



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112143731 B

(45) 授权公告日 2022.03.15

(21) 申请号 202010960568.3

A61K 47/69 (2017.01)

(22) 申请日 2020.09.14

A61K 47/59 (2017.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112143731 A

(43) 申请公布日 2020.12.29

(73) 专利权人 广州瑞风生物科技有限公司

地址 510700 广东省广州市黄埔区开源大道188号自编四栋801房

(72) 发明人 梁峻彬 欧家裕 皇甫德胜 徐辉古博

(74) 专利代理机构 广州新诺专利商标事务有限公司 44100

代理人 李海恬

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 111328343 A, 2020.06.23

CN 111139242 A, 2020.05.12

CN 111518809 A, 2020.08.11

CN 111139241 A, 2020.05.12

CN 110656123 A, 2020.01.07

Timothy R. Abbott等. Development of CRISPR as an Antiviral Strategy to Combat SARS-CoV-2 and Influenza.《Cell》.2020,第181卷

Tuan M. Nguyen等. Virus against virus: a potential treatment for 2019-nCov (SARS-CoV-2) and other RNA viruses.《Cell Research》.2020,第30卷

审查员 程珂

权利要求书1页 说明书10页

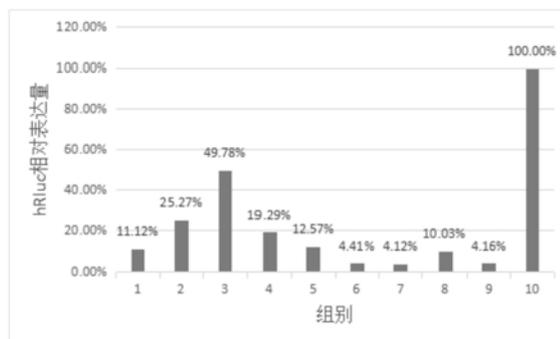
序列表3页 附图4页

(54) 发明名称

靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组的gRNA及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组的gRNA及其应用,属于基因编辑技术领域。该gRNA包括靶向结构域,所述靶向结构域的序列靶向所述SARS-CoV-2病毒基因组的S区域。本发明还提供用于治疗SARS-CoV-2病毒感染的gRNA表达载体、Crispr系统、和包含所述gRNA或编码其的核苷酸的组合物,以及它们的制药用途。本发明的gRNA靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组Spike区域,可用于治疗SARS-CoV-2病毒感染。



1. 一种靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组的gRNA,其特征在于,所述gRNA包含靶向结构域,所述靶向结构域的序列靶向所述SARS-CoV-2病毒基因组的S区域;

所述靶向结构域的序列选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:5~SEQ ID NO:7任一所示的基础序列。

2. 根据权利要求1所述的gRNA,其特征在于,所述基础序列选自SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示序列。

3. 一种靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组的gRNA表达载体,其特征在于,包含编码如权利要求1~2任一项所述的gRNA的核苷酸序列。

4. 一种靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组的Crispr系统,其特征在于,包括权利要求1~2任一项所述的gRNA,或编码所述gRNA的核苷酸序列。

5. 一种靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组的组合物,其特征在于,包括:

权利要求1~2任一项所述的gRNA,以及Cas13d蛋白;

或,权利要求1~2任一项所述的gRNA,以及编码Cas13d蛋白的核苷酸序列;

或,权利要求1~2任一项所述的gRNA,以及编码Cas13d蛋白的mRNA;

或,编码如权利要求1~2中任一项所述的gRNA的核苷酸序列,以及Cas13d蛋白;

或,编码如权利要求1~2中任一项所述的gRNA的核苷酸序列,以及编码Cas13d蛋白的核苷酸序列。

6. 一种用于非诊断治疗目的的改变SARS-CoV-2病毒基因组核酸序列的方法,其特征在于,使SARS-CoV-2病毒感染细胞与以下物质进行接触:

权利要求1~2任一项所述的gRNA、权利要求3的gRNA表达载体、权利要求4所述的Crispr系统、或权利要求5所述的组合物。

7. 权利要求1~2任一项所述的gRNA、权利要求3所述的gRNA表达载体、权利要求4所述的Crispr系统、或权利要求5所述的组合物在制备用于治疗SARS-CoV-2病毒感染的药物中的用途。

8. 一种用于治疗SARS-CoV-2病毒感染的药物,其特征在于,包括Cas13d mRNA-gRNA脂质纳米颗粒或Cas13d mRNA-gRNA-超支化聚( $\beta$ -氨基酯)聚合物纳米颗粒,所述gRNA为权利要求1~2任一项所述的gRNA。

## 靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组的gRNA及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基因编辑技术领域,特别是涉及一种靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组的gRNA及其应用。

### 背景技术

[0002] 冠状病毒有多种类型,大多数类型仅感染动物,但有时会发生变异并感染人类。2019年底出现的新型冠状病毒——SARS-CoV-2,是一种变异的、可在人与人之间快速感染传播、并可导致严重呼吸系统疾病的病毒。该病毒当前在全球爆发,导致了超过2000万人感染,70万人死亡,并且增势仍未放缓。其传染性强、危害大,目前尚无可以治疗新型冠状病毒的特效药物和方法。尽管有研究者提出一些上市或者在研的抗病毒药物可能对新型冠状病毒有抑制作用,但还未被证明其有效性和安全性,需要进一步的临床研究。因此,开发新的治疗技术和药物成为了迫切需要。

[0003] SARS-CoV-2属于冠状病毒谱系B(Betacoronavirus Lineage B, Sarbecovirus),其遗传物质为正链单股RNA,基因组长度约30000个核苷酸左右。SARS-CoV-2侵入宿主细胞的第一步是结合到细胞表面,其病毒包膜上的刺突蛋白(Spike protein)通过与细胞表面ACE2受体结合,介导病毒包膜与细胞膜的融合从而让病毒颗粒进入细胞。随后,病毒在细胞内进行复制以及再组装。如果能够有效破坏宿主细胞内病毒的RNA,就可以有效抑制病毒的复制和分泌,从而使病毒感染得到有效的控制。

