



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118215738 A

(43) 申请公布日 2024.06.18

(21) 申请号 202280063720.5

杰西卡·皮哈姆 路易莎·拉德尔

(22) 申请日 2022.07.22

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司 11006

(30) 优先权数据

63/224,818 2021.07.22 US

专利代理师 徐金国

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.03.20

(51) Int.Cl.

C12N 15/86 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/038010 2022.07.22

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/004113 EN 2023.01.26

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 卡特里奥娜·詹姆森

加布里埃尔·皮内达

爱德华多·雷诺索·莫雷诺

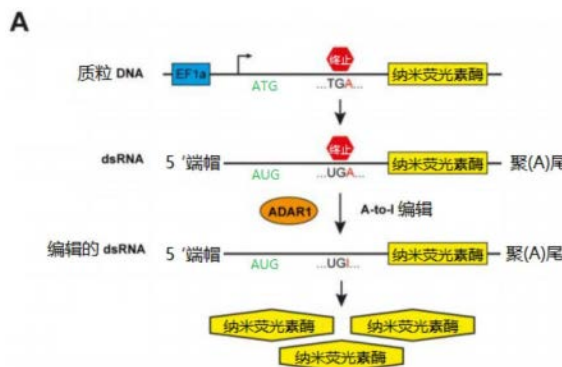
权利要求书3页 说明书23页 附图7页

(54) 发明名称

使用纯化的人RNA编辑酶的组合物和方法

(57) 摘要

在替代实施方案中,提供了用于根除或减少体内肿瘤干细胞数量的方法,包括向有需要的个体施用ADAR1 (RNA1相关的腺苷脱氨酶) 抑制剂,其中ADAR1抑制剂降低或显著降低细胞系中和人类肿瘤干细胞测定中的ADAR1Nano-luc报告基因活性。在替代实施方案中,提供了用于抑制RNA病毒或逆转录病毒(可选地SARs-CoV-2病毒)的方法,包括慢病毒ADAR1过表达以及体内施用(可选地静脉内(IV)施用)慢病毒ADAR1转导的干细胞,可选地干细胞是脐带血CD34+细胞或间充质基质细胞。



1. 一种抑制RNA病毒或逆转录病毒的方法,可选地SARs-CoV-2病毒,可选地体内抑制有需要的个体中的RNA病毒或逆转录病毒,包括:慢病毒ADAR1表达或过表达,以及体内施用(可选地静脉注射(IV)施用)慢病毒ADAR1转导的干细胞,可选地干细胞为脐带血CD34+细胞或间充质基质细胞。

2. 一种抑制RNA病毒或逆转录病毒复制的方法,可选地SARs-CoV-2病毒,可选地体内抑制有需要的个体中的RNA病毒或逆转录病毒,包括:向有需要的个体体内递送或施用ADAR1催化结构域纳米蛋白,

以及可选地递送或施用包含在或配制在脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、或纳米脂质体中的ADAR1催化结构域纳米蛋白,可选地通过静脉给药或通过吸入递送ADAR1催化结构域纳米蛋白。

3. 一种抑制RNA病毒或逆转录病毒复制的方法,可选地SARs-CoV-2病毒,可选地体内抑制有需要的个体中的RNA病毒或逆转录病毒,包括:向有需要的个体体内递送或施用ADAR1全长纳米蛋白,

其中可选地ADAR1全长纳米蛋白包含在或配制在脂质体中,以及可选地ADAR1全长纳米蛋白是通过静脉给药或通过吸入递送或施用。

4. 一种抑制RNA病毒或逆转录病毒复制的方法,可选地SARs-CoV-2病毒,可选地体内抑制有需要的个体中的RNA病毒或逆转录病毒,包括:向有需要的个体体内递送或施用ADAR1Z α 结构域缺失的纳米蛋白递送物,

其中可选地ADAR1Z α 结构域缺失的纳米蛋白包含在或配制在脂质体中,以及可选地ADAR1Z α 结构域缺失的纳米蛋白是通过静脉给药或通过吸入递送或施用。

5. 一种根除或减少体内肿瘤干细胞数量的方法,包括向有需要的个体施用ADAR1(RNA1相关的腺苷脱氨酶)抑制剂,其中ADAR1抑制剂可降低或显著降低细胞系和/或人肿瘤干细胞测定中ADAR1Nano-luc报告基因的活性。

6. 如权利要求5所述的方法,其中所述ADAR1抑制剂包括JAK2抑制剂。

7. 如权利要求6所述的方法,其中所述JAK2抑制剂包括菲卓替尼,或INREBICTM,或鲁索替尼,或JAKAFITM。

8. 如权利要求5所述的方法,其中所述ADAR1抑制剂包括STAT3抑制剂。

9. 如权利要求5所述的方法,其中所述ADAR1抑制剂包括8-氮杂腺苷、核苷类似物或整合酶抑制剂。

10. 权利要求5的方法,其中所述ADAR1抑制剂包括雷特格韦(或ISENTRESSTM)或度鲁特韦(或TIVICAYTM)。

11. 如权利要求5所述的方法,其中所述ADAR1抑制剂包括慢病毒shRNAADAR1敲除载体。

12. 如权利要求5所述的方法,其中所述ADAR1抑制剂包括慢病毒ADAR1突变载体。

13. 如权利要求5所述的方法,其中所述ADAR1抑制剂包括慢病毒ADAR1Z α 结构域缺失载体。

14. 如权利要求5所述的方法,其中所述ADAR1抑制剂包括干扰素抑制化合物。

15. 如权利要求5所述的方法,其中所述ADAR1抑制剂包括慢病毒ADAR1或慢病毒ADAR1shRNA。

16. 如权利要求5所述的方法,其中所述ADAR1抑制剂包括重组人全长ADAR1。

17. 如权利要求6所述的方法,其中所述ADAR1抑制剂包括重组人ADAR1催化结构域。

18. 如权利要求5所述的方法,其中所述ADAR1抑制剂包括重组人Z α 结构域缺失的ADAR1。

19. 如权利要求5所述的方法,其中所述ADAR1抑制剂包括JAK2表达载体,可选地逆转录病毒或慢病毒JAK2表达载体,可选地逆转录病毒或慢病毒JAK2过表达载体。

20. 如权利要求5至19中任一项所述的方法,其中所述ADAR1抑制剂配制或制造成肠外制剂、水溶液、脂质体、注射液、片剂、丸剂、锭剂、胶囊、喷雾剂、散剂(sachet)、吸入剂、粉剂、冻干粉剂、吸入剂、贴剂、凝胶剂、凝胶包衣剂、纳米悬浮剂、纳米颗粒、纳米脂质体、微凝胶剂、颗粒剂、栓剂或它们的任意组合,

以及可选地,药物递送装置或制造的产品是或包括植入物。

21. 如权利要求5至20中任一项所述的方法,其中所述ADAR1抑制剂一起配制或制造在一种肠外制剂、一种水溶液、一种脂质体、一种注射液、一种冻干粉、一种饲料、一种食品、一种食品补充剂、一种颗粒、一种锭剂、一种液体、一种酞剂、一种气雾剂、一种吸入剂、一种粘合剂、一种喷雾剂、一种粉剂、一种冻干粉剂、一种贴剂、一种片剂、一种丸剂、一种胶囊剂、一种凝胶剂、一种凝胶包衣剂、一种锭剂、一种囊片剂、一种纳米悬浮剂、一种纳米颗粒、一种纳米脂质体、一种微凝胶剂或一种栓剂中。

22. 如权利要求5至21中任一项所述的方法,其中所述ADAR1抑制剂配制成单位剂量为0.1mg至约1g,以及可选地配制为速释制剂或控释制剂。

23. ADAR1抑制剂用于根除或减少体内肿瘤干细胞数量的用途,其中向有需要的个体施用ADAR1抑制剂,

以及可选地,所述ADAR1抑制剂包括:

JAK2抑制剂,以及可选地JAK2抑制剂包括菲卓替尼或INREBICTM,或鲁索替尼或JAKAFITM;STAT3抑制剂;8-氮腺苷、核苷类似物或整合酶抑制剂;雷特格韦(或ISENTRESSTM)或度鲁特韦(或TIVICAYTM);逆转录病毒或慢病毒shRNA ADAR1敲除载体;逆转录病毒或慢病毒ADAR1突变表达载体;慢病毒ADAR1Z α 结构域缺失载体;干扰素抑制化合物;慢病毒ADAR1或慢病毒ADAR1shRNA;重组人全长ADAR1蛋白;重组人ADAR1催化结构域蛋白;重组人Z α 结构域缺失ADAR1蛋白;和/或JAK2表达载体,可选地逆转录病毒或慢病毒JAK2表达载体,可选地逆转录病毒或慢病毒JAK2过表达载体。

24. 一种用于根除或减少体内肿瘤干细胞数量的ADAR1抑制剂,其中向有需要的个体施用ADAR1抑制剂,

以及可选地,所述ADAR1抑制剂包括:

JAK2抑制剂,以及可选地JAK2抑制剂包括菲卓替尼或INREBICTM,或鲁索替尼或JAKAFITM;STAT3抑制剂;8-氮腺苷、核苷类似物或整合酶抑制剂;雷特格韦(或ISENTRESSTM)或度鲁特韦(或TIVICAYTM);逆转录病毒或慢病毒shRNAADAR1敲除载体;逆转录病毒或慢病毒ADAR1突变表达载体;慢病毒ADAR1Z α 结构域缺失载体;干扰素抑制化合物;慢病毒ADAR1或慢病毒ADAR1shRNA;重组人全长ADAR1蛋白;重组人ADAR1催化结构域蛋白;重组人Z α 结构域缺失ADAR1蛋白;和/或JAK2表达载体,可选地逆转录病毒或慢病毒JAK2表达载体,可选地逆转录病毒或慢病毒JAK2过表达载体。

25. 一种包含有慢病毒ADAR1过表达载体和Nano-luc报告基因的稳定转导的人非干扰

素反应性细胞系,其用于检测RNA病毒抑制,其中可选地病毒为SARS-CoV-2、或者A型或B型流感病毒。

26.一种包含有慢病毒ADAR1过表达载体和Nano-luc报告基因的稳定转导的人干扰素反应性细胞系,其用于检测感染RNA病毒或逆转录病毒后的RNA病毒抑制,其中可选地病毒为SARS-CoV-2、或者A型或B型流感病毒、或者HIV。

27.一种识别ADAR1激动剂的方法,包括使ADAR1Nano-luc报告基因干扰素-反应性细胞系与干扰素细胞系候选ADAR1激动剂接触。

28.如权利要求27所述的方法,其中所述候选ADAR1激动剂包括重组人全长ADAR1。

29.如权利要求27所述的方法,其中所述候选ADAR1激动剂包括重组人ADAR1催化结构域。

30.如权利要求27所述的方法,其中所述候选ADAR1激动剂包括重组人Z α 结构域缺失ADAR1。

31.如权利要求27所述的方法,其中所述候选ADAR1激动剂包括逆转录病毒或慢病毒JAK2过表达载体。

使用纯化的人RNA编辑酶的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本专利公约条约(PCT)国际申请根据35U.S.C.§119(e)要求享有2021年7月22日提交的美国临时序列申请号(USSN)63/224,818的优先权。前述申请的全部内容通过引用明确并入本文用于所有目的。本文引用的所有出版物、专利、专利申请均通过引用明确并入本文用于所有目的。

技术领域

[0003] 本发明大体涉及分子生物学和医学。在替代实施方案中,提供了用于根除或减少体内肿瘤干细胞数量的方法,包括向有需要的个体施用ADAR1(RNA1相关的腺苷脱氨酶)抑制剂,其中ADAR1抑制剂可降低或显著降低细胞系中和人类肿瘤干细胞测定中的ADAR1Nano-luc报告基因活性。在替代实施方案中,提供了用于抑制RNA病毒或逆转录病毒(可选地SARs-CoV-2病毒)的方法,包括:慢病毒ADAR1过表达,以及体内施用(可选地静脉内(IV)施用)慢病毒ADAR1转导的干细胞,可选地干细胞是脐带血CD34+细胞或间充质基质细胞。

背景技术

[0004] ADAR1的抗病毒脱氨基作用可诱导腺苷到肌苷(A-to-I)的编辑,从而限制RNA病毒(如冠状病毒和流感)以及逆转录病毒(如HIV)的复制。ADAR1的靶向碱基编辑也已成为在RNA中引入单核苷酸变化的有效手段,从而改变剪接受位点和转录本对microRNA靶向的敏感性,并最终改变翻译。此外,ADAR1的ZαDNA结合可改变选定的含Alu区域的表观基因组,而ZαRNA结合可引起转录本稳定性的变化。ADAR1的过度编辑诱导了存活和干细胞转录物、lncRNA和初级microRNA中的RNA改变,主要是在由Alu序列形成的双链RNA环的背景下,并促进了肿瘤干细胞的抗药性以及正常人类造血干细胞的自我更新。

[0005] 作为一种先天性免疫抗病毒脱氨酶,ADAR1通过JAK2/STAT和干扰素α、β和γ信号经炎症细胞因子信号传导后转录激活。因此,选择性的JAK2和STAT3抑制阻止了ADAR1的激活。

发明内容

[0006] 在替代实施方案中,提供了用于抑制RNA病毒或逆转录病毒的方法,可选地SARs-CoV-2病毒,可选地体内抑制有需要的个体中的RNA病毒或逆转录病毒,包括:体内慢病毒ADAR1表达或过表达,以及体内施用(可选地静脉注射(IV)施用)慢病毒ADAR1转导的干细胞,可选地干细胞是脐带血CD34+细胞或间充质基质细胞。

[0007] 在替代实施方案中,提供了用于抑制RNA病毒或逆转录病毒复制的方法,可选地SARs-CoV-2病毒,可选地体内抑制有需要的个体中的RNA病毒或逆转录病毒,包括:体内递送或施用ADAR1催化结构域纳米蛋白,可选地递送或施用包含在或配制在脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)或纳米脂质体中的ADAR1催化结构域纳米蛋白,可选地通过静脉给药或通过吸入

