



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101875931 B

(45) 授权公告日 2013.06.12

(21) 申请号 200910107003.4

(22) 申请日 2009.04.28

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院  
地址 518057 广东省深圳市南山区科技园南区深圳虚拟大学园 A216 室

(72) 发明人 钱忠明 葛啸虎 柯亚

(74) 专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司 44281

代理人 罗瑶

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101307085 A, 2008.11.19, 全文.  
宋宁. FP1 和 HP 在 6-羟基多巴胺导致的腹

侧中脑神经元和 MES23.5 细胞铁聚积中的作用的研究. 《中国博士学位论文全文数据库 基础科学辑》. 2009, (第 2 期), 全文.

柯亚 等. 脑铁代谢紊乱引起的神经退行性疾病及其治疗. 《中草药》. 2006, 第 37 卷第 7-8 页.

审查员 靳春鹏

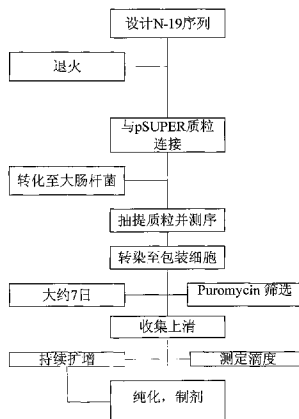
权利要求书1页 说明书6页  
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

抑制人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因表达的 siRNA 重组慢病毒及应用

(57) 摘要

本发明提供了一种抑制人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因 (HEPH) 表达的小干扰性 RNA, 所述小干扰性 RNA 与人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因 mRNA 反向互补, 长度为 19-27bp。本发明进一步公开了编码所述小干扰性 RNA 的相应 shRNA 的 DNA 序列以及能表达所述 shRNA 的重组慢病毒。本发明的小干扰性 RNA、编码 shRNA 的 DNA 以及重组慢病毒能够有效抑制体内人膜铁转运蛋白辅助蛋白表达、抑制铁的释放与代谢, 调节体内的血清铁水平, 从而达到治疗铁代谢相关疾病的目的。



1. 一种抑制人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因表达的小干扰性 RNA,其特征在于:所述小干扰性 RNA 与人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因 mRNA 反向互补;  
所述小干扰性 RNA 为以下序列:  
Seq ID No. 1 :5' -AGGGGTGGATAAAGAATTC-3'。
2. 一种编码 shRNA 的 DNA,其特征在于:所述 shRNA 是含有权利要求 1 所述的小干扰性 RNA 的正义链或反义链的 shRNA。
3. 根据权利要求 2 所述的一种编码 shRNA 的 DNA,其特征在于:所述 DNA 含有序列表中 Seq ID No. 2 和 / 或 Seq ID No. 3 所示的序列。
4. 根据权利要求 2 所述的一种编码 shRNA 的 DNA,其特征在于:所述 DNA 还含有 H1 启动子及 PolyA 终止信息序列。
5. 一种抑制人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因表达的重组慢病毒,其特征在于:所述重组慢病毒含有权利要求 2 ~ 4 中任意一项所述的 DNA 以及慢病毒载体。
6. 根据权利要求 5 所述的一种抑制人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因表达的重组慢病毒,其特征在于:所述慢病毒载体为自身失活慢病毒载体 SIN。
7. 权利要求 1 所述的小干扰性 RNA 在制备用于治疗铁代谢紊乱疾病的药物中的应用。
8. 权利要求 2 至 4 中任意一项所述的 DNA 在制备用于治疗铁代谢紊乱疾病的药物中的应用。
9. 权利要求 5 或 6 中任意一项所述的重组慢病毒在制备用于治疗铁代谢紊乱疾病的药物中的应用。
10. 一种药物组合物,包括具有权利要求 1 所述的小干扰性 RNA。
11. 一种药物组合物,包括具有权利要求 2 至 4 中任一项所述的编码 shRNA 的 DNA。
12. 一种药物组合物,包括具有权利要求 5 或 6 中任一项所述的一种抑制人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因表达的重组慢病毒。

