(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113286578 A
(43)申请公布日 2021.08.20

(21)申请号 201980063528.4
(22)申请日 2019.08.09
(30)优先权数据
1812992.4 2018.08.09 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.03.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2019/052239 2019.08.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/030923 EN 2020.02.13
(71)申请人 格林威治大学
地址 英国伦敦
(72)发明人 西蒙·理查德森 贝内迪塔·费龙
(74)专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理有限公司 11444
代理人 王刚 葛强
(51)Int.Cl.
A61K 9/127(2006.01)
C12N 15/113(2006.01)
A61K 31/713(2006.01)

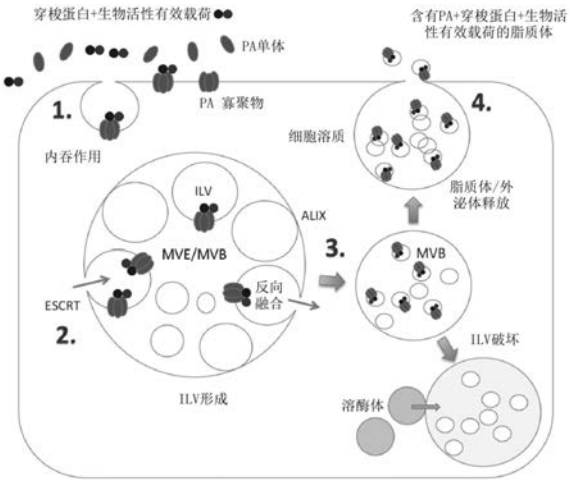
权利要求书3页 说明书27页 附图12页

(54)发明名称

制备脂质体的方法

(57)摘要

本申请涉及脂质体、生产脂质体的方法以及使细胞衍生的脂质体装载货物分子的方法。本发明延伸到此类脂质体本身，并延伸到将这些脂质体用作细胞递送系统，用于将生物和治疗活性有效载荷分子，比如小分子、RNAi分子(如siRNA)、生物活性蛋白、基因组编辑工具(如Cas9)和药物递送至细胞中以治疗一系列疾病。还可以将脂质体用在一系列诊断和治疗诊断应用中。本发明延伸到包含此类脂质体的药物组合物，脂质体包含细胞外囊泡(EV)的群组、外泌体，以及延伸到融合蛋白。



CN 113286578 A

1.一种制备脂质体的方法,所述方法包括使至少一种细胞与如下接触:(i)成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段;和(ii)穿梭蛋白,其任选地附接于生物活性有效载荷分子,其中,所述成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段创建贯穿所述至少一种细胞的磷脂双层的孔,且所述穿梭蛋白与所述成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段相互作用,并被内化至所述细胞中而由此产生脂质体,可选地,所述脂质体装载有生物活性有效载荷分子。

2.根据权利要求1所述的方法,其中,所述方法进一步包括自所述细胞分离所述脂质体。

3.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述脂质体包含囊泡。

4.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述脂质体包含细胞外囊泡(EV)、细胞内囊泡或管腔内囊泡(ILV)。

5.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述脂质体包含外泌体。

6.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述脂质体具有10nm至500nm、或20nm至400nm、或30nm至300nm、或40nm至200nm、或50nm至150nm、或60nm至120nm的平均直径。

7.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述细胞包括生物细胞,可选地包括哺乳动物或人细胞。

8.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段包含或者衍生自无毒蛋白。

9.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段衍生自炭疽杆菌或蓖麻毒蛋白。

10.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段衍生自炭疽杆菌毒力因子保护性抗原(PA)。

11.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段衍生自炭疽杆菌83或63。

12.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段包含基本上如SEQ ID No:1、SEQ ID No:2、SEQ ID No:5至SEQ ID No:10中任一个所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:1、SEQ ID No:2、SEQ ID No:5至SEQ ID No:10中任一个所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

13.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述穿梭蛋白配置为便于通过所述预成形蛋白的孔而优选地将生物活性有效载荷分子运输通过所述孔。

14.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述穿梭蛋白包含减毒毒素蛋白。

15.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述穿梭蛋白为衍生自炭疽杆菌的致死因子(LF)或水肿因子(EF)。

16.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述穿梭蛋白包含基本上如SEQ ID No:11所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:11所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

17.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述穿梭蛋白包含连接子蛋白。

18.根据权利要求17所述的方法,其中,在所述减毒毒素中,至少一个毒性结构域,可选地炭疽杆菌致死因子蛋白毒素的毒性结构域II-IV中的一个或多个,被所述连接子蛋白取

代。

19.根据权利要求17所述的方法,其中,所述连接子蛋白包含核酸结合结构域。

20.根据权利要求19所述的方法,其中,所述核酸结合结构域为酿酒酵母GAL4。

21.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述穿梭蛋白包含基本上如SEQ ID No:12或SEQ ID No:13所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:12或SEQ ID No:13所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

22.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述生物活性有效载荷分子是在细胞胞质内、细胞核内、诸如囊泡或液泡的细胞器或细胞内结构内、细胞表面脂质膜或细胞内脂质膜内具有活性的治疗活性分子。

23.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述生物活性化合物的分子量为1Da至10MDa。

24.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述生物活性分子为:(i)小分子、蛋白质、核苷酸、DNA或DNA构建体、质粒、RNA或RNA构建体、mRNA、miRNA、指导RNA、snRNA、siRNA、反义寡核苷酸(ASO);或(ii)大分子,比如蛋白质或酶或其片段、核酸酶、或抗体或其抗原结合片段。

25.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述生物活性有效载荷分子包含基因组编辑工具,所述基因组编辑工具可选地为核酸酶,优选Cas9、Cpf1、TALEN或锌指核酸酶。

26.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述生物活性分子包含基本上如SEQ ID No:14所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:14所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

27.一种通过权利要求1-26中任一项所述的方法获得或能够获得的脂质体。

28.一种脂质体,其包含:围绕着腔、成孔蛋白或成孔结构域或其变体或片段的磷脂双层,和穿梭蛋白。

29.根据权利要求28所述的脂质体,其中,所述脂质体为如权利要求1-26中任一项所定义的。

30.根据权利要求27-29中任一项所述的脂质体,其用在治疗或诊断中。

31.根据权利要求27-29中任一项所述的脂质体,其用在治疗、预防或改善疾病中。

32.根据权利要求31所用的脂质体,其中,待治疗的所述疾病为肥胖,更优选地为FMO5-调节的肥胖。

33.根据权利要求31所用的脂质体,其中,待治疗的所述疾病为前列腺素D2调节的疾病,所述前列腺素D2调节的疾病选自:雄激素性脱发(AGA);粉刺;红斑痤疮;和前列腺癌。

34.根据权利要求31所用的脂质体,其中,所述脂质体是用于治疗、预防或改善:寨卡热(或寨卡病毒疾病)、埃博拉病毒疾病、获得性免疫缺陷综合症(人免疫缺陷病毒)、Stat3-响应性癌、P53-缺乏癌、病毒介导的宫颈癌(即人乳头瘤病毒)、家族性高胆固醇血症、杜氏型肌营养不良症、脊髓性肌肉萎缩、克罗恩病、或炎性疾病,特别是与细胞内粘附分子-1(ICAM-1)的过表达有关的肠病。

35.根据权利要求30-34中任一项所用的脂质体,其中,用于构建脂质体的所述细胞从被治疗的受试者中获得。

36.根据权利要求35所用的脂质体,其中,从干细胞系或从所述受试者的靶组织获得健康细胞,并将所述健康细胞在培养中扩增,然后用于生产装载有适于治疗临床症状的治疗性化合物的脂质体。

37.根据权利要求35所用的脂质体,其中,自所述受试者获得的细胞,可选地自患者活检获得的细胞,不包含健康细胞。

38.一种试剂盒,其包含根据权利要求27-29中任一项所述的脂质体,和使用说明书。

39.根据权利要求27-29中任一项所述的脂质体,其用在基因组编辑技术中。

40.一种基因组编辑方法,所述方法包括使根据权利要求27-29中任一项所述的脂质体装载有:(i)指导RNA,和/或(ii)核酸酶或编码核酸酶的基因构建体,和将装载后的脂质体用在基因编辑治疗中。

41.根据权利要求40所述的方法,其中,所述核酸酶包含Cas9或Cpf1或TALEN或锌指核酸酶。

42.一种穿梭蛋白,其包含与蛋白激酶R(PKR)附接的减毒毒素蛋白。

43.根据权利要求42所述的穿梭蛋白,其中,所述蛋白包含基本上如SEQ ID No:11所示的氨基酸序列或其片段或变体,或由基本上如SEQ ID No:11所示的氨基酸序列或其片段或变体组成。

制备脂质体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及脂质体，并且特别地但非排他地涉及生产脂质体的方法以及使细胞衍生的脂质体装载货物分子的方法。本发明延伸到此类脂质体本身，并延伸到将这些脂质体用作细胞递送系统，用于将生物和治疗活性有效载荷分子，比如小分子、RNAi分子(如siRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、生物活性蛋白、基因组编辑工具(核酸酶，比如Cas9)和药物隐蔽递送至细胞内以治疗一系列疾病。还可以将脂质体用在一系列诊断和治疗应用中。本发明延伸到包含此类脂质体的药物组合物，包含细胞外囊泡(EV)的群组，以及延伸到融合蛋白。

背景技术

[0002] 已有文献记载了用于小分子和高分子量治疗剂的靶向、亚细胞递送和控制释放的合成的、纳米级的先进药物递送系统[1]。这些系统非穷尽地引入了纳米微粒系统、脂质体、水凝胶、乳液、胶束和基于可溶性聚合物的药物递送技术[1]。近来，利用生物系统，重组进化为执行特定任务(即促进治疗剂的递送)的离散的蛋白质结构域的可能性受到了关注[2]。这些努力包括使用蛋白毒素衍生的材料来操纵细胞内膜系统，以实现大的、膜不渗透分子(比如反义寡核苷酸(ASO))的靶向递送[2]。这是有用的，因为没有手段可以穿越细胞内区室屏障，这些试剂(ASO)的生物利用度受到限制[2]。

[0003] 诸如炭疽毒素(Atx)的蛋白质已经进化为破坏内膜系统而进入细胞溶质中。这是通过在凋亡相关基因2-相互作用蛋白X(ALIX)依赖过程中多泡内体(MVE)/多泡体(MVB)内的管腔内囊泡(ILV)与MVE/MVB的限制性膜之间的反向融合事件(back-fusion event)实现的[3&4]。

[0004] 文献中将Atx的PA低聚物(孔)成分报道为阳离子选择性孔[6]，其负责将水肿因子(EF)和致死因子(LF)从MVE/MVB的管腔移至ILV的管腔。此外，EF和LF均需要经历熔融-颗粒过渡(即，展开)才能移动穿过$PA63_n$低聚物[7]。进一步公开的是，CAS9不应通过PA孔[8]。

[0005] 此外，仅有偶然的间接证据表明在siRNA或ASO的递送过程中发生了孔易位[2]，因为一直存在这样的可能性(特别是考虑到使用了高浓度的PA83时)，即，跨越MVE/MVB的限制性膜发生易位[3]或MVE/MVB限制性膜破裂。

[0006] 当将LF的催化亚基(即结构域II-IV)自LF中移除时，已证明得到的无毒LF截短体(LFn)有助于促进与其融合的选择性货物通过PA孔道向细胞溶质中移动[2]。先前已经报道了采用PA83和LFn-GAL4递送ASO或采用PA83::LFn-PKR递送siRNA至细胞的细胞溶质[2]。

[0007] 由于多种原因，由PA83:LFn-GAL4或PA83::LFn-PKR介导的核酸(和蛋白质)的细胞核质(nucleocytosolic)递送并不理想。首先，采用上述系统会(即在静脉施用之后)系统地将货物和药物递送系统暴露在人体的防御之下。由于已知这种递送技术的成分是免疫原性的(即PA83和LFn)[11]，如果需要重复给药，这些构建体的血浆停留时间可能会受到限制。其次，在全身施用后，在转移至靶细胞的过程中，还可能破坏蛋白递送系统或其货物。另外，由于已经证明负责PA83内化的受体的表达几乎无处不在，因此靶向递送至特定细胞群的范

围很小[12]。最后，还应考虑由聚阴离子(如ASO)的电荷驱动的受限的PK-PD的可能性，即通过网状内皮系统的细胞自血浆库中快速移除它们的可能性[13]。

[0008] 鉴于已在ILV和脂质体(如外泌体)中均记录了野生型LF，并且已知在释放了ER储存钙后，ILV可以作为脂质体从细胞中分泌出来[5]，发明人已推导出重组LF也可以被捕获或装载到脂质体中。此外，使用离子载体(如，离子霉素)可按需释放ER钙，从而触发ILV的胞外分泌，作为脂质体。因此，可以将离子霉素用于自先前用Atx衍生的递送系统处理的细胞中暂时捕获包含货物的ILV。然后允许将分泌到细胞培养基中的装载货物的脂质体分离出来。

[0009] 本发明致力于解决现有技术中存在的一个或多个问题。

发明内容

[0010] 发明人开发了一种新的用于装载管腔内囊泡(或脂质体)的方法学，随后所述管腔内囊泡(或脂质体)可作为外泌体收集，其包含膜不渗透(治疗性)货物物质。该种策略赋予截留在囊泡的腔内的货物“隐蔽”特性，使所述货物对免疫系统屏蔽，并保护其免受与血清或其他体液相关的酶的破坏。本文所述的脂质体可以使管腔内容物免受酶破坏并对免疫应答屏蔽，并通常将脂质体看作天然存在的旁分泌运输系统，其在转运中保护抗原性或酶不稳定的物质。它还具有靶向细胞或组织的能力。

[0011] 因此，在本发明的第一方面，提供了一种制备脂质体的方法，所述方法包括使至少一种细胞与如下接触：(i)成孔蛋白或成孔结构域或其变体或片段；和(ii)穿梭蛋白，其任选地附接于生物活性有效载荷分子，其中所述成孔蛋白或成孔结构域或其变体或片段创建贯穿所述至少一种细胞的磷脂双层的孔，且所述穿梭蛋白与成孔蛋白或成孔结构域或其变体或片段相互作用，并被内化至细胞内而由此产生脂质体，可选地，所述脂质体装载有生物活性有效载荷分子。

[0012] 有利地，发明人已经证明了第一方面的方法能够有效地生产脂质体(在本文中还称为“外泌体”)，其包含由外部的磷脂双层围绕或封装的内腔。图7示出了本发明的方法实施方案。如图1所示，发明人已经发现在存在成孔蛋白PA83的情况下，标记的穿梭蛋白(优选与穿梭蛋白共价缀合的荧光团，最优选德克萨斯红(Texas Red)标记的LFn-PKR)可以与CD63阳性的、界定了膜的结构内的管腔内囊泡结合。此外，可以如图2和图5所示分离这些管腔内囊泡。在一些实施方案中，可以使脂质体成功地装载生物活性有效载荷或货物分子并随后使其被靶细胞(如患有某种病症的患者的细胞)吸收。生物活性有效载荷或货物分子可以产生有效的生物学或治疗效果(如，参见图6)。因此，发明人已经设想了脂质体的治疗应用。发明人还表明，生物活性有效载荷分子可以与穿梭蛋白接合，并且图3提供了分离的脂质体包含用荧光团德克萨斯红标记的生物活性有效载荷分子的明确证据。在图3中，生物活性有效载荷分子是核酸酶蛋白Cas9，且在图4中，有效载荷分子是小分子，比如德克萨斯红。

[0013] 本发明的方法可以在体外(in vitro)、体内(in vivo)或间接体内(ex vivo)进行。在一个优选的实施方案中，所述方法进一步包括从细胞中分离脂质体。穿梭蛋白可以不附接于生物活性有效载荷分子上。然而，在一个优选的实施方案中，穿梭蛋白以共价或非共价的方式附接于生物活性有效载荷分子。

[0014] 发明人还证明，可将成孔蛋白和穿梭蛋白用于成功地使脂质体装载药理活性的

siRNA,如图6所示。本发明的方法可用于将生物活性货物化合物装载并递送至脂质体中,可以分离所述脂质体并将其用于将货物从一个细胞群转移到另一个细胞群。因此,鉴于这些数据,很明显,根据所携带的生物活性有效载荷分子,第一方面的方法产生的脂质体可治疗性地用于治疗广泛的疾病。

[0015] 根据第二方面,提供一种通过第一方面的方法获得或可获得的脂质体。

[0016] 根据第三第二方面,提供一种脂质体,其包含:围绕着腔、成孔蛋白或成孔结构域或其变体或片段的磷脂双层,和穿梭蛋白。

[0017] 还设想,将本发明的脂质体用在包括治疗、预防或改善病症的治疗中或用在诊断中。

[0018] 因此,根据第四方面,提供根据第二或第三方面的脂质体用在治疗或诊断中。

[0019] 根据第五方面,提供根据第二或第三方面所述的脂质体用在治疗、预防或改善疾病中。

[0020] 根据第六方面,提供治疗、预防或改善受试者疾病的方法,所述方法包括向有此治疗需要的受试者施用治疗有效量的根据第二或第三方面的脂质体。

[0021] 具体而言,发明人设想脂质体在治疗FMO5调节的肥胖或男性型脱发是有用的。因此,在一个优选的实施方案中,治疗的疾病为肥胖,更优选地为FMO5调节的肥胖。在另一个优选的实施方案中,治疗的疾病为前列腺素D2调节的疾病。前列腺素D2调节的疾病选自:雄激素性脱发(AGA);粉刺;红斑痤疮;和前列腺癌。

[0022] 在另一优选的实施方案中,脂质体可在治疗中用作预防药。脂质体可用于,但不限于治疗:寨卡热(或寨卡病毒疾病)、埃博拉病毒疾病、获得性免疫缺陷综合症(人免疫缺陷病毒)、Stat3-响应性癌、P53-缺乏癌、病毒介导的宫颈癌(即人乳头瘤病毒)、家族性高胆固醇血症、杜氏型肌营养不良症、脊髓性肌肉萎缩、克罗恩病、和多种炎性疾病,特别是与细胞内粘附分子-1(ICAM-1)过表达有关的肠病。

[0023] 根据第七方面,提供诊断受试者中疾病的方法,该方法包括从测试的受试者中获得生物样品;并采用第一方面的方法,使用样品中的细胞来生产装载了诊断化合物的脂质体。

[0024] 在一个实施方案中,这会包括将治疗诊断化合物装载至脂质体中,所述脂质体通过脂质体的货物与带有患病细胞的疾病标志物的相互作用来报告疾病存在与否。

[0025] 在另一实施方案中,并如实施例8所证明的,使非源自患者细胞(如源自培养的间充质干细胞的脂质体)的脂质体装载治疗诊断化合物。在又一实施方案中,通过使并非来自患者而是来自细胞系的脂质体装载另一货物以用作治疗剂。在一个实施方案中,疾病由非患者来源的脂质体治疗。在一个实施方案中,非患者来源的脂质体源自非患者细胞。在另一实施方案中,非患者来源的脂质体源自干细胞。然后可以将得到的脂质体施用于患者而不产生不利的免疫学作用,即作为“隐蔽”疗法。