[0004] 2015年,研究者发现了一种新的CRISPR/Cas基因编辑系统,被称为Cas13系统,与之前发现的切割DNA的Cas9编辑系统不同,该Cas13系统可以在小RNA的指导下特异地识别并切割单链的RNA。2019年9月,有研究者利用该系统,成功地实现了体外培养细胞中三种RNA病毒(淋巴细胞病毒LCMV、甲类流行性感冒病毒IAV、水疱性口炎病毒VSV)的靶向切割,其有效性不亚于shRNA介导的RNA干扰作用。由于此前的研究已经证明Cas13系统具有非常低的脱靶风险,该研究提示,利用Cas13系统直接靶向宿主细胞内的病毒RNA将是一种安全高效的抗病毒策略。Cas13家族包含Cas13a(以前称为C2c2)、Cas13b、Cas13c和Cas13d等亚型。

[0005] 目前仍未有用于SARS-CoV-2病毒感染的可行的Cas13d基因编辑疗法被发明出来。

### 发明内容

[0006] 基于此,有必要针对上述问题,提供一种靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组的gRNA及其应用,该gRNA或编码其的核酸递送至细胞将可作为CRISPR系统识别靶序列的组分,包含该gRNA或编码其的核酸的Crispr-Cas13d系统可有效破坏SARS-CoV-2病毒基因组Spike区域,可用于治疗SARS-CoV-2病毒感染。

[0007] 一种靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组的gRNA,所述gRNA包含靶向结构域,所述靶向结构域的序列靶向所述SARS-CoV-2病毒基因组的S区域。

[0008] 上述gRNA,可有效破坏SARS-CoV-2病毒基因组Spike区域,实现细胞内高效破坏

SARS-COV-2的病毒基因组,该gRNA或编码其的核酸的Crispr-Cas13d系统可用于治疗SARS-CoV-2病毒感染。

[0009] 在其中一个实施例中,所述靶向结构域的序列选自:

[0010] 1) SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:7任一所示的基础序列;

[0011] 2) 与所述基础序列具有至少70%相似性的扩展序列。

[0012] 优选的,所述扩展序列与所述基础序列的相似性为80%以上。更优选的,所述扩展序列与所述基础序列的相似性为90%以上。更优选的,所述扩展序列与所述基础序列的相似性为95%以上。

[0013] 在其中一个实施例中,所述扩展序列通过以下方法获得:

[0014] 通过在基础序列的末端删减不超过12个核苷酸而得;

[0015] 或,通过在基础序列的末端增加不超过5个核苷酸而得,且增加的核苷酸与靶序列对应位置互补;

[0016] 或,通过在基础序列的基础上替换不超过5个核苷酸而得;

[0017] 或,通过在基础序列的末端删减不超过12个核苷酸的基础上,替换不超过5个核苷酸而得;

[0018] 或,通过在基础序列的末端增加不超过5个核苷酸的基础上,替换不超过5个核苷酸而得。

[0019] 在其中一个实施例中,所述扩展序列通过在基础序列的末端增加不超过3个核苷酸而得。

[0020] 在其中一个实施例中,所述扩展序列通过在基础序列的末端删减不超过10个核苷酸而得。更优选的,所述扩展序列通过在基础序列的末端删减不超过8个核苷酸而得。更优选的,所述扩展序列通过在基础序列的末端删减不超过6个核苷酸而得。

[0021] 在其中一个实施例中,所述扩展序列通过在SEQ ID NO:1~SEQ ID NO:7任一所示序列的末端删减不超过10个核苷酸而得。

[0022] 在其中一个实施例中,所述基础序列选自SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示序列。靶向结构域为SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7的gRNA能更有效地靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组。

[0023] 本发明还提供一种靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组的gRNA表达载体,所述gRNA表达载体包含编码上述gRNA的核苷酸序列。

[0024] 在其中一个实施例中,所述gRNA表达载体包含编码上述gRNA的核苷酸序列,以及与所述核苷酸序列有效连接的启动子。

[0025] 在其中一个实施例中,所述gRNA表达载体选自:质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体、单纯疱疹病毒。

[0026] 本发明还提供一种靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组的Crispr系统,包括上述gRNA或编码其的核苷酸序列。

[0027] 本发明还提供一种靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组的组合物,包括:

[0028] 上述gRNA,以及Cas13d蛋白;

[0029] 或,上述gRNA,以及编码Cas13d蛋白的核苷酸序列;

[0030] 或,上述gRNA,以及编码Cas13d蛋白的mRNA;

[0031] 或,编码上述gRNA的核苷酸序列,以及Cas13d蛋白;

[0032] 或,编码上述gRNA的核苷酸序列,以及编码Cas13d蛋白的核苷酸序列。

[0033] 本发明还提供一种用于非诊断治疗目的的改变SARS-CoV-2病毒基因组核酸序列的方法,使SARS-CoV-2病毒感染细胞与以下物质进行接触:

[0034] 上述gRNA、gRNA表达载体、Crispr系统、或组合物。

[0035] 本发明还提供一种改变SARS-CoV-2病毒基因组核酸序列的方法,使SARS-CoV-2病毒感染细胞与上述gRNA、表达载体、组合物、或Crispr系统进行接触。

[0036] 本发明还提供一种上述gRNA、表达载体、Crispr系统、或组合物在制备用于治疗SARS-CoV-2病毒感染的药物中的用途。

[0037] 在其中一个实施例中,所述药物在肺部给药。

[0038] 本发明一方面还提供一种用于治疗SARS-CoV-2病毒感染的药物,包括Cas13d mRNA-gRNA脂质纳米颗粒或Cas13d mRNA-gRNA-超支化聚(β-氨基酯)聚合物纳米颗粒,所述gRNA为上述gRNA。所述Cas13d mRNA-gRNA脂质纳米颗粒或Cas13d mRNA-gRNA-超支化聚(β-氨基酯)聚合物纳米颗粒可通过将Cas13d mRNA、gRNA与脂质或超支化聚(β-氨基酯)聚合物混合后制备得到。随着新的RNA修饰方式和递送技术的发展,新型可降解纳米颗粒高效递送mRNA药物的技术可以安全有效地将mRNA分子递送到靶细胞,使得mRNA的成药性进一步拓展。比如,麻省理工学院的研究人员设计了一种可吸入式的mRNA,利用这种气溶胶直接作用于肺部,以帮助治疗囊性纤维化等疾病。研究者合成了一种带正电荷的聚合物——超支化聚合物(聚β氨基酯),聚(β-氨基酯)是一种生物可降解聚合物,不会在体内堆积从而损害机体。研究人员将mRNA与该聚合物混合制成150纳米的颗粒并将这些颗粒悬浮在液滴中,使用喷雾器将它们作为可吸入的气雾递送给小鼠。研究人员发现这种方式可以特异地将药物递送到小鼠肺部,而其它器官却几乎没有信号。该研究结果提示,通过吸入式递送mRNA有可能治疗一系列肺部疾病,包括病毒感染。

