



(21) 申請案號：112113696

(22) 申請日：中華民國 112 (2023) 年 04 月 12 日

(51) Int. Cl. :

A61K48/00 (2006.01)

A61K31/435 (2006.01)

A61K31/41 (2006.01)

A61K31/495 (2006.01)

A61K31/535 (2006.01)

A61K31/40 (2006.01)

C12N15/86 (2006.01)

(30) 優先權：2022/04/12

美國

63/330,245

(71) 申請人：美商健臻公司 (美國) GENZYME CORPORATION (US)

美國

(72) 發明人：喬杜里 索拉夫 CHOUDHURY, SOURAV ROY (IN)；莫特瓦尼 摩納 MOTWANI, MONA (IN)；穆勒 克利斯汀安 MUELLER, CHRISTIAN (US)；里德 約翰 REED, JOHN (US)

(74) 代理人：陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：98 項 圖式數：7 共 114 頁

(54) 名稱

IRAK4 調節劑於基因療法之用途(二)

(57) 摘要

本文提供了通過投予 IRAK 降解劑與基因療法以抑制對基因療法的先天免疫來增強個體的基因療法的方法。在一些實施例中，所述基因療法使用腺相關病毒(AAV)載體、腺病毒載體、慢病毒載體、單純皰疹病毒(HSV)載體或脂質奈米顆粒。本文還提供了用於選擇用 IRAK 降解劑與基因治療劑組合治療的個體的方法。

Provided herein are methods for enhancing gene therapy in an individual by administering an IRAK degrader with the gene therapy to suppress innate immunity to the gene therapy. In some embodiments, the gene therapy uses an adeno-associated virus (AAV) vector, an adenovirus vector, a lentivirus vector, a Herpes simplex virus (HSV) vector or a lipid nanoparticle. Also provided herein are methods for selecting an individual for treatment with an IRAK degrader in combination with a gene therapy agent.

指定代表圖：

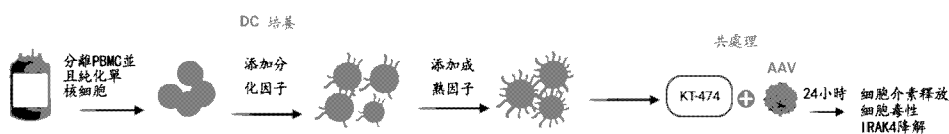


圖1

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 IRAK4調節劑於基因療法之用途(二)

【英文發明名稱】 USE OF AN IRAK4 MODULATORS FOR GENE THERAPY

### 【中文】

本文提供了通過投予IRAK降解劑與基因療法以抑制對基因療法的先天免疫來增強個體的基因療法的方法。在一些實施例中，所述基因療法使用腺相關病毒(AAV)載體、腺病毒載體、慢病毒載體、單純疱疹病毒(HSV)載體或脂質奈米顆粒。本文還提供了用於選擇用IRAK降解劑與基因治療劑組合治療的個體的方法。

### 【英文】

Provided herein are methods for enhancing gene therapy in an individual by administering an IRAK degrader with the gene therapy to suppress innate immunity to the gene therapy. In some embodiments, the gene therapy uses an adeno-associated virus (AAV) vector, an adenovirus vector, a lentivirus vector, a Herpes simplex virus (HSV) vector or a lipid nanoparticle. Also provided herein are methods for selecting an individual for treatment with an IRAK degrader in combination with a gene therapy agent.

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 IRAK4調節劑於基因療法之用途(二)

【英文發明名稱】 USE OF AN IRAK4 MODULATORS FOR GENE THERAPY

【技術領域】

【0001】 本發明涉及通過投予IRAK降解劑與基因療法以抑制對基因療法的先天免疫來增強個體的基因療法的方法。在一些態樣，本發明提供了選擇用IRAK降解劑與基因治療劑組合治療的個體的方法。

【先前技術】

【0002】 用於治療罕見遺傳疾病的基因療法成功在很大程度上依賴於腺相關病毒(AAV)病毒載體，所述AAV病毒載體提供了許多有吸引力的特徵，包括組織特異性向性、靜止期細胞的轉導和修飾基因表現的維持。然而，對AAV載體的免疫反應對成功的臨床轉化造成了重大挑戰。衣殼、病毒基因體以及轉基因觸發了涉及免疫系統先天和適應性免疫兩者的啟動的免疫反應。由TLR途徑啟動的先天性免疫系統隨後在暴露於病原體的人的B細胞和T細胞中引發適應性免疫反應(Iawaski, A和Medzhitov, R, *Nat Immunol* 2004 5(10):987-985)。基於幾項小鼠研究表明，識別富含CpG的低甲基化DNA的內體DNA感測器TLR9在AAV載體的基因體識別中起著重要作用。TLR9觸發的信號傳導級聯啟動適應性免疫反應，最終導致通過T細胞介導的細胞毒性清除轉基因誘導的細胞。缺乏TLR9感測器的小鼠顯示出更長的轉基因表現的維持和減弱的免疫反應(Ashley, SN等人, *Cell Immunol* 2019 Dec; 346:103997，和Faust SM等人, *J Clin Invest* 2013

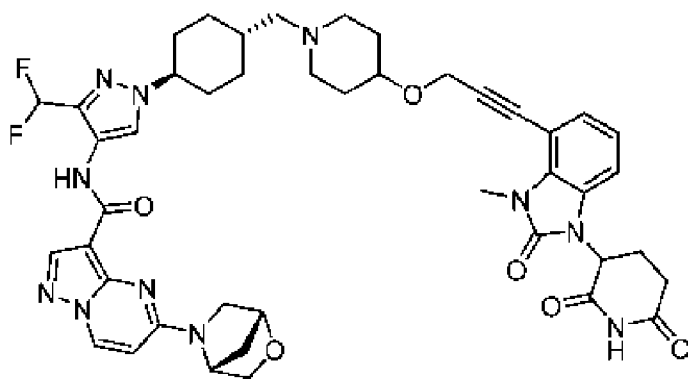
123(7):2994-3001)。與此一致，來自血友病臨床試驗的資料揭示，CpG鹼基總數的減少降低了對藥物免疫抑制劑的需求，並且顯示血友病患者的細胞毒性T淋巴細胞反應減少，而接受在他們的轉基因中含有更多CpG鹼基的載體的患者對免疫抑制劑的需求要大得多(Wright, *JF Mol. Ther.* 2020 28(3):701-703)。儘管廣泛作用的免疫抑制劑在臨床試驗中成功地改善了AAV的遞送，但它們仍然會導致轉基因表現的喪失並且存在副作用和機會性感染的風險。開發不含CpG鹼基的載體是一項挑戰，因為非密碼子優化的載體(即，不含或含低CpG含量的載體)顯示出較差的轉基因表現(Wright, *JF Mol. Ther.* 2020 28(3):701-703)。因此，需要的是不同類別的表現出增強的特異性和低副作用的免疫降解劑。

**【0003】** 將本文引用的所有參考文獻(包括專利申請和出版物)都通過引用以其整體併入。

### **【發明內容】**

**【0004】** 在一些態樣，本發明提供了用於將核酸遞送至個體的細胞的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。在一些態樣，本發明提供了用基因治療劑治療有需要的個體的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予所述基因治療劑。在一些態樣，本發明提供了用於改善個體的基因療法的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。在一些態樣，本發明提供了用於抑制對基因治療劑的免疫反應的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。

【0005】 在本發明的一些實施例中，IRAK降解劑調節IRAK蛋白激酶的活性或表現。在一些實施例中，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。在一些實施例中，IRAK降解劑調節IRAK-4蛋白激酶的活性或表現。在一些實施例中，IRAK降解劑包含式[I]的化合物：



[I]，

或其醫藥上可接受的鹽。

【0006】 在一些實施例中，基因治療劑包含病毒載體。在一些實施例中，病毒載體是AAV顆粒。在一些實施例中，AAV顆粒包含AAV1衣殼、AAV2衣殼、AAV3衣殼、AAV4衣殼、AAV5衣殼、AAV6衣殼、AAV7衣殼、AAV8衣殼、AAVrh8衣殼、AAV9衣殼、AAV10衣殼、AAVrh10衣殼、AAV11衣殼、AAV12衣殼、AAVrh32.33衣殼、AAV-XL32衣殼、AAV-XL32.1衣殼、AAV LK03衣殼、AAV2R471A衣殼、AAV2/2-7m8衣殼、AAV DJ衣殼、AAV DJ8衣殼、AAV2 N587A衣殼、AAV2 E548A衣殼、AAV2 N708A衣殼、AAV V708K衣殼、山羊AAV衣殼、AAV1/AAV2嵌合衣殼、牛AAV衣殼、小鼠AAV衣殼、rAAV2/HBoV1(嵌合AAV/人類博卡病毒屬病毒1)、AAV2HBKO衣殼、AAVPHP.B衣殼或AAVPHP.eB衣殼或其功能變體。在一些實施例中，AAV衣殼包含酪胺酸突變、肝素結合突變或HBKO突變。在一些實施例中，AAV病毒顆粒包含含有一種或多種末端反

向重複(ITR)的AAV基因體，其中所述一種或多種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。在一些實施例中，AAV顆粒的所述一種或多種ITR和所述衣殼源自相同的AAV血清型。在一些實施例中，AAV顆粒的所述一種或多種ITR和所述衣殼源自不同的AAV血清型。

**【0007】** 在一些實施例中，病毒載體是腺病毒顆粒。在一些實施例中，腺病毒顆粒包含來自以下的衣殼：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Ad3型、犬Ad2型、綿羊Ad或豬Ad3型或其功能變體。

**【0008】** 在一些實施例中，病毒載體是慢病毒顆粒。在一些實施例中，慢病毒顆粒經水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎病毒(LCMV)、羅斯河病毒(RRV)、伊波拉病毒、瑪律堡病毒、莫柯拉病毒(Mokala virus)、狂犬病毒、RD114或其功能變體假型化。

**【0009】** 在一些實施例中，病毒載體是單純疱疹病毒(HSV)顆粒。在一些實施例中，所述HSV顆粒是HSV-1顆粒或HSV-2顆粒或其功能變體。

**【0010】** 在一些實施例中，基因治療劑包含脂質奈米顆粒。

**【0011】** 在一些實施例中，基因治療劑包含編碼異源轉基因的核酸。在一些實施例中，異源轉基因可操作地連接至啟動子。在一些實施例中，啟動子是組成型啟動子、組織特異性啟動子或誘導型啟動子。

【0012】 在一些實施例中，在投予基因治療劑之前、同時或之後，投予 IRAK 降解劑。在一些實施例中，個體具有適合於通過基因療法治療的疾病或病症。在一些實施例中，疾病或病症是單基因病或病症。在一些實施例中，將基因治療劑靜脈內、腹膜內、動脈內、肌肉內、皮下或肝內投予。在一些實施例中，將 IRAK 降解劑口服、靜脈內、腹膜內、動脈內、肌肉內、皮下或肝內投予。

【0013】 在一些態樣，本發明提供了用於將核酸遞送至個體的細胞的方法，所述方法包括 a) 將來自所述個體的先天性免疫細胞與所述基因治療劑一起培育， b) 分析所述先天性免疫細胞的一種或多種細胞激素的表現，其中與所述基因治療劑一起培育後細胞激素特徵(cytokine signature)的表現鑒定出對基因治療劑具有先天免疫的個體， c) 向在步驟 b) 中鑒定出的所述個體投予 IRAK 降解劑，並且 d) 向在步驟 b) 中鑒定出的所述個體投予所述基因治療劑。在一些態樣，本發明提供了用於治療有需要的個體的方法，所述方法包括 a) 將來自所述個體的先天性免疫細胞與所述基因治療劑一起培育， b) 分析所述先天性免疫細胞的一種或多種細胞激素的表現，其中與所述基因治療劑一起培育後細胞激素特徵的表現鑒定出對基因治療劑具有先天免疫的個體， c) 向在步驟 b) 中鑒定出的所述個體投予 IRAK 降解劑，並且 d) 向在步驟 b) 中鑒定出的所述個體投予所述基因治療劑。在一些態樣，本發明提供了用於選擇用基因治療劑和 IRAK 降解劑治療的個體的方法，所述方法包括 a) 將來自所述個體的先天性免疫細胞與所述基因治療劑一起培育， b) 分析所述先天性免疫細胞的一種或多種細胞激素的表現，其中與所述基因治療劑一起培育後細胞激素特徵的表現鑒定出用基因治療劑和 IRAK 降解劑治療的個體， c) 選擇在步驟 b) 中鑒定出的所述個體用基因治療劑和 IRAK 降解劑治療。

【0014】 在一些實施例中，先天性免疫細胞是樹突細胞、單核細胞、巨噬細胞或自然殺手(NK)細胞。在一些實施例中，從來自所述個體的外周血單個核細胞中分離先天性免疫細胞。在一些實施例中，先天性免疫細胞是樹突細胞。在一些實施例中，所述樹突細胞源自個體的單核細胞。

【0015】 在一些實施例中，所述方法進一步包括從個體中分離單核細胞，並且在樹突細胞培養基中培育所述單核細胞以衍生來自所述單核細胞的樹突細胞，之後將樹突細胞與基因治療劑一起培育。在一些實施例中，單核細胞是CD14<sup>+</sup>單核細胞。在一些實施例中，將單核細胞用樹突細胞培養基培育約5至約10天或約7至約8天以衍生來自所述單核細胞的樹突細胞。在一些實施例中，在與步驟c)的所述基因治療劑一起培育之前將樹突細胞重新鋪板。在一些實施例中，將樹突細胞重新鋪板到微孔皿中。

【0016】 在一些實施例中，基因治療劑是病毒載體，並且其中將所述先天性免疫細胞與所述病毒載體以約 $1 \times 10^3$ 至約 $1 \times 10^5$ 或約 $1 \times 10^4$ 的MOI培育。在一些實施例中，基因治療劑是非病毒載體，並且其中將所述先天性免疫細胞與濃度為約1 ng/mL至約1 mg/mL的非病毒載體一起培育。在一些實施例中，將先天性免疫細胞與基因治療劑一起培育約12小時至約36小時或約24小時。

【0017】 在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的一種或多種的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表現增加。在一些實施例中，與合適的對照相比，細胞激素特徵中細胞激素的表現增加。在一些實施例中，合適的對照是來自未與基因治療劑一起培育的先天性免疫細胞的細胞激素特徵中細胞激素的表現，

或者其中合適的對照是來自與基因治療劑一起培育之前的先天性免疫細胞的細胞激素特徵中細胞激素的表現。

**【0018】** 在一些態樣，本發明提供了組合物在製造用於將核酸遞送至有需要的個體的細胞的藥劑中的用途，其中所述組合物包含基因治療劑，並且其中所述組合物被配製用於與IRAK降解劑組合使用。在一些態樣，本發明提供了組合物在製造用於將核酸遞送至有需要的個體的細胞的藥劑中的用途，其中所述組合物包含IRAK降解劑，並且其中所述組合物被配製用於與基因治療劑組合使用。在一些態樣，本發明提供了組合物在製造用於治療需要基因療法的個體的藥劑中的用途，其中所述組合物包含基因治療劑，並且其中所述組合物被配製用於與IRAK降解劑組合使用。在一些態樣，本發明提供了組合物在製造用於治療需要基因療法的個體的藥劑中的用途，其中所述組合物包含IRAK降解劑，並且其中所述組合物被配製用於與基因治療劑組合使用。在一些態樣，本發明提供了組合物在製造用於調節需要基因療法的個體對基因療法的免疫反應的藥劑中的用途，其中所述組合物包含基因治療劑，並且其中所述組合物被配製用於與IRAK降解劑組合使用。在一些態樣，本發明提供了組合物在製造用於調節個體對基因療法的免疫反應的藥劑中的用途，其中所述組合物包含IRAK降解劑，並且其中所述組合物被配製用於與基因治療劑組合使用。在一些實施例中，基因治療劑是AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒。在一些實施例中，IRAK降解劑是IRAK-4降解劑。

**【0019】** 在一些態樣，本發明提供了包含用於在將核酸遞送至有需要的個體的細胞中使用的基因治療劑的組合物，其中所述基因治療劑與IRAK降解劑組合使用。在一些態樣，本發明提供了包含用於在將核酸遞送至有需要的個體的

細胞中使用的IRAK降解劑的組合物，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑組合使用。在一些態樣，本發明提供了包含用於在治療需要基因療法的個體中使用的基因治療劑的組合物，其中所述基因治療劑與IRAK降解劑組合使用。在一些態樣，本發明提供了包含用於在治療需要基因療法的個體中使用的IRAK降解劑的組合物，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑組合使用。在一些態樣，本發明提供了包含用於調節需要基因療法的個體對基因療法的免疫反應的IRAK降解劑的組合物，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑組合使用。在一些態樣，本發明提供了包含用於抑制需要基因療法的個體對基因療法的免疫反應的IRAK降解劑的組合物，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑組合使用。在一些實施例中，基因治療劑是AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒。在一些實施例中，IRAK降解劑是IRAK-4降解劑。

**【0020】** 在一些實施例中，本發明提供了用於在本發明的方法中使用的套組。

#### **【圖式簡單說明】**

**【0021】** 圖1示出了評估IRAK4降解劑KT-474對用AAV處理的人類樹突細胞的影響的一般方案。

**【0022】** 圖2A-2C示出了AAV與KT-474的共處理導致抑制細胞激素釋放。圖2A示出了由單獨投予AAV或與各種濃度的KT-474一起投予誘導的細胞激素IL1b釋放。圖2B示出了由單獨投予AAV或與各種濃度的KT-474一起投予誘導的細胞激素IL6釋放。圖2C示出了由單獨投予AAV或與各種濃度的KT-474一起投予誘導的細胞激素TNFA釋放。

【0023】 圖3示出了KT-474的處理不引起原代人類單核細胞性樹突細胞中的細胞毒性。

【0024】 圖4示出了KT-474的處理引起原代人類單核細胞性樹突細胞中的IRAK4蛋白的降解。

【0025】 圖5示出了用於評估IRAK4降解劑KT-474對由AAV誘導的免疫反應的影響的體內小鼠實驗的示意圖。

【0026】 圖6A-6B示出了KT-474的治療減少轉基因LacZ特異性CD8 T細胞。圖6A示出了在注射AAV後第14天源自外周血的PBMC中轉基因LacZ特異性CD8 T細胞的減少。圖6B示出了在注射AAV後第21天脾臟中轉基因LacZ特異性CD8 T細胞的減少。

【0027】 圖7示出了評估口服投予IRAK4降解劑KT-474對由AAV誘導的免疫反應的影響的體內小鼠模型的總體示意圖。

### 【實施方式】

【0028】 相關申請的交叉引用

【0029】 本申請要求2022年4月12日提交的美國臨時申請序號63/330,245的優先權權益，將其通過引用以其整體併入。

【0030】 在一些態樣，本發明提供了用於將核酸遞送至個體的細胞的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，並且b) 投予包含核酸的基因治療劑。如本文所用，“基因治療劑”可以是要向個體投予的基因療法的治療性組分和/或載劑組分(例如，核酸(例如，封閉端DNA)、病毒載體(例如，AAV載體、腺病毒載體、慢病毒載體、HSV載體)、脂質奈米顆粒、抗體

的全部或部分(例如，奈米抗體、Fc區等)。在一些態樣，本發明提供了用包含基因治療劑的組合物治療有需要的個體的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。在一些態樣，本發明提供了用於改善個體的基因療法的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。在一些態樣，本發明提供了用於調節對基因治療劑的免疫反應的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。在一些態樣，本發明提供了用於抑制對基因治療劑的免疫反應的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。在一些態樣，本發明提供了用於誘導對基因治療劑的耐受性的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。

**【0031】** 在一些態樣，本發明提供了用於將核酸遞送至個體的細胞的方法，所述方法包括a) 將來自個體的先天性免疫細胞與基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)一起培育，b) 分析所述先天性免疫細胞的一種或多種細胞激素的表現，其中與所述基因治療劑一起培育後細胞激素特徵的表現鑒定出對基因治療劑具有免疫(例如，先天免疫、適應性免疫)的個體，c) 向在步驟b) 中鑒定的所述個體投予IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，並且d) 向在步驟b) 中鑒定的所述個體投予所述基因治療劑。在一些實施例中，先天性免疫細胞是樹突細胞、單核細胞、巨噬細胞或自然殺手(NK)細胞。在一些實施例中，所述方法進一步包括以下步驟：從個體中分離所述先天性免疫細胞，之後將先天性免疫細胞與基因治療劑一起培育。在一些實施例中，所述方法進一步包括以下步驟：從個體中分離單核細胞，並且在樹突細胞培養

基中培育所述單核細胞以衍生來自所述單核細胞的樹突細胞，之後將樹突細胞與基因治療劑一起培育。如本文所用，術語“衍生”樹突細胞包括細胞(例如，單核細胞)分化以產生樹突細胞。

**【0032】** 在一些態樣，本發明提供了用於治療有需要的個體的方法，所述方法包括a) 將來自個體的先天性免疫細胞與基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)一起培育，b) 分析所述先天性免疫細胞的一種或多種細胞激素的表現，其中與所述基因治療劑一起培育後細胞激素特徵的表現鑒定出對基因治療劑具有免疫(例如，先天免疫、適應性免疫)的個體，c) 向在步驟b) 中鑒定出的所述個體投予IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，並且d) 向在步驟b) 中鑒定出的所述個體投予所述基因治療劑。在一些實施例中，先天性免疫細胞是樹突細胞、單核細胞、巨噬細胞或自然殺手(NK)細胞。在一些實施例中，所述方法進一步包括以下步驟：從個體中分離所述先天性免疫細胞，之後將先天性免疫細胞與基因治療劑一起培育。在一些實施例中，所述方法進一步包括以下步驟：從個體中分離單核細胞，並且在樹突細胞培養基中培育所述單核細胞以衍生來自所述單核細胞的樹突細胞，之後將樹突細胞與基因治療劑一起培育。

**【0033】** 在一些態樣，本發明提供了用於選擇用基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)和IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)治療的個體的方法，所述方法包括a) 將來自所述個體的先天性免疫細胞與所述基因治療劑一起培育，b) 分析所述先天性免疫細胞的一種或多種細胞激素的表現，其中與所述基因治療劑一起培育後細胞激素特徵的表現鑒定出用基因治療劑和IRAK降解劑治療的個體，c) 選擇在步驟b) 中鑒定出的所

述個體用基因治療劑和IRAK降解劑治療。在一些實施例中，所述方法進一步包括以下步驟：d) 向在步驟b) 中鑒定出的個體投予IRAK降解劑，並且e) 向在步驟b) 中鑒定出的個體投予基因治療劑。在一些實施例中，先天性免疫細胞是樹突細胞、單核細胞、巨噬細胞或自然殺手(NK)細胞。在一些實施例中，所述方法進一步包括以下步驟：從個體中分離所述先天性免疫細胞，之後將先天性免疫細胞與基因治療劑一起培育。在一些實施例中，所述方法進一步包括以下步驟：從個體中分離單核細胞，並且在樹突細胞培養基中培育所述單核細胞以衍生來自所述單核細胞的樹突細胞，之後將樹突細胞與基因治療劑一起培育。

### 通用技術

【0034】 本文所述或參考的技術和程式通常是本領域技術人員很好理解和使用常規方法通常使用的，例如像在以下文獻中所述的廣泛使用的方法：*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook等人, 第4版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012)；*Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, 等人編輯, 2003)；叢書*Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.)；*PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames 和G.R. Taylor編輯, 1995)；*Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow和Lane, 編輯, 1988)；*Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 第6版, J. Wiley and Sons, 2010)；*Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, 編輯, 1984)；*Methods in Molecular Biology*, Humana Press；*Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, 編輯, Academic Press, 1998)；*Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather和P.E. Roberts, Plenum Press, 1998)；*Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, 和

D.G. Newell, 編輯, J. Wiley and Sons, 1993-8) ; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir和C.C. Blackwell, 編輯, 1996) ; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller和M.P. Calos, 編輯, 1987) ; *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis等人, 編輯, 1994) ; *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan等人, 編輯, 1991) ; *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel等人, 編輯, J. Wiley and Sons, 2002) ; *Immunobiology* (C.A. Janeway等人, 2004) ; *Antibodies* (P. Finch, 1997) ; *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., 編輯, IRL Press, 1988-1989) ; *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd和C. Dean, 編輯, Oxford University Press, 2000) ; *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow和D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999) ; *The Antibodies* (M. Zanetti和J. D. Capra, 編輯, Harwood Academic Publishers, 1995) ; 和 *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita等人, 編輯, J.B. Lippincott Company, 2011)。

### 定義

【0035】如本文所用，術語“降解劑”是異雙功能化合物，其以可測量的親和力結合和/或抑制IRAK激酶和E3連接酶兩者，導致IRAK激酶的泛素化和隨後的降解。在某些實施例中，降解劑的DC<sub>50</sub>小於約50 μM、小於約1 μM、小於約500 nM、小於約100 nM、小於約10 nM或小於約1 nM。如本文所用，術語“單價”是指沒有附加的E3連接酶結合部分的降解劑化合物。

【0036】如本文所用，關於IRAK的術語“抑制劑”是以可測量的親和力結合和/或抑制IRAK激酶的化合物。在某些實施例中，抑制劑的IC<sub>50</sub>和/或結合常數小於約50 μM、小於約1 μM、小於約500 nM、小於約100 nM、小於約10 nM或小於

約1 nM。

【0037】如本文所用，關於IRAK的術語“調節劑”是刺激、延遲、抑制和/或阻抑(完全地或部分地)IRAK激酶活性的化合物。

【0038】如本文所用，術語“基因治療劑”是指核酸(例如，表現構建體、miRNA、反義、shRNA、siRNA)或核酸與用於將核酸遞送至個體或細胞以修飾或操縱個體或細胞中的一種或多種核酸(例如，基因、mRNA)的表現以改變活細胞的生物特性的藥劑的組合。基因治療劑的例子包括但不限於病毒載體(例如，腺相關病毒、腺病毒、慢病毒、單純疱疹病毒、桿狀病毒)、細菌載體和非病毒載體(例如，包封包含治療性核酸和/或編碼治療性多肽的治療性核酸或質體DNA(例如，封閉端DNA)的脂質奈米顆粒)。

【0039】如本文所用，術語“基因治療劑”是指用於將核酸遞送至個體或細胞以修飾或操縱個體或細胞中的一種或多種基因的表現以改變活細胞的生物特性的藥劑。基因治療劑的例子包括但不限於病毒載體(例如，腺相關病毒、腺病毒、慢病毒、單純疱疹病毒、桿狀病毒)、細菌載體和非病毒載體(例如，包封包含治療性核酸和/或編碼治療性多肽的治療性核酸或質體DNA的脂質奈米顆粒)。

【0040】如本文所用，“載體”是指包含有待在體外或在體內遞送至宿主細胞中的核酸的重組質體或病毒。

【0041】如本文所用，術語“多核苷酸”或“核酸”是指任何長度的核苷酸(核糖核苷酸或去氧核糖核苷酸)聚合形式。因此，此術語包括但不限於單股、雙股或多股DNA或RNA；基因體DNA；cDNA；DNA-RNA雜合體；或者包含嘌呤和嘧啶鹼基或其他天然的核苷酸鹼基、經化學修飾的或經生化修飾的核苷酸鹼基、

