

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C12N 15/87

[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 14/035 C12N 15/86

C12N 5/10 C12N 1/21

[21] 申请号 96195845.6

[43]公开日 1999年2月17日

[11]公开号 CN 1208438A

[22]申请日 96.7.25 [21]申请号 96195845.6

[30]优先权

[32]95.7.28 [33]GB [31]9515568.5

[32]96.1.26 [33]GB [31]9601570.6

[86]国际申请 PCT/GB96/01831 96.7.25

[87]国际公布 WO97/05265 英 97.2.13

[85]进入国家阶段日期 98.1.24

[71]申请人 玛丽·柯里癌症治疗中心

地址 英国伦敦

[72]发明人 P·F·J·奥黑尔

G·D·埃利奥特

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 郭建新

权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图页数 8 页

[54]发明名称 转运蛋白及其应用

[57]摘要

本发明涉及转运蛋白,具体涉及 VP22 及其同源物,并涉及递送这些蛋白质 和任何结合的分子至靶细胞群的方法。该转运蛋白可应用于基因治疗和引导试剂至需要高效导向的细胞的方法。



(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. VP22 或者其活性部分、片段或同源物作为能被靶细胞群摄取的转运蛋白的应用。

2. 权利要求 1 的应用, 其中转运蛋白至少包括 VP22 的 C 端 34 个氨基酸。

3. 权利要求 1 或权利要求 2 的应用, 其中转运蛋白与一个或多个需要转运至靶细胞群的其它分子结合。

4. 权利要求 3 的应用, 其中的一个或多个相关分子是非肽基分子。

5. 前述权利要求任一项的应用, 其中的蛋白质还能从表达它的靶细胞群的第一部分输出, 并被不直接产生该蛋白质的靶细胞群的第二部分摄取。

6. 转运蛋白质, 它包括 VP22 或者其活性部分、片段或同源物, 该蛋白质结合需要转运至靶细胞群的一个或多个其它分子。

7. 权利要求 6 的转运蛋白, 其中的一个或多个相关分子是非肽基分子。

8. 权利要求 6 或权利要求 7 的转运蛋白, 其中的蛋白质还能从表达它的靶细胞群的第一部分输出, 并被不直接产生该蛋白质的靶细胞群的第二部分摄取。

9. 核酸, 它编码权利要求 6、7 和 8 中任一项的转运蛋白。

10. 表达载体, 它包括权利要求 9 的核酸。

11. 哺乳动物或微生物宿主细胞, 它包括权利要求 10 的载体或权利要求 9 的核酸。

12. 转运所需蛋白质或肽至靶细胞群的方法, 该方法包括:

i) 将权利要求 9 或权利要求 10 的核酸或载体引入靶细胞群的第一部分;

ii) 表达该核酸而产生蛋白质, 随后从细胞中输出该转运蛋白, 连同与之结合的其它任何蛋白质, 而被不直接产生该蛋白质的靶细胞

群的第二部分摄取。

13. 权利要求 12 的方法, 其中通过重组病毒将核酸引入靶细胞群的第一部分。

14. 权利要求 12 的方法, 其中通过转染将核酸引入靶细胞群的第一部分。

15. 权利要求 12 的方法, 其中通过显微注射将核酸引入靶细胞群的第一部分。

16. 将所需分子转运至细胞群的方法, 该方法包括:

i) 将所需分子与包括 VP22 或其活性部分、片段或同源物的转运蛋白偶联而形成复合物; 和,

ii) 使细胞与该复合物接触使细胞能摄取该复合物。

17. 权利要求 16 的方法, 其中所需的分子是非肽基分子。

18. 权利要求 16 或权利要求 17 的方法, 其中通过掺入脂质基载体而将所需分子与转运蛋白偶联。

说 明 书

转运蛋白及其应用

本发明涉及转运蛋白,具体涉及基于 VP22 的转运蛋白、VP22 的同源物或其片段,还涉及包括转运蛋白的分子和组合物,并涉及高效递送这类蛋白质和任何结合的分子至靶细胞群的方法。

1 型单纯疱疹病毒(HSV-1)UL49 基因的产物,结构蛋白 VP22(4),是 HSV 壳的主要成分,处于病毒壳体外和包膜内的毒粒的区室,由至少 10 个或更多个病毒多肽构成(参见综述(6))。VP22 的分子量为 32k,具有较强的碱性,并通过感染细胞内的磷酸化和核苷酸化(1、4、8、9、11)而被修饰。

尽管和已被完全鉴定的转录调节蛋白 VP16 一起是毒粒内主要壳蛋白之一,但对于 VP22 在病毒复制循环中的作用知道得很少。尚不知它是否是必需的病毒蛋白,但在类似于 VP16 的方式中,VP22 有可能在感染期间起两个作用—首先在病毒基因表达中作为功能蛋白,其次在病毒装配中作为毒粒的结构成分。至于前者,一些迹象表明 VP22 能与 HSV-1 DNA 专一性地结合(2、8、10)。

我们最近阐述了 VP16 和 VP22 之间存在稳定的和专一性的相互作用,它与装配和转录激活中 VP16 的作用机制有联系。在那些研究中,我们发现当 VP22 自身在细胞中时,它具有独特的行为模式。在本文所述的工作中,我们扩展了这些研究以详细探讨细胞的定位作用,业已发现 VP22 表现出极为独特的性能,因为它从最初表达它、而且它在其中表现胞质定位作用的细胞有效地转运至单细胞层内的毗邻细胞,它在毗邻细胞中被摄取入细胞核。我们试验过的一些蛋白质中的其它任何蛋白质例如 VP16 均未观测到这种行为模式;而且据我们所知,这些性能和活性是前所未有的。

当将 VP22 或 VP16 引入单细胞层大约 30 小时之后观测到 VP22 的这种意外的性能,虽然平均而言可在约 2-5% 的细胞内检

测到 VP16(是这种试验中常见的),但 VP22 几乎可在单细胞层的每个细胞中被检测到。我们还发现 VP22 胞间转运的专一性,并业已证实了在该蛋白质的 C 端含有决定子。这是由于,缺失 C 端 34 个氨基酸的变体虽然在初始表达细胞内的胞质定位中被表达,但未被转运至毗邻的细胞。

蛋白质分泌或外排通常是通过专一途径发生的,要求已被完全鉴定的信号序列,分选入输出途径中包括的区室和小泡,可参见综述(12)。VP22 没有惯常的任意信号序列,而且它的转运途径和机制相当独特,从未被鉴定过。对于 VP22 中需要的决定子和细胞内生理需要的进一步研究应有助于阐明所涉及的途径。因此,VP22 或者更具体地指 VP22 转运中涉及的决定子,可被转移到其它蛋白质,以能在靶细胞群内转运和有效表达或摄取。可容易地设想该性质的广泛效用和应用。

因此,本发明基于上述发现,即有可能将编码转运蛋白的核酸引入靶细胞群的第一部分,和任选地用编码与转运蛋白结合的蛋白质(例如融合配偶体)的核酸,来表达核酸,任选地从组织专一性启动子产生蛋白质;然后该转运蛋白连同相关任意蛋白质从细胞中输出,而被不直接产生蛋白质的靶细胞群的第二部分摄取。通常发现该蛋白质被靶细胞群的第二部分高效地摄取,并倾向于定位在靶细胞群的第二部分的核内。于是,将初始引入作用和后续的转运结合可使转运蛋白和任何相关蛋白质被高效递送至靶细胞群。

因此,本发明的一方面在于提供这种蛋白质:它可从表达它的细胞内输出,并能被其它细胞例如不直接产生该蛋白质的细胞摄取。该转运蛋白优选与需要递送至靶细胞群的一种或多种其它蛋白质结合。

