



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117778474 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 29

(21) 申请号 202410024447.6

(22) 申请日 2024.01.08

(71) 申请人 金陵科技学院

地址 210000 江苏省南京市江宁区弘景大道99号

(72) 发明人 戴薇 陈俊红 商梦艳 王颖 戴鼎震

(74) 专利代理机构 江苏圣典律师事务所 32237 专利代理师 肖明芳

(51) Int. Cl.

C12N 15/864 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 9/22 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

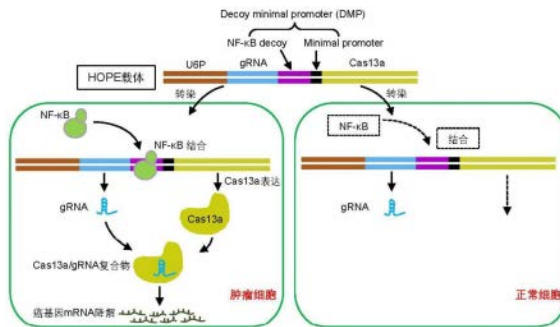
权利要求书1页 说明书13页 序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

一种基于CRISPR-Cas13a靶向敲低癌基因的表达载体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种基于CRISPR-Cas13a的新型HOPE骨架表达载体及其在结肠癌基因治疗中的应用。HOPE骨架表达载体由NF-κB特异性启动子DMP控制Cas13a的表达,由U6启动子控制gRNA的表达;Cas13a蛋白在gRNA引导下结合并靶向切割特定基因的mRNA,导致靶向基因的表达受到抑制。本发明以内源性癌基因为靶向基因,构建的新型HOPE表达载体可靶向敲低肿瘤细胞中的癌基因表达,进而诱导肿瘤细胞凋亡,但不影响正常细胞的生长;本发明将新型HOPE表达载体制备成新型癌症基因治疗试剂,应用于体内结肠癌基因治疗。



1. 一种基于CRISPR-Cas13a的表达载体,其特征在于,由DMP启动子控制Cas13a表达,由U6启动子控制gRNA表达;所述的Cas13a连接在gRNA下游;其中,所述的gRNA,其靶向基因为TERT、PLK1、MYC和KRAS四种基因中的任意一种或多种的组合。
2. 根据权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述的靶向基因为TERT、PLK1、MYC和KRAS四种基因的组合。
3. 根据权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述的gRNA包含靶向基因mRNA的28bp序列和两个侧翼BbsI酶切位点。
4. 根据权利要求3所述的表达载体,其特征在于,所述的28bp序列如SEQ ID NO.1-8所示的任意一种。
5. 根据权利要求2所述的表达载体,其特征在于,所述的gRNA序列包含如SEQ ID NO.9-10所示的任意一种。
6. 权利要求1-5任意一项所述的表达载体在制备结肠癌基因治疗试剂中的应用。
7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述的表达载体包装进腺相关病毒载体中。
8. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述的结肠癌基因治疗试剂用于皮下注射、腹腔注射或静脉注射注入体内,抑制体内肿瘤生长。

一种基于CRISPR-Cas13a靶向敲低癌基因的表达载体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及癌症基因治疗生物技术领域,具体涉及基于CRISPR-Cas13a靶向敲低癌基因的HOPE表达载体及其在抑制癌细胞生长和结肠癌基因治疗中的应用。

背景技术

[0002] 癌症是全球范围内困扰人类健康、威胁人类生命的重大疾病。据国际癌症研究机构(IARC)最新数据显示,2020年全球新发癌症病例1,929万例,癌症死亡病例996万例。预计到本世纪末,癌症将超过心血管疾病,成为全球头号“杀手”,也是阻碍人类预期寿命延长的最大“拦路虎”。统计显示,我国癌症发病率和死亡率均位居全球第一,癌症严重威胁着国民生命和健康。传统的手术切除、放疗和化疗已普遍用于癌症临床治疗,但治疗效果还与病人对于生命和健康的期望有一定差距。近年来,癌症免疫疗法成为癌症治疗的前沿技术,其治疗的关键是要找到在肿瘤细胞表面表达的抗原,患者体内肿瘤抗原越多,治疗效果越好。正因如此,目前应用最广泛且有效的PD-1/PD-L1免疫检查点抑制剂药物,临床总体应答率仅为20%~30%;CTLA-4抑制剂的长期响应率稳定在23%左右。此外,肿瘤抗原对于CAR-T细胞疗法更为重要,由于这类可利用的抗原极其有限,且大多数在正常细胞上也有少量表达(如CD19),导致CAR-T疗法应用时会攻击正常细胞,引起神经毒性或免疫反应。因此,在人类可治愈癌症之前,探索新的癌症治疗技术,提高癌症治疗效果,将始终是科学界和医学界努力的方向。

[0003] 随着基因组学的快速发展,特别是人类基因组计划完成,功能基因组学已成为生命科学的研究重点,其研究的中心课题之一就是基因表达调控。得益于此,基因治疗(gene therapy)打了一场翻身仗,实现了半个世纪前人们对它的期望,目前已被用于多种疾病治疗领域,尤其是罕见病和恶性肿瘤。CAR-T细胞疗法实质也是一种离体肿瘤基因治疗。必须指出,任何将病人细胞分离出来,进行体外培养、遗传操作之后,再回输到病人体内的治疗方案,都存在一定风险,尤其是体外遗传操作风险。目前,在体肿瘤基因治疗主要有溶瘤病毒、反义寡核苷酸和自杀基因疗法。不论何种疗法,特异性是肿瘤治疗成功与否的关键,即效应基因在肿瘤细胞中特异性表达,杀伤肿瘤细胞的同时不损伤正常细胞。正因如此,以瘤内注射为主的溶瘤病毒制约了临床应用范围,因为系统性给药易引起全身扩散,导致非靶向性感染;反义寡核苷酸由于不易靶向到肿瘤部位,会带来脱靶毒性,尚未有用于肿瘤治疗的该药物上市;自杀基因转移至肿瘤组织的效率相对较低,其治疗效果很大程度上取决于旁观者效应。特异性仍是肿瘤治疗面临的巨大挑战。

[0004] 研究发现,NF- κ B是一种序列特异性DNA结合型转录因子(transcription factor, TF),与特定DNA序列即 κ B位点结合,是其调控靶基因转录、炎症反应、免疫应答等生物学过程的关键。现已证实,NF- κ B还是一种重要的炎症相关转录因子,可调控炎症介质的表达,而炎症和癌症关系密切,慢性炎症持续存在的发展结局往往就是癌症,例如慢性肝炎引发肝癌。目前,大量科学研究和临床样本检测分析已证实,NF- κ B活性在几乎所有类型肿瘤中被

广泛激活,被视为一种优良的肿瘤治疗靶点。过去几十年间,开发了无数的NF- κ B活性抑制剂用于治疗肿瘤。然而,NF- κ B还是一把“双刃剑”,NF- κ B靶向的肿瘤治疗策略由于肿瘤细胞特异性不强,会造成其活性的过度抑制,产生较严重的毒副作用,目前无一例NF- κ B活性抑制剂成为临床治疗肿瘤的药物。

[0005] 是否可以转换思路,由抑制NF- κ B活性转变为利用?基于此,发明人前期利用NF- κ B的活性,结合CRISPR-Cas9技术,构建了一种肿瘤细胞特异性NF- κ B激活的基因表达(NF- κ B-activated gene expression,Nage)载体,用于体内癌症基因治疗。Nage载体以5个高亲和力的 κ B位点作为NF- κ B诱骗子(decoy),与最小启动子(minimal promoter)融合形成NF- κ B特异性启动子DMP(decoy minimal promoter)。Nage载体导入细胞后,肿瘤细胞中高度活化的NF- κ B识别并与 κ B位点结合,启动最小启动子,激活外源效应基因Cas9表达,产生Cas9蛋白,与端粒靶向sgRNA形成Cas9/sgRNA复合物,靶向切割肿瘤细胞染色体末端的端粒,造成端粒DNA损伤,诱导肿瘤细胞凋亡。而在正常细胞中,由于NF- κ B表达水平较低,无法识别并与 κ B位点结合,无法启动Cas9基因表达,Nage载体对正常细胞不产生影响。实验证实,Nage载体特异性杀伤多种肿瘤细胞(HepG2、HeLa、PANC-1、A549、MDA-MB-453、SKOV-3、Hepa1-6和RAW264.7等),而不损伤正常细胞(293T、MRC-5和HL7702);荷载Nage的AAV经尾静脉注射给药,有效抑制肝癌荷瘤裸鼠模型体内的肿瘤生长,无毒副作用。

[0006] CRISPR是近年来快速发展的新技术。“CRISPR之父”张锋2016年报道了一种RNA介导的RNA靶向CRISPR相关蛋白Cas13a,亦称C2c2。同年,“CRISPR女神”Jennifer Doudna提出,Cas13a在crRNA介导下切割靶RNA之后可能会继续爆发性地切割非靶RNA,这种“侧向切割”活性可用于RNA检测。值得注意的是,Cas13a在细胞中没有侧向切割活性,仅保留了高度特异性的RNA靶向切割功能。研究证实,LwaCas13a可在哺乳动物和植物细胞中异源表达,并在向导RNA(guide RNA,gRNA)引导下有效敲低报告基因和内源基因mRNA的表达,敲低效率与RNAi技术相当。此外,LwaCas13a的敲低功能显著降低了脱靶效率,为癌症等人类疾病的基因治疗提供了更灵活的平台。与CRISPR-Cas9 DNA编辑技术不同,CRISPR-Cas13a RNA编辑技术不需要同源指导修复机制,不需要靶位点上的PAM序列,更加灵活;可以自己加工成熟gRNA,更加先进;可以同时靶向多个基因以及单个基因的不同转录本,更加高效。最为重要的是,RNA编辑不涉及编码基因DNA序列的改变(DNA碱基改变后不可逆),而是对基因转录产物(mRNA)进行编辑,时间上和效率上更加可控,安全性更好,更容易被大众接受。这些优势使得CRISPR-Cas13a技术在疾病基因治疗领域具有广阔的应用前景,有望成为CRISPR-Cas9之后下一代生物技术的核心。

