



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107828787 B

(45)授权公告日 2020.05.26

(21)申请号 201711014985.3

A61K 31/7088(2006.01)

(22)申请日 2017.10.26

A61P 35/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107828787 A

(56)对比文件

US 2018066323 A1,2018.03.08,
CN 1948482 A,2007.04.18,
CN 104977416 A,2015.10.14,
Jiahua Guo等.PTBP1 and PTBP2 impaired
autoregulation of SRSF3 in cancer cells.
《Scientific Reports》.2015,

(43)申请公布日 2018.03.23

(73)专利权人 武汉大学
地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山
武汉大学

审查员 李杏

(72)发明人 郭继华 贾荣

(74)专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222

代理人 彭劲松

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

A61K 48/00(2006.01)

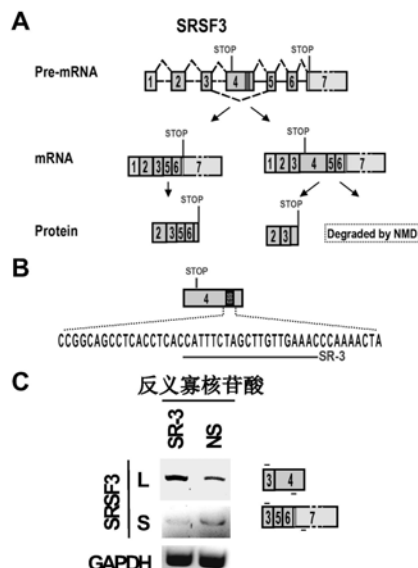
权利要求书1页 说明书4页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

抑制人SRSF3基因表达的反义寡核苷酸序列
及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种抑制人SRSF3基因表达的反义寡核苷酸序列及其应用。该反义寡核苷酸序列的分子式为:5'-GTTTCAACAAGCTAGAAATG-3',每个反义寡核苷酸的碱基都做了2'-O-Methyl和硫代修饰。本发明的反义寡核苷酸抑制SRSF3基因外显子4的外显子剪切抑制子的功能,促进了可变外显子4的剪切,进而减少了全长有功能的SRSF3蛋白的表达,抑制了口腔癌细胞的生长,具有抑制口腔癌的开发和应用前景。



1. 一种反义寡核苷酸,其特征在於,其分子式为:5' -GTTTCAACAAGCTAGAAATG-3',所有碱基都经2'-O-Methyl修饰和硫代修饰。

2. 一种组合物,其特征在於,其含有0.001-99.99% 权利要求1所述的反义寡核苷酸以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

3. 权利要求1所述的反义寡核苷酸在制备抑制肿瘤细胞生长的组合物或治疗肿瘤的药物组合物中的用途。

4. 根据权利要求3所述的用途,其特征在於,所述的肿瘤细胞或肿瘤表达全长有功能的SRSF3蛋白。

5. 根据权利要求4所述的用途,其特征在於,所述的肿瘤细胞为口腔癌细胞。

抑制人SRSF3基因表达的反义寡核苷酸序列及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术和医学领域。具体涉及针对癌基因SRSF3的反义寡核苷酸序列及其应用。

背景技术

[0002] 人的基因序列包括外显子(exon)和内含子(intron)。由RNA聚合酶根据基因模板合成前体信使RNA(mRNA)包括外显子和内含子。内含子必须由剪切复合体(spliceosome)去除并将外显子连接,才能形成成熟的mRNA,并指导蛋白质的合成。前体mRNA中内含子和外显子的剪切并不是一成不变的,可以有多种剪切方式被称为可变剪切(alternative splicing)。比如:有些外显子可能在剪切时被排除在成熟的mRNA中,称为外显子跳跃(exon skipping),有些内含子被保留在成熟的mRNA中,称为内含子保留(intron retention)。因此,通过可变剪切的方式,一个基因往往可以产生多种mRNA,并编码多种蛋白质。目前发现超过90%的人类基因的前体mRNA都会发生可变剪切,产生多种mRNA,极大地丰富了基因组的编码能力。

