(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119265136 A
(43)申请公布日 2025.01.07

(21)申请号 202411261913.9

(22)申请日 2019.04.25

(30)优先权数据
10-2018-0048486 2018.04.26 KR

(62)分案原申请数据
201980028175.4 2019.04.25

(71)申请人 白雁生物技术公司
地址 韩国大田市

(72)发明人 韩圭范 金天炯 金有珍 柳信惠 金奈英 金美真 崔容秀 李敍澈

(74)专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
专利代理师 水文钰 薛琦

(51)Int.Cl.
C12N 5/10(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 5/071(2010.01)
C12N 9/16(2006.01)
C12N 9/64(2006.01)
A61K 35/12(2015.01)
A61K 35/54(2015.01)
A61K 35/545(2015.01)
A61K 38/02(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61K 38/55(2006.01)
A61K 38/48(2006.01)
A61K 38/46(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)

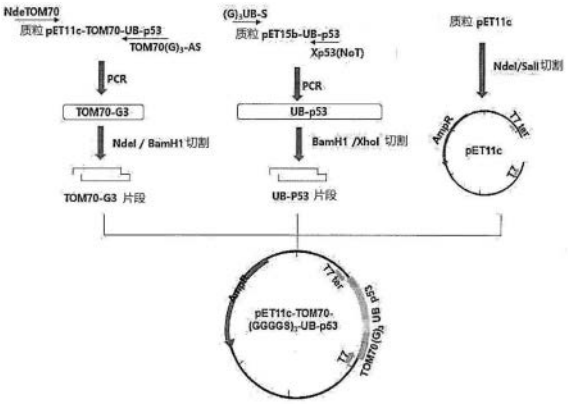
权利要求书2页 说明书36页
序列表（电子公布） 附图47页

(54)发明名称

修饰的线粒体及其应用

(57)摘要

根据本发明的一个实施方案，通过靶向蛋白修饰的线粒体可以被有效地递送至靶点。另外，当结合至所述修饰的线粒体的目的蛋白被递送到细胞内时，可以表现出各种活性。所述修饰的线粒体可以有效地导致癌症组织死亡，因此也可以用作抗癌剂。进一步地，根据修饰的线粒体上负载的靶向蛋白表现出各种活性，因此修饰的线粒体可应用于治疗各种疾病。另外，根据本发明的一个实施方案，包含所需蛋白质的融合蛋白和包含靶向蛋白的融合蛋白可以用来修饰线粒体。而且，经融合蛋白修饰的线粒体在靶细胞中表现出各种作用。



CN 119265136 A

1.一种分离的修饰的线粒体,其中,外源蛋白结合至所述线粒体的外膜;

其中,所述外源蛋白为融合蛋白,所述融合蛋白包含线粒体锚定肽和靶点靶向蛋白,所述靶点靶向蛋白能够与存在于细胞膜中的配体或受体结合;

其中,所述外源蛋白通过线粒体锚定肽结合至所述线粒体的外膜。

2.如权利要求1所述的分离的修饰的线粒体,其中,所述线粒体分离自真核细胞、组织或血小板。

3.如权利要求1所述的分离的修饰的线粒体,其中,所述线粒体锚定肽包含蛋白质的N末端区域或C末端区域,所述蛋白质存在于线粒体膜蛋白中。

4.如权利要求3所述的分离的修饰的线粒体,其特征在于,存在于所述线粒体膜蛋白中的所述蛋白质的N末端区域或C末端区域位于所述线粒体的外膜上。

5.如权利要求3所述的分离的修饰的线粒体,其特征在于,所述线粒体锚定肽选自由TOM20、TOM70、OM45、TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中的任何一种。

6.如权利要求3所述的分离的修饰的线粒体,其特征在于,所述线粒体锚定肽包含选自由TOM20、TOM70和OM45构成的组中任何一种的N末端区域。

7.如权利要求3所述的分离的修饰的线粒体,其特征在于,所述线粒体锚定肽包含选自由TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中任何一种的C末端区域。

8.如权利要求1所述的分离的修饰的线粒体,其中,所述外源蛋白为靶点靶向蛋白,所述靶点靶向蛋白结合至TOM20、TOM70或OM45的N末端区域。

9.如权利要求1所述的分离的修饰的线粒体,其中,所述靶点靶向蛋白为存在于肿瘤细胞表面上的配体或受体。

10.如权利要求9所述的分离的修饰的线粒体,其中,存在于肿瘤细胞表面上的配体或受体为选自由CD19、CD20、黑色素瘤抗原E即MAGE、NY-ESO-1、癌胚抗原即CEA、黏蛋白1细胞表面相关蛋白即MUC-1、前列腺酸磷酸酶即PAP、前列腺特异性抗原即PSA、存活蛋白、酪氨酸相关蛋白1即tyrp1、酪氨酸相关蛋白1即tyrp2、Brachyury、间皮素、表皮生长因子受体即EGFR、人表皮生长因子受体2即HER-2、ERBB2、Wilms肿瘤蛋白即WT1、FAP、EpCAM、PD-L1、ACPP、CPT1A、IFNG、CD274、FOLR1、EPCAM、ICAM2、NCAM1、LRRC4、UNC5H2 LILRB2、CEACAM、连接素3或其组合构成的组中的任何一种。

11.如权利要求1所述的分离的修饰的线粒体,其中,所述外源蛋白为靶点靶向蛋白,所述靶点靶向蛋白结合至选自由TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中任何一种的C末端区域。

12.如权利要求1所述的分离的修饰的线粒体,其特征在于,所述外源蛋白进一步包含至少一个接头。

13.如权利要求12所述的分离的修饰的线粒体,其中,所述接头由1至150个氨基酸组成。

14.如权利要求12所述的分离的修饰的线粒体,其中,所述接头由5至50个氨基酸组成,所述氨基酸为甘氨酸和丝氨酸。

15.如权利要求14所述的分离的修饰的线粒体,其中,所述接头为(G4S)n,其中n是1至10的整数。

16.如权利要求12所述的分离的修饰的线粒体,其中,所述融合蛋白具有以下任一结构:

1)N末端-靶点靶向蛋白-线粒体锚定肽-C末端;

2)N末端-靶点靶向蛋白-泛素或其片段-线粒体锚定肽-C末端;

3)N末端-靶点靶向蛋白-接头1-泛素或其片段-线粒体锚定肽-C末端;

4)N末端-靶点靶向蛋白-泛素或泛素片段-接头2-线粒体锚定肽-C末端;

5)N末端-靶点靶向蛋白-接头1-泛素或其片段-接头2-线粒体锚定肽-C末端;

6)N末端-线粒体锚定肽-靶点靶向蛋白-C末端;

7)N末端-线粒体锚定肽-泛素或其片段-靶点靶向蛋白-C末端;

8)N末端-线粒体锚定肽-接头1-泛素或其片段-靶点靶向蛋白-C末端;

9)N末端-线粒体锚定肽-泛素或其片段-接头2-靶点靶向蛋白-C末端;和

10)N末端-线粒体锚定肽-接头1-泛素或其片段-接头2-靶点靶向蛋白C末端。

17.一种药物组合物,其包含如权利要求1所述的分离的修饰的线粒体作为活性成分。

18.如权利要求17所述的药物组合物,其中,所述药物组合物用于预防或治疗癌症。

19.如权利要求18所述的药物组合物,其中,所述癌症为选自由胃癌、肝癌、肺癌、结肠直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、宫颈癌、甲状腺癌、喉癌、急性髓细胞性白血病、脑瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、唾液腺癌和淋巴瘤构成的组中的任何一种。

20.如权利要求1所述的分离的修饰的线粒体作为胞内和胞外递送外源蛋白的手段的用途,所述外源蛋白包含靶点靶向蛋白,所述靶点靶向蛋白能够与存在于细胞膜中的配体或受体结合,

所述外源蛋白通过线粒体锚定肽结合至所述线粒体的外膜。

21.一种融合蛋白,其包含具有与存在于细胞膜中的配体或受体结合的能力的靶点靶向蛋白和线粒体外膜锚定肽。

22.如权利要求21所述的融合蛋白,其中,所述线粒体外膜锚定肽为选自由TOM20、TOM70、OM45、TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中的任何一种。

23.如权利要求21所述的融合蛋白,其中,所述靶点靶向蛋白和线粒体锚定肽从N末端至C末端结合。

24.如权利要求21所述的融合蛋白,其中,所述靶点靶向蛋白为抗体或其片段。

25.如权利要求24所述的融合蛋白,其中,所述抗体的片段为选自由Fab、Fab'、scFv和$F(ab)_2$构成的组中的任何一种。

26.一种多核苷酸,其编码如权利要求21所述的融合蛋白。

27.一种制备分离的修饰的线粒体的方法,包括将分离的线粒体与如权利要求21所述的融合蛋白混合的步骤。

28.一种从转化的细胞中制备分离的修饰的线粒体的方法,通过将编码如权利要求21所述的融合蛋白的多核苷酸注射到真核细胞中。

修饰的线粒体及其应用

[0001] 本申请是申请号为:201980028175.4,申请日为2019年04月25日,发明创造名称为“修饰的线粒体及其应用”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明提供了一种能修饰线粒体的融合蛋白,经所述融合蛋白修饰的线粒体以及包含其作为活性成分的药物组合物。

背景技术

[0003] 线粒体是真核细胞的细胞器,参与细胞内能量来源-三磷酸腺苷(ATP)的合成和调节。线粒体与体内的多种代谢途径相关,例如,细胞信号传导、细胞分化、细胞死亡以及细胞周期和细胞生长的控制。线粒体具有自己的基因组,并且是在细胞的能量代谢中起着核心作用的细胞器。线粒体通过电子传递和氧化磷酸化过程产生能量,并在参与凋亡信号通路中起重要作用。

[0004] 据报道,由于线粒体功能下降引起的能量产生的减少导致多种疾病。当电子传递链反应的功能由于线粒体基因组和蛋白质组的变化而降低时,发生ATP产生的降低、过量活性氧产生、钙调节功能的降低等。在这种情况下,线粒体的膜通透性发生变化,并且凋亡功能可能异常发生,并导致癌症和不治之症。

[0005] 因此,据报道由线粒体功能障碍导致的人类疾病包括与线粒体相关的遗传疾病(Wallace DC 1999)、糖尿病(Maechler P 2001)、心脏病(Sorescu D 2002)、老年性痴呆(如帕金森氏病或阿尔茨海默氏病)(Lin MT 2006)、以及各种癌症(Petros JA,2005)和癌症转移(Ishikawa K,2008)的发生等已见诸报道。此外,在超过200种类型的癌症中发现的共同特点包括凋亡功能受损、炎症反应增强和异常代谢增加。所有这些过程都与线粒体功能密切相关,癌症与线粒体之间的相关性正在引起人们的注意。

[0006] 另一方面,已知正常细胞每一分子葡萄糖通过一个电子传递系统过程产生36个ATP,但是癌细胞与正常细胞不同,在足够氧气的条件下,每一分子葡萄糖通过糖酵解产生2个ATP(有氧糖酵解)。因此,已知癌细胞与正常细胞不同,在能量方面使用效率低下的糖酵解过程,以产生快速细胞增殖所需的氨基酸、脂质,核酸等。由于这个原因,得知癌细胞比正常细胞需要更少的氧气但产生更大量的乳酸。

[0007] 因此,由于癌细胞中代谢异常导致的肿瘤微环境组成的变化、线粒体功能异常导致的凋亡抑制、以及炎症反应的增强、以及癌细胞中异常代谢反应在肿瘤生长中起着非常重要的作用。因此,利用这些特点开发代谢相关的抗癌剂可能是解决常规抗癌剂副作用和经济问题的好方法。

[0008] 已知当将存在于细胞中的线粒体分离,并在体外对所述细胞进行处理,或将线粒体注射入体内时,线粒体进入细胞。通过利用这种现象,可以将从细胞中分离出的正常线粒体注射到体内以治疗由线粒体功能障碍引起的疾病,或具体地,以线粒体为载体将特定蛋白质有效地递送至细胞中来治疗疾病,但是尚未有报道。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 本发明的一个目的是提供一种有效的蛋白质传递系统,显示线粒体可以作为将表现出各种药理作用的蛋白质有效地递送至细胞中的手段。另外,本发明的一个目的是提供用于有效递送药物的重组蛋白,并提供使用所述重组蛋白生产的修饰的线粒体。另外,本发明的一个目的是提供包含修饰的线粒体作为活性成分的药物组合物。

[0011] 解决问题的方案

[0012] 为了解决上述问题,提供了一种修饰的线粒体,其中外源蛋白结合至所述线粒体的外膜。此外,为了制备所述修饰的线粒体,提供了一种融合蛋白,其包含线粒体外膜锚定肽和所需的药物蛋白。另外,提供了包含抗体或其片段和线粒体外膜锚定肽的融合蛋白。

[0013] 发明效果

[0014] 当将结合有外源蛋白的线粒体施用于人体时,所述外源蛋白可被有效地递送至细胞中。另外,细胞的受损功能可以通过递送至细胞中的药理活性蛋白质来修复。此外,当将结合有药理活性蛋白质的外源蛋白的线粒体递送至细胞中时,所述药理活性蛋白质从细胞中的线粒体解离,并且可以预期有效的作用。另外,包含抗体片段的修饰的线粒体可被有效地递送至靶细胞。具体地,当靶向存在于癌组织表面上的蛋白质的抗体的片段结合至所述线粒体的表面时,所述修饰的线粒体可被有效地递送至癌细胞中。因此,引入修饰的线粒体不仅可以恢复受损的细胞电子传递系统,并且可以通过结合至修饰的线粒体的药理活性蛋白质来预防或治疗各种疾病。

附图说明

[0015] 图1为制备pTA-p53的方法的示意图。

[0016] 图2为制备pET15b-UB-p53载体的方法的示意图。

[0017] 图3显示了UB-p53蛋白在E.coli中的表达。

[0018] 图4为制备pET11C-TOM70-UB-p53载体的方法的示意图。

[0019] 图5显示了TOM70-UB-p53蛋白在E.coli中的表达。

[0020] 图6为制备pET11C-TOM70-(GGGGS)3-UB-p53载体的方法的示意图。

[0021] 图7显示了TOM70-(GGGGS)3-UB-p53蛋白在E.coli中的表达。

[0022] 图8显示了制备pET11C-TOM70-(GGGGS)3-p53载体的方法。

[0023] 图9显示了TOM70-(GGGGS)3-p53蛋白在E.coli中的表达。

[0024] 图10显示了制备pET15b-UB-p53-TOM7载体的方法。

[0025] 图11显示了UB-p53-TOM7蛋白在E.coli中的表达。

[0026] 图12显示了制备pCMV-p53-myc/His载体的方法。

[0027] 图13显示了p53-myc/His蛋白在转化的CHO中的表达。

[0028] 图14显示了纯化TOM70-(GGGGS)3-p53蛋白然后鉴定的结果。

[0029] 图15为显示纯化的TOM70-(GGGGS)3-p53蛋白的图。

[0030] 图16显示了纯化TOM70-(GGGGS)3-UB-p53蛋白然后鉴定的结果。

[0031] 图17为显示纯化的TOM70-(GGGGS)3-UB-p53蛋白的图。

[0032] 图18显示了纯化UB-p53蛋白然后鉴定的结果。

[0033] 图19为显示纯化的UB-p53蛋白的图。

[0034] 图20显示了纯化UB-p53-TOM7蛋白然后鉴定的结果。

[0035] 图21为显示纯化的UB-p53-TOM7蛋白的图。

[0036] 图22显示了制备pTA-GranzymeB载体的方法。

[0037] 图23显示了制备pET11C-TOM70-(GGGGS)3-UB-GranzymeB载体的方法。

[0038] 图24显示了TOM70-(GGGGS)3-UB-GranzymeB蛋白在E.coli中的表达。

[0039] 图25显示了制备pET15b-UB-GranzymeB-TOM7载体的方法。

[0040] 图26显示了UB-GranzymeB-TOM7蛋白在E.coli中的表达。

[0041] 图27显示了纯化TOM70-(GGGGS)3-UB-GranzymeB蛋白的结果。

[0042] 图28为显示纯化的TOM70-(GGGGS)3-UB-GranzymeB蛋白的图。

[0043] 图29显示了制备pTA-RKIP载体的方法。

[0044] 图30显示了制备pET11C-TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP载体的方法。

[0045] 图31显示了TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP蛋白在E.coli中的表达。

[0046] 图32显示了纯化TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP蛋白的结果。

[0047] 图33为显示纯化的TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP蛋白的图。

[0048] 图34显示了制备pTA-PTEN载体的方法。

[0049] 图35显示了制备pET11C-TOM70-(GGGGS)3-UB-PTEN载体的方法。

[0050] 图36显示了TOM70-(GGGGS)3-UB-PTE蛋白在E.coli中的表达。

[0051] 图37显示了纯化TOM70-(GGGGS)3-UB-PTEN蛋白的结果。

[0052] 图38为显示纯化的TOM70-(GGGGS)3-UB-PTEN蛋白的图。

[0053] 图39显示了纯化UB-GFP-TOM7蛋白然后鉴定的结果。

[0054] 图40为显示纯化的UB-GFP-TOM7蛋白的图。

[0055] 图41显示了纯化TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP蛋白然后鉴定的结果

[0056] 图42为显示纯化的TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP蛋白的图。

[0057] 图43显示了制备pET15b-UB-scFvHER2-TOM7载体的方法。

[0058] 图44显示了UB-scFvHER2-TOM7蛋白在E.coli中的表达。

[0059] 图45显示了制备pCMV-scFvHER2-TOM7-myc/His载体的方法。

[0060] 图46显示了scFvHER2-TOM7-myc/His蛋白在转化的CHO中的表达。

[0061] 图47显示了纯化UB-ScFvHER2-TOM7蛋白的结果。

[0062] 图48为显示纯化的UB-ScFvHER2-TOM7蛋白的图。

[0063] 图49显示了制备pET15b-UB-scFvMEL-TOM7载体的方法。

[0064] 图50显示了UB-scFvMEL-TOM7蛋白在E.coli中的表达。

[0065] 图51显示了制备pCMV-scFvMEL-TOM7-myc/His载体的方法。

[0066] 图52显示了scFvMEL-TOM7-myc/His蛋白在转化的CHO中的表达。

[0067] 图53显示了制备pCMV-scFvPD-L1-TOM7-myc/His载体的方法。

[0068] 图54显示了scFvPD-L1-TOM7-myc/His蛋白在转化的CHO中的表达。

[0069] 图55为确认荧光蛋白是否与线粒体的外膜结合的图。在这种情况下,所述线粒体用MitoTracker CMXRos染色呈红色,TOM70-UB-GFP呈绿色。这两部分重叠的区域显示黄色。此时,a部分的放大倍数是200倍,而b部分的放大倍数是600倍。

[0070] 图56显示了使用Western blot分析以鉴定重组蛋白TOM70-(GGGGS)3-UB-p53和UB-p53-TOM7结合至外源线粒体外膜的结果。

[0071] 图57显示了在分离外源线粒体之后,使用荧光显微镜根据线粒体的浓度观察胞内注射程度,然后将线粒体注射到细胞中的结果。

[0072] 图58为证实正常线粒体对皮肤癌细胞增殖的影响的图。

[0073] 图59为证实正常线粒体对皮肤癌细胞中活性氧(ROS)产生抑制的图。

[0074] 图60为证实正常线粒体对耐药性的影响的图。

[0075] 图61为证实正常线粒体对细胞中抗氧化剂基因表达的影响的图。

[0076] 图62为显示正常线粒体对癌细胞转移相关的基因表达的影响的图。

[0077] 图63为用于证实重组蛋白p53装载于外源线粒体的外膜上并将重组蛋白p53注射入细胞中的方法的示意图。

[0078] 图64为证实重组蛋白p53装载于外源线粒体的外膜上并且p53被注射到细胞中的图。此时,放大倍数为200倍。

[0079] 图65为证实重组蛋白p53装载于外源线粒体的外膜上并且p53被注射到细胞中的视图。此时,放大倍数为600倍。

[0080] 图66为证实装载有注入细胞的p53的修饰的线粒体的凋亡能力的方法的示意图,所述细胞使用胃癌细胞系。

[0081] 图67a为通过TUNEL法证实装载有注入胃癌细胞的p53的修饰的线粒体的凋亡能力的图。此时,放大倍数为600倍。

[0082] 图67b为通过荧光测定法证实装载有注入胃癌细胞的p53的修饰的线粒体的凋亡能力的图。

[0083] 图68为证实MDA-MB-231细胞中装载有RKIP的修饰的线粒体对癌细胞转移的抑制作用的图。

[0084] 图69为证实在细胞中表达了靶向癌细胞的单链可变片段(ScFv)抗体的图。

[0085] 图70为通过免疫细胞化学(ICC)实验方法证实靶向癌细胞的单链可变片段(ScFv)抗体的表达并结合至细胞中存在的线粒体的图。在这种情况下,放大倍数为200倍。

[0086] 图71为通过免疫细胞化学(ICC)实验方法证实靶向癌细胞的单链可变片段(ScFv)抗体的表达并结合至细胞中存在的线粒体的图。在这种情况下,放大倍数为600倍。

[0087] 图72为比较与靶向癌细胞的单链可变片段抗体结合的线粒体注射到胃癌细胞系中的效果的图。

[0088] 图73为使用修饰的线粒体的动物实验方案的示意图。

[0089] 图74为一张照片,其中肉眼可观察到肿瘤组织的增加。

[0090] 图75为证实施用线粒体和修饰的线粒体后小鼠体重变化的图。

[0091] 图76为证实施用线粒体和修饰的线粒体后的肿瘤大小的图。

[0092] 图77为证实装载有TOM-UB-p53蛋白的修饰的线粒体可有效抑制A431细胞的增殖的图。

[0093] 图78为通过ATP含量证实分离的线粒体的功能的图。

[0094] 图79为通过膜电位证实分离的线粒体的功能的图。

[0095] 图80为通过测定线粒体ROS(mROS产生)来证实分离的线粒体的损伤程度的图。

[0096] 图81a为显示在线粒体的外膜中存在的蛋白质的结构和TOM70、TOM20或OM45的N末端区域的氨基酸序列的图。

[0097] 图81b为显示TOM5、TOM7、Fis1、VAMP1B、Cytb5、BCL-2或BCL-X的C末端区域的氨基酸序列的图。

[0098] 图82为根据外膜锚定肽和泛素之间是否存在接头来证实所需蛋白质是否解离的图。

[0099] 图83为证实与修饰的线粒体结合的所需蛋白质在细胞中与线粒体分离的图。

具体实施方式

[0100] 在下文中,将详细描述本发明。

[0101] 本发明的一个方面提供了修饰的线粒体,其中,外源蛋白结合至所述线粒体的外膜。

[0102] 所述线粒体可以从哺乳动物中获得,也可以从人类中获得。具体地,所述线粒体可以分离自细胞或组织。例如,所述线粒体可以从体细胞、生殖细胞或干细胞中获得。另外,所述线粒体可以是细胞中的正常线粒体,所述细胞中的线粒体生物活性正常。另外,所述线粒体可以在体外培养。

[0103] 另外,所述线粒体可以获自自体、同种异体或异种对象。具体地,自体线粒体是指从同一对象的组织或细胞获得的线粒体。另外,同种异体线粒体是指从与该对象属于同一物种并且具有等位基因的不同基因型的对象获得的线粒体。另外,异种线粒体是指从与该对象属于不同物种的对象获得的线粒体。

[0104] 具体而言,所述体细胞可以是肌细胞、肝细胞、神经细胞、成纤维细胞、上皮细胞、脂肪细胞、骨细胞、白细胞、淋巴细胞、血小板或粘膜细胞。另外,所述生殖细胞是经历减数分裂和有丝分裂的细胞,并且可以是精子或卵。另外,所述干细胞可以是选自间充质干细胞、成体干细胞、诱导多能干细胞、胚胎干细胞、骨髓干细胞、神经干细胞、角膜缘干细胞和组织来源干细胞中的任何一种。在这种情况下,所述间充质干细胞可以是选自由脐带、脐带血、骨髓、脂肪、肌肉、神经、皮肤、羊膜和胎盘构成的组中的任何一种。

[0105] 另一方面,当从特定细胞分离线粒体时,可以通过各种已知方法分离所述线粒体,例如,使用特定的缓冲液或使用电势差和磁场等。

[0106] 本文所使用的术语“外源蛋白”是指一种蛋白质,所述蛋白质包括能在细胞内和细胞外发挥功能的所需蛋白质。在这种情况下,所述外源蛋白是线粒体中不存在的蛋白质,并且可以是重组蛋白。具体地,所述外源蛋白可以包含线粒体锚定肽和所需蛋白质。另外,所述外源蛋白可以是包含线粒体锚定肽和所需蛋白质的重组融合蛋白。在这种情况下,所述外源蛋白可以包含线粒体锚定肽。优选地,所述线粒体锚定肽可以是可位于线粒体外膜上的肽。因此,所述外源蛋白可以通过线粒体锚定肽结合至所述线粒体的外膜。所述线粒体锚定肽可以是包含存在于线粒体膜蛋白中的蛋白质的N末端区域或C末端区域的肽,并且所述存在于线粒体膜蛋白中的蛋白质的N末端区域或C末端区域可位于所述线粒体的外膜上。在这种情况下,所述锚定肽可以进一步包含线粒体信号序列。

[0107] 所述存在于线粒体膜蛋白中的蛋白质的一个实施方案可以是选自由TOM20、TOM70、OM45、TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中的任何一种。

具体地,当所述线粒体锚定肽来源于由TOM20、TOM70和OM45构成的组中的任何一种时,其可以包含TOM20、TOM70或OM45的N末端区域。所述线粒体锚定肽的一个实施方案可以是来源于酵母的如SEQ ID NO:75所示的TOM70,或来源于人的如SEQ ID NO:76所示的TOM70。另一实施方案可以是来源于酵母的如SEQ ID NO:77所示的TOM20,或来源于人的如SEQ ID NO:78所示的TOM20。另一个实施方案可以是来源于酵母的如SEQ ID NO:79所示的OM45。

[0108] 另外,当所述线粒体锚定肽来源于由TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中的任何一种时,其可以包含选自由TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中的任何一种的C末端区域。所述线粒体锚定肽的一个实施方案可以是来源于酵母的如SEQ ID NO:80所示的TOM5或来源于人的如SEQ ID NO:81所示的TOM5。另一实施方案可以是来源于酵母的如SEQ ID NO:82所示的TOM7,或来源于人的如SEQ ID NO:83所示的TOM7。另一个实施方案可以是来源于酵母的如SEQ ID NO:84所示的TOM22,或来源于人的如SEQ ID NO:85所示的TOM22。另一个实施方案可以是来源于酵母的如SEQ ID NO:86所示的Fis1,或来源于人的如SEQ ID NO:87所示的Fis1。另一个实施方案可以是来源于人的如SEQ ID NO:88所示的Bcl-2α。另一个实施方案可以是来源于酵母的如SEQ ID NO:89所示的VAMP1,或来源于人的如SEQ ID NO:90所示的VAMP1。

[0109] 在这种情况下,能在细胞内和细胞外发挥功能的所需蛋白质可以是选自由在细胞中表现出活性的活性蛋白质、存在于细胞中的蛋白质、以及具有与存在于细胞膜中的配体或受体结合的能力的蛋白质构成的组中的任何一种。

[0110] 所述活性蛋白质或存在于细胞中的蛋白质的一个实施方案可以是选自由p53、Granzyme B(粒酶B)、Bax、Bak、PDCD5、E2F、AP-1(Jun/Fos)、EGR-1、视网膜母细胞瘤(RB)、磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)、E-钙黏附蛋白、神经纤维瘤蛋白2(NF-2)、聚[ADP-核糖]合酶1(PARP-1)、BRCA-1、BRCA-2、腺瘤性息肉病(APC)、肿瘤坏死因子受体相关因子(TRAF)、RAF激酶抑制蛋白(RKIP)、p16、KLF-10、LKB1、LHX6、C-RASSF、DKK-3PD1、Oct3/4、Sox2、Klf4和c-Myc构成的组中的任何一种。当所需蛋白质选自上述组时,所述所需蛋白质可以结合至包含TOM20、TOM70或OM45的N末端区域的锚定肽。

[0111] 此种融合蛋白可以按以下顺序结合:

[0112] N末端-包含TOM20、TOM70或OM45的N末端区域的锚定肽-所需蛋白质-C末端。

[0113] 另外,所述外源蛋白可进一步包含被真核细胞中的蛋白水解酶识别的氨基酸序列,或在锚定肽与所需蛋白质之间的泛素或其片段。真核细胞中的所述蛋白水解酶是指降解真核细胞中存在的蛋白质的酶。在这种情况下,因为外源蛋白包含被降解蛋白质的酶识别的氨基酸序列,结合至线粒体外膜的外源蛋白可以在细胞中分离成锚定肽和所需蛋白质。

[0114] 在这种情况下,所述泛素片段可以包含如SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列的C末端Gly-Gly,并且包含自所述C末端起连续的3至75个氨基酸。另外,所述外源蛋白可进一步包含在所需蛋白质与泛素或其片段之间的接头。在这种情况下,所述接头可以,但不限于由1至150个氨基酸组成,或由10至100个氨基酸组成,或由20至50个氨基酸组成。所述接头可以由适当地选自20种氨基酸的氨基酸组成,优选由甘氨酸和/或丝氨酸组成。所述接头的一个实施方案可以由5至50个氨基酸组成,所述氨基酸由甘氨酸和丝氨酸组成。所述接头的一个实施方案可以是(G4S)n,其中n是1至10的整数,并且n可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

[0115] 另外,所述具有与存在于细胞膜中的配体或受体结合的能力的蛋白质可以是存在于肿瘤细胞表面的配体或受体。在这种情况下,所述存在于肿瘤细胞表面上的配体或受体为选自由CD19、CD20、黑色素瘤抗原E(MAGE)、NY-ESO-1、癌胚抗原(CEA)、黏蛋白1细胞表面相关蛋白(MUC-1)、前列腺酸磷酸酶(PAP)、前列腺特异性抗原(PSA)、存活蛋白、酪氨酸相关蛋白1(tyrp1)、酪氨酸相关蛋白1(tyrp2)、Brachyury、间皮素、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER-2)、ERBB2、Wilms肿瘤蛋白(WT1)、FAP、EpCAM、PD-L1、ACPP、CPT1A、IFNG、CD274、FOLR1、EPCAM、ICAM2、NCAM1、LRRC4、UNC5H2 LILRB2、CEACAM、连接素3构成的组中的任何一种或其组合。

[0116] 另外,所述具有与存在于细胞膜中的配体或受体结合的能力的蛋白质可以是与选自以上组的任一种结合的抗体或其片段。具体地,抗体片段是指具有与抗体相同的互补决定区(CDR)的片段。具体地,其可以是Fab、scFv、F(ab')2或其组合。

[0117] 在这种情况下,所述所需蛋白蛋可以结合到锚定肽上,所述锚定肽包含选自由TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中的任何一种的C末端区域,并且所述外源蛋白可以按以下顺序结合:

[0118] N末端-所需蛋白质-锚定肽,其包含选自由TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中的任何一种的C末端区域-C末端。

[0119] 另外,所述外源蛋白可以进一步包含在所需蛋白质与选自由TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中任何一种的C末端区域之间的接头。在这种情况下,所述接头如上所述。在这种情况下,所需蛋白质、活性蛋白质、存在于细胞中的蛋白质以及具有与存在于细胞膜中的配体或受体结合的能力的蛋白质等如上所述。

[0120] 在所述所需蛋白质的一个实施方案中,靶向特定细胞的抗体或其片段可以是与锚定肽结合的形式,所述锚定肽包含选自由TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中的任何一种的C末端区域。与所述所需蛋白质结合的所述修饰的线粒体可以容易地引入特定的靶点,从而所述线粒体可有效地进入特定细胞。

[0121] 所述修饰的线粒体的一个实施方案可以是与一种或多种所需蛋白质结合的形式。具体而言,可以是与含有p53的所需蛋白质和含有抗HER-2抗体的所需蛋白质或其片段结合的形式。这种修饰的线粒体可以有效地将线粒体递送至表达HER-2的癌细胞中。另外,可通过与修饰的线粒体结合的p53有效杀死癌细胞。

[0122] 根据修饰的线粒体的目的,可以构建包含一种或多种活性蛋白质的所需蛋白质,并使其与线粒体结合。另外,根据靶细胞,可以以各种方式构建靶向细胞的所需蛋白质。

[0123] 在本发明的另一方面,提供了一种药物组合物,其包含上述修饰的线粒体作为活性成分。在这种情况下,所述药物组合物可以用于预防或治疗癌症。在这种情况下,所述癌症可以为选自由胃癌、肝癌、肺癌、结肠直肠癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、胰腺癌、宫颈癌、甲状腺癌、喉癌、急性髓细胞性白血病、脑瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、唾液腺癌和淋巴瘤构成的组中的任何一种。

[0124] 具体地,当活性蛋白质,例如p53,杀死肿瘤细胞时,或者当抑制增殖的蛋白结合到线粒体上时,结合有p53的修饰的线粒体可以用作抗癌剂。另外,当能够抑制癌细胞转移的诸如RKIP的蛋白质结合至线粒体时,结合RKIP的修饰的线粒体可以用作肿瘤转移抑制剂。当选自由抑制肿瘤细胞增殖,或者控制肿瘤细胞中磷酸化反应的粒酶B、Bax、Bak、PDCD5、

E2F、AP-1(Jun/Fos)、EGR-1、视网膜母细胞瘤(RB)、磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)、E-钙黏附蛋白、神经纤维瘤蛋白2(NF-2)、聚[ADP-核糖]合酶1(PARP-1)、BRCA-1、BRCA-2、腺瘤性息肉病(APC)、肿瘤坏死因子受体相关因子(TRAF)、RAF激酶抑制蛋白(RKIP)、p16、KLF-10、LKB1、LHX6、C-RASSF、DKK-3PD1及其组合构成的组中的任何一种时,结合至线粒体,与所述活性蛋白质结合的修饰的线粒体可以用作抗癌剂。

[0125] 另外,对于药物组合物,可以但不限于以0.1μg/mL至500μg/mL、0.2μg/mL至450μg/mL或0.5μg/mL至400μg/mL的浓度包含线粒体。所述线粒体的含量在上述范围内可以促进给药后线粒体的剂量调节,并且可以增加患者疾病症状的改善程度。在这种情况下,所述线粒体的剂量可以通过量化分离的线粒体的膜蛋白进行线粒体量化来确定。具体地,所述分离的线粒体可以通过Bradford蛋白测定法(James D.McCully撰写的论文(JVis Exp.2014;(91):51682.)进行定量。

[0126] 另外,对于药物组合物,结合线粒体的活性蛋白质可以但不限于是0.1μg/mL至500μg/mL、0.2μg/mL至450μg/mL或0.5μg/mL至400μg/mL的浓度。在上述范围内包含的活性蛋白质可以促进给药后活性蛋白质的剂量调节,并且可以增加患者疾病症状的改善程度。

[0127] 另外,对于药物组合物,能将线粒体递送至特定细胞的靶向蛋白可以但不限于是0.1μg/mL至500μg/mL、0.2μg/mL至450μg/mL或0.5μg/mL至400μg/mL的浓度。在上述范围内包含的靶向蛋白可以在施用时促进靶向蛋白的剂量调节并且可以增加患者疾病症状的改善程度。

[0128] 具体地,根据本发明的药物组合物可以但不限于基于体重以每次0.01-5mg/kg、0.1-4mg/kg或0.25-2.5mg/kg的线粒体的量施用于用药的个体。即,就细胞活性而言,最优选基于具有癌组织的个体的体重,以修饰的线粒体的量落入上述范围内的方式施用所述药物组合物。另外,所述药物组合物可以施用1-10次、3-8次或5-6次,优选5次。在这种情况下,给药间隔可以是1-7天、或2-5天,优选3天。

[0129] 另外,根据本发明的药物组合物可以施用于易患癌症或患有癌症的人或其他哺乳动物。另外,所述药物组合物可以是可以静脉内施用的注射剂或可以局部施用的注射剂,并且可以优选地是用于注射的制剂。

[0130] 因此,根据本发明的药物组合物可以通过使用可用于注射剂制备的缓冲溶液如酸性水溶液或磷酸盐来调节组合物的pH,从而制备物理或化学上高度稳定的注射剂,以确保在注射剂分配过程中产品的稳定性。

[0131] 具体而言,本发明的药物组合物可以包含注射用水。所述注射用水是为溶解固体注射剂或稀释水溶性注射剂而制备的蒸馏水,可以是葡萄糖注射剂、木糖醇注射剂、D-甘露醇注射剂、果糖注射剂、盐水、右旋糖酐40注射剂、右旋糖酐70注射剂、氨基酸注射液、林格氏溶液、乳酸-林格氏溶液、pH为3.5至7.5的磷酸盐缓冲溶液、磷酸二氢钠-柠檬酸盐缓冲溶液等。

[0132] 另外,本发明的药物组合物可以包含稳定剂或溶解助剂。例如,所述稳定剂可以是焦亚硫酸钠或乙二胺四乙酸,并且所述溶解助剂可以是盐酸、乙酸、氢氧化钠、碳酸氢钠、碳酸钠或氢氧化钾。

[0133] 另外,本发明可以提供一种预防或治疗癌症的方法,其包括将上述药物组合物施用于个体。在此,所述个体可以是哺乳动物,并且优选地是人类。

[0134] 本发明的一个方面提供了一种制备修饰的线粒体的方法,其包括将分离的线粒体与包含活性蛋白质的所需蛋白质和/或包含靶向蛋白靶点的所需蛋白质混合的步骤。

[0135] 在这种情况下,所述所需蛋白质和所述线粒体可以适当的比例混合。例如,所需蛋白质:线粒体可以基于1:100至100:1的重量比混合。具体地,可以以1:10、1:5、1:4、1:3、1:2或1:1的比例混合。另外,所述比例可以为10:1、5:1、4:1、3:1或2:1。

[0136] 在本发明的另一方面,提供了一种通过将编码上述所需蛋白质的多核苷酸注射到真核细胞中来从转化细胞制备修饰的线粒体的方法。具体地,提供了一种制备上述融合蛋白的方法,其包括将上述多核苷酸转化到没有泛素降解酶或蛋白水解酶的原核细胞或真核细胞中的步骤;和获得融合蛋白的步骤。所述制备方法适用于所需蛋白质不包含被真核细胞中的蛋白水解酶或者泛素或其片段识别的氨基酸序列。

[0137] 在本发明的另一方面,所需蛋白质可以通过原核细胞或原核细胞提取物制备。另外,提供了一种使用不具有泛素降解酶或蛋白水解酶的真核细胞或真核细胞提取物制备修饰的线粒体的方法。

[0138] 在本发明的另一方面,提供了线粒体作为外源蛋白的递送手段的用途。具体地,所述修饰的线粒体可以作为胞内和胞外递送包含能在细胞内和细胞外发挥功能的所需蛋白质的外源蛋白的手段。所述线粒体可以有效地引入细胞,并且在这种情况下,期望被递送至细胞的外源蛋白可以被有效地递送至细胞。在这种情况下,所述线粒体可以作为有效的蛋白质递送系统。所述所需蛋白质如上所述。

[0139] 本发明的另一方面提供了一种融合蛋白,其包含线粒体外膜锚定肽和所需蛋白质。在这种情况下,所述所需蛋白质如上所述。

[0140] 如本文使用的术语“线粒体外膜锚定肽”可以是存在于线粒体外膜中的蛋白质的N末端或C末端。所述线粒体外膜锚定肽可以具有特异性定位于线粒体外膜的氨基酸序列。在这种情况下,所述线粒体外膜锚定肽使本发明公开的融合蛋白附着于线粒体的外膜。在这种情况下,所述线粒体外膜锚定肽可以与线粒体外膜靶向肽具有相同的使用意义。