[0026] 根据第八方面,提供一种试剂盒,其包含根据第二或第三方面所述的脂质体,和使用说明书。

[0027] 脂质体可包含囊泡,所述囊泡可以是细胞外囊泡(EV)、细胞内囊泡或管腔内囊泡(ILV)。最优选地,所述脂质体包含外泌体。本领域技术人员将理解,尽管本文提及的脂质结构大多是细胞外的,但也应认为本发明基本上涵盖细胞内的脂质双层结构,比如溶酶体、核

内体和其他细胞内脂质双层结构，无论是真核的还是原核的，以及其中的囊泡。还将理解，本发明还涵盖人工脂质双层结构，比如人工囊泡，人工脂质体和其他人工脂质双层结构。

[0028] 在一个实施方案中，脂质体具有10nm至500nm的平均直径。可以例如采用小角中子散射[2]来测量脂质体的尺寸。在优选的实施方案中，脂质体具有20nm至400nm的平均直径。在更优选的实施方案中，脂质体具有30nm至300nm的平均直径。在又更优选的实施方案中，脂质体具有40nm至200nm的平均直径。在再更优选的实施方案中，脂质体具有50nm至150nm的平均直径。在最优选的实施方案中，脂质体具有60nm至120nm的平均直径。

[0029] 在优选的实施方案中，脂质体包含磷脂双层，磷脂双层内有成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段。成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段可以完全延伸至横跨磷脂双层的宽度，或者可以仅延伸至部分地横跨磷脂双层的宽度。成孔蛋白、或成孔结构域、或其变体或片段可以延伸至细胞的腔中和/或可以延伸至细胞的细胞外空间中。成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段可仅延伸至横跨磷脂双层，而不延伸至细胞的腔内和/或细胞的细胞外空间。

[0030] 优选地，在第一方面的方法中使用的细胞包括生物细胞。优选地，细胞包括哺乳动物细胞，其最优选地为人细胞。最优选地，细胞包括自正在治疗的受试者获得的细胞。例如，细胞可以是自受试者获得的(如从活检中收集的)不健康的细胞。可选地，细胞包括自干细胞系获得的细胞。干细胞系可以是间充质细胞系。

[0031] 在非限制性实例中，可以从靶组织中收集健康细胞，并将所述健康细胞在培养中扩增，然后用于生产装载有适于治疗所讨论的临床症状的治疗化合物的脂质体(如外泌体)。这将使脂质体被人体识别为“非自身”的可能性降至最低。还存在这样的可能性，即处理脂质体以移除可能在使该脂质体装载治疗药的过程中留下的任何残留抗原物质。在一个实施方案中，收集的细胞可包含健康细胞。在可选的非限制性实例中，收集的细胞可以不包含健康细胞。

[0032] 优选地，成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段包含，或者衍生自无毒蛋白。在一个实施方案中，成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段为蓖麻毒蛋白。

[0033] 在一个优选的实施方案中，成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段衍生自炭疽杆菌。在一个优选的实施方案中，成孔蛋白为炭疽杆菌毒力因子保护性抗原(PA)。在一个实施方案中，成孔蛋白为炭疽杆菌PA83。在一个实施方案中，所述炭疽杆菌PA83具有如下的在本文中以SEQ ID NO:1提供的氨基酸序列：

[0034] MRGSHHHHHHGSEVKQENRLLNESESSSQGLLGYYFSDLNFQAPMVVTSSTTGDLSIPSSELENIPSEN
QYFQSAIWSGFIKVKKSDEYTFATSADNHVTMWVDDQEVINKASNSNKIRLEKGRLYQIKIQYQRENPTEKGLDFKL
YWTDSQNKKEVISSDNLQLPELKQKSSNSRKKRSTSAGPTVPDRDNDGIPDSLEVEGYTVDVKNKRTFLSPWISNIH
EKKGLTKYKSSPEKWSTASDPYSDFEKVTGRIDKNVSPEARHPLVAAYPIVHVDMENIILSKNEDQSTQNTDSQTRT
ISKNTSTSRTHTSEVHGNAEVHASFFDIGGSVSAGFSNSNSSTVAIDHSLSLAGERTWAETMGLNTADTARLNANIR
YVNTGTAPIYNVLPTTSLVLGKNQTLATIKAKENQLSQILAPNNYYPSKNLAPIALNAQDDFSSTPITMNYNQFLEL
EKTKQLRLDTDQVYGNIATYNFENGRVRVDTGSNWSEVLPQIQETTARIIFNGKDLNLVERRIAAVNPSDPLETTKP
DMTLKEALKIAFGFNEPNGNLQYQGKDITEFDFNFDQQTSQNIKNQLAELNATNIYTVLDKIKLNAKMNILIRDKRF
HYDRNNIAVGADESVVKEAHREVINSSTEGLLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGK
TFIDFKKYNDKLPLYISNPNYKVNVYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG

[0035] [SEQ ID No:1]

[0036] 因此,优选地成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段包含基本上如SEQ ID No:1所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:1所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

[0037] 在一个优选的实施方案中,炭疽杆菌PA83包含PA83变体(本文称为"MRSG-6His-PA83"),所述PA83变体具有如下的在本文中以SEQ ID NO:2提供的氨基酸序列:

[0038] MRGSHHHHHHGSEVKQENRLLNESESSSQGLLGYYFSDLNFQAPMVVTSSTTGDLSIPSSELENIPSENQYFQSAIWSGFIKVKKSDEYTFATSADNHVTMWVDDQEVINKASNSNKIRLEKGRLYQIKIQYQRENPTEKGLDFKLYWTDSQNKKEVISSDNLQLPELKQKSSNSRKKRSTSAGPTVPDRDNDGIPDSLEVEGYTVDVKNKRTFLSPWISNIHEKKGLTKYKSSPEKWSTASDPYSDFEKVTGRIDKNVSPEARHPLVAAYPIVHVDMENIILSKNEDQSTQNTDSQTRTISKNTSTSRTHTSEVHGNAEVHASFFDIGGSVSAGFSNSNSSTVAIDHSLSLAGERTWAETMGLNTADTARLNANIRYVNTGTAPIYNVLPTTSLVLGKNQTLATIKAKENQLSQILAPNNYYPSKNLAPIALNAQDDFSSTPITMNYNQFLELEKTKQLRLDTDQVYGNIATYNFENGRVRVDTGSNWSEVLPQIQETTARIIFNGKDLNLVERRIAAVNPSDPLETTKPDMTLKEALKIAFGFNEPNGNLQYQGKDITEFDFNFDQQTSQNIKNQLAELNATNIYTVLDKIKLNAKMNILIRDKRFHYDRNNIAVGADESVVKEAHREVINSSTEGLLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKKYNDKLPLYISNPNYKVNVYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG

[0039] [SEQ ID No:2]

[0040] 因此,优选地成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段包含基本上如SEQ ID No:2所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:2所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

[0041] 技术人员将理解,根据SEQ ID No:2的PA83变体包含N-末端标记的变体,其中标签包含MRSG-6H并具有如下的在本文中以SEQ ID NO:3提供的氨基酸序列:

[0042] MRGSHHHHHH

[0043] [SEQ ID No:3]

[0044] 在本文中以如下的SEQ ID NO:4提供了包含6His的可选蛋白质标签:

[0045] HHHHHH

[0046] [SEQ ID No:4]

[0047] 本领域技术人员将理解,可以将如SEQ ID No:3和SEQ ID No:4所示的MRSG-6His和6-His标签添加到本文所述的任何蛋白质的N-末端或C-末端,并且应理解此类形式的公开同时保护了标记的和未标记的蛋白质变体。

[0048] 应当理解,成孔蛋白可包含单个执行结构域或亚基,其可形成寡聚体,比如炭疽杆菌PA63。因此,在另一个优选的实施方案中,成孔蛋白是炭疽杆菌PA63。在一个实施方案中,所述炭疽杆菌PA63具有如下的在本文中以SEQ ID NO:5提供的氨基酸序列:

[0049] STSAGPTVPDRDNDGIPDSLEVEGYTVDVKNKRTFLSPWISNIHEKKGLTKYKSSPEKWSTASDPYSDFEKVTGRIDKNVSPEARHPLVAAYPIVHVDMENIILSKNEDQSTQNTDSQTRTISKNTSTSRTHTSEVHGNAEVHASFFDIGGSVSAGFSNSNSSTVAIDHSLSLAGERTWAETMGLNTADTARLNANIRYVNTGTAPIYNVLPTTSLVLGKNQTLATIKAKENQLSQILAPNNYYPSKNLAPIALNAQDDFSSTPITMNYNQFLELEKTKQLRLDTDQVYGNIATYNFENGRVRVDTGSNWSEVLPQIQETTARIIFNGKDLNLVERRIAAVNPSDPLETTKPDMTLKEALKIAFGFNEPNGNLQYQGKDITEFDFNFDQQTSQNIKNQLAELNATNIYTVLDKIKLNAKMNILIRDKRFHYDRNNIAVGADESVVKEAHREVIN

SSTEGLLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKKYNDKLPLYISNPNYKVNV
YAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG

[0050] [SEQ ID No:5]

[0051] 因此,优选地成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段包含基本上如SEQ ID No:5所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:5所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

[0052] 还应理解,在一些情况下,成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段可包含成孔蛋白的片段。例如,可以将成孔蛋白如通过酶截短或消化从而仅留下成孔片段。因此,在一个实施方案中,成孔蛋白是炭疽杆菌PA83的片段,其中已经通过酶法移除了细胞外结构域。在另一个实施方案中,成孔蛋白是炭疽杆菌PA63的片段,其中已经通过酶法移除了细胞外结构域。技术人员将理解该两种蛋白质片段将具有如下的在本文中以SEQ ID NO:6提供的氨基酸序列:

[0053] VHVDMENIILSKNEDQSTQNTDSQTRTISKNTSTSRTHTSEVHGNAEVHASFFDIGGSVSAGFSNSNSS
TVAIDHSLSLAGERTWAETMGLNTADTARLNANIRYVNT

[0054] [SEQ ID No:6]

[0055] 因此,优选地成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段包含基本上如SEQ ID No:6所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:6所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

[0056] 还应理解,在一些情况下,成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段可包含成孔蛋白的突变体或变体,例如,天然蛋白的一个或多个残基被修饰。

[0057] 因此,在进一步的实施方案中,成孔蛋白是炭疽杆菌PA83 D512K突变体并具有如下的在本文中以SEQ ID NO:7提供的氨基酸序列:

[0058] MRGSHHHHHHGSEVKQENRLLNESESSSQGLLGYYFSDLNFQAPMVVTSSTTGDLSIPSSELENIPSEN
QYFQSAIWSGFIKVKKSDEYTFATSADNHVTMWVDDQEVINKASNSNKIRLEKGRLYQIKIQYQRENPTEKGLDFKL
YWTDSQNKKEVISSDNLQLPELKQKSSNSRKKRSTSAGPTVPDRDNDGIPDSLEVEGYTVDVKNKRTFLSPWISNIH
EKKGLTKYKSSPEKWSTASDPYSDFEKVTGRIDKNVSPEARHPLVAAYPIVHVDMENIILSKNEDQSTQNTDSQTRT
ISKNTSTSRTHTSEVHGNAEVHASFFDIGGSVSAGFSNSNSSTVAIDHSLSLAGERTWAETMGLNTADTARLNANIR
YVNTGTAPIYNVLPTTSLVLGKNQTLATIKAKENQLSQILAPNNYYPSKNLAPIALNAQDDFSSTPITMNYNQFLEL
EKTKQLRLDTDQVYGNIATYNFENGRVRVDTGSNWSEVLPQIQETTARIIFNGKDLNLVERRIAAVNPSKPLETTKP
DMTLKEALKIAFGFNEPNGNLQYQGKDITEFDFNFDQQTSQNIKNQLAELNATNIYTVLDKIKLNAKMNILIRDKRF
HYDRNNIAVGADESVVKEAHREVINSSTEGLLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGK
TFIDFKKYNDKLPLYISNPNYKVNVYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG

[0059] [SEQ ID No:7]

[0060] 因此,优选地成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段包含基本上如SEQ ID No:7所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:7所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

[0061] 在又进一步的实施方案中,成孔蛋白是炭疽杆菌PA83 K245G;R252N[16]突变体并具有如下的在本文中以SEQ ID NO:8提供的氨基酸序列:

[0062] MRGSHHHHHHGSEVKQENRLLNESESSSQGLLGYYFSDLNFQAPMVVTSSTTGDLSIPSSELENIPSEN

QYFQSAIWSGFIKVKKSDEYTFATSADNHVTMWVDDQEVINKASNSNKIRLEKGRLYQIKIQYQRENPTEKGLDFKL
YWTDSQNKKEVISSDNLQLPELKQKSSNSRKKRSTSAGPTVPDRDNDGIPDSLEVEGYTVDVKNKRTFLSPWISNIH
EKKGLTKYKSSPEKWSTASDPYSDFEKVTGRIDGNVSPEANHPLVAAYPIVHVDMENIILSKNEDQSTQNTDSQTRT
ISKNTSTSRTHTSEVHGNAEVHASFFDIGGSVSAGFSNSNSSTVAIDHSLSLAGERTWAETMGLNTADTARLNANIR
YVNTGTAPIYNVLPTTSLVLGKNQTLATIKAKENQLSQILAPNNYYPSKNLAPIALNAQDDFSSTPITMNYNQFLEL
EKTKQLRLDTDQVYGNIATYNFENGRVRVDTGSNWSEVLPQIQETTARIIFNGKDLNLVERRIAAVNPSDPLETTKP
DMTLKEALKIAFGFNEPNGNLQYQGKDITEFDFNFDQQTSQNIKNQLAELNATNIYTVLDKIKLNAKMNILIRDKRF
HYDRNNIAVGADESVVKEAHREVINSSTEGLLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGK
TFIDFKKYNDKLPLYISNPNYKVNVYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG

[0063] [SEQ ID No:8]

[0064] 因此,优选地成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段包含基本上如SEQ ID No:8所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:8所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

[0065] 在又进一步的实施方案中,成孔蛋白是炭疽杆菌PA83 K245N;R252S[16]突变体并具有如下的在本文中以SEQ ID NO:9提供的氨基酸序列:

[0066] MRGSHHHHHHGSEVKQENRLLNESESSSQGLLGYYFSDLNFQAPMVVTSSTTGDLSIPSSELENIPSE
NQYFQSAIWSGFIKVKKSDEYTFATSADNHVTMWVDDQEVINKASNSNKIRLEKGRLYQIKIQYQRENPTEKGLDF
KLYWTDSQNKKEVISSDNLQLPELKQKSSNSRKKRSTSAGPTVPDRDNDGIPDSLEVEGYTVDVKNKRTFLSPWIS
NIHEKKGLTKYKSSPEKWSTASDPYSDFEKVTGRIDNNVSPEASHPLVAAYPIVHVDMENIILSKNEDQSTQNTDS
QTRTISKNTSTSRTHTSEVHGNAEVHASFFDIGGSVSAGFSNSNSSTVAIDHSLSLAGERTWAETMGLNTADTARL
NANIRYVNTGTAPIYNVLPTTSLVLGKNQTLATIKAKENQLSQILAPNNYYPSKNLAPIALNAQDDFSSTPITMNY
NQFLELEKTKQLRLDTDQVYGNIATYNFENGRVRVDTGSNWSEVLPQIQETTARIIFNGKDLNLVERRIAAVNPSD
PLETTKPDMTLKEALKIAFGFNEPNGNLQYQGKDITEFDFNFDQQTSQNIKNQLAELNATNIYTVLDKIKLNAKMN
ILIRDKRFHYDRNNIAVGADESVVKEAHREVINSSTEGLLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLN
ISSLRQDGKTFIDFKKYNDKLPLYISNPNYKVNVYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG.

[0067] [SEQ ID No:9]

[0068] 因此,优选地成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段包含基本上如SEQ ID No:9所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:9所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

[0069] 在另一实施方案中,成孔蛋白包含引入了溶血素的跨膜结构域[17]以取代PA63跨膜结构域的炭疽杆菌PA83-HL杂交分子,具有如下的在本文中以SEQ ID NO:10提供的氨基酸序列:

[0070] GSEVKQENRLLNESESSSQGLLGYYFSDLNFQAPMVVTSSTTGDLSIPSSELENIPSENQYFQSAIWSG
FIKVKKSDEYTFATSADNHVTMWVDDQEVINKASNSNKIRLEKGRLYQIKIQYQRENPTEKGLDFKLYWTDSQNKKE
VISSDNLQLPELKQKSSNSRKKRSTSAGPTVPDRDNDGIPDSLEVEGYTVDVKNKRTFLSPWISNIHEKKGLTKYKS
SPEKWSTASDPYSDFEKVTGRIDKNVSPEARHPLVAAYPIVHVDMENIILSKNEDQSTQNTDSQTRTISKNTSKEYM
STLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYAIDHSLSLAGERTWAETMGLNTADTARLNANIRYVNTGTAPI
YNVLPTTSLVLGKNQTLATIKAKENQLSQILAPNNYYPSKNLAPIALNAQDDFSSTPITMNYNQFLELEKTKQLRLD
TDQVYGNIATYNFENGRVRVDTGSNWSEVLPQIQETTARIIFNGKDLNLVERRIAAVNPSDPLETTKPDMTLKEALK

IAFGFNEPNGNLQYQGKDITEFDFNFDQQTSQNIKNQLAELNATNIYTVLDKIKLNAKMNILIRDKRFHYDRNNIAV
GADESVVKEAHREVINSSTEGLLLNIDKDIRKILSGYIVEIEDTEGLKEVINDRYDMLNISSLRQDGKTFIDFKKYN
DKLPLYISNPNYKVNVYAVTKENTIINPSENGDTSTNGIKKILIFSKKGYEIG

[0071] [SEQ ID No:10]

[0072] 因此,优选地成孔蛋白、或成孔结构域或其变体或片段包含基本上如SEQ ID No:10所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:10所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

[0073] 本领域技术人员将理解,以上实施方案代表了孔形成蛋白的实例,并且不是限制性的或排他的。将进一步理解的是,成孔蛋白的任何其他片段、变体或突变体也落入本发明的范围内。

[0074] 优选的成孔蛋白的其他实例包括Atx的PA83或PA63组分、PA83或PA63的突变体(比如所述的形成八聚物的突变体[16])、或PA杂交物(比如所述的PA-α溶血素杂交体)或修饰为介导脂质双层上的易位的非Atx成孔蛋白(比如重组链球菌溶血素O(SLO)或α-溶血素)。

[0075] 术语“穿梭蛋白”可以指被配置为便于通过孔输送预成形蛋白的的任何蛋白或肽。在一个优选的实施方案中,将穿梭蛋白配置为便于通过孔输送生物活性有效载荷分子。因此,优选地穿梭蛋白为可以携带有效载荷或货物并通过孔穿过核内体的限制膜的载体。有效载荷可以与穿梭蛋白共价或非共价结合。图7阐明了任选地携带有效载荷的穿梭蛋白与成孔蛋白之间的相互作用。

