

CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种靶向线粒体的自组装蛋白质纳米颗粒的制备与应用

技术领域

本发明涉及生物工程及医药领域，特别涉及肿瘤成像和治疗以及药物递送技术领域，具体涉及一种新型靶向线粒体的蛋白质纳米颗粒（GSTP1-MT3），该蛋白质纳米颗粒具有线粒体靶向、引起线粒体功能性紊乱、在肿瘤周围富集以及抑制肿瘤生长等相关性质。

背景技术

癌症是当前人们亟待解决的世界性难题，根据世界卫生组织统计，每年将近有 1400 万人死于癌症，其中乳腺癌是在女性中发病率仅次于皮肤病的第二大癌症。根据美国卫生局统计，每年将近有 26 万的女性死于乳腺癌。因此，对于乳腺癌的治疗也越来越受到人们的关注。

然而，病人一般在癌症晚期才会发现自己的相关症状，同时很多的癌症病人会对很多的化疗药物产生一定的多重耐药性等问题，这给癌症的治疗带来了很大的挑战。线粒体作为细胞内主要的 ATP 供应站，对于维持细胞的生长与代谢起着非常重要的作用。由于线粒体功能性损伤，会细胞造成不可逆的损伤，因此越来越多的人在探索基于线粒体功能性紊乱的癌症治疗方案。最近人们发现对线粒体功能性紊乱，能够从一定程度上克服癌症的多重耐药性这一难题。然而现在能够靶向线粒体的药物主要是一些三苯基膦类似物以及线粒体穿膜肽等小分子，但是这些小分子存在半衰期短、在肿瘤周围不能有效富集等问题，这些不足极大限制了其在癌症治疗中的应用。

发明内容

为了有效解决上述问题，本发明提供一种新型线粒体靶向的蛋白质纳米颗粒（GSTP1-MT3），该蛋白质纳米颗粒能够以大肠杆菌作为宿主菌进行融合表达，再经金属离子诱导而获得。在 Balb/c 小鼠中移植 4T1 乳腺癌细胞构建小鼠的乳腺癌模型，发现 GSTP1-MT3 蛋白质纳米颗粒能够在肿瘤部位富集，快速进入到肿瘤细胞的线粒体中，造成线粒体膜电位下降以及细胞内 ROS 含量的增加，最终能够有效地抑制肿瘤的生长。同时我们还发现 GSTP1-MT3 (Co^{2+}) 通过化学偶联的方式和紫杉醇联用，不仅能够提高紫杉醇的水溶性，而且还极大地延长

了小鼠的生存期，为临床上乳腺癌治疗提供了广阔的前景。

一方面，本发明提供一种新型线粒体靶向的自组装蛋白质纳米颗粒，其特征在于：所述蛋白质纳米颗粒由蛋白质单体自组装形成，所述蛋白质单体包括由金属硫蛋白、连接肽以及谷胱甘肽硫转移酶以从氨基端到羧基端的顺序依次连接组成的融合蛋白，所述连接肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

本发明所述蛋白质纳米颗粒，其特征在于：所述谷胱甘肽硫转移酶为 GSTP1，所述 GSTP1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。

本发明所述蛋白质纳米颗粒，其特征在于：所述金属硫蛋白优选为 MT3，所述 MT3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

本发明所述自组装蛋白质纳米颗粒，其特征在于：所述蛋白质纳米颗粒是由金属离子诱导而形成的融合蛋白，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示。所述金属离子包含 Cd^{2+} 、 Gd^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 等金属离子。

本发明所述蛋白质纳米颗粒，其特征在于：谷胱甘肽硫转移酶位于所述融合蛋白的 C 端。

第二方面，本发明还提供编码所述的蛋白质纳米颗粒中的融合蛋白的核酸，所述核酸的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示。

第三方面，本发明还提供包含所述编码核酸的构建体，所述构建体包括表达盒、载体。

本发明所述载体包括原核表达载体，所述表达载体中包括启动子、终止子和其他调控元件。

第四方面，本发明还提供一种含有所述编码核酸、核酸构建体的宿主表达菌。

本发明所述宿主细胞包括原核宿主表达菌，所述原核宿主 BL21(DE3)。

第五方面，本发明还提供所述线粒体靶向的蛋白质纳米颗粒在癌症诊断中的应用。

其中，所述蛋白质纳米颗粒还能够连接有活性物质，所述活性物质为诊断试剂。

其中，所述蛋白质纳米颗粒能够在肿瘤周围富集。所述诊断试剂包括荧光基团、同位素、MRI 造影剂、放射性同位素等物质。

第六方面，本发明还提供所述线粒体靶向的蛋白质纳米颗粒在肿瘤治疗中的应用。

其中，所述线粒体靶向的蛋白质纳米颗粒能够抑制肿瘤生长。

其中，所述蛋白质纳米颗粒还连接有活性物质，所述活性物质为肿瘤治疗药物，所述肿瘤治疗药物为紫杉醇、所述肿瘤为乳腺癌。

第七方面，本发明还提供一种新型的线粒体靶向的自组装蛋白质纳米颗粒制备方法。

本发明所述制备线粒体靶向的新型蛋白质纳米颗粒的方法，其特征在于：蛋白质单体在 0.3 mM 的金属离子的诱导下，可能利用金属和蛋白质上的氨基和巯基配位，自组装形成蛋白质纳米颗粒。

本发明所述制备线粒体靶向的新型蛋白质纳米颗粒的方法，其中所述金属离子包含 Cd^{2+} 、 Gd^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 等金属离子。

本发明所述制备线粒体靶向的新型蛋白质纳米颗粒的方法，其还包括利用 GST 纯化柱对自组装形成的蛋白质纳米颗粒进行纯化的步骤。

第八方面，本发明提供了一种能显著提高紫杉醇水溶性的蛋白质纳米颗粒。

其中，所述蛋白质纳米颗粒和紫杉醇联用后，显著延长 4T1 乳腺癌小鼠的生存期。

与现有技术相比，本发明的技术方案具有以下优点：

第一、首次报道了通过金属介导的自组装蛋白质纳米颗粒，该蛋白质纳米颗粒能够快速靶向到线粒体，实时监测线粒体的变化。相比于其它的靶向线粒体的小分子而言，该蛋白质纳米颗粒的生物相容性和水溶性较好，而且靶向速度快，更能实时反映线粒体真实情况。