[0039] 在其中一个实施例中,Cas13d mRNA-gRNA-超支化聚(β-氨基酯)聚合物纳米颗粒为可降解纳米颗粒。

[0040] 在其中一个实施例中,Cas13d mRNA-gRNA脂质纳米颗粒或Cas13d mRNA-gRNA-超支化聚(β-氨基酯)聚合物纳米颗粒中gRNA的靶向结构域的序列包含选自SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的序列,或与所述SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7具有至少70%相似性的扩展序列。优选地,gRNA的靶向结构域的序列包含选自SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7所示的序列。

[0041] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0042] 本发明的靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组的gRNA,可有效破坏SARS-CoV-2病毒基因组Spike区域,实现细胞内高效破坏SARS-COV-2的病毒基因组,含该gRNA或编码其的核酸的Crispr-Cas13d系统可用于治疗SARS-CoV-2病毒感染。

[0043] 本发明通过实验证实,本发明的gRNA用于Crispr-Cas13d系统可有效破坏SARS-CoV-2病毒基因组RNA的Spike区域。其中,靶向结构域为nCoV-S-6和nCoV-S-7的gRNA效果尤其显著。实验还证实,本发明的gRNA可通过脂质纳米颗粒的形式实现有效的肺部递送。

## 附图说明

- [0044] 图1为SARS-CoV-2基因组结构图；  
[0045] 图2为psiCHECK2-nCoV-S载体图谱；  
[0046] 图3为pXR004载体图谱；  
[0047] 图4为pXR001载体图谱；  
[0048] 图5为实施例3中hRluc表达量测试结果；  
[0049] 图6为实施例4中hRluc表达量测试结果。

## 具体实施方式

[0050] 为了便于理解本发明，下面将参照相关附图对本发明进行更全面的描述。附图中给出了本发明的较佳实施例。但是，本发明可以以许多不同的形式来实现，并不限于本文所描述的实施例。相反地，提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻全面。

[0051] 除非另有定义，本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的，不是旨在于限制本发明。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0052] 以下实施例所设计的内切酶均购自Thermo公司，核酸纯化试剂盒与2×Taq master Mix购自湖南艾科瑞生物工程有限公司，PrimeSTAR Max DNA polymerase premix和T4连接酶购自TAKARA公司，ClonExpress II One Step Cloning Kit购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司，双荧光素酶报告基因检测系统购自Promega公司。质粒构建与测序所用的引物由上海生工生物工程有限公司合成。Stb13感受态细菌购自深圳康体生命科技有限公司。实施例中的其他试剂如无特殊说明，均为市售试剂。实施例中的实验方法如无特殊说明，均为本领域的常规实验方法或现有实验方法。

[0053] 实施例1

[0054] Reporter载体设计与构建。

[0055] psiCHECK2质粒使用XhoI和NotI双酶切线性化，37℃反应1小时。酶切产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，切胶回收6242bp的酶切产物，-20℃保存备用。

[0056] 根据公布的SARS-CoV-2基因组序列(NC\_045512.2)，全基因合成其S区域至pcDNA6B载体。SARS-CoV-2基因组结构如图1所示。

[0057] 使用PrimeSTAR Max DNA polymerase premix进行PCR扩增Spike区域的第24~3804bp的碱基，同时引物中带入15~20bp的同源臂，用于后续克隆到psiCHECK2的NotI和XhoI酶切位点之间，作为hRluc的3' UTR。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳，切胶回收目的条带。

[0058] PCR回收产物和psiCHECK2-XhoI/NotI酶切线性化回收产物使用ClonExpress II One Step Cloning Kit进行重组连接，连接产物使用热击法转化大肠杆菌感受态细胞Stb13，转化后向离心管中加入不含抗生素的LB液体培养基，置于恒温摇床37℃、200rpm振荡培养60分钟使菌体复苏。

[0059] 将复苏后的Stb13细胞涂布氨苄青霉素抗性的LB琼脂平板，于恒温培养箱37℃倒

置培养12-16小时。

[0060] 从上述平板上分别挑取单菌落接种到50 $\mu$ l含氨苄青霉素的LB液体培养基中,使用引物nCoV-S-F(5'-TGGCACACACTGGTTTGTAAACAC-3')(SEQ ID NO:10)和HSV TK-R(5'-CCGCGTCAGACAAACCCTAAC-3')(SEQ ID NO:11),对上述菌液进行PCR鉴定。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳后,筛选出包含阳性克隆的菌液,接种至5ml含氨苄青霉素的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200rpm振荡培养12-16小时。

[0061] 提取质粒并测定质粒浓度后,取部分质粒进行Sanger测序,测序正确的质粒保存于-20 $^{\circ}$ C备用,该质粒命名为psiCHECK2-nCoV-S。psiCHECK2-nCoV-S载体图谱如图2所示。

[0062] 实施例2

[0063] gRNA载体设计与构建。

[0064] 根据SARS-CoV-2基因组S区域的靶序列设计30nt的gRNA靶向结构域序列,同时针对hR1uc区域设计2个gRNA作为对照,所述gRNA的靶向结构域如表1所示。

