

## 人血清白蛋白-睫状神经营养因子突变体融合蛋白基因在毕赤酵母中的表达及表达产物的纯化和活性鉴定

# Purification and Activity Assay of HSA-AX15(R13K) Fusion Protein Expressed in *Pichia pastoris*

赵洪亮, 薛 冲, 熊向华, 张 伟, 杨秉芬, 刘志敏\*

ZHAO Hong-Liang, XUE Chong, XIONG Xiang-Hua, ZHANG Wei, YANG Bing-Fen and LIU Zhi-Min\*

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

**摘 要** 为了延长人睫状神经营养因子突变体的体内半衰期, 将人血清白蛋白(HSA)的 C-末端和人睫状神经营养因子突变体 AX15(R13K)的 N-末端通过一个 11 个氨基酸的连接肽融合在一起, 构建了融合蛋白 HSA-AX15(R13K)。HSA-AX15(R13K)融合蛋白基因在巴斯德毕赤酵母中进行表达后通过阳离子交换层析、反向层析和凝胶过滤对表达产物进行了分离纯化。体外 TF-1 细胞存活实验表明与 HSA 融合并未影响 AX15(R13K)的生物学活性。体内动物实验表明 HSA-AX15(R13K)融合蛋白的疗效比 AX15(R13K)更为持久: 每 3 天注射一次 4.8mg/kg 的 HSA-AX15(R13K)融合蛋白的治疗效果优于每天注射一次 1.6mg/kg 的 AX15(R13K)的治疗效果。HSA-AX15(R13K)融合蛋白不但可以减少用药次数, 提高病人的顺应性, 而且还可以减少用药量和血药浓度的波动, 从而降低副作用, 在临床应用上具有一定的优势。

**关键词** 睫状神经营养因子, 巴斯德毕赤酵母, 长效蛋白药物

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0254-05

**Abstract** To increase the *in vivo* half-life of human CNTF mutein AX15(R13K), HSA-AX15(R13K) fusion protein was constructed by the fusion of the C-terminus of HSA to the N-terminus of AX15(R13K) via an 11 amino acids linker. HSA-AX15(R13K) fusion protein was purified to homogeneity by cation exchange chromatography, reverse phase chromatography and gel filtration after expressed in *pichia pastoris*. TF-1 cell survival bioassay showed the biological activity of AX15(R13K) was not affected by the fusion to HSA. It was demonstrated that tertian injection of 4.8mg/kg HSA-AX15(R13K) fusion protein could produce more potent anti-obesity effects on KM mice than daily injection of 1.6mg/kg AX15(R13K). The long-acting form of hCNTF variant has the potential to reduce discomfort by requiring fewer injections and to minimize the side-effects by decreasing the dosage and fluctuation of plasma concentration, and thus has superior clinical application.

**Key words** ciliary neurophic factor, *Pichia pastoris*, long-acting protein pharmaceutical

睫状神经营养因子(Ciliary neurotrophic factor, CNTF)最初由于其具有促进鸡胚睫状体神经节副交

Received: October 29, 2004; Accepted: December 9, 2004.

This work was supported by Grants from National Hi-tech Research and Development Program of China (No. 2002AA2Z345B and 2002AA217021).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-66948823; E-mail: liuzhm@vip.sina.com

国家“863”高新技术研究发展计划项目资助(No. 2002AA2Z345B 和 2002AA217021)。

感神经元存活的活性而被发现和得名<sup>[1]</sup>。最近研究表明 CNTF 可以作为一种天然的 Leptin 类似物(模拟物),从而有效地绕过 Leptin 耐受,在治疗肥胖症上显示出了良好的应用前景<sup>[2]</sup>。AX15 是由 Regeneration 公司发明的 hCNTF 的一个三重突变体:17 位的 Cys 被 Ala 替换,63 位的 Gln 被 Arg 替换,并缺失了 C 末端的 15 个氨基酸。与天然 hCNTF 相比,AX15 具有更高的生物学活性,更好的稳定性和可溶性<sup>[1]</sup>。目前 AX15 已完成肥胖症的 III 期临床实验,并取得了统计学上具有显著性差异的结果<sup>[3]</sup>。AX15 (R13K)是本实验室构建的 KEX2 蛋白酶抗性的 AX15 突变体<sup>[4]</sup>。AX15 (R13K)比 AX15 更适合在酵母表达系统中进行表达。

