(O)NR₂、-N(R)C(O)OR、N(R)C(O)R、-N(R)C(O)NR₂或-N(R)S(O)₂R;

R^{5a} 是氢、C₁₋₄脂族或-CN;

每个 R^{6a} 独立地是选自以下的任选经取代的基团:C₁₋₆脂族,苯基,具有1-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的4-7元饱和或部分不饱和杂环,和具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环;

环A是4-10元饱和单环或双环碳环或具有0-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环;

环C是苯基或具有1-5个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-10元单环或双环杂芳基环; L^2 和 L^3 中的每一个独立地是共价键或C₁₋₃二价直链或支链饱和或不饱和烃链,其中该链的1-3个亚甲基单元独立地且任选地被以下替代:-O-、-C(O)-、-C(S)-、-C(R)2-、-CH(R)-、-C(F)₂-、-N(R)-、-S-、-S(O)₂-或-CR=CR-;

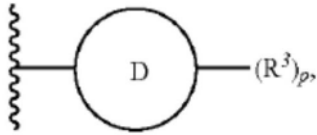
每个 R^1 独立地是氢、 R^5 、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-S(O)(NR)R、-P(O)(OR)₂、-P(O)(NR₂)₂、-CFR₂、-CF₂(R)、-CF₃、-CR₂(OR)、-CR₂(NR₂)、-C(O)R、-C(O)OR或-C(O)NR₂;

每个R独立地是氢或选自以下的任选经取代的基团:C₁₋₆脂族,苯基,具有1-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的4-7元饱和或部分不饱和杂环,和具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环,或者:

同一原子上的两个R基团任选地与介于它们中间的原子一起形成任选经取代的4-11元饱和或部分不饱和碳环或具有除它们所附接的原子之外的0-3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环单环、双环、桥接双环、螺环、或杂芳基环;

每个 R^2 独立地是氢、 R^5 、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-S(O)(NR)R、-P(O)(OR)₂、-P(O)(NR₂)₂、-CF₂(R)、-CF₃、-CR₂(OR)、-CR₂(NR₂)、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NR₂、-C(O)N(R)OR、-OC(O)R、-OC(O)NR₂、-N(R)C(O)OR、-N(R)C(O)R、-N(R)C(O)NR₂或-N(R)S(O)₂R;

R^4 选自



氢、或选自以下的任选经取代的基团： C_{1-6} 脂族或4-11元饱和或部分不饱和单环、双环、桥接双环或螺环碳环或具有1-3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环；

环D是苯基，4-10元饱和或部分不饱和单环或双环碳环或具有1-3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环，或具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环；

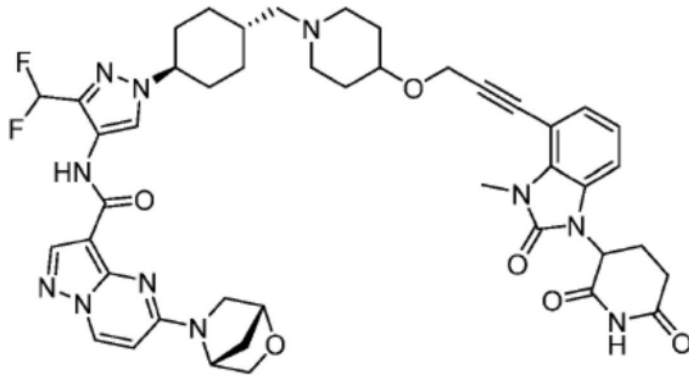
每个 R^3 独立地是氢、 R^5 、卤素、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-NR^2$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2NR_2$ 、 $-S(O)R$ 、 $-S(O)(NR)R$ 、 $-P(O)(OR)_2$ 、 $-P(O)(NR_2)_2$ 、 $-CF_2(R)$ 、 $-CF_3$ 、 $-CR_2(OR)$ 、 $-CR_2(NR_2)$ 、 $-C(O)R$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-C(O)NR_2$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-OC(O)NR_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)C(O)NR_2$ 或 $-N(R)S(O)_2R$ ；

每个 R^5 独立地是选自以下的任选经取代的基团： C_{1-6} 脂族，苯基，3-7元饱和或部分不饱和和碳环或具有1-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环，和具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环；

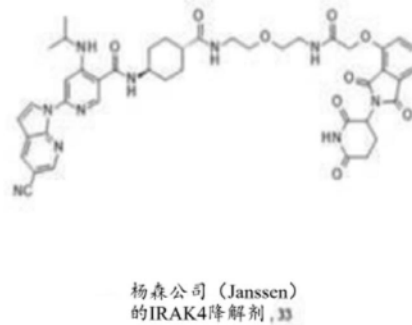
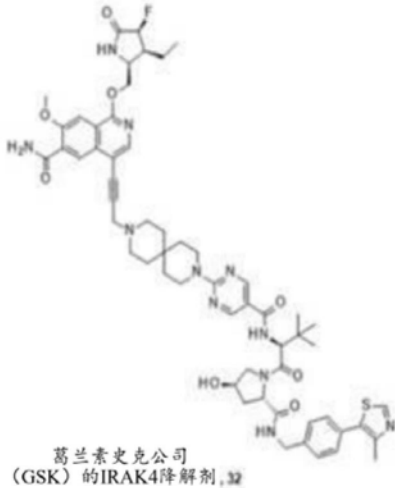
n是0、1或2；

每个m独立地是0、1、2、3或4；并且p是0、1、2、3或4。

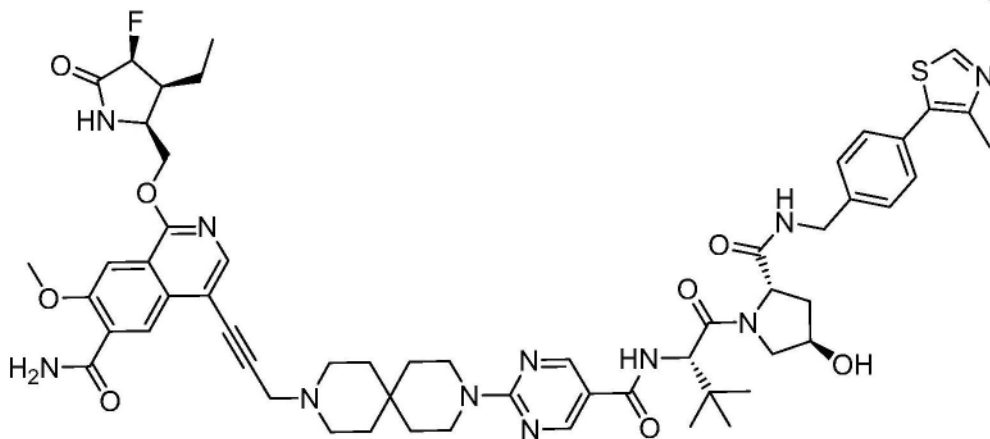
64. 如权利要求37-62中任一项所述的方法，其中该IRAK调节剂包含式[II]-[V]的化合物中的任一个：



[II]、



[III] 或



[IV]、

或其药学上可接受的盐。

65. 如权利要求37-62中任一项所述的方法, 其中该IRAK调节剂是式[II]的化合物、PROTAC IRAK-4降解剂1或PF 06650833。

66. 如权利要求37-61中任一项所述的方法, 其中该IRAK调节剂是CRISPR、siRNA、shRNA、miRNA、RNAi、反义RNA、核酶或脱氧核酶。

67. 如权利要求37-66中任一项所述的方法, 其中该IRAK调节剂阻断TLR9功能。

68. 如权利要求37-67中任一项所述的方法, 其中该基因治疗剂是病毒载体。

69. 如权利要求68所述的方法, 其中该病毒载体是AAV颗粒。

70. 如权利要求69所述的方法,其中该AAV颗粒包含AAV1衣壳、AAV2衣壳、AAV3衣壳、AAV4衣壳、AAV5衣壳、AAV6衣壳、AAV7衣壳、AAV8衣壳、AAVrh8衣壳、AAV9衣壳、AAV10衣壳、AAVrh10衣壳、AAV11衣壳、AAV12衣壳、AAVrh32.33衣壳、AAV-XL32衣壳、AAV-XL32.1衣壳、AAV LK03衣壳、AAV2R471A衣壳、AAV2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳、AAV DJ8衣壳、AAV2 N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、山羊AAV衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳、牛AAV衣壳、小鼠AAV衣壳、rAAV2/HBoV1(嵌合AAV/人博卡病毒1型)、AAV2HBK0衣壳、AAVPHP.B衣壳或AAVPHP.eB衣壳或其功能变体。

71. 如权利要求70所述的方法,其中该AAV衣壳包含酪氨酸突变、肝素结合突变或HBK0突变。

72. 如权利要求69-71中任一项所述的方法,其中该AAV病毒颗粒包含含有一个或多个反向末端重复(ITR)的AAV基因组,其中该一个或多个ITR是AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AAV4 ITR、AAV5 ITR、AAV6ITR、AAV7 ITR、AAV8 ITR、AAVrh8 ITR、AAV9 ITR、AAV10 ITR、AAVrh10ITR、AAV11 ITR或AAV12 ITR。

73. 如权利要求72所述的方法,其中该AAV颗粒的该一个或多个ITR和该衣壳衍生自相同的AAV血清型。

74. 如权利要求72所述的方法,其中该AAV颗粒的该一个或多个ITR和该衣壳衍生自不同的AAV血清型。

75. 如权利要求68所述的方法,其中病毒载体是腺病毒颗粒。

76. 如权利要求75所述的方法,其中该腺病毒颗粒包含来自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu 3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型或其功能变体的衣壳。

77. 如权利要求68所述的方法,其中该病毒载体是慢病毒颗粒。

78. 如权利要求77所述的方法,其中该重组慢病毒颗粒用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫科拉病毒、狂犬病病毒、RD114或其功能变体假型化。

79. 如权利要求68所述的方法,其中该病毒载体是单纯疱疹病毒(HSV)颗粒。

80. 如权利要求79所述的方法,其中该HSV颗粒是HSV-1颗粒或HSV-2颗粒或其功能变体。

81. 如权利要求37-80中任一项所述的方法,其中该基因治疗剂是脂质纳米颗粒。

82. 如权利要求37-81中任一项所述的方法,其中该基因治疗剂包含编码异源转基因的核酸。

83. 如权利要求82所述的方法,其中该异源转基因与启动子可操作地连接。

84. 如权利要求83所述的方法,其中该启动子是组成型启动子、组织特异性启动子或诱导型启动子。

85. 如权利要求37-84中任一项所述的方法,其中在施用该基因治疗剂之前、同时或之后施用该IRAK调节剂。

86. 如权利要求37-85中任一项所述的方法,其中该个体患有适合于通过基因疗法治疗的疾病或障碍。

87. 如权利要求86所述的方法,其中该疾病或障碍是单基因病或障碍。
88. 如权利要求37-87中任一项所述的方法,其中将该基因治疗剂静脉内、腹膜内、动脉内、肌内、皮下或肝内施用。
89. 如权利要求37-88中任一项所述的方法,其中将该IRAK调节剂口服、静脉内、腹膜内、动脉内、肌内、皮下或肝内施用。
90. 如权利要求1-89中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂减少激活的T细胞。
91. 组合物在制造用于将核酸递送至有需要的个体的细胞的药剂中的用途,其中该组合物包含基因治疗剂,并且其中该组合物被配制用于与IRAK调节剂组合使用。
92. 组合物在制造用于将核酸递送至有需要的个体的细胞的药剂中的用途,其中该组合物包含IRAK调节剂,并且其中该组合物被配制用于与基因治疗剂组合使用。
93. 组合物在制造用于治疗需要基因疗法的个体的药剂中的用途,其中该组合物包含基因治疗剂,并且其中该组合物被配制用于与IRAK调节剂组合使用。
94. 组合物在制造用于治疗需要基因疗法的个体的药剂中的用途,其中该组合物包含IRAK调节剂,并且其中该组合物被配制用于与基因治疗剂组合使用。
95. 组合物在制造用于调节需要基因疗法的个体对基因疗法的免疫应答的药剂中的用途,其中该组合物包含基因治疗剂,并且其中该组合物被配制用于与IRAK调节剂组合使用。
96. 组合物在制造用于调节个体对基因疗法的免疫应答的药剂中的用途,其中该组合物包含IRAK调节剂,并且其中该组合物被配制用于与基因治疗剂组合使用。
97. 如权利要求91-96中任一项所述的用途,其中该基因治疗剂是AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒。
98. 如权利要求91-97中任一项所述的用途,其中该IRAK调节剂是IRAK-4降解剂。
99. 一种组合物,该组合物包含用于在将核酸递送至有需要的个体的细胞中使用的基因治疗剂,其中该基因治疗剂与IRAK调节剂组合使用。
100. 一种组合物,该组合物包含用于在将核酸递送至有需要的个体的细胞中使用的IRAK调节剂,其中该IRAK调节剂与基因治疗剂组合使用。
101. 一种组合物,该组合物包含用于在治疗需要基因疗法的个体中使用的基因治疗剂,其中该基因治疗剂与IRAK调节剂组合使用。
102. 一种组合物,该组合物包含用于在治疗需要基因疗法的个体中使用的IRAK调节剂,其中该IRAK调节剂与基因治疗剂组合使用。
103. 一种组合物,该组合物包含用于调节需要基因疗法的个体对基因疗法的免疫应答的IRAK调节剂,其中该IRAK调节剂与基因治疗剂组合使用。
104. 一种组合物,该组合物包含用于抑制需要基因疗法的个体对基因疗法的免疫应答的IRAK调节剂,其中该IRAK调节剂与基因治疗剂组合使用。
105. 如权利要求99-104中任一项所述的组合物,其中该基因治疗剂是AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒。
106. 如权利要求99-105中任一项所述的组合物,其中该IRAK调节剂是IRAK-4降解剂。
107. 一种试剂盒,该试剂盒用于在如权利要求1-90中任一项所述的方法中使用。
108. 一种试剂盒,该试剂盒用于如权利要求91-98中任一项所述的用途。
109. 一种试剂盒,该试剂盒包含如权利要求99-106中任一项所述的组合物。

IRAK4调节剂用于基因疗法的用途

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2022年4月12日提交的美国临时申请序列号63/330,239的优先权权益,将其通过引用以其全文并入。

对电子序列表的引用

[0002] 将电子序列表(159792018040SEQLIST.xml;大小:1,987字节;以及创建日期:2023年4月12日)的内容通过引用以其全文并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及通过施用IRAK调节剂与基因疗法以抑制对基因疗法的先天免疫来增强个体的基因疗法的方法。在一些方面,本发明提供了用于选择用IRAK调节剂与基因治疗剂组合治疗的个体的方法。

背景技术

[0004] 用于治疗罕见遗传疾病的基因疗法的成功在很大程度上依赖于腺相关病毒(AAV)病毒载体,该AAV病毒载体提供了许多有吸引力的特征,包括组织特异性嗜性、静止期细胞的转导和经修饰的基因表达的维持。然而,对AAV载体的免疫应答对成功的临床转化构成了主要挑战。衣壳、病毒基因组以及转基因触发了涉及免疫系统先天免疫和适应性免疫两者的激活的免疫应答。由TLR途径激活的先天免疫系统随后在暴露于病原体的人的B和T细胞中引发适应性免疫应答(Iawaski, A和Medzhitov, R, Nat Immunol [自然免疫学] 2004 5 (10):987-985)。基于几项小鼠研究表明,识别富含CpG的低甲基化DNA的内体DNA传感器TLR9在AAV载体的基因组识别中起重要作用。TLR9触发的信号传导级联激活适应性免疫应答,最终导致通过T细胞介导的细胞毒性清除转基因诱导的细胞。缺乏TLR9传感器的小鼠显示出更长的转基因表达维持和减弱的免疫应答(Ashley, SN等人, Cell Immunol [细胞免疫学] 2019年12月;346:103997;以及Faust SM等人, J Clin Invest [临床研究杂志] 2013 123 (7):2994-3001)。与此一致,来自血友病临床试验的数据揭示了CpG碱基总数的减少降低了对药理学免疫抑制剂的需求,并且显示血友病患者的细胞毒性T淋巴细胞应答减少,而接受在转基因中含有更多CpG碱基的载体的患者对免疫抑制剂的需求要大得多(Wright, JF Mol. Ther. [分子疗法] 2020 28(3):701-703)。虽然广泛作用的免疫抑制剂在临床试验中已经成功地改善AAV递送,但是它们仍然会导致转基因表达的丧失并且存在副作用和机会性感染的风险。开发不含CpG碱基的载体是一项挑战,因为非密码子优化的载体(即,不含CpG的载体或具有低CpG含量的载体)显示出较差的转基因表达(Wright, JF Mol. Ther. [分子疗法] 2020 28(3):701-703)。因此,需要的是不同类别的显示出增强的特异性和低副作用的免疫调节剂。

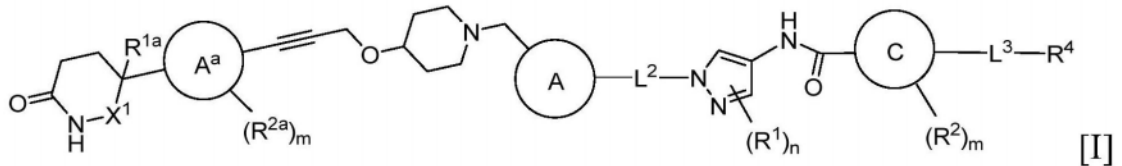
[0005] 本文引用的所有参考文献(包括专利申请和出版物)均通过引用以其全文并入。

发明内容

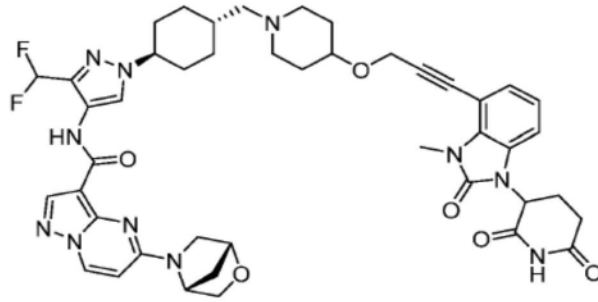
[0006] 在一些方面,本发明提供了用于将核酸递送至个体的细胞的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂,以及b)向该个体施用基因治疗剂。在一些方面,本发明提供了用于用基因治疗剂治疗有需要的个体的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂,以及b)向该个体施用该基因治疗剂。在一些方面,本发明提供了用于改善个体的基因疗法的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂,以及b)向该个体施用基因治疗剂。在一些方面,本发明提供了用于抑制个体对基因治疗剂的免疫应答的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂,以及b)向该个体施用基因治疗剂。

[0007] 在一些实施例中,该IRAK调节剂调节IRAK蛋白激酶的活性或表达。在一些实施例中,该IRAK蛋白激酶是IRAK-1蛋白激酶、IRAK-2蛋白激酶、IRAK-3蛋白激酶或IRAK-4蛋白激酶。在一些实施例中,该IRAK调节剂调节IRAK-4蛋白激酶的活性或表达。在一些实施例中,该IRAK调节剂是IRAK降解剂、IRAK抑制剂或赋予IRAK功能丧失的药剂。在一些实施例中,该IRAK调节剂是小分子。

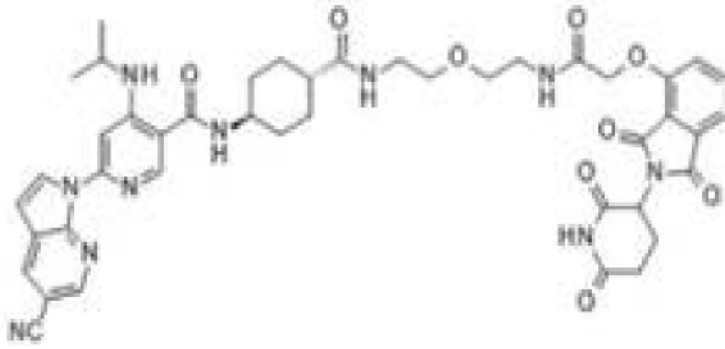
[0008] 在一些实施例中,该IRAK调节剂包含式[I]的化合物:



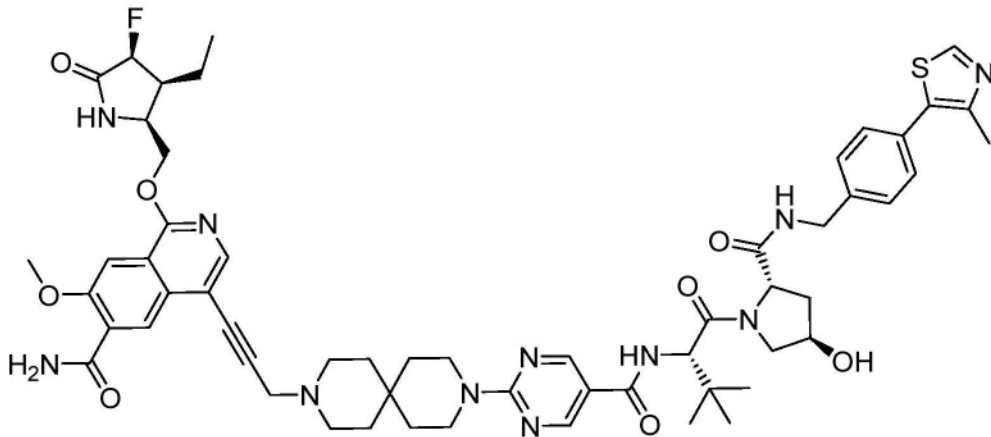
或其药学上可接受的盐,其中每个变量是如本文所定义和描述的。在一些实施例中,该IRAK调节剂包含式[II]-[V]的化合物中的任一个:



[II],



[III] 或



[IV],

或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,该IRAK调节剂是式[II]的化合物、PROTAC IRAK-4降解剂1或PF 06650833。在一些实施例中,该IRAK调节剂是CRISPR、siRNA、shRNA、miRNA、RNAi、反义RNA、核酶或脱氧核酶(DNAzyme)。在一些实施例中,该IRAK调节剂阻断TLR9功能。

[0009] 在一些实施例中,该基因治疗剂包含病毒载体。在一些实施例中,该病毒载体是AAV颗粒。在一些实施例中,该AAV颗粒包含AAV1衣壳、AAV2衣壳、AAV3衣壳、AAV4衣壳、AAV5衣壳、AAV6衣壳、AAV7衣壳、AAV8衣壳、AAVrh8衣壳、AAV9衣壳、AAV10衣壳、AAVrh10衣壳、AAV11衣壳、AAV12衣壳、AAVrh32.33衣壳、AAV-XL32衣壳、AAV-XL32.1衣壳、AAV LK03衣壳、AAV2R471A衣壳、AAV2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳、AAV DJ8衣壳、AAV2 N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、山羊AAV衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳、牛AAV衣壳、小鼠AAV衣壳、rAAV2/HBoV1(嵌合AAV/人博卡病毒1型)、AAV2HBK0衣壳、AAVPHP.B衣壳或AAVPHP.eB衣壳或其功能变体。在一些实施例中,该AAV衣壳包含酪氨酸突变、肝素结合突变或HBK0突变。在一些实施例中,该AAV病毒颗粒包含含有一个或多个反向末端重复(ITR)的AAV基因组,其中该一个或多个ITR是AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AAV4 ITR、AAV5 ITR、

AAV6 ITR、AAV7 ITR、AAV8 ITR、AAVrh8 ITR、AAV9 ITR、AAV10 ITR、AAVrh10 ITR、AAV11 ITR 或 AAV12 ITR。在一些实施例中,该 AAV 颗粒的该一个或多个 ITR 和该衣壳衍生自相同的 AAV 血清型。在一些实施例中,该 AAV 颗粒的该一个或多个 ITR 和该衣壳衍生自不同的 AAV 血清型。

[0010] 在一些实施例中,该病毒载体是腺病毒颗粒。在一些实施例中,该腺病毒颗粒包含来自腺病毒血清型 2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu 3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛 Ad 3 型、犬 Ad 2 型、绵羊 Ad 或猪 Ad 3 型或其功能变体的衣壳。

[0011] 在一些实施例中,该病毒载体是慢病毒颗粒。在一些实施例中,该慢病毒颗粒用水疱性口炎病毒 (VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、罗斯河病毒 (RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫科拉病毒、狂犬病病毒、RD114 或其功能变体假型化。

[0012] 在一些实施例中,该病毒载体是单纯疱疹病毒 (HSV) 颗粒。在一些实施例中,该 HSV 颗粒是 HSV-1 颗粒或 HSV-2 颗粒或其功能变体。

[0013] 在一些实施例中,该基因治疗剂包含脂质纳米颗粒。

[0014] 在一些实施例中,该基因治疗剂包含编码异源转基因的核酸。在一些实施例中,该异源转基因与启动子可操作地连接。在一些实施例中,该启动子是组成型启动子、组织特异性启动子或诱导型启动子。

[0015] 在一些实施例中,在施用该基因治疗剂之前、同时或之后施用该 IRAK 调节剂。在一些实施例中,该个体患有适合于通过基因疗法治疗的疾病或障碍。在一些实施例中,该疾病或障碍是单基因病或障碍。

[0016] 在一些实施例中,将该基因治疗剂静脉内、腹膜内、动脉内、肌内、皮下或肝内施用。在一些实施例中,将该 IRAK 调节剂口服、静脉内、腹膜内、动脉内、肌内、皮下或肝内施用。

[0017] 在一些方面,本发明提供了用于将基因治疗剂递送至个体的细胞的方法,该方法包括 a) 将来自该个体的先天免疫细胞与该基因治疗剂一起孵育, b) 分析这些先天免疫细胞的一种或多种细胞因子的表达,其中在与该基因治疗剂一起孵育之后细胞因子特征的表达鉴定出对该基因治疗剂具有先天免疫的个体, c) 向步骤 b) 中鉴定出的个体施用 IRAK 调节剂,以及 d) 向步骤 b) 中鉴定出的个体施用该基因治疗剂。在一些方面,本发明提供了用于用基因治疗剂治疗有需要的个体的方法,该方法包括 a) 将来自该个体的先天免疫细胞与该基因治疗剂一起孵育, b) 分析这些先天免疫细胞的一种或多种细胞因子的表达,其中在与该基因治疗剂一起孵育之后细胞因子特征的表达鉴定出对该基因治疗剂具有先天免疫的个体, c) 向步骤 b) 中鉴定出的个体施用 IRAK 调节剂,以及 d) 向步骤 b) 中鉴定出的个体施用该基因治疗剂。在一些方面,本发明提供了用于选择用基因治疗剂和 IRAK 调节剂治疗的个体的方法,该方法包括 a) 将来自该个体的先天免疫细胞与该基因治疗剂一起孵育, b) 分析这些先天免疫细胞的一种或多种细胞因子的表达,其中在与该基因治疗剂一起孵育之后细胞因子特征的表达鉴定出用基因治疗剂和 IRAK 调节剂治疗的个体, c) 选择在步骤 b) 中鉴定出的个体用基因治疗剂和 IRAK 调节剂治疗。在一些实施例中,该方法进一步包括以下步骤: d) 向步骤 b) 中鉴定出的个体施用 IRAK 调节剂,以及 e) 向步骤 b) 中鉴定出的个体施用该基因治

疗剂。

[0018] 在一些实施例中,该先天免疫细胞是树突细胞、单核细胞、巨噬细胞或自然杀伤(NK)细胞。在一些实施例中,从来自该个体的外周血单个核细胞中分离这些先天免疫细胞。在一些实施例中,该先天免疫细胞是树突细胞。在一些实施例中,该树突细胞衍生自该个体的单核细胞。

[0019] 在一些实施例中,本发明的方法进一步包括从该个体中分离单核细胞,以及将这些单核细胞在树突细胞培养基中孵育以从这些单核细胞中衍生出树突细胞,然后将这些树突细胞与该基因治疗剂一起孵育。在一些实施例中,这些单核细胞是CD14⁺单核细胞。在一些实施例中,将这些单核细胞用该树突细胞培养基孵育约5至约10天或约7至约8天,以从这些单核细胞衍生出树突细胞。在一些实施例中,在与步骤c)的基因治疗剂一起孵育之前将这些先天免疫细胞重新铺板。在一些实施例中,将这些先天免疫细胞重新铺板到微孔皿中。

[0020] 在一些实施例中,该基因治疗剂是病毒载体,并且其中将这些先天免疫细胞与病毒载体以约 1×10^3 至约 1×10^5 或约 1×10^4 的MOI一起孵育。在一些实施例中,该基因治疗剂是非病毒载体,并且其中将这些先天免疫细胞与浓度为约1ng/mL至约1mg/mL的非病毒载体一起孵育。在一些实施例中,将这些先天免疫细胞与该基因治疗剂一起孵育约12小时至约36小时或约24小时。

[0021] 在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的一种或多种的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 和IL-1 β 的增加的表达。在一些实施例中,与合适的对照相比,该细胞因子特征中这些细胞因子的表达增加。在一些实施例中,该合适的对照是来自未与该基因治疗剂一起孵育的先天免疫细胞的该细胞因子特征中的这些细胞因子的表达,或者其中该合适的对照是来自与该基因治疗剂一起孵育之前的先天免疫细胞的该细胞因子特征中的这些细胞因子的表达。

[0022] 在一些方面,本发明提供了组合物在制造用于将核酸递送至有需要的个体的细胞的药剂中的用途,其中该组合物包含基因治疗剂,并且其中该组合物被配制用于与IRAK调节剂组合使用。在一些方面,本发明提供了组合物在制造用于将核酸递送至有需要的个体的细胞的药剂中的用途,其中该组合物包含IRAK调节剂,并且其中该组合物被配制用于与基因治疗剂组合使用。在一些方面,本发明提供了组合物在制造用于治疗需要基因疗法的个体的药剂中的用途,其中该组合物包含基因治疗剂,并且其中该组合物被配制用于与IRAK调节剂组合使用。在一些方面,本发明提供了组合物在制造用于治疗需要基因疗法的个体的药剂中的用途,其中该组合物包含IRAK调节剂,并且其中该组合物被配制用于与基因治疗剂组合使用。在一些方面,本发明提供了组合物在制造用于调节需要基因疗法的个体对基因疗法的免疫应答的药剂中的用途,其中该组合物包含基因治疗剂,并且其中该组合物被配制用于与IRAK调节剂组合使用。在一些方面,本发明提供了组合物在制造用于调节个体对基因疗法的免疫应答的药剂中的用途,其中该组合物包含IRAK调节剂,并且其中该组合物被配制用于与基因治疗剂组合使用。在一些实施例中,该基因治疗剂是AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒。在一些实施例中,该IRAK调节剂是IRAK-4降解剂。

[0023] 在一些方面,本发明提供了一种组合物,该组合物包含用于在将核酸递送至有需

要的个体的细胞中使用的基因治疗剂,其中该基因治疗剂与IRAK调节剂组合使用。在一些方面,本发明提供了一种组合物,该组合物包含用于在将核酸递送至有需要的个体的细胞中使用的IRAK调节剂,其中该IRAK调节剂与基因治疗剂组合使用。在一些方面,本发明提供了一种组合物,该组合物包含用于在治疗需要基因疗法的个体中使用的基因治疗剂,其中该基因治疗剂与IRAK调节剂组合使用。在一些方面,本发明提供了一种组合物,该组合物包含用于在治疗需要基因疗法的个体中使用的IRAK调节剂,其中该IRAK调节剂与基因治疗剂组合使用。在一些方面,本发明提供了一种组合物,该组合物包含用于调节需要基因疗法的个体对基因疗法的免疫应答的IRAK调节剂,其中该IRAK调节剂与基因治疗剂组合使用。在一些方面,本发明提供了一种组合物,该组合物包含用于抑制需要基因疗法的个体对基因疗法的免疫应答的IRAK调节剂,其中该IRAK调节剂与基因治疗剂组合使用。在一些实施例中,该基因治疗剂是AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒。在一些实施例中,该IRAK调节剂是IRAK-4降解剂。

[0024] 在一些实施例中,本发明提供了用于在本文所述的任何方法或用途中使用的试剂盒。

附图说明

[0025] 图1示出了用于评估IRAK调节剂(例如,IRAK4降解剂和IRAK4抑制剂)的功效的实验方案。从经富集白细胞单采术产物(leukopak)中分离外周血单个核细胞(PBMC)。从(PBMC)中纯化CD14⁺单核细胞,向这些单核细胞中添加分化因子混合物以允许分化成树突细胞,并且添加成熟因子以获得成熟树突细胞。将成熟树突细胞用IRAK调节剂(如zimlovisertib和PROTAC IRAK4降解剂-1)预处理18小时,然后用AAV颗粒感染。AAV感染后二十四小时,收集培养基上清液用于下游分析(如细胞因子释放和细胞毒性)。使用这些细胞来测量IRAK4抑制或降解的水平。在不同的设置中,将IRAK4调节剂zimlovisertib IRAK4和PROTAC IRAK4降解剂-1与AAV同时添加(称为共处理),并且收集培养基上清液用于下游分析(如细胞因子释放和细胞毒性)。

[0026] 图2A-图2B示出了用两种不同IRAK调节剂(IRAK抑制剂和IRAK4降解剂)预处理导致细胞因子释放受抑制。图2A示出了用IRAK4抑制剂zimlovisertib预处理人单核细胞性树突细胞导致细胞因子释放受抑制。图2B示出了用IRAK4降解剂PROTAC IRAK4降解剂-1预处理人单核细胞性树突细胞导致细胞因子释放受抑制。

[0027] 图3A-图3B示出了用两种不同IRAK调节剂(IRAK抑制剂和IRAK4降解剂)共处理导致细胞因子释放受抑制。图3A示出了用IRAK4抑制剂zimlovisertib预处理人单核细胞性树突细胞导致细胞因子释放受抑制。图3B示出了用PROTAC IRAK4降解剂-1共处理人单核细胞性树突细胞导致细胞因子释放受抑制。

[0028] 图4A-图4B示出了用两种不同IRAK调节剂(IRAK抑制剂和IRAK4降解剂)处理在原代人单核细胞性树突细胞中不引起细胞毒性。图4A示出了在施用IRAK4抑制剂zimlovisertib与AAV后的毒性结果。图4B示出了在施用PROTAC IRAK4降解剂-1与AAV后的毒性结果。

[0029] 图5A-图5B示出了用IRAK4抑制剂处理阻断IRAK4激酶靶蛋白NF κ B的磷酸化,并且IRAK4降解剂引起原代人单核细胞性树突细胞中IRAK4蛋白的降解。图5A示出了用IRAK4抑

制剂zimlovisertib处理人单核细胞性树突细胞阻断由LPS诱导的IRAK4激酶活性。图5B示出了PROTAC IRAK4降解剂-1AAV降低AAV.SAN024感染细胞中的IRAK4水平。

[0030] 图6示出了体内小鼠实验的示意图,该体内小鼠实验被设计为显示在注射AAV后IRAK4抑制对CD8 T细胞和记忆T细胞的影响。

[0031] 图7A-图7B示出了在小鼠中注射AAV后,用IRAK4抑制剂处理减少PBMC中的转基因lacZ特异性CD8 T细胞和效应记忆T细胞。图7A示出了用IRAK4抑制剂zimlovisertib处理的小鼠中lacZ特异性CD8 T细胞减少。图7B示出了用IRAK4抑制剂zimlovisertib处理的小鼠中效应记忆细胞减少。