第二、该蛋白纳米颗粒能够造成线粒体膜电位下降、细胞内 ROS 含量的增加，进而引起细胞发生凋亡。

第三、癌症对化学药物的多重耐药性是降低化学药物治疗效果的主要因素。线粒体作为细胞内 ATP 供应站，在细胞的生长与分裂中扮演着重要的角色。由于线粒体的损伤是不可逆性的，因此对线粒体功能性紊乱能够有效地克服多重药物耐受等问题，该蛋白质纳米颗粒在克服多重耐药性方面起着重要的作用。

第四、相比于其它的线粒体靶向小分子而言，该蛋白质能够在肿瘤周围进

行有效地富集，能够减少药物对其它器官的损伤，因此减少对正常组织的损伤。

附图说明

通过阅读下文优选实施方式的详细描述，各种其他的优点和益处对于本领域普通技术人员将变得清楚明了。附图仅用于示出优选实施方式的目的，而并不认为是对本发明的限制。

图 1: GSTP1-MT3 线粒体靶向的蛋白质纳米颗粒的氨基酸序列构成

图 2: GSTP1-MT3 蛋白质纳米颗粒的相关表征

A: 分别在金属 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 诱导下的蛋白表达情况;

B: 在 1 mmol/L 不同金属诱导下，蛋白质的表达量高低;

C: GSTP1-MT3(Co^{2+}) 粒径大小测定;

D: GSTP1-MT3(Co^{2+}) 蛋白质纳米颗粒在不同 pH 条件下二级结构的变化;

E-F: GSTP1-MT3(Co^{2+}) 蛋白质纳米颗粒形貌测定(E)扫描电镜、(F)透射电镜。

图 3: 不同浓度下 Co^{2+} 的表达量水平高低。

图 4: GSTP1-MT3(Co^{2+}) 靶向线粒体。

图 5: 线粒体的 Pearson's co-localization efficiency 测定

图 6: GSTP1-MT3 蛋白质纳米颗粒能够引起细胞内 ROS 含量的增加。

图 7: 细胞内 ROS 含量的测定。

图 8: GSTP1-MT3(Co^{2+}) 在肿瘤周围富集。

图 9: GSTP1-MT3(Co^{2+}) 抑制肿瘤生长

A: 小鼠体重的变化，其中箭头代表给药的时间点;

B: 小鼠肿瘤大小的测定，其中箭头代表给药的时间点;

C: 第 21 天时，小鼠的实体图（上）以及小鼠的肿瘤实体图片（下）;

D: 第 21 天时，小鼠肿瘤的体重。

图 10: GSTP1-MT3(Co^{2+}) 偶联 PTX（紫杉醇）延长 4T1 乳腺癌小鼠的生存期。

图 11: GSTP1-MT3 蛋白纳米颗粒体内抗肿瘤作用机理示意图。

具体实施方式

下面将参照附图更详细地描述本公开的示例性实施方式。虽然附图中显示了本公开的示例性实施方式，然而应当理解，可以以各种形式实现本公开而不应被这里阐述的实施方式所限制。相反，提供这些实施方式是为了能够更透彻

地理解本公开，并且能够将本公开的范围完整的传达给本领域的技术人员。

根据本发明的实施方式，提出以下实施案例

实施例一、构建 GSTP1-MT3 线粒体靶向的蛋白质纳米颗粒氨基酸序列：

基于前期实验研究，构建了如下的线粒体靶向的蛋白质纳米颗粒表达载体，如图 1 所示，GSTP1-MT3 主要由 GSTP1 和 MT3 两部分组成，其中 MT3 在氨基酸序列的 N 端，GSTP1 在氨基酸序列的 C 端，MT3 和 GSTP1 中间通过 GGGGS 序列偶联。

GSTP1 氨基酸序列：

MPPYTVVYFPVRGRCAALRMLLADQGQSWKEEVTVETWQEGSLKASCLYGQLPKFQ
DGDLTLYQSNILRHLGRTLGLYGKDQQAALVDMVNDGVEDLRCKYISLIYTNYEAGKDDYVK
ALPGQLKPFETLLSQNQGGKTFIVGDQISFADYNLLDLLLIHEVLAPGCLDAFPLLSAYVGRLSAR
PKLKAFLASPEYVNLPIGNGKQ (SEQ ID NO: 1)；

MT3 氨基酸序列：

MDPETCPCPSGGSCCTCADSCKCEGCKCTSCKKSCCSCCPAECEKCAKDCVCKGGEEAAEAE
AEKSCCCQ (SEQ ID NO: 2)；

GSTP1 和 MT3 之间的 linker：

GGGGS (SEQ ID NO: 3)。

完整的 GSTP1-MT3 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示，其分子量为 30.566 kDa，等电点 PI 为 5.14；GSTP1-MT3 的编码核苷酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示。

实施例二、GSTP1-MT3 蛋白质纳米颗粒载体构建

为了利于后续的 GSTP1-MT3 蛋白质纳米颗粒在重组细胞中的表达，构建了其原核表达载体，其中选择 pET-28a(+)作为原核表达载体，利用其上的酶切位点 HindIII、NdeI 将如 SEQ ID NO: 5 所示编码 GSTP1-MT3 的核苷酸序列连接到 pET-28a(+)中，经酶切、电泳及单克隆测序检测后成功获得重组表达载体 pET-28a(+)-GSTP1-MT3。

实施例三、GSTP1-MT3 蛋白质纳米颗粒的重组表达

采用大肠杆菌作为宿主菌进行重组表达，具体表达方法如下：

1、质粒转化

取 2 μL 42 ng/ μL pET-28a(+)-GSTP1-MT3 质粒，加入到 20 μL *BL21 (DE3)* 感受态细胞，在冰上预混 15-30 分钟，然后放在 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中加热 90 秒，随后冰上再放置 10 分钟。加入 800 μL 的无抗性的 LB 培养基，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 220 rpm 培养 1 小时，然后在 3500 rpm 离心 10 分钟，移去 600 μL 的上清，剩余的 200 μL 混匀后，待用。

2、抗性筛选

将步骤 1 中剩余的 200 μL 菌液加入到含有卡那霉素的琼脂糖平板中，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 2 小时后，将平板倒置培养过夜。

3、单克隆挑选

挑选单个克隆，加入到 10 mL 含有卡那霉素的 LB 培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 220 rpm 培养 10 小时，溶液逐渐变浑浊。