但是临床研究发现 CNTF 及其突变体的体内半衰期较短,约为 170min<sup>[5]</sup>。如此短的半衰期决定了只有频繁给药才能取得令人满意的疗效,如在临床治疗中往往采用每天注射 1 次的用药方式。但如此频繁的用药方式再加上较长的治疗周期(3~12 个月)使得病人的顺应性较差。

人血清白蛋白融合技术(HSA fusion technology)是构建长效蛋白药物的一个通用技术,近年来在长效干扰素(IFN)、粒细胞生长因子(G-CSF)、生长激素(GH)及白介素-2(IL-2)等药物的研制上取得了广泛的应用<sup>[6,7]</sup>。为了延长 hCNTF 突变体的半衰期,本研究构建了 HSA 和人睫状神经营养因子突变体 AX15(R13K)的融合蛋白,并对其体内疗效进行研究,为开发长效人 CNTF 突变体奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 质粒、菌株、细胞株、实验动物:**巴斯德毕赤酵母宿主菌 GS115 和表达载体 pPIC9 购自 Invitrogen 公司,大肠杆菌 TG1 为本室保存。AX15(R13K)基因和人血清白蛋白基因由本室保存,其中前者为天然基因,后者系按毕赤酵母偏爱密码子合成的人工基因。AX15(R13K)测活用细胞 TF-1 由本室保存,昆明小鼠购自军事医学科学院实验动物中心。

**1.1.2 工具酶与试剂:**限制酶 *EcoR* I、*Bam* H I、*Bgl* II 为大连宝生物工程公司产品。*Taq* DNA 聚合酶购自华美生物工程公司。*pfu* DNA 聚合酶购自上海生工生物工程有限公司。酵母抽提物、蛋白胨购自 Oxoid 公司。酵母基本氮源 YNB 购自 Difco 公司。重组人 CNTF(rhCNTF)标准品购自 Peprotech 公司,AX15 及 AX15(R13K)由本实验室制备。其余试剂

为国产或进口分析纯试剂。

**1.1.3 纯化和发酵设备:**Prostar 层析仪为 Varian 公司产品,HiLoad S Sepharose F. F. 16/20、Superdex200 prep grade (26/60)层析柱及 SOURCE30RPC 填料为 Pharmacia 公司产品。Biostat B5 型 5L 发酵罐为 B. Braun Biotech 公司产品。

**1.1.4 引物(引物中加下划线部分分别为 *Bam* H I 和 *Eco* R I 酶切位点,所有引物由博亚生物技术公司合成):**引物 1 5'-AAGGATCCAAACGATGAAGTGGGTTACTTTC-3';引物 2 5'-GGGAATTCCTATTACCCAGTCTGATGAGAAGAAAT-3';引物 3 5'-GGTGGTGGTGGTTCGGGTGGTGGTGGTGGTTCTGCTTTCACAGAGCATTACCGCTGAC-3';引物 4 5'-AGAACCACCACCACCACCGGAACCACCACCACCCAAACCCAAAGCAGCTTGAGAGCAGC-3'。

### 1.2 方 法

**1.2.1 HSA-AX15(R13K)融合蛋白基因的构建:**用引物 1、4 以 HSA 基因为模板扩增出 3'端含有连接肽编码序列的 HSA 基因,用引物 2、3 以 AX15 (R13K)基因为模板扩增出 5'端含有连接肽编码序列 AX15 (R13K)基因,最后合并上述扩增产物作为模板,用引物 1、2 利用重组 PCR 技术构建构建出含 11 个氨基酸连接肽(GGGGSGGGGS)的 HSA-AX15 (R13K)融合蛋白基因。

