



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110885789 A

(43)申请公布日 2020.03.17

(21)申请号 201811034756.2

(22)申请日 2018.09.05

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 张先恩 王殿冰 黄琳

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 张莹

(51)Int.Cl.

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

A61K 47/42(2017.01)

A61K 31/7105(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

高效可控包装内源核酸的工程化外泌体制
备及其应用

(57)摘要

本发明涉及高效可控包装内源核酸的工程化外泌体制备及其应用。本发明公开了工程化外泌体,所述工程化外泌体包含:1)核酸分子,所述核酸分子编码与核酸药物连接的结合蛋白的核酸序列,2)与膜定位信号肽融合的CIBN融合蛋白,3)与所述核酸序列结合的蛋白融合的CRY2融合蛋白。本发明还提供包含所述外泌体的核酸药物递送系统或试剂盒,制备所述外泌体和核酸药物递送系统或试剂盒的方法,以及所述工程化外泌体或所述核酸药物递送系统递送核酸药物的用途。本发明的外泌体具有内源性、稳定性、生物相容性、纳米尺寸、跨越血脑屏障的能力以及成分的可设计性等优点。

1. 一种工程化外泌体,所述工程化外泌体包含:

- 1) 核酸分子,所述核酸分子编码与核酸药物连接的结合蛋白的核酸序列,
- 2) 与膜定位信号肽融合的CIBN融合蛋白,
- 3) 与所述核酸序列结合的蛋白融合的CRY2融合蛋白。

2. 权利要求1的工程化外泌体,其中所述核酸药物包括DNA和RNA药物,例如所述核酸药物包括结合内源RNA的RNA结合分子,例如所述内源RNA包括内源miRNA,例如所述核酸药物可以是结合内源miRNA的miRNA海绵。

3. 权利要求1或2的工程化外泌体,其中所述膜定位信号肽包括CAAX, PB, CD63, CD81, CD9, lamp2b以及Paln。

4. 权利要求1-3任一项的工程化外泌体,其中所述核酸序列为核酸适配体,包括DNA适配体和RNA适配体。

5. 权利要求1-4任一项的工程化外泌体,其中所述工程化外泌体进一步包含靶向疾病细胞如肿瘤细胞的修饰,所述修饰包括靶向疾病细胞如肿瘤细胞的肽或核酸适配体,例如靶向疾病细胞如肿瘤细胞上特异性表达的蛋白的肽或核酸适配体,例如靶向疾病细胞如肿瘤细胞上过表达的蛋白的肽或核酸适配体。

6. 一种核酸药物递送系统或试剂盒,其包含权利要求1-6任一项所述的工程化外泌体。

7. 制备权利要求1-5任一项的工程化外泌体或权利要求6的核酸药物递送系统或试剂盒的方法,所述方法包括:

1) 构建用于转染细胞的载体,所述载体编码i) 与膜定位信号肽融合的CIBN融合蛋白,和ii) 与噬菌体蛋白MCP融合的CRY2融合蛋白,和iii) 与核酸药物连接的结合所述噬菌体蛋白MCP的核酸适配体,

2) 用构建的载体构建稳转细胞系,和

3) 从稳转细胞系中收集获得所述工程化外泌体。

8. 权利要求7的方法,其中所述载体是病毒载体,例如逆转录病毒载体,例如慢病毒载体。

9. 权利要求7或8的方法,其中所述方法包括用靶向疾病如肿瘤细胞的核酸适配体修饰工程化外泌体的步骤。

10. 权利要求1-5任一项的工程化外泌体或权利要求6的核酸药物递送系统在制备用于递送核酸药物到疾病如肿瘤患者中的药物递送系统或试剂盒中的用途。

高效可控包装内源核酸的工程化外泌体制备及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于药物递送领域,具体涉及一种靶向运送核酸药物如RNA药物的工程化外泌体的制备及应用。

背景技术

[0002] 以核酸为基础的肿瘤治疗方法已发展到了临床试验阶段,主要包括siRNA、反义寡核苷酸(ASO)、RNA aptamer、合成mRNA和miRNA治疗等。其中,以miRNA为基础的治疗也是一种具有潜力的癌症治疗方法。其主要通过模拟或抑制靶miRNA的功能。到目前为止,一些miRNA靶向治疗也已经达到临床试验阶段,如肿瘤抑制因子miR-34模拟物(NCT01829971)和miR-16模拟物(NCT02369198)。此外,抗miRNA的寡核苷酸(AMOs)、miRNA海绵(miRNA sponge)等多种基于miRNA的疗法也广泛被研究。近年来,miRNA海绵作为一种miRNA抑制剂也表现出巨大的潜力。miRNA海绵具有重复的miRNA反义序列,可以同时靶向多个miRNA,并可以持续抑制miRNA的功能。尽管基于miRNA的治疗方法已经取得了许多成果,但它们在体内的递送仍然是一个挑战。目前,主要的递送系统由病毒递送和非病毒递送组成。病毒载体可以以高的递送效率装载内源性RNA,但安全问题需要进一步研究。非病毒递送包括基于脂质的递送、基于聚合物的递送和基于纳米颗粒的递送。它们具有低免疫毒性和良好的生物相容性,但不能负载内源性RNA,且缺乏货物保护,以及低效率的内体逃逸。因此,仍有必要开发一种新的递送系统,可以有效地装载长RNA并将其递送到靶向细胞中进行治疗。

