

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910043674.9

[43] 公开日 2009年12月9日

[11] 公开号 CN 101596316A

[22] 申请日 2009.6.12

[21] 申请号 200910043674.9

[71] 申请人 长沙新生康源生物医药有限公司

地址 410006 湖南省长沙市长沙高新开发区
火炬城 M0 组团北七楼

[72] 发明人 谭拥军

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 13 页

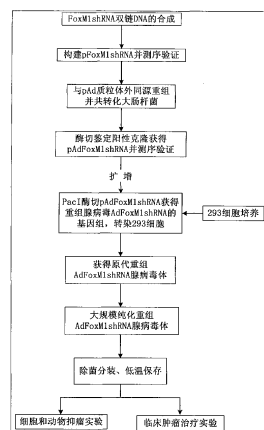
[54] 发明名称

表达 FoxM1siRNA 的重组腺病毒及其在肿瘤治疗和预防中的应用

[57] 摘要

针对转录因子 Forkhead Box M1 (FoxM1) 核酸和蛋白或其功能片段制备的各类药物, 包括化学合成药物、RNA 干扰分子、小分子多肽片段、抗体等及其药物组合, 通过抑制 FoxM1 的表达、活性和功能, 阻断肿瘤生长, 用于预防、治疗人类肿瘤。运用病毒载体, 构建能在肿瘤中表达抑制 FoxM1 的短发夹 RNA (shRNA) 的基因治疗载体。本发明依据抑制 FoxM1 表达的小分子干扰 RNA (siRNA) 序列, 构建了能表达针对 FoxM1 的 shRNA 的腺病毒载体; 该载体感染肿瘤细胞后高量表达特定的 shRNA, 并随后被加工成针对 FoxM1 mRNA 分子的 siRNA, 抑制 FoxM1 表达而阻断肿瘤的生长。本发明的腺病毒载体, 可制备成临床级基因治疗制品, 用于治疗 and 预防人类恶性肿瘤。

重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒载体的构建与制备技术路线图



1、一种预防、治疗或延缓人类肿瘤的方法，其特征在于，针对人肿瘤生长基因 FoxM1 核酸和蛋白或其功能片段设计制备的各类药物，包括化学合成药物、RNA 干扰分子、小分子多肽片段、抗体等及其药物组合，抑制或降低 FoxM1 的表达、活性和功能。

2、如权利要求 1 所述方法，其特征在于，一种病毒载体与能表达抑制 FoxM1 的特定短发夹 RNA (shRNA) 而抑制肿瘤生长的重组体，该重组体是由 DNA 克隆技术构建的病毒载体与针对 FoxM1 的 shRNA 表达盒相结合，构建成一个能在肿瘤细胞中表达针对 FoxM1 的 shRNA 的基因治疗载体。

3、如权利要求 2 所述的重组体，其特征在于，该重组体的载体是腺病毒载体或含有腺病毒载体序列的复合载体。

4、如权利要求 3 所述的重组体，其特征在于，它是由腺病毒载体与针对 FoxM1 的 shRNA 表达盒构建而成，其融合序列为：

腺病毒 5 基因组序列左侧—GGA CCA CTT TCC CTA CTT TCG AAA AAG TAG GGA AAG TGG TCC—腺病毒 5 基因组序列右侧

其中：

- 1) 腺病毒 5 基因组序列左侧和腺病毒 5 基因组序列右侧见 Cenebank No: HC_001406 的腺病毒 5 基因组全序列
- 2) 1-458: 腺病毒左侧臂碱基 1-458, 包括 5' L-ITR 和病毒包装信号
- 3) 459-572: 病毒构建所需序列, 包括 attB1 位点, 碱基 512-536
- 4) 573-836: U6 启动子
- 5) 837-879: FoxM1 shRNA
- 6) 880-885: Pol III 终止子
- 7) 886-931: 病毒构建所需序列, 包括 attB2 位点, 碱基 890-914
- 8) 932-30931: 腺病毒右侧臂, 其 932 位碱基位于腺病毒 5 基因组序列正向 3513 位碱基, E3 区缺失, 包括 3' R-ITR。

5、如权利要求 2 所述的重组体，其特征在于，该重组体的针对 FoxM1 的 shRNA 表达盒是由 U6 启动子+表达 FoxM1 特异性 shRNA 的双链 oligo+Pol III 终止子构成的特征序列。

6、如权利要求 2 所述的重组体，其特征在于，该重组体的针对 FoxM1 的 shRNA 序列来源于能抑制 FoxM1 表达的小分子干扰 RNA (siRNA) 序列：GGA CCA CUU UCC CUA CUU U。FoxM1 特异性的 shRNA 表达盒中双链 oligo 序列是由 FoxM1siRNA 序列+CGAA+FoxM1siRNA 反义序列组成的 DNA 序列。

7、如权利要求 2 所述的重组体，其特征在于，该重组体的针对 FoxM1 的 shRNA 表达盒中双链 oligo 序列还可由 FoxM1siRNA 序列+任意 4 至 15 核苷酸+FoxM1siRNA 反义序列组成。

8、如权利要求 3 所述的重组体，其特征在于，该重组体是通过位点特异性同源重组获得的，首先构

建含 attB1 重组位点/针对 FoxM1 的 shRNA 表达盒/ attB2 重组位点的质粒 pFoxM1shRNA，再与含有腺病毒左侧碱基 1-458/attR1 重组位点/氯霉素抗性基因 (CmR) 和大肠杆菌 ccdB 基因/ attR2 重组位点/腺病毒右侧碱基 3513-35935 (E3 缺失) 的 pAd 质粒在体外进行位点特异性同源重组，转化大肠杆菌获得重组体 pAdFoxM1shRNA，随后经内切酶 PacI 线性化去除原核质粒序列，再转染 293 细胞，获得重组腺病毒体 AdFoxM1shRNA。

9、如权利要求 1 所述的方法用于制备治疗各种恶性肿瘤的药物及预防肿瘤的发生和手术切除后的肿瘤再生的药物。

10、如权利要求 2 所述的重组体用于制备进行静脉注射、动脉注射，瘤内注射、肌肉注射、皮下注射、器官注射和胸、腹水内注射的药物。

表达 FoxM1siRNA 的重组腺病毒及其在肿瘤治疗和预防中的应用

技术领域

本发明涉及医药领域，针对 FoxM1 核酸和蛋白或其功能片段设计制备的各类药物，通过抑制或降低 FoxM1 的表达、活性和功能，用于预防、治疗或延缓人类肿瘤。具体地说是涉及肿瘤基因治疗领域，涉及一种表达针对 FoxM1 的 shRNA 的重组腺病毒及其在肿瘤治疗和预防中的应用。

背景技术

转录因子 Forkhead Box M1 (FoxM1) 是完成细胞周期所必需的调控蛋白，抑制其表达能有效终止细胞周期、阻断细胞生长[1-5]。目前已研究的各种人实体瘤样本的肿瘤细胞中，都存在 FoxM1 过表达的现象[6-9]，对其表达水平的检测，已被用于多种肿瘤的诊断和预后（美国专利 7056674 “Prediction of likelihood of cancer recurrence”、美国专利 7081340 “Gene expression profiling in biopsied tumor tissues”、美国专利 7308364 “Diagnosis of multiple myeloma on gene expression profiling”、美国专利 7526387 “Expression profile algorithm and test for cancer prognosis”、美国专利 7531300 “Method of diagnosing breast cancer”）。在小鼠活体肿瘤模型中特异性抑制 FoxM1 表达后，肿瘤的发生和发展都受到阻断[10-12]。这些证据表明，FoxM1 可作为抑制肿瘤生长的靶基因[13, 14]。因此，本发明提出针对 FoxM1 核酸和蛋白或其功能片段设计制备的各类药物，包括化学合成药物、RNA 干扰分子、小分子多肽片段、抗体等及其药物组合，通过抑制或降低 FoxM1 的表达、活性和功能，用于预防、治疗或延缓人类肿瘤。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是正常生物体内抑制特定基因表达的一种现象，它是指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[15]。外源双链 RNA 进入细胞后产生的小分子干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 的反义链和多种核酸酶形成了沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)，RISC 具有结合和切割 mRNA 的作用而介导 RNA 干扰的过程。RNAi 具有抑制基因表达的特异性 and 高效性，该技术已经成为研究基因功能的重要工具，并在病毒感染性疾病、遗传性疾病和肿瘤的治疗等方面发挥重要作用[16-19]。本发明运用腺病毒介导的 RNA 干扰技术，通过在肿瘤细胞中高量表达 FoxM1 特异性的 shRNA，抑制肿瘤细胞中 FoxM1 的表达，从而达到抑制肿瘤生长的目的。