4、蛋白质诱导表达

将步骤 3 中的 10 mL 菌液加入到 1 L 含有卡那霉素的 LB 培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 220 rpm 培养 4 小时后，再分别加入 1 mL 0.1 mol/L IPTG (培养基中终浓度 0.1 mmol/L) 和 1 mmol/L 不同金属离子 (金属离子可为 Cd^{2+} 、 Gd^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 等) 继续诱导表达过夜，4 $^{\circ}\text{C}$ 4000 rpm 离心 20 分钟，弃去上清，加入 20 mL GST 重悬液 (pH=8.0、50 mM Tris/HCl、100 mM NaCl、60 mM β -Mercaptoethanol) 进行超声波碎 (30% 的功率, SCIENTZ, JY 92-IIIN), 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 rpm 超速离心，收集上清，使用 0.22 μm 的滤膜进行过滤，有待进一步纯化。

5、蛋白纯化

利用 AKTA 纯化系统进行纯化，首先使用 5 倍 (5V) 柱体积的 PBS 平衡，然后利用 AKTA 将步骤 4 中上清结合到 GST 柱子上，继续使用 5V 柱体积的 PBS 进行冲洗待基线平稳后，使用 GST 洗脱液 (pH=8.0、10 mmol/L GSH、50 mM Tris/HCl、100 mM NaCl、60 mM β -Mercaptoethanol) 洗脱并收集。收集的蛋白使用 10 kDa 超滤管除去蛋白中的 GSH，最后使用 0.22 μm 的滤膜过滤。4 $^{\circ}\text{C}$ 短

期保存（如长期-80 °C保存，需要保存在 10 %的甘油中）。

如图 2 所示，经由 Co^{2+} 或 Ni^{2+} 诱导均能获得分子量约 30 kDa 的 GSTP1-MT3（图 2A）；而 1 mmol/L 的不同金属离子（金属离子可为 Cd^{2+} 、 Gd^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 等）均能够用于诱导 GSTP1-MT3 蛋白质纳米颗粒，其中 Co^{2+} 的诱导能力最强（图 2B），因此，后续还探索了 Co^{2+} 在不同浓度下表达量的高低，结果表明 Co^{2+} 最适宜的诱导浓度为 0.3 mmol/L（图 3）（无特殊说明所有的金属诱导浓度均为 0.3 mmol/L）。采用 Co^{2+} 诱导的蛋白质纳米颗粒进行功能分析；图 2D 给出了 GSTP1-MT3 蛋白质纳米颗粒在不同的 pH 条件下二级结构情况；由图 2C、图 2E-2F 可知，GSTP1-MT3 经由金属离子诱导后形成了大小分布均匀的纳米颗粒。

实施例四、GSTP1-MT3 标记 Cy5.5 荧光

以实施例 3 获得的 GST-MT3(Co^{2+})为例，将 500 μL 100 μM GST-MT3(Co^{2+})加入到 pH=9.0 的 Tris/HCl 缓冲液中，充分混匀后，向其中加入 6.7 μL 15 mM Cy5.5-NHS（Cy5.5-NHS 溶解在 DMSO 中），快速混匀，放到 25 °C 1000rpm 混匀器中反应过夜（全程避光），利用脱盐柱除去没有反应完的 Cy5.5-NHS，最后用 0.22 μm 的滤膜过滤，反应后的产物记为 GSTP1-MT3(Co^{2+})-Cy5.5，4 °C 避光保存。

实施例五、GSTP1-MT3 靶向线粒体

以 U87MG 细胞株为例，向共聚焦皿中加入 5×10^4 个 U87MG 细胞，37 °C、5 % CO_2 培养过夜，向其中加入实施例 4 制备的 GSTP1-MT3(Co^{2+})-Cy5.5（终浓度 6 $\mu\text{mol/L}$ ），然后使用 PBS 清洗三次，最后加入 Mitotracker® Green FM（终浓度 2 $\mu\text{mol/L}$ ），继续在 37°C、5 % CO_2 培养 30 分钟，最终使用 PBS 清洗 3 次，使用共聚焦成像，并使用 *Image J* 计算 Pearson's co-localization efficiency。

结果如图 4 和图 5 可知，该蛋白质纳米颗粒能够很好地定位到线粒体，其中 GSTP1 在线粒体靶向中起着关键性作用。

以 U87MG 细胞株为例，向共聚焦皿中加入 5×10^4 个 U87MG 细胞，37 °C、

5 % CO₂ 培养过夜，向其中加入实施例 3 制备的 GSTP1-MT3(Fe²⁺) 和 GSTP1-MT3(Co²⁺) (终浓度 6 μmol/L)继续培养 24 小时，然后使用 PBS 清洗三次，随后加入 10 μmol/L DCFH-DA (ROS 探针)，37 °C 孵育 30 分钟后，使用 PBS 清洗三次，最后进行共聚焦成像，并统计 ROS 的含量高低。如图 6-7 结果表明 GSTP1-MT3(Co²⁺)能够显著引起细胞内 ROS 含量的增加。

实施例六、GSTP1-MT3(Co²⁺)在肿瘤富集

以 Balb/c 小鼠的乳腺癌为例，向 Balb/c 小鼠接种 3*10⁶ 4T1(稳转 Luciferase) 乳腺癌细胞，当肿瘤生长到 150 mm³。通过尾静脉注射 100 μL 30 μmol/L GSTP1-MT3(Co²⁺)-Cy5.5，在不同时间点观察荧光的强度，然后通过腹腔注射 Luciferase 底物，观察肿瘤的共同定位情况。

结果如图 8 所示，Cy5.5 荧光能和 Luciferase 生物发光很好地重合在一起，表明 GSTP1-MT3(Co²⁺)-Cy5.5 能够很好地在肿瘤部位富集。

实施例七、GSTP1-MT3(Co²⁺)对乳腺癌的治疗

以 Balb/c 小鼠的乳腺癌为例，向 Balb/c 小鼠接种 3 × 10⁶ 4T1(稳转 Luciferase) 乳腺癌细胞，当肿瘤生长到 50-70 mm³。通过尾静脉注射 100 μL 30 μmol/L GSTP1-MT3(Co²⁺)作为实验组；通过尾静脉注射 100μL PBS 作为对照组。每两天注射一次，即在实验开始的第 3 天、第 5 天、第 7 天、第 9 天和第 11 天分别进行尾静脉注射，一共注射 5 次，在不同时间点记录小鼠的体重以及肿瘤大小。

