

权 利 要 求

1. 融合蛋白，其包含细胞穿膜肽、pH 敏感融合肽以及蛋白酶识别序列，其中，所述蛋白酶选自弗林蛋白酶和/或溶酶体半胱氨酸蛋白酶。

2. 权利要求 1 所述的融合蛋白，其中，所述弗林蛋白酶识别序列包含 **R-X₁-X₂-R** (SEQ ID NO: 1)，其中，X₁ 为任意氨基酸，X₂ 为 K 或 R；

优选地，所述弗林蛋白酶识别序列包含 **R-R-X₁-X₂-R** (SEQ ID NO: 2)；

优选地，所述弗林蛋白酶识别序列包含 SEQ ID NO: 3 所示的序列；

优选地，所述弗林蛋白酶识别序列包含 SEQ ID NO: 4 所示的序列。

3. 权利要求 1 或 2 所述的融合蛋白，其中，所述溶酶体半胱氨酸蛋白酶选自组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 C、组织蛋白酶 X、组织蛋白酶 S、组织蛋白酶 L、组织蛋白酶 D 或组织蛋白酶 H；

优选地，所述溶酶体半胱氨酸蛋白酶是组织蛋白酶 L；

优选地，所述组织蛋白酶 L 识别序列包含 SEQ ID NO: 6 所示的序列。

4. 权利要求 1-3 任一项所述的融合蛋白，其中，所述蛋白酶识别序列包含弗林蛋白酶识别序列和组织蛋白酶 L 识别序列；

优选地，所述蛋白酶识别序列包含 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 6；

优选地，所述蛋白酶识别序列包含 SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 6。

5. 权利要求 1-4 任一项所述的融合蛋白，其中，所述 pH 敏感融合肽选自流感病毒 HA2 或其突变体（例如 INF7，KALA 或 GALA）、蜂毒素（Melittin），及其任意组合；

优选地，所述 pH 敏感融合肽包含 INF7；

优选地，所述 pH 敏感融合肽包含如 SEQ ID NO: 8 所示的序列。

6. 权利要求 1-5 任一项所述的融合蛋白，其中，所述细胞穿膜肽选自穿透素 (Penetratin)、Tat 衍生肽（例如，Tat(48-60)或 Tat(47-57)）、Rev(34-50)、VP22、转运肽 (transportan)、Pep-1、Pep-7，及其任意组合；

优选地，所述细胞穿膜肽包含 Tat 衍生肽，例如 Tat(48-60)；

优选地，所述细胞穿膜肽包含如 SEQ ID NO: 10 所示的序列。

7. 权利要求 1-6 任一项所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白从 N 端至 C 端包含所述 pH 敏感融合肽、细胞穿膜肽和蛋白酶识别序列；或者，所述融合蛋白从 N 端至 C 端包含所述细胞穿膜肽、pH 敏感融合肽和蛋白酶识别序列；

优选地，所述蛋白酶识别序列从 N 端至 C 端包含所述弗林蛋白酶识别序列和组织蛋白酶 L 识别序列，或者从 N 端至 C 端包含所述组织蛋白酶 L 识别序列和弗林蛋白酶识别序列。

8. 权利要求 1-7 任一项所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白包含 SEQ ID NOs: 12-14 任一项所示的序列。

9. 权利要求 1-8 任一项所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白进一步包含特异性结合序列，所述特异性结合序列允许另外的分子（例如多肽、蛋白或核酸）与其发生特异性结合；

