

用于胞内递送分子的复合物

技术领域

本发明涉及分子生物学领域，更具体的说，涉及用于胞内递送货物分子的融合蛋白及复合物。

背景技术

细胞膜作为选择性透过性屏障对细胞存活和功能至关重要，虽然小分子物质可以通过细胞的天然过程或脂质双层的直接扩散穿过细胞膜，但是在大多数情况下，外源性的活性生物大分子等细胞内载物从细胞质膜的有效通过，仍然是细胞运送过程的主要障碍。因此，一种能够有效提高细胞内载物向活细胞运输效率的分子转运工具对于其在生物医药等领域的应用极为重要。

细胞穿膜肽 (Cell-penetrating peptides, CPPs) 是目前用于实现细胞摄取过程的最普遍和有效的载体之一。细胞穿膜肽，通常含有 5-30 个氨基酸，可以以化学交联、融合表达或非共价结合的方式携带生物大分子穿过细胞膜进入胞内。迄今，已有上百种来源于天然蛋白或人工合成的 CPPs 被报道并用于细胞内载物的胞内递送研究，根据其化学性质的不同，可以分为三类：(1) 阳离子型，富含精氨酸和赖氨酸残基，在生理 pH 下具有强正电荷；(2) 两亲型，包含极性和非极性区域，除了分布在序列中的赖氨酸和精氨酸外，它们还富含疏水残基，如缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和丙氨酸等；(3) 疏水型，主要含有非极性氨基酸。CPPs 通过其强正电荷或疏水基团与细胞膜表面负电荷或疏水脂双层相互作用，当携带小分子时可以采用非耗能的方式直接转位穿过细胞膜，当携带生物大分子时基本上采用能量依赖的胞吞作用(endocytosis)进入胞内。由于 CPPs 在介导入胞时用量低、转运所需时间段、剂量可控、操作简单以及毒副作用低等优点，目前 CPP 已在体外及体内被广泛应用于转运多肽、蛋白、寡核苷酸、质粒、脂质体和金属离子，小分子荧光，纳米颗粒等等。

尽管 CPPs 在转导生物大分子上具有诸多优势，但仍存在一些局限性，其中首先需要解决的是其较低的跨膜递送效率。目前普遍认为，在转导内载物入胞时，CPPs 与细胞膜表面相互作用，然后通过细胞内吞(endocytosis)进入胞内。细胞内吞可根据其内吞机制的不同可分为四种主要方式：巨胞饮作用 (macropinocytosis)、网格蛋白介导的内吞 (clathrin-mediated endocytosis)、胞膜窖/脂筏介导的内吞 (caveolae/lipid raft-mediated

endocytosis) 以及不依赖于网格蛋白/胞膜窖的内吞 (clathrin/caveolae- independent endocytosis) 等。这些不同的细胞内吞方式最终都会生成内吞小泡(endosome), 并由早期内吞小泡(early endosome)向晚期内吞小泡(late endosome)单向成熟并伴随小泡内 pH 逐步降低, 最终与溶酶体(lysosome)融合。细胞内载物需要在进入溶酶体之前从内吞小泡逃逸

5 (endosomal escape)进入胞浆, 否则, 将最终进入溶酶体并被降解而不能发挥功能。已有研究表明, CPPs 携带的生物大分子仅有 1%能在内吞小泡逃逸成功, 大部分最终导向溶酶体而被降解。因此, 细胞内载物的小泡逃逸是 CPPs 胞内递送过程的关键限制因素, 其效率决定了总体递送效率。

对于提升小泡逃逸效率, 主要策略为在成熟酸化的过程中破坏小泡囊膜的完整性,

10 从而使其内容物(包括被递送的细胞内载物)释放到胞浆中。有报道可以通过在体系中加入缓冲剂, 比如氯喹 (chloroquine), 甲胺 (methylamine), 或者氯化铵 (ammonium chloride), 以物理性方式促进内吞小泡的渗透破裂, 但因其较强的细胞毒性阻碍了在临床上的应用。而目前最有效的方式是利用来源于病毒、细菌、动植物或者人类的 pH 敏感肽(pH sensitive fusogenic peptides)。pH 敏感肽含有一定比例的疏水氨基酸, 且在低

15 pH 值的情况下会发生构象的剧烈改变。在 CPPs 介导细胞内吞后, 内吞小泡在成熟酸化的过程中, 一旦 pH 值下降到临界点, 与 CPPs 偶联的 pH 敏感肽发生构象改变并与小泡囊膜的脂双层结合从而剧烈扰动磷脂双层膜的完整性, 在其上形成小孔或导致囊膜裂解, 最后将被转运的生物大分子释放进入胞浆。目前较为常用的 pH 敏感肽为流感病毒血凝素抗原茎部区的一段多肽(以下简称 HA2), 以及基于 HA2 人工改造后毒性更低、破膜效

20 果更好的 INF7, 二者与 CPPs 及蛋白分子融合表达后, 能够提升转运蛋白分子的内吞小泡逃逸效率。然而, 虽然融合 pH 敏感肽后的 CPPs 大分子胞内递送系统的内吞小泡逃逸效率确实得到提高, 但相当一部分的被转运大分子仍留存在内吞小泡内(以荧光蛋白作为被转运大分子可见明显的点状分布)。

因此, 仍然需要开发新的递送系统, 以实现被转运的生物大分子从内吞小泡的高效

25 释放。

发明内容

本申请的发明人经过大量实验和反复摸索, 出人意料地发现将 pH 敏感肽与特定蛋白酶识别序列联用作为递送载体能够显著提高货物分子从内吞小泡的释放, 从而显著提升

30 货物分子的细胞质递送效率, 使货物分子充分发挥其相应的生物学功能。基于这些发现,

本发明人开发了能够实现高效细胞质递送的载体系统。

融合蛋白

因此，本发明第一方面提供了一种融合蛋白，其包含细胞穿膜肽、pH 敏感融合肽
5 (pH-sensitive fusogenic peptide) 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。

在某些实施方案中，所述弗林蛋白酶识别序列包含下述序列或由其组成： $R-X_1-X_2-R^{\downarrow}$ (SEQ ID NO: 1)，其中， X_1 为任意氨基酸， X_2 为 K 或 R， $\downarrow$ 表示切割位点。

在某些实施方案中，所述弗林蛋白酶识别序列包含下述序列或由其组成： $R-R-X_1-X_2-R^{\downarrow}$ (SEQ ID NO: 2)。
10

在某些实施方案中， X_1 选自丙氨酸 (A)、精氨酸 (R)、天冬氨酸 (D)、半胱氨酸 (C)、谷氨酰胺 (Q)、谷氨酸 (E)、组氨酸 (H)、异亮氨酸 (I)、甘氨酸 (G)、天冬氨酸 (N)、亮氨酸 (L)、赖氨酸 (K)、甲硫氨酸 (M)、苯丙氨酸 (F)、脯氨酸 (P)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)、色氨酸 (W)、酪氨酸 (Y) 和缬氨酸 (V)。

在某些实施方案中，所述弗林蛋白酶识别序列包含下述序列或由其组成： $RRHKR^{\downarrow}$ (SEQ ID NO: 3)。
15

在某些实施方案中，所述弗林蛋白酶识别序列包含下述序列或由其组成： $QSVASSRRHKR^{\downarrow}FAGV$ (SEQ ID NO: 4)。

在某些实施方案中，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、
20 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。

在某些实施方案中，所述溶酶体半胱氨酸蛋白酶是组织蛋白酶 L。

在某些实施方案中，所述组织蛋白酶 L 识别序列包含下述序列或由其组成： $NNTHDLVGDVRLAGV$ (SEQ ID NO: 6)。

在某些实施方案中，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
25 识别序列。在某些实施方案中，所述蛋白酶识别序列是单链多肽，其从 N 端至 C 端包含弗林蛋白酶识别序列和组织蛋白酶 L 识别序列，或者其从 N 端至 C 端包含组织蛋白酶 L 识别序列和弗林蛋白酶识别序列。

在某些实施方案中，所述蛋白酶识别序列包含 $RRHKR$ (SEQ ID NO: 3) 和 $NNTHDLVGDVRLAGV$ (SEQ ID NO: 6)。在某些实施方案中，所述蛋白酶识别序列包
30 含 SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 6。

在本发明中，术语“pH敏感融合肽（pH-sensitive fusogenic peptide）”与“pH敏感肽”可互换使用，其是指一类能够在酸性条件（例如，pH<6.5）下发生构象改变从而促进与内吞小泡囊膜融合的多肽。当pH敏感肽被细胞内吞后，内吞小泡在成熟酸化的过程中，一旦pH值下降到临界点，此类多肽发生构象改变并与小泡囊膜的脂双层结合从而剧烈扰动磷脂双层膜的完整性，在其上形成小孔或导致囊膜裂解，从而将被转运的生物大分子释放进入胞浆。这类多肽是本领域熟知的，并描述于例如， Varkouhi, Amir K., et al. *Journal of Controlled Release* 151.3 (2011): 220-228; Erazo-Oliveras A, Muthukrishnan N, Baker R, et al. *Pharmaceuticals*, 2012, 5(11): 1177-1209，其全部通过引用并入本文。

能够用于本发明的融合蛋白的pH敏感肽可以选自下列的蛋白或多肽，或者源自选自下列蛋白或多肽：

病毒蛋白来源：HA2（流感病毒）及其突变体 KALA, GALA；五邻体蛋白(penton base)（腺病毒或鼻病毒），gp41（HIV），L2（乳头瘤病毒），包膜蛋白（西尼罗河病毒 (West Nile virus)）；

细菌蛋白来源：单增李斯特氏菌溶血素 O（Listeriolysin O (LLO)），肺炎球菌溶血素（Pneumococcal pneumolysin (PLO)），链球菌溶血素 O（Streptococcal streptolysin O (SLO)），白喉毒素（Diphtheria toxin），铜绿假单胞菌外毒素 A（Pseudomonas aeruginosa exotoxin A），志贺毒素（Shiga toxin），霍乱毒素（Cholera toxin）；

植物蛋白来源：蓖麻毒素（Ricin），皂草素（Saporin），Gelonin 毒素；

人类/动物蛋白来源：人降钙素，成纤维细胞生长因子受体，蜂毒素（Melittin）；

人工合成多肽：(R-Ahx-R)(4) AhxB，穿透素（Penetratin (pAntp)），EB1，牛朊蛋白（Bovine prion protein (bPrPp)），甜箭肽（Sweet Arrow Peptide (SAP)），聚 L-组氨酸（Poly (L-histidine)），脯氨酸富含肽（Proline-rich）。

在某些实施方案中，所述 pH 敏感融合肽选自流感病毒 HA2（SEQ ID NO: 38）或其突变体、蜂毒素(Melittin)（SEQ ID NO: 41），及其任意组合。在某些实施方案中，所述流感病毒 HA2 的突变体选自 INF7（SEQ ID NO: 8）、KALA（SEQ ID NO: 39）或 GALA（SEQ ID NO: 40）。