## 抑制人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因表达的 siRNA 重组慢病毒及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学、生物医药及基因工程技术领域,具体涉及利用慢病毒(Retrovirus)介导的RNA干扰技术,构建针对人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因(HEPH)的慢病毒干扰体系(Retro-Heph),及在制备铁代谢紊乱疾病的药物中的应用。

### 背景技术

[0002] RNAi指的是当细胞中导入与内源性mRNA编码区同源的双链RNA时,该mRNA发生降解而导致基因表达沉默的现象。

[0003] 2001年,Tuschl等将短的siRNA导入到哺乳动物细胞中并由此解决了在哺乳细胞内导入长的双链RNA时引发的干扰素效应,由此拓展了RNAi在基因治疗上应用前景。RNAi机制普遍存在于生物中,因此被认为是进化上相对保守的基因表达调控机制。一种假说为, RNAi机制是作为在RNA水平上抵御病毒入侵的防御机制而存在的。目前发现, RNAi机制中的相关一些因子如内源性双链RNA及蛋白因子可以在多种层次上对基因表达进行调控,其范围已经超越了PTGS(post transcriptional gene silencing),如RNAi机制同样参与了转录水平上的基因表达调控过程中。由外界导入的长的双链RNA首先被称作Dicer并具有RNaseIII活性的RNA酶切割成21~23碱基对的小的双链RNA,这种RNA被称作small interferingRNA(siRNA),其特征是3'端相对于互补链突出两个碱基。完成上述过程后,siRNA上结合RNAi蛋白因子,并形成称为RISC(RNA-induced silencing complex)的RNA-蛋白复合物。在RISC复合物中,siRNA依赖于ATP/或ATP非依赖性的转换为单链,进而RISC被活化。活化型RISC受已成单链的siRNA引导(guide strand),序列特异性地结合在靶mRNA上并切断靶mRNA,引发靶mRNA的特异性分解。

[0004] RNAi在基因沉默方面的具有高效性和简单性,所以是基因功能研究的重要工具。大多数药物属于靶标基因(或疾病基因)的抑制剂,因此RNAi模拟了药物的作用,这功能丢失(LOF)的研究方法比传统的功能获得(GOF)方法更具优势。因此, RNAi在今天的制药产业中是药物靶标确认的一个重要工具。同时,那些在靶标实验中证明有效的siRNA/shRNA本身还可以被进一步开发成为RNAi药物。在疾病治疗方面,双链小分子RNA或siRNA已被用于临床测试用于几种疾病治疗,如老年视黄斑退化。

[0005] 然而RNA干扰片段表达持续以及表达效率等重要问题阻碍了RNA干扰技术运用于临床治疗,要将RNA干扰用于基因治疗,必须解决其靶向性、安全性以及表达持续性的问题。

[0006] shRNA即短发夹RNA(short hairpin RNA)。在RNAi感染过程中,产生dsRNA的一个有效方法就是在体内表达一个短发夹RNA,这种shRNA包含两个短反向重复序列(其中一个与目的基因互补),中间由一个loop序列分隔,组成发夹结构。在体内shRNA可以被加工成siRNA,从而降解目的基因抑制其表达。

[0007] 膜铁转运蛋白辅助蛋白基因(HEPH)介绍

[0008] 早在 1962 年, Grewal 等就在放射诱导的突变小鼠中发现了一种新型的遗传性小鼠低色素性贫血。由于其与 X 染色体相关, 这种小鼠被称为 sla(伴性贫血) 小鼠。Vulpe 等 (1999) 通过基因谱研究, 证实了 sla 小鼠 X 染色体上缺陷基因的存在。此基因被命名为 Hephaestin (HP 或 Heph), 取自希腊神话中的金属工艺之神 Hephaestus。