外源基因不能主动进入细胞。通常把基因治疗中将治疗基因导入细胞内的运载工具称作基因转移载体，它分为病毒载体和非病毒载体两大类[20, 21]。以人工改造的病毒作为基因进入细胞的运输工具称为病毒载体，它能与细胞的表面受体相互识别继而把外源基因转入靶细胞内。病毒具有一些独特的性质，如多数病毒可感染特异的细胞，在细胞内不易降解等，因此病毒载体是良好的基因转载体。目前已被用作载体的病毒有腺病毒、逆转录病毒、腺相关病毒、疱疹病毒等[20]，尤其常用的是腺病毒。腺病毒是长度

约 36Kb 的线性双链 DNA 无包膜病毒，可感染包括非分裂细胞在内的几乎所有细胞，能制备获得很高的病毒滴度[22]。基因治疗采用的腺病毒载体经改造去除了部分病毒复制必须的基因(E1 和 E3 区缺失)，使之在野生环境下无法自我复制，确保了病毒载体的安全性并降低其免疫原性，获得了插入外源基因的空间[23, 24]。腺病毒 DNA 不整合到宿主细胞基因组中，对人体无遗传毒性，作为基因载体，重组腺病毒具有感染效率高、外源基因高表达和安全的特点[25]并有效用于基础科研[26-29]。目前，全世界基因治疗临床方案所使用的载体系统中，重组腺病毒载体占 26%，数目居各方案之首。其他可用于基因治疗的病毒和非病毒载体均存在不同的优缺点。

肿瘤主要表现为细胞失去控制的异常增生，导致机体局部形成肿块。恶性肿瘤除了表现肿瘤本身的持续增殖之外，还会对邻近正常组织的侵犯及经血管、淋巴管和体腔转移到身体其它部位，而这往往是肿瘤致死的原因。世界卫生组织报告，2005 年全球因恶性肿瘤死亡 760 万人，患恶性肿瘤病例 2460 万，估计到 2020 年将达到 3000 万，每年将造成 1000 多万人死亡。过去的 10 年间，全球恶性肿瘤发病率增长了 22%，如果这一趋势继续，每年新病例预期将从 2002 年 1090 万增加至 2020 年 1600 万。它已经成为常见且严重威胁人们生命和生活质量的主要疾病之一。

近年来随着对肿瘤发病分子机制及细胞增殖调控机理研究的深入，肿瘤的基因治疗研究取得了巨大的进展，根据肿瘤的类型和分布，采用了多种技术来抑制和消除肿瘤细胞，许多已经应用到了临床试验[30-32]。目前基因临床中，67%病例是对于肿瘤的基因治疗，占有基因临床治疗的绝大部分。

主要参考文献：见《实质审查参考资料》

发明内容

本发明旨在寻找一种预防、治疗或延缓人类肿瘤的方法。运用 RNAi 技术，针对癌细胞增殖过程中一个重要基因 FoxM1，设计出针对该基因核酸序列的 shRNA 片段，并将其与一种安全高效的病毒载体相结合，使之可以直接在肿瘤细胞中转录该片段，抑制肿瘤细胞内 FoxM1 的表达，从而达到抑制肿瘤细胞增殖的目的，在此基础上开发出一种新型的抗肿瘤药物。

本发明主要涉及到病毒基因治疗重组载体的制备方法及其用于制备预防或/和治疗肿瘤药物的应用。

本发明运用 DNA 克隆技术，先构建完整的针对 FoxM1 的 shRNA 转录表达盒，然后将其与病毒载体相结合，构建成一个能在肿瘤细胞中表达针对 FoxM1 的 shRNA 的基因治疗重组体。该重组体选用的载体可以为 DNA 病毒或 RNA 病毒的任一种，其优选载体为腺病毒载体或含有腺病毒载体序列的复合载体，最优选载体为腺病毒载体。

该重组体由腺病毒载体与针对 FoxM1 的 shRNA 表达盒构建而成，定义为重组腺病毒体 AdFoxM1shRNA，其融合序列为：

腺病毒 5 基因组序列左侧—GGA CCA CTT TCC CTA CTT TCG AAA AAG TAG GGA AAG TGG TCC—腺病毒 5 基因组序列右侧

其中：

- 1) 腺病毒 5 基因组序列左侧和腺病毒 5 基因组序列右侧见 Genbank No: HC_001406 的腺病毒 5 基因组全序列
- 2) 1-458: 腺病毒左侧臂碱基 1-458, 包括 5' L-ITR 和病毒包装信号
- 3) 459-572: 病毒构建所需序列, 包括 attB1 位点, 碱基 512-536
- 4) 573-836: U6 启动子
- 5) 837-879: FoxM1 shRNA
- 6) 880-885: Pol III 终止子
- 7) 886-931: 病毒构建所需序列, 包括 attB2 位点, 碱基 890-914
- 8) 932-30931: 腺病毒右侧臂, 其 932 位碱基位于腺病毒 5 基因组序列正向 3513 位碱基, E3 区缺失, 包括 3' R-ITR。

该重组体的针对 FoxM1 的 shRNA 表达盒是由 U6 启动子+表达 FoxM1 特异性 shRNA 的双链 oligo+Pol III 终止子构成的特征序列。

本发明的重组体是通过位点特异性同源重组获得的, 首先构建含 attB1 重组位点/针对 FoxM1 的 shRNA 表达盒/ attB2 重组位点的质粒 pFoxM1shRNA, 再与含有腺病毒左侧碱基 1-458/attR1 重组位点/氯霉素抗性基因 (CmR) 和大肠杆菌 ccdB 基因/ attR2 重组位点/腺病毒右侧碱基 3513-35935 (E3 缺失) 的 pAd 质粒在体外进行位点特异性同源重组, 转化大肠杆菌获得重组体 pAdFoxM1shRNA, 随后经内切酶 PacI 线性化去除原核质粒序列, 再转染 293 细胞, 获得重组腺病毒体 AdFoxM1shRNA。

根据上述方案, 首先通过人工合成的方法合成 DNA 序列 CAC CGG GAC CAC TTT CCC TAC TTT CGA AAA AGT AGG GAA AGT GGT CC 和互补链 AAA AGG ACC ACT TTC CTA CTT TTT CGA AAG TAG GGA AAG TGG TCC C, 经变性与复性后形成双链 DNA, 克隆成质粒 pFoxM1shRNA, 该质粒含 U6 启动子和 attB1、attB2 重组位点。合成得到的双链 DNA 位于 U6 启动子下游, 构成针对 FoxM1 的 shRNA 表达盒。测序验证后, 运用细胞转染技术证实该质粒在肿瘤细胞中能通过表达针对 FoxM1 的 shRNA 而抑制 FoxM1 的表达。

运用质粒 pFoxM1shRNA 和含有腺病毒左侧碱基 1-458/attR1 重组位点/氯霉素抗性基因 (CmR) 和大肠杆菌 ccdB 基因/ attR2 重组位点/腺病毒右侧碱基 3513-35935 (E3 缺失) 的 pAd 质粒, 通过重组酶反应, 在体外进行位点特异性同源重组 (attB1 与 attR1 之间、attB2 与 attR2 之间), 转化大肠杆菌获得重组体质粒 pAdFoxM1shRNA。测序验证后, 运用细胞转染技术证实该质粒能抑制 FoxM1 的表达。

进一步大量扩增 pAdFoxM1shRNA 质粒, 经内切酶 PacI 线性化, 再转染 293 细胞, 在细胞内包装成腺病毒, 获得重组腺病毒体 AdFoxM1shRNA。

该重组 FoxM1shRNA 腺病毒载体具有下列特点：

它是由腺病毒载体和 FoxM1shRNA 转录表达盒两部分构成，

1. 结构特点：其本质是一个活的重组腺病毒体，不同于现有的化学合成药物、中药、基因工程药物等。它是直接实现目的 DNA 片段在体内表达，生物学活性高，可有效达到治疗作用；腺病毒载体转染率高、可制备高效价的病毒颗粒，宿主范围广，安全性好，致病性低，尤其是经改建后的腺病毒载体免疫原性大大下降，使目的基因易于在机体内稳定、持久地转录表达；FoxM1shRNA 转录表达盒是用 U6 启动子直接启动 FoxM1shRNA 的转录，末端是 Poly III RNA 终止子信号，从而构成一个完整的 U6 启动子-FoxM1shRNA RNAi 转录表达盒 (U6-FoxM1shRNA RNAi expression cassette)，可导致 FoxM1shRNA 在靶细胞中高效转录。

