

IL-1ra 突变体的构建、表达及初步的药代动力学分析 Construction, Expression and Preliminary Pharmacokinetic Analysis of IL-1ra Mutants

王宇新, 杨志新, 朱恒奇, 周晓巍*, 黄培堂*

WANG Yu-Xin, YANG Zhi-Xin, ZHU Heng-Qi, ZHOU Xiao-Wei* and HUANG Pei-Tang*

北京生物工程研究所, 北京 100071

Institution of Biotechnology, Beijing 100071, China

摘要 白细胞介素 1 受体拮抗剂 (Interleukin 1 receptor antagonist, IL-1ra) 是 IL-1 家族的一员, 由于它可以特异性地抑制 IL-1 的生物学效应, 因此在类风湿性关节炎 (Rheumatoid Arthritis, RA) 的治疗中倍受重视。为了提高 IL-1ra 的代谢稳定性, 利用 Ala 代替其序列中的双碱性氨基酸, 构建了 3 个突变体, 分别为 IL-1ra-1 (R⁶K⁷-AA), IL-1ra-2 (R⁹³K⁹⁴-AA), IL-1ra-3 (K⁹⁷R⁹⁸-AA); 将突变后的序列插入表达载体 pTIG-Trx, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3); 利用 Ni²⁺ 金属螯合层析, Sephadex G75 凝胶过滤纯化表达产物; 体外活性检测的结果表明, 3 个突变体的生物学活性与 IL-1ra 相比没有显著性差别 ($P = 0.2248$); 初步的药代动力学分析结果显示: 3 号突变体 IL-1ra-3 的半衰期与 IL-1ra 相比提高了 2.26 倍。

关键词 IL-1 受体拮抗剂, 定点突变, 药代动力学

中图分类号 Q756 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)03-0472-05

Abstract Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), a member of IL-1 family, is a naturally occurring IL-1 inhibitor as "receptor antagonist", which blocks biological responses mediated by IL-1. Recombinant human IL-1ra (rhIL-1ra, Kineret) was introduced in clinical trials involving patients with RA. Between 2001 ~ 2002, rhIL-1ra was approved by the US Food and Drug Administration and the European Agency for the Evaluation of Medicine Procedure. Unfortunately, 10 000 to 100 000-fold excess amounts of IL-1ra are needed to relieve disease because minimal IL-1 can induce complete biological responses, and the dosage of 100 ~ 150mg/day in a RA patient is so big that it greatly influence patients' physical, psychological and economical situation. In this study, IL-1ra mutants were established by site-specific mutagenesis to improve its stability. The sites of mutagenesis included R⁶K⁷-AA, R⁹³K⁹⁴-AA and K⁹⁷R⁹⁸-AA. IL-1ra and its mutants were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) using pTIG-Trx expressing system with the induction of IPTG. The recombinant proteins were purified by Ni²⁺ chelate chromatography and Sephadex G75 gel filtration chromatography. The activity of mutants is as high as IL-1ra. We characterized the pharmacokinetic profile of IL-1ra and its mutants. The third mutant's half life is 2.26 times than wt IL-1ra. The study has provided some approaches and experience for further research to improve the metabolism stability of IL-1ra.

Key words IL-1ra, site-specific mutagenesis, pharmacokinetic

IL-1ra 是生物体内的一种天然的蛋白质分子, 与 IL-1 α 、IL-1 β 同为 IL-1 家族的成员¹, 其本身无任何激动剂的作用, 但能特异性地与 IL-1 受体结合,

从而拮抗 IL-1 的各种生物学效应²⁻⁵。一系列的证据证明 IL-1 在 RA 发病的慢性炎症过程中具有重要的作用^{6,7}, IL-1 主要由活化的单核/巨噬细胞产生,

Received: December 20, 2005; Accepted: January 16, 2006.