[0009] Heph 的分布

[0010] HP 在体内的分布与铁的吸收相关。免疫杂交技术和 Western 印迹法、Northern 印迹法显示在成年小鼠体内 HP 蛋白及 mRNA 在整段小肠及结肠内高表达, 在肾、肺、皮肤、肝、胎盘及其他组织中也有表达。原位杂交技术显示在 HP 基因高表达的小肠区, 绒毛处信号极强, 而隐窝处几乎没有阳性信号。这与铁在小肠绒毛处的吸收相一致。但 HP 在结肠高表达, 而后者在铁吸收过程中的作用甚微。在肠上皮细胞中, HP 蛋白定位于基侧膜, 同时存在于细胞内的核周区; 在培养的大鼠小肠细胞系 IEC26 中, HP 蛋白主要分布于核周区, 在细胞浆中也有少量存在。

[0011] Heph 的功能

[0012] HP 作为亚铁氧化酶的直接证据来自于对酵母菌的研究。研究证明, Fet3p(外膜上的亚铁氧化酶) 与 Ftr1p(铁透性酶) 联合作用, 参与三价铁的吸收过程。Fet3 基因缺陷的酵母菌会出现铁缺乏, 且不能在低铁培养基上生存, 但外源性表达的 HP 即可部分纠正酵母菌的缺铁状态。以上说明, HP 可能与 Fet3p 相似, 通过与一种膜转运体共同作用来参与铁的跨膜转运。此外, HP 只有一个跨膜区域, 它不可能同时是一种跨膜的铁转运体介导铁的转运过程, 也要求其必须与某种铁转运体协同作用使铁穿过细胞膜。目前认为这种转运体为 Ferroportin1 (FP1), 又称 Ireg1、Mtp1。FP1 在网状内皮细胞系统存在的肝、脾、胎盘等组织表达, 提示其与铁的释放相关。与 HP 相似, FP1 基因在近端小肠内高表达, 且仅在成熟的肠上皮细胞中高表达, 免疫组化技术显示 FP1 蛋白主要定位于细胞的基侧膜, 细胞内也有少量存在。FP1 与 HP 共同分布于近端小肠, 提示 HP 与 FP1 在肠上皮细胞中协同作用于铁的跨膜转运。HP 在细胞内的分布, 提示其可能在细胞内参与铁的氧化过程。如二价铁离子需要被氧化成三价, 才能与铁的主要储存部位即铁蛋白结合。此外, 整合三价铁的转铁蛋白在细胞内的生理作用也可能需要 HP 的铁氧化作用。由于 HP 基因在整段小肠和结肠中高表达, 而远端小肠和结肠并不是铁吸收的主要部位, 这就提示了 HP 的其他功能或在远端肠道补吸收铁的功能。

[0013] Heph 对细胞内铁浓度的调节

[0014] HP 作为铁转运相关蛋白, 其表达首先受机体铁需求量的调节。铁在体内的浓度主要受铁储存量和红细胞生成速率的影响。肠上皮细胞铁的转运量与整体铁需求量成正相关。当机体缺铁、溶血和缺氧时都可刺激铁的吸收。研究表明, 整体铁水平信号先作用于隐窝上皮细胞, 在其分化为成熟肠上皮细胞并移至绒毛顶端后, 细胞对该信号做出应答, 使基侧缘铁转出蛋白表达水平发生变化, 从而影响到成熟肠上皮细胞内铁的浓度, 最终决定了刷状缘 DMT1 等转入蛋白上调或下调铁的吸收。在铁的吸收过程中, 由于基侧缘转运的铁不可能比刷状缘吸收的铁多, 故目前认为, 基侧缘铁的转运是铁吸收过程的限速步骤。在小肠, HP 的最大调节限度是正常状态下的 2 倍, FP1 的调节范围约 3 ~ 5 倍, 而 DMT1 的调节能力则要大得多。刷状缘铁转运成分对铁浓度变化敏感而迅速的反应, 可以使基侧缘转运分子转运铁的速度恒定, 从而保证机体对铁的需求。所以整体铁信号主要通过基侧缘的转运