2. 应用特点：该重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒载体为广谱抗癌药，其作用机理为：(一) 通过直接抑制肿瘤细胞内 FoxM1 的表达而导致细胞增殖过程停止，达到抑制肿瘤增殖的目的；(二) 已发表实验证据表明降低肿瘤组织 FoxM1 的表达可以抑制肿瘤内新生血管的形成，从而达到抑制肿瘤的目的；(三) 降低肿瘤细胞内 FoxM1 的表达可以促使细胞对 DNA 损伤更为敏感，增进 DNA 损伤剂和放射性疗法的治疗效果。利用该重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒载体进行的针对多种人肿瘤细胞系增殖和成瘤抑制实验表明，该重组体可以对肝癌、肺癌、子宫颈癌、骨肉瘤、鼻咽癌等的增殖有明显的抑制作用。同时，抑制 FoxM1 表达增高肿瘤细胞内 DNA 损伤的水平并增进 DNA 损伤剂造成的 DNA 损伤效果。

本发明所制备的重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒体，通过转染到基因工程改造过的特定细胞中培养、繁殖，浓缩纯化即可成为用于临床的重组腺病毒 AdFoxM1shRNA 抗癌注射液。

其中本发明实验所用的 293 细胞系 (ATCC CRL-1573, 第 32 代次, 2007 年 3 月 28 日从 ATCC 订购) 来源于经 5 型腺病毒 (Ad5) DNA 转化人胚胎肾上皮细胞获得，含有 Ad5 5' 端的 11% 的基因组 (包括 E1A、E1B 基因)。该细胞对腺病毒的感染和生长是高度许可的。

应用该重组 FoxM1shRNA 腺病毒体在多种人源肿瘤细胞中进行的研究表明，AdFoxM1shRNA 感染鼻咽癌细胞 CNE、肝癌细胞 HepG2、子宫颈癌细胞 HeLa、肺癌细胞 A549、骨肉瘤细胞 U2OS 等细胞株，与对照组相比，肿瘤细胞增殖出现明显抑制，细胞计数结果差异明显，实例见附图 7 和图 9-12，同时，AdFoxM1shRNA 能明显降低 CNE 鼻咽癌细胞的成瘤能力，见附图 8。另外，AdFoxM1shRNA 感染肿瘤细胞导致 FoxM1 表达降低后，胞内 DNA 损伤程度增高，同时肿瘤细胞对 DNA 损伤药剂造成 DNA 损伤的敏感性增加，图 13 中显示 AdFoxM1shRNA 感染后，肿瘤细胞中出现大量 DNA 断裂；经 DNA 损伤药剂 Etoposide (20 mM) 造成的 DNA 损伤后 24 小时，被 AdFoxM1shRNA 感染的细胞与未感染细胞或对照病毒感染的细胞相比，胞内未被修复的 DNA 断裂明显增多，暗示本药物可以增加临床肿瘤治疗中化疗与放疗的效果。

本发明的贡献在于，利用“RNA 干扰”原理，构建 U6 启动子-FoxM1shRNA 转录表达盒并克隆到腺病毒 E1 缺失株中，通过该病毒感染肿瘤细胞或组织，使其在肿瘤内表达出 FoxM1 的干扰序列，抑制 FoxM1 的表达，进而阻滞细胞增殖过程，达到抑制肿瘤生长的目的。“RNA 干扰”药物被认为是未来肿瘤治疗的一种非

常有潜力的药物。直接利用体外合成的 RNA 干扰药物进行的抗肿瘤研究, 存在成本高、RNA 不稳定和易降解、药效作用时间短等问题, 使其实现临床应用存在较大的难度。本发明利用重组腺病毒载体携带 RNA 干扰序列, 直接在肿瘤细胞内表达, 解决了直接合成 RNA 干扰药物存在的一系列应用难题。

运用重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒载体进行的抗肿瘤研究表明, 该腺病毒可以在肿瘤细胞内持续、高效地表达 FoxM1shRNA, 明显降低肿瘤细胞内 FoxM1 的表达水平, 使肿瘤细胞的增殖停滞。同时, 由于降低 FoxM1 的表达可抑制肿瘤细胞的 DNA 损伤修复能力, 使其对放射性照射或 DNA 损伤药剂造成的 DNA 损伤更为敏感, 因而在临床肿瘤治疗中可结合放射性疗法或化疗, 增加肿瘤细胞对已有传统治疗手段的敏感度, 提高治疗效果。另外, 已有实验证据表明 FoxM1 参与新生血管生成, 抑制 FoxM1 的表达可以降低肿瘤内新生血管的生成, 因此, 直接将该重组体注射到肿瘤组织内, 抑制 FoxM1 表达有助于降低肿瘤内新生血管生成, 从而抑制肿瘤整体生长的目的, 提高肿瘤患者的生存率。本发明实现了将外源性 RNA 干扰序列在细胞内高效表达, 从而抑制细胞增殖特异性基因 FoxM1 的功能, 阻断肿瘤细胞增殖和肿瘤生长, 使得肿瘤基因治疗的目的得以实现。

附图说明

图 1 是本发明的重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒体的构建与制备技术路线框图。

图 2 是本发明的重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒体的构建过程示意图。

图 3 是所获 pAdFoxM1shRNA 质粒, 经纯化后 PacI 酶切的琼脂糖凝胶分析结果。泳道 1 为分子量标志, 泳道 2 为 pAdFoxM1shRNA/PacI 限制性内切酶酶切样品。

图 4 是 CsCl₂ 密度梯度离心纯化的重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒体及病毒滴度测定和所制备病毒中复制型腺病毒的检测。

图 5 是已纯化重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒体感染 U2OS 细胞后, 提取细胞裂解物, 后经 Western blotting 测定 FoxM1 蛋白水平的分析结果。图中: 1, 人 U2OS 骨肉瘤细胞, 2, AdFoxM1shRNA(小鼠), 感染 U2OS 细胞 3 天后, 3, AdFoxM1shRNA(人), 感染 U2OS 细胞 3 天后。

图 6 是重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒体抑制 CNE 鼻咽癌细胞中 FoxM1 的表达的分析结果。

图 7 是重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒体抑制 CNE 鼻咽癌细胞增殖的分析结果。

图 8 是重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒体抑制 CNE 鼻咽癌细胞成瘤能力的软琼脂集落形成实验的分析结果。

图 9 是重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒体对 HepG2 肝癌细胞增殖抑制作用的曲线示意图。

图 10 是重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒体对 HeLa 宫颈癌细胞增殖抑制作用的曲线示意图。

图 11 是重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒体对 A549 肺癌细胞增殖抑制作用的曲线示意图。

图 12 是重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒体对 U2OS 骨肉瘤细胞增殖抑制作用的曲线示意图。

图 13 是重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒体增高肿瘤细胞对 DNA 损伤药剂造成 DNA 损伤的敏感性的 γ H2AX foci 免疫染色结果。

具体实施方式

下列实施例是对本发明的进一步解释和说明，对本发明不构成任何限制。

实施例 1，构建重组腺病毒体 AdFoxM1shRNA 及其鉴定

本发明的重组 AdFoxM1shRNA 腺病毒体的构建与制备技术路线见图 1。

1、根据 FoxM1 的 siRNA 序列，人工合成 FoxM1shRNA 的 DNA 正链 CAC CGG GAC CAC TTT CCC TAC TTT CGA AAA AGT AGG GAA AGT GGT CC 和互补链 AAA AGG ACC ACT TTC CTA CTT TTT CGA AAG TAG GGA AAG TGG TCC C。经变性与复性后形成双链 DNA，连接形成质粒 pFoxM1shRNA：FoxM1shRNA 双链 DNA 位于 U6 启动子下游，构成针对 FoxM1 的 shRNA 表达盒。

2、将 pFoxM1shRNA 质粒与的 pAd 质粒进行体外同源重组反应，并转化大肠杆菌，经 4℃ 孵育 30 分钟、42℃ 热休克 45 秒钟后，加 1ml LB 培养液 37℃ 振荡 1 小时；将菌铺到 LB 琼脂培养板，待其上长出克隆子，用灭菌牙签挑取单个细菌克隆，然后放入干净的含有 LB 的培养瓶中，24 小时后，按常规方法提取质粒，获得阳性克隆质粒 pAdFoxM1shRNA（图 2）。

3、经 CsCl₂ 密度梯度离心纯化大量制备 pAdFoxM1shRNA 质粒后，用限制性内切酶 PacI 将该质粒酶切过夜，琼脂糖胶电泳分析，可见 AdFoxM1shRNA 基因组片段（图 3）。