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948832; E-mail: amms832@126.com

它可以促进成纤维细胞如滑膜细胞增殖,刺激前列腺素和基质金属蛋白酶如胶原酶的产生增加,从而导致软骨破坏,增加破骨细胞活性,促进骨吸收等,有研究证实直接向动物关节腔中注射 IL-1 可以诱导关节炎的发生^[8]。

IL-1ra 由于可以特异性地抑制 IL-1 的生物学功能,因此在 RA 的治疗中备受重视^[2,9,10-13]。2001 年,由 Amgen 公司生产的重组人白细胞介素 1 受体拮抗剂(rhIL-1ra,专利名称为 Kineret)被美国食品与药物管理局(FDA)和欧洲 EMEA 批准上市,用于治疗 RA,但是由于 IL-1ra 在体内不稳定,而且微量的 IL-1 就可以引起完全的生物学效应,在疾病治疗过程中只有 IL-1ra 与 IL-1 的比值达到 10000 ~ 100000 时才能有效地缓解症状^[9,14,15],因此 rhIL-1ra 的用量高达 100 ~ 150mg/d,频繁用药加重了病人的身体、心理和经济负担。

多种因素可以影响蛋白质在体内的稳定性,其中体内存在的蛋白酶可使相应的蛋白质和多肽迅速失活,这也是蛋白多肽类药物主要的代谢途径^[16]。由于多种蛋白酶的识别位点包括碱性氨基酸,本研究利用 Ala 代替 IL-1ra 中的双碱性氨基酸,从中筛选代谢稳定性提高的突变体,动物实验的结果证实其中一个突变体半衰期有了显著的提高。目前国内还没有类似的研究报告。

表 1 PCR 扩增所用的引物及序列

Table 1 Primer sequence used for the PCR amplification

Primer	Primer sequence
P ₂₇	5'-CGGGAATTCTAATGCGACCCTCTCGGAGAAAA-3'
P ₂₈	5'-CGGCTCGAGCTCGTCTCTCGGAAGTA-3'
P _{1,2}	5'-CGGAAITCTAATGCGACCCTCTGGGCGCGCTCCAGCAAGATGCAAGCC-3'
P _{2,1}	5'-TGTCTCTGCGCCCGTCTCTCGCTCAGGTCA-3'
P _{2,2}	5'-GAGAACGGGGCGCAGGACAAGCGCTTC-3'
P _{3,1}	5'-GGCGAACGGCGCTCTCTCTCTGTT-3'
P _{3,2}	5'-CAGGACGGCGGTTTCGCTTCATCCGCT-3'

以本实验室保存的 IL-1ra 的基因为模板,P₂₇和 P₂₈配对扩增 IL-1ra;P_{1,2}与 P₂₈配对扩增得到 1 号突变体 IL-1ra-1;P_{2,2}和 P₂₈配对,P_{2,1}和 P₂₇配对,分别进行 PCR,以得到的 2 种 PCR 产物为模板,P₂₇和 P₂₈配对作为引物进行重叠延伸 PCR 得 2 号突变体 IL-1ra-2;P_{3,2}和 P₂₈配对,P_{3,1}和 P₂₇配对,分别进行 PCR,其余同 2 号突变体,最后扩增得 3 号突变体 IL-1ra-3。PCR 的条件为:50℃退火,延伸 30s,做 25 个循环,其余同常规设置。

1.2.2 载体构建:将通过 PCR 反应中得到的 IL-1ra 以及 3 个突变体 IL-1ra-1,IL-1ra-2 和 IL-1ra-3 的片段

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体、菌株和细胞:pTIG-Trx 质粒、大肠杆菌 BL21(DE3)为本实验室保存;淋巴细胞系 EL-4、CTLL-2 购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 试剂:Taq plus DNA 聚合酶为上海生物工程有限公司产品;限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 为 NEB 公司产品;DNA 分子量标准 DL2000 为大连宝生物工程有限公司产品;蛋白质分子量标准、辣根酶标记的亲合素(streptavidin-horseradish peroxidase conjugate)为 Amersham 公司产品;抗 IL-1ra 的多克隆抗体为 R&D 公司产品;辣根酶标记的兔抗羊 IgG 抗体、生物素化的抗山羊 IgG 为中山公司产品;蛋白预染 Marker (BenchMark™ pre-stained protein ladder)为 Invitrogen 公司产品;钙调蛋白 A23187 为 Sigma 公司产品;重组人 IL-2 为北京四环制药厂产品;其他试剂均为国产或进口的分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 介导的定点突变:IL-1ra 两端的引物为 P₂₇和 P₂₈,在计划构建的三个突变体中,1 号突变体的突变位点位于 IL-1ra 序列的 5'端,突变引物 P_{1,2};2 号和 3 号突变体的突变位点位于 IL-1ra 序列中间,突变引物分别为 P_{2,1}和 P_{2,2},P_{3,1}和 P_{3,2}(见表 1)。