成分 HP 和 FP1 起调节作用。在缺铁的病人及动物模型中,十二指肠的铁转运成分如 Dcytb、DMT1、FP1 及 HP 的表达都增高,从而保证铁的吸收。

### 发明内容

[0015] 本发明的目的就是针对现有技术的上述问题即 RNA 干扰片段表达持续以及表达效率等重要问题,提供一种能够有效抑制体内人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因表达、从而调节体内铁水平的小干扰性 RNA (siRNA)。

[0016] 本发明的另一目的在于提供编码含有上述小干扰性 RNA 的 shRNA (短发夹 RNA) 的 DNA。

[0017] 本发明的再一目的在于提供具有优良的靶向性、安全性以及持续表达上述 shRNA 并进而抑制人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因 (HEPH) 表达的重组慢病毒。

[0018] 本发明的再一目的在于提供上述小干扰性 RNA、DNA 以及重组慢病毒在制备药物方面的应用。用途和药物

[0019] 为实现上述目的,本发明采用了以下技术方案:

[0020] 本发明公开了一种抑制人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因 (HEPH) 表达的小干扰性 RNA (siRNA),所述小干扰性 RNA 与人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因 mRNA 反向互补,其长度为 19-27bp。

[0021] 优选地,所述小干扰性 RNA 含有以下序列:

[0022] Seq ID No. 1 :5' -AGGGGTGGATAAAGAATTC-3'

[0023] 本发明进一步公开了一种编码含有上述小干扰性 RNA 的正义链及反义链的 shRNA 的 DNA。

[0024] 优选地,所述 DNA 还含有启动子及 PolyA 终止信息序列,启动子优选为 H1 启动子。

[0025] 本发明还公开了一种抑制人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因 (HEPH) 表达的重组慢病毒,所述重组慢病毒含有上述 DNA 以及慢病毒载体。

[0026] 优选地,所述慢病毒载体为自身失活慢病毒载体 (SIN)。

[0027] 本发明进一步公开了上述小干扰性 RNA、上述 DNA 以及上述重组慢病毒在制备用于治疗铁代谢紊乱疾病的药物中的应用。

[0028] 所述铁代谢紊乱疾病如老年性痴呆、帕金森综合症、神经退行性疾病等。

[0029] 由于采用了以上技术方案,使本发明具备了以下有益效果:

[0030] 本发明的小干扰性 RNA、编码 shRNA 的 DNA 以及重组慢病毒能够有效抑制体内人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因表达、抑制铁的吸收与代谢,并降低体内的血清铁水平,从而达到治疗铁代谢相关疾病的目的。

[0031] 特别地,本发明的重组慢病毒通过选择第三代慢病毒载体——自身灭活慢病毒载体 (SIN),大大的提高了载体的安全性以及靶向性。慢病毒载体可以选择性插入染色体中,不会出现插入失活的情况。慢病毒携带 shRNA 进入靶细胞,可以整合入细胞的基因组,持续长期的表达相关 shRNA,而不会引起对细胞的毒害作用。本发明的慢病毒干扰体系具有优良的靶向性、安全性以及表达持续性,降低血清铁的浓度,并且对正常细胞无任何毒副作用。通过多次实验,均证明本发明的慢病毒干扰体系能有效的调节铁在体内的代谢与吸收。

[0032] 本发明设计的 shRNA 经过体内及体外实验证明,能有效的抑制 HEPH 表达量的 95%

以上,有效的调节血清铁的水平。

### 附图说明

[0033] 图 1 是 Retro-HEPHi 系统构建流程图;

[0034] 图 2 是 Retro-HEPHi 系统感染体细胞后,HEPH 蛋白的表达情况图;

[0035] 图 3 是通过高铁饲料饲养 SD 大鼠,构建高血清铁动物模型,然后利用 Retrovirus-HEPHi 系统进行体内实验,降低血清铁水平结果图。

### 具体实施方式

[0036] 本发明利用铁代谢相关疾病的发病机理,有针对性的调节 HEPH 的表达,设计特定的小干扰性 RNA 以及编码 shRNA 的 DNA,从而降低血清铁对细胞的损害。本发明的小干扰性 RNA 以及 shRNA 所编码的 DNA,能特异性的识别序列:AGGGGTGGATAAAGAATTC,该序列位于 HEPH(AJ296162) 第 2379-2397 碱基处。