[0032] 图8A-图8C示出了在小鼠中注射AAV后,用IRAK4抑制剂处理减少产生IFN γ 的CD8 T细胞。图8A示出了从经处理的小鼠分离脾细胞并且随后用AAV肽库刺激后干扰素 γ 的产生(激活的CD8 T细胞的量度)。图8B示出了从经处理的小鼠分离脾细胞并且随后用免疫显性肽刺激后干扰素 γ 的产生。图8C示出了从经处理的小鼠分离脾细胞并且随后用LacZ免疫显性肽刺激后干扰素 γ 的产生。

[0033] 图9A-图9D示出了用IRAK4降解剂PROTAC IRAK4-1处理降低免疫细胞中的IRAK4表达。图9A示出了用IRAK降解剂处理减少PBMC。图9B示出了用IRAK降解剂处理减少T细胞。图9C示出了用IRAK降解剂处理减少B细胞。图9D示出了用IRAK降解剂处理减少单核细胞。

[0034] 图10A-图10B示出了在小鼠中注射AAV后,用式(II)的IRAK4降解剂(KT-474)预处理减少了衣壳转基因特异性CD8 T细胞和产生干扰素 γ 的免疫细胞。图10A示出了PBMC中lacZ特异性CD8 T细胞减少。图10B示出了脾中lacZ特异性CD8 T细胞减少。

[0035] 图11示出了与AAV组合施用的IRAK4调节剂的口服处理的体内小鼠实验。可以将IRAK4调节剂在AAV之前或与其并行施用。

具体实施方式

[0036] 在一些方面,本发明提供了用于将核酸递送至个体的细胞的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂),以及b)施用包含核酸的基因治疗剂。如本文所用,“基因治疗剂”可以是待向个体施用的基因疗法的治疗性组分和/或载体组分,例如,核酸(末端封闭的DNA)、病毒载体(例如,AAV载体、腺病毒载体、慢病毒载体、HSV载体)、脂质纳米颗粒、抗体的全部或部分(例如,纳米抗体、Fc区等)。在一些方面,本发明提供了用于用包含基因治疗剂的组合物治疗有需要的个体的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂,以及b)向该个体施用基因治疗剂。在一些方面,本发明提供了用于改善个体的基因疗法的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂,以及b)向该个体施用基因治疗剂。在一些方面,本发明提供了用于调节对基因治疗剂的免疫应答的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂,以及b)向该个体施用基因治疗剂。在一些方面,本发明提供了用于抑制对基因治疗剂的免疫应答的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂,以及b)向该个体施用基因治疗剂。在一些方面,本发明提供了用于诱导对基因治疗剂的耐受性的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂,以及b)向该个体施用基因治疗剂。

[0037] 在一些方面,本发明提供了用于将核酸递送至个体的细胞的方法,该方法包括a)将来自该个体的先天免疫细胞与该基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)一起孵育,b)分析这些先天免疫细胞的一种或多种细胞因子的表

达,其中在与该基因治疗剂一起孵育之后细胞因子特征的表达鉴定出对该基因治疗剂具有免疫(例如,先天免疫、适应性免疫)的个体,c)向步骤b)中鉴定出的个体施用IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂),以及d)向步骤b)中鉴定出的个体施用该基因治疗剂。在一些实施例中,先天免疫细胞是树突细胞、单核细胞、巨噬细胞或自然杀伤(NK)细胞。在一些实施例中,该方法进一步包括以下步骤:从个体中分离先天免疫细胞,然后将这些先天免疫细胞与基因治疗剂一起孵育。在一些实施例中,该方法进一步包括以下步骤:从该个体中分离单核细胞,以及将这些单核细胞在树突细胞培养基中孵育以从这些单核细胞中衍生出树突细胞,然后将这些树突细胞与该基因治疗剂一起孵育。如本文所用,术语“衍生出”树突细胞包括细胞(例如,单核细胞)分化以产生树突细胞。

[0038] 在一些方面,本发明提供了用于治疗有需要的个体的方法,该方法包括a)将来自该个体的先天免疫细胞与该基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)一起孵育,b)分析这些先天免疫细胞的一种或多种细胞因子的表达,其中在与该基因治疗剂一起孵育之后细胞因子特征的表达鉴定出对该基因治疗剂具有免疫(例如,先天免疫、适应性免疫)的个体,c)向步骤b)中鉴定出的个体施用IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂),以及d)向步骤b)中鉴定出的个体施用该基因治疗剂。在一些实施例中,先天免疫细胞是树突细胞、单核细胞、巨噬细胞或自然杀伤(NK)细胞。在一些实施例中,该方法进一步包括以下步骤:从个体中分离先天免疫细胞,然后将这些先天免疫细胞与基因治疗剂一起孵育。在一些实施例中,该方法进一步包括以下步骤:从该个体中分离单核细胞,以及将这些单核细胞在树突细胞培养基中孵育以从这些单核细胞中衍生出树突细胞,然后将这些树突细胞与该基因治疗剂一起孵育。

[0039] 在一些方面,本发明提供了用于选择用基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)和IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)治疗的个体的方法,该方法包括a)将先天免疫细胞与该基因治疗剂一起孵育,b)分析这些先天免疫细胞的一种或多种细胞因子的表达,其中在与该基因治疗剂一起孵育之后细胞因子特征的表达鉴定出用基因治疗剂和IRAK调节剂治疗的个体,c)选择步骤b)中鉴定出的个体用基因治疗剂和IRAK调节剂治疗。在一些实施例中,先天免疫细胞是树突细胞、单核细胞、巨噬细胞或自然杀伤(NK)细胞。在一些实施例中,该方法进一步包括以下步骤:从个体中分离先天免疫细胞,然后将这些先天免疫细胞与基因治疗剂一起孵育。在一些实施例中,该方法进一步包括以下步骤:从该个体中分离单核细胞,以及将这些单核细胞在树突细胞培养基中孵育以从这些单核细胞中衍生出树突细胞,然后将这些树突细胞与该基因治疗剂一起孵育。在一些实施例中,该方法进一步包括以下步骤:d)向步骤b)中鉴定出的个体施用IRAK调节剂,以及e)向步骤b)中鉴定出的个体施用该基因治疗剂。

通用技术

[0040] 本文所描述或所引用的技术和程序通常是本领域技术人员熟知的且通常使用常规方法而被采用,例如像以下文献中所描述的广泛利用的方法:Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册](Sambrook等人,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],冷泉港,纽约州,2012);Current Protocols in Molecular Biology[当前分子生物学方案](F.M.Ausubel等人编辑,2003);系列Methods in Enzymology[酶学方法](Academic Press,Inc.[学术出版公司]);PCR 2:A Practical

Approach[PCR 2:实用方法](M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编辑,1995); Antibodies,A Laboratory Manual[抗体,实验室手册](Harlow和Lane编辑,1988); Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique and Specialized Applications[动物细胞的培养:基本技术和专业应用手册](R.I.Freshney,第6版, J.Wiley and Sons[约翰·威利父子出版公司],2010);Oligonucleotide Synthesis[寡核苷酸合成](M.J.Gait编辑,1984);Methods in Molecular Biology[分子生物学方法], Humana Press[胡马纳出版社];Cell Biology:A Laboratory Notebook[细胞生物学:实验室笔记本](J.E.Cellis编辑,Academic Press[学术出版社],1998);Introduction to Cell and Tissue Culture[细胞和组织培养的介绍](J.P.Mather和P.E.Roberts,Plenum Press[普伦姆出版社],1998);Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures[细胞和组织培养:实验室程序](A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell编辑,J.Wiley and Sons [约翰·威利父子出版公司],1993-8);Handbook of Experimental Immunology[实验免疫学手册](D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑,1996);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells[用于哺乳动物细胞的基因转移载体](J.M.Miller和M.P.Calos编辑,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction[PCR:聚合酶链式反应](Mullis等人编辑,1994);Current Protocols in Immunology[当今免疫学方案](J.E.Coligan等人编辑,1991);Short Protocols in Molecular Biology[精编分子生物学方案](Ausubel等人编辑,J.Wiley and Sons[约翰·威利父子出版公司],2002);Immunobiology[免疫生物学](C.A.Janeway 等人,2004);Antibodies[抗体](P.Finch,1997);Antibodies:A Practical Approach[抗体:实用方法](D.Catty.编辑,IRL Press[IRL出版社],1988-1989);Monoclonal Antibodies:A Practical Approach[单克隆抗体:实用方法](P.Shepherd和C.Dean编辑, Oxford University Press[牛津大学出版社],2000);Using Antibodies:A Laboratory Manual[使用抗体:实验室手册](E.Harlow和D.Lane,Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],1999);The Antibodies[抗体](M.Zanetti和J.D.Capra编辑,Harwood Academic Publishers[哈伍德学术出版社],1995);以及Cancer:Principles and Practice of Oncology[癌症:肿瘤学的原理和实践](V.T.DeVita等人编辑, J.B.Lippincott Company[J.B.利平科特公司],2011)。

定义

[0041] 如本文所用,术语“IRAK降解剂”是异双功能化合物,其以可测量的亲和力结合和/或抑制(完全或部分)IRAK激酶和E3连接酶两者,导致IRAK激酶的泛素化和随后降解。在某些实施例中,降解剂具有小于约50 μ M、小于约1 μ M、小于约500nM、小于约100nM、小于约10nM或小于约1nM的DC₅₀。如本文所用,术语“单价”是指不含附加的E3连接酶结合部分的降解剂化合物。

[0042] 如本文所用,关于IRAK的术语“抑制剂”是以可测量的亲和力结合和/或抑制(完全或部分)IRAK激酶的化合物。在某些实施例中,抑制剂具有小于约50 μ M、小于约1 μ M、小于约500nM、小于约100nM、小于约10nM或小于约1nM的IC₅₀和/或结合常数。

[0043] 如本文所用,关于IRAK的术语“调节剂”是刺激、延迟、抑制和/或阻抑(完全或部分)IRAK激酶的活性的化合物。

[0044] 如本文所用,术语“基因疗法”是指这样的疗法,凭借该疗法修饰核酸(例如,基因、

mRNA等) 在个体的细胞中的表达以改变细胞的生物学特性。在一些实例中, 基因疗法包括递送有待在个体的细胞中表达的外源核酸。在一些实例中, 基因疗法改变(例如, 降解、抑制、增强) 内源基因在个体的细胞中的表达。在一些实例中, 基因疗法是体内疗法。在一些实例中, 基因疗法是离体疗法(例如, 细胞疗法)。

[0045] 如本文所用, 术语“基因治疗剂”是指核酸(例如, 表达构建体、miRNA、反义、shRNA、siRNA) 或核酸与试剂的组合, 该试剂用于将核酸递送至个体或细胞以修饰或操纵个体或细胞中一种或多种核酸(例如, 基因、mRNA) 的表达以改变活细胞的生物学特性。基因治疗剂的实例包括但不限于病毒载体(例如, 腺相关病毒、腺病毒、慢病毒、单纯疱疹病毒、杆状病毒)、细菌载体和非病毒载体(例如, 包封治疗性核酸或包封包含治疗性核酸和/或编码治疗性多肽的质粒DNA(例如, 末端封闭的DNA) 的脂质纳米颗粒)。

[0046] 如本文所用, “载体”是指包含有待在体外或体内递送到宿主细胞中的核酸的重组质粒或病毒。

[0047] 如本文所用, 术语“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸) 的聚合形式。因此, 该术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂合体, 或包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然的、经化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生的核苷酸碱基的聚合物。核酸的主链可以包含糖和磷酸基团(如通常可以在RNA或DNA中发现的), 或经修饰的或经取代的糖或磷酸基团。可替代地, 核酸的主链可以包含合成亚基如氨基磷酸酯的聚合物, 因此可以是寡脱氧核苷氨基磷酸酯(P-NH₂) 或混合的氨基磷酸酯-磷酸二酯寡聚物。此外, 双链核酸可以通过以下方式从化学合成的单链多核苷酸产物获得: 通过合成互补链并在适当条件下使链退火, 或通过使用DNA聚合酶用适当引物从头合成互补链。

[0048] 术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用以指代氨基酸残基的聚合物, 并且不限于最小长度。此类氨基酸残基的聚合物可以含有天然或非天然氨基酸残基, 并且包括但不限于氨基酸残基的肽、寡肽、二聚体、三聚体和多聚体。该定义涵盖了全长蛋白质及其片段二者。该术语还包括多肽的翻译后修饰, 例如糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化等。此外, 出于本发明的目的, “多肽”是指相对于天然序列包括修饰(如缺失、添加和取代, 通常在本质上是保守的) 的蛋白质, 只要该蛋白质保持所需活性即可。这些修饰可以是有意的, 如通过定点诱变, 或者可以是偶然的, 诸如通过产生蛋白质的宿主的突变或由于PCR扩增的错误产生。

[0049] “重组病毒载体”是指包含一个或多个异源序列(即, 非病毒来源的核酸序列) 的重组多核苷酸载体。在重组AAV载体的情况下, 重组核酸的侧翼是至少一个, 例如两个反向末端重复序列(ITR)。

[0050] “重组AAV载体(rAAV载体)”是指包含一个或多个异源序列(即, 非AAV来源的核酸序列) 的多核苷酸载体, 这些异源序列的侧翼是至少一个, 例如两个AAV反向末端重复序列(ITR)。当存在于已被合适的辅助病毒感染(或正在表达合适的辅助功能) 并且正在表达AAV rep和cap基因产物(即, AAV Rep和Cap蛋白) 的宿主细胞中时, 此类rAAV载体可以复制并包装到感染性病毒颗粒中。当rAAV载体掺入较大的多核苷酸中(例如, 染色体中或另一种载体诸如用于克隆或转染的质粒中) 时, 则rAAV载体可称为“前载体”, 其可以在AAV包装功能和合适的辅助功能的存在下通过复制和衣壳化得以“挽救”。rAAV载体可以是多种形式中的任一种, 包括但不限于质粒、线性人工染色体、与脂质复合、包封在脂质体中以及在实施例中

衣壳化在病毒颗粒(特别是AAV颗粒)中。rAAV载体可以被包装在AAV病毒衣壳中,以产生“重组腺相关病毒颗粒(rAAV颗粒)”。

[0051] “rAAV病毒”或“rAAV病毒颗粒”是指由至少一种AAV衣壳蛋白和衣壳化的rAAV载体基因组构成的病毒颗粒。

[0052] “重组腺病毒载体”是指包含一个或多个异源序列(即,非腺病毒来源的核酸序列)的多核苷酸载体,这些异源序列的侧翼是至少一个腺病毒反向末端重复序列(ITR)。在一些实施例中,重组核酸的侧翼是两个反向末端重复序列(ITR)。当存在于表达从重组病毒基因组中缺失的必要腺病毒基因(例如,E1基因、E2基因、E4基因等)的宿主细胞中时,此类重组病毒载体可以被复制并且包装到感染性病毒颗粒中。当将重组病毒载体掺入较大核苷酸中(例如,在染色体中或在用于克隆或转染的另一种载体如质粒中)时,重组病毒载体可以称为“前载体”,该前载体可以通过在存在腺病毒包装功能的情况下复制和衣壳化而被“挽救”。重组病毒载体可以是多种形式中的任一种,包括但不限于质粒、线性人工染色体、与脂质复合、包封在脂质体中以及衣壳化在病毒颗粒(例如腺病毒颗粒)中。重组病毒载体可以被包装到腺病毒衣壳中以产生“重组腺病毒颗粒”。

[0053] “重组慢病毒载体”是指包含一个或多个异源序列(即,非慢病毒来源的核酸序列)的多核苷酸载体,这些异源序列的侧翼是至少一个慢病毒末端重复序列(LTR)。在一些实施例中,重组核酸的侧翼是两个慢病毒末端重复序列(LTR)。当存在于已经被合适的辅助功能感染的宿主细胞中时,此类重组病毒载体可以被复制并且包装到感染性病毒颗粒中。可以将重组慢病毒载体包装到慢病毒衣壳中以产生“重组慢病毒颗粒”。

[0054] “重组单纯疱疹病毒载体(重组HSV载体)”是指包含一个或多个异源序列(即,非HSV来源的核酸序列)的多核苷酸载体,这些异源序列的侧翼是HSV末端重复序列。当存在于已经被合适的辅助功能感染的宿主细胞中时,此类重组病毒载体可以被复制并且包装到感染性病毒颗粒中。当将重组病毒载体掺入较大核苷酸中(例如,在染色体中或在用于克隆或转染的另一种载体如质粒中)时,重组病毒载体可以称为“前载体”,该前载体可以通过在存在HSV包装功能的情况下复制和衣壳化而被“挽救”。重组病毒载体可以是多种形式中的任一种,包括但不限于质粒、线性人工染色体、与脂质复合、包封在脂质体中以及衣壳化在病毒颗粒(例如HSV颗粒)中。可以将重组病毒载体包装到HSV衣壳中以产生“重组单纯疱疹病毒颗粒”。

[0055] 如本文所用,“固体脂质纳米颗粒”(SLN、sLNP)或“脂质纳米颗粒”(LNP)是指由脂质构成的纳米颗粒。在一些实例中,仅存在一层磷脂层,并且颗粒内部的大部分由亲脂性物质构成。有效载荷(如核酸)可以嵌入内部。在一些实例中,脂质纳米颗粒是包含脂质双层的脂质体。

[0056] 如本文所用,涉及基因疗法时的术语“改善”可以是指加强、提高、延长或以其他方式增加基因治疗剂的治疗性基因有效载荷的表达的行为。在一些实施例中,改善的基因疗法是这样的基因疗法,其中与不与IRAK调节剂一起施用的基因疗法相比,与IRAK调节剂一起施用的基因治疗剂的治疗性基因有效载荷的表达增加大于约10%、25%、50%、75%或100%中的任一者。在一些实施例中,改善的基因疗法是这样的基因疗法,其中与不与IRAK调节剂一起施用的基因疗法相比,与IRAK调节剂一起施用的基因治疗剂的治疗性基因有效载荷的表达时间延长大于约10%、25%、50%、75%或100%中的任一者。在一些实例中,通

过降低对基因治疗剂的免疫应答(例如,先天免疫应答)来改善基因疗法。在一些实施例中,改善的基因疗法是这样的基因疗法,其中与不与IRAK调节剂一起施用的基因疗法相比,对与IRAK调节剂一起施用的基因疗法的免疫应答降低大于约10%、25%、50%、75%或100%中的任一者。在一些实施例中,对基因治疗剂的免疫应答的降低被测量为与将基因治疗剂在不存在IRAK调节剂的情况下暴露于免疫细胞相比,将基因治疗剂在存在IRAK调节剂的情况下暴露于免疫细胞后细胞因子特征的降低。

[0057] 如本文所用,提及基因疗法时的术语“调节”可以是指改变、变化、变动、改善或以其他方式修饰基因治疗剂的存在或活性的行为。例如,调节对基因治疗剂的免疫应答可以是指导致改变、变化、变动、改善或以其他方式修饰对基因治疗剂的免疫应答(例如,减少、延迟和/或消除对基因治疗剂的免疫应答(例如,先天免疫应答))的任何行为。

[0058] 如本文所用,涉及对基因治疗剂的免疫应答(例如,先天免疫应答)时的术语“细胞因子特征”是指在将先天免疫细胞暴露于基因治疗剂之后,一种或多种细胞因子的改变(例如,增加、减少)的表达。在一些实例中,细胞因子特征的细胞因子是TLR途径(例如,TLR2、TLR3、TLR4或TLR9途径)特有的。

[0059] 先天免疫细胞是介导先天免疫的白细胞,并且包括嗜碱性粒细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞、朗格汉斯细胞、肥大细胞、单核细胞和巨噬细胞、嗜中性粒细胞和NK细胞。不同的AAV衣壳可以以不同效率(通常称为转导效率)进入这些先天免疫细胞。一些血清型(如AAV1)在转导像单核细胞的某些免疫细胞方面是有效的,而其他AAV(如AAV6)在转导像树突细胞的细胞方面是有效的(Grimm,D等人,J.Virol.[病毒学杂志],2008,82(12):5887-5911)。细胞进入后的AAV可以引起免疫应答。这种免疫应答的程度取决于AAV血清型和细胞类型。一旦AAV转导宿主免疫细胞,它们就可以接合免疫受体,如TLR(例如,TLR9)。几项使用小鼠模型的研究揭示,TLR9是促成AAV免疫原性的关键DNA传感器(Zhu,J等人,J Clin Invest.[临床研究杂志]2009;119(8):2388-2398;Ashley SN等人,Cell.Immunol.[细胞免疫学]2019,346:103997)。一旦这些TLR被病毒激活,它们就分泌细胞因子,这些细胞因子在受感染的细胞内建立抗病毒状态并且警告邻近细胞。(Carty,M和Bowie,AG,Clin Exp Immunol[临床实验免疫学],2010,161(3):397-406;Lester,SN和Li,K,J Mol Biol.[分子生物学杂志]2014;426(6):1246-1264;Fitzgerald,KA和Kagan,JC,Cell[细胞],2020180(6):1044-1066)。

[0060] 这些细胞因子还负责激活适应性免疫系统,该适应性免疫系统包含分别产生抗体以及产生细胞毒性以杀伤病毒感染的细胞的B细胞和T细胞。如本文所用,细胞因子的某些亚群的上调或下调称为“细胞因子特征”。这些包含三种或更多种细胞因子的细胞因子特征可以用作疾病和疗法成功的预测标记物。细胞因子特征的实例可见于Zuniga,J等人,Int.J.Infect.Diseases[国际感染性疾病杂志],2020,94:4-11,Bergamaschi,C等人,Cell Reports[细胞报告],2021,36:109504;Del Valle,DM等人,Nat.Med.[自然医学]2020,26:1636-1643。

[0061] “异源的”意指衍生自基因型不同于其所比较或其所引入或掺入的实体的其余部分的实体。例如,通过基因工程技术引入不同细胞类型中的核酸是异源核酸(并且在表达时可以编码异源多肽)。类似地,并入病毒载体中的细胞序列(例如,基因或其部分)相对于载体是异源核苷酸序列。

[0062] 术语“转基因”是指引入细胞中并且能够被转录成RNA并且任选地在适当条件下翻译和/或表达的核酸。在一些方面,它赋予其被引入的细胞期望的特性,或以其他方式产生期望的治疗或诊断结局。在另一方面,它可以被转录成介导RNA干扰的分子,如siRNA。

[0063] 如关于病毒滴度使用的术语“基因组颗粒(gp)”、“基因组当量”或“基因组拷贝”是指含有重组AAV DNA基因组的病毒体的数目,而与感染性或功能性无关。特定载体制剂中基因组颗粒的数目可以通过诸如本文实例中或例如Clark等人(1999)Hum. Gene Ther. [人类基因疗法], 10:1031-1039; Veldwijk等人(2002)Mol. Ther. [分子疗法], 6:272-278中描述的程序测量。

[0064] 如关于病毒滴度使用的术语“感染单位(iu)”、“感染性颗粒”或“复制单位”是指通过感染中心测定(也称为复制中心测定),如例如McLaughlin等人(1988)J. Virol. [病毒学杂志], 62:1963-1973中所述测量的感染性和复制型重组AAV载体颗粒的数目。

[0065] 如关于病毒滴度使用的术语“转导单位(tu)”是指引起功能性转基因产物产生的感染性重组AAV载体颗粒的数目,如诸如本文实例中或例如Xiao等人(1997)Exp. Neurobiol. [实验神经生物学], 144:113-124; 或Fisher等人(1996)J. Virol. [病毒学杂志], 70:520-532(LFU测定)中描述的功能性测定中所测量的。

[0066] “反向末端重复”或“ITR”序列是本领域熟知的术语,并且是指在病毒基因组末端发现的处于相反取向的相对短的序列。

[0067] “AAV反向末端重复(ITR)”序列是本领域众所周知的术语,是存在于天然单链AAV基因组的两个末端处的大约145个核苷酸的序列。ITR最外面的125个核苷酸可以以两个选择性取向中的任一取向存在,导致不同AAV基因组之间和单个AAV基因组的两个末端之间的异质性。最外面的125个核苷酸还含有几个较短的自身互补区(命名为A区、A'区、B区、B'区、C区、C'区和D区),允许在ITR的该部分内发生链内碱基配对。

[0068] “末端解离序列”或“trs”是AAV ITR的D区中在病毒DNA复制期间被AAV rep蛋白切割的序列。突变型末端解离序列是耐AAV rep蛋白切割的。“AAV辅助功能”是指允许AAV被宿主细胞复制和包装的功能。AAV辅助功能可以按多种形式中的任一种提供,包括但不限于协助AAV复制和包装的辅助病毒或辅助病毒基因。其他AAV辅助功能是本领域中已知的,如基因毒性剂。

[0069] “AAV辅助功能”是指允许AAV被宿主细胞复制和包装的功能。AAV辅助功能可以按多种形式中的任一种提供,包括但不限于协助AAV复制和包装的辅助病毒或辅助病毒基因。其他AAV辅助功能是本领域中已知的,如基因毒性剂。

[0070] AAV的“辅助病毒”是指允许AAV(其是缺陷型细小病毒)被宿主细胞复制和包装的病毒。已经鉴定了许多此类辅助病毒,包括腺病毒、疱疹病毒、痘病毒(如牛痘)和杆状病毒。腺病毒涵盖许多不同的亚群,但是C亚群的5型腺病毒(Ad5)是最常用的。人、非人哺乳动物和禽类来源的许多腺病毒是已知的并且可从诸如ATCC等保藏机构获得。也可从诸如ATCC等保藏机构获得的疱疹家族的病毒包括例如单纯疱疹病毒(HSV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)和假狂犬病病毒(PRV)。可以从保藏机构获得的杆状病毒包括苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)核型多角体病毒。

[0071] 关于参考多肽或核酸序列的“序列同一性百分比(%)”被定义为在比对序列并引入空位(如果必要)以获得最大序列同一性百分比并且不考虑任何保守取代作为序列同一

性的一部分之后,候选序列中的氨基酸残基或核苷酸与参考多肽或核酸序列中的氨基酸残基或核苷酸相同的百分比。用于确定氨基酸或核酸序列同一性百分比目的的比对可以用在本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用公开可用的计算机软件程序,例如,在 Current Protocols in Molecular Biology[分子生物学实验操作手册](Ausubel等人编辑,1987),增刊30,章节7.7.18,表7.7.1中描述的那些,并且包括BLAST、BLAST-2、ALIGN或 Megalign (DNASTAR) 软件。潜在的比对程序是ALIGN Plus (科学教育软件公司 (Scientific and Educational Software),宾夕法尼亚州)。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。出于本文的目的,给定氨基酸序列A与、和或针对给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(可以替代性地表述为给定氨基酸序列A与、和或针对给定氨基酸序列B具有或包含一定的%氨基酸序列同一性)计算如下:100乘以分数X/Y,其中X是通过序列比对程序在程序对A和B的比对中评定为相同匹配的氨基酸残基的数目,并且其中Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解,在氨基酸序列A的长度与氨基酸序列B的长度不相等时,A与B的氨基酸序列同一性%将和B与A的氨基酸序列同一性%不相等。出于本文的目的,给定核酸序列C与、和或针对给定核酸序列D的核酸序列同一性%(可以替代性地表述为给定核酸序列C与、和或针对给定核酸序列D具有或包含一定的核酸序列同一性%)计算如下:100乘以分数W/Z,其中W是通过序列比对程序在该程序对C和D的比对中评定为相同匹配的核苷酸的数目,并且其中Z是D中核苷酸的总数。应当理解,在核酸序列C的长度与核酸序列D的长度不相等时,C与D的核酸序列同一性%将和C与D的核酸序列同一性%不相等。

[0072] 药剂的“有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效实现所需治疗结果的量。例如,基因治疗剂的有效量是指在必要的剂量和时间段内有效实现所需基因治疗结果的量。在另一个实例中,IRAK调节剂的有效量可以是指必要的剂量和时间段内有效实现改善的基因疗法的所需结果的量。

[0073] 本发明的物质/分子(例如,基因治疗剂和/或IRAK调节剂)的“治疗有效量”可以根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及物质/分子、激动剂或拮抗剂在个体中引发所需应答的能力等因素而变化。治疗有效量还是其中治疗有益作用胜过物质/分子的任何毒性或有害作用的量。

[0074] 提及细胞因子特征时的术语“合适的对照”是来自未与基因治疗剂一起孵育的先天免疫细胞的细胞因子特征中细胞因子的表达,或来自与基因治疗剂一起孵育之前的先天免疫细胞的细胞因子特征中细胞因子的表达。

[0075] 涉及基因治疗剂和先天免疫应答调节剂(例如,IRAK调节剂)时的“与……组合”施用包括以任何顺序同时(并行)、连续或依序施用基因治疗剂和先天免疫应答调节剂(例如,IRAK调节剂)。

[0076] 术语“并行”在本文使用是指代施用基因治疗剂和先天免疫应答调节剂(例如,IRAK调节剂),其中施用的至少一部分在时间上重叠。因此,并行施用包括当基因治疗剂或先天免疫应答调节剂(例如,IRAK调节剂)的施用在停止施用另一种药剂/调节剂后继续进行时的给药方案。

[0077] 如本文所用,“与……结合”是指除一种治疗方式外,还施用另一种治疗方式。因此,“与……结合”是指在向个体施用一种治疗方式之前、期间或之后,施用另一种治疗方式

(基因治疗剂或先天免疫应答调节剂(例如,IRAK调节剂))。

[0078] “分离的”分子(例如,核酸或蛋白质)或细胞意指它已经从其天然环境的组分中被鉴定并且分离和/或回收。

[0079] 本文对“约”某一值或参数的提及包括(并描述)涉及该值或参数本身的实施例。例如,提及“约X”的描述包括对“X”的描述。

[0080] 如本文所用,除非另有指示,否则冠词的单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“该”包括复数引用物。

[0081] 应理解,本文所述的本发明的方面和实施例包括“包含方面和实施例”、“由方面和实施例组成”和/或“基本上由方面和实施例组成”。

治疗方法

[0082] 在一些方面,本发明提供了用于将核酸递送至个体的细胞的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂,以及b)向该个体施用基因治疗剂。在一些方面,本发明提供了用于治疗有需要的个体的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂,以及b)向该个体施用基因治疗剂。在一些方面,本发明提供了用于改善个体的基因疗法的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂,以及b)向该个体施用基因治疗剂。在一些方面,本发明提供了用于调节对基因治疗剂的免疫应答的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂,以及b)向该个体施用基因治疗剂。在一些方面,本发明提供了用于抑制对基因治疗剂的免疫应答的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂,以及b)向该个体施用基因治疗剂。在一些方面,本发明提供了用于诱导对基因治疗剂的耐受性的方法,该方法包括a)向该个体施用IRAK调节剂,以及b)向该个体施用基因治疗剂。在一些实施例中,IRAK调节剂调节IRAK蛋白激酶的活性。在一些实施例中,IRAK调节剂调节IRAK-4蛋白激酶的活性。在一些实施例中,基因治疗剂是病毒基因治疗剂(例如,病毒载体)或非病毒基因治疗剂(例如,包含非病毒基因治疗剂的脂质纳米颗粒)。在一些实施例中,基因治疗剂是腺相关病毒(AAV)载体、腺病毒载体、慢病毒载体或单纯疱疹病毒(HSV)载体。

[0083] 在本发明的一些实施例中,可以将基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)施用至特定的目的组织,或可以将其全身施用。在一些实施例中,可以将有效量的基因治疗剂施用于受试者。在一些实施例中,可以将有效量的基因治疗剂肠胃外施用。肠胃外施用途径可以包括而限于静脉内、腹膜内、骨内、动脉内、大脑内、肌内、鞘内、皮下、脑室内、肝内等。在一些实施例中,可以将有效量的基因治疗剂通过一种施用途径施用。在一些实施例中,可以将有效量的基因治疗剂通过施用途径的组合或多种(例如,两种、三种等)施用途径施用。在一些实施例中,将有效量的基因治疗剂施用至一个部位。在其他实施例中,可以将有效量的基因治疗剂施用至多于一个部位。

[0084] 根据治疗目标施用有效量的基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒、或脂质纳米颗粒)。例如,在低百分比的转导或转染可以实现所需治疗效果的情况下,则治疗目标通常是满足或超过此转导或转染水平。在一些情况下,这种转导或转染水平可以通过转导或转染仅约1%至5%的所需组织类型的靶细胞、在一些实施例中至少约20%的所需组织类型的细胞、在一些实施例中至少约50%、在一些实施例中至少约80%、在一些实施例中至少约95%、在一些实施例中至少约99%的所需组织类型的细胞来实现。基因治疗剂可以在相同的程序期间或间隔开数天、数周、数月或数年通过一次或多次施用来

施用。可以使用本文所述的任何施用途径中的一种或多种。在一些实施例中,多种基因治疗剂可以用于治疗人;例如,AAV载体和慢病毒载体。

[0085] 鉴定由基因治疗剂转导或转染的细胞的方法是本领域已知的;例如,可以使用免疫组织化学或使用标记物(如增强型绿色荧光蛋白)来检测被基因治疗剂转导或转染的细胞。

[0086] 在一些实施例中,将有效量的基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)同时或依序地施用至多于一个部位。在其他实施例中,将有效量的基因治疗剂多于一次地(例如,重复)施用至单个部位。在一些实施例中,基因治疗剂的多次注射间隔不超过一小时、两小时、三小时、四小时、五小时、六小时、九小时、十二小时或24小时。

[0087] 在一些实施例中,这些方法包括施用有效量的包含基因治疗剂的药物组合物以治疗需要基因疗法治的个体。在一些实施例中,病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度为至少约 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 10×10^{12} 、 11×10^{12} 、 15×10^{12} 、 20×10^{12} 、 25×10^{12} 、 30×10^{12} 或 50×10^{12} 个基因组拷贝/mL中的任一个。在一些实施例中,病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度为约 5×10^{12} 至 6×10^{12} 、 6×10^{12} 至 7×10^{12} 、 7×10^{12} 至 8×10^{12} 、 8×10^{12} 至 9×10^{12} 、 9×10^{12} 至 10×10^{12} 、 10×10^{12} 至 11×10^{12} 、 11×10^{12} 至 15×10^{12} 、 15×10^{12} 至 20×10^{12} 、 20×10^{12} 至 25×10^{12} 、 25×10^{12} 至 30×10^{12} 、 30×10^{12} 至 50×10^{12} 或 50×10^{12} 至 100×10^{12} 个基因组拷贝/mL中的任一个。在一些实施例中,病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度为至少约 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 10×10^9 、 11×10^9 、 15×10^9 、 20×10^9 、 25×10^9 、 30×10^9 或 50×10^9 个转导单位/mL中的任一个。在一些实施例中,病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度为约 5×10^9 至 6×10^9 、 6×10^9 至 7×10^9 、 7×10^9 至 8×10^9 、 8×10^9 至 9×10^9 、 9×10^9 至 10×10^9 、 10×10^9 至 11×10^9 、 11×10^9 至 15×10^9 、 15×10^9 至 20×10^9 、 20×10^9 至 25×10^9 、 25×10^9 至 30×10^9 、 30×10^9 至 50×10^9 或 50×10^9 至 100×10^9 个转导单位/mL中的任一个。在一些实施例中,病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度为约 5×10^9 至 10×10^9 、 10×10^9 至 15×10^9 、 15×10^9 至 25×10^9 或 25×10^9 至 50×10^9 个转导单位/mL中的任一个。在一些实施例中,病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度为至少约 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 10×10^{10} 、 11×10^{10} 、 15×10^{10} 、 20×10^{10} 、 25×10^{10} 、 30×10^{10} 、 40×10^{10} 或 50×10^{10} 个感染单位/mL中的任一个。在一些实施例中,病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度为至少约 5×10^{10} 至 6×10^{10} 、 6×10^{10} 至 7×10^{10} 、 7×10^{10} 至 8×10^{10} 、 8×10^{10} 至 9×10^{10} 、 9×10^{10} 至 10×10^{10} 、 10×10^{10} 至 11×10^{10} 、 11×10^{10} 至 15×10^{10} 、 15×10^{10} 至 20×10^{10} 、 20×10^{10} 至 25×10^{10} 、 25×10^{10} 至 30×10^{10} 、 30×10^{10} 至 40×10^{10} 、 40×10^{10} 至 50×10^{10} 或 50×10^{10} 至 100×10^{10} 个感染单位/mL中的任一个。在一些实施例中,病毒颗粒(例如,rAAV颗粒)的病毒滴度为至少约 5×10^{10} 至 10×10^{10} 、 10×10^{10} 至 15×10^{10} 、 15×10^{10} 至 25×10^{10} 或 25×10^{10} 至 50×10^{10} 个感染单位/mL中的任一个。