如图 6 所示，实验组小鼠和对照组小鼠的体重相差不大，表明 GSTP1-MT3(Co²⁺)对小鼠无明显毒副作用；从肿瘤体积和重量来看，实验组小鼠和对照组小鼠的肿瘤体积差异显著 (P<0.05)，而且实验组小鼠和对照组小鼠的肿瘤重量差异显著 (p<0.05)，表明 GSTP1-MT3 蛋白质纳米颗粒能够显著抑制肿瘤生长。

同时，结果发现 GSTP1-MT3 (Co²⁺) 偶联紫杉醇以后，能够显著延长 4T1 乳腺癌小鼠的生存期 (如图 10)。GSTP1-MT3 体内抗肿瘤作用机理示意图如图 11 所示。

以上所述，仅为本发明较佳的具体实施方式，但本发明的保护范围并不局限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内，可轻易想到的变化或替换，都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此，本发明的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。

权利要求书

1、一种线粒体靶向的自组装蛋白质纳米颗粒，其特征在于：所述蛋白质纳米颗粒由蛋白质单体自组装形成，所述蛋白质单体包括由金属硫蛋白、连接肽、谷胱甘肽硫转移酶以从氨基端到羧基端的顺序依次连接组成的融合蛋白，所述连接肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO： 3 所示。

2、如权利要求 1 所述的自组装蛋白质纳米颗粒，其特征在于：所述谷胱甘肽硫转移酶为 GSTP1，所述 GSTP1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO： 1 所示；所述金属硫蛋白为 MT3，所述 MT3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO： 2 所示。

3、如权利要求 1 所述的自组装蛋白质纳米颗粒，其特征在于：所述蛋白质纳米颗粒是由金属离子诱导而形成的融合蛋白，其氨基酸序列如 SEQ ID NO： 4 所示；所述金属离子包含 Cd^{2+} 、 Gd^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 等。

4、一种线粒体靶向的自组装蛋白质纳米颗粒制备方法，其特征在于：蛋白质单体在金属离子诱导下，利用金属离子和蛋白质上的氨基和巯基配位自组装成蛋白质纳米颗粒。

5、编码权利要求 1-3 所述的蛋白质纳米颗粒中的融合蛋白的核酸，其特征在于：所述核酸的核苷酸序列如 SEQ ID NO： 5 所示。

6、包含权利要求 5 所述核酸的核酸构建体，所述构建体包括表达盒、载体。

7、含有权利要求 5 所述核酸或权利要求 6 所述核酸构建体的原核宿主细胞或真核宿主细胞。

8、权利要求 1-3 所述线粒体靶向的蛋白质纳米颗粒在癌症诊断药物或治疗药物中的用途。

9、权利要求 1-3 所述蛋白质纳米颗粒在制备肿瘤治疗药物中的用途。

10、如权利要求 8 或 9 所述的用途，其特征在于：所述蛋白质纳米颗粒能够连接活性物质，所述活性物质为诊断标记或肿瘤治疗药物，所述活性物质主要包括荧光分子、同位素、MRI 造影剂、放射物质、抗氧化以及抗癌药物等。



Linker GGGGS

MT3 MDPETPCPSGGGSCCADSCKCEGCKCTSCKKSCCSCCPAECEKCAKDCVCKGGEEAAEAEEKSCCQ

GSTP1 MPPYTVVYFPVRGRCAALRMLLADQGGQSWKEEVTVETWQEGSLKASCLYG
QLPKFQDGDLTLYQSNTILRLHLGRTLGLYGKDKQEAALVDMVNDGVEDLRCKYISLIYTNYEAGKDDYVKALPGQLKPFETLLS
QNQGGKTFIVGDQJFSADYNLLDLLLIHEVLAPGCLDAFPLLSAYVGRISARPKLKAFLASPEYVNLPIINGNGKQ

