

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2025 年 1 月 16 日 (16.01.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/010935 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/137624
- (22) 国际申请日: 2023 年 12 月 8 日 (08.12.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202310841862.6 2023年7月7日 (07.07.2023) CN
- (71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTE OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道1068号, Guangdong 518055 (CN)。
- (72) 发明人: 恩琼格露西·万吉鲁 (NJUNGE, Lucy Wanjiru); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055

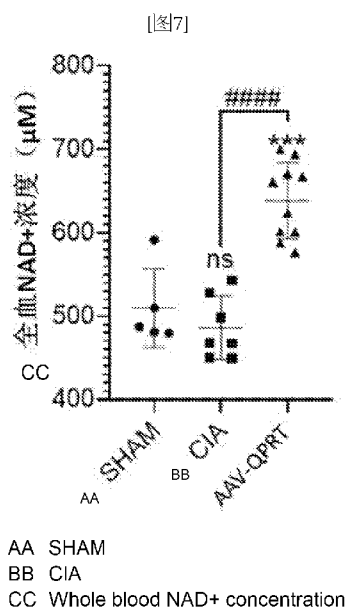
(CN)。於邱黎阳 (YU, Qiuliyang); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京中巡通大知识产权代理有限公司 (BEIJING ZHONG XUN TONG DA INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国北京市西城区西直门外大街 1 号院 2 号楼 7 层 7C1, Beijing 100044 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: DRUG FOR TREATING RHEUMATOID ARTHRITIS

(54) 发明名称: 用于治疗类风湿性关节炎的药物



(57) Abstract: Provided is a drug for treating rheumatoid arthritis, the drug comprising a gene therapy vector, and the gene therapy vector comprising a nucleic acid sequence encoding quinolinate phosphoribosyltransferase (QPRT). The provided drug provides prolonged or sustained QPRT in vivo, which can restore or enhance the capability of cells producing NAD⁺ and regulate processes in secretion pathways, thereby preventing pathological secretion of cytokines, stopping the inflammatory progression at the origin, and effectively avoiding immune response, neovascularization and tissue destruction in joints. The provided drug based on gene therapy can improve spatial and temporal distribution, improve the treatment effect and reduce side effects; the drug achieves prolonged or sustained QPRT release, and thus has long efficacy; and, along with the prolonged expression of QPRT, the dosage of the drug can be reduced.

(57) 摘要: 提供一种用于治疗类风湿性关节炎的药物, 所述药物包括基因治疗载体, 所述基因治疗载体包含编码喹啉酸磷酸核糖基转移酶 (QPRT) 的核酸序列。提供的药物通过在体内提供延长或持续的QPRT, 可以恢复或增加细胞产生NAD⁺的能力, 调节分泌途径中的过程, 从而阻止细胞因子的病理性分泌, 在起源点停止炎症过程, 有效避免关节中的免疫反应、新生血管形成和组织破坏。提供的基于基因治疗的药物能够改善时空分布, 提高治疗效果, 减少副作用, 能够实现QPRT的延长或持续释放, 药效长, 且随着QPRT的延长表达, 可以减少药物的使用剂量。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

说明书

发明名称: 用于治疗类风湿性关节炎的药物

技术领域

[0001] 本发明涉及类风湿性关节炎诊断与治疗技术领域，尤其涉及用于治疗类风湿性关节炎的药物。

背景技术

[0002] 类风湿性关节炎（RA）是一种慢性自身免疫性疾病，其特征是过度产生细胞因子，从而导致炎症和血管生成，最终导致自身免疫和关节组织破坏。且细胞代谢异常是促进RA炎症和免疫反应的重要原因之一。目前，可用于RA患者的疗法主要是基于利用甲氨蝶呤等免疫抑制剂或靶向炎性细胞因子、阻断细胞因子或其受体的策略，这些策略针对的是炎症过程的下游事件，然而细胞因子及其下游事件对许多生理过程至关重要，它们的靶向无疑会导致不良的副作用。此外，在临床上，甲氨蝶呤等免疫制剂还存在明显的肝肾毒性，这是大部分患者不得已停药的主要原因。此外，由于RA的临床和发病机制的异质性，如细胞因子的产生、自身抗体和对特定细胞因子抑制剂的反应等，只有一部分患者对批准的小分子抑制剂和生物制剂有反应。

[0003] 因此，针对上游生化和代谢事件的治疗方法在起点干预病理过程是一种非常有前景的策略，有望解决现有针对炎症过程的下游事件的策略存在的上述问题。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD⁺）在调节细胞代谢和调节包括细胞因子产生和免疫反应在内的重要信号通路方面发挥着重要作用。NAD⁺被认为是促进RA的T细胞中肿瘤坏死因子（TNF）分泌的上游机制，NAD⁺水平在细胞中的恢复阻止了TNF的过量产生和炎症。因此，前期科研团队已经研究了几种NAD⁺前体，如烟酸单核苷酸（NMN）和烟酸核糖核苷酸（NR）在RA干预中的应用。然而，这些化合物只能发挥短期作用，需要长期给药，且响应率有限，这会导致患者的不耐受和经济负担。此外，这些化合物的口服给药和高治疗剂量会导致全身效应，靶向特定组织和器官的能力不强，有增加毒性和副作用的风险。鉴

于NAD⁺在RA中的潜在治疗作用，有必要确定能够靶向、长期和持续产生NAD⁺的策略。

[0004] 因此，现有技术还有待于改进和发展。

发明概述

技术问题

[0005] 鉴于上述现有技术的不足，本发明的目的在于提供用于治疗RA的药物，旨在解决现有用于治疗RA的药物药效短、用量大的问题。

技术解决方案

[0006] 鉴于上述现有技术的不足，本发明的目的在于提供用于治疗RA的药物，旨在解决现有用于治疗RA的药物药效短、用量大的问题。

[0007] 本发明的技术方案如下：

[0008] 本发明的第一方面，提供一种用于治疗RA的药物，其中，包括基因治疗载体，所述基因治疗载体包含编码喹啉酸磷酸核糖基转移酶（QPRT）的核酸序列。

[0009] 可选地，所述基因治疗载体包括病毒载体、非病毒载体中的至少一种。

[0010] 可选地，所述病毒载体包括腺相关病毒载体、腺病毒载体、慢病毒载体、单纯疱疹病毒载体中的一种或多种。

[0011] 可选地，所述腺相关病毒载体包括AAV1载体、AAV2载体、AAV5载体、AAV6载体、AAV8载体、AAV9载体、AAVrh10载体中的一种或多种。

[0012] 可选地，所述非病毒性载体包括质粒、阳离子脂质、脂质纳米颗粒、脂质体、聚合物基载体、细胞外囊泡中的一种或多种。

[0013] 可选地，所述药物还包括药学上可接受的辅料。

[0014] 可选地，所述药物的剂型为注射剂。

[0015] 可选地，所述药物的给药方式为静脉内注射、皮下注射、肌肉注射、关节内注射、皮内注射中的一种或多种。

[0016] 本发明的第二方面，提供检测QPRT的试剂在制备用于诊断RA的产品中的应用。

[0017] 可选地，所述产品包括试剂盒、试纸中的一种。

有益效果

- [0018] 有益效果：发明人发现QPRT是NAD⁺从头合成途径中的限速酶，参与了大量重要的细胞过程，包括炎症反应、病原体耐药性和组织重塑。因此，提供了上述用于治疗RA的基因治疗药物，本发明提供的药物通过在体内提供延长或持续的QPRT，可以恢复或增加细胞产生NAD⁺的能力，调节分泌途径中的过程，从而阻止细胞因子的病理性分泌，在起源点停止炎症过程，有效避免关节中的免疫反应、新生血管形成和组织破坏。本发明提供的基于基因治疗的药物能够改善QPRT在关节中的时空分布，提高治疗效果，减少副作用，能够实现QPRT的延长或持续释放，药效长，且随着QPRT的延长表达，可以减少药物的使用剂量。