[0088] 在一些实施例中,施用于个体的基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)的剂量为至少约 1×10^8 至约 6×10^{13} 个基因组拷贝/kg体重中的任一个。在一些实施例中,施用于个体的基因治疗剂的剂量为约 1×10^8 至约 6×10^{13} 个基因组拷贝/kg体重中的任一个。

[0089] 在一些实施例中,施用于个体的基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)的总量为至少约 1×10^9 至约 1×10^{14} 个基因组拷贝中的任一个。在一些实施例中,施用于个体的基因治疗剂的总量为约 1×10^9 至约 1×10^{14} 个基因组拷贝中的任一个。

[0090] 包含基因疗法(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)的本发明的组合物可以单独使用或与除IRAK调节剂之外的一种或多种另外的治疗剂组合使用。依序施用之间的间隔可以是按至少(或替代性地,少于)数分钟、数小时或数天计算。

[0091] 在本发明的一些实施例中,包含IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)的组合物可以口服、肠胃外、通过吸入喷雾、局部、直肠、经鼻、经颊、经阴道或经由植入式储器施用。如本文所用,术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内和颅内注射或输注技术。在一些实施例中,将组合物口服、腹膜内或静脉内施用。本发明的组合物的无菌可注射形式可以是水性或油性混悬剂。这些混悬剂可以根据本领域已知的技术使用合适的分散剂或润湿剂以及助悬剂来配制。无菌可注射制剂也可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或混悬剂,例如作为在1,3-丁二醇中的溶液。在可接受的媒介物和溶剂中,可以采用的是水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。此外,常规地采用无菌不挥发油作为溶剂或助悬介质。

[0092] 可以与载剂材料组合以产生单一剂型的组合物(例如,药物组合物)的IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)的量将根据个体和特定施用方式而变化。在一些实施例中,配制包含IRAK调节剂的组合物,使得向个体施用剂量在约0.01mg/kg至约100mg/kg体重之间的IRAK调节剂。在一些实施例中,将IRAK调节剂以约0.01mg/kg至约100mg/kg、约0.01mg/kg至约75mg/kg、约0.01mg/kg至约500mg/kg、约0.01mg/kg至约25mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.01mg/kg至约5mg/kg、约0.01mg/kg至约1.0mg/kg、约1.0mg/kg至约100mg/kg、约1.0mg/kg至约75mg/kg、约1.0mg/kg至约50mg/kg、约1.0mg/kg至约25mg/kg、约1.0mg/kg至约10mg/kg、约1.0mg/kg至约5mg/kg、约10mg/kg至约100mg/kg、约10mg/kg至约75mg/kg、约10mg/kg至约50mg/kg、约10mg/kg至约25mg/kg、约25mg/kg至约100mg/kg、约25mg/kg至约75mg/kg、约25mg/kg至约50mg/kg、约50mg/kg至约100mg/kg、约50mg/kg至约75mg/kg或约75mg/kg至约100mg/kg个体体重中的任一个的剂量水平口服或肠胃外施用。在一些实施例中,将IRAK调节剂以多于约0.01mg/kg、1.0mg/kg、5mg/kg、25mg/kg、50mg/kg、75mg/kg、100mg/kg体重、200mg/kg体重、300mg/kg体重、400mg/kg体重或500mg/kg个体体重中的任一个的剂量水平口服或肠胃外施用。

[0093] 用于口服施用IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、混悬剂、糖浆和酏剂。除了活性化合物之外,液体剂型可以含有本领域常用的惰性稀释剂(例如像水或其他溶剂)、增溶剂和乳化剂,如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油类(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨醇脂肪酸酯及其混合物。除了惰性稀释剂之外,口服组合物还可以包括佐剂,如润湿剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、调味剂和芳香剂。

[0094] 可注射制剂,例如无菌可注射水性或油性混悬剂或IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解

剂)可以根据已知技术使用合适的分散剂或润湿剂和助悬剂配制。无菌可注射制剂还可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液、混悬剂或乳剂,例如作为在1,3-丁二醇中的溶液。在可接受的媒介物和溶剂中,可以采用的是水、林格氏溶液、U.S.P.和等渗氯化钠溶液。此外,常规地采用无菌不挥发油作为溶剂或助悬介质。为此目的,可以使用任何温和的不挥发油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸如油酸用于制备可注射剂。

[0095] 可注射配制品或IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)可以例如通过以下方式灭菌:经细菌截留过滤器过滤,或掺入呈无菌固体组合物形式的灭菌剂,这些无菌固体组合物可以在使用前溶解或分散于无菌水或其他无菌可注射介质中。

[0096] 用于口服施用IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、散剂和颗粒剂。在此类固体剂型中,将活性化合物与至少一种惰性的药学上可接受的赋形剂或载剂(如柠檬酸钠或磷酸二钙)和/或a)填充剂或增量剂,如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和硅酸;b)粘合剂,例如像,羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶;c)保湿剂,如甘油;d)崩解剂,如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;e)溶液阻滞剂,如石蜡;f)吸收加速剂,如季铵化合物;g)润湿剂,例如像,鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;h)吸收剂,如高岭土和膨润土粘土;和i)润滑剂,如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物混合。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型还可以包含缓冲剂。

[0097] 还可以使用诸如乳糖(lactose或milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等赋形剂,将相似类型的固体组合物用作软填充和硬填充明胶胶囊中的填充剂。片剂、糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂的固体剂型可以制备有包衣和外壳,如肠溶包衣和药物配制领域熟知的其他包衣。它们可以任选地含有遮光剂,并且还可以具有如下的组合物:该组合物在肠道的某一部分中,任选以延迟的方式仅或优先释放一种或多种活性成分。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物和蜡。还可以使用诸如乳糖(lactose或milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等赋形剂,将相似类型的固体组合物用作软填充和硬填充明胶胶囊中的填充剂。

[0098] IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)也可以呈具有一种或多种如上所述的赋形剂的微包封形式。片剂、糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂的固体剂型可以制备有包衣和外壳,如肠溶包衣、控释包衣和药物配制领域中熟知的其他包衣。在此类固体剂型中,活性化合物可以与至少一种惰性稀释剂(如蔗糖、乳糖或淀粉)混合。此类剂型还可以包含(作为正常实践)除惰性稀释剂(例如,压片润滑剂)和其他压片助剂(如硬脂酸镁和微晶纤维素)之外的另外的物质。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型还可以包含缓冲剂。它们可以任选地含有遮光剂,并且还可以具有如下的组合物:该组合物在肠道的某一部分中,任选以延迟的方式仅或优先释放一种或多种活性成分。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物和蜡。

[0099] 在一些实施例中,在施用基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)之前,施用IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)。在一些实施例中,在施用基因治疗剂之前约1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、3天、4天、5天、6天、一周或多于一周中的任一者,将IRAK调节剂施用于个体。在一些实施例中,在施用基因治疗剂之前小于约1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、3天、4天、5天、6天或一周中的任一者,将

IRAK调节剂施用于个体。在一些实施例中,在约相同时间(例如,在约一小时内)施用IRAK调节剂和基因治疗剂。在一些实施例中,在施用基因治疗剂之后施用IRAK调节剂。在一些实施例中,在施用基因治疗剂之后约1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、3天、4天、5天、6天、一周或多于一周中的任一者,将IRAK调节剂施用于个体。在一些实施例中,在施用基因治疗剂之后小于约1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、3天、4天、5天、6天或一周中的任一者,将IRAK调节剂施用于个体。

[0100] 在一些实施例中,将基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)与IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)结合使用以治疗适合于通过基因疗法治疗的疾病或障碍。在一些实施例中,该疾病或障碍是单基因病或障碍。

[0101] 在一些实施例中,将基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)与IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)结合使用以治疗CNS的障碍。CNS的非限制性障碍包括中风、亨廷顿病、癫痫、帕金森病、卢伽雷氏病(Lou Gehrig's disease)(也称为肌萎缩侧索硬化)、阿尔茨海默病、皮质基底节变性或CBD、皮质基底节神经节变性或CBGD、额颞叶痴呆或FTD、进行性核上性麻痹或PSP、多系统萎缩或MSA、脑癌和溶酶体贮积病(LSD)。可以通过基因疗法结合IRAK调节剂治疗的本发明的障碍的其他非限制性实例包括创伤性脑损伤、酶功能障碍性障碍、精神障碍(包括创伤后应激综合征)、神经系统变性疾病和认知障碍(包括痴呆、自闭症和抑郁症),并且酶功能障碍包括而限于脑白质营养不良(包括卡纳万病)。

[0102] 在一些实施例中,将基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)与IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)结合使用以治疗溶酶体贮积病。如本领域中通常已知的,溶酶体贮积病是罕见的遗传性代谢障碍,其特征在于溶酶体功能缺陷。此类障碍通常是由适当的粘多糖、糖蛋白和/或脂质代谢所需的酶的缺乏引起的,导致溶酶体储存的细胞材料的病理性积累。可以通过本发明的治疗性多肽或治疗性核酸治疗的本发明的溶酶体贮积病的非限制性实例包括戈谢病2型或3型、GM1神经节苷脂贮积症、亨特病、克拉伯病、甘露糖苷贮积症、 β 甘露糖苷贮积症、异染性脑白质营养不良症、粘脂贮积症II/III型病、尼曼-皮克A型病、尼曼-皮克C型病、庞贝病、桑德霍夫病、沙费利波A型病、沙费利波B型病、沙费利波C型病、沙费利波D型病、申德勒病、斯莱病、泰-萨克斯病和沃尔曼病。

[0103] 在一些实施例中,基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)与IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)结合使用以治疗血友病A、血友病B、年龄相关性黄斑变性、糖尿病性视网膜病变、青光眼、肌营养不良、X连锁肌管性肌病、脊髓性肌萎缩、莱伯氏先天性黑朦、无脉络膜症、莱伯遗传性视神经病变、鸟氨酸氨甲酰基转移酶(OTC)缺乏症、瓜氨酸血症1型、苯丙酮尿症(PKU)、肾上腺脑白质营养不良、镰状细胞病、肌营养不良或 β 地中海贫血。

[0104] 在一些方面,本发明提供了用于在制造用于将核酸递送至有需要的个体的细胞的药剂中使用的组合物,其中该组合物包含基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒),并且其中该组合物配制被配置用于与IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)组合使用。在一些方面,本发明提供了用于在制造用于将核酸递送至有需要的个体的细胞的药剂中使用的组合物,其中该组合物包含IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解

剂),并且其中该组合物被配制用于与基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)组合使用。

[0105] 在一些方面,本发明提供了用于在制造用于治疗需要基因疗法的个体的药剂中使用的组合物,其中该组合物包含基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒),并且其中该组合物被配制用于与IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)组合使用。在一些方面,本发明提供了用于在制造用于治疗需要基因疗法的个体的药剂中使用的组合物,其中该组合物包含IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂),并且其中该组合物被配制用于与基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)组合使用。

[0106] 在一些方面,本发明提供了用于在制造用于调节需要基因疗法的个体对基因疗法的免疫应答的药剂中使用的组合物,其中该组合物包含基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒),并且其中该组合物被配制用于与IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)组合使用。在一些方面,本发明提供了用于在制造用于调节个体对基因疗法的免疫应答的药剂中使用的组合物,其中该组合物包含IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂),并且其中该组合物被配制用于与基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)组合使用。

[0107] 在一些方面,本发明提供了用于在制造用于抑制需要基因疗法的个体对基因疗法的免疫应答的药剂中使用的组合物,其中该组合物包含基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒),并且其中该组合物被配制用于与IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)组合使用。在一些方面,本发明提供了用于在制造用于抑制个体对基因疗法的免疫应答的药剂中使用的组合物,其中该组合物包含IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂),并且其中该组合物被配制用于与基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)组合使用。

[0108] 在一些方面,本发明提供了用于在制造用于改善需要基因疗法的个体中的基因疗法的药剂中使用的组合物,其中该组合物包含基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒),并且其中该组合物被配制用于与IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)组合使用。在一些方面,本发明提供了用于在制造用于改善个体中的基因疗法的药剂中使用的组合物,其中该组合物包含IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂),并且其中该组合物被配制用于与基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)组合使用。

[0109] 在一些方面,本发明提供了用于在制造用于诱导需要基因疗法的个体对基因疗法的耐受性的药剂中使用的组合物,其中该组合物包含基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒),并且其中该组合物被配制用于与IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)组合使用。在一些方面,本发明提供了用于在制造用于诱导个体对基因疗法的耐受性的药剂中使用的组合物,其中该组合物包含IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂),并且其中该组合物被配制用于与基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)组合使用。

[0110] 在一些方面,本发明提供了用于在将核酸递送至有需要的个体的细胞中使用的基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒),其中该基因

治疗剂与IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)组合使用。在一些方面,本发明提供了用于在将核酸递送至有需要的个体的细胞中使用的IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂),其中该IRAK调节剂与基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)组合使用。

[0111] 在一些方面,本发明提供了用于在治疗需要基因疗法的个体中使用的基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒),其中该基因治疗剂与IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)组合使用。在一些方面,本发明提供了用于在治疗需要基因疗法的个体中使用的IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂),其中该IRAK调节剂与基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)组合使用。

[0112] 在一些方面,本发明提供了用于调节需要基因疗法的个体对基因疗法的免疫应答的IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂),其中将该IRAK调节剂与基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)组合使用。

[0113] 在一些方面,本发明提供了用于抑制需要基因疗法的个体对基因疗法的免疫应答的IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂),其中将该IRAK调节剂与基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)组合使用。

IRAK调节剂

[0114] 在一些方面,本发明提供了使用IRAK调节剂与基因治疗剂用于通过抑制对基因治疗剂的免疫应答(例如先天免疫应答、适应性免疫应答)来改善基因疗法的方法。IRAK通过诱导急性炎症、随后诱导另外的适应性免疫应答,在对引入人体的病原体的保护性应答中发挥核心作用。IRAK是白介素-1受体信号传导途径和一些Toll样受体信号传导途径的必需组分。Toll样受体(TLR)通过识别特定病原体相关分子模式(PAMP)来检测微生物,并且IL-1R家族成员响应于白介素-1(IL-1)家族细胞因子。这些受体通过衔接蛋白(主要是MyD88)启动细胞内信号传导级联。

[0115] IRAK家族由IRAK-1、IRAK-2和IRAK-4(它们在多种人免疫细胞类型中表达)、以及IRAK-M(也称为IRAK-3)(它们的表达主要限于单核细胞和巨噬细胞)构成。所有四种IRAK家族蛋白都含有N末端死亡结构域(DD)、ProST结构域和位于中央的激酶结构域。IRAK-1、IRAK-2和IRAK-M还含有C末端结构域。DD充当允许与其他含DD蛋白质的蛋白质间相互作用的平台,这些其他含DD蛋白质中最重要的是衔接蛋白髓样分化因子88(MyD88)。诸位发明人假设阻断IRAK功能会导致特异性阻断TLR9途径,从而导致特异性免疫调节。在一些实施例中,使用IRAK调节剂来阻断TLR9途径。在一些实施例中,该IRAK调节剂阻断TLR9功能。在一些实施例中,该IRAK调节剂是IRAK抑制剂和/或IRAK降解剂。

[0116] 在一些实施例中,该IRAK降解剂是双功能化合物,其功能是将IRAK激酶募集到E3泛素连接酶中用于降解。在一些实施例中,该IRAK降解剂是IRAK激酶的靶向泛素化的调节剂。

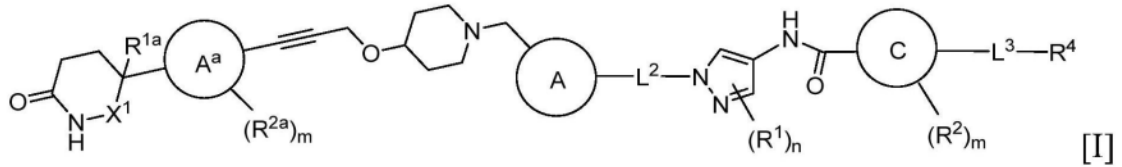
[0117] 蛋白质降解剂是包含以下三种组分的双功能化合物:E3泛素连接酶配体、接头和目的靶蛋白的配体。它们通过同时结合E3连接酶和靶蛋白两者来诱导三元复合物的形成。三元复合物的形成有效募集E3连接酶以使目的靶标多泛素化,从而通过蛋白酶体诱导随后的降解。降解剂是有吸引力的工具,可用于以可逆和可调的方式诱导选择性蛋白质敲低。在一些实施例中,IRAK降解剂是蛋白水解靶向嵌合体(Proteolysis Targeting Chimeric)

(PROTAC)。

[0118] 在一些实施例中,该IRAK降解剂是IRAK-1降解剂、IRAK-2降解剂、IRAK-M降解剂(或IRAK-3降解剂)或IRAK-4降解剂。

[0119] 用于在本发明的方法中使用的合适的IRAK4降解剂化合物描述于专利申请WO 2019/133531、WO 2020/113233、WO 2020/264490、WO 2021/127283或WO 2021/011868中。

[0120] 在一些实施例中,该IRAK-4降解剂包含描述于美国专利号11,117,889中的式[I]的化合物:



或其药学上可接受的盐,其中:

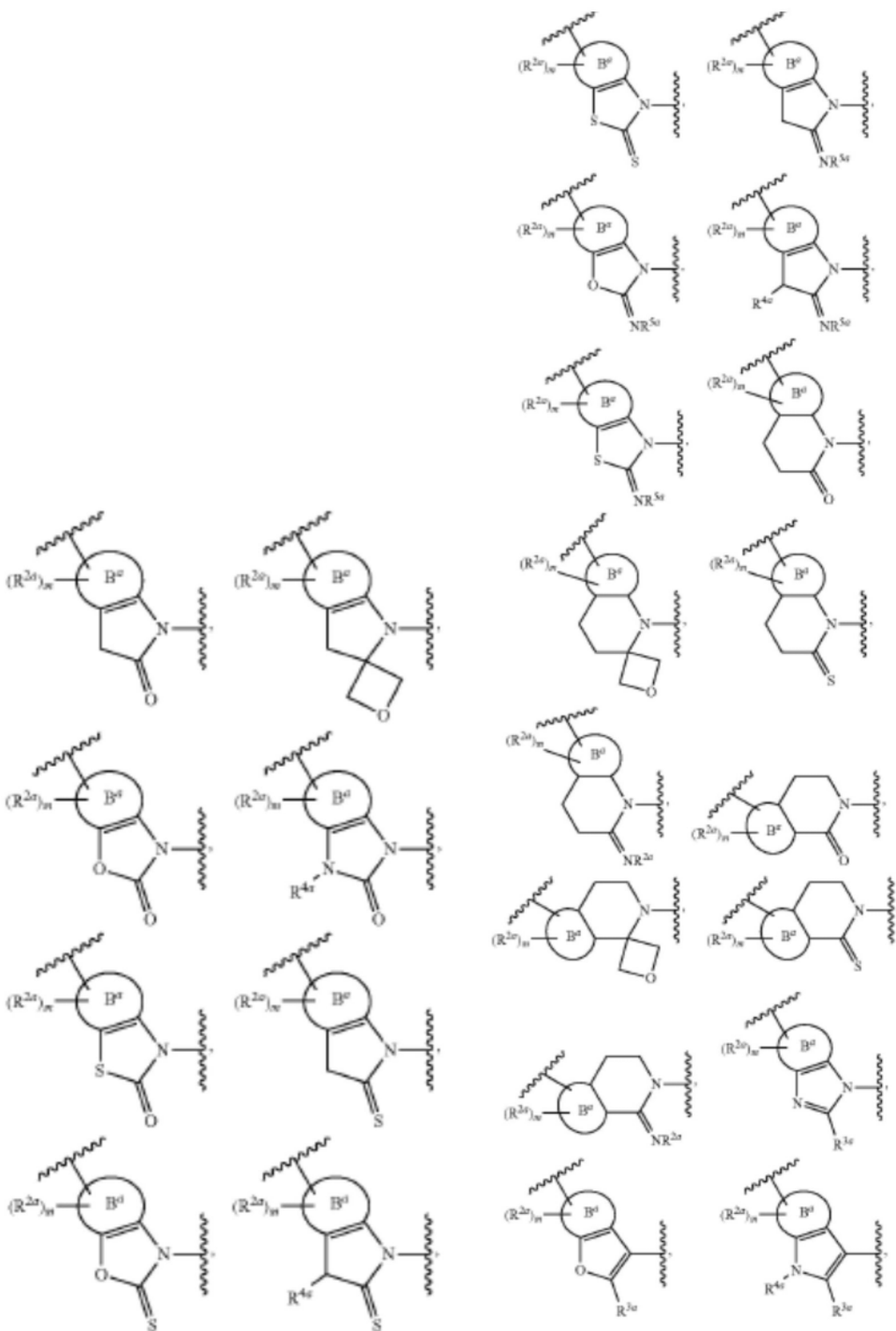
X¹是选自以下的二价部分:共价键、-CH₂-、-C(O)-、-C(S)-,并且

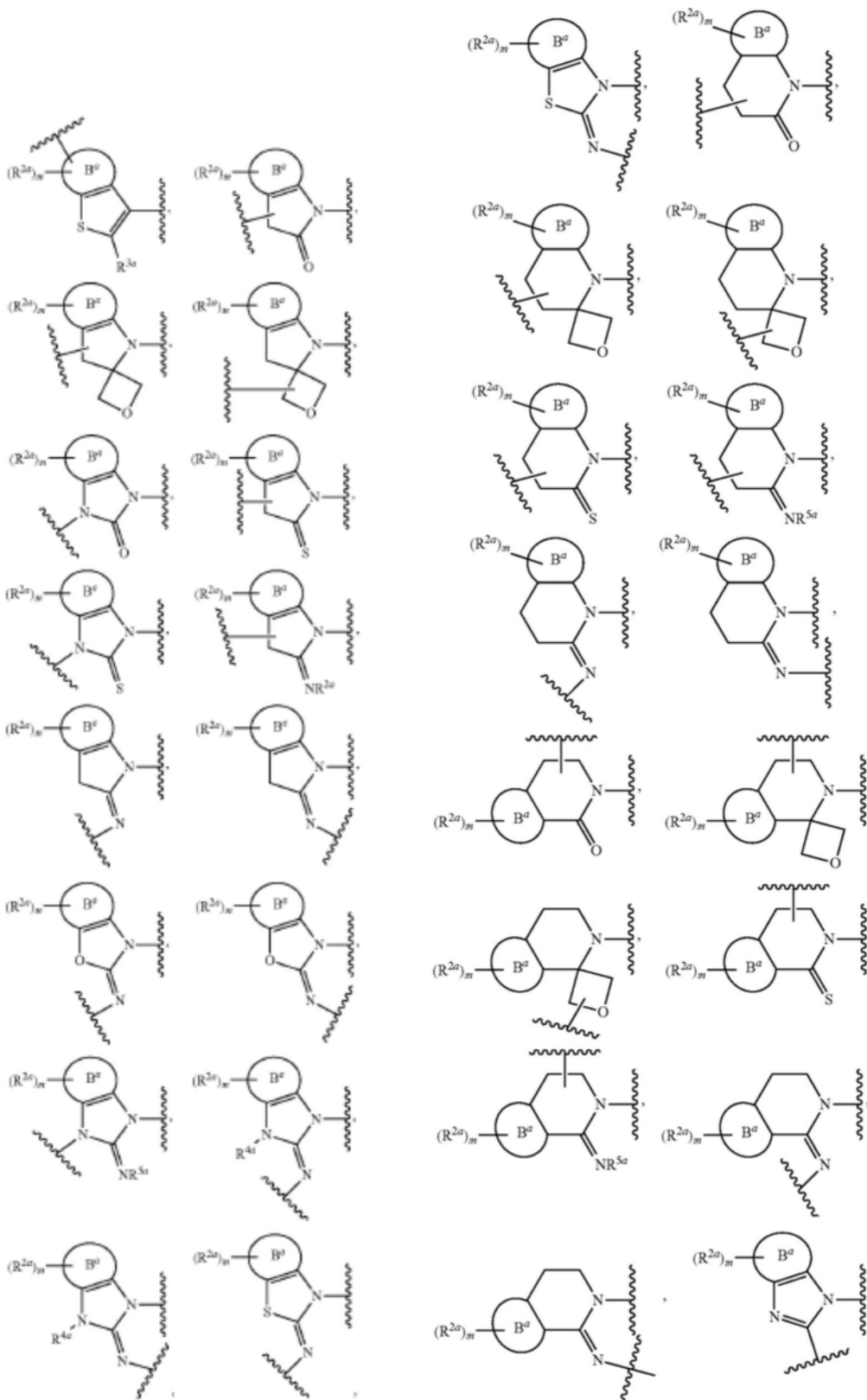


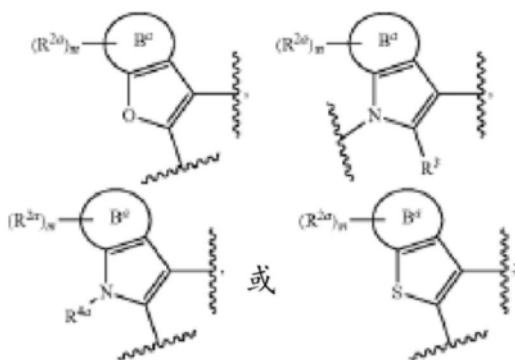
R^{1a}是氢、卤素、-CN、-OR、-SR、-S(O)R、-S(O)₂R、-N(R)₂、-Si(R)₃或任选经取代的C₁₋₄脂族;

每个R^{2a}独立地是氢、R^{6a}、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NR₂、-C(O)N(R)OR、-OC(O)R、-OC(O)NR₂、-N(R)C(O)OR、-N(R)C(O)R、-N(R)C(O)NR₂或-N(R)S(O)₂R;

环A是选自以下的双环或三环:







环B^a是选自以下的稠合环:含有0-2个氮原子的6元芳基,5至7元部分饱和的碳环基,具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5至7元部分饱和杂环基,或具有1-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5元杂芳基;

R^{3a}选自氢、卤素、-OR、-N(R)₂或-SR;

每个R^{4a}独立地是氢、R^{6a}、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NR₂、-C(O)N(R)OR、-OC(O)R、-OC(O)NR₂、-N(R)C(O)OR、N(R)C(O)R、-N(R)C(O)NR₂或-N(R)S(O)₂R;

R^{5a}是氢、C₁₋₄脂族或-CN;

每个R^{6a}独立地是选自以下的任选经取代的基团:C₁₋₆脂族,苯基,具有1-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的4-7元饱和或部分不饱和杂环,和具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环;

环A是4-10元饱和单环或双环碳环或具有0-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环;

环C是苯基或具有1-5个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-10元单环或双环杂芳基环;L²和L³中的每一个独立地是共价键或C₁₋₃二价直链或支链饱和或不饱和烃链,其中该链的1-3个亚甲基单元独立地且任选地被以下替代:-O-、-C(O)-、-C(S)-、-C(R)2-、-CH(R)-、-C(F)₂-、-N(R)-、-S-、-S(O)₂-或-CR=CR-;

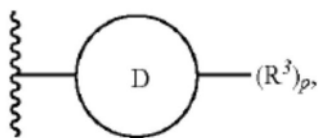
每个R¹独立地是氢、R⁵、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-S(O)(NR)R、-P(O)(OR)₂、-P(O)(NR₂)₂、-CFR₂、-CF₂(R)、-CF₃、-CR₂(OR)、-CR₂(NR₂)、-C(O)R、-C(O)OR或-C(O)NR₂;

每个R独立地是氢或选自以下的任选经取代的基团:C₁₋₆脂族,苯基,具有1-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的4-7元饱和或部分不饱和杂环,和具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环,或者:

同一原子上的两个R基团任选地与介于它们中间的原子一起形成任选经取代的4-11元饱和或部分不饱和碳环或具有除它们所附接的原子之外的0-3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环单环、双环、桥接双环、螺环、或杂芳基环;

每个R²独立地是氢、R⁵、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-S(O)(NR)R、-P(O)(OR)₂、-P(O)(NR₂)₂、-CF₂(R)、-CF₃、-CR₂(OR)、-CR₂(NR₂)、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NR₂、-C(O)N(R)OR、-OC(O)R、-OC(O)NR₂、-N(R)C(O)OR、-N(R)C(O)R、-N(R)C(O)NR₂或-N(R)S(O)₂R;

R⁴选自



氢、或选自以下的任选经取代的基团： C_{1-6} 脂族或4-11元饱和或部分不饱和单环、双环、桥接双环或螺环碳环或具有1-3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环；

环D是苯基，4-10元饱和或部分不饱和单环或双环碳环或具有1-3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环，或具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环；

每个 R^3 独立地是氢、 R^5 、卤素、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-NR^2$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2NR_2$ 、 $-S(O)R$ 、 $-S(O)(NR)R$ 、 $-P(O)(OR)_2$ 、 $-P(O)(NR_2)_2$ 、 $-CF_2(R)$ 、 $-CF_3$ 、 $-CR_2(OR)$ 、 $-CR_2(NR_2)$ 、 $-C(O)R$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-C(O)NR_2$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-OC(O)NR_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)C(O)NR_2$ 或 $-N(R)S(O)_2R$ ；

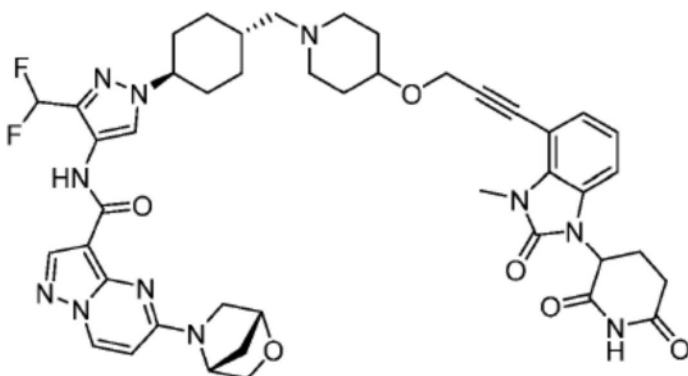
每个 R^5 独立地是选自以下的任选经取代的基团： C_{1-6} 脂族，苯基，3-7元饱和或部分不饱和碳环或具有1-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环，和具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环；

n 是0、1或2；

每个 m 独立地是0、1、2、3或4；并且 p 是0、1、2、3或4。

[0121] 在一些实施例中，IRAK-4降解剂包含描述于WO 2021/247899中的5-((1R,4R)-2-氧杂-5-氮杂双环[2.2.1]庚-5-基)-N-(3-(二氟甲基)-1-((1R,4R)-4-((4-((3-(1-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-3-甲基-2-氧代-2,3-二氢-1H苯并[d]咪唑-4-基)丙-2-炔-1-基)氧基)哌啶-1-基)甲基)环己基)-1H-吡唑-4-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺及其药学上可接受的盐。在一些实施例中，IRAK-4降解剂包含结晶形式的5-((1R,4R)-2-氧杂-5-氮杂双环[2.2.1]庚-5-基)-N-(3-(二氟甲基)-1-((1R,4R)-4-((4-((3-(1-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-3-甲基-2-氧代-2,3-二氢-1H苯并[d]咪唑-4-基)丙-2-炔-1-基)氧基)哌啶-1-基)甲基)环己基)-1H-吡唑-4-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺及其药学上可接受的盐。

[0122] 在一些实施例中，IRAK-4降解剂包含式[II]的化合物或式[II]的化合物的氘化形式或其药学上可接受的盐(描述于WO 2021/247897)。

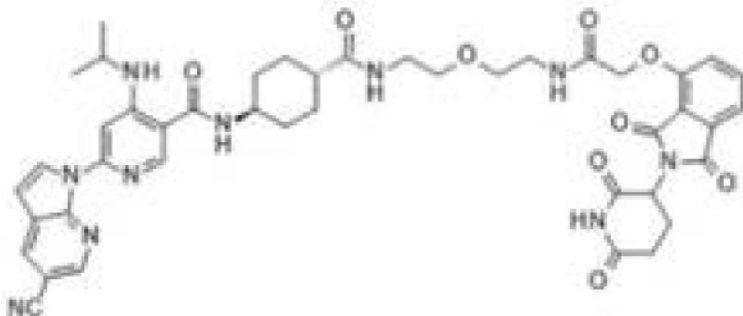


[II]

[0123] 式[II]的化合物是5-((1R,4R)-2-氧杂-5-氮杂双环[2.2.1]庚-5-基)-N-(3-(二氟甲基)-1-((1R,4R)-4-((4-((3-(1-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-3-甲基-2-氧代-2,3-二氢-1H苯并[d]咪唑-4-基)丙-2-炔-1-基)氧基)哌啶-1-基)甲基)环己基)-1H-吡唑-4-基)吡唑

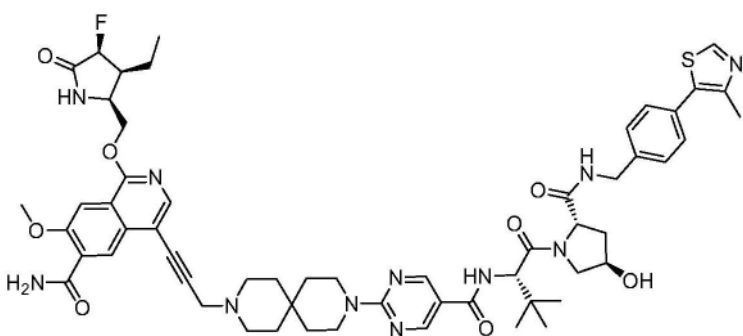
并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺。

[0124] 在一些实施例中,IRAK-4降解剂包含式[III]或[IV]的化合物或其药学上可接受的盐(描述于ACS Med.Chem.Lett.[ACS药物化学快报]2019,10,7,1081-1085)。



[III]

以及

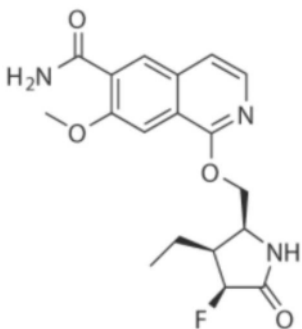


[IV]

