



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105803056 B

(45)授权公告日 2020.09.08

(21)申请号 201410857253.0

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2014.12.30

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 102186987 A, 2011.09.14

申请公布号 CN 105803056 A

WO 2015144929 A1, 2015.10.01

(43)申请公布日 2016.07.27

Paul Mazaris等. Key determinants of

(73)专利权人 上海吉凯基因科技有限公司

short-term and long-term glioblastoma survival: A 14-year retrospective study of patients from the Hermelin Brain Tumor Center at Henry Ford Hospital.《Clinical Neurology and Neurosurgery》.2014,

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技

Igor Cestari等. Inhibition of Isoleucyl-tRNA Synthetase as a Potential Treatment for Human African Trypanosomiasis.《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.2013,

园区爱迪生路328号101-A室

(72)发明人 谭畅 杨岳微 高博 谢胜华

金杨晟 曹跃琼

(74)专利代理机构 上海光华专利事务所(普通

合伙) 31219

代理人 张艳 李慧

审查员 魏应亮

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

C12N 15/867(2006.01)

A61K 31/713(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

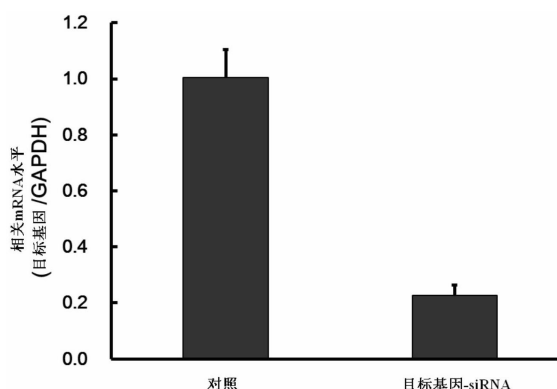
序列表5页 附图2页

(54)发明名称

人IARS2基因的用途及其相关药物

(57)摘要

本发明公开了人IARS2基因的用途及其相关药物。本发明公开了人IARS2基因在肿瘤治疗、肿瘤诊断及药物制备中的用途。本发明还进一步构建了人IARS2基因小分子干扰RNA、人IARS2基因干扰核酸构建体、人IARS2基因干扰慢病毒并公开了它们的用途。本发明提供的siRNA或者包含该siRNA序列的核酸构建体、慢病毒能够特异性抑制人IARS2基因的表达,尤其是慢病毒,能够高效侵染靶细胞,高效率地抑制靶细胞中IARS2基因的表达,进而抑制肿瘤细胞的生长,促进肿瘤细胞凋亡,在肿瘤治疗中具有重要意义。



1. 能够特异性抑制IARS2基因的转录或翻译、或能够特异性抑制IARS2基因的表达或活性的分子在制备肿瘤治疗药物中的用途,所述肿瘤选自胶质瘤,所述分子选自核酸分子,所述核酸分子包含:

a) 双链RNA,所述双链RNA中含有能够在严紧条件下与IARS2基因杂交的核苷酸序列,所述双链RNA包含第一链和第二链,所述第一链和所述第二链互补共同形成RNA二聚体,并且所述第一链的序列与IARS2基因中的靶序列基本相同;或者

b) shRNA,所述shRNA中含有能够在严紧条件下与IARS2基因杂交的核苷酸序列,所述shRNA包括正义链片段和反义链片段,以及连接所述正义链片段和反义链片段的茎环结构,所述正义链片段和所述反义链片段的序列互补,并且所述正义链片段的序列与IARS2基因中的靶序列基本相同;

IARS2基因的靶序列含有SEQ ID NO:1。

2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述双链RNA为小干扰RNA,该小干扰RNA第一链的序列如SEQ ID NO:9所示。

3. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述shRNA的序列如SEQ ID NO:14所示。

4. 一种IARS2基因干扰核酸构建体在制备肿瘤治疗药物中的用途,所述肿瘤选自胶质瘤,所述IARS2基因干扰核酸构建体含有编码shRNA的基因片段,能表达所述shRNA,所述shRNA中含有能够在严紧条件下与IARS2基因杂交的核苷酸序列,所述shRNA包括正义链片段和反义链片段,以及连接所述正义链片段和反义链片段的茎环结构,所述正义链片段和所述反义链片段的序列互补,并且所述正义链片段的序列与IARS2基因中的靶序列基本相同;

IARS2基因的靶序列含有SEQ ID NO:1。

5. 如权利要求4所述的用途,其特征在于,所述IARS2基因干扰核酸构建体为干扰慢病毒载体。

6. 如权利要求5所述的用途,其特征在于,所述干扰慢病毒载体由将编码所述shRNA的基因片段克隆入慢病毒载体后获得,所述慢病毒载体选自:pLK0.1-puro、

pLK0.1-CMV-tGFP、pLK0.1-puro-CMV-tGFP、pLK0.1-CMV-Neo、pLK0.1-Neo、pLK0.1-Neo-CMV-tGFP、pLK0.1-puro-CMV-TagCFP、pLK0.1-puro-CMV-TagYFP、pLK0.1-puro-CMV-TagRFP、pLK0.1-puro-CMV-TagFP635、pLK0.1-puro-UbC-TurboGFP、pLK0.1-puro-UbC-TagFP635、pLK0-puro-IPTG-1xLac0、pLK0-puro-IPTG-3xLac0、pLP1、pLP2、pLP/VSV-G、pENTR/U6、pLenti6/BLOCK-iT-DEST、pLenti6-GW/U6-laminshrna、pcDNA1.2/V5-GW/lacZ、pLenti6.2/N-Lumio/V5-DEST、pGCSIL-GFP或pLenti6.2/N-Lumio/V5-GW/lacZ中的任一。

7. 一种IARS2基因干扰慢病毒在制备肿瘤治疗药物中的用途,所述肿瘤选自胶质瘤,所述IARS2基因干扰慢病毒由干扰慢病毒载体在慢病毒包装质粒、细胞系的辅助下,经过病毒包装而成,所述干扰慢病毒载体含有编码shRNA的基因片段,能表达所述shRNA,所述shRNA中含有能够在严紧条件下与IARS2基因杂交的核苷酸序列,所述shRNA包括正义链片段和反义链片段,以及连接所述正义链片段和反义链片段的茎环结构,所述正义链片段和所述反义链片段的序列互补,并且所述正义链片段的序列与IARS2基因中的靶序列基本相同;