发明内容

[0007] 发明目的:本发明所要解决的技术问题是针对现有技术中CRISPR-Cas13a表达载体的不足,提供一种基于CRISPR-Cas13a的靶向敲低癌基因骨架表达载体,运用骨架表达载体可以制备靶向敲低癌细胞中致癌基因的表达载体,以抑制癌细胞的生长,并利用表达载体制备结肠癌基因治疗试剂。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明公开了一种基于CRISPR-Cas13a的骨架表达载体(HOPE),由DMP启动子控制Cas13a表达,由U6启动子控制gRNA表达。

[0009] 其中,所述骨架表达载体的功能元件为U6-gRNA-DMP-Cas13a。

[0010] 本发明的另一方面在于,所述的骨架表达载体可制备成靶向敲低癌基因的表达载体。所述的靶向敲低癌基因的表达载体由DMP启动子控制Cas13a表达,由U6启动子控制gRNA表达,所述Cas13a在gRNA下游。所述的gRNA,其靶向基因为TERT、PLK1、MYC、KRAS四种基因中的任意一种或多种的组合。优选地,所述的靶向基因为TERT、PLK1、MYC和KRAS四种基因的组合。所述的四种基因的组合为TPMK。

[0011] 其中,所述DMP启动子为一种NF- κ B特异性启动子,由NF- κ B诱骗子(decoy)序列和最小启动子(minimal promoter)序列构成,可以在NF- κ B活性高的肿瘤细胞中启动下游效应基因的表达,而在NF- κ B活性低的正常细胞中不发挥作用(参考中国专利申请号CN2018101638234)。

[0012] 其中,所述的U6启动子为一种RNA聚合酶III型启动子,是CRISPR-Cas13a RNA编辑载体系统中驱动gRNA转录的重要元件,可以激活gRNA在真核细胞中表达。

[0013] 其中,所述gRNA为一种向导RNA,可以结合并引导Cas13a。

[0014] 其中,所述gRNA包含靶向基因mRNA的28bp序列和两个侧翼BbsI酶切位点。

[0015] 其中,所述表达载体产生的gRNA可以同时靶向多个癌基因mRNA,此时28bp靶向基因序列串联间隔序列,形成靶向基因序列—间隔序列—靶向基因序列串联重复结构;该表达载体可以同时靶向敲低多个癌基因的表达,达到协同作用效果。

[0016] 其中,所述的表达载体的表达产物为Cas13a和gRNA;表达产生的Cas13a蛋白与gRNA可以形成Cas13a/gRNA复合物,在gRNA引导下Cas13a蛋白结合并切割靶向基因mRNA,导致靶向基因表达受到抑制。其中,所述的靶向基因TERT、PLK1、MYC、KRAS为与肿瘤发生发展密切相关的内源性致癌基因。

[0017] 其中,所述的靶向基因为人或小鼠的基因。

[0018] 其中,所述靶向基因TERT、PLK1、MYC和KRAS的mRNA的28bp序列分别如SEQ ID NO.1-8所示。其中序列SEQ ID NO.1-4分别为靶向人癌基因TERT、PLK1、MYC和KRAS mRNA的28bp序列,序列SEQ ID NO.5-8分别为靶向小鼠癌基因TERT、PLK1、MYC和KRAS mRNA的28bp序列。

[0019] 其中,所述的靶向TERT、PLK1、MYC、KRAS四种基因组合(TPMK)的gRNA序列包含如SEQ ID NO.9-10所示的任意一种。靶向四种人癌基因TERT、PLK1、MYC和KRAS(hTPMK)组合mRNA的gRNA序列包含序列SEQ ID NO.9,靶向四种小鼠癌基因TERT、PLK1、MYC和KRAS(mTPMK)组合mRNA的gRNA序列包含序列SEQ ID NO.10。

[0020] 本发明还公开了上述表达载体在制备结肠癌基因治疗试剂中的应用。

[0021] 其中,所述结肠癌基因治疗试剂应用于抑制结肠癌皮下移植瘤小鼠模型体内的肿瘤生长。

[0022] 其中,所述的表达载体可以包装进腺相关病毒(AAV)载体中。

[0023] 其中,所述的结肠癌基因治疗试剂用于皮下注射、腹腔注射或静脉注射等给药途径注入体内,达到抑制体内肿瘤生长的目的。

[0024] 有益效果:与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0025] (1)本发明利用先进的CRISPR-Cas13a RNA编辑技术,从转录水平有效抑制基因功能而不涉及编码基因序列的改变,避免引入基因突变带来遗传变异的风险,安全性高;同时靶向敲低一种或多种与癌症发生发展密切相关的癌基因表达,从源头诱导癌细胞凋亡,更

加高效;选择能在哺乳动物细胞中表达的Cas13a作为效应基因,可自己加工成熟gRNA,并且具有较高的基因敲低效率,显著降低了脱靶效率,具有广阔的应用前景。

[0026] (2) 本发明构建了一种基于CRISPR-Cas13a的HOPE通用骨架表达载体。HOPE骨架载体具有非常简单的结构,仅由U6、gRNA、DMP和Cas13a构成。但重要之处在于gRNA靶序列两端预留了BbsI酶切位点,一旦完成HOPE骨架表达载体(包括U6启动子、gRNA、DMP和Cas13a)的构建,当靶向不同基因时,仅需合成相应的两条寡核苷酸,退火后经BbsI酶切连接即可。

[0027] (3) 本发明以AAV作为基因递送载体。尽管具有诸多优势,AAV载体临床应用最大的限制性因素就是有限的病毒包装量(~4.7kb)。本发明使用CRISPR家族中较小的Cas13a蛋白,其编码序列约3.5kb,并且DMP、U6和gRNA编码序列较短,足以将靶向4种癌基因的HOPE表达载体包装进一个AAV,制备成单一剂型的癌症基因治疗试剂rAAV-HOPE。这种单一的重组AAV有利于增加单次给药量,比目前多种AAV组合的体内应用疗效更加显著。由于HOPE表达载体使用的DMP是一种弱启动子,有助于AAV载体发挥长期稳定的转基因表达功能,有利于Cas13a蛋白充分表达,最大限度地发挥其基因敲低功能。此外,新型癌症基因治疗试剂rAAV-HOPE仅需通过静脉注射给药即可完成治疗,是一种无创性的癌症基因治疗技术,避免了手术、放化疗、免疫治疗等具有一定损伤性、较繁琐的治疗过程,有助于提高癌症患者的生活质量。

[0028] 总之,本发明构建了一种HOPE骨架表达载体,由DMP启动子控制Cas13a表达,由U6启动子控制gRNA表达。运用该骨架表达载体可以制备靶向敲低癌基因的新型HOPE表达载体,以内源性癌基因TERT、PLK1、MYC和KRAS作为靶向基因,证明HOPE表达载体可以在肿瘤细胞中靶向敲低上述基因的表达,进而抑制肿瘤细胞生长,起到杀伤肿瘤细胞效应,而对正常细胞生长不产生影响。同时,本发明证明了将靶向上述癌基因的HOPE表达载体包装进AAV中,成功制备出新型癌症基因治疗试剂,通过尾静脉注射给药途径注入体内,有效抑制结肠癌皮下移植瘤小鼠模型体内的肿瘤生长,达到体内结肠癌基因治疗的目的,并且具有较好的生物安全性。因此,本发明公开的一种基于CRISPR-Cas13a靶向敲低癌基因的新型HOPE表达载体在制备新型癌症基因治疗试剂中具有潜在的应用价值。

附图说明

[0029] 下面结合附图和具体实施方式对本发明做更进一步的具体说明,本发明的上述和/或其他方面的优点将会变得更加清楚。

[0030] 图1为HOPE表达载体靶向敲低癌基因表达的原理示意图。decoy,诱骗子;minimal promoter,最小启动子;DMP,NF- κ B特异性启动子。

[0031] 图2为HOPE表达载体体外敲低报告基因。(A) HEK-293T细胞荧光显微镜图像。以表达绿色荧光蛋白的ZsGreen报告基因或表达红色荧光蛋白的mCherry报告基因作为靶向基因,构建相应的HOPE表达载体并转染HEK-293T细胞;Phase:明场下荧光显微镜图像;比例尺:50 μ m。(B) 荧光细胞计数。使用ImageJ 2 \times 软件(n=3张图像)对细胞荧光显微镜图像进行绿色荧光细胞和红色荧光细胞计数。(C) ZsGreen和mCherry靶向基因表达qPCR检测。相应的HOPE表达载体转染HEK-293T细胞24小时后,使用qPCR分别检测ZsGreen和mCherry靶向基因mRNA表达情况; $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$;RQ,相对数量。