[0076] 优选地,穿梭蛋白包含减毒毒素蛋白。特别地,穿梭蛋白可以为衍生自炭疽杆菌的致死因子(LF)或水肿因子(EF)。在一个实施方案中,致死因子结构域I(LFn)具有如下的在本文中以SEQ ID NO:11提供的氨基酸序列:

[0077] MERNKTQEEHLKEIMKHIVKIEVKGEEAVKKEAAEKLLEKVPSDVLEMYKAIGGKIYIVDGDITKHISL
EALSEDKKKIKDIYGKDALLHEHYVYAKEGYEPVLVIQSSEDYVENTEKALNVYYEIGKILSRDILSKINQPYQKFL
DVLNTIKNASDSDGQDLLFTNQLKEHPTDFSVEFLEQNSNEVQEVFAKAFAYYIEPQHRDVLQLYAPEAFNYMDKFN
EQEINLS

[0078] [SEQ ID No:11]

[0079] 因此,优选地穿梭蛋白包含基本上如SEQ ID No:11所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:11所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

[0080] 在一个优选的实施方案中,穿梭蛋白还包含连接子蛋白。优选地,在减毒毒素中,至少一个毒素结构域,例如炭疽杆菌致死因子蛋白毒素的毒性结构域II-IV中的一个或多个,被连接子蛋白取代。在一个更优选的实施方案中,连接子蛋白包含核酸结合结构域。例如,核酸结合结构域可以为(与LFn融合的)酿酒酵母GAL4,其具有如下的在本文中以SEQ ID NO:12提供的氨基酸序列:

[0081] MGKPIPNPLLGLDSTMERNKTQEEHLKEIMKHIVKIEVKGEEAVKKEAAEKLLEKVPSDVLEMYKAIGG
KIYIVDGDITKHISLEALSEDKKKIKDIYGKDALLHEHYVYAKEGYEPVLVIQSSEDYVENTEKALNVYYEIGKILS
RDILSKINQPYQKFLDVLNTIKNASDSDGQDLLFTNQLKEHPTDFSVEFLEQNSNEVQEVFAKAFAYYIEPQHRDVL
QLYAPEAFNYMDKFNEQEINLSMKLLSSIEQACDICRLKKLKCSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLTRAHLT
EVESRLERLEQLFLLIFPREDLDMILKMDSLQDIKALLTGLFVQDNVNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSS
SEESSNKGQRQLTVSHHHHHH

[0082] [SEQ ID No:12]

[0083] 因此,优选地穿梭蛋白包含基本上如SEQ ID No:12所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:12所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

[0084] 然而,发明人发现,由于LFn-GAL4倾向于以非调控的方式非特异性地聚集,因此有时难以使用LFn-GAL4。LFn蛋白激酶R(PKR)结合ASO(其基本上是基于DNA而不是基于RNA)的使用是新的,并且在此也首次报道。应当指出的是,LFn-PKR尚未显示出以与LFn-GAL4相同的方式促进质粒DNA向细胞溶质中的易位[9&10]。因此,本发明人还开发了一种新的和改进的构建体,其中PKR替代了上述构建体中的GAL4。

[0085] 发明人相信与GAL4相比,PKR形成了更稳定的连接子蛋白,并且相信PKR与RNA和ASO的双链部分结合。因此,在优选的实施方案中,连接子蛋白包含蛋白激酶R或其片段、变体或突变体,具有如下的在本文中以SEQ ID NO:13提供的氨基酸序列:

[0086] MGKPIPNPLLGLDSTMERNKTQEEHLKEIMKHIVKIEVKGEEAVKKEAAEKLLEKVPSDVLEMYKAIGGKIYIVDGDITKHISLEALSEDKKKIKDIYGKDALLHEHYVYAKEGYEPVLVIQSSEDYVENTEKALNVYYEIGKILSRDILSKINQPYQKFLDVLNTIKNASDSDGQDLLFTNQLKEHPTDFSVEFLEQNSNEVQEVFAKAFAYYIEPQHRDVLQLYAPEAFNYMDKFNEQEINLSMAGDLSAGFFMEELNTYRQKQGVVLKYQELPNSGPPHDRRFTFQVIIDGREFPEGEGRSKKEAKNAAAKLAVEILNKEHHHHHH

[0087] [SEQ ID No:13]

[0088] 因此,优选地穿梭蛋白包含基本上如SEQ ID No:13所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:13所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

[0089] 发明人相信这是本发明的重要方面。

[0090] 因此,根据本发明的第九方面,提供一种穿梭蛋白,其包含附接于蛋白激酶R(PKR)的减毒毒素蛋白。

[0091] 优选地,根据第九方面所述的穿梭蛋白包含基本上如SEQ ID No:11所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:11所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

[0092] 在最优选的实施方案中,穿梭蛋白偶联至生物活性有效载荷分子。在一些实施方案中,偶联可包含共价键。在一个可选的实施方案中,偶联可包含非共价键。换言之,有效载荷可以与穿梭蛋白共价或非共价结合。生物活性有效载荷分子可以是,但不限于在细胞胞质内、细胞核内、诸如囊泡或液泡的细胞器或细胞内结构内、细胞表面脂质膜或细胞内脂质膜内具有活性的治疗活性分子。生物活性有效载荷分子本身可进一步但并非排他地具有活性,或者在在细胞内被激活之前其可以是无活性的。可以但并非排他地使生物活性有效载荷分子在细胞内破碎以形成活性或非活性组份。

[0093] 生物活性分子可以是,但不限于小分子、蛋白质、RNA分子或片段、或DNA构建体。生物活性化合物的分子量可以为1Da至10MDa。

[0094] 发明人发现脂质体可以有效地装载优选具有治疗活性的小分子。因此,在一个实施方案中,生物活性有效载荷分子包括小分子。小分子的分子量可以为1-900Da。可选地,小分子的分子量可以是100-800Da、200-700Da、300-600Da或400-500Da。小分子可以是但不限于具有激动或拮抗性质的药理制剂或药物,或者可以是染料或荧光分子。

[0095] 发明人还发现脂质体可以有效地装载大分子,比如治疗活性或生物活性蛋白。因

此,在可选的实施方案中,生物活性有效载荷分子包括大分子,比如蛋白质或酶。在一个优选的实施方案中,蛋白质包含酶或其片段。在另一实施方案中,蛋白质包含抗体或其抗原结合片段,优选单克隆抗体或其抗原结合片段,或抗体模拟物或适配子。在一个实施方案中,生物活性有效载荷分子包含Fab或vNAR。

[0096] 在另一优选的实施方案中,生物活性有效载荷分子包含与LFn连接的白喉毒素A(DTA),具有如下的在本文中以SEQ ID NO:15提供的氨基酸序列:

[0097] MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAGGHGDVGMHVKEKEKNKDENKRKDEERNKTQEEHLKEIMKHIVKIEV
KGEEAVKKEAAEKLLEKVPSDVLEMYKAIGGKIYIVDGDITKHISLEALSEDKKKIKDIYGKDALLHEHYVYAKEGY
EPVLVIQSSEDYVENTEKALNVYYEIGKILSRDILSKINQPYQKFLDVLNTIKNASDSDGQDLLFTNQLKEHPTDFS
VEFLEQNSNEVQEVFAKAFAYYIEPQHRDVLQLYAPEAFNYMDKFNEQEINLSAMGSSHHHHHHSSGLVPRGADDVV
DSSKSFVMENFSSYHGTKPGYVDSIQKGIQKPKSGTQGNYDDDWKGFYSTDNKYDAAGYSVDNENPLSGKAGGVVKV
TYPGLTKVLALKVDNAETIKKELGLSLTEPLMEQVGTEEFIKRFGDGASRVVLSLPFAEGSSSVEYINNWEQAKALS
VELEINFETRGKRGQDAMYEYMAQACAGNR

[0098] [SEQ ID No:15]

[0099] 因此,优选地生物活性有效载荷分子包含基本上如SEQ ID No:15所示的氨基酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:15所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

[0100] 在一个实施方案中,生物活性有效载荷分子由如下的在本文中以SEQ ID NO:16提供的核酸序列编码:

[0101] atgggcagcagccatcatcatcatcacagcagcggcctggtgccgcgcggcagccatatggcggg
cggtcatggtgatgtaggtatgcacgtaaaagagaaagagaaaaataaagatgagaataagagaaaagatgaagaa
cgaaataaaacacaggaagagcatttaaaggaaatcatgaaacacattgtaaaaatagaagtaaaaggggaggaag
ctgttaaaaaagaggcagcagaaaagctacttgagaaagtaccatctgatgttttagagatgtataaagcaattgg
aggaaagatatatattgtggatggtgatattacaaaacatatatctttagaagcattatctgaagataagaaaaaa
ataaaagacatttatgggaaagatgctttattacatgaacattatgtatatgcaaaagaaggatatgaacccgtac
ttgtaatccaatcttcggaagattatgtagaaaatactgaaaaggcactgaacgtttattatgaaataggtaagat
attatcaagggatattttaagtaaaattaatcaaccatatcagaaatttttagatgtattaaataccattaaaaat
gcatctgattcagatggacaagatcttttatttactaatcagcttaaggaacatcccacagacttttctgtagaat
tcttggaacaaaatagcaatgaggtacaagaagtatttgcgaaagcttttgcatattatatcgagccacagcatcg
tgatgttttacagctttatgcaccggaagcttttaattacatggataaatttaacgaacaagaaataaatctatcc
gccatgggcagctctcaccaccaccaccaccactcttccggcctggttccacgtggtgctgacgacgttgttgact
cttctaaatctttcgttatggaaaacttctcttcttaccacggtaccaaaccgggttacgtcgactctatccagaa
aggtatccagaagccgaaatctggtacccagggtaactacgacgacgactggaaaggtttctactctaccgacaac
aaatacgacgccgcgggttactctgttgacaacgaaaacccgctgtctggtaaagctggtggtgttgttaaagtta
cctacccgggtctgaccaaagttctggctctgaaagttgacaacgctgaaaccatcaaaaaagaactgggtctctc
tctgaccgaaccgctgatggaacaggttggtaccgaagaattcatcaaacgtttcggtgacggtgcttctcgtgtt
gttctgtctctgccgttcgctgagggctcttcttctgttgaatacatcaacaactgggaacaggctaaagctctgt
ctgttgaactggaaatcaacttcgaaacccgtggtaaacgtggccaggacgctatgtacgaatacatggctcaggc
ttgtgcaggtaaccgttaa

[0102] [SEQ ID No:16]

[0103] 因此,优选地生物活性有效载荷分子由包含基本上如SEQ ID No:16所示的核苷酸序列或其变体或片段的核酸编码。将DTA用作有效载荷特别适用于治疗诸如宫颈癌的癌症。

[0104] 发明人还发现脂质体可以装载诊断剂,比如染料和荧光分子,如德克萨斯红(实施例4)。因此,在另一个实施方案中,生物活性分子是诊断标记。作为诊断剂的生物活性分子可包含染料或荧光分子。作为诊断剂的生物活性分子可以包含蛋白质(如,GFP)或小分子(如,德克萨斯红)。

[0105] 在一些实施方案中,生物活性有效载荷分子或组分还可用在治疗诊断(即,组合的治疗和诊断应用)中。

[0106] 生物活性有效载荷分子可包含核苷酸,所述核苷酸可以是DNA或RNA。

[0107] 发明人已经发现脂质体(比如外泌体)可有效地装载反义寡核苷酸(ASO)。因此,在一个实施方案中,生物活性有效载荷分子包含ASO。

[0108] 在一个实施方案中,ASO可包含抗番茄红串联二聚体ASO序列,其在本文中以SEQ ID NO:17提供,如下所示:

[0109] ZZE OZE ZOO FOE ZFE ZFE ZFE GCA TGC CGG CAT CAG AGC AGC CGG CAT

[0110] [SEQ ID No:17]

[0111] 在另一实施方案中,ASO可包含抗番茄红串联二聚体ASO序列,其在本文中以SEQ ID NO:18提供,如下所示:

[0112] ZZE OZE ZOO FOE ZFE ZFE ZFE GCA TGC CGG CTG CTC TGA TGC CGG CAT

[0113] [SEQ ID No:18]

[0114] 因此,优选地ASO包含基本上如SEQ ID No:17或18所示的核酸序列或其变体或片段,或由基本上如SEQ ID No:17或18所示的核酸序列或其变体或片段组成。实施例10中的表格解释了上述硫代磷酸酯代码。

[0115] 发明人还发现脂质体(比如外泌体)可有效地装载RNA分子。因此,在一个实施方案中,生物活性有效载荷分子包含RNA。优选地,生物活性有效载荷分子包含mRNA、miRNA、指导RNA(用于基因组编辑的),或snRNA。最优选地,生物活性有效载荷分子包含siRNA。

[0116] 在另一实施方案中,生物活性有效载荷分子包含诸如质粒的DNA。

[0117] 如实施例3所证明的,发明人已经示出了如何使本发明的脂质体成功地携带基因编辑核酸酶(比如Cas9),以用在基因编辑方法中。如上所讨论的,发明人已证明可以将基因组编辑核酸酶(Cas9)封装在本发明的脂质体中,并因此可以将脂质体用在基因组编辑技术中。还证明(参见实施例4、5和6),可以在脂质体(如外泌体)内捕获或装载RNA类似物以及RNA结合蛋白(LFn-PKR)。因此,可以递送RNA或RNA类似物。这意味着已经证明了可在脂质体内捕获或装载Cas9和RNA二者。由于Cas9需要对靶序列特异性的指导RNA(gRNA),这两个方面对于Cas9的实用性都很重要。

[0118] 因此,根据第十方面,提供根据第二或第三方面的脂质体用在基因组编辑技术中。

[0119] 根据第十一方面,提供一种基因组编辑方法,所述方法包括使根据第二或第三方面的脂质体装载:(i)指导RNA,和/或(ii)核酸酶或编码核酸酶的基因构建体,并将装载的脂质体用在基因编辑疗法中。

[0120] 将理解的是,基因组编辑方法可以在体外、体内或间接体内进行。

[0121] 因此,在一个实施方案中,生物活性有效载荷分子包含基因组编辑工具,比如核酸

酶。在一个优选的实施方案中，生物活性有效载荷分子包含Cas9或Cpf1或TALEN或锌指核酸酶。因此，生物活性有效载荷分子可以用于患者细胞内的转录干扰或转录激活。

[0122] 在一个实施方案中，基因组编辑方法可包括使根据第二或第三方面的脂质体装载编码核酸酶(比如Cas9)的构建体。所述构建体可以是包含编码核酸酶的核酸序列的质粒或表达载体。在优选的实施方案中，质粒编码Cas9。

[0123] 根据另一实施方案，提供一种基因组编辑方法，该方法包含使根据第二或第三方面的脂质体装载指导RNA，指导RNA靶向待编辑的基因序列。

[0124] 在优选的实施方案中，生物活性分子包含Cas9并偶联至LFn，具有如下的在本文中以SEQ ID NO:14提供的氨基酸序列：

[0125] MGKPIPNPLLGLDSTMERNKTQEEHLKEIMKHIVKIEVKGEEAVKKEAAEKLLEKVPSDVLEMYKAIG
GKIYIVDGDITKHISLEALSEDKKKIKDIYGKDALLHEHYVYAKEGYEPVLVIQSSEDYVENTEKALNVYYEIGKI
LSRDILSKINQPYQKFLDVLNTIKNASDSDGQDLLFTNQLKEHPTDFSVEFLEQNSNEVQEVFAKAFAYYIEPQHR
DVLQLYAPEAFNYMDKFNEQEINLSLEVLFQGPMKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVEN
NEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVH
NVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSDYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQ
SFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDE
NEKLEYYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIIENAEL
LDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKL
VPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNR
QTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNNKVLV
KQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRY
ATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKLDKAKKV
MENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVN
NLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKK
IKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKK
ISNQAEFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYS
TDILGNLYEVKSKKHPQIIKKGYPYDVPDYAENLYFQGHHHHHH.

[0126] [SEQ ID No:14]

[0127] 因此，优选地生物活性分子包含基本上如SEQ ID No:14所示的氨基酸序列或其变体或片段，或由基本上如SEQ ID No:14所示的氨基酸序列或其变体或片段组成。

[0128] 应当理解，脂质体和包封在脂质体内的生物活性有效载荷分子可以用在药物中，所述药物可以用作单一疗法，以用于治疗、改善或预防疾病(如FMO5调节的肥胖、前列腺素D2调节的疾病(比如雄激素性脱发、粉刺、红斑痤疮、前列腺癌)、寨卡热、埃博拉病毒疾病、获得性免疫缺陷综合症、Stat3-响应性癌、P53-缺乏癌、病毒介导的宫颈癌、家族性高胆固醇血症、杜氏型肌营养不良症、脊髓性肌肉萎缩、克罗恩病和各种炎性疾病)，或用于使用核酸酶(Cas9)的基因组编辑。可选地，根据本发明的脂质体可以作为已知疗法的辅助或与其组合，以用于治疗、改善或预防疾病或疾病的症状。

[0129] 可以将根据本发明的脂质体组合在具有多种不同形式(特别是取决于组合物的使用方式)的组合物中。因此，例如，组合物可以是粉末、片剂、胶囊、液体、软膏剂、乳霜、凝胶、

水凝胶、气雾剂、喷雾剂、胶束溶液、透皮贴剂、脂质体悬浮剂或任何其他可以向有治疗需要的人或动物施用的合适形式。应当理解，根据本发明的药物的载体应该是被其所给予的受试者良好耐受的载体。

[0130] 还可以将根据本发明的脂质体引入缓释或延迟释放装置中。此类装置可以是，比如插入皮肤之上或之下并且药物可以在数小时、数天、数周甚至数月内释放。所述装置可以至少位于治疗部位附近。当需要用脂质体长期治疗并且通常需要频繁施用(如至少每天注射)时，此类装置可能是特别有利的。

[0131] 脂质体药物可通过注射入血流、神经或直接注射入需要治疗的部位而施用至受试者。注射可以是静脉内(团注或输注)或皮下(团注或输注)、皮内(团注或输注)、鞘内(团注或输注)或经由硬膜外或脊椎穿刺(团注或输注)注入脑脊液(CSF)。

[0132] 应当理解，所需的脂质体的量由封装于其中的生物活性有效载荷分子及其生物活性和生物利用度决定，这又取决于施用方式、脂质体的理化性质和包封于其中的生物活性有效载荷分子以及其是用作单一疗法还是联合疗法。施用频率受有效载荷分子的半衰期以及治疗的受试者中的靶分子(即蛋白)的半衰期的影响。施用的最佳剂量可以由本领域技术人员确定，并将随着使用的特定脂质体和特定的生物活性有效载荷分子、药物组合物的强度、施用方式以及待治疗的疾病或症状的进展而变化。取决于治疗的特定受试者的其他因素将导致需要调整剂量，包括受试者的年龄、体重、性别、饮食和施用时间。