4、从 pAdFoxM1shRNA/PacI 酶切电泳后的琼脂糖胶中分离获得 AdFoxM1shRNA 基因组片段，用脂质体转染方法将该片段转染进 293 细胞。7 天后细胞出现病毒感染病变效应，收集细胞和上清。经 37℃、-80℃ 反复冻融裂解细胞三次，2000rpm 离心 10 分钟，取上清，该上清中含第一代 AdFoxM1shRNA 腺病毒体。运用该上清感染更多量的 293 细胞来扩增病毒，3 天后收集出现病变效应的细胞。冻融裂解细胞三次后，病毒样本进行 CsCl₂ 密度梯度离心二次，条件为：第一次，下层 CsCl₂ 密度为 1.4 g/L，上层 CsCl₂ 密度为 1.2 g/L，23,000rpm 4℃ 离心 1.5 小时，收集腺病毒体分离带；第二次，同样条件离心 16 小时后收集腺病毒体分离带（图 4，A 箭头所示）。病毒样品经 4℃ 透析 4 小时，用 0.25um 的滤膜过滤除菌分装，-80℃ 保存。

5、运用组织培养半数感染剂量法测定 AdFoxM1shRNA 病毒滴度：（1）用完全培养基稀释病毒；（2）制备 1×10^5 cells/ml 的 293 细胞悬液，以 100μl/孔接种于 96 孔板；（3）每排前 10 孔用不同稀释倍数（ 10^5 至 10^{-12} ）的病毒 100 μl 进行感染，后 2 孔加入 100μl 完全培养基做阴性对照；（4）被感染细胞置于 5%CO₂ 孵箱内 37℃ 培养 10d，然后在荧光倒置显微镜下观察，判断并记录每排细胞病变效应情况，只要有少量细胞发生病变效应即为阳性。按照下述公式计算病毒滴度： $T=10^{1+d(S-0.5)}$ IU/ml，其中 $d=\text{Log}_{10}$ 稀释倍数， S 是从第一次稀释起的阳性比率之和。所得 AdFoxM1shRNA 病毒滴度结果见图 4，B， $T=10^{9.3}=2.0 \times 10^9$ IU/ml。

6、所制备 AdFoxM1shRNA 病毒中复制型腺病毒的检测：接种 A549 细胞于 12 孔板（ 4×10^5 cells/孔），5%CO₂ 孵箱 37℃ 培养过夜，将 3×10^{10} 病毒颗粒稀释到 120 ml 完全培养基中后，感染 A549 细胞（1 ml/孔，共 10 个 12 孔板），另设野生型腺病毒 Ad5 感染板（阳性对照）和非处理板（阴性对照）。培养 2 周后显微

镜下观测是否出现病变效应。结果如图 4, C 所示, 10 个板都无病变效应形成, 表明所制备 AdFoxM1shRNA 病毒中复制型腺病毒水平低于 1 复制型腺病毒/ 3×10^{10} 病毒颗粒, 符合 SFDA 标准。图 4, D 为阳性对照。

7、AdFoxM1shRNA 腺病毒体抑制肿瘤细胞中 FoxM1 的表达。运用 AdFoxM1shRNA 腺病毒体感染 U2OS 细胞 (10 IU/cell), 3 天后收集细胞制备蛋白, 取 $100\mu\text{g}$ 蛋白样品上样, 运用 Western Blotting 方法分析 FoxM1 的蛋白水平。同时以未处理细胞和小鼠 FoxM1 特异性的 AdFoxM1shRNA (Mouse) 感染细胞为对照。β actin 蛋白水平作为上样对照。结果见图 5, 证实 AdFoxM1shRNA 腺病毒体能抑制 U2OS 肿瘤细胞中 FoxM1 的表达。

实施例 2, AdFoxM1shRNA 腺病毒体抑制 CNE 鼻咽癌细胞的增殖及成瘤

鼻咽癌在我国是常见的恶性肿瘤之一, 为耳鼻咽喉科最常见的恶性肿瘤, 占头颈部恶性肿瘤的 78.08%, 占上呼吸道癌的 92.99%。鼻咽癌原发于鼻咽粘膜上皮, 具有原发部位隐蔽、不易被早期发现、病理分化差、恶性程度高、易呈浸润性生长及早期转移的特点。95% 以上的鼻咽癌恶性程度高, 生长快, 容易出现淋巴结或血道转移, 对这种晚期肿瘤, 传统的放射治疗效果较差。

1、AdFoxM1shRNA 腺病毒体抑制 CNE 鼻咽癌细胞中 FoxM1 的表达。运用 AdFoxM1shRNA 腺病毒体感染鼻咽癌细胞株 CNE (2000 病毒颗粒/细胞), 3 天后收集样品制备总 RNA 和蛋白裂解液, 采用半定量 RT-PCR 方法和 Western Blotting 方法检测 FoxM1 表达水平。与 CNE 细胞及对照病毒 AdGFP 感染细胞相比, AdFoxM1shRNA 感染样品中 FoxM1 mRNA 水平明显降低 (图 6, A); 同时, FoxM1 的蛋白水平明显下降 (图 6, B), 说明 AdFoxM1shRNA 腺病毒体能有效抑制 CNE 细胞中 FoxM1 的表达。

2、AdFoxM1shRNA 腺病毒体抑制 CNE 鼻咽癌细胞的增殖。AdFoxM1shRNA 感染 CNE 细胞 (2000 病毒颗粒/细胞) 后, 显微观测可发现细胞形态发生显著变化, 出现细胞增殖减缓的外形特征, 胞体增大 (图 7, A)。用 AdFoxM1shRNA (2000 病毒颗粒/细胞) 感染 CNE 细胞, 起始细胞数为 1×10^5 个, 随后每天计数, 确定细胞增殖速度, 同时用 AdGFP 对照病毒感染细胞作为对照。细胞计数表明, AdFoxM1shRNA 能明显抑制 CNE 细胞的增殖 (图 7, B, **代表 T-test 统计分析 p 值 < 0.01 , *** 代表 T-test 统计分析 p 值 < 0.001)。

3、AdFoxM1shRNA 腺病毒体抑制 CNE 鼻咽癌细胞的成瘤。采用软琼脂集落形成实验测定 AdFoxM1shRNA 对 CNE 细胞成瘤能力的影响: AdFoxM1shRNA 感染 1000 个 CNE 细胞 (2000 病毒颗粒/细胞), 与 0.35% 琼脂培养基混合后, 加入 60mm 细胞培养板 (铺好 0.7% 琼脂培养基做底层)。待上层琼脂凝固后, 置入 5% CO_2 培养箱, 37°C 培养 10—14 天, 在体式显微镜下观察集落形成情况, 同时用 CNE 细胞和 AdGFP 对照病毒感染细胞作为对照。结果表明, AdFoxM1shRNA 能明显抑制 CNE 细胞的成瘤能力 (图 8, A), 通过集落计数, AdFoxM1shRNA 感染组集落数目明显低于 CNE 细胞组和 AdGFP 病毒感染对照组 (图 8, B, *** 代表 T-test 统计分析 p 值 < 0.001)。

实施例 3, AdFoxM1shRNA 腺病毒体抑制多种肿瘤细胞的增殖

运用肝癌细胞 HepG2、子宫颈癌细胞 HeLa、肺癌细胞 A549、骨肉瘤细胞 U2OS 等细胞株, 测定 AdFoxM1shRNA 对不同肿瘤细胞增殖的抑制作用。用 AdFoxM1shRNA (2000 病毒颗粒/细胞) 分别感染上述肿瘤细胞, 每天计数确定细胞生长速度。与 AdLacZ 对照病毒感染组相比, 肿瘤细胞增殖出现明显抑制, 细胞计数结果差异明显, 结果见图 9—12 (*代表 T-test 统计分析 p 值<0.05, **代表 T-test 统计分析 p 值<0.01, *** 代表 T-test 统计分析 p 值<0.001)。

实施例 4, AdFoxM1shRNA 腺病毒体增高肿瘤细胞对 DNA 损伤药剂造成 DNA 损伤的敏感性

AdFoxM1shRNA 感染肿瘤细胞导致 FoxM1 表达降低后, 胞内 DNA 损伤程度增高, 同时肿瘤细胞对 DNA 损伤药剂及放射性照射造成 DNA 损伤的敏感性增加, 图 13 中显示 AdFoxM1shRNA 感染后, 肿瘤细胞中出现大量 DNA 断裂 (由 γ H2AX foci 免疫染色确定); 经 DNA 损伤药剂 Etoposide (20 mM) 造成的 DNA 损伤后 24 小时, 被 AdFoxM1shRNA 感染的细胞与未感染细胞或对照病毒感染的细胞相比, 胞内未被修复的 DNA 断裂明显增多, 暗示本药物可以增加临床肿瘤治疗中化疗和放疗的效果。