IARS2基因的靶序列含有SEQ ID NO:1。

8. 一种用于预防或治疗肿瘤的药物组合物在制备治疗胶质瘤的肿瘤治疗药物中的应

用,所述药物组合物的有效物质含有一种降低肿瘤细胞中IARS2基因表达的分离的核酸分子;

或,所述药物组合物的有效物质含有一种IARS2基因干扰核酸构建体,所述IARS2基因干扰核酸构建体含有编码shRNA的基因片段,能表达所述shRNA;

或,所述药物组合物的有效物质含有一种IARS2基因干扰慢病毒,所述IARS2基因干扰慢病毒由干扰慢病毒载体在慢病毒包装质粒、细胞系的辅助下,经过病毒包装而成,所述干扰慢病毒载体含有编码shRNA的基因片段,能表达所述shRNA;

所述shRNA中含有能够在严紧条件下与IARS2基因杂交的核苷酸序列,所述shRNA包括正义链片段和反义链片段,以及连接所述正义链片段和反义链片段的茎环结构,所述正义链片段和所述反义链片段的序列互补,并且所述正义链片段的序列与IARS2基因中的靶序列基本相同;

IARS2基因的靶序列含有SEQ ID NO:1;

所述药物组合物还包括药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

人IARS2基因的用途及其相关药物

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,更具体地涉及人IARS2基因的用途及其相关药物。

背景技术

[0002] RNA干扰(RNA interference, RNAi)即用核苷酸组成的短的双链RNA(dsRNA)进行转录后基因沉默。它可高效、特异地阻断体内特定基因的表达,导致其降解,从而引起生物体内特异基因的沉默,使细胞表现出某种基因表型的缺失,是近年来新兴的一种常用的研究基因功能、寻找疾病治疗方法的实验室技术。研究表明,长度为21-23nt的双链RNA能够在转录和转录后水平特异性的引起RNAi(Tuschl T, Zamore PD, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000;101:25-33.)。肿瘤患者虽经化疗、放疗和综合治疗,但五年生存率仍很低,如能对肿瘤发病和进展有关的基因进行干预,将能为肿瘤的治疗开辟新途径。近年来, RNAi已成为肿瘤的基因治疗的有效策略。利用RNAi技术可以抑制原癌基因、突变的抑癌基因、细胞周期相关基因、抗凋亡相关基因等的表达来抑制肿瘤进程(Uprichard, Susan L. The therapeutic potential of RNA interference. *FEBS Letters* 2005;579:5996-6007.)。

[0003] IARS2是一个线粒体蛋白(Cotter D, Guda P, Fahy E, Subramaniam S. 2004. Mito Proteome: mitochondrial protein sequence database and a notation system. *Nucleic Acids Res* 32:D463-D467.), IARS2基因具有很高的保守进化序列,并且研究表明在多物种中,比对了IARS2基因,在图谱中显示909位点是一个保守位点,通过SIFT查询p.P909L是一个有效的功能蛋白,但是很可能被PolyPhen2HumDiv和PolyPhen2HumVar破坏。更进一步的研究表明病人的皮肤细胞的IARS2蛋白直接影响到p.P909L突变[Yao and Shoubridge, 1999]。通过免疫组化多克隆抗体结合的方法检测到,相对野生型的纤维细胞里,突变型的细胞里更多存在IARS2抗体。对于p.P909L突变存在于IARS2基因里不影响线粒体酶的转录活性(Sasarman F, Shoubridge EA. 2012. Radio active labeling of mitochondrial translation products in cultured cells. *Methods Mol Biol* 837: 207-217)。

[0004] 临床研究表明IARS2蛋白水平的降低在一些病人身上细胞发现,由此可以得出IARS2的改变是属于病理学上的突变,是引起一些晚期病人的病理表型的初始原因。一些功能学实验也证明了IARS2蛋白的减少引起OXPHO呼吸系统的异常的翻译(Konovalova S, Tyynismaa H. 2013. Mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases in human disease. *Mol Genet Metab* 108:206-211)。

[0005] 然而,目前关于IARS2基因在肿瘤相关领域的实验性报道还是一片空白,特别是人胶质瘤研究领域。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于公开与人IARS2基因相关的治疗方法及药物,以RNA干扰(RNAi)为手段研究IARS2基因在肿瘤细胞的存活和凋亡过程中的作用。

[0007] 本发明第一方面,以RNA干扰为手段,研究了IARS2基因在肿瘤发生和发展中的作用,公开了一种抑制或降低肿瘤细胞生长、增殖、分化和/或存活的方法,该方法包括:向肿瘤细胞施用一种能够特异性抑制IARS2基因的转录或翻译,或能够特异性抑制IARS2基因的表达或活性的分子,以此来抑制肿瘤细胞的生长、增殖、分化和/或存活。

[0008] 所述肿瘤细胞选自其生长与IARS2基因的表达或活性相关的肿瘤细胞。较优的,所述肿瘤细胞选自胶质瘤。

[0009] 所述抑制或降低肿瘤细胞生长、增殖、分化和/或存活的方法中,所述分子的施用量为足够降低IARS2基因的转录或翻译,或者足够降低IARS2基因的表达或活性的剂量。进一步的,所述IARS2基因的表达至少被降低50%、80%、90%、95%或99%。

[0010] 所述分子可选自但不限于:核酸分子、碳水化合物、脂类、小分子化学药、抗体药、多肽、蛋白或干扰慢病毒。

[0011] 所述核酸包括但不限于:反义寡核苷酸、双链RNA(dsRNA)、核酶、核糖核酸内切酶III制备的小干扰RNA(siRNA)或者短发夹RNA(shRNA)。

[0012] 所述双链RNA、核酶、esiRNA或者shRNA含有IARS2基因的启动子序列或IARS2基因的信息序列。

[0013] 进一步的,所述双链RNA为小干扰RNA(siRNA)。所述小干扰RNA包含第一链和第二链,所述第一链和所述第二链互补共同形成RNA二聚体,并且所述第一链的序列与IARS2基因中15-27个连续的核苷酸序列基本相同。所述小分子干扰RNA能特异性结合靶序列所编码的mRNA片段,并特异性沉默人IARS2基因的表达。