递送ADAR1催化结构域纳米蛋白。

[0008] 在替代实施方案中,提供了用于抑制RNA病毒或逆转录病毒复制的方法,可选地SARs-CoV-2病毒,可选地体内抑制有需要的个体中的RNA病毒或逆转录病毒,包括:体内递送或施用ADAR1全长纳米蛋白,其中可选地ADAR1全长纳米蛋白包含在或配制在脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)或纳米脂质体中,以及可选地ADAR1全长纳米蛋白是通过静脉给药或通过吸入施用。

[0009] 在替代实施方案中,提供了用于抑制RNA病毒或逆转录病毒复制的方法,可选地SARs-CoV-2病毒,可选地体内抑制有需要的个体中的RNA病毒或逆转录病毒,包括:体内递送或施用ADAR1Z α 结构域缺失的纳米蛋白递送物,其中可选地ADAR1Z α 结构域缺失的纳米蛋白包含在或配制在脂质体、脂质纳米粒子(LNP)或纳米脂质体中,以及可选地ADAR1Z α 结构域缺失纳米蛋白是通过静脉给药或通过吸入递送或施用。

[0010] 在替代实施方案中,提供了慢病毒ADAR1转导的干细胞,可选地脐带血CD34+细胞或间充质基质细胞,用于抑制RNA病毒或逆转录病毒(可选地SARs-CoV-2病毒)的用途,可选地用于体内抑制有需要的个体中的RNA病毒或逆转录病毒,包括体内慢病毒ADAR1表达或过表达以及体内施用,可选地通过静脉(IV)施用它。

[0011] 在替代实施方案中,提供了包含在或配制在脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)或纳米脂质体中的ADAR1催化结构域纳米蛋白的用途,可选地ADAR1催化结构域纳米蛋白是通过静脉给药或通过吸入递送,用于抑制RNA病毒或逆转录病毒的复制,可选地SARs-CoV-2病毒,可选地体内抑制有需要的个体中的RNA病毒或逆转录病毒,包括体内递送或施用ADAR1催化结构域纳米蛋白。

[0012] 在替代实施方案中,提供了包含在或配制在脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)或纳米脂质体中的ADAR1全长纳米蛋白的用途,用于抑制RNA病毒或逆转录病毒的复制,可选地SARs-CoV-2病毒,可选地体内抑制有需要的个体中的RNA病毒或逆转录病毒,包括体内递送或施用ADAR1全长纳米蛋白,可选地ADAR1全长纳米蛋白是通过静脉给药或通过吸入递送或施用。

[0013] 在替代实施方案中,提供了包含在或配制在脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)或纳米脂质体中的ADAR1Z α 结构域缺失的纳米蛋白的用途,用于抑制RNA病毒或逆转录病毒的复制,可选地SARs-CoV-2病毒,可选地体内抑制有需要的个体中的RNA病毒或逆转录病毒,包括体内递送或施用ADAR1Z α 结构域缺失的纳米蛋白递送物,可选地ADAR1Z α 结构域缺失的纳米蛋白是通过静脉给药或通过吸入递送或施用。

[0014] 在替代实施方案中,提供了用于根除或减少体内肿瘤干细胞数量的方法,包括向有需要的个体施用ADAR1(RNA1相关的腺苷脱氨酶)抑制剂,其中ADAR1抑制剂降低或显著降低细胞系中和人肿瘤干细胞检测中的ADAR1Nano-luc报告基因活性。

[0015] 在本文所提供方法的替代实施方案中:

[0016] -ADAR1抑制剂包括JAK2抑制剂,可选地JAK2抑制剂包括菲卓替尼(fedratinib)、或INREBIC[™],或鲁索替尼(ruxolitinib)、或JAKAFI[™];

[0017] -ADAR1抑制剂包括STAT3抑制剂;

[0018] -ADAR1抑制剂包括8-氮腺苷、核苷类似物或整合酶抑制剂;

[0019] -ADAR1抑制剂包括雷特格韦(或ISENTRESS[™])或度鲁特韦(或TIVICAY[™]);

- [0020] -ADAR1抑制剂包括慢病毒shRNAADAR1敲除载体；
- [0021] -ADAR1抑制剂包括慢病毒ADAR1突变载体；
- [0022] -ADAR1抑制剂包括慢病毒ADAR1Z α 结构域缺失载体；
- [0023] -ADAR1抑制剂包括干扰素抑制化合物；
- [0024] -ADAR1抑制剂包括慢病毒ADAR1或慢病毒ADAR1shRNA；
- [0025] -ADAR1抑制剂包括重组人全长ADAR1蛋白；
- [0026] -ADAR1抑制剂包括重组人ADAR1催化结构域蛋白；
- [0027] -ADAR1抑制剂包括重组人Z α 结构域缺失ADAR1蛋白；和/或
- [0028] -ADAR1抑制剂包括JAK2表达载体,可选地逆转录病毒或慢病毒JAK2表达载体,可选地逆转录病毒或慢病毒JAK2过表达载体。
- [0029] 在替代实施方案中,提供了识别ADAR1激动剂的方法,包括使ADAR1Nano-luc报告基因干扰素-反应性细胞系与干扰素细胞系候选ADAR1激动剂接触;以及,可选地候选ADAR1激动剂包括重组人全长ADAR1,可选地候选ADAR1激动剂包括重组人ADAR1催化结构域;以及可选地候选ADAR1激动剂包括重组人Z α 结构域缺失ADAR1;以及可选地候选ADAR1激动剂包括慢病毒JAK2过表达载体。
- [0030] 在替代实施方案中,提供了稳定转导的人非干扰素反应性细胞系,其包含有慢病毒ADAR1过表达载体和Nano-luc报告基因,用于检测RNA病毒抑制,其中可选地RNA病毒是SARS-CoV-2、或者A或B型流感病毒。
- [0031] 在替代实施方案中,提供了稳定转导的人干扰素反应性细胞系,其包含有慢病毒ADAR1过表达载体和Nano-luc报告物,用于检测RNA病毒或逆转录病毒感染后的RNA病毒抑制,其中可选地病毒为SARS-CoV-2、或者A型或B型流感病毒、或者HIV。
- [0032] 在替代实施方案中,提供了ADAR1抑制剂用于根除或减少体内肿瘤干细胞数量的用途,其中向有需要的个体施用ADAR1抑制剂,以及可选地ADAR1抑制剂包括:JAK2抑制剂,以及可选地JAK2抑制剂包括:菲卓替尼、或INREBICTM、或鲁索替尼、或JAKAFITM;STAT3抑制剂;8-氮腺苷、核苷类似物或整合酶抑制剂;雷特格韦(或ISENTRESSTM)或度鲁特韦(或TIVICAYTM);逆转录病毒或慢病毒shRNAADAR1敲除载体;逆转录病毒或慢病毒ADAR1突变表达载体;慢病毒ADAR1Z α 结构域缺失载体;干扰素抑制化合物;慢病毒ADAR1或慢病毒ADAR1shRNA;重组人全长ADAR1蛋白;重组人ADAR1催化结构域蛋白;重组人Z α 结构域缺失ADAR1蛋白;和/或JAK2表达载体,可选地逆转录病毒或慢病毒JAK2表达载体,可选地逆转录病毒或慢病毒JAK2过表达载体。
- [0033] 在替代实施方案中,提供了用于根除或减少体内肿瘤干细胞数量的ADAR1抑制剂,其中向有需要的个体施用ADAR1抑制剂,以及可选地ADAR1抑制剂包括:JAK2抑制剂,以及可选地JAK2抑制剂包括:菲卓替尼、或INREBICTM、或鲁索替尼、或JAKAFITM;STAT3抑制剂;8-氮腺苷、核苷类似物或整合酶抑制剂;雷特格韦(或ISENTRESSTM)或度鲁特韦(或TIVICAYTM);逆转录病毒或慢病毒shRNAADAR1敲除载体;逆转录病毒或慢病毒ADAR1突变表达载体;慢病毒ADAR1Z α 结构域缺失载体;干扰素抑制化合物;慢病毒ADAR1或慢病毒ADAR1shRNA;重组人全长ADAR1蛋白;重组人ADAR1催化结构域蛋白;重组人Z α 结构域缺失ADAR1蛋白;和/或JAK2表达载体,可选地逆转录病毒或慢病毒JAK2表达载体,可选地逆转录病毒或慢病毒JAK2过表达载体。

[0034] 本发明的一个或多个示例性实施例的细节记载于附图和下文的描述中。本发明的其他特征、目的和优点可见于说明书、附图和权利要求书中。

[0035] 本文引用的所有出版物、专利、专利申请通过引用明确并入全文用于所有目的。

附图说明

[0036] 专利或专利申请文件至少包含一副彩色附图。如果申请者提出要求并支付必要的费用，专利局将提供带有彩色附图的本专利或专利申请出版物的副本。

[0037] 本文阐述的附图是本文提供的示例性实施例的说明，并不意味着限制权利要求书所涵盖的本发明的范围。

[0038] 图1A-K显示了在BJ2168酵母菌表达系统中表达和纯化重组人ADAR1催化结构域(hADAR1CD)的示例性过程：

[0039] 图1A图示了在酵母中表达hADAR1催化结构域(CD)的密码子优化；

[0040] 图1B展示了hADAR1催化结构域(CD)的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)，其中着色(或着色浅)氨基酸在 Δ 环构建体中已被删除；

[0041] 图1C显示了示例性pEG(KT)GST-TEV-hADAR1催化结构域(CD)和pEG(KT)GST-TEV-hADAR1 CD Δ 环载体图的示意图；

[0042] 图1D显示了示例性半乳糖诱导表达系统的示意图；

[0043] 图1E显示了考马斯蓝染色的 α -ADAR1蛋白质印迹图像，证实了GST标记的hADAR1催化结构域(CD)的半乳糖诱导表达；

[0044] 图1F显示了示例性工作流程示意图，显示了从酵母细胞提取物中纯化蛋白质的步骤；

[0045] 图1G显示了考马斯蓝染色凝胶的图像，显示TEV酶成功裂解GST标签；

[0046] 图1H显示了银染色凝胶的图像，显示最终纯化步骤后hADAR1催化结构域(CD)蛋白质产物的纯度；

[0047] 图1I图示了使用SUPERDEX 200 10/300GLTM凝胶过滤柱对纯化的hADAR1催化结构域(CD)进行尺寸排阻色谱分析的数据；

[0048] 图1J图示了通过质谱测定的纯化的hADAR1催化结构域(CD)蛋白质产物的蛋白质量数据；以及

[0049] 图1K图示了纯化的hADAR1催化结构域(CD)的分析超速离心数据，证明了最终蛋白质产物的纯度，

[0050] 如下文实施例1中进一步详细讨论，

[0051] 图2A-C显示了在BJ2168酵母菌表达系统中表达和纯化重组人全长ADAR1催化结构域(hADAR1CD)的示例性过程：

[0052] 图2A显示了示例性p42410xHis标记的全长ADAR1载体图的示意图；

[0053] 图2B显示了示例性半乳糖诱导表达系统的示意图；以及

[0054] 图1C图示了考马斯蓝染色凝胶的数据，证实了10xHis标记的全长ADAR1的半乳糖诱导表达，

[0055] 如下文实施例1中进一步详细讨论，

[0056] 图3A-C显示了示例性的基于纳米荧光素酶的RNA编辑酶活性报告基因的体外测

定:

[0057] 图3A显示了示例性纳米荧光素酶报告基因设计的示意图;

[0058] 图3B显示了慢病毒纳米荧光素酶RNA编辑酶报告基因表达载体的示意图;

[0059] 图3C上部图示了纳米荧光素酶活性测定,显示在用FLAG标记的ADAR1构建体和纳米荧光素酶报告基因共转染后HEK293T细胞中ADAR1编辑酶活性的浓度依赖性和特异性;

[0060] 图3C下部显示了 α -FLAG蛋白质印迹分析图像,证明了FLAG-ADAR蛋白质水平增加;

[0061] 图3D上部显示了示例性纳米荧光素酶活性测定的示意图,比较了与pCDH/ADAR1和纳米荧光素酶报告基因共转导后的K562细胞中ADAR1RNA编辑酶活性;以及

[0062] 图3D下部显示了 α -ADAR1蛋白质印迹分析图像显示所有条件下ADAR1蛋白质水平相同(左);以及RT-PCR显示所有条件下以及作为对照的亲代未转导K562细胞中,纳米荧光素酶报告基因表达相同(右);

[0063] 如下文实施例1中进一步详细讨论,

[0064] 图4A-B显示了示例性的基于纳米荧光素酶的RNA编辑酶活性报告基因的体内测定:

[0065] 图4A上方图示了纳米荧光素酶活性测定,比较了与pCDH载体/ADAR1和纳米荧光素酶报告基因共转导后K562细胞的ADAR1RNA编辑酶活性;

[0066] 图4A下方图示了 α -ADAR1蛋白质印迹分析图像显示在所有条件下ADAR1蛋白质水平相同(左);以及RT-PCR显示所有条件下以及作为对照的亲代未转导K562细胞中纳米荧光素酶报告基因的表达相同(右);和

[0067] 图4B显示了6.5周龄小鼠在新生儿肝内移植K562细胞后的IVISTM成像,所述细胞与pCDH/野生型ADAR1/编辑酶缺陷型ADAR1 E912A和纳米荧光素酶报告基因共转导,显示了RNA编辑酶活性的体内可视化,

[0068] 如下文实施例1中进一步详细讨论,

[0069] 图5A-D显示了ADAR1野生型(WT)和shADAR1敲除后ADAR1突变体的稳定慢病毒过表达的示例性测定:

[0070] 图5A通过qPCR图示了用shSchramble和shADAR1转导后的TF1a细胞中总ADAR1(左)和ADAR1 p150亚型(右)的表达水平(归一化为HPRT);

[0071] 图5B显示了蛋白质印迹分析图像,显示了用shSchramble和shADAR1转导后的TF1a细胞中ADAR1的蛋白质水平;

[0072] 图5C显示了示例性慢病毒表达载体的示意图:HA标记的抗shADAR1(shR)的ADAR1野生型、ADAR1编辑酶缺陷突变体E921A、ADAR1DNA结合域缺陷突变体dZa以及ADAR1突变体E912A dZa构建体;和