附图说明

- [0019] 图1为滑膜组织中QPRT的mRNA表达结果，其中a为正常组和RA组，b为OA组和RA组。
- [0020] 图2中a为不同细胞因子的条带图，b为TNF- α 的浓度结果图，c为CTGF的浓度结果图。
- [0021] 图3为不同条件培养基上生长的内皮细胞中的血管图，其中a为shCtrl组，b为shQPRT组。
- [0022] 图4中a为血管节点数量图，b为血管交叉点数量图。
- [0023] 图5中a为临床关节炎评分随着注射免疫周数的增加的变化曲线图，b为a中曲线下方区域的面积图，c为爪子的体积随着注射免疫周数的增加的变化曲线图，d为c中曲线下方区域的面积图。
- [0024] 图6中a为QPRT表达条带图，b为QPRT表达柱状图。
- [0025] 图7为不同组别的血清中NAD⁺浓度的结果图。
- [0026] 附图中，★表示与对照组/假手术组相比 $p<0.05$ ，★★表示与对照组/假手术组相比 $p<0.01$ ，★★★表示与对照组/假手术组相比 $p<0.001$ ；####表示与CIA组相比 $p<0.0001$ ；ns表示不显著。

本发明的实施方式

- [0027] 本发明提供一种用于治疗RA的药物，为使本发明的目的、技术方案及效果更加清楚、明确，以下对本发明进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。
- [0028] 除非另有定义，本文所使用的所有的技术术语和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施方式的目的，不是旨在于限制本发明。
- [0029] NAD⁺是促进RA的T细胞中TNF分泌的上游过程，其在细胞中的恢复阻止了TNF的过量产生和炎症。然而，NAD⁺前体的直接给药治疗RA无效。发明人发现QPRT是NAD⁺从头合成途径中的限速酶，参与了大量重要的细胞过程，包括炎症反应、病原体耐药性和组织重塑。基于此，本发明提供一种用于治疗RA的药物，其中包括基因治疗载体，所述基因治疗载体包含编码QPRT的核酸序列。编码QPRT的mRNA序列可在美国国家生物技术信息中心（NCBI）NM_133686.1获得，其序列如SEQ ID NO：1所示。
- [0030] 本发明提供的基于基因治疗的药物通过在体内提供延长或持续的QPRT，可以恢复或增加细胞产生NAD⁺的能力，调节分泌途径中的过程，从而阻止细胞因子的病理性分泌，在起源点停止炎症过程，有效避免关节中的免疫反应、新生血管形成和组织破坏。本发明提供的基于基因治疗的药物能够改善QPRT在关节中的时空分布，提高治疗效果，减少副作用，能够实现QPRT的延长或持续释放，药效长，且随着QPRT的延长表达，可以减少药物的使用剂量。
- [0031] 虽然细胞因子或其受体的直接靶向是目前RA治疗的常用方法，但本发明将QPRT递送到关节中的基因治疗方法可以为患者提供更好的治疗效果，因为发明中的基因治疗可以在体内提供延长或持续的QPRT，而不需要重复注射，降低增加炎症的风险及其他不良反应。因此，通过基因治疗将QPRT输送到患者的关节中，可以为患者提供更安全、更具成本效益和更方便的治疗选择。
- [0032] 在一些实施方式中，所述基因治疗载体包括病毒载体、非病毒载体中的至少一种，但不限于此。
- [0033] 在一些实施方式中，所述病毒载体包括腺相关病毒（AAV）载体、腺病毒（Ad）载体、慢病毒（LV）载体、单纯疱疹病毒（HSV）载体中的一种或多种，

但不限于此。这些病毒载体具有如下优势：（1）可通过基因修饰患者的细胞进行体外基因治疗或直接将基因材料直接传递到特定的细胞或组织进行体内基因治疗，从而实现持续长期的疗效；（2）具有细胞和组织特异性靶向作用；（3）减少全身性并发症的风险。

[0034] 在一些实施方式中，所述AAV载体包括AAV1载体、AAV2载体、AAV5载体、AAV6载体、AAV8载体、AAV9载体、AAVrh10载体中的一种或多种。AAV根据血清型的不同可分为AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9和AAVrh10。

[0035] 下文中，当基因治疗载体选自AAV2时，则包含编码QPRT的核酸序列的基因治疗载体记作AAV2-QPRT，用于治疗RA的药物包括AAV2-QPRT。

[0036] 在一些实施方式中，非病毒性载体包括质粒、阳离子脂质、脂质纳米颗粒（LNP）、脂质体、聚合物基载体、细胞外囊泡中的一种或多种，但不限于此。

[0037] 在一些实施方式中，所述药物还包括药学上可接受的辅料，但不限于此。所述药学上可接受的辅料包括但不限于：离子交换剂，氧化铝，硬脂酸铝，卵磷脂，血清蛋白例如人血清白蛋白，缓冲物质（如磷酸盐类），甘氨酸，山梨酸，山梨酸钾，饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物，水，盐类或电解质类（例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐），胶体二氧化硅，三硅酸镁，聚乙烯吡咯烷酮，基于纤维素的物质，聚乙二醇，环糊精类，羧甲基纤维素钠，聚丙烯酸酯类，蜡类，聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段共聚物，聚乙二醇和羊毛脂。

[0038] 在一些实施方式中，所述药物的剂型为注射剂。其形式可以是冻干粉、溶液、悬浮液。

[0039] 在一些实施方式中，所述药物的给药方式为静脉内（IV）注射、皮下（SC）注射、肌肉（IM）注射、关节内（IA）注射、皮内（ID）注射中的一种或多种。

[0040] 本发明实施例还提供了检测QPRT的试剂在制备用于诊断类风湿性关节炎的产品中的应用。本发明中证实了QPRT的减少促进了细胞因子的产生和分泌，促进了血管生成和炎症。因此，可以证明QPRT是一种潜在的RA生物标志物，可作为RA干预的靶点。因此，用于检测QPRT的试剂，可用于诊断RA。

- [0041] 在一些实施方式中，所述产品包括试剂盒、试纸中的一种，但不限于此。
- [0042] 下面通过具体的实施例进行详细说明。
- [0043] 以下实施例中所有实验均按照相关指南和规定进行。所有实验方案均经深圳先进技术研究院伦理委员会批准。将 DBA/1 (H-2q) 雌性小鼠品系以5-6只小鼠/笼安置在标准实验室笼中，可随意获得食物和水。
- [0044] 实施例1
- [0045] RA滑膜、正常滑膜、骨关节炎 (OA) 滑膜中QPRT的表达
- [0046] 从Gene Expression Omnibus (GEO)数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中检索关于RA的基因表达数据集。研究类型仅限于阵列和人类物种的表达谱分析。使用以下关键词搜索数据集：“rheumatoid arthritis”、“RA”、“Homo sapiens”、“Microarray”和“high-throughput sequencing”即分别为“类风湿关节炎”、“RA”、“智人”、“微阵列”和“高通量测序”。采用以下标准：
(1) 使用高通量阵列或下一代测序检测RA患者和对照组的mRNA谱；(2) 数据集中RA和健康对照组分别包含不少于3个样本；(3) 从人类膝关节滑膜组织中提取总RNA。最终选定GEO数据集 (GSE1919)，下载了相应的基因表达谱和临床注释信息进行进一步分析。组别设置为RA组，并以正常组、骨关节炎 (OA) 组作为对照组，不包含其他治疗。然后分析不同组别中QPRT的表达情况，即RA组与正常组和RA组与OA组。通过计算各组中QPRT的FKPM (每千个碱基的片段数) 的对数值来计算QPRT的mRNA表达对数值。结果如图1中a和b所示，可知，与正常 (Normal) 组和OA组相比，RA组滑膜中QPRT的mRNA表达减少。即QPRT在RA滑膜中受到抑制，这种抑制与RA的炎症过程有关。
- [0047] 实施例2人RA成纤维样滑膜细胞 (FLSs) 的获取
- [0048] 本实施例中的患者符合美国风湿病学会/欧洲风湿病联盟的RA分类标准。
- [0049] 取6例接受了膝关节置换手术的活动期RA患者的滑膜组织，用含有10%链霉素和青霉素的无菌磷酸缓冲溶液 (PBS) 洗涤3次，然后用含有1%链霉素和青霉素的PBS洗涤3次。
- [0050] 将洗涤后的滑膜组织转移到无菌培养皿中，并使用无菌手术刀将其切成小块 (大小为1-2mm)，然后将这些滑膜组织小块均匀分布在25cm² (T25) 的培