图 1

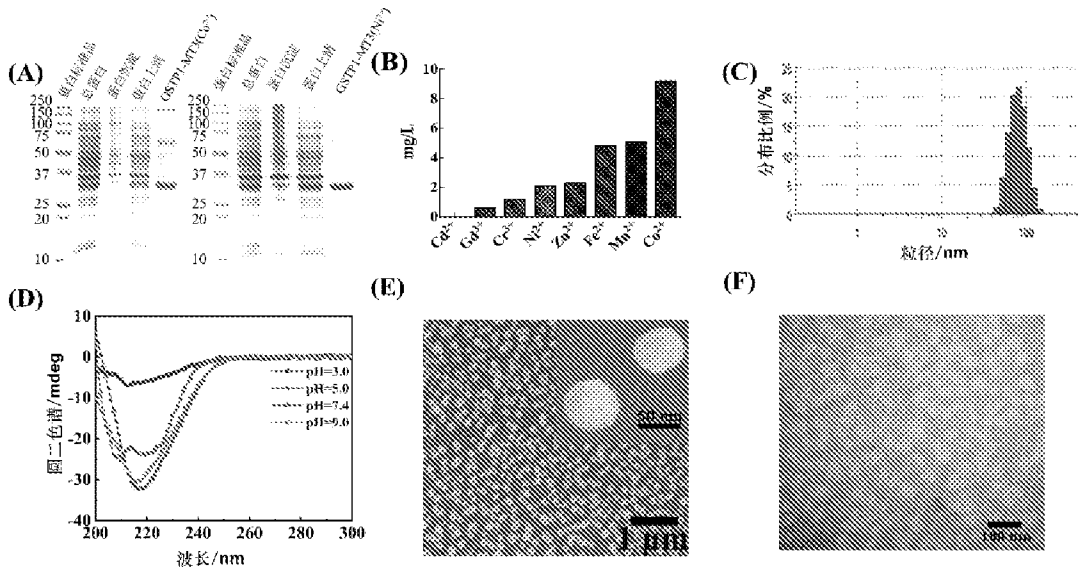


图 2

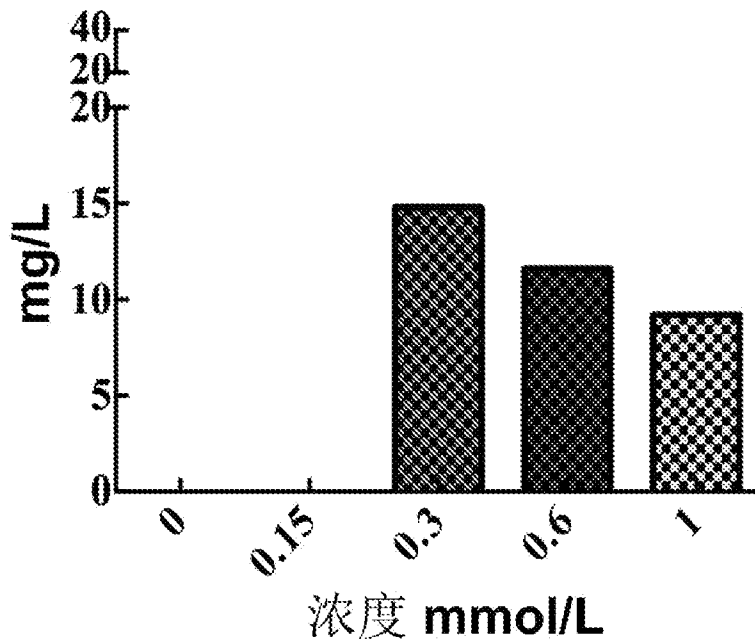


图 3

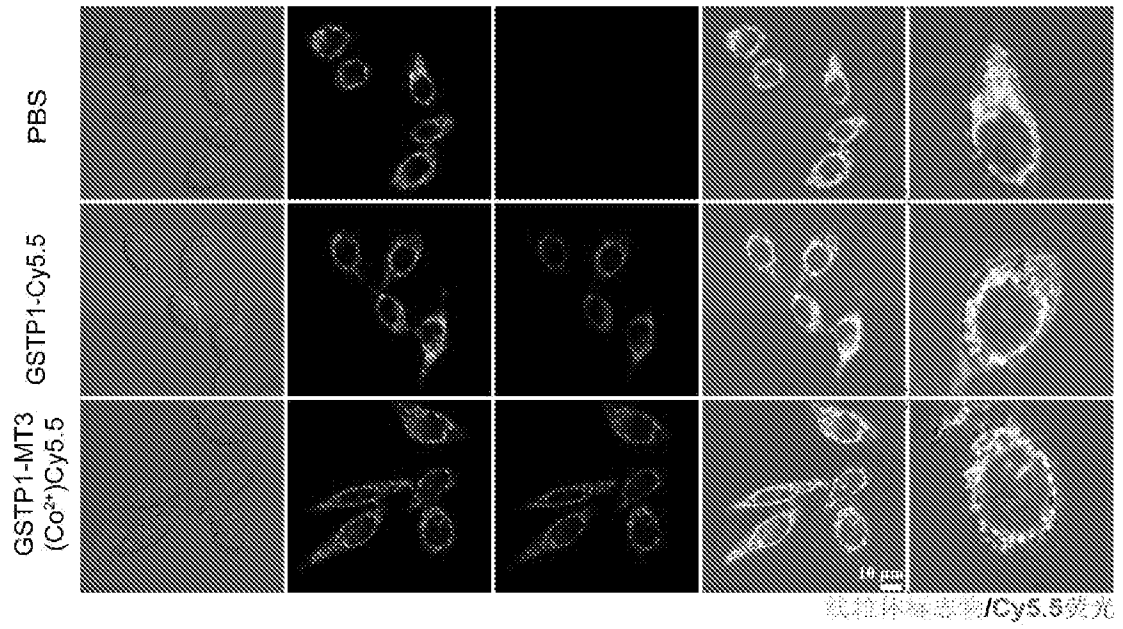


图 4

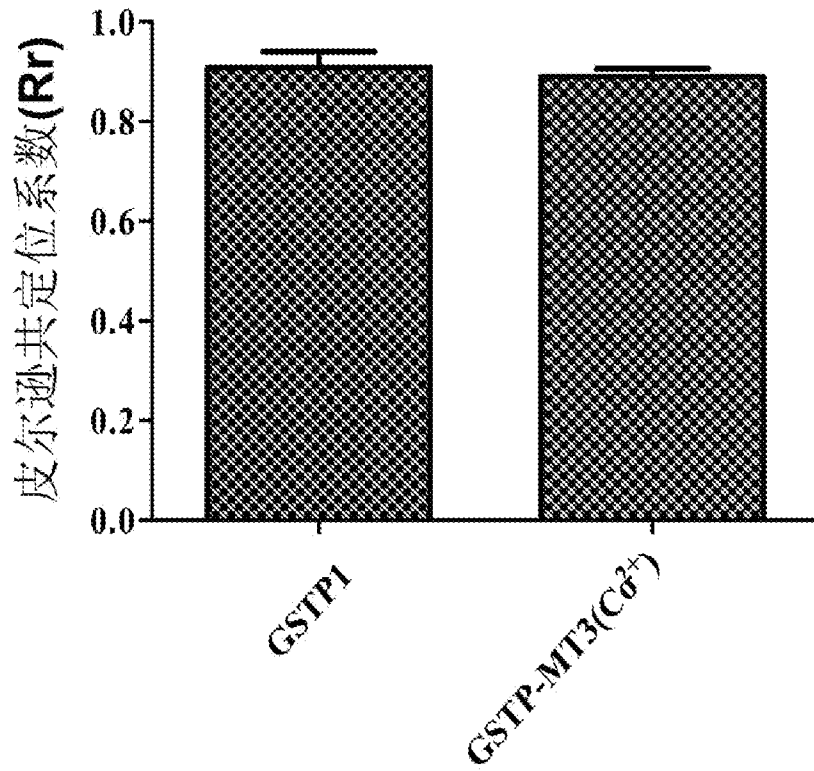


图 5

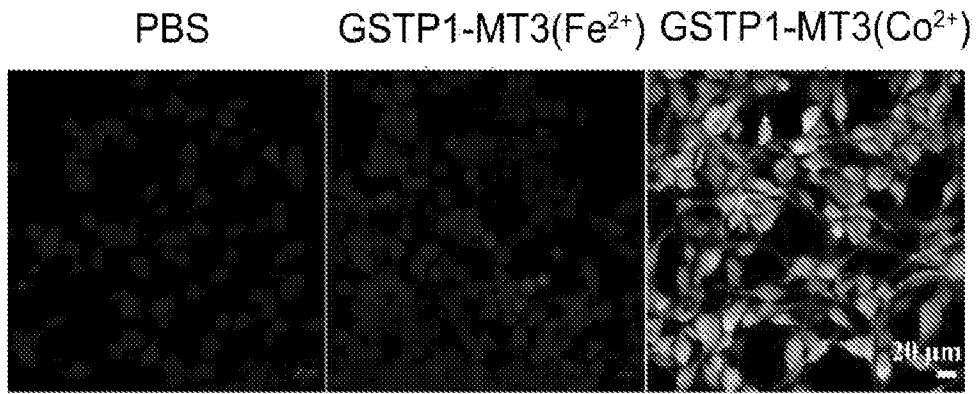


图 6

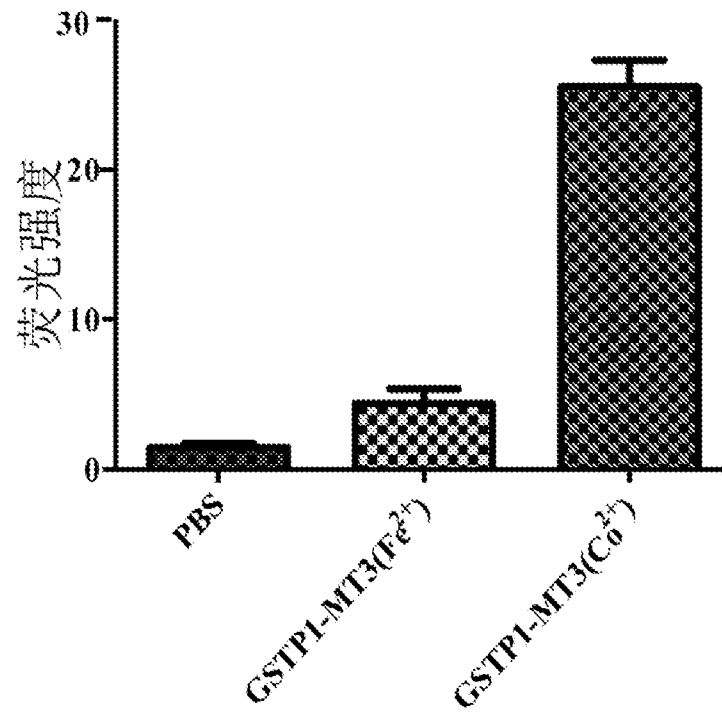


图 7

荧光素酶通道

Cy5.5荧光通路



图 8

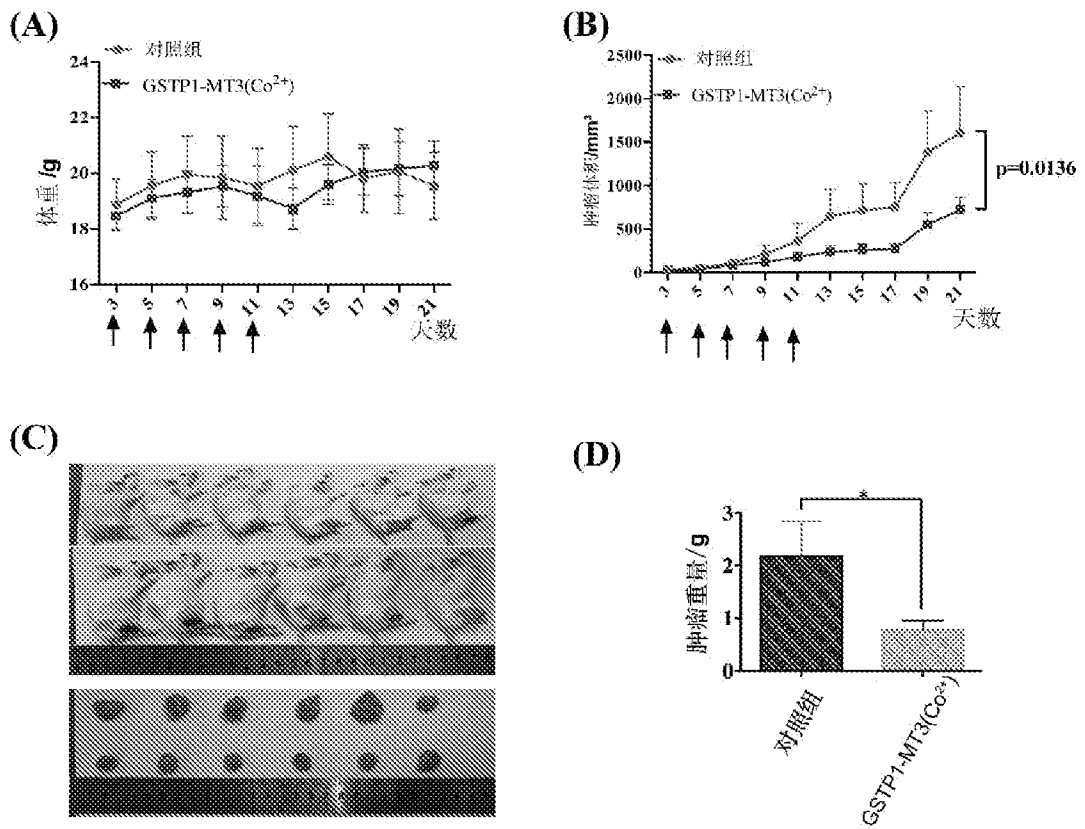


图 9

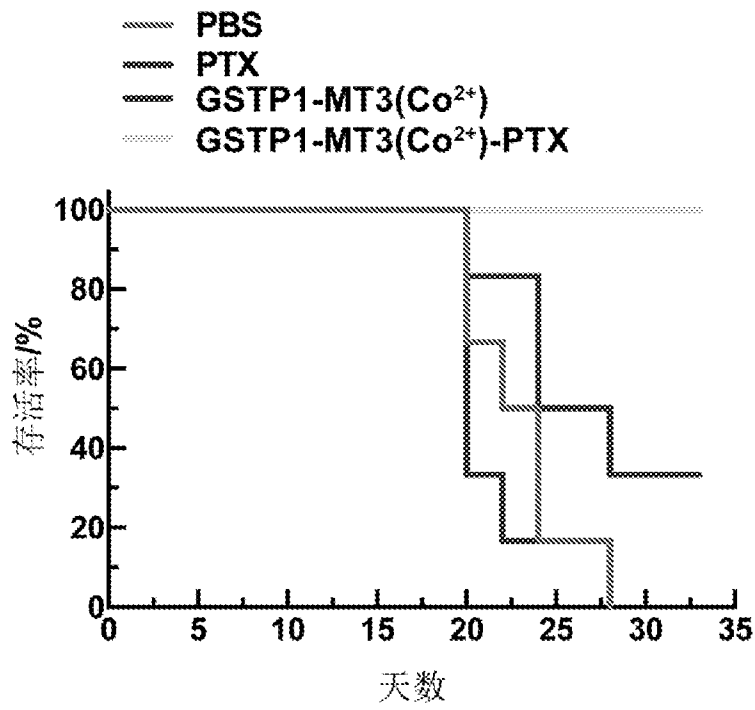


图 10

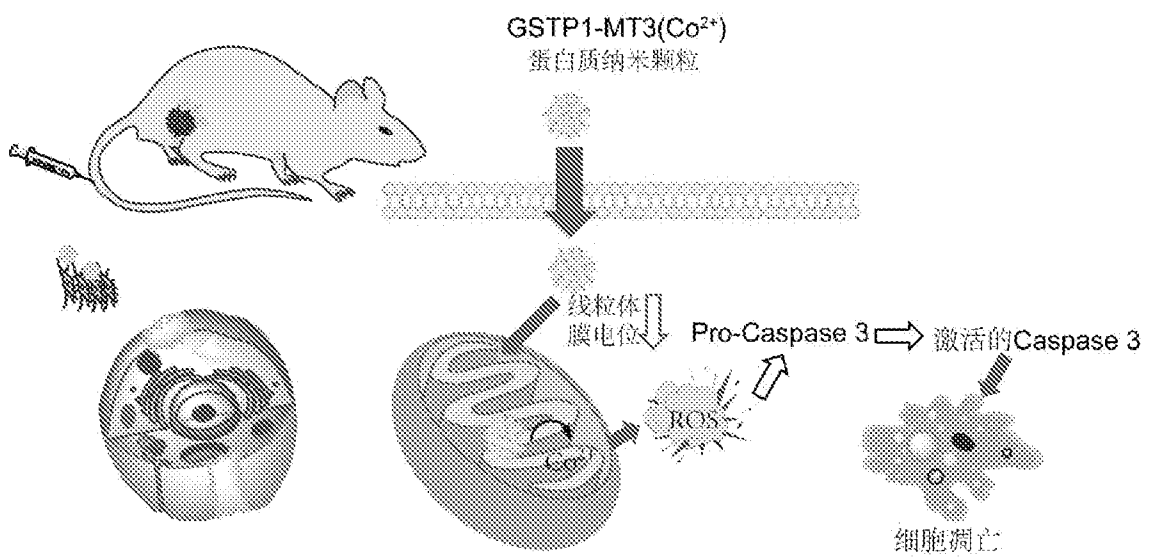


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/100706

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 47/69(2017.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; A61K 47/65(2017.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS, VEN, CNKI, CNTXT, USTXT, GOOGLE, PUBMED; 林坚, 朱新杰, 徐良, 许诺, 陈龙, 北京大学, 靶向, 线粒体, 自组装, 纳米颗粒, 谷胱甘肽硫转移酶, 金属硫蛋白, 肿瘤, 癌症, 乳腺癌, LIN JIAN, ZHU XINJIE, XU LIANG, XU NUO, CHEN LONG, NANOPARTICLE, TARGET, MITOCHONDRIA, MITOCHONDRIA-TARGETING, MITOCHONDRIA-TARGETED, CANCER, TUMOR, MAMMARY, BREAST, SELF-ASSEMBLING, SELF-ASSEMBLED, GSTP1-MT3, GSTP1, GSTPI, GSTM1, GST, MT3, GLUTATHIONE S-TRANSFERASE, MTEALLOTHIONEIN, SEQ ID NO: 3 and 4.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109529046 A (PEKING UNIVERSITY) 29 March 2019 (2019-03-29) claims 1-10	1-10