优选地，所述特异性结合序列包含亮氨酸拉链，并且所述亮氨酸拉链能够与其反向序列形成异源二聚体；

优选地，所述特异性结合序列包含亮氨酸拉链 NZ 或 CZ；

优选地，所述特异性结合序列包含 SEQ ID NO: 49 或 50 所示的序列；

优选地，所述特异性结合序列位于所述蛋白酶识别序列的 C 端。

10. 复合物，其包含权利要求 1-9 任一项所述的融合蛋白，以及货物分子；

优选地，所述货物分子选自核酸、肽或蛋白、糖类、脂质、化学化合物以及其任意的混合物；

优选地，所述核酸选自 DNA 分子、RNA 分子、siRNA、反义寡核苷酸、核酶、适体 (aptamer) 及其任意组合；

优选地，所述货物分子包含可检测的标记；

优选地，所述货物分子包含表位标签、报告基因序列和/或核定位信号 (NLS) 序列。

11. 权利要求 10 所述的复合物，其中，所述融合蛋白与货物分子是融合的，所述货物分子是肽或蛋白质；

优选地，所述货物分子融合至所述融合蛋白的 C 端；

优选地，所述复合物包含单链多肽，所述单链多肽从 N 端至 C 端包含所述 pH 敏感融合肽、细胞穿膜肽、蛋白酶识别序列和货物分子；优选地，所述蛋白酶识别序列从 N 端至 C 端包含所述弗林蛋白酶识别序列和组织蛋白酶 L 识别序列，或者从 N 端至 C 端包含所述组织蛋白酶 L 识别序列和弗林蛋白酶识别序列；

优选地，所述复合物包含单链多肽，所述单链多肽从 N 端至 C 端包含所述细胞穿膜肽、pH 敏感融合肽、蛋白酶识别序列和货物分子；优选地，所述蛋白酶识别序列从 N 端至 C 端包含所述弗林蛋白酶识别序列和组织蛋白酶 L 识别序列，或者从 N 端至 C 端包含所述组织蛋白酶 L 识别序列和弗林蛋白酶识别序列。

12. 权利要求 10 所述的复合物，其中，所述融合蛋白与货物分子化学偶联；

优选地，所述化学偶联通过二硫键、磷酸二酯键、硫代磷酸酯键、酰胺键、胺键、硫醚键、醚键、酯键或碳-碳键实现；

优选地，所述货物分子偶联至所述融合蛋白的 N 端或 C 端。

13. 权利要求 10 所述的复合物，其中，所述融合蛋白与货物分子非共价连接。

14. 权利要求 13 所述的复合物，其中，所述融合蛋白是权利要求 9 所述的融合蛋白，所述货物分子包含能够与所述融合蛋白中的特异性结合序列发生特异性结合的结构域；

优选地，所述能够与所述融合蛋白中的特异性结合序列发生特异性结合的结构域是氨基酸序列；

优选地，所述货物分子是肽或蛋白质；

优选地，所述融合蛋白中的特异性结合序列包含亮氨酸拉链，所述货物分子包含所述亮氨酸拉链的反向序列，从而所述亮氨酸拉链能够与该反向序列形成异源二聚体；

优选地，所述融合蛋白中的特异性结合序列包含亮氨酸拉链 NZ（例如，SEQ ID NO: 49 所示的序列），所述货物分子包含亮氨酸拉链 CZ（例如，SEQ ID NO: 50 所示的序列）；

优选地，所述融合蛋白中的特异性结合序列包含亮氨酸拉链 CZ（例如，SEQ ID NO: 50 所示的序列），所述货物分子包含亮氨酸拉链 NZ（例如，SEQ ID NO: 49 所示的序列）。

15. 权利要求 13 所述的复合物，其中，所述融合蛋白与货物分子通过静电作用缀合。

16. 组合物，其包含权利要求 1-9 任一项所述的融合蛋白，以及货物分子；

优选地，所述货物分子选自核酸、肽或蛋白、糖类、脂质、化学化合物以及其任意的混合物；

优选地，所述货物分子选自核酸、肽或蛋白；

优选地，所述核酸选自 DNA 分子、RNA 分子、siRNA、反义寡核苷酸、核酶、适体 (aptamer) 及其任意组合。

17. 权利要求 16 所述的组合物，其包含权利要求 9 所述的融合蛋白，所述货物分子包含能够与所述融合蛋白中的特异性结合序列发生特异性结合的结构域；

优选地，所述能够与所述融合蛋白中的特异性结合序列发生特异性结合的结构域是氨基酸序列；

优选地，所述货物分子是肽或蛋白质；

优选地，所述融合蛋白中的特异性结合序列包含亮氨酸拉链，所述货物分子包含所述亮氨酸拉链的反向序列，从而所述亮氨酸拉链能够与该反向序列形成异源二聚体；

优选地，所述融合蛋白中的特异性结合序列包含亮氨酸拉链 NZ（例如，SEQ ID NO: 49 所示的序列），所述货物分子包含亮氨酸拉链 CZ（例如，SEQ ID NO: 50 所示的序列）；