在某些实施方案中，所述 pH 敏感融合肽包含 INF7。在某些实施方案中，所述 pH 敏感融合肽包含下述序列或由其组成：SEQ ID NO: 8。

在本发明中，术语“细胞穿膜肽（cell penetrating peptide，CPP）”又称为“细胞穿透肽”、“蛋白质转导域（protein translocation domain，PTD）”、“Trojan horse peptides”或“转导肽（transduction peptide）”等，其是指，能够促进各种分子（例如，各种大分子包括蛋白或核酸）的细胞摄取的多肽。这类多肽是本领域熟知的，并描述于例如，Stewart KM, et al. *Org Biomol Chem.* 2008 Jul 7;6(13):2242-55以及中国专利申请CN101490081A（其全部通过引用并入本文）；或者可以通过本领域已知的方法获得，例如详细描述于美国专利申请US 2008/0234183中的方法，其全部通过引用并入本文。

能够用于本发明的融合蛋白的CPP包括但不限于：阳离子型：Penetratin、HIV-TAT-47-57、HIV-1 Rev 34-50、FHV coat-35-49、低聚精氨酸(Oligoarginines) (R9-R12)、CCMV Gag-7-25、S413-PV、VP22、BP16、DPV3、DPV6、FAH外壳蛋白、鱼精蛋白1(Protamine 1)、人cJun、Engrailed-2、Islet-1、HoxA-13、TP10等；两亲性型：转运肽(transportan)、Transportan 10、Pep-1、MPG α 、MPG β 、CADDY、Pepfect6、Pepfect14、Pepfect15、NickFect、Hel、sC18、pVEC、ARF (1-22)、YTA2、PAR1 (Palmitoyl-SFLLRN)、F2Pal10 (Palmitoyl-SFLLRN)、BPrPp(1-30)、hLF肽(19-40)、Biforin 2、Crotamine、Azurin p18、hCT肽(18-32)、S413-PVrev等；疏水型：Kaposi's肉瘤成纤维细胞生长因子、源自*Caiman crocodylus*的Ig轻链的信号肽、整合素 β 3片段、Grb2-SH2结构域、HIV-1 gp41 (1-23)、HBV移位基序(translocation motif)、精卵融合蛋白(89-111)、人降钙素(9-32)、Pep-7、C105Y、K-FGF等。

此外，用作本发明的融合蛋白中的CPP还可以选自与如上所述的任何多肽序列具有大约60、70、80、90、95、99%或100%的序列同一性的多肽序列，只要该多肽序列仍然保留其生物学活性，即，促进分子的细胞摄取。

在某些实施方案中，所述细胞穿膜肽选自穿透素(Penetratin) (SEQ ID NO: 42)、Tat衍生肽、Rev(34-50) (SEQ ID NO: 44)、VP22 (SEQ ID NO: 45)、转运肽(transportan) (SEQ ID NO: 46)、Pep-1 (SEQ ID NO: 47)、Pep-7 (SEQ ID NO: 48)，及其任意组合。在某些实施方案中，所述 Tat 衍生肽选自 Tat(48-60) (SEQ ID NO: 10) 或 Tat(47-57) (SEQ ID NO: 43)。

在某些实施方案中，所述细胞穿膜肽包含 Tat 衍生肽，例如 Tat(48-60)。在某些实施方案中，所述细胞穿膜肽包含下述序列或由其组成：SEQ ID NO:10。

在一些实施方案中，本发明的融合蛋白从 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。在某些实施方案中，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、弗林蛋白酶识别序列和组织蛋白酶 L 识别序列。在某些实
5 施方案中，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、组织蛋白酶 L 识别序列和弗林蛋白酶识别序列。

在另一些实施方案中，本发明的融合蛋白从 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。在某些实施方案中，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、弗林蛋白酶识别序列和组织蛋白酶 L 识别序列。在某些
10 实施方案中，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、组织蛋白酶 L 识别序列和弗林蛋白酶识别序列。

在某些实例性实施方案中，所述融合蛋白包含选自下列的序列或由其组成：SEQ ID NOs: 12-14 任一项所示的序列。

某些实施方案中，所述融合蛋白在其 N 端可进一步包含蛋白标签。在某些实施方案
15 中，所述蛋白标签具有促溶作用。在某些实施方案中，所述蛋白标签选自 TrxA、SUMO、NusA、MBP、GST。

本发明第二方面还提供了一种融合蛋白，其在第一方面所述的融合蛋白的基础上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
20 酸(如DNA)）与其发生特异性结合。在本文中，术语“特异性结合”是指两分子间的非随机的结合反应，如抗体（或其抗原结合片段）和其所针对的抗原（或抗原表位）之间的反应，或者两个氨基酸序列（例如反向平行的两个亮氨酸拉链结构域）之间形成异源二聚体的反应。

在某些实施方案中，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。在某些实施方案中，所述特异性结合序列包含亮氨酸
25 拉链 NZ 或 CZ。本领域已知，亮氨酸拉链 NZ 与 CZ 互为反向序列，两者之间具有较强相互作用力，从而反向平行的亮氨酸拉链 NZ 与 CZ 可形成异源二聚体。在某些实施方案中，所述亮氨酸拉链 NZ 包含 SEQ ID NO: 49 所示的序列。在某些实施方案中，所述亮氨酸拉链 CZ 包含 SEQ ID NO: 50 所示的序列。

30 在一些实施方案中，所述特异性结合序列包含 SEQ ID NO: 49 所示的序列。在另一

些实施方案中，所述特异性结合序列包含 SEQ ID NO: 50 所示的序列。

在某些实施方案中，所述特异性结合序列位于所述蛋白酶识别序列的 C 端。在某些实施方案中，所述融合蛋白在其 C 端包含所述特异性结合序列。

某些实施方案中，所述融合蛋白在其 N 端可进一步包含蛋白标签。在某些实施方案中，所述蛋白标签具有促溶作用。在某些实施方案中，所述蛋白标签选自 TrxA、SUMO、NusA、MBP、GST。

融合蛋白的制备

本发明的融合蛋白可以本领域已知的各种方法来制备，例如，通过基因工程方法（重组技术）产生，也可以通过化学合成方法（例如 Fmoc 固相方法）产生。本发明的融合蛋白不受其产生方式的限定。

因此，在另一方面，本发明提供了一种分离的核酸分子，其包含编码本发明第一或第二方面的融合蛋白的核苷酸序列。

在另一方面，本发明提供了一种载体（例如克隆载体或表达载体），其包含如上所述的分离的核酸分子。在某些实施方案中，所述载体是例如质粒，粘粒，噬菌体等。

在另一方面，本发明提供了一种宿主细胞，其包含如上所述的分离的核酸分子或载体。此类宿主细胞包括但不限于，原核细胞例如大肠杆菌细胞，以及真核细胞例如酵母细胞，昆虫细胞，植物细胞和动物细胞（如哺乳动物细胞，例如小鼠细胞、人细胞等）。

在另一方面，提供了制备本发明第一或第二方面的融合蛋白的方法，其包括，在允许所述融合蛋白表达的条件下，培养如上所述的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述融合蛋白。

复合物

在另一方面，本发明提供了一种复合物，其包含本发明第一或第二方面的融合蛋白以及货物分子（cargo）。所述货物分子可以是任意的分子。

在某些实施方案中，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。

在某些实施方案中，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。

在某些实施方案中，所述货物分子的分子量小于 10000Da，例如小于 5000 Da，小于

3000Da, 或小于 1000Da。

在某些实施方案中, 所述货物分子包含可检测的标记, 例如酶、放射性核素、荧光染料、化学发光物质或生物素等。

在某些实施方案中, 所述货物分子包含表位标签(epitope tag)、报告基因序列和/或核
5 定位信号(NLS)序列。在某些实施方案中, 所述货物分子是肽或蛋白。

可用于货物分子中的表位标签是本领域技术人员熟知的, 其实例包括但不限于 His、V5、FLAG、HA、Myc、VSV-G、Trx 等, 并且本领域技术人员已知如何根据期望目的(例如, 纯化、检测或示踪)选择合适的表位标签。在某些实例性实施方案中, 所述货物分子包含 His 标签。

10 可用于货物分子中的报告基因序列是本领域技术人员熟知的, 其实例包括但不限于 GST、HRP、CAT、GFP、HcRed、DsRed、CFP、YFP、BFP 等。

可用于货物分子中的核定位信号(NLS)序列是本领域技术人员熟知的, 其实例包括但不限于 SV40 病毒大 T 抗原的 NLS。在某些实例性实施方案中, 所述 NLS 序列如 SEQ ID NO: 15 所示。

15 在一些实施方案中, 本发明的融合蛋白与货物分子是融合的, 其中所述货物分子是肽或蛋白质。在某些实施方案中, 所述融合蛋白如第一方面定义。

在某些实施方案中, 所述货物分子融合至所述融合蛋白的 N 端或 C 端。在某些实施方案中, 所述货物分子融合至所述融合蛋白的 C 端。

20 在一些实施方案中, 本发明的复合物包含单链多肽, 其从 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。在某些实施方案中, 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、弗林蛋白酶识别序列、组织蛋白酶 L 识别序列和货物分子。在某些实施方案中, 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、组织蛋白酶 L 识别序列、弗林蛋白酶识别序列和货物分子。

25 在另一些实施方案中, 本发明的复合物包含单链多肽, 其从 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。在某些实施方案中, 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、弗林蛋白酶识别序列、组织蛋白酶 L 识别序列和货物分子。在某些实施方案中, 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、组织蛋白酶 L 识别序列、弗林蛋白酶识别序列和货物
30 分子。

在某些实例性实施方案中，所述货物分子是锌指蛋白（例如 ZFP9）、蛋白磷酸酶（例如 Ppm1b）或 Cas 效应蛋白（例如 Cas9）。表述“Cas 效应蛋白”是指 CRISPR-Cas 系统的效应蛋白。在某些实例性实施方案中，所述锌指蛋白或 Cas 效应蛋白包含 NLS 序列。

5

在另一些实施方案中，本发明的融合蛋白与货物分子化学偶联（chemical coupling）。所述“化学偶联”指在融合蛋白所包含的反应基团与货物分子所包含的反应基团之间的化学反应中获得的键合，所述化学反应后两个部分通过共价键连接。在上述化学反应（偶联反应）之前，可以用接头分子在独立的反应中对融合蛋白、货物分子或二者进行修饰以使它们分别包含该化学偶联所需的反应基团。用于修饰融合蛋白或货物分子的接头分子的选择取决于所使用的偶联策略。在某些实施方案中，所述融合蛋白如第一方面定义。