[0073] 图5D(左)图示了纳米荧光素酶活性测定,比较了在shRNA介导的ADAR1敲除背景下,用pCDH/ADAR1 shR载体和纳米荧光素酶报告基因共转导后的TF1a细胞中的ADAR1 RNA编辑酶活性;和

[0074] 图5D(右)图示了 α -HA蛋白质印迹分析,显示所有条件下ADAR1蛋白质水平相似;

[0075] 如下文实施例1中进一步详细讨论,

[0076] 图6A-D显示了ADAR1参与JAK/STAT通路的数据,并证明JAK抑制剂如鲁索替尼和菲卓替尼可以用作ADAR-1抑制剂:

[0077] 图6A通过qPCR图示了在使用PBS (对照) 或干扰素 α 处理16小时后,TF1a细胞中ADAR1p150亚型的表达水平(归一化为HPRT);

[0078] 图6B显示了TF1a细胞的蛋白质印迹分析图,描绘了用PBS (对照) 或干扰素 α 处理16小时后ADAR1和JAK/STAT通路的各成员的蛋白质水平;

[0079] 图6C显示了继发性AML (患者672) CD34+细胞的蛋白质印迹分析的图像,显示了用PBS (对照)、干扰素 α 、 β 或 γ 处理16小时后,ADAR1、STAT3和磷酸化-STAT3Y705的蛋白质水平;

[0080] 图6D显示了继发性AML (患者255) CD34+细胞的蛋白质印迹分析图像,在浓度1nM、10nM和100nM下,用FDA批准的JAK2抑制剂(Ruxolitinib和Fedratinib)处理的细胞与用JAK3抑制剂(FM-381)处理的细胞进行比较。

[0081] 如下文实施例1中进一步详细讨论,

[0082] 各附图中的相同参考符号表示相同元件。

具体实施方式

[0083] 在替代实施方案中,提供了用于纯化和生产人功能性抗病毒RNA编辑酶ADAR1 (RNA1相关的腺苷脱氨酶) 和相关慢病毒载体、编辑报告基因和化合物的方法,以及与发现抗病毒化合物、干细胞扩增、抑制肿瘤干细胞和选择性RNA碱基编辑和抑制包括SARSCoV-2和逆转录病毒在内的RNA病毒有关的使用方法。在替代实施方案中,提供了生产大量重组人全长ADAR1、Z α 结合结构域缺失的ADAR1、以及ADAR1催化结构域的方法。

[0084] 在替代实施方案中,提供了纯化人全长ADAR1、Z α 结构域缺失ADAR1和人ADAR1的催化结构域的方法。

[0085] 在替代实施方案中,提供了生产慢病毒ADAR1Nano-luc报告基因转导的干扰素反应性和非反应性细胞系的方法,这些细胞系具有ADAR1过表达和shRNA敲除,用于筛选能够抑制RNA病毒和逆转录病毒复制的抗病毒化合物。

[0086] 在替代实施方案中,提供了识别ADAR1拮抗剂的方法,所述拮抗剂包括能够抑制肿瘤干细胞的慢病毒ADAR1shRNA敲除、突变体和Z α 结构域缺失ADAR1载体。

[0087] 在替代实施方案中,提供了检测ADAR1激动剂的方法,所述激动剂包括能够增强干细胞存活和自我更新的慢病毒ADAR1过表达载体,以及具有抗病毒活性的载体。

[0088] ADAR1体内递送和基因递送载体

[0089] 在替代实施方案中,本文提供的方法包括抑制RNA病毒或逆转录病毒,可选地SARs-CoV-2病毒,包括病毒,例如慢病毒或腺相关病毒(AAV)介导的ADAR1过表达,以及体内施用,可选地通过静脉注射(IV)施用病毒,例如慢病毒-或AAV-ADAR1转导的干细胞,其中可选地,干细胞可以是脐带血CD34+细胞或间充质基质细胞。在替代实施方案中,病毒载体被体外(invitro)、离体(exvivo)或体内(invivo)递送至一个或多个细胞,例如,作为ADAR1递送载体。

[0090] 在替代实施方案中,用于实施本文所提供方法的表达载体、载体、重组病毒或等价物是或包括:腺相关病毒(AAV)、慢病毒载体或腺病毒载体;AAV血清型AAV5、AAV6、AAV8或AAV9;恒河猴源性AAV,或恒河猴源性AAVAARh.10hCLN2;器官亲嗜性AAV;和/或AAV衣壳突变体或AAV杂交血清型。在替代实施方案中,对AAV进行改造,以提高其靶向对野生型(wt)

AAV不敏感的特定细胞类型的效率,和/或提高其仅感染感兴趣的细胞类型的功效。在替代实施方案中,杂交AAV通过一种或多种修饰被重新定向或设计为杂交血清型,这些修饰包括:1)衣壳转移;2)将双特异性抗体吸附到衣壳表面;3)工程设计嵌合体衣壳(mosaiccapsid);和/或4)工程设计嵌合衣壳(chimericcapsid)。如何设计腺相关病毒(AAV)衣壳,以提高其靶向对野生型(wt)AAV不敏感的特定细胞类型的效率,并提高其仅感染感兴趣的细胞类型的功效,是本领域众所周知的;例如,见Wu et al., Mol. Ther. 2006 Sep; 14(3):316-27. Epub 2006 Jul 7; Choi, et al., Curr. Gene Ther. 2005 Jun; 5(3):299-310。

[0091] 例如,可以使用恒河猴源性AAVrh.10hCLN2或其等同物,其中恒河猴源性AAV可能不会被人体内预先存在的任何免疫所抑制;例如,见Sondhi, et al., Hum Gene Ther. Methods. 2012 Oct; 23(5):324-35, Epub 2012 Nov 6; Sondhi, et al., Hum Gene Ther. Methods. 2012 Oct 17;其教导了在大鼠和非人灵长类动物的中枢神经系统中以可扩展至人类的剂量直接施用AAVrh.10hCLN2具有可接受的安全性,并能在中枢神经系统(CNS)中介导显著的有效载荷表达。

[0092] 由于腺相关病毒(AAV)是灵长类动物的常见感染源,因此,健康的灵长类动物体内携带大量AAV特异性中和抗体(NAb),其抑制了AAV介导的基因转移治疗策略;本文提供的方法还包括在治疗前筛选候选患者的AAV特异性NAb,特别是常用的AAV8衣壳组件,以促进个体化治疗设计并提高疗效;例如,见Sun, et al., J. Immunol. Methods. 2013 Jan 31; 387(1-2):114-20, Epub 2012 Oct 11。

[0093] 任何慢病毒载体都可用于实施本文提供的方法,例如,体外、离体或体内递送ADAR1或表达ADAR1的细胞,例如干细胞,例如,如美国专利号11,299,752;11,208,669;11,078,495;11,007,209和10,954,530所述。

[0094] 药物组合物和制剂

[0095] 在替代实施方案中,用于实施本文所提供方法的ADAR1抑制剂,包括药物、载体、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体或纳米颗粒,配制成可通过任意或多种方式给药,包括口服、肠外、吸入喷雾、鼻腔、局部、鞘内、鞘内、脑内、硬膜外、颅内或直肠给药。用于实施本文所提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、载体、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体或纳米颗粒,可进一步包含药理学上可接受的载体、佐剂和赋形剂。在替代实施方案中,本文提供的药物的治疗组合和用于实施本文提供的方法的药物被配制用于非肠道给药,包括鞘内、脑内或硬膜外(进入鞘内、脑内、硬膜外腔)、皮下、静脉内、肌肉内和/或动脉内给药;例如,通过注射途径,还包括各种输注技术。某些实施方案中使用的动脉内、鞘内、颅内、硬膜外、静脉内和其他注射可以包括通过导管或泵给药,例如鞘内泵或植入式医疗设备(其可以是鞘内泵或导管)。

[0096] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,按照适用于所需给药途径的常规程序配制。在替代实施方案中,本文提供的药物的治疗组合和用于实施本文提供的方法的药物,被配制或制造成冻干物、粉末、锭剂、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、悬浮液、溶液或置于油性或水性载体中的乳液,并且可以包含配方剂,如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0097] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂

质体、载体或纳米颗粒,可配制成制剂用于植入或注射。因此,例如,可将化合物与适宜的聚合物或疏水材料(例如,在可接受的油中形成乳液)或离子交换树脂配制、或作为难溶性衍生物(例如,作为难溶性盐)。另外,活性成分也可以是粉末形式,在使用前与适宜的载体(例如无菌无热原水)混合。上述每种给药方法的适宜的可替代和示例性制剂可参见,例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, ed., 20th edition, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa。

[0098] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,与无菌水或生理盐水、聚亚烷基二醇(如聚乙二醇)、合成油或植物油、氢化萘等配制。在替代实施方案中,本文所提供的药物的治疗组合和用于实施本文所提供方法的药物可以配制在生物相容性好、可生物降解的乳酸聚合物中,乳酸/乙二醇共聚物、或聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物可以是控制活性化合物释放的有用赋形剂。

[0099] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,使用肠外给药系统给药,如乙烯-醋酸乙烯共聚物颗粒、渗透泵、植入式输注系统、鞘内导管、泵和植入物,和/或使用脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体。用于肠外给药的制剂还可包括用于口腔给药的甘氨酸酸盐、用于直肠给药的甲氧基水杨酸盐、或用于阴道给药的柠檬酸。用于吸入给药的制剂可以含有如乳糖等赋形剂,也可以是含有聚氧乙烯-9-呋喃基醚、甘氨酸酸盐和脱氧胆酸盐等成分的水溶液,或者是以滴鼻剂形式给药的油性溶液,或者是用于鼻内给药的凝胶。

[0100] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,经鼻内给药。通过这种途径给药时,适当剂型的实例有鼻腔喷雾剂或干粉,这已为本领域技术人员所熟知。例如,鼻腔制剂可以包含常规的表面活性剂,通常是非离子表面活性剂。在鼻腔制剂中使用表面活性剂时,其用量将根据所选的特定表面活性剂、特定的给药方式(例如滴鼻或喷鼻)和所需的效果而有所不同。

[0101] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,采用无菌注射制剂的形式,如无菌注射水性或油性悬浮液。这种悬浮液可根据已知技术使用合适的分散剂、润湿剂和悬浮剂配制。无菌注射制剂也可以是在无毒的肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或悬浮液,如在1,3-丁二醇中的溶液,或制备成冻干粉。可使用的可接受载体和溶剂包括水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。在替代实施方案中,无菌固定油通常被用作溶剂或悬浮介质。为此,可以使用任何味道温和的固定油,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。在替代实施方案中,脂肪酸(如油酸)也可用于制备注射剂。用于静脉注射的制剂可以包括无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,制剂还可包括增溶剂和局部麻醉剂,以减轻注射部位的疼痛。一般来说,这些成分可以单独供应,也可以混合在一起以单位剂量的形式供应,例如,以干冻干粉或无水浓缩物的形式装在密封容器,如安瓿瓶(ampoule)或小袋(sachet)中,并标明活性剂的数量。如果要通过输液给药,可以用输液瓶配制,瓶内含有无菌药用级水、生理盐水或葡萄糖/水。如果化合物通过注射给药,可提供无菌注射用水或生理盐水的安瓿,以便在给药前混合各成分。

[0102] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,进一步包括水性和非水性无菌注射液,其中可包含(包括)抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、杀菌抗生素和使制剂与目标受体体液呈等渗状态的溶质;和/或水性和

非水性无菌悬浮液,可包括悬浮剂和增稠剂。

[0103] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,配制成局部给药的形式,例如液体、乳液、乳膏或凝胶。局部用药可通过直接涂抹在治疗部位来实现。例如,可将制剂(如乳液或凝胶)涂抹在治疗部位的皮肤上,或将液体制剂喷洒在涂抹部位或治疗部位。

[0104] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包括生物植入物或生物植入材料,还可以包覆本发明的化合物或其他化合物,以改善细胞与植入物之间的相互作用。

[0105] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包括少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。

[0106] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,是与传统的粘合剂和载体,如甘油三酯一起配制成栓剂。

[0107] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包括口服制剂,如片剂、丸剂、含片(troch)、锭剂(例如,见USPN5,780,055中所述)、水性或油性悬浮剂、可分散粉末或颗粒、乳剂、硬胶囊或软胶囊或凝胶包衣剂、凝胶剂、胶冻剂、糖浆和/或酏剂。用于口服的组合物可根据本领域已知的任何药物组合物制造方法制备,此类组合物可包含一种或多种辅剂,包括甜味剂、掩味剂、调味剂、着色剂和防腐剂,以提供适口的制剂。口服制剂可包括标准载体,如药用级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。片剂是可接受的中,片剂中含有活性成分与适于制造片剂的无毒的药学上可接受的赋形剂混合。例如,这些赋形剂可以是惰性稀释剂,如碳酸钙或碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;制粒剂和崩解剂,如玉米淀粉或海藻酸;粘合剂,如淀粉、明胶或阿拉伯树胶;润滑剂,如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。片剂可不包衣,也可通过已知技术包衣,包括微囊包衣,以延迟在胃肠道中的崩解和吸附,从而提供较长时间的持续作用。例如,单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯等延时材料可单独或与蜡一起使用。

[0108] 在替代实施方案中,口服制剂为硬明胶胶囊,其中活性成分与惰性固体稀释剂(如磷酸钙或高岭土)混合;或者为软明胶胶囊,其中活性成分与水或油性介质(如花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。

[0109] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包括水性悬浮液,其包括活性材料与适用于制造水性悬浮液的赋形剂混合。示例性赋形剂包括悬浮剂,如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄芪胶和阿拉伯树胶,以及分散剂或润湿剂,如天然存在的磷脂(如卵磷脂)、烯基氧化物与脂肪酸的缩合产物(如聚氧乙烯硬脂酸酯)、环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物(如十七乙基-十六烷氧烯醇,heptadecaethyl-eneoxycetanol)、环氧乙烷与从脂肪酸和己糖醇衍生出的偏酯的缩合产物(如聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯)。水性混悬剂也可包含一种或多种防腐剂,如对羟基苯甲酸乙酯或正丙酯;一种或多种着色剂;一种或多种调味剂,和一种或多种甜味剂,如蔗糖或糖精。

[0110] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包括油性悬浮液,其可通过将活性成分(例如本发明的化合物)悬浮