进一步的实验证实,当 VP22 作为提取物被加入胞外介质时它就被输入细胞。这说明,要发生观测到的胞间转运,无需在至少部分细胞群中表达 VP22。

在另一方面,VP22 转运蛋白例如可通过共价键与相关分子偶联,或与相关分子结合,并以该形式应用;这与应用表达载体产生蛋

白质和/或相关分子恰好相反。具体地说,这可使非肽基分子如核酸、药物或标志物(蛋白质除外或作为蛋白质的替代物)与转运蛋白结合并被细胞群摄取,而无需在至少部分细胞群内表达 VP22 及相关分子,其中需要将 VP22 和/或相关分子递送至这些细胞群。

在一个优选的实施方案中,本发明提供如下转运蛋白:

(i)VP22 或其活性部分;

(ii)VP22 的片段或同源物,包括提供转运性能的一种或多种决定子;或者,

(iii)得自 VP22 的 C 端 34 个氨基酸的片段;

该转运蛋白任选与需要转运至靶细胞群的一个或多个其它分子结合。

在本发明中,“活性部分”表示比全长 VP22 短的肽,但它保留被产生它的细胞分泌和被其它分子摄取的性能。

本发明的进一步方面是提供包括一种或多种上述转运蛋白的组合物,该蛋白质任选与需要递送至细胞群的一个或多个分子结合。

本发明的又一方面在于提供将所需分子转运入细胞群的方法,是通过将细胞暴露于所需分子和上述转运蛋白而实施的。

因此在该方面,本发明提供的方法避免初始需要用编码转运蛋白和任选所需分子的核酸转染细胞群。这样,也可以转运非肽基、不能在细胞内表达分子,因为可将所需分子和转运蛋白加入细胞周围的介质中。

在一些实施方案中,可使所需分子与转运蛋白共价偶联,并将这些实体暴露于靶细胞群。也可将所需分子与转运蛋白非共价键结合,例如利用脂质基载体掺合如核酸的所需分子和转运蛋白。

因此在另一方面,本发明提供制备含有待转运至靶细胞群的所需分子的组合物的方法,该方法包括共价键或非共价键地结合所需分子与转运蛋白。

本发明的进一步方面在于,提供编码转运蛋白和(任选)相关分子的核酸。例如,在其中转运蛋白作为融合构建物表达的实施方案中,提供的核酸编码转运蛋白及其融合配偶体。

本发明的进一步方面在于提供这种表达载体：它结合编码转运蛋白或其活性部分或其片段的核酸，和任选的编码相关分子的核酸。

本发明的进一步方面在于提供用上述表达载体转染的宿主细胞。

本发明的进一步方面在于提供转运所需蛋白质或肽至靶细胞群的方法，该方法包括：

(i)用编码转运蛋白的核酸并任选地用编码与转运蛋白结合的蛋白质的核酸转染、感染或其它方式引入靶细胞群的第一部分；

(ii)表达该核酸而产生蛋白质，随后从细胞输出该转运蛋白，连同与之结合的其它任何蛋白质，由不直接产生该蛋白质的靶细胞群的第二部分摄取。

应懂得，可通过用重组病毒感染而实现靶细胞群第一部分的转染。

本发明的进一步方面在于提供将所需分子转运入细胞群的方法，该方法包括：

(i)将所需分子与转运蛋白偶联形成复合体；和

(ii)使细胞暴露于复合体中使细胞摄取该复合体。

在该方法中，将可以是非肽基的所需分子例如通过共价作用或掺合作用与转运蛋白结合。

本发明的进一步方面在于提供上述转运蛋白和载体以用于转运分子的方法中。其中的方法指研究方法和治疗方法。本发明特别适用于引导试剂至需要高效导向的细胞群的方法中，例如在基因治疗方法中；癌的治疗，例如可通过递送肿瘤抑制剂至细胞。

对图的简要描述

图1示出表达VP22的COS-1细胞的免疫荧光。用VP22表达载体转染生长于盖玻片上的COS-1细胞。转染40小时后，细胞于室温下100%甲醇中被固定15分钟，并与抗VP22单克隆抗体P43培养，接着与FITC-缀合次级抗体培养。然后用共焦显微镜检术(confocal microscopy)分析这些细胞。(a)VP22表达细胞显示的典型核定位。(b)存在于约5-10%表达细胞中VP22表达的胞质模

式。(c)当表达量增加时观测到的 VP22 定位模式。(d)VP22 表达导致蛋白质被定位于单细胞层内每个细胞中。

图 2 示出 VP22 在 Vero 细胞中的转运。按对图 1 那样进行转染和检测,只是该实验是在 Vero 细胞中进行的。该画面示出处于中心细胞胞质内 VP22 的焦点和在周围细胞中(它被定位于细胞核内)呈密度梯度。

图 3 示出 VP22 表达的转染时间过程,表明 VP22 在细胞之间被转运。COS-1 细胞被转染并在转染后 14、20、26 和 38 小时被固定。示出的共焦图像表示在 20hr 时间点时放大 20 倍(a 栏)和 38hr 时放大 100 倍(b 栏)。

图 4 示出 VP22 的蛋白质编码序列,它是 HSV-1 UL49 基因的产物,该显示 $\Delta 267$ 突变体的截断点;

图 5(a)和(b)示出当含全长 VP22 和 $\Delta 267$ VP22 的提取物被加入胞外介质后进行的免疫荧光分析结果;和

图 5(c)示出全长 VP22 和 $\Delta 267$ VP22 细胞提取物的蛋白质印迹;

图 6 示出应用于介质时 VP22 或其修饰物的输入。

图 7a 示出用 β -gal 的抗体染色后一个显微注射细胞的视野的典型图。

图 7b 示出细胞的相同视野,其中 VP22 不但可见于显微注射的细胞中,而且可见于周围许多细胞中。

图 8a 示出由 T-抗原阳性 COS 细胞标记的混合细胞的典型视野。T-抗原抗体未检测到周围的 BHK 细胞;

图 8b 示出 VP22 阳性细胞,即见到中央 COS 细胞加上周围的非转染 BHK 细胞;

图 9a 示出:将表达全长 VP22 的 COS-1 细胞对于 VP22 和 DNA 进行染色,并分析有丝分裂不同阶段的细胞。为染色 DNA,将碘化丙锭(propidium iodide)加到甘油固定物上,最终浓度为 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 。示出代表前期、前中期和后期的细胞。

图 9b 示出与末端标记的 40bp 寡核苷酸(T24)一起培养的增加

量的 GST 和 GST-VP22 融合蛋白;采用凝胶移位分析法分析所得复合体。将 VP22 专一性复合体标记为 1~3;和

图 10 示出用 HSV-1[gH-ve]感染的 Vero 细胞。a 表示对 β -半乳糖苷酶染色而感染 24 小时后的视野。b 示出对 VP22 染色后的相同视野。c 示出对 β -半乳糖苷酶染色而感染 66 小时后的视野。d 示出对 VP22 染色后的相同视野。

原料和方法

细胞和病毒。

HeLa(人上皮癌细胞), COS-1 细胞(由 SV40 T-抗原转化的猴肾成纤维细胞), Vero 细胞(猴肾成纤维细胞)和 BHK(幼仓鼠细胞)均生长于含 10% 新生小牛血清的 Dulbecco 改进的极限必需介质中。

质粒。

受 hCMV IE 启动子控制的真核表达载体 pGE 109 含 VP22 开放读框, 以前曾被描述过(4)。简言之, 该表达构建物是这样制备的: 利用聚合酶链反应, 以含 Bg III 或 BamHI 限制酶切位点的接头扩增 VP22 开放读框, 以便于后续在 hCMV 增强子/启动子区控制下引入载体。