非天然的核苷酸鹼基或衍生的核苷酸鹼基的聚合物。核酸的骨架可以包含糖和磷酸基團(如通常可以在RNA或DNA中發現的)或者經修飾的或經取代的糖或磷酸基團。可替代地，核酸的骨架可以包含合成亞基(如胺基磷酸酯)的聚合物，並且因此可以是寡去氧核苷胺基磷酸酯(P-NH<sub>2</sub>)或混合的胺基磷酸酯-磷酸二酯寡聚物。另外，雙股核酸可以從化學合成的單股多核苷酸產物通過合成互補股並在適當的條件下使股退火或者通過使用DNA聚合酶用適當的引物從頭合成互補股來獲得。

**【0042】** 術語“多肽”和“蛋白質”可互換使用以指代胺基酸殘基的聚合物，並且不限於最小長度。胺基酸殘基的此類聚合物可含有天然或非天然胺基酸殘基，並且包括但不限於胺基酸殘基的肽、寡肽、二聚體、三聚體和多聚體。所述定義涵蓋全長蛋白質及其片段兩者。所述術語還包括多肽的轉譯後修飾，例如糖基化、唾液酸化、乙醯化、磷酸化等。此外，出於本發明的目的，“多肽”是指相對於天然序列包括修飾(如缺失、添加和取代)的蛋白質(通常在本質上是保守的)，只要該蛋白質保持所希望的活性即可。這些修飾可能是故意的(如通過定點誘變)，或者可能是偶然的(諸如通過產生蛋白質的宿主的突變或由於PCR擴增引起的錯誤)。

**【0043】** “重組病毒載體”是指包含一個或多個異源序列(即，非病毒來源的核酸序列)的重組多核苷酸載體。在重組AAV載體的情況下，重組核酸側接至少一個(例如，兩個)末端反向重複序列(ITR)。

**【0044】** “重組AAV載體(rAAV載體)”是指包含側接至少一個(例如，兩個)AAV末端反向重複序列(ITR)的一個或多個異源序列(即，非AAV來源的核酸序列)的多核苷酸載體。當此類rAAV載體存在於已感染合適的輔助病毒(或所述

輔助病毒表現合適的協助工具)並且正在表現AAV rep和cap基因產物(即AAV Rep和Cap蛋白)的宿主細胞中時，所述rAAV載體可以被複製並包裝在感染性病毒顆粒中。當將rAAV載體摻入較大多核苷酸中(例如，在染色體中或在用於選殖或轉染的另一種載體如質體中)時，則rAAV載體可稱為“前載體”，其可以通過在AAV包裝功能和合適協助工具的存在下複製和衣殼化被“挽救”。rAAV載體可以呈多種形式中的任何一種，包括但不限於質體、線性人工染色體、與脂質複合、包封在脂質體內和(在多個實施例中)衣殼化於病毒顆粒(特別是AAV顆粒)中。rAAV載體可以被包裝在AAV病毒衣殼中，以產生“重組腺相關病毒顆粒(rAAV顆粒)”。

**【0045】** “rAAV病毒”或“rAAV病毒顆粒”是指由至少一種AAV衣殼蛋白和衣殼化的rAAV載體基因體組成的病毒顆粒。

**【0046】** “重組腺病毒載體”是指包含側接至少一個腺病毒末端反向重複序列(ITR)的一個或多個異源序列(即，非腺病毒來源的核酸序列)的多核苷酸載體。在一些實施例中，重組核酸側接兩個末端反向重複序列(ITR)。當存在於表現從重組病毒基因體缺失的必要腺病毒基因(例如，E1基因、E2基因、E4基因等)的宿主細胞中時，此類重組病毒載體可以被複製並包裝在感染性病毒顆粒中。當將重組病毒載體摻入較大多核苷酸(例如，在用於選殖或轉染的染色體或另一種載體如質體中)時，重組病毒載體可稱為“前載體”，其可通過在腺病毒包裝功能的存在下複製和衣殼化而被“挽救”。重組病毒載體可以是多種形式中的任何一種，包括但不限於質體、線性人工染色體、與脂質複合、包封在脂質體內、和衣殼化於病毒顆粒(例如腺病毒顆粒)中。可將重組病毒載體包裝在腺病毒衣殼中以產生“重組腺病毒顆粒”。

**【0047】** “重組慢病毒載體”是指包含側接至少一個慢病毒末端重複序列(LTR)的一個或多個異源序列(即，非慢病毒來源的核酸序列)的多核苷酸載體。在一些實施例中，重組核酸側接兩個慢病毒末端重複序列(LTR)。當存在於已經感染合適協助工具的宿主細胞中時，此類重組病毒載體可以被複製並且包裝在感染性病毒顆粒中。可將重組慢病毒載體包裝在慢病毒衣殼中以產生“重組慢病毒顆粒”。

**【0048】** “重組單純疱疹載體(重組HSV載體)”是指包含側接HSV末端重複序列的一個或多個異源序列(即，非HSV來源的核酸序列)的多核苷酸載體。當存在於已經感染合適協助工具的宿主細胞中時，此類重組病毒載體可以被複製並且包裝在感染性病毒顆粒中。當將重組病毒載體摻入較大多核苷酸(例如，在用於選殖或感染的染色體或另一種載體如質體中)時，重組病毒載體可稱為“前載體”，其可通過在HSV包裝功能的存在下複製和衣殼化而被“挽救”。重組病毒載體可以是多種形式中的任何一種，包括但不限於質體、線性人工染色體、與脂質複合、包封在脂質體內、和衣殼化於病毒顆粒(例如HSV顆粒)中。可將重組病毒載體包裝在HSV衣殼中以產生“重組單純疱疹病毒顆粒”。

**【0049】** 如本文所用，“固體脂質奈米顆粒”(SLN、sLNP)或“脂質奈米顆粒”(LNP)是指由脂質構成的奈米顆粒。在一些例子中，只有一層磷脂層並且顆粒內部的大部分由親脂性物質構成。諸如核酸的有效載荷可以嵌入內部。在一些例子中，脂質奈米顆粒是脂質體，其包含脂質雙層。

**【0050】** [如本文所用，涉及基因療法時的術語“改善”可以指推進、加強、延長或以其他方式增加基因治療劑的治療性基因有效載荷的表現的行為。在一些實施例中，改善的基因療法是指其中和不與IRAK調節劑一起投予的基因療法

相比，與IRAK調節劑一起投予的基因治療劑的治療性基因有效載荷的表現增加大於約10%、25%、50%、75%或100%中任一個的基因療法。在一些實施例中，改善的基因療法是指其中和不與IRAK降解劑一起投予的基因療法相比，與IRAK降解劑一起投予的基因治療劑的治療性基因有效載荷的表現時間延長了大於約10%、25%、50%、75%或100%中任一個的基因療法。在一些例子中，通過減少對基因治療劑的免疫反應(例如，先天性免疫反應)改善基因療法。在一些實施例中，改善的基因療法是指其中和不與IRAK降解劑一起投予的基因療法相比，對與IRAK降解劑一起投予的基因治療劑的免疫反應減少大於約10%、25%、50%、75%或100%中任一個的基因療法。在一些實施例中，將對基因治療劑的免疫反應的減少測量為與在不存在IRAK降解劑的情況下基因治療劑暴露於免疫細胞相比，在存在IRAK降解劑的情況下基因治療劑暴露於免疫細胞後細胞激素特徵的減少。

**【0051】** 如本文所用，提及基因療法時的術語“調節”可以指改變、變動、變化、改善或以其他方式修飾基因治療劑的存在或活性的行為。例如，調節對基因治療劑的免疫反應可以指代導致改變、變動、變化、改善或以其他方式修飾對基因治療劑的免疫反應(例如，減少、延遲和/或消除對基因治療劑的免疫反應(例如，先天性免疫反應))的任何行為。

**【0052】** 如本文所用，涉及對基因治療劑的免疫反應(例如，先天性免疫反應)時的術語“細胞激素特徵”是指在先天性免疫細胞暴露於基因治療劑後一種或多種細胞激素的表現增加。在一些例子中，細胞激素特徵的細胞激素是TLR途徑(例如，TLR2、TLR3、TLR4或TLR9途徑)特有的。

**【0053】** 先天性免疫細胞是介導先天免疫的白血細胞，並且包括嗜鹼性粒

細胞、樹突細胞、嗜酸性粒細胞、朗格漢斯細胞、肥大細胞、單核細胞和巨噬細胞、嗜中性粒細胞和NK細胞。不同的AAV衣殼可以以不同的效率(通常稱為轉導效率)進入這些先天性免疫細胞。一些血清型(如AAV1)能有效地轉導某些免疫細胞(像單核細胞)，而像AAV6的其他AAV能有效地轉導諸如樹突細胞的細胞(Grimm, D等人, *J. Virol.*, 2008, 82(12):5887-5911)。AAV進入細胞後可以引發免疫反應。該免疫反應的程度取決於AAV血清型和細胞類型。一旦AAV轉導宿主免疫細胞，它們就可以接合諸如TLR(例如，TLR9)的免疫受體。幾項使用小鼠模型的研究揭示，TLR9是參與AAV免疫原性的關鍵DNA感測器(Zhu, J等人, *J Clin Invest.* 2009;119(8):2388-2398; Ashley SN等人, *Cell. Immunol.* 2019, 346:103997)。一旦這些TLR被病毒啟動，它們就會分泌細胞激素，在受感染的細胞內建立抗病毒狀態並且警示鄰近細胞。(Carty, M和Bowie, AG, *Clin Exp Immunol*, 2010, 161(3):397-406; Lester, SN和Li, K, *J Mol Biol.* 2014; 426(6):1246-1264; Fitzgerald, KA和Kagan, JC, *Cell*, 2020 180(6):1044-1066)。

**【0054】** 這些細胞激素還負責啟動包含B細胞和T細胞的適應性免疫系統，所述B細胞和T細胞產生抗體並且產生細胞毒性以分別殺死病毒感染的細胞。如本文所用，細胞激素的某些亞群的上調或下調稱為“細胞激素特徵”。這些包含三種或更多種細胞激素的細胞激素特徵可以用作疾病和療法成功的預測標記物。細胞激素特徵的例子見於Zuniga, J等人, *Int. J. Infect. Diseases*, 2020, 94:4-11, Bergamaschi, C等人, *Cell Reports*, 2021, 36:109504; Del Valle, DM等人, *Nat. Med.* 2020, 26:1636-1643。

**【0055】** “異源的”意指源自基因型不同於其所比較或其所引入或摻入的實體的其餘部分的實體。例如，通過基因工程技術引入不同細胞類型中的核酸

是異源核酸(並且在表現時可以編碼異源多肽)。類似地，摻入病毒載體中的細胞序列(例如，基因或其部分)就該載體而言是異源核苷酸序列。

**【0056】** 術語“轉基因”是指引入細胞中並且能夠被轉錄成RNA並且任選地在適當條件下轉譯和/或表現的核酸。在多個態樣，它賦予其所引入的細胞所需的特性，或以其他方式產生所需的治療或診斷結局。在另一個態樣，它可以被轉錄成介導RNA干擾的分子，如siRNA。

**【0057】** 如關於病毒滴度使用的術語“基因體顆粒(gp)”、“基因體當量”或“基因體拷貝”是指含重組AAV DNA基因體的病毒粒子的數量，與感染性或功能性無關。特定載體製劑中基因體顆粒的數量可以通過諸如本文實例實例中或例如Clark等人 (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039；Veldwijk等人 (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278中所述的程式來測量。

**【0058】** 如關於病毒滴度使用的術語“感染單位(iu)”、“感染性顆粒”或“複製單位”是指感染性和複製型重組AAV載體顆粒的數量，如通過感染中心測定(也稱為複製中心測定)測量的，如例如McLaughlin等人 (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973中所述。

**【0059】** 如關於病毒滴度使用的術語“轉導單位(tu)”是指導致產生功能轉基因產物的感染性重組AAV載體顆粒的數量，如在功能測定中測量的，如本文實例中或例如以下文獻中所述：Xiao等人 (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124；或Fisher等人 (1996) *J. Virol.*, 70:520-532(LFU測定)。

**【0060】** “末端反向重複”或“ITR”序列是本領域中熟知的術語，並且是指在病毒基因體末端發現的處於相反方向的相對較短的序列。

**【0061】** “AAV末端反向重複(ITR)”序列是本領域中熟知的術語，是存在於

天然單股AAV基因體的兩端處的大約145個核苷酸的序列。ITR的最外側的125個核苷酸能以兩個可替代的方向中的任一個存在，導致不同AAV基因體之間以及單個AAV基因體兩端之間的異質性。最外側的125個核苷酸也含有幾個較短的自身互補性區域(指定為A、A'、B、B'、C、C'和D區)，使得在ITR的這個部分內發生股內鹼基配對。

**【0062】** “末端解股序列”或“trs”是AAV ITR的D區中的序列，其在病毒DNA複製期間被AAV rep蛋白切割。突變體末端解股序列難以被AAV rep蛋白切割。“AAV協助工具”是指允許AAV被宿主細胞複製和包裝的功能。AAV協助工具可以按多種形式中的任一種提供，包括但不限於協助AAV複製和包裝的輔助病毒或輔助病毒基因。其他AAV協助工具在本領域中是已知的，如基因毒性劑。

**【0063】** “AAV協助工具”是指允許AAV被宿主細胞複製和包裝的功能。AAV協助工具可以按多種形式中的任一種提供，包括但不限於協助AAV複製和包裝的輔助病毒或輔助病毒基因。其他AAV協助工具在本領域中是已知的，如基因毒性劑。

**【0064】** AAV的“輔助病毒”是指允許AAV(其是缺陷型細小病毒)被宿主細胞複製和包裝的病毒。已經鑒定了多種此類輔助病毒，包括腺病毒、疱疹病毒、痘病毒(如牛痘)和桿狀病毒。腺病毒涵蓋多種不同子群，但子群C的5型腺病毒(Ad5)是最常用的。人、非人哺乳動物和鳥類來源的許多腺病毒是已知的，並且可從如ATCC等保藏機構獲得。也可從如ATCC等保藏機構獲得的疱疹家族病毒包括例如單純疱疹病毒(HSV)、愛潑斯坦-巴爾(Epstein-Barr)病毒(EBV)、巨細胞病毒(CMV)和假狂犬病毒(PRV)。可從保藏機構獲得的桿狀病毒包括苜蓿銀紋夜蛾(*Autographa californica*)核型多角體病毒。

**【0065】** 將關於參考多肽或核酸序列的“序列同一性百分比(%)”定義為在比對序列並引入空位(如果需要)以實現最大序列同一性百分比並且不將任何保守取代視為序列同一性的一部分之後，候選序列中與參考多肽或核酸序列中的胺基酸殘基或核苷酸相同的胺基酸殘基或核苷酸的百分比。用於確定胺基酸或核酸序列同一性百分比的目的的比對可以用在本領域技術範圍內的多種方式實現，例如使用可公開獲得的電腦軟體程式，例如Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人, 編輯, 1987), 增刊30, 第7.7.18章, 表7.7.1中描述的那些，並且包括BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)軟體。潛在的比對程式是ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, 賓夕法尼亞州)。本領域技術人員可以確定用於測量比對的適當參數，包括在所比較序列的全長上實現最大比對所需的任何演算法。出於本文目的，給定胺基酸序列A和、與或相對於給定胺基酸序列B的胺基酸序列同一性%(其可替代地表述為給定胺基酸序列A和、與或針對給定胺基酸序列B具有或包含一定胺基酸序列同一性%)計算如下：100乘以分數 $X/Y$ ，其中X是通過序列比對程式在A與B的該程式比對中評定為相同匹配的胺基酸殘基數，並且其中Y是B中胺基酸殘基的總數。可以理解，當胺基酸序列A的長度不等於胺基酸序列B的長度時，A與B的胺基酸序列同一性%將不等於B與A的胺基酸序列同一性%。出於本文目的，給定的核酸序列C和、與或針對給定的核酸序列D的核酸序列同一性%(其可替代地表述為給定的核酸序列C和、與或針對給定的核酸序列D具有或包含一定核酸序列同一性%)計算如下：100乘以分數 $W/Z$ ，其中W是通過序列比對程式在C與D的程式比對中評定為相同匹配的核苷酸的數量，並且其中Z是D中核苷酸的總數。可以理解，當核酸序列C的長度不等於核酸序列D的長度時，C與D的核酸序列同一性%將不等於D與C的核

酸序列同一性%。

**【0066】** 藥劑的“有效量”是指在必要的劑量和時間段內有效實現所需治療結果的量。例如，基因治療劑的有效量是指在必要的劑量和時間段內有效實現所需基因治療結果的量。在另一個例子中，IRAK降解劑的有效量可以指在必要的劑量和時間段內有效實現改善的基因療法的所需結果的量。

**【0067】** 本發明的物質/分子(例如，基因治療劑和/或IRAK降解劑)的“治療有效量”可根據諸如個體的疾病狀態、年齡、性別和體重，以及物質/分子、激動劑或拮抗劑在個體中引發所需反應的能力等因素而變化。治療有效量也是其中治療上有益的效果超過物質/分子的任何毒性或有害影響的量。

**【0068】** 提及細胞激素特徵時的術語“合適的對照”是來自未與所述基因治療劑一起培育的先天性免疫細胞的細胞激素特徵中細胞激素的表現或來自與所述基因治療劑一起培育之前的先天性免疫細胞的細胞激素特徵中細胞激素的表現。

**【0069】** 涉及基因治療劑和IRAK降解劑時的“組合”投予包括將基因治療劑和IRAK降解劑以任意順序同時(並行)和連續或依序投予。

**【0070】** 術語“並行”在本文用於指基因治療劑和IRAK降解劑的投予，其中至少部分投予在時間上重疊。因此，並行投予包括當基因治療劑或IRAK降解劑的投予在停止投予另一種藥劑/降解劑後繼續進行時的用劑方案。

**【0071】** 如本文所用，術語“與.....結合”是指除了一種治療模式之外還投予另一種治療模式。因此，“與.....結合”是指在向個體投予一種治療模式之前、期間或之後投予另一種治療模式(基因治療劑或IRAK降解劑)。

**【0072】** “分離的”分子(例如，核酸或蛋白質)或細胞意指所述分子或細胞

已經從其天然環境的組分中得以鑒定並分離和/或回收。

**【0073】** 本文對“約”某一值或參數的提及包括(並描述)涉及該值或參數本身的實施例。例如，提及“約X”的描述包括“X”的描述。

**【0074】** 除非另外指示，否則如本文所用，冠詞的單數形式“一個/一種(a)”、“一種/一種(an)”和“所述(the)”包括複數指示物。

**【0075】** 應理解，本文所述的本發明的態樣和實施例包括“包含多個態樣和實施例”、“由多個態樣和實施例組成”和/或“基本上由多個態樣和實施例組成”。

## 治療方法

**【0076】** 在一些態樣，本發明提供了用於將核酸遞送至個體的細胞的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。在一些態樣，本發明提供了用於治療有需要的個體的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。在一些態樣，本發明提供了用於改善個體的基因療法的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。在一些態樣，本發明提供了用於調節對基因治療劑的免疫反應的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。在一些態樣，本發明提供了用於抑制對基因治療劑的免疫反應的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。在一些態樣，本發明提供了用於誘導對基因治療劑的耐受性的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。在一些實施例中，IRAK降解劑調節IRAK蛋白激酶的活性。在一些實施例中，IRAK降解劑調節IRAK-4蛋白激酶

的活性。在一些實施例中，基因治療劑是病毒基因治療劑(例如，病毒載體)或非病毒基因治療劑(例如，包含非病毒基因治療劑的脂質奈米顆粒)。在一些實施例中，基因治療劑是腺相關病毒(AAV)載體、腺病毒載體、慢病毒載體或單純疱疹病毒(HSV)載體。

**【0077】** 在本發明的一些實施例中，基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)可以投予至特定目的組織，或者它可以全身投予。在一些實施例中，可以向受試者投予有效量的基因治療劑。在一些實施例中，可以腸胃外投予有效量的基因治療劑。腸胃外投予途徑可以包括而不限於靜脈內、腹膜內、骨內、動脈內、大腦內、肌肉內、鞘內、皮下、腦室內、肝內等。在一些實施例中，可以通過一種投予途徑投予有效量的基因治療劑。在一些實施例中，可以通過多種(例如，兩種、三種等)投予途徑的組合投予有效量的基因治療劑。在一些實施例中，將有效量的基因治療劑投予至一個部位。在其他實施例中，可以將有效量的基因治療劑投予至多於一個部位。

**【0078】** 根據治療目標投予有效量的基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)。例如，當低百分比的轉導或轉染可以實現期望的治療效果時，則治療的目標通常是達到或超過這一轉導或轉染水準。在一些情況下，這種轉導或轉染水準可以通過轉導或轉染僅約1%至5%的所期望組織類型的靶細胞，在一些實施例中至少約20%的所期望組織類型的細胞，在一些實施例中至少約50%，在一些實施例中至少約80%，在一些實施例中至少約95%，在一些實施例中至少約99%的所期望組織類型的細胞來實現。基因治療劑可以通過在同一程式期間或者間隔數天、數周、數月或數年的一次或多次投予來投予。可以使用本文所述的任何投予途徑中的一種或多種。在一些實

施例中，多種基因治療劑可以用於治療人；例如，AAV載體和慢病毒載體。

**【0079】** 鑒定被基因治療劑轉導或轉染的細胞的方法在本領域是已知的；例如，免疫組織化學或使用標記物(如增強型綠色螢光蛋白)可以用於檢測被基因治療劑轉導或轉染的細胞。

**【0080】** 在一些實施例中，將有效量的基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)同時或依序投予至多於一個部位。在其他實施例中，將有效量的基因治療劑投予至單一部位多於一次(例如，重複)。在一些實施例中，多次注射基因治療劑的間隔不超過1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、9小時、12小時或24小時。

**【0081】** 在一些實施例中，所述方法包括投予有效量的包含基因治療劑的醫藥組合物以治療需要基因療法治療的個體。在一些實施例中，病毒顆粒(例如，rAAV顆粒)的病毒滴度至少約為以下中的任一個： $5 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12}$ 、 $9 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12}$ 、 $11 \times 10^{12}$ 、 $15 \times 10^{12}$ 、 $20 \times 10^{12}$ 、 $25 \times 10^{12}$ 、 $30 \times 10^{12}$ 、或 $50 \times 10^{12}$ 個基因體拷貝/mL。在一些實施例中，病毒顆粒(例如，rAAV顆粒)的病毒滴度約為以下中的任一個： $5 \times 10^{12}$ 至 $6 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12}$ 至 $7 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12}$ 至 $8 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12}$ 至 $9 \times 10^{12}$ 、 $9 \times 10^{12}$ 至 $10 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12}$ 至 $11 \times 10^{12}$ 、 $11 \times 10^{12}$ 至 $15 \times 10^{12}$ 、 $15 \times 10^{12}$ 至 $20 \times 10^{12}$ 、 $20 \times 10^{12}$ 至 $25 \times 10^{12}$ 、 $25 \times 10^{12}$ 至 $30 \times 10^{12}$ 、 $30 \times 10^{12}$ 至 $50 \times 10^{12}$ 、或 $50 \times 10^{12}$ 至 $100 \times 10^{12}$ 個基因體拷貝/mL。在一些實施例中，病毒顆粒(例如，rAAV顆粒)的病毒滴度約為以下中的任一個： $5 \times 10^{12}$ 至 $10 \times 10^{12}$ 、 $10 \times 10^{12}$ 至 $25 \times 10^{12}$ 、或 $25 \times 10^{12}$ 至 $50 \times 10^{12}$ 個基因體拷貝/mL。在一些實施例中，病毒顆粒(例如，rAAV顆粒)的病毒滴度至少約為以下中的任一個： $5 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9$ 、 $11 \times 10^9$ 、 $15 \times 10^9$ 、 $20 \times 10^9$ 、 $25 \times 10^9$ 、 $30$

$\times 10^9$ 、或 $50 \times 10^9$ 個轉導單位/mL。在一些實施例中，病毒顆粒(例如，rAAV顆粒)的病毒滴度約為以下中的任一個： $5 \times 10^9$ 至 $6 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 至 $7 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 至 $8 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 至 $9 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9$ 至 $10 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9$ 至 $11 \times 10^9$ 、 $11 \times 10^9$ 至 $15 \times 10^9$ 、 $15 \times 10^9$ 至 $20 \times 10^9$ 、 $20 \times 10^9$ 至 $25 \times 10^9$ 、 $25 \times 10^9$ 至 $30 \times 10^9$ 、 $30 \times 10^9$ 至 $50 \times 10^9$ 或 $50 \times 10^9$ 至 $100 \times 10^9$ 個轉導單位/mL。在一些實施例中，病毒顆粒(例如，rAAV顆粒)的病毒滴度約為以下中的任一個： $5 \times 10^9$ 至 $10 \times 10^9$ 、 $10 \times 10^9$ 至 $15 \times 10^9$ 、 $15 \times 10^9$ 至 $25 \times 10^9$ 、或 $25 \times 10^9$ 至 $50 \times 10^9$ 個轉導單位/mL。在一些實施例中，病毒顆粒(例如，rAAV顆粒)的病毒滴度至少約為以下中的任一個： $5 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10}$ 、 $11 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10}$ 、 $20 \times 10^{10}$ 、 $25 \times 10^{10}$ 、 $30 \times 10^{10}$ 、 $40 \times 10^{10}$ 或 $50 \times 10^{10}$ 個感染單位/mL。在一些實施例中，病毒顆粒(例如，rAAV顆粒)的病毒滴度至少約為以下中的任一個： $5 \times 10^{10}$ 至 $6 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10}$ 至 $7 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10}$ 至 $8 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10}$ 至 $9 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10}$ 至 $10 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10}$ 至 $11 \times 10^{10}$ 、 $11 \times 10^{10}$ 至 $15 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10}$ 至 $20 \times 10^{10}$ 、 $20 \times 10^{10}$ 至 $25 \times 10^{10}$ 、 $25 \times 10^{10}$ 至 $30 \times 10^{10}$ 、 $30 \times 10^{10}$ 至 $40 \times 10^{10}$ 、 $40 \times 10^{10}$ 至 $50 \times 10^{10}$ 或 $50 \times 10^{10}$ 至 $100 \times 10^{10}$ 個感染單位/mL。在一些實施例中，病毒顆粒(例如，rAAV顆粒)的病毒滴度至少約為以下中的任一個： $5 \times 10^{10}$ 至 $10 \times 10^{10}$ 、 $10 \times 10^{10}$ 至 $15 \times 10^{10}$ 、 $15 \times 10^{10}$ 至 $25 \times 10^{10}$ 或 $25 \times 10^{10}$ 至 $50 \times 10^{10}$ 個感染單位/mL。

**【0082】** 在一些實施例中，向個體投予的基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)的劑量至少約為以下中的任一個： $1 \times 10^8$ 至約 $6 \times 10^{13}$ 個基因體拷貝/kg體重。在一些實施例中，向個體投予的基因治療劑的劑量約為以下中的任一個： $1 \times 10^8$ 至約 $6 \times 10^{13}$ 個基因體拷貝/kg體重。

【0083】 在一些實施例中，向個體投予的基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)的總量至少約為以下中的任一個： $1 \times 10^9$ 至約 $1 \times 10^{14}$ 個基因體拷貝。在一些實施例中，向個體投予的基因治療劑的總量約為以下中的任一個： $1 \times 10^9$ 至約 $1 \times 10^{14}$ 個基因體拷貝。