[0032] 图3为HOPE表达载体体外杀伤肿瘤细胞。(A) 吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)染色后肿瘤

细胞荧光显微镜图像。Stain, A0/EB染色;比例尺:50 μ m。(B) 细胞计数。使用ImageJ 2 \times 软件(n=3张图像)对A0/EB染色后的肿瘤细胞荧光显微镜图像进行细胞计数。(C) 吖啶橙/溴化乙锭(A0/EB)染色后正常细胞荧光显微镜图像。Stain, A0/EB染色;比例尺:50 μ m。(D) 细胞计数。使用ImageJ 2 \times 软件(n=3张图像)对A0/EB染色后的正常细胞荧光显微镜图像进行细胞计数。

[0033] 图4为HOPE表达载体体外杀伤结肠癌细胞。(A) 吖啶橙/溴化乙锭(A0/EB)染色后CT-26细胞/HT-29细胞荧光显微镜图像。比例尺:50 μ m。(B) 细胞计数。靶向敲低癌基因的HOPE表达载体转染CT-26和HT-29细胞24小时、48小时、72小时后,进行A0/EB染色,使用ImageJ 2 \times 软件(n=3张图像)对染色后的细胞荧光显微镜图像进行细胞计数。(C) CCK-8细胞活力检测。靶向敲低癌基因的HOPE表达载体转染CT-26和HT-29细胞0小时、24小时、48小时、72小时后,使用CCK-8试剂(n=3孔)进行细胞活力检测。(D) 靶向基因表达qPCR检测。靶向敲低癌基因的HOPE表达载体转染CT-26和HT-29细胞24小时后,使用qPCR检测TERT、PLK1、MYC和KRAS靶向基因mRNA表达情况; $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$;RQ,相对数量。

[0034] 图5为HOPE癌症基因治疗试剂体内结肠癌基因治疗。(A) CT-26细胞结肠癌皮下移植瘤小鼠模型构建及治疗示意图。CT-26细胞经皮下注射(s.c.)建立结肠癌皮下移植瘤小鼠模型;成瘤小鼠随机分为5组,分别用PBS(n=8)以及新型HOPE癌症基因治疗试剂rAAV-HOPE-mPLK1(n=8)、rAAV-HOPE-mMYC(n=8)、rAAV-HOPE-mKRAS(n=8)和rAAV-HOPE-mTPMK(n=8)经尾静脉注射(i.v.)给药途径治疗结肠癌小鼠。(B) 成瘤结肠癌小鼠模型的体重随时间变化。(C) 成瘤结肠癌小鼠模型的肿瘤体积随时间变化。(D) PBS对照组和rAAV-HOPE治疗组结肠癌小鼠的相应肿瘤图像。(E) PBS对照组和rAAV-HOPE治疗组结肠癌小鼠的肿瘤体积。(F) PBS对照组和rAAV-HOPE治疗组结肠癌小鼠的肿瘤重量。(G) PBS对照组和rAAV-HOPE治疗组结肠癌小鼠的相应脾脏图像。(H) PBS对照组和rAAV-HOPE治疗组结肠癌小鼠的脾脏重量。(I) 肾功能UREA、CREA和UA血清生化指标检测。(J) 肝功能ALP、ALT、AST和 γ -GT血清生化指标检测。

具体实施方式

[0035] 下面通过具体的实施例详细说明本发明。

[0036] 实施例

[0037] 一种基于CRISPR-Cas13a靶向敲低癌基因的表达载体及其应用

[0038] 1. 材料和方法

[0039] 1.1 质粒载体的构建

[0040] 通过化学合成NF- κ B特异性启动子DMP,包含五个NF- κ B高亲和力位点(GGGAATTTCC GGACTTTCC GGAATTTCC GGACTTTCC GGAATTTCC)和一个最小启动子序列(TAGAGGGTATA),通过PCR方法扩增出带有酶切位点的DMP序列,使用EcoRI和BamHI双酶切克隆到pAAV-MCS载体中,以生成pAAV-DMP载体。化学合成U6启动子序列和gRNA序列(U6-gRNA),在gRNA序列两端添加BbsI二型限制性内切酶酶切位点,使用MIuI和EcoRI双酶切将U6-gRNA克隆到pAAV-DMP载体中DMP上游,以生成pAAV-U6-gRNA-DMP载体。通过PCR方法从pET-His6-TwinStrep-SUMO-LwCas13a载体中扩增出带有酶切位点的Cas13a编码序列,使用BamHI和SalI双酶切将Cas13a克隆到pAAV-U6-gRNA-DMP载体中DMP下游,以生成靶向敲低癌基因(high-

specificity oncogene prevention element,HOPE)的pAAV-U6-gRNA-DMP-Cas13a骨架表达载体(简称pHOPE,图1为HOPE骨架表达载体功能元件示意图)。表1中列出了用于构建pHOPE骨架表达载体的引物序列。

[0041] 表1用于构建pHOPE骨架载体的寡核苷酸序列

名称	序列 (5'-3')
DMP EF SEQ11	CCGGAATTCGGCCTAACTGGCCGGTACCGGGAATTC
DMP BR SEQ12	CGCGGATCCCTGGAAGTCGAGCTTCCATTATATACCC
[0042] Cas13a BF SEQ13	CGCGGATCCGCCACCATGCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCATGAAAGTGAC CAAGGTCGACGGCATC
Cas13a SR SEQ14	ACGCGTCGACTCACTTTTTCTTTTTTGCCTGGCCGGCCTTTTTTCGTGGCCGC CGGCCTTTTTTCCAGGGCCTTGTAC

[0043] 注:下划线部分表示酶切位点。

[0044] 使用CHOPCHOP在线软件(<http://chopchop.cbu.uib.no/>)设计靶向NT(无转录本,对照)、靶向报告基因ZsGreen、mCherry以及靶向人和小鼠内源性致癌基因TERT、PLK1、MYC和KRAS的gRNA。化学合成28bp包含靶向基因mRNA的gRNA互补寡核苷酸,在寡核苷酸两侧添加BbsI二型限制性内切酶的酶切位点(所述的靶向基因TERT、PLK1、MYC和KRAS的28bp序列如SEQ ID NO.1-8所示),退火形成双链寡核苷酸,通过Golden-Gate方法将其连接到pHOPE骨架表达载体中。连接反应包括10单位的BbsI酶(NEB)、1000单位的T4 DNA连接酶(NEB)、1μL的10×T4 DNA连接酶缓冲液(NEB)、1μL的0.1mg/mL牛血清白蛋白(BSA)、1nM的双链寡核苷酸、50ng的pHOPE骨架表达质粒,补充无核酸酶的ddH₂O至10μL。连接反应在PCR仪上进行:37℃5min和16℃10min进行10个循环,然后37℃30min,80℃5min。产生的pHOPE表达载体质粒分别命名为:pHOPE-NT、pHOPE-ZsGreen、pHOPE-mCherry、pHOPE-hTERT、pHOPE-hPLK1、pHOPE-hMYC、pHOPE-hKRAS、pHOPE-mTERT、pHOPE-mPLK1、pHOPE-mMYC、pHOPE-mKRAS。此外,构建了同时靶向人和小鼠TERT、PLK1、MYC和KRAS四种癌基因的pHOPE表达载体质粒(所述的靶向四种基因组合TPMK的gRNA序列包含如SEQ ID NO.9-10所示的序列),分别命名为:pHOPE-hTPMK和pHOPE-mTPMK。表2列出了用于构建包含靶向基因mRNA的28bp序列的gRNA寡核苷酸。

[0045] 表2用于构建包含靶向基因mRNA的28bp序列的gRNA寡核苷酸

名称	序列 (5'→3')
NT-gF SEQ15	AGGAAGACTAAAACCTAGATTGCTGTTCTACCAAGTAATCCATTTTTGCGTCT TCGA
[0046] NT-gR SEQ16	TCGAAGACGCAAAAATGGATTACTTGGTAGAACAGCAATCTAGTTTTAGTCTTC CT
ZsGreen-gF SEQ17	AGGAAGACTAAAACCTGTTGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGCCTTTTTGCGTCT TCGA

ZsGreen-gR SEQ18	TCGAAGACGCAAAAAGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGGTTTTAGTCTT CCT
mCherry-gF SEQ19	AGGAAGACTAAAACCCCTCGAAGTTCATCACGCGCTCCCACCTTTTTTGCCTCT TCGA
mCherry-gR SEQ20	TCGAAGACGCAAAAAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGGTTTTAGTCTT CCT
hTERT-gF SEQ21	AGGAAGACTAAAACCGCGAGTTTCAGGCAGCGCTGCGTCTCTGTTTTGCGTC TTCGA
hTERT-gR SEQ22	TCGAAGACGCAAAACAGGACGCAGCGCTGCCTGAAACTCGCGGTTTTAGTCTT CCT
hPLK1-gF SEQ23	AGGAAGACTAAAACCTATGCACATTAACAGATGTGAATATCTTTTTGCGTCT TCGA
hPLK1-gR SEQ24	TCGAAGACGCAAAAAGAATATTCACATCTGTTTAATGTGCATAGTTTTAGTCTTCC T
hMYC-gF SEQ25	AGGAAGACTAAAACCAAATATATCATTGAGCCAAATCTTAAGTTTTGCGTCT TCGA
hMYC-gR SEQ26	TCGAAGACGCAAAACTTAAGATTTGGCTCAATGATATAATTTGGTTTTAGTCTTCC T
hKRAS-gF SEQ27	AGGAAGACTAAAACCTATAAAAAGAAAAAAATGGAAAAAAATTTTTGCGTC TTCGA
hKRAS-gR SEQ28	TCGAAGACGCAAAAATTTTTTCCATTTTTTCTTTTTATAGTTTTAGTCTTCCCT
[0047] hTPMK-gF SEQ29	AGGAAGACTAAAACCGCGAGTTTCAGGCAGCGCTGCGTCTGGAAACACC GATTTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAACCTATGCACATTAACA GATGTGAATATTCGAAACACCGATTTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGAC TAAAACCAAATATATCATTGAGCCAAATCTTAAGGAAACACCGATTTAGAC TACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAACCTATAAAAAGAAAAAAATGGAAAA AAATTTTTGCGTCTTCGA
hTPMK-gR SEQ30	TCGAAGACGCAAAAATTTTTTCCATTTTTTCTTTTTATAGTTTTAGTCCCCTT CGTTTTTGGGGTAGTCTAAATCGGTGTTTCTTAAGATTTGGCTCAATGATATAT TTGGTTTTAGTCCCCTTCGTTTTTGGGGTAGTCTAAATCGGTGTTTCGAATATTC ACATCTGTTAATGTGCATAGTTTTAGTCCCCTTCGTTTTTGGGGTAGTCTAAAT CGGTGTTTCCAGGACGCAGCGCTGCCTGAAACTCGCGGTTTTAGTCTTCCCT
mTERT-gF SEQ31	AGGAAGACTAAAACCTCCCAGCCTCATCTTTTTTCGTCGTGGATTTTGCCTCT TCGA
mTERT-gR SEQ32	TCGAAGACGCAAAATCCACGACGAAAAAGATGAGGCTGGGAAGTTTTAGTCTT CCT
mPLK1-gF SEQ33	AGGAAGACTAAAACCGGCCCTTGTAACGTTCCCAGCGCCGCTTTTGCCTC TTCGA
mPLK1-gR SEQ34	TCGAAGACGCAAAAGCGGCGCTGGGAACGTTACAAGGGCCTGGTTTTAGTCTT CCT
mMYC-gF SEQ35	AGGAAGACTAAAACCGCCCTTATATTCCGGGGTCTGCGCGTTTTGCGTC TTCGA
mMYC-gR SEQ36	TCGAAGACGCAAAACGCGCAGACCCCGGAATATAAAGGGCGGTTTTAGTCTT

	<u>CCT</u>
mKRAS-gF SEQ37	AGGAAGACTAAAAC TGGAAAATGTTGAAATCCATT CAGTTTCTTTTGC GTCT TCGA
mKRAS-gR SEQ38	TCGAAGACGCAAAAGAA ACTGAATGGATT TCAACATTTCCAGTTT TAGTCTTC CT
mTPMK-gF SEQ39	AGGAAGACTAAAAC TCCCAGCCTCATCTTTTTCGTCGTGGAGAAACACCG ATTTAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAAC CAGGCCCTTGTAACGT TCCCAGCGCCGCGAAACACCGATT TAGACTACCCCAAAAACGAAGGGGACT AAAACCGCCCTTTATAT TCCGGGGGTCTGCGCGGAAACACCGATT TAGACT ACCCCAAAAACGAAGGGGACTAAAAC TGGAAAATGTTGAAATCCATT CAGT TTCTTTTGCCTTCGA
[0048]	
mTPMK-gR SEQ40	TCGAAGACGCAAAAGAA ACTGAATGGATT TCAACATTTCCAGTTT TAGTCCC CTTCGTTTTTGGGGTAGTCTAAATCGGTGTTTCCGCGCAGACCCCGGAATAT AAAGGGCGGTTTTAGTCCCTTCGTTTTTGGGGTAGTCTAAATCGGTGTTTCGC GGCGCTGGGAACGTTACAAGGGCCTGGTTTTAGTCCCTTCGTTTTTGGGGTA GTCTAAATCGGTGTTTCTCCACGACGAAAAAGATGAGGCTGGGAAGTTTTAGT CTTCCT

[0049] 注：下划线部分表示BbsI二型限制性内切酶的酶切位点；加粗部分表示化学合成的靶向基因mRNA的28bp序列；h,人；m,小鼠。

[0050] 1.2细胞培养

[0051] 所用癌细胞系包括SiHa(人宫颈癌细胞)、BGC823(人胃癌细胞)、A549(人非小细胞肺癌细胞)、HT-29(人结肠癌细胞)和CT-26(小鼠结肠癌细胞),所用正常细胞系包括HL7702(人正常肝脏细胞)、GES-1(人胃黏膜上皮细胞)、MRC-5(人胚肺成纤维细胞)和HEK-293T(人胎肾细胞)。上述细胞均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。其中, SiHa、BGC823和HEK-293T细胞使用高糖Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)培养基(购于赛默飞世尔科技公司Gbico培养基)培养; A549、HT-29、CT-26、HL7702和GES-1细胞使用Roswell Park Memorial Institute(RPMI)1640培养基(购于赛默飞世尔科技公司Gbico培养基)培养; MRC-5细胞使用Minimum Essential Medium(MEM)培养基(购于赛默飞世尔科技公司Gbico培养基)培养。DMEM、RPMI1640和MEM培养基均添加10%胎牛血清(FBS)(购于YEASEN翌生生物科技(上海)股份有限公司)、100单位/mL青霉素和100μg/mL链霉素(购于生工生物工程(上海)股份有限公司),所有细胞置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养至细胞汇合度85%以上。

[0052] 1.3细胞转染

[0053] 将SiHa、BGC823、A549、HL7702、GES-1、MRC-5、CT-26、HT-29和HEK-293T细胞以1×10⁵细胞/孔的密度接种到24孔细胞培养板中37℃过夜培养16~18h。次日,按照说明书,使用Lipofectamine[®]2000(ThermoFisher)脂质体转染500ng质粒。具体转染步骤如下:细胞使用500μL Opti-MEM[®]减血清培养基(ThermoFisher)在37℃、5%CO₂培养箱中培养30分钟,分别准备含有500ng质粒的50μL Opti-MEM培养基储备液和含有2μL Lipofectamine[®]2000脂质体的50μL Opti-MEM培养基储备液;两种储备液室温分别孵育5分钟后,将Opti-MEM/Lipofectamine储备液滴加到Opti-MEM/质粒储备液中,混匀,室温孵育20分钟;最后,将Opti-MEM/Lipofectamine/质粒混合物溶液分别滴加到相应细胞孔中。培养4小时后,每孔

更换为500 μ L含10%FBS的DMEM、RPMI 1640或MEM培养基。转染24小时后,用PBS(pH=7.4)洗涤细胞,再根据说明书用吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)对细胞进行染色,随后用荧光显微镜(Olympus)观察细胞并拍照,用ImageJ \times 软件对细胞进行计数。

[0054] 1.4细胞活力测定

[0055] 将CT-26和HT-29细胞以 5×10^3 细胞/孔的密度接种到96孔细胞培养板中37 $^{\circ}$ C过夜培养16~18h。次日,按照说明书,使用Lipofectamine[®]2000脂质体转染100ng质粒。转染4小时后,每孔更换为100 μ L含10%FBS的DMEM或RPMI 1640培养基。转染0小时、24小时、48小时、72小时后,每孔加入10 μ L Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂,细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中继续培养1小时,使用酶标仪在450nm处测量每孔的吸光度(A450)。未转染的细胞视为空白孔,细胞活力百分比(%)计算如下:细胞活力(%)=[A450(处理孔)-A450(空白孔)]/[A450(对照孔)-A450(空白孔)] \times 100%。

[0056] 1.5靶向基因qPCR检测

[0057] 将CT-26和HT-29细胞以 1.5×10^6 细胞/孔的密度接种到6孔细胞培养板中37 $^{\circ}$ C过夜培养16~18h。次日,按照说明书,使用Lipofectamine[®]2000脂质体转染2500ng质粒。转染24小时后,按照说明书使用Trizol[®](Invitrogen)试剂提取细胞总RNA,并测定RNA浓度。使用Hifair[®]V one step RT-gDNA digestion SuperMix for qPCR(YEASEN)试剂按照说明书将500ng总RNA反转录为cDNA。使用Analytic Jena(qTOWER3 G)仪器对靶向基因TERT、PLK1、MYC和KRAS的mRNA表达水平进行qPCR检测。qPCR反应体系为(20 μ L):10 μ L HieffUNICON[®] Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix(2 \times)(YEASEN)、上下游引物各0.2 μ M、2 μ L cDNA,补充无核酸酶ddH₂O至20 μ L。qPCR反应程序如下:95 $^{\circ}$ C 2min,95 $^{\circ}$ C 10s,60 $^{\circ}$ C 30s,45个循环,并使用仪器自带熔解曲线扩增程序。熔解曲线分析显示单一PCR产物,根据仪器软件计算Ct值,通过减去GAPDH获得的Ct值来标准化检测样品的Ct值。mRNA表达水平计算为相对量(RQ), $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$,其中 $\Delta Ct_{target} = Ct_{target} - Ct_{GAPDH}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{treatment} - \Delta Ct_{control}$ 。每个样本的qPCR检测至少进行三次技术性重复。表3列出了用于qPCR检测所用引物,qPCR检测TPMK表达水平所用引物为TERT、PLK1、MYC、KRAS中任意一种基因qPCR检测所用引物。