[0014] 进一步的,所述小干扰RNA的第一链序列与IARS2基因中的靶序列基本相同。较优的,所述IARS2基因中的靶序列含有SEQ ID NO:1。

[0015] 所述IARS2基因中的靶序列即为所述小分子干扰RNA特异性沉默IARS2基因表达时,与所述的小分子干扰RNA互补结合的mRNA片段所对应的IARS2基因中的片段。

[0016] 较佳的,所述IARS2基因来源于人。

[0017] 本发明第一方面还公开了一种分离的人IARS2基因在制备或筛选肿瘤治疗药物,或者在制备肿瘤诊断药物中的用途。

[0018] 进一步的,所述肿瘤选自胶质瘤。

[0019] 所述将分离的IARS2基因用于制备或筛选肿瘤治疗药物包括两方面的内容:其一,将IARS2基因作为药物或制剂针对肿瘤细胞的作用靶标应用于制备肿瘤治疗药物或制剂;其二,将IARS2基因作为药物或制剂针对肿瘤细胞的作用靶标应用于筛选肿瘤治疗药物或制剂。

[0020] 所述将IARS2基因作为药物或制剂针对肿瘤细胞的作用靶标应用于制备肿瘤治疗药物或制剂具体是指:将IARS2基因作为RNA干扰作用的靶标,来研制针对肿瘤细胞的药物或制剂,从而能降低肿瘤细胞内IARS2基因的表达水平。

[0021] 所述将IARS2基因作为药物或制剂针对肿瘤细胞的作用靶标应用于筛选肿瘤治疗药物或制剂具体是指:将IARS2基因作为作用对象,对药物或制剂进行筛选,以找到可以抑

制或促进人IARS2基因表达的药物作为肿瘤治疗备选药物。如本发明所述的IARS2基因小分子干扰RNA(siRNA)即是以人IARS2基因为作用对象筛选获得的,可用作具有抑制肿瘤细胞增殖作用的药物。除此之外,诸如抗体药物,小分子药物等也可将IARS2基因及其蛋白作为作用对象。

[0022] 所述将IARS2基因用于制备肿瘤诊断药物,是指将IARS2基因表达产物作为一项肿瘤诊断指标应用于肿瘤诊断药物的制备。

[0023] 通过Real-time Quantitative PCR的方法检测IARS2基因在4株胶质瘤细胞中的表达水平。研究发现:IARS2在4株胶质瘤细胞中表达丰度为高。提示IARS2可能作为一种癌基因,在肿瘤的发生发展中发挥重要作用;IARS2基因的表达水平可能成为肿瘤诊断的标志。

[0024] 所述肿瘤治疗药物为能够特异性抑制IARS2基因的转录或翻译,或能够特异性抑制IARS2蛋白的表达或活性的分子,从而降低肿瘤细胞中IARS2基因的表达水平,达到抑制肿瘤细胞的增殖、生长、分化和/或存活的目的。

[0025] 所述通过分离的IARS2基因制备或筛选获得的肿瘤治疗药物或者肿瘤诊断药物包括但不限于:核酸分子、碳水化合物、脂类、小分子化学药、抗体药、多肽、蛋白或干扰慢病毒。

[0026] 所述核酸包括但不限于:反义寡核苷酸、双链RNA(dsRNA)、核酶、核糖核酸内切酶III制备的小干扰RNA(esRNA)或者短发夹RNA(shRNA)。

[0027] 所述肿瘤治疗药物的施用量为足够降低人IARS2基因的转录或翻译,或者足够降低人IARS2基因的表达或活性的剂量。以使人IARS2基因的表达至少被降低50%、80%、90%、95%或99%。

[0028] 采用前述肿瘤治疗药物治疗肿瘤的方法,主要是通过降低人IARS2基因的表达水平抑制肿瘤细胞的增殖来达到治疗的目的。具体的,治疗时,将能有效降低人IARS2基因表达水平的物质给药于患者。

[0029] 本发明第二方面公开了一种降低肿瘤细胞中IARS2基因表达的分离的核酸分子,所述核酸分子包含:

[0030] a) 双链RNA,所述双链RNA中含有能够在严紧条件下与IARS2基因杂交的核苷酸序列;

[0031] 或者

[0032] b) shRNA,所述shRNA中含有能够在严紧条件下与IARS2基因杂交的核苷酸序列。

[0033] 进一步的,所述双链RNA包含第一链和第二链,所述第一链和所述第二链互补共同形成RNA二聚体,并且所述第一链的序列与IARS2基因中15-27个连续的核苷酸序列基本相同。较佳的,所述第一链的序列与IARS2基因中19-23个连续的核苷酸序列基本相同;更佳的,所述第一链的序列与IARS2基因中19、20或者21个连续的核苷酸序列基本相同。

[0034] 更进一步的,所述双链RNA包含第一链和第二链,所述第一链和所述第二链互补共同形成RNA二聚体,并且所述第一链的序列与IARS2基因中的靶序列基本相同。

[0035] 所述双链RNA第一链和第二链的长度均为15-27个核苷酸;较佳的,长度均为19-23个核苷酸;最佳的,长度均为19、20或者21个核苷酸。

[0036] 进一步的,所述双链RNA为小干扰RNA(siRNA)。更进一步的,所述小干扰RNA第一链

的序列如SEQ ID NO:9所示,具体为5'-GUACUUGCAGUCAUCCAUA-3'。

[0037] SEQ ID NO:9所示的siRNA为以SEQ ID NO:1所示的序列为RNA干扰靶序列设计的、针对人IARS2基因的小干扰RNA的一条链,另一条链即第二链的序列与第一链序列互补,该siRNA可以起到特异性沉默肿瘤细胞中内源IARS2基因表达的作用。

[0038] 进一步的,所述shRNA包括正义链片段和反义链片段,以及连接所述正义链片段和反义链片段的茎环结构,所述正义链片段和所述反义链片段的序列互补,并且所述正义链片段的序列与IARS2基因中15-27个连续的核苷酸序列基本相同。所述shRNA经加工后可成为小干扰RNA(siRNA)进而起到特异性沉默肿瘤细胞中内源IARS2基因表达的作用。

[0039] 更进一步的,所述shRNA包括正义链片段和反义链片段,以及连接所述正义链片段和反义链片段的茎环结构,所述正义链片段和所述反义链片段的序列互补,并且所述正义链片段的序列与IARS2基因中的靶序列基本相同。