抗体。

这些实验用到抗 VP16 单克隆抗体 LP1 和抗 VP22 单克隆抗体 p43。p43 抗体是通过单纯疱疹病毒的毒粒蛋白制剂对小鼠免疫接种而产生的。对 VP22 有反应活性的多克隆抗体(AGV30)是通过用由与 VP22 开放读框连接的谷胱甘肽 S-转移酶构成的融合蛋白对兔子免疫接种而产生的。该融合蛋白是这样生成的: 通过得自 pGE109 的 Bgl II - BamHI 片段符合读框插入可商购的(Pharmacia)细菌表达载体 pGEX2T 的 BamHI 位点而产生载体 pGST-VP22。往对数期培养物中加入 IPTG(0.1mM)而引入含 pGST-VP22 的大肠杆菌(E. coli)株 HB101, 再过 3 小时后收集细胞。沉淀后, 使细胞重悬浮于含 0.5% NP-40 的磷酸盐缓冲盐水, 用 Branson Ultra-

sonic 细胞匀浆器进行超声处理,接着于 4℃ 下在 12000rpm 时离心净化 20 分钟。然后通过谷胱甘肽琼脂糖凝胶珠(Pharmacia)上亲和层析,在 PBS 0.5% NP40 中洗涤未结合的蛋白质,再用含 5mM 谷胱甘肽的 10mM Tris-Hcl 缓冲液(pH8.0)洗脱来纯化 GST-VP22 融合蛋白。对 3 只兔子中的每只每隔 4 周注射一次(每次约 50 μ g)该融合蛋白的佐剂溶液,并于总计 17 周后采集血清。

SDS-PAGE 和蛋白质印迹。

通过用双丙烯酰胺交联的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质。干燥含放射性标记的样品的凝胶并暴露于 X 光片。用于蛋白质印迹分析的凝胶被转至硝酸纤维素滤器与合适的抗体反应。应用辣根过氧化物酶连接的次级偶联物,以 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸二水合物(DAB)或以增强的化学荧光显影可见到活性带。

转染和免疫荧光。

转染前那天将细胞置于 6 孔盘(6x35mm),每孔配有一个盖玻片,密度为每孔 2×10^5 个细胞。用 pUC19 DNA 将 500ng 表达质粒配成 2 μ g 而进行 DNA 转染,利用磷酸钙沉淀法,其中以 BES[N,N-二(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸]缓冲盐水代替以前描述的 HEPES 缓冲盐水作出修改(3,5)。转染 40 小时后于室温下在 100% 甲醇中固定细胞达 15 分钟,然后用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。转染时,将盖玻片上的细胞在室温下与 PBS/10% 小牛血清培养 15 分钟而封阻细胞。往此同一溶液(p43 在 1:100 的稀释度下)中加入初级抗体并于室温下培养 20 分钟。用 PBS 充分洗涤后,将次级抗体(FITC 偶联的抗小鼠 IgM 和/或 Texas Red(德克萨斯红)偶联的抗兔 IgG)加入 PBS/10% 小牛血清并培养 10 分钟。再用 PBS 充分洗涤,然后使盖玻片在甘油中固定,应用 Biorad MRC600 共焦显微镜在双通道中检验。利用普通光学显微镜拍下相差照片。

结果

VP22 定位于两个不同的模式中。

是这样研究 VP22 的细胞定位的:先应用抗 VP22 单克隆 P43 进行 VP22 表达细胞的免疫荧光分析,接着通过共焦显微镜检术分

析。依上述方法转染 COS 细胞,然后使细胞在甲醇中固定 30~40 小时并加工处理以检测 VP22。初始结果表明,在大部分含 VP22 的细胞中,蛋白质存在于独特的核模式中,往往表现出在核边缘富集。图 1a 表示 VP22 的核模式的典型实例。但在一些细胞中,VP22 呈完全不同的胞质的纤维状模式(图 1b)。此时,检测到的蛋白质在胞质内呈网络状或笼形模式并被排除在细胞核外。这种分布不均一性虽然其自身并非异常,但对于本研究的其它 HSV 壳蛋白(VP16)未观察到该不均一性,它呈现的模式因细胞不同而略有不同,主要包括扩散胞质模式,少量存在于细胞核内。

进一步研究表明,VP22 的胞质分布与核分布相互间不是无规的,即含胞质 VP22 的中心细胞周围被含核 VP22 的细胞晕圈环绕,后者细胞区中明显地富含该蛋白质,这些细胞毗邻含胞质 VP22 的中心细胞(图 1c)。最后,单细胞层区(其中每个细胞中可检测到 VP22)也呈现这种分布,在少量细胞中观察到胞质模式,在周围细胞中观察到核模式(图 1d)。

最初是在 COS 细胞内进行这些实验的,它依靠 SV40T—抗原复制本文所用的 VP22 表达质粒。尽管我们对于相同载体表达的其它蛋白质(例如前述 VP16)未检测到这种分布,但我们希望排除这种可能性即 VP22 分布模式与 COS 细胞的应用有关。于是用 Vero 细胞和 HeLa 细胞进行了同样实验,并得出完全相同的结果。图 2 示出 VP22 在 Vero 细胞中的表达呈上述模式,其中含胞质 VP22 的中心细胞周围被含核 VP22 的细胞环绕。此时,可见 VP22 呈递降的密度梯度,从中心细胞至毗邻细胞具有稠密的核 VP22,而相距更远的细胞核 VP22 密度更小。

这些意外结果指出,VP22 从最初在其中合成并呈胞质形式的细胞中被转运至毗邻细胞,也被转运至再一次转移的细胞,其中它定位于细胞核。为了阐述 VP22 在细胞间的移动,研究了转染的时间过程。转染 14 小时后,可以在各个细胞中检测到 VP22 表达。在 20 小时,可见到含 VP22 的细胞灶,其中含稠密的 VP22 的中心细胞周围环绕数个含更低密度的 VP22 的细胞(图 3a,较低的放大倍数以利

于看清点的分布),而 38 小时后实际上每个细胞中都含该蛋白质(图 3b)。

作为 VP22 在细胞间被转运的另一个证据,用 VP22 表达载体,和 pRG50(一种 VP16 表达载体)转染独立的两皿 COS-1 细胞。24 小时后,每皿细胞用胰蛋白酶消化,再将两组细胞群混合后固定于盖玻片上。24 小时后,可能检测 VP16 表达细胞,其细胞核内也含有 VP22,这表明从未暴露于 VP22 表达载体的细胞已摄取 VP22 蛋白。

胞间转运需要 VP22 内的 C 端决定子。

为开始鉴定 VP22 内的需要,我们测试了含短链(3-4 个氨基酸)的符合读框的插入物的一组变体和缺残基 267 至该蛋白末端(残基 301)的缺失突变体。插入突变体在位置 60、159、192 和 267 上含插入物。在插入突变体 Ins60、Ins159 或 Ins267 中,任何一个都不影响 VP22 定位的模式或者其进行胞间转运的能力(数据未显示,均与野生型相同)。然而在位置 192 上的插入具有显著影响。该突变体表现的分布模式类似于从野生型见到的胞质分布;于是,未观测到毗邻细胞中的核染色,总体观测到更少的阳性细胞,而且在 VP22 阳性细胞中模式全是胞质的(图 3c)。

对于缺乏 C 端 34 个残基 267-301 的缺失突变体观测到完全相同的表型(图 3d)。应注意在位置 267 上的插入突变体是正常的。分布模式显示全为胞质 VP22 和 267-301 缺失突变体和插入突变体 192 没有转运至周围细胞,这并非由于无效合成。当用蛋白质印迹比较总的合成时,观测到相似量的 w/t 和突变型蛋白质。

为开始提出这种可能性,即胞间转运性能可用于转运其它肽或蛋白质,我们测试了 VP22 的一种变体(VP22ep)是否也能被转运,该变体在其 C 端末端含 12 个残基延伸(它含有单克隆抗体识别位点)。结果表明,该延伸蛋白被有效地转运。事实上,阐述 Vero 细胞中转运的图 3b 用到该 C 端延伸变体。如上所述,含中心胞质 VP22ep 的细胞灶周围环绕含核 VP22ep 的细胞,而且,至于 w/t 蛋白质,其实可在单细胞层的每个细胞中检测到 VP22 的表达。此外,被检测到的蛋白质就是融合蛋白,而不是某些偶然的缺失产物,因为