优选地，所述融合蛋白中的特异性结合序列包含亮氨酸拉链 CZ（例如，SEQ ID NO: 50 所示的序列），所述货物分子包含亮氨酸拉链 NZ（例如，SEQ ID NO: 49 所示的序列）。

18. 分离的核酸分子，其包含编码权利要求 1-9 任一项所述的融合蛋白、或权利要求 11 所述的复合物、或权利要求 16 或 17 所述的组合物的核苷酸序列。

19. 载体，其包含权利要求 18 所述的分离的核酸分子。

20. 宿主细胞，其包含权利要求 18 所述的分离的核酸分子或权利要求 19 所述的载体。

21. 制备权利要求 1-9 任一项所述的融合蛋白、或者权利要求 11 所述的复合物的方法，

其包括，在合适的条件下培养权利要求 20 的宿主细胞，和从细胞培养物中回收所述融合蛋白或者复合物。

22. 药物组合物，其包含权利要求 1-9 任一项所述的融合蛋白、权利要求 10-15 任一项所述的复合物、权利要求 16 或 17 所述的组合物、权利要求 18 所述的分离的核酸分子、权利要求 19 所述的载体或权利要求 20 所述的宿主细胞，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂；

优选地，所述药物组合物包含权利要求 10-15 任一项所述的复合物，其中，所述货物分子是药学活性剂或可检测的标记。

23. 权利要求 1-9 任一项所述的融合蛋白或包含编码所述融合蛋白的核苷酸序列的分离的核酸分子、载体或宿主细胞，用于制备药物的用途。

24. 权利要求 10-15 任一项所述的复合物或权利要求 16 或 17 所述的组合物、或包含编码所述复合物或组合物的核苷酸序列的分离的核酸分子、载体或宿主细胞，在制备用于治疗疾病的药物中的用途；其中，所述复合物或组合物所包含的货物分子能够治疗所述疾病；

优选地，所述疾病是与细胞程序性坏死相关的疾病，并且，所述货物分子包含蛋白磷酸酶 1B；优选地，所述与细胞程序性坏死相关的疾病包括肝损伤（例如药源性肝损伤）、炎性疾病、缺血再灌注损伤和/或神经退行性疾病。

25. 试剂盒，其包含权利要求 1-9 任一项所述的融合蛋白、权利要求 10-15 任一项所述的复合物、权利要求 16 或 17 所述的组合物、权利要求 18 所述的分离的核酸分子、权利要求 19 所述的载体或权利要求 20 所述的宿主细胞；

优选地，所述试剂盒进一步包括用于转染和/或胞内递送的说明书。

26. 权利要求 1-9 任一项所述的融合蛋白、权利要求 1-15 任一项所述的复合物、权利要求 16 或 17 所述的组合物、权利要求 18 所述的分离的核酸分子、权利要求 19 所述的载体或权利要求 20 所述的宿主细胞，作为递送试剂的用途。

27. 用于将货物分子递送入细胞的方法，其包括使所述细胞与权利要求 10-15 任一项所述的复合物接触，其中所述复合物包括所述货物分子；

优选地，所述细胞与所述复合物的接触在体外实施；

优选地，所述分子选自核酸、肽或蛋白、糖类、脂质、化学化合物以及其任意的混合物；优选地，所述核酸选自 DNA 分子、RNA 分子、siRNA、反义寡核苷酸、核酶、适体(aptamer)及其任意组合。