[0040] 较佳的,所述正义链片段与IARS2基因中19-23个连续的核苷酸序列基本相同;更佳的,所述正义链片段与IARS2基因中19、20或者21个连续的核苷酸序列基本相同。

[0041] 进一步的,所述shRNA的茎环结构的序列可选自以下任一:UUCAAGAGA、AUG、CCC、UUCG、CCACC、CTCGAG、AAGCUU和CCACACC。

[0042] 更进一步的,所述shRNA的序列如SEQ ID NO:14所示,具体为:5'-GUACUUGCAGUCAUCCAUAUUAUUAAGAGAUUAAUGGAUGACUGCAAGUAC-3'。

[0043] shRNA经酶切加工后可成为siRNA,进而起到特异性沉默肿瘤细胞中内源性人IARS2基因表达的作用。

[0044] 编码本发明所述shRNA的基因片段的干扰慢病毒载体含有SEQ ID NO:1及其互补序列。

[0045] 所述双链RNA的第一链或所述shRNA的正义链片段与IARS2基因中的靶序列基本相同,所述IARS2基因的靶序列即为siRNA用于特异性沉默IARS2基因表达时,被所述siRNA识别并沉默的mRNA片段所对应的IARS2基因中的片段。

[0046] 较佳的,所述IARS2基因中的靶序列含有SEQ ID NO:1。

[0047] 进一步的,所述IARS2基因来源于人。

[0048] 本发明第三方面,公开了一种IARS2基因干扰核酸构建体,含有编码本发明所述分离的核酸分子中的shRNA的基因片段,能表达所述shRNA。

[0049] 所述的人IARS2基因干扰核酸构建体可以是将编码前述人IARS2基因shRNA的基因片段克隆入已知载体获得。进一步的,所述IARS2基因干扰核酸构建体为IARS2基因干扰慢病毒载体。

[0050] 本发明的IARS2基因干扰慢病毒载体是将编码前述IARS2基因shRNA的DNA片段克隆入已知载体获得,所述已知载体多为慢病毒载体,所述IARS2基因干扰慢病毒载体经过病毒包装成为有感染力的病毒颗粒后,感染肿瘤细胞,进而转录出本发明所述shRNA,通过酶切加工等步骤,最终获得所述siRNA,用于特异性沉默IARS2基因的表达。

[0051] 进一步的,所述IARS2基因干扰慢病毒载体还含有启动子序列和/或编码肿瘤细胞中可被检测的标记物的核苷酸序列;较优的,所述可被检测的标记物如绿色荧光蛋白(GFP)。

[0052] 进一步的,所述慢病毒载体可以选自:pLK0.1-puro、pLK0.1-CMV-tGFP、pLK0.1-

puro-CMV-tGFP、pLK0.1-CMV-Neo、pLK0.1-Neo、pLK0.1-Neo-CMV-tGFP、pLK0.1-puro-CMV-TagCFP、pLK0.1-puro-CMV-TagYFP、pLK0.1-puro-CMV-TagRFP、pLK0.1-puro-CMV-TagFP635、pLK0.1-puro-UbC-TurboGFP、pLK0.1-puro-UbC-TagFP635、pLK0-puro-IPTG-1xLac0、pLK0-puro-IPTG-3xLac0、pLP1、pLP2、pLP/VSV-G、pENTR/U6、pLenti6/BLOCK-iT-DEST、pLenti6-GW/U6-laminshrna、pcDNA1.2/V5-GW/lacZ、pLenti6.2/N-Lumio/V5-DEST、pGCSIL-GFP或pLenti6.2/N-Lumio/V5-GW/lacZ中的任一。

[0053] 本发明实施例具体列举了以pGCSIL-GFP为载体构建的人IARS2基因干扰慢病毒载体,命名为pGCSIL-GFP-IARS2-siRNA。

[0054] 本发明分离的核酸分子可用于制备预防或治疗肿瘤的药物,所述肿瘤为胶质瘤。

[0055] 本发明的IARS2基因siRNA可用于抑制肿瘤细胞的增殖,进一步地可以用作治疗肿瘤的药物或制剂。IARS2基因干扰慢病毒载体则可用于制备所述IARS2基因siRNA。当用作治疗肿瘤的药物或制剂时,是将安全有效量的所述核酸分子施用于哺乳动物。具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围内的。

[0056] 本发明第四方面,公开了一种IARS2基因干扰慢病毒,由前述IARS2基因干扰慢病毒载体在慢病毒包装质粒、细胞系的辅助下,经过病毒包装而成。该慢病毒可感染肿瘤细胞并产生针对IARS2基因的小分子干扰RNA,从而抑制胶质瘤肿瘤细胞的增殖。该IARS2基因干扰慢病毒可用于制备预防或治疗肿瘤的药物。

[0057] 本发明第五方面,公开了一种用于预防或治疗肿瘤的药物组合物,其有效物质含有前述的分离的核酸分子,IARS2基因干扰核酸构建体或IARS2基因干扰慢病毒中的一种或多种的组合。

[0058] 进一步的,所述药物组合物含有1~99wt%所述双链RNA、shRNA、IARS2基因干扰核酸构建体或IARS2基因干扰慢病毒,以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0059] 在制备这些组合物时,通常将活性成分与赋形剂混合,或用赋形剂稀释,或包在可以胶囊或药囊形式存在的载体中。当赋形剂起稀释剂作用时,它可以是固体、半固体或液体材料作为赋形剂、载体或活性成分的介质。因此,组合物可以是片剂、丸剂、粉剂、溶液剂、糖浆剂、灭菌注射溶液等。合适的赋形剂的例子包括:乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、等。制剂还可包括:湿润剂、乳化剂、防腐剂(如羟基苯甲酸甲酯和丙酯)、甜味剂等。

[0060] 本发明还公开了所述药物组合物在制备治疗胶质瘤的肿瘤治疗药物中的应用。

[0061] 该药物组合物的应用为肿瘤的治疗提供了一种方法,具体为一种预防或治疗对象体内肿瘤的方法,包括将有效剂量的所述的药物组合物施用于对象中。进一步的,所述肿瘤为胶质瘤。

[0062] 所述药物组合物用于预防或治疗对象体内肿瘤时,需要将有效剂量的所述的药物组合物施用于对象中。采用该方法,所述肿瘤的生长、增殖、复发和/或转移被抑制。进一步的,所述肿瘤的生长、增殖、复发和/或转移的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的部分被抑制。