[0125] 在一些实施例中,IRAK-4降解剂是1-(((2S,3S,4S)-3-乙基-4-氟-5-氧代吡咯烷-2-基)甲氧基)-4-(3-(9-(5-(((S)-1-((2S,4R)-4-羟基-2-((4-(4-甲基噻唑-5-基)苄基)氨基甲酰基)吡咯烷-1-基)-3,3-二甲基-1-氧代丁-2-基)氨基甲酰基)嘧啶-2-基)-3,9-二氮杂螺[5.5]十一烷-3-基)丙-1-炔-1-基)-7-甲氧基异喹啉-6-甲酰胺。

[0126] 在一些实施例中,IRAK-4降解剂包含描述于WO 2019/160915、WO 2020/006265或WO 2021/168197中的IRAK-4降解剂。

[0127] 在一些实施例中,IRAK-4抑制剂是Zimlovisertib(其是式[V]的化合物)或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,IRAK-4降解剂是1-[[(2S,3S,4S)-3-乙基-4-氟-5-氧代-2-吡咯烷基]甲氧基]-7-甲氧基-6-异喹啉甲酰胺或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,IRAK-4降解剂是CAS号为1817626-54-2的化合物。



[V]

[0128] 式[V]的化合物是1-[[(2S,3S,4S)-3-乙基-4-氟-5-氧代-2-吡咯烷基]甲氧基]-

AAV

[0135] 在一些实施例中,本发明提供了使用IRAK调节剂与AAV颗粒用于改善基因疗法的方法。在用于基因疗法的AAV颗粒中,将编码异源核酸(例如,治疗性转基因)的重组AAV(rAAV)基因组衣壳化在AAV衣壳中。在一些实施例中,病毒基因组包含在转录方向上可操作地连接的异源核酸和/或以下组分中的一种或多种:控制序列(包括转录起始序列和终止序列),从而形成表达盒。

[0136] 在一些实施例中,rAAV基因组包含一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列(典型地两个AAV ITR序列)。例如,表达盒可以在5'和3'端侧翼为至少一个功能性AAV ITR序列。“功能性AAV ITR序列”意指ITR序列的功能如同预期用于AAV病毒体的挽救、复制和包装。参见Davidson等人,PNAS[美国国家科学院院刊],2000,97(7)3428-32;Passini等人,J.Virol.[病毒学杂志],2003,77(12):7034-40;以及Pechan等人,Gene Ther.[基因疗法],2009,16:10-16,将它们所有均通过引用以其全文并入本文。为了实施本发明的一些方面,重组病毒基因组至少包含所有对于衣壳化到AAV衣壳中所必需的AAV序列和用于由AAV颗粒感染的物理结构。用于在本发明的载体中使用的AAV ITR不必具有野生型核苷酸序列(例如,如描述于Gene Ther.[基因疗法],1994,5:793-801),并且可以通过核苷酸的插入、缺失或取代改变,或者AAV ITR可以衍生自几种AAV血清型中的任一种。目前已知多于40种AAV血清型,并且不断鉴定出新的血清型和现有血清型的变体。参见Gao等人,PNAS[美国国家科学院院刊],2002,99(18):11854-6;Gao等人,PNAS[美国国家科学院院刊],2003,100(10):6081-6;以及Bossis等人,J.Virol.[病毒学杂志],2003,77(12):6799-810。任何AAV血清型的使用都被认为在本发明的范围内。在一些实施例中,rAAV载体是衍生自包括但不限于以下的AAV血清型的载体:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV LK03、AAV2R471A、AAV DJ、AAV DJ8、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV ITR等。在一些实施例中,AAV核酸(例如,rAAV载体)包含以下的一个或多个(例如,在一些方面,两个)ITR:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV LK03、AAV2R471A、AAV DJ、AAV DJ8、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV ITR等。在一些实施例中,AAV颗粒包含编码侧翼是一个或多个AAV ITR的异源转基因的AAV载体。

[0137] 在一些实施例中,AAV颗粒包含选自以下的衣壳蛋白:AAV1衣壳、AAV2衣壳、AAV3衣壳、AAV4衣壳、AAV5衣壳、AAV6衣壳、AAV7衣壳、AAV8衣壳、AAVrh8衣壳、AAV9衣壳、AAV10衣壳、AAVrh10衣壳、AAV11衣壳、AAV12衣壳、AAVrh32.33衣壳、AAV-XL32衣壳、AAV-XL32.1衣壳、AAV LK03衣壳、AAV2R471A衣壳、AAV2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳、AAV DJ8衣壳、AAV2 N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、山羊AAV衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳、牛AAV衣壳、小鼠AAV衣壳、rAAV2/HBoV1(嵌合AAV/人博卡病毒1型)、AAV2HBKO衣壳、AAVPHP.B衣壳或AAVPHP.eB衣壳或其功能变体。AAV衣壳的“功能变体”意指变体衣壳能够包装AAV基因组以产生感染性AAV病毒体。在另外的实施例中,rAAV颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型的衣壳蛋白。

[0138] 在一些方面,本发明提供了包含重组自身互补型基因组(例如,自身互补的或自身互补型AAV载体)的AAV颗粒。具有自身互补型载体基因组的rAAV病毒颗粒和使用自身互补型AAV基因组的方法描述在美国专利号6,596,535;7,125,717;7,465,583;7,785,888;7,

790,154;7,846,729;8,093,054;和8,361,457;和Wang Z.,等人,(2003)Gene Ther 10:2105-2111中,将其各自通过引用以其全文并入本文。包含自身互补型基因组的AAV颗粒依靠其部分互补型序列(例如,异源核酸的互补型编码链和非编码链)将快速形成双链DNA分子。在一些实施例中,载体包含编码异源核酸的第一核酸序列和编码该核酸的互补序列的第二核酸序列,其中第一核酸序列可以沿其大部分或全部长度与第二核酸序列形成链内碱基对。

[0139] 在一些实施例中,第一异源核酸序列和第二异源核酸序列通过突变的ITR(例如,右侧ITR)连接。在一些实施例中,ITR包含多核苷酸序列5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GGGCGACCAAAGTTCGCCACGCCGGGCTTTGCCCGGGCG-3'(SEQ ID NO:1)。突变的ITR包含含有末端解离序列的D区的缺失。因此,在复制rAAV基因组时,rep蛋白将不会在突变的ITR处切割病毒基因组,并且因此,按5'至3'顺序包含以下项的重组病毒基因组将包装在病毒衣壳中:AAV ITR,包含调控序列的第一异源多核苷酸序列,突变的AAV ITR,与第一异源多核苷酸处于相反取向的第二异源多核苷酸,和第三AAV ITR。

[0140] 不同的AAV血清型用于优化特定靶细胞的转导或靶向特定靶组织(例如,患病组织)内的特定细胞类型。AAV可以包含相同血清型或混合血清型的病毒蛋白和病毒核酸。例如,AAV颗粒可以含有衍生自相同AAV血清型的一个或多个ITR和衣壳,或者AAV颗粒可以含有衍生自与AAV颗粒的衣壳不同的AAV血清型的一个或多个ITR。

[0141] 在一些实施例中,AAV衣壳包含突变,例如衣壳包含突变型衣壳蛋白。在一些实施例中,突变是酪氨酸突变或肝素结合突变。在一些实施例中,突变型衣壳蛋白保持形成AAV衣壳的能力。在一些实施例中,AAV颗粒包含AAV2或AAV5酪氨酸突变型衣壳(参见例如,Zhong L.等人,(2008)Proc Natl Acad Sci U S A[美国国家科学院院刊]105(22):7827-7832),如Y444或Y730(根据AAV2编号)中的突变。在另外的实施例中,AAV颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型的衣壳蛋白(Gao等人,J.Virol.[病毒学杂志]2004,78(12):6381)。

[0142] 本领域已知用于产生用于基因疗法的AAV颗粒的多种方法,包括转染、稳定细胞系产生和感染性杂合病毒生产系统,这些系统包括腺病毒-AAV杂合体、疱疹病毒-AAV杂合体(Conway,JE等人,(1997)J.Virology[病毒学杂志]71(11):8780-8789)和杆状病毒-AAV杂合体(Urabe,M.等人,(2002)Human Gene Therapy[人类基因疗法]13(16):1935-1943;Kotin,R.(2011)Hum Mol Genet.[人类分子遗传学]20(R1):R2-R6)。用于产生AAV颗粒的AAV生产培养物全部需要;1)合适的宿主细胞,2)合适的辅助病毒功能,3)AAV rep和cap基因和基因产物;4)侧翼是至少一个AAV ITR序列的核酸(如治疗性核酸);和5)支持AAV产生的合适的培养基和培养基组分。在一些实施例中,合适的宿主细胞是灵长类动物宿主细胞。在一些实施例中,合适的宿主细胞是人来源的细胞系,如HeLa、A549、293或Perc.6细胞。在一些实施例中,由野生型或突变型腺病毒(如温度敏感型腺病毒)、疱疹病毒(HSV)、杆状病毒或提供辅助功能的质粒构建体提供合适的辅助病毒功能。在一些实施例中,AAV rep和cap基因产物可以来自任何AAV血清型。一般而言,但不是必须的,AAV rep基因产物与rAAV基因组的ITR具有相同的血清型,只要rep基因产物可以起到复制和包装rAAV基因组的作用即可。本领域已知的合适培养基可以用于产生AAV颗粒。在一些实施例中,AAV辅助功能由腺病毒或HSV提供。在一些实施例中,AAV辅助功能由杆状病毒提供,并且宿主细胞是昆虫细胞(例如,草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)(Sf9)细胞)。

[0143] 用于产生AAV颗粒的一种方法是三重转染方法。简言之,可以将含有rep基因和衣壳基因的质粒与辅助腺病毒质粒一起转染(例如,使用磷酸钙方法)到细胞系(例如,HEK-293细胞)中,并且可以收集和任选地纯化病毒。因此,在一些实施例中,通过将编码AAV载体的核酸、编码AAV rep和cap的核酸和编码AAV辅助病毒功能的核酸三重转染到宿主细胞中来产生AAV颗粒,其中将核酸转染到宿主细胞中产生能够产生AAV颗粒的宿主细胞。

[0144] 在一些实施例中,AAV颗粒可以通过生产细胞系方法产生(参见Martin等人,(2013)Human Gene Therapy Methods[人类基因疗法方法]24:253-269;美国专利授权前公开号US2004/0224411;和Liu,X.L.等人(1999)Gene Ther.[基因疗法]6:293-299)。简言之,可以用含有rep基因、衣壳基因和包含启动子-异源核酸序列的载体基因组的质粒稳定转染细胞系(例如,HeLa、293、A549或Perc.6细胞系)。可以筛选细胞系以选择用于AAV产生的前导克隆物,然后将前导克隆物扩增至生产生物反应器中并且用辅助病毒(例如,腺病毒或HSV)感染,以启动AAV产生。随后可以收获病毒,可以灭活(例如,通过加热)和/或去除腺病毒,并且可以纯化AAV颗粒。因此,在一些实施例中,AAV颗粒由包含以下中的一种或多种的生产细胞系产生:编码rAAV基因组的核酸、编码AAV rep和cap的核酸以及编码AAV辅助病毒功能的核酸。

[0145] 在一些实施例中,将编码AAV rep和cap基因和/或AAV病毒基因组的核酸稳定地维持在生产细胞系中。在一些实施例中,将编码AAV rep和cap基因和/或rAAV基因组的核酸在一个或多个质粒上引入细胞系中以产生生产细胞系。在一些实施例中,将AAV rep、AAV cap和AAV基因组在相同质粒上引入细胞中。在其他实施例中,将AAV rep、AAV cap和rAAV基因组在不同质粒上引入细胞中。在一些实施例中,用质粒稳定转染的细胞系在细胞系的多次传代(例如,5、10、20、30、40、50或多于50次细胞传代)中维持质粒。例如,一个或多个质粒可以随着细胞复制而复制,或者一个或多个质粒可以整合到细胞基因组中。已经鉴定了使质粒能够在细胞(例如,人细胞)中自主复制的多种序列(参见例如,Krysan,P.J.等人(1989)Mol.Cell Biol.[分子细胞生物学]9:1026-1033)。在一些实施例中,一个或多个质粒可以含有允许对维持质粒的细胞进行选择的选择性标记物(例如,抗生素抗性标记物)。哺乳动物细胞中常用的选择性标记物包括而限于杀稻瘟素、G418、潮霉素B、博莱霉素、嘌呤霉素及其衍生物。用于将核酸引入细胞中的方法是本领域已知的,并且包括而限于病毒转导、阳离子转染(例如,使用阳离子聚合物如DEAE-葡聚糖或阳离子脂质如lipofectamine)、磷酸钙转染、显微注射、粒子轰击、电穿孔和纳米颗粒转染(关于更多细节,参见例如Kim,T.K.和Eberwine,J.H.(2010)Anal.Bioanal.Chem.[分析和生物分析化学]397:3173-3178)。

[0146] 在一些实施例中,生产细胞系衍生自灵长类动物细胞系(例如,非人灵长类动物细胞系,如Vero或FRhL-2细胞系)。在一些实施例中,细胞系衍生自人细胞系。在一些实施例中,生产细胞系衍生自HeLa、293、A549或PERC.6®(克鲁赛尔公司(Cruce11))细胞。例如,在将编码AAV rep和cap基因和/或rAAV基因组的核酸引入和/或稳定维持/整合到细胞系中以产生生产细胞系之前,细胞系是HeLa、293、A549或PERC.6®(克鲁赛尔公司)细胞系或其衍生物。

[0147] 在一些实施例中,生产细胞系适于悬浮生长。如本领域已知的,锚定依赖性细胞典型地不能在缺乏基质(如微载体珠)的情况下悬浮生长。使细胞系适于悬浮生长可以包括例如使细胞系在具有搅拌桨的旋动培养中生长,使用缺乏钙和镁离子的培养基以防止结块

(和任选地消泡剂),使用用渗硅化合物包被的培养容器,以及在每次传代时选择培养物中(而不是在大块中或在器皿的侧面上)的细胞。

[0148] 可以通过裂解生产培养物的宿主细胞或通过从生产培养物中收获用过的培养基而从AAV生产培养物中收获本发明的AAV颗粒,条件是将细胞在本领域中已知引起AAV颗粒从完整细胞释放到培养基中的条件下培养,如美国专利号6,566,118中更全面地描述的。裂解细胞的合适方法也是本领域中已知的,并且包括例如多个冷冻/解冻循环、超声处理、微流化以及用化学品(如洗涤剂 and/或蛋白酶)处理。

[0149] 在另外的实施例中,纯化AAV颗粒。如本文所用,术语“纯化的”包括AAV颗粒的如下制剂,其缺乏至少一些也可以存在于AAV颗粒天然存在处或最初所制备的地方处的其他组分。因此,例如,分离的AAV颗粒可以使用纯化技术使其从来源混合物(诸如培养裂解物或生产培养上清液)中富集来制备。富集可以以多种方式测量,例如通过溶液中存在的DNA酶抗性颗粒(DRP)或基因组拷贝(gc)的比例,或通过感染性,或者可以相对于来源混合物中存在的第二种潜在干扰物质对富集进行测量,该第二种潜在干扰物质诸如为污染物,包括生产培养物污染物或过程中污染物,包括辅助病毒、培养基组分等。

[0150] 在一些实施例中,使AAV生产培养收获物澄清以去除宿主细胞碎片。在一些实施例中,通过经由一系列深层过滤器过滤来使生产培养收获物澄清,这些深层过滤器包括例如DOHC级Millipore Millistak+HC Pod过滤器、A1HC级Millipore Millistak+HC Pod过滤器和0.2 μ m Filter Opticap XL10 Millipore Express SHC亲水性膜过滤器。澄清也可以通过本领域中已知的多种其他标准技术来实现,如离心或通过本领域中已知的0.2 μ m或更大孔径的任何醋酸纤维素过滤器过滤。

[0151] 在一些实施例中,用Benzonase[®]进一步处理AAV生产培养收获物以消化生产培养物中存在的任何高分子量DNA。在一些实施例中,Benzonase[®]消化是在本领域已知的标准条件下进行的,这些标准条件包括例如1-2.5单位/ml的Benzonase[®]的终浓度,在范围从环境温度至37°C的温度下持续30分钟至几小时的时间段。

[0152] 可以使用以下纯化步骤中的一个或多个来分离或纯化AAV颗粒:平衡离心;流过型阴离子交换过滤;用于浓缩AAV颗粒的切向流过滤(TFF);通过磷灰石色谱法进行AAV捕获;辅助病毒的热灭活;通过疏水相互作用色谱法进行AAV捕获;通过尺寸排阻色谱法(SEC)进行缓冲液交换;纳滤;以及通过阴离子交换色谱法、阳离子交换色谱法或亲和色谱法进行AAV捕获。这些步骤可以单独使用,以各种组合使用,或者以不同顺序使用。在一些实施例中,该方法以如下所述的顺序包括所有步骤。纯化AAV颗粒的方法可见于例如Xiao等人,(1998) Journal of Virology[病毒学杂志]72:2224-2232;美国专利号6,989,264和8,137,948;和WO 2010/148143。

腺病毒

[0153] 在一些实施例中,本发明提供了使用IRAK调节剂与腺病毒颗粒用于改善基因疗法的方法。用于基因疗法的腺病毒载体典型地是具有重组腺病毒(rAd)基因组的腺病毒颗粒,该重组腺病毒基因组在衣壳化到腺病毒衣壳中的两个腺病毒ITR之间包含一个或多个异源序列(即,非腺病毒来源的核酸序列)。在一些实施例中,异源序列编码治疗性转基因。在一些实施例中,rAd基因组缺乏一个或多个E1基因或含有一个或多个E1基因的缺陷拷贝,这使得腺病毒具有复制缺陷。腺病毒在大的(约950Å)无包膜二十面体衣壳内包括线性双链DNA

基因组。腺病毒具有可以掺入超过30kb的异源序列(例如,替代E1和/或E3区)的大基因组,使得它们独特地适合与较大的异源基因一起使用。还已知它们感染分裂和非分裂细胞,并且不天然整合到宿主基因组中(但杂合变体可能具有这种能力)。在一些实施例中,腺病毒载体可以是具有替代E1的异源序列的第一代腺病毒载体。在一些实施例中,腺病毒载体可以在E2A、E2B和/或E4中具有另外的突变或缺失的第二代腺病毒载体。在一些实施例中,腺病毒载体可以是第三代或内部破坏的(gutted)腺病毒载体,其缺乏所有病毒编码基因(仅保留ITR和包装信号)并且需要反式辅助腺病毒用于复制和包装。已经研究了腺病毒颗粒用作瞬时转染哺乳动物细胞的载体以及基因治疗载体。关于进一步的描述,参见例如,Danthinne,X.和Imperiale,M.J.(2000)Gene Ther.[基因疗法]7:1707-14;以及Tatsis,N.和Ertl,H.C.(2004)Mol.Ther.[分子疗法]10:616-29。

[0154] 在一些实施例中,腺病毒颗粒包含含有治疗性转基因的rAd基因组。任何腺病毒血清型的用途被认为在本发明的范围内。在一些实施例中,腺病毒颗粒衍生自包括但不限于以下的腺病毒血清型:AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu5、AdHu7、AdHu11、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad和猪Ad 3型。腺病毒颗粒还包含衣壳蛋白。在一些实施例中,腺病毒颗粒包括一种或多种外来病毒衣壳蛋白。此类组合可以称为假型化腺病毒颗粒。在一些实施例中,假型化腺病毒颗粒中使用的外来病毒衣壳蛋白衍生自外来病毒或衍生自另一种腺病毒血清型。在一些实施例中,外来病毒衣壳蛋白衍生自(包括但不限于)呼肠孤病毒3型。假型化腺病毒颗粒中使用的载体和衣壳蛋白组合的实例可见于以下参考文献(Tatsis,N.等人(2004)Mol.Ther.[分子疗法]10(4):616-629;以及Ahi,Y.等人(2011)Curr.Gene Ther.[当前基因疗法]11(4):307-320)。可以使用不同的腺病毒血清型来优化特定靶细胞的转导或靶向特定靶组织(例如,患病组织)内的特定细胞类型。由特定腺病毒血清型靶向的组织或细胞包括但不限于肺(例如HuAd3)、脾和肝(例如HuAd37)、平滑肌、滑膜细胞、树突细胞、心血管细胞、肿瘤细胞系(例如HuAd11)和树突细胞(例如,用呼肠孤病毒3型假型化的HuAd5、HuAd30或HuAd35)。关于进一步的描述,参见Ahi,Y.等人(2011)Curr.Gene Ther.[当前基因疗法]11(4):307-320;Kay,M.等人(2001)Nat.Med.[自然医学]7(1):33-40;以及Tatsis,N.等人(2004)Mol.Ther.[分子疗法]10(4):616-629。

[0155] 用于生产腺病毒颗粒的许多方法是本领域已知的。例如,对于内部破坏的腺病毒载体,可以将腺病毒载体基因组和辅助腺病毒基因组转染到包装细胞系(例如,293细胞系)中。在一些实施例中,辅助腺病毒基因组可以含有在其包装信号侧翼的重组位点,并且两个基因组可以被转染到表达重组酶的包装细胞系中(例如,可以使用Cre/loxP系统),使得与辅助腺病毒相比,目的腺病毒载体被更有效地包装(参见例如,Alba,R.等人(2005)Gene Ther.[基因疗法]12增刊1:S18-27)。可以使用标准方法(如本文描述的那些)收获和纯化腺病毒载体。

慢病毒

[0156] 在一些实施例中,本发明提供了使用IRAK调节剂与慢病毒颗粒用于改善基因疗法的方法。用于基因疗法的慢病毒载体典型地是具有重组慢病毒基因组的慢病毒颗粒,该重组慢病毒基因组在两个长末端重复(LTR)之间包含一个或多个异源序列(即,非慢病毒来源的核酸序列)。在一些实施例中,异源序列编码治疗性转基因。慢病毒是具有大约10kb基因

组的正义ssRNA逆转录病毒。慢病毒整合到分裂和非分裂细胞的基因组中。可以例如通过将多个质粒(典型地慢病毒基因组以及复制和/或包装所需的基因被分开以防止病毒复制)转染到包装细胞系中来产生慢病毒颗粒,该包装细胞系将经修饰的慢病毒基因组包装到慢病毒颗粒中。在一些实施例中,慢病毒颗粒可以是指缺乏包膜蛋白的第一代载体。在一些实施例中,慢病毒颗粒可以是指缺乏除了gag/pol和tat/rev区之外的所有基因的第二代载体。在一些实施例中,慢病毒颗粒可以指第三代载体,其仅含有内源rev、gag和pol基因并且具有用于在没有tat基因的情况下进行转导的嵌合LTR(参见Dull,T.等人(1998)J.Virol.[病毒学杂志]72:8463-71)。关于进一步的描述,参见Durand,S.和Cimarelli,A.(2011)Viruses[病毒]3:132-59。

[0157] 任何慢病毒载体的使用都被认为在本发明的范围内。在一些实施例中,慢病毒载体衍生自包括而限于以下的慢病毒:人类免疫缺陷病毒-1(HIV-1)、人类免疫缺陷病毒-2(HIV-2)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)、杰姆布拉纳病毒(Jembrana disease virus,JDV)、维斯纳病毒(visna virus,VV)和山羊关节炎脑炎病毒(CAEV)。慢病毒颗粒还包含衣壳蛋白。在一些实施例中,慢病毒颗粒包括一种或多种外来病毒衣壳蛋白。此类组合可以称为假型化慢病毒颗粒。在一些实施例中,假型化慢病毒颗粒中使用的外来病毒衣壳蛋白衍生自外来病毒。在一些实施例中,假型化慢病毒颗粒中使用的外来病毒衣壳蛋白是水疱性口炎病毒糖蛋白(VSV-GP)。VSV-GP与遍在细胞受体相互作用,为假型化慢病毒颗粒提供广泛的组织嗜性。此外,VSV-GP被认为为假型化慢病毒颗粒提供更高的稳定性。在其他实施例中,外来病毒衣壳蛋白源自(包括而限于)金迪普拉病毒、狂犬病病毒、莫科拉病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、辛德毕斯病毒、塞姆利基森林病毒(SFV)、委内瑞拉马脑炎病毒、雷斯顿埃博拉病毒、萨伊埃博拉病毒、马尔堡病毒、拉沙病毒、禽白血病病毒(ALV)、绵羊肺腺瘤逆转录病毒(JSRV)、莫洛尼鼠白血病病毒(MLV)、长臂猿白血病病毒(GALV)、猫内源性逆转录病毒(RD114)、人T-嗜淋巴细胞病毒1(HTLV-1)、人泡沫病毒、梅迪-维斯纳病毒(MVV)、SARS-CoV、仙台病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、3型人副流感病毒、丙型肝炎病毒(HCV)、流感病毒、鸡瘟病毒(FPV)或苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)。假型化慢病毒颗粒中使用的载体和衣壳蛋白组合的实例可见于例如Cronin,J.等人(2005).Curr.Gene Ther.[当前基因疗法]5(4):387-398。可以使用不同的假型化慢病毒颗粒来优化特定靶细胞的转导或靶向特定靶组织(例如,患病组织)内的特定细胞类型。例如,由特定假型化慢病毒颗粒靶向的组织包括而限于肝(例如用VSV-G、LCMV、RRV或SeV F蛋白假型化)、肺(例如用埃博拉、马尔堡、SeV F和HN或JSRV蛋白假型化)、胰岛细胞(例如用LCMV蛋白假型化)、中枢神经系统(例如用VSV-G、LCMV、狂犬病或莫科拉蛋白假型化)、视网膜(例如用VSV-G或莫科拉蛋白假型化)、单核细胞或肌肉(例如用莫科拉或埃博拉蛋白假型化)、造血系统(例如用RD114或GALV蛋白假型化)或癌细胞(例如用GALV或LCMV蛋白假型化)。关于进一步的描述,参见Cronin,J.等人(2005).Curr.Gene Ther.[当前基因疗法]5(4):387-398;和Kay,M.等人(2001)Nat.Med.[自然医学]7(1):33-40。

[0158] 许多用于产生慢病毒颗粒的方法是本领域已知的。例如,对于第三代慢病毒载体,可以将含有具有gag和pol基因的目的重组慢病毒基因组的载体连同含有rev基因的载体共转染到包装细胞系(例如,293细胞系)中。目的重组慢病毒基因组还含有促进在不存在Tat

的情况下进行转录的嵌合LTR(参见Dull,T.等人(1998) *J. Virol.* [病毒学杂志] 72:8463-71)。可以使用本文所述的方法(例如, Segura MM等人, (2013) *Expert Opin Biol Ther.* [生物疗法专家意见] 13(7):987-1011)收获并纯化慢病毒载体。

HSV

[0159] 在一些实施例中,本发明提供了使用IRAK调节剂与HSV颗粒用于改善基因疗法的方法。用于基因疗法的HSV载体典型地是具有重组HSV基因组的HSV颗粒,该重组HSV基因组在两个末端重复(TR)之间包含一个或多个异源序列(即,非HSV来源的核酸序列)。在一些实施例中,异源序列编码治疗性转基因。HSV是具有大约152kb基因组的包膜双链DNA病毒。有利地,其基因的大约一半是非必需的,并且可以缺失以适应异源序列。HSV颗粒感染非分裂细胞。此外,它们天然地在神经元中建立潜伏期,通过逆向转运行进,并且可以跨突触转移,使得它们有利于神经元的转染和/或有利于涉及神经系统的基因治疗方法。在一些实施例中,HSV颗粒可以是复制缺陷型或复制型(例如,能够通过使一种或多种晚期基因失活进行单个复制周期)。关于进一步的描述,参见Manservigi,R.等人(2010) *Open Virol. J.* [开放病毒学杂志] 4:123-56。

[0160] 在一些实施例中,HSV颗粒包含含有转基因的重组HSV基因组。任何HSV载体的使用被认为在本发明的范围内。在一些实施例中,HSV载体衍生自HSV血清型,包括而限于HSV-1和HSV-2。HSV颗粒还包含衣壳蛋白。在一些实施例中,HSV颗粒包括一种或多种外来病毒衣壳蛋白。此类组合可以称为假型化HSV颗粒。在一些实施例中,假型化HSV颗粒中使用的外来病毒衣壳蛋白衍生自外来病毒或衍生自另一种HSV血清型。在一些实施例中,假型化HSV颗粒中使用的外来病毒衣壳蛋白是水疱性口炎病毒糖蛋白(VSV-GP)。VSV-GP与遍在细胞受体相互作用,为假型化HSV颗粒提供广泛的组织嗜性。此外,VSV-GP被认为为假型化HSV颗粒提供更高的稳定性。在其他实施例中,外来病毒衣壳蛋白可以来自不同的HSV血清型。例如,HSV-1载体可以含有一种或多种HSV-2衣壳蛋白。可以使用不同的HSV血清型来优化特定靶细胞的转导或靶向特定靶组织(例如,患病组织)内的特定细胞类型。由特定腺病毒血清型靶向的组织或细胞包括而限于中枢神经系统和神经元(例如,HSV-1)。关于进一步的描述,参见Manservigi,R.等人(2010) *Open Virol. J.* [开放病毒学杂志] 4:123-156; Kay,M.等人(2001) *Nat. Med.* [自然医学] 7(1):33-40;和Meignier,B.等人(1987) *J. Infect. Dis.* [传染病杂志] 155(5):921-930。

[0161] 许多用于产生HSV颗粒的方法是本领域中已知的。可以使用标准方法(如本文描述的那些)收获和纯化HSV载体。例如,对于复制缺陷型HSV载体,可以将缺乏所有立即早期(IE)基因的目的HSV基因组转染到提供病毒产生所需的基因(如ICP4、ICP27和ICP0)的互补细胞系中(参见例如,Samaniego,L.A.等人(1998) *J. Virol.* [病毒学杂志] 72:3307-20)。可以使用所述的方法(例如,Goins,WF等人,(2014) *Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology* [分子生物学中的单纯疱疹病毒方法] 1144:63-79)收获并纯化HSV载体。

非病毒基因治疗剂

[0162] 在一些实施例中,本发明提供了使用IRAK调节剂与非病毒基因转移方法用于基因疗法的方法。非病毒载体递送系统包括DNA质粒、裸核酸和与递送系统复合的核酸。例如,载体可以与脂质(例如,阳离子脂质或中性脂质)、脂质体、聚阳离子、脂质纳米颗粒或增强细

胞对核酸的摄取的试剂复合。核酸可以与适用于本文所述的任何递送方法的试剂复合。在一些实施例中,核酸编码治疗性转基因。

[0163] 用于基因疗法的脂质纳米颗粒典型地包含包封在脂质颗粒中的载体基因组或与脂质复合的载体基因组。在一些实施例中,异源序列编码治疗性转基因。在一些实施例中,载体基因组被配制在阳离子脂质体/核酸复合物(lipoplex)纳米颗粒或脂质体中。在一些实施例中,用于基因治疗剂的阳离子脂质体/核酸复合物纳米颗粒配制品包含合成的阳离子脂质(R)-N,N,N-三甲基-2,3-二油酰基氧基-1-丙基氯化铵(DOTMA)和磷脂1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。在一些实施例中,DOTMA/DOPE脂质体组分被优化用于递送和靶向个体中的细胞。

[0164] 在一些实施例中,将包含载体基因组的核酸与包含一种或多种阳离子脂质(包括例如(R)-N,N,N-三甲基-2,3-二油酰基氧基-1-丙基氯化铵(DOTMA)和磷脂1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE))的药物组合物混合。在一些实施例中,药物组合物包含至少一种脂质。在一些实施例中,药物组合物包含至少一种阳离子脂质。阳离子脂质可以是单阳离子的或聚阳离子的。任何阳离子两亲性分子(例如,包含至少一个亲水性和亲脂性部分的分子)是在本发明的含义内的阳离子脂质。在一些实施例中,正电荷由至少一种阳离子脂质贡献,并且负电荷由核酸贡献。在一些实施例中,药物组合物包含至少一种辅助脂质。辅助脂质可以是中性脂质或阴离子脂质。辅助脂质可以是天然脂质(如磷脂)或天然脂质的类似物、或与天然脂质没有相似性的完全合成的脂质或脂质样分子。在一个实施例中,阳离子脂质和/或辅助脂质是形成双层的脂质。辅助脂质的实例包括但不限于1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或其类似物或衍生物、胆固醇(Chol)或其类似物或衍生物和/或1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)或其类似物或衍生物。

[0165] 在一些实施例中,至少一种阳离子脂质与至少一种辅助脂质的摩尔比率为10:0至3:7,优选9:1至3:7、4:1至1:2、4:1至2:3、7:3至1:1或2:1至1:1,优选约1:1。在一些实施例中,以此比率,阳离子脂质的摩尔量由阳离子脂质的摩尔量乘以阳离子脂质中的正电荷数产生。

[0166] 在一些实施例中,脂质包含在包封载体基因组的囊泡中。囊泡可以是多层囊泡、单层囊泡或其混合物。囊泡可以是脂质体。

载体基因组

[0167] 在一些实施例中,本发明提供了使用IRAK调节剂与基因治疗剂用于将治疗性转基因递送至个体中所希望的靶标的方法。在一些实施例中,基因治疗剂包含载体基因组,用于在个体中所希望的靶标中递送和表达治疗性转基因。

[0168] 本发明考虑了基因治疗剂用于引入编码治疗性多肽和/或核酸的一种或多种核酸序列以包装到病毒颗粒中(用于病毒基因治疗剂)的用途。载体基因组可以包括建立治疗性多肽和/或核酸的表达的任何元件,例如启动子、本披露的ITR、核糖体结合元件、终止子、增强子、选择性标记物、内含子、聚A信号和/或复制起点。

[0169] 在一些实施例中,治疗性转基因编码治疗性多肽。治疗性多肽可以例如提供在细胞或生物中不存在或以降低的水平存在的多肽和/或酶活性。可替代地,治疗性多肽可以提供间接抵消细胞或生物中的失衡的多肽和/或酶活性。例如,用于与代谢酶或活性缺陷引起的代谢物积聚相关的障碍的治疗性多肽可以提供缺失的代谢酶或活性,或者它可以提供导

致代谢物减少的替代性代谢酶或活性。治疗性多肽还可以用于通过例如作为显性失活多肽起作用来降低多肽(例如,过表达的、通过功能获得突变激活的、或者其活性以其他方式被错误调节的多肽)的活性。

[0170] 本发明的载体基因组可以编码这样的多肽,这些多肽是细胞内蛋白、锚定在细胞膜中、保留在细胞内、或者是由用本发明的载体转导的细胞分泌的。关于由接受载体的细胞分泌的多肽;这些多肽可以是可溶的(即,不附着于细胞)。例如,可溶性多肽缺乏跨膜区并且从细胞分泌。鉴定和去除编码跨膜结构域的核酸序列的技术是本领域已知的。

[0171] 在一些实施例中,本发明的载体基因组编码用于治疗个体的疾病或障碍的多肽。由本发明的基因治疗剂治疗的疾病和障碍包括但不限于亨廷顿病(HD)、进行性核上性麻痹(PSP)、多系统萎缩(MSA)、异染性脑白质营养不良(MLD)、肌萎缩侧索硬化(ALS)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、先天性肌营养不良(CMD)、苯丙酮尿症(PKU)、肌营养不良(MD)、A1AT缺乏、局灶节段性肾小球硬化症(FSGS)、胱氨酸尿症、血友病A、血友病B、戈谢病(GBA)、帕金森病(PD)和庞贝病。