[0133] 通常，取决于使用的脂质体和生物活性有效载荷分子，可以将根据本发明的有效载荷分子的0.001μg/kg体重至10mg/kg体重、或0.01μg/kg体重至1mg/kg体重的日剂量用于治疗、改善或预防某种疾病或某种疾病的症状。

[0134] 可以在待治疗的疾病或症状发作之前、之中或之后施用脂质体。日剂量可以单次施用(如单次日注射或吸入鼻喷剂)。或者，可能需要在一天内两次或更多次施用脂质体。

[0135] 作为实例，脂质体可以以0.07μg至700mg的每日两次的(或根据治疗的疾病的严重程度更多次的)剂量施用(即假设体重为70千克)。接受治疗的患者可以在醒来时服用第一剂量，然后在晚上(如果是两剂量方案)或此后3或4小时间隔服用第二剂量。或者，可以使用缓释装置向患者提供最佳剂量的根据本发明的脂质体，而无需施用重复剂量。

[0136] 可以将已知程序，比如制药工业常规使用的那些(如体内实验、临床试验等)用于形成根据本发明的脂质体的特定剂型、精确的治疗方案(比如试剂的日剂量和施用频率)、或包封在脂质体中的生物活性有效载荷分子的量。发明人相信他们是提出通过本文所述的方法装载脂质体的第一人。

[0137] 根据第十三方面，提供一种药物组合物，所述药物组合物包含根据第二或第三方面的脂质体和药学上可接受的载体。

[0138] 根据第十四方面，提供一种制备根据第十三方面的药物组合物的方法，所述方法包括使根据根据第二或第三方面的脂质体与药学上可接受的载体接触。

[0139] “受试者”可以是脊椎动物、哺乳动物或家畜。因此，可以将根据本发明的组合物和药物用于治疗任何哺乳动物，例如牲畜(如马)、宠物，或用于其他兽医应用。然而，最优选地，受试者是人。

[0140] 脂质体和包封在其中的生物活性有效载荷分子的“治疗有效量”为当将其施用于受试者时，治疗疾病或疾病的症状所需的前述量的任何量。

[0141] 例如,所使用的脂质体和包封在其中的生物活性有效载荷分子的治疗有效量可以为约0.01mg至约800mg,且优选地为约0.01mg至约500mg。优选地,脂质体和包封在其中的生物活性有效载荷分子的量为约0.1mg至约250mg,且最优选地为约0.1mg至约20mg。

[0142] 本文提及的"药学上可接受的载体"是本领域技术人员已知可用于配制药物组合物的任何已知的化合物或已知化合物的组合。

[0143] 在一个实施方案中,药学上可接受的载体可以是固体,且组合物可为散剂(powder)或片剂的形式。固体药学上可接受的载体可包括一种或多种物质,其也可用作调味剂、润滑剂、增溶剂、助悬剂、染料、填充剂、助流剂、压紧助剂、惰性粘合剂(inert binders)、甜味剂、防腐剂、染料、包衣剂或片剂崩解剂。载体还可以是包封材料。还可以通过使用合适的封装(如肠封装)将药学上可接受的载体配置为在体内(如在胃中、血液中或其他内部器官和结构中)控制释放。在散剂中,载体是与本发明的活性剂细末混合的固体细末。在片剂中,活性剂(如根据本发明的脂质体和包封在其中的生物活性有效载荷分子)可以合适比例与具有必需的压紧性质的载体混合,并按所需形状和大小压实。散剂和片剂优选含有高达99%的活性剂。合适的固体载体包含例如磷酸钙、硬脂酸镁、滑石粉、糖、乳糖、糊精、淀粉、明胶、纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、低熔点蜡和离子交换树脂。在另一个实施方案中,药用载体可以是凝胶,且组合物可为乳膏剂等的形式。

[0144] 然而,药用载体可以是液体,且药物组合物为溶液的形式。液体载体用于制备溶液剂、混悬剂、乳液、糖浆剂、酏剂和加压组合物。可将本发明的脂质体溶于或悬浮于药学上可接受的液体载体(比如水、有机溶剂、两者的混合物或药学上可接受的油或脂肪)中。液体载体可包含其它合适的药用添加剂,比如增溶剂、乳化剂、缓冲剂、防腐剂、甜味剂、调味剂、助悬剂、增稠剂、着色剂、粘度调节剂、稳定剂或渗透压调节剂。对于口服和胃肠外给药,液体载体的合适实例包括水(部分含有上述添加剂,如纤维素衍生物,优选羧甲基纤维素钠溶液)、醇(包括一元醇和多元醇,如乙二醇)及其衍生物和油(如分馏的椰子油和花生油)。对于胃肠外给药,载体还可为油性酯,比如油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯。无菌液体载体可用于胃肠外给药的无菌液体形式的组合物。用于加压组合物的液体载体可以是卤代烃或其它药学上可接受的喷射剂(propellant)。

[0145] 可以将为无菌溶液或悬浮液的液体药物组合物,通过例如肌内、鞘内、硬膜外、腹腔内、静脉和皮下注射来使用。可以将脂质体制备为无菌固体组合物,在施用时使用无菌水、盐水或其他适当的无菌可注射介质使所述无菌固体组合物溶解或悬浮。

[0146] 本发明的脂质体可以无菌溶液或混悬剂的形式口服施用,所述溶液或混悬剂含有其它溶质或助悬剂(例如足够的盐水或葡萄糖以使溶液等渗)、胆汁盐、阿拉伯胶、明胶、脱水山梨醇单油酸酯、聚山梨醇酯80(山梨糖醇及其脱水物的油酸酯与环氧乙烷共聚)等。还可以以液体或固体组合物形式口服施用根据本发明的脂质体。适于口服施用的组合物包括固体形式(比如丸剂、胶囊剂、颗粒剂、片剂和散剂)和液体形式(比如溶液剂、糖浆剂、酏剂和混悬剂)。可用于胃肠外施用的形式包括无菌溶液剂、乳液和混悬剂。可选地,脂质体可以如经由灌肠剂直肠施用。

[0147] 应当理解,本发明延伸到任何核酸或肽或其变体、衍生物或类似物,其基本上包含本文提及的序列中的任一个的氨基酸或核酸序列,包括其变体或片段。术语"基本上的氨基酸/核苷酸/肽序列"、"变体"和"片段"可以是与本文提及的序列中的任一个的氨基酸/核苷

酸/肽序列具有至少40％序列同一性(例如与识别为SEQ ID No:1至SEQ ID No:14的序列有40％同一性)的序列。

[0148] 还预期与本文提及的序列中的任一个具有大于65％、更优选地大于70％，甚至更优选地大于75％和仍更优选地大于80％的序列同一性的氨基酸/多核苷酸/多肽序列。优选地，氨基酸/多核苷酸/多肽序列与本文提及的序列中的任一个具有至少85％的同一性，更优选与本文提及的序列中的任一个具有至少90％的同一性，甚至更优选地至少92％的同一性，甚至更优选地至少95％的同一性，甚至更优选地至少97％的同一性，甚至更优选地至少98％的同一性，和最优选地至少99％的同一性。

[0149] 技术人员应了解如何计算2条氨基酸/多核苷酸/多肽序列之间的百分比同一性。为了计算2条氨基酸/多核苷酸/多肽序列的百分比同一性，首选必须准备2条序列的比对，然后计算序列同一性值。2条序列的百分比同一性可取不同的值，这取决于：(i)用来比对序列的方法，例如ClustalW、BLAST、FASTA、Smith-Waterman(在不同的程序中执行)，或3D比较的结构比对；和(ii)比对方法所用的参数，例如局部与全局比对，所用双序列评分矩阵(如BLOSUM62、PAM250、Gonnet等)和空位罚分，例如函数形式和常数。

[0150] 完成比对后，有许多不同的计算2条序列之间的百分比同一性的方法。例如，可将同一性的数值除以：(i)最短序列的长度；(ii)比对的长度；(iii)序列的平均长度；(iv)无空位位置的数目；或(v)不包括突出粘性末端(overhangs)的等同位置的数目。此外，应认识到，百分比同一性也是有很强的长度依赖性。因此，一对序列越短，可预期偶然发生的序列同一性越高。

[0151] 因此，应认识到，蛋白或DNA序列的精确比对是一个复杂的过程。流行的多个比对程序ClustalW(Thompson等，1994，Nucleic Acids Research，22，4673-4680；Thompson等，1997，Nucleic Acids Research，24，4876-4882)是用于产生本发明的蛋白质或DNA的多种比对的优选方法。ClustalW的合适参数可如下：对于DNA比对：空位开放罚分＝15.0，空位延伸罚分＝6.66，且矩阵＝单位矩阵。对于蛋白质比对：空位开放罚分＝10.0，空位延伸罚分＝0.2，且矩阵＝Gonnet矩阵。对于DNA和蛋白质比对：ENDGAP＝-1，GAPDIST＝4。本领域技术人员将意识到，可能需要改变这些和其他参数以获得最佳的序列比对。

[0152] 优选地，然后可从所述比对将2条氨基酸/多核苷酸/多肽序列之间的百分比同一性计算为(N/T)*100，其中N是序列共有相同残基的位置的数目，T为所比较位置的总数，包括空位且包括或不包括突出粘性末端。优选地，计算中包括突出粘性末端。因此，计算2条序列之间的百分比同一性的最优选的方法包括(i)使用采用了一组合适的参数(例如上文列出的参数)的ClustalW程序准备序列比对；和(ii)将N和T值代入下式：-序列同一性＝(N/T)*100。

[0153] 用于识别类似序列的可选方法为本领域技术人员所知。例如，基本相似的核苷酸序列将由在严格条件下与DNA序列或其互补序列杂交的序列编码。提及严格条件，发明人意指核苷酸在3x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中在约45℃同与滤膜结合的DNA或RNA杂交，随后在0.2x SSC/0.1％SDS中在约20-65℃下洗涤至少一次。或者，基本相似的多肽可与例如SEQ ID No:1至SEQ ID No:14所示的序列相比至少1个，但小于5、10、20、50或100个氨基酸不同。

[0154] 由于遗传代码的简并性，显然可变动或改变本文所述任何核酸序列而不实质性地影响由其编码的蛋白质的序列以提供其功能变体。合适的核苷酸变体是具有通过替换对序

列内同一氨基酸进行编码的不同密码子而改变的序列，并因此产生沉默变化(同义变化)的那些。其它合适的变体是具有同源核苷酸序列但包含通过替换对与其替换的氨基酸具有相似生物生理性质的侧链的氨基酸进行编码的不同密码子以产生保守变化而改变的全部或部分序列的那些。例如，小的非极性疏水氨基酸包括甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸和甲硫氨酸。大的非极性疏水氨基酸包括苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。极性中性氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电荷的(碱性)氨基酸包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸。带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。因此应理解，氨基酸可被具有相似生物物理性质的氨基酸替换，并且技术人员了解编码这些氨基酸的核苷酸序列。

[0155] 本文(包括任何随附权利要求、摘要和附图)所述所有特征和/或所公开的任何方法或过程的所有步骤，可以与上述任意方面以任意组合来进行组合，除了其中至少一些这样的特征和/或步骤是互斥的组合之外。

附图说明

[0156] 为了更好理解本发明和为了显示其实施方案可以如何实施，现在借助实施例提及所附的附图，其中：

[0157] 图1为来自光学显微镜(经由Airyscan检测器的LSM880，(Carl Zeiss Ltd))的图像，其显示了德克萨斯红标记的货物(即，德克萨斯红标记的LFn-PKR)在用α-CD63染色(3h追踪)的HeLa细胞内的管腔内结构的定位。小图示出了德克萨斯红标记的LFn-PKR(中)；α-CD63(右)；和合并的图像(左)；

[0158] 图2为从用(Cy5)细胞膜(cell mask)染色的HeLa细胞中分离的脂质体/外泌体的图像；

[0159] 图3为来自光学显微镜的图像，其显示了使用两种不同放大倍数的来自暴露于PA83和德克萨斯红标记的LFn-SaCas9的HeLa细胞的外泌体制备物；

[0160] 图4为显示了来自暴露于PA83和德克萨斯红标记的LFn-PKR(小图A)或PA83和德克萨斯红标记的BSA(小图B，对照)3小时后的HeLa细胞的外泌体制备物的结果的图像；

[0161] 图5为TCA沉淀由PA83以及德克萨斯红标记的LFn-SaCas9、德克萨斯红标记的LFn-PKR或德克萨斯红标记的BSA制备的脂质体/外泌体的结果；

[0162] 图6为在用对照脂质体/外泌体处理的细胞和在用装载了靶向β-半乳糖苷酶翻译的siRNA的脂质体/外泌体处理的细胞中β-半乳糖苷酶的生物活性；

[0163] 图7为显示了本发明脂质体(即外泌体)的细胞生产的示意图；

[0164] 图8示出了在用HeLa细胞温育之前，在37℃下用过量的胰蛋白酶温育60min(n＝3±SEM)之后，装载了LFn-白喉毒素A链(DTA)的外泌体的活性。在两种情况下，细胞活力均约为未处理对照的55％；

[0165] 图9示出了装载了野生型PA83、LFnPKR和抗-TdTom反义寡核苷酸(ASO)的HelA外泌体和细胞外囊泡级分的光子相关光谱分析；

[0166] 图10示出了装载了强制的(forced)八聚物PA83突变体、LFnPKR和抗-TdTom反义寡核苷酸(ASO)的HelA外泌体和细胞外囊泡级分的光子相关光谱分析；

[0167] 图11示出了外泌体处理48小时后HEK293细胞的标准化β-半乳糖苷酶表达；和

[0168] 图12示出了用装载了α-GFP siRNA并用ExoEasy试剂盒分离的HeLa外泌体转染HEK293细胞后的β-半乳糖苷酶的活性。随时间的用PA:LF nPKR::50nM si RNA处理喂养细胞。

具体实施方式

[0169] 发明人开发了一种生产脂质体(如外泌体)的新方法和一种包含这些脂质体的新的细胞递送系统以用于将有生物和治疗活性的有效载荷分子,比如小分子、反义寡核苷酸(ASO)、RNA分子(如siRNA)、生物活性蛋白、基因组编辑工具(如Cas9)和药物隐蔽地递送至细胞从而用于治疗多种疾病。

[0170] 参照图7,其示出了概述了生产本发明的脂质体的四个阶段(解释如下)的示意图:

[0171] 1、使成孔蛋白(例如PA83)在细胞膜中寡聚,从而形成一个孔,且任选地附接于生物活性的有效载荷分子(如siRNA或Cas9或ASO等)的穿梭蛋白(如LFn或PKR)与成孔蛋白相互作用,并通过内吞作用被内化到细胞中,从而形成内吞囊泡。

[0172] 2、运输所需的胞内体分选复合物(ESCRT)机器将内吞囊泡转运到内吞囊泡形成管腔内囊泡(ILV)的多泡体(MVB)中,所述内吞囊泡装载了成孔蛋白和可选地附接于生物活性有效载荷分子的穿梭蛋白。

[0173] 3、在凋亡相关基因2-相互作用蛋白X(ALIX)依赖性过程中,MVB内的ILV与MVB的限制膜之间的反向融合事件破坏了内膜系统(这通常会导致与溶酶体融合和ILV的破坏),从而进入细胞溶质。

[0174] 4、然后使包含装载了成孔蛋白和穿梭蛋白(该穿梭蛋白任选地附接于生物活性有效载荷分子)的ILV的MVB从含有成孔蛋白和穿梭蛋白(该穿梭蛋白任选地附接于生物活性有效载荷分子)的脂质体/外泌体中释放出来。

[0175] 材料和方法

[0176] 常规化学品、荧光探针和试剂

[0177] 除非另有说明,否则常规实验室试剂均来自Sigma Aldrich(Dorset,UK)。德克萨斯红-N-羟基琥珀酰亚胺酯(TxR-SE)来自Invitrogen(Paisley,UK)。杜尔贝科最低基本培养基(Dulbecco's Minimal Essential Medium)、Eagles最低基本培养基(Eagles-Minimal Essential Medium)、非必需氨基酸、青霉素、链霉素和谷氨酰胺溶液均来自Gibco(ThermoFisher Scientific,Paisley UK),杀稻瘟菌素溶液(Blasticidin solution)来自Invitrogen(Paisley UK)且离子霉素来自Sigma Aldrich(Dorset UK)。小鼠单克隆抗-CD63来自AbCam且单克隆抗-Lamp2来自DHSB(Iowa大学,IA,USA)。Alexaflour 488-标记的山羊抗-小鼠抗体来自Invitrogen(Paisley UK)。山羊抗-德克萨斯红单克隆抗体和HRP-缀合的驴抗-山羊抗体来自Vector Labs。exoEasy Maxi试剂盒(20)(Cat No:76064)来自QIAgen,且总外泌体提取试剂(Total exosome Isolation reagent,来自细胞培养基)(Cat No:4478359)(PEG溶液)来自Invitrogen(Paisley UK)。Stealth RNAi™ siRNA GFP报告基因对照(Cat No:12935145)来自Invitrogen(Paisley UK),并以20μM的溶液提供。

[0178] 不含外泌体的培养基

[0179] 使FCS中的牛脂质体/外泌体在4℃下以180000x g沉淀18小时。收集上清液并加入至无血清但完全的培养基(MEM)中,并在负压下进行过滤灭菌(0.2μm过滤器,Sartorus)。

[0180] 细胞培养

[0181] 按照供应商的说明进行HeLa(ATCC:CCL2)和HEK293(AMSBIO:SC008)细胞的培养和传代。将用于显微镜的细胞以1x10^5个细胞/孔的密度接种到无菌盖玻片上。按照先前所述进行固定、抗体杂交和检测[2]。将CD63免疫染色的细胞固定在冷甲醇中。

[0182] 蛋白质生产、分离和富集

[0183] 先前已经描述了编码蛋白PA83的DNA序列(基于GenBank登录号AAF86457和AAT98414)[2]。采用GenBank登录号AAY15237(对于LFn)和NM_002759(对于PKR)通过BioBasic Inc.(Ontario,Canada)合成LFn-PKR。如先前[2]和PCT/GB2014/051918中所述,将编码LFn-PKR的开放阅读框亚克隆至细菌表达盒pET151/D(Invitrogen,Paisley,UK)中。采用pET151细菌表达系统作为亲本质粒,通过Invitrogen合成编码LFn-金黄色葡萄球菌(Sa)Cas9和GST-PA63的质粒。使用的GST序列来自pGEX3x,且SaCAS9序列从Genbank登录号CCK74173.1进行密码子优化(即SEQ ID No:14)。V5表位标签和6x组氨酸亲和标签的添加使得可以从细菌裂解物中进行蛋白质的免疫检测和亲和纯化。