用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切后,插入 pTIG-Trx 载体中,构建好的载体转化大肠杆菌 BL21(DE3),挑取菌落 PCR 阳性的克隆进行测序。

1.2.3 IL-1ra 及其突变体在 BL21(DE3)中的表达及表达形式的鉴定:将测序正确的单菌落接入含 100mg/L Amp 的 LB 培养基中,0.3mmol/L IPTG 诱导表达 6h。以 BL21(DE3)空菌,BL21(DE3)/pTIG-Trx-IL-1ra 诱导前为对照,进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 IL-1ra 及其突变体的 Western blot 检测:IL-1ra 及突变体的表达菌经 SDS-PAGE 分离后,电转至 PVDF 膜,以羊抗人 IL-1ra 的多克隆抗体为一抗,辣

根过氧化物酶(HRP)偶联的兔抗羊 IgG 为二抗, DAB 显色。

1.2.5 IL-1ra 及其突变体的纯化:用 Binding buffer (2.3g Na_2HPO_4 + 0.456g NaH_2PO_4 + 29.22g NaCl + 1000mL H_2O)平衡 Ni^{2+} 金属螯合柱, 超声破碎后的菌悬液离心取上清吸附柱子, 用洗脱液 (Binding buffer 配制的 0.5mol/L 咪唑) 进行连续梯度洗脱, 分步收集。以 $1 \times \text{PBS}$ 溶液平衡凝胶过滤柱, 将经过 Ni^{2+} 金属螯合柱的收集样品上柱, 以 $1 \times \text{PBS}$ 进行洗脱, 分步收集, SDS-PAGE 检测。

1.2.6 IL-1ra 及突变体的体外细胞活性测定:EL-4 细胞膜表面富含 IL-1 受体, 与 IL-1 结合后刺激 EL-4 细胞产生 IL-2, 而 IL-1ra 与 IL-1 受体的竞争性结合将会降低 IL-1 与受体结合的机会, 使得 IL-2 的合成减少, 根据 IL-2 依赖的 CTLL-2 细胞的存活情况可以间接测定 IL-1ra 及突变体的活性。纯化后的 IL-1ra 及突变体蛋白用完全培养基进行梯度稀释, 得到 25, 2.5, 0.25, 0.025, 0.005, 0.0025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品, 以完全培养基作为对照, 依次加入 96 孔板, 每孔 50 μL , 每个样品重复 3 次, 然后依次加入钙调蛋白 A23187 (终浓度为 5×10^{-7} mol/L), IL-1 (10u/mL) 100 μL , 处于对数生长期的 EL-4 细胞 (2×10^6 细胞/mL) 100 μL , 总体积 250 μL , 37 $^\circ\text{C}$, CO_2 培养箱培养过夜; 将 100 μL 培养上清液对应转入一个新的 96 孔板, 分别加入 CTLL-2 细胞 ($1 \times 10^5/\text{mL}$) 100 μL , 37 $^\circ\text{C}$, CO_2 培养箱培养 20h; 每孔加入 10 μL MTT (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 4h; 吸掉 180 μL 上清, 然后每孔加入 100 μL 酸化异丙醇 (异丙醇中加入盐酸至终浓度为 0.04mol/L), 使用酶联仪测 570nm 波长的光吸收; 比较不同样品对 CTLL-2 细胞存活的影响, 而确定其体外细胞活性。

1.2.7 初步的药代动力学分析:选择雌性大耳兔, 皮下注射给药, 用药量 1mg/kg, 分别于注射前、注射后 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 36, 48h 于耳缘静脉取血 500 μL ^[17], 1% 肝素钠抗凝, 血液以 10 000 r/min 离心 1min, 取血浆, 直接 ELISA 测定血浆中 IL-1ra 及突变体的浓度: 兔血浆配制的标准样品和药代实验中取的血浆一起包被酶联板, 以羊抗人 IL-1ra 的多克隆抗体为一抗, 生物素化的抗山羊 IgG 为二抗, 辣根酶标记的亲合素为三抗, OPD 显色, 570nm 测定光吸收, 根据标准样品的读数绘制标准曲线, 计算血浆中 IL-1ra 及突变体的浓度。绘制血药浓度-时间曲线, 利用药代动力学软件 3p97 对 IL-1ra 及三