它可用抗 VP22 抗体 p43 或 C 端肽延伸的抗体检测。这一重要结果表明,确实可以通过将肽或蛋白质与合适的转运蛋白如 VP22 连接而促使它们递送至细胞。

本领域技术人员可以惯常地应用这些或者其它定点诱变方法来定位或精修对于转运性能至关重要和/或重要的 VP22 中决定子,因而能够应用 VP22 片段而不是全长蛋白质。

从介质摄取 VP22。

虽然在细胞表面易于检测 VP22,但我们还不能检测已转染细胞的介质中的 VP22。然而为检验 VP22 被从胞外介质输入的能力,将从 VP22 表达细胞制备的可溶性提取物加入未转染细胞介质。VP22 被高效和迅速地输入并定位于细胞核(见图 5(a)),加入介质后 5 分钟内被摄取(可解释我们未能在介质中检测它)。摄取机理不受 4°C 下培养作用的影响,说明不是通过正常的胞吞作用内在化。在对照实验中,对于所试验的其它任何蛋白质均未观测到从介质摄取。

将含全长(WT)或者截短($\Delta 267$)VP22 的可溶性提取物加入覆盖盖玻片上生长的 COS-1 细胞的介质,1 小时后固定细胞。还通过 SDS-PAGE 和蛋白质印迹法分析等量的提取物。

为制备可溶性提取物,用全长或 $\Delta 267$ VP22 表达载体转染一百万个 COS-1 细胞,16 小时后收集细胞,将提取物调和于 10mM HEPES(pH7.9)、400mM NaCl、0.1mM EDTA、0.5mM DTT 和 5% 甘油中。然后将一半提取物加入覆盖生长于盖玻片上 5×10^5 个 COS-1 细胞的介质,1 小时后固定细胞,利用多克隆抗 VP22 抗体进行免疫荧光分析(见图 5(a)和 5(b))。分析 1/10 的所述提取物是在 10% 丙烯酰胺凝胶上进行电泳,接着用单克隆抗体 P43 进行蛋白质印迹分析(见图 5(c))。

此外,虽然在可溶性提取物中存在与全长 VP22 等量的 VP22 缺失突变体 $\Delta 267$ (见图 5(c), $\Delta 267$),但在细胞间未检测出,表明该过程需要 C 端 34 个残基(图 5(b))。

为了进一步研究,我们制备了相应于该 C 端 34 个残基的肽并续上一个 12 个残基的标记以便于免疫检测。将此肽应用于细胞介质后,它可进入细胞并被转运至细胞核(图 6b)。这些实验表明,这些 C 端 34 个残基是 a)所需的和 b)足以引起转运。

转运融合蛋白

虽然如上所述,我们已阐明可将肽融合至 VP22 而转运,但尚不知道多大的蛋白质可与 VP22 融合以便利转运。

用质粒 pGE109、 Δ 267 或 VP22 - GFP 转染 6mm 皿中的 COS-1 细胞,VP22-GFP 的构建是将 UL49 开放读框插入质粒 pGFP-N1(Clontech)的 BamH1 位点,得到 VP22 与绿荧光蛋白(GFP)的 N 端的融合体。转染 40 小时后收集细胞,制备高含盐量提取物。这些提取物的蛋白质印迹表明,虽然提取物中存在等量的全长 VP22 和 VP22 的 Δ 267 变体,但 22 - GFP 蛋白质的含量约小 5 倍。将等量的各提取物加入覆盖盖玻片上 COS-1 细胞的介质,放置 1 小时,然后在 100% 甲醇中固定。用 AGV30 进行免疫荧光分析。结果示出(图 6a),可在受体细胞中检测到 VP22 - GFP 融合蛋白,而且它已积累于细胞核内。

总之,我们已证实能获得表达融合蛋白的细胞提取物,其中连接的蛋白质是 32Kda,而且将该提取物应用于细胞介质后,可检测细胞核内的融合蛋白。

显微注射 VP22

虽然通过转染而转运适用于组织培养应用中,但在组织或病人中递送可能不是真正有效的途径。

显微注射(还有脂质体递送)被用于活体内且它还适用于阐述通过活体内实用的递送途径的 VP22 转运。

用 100ng/ μ l pGE109 和 100ng/ μ l pBAG 混合物作为注射细胞用的标记物(PNAS 84:156 - 160)显微注射铺板于盖玻片上的 COS-1 细胞,应用 Carl Zeiss 半自动手工操作型显微注射器。将细胞培养

24 小时,于 100% 甲醇中固定,应用多克隆抗 VP22 抗体 AGV30(1:500)和单克隆抗 β -半乳糖苷酶(1:50)(Promega)进行双免疫荧光分析。图 7a 示出用 β -gal 的抗体染色的一个显微注射细胞视野的代表图。在这些细胞的相同视野内,不但在显微注射细胞内而且在很多非注射细胞内可见到 VP22(图 7b)。因此,该递送途径可用于活体内通过显微注入例如肿瘤中心以递送 VP22 或其变体。当然,其它递送途径也同样可行,这里只是阐述一种直接途径。目前,应用两种主要途径递送基因,即脂质体介导的感染和病毒感染。因此,可以把 VP22 或各种修饰物(包括融合蛋白)的基因掺入脂质体载体供活体内递送。同样,脂质体递送也可用于组织培养系统。也可将 VP22 或其变体的基因插入例如腺病毒或逆转录病毒的基因组以传递感染。在两种情况下,将在初始转染或感染细胞群中表达,但 VP22 将被递送至周围细胞内。这特别适用于通过设计成不复制的缺损病毒载体(disabled virus vectors)的递送。该场合的递送将会增强。直接显微注射基因或者直接应用裸 DNA 也是本领域中正在研究的方法。

转运 VP22 至不同种细胞

我们已进一步证实了 VP22 可从初始表达它的细胞被转运至不同种细胞。

用被 PUC19 DNA 从 $1\mu\text{g}$ 配成 $4\mu\text{g}$ 的 pGE109 转染 60mm 板中的 COS-1 细胞。转染 24 小时后用胰蛋白酶消化除去细胞,再与先被胰蛋白酶消化的 BHK-21 细胞(仓鼠)以 1:20 的比率混合。将该细胞混合物铺板于 6 孔板中的盖玻片上,再进一步培养 20 小时,然后在 100% 甲醇中固定。应用 AGV30(1:500)和单克隆抗 T 抗原 pAB419(纯净的)进行双免疫荧光分析以鉴定 COS-1 细胞(J. Virol. 39:861-869)。

图 8 示出混合细胞的典型视野,其中可见 T 抗原阳性 COS 细胞(图 6a, 左边栏),周围的 BHK 细胞当然未被 T 抗原抗体检测到),而在图 8b 右边栏中是 VP22 阳性细胞,即中心 COS 细胞和周围的未

转染 BHK 细胞均可见。

VP22 的 DNA 结合性能

我们已证实,在 VP22 在核内的细胞中,它在有丝分裂期间与浓缩染色体结合。这表明有丝分裂期间与染色体的强烈结合,且说明一旦 VP22 或其变体被摄入细胞,它们也在分裂后被传给子细胞。这性能使 VP22 更适用于递送。此外我们已证实,在体外,VP22 具有非专一性 DNA 结合性能,这可能(至少部分地)解释活体内染色质结合。综合这两种现象得知 VP22 有可能结合 DNA 和递送 DNA/基因至细胞核。

分析期间我们发现,一部分核内含 VP22 的细胞中该蛋白质的模式类似于有丝分裂染色质的模式。对 VP22 和 DNA 的细胞双染色表明,对于有丝分裂各阶段的细胞均可检测出 VP22 定位于浓缩染色体周围(图 9a)。为测定 VP22 是否能与 DNA 直接作用,我们通过凝胶阻滞分析测试了 GST-VP22 融合蛋白结合 40bp 寡核苷酸探针的能力。对于 GST-VP22 观测到 3 种复合体的出现随剂量增大而增强(图 9b),在 GST 对照组中未存在该现象。尺寸更大的复合体可能表示该蛋白质的多聚化,因为所形成的最大一个对于更短的探针结合效果差(未显示)。此外,VP22 能结合一系列 DNA 探针,说明该蛋白质与 DNA 以非专一性方式作用。

