

聚乙二醇单修饰重组人粒细胞集落刺激因子的研究

Study on rhG-CSF Modified with Polyethylene Glycol

张霖琳^{1,2}, 郑春杨¹, 雷建都¹, 马光辉^{1*}, 苏志国¹, 汪 莉²

ZHANG Lin-Lin^{1,2}, ZHENG Chun-Yang¹, LEI Jian-Du¹, MA Guang-Hui^{1*}, SU Zhi-Guo¹ and WANG Li²

1 中国科学院过程工程所生化工程国家重点实验室 北京 100080

2 北京科技大学土木与环境工程学院 北京 100083

1 National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

2 Civil and Environmental Engineering School, University of Science and Technology of Beijing, Beijing 100083, China

摘 要 制备单修饰的 PEG-蛋白偶联物,对获得重复性好的修饰产品,减少后续分离步骤具有重要的意义。用 N-羟基琥珀酰亚胺活化法对单甲氧基聚乙二醇(mPEG,分子量 20000)进行活化,红外光谱分析,并考察了其水解动力学性质。对重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)进行化学修饰,通过正交试验结合 SDS-PAGE 电泳检测建立了单条 PEG 链修饰 rhG-CSF 的条件,单修饰 PEG-rhG-CSF 的收率为 90%。离子交换层析对修饰产物进行分离纯化,高效凝胶过滤色谱(SEC-HPLC)检测纯度达到 97%。

关键词 重组人粒细胞集落刺激因子,聚乙二醇,化学修饰

中图分类号 Q511 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)06-0965-05

Abstract Monomethoxy Polyethylene Glycol(mPEG20000) was activated by N-hydroxysuccinimide and analyzed by infrared spectrum and hydrolysis kinetics. In order to propose the optimized reaction conditions of mono-PEGylated rhG-CSF, orthogonal design of the experiment was investigated. Ion exchange chromatography was used to separate and purify PEGylated rhG-CSF from unPEGylated rhG-CSF. The purity of mono-PEGylated rhG-CSF was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) to be 97%.

Key words rhG-CSF, polyethylene glycol, chemical modification

粒细胞集落刺激因子(Granulocyte Colony Stimulating Factor, G-CSF)是刺激骨髓细胞集落形成的集落刺激因子之一,能够特异性地刺激和调节粒细胞系统的增殖、分化、存活和活化,主要用于治疗各种原因引起的中性粒细胞减少症^[1]。但是 G-CSF 的临床应用存在体内半衰期短,易被酶水解和肾脏清除,需要多次注射的问题,这不仅给患者带来了很大的不便,而且重复注射也会引起一些不良反应。

聚乙二醇修饰(PEG modification)是用聚乙二醇衍生物修饰剂共价修饰蛋白质或多肽等生物分子的过程^[2]。聚乙二醇(PEG)具有良好的生物相容性、无毒性和无抗原性等优点,修饰后的蛋白和多肽类药物的药代动力学和药效学性质能够得到改善。这主要是因为 PEG 对蛋白质进行修饰之后,PEG 在其表面具有遮蔽作用,不易被蛋白酶降解,阻止抗体接近,降低免疫原性,稳定性提高,并且蛋白质被修饰

Received: July 15, 2005; Accepted: August 23, 2005.

This work was supported by a grant from the National High Technology Project (No. 2004AA2Z3401).

* Corresponding author. Tel: 86-10-82627072; E-mail: ghma@home.ipe.ac.cn

国家重大科技专项基金资助(No. 2004AA2Z3401)

后分子量大大提高,不易被肾小球过滤,因此经修饰的蛋白质循环半衰期均有不同程度的提高等^[3]。目前,PEG 修饰技术多被用于长效药物的开发。2002 年美国 FDA 批准了 Amgen 公司的 Neulasta® 上市销售,主要用于治疗中性粒细胞减少症。