于植物油(如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)或矿物油(如液体石蜡)中来配制。口服混悬液可包含增稠剂,如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可添加甜味剂(如上文所述)和调味剂,以提供适口的口服制剂。这些组合物可以通过添加抗氧化剂(如抗坏血酸)来防腐。

[0111] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包括控制化合物释放的辅剂,从而提供定时或持续释放的化合物。

[0112] 在替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,被配制或制成多颗粒和/或固体分散制剂,例如,如美国专利申请公开号No.20080118560中所述,例如,由疏水基质前体(不溶于水、非溶胀性两亲性脂质)和亲水基质前体(可熔化、可溶于水的赋形剂)组成。在可替代实施方案中,ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包含在片剂、丸剂、胶囊、含片等药物中,其中包括粘合剂的任意组合,例如淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、黄芪胶或明胶;填充剂,例如微晶纤维素或乳糖;崩解剂,例如交联聚维酮、淀粉乙醇酸钠、玉米淀粉等;润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸、甘油山嵛酸酯;助流剂,例如胶态二氧化硅和滑石粉;甜味剂,例如蔗糖或糖精、阿斯巴甜、安赛蜜K;和/或调味剂,例如薄荷、水杨酸甲酯或橙香精。当剂量单位形式为胶囊时,还可以包括液体载体,如脂肪油。

[0113] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包括(或包含在或包装在)具有包衣的单位剂量制剂,例如,包衣包括糖、虫胶、持续性的和/或其他肠溶包衣剂,或任何药学上纯的和/或无毒的辅剂。

[0114] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包括(或包含在或包装在)单位剂量制剂,其中组合物或制造产品的每种不同化合物都包含在丸剂、片剂或胶囊的不同层中,例如,如USPN7,384,653中所述,例如,具有外层碱溶性层和内层酸溶性层。在替代实施方案中,本文所提供的药物的治疗组合以及用于实施本文所提供方法的药物包括(或包含在或包装在)单位剂量制剂,其中制造的组合物或产品的每种不同化合物都包含在不同粘度的液体或凝胶中,例如,如美国专利申请公开号No.20050214223中所述。在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包括(或包含在或包装在)具有减少滥用可能性的单位剂量制剂,例如,如美国专利申请公开号No.20040228802中所述,例如,包括苦味剂、光亮阻遏剂/指示染料、或细的不溶性颗粒物质。

[0115] 载体

[0116] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包括或配制成水溶液或非水溶液、悬浮液、乳液和固体。适用于本文的非水性溶剂的实例包括但不限于丙二醇、聚乙二醇、植物油(如橄榄油)和可注射的有机酯(如油酸乙酯)。在替代实施方案中,水性载体可包括水、乙醇、酒精/水溶液、甘油、乳剂和/或悬浮剂,包括生理盐水和缓冲介质。口服载体可以是酞剂、糖浆、胶囊、片剂等。

[0117] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,其制造或配制中使用液体载体,包括用

于制备溶液、悬浮液、乳液、糖浆、酞剂和压制的化合物的载体。活性成分可以溶解或悬浮在药学上可接受的液体载体中,例如水、有机溶剂、二者的混合物或药学上可接受的油或脂肪。液体载体可以包括其他适宜的药物添加剂,例如增溶剂、乳化剂、缓冲剂、防腐剂、甜味剂、调味剂、悬浮剂、增稠剂、色素、粘度调节剂、稳定剂或渗透调节剂。

[0118] 在替代实施方案中,用于制造或配制本发明的化合物的液体载体包括水(部分含有上述添加剂,例如纤维素衍生物,或者羧甲基纤维素钠溶液)、醇类(包括一元醇和多元醇,例如乙二醇)及其衍生物,以及油类(例如分馏椰子油和花生油)。对于肠外给药,载体还可以包括油性酯,如油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯。无菌液体载体可用在包含肠外给药用化合物的无菌液体形式中。本文公开的加压化合物液体载体可以是卤代烃或其他药学上可接受的推进剂。

[0119] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,其制造或配制中使用固体载体,固体载体包括如乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、磷酸二钙、甘露醇等物质。固体载体还可以包括一种或多种物质,用作调味剂、润滑剂、增溶剂、悬浮剂、填充剂、助流剂、压缩助剂、粘合剂或片剂崩解剂;它还可以是一种包封材料。在粉剂中,载体可以是与细分的活性化合物相混合的细分固体。在片剂中,活性化合物与具有必要压缩性能的载体按适当比例混合,并压制成所需的形状和大小。例如,适宜的固体载体包括磷酸钙、硬脂酸镁、滑石粉、糖、乳糖、糊精、淀粉、明胶、纤维素、聚乙烯吡咯烷、低熔点蜡和离子交换树脂。片剂可通过压制或模塑制成,也可选择加入一种或多种辅助成分。压制的片剂可通过在合适的机器中压制粉末或颗粒等自由流动形式的活性成分来制备,可选择地与粘合剂(例如聚维酮、明胶、羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如羧甲基淀粉钠、交联聚维酮、交联羧甲基纤维素钠)表面活性剂或分散剂混合。模塑片剂可通过在适宜的机器中对惰性液体稀释剂润湿的粉末状化合物的混合物进行模塑来制备。可选地,片剂可被包衣或刻痕,并且可配制,以便提供其中活性成分的缓慢或受控释放,例如使用不同比例的羟丙基甲基纤维素,以提供所需的释放曲线。可选地,片剂可具有肠溶包衣,以在除胃以外的肠道部分提供释放。

[0120] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,其制造或配制中使用肠胃外载体。适用于本文的肠胃外载体,包括但不限于氯化钠溶液、林格氏葡萄糖(右旋糖)、葡萄糖(右旋糖)和氯化钠、乳酸林格氏液和不挥发性油。静脉内载体可以包括液体和营养补充剂、电解质补充剂,例如基于林格氏葡萄糖的那些。防腐剂和添加剂也可以包括例如抗菌剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

[0121] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,其制造或配制中使用的载体可以使用本领域已知的常规技术,根据需要与崩解剂、稀释剂、制粒剂、润滑剂、粘合剂等混合。载体还可以采用本领域通常已知的不会与化合物发生有害反应的方法进行灭菌。

[0122] 本发明还提供了制品和试剂盒,其包含(包括)用于实施本文所提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包括药物组合物和制剂。仅举个例子,试剂盒或制品可以包括具有所需量的本文所述的化合物

(或化合物的药物组合物)的容器(例如瓶)。这些试剂盒或制品可以进一步包括使用本文所述的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒的说明书。说明书可以附在容器上,也可以包含在装有容器的包装(如盒子、塑料袋或箔袋)中。

[0123] 用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,可以通过任何方法或方案递送至机体或靶向至特定组织或器官(例如,肌肉或脑),例如,包括用本文提供的药物的治疗组合和用于实施本文提供的方法的药物进行离体“细胞负载”,其中“负载的细胞”是肌肉内、或鞘内、脑内或硬膜外给药到中枢神经系统(CNS)中,例如,如美国专利申请公开号No.20050048002中所述。

[0124] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,首先被冻干,然后悬浮在疏水介质中,例如包括脂肪族、环状或芳香族分子,例如,如美国专利申请公开号No.20080159984中所述。

[0125] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包含或配制为药学上可接受的盐。药学上可接受的盐可以包括其适宜的酸加成盐或碱盐。在替代实施方案中,化合物可以如Berge et al., J Pharm Sci, 66, 1-19 (1977) 中所述配制。

[0126] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,被配制为盐;所述盐是与如下物质形成:例如强无机酸如矿物酸,例如氢卤酸如盐酸、氢溴酸和氢碘酸、硫酸、磷酸硫酸盐、硫酸氢盐、半硫酸盐、硫氰酸盐、过硫酸盐和磺酸;强有机羧酸,例如1至4个碳原子的未取代或被取代(例如被卤素取代)的烷烃羧酸,例如乙酸;饱和或不饱和二羧酸,例如草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、邻苯二甲酸或对苯二甲酸;羟基羧酸,例如抗坏血酸、乙醇酸、乳酸、苹果酸、酒石酸或柠檬酸;氨基酸,例如天冬氨酸或谷氨酸;苯甲酸;或有机磺酸,例如未取代的或被取代(例如被卤素取代)的(C₁-C₄)-烷基-或芳基磺酸,例如甲烷-或对甲苯磺酸。本发明的化合物还包括不可药用的盐,例如,盐在合成或分析方法或方案中作为中间体可能仍然是有价值的。

[0127] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包括任意可接受的盐,例如乙酸盐、三氟乙酸盐、乳酸盐、葡萄糖酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、苹果酸盐、泛酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、丁酸盐、二葡萄糖酸盐、环戊酸盐、葡糖庚酸盐、甘油磷酸盐、草酸盐、庚酸盐、己酸盐、富马酸盐、烟酸盐、棕榈酸盐、果胶酸盐、3-苯基丙酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、酒石酸酯、乳糖酸盐、新戊酸盐(pivalate)、樟脑酸盐、十一酸盐和琥珀酸盐;有机磺酸盐,例如甲磺酸盐、乙磺酸盐、2-羟基乙磺酸盐、樟脑磺酸盐、2-萘磺酸盐、苯磺酸盐、对氯苯磺酸盐和对甲苯磺酸盐;和无机酸盐,例如盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、半硫酸盐、硫氰酸盐、过硫酸盐、磷酸盐或磺酸盐。本文公开的药物组合物可以根据本领域熟知和常规实施的方法制备,例如,见Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; and Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc.,

New York, 1978。

[0128] 在一些实施方案中,本文所提供的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,是以药学上可接受的盐的形式提供,所述盐包含本质上是碱性的且可与无机或有机酸反应以形成药学上可接收的酸加成盐的胺;例如所述盐包括无机酸,如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸和磷酸,以及有机酸,如对甲苯磺酸、甲磺酸、草酸、对溴苯基磺酸、碳酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸和乙酸,以及相关的无机酸和有机酸;或可选地这类药学上可接受的盐包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、单氢磷酸盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、癸酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸酯、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、对苯二甲酸盐、磺酸盐、二甲苯磺酸盐、苯乙酸盐、苯丙酸盐、苯丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、 β -羟基丁酸盐、乙醇酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、丙磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、扁桃酸盐、马尿酸盐、葡萄糖酸盐、乳糖酸盐、亚甲基-双-羟基萘甲酸盐、龙胆酸盐、羟乙基磺酸盐、二对甲苯酰酒石酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、环己基氨基磺酸盐和奎尼酸盐月桂基磺酸盐(quinateslaurylsulphonate),以及类似的盐。

[0129] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包括在“良好制造规范”或GMP或“当前良好制造规范(cGMP)”条件下制造的组合物。

[0130] 给药方法

[0131] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,通过任何或多种方式给药,包括口服、非肠道、通过吸入喷雾、鼻腔、局部、鞘内、鞘内、脑内、硬膜外、颅内或直肠。用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,可以与药学上可接受的载体、佐剂和赋形剂一起给药。在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,通过注射途径给药,包括各种输注技术。动脉内、鞘内、颅内、硬膜外、静脉内和其他注射可以包括通过导管或泵给药,例如鞘内泵或植入式医疗设备(可以是鞘内泵或者导管)。

[0132] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,通过任何已知的方法或途径给药,包括通过鼻内、肌肉内、静脉内、局部或口服,或其组合途径。

[0133] 一种实施方案包括制造的产品,其包含药物组合物或制剂、泡罩包装、带盖泡罩或泡罩卡或包、掀盖式、托盘式或收缩包装、或试剂盒,其包含ADAR1抑制剂,包括本文提供的用于口服给药的药物、载体或纳米颗粒制剂。

[0134] 在替代实施方案中,尽管所有成分可以在一个泡罩包装、带盖泡罩或泡罩卡或包、掀盖式、托盘式或收缩包装、或试剂盒中,但也可以配制单独的成分,例如用于局部应用、用于口服或局部应用。每种成分可以单独包装,也可以配制成一个单位剂量,例如,一管(例如

与凝胶、乳液等一起)、安瓿、泡罩包装等。

[0135] 剂量

[0136] 替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,以各种不同的剂量和治疗方案配制和施用,这取决于待改善的疾病或状况、待治疗的个体的状况、治疗目标等等,由临床医生常规确定,例如参见如上所述的最新版的Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Mack PublishingCo.。

[0137] 替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,包括立体异构体、盐、水合物或溶剂合物,为个体或受试者(例如患者)的每kg体重约0.1mg和约20.0mg。在另一种变体中,有效量为个体或受试者(例如患者)的每kg体重约0.1mg至约10.0mg之间,或患者每kg体重约0.1mg至约5.0mg之间。或者,有效量为个体或受试者(例如患者)的每kg体重约0.2mg至约2mg。

[0138] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒(例如,作为固体剂量,如丸剂、片剂或锭剂),为所述个体、受试者或患者的每kg体重约0.1mg至约10.0mg;或为每kg体重约0.1mg至约2.0mg;或为每kg体重约0.1mg、约0.15mg、约0.2mg、约0.25mg、约0.3mg、约0.35mg、约0.4mg、约0.45mg、约0.5mg、约0.55mg、约0.6mg、约0.65mg、约0.7mg、约0.75mg、约0.8mg、约0.85mg、约0.9mg、约0.95mg或约1.0mg;或有效量的本文提供的药物或化合物,或用于实施本文提供的方法的组合物,为每kg体重约0.1mg、约0.15mg、约0.2mg、约0.25mg或约0.3mg。

[0139] 在替代实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,包括药物、脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体、载体或纳米颗粒,其有效量(例如,作为固体剂型,如丸剂、片剂或锭剂)为约0.25mg至约100mg,约0.5mg至约200mg,或约1mg至约400mg;或者为固体剂型,其包含约0.25mg至约100mg、约0.5mg至约200mg、约1mg至约250mg;或者所述固体剂型包括约5mg至约150;或者固体剂型(例如,作为丸剂、片剂或锭剂)包括约1mg至约75;或所述固体剂型包括约5mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg或约75mg。