PX	Zhu, X. J. et al. "A Novel Self-Assembled Mitochondria-Targeting Protein Nanoparticle Acting as Theranostic Platform for Cancer." <i>SMALL</i> , Vol. 15, 19 November 2018 (2018-11-19), no. 1803428, pp. 1-7	1-10
A	CN 105726481 A (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 06 July 2016 (2016-07-06) claims 1-7, and description, paragraphs [0008]-[0023], [0043], and [0044]	1-10
A	WO 2015157409 A1 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 15 October 2015 (2015-10-15) entire document	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
30 October 2019		13 November 2019
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/100706

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107501245 A (ZHEJIANG UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 22 December 2017 (2017-12-22) entire document	1-10
A	CN 107158405 A (UNIVERSITY OF ELECTRONIC SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) 15 September 2017 (2017-09-15) entire document	1-10
A	CN 106317018 A (HUNAN UNIVERSITY) 11 January 2017 (2017-01-11) entire document	1-10
A	CN 106957436 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 18 July 2017 (2017-07-18) entire document	1-10
A	WO 2014124425 A1 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 14 August 2014 (2014-08-14) entire document	1-10
A	Yue, C. X. et al. "ROS-Responsive Mitochondria-Targeting Blended Nanoparticles: Chemo- and Photodynamic Synergistic Therapy for Lung Cancer with On-Demand Drug Release upon Irradiation with a Single Light Source." <i>THERANOSTICS</i> , Vol. 6, No. 13, 01 October 2016 (2016-10-01), abstract, p. 2365, left column, paragraph 1	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/100706

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: **8**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

[1] Claim 8 relates to the use of mitochondrial-targeted protein nanoparticles in cancer diagnostic drugs or therapeutic drugs. Claim 8 includes the use of mitochondrial-targeted protein nanoparticles in cancer therapeutic drugs and belongs to the method for treating the disease in the sense of PCT Rule 39.1 (iv). The present report is made based on the use of mitochondrial-targeted protein nanoparticles in the preparation of drugs for cancer treatment.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/100706