[0141] 另外,所述线粒体外膜锚定肽阻止本发明中公开的融合蛋白进入线粒体的内部。存在于线粒体外膜中的TOM(外膜转运酶)复合物的氨基端具有线粒体靶序列和单个外膜锚定域,并且大多数的羧基端可能具有暴露于胞质的结构(图81a)。线粒体外膜中存在的TOM(外膜转运酶)复合物的羧基端具有线粒体靶序列和单个外膜锚定域,并且大多数的氨基端也可能具有暴露于胞质的结构(图81b)。另外,存在于线粒体外膜中的蛋白质可以选自存在于真核细胞中的线粒体中的蛋白质。例如,它可以选自存在于酵母、动物细胞或人类细胞中的线粒体外膜中的蛋白质。

[0142] 在这种情况下,存在于线粒体外膜中的蛋白质的一个实施方案可以是选自由TOM20、TOM70、OM45、TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B或其片段构成的组中的任何一种。在这种情况下,所述线粒体外膜锚定肽可以是选自由TOM20、TOM70、OM45、TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中的任何一种蛋白质的片段。在这种情况下,所述外膜锚定肽可以是位于线粒体外膜中的TOM20、TOM70、OM45、TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B的C末端或N末端多肽。

[0143] 具体地,当线粒体外膜锚定肽与所需蛋白质的N末端融合时,所述线粒体外膜锚定肽可以包含选自由TOM20、TOM70和OM45构成的组中的蛋白质的末端序列。优选地,其可以是

选自由TOM20、TOM70和OM45构成的组中的蛋白质的N末端序列。所述线粒体外膜锚定肽的一个实施方案如上所述。

[0144] 另外,当线粒体外膜锚定肽与所需蛋白质的C末端融合时,外膜靶向蛋白可包含选自由TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中的蛋白质的末端序列。优选地,其可以是选自由TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中的蛋白质的C末端序列。所述线粒体外膜锚定肽的一个实施方案如上所述。

[0145] 如本文使用的术语“活性蛋白质”可以是表现出生理活性的蛋白质。这种活性蛋白质的一个实施方案可以是在受损的癌细胞中存在的功能降低的蛋白质或修饰的蛋白质。所述活性蛋白质的一个实施方案可以是增强细胞活性的蛋白质。这种活性蛋白质的一个实施方案如上所述。

[0146] 所述融合蛋白可以是从N末端到C末端结合了线粒体外膜靶向蛋白和所需蛋白质的蛋白质。在这种情况下,其可以进一步包含在线粒体外膜靶向蛋白和所需蛋白质之间具有泛素蛋白酶特异性切割位点(甘氨酸-甘氨酸)的泛素或其片段。在这种情况下,为了促进泛素蛋白酶的切割,其可以进一步包含在线粒体外膜靶向蛋白和泛素蛋白之间的含有亲水和极性氨基酸(丝氨酸、甘氨酸和苏氨酸)的接头。

[0147] 如本文使用的术语“泛素”是指参与蛋白水解过程的蛋白质,也称为UB。所述泛素的一个实施方案可以是存在于人体中的泛素或存在于酵母中的泛素。人体中的泛素由76个氨基酸组成。在这种情况下,泛素可以以成熟形式使用。如本文使用的术语“成熟形式”可以指去除信号肽的形式的蛋白质。

[0148] 另外,一种称为泛素蛋白酶或UBP(泛素特异性蛋白酶)的酶天然存在于真核细胞中,并且可以通过裂解细胞中泛素的C末端氨基酸甘氨酸-甘氨酸位点来诱导所需蛋白质的自然解离。

[0149] 在这种情况下,泛素片段可以包含泛素的C末端的Gly-Gly氨基酸,并且可以包含自C末端起连续的3至75个氨基酸。具体地,所述泛素片段的一个实施方案可以是Arg-Gly-Gly、Leu-Arg-Gly-Gly、Arg-Leu-Arg-Gly-Gly、或Leu-Arg-Leu-Arg-Gly-Gly。另外,所述泛素片段可以具有如SEQ ID NO:71所示的氨基酸序列。

[0150] 包含线粒体外膜靶向蛋白和所需蛋白质的融合蛋白可以称为修饰线粒体活性的融合蛋白。此种融合蛋白可具有以下任何一种结构:

[0151] <结构式1>

[0152] N末端-线粒体外膜锚定肽-所需蛋白质-C末端

[0153] <结构式2>

[0154] N末端-线粒体外膜锚定肽-泛素或其片段-所需蛋白质-C末端

[0155] <结构式3>

[0156] N末端-线粒体外膜靶向肽-接头1-泛素或其片段-所需蛋白质-C末端

[0157] <结构式4>

[0158] N末端-线粒体外膜锚定肽-泛素或其片段-接头2-所需蛋白质-C末端

[0159] <结构式5>

[0160] N末端-线粒体外膜锚定肽-接头1-泛素或其片段-接头2-所需蛋白质-C末端

[0161] 在上述结构式1-5中,所述外膜锚定肽可以为选自由TOM20、TOM70和OM45构成的组

中的蛋白质的末端序列,并且所述所需蛋白质可以为选自由p53、粒酶B、Bax、Bak、PDCD5、E2F、AP-1(Jun/Fos)、EGR-1、视网膜母细胞瘤(RB)、磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)、E-钙黏附蛋白、神经纤维瘤蛋白2(NF-2)、聚[ADP-核糖]合酶1(PARP-1)、BRCA-1、BRCA-2、腺瘤性息肉病(APC)、肿瘤坏死因子受体相关因子(TRAF)、RAF激酶抑制蛋白(RKIP)、p16、KLF-10、LKB1、LHX6、C-RASSF、DKK-3PD1构成的组中的任何一种。

[0162] 在这种情况下,所述接头1或2可以为分别由1至100、1至80、1至50或1至30个氨基酸组成的多肽,并且可以优选地是由1至30个氨基酸组成的多肽,所述氨基酸为单独的丝氨酸、甘氨酸或苏氨酸或者其组合。另外,接头1或2可以为分别由5至15个氨基酸组成的多肽,并且可以为优选地由5至15个氨基酸组成的多肽,所述氨基酸为单独的丝氨酸、甘氨酸或苏氨酸或其组合。所述接头的一个实施方案可以是(GGGGS)3(SEQ ID NO:70)。

[0163] <结构式6>

[0164] N末端-所需蛋白质-线粒体外膜锚定肽-C末端

[0165] <结构式7>

[0166] N末端-所需蛋白质-泛素或其片段-线粒体外膜锚定肽-C末端

[0167] <结构式8>

[0168] N末端-所需蛋白质-接头1-泛素或其片段-线粒体外膜锚定肽-C末端

[0169] <结构式9>

[0170] N末端-所需蛋白质-泛素或其片段-接头2-线粒体外膜锚定肽-C末端

[0171] <结构式10>

[0172] N末端-所需蛋白质-接头1-泛素或其片段-接头2-线粒体外膜靶向肽-C末端

[0173] 在上述结构式6至10中,所述外膜锚定肽可以为选自由TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-X和VAMP1B构成的组中的蛋白质的末端序列,并且所述所需蛋白质可以为选自由p53、粒酶B、Bax、Bak、PDCD5、E2F、AP-1(Jun/Fos)、EGR-1、视网膜母细胞瘤(RB)、磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)、E-钙黏附蛋白、神经纤维瘤蛋白2(NF-2)、聚[ADP-核糖]合酶1(PARP-1)、BRCA-1、BRCA-2、腺瘤性息肉病(APC)、肿瘤坏死因子受体相关因子(TRAF)、RAF激酶抑制蛋白(RKIP)、p16、KLF-10、LKB1、LHX6、C-RASSF、DKK-3PD1、Oct3/4、Sox2、Klf4和c-Myc构成的组中的任何一种。在这种情况下,所述接头1或2如上所述。

[0174] 本发明的一个方面提供了一种编码融合蛋白的多核苷酸,其包含线粒体外膜锚定肽和所需蛋白质。

[0175] 另外,本发明的一个方面提供了一种载体,其负载编码包含所需蛋白质的融合蛋白的多核苷酸。

[0176] 另外,本发明的一个方面提供了一种宿主细胞,其中引入了负载有编码包含所需蛋白质的融合蛋白的多核苷酸的载体。

[0177] 本发明的一个方面提供了一种融合蛋白,其包含靶点靶向蛋白质和线粒体外膜靶向蛋白。

[0178] 在这种情况下,所述靶点靶向蛋白质和线粒体外膜锚定蛋白可以从N末端结合至C末端。在此,所述线粒体外膜锚定肽可以为选自由TOM20、TOM70、OM45、TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中的任何一种。

[0179] 如本文使用的术语“靶点”是指修饰的线粒体应被递送的位置。所述靶点的一个实

施方案可以是癌细胞。具体地,所述靶点的一个实施方案可以是存在于癌细胞表面上的生物标志物。具体而言,所述靶点可以是肿瘤相关抗原(TAA)。在这种情况下,所述肿瘤相关抗原可以为选自由CD19、CD20、黑色素瘤抗原E(MAGE)、NY-ESO-1、癌胚抗原(CEA)、黏蛋白1细胞表面相关蛋白(MUC-1)、前列腺酸磷酸酶(PAP)、前列腺特异性抗原(PSA)、存活蛋白、酪氨酸相关蛋白1(tyrp1)、酪氨酸相关蛋白1(tyrp2)、Brachyury、间皮素、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER-2)、ERBB2、Wilms肿瘤蛋白(WT1)、FAP、EpCAM、PD-L1、ACPP、CPT1A、IFNG、CD274、FOLR1、EPCAM、ICAM2、NCAM1、LRRC4、UNC5H2 LILRB2、CEACAM、连接素3及其组合构成的组中的任何一种。

[0180] 如本文使用的术语"靶点靶向蛋白"可以是能够结合上述靶点的蛋白序列。在这种情况下,所述靶点靶向蛋白的一个实施方案可以是与癌细胞表面上存在的生物标志物结合的蛋白。在这种情况下,所述存在于癌细胞表面的生物标志物的实施方案可以是但不限于ICAM2、NCAM1、LRRC4、UNC5H2 LILRB2、CEACAM或连接素-3。在这种情况下,所述靶点靶向蛋白可以包括在上述外源蛋白中。

[0181] 所述靶点靶向蛋白的一个实施方案可以是抗体或其片段。具体地,其可以是与肿瘤相关抗原特异性结合的抗体或其片段。另外,所述抗体的片段可以是选自由Fab、Fab'、scFv和F(ab)2构成的组中的任何一种。

[0182] 所述靶点靶向蛋白的一个实施方案可以是能结合表皮生长因子受体的scFvHER。另一个实施方案可以是能靶向黑色素瘤的scFvMEL。另一个实施方案可以是能结合在癌细胞表面过表达的PD-L1的scFvPD-L1。另一个实施方案可以是能结合在癌细胞表面过表达的PDL-1的PD-1。

[0183] 本发明的一个方面可以进一步在靶点靶向蛋白和线粒体外膜靶向蛋白之间包含泛素或其片段。包含所述线粒体靶点靶向蛋白和所述所需蛋白的所述融合蛋白可以称为修饰线粒体活性的融合蛋白。此种融合蛋白可具有以下任何一种结构:

[0184] <结构式11>

[0185] N末端-靶点靶向蛋白-线粒体外膜锚定肽-C末端

[0186] <结构式12>

[0187] N末端-靶点靶向蛋白-泛素或其片段-线粒体外膜锚定肽-C末端

[0188] <结构式13>

[0189] N末端-靶点靶向蛋白-接头1-泛素或其片段-线粒体外膜锚定肽-C末端

[0190] <结构式14>

[0191] N末端-靶点靶向蛋白-泛素或其片段-接头2-线粒体外膜锚定肽-C末端

[0192] <结构式15>

[0193] N末端-靶点靶向蛋白-接头1-泛素或其片段-接头2-线粒体外膜锚定肽-C端

[0194] 在上述结构式11至15中,所述外膜锚定肽可以为选自由TOM5、TOM6、TOM7、TOM22、Fis1、Bcl-2、Bcl-x和VAMP1B构成的组中的蛋白质的末端序列,并且所述靶点靶向蛋白可以为选自由肿瘤相关抗原、CD19、CD20、黑色素瘤抗原E(MAGE)、NY-ESO-1、癌胚抗原(CEA)、黏蛋白1细胞表面相关蛋白(MUC-1)、前列腺酸磷酸酶(PAP)、前列腺特异性抗原(PSA)、存活蛋白、酪氨酸相关蛋白1(tyrp1)、酪氨酸相关蛋白1(tyrp2)、Brachyury、间皮素、表皮生长因子受体(EGFR)、人表皮生长因子受体2(HER-2)、ERBB2、Wilms肿瘤蛋白(WT1)、FAP、EpCAM、

PD-L1、ACPP、CPT1A、IFNG、CD274、FOLR1、EPCAM、ICAM2、NCAM1、LRRC4、UNC5H2 LILRB2、CEACAM、连接素3中及其组合构成的组中的任何一种。另外,所述靶点靶向蛋白可以是与肿瘤相关抗原或其片段特异性结合的抗体。在这种情况下,所述接头1或2,以及被蛋白水解酶识别的氨基酸序列如上所述。

[0195] <结构式16>

[0196] N末端-线粒体外膜锚定肽-靶点靶向蛋白-C末端

[0197] <结构式17>

[0198] N末端-线粒体外膜锚定肽-泛素或其片段-靶点靶向蛋白-C末端

[0199] <结构式18>

[0200] N末端-线粒体外膜锚定肽-接头1-泛素或其片段-靶点靶向蛋白-C末端

[0201] <结构式19>

[0202] N末端-线粒体外膜锚定肽-泛素或其片段-接头2-靶点靶向蛋白-C末端

[0203] <结构式20>

[0204] N末端-线粒体外膜锚定肽-接头1-泛素或其片段-接头2-靶点靶向蛋白-C末端

[0205] 在上述结构式16至20中,所述外膜锚定肽可以为选自由TOM20、TOM70和OM45构成的组中的任何一种。另外,所述靶点靶向蛋白、泛素或其片段以及接头1或2如上所述。

[0206] 本发明的一个方面提供了编码包含靶点靶向蛋白的融合蛋白的多核苷酸。

[0207] 另外,本发明的一个方面提供了一种载体,其负载编码包含靶点靶向蛋白的融合蛋白的多核苷酸。

[0208] 另外,本发明的一个方面提供了一种宿主细胞,其中引入了负载有编码包含靶点靶向蛋白的融合蛋白的多核苷酸的载体。所述宿主细胞可以为原核细胞或真核细胞。在这种情况下,优选地,所述真核细胞可以是去除了可降解泛素的酶的菌株。

[0209] 另外,本发明的一个方面提供了一种通过将编码融合蛋白的多核苷酸注射到真核细胞中以从转化的细胞制备修饰的线粒体的方法。

[0210] 实施例

[0211] 在下文中,将提出优选实施方案以帮助理解本发明。然而,提供以下实施例仅是为了容易理解本发明,并且本发明不限于以下实施例。

[0212] I.制备包含线粒体外膜锚定肽、接头、泛素和所需蛋白质的融合蛋白

[0213] 实施例1.制备包含p53的融合蛋白

[0214] 实施例1.1.p53基因的扩增

[0215] 为了以重组蛋白表达人p53,从人上皮细胞中提取总RNA,并由此合成cDNA。具体地,将人皮肤成纤维细胞在5%二氧化碳和37℃的条件下培养于10%血清培养基中(1×10^6细胞)。然后,除去培养液并通过向细胞中加入PBS缓冲液洗涤两次,之后直接加入0.5ml RNA提取物(Trizol试剂,Thermo Fisher Scientific)。将添加有RNA提取物的混合物在环境温度下静置10分钟,然后添加0.1ml的氯仿并搅拌15秒,然后以约12,000×g离心10分钟。接下来,取出分离的上清液,并加入相同体积的异丙醇,并以12,000×g再次离心10分钟。此后,除去液体并用75%乙醇洗涤一1次,并将RNA在环境温度下干燥。

[0216] 加入约50μl无核酸酶的纯化蒸馏水,并使用分光光度计测定RNA的量和纯度。为了合成cDNA,将2μg纯化的总RNA与oligo dT在70℃下结合反应5分钟。之后,加入10×逆转录

反应缓冲液、10mM dNTP、核酸酶抑制剂和M-MLV逆转录酶(Enzynomics,Korea),并在42℃进行cDNA合成反应60分钟。之后,通过在72℃加热5分钟使逆转录酶失活,然后加入RNA酶H以除去单链RNA,其用作p53基因的聚合酶链式反应的模板。

[0217] 为了获得从人皮肤成纤维细胞去除信号肽序列的p53基因,合成了从氨基端谷氨酸编码的引物(T2p53)和从羧基端编码的引物(Xp53),并使用以上制备的cDNA作为模板进行PCR。各引物的序列如下表1所示。

[0218] [表1]

[0219]

引物	序列	SEQ ID NO.
T2p53	5'-AAA AAACCG CGG TGG TGA GGA GCC GCA GTC AGA TCC TAG-3'	SEQ ID NO:1
Xp53	5'-AAA AAACTC GAG TGA GTC TGA GTC AGG CCC TTC TG-3'	SEQ ID NO:2

[0220] 将0.2pmol T2p53引物和0.2pmol Xp53引物与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、40个循环进行扩增反应。反应后,将扩增的约1.2kbp的DNA片段通过1%琼脂糖凝胶电泳分离,然后使用T4DNA连接酶插入到pGEM-T easy(Promega,USA)载体中。对获得的DNA进行测序的结果,证实获得了编码人p53蛋白的cDNA。将获得的p53基因命名为pTA-p53,其碱基序列与如SEQ ID NO:3所示的碱基序列相同(图1)。

[0221] 实施例1.2.制备p53 E.coli表达载体

[0222] 实施例1.2.1制备质粒pET15b-UB-p53

[0223] 为了制备与泛素融合形式的p53蛋白,制备了以下表达载体。为了获得泛素基因,制备NdeUB引物和T2UB引物。各引物的序列如下表2所示。

[0224] [表2]

[0225]

引物	序列	SEQ ID NO.
NdeUB	5'-GGA TTC CAT ATG CAA CTT TTC GTC AAA ACT CTA AC-3'	SEQ ID NO:4
T2UB	5'-ATG ACC ACC GCG GAG TCT CAA CAC CAA-3'	SEQ ID NO:5

[0226] 将0.2pmol NdeUB引物和0.2pmol T2UB引物与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、25个循环进行扩增反应,得到泛素(UB)基因。用限制酶NdeI和SacII切割扩增的泛素基因,并用限制酶SacII和XhoI切割质粒pTA-p53。之后,通过2%琼脂糖凝胶电泳分别获得约210bp和1,200bp的DNA片段,并用T4DNA连接酶插入到限制酶NdeI和XhoI切割的pET15b载体中,从而获得质粒pET15b-UB-p53(图2)。在这种情况下,UB-p53由如SEQ ID NO:6所示的碱基序列表示。

[0227] 使用质粒pET15b-UB-p53转化E.coli BL21(DE3)菌株。之后,将转化的菌株在添加了抗生素氨苄青霉素的Luria-Bertani(LB)固体培养基中培养,然后将获得的菌落在37℃的LB液体培养基中培养。之后,当细胞密度在OD600达到约0.2吸光度时,加入终浓度为1mM的IPTG,然后继续进行振荡培养约4小时。

[0228] 通过离心获得一部分E.coli细胞,然后破碎细胞,之后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳。如图3所示,证实表达了约60kDa大小的泛素融合的p53蛋白。在这种情况下,图3中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示添加IPTG4小时后破碎E.coli并离心的沉淀物,并且泳

道2显示E.coli破碎后离心的上清液。

[0229] 实施例1.2.2.制备质粒pET11C-TOM70-UB-p53

[0230] 为了制备与结合线粒体外膜的TOM70和泛素融合的p53蛋白,制备了能够以融合TOM70和泛素的形式表达p53的表达载体。为了获得TOM70和泛素基因,制备了NdeTOM70引物、TOM70-AS引物、TOM70UB-S引物和T2UB-AS引物。各种引物的序列如下表3所示。

[0231] [表3]

[0232]

引物	序列	SEQ ID NO.
NdeTOM70	5'-GAA TTC CAT ATG AAA AGT TTT ATA ACT CGG AAT AAA ACT GCA ATT TTC GCA ACT GTT GC -3'	SEQ ID NO: 7
TOM70-AS	5'- GGT GCA TAC TAC TAT TAT CAAA CTT TTC GTC AAA ACT C-3'	SEQ ID NO: 8
TOM70UB-S	5'- GGC TAC GT ATT TAT TTC CAA CTT TTC GTC AAA ACT C-3'	SEQ ID NO: 9
T2UB-AS	5'- GGC ACC ACC GCG GAG TCT CAA CAC 3'	SEQ ID NO: 10

[0233] 为了获得TOM70基因,将0.2pmol NdeTOM70引物和0.2pmol TOM70-AS引物与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、25个循环进行扩增反应,得到TOM70基因。扩增的DNA片段称为N-TOM70。实施例1.2.1中获得的质粒pET15b-UB-p53作为模板,加入0.2pmol TOM70UB-S引物和0.2pmol T2UB-AS引物,以及0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、25个循环进行扩增反应,得到UB基因。扩增的DNA片段称为C-UB。

[0234] 扩增的DNA N-TOM70和C-UB作为模板,并将0.2pmol NdeTOM70引物和0.2pmol T2UB-AS引物与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、25个循环进行扩增反应,得到与扩增的TOM70融合的泛素基因TOM70-UB。

[0235] 用限制酶NdeI和SacII切割扩增的TOM70-UB基因,并用SacII和XhoI切割质粒pTA-p53,并通过2%琼脂糖凝胶电泳分别获得330bp和1,500bp的DNA片段。之后,使用T4DNA连接酶将其插入限制酶NdeI和SalI切割的pET11c载体中,获得质粒pET11c-TOM70-UB-p53(图4)。在这种情况下,TOM70-UB-p53由如SEQ ID NO:11所示的碱基序列表示。

[0236] 使用质粒pET11c-TOM70-UB-p53转化E.coli BL21(DE3)菌株。之后,将转化的菌株在添加有抗生素氨苄青霉素的Luria-Bertani(LB)固体培养基中培养,然后将获得的菌落在振荡培养箱中用LB液体培养基37℃培养。之后,当细胞密度在OD600达到约0.2吸光度时,加入终浓度为1mM的IPTG,然后继续进行振荡培养约4小时。

[0237] 通过离心获得一部分E.coli细胞,然后破碎细胞,之后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳。如图5所示,证实表达了约62kDa大小的融合了泛素的p53蛋白。在这种情况下,泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在添加IPTG4小时后,破碎E.coli后离心的上清液。

[0238] 实施例1.2.3制备质粒pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-p53

[0239] 为了制备融合有结合线粒体外膜的TOM70、接头(GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO:70))和泛素的p53蛋白,制备能够表达融合有TOM70结、接头、以及泛素形式的p53。为了获得与TOM70结合的接头基因,制备TOM70(G)3-AS引物、(G)3UB-S引物和Xp53(noT)引物。各种引物的序列如下表4所示。

[0240] [表4]

[0241]

引物	序列	SEQ ID NO.
TOM70$(G)_3$-AS	5'-GCC CCC GGA TCC TCC ACC CCC GCT TCC GCC ACC	SEQ ID NO: 12

[0242]

	TCC ATA ATA GT AGT ATG CAC CAA TAG -3'	
$(G)_3$UB-S	5'-GGT GGA GGA TCC GGG GGC GC GGA AGC CAA ATC-3'	SEQ ID NO: 13
Xp53(noT)	5'- AAA AAA CTC GAG GTC TGA GTC AGG CCC TTC TG-3'	SEQ ID NO: 14

[0243] 实施例1.2.2中获得的质粒pET11c-TOM70-UB-p53作为模板,加入0.2pmol NdeTOM70引物和0.2pmol TOM70(G)3-AS引物,并与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、25个循环进行扩增反应,得到TOM70-G3基因,其结合了TOM70基因和一个接头。另外,实施例1.2.1中获得的质粒pET15b-UB-p53作为模板,将0.2pmol(G)3UB-S引物和0.2pmol Xp53(noT)引物与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。

[0244] 之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、25个循环进行扩增反应,得到p53与泛素基因融合的UB-p53。用限制酶NdeI和BamHI切割扩增的TOM70-G3基因,并用BamHI和XhoI切割扩增的UB-p53基因,通过2%琼脂糖凝胶电泳分别获得约100bp和1,500bp的DNA片段。之后,用T4DNA连接酶将其插入到限制酶NdeI和SalI切割的pET11c载体中,从而获得质粒pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-p53(图6)。在这种情况下,TOM70-(GGGGS)3-UB-p53由如SEQ ID NO:15所示的碱基序列表示。

[0245] 使用质粒pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-p53转化E.coli BL21(DE3)菌株。将转化的菌株在添加了抗生素氨苄青霉素的Luria-Bertani(LB)固体培养基中培养,然后将获得的菌落在LB液体培养基中于37℃培养。之后,当细胞密度在OD600达到约0.2吸光度时,加入终浓度为1mM的IPTG,然后继续进行振荡培养约4小时。

[0246] 通过离心获得一部分E.coli细胞,然后破碎细胞,之后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳。如图7所示,证实表达了约62kDa大小的融合有TOM70、接头以及泛素的p53蛋白。在这种情况下,图7中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示添加IPTG4小时后,在E.coli破碎后离心的沉淀物,并且泳道2显示E.coli破碎后离心的上清液。

[0247] 实施例1.2.4.制备质粒pET11c-TOM70-(GGGGS)3-p53

[0248] 为了制备与结合线粒体外膜的TOM70和接头(GGGGSGGGGSGGGGS)融合的p53蛋白,制备了能够表达与TOM70和接头融合的p53蛋白的表达载体。为了获得融合TOM70和接头的

p53基因,制备了引物(B(G)3p53)。各引物的序列如下表5所示。

[0249] [表5]

[0250]

引物	序列	SEQ ID NO.
$B(G)_3p53$	5'-GGT GGA GGA TCC GGG GGC GGC GGA AGC GAG GAG CCG CAG TCA GAT CCT AGC -3'	SEQ ID NO: 16

[0251] 实施例1.2.2中获得的质粒pET11c-TOM70-UB-p53作为模板,加入0.2pmol NdeTOM70引物和0.2pmol TOM70(G)3-AS引物,并与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、25个循环进行扩增反应,得到TOM70基因。扩增的DNA片段称为TOM70-G3。

[0252] 实施例1.2.1中获得的质粒pET15b-UB-p53作为模板,将0.2pmol B(G)3p53引物和0.2pmol Xp53(noT)引物与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、25个循环进行扩增反应。扩增的DNA片段称为G3-p53。

[0253] 用NdeI和BamHI切割扩增的DNA片段TOM70-G3,并用限制酶BamHI和XhoI切割DNA片段G3-53。通过2%琼脂糖凝胶电泳分别获得约150bp和1,300bp的DNA片段;之后,用T4DNA连接酶将其插入到限制酶NdeI和SalI切割的pET11c载体中,从而获得质粒pET11c-TOM70-(GGGGS)3-p53(图8)。在这种情况下,质粒pET11c-TOM70-(GGGGS)3-p53由如SEQ ID NO:17所示的碱基序列表示。

[0254] 使用质粒pET11c-TOM70-(GGGGS)3-p53转化E.coli BL21(DE3)菌株。将转化的菌株在添加了抗生素氨苄青霉素的Luria-Bertani(LB)固体培养基中培养,然后将获得的菌落在LB液体培养基中于振荡培养箱37℃培养。之后,当细胞密度在OD600达到约0.2吸光度时,加入终浓度为1mM的IPTG,然后继续进行振荡培养约4小时。

[0255] 通过离心获得一部分E.coli细胞,然后破碎细胞,之后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳。如图9所示,证实表达了约60kDa大小的融合TOM70的p53蛋白。在这种情况下,泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在添加IPTG 4小时后,E.coli破碎后离心的沉淀物,并且泳道2显示E.coli破碎后离心的上清液。

[0256] 实施例1.2.5.pET15b-UB-p53-TOM7

[0257] 为了制备融合有泛素和与线粒体外膜结合的TOM7的p53蛋白,制备了能够表达融合有泛素、p53和TOM的p53的表达载体。为了获得融合TOM7和泛素的p53基因,制备了Xp53(noT)引物、XTOM7引物和LTOM7引物。各种引物的序列如下表6所示。

[0258] [表6]

[0259]

引物	序列	SEQ ID NO.
Xp53(noT)	5'-AAA AAA CTC GAG GTC TGA GTC AGG CCC TTC TG -3'	SEQ ID NO: 18
XTOM7	5'-AAA AAA CTC GAG ttt gcc att cgc tgg ggc ttt atc-3'	SEQ ID NO: 19
LTOM7	5'-AAA AAA GTC GAC TTA TCC CCA AAG TAG GCT CAA AAC AG-3'	SEQ ID NO: 20

[0260] 实施例1.2.1中获得的质粒pET15b-UB-p53作为模板,加入0.2pmol NdeUB引物和0.2pmol Xp53(noT)引物,并与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、25个循环进行扩增反应,得到UB-p53基因。另外,上述制备的cDNA作为模板,将0.2pmol XTOM7引物和0.2pmol LTOM7引物与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。

[0261] 之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、40个循环进行扩增反应,得到TOM7基因。用限制酶NdeI和XhoI切割扩增的DNA片段,UB-p53,并用XhoI和SalI切割扩增的TOM7基因,通过2%琼脂糖凝胶电泳分别获得约1,500bp和150bp的DNA片段;之后,用T4DNA连接酶将其插入到限制酶NdeI和XhoI切割的pET15b载体中,从而获得质粒pET15b-UB-p53-TOM7(图10)。在这种情况下,pET15b-UB-p53-TOM7由如SEQ ID NO:21所示的碱基序列表示。

[0262] 使用质粒pET15b-UB-p53-TOM7转化E.coli BL21(DE3)菌株。将转化的菌株在添加了抗生素氨苄青霉素的Luria-Bertani(LB)固体培养基中培养,然后将获得的菌落在37℃的LB液体培养基中培养。之后,当细胞密度在OD600达到约0.2吸光度时,加入终浓度为1mM的IPTG,然后继续进行振荡培养约4小时。

[0263] 通过离心获得一部分E.coli细胞,然后破碎细胞,之后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳。如图11所示,证实表达了约60kDa大小的融合泛素和TOM7的p53蛋白。在这种情况下,泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在添加IPTG4小时后,破碎E.coli后离心的上清液,并且泳道2显示E.coli破碎后离心的上清液。

[0264] 实施例1.2.6.构建哺乳动物表达载体pCMV-p53-myc/His

[0265] 制备了能够表达p53的动物细胞的表达载体。为了获得p53基因,制备了Rp53引物。各种引物的序列如下表7所示。

[0266] [表7]

[0267]

引物	序列	SEQ ID NO.
Rp53	5'-AAA AAA GAA TTC ATG GTC TGA GTC AGG CCC TTC TG-3'	SEQ ID NO:23

[0268] 实施例1.2.1中获得的质粒pET-UB-p53作为模板,并将0.2pmol Rp53引物和0.2pmol Xp53(noT)引物与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、25个循环进行扩增反应,得到p53基因。

[0269] 用限制酶EcoRI和XhoI切割扩增的p53基因,并通过2%琼脂糖凝胶电泳获得约1,

300bp的DNA片段;之后,使用T4DNA连接酶将其插入限制酶EcoRI和XhoI切割的pcDNA3.1-myc/His A载体中,获得质粒pCMV-p53-myc/His(图12)。在这种情况下,p53-myc/His由如SEQ ID NO:23所示的碱基序列表示。

[0270] 使用质粒pCMV-p53-myc/His转染动物细胞CHO,然后破碎细胞,之后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳,并通过抗c-myc抗体进行Western blot显示。如图13所示,证实表达了约55kDa大小的p53蛋白。在这种情况下,泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示其已转染动物细胞CHO,然后破碎细胞,之后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳,并通过抗c-myc抗体进行Western blot显示。

[0271] 实施例1.3.分离和纯化包含p53的融合蛋白

[0272] 实施例1.3.1分离和纯化来源于E.coli的重组TOM70-(GGGGS)3-p53蛋白

[0273] 将表达重组TOM70-(GGGGS)3-p53蛋白的E.coli BL21(DE3)生产菌株接种到LB液体培养基中,并在37℃的条件下培养。之后,当OD600处的吸光度达到0.4时,加入0.5mM IPTG,并且进一步振荡培养4小时以表达TOM70-(GGGGS)3-p53蛋白。

[0274] 培养完成后,通过离心回收细胞,并用PBS洗涤1次回收的细胞,然后使用PBS溶液悬浮细胞,并使用超声仪对悬浮的细胞进行破碎处理。使用高速离心机离心破碎的细胞,然后回收不溶组分,并使用含50mM Tris、100mM乙二胺四乙酸(EDTA),pH 8.0溶液将回收的不溶组分洗涤3次。之后,将其溶解在含6M胍、100mM磷酸钠、10mM Tris,pH 8.0溶液中,并使用0.45μm过滤器过滤,然后装载在预填充的镍色谱柱上以进行初步纯化。

[0275] 载入包含TOM70-(GGGGS)3-p53蛋白的溶液,然后直到未检测到未结合的杂质为止,用含8M尿素、50mM磷酸钠、500mM NaCl、10mM咪唑,pH 8.0的溶液作为流入的洗涤溶液,并当咪唑浓度更改为50mM、100mM、250mM、500mM时,使用含8M尿素、50mM磷酸钠、500mM NaCl、500mM咪唑、pH 8.0的溶液洗脱蛋白质(图14)。在这种情况下,图14中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示镍亲和色谱上样样品。泳道2显示其没有与镍亲和树脂结合。泳道3至4显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/50mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道5至7显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/100mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道8至9显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/250mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道10至11显示了用8MUREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/500mM咪唑溶液洗脱的结果。

[0276] 从镍色谱柱回收的洗脱溶液应用通透压原理与PBS进行溶液交换。溶液交换完成后,将洗脱液进行离心分离以回收上清液,并通过蛋白质定量方法测定回收的洗脱液的蛋白量,并使用SDS-PAGE进行确认。如图15所示,确认完成后,将TOM70-(GGGGS)3-p53蛋白用液氮淬灭,并保存在-80℃的低温冷冻冰箱中。在这种情况下,泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在PBS缓冲溶液中透析后获得的TOM70-(GGGGS)3-p53蛋白。

[0277] 实施例1.3.2.分离和纯化来源于E.coli的重组TOM70-(GGGGS)3-UB-p53蛋白

[0278] 采用与实施例1.3.1相同的方法,将表达TOM70-(GGGGS)3-UB-p53重组蛋白的E.coli用于分离和纯化TOM70-(GGGGS)3-UB-p53蛋白。结果,TOM70-(GGGGS)3-UB-p53蛋白得以洗脱(图16)。在这种情况下,图16中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示镍亲和色谱上样样品。泳道2显示其没有与镍亲和树脂结合。泳道3显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/50mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道4至7显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/100mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道8至11显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/

250mM咪唑溶液洗脱的结果。

[0279] 通过蛋白质定量方法测定回收的洗脱溶液的蛋白量,并使用SDS-PAGE确认。如图17所示,确认完成后,将TOM70-(GGGGS)3-UB-p53蛋白用液氮淬灭,并保存在-80℃的低温冷冻冰箱中。在这种情况下,图17中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在PBS缓冲溶液中透析后获得的TOM70-(GGGGS)3-UB-p53蛋白。

[0280] 实施例1.3.3.分离和纯化来源于E.coli的重组UB-p53蛋白

[0281] 将表达与泛素融合的成熟UB-p53蛋白的BL21(DE3)生产菌株接种到LB液体培养基中,并在37℃的振荡培养箱中培养。当OD 600处的吸光度达到0.4时,加入0.5mM IPTG,并进一步振荡培养4小时以表达与泛素融合的成熟形式的UB-p53蛋白。

[0282] 然后,以与实施例1.3.1相同的方法分离并纯化UB-p53蛋白。结果,洗脱UB-p53蛋白(图18)。在这种情况下,图18中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示镍亲和色谱柱上样样品。泳道2显示其没有与镍亲和树脂结合。泳道3显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/50mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道4至6显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/100mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道7至9显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/250mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道10至11显示了用8MUREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/500mM咪唑溶液洗脱的结果。

[0283] 通过蛋白质定量方法测定回收的洗脱溶液的蛋白量,并使用SDS-PAGE确认。如图19所示,确认完成后,用液氮淬灭UB-p53蛋白,并保存在-80℃的低温冷冻冰箱中。在这种情况下,图19中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在PBS缓冲溶液中透析后获得的UB-p53蛋白。

[0284] 实施例1.3.4.分离和纯化来源于E.coli的重组UB-p53-TOM7蛋白

[0285] 将表达与泛素融合的成熟形式的UB-p53-TOM7蛋白的E.coliBL21(DE3)生产菌株接种到LB液体培养基中,并在37℃的条件下培养。当OD600处的吸光度达到0.4时,加入0.5mM IPTG,并且进一步进振荡培养4小时以表达融合泛素的成熟形式的UB-p53-TOM7蛋白。

[0286] 然后,以与实施例1.3.1相同的方法分离并纯化UB-p53-TOM7蛋白。结果,UB-p53-TOM7蛋白得以洗脱(图20)。在这种情况下,图20中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示镍亲和色谱柱上样样品。泳道2显示其没有与镍亲和树脂结合。泳道3显示了8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/10mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道4显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/50mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道5至7显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/100mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道8至9显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/250mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道10至11显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/500mM咪唑溶液洗脱的结果。

[0287] 通过蛋白质定量方法测定回收的洗脱溶液的蛋白量,并使用SDS-PAGE确认。如图21所示,确认完成后,用液氮淬灭UB-p53蛋白,并保存在-80℃的低温冷冻冰箱中。在这种情况下,图21中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在PBS缓冲溶液中透析后获得的UB-p53-TOM7蛋白。

[0288] 实施例2.制备包含粒酶B的融合蛋白

[0289] 实施例2.1扩增粒酶B基因

[0290] 为以重组蛋白表达人粒酶B,从人自然杀伤细胞中提取总RNA,并由此合成cDNA。具体地,将人自然杀伤细胞在5%二氧化碳和37℃的条件下培养于10%血清培养基中(1×10^6细胞)。之后,以与实施例1.1相同的方法获得RNA,然后将其用作粒酶B基因的聚合酶链式反应的模板。

[0291] 为了获得从人自然杀伤细胞中去除了信号肽序列的粒酶B基因,合成了从氨基端异亮氨酸编码的引物T2GZMB和从羧基端编码的引物XGZMB(noT),然后以上述制备的cDNA作为模板进行PCR。各种引物的序列如下表8所示。

[0292] [表8]

[0293]

引物	序列	SEQ ID NO.
T2GZMB	5'-AAA AAA CCG CGG TGG TAT CAT CGG GGG ACA TGA GGC ACA TGA GGC CAA GCC -3'	SEQ ID NO: 24
XGZMB(noT)	5'-AAA AAA CTC GAG GTA GCG TTT CAT GGT TTT CTT TAT CC-3'	SEQ ID NO: 25

[0294] 将上述制备的cDNA作为模板,并将0.2pmol T2GZMB引物和0.2pmol XGZMB(noT)引物与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、40个循环进行扩增反应。反应后,通过1%琼脂糖凝胶电泳分离约700bp的扩增的DNA片段,然后使用T4DNA连接酶插入到pGEM-T easy(Promega,USA)载体中。对获得的DNA进行测序的结果,证实获得了编码人粒酶B蛋白的cDNA。将获得的粒酶B基因命名为pTA-Granzyme B,并且粒酶B基因由如SEQ ID NO:26所示的碱基序列表示(图22)。

[0295] 实施例2.2.制备粒酶B蛋白的E.coli表达载体

[0296] 实施例2.2.1.制备质粒pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-Granzyme B

[0297] 为了制备融合有结合至线粒体外膜的TOM70、接头(GGGGSGGGGSGGGGS)和泛素融合的粒酶B蛋白,制备能够表达融合有TOM70、接头和泛素的粒酶B的表达载体。

[0298] 用限制酶SacII和XhoI切割上述实施例2.1中获得的质粒pTA-Granzyme B基因,并通过2%琼脂糖凝胶电泳获得约700bp的DNA片段。之后,使用T4DNA连接酶将其插入到限制酶SacII和XhoI切割的pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-(p53)载体中,得到质粒pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-Granzyme B(SEQ ID NO:27)(图23)。