**1.2.2 HSA-AX15(R13K)融合蛋白在巴斯德毕赤酵母中的表达:**按 Invitrogen 公司说明书进行。

**1.2.3 HSA-AX15(R13K)融合蛋白的分离纯化:**将培养上清 pH 调整至 5.0 并稀释 5 倍后用 S Sepharose F. F 进行初步纯化。阳离子交换层析所用平衡缓冲液为 50 mmol/L pH5.0 醋酸缓冲液,洗脱缓冲液为含 1mol/L NaCl 的 50mmol/L pH5.0 醋酸缓冲液。经阳离子交换层析后再用 Source30RPC 反向层析进行纯化。反向色谱所用平衡缓冲液为含 0.1% TFA 蒸馏水,洗脱缓冲液为含 0.1% TFA 乙腈。最后用 Superdex200 分子筛进行进一步纯化。凝胶过滤所用缓冲液为 PBS,0.1% Tween80。

**1.2.4 HSA-AX15(R13K)融合蛋白的促细胞存活活性测定:**利用 TF-1 细胞测定 HSA-AX15(R13K)融合蛋白的促细胞存活活性,具体方法参考文献[2],但最后不是用<sup>3</sup>H 掺入法而是用 MTT 检测存活的细胞数量。

**1.2.5 动物实验:**10~12 周昆明小鼠用鼠蛋白料饲养至连续 3d 体重恒定后随机分组,每组 5 只,分别接受 AX15 (R13K)及 HSA-AX15 (R13K)融合蛋白治

疗。各组经皮下注射不同剂量的 AX15 (R13K) 及 HSA-AX15 (R13K) 融合蛋白, 每只小鼠每次注射 0.2mL。每隔 24h 测量小鼠体重及摄食。

## 2 结果

### 2.1 HSA-AX15(R13K)融合蛋白基因的构建

利用重组 PCR 技术构建 HSA-AX15(R13K)融合蛋白基因的原理示意图和各步 PCR 扩增的结果分别见图 1 和图 2。HSA-AX15(R13K)融合蛋白基因经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后克隆至经同样双酶切的 pPIC9 载体中, 并经 DNA 测序证实所构建的表达载体 pPIC9/HSA-AX15(R13K)序列正确无误。

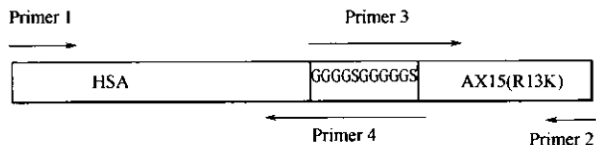


图 1 HSA-AX15(R13K)融合蛋白基因构建的原理示意图

Fig.1 Schematic representation of the construction of the gene encoding HSA-AX15(R13K) fusion protein

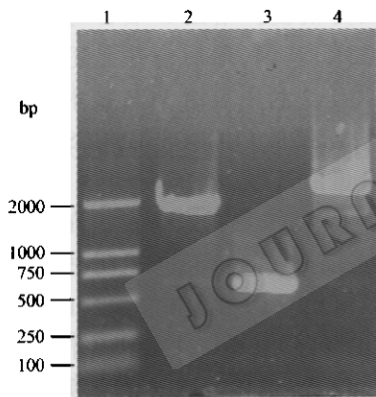


图 2 HSA-AX15(R13K)融合蛋白基因的扩增

Fig.2 Amplification of the gene encoding HSA-AX15(R13K) fusion protein

1: DL2000 DNA marker; 2: HSA gene amplified by PCR; 3: AX15 (R13K) gene amplified by PCR; 4: HSA-AX15 (R13K) fusion protein gene amplified by recombinant PCR.

### 2.2 HSA-AX15 (R13K) 融合蛋白在巴斯德毕赤酵母中的表达

表达载体 pPIC9/HSA-AX15 (R13K) 经电击转化巴斯德毕赤酵母宿主菌 GS115 后, 随机挑取 7 个转化子在 BMGY/BMMY 培养基中进行表达, 待诱导至 60h 后取 30 $\mu$ L 上清进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 3。HSA-AX15(R13K)融合蛋白在巴斯德毕赤酵母中表达时除了在大约 90kD 处有表达条带外, 在分子量为 67kD 和 45kD 处还存在明显的降解产物。为了进