养瓶底部，并将瓶子竖立放置在孵箱中，使其附着。将5mL含有10%胎牛血清（FBS）的成纤维细胞培养基加入到培养瓶中，然后在37℃、5%CO₂的培养箱中孵育。5-7天后，观察到FLSs从滑膜组织中迁移并附着在培养瓶的表面上。将培养基倒掉，然后用无菌PBS清洗附着的FLSs，以去除非粘附细胞，从组织中获取的FLSs视为第0代（P0）。

[0051] FLSs保存在T25瓶中，以5%CO₂、37℃的条件培养，培养基每2天更换一次。当细胞达到>85%的融合度时，去除培养基，用PBS清洗粘附的细胞，然后加入到胰蛋白酶溶液中（0.25%胰蛋白酶/1mM乙二胺四乙酸（EDTA））进行消化。接着，向消化好的组织中加入含有10%FBS的成纤维细胞培养基以停止酶活性终止消化。将得到的细胞悬液以1200rpm的速度离心5min。然后将细胞分成两部分，分别接种到新的培养瓶中，这视为第1代（P1）。汇合后，重复此过程，并且每个循环增加细胞传代n+1。以下实施例中使用的FLSs来自第3-6代，这是一种均质的细胞群。

[0052] 实施例3 shRNA的转染

[0053] 准备质粒：

[0054] 克隆有靶向QPRT的shRNA序列(shQPRT)的pGPU6/Hygro质粒，克隆有对照shRNA序列(shCtrl)的pGPU6/Hygro质粒均购自Genepharma公司，分别记作shQPRT质粒和shCtrl质粒。包装质粒psPAX2(addgene #394976)和pMD2.G(addgene #12259)来自于吉玛基因SuperSilencing™ shRNA质粒表达载体套装（C01001）。

[0055] 其中，对照 shRNA 序列(shCtrl)如SEQ ID NO：2所示，具体为：
GTTCTCCGAACGTGTCACGT。

[0056] shRNA 序列(shQPRT)包括shQPRT#1: GCCATATTTACCCAACTCAAC（如SEQ ID NO：3所示）、shQPRT#2: GATGGTGAAGGATAACCATGT（如SEQ ID NO：4所示）、shQPRT#3: GGCTGACTTCACTCTGAAGGT（如SEQ ID NO：5所示）。

[0057] 慢病毒的制备：

- [0058] 将HEK 293T细胞以 4×10^5 个细胞/孔的密度接种到6孔细胞培养板中，并向每个孔中加入2mL DMEM培养基。24小时后，用无菌PBS洗涤细胞，并向细胞中加入2mLOpti-MEM培养基。
- [0059] 将 $2 \mu\text{g}$ shQPRT质粒和包装质粒稀释在 $100 \mu\text{L}$ Opti-MEM培养基中（管A），并将 $18 \mu\text{L}$ LPEI转染试剂稀释在另外的 $100 \mu\text{L}$ Opti-MEM培养基中（管B）。5分钟后，将管B中的物质加入到管A中并轻轻混合。将混合物在室温下孵育20分钟，得到转染混合物。
- [0060] 将转染混合物加入到上述HEK 293T细胞中，在5% CO₂的恒温培养箱中37℃孵育6小时。然后将培养基更换为含有10% FBS的高糖DMEM培养基，再培养72小时。通过收集细胞培养基并通过0.45微米注射器过滤，收集包含慢病毒的上清液。
- [0061] 人RAFLSs转染：
- [0062] 取上述含慢病毒的上清液，将聚苯乙烯添加到其中，聚苯乙烯浓度为 $8 \mu\text{g/mL}$ ，得到含有聚苯乙烯的慢病毒上清液。
- [0063] 将人RAFLSs以 1×10^5 个细胞/孔的密度接种到6孔细胞培养板中，孵育24小时后，用无菌PBS洗涤细胞，并将2mL含有聚苯乙烯的慢病毒上清液添加到细胞中，在5% CO₂的恒温培养箱中37℃孵育24小时。然后加入新的含有10% FBS的高糖DMEM培养基，再孵育24小时，48小时后，得到shQPRT转染的人RAFLSs。
- [0064] 采用类似的方法，只是在慢病毒的制备步骤中将采用的shQPRT质粒替换为shCtrl质粒，最终得到shCtrl转染的人RAFLSs。
- [0065] 采用蛋白质印迹法及酶联免疫吸附法分别对shQPRT转染的人RAFLSs和shCtrl转染的人RAFLSs的细胞因子进行检测，结果如图2所示，可见QPRT沉默的shQPRT转染的人RAFLSs中的各种细胞因子（细胞内的VEGF、分泌的VEGF、IL-6、TNF- α 、CTGF）的产生和分泌增加。即QPRT沉默或抑制促进细胞因子的产生和分泌。
- [0066] 实施例4血管生成测定分析

- [0067] 条件培养基的制备：shQPRT和shCtrl转染的人RA FLSs分别在1%FBS条件培养基中饥饿过夜。第二天，取出培养基，将新鲜含有10% FBS的高糖DMEM培养基加入细胞中，并在37℃、5%CO₂的培养箱中培养24小时。24小时后，收集培养基，离心并储存在-20℃中，分别得到QPRT沉默的shQPRT人RAFLSs条件培养基和shCtrl人RA FLSs条件培养基。
- [0068] 体外管形成测定：将人脐静脉内皮细胞系EA.hy926在含有10%FBS的高糖DMEM培养基中培养直至汇合。将15孔载玻片（ibidi）用50μL生长因子还原基质胶（Corning）包被，并在37℃下固化30分钟。通过对细胞单层进行胰蛋白酶解，并将细胞以 1×10^4 个细胞/mL的比例重悬在QPRT沉默的shQPRT人RA FLSs条件培养基和shCtrl人RA FLSs条件培养基中，制备得到内皮细胞悬浮液。
- [0069] 向每个孔中加入50μL内皮细胞悬浮液，培养细胞24小时，并在×10放大倍数下成像。然后使用image J血管生成分析仪对图像进行分析，结果如图3和4所示，由图3和4可知，相比shCtrl人RA FLSs条件培养基，QPRT沉默的shQPRT人RA FLSs条件培养基上生长的内皮细胞的血管形成增加，且血管网络复杂性和分支增加。图4中a为血管节点数量图，b为血管交叉点数量图。节点定义为三条或三条以上管道相交的点，交叉点定义为两条管道相交的点。节点和交叉点的数量可以作为管道网络复杂性和分支的量化指标。由此，说明QPRT沉默或抑制可增加血管的形成。
- [0070] 实施例5 含有编码QPRT的核酸序列的AAV2（AAV2-QPRT）的制备
- [0071] 1、准备质粒
- [0072] 准备穿梭质粒（AAV2 ITR-QPRT，其含有编码QPRT的目的基因）、pHelper(携带腺病毒来源的基因)质粒和pAAV-RC(携带AAV复制和决定AAV血清型的相应衣壳基因)质粒。这三个质粒或来自于武汉枢密脑科学技术有限公司或由武汉枢密脑科学技术有限公司合成，使用前进行抽提。其中，pCMV-SPORT6-QPRT质粒提供编码QPRT的目的基因；rAAV-CMV-WPRE-pA质粒；AAV2/2 (货号PT-0545，武汉枢密脑科学技术有限公司)含有关键元件，通过这两个质粒制备穿梭质粒（即AAV2 ITR-QPRT，也即rAAV-CMV-Qprt（m）-WPRE-pA）。