[0065] 表1.gRNA的靶向结构域

名称	靶向结构域	序列编号
nCoV-S-1	AUAACCCACAUAUAAGCUGCAGCACCAGC	SEQ ID NO:1
nCoV-S-2	UUAGAAUCCAAGCUUAACGCAGCCUGUA	SEQ ID NO:2
nCoV-S-3	UAGAACCUGUAGAAUAAACACGCCAAGUAG	SEQ ID NO:3
nCoV-S-4	UCACCAUAUUGUUUGAUGAAGCCAGCAUCU	SEQ ID NO:4
nCoV-S-5	ACUCUGACAUUUAGUAGCAGCAAGAUUAG	SEQ ID NO:5
nCoV-S-6	AGCAGGAUCCACAAGAACAACAGCCCUUGA	SEQ ID NO:6
nCoV-S-7	CAGAGACAUGUAUAGCAUGGAACCAAGUAA	SEQ ID NO:7
hR1uc-1	ACAAAGAUGAUUUUCUUUGGAAGGUUCAGC	SEQ ID NO:8
hR1uc-2	CGAAGAAGUUAUUCUCAAGCACCAUUUUCU	SEQ ID NO:9

[0067] 分别合成靶序列对应的Oligo DNA,正义链为靶序列的反向互补序列,并且5'加AAAC,反义链为靶序列5'加CTTG。

[0068] pXR004质粒使用BpiI酶切线性化,37 $^{\circ}$ C反应1小时。将上述靶序列对应的Oligo DNA正义链和反义链混合,95 $^{\circ}$ C孵育5分钟后放置在冰上冷却退火形成带粘性末端的双链DNA。pXR004载体图谱如图3所示。

[0069] 酶切产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收2923bp的酶切产物。

[0070] 退火产物和pXR004-BpiI酶切线性化回收产物使用T4连接酶进行连接,连接产物使用热击法转化大肠杆菌感受态细胞Stb13,转化后向离心管中加入不含抗生素的LB液体培养基,置于恒温摇床37 $^{\circ}$ C、200rpm振荡培养60分钟使菌体复苏。

[0071] 将复苏后的Stb13细胞涂布氨苄青霉素抗性的LB琼脂平板,于恒温培养箱37 $^{\circ}$ C倒置培养12-16小时。

[0072] 从上述平板上分别挑取单菌落接种到50 $\mu$ l含氨苄青霉素的LB液体培养基中,使用引物U6 Promoter-F(5'-GGGCCTATTTCCCATGATTCCTT-3')(SEQ ID NO:12)和f1 ori-R(5'-GCTGGCAAGTGTAGCGGTCA-3')(SEQ ID NO:13),对上述菌液进行PCR鉴定。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳后,筛选出包含阳性克隆的菌液,接种至5ml含氨苄青霉素的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、200rpm振荡培养12-16小时。

[0073] 提取质粒并测定质粒浓度后,取部分质粒进行Sanger测序,测序正确的质粒保存于-20℃备用。

[0074] 将包含编码靶向nCoV-S-1的gRNA的序列的载体命名为pXR004-nCoV-S-Pre-gRNA1,包含编码靶向hRluc-1的gRNA的序列的载体命名为pXR004-hRluc-Pre-gRNA1,其他载体的命名以此类推。pXR004-nCoV-S-Pre-gRNA1所表达的Pre-gRNA序列为CAAGUAAACCCCUACCAACUGGUCGGGUUUGAAACAUAACCCACAUAUAAGCUGCAGCACCAGCCAAGUAAACCCCUACCAACUGGUCGGGUUUGAAAC (SEQ ID NO:14),其他Pre-gRNA分子除靶向结构域外的其他部分与pXR004-nCoV-S-Pre-gRNA1相同。

[0075] 实施例3

[0076] 质粒转染与双荧光素酶报告基因检测。

[0077] 293T细胞按一定量接种至24孔板,使得24小时后细胞汇合度达到约80%。

[0078] 使用Lipofectamine 2000脂质体转染试剂,将克隆了gRNA的pXR004质粒、表达Cas13d的pXR001质粒(pXR001载体图谱如图4所示)、psiCHECK2-nCoV-S质粒按1:1:1的比例共转染上述293T细胞,单独转染psiCHECK2-nCoV-S质粒设为阴性对照组,不转染任何质粒的细胞作为空白对照。每个转染设置3个复孔(A/B/C)。质粒转染分组如表2所示。

[0079] 表2. 质粒转染分组

分组	质粒 1	质粒 2	质粒 3
[0080]	1	psiCHECK2-nCoV-S	pXR001
	2	psiCHECK2-nCoV-S	pXR001
[0081]	3	psiCHECK2-nCoV-S	pXR001
	4	psiCHECK2-nCoV-S	pXR001
	5	psiCHECK2-nCoV-S	pXR001
	6	psiCHECK2-nCoV-S	pXR001
	7	psiCHECK2-nCoV-S	pXR001
	8	psiCHECK2-nCoV-S	pXR001
	9	psiCHECK2-nCoV-S	pXR001
	10	psiCHECK2-nCoV-S	/
	11	/	/

[0082] 转染质粒48小时后按照双荧光素酶报告基因检测系统的使用方法,使用1×PLB Buffer将细胞震荡裂解,随后将所有细胞碎片以及液体转移到1.5ml离心管,置于-80℃保存。

[0083] 按照双荧光素酶报告基因检测系统的使用方法,使用多功能酶标仪进行双荧光素酶检测。

[0084] 数据处理与分析见下表3和图5。结果显示1-9组可显著降低hRluc的表达量。其中靶向结构域为nCoV-S-6和nCoV-S-7的两组尤其能够有效地降低hRluc的表达量,抑制率超过95%,优于其他靶向结构域的分组,甚至优于直接靶向hRluc区域的分组。