[0003] 很多研究都发现可变剪切与癌症的发生发展有密切的关系。癌细胞的前体mRNA的可变剪切方式与正常细胞有显著区别¹。细胞中前体mRNA可变剪切的调节主要是可变剪切因子(splicing factor)。SRSF3(又称为SRp20)是一个重要的可变剪切调节因子。我们在2010年发现SRSF3是一个原癌基因²。很多癌组织中都高表达SRSF3;抑制SRSF3的表达导致癌细胞生长受到明显影响,在裸鼠体内成瘤能力也明显下降;在非癌细胞中提高SRSF3的表达水平可以促进细胞生长和在裸鼠体内成瘤。抑制SRSF3的表达可以作为治疗癌症的一种方法。我们在2015年发现人的SRSF3基因有一个可变外显子⁴。不包含该外显子的mRNA可以编码全长的有功能的SRSF3蛋白。而包含该外显子的mRNA,由于出现了终止密码子,只能编码截短的SRSF3蛋白或经NMD(nonsense-mediated decay)途径降低。因此在癌细胞中包含外显子4的mRNA很少,主要是不包括外显子4的mRNA,有利于全长有功能的SRSF3蛋白的表达。在外显子4的3'端有一个外显子剪切抑制子,能与PTPB1和PTBP2蛋白相互作用,促进了可变外显子4的跳过丢失,进而增加了全长有功能的SRSF3蛋白的表达,有利于癌症的发生和发展³。因此,建立抑制细胞中前体mRNA的SRSF3基因中外显子4在剪切中的跳跃丢失是亟待解决的问题。

[0004] 反义药物又称反义寡核苷酸药物,是指作为药物使用的,长度为10-30个碱基的人工合成DNA分子及其类似物。根据核苷酸杂交原理,反义药物能与特定基因的mRNA杂交,在转录水平上干扰致病蛋白质的产生过程。蛋白质在人体代谢过程中扮演重要角色,大多数疾病都是由于蛋白质异常引起的,无论肿瘤、心血管疾病或传染性疾病,传统药物主要直接作用于致病蛋白质本身,而反义药物则作用于产生蛋白质的mRNA,因此可广泛应用于各种疾病的治疗,比传统药物更具选择性,而且具有高效低毒、用量少等特点。数年前,由于反义药物合成价格昂贵,使该类药物难以进行广泛的临床试验。近年来,由于合成技术的改进和合成仪器的研制成功,反义药物的成本已大为降低,从而加速了反义药物的研究与开发。

[0005] 从药动学角度而言,由于体内各器官组织存在核酸酶,因此天然的寡核苷酸进入体内极易被分解失活,故反义药物多以修饰寡核苷酸为主,以增强其抗核酸酶降解的作用。

[0006] 反义基因治疗依据碱基互补原理,应用能与目的基因或其mRNA互补的核酸,通过空间阻遏作用,诱导RNA酶H(RNase H)活性或与目的DNA双股螺旋形成三聚体(triplehelix),在基因复制、转录、剪接、mRNA转运及翻译水平上,抑制蛋白质合成的特性、抑制癌基因的表达、抑制生长因子的分泌或封闭其受体,从而阻断癌细胞内的异常信号传导及自分泌和旁分泌环路,使癌细胞进入正常化轨道或引起癌细胞凋亡。

[0007] 通过对反义寡核苷酸药物的开发和研究,目前已有17种反义寡核苷酸药物进入临床试验。其中Vitravene是1998年经FDA批准进入市场的反义药物,其分子结构的两端有一个修饰帽,从而增强了其稳定性。该药物抗病毒作用较强,用于治疗巨细胞病毒性视网膜炎和艾滋病并发巨细胞视网膜炎。不良反应有虹膜炎、玻璃体炎,发生率为25%,用糖皮质激素治疗可缓解或消除其炎性反应。参考文献

[0008] 1.Zhang,J.and Manley,J.L.,CANCER DISCOV,2013,3,1228-1237.