【0084】 包含基因療法(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)的本發明的組合物可以單獨使用或與除IRAK降解劑之外的一種或多種另外的治療劑組合使用。依序投予之間的間隔可以是按至少(或，可替代地，少於)數分鐘、數小時或數天計算。

【0085】 在本發明的一些實施例中，包含IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)的組合物可以口服、腸胃外、通過吸入噴霧劑、外用、直腸、鼻、頰、陰道或經由植入式儲器投予。如本文所用，術語“腸胃外”包括皮下、靜脈內、肌肉內、關節內、滑膜內、胸骨內、鞘內、肝內、病灶內和顱內注射或輸注技術。在一些實施例中，將組合物口服、腹膜內或靜脈內投予。本發明的組合物的無菌可注射形式可以是水性或油性混懸劑。可以根據本領域已知的技術使用合適的分散劑或潤濕劑和助懸劑來配製這些混懸劑。無菌可注射製劑還可以在無毒的腸胃外可接受的稀釋劑或溶劑中的無菌可注射溶液或混懸劑例如作為在1,3-丁二醇中的溶液。可以採用的可接受的媒劑和溶劑包括水、林格氏溶液和等滲氯化鈉溶液。另外，常規地將無菌的非揮發性油用作溶劑或助懸介質。

【0086】 可以與載劑材料組合以產生呈單一劑型的組合物(例如，醫藥組合物的IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)的量將根據個體和特定的投予方式而變化。在一些實施例中，配製包含IRAK降解劑的組合物從而向個體投予在約0.01 mg/kg至約100 mg/kg體重之間的劑量的IRAK降解劑。在一些實施例中，將IRAK

降解劑按以下中的任一者的劑量水準口服或腸胃外投予：約0.01 mg/kg至約100 mg/kg、約0.01 mg/kg至約75 mg/kg、約0.01 mg/kg至約500 mg/kg、約0.01 mg/kg至約25 mg/kg、約0.01 mg/kg至約10 mg/kg、約0.01 mg/kg至約5 mg/kg、約0.01 mg/kg至約1.0 mg/kg、約1.0 mg/kg至約100 mg/kg、約1.0 mg/kg至約75 mg/kg、約1.0 mg/kg至約50 mg/kg、約1.0 mg/kg至約25 mg/kg、約1.0 mg/kg至約10 mg/kg、約1.0 mg/kg至約5 mg/kg、約10 mg/kg至約100 mg/kg、約10 mg/kg至約75 mg/kg、約10 mg/kg至約50 mg/kg、約10 mg/kg至約25 mg/kg、約25 mg/kg至約100 mg/kg、約25 mg/kg至約75 mg/kg、約25 mg/kg至約50 mg/kg、約50 mg/kg至約100 mg/kg、約50 mg/kg至約75 mg/kg、或約75 mg/kg至約100 mg/kg個體體重。在一些實施例中，將IRAK降解劑以大於約以下中的任一個的劑量水準口服或腸胃外投予：0.01 mg/kg、1.0 mg/kg、5 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg、75 mg/kg、100 mg/kg體重、200 mg/kg體重、300 mg/kg體重、400 mg/kg體重、或500 mg/kg個體體重。

**【0087】** IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)的用於口服投予的液體劑型包括但不限於醫藥上可接受的乳劑、微乳劑、溶液、混懸劑、糖漿劑和酞劑。除活性化合物外，這些液體劑型可含有本領域常用的惰性稀釋劑，諸如例如水或其他溶劑、增溶劑和乳化劑，諸如乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺、油(特別是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄欖油、蓖麻油、和芝麻油)、甘油、四氫糠醇、聚乙二醇、和脫水山梨醇脂肪酸酯及其混合物。除惰性稀釋劑外，這些口服組合物還可包含佐劑，諸如潤濕劑、乳化劑和助懸劑、甜味劑、調味劑和芳香劑。

**【0088】** 可以使用合適的分散劑或潤濕劑和助懸劑根據已知技術配製IRAK-4降解劑的可注射製劑，例如無菌可注射水性或油性懸浮液。該無菌可注

射製劑還可以在無毒的腸胃外可接受的稀釋劑或溶劑中的無菌可注射溶液、混懸劑或乳劑，例如作為在1,3-丁二醇中的溶液。可以採用的可接受的媒劑和溶劑包括水、林格氏溶液、U.S.P.和等滲氯化鈉溶液。另外，常規地將無菌的非揮發性油用作溶劑或助懸介質。出於這個目的，可以採用任何溫和的非揮發性油，包括合成甘油單酯或甘油二酯。此外，使用脂肪酸(如油酸)製備注射劑。

**【0089】** IRAK-4降解劑的可注射配製品可以例如通過以下方式來滅菌：經細菌截留過濾器過濾，或摻入呈無菌固體組合物形式的滅菌劑，所述無菌固體組合物可以在使用前溶解或分散於無菌水或其他無菌可注射介質中。

**【0090】** 用於口服投予IRAK-4降解劑的固體劑型包括膠囊、片劑、丸劑、散劑和顆粒劑。在此類固體劑型中，將活性化合物與至少一種醫藥上可接受的惰性賦形劑或載劑(如檸檬酸鈉或磷酸氫鈣)和/或以下物質混合：a) 填充劑或增量劑，如澱粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和矽酸；b) 粘合劑，例如羧甲基纖維素、海藻酸鹽、明膠、聚乙烯吡咯啶酮、蔗糖和阿拉伯膠；c) 保濕劑，如甘油；d) 崩解劑，如瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、海藻酸、某些矽酸鹽和碳酸鈉；e) 溶液阻滯劑，如石蠟；f) 吸收促進劑，如季銨化合物；g) 潤濕劑，例如鯨蠟醇和單硬脂酸甘油酯；h) 吸附劑，如高嶺土和膨潤土；以及i) 潤滑劑，如滑石、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、固體聚乙二醇、月桂基硫酸鈉及其混合物。在膠囊、片劑和丸劑的情況下，劑型還可以包含緩衝劑。

**【0091】** 相似類型的固體組合物也可作為填充劑用於使用諸如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等賦形劑的軟和硬填充明膠膠囊中。片劑、糖衣丸、膠囊、丸劑和顆粒劑的固體劑型可以用包衣和外殼(如腸溶包衣和藥物配製領域中熟知的其他包衣)製備。它們可以任選地含有遮光劑，並且還可以具有如下的

組合物：使得它們僅釋放一種或多種活性成分，或優先在腸道的某一部分中，任選以延遲的方式釋放。可以使用的包埋組合物的例子包括聚合物物質和蠟。相似類型的固體組合物也可作為填充劑用於使用如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等的賦形劑的軟和硬填充明膠膠囊中。

**【0092】** IRAK-4降解劑還可以呈具有一種或多種如上所指出的賦形劑的微包封形式。片劑、糖衣丸、膠囊、丸劑和顆粒劑的固體劑型可以用包衣和外殼(如腸溶包衣、控釋包衣以及藥物配製領域熟知的其他包衣)製備。在此類固體劑型中，活性化合物可以與至少一種惰性稀釋劑(如蔗糖、乳糖或澱粉)混合。此類劑型還可包含(作為正常實踐)除惰性稀釋劑(例如壓片潤滑劑)和其他壓片助劑(諸如硬脂酸鎂和微晶纖維素)之外的其他物質。在膠囊、片劑和丸劑的情況下，劑型還可包含緩衝劑。它們可以任選地含有遮光劑，並且還可以具有如下的組合物：使得它們僅釋放一種或多種活性成分，或優先在腸道的某一部分中，任選以延遲的方式釋放。可以使用的包埋組合物的例子包括聚合物物質和蠟。

**【0093】** 在一些實施例中，投予IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，之後投予基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)。在一些實施例中，投予基因治療劑前約以下中的任一時間向個體投予IRAK降解劑：1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、12小時、18小時、24小時、36小時、48小時、3天、4天、5天、6天、一周或多於一周。在一些實施例中，投予基因治療劑前少於約以下中的任一時間向個體投予IRAK降解劑：1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、12小時、18小時、24小時、36小時、48小時、3天、4天、5天、6天或一周。在一些實施例中，在約相同的時間(例如，約一小時內)投予IRAK降解劑和基因治療劑。在一些實施例中，投

予基因治療劑後，投予IRAK降解劑。在一些實施例中，投予基因治療劑後約以下中的任一時間向個體投予IRAK降解劑：1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、12小時、18小時、24小時、36小時、48小時、3天、4天、5天、6天、一周或多於一周。在一些實施例中，投予基因治療劑後少於約以下中的任一時間向個體投予IRAK降解劑：1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、12小時、18小時、24小時、36小時、48小時、3天、4天、5天、6天或一周。

**【0094】** 在一些實施例中，將基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)與IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)結合使用以治療適合於通過基因療法治療的疾病或病症。在一些實施例中，疾病或病症是單基因病或病症。

**【0095】** 在一些實施例中，將基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)與IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)結合使用以治療CNS的病症。CNS的非限制性病症包括中風、亨廷頓病、癲癇、帕金森病、盧伽雷氏病(還稱為肌萎縮側索硬化)、阿爾茨海默病、皮質基底節變性或CBD、皮質基底神經節變性或CBGD、額顳葉癡呆或FTD、進行性核上性麻痺或PSP、多系統萎縮症或MSA、腦癌和溶酶體貯積病(LSD)。可以通過基因療法結合IRAK降解劑治療的本發明的病症的其他非限制性例子包括創傷性腦損傷、酶功能病症、精神病症(包括創傷後應激症候群)、神經系統變性疾病和認知病症(包括癡呆、自閉症和抑鬱症)，並且酶功能病症包括而不限於腦白質營養不良(包括卡納萬病(Canavan's disease))。

**【0096】** 在一些實施例中，將基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)與IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)

結合使用以治療溶酶體貯積病。如在本領域中通常已知的，溶酶體貯積病是罕見的遺傳性代謝病症，其特徵在於溶酶體功能的缺陷。此類病症通常由適當的粘多糖、糖蛋白和/或脂質代謝所需的酶缺陷引起，導致溶酶體儲存的細胞材料的病理性積累。可以通過本發明的治療性多肽或治療性核酸治療的溶酶體貯積病的非限制性例子包括戈謝病2型或3型、GM1神經節苷脂貯積症、亨特病(Hunter disease)、克拉伯病、甘露糖貯積症病、 $\beta$ 甘露糖貯積症病、異染性腦白質營養不良病、粘脂質貯積症II/III型病、A型尼曼-皮克病、C型尼曼-皮克病、龐貝病(Pompe disease)、桑德霍夫病(Sandhoff disease)、A型聖菲利波病、B型聖菲利波病、C型聖菲利波病、D型聖菲利波病、申德勒病、斯萊病(Sly disease)、泰-薩克斯病(Tay-Sachs disease)和沃爾曼病(Wolman disease)。

**【0097】** 在一些實施例中，將基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)與IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)結合使用以治療血友病A、血友病B、年齡相關性黃斑變性、糖尿病性視網膜病變、青光眼、肌營養不良、X連鎖肌管性肌病(X-Linked Myotubular Myopathy)、脊髓性肌萎縮、利伯氏先天性黑朦(Leber's congenital amaurosis)、無脈絡膜症(choroideremia)、萊伯遺傳性視神經病變、鳥胺酸轉胺甲醯酶(OTC)缺乏症、瓜胺酸血症1型、苯丙酮尿症(PKU)、腎上腺腦白質營養不良、鐮狀細胞疾病、肌營養不良或 $\beta$ 地中海貧血。

**【0098】** 在一些態樣，本發明提供了用於在製造用於將核酸遞送至有需要的個體的細胞的藥劑中使用的組合物，其中所述組合物包含基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)，並且其中所述組合物被配製用於與IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)組合使用。在一些態

樣，本發明提供了用於在製造用於將核酸遞送至有需要的個體的細胞的藥劑中使用的組合物，其中所述組合物包含IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，並且其中所述組合物被配製用於與基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)組合使用。

**【0099】** 在一些態樣，本發明提供了用於在製造用於治療需要基因療法的個體的藥劑中使用的組合物，其中所述組合物包含基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)，並且其中所述組合物被配製用於與IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)組合使用。在一些態樣，本發明提供了用於在製造用於治療需要基因療法的個體的藥劑中使用的組合物，其中所述組合物包含IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，並且其中所述組合物被配製用於與基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)組合使用。

**【0100】** 在一些態樣，本發明提供了用於在製造用於調節需要基因療法的個體對基因療法的免疫反應的藥劑中使用的組合物，其中所述組合物包含基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)，並且其中所述組合物被配製用於與IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)組合使用。在一些態樣，本發明提供了用於在製造用於調節個體對基因療法的免疫反應的藥劑中使用的組合物，其中所述組合物包含IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，並且其中所述組合物被配製用於與基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)組合使用。

**【0101】** 在一些態樣，本發明提供了用於在製造用於抑制需要基因療法的個體對基因療法的免疫反應的藥劑中使用的組合物，其中所述組合物包含基因

治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)，並且其中所述組合物被配製用於與IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)組合使用。在一些態樣，本發明提供了用於在製造用於抑制個體對基因療法的免疫反應的藥劑中使用的組合物，其中所述組合物包含IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，並且其中所述組合物被配製用於與基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)組合使用。

**【0102】** 在一些態樣，本發明提供了用於在製造用於改善需要基因療法的個體中的基因療法的藥劑中使用的組合物，其中所述組合物包含基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)，並且其中所述組合物被配製用於與IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)組合使用。在一些態樣，本發明提供了用於在製造用於改善個體的基因療法的藥劑中使用的組合物，其中所述組合物包含IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，並且其中所述組合物被配製用於與基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)組合使用。

**【0103】** 在一些態樣，本發明提供了用於在製造用於誘導需要基因療法的個體對基因療法的耐受性的藥劑中使用的組合物，其中所述組合物包含基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)，並且其中所述組合物被配製用於與IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)組合使用。在一些態樣，本發明提供了用於在製造用於誘導個體對基因療法的耐受性的藥劑中使用的組合物，其中所述組合物包含IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，並且其中所述組合物被配製用於與基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)組合使用。

**【0104】** 在一些態樣，本發明提供了用於在將核酸遞送至有需要的個體的細胞中使用的基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)，其中所述基因治療劑與IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)組合使用。在一些態樣，本發明提供了用於在將核酸遞送至有需要的個體的細胞中使用的IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)組合使用。

**【0105】** 在一些態樣，本發明提供了用於在治療需要基因療法的個體中使用的基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)，其中所述基因治療劑與IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)組合使用。在一些態樣，本發明提供了用於在治療需要基因療法的個體中使用的IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)組合使用。

**【0106】** 在一些態樣，本發明提供了用於調節需要基因療法的個體對基因療法的免疫反應的IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)組合使用。

**【0107】** 在一些態樣，本發明提供了用於抑制需要基因療法的個體對基因療法的免疫反應的IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)組合使用。

## **IRAK降解劑**

**【0108】** 在一些態樣，本發明提供了使用IRAK降解劑與基因治療劑用於通過抑制對基因治療劑的免疫反應(例如，先天性免疫反應、適應性免疫反應)改善基因療法的方法。IRAK通過誘導急性炎症然後誘導另外的適應性免疫反應，在對引入人體的病原體的保護反應中發揮核心作用。IRAK是白介素-1受體信號傳導路徑和一些Toll樣受體信號傳導路徑必需的組分。Toll樣受體(TLR)通過識別特定的病原體相關分子模式(PAMP)檢測微生物，並且IL-1R家族成員對白介素-1(IL-1)家族細胞激素作出反應。這些受體通過銜接蛋白(主要是MyD88)引發胞內信號傳導級聯。

**【0109】** IRAK家族由IRAK-1、IRAK-2和IRAK-4(它們在多種人免疫細胞類型中表現)以及IRAK-M(還稱為IRAK-3)(其表現主要局限於單核細胞和巨噬細胞)構成。所有四種IRAK家族蛋白都含有N末端死亡結構域(DD)、ProST結構域和位於中心的激酶結構域。IRAK-1、IRAK-2和IRAK-M還含有C末端結構域。DD充當允許與其他含DD蛋白質的蛋白質間相互作用的平臺，所述其他含DD蛋白質中最重要的是銜接蛋白髓樣分化因子88(MyD88)。諸位發明人假設阻斷IRAK功能會導致特異性阻斷TLR9途徑，從而導致特異性免疫調節。在一些實施例中，IRAK降解劑用於阻斷TLR9途徑。在一些實施例中，IRAK降解劑阻斷TLR9功能。

**【0110】** 在一些實施例中，IRAK降解劑是雙功能化合物，其功能是将IRAK激酶募集到E3泛素連接酶用於降解。在一些實施例中，IRAK降解劑是IRAK激酶的靶向泛素化的調節劑。

**【0111】** 蛋白質降解劑是包含以下三種組分的雙功能化合物：E3泛素連接酶配體、接頭和目的靶蛋白的配體。它們通過同時與E3連接酶和靶蛋白兩者結

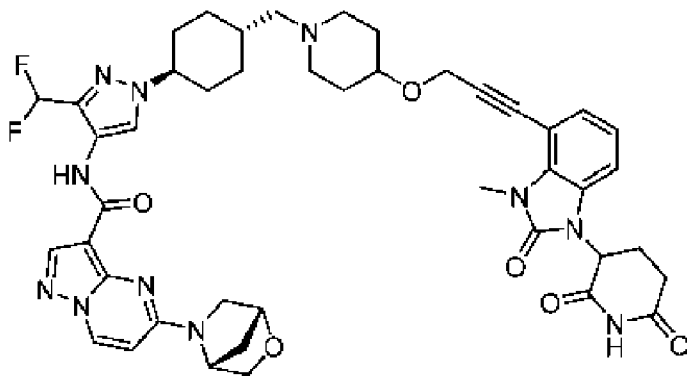
合來誘導三元複合物的形成。三元複合物的形成有效募集E3連接酶以使目的靶標多泛素化，從而通過蛋白酶體誘導隨後的降解。降解劑是有吸引力的工具，可用於以可逆和可調的方式誘導選擇性蛋白質敲低。在一些實施例中，IRAK降解劑是蛋白水解靶向嵌合體(Proteolysis Targeting Chimeric)(PROTAC)。

**【0112】** 在一些實施例中，IRAK降解劑是IRAK-1降解劑、IRAK-2降解劑、IRAK-M降解劑(或IRAK-3降解劑)、或IRAK-4降解劑。

**【0113】** 用於本發明的方法的適合的IRAK4降解劑化合物描述於專利申請WO 2019/133531、WO 2020/113233、WO 2020/264490、WO 2021/127283或WO 2021/011868中。

**【0114】** 在一些實施例中，IRAK-4降解劑包含描述於WO 2021/247899中的5-((1R,4R)-2-氧雜-5-氮雜雙環[2.2.1]庚-5-基)-N-(3-(二氟甲基)-1-((1R,4R)-4-((4-((3-(1-(2,6-二側氧基哌啶-3-基)-3-甲基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-苯並[d]咪唑-4-基)丙-2-炔-1-基)氧基)哌啶-1-基)甲基)環己基)-1H-吡唑-4-基)吡唑並[1,5-a]嘓啶-3-甲醯胺及其醫藥上可接受的鹽。在一些實施例中，IRAK-4降解劑包含5-((1R,4R)-2-氧雜-5-氮雜雙環[2.2.1]庚-5-基)-N-(3-(二氟甲基)-1-((1r,4R)-4-((4-((3-(1-(2,6-二側氧基哌啶-3-基)-3-甲基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-苯並[d]咪唑-4-基)丙-2-炔-1-基)氧基)哌啶-1-基)甲基)環己基)-1H-吡唑-4-基)吡唑並[1,5-a]嘓啶-3-甲醯胺的晶型及其醫藥上可接受的鹽。

**【0115】** 在一些實施例中，IRAK-4降解劑包含式[I]的化合物或式[I]的化合物的氘代形式或其醫藥上可接受的鹽(描述於WO 2021/247897中)。



[I]

式[I]的化合物是5-((1R,4R)-2-氧雜-5-氮雜雙環[2.2.1]庚-5-基)-N-(3-(二氟甲基)-1-((1R,4R)-4-((4-((3-(1-(2,6-二側氧基哌啶-3-基)-3-甲基-2-側氧基-2,3-二氫-1H-苯並[d]咪唑-4-基)丙-2-炔-1-基)氧基)哌啶-1-基)甲基)環己基)-1H-吡唑-4-基)吡唑並[1,5-a]嘧啶-3-甲醯胺。

### 基因治療劑

【0116】 在一些態樣，本發明提供了使用IRAK降解劑與基因治療劑通過抑制對基因治療劑的先天性免疫反應用於改善的基因療法的方法。在一些實施例中，基因治療劑是病毒顆粒或脂質奈米顆粒。在一些實施例中，基因治療劑是腺相關病毒(AAV)顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒或單純疱疹病毒(HAV)顆粒。在一些實施例中，基因治療劑是脂質奈米顆粒或脂質體。在一些實施例中，對基因治療劑的免疫反應是對病毒顆粒(例如，病毒衣殼蛋白、病毒包膜等)的免疫反應。在一些實施例中，對基因治療劑的免疫反應是對LNP(例如，一種或多種用於產生LNP的脂質)的免疫反應。在一些實施例中，對基因治療劑的免疫反應是對基因療法有效載荷的免疫反應；所述基因療法有效載荷為例如，編碼治療性轉基因(病毒基因體、質體、閉合DNA、mRNA、反義核酸、siRNA、shRNA等)的核酸。在一些實施例中，對基因治療劑的免疫反應是對轉基因產物(例如，治療性多肽或治療性核酸)的免疫反應。

*AAV*

【0117】 在一些實施例中，本發明提供了使用IRAK降解劑與AAV顆粒用於改善的基因療法的方法。在用於基因療法的AAV顆粒中，將編碼異源核酸(例如，治療性轉基因)的重組AAV(rAAV)基因體包裹在AAV衣殼中。在一些實施例中，病毒基因體包含在轉錄方向上可操作地連接的異源核酸和/或一種或多種以下組分：控制序列(包括轉錄起始序列和終止序列)，從而形成表現盒。

【0118】 在一些實施例中，rAAV基因體包含一個或多個AAV末端反向重複(ITR)序列(通常為兩個AAV ITR序列)。例如，表現盒可以在5'和3'端側接至少一個功能性AAV ITR序列。“功能性AAV ITR序列”意指旨在用於挽救、複製和包裝AAV病毒粒子的ITR序列功能。參見Davidson等人, *PNAS*, 2000, 97(7)3428-32；Passini等人, *J. Virol.*, 2003, 77(12):7034-40；和Pechan等人, *Gene Ther.*, 2009, 16:10-16，將其全部通過引用以其整體併入本文。為了實施本發明的一些態樣，重組病毒基因體至少包含所有對於包裹到AAV衣殼中所必需的AAV序列和用於由AAV顆粒感染的物理結構。用於本發明的載體的AAV ITR不需要具有野生型核苷酸序列(例如，如Kotin, *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5:793-801中所描述的)，並且可以通過核苷酸的插入、缺失或取代而改變，或者AAV ITR可以源自幾種AAV血清型中的任何一種。目前已知超過40種AAV血清型，並且仍在鑒定出新的血清型和現有血清型的變體。參見Gao等人, *PNAS*, 2002, 99(18): 11854-6；Gao等人, *PNAS*, 2003, 100(10):6081-6；和Bossis等人, *J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810。使用任何AAV血清型都被視為在本發明的範圍之內。在一些實施例中，rAAV載體是源自AAV血清型的載體，包括而不限於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。在一些實施例中，AAV核酸(例如，rAAV載體)包含一種或多種(例如，在一些態樣兩種)以下的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。在一些實施例中，AAV顆粒包含編碼側接一個或多個AAV ITR的異源轉基因的AAV載體。

**【0119】** 在一些實施例中，AAV顆粒包含選自以下的衣殼蛋白：AAV1衣殼、AAV2衣殼、AAV3衣殼、AAV4衣殼、AAV5衣殼、AAV6衣殼、AAV7衣殼、AAV8衣殼、AAVrh8衣殼、AAV9衣殼、AAV10衣殼、AAVrh10衣殼、AAV11衣殼、AAV12衣殼、AAVrh32.33衣殼、AAV-XL32衣殼、AAV-XL32.1衣殼、AAV LK03衣殼、AAV2R471A衣殼、AAV2/2-7m8衣殼、AAV DJ衣殼、AAV DJ8衣殼、AAV2 N587A衣殼、AAV2 E548A衣殼、AAV2 N708A衣殼、AAV V708K衣殼、山羊AAV衣殼、AAV1/AAV2嵌合衣殼、牛AAV衣殼、小鼠AAV衣殼、rAAV2/HBoV1(嵌合AAV/人類博卡病毒屬病毒1)、AAV2HBKO衣殼、AAVPHP.B衣殼或AAVPHP.eB衣殼或其功能變體。AAV衣殼的“功能變體”意指該變體衣殼能夠包裝AAV基因體以產生感染性AAV病毒粒子。在另外的實施例中，rAAV顆粒包含來自進化枝A-F的AAV血清型的衣殼蛋白。

**【0120】** 在一些態樣，本發明提供了包含重組自身互補型基因體(例如，自身互補的或自身互補型AAV載體)的AAV顆粒。具有自身互補型載體基因體的rAAV病毒顆粒和使用自身互補的AAV基因體的方法描述在美國專利號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，將其各自通過引用以其整體併入本文。包含自身互補型基因體的AAV顆粒將借助其部分互補的序列(例如，異源核酸的互補編碼股和非編碼股)迅速形成雙股DNA。在一些實施例中，載體包含編碼異源核酸的第一核酸序列和編碼該核酸的互補序列的第二核酸序列，其中第一核酸序列可以與第二核酸序列沿著其大部分或所有長度形成股內鹼基對。

**【0121】** 在一些實施例中，第一異源核酸序列和第二異源核酸序列通過突變的ITR(例如，右ITR)連接。在一些實施例中，ITR包含多核苷酸序列 5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC GGGCGACCAAAGGTCGCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG - 3'(SEQ ID NO: 1)。突變的ITR包含含有末端解股序列的D區的缺失。因此，在複製rAAV基因體時，rep蛋白將不會在突變的ITR處切割病毒基因體，並且因此，以5'至3'順序包含以下的重組病毒基因體將被包裝在病毒衣殼中：AAV ITR、包括調節序列的第一異源多核苷酸序列、突變的AAV ITR、與第一異源多核苷酸反向的第二異源多核苷酸和第三AAV ITR。

**【0122】** 使用不同的AAV血清型優化特定靶細胞的轉導或靶向特定靶組織(例如，病變組織)內的特定細胞類型。AAV顆粒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顆粒可以含有源自相同AAV血清型的一個或多個ITR和衣殼，或者AAV顆粒可以含有源自與AAV顆粒衣殼不同的AAV血清型的一個或多個ITR。

**【0123】** 在一些實施例中，AAV衣殼包含突變，例如衣殼包含突變型衣殼蛋白。在一些實施例中，突變是酪胺酸突變或肝素結合突變。在一些實施例中，

突變型衣殼蛋白保留形成AAV衣殼的能力。在一些實施例中，AAV顆粒包含AAV2或AAV5酪胺酸突變型衣殼(參見例如，Zhong L.等人, (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105(22):7827-7832)，如Y444或Y730中的突變(根據AAV2編號)。在另外的實施例中，AAV顆粒包含來自進化枝A-F的AAV血清型的衣殼蛋白(Gao等人, *J. Virol.* 2004, 78(12):6381)。