[0003] 外泌体是细胞来源的膜结合的细胞外泡,大小为30-150nm,在多泡体(MVBs)中产生,并通过MVBs与细胞膜的融合分泌到胞外液中。含有母细胞来源的蛋白质、脂类和核酸的外泌体对细胞间交流起着重要作用。大量的研究表明,功能活跃的生物分子可以通过外泌体在细胞之间交换,并在受体细胞中发挥作用。这种独特的特性使得外泌体作为天然药物递送系统受到了广泛的关注。迄今为止,外泌体已被成功地用于在体内和体外传递小分子、短RNA和蛋白质。与合成材料相比,外泌体递送系统具有多种优势,如它们具有内源性、稳定性、生物相容性、纳米尺寸、跨越血脑屏障的能力以及成分的可设计性等。然而,如何提高外泌体的有效装载及运送药物到靶点的能力仍然缺乏,目前主要使用的电穿孔和转染试剂也都存在一些问题,包括装载效率低(大分子)以及影响药物活性等。为了克服这些挑战,需要一种新的设计策略来提高药物的递送效率。

发明内容

[0004] 在一些实施方案中,本发明提供工程化外泌体,所述工程化外泌体包含:1)核酸分子,所述核酸分子编码与核酸药物连接的结合蛋白的核酸序列,2)与膜定位信号肽融合的CIBN融合蛋白,3)与所述核酸序列结合的蛋白融合的CRY2融合蛋白。在一些实施方案中,膜定位信号肽可以将与其融合的蛋白如CIBN定位到细胞膜上。在一些实施方案中,膜定位信号肽可以进一步将与融合蛋白结合的其他组分如其它融合蛋白定位到细胞膜。在一些实施方案中,本发明中使用的膜定位信号肽没有特别限制,只要其能够将其连接的多肽或蛋

白定位到细胞膜并分选到外泌体中即可。在此意义上,膜定位信号肽的长度没有特别限制,其可以包括例如约5-9个氨基酸残基(肽)、10-100个氨基酸残基(多肽)或大于100个氨基酸残基(蛋白质),这样的膜定位信号肽是本领域广泛已知的。例如,在一些实施方案中,本发明的膜定位信号肽可以是CAAX,PB,CD63,CD81,CD9,lamp2b以及Palm等。在一些实施方案中,本发明的膜定位信号肽是Palm。

[0005] 在本文中,除非另有说明或上下文限制,所使用的术语肽、多肽、蛋白没有特别限制,可以在适当的情况下相互替换,例如仅提及肽、多肽或蛋白中的任何一种可以包括例如约5-9个氨基酸残基(肽)、10-100个氨基酸残基(多肽)或大于100个氨基酸残基(蛋白质)。

[0006] 在一些实施方案中,本发明的核酸药物包括DNA和RNA药物。在一些实施方案中,核酸药物是指能够递送到靶细胞如疾病细胞在基因水平发挥作用的核酸,如DNA或RNA。在一些实施方案中,核酸药物可以调节基因的表达例如提高或抑制靶基因的表达。在一些实施方案中,DNA和RNA药物包括siRNA、mRNA、tRNA、rRNA、cDNA、miRNA、核酶、反义寡核苷酸、诱饵寡核苷酸、肽核酸、三链形成性寡核苷酸(Triplex Forming Oligonucleotide,TFO)、基因等。在一些实施方案中,核酸药物包括结合内源RNA的RNA结合分子。在一些实施方案中,内源RNA包括例如能够调节基因表达的各种类型的RNA,例如内源miRNA。在一些实施方案中,核酸药物可以是结合内源miRNA的miRNA海绵。在一些实施方案中,miRNA可以是miRNA21。

[0007] 在一些实施方案中,本发明的核酸药物可以是来自人、动物、植物、细菌、病毒等的核酸,在一些实施方案中,本发明的核酸药物也可以是通过化学合成制造的核酸。在一些实施方案中,上述核酸可以是单链、双链、三链中的任一种,并且对其分子量也没有特殊的限定。

[0008] 在一些实施方案中,结合蛋白的核酸序列(例如核酸适配体或其它能够与蛋白结合的核酸序列)与相应蛋白(本文中也称为核酸结合蛋白)结合将核酸药物递送到细胞膜和分选到外泌体中。在一些实施方案中,可以使用任何适当的核酸结合蛋白(例如核酸适配体结合蛋白)和相应的核酸序列(例如核酸适配体)对或蛋白(肽)和与蛋白(肽)特异性结合的特殊RNA结构序列。在一些实施方案中,核酸适配体结合蛋白可以是噬菌体蛋白MCP,并且相应的所述核酸适配体可以是结合所述噬菌体蛋白MCP的核酸适配体。在一些实施方案中,蛋白可以是L7Ae蛋白,相应的核酸序列为RNA结构序列C/Dbox(5'-CCA AGG GAU CAA UCG GUC UCU CGA GGG UCC GAG UCU AGA CCA GAU UGG UCU CUC UGG-3')。在一些实施方案中,本发明的与核酸药物连接的核酸序列包括核酸适配体,例如DNA适配体和RNA适配体。在一些实施方案中,核酸适配体可以通过SELEX筛选,其是能够特异性结合蛋白质或其它小分子物质的寡核苷酸。在一些实施方案中,核酸适配体结合蛋白和核酸适配体对不受特别限制,只要二者能够相互作用将核酸药物递送到细胞膜和分选到外泌体中即可。在一些实施方案中,核酸适配体通过结合核酸适配体结合蛋白将与其连接的核酸药物递送到目标位置,例如递送到细胞膜,这样的适配体能够通过本领域已知的方法筛选制备,或者使用本领域任何已知的与核酸适配体结合蛋白特异性结合的核酸适配体。在一些实施方案中,本发明的核酸适配体是单链,长度为约20至约60个核苷酸。在一些实施方案中,RNA适配体可以是MS2。