[0063] 所述方法的对象可以为人。

[0064] 本发明第六方面,公开了一种用于降低肿瘤细胞中的IARS2基因表达的试剂盒,所述试剂盒包括:存在于容器中的所述分离的核酸分子,IARS2基因干扰核酸构建体,和/或所

述的IARS2基因干扰慢病毒。

[0065] 综上所述,本发明设计了针对人IARS2基因的1个RNAi靶点序列,构建相应的IARS2基因RNAi载体,其中编码序列SEQ ID NO:1的RNAi载体pGCSIL-GFP-IARS2-siRNA能够显著下调IARS2基因在mRNA水平和蛋白水平的表达。使用慢病毒(lentivirus,简称为Lv)作为基因操作工具携带RNAi载体pGCSIL-GFP-IARS2-siRNA能够靶向地将针对IARS2基因的RNAi序列高效导入胶质瘤U251细胞,降低IARS2基因的表达水平,显著抑制上述肿瘤细胞的增殖能力。因此慢病毒介导的IARS2基因沉默是恶性肿瘤潜在的临床非手术治疗方式。

[0066] 本发明提供的siRNA或者包含该siRNA序列的核酸构建体、慢病毒能够特异性抑制人IARS2基因的表达,尤其是慢病毒,能够高效侵染靶细胞,高效率地抑制靶细胞中IARS2基因的表达,促进细胞凋亡、降低肿瘤细胞的侵袭和转移能力等,进而抑制肿瘤细胞的生长,促进肿瘤细胞凋亡,在肿瘤治疗中具有重要意义。

附图说明

[0067] 图1:pGCSIL-GFP质粒DNA图谱

[0068] 图2:IARS2-RNAi慢病毒侵染人胶质瘤U251细胞5天后,IARS2mRNA的表达水平显著降低

[0069] 图3:IARS2-RNAi慢病毒侵染人胶质瘤U251细胞5天后,引起细胞增殖抑制

具体实施方式

[0070] 本发明涉及了一组针对人IARS2基因的小分子干扰RNA(siRNA)序列、RNA干扰载体和RNA干扰慢病毒。选取人IARS2mRNA编码区序列作为siRNA的靶位点,根据靶位点中连续的10-30(优选15-27,更优选19-23)个碱基序列设计siRNA靶点序列。通过基因克隆,构建表达上述siRNA的核酸构建体,包装表达上述siRNA的慢病毒。细胞实验证明,上述siRNA序列能够特异性沉默人肿瘤细胞中内源IARS2基因的表达。

[0071] 发明人发现,采用RNAi方法下调人IARS2基因的表达后可有效地抑制肿瘤细胞的增殖等,可以有效地控制肿瘤的生长进程,这一研究成果表明IARS2基因是原癌基因,可作为肿瘤治疗的靶点。发明人进一步合成和测试了多种针对IARS2基因的siRNA,筛选出了可有效抑制IARS2表达进而抑制人胶质瘤U521细胞增殖和生长的siRNA,在此基础上完成了本发明。

[0072] 本发明提供了一系列干扰人IARS2基因的小干扰RNA(siRNA)序列,构建了可特异性沉默IARS2基因表达的慢病毒。本发明研究发现,针对人IARS2基因设计的小干扰RNA及RNAi慢病毒,稳定并特异地下调IARS2基因的表达,并有效地抑制人肿瘤细胞的增殖。本发明表明IARS2基因可促进肿瘤细胞生长,有望成为肿瘤早期诊断和治疗的靶点。而且,通过RNAi方式沉默IARS2基因的表达,可作为抑制肿瘤发展的有效手段。

[0073] 本发明的设计思路为:

[0074] 本发明通过如下方法来筛选获得一种人IARS2基因RNAi慢病毒:从Genbank中调取人IARS2基因序列;预测siRNA位点;合成针对IARS2基因的有效的siRNA序列、两端含酶切位点粘端的双链DNA Oligo;慢病毒载体双酶切后与双链DNA Oligo连接,构建表达IARS2基因siRNA序列的RNAi质粒;将RNAi质粒和慢病毒包装需要的辅助载体(Packing Mix,Sigma-

aldrich公司)共转染人胚肾细胞293T,产生重组慢病毒颗粒,即可制得高效沉默IARS2基因的慢病毒。

[0075] 基于上述方法,本发明提供了1个干扰IARS2基因的有效靶点(具体如SEQ ID NO:1所示),构建了特异干扰人IARS2基因的慢病毒。

[0076] 同时本发明还公开一种人IARS2基因RNAi慢病毒(IARS2-RNAi)及其制备与应用。

[0077] 本研究发现,利用慢病毒介导的RNAi方法,在降低IARS2基因在肿瘤细胞中的表达后,可以有效抑制肿瘤细胞的增殖。研究表明,IARS2基因是一个原癌基因,可促进肿瘤细胞增殖,在肿瘤发生和发展中具有重要的生物学功能,IARS2基因可以为肿瘤治疗的靶标,慢病毒介导的IARS2基因特异性沉默可作为肿瘤治疗的一种新手段。

[0078] 下面结合实施例进一步阐述本发明。应理解,实施例仅用于说明本发明,而非限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件的实验方法及未说明配方的试剂均为按照常规条件,如[美]Sambrook.J等著;黄培堂等译。分子克隆试验指南,第三版。北京:科学出版社2002中所述的条件或者制造商建议的条件进行或配置。

[0079] 实施例1 针对人IARS2基因RNAi慢病毒的制备

[0080] 1.筛选针对人IARS2基因的有效的siRNA靶点

[0081] 从Genbank调取IARS2(NM_018060)基因信息;设计针对IARS2基因的有效的siRNA靶点。表1列出了其中1条针对IARS2基因的有效siRNA靶点序列。

[0082] 表1 靶向于人IARS2基因的siRNA靶点序列

[0083]	SEQ ID NO	TargetSeq
	1	GTACTTGCAGTCATCCATTAA

[0084] 2.慢病毒载体的制备

[0085] 针对siRNA靶点(以SEQ ID NO:1为例)合成两端含Age I和EcoR I酶切位点粘端的双链DNA Oligo序列(表2);以Age I和EcoR I限制性内切酶作用于pGCSIL-GFP载体(上海吉凯基因化学技术有限公司提供,图1),使其线性化,琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切片段。