[0009] 2.Jia,R.,Li,C.,McCoy,J.P.,Deng,C.X.and Zheng,Z.M.,INT J BIOL SCI,2010,6,806-826.

[0010] 3.Guo,J.,Jia,J.and Jia,R.,Sci Rep,2015,5,14548.

发明内容

[0011] 本发明的目的就是提供一种可有效抑制肿瘤的反义寡核苷酸,所述的反义寡核苷酸特异性地在前体mRNA水平靶向原癌基因SRSF3,对表达全长有功能的SRSF3蛋白的肿瘤细胞的生物学行为进行干预,从而有效抑制全长有功能的SRSF3蛋白的表达,达到抗肿瘤效果。

[0012] 在本发明的第一方面中,提供了一种反义寡核苷酸,抑制SRSF3基因中可变外显子4上外显子剪切抑制子的功能,从而抑制SRSF3表达全长有功能的SRSF3蛋白,其分子式为:5'-GTTTCAACAAGCTAGAAATG-3',所有碱基都经2'-O-Methyl修饰和硫代修饰。

[0013] 本发明的第二方面,还涉及一种组合物,其含有0.001-99.99%如前所述的反义寡核苷酸以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0014] 本发明的第三方面,提供了如前所述的反义寡核苷酸的用途,它被用于制备抑制肿瘤细胞生长组合物或治疗肿瘤的药物组合物。更佳地,所述的肿瘤细胞或肿瘤表达全长有功能的SRSF3蛋白。更佳地,所述的肿瘤细胞为口腔癌细胞。

[0015] 目前癌症的治疗依然有很多难点,治疗效果还很不理想。SRSF3是癌基因,癌细胞的增殖和成瘤需要全长有功能的SRSF3蛋白。本发明针对癌基因SRSF3,利用2'-O-Methyl修饰和硫代修饰的反义寡核苷酸抑制SRSF3基因外显子4的外显子剪切抑制子的功能,促进了可变外显子4的剪切,进而减少了全长有功能的SRSF3蛋白的表达,抑制了口腔癌细胞的生长,具有抑制口腔癌的开发和应用前景。

附图说明

[0016] 图1为反义寡核苷酸SR-3促进SRSF3外显子4的可变剪切

[0017] A.SRSF3外显子4的可变剪切的示意图,方框表示外显子,外显子间的横线表示内

含子,虚线表示RNA剪切的方向。STOP:终止密码子;Degraded by NMD:由non-sense-mediated degradation (NMD) 机制介导的mRNA降解;

[0018] B. 外显子4的3'端有一个外显子剪切抑制子(ESS),SR-3是反义寡核苷酸;

[0019] C. 将SR-3转入CAL 27细胞中,用RT-PCR检测外显子4的可变剪切。

[0020] 图2为SR-3抑制SRSF3的表达和口腔癌细胞的生长。

[0021] A. 将20nM经2'-O-Methyl和硫代修饰的反义寡核苷酸转染CAL 27细胞,3天后进行细胞计数和结晶紫染色;

[0022] B. 用western杂交检测SRSF3蛋白的表达水平,Actin作为上样量的对照。

具体实施方式

[0023] 通过以下详细说明结合附图可以进一步理解本发明的特点和优点。所提供的实施例仅是对本发明方法的说明,而不以任何方式限制本发明揭示的其余内容。

[0024] 【实施例1】SRSF3基因的外显子4的外显子剪切抑制子的反义寡核苷酸的获得

[0025] 根据我们已发表的研究结果³,我们确定SRSF3外显子4的外显子剪切抑制子及其上下游的邻近序列CCTCACCTCACCATTCTAGCTTGTGAAACCCA(划线的是外显子剪切抑制子序列)。根据这个序列我们设计了反义寡核苷酸SR-3,其序列为GTTTCAACAAGCTAGAAATG。我们设计了一个非特异性的反义寡核苷酸(NS)作为对照,其序列是:ACTCTATCTGCACGCTGACT。