[0172] 在一些实施例中,治疗性多肽是亨廷顿蛋白(HTT)、 τ 蛋白、淀粉样前体蛋白、 α -突触核蛋白、假芳基硫酸酯酶(ARSA)、超氧化物歧化酶1(SOD1)、苯丙氨酸羟化酶(PAH)、抗肌萎缩蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶(A1AT)、半胱氨酸转运蛋白、因子VIII(FVIII)、因子IX(FIX)、酸性 β -葡萄糖苷酶、神经胶质源性生长因子(GDNF)、脑源性生长因子(BDNF)、酪氨酸羟化酶(TH)、GTP环水解酶(GTPCH)和/或氨基酸脱羧酶(AADC)或 α -葡萄糖苷酶。

[0173] 在一些实施例中,异源核酸编码例如可用于替换或敲低一种或多种缺陷基因的治疗性核酸。在一些实施例中,治疗性核酸可以包括而限于DNA、siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、反义RNA、核酶或脱氧核酶。因此,治疗性核酸可以编码如下RNA,当该RNA从载体的核酸转录时,该RNA可以通过干扰与本发明的障碍相关的异常或过量蛋白质的翻译或转录来治疗障碍。例如,本发明的核酸可以编码如下RNA,该RNA通过高度特异性消除或减少编码异常和/或过量蛋白质的mRNA来治疗障碍。治疗性RNA序列包括RNAi、小抑制性RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)和/或核酶(如锤头和发夹核酶),它们可以通过高度特异性消除或减少编码异常和/或过量蛋白质的mRNA来治疗障碍。

[0174] 在一些实施例中,治疗性多肽或治疗性核酸用于治疗CNS的障碍。不希望受理论束缚,认为治疗性多肽或治疗性核酸可以用于用野生型或改善的基因替代突变基因,降低或消除其功能获得与障碍相关的多肽的表达和/或活性,或者增强多肽的表达和/或活性以补充与障碍相关的缺陷(例如,其表达显示相似或相关活性的基因的突变)。可以通过本发明的治疗性多肽或治疗性核酸治疗的本发明的障碍的非限制性实例(可以被靶向或提供的示例性基因提供在每种障碍的括号中)包括中风(例如,半胱天冬酶-3、Beclin1、Ask1、PAR1、HIF1 α 、PUMA、和/或Fukuda, A.M.和Badaut, J. (2013) Genes (Basel) [基因(Basel)] 4: 435-456中所述的任何基因)、亨廷顿病(突变型HTT)、癫痫(例如,SCN1A、NMDAR、ADK、和/或Boison, D. (2010) Epilepsia [癫痫] 51: 1659-1668中所述的任何基因)、帕金森病(α -突触核蛋白)、卢伽雷氏病(也称为肌萎缩侧索硬化;SOD1)、阿尔茨海默病(τ 蛋白,淀粉样蛋白前体蛋白)、皮质基底节变性或CBD(τ 蛋白)、皮质基底节神经节变性或CBGD(τ 蛋白)、额颞叶痴呆或FTD(τ 蛋白)、进行性核上性麻痹或PSP(τ 蛋白)、多系统萎缩或MSA(α -突触核蛋白)、脑癌(例如,脑癌症中涉及的突变型或过表达的致癌基因)和溶酶体贮积病(LSD)。本发明的障碍

可以包括涉及大面积皮质(例如皮质的多于一个功能区、皮质的多于一个叶和/或整个皮质)的那些。可以通过本发明的治疗性多肽或治疗性核酸治疗的障碍的其他非限制性实例包括创伤性脑损伤、酶功能障碍性障碍、精神障碍(包括创伤后应激综合征)、神经变性疾病和认知障碍(包括痴呆、自闭症和抑郁症)。酶功能障碍性障碍包括而限于脑白质营养不良(包括卡纳万病(Canavan's disease))和以下描述的溶酶体贮积病中的任一种。

[0175] 在一些实施例中,治疗性多肽或治疗性核酸用于治疗溶酶体贮积病。如本领域中通常已知的,溶酶体贮积病是罕见的遗传性代谢障碍,其特征在于溶酶体功能缺陷。此类障碍通常是由适当的粘多糖、糖蛋白和/或脂质代谢所需的酶的缺乏引起的,导致溶酶体储存的细胞材料的病理性积累。可以通过本发明的治疗性多肽或治疗性核酸治疗的障碍的非限制性实例(可以被靶向或提供的示例性基因提供在每种障碍的括号中)包括2型或3型戈谢病(酸性 β -葡萄糖苷酶,GBA)、GM1神经节苷脂贮积症(β -半乳糖苷酶-1, GLB1)、亨特病(艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶,IDS)、克拉伯病(半乳糖神经酰胺酶,GALC)、 α 甘露糖苷贮积病(α 甘露糖苷酶,如 α -D-甘露糖苷酶,MAN2B1)、 β 甘露糖苷贮积病(β -甘露糖苷酶,MANBA)、异染性脑白质营养不良病(假芳基硫酸酯酶A,ARSA)、粘脂贮积症II/III型病(N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移酶,GNPTAB)、尼曼-匹克A型病(酸性鞘磷脂酶,ASM)、尼曼匹克C型病(尼曼匹克C蛋白,NPC1)、庞贝病(酸性 α -1,4-葡萄糖苷酶,GAA)、桑霍夫病(氨基己糖苷酶 β 亚基,HEXB)、沙费利波A型病(N-磺基葡萄糖胺磺基水解酶,MPS3A)、沙费利波B型病(N- α -乙酰葡萄糖胺糖苷酶,NAGLU)、沙费利波C型病(肝素乙酰辅酶A-CoA: α -葡萄糖胺糖苷酶N-乙酰基转移酶,MPS3C)、沙费利波D型病(N-乙酰葡萄糖胺-6-硫酸酯酶,GNS)、申德勒病(α -N-乙酰氨基半乳糖苷酶,NAGA)、斯莱病(β -葡萄糖醛酸糖苷酶,GUSB)、泰-萨克斯病(氨基己糖苷酶 α 亚基,HEXA)和沃尔曼病(溶酶体酸性脂肪酶,LIPA)。

[0176] 在一些实施例中,治疗性多肽编码因子VIII、因子IX、肌微管素、存活运动神经元蛋白(SMN)、类视黄醇异构水解酶(RPE65)、NADH-泛醌氧化还原酶链4、无脉络膜症蛋白(CHM)、鸟氨酸转氨甲酰酶、精氨酸琥珀酸合成酶、 β -珠蛋白、 γ -珠蛋白、苯丙氨酸羟化酶、肾上腺脑白质营养不良蛋白(ALD)、抗肌萎缩蛋白、截短型抗肌萎缩蛋白、抗VEGF剂或其功能变体。

[0177] 在一些实施例中,异源核酸与启动子可操作地连接。示例性的启动子包括但不限于巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子和CK6启动子、转甲状腺素蛋白启动子(TTR)、TK启动子、四环素反应性启动子(TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特异性启动子(LSP)、E2F启动子、端粒酶(hTERT)启动子;巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子(CAG启动子;Niwa等人,Gene[基因],1991,108(2):193-9)和延伸因子1- α 启动子(EF1- α)启动子(Kim等人,Gene[基因],1990,91(2):217-23和Guo等人,Gene Ther.[基因疗法],1996,3(9):802-10)。在一些实施例中,启动子包括人 β -葡萄糖醛酸糖苷酶启动子或与鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子连接的巨细胞病毒增强子。启动子可以是组成型启动子、诱导型启动子或阻遏型启动子。在一些实施例中,本发明提供了重组载体,该重组载体包含编码与CBA启动子可操作地连接的本披露的异源转基因的核酸。示例性启动子和描述可见于例如美国授权前公开案20140335054。

[0178] 组成型启动子的实例包括而限于逆转录病毒劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选地具有RSV增强子)、巨细胞病毒(CMV)启动子(任选地具有CMV增强子)[参见例如, Boshart等人, Cell[细胞], 41:521-530(1985)]、SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、13-肌动蛋白启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子和EF1a启动子[英杰公司(Invitrogen)]。

[0179] 诱导型启动子允许调控基因表达并且可以受外源供给的化合物、环境因素(诸如温度)或特定生理状态的存在调控,特定生理状态例如急性期、细胞的特定分化状态,或仅在复制细胞中。诱导型启动子和诱导型系统可从多种商业来源(包括而限于英杰公司、克隆技术公司(Clontech)和阿里阿德公司(Ariad))获得。许多其他系统已经被描述并且可以由本领域技术人员容易地选择。受外源供给启动子调控的诱导型启动子的实例包括锌诱导型绵羊金属硫蛋白(MT)启动子、地塞米松(Dex)诱导型小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、T7聚合酶启动子系统(WO 98/10088);蜕皮激素昆虫启动子(No等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊], 93:3346-3351(1996))、四环素阻遏型系统(Gossen等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊], 89:5547-5551(1992))、四环素诱导型系统(Gossen等人, Science[科学], 268:1766-1769(1995)),还参见Harvey等人, Curr.Opin.Chem.Biol.[化学生物学的当前观点], 2:512-518(1998)、RU486诱导型系统(Wang等人, Nat.Biotech.[自然生物技术], 15:239-243(1997)以及Wang等人, Gene Ther.[基因疗法], 4:432-441(1997))和雷帕霉素诱导型系统(Magari等人, J.Clin.Invest.[临床检查杂志], 100:2865-2872(1997))。在该上下文中可用的其他类型的诱导型启动子是受特定生理状态调控的启动子,特定生理状态例如温度、急性期、细胞的特定分化状态,或仅在复制细胞中。

[0180] 在另一个实施例中,将使用用于转基因的天然启动子或其片段。当希望转基因的表达应当模拟天然表达时,可以使用天然启动子。当必须在时间上或发育上、或以组织特异性方式、或响应于特定转录刺激物调节转基因的表达时,可以使用天然启动子。在另外的实施例中,也可以使用其他天然表达控制元件(如增强子元件、聚腺苷酸化位点或科扎克共有序列)来模拟天然表达。

[0181] 在一些实施例中,调控序列赋予组织特异性基因表达能力。在一些情况下,组织特异性调控序列结合以组织特异性方式诱导转录的组织特异性转录因子。此类组织特异性调控序列(例如,启动子、增强子等)是本领域熟知的。

[0182] 在一些实施例中,载体包含内含子。例如,在一些实施例中,内含子是衍生自鸡 β -肌动蛋白和兔 β -珠蛋白的嵌合内含子。在一些实施例中,内含子是小鼠微小病毒(MVM)内含子。

[0183] 在一些实施例中,载体包含聚腺苷酸化(聚A)序列。聚腺苷酸化序列的多个实例是本领域已知的,如牛生长激素(BGH)聚(A)序列(参见例如,登录号EF592533)、SV40聚腺苷酸化序列和HSV TK pA聚腺苷酸化序列。

用于选择用基因治疗剂和IRAK调节剂治疗的方法

[0184] 在一些方面,本发明提供了用于将核酸递送至个体的细胞的方法,该方法包括a)将来自该个体的先天免疫细胞与该基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)一起孵育,b)分析这些先天免疫细胞的一种或多种细胞因子的表达,其中在与该基因治疗剂一起孵育之后细胞因子特征的表达鉴定出对该基因治疗剂具有

先天免疫的个体,c)向步骤b)中鉴定出的个体施用IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂),以及d)向步骤b)中鉴定出的个体施用该基因治疗剂。在一些实施例中,先天免疫细胞是树突细胞、单核细胞、巨噬细胞或自然杀伤(NK)细胞。在一些实施例中,该方法进一步包括以下步骤:从个体中分离先天免疫细胞,然后将这些先天免疫细胞与基因治疗剂一起孵育。在一些实施例中,该方法进一步包括以下步骤:从该个体中分离单核细胞,以及将这些单核细胞在树突细胞培养基中孵育以从这些单核细胞中衍生出树突细胞,然后将这些树突细胞与该基因治疗剂一起孵育。

[0185] 在一些方面,本发明提供了用于治疗有需要的个体的方法,该方法包括a)将来自该个体的先天免疫细胞与该基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)一起孵育,b)分析这些先天免疫细胞的一种或多种细胞因子的表达,其中在与该基因治疗剂一起孵育之后细胞因子特征的表达鉴定出对该基因治疗剂具有先天免疫的个体,c)向步骤b)中鉴定出的个体施用IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂),以及d)向步骤b)中鉴定出的个体施用该基因治疗剂。在一些实施例中,先天免疫细胞是树突细胞、单核细胞、巨噬细胞或自然杀伤(NK)细胞。在一些实施例中,该方法进一步包括以下步骤:从个体中分离先天免疫细胞,然后将这些先天免疫细胞与基因治疗剂一起孵育。在一些实施例中,该方法进一步包括以下步骤:从该个体中分离单核细胞,以及将这些单核细胞在树突细胞培养基中孵育以从这些单核细胞中衍生出树突细胞,然后将这些树突细胞与该基因治疗剂一起孵育。

[0186] 在一些方面,本发明提供了用于选择用基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)和IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)治疗的个体的方法,该方法包括a)将来自该个体的先天免疫细胞与该基因治疗剂一起孵育,b)分析这些树突细胞的一种或多种细胞因子的表达,其中在与该基因治疗剂一起孵育之后细胞因子特征的表达鉴定出用于用基因治疗剂和IRAK调节剂治疗的个体,c)选择步骤b)中鉴定出的个体用基因治疗剂和IRAK调节剂治疗。在一些实施例中,该方法进一步包括以下步骤:d)向步骤b)中鉴定出的个体施用IRAK调节剂,以及e)向步骤b)中鉴定出的个体施用该基因治疗剂。在一些实施例中,这些先天免疫细胞是树突细胞、单核细胞、巨噬细胞或自然杀伤(NK)细胞。在一些实施例中,该方法进一步包括以下步骤:从个体中分离先天免疫细胞,然后将这些先天免疫细胞与基因治疗剂一起孵育。在一些实施例中,该方法进一步包括以下步骤:从该个体中分离单核细胞,以及将这些单核细胞在树突细胞培养基中孵育以从这些单核细胞中衍生出树突细胞,然后将这些树突细胞与该基因治疗剂一起孵育。

[0187] 在一些实施例中,从来自该个体的外周血单个核细胞中分离这些先天免疫细胞。在一些实施例中,该先天免疫细胞是树突细胞。在一些实施例中,该树突细胞衍生(例如,分化)自该个体的单核细胞。在一些实施例中,从来自该个体的外周血单个核细胞中分离这些单核细胞。在一些实施例中,这些单核细胞是CD14⁺单核细胞。在一些实施例中,将这些单核细胞用该树突细胞培养基孵育约5至约10天或约7至约8天,以从这些单核细胞衍生出树突细胞。在一些实施例中,将单核细胞用树突细胞培养基一起孵育约3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或超过12天中的任一者以从单核细胞衍生出树突细胞。在一些实施例中,在与步骤c)的基因治疗剂一起孵育之前,将树突细胞重新铺板。在一些实施例中,在与基因治疗剂一起孵育之前,将树突细胞重新铺板到微孔皿中。

[0188] 在一些实施例中,将树突细胞与病毒基因治疗剂以约 1×10^3 至约 1×10^5 或约 1×10^4 的MOI一起孵育。在一些实施例中,将树突细胞与基因治疗剂以小于约 1×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 或 5×10^5 中的任一个的MOI一起孵育。

[0189] 在一些实施例中,将树突细胞与浓度为约1ng/mL至约1mg/mL的非病毒基因治疗剂一起孵育。在一些实施例中,将树突细胞与浓度为约1ng/mL至约10ng/mL、约10ng/mL至约100ng/mL、约100ng/mL至约1 μ g/mL、约1 μ g/mL至约10 μ g/mL、约10 μ g/mL至约100 μ g/mL、或约100 μ g/mL至约1mg/mL的非病毒基因治疗剂一起孵育。

[0190] 在一些实施例中,将树突细胞与基因治疗剂一起孵育约12小时至约36小时或约24小时。在一些实施例中,将树突细胞与基因治疗剂一起孵育约6小时与约48小时之间、约6小时与约36小时之间、约6小时与约24小时之间、约6小时与约18小时之间、约6小时与约12小时之间、约12小时与约48小时之间、约12小时与约36小时之间、约12小时与约24小时之间、约12小时与约18小时之间、约18小时与约48小时之间、约18小时与约36小时之间、约18小时与约24小时之间、约24小时与约48小时之间、约24小时与约36小时之间、或约36小时与约48小时之间。

[0191] 在一些实施例中,通过使来自多个个体的特定免疫细胞与基因治疗剂接触并且确定与先天免疫应答相关的一种或多种细胞因子表达的变化,来针对基因治疗剂确定特定免疫细胞(例如,树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、NK细胞等)中的细胞因子特征,其中该一种或多种细胞因子表达变化(例如,表达增加或减少)的共性指示细胞因子特征的存在。在一些实施例中,与先天免疫应答相关的细胞因子与tol1样受体(TLR)途径(例如,TLR2、TLR3、TLR4或TLR9途径)相关。在一些实施例中,细胞因子特征包括多于1、2、3、4、5、6、7、8、9或10种细胞因子中的任一者的表达变化。在一些实施例中,多个个体包括多于1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个个体中的任一者。在一些实施例中,表达变化的共性包括在多个个体中大于约25%、50%、75%或90%的个体中先天免疫细胞中细胞因子的表达水平的类似变化。

[0192] 在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的一种或多种的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的两种或更多种的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的三种或更多种的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的四种或更多种的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 和IL-1 β 的增加的表达。

[0193] 在一些实施例中,该先天免疫细胞是树突细胞,并且该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的一种或多种的增加的表达。在一些实施例中,该先天免疫细胞是树突细胞,并且该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的两种或更多种的增加的表达。在一些实施例中,该先天免疫细胞是树突细胞,并且该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的三种或更多种的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的四种或更多种的增加的表达。在一些实施例中,该先天免疫细胞是树突细胞,并且该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 和IL-1 β 的增加的表达。

[0194] 在一些实施例中,与合适的对照中的细胞因子的表达相比,该细胞因子特征中这些细胞因子的表达增加。合适的对照的实例包括来自未与基因治疗剂一起(在不存在基因治疗剂的情况下)孵育的先天免疫细胞的细胞因子特征,以及来自与基因治疗剂一起孵育之前的相同或类似先天免疫细胞的细胞因子特征中细胞因子的表达(例如,其中细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的一种或多种的增加的表达)。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的两种或更多种的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的三种或更多种的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的四种或更多种的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 和IL-1 β 的增加的表达。在一些实施例中,表达增加约10%、约20%、约25%、约50%、约75%、约100%或超过100%中的任一者鉴定出用基因治疗剂和IRAK调节剂治疗的个体。

[0195] 在一些实施例中,与在不存在基因治疗剂的情况下孵育的树突细胞的细胞因子特征中细胞因子的表达相比,或与来自与基因治疗剂一起孵育之前的树突细胞的细胞因子特征中细胞因子的表达相比,细胞因子特征中细胞因子的表达增加,其中细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的一种或多种的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的两种或更多种的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的三种或更多种的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的四种或更多种的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 的增加的表达。在一些实施例中,该细胞因子特征包括IL6、TNF α 和IL-1 β 的增加的表达。在一些实施例中,表达增加约10%、约20%、约25%、约50%、约75%、约100%或超过100%中的任一者鉴定出用基因治疗剂和IRAK调节剂治疗的个体。

药物组合物

[0196] 在一些方面,本发明涉及药物组合物,该药物组合物包含如本文所述的基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)和/或IRAK调节剂(例如IRAK-4降解剂)。药物组合物可适用于本文所述或本领域已知的任何施用模式。

[0197] 在一些实施例中,药物组合物包含药学上可接受的赋形剂。如本领域中熟知的,药学上可接受的赋形剂是相对惰性的物质,这些物质有助于施用药理学上有效的物质,并且可以作为液体溶液或混悬剂、作为乳剂、或作为适用于在使用前溶解或悬浮在液体中的固体形式提供。例如,赋形剂可以赋予形式或稠度,或充当稀释剂。合适的赋形剂包括但不限于稳定剂、润湿剂和乳化剂、用于改变渗透压摩尔浓度的盐、包封剂、pH缓冲物质、和缓冲液。此类赋形剂包括适用于直接递送至眼睛的任何药剂,其可以在没有过度毒性的情况下施用。药学上可接受的赋形剂包括但不限于山梨糖醇,各种TWEEN化合物中的任一种以及液体(如水、盐水、甘油和乙醇)。可以在其中包括药学上可接受的盐,例如无机酸盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;以及有机酸盐,如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。药学上可接受的赋形剂的全面讨论可在REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES[雷明顿制药科学](Mack Pub.Co.[马克出版公司],新泽西州1991)中获得。在一些实施例中,包含本文所述的rAAV颗粒和药学上可接受的载剂的药物组合物适用于施用于人。此类载剂是本领域

域熟知的(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿制药科学],第15版,第1035-1038和1570-1580页)。

[0198] 此类药学上可接受的载剂可以是无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油等。盐水溶液及右旋糖、聚乙二醇(PEG)和甘油水溶液也可以用作液体载剂,特别是对于注射液而言。药物组合物可以进一步包含另外的成分,例如防腐剂、缓冲液、张力剂、抗氧化剂和稳定剂、非离子润湿剂或澄清剂、增粘剂等。本文所述的药物组合物可以单一单位剂量或以多剂量形式包装。这些组合物通常配制为无菌和基本上等渗的溶液。

试剂盒和制品

[0199] 如本文所述的基因治疗剂(例如,AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒)和/或IRAK调节剂(例如,IRAK-4降解剂)可以包含在例如被设计用于在如本文所述的本发明的方法之一中使用的试剂盒或制品内。

[0200] 在一些实施例中,试剂盒或制品进一步包括用于施用IRAK调节剂和/或基因治疗剂的说明书。本文所述的试剂盒或制品可以进一步包含从商业和使用者的角度来看合乎需要的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器以及具有用于进行本文所述的任何方法的说明书的包装插页。合适的包装材料也可以被包括在内,并且可以是本领域已知的任何包装材料,包括例如小瓶(如密封小瓶)、器皿、安瓿、瓶、罐、柔性包装(例如,密封的麦拉片(Mylar)或塑料袋)等。这些制品可以进一步灭菌和/或密封。

[0201] 在一些实施例中,试剂盒或制品进一步含有本文所述的缓冲液和/或药学上可接受的赋形剂中的一种或多种(例如,如描述于REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES[雷明顿制药科学](Mack Pub.Co.[马克出版公司],新泽西州1991)。在一些实施例中,试剂盒或制品包括本文所述的一种或多种药学上可接受的赋形剂、载剂、溶液和/或另外的成分。本文所述的试剂盒或制品可以以单一单位剂量或以多剂量形式包装。试剂盒或制品的内容物通常被配制为无菌的,并且可以冻干或作为基本上等渗的溶液提供。

示例性实施例

[0202] 本发明包括以下枚举的实施例。

[0203] 1.一种用于将核酸递送至个体的细胞的方法,该方法包括

- a) 向该个体施用IRAK调节剂,以及
- b) 向该个体施用基因治疗剂。

[0204] 2.一种用于用基因治疗剂治疗有需要的个体的方法,该方法包括

- a) 向该个体施用IRAK调节剂,以及
- b) 向该个体施用该基因治疗剂。

[0205] 3.一种用于改善个体的基因疗法的方法,该方法包括

- a) 向该个体施用IRAK调节剂,以及
- b) 向该个体施用基因治疗剂。

[0206] 4.一种用于抑制个体对基因治疗剂的免疫应答的方法,该方法包括

- a) 向该个体施用IRAK调节剂,以及
- b) 向该个体施用基因治疗剂。

[0207] 5.如实施例1-4中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂调节IRAK蛋白激酶的活

性或表达。

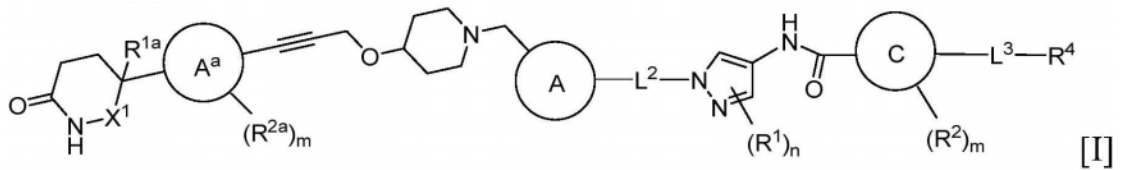
[0208] 6. 如实施例5所述的方法,其中该IRAK蛋白激酶是IRAK-1蛋白激酶、IRAK-2蛋白激酶、IRAK-3蛋白激酶或IRAK-4蛋白激酶。

[0209] 7. 如实施例1-6中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂调节IRAK-4蛋白激酶的活性或表达。

[0210] 8. 如实施例1-7中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂是IRAK降解剂、IRAK抑制剂或赋予IRAK功能丧失的药剂。

[0211] 9. 如实施例1-8中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂是小分子。

[0212] 10. 如实施例1-9中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂包含式[I]的化合物:



或其药学上可接受的盐,其中:

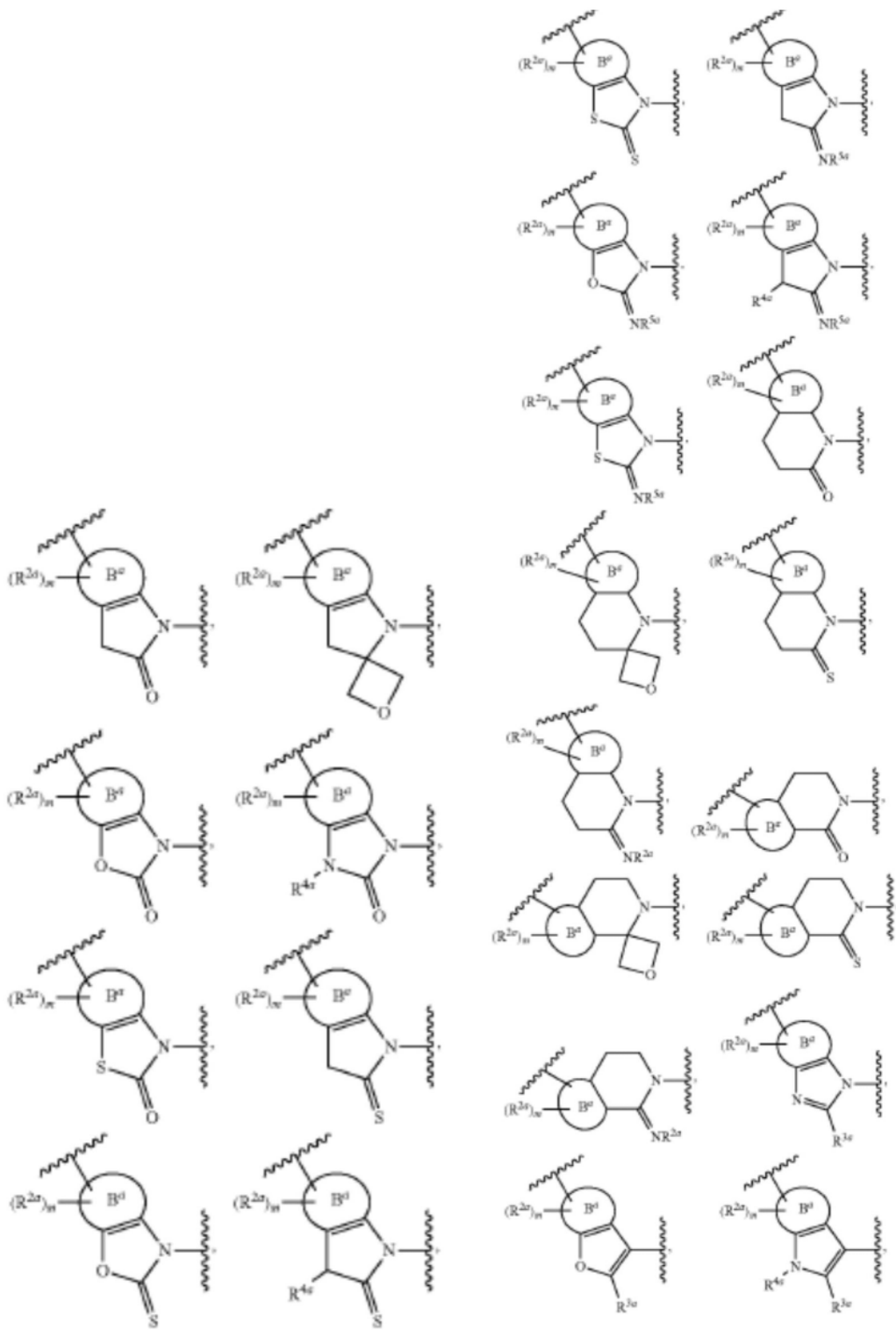
X¹是选自共价键、-CH₂-、-C(O)-、-C(S)-的二价部分,并且

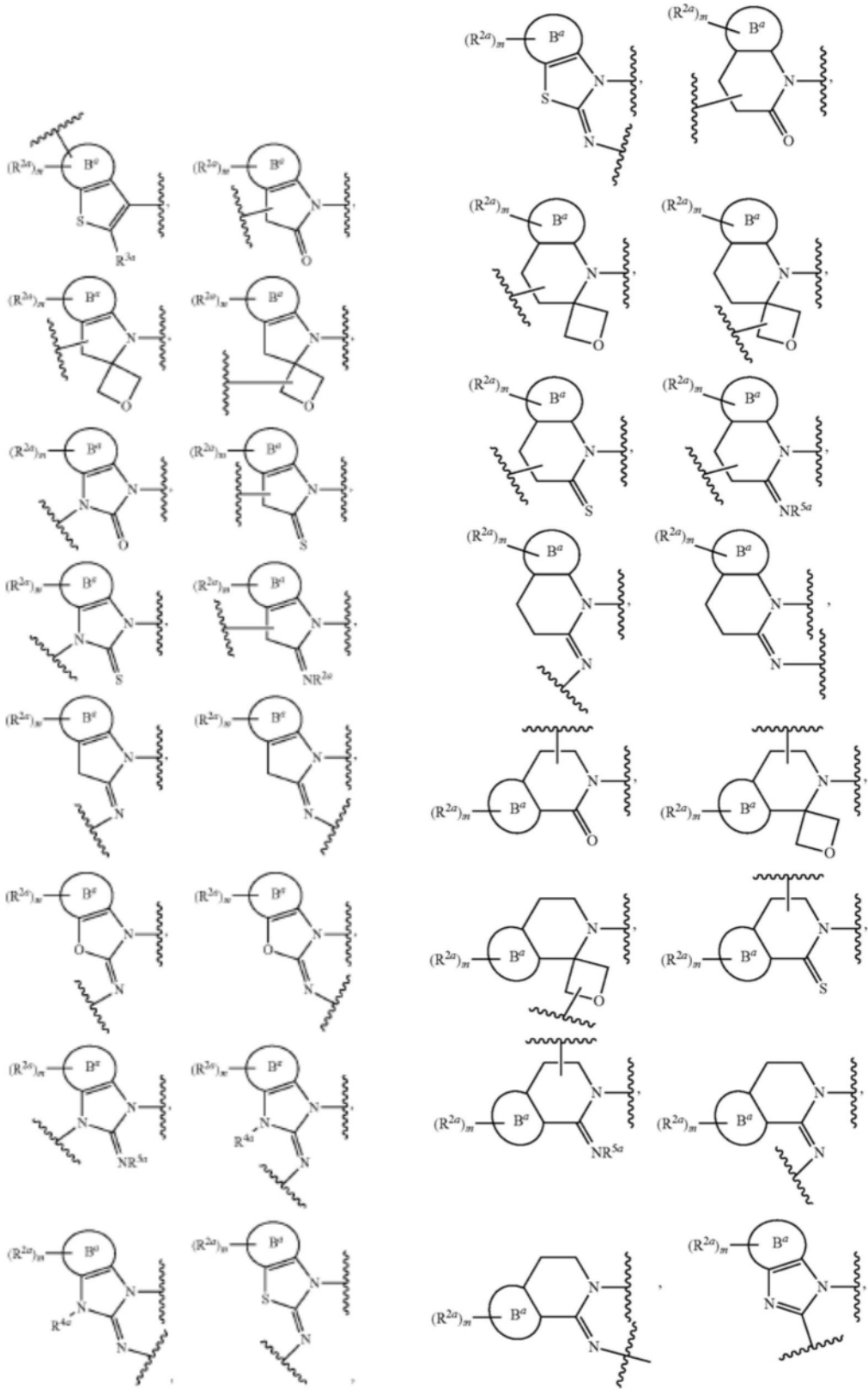


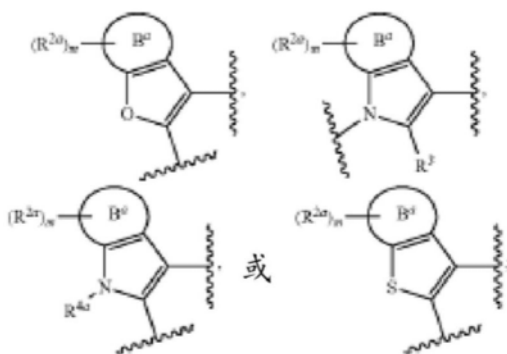
R^{1a}是氢、卤素、-CN、-OR、-SR、-S(O)R、-S(O)₂R、-N(R)₂、-Si(R)₃或任选经取代的C₁₋₄脂族;

每个R^{2a}独立地是氢、R^{6a}、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NR₂、-C(O)N(R)OR、-OC(O)R、-OC(O)NR₂、-N(R)C(O)OR、-N(R)C(O)R、-N(R)C(O)NR₂或-N(R)S(O)2R;

环A^a是选自以下的双环或三环:







环 B^a 是选自以下的稠合环:含有0-2个氮原子的6元芳基,5至7元部分饱和的碳环基,具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5至7元部分饱和杂环基,或具有1-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5元杂芳基;

R^{3a} 选自氢、卤素、-OR、-N(R)₂或-SR;

每个 R^{4a} 独立地是氢、 R^{6a} 、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NR₂、-C(O)N(R)OR、-OC(O)R、-OC(O)NR₂、-N(R)C(O)OR、N(R)C(O)R、-N(R)C(O)NR₂或-N(R)S(O)₂R;

R^{5a} 是氢、C₁₋₄脂族或-CN;

每个 R^{6a} 独立地是选自以下的任选经取代的基团:C₁₋₆脂族,苯基,具有1-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的4-7元饱和或部分不饱和杂环,和具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环;

环A是4-10元饱和单环或双环碳环或具有0-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环;

环C是苯基或具有1-5个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-10元单环或双环杂芳基环; L^2 和 L^3 中的每一个独立地是共价键或C₁₋₃二价直链或支链饱和或不饱和烃链,其中该链的1-3个亚甲基单元独立地且任选地被以下替代:-O-、-C(O)-、-C(S)-、-C(R)2-、-CH(R)-、-C(F)₂-、-N(R)-、-S-、-S(O)₂-或-CR=CR-;

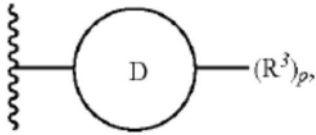
每个 R^1 独立地是氢、 R^5 、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-S(O)(NR)R、-P(O)(OR)₂、-P(O)(NR₂)₂、-CFR₂、-CF₂(R)、-CF₃、-CR₂(OR)、-CR₂(NR₂)、-C(O)R、-C(O)OR或-C(O)NR₂;