一步研究降解发生的时间, 对不同诱导时间的表达上清进行了 SDS-PAGE 分析, 结果见图 4。电泳结果表明在诱导的前 36h 内降解较少, 诱导 48h 后出现明显的降解产物, 随着诱导时间的延长降解持续增加。

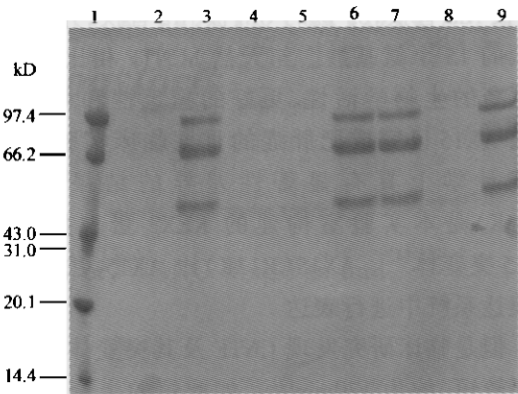


图 3 HSA-AX15(R13K)融合蛋白在巴斯德毕赤酵母中的表达(诱导 60h)

Fig.3 Expression of HSA-AX15(R13K) fusion protein in *Pichia pastoris* after 60h of induction

1: LMW protein marker; 2: negative control; 3 - 9: randomly selected HSA-AX15(R13K) transformants.

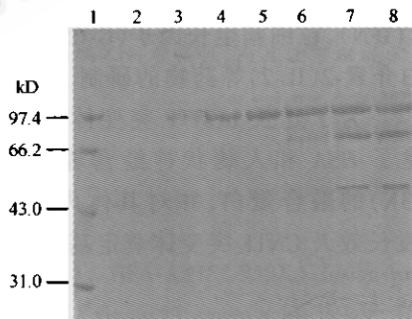


图 4 诱导后不同时间融合蛋白在巴斯德毕赤酵母中的表达

Fig.4 The time course expression profile of HSA-AX15 (R13K) fusion protein in *Pichia pastoris*

1: LMW protein marker; 2: before induction; 3 - 8: 12, 24, 36, 48, 60, 72h post induction.

### 2.3 HSA-AX15(R13K)融合蛋白的分离纯化

为了减少降解, 取诱导 36h 的培养上清采用阳离子交换层析、反向层析和凝胶过滤对 HSA-AX15 (R13K)融合蛋白进行了分离纯化, 结果见图 4。诱导 36h 时 HSA-AX15(R13K)融合蛋白的表达量约为 38mg/L, 经三步分离纯化后每升培养上清可获得纯度 > 90% 的样品 14mg, 总回收率为 36.8%。

### 2.4 HSA-AX15(R13K)融合蛋白的促 TF-1 细胞存活活性测定

利用 TF-1 细胞系测定 HSA-AX15(R13K)融合蛋

白促细胞存活活性的结果见图 7。当以蛋白质质量为单位时, HSA-AX15(R13K) 融合蛋白的比活约是 AX15(R13K) 的 1/4。但由于 AX15(R13K) 的分子量是 21 085D, 而 HSA-AX15(R13K) 融合蛋白的分子量是 88 210D, 融合蛋白中 AX15(R13K) 部分只占整个分子的 1/4 左右, 因此与 HSA 融合并未影响 AX15(R13K) 的活性。

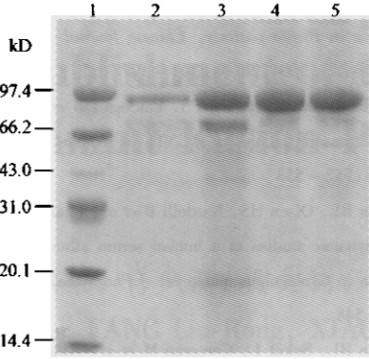


图 5 HSA-AX15(R13K) 融合蛋白的纯化(诱导 36h)

Fig.5 Purification of HSA-AX15(R13K) fusion protein

1: LMW protein marker; 2: cultural supernatant; 3: eluent from S Sepharose F.F. chromatography; 4: eluent from Source30RPC chromatography; 5: eluent from Superdex200 chromatography.