核苷酸序列表

具有抑制人 FoxM1 表达的功能的小分子干扰 RNA (siRNA) 序列:

5' - GGA CCA CUU UCC CUA CUU U -3'

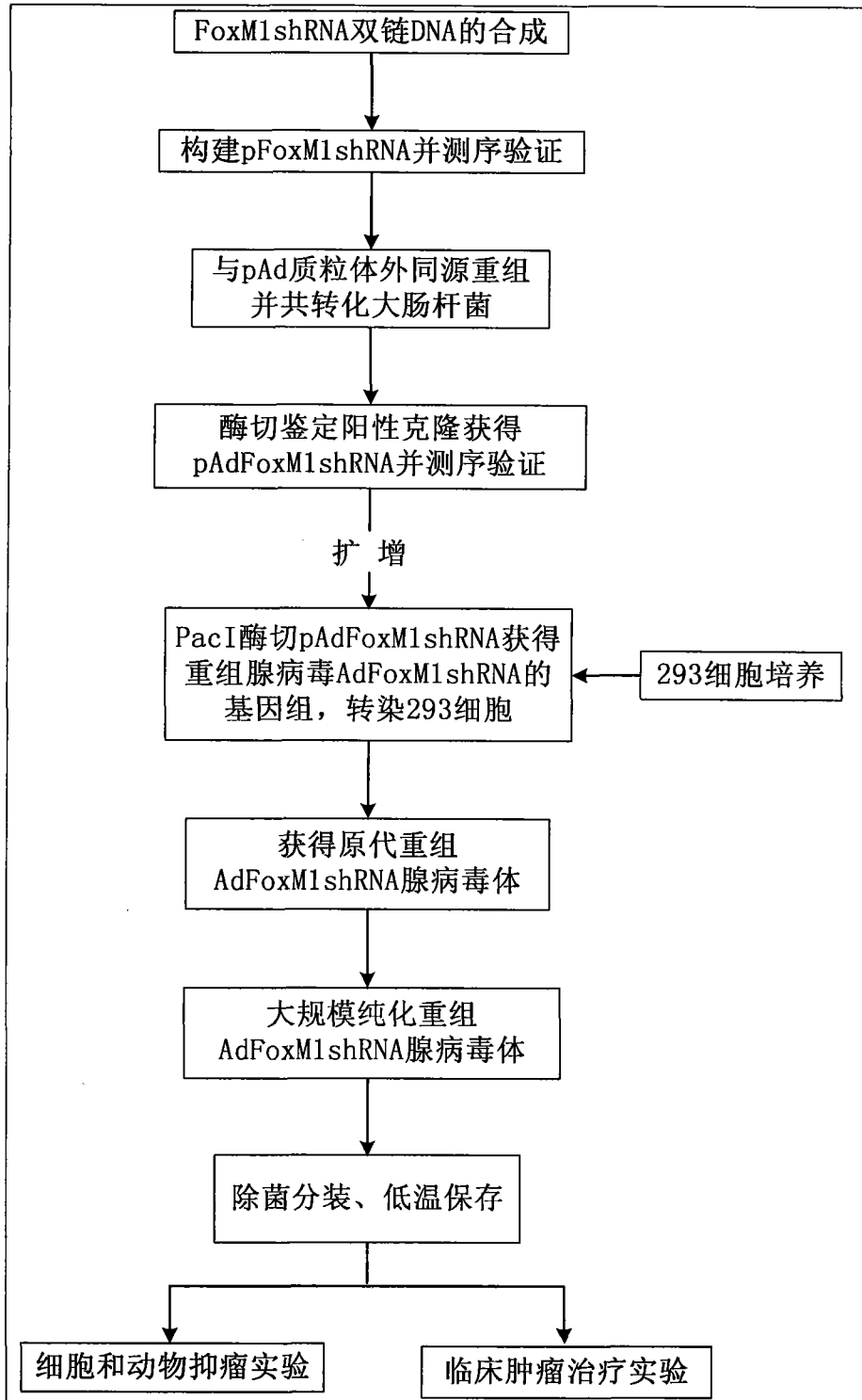


图 1

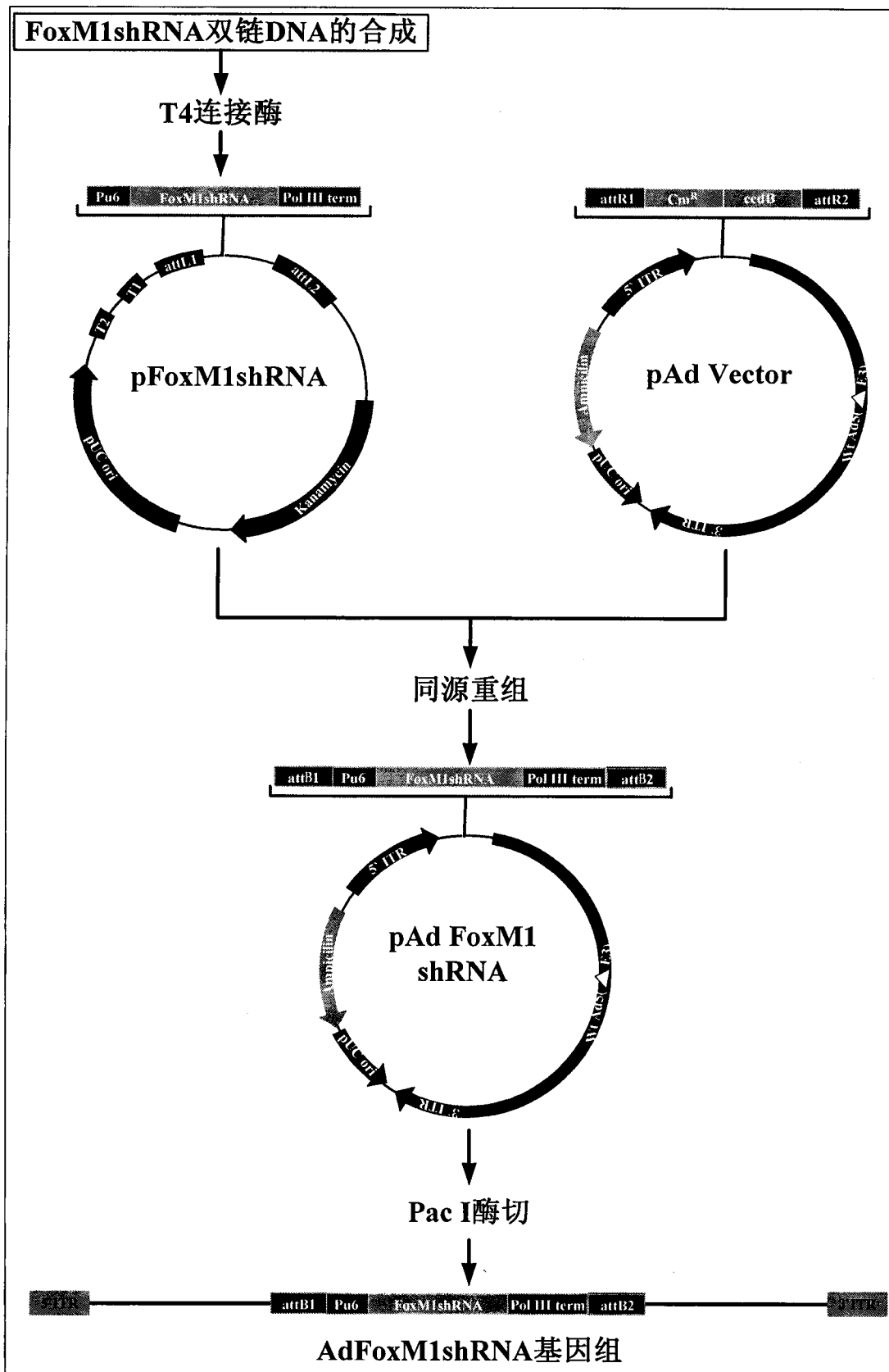


图 2

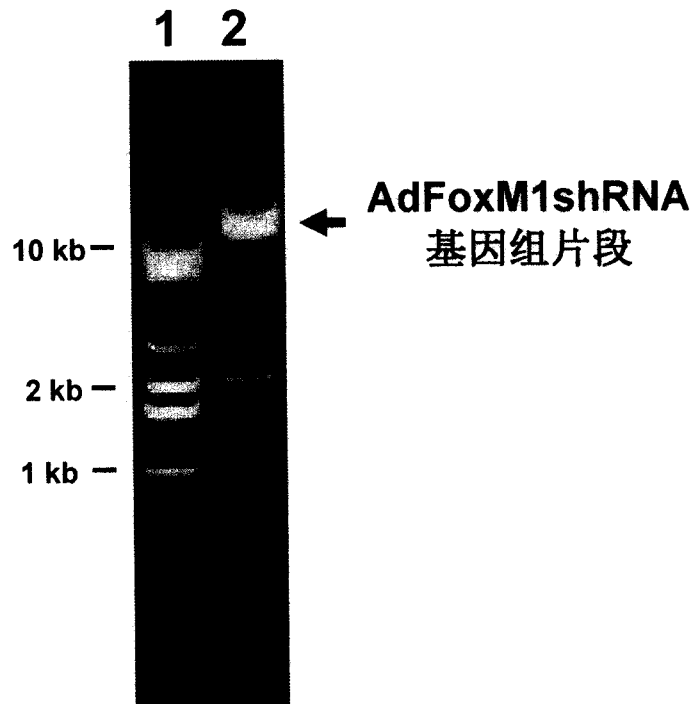
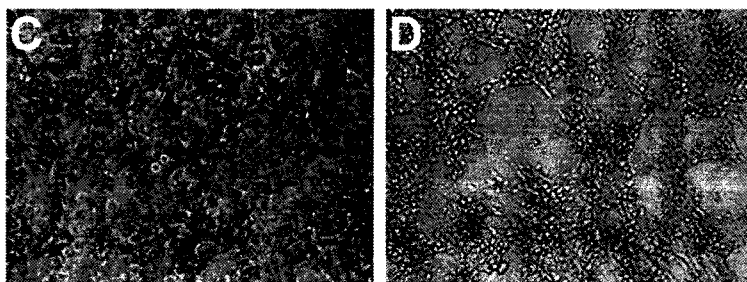
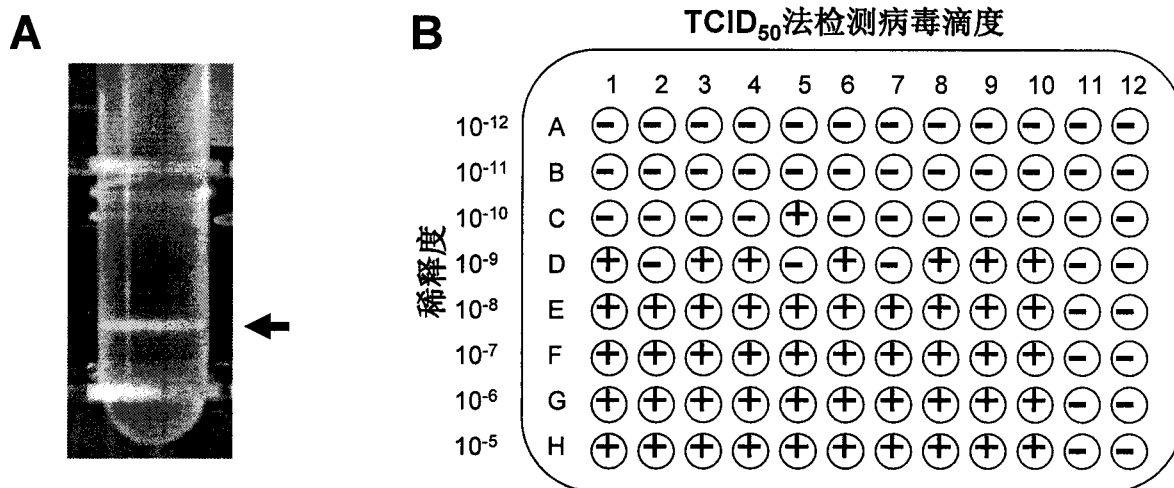