[0009] 在一些实施方案中,为了靶向疾病细胞,可以对本发明的工程化外泌体进行修饰。在一些实施方案中,本发明的工程化外泌体在其表面上进一步包含靶向疾病细胞核酸适配体。如上文描述的,核酸适配体可以特异性结合蛋白质或其它小分子物质。在一些实施方案

中,本发明包括对所述外泌体进行修饰,以在其表面添加靶向疾病细胞的核酸适配体。在一些实施方案中,核酸适配体可以是靶向疾病细胞如肿瘤细胞上特异性表达的蛋白的核酸适配体。在一些实施方案中,核酸适配体可以是靶向疾病细胞如肿瘤细胞上过表达的蛋白的核酸适配体。例如,在一些实施方案中,肿瘤细胞上过表达的蛋白可以是白介素3(IL3),核仁素,整合素,前列腺特异性膜抗原(PSMA),表皮生长因子受体(EGFR)等。在一些实施方案中,所述靶向疾病细胞的核酸适配体靶向疾病细胞表面的受体蛋白,特别是疾病细胞特有的表面蛋白。如本领域广泛已知的,许多疾病细胞如癌症细胞表达特有的蛋白,由此能够通过与所述蛋白特异性结合的分子如适配体将药物如核酸药物特异性靶向所述疾病细胞。这样的疾病细胞表面特异性表达的蛋白是本领域广泛已知的。

[0010] 在一些实施方案中,为了靶向疾病细胞,可以对本发明的工程化外泌体进行修饰。例如,在一些实施方案中,可以在本发明的工程化外泌体表面上进一步包含靶向疾病细胞的蛋白或者肽,或者靶向疾病细胞的蛋白或者肽可以在外泌体形成过程中分选到外泌体膜上。如本领域技术人员已知的,蛋白或肽之间可以相互作用,从而形成特异性结合。在一些实施方案中,本发明包括对所述外泌体进行修饰,以包括靶向疾病细胞的蛋白或肽。在一些实施方案中,蛋白或肽可以是靶向疾病细胞如肿瘤细胞上特异性表达的蛋白的蛋白或肽。在一些实施方案中,蛋白或肽可以是靶向疾病细胞如肿瘤细胞上过表达的蛋白的蛋白或肽。例如,在一些实施方案中,肿瘤细胞上过表达的蛋白可以是白介素3(IL3),核仁素,整合素,前列腺特异性膜抗原(PSMA),表皮生长因子受体(EGFR)等。在一些实施方案中,所述靶向疾病细胞的蛋白或肽靶向疾病细胞表面的受体蛋白,特别是疾病细胞特有的表面蛋白。如本领域广泛已知的,许多疾病细胞如癌症细胞表达特有的蛋白,由此能够通过与所述蛋白特异性结合的蛋白或肽将药物如核酸药物特异性靶向所述疾病细胞。这样的疾病细胞表面特异性表达的蛋白是本领域广泛已知的。

[0011] 在一些实施方案中,疾病细胞包括癌症细胞,例如上皮癌,包括肺癌、乳腺癌、食管癌、胃癌、宫颈癌、结肠癌,等;肉瘤,包括横纹肌肉瘤,脂肪肉瘤,骨肉瘤,等;白血病,包括急性淋巴细胞白血病(ALL),急性髓性白血病(AML),低增生性急性白血病,成人T淋巴细胞白血病,浆细胞白血病,肥大细胞白血病,嗜酸粒细胞白血病,嗜碱粒细胞白血病,慢性髓性白血病(CML),慢性淋巴细胞性白血病(CLL),骨髓增生异常综合征(MDS),等;淋巴瘤,包括非霍奇金淋巴瘤(NHL)和霍奇金淋巴瘤(HL),等;骨髓瘤,等等。在一些实施方案中,疾病细胞可以是白血病细胞。

[0012] 在一些实施方案中,靶向疾病细胞的核酸适配体可以是DNA适配体或RNA适配体,其特异性地靶向疾病细胞。在一些实施方案中,本发明的核酸适配体是单链,长度为约20至约60个核苷酸。在一些实施方案中,适配体是白血病细胞上过表达的核仁素的DNA适配体。在一些实施方案中,核酸适配体可以进行修饰,以引入到外泌体膜。例如,在一些实施方案中,其可以通过修饰在其末端的胆固醇与外泌体膜的相互作用而固定到外泌体膜上。