[0026] 在生工生物工程(上海)股份有限公司合成了这些反义寡核苷酸,每个反义寡核苷酸的碱基都做了2'-O-Methyl和硫代修饰。

[0027] 【实施例2】反义寡核苷酸SR-3促进SRSF3外显子4的可变剪切并抑制SRSF3蛋白的表达和口腔癌细胞的生长。

[0028] 利用脂质体转染剂Lipofecatmin 3000(Thermofisher公司),将反义寡核苷酸转染CAL 27细胞,终浓度为20nM。24小时后提取细胞总RNA,然后进行RT-PCR反应,具体包括:

[0029] 1) 逆转录

[0030] 取1μgRNA样本进行DNA酶处理,加1μL 10×DNase buffer(Thermofisher公司)和1μL DNaseI(1U/μL)(Thermofisher公司),加无RNA酶水补足体积至10μL。混匀后,室温静置10min。然后加入1μL 25mM EDTA溶液,65℃10分钟,中止DNA酶的作用。取出9μL处理好的RNA样本,加1μL Random Primers(Promega公司)和无RNA酶水4μL,70℃孵育5min后,立即取出置冰上。再加入1.25μL dNTPs(Thermofisher公司)、0.125μL RNase inhibitor(Promega公司)、5μL 5×MMLV buffer(Promega公司)、1μL MMLV逆转录酶(Promega公司)和无RNA酶水3.625μL。混匀后置37℃60min,完成逆转录,得到cDNA。

[0031] 2) RT-PCR

[0032] 取1μL cDNA,加12.5μL 2×Premix Taq DNA聚合酶混合物(Takara公司)、1μL正向引物(10μM)、1μL反向引物(10μM)和9.5μL无RNA酶水。检测包含SRSF3第四个外显子的引物序列是:5' CTCCTCTTGGGGTCGTCGC 3' 和5' CATGTGAAACGACACCAGCCAAGC 3'。检测跳过SRSF3第四个外显子的引物序列是:5' CCATAGAGAATTACACCTTTGTGTCCTG 3' 和5' AGTCCTCCACCTCGTCGCAGATCTC 3'。检测内对照GAPDH的引物序列是:5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3' 和5' GAAGATGGTGATGGGATTTC 3'。反应参数是:94℃2min,经35个循环(94℃20秒,57℃30秒,72℃1分钟)后72℃7分钟。反应完成后在2%的琼脂糖凝胶中电

泳观察反应产物。结果表明反义寡核苷酸SR-3可以高效地抑制能够抑制外显子剪切抑制子功能,促进外显子4保留在mRNA中(图1)。

[0033] 3) 利用脂质体转染剂Lipofecatmin 3000 (Thermofisher公司),我们将反义寡核苷酸转染CAL 27细胞,终浓度为20nM。3天后用0.25%的胰酶-EDTA (Thermofisher公司) 消化细胞,并计数。或者不消化细胞,用1%结晶紫溶液给细胞染色,以直观显示细胞的数量。结果发现,SR-3反义寡核苷酸可以显著地抑制CAL 27细胞的生长(图2A)。

[0034] 在第3天收集上述转染细胞的总蛋白,对SRSF3蛋白表达水平进行分析。将蛋白质样本在10%的SDS-PAGE胶 (Thermofisher公司) 中分离,用Western转印仪 (Biorad公司) 在60V电压下经2个小时转移到硝酸纤维素膜 (Pa11公司) 上。将膜用5%脱脂牛奶封闭膜1个小时,与小鼠抗SRSF3抗体 (Santa Cruz公司,1:1000稀释) 孵育2小时,与辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG抗体 (Sigma公司,1:10000) 孵育1小时,用发光底物 (Thermofisher) 和X线胶片检测特异性SRSF3蛋白的表达水平。结果发现,SR-3可以显著地抑制SRSF3蛋白的表达(图2B)。