图 3



AdFoxM1shRNA制备病毒中的复制型腺病毒检测

图 4

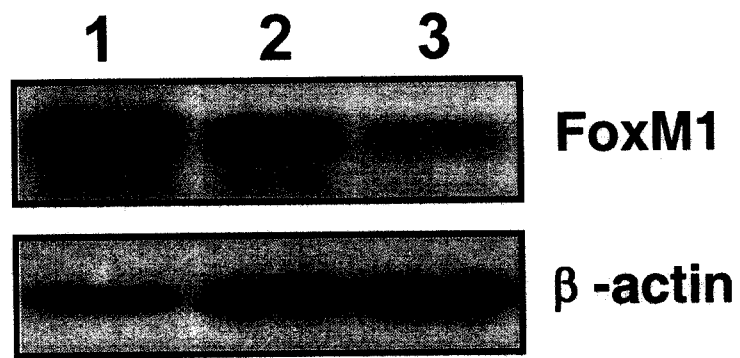


图 5

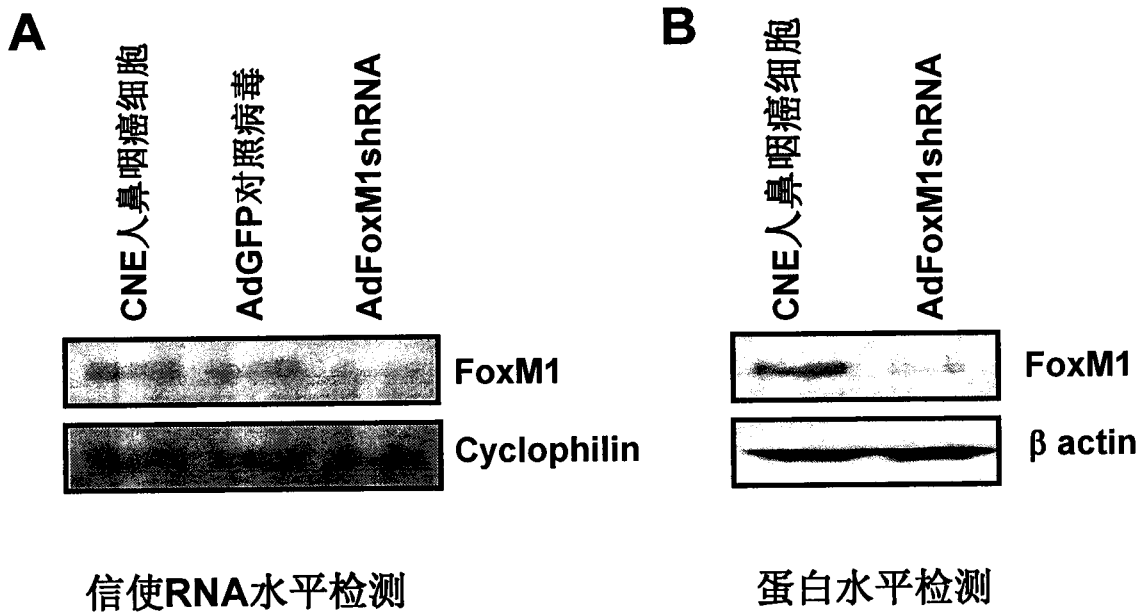


图 6

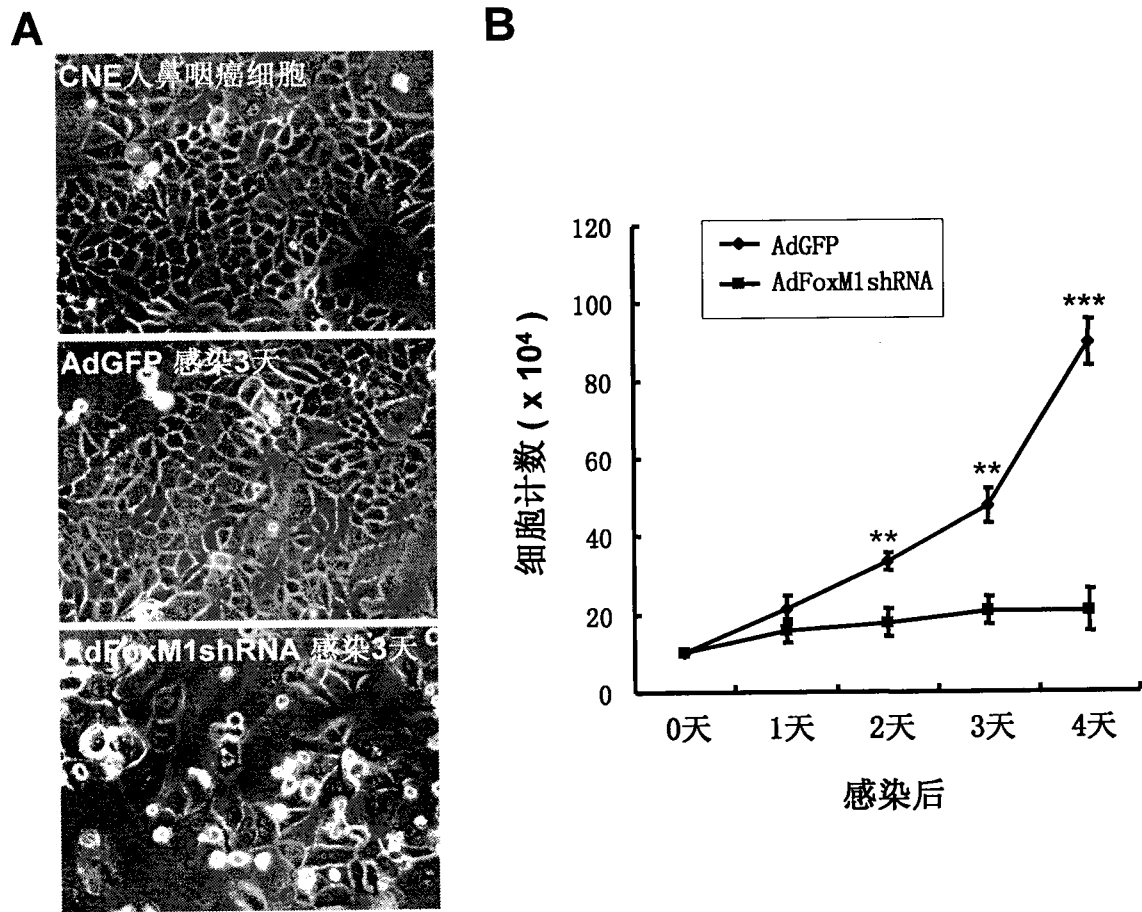