- [0073] pAAV-RC (pAAVRepCap, 携带AAV复制和决定AAV血清型的相应衣壳基因) 质粒和pHelper (携带来自腺病毒源的基因) 质粒与穿梭质粒 (AAV2 ITR-QPRT, 其含有编码QPRT的目的基因) 一起用于产生感染性AAV2颗粒。ITR: 反向终端重复。
- [0074] 2、人胚肾细胞 (AAV-293细胞) 培养
- [0075] 2.1 AAV-293细胞复苏
- [0076] 1) 预热培养基。
- [0077] 2) 从液氮罐中取出AAV-293细胞冻存管, 迅速放入盛有37℃水的水浴中, 并不时摇动, 尽快解冻。用70%酒精擦拭消毒后, 移至超净工作台。
- [0078] 3) 吸出AAV-293细胞悬液加入到3mL培养基中, 再加入5mL培养基稀释, 轻柔吹散。
- [0079] 4) 1000rpm, 3min离心收集AAV-293细胞。
- [0080] 5) 适量培养基重悬AAV-293细胞。
- [0081] 2.2 AAV-293细胞传代(10cm培养皿为例)
- [0082] 1) 弃去旧培养液, 加入10mL灭菌PBS, 轻轻晃动, 洗涤细胞生长面, 然后弃去PBS。
- [0083] 2) 加入1mL胰酶消化液, 进行消化, 直到细胞变圆开始脱落 (一般消化时间为1~2 min)。
- [0084] 3) 加入2mL完全培养基终止消化, 并将皿底细胞吹打成单细胞。
- [0085] 4) 按需要离心重悬计数接种, 或混匀细胞直接分到新的培养瓶中, 继续培养。
- [0086] 2.3 AAV-293细胞冻存
- [0087] 1) 取培养2~3天生长旺盛的AAV-293细胞, 根据传代步骤将AAV-293细胞消化并吹打成单细胞。
- [0088] 2) 1000rpm, 3min离心收集AAV-293细胞。
- [0089] 3) 加入适量PBS重悬AAV-293细胞, 计数。
- [0090] 4) 1000rpm, 3min离心收集AAV-293细胞。
- [0091] 5) 用冻存培养基再悬浮AAV-293细胞至 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个/mL, 然后分装细胞悬液到2mL冷冻管, 1 mL/管。

[0092] 6) 将冷冻管置于程序降温盒, 然后将盒子放入 -80°C 冷冻过夜, 第二天转移冻存细胞的冷冻管到液氮中长期保存。

[0093] 3、细胞转染

[0094] 1) 接种AAV-293细胞于10cm培养皿, 48h后, 汇合度达到80%, 用于转染。

[0095] 2) 转染前1h取细胞培养板, 去除原有细胞培养基, 加入10mL的Opti-MEM培养基。

[0096] 3) 制备转染试剂和质粒的复合物。

[0097] a、将待转染的病毒载体质粒 $32\mu\text{g}$ (pHelper: pAAV-RC: 穿梭质粒=1: 1: 1) 溶于Opti-MEM培养基, 总体积为 $500\mu\text{L}$, 轻轻混匀, 静置5min, 得到质粒稀释液;

[0098] b、将转染试剂溶于Opti-MEM培养基, 总体积为 $500\mu\text{L}$, 轻轻混匀, 静置5min, 得到转染试剂稀释液;

[0099] c、将转染试剂稀释液滴加到质粒稀释液中, 边加边轻轻混匀后在室温放置20min, 使质粒和转染试剂充分结合形成稳定的转染复合体。

[0100] 4) 将配好的转染复合体加入到上述细胞培养皿中。

[0101] 5) 6h后吸去培养基, PBS洗一次, 加入10mL新鲜完全培养基培养。

[0102] 4、病毒收获及纯化

[0103] 1) 转染60h后, 使用细胞刮将细胞刮下, 并收集到离心管中。2) 1500g 、 4°C 离心5min后, 分别收集上清和细胞沉淀, 并将细胞沉淀重悬在9mL的裂解缓冲液(10 mL PBS + 0.001% pluronic F68 + 200mM NaCl, pluronic F68为非离子表面活性剂)中, 收集到500mL瓶中, 得到细胞裂解液。

[0104] 3) 将步骤2) 中的细胞裂解液置于液氮中冷冻3min, 37°C 水浴, 反复冻融3次。

4) 加入250U的benzonase核酸酶, 混匀后 37°C 孵育1h。5) 加入NaCl至终浓度为150mM, 混匀后 37°C 孵育30min。6) 2500g 、室温离心10min, 取上清弃去沉淀。7) 将步骤6) 离心后得到的上清倒入步骤2) 离心后收集的上清中, 加入PEG8000和NaCl至终浓度分别为8%、0.5M, 4°C 过夜。8) 12000rpm , 4°C 离心1.5h, 弃掉上清, 沉淀用10mL PBS重悬。

- [0105] 9) 将重悬后的病毒原液加入到装有碘克沙醇（其中，超速离心管中碘克沙醇的浓度从上到下分别为15%、25%、40%、60%）的超速离心管中，63000rpm、18℃离心2h。10) 用10mL注射器抽出40%的样品装入透析袋中，4℃透析，12-16h（本实施例采用14h）换透析液，每次使用2L缓冲液。
- [0106] 11) 收集透析后的样品，使用超滤管进行浓缩。
- [0107] 5、滴度测定
- [0108] 目前测定AAV2的滴度通过定量PCR检测基因组中AAV2载体的基因组拷贝数来测定AAV2的病毒颗粒数。
- [0109] 1) 准备标准品：用质粒标准品，计算标准品的浓度，稀释至 10^8 个/ μL ，梯度稀释，直至 10^3 个/ μL ，共6个梯度。
- [0110] 2) 准备样品：碱裂解-取5 μL 浓缩后的病毒样品，加入NaOH至终浓度为1M，55℃水浴30min后加入HCl中和，加入纯水或1×PBS稀释10倍。
- [0111] 3) 在每个反应孔中加入反应液18 μL ，然后加入2 μL 的模板。
- [0112] 4) 上机，退火温度设为60℃，按照标准操作得到Ct值并计算AAV2-QPRT样品中的拷贝数。经过测试得出：AAV2-QPRT样品的拷贝数为 2.5×10^{12} 。
- [0113] 实施例6 胶原诱导性关节炎（CIA）模型及关节炎严重程度的评分标准的建立
- [0114] CIA和RA在临床前、病理学和免疫学等方面具有相似性。
- [0115] 取17只8周龄的雌性DBA小鼠，在第0天，在其尾部底部皮内注射100 μL 鸡II型胶原和弗氏不完全佐剂（1:1）的乳液进行免疫诱导，建立CIA模型小鼠，注射免疫后第14天对其进行治疗。
- [0116] 关节炎严重程度评分由两名独立观察者评估，小鼠每只爪子的临床评分标准如下：
- [0117] 0=正常；1=1个指头肿胀；2=超过1个指头或腕部或踝关节肿胀；3=整个爪子肿胀；4=畸形和/或强直，最高得分为每只小鼠16分（4只爪子×4）。
- [0118] 实施例7 AAV2-QPRT的治疗
- [0119] （1）将17只CIA模型小鼠分为两组，第一组为CIA组（7只，不做治疗处理，注入空载的AAV2），第二组为AAV-QPRT组（10只，进行治疗，注入AAV2-QPRT）。