[0184] 从大肠杆菌培养物中富集了LFn-PKR和PA83,收率为约2mg/L(LFn-SaCas9为约0.5mg/L)。使用被10ng质粒转化的化学组分大肠杆菌BL21*DE3pLys(Invitrogen,Paisley,UK),将其在含有200μg/mL氨苄青霉素(Sigma,Dorset,UK)的2xYT中培养过夜,然后在37℃和200rpm下于1000mL 2xYT中生长3小时。随后,加入异丙硫基-β-半乳糖苷(IPTG)(Sigma,Dorset,UK)至终浓度为1mM,进一步温育3小时。采用设置为15000psi的French Press(Thermo Scientific,Paisley,UK)将通过离心(6000xg,在4℃下达6min)制备的细菌球团(pellet)进行裂解。清除裂解物(20 000xg,在4℃下达20min),并使上清液通过6x组氨酸亲和色谱柱(Talon® resin;Clontech,Saint-Germain-en-Laye,France)。使用150mM PBS中的咪唑(Sigma,Dorset,UK),以1mL的级分洗脱含有6xHis的蛋白质。将蛋白质级分进行纯度和浓度分析、合并、用PBS透析至完全耗尽,最后过滤灭菌(0.2μm过滤器,Sartorus)。通过SDS-PAGE评估最终的蛋白质制备物,并使其经受考马斯染色(以确定纯度)和采用所述抗体的蛋白质印迹分析。

[0185] 探针的合成与表征

[0186] 使用先前描述的方法[14]制备LFn-PKR-TxR和LFn-SaCas9-TxR。简言之,将TxR-SE(5mg)溶于DMSO(5mL)中。向2.5mL PBS中,加入100μL TxR溶液至约5mg重组蛋白中,并在25℃下于黑暗中放置1小时。使用PD-10柱(GE Healthcare,Chalfont St Giles,UK)和PBS作为洗脱液以收集0.5mL级分,从而纯化产物。然后选择光学密度最高的级分并合并,从而得到LFn-PKR-TxR或LFn-SaCas9-TxR缀合物。然后将荧光缀合物过滤灭菌(0.2μm过滤器,Sartorus),并于-80℃下冷冻。

[0187] 用于外泌体装载的细胞培养

[0188] 将细胞接种到175cm^2的经TC处理的培养皿中,并在标准温育条件下(即在37℃下,5%(v/v)CO_2中)放置以生长。在90%汇合时,在外泌体装载之前,将细胞单层在PBS中洗涤3次。

[0189] 用LFn-PKR-TxR或LFn-SaCas9-TxR装载脂质体/外泌体

[0190] 在37℃下于3mL无血清DMEM中用PA83(50μg/mL)和LFn-PKR-TxR(50μg/mL)或LFn-SaCas9-TxR(50μg/mL)温育细胞1h。1h后,加入5mL不含外泌体的具有10%(v/v)FCS的DMEM

至终体积为8mL,将板放置在37℃下温育3h。

[0191] 用LFn-PKR::siRNA装载脂质体/外泌体

[0192] 在无血清DMEM中将LFn-PKR(50μg/mL)放置以用GFP siRNA(50nM)温育5分钟,然后加入PA83(50μg/mL)。然后将混合物加到细胞单层中,并将细胞在37℃下温育1h。1h后,加入5mL不含外泌体的具有10%(v/v)FCS的DMEM至终体积为8mL,将板放置在37℃下温育3h。

[0193] 脂质体/外泌体分离

[0194] 将离子霉素(50μM)加入培养基中,并在标准条件下放置以温育30分钟。然后收集培养基,并在4℃下以1500x g离心2分钟后使细胞碎片沉淀。将所得的上清液过滤除菌(0.8μm,Sartorous),然后冷冻或外泌体分离。使用以下三种方法之一进行外泌体分离:

[0195] 1、差速离心

[0196] 该方法由[15]修改而来。简言之,将冷冻的过滤后的条件培养基在冰上解冻,并经受10000x g达30min从而使EV沉淀。然后在4℃下使上清液经受110000x g达70min,并将球团收集在1mL PBS中。然后将重新悬浮的球团在4℃下以100000x g经受第二轮沉淀达70min。然后将得到的球团悬浮在1000μL不含外泌体的培养基中,通过0.2μm过滤器(Sartorus)过滤,并在-20℃下冷冻保存直至需要。

[0197] 2、通过聚乙二醇沉淀分离

[0198] 简言之,估算清除的和过滤的细胞培养基的体积,并向其中加入0.5体积的分离试剂。将该制备物在4℃下放置过夜。然后将混合物在4℃下以10000x g离心1h。然后将得到的球团悬浮在终体积为1000μL的不含外泌体的培养基中,并在-20℃下冷冻保存直至需要。

[0199] 3、通过膜吸附分离

[0200] 该方法采用QIAgen exoEasy试剂盒根据制造商的说明书进行。简言之,将8mL XPB缓冲液与细胞培养试剂混合,分离后,添加另外的步骤以便从外泌体制备物中移除洗脱(XE)缓冲液。这是通过在4℃下以110 000x g离心洗脱液70min来实现。然后将得到的球团悬浮在1000μL不含外泌体的培养基中,并在-20℃下冷冻保存直至需要。

[0201] 蛋白质定量

[0202] 根据二辛可宁酸试剂盒(BCA-1)(Sigma Aldrich,Dorset UK)的说明书进行了二辛可宁酸测定(BCA)试验,以确定储存前的最终外泌体样品的蛋白质浓度。此外,根据制造商推荐的方案,使用μlite(BioDrop Inc.)设备分别在OD_{260}和OD_{280}下测定了DNA和蛋白质的浓度。

[0203] 显微镜检查

[0204] 通过将等体积的外泌体制备物与等体积的其中引入Cy5荧光团(Cat.No.C10046;Invitrogen,Paisley,UK)的细胞膜(cell mask)试剂混合来进行脂质体/外泌体的显微镜可视化。这允许采用装有Airyscan单元的LSM880激光扫描共聚焦显微镜(Carl Zeiss Ltd,Germany)在荧光下对脂质体/外泌体成像。Airyscan单元的超分辨率能力使脂质体/外泌体的分辨成为可能。对于装载了德克萨斯红标记的蛋白的脂质体/外泌体,采用LSM880的Airyscan单元(Carl Zeiss Ltd,Germany)的超分辨率能力使得脂质体/外泌体直接可视化。在这两种情况下,均使用Plan-Apochromat63x/1.40数值孔径Oil DIC f/ELYRA物镜。如前所述,对在盖玻片上生长的多聚甲醛固定的或冷(20℃)甲醇固定的细胞进行免疫染色。

[0205] 分析siRNA活性

[0206] 为了评估siRNA的递送，购买了对GFP特异性的对照siRNA。它针对在HEK293(SC008)细胞中表达的稳定表达的转基因，并用作报告基因活性的标准。分光光度法在620nm处检测到HEK293细胞过表达在框内GFP与β-半乳糖苷酶(一种负责将x-gal从无色前体水解为不溶的蓝色化合物的酶)融合的GFP。因此，有可能通过测量β-半乳糖苷酶介导的X-gal转化来监测GFP siRNA活性。最后，在将β-半乳糖苷酶活性标准化(OD620)为蛋白质浓度后，将其表示为未处理对照的百分比。

[0207] 用于基因调控测定的细胞培养

[0208] 使用6孔板评估活性。将细胞以$5x10^5$个细胞/孔(HEK293，AMSBIO)接种，然后在37℃下于5％(v/v)CO_2中放置以温育24h，然后进行处理。

[0209] 脂质体/外泌体给药

[0210] 将细胞用200μL外泌体制备物处理，并在2mL完全培养基中稀释。在与细胞温育所需时间(24h、48h、72h)之前，将该制备物过滤灭菌(0.2μm过滤器，Sartorus)。

[0211] 测定基因调控

[0212] 弃去培养基，并在冷却的PBS中将细胞单层小心洗涤3次，然后向每个孔中加入500μL RIPA缓冲液(RO278-50ML，Sigma Aldrich)。在冰上经15min温育时间段后，自每个孔中抽取细胞裂解物10次，然后移入标记的Eppendorf中。在4℃下以21000x g离心10min后，将上清液转移至新的Eppendorf中，弃去球团。然后，将10μL裂解物添加到96孔板中的100μL 2％BCA试剂中，并在37℃下温育。将剩余的400μL上清液与12μl X-gal(在DMSO中的50mM)(RO404，ThermoFisher)混合，并以100μL/孔转移到96孔板中。采用设置为37℃的分光光度计，在620nm下随时间测定X-Gal转化率(5小时内每15分钟获取一次读数)。

[0213] 蛋白质印记和TCA沉淀

[0214] 采用mini-tetracell设备(BioRad)按照制造商的说明进行蛋白质印迹和免疫检测。对于蛋白质分离，使用10％(w/v)丙烯酰胺凝胶，并在200V下运行60min。在400mM下转移到硝酸纤维素膜上进行60min。采用在含有0.1％(v/v)吐温20试剂的PBS中的5％(w/v)脱脂奶粉溶液进行45min封闭。采用制造商建议的抗体稀释度，在震荡条件下，在37℃下于3mL中进行抗体杂交60min。使用增强的ECL试剂(Pierce，ThermoFisher Scientific)按照制造商的说明进行HRP标记的二抗的检测。通过运行多种预染的蛋白质标记物(Invitrogen)来校准凝胶和印迹。通过向外泌体制备物中添加0.6体积的TCA来进行外泌体蛋白的TCA沉淀。然后将其在4℃下温育30min。然后将制备物在4℃下以21000x g沉淀10min，并同样在4℃下将球团在丙酮中洗涤两次。将得到的球团溶解在Laemmli缓冲液中，进行蛋白质免疫印迹，并在非还原条件下用抗-LAMP2特异性一抗(DHSB，Iowa大学，IA，USA)探测；或用采用制造商建议的稀释度的德克萨斯红特异性一抗(Vector labs)探测。

[0215] 实施例1-细胞摄取脂质体

[0216] 如图1所示，德克萨斯红-标记的货物(即德克萨斯红标记的LFn-PKR)位于HeLa细胞内的管腔内结构。由于这些管腔内结构对于外泌体免疫标记CD63(也称为LAMP3)呈阳性，因此这种管腔内信号可能在多囊泡核内体(即晚期核内体)内。这表明，当添加到具有PA83的细胞中时德克萨斯红标记的LFn-PKR能够在添加到细胞3h后优先标记MVE/MVB内的管腔内膜。

[0217] 实施例2-脂质体与生理外泌体大小相似

[0218] 图2示出了发明人的发现,这些发现证明从Hela条件培养基分离的、用Cy5-细胞膜(Cell Mask)染色、并使用Airyscan检测器可视化的脂质体/外泌体约为外泌体的合适大小(60-120nm)。应该注意的是,在x-y平面上,该系统的分辨率的限制为120nM。还使从exoEasy试剂盒中分离的脂质体/外泌体经受了采用LAMP2作为探针的免疫印迹分析,并且如所预料的,在外泌体制备物中在大约合适的分子量处可见条带。这意味着使用exoEasy试剂盒分离的脂质体/外泌体不仅大小大致正确,而且如预期的那样,还包含特征明确的外泌体免疫标记物。

[0219] 实施例3-可以使脂质体装载Cas9

[0220] 使脂质体/外泌体有效装载金黄色葡萄球菌Cas9(即SaCAS9)。在图3中,在来自暴露于PA83和德克萨斯红标记的LFn-SaCAS9的Hela细胞的外泌体制备物中,可以清楚地看到来自LFn-SaCAS9的红色信号。即使当与细胞膜(cell mask)一起温育以检查聚焦平面时,对照脂质体/外泌体Rwith:无PA83、无货物或非易位货物(BSA-德克萨斯红)也不会产生任何红色信号(图3B)。

[0221] 实施例4-可以使脂质体装载小分子

[0222] 已经进一步证明可以使脂质体/外泌体有效装载小分子。在图4中,来自暴露于PA83和德克萨斯红标记的LFn-PKR或PA83达3小时后的Hela细胞的外泌体制备物摄取了小分子(德克萨斯红)。将德克萨斯红标记的BSA用作阴性对照。在此,可以很容易地在脂质体/外泌体的细胞膜(cell mask)阳性群中检测到德克萨斯红标记的LFn-PKR,而不能检测到德克萨斯红标记的BSA。

[0223] 实施例5-装载的蛋白存在于分离的脂质体中

[0224] 图5示出了TCA沉淀由PA83以及德克萨斯红标记的LFn-SaCAS9、德克萨斯红标记的LFn-PKR或德克萨斯红标记的BSA制备的脂质体/外泌体的结果。从PA83德克萨斯红标记的LFn-SaCAS9和PA83德克萨斯红标记的LFn-PKR制备物中,球团中清晰可见德克萨斯红。对于“未处理的”或PA83和BSA-德克萨斯红“处理的”对照,很难检测到德克萨斯红。类似地,在采用德克萨斯红特异性一抗的免疫印迹和检测后,在来自与之前相同的TCA沉淀物中检测到标记预测分子量的蛋白的德克萨斯红。

[0225] 实施例6-装载siRNA的脂质体在下调蛋白中有效

[0226] 图6示出了采用exoEasy试剂盒和差速离心自细胞培养基中分离的脂质体/外泌体的生物活性。在此,记载的每单位细胞蛋白的β-半乳糖苷酶活性的降低证明了:1)发明人能够将siRNA装载到脂质体/外泌体中,和2)装载siRNA的脂质体/外泌体的生物学活性,即他们能够将siRNA递送至第二细胞群的细胞溶质中。

[0227] 实施例7-寨卡病毒感染的治疗

[0228] 作为理论实施例,将通过第一方面的方法生产的脂质体用于治疗感染寨卡病毒的患者。首先,对患者进行活检,并分离出一些患者的细胞。然后使用第一方面的方法从细胞产生脂质体,并使脂质体装载抗-寨卡病毒siRNA。然后将含有抗-寨卡病毒siRNA的脂质体施用于患者,并经由内吞作用被患者的细胞摄取。因此,抗-寨卡病毒siRNA存在于患者的细胞中,并且寨卡病毒在患者体内繁殖的能力受到抑制。

[0229] 实施例8-肥胖的治疗

[0230] 作为另一个理论实施例,将通过第一方面的方法生产的脂质体用于治疗患有

FMO5-调节的肥胖的患者。在该实施例中，然后使用第一方面的方法从培养的间充质干细胞衍生脂质体，并使脂质体装载抗-FMO5 siRNA。然后将含有抗-FMO5 siRNA的脂质体施用于患者，并通过内吞作用被患者的细胞摄取。因此，抗-FMO5 siRNA存在于患者的细胞中，并且FMO5酶被下调，且患者不再表现出与肥胖相关的症状。

[0231] 讨论

[0232] 采用PA83::LFn融合物发明人向脂质体/外泌体中装载的材料包括：低分子量共价缀合物(即德克萨斯红)、LFn-PKR::siRNA、LFn-PKR缀合-德克萨斯红、LFn-Gal4::eGFP-Rab5和LFn-SaCAS9缀合-德克萨斯红。因此，此处提供的数据支持了新的想法，即LFn融合蛋白可以将选择性货物(而非仅仅LF或EF)递送至称为外泌体的生物衍生的隐蔽递送系统。在此，首次公开了一种可以实现外泌体装载而不引起货物过表达或外泌体破坏的方法，并讨论了支持该结论的证据。

[0233] 图1表明，在PA83存在下，德克萨斯红标记的LFn-PKR可以与CD63阳性、界定了膜的结构内的管腔内囊泡结合。这些数据支持以下假设：LFn-PKR使用与野生型LF类似的细胞溶质易位途径[3]。图2通过显微镜(测量囊泡大小)和分离的脂质体/外泌体群中外泌体标记物LAMP2的免疫印迹检测验证了采用QIAgen exoEasy试剂盒分离了脂质体/外泌体。数据表明确实分离了脂质体/外泌体。图3提供了分离的脂质体/外泌体包含被荧光团德克萨斯红标记的货物蛋白的证据。在这种情况下，货物蛋白是之前报道的不太可能作为PA易位酶底物的LFn-SaCAS9。在此，已经在分离的脂质体/外泌体群中记录了LFn-SaCas9。图4(小图a)重复了这种方法表明了重现性，仅这次使用了不同的货物蛋白：德克萨斯红-标记的LFn-PKR。这进一步证明该系统将与PA孔底物(如LFn融合蛋白)共价缀合的选定小分子移入脂质体/外泌体群体的能力。图4(小图B)作为阴性对照，表明：1)BSA标记的德克萨斯红不作为PA易位酶底物，2)所记录的信号对德克萨斯红是特异性的，而不是由于Cy5细胞膜(cell mask)通道流出的自发荧光。

[0234] 图5证明了使用三氯乙酸(TCA)可以使来自分离的脂质体/外泌体的德克萨斯红信号沉淀(即附接于蛋白质)，并且在蛋白质印记分析后，其具有预测的分子量。这表明该蛋白是完整的，并在PA孔易位后仍与德克萨斯红荧光团结合。图6证明了可以将PA和LFn-PKR用于使脂质体/外泌体装载siRNA并证明了可以通过exoEasy试剂盒或通过差速离心来分离这些脂质体/外泌体。还表明，脂质体/外泌体是有活性的，具有受体细胞(recipient cell)融合能力，并且能够递送药理活性的siRNA。这是这样概念的证明，即，所描述的外泌体装载方法可用于将货物装载并递送至脂质体/外泌体中，并且将脂质体/外泌体分离并用于将生物活性货物从一个细胞群转移到另一细胞群。这将支持这样的想法，即该方法可用于将药物装载到由间接体内生长的患者细胞衍生的外泌体中，以促进三阶靶向和个性化的精密药物(如siRNA、基因编辑蛋白和gRNA、shRNA、miRNA、基因和治疗性蛋白质)的隐蔽递送。

[0235] 在优化向脂质体/外泌体中装载材料的尝试中，还研究了PA63(以PA63-TEV识别位点-GST生产)、PA83、PA83 $D^{512}K$、PA83 G至N和PA83N至S[16]装载脂质体/外泌体的能力。最后，将引入了溶血素的跨膜结构域[17]以取代PA63跨膜结构域的PA83杂合分子编码至细菌表达盒(pET151)中，并被构建以研究就货物孔隙运输过程中与布朗棘轮效应(Brownian ratchetting)现象[6]相关的速率限制而言的PA83跨膜装配的运转(roll)。

[0236] 实施例9

[0237] 除了所使用的质粒之外，即质粒来自Addgene(pET-15b LFn-DTA,Addgene编号11075)(https://www.addgene.org/11075/)，如上所述，本发明人采用PA83使外泌体装载条件致命货物LFn-白喉毒素A链(DTA)。

[0238] 装载外泌体

[0239] 通过在37℃下于含5％(v/v)CO_2的湿润气氛中用浓度为10μg/ml的HeLa细胞和50μg/ml的SEQ ID No.2(PA83)温育LFnDTA-SEQ ID No:15(蛋白)和SEQ ID No:16(DNA)4小时来装载外泌体。此后，将细胞用PBS洗涤，并在无血清培养基中用5μM离子霉素(Sigma chemical company目录号I9657-1MG)温育。然后，如先前所述，使用差速离心从现在的条件培养基中分离外泌体。