[0085] 表3. 各组hRluc的表达量

组别	样品名	Luc	hRLuc	hRLuc/Luc	hRLuc/Luc 平均值	相对 表达量	
1	1A	91430	3402	0.0372	0.0385*	11.12%	
	1B	99739	3999	0.0401			
	1C	91717	3513	0.0383			
2	2A	114262	10022	0.0877	0.0876*	25.27%	
	2B	113553	10181	0.0897			
	2C	137667	11742	0.0853			
3	3A	136791	24027	0.1756	0.1725*	49.78%	
	3B	144391	24624	0.1705			
	3C	155010	26560	0.1713			
4	4A	93191	6827	0.0733	0.0669*	19.29%	
	4B	114652	7138	0.0623			
	4C	110829	7210	0.0651			
5	5A	111410	4469	0.0401	0.0436*	12.57%	
	5B	106184	4844	0.0456			
	5C	119831	5385	0.0449			
6	6A	111458	1734	0.0156	0.0153*	4.41%	
	6B	106359	1692	0.0159			
	6C	110526	1590	0.0144			
7	7A	122587	1733	0.0141	0.0143*	4.12%	
	7B	121010	1682	0.0139			
	7C	121902	1808	0.0148			
8	8A	70861	2557	0.0361	0.0348*	10.03%	
	8B	81265	2868	0.0353			
	8C	86563	2852	0.0329			
9	9A	29834	462	0.0155	0.0144*	4.16%	
[0087]	9B	28846	414	0.0144	0.3465	100.00%	
	9C	34335	462	0.0135			
	10	10A	1929207	640427			0.3320
		10B	1946343	729563			0.3748
		10C	2040068	678936			0.3328
	11	293T	980	167			0.1704

[0088] 备注:\*表示与组10相比具有统计学差异 ( $P < 0.01$ )。

[0089] 实施例4

[0090] 质粒转染与双荧光素酶报告基因检测。

[0091] 293T细胞按一定量接种至24孔板,使得24小时后细胞汇合度达到约80%。

[0092] 使用Lipofectamine 2000脂质体转染试剂,将克隆了gRNA的pXR004质粒、表达Cas13d的pXR001质粒按1:1的比例共转染上述293T细胞,24小时后再转染psiCHECK2-nCoV-S质粒。每个转染设置3个复孔(A/B/C)。质粒转染分组如表4所示。不转染任何质粒的细胞作为空白对照(组6)。

[0093] 表4. 质粒转染分组

分组	质粒1	质粒2	质粒3
1	psiCHECK2-nCoV-S	pXR001	pXR004-nCoV-S-Pre-gRNA6
2	psiCHECK2-nCoV-S	pXR001	pXR004-nCoV-S-Pre-gRNA7
3	psiCHECK2-nCoV-S	pXR001	pXR004-hRluc-Pre-gRNA2
4	psiCHECK2	pXR001	pXR004-nCoV-S-Pre-gRNA7
5	psiCHECK2-nCoV-S	/	/
6	/	/	/

[0095] 转染质粒48小时后按照双荧光素酶报告基因检测系统的使用方法,使用1×PLB Buffer将细胞震荡裂解,随后将所有细胞碎片以及液体转移到1.5ml离心管,置于-80℃保存。

[0096] 按照双荧光素酶报告基因检测系统的使用方法,使用多功能酶标仪进行双荧光素酶检测。

[0097] 数据处理与分析见下表5和图6。靶向结构域为nCoV-S-6和nCoV-S-7的两组能有效降低hRluc的表达量,抑制率约90%。

[0098] 表5. 各组hRluc的表达量

组别	样品名	Luc	hRLuc	hRLuc/Luc	hRLuc/Luc 平均值	相对 表达量
1	1A	187051	10957	0.0586	0.0678 <sup>*#</sup>	10.20%
	1B	107188	7288	0.0680		
	1C	90466	6950	0.0768		
2	2A	78182	7054	0.0902	0.0817 <sup>*#</sup>	12.29%
	2B	89216	6902	0.0774		
	2C	91996	7117	0.0774		
3	3A	35275	4715	0.1337	0.1237 <sup>*#</sup>	18.61%
	3B	38701	4766	0.1231		
	3C	37777	4316	0.1142		
4	4A	150294	98983	0.6586	0.6567	98.82%
5	4B	170592	106089	0.6219	0.6646	100.00%
	4C	156102	107666	0.6897		
	5A	415567	243469	0.5859		
5	5B	290431	226740	0.7807	0.6646	100.00%
	5C	296987	186254	0.6271		
6	293T	72	48	0.6667	/	/

[0101] 备注:\*表示与组4相比具有统计学差异( $P < 0.01$ ),#表示与组5相比具有统计学差异( $P < 0.01$ )。

[0102] 实施例3和实施例4的实验结果显示,本发明的gRNA用于Crispr-Cas13d系统可破坏SARS-CoV-2病毒基因组RNA的Spike区域,效果显著,因此可用于治疗SARS-CoV-2病毒感染。

[0103] 实施例5

[0104] Cas13d-mRNA及gRNA纳米系统的制备与递送。

[0105] 一、配制脂分子溶液。

[0106] 按照摩尔比5A2-SC8/DOPE/cholesterol/DMG-PEG/DOTAP=15/15/30/3/63的配比进行脂分子溶液配制。以配制100ml的脂分子溶液为例,将488mg DLin-MC3-DMA(分子量642.11)、565.46mg DOPE(分子量744.03)、587.71mg Cholesterol(分子量386.65)、381.40mg DMG-PEG2000(分子量2509.20)、2229.74mg DOTAP(分子量698.54)溶于100ml无水乙醇,最终获得脂分子浓度为42.52mg/ml的乙醇溶液。

[0107] 二、体外转录与配制RNA溶液。

[0108] 使用Ribo<sup>TM</sup> RNAmx-T7体外转录试剂盒在体外转录和纯化Cas13d mRNA和pregRNA6(实施例2中SEQ ID NO:6所对应的pregRNA),测定浓度后将Cas13d mRNA和pregRNA6按摩尔比=1/4的配比溶于citrate buffer(10mM,pH 4.0),调节浓度至1.06mg/ml。

[0109] 三、制备递送用纳米颗粒溶液。

[0110] 取1ml上述RNA溶液,加入2ml citrate buffer(10mM,pH 4.0),然后再迅速与1ml脂分子溶液混合,即体积比为3:1(水相:乙醇相),室温静置10min。其中脂分子:RNA分子(wt/wt)=40:1,所得纳米颗粒溶液中RNA的浓度为:0.27mg/ml。纳米颗粒溶液通过超滤的方法进行浓缩以及Buffer置换,将加到10KD的超滤管中,4000rpm离心10min,随后加入5ml PBS并再次按上述方法离心,重复用PBS洗2次后,最后用PBS调整体积至2ml。此时纳米颗粒溶液中含有1.06mg RNA,浓度约为0.53mg/ml。重复该步骤,制备6ml递送用纳米颗粒溶液。