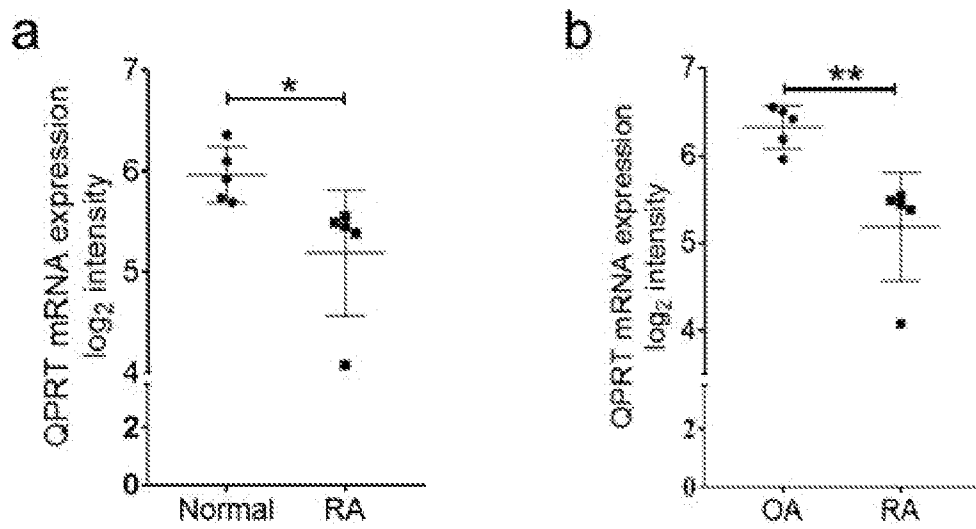
- [0120] 由于小鼠后爪的大小几乎是前爪的两倍，所以注射免疫后第14天，在AAV-QPRT组小鼠的前爪经皮注射 1.5×10^9 个病毒载量/爪（以PBS作为溶剂，注射 $2.5 \mu\text{L}$ ），后爪经皮内注射 3.3×10^9 个病毒载量/爪（以PBS作为溶剂，注射 $5 \mu\text{L}$ ），进行治疗。
- [0121] 同时，在注射免疫后的第0周、1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周，使用上述关节炎严重程度的评分标准对CIA组和AAV-QPRT组中的每只小鼠进行评分，为每只小鼠记录数据，并绘制临床关节炎评分曲线（见图5中a）；使用Prism软件计算图5的a中关节炎评分曲线下的区域面积（AUC），结果如图5中b所示。可见AAV-QPRT组的评分明显低于CIA组，证实了AAV2-QPRT的抗关节炎作用，QPRT的过度表达显著抑制了CIA小鼠关节炎的严重程度，AAV2-QPRT可有效治疗RA。
- [0122] 同时，注射免疫后的第0周、1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周，测定CIA组和AAV-QPRT组中每只小鼠爪子的体积，结果如图5中c所示，其中Sham和QPRT分别是CIA和AAV-QPRT的对照组；另外，使用Prism软件计算图5中c小鼠爪子体积曲线下的区域面积（AUC），结果如图5中d所示，结果显示AAV-QPRT组的小鼠爪子的体积明显低于CIA组，证实AAV2-QPRT的抗关节炎作用，QPRT的过度表达显著抑制了CIA小鼠关节炎的严重程度，AAV2-QPRT可有效治疗RA。
- [0123] （2）所有小鼠在注射AAV2-QPRT六周后实施安乐死，并对其爪子进行免疫组织化学和组织学分析。
- [0124] 取小鼠爪子组织匀浆，然后用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA缓冲液裂解，将 $40 \mu\text{g}$ 样品加载到10%聚丙烯酰胺凝胶上，并转移到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上。然后用含有5%脱脂乳的TBS/Tween-20封闭膜1 h，然后在 4°C 过夜。将膜与二抗一起孵育1 h，并使用ECL观察条带。通过ImageJ软件（美国国立卫生研究院）对来自条带的信号进行量化。结果如图6所示，可见在小鼠的爪子注射AAV2-QPRT进行治疗之后，QPRT的蛋白质表达增加。其中a中的两个AAV-QPRT组表示来源于不同的小鼠。

- [0125] 获取小鼠血清样品，测试NAD⁺浓度，结果如图7所示，可见相比未经治疗的CIA组，在小鼠的爪子注射AAV2-QPRT进行治疗之后，全血中NAD⁺浓度升高。
- [0126] 以上结果表明，AAV2-QPRT介导的QPRT高表达可以有效上调组织QPRT表达量，减少细胞血管新生，提高受体NAD⁺水平，并降低CIA模型小鼠足掌厚度、体积和临床评分。
- [0127] 本发明中，QPRT的AAV2递送提供了组织和传导特异性，改善了QPRT在关节中的时空分布，从而提高了其治疗效果，同时减少了副作用，且能够实现QPRT的延长或持续释放，药效长，随着QPRT的延长表达，可以减少药物的使用剂量。目前，免疫抑制药物可能对RA无症状临床前阶段的人不利，本发明的药物提供了一种对抗免疫反应的替代方法。
- [0128] 应当理解的是，本发明的应用不限于上述的举例，对本领域普通技术人员来说，可以根据上述说明加以改进或变换，所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

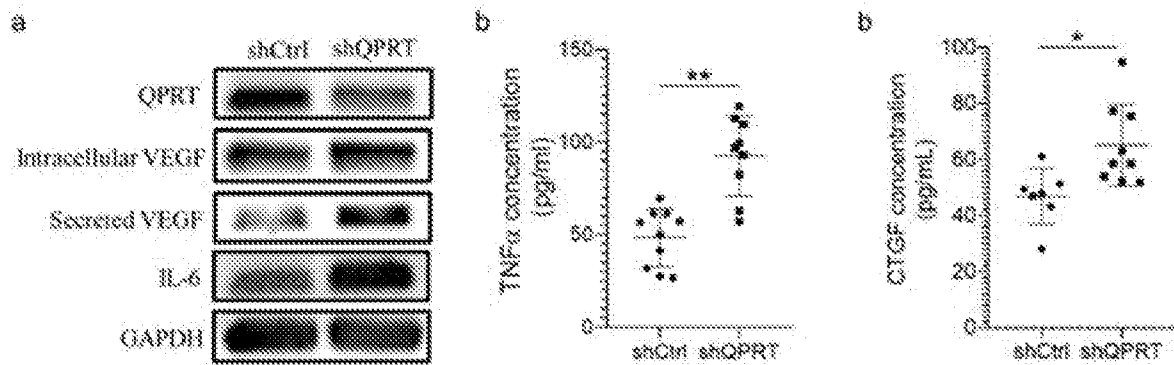
权利要求书

- [权利要求 1] 一种用于治疗类风湿性关节炎的药物，其特征在于，包括基因治疗载体，所述基因治疗载体包含编码喹啉酸磷酸核糖基转移酶的核酸序列。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的药物，其特征在于，所述基因治疗载体包括病毒载体、非病毒载体中的至少一种。
- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的药物，其特征在于，所述病毒载体包括腺相关病毒载体、腺病毒载体、慢病毒载体、单纯疱疹病毒载体中的一种或多种。
- [权利要求 4] 根据权利要求3所述的药物，其特征在于，所述腺相关病毒载体包括AAV1载体、AAV2载体、AAV5载体、AAV6载体、AAV8载体、AAV9载体、AAVrh10载体中的一种或多种。
- [权利要求 5] 根据权利要求2所述的药物，其特征在于，所述非病毒性载体包括质粒、阳离子脂质、脂质纳米颗粒、脂质体、聚合物基载体、细胞外囊泡中的一种或多种。
- [权利要求 6] 根据权利要求1所述的药物，其特征在于，所述药物还包括药学上可接受的辅料。
- [权利要求 7] 根据权利要求1所述的药物，其特征在于，所述药物的剂型为注射剂。
- [权利要求 8] 根据权利要求7所述的药物，其特征在于，所述药物的给药方式为静脉内注射、皮下注射、肌肉注射、关节内注射、皮内注射中的一种或多种。
- [权利要求 9] 检测喹啉酸磷酸核糖基转移酶的试剂在制备用于诊断类风湿性关节炎的产品中的应用。
- [权利要求 10] 根据权利要求9所述的应用，其特征在于，所述产品包括试剂盒、试纸中的一种。