VP22 在病毒感染的细胞内转运

基因治疗中递送基因的主要途径之一是应用病毒来进行。这类病毒一般在某些方面无功效以至它们低效复制或完全不能复制。希望限制复制以防止病理方面的并发症。病毒载体的安全性是基因治疗中的主要问题,研究人员作出很大努力试图开发严格缺损的病毒。但应用缺损病毒的缺点在于:目的基因只能被递送至初始感染的细胞。

我们意在直接证实 VP22 可从病毒感染的细胞被转运至未感染的细胞。为此,我们用缺损的单纯疱疹病毒突变体 HSV-1[gH-ve]感染细胞。该病毒缺乏病毒糖蛋白 gH 必需的基因,且必需在含

gH的特化互补细胞系上繁殖。但当该病毒感染非互补细胞(即不含病毒gH的任何细胞类型)时,该病毒能渗入初始细胞群、合成病毒蛋白(gH除外)和装配病毒粒子,但这些都是非感染性的。未发生第二轮感染。我们想证实VP22可从初始用HSV-1[gH-ve]病毒突变体感染的细胞转运(Desai, P. J. 等, J Gen Virol 69(pt 6):1147-56 (1988); Forrester, A. 等, J Virol 66:341-8(1992) U. Gompels & A. Minson Virology 153:230-47(1986))。在大约0.2pfu/细胞的感染复数下用HSV-1[gH-ve]感染Vero细胞。因而大约5个细胞中有一个开始时将被感染。感染24或66小时后使细胞在甲醇中固定,再估测VP22或 β -半乳糖苷酶的存在。应注意,该病毒含 β -半乳糖苷酶的基因,而且存在的 β -半乳糖苷酶用作初级感染细胞的标记物。结果示于图10。

图10a示出对 β -半乳糖苷酶染色、感染24小时后的视野。

图10b示出对VP22染色的相同视野。

图10c示出对 β -半乳糖苷酶染色、感染66小时后的视野。

图10d示出对VP22染色的相同视野。

图10a中用箭头标出了表达 β -半乳糖苷酶的两个细胞。注意周围的细胞缺乏 β -半乳糖苷酶。在对VP22染色的相同视野(图10)中,这两个细胞也是VP22阳性的(大箭头),但还检测到几个周围细胞含VP22(小箭头),它们是 β -半乳糖苷酶阴性的。

在图10c(感染66小时后)中示出的3个细胞也是 β -半乳糖苷酶阳性的(大箭头)。在对VP22染色的相同视野(图10d)中,这3个细胞是阳性的,但周围其它细胞是 β -半乳糖苷酶阴性的因而未感染,不过含有VP22,它已积聚于细胞核内(小箭头)。注意尽管在3个中心阳性细胞中浓染色,最后的这些细胞完全缺乏可检测的 β -半乳糖苷酶。

结果表明,VP22可从病毒感染细胞转运。这不只是疱疹病毒感染的性质,因为VP22可从转染的细胞或显微注射的细胞转运。因此,转运不需其它任何疱疹病毒编码的蛋白质,于是应用任何病毒载体如腺病毒或逆转录病毒都几乎肯定会发生转运。

这样我们直接证实了 VP22 从病毒感染细胞转运的原理依据。很容易预测,含目的基因的融合蛋白可通过与 VP22 的基因或其活性部分连接而被构建,并在基本上有效的或组织专一性的启动子控制下被插入病毒载体。随后该融合蛋白可被递送至比初始感染的细胞群要大得多的细胞群。

讨论

上述结果表明,VP22 表现出相当独特的性能,因为它被有效地从初始表达它、而且它在其中表现为胞质定位的细胞转运至细胞单层中毗邻细胞,在那里它被细胞核摄取。在我们试验过的一系列蛋白质中,对于其它任何蛋白质均未观测到这种行为模式,而且以前从未阐述过这种活性。于是,例如 VP16 也是在细胞胞质中表达的,但它的表达模式在表达细胞群中是完全均匀的,而且它未被转运至毗邻细胞。这种差异和 VP22 的这种意外的性能从如下结果得以证实即,当 VP22 或 VP16 被引入细胞单层大约 30 小时后,虽然 VP16 能在平均约 2-5% 的细胞中被检测到,但 VP22 能在单层的每个细胞中被检测到。

本工作还证明了 VP22 胞间转运的专一性,并证明了该蛋白质 C 端包含一个决定子,因为缺乏 C 端 34 个氨基酸的变体虽然在初始表达细胞内胞质定位中被表达,但未被转运至毗邻细胞。这些实验表明,VP22 的胞间转运可在一些不同种细胞包括 COS-1 细胞、Vero 细胞和 HeLa 细胞中进行,即该现象对其中最初观察到该现象的 COS 细胞不具有专一性。

蛋白质分泌或外排通常经过特定途径发生,要求完全鉴定的信号序列以分选入外排途径中包括的区室和载体。在蛋白质分泌的主要机制之一中,信号序列通常残留于蛋白质的 N 末端,被 7S RNA 和至少 6 个多肽的复合体识别,其中复合体的组分一起包括信号识别颗粒(SRP)。由 SRP 识别后接着在内质膜中停靠和将信号肽传递给受体。然后该出现的多肽通过 ER 膜排出,接着通过在 Golgi 网络中相互作用和小泡装配的复杂网络进行处理。VP22 不具备任何惯常的信号序列,而且它在胞质内的分布模式与 ER 分布或 Golgi 分

布不相似。

已有少量有关哺乳动物蛋白质通过非经典途径分泌的现有实例,例如包括细胞因子白细胞介素 1α 和 1β , 以及碱性和酸性成纤维细胞生长因子(7)。输出这类成分的一种可能性是通过 ABC-转运蛋白系统。这些蛋白质包括依赖于 ATP 的蛋白质和膜结合蛋白质, 它们含跨膜螺旋。它们包括于蛋白质专一性结合中和转运穿过膜并在细菌系统中已被最完全鉴定。然而, 迄今尚无有关任意哺乳动物 ABC-转运蛋白在蛋白质分泌中的作用的直接证据。

还有, 虽然某些蛋白质是通过非经典途径被分泌的, 但 VP22 分泌的模式极为独特。由于不想受任何具体理论的束缚, 对于我们的结果的最简单解释是这样的: VP22 被分泌后就被靶细胞的核摄取并在其中浓缩。又一次地, 虽然该蛋白质的预计分子量为 32k, 但 VP22 中没有明显的核定位信号, 所以它无需专门的信号就能进入细胞核。对于 VP22 内所需决定子和细胞内生理需求的进一步研究将会有助于阐明所包括的途径, 而对于 VP22 如何被分泌的理解将有助于理解其它蛋白质在非经典输出途径中是如何被转运的。

这些结果揭示了有可能应用 VP22 转运中涉及的决定子来使其它蛋白质或与 VP22 决定子相关的其他分子在靶细胞群中被转运、有效表达或摄取。我们业已证实, 短肽(12 个残基)可与 VP22 连接且该融合蛋白仍能被转运至单层的每个细胞中。该结果表明, 确实易于通过将肽与 VP22 连接而促使肽的传递。

此外, 我们已证实大型蛋白质(32Kd)与 VP22 连接后可从细胞介质被输入细胞, 并看到它在细胞核内积聚。

容易预测这种能力的广泛应用。例如有可能将 DNA 结合蛋白质与 VP22 决定子连接, 使得当递送至靶细胞群后, 它们将在大得多的细胞群中被有效地表达。

其它应用包括:

宿主加强免疫响应需要共同刺激分子和细胞因子

疫苗开发领域的近期资料着重于对共同刺激分子和细胞因子的

需求,以使疫苗有效地作用以加强细胞水平的宿主免疫响应。肿瘤细胞不在其细胞表面表达共同刺激分子,这就是为什么在宿主中没有 CTL(细胞毒性 T 细胞)的克隆扩充的原因,导致病人没有药物介入就不能使肿瘤收缩。