[0086] 表2 两端含Age I和EcoR I酶切位点粘端的双链DNA Oligo

	5'	颈	环	颈	3'	SEQ
[0087]	正义链	CCGG	GTACTTGCAGTCATC CATTAA	TTCAAGA GA	TTAATGGATGACTG CAAGTAC	TTTT TG 2
	反义链	AATTCA AAAA	GTACTTGCAGTCATC CATTAA	TCTCTTG AA	TTAATGGATGACTG CAAGTAC	3

[0088] 通过T4DNA连接酶将双酶切线性化(酶切体系如表4所示,37℃,反应1h)的载体DNA和纯化好的双链DNA Oligo连接,在适当的缓冲体系(连接体系如表5所示)中于16℃连接过夜,回收连接产物。将连接产物转化氯化钙制备的新鲜的大肠杆菌感受态细胞(转化操作参考:分子克隆实验指南第二版55-56页)。在连接转化产物长出菌克隆表面沾一下,溶于10μl LB培养基,混匀取1μl作为模板;在以慢病毒载体中RNAi序列的上下游,设计通用PCR引物,上游引物序列:5'-CCTATTTCCCATGATTCCTTCATA-3'(SEQ ID NO:6);下游引物序列:5'-GTAATACGGTTATCCACGCG-3'(SEQ ID NO:7),进行PCR鉴定实验(PCR反应体系如表6-1,反应条件如表6-2)。对PCR鉴定阳性的克隆进行测序和比对分析,比对正确的克隆即为构建成功的针对SEQ ID NO:1的表达RNAi的载体,命名为pGCSIL-GFP-IARS2-siRNA。

[0089] 构建pGCSIL-GFP-Scr-siRNA阴性对照质粒,阴性对照siRNA靶序列为5' -

TTCTCCGAACGTGTACAGT-3' (SEQ ID NO:8)。构建pGCSIL-GFP-Scr-siRNA阴性对照质粒时,针对Scr siRNA靶点合成两端含Age I和EcoR I酶切位点粘端的双链DNA Oligo序列(表3),其余构建方法、鉴定方法及条件均同pGCSIL-GFP-IARS2-siRNA。

[0090] 表3 两端含Age I和EcoR I酶切位点粘端的双链DNA Oligo

	5'	颈	环	颈	3'	SEQ
[0091] 正义链	CCGG	TTCTCCGAACGTGTCA CGT	TTCAAGA GA	ACGTGACACGTTTCGGA GAA	TTTT G	4
反义链	AATTCA AAAA	TTCTCCGAACGTGTCA CGT	TCTCTTGA A	ACGTGACACGTTTCGGA GAA		5

[0092] 通过T4DNA连接酶将双酶切线性化(酶切体系如表4所示,37℃,反应1h)的载体

[0093] 表4 pGCSIL-GFP质粒酶切反应体系

[0094]	试剂	体积(μl)
	pGCSIL-GFP质粒(1μg/μl)	2.0
	10×buffer	5.0
	100×BSA	0.5
	Age I(10U/μl)	1.0
	EcoR I(10U/μl)	1.0
	dd H ₂ O	40.5
	Total	50.0

[0095] 表5 载体DNA和双链DNA Oligo连接反应体系

[0096]	试剂	阳性对照(μl)	自连对照(μl)	连接组(μl)
	线性化的载体DNA(100ng/μl)	1.0	1.0	1.0
	退火的双链DNA Oligo(100ng/μl)	1.0	-	1.0
	10×T4噬菌体DNA连接酶缓冲液	1.0	1.0	1.0
	T4噬菌体DNA连接酶	1.0	1.0	1.0
	dd H ₂ O	16.0	17.0	16.0
	Total	20.0	20.0	20.0

[0097] 表6-1 PCR反应体系

[0098]	试剂	体积(μl)
	10×buffer	2.0
	dNTPs(2.5mM)	0.8
	上游引物	0.4
	下游引物	0.4
	Taq聚合酶	0.2
	模板	1.0
	ddH ₂ O	15.2
	Total	20.0

[0099] 表6-2 PCR反应体系程序设定

[0100]	1 Cycle	30 Cycles			1 Cycle
	94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C
	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec	6 min

[0101] 3. 包装IARS2-siRNA慢病毒

[0102] 以Qiagen公司的质粒抽提试剂盒提取RNAi质粒pGCSIL-GFP-IARS2-siRNA的DNA，配制成100ng/μl储存液。

[0103] 转染前24h，用胰蛋白酶消化对数生长期的人胚肾细胞293T细胞，以含10%胎牛血清的DMEM完全培养基调整细胞密度为 1.5×10^5 细胞/ml，接种于6孔板，37°C，5%CO₂培养箱内培养。待细胞密度达70%-80%时即可用于转染。转染前2h，吸出原有培养基，加入1.5ml新鲜的完全培养基。按照Sigma-aldrich公司的MISSION Lentiviral Packaging Mix试剂盒的说明，向一灭菌离心管中加入Packing Mix (PVM) 20μl，PEI 12μl，无血清DMEM培养基400μl，取20μl上述抽提的质粒DNA，加至上述PVM/PEI/DMEM混合液。

[0104] 将上述转染混和物在室温下孵育15min，转移至人胚肾细胞293T细胞的培养基中，37°C，5%CO₂培养箱内培养16h。弃去含有转染混和物的培养介质，PBS溶液洗涤，加入完全培养基2ml，继续培养48h。收集细胞上清液，Centricon Plus-20离心超滤装置 (Millipore) 纯化和浓缩慢病毒，步骤如下：(1) 4°C，4000g离心10min，除去细胞碎片；(2) 0.45μm滤器过滤上清液于40ml超速离心管中；(3) 4000g离心，10-15min，至需要的病毒浓缩体积；(4) 离心结束后，将过滤杯和下面的滤过液收集杯分开，将过滤杯倒扣在样品收集杯上，离心2min离心力不超过1000g；(5) 把离心杯从样品收集杯上移开，样品收集杯中的即为病毒浓缩液。将病毒浓缩液分装后于-80摄氏度保存。病毒浓缩液中含有的siRNA的第一链的序列如SEQ ID NO:9所示。对照慢病毒的包装过程同IARS2-siRNA慢病毒，仅以pGCSIL-GFP-Scr-siRNA载体代替pGCSIL-GFP-IARS2-siRNA载体。

