

(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
2019年2月28日 (28.02.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/037057 A1

(51) 国际专利分类号: *CI2N 15/113* (2010.01) IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/098914

(22) 国际申请日: 2017年8月24日 (24.08.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

本国际公布:

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

(71) 申请人: 深圳市博奥康生物科技有限公司 (SHENZHEN BIOCAN TECHNOLOGIES CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽街道珠光路134号珠光创新科技园1栋509室毛吉炎, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 毛吉炎 (MAO, Jiyan); 中国广东省深圳市南山区西丽街道珠光路134号珠光创新科技园1栋509室毛吉炎, Guangdong 518055 (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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,

(54) **Title:** SHRNA TARGETING SILENT DD1 α

(54) 发明名称: 靶向沉默 DD1 α 的 shRNA

(57) **Abstract:** Provided is specific shRNA for silent target protein DD1 α . A silencing vector for DD1 α is constructed. First, a 19-bp shRNA core fragment is designed according to the sequence of a human DD1 α gene, two ends of the synthesized fragment having suitable restriction enzyme cutting sites; the target fragment is connected to a pSUPER vector to form a core silencing vector; after transformation, a positive clone is selected for PCR verification; a correct vector is verified, DNA sequencing is performed, and then silencing efficiency is measured by means of an immunoblotting experiment. A 19-bp shRNA core fragment capable of targeting human DD1 α is synthesized and designed, and the sequence of the shRNA core fragment is 5'-GGTGCAGACAGGCAAAGAT-3'.

(57) **摘要:** 提供了特异性沉默靶蛋白 DD1 α 的 shRNA。构建的是 DD1 α 的沉默载体。首先是根据人 DD1 α 基因的序列设计出 19bp 的 shRNA 核心片段, 所合成片段两端带有合适的酶切位点, 将目的片段连接到 pSUPER 载体上, 形成核心的沉默载体, 转化后, 挑取阳性克隆进行 PCR 鉴定。鉴定正确的载体, 进行 DNA 测序, 随后通过免疫印记实验进行沉默效率的检测。设计合成了一个能够靶向人 DD1 α 的 19bp 的 shRNA 核心片段, 其序列为 5'-GGTGCAGACAGGCAAAGAT-3'。

WO 2019/037057 A1

说明书

发明名称: 靶向沉默DD1 α 的shRNA

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程中的DNA重组技术领域, 具体涉及特异性沉默靶标蛋白DD1 α 的shRNA。

背景技术

[0002] DD1 α 蛋白为PD-L1蛋白家族的新成员, 是一种新型的且结构不同的Ig超家族抑制性配体, 其胞外域具有与B7家族配体PD-L1的同源性。

技术问题

[0003] 现有研究发现, DD1 α 蛋白多种癌症和自身免疫疾病、过敏、感染和炎症病症例如多发性硬化和关节病症的细胞免疫中起重要作用, 需进行大量转化研究方可应用于临床, 但现有技术中缺乏特异抑制DD1 α 基因表达的慢病毒载体使得相关研究无法很好地开展。

问题的解决方案

技术解决方案

[0004] 本发明的目的是合成特定的能够靶向沉默 DD1 α 的特异碱基序列, 为更加深入的研究 DD1 α 的作用提供了有效的手段。

[0005] 本发明中所需要主要构建的是 DD1 α 的沉默载体。核心沉默载体构建分为两个大的步骤, 首先是根据人 DD1 α 序列设计出19bp的shRNA核心片段, 所合成片段两端带有合适的酶切位点, 将目的片段连接到pSUPER载体上, 形成核心的沉默载体, 转化后, 挑取阳性克隆进行PCR鉴定。鉴定正确的载体, 进行DNA测序, 随后通过免疫印记实验进行沉默效率的检测。

[0006] 本发明中设计合成了一个能够靶向人 DD1 α 的19bp的shRNA核心片段, 其序列为5'-GGTGCAGACAGGCAAAGAT-3' (SEQ ID No: 1)。

[0007] 特异性沉默 DD1 α 的表达载体的构建包括以下步骤:

[0008] 第一步, shRNA片段序列设计

[0009] 根据人 DD1 α 基因序列应用相应的软件设计特异性识别 DD1 α 的序列。

[0010] 第二步，双链shRNA片段的人工合成

[0011] 将人工合成的Sense (SEQ ID No: 2) 和Antisense (SEQ ID No: 3) 通过变性、退火形成双链DNA。

[0012] 第三步，沉默载体的构建

[0013] 将沉默载体pSUPER双酶切后，利用回收试剂盒回收线性化载体，将回收片段与退火所得的shRNA片段进行连接、转化、鉴定阳性克隆、测序得到构建成功的沉默载体。