直接刺激宿主中的细胞毒性 T 细胞响应

递送具有抗癌性能的外源蛋白至细胞核。外源蛋白可能是已知能引起对肿瘤的免疫(T 细胞)响应的肿瘤特异抗原。

该外源蛋白可与 VP22 分子一起直接递送至细胞核(这也会模拟病毒感染—见注释)。然后该外源蛋白在细胞的蛋白体中会断裂成肽。如果接着进行经典的 T 细胞引入途径,则肽被导向通过细胞的 ER 和高尔基体并与 MHC-I 型分子结合呈现于细胞表面。加强病人中 CTL 响应对于非癌治疗,尤其是由病毒感染引起的疾病有显著作用。认为在宿主中引起强烈的 CTL 响应可导致体内病毒的消除,近期已获得科学证据。

用待导向的蛋白质/抗原加强递送 MHC 分子的免疫响应

有可能通过导向抗原加 HLA 分子来解决细胞群中 MHC 限制性并加强细胞的响应的问题。该应用也会具有非癌用途。

信号转导途径的调节

很多信号转导途径是通过如下方法进行的:转移环境信号、激素、将配体与膜结合、胁迫(DNA 损伤、热渗透的等等)细胞核以引起基因表达变化。可以通过将蛋白质或肽与信号分子偶合而应用 VP22 介导这种信号。递送融合蛋白或相应基因将会增强信号,因为融合体也是输出至相邻细胞。例如,将 VP22 与质膜相关性信号效应子的显性突变体(例如小 GTP 酶及其效应子或编程性细胞死亡(apoptotic)调节分子)融合可能实现所需途径,不但可在存在该基因的受体细胞内实现,还能在没有该基因的周围细胞中实现。可设想调节信号转导途径的多种变化形式。

VP22 在体外与 DNA 结合的能力和 VP22 在有丝分裂期间与浓缩染色体结合的能力可应用于基因/DNA 治疗。该应用有如下几种形式:

a) 病毒感染, 其中 VP22 或其突变体的基因被插入腺病毒或逆转录病毒的基因组以传递感染。同样, 也可插入所需蛋白质的基因从而可表达包括 VP22 和目的蛋白质的融合蛋白。然后 VP22 就能递送目的蛋白质至周围细胞群。这样, 可使这类病毒的量减少因而降低病毒感染的危害。

b) 将编码 VP22(或其变体)的核酸和目的蛋白质直接显微注入细胞, 于是一旦表达, VP22 就能将目的蛋白质转运入周围细胞群。

c) 脂质体介导的感染, 其中 VP22 的基因或包括融合蛋白的各种修饰物被掺入脂质体载体以供活体内递送。

对技术人员而言, 将 DNA 引入细胞的其它方法是显而易见的, 例如, 直接划痕(direct scarification), 其中 DNA 直接被组织摄取; 受体介导的 DNA 转化; 磷酸钙介导的转染; 和弹道式递送(ballistic delivery)。

有效递送功能分子是基因/蛋白质治疗中所期望的。该机制的另外优点在于, 表达 VP22 的基因将只存在于小群细胞中, 而蛋白质存在于大得多的细胞群内。当需要考虑递送基因的可能有害效果时, 这将是有用的因素。低基因递送量同时保持较大功能性蛋白递送量是所期望的。实际上可预测, 需要或者希望有效表达试验蛋白质的任何应用都可运用 VP22 递送机制。递送肿瘤抑制蛋白、酶等等。我们还已证实有可能将核酸与 VP22 结合, 因此, 除了 DNA 之外也可以递送反义 RNA 核酸等等。

参考文献

1. Blaho, J. A., C. Mitchell, 和 B. Roizman. 1994. 由单纯疱疹病毒 1 α 调节蛋白 0、4、22 和 27 共享的氨基酸序列预示 UL21、UL31、UL47 和 UL49 基因产物的核苷酰化(nucleotidylylation)。J. Biol Chem 269:17401 - 10。
2. Blair, E. D., 和 R. W. Honess. 1983. 由 herpes virus saimiri 专一化的 DNA 结合蛋白。J. Gen. Virol. 64:2697 - 2715。
3. Chen, C., 和 H. Okayama. 1987. 用质粒 DNA 高效转化哺乳动物

- 细胞。Mol. Cell Biol. 7:2745 - 2752。
4. Elliott, G. D., 和 D. M. Meredith. 1992。由基因 UL49 编码单纯疱疹病毒 - 1 型壳蛋白 VP22。J. Gen. Virol. 73:723 - 6。
 5. Greaves, R. F., 和 P. O'Hare. 1990。对于同细胞八聚体结合蛋白序列和靶 TAATGARAT 序列作用的单纯疱疹病毒 - 1 型反式激活蛋白 Vmw65 的结构要求。J. Virol. 64:2716 - 2724。
 6. Haarr, L., 和 S. Skulstad. 1994。单纯疱疹病毒 - 1 型粒子:结构和分子功能。论文综述。Apmis 102:321 - 46。
 7. Klucher, K. 1993。蛋白质分泌的独特途径:简易分泌方式。Trends in Cell Biol. 3:421 - 426。
 8. Knopf, K. W., 和 H. C. Kaerner. 1980。与单纯疱疹病毒 - 1 型 (HSV - 1) 粒子结合的病毒特异性碱性磷蛋白和 HSV - 1 感染的细胞的染色质。J. Gen. Virol. 46:405 - 414。
 9. Meredith, D. M., J. A. Lindsay, I. W. Halliburton, 和 G. R. Whitaker. 1991。通过糖基化作用和磷酸化作用对单纯疱疹病毒 - 1 型的壳蛋白 (VP13 和 VP14) 的翻译后修饰。J. Gen. Virol. 72:2771 - 5。
 10. Pinard, M. F., R. Simard, 和 V. Bibor - Hardy. 1987。单纯疱疹病毒 - 1 型感染的 BHK 细胞核基质的 DNA 结合蛋白。J. Gen. Virol. 68:727 - 35。
 11. Preston, C. M., 和 E. L. Notarianni. 1983。单纯疱疹病毒立即早期多肽的聚(ADP - 核糖基)化作用。Virol. 131:492 - 501。
 12. Rothman, J. E. 1994。胞内蛋白质转运的机制。Nature. 372:55 - 63。