[0058] 表3用于qPCR检测所用引物

Name	Sequences (5'-3')	Name	Sequences (5'-3')
hGAPDH-qF	ATTTGGTCGTATTGGGCG	hGAPDH-qR	CTCGCTCCTGGAAGATGG
hTERT-qF	GGCACGGCTTTTGTTTCAGATG	hTERT-qR	GCTGTTACCTGCAAATCCA
hPLK1-qF	CAAGTGGGTGGACTATTCGG	hPLK1-qR	CAGGCTGTCACCATCATTGT
hMYC-qF	ACAGCAAACCTCCTCACAG	hMYC-qR	TGTCCAACCTTGACCCTCTT
[0059] hKRAS-qF	TAGCAAGAAGTTATGGAA	hKRAS-qR	AATCTGTATTGTCGGATC
mGAPDH-qF	TCACCACCATGGAGAAGGC	mGAPDH-qR	GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA
mTERT-qF	TCTACCGCACTTTGGTTGCC	mTERT-qR	CAGCACGTTTCTCTCGTTGC
mPLK1-qF	CCCTATTACCTGCCTCACC	mPLK1-qR	CAATGGCCTCATTGTCTC
mMYC-qF	TGTATGTGGAGCGGTTTCT	mMYC-qR	GCTGTGCTTGAGCGGGTA
mKRAS-qF	GTGGATGAGTACGACCCT	mKRAS-qR	CTCTCTTGACCTGCTGT

[0060] 注:h,人;m,小鼠。

[0061] 1.6rAAV的制备

[0062] HEK-293T细胞以 5×10^6 细胞/瓶的密度接种于75cm²细胞培养瓶中37 $^{\circ}$ C过夜培养16

~ 18h。次日,按照说明书,使用Lipofectamine[®] 2000脂质体共转染4 μ g pAAV-RC (Stratagene) 质粒、4 μ g pAAV-Helper (Stratagene) 质粒和4 μ g pHOPE质粒(包括pHOPE-NT、pHOPE-mTERT、pHOPE-mPLK1、pHOPE-mMYC、pHOPE-mKRAS和pHOPE-mTPMK)。HEK-293T细胞转染72小时后,使用AAVpro[®] Purification Kit Maxi (TaKaRa) 试剂盒按照说明书纯化并浓缩病毒。最终的重组AAV (rAAV) 产物分别命名为:rAAV-HOPE-NT、rAAV-HOPE-mTERT、rAAV-HOPE-mPLK1、rAAV-HOPE-mMYC、rAAV-HOPE-mKRAS和rAAV-HOPE-mTPMK。

[0063] 1.7动物实验

[0064] 动物实验遵循江苏省科学技术厅依据中国实验动物法(2017)授权的项目许可证(SYXK(su) 2023-0021)要求的准则和道德规范,并经金陵科技学院(中国南京)动物保护委员会批准。

[0065] 所使用体重18-22g的4周龄雌性BALB/c小鼠购自常州卡文斯实验动物有限公司(中国),所有小鼠均饲养在特定的无菌条件下。每只小鼠左侧大腿腹股沟皮下移植 1×10^6 CT-26细胞,建立CT-26皮下移植瘤结肠癌小鼠模型。小鼠饲养8天后成瘤,将荷瘤成功的小鼠随机分为五组,每组8只,尾静脉分别注射PBS以及 1×10^{10} vg的rAAV-HOPE,包括rAAV-HOPE-mPLK1、rAAV-HOPE-mMYC、rAAV-HOPE-mKRAS和rAAV-HOPE-mTPMK,每间隔一天尾静脉重复注射,共注射三次。每隔一天测量小鼠体重和肿瘤大小。肿瘤体积(V)按如下公式计算: $V = (Dd^2)/2$,其中D和d分别代表肿瘤的长轴和短轴。第一次病毒注射后第14天,对小鼠实施安乐死并拍照。收集每只小鼠的肿瘤和脾脏,称重并拍照。采集小鼠血液和血清样本送至武汉塞维尔生物科技有限公司进行血常规检查和血清生化指标检测,包括丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、 γ -谷氨酰转氨酶(γ -GT)用于肝功能检查,尿素(UREA)、肌酐(CREA)尿酸(UA)用于肾功能检查。

[0066] 1.8数据统计分析

[0067] 数据表示为平均值 \pm 标准差(SD)。通过双尾未配对学生t检验分析两组数据之间的统计显著性。通过单向或双向方差分析(ANOVA)以及Tukey校正对三组或更多组数据进行比较。 $p < 0.05$ 的差异被认为具有统计显著性。

[0068] 2. 结果与分析

[0069] 2.1HOPE表达载体靶向敲低癌基因的原理

[0070] 鉴于现有CRISPR-Cas13a表达载体的不足,本发明构建了一种基于CRISPR-Cas13a靶向敲低癌基因的新型HOPE骨架表达载体(图1),该表达载体可以同时由NF- κ B特异性启动子DMP控制Cas13a表达、U6启动子控制gRNA表达。DMP启动子由5个NF- κ B高亲和力结合位点(称为诱骗子decoy)和最小启动子(minimal promoter)组成。众所周知,NF- κ B是一种序列特异性DNA结合型转录因子,在几乎所有肿瘤细胞或肿瘤组织中过度活化。因此,当HOPE骨架表达载体转染到NF- κ B高度活化的肿瘤细胞时,过度激活的NF- κ B会与decoy结合,激活Cas13a的表达,产生Cas13a蛋白;Cas13a蛋白与gRNA结合生成Cas13a/gRNA复合物,该复合物可以结合并切割靶向基因mRNA,抑制靶向基因的表达。以内源性癌基因作为靶向基因,构建新型HOPE表达载体,可以靶向敲低肿瘤细胞中的癌基因mRNA,导致肿瘤细胞凋亡。相比之下,当HOPE表达载体转染到NF- κ B活性较低的正常细胞时,由于缺乏NF- κ B,无法与decoy结合,不会激活产生Cas13a蛋白和Cas13a/gRNA复合物,因此HOPE表达载体对正常细胞不产生影响。本发明以与肿瘤发生发展密切相关的4个高表达癌基因TERT、PLK1、MYC、KRAS作为靶

向基因,为了全面评估新型HOPE表达在细胞和动物中的作用效果,设计并制备了靶向人和小鼠TERT、PLK1、MYC和KRAS基因的gRNA,以及同时靶向4种癌基因(TPMK)的gRNA。

[0071] 2.2HOPE表达载体体外敲低报告基因

[0072] 为了评估HOPE表达载体体外基因敲低的靶向性和效率,以表达绿色荧光蛋白的报告基因ZsGreen和表达红色荧光蛋白的mCherry作为靶向基因,设计了靶向ZsGreen和mCherry基因的gRNA,并将其克隆到HOPE骨架表达载体中,构建pHOPE-ZsGreen和pHOPE-mCherry表达载体。选择前期研究证实具有NF- κ B活性的HEK-293T细胞,首先以ZsGreen作为靶向基因,以mCherry作为对照,将pZsGreen、pHOPE-ZsGreen、pmCherry和pHOPE-mCherry表达载体按照不同组合共转染HEK-293T细胞。荧光显微镜图像结果表明,如图2A所示,pHOPE-ZsGreen表达载体转染HEK-293T细胞24小时后显著敲低了报告基因ZsGreen的表达,降低了绿色荧光蛋白的表达,但是没有影响mCherry红色荧光蛋白的表达。类似地,再以mCherry作为靶向基因,以ZsGreen作为对照,将pZsGreen、pHOPE-ZsGreen、pmCherry和pHOPE-mCherry表达载体按照不同组合共转染HEK-293T细胞。荧光显微镜图像结果表明,pHOPE-mCherry表达载体转染HEK-293T细胞24小时后明显敲低了报告基因mCherry的表达,降低了红色荧光蛋白的表达,但是不影响ZsGreen绿色荧光蛋白的表达。进一步对ZsGreen和mCherry报告基因表达产生的绿色荧光细胞和红色荧光细胞进行计数。如图2B所示,结果表明,pHOPE-ZsGreen表达载体转染HEK-293T细胞后产生的绿色荧光细胞数量远低于对照组(pZsGreen)($p < 0.0001$)。相应地,pHOPE-mCherry表达载体转染HEK-293T细胞后产生的红色荧光细胞数量显著少于对照组(pmCherry)($p < 0.0001$) (图2B,图2B中每幅图的从左至右处理组与图例自上而下相对应)。此外,同时设计并制备了靶向哺乳动物细胞中无转录本(NT)的gRNA作为阴性对照,并将其克隆到HOPE骨架表达载体中以生成pHOPE-NT表达载体。结果发现,pHOPE-NT转染HEK-293T细胞后既不影响ZsGreen绿色荧光蛋白的表达,也不影响mCherry红色荧光蛋白的表达。

[0073] 随后使用qPCR方法在mRNA水平检测报告基因ZsGreen和mCherry的表达,进一步证实HOPE表达载体体外基因敲低的靶向性和效率。如图2C所示,结果表明,与pZsGreen转染对照组相比,pHOPE-ZsGreen表达载体转染HEK-293T细胞后显著敲低了ZsGreen报告基因的表达水平($p < 0.0001$);与pmCherry转染对照组相比,pHOPE-mCherry表达载体转染HEK-293T细胞后明显敲低了mCherry报告基因的表达水平($p < 0.0001$) (图2C)。上述结果与预期和现有研究结果一致,基于CRISPR-Cas13a的新型HOPE表达载体可以在RNA水平靶向敲低靶向基因的表达,并且具有较高的基因敲低效率。