图 7

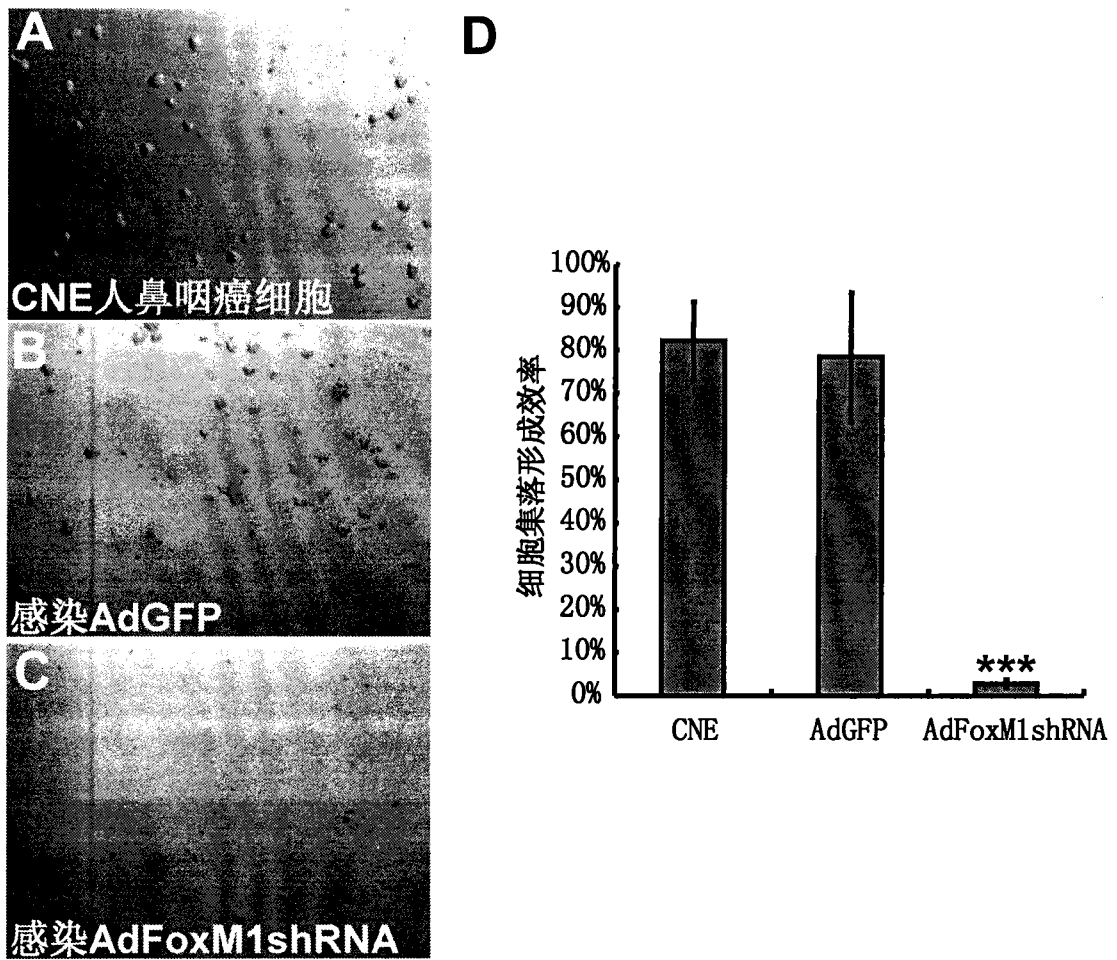


图 8

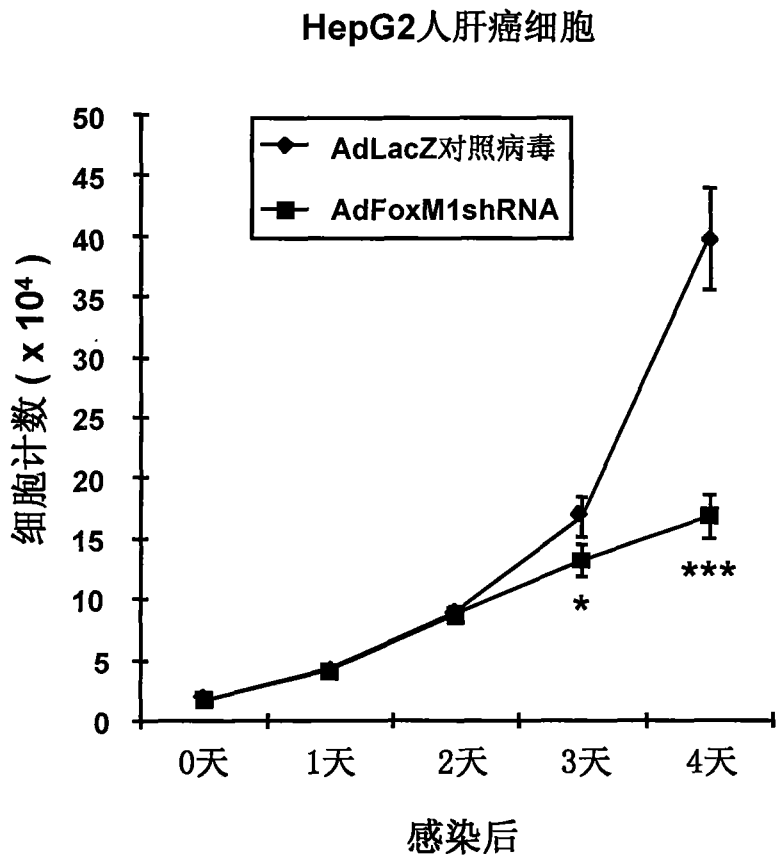


图 9

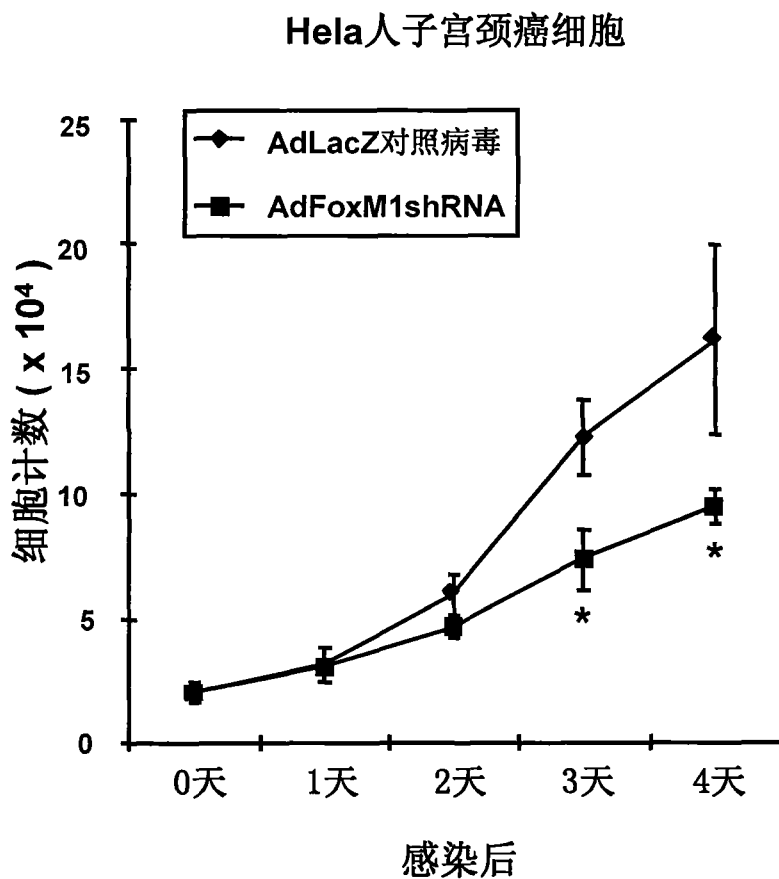


图 10