10

在某些实施方案中，所述共价键为二硫键、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。

在某些实施方案中，所述货物分子偶联至所述融合蛋白的 N 端或 C 端。在某些实施方案中，所述货物分子偶联至所述融合蛋白的 C 端。

15

在某些实施方案中，所述货物分子是核酸。

在另一些实施方案中，本发明的融合蛋白与货物分子非共价连接。

在某些实施方案中，所述融合蛋白与货物分子通过静电作用缀合。在某些实施方案中，所述货物分子是核酸。

20

在某些实施方案中，所述融合蛋白如第二方面定义，所述融合蛋白通过其所包含的特异性结合序列与货物分子通过非共价连接。在此类实施方案中，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。

在某些实施方案中，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。

25

在某些实施方案中，所述货物分子是肽或蛋白质。在某些实施方案中，所述货物分子在其 N 端包含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氨基酸序列。

在某些实施方案中，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

30

二聚体。

在某些实施方案中，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）。

- 5 在某些实施方案中，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）。

复合物的制备

- 10 本发明的复合物可以本领域已知的各种方法来制备，例如，通过基因工程方法（重组技术）产生，也可以通过化学合成方法（例如 **Fmoc** 固相方法）产生。本发明的复合物不受其产生方式的限定。

- 在一些实施方案中，当所述复合物包含融合的融合蛋白与货物分子时，本发明的复合物可以通过基因工程重组技术来获得。例如，通过化学合成或 **PCR** 扩增获得编码该复
15 合物的 **DNA** 分子。将所得 **DNA** 分子插入表达载体内，然后转染宿主细胞。然后，在特定条件下培养转染后的宿主细胞，并表达本发明的复合物。

因此，在另一方面，本发明提供了一种分离的核酸分子，其包含编码如上所述的复合物的核苷酸序列。

- 在另一方面，本发明提供了一种载体（例如克隆载体或表达载体），其包含如上所述
20 的分离的核酸分子。在某些实施方案中，所述载体是例如质粒，粘粒，噬菌体等。

在另一方面，本发明提供了一种宿主细胞，其包含如上所述的分离的核酸分子或载体。此类宿主细胞包括但不限于，原核细胞例如大肠杆菌细胞，以及真核细胞例如酵母细胞，昆虫细胞，植物细胞和动物细胞（如哺乳动物细胞，例如小鼠细胞、人细胞等）。

- 在另一方面，提供了制备如上所述的复合物的方法，其包括，在允许所述复合物表
25 达的条件下，培养如上所述的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述复合物。

- 在另一些实施方案中，当所述复合物包含化学偶联的融合蛋白与货物分子时，本发
明的复合物可以通过下述实例性方法获得：在允许所述融合蛋白和货物分子所分别包含
的反应基团发生化学反应的条件下，将所述融合蛋白与货物分子混合，以使得所述两个
30 部分通过共价键连接。在某些实施方案中，所述方法还包括：使用接头分子对融合蛋白、

货物分子或二者进行修饰以使它们分别包含上述化学反应所需的反应基团。在某些实施方案中，所述货物分子是核酸。

在另一些实施方案中，当所述复合物包含通过静电作用缀合的融合蛋白与货物分子时，本发明的复合物可以通过下述实例性方法获得：(1) 使本发明的融合蛋白与货物分子混合，以形成混合物；和(2) 培育所述混合物以使得所述融合蛋白与货物分子形成复合物。在某些实施方案中，所述货物分子是核酸。

在另一些实施方案中，当所述复合物包含通过特异性结合而非共价连接的融合蛋白与货物分子时，本发明的复合物可以通过下述实例性方法获得：(1) 使本发明第二方面所述的融合蛋白与货物分子混合，所述货物分子包含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；和(2) 培育所述混合物以使得所述融合蛋白与货物分子形成复合物。在某些实施方案中，所述货物分子是多肽或蛋白。

15 组合物

当本发明的融合蛋白能够通过非共价作用与货物分子连接时，通过将融合蛋白与货物分子混合即可获得递送复合物。因此，在另一方面，本发明还提供了一种组合物，其包含本发明的融合蛋白以及货物分子。

在某些实施方案中，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。在某些实施方案中，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。

在某些实施方案中，所述货物分子选自核酸。

在某些实施方案中，所述货物分子是多肽或蛋白。

在某些实施方案中，所述融合蛋白如第二方面定义。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。

用途及方法

本发明的融合蛋白能够使货物分子从内吞小泡中高效释放，一旦在细胞质中可获得货物分子时，它们就可发挥与其相关的任何作用。因此，本发明的融合蛋白可用作胞内递送试剂，从而进一步用于研究以及治疗和诊断应用。

因此，在另一方面，本发明提供了一种药物组合物，其含有本发明的融合蛋白、复合物、组合物、分离的核酸分子、载体或宿主细胞，以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

在某些实施方案中，所述复合物或组合物所包含的货物分子是药学活性剂。

5 在某些实施方案中，所述复合物或组合物所包含的货物分子是可检测的标记。所述标记可用于诊断、用于研究药物处置(例如，吸收、分布、代谢、排泄)、用于研究治疗或药物的功效或副作用等。

在另一方面，本发明还涉及本发明的融合蛋白、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，作为递送试剂（例如胞内递送试剂和/或转染试剂）用于制备药物的用途。
10

在另一方面，本发明还涉及本发明的复合物或组合物、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。

在某些实施方案中，所述疾病是与细胞程序性坏死相关的疾病，其中，所述货物分子包含蛋白磷酸酶 1B。在某些实施方案中，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。
15

本发明的融合蛋白、复合物或组合物、或药物组合物可以为医学领域已知的任何形式，例如，可以是片剂、丸剂、混悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、
20 酞剂、锭剂、栓剂、注射剂（包括注射液、冻干粉剂）、吸入剂、喷雾剂等形式。优选剂型取决于预期的给药方式 and 治疗用途。

本发明的融合蛋白、复合物或组合物、或药物组合物，可以通过本领域已知的任何合适的方法来施用，包括但不限于，口服、直肠、肠胃外或局部给药。

一种示例性施用途径是口服给药。用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、悬浮剂、糖浆剂、酞剂等。除活性化合物以外，液体剂型可含有本领域常用的惰性稀释剂，例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂，例如乙醇、异丙醇、醋酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油类（例如棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油）、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯及其混合物。除惰性稀释剂以外，口服给药的液体剂型也可包括助剂，例如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、矫味剂和芳香剂等。用于
30

口服给药的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、锭剂、粉剂、颗粒剂等。除活性化合物以外，固体剂型可含有药学上可接受的惰性赋形剂或载体，例如填充剂（如乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、淀粉、微晶纤维素、半乳糖、交联聚维酮和硫酸钙）；粘合剂（如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶）；湿润剂（如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯）；崩解剂（如琼胶、碳酸钙、淀粉、褐藻酸、羧甲基纤维素钠、羧甲基淀粉钠）；润滑剂（如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠）；及其混合物。

本发明的融合蛋白、复合物或组合物、或药物组合物也可通过非口服途径给药。

因此，另一种示例性的施用途是肠胃外给药，例如，皮下注射、静脉注射、腹膜内注射、肌肉注射、胸骨内注射和注入。用于肠道外给药的剂型可以为注射制剂，包括注射液、注射用无菌粉末或注射用浓溶液。除活性化合物以外，注射剂型可含有药学上可接受的载体例如无菌水、林格氏液和等渗氯化钠溶液，也可根据药物的性质加入适宜的附加剂例如抗氧化剂、缓冲剂和抑菌剂。

另一种示例性的施用途是局部给药，例如经皮给药（如通过经皮贴剂或离子电渗装置给药）、眼内给药或者鼻内或吸入给药。用于经皮给药的剂型可以为局部凝胶剂、喷雾剂、软膏剂和霜剂。除活性化合物以外，局部剂型可含有能够提高该活性化合物通过皮肤或其它作用区域的吸收或渗透的成分。

另一种示例性的施用途是直肠给药。用于直肠给药的剂型可以为栓剂。

此外，还可以使用药学领域已知的其它载体材料和给药方式。本发明的融合蛋白、复合物或组合物、或药物组合物可以通过任何公知的制药工艺制备，例如有效的制剂和给药方法。

在另一方面，本发明提供了一种试剂盒，其含有本发明的融合蛋白、复合物、组合物、分离的核酸分子、载体或宿主细胞。在某些实施方案中，所述试剂盒进一步包括用于转染和/或胞内递送（**intracellular delivery**）的说明书。在某些实施方案中，所述试剂盒用于转染和/或胞内递送货物分子（例如，核酸、肽或蛋白、糖类、脂质、化学化合物以及其任意的混合物）。在某些实施方案中，所述细胞是哺乳动物细胞，例如人类细胞。

在另一方面，本发明还涉及本发明的融合蛋白、复合物、组合物、分离的核酸分子、载体或宿主细胞，作为递送试剂（例如转染试剂或胞内递送试剂）的用途。在某些实施

方案中，所述递送试剂用于胞内递送货物分子（例如，核酸、肽或蛋白、糖类、脂质、化学化合物以及其任意的混合物）。在某些实施方案中，所述细胞是哺乳动物细胞，例如人类细胞。

- 5 在另一方面，本发明提供了一种用于将分子递送入细胞的方法，其包括使所述细胞与本发明的复合物接触，其中所述复合物包括所述分子。

在某些实施方案中，所述细胞与所述复合物的接触在体内实施。

在某些实施方案中，所述细胞与所述复合物的接触离体实施。

在某些实施方案中，所述细胞与所述复合物的接触在体外实施。

- 10 在某些实施方案中，所述细胞是真核细胞，例如哺乳动物细胞，例如人类细胞。

术语定义

- 在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、生物化学、核酸化学、免疫学实验室等操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本
- 15 发明，下面提供相关术语的定义和解释。

- 如本文中所使用的，术语“分离的”是指，经人工手段从天然状态下获得。如果自然界中出现某一种“被分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变或从天然环境下离分出该物质，或二者情况均有发生。比如，对于某一活体动物体内
- 20 天然存在的某种未被分离的多聚核苷酸或多肽而言，从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为“分离的”。术语“分离的”不排除人工或合成的物质的存在，也不排除不影响物质活性的其它不纯物质的存在。

- 如本文中所使用的，术语“载体(vector)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。
- 25 载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。一种载
- 30 体

体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如S2
5 果蝇细胞或Sf9等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO细胞，COS细胞，NSO细胞，HeLa细胞，BHK细胞，HEK 293细胞或人细胞等的动物细胞。