[0105] 实施例2 实时荧光定量RT-PCR法检测IARS2基因的沉默效率

[0106] 处于对数生长期的胶质瘤U251细胞进行胰酶消化，制成细胞悬液(细胞数约为 5×10^4 /ml)接种于6孔板中，培养至细胞融合度达到约30%。根据感染复数(MOI, U251:5)值，加入适宜量的实施例1制备的病毒，培养24h后更换培养基，待感染时间达到5天后，收集细胞。根据Invitrogen公司的Trizol操作说明书，抽提总RNA。根据Promega公司的M-MLV操作说明书，将RNA逆转录获得cDNA(逆转录反应体系见表7，42°C反应1h，然后在70°C水浴锅中水浴10min使逆转录酶失活)。

[0107] 采用TP800型Real time PCR仪(TAKARA)进行实时定量检测。IARS2基因的引物如下：上游引物5'-TGGACCTCCTTATGCAAACGG-3'(SEQ ID NO:10)和下游引物5'-GGCAACCCATGACAATCCCA-3'(SEQ ID NO:11)。以管家基因GAPDH为内参，引物序列如下：上游引物5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3'(SEQ ID NO:12)和下游引物5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'(SEQ ID NO:13)。按表8中的比例配置反应体系。

[0108] 表7 逆转录反应体系

[0109]	试剂	体积(μl)
	5×RT buffer	4.0
	10mM dNTPs	2.0
	RNasin	0.5

M-MLV-RTase	1.0
DEPC H ₂ O	3.5
Total	11.0

[0110] 表8 Real-time PCR反应体系

试剂	体积 (μl)
SYBR premix ex taq:	10.0
上游引物 (2.5μM) :	0.5
下游引物 (2.5μM) :	0.5
cDNA	1.0
ddH ₂ O	8.0
Total	20.0

[0112] 设定程序为两步法Real-time PCR:预变性95℃,15s;之后每一步变性95℃,5s;退火延伸60℃,30s;共进行45个循环。每次在延伸阶段读取吸光值。PCR结束后,95℃变性1min,然后冷却至55℃,使DNA双链充分结合。从55℃开始到95℃,每一步增加0.5℃,保持4s,同时读取吸光值,制作熔解曲线。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析法计算侵染了IARS2mRNA的表达丰度。侵染对照病毒(Lv-Scr-siRNA)的细胞作为对照。实验结果(图2)表明,胶质瘤U251细胞中IARS2mRNA的表达水平下调了87.3%。

[0113] 实施例3 检测侵染了IARS2-siRNA慢病毒的肿瘤细胞的增殖能力

[0114] 处于对数生长期的胶质瘤U251细胞进行胰酶消化,制成细胞悬液(细胞数约为 5×10^4 /ml)接种于6孔板中,培养至细胞融合度达到约30%。根据侵染复数(MOI,U251:5),加入适宜量的病毒,培养24h后更换培养基,待侵染时间达到5天后,收集处于对数生长期的实验组细胞。完全培养基重悬成细胞悬液(2×10^4 /ml),以细胞密度约为2000个/孔,接种96孔板。每组5个复孔,每孔100μl。铺好板后,置37℃、5%CO₂培养箱培养。从铺板后第二天开始,每天用Cellomics仪器(Thermo Fisher)检测读板一次,连续检测读板5天。通过调整Cellomics arrayscan的输入参数,准确地计算出每次扫描孔板中的带绿色荧光的细胞的数量,对数据进行统计绘图,绘出细胞增殖曲线(结果如图3所示)。结果表明,慢病毒侵染组肿瘤细胞体外培养5天后,增殖速度显著减缓,远低于对照组肿瘤细胞的增殖速度,活力细胞数目下降了80.2%,表明IARS2基因沉默导致肿瘤细胞增殖能力被抑制。

[0115] 以上所述,仅为本发明的较佳实施例,并非对本发明任何形式上和实质上的限制,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明方法的前提下,还将可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。凡熟悉本专业的技术人员,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,当可利用以上所揭示的技术内容而做出的些许更动、修饰与演变的等同变化,均为本发明的等效实施例;同时,凡依据本发明的实质技术对上述实施例所作的任何等同变化的更动、修饰与演变,均仍属于本发明的技术方案的范围。

序列表

	<110> 上海吉凯基因科技有限公司	
	<120> 人 IARS2 基因的用途及其相关药物	
	<130> PCNJK	
	<160> 14	
	<170> PatentIn version 3.3	
	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 1	
	gtacttgcag tcatccatta a	21
[0001]	<210> 2	
	<211> 61	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 双链 DNA Oligo 正义链	
	<400> 2	
	ccgggtactt gcagtcaccc attaatcaa gagattaatg gatgactgca agtacttttt	60
	g	61
	<210> 3	
	<211> 61	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 双链 DNA Oligo 反义链	

	<400> 3	
	aattcaaaaa gtacttgcag tcatccatta atctcttgaa ttaatggatg actgcaagta	60
	c	61
	<210> 4	
	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 双链 DNA Oligo 正义链	
	<400> 4	
	ccggttctcc gaacgtgtca cgtttcaaga gaacgtgaca cgttcggaga atttttg	57
	<210> 5	
	<211> 57	
[0002]	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 双链 DNA Oligo 反义链	
	<400> 5	
	aattcaaaaa ttctccgaac gtgtcacgtt ctcttgaaac gtgacacgtt cggagaa	57
	<210> 6	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 上游引物	
	<400> 6	
	cctatttccc atgattcctt cata	24

	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 下游引物	
	<400> 7	
	gtaatacggg tatccacg	20
	<210> 8	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
[0003]	<223> 阴性对照 siRNA 靶序列	
	<400> 8	
	ttctccgaac gtgtcacgt	19
	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> siRNA 第一链	
	<400> 9	
	guacuugcag ucauccaua a	21
	<210> 10	
	<211> 21	

	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 上游引物	
	<400> 10	
	tggacctcct tatgcaaacg g	21
	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 下游引物	
	<400> 11	
[0004]	ggcaacccat gacaatccca	20
	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> 内参上游引物	
	<400> 12	
	tgacttcaac agcgacaccc a	21
	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	