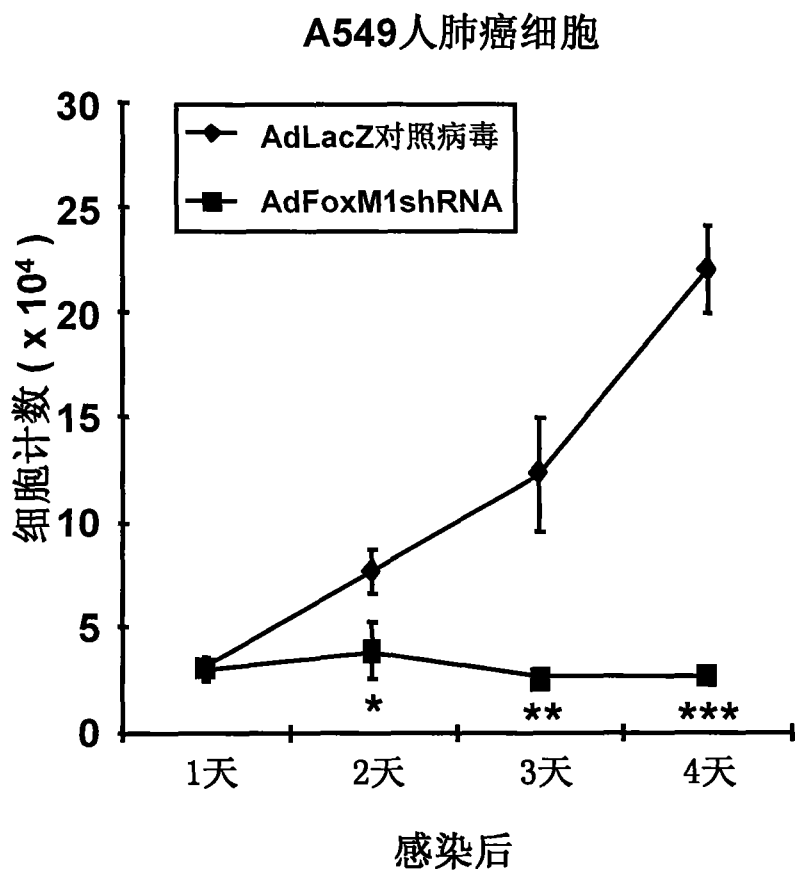


图 11

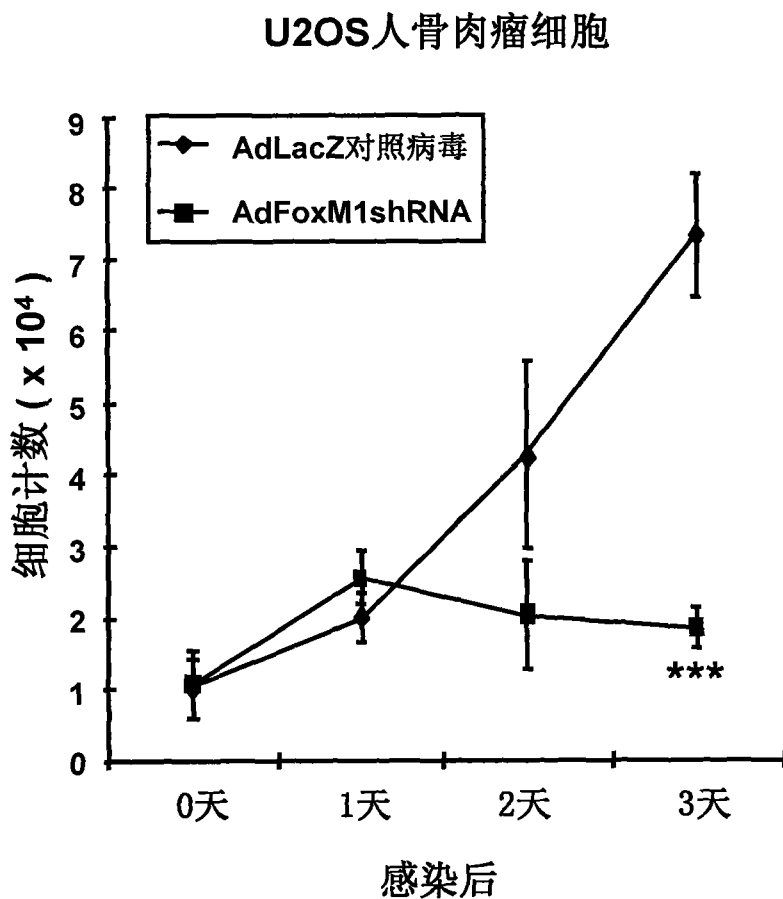


图 12

γ H2AX foci 免疫染色

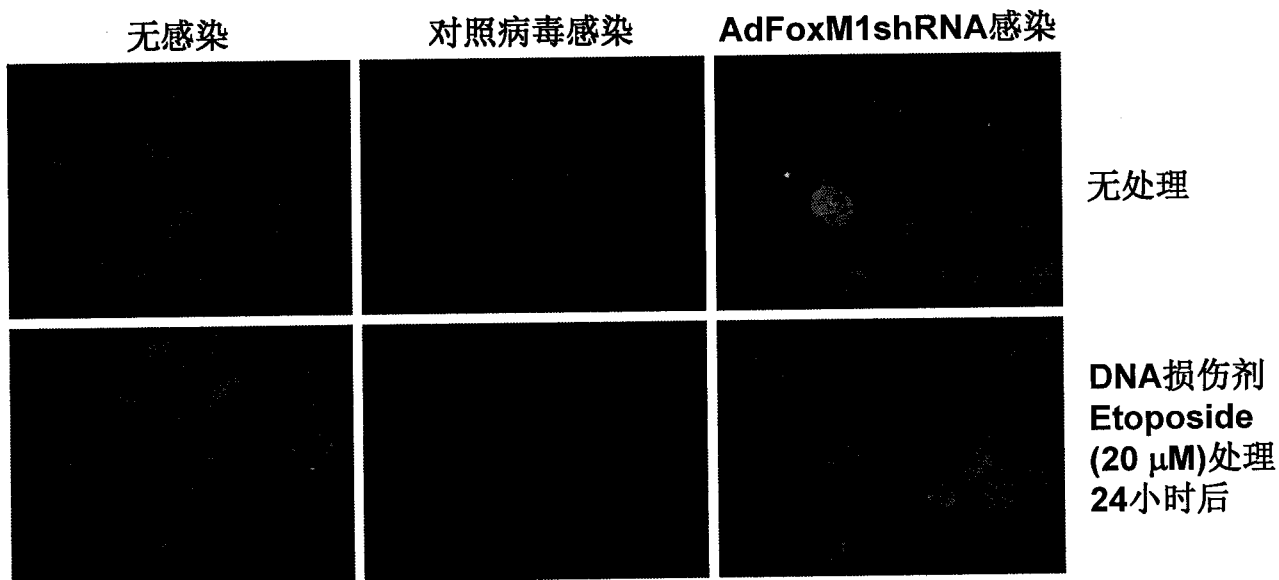


图 13