[0074] 2.3HOPE表达载体体外杀伤肿瘤细胞

[0075] 为了评估HOPE表达载体是否能够有效敲低内源性癌基因的表达,进而诱导肿瘤细胞凋亡起到治疗肿瘤的目的,设计了靶向人TERT、PLK1、MYC、KRAS四种癌基因的gRNA,以及同时靶向四种癌基因组合(TPMK)的gRNA,并将其克隆到HOPE骨架表达载体中,分别生成pHOPE-hTERT、pHOPE-hPLK1、pHOPE-hMYC、pHOPE-hKRAS和pHOPE-hTPMK表达载体。上述HOPE表达载体分别转染NF- κ B过度活化的肿瘤细胞,包括SiHa、BGC823和A549,以及几乎没有NF- κ B活性的正常细胞,包括HL7702、GES-1和MRC-5,同时转染pHOPE-NT表达载体作为阴性对照。AO/EB染色结果显示,如图3A所示,与转染阴性对照pHOPE-NT表达载体相比,靶向TERT、PLK1、MYC、KRAS癌基因的HOPE表达载体转染后对肿瘤细胞SiHa、BGC823、A549均产生明显的

杀伤作用,具有较强的抗肿瘤效果,并且同时靶向4种癌基因的HOPE表达载体较靶向单一癌基因的HOPE表达载体具有更显著的杀伤肿瘤细胞效果。活细胞计数结果表明,如图3B所示,与转染阴性对照pHOPE-NT表达载体相比,靶向癌基因的新型HOPE表达载体转染后导致肿瘤细胞数量显著减少,转染24小时后,肿瘤细胞SiHa、BGC823和A549几乎没有活细胞存活,表明新型HOPE表达载体具有较强的抗肿瘤作用。值得注意的是,同时靶向四种癌基因的HOPE表达载体比靶向单一癌基因的HOPE表达载体产生更强的肿瘤细胞杀伤作用。

[0076] 此外,靶向TERT、PLK1、MYC、KRAS癌基因以及同时靶向四种癌基因组合TPMK的HOPE表达载体对正常细胞HL7702、GES-1和MRC-5的生长均不产生影响(图3C),细胞数量不发生明显变化(图3D);阴性对照表达载体pHOPE-NT对肿瘤细胞和正常细胞的生长均不产生影响。上述结果不仅证实了靶向癌基因的新型HOPE表达载体可以特异性的诱导肿瘤细胞死亡而对正常细胞不产生影响,而且表明HOPE表达载体具有较强的抗肿瘤效果,此外,靶向多种癌基因的HOPE表达载体较单一靶向癌基因的HOPE表达载体具有更显著的抗肿瘤效果。

[0077] 2.4HOPE表达载体体外杀伤结肠癌细胞

[0078] 为了探讨靶向癌基因的新型HOPE表达载体体外杀伤结肠癌细胞的效果,为研究体内结肠癌基因治疗奠定基础,以NF- κ B过度激活的小鼠结肠癌细胞CT-26和人结肠癌细胞HT-29为研究对象。分别用靶向小鼠和人的HOPE表达载体,包括pHOPE-NT、pHOPE-TERT、pHOPE-PLK1、pHOPE-MYC、pHOPE-KRAS和pHOPE-TPMK转染CT-26和HT-29细胞24小时至72小时。AO/EB染色结果表明,与转染阴性对照pHOPE-NT表达载体相比,靶向癌基因的HOPE表达载体转染CT-26和HT-29细胞后均产生明显的时间依赖性结肠癌细胞杀伤效果,并且同时靶向四种癌基因组合TPMK的HOPE表达载体杀伤结肠癌细胞的效果显著高于靶向单一癌基因的HOPE表达载体(图4A)。活细胞计数结果表明,与转染阴性对照pHOPE-NT表达载体相比,新型HOPE表达载体转染后导致结肠癌细胞数量显著减少,转染结肠癌细胞72小时后,仅有少量的CT-26和HT-29细胞存活,特别是同时靶向四种癌基因组合的pHOPE-mTPMK和pHOPE-hTPMK表达载体比靶向单一癌基因的HOPE表达载体产生更强的结肠癌细胞杀伤作用(图4B)。此外,细胞活力测定结果进一步表明,HOPE表达载体表现出较高的结肠癌细胞杀伤效率,并且靶向多个癌基因HOPE表达载体产生更显著的抗肿瘤效果(图4C)。此外,阴性对照pHOPE-NT表达载体转染后对CT-26和HT-29细胞的生长均不产生影响,细胞数量和细胞活力均不发生明显变化。

[0079] 为在mRNA水平上验证HOPE表达载体体外杀伤结肠癌细胞的效果,使用qPCR方法检测了转染HOPE表达载体后CT-26和HT-29细胞中靶向基因mRNA表达情况。结果表明,与转染阴性对照pHOPE-NT表达载体相比,转染HOPE表达载体后CT-26和HT-29细胞中相应的靶向基因mRNA表达水平显著下调($p < 0.001$),例如转染pHOPE-mMYC表达载体显著敲低了CT-26细胞中靶向基因MYC的表达($p < 0.001$)(图4D)。此外,靶向多个癌基因的pHOPE-mTPMK和pHOPE-hTPMK表达载体转染结肠癌细胞后,敲低靶向基因的效率显著高于靶向单个癌基因的HOPE表达载体,例如pHOPE-hTPMK表达载体转染后HT-29细胞中靶向基因KRAS表达量较pHOPE-hKRAS后更显著降低(图4D)。

[0080] 2.5HOPE癌症基因试剂体内结肠癌基因治疗

[0081] 为探究靶向癌基因的HOPE表达载体体内结肠癌基因治疗效果,以体外杀伤结肠癌细胞效果较好的PLK1、MYC、KRAS和TPMK作为靶向基因,以AAV作为体内基因递送载体,将

HOPE表达载体制备成新型癌症基因治疗试剂rAAV-HOPE,应用于体内结肠癌基因治疗。将小鼠结肠癌细胞CT-26皮下移植到BALB/c小鼠体内,建立结肠癌皮下移植瘤小鼠模型。成瘤小鼠随机分为5组,分别用PBS以及新型癌症基因治疗试剂rAAV-HOPE,包括rAAV-HOPE-mPLK1、rAAV-HOPE-mMYC、rAAV-HOPE-mKRAS和rAAV-HOPE-mTPMK经尾静脉注射给药(图5A)。结果表明,与注射PBS对照组相比,注射新型癌症基因治疗试剂rAAV-HOPE后显著抑制结肠癌小鼠体内的肿瘤生长,小鼠体重缓慢增加(图5B)。rAAV-HOPE治疗组结肠癌小鼠的肿瘤体积明显小于PBS对照组($p < 0.05$)(图5C)。肿瘤图像结果表明,与PBS对照组相比,rAAV-HOPE治疗组结肠癌小鼠体内的肿瘤生长得到有效控制,肿瘤缓慢生长(图5D)。rAAV-HOPE治疗组,包括rAAV-HOPE-mPLK1、rAAV-HOPE-mMYC、rAAV-HOPE-mKRAS和rAAV-HOPE-mTPMK组结肠癌小鼠的肿瘤体积明显小于PBS对照组($p < 0.01$)(图5E),并且肿瘤重量显著低于PBS对照组($p < 0.01$)(图5F)。脾脏图像结果显示,PBS对照组小鼠的脾脏大小较rAAV-HOPE治疗组小鼠的脾脏明显肿大(图5G),而rAAV-HOPE治疗组小鼠的脾脏重量明显小于PBS对照组($p < 0.05$)(图5H)。实验结果表明,单一靶向PLK1、MYC、KRAS癌基因以及同时靶向四种癌基因组合(TPMK)的新型癌症基因治疗试剂rAAV-HOPE可以显著抑制结肠癌小鼠模型体内的肿瘤生长,具有较好的结肠癌体内肿瘤基因治疗效果。

[0082] 为了进一步探讨新型癌症基因治疗试剂rAAV-HOPE体内结肠癌基因治疗的生物安全性,收集了结肠癌小鼠的全血并分离血清,进行血常规和血清生化指标检测,包括UREA、CREA、UA肾功能检测和ALP、ALT、AST、 γ -GT肝功能检测。结果表明,注射PBS的对照组结肠癌小鼠的肾功能有一定损伤,UREA、CREA和UA检测值高于rAAV-HOPE治疗组小鼠,较rAAV-HOPE-mTPMK组明显升高($p < 0.05$)(图5I)。此外,PBS对照组小鼠肝功能有一定损伤,ALP、ALT、AST和 γ -GT检测值均高于rAAV-HOPE治疗组小鼠,ALT、AST和 γ -GT检测值显著高于rAAV-HOPE-mTPMK组($p < 0.05$)(图5J)。提示靶向癌基因的新型癌症基因治疗试剂rAAV-HOPE具有良好的生物安全性,应用于体内结肠癌基因治疗时不产生毒副作用。