[0240] 胰蛋白酶消化

[0241] 对于一半的外泌体制备物，将5μl细胞培养胰蛋白酶/EDTA(TE)缓冲液(ThermoFisher Scientific目录号25200056)加入到外泌体中，并用PBS将体积调节至100μl。对于另一半制备物，加入PBS至100μl。然后将外泌体制备物在已经证明足以消化5μg LFnDTA(其大大超过了外泌体制备物中所包含的LFnDTA的量)的条件下温育60min。然后将外泌体添加到具有胰蛋白酶对照(发现无毒)的HeLa细胞培养物中，并在24小时后测定细胞活力。结果表示为标准化为未处理对照(含有LFnDTA的外泌体杀死了约45％的细胞)的DTA活性(％)。

[0242] 结果

[0243] 参照图8，随后对最初使用PA83(即SEQ ID No:2)装载货物(即LFn-白喉毒素A链(DTA)-SEQ ID No:15和16)的外泌体进行表征，表明这些外泌体受保护而不受外部酶(即胰蛋白酶)活性的影响。这些数据表明，可以成功地使外泌体装载LFnDTA，其可用于治疗比如宫颈癌的癌症。

[0244] 实施例10

[0245] 在该实施例中，发明人使用动态光散射AKA光子相关光谱法来表征采用差速离心分离的外泌体和细胞外囊泡(EV)的大小。

[0246] 装载外泌体

[0247] 使来自HeLa细胞的外泌体装载对浓度为200pMol/ml(总ASO)-SEQ ID No:17和18的番茄红串联二聚体特异性的预杂交的硫代磷酸酯-磷酸二酯杂合反义寡核苷酸(ASO)。下表解释了硫代磷酸酯代码(来自Thermofisher网站)。

[0248]

硫代磷酸酯	参见如下	硫被用来替代核苷酸之间的磷酸二酯键中的一个氧。该连接位于指定碱基的3'侧。
A-硫代磷酸酯	F	

[0249]

C-硫代磷酸酯	O	
G-硫代磷酸酯	E	
T-硫代磷酸酯	Z	

[0250] 采用550μg/ml LFnPKR和50μg/ml SEQ ID No:2,(PA83)或50μg/ml PA强制的

(forced)八聚物突变体将这些ASO装载至外泌体中。在37℃下于含5％(v/v)CO_2的湿润气氛中用HeLa细胞在无血清培养基中温育该混合物4小时。移除培养基，并用PBS洗涤细胞，然后在无血清培养基中将细胞用5μM离子霉素温育30min。

[0251] 外泌体分离

[0252] 首先通过以1.5k x g离心2min来清除条件培养基，然后通过0.8微米的过滤器过滤。在4℃下使液流经受10 000x g离心达30min。最后通过在4℃下以110 000x g沉淀70min，重新悬浮在PBS中然后在4℃下以110 000x g再沉淀70min来分离外泌体。将外泌体储存在4℃下以待之后使用。当用于细胞培养时，将外泌体稀释在所需量的无血清培养基中，并在用细胞温育之前再次通过0.8μ过滤器过滤。

[0253] 结果

[0254] 参照图9，当采用50μg/ml PA83(SEQ ID No:2)和50μg/ml LFnPKR(SEQ ID No:13)装载200pMol/ml抗-番茄红串联二聚体(TdTom)反义寡核苷酸(ASO)时，外泌体显示具有预测的大小。

[0255] 参照图10，当用强制的八聚物PA83突变体，即25μg/ml PA83$D^{512}K$(SEQ ID No:7)和25μg/ml PA83 K245G;R252N(SEQ ID No:8)以及50μg/ml LFnPKR(SEQ ID No:13)装载200pMol/ml anti-TdTom ASO时，外泌体也显示具有预测的大小。这些数据证明，产生的膜级分具有外泌体和EV的预测的大小。

[0256] 实施例11

[0257] 发明人测试了装载了活性ASO的外泌体是否保留了其药理活性。

[0258] 装载外泌体

[0259] 通过用200pMol/ml抗-TdTom ASO(SEQ ID No:17和18)和50μg/ml七聚物(PA83-SEQ ID No:2)，或强制的八聚物PA83突变体(即25μg/ml-SEQ ID No:7,(PA83 $D^{512}K$)和25μg/ml SEQ ID No:8,(PA83 $K^{245}G;R^{252}N$))和50μg/ml SEQ ID No:13(LFnPKR)温育HeLa细胞来装载外泌体。分离后，这些装载了ASO的外泌体对编码GFP融合β-半乳糖苷酶且双顺反地表达在HEK293细胞(来自ASMBIO，目录号SC008)中过表达的番茄红串联二聚体的mRNA靶标表现出反义活性。

[0260] HEK细胞(～$1x10^6$每孔)用如下处理：57μg[在OD_{280}下测量的总蛋白]的七聚物::ASO外泌体制备物或42μg[在OD_{280}下测量的总蛋白]的八聚物::ASO。

[0261] 结果

[0262] 参照图11，装载了ASO的外泌体显示具有药理活性。这些数据证明，可以将该方法用于将ASO装载到外泌体中，并且这些外泌体：(i)具有融合能力；(ii)含有ASO；(iii)ASO是有活性的；(iv)外泌体可用于递送ASO。这些数据还表明可以将PA的变体用来装载外泌体。

[0263] 实施例12

[0264] 采用重新悬浮在无血清培养基中的50nM隐蔽报告基因抗-GFP siRNA(Invitrogen目录号12935-145)、50μg/ml PA83(SEQ ID No:2)和50μg/ml LFnPKR(SEQ ID No:13)装载外泌体。如前所述，即在无血清培养基中用蛋白质::siRNA混合物温育4小时，并用5μM离子霉素温育30min后，分离外泌体。如前所述，所有温育均在37℃下进行，两次温育之间用PBS洗涤细胞。使用来自Qiagen(目录号76064)的exoEasy试剂盒分离外泌体。将外泌体用PBS洗涤并如前所述沉淀(即在4℃下110 000x g达70min)，然后重悬于500μl PBS中。将外泌体用

完全培养基稀释并添加至稳定表达GFP融合β-半乳糖苷酶和番茄红串联二聚体(来自ASMBIO,目录号SC008)的HEK293细胞中。然后通过在OD_{620}下测量随时间的X-gal转化率并将转化率标准化为总细胞裂解物蛋白浓度,来测定细胞裂解物中β-半乳糖苷酶的活性。

[0265] 参照图12,可以看出采用PA83和LFnPKR装载至HeLa衍生的外泌体的抗-GFP siRNA具有药理活性。如实施例11的ASO一样,这些数据表明,siRNA在外泌体中保留了其活性。

[0266] 总结

[0267] 本文描述的脂质体的方面和实施方案的优势在于寻求通过在ILV反向融合之前将装载了Atx相关货物的ILV隔离为脂质体(例如外泌体)来解决现有技术中存在的一个或多个问题。此外,还涉及了与Atx PA63具有相同功能但包含重组跨膜序列的跨膜序列(membrane spanning sequences)的使用。

[0268] 脂质体/外泌体可以使管腔内容物免受酶破坏和免疫反应的伤害,并通常将它们称为在运输过程中保护抗原或酶不稳定物质的天然存在的、旁分泌运输系统。鉴于已经在ILV和脂质体(如外泌体)中都记录了野生型LF,并且已知在释放ER储存钙后ILV可以作为脂质体(如外泌体)自细胞中分泌[5],发明人认为也可以将重组LF捕获或装载至脂质体(如外来体)中。此外,离子载体(如离子霉素)的使用导致按需释放ER钙,触发作为脂质体(如外泌体)的ILV的胞吐作用。因此,将离子霉素用于从先前用Atx衍生的递送系统处理过的细胞中暂时捕获包含货物的ILV。然后,这允许将分泌到细胞培养基中的装载了货物的外泌体分离出来。尽管已经报道了使Atx成分保护性抗原(PA)83或PA63、致死因子(LF)和水肿因子(EF)定位于脂质体/外泌体中[4],但以前没有报道过采用成孔重组蛋白将相关分子(如LFn-GAL4、LFn-PKR、LFn-PKR-德克萨斯红、siRNA、CAS9或Cas9-德克萨斯红)装载在脂质体/外泌体中。

[0269] 参考文献

[0270] [1]Tyagi P.,Subramony J.A.(2018)Nanotherapeutics in oral and parenteral drug delivery:Key learnings and future outlooks as we think small.J.Control Release.272:159-168。

[0271] [2]S.C.Richardson,S.C.Winistorfer,V.Poupon,J.P.Luzio,R.C.Piper.(2004)Mammalian late vacuole protein sorting orthologues participate in early endosomal fusion and interact with the cytoskeleton,Mol Biol Cell.15,1197-1210。

[0272] [3]Abrami,L.,Lindsay,M.,Parton,R.G.,Leppla,S.H.,&van der Goot,F.G.(2004).Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway.The Journal of Cell Biology,166(5),645-651。

[0273] [4]Abrami,L.,Brandi,L.,Moayeri,M.,Brown,M.J.,Krantz,B.A.,Leppla,S.H.,&van der Goot,F.G.(2013).Hijacking Multivesicular Bodies Enables Long-Term and Exosome-Mediated Long-Distance Action of Anthrax Toxin,5(4),986-996。

[0274] [5]Kuznetsov G.,Brostrom M.A.,and Brostrom C.(1992)Demonstration of aCalcium Requirement for Secretory Protein Processing and Export.The Journal of Biological Chemistry.267(6);3932-3939。

[0275] [6]Blaustein,R.O.,Koehler,T.M.,Collier,R.J.,and Finkelstein, A.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86,2209-2213(1989)。

[0276] [7]B.A.Krantz,等,Acid-induced unfolding of the amino-terminal domains of the lethal and edema factors of anthrax toxin,J.Mol.Biol.344(3)(2004)739-756。

[0277] [8]Auger A.,Park M.,NitschkeF.,MinassianL.M.,BeilhartzG.L.,Minassian B.A.和Melnyk R.A.(2105)Efficient Delivery of Structurally Diverse Protein Cargo into Mammalian Cells by a Bacterial Toxin.Mol.Pharmaceutics,,12(8),pp 2962-2971。

[0278] [9]Dyer P.D.(2013)Development of a Protein-Based Antisense Delivery Platform Modelled on Anthrax Toxin.PhD Thesis,University of Greenwich。

[0279] [10]Gaur,R.,Gupta,P.,Goyal,A.,Wels,W.&Singh,Y.Delivery of nucleic acid into mammalian cells by anthrax toxin.Biochem.Biophys.Res.Commun.297, 1121-1127(2002)。

[0280] [11]Baillie,L W.,Huwar,T.B.,Moore,S.,Mellado-Sanchez,G.,Rodriguez,L., Neeson,B.N.,等(2010).An anthrax subunit vaccine candidate based on protective regions of Bacillus anthracis protective antigen and lethal factor.Vaccine,28 (41),6740-6748。

[0281] [12]Khandia R.,Bhatia S.,Chanu K.V.,Sood R.和Dhama K.(2014).Anthrax Toxin Receptors,Functions and their Possible Use in Therapeutics:A Review.Asian Journal of Animal and Veterinary Advances,9:599-609。

[0282] [13]Guo S.&Huang L.(2011)Nanoparticles Escaping RES and Endosome: Challenges for siRNA Delivery for Cancer Therapy.Journal of Nanomaterials.Article ID 742895.DoI:10.1155/2011/742895。

[0283] [14]S.C.Richardson,S.C.Winistorfer,V.Poupon,J.P.Luzio, R.C.Piper.Mammalian late vacuole protein sorting orthologues participate in early endosomal fusion and interact with the cytoskeleton,Mol Biol Cell. (2004)15,1197-1210。

[0284] [15]Willms E.,Johansson H.J.,Mager I.,Lee Y.,等(2015)Cells Release Subpopulations of Exosomes with Distinct Molecular and Biological Properties.Scientific Reports 6:22519。

[0285] [16]Phillips D.D.,Fattah R.J.,Crown D.,等(2013)Engineering Anthrax Toxin Variants That Exclusively Form Octamers and Their Application to Targeting Tumors.J.Biol.Chem.,288:9058-9065。

[0286] [17]Karginov,V.A.,Nestorovich E.M.,Schmidtmann,F.Robinson T.M., Yohannes,A.,Fahmi N.E.,Bezrukov S.M.,,和Hecht S.M.(2007)Inhibition of S.aureusα-Hemolysin and B.anthracis Lethal Toxin byβ-Cyclodextrin Derivatives.Bioorg Med Chem.;15(16):5424-5431。

[0287] [18]Feld G.K.,Brown,M.J.&Krantz B.A.(2012)Ratcheting up protein

translocation with anthrax toxin.PROTEIN SCIENCE.21:606—624。

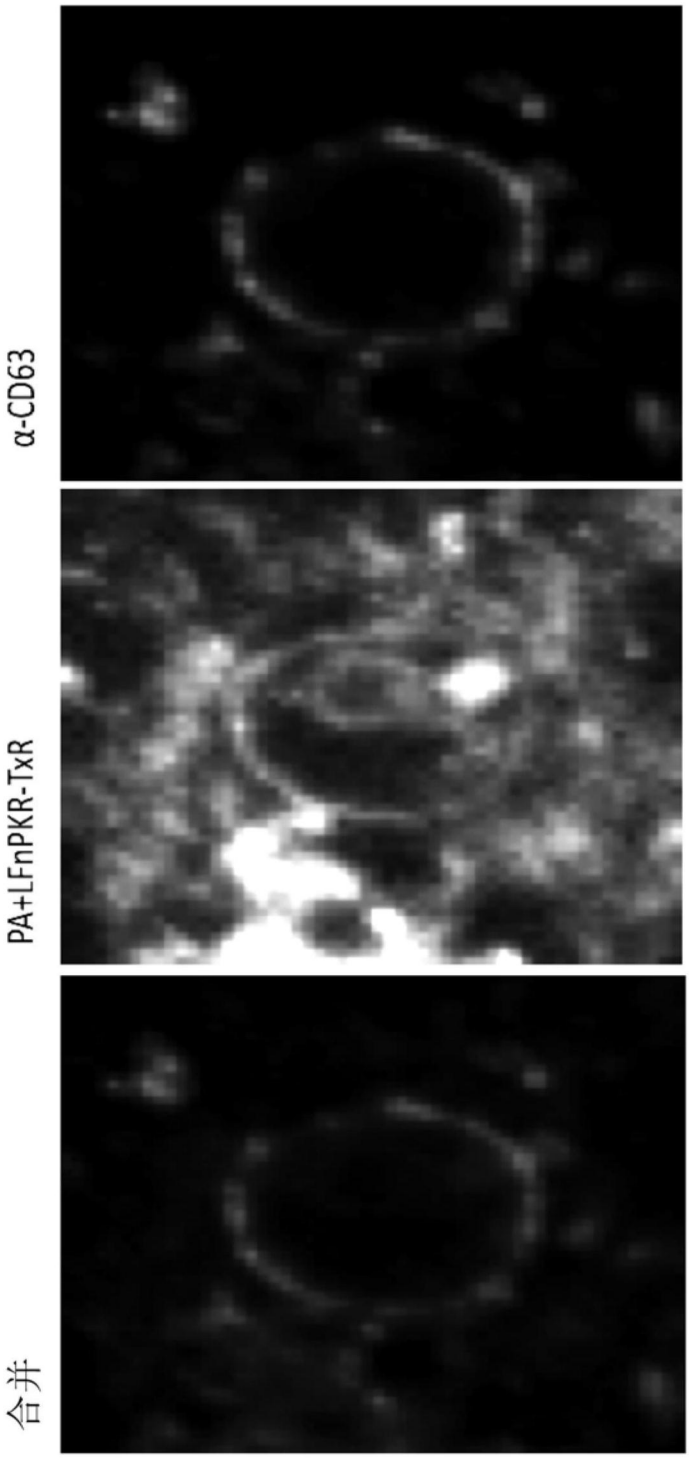
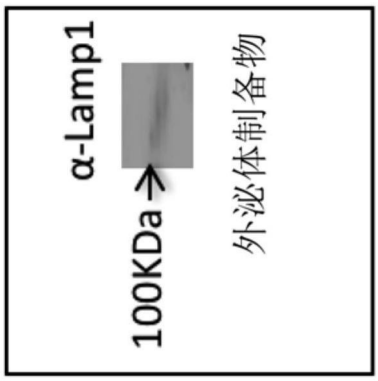