[0014] 第四步，沉默靶蛋白效率的检测

[0015] 提取质粒，转染细胞后提取总RNA，逆转录为cDNA后利用定量PCR检测沉默效率。

发明的有益效果

有益效果

[0016] 本发明中设计合成的shRNA片段，能够特异性的沉默 **DD1 α** 。实验结果表明，构建成功的载体，能够特异性的沉默 **DD1 α** ，降低细胞内 **DD1 α** 的表达。因此，**DD1 α** 沉默载体的应用能够更为精细地研究 **DD1 α** 的功能，为解释相关机制提供理论基础

[0017] 。

对附图的简要说明

附图说明

[0018] 图1为转染pSUPER-DD1 α 载体后Jurkat细胞的定量PCR检测 **DD1 α** 基因表达情况结果示意图。

实施该发明的最佳实施例

本发明的最佳实施方式

[0019] 下面结合附图与具体实施例对本发明做进一步的说明。

[0020] Jurkat细胞购自上海生命科学院细胞资源中心，RNeasy Mini Kit购自Qiagen公司。下文所述完全培养基为加入了10%胎牛血清的细胞培养基。

[0021] 实施例一 shRNA寡核苷酸序列的设计

- [0022] 在GenBank查找到 **DD1 α** 的mRNA全序列，经BLAST同源性比对证实特异性后应用RNAstructure 4.4软件对靶mRNA序列的二级结构进行评估，最后获得靶核苷酸序列，如SEQ ID NO: 1所示。
- [0023] 以Bgl II-GN18-TT-loop-81NC-Hind III形式设计59bp序列，81NC为NG18的反向互补，5'端为Bgl II酶切位点，3'端为Hind III酶切位点，所获序列分别如SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO: 3所示。
- [0024] 实施例二 shRNA慢病毒表达载体的构建
- [0025] 将合成的shRNA寡核苷酸单链等量混合，退火形成双链的shRNA。取2 μ g pSUPER载体，Bgl II和Hind III双酶切，电泳，回收线性pSUPER大片段。将线性化pSUPER浓度稀释至100 ng/ μ L，与退火所得双链shRNA用T4DNA连接酶（NEB）4 $^{\circ}$ C连接过夜。将连接产物转化Top10感受态细胞，涂布在具有Kan抗性的LB平板上。在转化平板上挑取单克隆摇菌，培养过夜后送至上海生工测序。测序正确的菌用于无内毒素质粒的提取，获得pSUPER- **DD1 α** 载体。
- [0026] 实施例三 pSUPER- **DD1 α** 载体转导Jurkat细胞。
- [0027] 培养Jurkat细胞，取生长状态良好的细胞接种到六孔板中，每孔 10^6 个细胞，18 h后细胞密度约为60%，利用Lipofectamin 2000将提取的pSUPER- **DD1 α** 载体3 μ g转导Jurkat细胞。6 h后，将培养基换为新鲜的完全培养基继续培养48 h。
- [0028] 实施例四 **DD1 α** 基因表达水平检测
- [0029] 分别接种Jurkat细胞和转导了pSUPER- **DD1 α** 载体的Jurkat细胞至6孔板。细胞密度达到80%-90%时，用RNeasy Mini Kit提取各组细胞的总RNA，利用PrimeScript RT reagent Kit将mRNA逆转录为cDNA，逆转录条件：37 $^{\circ}$ C，15min；85 $^{\circ}$ C，5s；4 $^{\circ}$ C， ∞ 。反转录结束后，加入90 μ l的RNase-Free dH₂O稀释cDNA，-20 $^{\circ}$ C保存。
- [0030] 取各组细胞的cDNA 1 μ L为模板，以GAPDH为内参，实时荧光定量PCR（QPCR）检测 **DD1 α** 相对表达量，设置反应条件：95 $^{\circ}$ C 10s，1个循环；95 $^{\circ}$ C 5s，60 $^{\circ}$ C 30s，共40个循环，利用SYBR Primescript RT-PCR Kit检测各组细胞 **DD1 α**

基因相对表达量，结果如图2所示。结果显示转导了pSUPER- **DD1 α** 载体的Jurkat细胞， **DD1 α**

基因表达明显受到抑制，干扰片段对目的基因的抑制效率达81.9% \pm 6.3%，从而证明本实验中采用的pSUPER- **DD1 α** 载体能特异抑制 **DD1 α** 基因的表达，且抑制效果非常显著。

[0031] 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。

工业实用性

[0032] 本发明中设计合成的shRNA片段，能够特异性的沉默 **DD1 α** 。实验结果表明，构建成功的载体，能够特异性的沉默 **DD1 α** ，降低细胞内 **DD1 α** 的表达。因此，**DD1 α** 沉默载体的应用能够更为精细地研究 **DD1 α** 的功能，为解释相关机制提供理论基础