如本文中所使用的，术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时(例如，两个DNA分子的每一个中的某个位置都被腺嘌呤占据，或两个多肽的每一个中的某个位置都被赖氨酸占据)，那么各分子在该位置上是同一的。两个序列之间的
10 “百分数同一性”是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目 $\times 100$ 的函数。例如，如果两个序列的10个位置中有6个匹配，那么这两个序列具有60%的同一性。例如，DNA序列CTGACT和CAGGTT共有50%的同一性(总共6个位置中有3个位置匹配)。通常，在将两个序列比对以产生最大同一性时进行比较。这样的比对可通过
15 使用，例如，可通过计算机程序例如Align程序(DNAstar, Inc.)方便地进行的Needleman等人(1970)*J. Mol. Biol.* 48: 443-453的方法来实现。还可使用已整合入ALIGN程序(版本2.0)的E. Meyers和W. Miller (*Comput. Appl Biosci.*, 4:11-17 (1988))的算法，使用PAM120权重残基表(weight residue table)、12的缺口长度罚分和4的缺口罚分来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。此外，可使用已整合入GCG软件包
20 (可在www.gcg.com上获得)的GAP程序中的Needleman和Wunsch (*J Mol Biol.* 48:444-453 (1970))算法，使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵以及16、14、12、10、8、6或4的缺口权重(gap weight)和1、2、3、4、5或6的长度权重来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。

本文涉及的二十个常规氨基酸的编写遵循常规用法。参见例如，Immunology-A
25 Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))，其以引用的方式并入本文中。在本发明中，术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用A或Ala表示。

如本文中所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指，在药理学和/或
30 生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的(参见例如

Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), 并且包括但不限于: pH调节剂, 表面活性剂, 离子强度增强剂, 维持渗透压的试剂, 延迟吸收的试剂, 稀释剂, 佐剂, 防腐剂, 稳定剂等。例如, pH调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液。表面活性剂包括但不限于阳离子, 5 阴离子或者非离子型表面活性剂, 例如Tween-80。离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。维持渗透压的试剂包括但不限于糖、NaCl及其类似物。延迟吸收的试剂包括但不限于单硬脂酸盐和明胶。稀释剂包括但不限于水, 水性缓冲液(如缓冲盐水), 醇和多元醇(如甘油)等。佐剂包括但不限于铝佐剂(例如氢氧化铝), 弗氏佐剂(例如完全弗氏佐剂)等。防腐剂包括但不限于各种抗细菌试剂和抗真菌试剂, 例如硫柳汞, 2-苯

10 氧乙醇, 对羟苯甲酸酯, 三氯叔丁醇, 苯酚, 山梨酸等。稳定剂具有本领域技术人员通常理解的含义, 其能够稳定药物中的活性成分的期望活性(例如对PSD-95泛素化的抑制活性), 包括但不限于谷氨酸钠, 明胶, SPGA, 糖类(如山梨醇, 甘露醇, 淀粉, 蔗糖, 乳糖, 葡聚糖, 或葡萄糖), 氨基酸(如谷氨酸, 甘氨酸), 蛋白质(如干燥乳清, 白蛋白或酪蛋白)或其降解产物(如乳白蛋白水解物)等。

15 如本文中所使用的, 术语“治疗”是指, 为了获得有益或所需临床结果而实施的方法。为了本发明的目的, 有益或所需的临床结果包括(但不限于)减轻症状、缩小疾病的范围、稳定(即, 不再恶化)疾病的状态, 延迟或减缓疾病的发展、改善或减轻疾病的状态、和缓解症状(无论部分或全部), 无论是可检测或是不可检测的。此外, “治疗”还可以指, 与期望的存活期相比(如果未接受治疗), 延长存活期。

20 如本文中使用的, 术语“受试者”是指哺乳动物, 例如灵长类哺乳动物, 例如人。

发明的有益效果

本发明的递送系统能够显著提高货物分子从内吞小泡的释放, 从而显著提升货物分子的细胞质递送效率, 使货物分子充分发挥其相应的生物学功能。因此, 本发明的递送

25 系统提供了用于影响细胞的生物学机制和途径的有效手段, 可用于研究、治疗、诊断等诸多领域, 具有广阔的应用前景及临床价值。

下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述, 但是本领域技术人员将理解, 下列附图和实施例仅用于说明本发明, 而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述, 本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员

30

来说将变得显然。

附图说明

图 1 显示了实施例 1 中 Split-GFP 系统检测内吞小泡逃逸效率的原理示意图。

5 图 2 显示了实施例 1 中递送系统-GFP β 1-10 蛋白复合物的结构示意图。

图 3-4 显示了实施例 1 中递送系统-GFP β 1-10 复合物的 SDS-PAGE 结果。

图 5 显示了实施例 1 中递送系统转导 GFP β 1-10 的流式细胞仪分析结果。

图 6 显示了实施例 1 中递送系统转导 GFP β 1-10 的荧光显微镜观察结果。

10 图 7 显示了实施例 1 中包含酶切位点突变的递送系统转导 GFP β 1-10 的流式细胞仪分析结果。

图 8 显示了实施例 1 中经递送系统转导后的胞内发生切割及未切割/完整的 GFP β 1-10 相对比例及其在胞内存留时间的 Western blot 检测结果。

图 9 显示了实施例 1 中包含酶切位点突变的递送系统转导后的胞内发生切割及未切割/完整的 GFP β 1-10 相对比例的 Western blot 检测结果。

15 图 10 显示了实施例 1 中包含酶切位点但不存在 pH 敏感肽的递送系统转导后流式细胞仪分析结果。

图 11 显示了实施例 1 中包含酶切位点但不存在 pH 敏感肽的递送系统转导后的胞内发生切割及未切割/完整的 GFP β 1-10 相对比例的 Western blot 检测结果。

图 12 显示了实施例 2 中递送系统-ZFP9 复合物的结构示意图。

20 图 13 显示了实施例 2 中递送系统-ZFP9 复合物的 SDS-PAGE 结果。

图 14 显示了实施例 2 中含有 ZFP9 结合位点的真核表达质粒图谱。

图 15-16 显示了实施例 2 中递送系统转导 ZFP9 的流式细胞仪分析结果。

图 17 显示了实施例 3 中递送系统-Ppm1b 复合物的结构示意图。

图 18 显示了实施例 3 中递送系统-Ppm1b 复合物的 SDS-PAGE 结果。

25 图 19 显示了实施例 3 中递送系统-Ppm1b 复合物对 TNF- α 诱发的细胞坏死比率的影响的流式细胞仪分析结果。

图 20 显示了实施例 4 中递送系统-Cas9 复合物的结构示意图。

图 21 显示了实施例 4 中递送系统-Cas9 复合物的 SDS-PAGE 结果。

30 图 22 显示了实施例 4 中应用 HEK293T-RFP reporter 细胞检测 CRISPR/Cas9 编辑效率的原理示意图。

- 图 23 显示了实施例 4 中 **RFP repoter** 慢病毒质粒图谱。
- 图 24 显示了实施例 4 中递送系统-Cas9 复合物的基因编辑效率的流式细胞仪分析结果。
- 图 25 显示了实施例 5 中基于 **adapter** 方式的递送系统原理。
- 5 图 26 显示了实施例 5 中基于 **adapter** 方式的递送系统重组蛋白相关克隆设计。
- 图 27 显示了实施例 5 中基于 **adapter** 方式的递送系统重组蛋白纯化结果。
- 图 28 显示了实施例 5 中基于 **Split-GFP** 小泡逃逸体系评价基于 **adapter** 方式的递送系统的递送效果。

10 序列信息

本发明涉及的部分序列的信息提供于下面的表 1 中。

表 1：序列的描述

SEQ ID NO	描述
1	弗林蛋白酶识别序列-1
2	弗林蛋白酶识别序列-2
3	弗林蛋白酶识别序列-3
4	弗林蛋白酶识别序列-4 (Ne)
5	编码 Ne 的核酸序列
6	CTSL 识别序列 N
7	编码 N 的核酸序列
8	INF7
9	编码 INF7 的核酸序列
10	Tat(48-60)
11	编码 Tat(48-60)的核酸序列
12	融合蛋白 TIN
13	融合蛋白 TINe
14	融合蛋白 TINNe
15	NLS
16	CTSL 识别序列 Na
17	CTSL 识别序列 Nb
18	Furin 识别序列 Nc
19	Furin 识别序列 Nd
20	CTSD 识别序列 Nf
21	突变的 N
22	突变的 Ne

23	GFP β 1-10-NLS
24	编码 GFP β 1-10-NLS 的核酸序列
25	编码 Histone-H3 的核酸序列
26	编码 GFP β 11 的核酸序列
27	ZFP9-NLS
28	编码 ZFP9-NLS 的核酸序列
29	编码 BFP 的序列
30	ZFP9 结合位点序列
31	Ppm1b
32	编码 Ppm1b 的核酸序列
33	Cas9-NLS
34	编码 Cas9-NLS 的核酸序列
35	编码 dsRed 的核酸序列
36	编码 mCherry 的核酸序列
37	sgRNA 的识别位点 DNA 序列
38	流感病毒 HA2
39	KALA
40	GALA
41	Melittin
42	Penetratin
43	HIV-TAT(47-57)
44	HIV-1 Rev(34-50)
45	VP22
46	Transportan
47	Pep-1
48	Pep-7
49	亮氨酸拉链 NZ
50	亮氨酸拉链 CZ
51	编码亮氨酸拉链 NZ 的核酸序列
52	编码亮氨酸拉链 CZ 的核酸序列
53	TrxA 氨基酸序列
54	TrxA 核酸序列

具体实施方式

现参照下列意在举例说明本发明(而非限定本发明)的实施例来描述本发明。

- 除非特别指明，本发明中所使用的分子生物学实验方法和免疫检测法，基本上参
- 5 照 J. Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室出版社，1989，以及 F. M. Ausubel 等人，精编分子生物学实验指南，第 3 版，John Wiley & Sons，

Inc., 1995 中所述的方法进行; 限制性内切酶的使用依照产品制造商推荐的条件。本领域技术人员知晓, 实施例以举例方式描述本发明, 且不意欲限制本发明所要求保护的范围。

以下实施例涉及的主要试剂的来源如下:

5 克隆构建相关试剂所需材料如下: DNA 聚合酶 (TaKaRa, R040A), DNA 回收试剂盒 (TianGen, DP214-03), 质粒小提试剂盒 (TianGen, DP103-03), 质粒大提试剂盒 (QIAGEN, 12663), Gibson 装配预混液 5 管 (NEB, E2611L), DNA marker (ThermoFisher, SM0331), 琼脂糖 (Biowest, BW-R0100),

10 蛋白大量表达所需材料如下: 蛋白胨 (BISIGMA-ALDRICH, T7293-1KG), 酵母粉 (OXOID, LP0021B), 氯化钠 (西陇化工, 10011012AR), IPTG (Inalco, 1758-1400)

蛋白纯化所需介质如下: SP SEPHAROSE FAST FLOW (GE Healthcare, 17-0729-01), NI SEPHAROSE (GE Healthcare, 17-5268-02)

15 蛋白纯化及保存所需试剂如下: 甘油/丙三醇/ $C_3H_8O_3$ (SIGMA-ALDRICH, G5516), KCl (西陇化工, 1002007), $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (西陇化工, 1001067AR), KH_2PO_4 (西陇化工, 1002048AR500), 咪唑 (SIGMA-ALDRICH, V900153), Tris base (Seebio, 183995), 葡萄糖 (西陇化工, 1064008AR500), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Thermo Scientific, 23227);