**【0124】** 在本領域中已知許多方法用於產生用於基因療法的AAV顆粒，包括轉染、穩定細胞株生產和感染性雜交病毒生產系統，該系統包括腺病毒-AAV雜合體、疱疹病毒-AAV雜合體(Conway, JE等人, (1997) *J. Virology* 71(11):8780-8789)和桿狀病毒-AAV雜合體(Urabe, M.等人, (2002) *Human Gene Therapy* 13(16):1935-1943；Kotin, R. (2011) *Hum Mol Genet.* 20(R1): R2-R6)。用於產生AAV顆粒的AAV生產培養物都需要：1) 合適的宿主細胞；2) 合適的輔助病毒功能；3) AAV rep和cap基因和基因產物；4) 側接至少一個AAV ITR序列的核酸(如治療性核酸)；以及5) 支持產生AAV的合適的培養基和培養基組分。在一些實施例中，合適的宿主細胞是靈長類動物宿主細胞。在一些實施例中，合適的宿主細胞是人源細胞株，如HeLa、A549、293或Perc.6細胞。在一些實施例中，合適的輔助病毒功能由野生型或突變體腺病毒(如溫度敏感性腺病毒)、疱疹病毒(HSV)、桿狀病毒或提供協助工具的質體構建體提供。在一些實施例中，AAV rep和cap基因產物可以來自任何AAV血清型。通常但不是必須的，AAV rep基因產物與rAAV基因體的ITR具有相同血清型，只要rep基因產物可以發揮複製和包裝rAAV基因體的作用即可。本領域中已知的合適的培養基可以用於產生AAV顆粒。在一些實施例中，AAV協助工具由腺病毒或HSV提供。在一些實施例中，AAV協助工具由桿狀病毒提供，並且宿主細胞是昆蟲細胞(例如，草地貪夜蛾

(*Spodoptera frugiperda*)(Sf9)細胞)。

【0125】 用於產生AAV顆粒的一種方法是三重轉染方法。簡而言之，可以將含rep基因和衣殼基因的質體連同輔助腺病毒質體轉染(例如利用磷酸鈣法)到細胞株(例如，HEK-293細胞)中，並可以收集並任選地純化病毒。因此，在一些實施例中，通過將編碼AAV載體的核酸、編碼AAV rep和cap的核酸以及編碼AAV輔助病毒功能的核酸三重轉染到宿主細胞中來產生AAV顆粒，其中核酸向宿主細胞的轉染得到能夠產生AAV顆粒的宿主細胞。

【0126】 在一些實施例中，AAV顆粒可以通過生產細胞株方法產生(參見Martin等人, (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269；美國專利授予前公開號US 2004/0224411；和Liu, X.L. 等人 (1999) *Gene Ther.* 6:293-299)。簡而言之，可以用含有rep基因、衣殼基因和包含啟動子-異源核酸序列的載體基因體的質體穩定地轉染細胞株(例如，HeLa、293、A549或Perc.6細胞株)。可以篩選細胞株，以選擇用於AAV產生的前導殖株(lead clone)，然後可以將其擴增至生產生物反應器，並且用輔助病毒(例如，腺病毒或HSV)感染，以啟動AAV生產。隨後可以收穫病毒，可以使腺病毒失活(例如，通過加熱)和/或去除，並且可以純化AAV顆粒。因此，在一些實施例中，通過包含編碼rAAV基因體的核酸、編碼AAV rep和cap的核酸和編碼AAV輔助病毒功能的核酸中的一種或多種的生產細胞株產生AAV顆粒。

【0127】 在一些實施例中，編碼AAV rep和cap基因和/或AAV病毒基因體的核酸穩定地維持在生產細胞株中。在一些實施例中，將編碼AAV rep和cap基因和/或rAAV基因體的核酸在一種或多種質體上引入細胞株中以產生生產細胞株。在一些實施例中，將AAV rep、AAV cap和AAV基因體在相同質體上引入細胞中。

在其他實施例中，將AAV rep、AAV cap和rAAV基因體在不同質體上引入細胞中。在一些實施例中，用質體穩定地轉染的細胞株在細胞株的多次傳代(例如，5、10、20、30、40、50或超過50次細胞傳代)中維持質體。例如，所述一種或多種質體可以在細胞複製時複製，或者所述一種或多種質體可以整合到細胞基因體中。已經鑒定了使質體能夠在細胞(例如，人細胞)中自主複製的多種序列(參見例如，Krysan, P.J.等人 (1989) *Mol. Cell Biol.* 9:1026-1033)。在一些實施例中，所述一種或多種質體可以含有允許對維持質體的細胞進行選擇的選擇性標記物(例如，抗生素抗性標記物)。通常用於哺乳動物細胞的選擇性標記物包括而不限於殺稻瘟素、G418、潮黴素B、博萊黴素、嘌呤黴素及其衍生物。用於將核酸引入細胞中的方法在本領域中是已知的，並且包括而不限於病毒轉導、陽離子轉染(例如，使用陽離子聚合物如DEAE-葡聚糖或陽離子脂質如lipofectamine)、磷酸鈣轉染、顯微注射、粒子轟擊、電穿孔和奈米顆粒轉染(關於更多細節，參見例如，Kim, T.K.和Eberwine, J.H. (2010) *Anal. Bioanal. Chem.* 397:3173-3178)。

**【0128】** 在一些實施例中，生產細胞株源自靈長類動物細胞株(例如，非人靈長類動物細胞株，如Vero或FRhL-2細胞株)。在一些實施例中，細胞株源自人細胞株。在一些實施例中，生產細胞株源自HeLa、293、A549或PERC.6®(Crucell)細胞。例如，在將編碼AAV rep和cap基因和/或rAAV基因體的核酸引入和/或穩定維持/整合到細胞株中以產生生產細胞株之前，細胞株是HeLa、293、A549或PERC.6®(Crucell)細胞株或其衍生物。

**【0129】** 在一些實施例中，生產細胞株適於在懸浮液中生長。如在本領域中已知的，錨定依賴性細胞通常不能在沒有基質(如微載劑珠)的情況下在懸浮液中生長。使細胞株適於在懸浮液中生長可以包括例如使用缺少鈣和鎂離子的培

養基以防止結塊(和任選地消泡劑)，使用用滲矽化合物塗布的培養器皿，採用攪拌槳使細胞株在旋動培養中生長，並且在每次傳代時選擇培養物中(而不是在大塊中或在器皿的側面上)的細胞。

**【0130】** 本發明的AAV顆粒可以通過裂解生產培養物的宿主細胞或通過從生產培養物中收穫用過的培養基而從AAV生產培養物中收穫，條件是細胞在本領域中已知的引起AAV顆粒從完整細胞釋放到培養基中的條件下培養，如美國專利號6,566,118中更全面地描述的。裂解細胞的合適方法在本領域中也是已知的，並且包括例如多次冷凍/解凍循環、超聲處理、微流化和用化學品(如洗滌劑和/或蛋白酶)處理。

**【0131】** 在另外的實施例中，純化AAV顆粒。如本文所用，術語“純化的”包括AAV顆粒的如下製劑，其缺乏至少一些也可以存在於AAV顆粒天然存在處或最初所製備的地方處的其他組分。因此，例如，分離的AAV顆粒可以使用純化技術使其從源混合物(如培養裂解物或生產培養上清液)富集而製備。能以多種方式測量富集情況，例如像根據溶液中存在的DNA酶抗性顆粒(DRP)或基因體拷貝(gc)的比例、或根據感染性，或者可以根據源混合物中存在的第二潛在干擾物質(如污染物，包括生產培養污染物或進程內污染物，包括輔助病毒、培養基組分等)來測量。

**【0132】** 在一些實施例中，澄清AAV生產培養收穫物以除去宿主細胞碎片。在一些實施例中，通過經由一系列深度過濾器過濾來澄清生產培養收穫物，所述深度過濾器包括例如DOHC Millipore Millistak+ HC Pod級過濾器、A1HC Millipore Millistak+ HC Pod級過濾器和0.2  $\mu\text{m}$  Filter Opticap XL10 Millipore Express SHC Hydrophilic Membrane過濾器。澄清也可以通過本領域中已知的多

種其他標準技術來實現，如離心或通過本領域中已知的0.2 μm或更大孔徑的任何醋酸纖維素過濾器過濾。

【0133】 在一些實施例中，用Benzonase<sup>®</sup>進一步處理AAV生產培養收穫物以消化生產培養物中存在的任何高分子量DNA。在一些實施例中，Benzonase<sup>®</sup>消化在本領域中已知的標準條件下進行，所述標準條件包括例如1-2.5單位/ml的Benzonase<sup>®</sup>的終濃度，在範圍從環境溫度至37°C的溫度下持續30分鐘至幾小時的時間段。

【0134】 可以使用以下一個或多個純化步驟分離或純化AAV顆粒：平衡離心；流過式陰離子交換過濾；用於濃縮AAV顆粒的切向流過濾(TFF)；通過磷灰石層析捕獲AAV；輔助病毒的熱滅活；通過疏水相互作用層析捕獲AAV；通過尺寸排阻層析(SEC)進行緩衝液交換；納濾；以及通過陰離子交換層析、陽離子交換層析或親和層析捕獲AAV。這些步驟可以單獨使用，以各種組合使用，或者以不同順序使用。在一些實施例中，所述方法以如下所述的順序包括所有步驟。純化AAV顆粒的方法見於例如以下文獻中：Xiao等人, (1998) *Journal of Virology* 72:2224-2232；美國專利號6,989,264和8,137,948；和WO 2010/148143。

### 腺病毒

【0135】 在一些實施例中，本發明提供了使用IRAK降解劑與腺病毒顆粒用於改善的基因療法的方法。用於基因療法的腺病毒載體通常是具有重組腺病毒(rAd)基因體的腺病毒顆粒，所述重組腺病毒基因體包含在被包裹到腺病毒衣殼中的兩個腺病毒ITR之間的一個或多個異源序列(即，非腺病毒來源的核酸)。在一些實施例中，異源序列編碼治療性轉基因。在一些實施例中，rAd基因體缺少一個或多個E1基因或包含一個或多個E1基因的缺陷拷貝，這使得腺病毒具有

複製缺陷。腺病毒在大型(約950Å)無包膜二十面體衣殼內包括線性雙股DNA基因體。腺病毒具有大型基因體，可摻入超過30 kb異源序列(例如，替代E1和/或E3區)，使得它們特別適合與較大異源基因一起使用。還已知，它們感染分裂和非分裂細胞，且不會自然地整合到宿主基因體中(但雜合變體可具有這種能力)。在一些實施例中，腺病毒載體可以是具有以異源序列替代E1的第一代腺病毒載體。在一些實施例中，腺病毒載體可以是E2A、E2B和/或E4中具有額外突變或缺失的第二代腺病毒載體。在一些實施例中，腺病毒載體可以是第三代或內部破壞的(gutted)腺病毒載體，其缺失所有病毒編碼基因，只保留ITR和包裝信號，且需要反式輔助腺病毒進行複製和包裝。已經研究了將腺病毒顆粒用作暫態轉染哺乳動物細胞的載體以及基因療法載體。關於進一步說明，參見例如，Danthinne, X. 和 Imperiale, M.J. (2000) *Gene Ther.* 7:1707-14 以及 Tatsis, N. 和 Ertl, H.C. (2004) *Mol. Ther.* 10:616-29。

**【0136】** 在一些實施例中，腺病毒顆粒包含含有治療性轉基因的rAd基因體。使用任何腺病毒血清型都被視為在本發明的範圍之內。在一些實施例中，腺病毒顆粒源自腺病毒血清型，包括而不限於AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu5、AdHu7、AdHu11、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad3型、犬Ad2型、綿羊Ad和豬Ad3型。腺病毒顆粒還包含衣殼蛋白。在一些實施例中，腺病毒顆粒包括一種或多種外來病毒衣殼蛋白。此類組合可以稱為假型腺病毒顆粒。在一些實施例中，用於假型腺病毒顆粒的外來病毒衣殼蛋白源自外來病毒或另一種腺病毒血清型。在一些實施例中，外來病毒衣殼蛋白源自(包括而不限於)呼腸孤病毒3型。用於假型腺病毒顆粒的載體和衣殼蛋白組合的例子可以見於以

下參考文獻中(Tatsis, N.等人 (2004) *Mol. Ther.* 10(4):616-629和Ahi, Y.等人 (2011) *Curr. Gene Ther.* 11(4):307-320)。可使用不同的腺病毒血清型優化特定靶細胞的轉導或靶向特定靶組織(例如病變組織)內的特定細胞類型。由特定腺病毒血清型靶向的組織或細胞包括而不限於肺(例如HuAd3)、脾和肝(例如HuAd37)、平滑肌、滑膜細胞、樹突細胞、心血管細胞、腫瘤細胞株(例如HuAd11)和樹突細胞(例如經呼腸孤病毒型3、HuAd30或HuAd35假型化的HuAd5)。關於進一步說明，參見Ahi, Y.等人 (2011) *Curr. Gene Ther.* 11(4):307-320，Kay, M.等人 (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40以及Tatsis, N.等人 (2004) *Mol. Ther.* 10(4):616-629。

**【0137】** 本領域內已知許多生產腺病毒顆粒的方法。例如，對於內部破壞的腺病毒載體，可將腺病毒載體基因體和輔助腺病毒基因體轉染至包裝細胞株(例如，293細胞株)中。在一些實施例中，輔助腺病毒基因體可包含在其包裝信號側翼的重組位點，且可將兩個基因體轉染到表現重組酶的包裝細胞株中(例如，可使用Cre/loxP系統)，使得目的腺病毒載體的包裝效率高於輔助腺病毒(參見，例如Alba, R.等人 (2005) *Gene Ther.* 12增刊1:S18-27)。可以使用標準方法收穫和純化腺病毒載體，諸如本文所述的那些。

### 慢病毒

**【0138】** 在一些實施例中，本發明提供了使用IRAK降解劑與慢病毒顆粒用於改善的基因療法的方法。用於基因療法的慢病毒載體通常是具有重組慢病毒基因體的慢病毒顆粒，所述重組慢病毒基因體包含在兩個長末端重複序列(LTR)之間的一個或多個異源序列(即，非慢病毒來源的核酸序列)。在一些實施例中，異源序列編碼治療性轉基因。慢病毒是具有大約10 kb基因體的有義ssRNA逆轉錄病毒。慢病毒整合到分裂和非分裂細胞的基因體中。可如下生產慢病毒

顆粒，例如，通過將多個質體(通常將慢病毒基因體和複製和/或包裝所需的基因分開以防止病毒複製)轉染到包裝細胞株中，所述包裝細胞株將修飾的慢病毒基因體包裝到慢病毒顆粒中。在一些實施例中，慢病毒顆粒可以指缺少包膜蛋白的第一代載體。在一些實施例中，慢病毒顆粒可以指缺少除gag/pol和tat/rev區以外的所有基因的第二代載體。在一些實施例中，慢病毒顆粒可以指第三代載體，其只含內源rev、gag和pol基因且具有用於在沒有tat基因的情況下進行轉導的嵌合LTR(參見Dull, T.等人 (1998) *J. Virol.* 72:8463-71)。關於進一步說明，參見Durand, S.和Cimarelli, A. (2011) *Viruses* 3:132-59。

**【0139】** 使用任何慢病毒載體都被視為在本發明的範圍之內。在一些實施例中，慢病毒載體源自慢病毒，包括而不限於人類免疫缺陷病毒-1(HIV-1)、人類免疫缺陷病毒-2(HIV-2)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、貓免疫缺陷病毒(FIV)、馬傳染性貧血病毒(EIAV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)、傑姆布拉納病(Jembrana disease)病毒(JDV)、綿羊髓鞘脫落病毒(VV)和山羊關節炎腦炎病毒(CAEV)。慢病毒顆粒還包含衣殼蛋白。在一些實施例中，慢病毒顆粒包括一種或多種外來病毒衣殼蛋白。此類組合可稱為假型慢病毒顆粒。在一些實施例中，用於假型慢病毒顆粒的外來病毒衣殼蛋白源自外來病毒。在一些實施例中，用於假型慢病毒顆粒的外來病毒衣殼蛋白是水疱性口炎病毒糖蛋白(VSV-GP)。VSV-GP與無處不在的細胞受體相互作用，為假型慢病毒顆粒提供了廣泛組織向性。此外，認為VSV-GP為假型慢病毒顆粒提供了更高穩定性。在其他實施例中，外來病毒衣殼蛋白源自(包括而不限於)金迪普拉病毒、狂犬病毒、莫柯拉病毒、淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎病毒(LCMV)、羅斯河病毒(RRV)、辛德畢斯病毒、塞姆利基森林病毒(SFV)、委內瑞拉馬腦炎病毒、雷斯頓伊波拉病毒、薩伊伊波拉病毒、瑪律堡

病毒、拉沙病毒、禽白血病病毒(ALV)、綿羊肺腺瘤逆轉錄病毒(JSRV)、莫洛尼鼠白血病病毒(MLV)、長臂猿白血病毒(GALV)、貓內源性逆轉錄病毒(RD114)、人T-嗜淋巴細胞病毒1(HTLV-1)、人泡沫病毒、綿羊髓鞘脫落病毒(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、雞瘟病毒(FPV)或苜蓿銀紋夜蛾核型多角體病毒(AcMNPV)。用於假型慢病毒顆粒的載體和衣殼蛋白組合的例子可見於例如Cronin, J.等人 (2005). *Curr. Gene Ther.* 5(4):387-398。可使用不同的假型慢病毒顆粒優化特定靶細胞的轉導或靶向特定靶組織(例如病變組織)內的特定細胞類型。例如，由特定假型慢病毒顆粒靶向的組織包括而不限於肝(例如經VSV-G、LCMV、RRV或SeV F蛋白假型化)、肺(例如經伊波拉、瑪律堡、SeV F和HN或JSRV蛋白假型化)、胰島細胞(例如經LCMV蛋白假型化)、中樞神經系統(例如經VSV-G、LCMV、狂犬病或莫柯拉蛋白假型化)、視網膜(例如經VSV-G或莫柯拉蛋白假型化)、單核細胞或肌肉(例如經莫柯拉或伊波拉蛋白假型化)、造血系統(例如經RD114或GALV蛋白假型化)或癌細胞(例如經GALV或LCMV蛋白假型化)。關於進一步說明，參見Cronin, J.等人 (2005). *Curr. Gene Ther.* 5(4):387-398以及Kay, M.等人 (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40。

**【0140】** 本領域內已知許多產生慢病毒顆粒的方法。例如，對於第三代慢病毒載體，含有帶gag和pol基因的目的重組慢病毒基因體的載體可與含rev基因的載體共同轉染到包裝細胞株(例如，293細胞株)中。目的重組慢病毒基因體還包含促進在不存在Tat的情況下進行轉錄的嵌合LTR(參見Dull, T.等人 (1998) *J. Virol.* 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.* 13(7):987-1011)收穫並且純化慢病毒載體。

*HSV*

【0141】 在一些實施例中，本發明提供了使用IRAK降解劑與HSV顆粒用於改善的基因療法的方法。用於基因療法的HSV載體通常是具有重組HSV基因體的HSV顆粒，所述重組HSV基因體包含在兩個末端重複序列(TR)之間的一個或多個異源序列(即，非HSV來源的核酸序列)。在一些實施例中，異源序列編碼治療性轉基因。HSV是具有大約152 kb基因體的包膜雙股DNA病毒。有利地，其大約一半的基因是非必需的，且可缺失以適應異源序列。HSV顆粒感染非分裂細胞。此外，它們自然地在神經元中建立潛伏期，通過逆向轉運行進，並可跨突觸轉移，使得它們有利於轉染神經元和/或有利於涉及神經系統的基因治療方法。在一些實施例中，HSV顆粒可以是複製缺陷型或複製型(例如，能夠通過使一種或多種晚期基因失活進行單次複製循環)。關於進一步說明，參見Manservigi, R.等人 (2010) *Open Virol. J.* 4:123-56。

【0142】 在一些實施例中，HSV顆粒包含含有轉基因的重組HSV基因體。使用任何HSV載體都被視為在本發明的範圍之內。在一些實施例中，HSV載體源自HSV血清型，包括而不限於HSV-1和HSV-2。HSV顆粒還包含衣殼蛋白。在一些實施例中，HSV顆粒包括一種或多種外來病毒衣殼蛋白。此類組合可稱為假型HSV顆粒。在一些實施例中，用於假型HSV顆粒的外來病毒衣殼蛋白源自外來病毒或來自另一種HSV血清型。在一些實施例中，在假型HSV顆粒中使用的外來病毒衣殼蛋白是水疱性口炎病毒糖蛋白(VSV-GP)。VSV-GP與無處不在的細胞受體相互作用，為假型HSV顆粒提供了廣泛組織向性。此外，認為VSV-GP為假型HSV顆粒提供了更高穩定性。其他實施例中，外來病毒衣殼蛋白可以來自不同HSV血清型。例如，HSV-1載體可以包含一種或多種HSV-2衣殼蛋白。可

使用不同的HSV血清型優化特定靶細胞的轉導或靶向特定靶組織(例如病變組織)內的特定細胞類型。由特定腺病毒血清型靶向的組織或細胞包括而不限於中樞神經系統和神經元(例如HSV-1)。關於進一步說明，參見Manservigi, R.等人 (2010) *Open Virol J* 4:123-156，Kay, M.等人 (2001) *Nat. Med.* 7(1):33-40，以及 Meignier, B.等人 (1987) *J. Infect. Dis.* 155(5):921-930。

**【0143】** 本領域內已知許多產生HSV顆粒的方法。可以使用標準方法收穫和純化HSV載體，諸如本文所述的那些。例如，對於複製缺陷型HSV載體，可將缺少所有即時早期(IE)基因的目的HSV基因體轉染到提供生產病毒所需基因(諸如ICP4、ICP27和ICP0)的補充細胞株中(參見例如，Samaniego, L.A.等人 (1998) *J. Virol.* 72:3307-20)。可以使用所描述的方法收穫並純化HSV載體(例如，Goins, WF等人, (2014) *Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology* 1144:63-79)。

#### *非病毒基因治療劑*

**【0144】** 在一些實施例中，本發明提供了使用IRAK降解劑與非病毒基因轉移方法用於基因療法的方法。非病毒載體遞送系統包括DNA質體、裸核酸和與遞送系統複合的核酸。例如，所述載體可以與脂質(例如陽離子或中性脂質)、脂質體、聚陽離子、脂質奈米顆粒或增強細胞對核酸的攝取的試劑複合。所述核酸可以與適用於本文所述任何遞送方法的試劑複合。在一些實施例中，核酸編碼治療性轉基因。

**【0145】** 用於基因療法的脂質奈米顆粒通常包含包封在脂質顆粒中的載體基因體或與脂質複合的載體基因體。在一些實施例中，異源序列編碼治療性轉基因。在一些實施例中，將載體基因體配製在陽離子脂質體/核酸複合物(lipoplex)奈米顆粒或脂質體中。在一些實施例中，用於基因治療劑的陽離子脂

質體/核酸複合物奈米顆粒配製品包含合成性陽離子脂質(R)-N,N,N-三甲基-2,3-二油醯基氧基-1-丙基氯化銨(DOTMA)和磷脂1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)。在一些實施例中，DOTMA/DOPE脂質體組分被優化用於遞送和靶向個體中的細胞。

**【0146】** 在一些實施例中，將包含載體基因體的核酸與包含一種或多種陽離子脂質(包括例如，(R)-N,N,N-三甲基-2,3-二油醯基氧基-1-丙基氯化銨(DOTMA)和磷脂1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE))的醫藥組合物混合。在一些實施例中，醫藥組合物包含至少一種脂質。在一些實施例中，醫藥組合物包含至少一種陽離子脂質。陽離子脂質可以是單陽離子的或多陽離子的。任何陽離子兩親分子(例如，包含至少一個親水性和親脂性部分的分子)是本發明意義內的陽離子脂質。在一些實施例中，正電荷由至少一種陽離子脂質貢獻並且負電荷由核酸貢獻。在一些實施例中，醫藥組合物包含至少一種輔助脂質。輔助脂質可以是中性脂質或陰離子脂質。輔助脂質可以是天然脂質(如磷脂或天然脂質的類似物)或完全合成的脂質或類脂分子，與天然脂質沒有相似之處。在一個實施例中，陽離子脂質和/或輔助脂質是形成雙層的脂質。輔助脂質的例子包括但不限於1,2-二-(9Z-十八碳烯醇)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或其類似物或衍生物、膽固醇(Chol)或其類似物或衍生物和/或1,2-二油醯基-sn-甘油-3-磷酸膽鹼(DOPC)或其類似物或衍生物。

**【0147】** 在一些實施例中，至少一種陽離子脂質與至少一種輔助脂質的莫耳比為10:0至3:7，優選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，優選約1:1。在一些實施例中，在該比率中，陽離子脂質的莫耳量由陽離子脂質的莫耳量乘以陽離子脂質中的正電荷數得出。

【0148】 在一些實施例中，脂質被包含在包封載體基因體的囊泡中。囊泡可以是多層囊泡、單層囊泡或其混合物。囊泡可以是脂質體。

#### 載體基因體

【0149】 在一些實施例中，本發明提供了使用IRAK降解劑與基因治療劑用於遞送治療性轉基因至個體中的所需靶標的方法。在一些實施例中，基因治療劑包含用於在個體的所需靶標中遞送和表現的治療性轉基因的載體基因體。

【0150】 本發明考慮了基因治療劑用於引入一種或多種編碼治療性多肽和/或核酸的核酸序列以便包裝到病毒顆粒(針對病毒基因治療劑)中的用途。載體基因體可以包括建立治療性多肽和/或核酸的表現的任何元件，例如啟動子、本公開文本的ITR、核糖體結合元件、終止子、增強子、選擇性標記物、內含子、polyA信號和/或複製起點。

【0151】 在一些實施例中，治療性轉基因編碼治療性多肽。治療性多肽可以例如提供在細胞或生物體中不存在或以降低的水準存在的多肽和/或酶活性。可替代地，治療性多肽可以提供間接抵消細胞或生物體中的失衡的多肽和/或酶活性。例如，用於與代謝酶或活性缺陷引起的代謝物累積相關的病症的治療性多肽可以提供缺失的代謝酶或活性，或者它可以提供導致代謝物減少的替代代謝酶或活性。治療性多肽還可以通過例如作為顯性失活多肽起作用而用於降低多肽(例如，過表現、通過功能獲得性突變啟動或其活性以其他方式被錯誤調節的多肽)的活性。

【0152】 本發明的載體基因體可以編碼作為細胞內蛋白質、錨定在細胞膜內、保留在細胞內或由用本發明的載體轉導的細胞分泌的多肽。對於由接受載體的細胞分泌的多肽，多肽可以是可溶的(即，不附著於細胞)。例如，可溶性多

肽缺乏跨膜區並且從細胞分泌。鑒定和去除編碼跨膜結構域的核酸序列的技術是本領域中已知的。

**【0153】** 在一些實施例中，本發明的載體基因體編碼用於治療個體的疾病或病症的多肽。由本發明的基因治療劑治療的疾病和病症包括但不限於亨廷頓病(HD)、進行性核上性麻痺(PSP)、多系統萎縮症(MSA)、異染性腦白質營養不良(MLD)、肌萎縮側索硬化(ALS)、年齡相關性黃斑變性(AMD)、先天性肌營養不良(CMD)、苯丙酮尿症(PKU)、肌營養不良(MD)、A1AT缺乏、局灶節段性腎小球硬化症(FSGS)、胱胺酸尿症、血友病A、血友病B、戈謝病(GBA)、帕金森病(PD)和龐貝病。