Amgen 公司的产品是利用末端带醛基的 PEG 修饰剂,实现了单修饰的 PEG-G-CSF。其特点是 PEG 与 G-CSF 以 C-N 键相连,在体内不会发生水解。然而,PEG 分子链会在一定程度上遮盖 G-CSF 的活性部位,使修饰产物的活性降低。理想的修饰剂是不仅能增长产物的分子量,而且能在体内逐步释放出蛋白药物,使药物恢复其活性。本文用 N-羟基琥珀酰亚胺活化法合成 NHS-PEG 修饰剂,NHS-PEG 的特点是能与 rhG-CSF 的赖氨酸氨基形成尿烷键,尿烷键能在体内缓慢水解,使 rhG-CSF 恢复其活性^[4]。但是,NHS-PEG 的活性高,选择性差,很难获得单修饰的修饰产物,而单修饰产物与多修饰产物相比能够更好地保持其天然活性,且单修饰产物均一有利于分离纯化、易于大规模制备时的质量控制和保证批次稳定性。因此为了得到单修饰的 rhG-CSF,本文采用两个策略:①采用分子量较高的 PEG20000 来增加立体障碍,从而抑制多修饰产物的产生;②在修饰反应上进行控制,而目前对于分子量为 19600 的 rhG-CSF 来说这方面的研究工作还较少。首先通过水解动力学考察修饰剂的性质,进一步设计正交试验对 rhG-CSF 进行化学修饰,结合 SDS-PAGE 电泳检测建立 NHS-mPEG20000 单修饰 rhG-CSF 的最佳条件,对修饰产物采用离子交换层析进行分离,将修饰的和未修饰的 rhG-CSF 分开,高效凝胶过滤色谱检测单修饰产物纯度达到 97%,为进一步考察其药代动力学和药效学奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 原料:单甲氧基聚乙二醇 mPEG(Shear Water),重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)(北医联合生物工程公司)。

1.1.2 主要试剂:N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,Aldrich Chemie),三光气,Folin 酚,牛血清白蛋白(BSA,SIGMA),丙烯酰胺(SIGMA),甲叉丙烯酰胺(SIGMA),标准蛋白(中科院上海生化研究所),其余试剂均为国产分析纯或生化纯试剂。

1.1.3 主要仪器:ÄKTA explorer 100 液相色谱系统(GE Healthcare Biosciences),SP-Sepharose Fast Flow 色

谱柱(GE Healthcare Biosciences),电泳仪 Mini protein II(Bio-Rad),凝胶扫描系统 Quantity One(Bio-Rad),分光光度计 Ultrospec2000(GE Healthcare Biosciences),96 孔细胞培养板(Costar),试验用水均采用 Rios 超纯水系统处理。

1.2 方法

1.2.1 mPEG 的活化:以分子量为 20000 的单甲氧基聚乙二醇(mPEG20000)为原料,按照文献报道的方法^[5]加以适当改进,合成修饰剂 NHS-mPEG20000,真空干燥 24h 后称重计算回收率。红外光谱对修饰剂进行分析鉴定。测定 NHS-mPEG 的活化度,参照 Miron 与 Wilchel 于 1982 年报道的方法^[6],在弱碱性(0.1mol/L 氨水)室温条件下,分光光度计测定 260nm 发光基团的特征吸收值。

1.2.2 修饰剂的性质考察:为了合理地设计修饰反应的条件,水解动力学实验考察不同 pH 值对 NHS-mPEG20000 活性的影响,通过修饰剂的水解速度确定反应时间。室温下,取 pH 值为 8.0、9.0 和 10.0,离子强度为 0.1mol/L 的缓冲液各 3mL,分别加入 5mg 的 NHS-mPEG20000,振荡溶解后立即放入分光光度计中,紫外 260nm 波长测其水解动力学。

1.2.3 重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)的修饰反应:在 4℃ 下用动态透析的方法,将 rhG-CSF 置换到不同 pH 值的缓冲液中,以保证其生物学活性。Lowry 法测定蛋白浓度,将蛋白稀释到实验所需的各个浓度,按摩尔配比(PEG:蛋白质)加入修饰剂,混合均匀,按正交试验设计的温度进行反应,反应时间为 2h。