每个R独立地是氢或选自以下的任选经取代的基团:C₁₋₆脂族,苯基,具有1-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的4-7元饱和或部分不饱和杂环,和具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环,或者:

同一原子上的两个R基团任选地与介于它们中间的原子一起形成任选经取代的4-11元饱和或部分不饱和碳环或具有除它们所附接的原子之外的0-3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环单环、双环、桥接双环、螺环、或杂芳基环;

每个 R^2 独立地是氢、 R^5 、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-S(O)(NR)R、-P(O)(OR)₂、-P(O)(NR₂)₂、-CF₂(R)、-CF₃、-CR₂(OR)、-CR₂(NR₂)、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NR₂、-C(O)N(R)OR、-OC(O)R、-OC(O)NR₂、-N(R)C(O)OR、-N(R)C(O)R、-N(R)C(O)NR₂或-N(R)S(O)₂R;

R^4 选自



氢、或选自以下的任选经取代的基团： C_{1-6} 脂族或4-11元饱和或部分不饱和单环、双环、桥接双环或螺环碳环或具有1-3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环；

环D是苯基，4-10元饱和或部分不饱和单环或双环碳环或具有1-3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环，或具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环；

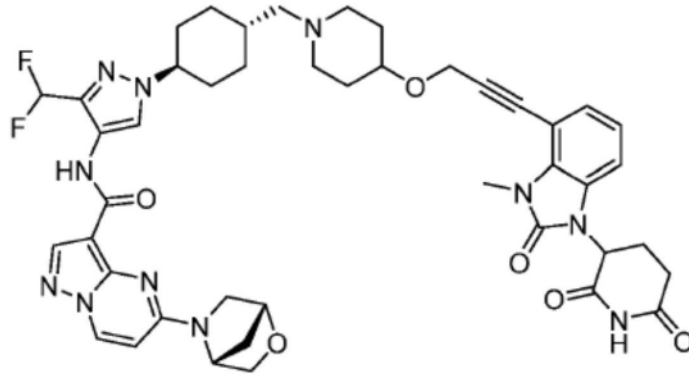
每个 R^3 独立地是氢、 R^5 、卤素、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-NR^2$ 、 $-S(O)_2R$ 、 $-S(O)_2NR_2$ 、 $-S(O)R$ 、 $-S(O)(NR)R$ 、 $-P(O)(OR)_2$ 、 $-P(O)(NR_2)_2$ 、 $-CF_2(R)$ 、 $-CF_3$ 、 $-CR_2(OR)$ 、 $-CR_2(NR_2)$ 、 $-C(O)R$ 、 $-C(O)OR$ 、 $-C(O)NR_2$ 、 $-C(O)N(R)OR$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-OC(O)NR_2$ 、 $-N(R)C(O)OR$ 、 $-N(R)C(O)R$ 、 $-N(R)C(O)NR_2$ 或 $-N(R)S(O)_2R$ ；

每个 R^5 独立地是选自以下的任选经取代的基团： C_{1-6} 脂族，苯基，3-7元饱和或部分不饱和碳环或具有1-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环，和具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环；

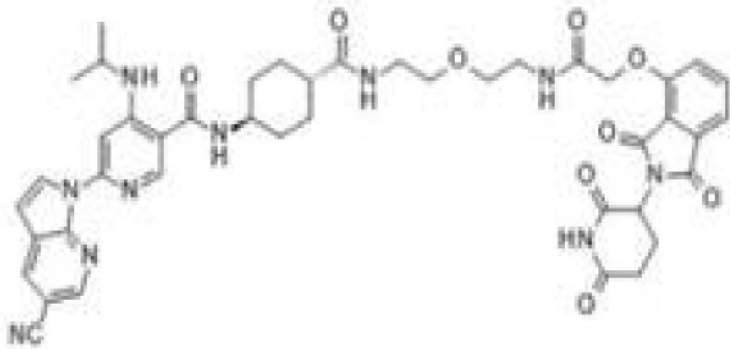
n是0、1或2；

每个m独立地是0、1、2、3或4；并且p是0、1、2、3或4。

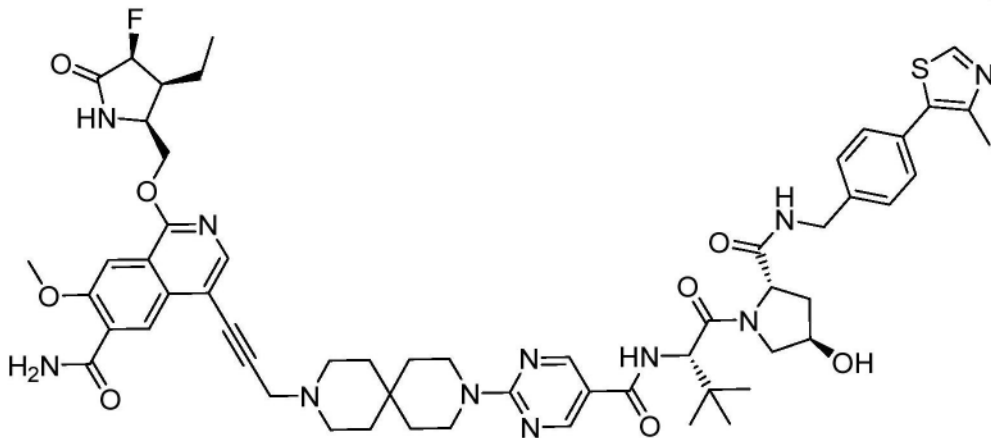
[0213] 11. 如实施例1-9中任一项所述的方法，其中该IRAK调节剂包含式[II]-[V]的化合物中的任一种：



[II]、



[III] 或



[IV]、

或其药学上可接受的盐。

[0214] 12. 如实施例1-9中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂是式[II]的化合物、PROTAC IRAK-4降解剂1或PF 06650833。

[0215] 13. 如实施例1-9中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂是CRISPR、siRNA、shRNA、miRNA、RNAi、反义RNA、核酶或脱氧核酶。

[0216] 14. 如实施例1-13中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂阻断TLR9功能。

[0217] 15. 如实施例1-14中任一项所述的方法,其中该基因治疗剂包含病毒载体。

[0218] 16. 如实施例15所述的方法,其中该病毒载体是AAV颗粒。

[0219] 17. 如实施例16所述的方法,其中该AAV颗粒包含AAV1衣壳、AAV2衣壳、AAV3衣壳、AAV4衣壳、AAV5衣壳、AAV6衣壳、AAV7衣壳、AAV8衣壳、AAVrh8衣壳、AAV9衣壳、AAV10衣壳、AAVrh10衣壳、AAV11衣壳、AAV12衣壳、AAVrh32.33衣壳、AAV-XL32衣壳、AAV-XL32.1衣壳、

AAV LK03衣壳、AAV2R471A衣壳、AAV2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳、AAV DJ8衣壳、AAV2 N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、山羊AAV衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳、牛AAV衣壳、小鼠AAV衣壳、rAAV2/HBoV1 (嵌合AAV/人博卡病毒1型)、AAV2HBKO衣壳、AAVPHP.B衣壳或AAVPHP.eB衣壳或其功能变体。

[0220] 18. 如实施例17所述的方法,其中该AAV衣壳包含酪氨酸突变、肝素结合突变或HBKO突变。

[0221] 19. 如实施例16-18中任一项所述的方法,其中该AAV病毒颗粒包含含有一个或多个反向末端重复 (ITR) 的AAV基因组,其中该一个或多个ITR是AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AAV4 ITR、AAV5 ITR、AAV6 ITR、AAV7 ITR、AAV8 ITR、AAVrh8 ITR、AAV9 ITR、AAV10 ITR、AAVrh10 ITR、AAV11 ITR或AAV12 ITR。

[0222] 20. 如实施例19所述的方法,其中该AAV颗粒的该一个或多个ITR和该衣壳衍生自相同的AAV血清型。

[0223] 21. 如实施例19所述的方法,其中该AAV颗粒的该一个或多个ITR和该衣壳衍生自不同的AAV血清型。

[0224] 22. 如实施例15所述的方法,其中病毒载体是腺病毒颗粒。

[0225] 23. 如实施例22所述的方法,其中该腺病毒颗粒包含来自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu 3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型或其功能变体的衣壳。

[0226] 24. 如实施例15所述的方法,其中该病毒载体是慢病毒颗粒。

[0227] 25. 如实施例24所述的方法,其中该重组慢病毒颗粒用水疱性口炎病毒 (VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、罗斯河病毒 (RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫科拉病毒、狂犬病病毒、RD114或其功能变体假型化。

[0228] 26. 如实施例15所述的方法,其中该病毒载体是单纯疱疹病毒 (HSV) 颗粒。

[0229] 27. 如实施例26所述的方法,其中该HSV颗粒是HSV-1颗粒或HSV-2颗粒或其功能变体。

[0230] 28. 如实施例1-14中任一项所述的方法,其中该基因治疗剂包含脂质纳米颗粒。

[0231] 29. 如实施例1-28中任一项所述的方法,其中该基因治疗剂包含编码异源转基因的核酸。

[0232] 30. 如实施例29所述的方法,其中该异源转基因与启动子可操作地连接。

[0233] 31. 如实施例30所述的方法,其中该启动子是组成型启动子、组织特异性启动子或诱导型启动子。

[0234] 32. 如实施例1-31中任一项所述的方法,其中在施用该基因治疗剂之前、同时或之后施用该IRAK调节剂。

[0235] 33. 如实施例1-32中任一项所述的方法,其中该个体患有适合于通过基因疗法治疗的疾病或障碍。

[0236] 34. 如实施例33所述的方法,其中该疾病或障碍是单基因病或障碍。

[0237] 35. 如实施例1-34中任一项所述的方法,其中将该基因治疗剂静脉内、腹膜内、动脉内、肌内、皮下或肝内施用。

- [0238] 36. 如实施例1-35中任一项所述的方法, 其中将该IRAK调节剂口服、静脉内、腹膜内、动脉内、肌内、皮下或肝内施用。
- [0239] 37. 一种用于将基因治疗剂递送至个体的细胞的方法, 该方法包括
- 将来自该个体的先天免疫细胞与该基因治疗剂一起孵育,
 - 分析这些先天免疫细胞的一种或多种细胞因子的表达, 其中在与该基因治疗剂一起孵育之后细胞因子特征的表达鉴定出对该基因治疗剂具有先天免疫的个体,
 - 向步骤b) 中鉴定出的个体施用IRAK调节剂, 以及
 - 向步骤b) 中鉴定出的个体施用该基因治疗剂。
- [0240] 38. 一种用于用基因治疗剂治疗有需要的个体的方法, 该方法包括
- 将来自该个体的先天免疫细胞与该基因治疗剂一起孵育,
 - 分析这些先天免疫细胞的一种或多种细胞因子的表达, 其中在与该基因治疗剂一起孵育之后细胞因子特征的表达鉴定出对该基因治疗剂具有先天免疫的个体,
 - 向步骤b) 中鉴定出的个体施用IRAK调节剂, 以及
 - 向步骤b) 中鉴定出的个体施用该基因治疗剂。
- [0241] 39. 一种用于选择用基因治疗剂和IRAK调节剂治疗的个体的方法, 该方法包括
- 将来自该个体的先天免疫细胞与该基因治疗剂一起孵育,
 - 分析这些先天免疫细胞的一种或多种细胞因子的表达, 其中在与该基因治疗剂一起孵育之后细胞因子特征的表达鉴定出用基因治疗剂和IRAK调节剂治疗的个体,
 - 选择在步骤b) 中鉴定出的个体用基因治疗剂和IRAK调节剂治疗。
- [0242] 40. 如实施例39所述的方法, 该方法进一步包括以下步骤
- 向步骤b) 中鉴定出的个体施用IRAK调节剂, 以及
 - 向步骤b) 中鉴定出的个体施用该基因治疗剂。
- [0243] 41. 如实施例37-40中任一项所述的方法, 其中该先天免疫细胞是树突细胞、单核细胞、巨噬细胞或自然杀伤(NK) 细胞。
- [0244] 42. 如实施例37-41中任一项所述的方法, 其中从来自该个体的外周血单个核细胞中分离这些先天免疫细胞。
- [0245] 43. 如实施例38-42中任一项所述的方法, 其中该先天免疫细胞是树突细胞。
- [0246] 44. 如实施例43所述的方法, 其中该树突细胞衍生自该个体的单核细胞。
- [0247] 45. 如实施例44所述的方法, 该方法进一步包括从该个体中分离单核细胞, 以及将这些单核细胞在树突细胞培养基中孵育以从这些单核细胞中衍生出树突细胞, 然后将这些树突细胞与该基因治疗剂一起孵育。
- [0248] 46. 如实施例44或45所述的方法, 其中该单核细胞是CD14⁺单核细胞。
- [0249] 47. 如实施例44-46中任一项所述的方法, 其中将这些单核细胞用该树突细胞培养基孵育约5至约10天或约7至约8天, 以从这些单核细胞衍生出树突细胞。
- [0250] 48. 如实施例37-47中任一项所述的方法, 其中在与步骤c) 的基因治疗剂一起孵育之前将这些先天免疫细胞重新铺板。
- [0251] 49. 如实施例48所述的方法, 其中将这些先天免疫细胞重新铺板到微孔皿中。
- [0252] 50. 如实施例37-49中任一项所述的方法, 其中该基因治疗剂是病毒载体, 并且其中将这些先天免疫细胞与病毒载体以约 1×10^3 至约 1×10^5 或约 1×10^4 的MOI一起孵育。

[0253] 51. 如实施例37-49中任一项所述的方法, 其中该基因治疗剂是非病毒载体, 并且其中将这些先天免疫细胞与浓度为约1ng/mL至约1mg/mL的非病毒载体一起孵育。

[0254] 52. 如实施例37-51中任一项所述的方法, 其中将这些先天免疫细胞与该基因治疗剂一起孵育约12小时至约36小时或约24小时。

[0255] 53. 如实施例37-52中任一项所述的方法, 其中该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 中的一种或多种的增加的表达。

[0256] 54. 如实施例37-53中任一项所述的方法, 其中该细胞因子特征包括IL6、TNF α 、IL-1 β 、MCP1和MIP-1 α 的增加的表达。

[0257] 55. 如实施例37-53中任一项所述的方法, 其中该细胞因子特征包括IL6、TNF α 和IL-1 β 的增加的表达。

[0258] 56. 如实施例37-55中任一项所述的方法, 其中与合适的对照相比, 该细胞因子特征中这些细胞因子的表达增加。

[0259] 57. 如实施例56所述的方法, 其中该合适的对照是来自未与该基因治疗剂一起孵育的先天免疫细胞的细胞因子特征中这些细胞因子的表达, 或者其中该合适的对照是来自与该基因治疗剂一起孵育之前的先天免疫细胞的细胞因子特征中这些细胞因子的表达。

[0260] 58. 如实施例37-57中任一项所述的方法, 其中该IRAK调节剂调节IRAK蛋白激酶的活性。

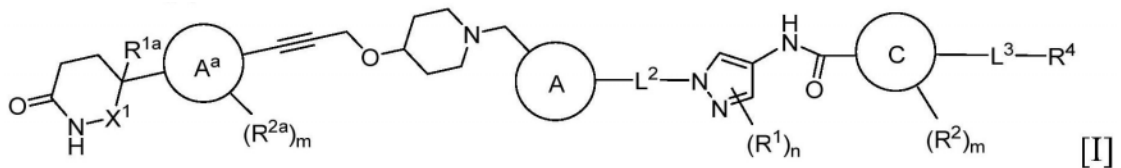
[0261] 59. 如实施例58所述的方法, 其中该IRAK蛋白激酶是IRAK-1蛋白激酶、IRAK-2蛋白激酶、IRAK-3蛋白激酶或IRAK-4蛋白激酶。

[0262] 60. 如实施例37-59中任一项所述的方法, 其中该IRAK调节剂调节IRAK-4蛋白激酶的活性。

[0263] 61. 如实施例37-60中任一项所述的方法, 其中该IRAK调节剂是IRAK降解剂、IRAK抑制剂或赋予IRAK功能丧失的药剂。

[0264] 62. 如实施例37-61中任一项所述的方法, 其中该IRAK调节剂是小分子。

[0265] 63. 如实施例37-62中任一项所述的方法, 其中该IRAK调节剂包含式[I]的化合物:



或其药学上可接受的盐, 其中:

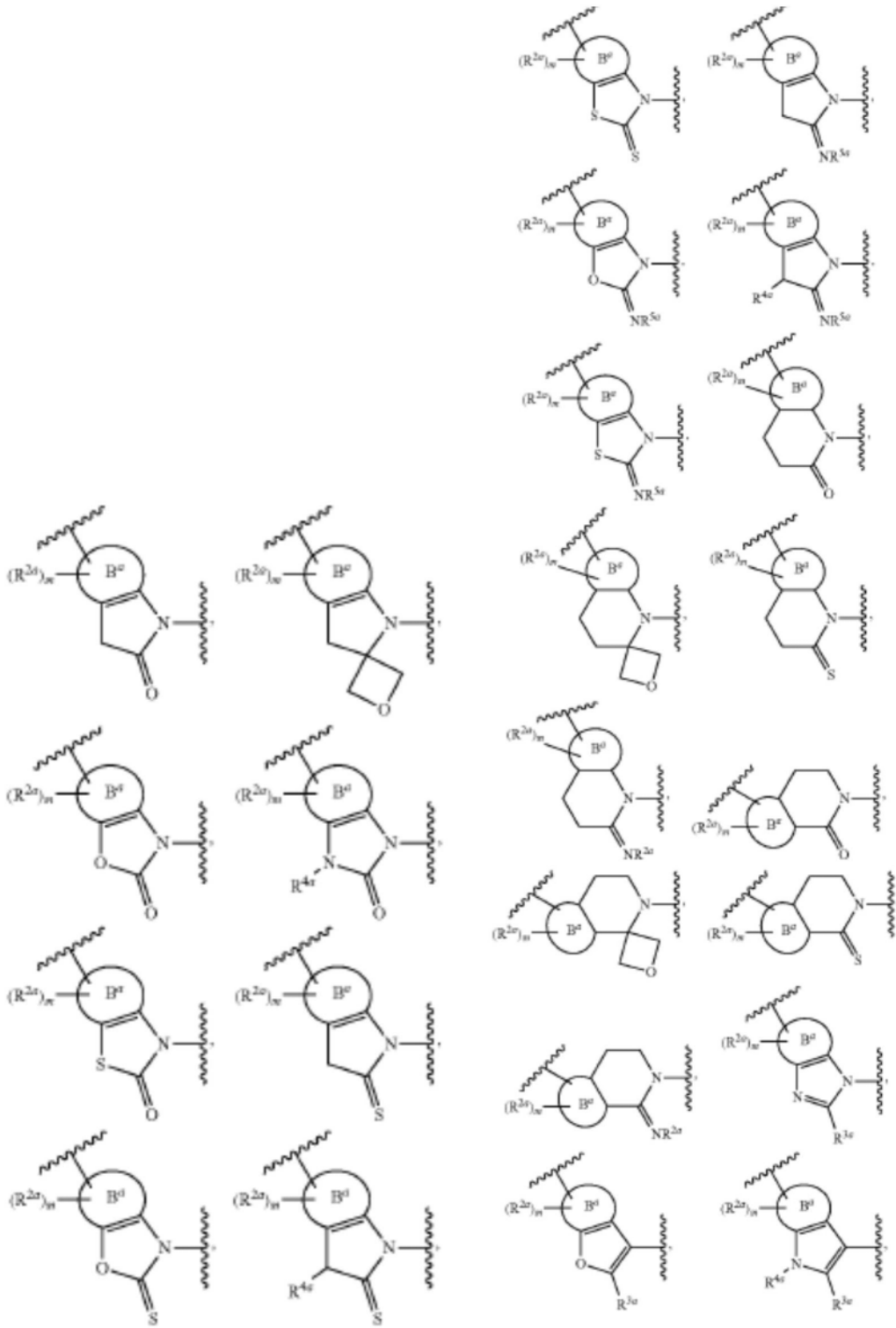
X¹是选自共价键、-CH₂-、-C(O)-、-C(S)-的二价部分, 并且

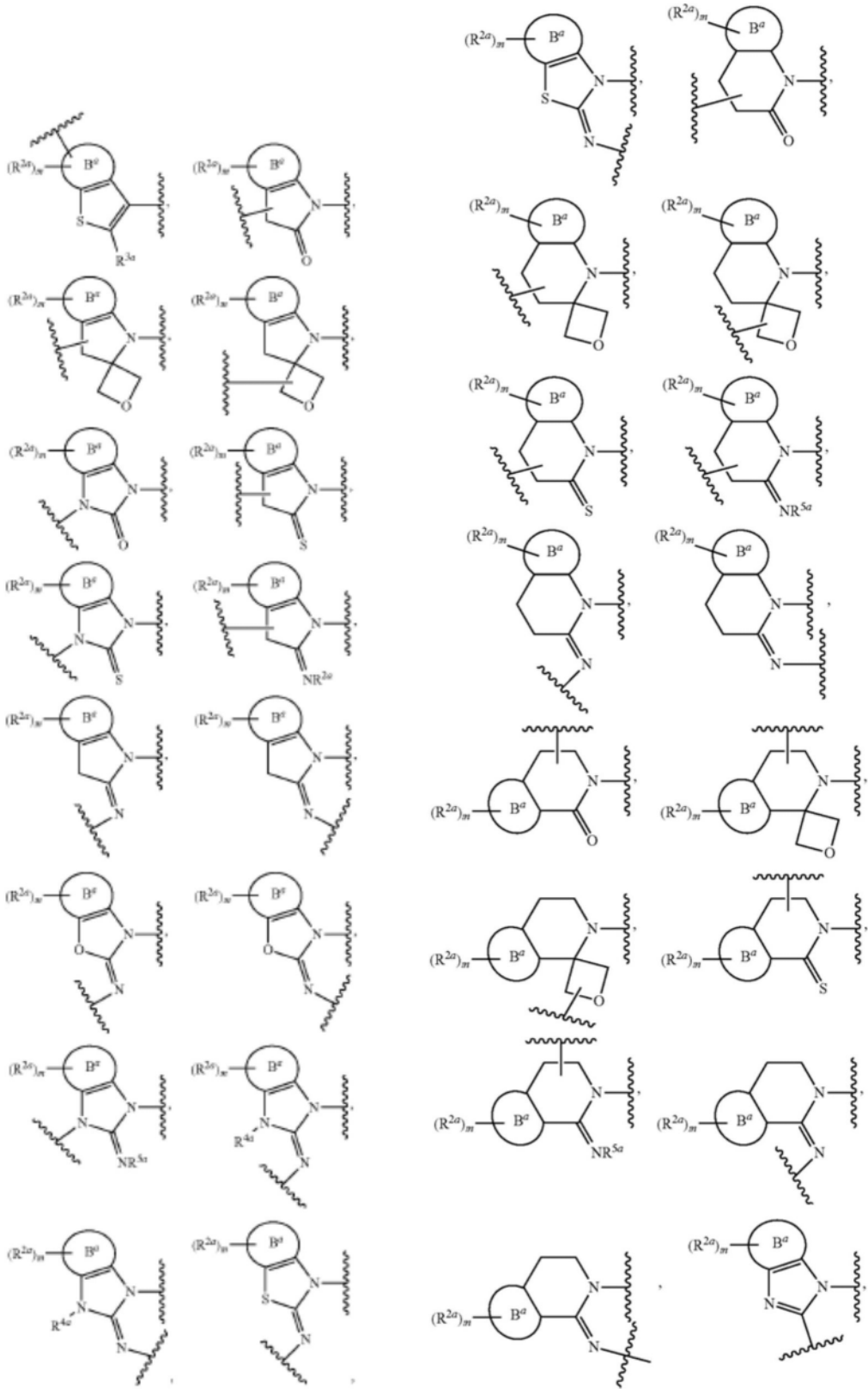


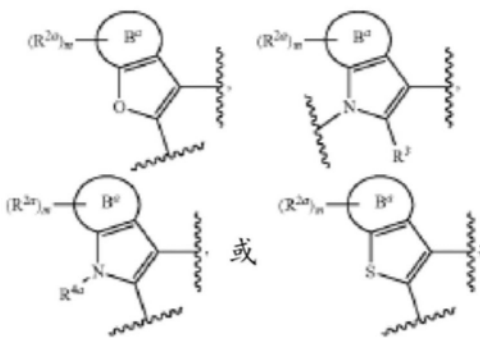
R^{1a}是氢、卤素、-CN、-OR、-SR、-S(O)R、-S(O)₂R、-N(R)₂、-Si(R)₃或任选经取代的C₁₋₄脂族;

每个R^{2a}独立地是氢、R^{6a}、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NR₂、-C(O)N(R)OR、-OC(O)R、-OC(O)NR₂、-N(R)C(O)OR、-N(R)C(O)R、-N(R)C(O)NR₂或-N(R)S(O)2R;

环A^a是选自以下的双环或三环:







环 B^a 是选自以下的稠合环:含有0-2个氮原子的6元芳基,5至7元部分饱和的碳环基,具有1-2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5至7元部分饱和杂环基,或具有1-3个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5元杂芳基;

R^{3a} 选自氢、卤素、-OR、-N(R)₂或-SR;

每个 R^{4a} 独立地是氢、 R^{6a} 、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NR₂、-C(O)N(R)OR、-OC(O)R、-OC(O)NR₂、-N(R)C(O)OR、N(R)C(O)R、-N(R)C(O)NR₂或-N(R)S(O)₂R;

R^{5a} 是氢、C₁₋₄脂族或-CN;

每个 R^{6a} 独立地是选自以下的任选经取代的基团:C₁₋₆脂族,苯基,具有1-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的4-7元饱和或部分不饱和杂环,和具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环;

环A是4-10元饱和单环或双环碳环或具有0-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环;

环C是苯基或具有1-5个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-10元单环或双环杂芳基环; L^2 和 L^3 中的每一个独立地是共价键或C₁₋₃二价直链或支链饱和或不饱和烃链,其中该链的1-3个亚甲基单元独立地且任选地被以下替代:-O-、-C(O)-、-C(S)-、-C(R)2-、-CH(R)-、-C(F)₂-、-N(R)-、-S-、-S(O)₂-或-CR=CR-;

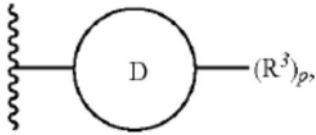
每个 R^1 独立地是氢、 R^5 、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-S(O)(NR)R、-P(O)(OR)₂、-P(O)(NR₂)₂、-CFR₂、-CF₂(R)、-CF₃、-CR₂(OR)、-CR₂(NR₂)、-C(O)R、-C(O)OR或-C(O)NR₂;

每个R独立地是氢或选自以下的任选经取代的基团:C₁₋₆脂族,苯基,具有1-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的4-7元饱和或部分不饱和杂环,和具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环,或者:

同一原子上的两个R基团任选地与介于它们中间的原子一起形成任选经取代的4-11元饱和或部分不饱和碳环或具有除它们所附接的原子之外的0-3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环单环、双环、桥接双环、螺环、或杂芳基环;

每个 R^2 独立地是氢、 R^5 、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR₂、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-S(O)(NR)R、-P(O)(OR)₂、-P(O)(NR₂)₂、-CF₂(R)、-CF₃、-CR₂(OR)、-CR₂(NR₂)、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NR₂、-C(O)N(R)OR、-OC(O)R、-OC(O)NR₂、-N(R)C(O)OR、-N(R)C(O)R、-N(R)C(O)NR₂或-N(R)S(O)₂R;

R^4 选自



氢、或选自以下的任选经取代的基团： C_{1-6} 脂族或4-11元饱和或部分不饱和单环、双环、桥接双环或螺环碳环或具有1-3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环；

环D是苯基，4-10元饱和或部分不饱和单环或双环碳环或具有1-3个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环，或具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环；

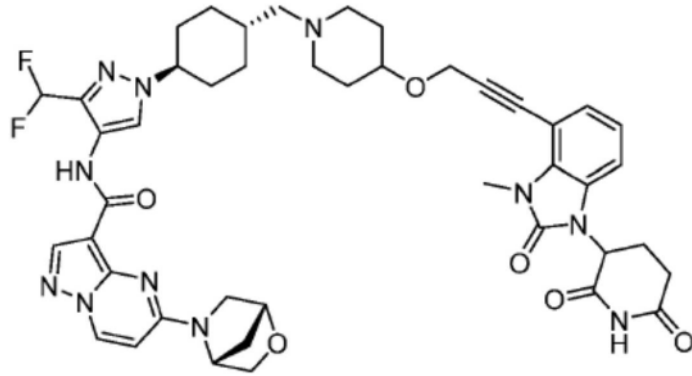
每个 R^3 独立地是氢、 R^5 、卤素、-CN、-NO₂、-OR、-SR、-NR²、-S(O)₂R、-S(O)₂NR₂、-S(O)R、-S(O)(NR)R、-P(O)(OR)₂、-P(O)(NR₂)₂、-CF₂(R)、-CF₃、-CR₂(OR)、-CR₂(NR₂)、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NR₂、-C(O)N(R)OR、-OC(O)R、-OC(O)NR₂、-N(R)C(O)OR、-N(R)C(O)R、-N(R)C(O)NR₂或-N(R)S(O)₂R；

每个 R^5 独立地是选自以下的任选经取代的基团： C_{1-6} 脂族，苯基，3-7元饱和或部分不饱和碳环或具有1-2个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的杂环，和具有1-4个独立地选自氮、氧和硫的杂原子的5-6元杂芳基环；

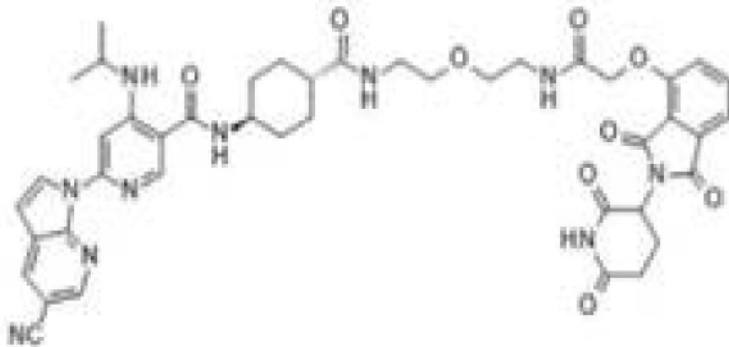
n是0、1或2；

每个m独立地是0、1、2、3或4；并且p是0、1、2、3或4。

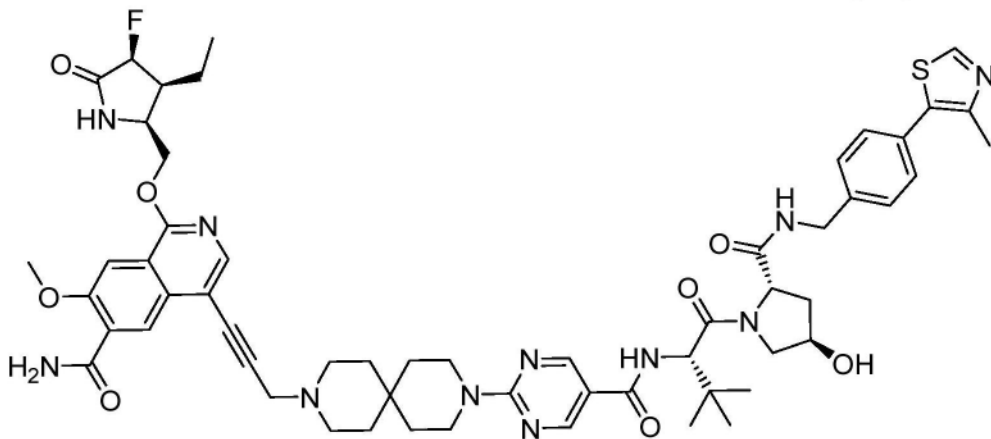
[0266] 64. 如实施例37-62中任一项所述的方法，其中该IRAK调节剂包含式[II]-[V]的化合物中的任一种：



[II]、



[III] 或



[IV]、

或其药学上可接受的盐。

[0267] 65. 如实施例37-62中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂是式[II]的化合物、PROTAC IRAK-4降解剂1或PF 06650833。

[0268] 66. 如实施例37-61中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂是CRISPR、siRNA、shRNA、miRNA、RNAi、反义RNA、核酶或脱氧核酶。

[0269] 67. 如实施例37-66中任一项所述的方法,其中该IRAK调节剂阻断TLR9功能。

[0270] 68. 如实施例37-67中任一项所述的方法,其中该基因治疗剂是病毒载体。

[0271] 69. 如实施例68所述的方法,其中该病毒载体是AAV颗粒。

[0272] 70. 如实施例69所述的方法,其中该AAV颗粒包含AAV1衣壳、AAV2衣壳、AAV3衣壳、AAV4衣壳、AAV5衣壳、AAV6衣壳、AAV7衣壳、AAV8衣壳、AAVrh8衣壳、AAV9衣壳、AAV10衣壳、

AAVrh10衣壳、AAV11衣壳、AAV12衣壳、AAVrh32.33衣壳、AAV-XL32衣壳、AAV-XL32.1衣壳、AAV LK03衣壳、AAV2R471A衣壳、AAV2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳、AAV DJ8衣壳、AAV2 N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、山羊AAV衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳、牛AAV衣壳、小鼠AAV衣壳、rAAV2/HBoV1 (嵌合AAV/人博卡病毒1型)、AAV2HBKO衣壳、AAVPHP.B衣壳或AAVPHP.eB衣壳或其功能变体。

[0273] 71. 如实施例70所述的方法,其中该AAV衣壳包含酪氨酸突变、肝素结合突变或HBKO突变。

[0274] 72. 如实施例69-71中任一项所述的方法,其中该AAV病毒颗粒包含含有一个或多个反向末端重复 (ITR) 的AAV基因组,其中该一个或多个ITR是AAV1 ITR、AAV2 ITR、AAV3 ITR、AAV4 ITR、AAV5 ITR、AAV6 ITR、AAV7 ITR、AAV8 ITR、AAVrh8 ITR、AAV9 ITR、AAV10 ITR、AAVrh10 ITR、AAV11 ITR或AAV12 ITR。

[0275] 73. 如实施例72所述的方法,其中该AAV颗粒的该一个或多个ITR和该衣壳衍生自相同的AAV血清型。

[0276] 74. 如实施例72所述的方法,其中该AAV颗粒的该一个或多个ITR和该衣壳衍生自不同的AAV血清型。

[0277] 75. 如实施例68所述的方法,其中病毒载体是腺病毒颗粒。

[0278] 76. 如实施例75所述的方法,其中该腺病毒颗粒包含来自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型或其功能变体的衣壳。

[0279] 77. 如实施例68所述的方法,其中该病毒载体是慢病毒颗粒。

[0280] 78. 如实施例77所述的方法,其中该重组慢病毒颗粒用水疱性口炎病毒 (VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、罗斯河病毒 (RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫科拉病毒、狂犬病病毒、RD114或其功能变体假型化。