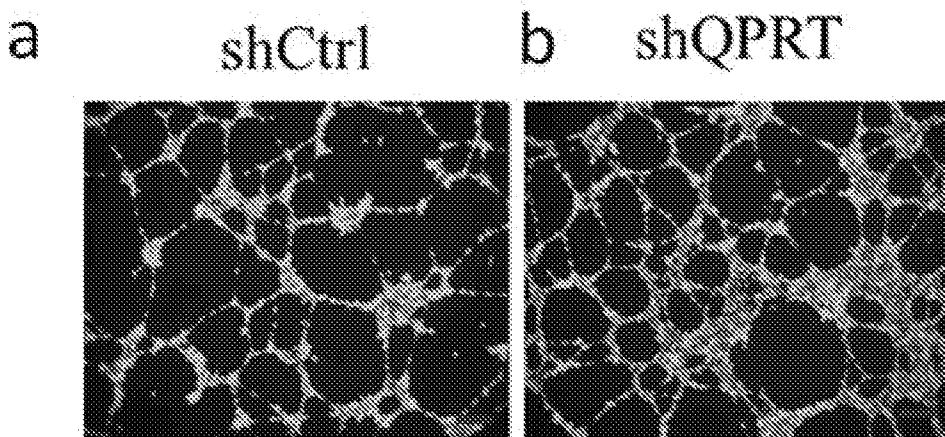
[图1]



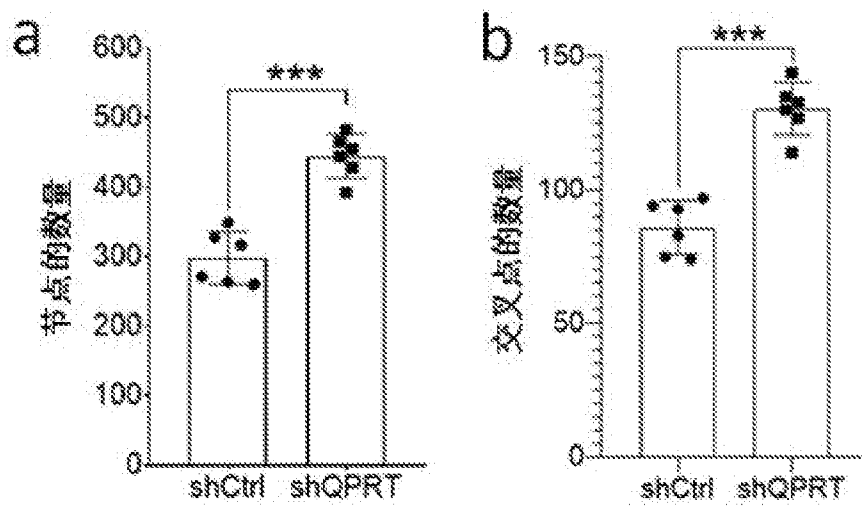
[图2]



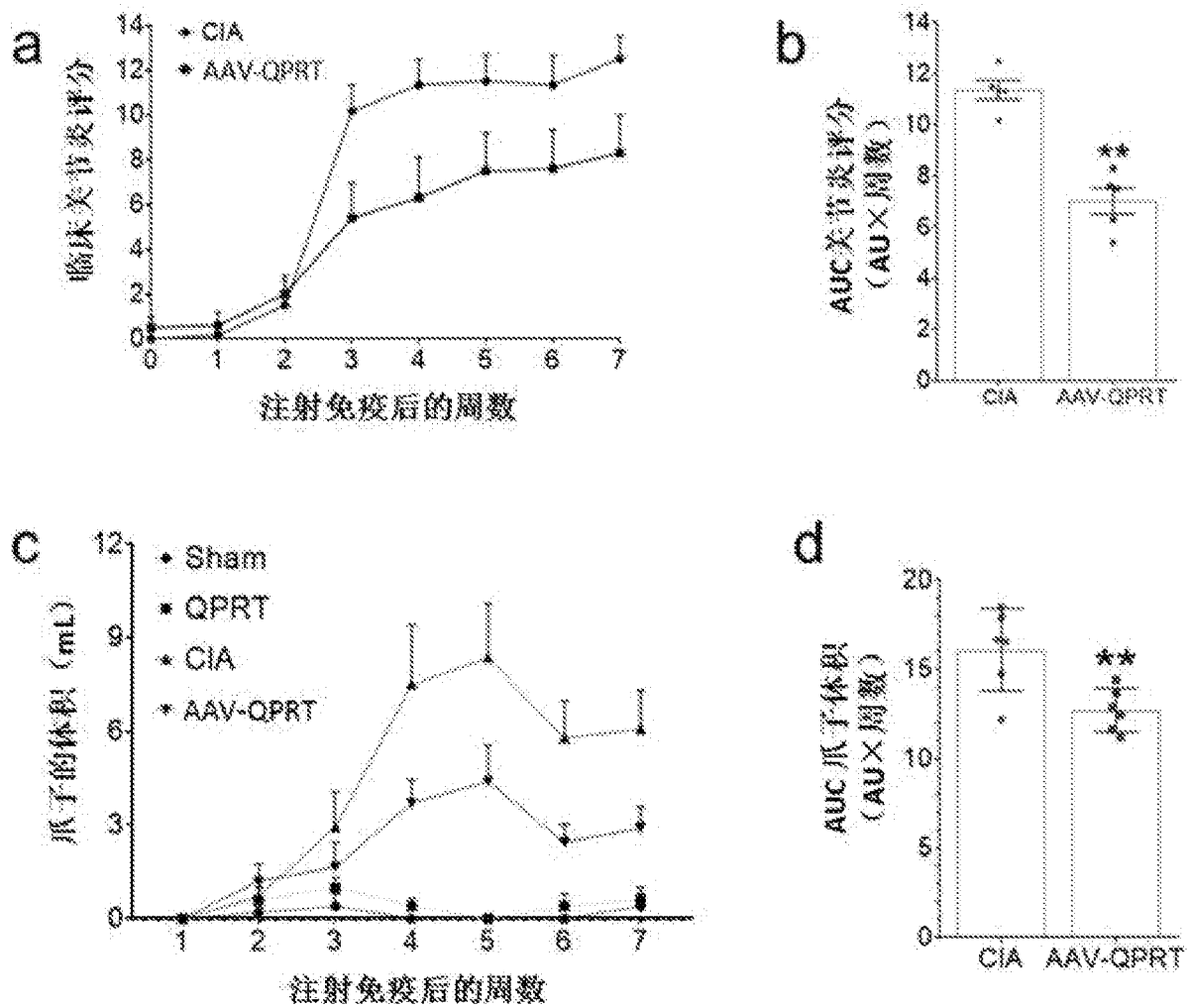
[图3]



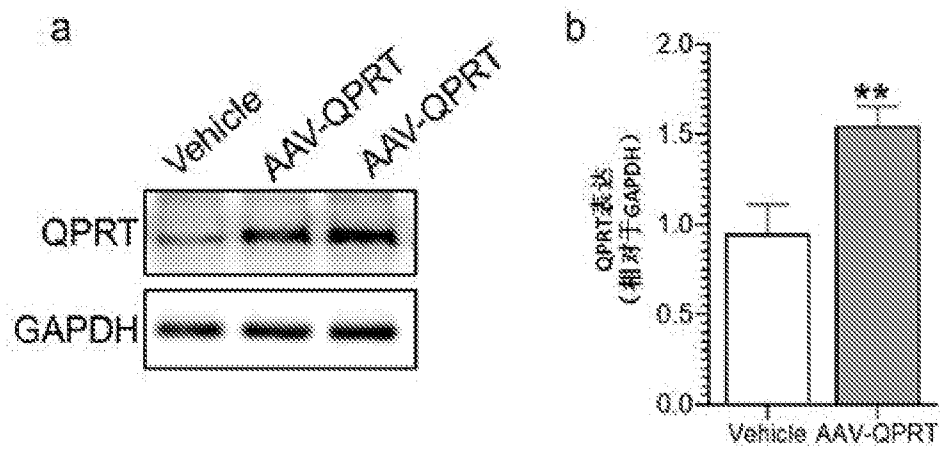
[图4]