[0140] 纳米粒子、纳米脂质体和脂质体

[0141] 提供了纳米颗粒、纳米脂质体、囊泡和脂质体膜,其包含用于实施本文所提供的方法和实施方案的化合物和组合物,例如包括ADAR1抑制剂。提供了多层脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体,其包含用于实施本文所提供的实施方案的化合物,例如Park等人的美国专利申请公开号No.20070082042中所述。所述多层脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体可使用油相组分的混合物制备,包含角鲨烷、甾醇、神经酰胺、中性脂质或油、脂肪酸和卵磷脂,颗粒粒径为约200至5000nm,以包埋用于实施本文所提供的实施方案的组合物。

[0142] 脂质体、脂质纳米颗粒(LNP)、纳米脂质体可以使用任何方法制备,例如,如Park等人的美国专利申请公开号No.20070042031中所述,包括通过包封活性物质(例如,用于实施本文所提供的方法的ADAR1抑制剂或任何化合物)生产脂质体的方法,该方法包括在第一储存器中提供水溶液;在第二储存器中提供有机脂质溶液,然后在第一混合区中将水溶液与有机脂质溶液混合以产生脂质体溶液,其中有机脂质溶液与水溶液混合以基本上即时产生包封活性剂的脂质体;然后将脂质体溶液与缓冲溶液混合以制备稀释的脂质体溶液。

[0143] 在一种实施方案中,用于实施本文提供的实施方案的脂质体组合物包括取代的铵和/或聚阴离子,例如,用于靶向递送本文提供的化合物或用于实施本文所提供的方法的化合物至期望的细胞类型或器官,例如脑,例如美国专利申请公开号No.20070110798中所述。

[0144] 提供了包含本文所提供的化合物的纳米颗粒,例如,以含活性剂的纳米颗粒(例如,二次纳米颗粒)的形式用于实施本文所提供的方法,例如,如美国专利申请公开号No.20070077286中所述。在一种实施方案中,提供了纳米颗粒,其包括用于实施本文所提供的实施方案的脂溶性活性剂,或者与二价或三价金属盐作用的脂溶性、水溶性的活性剂。

[0145] 在一种实施方案中,固体脂质悬浮液可用于配制用于实施本文提供的实施方案的组合物并将其递送至体内、体外或离体哺乳动物细胞,例如美国专利申请公开号No.20050136121中所述。

[0146] 在替代实施方案中,使用本文提供的方法,将用于实施本文所提供的方法的编码ADAR1的核酸或载体递送体内,其可以是或者包括下述形式:RNA,例如mRNA,其可以配制在脂质制剂或脂质体中并注射(例如肌肉内注射(IM)),例如使用美国专利申请No.US20210046173A1中所述的方法,其描述了向受试者递送(例如通过肌肉内给药)编码ADAR1的核酸,该核酸包括RNA(例如mRNA),其包含开放阅读框(ORF),所述开放阅读框包含(或由或基本上由其组成)或编码了ADAR1-编码核酸;其中可选地,所述RNA(或所述携带DNA的表达载体)配制在脂质体、或脂质纳米颗粒(LNP)、或纳米脂质体中,其包括:非阳离子脂质,其包括胆固醇和DSPC的混合物,或PEG-脂质,或PEG修饰的脂质,或LNP,或可电离的阳离子脂质;或(13Z,16Z)-N,N-二甲基-2-壬基二十一碳-12,15-二烯-1-胺、胆固醇、DSPC与PEG-2000DMG的混合物。在替代实施方案中,PEG-脂质是1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油甲氧基聚乙二醇(PEG-DMG)、PEG二硬脂基甘油(PEG-DSG)、PEG-二棕榈烯基、PEG-二油酰基、PEG-二硬脂酰基、PEG二酰基甘油酰胺(PEG-DAG)、PEG-二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(PEG-DPPE)或PEG-1,2-二肉豆蔻酰氧基丙基-3-胺(PEG-c-DMA),或者PEG脂质是与二肉豆蔻酰基甘油偶联的PEG(PEG-DMG)。在替代实施方案中,LNP包含20-99.8摩尔%的可电离阳离子脂质、0.1-65摩尔%的非阳离子脂质和0.1-20摩尔%的PEG-脂质。在替代实施方案中,LNP包括可电离的阳离子脂质,其选自(2S)-1-({6-[(3)-胆甾-5-烯-3-基氧基]己基}氧基)-N,N-二甲基-3-[(9Z)-十八碳-9-烯-1-氧基]丙烷-2-胺;(13Z,16Z)-N,N-二甲基-3-壬基二十二碳-13,16-二烯-1-胺;和N,N-二甲基-1-[(1S,2R)-2-辛基环丙基]十七烷-8-胺;或其药学上可接受的盐,或前述任意一种的立体异构体。在替代实施方案中,PEG修饰的脂质包括PEG修饰的磷脂酰乙醇胺、PEG修饰的磷脂酸、PEG修饰的神经酰胺、PEG修饰的二烷基胺、PEG修饰的二酰基甘油、PEG修饰的二烷基甘油,及其混合物。在替代实施方案中,可电离的阳离子脂质包括:2,2-二亚油基-4-二甲氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)、二亚油基-甲基-4-二甲氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA)、二((Z)-壬-2-烯-1-基)9-((4-(二甲氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸酯(L319)、(13Z,16Z)-N,N-二甲基-3-壬基二十二碳-13,16-二烯-1-胺、(12Z,15Z)-N,N-二甲基-2-壬基二十一碳-12,15-二烯-1-胺、和N,N-二甲基-1-[(1S,2R)-2-辛基环丙基]十七烷-8-胺。在一种实施方案中,脂质是(13Z,16Z)-N,N-二甲基-3-壬基二十二碳-13,16-二烯-1-胺或N,N-二甲基-1-[(1S,2R)-2-辛基环丙基]十七烷-8-胺,其各自描述于PCT/US2011/052328中,将其全部内容作为参考引入本文中。在一些实施方案中,本发明公开的非阳离子脂质包括1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、1,2-二油酰基-

sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (DOPE)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DLPC)、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DMPC)、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DOPC)、1,2-二棕榈酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DPPC)、1,2-双十一酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (DUPC)、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (POPC)、1,2-二-0-十八碳烯基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (18:0二酰PC)、1-油酰基-2-胆固醇基半琥珀酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (OChemsPC)、1-十六烷基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱 (C16LysoPC)、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-双二十二碳六烯酸-sn-甘油-3-磷酸胆碱、1,2-二甲酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (ME 16.0PE)、1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二亚油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-花生四烯酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-双二十二碳六烯酸-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸-外消旋-(1-甘油)钠盐 (DOPG)、鞘磷脂或其混合物。

[0147] 递送载体

[0148] 在替代实施方案中,任何递送载体可用于实施本文提供的方法,例如将本文提供的化合物和组合物,或用于实施本文所提供的方法的化合物(例如ADAR1抑制剂)递送至哺乳动物细胞,例如体内、体外或离体。例如,可使用包含聚阳离子、阳离子聚合物和/或阳离子肽(例如聚乙烯亚胺衍生物)的递送载体,如美国专利公开号No.20060083737中所述。

[0149] 在一种实施方案中,干燥的多肽-表面活性剂复合物用于配制本文提供的化合物和组合物,或配制用于实施本文提供的实施方案的化合物,如美国专利公开号No.20040151766中所述。

[0150] 在一种实施方案中,用于实施本文提供的方法的ADAR1抑制剂,可以通过使用具有细胞膜渗透肽缀合物的载体应用于细胞,例如,如美国专利No.7,306,783、No.6,589,503中所述。一方面,将待递送的组合物缀合到细胞膜渗透肽。在一种实施方案中,待递送的组合物和/或递送载体与转运介导肽缀合,例如,如美国专利No.5,846,743中所述,其描述了高度碱性并结合多磷酸肌醇的转运介导肽。

[0151] 在一种实施方案中,电渗透作用被用作将组合物递送到细胞的主要或辅助手段,例如,使用如美国专利No.7109034、No.6,261,815、No.5,874,268中所述的任意电穿孔系统。

[0152] 制品、配方和试剂盒

[0153] 提供了用于实施本文所提供的方法的制品、制剂、药物组合物或制剂、以及试剂盒,其包含用于实施本文所提供方法的组分和组合物,例如,包含ADAR1 (RNA1相关的腺苷脱氨酶)抑制剂,例如,包括:JAK2抑制剂,如菲卓替尼,或INREBC™,或鲁索替尼,或JAKAFI™,或STAT3抑制剂,或8-氮腺苷、核苷类似物或整合酶抑制剂,或雷特格韦(或ISENTRES™)或度鲁特韦,或TIVICAY™,或慢病毒shRNAADAR1敲除载体,或慢病毒ADAR1突变载体,或慢病毒ADAR1Z α 结构域缺失载体,或干扰素抑制化合物,或者慢病毒ADAR1或慢病毒ADAR1-shRNA;并且可选地,制品和试剂盒可以进一步包括用于实施本文所提供的方法的说明书。

[0154] 上述方面和实施方案中的任何一个都可以与本文在概述、附图和/或详细描述部分中公开的任何其他方面或实施例组合。

[0155] 如本说明书和权利要求书中所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指示物,除非上下文另外明确指出。

[0156] 除非特别说明或从上下文中显而易见,否则如本文所用的,术语“或”应理解为包括性的并且涵盖“或”和“和”两者。

[0157] 除非具体说明或从上下文显而易见,否则如本文所用,术语“约”应理解为在本领域的正常公差范围内,例如在平均值的2个标准偏差内。约(使用术语“约”)可以理解为在规定值的20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%。除非上下文另有明确说明,否则本文提供的所有数值均由术语“约”修饰。

[0158] 除非具体说明或从上下文显而易见,否则本文所用的术语“基本上全部”、“基本上大部分”、“基本上全部的”或“大多数的”涵盖组合物的参考量的至少约75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%或更多。

[0159] 本文引用的每个专利、专利申请、出版物和文件的全部内容均通过引用并入本文。引用上述专利、专利申请、出版物和文件并不表示承认前述任何内容是相关现有技术,也不构成对这些出版物或文件的内容或日期的任何承认。单独引用这些文件不应被解释为断言或承认任何文件内容的任何部分被认为是满足专利申请的任何国家或地区法定公开要求的基本材料。尽管如此,保留在适当情况下依赖任何此类文件来提供审查机构或法院认为对所主张主题至关重要的材料的权利。

[0160] 在不脱离本发明的基本方面的情况下,可以对前述内容进行修改。尽管已经参考一个或多个具体实施方案对本发明进行了相当详细的描述,但是本领域的普通技术人员将认识到,可以对本申请中具体公开的实施方案进行改变,并且这些修改和改进都在本发明的范围和精神内。本文适当地说明性描述的本发明可以在不存在本文未具体公开的任何元素的情况下实施。因此,例如,在本文的每种情况下,术语“包括”、“基本上由...组成”和“由...组成”中的任何一个可以用其他两个术语中的任一个代替。因此,已经采用的术语和表达被用作描述术语而不是限制,不排除示出和描述的特征或其部分的等效物,并且应认识到在本发明的范围内可以进行各种修改。本发明的实施方案在所附权利要求中阐述。

[0161] 将参考本文描述的实施例进一步描述本发明;然而,应当理解,本发明不限于这些实施例。

[0162] 实施例

[0163] 除非实施例中另有说明,所有重组DNA技术均根据标准方案进行,例如,如 Sambrook等人(2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY以及 Ausubel等人(1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, *Current Protocols*, USA的第1卷和第2卷中所述。标准分子生物学技术的其他参考文献包括 Sambrook和 Russell(2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Volumes I and II of Brown(1998) *Molecular Biology LabFax*,第二版,Academic Press(UK)。聚合酶链反应的标准材料和方法可以在 Dieffenbach和 Dveksler(1995) *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press以及 McPherson等人(2000) *PCR-Basics: From Background to Bench*,第一版, Springer Verlag, Germany中找到。

[0164] 实施例1:人功能性抗病毒RNA编辑酶、ADAR1和相关慢病毒载体、编辑报告基因和化合物的纯化和生产

[0165] 本实施例使用示例性方法证明了本文提供的方法是有效的,可用于根除或减少体内肿瘤干细胞的数量。

[0166] 方法

[0167] 人ADAR1催化结构域(CD)纯化方法

[0168] 酵母菌株: *Saccharomyces cerevisiae* BJ2168(来自Goode实验室)

[0169] 表达载体: pEG(KT) (URA/LEU minus) (来自Zakarian实验室/Princeton)

[0170] 基因: 密码子优化的ADAR1-CD(GenScript)

[0171] 酵母生长培养基(1L)

[0172] 最低限度选择培养基(URA/LEU缺陷生长培养基): 100mM磷酸钾pH6.0、6.7g酵母氮源基础、1.92g合成氨基酸Drop-Out Mix(Minus URA/LEU)、5.0g硫酸铵、10.0g琥珀酸、2%甘油、3%乳酸、2%棉子糖。使用NaOH颗粒将培养基pH值调至6.0,并使用0.22um过滤器进行灭菌。

[0173] 5X诱导培养基: 50g/L选择酵母提取物, 100g/L细菌用胰蛋白胨, 10% D(+)-半乳糖。使用0.22um无菌过滤器过滤培养基。

[0174] 纯化缓冲液

[0175] 酵母“Popcorn”缓冲液: 20mM Hepes pH 8.0, 150mM NaCl

[0176] -加入新鲜的1mM PMSF和1粒Roche蛋白酶抑制剂鸡尾酒丸

[0177] YeastBuster裂解缓冲液(Novagen)

[0178] -加入1X THP、1mM 1,4-二硫苏糖醇(DTT)、1mM苯甲磺酰氟(PMSF)和1粒Roche蛋白酶抑制剂鸡尾酒丸;

[0179] GST-Pulldown缓冲液

[0180] GST结合缓冲液: 20mM Hepes pH 8.0、150mM NaCl、0.1% Triton X100、5%甘油、1mM DTT

[0181] -加入新鲜的1mM PMSF和1粒Roche蛋白酶抑制剂鸡尾酒丸

[0182] 高盐洗涤缓冲液: 20mM Hepes pH 8.0、500mM NaCl、0.1% Triton X100、5%甘油、1mM DTT; 低盐洗涤缓冲液: 20mM Hepes pH 8.0、75mM NaCl、0.1% Triton X100、5%甘油、1mM DTT