[0281] 79. 如实施例68所述的方法,其中该病毒载体是单纯疱疹病毒 (HSV) 颗粒。

[0282] 80. 如实施例79所述的方法,其中该HSV颗粒是HSV-1颗粒或HSV-2颗粒或其功能变体。

[0283] 81. 如实施例37-80中任一项所述的方法,其中该基因治疗剂是脂质纳米颗粒。

[0284] 82. 如实施例37-81中任一项所述的方法,其中该基因治疗剂包含编码异源转基因的核酸。

[0285] 83. 如实施例82所述的方法,其中该异源转基因与启动子可操作地连接。

[0286] 84. 如实施例83所述的方法,其中该启动子是组成型启动子、组织特异性启动子或诱导型启动子。

[0287] 85. 如实施例37-84中任一项所述的方法,其中在施用该基因治疗剂之前、同时或之后施用该IRAK调节剂。

[0288] 86. 如实施例37-85中任一项所述的方法,其中该个体患有适合于通过基因疗法治疗的疾病或障碍。

[0289] 87. 如实施例86所述的方法,其中该疾病或障碍是单基因病或障碍。

[0290] 88. 如实施例37-87中任一项所述的方法,其中将该基因治疗剂静脉内、腹膜内、动

脉内、肌内、皮下或肝内施用。

[0291] 89. 如实施例37-88中任一项所述的方法, 其中将该IRAK调节剂口服、静脉内、腹膜内、动脉内、肌内、皮下或肝内施用。

[0292] 90. 组合物在制造用于将核酸递送至有需要的个体的细胞的药剂中的用途, 其中该组合物包含基因治疗剂, 并且其中该组合物被配制用于与IRAK调节剂组合使用。

[0293] 91. 组合物在制造用于将核酸递送至有需要的个体的细胞的药剂中的用途, 其中该组合物包含IRAK调节剂, 并且其中该组合物被配制用于与基因治疗剂组合使用。

[0294] 92. 组合物在制造用于治疗需要基因疗法的个体的药剂中的用途, 其中该组合物包含基因治疗剂, 并且其中该组合物被配制用于与IRAK调节剂组合使用。

[0295] 93. 组合物在制造用于治疗需要基因疗法的个体的药剂中的用途, 其中该组合物包含IRAK调节剂, 并且其中该组合物被配制用于与基因治疗剂组合使用。

[0296] 94. 组合物在制造用于调节需要基因疗法的个体对基因疗法的免疫应答的药剂中的用途, 其中该组合物包含基因治疗剂, 并且其中该组合物被配制用于与IRAK调节剂组合使用。

[0297] 95. 组合物在制造用于调节个体对基因疗法的免疫应答的药剂中的用途, 其中该组合物包含IRAK调节剂, 并且其中该组合物被配制用于与基因治疗剂组合使用。

[0298] 96. 如实施例90-95中任一项所述的用途, 其中该基因治疗剂是AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒。

[0299] 97. 如实施例90-96中任一项所述的用途, 其中该IRAK调节剂是IRAK-4降解剂。

[0300] 98. 一种组合物, 该组合物包含用于在将核酸递送至有需要的个体的细胞中使用的基因治疗剂, 其中该基因治疗剂与IRAK调节剂组合使用。

[0301] 99. 一种组合物, 该组合物包含用于在将核酸递送至有需要的个体的细胞中使用的IRAK调节剂, 其中该IRAK调节剂与基因治疗剂组合使用。

[0302] 100. 一种组合物, 该组合物包含用于在治疗需要基因疗法的个体中使用的基因治疗剂, 其中该基因治疗剂与IRAK调节剂组合使用。

[0303] 101. 一种组合物, 该组合物包含用于在治疗需要基因疗法的个体中使用的IRAK调节剂, 其中该IRAK调节剂与基因治疗剂组合使用。

[0304] 102. 一种组合物, 该组合物包含用于调节需要基因疗法的个体对基因疗法的免疫应答的IRAK调节剂, 其中该IRAK调节剂与基因治疗剂组合使用。

[0305] 103. 一种组合物, 该组合物包含用于抑制需要基因疗法的个体对基因疗法的免疫应答的IRAK调节剂, 其中该IRAK调节剂与基因治疗剂组合使用。

[0306] 104. 如实施例98-103中任一项所述的组合物, 其中该基因治疗剂是AAV颗粒、腺病毒颗粒、慢病毒颗粒、HSV颗粒或脂质纳米颗粒。

[0307] 105. 如实施例98-104中任一项所述的组合物, 其中该IRAK调节剂是IRAK-4降解剂。

[0308] 106. 一种试剂盒, 该试剂盒用于在如实施例1-89中任一项所述的方法中使用。

[0309] 107. 一种试剂盒, 该试剂盒用于如实施例90-97中任一项所述的用途。

[0310] 108. 一种试剂盒, 该试剂盒包含如实施例98-105中任一项所述的组合物。

实例

[0311] 通过参考以下实例将更充分地理解本发明。然而,这些实例不应被解释为限制本发明的范围。应理解,本文所述的实例和实施例仅用于说明性目的,并且根据所述实例和实施例进行的各种修改或改变将是本领域技术人员所想到的并且应包括在本申请的精神和范围内以及所附权利要求的范围内。

实例1:评估IRAK4降解剂对用AAV处理的人细胞的影响的离体方案。

[0312] 本实例提供了检查IRAK4抑制对暴露于AAV的淋巴细胞和树突细胞的影响的策略。

[0313] AAV触发涉及先天免疫系统和适应性免疫系统两者的激活的免疫应答。虽然相对好地表征了对AAV的适应性免疫应答,但对由AAV引起的先天免疫激活了解得很少。

[0314] IRAK4是TLR途径内的激酶,其激活先天免疫应答。虽然广泛作用的免疫抑制剂改善AAV递送,但是这导致转基因表达的丧失、副作用和机会性感染风险。因此,抑制IRAK4可以导致有利于AAV治疗的更具特异性的免疫调节。

[0315] 为了制备外周血单个核细胞(PBMC),将来自经富集白细胞单采术产物的血液倾析到50mL管中,并且以1:1的比率添加DPBS。将血液轻轻地移液到含有15mL Ficoll (GE17-5442-02)的单独的50mL管中,以确保血液和Ficoll层不混合。将混合物在室温下以2000RPM离心25分钟(9加速且无制动)。收集含有白细胞和血小板的血沉棕黄层,将其转移到新的管中,并且以400RCF离心五分钟。将细胞用含有1% FBS或FCS的PBS洗涤三次并且对其进行计数。

[0316] 使用CD14微珠根据可在线获得的制造商方案(万维网miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0001260.PDF;美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotech),德国,订单号130-050-201)从PBMC中分离CD14+单核细胞。简言之,在2°C-8°C下将细胞与20 μ L CD14微珠/10⁷个总细胞一起孵育15分钟。将细胞施加到磁性柱上,并且允许未经标记的细胞通过。在将柱洗涤三次之后,将柱从磁性分离器中取出,置于收集管上,并且通过将柱塞推入柱中来冲洗出经磁性标记的细胞。

[0317] 使用ImmunoCult-ACF树突细胞培养基、分化补充剂和成熟补充剂(cdn.stemcell.com/media/Files/pis/DX20521-PIS_1_2_0.pdf?_ga=2.81451927.1035383195.16421057001174975582.1603298321;干细胞技术公司(Stem Cell Technologies),目录号10986、10988和10989),根据可在线获得的制造商方案,使单核细胞分化为树突细胞。简言之,将经纯化的单核细胞添加到含有分化补充剂的树突细胞培养基中,并且在37°C下孵育三天。在第3天,更换培养基并且将细胞再孵育两天。在第五天以1比100稀释度(例如,50 μ L补充剂/5mL培养物)添加成熟补充剂。

[0318] 在第七天收获分化的细胞。通过将4mL ImmunoCult XF T细胞扩增培养基(干细胞技术公司,目录号10981)添加到解冻的PBMC中来刺激T细胞。将细胞以400g离心5分钟,吸出培养基,并且使细胞在10mL新鲜扩增培养基中静置过夜。

[0319] 在收集和计数后,将静置的细胞以400g离心五分钟并且重悬。在96孔板中在T细胞完全培养基中进行细胞刺激。培养基中细胞因子的终浓度为100IU IL-2、5ng/mL IL-7和25ng/mL IL-15。以1e5 MOI进行AAV刺激,其中使用10 μ g PHA-p作为阳性对照。每三天进行半耗尽。解冻PBMC后十天,在普通T细胞培养基中用AAV再次刺激细胞。在24小时刺激后收集培养基。

[0320] 使用标准三重转染方法(Sena-Esteves和Gao,Cold Spring Harb Protoc[冷泉港

方案];doi:10.1101/pdb.top095513,2020)产生rAAV载体(例如,AAV1、AAV2和/或AAVrh32.33)。将病毒通过氯化铯超速离心纯化,并且使用银染色和定量聚合酶链式反应(qPCR)两者进行滴定。

[0321] 将淋巴细胞和树突细胞与AAV载体一起孵育,并且用IRAK4降解剂进行预处理、后处理或共处理。在AAV孵育之前或之后3、6、12、24或48小时,用IRAK4降解剂进行预处理和后处理。将细胞与AAV以 1×10^5 MOI一起孵育6、12、24、48或72小时。将细胞用剂量范围为1nM至1M的PROTAC IRAK4降解剂-1(药物化学表达公司,目录号HY-129966)、PZ0327(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich),目录号PF06650833)、或式[II]的化合物(凯迈瑞治疗公司(Kymera Therapeutics))处理。使用LPS(300ng/mL持续24小时,西格玛公司(Sigma) L2630100MG)和R848(1 μ g/mL持续24小时,英杰公司t1r1-r948-5)作为对照。另外的测试组包括单独用AAV处理、单独用IRAK4抑制剂处理或用IRAK4抑制剂与LPS或R848一起处理。

[0322] 为了确定在用IRAK4降解剂处理的细胞中TLR9途径被抑制的程度,收集细胞培养基并且将其使用美赛(Meso Scale Discovery,MSD)测定进行分析以确定细胞因子释放的水平。使用V-PLEX人生物标记物54-Plex试剂盒,并且根据制造商的方案(美赛公司,洛克维尔,马里兰州)进行测定。

实例2: IRAK4降解剂在用AAV或LNP处理的小鼠中的体内分析

[0323] 本实例提供了检查用IRAK4降解剂处理动物时AAV免疫原性是否被抑制的体内策略。

[0324] 所有动物饲养、维护、处理和实验都是基于机构动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)指南进行的。

[0325] 动物接受AAV或LNP注射,并且用IRAK4抑制剂预处理、后处理或共处理。在AAV或LNP注射之前6小时、过夜、24小时或48小时进行用IRAK4降解剂的预处理,或者在AAV或LNP注射之后6小时、过夜、24小时或48小时进行用IRAK4降解剂的后处理。肌肉注射AAV以 5×10^{11} vg/kg的剂量进行,并且监测7、14、21、28、35、42和63天。LNP注射是以1mg/kg、10mg/kg或100mg/kg的剂量静脉内、皮下或腹膜内进行的。另外,将动物用皮下、腹膜内或口服给予的1mg/kg、10mg/kg或100mg/kg PROTAC IRAK4降解剂-1(药物化学表达公司,目录号HY-129966)、PZ0327(西格玛-奥德里奇公司,目录号PF06650833)或式[II]的化合物(凯迈瑞治疗公司)预处理、后处理或共处理。另外的测试组包括单独用AAV处理、单独用IRAK4抑制剂处理或用IRAK4抑制剂与LPS或R848一起处理。

[0326] 处理后7、14、21、28、35、42或63天将动物处死,并且分离肌肉、肝、骨髓、脾、血液和胸腺。将组织样品在干冰上立即冷冻。提取DNA和RNA样品,并且使用实时定量PCR(qPCR)对载体基因组拷贝和转基因表达进行定量。

[0327] 使用苏木精和伊红(H&E)染色测定经处理的动物中的组织炎症。根据本领域熟知的方法,对福尔马林固定和石蜡包埋的肌肉和肝组织进行染色。(Gernoux, G等人, Mol Ther [分子疗法], 2020, 28(3): 747-757)。

[0328] 根据本领域熟知的方法(Gernoux, G等人, Mol Ther [分子疗法], 2020, 28(3): 747-757),对肌肉、肝和脾冷冻切片进行免疫组织化学测定。将样品收集在载玻片上,风干,并且用3%多聚甲醛固定。分析样品中的激活的免疫细胞(如T细胞(使用抗CD3、CD4和MHC II)和巨噬细胞(使用抗F4/80和MHC II))和AAV转基因表达。使用标准X-gal方案评估细胞核和细

胞质 β -gal。

[0329] 为了分析经处理的动物中的细胞因子水平,收集来自这些受试者的血清并且将其用于美赛(MSD)测定。使用V-PLEX人生物标记物54-Plex试剂盒,并且根据制造商的方案(美赛公司,洛克维尔,马里兰州)进行测定。

[0330] 为了测量经处理的动物中的IFN- γ 分泌,对注射后分离的脾细胞进行ELISpot测定(Gernoux,G等人,Mol Ther[分子疗法],2020,28(3):747-757)。使用AAV将经分离的细胞在体外刺激48小时。使用iSpot ELISpot Reader ELR068IFL(AID)确定斑点数,并且使用AID ELISpot Reader软件v.6.0进行分析。当斑点形成单位超过50/1e6个细胞并且是对照条件中的至少三倍时,应答被认为是阳性的。使用未经刺激的细胞作为阴性对照,并且使用CEFT和CD3/CD28刺激作为阳性对照。

[0331] 从脾和骨髓样品获得单细胞悬浮液。将细胞在CD16/32(Fc Block;BD生物科学公司(BD Biosciences))中孵育并且用抗体染色。在LSR II(BD生物科学公司)上采集细胞,并且将其用FlowJo软件(树星公司(Tree Star))进行分析。

[0332] 为了分析经处理的动物中的细胞因子表达,使用细胞内细胞因子染色,将经分离的脾细胞针对IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4和IL-6进行染色。如Mays,J Immunol[免疫学杂志]2009 182(1)6051-6060中所述制备脾细胞。将脾细胞铺板在补充有1 μ g/mL布雷菲德菌素A(GolgiPlug,BD制药公司(BD Pharmigen))和20ng/mL小鼠IL-2(BD制药公司)的T细胞测定培养基中。在染色之前,在37 $^{\circ}$ C下在10% CO₂中,在存在或不存在IRAK4降解剂的情况下将细胞用AAV刺激5小时。在刺激后,将细胞洗涤,用抗体染色,并且使用流式细胞术检查。在LSR II上采集样品,并且将其用FlowJo软件进行分析。

[0333] 根据描述于Mays,J Immunol[免疫学杂志]2009 182(1)6051-6060中的方案,通过使用PE缀合的MHC I类H2-Kb-ICPMYARV四聚体复合物(贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter))的MHC I类四聚体染色来确定用AAV和IRAK4降解剂处理的动物的T细胞应答。在用AAV和IRAK4降解剂处理后的不同时间,对通过眶后取血分离的肝素化全血细胞进行四聚体染色。将细胞在室温下用PE缀合的四聚体和FITC缀合的抗CD8 α (Ly-2)抗体(BD制药公司)共染色30分钟,并且在室温下用补充固定溶液(贝克曼库尔特公司)的iTAg MHC四聚体裂解溶液固定15分钟。将细胞在PBS中洗涤三次并且重悬于0.01% BD CytoFix(BD生物科学公司)中。在LSR II上采集样品,并且将其用FlowJo软件进行分析。

实例3:IRAK4降解剂对用AAV处理的人细胞的影响的离体分析

材料和方法

[0334] 外周血单个核细胞的制备。将来自不同供体的来自经富集白细胞单采术产物(干细胞技术公司)的血液倾析到50mL管中,并且以1:1的比率添加杜尔贝科磷酸盐缓冲盐水(DPBS)。将血液加DBPS的混合物轻轻地移液到含有15mL Ficoll(GE17-5442-02)的单独的50mL管中,以确保血液和Ficoll相不混合。将混合物在室温下以2000RPM离心25分钟(9加速且无制动)。收集含有外周血单个核细胞(PBMC)的血沉棕黄层,将其转移到新的管中,并且以400RCF离心五分钟。将PBMC用含有1%胎牛血清(FBS)或胎牛犊血清(FCS)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤三次并且计数。

[0335] 单核细胞的分离。使用CD14微珠根据制造商方案(美天旎生物技术公司,德国,订单号130-050-201,可在万维网在线获得的方案miltenyibiotec.com/upload/assets/

IM0001260.PDF),从PBMC中分离CD14+单核细胞。简言之,在2°C-8°C下将PBMC与20μL CD14微珠/10⁷个总细胞一起孵育15分钟。将PBMC施加到磁性柱(美天旎公司;万维网miltenyibiotec.com/US-en/products/lc-columns.html#130-042-401)上,并且允许未经标记的细胞通过。在将柱洗涤三次后,将柱从磁性分离器(美天旎公司;万维网miltenyibiotec.com/US-en/products/quadromacs-separator-and-starting-kits.html#130-091-051)中取出,置于收集管上,并且通过将柱塞推入柱中来冲出经磁性标记的CD14+单核细胞。

[0336] 单核细胞的分化。使用ImmunoCult-ACF树突细胞培养基、分化补充剂和成熟补充剂(干细胞技术公司,目录号10986、10988和10989;万维网cdn.stemcell.com/media/Files/pis/DX20521-PIS_1_2_0.pdf?_ga=2.81451927.1035383195.1642105700-1174975582.1603298321),根据可在线获得的制造商方案,使CD14+单核细胞分化为树突细胞。简言之,将经纯化的CD14+单核细胞添加到含有分化补充剂的树突细胞培养基中,并且在37°C下孵育三天。在第3天,将培养基用含有分化补充剂的新鲜树突细胞培养基替换,并且将细胞再孵育两天。在第5天,将成熟补充剂以1比100稀释度(例如,50μL补充剂/5mL培养物)添加到细胞中。在第7天收获分化的树突细胞。

[0337] rAAV产生和滴定。使用标准三重转染方法(Sena-Esteves和Gao,Cold Spring Harb Protoc[冷泉港方案];doi:10.1101/pdb.top095513,2020)产生rAAV载体(AAV.SAN024和AAV.SAN029)。测试的所有血清型编码相同的GFP转基因。将病毒通过氯化铯超速离心进行纯化,并且使用银染色和定量聚合酶链式反应(qPCR)两者进行滴定。

[0338] IRAK4靶向药物和AAV处理。将树突细胞以200,000个细胞/孔铺板在96孔板中。一式三份地进行每种处理。将细胞在培养箱中在37°C、5%CO₂下用zimlovisertib IRAK4抑制剂(别名:PF-06650833)(目录号:HY-19836(药物化学表达公司))和PROTAC IRAK4降解剂-1(目录号:HY-129966(药物化学表达公司))以16nm、80nm、400nm和2000nm处理18h。在用药物预处理18h后,以1e5 MOI使用AAV载体。将细胞在37°C、5% CO₂下在培养箱中孵育24小时。在24小时后,将板离心并且收集培养基上清液。通过由DC3治疗公司(DC3 therapeutics) <https://www.dc3therapeutics.com/services>进行的美赛MSD(万维网mesoscale.com/products/v-plex-proinflammatory-panel-1-human-kit-k15049d/)分析澄清的培养基。PBMC分离、单核细胞纯化和树突细胞分化的实验概要展示在图1中。此图还示出了如何用不同的药物和AAV处理树突细胞。在一些实验中,使用脂多糖LPS(300ng/mL)(西格玛奥德里奇精细化学品生物科学公司(Sigma Aldrich Fine Chemicals Biosciences)L2630100MG)作为阳性对照,已知该阳性对照激活IRAK 4并且诱导IRAK4靶蛋白的磷酸化。

[0339] LDH释放测定。通过培养基上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的释放来测量细胞毒性。使用普洛麦格公司(Promega)试剂盒(目录号G1780)按照制造商的方案来定量LDH。简言之,在实验处理后,将上清液样品转移到96孔板中,并且将等体积的CytoTox 96®试剂添加到每个孔中并且孵育30分钟。添加终止溶液,并且在读板仪中在490nm处测量吸光度信号。<https://www.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/cytotox-96-non-radioactive-cytotoxicity-assay/?catNum=G1780#protocols>

[0340] AlphaLISA测定。进行此测定以测量细胞中IRAK4蛋白的水平。按照制造商(珀金埃

尔默公司(Perkin Elmer)(目录号AL3117C))的建议遵循该方案。简言之,将细胞裂解并且将5 μ L裂解物添加到抗IRAK4受体珠粒中并且在23 $^{\circ}$ C下孵育30min,然后添加生物素化抗IRAK4抗体并且在23 $^{\circ}$ C下孵育60min。最终,添加SA供体珠粒并且在30min后使用EnVision-Alpha Reader(615nm)读取板https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/MAN_AlphaLISA_IRAK4_AL3117.pdf?_gl=1*7jzf5d*_ga*MzQ4MTQ1NzA3LjE2NDY2NzY5MjI.*_ga_W34ZJ1Z1Q1*MTY3NzE5MjAyOS4zLjEuMTY3NzE5MjAy2Mi4yN_y4wLjA.&_ga=2.178521252.1409175695.1677192029-348145707.1646676922。使用AlphaLISA SureFire Ultra p-NF κ B(Ser536)测定试剂盒-高容量目录号ALSU-PNF κ B-A-HV使用相同的方案测量NF κ B的磷酸化水平。

结果

用IRAK4调节剂预处理导致细胞因子释放受抑制

[0341] 将人单核细胞性树突细胞用如所示的不同剂量(16nM、80nM、400nM和2000nM)的药物预处理18h,然后将相同的细胞用AAV.SAN024以1e5的MOI感染24小时,并且分析培养基上清液的细胞因子释放。用AAV处理诱导树突细胞分泌IL1b细胞因子,并且这种分泌被所有剂量的IRAK4抑制剂zimlovisertib(图2A)和IRAK4降解剂PROTAC IRAK4降解剂-1(图2B)两者阻断。条形图上的每个点代表一个供体。在三个供体上进行实验,并且利用单因素方差分析来确定统计学显著性。细胞因子分泌表示为在所有供体中的百分比。还观察到关于其他细胞因子(如IL6和TNFa)的细胞因子阻断。

用IRAK4调节剂共处理导致细胞因子释放受抑制

[0342] 将人单核细胞性树突细胞用如所示的不同剂量(16nM、80nM、400nM和2000nM)的药物共处理,并且同时将相同的细胞用AAV.SAN024以1e5的MOI感染24h,并且分析培养基上清液的细胞因子释放。用AAV处理诱导树突细胞分泌IL1b细胞因子,并且这种分泌被所有剂量的IRAK4抑制剂zimlovisertib(图3A)和IRAK4降解剂PROTAC IRAK4降解剂-1(图3B)两者阻断。条形图上的每个点表示代表性供体的技术重复。在三个供体上进行实验,并且利用单因素方差分析来确定统计学显著性。细胞因子分泌表示为在所有供体中的百分比。还观察到关于其他细胞因子(如IL6和TNFa)的细胞因子阻断。

IRAK4调节剂在原代人单核细胞性树突细胞中不引起细胞毒性

[0343] 将人单核细胞性树突细胞用如所示的不同剂量(16nM、80nM、400nM和2000nM)的IRAK4抑制剂zimlovisertib(图4A)或IRAK降解剂PROTAC IRAK4降解剂-1(图4B)处理,并且将相同的细胞用AAV.SAN024以1e5的MOI感染24h。分析培养基上清液的LDH释放。在对照(未经处理的/未经感染的细胞)与经处理的细胞和经AAV.SAN024感染的细胞之间未观察到显著差异,这表明两种IRAK4调节剂均没有细胞毒性。

用IRAK4抑制剂处理阻断IRAK4激酶靶蛋白的磷酸化,并且IRAK4降解剂引起原代人单核细胞性树突细胞中IRAK4蛋白的降解

[0344] 将人单核细胞性树突细胞用如所示的不同剂量(16nM、80nM、400nM和2000nM)的药物处理,并且将相同的细胞用LPS 300ng/ml处理。LPS引起IRAK4激酶活性并且允许IRAK4靶蛋白(如NF κ B)的磷酸化。在400nM和2000nM下用IRAK4激酶抑制剂zimlovisertib处理(图5A)阻断NF κ B的磷酸化。

[0345] 为了确定PROTAC降解剂的活性,将人单核细胞性树突细胞用如所示的不同剂量

(16nM、80nM、400nM和2000nM)的药物处理,并且将相同的细胞用AAV.SAN024以1e5的MOI感染24h。分析细胞裂解物的IRAK4降解。在对照(未经处理的/未经感染的)细胞与经处理的细胞和经AAV.SAN024感染的细胞之间未观察到显著差异,但是将经AAV.SAN024感染的细胞用所有剂量的降解剂处理都引起IRAK4水平的降低(图5B)。

实例4:在体内小鼠模型中IRAK4调节剂对由AAV诱导的免疫应答的影响的分析

材料和方法

[0346] 体内小鼠实验。C57BL/6J小鼠购买自杰克逊实验室(Jackson Laboratories)。将6-8周龄雄性小鼠分为3组-PBS组、AAV组和AAV+IRAK4组,所有组各自具有10只小鼠。将Zimlovisertib IRAK4抑制剂(别名:PF-06650833)(目录号:HY-19836(药物化学表达公司))以30mg/kg的剂量与小鼠食物(目录号2016, Teklad全球16%蛋白质啮齿动物饮食<https://www.inotivco.com/rodent-natural-ingredient-2016-diets>)混合。在注射AAV前15天向AAV+IRAK4组饲喂食物和Zimlovisertib IRAK4抑制剂,而向PBS组和AAV组饲喂小鼠食物(目录号2016, Teklad全球16%蛋白质啮齿动物饮食<https://www.inotivco.com/rodent-natural-ingredient-2016-diets>)。向PBS组小鼠肌肉内注射100ul PBS,向AAV组对于双腿的每个股四头肌肌肉内注射1e11 vg(100ul体积)。

[0347] 每组中n=6只小鼠的PBS组、AAV组和AAV+IRAK4降解剂PROTAC IRAK4降解剂-1(目录号:HY-129966(药物化学表达公司))(将其以100mg/kg与食物混合并且在注射AAV之前15天饲喂给小鼠)遵循相同的实验设计。将两种不同的IRAK4 PROTAC降解剂-即可商购的PROTAC IRAK4降解剂-1(目录号:HY-129966(药物化学表达公司)) and KT-474以100mg/kg剂量与食物混合,并且在施用AAV前15天饲喂。研究中使用的AAV衣壳具有LacZ转基因。在弗雷明汉的赛诺菲公司(Sanofi)根据机构动物护理和使用委员会进行所有的动物实验。每周进行下颌下取血,并且在注射AAV后三周进行尸检。

[0348] PBMC分离和表面染色。将120ul血液收集在K2EDTA包被的管中。将血液与DBPS以1:1比率混合,并且移液到含有Ficoll(GE17-5442-02)的单独的管中,以确保血液和Ficoll不混合。将混合物在室温下以2000RPM离心25分钟(9加速且无制动)。收集含有外周血单个核细胞(PBMC)的血沉棕黄层,将其转移到新的管中,并且以400RCF离心五分钟。将PBMC用含有1%胎牛血清(FBS)或胎牛犊血清(FCS)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤三次并且计数。将如此获得的PBMC细胞用不同的抗体染色以定量外周血中不同免疫细胞亚群的百分比。

[0349] PBMC CD8 TEM和lacZ四聚体染色。从约120ul的小鼠血液中分离PBMC,并且将其转移到96孔U形底板中。将PBMC通过以2,000rpm离心5分钟用200ul FACS缓冲液洗涤一次,并且将PBMC用流动抗体混合物(1:100抗CD4 PE-Cy7、1:50抗CD8a FITC、1:100抗CD62L APC、1:100抗CD44太平洋蓝、1:100活/死细胞染色试剂盒和1:20H-2Kbβ-半乳糖苷酶四聚体)在4℃下染色30分钟。在孵育后,将细胞用FACS缓冲液洗涤2次,然后用100ul BD Cytotfix/Cytoperm固定/透化溶液试剂盒在4℃下固定15分钟。将细胞用FACS缓冲液洗涤2次,然后将样品在流式细胞仪(Novocyte Penteon流式细胞仪系统5激光器,安捷伦科技公司(Agilent Technology))上运行。

[0350] 细胞内细胞因子染色。从小鼠脾中收获脾细胞,并且将200万个细胞接种在96孔U形底板上。将细胞以2,000rpm离心5分钟,然后用100ul含10% FBS和1X 2-巯基乙醇的RPMI重悬。在含10% FBS、1X 2-巯基乙醇和1:500GolgiStop的RPMI1640中制备10ug/ml浓度的

AAVrh32.33重叠肽、AAVrh32.33 LacZ免疫显性肽和LacZ免疫显性肽。对于阳性对照,在含10% FBS、1X 2-巯基乙醇和1:500GolgiStop的RPIM1640中制备0.10 μ g/ml PMA和2 μ g/ml离子霉素溶液。然后,将100 μ l制备的溶液添加到细胞中,使得终浓度为5 μ g/ml (或0.05 μ g/ml PMA和1 μ g/ml离子霉素)。将细胞在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中孵育过夜以刺激细胞。第二天,将细胞以2,000rpm离心5分钟,然后用FACS缓冲液洗涤一次。将细胞用抗体混合物(1:100抗CD4 FITC、1:100抗CD8a PerCP-Cy5.5、1:100抗CD44太平洋蓝、1:100活/死细胞染色试剂盒)在4 $^{\circ}$ C下染色30分钟。然后,将细胞用FACS缓冲液洗涤2次。洗涤后,将细胞用100 μ l BD Cytotfix/Cytoperm固定/透化溶液试剂盒在4 $^{\circ}$ C下透化20分钟。将细胞用1XPermWash洗涤两次,然后用抗体混合物(1:100抗IFN γ APC、1:100抗IL2PE、1:100抗TNF α PE-Cy7)在4 $^{\circ}$ C下染色30分钟。将细胞用FACS缓冲液洗涤两次,并且将样品在流式细胞仪上运行。

[0351] 表1示出了本实例所述测定中使用的各种试剂的供应商的列表

表1:试剂和供应商的列表

试剂	目录号	供应商
AAVrh32.33 重叠肽		迈默拓普公司 (Mimotopes)
AAVrh32.33 免疫显性肽		金斯瑞公司 (GenScript)
LacZ 免疫显性肽		金斯瑞公司
PerCP-Cy TM 5.5 大鼠抗小鼠 CD8a	551162	BD 生物科学公司
FITC 大鼠抗小鼠 CD4	553046	BD 生物科学公司
LIVE/DEAD TM 可固定近 IR 死细胞染色试剂盒, 用于 633 或 635 nm 激发	L34975	英杰公司
Pacific Blue TM 抗小鼠/人 CD44 抗体	103020	生物传奇公司 (Biolegend)
具有 GolgiPlug TM 的 BD Cytotfix/Cytoperm 固定/透化溶液试剂盒	555028	BD 生物科学公司
CD8 α 单克隆抗体 (KT15), FITC	MA5-16759	赛默飞世尔公司 (ThermoFisher)
MBL 国际公司 H-2KB B-半乳糖苷酶四聚体	NC2097436	赛默飞世尔公司
APC 抗小鼠 CD62L 抗体	104412	生物传奇公司
PE/青色素 7 抗小鼠 CD4 抗体	100422	生物传奇公司
PMA	t1rl-pma	安维沃根公司 (Invivogen)
离子霉素	inh-ion	安维沃根公司

APC 大鼠抗小鼠 IFN- γ	554413	BD 生物科学公司
PE-Cy TM 7 大鼠抗小鼠 TNF	557644	BD 生物科学公司
PE 大鼠抗小鼠 IL-2	554428	BD 生物科学公司
2-巯基乙醇	21985023	赛默飞世尔公司
RPMI 1640 培养基, GlutaMAX TM 补充剂	61870036	赛默飞世尔公司
含 2%胎牛血清的杜尔贝科磷酸盐缓冲盐水 (FACS 缓冲液)	7905	干细胞技术公司 (Stem cells technologies)

结果

用IRAK4抑制剂处理减少了在注射AAV后14天衍生自外周血的PBMC中的转基因LacZ特异性CD8 T细胞和效应记忆T细胞,并且减少了产生IFN γ 的CD8 T细胞

[0352] 体内小鼠实验被设计为显示在注射AAV后IRAK4抑制对CD8T细胞和记忆T细胞的影响(图6)。图6中描绘的小鼠示出了AAV+IRAK4组,其中在注射AAV前15天将IRAK4抑制剂zimlovisertib混合食物饲喂给小鼠,然后在第14天收集血液用于PBMC分析。在第21天进行小鼠尸检以收获脾。仅PBS组和仅AAV组饲喂常规食物,并且在第14天取血,并且在第21天进行尸检。

[0353] 在注射AAV后第14天对小鼠取血,并且分离PBMC。将PBMC用不同的抗体染色以定量LacZ四聚体阳性CD8 T细胞(图7A)和CD44+CD62L+效应记忆细胞(图7B)。与PBS对照相比,在施用AAV后,这些细胞群体上调。分别如图7A和图7B所示,在接受IRAK4抑制剂的小鼠中观察到CD8 T细胞和效应细胞的显著减少。每组N=10只小鼠,并且进行单因素方差分析以确定统计学显著性。

[0354] 在第21天,对小鼠实施安乐死并且收获脾细胞。将脾细胞用AAV肽库(图8A)或AAV免疫显性肽(图8B)刺激,以解释激活的衣壳特异性CD8 T细胞。类似地,将细胞用LacZ免疫显性肽(图8C)处理以定量转基因特异性激活的CD8 T细胞。激活的CD8 T细胞产生细胞因子干扰素 γ ,将其通过流式细胞术定量。在所有情况下,与PBS对照相比,这些细胞群体在施用AAV后上调,然后在IRAK4抑制剂处理后显著减少。每组N=10只小鼠,并且进行单因素方差分析以确定统计学显著性。

用IRAK4降解剂PROTAC IRAK4降解剂-1处理减少了免疫细胞中的IRAK4表达

[0355] 在第14天对小鼠取血,并且收获PBMC。通过流式细胞术鉴定PBMC中不同的免疫细胞类型(图9A-图9D)。在所评价的所有不同免疫细胞类型中,在经由食物进行IRAK4降解剂处理后,IRAK4蛋白表达显著降低。每组N=6只小鼠,并且进行单因素方差分析以确定统计学显著性。

用KT-474食物处理减少PBMC和脾中的转基因特异性CD8 T细胞。

[0356] 在注射AAV后第14天对小鼠取血,并且分离PBMC。在注射AAV后第21天收获脾细胞。将PBMC和脾细胞用不同的抗体染色,以定量LacZ四聚体阳性细胞。与PBS对照相比,这些细胞群在施用AAV后上调,然后在KT-474处理后显著减少(图10)。图10A示出了注射AAV后14天衍生自外周血的PBMC中转基因LacZ特异性CD8 T细胞的减少。图10B示出了注射AAV后21天脾中的转基因LacZ特异性CD8 T细胞的减少,并且使用ROUT异常值方法和单因素方差分析