[0299] 使用质粒pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-Granzyme B转化E.coli BL21(DE3)菌株。之后,将转化的菌株在添加了抗生素氨苄青霉素的Luria-Bertani(LB)固体培养基中培养,然后将获得的菌落在LB液体培养基中振荡培养箱37℃培养。之后,当细胞密度在OD 600达到约0.2吸光度时,加入终浓度为0.5mM的IPTG,然后继续进行振荡培养约4小时。

[0300] 通过离心获得一部分E.coli细胞,然后破碎细胞,之后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳。如图24所示,证实表达了约35kDa大小的融合有TOM70、接头和泛素的粒酶B蛋白。在这种情况下,图24中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在添加IPTG4小时后,破碎E.coli并离心的沉淀物,并且泳道2显示E.coli破碎后离心的上清液。

[0301] 实施例2.2.2.制备质粒pET15b-UB-Granzyme B-TOM7

[0302] 为了制备融合泛素和与线粒体外膜结合的TOM7的Granzyme B(粒酶B)蛋白,制备能够表达融合有泛素、Granzyme B和TOM7的形式表达Granzyme B蛋白的表达载体。

[0303] 用限制酶SacII和XhoI切割上述实施例2.1中获得的质粒pTA-Granzyme B基因,并通过2%琼脂糖凝胶电泳获得约700bp的DNA片段。之后,使用T4DNA连接酶将其插入到限制酶SacII和XhoI切割的pET15b-UB-(p53)-TOM7载体中,获得质粒pET15b-UB-GranzymeB-TOM7(图25)。在此,UB-GranzymeB-TOM7由如SEQ ID NO:28所示的碱基序列表示。

[0304] 使用质粒pET15b-UB-GranzymeB-TOM7转化E.coli BL21(DE3)菌株。此后,将转化的菌株在添加了抗生素氨苄青霉素的Luria-Bertani(LB)固体培养基中培养,然后在37℃的LB液体培养基中培养获得的菌落。之后,当细胞密度在OD600达到约0.2吸光度时,加入终浓度为0.5mM的IPTG,然后继续进行振荡培养约4小时。

[0305] 通过离心获得一部分E.coli细胞,然后破碎细胞,之后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳。如图26所示,证实表达了约35kDa大小的融合有泛素和TOM70的Granzyme B蛋白。在这种情况下,图26中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在添加IPTG4小时后,破碎E.coli并离心的沉淀物,并且泳道2显示E.coli破碎后离心的上清液。

[0306] 实施例2.3.分离和纯化来源于E.coli的重组TOM70-(GGGGS)3-UB-GranzymeB蛋白

[0307] 用与实施例1.3.1相同的方法分离并纯化TOM70-(GGGGS)3-UB-GranzymeB蛋白。结果,TOM70-(GGGGS)3-UB-GranzymeB蛋白得以洗脱(图27)。在这种情况下,图27中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示镍亲和色谱柱上样样品。泳道2显示其没有与镍亲和树脂结合。泳道3和4显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/50mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道5至7显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/100mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道8至9显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/250mM咪唑溶液洗脱的结果。

[0308] 通过蛋白质定量方法测定回收的洗脱溶液的蛋白量,并使用SDS-PAGE确认。如图28所示,在确认完成后,将TOM70-(GGGGS)3-UB-粒酶B蛋白用液氮淬灭,并储存在-80℃的低温冷冻冰箱中。在这种情况下,图28中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在PBS缓冲溶液中透析后获得的TOM70-(GGGGS)3-UB-GranzymeB蛋白。

[0309] 实施例3.制备包含RKIP的融合蛋白

[0310] 实施例3.1扩增RKIP基因

[0311] 为了以重组蛋白表达人RKIP(Raf激酶抑制蛋白)基因,从人上皮细胞提取总RNA,并由此合成cDNA。在5%二氧化碳和37℃的条件下,将人皮肤成纤维细胞在10%血清培养基中培养(1×10^6细胞)。此后,以与实施例1.1相同的方法获得RNA,然后将其用作RKIP基因的聚合酶链式反应的模板。

[0312] 为了获得从人皮肤成纤维细胞中去除了信号肽序列的RKIP基因,合成了从氨基端脯氨酸编码的T2RKIP引物和从羧基端编码的XRKIP(noT)引物,并使用以上制备的cDNA作为模板进行PCR。各种引物的序列如下表9所示。

[0313] [表9]

[0314]

引物	序列	SEQ ID NO.
T2RKIP	5'-AAA AAA CCG CGG TGG Tcc ggt gga cct cag caa gtg gtc-3'	SEQ ID NO: 29
XRKIP(noT)	5'- AAA AAA CTC GAG CTT CCC AGA CAG CTG CTC GTA CAG TTT GG-3'	SEQ ID NO: 30

[0315] 将上述制备的cDNA作为模板,并将0.2pmol T2RKIP引物和0.2pmol XRKIP(noT)引物与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、40个循环进行扩增反应。反应后,通过1%琼脂糖凝胶电泳分离出约560bp的扩增DNA片段,然后使用T4DNA连接酶插入到pGEM-T easy(Promega,USA)载体中。对获得的DNA进行测序的结果,证实获得了编码人RKIP蛋白的cDNA。将获得的RKIP基因命名为pTA-RKIP(图29),并且所述RKIP基因的碱基序列由如SEQ ID NO:31所示的碱基序列表示。

[0316] 实施例3.2.制备RKIP蛋白的E.coli表达载体

[0317] 实施例3.2.1.制备质粒pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP

[0318] 为了制备融合有结合至线粒体外膜的TOM70、接头(GGGGSGGGGSGGGGS)和泛素的RKIP蛋白,制备能够表达融合有TOM70、接头和泛素的RKIP的表达载体。

[0319] 用限制酶SacII和XhoI切割实施例3.1中获得的质粒pTA-RKIP基因,并通过2%琼脂糖凝胶电泳获得约560bp的DNA片段,然后用T4DNA连接酶将其插入限制酶SacII和XhoI切割的pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-(p53)载体中,得到质粒pET11-TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP(图30)。在此,TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP由如SEQ ID NO:32所示的碱基序列表示。

[0320] 使用质粒pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP转化E.coli BL21(DE3)菌株。之后,将转化的菌株在添加了抗生素氨苄青霉素的Luria-Bertani(LB)固体培养基中培养,然后将获得的菌落在LB液体培养基中振荡培养箱37℃培养。之后,当细胞密度在OD 600达到约0.2吸光度时,加入终浓度为0.5mM的IPTG,然后继续进行振荡培养约4小时。

[0321] 通过离心获得一部分E.coli细胞,然后破碎细胞,之后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳。如图31所示,证实表达了约33kDa大小的融合有TOM70、接头和泛素的RKIP蛋白。在这种情况下,图31中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在添加IPTG4小时后,破碎E.coli并离心的沉淀物,并且泳道2显示E.coli破碎后离心的上清液。

[0322] 实施例3.3.分离和纯化来源于E.coli的重组TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP蛋白

[0323] 将表达重组TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP的E.coli BL21(DE3)生产菌株接种到LB液体培养基中,并在37℃的条件下培养。当在OD600的吸光度达到0.3时,将其放入冰箱中以降低培养液的温度,并将培养箱的温度改变为18℃,然后加入0.5mM IPTG,并振荡培养1天以表达TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP蛋白。

[0324] 然后,以与实施例1.3.1相同的方法分离并纯化TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP蛋白。结果,TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP蛋白得以洗脱(图32)。在这种情况下,图32中的泳道M显示了蛋白质分子量标记,泳道1显示了镍亲和色谱柱上样样品。泳道2显示其没有与镍亲和树脂结合。泳道3显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/10mM咪唑洗脱的结果。泳道4至6显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/50mM咪唑洗脱的结果。泳道7至8显示了用50mM磷酸钠/500mM

NaCl/100mM咪唑洗脱的结果。泳道9至10显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/175mM咪唑洗脱的结果。泳道11至13显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/250mM咪唑洗脱的结果。泳道14至16显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/500mM咪唑洗脱的结果。

[0325] 通过蛋白质定量方法测定回收的洗脱溶液的蛋白量,并使用SDS-PAGE确认。如图33所示,在确认完成后,将TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP蛋白用液氮淬灭,并储存在-80℃的低温冰箱中。在这种情况下,图33中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在PBS缓冲溶液中透析后获得的TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP蛋白。

[0326] 实施例4.制备包含PTEN的融合蛋白

[0327] 实施例4.1.扩增PTEN基因

[0328] 为了以重组蛋白表达人PTEN(磷酸酶和肌腱蛋白同源物),从人上皮细胞提取总RNA,并由此合成cDNA。将成纤维细胞(人皮肤成纤维细胞)在5%二氧化碳和37℃的条件下培养于10%血清培养基中(1×10^6细胞)。此后,以与实施例1.1相同的方法获得RNA,然后将其用作PTEN基因的聚合酶链式反应的模板。

[0329] 为了获得从人皮肤成纤维细胞中去除了信号肽序列的PTEN基因,合成了从氨基端苏氨酸编码的T2PTEN引物和从羧基端编码的XPTEN(noT)引物,并使用以上制备的cDNA作为模板进行PCR。各引物的序列如下表10所示。

[0330] [表10]

[0331]

引物	序列	SEQ ID NO.
T2PTEN	5'-AAA AAA CCG CGG TGG Tac agc cat cat caa aga gat cgt tag -3'	SEQ ID NO: 33
XPTEN(noT)	5'- AAA AAA CTC GAG GAC TTT TGT AAT TTG TGT ATG CTG -3'	SEQ ID NO: 34

[0332] 将上述制备的cDNA作为模板,并将0.2pmol T2RKIP引物和0.2pmol XRKIP(noT)引物与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、40个循环进行扩增反应。反应后,通过1%琼脂糖凝胶电泳分离出约1,200bp的扩增DNA片段,然后使用T4DNA连接酶插入到pGEM-T easy(Promega,USA)载体中。对获得的DNA进行测序的结果,证实获得了编码人RKIP蛋白的cDNA。将获得的PTEN基因命名为pTA-PTEN(图34),并且PTEN的碱基序列由如SEQ ID NO:35所示的碱基序列表示。

[0333] 实施例4.2制备PTEN蛋白的E.coli表达载体

[0334] 实施例4.2.1制备质粒pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-PTEN

[0335] 为了制备融合有结合至线粒体外膜的TOM70、接头(GGGGSGGGGSGGGGS)和泛素的PTEN蛋白,制备能够表达融合有TOM70、接头和泛素的PTEN基因的表达载体。

[0336] 用限制酶SacII和XhoI切割上述实施例4.1中获得的质粒pTA-PTEN基因,并通过2%琼脂糖凝胶电泳获得约1,200bp的DNA片段。然后,使用T4DNA连接酶将其插入限制酶SacII和XhoI切割的pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-(p53)载体中,获得质粒pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-PTEN(图35)。在此,TOM70-(GGGGS)3-UB-PTEN由如SEQ ID NO:36所示的碱基序列表示。

[0337] 使用质粒pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-PTEN转化E.coli BL21(DE3)菌株。之后,将转化的菌株在添加了抗生素氨苄青霉素的Luria-Bertani(LB)固体培养基中培养,然后在37℃的条件下在LB液体培养基中培养获得的菌落。之后,当细胞密度在OD 600达到约0.2吸光度时,加入终浓度为0.5mM的IPTG,然后继续进行振荡培养约4小时。

[0338] 通过离心获得一部分E.coli细胞,然后破碎细胞,之后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳。如图36所示,证实表达了约73kDa大小的融合了TOM70、接头和泛素的PTEN蛋白。在这种情况下,图36中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在添加IPTG4小时后,破碎E.coli并离心的沉淀物,并且泳道2显示E.coli破碎后离心的上清液。

[0339] 实施例4.3.分离和纯化来源于E.coli的重组TOM70-(GGGGS)3-UB-PTEN蛋白

[0340] 以与实施例1.3.1相同的方法分离并纯化TOM70-(GGGGS)3-UB-PTEN蛋白。结果,洗脱TOM70-(GGGGS)3-UB-PTEN蛋白(图37)。在这种情况下,图37中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示镍亲和色谱柱上样样品。泳道2显示其没有与镍亲和树脂结合。泳道3显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/10mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道4显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/50mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道5至8显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/100mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道9至10显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/250mM咪唑溶液洗脱的结果。泳道11显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/500mM咪唑溶液洗脱的结果。

[0341] 通过蛋白质定量方法测定回收的洗脱溶液的蛋白量,并使用SDS-PAGE确认。如图38所示,在确认完成后,将TOM70-(GGGGS)3-UB-PTEN蛋白用液氮淬灭并储存在-80℃的低温冰箱中。在这种情况下,图38中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在PBS缓冲溶液中透析后获得的TOM70-(GGGGS)3-UB-PTEN蛋白。

[0342] 实施例5.制备包含线粒体外膜蛋白、泛素和GFP的融合蛋白

[0343] 实施例5.1.分离和纯化来源于E.coli的重组UB-GFP-TOM7蛋白

[0344] 将表达有融合泛素的成熟UB-GFP-TOM7蛋白的E.coli BL21(DE3)生产菌株接种到LB液体培养基中,并在37℃的条件下培养。当在OD600的吸光度达到0.3时,将其放入冰箱中以降低培养液的温度,并将培养箱的温度改变为18℃,然后添加0.5mM IPTG,并进行振荡培养1天以表达融合泛素的成熟形式的GFP-TOM7蛋白。

[0345] 培养完成后,通过离心回收细胞,并用PBS洗涤1次回收的细胞,然后用含50mM磷酸钠、500mM NaCl、10mM咪唑,pH 8.0的溶液悬浮细胞,并使用超声仪对悬浮的细胞进行破碎处理。使用高速离心机离心分离破碎的细胞,然后回收上清液,并使用0.45μm的过滤器过滤回收的上清液,然后装载在预装的镍色谱柱上进行初步纯化。

[0346] 载入含有融合了泛素的成熟形式的UB-GFP-TOM7蛋白的破碎溶液,然后直到未检测到未结合的杂质为止,用含50mM磷酸钠、500mM NaCl、20mM咪唑,pH 8.0的溶液作为洗涤溶液流入,并根据浓度梯度使用含50mM磷酸钠、500mM NaCl、500mM咪唑,pH 8.0的溶液洗脱蛋白质(图39)。在这种情况下,图39中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示镍亲和色谱柱上样样品。泳道2显示其没有与镍亲和树脂结合。泳道3显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/20mM咪唑洗脱的结果。泳道4显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/55mM咪唑洗脱的结果。泳道5显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/60mM咪唑洗脱的结果。泳道6显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/65mM咪唑洗脱的结果。泳道7显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/70mM咪

唑洗脱的结果。泳道8显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/75mM咪唑洗脱的结果。泳道9显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/80mM咪唑洗脱的结果。泳道10显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/85mM咪唑洗脱的结果。泳道11显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/90mM咪唑洗脱的结果。泳道12显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/95mM咪唑洗脱的结果。泳道13显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/100mM咪唑洗脱的结果。泳道14显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/105mM咪唑洗脱的结果。

[0347] 为了除去洗脱溶液中的咪唑,应用通透压原理在含50mM磷酸钠、500mM NaCl,pH 8.0的溶液中进行透析(图40)。将鉴定出的最终UB-GFP-TOM7蛋白用液氮淬灭,并保存在-80℃的低温冷冻冰箱中。在这种情况下,图40中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示了在50mM磷酸钠/500mM NaCl溶液中进行透析后获得的蛋白质。

[0348] 实施例5.2.分离和纯化来源于E.coli的重组TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP蛋白

[0349] 将表达重组蛋白TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP的E.coliBL21(DE3)生产菌株接种到LB液体培养基中,并在37℃的条件下培养。当在OD600的吸光度达到0.3时,将其放入冰箱中以降低培养液的温度,并将培养箱的温度改变为18℃,然后添加0.5mM IPTG,并进行振荡培养1天以表达重组蛋白TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP。

[0350] 培养完成后,离心回收细胞,并用PBS洗涤回收的细胞1次,然后用含50mM磷酸钠、500mM NaCl、10mM咪唑,pH 8.0溶液悬浮细胞,并使用超声仪对悬浮的细胞进行破碎处理。使用高速离心机离心分离破碎的细胞,然后回收上清液,并使用0.45μm的过滤器过滤回收的上清液,然后装载在预装的镍色谱柱上进行初步纯化。

[0351] 将包含重组蛋白TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP的破碎溶液载入含有镍树脂的色谱柱上,然后直到未检测到未结合的杂质为止,用含50mM磷酸钠、500mM NaCl、20mM咪唑,pH 8.0的溶液作为洗涤液流入。然后,当将咪唑的浓度更改为50mM、100mM、250mM、500mM时,使用50mM磷酸钠、500mM NaCl、500mM咪唑、pH 8.0溶液洗脱蛋白质(图41)。在这种情况下,图41中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示镍亲和色谱柱上样样品。泳道2显示其没有与镍亲和树脂结合。泳道3显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/20mM咪唑洗脱的结果。泳道4显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/50mM咪唑洗脱的结果。泳道5至8显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/100mM咪唑洗脱的结果。泳道9至11显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/250mM咪唑洗脱的结果。泳道12显示了用50mM磷酸钠/500mM NaCl/500mM咪唑洗脱的结果。

[0352] 应用通透压原理,将从镍色谱中回收的洗脱溶液与PBS缓冲溶液进行溶液交换。溶液交换完成后,使用蛋白质定量和SDS-PAGE鉴定回收的最终蛋白质TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP。如图42所示,鉴定完成后,将TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP蛋白用液氮淬灭,并保存在-80℃的低温冰箱中。在这种情况下,图42中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在PBS缓冲溶液中进行透析后获得的TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP蛋白。

[0353] II.制备包含线粒体外膜靶向蛋白和靶点靶向蛋白的融合蛋白

[0354] 实施例6.制备包含scFvHER2的融合蛋白

[0355] 实施例6.1合成scFvHER2基因

[0356] 为了以重组蛋白表达人scFvHER2,向Bionics Co.,Ltd请求基因合成而获得的scFvHER2基因命名为pUC57-scFvHER2,并且scFvHER2的碱基序列与SEQ ID NO:37的碱基序列相同。

[0357] 实施例6.2.制备scFvHER2蛋白表达载体

[0358] 实施例6.2.1.pET15b-UB-scFvHER2-TOM7

[0359] 为了制备融合有泛素和结合至线粒体外膜的TOM7的scFvHER2蛋白,制备能够表达融合泛素和TOM7的scFvHER2基因的表达载体。

[0360] 用限制酶SacII和XhoI切割实施例6.1中获得的质粒pUC57-scFvHER2基因,并通过2%琼脂糖凝胶电泳获得约750bp的DNA片段,然后使用T4DNA连接酶将其插入限制酶SacII和XhoI切割的pET15b-UB-(p53)-TOM7载体中,获得质粒pET15b-UB-scFvHER2-TOM7(图39)。在这种情况下,UB-scFvHER2-TOM7由如SEQ ID NO:38所示的碱基序列表示。

[0361] 使用质粒pET15b-UB-scFvHER2-TOM7转化E.coli BL21(DE3)菌株。此后,将转化的菌株在添加了抗生素氨苄青霉素的Luria-Bertani(LB)固体培养基中培养,然后在37℃的条件下在LB液体培养基中培养获得的菌落。然后,当细胞密度在OD600达到约0.2吸光度时,加入终浓度为1mM的IPTG,然后继续进行振荡培养约4小时。

[0362] 通过离心获得一部分E.coli细胞,然后破碎细胞,之后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳。如图44所示,证实表达了约35kDa大小的融合泛素和TOM7的scFvHER2蛋白。在这种情况下,图44中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在添加IPTG4小时后,破碎E.coli并离心的沉淀物,并且泳道2显示E.coli破碎后离心的上清液。

[0363] 实施例6.2.2制备pCMV-scFvHER2-TOM7-myc/His

[0364] 为了制备融合有与线粒体外膜结合的TOM7的scFvHER2蛋白,制备能够表达融合TOM7的scFvHER2的动物细胞的表达载体。为了获得TOM7和scFvHER2基因,制备了RscFvHER2引物和XTOM7(noT)引物。各种引物的序列如下表11所示。

[0365] [表11]

[0366]

引物	序列	SEQ ID NO.

[0367]

RscFvHER2	5'-AAA AAA GAA TTC ATG GAA GTG CAA CTT GTT GAG AGT GG -3'	SEQ ID NO: 39
XTOM7(noT)	5'- AAA AAA CTC GAG TCC CCA AAG TAG GCT CAA AAC AG-3'	SEQ ID NO: 40

[0368] 实施例6.2.1中获得的质粒pET15b-UB-scFvHER2-TOM7作为模板,将0.2pmol引物(RscFvHER2)和0.2pmol引物(XTOM7(noT))与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、25个循环进行扩增反应,得到基因scFvHER2-TOM7。限制酶EcoRI和XhoI切割扩增的scFvHER2-TOM7基因,通过1%琼脂糖凝胶电泳分别获得约850bp的DNA片段,然后使用T4DNA连接酶插入到限制酶EcoRI和XhoI切割的pcDNA3.1-myc/His A中,得到质粒pCMV-scFvHER2-TOM7-myc/His(图45)。

[0369] 在这种情况下,scFvHER2-TOM7-myc/His由如SEQ ID NO:41所示的碱基序列表示。使用质粒pCMV-scFvHER2-TOM7-myc/His转染到动物细胞CHO中,并将细胞破碎,然后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳,并且使用抗c-myc抗体通过Western blot进行显示。如图46所示,证实表达了约35kDa的融合TOM7的scFvHER2蛋白。在这种情况下,图46中的泳道M显示蛋白质

分子量标记,泳道1显示将其转染到动物细胞CHO中,将细胞破碎,然后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳,之后通过抗c-myc抗体进行Western blot检测证实。

[0370] 实施例6.3.分离和纯化E.coli来源的重组UB-ScFvHER2-TOM7蛋白

[0371] 以与实施例1.3.1相同的方法分离并纯化UB-ScFvHER2-TOM7蛋白。结果,UB-ScFvHER2-TOM7蛋白得以洗脱(图47)。在这种情况下,图47中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示镍亲和色谱柱上样样品。泳道2显示其没有与镍亲和树脂结合。泳道3显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/10mM咪唑洗脱的结果。泳道4至5显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/50mM咪唑洗脱的结果。泳道6至8显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/100mM咪唑洗脱的结果。第9至10道显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/250mM咪唑洗脱的结果。泳道11显示了用8M UREA/50mM磷酸钠/500mM NaCl/500mM咪唑洗脱的结果。

[0372] 通过蛋白质定量方法测定回收的洗脱溶液的蛋白量,并使用SDS-PAGE确认。如图48所示,确认完成后,将UB-ScFvHER2-TOM7蛋白用液氮淬灭,并保存在-80℃的低温冷冻冰箱中。在这种情况下,图48中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在PBS缓冲溶液中透析后获得的UB-ScFvHER2-TOM7蛋白。

[0373] 实施例7.制备包含scFvMEL的融合蛋白

[0374] 实施例7.1.合成scFvMEL基因

[0375] 为了以重组蛋白表达人scFvMEL作为抗黑色素瘤的抗体片段,向Bionics Co.,Ltd.请求基因合成而获得的scFvMEL基因命名为pUC57-scFvMEL,并且scFvMEL的碱基序列与SEQ ID NO:42的碱基序列相同。

[0376] 实施例7.2.制备scFvMEL蛋白表达载体

[0377] 实施例7.2.1.制备pET15b-UB-scFvMEL-TOM7

[0378] 为了制备融合泛素和结合至线粒体外膜的TOM7的scFvMEL蛋白,制备能够表达融合泛素和TOM7的scFvMEL的表达载体。

[0379] 用限制酶SacII和XhoI切割实施例7.1中获得的质粒pUC57-scFvMEL基因,并通过2%琼脂糖凝胶电泳获得约750bp的DNA片段,然后用T4DNA连接酶插入限制酶SacII和XhoI切割的pET15b-UB-(p53)-TOM7载体中,获得质粒pET15b-UB-scFvMEL-TOM7(图49)。在这种情况下,UB-scFvMEL-TOM7由如SEQ ID NO:43所示的碱基序列表示。

[0380] 使用质粒pET15b-UB-scFvMEL-TOM7转化E.coli BL21(DE3)菌株。之后,将转化的菌株在添加了抗生素氨苄青霉素的Luria-Bertani(LB)固体培养基中培养,然后将获得的菌落在LB液体培养基中振荡培养箱37℃培养。之后,当细胞密度在OD600达到约0.2吸光度时,加入终浓度为1mM的IPTG,然后继续进行振荡培养约4小时。

[0381] 通过离心获得一部分E.coli细胞,然后破碎细胞,之后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳。如图50所示,证实表达了约35kDa大小的与泛素和TOM7融合的scFvMEL蛋白。在这种情况下,图50中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示在添加IPTG4小时后,破碎E.coli并离心的沉淀物,并且泳道2显示E.coli破碎后离心的上清液。

[0382] 实施例7.2.2制备pCMV-scFvMEL-TOM7-myc/His

[0383] 为了制备融合与线粒体外膜结合的TOM7的scFvMEL蛋白,制备能够表达融合TOM7的scFvMEL的动物细胞的表达载体。为了获得TOM7和scFvMEL基因,制备了引物(RscFvMEL)。

各引物的序列如下表12所示。

[0384] [表12]

[0385]

引物	序列	SEQ ID NO.
RscFvMEL	5'-AAA AAA GAA TTC ATG AAA ACA AGT AAC CCA GGA GTG-3'	SEQ ID NO:44

[0386] 实施例6.2.1中获得的质粒pET15b-UB-scFvMEL-TOM7作为模板,将0.2pmol RscFvMEL引物和0.2pmol XTOM7(noT)引物与0.2nM dNTP、1×AccuPrime Taq DNA聚合酶反应缓冲液(Invitrogen,USA)和1单位AccuPrime Taq DNA聚合酶混合。之后,在聚合酶链式反应仪器中,以95℃40秒、58℃30秒、72℃1分钟、25个循环进行扩增反应,得到scFvMEL-TOM7。限制酶EcoRI和XhoI切割扩增的scFvMEL-TOM7基因,并通过1%琼脂糖凝胶电泳获得约850bp的DNA片段。然后,使用T4DNA连接酶将其插入限制酶EcoRI和XhoI切割的pcDNA3.1-myc/His A载体中,获得质粒pCMV-scFvMEL-TOM7-myc/His(图51)。在此,scFvMEL-TOM7-myc/His由如SEQ ID NO:45所示的碱基序列表示。

[0387] 使用质粒pCMV-scFvMEL-TOM7-myc/His转染到动物细胞CHO中,将细胞破碎,然后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳,并使用抗c-myc抗体通过Western blot显示。如图52所示,证实表达了约35kDa大小的融合TOM7的scFvMEL蛋白。在这种情况下,图52中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示将其转染到动物细胞CHO中,将细胞破碎,然后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳,然后使用抗c-myc抗体通过Western blot检测确认。

[0388] 实施例8.制备包含scFvPD-L1的融合蛋白

[0389] 实施例8.1合成scFvPD-L1基因

[0390] 为了以重组蛋白表达人scFvPD-L1,向Bionics Co.,Ltd.请求基因合成而获得的scFvPD-L1基因命名为pUC57-scFvPD-L1,其碱基序列与如SEQ ID NO:46所示的碱基序列相同。

[0391] 实施例8.2.制备scFvPD-L1蛋白表达载体

[0392] 实施例8.2.1.制备pCMV-scFvPD-L1-TOM7-myc/His

[0393] 为了制备融合与线粒体外膜结合的TOM7的scFvPD-L1蛋白,制备了能够表达融合泛素和TOM7的scFvPD-L1的动物细胞的表达载体。

[0394] 用限制酶EcoRI和XhoI切割质粒pUC57-scFvPD-L1,并通过1%琼脂糖凝胶电泳获得约760bp的DNA片段。然后,使用T4DNA连接酶将其插入限制酶EcoRI和XhoI切割的pCMV-(scFvMEL)-TOM7-myc/His载体中,获得质粒pCMV-scFvPD-L1-TOM7-myc/His(图53)。在这种情况下,scFvPD-L1-TOM7-myc/His由如SEQ ID NO:47所示的碱基序列表示。

[0395] 使用质粒pCMV-scFvPD-L1-TOM7-myc/His转染到动物细胞CHO中,将细胞破碎,然后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳,并通过抗c-myc抗体进行Western blot显示。如图54所示,证实表达了融合有TOM7的scFvPD-L1蛋白,其大小约为35kDa。在这种情况下,图54中的泳道M显示蛋白质分子量标记,泳道1显示将其转染到动物细胞CHO中,将细胞破碎,然后进行SDS-聚丙烯酰胺电泳,然后使用抗c-myc抗体通过Western blot检测确认。

[0396] III.制备融合蛋白结合的修饰的线粒体

[0397] 实施例9.制备修饰的线粒体

[0398] 进行以下实验以证实与线粒体外膜结合位点融合的荧光蛋白是否与线粒体的外膜结合。首先,通过离心法从脐带来源的间充质干细胞(UC-MSC)中分离线粒体。之后,将其

用MitoTracker CMXRos Red染色。将其与上述从E.coli纯化的重组蛋白TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP混合,并在环境温度下孵育约30分钟。

[0399] 之后,通过离心除去未反应的蛋白质,并用PBS缓冲液洗涤两次。之后,使用荧光显微镜观察与线粒体结合的荧光蛋白。使用不包含线粒体外膜结合位点的纯化的GFP蛋白作为对照组。结果,证实了与线粒体外膜结合位点融合的荧光蛋白(TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP)与脐带来源的间充质干细胞(UC-MSC)的线粒体位于同一位置(图55的a部分,图55的b部分)。

[0400] 实施例10.证实重组蛋白p53结合外源线粒体外膜的能力

[0401] 将使用离心法从脐带来源的间充质干细胞中分离出的线粒体与纯化的重组蛋白TOM70-(GGGGS)3-UB-p53或UB-p53-TOM7混合,并以1:1的比例在4℃的反应条件下结合1小时。使用不与蛋白质混合的线粒体作为对照组。线粒体与p53之间的结合能力通过Western blot实验方法得到证实(图56)。

[0402] 首先,线粒体和p53蛋白结合,然后以13,000rpm离心10分钟,以获得线粒体或与p53结合的线粒体沉淀物。通过两次PBS洗涤过程去除未结合线粒体的蛋白质,并将洗涤得到的沉淀物进行蛋白质电泳(SDS-PAGE),然后进行Western blot。兔抗p53抗体用作一抗,抗兔IgG HRP用作二抗。证实条带位于与60kDa的大小相同的位置,而相较于未结合蛋白质的单独的线粒体,这是实验组中线粒体确实与TOM70-(GGGGS)3-UB-p53或UB-p53-TOM7结合的期望分子量(图56)。

[0403] IV.证实活性蛋白质结合的修饰的线粒体的活性

[0404] 实施例11.外源线粒体的分离和胞内注射

[0405] 使用离心法从脐带来源的间充质干细胞(UC-MSCs)中分离线粒体。将分离的线粒体用Mitotracker CMX Ros染色,并通过BCA定量方法确定分离的线粒体的浓度和总量,并向SNU-484细胞,一种胃癌细胞系中,采用离心法注入0μg、1μg、5μg、10μg、50μg、100μg的线粒体。实验的结果,通过荧光显微镜证实了注入到细胞中的线粒体的浓度取决于线粒体的量(图57)。

[0406] 实施例12.证实正常线粒体对癌细胞的影响

[0407] 进行以下实验以研究正常细胞来源的线粒体如何影响癌细胞的增殖和ROS的产生。首先,选择肝细胞(WRL-68)、成纤维细胞和脐带来源的间充质干细胞(UC-MSC)作为线粒体供体细胞。通过离心分离法分别从细胞中分离线粒体。作为线粒体受体细胞的癌细胞为皮肤表皮癌细胞A431细胞系。在这种情况下,根据浓度利用离心力将线粒体递送至皮肤表皮癌细胞中(参见韩国专利申请第10-2017-0151526号)。

[0408] 引入后24、48和72小时,观察到皮肤表皮癌细胞的增殖和活性氧(ROS)的产生。结果,证实了当将从各种来源的正常细胞获得的线粒体注射到癌细胞中时,具有浓度依赖的抑制癌细胞增殖的作用。另外,证实了癌细胞中ROS的产生受到抑制,这取决于正常线粒体的浓度(图58和59)。

[0409] 实施例13.证实正常线粒体对耐药性的影响

[0410] 通过以下方法研究了当将正常细胞来源的线粒体注入癌细胞中时,如何影响耐药性、抗氧化剂基因的表达、癌细胞转移(转移),这都是癌细胞的特点。首先,将正常肝细胞(WRL-68)设置为线粒体供体细胞,并通过离心分离法从细胞中分离线粒体,并使用肝癌细

胞系HepG2细胞作为线粒体受体细胞的癌细胞。根据浓度利用离心力将线粒体递送至肝癌细胞中,然后证实,通过观察对抗癌药阿霉素的耐药性,接受了线粒体的癌细胞系显示出更高的药物敏感性(图60)。

[0411] 实施例14.证实正常线粒体对抗氧化作用的影响

[0412] 将分离自正常细胞的线粒体注入到肝癌细胞系HepG2细胞中,根据浓度,证实了癌细胞中过氧化氢酶、抗氧化蛋白和SOD-2(超氧化物歧化酶-2)基因的表达增加(图61)。

[0413] 实施例15.证实正常线粒体对癌细胞转移的影响

[0414] 对于转移,已经证实是否存在α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)基因的表达,其是参与EMT(上皮到间质转化)的基因之一。在这种情况下,发现与未接受线粒体的肝癌细胞相比,接受线粒体的肝癌细胞,α-SMA蛋白的表达根据线粒体的浓度而显著降低。相反,发现细胞粘附蛋白之一的E-钙粘附蛋白根据线粒体的浓度而增加(图62)。证实了已知参与癌症转移的蛋白质的变化是由注入癌细胞的正常线粒体引起的,因此也影响了癌细胞的转移。

[0415] 实施例16.证实重组蛋白p53载入外源线粒体外膜并注入细胞

[0416] 使用离心法从脐带来源的间充质干细胞中分离线粒体,然后用Mitotracker CMX Ros染色,然后与纯化的重组蛋白TOM70-(GGGGS)3-UB-p53或UB-p53-TOM7混合,并以1:1的比例在4℃的反应条件下孵育1小时,然后离心除去未反应的蛋白质,之后用缓冲溶液PBS洗涤两次,然后以通过离心法将结合有p53蛋白的线粒体注射到胃癌细胞系SNU-484细胞中(图63)。在这种情况下,为不使用线粒体的组和仅使用线粒体的组设置对照组。培养一天后,使用免疫细胞化学(ICC)用荧光显微镜观察到载入p53蛋白的外源线粒体注射入细胞中。

[0417] 兔抗p53抗体作为一抗,山羊抗兔IgG Alexa Fluor 488作为二抗。结果,证实在注射入细胞的过程中随之注射了外源线粒体的细胞中,装载在外源线粒体(红色)上的TOM70-(GGGGS)3-UB-p53(绿色)或UB-p53-TOM7(绿色)蛋白位于细胞质中(图64,放大200倍,图65,放大400倍)。结果,发现重组蛋白易于通过线粒体注射到细胞中。

[0418] 实施例17.证实癌细胞系中p53负载的线粒体的活性

[0419] 实施例17.1.用胃癌细胞系证实注入细胞的p53负载的外源线粒体的细胞凋亡能力

[0420] 使用离心法从脐带来源的间充质干细胞分离的线粒体与从E.coli中纯化的重组蛋白TOM70-(GGGGS)3-UB-p53或UB-p53-TOM7混合,并使其在4℃的反应条件下以1:1的比例结合1小时。不包含TOM70的UB-p53蛋白和不包含泛素的TOM70-(GGGGS)3-p53作为对照组。通过离心和PBS洗涤过程去除未结合的蛋白质,并将结合了蛋白质的线粒体通过离心注射入由于p53基因变异而缺乏p53能力的胃癌细胞系SNU-484(图66)。培养1天后,用4%多聚甲醛固定1小时,然后用通透溶液(0.1%柠檬酸钠缓冲液,包含0.1%Triton-X-100,pH 7.4)诱导细胞通透,并与TUNEL溶液(原位细胞死亡检测试剂盒,TMR RED,Roche)反应在37℃下反应1小时。

[0421] 在TUNEL分析方法中,发生核酸片段化(DNA片段化)的部分被染成红色,表明发生了细胞凋亡。与对照组相比,在注射了结合了TOM70-(GGGGS)3-ub-p53或p53-TOM7的线粒体的细胞中,发现了大量的红色部分,表明细胞凋亡是由于TOM70-(GGGGS)3-UB-p53或UB-p53-TOM7所结合的线粒体。具体地,证实了与TOM70-(GGGGS)3-UB-p53蛋白质结合的线粒体

中发生了更多的凋亡(图67a)。

[0422] 实施例17.2证实荧光素酶结合的、p53负载的外源线粒体的细胞凋亡能力

[0423] 为了证实结合了上述实施例5.2获得的线粒体的TOM70-(GGGGS)3-UB-p53蛋白在递送至受体细胞后,递送的TOM70-(GGGGS)3-UB-p53蛋白在受体细胞中是否维持了生物活性,使用报告基因进行基于细胞的分析。由于p53蛋白是转录因子,按照下述序列合成p53转录因子可结合的重复6次的碱基序列RRRCWWGYYY(其中R代表G或A,W代表A或T,Y代表C或T)基因。P53-promoter-S的碱基序列如下(5'-GGG CAT GCT CGG GCA TGC CCG GGC ATG CTC GGG CAT GCC CGG GCA TGC TCG GGC ATG CCC-3')(SEQ ID NO:91),P53-promoter-AS的碱基序列如下(5'-GGG CAT GCC CGA GCA TGC CCG GGC ATG CCC GAG CAT GCC CGG GCA TGC CCG AGC ATG CCC-3')(SEQ ID NO:92)。

[0424] 将5μg的合成基因P53-promter-S和5μg的合成基因P53-promter-AS在70℃下孵育20分钟以促进双螺旋基因的合成,然后使用多核苷酸T4激酶诱导磷酸化反应。将诱导磷酸化的双螺旋基因插入到限制酶Sma I切割的pGL3载体中,并将p53转录因子可以结合的碱基序列(RRRCWWGYYY)重复6次的基因与报告基因荧光素酶结合,以制备质粒p6xp53-Luc。通过脂转染胺法将质粒p6xp53-Luc和β-半乳糖苷酶表达载体质粒pRSVb-gal转化入人肾细胞HEK293细胞。

[0425] 接着,在6小时之后,分别结合10μg的线粒体和5μg、10μg和20μg的TOM70-(GGGGS)3-UB-p53蛋白处理HEK293细胞。在这种情况下,作为对照组,分别用结合了PBS或p53蛋白的10μg线粒体处理细胞。将处理的细胞培养18小时,然后测定和分析荧光素酶活性。在这种情况下,为了校正转化效率,将荧光素酶值除以通过测定β-半乳糖苷酶的活性而获得的值作为校正的荧光素酶值。

[0426] 证实了分别结合10μg的线粒体和5μg、10μg和20μg的TOM70-(GGGGS)3-UB-p53蛋白处理的细胞中荧光素酶值增加。因此,证实了p53蛋白进入了细胞并表现出活性(图67b)。

[0427] 实施例18.证实注入细胞中的RKIP负载的外源线粒体减少癌细胞系转移的能力将采用离心法分离自脐带来源的间充质干细胞的线粒体,与纯化的重组蛋白TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP混合,以1:1的比例在4℃反应条件下结合1小时。通过离心将与蛋白质结合的线粒体注射入乳腺癌细胞系MDA-MB-231中,该细胞系由于RKIP蛋白的减少而具有增强的转移能力。