		序列表	
[0001]			
[0002]	<110>	武汉大学	
[0003]	<120>	抑制人SRSF3基因表达的反义寡核苷酸序列及其应用	
[0004]	<160>	8	
[0005]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0	
[0006]	<210>	1	
[0007]	<211>	20	
[0008]	<212>	DNA	
[0009]	<213>	寡核苷酸()	
[0010]	<400>	1	
[0011]		gtttcaaca gctagaaatg	20
[0012]	<210>	2	
[0013]	<211>	20	
[0014]	<212>	DNA	
[0015]	<213>	寡核苷酸()	
[0016]	<400>	2	
[0017]		actctatctg cacgctgact	20
[0018]	<210>	3	
[0019]	<211>	20	
[0020]	<212>	DNA	
[0021]	<213>	人工序列()	
[0022]	<400>	3	
[0023]		ctccctcttg gggtcgtcgc	20
[0024]	<210>	4	
[0025]	<211>	24	
[0026]	<212>	DNA	
[0027]	<213>	人工序列()	
[0028]	<400>	4	
[0029]		catgtgaaac gacaccagcc aagc	24
[0030]	<210>	5	
[0031]	<211>	29	
[0032]	<212>	DNA	
[0033]	<213>	人工序列()	
[0034]	<400>	5	
[0035]		ccatagagaa ttacaccttt gtgtcactg	29
[0036]	<210>	6	
[0037]	<211>	25	
[0038]	<212>	DNA	

[0039]	<213>	人工序列()		
[0040]	<400>	6		
[0041]	agtcctccac	ctcgtcgcag	atctc	25
[0042]	<210>	7		
[0043]	<211>	19		
[0044]	<212>	DNA		
[0045]	<213>	人工序列()		
[0046]	<400>	7		
[0047]	gaaggtgaag	gtcggagtc		19
[0048]	<210>	8		
[0049]	<211>	20		
[0050]	<212>	DNA		
[0051]	<213>	人工序列()		
[0052]	<400>	8		
[0053]	gaagatggtg	atgggatttc		20