1.2.4 蛋白浓度的测定:按“生物制品化学及其它检定方法”中微量法(Lowry)^[7]的要求测定蛋白质浓度。

1.2.5 修饰产物的分离纯化:采用 ÄKTA purifier 10 高效液相色谱系统,离子交换色谱分离 PEG 修饰的 rhG-CSF 与未修饰的 rhG-CSF。SP Sepharose Fast Flow 阳离子交换介质色谱柱(1.6cm × 18cm),流动相是 10mmol/L pH4.0 的醋酸盐(缓冲液 A),上样前先将色谱柱用 5 倍于柱体积的缓冲液 A 平衡,上样后收集流穿峰,然后用含有 1mol/L NaCl 的缓冲液 B 洗脱,收集洗脱峰。流速是 1mL/min,检测波长 280nm,所有操作均在室温下进行。将收集的样品用 SDS-PAGE 电泳和高效凝胶过滤色谱检测。

1.2.6 SDS-PAGE 电泳检测:按 Laemmli^[8]方法进行,浓缩胶为 5%,分离胶为 15%,银染^[9]。

1.2.7 高效凝胶过滤色谱检测:高效凝胶过滤色谱

(SEC-HPLC)色谱条件 Superdex™75 HR10/30 凝胶色谱柱,洗脱缓冲液为 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液中加入 0.1mol/L 硫酸钠,流速 0.4mL/min,上样量 100μL,检测波长为 280nm。色谱柱先用缓冲液充分平衡后再上样。

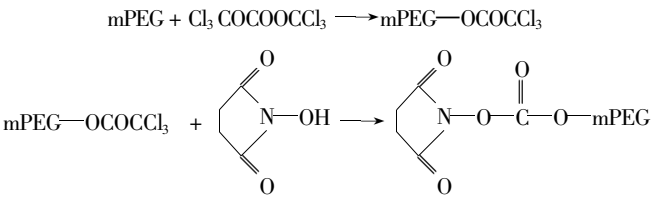
1.2.8 体外生物活性的测定:采用 MTT 方法^[10]稍加修改,在 96 孔细胞培养板中接种一定浓度的细胞悬浮液(50μL/孔);将 rhG-CSF 标准品和修饰 rhG-CSF 样品系列稀释,各 50μL 加入 96 孔培养板中,设

阳性对照、阴性对照(不含 rhG-CSF)和空白对照(只含培养液),37℃,5% CO2 培养 36 ~ 48h,加 MTT 溶解液 100μL/孔,次日测定各孔 A_{570/630} 值。

2 结果

2.1 NHS-mPEG20000 的合成

聚乙二醇末端的羟基是反应的基团,但是它并不活泼,只有对其活化才能够和蛋白偶联。mPEG 活化的反应过程如下:

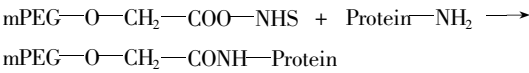


将合成的 NHS-mPEG20000 用乙酸乙酯重结晶三次,真空干燥 24h,称重计算收率为 90%。为了考察修饰剂活化的程度,在修饰反应中准确地计算加入的量,测定 NHS-mPEG20000 的活化度为 96%。通过红外光谱图(图 1)可以看出,活化之后的 NHS-mPEG20000 与 mPEG20000 相比,有如下特征峰: 1810cm⁻¹、1790cm⁻¹(琥珀酰亚胺),1742cm⁻¹(羧基)。

越强水解速度越快,在接近两个小时的时候水解接近完全。因此在对 rhG-CSF 进行修饰反应的时候,为了提高有效偶联,避免高 pH 值时水解副反应发生,正交试验选取 pH 值为 6.0、7.0 和 8.0 的缓冲体系,反应 2h,使修饰剂与蛋白反应完全。

2.2 修饰反应正交试验结果

修饰反应是 NHS-mPEG20000 与 rhG-CSF 的氨基进行的酰基化反应,反应方程式如下:



修饰反应一般总是尽可能在蛋白稳定的条件下进行,反应的最终结果要得到蛋白和修饰剂的高结合率,以及蛋白活性的高回收率。蛋白质与修饰剂作用所要求的反应条件,除允许修饰过程能够顺利进行外,还必须满足如下要求:一是不引起蛋白质的不可逆变性,二是有利于选择性地修饰蛋白质。pH 值、蛋白浓度、修饰剂与蛋白的配比、反应温度、反应介质和离子强度等都要控制在一定的范围。因此本实验采用 L₉(3⁴)正交表(表 1),通过四因素三水平正交试验法确定 rhG-CSF 偶联一条 PEG 链的最佳修饰条件。

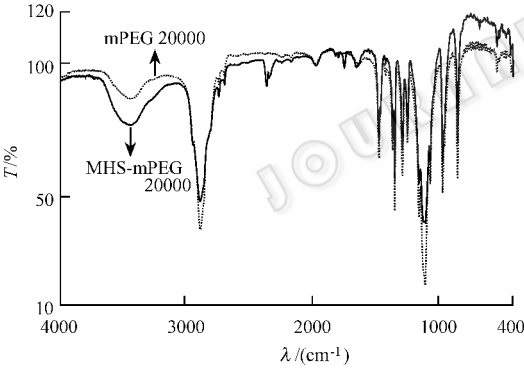


图 1 mPEG20000 与 NHS-mPEG20000 的红外光谱图

Fig. 1 Infrared spectrum of mPEG20000 and NHS-mPEG20000

水解动力学考察 NHS-mPEG 的性质,碱性

表 1 因素水平表
Table 1 Factor and level table

Factor	A	B	C	D
Level	pH	Temperature/℃	Concentration(mg/mL)	Molar ratio(PEG :rhG-CSF)
1	6.0(0.1mol/L PBS)	4	0.2	5:1
2	7.0(0.1mol/L PBS)	25	0.4	10:1
3	8.0(0.1mol/L borate)	37	0.6	20:1

将正交试验的样品进行 SDS-PAGE 电泳检测和

高效凝胶过滤层析检测,以蛋白的单修饰和高转化

率为依据,根据正交实验数据处理方法,能够得出修饰剂与蛋白的配比对反应的影响最大,pH 值其次,温度和蛋白浓度影响较小,且随着蛋白浓度、配比、温度和 pH 值的增加,蛋白的转化率会有所提高,但是也容易得到多条 PEG 链修饰的蛋白。因此,为了控制反应得到单修饰和高转化率的蛋白,确定出 NHS-mPEG20000 单修饰 rhG-CSF 最佳反应条件为:在 pH 值为 7.0、离子强度 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲体系中,选择蛋白浓度为 0.4mg/mL,加入修饰剂 NHS-mPEG20000 与蛋白的配比为 5:1,4℃ 反应 2h(表 2)。

表 2 NHS-mPEG20000 单修饰 rhG-CSF 最佳条件

Table 2 The optimized reaction conditions of NHS-mPEG20000 modified rhG-CSF

PEG	pH	Temperature /℃	Concentration (mg/mL)	Molar ratio (PEG :rhG-CSF)
NHS-mPEG20000	7.0	4	0.4	5:1

2.3 离子交换分离修饰产物

rhG-CSF 的等电点在 4~5 之间,经 PEG 修饰后等电点会有所下降,因此分离修饰产物采用穿透式阳离子交换层析的方法,首先让 PEG 修饰的蛋白随穿透峰穿出,未修饰的蛋白吸附在介质上,再通过高盐缓冲液洗脱增强离子强度,使出未修饰的蛋白洗脱下来。图 2 所示为 NHS-mPEG20000 修饰 rhG-CSF 的分离纯化图谱。此模式时间短、通透量高、稳定易于放大,单修饰的和未修饰的 rhG-CSF 能够达到基线分离,因此还可以回收未修饰的蛋白重复使用。