[0428] 为了证实癌细胞的转移能力,使用transwell板进行细胞侵袭实验。在37℃下用基质胶将孔径为8μm的transwell上室涂覆30分钟。作为测试组,使用仅注射了线粒体的MDA-MB-231细胞和注射了结合了RKIP蛋白的线粒体的MDA-MB-231细胞。将每孔1×10^5个细胞置于含有无血清培养基的transwell上室中,并将包含10%胎牛血清的培养基置于下室中。在37℃下培养12小时后,用4%多聚甲醛固定1小时,然后将通过基质胶的细胞用1%结晶紫染色。

[0429] 通过显微镜观察的结果,在上室下方的膜中观察到紫色染色的细胞,这可以说是发生了细胞转移的过程。可以证实,与进行空白处理的对照组相比,仅进行线粒体处理的实验组和与RKIP结合的线粒体处理的实验组的紫色染色细胞减少。随机选择四个部分,然后测定染色细胞的数量并将其绘制在图表上(图68)。

[0430] IV.证实与靶点靶向蛋白结合的修饰的线粒体的递送速率

[0431] 实施例19.证实用于靶向癌细胞的单链可变片段(ScFv)抗体的细胞内表达并证实与细胞中线粒体的结合

[0432] 为了在动物细胞中表达pCMV-ScFv-HER2-TOM7或pCMV-ScFv-MEL-TOM7或pCMV-ScFv-PD-L1-TOM7,使用Lipofectamine LTX和PLUS或Lipofectamine 2000将DNA转染到CHO细胞中。GFP-TOM7 DNA作为对照组。为了证实其在细胞中表达并与同一细胞中的线粒体结合,使用离心法从转染的细胞中分离出胞质溶胶和线粒体,并通过BCA分析方法将其调节至相同的蛋白量,然后进行PAGE电泳,之后通过Western blot观察结果。单克隆c-myc抗体作为一抗,抗小鼠IgG HRP作为二抗。

[0433] 鉴定了ScFv-HER2-TOM7或ScFv-MEL-TOM7蛋白的条带,其预期大小为35kDa。基于所有这些均在线粒体层面上鉴定,可以预期转染和表达的蛋白质通过TOM7与细胞中的线粒体结合(图69)。

[0434] 接下来,为了证实细胞中表达的靶向蛋白与同一细胞中的线粒体的结合,使用免疫细胞化学(ICC)实验方法在荧光显微镜下观察细胞中表达的ScFv-HER2-TOM7、ScFv-MEL-TOM7或ScFv-PD-L1-TOM7蛋白。单克隆c-myc抗体作为一抗,山羊抗小鼠IgG Alexa Fluor 488作为二抗。细胞中的线粒体用Mitotracker CMX Ros染色。结果,证实表达的ScFv-HER2-TOM7、ScFv-MEL-TOM7或ScFv-PD-L1-TOM7蛋白与线粒体共定位并结合到细胞中的线粒体上(图70和71)。

[0435] 实施例20.分离结合了靶向癌细胞的单链可变片段抗体的线粒体并比较胃癌细胞系中线粒体的注射

[0436] 从转染了pCMV-ScFv-HER2-TOM7或pCMV-ScFv-PD-L1-TOM7的CHO细胞中分离线粒体。分离未转化的CHO细胞的线粒体作为对照组。从每个细胞分离的线粒体用Mitotracker CMX Ros染色。用相同的量的线粒体处理胃癌细胞系SNU-484,第二天,通过荧光显微镜比较并证实注入细胞的线粒体浓度。可以证实,与对照组相比,注入癌细胞的结合ScFv-HER2-TOM7或ScFv-PD-L1-TOM7的线粒体多于对照组获得的线粒体(图72)。因此,发现单独使用线粒体时,与靶向蛋白结合的线粒体更容易注入癌细胞。

[0437] VI.证实与活性蛋白质结合的修饰的线粒体的体内活性

[0438] 实施例21.构建异种移植模型(SNU-484)和施用待测物质

[0439] 实施例21.1.制备癌细胞

[0440] 在实验当天,将SNU-484细胞系(一种胃癌细胞系)制备为每只小鼠5×10^6个细胞。除去细胞的培养基,然后添加PBS以洗涤细胞。使用胰蛋白酶-EDTA溶液解离细胞,然后将细胞置于50mL管中,并用PBS缓冲溶液洗涤两次,然后加入20mL PBS,并测定细胞个数和活力。基于测得的细胞个数,将细胞个数调整为每只小鼠5×10^6细胞,并通过分成几组来制备细胞。将每只小鼠的移植体积调整为相同的100μL。制备100μL单独的癌细胞组作为对照组。

[0441] 实施例21.2制备待测物质

[0442] 如上所述,用从脐带来源的间充质干细胞分离出的线粒体依据蛋白质浓度制备每只小鼠移植50μg。在仅施用线粒体的组中,通过混合已混合癌细胞的100μL PBS的孔来制备线粒体。在修饰的线粒体组中,在与癌细胞混合之前,将TOM70-(GGGGS)3-UB-p53蛋白与在Eppendorf管中制备的线粒体以1:1的浓度比混合在一起,然后在环境温度下静置1小时。反应时间结束后,以20,000×g离心10分钟后,除去上清液,得到结合了蛋白质的线粒体(MT+

TOM70-(GGGGS)3-UB-p53)的颗粒。使用PBS缓冲溶液洗涤两次,然后通过与100μL其中混合有癌细胞的PBS混合来制备结合了p53蛋白的线粒体(MT+TOM70-(GGGGS)3-UB-p53)。

[0443] 实施例21.3准备实验动物和移植待测物质

[0444] 对于按组制备的移植样品,以与PBS相同的量添加基质胶(BD),并与细胞轻轻混合以制备每只小鼠200μL的待测物质。在这种情况下,所有操作均在冰上进行。对于模型构建,从RAONBIO购买了Balb/c裸鼠(雌性,7周大),并通过吸入异氟烷进行麻醉,以用于癌细胞的移植,然后在右后方区域(以动物为基准)用酒精棉签消毒。之后,使用装有注射液的1mL注射器皮下注射200μL至实验动物的右后方区域。给药后,每周两次测量动物的体重和肿瘤的大小,并在观察长达3周的同时进行结果分析(图73)。

[0445] 实施例21.4证实肿瘤形成

[0446] 通过测量肿瘤的长轴长度和短轴长度并将其应用于以下等式来计算肿瘤的体积。

[0447] <数学等式1>

[0448] 长轴×短轴×短轴×0.5=肿瘤体积(mm^3)

[0449] 实施例21.5观察生理和形态变化

[0450] 为了观察施用抗癌候选物的小鼠的生理和形态变化,自施用癌细胞和待测物质开始,每周两次测量体重和肿瘤大小的变化(图74)。

[0451] 使用体重计测量小鼠的体重,并采用每周两次测量的值分析各组的变化(图75)。可以证实的是,不注射线粒体的组、单独注射线粒体的组和注射修饰的线粒体的组之间,3周内的体重变化没有显著差异。通过使用卡尺测量肿瘤的长轴(长度)和短轴(宽度)的长度,然后将其应用于上述数学等式1的等式,来计算肿瘤的大小。使用每周两次的测量值来分析各组的变化(图76)。已经发现,在未经线粒体治疗的组中,肿瘤的大小随时间显著增加,而在给予线粒体的小鼠中,肿瘤的大小增长随时间的增长显著减缓。另外,已经证实,与单独施用线粒体的组相比,施用p53蛋白负载的线粒体组的肿瘤大小的增加明显降低(图76)。

[0452] 实施例22.证实修饰的线粒体抑制皮肤癌细胞增殖的作用

[0453] 通过离心法将上述获得的结合有p53的线粒体递送至皮肤癌细胞A431细胞,然后观察到A431细胞的增殖。在这种情况下,将生理盐水作为对照组,并且将等量的未融合p53蛋白的线粒体作为测试对照组。已证实,与对照组和仅使用线粒体的组相比,装载有诱导细胞凋亡的蛋白-p53蛋白的线粒体可以显著抑制A431细胞的增殖(图76)。

[0454] V.证实分离的线粒体的活性

[0455] 实施例23.证实分离的线粒体功能:ATP含量

[0456] 为了从脐带来源的间充质干细胞(UC-MSC)中分离胞内线粒体,使用注射器进行均质化以破坏细胞,然后连续离心以获得线粒体。为了证实分离的线粒体的功能,通过BCA分析定量分离的线粒体的线粒体蛋白浓度以制备5μg的线粒体。使用CellTiter-Glo发光试剂盒(Promega,Madison,WI)证实线粒体中ATP的量。

[0457] 将制备的线粒体混合在100μl的PBS中,然后在96孔板中制备,并且与作为对照组的不包含线粒体的100μl的PBS进行比较。以相同的方式加入试剂盒中包含的100μL测试溶液,在搅拌器中反应并充分混合2分钟,然后在环境温度下反应10分钟,之后使用发光酶标仪测定ATP的量。证实了与对照组相比,当包含线粒体时,ATP增加,并且证实了线粒体的功

能(图78)。

[0458] 实施例24.证实分离的线粒体功能:膜电位

[0459] 为了证实分离的线粒体的膜电位,使用了JC-1染料(分子探针,目录号1743159)。将制备的线粒体与50μL PBS混合,然后在96孔板中制备。制备不含线粒体的PBS(50μL)组作为对照组,并制备CCCP(R&D systems,CAS 555-60-2)作为治疗组。CCCP是线粒体的离子载体,通过使线粒体膜电位去极化来抑制线粒体功能。将CCCP组与浓度为50μM的分离的线粒体在室温下反应10分钟。

[0460] 之后,以相同的方法使其与JC-1染料(2μM)反应,然后根据膜电位变化所产生的浓度,利用具有不同光谱的性质来测量吸光度。在低浓度下,分离的线粒体作为单体存在并显示绿色荧光,在高浓度下,染料聚集(J聚合体)显示红色荧光。通过计算绿色吸光度与红色吸光度之比来分析线粒体膜电位。反应完成后,使用荧光酶标仪(单体:Ex485/Em 530,J-聚合体:Ex 535/Em 590)测定线粒体膜电位。结果如图79所示。

[0461] 实施例25.通过证实mROS产生来证实分离的线粒体的损伤程度

[0462] 为了证实如上所述制备的5μg线粒体是否受到损伤,使用了能够分析分离的线粒体中线粒体活性氧种类的MitoSOX红色指示剂(Invitrogen,目录号M36008)。将制备的线粒体与50μL PBS混合,然后在96孔板中制备,并与作为对照组的不含线粒体的50μLPBS进行比较。将MitoSOX红色染料与50μL PBS混合至浓度为10μM,并置于96孔板(终浓度为5μM)中,然后在37℃的CO_2培养箱中反应20分钟。反应完成后,使用酶标仪(Ex 510/Em 580)测定线粒体中ROS的量。结果如图80所示。

[0463] VI.证实与细胞外和细胞内的线粒体外膜蛋白结合的所需蛋白质的解离

[0464] 实施例26.证实结合至细胞外的线粒体外膜蛋白的所需蛋白质的解离

[0465] 为了在将与线粒体结合的活性蛋白质注射到细胞中时获得游离形式的所需的蛋白质,由E.coli制备泛素蛋白插入于线粒体外膜蛋白和所需蛋白质之间的融合蛋白(TOM70-UB-p53或TOM-UB-GFP)。为了证实泛素切割酶UBP1是否切割了泛素序列,重组融合蛋白TOM70-UB-p53与UBP1酶在37℃下反应1小时。

[0466] 之后,通过SDS-PAGE电泳的分析的结果,证实了根本没有发生泛素蛋白通过UBP1从融合蛋白解离。这被认为是线粒体外膜蛋白在结构上的干扰现象,因此,由氨基酸甘氨酸和丝氨酸组成的接头蛋白插入到线粒体外膜蛋白和泛素蛋白之间,并从E.coli中纯化获得了新的融合蛋白(TOM70-(GGGGS)3-UB-p53或TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP),然后如上所述在37℃下与UBP1酶反应1小时。结果,通过SDS-PAGE电泳证实了泛素的3'末端被UBP1酶切割,并且仅p53蛋白如预期的那样解离(图82)。

[0467] 实施例26.证实结合至细胞内的线粒体外膜蛋白的所需蛋白质的解离

[0468] 当上述实施例中获得的融合蛋白(TOM70-(GGGGS)3-UB-p53或TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP)以与线粒体结合的状态进入细胞时,观察其活性蛋白质是否通过细胞中存在的泛素裂解酶解离。首先,将从脐带来源间充质细胞中获得的线粒体与融合蛋白TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP在微管中反应1小时使其结合,然后通过离心去除未结合的融合蛋白,然后用PBS缓冲溶液洗涤两次。在这种情况下,将去除了泛素的融合蛋白(TOM70-(GGGGS)3-GFP)作为对照组。

[0469] 之后,通过离心法将结合线粒体的蛋白质注射入乳腺癌细胞系MDA-MB-231细胞

中。一天后,利用分化的重力将MDA-MB-231细胞破碎并分成线粒体部分和胞质部分。SDS-PAGE电泳和Western blot分析的结果发现,在包含泛素的融合蛋白中,GFP蛋白从线粒体外膜蛋白上解离,在胞质部分主要检测到接头蛋白和泛素。发现在去除了泛素的融合蛋白中,线粒体部分主要检测到与线粒体外膜蛋白和接头蛋白结合的GFP蛋白(图83)。

[0470] 结果发现,当将与线粒体结合的线粒体外膜蛋白-接头-泛素-活性蛋白质注射到细胞中时,泛素和活性蛋白质的连接位点被切割,并且解离的活性蛋白质释放到胞质;并发现通过这种方法,线粒体可以用作递送工具,作为有效地将有用蛋白递送至细胞中的方法之一。

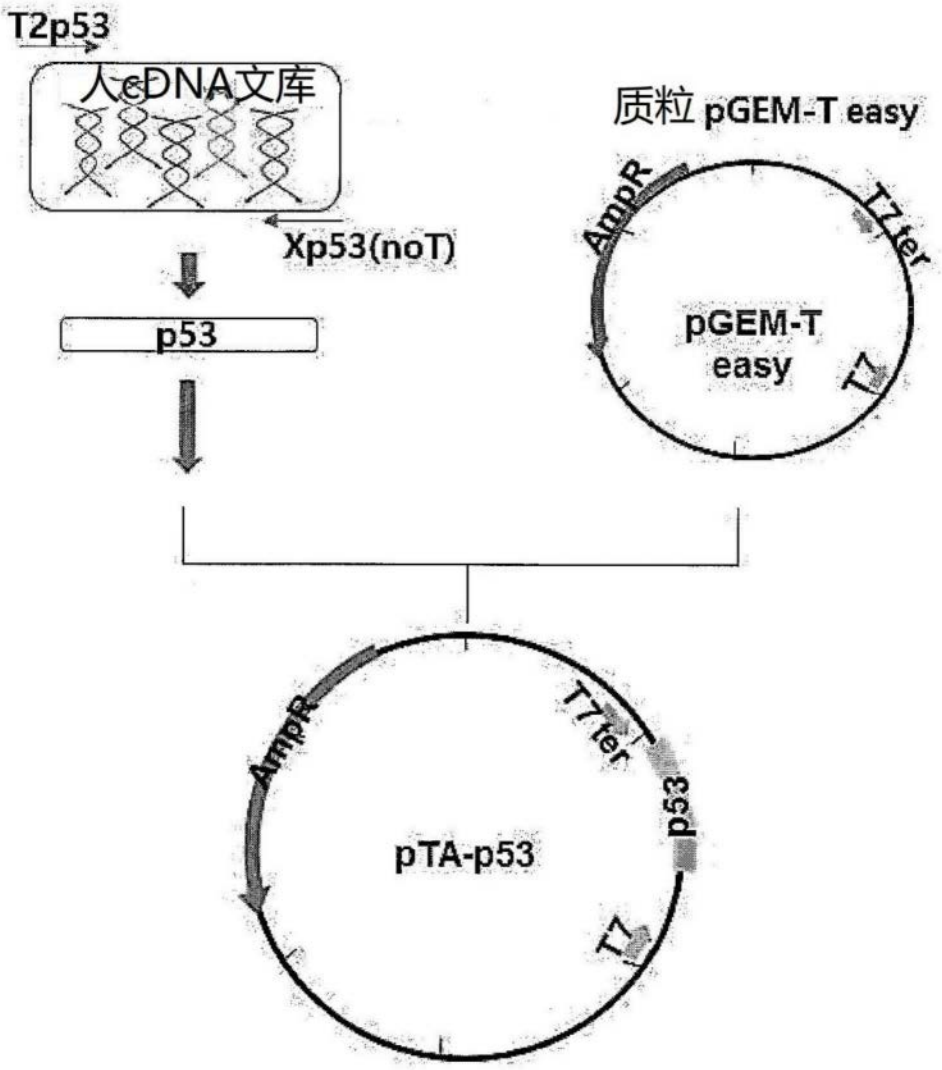

T2p53
人cDNA文库
Xp53(noT)
p53
质粒 pGEM-T easy
AmpR
T7ter
pGEM-T
easy
T7
AmpR
T7ter
p53
pTA-p53
T7

图1

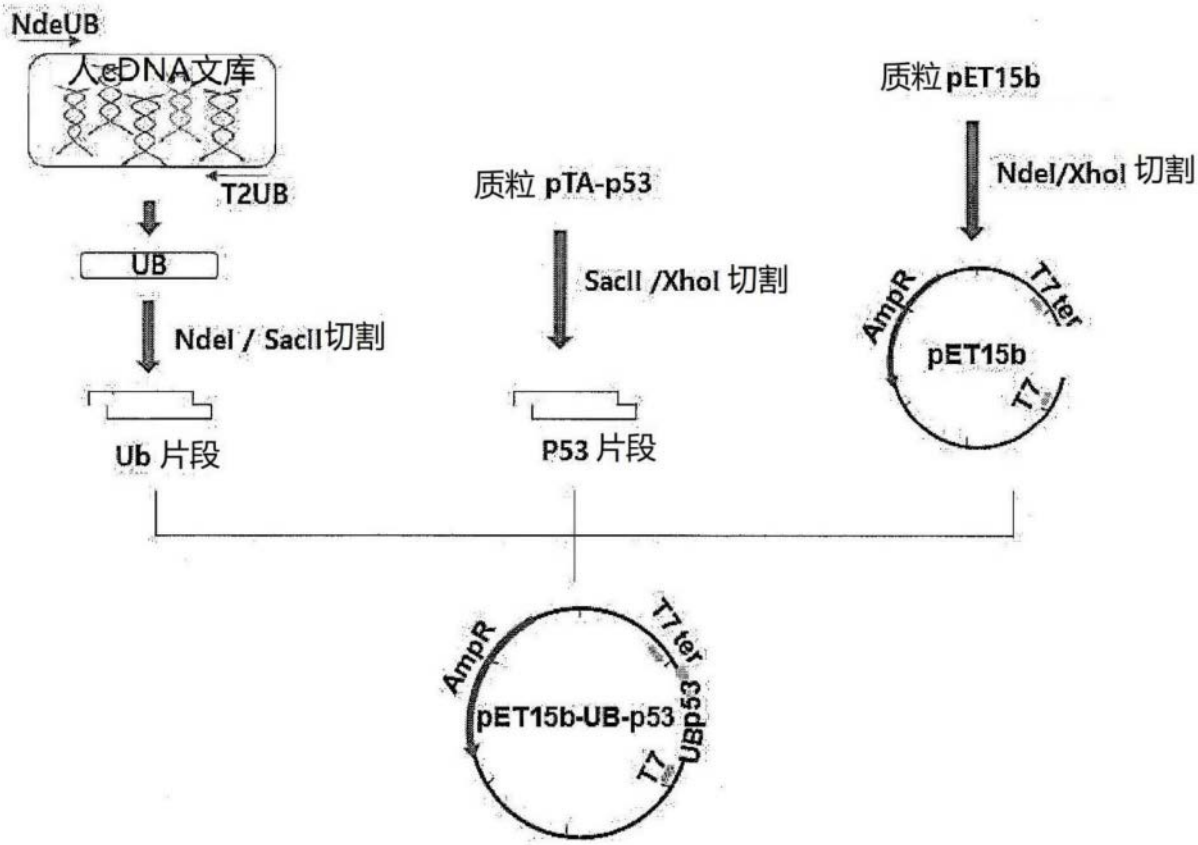

NdeUB
人cDNA文库
T2UB
UB
NdeI / SacII切割
Ub 片段
质粒 pTA-p53
SacII /XhoI 切割
P53 片段
质粒 pET15b
NdeI/XhoI 切割
AmpR
T7 ter
pET15b
T7
AmpR
T7 ter
pET15b-UB-p53
UBP53
T7

图2

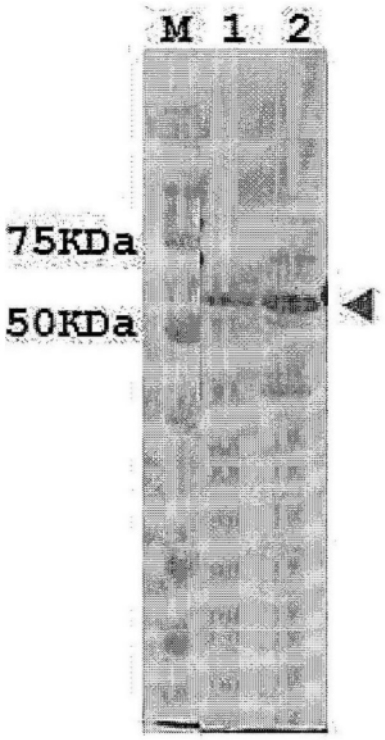

M 1 2
75KDa
50KDa

图3

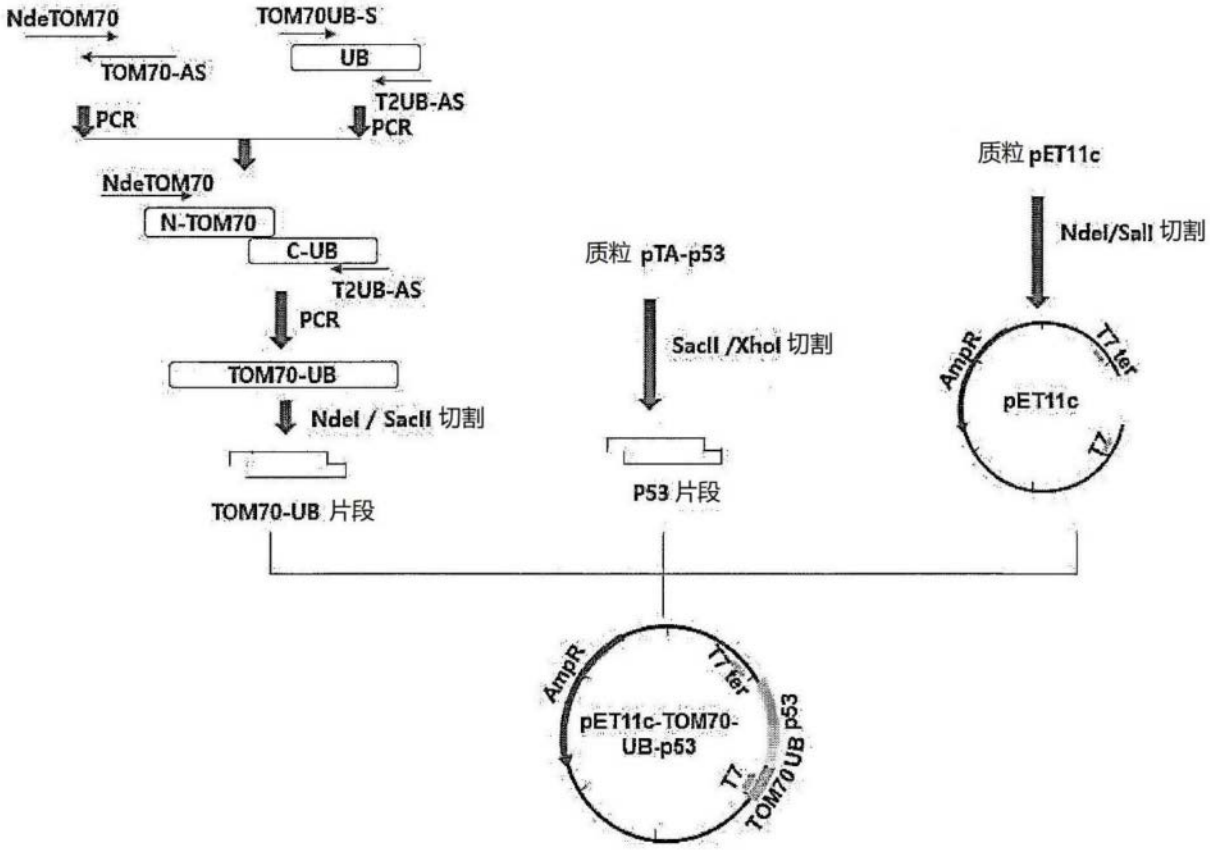

NdeTOM70
TOM70-AS
TOM70UB-S
UB
T2UB-AS
PCR
PCR
NdeTOM70
N-TOM70
C-UB
T2UB-AS
PCR
TOM70-UB
NdeI / SacII 切割
TOM70-UB 片段
质粒 pTA-p53
SacII /XhoI 切割
P53 片段
质粒 pET11c
NdeI/SalI 切割
AmpR
T7 ter
pET11c
T7
AmpR
T7 ter
pET11c-TOM70-
UB-p53
T7
TOM70 UB p53

图4

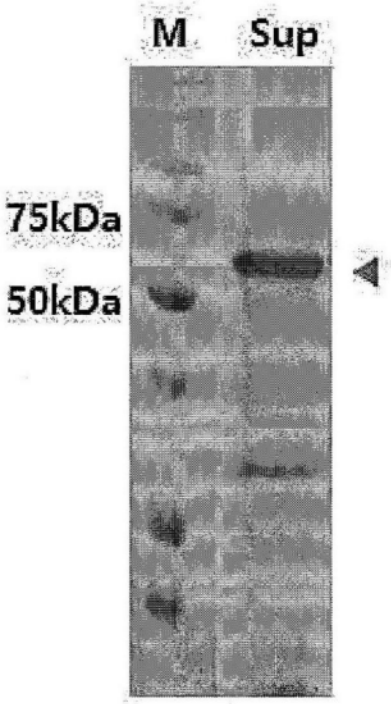

M
Sup
75kDa
50kDa

图5

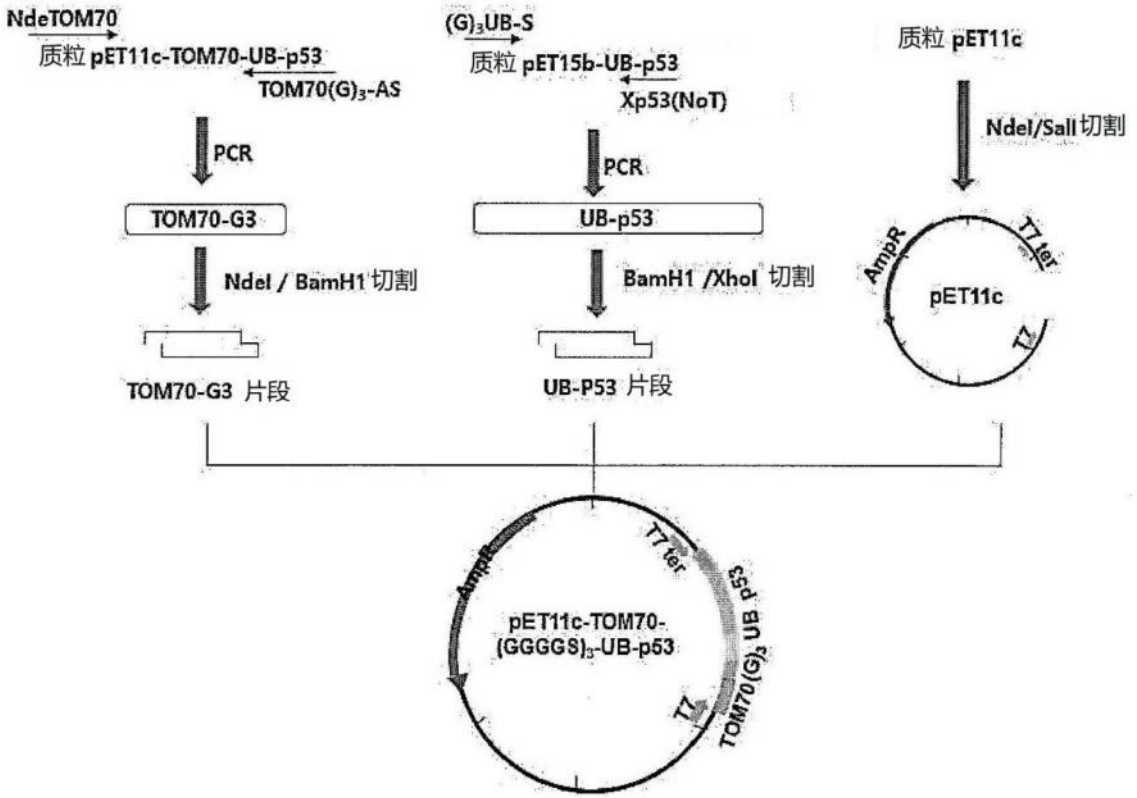

NdeTOM70
质粒 pET11c-TOM70-UB-p53
TOM70(G)3-AS
PCR
TOM70-G3
NdeI / BamH1 切割
TOM70-G3 片段
(G)3UB-S
质粒 pET15b-UB-p53
Xp53(NoT)
PCR
UB-p53
BamH1 /XhoI 切割
UB-P53 片段
质粒 pET11c
NdeI/SalI 切割
AmpR
T7 ter
pET11c
T7
pET11c-TOM70-
(GGGGS)3-UB-p53
Amp
T7 ter
TOM70(G)3 UB p53
T7

图6

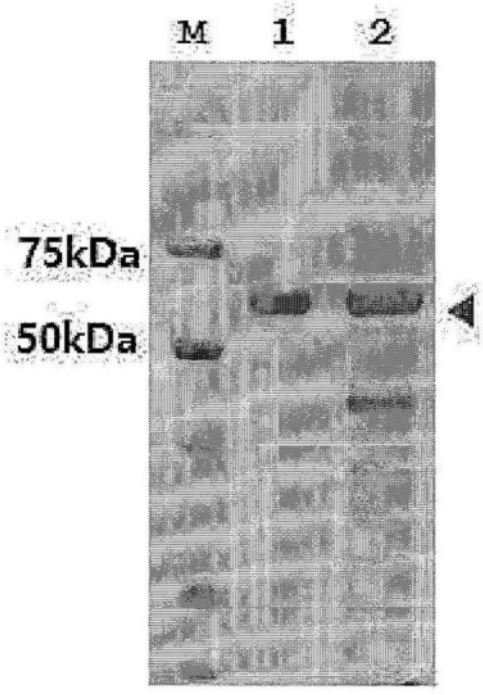

M
1
2
75kDa
50kDa

图7

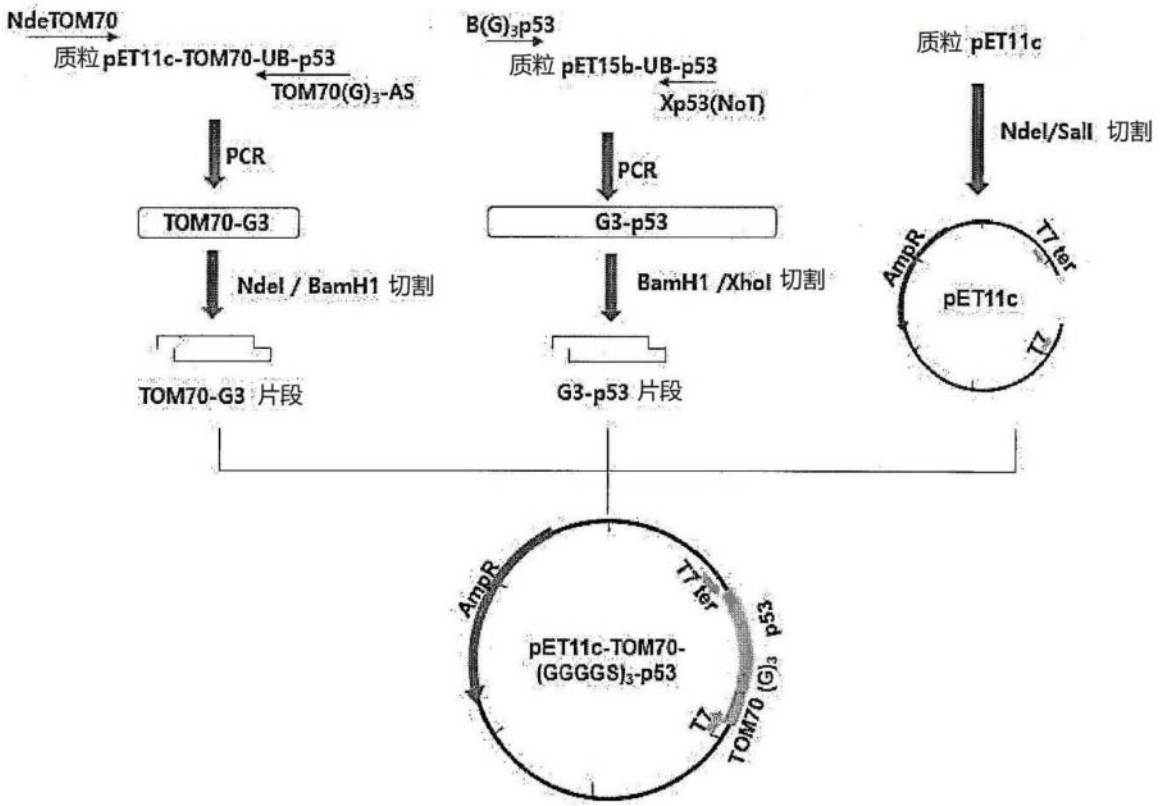

NdeTOM70
质粒 pET11c-TOM70-UB-p53
TOM70(G)3-AS
PCR
TOM70-G3
NdeI / BamH1 切割
TOM70-G3 片段
B(G)3p53
质粒 pET15b-UB-p53
Xp53(NoT)
PCR
G3-p53
BamH1 /XhoI 切割
G3-p53 片段
质粒 pET11c
NdeI/SalI 切割
AmpR
T7 ter
pET11c
T7
pET11c-TOM70-
(GGGGS)3-p53
AmpR
T7 ter
p53
TOM70 (G)3
T7

图8

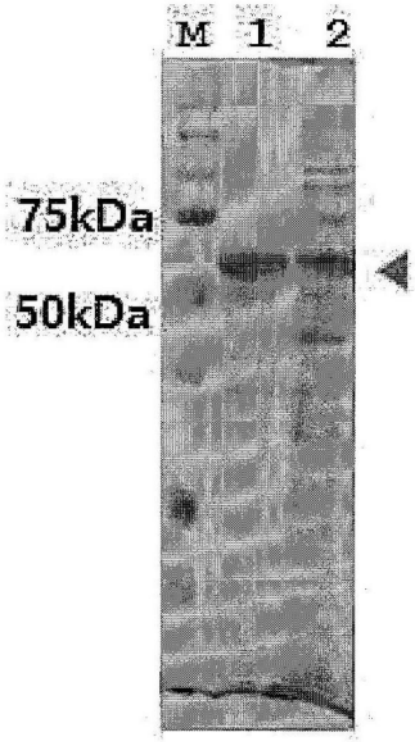

M
1
2
75kDa
50kDa

图9

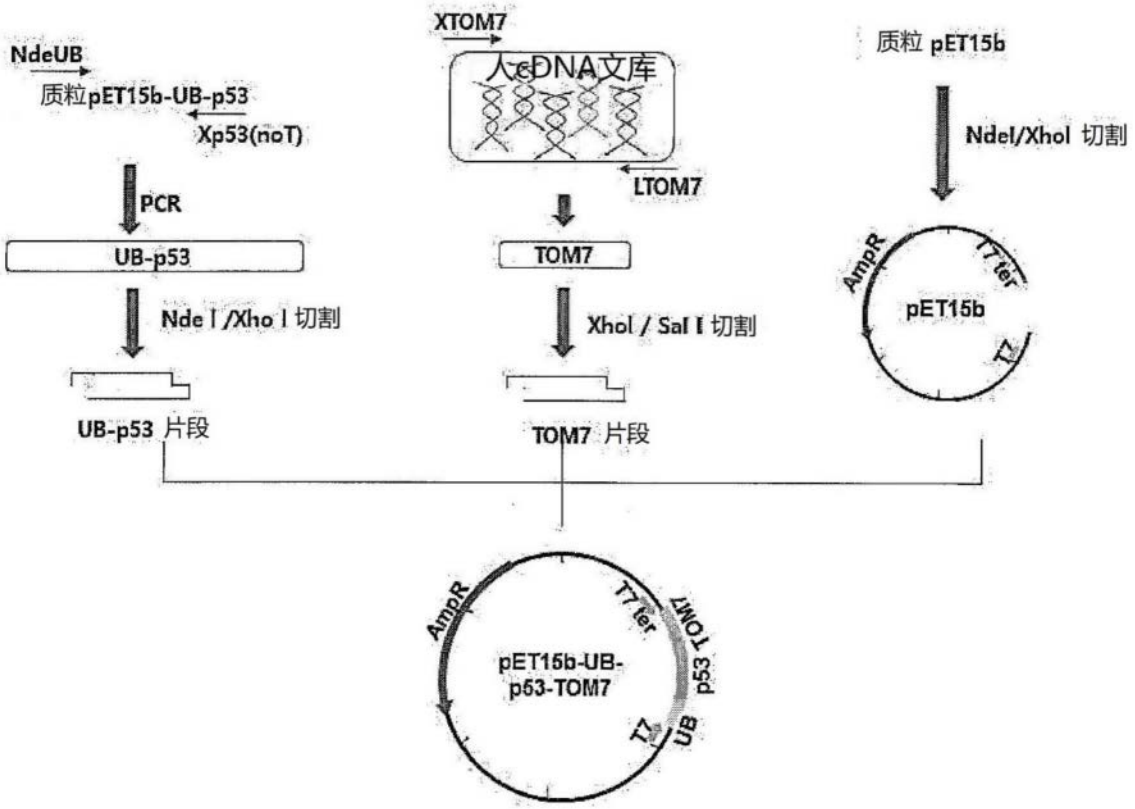

NdeUB
质粒pET15b-UB-p53
Xp53(noT)
PCR
UB-p53
Nde I /Xho I 切割
UB-p53 片段
XTOM7
人cDNA文库
LTOM7
TOM7
Xhol / Sal I 切割
TOM7 片段
质粒 pET15b
Ndel/Xhol 切割
AmpR
T7 ter
pET15b
pET15b-UB-p53-TOM7
UB
p53
TOM7