**【0154】** 在一些實施例中，治療性多肽是亨廷頓蛋白(HTT)、tau、澱粉樣前體蛋白、 $\alpha$ -突觸核蛋白、假芳基硫酸酯酶(ARSA)、超氧化物歧化酶1(SOD1)、苯丙胺酸羥化酶(PAH)、抗肌萎縮蛋白、 $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶(A1AT)、半胱胺酸轉運蛋白、因子VIII(FVIII)、因子IX(FIX)、酸性 $\beta$ -葡糖苷酶、神經膠質源性生長因子(GDNF)、腦源性生長因子(BDNF)、酪胺酸羥化酶(TH)、GTP環水解酶(GTPCH)和/或胺基酸脫羧酶(AADC)或 $\alpha$ -葡糖苷酶。

**【0155】** 在一些實施例中，異源核酸編碼治療性核酸，例如可用於替代或敲低一個或多個缺陷基因的治療性核酸。在一些實施例中，治療性核酸可以包括而不限於DNA、siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、反義RNA、核酶或DNA核酶(DNAzyme)。因此，治療性核酸可以編碼如下RNA，當從載體的核酸轉錄時，其可以通過干擾與本發明的病症相關的異常或過量蛋白質的轉譯或轉錄來治療病症。例如，本發明的核酸可以編碼通過高度特異性消除或減少編碼異常和/或過量蛋白質的mRNA來治療病症的RNA。治療性RNA序列包括RNAi、小抑制性

RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)和/或核酶(如錘頭和髮夾核酶)，其可以通過高度特異性消除或減少編碼異常和/或過量蛋白質的mRNA來治療病症。

**【0156】** 在一些實施例中，治療性多肽或治療性核酸用於治療CNS病症。不希望受理論束縛，認為治療性多肽或治療性核酸可以用於用野生型或改善的基因替代突變基因，降低或消除其功能獲得與病症相關的多肽的表現和/或活性，或者增強多肽的表現和/或活性以補充與病症相關的缺陷(例如，其表現顯示相似或相關活性的基因的突變)。可以通過本發明的治療性多肽或治療性核酸治療的本發明的病症的非限制性例子(可以被靶向或提供的例示性基因提供在每種病症的圓括號中)包括中風(例如，半胱天冬酶-3、*Beclin1*、*Ask1*、*PAR1*、*HIF1 $\alpha$* 、*PUMA*和/或Fukuda, A.M.和Badaut, J. (2013) *Genes (Basel)* 4:435-456中描述的任何基因)、亨廷頓病(突變型*HTT*)、癲癇(例如，*SCN1A*、*NMDAR*、*ADK*和/或Boison, D. (2010) *Epilepsia* 51:1659-1668中描述的任何基因)、帕金森病( $\alpha$ -突觸核蛋白)、葛雷克病(也稱為肌萎縮側索硬化症；*SOD1*)、阿爾茨海默病(*tau*，澱粉樣前體蛋白)、皮質基底節變性或CBD(*tau*)、皮質基底神經節變性或CBGD(*tau*)、額顳葉癡呆或FTD(*tau*)、進行性核上性麻痹或PSP(*tau*)、多系統萎縮症或MSA( $\alpha$ -突觸核蛋白)、腦癌(例如，腦癌中牽涉的突變型或過表現的致癌基因)和溶酶體貯積病(LSD)。本發明的病症可以包括涉及大面積皮質(例如，皮質的多於一個功能區域、皮質的多於一個葉和/或整個皮質)的那些。可以通過本發明的治療性多肽或治療性核酸治療的本發明的病症的其他非限制性例子包括創傷性腦損傷、酶功能病症、精神病症(包括創傷後應激症候群)、神經變性疾病和認知病症(包括癡呆、自閉症和抑鬱症)。酶功能病症包括而不限於腦白質營養不良(包括卡納萬病(Canavan's disease))和下文描述的任何溶酶體貯積病。

**【0157】** 在一些實施例中，治療性多肽或治療性核酸用於治療溶酶體貯積病。如在本領域中通常已知的，溶酶體貯積病是罕見的遺傳性代謝病症，其特徵在於溶酶體功能的缺陷。此類病症通常由適當的粘多糖、糖蛋白和/或脂質代謝所需的酶缺陷引起，導致溶酶體儲存的細胞材料的病理性積累。可以通過本發明的治療性多肽或治療性核酸治療的本發明的溶酶體貯積病的非限制性例子(可以被靶向或提供的例示性基因提供在每種病症的圓括號中)包括2型或3型戈謝病(酸性 $\beta$ -葡糖苷酶，*GBA*)、GM1神經節苷脂貯積症( $\beta$ -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(半乳糖神經醯胺酶，*GALC*)、甘露糖苷貯積症病(甘露糖苷酶，如 $\alpha$ -D-甘露糖苷酶，*MAN2B1*)、 $\beta$ 甘露糖苷貯積症( $\beta$ -甘露糖苷酶，*MANBA*)、異染性腦白質營養不良病(假芳基硫酸酯酶A，*ARSA*)、粘脂質貯積症II/III型病(N-乙醯葡糖胺-1-磷酸轉移酶，*GNPTAB*)、A型尼曼-皮克病(Niemann-Pick A disease)(酸性鞘磷脂酶，*ASM*)、C型尼曼-皮克病(尼曼-皮克C蛋白，*NPCI*)、龐貝病(酸性 $\alpha$ -1,4-葡糖苷酶，*GAA*)、桑德霍夫病(Sandhoff disease)(胺基己糖苷酶 $\beta$ 亞基，*HEXB*)、A型聖菲利波病(Sanfilippo A disease)(N-磺基葡糖胺磺基水解酶，*MPS3A*)、B型聖菲利波病(N- $\alpha$ -乙醯胺基葡糖苷酶，*NAGLU*)、C型聖菲利波病(肝素乙醯輔酶A: $\alpha$ -胺基葡糖苷酶N-乙醯轉移酶，*MPS3C*)、D型聖菲利波病(N-乙醯葡糖胺-6-硫酸酯酶，*GNS*)、申德勒病( $\alpha$ -N-乙醯胺基半乳糖苷酶，*NAGA*)、斯萊病( $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶，*GUSB*)、泰-薩克斯病(胺基己糖苷酶 $\alpha$ 亞基，*HEXA*)和沃爾曼病(溶酶體酸性脂肪酶，*LIPA*)。

**【0158】** 在一些實施例中，治療性多肽編碼因子VIII、因子IX、肌微管素、存活運動神經元蛋白(SMN)、類視黃醇異構水解酶(RPE65)、NADH-泛醌氧化還原酶鏈4、脈絡膜缺損蛋白(CHM)、鳥胺酸胺甲醯基轉移酶、精胺醯琥珀酸合成

酶、 $\beta$ -珠蛋白、 $\gamma$ -珠蛋白、苯丙胺酸羥化酶、腎上腺腦白質營養不良蛋白(ALD)、抗肌萎縮蛋白、截短型抗肌萎縮蛋白、抗VEGF劑或其功能變體。

**【0159】** 在一些實施例中，異源核酸可操作地連接至啟動子。例示性啟動子包括但不限於巨細胞病毒(CMV)即時早期啟動子、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)啟動子、猿猴病毒40(SV40)啟動子和CK6啟動子、甲狀腺素轉運蛋白啟動子(TTR)、TK啟動子、四環素反應型啟動子(TRE)、HBV啟動子、hAAT啟動子、LSP啟動子、嵌合肝臟特異性啟動子(LSP)、E2F啟動子、端粒酶(hTERT)啟動子、巨細胞病毒增強子/雞 $\beta$ -肌動蛋白/兔 $\beta$ -珠蛋白啟動子(CAG)啟動子；Niwa等人, *Gene*, 1991, 108(2):193-9)和延伸因子1- $\alpha$ 啟動子(EF1- $\alpha$ )啟動子(Kim等人, *Gene*, 1990, 91(2):217-23和Guo等人, *Gene Ther.*, 1996, 3(9):802-10)。在一些實施例中，啟動子包含人 $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶啟動子或連接至雞 $\beta$ -肌動蛋白(CBA)啟動子的巨細胞病毒增強子。啟動子可以是組成型、誘導型或阻抑型啟動子。在一些實施例中，本發明提供了包含編碼與CBA啟動子可操作地連接的本公開文本的異源轉基因的核酸的重組載體。例示性啟動子和描述可見於例如美國專利授予前公開案20140335054。

**【0160】** 組成型啟動子的例子包括而不限於逆轉錄勞斯肉瘤病毒(RSV)LTR啟動子(任選地具有RSV增強子)、巨細胞病毒(CMV)啟動子(任選地具有CMV增強子)[參見例如，Boshart等人, *Cell*, 41:521-530 (1985)]、SV40啟動子、二氫葉酸還原酶啟動子、13-肌動蛋白啟動子、磷酸甘油酸激酶(PGK)啟動子和EF1 $\alpha$ 啟動子[Invitrogen]。

**【0161】** 誘導型啟動子允許調節基因表現，並且可以通過外源提供的化合物、環境因子(如溫度)或存在特定生理狀態(例如，急性期)、細胞的特定分化狀

態或在僅複製細胞時進行調節。誘導型啟動子和誘導型系統可從多種商業來源獲得，包括而不限於Invitrogen、Clontech和Ariad。已經描述了許多其他系統，並且可以由本領域技術人員容易地選擇。由外源提供的啟動子調節的誘導型啟動子的例子包括鋅誘導型綿羊金屬硫蛋白(MT)啟動子、地塞米松(Dex)誘導型小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)啟動子、T7聚合酶啟動子系統(WO 98/10088)；蛻皮激素昆蟲啟動子(No等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3346-3351 (1996))、四環素抑制型系統(Gossen等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992))、四環素誘導型系統(Gossen等人, *Science*, 268:1766-1769 (1995))，還參見Harvey等人, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518 (1998))、RU486誘導型系統(Wang等人, *Nat. Biotech.*, 15:239-243 (1997)和Wang等人, *Gene Ther.*, 4:432-441 (1997))以及雷帕黴素誘導型系統(Magari等人, *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872 (1997))。在這種背景下可使用的仍其他類型的誘導型啟動子是通過特定生理狀態(例如，溫度、急性期)、細胞的特定分化狀態或在僅複製細胞時調節的那些。

**【0162】** 在另一個實施例中，將使用用於轉基因的天然啟動子或其片段。當希望轉基因表現應模擬天然表現時，可以使用天然啟動子。當必須暫時或發展地或以組織特異性方式或反應於特定轉錄刺激物調節轉基因的表現時，可使用天然啟動子。在另外的實施例中，也可以使用其他天然表現控制元件，如增強子元件、多腺苷酸化位點或Kozak共有序列模擬天然表現。

**【0163】** 在一些實施例中，調節序列賦予組織特異性基因表現能力。在一些情況下，組織特異性調節序列結合以組織特異性方式誘導轉錄的組織特異性轉錄因子。本領域中熟知此類組織特異性調節序列(例如，啟動子、增強子等)。

**【0164】** 在一些實施例中，載體包含內含子。例如，在一些實施例中，內

含子是源自雞 $\beta$ -肌動蛋白和兔 $\beta$ -珠蛋白的嵌合內含子。在一些實施例中，內含子是小鼠微小病毒(MVM)內含子。

**【0165】** 在一些實施例中，載體包含多腺苷酸化(polyA)序列。多腺苷酸化序列的許多例子在本領域中是已知的，如牛生長激素(BGH)Poly(A)序列(參見例如，登錄號EF592533)、SV40多腺苷酸化序列和HSV TK pA多腺苷酸化序列。

### 選擇用基因治療劑和IRAK降解劑治療的患者的方法

**【0166】** 在一些態樣，本發明提供了用於將核酸遞送至個體的細胞的方法，所述方法包括a) 將來自個體的先天性免疫細胞與基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)一起培育，b) 分析所述先天性免疫細胞的一種或多種細胞激素的表現，其中與所述基因治療劑一起培育後細胞激素特徵的表現鑒定出對基因治療劑具有先天免疫的個體，c) 向在步驟b) 中鑒定出的所述個體投予IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，並且d) 向在步驟b) 中鑒定出的所述個體投予所述基因治療劑。在一些實施例中，先天性免疫細胞是樹突細胞、單核細胞、巨噬細胞或自然殺手(NK)細胞。在一些實施例中，所述方法進一步包括以下步驟：從個體中分離所述先天性免疫細胞，之後將先天性免疫細胞與基因治療劑一起培育。在一些實施例中，所述方法進一步包括以下步驟：從個體中分離單核細胞，並且在樹突細胞培養基中培育所述單核細胞以衍生來自所述單核細胞的樹突細胞，之後將樹突細胞與基因治療劑一起培育。

**【0167】** 在一些態樣，本發明提供了用於治療有需要的個體的方法，所述方法包括a) 將先天性免疫細胞與基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)一起培育，b) 分析所述先天性免疫細胞的

一種或多種細胞激素的表現，其中與所述基因治療劑一起培育後細胞激素特徵的表現鑒定出對基因治療劑具有先天免疫的個體，c) 向在步驟b) 中鑒定出的所述個體投予IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)，並且d) 向在步驟b) 中鑒定出的所述個體投予所述基因治療劑。在一些實施例中，先天性免疫細胞是樹突細胞、單核細胞、巨噬細胞或自然殺手(NK)細胞。在一些實施例中，所述方法進一步包括以下步驟：從個體中分離所述先天性免疫細胞，之後將先天性免疫細胞與基因治療劑一起培育。在一些實施例中，所述方法進一步包括以下步驟：從個體中分離單核細胞，並且在樹突細胞培養基中培育所述單核細胞以衍生來自所述單核細胞的樹突細胞，之後將樹突細胞與基因治療劑一起培育。

**【0168】** 在一些態樣，本發明提供了用於選擇用基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)和IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)治療的個體的方法，所述方法包括a) 將先天性免疫細胞與所述基因治療劑一起培育，b) 分析所述先天性免疫細胞的一種或多種細胞激素的表現，其中與所述基因治療劑一起培育後細胞激素特徵的表現鑒定出用基因治療劑和IRAK降解劑治療的個體，c) 選擇在步驟b) 中鑒定出的所述個體用基因治療劑和IRAK降解劑治療。在一些實施例中，所述方法進一步包括以下步驟：d) 向在步驟b) 中鑒定出的個體投予IRAK降解劑，並且e) 向在步驟b) 中鑒定出的個體投予基因治療劑。在一些實施例中，先天性免疫細胞是樹突細胞、單核細胞、巨噬細胞或自然殺手(NK)細胞。在一些實施例中，所述方法進一步包括以下步驟：從個體中分離所述先天性免疫細胞，之後將先天性免疫細胞與基因治療劑一起培育。在一些實施例中，所述方法進一步包括以下步驟：從個體中分離單核細胞，並且在樹突細胞培養基中培育所述單核細胞以衍生來自所述單核細胞

的樹突細胞，之後將樹突細胞與基因治療劑一起培育。

**【0169】** 在一些實施例中，從來自所述個體的外周血單個核細胞中分離先天性免疫細胞。在一些實施例中，先天性免疫細胞是樹突細胞。在一些實施例中，樹突細胞源自(例如，分化自)個體的單核細胞。在一些實施例中，從來自所述個體的外周血單個核細胞中分離單核細胞。在一些實施例中，單核細胞是CD14<sup>+</sup>單核細胞。在一些實施例中，將單核細胞用樹突細胞培養基培育約5至約10天或約7至約8天以衍生來自所述單核細胞的樹突細胞。在一些實施例中，將單核細胞用樹突細胞培養基培育約3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或多於12天中的任一個以衍生來自單核細胞的樹突細胞。在一些實施例中，在與步驟c)的所述基因治療劑一起培育之前將樹突細胞重新鋪板。在一些實施例中，在與基因治療劑一起培育之前，將所述樹突細胞重新鋪板到微孔皿中。

**【0170】** 在一些實施例中，將樹突細胞以約 $1 \times 10^3$ 至約 $1 \times 10^5$ 或約 $1 \times 10^4$ 的MOI與病毒基因治療劑一起培育。在一些實施例中，將樹突細胞以少於約 $1 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 或 $5 \times 10^5$ 中的任一個的MOI與基因治療劑一起培育。

**【0171】** 在一些實施例中，將樹突細胞與濃度為約1 ng/mL至約1 mg/mL的非病毒基因治療劑一起培育。在一些實施例中，將樹突細胞與以下濃度的非病毒基因治療劑一起培育：約1 ng/mL至約10 ng/mL、約10 ng/mL至約100 ng/mL、約100 ng/mL至約1  $\mu$ g/mL、約1  $\mu$ g/mL至約10  $\mu$ g/mL、約10  $\mu$ g/mL至約100  $\mu$ g/mL、或約100  $\mu$ g/mL至約1 mg/mL。

**【0172】** 在一些實施例中，將樹突細胞與基因治療劑一起培育約12小時至約36小時或約24小時。在一些實施例中，將樹突細胞與基因治療劑一起培育約6

小時與約48小時、約6小時與約36小時、約6小時與約24小時、約6小時與約18小時、約6小時與約12小時、約12小時與約48小時、約12小時與約36小時、約12小時與約24小時、約12小時與約18小時、約18小時與約48小時、約18小時與約36小時、約18小時與約24小時、約24小時與約48小時、約24小時與約36小時、或約36小時與約48小時之間。

**【0173】** 在一些實施例中，通過使來自多個個體的特定免疫細胞與基因治療劑接觸並且確定與先天性免疫反應相關的一種或多種細胞激素表現的變化，來針對基因治療劑確定特定免疫細胞(例如，樹突細胞、單核細胞、巨噬細胞、NK細胞等)中的細胞激素特徵，其中一種或多種細胞激素表現變化(例如，表現增加或減少)的共性指示細胞激素特徵的存在。在一些實施例中，與先天性免疫反應相關的細胞激素與toll樣受體(TLR)途徑(例如，TLR2、TLR3、TLR4或TLR9途徑)相關。在一些實施例中，細胞激素特徵包括多於1、2、3、4、5、6、7、8、9或10種細胞激素中的任一者的表現變化。在一些實施例中，多個個體包含多於1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個個體中的任一者。在一些實施例中，表現變化的共性包括在多個個體中大於約25%、50%、75%或90%的個體中先天性免疫細胞中細胞激素表現水準的相似變化。

**【0174】** 在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的一種或多種的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的兩種或更多種的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的三種或更多種的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的四種或更多種的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、

IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表現增加。

**【0175】** 在一些實施例中，先天性免疫細胞是樹突細胞，並且細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的一種或多種的表現增加。在一些實施例中，先天性免疫細胞是樹突細胞，並且細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的兩種或更多種的表現增加。在一些實施例中，先天性免疫細胞是樹突細胞，並且細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的三種或更多種的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的四種或更多種的表現增加。在一些實施例中，先天性免疫細胞是樹突細胞，並且細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表現增加。

**【0176】** 在一些實施例中，與合適的對照中的細胞激素表現相比，細胞激素特徵中細胞激素的表現增加。合適的對照的例子包括來自未與基因治療劑一起(在不存在基因治療劑的情況下)培育的先天性免疫細胞的細胞激素特徵，以及來自與基因治療試劑一起培育之前的相同或相似先天性免疫細胞的細胞激素特徵中細胞激素的表現(例如，其中所述細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的一種或多種的表現增加)。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的兩種或更多種的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的三種或更多種的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的四種或更多種的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、

TNF $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表現增加。在一些實施例中，表現增加約10%、約20%、約25%、約50%、約75%、約100%或大於100%中的任一者鑒定出用基因治療劑和IRAK降解劑治療的個體。

**【0177】** 在一些實施例中，與在不存在基因治療劑的情況下培育的樹突細胞的細胞激素特徵中細胞激素的表現相比，或者與來自與基因治療劑一起培育之前的樹突細胞的細胞激素特徵中細胞激素的表現相比，細胞激素特徵中細胞激素的表現增加，其中所述細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的一種或多種的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的兩種或更多種的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的三種或更多種的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的四種或更多種的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 的表現增加。在一些實施例中，細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表現增加。在一些實施例中，表現增加約10%、約20%、約25%、約50%、約75%、約100%或大於100%中的任一者鑒定出用基因治療劑和IRAK降解劑治療的個體。

### 醫藥組合物

**【0178】** 在一些態樣，本發明涉及包含如本文所述的基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)和/或IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)的醫藥組合物。醫藥組合物可以適用於本文所述的或在本領域中已知的任何投予方式。

**【0179】** 在一些實施例中，醫藥組合物包含醫藥上可接受的賦形劑。如在

本領域熟知的，醫藥上可接受的賦形劑是相對惰性的物質，其促進藥理學有效物質的用劑，並且可以作為液體溶液或懸浮液、作為乳液或作為適用於在使用前溶解或懸浮在液體中的固體形式提供。例如，賦形劑可以賦予形式或稠度，或充當稀釋劑。合適的賦形劑包括但不限於穩定劑、潤濕劑和乳化劑、用於改變莫耳滲透壓濃度的鹽、包封劑、pH緩衝物質和緩衝液。此類賦形劑包括適用於直接遞送至眼睛的任何藥劑，其可以在沒有過度毒性的情況下投予。醫藥上可接受的賦形劑包括但不限於山梨糖醇、多種TWEEN化合物中的任何一種、以及諸如水、鹽水、甘油和乙醇等液體。其中可以包括醫藥上可接受的鹽，例如礦物酸鹽，如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、磷酸鹽、硫酸鹽等；和有機酸鹽，如乙酸鹽、丙酸鹽、丙二酸鹽、苯甲酸鹽等。醫藥上可接受的賦形劑的透徹討論可在REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(Mack Pub. Co., 新澤西州1991)中獲得。在一些實施例中，包含本文所述的rAAV顆粒和醫藥上可接受的載劑的醫藥組合物適用於投予至人。此類載劑是本領域熟知的(參見例如，Remington's Pharmaceutical Sciences, 第15版, 第1035-1038頁和第1570-1580頁)。

**【0180】** 此類醫藥上可接受的載劑可以是無菌液體，如水和油，所述油包括石油、動物、植物或合成源的那些油，如花生油、大豆油、礦物油等。鹽水溶液以及水性右旋糖、聚乙二醇(PEG)和甘油溶液也可以用作液體載劑，特別是用於可注射溶液。醫藥組合物還可以包含另外的成分，例如防腐劑、緩衝液、張力劑、抗氧化劑和穩定劑、非離子潤濕劑或澄清劑、增粘劑等。本文所述的醫藥組合物可以按單一單位劑量或按多劑量形式包裝。通常將組合物配製成無菌且基本上等滲的溶液。

## 套組和製品

**【0181】** 如本文所述的基因治療劑(例如，AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒)和/或IRAK降解劑(例如，IRAK-4降解劑)可以包含在被設計為例如用於在如本文所述的本發明的方法的一個中使用的套組或製品內。

**【0182】** 在一些實施例中，套組或製品進一步包括投予IRAK降解劑和/或基因治療劑的說明書。本文所述的套組或製品可以進一步包括從商業和用戶角度所需的其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、過濾器、針、注射筒和具有用於實施本文所述任何方法的說明書的包裝插頁。還可以包括合適的包裝材料，並且其可以是本領域中已知的任何包裝材料，包括例如小瓶(如密封小瓶)、器皿、安瓿、瓶子、罐子、軟包裝(例如，密封的麥拉片(Mylar)或塑膠袋)等。可進一步將這些製品滅菌和/或密封。

**【0183】** 在一些實施例中，套組或製品還含有一種或多種本文所述的緩衝液和/或醫藥上可接受的賦形劑(例如，如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(Mack Pub. Co.，新澤西州1991)中所述)。在一些實施例中，套組或製品包括一種或多種本文所述的醫藥上可接受的賦形劑、載劑、溶液和/或另外的成分。本文所述的套組或製品可以按單一單位劑量或按多劑量形式包裝。套組或製品的內容物通常配製成無菌的並且可以凍乾或作為基本上等滲的溶液提供。

### 例示性實施例

**【0184】** 本發明包括以下列舉的實施例。

**【0185】** 1. 一種用於將核酸遞送至個體的細胞的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。

【0186】 2. 一種用基因治療劑治療有需要的個體的方法，所述方法包括  
a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予所述基因治療劑。

【0187】 3. 一種用於改善個體的基因療法的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。

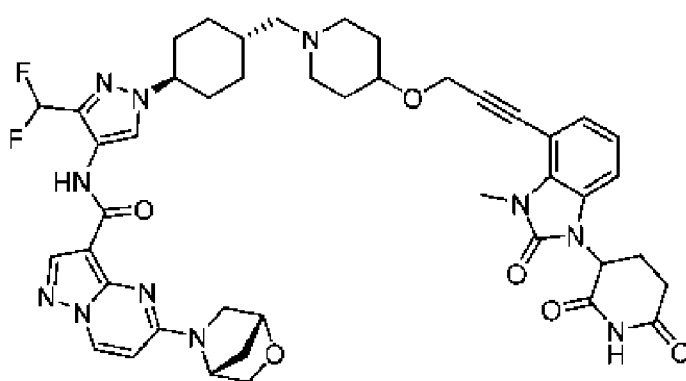
【0188】 4. 一種用於抑制對基因治療劑的免疫反應的方法，所述方法包括a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且b) 向所述個體投予基因治療劑。

【0189】 5. 根據實施例1-5中任一項所述的方法，其中所述IRAK降解劑調節IRAK蛋白激酶的活性或表現。

【0190】 6. 根據實施例5所述的方法，其中所述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。

【0191】 7. 根據實施例1-6中任一項所述的方法，其中所述IRAK降解劑調節IRAK-4蛋白激酶的活性或表現。

【0192】 8. 根據實施例1-10中任一項所述的方法，其中所述IRAK降解劑包含式[I]的化合物：



[I]，

或其醫藥上可接受的鹽。

【0193】 9. 根據實施例1-8中任一項所述的方法，其中所述基因治療劑包含病毒載體。

【0194】 10. 根據實施例9所述的方法，其中所述病毒載體是AAV顆粒。

【0195】 11. 根據實施例10所述的方法，其中所述AAV顆粒包含AAV1衣殼、AAV2衣殼、AAV3衣殼、AAV4衣殼、AAV5衣殼、AAV6衣殼、AAV7衣殼、AAV8衣殼、AAVrh8衣殼、AAV9衣殼、AAV10衣殼、AAVrh10衣殼、AAV11衣殼、AAV12衣殼、AAVrh32.33衣殼、AAV-XL32衣殼、AAV-XL32.1衣殼、AAV LK03衣殼、AAV2R471A衣殼、AAV2/2-7m8衣殼、AAV DJ衣殼、AAV DJ8衣殼、AAV2 N587A衣殼、AAV2 E548A衣殼、AAV2 N708A衣殼、AAV V708K衣殼、山羊AAV衣殼、AAV1/AAV2嵌合衣殼、牛AAV衣殼、小鼠AAV衣殼、rAAV2/HBoV1(嵌合AAV/人類博卡病毒屬病毒1)、AAV2HBKO衣殼、AAVPHP.B衣殼或AAVPHP.eB衣殼或其功能變體。

【0196】 12. 根據實施例11所述的方法，其中所述AAV衣殼包含酪胺酸突變、肝素結合突變或HBKO突變。

【0197】 13. 根據實施例10-12中任一項所述的方法，其中所述AAV病毒顆粒包含含有一個或多個末端反向重複(ITR)的AAV基因體，其中所述一種或多種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。