图1



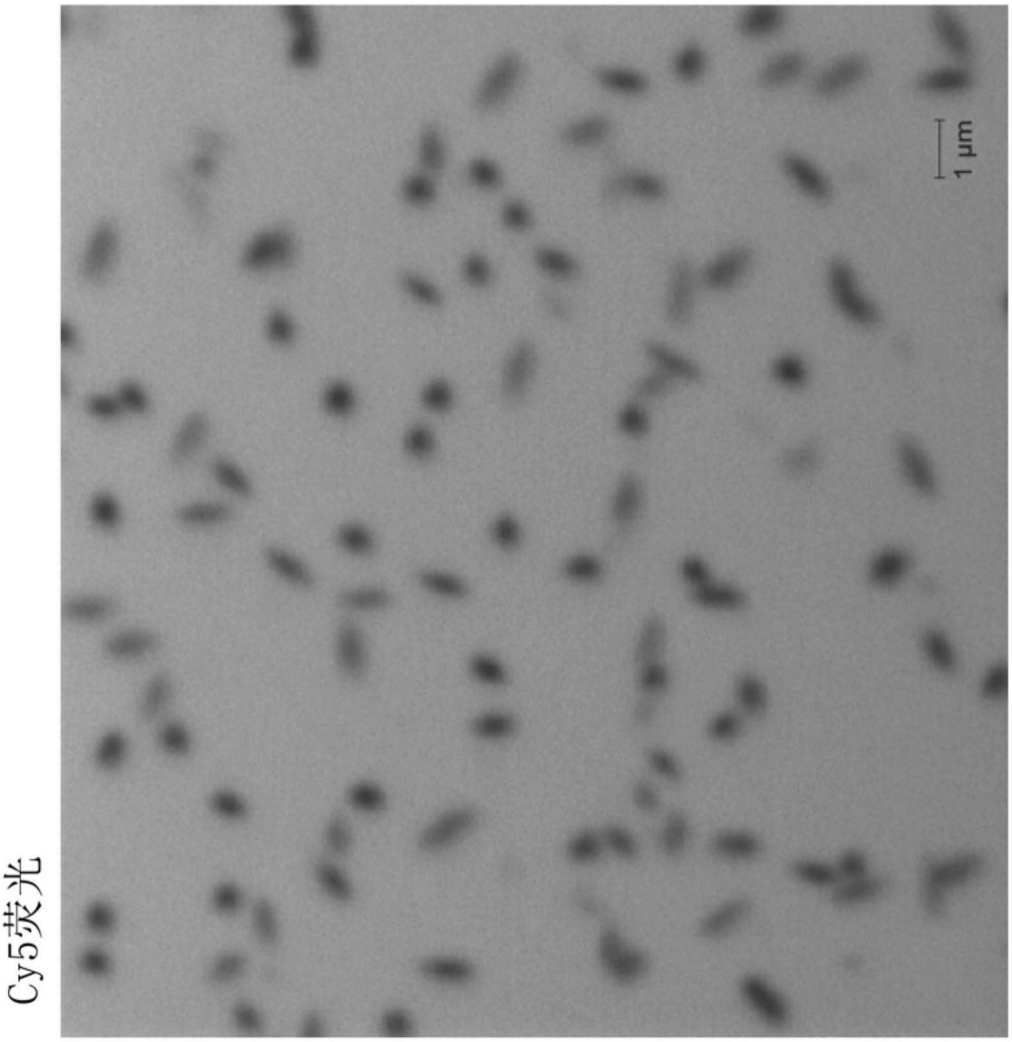


图2

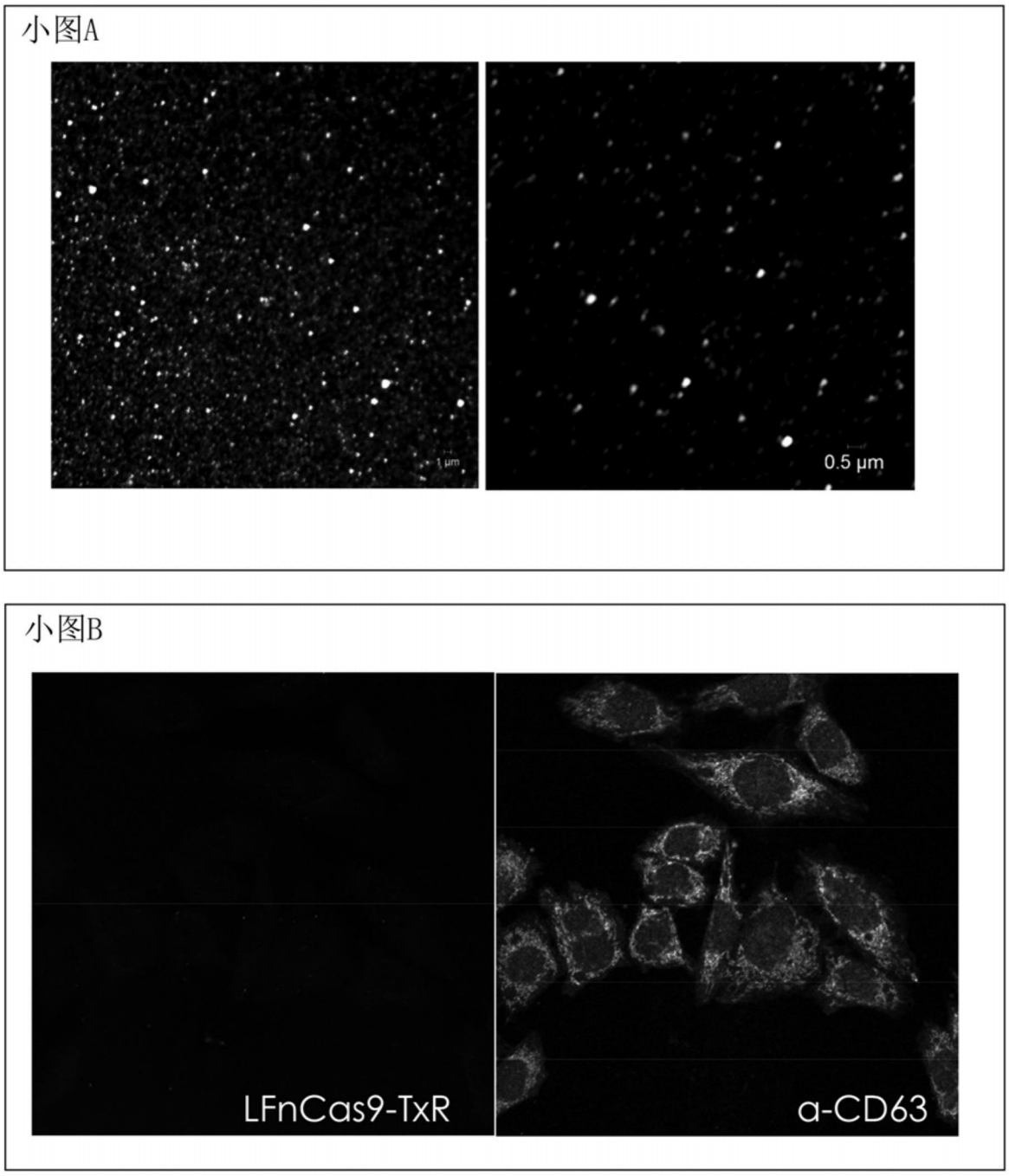


图3

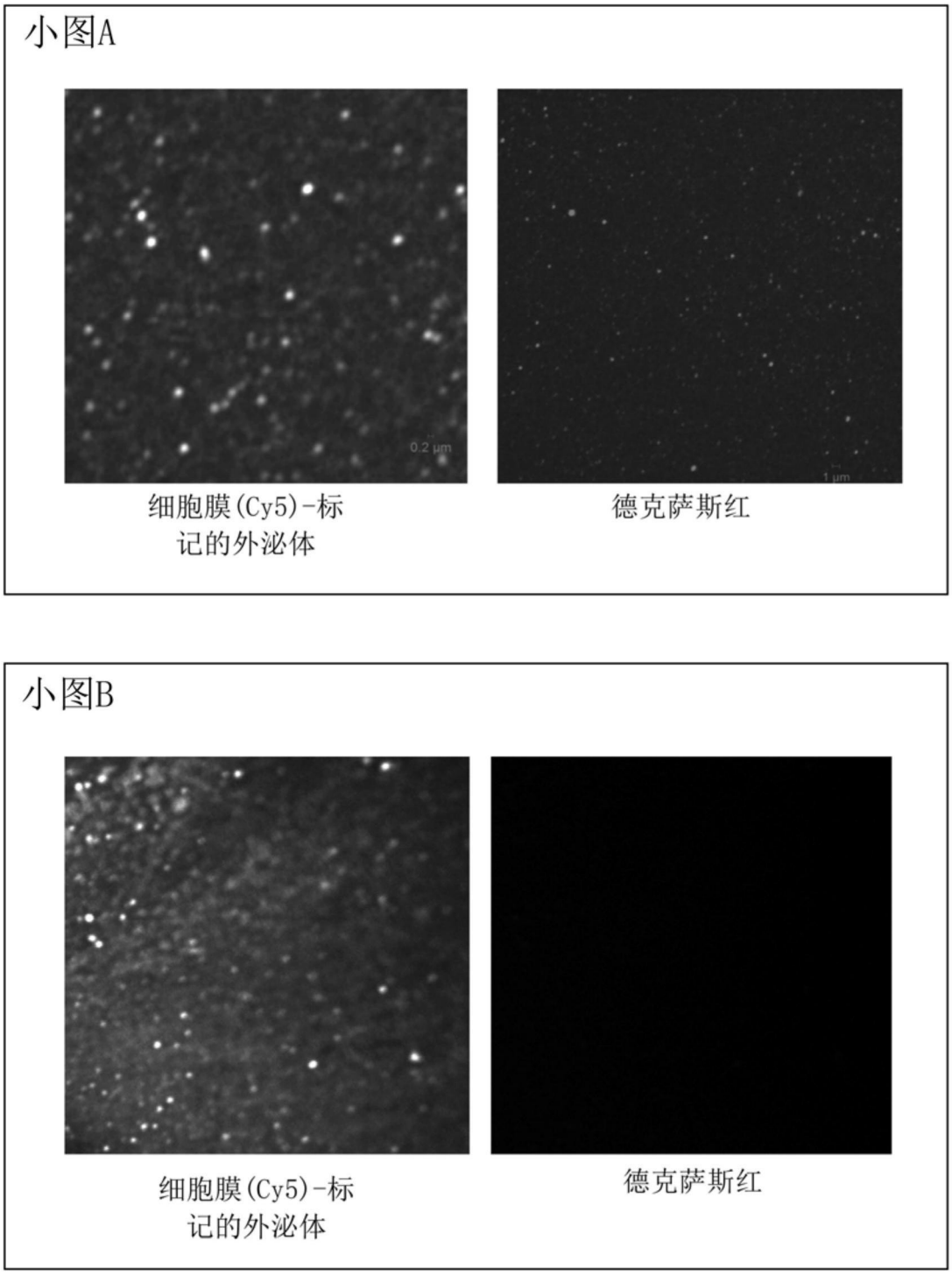


图4

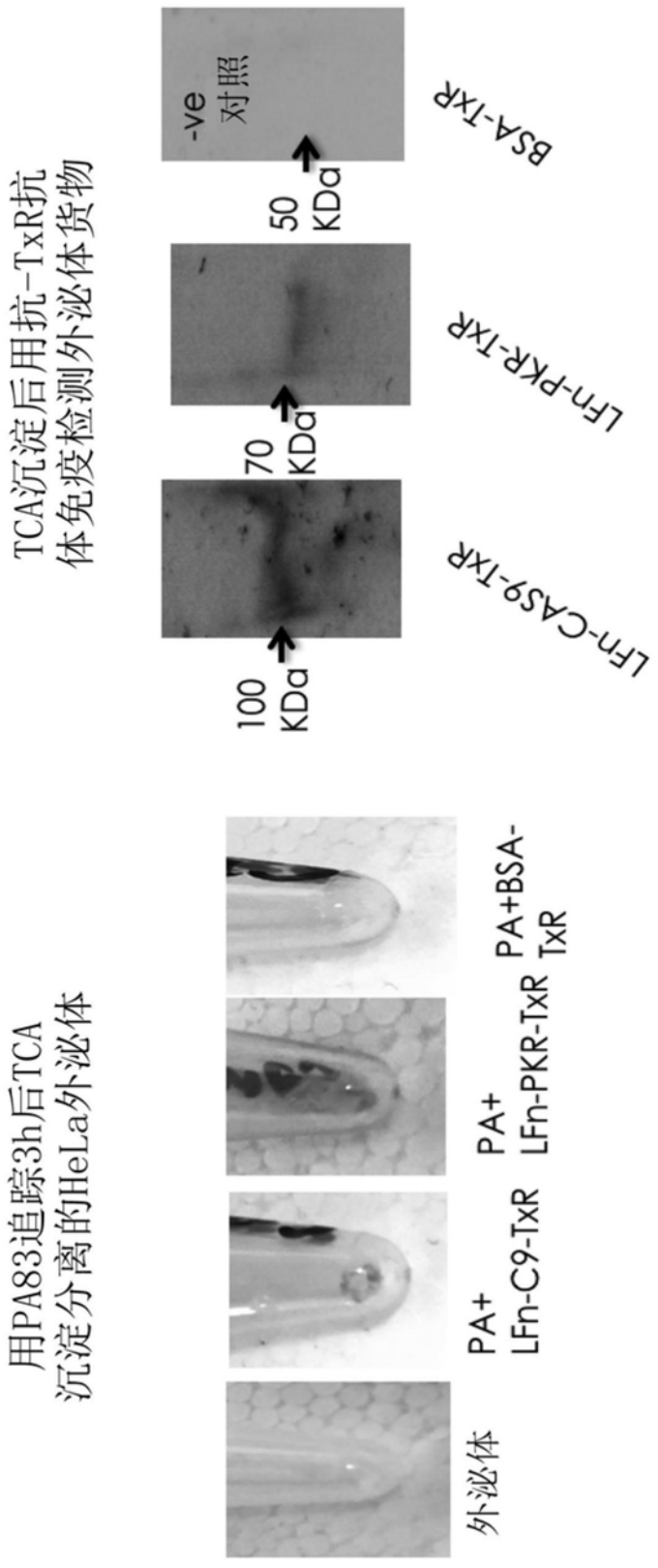

用PA83追踪3h后TCA
沉淀分离的HeLa外泌体
外泌体
PA+
LFn-C9-TxR
PA+
LFn-PKR-TxR
PA+BSA-
TxR
TCA沉淀后用抗-TxR抗
体免疫检测外泌体货物
100
KDa
70
KDa
50
KDa
LFn-CAS9-TxR
LFn-PKR-TxR
BSA-TxR
-ve
对照

图5

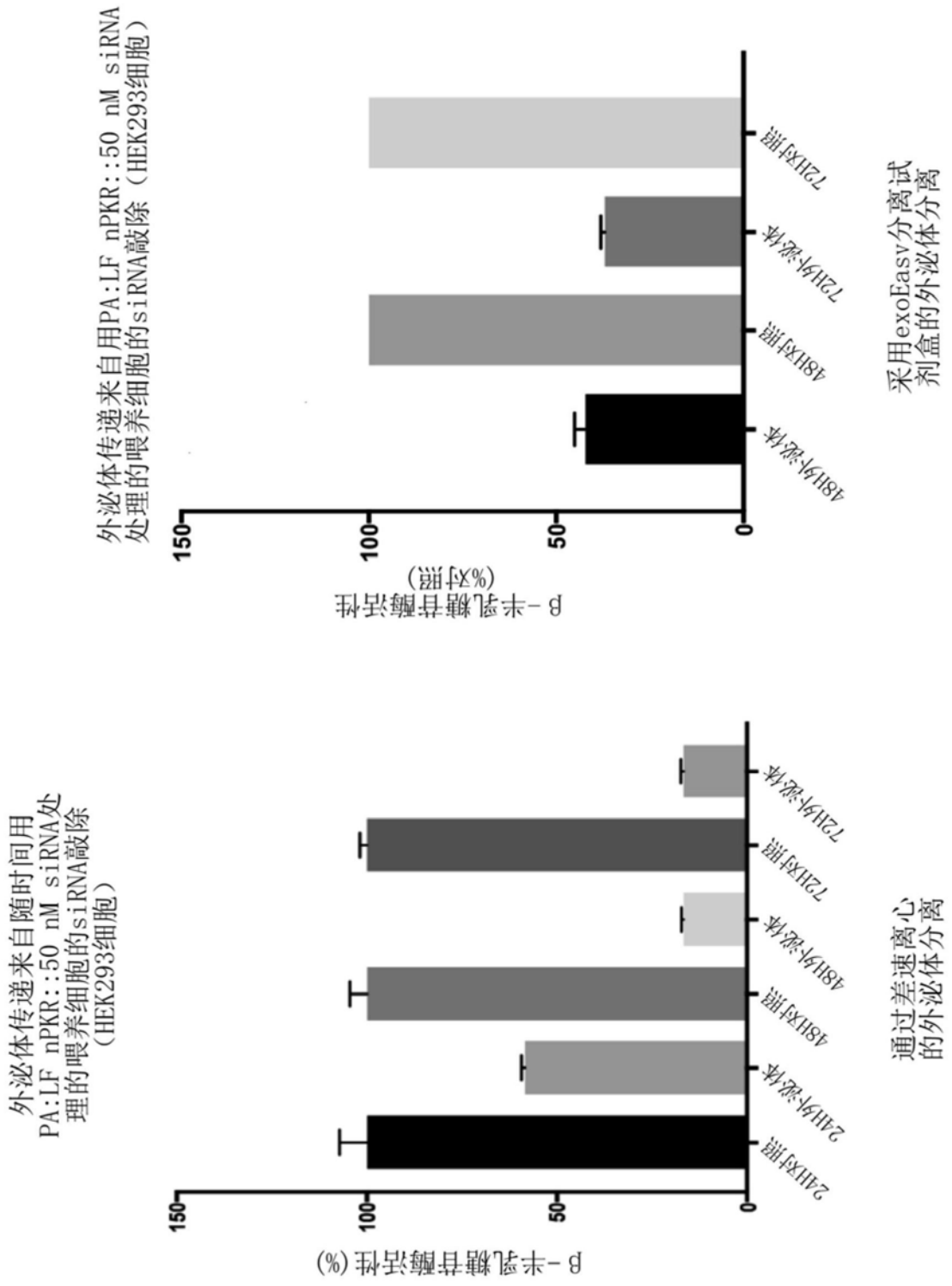

外泌体传递来自用PA:LF nPKR::50 nM siRNA处理的喂养细胞的siRNA敲除（HEK293细胞）
β-半乳糖苷酶活性（%对照）
150
100
50
0
48H外泌体
48H对照
72H外泌体
72H对照
采用exoEasv分离试剂盒的外泌体分离
外泌体传递来自随时间用PA:LF nPKR::50 nM siRNA处理的喂养细胞的siRNA敲除（HEK293细胞）
β-半乳糖苷酶活性(%)
2H对照
2H外泌体
48H对照
48H外泌体
72H对照
72H外泌体
通过差速离心的外泌体分离

图6

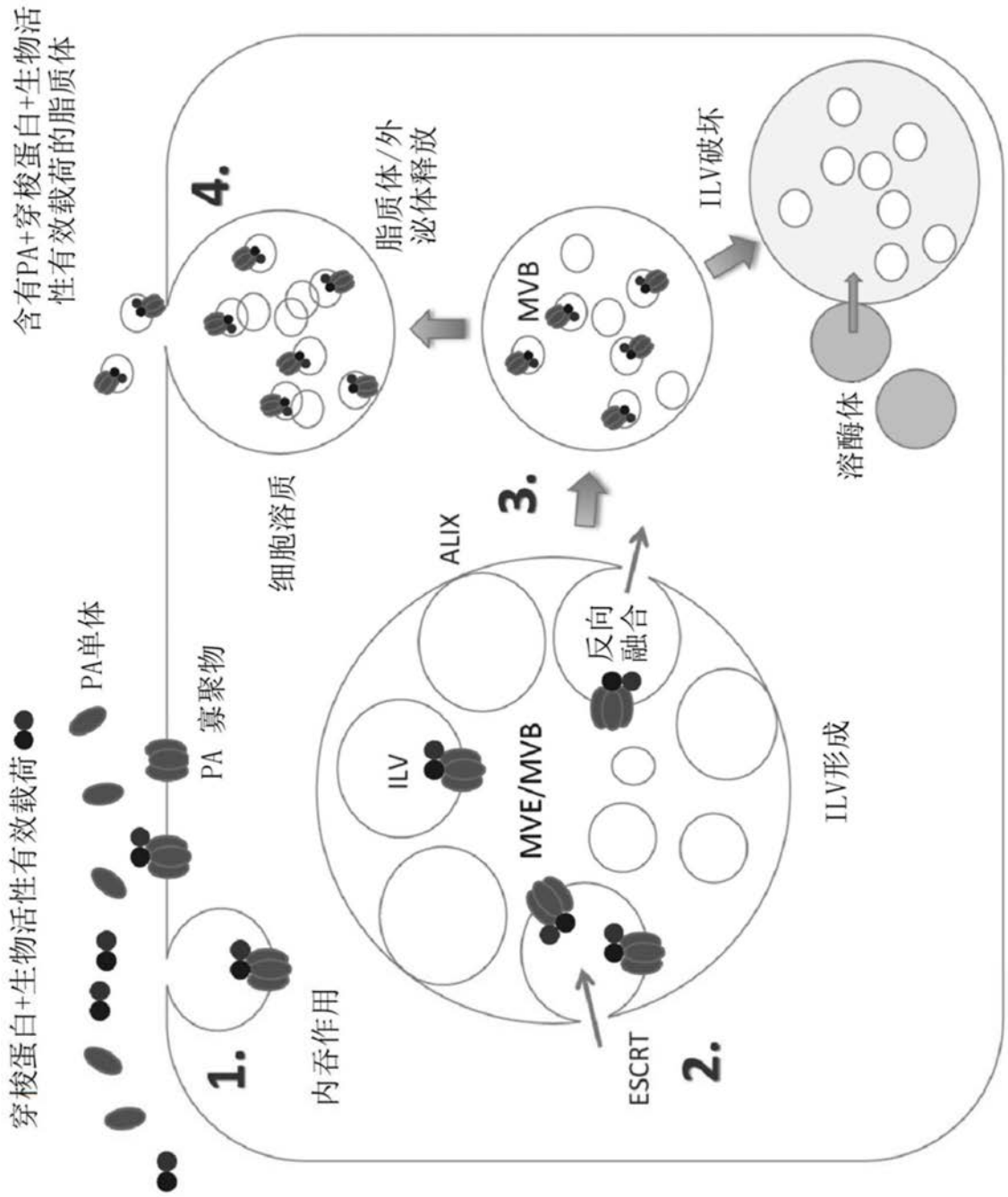

穿梭蛋白+生物活性有效载荷
PA单体
PA 寡聚物
含有PA+穿梭蛋白+生物活性有效载荷的脂质体
1.
内吞作用
细胞溶质
4.
脂质体/外泌体释放
ILV
ALIX
3.
MVB
MVE/MVB
反向融合
ESCRT
2.
ILV形成
ILV破坏
溶酶体