图10

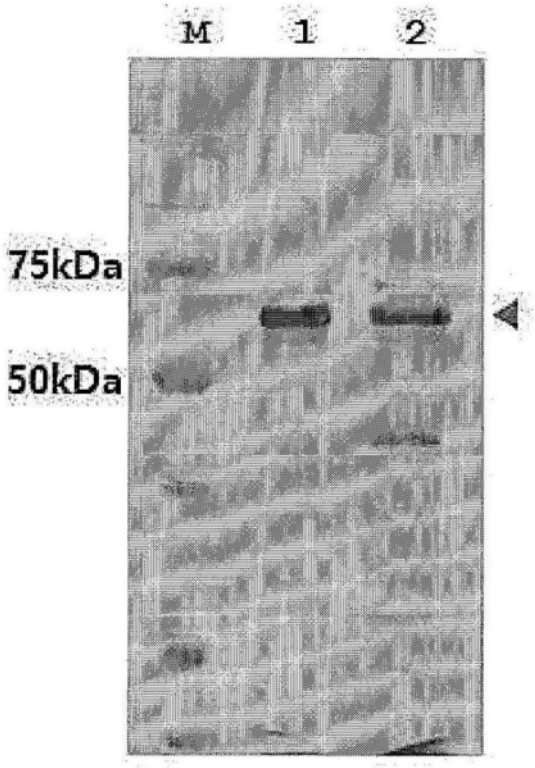

M
1
2
75kDa
50kDa

图11

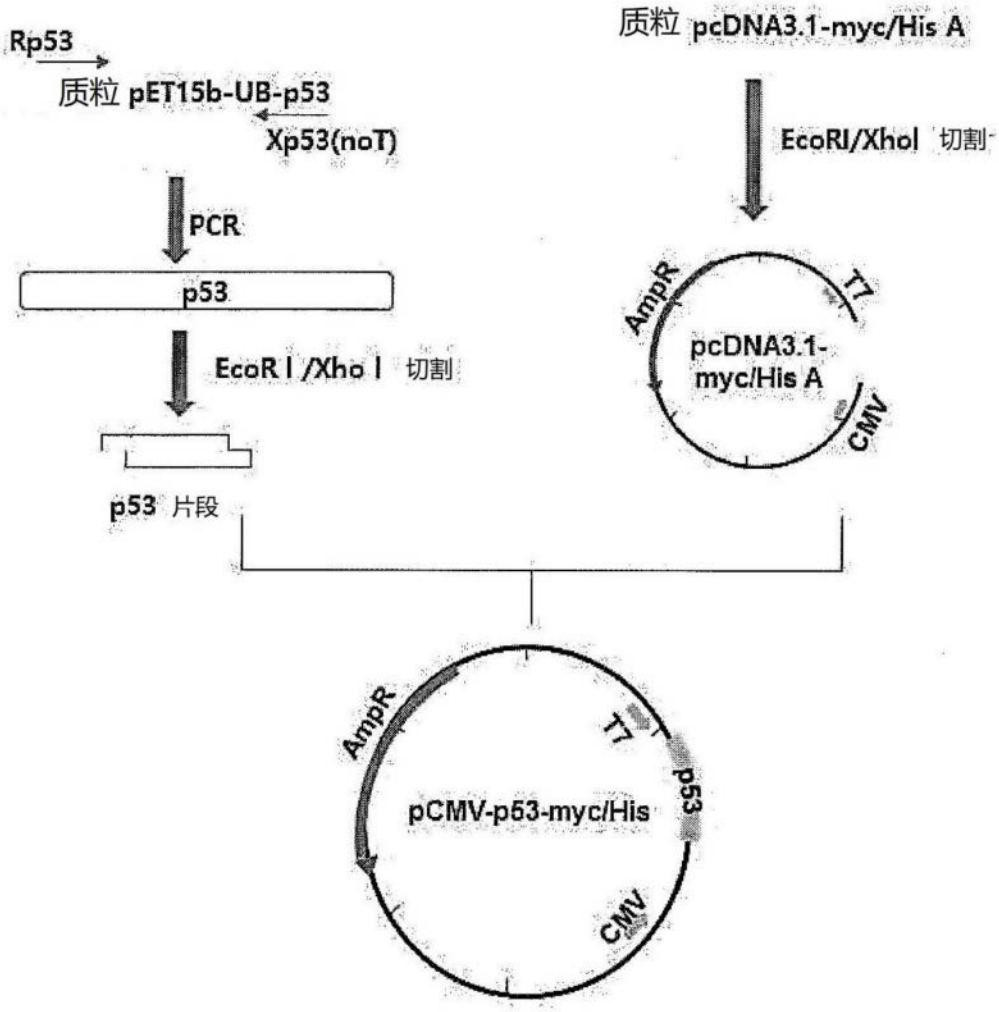

Rp53
质粒 pET15b-UB-p53
Xp53(noT)
PCR
p53
EcoR I /Xho I 切割
p53 片段
质粒 pcDNA3.1-myc/His A
EcoRI/Xhol 切割
AmpR
T7
pcDNA3.1-
myc/His A
CMV
AmpR
T7
p53
pCMV-p53-myc/His
CMV

图12

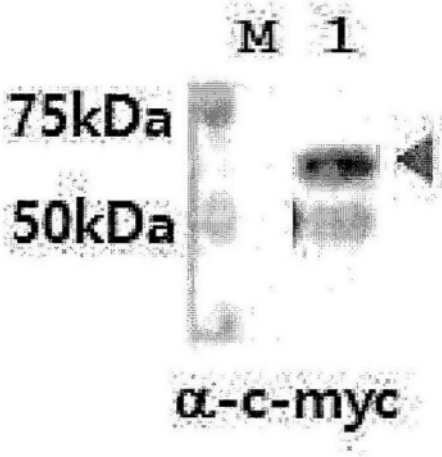

M 1
75kDa
50kDa
α-c-myc

图13

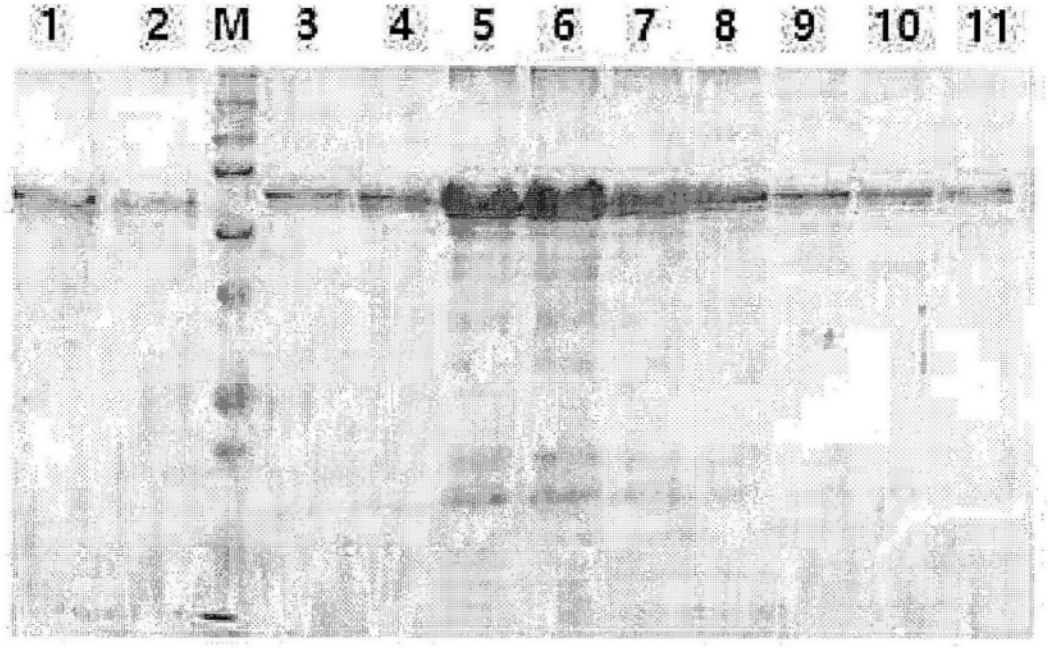


图14

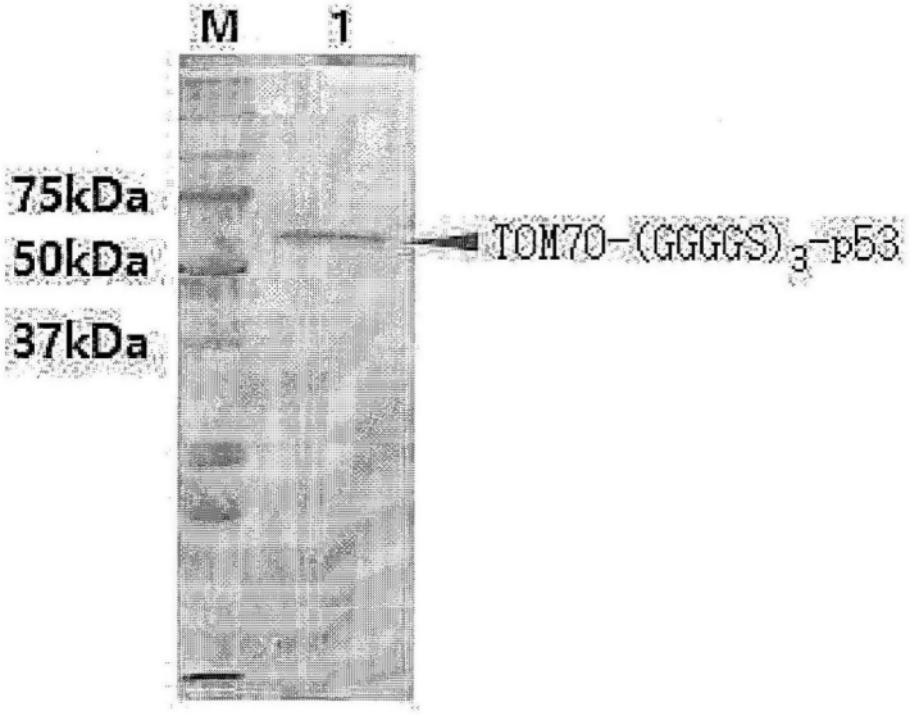


图15

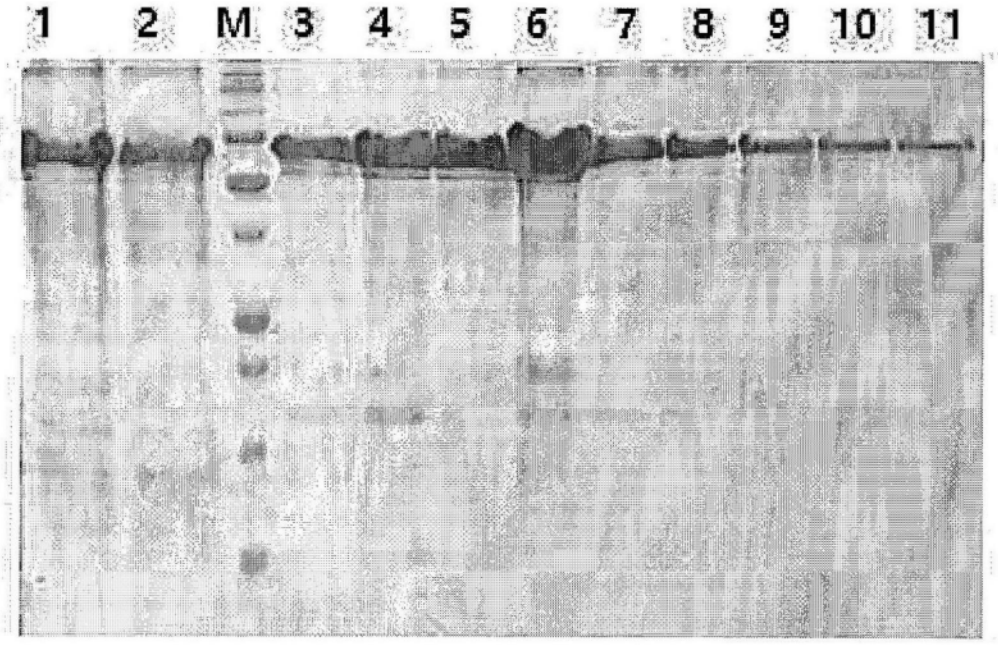


图16

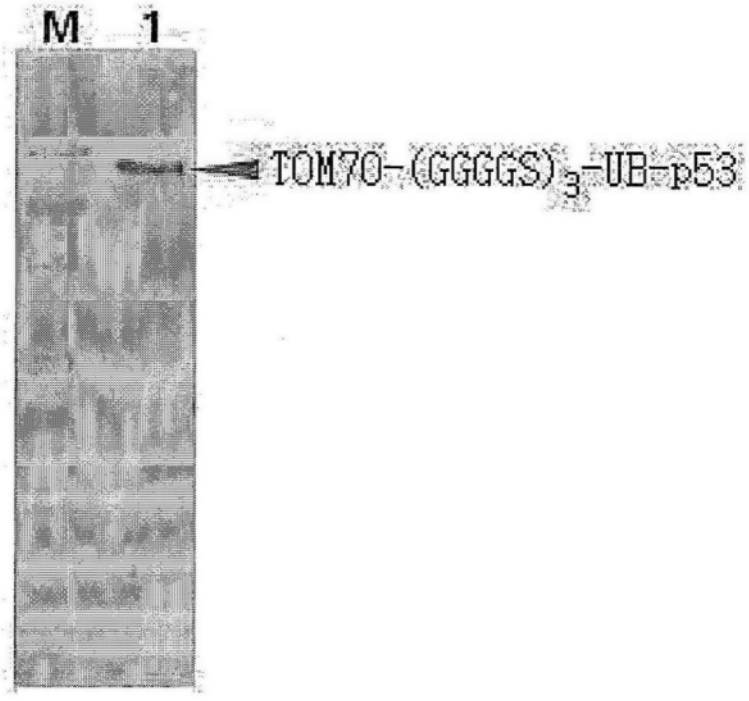


图17

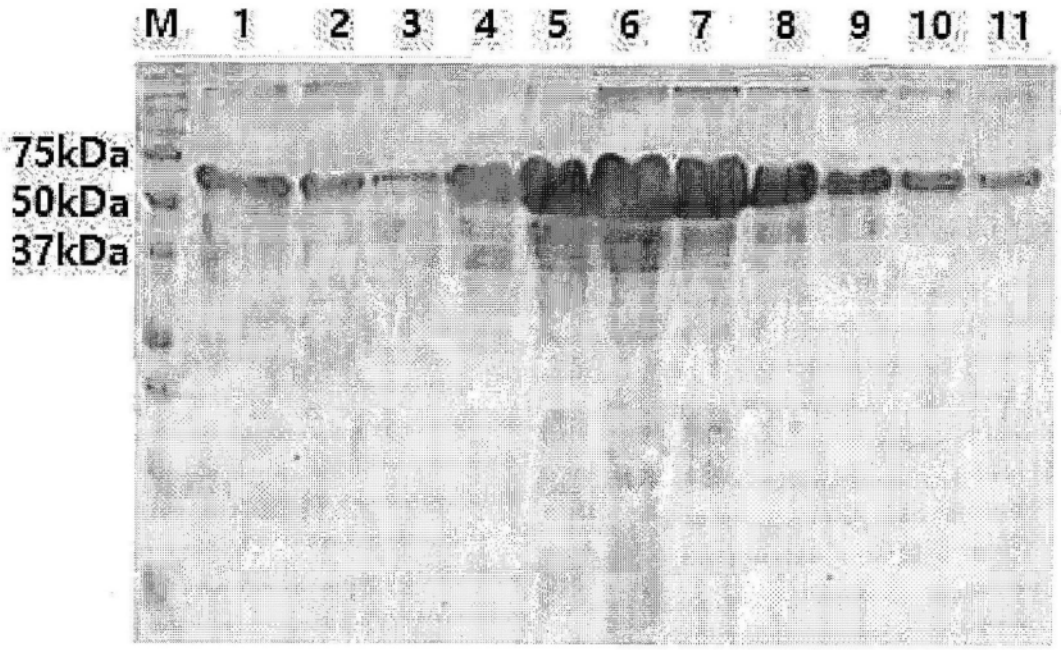

M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
75kDa
50kDa
37kDa

图18

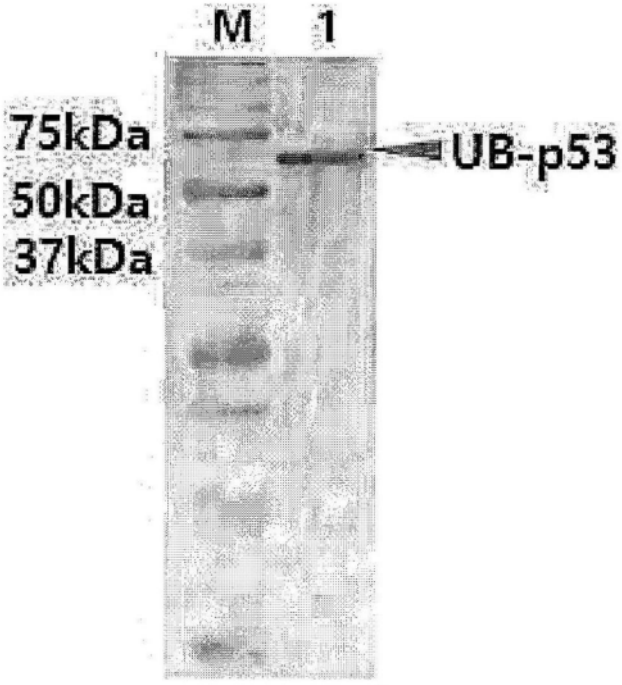

M
1
75kDa
50kDa
37kDa
UB-p53

图19

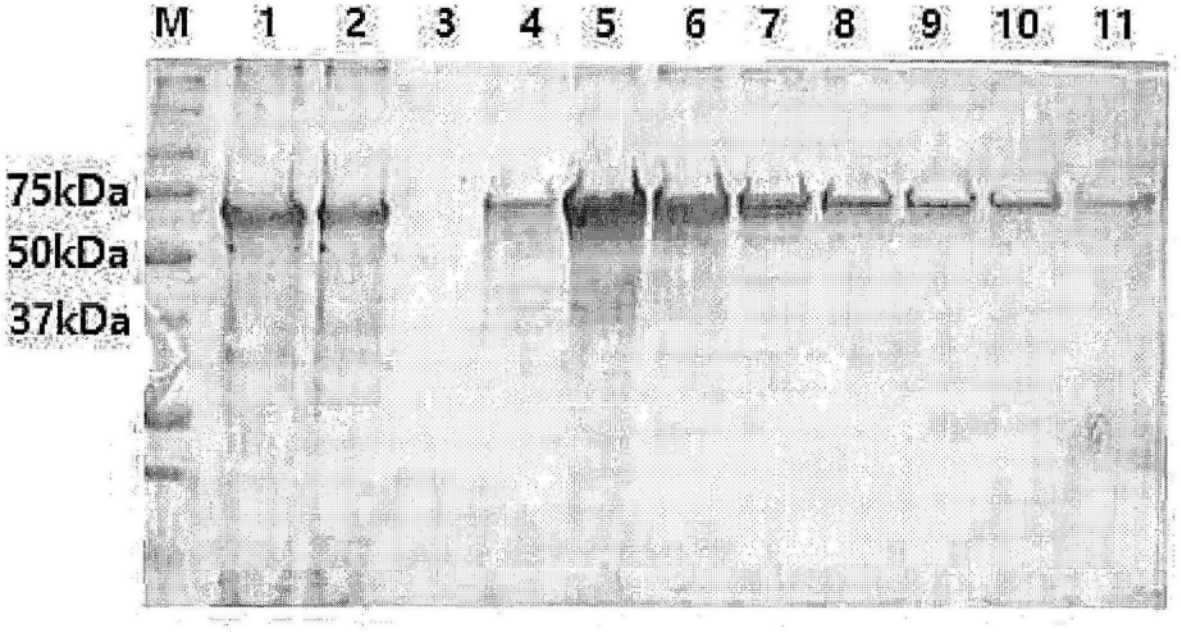

M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
75kDa
50kDa
37kDa

图20

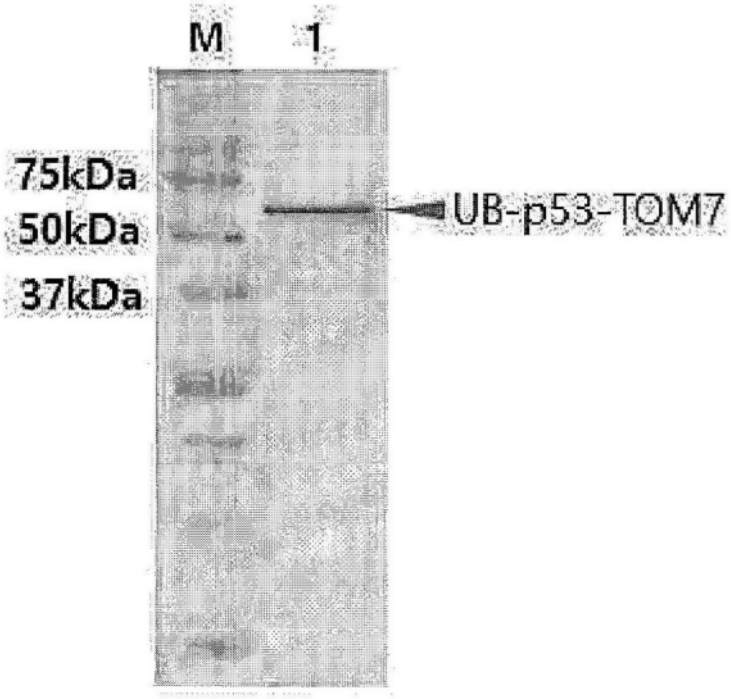

M
1
75kDa
50kDa
37kDa
UB-p53-TOM7

图21

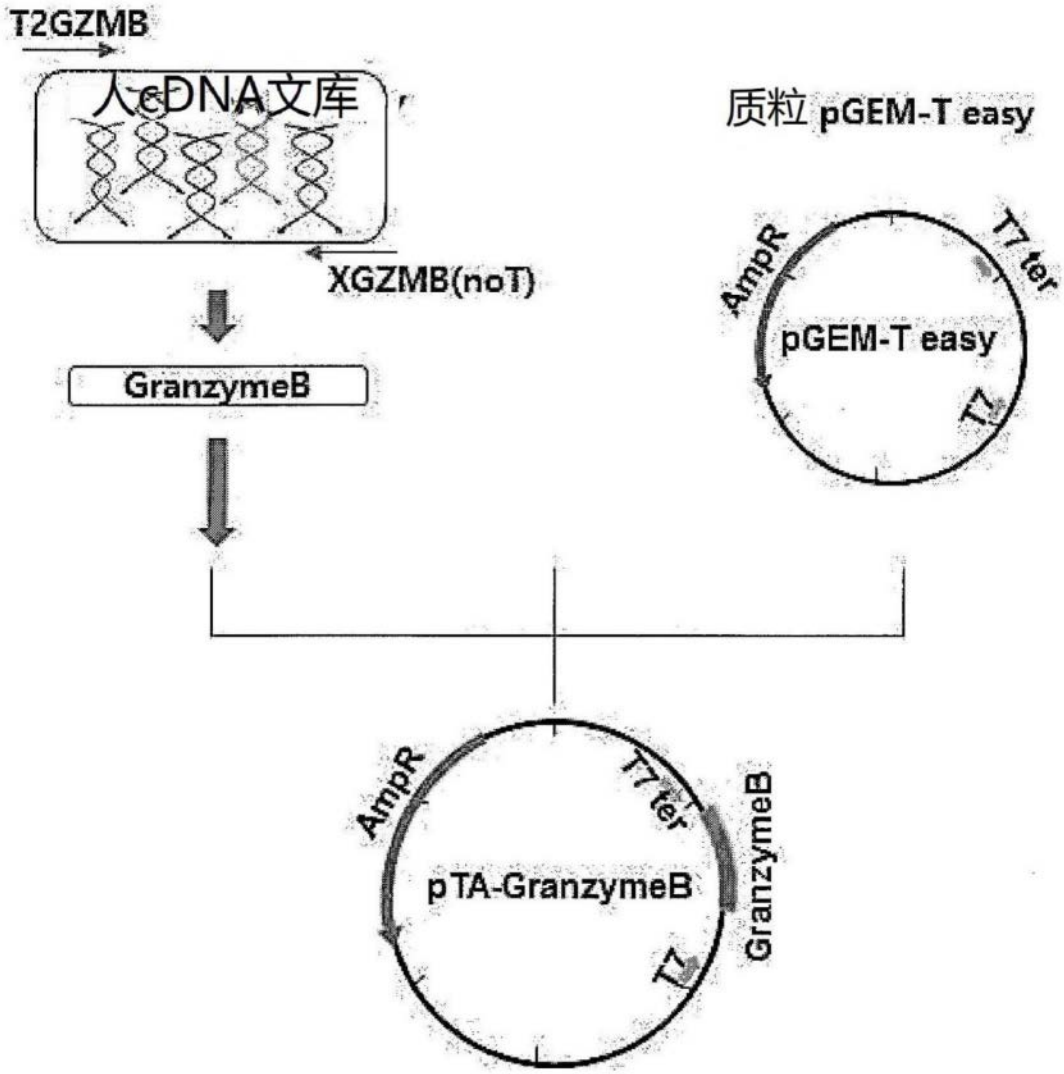

T2GZMB
人cDNA文库
XGZMB(noT)
GranzymeB
质粒 pGEM-T easy
AmpR
T7 ter
pGEM-T easy
T7
AmpR
T7 ter
pTA-GranzymeB
T7
GranzymeB

图22

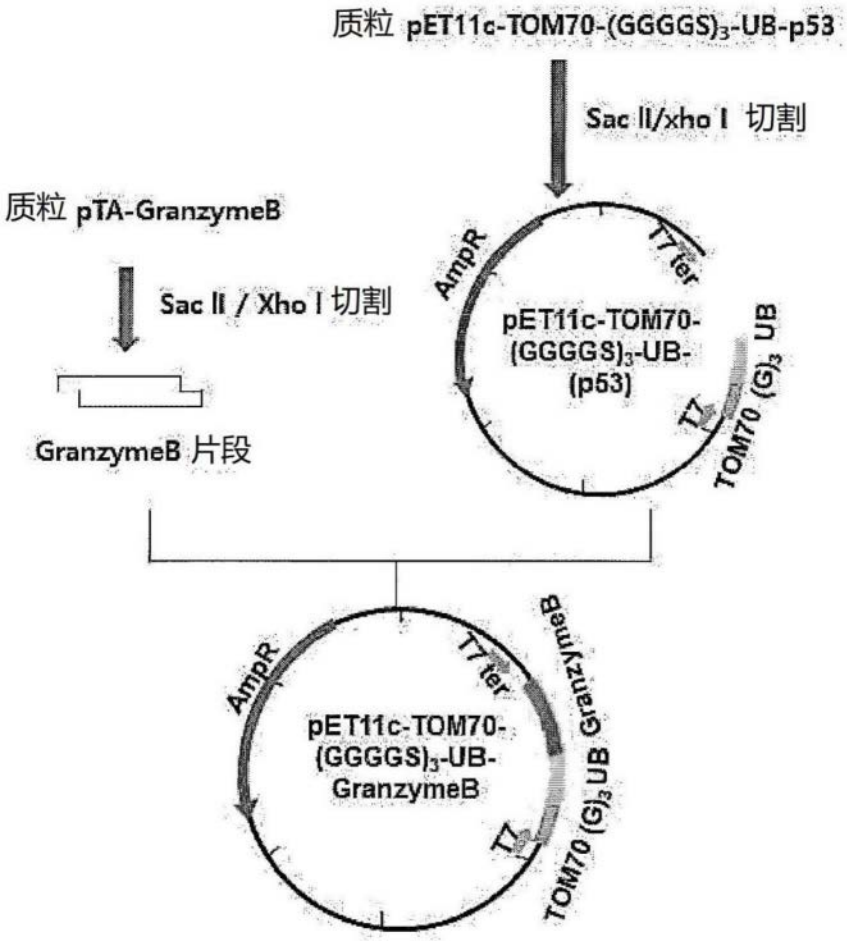

质粒 pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-p53
Sac II/xho I 切割
质粒 pTA-GranzymeB
Sac II / Xho I 切割
GranzymeB 片段
AmpR
T7 ter
pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-(p53)
T7
TOM70 (G)3 UB
AmpR
T7 ter
pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-GranzymeB
T7
TOM70 (G)3 UB GranzymeB

图23

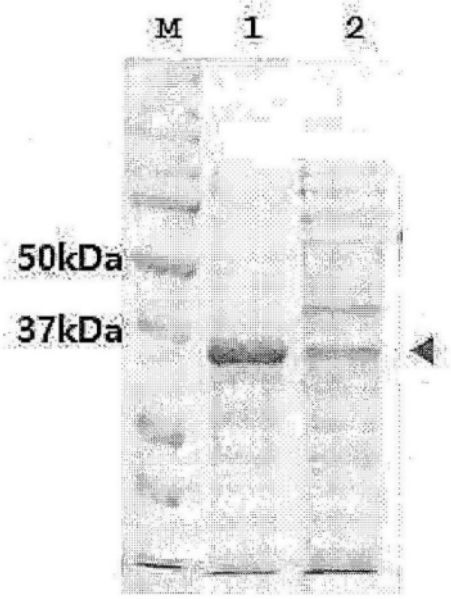

M
1
2
50kDa
37kDa

图24

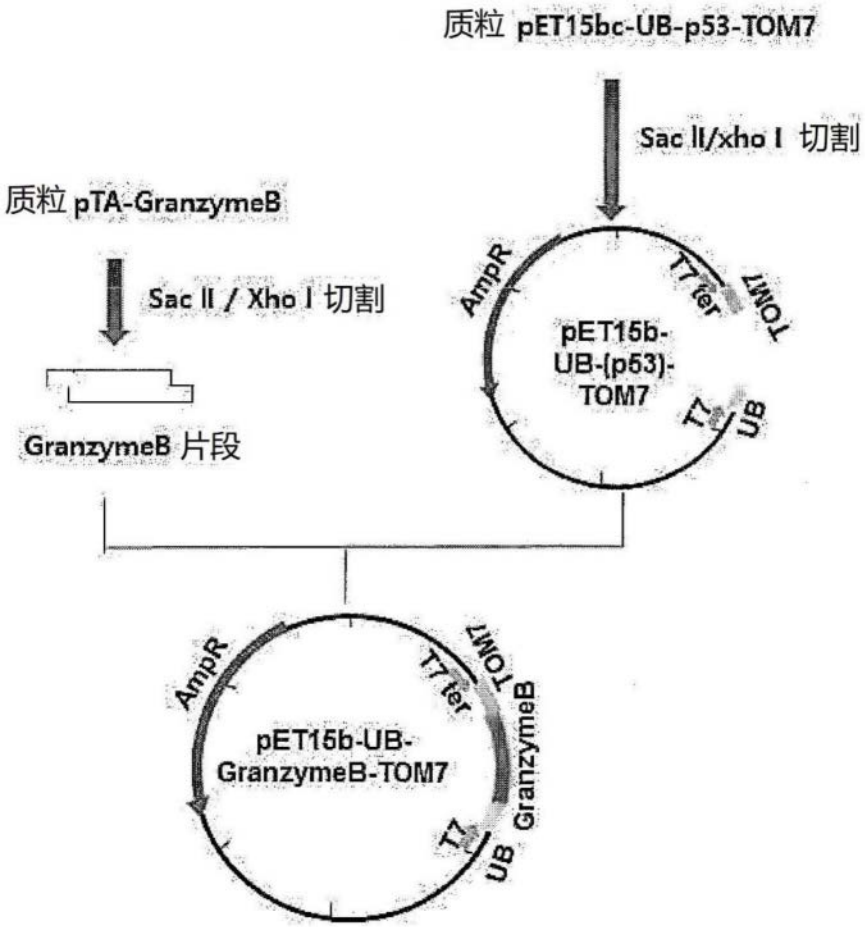

质粒 pET15bc-UB-p53-TOM7
Sac II/xho I 切割
质粒 pTA-GranzymeB
Sac II / Xho I 切割
GranzymeB 片段
AmpR
T7 ter
TOM7
pET15b-
UB-(p53)-
TOM7
T7
UB
AmpR
T7 ter
TOM7
pET15b-UB-
GranzymeB-TOM7
T7
UB
GranzymeB

图25

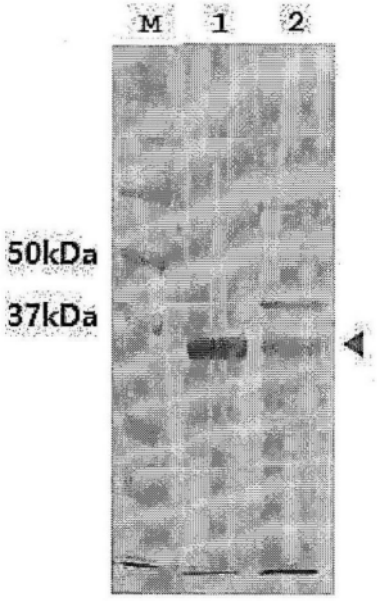

M
1
2
50kDa
37kDa

图26

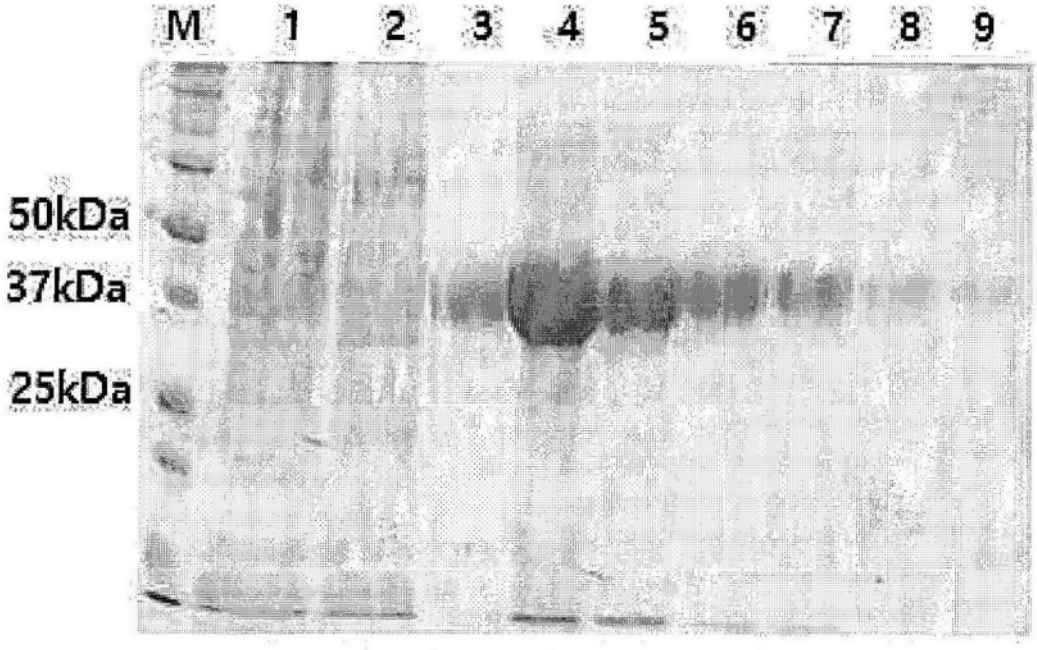

M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
50kDa
37kDa
25kDa

图27

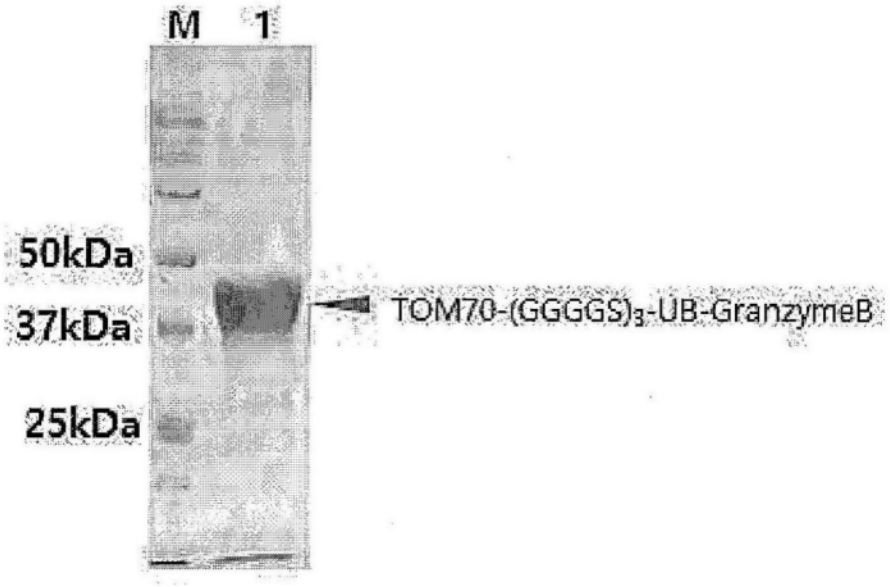

M
1
50kDa
37kDa
25kDa
TOM70-(GGGGS)3-UB-GranzymeB

图28

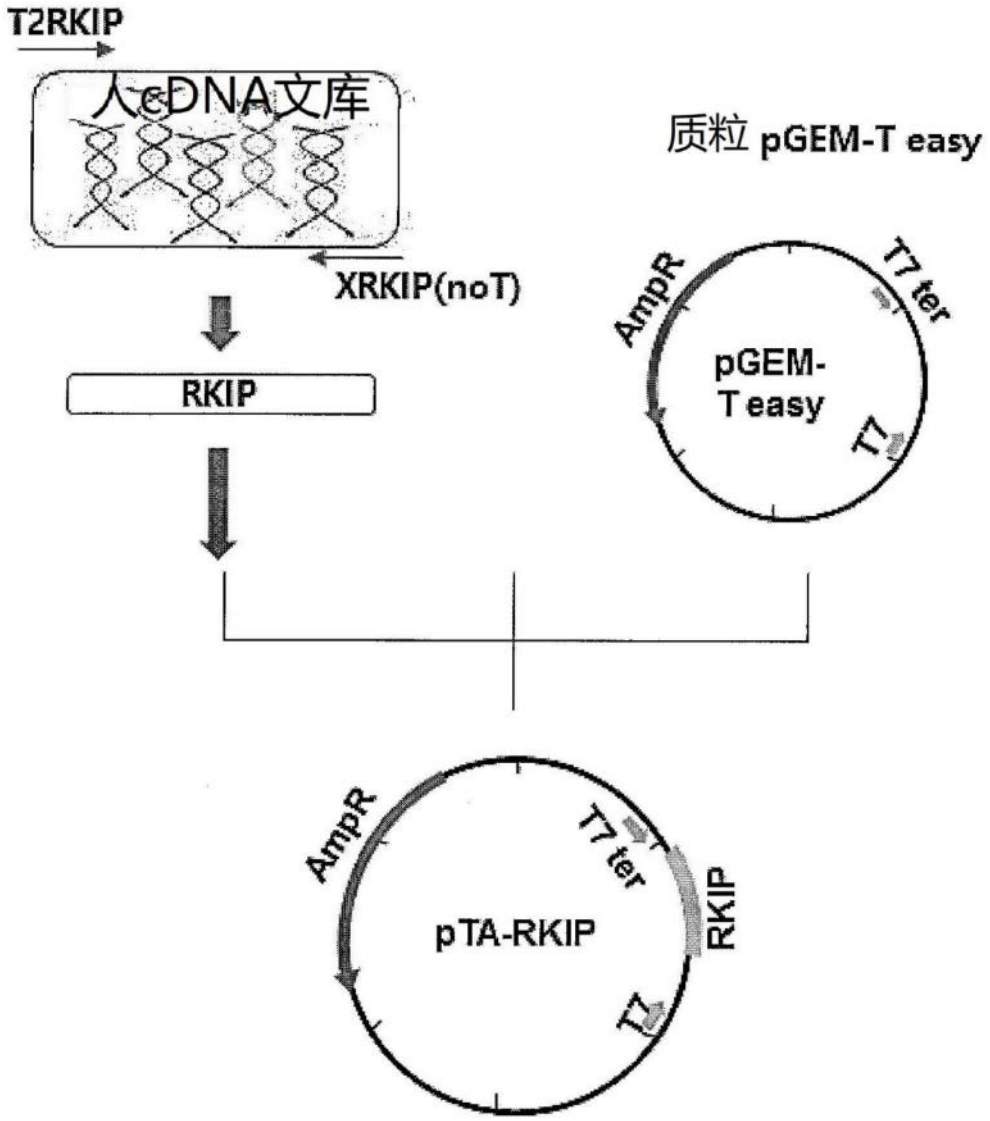

T2RKIP
人cDNA文库
XRKIP(noT)
RKIP
质粒 pGEM-T easy
AmpR
T7 ter
pGEM-
T easy
T7
AmpR
T7 ter
RKIP
pTA-RKIP
T7