20 细胞培养所需试剂: FBS (GIBCO, 10099-133), DMEM (GIBCO, 11965092), 胰蛋白酶 (AMRESCO, 0458);

慢病毒包装及感染所需试剂: 慢病毒包装质粒: pCMV-VSV-G (Addgene, 8454), pRSV-Rev (Addgene, 12253), pMDLg/pRRE (Addgene, 12251); X-tremeGENE 转染试剂 (Roche, 06366244001), Puromycin (InvivoGen, ant-pr-5), Blasticidin (InvivoGen, ant-bl-5b), polybrene (Santa Cruz, sc-134220);

25 实验中所用的 GFP β 1-10, ZFP9, Ppm1b, dsRed, mCherry, Histone-H3 相关质粒均由公司合成 (生工生物), 用于扩增 Cas9 序列的质粒 pCasKP-hph (Addgene, 117232);

其他试剂: TNF- α (Novoprotein, CF09), PI (ThermoFisher, P3566)

细胞系: HEK-293T (人肾上皮细胞), L929 (小鼠成纤维细胞) 均购自 ATCC。

实施例 1: 基于 Split-GFP 系统评价递送系统的内吞小泡逃逸效率

在 Split-GFP 系统中, GFP 的 11 个 β 折叠被分拆成大片段 ($\beta 1-10$) 和小片段 ($\beta 11$), 二者均失去了其荧光活性, 但如果相遇则可以自发缔合并恢复 GFP 的荧光性能。基于此, 我们构建了稳定表达 Histone- $\beta 11$ 的 HEK293T 细胞, 同时将带有入核信号 (NLS) 的 GFP $\beta 1-10$ 作为 Cargo 与拟评价的入胞递送系统融合表达, 然后转导该稳定细胞系。当递送系统转导 GFP $\beta 1-10$ 时, 只有成功从内吞小泡逃逸并进入到细胞质或者细胞核后才能与 GFP $\beta 11$ 结合生成完整的 GFP, 因此通过 GFP 的比例及相对荧光强度可对内吞小泡逃逸效率进行评估 (图 1)。

1.1 递送系统-GFP $\beta 1-10$ 蛋白复合物表达载体的构建

构建含有 TAT (SEQ ID NO: 10)、INF7 (SEQ ID NO: 8)、蛋白酶切割位点 (表 2) 和携带核定位信号 (NLS) 的货物分子 GFP $\beta 1-10$ (SEQ ID NO: 23) 的重组蛋白表达载体, 各重组蛋白的结构示意图如图 2 所示, 从 C 端到 N 端各组氨基酸序列如下表 3 所示。所述构建方法如下: 首先, 通过 PCR 扩增得到编码递送系统中的 TAT、INF7、N、Na、Nb、Nc、Nd、Ne、Nf、突变的 N、突变的 Ne、货物分子 GFP $\beta 1-10$ 的核酸序列, 并通过多轮 PCR 将各部分连接, 并在最后一轮 PCR 过程中通过上游引在片段的 5'端引入 *NdeI* 酶切位点及其与 pET21b(+)对应的 *NdeI* 酶切位点上游的重叠序列, 通过下游引在片段的 3'端引入 *BamHI* 酶切位点及其与 pET-21b(+)对应的 *BamHI* 酶切位点下游的重叠序列。pET-21b(+) 质粒通过 *NdeI*, *BamHI* 双酶切处理。通过 GIBSON 组装将带有重叠序列的插入片段连接到酶切载体 pET-21b(+)上。

表 2: 蛋白酶识别序列

蛋白酶	识别序列	SEQ ID NO:
CTSL	N	6
	突变的 N	21
	Na	16
	Nb	17
Furin	Nc	18
	Nd	19
	Ne	4
	突变的 Ne	22
CTSD	Nf	20

表 3：递送系统-货物分子复合物所包含的组分

复合物名称	N 端→C 端各组分及其序列			
	CPP	pH 敏感肽	蛋白酶识别序列	Cargo
T-GFP β1-10	Tat SEQ ID NO:10	无	无	GFP β1-10-NLS SEQ ID NO: 23
TI-GFP β1-10		INF7 SEQ ID NO: 8		
TIN-GFP β1-10			N	
TINa-GFP β1-10			Na	
TINb-GFP β1-10			Nb	
TINc-GFP β1-10			Nc	
TINd-GFP β1-10			Nd	
TINe-GFP β1-10			Ne	
TINf-GFP β1-10			Nf	
TINNe-GFP β1-10			N+Ne	
TNNE-GFP β1-10		无		

1.2 递送系统-GFP β 1-10 复合物的表达及纯化：

- 5 将 1.1 中所述的表达质粒转化入表达菌株 *E.coli* BL21(DE3)；从转化的平板上挑选单菌落接种到含氨苄抗性的 5 ml LB 液体培养基中培养过夜，然后取 1 ml 过夜培养的菌液转接到含氨苄抗性的 500ml LB 液体培养基中，37 °C，180 rpm 培养到菌液 OD₆₀₀ 在 0.6 左右，接着加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.2 mM，25°C 诱导 8 h；诱导表达结束后，4 °C，7000 g 离心 10 min 后收集菌体；接着用 10ml 蛋白纯化平衡缓冲液（50 ml 甘油，8 g
- 10 NaCl，0.201 g KCl，1.44 g Na₂HPO₄，0.24 g KH₂PO₄ 溶于 1 L 双蒸水中）重悬菌体，进行超声破碎。接着离心取上清液，并上样到蛋白纯化系统的聚组氨酸蛋白纯化柱上；然后利用蛋白纯化系统用蛋白纯化洗脱缓冲液（50 ml 甘油，8 g NaCl，0.201 g KCl，1.44 g Na₂HPO₄，0.24 g KH₂PO₄，17 g 咪唑溶于 1L 双蒸水中）洗脱目的蛋白。蛋白浓度可以

根据分光光度计或 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行测定。每个纯化后的融合蛋白分装后-20℃保存。各蛋白的 SDS-PAGE 结果如图 3-4 所示。

1.3 HEK293T-GFPβ11 细胞系的构建

5 1.3.1 GFPβ11 细胞系慢病毒质粒的构建:

Histone-H3 的编码序列 (SEQ ID NO: 25) 通过 PCR 扩增得到, GFPβ11 编码序列 (SEQ ID NO: 26) 较短直接设计在上游引物中, 通过多轮 PCR 将各组分连接, 并在最后一轮 PCR 过程中通过上游引在片段的 5'端引入 *Hind III* 酶切位点及其与 Lenti 载体对应的 *Hind III* 酶切位点上游的重叠序列, 通过下游引在片段的 3'端引入酶切位点 *BamHI* 及其与 Lenti 载体对应的 *BamHI* 酶切位点下游的重叠序列。Lenti 质粒通过 *Hind III*, *BamHI* 双酶切处理。通过 GIBSON 组装将带有重叠序列的插入片段连接到酶切后的 Lenti 载体上。

1.3.2 慢病毒包装、感染及抗性筛选细胞系:

将 HEK-293T 细胞接种到 6 孔板中, 过夜培养, 在质粒转染之前保证每孔的细胞数约为 2×10^7 /ml 左右; 转染之前, 细胞更换为无血清 DMEM 培养基; 在 300 μl 无血清 DMEM 分别加入 1.5 μg Lenti 重组质粒, 0.75 μg pMDL 质粒, 0.45 μg pVSV-G 质粒, 0.3μg pREV (质量比为 5:3:2:1), 缓慢吹匀后, 加入 9 μl (1:3) 的 X-tremeGENE 转染试剂, 缓慢吹匀, 室温静置 15 min, 滴加入细胞上清中, 8 h 后更为换为含 10% FBS 的 DMEM 继续培养; 60 h 后收取培养上清待感染。

20 将 HEK-293T 细胞接种到 12 孔板中, 过夜培养, 在慢病毒感染之前保证每孔的细胞数约为 2×10^6 /ml (50%密度) 左右; 弃去原有细胞培养上清, 加入 300 μl 慢病毒 (moi=3) 及 700 μl 10% FBS DMEM, 按 10 μg/ml 的浓度加入 polybrene, 细胞板无菌条件下 2500 rpm 离心 30 min 后继续培养。

慢病毒感染 48 h 后按 1/3 的比例进行细胞传代, 同时按 2.5μg/ml 的浓度加入 puromycin 进行抗性筛选; 将筛选得到的阳性细胞进行克隆化, 得到 HEK-293T-Hitone-GFPβ11 的单克隆细胞株。

1.4 Split-GFP 系统检测递送系统-GFPβ1-10 复合物的内吞小泡逃逸效率

30 将 1.3 中获得的 HEK-293T-Hitone-GFPβ11 细胞系接种到 12 孔板中, 过夜培养, 蛋白处理前保证每孔的细胞数约为 5×10^6 /ml 左右; 用无血清 DMEM 培养基润洗三次细胞,

在无血清培养基的环境下加入 100 μ l/5 μ M 1.2 中获得的递送系统-GFP β 1-10 复合物, 孵育 3 h, 用肝素溶液洗涤三次去除细胞表面吸附且尚未内吞入胞的蛋白后, 更换为含 10% FBS DMEM 培养基继续培养, 在 12 h 进行荧光显微镜观察及流式分析绿色荧光蛋白表达情况。

5 流式细胞仪分析结果如图 5 所示, 结果显示, 在 TAT 基础上加入 pH 敏感肽 INF7 后细胞平均荧光强度有所提升, 证明了 pH 敏感肽对内吞小泡囊膜的破膜作用; 特别地, 在 TAT-INF7 的基础上加入 CTSL 或 Furin 的酶切位点后, 细胞荧光强度进一步上升, 其中 CTSL 的酶切位点 N 以及 Furin 的酶切位点 Ne 效果最为显著。荧光显微镜观察如图 6 所示, 结果显示, 将上述两种酶切位点联合 (TINNe-GFP β 1-10) 能够进一步显著提升内吞
10 小泡逃逸效率。

在 N 或 Ne 酶切位点中的关键位点引入突变以获得包含突变的递送系统-货物分子复合物, 其中, 突变的 N 的序列如 SEQ ID NO: 21 所示, 突变的 Ne 的序列如 SEQ ID NO: 22 所示; 并比较突变的递送系统-货物分子复合物 (Mut) 与不含突变的递送系统-货物分子复合物 (WT) 的转染效率。结果如图 7 所示, 当将酶切位点中的关键氨基酸突变后,
15 无论是单个酶切位点, 还是双酶切位点联用, 均失去了其增强小泡逃逸效率的作用。以上结果表明, CTSL 及 Furin 酶切位点确实可以显著提升 Cargo 在小泡中的逃逸效率。