[0083] 总之,本发明基于CRISPR-Cas13a构建了一种新型HOPE骨架表达载体,可以在肿瘤细胞中特异性启动Cas13a表达,在gRNA引导下有效敲低靶向基因mRNA。以内源性癌基因TERT、PLK1、MYC和KRAS作为癌基因,构建新型HOPE基因表达载体,有效敲低肿瘤细胞中靶向基因的表达,诱导肿瘤细胞死亡,而对正常细胞生长不产生影响,并且同时靶向四种癌基因的HOPE表达载体较靶向单一癌基因的HOPE表达载体具有更显著的肿瘤细胞杀伤效果。以AAV作为基因递送载体,制备了新型癌症基因治疗试剂rAAV-HOPE,将其应用于结肠癌基因治疗中,有效抑制结肠癌皮下移植瘤小鼠模型体内的肿瘤生长,具有良好的生物安全性。

[0084] 本发明提供了一种基于CRISPR-Cas13a靶向敲低癌基因的表达载体及其应用的思路及方法,具体实现该技术方案的方法和途径很多,以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。本实施例中未明确的各组成部分均可用现有技术加以实现。

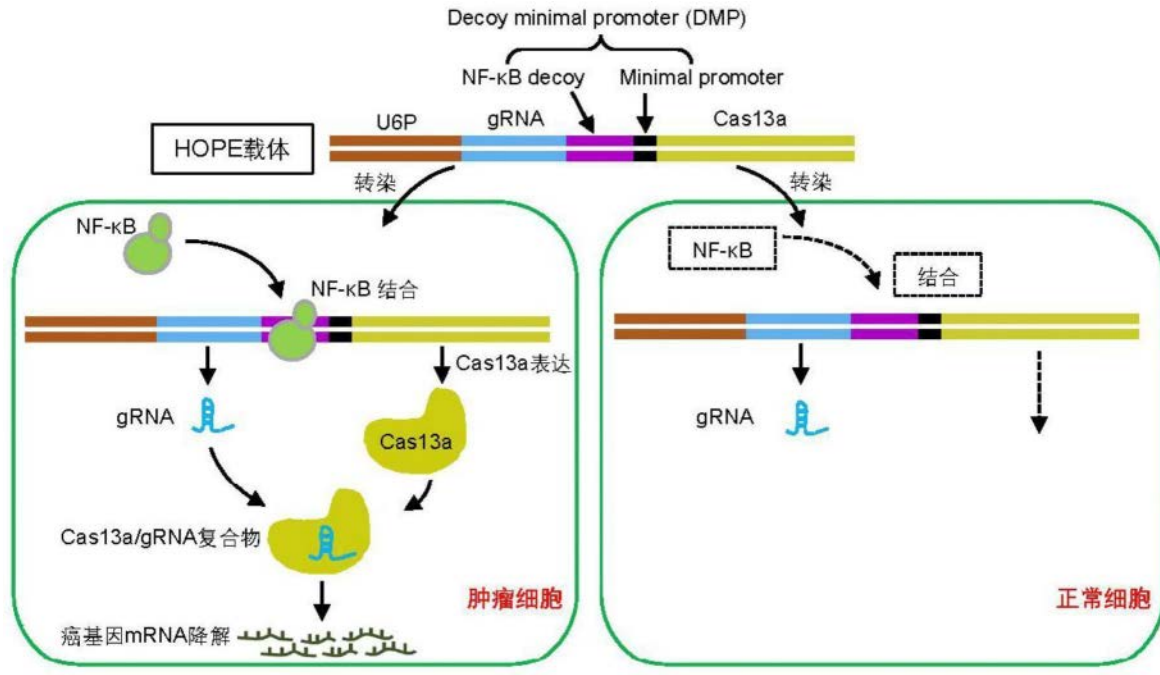


图1

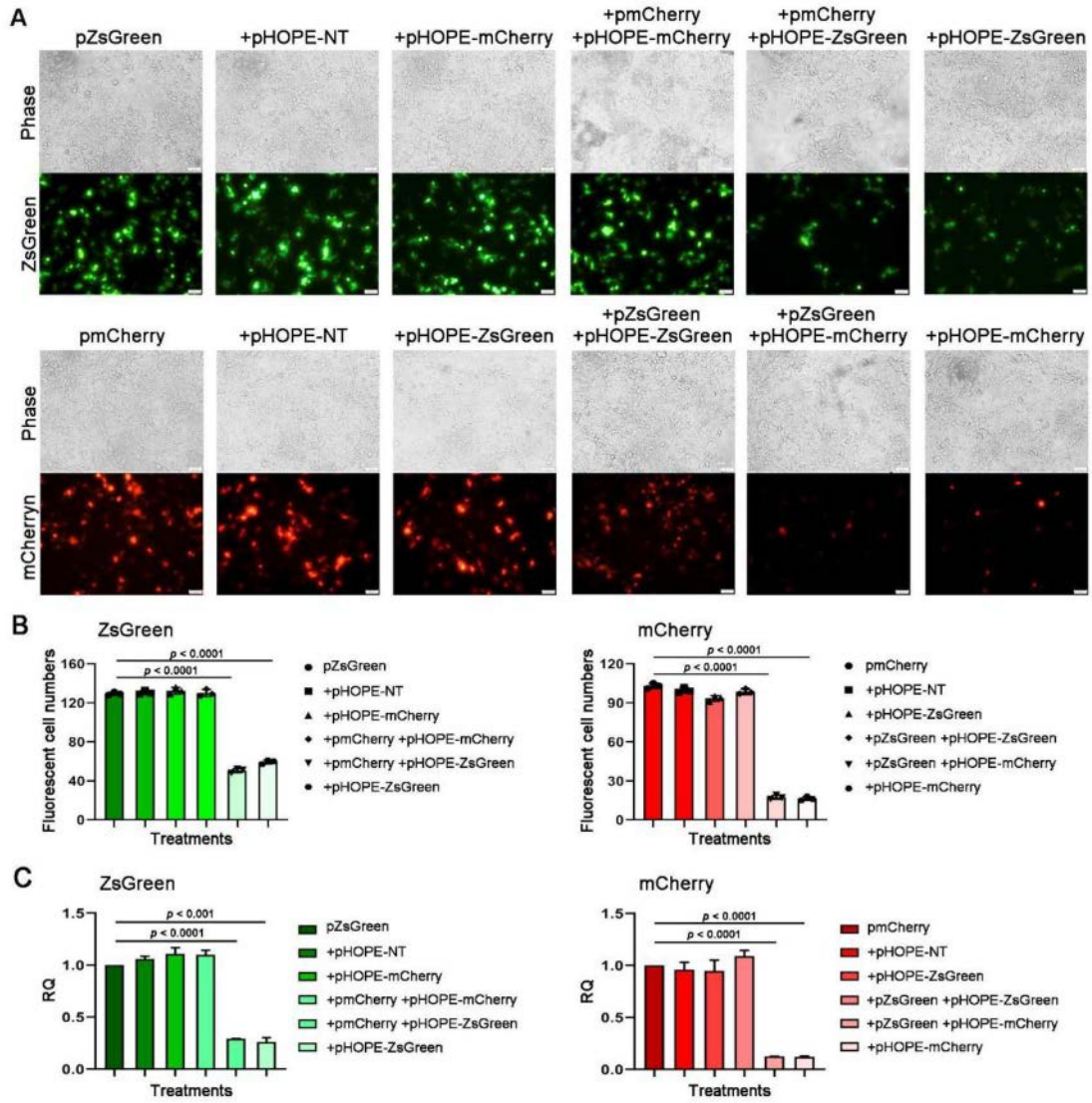


图2

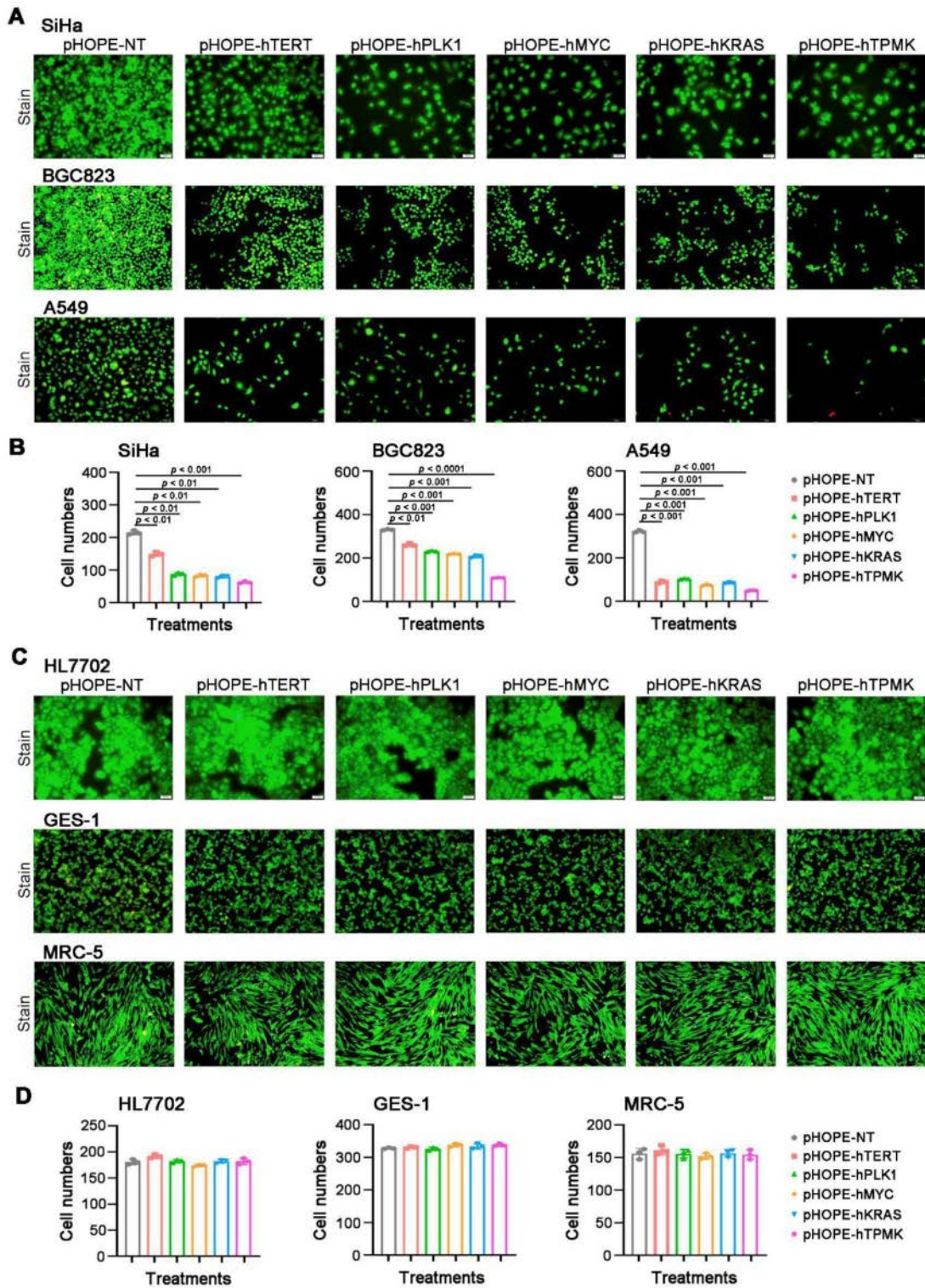


图3

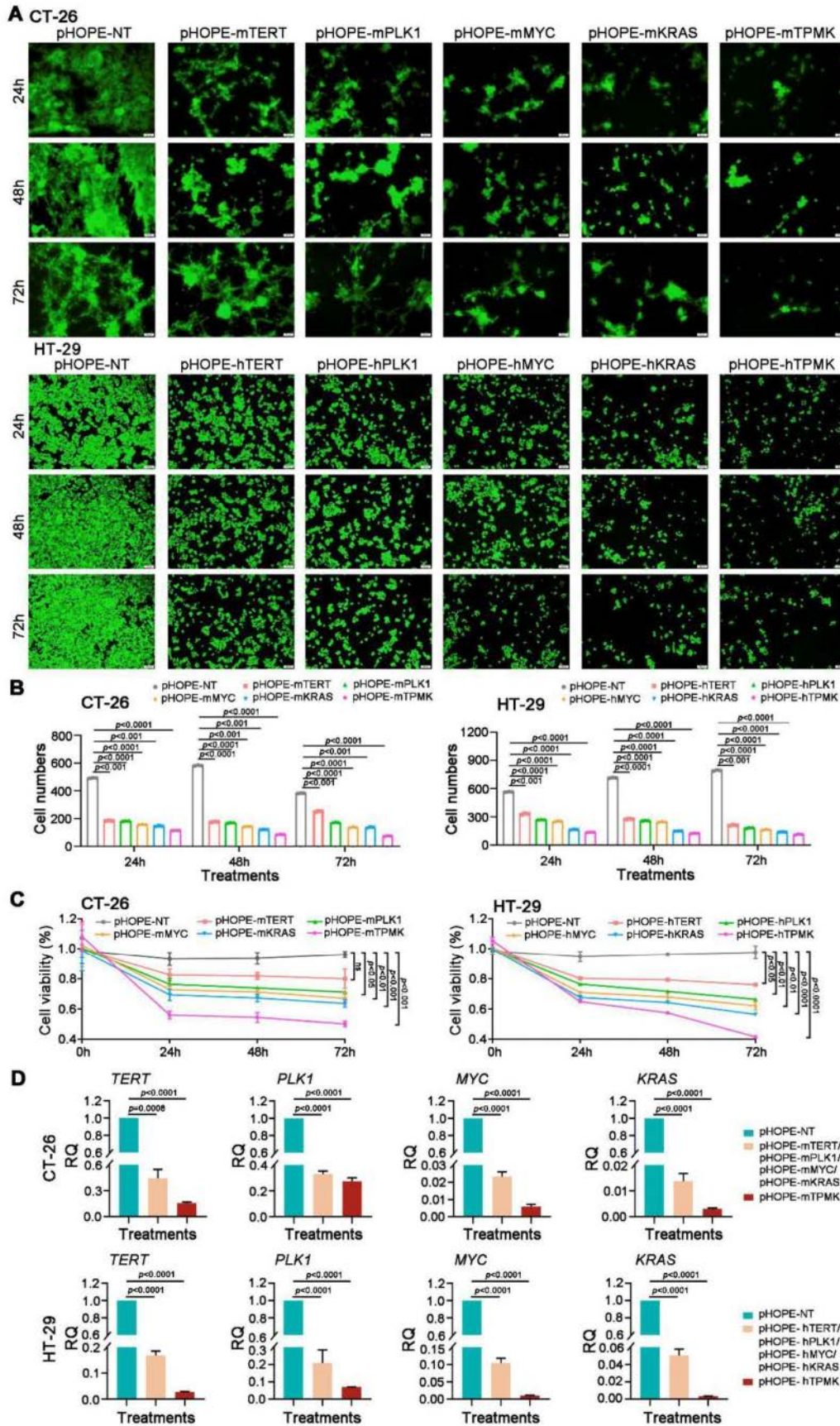


图4

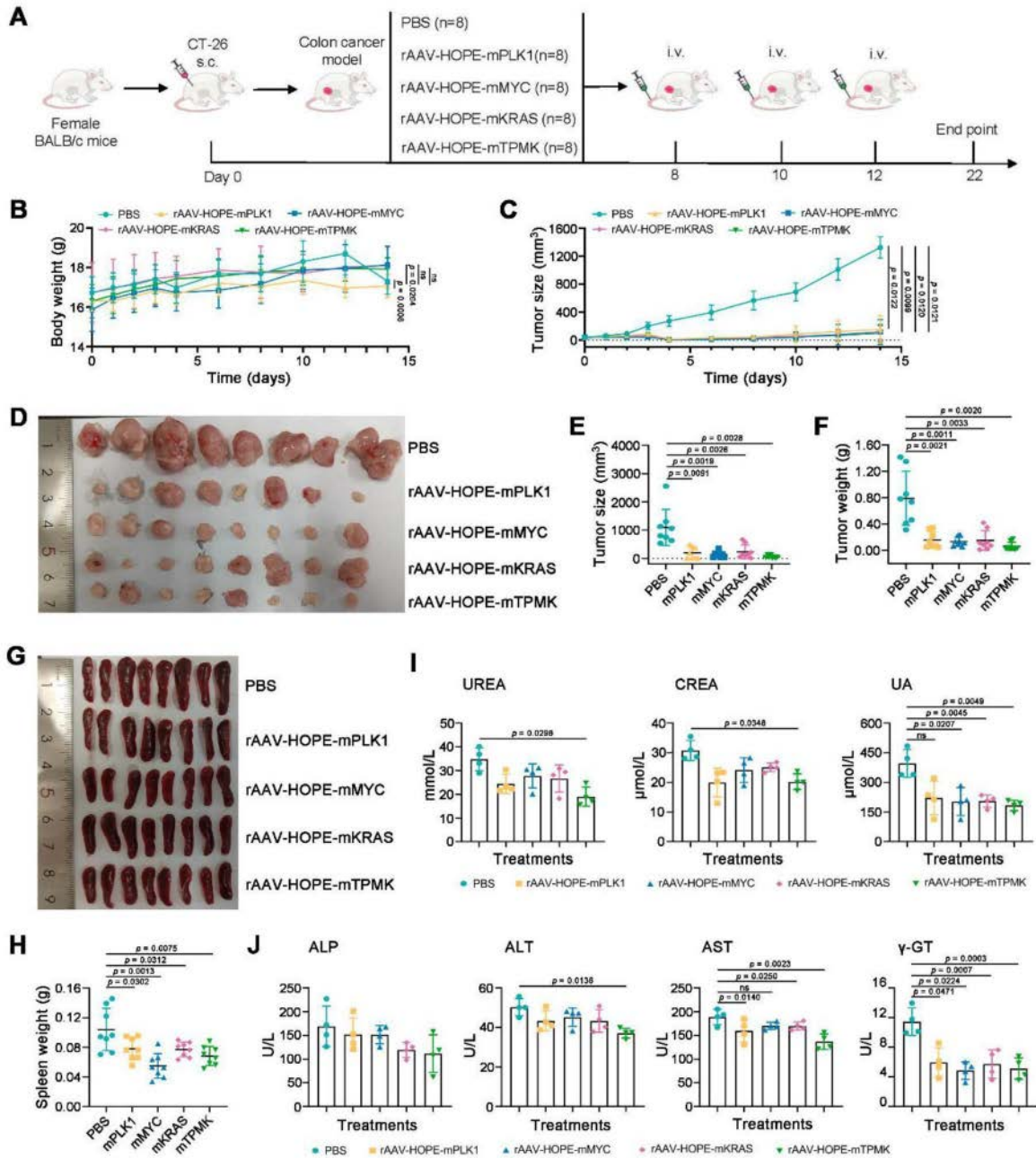


图5