【0198】 14. 根據實施例13所述的方法，其中所述AAV顆粒的所述一種或多種ITR和所述衣殼源自相同的AAV血清型。

【0199】 15. 根據實施例13所述的方法，其中所述AAV顆粒的所述一種或多種ITR和所述衣殼源自不同的AAV血清型。

【0200】 16. 根據實施例9所述的方法，其中病毒載體是腺病毒顆粒。

【0201】 17. 根據實施例16所述的方法，其中所述腺病毒顆粒包含來自以下的衣殼：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、綿羊Ad或豬Ad 3型或其功能變體。

【0202】 18. 根據實施例9所述的方法，其中所述病毒載體是慢病毒顆粒。

【0203】 19. 根據實施例18所述的方法，其中所述慢病毒顆粒經水皰性口炎病毒(VSV)、淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎病毒(LCMV)、羅斯河病毒(RRV)、伊波拉病毒、瑪律堡病毒、莫柯拉病毒、狂犬病毒、RD114、或其功能變體假型化。

【0204】 20. 根據實施例9所述的方法，其中所述病毒載體是單純皰疹病毒(HSV)顆粒。

【0205】 21. 根據實施例20所述的方法，其中所述HSV顆粒是HSV-1顆粒或HSV-2顆粒或其功能變體。

【0206】 22. 根據實施例1-8中任一項所述的方法，其中所述基因治療劑包含脂質奈米顆粒。

【0207】 23. 根據實施例1-22中任一項所述的方法，其中所述基因治療劑包含編碼異源轉基因的核酸。

【0208】 24. 根據實施例23所述的方法，其中所述異源轉基因可操作地連接至啟動子。

【0209】 25. 根據實施例24所述的方法，其中所述啟動子是組成型啟動子、

組織特異性啟動子或誘導型啟動子。

【0210】 26. 根據實施例1-25中任一項所述的方法，其中在投予所述基因治療劑之前、同時、或之後投予所述IRAK降解劑。

【0211】 27. 根據實施例1-26中任一項所述的方法，其中所述個體具有適合於通過基因療法治療的疾病或病症。

【0212】 28. 根據實施例27所述的方法，其中所述疾病或病症是單基因病或病症。

【0213】 29. 根據實施例1-28中任一項所述的方法，其中將所述基因治療劑靜脈內、腹膜內、動脈內、肌肉內、皮下或肝內投予。

【0214】 30. 根據實施例1-29中任一項所述的方法，其中將所述IRAK降解劑口服、靜脈內、腹膜內、動脈內、肌肉內、皮下或肝內投予。

【0215】 31. 一種用於將核酸遞送至個體的細胞的方法，所述方法包括a) 將來自所述個體的先天性免疫細胞與所述基因治療劑一起培育，b) 分析所述先天性免疫細胞的一種或多種細胞激素的表現，其中與所述基因治療劑一起培育後細胞激素特徵的表現鑒定出對基因治療劑具有先天免疫的個體，c) 向在步驟b) 中鑒定出的所述個體投予IRAK降解劑，並且d) 向在步驟b) 中鑒定出的所述個體投予所述基因治療劑。

【0216】 32. 一種用於治療有需要的個體的方法，所述方法包括a) 將來自所述個體的先天性免疫細胞與所述基因治療劑一起培育，b) 分析所述先天性免疫細胞的一種或多種細胞激素的表現，其中與所述基因治療劑一起培育後細胞激素特徵的表現鑒定出對基因治療劑具有先天免疫的個體，c) 向在步驟b) 中鑒定出的所述個體投予IRAK降解劑，並且d) 向在步驟b) 中鑒定出的所述個體投予

所述基因治療劑。

**【0217】** 33. 一種用於選擇用基因治療劑和IRAK降解劑治療的個體的方法，所述方法包括a) 將來自所述個體的先天性免疫細胞與所述基因治療劑一起培育，b) 分析所述先天性免疫細胞的一種或多種細胞激素的表現，其中與所述基因治療劑一起培育後細胞激素特徵的表現鑒定出用基因治療劑和IRAK降解劑治療的個體，c) 選擇在步驟b) 中鑒定出的所述個體用基因治療劑和IRAK降解劑治療。

**【0218】** 34. 根據實施例31-33中任一項所述的方法，其中所述先天性免疫細胞是樹突細胞、單核細胞、巨噬細胞或自然殺手(NK)細胞。

**【0219】** 35. 根據實施例31-34中任一項所述的方法，其中從來自所述個體的外周血單個核細胞中分離所述先天性免疫細胞。

**【0220】** 36. 根據實施例31-35中任一項所述的方法，其中所述先天性免疫細胞是樹突細胞。

**【0221】** 37. 根據實施例36所述的方法，其中所述樹突細胞源自所述個體的單核細胞。

**【0222】** 38. 根據實施例37所述的方法，其進一步包括從所述個體中分離單核細胞，並且在樹突細胞培養基中培育所述單核細胞以衍生來自所述單核細胞的樹突細胞，之後將所述樹突細胞與所述基因治療劑一起培育。

**【0223】** 39. 根據實施例37或38所述的方法，其中所述單核細胞是CD14+單核細胞。

**【0224】** 40. 根據實施例37-39中任一項所述的方法，其中將所述單核細胞用所述樹突細胞培養基培育約5至約10天或約7至約8天以衍生來自所述單核細胞

胞的樹突細胞。

【0225】 41. 根據實施例31-40中任一項所述的方法，其中在與步驟c) 的所述基因治療劑一起培育之前將所述樹突細胞重新鋪板。

【0226】 42. 根據實施例41所述的方法，其中將所述樹突細胞重新鋪板到微孔皿中。

【0227】 43. 根據實施例31-42中任一項所述的方法，其中所述基因治療劑是病毒載體，並且其中將所述先天性免疫細胞與所述病毒載體以約 $1 \times 10^3$ 至約 $1 \times 10^5$ 或約 $1 \times 10^4$ 的MOI培育。

【0228】 44. 根據實施例31-42中任一項所述的方法，其中所述基因治療劑是非病毒載體，並且其中將所述先天性免疫細胞與濃度為約1 ng/mL至約1 mg/mL的非病毒載體一起培育。

【0229】 45. 根據實施例31-44中任一項所述的方法，其中將所述先天性免疫細胞與所述基因治療劑一起培育約12小時至約36小時或約24小時。

【0230】 46. 根據實施例31-45中任一項所述的方法，其中所述細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的一種或多種的表現增加。

【0231】 47. 根據實施例31-46中任一項所述的方法，其中所述細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 的表現增加。

【0232】 48. 根據實施例31-47中任一項所述的方法，其中所述細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的表現增加。

【0233】 49. 根據實施例31-48中任一項所述的方法，其中與合適的對照相比，所述細胞激素特徵中所述細胞激素的表現增加。

【0234】 50. 根據實施例49所述的方法，其中所述合適的對照是來自未與

所述基因治療劑一起培育的先天性免疫細胞的細胞激素特徵中細胞激素的表現，或者其中所述合適的對照是來自與所述基因治療劑一起培育之前的先天性免疫細胞的細胞激素特徵中細胞激素的表現。

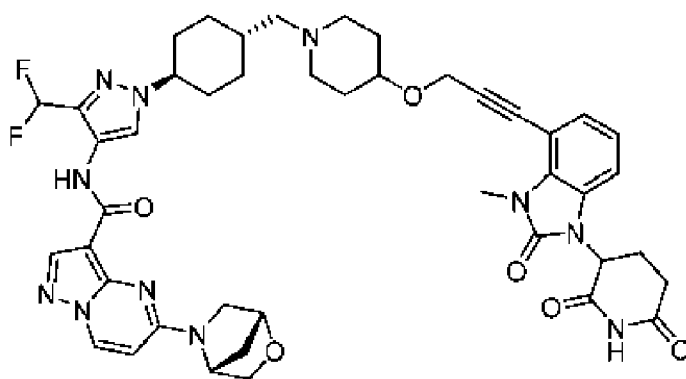
【0235】 51. 根據實施例31-50中任一項所述的方法，其中所述IRAK降解劑調節IRAK蛋白激酶的活性。

【0236】 52. 根據實施例51所述的方法，其中所述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。

【0237】 53. 根據實施例31-52中任一項所述的方法，其中所述IRAK降解劑調節IRAK-4蛋白激酶的活性。

【0238】 54. 根據實施例31-52中任一項所述的方法，其中所述IRAK降解劑是小分子。

【0239】 55. 根據實施例31-54中任一項所述的方法，其中所述IRAK降解劑包含式[I]的化合物：



[I]，

或其醫藥上可接受的鹽。

【0240】 56. 根據實施例31-55中任一項的方法，其中所述IRAK降解劑阻斷TLR9功能。

【0241】 57. 根據實施例31-56中任一項的方法，其中所述基因治療劑是病

毒載體。

【0242】 58. 根據實施例57所述的方法，其中所述病毒載體是AAV顆粒。

【0243】 59. 根據實施例58所述的方法，其中所述AAV顆粒包含AAV1衣殼、AAV2衣殼、AAV3衣殼、AAV4衣殼、AAV5衣殼、AAV6衣殼、AAV7衣殼、AAV8衣殼、AAVrh8衣殼、AAV9衣殼、AAV10衣殼、AAVrh10衣殼、AAV11衣殼、AAV12衣殼、AAVrh32.33衣殼、AAV-XL32衣殼、AAV-XL32.1衣殼、AAV LK03衣殼、AAV2R471A衣殼、AAV2/2-7m8衣殼、AAV DJ衣殼、AAV DJ8衣殼、AAV2 N587A衣殼、AAV2 E548A衣殼、AAV2 N708A衣殼、AAV V708K衣殼、山羊AAV衣殼、AAV1/AAV2嵌合衣殼、牛AAV衣殼、小鼠AAV衣殼、rAAV2/HBoV1(嵌合AAV/人類博卡病毒屬病毒1)、AAV2HBKO衣殼、AAVPHP.B衣殼或AAVPHP.eB衣殼或其功能變體。

【0244】 60. 根據實施例59所述的方法，其中所述AAV衣殼包含酪胺酸突變、肝素結合突變或HBKO突變。

【0245】 61. 根據實施例58-60中任一項所述的方法，其中所述AAV病毒顆粒包含含有一個或多個末端反向重複(ITR)的AAV基因體，其中所述一種或多種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。

【0246】 62. 根據實施例61所述的方法，其中所述AAV顆粒的所述一種或多種ITR和所述衣殼源自相同的AAV血清型。

【0247】 63. 根據實施例61所述的方法，其中所述AAV顆粒的所述一種或多種ITR和所述衣殼源自不同的AAV血清型。

【0248】 64. 根據實施例57所述的方法，其中病毒載體是腺病毒顆粒。

【0249】 65. 根據實施例64所述的方法，其中所述腺病毒顆粒包含來自腺病毒血清型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、綿羊Ad或豬Ad 3型或其功能變體的衣殼。

【0250】 66. 根據實施例57所述的方法，其中所述病毒載體是慢病毒顆粒。

【0251】 67. 根據實施例66所述的方法，其中所述重組慢病毒顆粒經水皰性口炎病毒(VSV)、淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎病毒(LCMV)、羅斯河病毒(RRV)、伊波拉病毒、瑪律堡病毒、莫柯拉病毒、狂犬病毒、RD114或其功能變體假型化。

【0252】 68. 根據實施例57所述的方法，其中所述病毒載體是單純皰疹病毒(HSV)顆粒。

【0253】 69. 根據實施例68所述的方法，其中所述HSV顆粒是HSV-1顆粒或HSV-2顆粒或其功能變體。

【0254】 70. 根據實施例31-565中任一項所述的方法，其中所述基因治療劑是脂質奈米顆粒。

【0255】 71. 根據實施例31-70中任一項所述的方法，其中所述基因治療劑包含編碼異源轉基因的核酸。

【0256】 72. 根據實施例71所述的方法，其中所述異源轉基因可操作地連接至啟動子。

【0257】 73. 根據實施例72所述的方法，其中所述啟動子是組成型啟動子、組織特異性啟動子或誘導型啟動子。

【0258】 74. 根據實施例31-73中任一項所述的方法，其中在投予所述基因治療劑之前、同時、或之後投予所述IRAK降解劑。

【0259】 75. 根據實施例31-74中任一項所述的方法，其中所述個體具有適合於通過基因療法治療的疾病或病症。

【0260】 76. 根據實施例75所述的方法，其中所述疾病或病症是單基因病或病症。

【0261】 77. 根據實施例31-76中任一項所述的方法，其中將所述基因治療劑靜脈內、腹膜內、動脈內、肌肉內、皮下或肝內投予。

【0262】 78. 根據實施例31-77中任一項所述的方法，其中將所述IRAK降解劑口服、靜脈內、腹膜內、動脈內、肌肉內、皮下或肝內投予。

【0263】 79. 一種組合物在製造用於將核酸遞送至有需要的個體的細胞的藥劑中的用途，其中所述組合物包含基因治療劑，並且其中所述組合物被配製用於與IRAK降解劑組合使用。

【0264】 80. 一種組合物在製造用於將核酸遞送至有需要的個體的細胞的藥劑中的用途，其中所述組合物包含IRAK降解劑，並且其中所述組合物被配製用於與基因治療劑組合使用。

【0265】 81. 一種組合物在製造用於治療需要基因療法的個體的藥劑中的用途，其中所述組合物包含基因治療劑，並且其中所述組合物被配製用於與IRAK降解劑組合使用。

【0266】 82. 一種組合物在製造用於治療需要基因療法的個體的藥劑中

的用途，其中所述組合物包含IRAK降解劑，並且其中所述組合物被配製用於與基因治療劑組合使用。

**【0267】** 83. 一種組合物在製造用於調節需要基因療法的個體對基因療法的免疫反應的藥劑中的用途，其中所述組合物包含基因治療劑，並且其中所述組合物被配製用於與IRAK降解劑組合使用。

**【0268】** 84. 一種組合物在製造用於調節個體對基因療法的免疫反應的藥劑中的用途，其中所述組合物包含IRAK降解劑，並且其中所述組合物被配製用於與基因治療劑組合使用。

**【0269】** 85. 根據實施例79-84中任一項所述的用途，其中所述基因治療劑是AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒。

**【0270】** 86. 根據實施例79-85中任一項所述的用途，其中所述IRAK降解劑是IRAK-4降解劑。

**【0271】** 87. 一種包含用於在將核酸遞送至有需要的個體的細胞中使用的基因治療劑的組合物，其中所述基因治療劑與IRAK降解劑組合使用。

**【0272】** 88. 一種包含用於在將核酸遞送至有需要的個體的細胞中使用的IRAK降解劑的組合物，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑組合使用。

**【0273】** 89. 一種包含用於在治療需要基因療法的個體中使用的基因治療劑的組合物，其中所述基因治療劑與IRAK降解劑組合使用。

**【0274】** 90. 一種包含用於在治療需要基因療法的個體中使用的IRAK降解劑的組合物，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑組合使用。

**【0275】** 91. 一種包含用於調節需要基因療法的個體對基因療法的免疫反應的IRAK降解劑的組合物，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑組合使用。

【0276】 92. 一種包含用於抑制需要基因療法的個體對基因療法的免疫反應的IRAK降解劑的組合物，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑組合使用。

【0277】 93. 根據實施例87-92中任一項所述的組合物，其中所述基因治療劑是AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒。

【0278】 94. 根據實施例87-93中任一項所述的組合物，其中所述IRAK降解劑是IRAK-4降解劑。

【0279】 95. 一種用於在根據實施例1-78中任一項所述的方法中使用的套組。

【0280】 96. 一種用於根據實施例78-86中任一項所述用途的套組。

【0281】 97. 一種包含根據實施例87-94中任一項所述的組合物的套組。

## 實例

【0282】 通過參考以下實例將更全面地理解本發明。然而，它們不應被解釋為限制本發明的範圍。應理解，本文所述的實例和實施例僅用於說明目的，並且根據它們進行的各種修改或改變應為本領域技術人員知曉，並且應包括在本申請的精神和範圍內以及所附申請專利範圍的範圍內。

### 實例1：評估IRAK4降解劑對用AAV處理的人細胞的影響的離體方案

【0283】 本實例提供了檢測IRAK4抑制對暴露於AAV的淋巴細胞和樹突細胞的影響的策略。

【0284】 AAV觸發涉及先天性免疫系統和適應性免疫系統兩者的啟動的免疫反應。雖然相對好地表徵了對AAV的適應性免疫反應，但對由AAV引起的先天性免疫啟動瞭解得很少。

【0285】 IRAK4是TLR途徑內的激酶，其啟動先天性免疫反應。雖然廣泛

作用的免疫抑制劑改善AAV遞送，但這會導致轉基因表現的喪失、副作用和機會性感染風險。因此，抑制IRAK4可導致有利於AAV治療的更具特異性的免疫調節。

**【0286】** 為了製備外周血單個核細胞(PBMC)，將來自經富集白細胞單采術產物(leukopaks)的血液傾倒入50 mL管中，並且以1:1比率添加DPBS。將血液緩慢移液到含有15 mL Ficoll(GE17-5442-02)的單獨的50 mL管中，以確保血液和Ficoll層不混合。將混合物在室溫下以2000 RPM離心25分鐘(9加速，且無制動)。將含有白細胞和血小板的血沈棕黃層收集，轉移到新的管中，並在400 RCF下離心五分鐘。將細胞用含有1% FBS或FCS的PBS洗滌三次並計數。

**【0287】** 遵循可網上獲得的製造商的方案(萬維網 [miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0001260.PDF](http://miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0001260.PDF) ; Miltenyi Biotech, 德國, 訂單號130-050-201)使用CD14微珠從PBMC中分離CD14+單核細胞。簡言之，將細胞用20 µL CD14微珠/ $10^7$ 個總細胞在2°C-8°C下培育15分鐘。將細胞施加到磁柱上並且允許未標記的細胞通過。洗滌柱三次後，將柱從磁性分離器中取出，放置在收集管上，並且通過將柱塞推入柱中來沖出磁性標記的細胞。

**【0288】** 遵循可網上獲得的製造商方案，使用ImmunoCult-ACF樹突細胞培養基、分化補充劑和成熟補充劑 ([cdn.stemcell.com/media/Files/pis/DX20521-PIS\\_1\\_2\\_0.pdf?\\_ga=2.81451927.1035383195.16421057001174975582.1603298321](http://cdn.stemcell.com/media/Files/pis/DX20521-PIS_1_2_0.pdf?_ga=2.81451927.1035383195.16421057001174975582.1603298321) ; Stem Cell Technologies, 目錄號10986、10988和10989)將單核細胞分化為樹突細胞。簡言之，將純化的單核細胞添加到含有分化補充劑的樹突細胞培養基中並且在37°C下培育三天。在第3天，更換培養基並且將細胞再培育兩天。在第五天以1比100稀釋度添加成熟補充劑(例如，

每5 mL培養物添加50  $\mu$ L補充劑)。

【0289】 在第七天收穫分化的細胞。通過向解凍的PBMC中添加4 mL ImmunoCult XF T細胞擴增培養基(Stem Cell Technologies, 目錄號10981)刺激T細胞。將細胞在400 g下旋轉5分鐘, 抽吸培養基並且使細胞在10 mL新鮮擴增培養基中靜息過夜。

【0290】 在收集和計數後, 將經靜息的細胞在400 g下旋轉五分鐘並且重懸。在T細胞完全培養基中的96孔板中進行細胞刺激。培養基中的細胞激素的最終濃度為100IU IL-2、5 ng/mL Il-7和25 ng/mL IL-15。以1e5 MOI進行AAV刺激, 並且10  $\mu$ g PHA-p用作陽性對照。每三天進行一次半耗盡。PBMC解凍後十天, 在普通T細胞培養基中用AAV再次刺激細胞。24小時刺激後收集培養基。

【0291】 使用標準的三重轉染方法(Sena-Esteves和Gao, *Cold Spring Harb Protoc*; doi:10.1101/pdb.top095513, 2020)產生rAAV載體(例如, AAV1、AAV2和/或AAVrh32.33)。將病毒通過氯化鈉超速離心進行純化, 並且使用銀染色和定量聚合酶連鎖反應(qPCR)兩者進行滴定。

【0292】 將淋巴細胞和樹突細胞與AAV載體一起培育並且用IRAK4降解劑預處理、後處理或共處理。在AAV培育之前或之後3、6、12、24或48小時, 用IRAK4降解劑進行預處理和後處理。將細胞以1e5 MOI與AAV一起培育6、12、24、48或72小時。將細胞用式[I]的化合物(Kymera Therapeutics)以範圍為1 nM至1 M的劑量處理。LPS(300 ng/mL, 24小時, Sigma L2630100MG)和R848(1  $\mu$ g/mL, 24小時, Invitrogen tlrl-r948-5)用作對照。另外的測試組包括單獨用AAV處理、單獨用IRAK4抑制劑處理或用IRAK4抑制劑與LPS或R848一起處理。

【0293】 為了確定在用IRAK4降解劑處理的細胞中TLR9途徑被抑制的程

度，收集細胞培養基並且使用Meso Scale Discovery(MSD)測定進行分析以確定細胞激素釋放水準。使用V-PLEX人生物標記物54-Plex套組並且根據製造商的方案(Meso Scale Discovery，馬里蘭州羅克維爾)進行測定。

### **實例2：用AAV或LNP治療的小鼠中IRAK4降解劑的體內分析**

**【0294】** 該實例提供了檢測用IRAK4降解劑治療動物時AAV免疫原性是否被抑制的體內策略。

**【0295】** 所有動物飼養、維護、治療和實驗都是基於研究機構動物管理與使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee，IACUC)指南進行的。

**【0296】** 動物接受AAV或LNP注射，並且用IRAK4抑制劑進行預治療、後治療或共治療。在AAV或LNP注射前或後6小時、過夜、24小時或48小時進行IRAK4降解劑的預治療和後治療。肌肉內注射AAV以 $5 \times 10^{11}$  vg/kg劑量進行，並且監測7、14、21、28、35、42和63天。將LNP以1 mg/kg、10 mg/kg或100 mg/kg的劑量靜脈內、皮下或腹膜內注射。另外，將動物用皮下、腹膜內或口服給予的1 mg/kg、10 mg/kg或100 mg/kg式[II]的化合物(Kymera Therapeutics)進行預治療、後治療或共治療。另外的測試組包括單獨用AAV治療、單獨用IRAK4抑制劑治療或用IRAK4抑制劑與LPS或R848一起治療。

**【0297】** 在治療後7、14、21、28、35、42或63天處死動物並且分離肌肉、肝臟、骨髓、脾臟、血液和胸腺。立即將組織樣品在乾冰上冷凍。提取DNA和RNA樣品，並且使用即時定量PCR(qPCR)對載體基因體拷貝和轉基因表現進行定量。

**【0298】** 使用蘇木精和伊紅(H&E)染色測定所治療動物的組織炎症。根據本領域熟知的方法對經福馬林固定和石蠟包埋的肌肉和肝臟組織進行染色。

(Gernoux, G等人, *Mol Ther*, 2020, 28(3):747-757)。

【0299】 按照本領域熟知的方法在肌肉、肝臟和脾臟冷凍切片上進行免疫組織化學測定(Gernoux, G等人, *Mol Ther*, 2020, 28(3):747-757)。將樣品收集在載玻片上，風乾，並且用3%多聚甲醛固定。分析樣品中的活化免疫細胞(如T細胞(使用抗CD3、CD4和MHC II)和巨噬細胞(使用抗F4/80和MHC II))以及AAV轉基因表現。使用標準X-gal方案評估細胞核和細胞質 $\beta$ -gal。

【0300】 為了分析所治療動物中的細胞激素水準，收集來自這些受試者的血清並且將其用於Meso Scale Discovery(MSD)測定。使用V-PLEX人生物標記物54-Plex套組並且根據製造商的方案(Meso Scale Discovery，馬里蘭州羅克維爾)進行測定。

【0301】 為了測量所治療動物的IFN- $\gamma$ 分泌，對注射後分離的脾細胞進行ELISpot測定(Gernoux, G等人, *Mol Ther*, 2020, 28(3):747-757)。將分離的細胞使用AAV在體外刺激48小時。使用iSpot ELISpot Reader ELR068IFL(AID)確定斑點數，並且使用AID ELISpot Reader軟體v.6.0進行分析。當斑點形成單位超過每 $1e6$ 個細胞50個並且比對照條件下高至少三倍時認為反應是陽性的。未刺激的細胞用作陰性對照，並且CEFT和CD3/CD28刺激用作陽性對照。

【0302】 從脾臟和骨髓樣品獲得單細胞懸浮液。將細胞在CD16/32(Fc Block；BD Biosciences)中培育並且用抗體染色。在LSR II(BD Biosciences)上採集細胞並且用FlowJo軟體(Tree Star)進行分析。

【0303】 為了分析所治療動物中的細胞激素表現，使用胞內細胞激素染色對分離的脾細胞進行IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-4和IL-6染色。脾細胞的製備如Mays, *J Immunol* 2009 182(1) 6051-6060中所述。將脾細胞鋪板於補充有 $1 \mu\text{g/mL}$ 佈雷菲

德菌素A(GolgiPlug, BD Pharmingen)和20 ng/mL小鼠IL-2(BD Pharmingen)的T細胞測定培養基中。染色前，將細胞在存在或不存在IRAK4降解劑的情況下在37°C下10% CO<sub>2</sub>中用AAV刺激5小時。刺激後，將細胞洗滌，用抗體染色並且使用流式細胞術檢查。在LSR II上採集樣品，並且使用FlowJo軟體進行分析。

**【0304】** 遵循Mays, *J Immunol* 2009 182(1) 6051-6060中描述的方案，通過使用PE綴合的MHC I類H2-Kb-ICPMYARV四聚體複合物(Beckman Coulter)的MHC I類四聚體染色來確定用AAV和IRAK4降解劑治療的動物的T細胞反應。在用AAV和IRAK4降解劑治療後的不同時間，對通過睜後取血分離的肝素化全血細胞進行四聚體染色。將細胞在室溫下用PE綴合的四聚體和FITC綴合的抗CD8 $\alpha$ (Ly-2)抗體(BD Pharmingen)共染色30分鐘，並且用補充有固定溶液(Beckman Coulter)的iTAg MHC四聚體裂解溶液在室溫下固定15分鐘。將細胞在PBS中洗滌三次並且重懸於0.01% BD CytoFix(BD Biosciences)中。在LSR II上採集樣品，並且使用FlowJo軟體進行分析。

### **實例3：IRAK4降解劑KT-474對用AAV處理的人細胞的影響的離體分析**

#### **材料與方法**

**【0305】** 外周血單個核細胞的製備。將來自不同供體的經富集白細胞單采術產物(Stem cell technologies)的血液傾倒入50 mL管中，並且以1:1的比率添加杜氏磷酸鹽緩衝鹽水(DPBS)。將血液加DBPS的混合物緩慢移液到含有15 mL Ficoll(GE17-5442-02)的單獨的50 mL管中，以確保血液和Ficoll相不混合。將混合物在室溫下以2000 RPM離心25分鐘(9加速並且無制動)。將含有外周血單個核細胞(PBMC)的血沈棕黃層收集，轉移到新的管中，並且以400 RCF離心五分鐘。將PBMC用含有1%胎牛血清(FBS)或胎牛犢血清(FCS)的磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)