	<223> 内参下游引物	
	<400> 13	
	caccctgttg ctgtagccaa a	21
	<210> 14	
	<211> 51	
[0005]	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> shRNA	
	<400> 14	
	guacuugcag ucauccauua auucaagaga uuaauggaug acugcaagua c	51

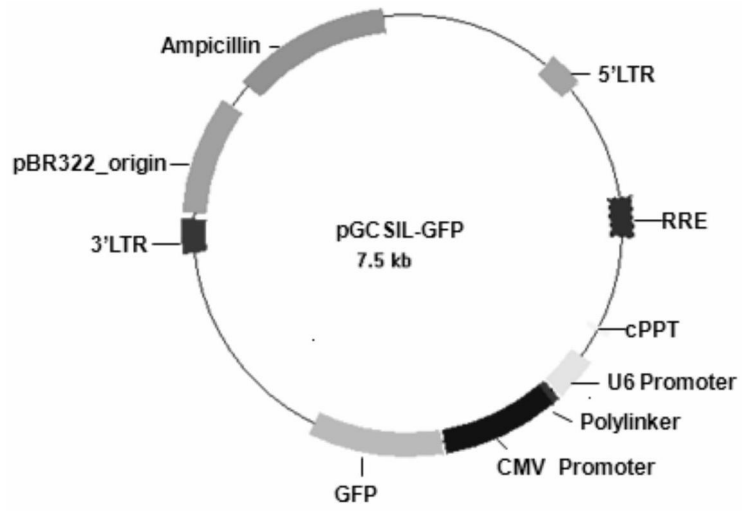


图1

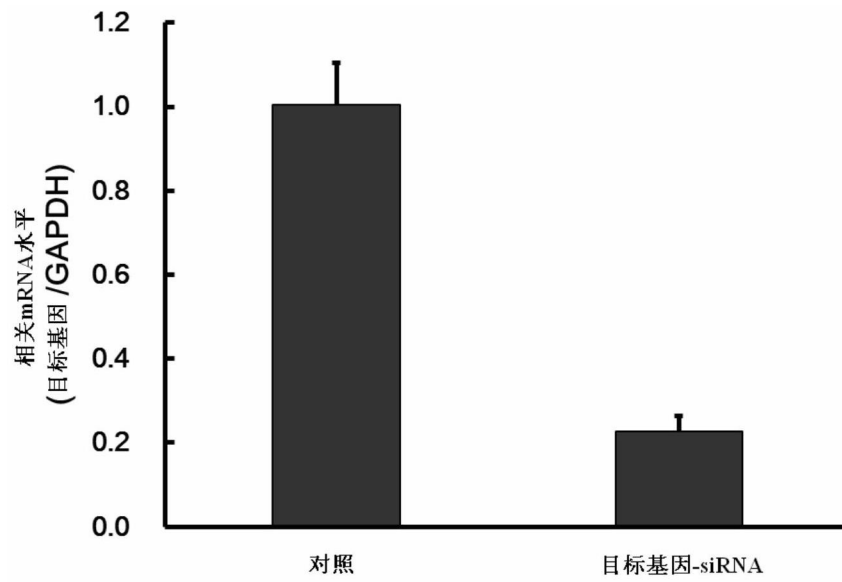


图2

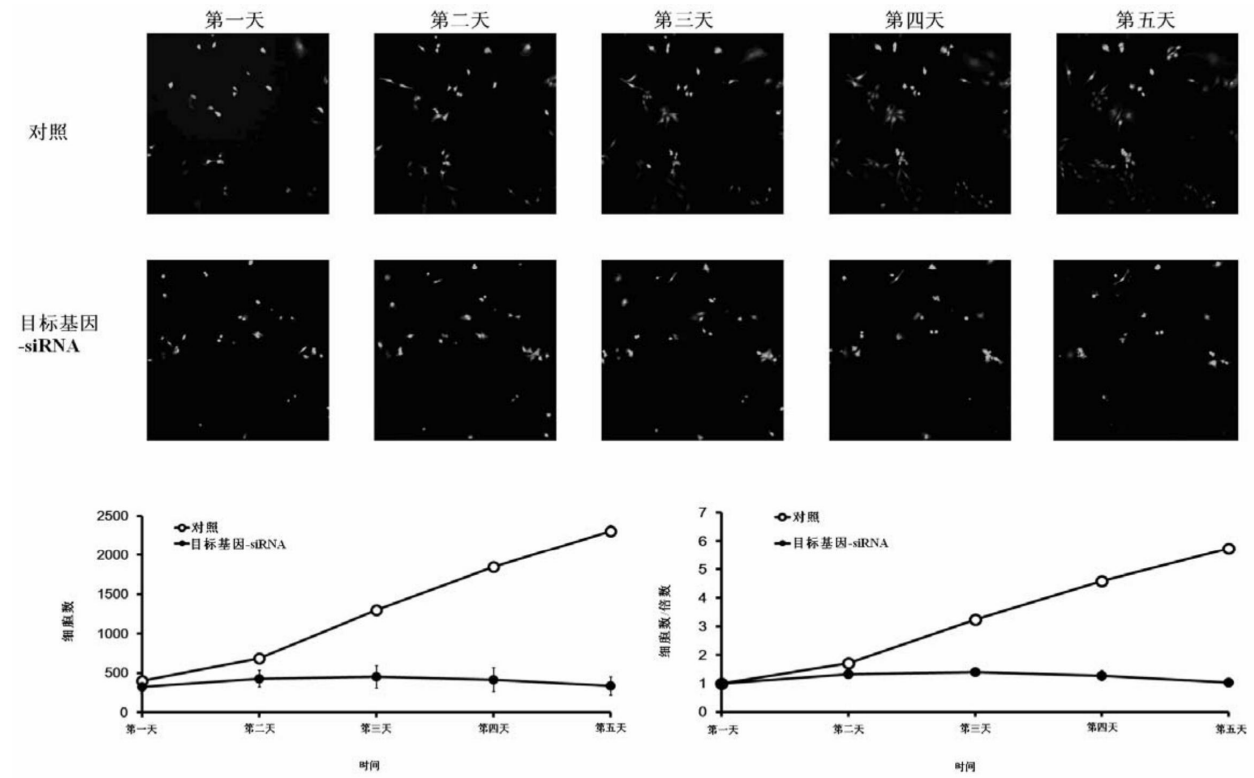


图3