[0037] 要将 RNA 干扰技术运用于临床治疗,就需要解决 RNA 干扰片段表达持续以及表达效率等重要问题。我们利用失活慢病毒载体携带 RNA 干扰片段的 DNA 模板,其在体内转录成 shRNA,完美的解决了 RNA 干扰基因治疗的靶向性、安全性以及表达持续性的问题。

[0038] 本发明通过合成干扰片段,将片段连接至慢病毒载体当中。转染重组体入 Phoenix 细胞,获取病毒上清,体外以及体内实验证明能够有效抑制 HEPH。

[0039] 在本发明优选的实施方式中,构建了人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因 (HEPH) 的慢病毒干扰体系 (Retro-HEPHi),并取得了良好的抑制效果。

[0040] 下面通过具体的实施例对本发明作进一步的详细描述。

[0041] 实施例 1

[0042] 根据人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因 (HEPH) 序列 (NM\_000617.2),设计模板链与编码链。分别与 5'端加上 BglIII 与 XhoI 酶切位点,送 Invitrogen 公司合成序列。经过筛选,获得干扰效果最为显著的本发明的 HEPH 干扰片断序列如下:优选的实施例

[0043] 模板链 (Seq ID No. 2):

[0044] 5' -GATCCCCAGGGGTGGATAAAGAATTCTTCAAGAGAGAATTCTTTATCCA

[0045] CCCCTTTTTTTA-3'

[0046] 编码链 (Seq ID No. 3):

[0047] 5' -AGCTTAAAAA AGGGGTGGATAAAGAATTC TCTCTTGA

[0048] AATTCTTTATCCACCCCT GGGG-3'

[0049] Retro-HEPHi 系统构建

[0050] 将合成的 HEPH 干扰片段 (Seq ID No. 2 及 Seq ID No. 3) 进行退火。具体步骤如下:

[0051] 1. 建立退火系统

[0052] 5ul 10x 退火 buffer

[0053] 2nmole 模板链 Seq ID No. 3

[0054] 2nmole 编码链 Seq ID No. 4

[0055] 用三蒸水补足至 50ul。

[0056] 2. 放入 PCR 仪, 95°C 5 分钟, 75°C 5 分钟, 55°C 5 分钟, 42°C 5 分钟, 37°C 15 分钟, 之后逐步递减温度至室温。

[0057] 3. 制 12% 1x TAE 聚丙烯酰胺胶, 取 10ul 上述退火产物跑胶 200V1h。银染观察退火条带。置于 -80°C 保存退火产物。

[0058] 酶切 (XbaI 与 XhoI) 慢病毒载体, 胶纯化回收后, 用 T4 连接酶与退火产物室温连接 24 小时, 经转化筛选之后, 获得正确克隆。送 Invitrogen 公司测序鉴定, 命名为 Retro-HEPHi 系统。具体操作步骤如下:

[0059] 1. 构建质粒酶切体系

[0060] Bgl II 10U

[0061] Xho I 10U

[0062] 10x Buffer 5ul

[0063] BSA 0.5ul

[0064] Retro 质粒 10ul

[0065] 用水补足 50ul, 37°C, 2h。

[0066] 3. 利用试剂盒 (invitrogen) 胶纯化上述酶切产物。

[0067] 4. 构建连接系统

[0068] 10x Buffer 2ul

[0069] T4 连接酶 1ul

[0070] Retro 酶切产物 1ul

[0071] 退火产物 5ul

[0072] 用水补足 20ul, 16°C, 16h。

[0073] 4. 取 5ul 连接产物转化感受态细胞, 涂板后, 氨苄青霉素筛选。

[0074] 5. 挑取阳性克隆, 小量扩增质粒。

[0075] 6. 用 EcoR I 与 Xho I 酶切鉴定质粒, 选择阳性结果质粒, 测序保存。

[0076] 重组慢病毒 Retro-HEPHi 的生产流程

[0077] 1、接种 Phoenix 细胞  $1.5 \times 10^7$  个细胞于 9cm 培养皿 (Corning) 中, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培养过夜;