洗滌三次並且計數。

**【0306】單核細胞的分離。**遵循製造商的方案(Miltenyi Biotech, 德國, 訂單號130-050-201, 方案可在網上萬維網 [miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0001260.PDF](http://miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0001260.PDF)獲得), 使用CD14微珠從PBMC中分離CD14+單核細胞。簡言之, 將PBMC與20  $\mu$ L CD14微珠/ $10^7$ 個總細胞在2°C-8°C下一起培育15分鐘。將PBMC施加到磁柱(Miltenyi; 萬維網 [miltenyibiotec.com/US-en/products/ls-columns.html#130-042-401](http://miltenyibiotec.com/US-en/products/ls-columns.html#130-042-401))上, 並且允許未標記的細胞通過。洗滌柱三次後, 將柱從磁性分離器(Miltenyi; 萬維網 [miltenyibiotec.com/US-en/products/quadromacs-separator-and-starting-kits.html#130-091-051](http://miltenyibiotec.com/US-en/products/quadromacs-separator-and-starting-kits.html#130-091-051))中取出, 放置在收集管上, 並且通過將柱塞推入柱中來沖出磁性標記的CD14+單核細胞。

**【0307】單核細胞的分化。**遵循可網上獲得的製造商方案, 使用ImmunoCult-ACF樹突細胞培養基、分化補充劑和成熟補充劑(Stem Cell Technologies, 目錄號10986、10988和10989; 萬維網 [cdn.stemcell.com/media/Files/pis/DX20521-PIS\\_1\\_2\\_0.pdf?\\_ga=2.81451927.1035383195.1642105700-1174975582.1603298321](http://cdn.stemcell.com/media/Files/pis/DX20521-PIS_1_2_0.pdf?_ga=2.81451927.1035383195.1642105700-1174975582.1603298321))將CD14+單核細胞分化為樹突細胞。簡言之, 將純化的CD14+單核細胞添加到含有分化補充劑的樹突細胞培養基中並且在37°C下培育三天。在第3天, 用含有分化補充劑的新鮮樹突細胞培養基替代培養基, 並且將細胞再培育兩天。在第5天, 將成熟補充劑以1比100稀釋度添加到細胞中(例如, 每5 mL培養物添加50  $\mu$ L補充劑)。在第7天收穫分化的樹突細胞。

**【0308】rAAV生產和滴定。**使用標準的三重轉染方法(Sena-Estevés和Gao, *Cold Spring Harb Protoc*; doi:10.1101/pdb.top095513, 2020)產生rAAV載體。所評

價的所有血清型都編碼相同的GFP轉基因。將病毒通過氯化銫超速離心進行純化，並且使用銀染色和定量聚合酶連鎖反應(qPCR)兩者進行滴定。

**【0309】 AAV、KT 474治療和細胞激素測量** 將人類單核細胞性樹突細胞以96孔格式鋪板，並且以 $1e5$  MOI用指定劑量的AAV和KT 474處理，並且24小時後收穫用於經由流式細胞術進行下游分析(如細胞毒性和靶基因表現)。收集培養基用於細胞激素分析。將細胞以2,000 rpm離心5分鐘，並且收集上清液以分析細胞激素。遵循製造商的方案利用luminex使用MILLIPLEX®人細胞激素/趨化介素/生長因子組套A 38 Plex預混合磁珠組套-免疫學多重測定目錄號HCYTA-60K-PX38測量細胞激素。

**【0310】 細胞活力評估和IRAK4表現：**將樹突細胞(DC)重懸於FACS緩衝液中並且轉移到U形底96孔板。將細胞以2,000 rpm離心5分鐘，並且丟棄上清液。為了分析細胞活力，對活/死負染色細胞進行門控，並且將百分比確定為細胞活力。將來自Invitrogen的LIVE/DEAD™可固定核-IR死細胞染色套組(用於633 nm或635 nm激發)目錄號L34975用於細胞染色。對於IRAK4染色，將樹突細胞裂解並且用1X BD Phosphoflow™裂解/固定緩衝液在37°C下固定10分鐘。然後，將樹突細胞用BD Phosphoflow™ Perm緩衝液III在4°C下透化30分鐘。然後，將樹突細胞用PE小鼠抗人IRAK4抗體在4°C下染色30分鐘，洗滌，並且運行流式細胞術。PE小鼠抗人IRAK4(BD Biosciences，目錄號560303)BD Phosphoflow™裂解/固定緩衝液(目錄號558049)BD Phosphoflow™ Perm緩衝液III，目錄號558050)。

**【0311】 圖1**示出了評估IRAK4降解劑KT-474對用AAV處理的人類樹突細胞的影響的方案。在**圖1**中，從經富集白細胞單采術產物中分離出外周血單個核

細胞(PBMC)。從PBMC中純化CD14+單核細胞，將分化因子混合物添加到單核細胞中以允許分化為樹突細胞，並且最後添加成熟因子以獲得成熟的樹突細胞。在處理後24小時，將成熟的樹突細胞用KT-474與AAV一起處理(共同處理)。將培養基上清液收集用於下游分析(如細胞激素釋放)。將細胞用於測量IRAK4降解的水準並且評估細胞活力。

## 結果

**【0312】** 將人類單核細胞性樹突細胞按指示用不同劑量的KT-474共處理，並且將相同的細胞在相同時間以 $1e5$ 的MOI用AAV感染24小時，並且分析培養基上清液的細胞激素釋放。**圖2**示出用KT-474與AAV共處理導致抑制細胞激素釋放。用AAV處理誘導來自樹突細胞的IL1b(**圖2A**)、IL6(**圖2B**)和TNFa(**圖2C**)細胞激素的分泌，並且該分泌被所有劑量的KT-474阻斷。橫條圖上的每個點表示代表性供體的技術重複。實驗在三名供體上進行並且利用單因素方差分析確定統計學顯著性。細胞激素分泌以遍及所有供體的百分比表示。

**【0313】** 將人類單核細胞性樹突細胞按指示用不同劑量的藥物處理，並且將相同的細胞以 $1e5$ 的MOI用AAV感染24小時。與處理的(AAV與KT474共處理的)和AAV感染的細胞相比，對照(未處理/未感染的細胞)之間沒有觀察到顯著差異，這表明KT-474在所測試的劑量下沒有細胞毒性(**圖3**)。橫條圖上的每個點表示一個供體，實驗在三個供體上進行並且利用單因素方差分析確定統計學顯著性。因此，用KT-474處理不引起原代人類單核細胞性樹突細胞中的細胞毒性。

**【0314】** 將人類單核細胞性樹突細胞按指示用不同劑量的KT-474處理，並且將相同的細胞以 $1e5$ 的MOI用AAV感染24小時。使用流式細胞術分析細胞的IRAK4降解。KT-474在所有劑量下引起IRAK4水準的降低(**圖4**)。橫條圖上的每

個點表示代表性供體的技術重複，實驗在三個供體上進行並且利用單因素方差分析確定統計學顯著性。

#### **實例4：體內小鼠模型中IRAK4降解劑KT-474對由AAV誘導的免疫反應的影響的分析**

##### **材料與方法**

**【0315】 體內小鼠實驗：**C57BL/6J小鼠購買自傑克森實驗室(Jackson Laboratory)。將6-8周雄性小鼠分為3組 - PBS組、AAV組和AAV+KT474組，所有組各具有6只小鼠。將式(I)的化合物(KT-474)以100 mg/kg劑量與小鼠食物(目錄號2016)(Teklad全面16%蛋白質齧齒動物飲食 <https://www.inotivco.com/rodent-natural-ingredient-2016-diets>)混合。對AAV+KT-474組在注射AAV前15天用食物和KT474餵養，而對PBS組和AAV組用小鼠食物(目錄號2016)(Teklad全面16%蛋白質齧齒動物飲食 <https://www.inotivco.com/rodent-natural-ingredient-2016-diets>)餵養。對PBS組小鼠肌肉內注射100 ul PBS，對AAV組以雙腿的每股四頭肌以 $1 \times 10^{11}$  vg肌肉內注射，100 ul體積。研究中使用的AAV衣殼具有LacZ轉基因。所有動物實驗均根據弗雷明漢賽諾菲(Sanofi)的研究機構動物管理與使用委員會進行。每週進行一次下頷下取血，並且在注射AAV後三周進行屍檢。

**【0316】 圖5**示出了體內小鼠實驗的示意圖。所描繪的小鼠示出組AAV+KT-474組，其中在注射AAV之前15天將KT-474混合食物喂給小鼠，然後在第14天收集血液用於PBMC分析，並且在第21天進行小鼠屍檢以收穫脾臟。對於僅PBS組和AAV組餵食常規食物，並且在第14天取血並且在第21天屍檢。

**【0317】 PBMC分離** 將120 ul血液收集在K2EDTA包被的管中。將血液與

DBPS以1：1比率混合，並且移液到含有Ficoll(GE17-5442-02)的單獨的管中以確保血液和Ficoll相不混合。將混合物在室溫下以2000 RPM離心25分鐘(9加速並且無制動)。將含有外周血單個核細胞(PBMC)的血沈棕黃層收集，轉移到新的管中，並且以400 RCF離心五分鐘。將PBMC用含有1%胎牛血清(FBS)或胎牛犢血清(FCS)的磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)洗滌三次並且計數。將由此獲得的PBMC細胞用不同的抗體染色以量化外周血中不同免疫細胞亞群的百分比。

**【0318】 LacZ四聚體染色** 從約120  $\mu$ l小鼠血液中分離出PBMC，並且將其轉移到96孔U形底板中。將PBMC通過以2,000 rpm離心5分鐘用200  $\mu$ l FACS緩衝液洗滌一次，並且將PBMC用流動抗體混合物(1：100抗CD4 PE-Cy7、1：50抗CD8a FITC、1：100抗CD62L APC、1：100抗CD44太平洋藍、1：100活/死細胞染色套組以及1：20 H-2Kb  $\beta$ -半乳糖苷酶四聚體)在4°C下染色30分鐘。培育後，將細胞用FACS緩衝液洗滌2次，然後用100  $\mu$ l BD Cytotfix/Cytoperm固定/透化溶液套組在4°C下固定15分鐘。將細胞用FACS緩衝液洗滌2次，然後將樣品在流式細胞儀(Novocyte Penton流式細胞儀系統5雷射器，Agilent Technology)上運行。

## 結果

**【0319】** 在注射AAV後第14天給小鼠取血並且分離PBMC。在注射AAV後第21天收穫脾細胞。用不同的抗體對PBMC和脾細胞染色以量化LacZ四聚體陽性細胞。與PBS對照相比，這些細胞群體在投予AAV後上調，然後在KT-474處理後顯著減少(圖6)。圖6A示出了在注射AAV後第14天源自外周血的PBMC中轉基因LacZ特異性CD8 T細胞的減少。圖6B示出了注射AAV後第21天脾臟中轉基因LacZ特異性CD8 T細胞的減少。ROUT異常值法和單因素方差分析法用於確定統計學顯著性。ROUT法從非線性回歸中識別異常值。

## 實例5：評估口服投予IRAK4降解劑KT-474對由AAV誘導的免疫反應的影響的體內小鼠模型

【0320】圖7示出了評估口服投予IRAK4降解劑KT-474對由AAV誘導的免疫反應的影響的體內小鼠模型的總體示意圖。C57BL/6J小鼠購自傑克森實驗室。將6-8周雄性小鼠分為3組 - PBS組、AAV組和AAV+KT474。經由口服投予途徑，以100 mg/kg劑量每日兩次處理作為預處理和共處理策略來測試KT-474。對於其他疾病，KT-474的口服投予正在臨床中測試 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04772885>)，並且因此應該會有效阻斷IRAK4蛋白。Kymera therapeutics公司還顯示了使用KT474在人細胞和小鼠組織中完全降解IRAK4蛋白的證據 ([https://www.kymeratx.com/wp-content/uploads/2021/09/Euro-Prot-Deg-Summit-Sept-21-Final\\_Anthony-Slavin.pdf](https://www.kymeratx.com/wp-content/uploads/2021/09/Euro-Prot-Deg-Summit-Sept-21-Final_Anthony-Slavin.pdf))。

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種用於將核酸遞送至有需要的個體的細胞的方法，所述方法包括

- a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且
- b) 向所述個體投予基因治療劑。

【請求項2】 一種用基因治療劑治療有需要的個體的方法，所述方法包括

- a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且
- b) 向所述個體投予所述基因治療劑。

【請求項3】 一種用於改善有需要的個體的基因療法的方法，所述方法包括

- a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且
- b) 向所述個體投予基因治療劑。

【請求項4】 一種用於抑制有需要的個體對基因治療劑的免疫反應的方法，所述方法包括

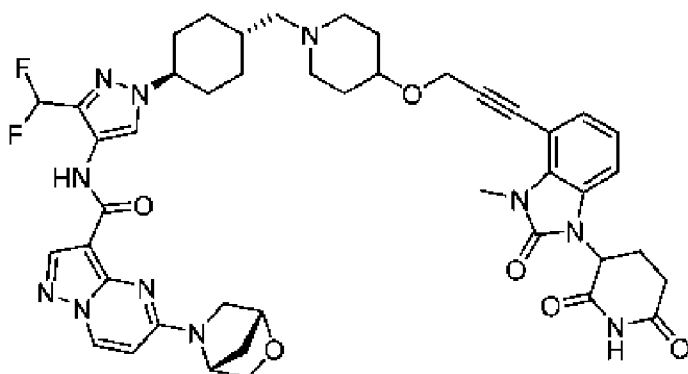
- a) 向所述個體投予IRAK降解劑，並且
- b) 向所述個體投予基因治療劑。

【請求項5】 如請求項1-4中任一項所述的方法，其中所述IRAK降解劑調節IRAK蛋白激酶的活性或表現。

【請求項6】 如請求項5所述的方法，其中所述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。

【請求項7】 如請求項1-6中任一項所述的方法，其中所述IRAK降解劑調節IRAK-4蛋白激酶的活性或表現。

【請求項8】如請求項1-7中任一項所述的方法，其中所述IRAK降解劑包含式II的化合物：



II，

或其醫藥上可接受的鹽。

【請求項9】如請求項1-8中任一項所述的方法，其中所述基因治療劑包含病毒載體。

【請求項10】如請求項9所述的方法，其中所述病毒載體是AAV顆粒。

【請求項11】如請求項10所述的方法，其中所述AAV顆粒包含AAV1衣殼、AAV2衣殼、AAV3衣殼、AAV4衣殼、AAV5衣殼、AAV6衣殼、AAV7衣殼、AAV8衣殼、AAVrh8衣殼、AAV9衣殼、AAV10衣殼、AAVrh10衣殼、AAV11衣殼、AAV12衣殼、AAVrh32.33衣殼、AAV-XL32衣殼、AAV-XL32.1衣殼、AAV LK03衣殼、AAV2R471A衣殼、AAV2/2-7m8衣殼、AAV DJ衣殼、AAV DJ8衣殼、AAV2 N587A衣殼、AAV2 E548A衣殼、AAV2 N708A衣殼、AAV V708K衣殼、山羊AAV衣殼、AAV1/AAV2嵌合衣殼、牛AAV衣殼、小鼠AAV衣殼、rAAV2/HBoV1(嵌合AAV/人類博卡病毒屬病毒1)、AAV2HBKO衣殼、AAVPHP.B衣殼或AAVPHP.eB衣殼或其功能變體。

【請求項12】如請求項11所述的方法，其中所述AAV衣殼包含酪胺酸突變、肝素結合突變、或HBKO突變。

【請求項13】 如請求項10-12中任一項所述的方法，其中所述AAV病毒顆粒包含含有一種或多種末端反向重複(ITR)的AAV基因體，其中所述一種或多種 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。

【請求項14】 如請求項13所述的方法，其中所述AAV顆粒的所述一種或多種ITR和所述衣殼源自相同的AAV血清型。

【請求項15】 如請求項13所述的方法，其中所述AAV顆粒的所述一種或多種ITR和所述衣殼源自不同的AAV血清型。

【請求項16】 如請求項9所述的方法，其中所述病毒載體是腺病毒顆粒。

【請求項17】 如請求項16所述的方法，其中所述腺病毒顆粒包含來自以下的衣殼：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、綿羊Ad或豬Ad 3型、或其功能變體。

【請求項18】 如請求項9所述的方法，其中所述病毒載體是慢病毒顆粒。

【請求項19】 如請求項18所述的方法，其中所述重組慢病毒顆粒經水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎病毒(LCMV)、羅斯河病毒(RRV)、伊波拉病毒、瑪律堡病毒、莫柯拉病毒、狂犬病毒、RD114、或其功能變體假型化。

【請求項20】 如請求項9所述的方法，其中所述病毒載體是單純疱疹病毒(HSV)顆粒。

【請求項21】 如請求項20所述的方法，其中所述HSV顆粒是HSV-1顆粒或HSV-2顆粒或其功能變體。

【請求項22】 如請求項1-8中任一項所述的方法，其中所述基因治療劑包含脂質奈米顆粒。

【請求項23】 如請求項1-22中任一項所述的方法，其中所述基因治療劑包含編碼異源轉基因的核酸。

【請求項24】 如請求項23所述的方法，其中所述異源轉基因可操作地連接至啟動子。

【請求項25】 如請求項24所述的方法，其中所述啟動子是組成型啟動子、組織特異性啟動子、或誘導型啟動子。

【請求項26】 如請求項1-25中任一項所述的方法，其中在投予所述基因治療劑之前、同時、或之後，投予所述IRAK降解劑。

【請求項27】 如請求項1-26中任一項所述的方法，其中所述個體具有適合於通過基因療法治療的疾病或病症。

【請求項28】 如請求項27所述的方法，其中所述疾病或病症是單基因病或病症。

【請求項29】 如請求項1-28中任一項所述的方法，其中將所述基因治療劑靜脈內、腹膜內、動脈內、肌肉內、皮下、或肝內投予。

【請求項30】 如請求項1-29中任一項所述的方法，其中將所述IRAK降解劑口服、靜脈內、腹膜內、動脈內、肌肉內、皮下、或肝內投予。

【請求項31】 一種用於將核酸遞送至有需要的個體的細胞的方法，所述方法包括

- a) 將來自所述個體的先天性免疫細胞與所述基因治療劑一起培育，
- b) 分析所述先天性免疫細胞的一種或多種細胞激素的表現，其中與所述基因治療劑一起培育後細胞激素特徵的表現鑒定出對所述基因治療劑具有先天免疫的個體，
- c) 向在步驟b) 中鑒定出的所述個體投予IRAK降解劑，並且
- d) 向在步驟b) 中鑒定出的所述個體投予所述基因治療劑。

**【請求項32】** 一種用於治療有需要的個體的方法，所述方法包括

- a) 將來自所述個體的先天性免疫細胞與所述基因治療劑一起培育，
- b) 分析所述先天性免疫細胞的一種或多種細胞激素的表現，其中與所述基因治療劑一起培育後細胞激素特徵的表現鑒定出對所述基因治療劑具有先天免疫的個體，
- c) 向在步驟b) 中鑒定出的所述個體投予IRAK降解劑，並且
- d) 向在步驟b) 中鑒定出的所述個體投予所述基因治療劑。

**【請求項33】** 一種用於選擇用基因治療劑和IRAK降解劑治療的個體的方法，所述方法包括

- a) 將來自所述個體的先天性免疫細胞與所述基因治療劑一起培育，
- b) 分析所述先天性免疫細胞的一種或多種細胞激素的表現，其中與所述基因治療劑一起培育後細胞激素特徵的表現鑒定出用基因治療劑和IRAK降解劑治療的個體，
- c) 選擇在步驟b) 中鑒定出的所述個體用基因治療劑和IRAK降解劑治療。

**【請求項34】** 如請求項31-33中任一項所述的方法，其中所述先天性免疫細胞是樹突細胞、單核細胞、巨噬細胞或自然殺手(NK)細胞。

【請求項35】 如請求項31-34中任一項所述的方法，其中從來自所述個體的外周血單個核細胞中分離所述先天性免疫細胞。

【請求項36】 如請求項31-35中任一項所述的方法，其中所述先天性免疫細胞是樹突細胞。

【請求項37】 如請求項36所述的方法，其中所述樹突細胞源自所述個體的單核細胞。

【請求項38】 如請求項37所述的方法，所述方法進一步包括從所述個體中分離單核細胞，並且

在樹突細胞培養基中培育所述單核細胞以衍生來自所述單核細胞的樹突細胞，之後將所述樹突細胞與所述基因治療劑一起培育。

【請求項39】 如請求項37或38所述的方法，其中所述單核細胞是CD14+單核細胞。

【請求項40】 如請求項37-39中任一項所述的方法，其中將所述單核細胞用所述樹突細胞培養基培育約5至約10天或約7至約8天以衍生來自所述單核細胞的樹突細胞。

【請求項41】 如請求項31-40中任一項所述的方法，其中在與步驟c)的所述基因治療劑一起培育之前將所述樹突細胞重新鋪板。

【請求項42】 如請求項41所述的方法，其中將所述樹突細胞重新鋪板到微孔皿中。

【請求項43】 如請求項31-42中任一項所述的方法，其中所述基因治療劑是病毒載體，並且其中將所述先天性免疫細胞與所述病毒載體以約 $1 \times 10^3$ 至約 $1 \times 10^5$ 或約 $1 \times 10^4$ 的MOI培育。

【請求項44】 如請求項31-42中任一項所述的方法，其中所述基因治療劑是非病毒載體，並且其中將所述先天性免疫細胞與濃度為約1 ng/mL至約1 mg/mL的非病毒載體一起培育。

【請求項45】 如請求項31-44中任一項所述的方法，其中將所述先天性免疫細胞與所述基因治療劑一起培育約12小時至約36小時或約24小時。

【請求項46】 如請求項31-45中任一項所述的方法，其中所述細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 中的一種或多種的表現增加。

【請求項47】 如請求項31-46中任一項所述的方法，其中所述細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP1和MIP-1 $\alpha$ 的表現增加。

【請求項48】 如請求項31-47中任一項所述的方法，其中所述細胞激素特徵包括IL6、TNF $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表現增加。

【請求項49】 如請求項31-48中任一項所述的方法，其中與合適的對照相比，所述細胞激素特徵中所述細胞激素的表現增加。

【請求項50】 如請求項49所述的方法，其中所述合適的對照是來自未與所述基因治療劑一起培育的先天性免疫細胞的細胞激素特徵中細胞激素的表現，或者其中所述合適的對照是來自與所述基因治療劑一起培育之前的先天性免疫細胞的細胞激素特徵中細胞激素的表現。

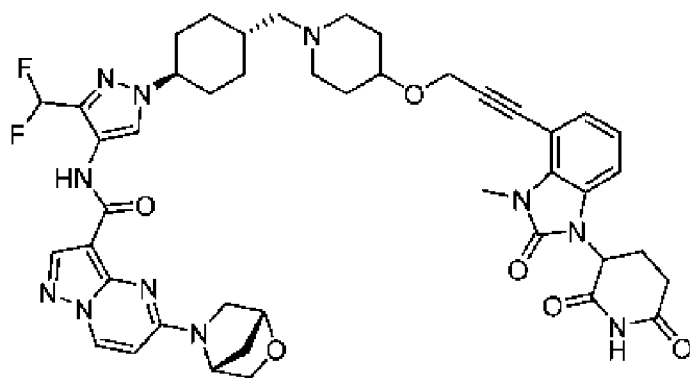
【請求項51】 如請求項31-50中任一項所述的方法，其中所述IRAK降解劑調節IRAK蛋白激酶的活性。

【請求項52】 如請求項51所述的方法，其中所述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。

【請求項53】 如請求項31-52中任一項所述的方法，其中所述IRAK降解劑調節IRAK-4蛋白激酶的活性。

【請求項54】 如請求項31-52中任一項所述的方法，其中所述IRAK降解劑是小分子。

【請求項55】 如請求項31-54中任一項所述的方法，其中所述IRAK降解劑包含式[I]的化合物：



[I]，

或其醫藥上可接受的鹽。

【請求項56】 如請求項31-55中任一項所述的方法，其中所述IRAK降解劑阻斷TLR9功能。

【請求項57】 如請求項31-56中任一項所述的方法，其中所述基因治療劑是病毒載體。

【請求項58】 如請求項57所述的方法，其中所述病毒載體是AAV顆粒。

【請求項59】 如請求項58所述的方法，其中所述AAV顆粒包含AAV1衣殼、AAV2衣殼、AAV3衣殼、AAV4衣殼、AAV5衣殼、AAV6衣殼、AAV7衣殼、AAV8衣殼、AAVrh8衣殼、AAV9衣殼、AAV10衣殼、AAVrh10衣殼、AAV11衣殼、AAV12衣殼、AAVrh32.33衣殼、AAV-XL32衣殼、AAV-XL32.1衣殼、AAV LK03衣殼、AAV2R471A衣殼、AAV2/2-7m8衣殼、AAV DJ衣殼、AAV DJ8

衣殼、AAV2 N587A衣殼、AAV2 E548A衣殼、AAV2 N708A衣殼、AAV V708K衣殼、山羊AAV衣殼、AAV1/AAV2嵌合衣殼、牛AAV衣殼、小鼠AAV衣殼、rAAV2/HBoV1(嵌合AAV/人類博卡病毒屬病毒1)、AAV2HBKO衣殼、AAVPHP.B衣殼或AAVPHP.eB衣殼或其功能變體。

【請求項60】 如請求項59所述的方法，其中所述AAV衣殼包含酪胺酸突變、肝素結合突變、或HBKO突變。

【請求項61】 如請求項58-60中任一項所述的方法，其中所述AAV病毒顆粒包含含有一種或多種末端反向重複(ITR)的AAV基因體，其中所述一種或多種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。

【請求項62】 如請求項61所述的方法，其中所述AAV顆粒的所述一種或多種ITR和所述衣殼源自相同的AAV血清型。

【請求項63】 如請求項61所述的方法，其中所述AAV顆粒的所述一種或多種ITR和所述衣殼源自不同的AAV血清型。

【請求項64】 如請求項57所述的方法，其中所述病毒載體是腺病毒顆粒。

【請求項65】 如請求項64所述的方法，其中所述腺病毒顆粒包含來自以下的衣殼：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、綿羊Ad或豬Ad 3型或其功能變體。

【請求項66】 如請求項57所述的方法，其中所述病毒載體是慢病毒顆粒。

【請求項67】 如請求項66所述的方法，其中所述重組慢病毒顆粒經水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴細胞性脈絡叢腦膜炎病毒(LCMV)、羅斯河病毒(RRV)、伊波拉病毒、瑪律堡病毒、莫柯拉病毒、狂犬病毒、RD114或其功能變體假型化。

【請求項68】 如請求項57所述的方法，其中所述病毒載體是單純疱疹病毒(HSV)顆粒。

【請求項69】 如請求項68所述的方法，其中所述HSV顆粒是HSV-1顆粒或HSV-2顆粒或其功能變體。

【請求項70】 如請求項31-56中任一項所述的方法，其中所述基因治療劑是脂質奈米顆粒。

【請求項71】 如請求項31-70中任一項所述的方法，其中所述基因治療劑包含編碼異源轉基因的核酸。

【請求項72】 如請求項71所述的方法，其中所述異源轉基因可操作地連接至啟動子。

【請求項73】 如請求項72所述的方法，其中所述啟動子是組成型啟動子、組織特異性啟動子或誘導型啟動子。

【請求項74】 如請求項31-73中任一項所述的方法，其中在投予所述基因治療劑之前、同時或之後，投予所述IRAK降解劑。

【請求項75】 如請求項31-74中任一項所述的方法，其中所述個體具有適合於通過基因療法治療的疾病或病症。

【請求項76】 如請求項75所述的方法，其中所述疾病或病症是單基因病或病症。

【請求項77】如請求項31-76中任一項所述的方法，其中將所述基因治療劑靜脈內、腹膜內、動脈內、肌肉內、皮下或肝內投予。

【請求項78】如請求項31-77中任一項所述的方法，其中將所述IRAK降解劑口服、靜脈內、腹膜內、動脈內、肌肉內、皮下或肝內投予。

【請求項79】如請求項1-78中任一項所述的方法，其中所述IRAK調節劑啟動CD8 T細胞。

【請求項80】一種組合物在製造用於將核酸遞送至有需要的個體的細胞的藥劑中的用途，其中所述組合物包含基因治療劑，並且其中所述組合物被配製用於與IRAK降解劑組合使用。