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109529046	A	29 March 2019	None			
CN	105726481	A	06 July 2016	None			
WO	2015157409	A1	15 October 2015	US	2018066004	A9	08 March 2018
				JP	2017516755	A	22 June 2017
				EP	3129017	A4	08 November 2017
				US	2017037071	A1	09 February 2017
				EP	3129017	A1	15 February 2017
CN	107501245	A	22 December 2017	None			
CN	107158405	A	15 September 2017	None			
CN	106317018	A	11 January 2017	CN	106317018	B	02 November 2018
CN	106957436	A	18 July 2017	CN	104758952	B	29 August 2017
				CN	104758952	A	08 July 2015
WO	2014124425	A1	14 August 2014	US	2015374714	A1	31 December 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/100706

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 47/69(2017.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; A61K 47/65(2017.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, VEN, CNKI, CNTXT, USTXT, GOOGLE, PUBMED, 林坚, 朱新杰, 徐良, 许诺, 陈龙, 北京大学, 靶向, 线粒体, 自组装, 纳米颗粒, 谷胱甘肽硫转移酶, 金属硫蛋白, 肿瘤, 癌症, 乳腺癌, LIN JIAN, ZHU XINJIE, XU LIANG, XU NUO, CHEN LONG, NANOPARTICLE, TARGET, MITOCHONDRIA, MITOCHONDRIA-TARGETING, MITOCHONDRIA-TARGETED, CANCER, TUMOR, MAMMARY, BREAST, SELF-ASSEMBLING, SELF-ASSEMBLED, GSTP1-MT3, GSTP1, GSTP1, GSTM1, GST, MT3, GLUTATHIONE S-TRANSFERASE, MTEALLOTHIONEIN, SEQ ID NO:3-4.</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 109529046 A (北京大学) 2019年 3月 29日 (2019 - 03 - 29) 权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>Zhu, X. J. 等. "A Novel Self-Assembled Mitochondria-Targeting Protein Nanoparticle Acting as Theranostic Platform for Cancer." SMALL, 第15卷, 2018年 11月 19日 (2018 - 11 - 19), 第1803428号1-7页</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105726481 A (中国科学院大连化学物理研究所) 2016年 7月 6日 (2016 - 07 - 06) 权利要求1-7, 说明书[0008]-[0023]、[0043-0044]段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2015157409 A1 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 2015年 10月 15日 (2015 - 10 - 15) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107501245 A (浙江工业大学) 2017年 12月 22日 (2017 - 12 - 22) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 109529046 A (北京大学) 2019年 3月 29日 (2019 - 03 - 29) 权利要求1-10	1-10	PX	Zhu, X. J. 等. "A Novel Self-Assembled Mitochondria-Targeting Protein Nanoparticle Acting as Theranostic Platform for Cancer." SMALL, 第15卷, 2018年 11月 19日 (2018 - 11 - 19), 第1803428号1-7页	1-10	A	CN 105726481 A (中国科学院大连化学物理研究所) 2016年 7月 6日 (2016 - 07 - 06) 权利要求1-7, 说明书[0008]-[0023]、[0043-0044]段	1-10	A	WO 2015157409 A1 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 2015年 10月 15日 (2015 - 10 - 15) 全文	1-10	A	CN 107501245 A (浙江工业大学) 2017年 12月 22日 (2017 - 12 - 22) 全文	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 109529046 A (北京大学) 2019年 3月 29日 (2019 - 03 - 29) 权利要求1-10	1-10																		
PX	Zhu, X. J. 等. "A Novel Self-Assembled Mitochondria-Targeting Protein Nanoparticle Acting as Theranostic Platform for Cancer." SMALL, 第15卷, 2018年 11月 19日 (2018 - 11 - 19), 第1803428号1-7页	1-10																		
A	CN 105726481 A (中国科学院大连化学物理研究所) 2016年 7月 6日 (2016 - 07 - 06) 权利要求1-7, 说明书[0008]-[0023]、[0043-0044]段	1-10																		
A	WO 2015157409 A1 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 2015年 10月 15日 (2015 - 10 - 15) 全文	1-10																		
A	CN 107501245 A (浙江工业大学) 2017年 12月 22日 (2017 - 12 - 22) 全文	1-10																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2019年 10月 30日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2019年 11月 13日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>彭海航</p> <p>电话号码 86-(010)-53961949</p>																		

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 107158405 A (电子科技大学) 2017年 9月 15日 (2017 - 09 - 15) 全文	1-10
A	CN 106317018 A (湖南大学) 2017年 1月 11日 (2017 - 01 - 11) 全文	1-10
A	CN 106957436 A (中国药科大学) 2017年 7月 18日 (2017 - 07 - 18) 全文	1-10
A	WO 2014124425 A1 (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 2014年 8月 14日 (2014 - 08 - 14) 全文	1-10
A	Yue, C. X. 等. "ROS-Responsive Mitochondria-Targeting Blended Nanoparticles: Chemo- and Photodynamic Synergistic Therapy for Lung Cancer with On-Demand Drug Release upon Irradiation with a Single Light Source." THERANOSTICS, 第6卷, 第13期, 2016年 10月 1日 (2016 - 10 - 01), 摘要, 第2365页左栏第1段	1-10

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. 权利要求： 8
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
[1] 权利要求8涉及线粒体靶向的蛋白质纳米颗粒在癌症诊断药物或治疗药物中的用途，该权利要求包含了线粒体靶向的蛋白质纳米颗粒在癌症治疗药物中的用途，属于PCT细则39.1(iv)规定的疾病的治疗方法，本报告基于线粒体靶向的蛋白质纳米颗粒在制备癌症治疗药物中的用途作出。

3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/100706

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109529046	A	2019年 3月 29日	无			
CN	105726481	A	2016年 7月 6日	无			
WO	2015157409	A1	2015年 10月 15日	US	2018066004	A9	2018年 3月 8日
				JP	2017516755	A	2017年 6月 22日
				EP	3129017	A4	2017年 11月 8日
				US	2017037071	A1	2017年 2月 9日
				EP	3129017	A1	2017年 2月 15日
CN	107501245	A	2017年 12月 22日	无			
CN	107158405	A	2017年 9月 15日	无			
CN	106317018	A	2017年 1月 11日	CN	106317018	B	2018年 11月 2日
CN	106957436	A	2017年 7月 18日	CN	104758952	B	2017年 8月 29日
				CN	104758952	A	2015年 7月 8日
WO	2014124425	A1	2014年 8月 14日	US	2015374714	A1	2015年 12月 31日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)