[0078] 2、转染前 20 分钟换新鲜培养基;

[0079] 3、取 20ul 上述 Retro-HEPHi 与 DMEM 培养基 500ul 混匀, 标记为 A 管, 另取 20ul 脂质体与 500ul DMEM 培养基混匀, 标记为 B 管。将 A 管与 B 管混匀, 室温放置 30min, 将混合物轻轻加入第 1 步中的 9cm 培养皿的培养基中, 培养过夜;

[0080] 5、24 小时后加 7.5ml 培养基继续培养 48 小时;

[0081] 6、收集细胞上清并用 0.45um 滤器过滤, 细胞可以扩大培养, 持续收取病毒上清。

[0082] 7、测定病毒上清滴度, 用 PH8.0 Tris-HCl 调整细胞滴度至 1000VP/ml。

[0083] 8、包装入 2ml 西林瓶中 (每瓶含 1ml), 保存于 -80°C。

[0084] 9、对病毒进行热源检测、微生物检测, 确保无热源, 无细菌、真菌、野生病毒污染。

[0085] Retro-HEPHi 系统构建流程如图 1 所示。

[0086] 重组慢病毒 Retro-HEPHi 体外实验

[0087] 复苏神经元细胞株 P12, 接种于 6 孔板, 每孔  $1 \times 10^6$  个。取 Retro-HEPHi 慢病毒液,

按照每毫升培养基加 1 $\mu$ l 病毒液 (1000VP/ml) 的比例加入 P12 细胞培养基中,轻轻左右混匀,以充分感染细胞株,分别处理 0h、6h、12h、24h、48h,收集细胞,利用 real-time PCR 技术进行定量测定 HEPH mRNA 表达情况,以 0h 为对照组,可见 HEPH 的表达在 12h 之后受到明显的抑制。如图 2。

[0088] 重组慢病毒 Retro-HEPHi 体外铁释放实验

[0089] 复苏神经元细胞株 P12,接种于 6 孔板,每孔  $1 \times 10^6$  个。将细胞分成两组,一组加 PBS,一组加 PLT-HEPHi 慢病毒液,按照每毫升培养基加 1 $\mu$ l 病毒液 (1000VP/ml) 的比例加入 P12 细胞培养基中,轻轻左右混匀,以充分感染细胞株。按照 0h、12h、24h、48h 的时间点进行 Fe55 同位素释放实验,发现在 24 小时后,铁的释放开始受到抑制,48 小时后出现明显抑制。如图 3。

[0090] 以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换,都应当视为属于本发明的保护范围。能够与 HEPH 的 mRNA 反向互补的所有其他 19-27 个碱基序列的小干扰性 RNA、编码此类小干扰性 RNA 的相应 shRNA 的 DNA 模板、以及含有这些 DNA 模板的重组慢病毒也同样可以实施到本发明中。



[0001]

序列表

<110> 香港理工大学深圳研究院

<120> 抑制人膜铁转运蛋白辅助蛋白基因表达的 siRNA 重组慢病毒及应用

<140> 2009101070034

<160> 3

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<214> 人工序列

<400> 1

aggggtggat aaagaattc

<210> 2

<211> 61

<212> DNA

<213> artificial sequence

<214> 人工序列

<400> 2

gatccccagg ggtggataaa gaattcttca agagagaatt cttatccac ccctttttt

a

[0002]