【請求項81】一種組合物在製造用於將核酸遞送至有需要的個體的細胞的藥劑中的用途，其中所述組合物包含IRAK降解劑，並且其中所述組合物被配製用於與基因治療劑組合使用。

【請求項82】一種組合物在製造用於治療需要基因療法的個體的藥劑中的用途，其中所述組合物包含基因治療劑，並且其中所述組合物被配製用於與IRAK降解劑組合使用。

【請求項83】一種組合物在製造用於治療需要基因療法的個體的藥劑中的用途，其中所述組合物包含IRAK降解劑，並且其中所述組合物被配製用於與基因治療劑組合使用。

【請求項84】一種組合物在製造用於調節需要基因療法的個體對基因療法的免疫反應的藥劑中的用途，其中所述組合物包含基因治療劑，並且其中所述組合物被配製用於與IRAK降解劑組合使用。

【請求項85】 一種組合物在製造用於調節個體對基因療法的免疫反應的藥劑中的用途，其中所述組合物包含IRAK降解劑，並且其中所述組合物被配製用於與基因治療劑組合使用。

【請求項86】 如請求項80-85中任一項所述的用途，其中所述基因治療劑是AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒或脂質奈米顆粒。

【請求項87】 如請求項80-86中任一項所述的用途，其中所述IRAK降解劑是IRAK-4降解劑。

【請求項88】 一種包含用於在將核酸遞送至有需要的個體的細胞中使用的基因治療劑的組合物，其中所述基因治療劑與IRAK降解劑組合使用。

【請求項89】 一種包含用於在將核酸遞送至有需要的個體的細胞中使用的IRAK降解劑的組合物，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑組合使用。

【請求項90】 一種包含用於在治療需要基因療法的個體中使用的基因治療劑的組合物，其中所述基因治療劑與IRAK降解劑組合使用。

【請求項91】 一種包含用於在治療需要基因療法的個體中使用的IRAK降解劑的組合物，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑組合使用。

【請求項92】 一種包含用於調節需要基因療法的個體對基因療法的免疫反應的IRAK降解劑的組合物，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑組合使用。

【請求項93】 一種包含用於抑制需要基因療法的個體對基因療法的免疫反應的IRAK降解劑的組合物，其中所述IRAK降解劑與基因治療劑組合使用。

【請求項94】 如請求項88-93中任一項所述的組合物，其中所述基因治療劑是AAV顆粒、腺病毒顆粒、慢病毒顆粒、HSV顆粒、或脂質奈米顆粒。

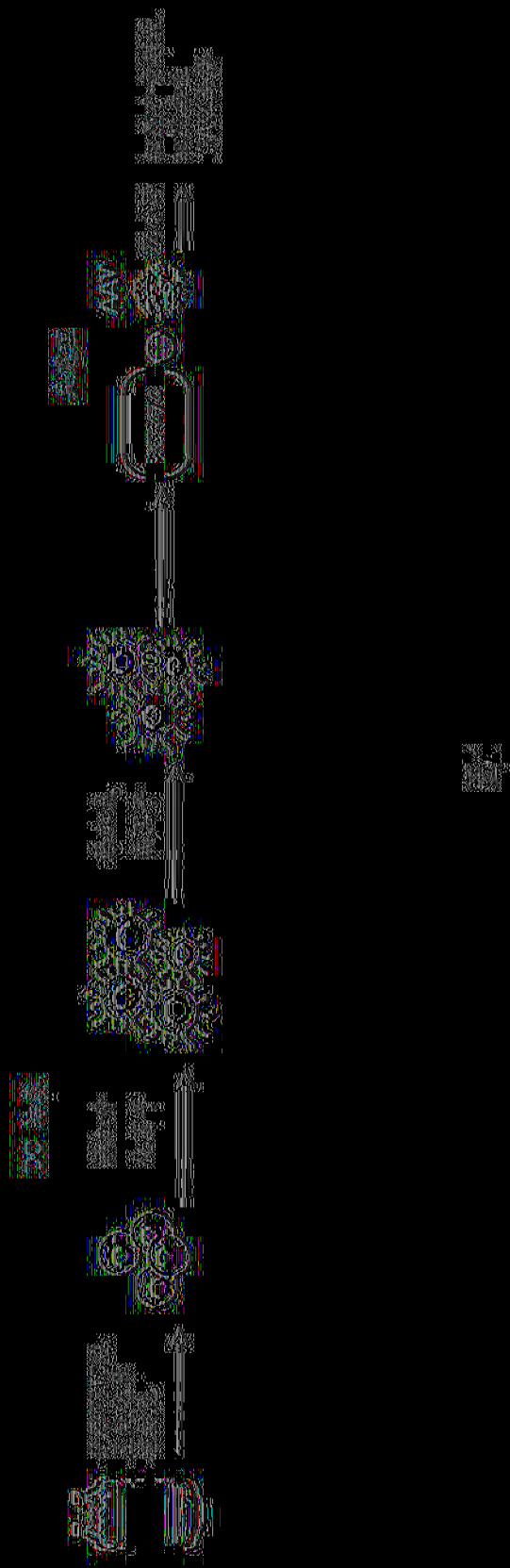
【請求項95】 如請求項88-94中任一項所述的組合物，其中所述IRAK降解劑是IRAK-4降解劑。

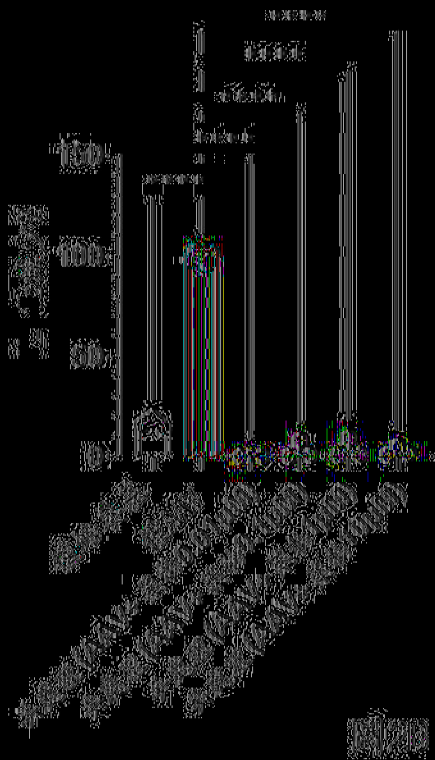
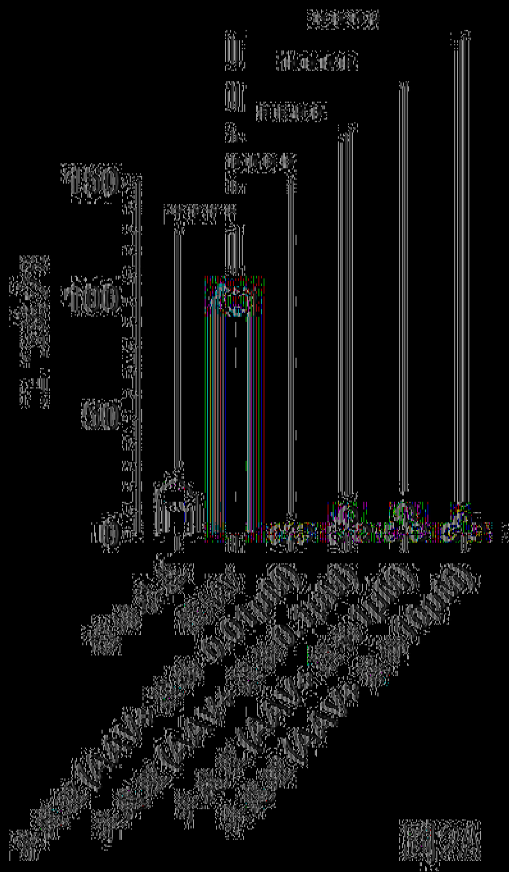
【請求項96】 一種用於在如請求項1-79中任一項所述的方法中使用的套組。

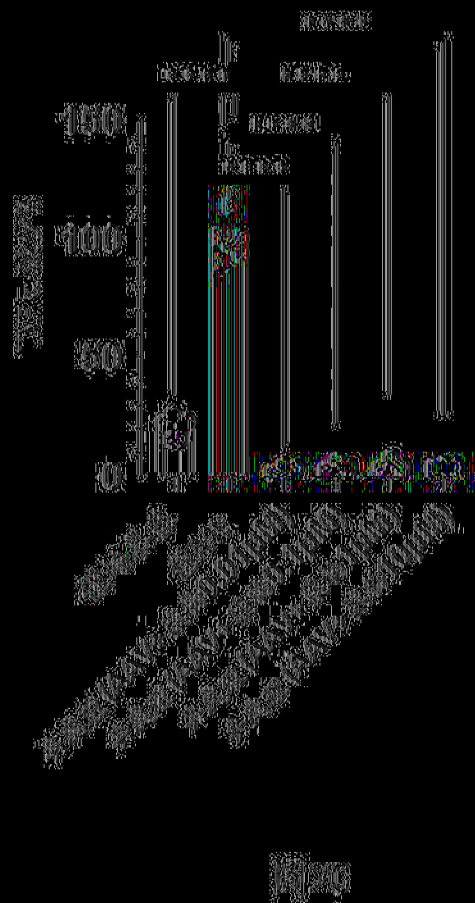
【請求項97】 一種用於如請求項80-87中任一項所述用途的套組。

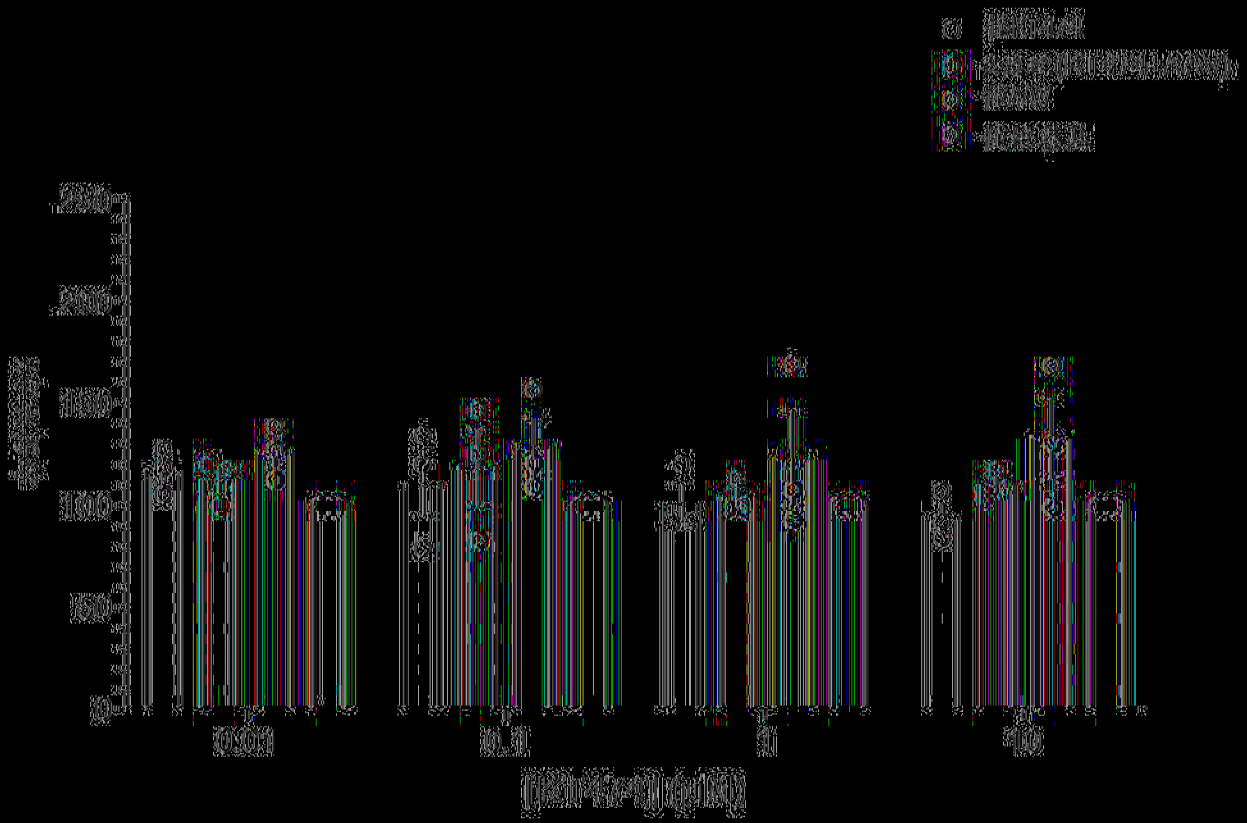
【請求項98】 一種包含如請求項92-97中任一項所述的組合物的套組。

(發明圖式)









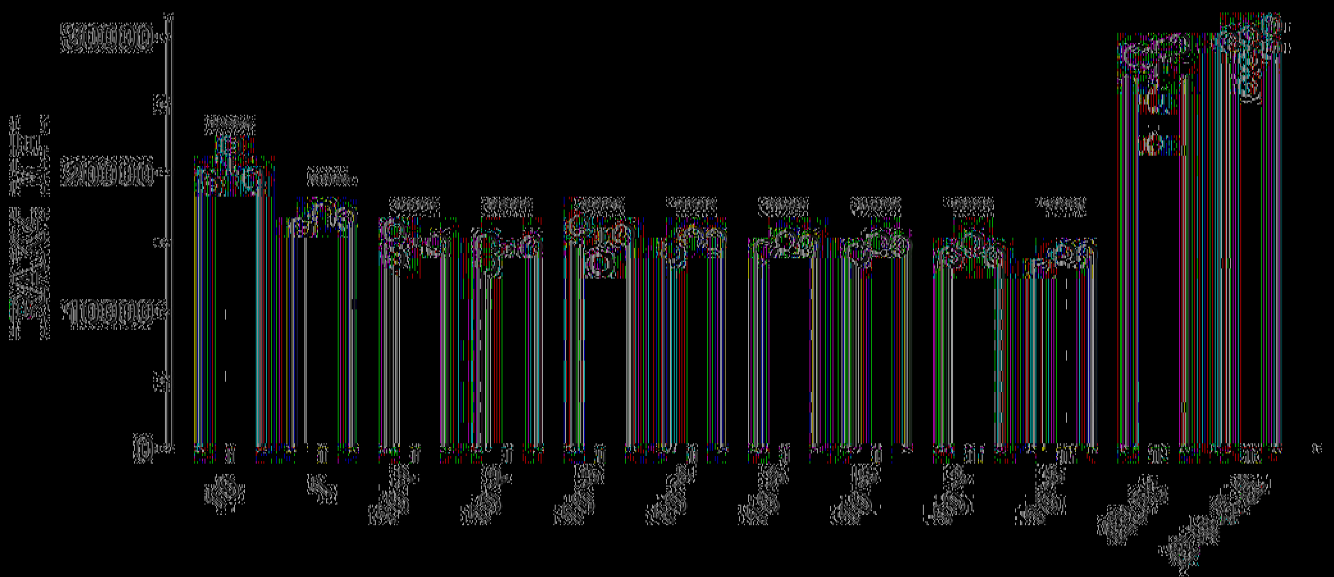
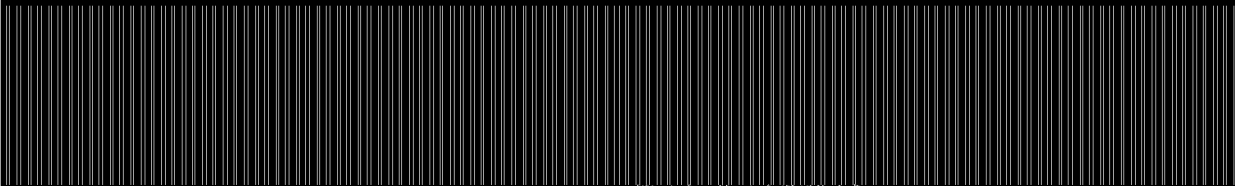
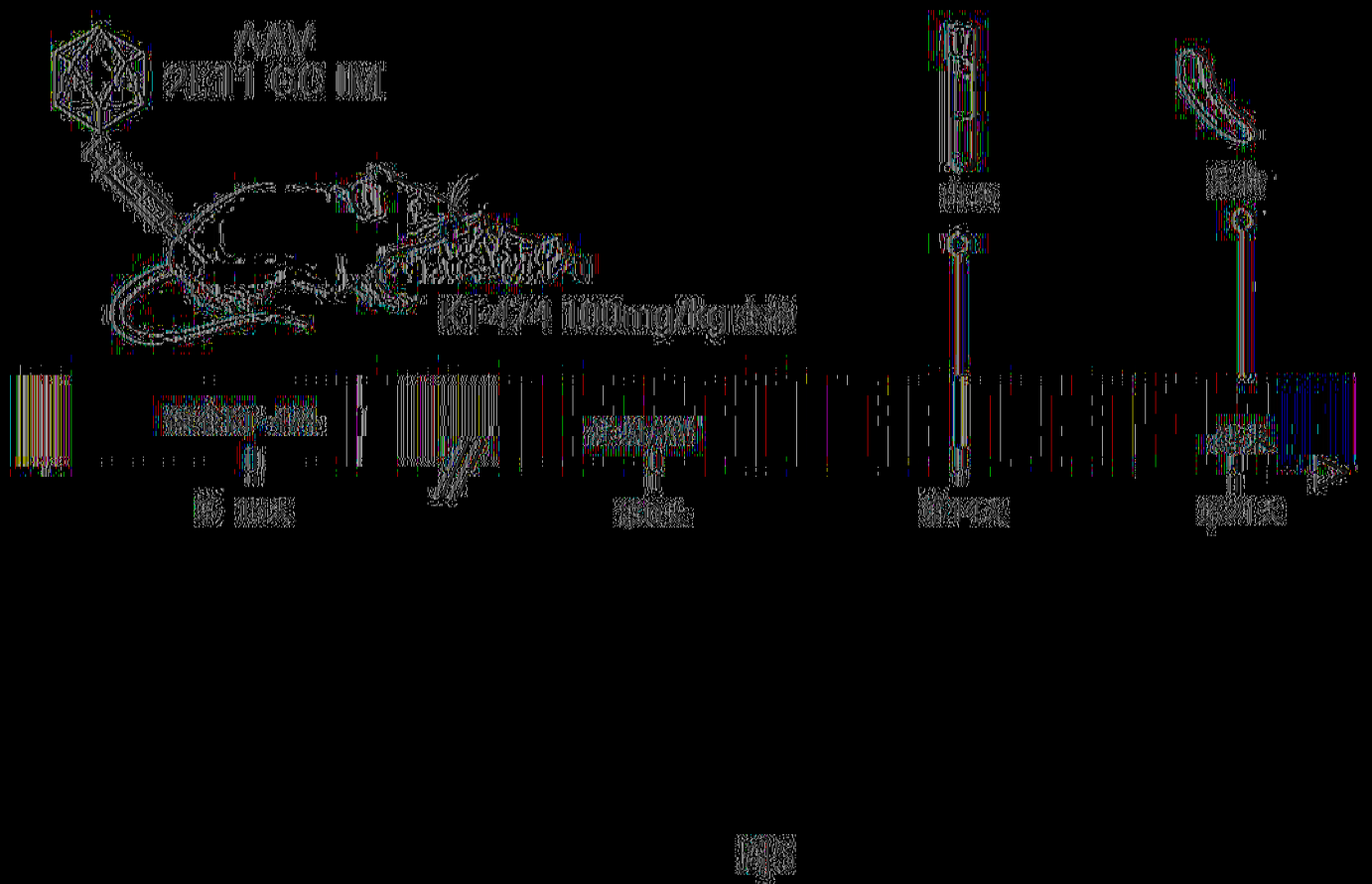
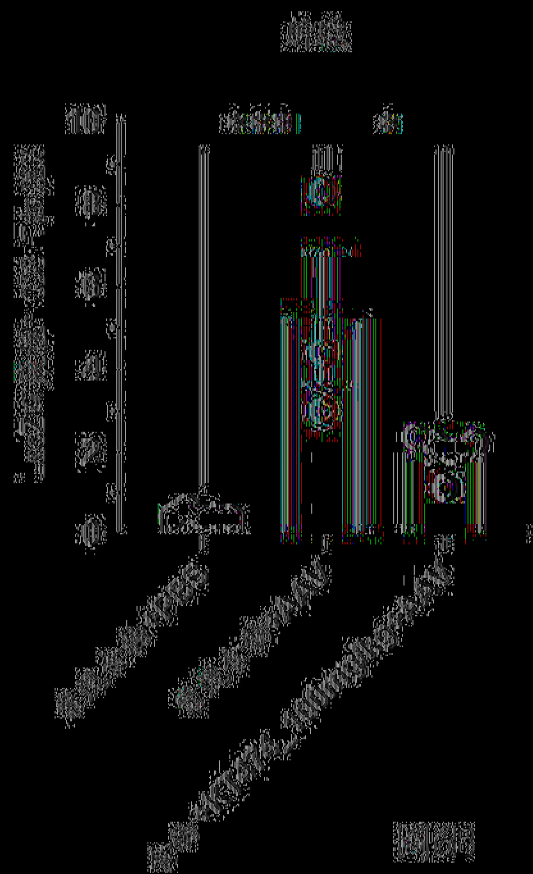
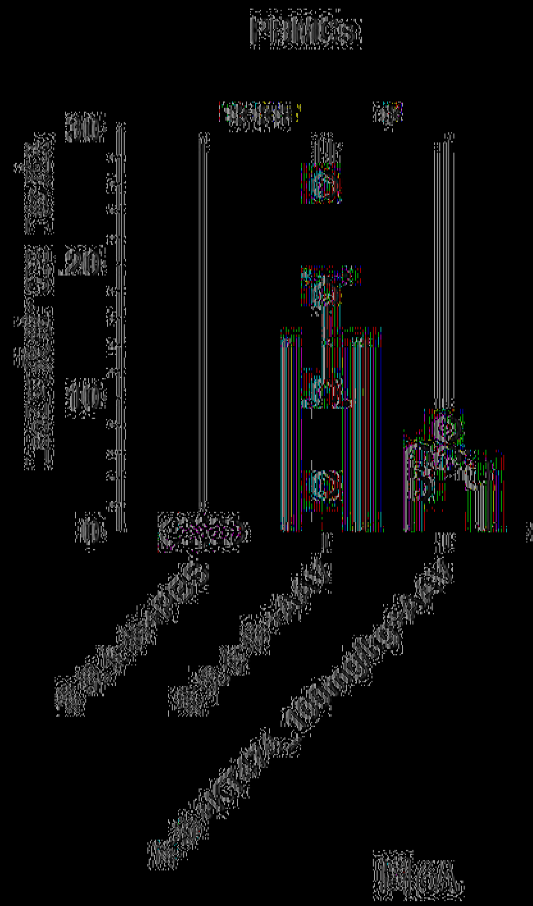
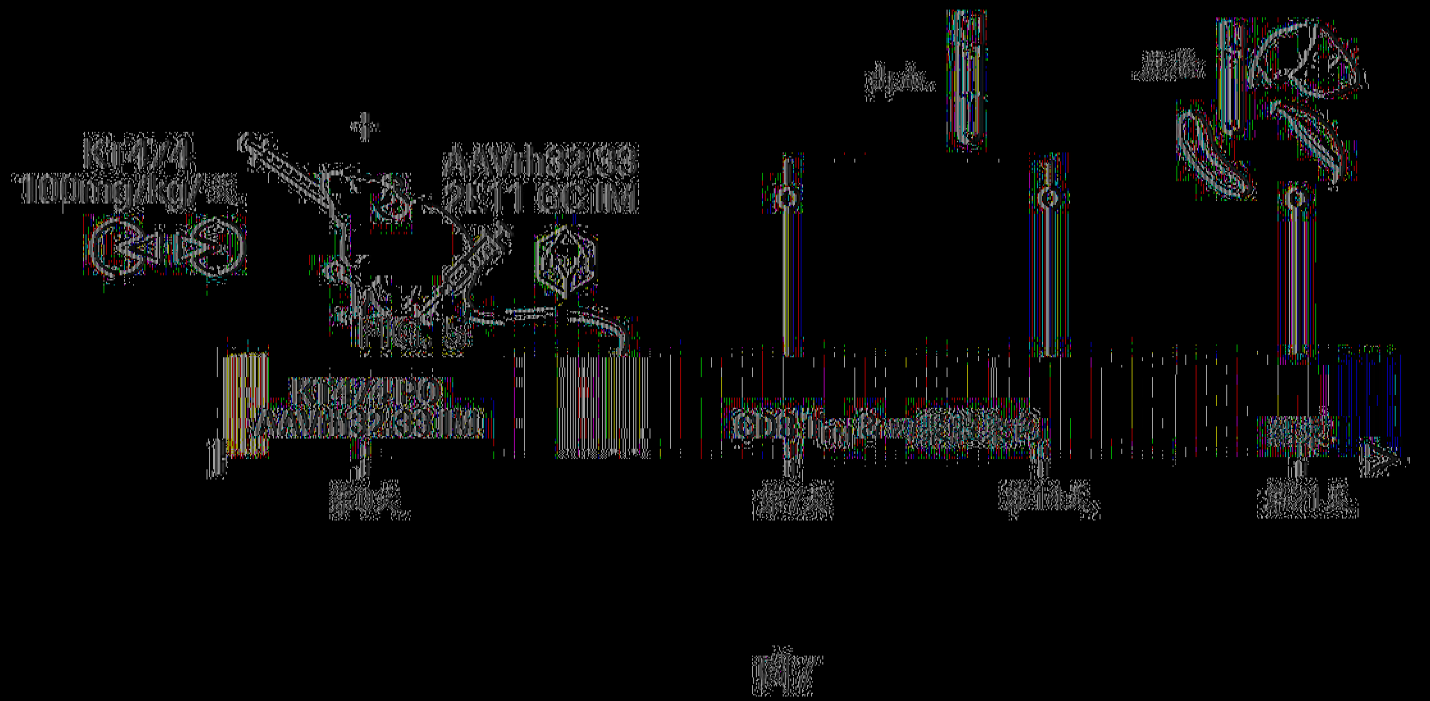


圖 1

圖 2







```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3" fileName="112120-seq.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0" productionDate="2023-07-
12">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>112113696</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-04-12</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>63/330,245</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-04-12</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">美商健臻公司</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>GENZYME CORPORATION</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">IRAK4調節劑於基因療法之用途(二
)</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>1</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>78</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..78</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q2">
              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

```
<NonEnglishQualifier_value>合成構築體</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>cactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggctgcccacgccc
gggctttgccgggcg</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```