[0111] 四、小鼠雾化吸入纳米颗粒。

[0112] 将小鼠雾化给药仪的气流速度设置为9L/min,小鼠放入雾化室内,加入2ml递送用纳米颗粒溶液(实验组),对照组小鼠使用2ml生理盐水,使其吸入雾化的溶液,直至所有的溶液被用完。实验组小鼠和对照组小鼠各雾化递送3只,雾化结束后48小时,处死小鼠,取约30mg肺组织,使用SteadyPure Universal RNA Extraction Kit(艾科瑞生物,AG21017)抽提RNA。

[0113] 五、RT-QPCR检测Cas13d mRNA。

[0114] 使用EvoM-MLV RT Kit with gDNA Clean for qPCR II(艾科瑞生物,AG11711)进行gDNA去除与逆转录反应。

[0115] QPCR检测Cas13d mRNA的表达,以mGAPDH为内参。引物设计及QPCR反应体系如下:

[0116] Cas13d-QPCR-F ATCAACAAGCTCAGGGAAGTG (SEQ ID NO:15)

[0117] Cas13d-QPCR-R AGGGACTTATTGGCGGCAGC (SEQ ID NO:16)

[0118] mGAPDH-QPCR-F CGTCCCGTAGACAAAATGGT (SEQ ID NO:17)

[0119] mGAPDH-QPCR-R TCAATGAAGGGGTCGTTGAT (SEQ ID NO:18)

[0120] 表6.QPCR反应体系

[0121]	2X SYBR® Green ProTaq HS Premix	10μl
	引物 F (10μM)	0.4μl
	引物 R (10μM)	0.4μl
	cDNA Template	2μl
	RNase free water	up to 10μl
42°C 2min → 4°C ∞		

[0122] 进行结果分析,结果如下表7所示。在雾化递送纳米颗粒后,可在小鼠肺部组织中检测到Cas13d mRNA的存在。

[0123] 表7.RT-QPCR检测Cas13d mRNA

		mGADH Ct Mean	Cas13d Ct Mean
[0124]	药物 递送组	小鼠 A	18.32
		小鼠 B	18.56
		小鼠 C	18.53
对照组	对照组 A	18.61	39.10
	对照组 B	18.89	39.62
	对照组 C	19.01	39.01

[0125] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0126] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 广州瑞风生物科技有限公司
- [0003] <120> 靶向破坏SARS-CoV-2病毒基因组的gRNA及其应用
- [0004] <160> 18
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 30
- [0008] <212> RNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] auaaccaca uauaagcug cagcaccagc 30
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 30
- [0014] <212> RNA
- [0015] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0016] <400> 2
- [0017] uuagaauucc aagcuauaac gcagccugua 30
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 30
- [0020] <212> RNA
- [0021] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0022] <400> 3
- [0023] uagaaccugu agaauaaaca cgccaaguag 30
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 30
- [0026] <212> RNA
- [0027] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0028] <400> 4
- [0029] ucaccuauu guuugaugaa gccagcaucu 30
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 30
- [0032] <212> RNA
- [0033] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0034] <400> 5
- [0035] acucugacau uuuaguagca gcaagauuag 30
- [0036] <210> 6
- [0037] <211> 30
- [0038] <212> RNA

- [0039] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0040] <400> 6  
[0041] agcaggaucc acaagaacaa cagcccuuga 30  
[0042] <210> 7  
[0043] <211> 30  
[0044] <212> RNA  
[0045] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0046] <400> 7  
[0047] cagagacaug uauagcaugg aaccaaguaa 30  
[0048] <210> 8  
[0049] <211> 30  
[0050] <212> RNA  
[0051] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0052] <400> 8  
[0053] acaaagauga uuuucuuugg aagguucagc 30  
[0054] <210> 9  
[0055] <211> 30  
[0056] <212> RNA  
[0057] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0058] <400> 9  
[0059] cgaagaaguu auucucaagc accauuuucu 30  
[0060] <210> 10  
[0061] <211> 23  
[0062] <212> DNA  
[0063] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0064] <400> 10  
[0065] tggcacacac tggtttgtaa cac 23  
[0066] <210> 11  
[0067] <211> 21  
[0068] <212> DNA  
[0069] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0070] <400> 11  
[0071] ccgcgtcaga caaacctaa c 21  
[0072] <210> 12  
[0073] <211> 23  
[0074] <212> DNA  
[0075] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0076] <400> 12  
[0077] gggcctatth cccatgattc ctt 23

- [0078] <210> 13  
[0079] <211> 20  
[0080] <212> DNA  
[0081] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0082] <400> 13  
[0083] gctggcaagt gtagcgggtca 20  
[0084] <210> 14  
[0085] <211> 102  
[0086] <212> RNA  
[0087] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0088] <400> 14  
[0089] caaguaaacc ccuaccaacu ggucgggguu ugaacauaa cccacauaau aagcugcagc 60  
[0090] accagccaag uaaaccccua ccaacugguc gggguuugaa ac 102  
[0091] <210> 15  
[0092] <211> 21  
[0093] <212> DNA  
[0094] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0095] <400> 15  
[0096] atcaccaagc tcaggaagt g 21  
[0097] <210> 16  
[0098] <211> 20  
[0099] <212> DNA  
[0100] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0101] <400> 16  
[0102] agggacttat tggcggcagc 20  
[0103] <210> 17  
[0104] <211> 20  
[0105] <212> DNA  
[0106] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0107] <400> 17  
[0108] cgtcccgtag acaaaatggt 20  
[0109] <210> 18  
[0110] <211> 20  
[0111] <212> DNA  
[0112] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0113] <400> 18  
[0114] tcaatgaagg ggtcgttgat 20