图 1

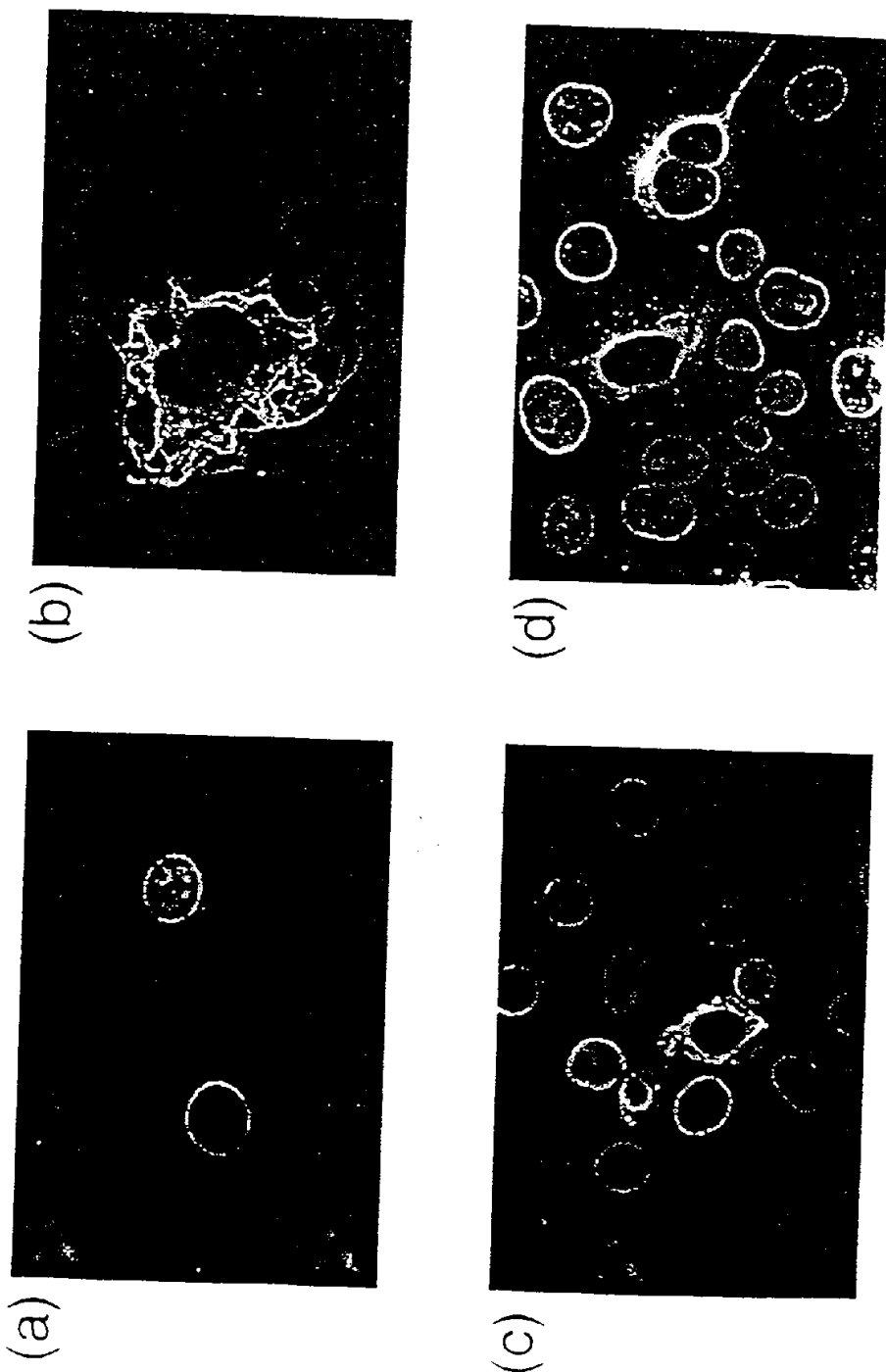
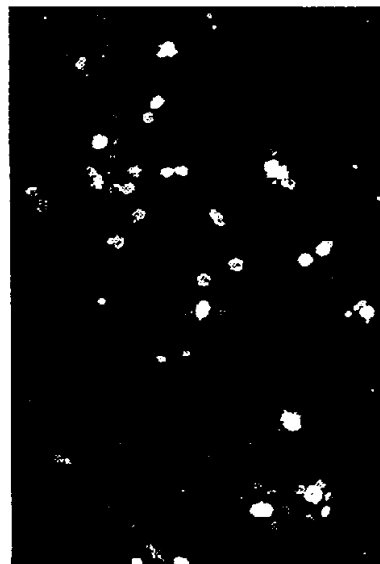


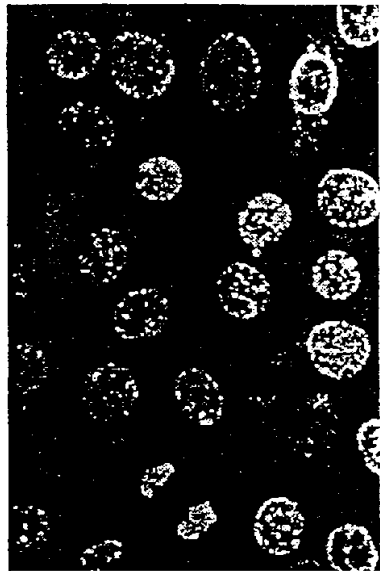
图 2



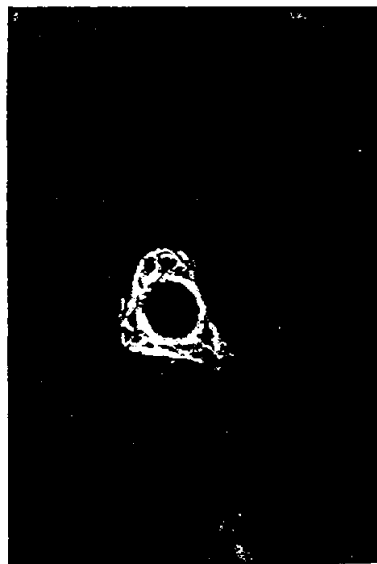
图 3



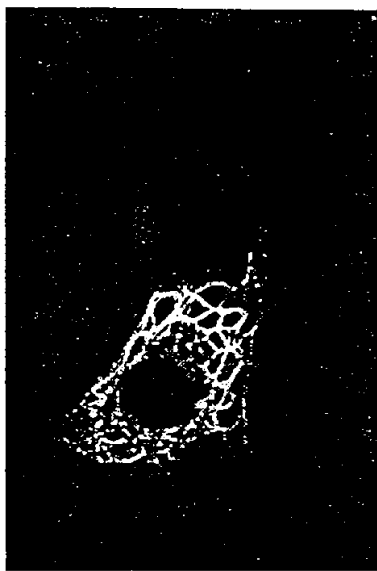
(a)



(b)



(c)



(d)

图 4

MTSRRSVKSGPREVPRDEYEDLYTPSSGMA SPDPDT SRRGALQTRSRQRGE
VRFVQYDESDYALYGGSSSEDEHPEVPRTRRPVSGAVLSGPGPARAPPPAGS
GGAGRTPTTAPRAPRTQRVATKAPAAPAAE TTRGRKSAQPESAALPDAPASTAPT
RSKTPAQGLARKLHFSTAPPNPDPWTPRVAGFNKRVFCAAVGRLAAMHARMAA
VQLWMSRPRTDEDL NELLGITTI RVTVCEGKNLLQRANELVNPDVVQDVDAATAT
RGRSAASRPTERPRAPARSASRRRPVE $\Delta 267$

图 5

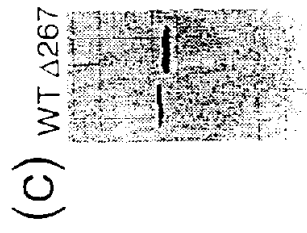


WT

(b)