用肝素溶液洗涤三次去除细胞表面吸附且尚未内吞入胞的蛋白后, 收集转导开始后不同时间节点的细胞, 裂解细胞提取蛋白并进行 SDS-PAGE 电泳, 随后利用识别 GFP β 1-10 的单抗 (Abcam, ab32146) 进行 western blot 检测, 以对胞内蛋白的酶切情
20 况与留存情况进行分析。结果如图 8 所示, 在 6 h 前的各个时间节点, 检测到的胞内蛋白总量在各组细胞间相当, 表明 pH 敏感肽和酶切位点并不增加 Cargo 的细胞内吞效率; 含酶切位点的蛋白 (TIN-、TINe-、TINNe-) 在 30min 时即已出现酶切现象, 3 h 后酶切后的蛋白量不再增加, 此时, 单酶切位点蛋白约 40% 出现酶切, 而双酶切位点蛋白约 70% 出现酶切; 此后, 没有酶切位点的蛋白 (T-、TI-) 以及酶切位点未被酶切的完整蛋白由于
25 于被导向溶酶体开始快速降解, 至 12 h 时相应条带几乎消失不见, 而酶切后与 TAT-INF7 分离的蛋白仍有留存, 且 TINNe 组存留最多。以上结果与流式细胞术检测结果一致, 酶切效率越高, 细胞内未被降解的留存 GFP β 1-10-NLS 越多, 其进入核内与 GFP β 11 合成的完整 GFP 越多, 绿色荧光强度越高。

进一步, 对上述在 N 或 Ne 酶切位点中包含突变的递送系统-货物分子复合物转导细胞 3 h 后的酶切情况分析进行 western blot 检测。结果如图 9 所示, 突变后的递送系统-货
30

物分子复合物（**TINm-**、**TINem-**和 **TINNem-**）无法实现在胞内的切割。因此结合图 7 所示的流式结果可知，无法实现酶切及之后的逃逸是突变后的递送系统-货物分子复合物失去高效的递送效果的原因，也进一步确认了 **CTSL**, **Furin** 酶切位点的在递送系统中的关键作用。

5 此外，还对缺失 **pH** 敏感肽组分的递送系统-复合物（**TNNe-GFPβ1-10-NLS**）的递送效率进行了流式检测，结果如图 10 所示。我们发现其转导 12 h 后的平均荧光强度和 **T-GFPβ1-10-NLS** 基本一致，说明即使存在酶切位点，但缺少 **pH** 敏感肽也无法实现高效递送。同时通过 **western blot** 检测发现，有无 **pH** 敏感肽对递送系统-复合物在胞内的酶切效率并无影响（图 11）。结合以上结果，我们证实了只有 **pH** 敏感肽与特定酶切位点在递送系统的同时存在才可实现最终的高效递送。

实施例 2：递送系统在转导锌指蛋白 **ZFP** 中的应用

2.1 递送系统-锌指蛋白 **ZFP9** 复合物表达载体的构建

构建含有 **TAT**、**INF7**、蛋白酶切割位点、携带核定位信号（**NLS**）的货物分子 **ZFP9**（**SEQ ID NO: 27**）的重组蛋白表达载体，各重组蛋白的结构示意图如图 12 所示，各组分氨基酸序列如下表 4 所示。所述构建方法如下：首先，通过 **PCR** 扩增得到编码递送系统中的 **TAT**、**INF7**、蛋白酶切割位点、货物分子 **ZFP9** 的核酸序列，并通过多轮 **PCR** 将各部分连接，并在最后一轮 **PCR** 过程中通过上游引在片段的 5'端引入 **NdeI** 酶切位点及其与 **pET-21b(+)**对应的 **NdeI** 酶切位点上游的重叠序列，通过下游引在片段的 3'端引入 **BamHI** 酶切位点及其与 **pET-21b(+)**对应的 **BamHI** 酶切位点下游的重叠序列。**pET-21b(+)** 质粒通过 **NdeI**, **BamHI** 双酶切处理。通过 **GIBSON** 组装将带有重叠序列的插入片段连接到酶切载体 **pET-21b(+)**上。

表 4：递送系统-货物分子复合物所包含的组分

复合物名称	N 端→C 端各组分及其序列			
	CPP	pH 敏感肽	蛋白酶识别序列	Cargo
ZFP9	无	无	无	ZFP9-NLS SEQ ID NO: 27
T- ZFP9	Tat SEQ ID NO:10	无	无	
TI- ZFP9		INF7		
TINNe-ZFP9		SEQ ID NO: 8	N+Ne	

25 2.2 递送系统-**ZFP9** 复合物的表达、纯化

将 2.1 中所述的表达质粒转化入表达菌株 *E.coli* BL21(DE3); 从转化的平板上挑选单菌落接种到含氨苄抗性的 5 ml LB 液体培养基中培养过夜, 然后取 1ml 过夜培养的菌液转接到含氨苄抗性的 500 ml LB 液体培养基中, 37 °C, 180 rpm 培养到菌液 OD₆₀₀ 在 0.6 左右, 接着添加诱导 IPTG 至终浓度为 0.2mM, 25 °C 诱导 8 小时; 诱导表达结束后, 4 °C, 7000 g 离心 10 min 后收集菌体, 取部分菌体检测蛋白质诱导表达情况; 接着用 10 ml 蛋白纯化平衡缓冲液 (50 ml 甘油, 3.6342 g Tris (Hydroxymethyl) aminomethane 溶于 1 L 双蒸水中, 调 pH 至 8.0) 重悬菌体, 进行超声破碎。接着离心取上清液, 并上样到 AKTA 蛋白纯化系统的 Sulphopropyl (SP) 阳离子交换柱上; 然后利用平衡缓冲液与高盐洗脱液 (50 ml 甘油, 116.88 g NaCl, 3.6342 g Tris(Hydroxymethyl) aminomethane 溶于 1 L 双蒸水中, 调 pH 至 8.0) 之间按不同比例来进行梯度洗脱得到目的蛋白。蛋白浓度可以根据分光光度计或 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行测定。每个纯化后的融合蛋白分装后 -20 °C 保存。各蛋白的 SDS-PAGE 结果如图 13 所示。

2.3 含有 ZFP9 结合位点的真核表达质粒的构建

构建含有蓝色荧光蛋白 (BFP) 编码序列和 ZFP9 结合位点的表达载体, 其结构示意图如图 14 所示。蓝色荧光蛋白编码序列 (SEQ ID NO: 29) 及 ZFP9 结合位点 6* binding sites (6 个结合位点) (SEQ ID NO: 30) 序列通过 PCR 扩增得到, 通过两轮 PCR 将二者连接, 并在第二轮 PCR 过程中通过上游引在片段的 5'端引入 *Hind III* 酶切位点及其与 pTT5 载体对应的 *Hind III* 酶切位点上游的重叠序列, 通过下游引在片段的 3'端引入酶切位点 *BamHI* 及其与 pTT5 载体对应的 *BamHI* 酶切位点下游的重叠序列。pTT5 质粒通过 *Hind III*, *BamHI* 双酶切处理。通过 GIBSON 组装将带有重叠序列的插入片段连接到酶切后的 pTT5 载体上, 从而获得 pTT5-BFP-6BS 质粒。

2.4 递送系统转导锌指蛋白 ZFP9 的递送效率检测

将 HEK293T 细胞接种到 12 孔板中, 过夜培养, 蛋白处理前保证每孔的细胞数约为 5×10^6 /ml 左右; 将 100 μ L/5 μ M 2.2 中获得的递送系统-ZFP9 复合物 (ZFP9、T-ZFP9、TI-ZFP9、TINNe-ZFP9) 和 2.3 中获得的 pTT5-BFP-6BS 质粒 5 μ g 在 37 °C 共孵育 30min 充分形成复合物, 并以 X-tremeGENE 转染试剂 (Roche) 作为阳性对照 (5 μ g 质粒与 15 μ l 转染试剂混合后在无血清条件下转染细胞, 并在 8 h 后更换为 10% FBS DMEM 继续培养); 用无血清 DMEM 培养基润洗三次细胞, 后加入复合物孵育 3h, 用

肝素溶液洗涤三次去除细胞表面吸附且尚未内吞入胞的蛋白后，更换为含 10% FBS DMEM 培养基继续培养更换有 10% FBS DMEM 继续培养，分别在换液 12 h、24 h、36 h、48 h 进行流式分析蓝色荧光蛋白表达情况。

流式检测结果如图 15-16 所示。与 ZFP9 结合的质粒只有进入细胞核内才能完成转录过程，因此，只有更多的 ZFP9 的从内吞小泡中逃逸，才能携带结合的质粒进入细胞核内，开始转录过程，进而表达蓝色荧光蛋白。相对于 T-ZFP9，pH 敏感肽 INF7 的加入（TI-ZFP9）可以使蓝色荧光比率上升 10%左右（ $p=0.035$ ），但仍然处于一个较低的水平，即大部分复合物未能逃逸并入核，而在此基础上，在系统中引入蛋白酶切割位点后（TINNE-ZFP9），结果显示蓝色荧光细胞比率大幅度上升，在 48h 时可达到 65%左右（ $p=0.018$ ），且能够与 Roche 转染试剂 X-tremeGENE 持平。由此可见，在递送系统携带 ZFP9/pTT5-BFP-6BS 复合物入胞的内吞过程中，CTSL 和 Furin 特异性切割位点 N 及 Ne 加入显著促进了所携带的 ZFP9 的逃逸过程，更多的复合物可以进入核内完成转录，进而表达 BFP 荧光。

15 实施例 3：递送系统在转导蛋白磷酸酶 Ppm1b 中的应用

TNF- α 与细胞表面受体结合后诱导 RIP3 磷酸化并形成多蛋白复合物的坏死小体（Necrosome），坏死小体中的磷酸化 RIP3 招募并磷酸化 Mkl1 后细胞进入坏死程序。在此过程中，胞内的蛋白磷酸酶 1B（Ppm1b）可通过使 RIP3 去磷酸化从而抑制细胞程序性坏死（Necroptosis）。鉴于目前已发现细胞程序性坏死与炎性疾病、缺血再灌注损伤、神经退行性疾病等多种疾病的发生密切相关，Ppm1b 蛋白在治疗上述与细胞程序性坏死相关的疾病方面展现出巨大潜力。

3.1 递送系统-Ppm1b 蛋白复合物表达载体构建

构建含有 TAT、INF7、蛋白酶切割位点、货物分子 Ppm1b（SEQ ID NO: 31）的重组蛋白表达载体，各重组蛋白的结构示意图如图 17 所示，各组分氨基酸序列如下表 6 所示。所述构建方法如下：通过 PCR 扩增得到 TAT、INF7、蛋白酶切割位点、Ppm1b 的核酸序列，并通过多轮 PCR 将各部分连接，并在最后一轮 PCR 过程中通过上游引在片段的 5'端引入 NdeI 酶切位点及其与 pET-21b(+)对应的 NdeI 酶切位点上游的重叠序列，通过下游引在片段的 3'端引入 BamHI 酶切位点及其与 pET-21b(+)对应的 BamHI 酶切位点下游的重叠序列。pET-21b(+) 质粒通过 NdeI, BamHI 双酶切处理。通过 GIBSON 组装方式将带有重叠序列的插入片段连接到酶切载体 pET-21b(+)。