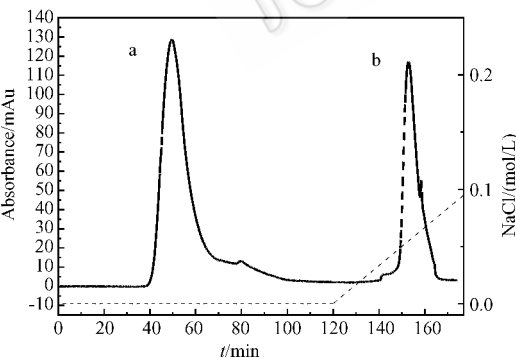


图 2 离子交换分离 PEG 修饰 rhG-CSF 产物图谱

Fig. 2 Ion exchange chromatography separation of PEGylated rhG-CSF

a : separated NHS-mPEG20000-rhG-CSF ; b : unmodified rhG-CSF .

2.4 SDS-PAGE 电泳

按照正交试验确定的最佳单修饰条件 NHS-mPEG20000 修饰 rhG-CSF 和离子交换分离修饰产物收集到的峰做 SDS-PAGE 电泳检测结果如图 3 所示:

第 2 道是 NHS-mPEG20000 修饰的 rhG-CSF 即分离前样品,在 60kD 附近的蛋白带为单修饰的 rhG-CSF 由于 PEG 的水力学半径大,其表观分子量较大,移动速度不均匀,因此 PEG 修饰后的 rhG-CSF 出现在比实际分子量大的位置。第 4 道是离子交换收集的流穿峰 a,第 5 道是洗脱峰 b,可以看出离子交换能够将修饰和未修饰的 rhG-CSF 完全分开。

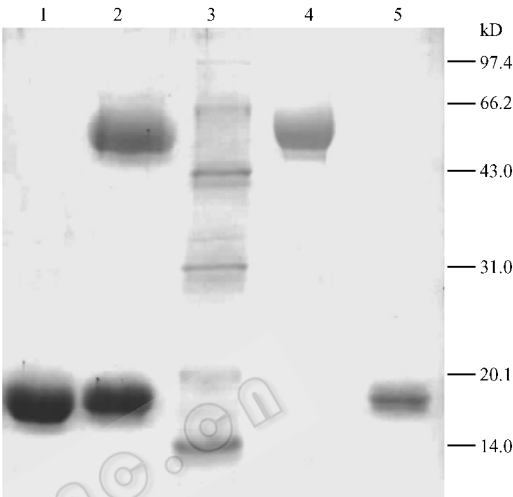


图 3 PEG 修饰 rhG-CSF 离子交换分离前后 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE profile of PEGylated rhG-CSF before and after separation using action anion exchange chromatography

1 : native rhG-CSF ; 2 : mono-NHS-mPEG20000-rhG-CSF ; 3 : standard marker 4 : separated NHS-mPEG20000-rhG-CSF 5 : unmodified rhG-CSF .

2.5 高效凝胶过滤检测

图 4 为 rhG-CSF 原蛋白的高效凝胶色谱,与其对照,图 5 在体积 8mL 处显示的色谱峰为连接一个 PEG 链的 rhG-CSF,13mL 的峰为未修饰的 rhG-CSF,通过计算峰面积比可以得出,离子交换分离 NHS-mPEG20000 修饰 rhG-CSF 所得到的样品,单修饰的高效纯度可达到 97%。

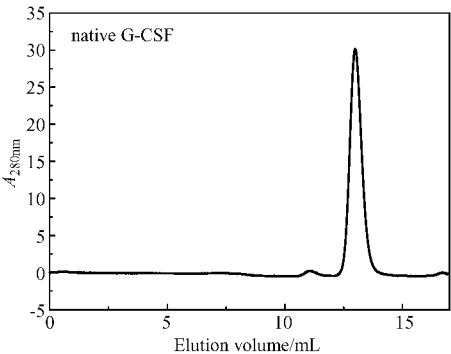


图 4 rhG-CSF 的高效凝胶过滤色谱图

Fig. 4 High performance liquid chromatography of rhG-CSF

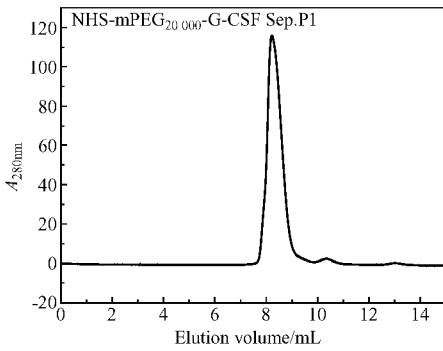


图5 离子交换分离 NHS-mPEG20000 修饰 rhG-CSF 收集的 P1 峰的高效凝胶过滤色谱图

Fig. 5 High performance liquid chromatography of separated rhG-CSF modified with NHS-mPEG20000 using ion exchange chromatography