图29

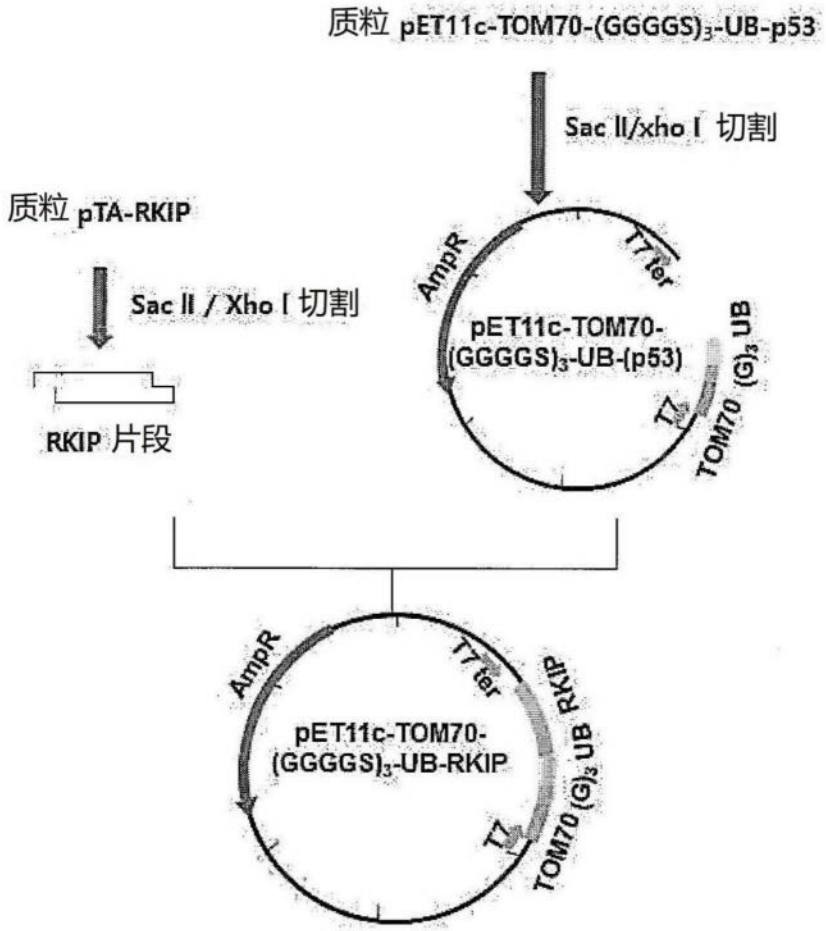

质粒 pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-p53
Sac II/xho I 切割
质粒 pTA-RKIP
Sac II / Xho I 切割
RKIP 片段
AmpR
T7 ter
pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-(p53)
T7
TOM70
(G)3
UB
AmpR
T7 ter
RKIP
pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP
T7
TOM70
(G)3
UB

图30

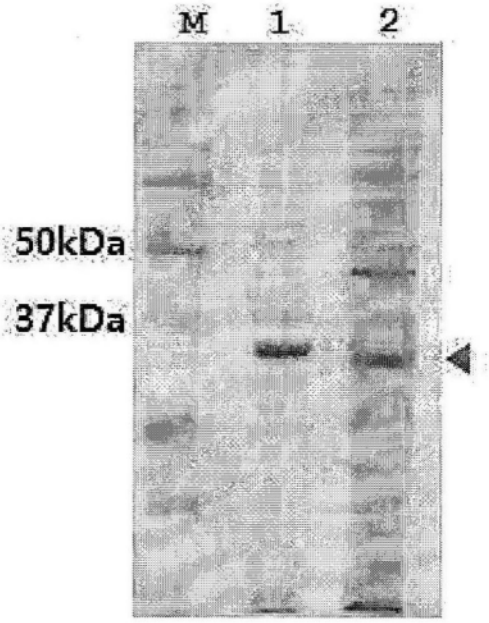

M
1
2
50kDa
37kDa

图31

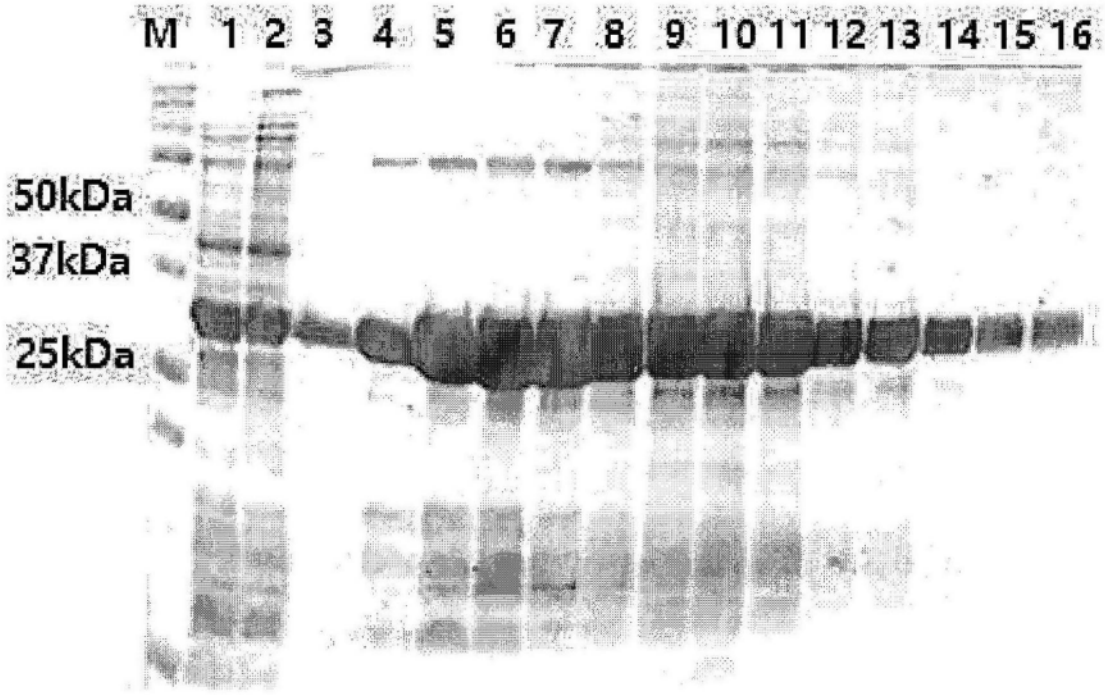

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
50kDa
37kDa
25kDa

图32

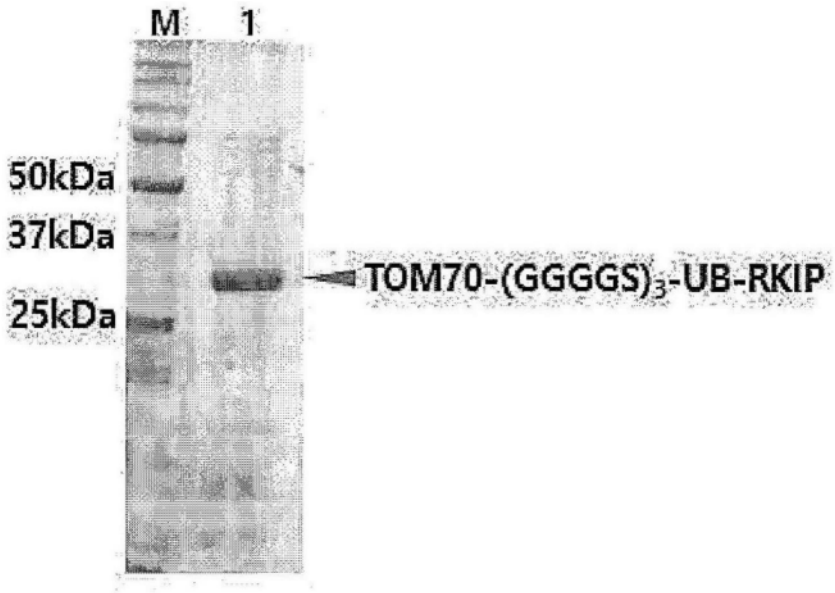

M 1
50kDa
37kDa
25kDa
TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP

图33

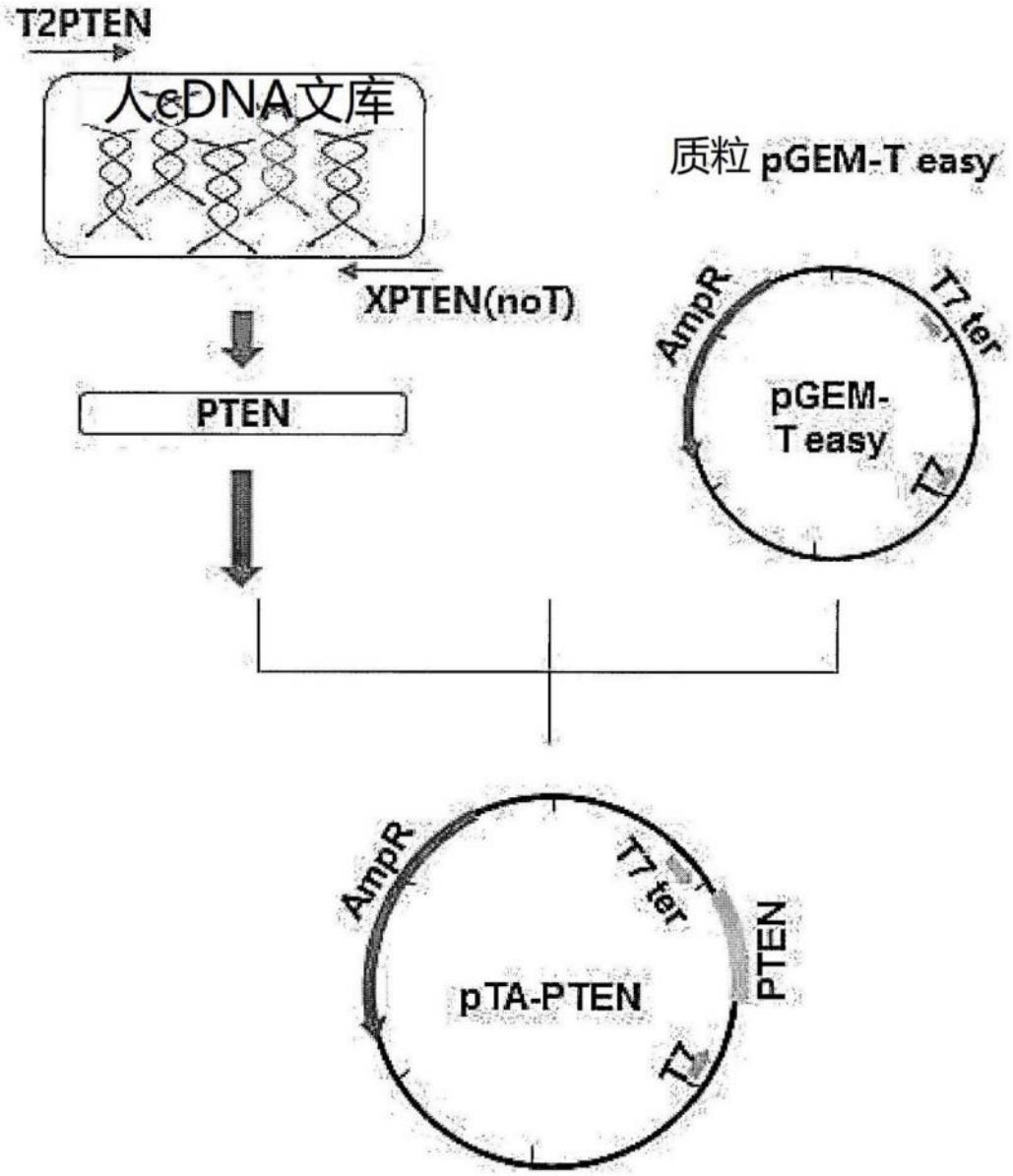

T2PTEN
人cDNA文库
XPTEN(noT)
PTEN
质粒 pGEM-T easy
AmpR
T7 ter
pGEM-
T easy
T7
AmpR
T7 ter
PTEN
pTA-PTEN
T7

图34

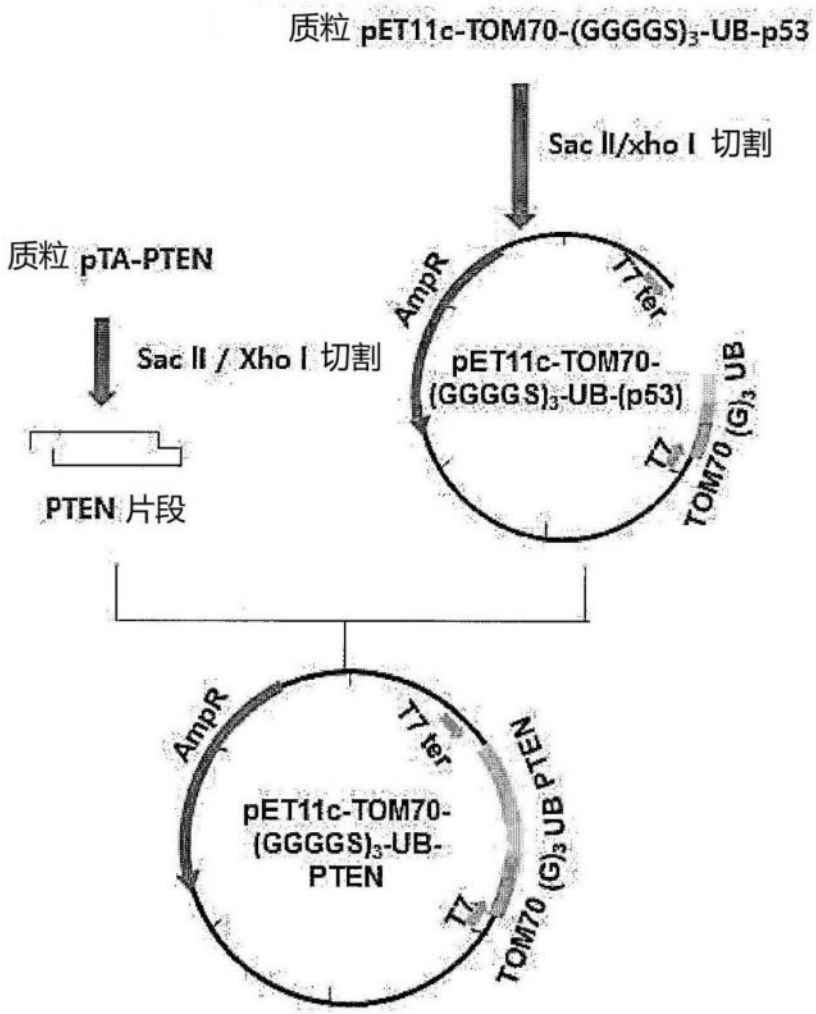

质粒 pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-p53
Sac II/xho I 切割
质粒 pTA-PTEN
Sac II / Xho I 切割
PTEN 片段
AmpR
T7 ter
pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-(p53)
T7
TOM70 (G)3 UB
AmpR
T7 ter
pET11c-TOM70-(GGGGS)3-UB-PTEN
T7
TOM70 (G)3 UB PTEN

图35

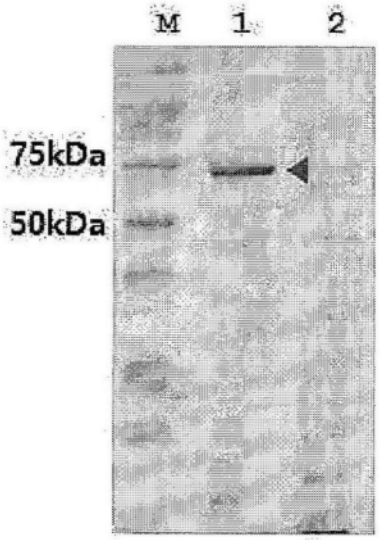

M
1
2
75kDa
50kDa

图36

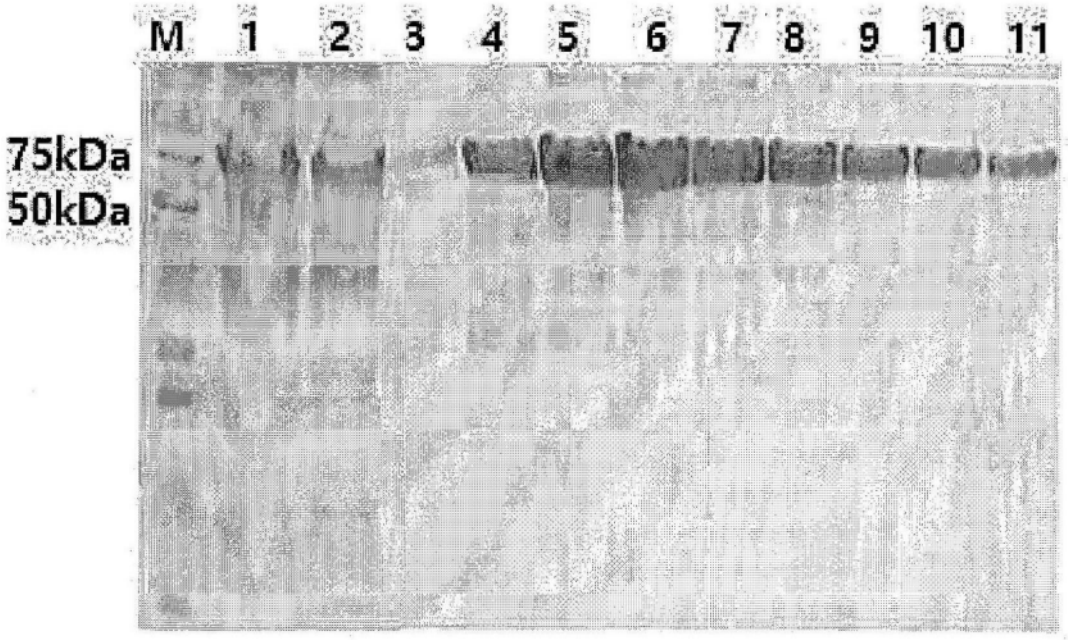

M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
75kDa
50kDa

图37

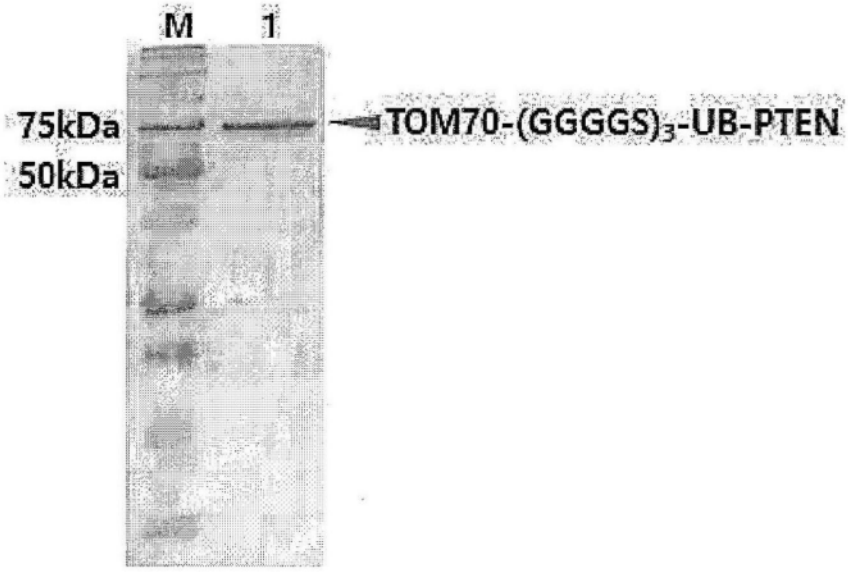

M
1
75kDa
50kDa
TOM70-(GGGGS)3-UB-PTEN

图38

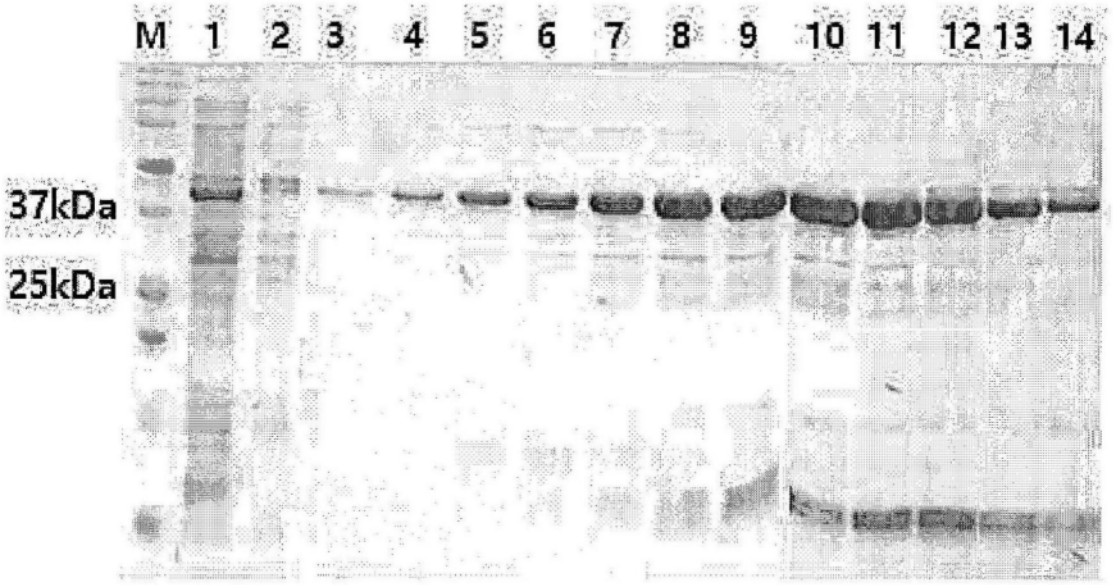

M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
37kDa
25kDa

图39

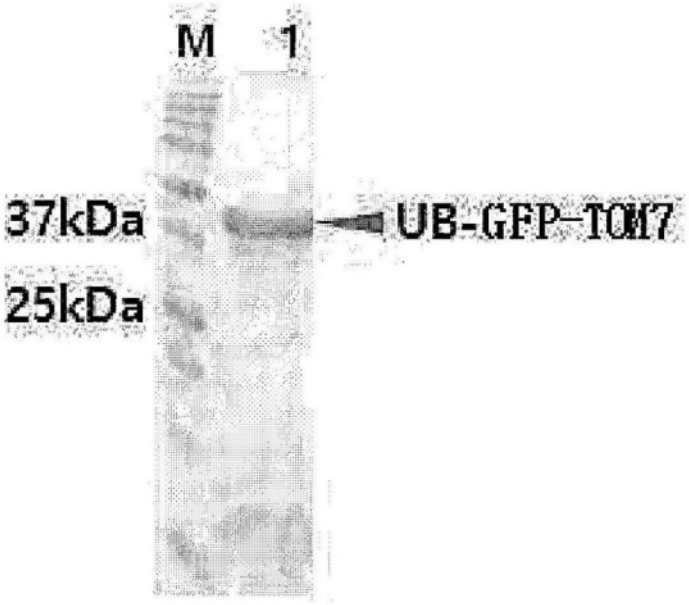

M
1
37kDa
25kDa
UB-GFP-TOM7

图40

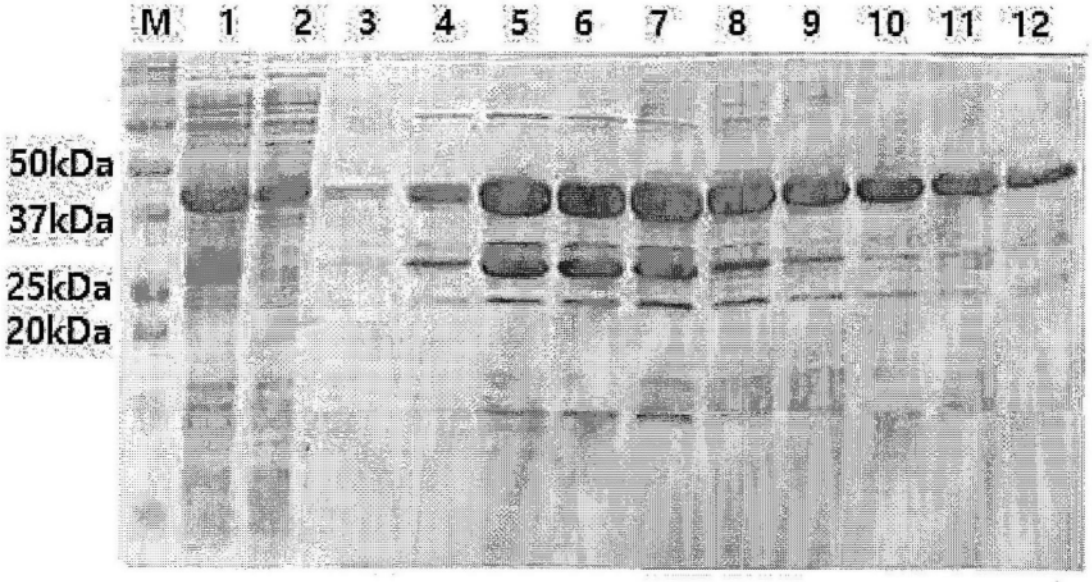

M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
50kDa
37kDa
25kDa
20kDa

图41

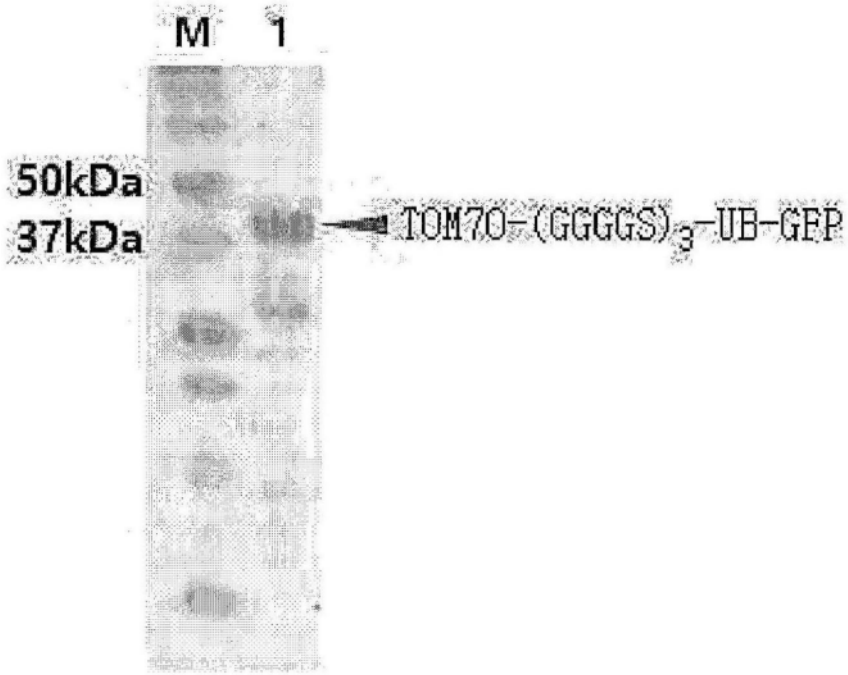

M
1
50kDa
37kDa
TOM70-(GGGGS)3-UB-GFP

图42

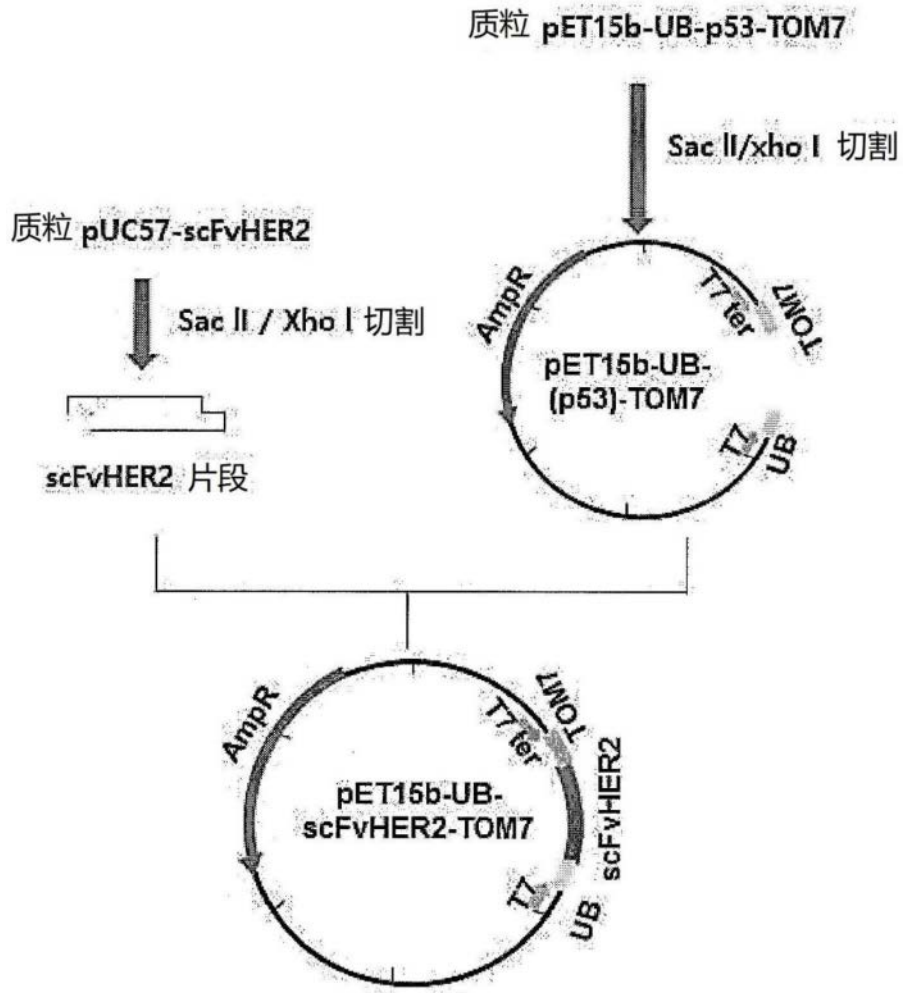

质粒 pET15b-UB-p53-TOM7
Sac II/xho I 切割
质粒 pUC57-scFvHER2
Sac II / Xho I 切割
scFvHER2 片段
AmpR
T7 ter
TOM7
pET15b-UB-
(p53)-TOM7
T7
UB
AmpR
T7 ter
TOM7
pET15b-UB-
scFvHER2-TOM7
T7
UB
scFvHER2

图43

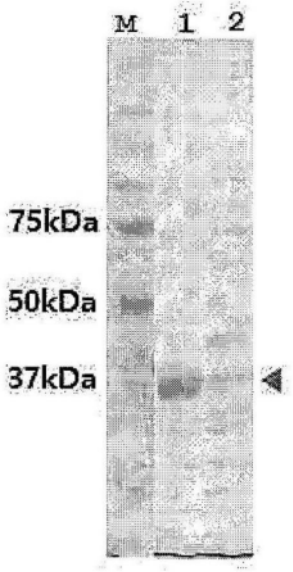

M
1
2
75kDa
50kDa
37kDa

图44

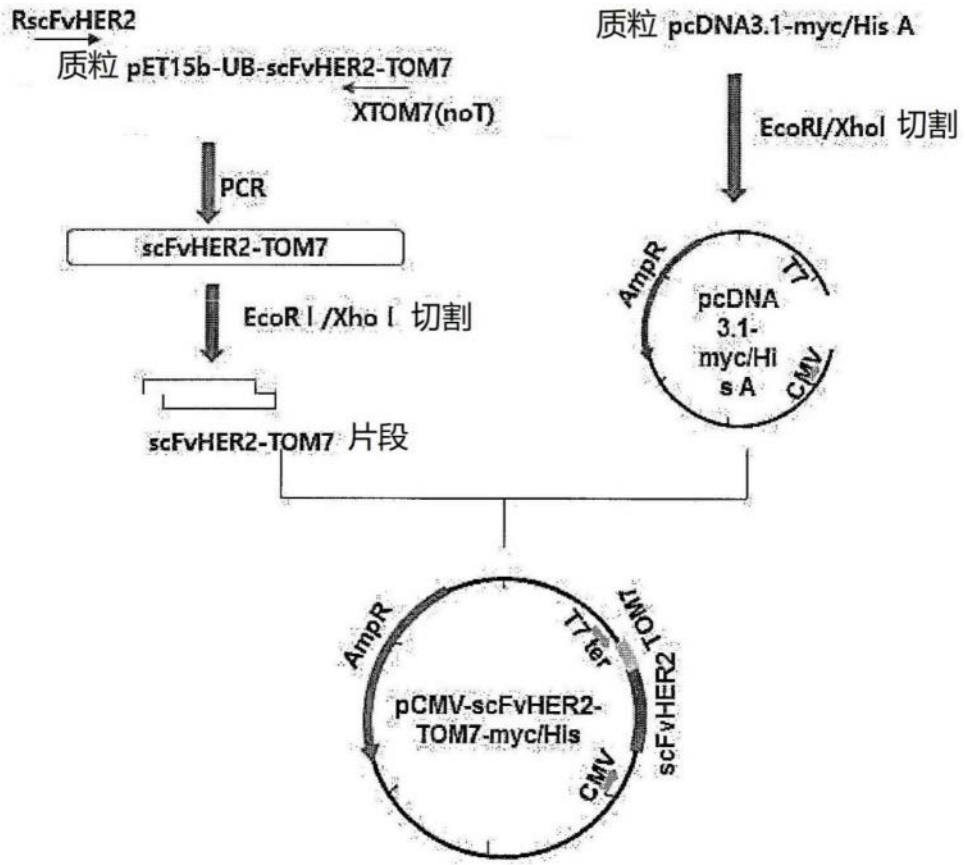

RscFvHER2
质粒 pET15b-UB-scFvHER2-TOM7
XTOM7(noT)
PCR
scFvHER2-TOM7
EcoR I /Xho I 切割
scFvHER2-TOM7 片段
质粒 pcDNA3.1-myc/His A
EcoRI/Xhol 切割
AmpR
T7
pcDNA 3.1-myc/His A
CMV
AmpR
T7 ter
TOM7
scFvHER2
pCMV-scFvHER2-TOM7-myc/His
CMV

图45

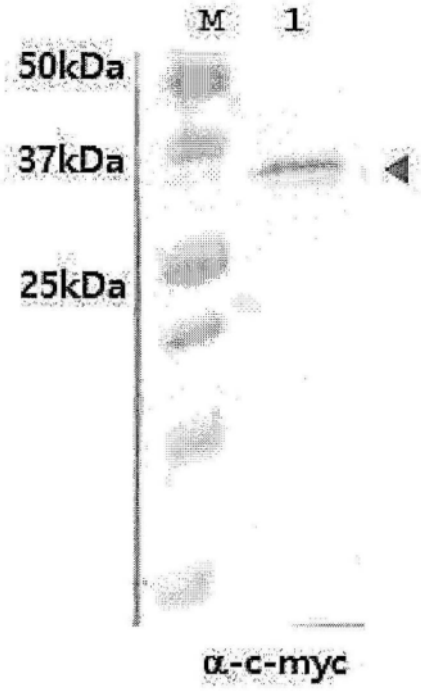

M
1
50kDa
37kDa
25kDa
α-c-myc

图46

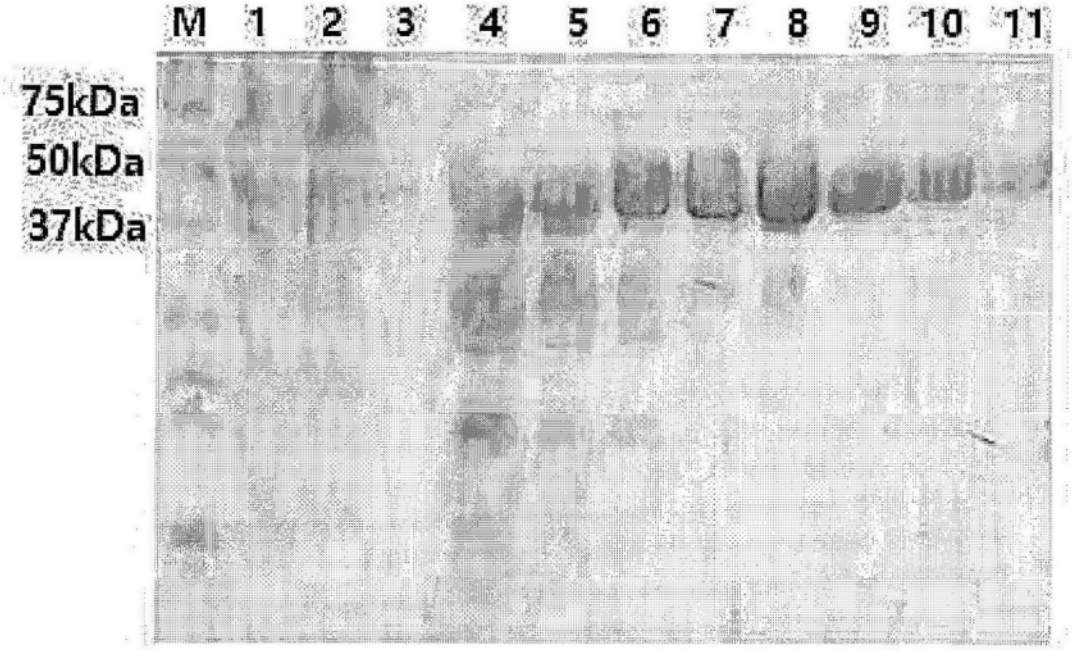

M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
75kDa
50kDa
37kDa

图47

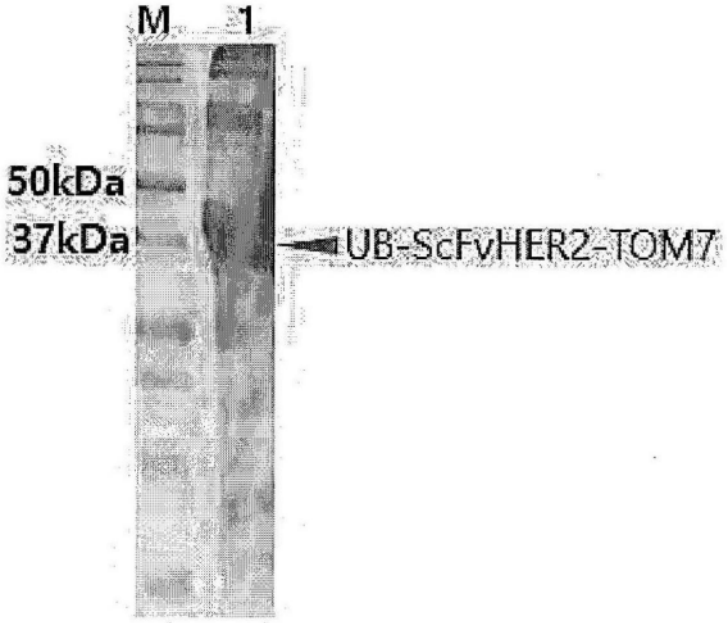

M
1
50kDa
37kDa
UB-ScFvHER2-TOM7

图48

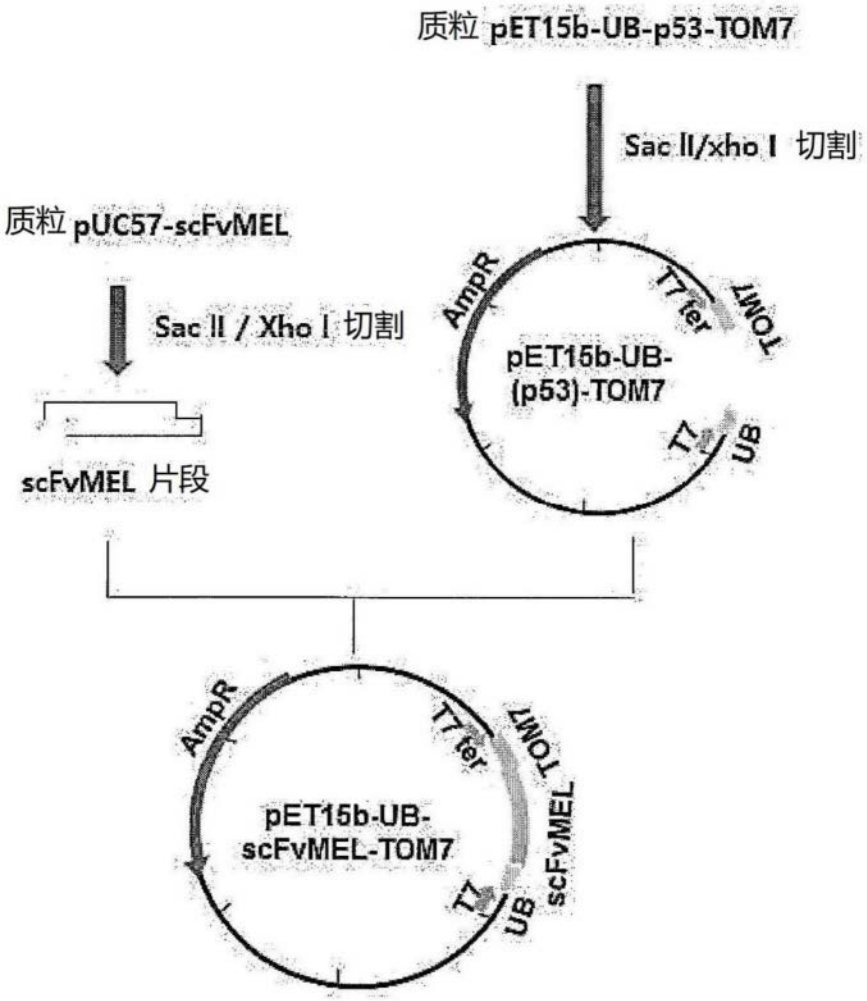

质粒 pET15b-UB-p53-TOM7
Sac II/xho I 切割
质粒 pUC57-scFvMEL
Sac II / Xho I 切割
scFvMEL 片段
AmpR
T7 ter
TOM7
pET15b-UB-
(p53)-TOM7
T7
UB
AmpR
T7 ter
TOM7
pET15b-UB-
scFvMEL-TOM7
T7
UB
scFvMEL