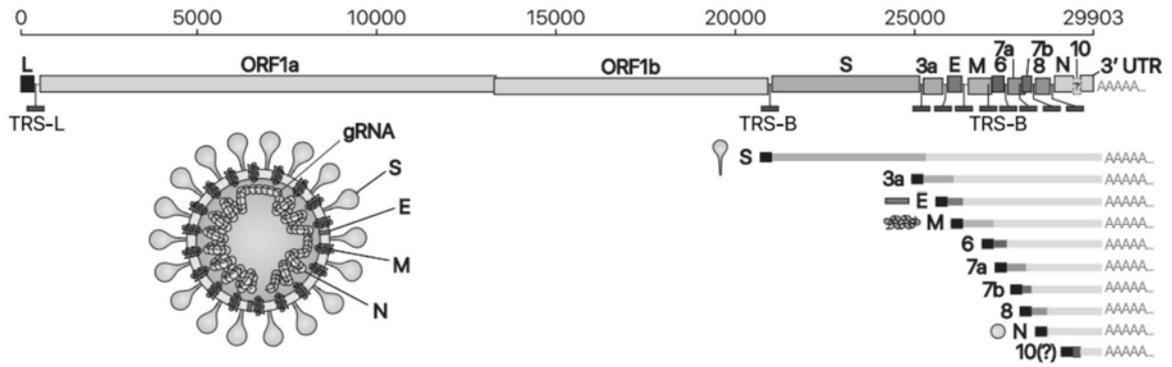


图1

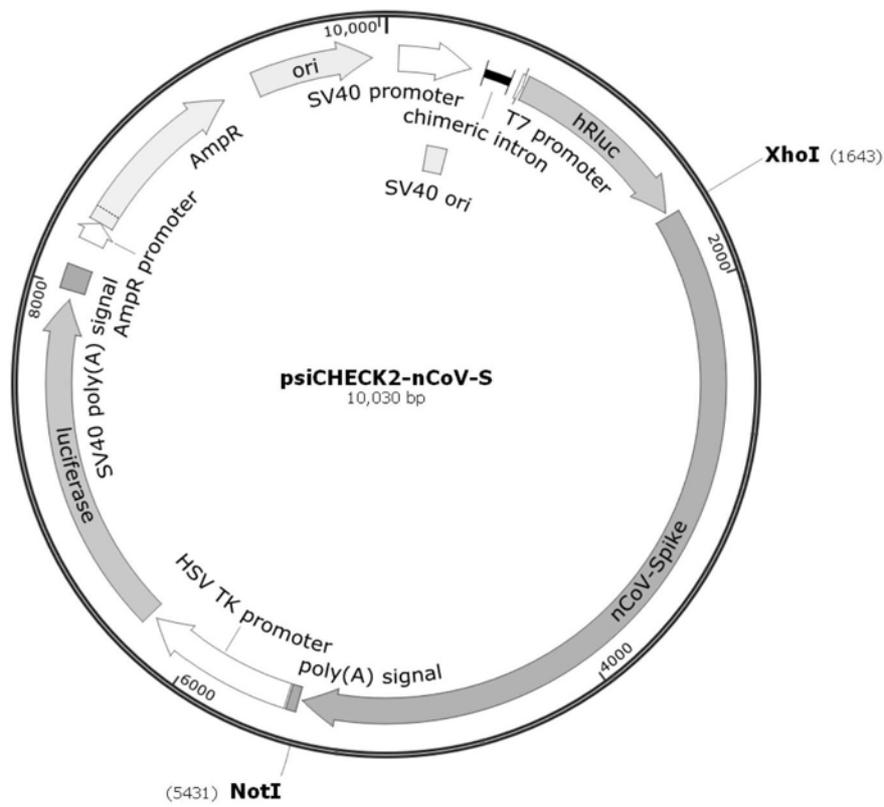


图2

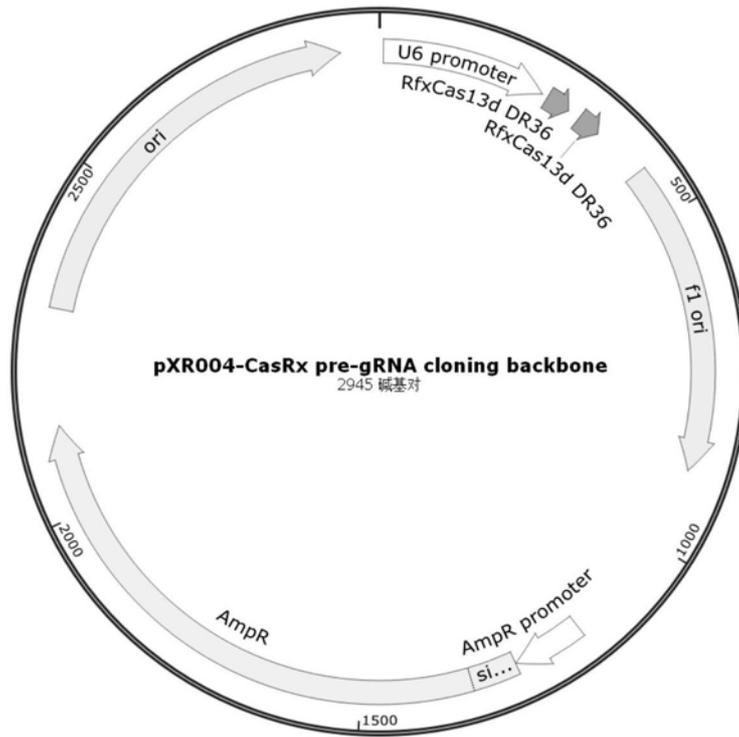


图3