2.6 体外活性的结果

采用 MTT 方法分别测定偶联产物的体外活性为 5.73×10^8 u/mg, 原蛋白的活性为 6.59×10^7 u/mg。修饰后的蛋白尽管体外活性下降, 其体内疗效却有显著提高。这是因为一方面, 修饰后的蛋白进入人体后, 随着水解被修饰蛋白的活性得到恢复; 另一方面, 修饰产物的稳定性较未修饰之前有所提高, 体内循环半衰期大大高于天然蛋白, 延长药用蛋白的作用时间, 增加生物利用率, 因此修饰后蛋白的体内活性不会受到影响反而会有所提高^[11]。

3 讨论

本研究通过 N-羟基琥珀酰亚胺活化法将 mPEG20000 活化, 收率 90%, 活化度 96%。修饰剂水解动力学的考察有助于设计修饰反应的时间和 pH 值。

不同 PEG 修饰度的 rhG-CSF 之间, 除了分子量和表面电荷的细小差别之外, 其它的理化性质非常接近, 因此从修饰反应上控制修饰产物的单一性, 解决了分离纯化的难题; 而且单修饰的 rhG-CSF 还能够较多修饰的更好保持天然活性。正交试验建立 NHS-mPEG20000 单修饰 rhG-CSF 的最佳条件: 蛋白浓度 0.4mg/mL, 修饰剂与蛋白配比 5:1, 在 pH 为 7.0、0.1mol/L 的磷酸盐缓冲体系中 4℃ 反应 2h。单

修饰的 PEG-rhG-CSF 的收率达到 90%。

对修饰产物的分离, 运用穿透式阳离子交换层析, 将修饰和未修饰的 rhG-CSF 分开, 产物经高效凝胶过滤色谱检测纯度达到 97%, 未修饰的蛋白还可以循环利用。此分离模式稳定便于放大制备, 同时也为进一步的药代动力学和药效学试验奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Hsieng SL, Christi LC, Linda ON *et al.* Folding and oxidation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor produced in *E. coli*. *J Biol Chem*, 1992, **267**(13): 8770–8779
- [2] Abuchowski A, Van ET, Palczuk NC *et al.* Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of poly (ethylene glycol). *J Biol Chem*, 1977, **252**(11): 3578–3581
- [3] Richard BG, Greenwald, Yun HC *et al.* Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, **55**: 217–250
- [4] Wang Yu-Sen, Youngster Stephen, Grace Michael *et al.* Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, **54**: 547–570
- [5] Zalipsky S, Barany G. Facile synthesis of α -hydroxyl- ω -carboxymethylpolyethylene oxide. *J Bioact Compat Polym*, 1990, **5**: 227–237
- [6] Miron T, Wilchek MA. Spectrophotometric assay for soluble and immobilized N-hydroxysuccinimide esters. *Anal Biochemistry*, 1982, **126**: 433–435
- [7] Lowry OH. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265–275
- [8] Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680–685
- [9] Swain M, Ross NW. A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 1995, **16**: 948–951
- [10] Okabe M, Asano M, Kuga T *et al.* *In vitro* and *in vivo* hematopoietic effect of mutant human granulocyte colony stimulating factor. *Blood*, 1990, **75**: 1783–1788
- [11] Sprial AB, Herik-Oudijk IE, Winkel JGJ. A single injection of polyethylene-glycol granulocyte colony-stimulating factor strongly prolongs survival of mice with systemic candidiasis. *Cytokine*, 2000, **12**(6): 666–670