图49

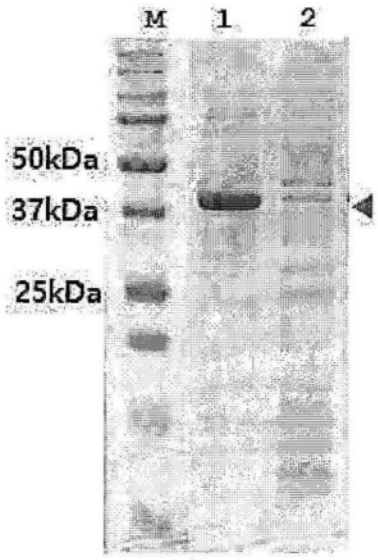

M
1
2
50kDa
37kDa
25kDa

图50

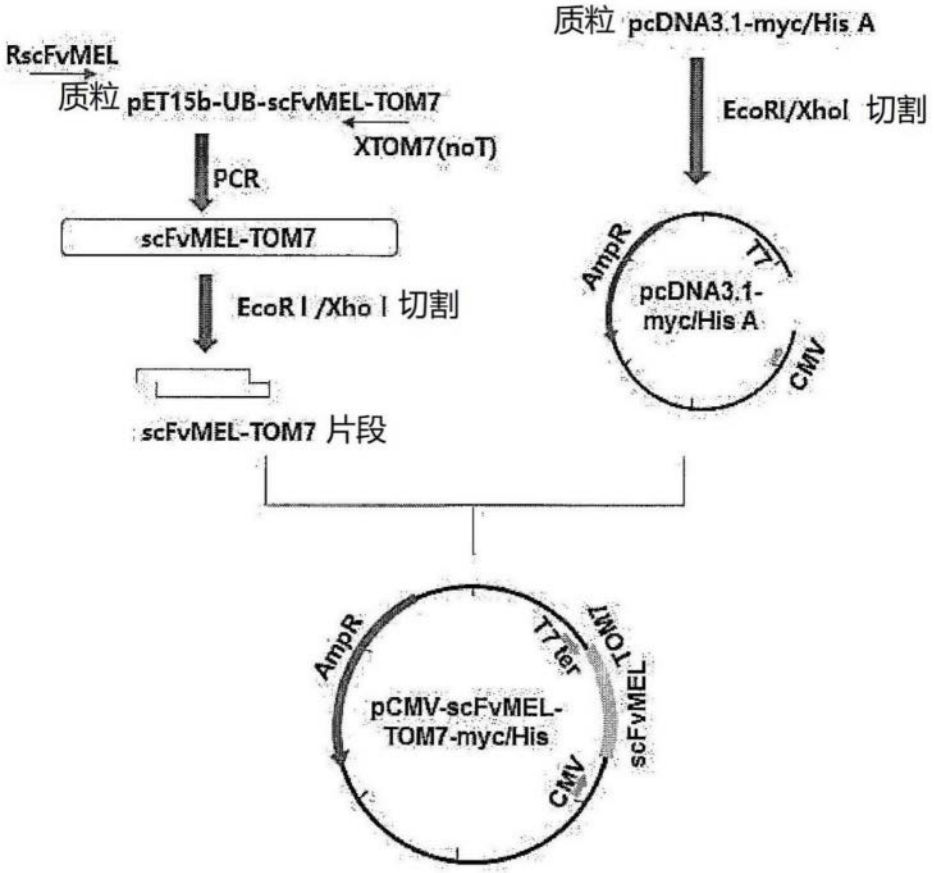

RscFvMEL
质粒 pET15b-UB-scFvMEL-TOM7
XTOM7(noT)
PCR
scFvMEL-TOM7
EcoR I /Xho I 切割
scFvMEL-TOM7 片段
质粒 pcDNA3.1-myc/His A
EcoRI/XhoI 切割
AmpR
T7
pcDNA3.1-myc/His A
CMV
AmpR
T7 ter
TOM7
scFvMEL
pCMV-scFvMEL-TOM7-myc/His
CMV

图51

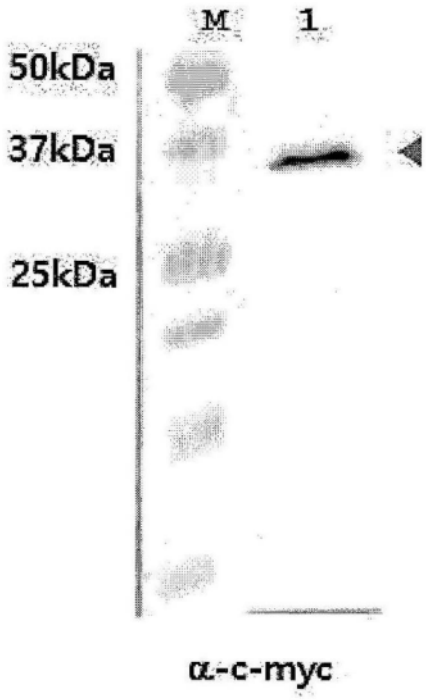

M
1
50kDa
37kDa
25kDa
α-c-myc

图52

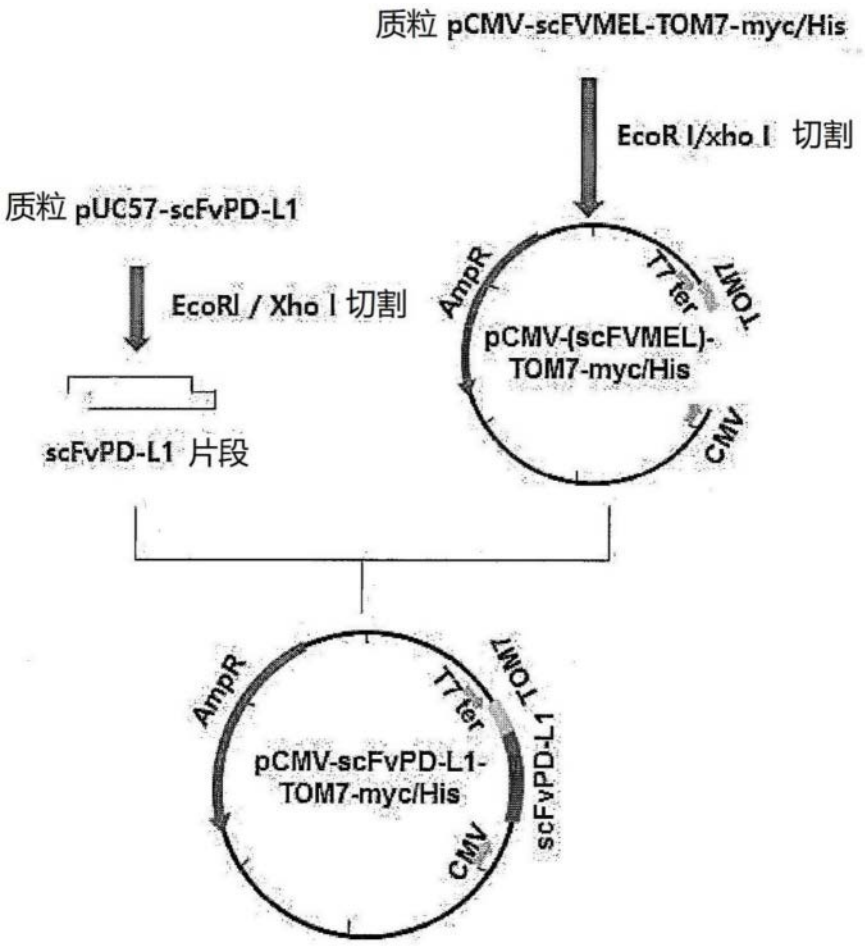

质粒 pCMV-scFVMEL-TOM7-myc/His
EcoR I/xho I 切割
质粒 pUC57-scFvPD-L1
EcoRI / Xho I 切割
scFvPD-L1 片段
AmpR
T7 ter
TOM7
pCMV-(scFVMEL)-
TOM7-myc/His
CMV
AmpR
T7 ter
TOM7
pCMV-scFvPD-L1-
TOM7-myc/His
CMV
scFvPD-L1

图53

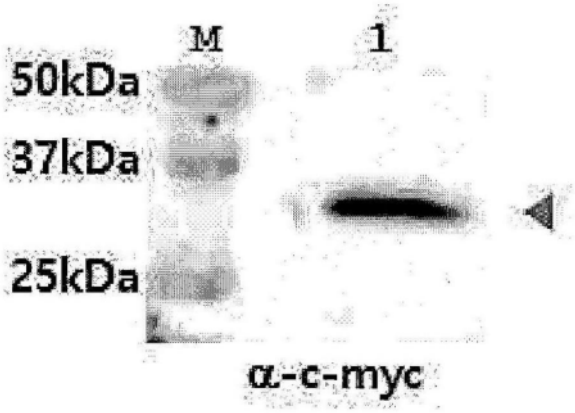

M
1
50kDa
37kDa
25kDa
α-c-myc

图54

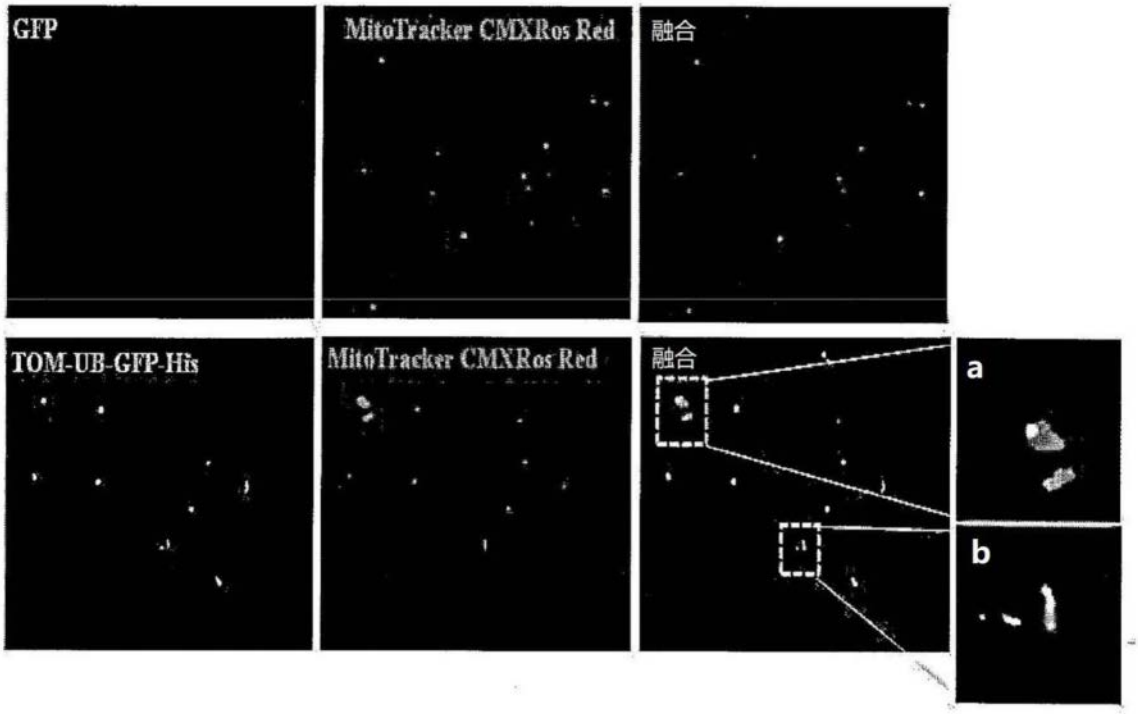

GFP
MitoTracker CMXRos Red
融合
TOM-UB-GFP-His
MitoTracker CMXRos Red
融合
a
b

图55

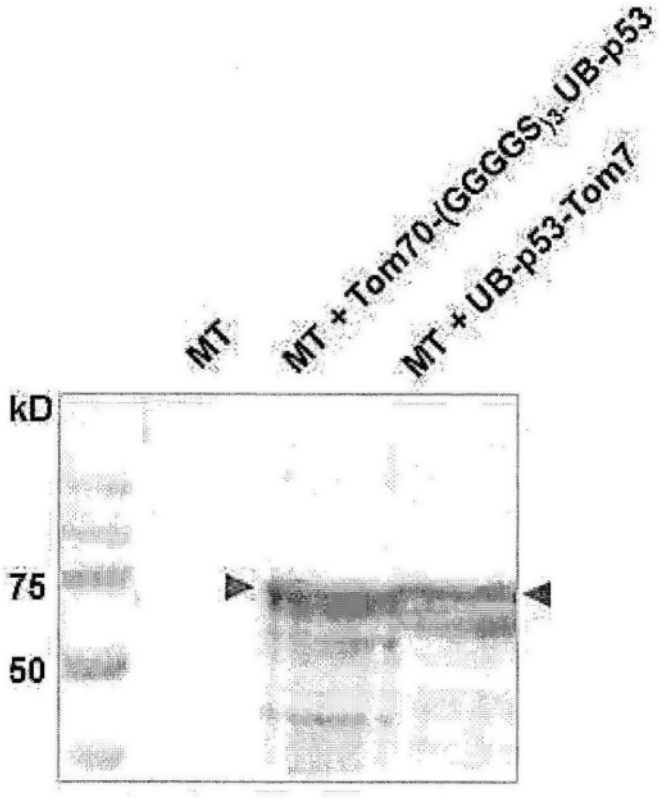

MT
MT + Tom70-(GGGGS)3-UB-p53
MT + UB-p53-Tom7
kD
75
50

图56

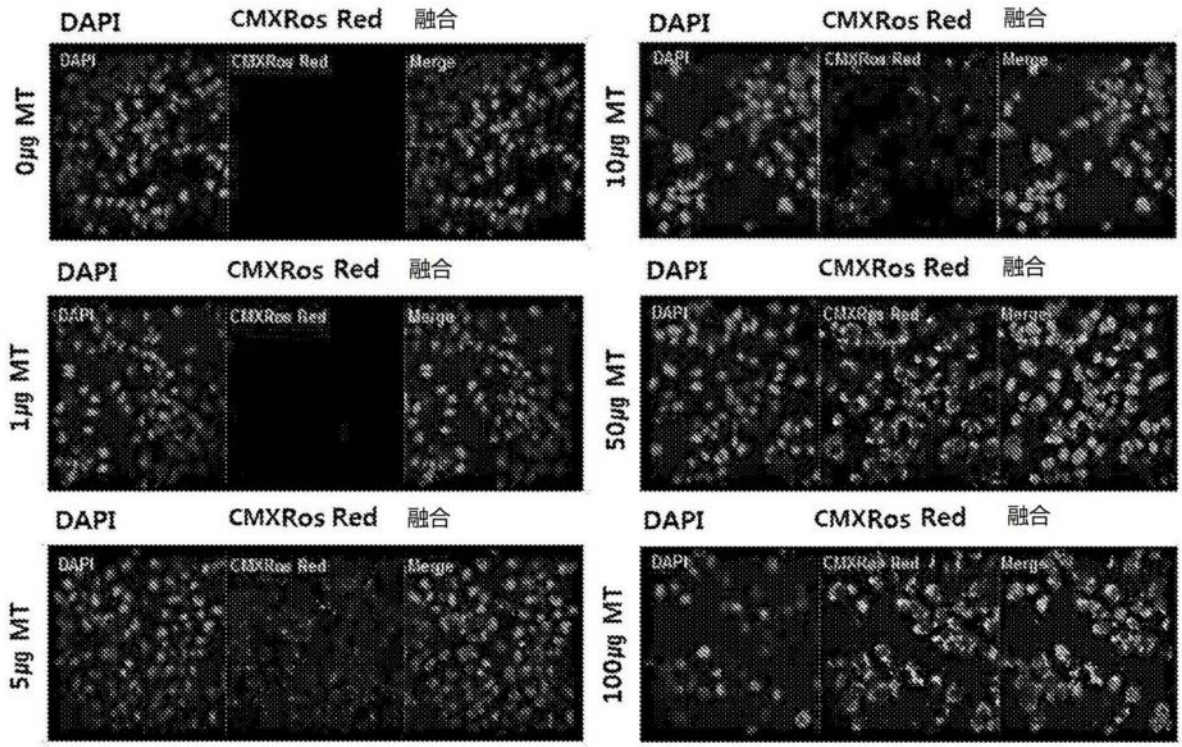

DAPI
CMXRos Red
融合
0μg MT
10μg MT
1μg MT
50μg MT
5μg MT
100μg MT

图57

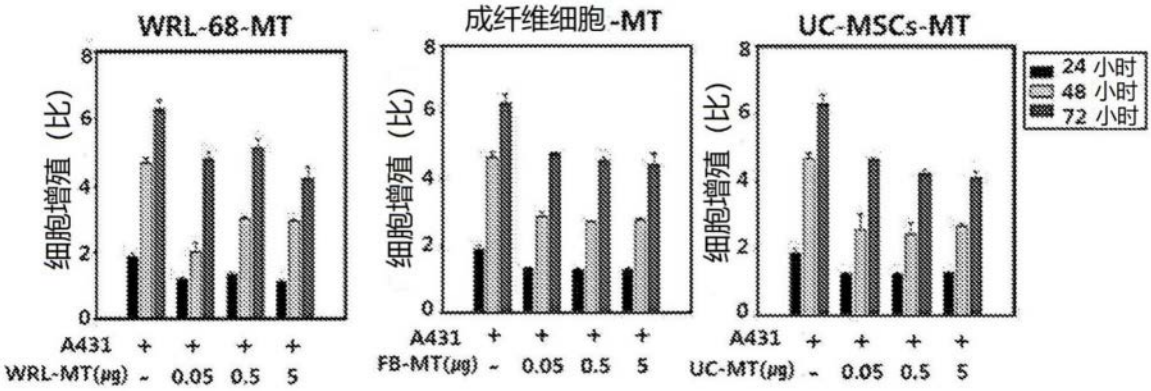

WRL-68-MT
成纤维细胞-MT
UC-MSCs-MT
细胞增殖（比）
24 小时
48 小时
72 小时
A431
WRL-MT(μg)
FB-MT(μg)
UC-MT(μg)
0
0.05
0.5
5

图58

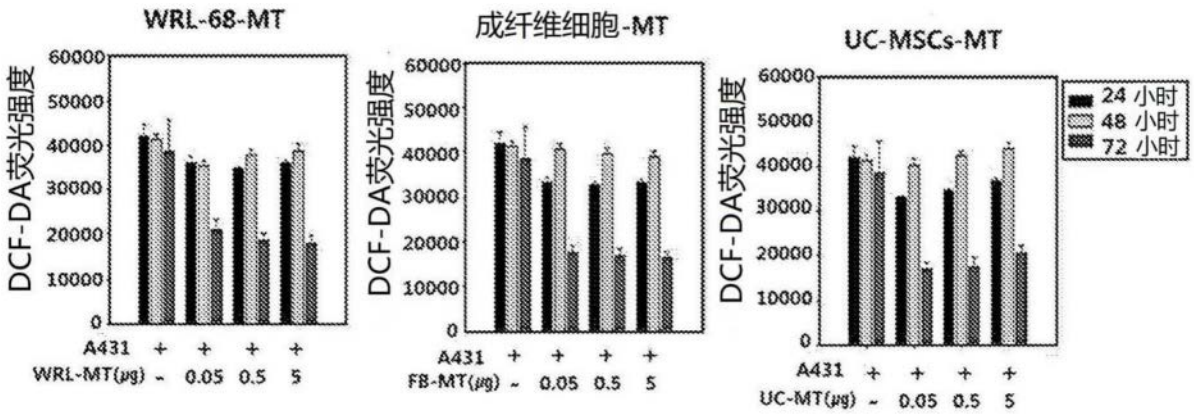

WRL-68-MT
成纤维细胞-MT
UC-MSCs-MT
DCF-DA荧光强度
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
24 小时
48 小时
72 小时
A431 + + + +
WRL-MT(μg) - 0.05 0.5 5
FB-MT(μg) - 0.05 0.5 5
UC-MT(μg) - 0.05 0.5 5

图59

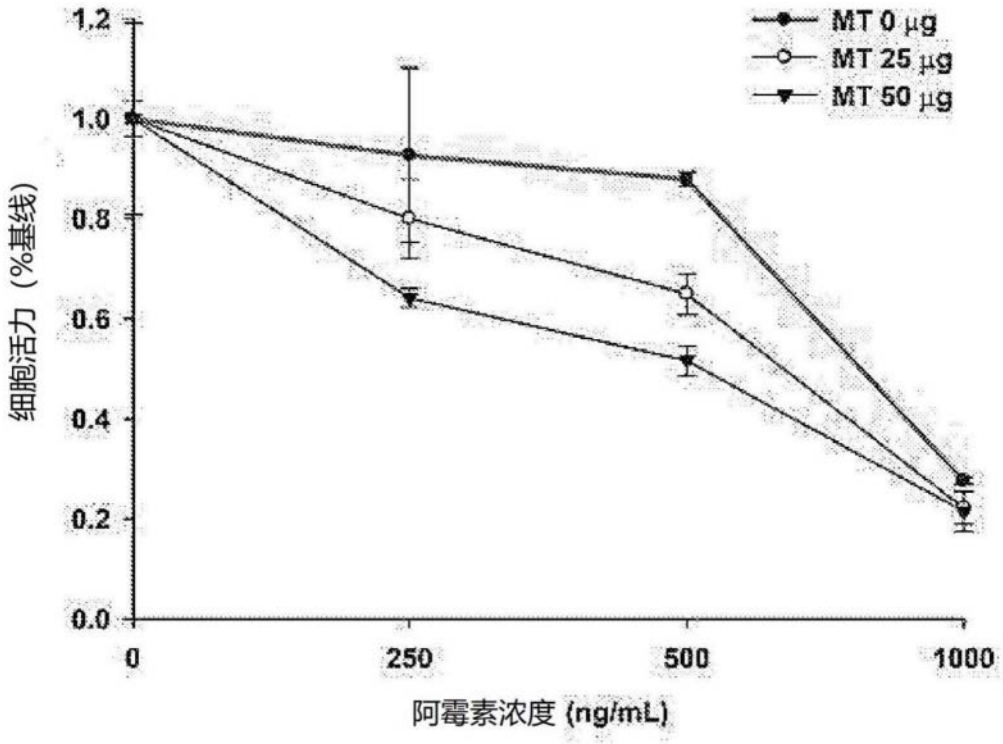

MT 0 μg
MT 25 μg
MT 50 μg
细胞活力（%基线）
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
250
500
1000
阿霉素浓度 (ng/mL)

图60

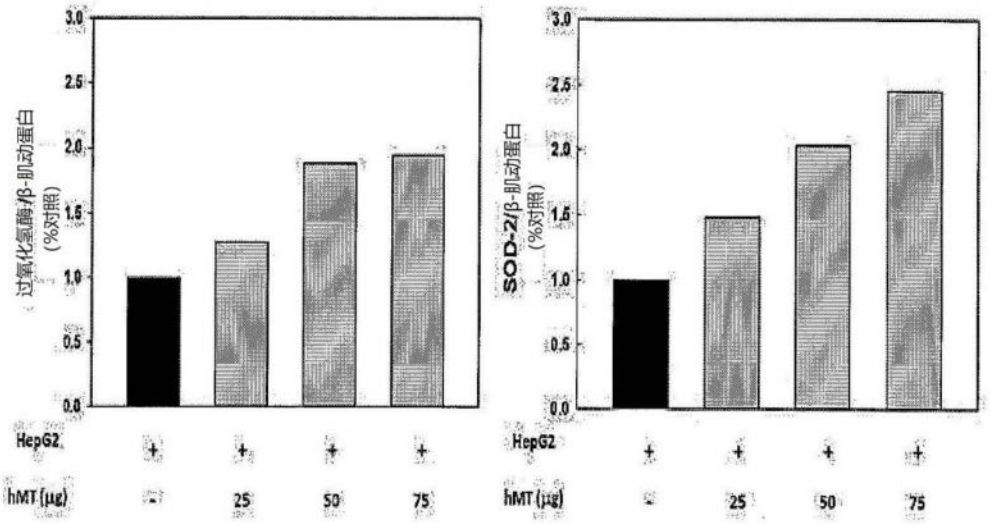

过氧化氢酶/β-肌动蛋白
(%对照)
SOD-2/β-肌动蛋白
(%对照)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
HepG2
hMT (μg)
-
25
50
75

图61

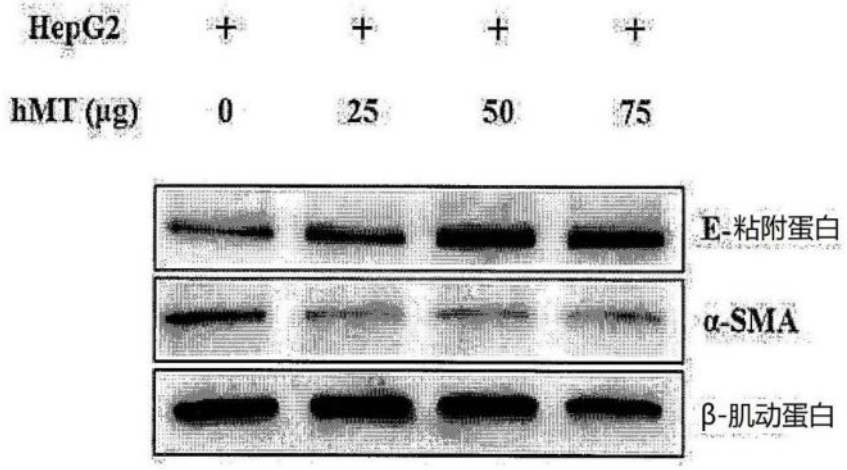

HepG2 + + + +
hMT (μg) 0 25 50 75
E-粘附蛋白
α-SMA
β-肌动蛋白

图62

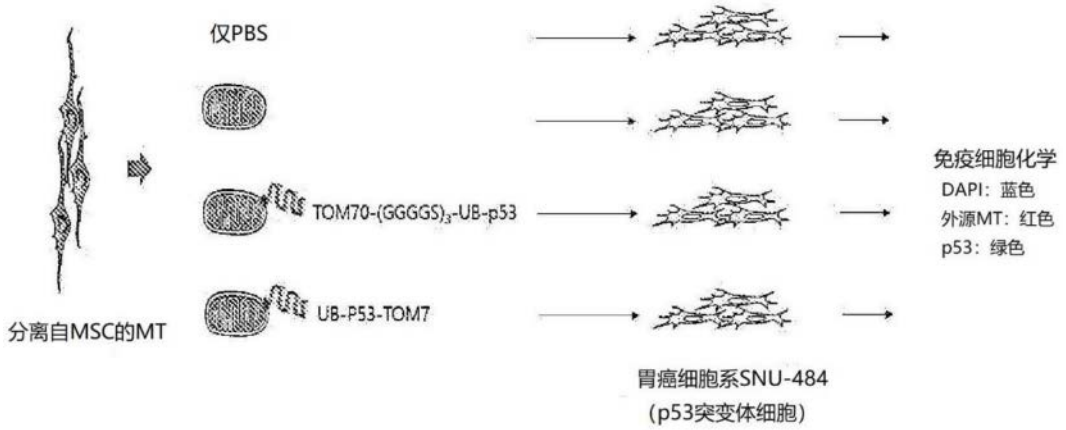

仅PBS
TOM70-(GGGGS)3-UB-p53
UB-P53-TOM7
分离自MSC的MT
免疫细胞化学
DAPI：蓝色
外源MT：红色
p53：绿色
胃癌细胞系SNU-484
(p53突变体细胞)

图63

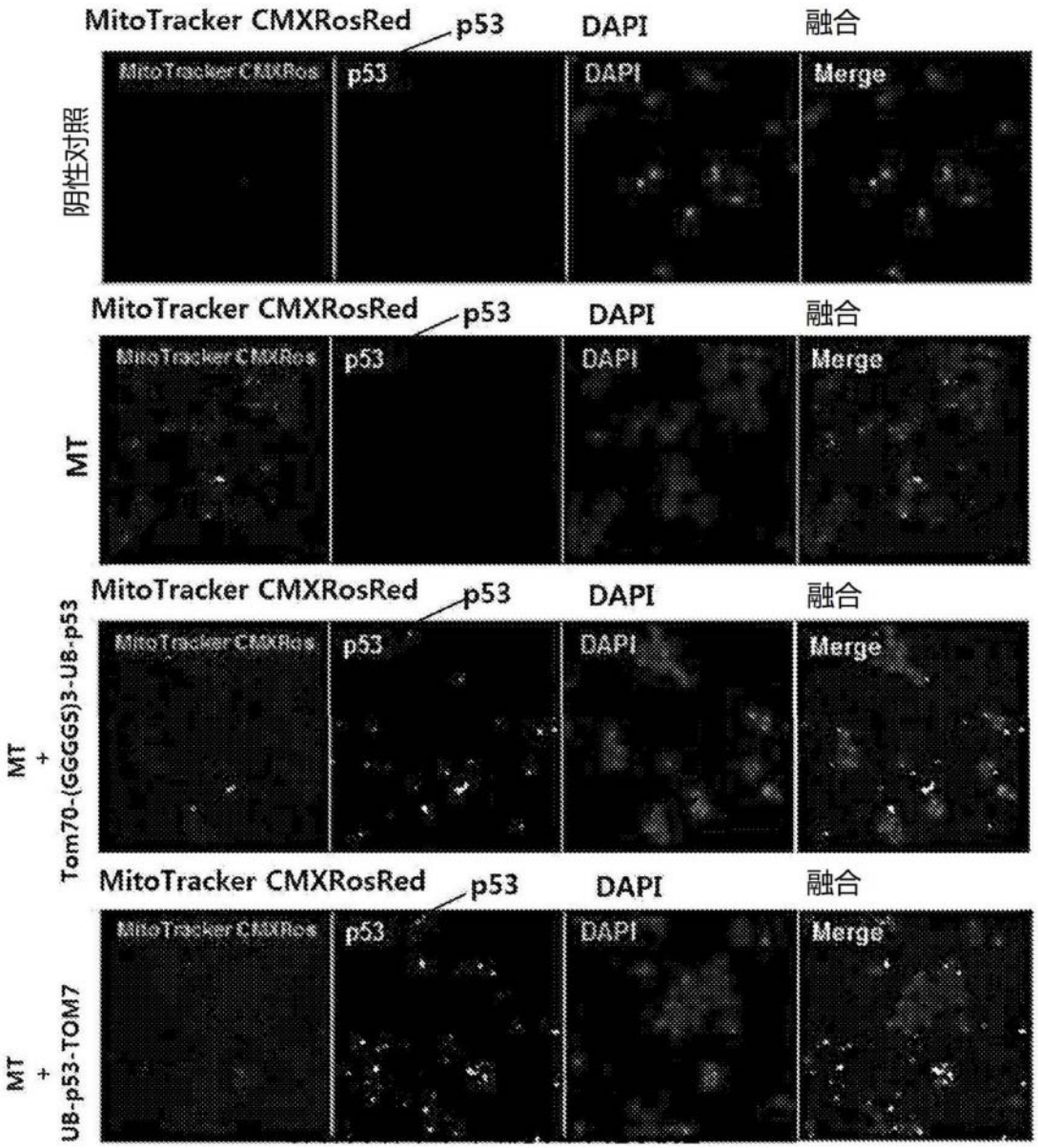

MitoTracker CMXRosRed
p53
DAPI
融合
阴性对照
MT
MT + Tom70-(GGGGS)3-UB-p53
MT + UB-p53-TOM7
Merge

图64

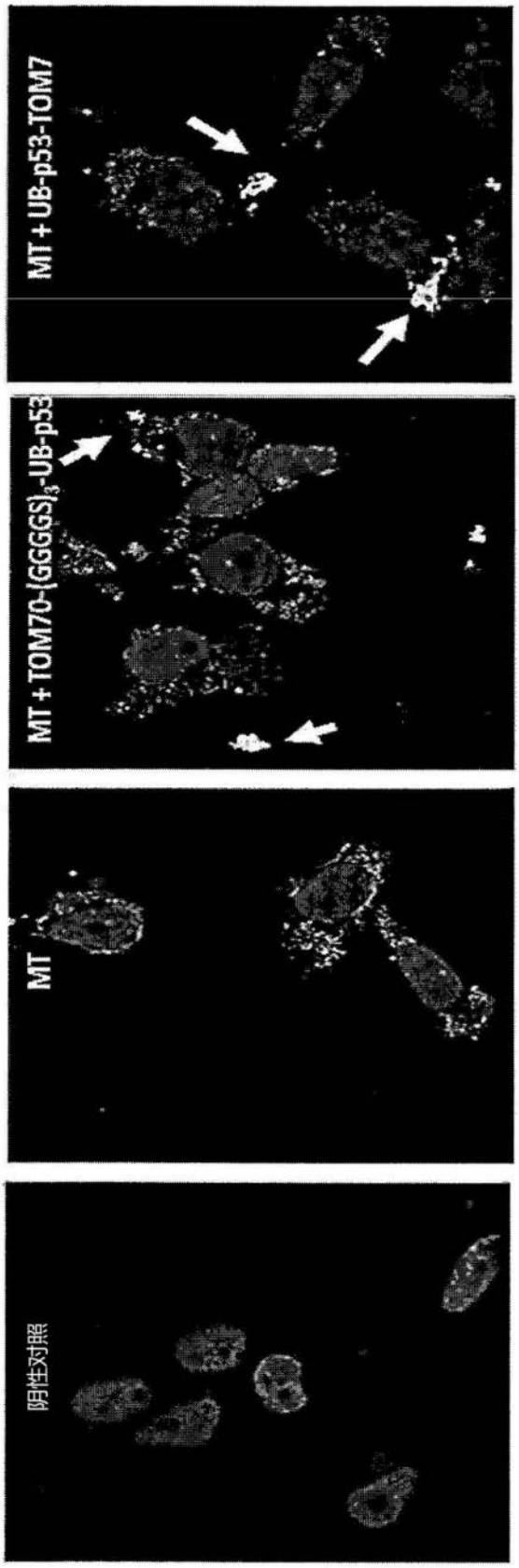


图65

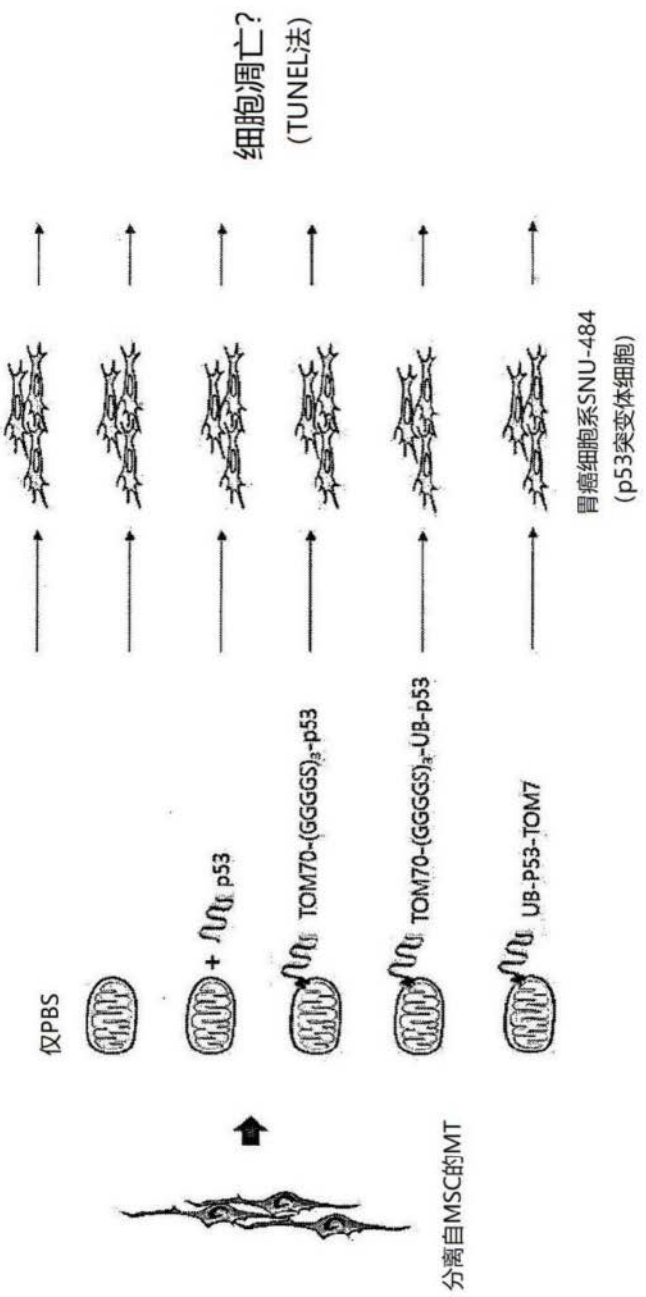

细胞凋亡?
(TUNEL法)
仅PBS
+ p53
TOM70-(GGGGS)3-p53
TOM70-(GGGGS)4-UB-p53
UB-P53-TOM7
分离自MSC的MT
胃癌细胞系SNU-484
(p53突变体细胞)