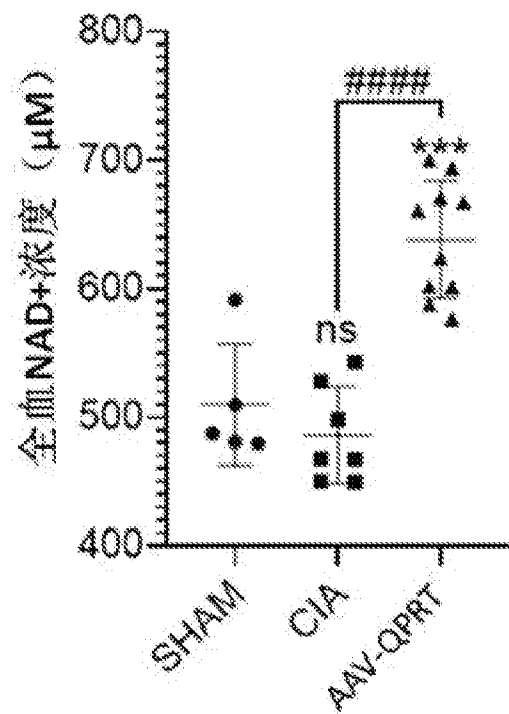
[图5]



[图6]



[图7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/137624

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K48/00(2006.01)i; C12N9/10(2006.01)i; A61K38/45(2006.01)i; A61P19/02(2006.01)i; A61P37/02(2006.01)i;
C12Q1/6883(2018.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:A61K,C12N, A61P,C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNXTX, CNABS, VEN, WOTXT, EPTXT, USTXT, PUBMED, BAIDU, 万方, WANFANG, ISI Web of knowledge, CNKI: 申请人, 发明人, 类风湿性关节炎, 载体, 喹啉酸磷酸核糖基转移酶, 喹啉酸磷酸核糖转移酶, QPRT, RA, Rheumatoid arthritis, NAD+, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, 提高, 腺相关病毒, 腺病毒, 慢病毒, 单纯疱疹, 载体, AAV, 自免

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 116983432 A (SHENZHEN INSTITUTE OF ADVANCED TECHNOLOGY) 03 November 2023 (2023-11-03) claims 1-10	1-10
Y	MEHR, A. P. et al. "De novo NAD ⁺ biosynthetic impairment in acute kidney injury in humans" <i>Nature Medicine (Author manuscript)</i> , Vol. 24, No. 9, 30 September 2018 (2018-09-30), 1351-1359 abstract, and discussion	1-10
Y	AU 2010201278 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE et al.) 22 April 2010 (2010-04-22) abstract, claims 1-17, description, page 4, second-to-last paragraph-page 5, paragraph 4, and figure 1	1-10
Y	KR 20150014250 A (광주과학기술원) 06 February 2015 (2015-02-06) abstract, and claims 1-23	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 March 2024

Date of mailing of the international search report

08 March 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/137624

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005021768 A1 (ACADEMISCH MEDISCH CENTRUM et al.) 10 March 2005 (2005-03-10) claims 1-17	1-10
Y	WO 2020012373 A1 (POLINDOLS S.R.L.S.) 16 January 2020 (2020-01-16) abstract, and claims 1-19	1-10
A	AU 2004203879 A1 (NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY) 02 September 2004 (2004-09-02) abstract, and claims 1-26	1-10
A	JP 2004357564 A (TOHOKU UNIVERSITY) 24 December 2004 (2004-12-24) abstract, and claims 1-6	1-10
A	US 6423520 B1 (NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY) 23 July 2002 (2002-07-23) claims 1-2	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/137624

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/137624

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	116983432	A	03 November 2023	None			
AU	2010201278	A1	22 April 2010	AU	2010201278	B2	15 November 2012
KR	20150014250	A	06 February 2015	KR	101599929	B1	07 March 2016
WO	2005021768	A1	10 March 2005	JP	2007504219	A	01 March 2007
				JP	4863874	B2	25 January 2012
				EP	2322638	A1	18 May 2011
				EP	1664315	A1	07 June 2006
				EP	1664315	B1	02 May 2012
				ES	2384975	T3	16 July 2012
				ATE	556140	T1	15 May 2012
				AU	2004269279	A1	10 March 2005
				AU	2004269279	B2	25 February 2010
				PT	1664315	E	31 July 2012
				DK	1664315	T3	09 July 2012
				PL	1664315	T3	28 September 2012
				CA	2536471	A1	10 March 2005
				CA	2536471	C	08 October 2013
WO	2020012373	A1	16 January 2020	None			
AU	2004203879	A1	02 September 2004	AU	2004203879	B2	02 November 2006
JP	2004357564	A	24 December 2004	JP	4150792	B2	17 September 2008
US	6423520	B1	23 July 2002	US	6586661	B1	01 July 2003
				CA	2484366	A1	17 December 1998
				DK	0991766	T3	12 July 2004
				US	2007011774	A1	11 January 2007
				HU	0003767	A2	28 February 2001
				HU	0003767	A3	28 October 2002
				HU	225888	B1	28 November 2007
				EE	9900575	A	15 August 2000
				EE	04595	B1	15 February 2006
				IL	132184	A	30 November 2010
				KR	20010013663	A	26 February 2001
				KR	100365969	B1	26 December 2002
				US	2003140366	A1	24 July 2003
				US	7304220	B2	04 December 2007
				US	2004168211	A1	26 August 2004
				US	7408098	B2	05 August 2008
				EP	0991766	A1	12 April 2000
				EP	0991766	B1	17 March 2004
				JP	2009112316	A	28 May 2009
				ES	2154624	T1	16 April 2001
				ES	2154624	T3	01 November 2004
				ID	29311	A	16 August 2001
				CU	23174	A3	22 September 2006
				EA	200400186	A1	26 August 2004
				EA	009898	B1	28 April 2008
				HK	1069411	A1	20 May 2005
				UA	72187	C2	15 February 2005
				CZ	367799	A3	12 April 2000
				CZ	297379	B6	15 November 2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/137624

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 2008131950 A	12 June 2008
		JP 4459271 B2	28 April 2010
		CA 2287776 A1	17 December 1998
		CA 2287776 C	03 April 2012
		PL 337442 A1	14 August 2000
		PL 201266 B1	31 March 2009
		HK 1065066 A1	08 February 2005
		NO 996169 D0	13 December 1999
		NO 996169 L	17 December 2007
		JP 2004290201 A	21 October 2004
		JP 4288206 B2	01 July 2009
		DE 69822463 D1	22 April 2004
		DE 69822463 T2	20 January 2005
		RO 121968 B1	30 September 2008
		EP 1457563 A1	15 September 2004
		EP 1457563 B1	08 August 2012
		HK 1027379 A1	12 January 2001
		US 2006191036 A1	24 August 2006
		US 7645925 B2	12 January 2010
		LV 12507 A	20 June 2000
		LV 12507 B	20 November 2000
		US 2006200872 A1	07 September 2006
		US 7795509 B2	14 September 2010
		AU 7829198 A	30 December 1998
		AU 748514 B2	06 June 2002
		YU 64899 A	31 December 2004
		RS 49677 B	15 November 2007
		BR 9810870 A	14 November 2000
		BRPI 9810870 B1	01 June 2021
		JP 2001522250 A	13 November 2001
		JP 4095678 B2	04 June 2008
		IL 132184 A0	19 March 2001
		EA 200000007 A1	26 June 2000
		EA 004652 B1	24 June 2004
		US 2006191035 A1	24 August 2006
		US 7425670 B2	16 September 2008
		GEP 20032871 B	27 January 2003
		GR 20010300003 T1	29 June 2001
		OA 11219 A	17 July 2003
		AP 9901680 A0	31 December 1999
		AP 1169 A	30 June 2003
		TR 199902728 T2	21 September 2000
		DE 991766 T1	04 April 2002
		PT 991766 E	31 August 2004
		SI 20215 A	31 October 2000
		SI 20215 B	30 April 2007
		LT 99142 A	26 June 2000
		LT 4706 B	25 September 2000
		BG 103886 A	31 July 2000
		BG 64319 B1	30 September 2004

International application No.