[0183] HiTrap肝素柱(GE)缓冲液

[0184] 缓冲液A: 20mM Hepes pH 8.0, 75mM NaCl, 5%甘油, 1mM DTT, 0.22um过滤; 缓冲液B: 20mM Hepes pH 8.0, 1M NaCl, 5%甘油, 1mM DTT, 0.22um过滤

[0185] 透析缓冲液/蛋白储存缓冲液: 20mM Hepes pH 8.0, 150mM NaCl, 5%甘油, 1mM DTT

[0186] Superdex 200 10/300GL(GE)缓冲液

[0187] 缓冲液A: 20mM Hepes pH 8.0, 150mM NaCl, 5%甘油, 1mM DTT, 0.22um过滤

[0188] 酵母生长程序

[0189] 1) 在无菌150mL挡板烧瓶中, 从新划线的URA/LEU缺陷板中挑选大的单一酵母菌落, 接种15mL最低限度选择培养基(URA/LEU缺陷培养基)。30°C培养过夜, 振动筛设置为250RPM。注: 本方案是为制备3L酵母培养物而设计。

[0190] 2) 第二天, 在2L挡板烧瓶中接种800mL最低限度选择培养基, 每个烧瓶中有1.5mL

起子培养物。培养物于30°C生长过夜,振动筛设置为250RPM。

[0191] 3) 第二天上午,使用Spectronic200分光光度计在600nm波长下测量培养物的光密度(OD)。对于理想的基因表达,OD600nm应该在1.0和2.0之间。为了诱导蛋白质表达,向每个烧瓶中加入200mL的5X诱导培养基。使酵母在30°C下生长24h,振动筛设置为250RPM。

[0192] 4) 通过使用500mL旋转瓶将培养物在5KRPM下旋转10分钟来收获酵母。重复这一步骤直到所有培养物都凝成颗粒。

[0193] 5) 丢弃上清液,用酵母“Popcorn”缓冲液重新悬浮来集合颗粒。首先,通过将颗粒在20mL缓冲液中涡旋来重新悬浮颗粒。然后将酵母转移到50mL锥形管中,并使用台式离心机在5KRPM下重新沉淀酵母10分钟。丢弃洗涤液并保存颗粒。

[0194] 6) 在酵母“Popcorn”缓冲液中再悬浮颗粒,该缓冲液含有1mMPMSF和1粒Roche蛋白酶抑制剂鸡尾酒丸。使用颗粒体积的一半进行重悬浮,通过涡旋使酵母完全重悬浮(例如10mL湿酵母颗粒使用5mLpopcorn缓冲液)。注:Roche蛋白酶抑制剂鸡尾酒丸在本方案中使用前已在popcorn缓冲液中预溶解。

[0195] 7) 最后,将酵母逐滴加到50mL锥形管的液氮中,制成酵母“popcorn”。将popcorn储存在-80°C,以便长期保存。

[0196] 酵母裂解程序

[0197] 1) 预冷陶瓷研钵和研杵,开始裂解程序。为此,将研钵放入装有干冰的桶中。确保干冰完全覆盖研钵的侧面。此外,在研钵中注入液氮,待液氮完全消散后再使用。在步骤2之前,还应将研杵和刮刀浸入液氮中进行预冷。注:处理液氮时务必使用蓝色低温手套。

[0198] 2) 接着,在研钵中放入少量酵母popcorn,并通过小心地使研杵做圆周运动开始研磨,直到形成非常细的粉末。每轮研磨可能需要长达10分钟的时间。

[0199] 3) 将磨碎的酵母材料或“粉末”转移到一个新的50mL锥形管中。如果需要,酵母粉可以在开始下个步骤前保存在-80°C。

[0200] 4) 在室温下解冻酵母粉。当粉末解冻时,活化100mLYeastBuster裂解缓冲液。为了活化缓冲液,加入1mL 100X THP、1mM DTT、1mM PMSF、100uL氰酸酶(50U/uL)和1粒Roche蛋白酶抑制剂鸡尾酒丸。

[0201] 5) 将粉末重悬浮在所有100mL活性Yeast Buster裂解缓冲液中。不要摇晃或涡旋样品,因为这会损坏蛋白质并导致泡沫形成!

[0202] 6) 将样品放入带有搅拌棒的500mL烧杯中,并在室温下以100RPM搅拌1小时。

[0203] 7) 将样品在预冷的均质器中均质30次,完成裂解步骤。每次可取15mL样品,逐次进行。

[0204] 8) 最后,在冷却的离心机中以15KRPM旋转提取物25分钟,将未破碎的细胞和细胞碎片沉淀下来。注:确保使用能够承受这些旋转速度的试管(例如Nalgene离心管)。

[0205] 9) 弃去颗粒,将含有蛋白质的上清液转移到新的50mL锥形管中。测量提取物的蛋白质浓度,并测定样品中蛋白质总量。使用液氮快速冷冻提取物,以备后用。将冷冻提取物保存在-80°C。

[0206] GST-DAR1-CD纯化程序

[0207] 1) 首先将蛋白质提取物在室温下解冻,优选在水中进行。解冻后,将提取物在GST结合缓冲液中稀释至总体积500mL。在最终稀释的提取物溶液(起始材料)中加入新鲜的1mM

DTT、1mM PMSF和1粒Roche蛋白酶抑制剂鸡尾酒丸。理想情况下,提取物的最终蛋白质浓度为1-2mg/mL。

[0208] 2) 在提取物解冻的同时,用150mL (3CV) 冰冷的GST结合缓冲液对GST树脂进行预平衡。

[0209] 3) 接着,使提取物穿过GST树脂。由于此步骤需要数小时才能完成,因此在整个过程中应将提取物和流穿液保持在冰上。此外,保存100uL的起始材料和流穿液,用于抗ADAR1或抗GST蛋白质印迹分析。

[0210] 4) 提取物穿过后,开始用以下洗涤缓冲液洗涤GST树脂:

[0211] a) 100mL GST结合缓冲液; b) 100mL 高盐洗涤缓冲液; c) 100mL GST结合缓冲液; d) 100mL 低盐缓冲液。

[0212] 5) 最后一次洗涤后,取下旋塞,换上小黄帽,并用石蜡膜密封。

[0213] 6) 加入50mL低盐缓冲液,小心重悬GST树脂,并将所有珠子均匀地转移到4×50mL锥形管中(~25mL/每管)。

[0214] 7) 在每个试管中加入50mL含1mM DTT的低盐缓冲液。最终洗脱体积为150mL (约3CV)。

[0215] 8) 在每个试管中加入300uL TEV蛋白酶,并在4°C下轻轻旋转孵育过夜。

[0216] 9) 第二天,将所有GST树脂和溶液转移回纯化柱中。首先松开/打开顶部旋盖,以释放柱的内部压力。然后,小心地打开底部旋盖,将TEV洗脱的蛋白质放入置于冰上的250mL烧杯中。保留160uL的洗脱液用于蛋白质浓度测量和考马斯蓝染色分析。

[0217] 10) 将洗脱液泵送至与AKTAPure系统(FPLC)串联的5mL HiTrap肝素柱(GE)上进行纯化。使用写在AKTAPure系统上的方法脚本。注:从步骤9中获得的毫克数将决定需要多少个肝素柱来捕获样品中的所有ADAR1-CD蛋白质。

[0218] 11) 在SDS-PAGE凝胶上观察肝素馏分并用考马斯蓝染色来测定ADAR1-CD和包括TEV蛋白酶在内的其他污染蛋白的分离。注:在进入下一步之前,确定蛋白质的分离至关重要。

[0219] 12) 收集含有ADAR1-CD但不含其他污染蛋白的FPLC产物,并将其转移到置于冰上的50mL锥形管中。

[0220] 13) 由于样品为高盐状态(~300mM),因此需要使用透析管在透析缓冲液中对样品进行透析,透析管在1mM EDTA pH 8.0 dH₂O中预平衡。确保透析管的截留分子量(MWCO)不大于10-14kDa。在3L缓冲液中用搅拌棒轻轻搅拌,在4°C透析过夜。

[0221] 14) 第二天上午,小心地将样品转移到置于冰上的新的50mL锥形管中。此时,可使用MWCO为10-14kDa的Millipore Amicon-Ultra离心旋转柱浓缩蛋白质。将样品在5000×g下离心20分钟。20分钟后,将样品从离心机中取出,小心地用吸管移出蛋白质溶液,以防止不需要的蛋白质聚集。继续旋转样品,直至最终体积达到500uL。

[0222] 15) 测量浓缩样品的蛋白质浓度,保存20uL用于进一步的SDS-PAGE分析,并将其余样品在液氮中快速冷冻。该样品现已准备好用于下游应用。注:或者,可在浓缩步骤后将样品加到Superdex200 10/300GL™凝胶过滤柱,以进一步纯化蛋白质。

[0223] 纳米荧光素酶报告基因设计

[0224] 体内RNA编辑酶报告基因构建

[0225] 通过以下称为NanoLuc的DNA序列亚克隆至pCDH-EF1-T2A-copGFP慢病毒表达质粒(CD521A-1, SBI Systems Biosciences), 生成RNA编辑酶反应性报告基因:

[0226] tctagaCTAGCCAAGGTGAGCGGTCAATAAACATGCACGTTTATTA

[0227] GCGCGCCACCCTGGAGCTAGCGTCTTCACACTCGAAGATTTTCGT

[0228] TGGGGACTGGCGACAGACAGCCGGCTACAACCTGGACCAAGTCC

[0229] TTGAACAGGGAGGTGTGTCCAGTTTGTTCAGAATCTCGGGGTGT

[0230] CCGTAACTCCGATCCAAAGGATTGTCCTGAGCGGTGAAAATGGG

[0231] CTGAAGATCGACATCCATGTCATCATCCCGTATGAAGGTCTGAGC

[0232] GGCGACCAAATGGCCAGATCGAAAAAATTTTAAAGGTGGTGTA

[0233] CCCTGTGGATGATCATCACTTTAAGGTGATCCTGCACTATGGCAC

[0234] ACTGGTAATCGACGGGTTACGCCGAACATGATCGACTATTTTCG

[0235] GACGGCCGTATGAAGGCATCGCCGTGTTTCGACGGCAAAAAGATC

[0236] ACTGTAACAGGGACCCTGTGGAACGGCAACAAAATTATCGACGA

[0237] GCGCCTGATCAACCCGACGGCTCCCTGCTGTTCCGAGTAACCAT

[0238] CAACGGAGTGACCGGCTGGCGGCTGTGCGAACGCATTCTGgcggcc

[0239] gct

[0240] (SEQ ID NO:2)

[0241] 扩增NanoLucs序列使用正向引物:GP17015XbaI/NanoLuc

[0242] (5'-ctagtctagactagccaaggtgagcgcgtca-3') (SEQ ID NO:3)

[0243] 和反向引物GP17023NotI/NanoLuc

[0244] 5'-atagtttagcggccgcagaatgcgttc gcacag-3'. (SEQ ID NO:4)

[0245] 扩增后的pCDH-EF1-T2A-copGFP载体用限制性内切酶XbaI和NotI消化。将上述序列连接到XbaI/NotI消化的pCDH-EF1-T2A-copGFP中, 在框内产生响应RNA编辑酶活性的NanoLuc报告基因。纳米荧光素酶上游有一个[TAG]终止密码子, 作为腺嘌呤被RNA编辑成肌苷后的响应, 该密码子被翻译为[TGG], 从而缓解终止密码子的阻断并诱导报告基因纳米荧光素酶的表达。管家延伸因子1 α (EF1) 启动子驱动报告基因的表达。寡核苷酸引物由EtonBioscience (San Diego, CA) 合成。使用限制性内切酶分析和DNA测序完成了NanoLuc报告基因的验证。

[0246] 通过Nano-luc报告基因实现ADAR1编辑酶活性的体内可视化

[0247] 转导

[0248] 来自ATCC的K562细胞首先用对照、ADAR1 WT或ADAR1 E912A突变载体转导并保持稳定。然后用相同MOI的ADAR1 NanoLuc报告基因慢病毒共同转导这些稳定株。然后对细胞进行亚培养并保持稳定, 然后移植到小鼠体内。

[0249] 移植和成像

[0250] 免疫受损的RAG2^{-/-}yc^{-/-}小鼠按照IACUC批准的方案进行繁殖并饲养在Sanford Consortium饲养箱内。新生小鼠(P2-P3)在肝内移植了100,000个K562细胞, 所述细胞用pCDH、ADAR1 WT或ADAR1 E912A载体, 以及ADAR1 NanoLuc报告基因(全部)转导。P21后每周对小鼠进行监测和称重。与非移植对照组相比体重减轻>20%的小鼠(约7周大)通过IVIS lumina成像系统成像。Promega NANOLUCTM底物在40 \times (无菌PBS)中制备, 以相当于10倍小鼠

体重(g)的体积(u1)腹腔注射。成像后,小鼠安乐死。

[0251] 图例

[0252] 图1. 重组人ADAR1催化结构域(hADAR1-CD)在BJ2168酵母表达系统中的表达和纯化。(A)在酵母中表达hADAR1 CD的密码子优化。(B)hADAR1-CD氨基酸序列,着色氨基酸在 Δ 环结构中已被删除。(C)pEG(KT)GST-TV-hADAR1 CD和pEG(KT)GST-TEV-hADAR1 CD Δ 环载体图。(D)半乳糖诱导表达系统的示意图。(E)考马斯蓝染色和 α -ADAR1蛋白质印迹证实GST标记的hADAR1 CD的半乳糖诱导表达。(F)显示从酵母细胞提取物中纯化蛋白质的步骤的工作流程。(G)考马斯蓝染色显示TEV酶成功裂解GST标签。(H)银染色显示最终纯化步骤后hADAR1CD蛋白质产物的纯度。(I)使用Superdex200 10/300GL凝胶过滤柱对纯化的hADAR1 CD进行尺寸排阻色谱。(J)通过质谱法测定纯化的hADAR1-CD蛋白质产物的蛋白质质量。(K)对纯化的hADAR1-CD进行分析超速离心,证明最终蛋白质产物的纯度。

[0253] 图2. 重组人全长ADAR1在BJ2168酵母表达系统中的表达和纯化。(A)p42410xHis标记的全长ADAR1载体图。(B)半乳糖诱导表达系统的示意图。(C)考马斯蓝染色证实10xHis标记的全长ADAR1的半乳糖诱导表达。