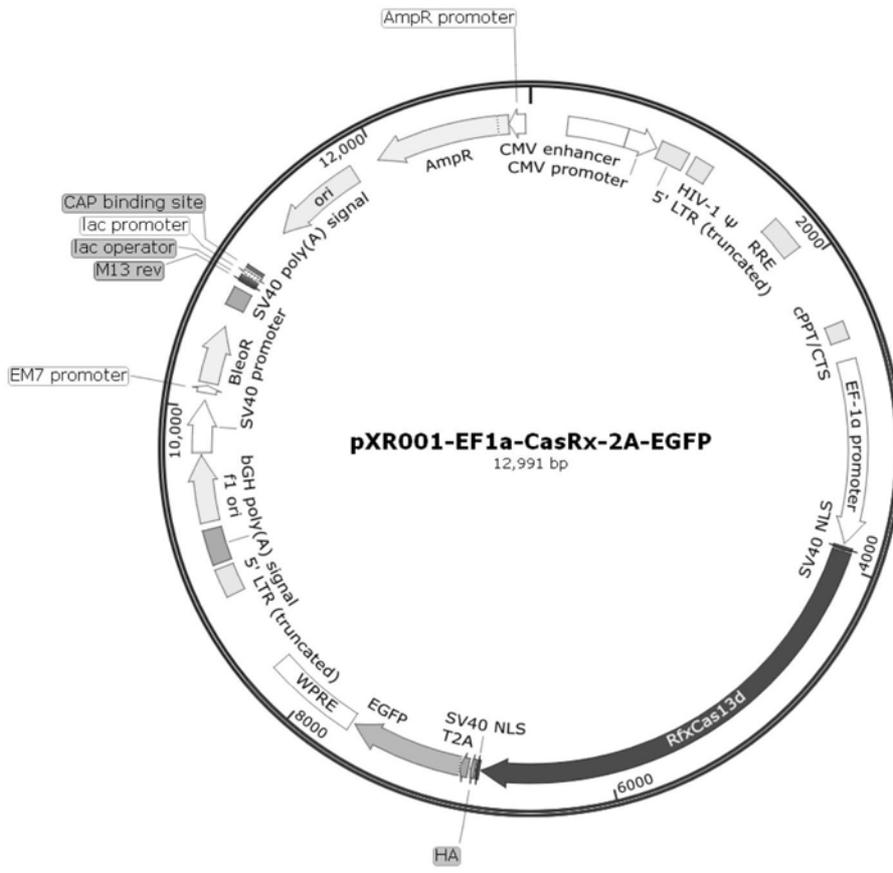


图4

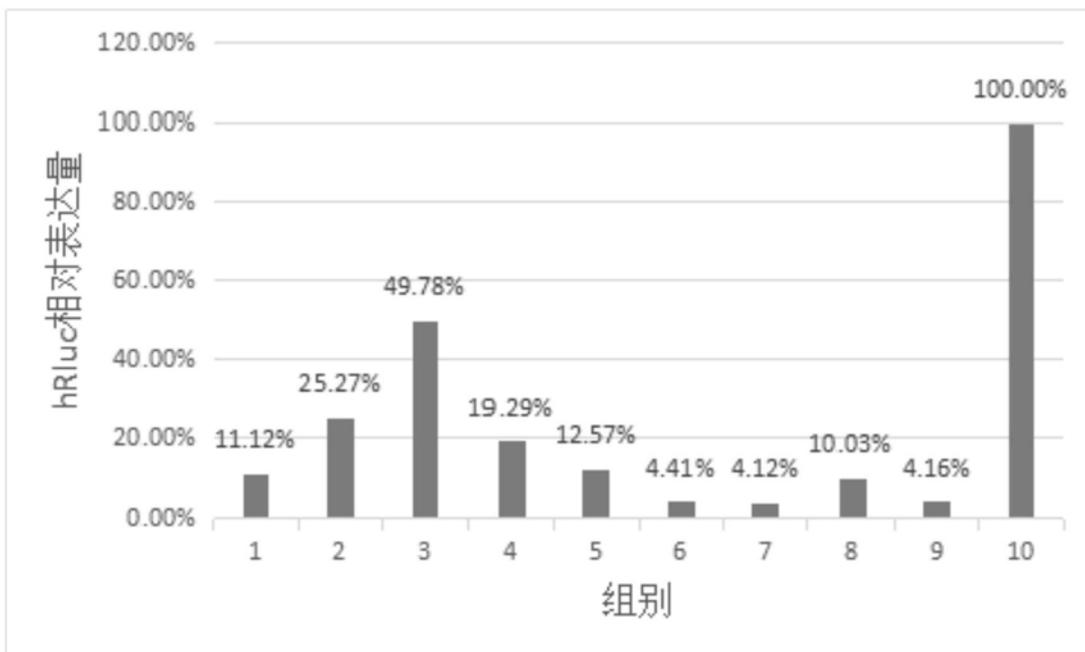


图5

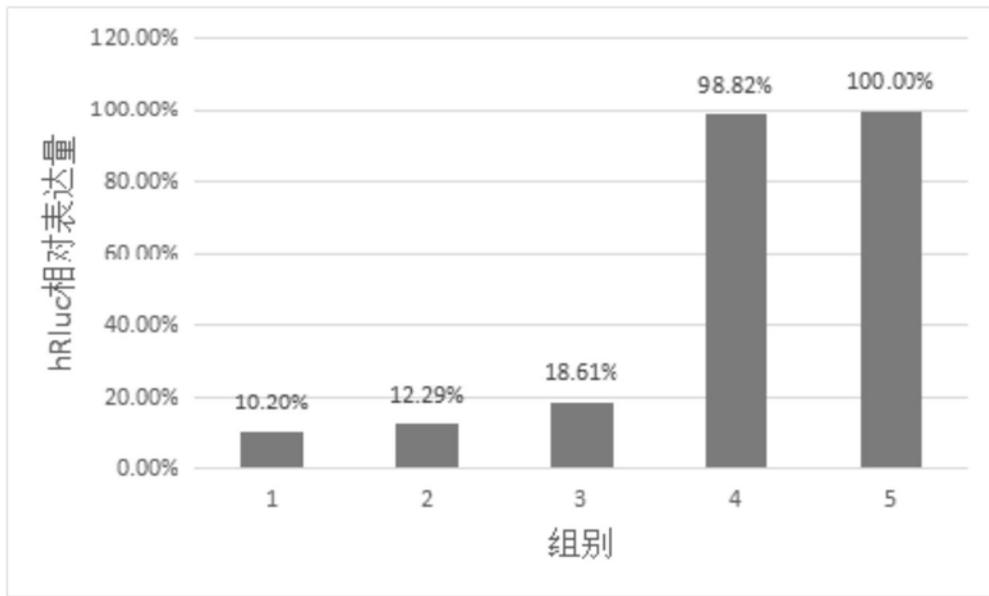


图6