图7

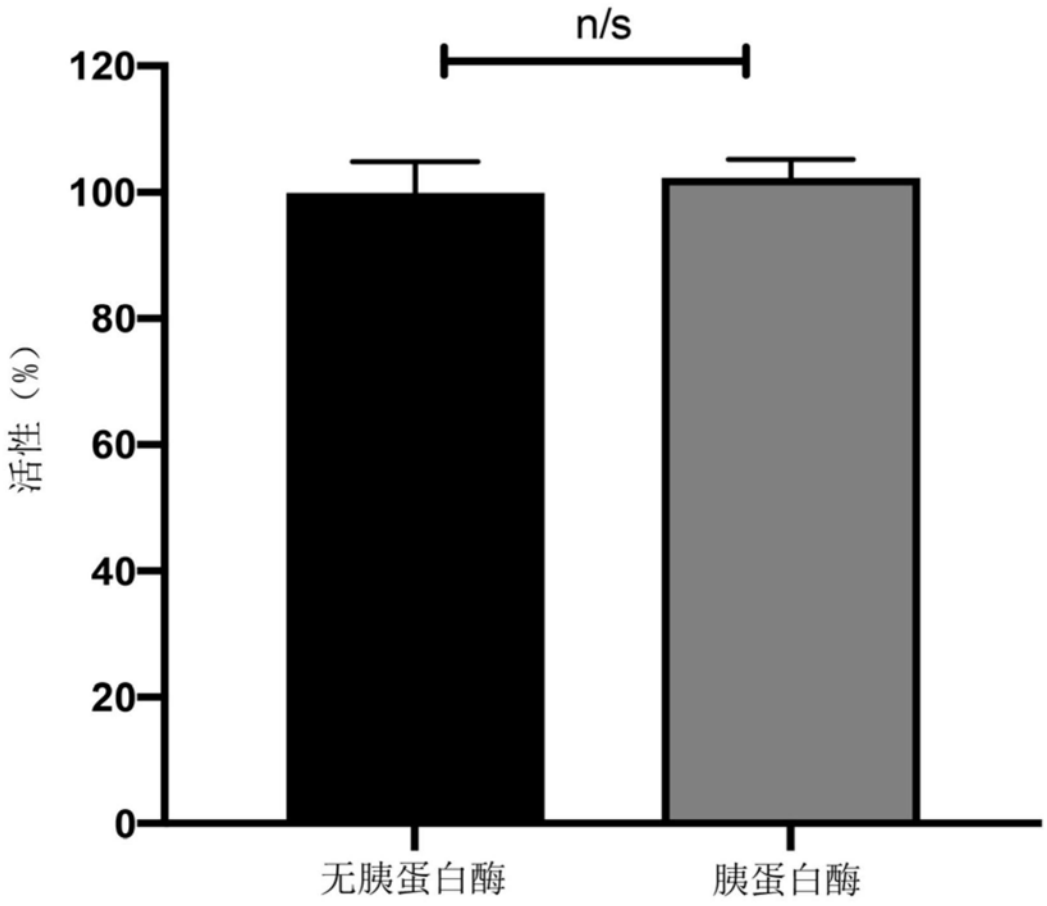


图8

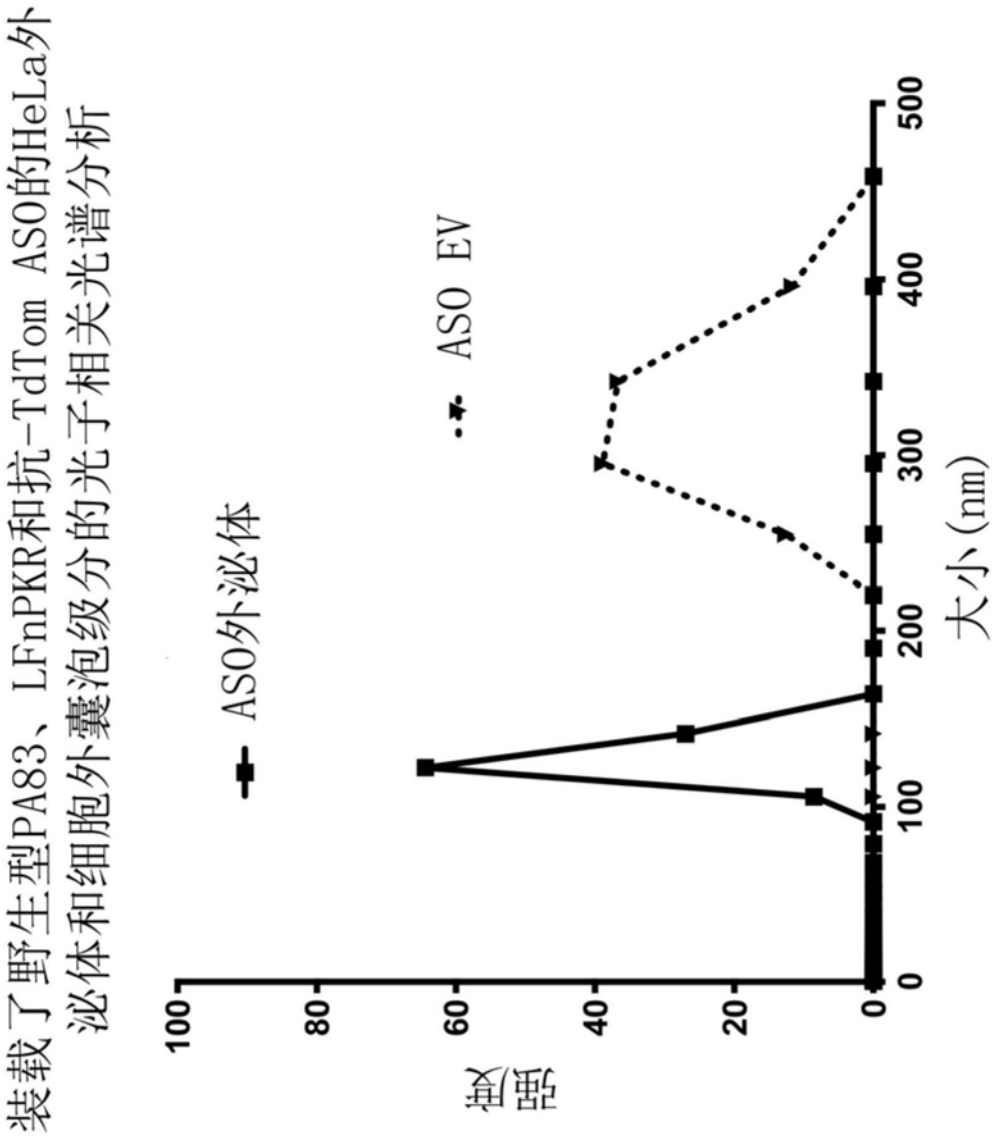

装载了野生型PA83、LFnPKR和抗-TdTom ASO的HeLa外泌体和细胞外囊泡级分的光子相关光谱分析
ASO外泌体
ASO EV
强度
大小(nm)
0
20
40
60
80
100
0
100
200
300
400
500

图9

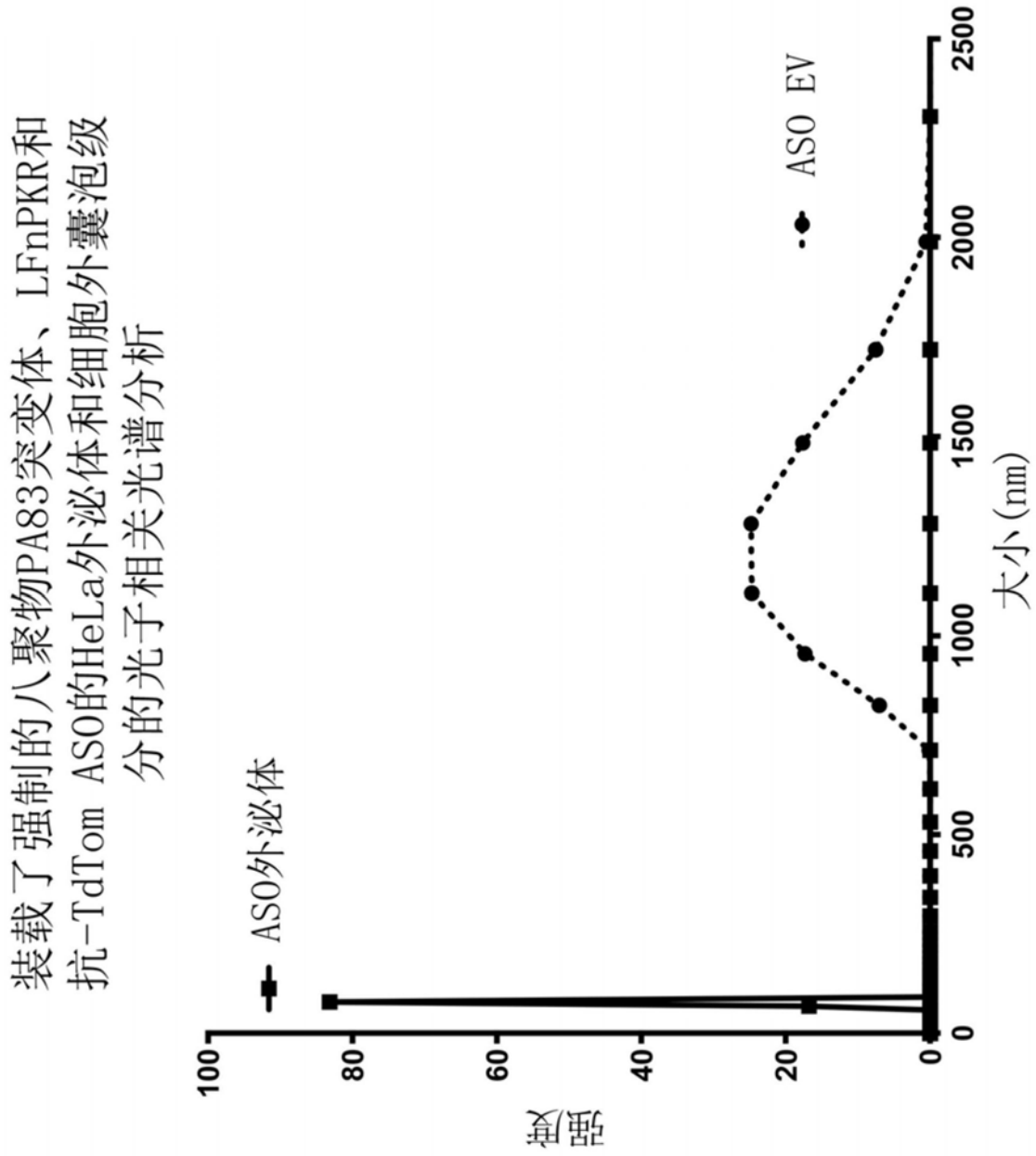

装载了强制的八聚物PA83突变体、LFnPKR和抗-TdTom ASO的HeLa外泌体和细胞外囊泡级分的光子相关光谱分析
ASO外泌体
ASO EV
强度
大小(nm)
0
20
40
60
80
100
0
500
1000
1500
2000
2500

图10

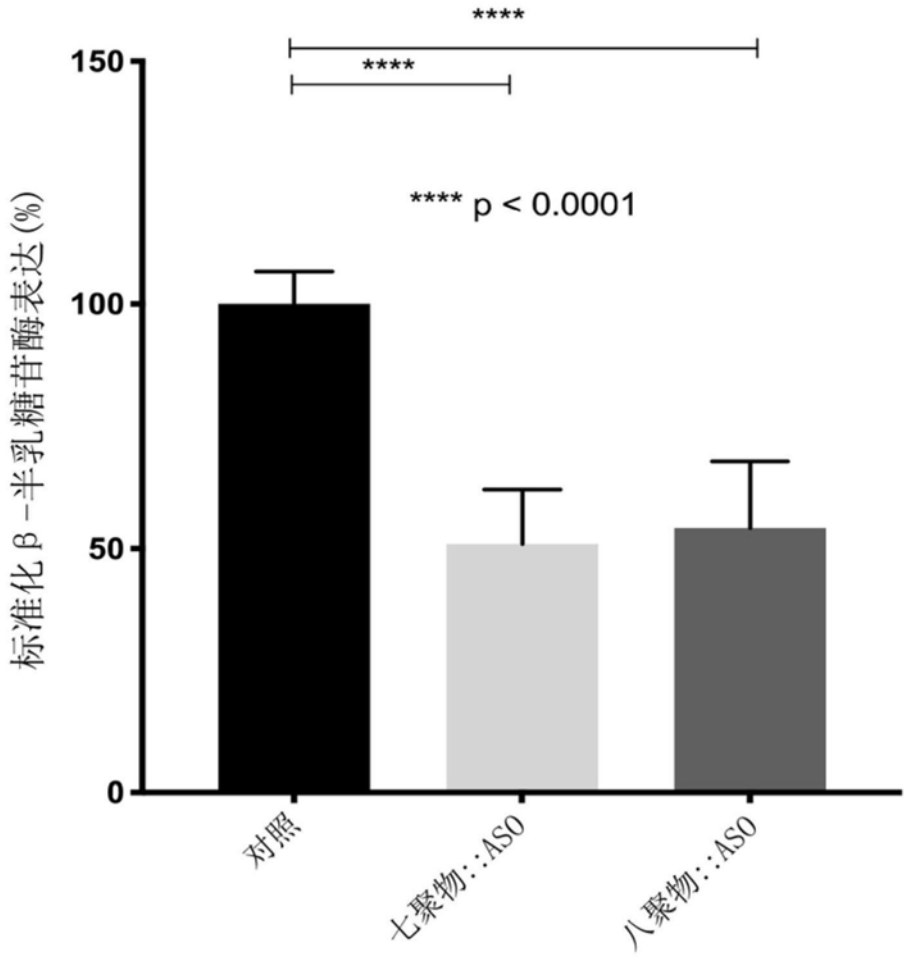

外泌体处理48小时后HEK293细胞的标准化β-半乳糖苷酶表达(N=6±SD)
****
****
**** p < 0.0001
150
100
50
0
标准化β-半乳糖苷酶表达(%)
对照
七聚物::ASO
八聚物::ASO

图11

用装载了α-GFP siRNA并用ExoEasy试剂盒分离的HeLa外泌体转染HEK293细胞后的β-半乳糖苷酶的活性。随时间的用PA:LF nPKR::50nM si RNA处理的喂养细胞

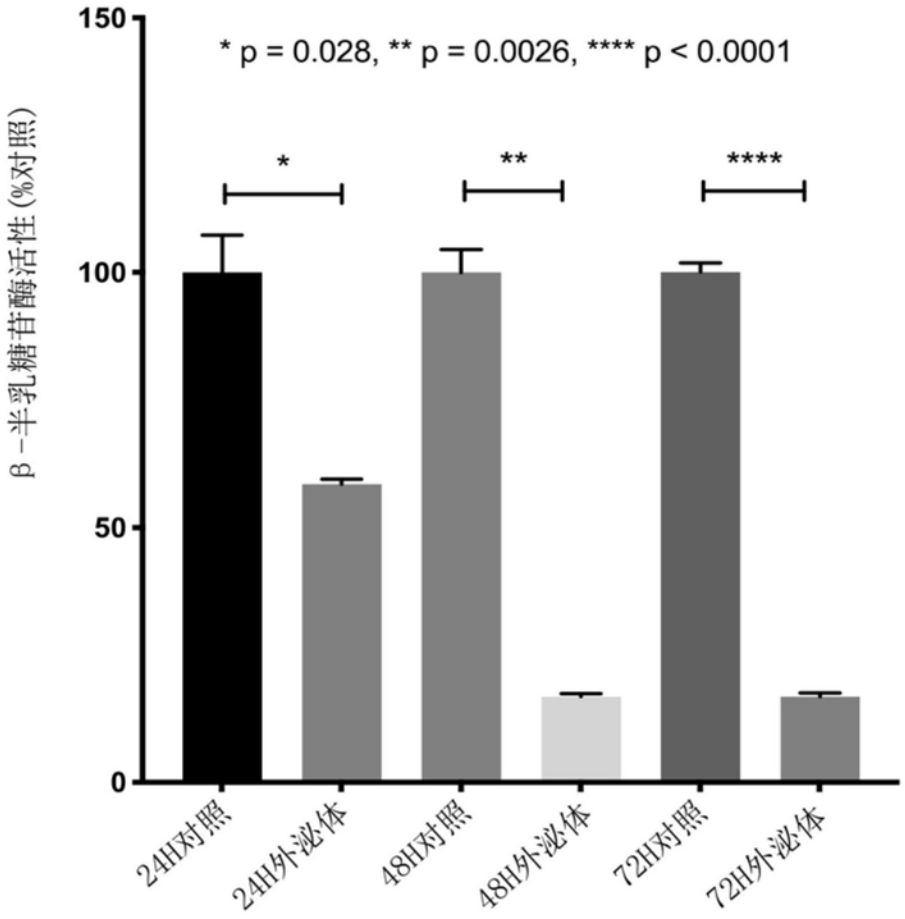


图12