表 5: 递送系统-货物分子复合物所包含的组分

复合物名称	N 端→C 端各组分及其序列			
	CPP	pH 敏感肽	蛋白酶识别序列	Cargo
Ppm1b	无	无	无	Ppm1b SEQ ID NO: 31
T- Ppm1b	Tat SEQ ID NO:10	无	无	
TI- Ppm1b		INF7		
TINNe- Ppm1b		SEQ ID NO: 8	N+Ne	

3.2 递送系统-Ppm1b 复合物的表达、纯化

将 3.1 中所述的表达质粒转化入表达菌株 *E.coli* BL21(DE3); 从转化的平板上挑选单菌落接种到含氨苄抗性的 5 ml LB 液体培养基中培养过夜, 然后取 1ml 过夜培养的菌液转接到含氨苄抗性的 500ml LB 液体培养基中, 37 °C, 180 rpm 培养到菌液 OD₆₀₀ 在 0.6 左右, 接着添加诱导 IPTG 至终浓度为 0.2 mM, 25 °C 诱导 8 h; 诱导表达结束后, 4 °C, 7000 g 离心 10 分钟后收集菌体, 取部分菌体检测蛋白质诱导表达情况; 接着用 10ml 蛋白纯化平衡缓冲液 (50 ml C₃H₈O₃, 3.6342 g Tris(Hydroxymethyl)aminomethane 溶于 1 L 双蒸水中, 调 pH 至 8.0) 重悬菌体, 进行超声破碎。接着离心取上清液, 并上样到 AKTA 蛋白纯化系统的 Sulphopropyl(SP)阳离子交换柱上; 然后利用平衡缓冲液与高盐洗脱液 (50 ml C₃H₈O₃, 116.88 g NaCl, 3.6342 g Tris(Hydroxymethyl) aminomethane 溶于 1L 双蒸水中, 调 pH 至 8.0) 之间按不同比例来进行梯度洗脱得到目的蛋白。蛋白浓度可以根据分光光度计或 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行测定。每个纯化后的融合蛋白分装后-20 °C 保存。各蛋白的 SDS-PAGE 结果如图 18 所示。

3.3 递送系统-Ppm1b 复合物对 TNF- α 诱发的细胞发生坏死比率的影响

将 L929 细胞接种到 12 孔的细胞培养板中, 过夜培养, 蛋白处理前保证每孔的细胞数约为 2*10⁶/ml 左右; 用无血清 DMEM 培养基润洗三次细胞, 然后在无血清培养基中分别加入 100 μ l/5 μ M 的 3.2 中获得的递送系统蛋白 (Ppm1b、T-Ppm1b、TI-Ppm1b、TINNe-Ppm1b), 孵育 3h 后, 加入用 10% FBS DMEM 稀释好含 20 ng/ml TNF- α 以及 20mM z-VAD 1 ml, 孵育 10h 后, 收集细胞进行 PI 染色, 流式分析细胞观察细胞坏死的比率。利用慢病毒转导 Ppm1b (Lenti-Ppm1b) 以及慢病毒 (Lenti-vec) 作为对照, 在 HEK-293T 细胞上包装收集的带有 Ppm1b 表达序列的慢病毒和对照慢病毒, 感染 L929 细胞 24 h 后, 以使 Ppm1b 在胞内充分表达, 将感染后的 L929 细胞重新铺版待 TNF- α 刺

激。

结果如图 19 所示，相对于单纯的 T-Ppm1b，pH 敏感肽 INF7 的加入（TI-Ppm1b）仅能略微抑制细胞坏死，但仍然处于一个较低的水平，而在此基础上，在系统中引入蛋白酶切割位点后（TINNe-Ppm1b），TINNe 组抑制细胞坏死的能力可达到慢病毒组的水平，细胞坏死率可大大降低至约 25%。因此，在递送系统携带 Ppm1b 复合物入胞的内吞过程中，CTSL 和 Furin 特异性位点 N 及 Ne 的加入显著促进了所携带的 Ppm1b 的逃逸过程，更多的 Ppm1b 进入细胞质内，抑制 RIP3 的磷酸化过程，降低细胞坏死比率。

实施例 4：递送系统在基因编辑工程酶 Cas9 中的应用

CRISPR/Cas9 基因编辑系统是通过 sgRNA 结合 Cas9 蛋白，通过 sgRNA 特异性识别靶向位点，Cas9 结合并切割 DNA 双链分子，通过非同源性末端重组或者同源性末端修复实现对靶向基因的编辑。该系统中 Cas9 必须进入细胞核内完成其功能，基于此我们将递送系统融合表达 Cas9 蛋白，实现在真核细胞上的基因编辑。

4.1 递送系统-Cas9 蛋白复合物表达载体的构建

构建含有 TAT、INF7、蛋白酶切割位点、携带核定位信号（NLS）的货物分子 Cas9（SEQ ID NO: 33）的重组蛋白表达载体，各重组蛋白的结构示意图如图 20 所示，各组分氨基酸序列如下表 6 所示。所述构建方法如下：通过 PCR 扩增得到编码 TAT、INF7、蛋白酶切割位点 N 及 Ne、Cas9 的核酸序列，并通过多轮 PCR 将各部分连接，并在最后一轮 PCR 过程中通过上游引在片段的 5'端引入 NdeI 酶切位点及其与 pET-21b(+)对应的 NdeI 酶切位点上游的重叠序列，通过下游引在片段的 3'端引入 BamHI 酶切位点及其与 pET-21b(+)对应的 BamHI 酶切位点下游的重叠序列（overlap）。pET-21b(+) 质粒通过 NdeI，BamHI 双酶切处理。通过 GIBSON 组装将带有重叠序列的插入片段连接到酶切载体 pET-21b(+)上。

表 6：递送系统-货物分子复合物所包含的组分

复合物名称	N 端→C 端各组分及其序列			
	CPP	pH 敏感肽	蛋白酶识别序列	Cargo
T- Cas9	Tat SEQ ID NO:10	无	无	Cas9-NLS SEQ ID NO: 33
TI- Cas9		INF7		
TINNe- Cas9		SEQ ID NO: 8	N+Ne	

4.2 递送系统-Cas9 复合物的表达及纯化

镍柱初纯：将 4.1 中所述的表达质粒转化入表达菌株 *E.coli* BL21(DE3)；从转化的平板上挑选单菌落接种到含氨苄抗性的 5ml LB 液体培养基中培养过夜，然后取 1 ml 过夜培养的菌液转接到含氨苄抗性的 500 ml LB 液体培养基中，37 °C，180 rpm 培养到菌液 OD₆₀₀ 在 0.6 左右，接着加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.2 mM，25°C 诱导 8 h；诱导表达结束后，4 °C，7000 g 离心 10 分钟后收集菌体；接着用 10ml 蛋白纯化平衡缓冲液（5% 甘油，30mM TB8.0，50mM 丙三醇，500 mM 氯化钠，25mM 葡萄糖）重悬菌体，进行超声破碎。接着离心取上清液，并上样到蛋白纯化系统的聚组氨酸蛋白纯化柱上；然后利用蛋白纯化系统用蛋白纯化洗脱缓冲液（5%甘油 30 mM TB8.0，50 mM 丙三醇，500 mM 氯化钠，25 mM 葡萄糖，250 mM 咪唑）洗脱目的蛋白。

10 阳离子交换柱精纯：将镍柱初纯收集的蛋白透析至平衡缓冲液（30 mM TB8.0，50 mM 丙三醇，25 0mM 氯化钠，25 mM 葡萄糖，调节 pH 至 7.2）中，并上样到 AKTA 蛋白纯化系统的 Sulphopropyl(SP)阳离子交换柱上；然后利用平衡缓冲液与高盐洗脱液（30 mM TB8.0，50 mM 丙三醇，2 M 氯化钠，25 mM 葡萄糖，调节 pH 至 7.2）之间按不同比例来进行梯度洗脱得到目的蛋白。蛋白浓度可以根据分光光度计或 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行测定。每个纯化后的融合蛋白分装后-20 °C 保存。各蛋白的 SDS-PAGE 结果如图 21 所示。

15

4.3 HEK293T-RFP reporter 细胞系的构建

Cas9 和 sgRNA 结合后可以特异性识别靶向位点，在不提供 donor 的情况下，会发生非同源性末端重组。因此通过慢病毒感染的方式将 sgRNA 识别位点及两个不在阅读框内的红色荧光蛋白基因（dsRed，mCherry 之间差一个 G）整合到 HEK-293T 细胞的基因组上，如果 Cas9 导致 sgRNA 识别位点上的 DNA 序列发生同源性末端重组，则会导致本来不在阅读框内的红色荧光蛋白基因进入阅读框而表达，而使细胞从无荧光变为红色荧光，通过是否产生红色荧光及红色荧光细胞的数目可以对递送系统转基因工程酶 Cas9 的效率进行评价（图 22）。

20

25

4.3.1 RFP reporter 细胞系慢病毒质粒的构建

通过 PCR 扩增得到 dsRed（SEQ ID NO: 35）及 mCherry 的编码序列（SEQ ID NO: 36），sgRNA 的识别位点 DNA 序列（SEQ ID NO: 37）较短直接设计在引物中，通过多轮 PCR 将各组连接，并在最后一轮 PCR 过程中通过上游引在片段的 5'端引入 *Hind* III 酶切位点及其与 Lenti 载体对应的 *Hind* III 酶切位点上游的重叠序列，通过下游引在

30

片段的 3'端引入酶切位点 *BamHI* 及其与 Lenti 载体对应的 *BamHI* 酶切位点下游的重叠序列。Lenti 质粒通过 *Hind III*, *BamH I* 双酶切处理。通过 GIBSON 组装将带有重叠序列的插入片段连接到酶切后的 Lenti 载体上, 构建成功的质粒图谱 (图 23)。

4.3.2 慢病毒包装、感染及细胞系抗性筛选

- 5 将 HEK293T 细胞接种到 6 孔板中, 过夜培养, 在质粒转染之前前保证每孔的细胞数约为 2×10^7 /ml 左右; 转染之前, 细胞更换为无血清 DMEM 培养基; 在 300 μ l 无血清 DMEM 分别加入 1.5 μ g Lenti 重组质粒 (RFP reporter), 0.75 μ g pMDL 质粒, 0.45 μ g pVSV-G 质粒, 0.3 μ g pREV 质粒 (质量比为 5:3:2:1), 缓慢吹匀, 静置 5 min 后, 加入 9 μ l 的 X-tremeGENE 转染试剂, 缓慢吹匀, 室温静置 15 min 后, 加入至细胞上清内, 8 h 后更换为含有 10% FBS DMEM 继续培养; 60 h 后收取培养上清, 4 $^{\circ}$ C 保存。