<210> 3

<211> 59

<212> DNA

<213> artifical sequence

<214> 人工序列

<400> 3

agcttaaaaa aggggtggat aaagaattct ctcttgaat tctttatcca ccctgggg

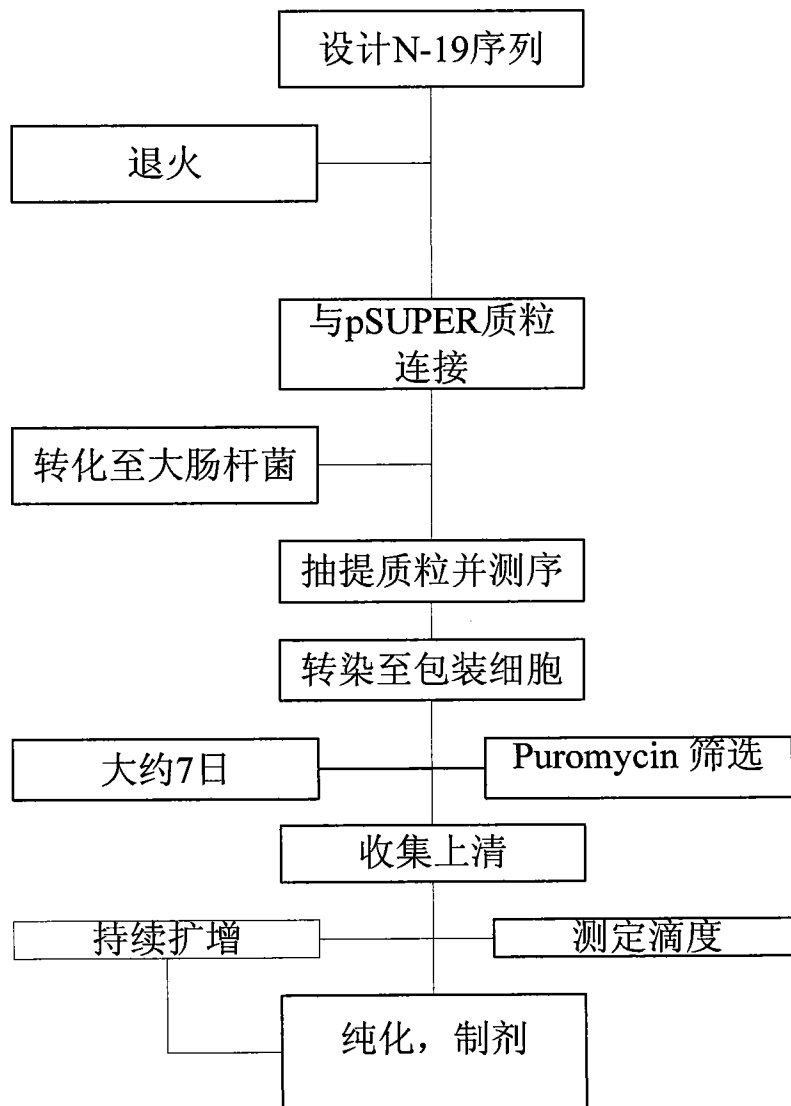


图 1

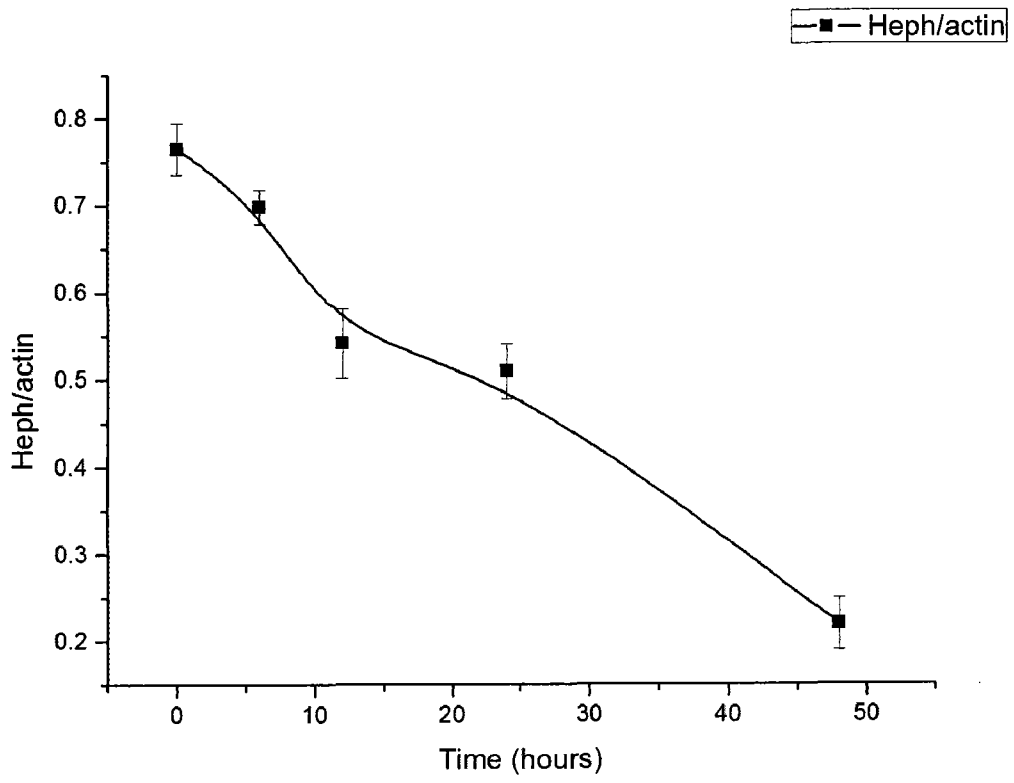


图 2

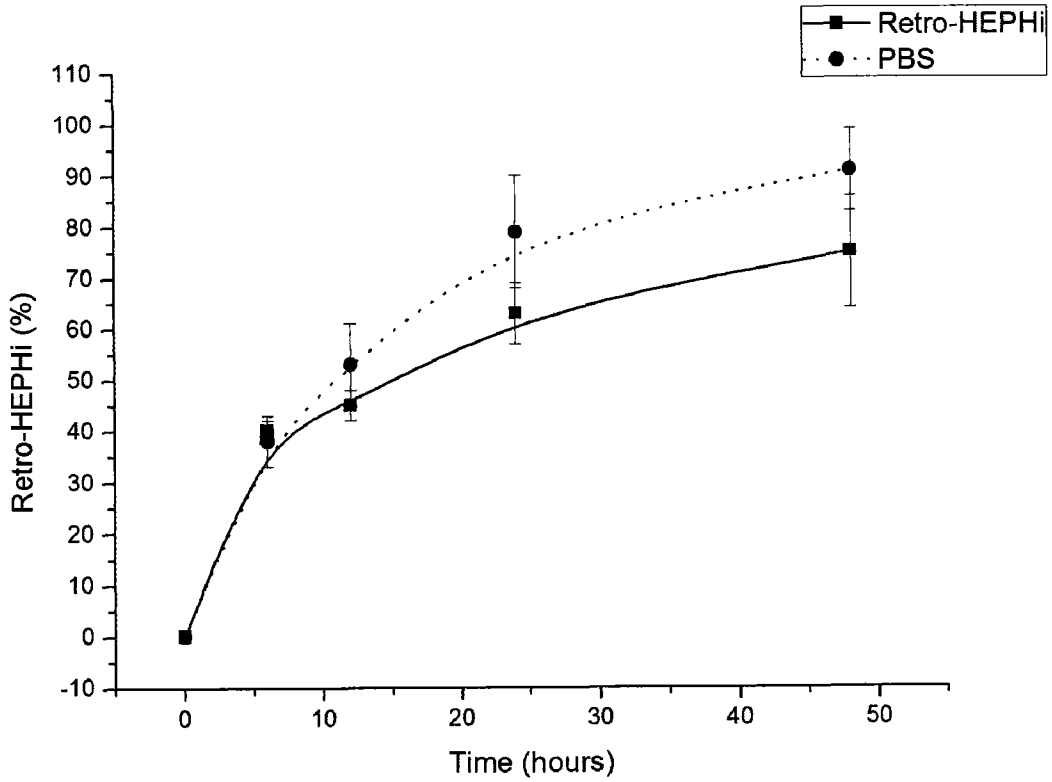


图 3