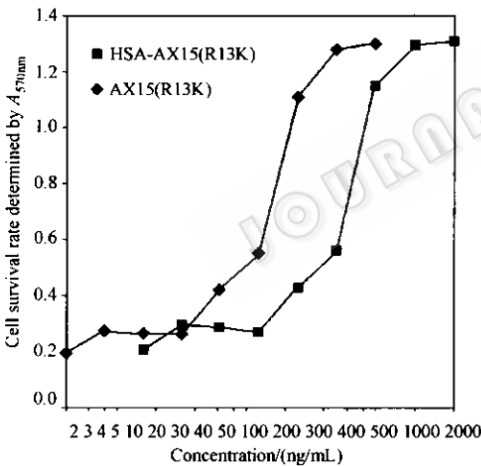


图 6 HSA-AX15(R13K) 融合蛋白促 TF-1 细胞存活活性的测定

Fig.6 TF-1 cell survival bioassay of HSA-AX15(R13K) fusion protein

### 2.5 动物实验

HSA-AX15(R13K) 融合蛋白和 AX15(R13K) 在昆明小鼠上减肥效果的比较见图 7。HSA-AX15(R13K) 融合蛋白的作用比 AX15(R13K) 更为持久: 注射 1.6mg/kg 的 AX15(R13K) 后 48h 内体重即开始反弹, 而注射 4.8mg/kg 的 HSA-AX15(R13K) 融合蛋白后能使体重连续 3d 保持下降。每 3 天注射 1 次 4.8mg/kg 的融合蛋白的治疗效果优于每天注射 1 次

1.6mg/kg 的 AX15(R13K) 的治疗效果。对于融合蛋白而言减去约 30% 的体重仅需接受 2 次治疗, 每只体重为 50g 小鼠每个治疗周期需要 480 $\mu$ g 蛋白, 而对 AX15(R13K) 而言要达到相似的治疗效果需接受 7 次治疗, 每只体重为 50g 的小鼠每个治疗周期需要 560 $\mu$ g 蛋白。

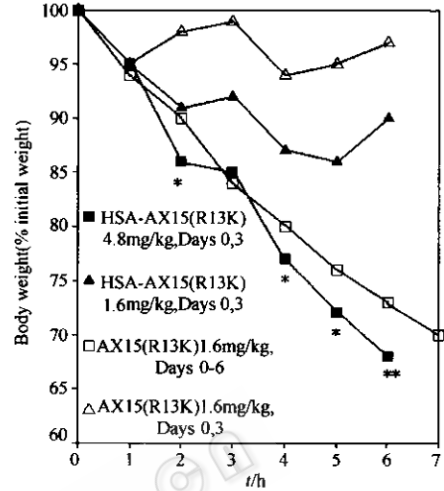


图 7 HSA-AX15(R13K) 融合蛋白在昆明小鼠上的减肥作用

Fig.7 The anti-obesity effects of HSA-AX15(R13K) fusion protein on KM mice

\*  $P < 0.05$  vs AX15(R13K) \*\*  $P < 0.01$  vs AX15(R13K)

### 3 讨论

临床实践表明延长蛋白药物半衰期是增加其体内疗效最为有效的手段<sup>[6-8]</sup>。长效蛋白药物的开发已成为对第一代基因工程产品进行二次开发的一个重要方向。不同蛋白药物有不同的体内代谢机制, 因此开发长效药物的策略也不相同。但对于分子量小于 70kD 的蛋白药物而言, 肾小球的滤过是一个共有的机制, 而增加其分子量则是一个通用的策略。常用的增加蛋白药物的分子量的方法有蛋白交联、PEG 修饰及蛋白融合。与其它方法相比, 人血清白蛋白融合技术具有以下优点: (1) HSA 与目标蛋白在胞内经蛋白翻译系统通过肽键连接, 不需额外的体外处理; (2) HSA 的表达水平较高, 与其融合后可以提高目的蛋白的表达水平; (3) HSA 是一个稳定的“惰性”蛋白, 与其融合后可以提高目的蛋白的稳定性; (4) HSA 融合蛋白具有比 PEG 修饰的蛋白药物更长的半衰期。HGS (Human Genome Sciences) 公司公布的临床结果表明 HSA-IFN 融合蛋白 Albuferon 的半衰期长达 145h, 而 PEG 修饰的干扰素的半衰期只有 40~80h。目前 HGS 公司已有白蛋白融合生长激素 (Albutropin), 白蛋白融合粒细胞生长因子 (Al-