PCT/CN2023/137624

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		ATE 262039 T1	15 April 2004
		SK 161899 A3	12 June 2000
		NZ 500963 A	28 September 2001
		WO 9856923 A1	17 December 1998
		US 2002108151 A1	08 August 2002
		US 7605308 B2	20 October 2009
		EP 1457562 A1	15 September 2004
		EP 1457562 B1	08 August 2012
		IL 192232 A0	29 December 2008

A. 主题的分类

A61K48/00(2006.01)i; C12N9/10(2006.01)i; A61K38/45(2006.01)i; A61P19/02(2006.01)i; A61P37/02(2006.01)i; C12Q1/6883(2018.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:A61K,C12N, A61P,C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNTEXT,CNABS,VEN,WOTXT,EPTXT,USTXT,PUBMED, BAIDU,万方,ISI Web of knowledge, CNKI: 申请人, 发明人, 类风湿性关节炎, 载体, 喹啉酸磷酸核糖基转移酶, 喹啉酸磷酸核糖转移酶, QPRT, RA, Rheumatoid arthritis, NAD+, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, 提高, 腺相关病毒、腺病毒、慢病毒、单纯疱疹, 载体, AAV, 自免

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 116983432 A (深圳先进技术研究院) 2023年11月3日 (2023 - 11 - 03) 权利要求1-10	1-10
Y	MEHR,A.P.等. "De novo NAD+ biosynthetic impairment in acute kidney injury in humans" Nat Med. (Author manuscript), 第24卷, 第9期, 2018年9月30日 (2018 - 09 - 30), 1351-1359 摘要, DISCUSSION	1-10
Y	AU 2010201278 A1 (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale等) 2010年4月22日 (2010 - 04 - 22) 摘要, 权利要求1-17, 说明书第4页倒数第2段-第5页第4段, 图1	1-10
Y	KR 20150014250 A (광주과학기술원) 2015年2月6日 (2015 - 02 - 06) 摘要, 权利要求1-23	1-10
Y	WO 2005021768 A1 (ACADEMISCH MEDISCH CENTRUM等) 2005年3月10日 (2005 - 03 - 10) 权利要求1-17	1-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"p" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年3月5日

国际检索报告邮寄日期

2024年3月8日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

刘苗

电话号码 (+86) 010-53961924

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	WO 2020012373 A1 (POLINDOLS S.R.L.S.) 2020年1月16日 (2020 - 01 - 16) 摘要，权利要求1-19	1-10
A	AU 2004203879 A1 (North Carolina State University) 2004年9月2日 (2004 - 09 - 02) 摘要，权利要求1-26	1-10
A	JP 2004357564 A (国立大学法人東北大学) 2004年12月24日 (2004 - 12 - 24) 摘要，权利要求1-6	1-10
A	US 6423520 B1 (North Carolina State University) 2002年7月23日 (2002 - 07 - 23) 权利要求1-2	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/137624

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	116983432	A	2023年11月3日	无	
AU	2010201278	A1	2010年4月22日	AU	2010201278 B2 2012年11月15日
KR	20150014250	A	2015年2月6日	KR	101599929 B1 2016年3月7日
WO	2005021768	A1	2005年3月10日	JP	2007504219 A 2007年3月1日
				JP	4863874 B2 2012年1月25日
				EP	2322638 A1 2011年5月18日
				EP	1664315 A1 2006年6月7日
				EP	1664315 B1 2012年5月2日
				ES	2384975 T3 2012年7月16日
				ATE	556140 T1 2012年5月15日
				AU	2004269279 A1 2005年3月10日
				AU	2004269279 B2 2010年2月25日
				PT	1664315 E 2012年7月31日
				DK	1664315 T3 2012年7月9日
				PL	1664315 T3 2012年9月28日
				CA	2536471 A1 2005年3月10日
				CA	2536471 C 2013年10月8日
WO	2020012373	A1	2020年1月16日	无	
AU	2004203879	A1	2004年9月2日	AU	2004203879 B2 2006年11月2日
JP	2004357564	A	2004年12月24日	JP	4150792 B2 2008年9月17日
US	6423520	B1	2002年7月23日	US	6586661 B1 2003年7月1日
				CA	2484366 A1 1998年12月17日
				DK	0991766 T3 2004年7月12日
				US	2007011774 A1 2007年1月11日
				HU	0003767 A2 2001年2月28日
				HU	0003767 A3 2002年10月28日
				HU	225888 B1 2007年11月28日
				EE	9900575 A 2000年8月15日
				EE	04595 B1 2006年2月15日
				IL	132184 A 2010年11月30日
				KR	20010013663 A 2001年2月26日
				KR	100365969 B1 2002年12月26日
				US	2003140366 A1 2003年7月24日
				US	7304220 B2 2007年12月4日
				US	2004168211 A1 2004年8月26日
				US	7408098 B2 2008年8月5日
				EP	0991766 A1 2000年4月12日
				EP	0991766 B1 2004年3月17日
				JP	2009112316 A 2009年5月28日
				ES	2154624 T1 2001年4月16日
				ES	2154624 T3 2004年11月1日
				ID	29311 A 2001年8月16日
				CU	23174 A3 2006年9月22日
				EA	200400186 A1 2004年8月26日
				EA	009898 B1 2008年4月28日
				HK	1069411 A1 2005年5月20日
				UA	72187 C2 2005年2月15日
				CZ	367799 A3 2000年4月12日
				CZ	297379 B6 2006年11月15日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/137624

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		JP 2008131950 A	2008年6月12日
		JP 4459271 B2	2010年4月28日
		CA 2287776 A1	1998年12月17日
		CA 2287776 C	2012年4月3日
		PL 337442 A1	2000年8月14日
		PL 201266 B1	2009年3月31日
		HK 1065066 A1	2005年2月8日
		NO 996169 D0	1999年12月13日
		NO 996169 L	2007年12月17日
		JP 2004290201 A	2004年10月21日
		JP 4288206 B2	2009年7月1日
		DE 69822463 D1	2004年4月22日
		DE 69822463 T2	2005年1月20日
		RO 121968 B1	2008年9月30日
		EP 1457563 A1	2004年9月15日
		EP 1457563 B1	2012年8月8日
		HK 1027379 A1	2001年1月12日
		US 2006191036 A1	2006年8月24日
		US 7645925 B2	2010年1月12日
		LV 12507 A	2000年6月20日
		LV 12507 B	2000年11月20日
		US 2006200872 A1	2006年9月7日
		US 7795509 B2	2010年9月14日
		AU 7829198 A	1998年12月30日
		AU 748514 B2	2002年6月6日
		YU 64899 A	2004年12月31日
		RS 49677 B	2007年11月15日
		BR 9810870 A	2000年11月14日
		BR-PI 9810870 B1	2021年6月1日
		JP 2001522250 A	2001年11月13日
		JP 4095678 B2	2008年6月4日
		IL 132184 A0	2001年3月19日
		EA 200000007 A1	2000年6月26日
		EA 004652 B1	2004年6月24日
		US 2006191035 A1	2006年8月24日
		US 7425670 B2	2008年9月16日
		GEP 20032871 B	2003年1月27日
		GR 20010300003 T1	2001年6月29日
		OA 11219 A	2003年7月17日
		AP 9901680 A0	1999年12月31日
		AP 1169 A	2003年6月30日
		TR 199902728 T2	2000年9月21日
		DE 991766 T1	2002年4月4日
		PT 991766 E	2004年8月31日
		SI 20215 A	2000年10月31日
		SI 20215 B	2007年4月30日
		LT 99142 A	2000年6月26日
		LT 4706 B	2000年9月25日
		BG 103886 A	2000年7月31日

国际申请号
PCT/CN2023/137624

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)	
		BG	64319	B1	2004年9月30日
		ATE	262039	T1	2004年4月15日
		SK	161899	A3	2000年6月12日
		NZ	500963	A	2001年9月28日
		WO	9856923	A1	1998年12月17日
		US	2002108151	A1	2002年8月8日
		US	7605308	B2	2009年10月20日
		EP	1457562	A1	2004年9月15日
		EP	1457562	B1	2012年8月8日
		IL	192232	A0	2008年12月29日