[0013] 在一些实施方案中,本发明提供了包含上述工程化外泌体的核酸药物递送系统,其包括核酸药物、包裹核酸药物的工程化外泌体、靶向疾病细胞的适配体及疾病细胞。

[0014] 在一些实施方案中,所述靶向疾病细胞的适配体及疾病细胞如上所述。在一些实施方案中,所述靶向疾病细胞的适配体是白血病细胞上过表达的核仁素的DNA适配体,所述疾病细胞是白血病细胞。

[0015] 在一些实施方案中,本发明提供了包含上述工程化外泌体的试剂盒,其还包括使用本发明的工程化外泌体的说明书。

[0016] 在一些实施方案中,本发明提供了制备工程化外泌体或包含其的核酸药物递送系统或试剂盒的方法,所述方法包括:

[0017] 1) 构建用于转染细胞的载体,所述载体编码

[0018] i) 与膜定位信号肽融合的CIBN融合蛋白,和

[0019] ii) 与噬菌体蛋白MCP融合的CRY2融合蛋白,和

[0020] iii) 与核酸药物连接的结合所述噬菌体蛋白MCP的核酸适配体,

[0021] 2) 用构建的载体构建稳转细胞系,和

[0022] 3) 从稳转细胞系中收集获得所述工程化外泌体

[0023] 在一些实施方案中,本发明的方法中使用的载体是病毒载体。在一些实施方案中,本发明的方法中使用的载体是逆转录病毒载体。在一些实施方案中,本发明的方法中使用的载体是慢病毒载体。

[0024] 在一些实施方案中,本发明的方法中使用的转染细胞没有特别限制,其可以是本领域已知的任何适合于转染的细胞,例如293T细胞。在一些实施方案中,可以使用适当的转染剂进行转染。在一些实施方案中,在收集外泌体前,本发明的方法包括将转染细胞在诱导剂如蓝光的间隔照射下进行培养。在一些实施方案中,可以使用任何适当的方法收集外泌体,例如收集工程化外泌体的方法,包括超速离心法,密度梯度离心法,超滤离心法,磁珠免疫法,PEG-base沉淀法,或采用可商购的外泌体提取试剂盒。在一些实施方案中,本发明的方法使用超速离心法来收集工程化外泌体。

[0025] 在一些实施方案中,本发明的方法还包括用靶向疾病如肿瘤细胞的核酸适配体修饰工程化外泌体的步骤。在一些实施方案中,本发明的方法中的靶向细胞是白血病细胞。在一些实施方案中,核酸适配体是白血病细胞上过表达的核仁素的DNA适配体。

[0026] 本发明还提供了包含工程化外泌体的核酸递送系统在制备用于递送核酸药物到疾病患者例如肿瘤患者的细胞中的核酸药物递送系统或试剂盒中的用途。

[0027] 在一些实施方案中,本发明提供能大量富集细胞内源mRNA的工程化外泌体。在一些实施方案中,本发明为药物递送提供一个新的载体。在一些实施方案中,本发明提供一种工程化外泌体在靶向治疗白血病中的应用。

[0028] 在一些实施方案中,本发明所提供的一种核酸药物递送系统及其应用,所述递送系统可以包括核酸药物、包裹核酸药物的工程化外泌体、靶向肿瘤细胞的适配体及白血病细胞。

[0029] 在一些实施方案中,可以通过下述步骤获得外泌体:

[0030] 首先,把形成工程化外泌体所需的3种元件palm-CIBN、CRY2-MCP及mir21海绵-MS2构建到包装慢病毒所需的载体PLVX上,然后分别转染293T细胞。palm是一个膜定位序列,CIBN和CRY2是两个可逆的蓝光诱导相互作用蛋白,MCP是一个噬菌体蛋白。palm-CIBN通过palm定位到细胞膜后,再通过CIBN和CRY2在蓝光下的相互作用把CRY2-MCP招募到细胞膜上。随后,mir21海绵-MS2表达出的mRNA可以通过MS2区域与MCP蛋白的相互作用把mir21海绵-MS2富集到膜上,MS2是MCP蛋白的一个RNA适配体。mir21海绵是mir21(序列是5' uagcuuaucaugacugauguuga3')的一种抑制剂。待慢病毒在细胞中形成后,收集细胞培养上清

中的慢病毒。用收集好的慢病毒分别感染293T细胞,然后通过抗性筛选出形成工程化外泌体所需的稳转细胞系。

[0031] 对所筛选出的稳转细胞系进行大量培养,并收集其培养上清。然后通过不同步骤的差速离心来获得上清中的外泌体。

[0032] 收集上述外泌体后,对外泌体进行靶向修饰。靶向修饰是在外泌体表面修饰一种具有识别白血病细胞的核酸适配体。该适配体是白血病细胞上过表达的核仁素的DNA适配体。DNA适配体通过修饰在其末端的胆固醇与外泌体膜的相互作用而固定到外泌体膜上。

[0033] 用上述修饰好的外泌体与白血病细胞K562细胞系进行孵育,然后观察白血病细胞的凋亡情况和mir21靶蛋白PTEN的表达变化。

[0034] 本发明相对于现有技术,具有如下的优点及效果:

[0035] 本发明首先提供了一种细胞内源核酸富集到外泌体中的方法,其次对外泌体作为核酸药物运送载体的可行性提供了具体的应用结果。结果说明,本发明所合成的工程化外泌体可以富集细胞中表达的特定核酸,并通过靶向修饰后能增强外泌体靶向疾病细胞的能力。其次,携带核酸药物的外泌体作用于白血病细胞后,与对照组相比,白血病细胞的凋亡明显增加,相应核酸药物作用的mirna的靶蛋白PTEN的表达也有所增加。因此,本发明的外泌体可以作为一种药物载体成功的运送活性核酸药物到靶细胞中。

附图说明

[0036] 图1是通过RT-PCR验证RNA在外泌体中的富集。a:琼脂糖凝胶电泳对外泌体中BFP-miRNA-21海绵-MS2的PCR结果的定性分析。泳道1:标记物二泳道2:BFP-miRNA-21海绵-MS2;泳道:miRNA-21海绵-MS2。b:Q-PCR对外泌体中mir21海绵的半定量分析。on:外泌体是在293T细胞培养时有蓝光刺激的条件下收集的,off:外泌体是在293T细胞培养时没有蓝光刺激的条件下收集的。

[0037] 图2是AS1411-RNA-外泌体靶向白血病细胞后,流式细胞仪对外泌体运送BFP-miRNA 21海绵-MS2到白血病细胞K562后细胞凋亡情况的分析。

[0038] 图3是BFP-miRNA 21海绵-MS2的质粒图谱。

[0039] 图4是CRY2PHR-mCHERRY-MCP的质粒图谱。

[0040] 图5是Pahn-EGFP-CIBN质粒图谱。

具体实施方式

[0041] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但不用来限制本发明的范围。

[0042] 本发明中使用的相关核酸由生物工程(上海)有限公司合成。miRNA-21海绵和MS2序列来源于CMV-d2EGFP-21(addgene,21972)和pSL-MS2-6X(addgene,27118)质粒。BFP,EGFP,mCherry,CIBN和CRY2序列由生物工程(上海)有限公司合成。转染试剂:lipofectamine 3000(L3000015)购买自ThermoFisher。抗-肌动蛋白(小鼠,abclonal,AC004),抗-CD63(小鼠,abcam,MX-49.129.5)。PTEN(兔,abclonal,A11193)。RNA提取试剂盒(TOYOBO,SCQ-101),反转录试剂盒(TOYOBO,FSQ-201)。qPCR试剂盒:(Transgen Biotech,AQ141-03)。Hoechst 33342(invitrogen,H3570)。Alexa Fluor 647-缀合的Annexin V和PI

试剂盒 (Yeasen, shanghai) .

[0043] AS1411:5' GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG3'

[0044] miRNA21:5' uagcuuaucaagacugauguuga3'

[0045] MS2:5' ACATGAGGATCACCCATGT3'

[0046] miR-21海绵:5' TCAACATCAGGACATAAGCTA3'

[0047] 本实施例所涉及的工程化外泌体的制备及其应用主要包括以下步骤:

[0048] (1) 稳转细胞系的建立

[0049] 首先构建制备工程化外泌体所需的质粒,包括pal_m-EGFP-CIBN(序列如下),CRY2-mCherry-MCP(序列如下)和BFP-6X miRNA21海绵-6X MS2(来源于CMV-d2EGFP-21(addgene, 21972和pSL-MS2-6X(addgene, 27118)质粒)三个质粒。其中EGFP, mCherry和BFP仅用来筛选稳转系及定位融合蛋白。首先把不同蛋白的氨基酸片段连接起来。Pal_m是16个氨基酸的肽段,其序列通过引物设计连接到CIBN的碱基序列(生物工程(上海)有限公司)上。CRY2(生物工程(上海)有限公司)和MCP通过内切酶的连接位点连接,miRNA21海绵和MS2也通过内切酶连接位点连接。片段连接好后再通过连接酶把片段连接到PLVX载体(从Clontech公司的plvx-puro改造而来)上。不同的质粒的PLVX载体上具有不同的荧光蛋白。

[0050] CRY2-mCherry-MCP的序列(其中粗体部分是CRY2序列,斜体部分是mCherry序列,加下划线的部分是MCP序列,CRY2序列和mCherry序列之间以及mCherry序列和MCP序列之间是接头序列):

[0051]

MKMDKKTIVWFRRLRIEDNPALAAAHEGSVFPVFIWCPEEEGQ
FYPGRASRWWMKQSLAHLSQLKALGSDTLIKTHNTISAILDCIR
VTGATKVVFNHLYDPVSLVRDHTVKEKLVVERGISVQSYNGDLLYEP
WEIYCEKKGKPF^{ts}FSNSYWK^{cl}LDMSIESV^{ml}PPPWRLMPITAAAE
AIWAC^{si}EELGLENEAEK^{ps}NALLTRAWSPGWSNADKLLNEFIEKQ
LIDYAKNSKKVVG^{ns}TSL^{sp}YLHFGEISVRHVFQCARMKQIIWAR
DKNSEGEESADLFLRGIGLREYSRYICFNFPFTHEQSLLSHLRFFPW
DADVDFKAWRQGR^{ty}PLVDAGMRELWATGWMHNRIRVIVSSF
AVKFLLLPWK^{wg}MKYFWD^{tl}LDADLECDILGWQYISGSIPDGHEL
DRLDNPALQGA^{ky}DPEGEYIRQWLPELARLPTEWIHHPWDAPLTV
LKASGVELGTNYAKPIVDIDTARELLAKAISRTREAQIMIGAAGGSG
SSGGSGGSGGSGLEMVSKGEEDNMAI^{ke}FMRFKVHMEGSVNGHEFEIE