bugranin)及白蛋白融合干扰素(Albuferon)等产品先后进入了 I/II 期临床研究,并显示出了较长的体内半衰期和较好的安全性及体内疗效。

在本研究中,AX15(R13K)与 HSA 融合后体内疗效得到了显著的提高:要达到减去约 30% 的体重的疗效仅需接受 2 次治疗,每只体重为 50g 小鼠每个治疗周期需要 480 $\mu$ g 融合蛋白,而对 AX15(R13K)而言要达到相似的治疗效果需接受 7 次治疗,每只体重为 50g 的小鼠每个治疗周期需要 560 $\mu$ g 蛋白。需要指出的是在注射的 480 $\mu$ g 融合蛋白中,AX15(R13K)部分约占 120 $\mu$ g,因此,融合蛋白不但可以减少用药次数,提高病人的顺应性,而且还可以减少用药量(尤其是有效蛋白药物部分的用量,120 $\mu$ g vs 560 $\mu$ g)和血药浓度的波动,从而减少副反应。

在本研究中还观察到 HSA-AX15(R13K)融合蛋白在巴斯德毕赤酵母中表达时在分子量为 67kD 和 45kD 处存在明显的降解产物。其中 45kD 的降解产物是白蛋白的特征性降解产物<sup>[9]</sup>。N-端氨基酸序列分析表明 67kD 的降解产物具有与白蛋白相同的 N-端氨基酸序列,因此降解位于两个蛋白的连接处。Gustavsson 等在毕赤酵母中表达纤维素结合结构域(cellulose binding domain, CBD)和脂肪酶融合蛋白时也观察到了在两个蛋白的连接处易发生降解<sup>[10]</sup>。Markaryan 等将该种降解称为非典型加工(atypical processing)<sup>[11]</sup>,造成该降解的蛋白酶有待进一步研究。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Sleeman MW, Anderson KD, Lambert PD *et al.* The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR $\alpha$ . *Pharma Acta Helv*, 2000, **74**:265 - 272
- [2] Lambert PD, Anderson KD, Sleeman MW *et al.* Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(8):4652 - 4657
- [3] Regeneron Press Release. Recently Completed Phase III Trial Suggests Early Weight Loss Identifies Patients Likely to Benefit the Most from AXOKINE Treatment. [www.regeneron.com](http://www.regeneron.com), 2003-05-19
- [4] Zhao HL(赵洪亮), Xue C(薛冲), Xiong XH(熊向华) *et al.* Construction of protease resistant mutein of human CNTF and its expression in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2004, **20**(3):394 - 397
- [5] Cedarbaum JM, Distefano PS, Lakings DB *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rhCNTF in rodents. *Annal Neurol*, 1996, **39**(4):552 - 553
- [6] Osborn BL, Olsen HS, Nardelli B *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon- $\alpha$  fusion protein in Cynomolgus monkeys. *J Pharm Exp Ther*, 2002, **303**(2):540 - 548
- [7] Osborn BL, Sekut L, Corcoran M *et al.* Albutropin: a growth-hormone-albumin fusion with improved pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats and monkeys. *Eur J Pharm*, 2002, **456**:149 - 158
- [8] Bailon P. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon- $\alpha$ : a 40kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjug Chem*, 2001, **12**:195 - 202
- [9] Kang HA, Choi ES, Hong WK *et al.* Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **53**:575 - 582
- [10] Gustavsson M, Lehtio J, Denman S *et al.* Stable linker peptides for a cellulose binding domain-lipase fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Engineering*, 2001, **14**(9):711 - 715
- [11] Markaryan A, Morozova I, Lee BS *et al.* Atypical processing of amyloid precursor fusion protein by proteolytic activity in *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **262**:263 - 268