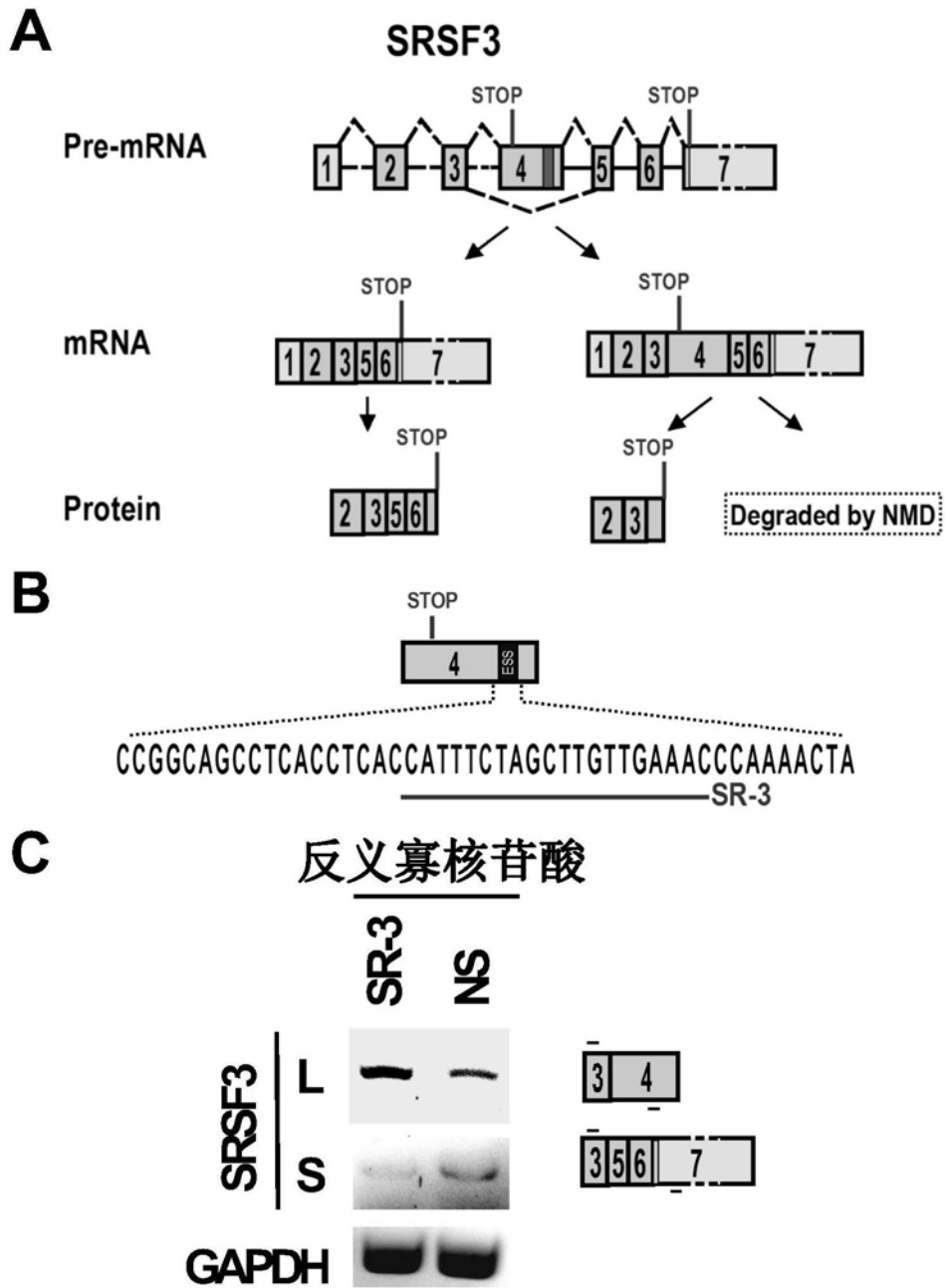


图1

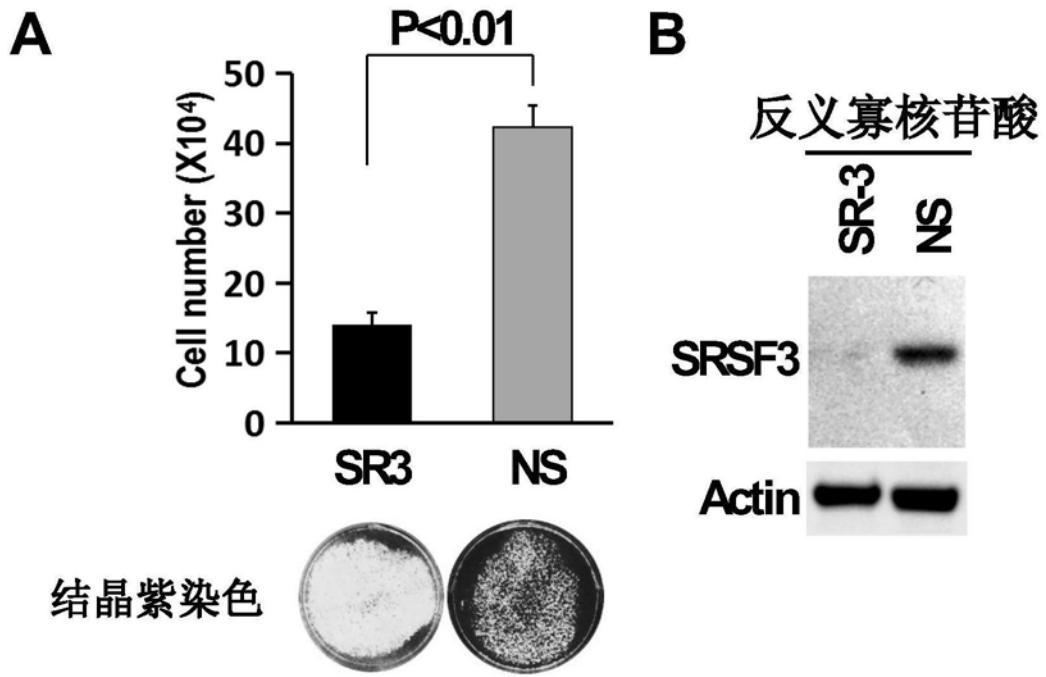


图2