方法来确定统计学显著性。ROUT方法从非线性回归中鉴定出异常值。

实例5: IRAK调节剂与AAV组合的口服处理的通用程序

[0357] C57BL/6J小鼠购买自杰克逊实验室。将6-8周龄雄性小鼠分为3组-PBS组、AAV组和AAV+IRAK4调节剂组,所有组各自具有10只小鼠。经由口服施用途径以100mg/kg剂量每天处理两次来测试IRAK 4调节剂(如IRAK4抑制剂Zimlovisertib IRAK4抑制剂(别名:PF-06650833)(目录号:HY-19836(药物化学表达公司)、PROTAC IRAK4降解剂-1(目录号HY-129966(药物化学表达公司)) 和KT-474。以处理前策略和共处理策略正测试IRAK4调节剂。在临床中针对其他疾病(<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13543784.2020.1752660>) 正测试IRAK4调节剂和KT-474<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04772885>的口服施用,并且因此在阻断IRAK4蛋白方面应是有效的。凯迈瑞治疗公司也示出了使用KT-474在人细胞以及在小鼠组织中完全降解IRAK4蛋白的证据https://www.kymeratx.com/wp-content/uploads/2021/09/Euro-Prot-Deg-Summit-Sept-21-Final_Anthony-Slavin.pdf。示出了IRAK4调节剂与AAV的组合的口服处理的通用程序的示意图示于图11中。

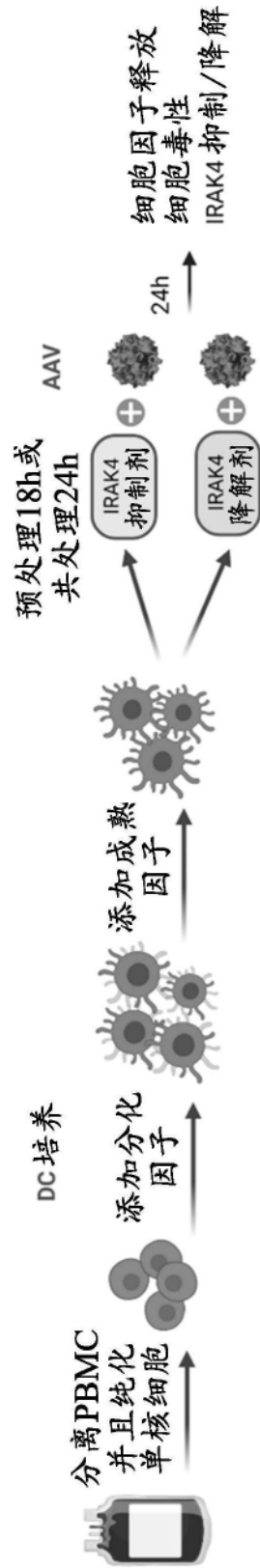


图1

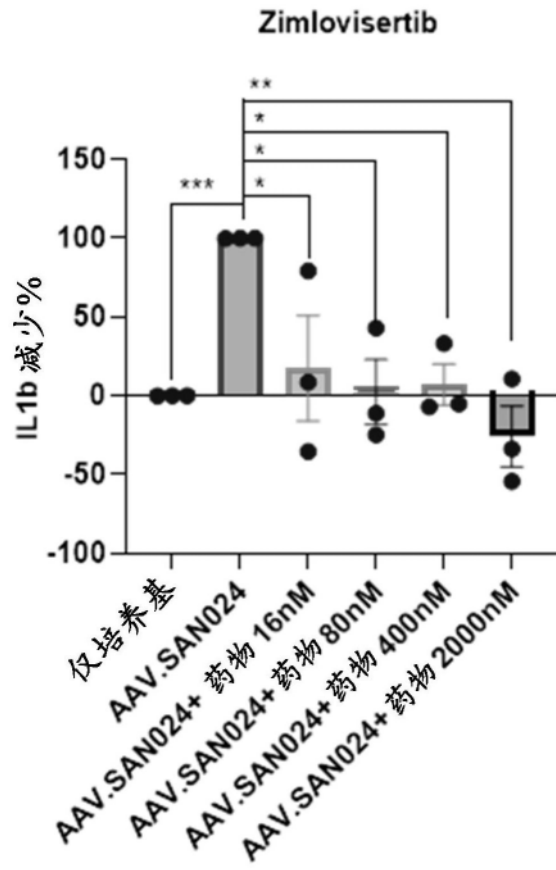


图2A

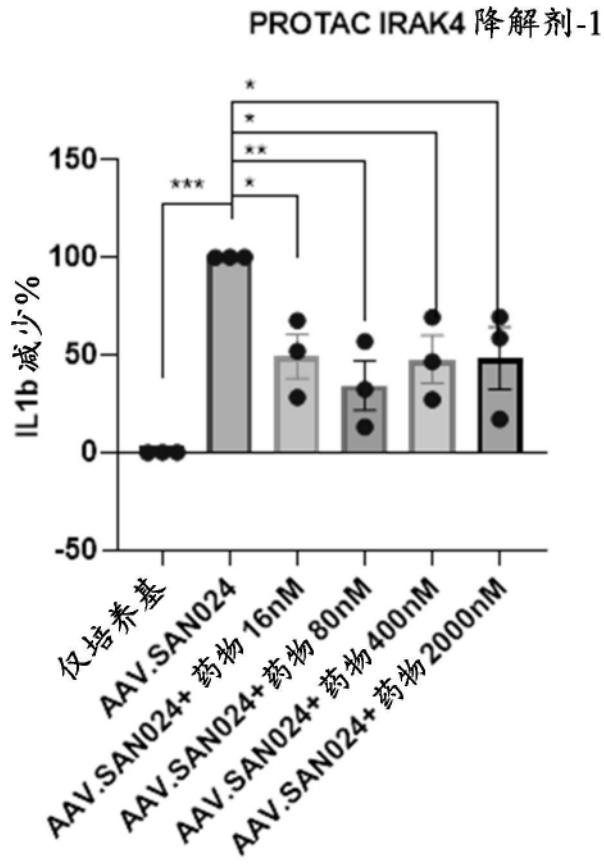


图2B

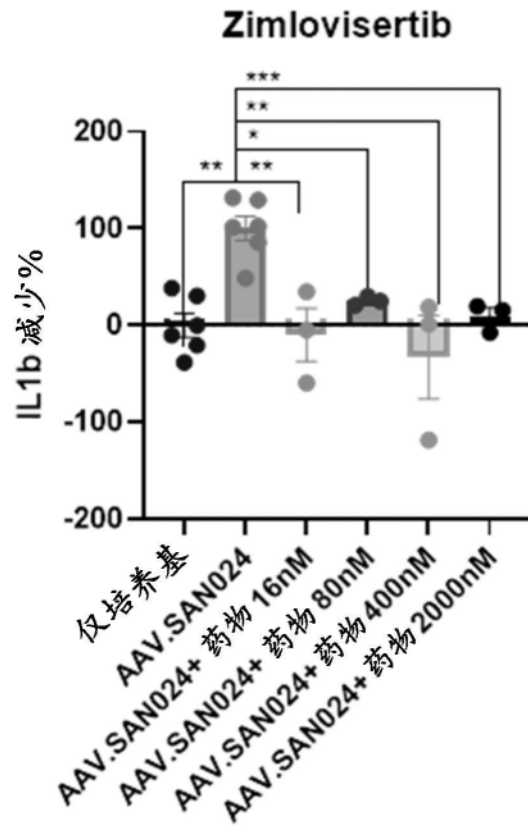


图3A

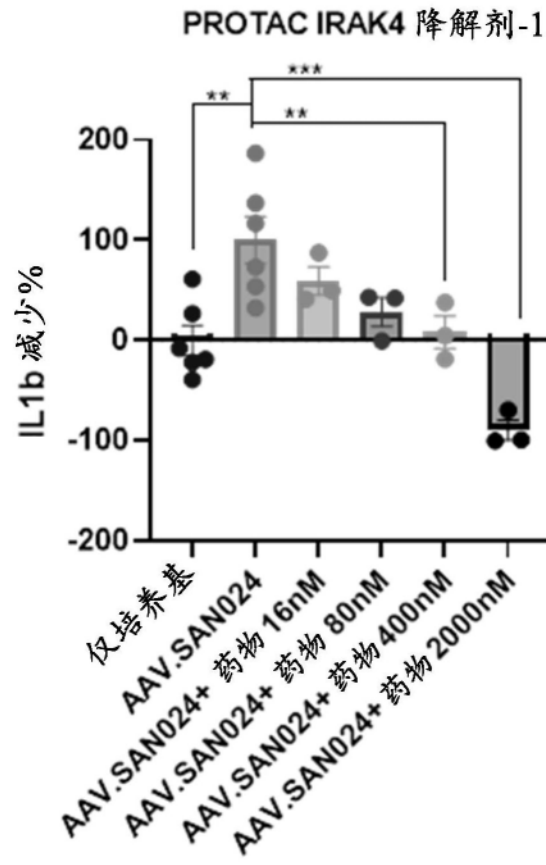


图3B

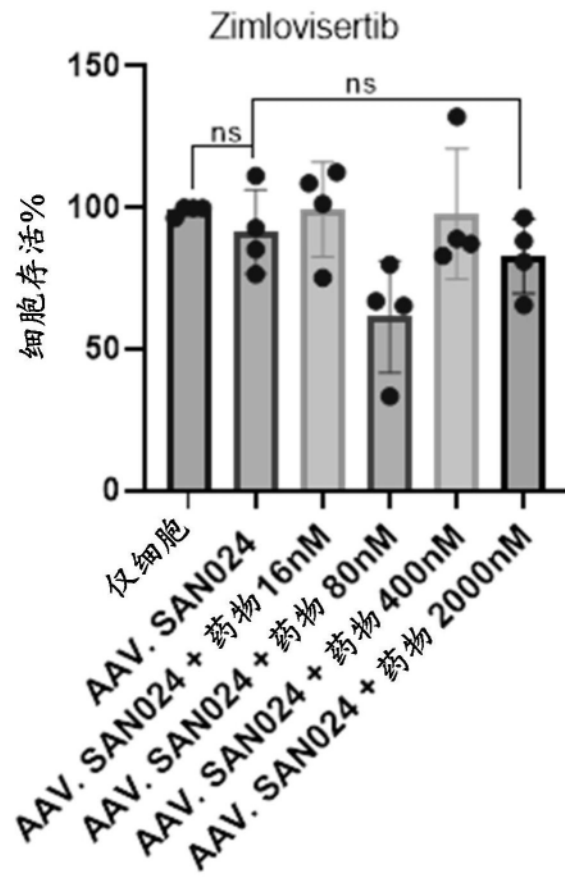


图4A

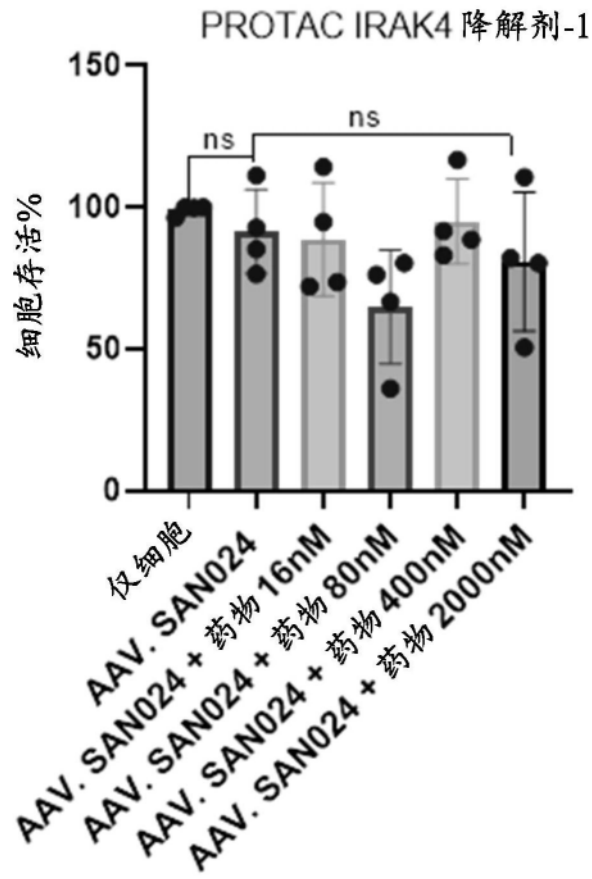


图4B

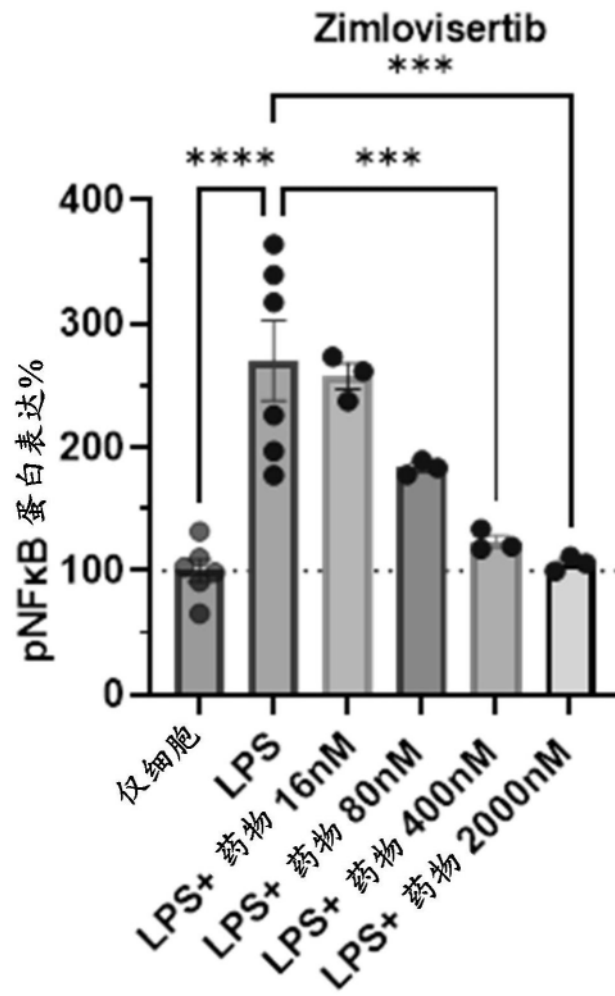


图5A

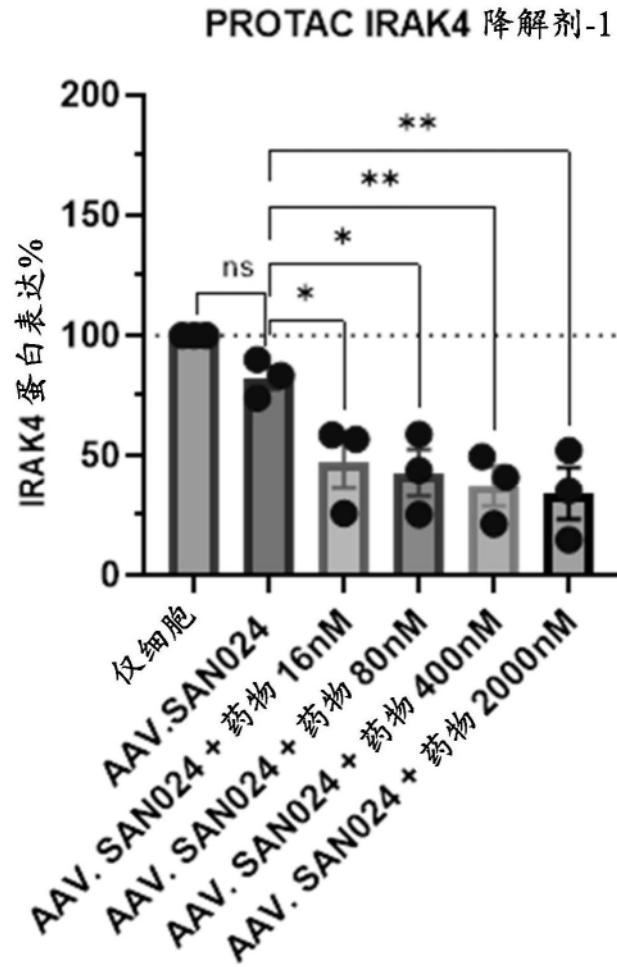


图5B

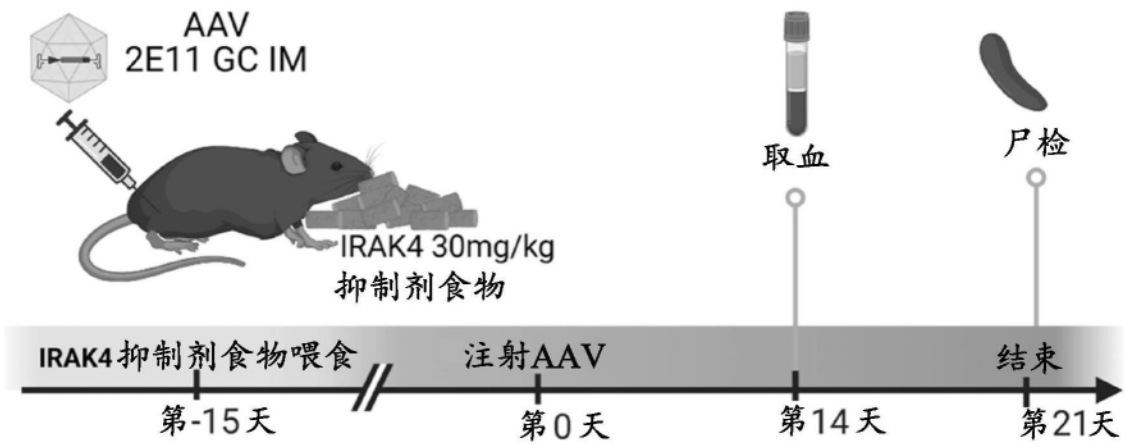


图6

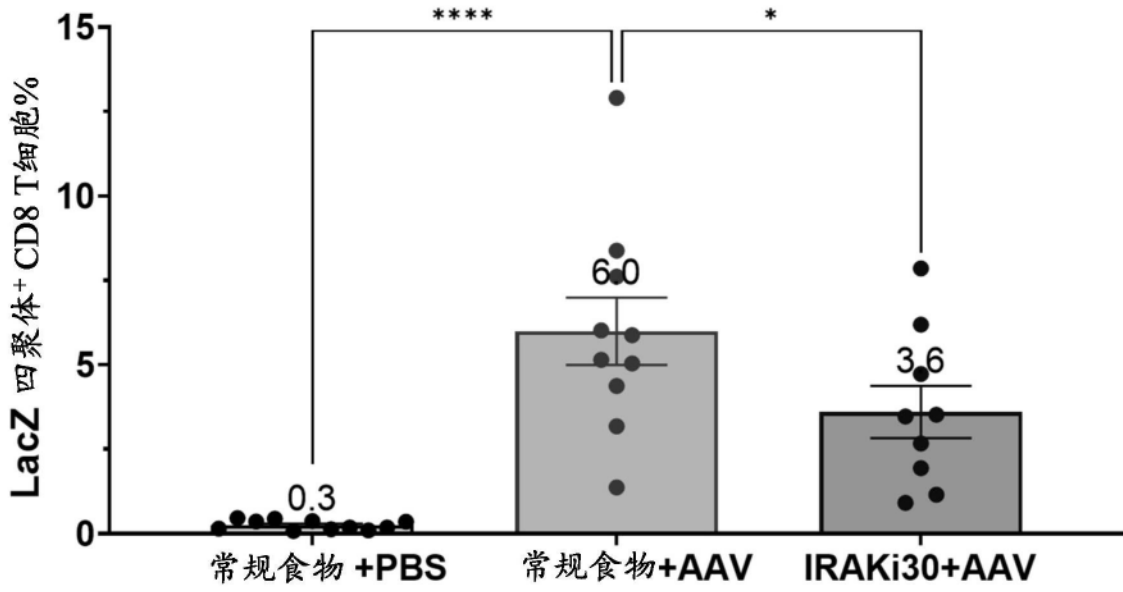


图7A

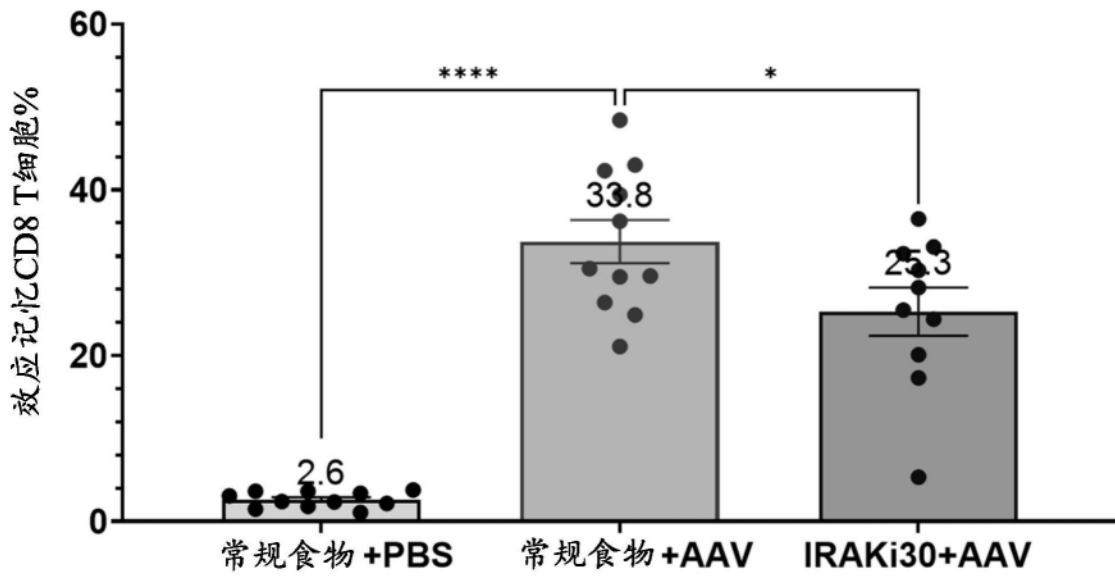


图7B

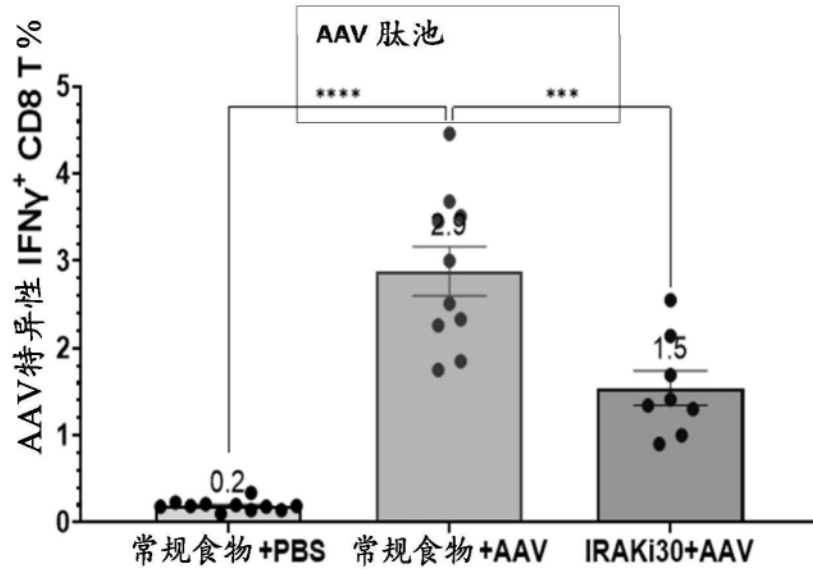


图8A

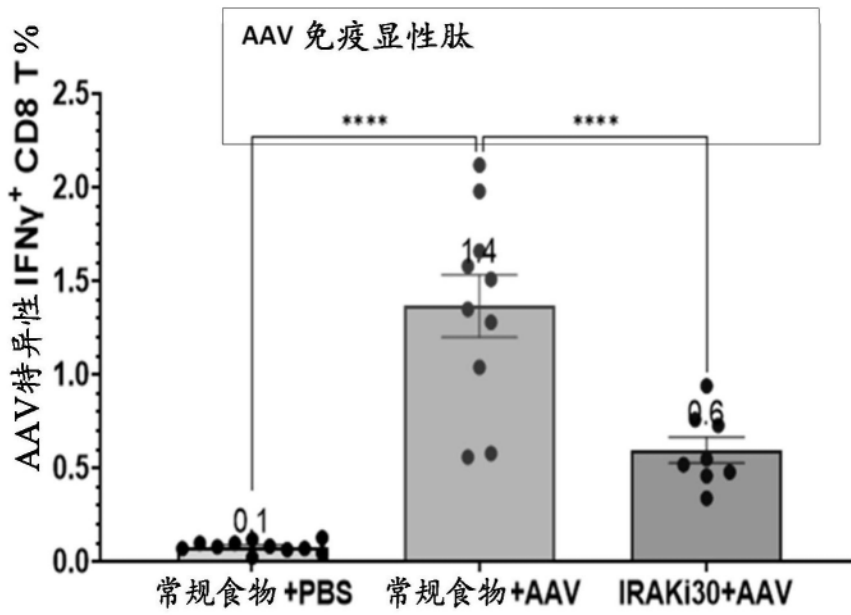


图8B

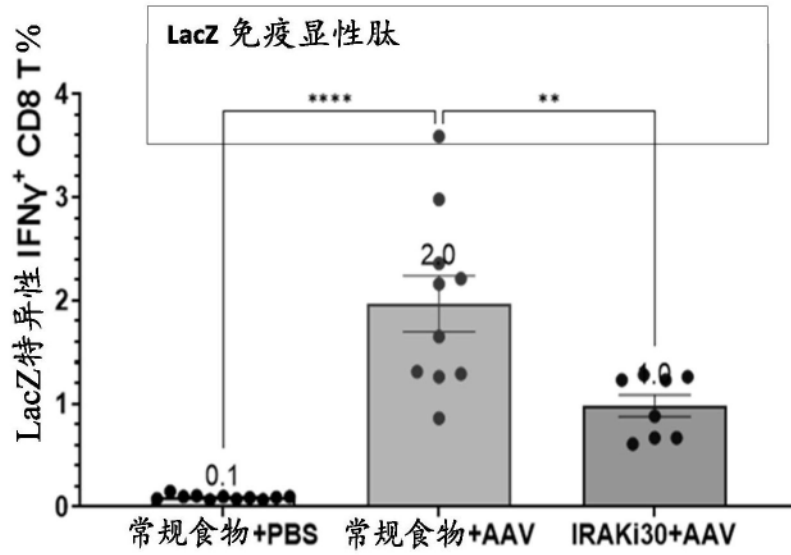


图8C

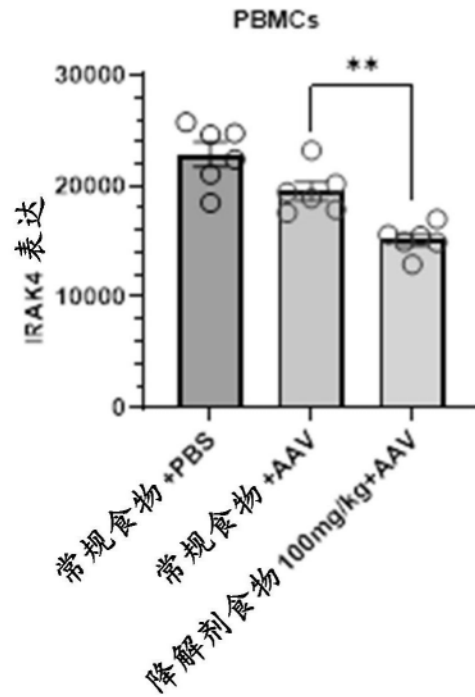


图9A

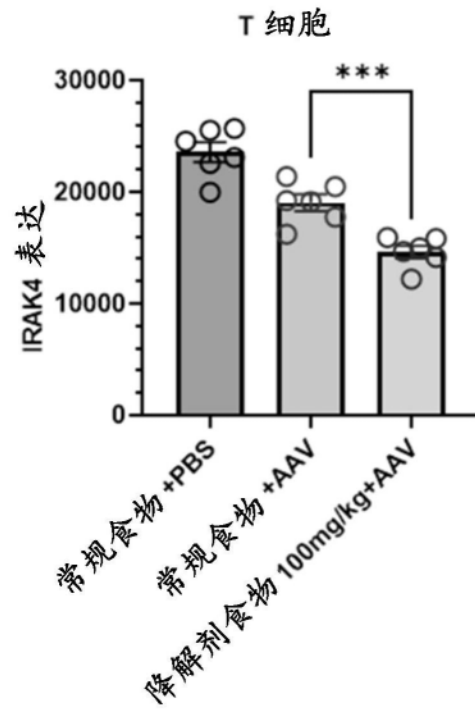


图9B

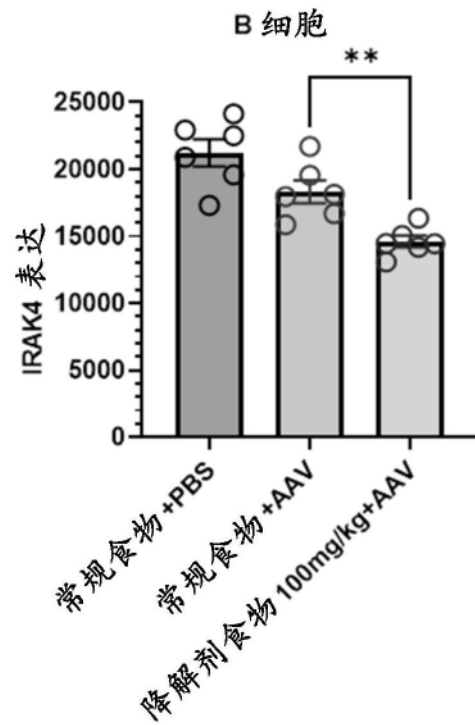


图9C

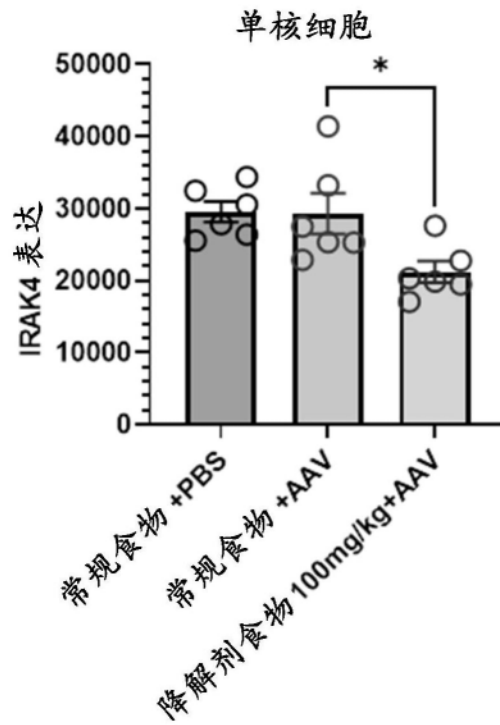


图9D

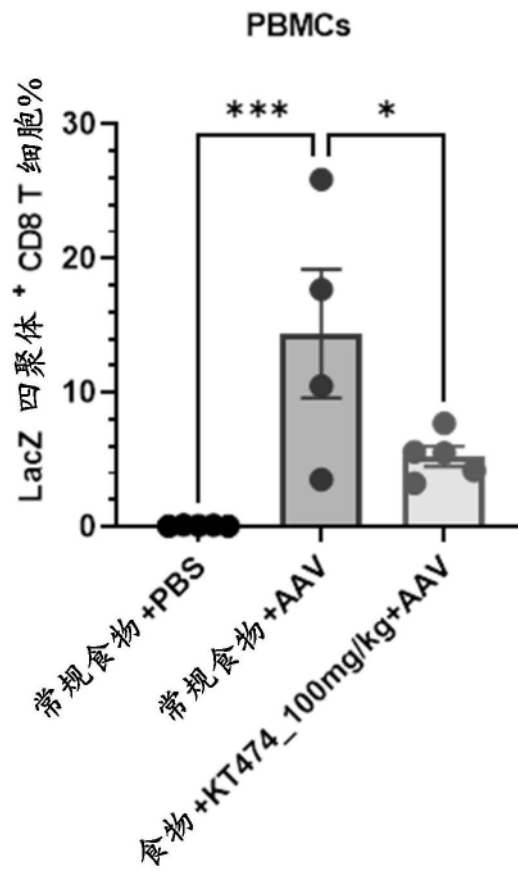


图10A

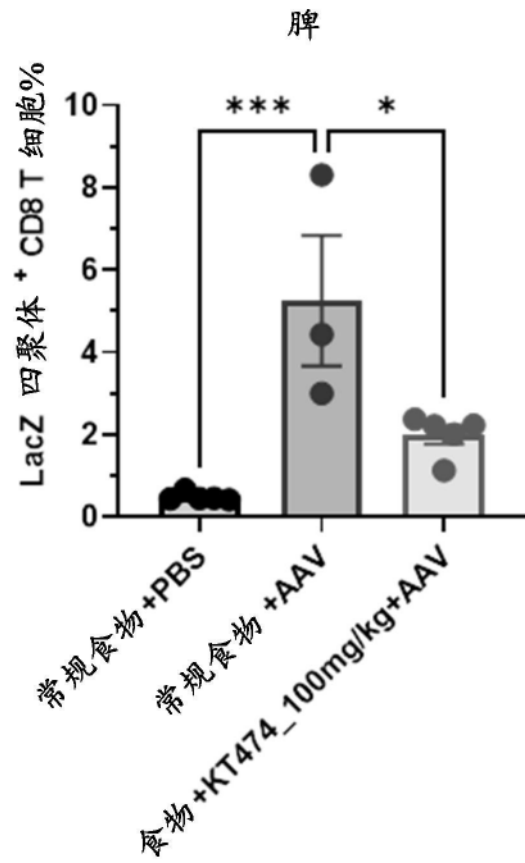


图10B

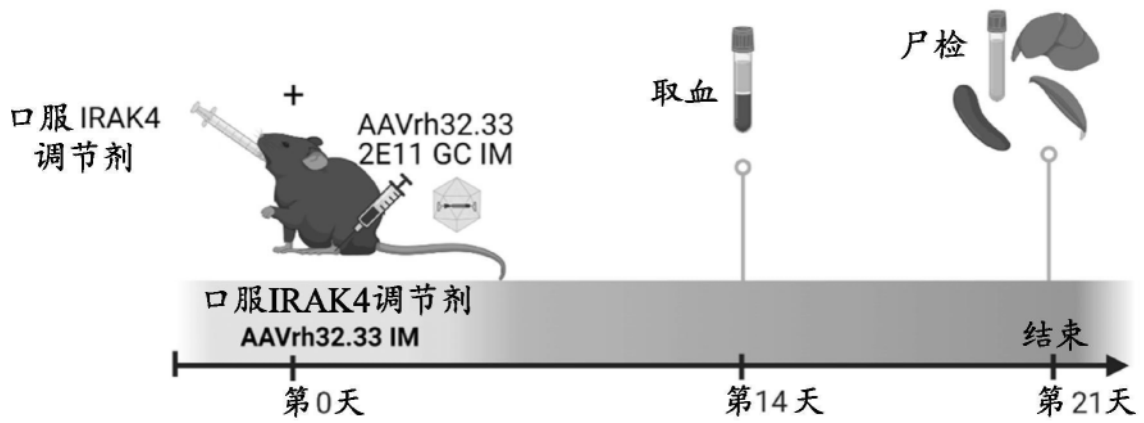


图11