将 HEK293T 细胞接种到 12 孔板中, 过夜培养, 在慢病毒感染之前保证每孔的细胞数约为 2×10^6 /ml (50%密度) 左右; 弃去细胞培养上清, 加入 300 μ l 慢病毒 (moi=3) 及 700 μ l 10% FBS DMEM, 按 10 μ g/ml 的浓度加入 polybrene, 无条件下 2500 rpm 离心 30 min 后继续培养。

- 15 慢病毒感染 48 h 后按 1/3 的比例进行细胞传代, 同时按 2.5 μ g/ml 的浓度加入 puromycin 进行抗性筛选; 将筛选得到的阳性细胞进行克隆化, 得到 HEK293T-RFP reporter 的单克隆细胞株。

4.3.3 GM3-gRNA 转录质粒的构建

- 20 gRNA 的导入采用转录质粒转染后在细胞内转录成为 gRNA 的方式, gRNA 所对应的 DNA 序列通过引物退火互搭产生, 在引物设计的过程中直接引入 *AflIII* 酶切位点的黏性末端; gRNA-cloning 载体利用 *AflIII* 单酶切处理; 载体和插入片段利用各自的黏性末端通过 T4 DNA 连接酶进行连接。

4.4 递送系统-Cas9 复合物的编辑效率评价

- 25 gRNA 转录质粒转染: 将 HEK-293T-RFP reporter 细胞系接种到 12 孔板中, 过夜培养, 转染前保证每孔的细胞数约为 2.5×10^6 /ml 左右; 转染前细胞更换为无血清 DMEM; 在 100 μ l 无血清 DMEM 中加入 1 μ g gRNA-GM3 转录质粒, 缓慢吹匀, 静置 5 min, 加入 3 μ l X-tremeGENE 转染试剂, 缓慢吹匀后静置 15 min, 加入至细胞上清中, 8 h 后更换为 10% FBS DMEM。

- 30 递送系统转导 Cas9: 在 gRNA 转录质粒转染 12 h 后 (换为有血清 DMEM 后 4 h), 用无血清 DMEM 润洗三次细胞, 在无血清 DMEM 的环境下加入 5 μ M 的 4.2 中获得的

递送系统-Cas9 复合物孵育 3 h；更换为 10% FBS DMEM 继续培养，在 48 h 进行观察及流式分析红色荧光蛋白表达情况。

流式结果如图 24 所示，T-Cas9 转导后，红色荧光细胞比例较低（3.7%），即大部分 Cas9 蛋白未能逃逸并入核；pH 敏感肽 INF7 的加入（TI-Cas9）能够增加红色荧光细胞比例至 9%；而在此基础上，在系统中引入蛋白酶切割位点后（TINNe-Cas9），表达红色荧光蛋白的细胞数目显著上升，在 48 h 可达到 14% 左右。因此，在递送系统携带 Cas9 入胞的内吞过程中，CTSL 和 Furin 特异性位点 N 及 Ne 的加入显著促进了所携带的 Cas9 的逃逸过程，更多的 Cas9 在入核信号的作用下进入细胞核，在与胞内转录形成的 GM3 sgRNA 结合后，特异性识别靶标序列，并在该位点附近发生同源性末端修复，从而使红色荧光基因进入阅读框并表达。

实施例 5：基于非共价连接的递送系统的建立

本发明的融合蛋白与货物的连接方式除融合表达之外，还可以通过蛋白结构域进行非共价连接，我们称之为 Adapter 作用对，如具有较强相互作用力的异源二聚体亮氨酸拉链（图 25）。两个反向平行的亮氨酸拉链结构域因其互相嵌合的空间特点以及电荷排布，可以自发地结合形成寡聚体。据研究报道，NZ 与 CZ 就是这样一对可以相互结合的亮氨酸拉链。我们尝试将 NZ 结构域与本发明的入胞递送系统融合表达（TINNe-NZ），CZ 结构域与带有入核信号（NLS）的 GFPβ1-10 融合表达作为 Cargo（CZ-GFPβ1-10-NLS）。将上述两种蛋白混合孵育相互结合后，转导稳定表达 Histone-β11 的 HEK293T 细胞，通过 GFP 的比例及相对荧光强度可对内吞小泡逃逸效率进行评估。从而评估 NZ-CZ 这对 adapter 连接融合蛋白与货物的可行性。

5.1 递送系统-NZ 融合蛋白及 CZ-GFPβ1-10 融合蛋白表达载体的构建

基于 pET32a 载体，构建含有 TAT、INF7、蛋白酶切割位点和 NZ 结构域的重组蛋白的表达载体，以及构建携带 CZ 结构域、核定位信号（NLS）的货物分子 GFPβ1-10 的重组蛋白表达载体，其中添加 TrxA 作为促溶标签。重组蛋白的结构示意图如图 26 所示，递送系统氨基酸序列如下表所示。所述构建方法如下：首先，以如前所述载体为模板，通过 PCR 扩增得到编码递送系统中的 TAT、INF7、N、Ne 及 NZ 序列，以及 CZ 序列、货物分子 sGFPβ1-10 的核酸序列，对于 TrxA-TINNe-NZ，在最后一轮 PCR 过程中通过上游引物在片段的 5'端引入 BamHI 酶切位点及其与 pET-32a(+)对应的 BamHI 酶切位点上游的重叠序列，通过下游引在片段的 3'端引入 HindIII 酶切位点及其与 pET-32a(+)对

应的 *HindIII* 酶切位点下游的重叠序列。pET-32a(+) 质粒通过 *BamHI*, *HindIII* 双酶切处理。通过 GIBSON 组装将带有重叠序列的插入片段连接到酶切载体 pET-32a(+)上; 对于 CZ-GFP β 1-10, 在最后一轮 PCR 过程中通过上游引在片段的 5'端引入 *NdeI* 酶切位点及其与 pET21b(+)对应的 *NdeI* 酶切位点上游的重叠序列, 通过下游引在片段的 3'端引入 *BamHI* 酶切位点及其与 pET-21b(+)对应的 *BamHI* 酶切位点下游的重叠序列。pET-21b(+) 质粒通过 *NdeI*, *BamHI* 双酶切处理。通过 GIBSON 组装将带有重叠序列的插入片段连接到酶切载体 pET-21b(+)上。

表 7: 递送系统所包含的组分

递送系统	N 端→C 端各组分及其序列				
	促溶标签	CPP	pH 敏感肽	蛋白酶识别序列	特异性结合序列
TINNe-NZ	TrxA SEQ ID NO:53	Tat SEQ ID NO:10	INF7 SEQ ID NO: 8	N+Ne	NZ SEQ ID NO:49

5.2 递送系统-NZ 融合蛋白及 CZ-GFP β 1-10 融合蛋白的表达及纯化

将 5.1 中所述的表达质粒转化入表达菌株 *E.coli* BL21(DE3); 从转化的平板上挑选单菌落接种到含氨苄抗性的 5 ml LB 液体培养基中培养过夜, 然后取 1 ml 过夜培养的菌液转接到含氨苄抗性的 500ml LB 液体培养基中, 37 °C, 180 rpm 培养到菌液 OD₆₀₀ 在 0.6 左右, 接着加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.2 mM, 25°C 诱导 8 h; 诱导表达结束后, 4 °C, 7000 g 离心 10 min 后收集菌体; 接着用 10ml 蛋白纯化平衡缓冲液 (50 ml 甘油, 8 g NaCl, 0.201 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄ 溶于 1 L 双蒸水中) 重悬菌体, 进行超声破碎。接着离心取上清液, 并上样到蛋白纯化系统的聚组氨酸蛋白纯化柱上; 然后利用蛋白纯化系统用蛋白纯化洗脱缓冲液 Elution buffer 2# (50 ml 甘油, 8 g NaCl, 0.201 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄, 17 g 咪唑溶于 1L 双蒸水中) 洗脱目的蛋白。蛋白浓度可以根据分光光度计或 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行测定。每个纯化后的融合蛋白分装后-20°C 保存。各蛋白的 SDS-PAGE 结果如图 27 所示。

5.3 Split-GFP 系统检测基于 adapter 的递送系统的递送效率

将上文中获得的 HEK-293T-Hitone-GFP β 11 细胞系接种到 12 孔板中, 过夜培养, 蛋白处理前保证每孔的细胞数约为 5×10^6 /ml 左右; 用无血清 DMEM 培养基润洗三次细胞, 对照组及实验组设置及蛋白(5.2 中所获得) 用量如下表所示, 其中, 在与细胞孵育前, 对

照组 2 及实验组中的两种蛋白在无血清培养基中室温混合 10min。在无血清培养基的环境下孵育 3 h，用肝素溶液洗涤三次去除细胞表面吸附且尚未内吞入胞的蛋白后，更换为含 10% FBS DMEM 培养基继续培养，在 12 h 进行荧光显微镜观察及流式分析绿色荧光阳性细胞的比例及 MFI。

5 流式细胞仪分析结果如图 28 所示，结果显示，两个对照组（CZ-GFPβ1~10/TrxA-TINNe+CZ-GFPβ1~10）的 MFI 均低于 5，其中对照组 2（TrxA-TINNe+CZ-GFPβ1~10）的 MFI 略高于对照组 1，我们推测是因为 TrxA-TINNe 本身与 CZ-GFPβ1~10 存在非特异性的吸附导致的，从而通过 TINNe 的作用将货物 CZ-GFPβ1~10 带入细胞内并发生内吞小泡逃逸。而 TrxA-TINNe-NZ+CZ-GFPβ1~10 组的 MFI 值接近 20，显著高于对照组，10 说明了在 NZ 和 CZ 的作用下，TrxA-TINNe 与 GFPβ1~10 发生一定程度的结合，并通过 TINNe 的作用，使 GFPβ1~10 进入细胞并发生逃逸。尽管 adpater 连接方式的荧光强度仍低于融合表达连接方式的 TINNe-GFPβ1~10，但该实验证实了基于 NZ-CZ 或者类似的 adapter，可以作为递送系统与货物的连接方式，并能够有效递送货物进入细胞及从小泡中逃逸。

15 表 8：对照组及实验组设置

组别	所加蛋白及其终浓度			
	TrxA-TINNe	TrxA-TINNe-NZ	CZ-GFP β1-10	TINNe-GFP β1-10
对照组 1			5μM	
对照组 2	5μM		5μM	
对照组 3				5μM
实验组		5μM	5μM	

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，但本领域技术人员将理解：根据已经公布的所有教导，可以对细节进行各种修改和变动，并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部分为由所附权利要求及其任何等同物给出。