[0033] 。

权利要求书

[权利要求 1] 靶向沉默人DD1 α 基因的shRNA，其特征是shRNA核心序列为5'-GGTGCAGACAGGCAAAGAT-3'。

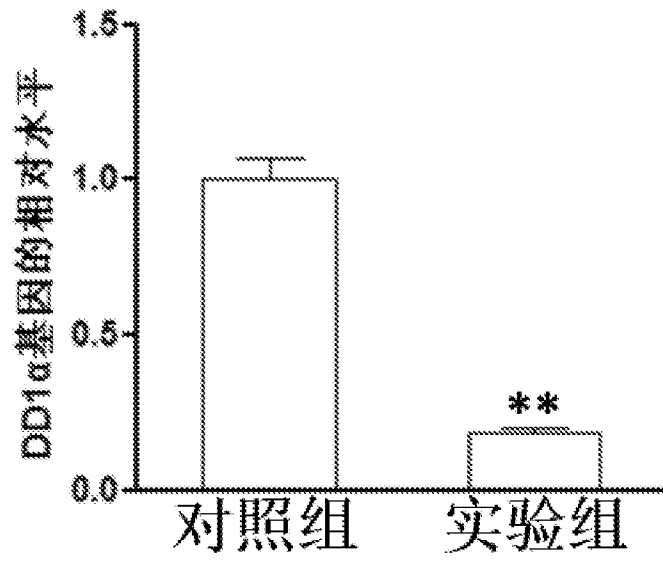


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/098914

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113 (2010.01) 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)

C12N

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)

Database: DWPI, SIPOABS, CNABS, CPRSABS, USTXT, EPTXT, CNTXT, WOTXT, TWTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System, DDBJ+EMBL+GENBANK Keyword: 短发夹 RNA, 抑制, 沉默, 程序性细胞死亡蛋白配体-1, shrna, DD1a, PD-L1, inhibition, silence, search on sequence GGTGCAGACAGGCAAAGAT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017112741 A1 (NOVARTIS AG et al.) 29 June 2017 (29.06.2017), see the abstract	1
A	CN 106955354 A (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CAS) 18 July 2017 (18.07.2017), see entire document	1
A	CN 105586320 A (HOPE BIO-TECHNOLOGY SUZHOU CO., LTD.) 18 May 2016 (18.05.2016), see entire document	1

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 09 April 2018	Date of mailing of the international search report 08 May 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer SUN, Yanke Telephone No. (86-10) 62088439

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/098914

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 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 filed or furnished:
 - a. (means)
 - on paper
 - in electronic form
 - b. (time)
 - in the international application as filed
 - together with the international application in electronic form
 - subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/098914

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2017112741 A1	29 June 2017	None	
CN 106955354 A	18 July 2017	WO 2017121320 A1	20 July 2017
CN 105586320 A	18 May 2016	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/098914

<p>A. 主题的分类 C12N 15/113(2010.01) i</p> <p>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</p>														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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)) 数据库: DWPI, SIPOABS, CNABS, CPRSABS, USTXT, EPTXT, CNTXT, WOTXT, TWTXT, CNKI, GOOGLE学术, 中国专利生物序列检索系统, DDBJ+EMBL+GENBANK 检索词: 短发夹RNA, 抑制, 沉默, 程序性细胞死亡蛋白配体-1, shrna, DD1α, PD-L1, inhibition, silence, 对序列GGTGCAGACAGGCAAAGAT进行检索</p>														
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017112741 A1 (NOVARTIS AG等) 2017年 6月 29日 (2017 - 06 - 29) 参见摘要</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106955354 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2017年 7月 18日 (2017 - 07 - 18) 参加全文</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105586320 A (厚朴生物科技苏州有限公司) 2016年 5月 18日 (2016 - 05 - 18) 参见全文</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	WO 2017112741 A1 (NOVARTIS AG等) 2017年 6月 29日 (2017 - 06 - 29) 参见摘要	1	A	CN 106955354 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2017年 7月 18日 (2017 - 07 - 18) 参加全文	1	A	CN 105586320 A (厚朴生物科技苏州有限公司) 2016年 5月 18日 (2016 - 05 - 18) 参见全文	1
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
A	WO 2017112741 A1 (NOVARTIS AG等) 2017年 6月 29日 (2017 - 06 - 29) 参见摘要	1												
A	CN 106955354 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2017年 7月 18日 (2017 - 07 - 18) 参加全文	1												
A	CN 105586320 A (厚朴生物科技苏州有限公司) 2016年 5月 18日 (2016 - 05 - 18) 参见全文	1												
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		<input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。												
<p>* 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 “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</p>		<p>“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</p>												
<p>国际检索实际完成的日期 2018年 4月 9日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期 2018年 5月 8日</p>												
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员 孙彦珂 电话号码 (86-10)62088439</p>												

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对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- 纸件形式
- 电子形式
- b. (提交时间)
- 含在申请提交时的国际申请中
- 以电子形式与国际申请一起提交
- 为检索之用随后提交本单位
2. 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。
3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2017/098914

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)
WO	2017112741	A1	2017年 6月 29日	无			
CN	106955354	A	2017年 7月 18日	WO	2017121320	A1	2017年 7月 20日
CN	105586320	A	2016年 5月 18日	无			