[0254] 图3. 基于纳米荧光素酶的RNA编辑酶活性报告基因的体外测定。(A)纳米荧光素酶报告基因设计的示意图。在启动子和纳米荧光素酶序列(Herbert序列)之间设计了一个UGA终止密码子的报告基因。当细胞中没有A-to-I编辑时,纳米荧光素酶序列前面的终止密码子会阻止其转录。因此将没有信号。在ADAR1存在的情况下,终止密码子将通过ADAR1的A-to-I RNA编辑酶活性进行编辑,从而不再阻止纳米荧光素酶序列的转录。因此,将存在发光信号,该发光信号可以被检测和量化。(B)慢病毒纳米荧光素酶RNA编辑酶报告基因表达载体。(C)上部:纳米荧光素酶活性测定显示在用FLAG标记的ADAR1构建体和纳米荧光素酶报告基因共转染后HEK293T细胞中ADAR1编辑酶活性的浓度依赖性和特异性。下部: α -FLAG蛋白质印迹分析证明了FLAG-ADAR蛋白质水平增加。(D)上部:纳米荧光素酶活性测定,比较与pCDH/ADAR1和纳米荧光素酶报告基因共转导后的K562细胞中ADAR1 RNA编辑酶活性。下部: α -ADAR1蛋白质印迹分析显示所有条件下ADAR1蛋白质水平相同(左),RT-PCR显示所有条件下以及作为对照的亲代未转导K562细胞中,纳米荧光素酶报告基因表达相同(右)。

[0255] 图4. 基于纳米荧光素酶的RNA编辑酶活性报告基因的体内测定。(A)上部:纳米荧光素酶活性测定,比较与pCDH载体/ADAR1和纳米荧光素酶报告基因共转导后K562细胞中ADAR1 RNA编辑酶活性。下部: α -ADAR1蛋白质印迹分析显示所有条件下ADAR1蛋白质水平相同(左),RT-PCR显示所有条件下以及作为对照的亲代未转导K562细胞中纳米荧光素酶报告基因表达相同(右)。(B)6.5周龄小鼠在新生儿肝内移植K562细胞后的IVISTM成像,所述细胞与pCDH/野生型ADAR1/编辑酶缺陷型ADAR1E912A和纳米荧光素酶报告基因共转导,显示RNA编辑酶活性的体内可视化。

[0256] 图5. 稳定的慢病毒shRNA介导的ADAR1的敲除以及shADAR1敲除后ADAR1野生型和ADAR1突变体的稳定慢病毒过表达。(A)通过qPCR(归一化为HPRT)显示用shSchramble和shADAR1转导后TF1a细胞中的总ADAR1(左)和ADAR1 p150亚型(右)表达水平,证实了有效(90%)的shRNA介导的ADAR1敲除。(B)通过蛋白质印迹分析显示用shSchramble和shADAR1转导后TF1a细胞中ADAR1的蛋白质水平,证实了有效(90%)的shRNA介导的ADAR1敲除。(C)HA标记的shADAR1抗性(shR)ADAR1野生型、ADAR1编辑酶缺陷突变体E921A、ADAR1 DNA结合

域缺陷突变体dZa和ADAR1突变体E912A-dZa构建体的慢病毒表达载体。(D) 纳米荧光素酶活性测定,比较在shRNA介导的ADAR1敲除背景下用pCDH/ADAR1 shR载体和纳米荧光素酶报告基因共转导后的TF1a细胞中的ADAR1 RNA编辑酶活性(左)。 α -HA蛋白质印迹分析显示在所有条件下ADAR1蛋白质水平相似。

[0257] 图6. ADAR1参与JAK/STAT通路和JAK抑制剂作为潜在的ADAR1抑制剂。(A) 通过qPCR显示在使用PBS(对照)或干扰素 α 处理16小时后,TF1a细胞中ADAR1 p150亚型的表达水平(归一化为HPRT)。(B) TF1a细胞的蛋白质印迹分析,描绘了用PBS(对照)或干扰素 α 处理16小时后ADAR1和JAK/STAT通路的各成员的蛋白质水平。(C) 继发性AML(患者672)CD34+细胞的蛋白质印迹分析,显示了用PBS(对照)、干扰素 α 、 β 或 γ 处理16小时后,ADAR1、STAT3和磷酸化-STAT3 Y705的蛋白质水平;(D) 继发性AML(患者255)CD34+细胞的蛋白质印迹分析,在浓度1nM、10nM和100nM下,用FDA批准的JAK2抑制剂(Ruxolitinib和Fedratinib)处理的细胞与用JAK3抑制剂(FM-381)处理的细胞进行比较。

[0258] 以上描述了本发明的多个实施方案。然而,可以理解的是,在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以进行各种修改。因此,其他实施例也在所附权利要求的范围之内。

A

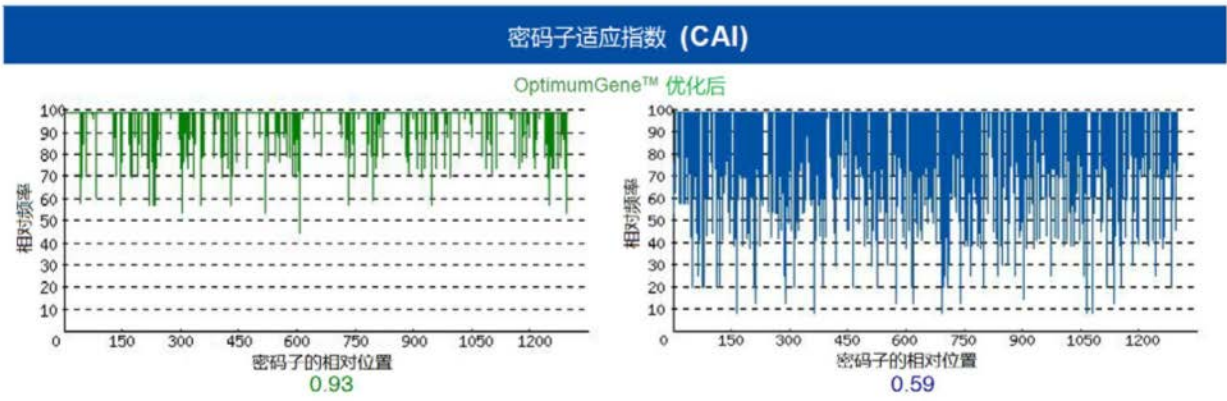


图1A

B

S M L L L S R S P E A Q P K T L P L T G S T F H D Q I A M L S H R C F N
T L T N S F Q P S L L G R K I L A A I I M K K D S E D M G V V V S L G T
G N R C V K G D S L S L K G E T V N D C H A E I I S R R G F I R F L Y S
E L M K Y N S Q T A K D S I F E P A K G G E K L Q I K K T V S F H L Y I
S T A P C G D G A L F D K S C S D R A M E S T H S R H Y P V F E N P K Q
G K L R T K V E N G E G T I P V E S S D I V P T W D G I R L G E R L R T
M S C S D K I L R W N V L G L Q G A L L T H F L Q P I Y L K S V T L G Y
L F S Q G H L T R A I C C R V T R D G S A F E D G L R H P F I V N H P K
V G R V S I Y D S K R Q S G K T K E T S V N W C L A D G Y D L E I L D G
T R G T V D G P R N E L S R V S K K N I F L L F K K L C S F R Y R R D L
L R L S Y G E A K K A A R D Y E T A K N Y F K K G L K D M G Y G N W I S
K P Q E E K N F Y L C P V