图66

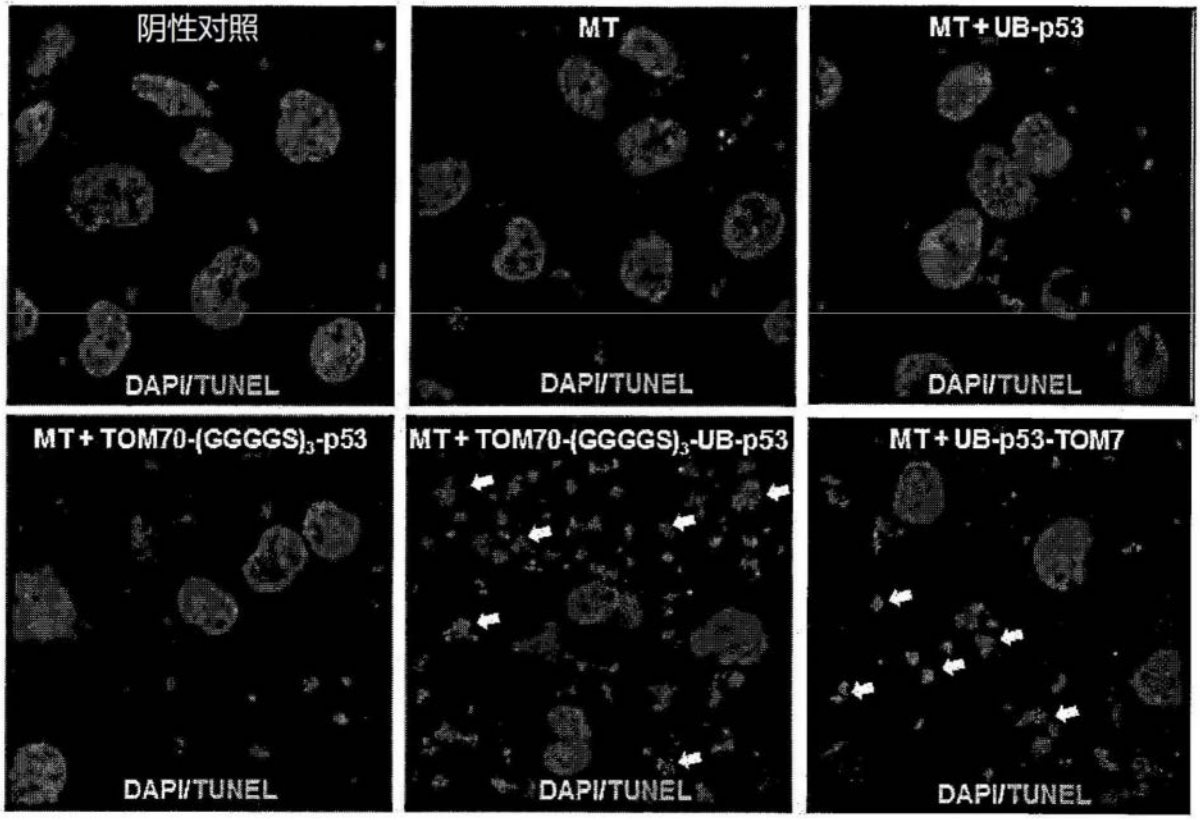

阴性对照
DAPI/TUNEL
MT
DAPI/TUNEL
MT+UB-p53
DAPI/TUNEL
MT+TOM70-(GGGGS)3-p53
DAPI/TUNEL
MT+TOM70-(GGGGS)3-UB-p53
DAPI/TUNEL
MT+UB-p53-TOM7
DAPI/TUNEL

图67a

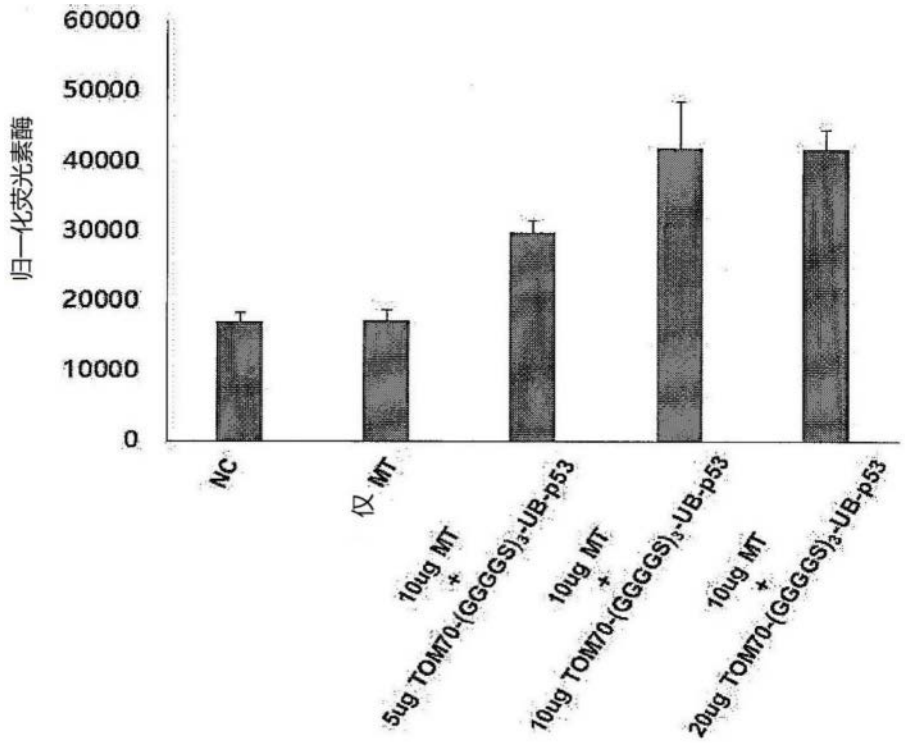

归一化荧光素酶
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
NC
仅 MT
10ug MT + 5ug TOM70-(GGGGS)3-UB-p53
10ug MT + 10ug TOM70-(GGGGS)3-UB-p53
10ug MT + 20ug TOM70-(GGGGS)3-UB-p53

图67b

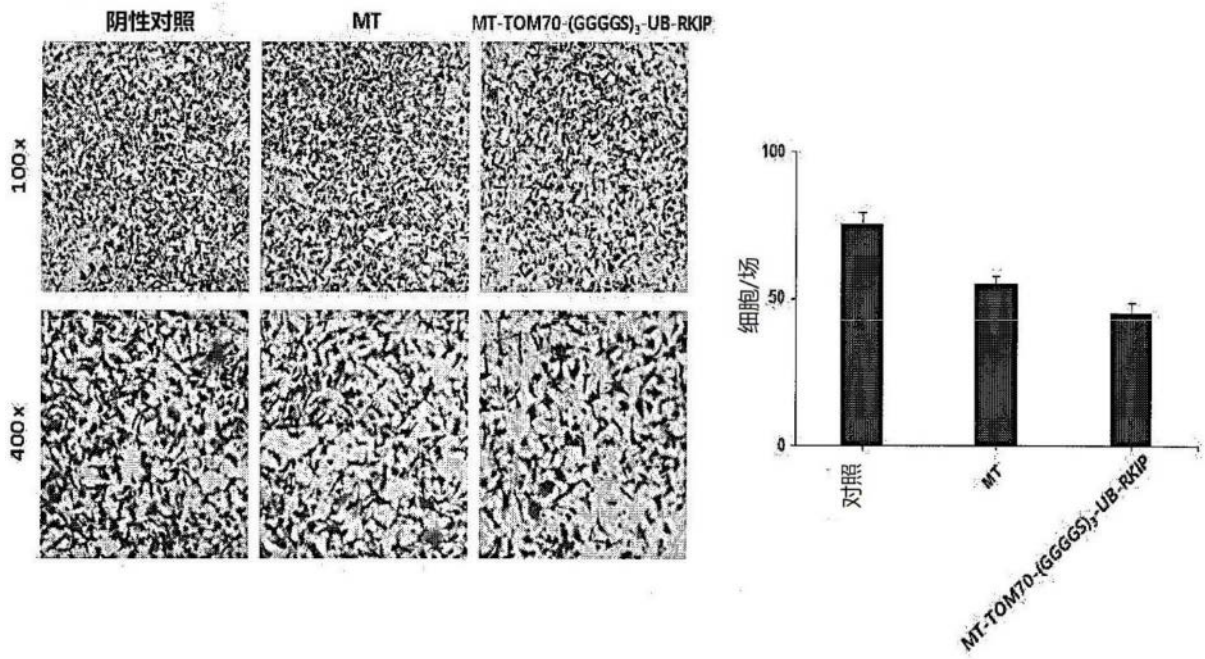

阴性对照
MT
MT-TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP
100×
400×
细胞/场
100
50
0
对照
MT
MT-TOM70-(GGGGS)3-UB-RKIP

图68

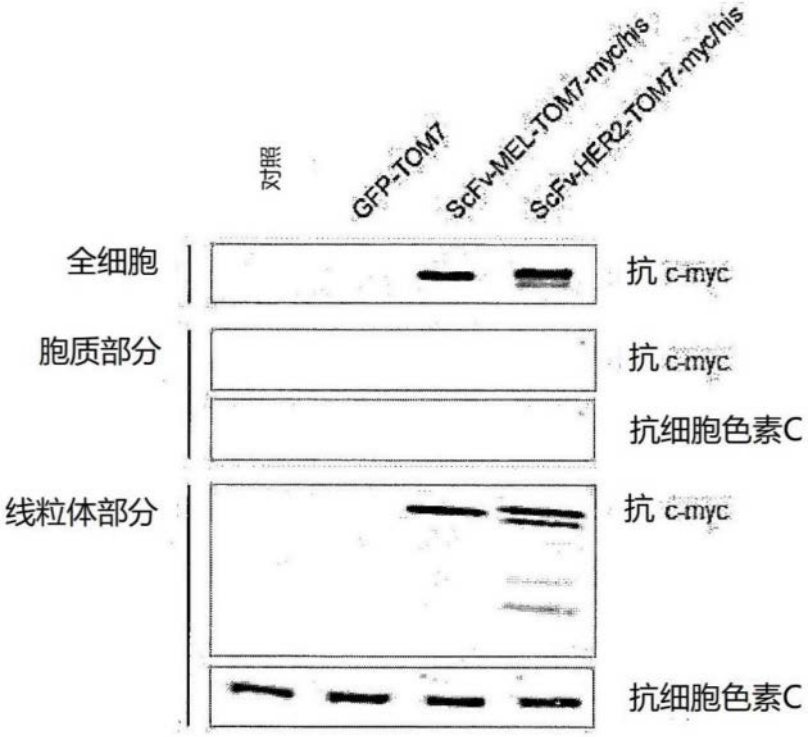

对照
GFP-TOM7
ScFv-MEL-TOM7-myc/his
ScFv-HER2-TOM7-myc/his
全细胞
抗 c-myc
胞质部分
抗 c-myc
抗细胞色素C
线粒体部分
抗 c-myc
抗细胞色素C

图69

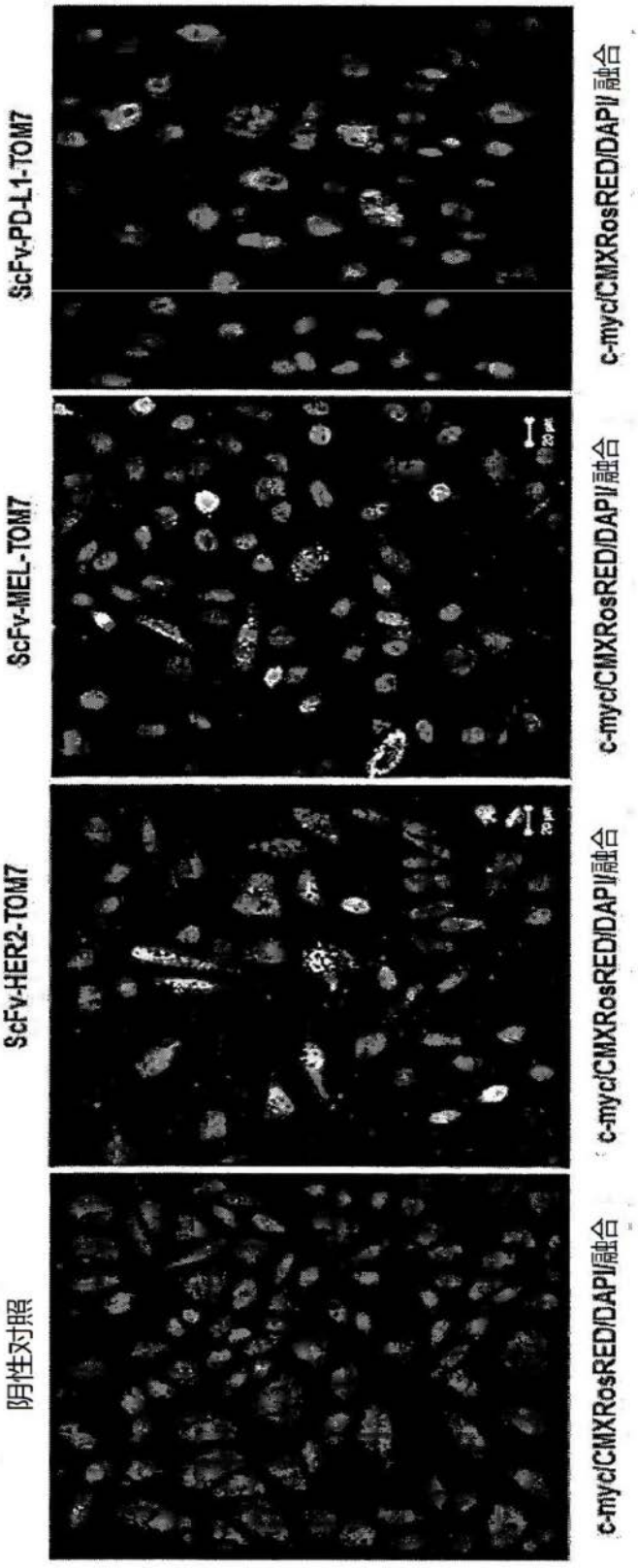

阴性对照
ScFv-HER2-TOM7
ScFv-MEL-TOM7
ScFv-PD-L1-TOM7
c-myc/CMXRosRED/DAPI/融合
c-myc/CMXRosRED/DAPI/融合
c-myc/CMXRosRED/DAPI/融合
c-myc/CMXRosRED/DAPI/融合

图70

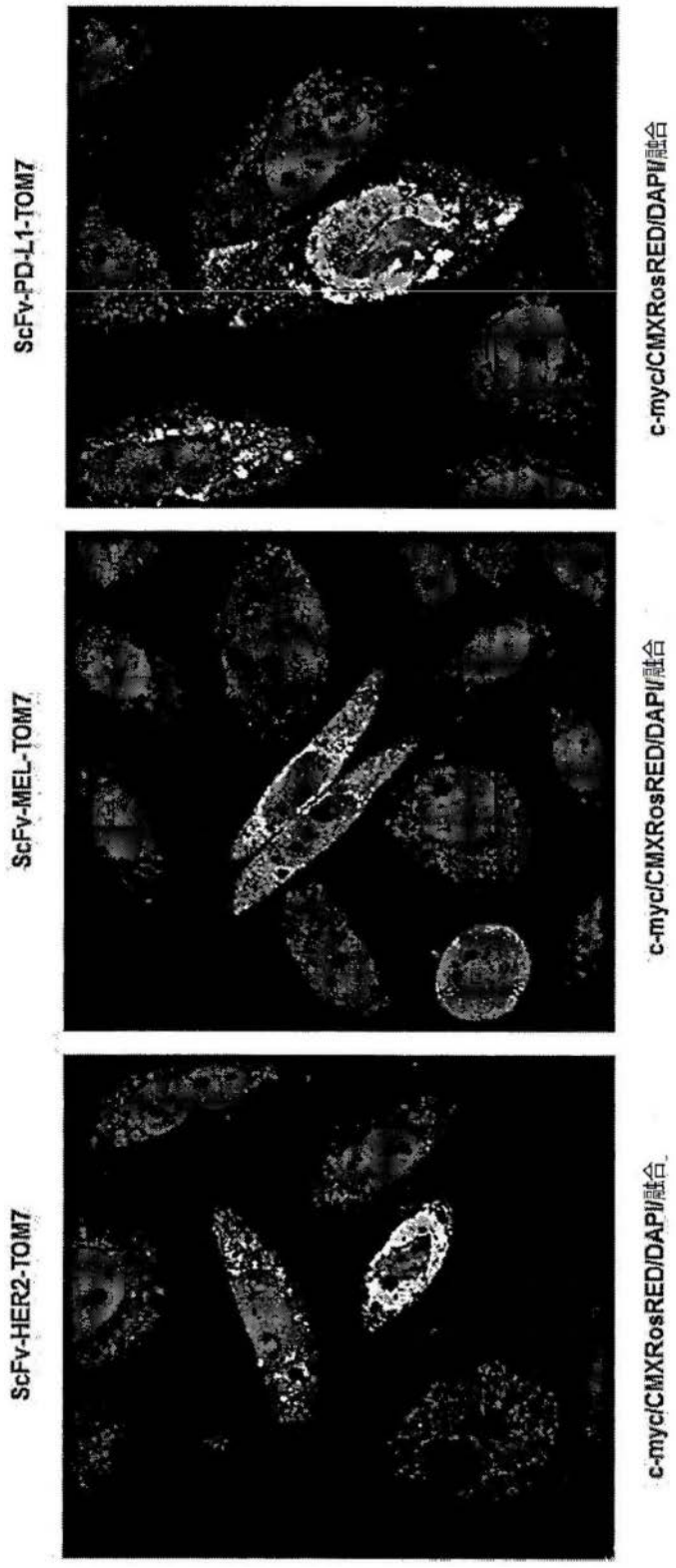

ScFv-PD-L1-TOM7
c-myc/CMXRosRED/DAPI/融合
ScFv-MEL-TOM7
c-myc/CMXRosRED/DAPI/融合
ScFv-HER2-TOM7
c-myc/CMXRosRED/DAPI/融合

图71

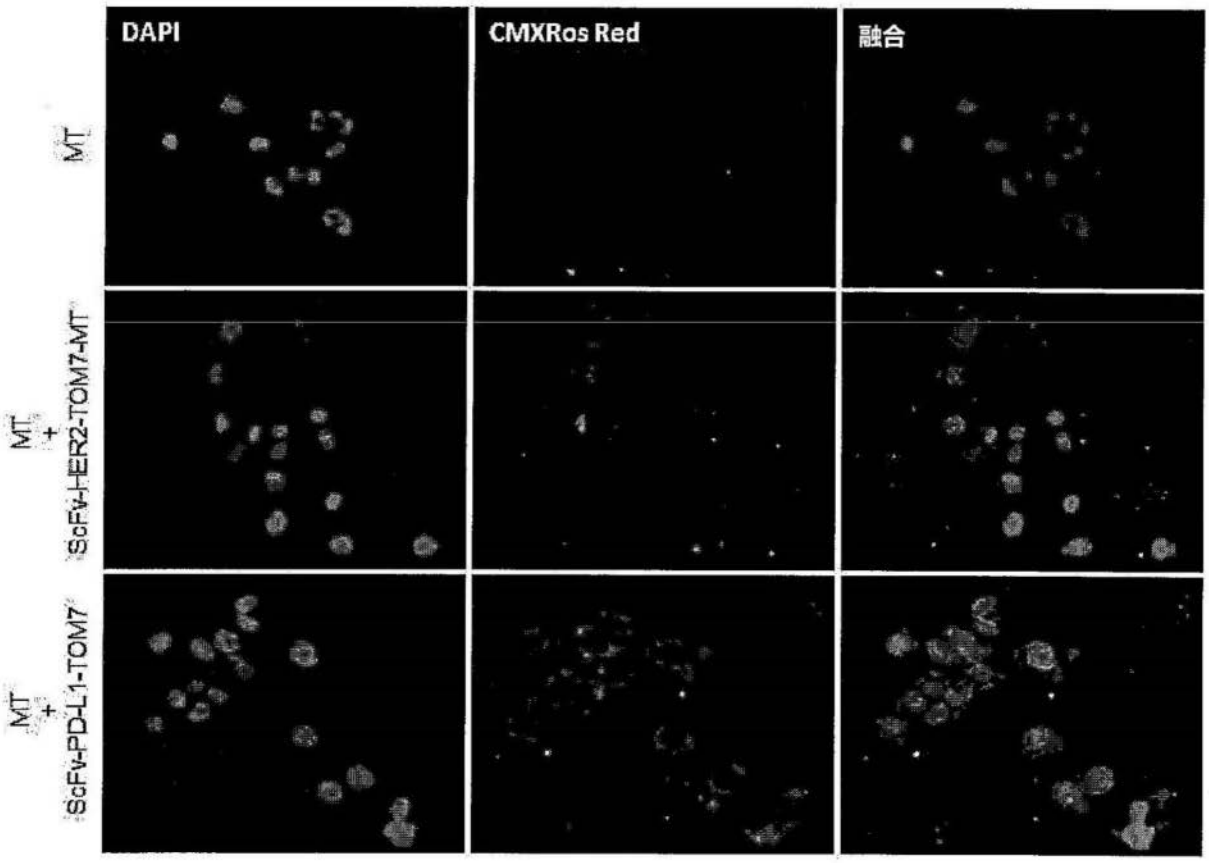

DAPI
CMXRos Red
融合
MT
MT + ScFv-HER2-TOM7-MT
MT + ScFv-PD-L1-TOM7

图72

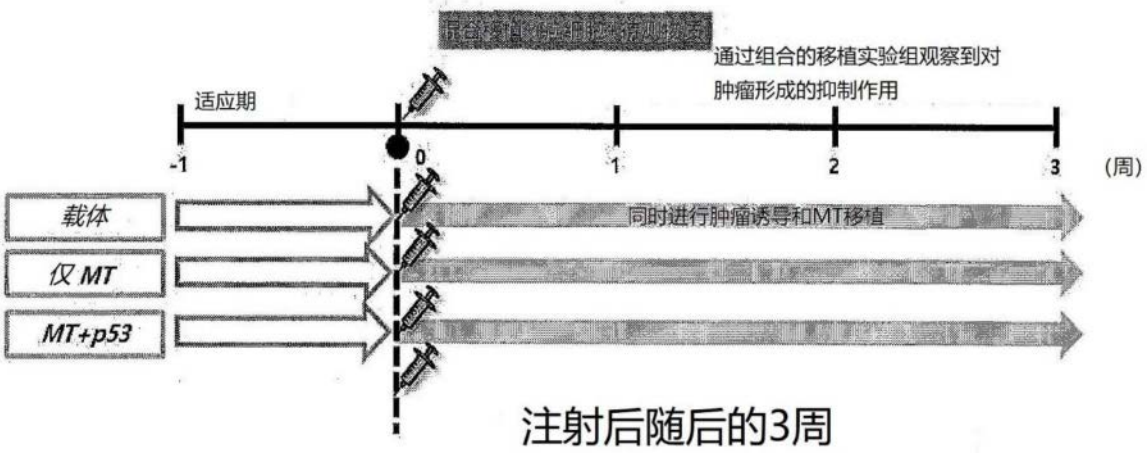

通过组合的移植实验组观察到对
肿瘤形成的抑制作用
适应期
-1
0
1
2
3
(周)
载体
仅 MT
MT+p53
同时进行肿瘤诱导和MT移植
注射后随后的3周

图73



图74

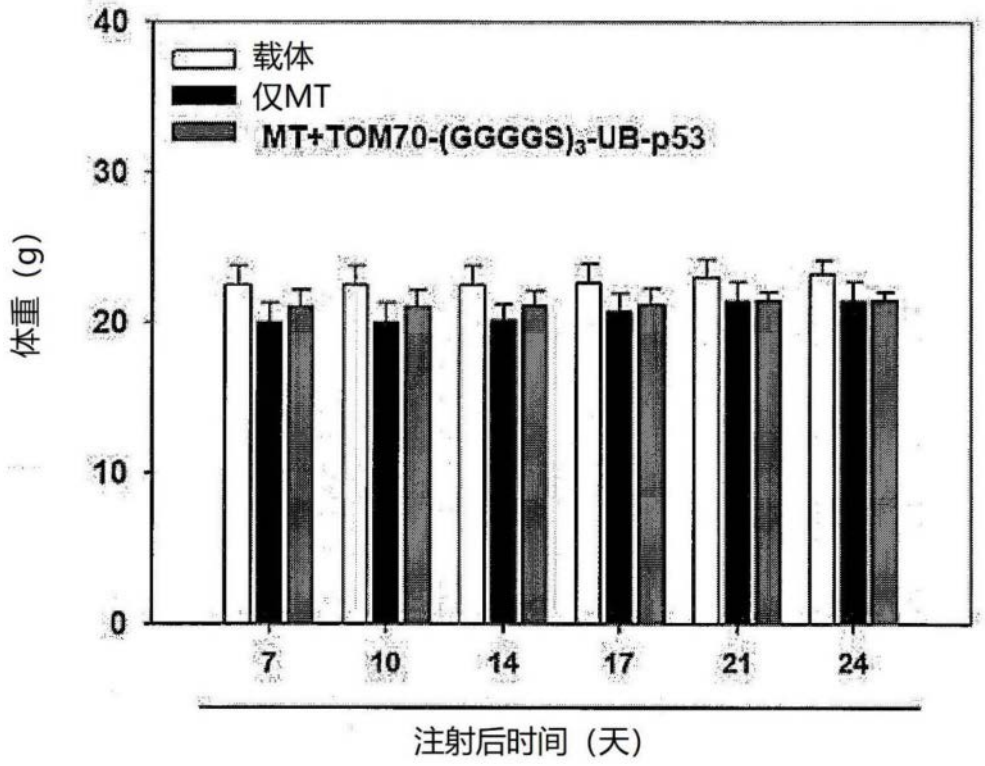

40
30
20
10
0
载体
仅MT
MT+TOM70-(GGGGS)3-UB-p53
体重（g）
7
10
14
17
21
24
注射后时间（天）

图75

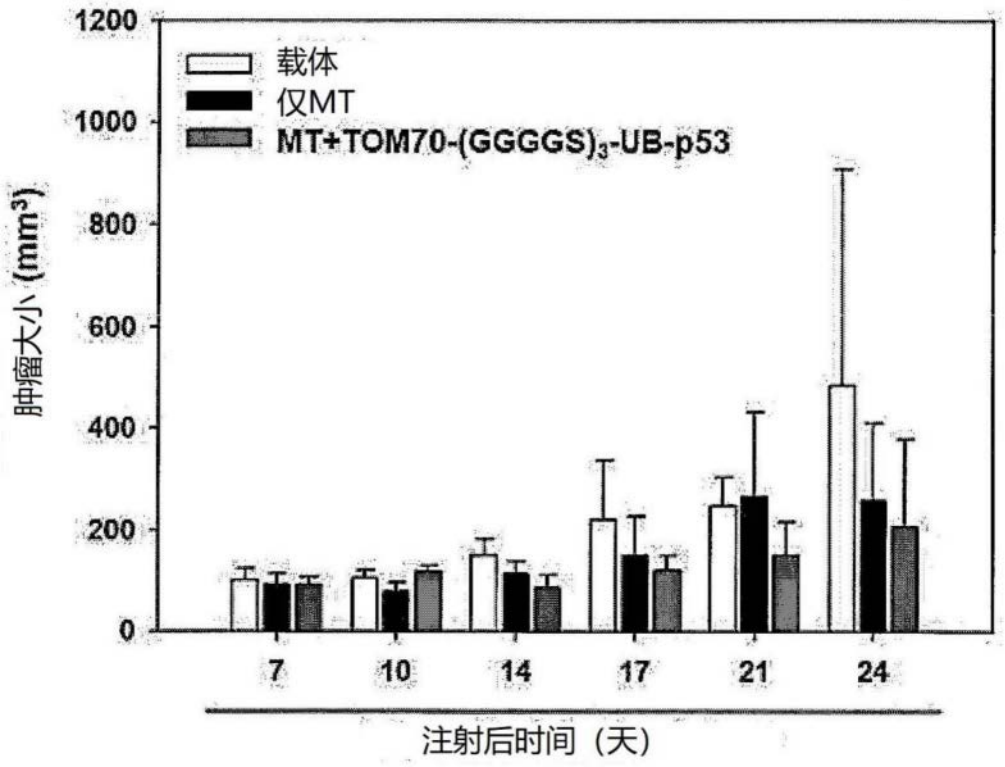

1200
1000
800
600
400
200
0
肿瘤大小 (mm³)
载体
仅MT
MT+TOM70-(GGGGS)3-UB-p53
7
10
14
17
21
24
注射后时间（天）

图76

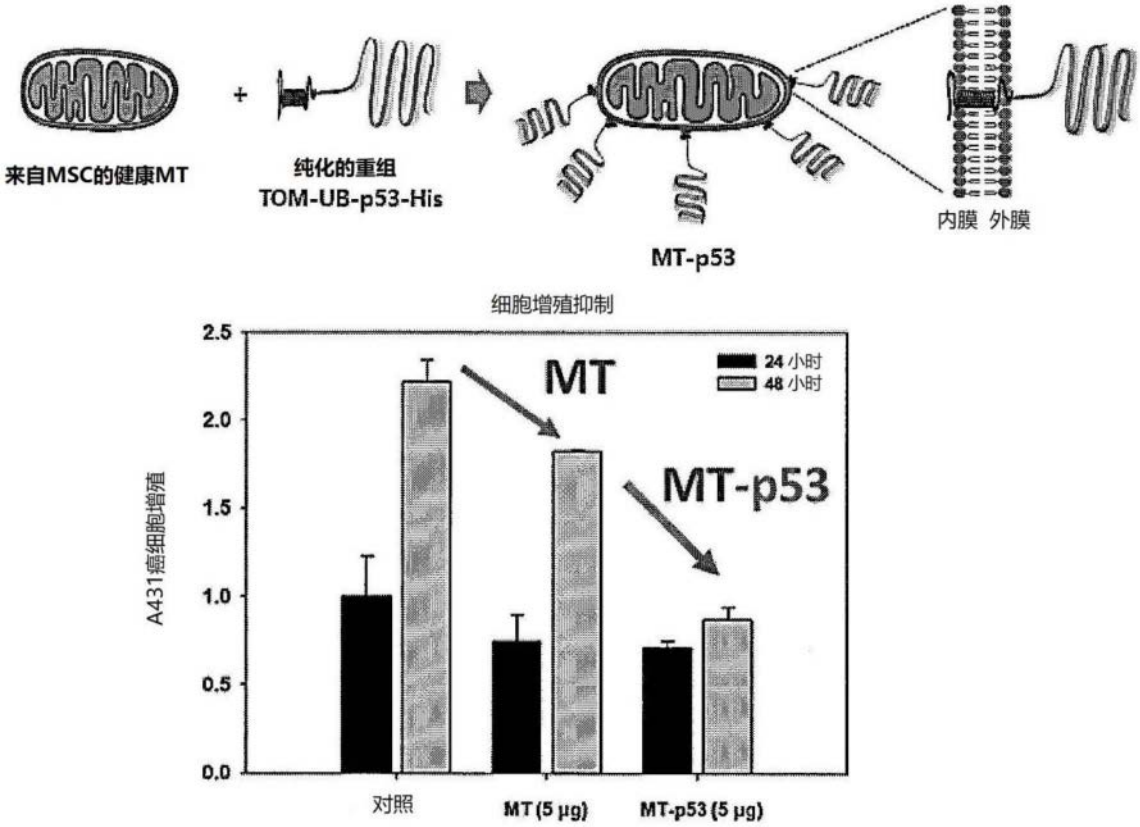

来自MSC的健康MT
+
纯化的重组
TOM-UB-p53-His
内膜 外膜
MT-p53
细胞增殖抑制
A431癌细胞增殖
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
MT
MT-p53
24 小时
48 小时
对照
MT (5 μg)
MT-p53 (5 μg)

图77

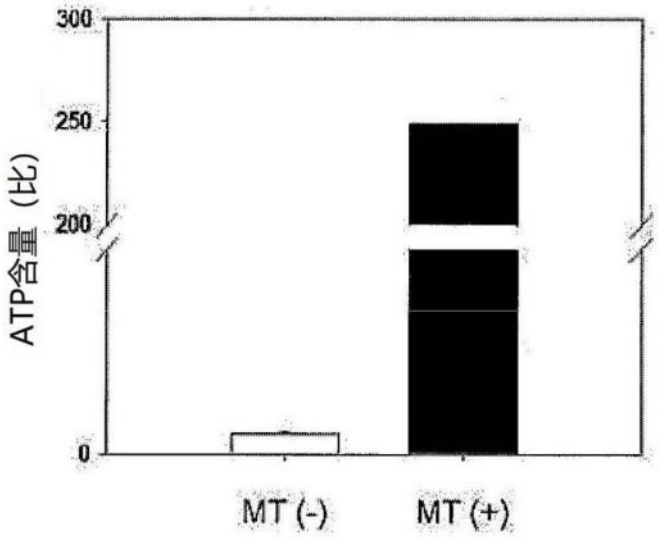

ATP含量 (比)
300
250
200
0
MT (-)
MT (+)

图78

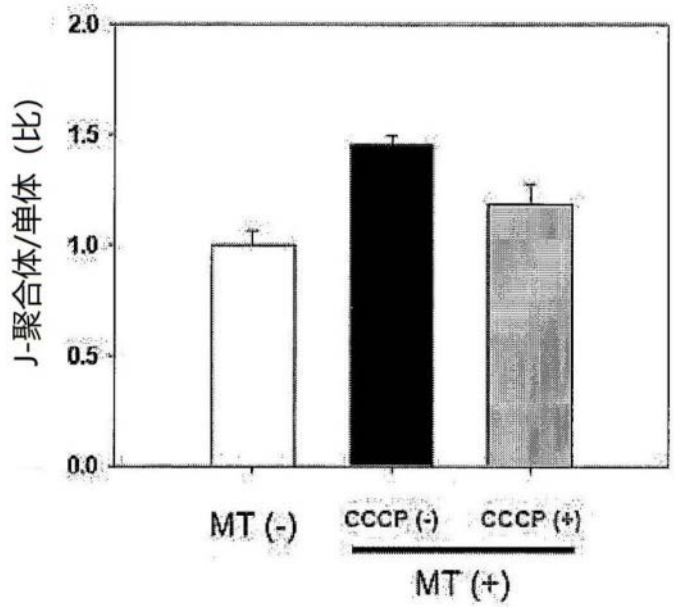

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
J-聚合体/单体（比）
MT (-)
CCCP (-)
CCCP (+)
MT (+)

图79

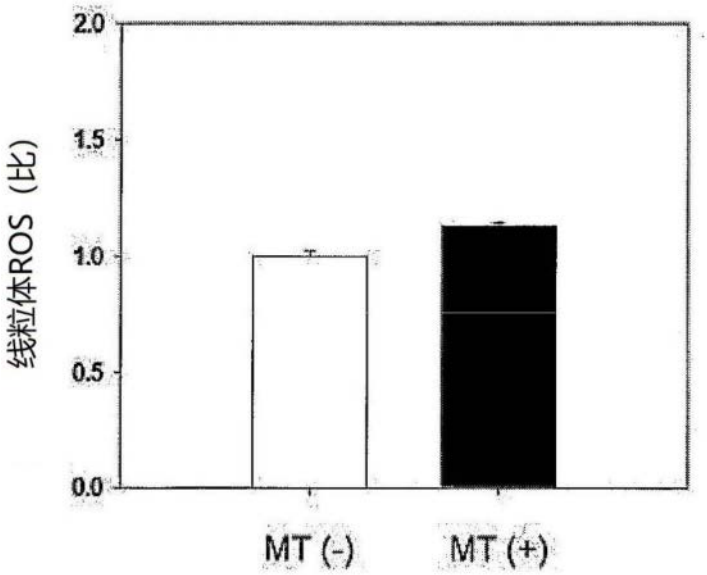

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
线粒体ROS（比）
MT (-)
MT (+)

图80



图81a

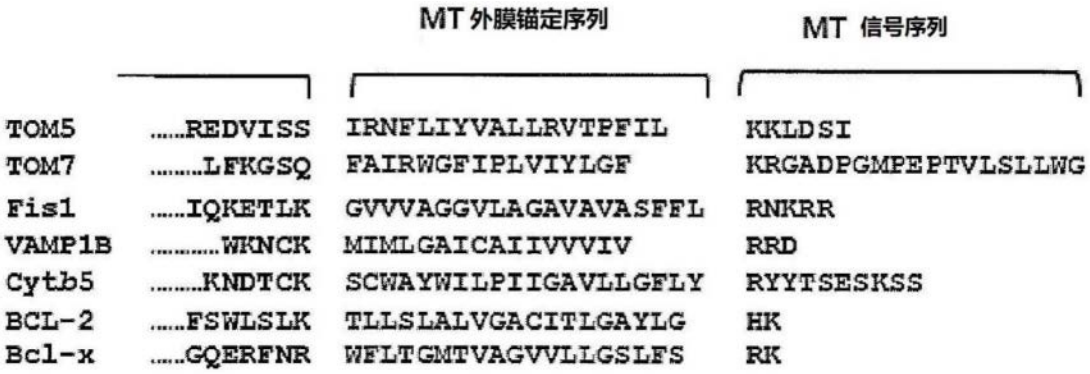


图81b

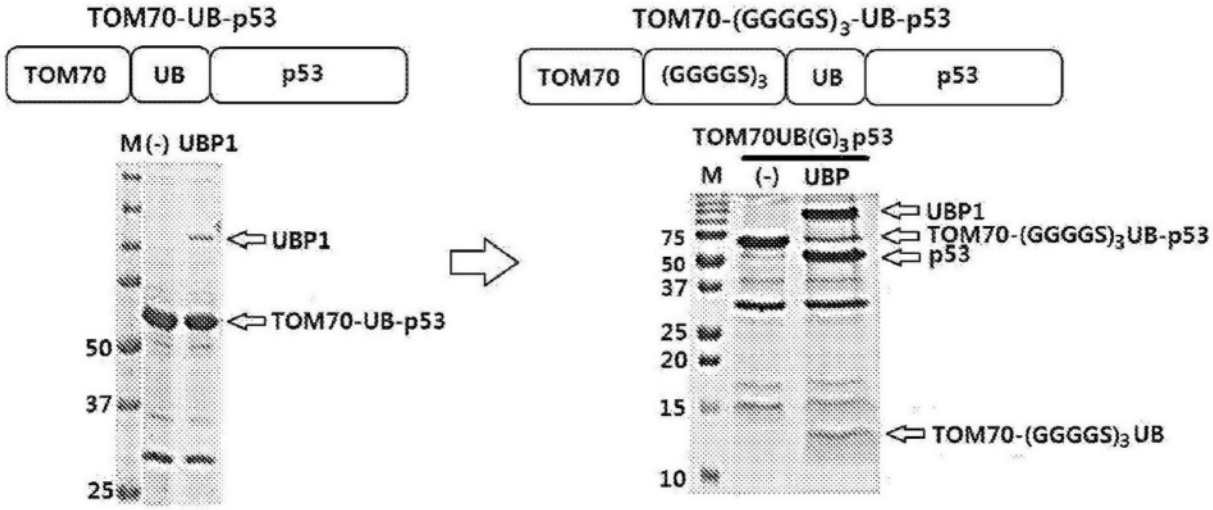


图82

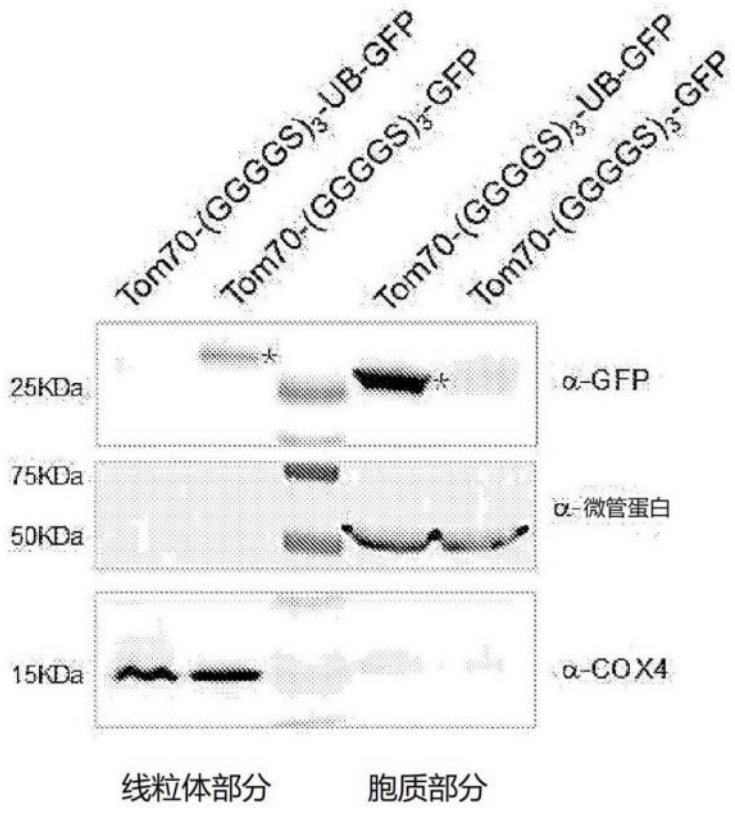

Tom70-(GGGGS)3-UB-GFP
Tom70-(GGGGS)3-GFP
Tom70-(GGGGS)3-UB-GFP
Tom70-(GGGGS)3-GFP
25KDa
α-GFP
75KDa
50KDa
α-微管蛋白
15KDa
α-COX4
线粒体部分
胞质部分

图83