[0052]

GEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPD
YLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPS
DGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTT
YKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK
TRGGGGSGGGGSGGGGSMASNFTQFVLVDNNGGTGDVTVAPSNFANGI
AEWISSNSRSQAYKVTCSVRQSSAQNRYTIKVEVPKGAWRSYLN MEL
TIPIFATNSDCELIVKAMQGLLKDGNPIPSAIAANS GIY

[0053] palm-EGFP-CIBN的序列(其中粗体部分是palm序列,斜体部分是EGFP序列,加下划线的部分是CIBN序列,palm序列和EGFP序列之间以及EGFP序列和CIBN序列之间是接头序列):

[0054]

MLCCMRRTKQVEKND*EDQKIMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHK*
*FSVSGEGEGDATYGKLT***LFICTTGKLPVPWPTLVTT***LYGVQCFSRYPDH*
MKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKG
*IDFKEDGNILGHKLEYNYN***SHNVYIMADKQKNGIKVNF***KIRHNIEDGSVQL*
*ADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH***YSTQSALS***KDPNEKRDHMLLEFVTAAGI*
*TLGMDELYKEFGGGGSGGGGSGGGGSMNGAIGG***DLLLNFPDMSVLER**
*QRAHLKYLNP****TFDSPLAGFFADSSMITGGEMDSYLSTAGLNLP****MMYGE*
*TTVEGDSRLSISPETTLGTGNFKAAKFD****TETKDCNEAAK****KMTMNRDDL*
VEEGEEEKSKITEQNNGSTKSIKKMKHKAKKEENNFSNDSSKVTKELE
KTDYIH

[0055] 质粒构建好后,把构建好的质粒分别转染293T细胞形成包装有目的质粒的慢病毒。转染48h后,收集细胞培养上清中,然后1000g离心去掉上清中的细胞碎片,并收集上清中的慢病毒于-80℃保存待用。为了形成稳定表达上述质粒的细胞,把收集的病毒一起侵染293T细胞,48h后从侵染的细胞中用流式细胞仪通过荧光选出整合有三种质粒的稳转细胞。

[0056] (2) 外泌体的收集

[0057] 外泌体的收集采用差速离心的方法。具体步骤如下:

[0058] 1.把上述所得的稳转细胞进行扩大培养,待细胞长到60-70%的汇度后,把培养基换成含有10%的外泌体去除血清的培养基,并继续培养48h后从细胞培养的上清中收集外泌体。为了产生富集miRNA21海绵的外泌体,细胞在外泌体去除血清培养的48h期间需要在蓝光的间隔照射下进行培养。蓝光由自己组装的蓝光灯提供。蓝光的照射强度可根据具体实验结果而定,本案列的照射时间为每间隔60s照射60s。

[0059] 2.收集细胞培养液,于4℃下500g离心5分钟除去培养液中残存的细胞。然后4℃下

2000g离心20分钟除去培养液中残存的细胞碎片。

[0060] 3.把步骤1所得的上清在4℃下10000g再次离心30分钟去除其中的大囊泡。

[0061] 4.收集上清,然后在4℃下100,000g离心90分钟得到外泌体沉淀。弃去上清,用PBS清洗沉淀后再次在4℃下100,000g离心90分钟,即得到较为纯净的外泌体。

[0062] (3) 外泌体包装miRNA21海绵的验证

[0063] 为了证明本发明所设计的工程化外泌体能富集miRNA21海绵,其母细胞培养在蓝光照射时收集的外泌体作为阳性组,培养在黑暗条件下时收集的外泌体作为阴性组。然后提取外泌体中的RNA,通过qPCR对其中的miRNA21海绵量进行相对定量。

[0064] (4) 外泌体的靶向修饰

[0065] 收集上述外泌体后,在其表面修饰核酸适配体以增强对白血病细胞的靶向能力。修饰的核酸适配体为AS1411(序列如下),可以特异性的识别核仁素蛋白。核酸适配体由公司合成(生物工程(上海)有限公司),且5'端修饰有胆固醇。核酸适配体与外泌体的结合通过胆固醇和外泌体膜的相互作用完成,具体步骤如下:100 μ l 1 μ g/ml的外泌体与5 μ l 10 μ M的核酸适配体在4℃孵育过夜,然后通过超速离心去除没有结合的核酸适配体。AS1411的序列:GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG

[0066] (5) 外泌体的靶向性研究

[0067] 得到上述修饰的工程化外泌体后,将其加入到K562细胞,与其孵育1h。然后取出细胞,并在1000g下离心10min去除多余的外泌体。把离心下来的细胞用PBS清洗重悬后滴加到载玻片上,然后用结构光照明显微镜观察细胞对外泌体的摄取情况。作为对照,把没有经过核酸适配体AS1411修饰的工程化外泌体也与细胞进行孵育,然后在共聚焦显微镜下观察K562细胞对外泌体的摄取情况。

[0068] (6) 外泌体对递送功能RNA的结果验证

[0069] 为了进一步验证我们所得到的工程化外泌体能包装miRNA21海绵并能成功的递送到靶细胞中发挥功能,经过靶向修饰后的外泌体与K562细胞孵育48h后收集细胞,然后通过流式细胞技术对细胞的凋亡情况进行分析。同时提取细胞的全蛋白,并通过蛋白印迹对PTEN蛋白的表达进行分析。其中,没有处理过以及加如没包装miRNA21海绵的外泌体作为对照。

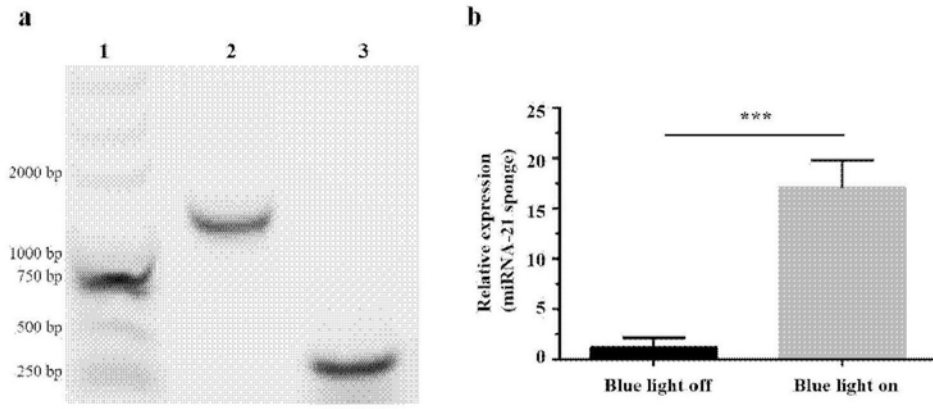


图1

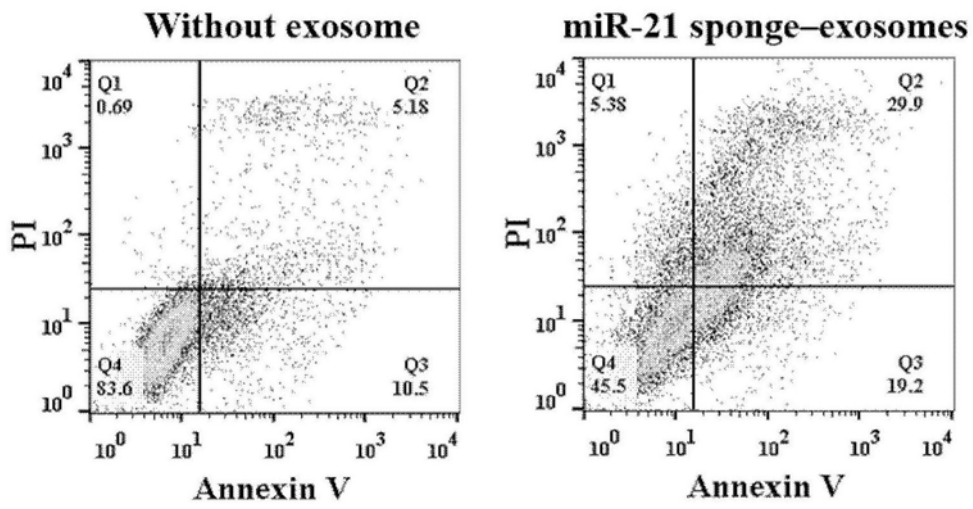


图2

Created with SnapGene®

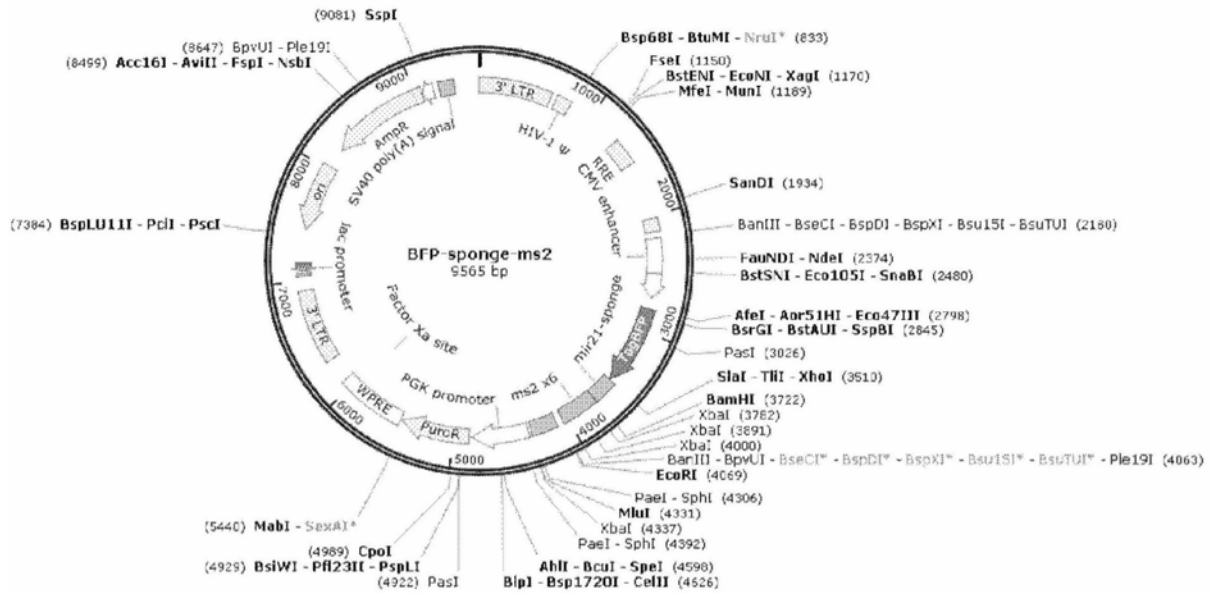


图3

Created with SnapGene®

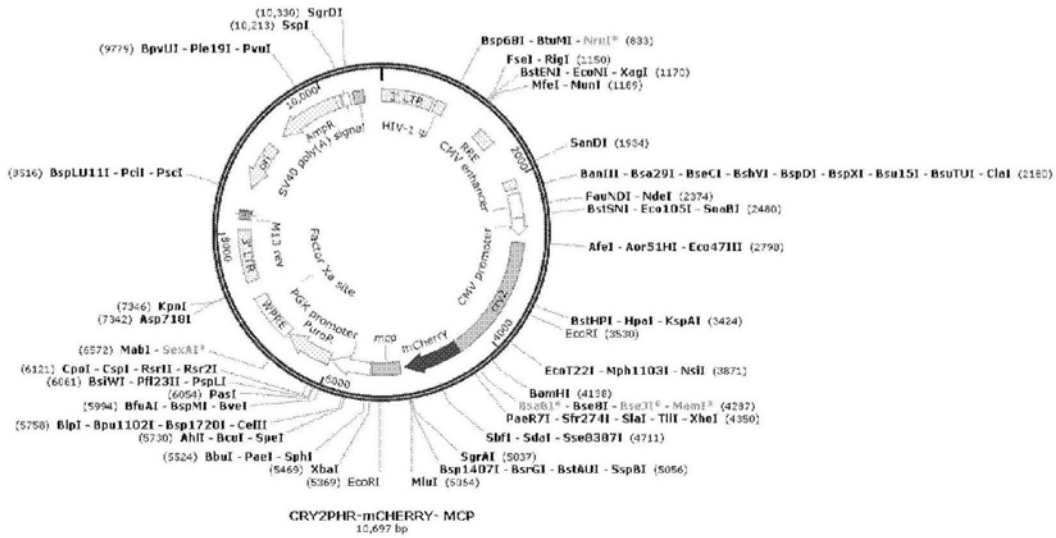


图4

Created with SnapGene®

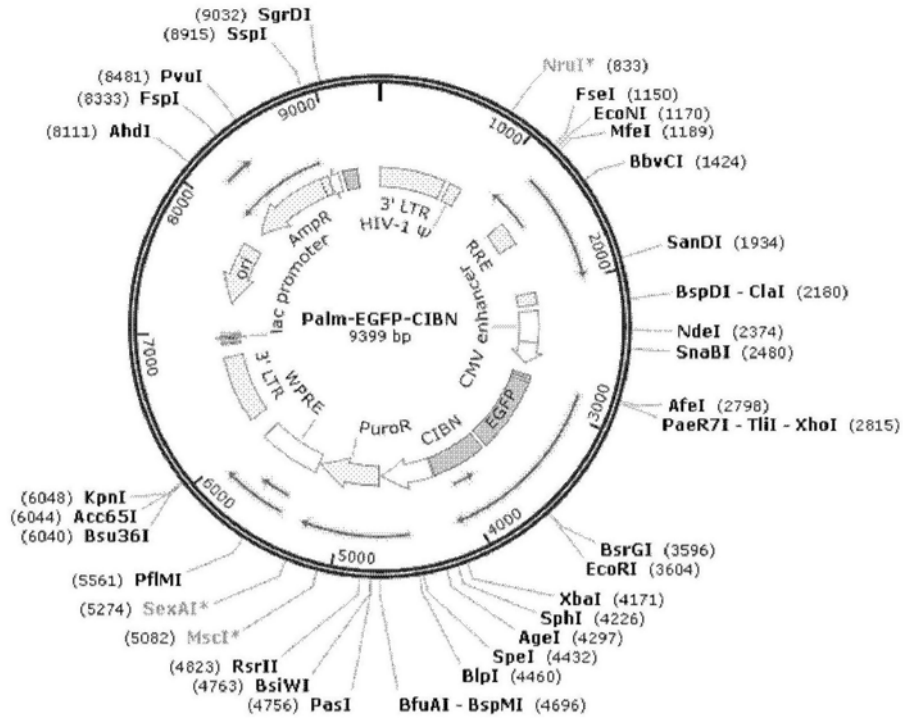


图5