$\Delta 267$



WT $\Delta 267$

图 6

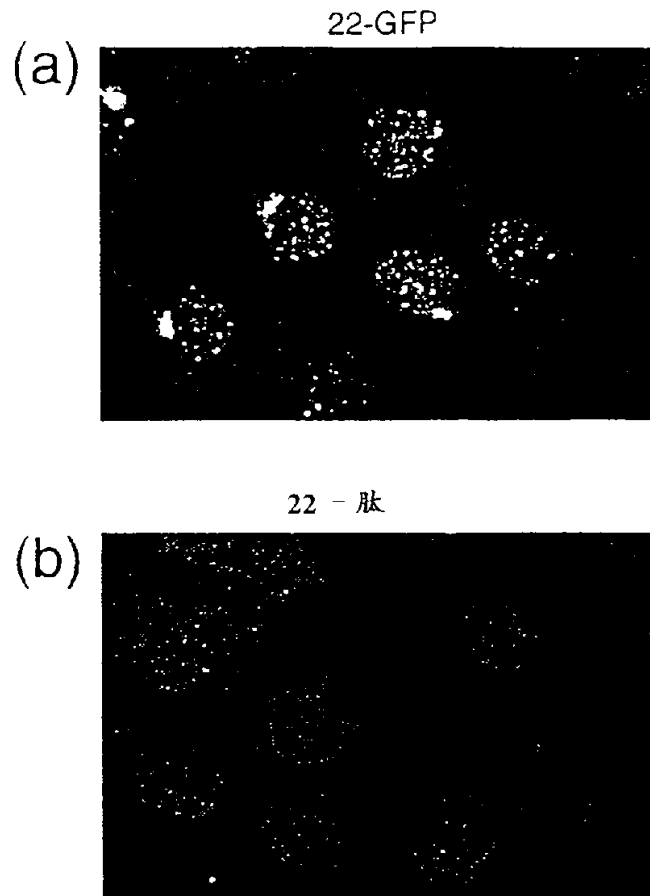


图 7

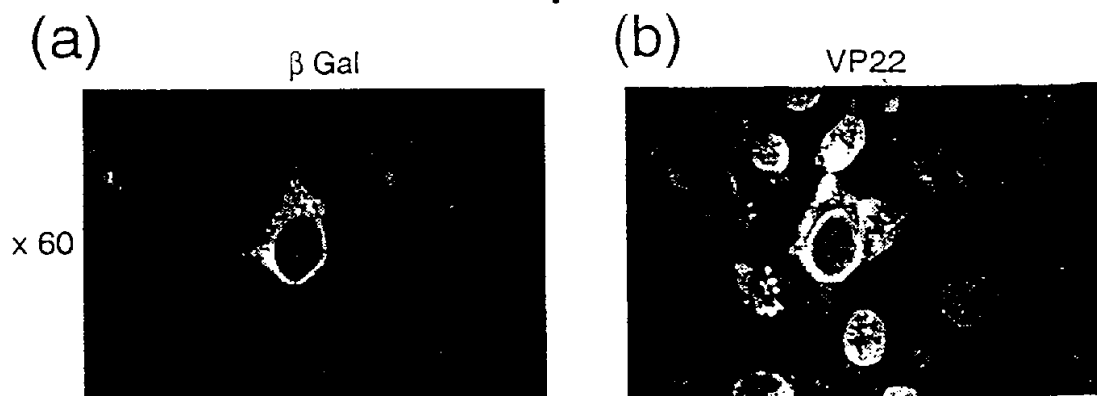
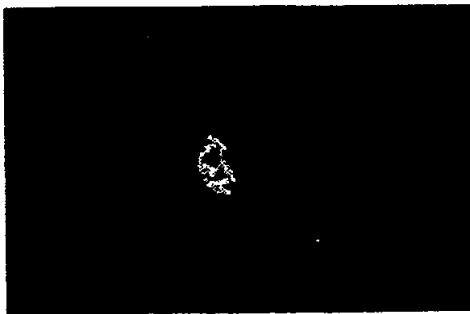
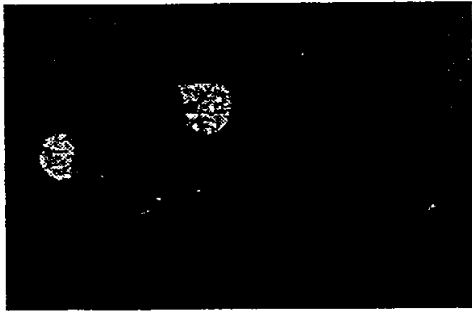
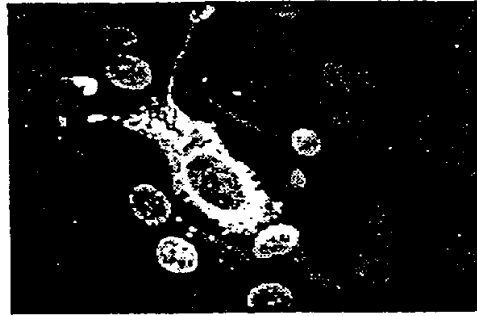
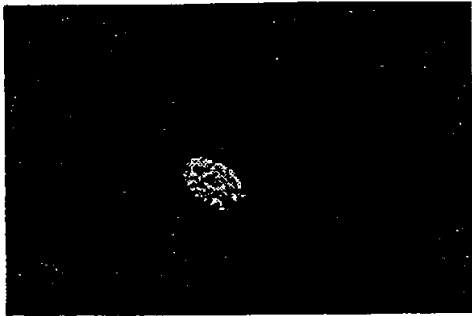


图 8

T 抗原

VP22



(a)

(b)

图 9

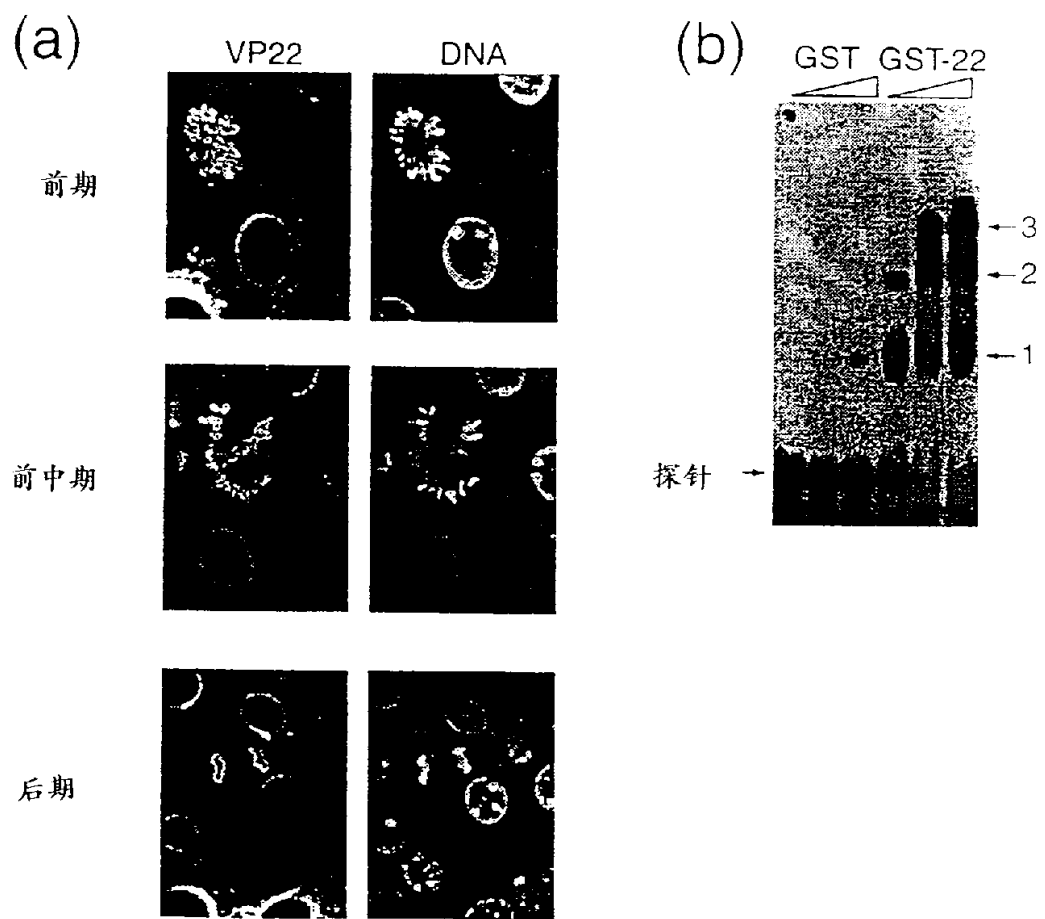


图 10



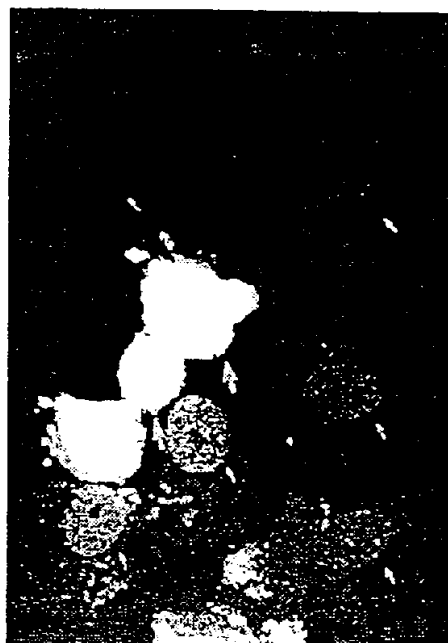
(a)



(c)



(b)



(d)