图1B

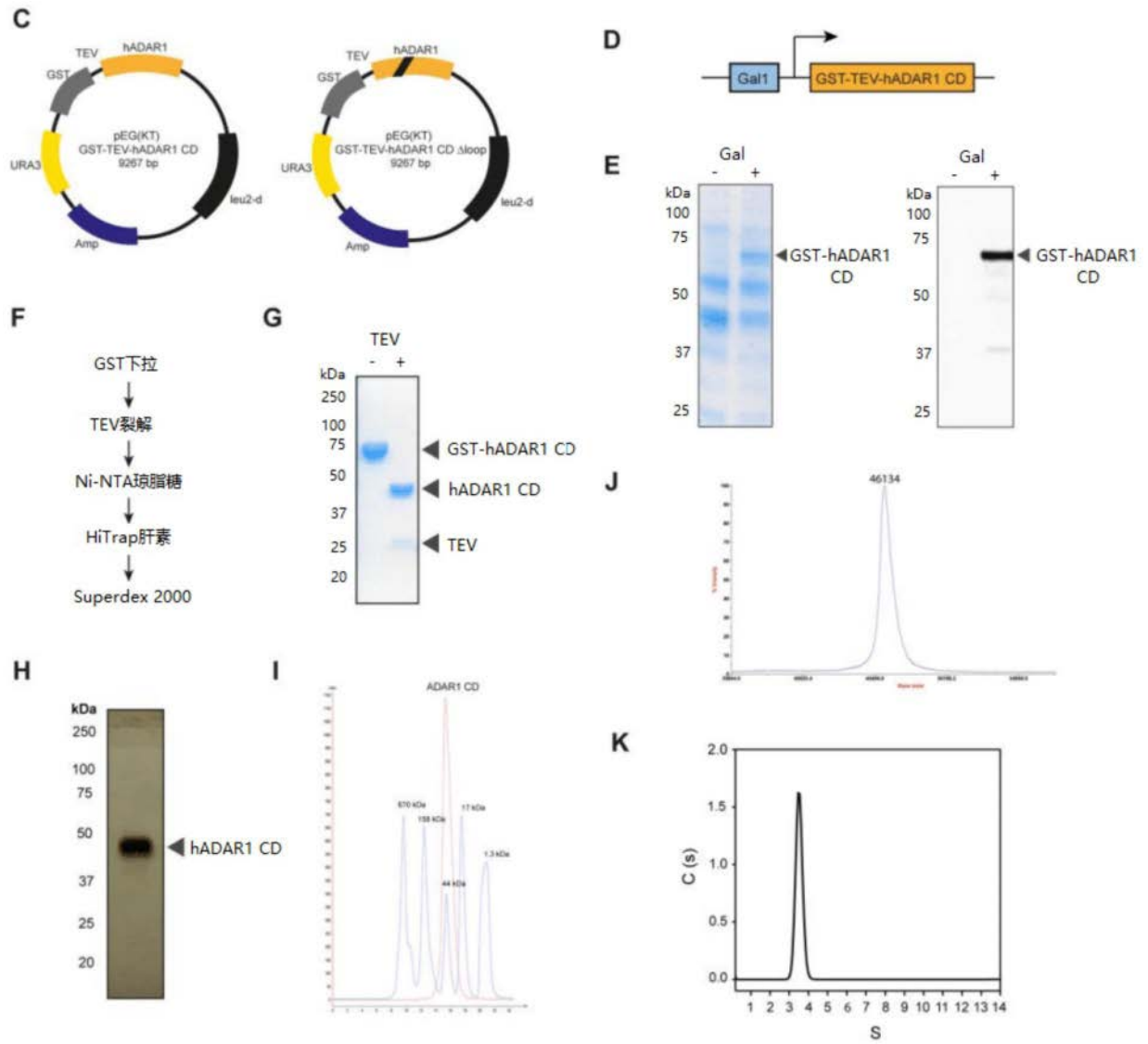


图1C-K

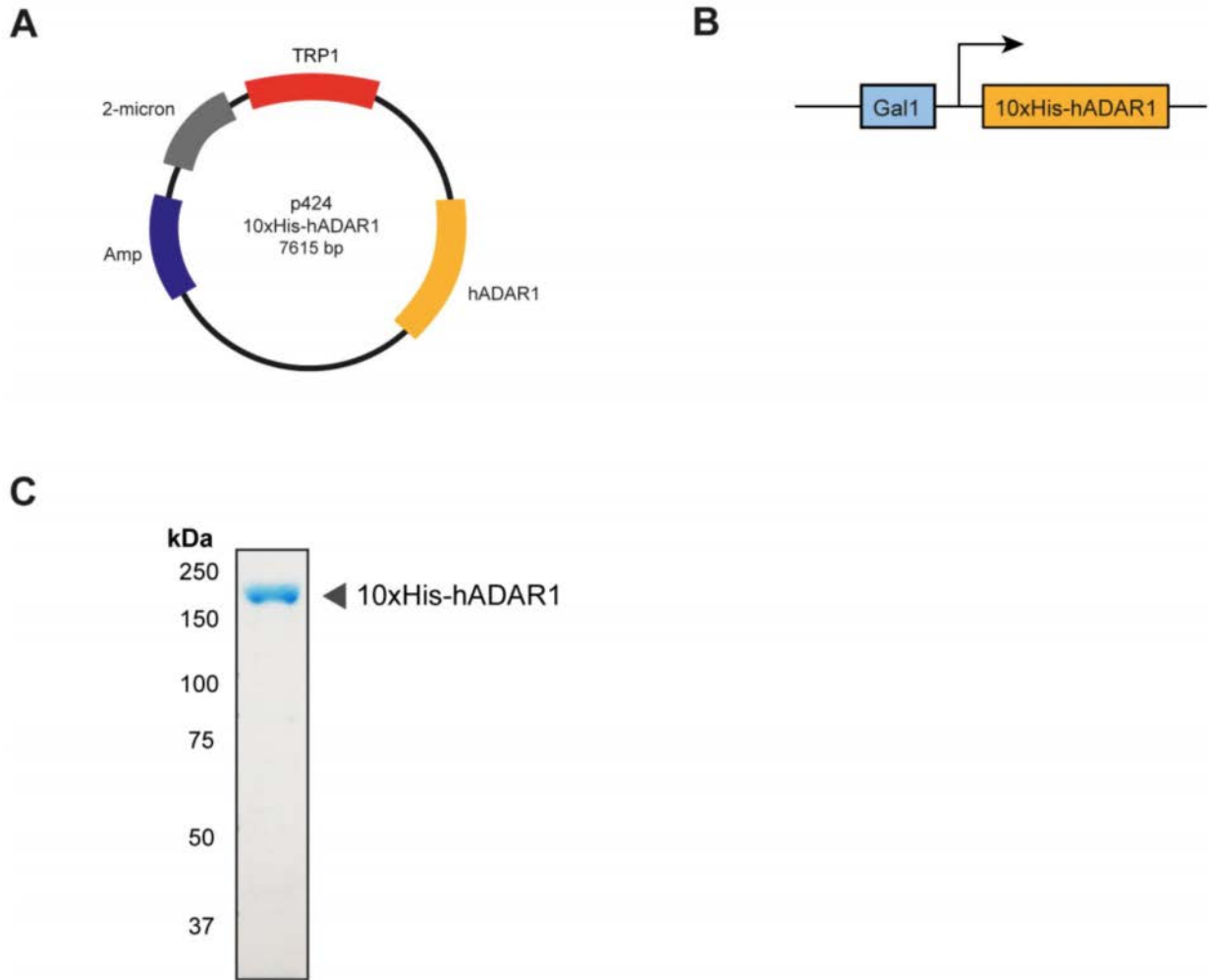


图2A-C

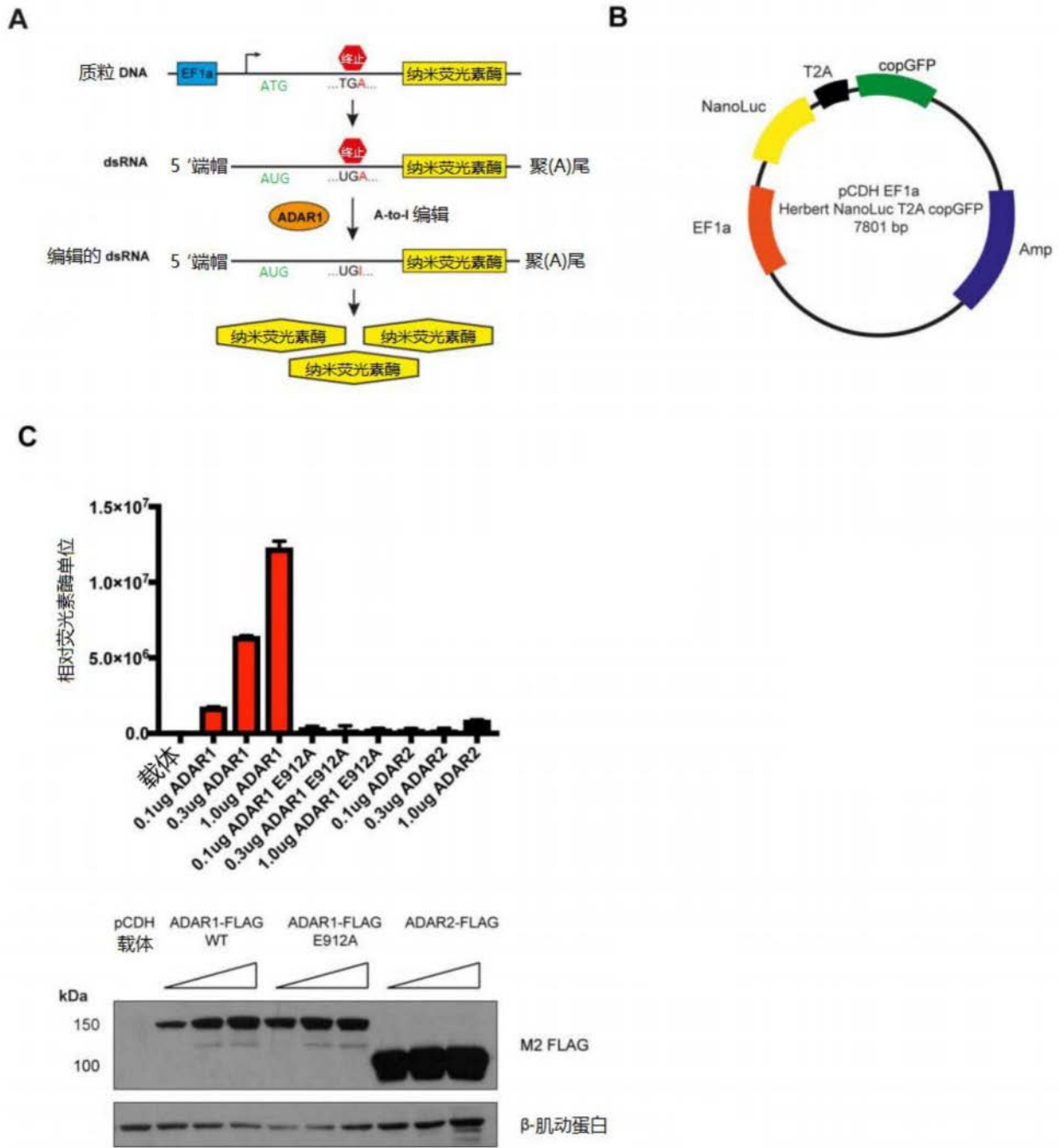
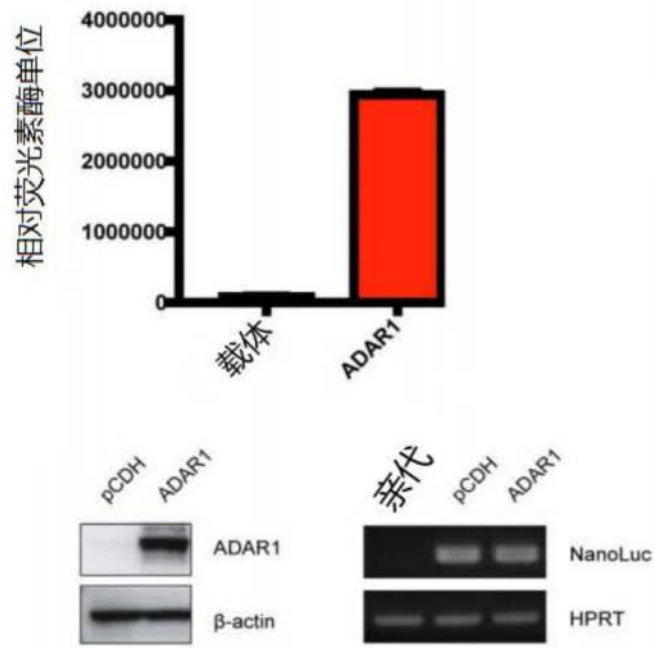


图3

A



B

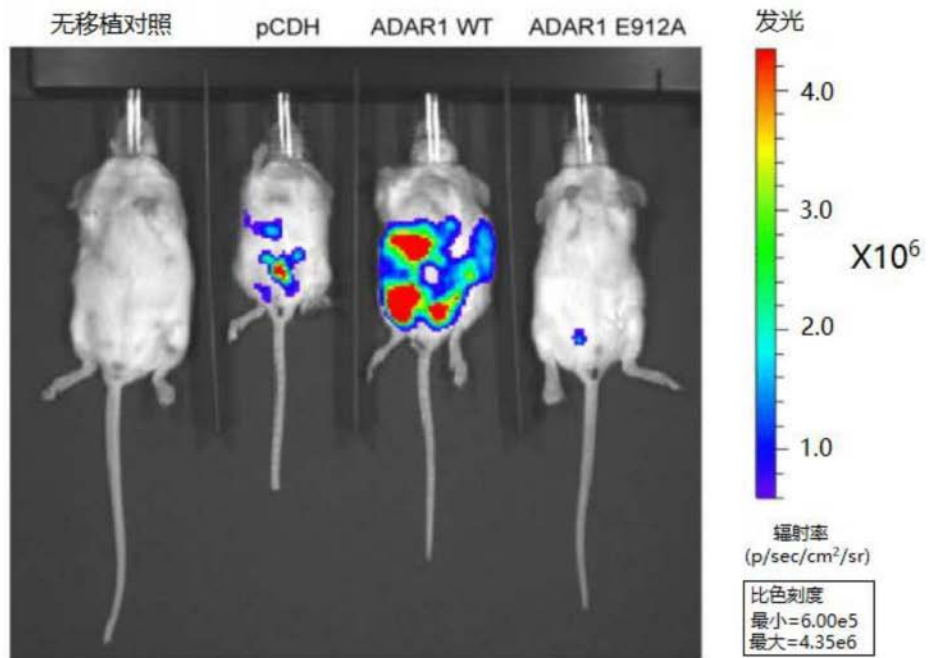
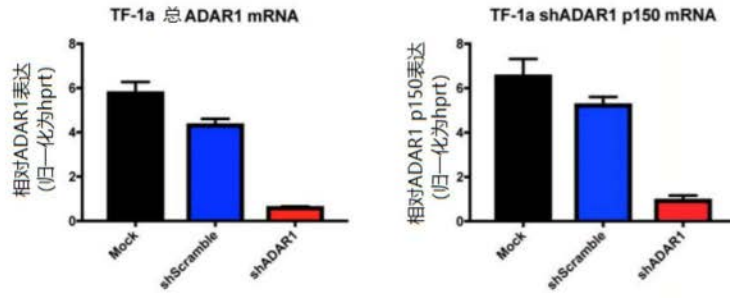
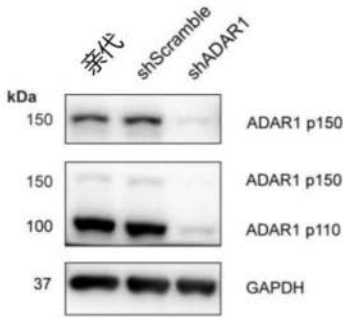


图4

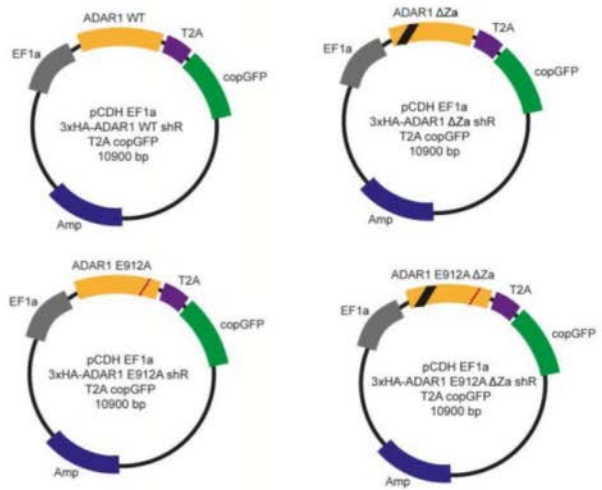
A



B



C



D



图5A-D

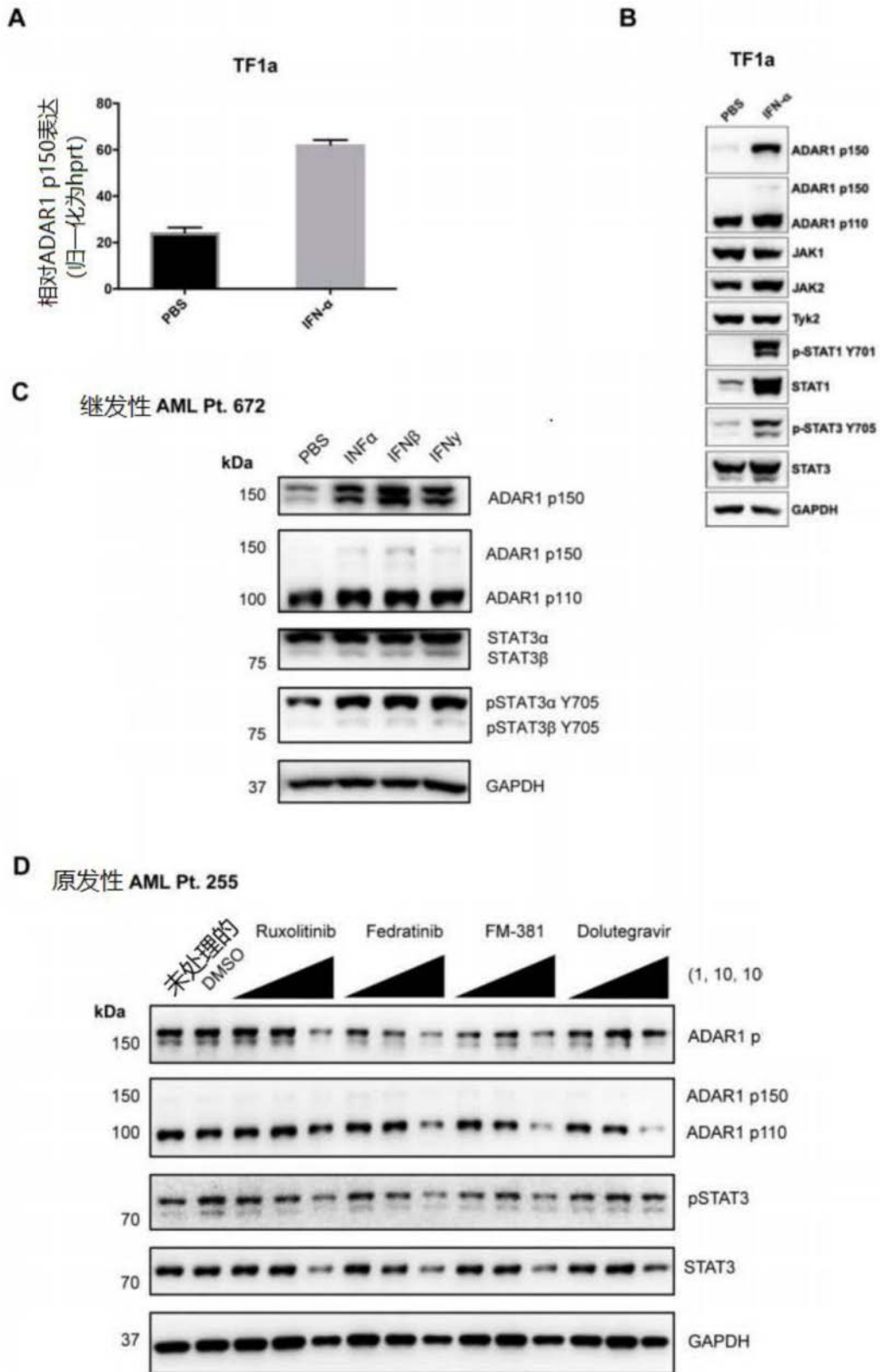


图6