个突变体进行初步的药代动力学分析。

2 结果

2.1 PCR 介导的定点突变

IL-1ra 和 1 号突变体 IL-1ra-1 经一次 PCR 扩增即可得到目的序列, 2 号突变体 IL-1ra-2 和 3 号突变体 IL-1ra-3 经过 2 轮 PCR 完成突变, 目的序列全长 479bp (Fig. 1)。

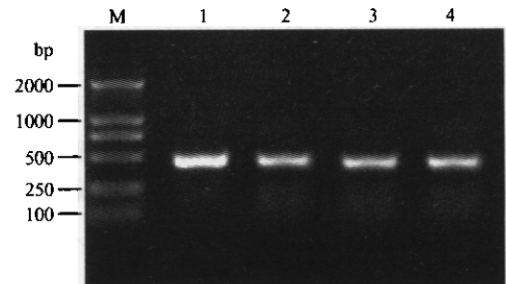


图 1 IL-1ra 及其突变体的 PCR 产物鉴定

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products of IL-1ra and its three mutants

M: DL2000 marker; 1: PCR product of IL-1ra; 2: PCR product of IL-1ra-1; 3: PCR product of IL-1ra-2; 4: PCR product of IL-1ra-3.

2.2 IL-1ra 及其突变体在 BL21 (DE3) 中的表达及表达形式的确定

按 1.2.3 所述方法进行 IL-1ra 及其突变体的诱导表达, SDS-PAGE 分析结果显示 4 种蛋白均实现高水平表达 (Fig. 2)。超声破碎菌体, 结果显示目的蛋白存在于上清中, 主要以可溶的形式表达 (资料未列出)。

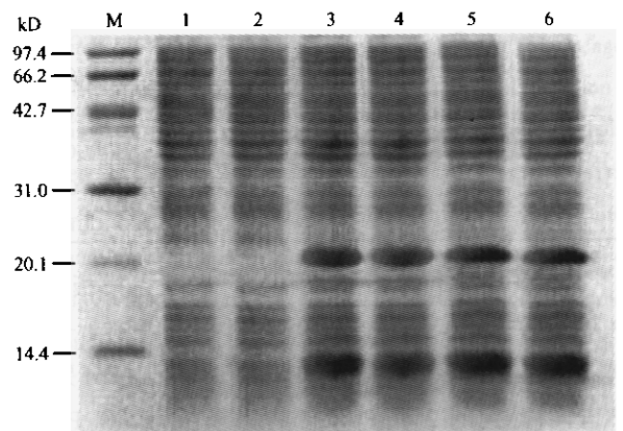


图 2 IL-1ra 及其突变体在 BL21 (DE3) 中的表达结果

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of IL-1ra and its mutants expressed in BL21 (DE3)

M: low molecular weight protein marker; 1: mixed proteins of BL21 (DE3); 2: total proteins of BL21 (DE3) / pTIG-Trx-IL-1ra before induction; 3 ~ 6: BL21 (DE3) / pTIG-Trx-IL-1ra and its three mutants after induction.

2.3 Western blot 检测

Western blot 结果显示, IL-1ra 及突变体与其多克隆抗体呈现特异性的结合(Fig.3)。

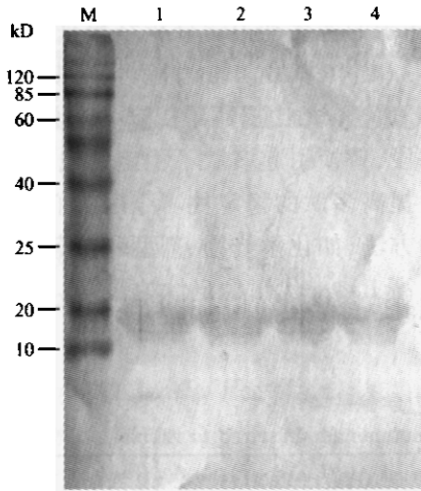


图3 IL-1ra 及三个突变体 Western blot 检测的结果

Fig.3 Western blotting analysis of IL-1ra and its mutants

M: BenchMark™ pre-stained protein ladder; 1~4: BL21(DE3)/pTIG-Trx-IL-1ra and its three mutants.

2.4 IL-1ra 及其突变体的纯化

如方法 1. 2.5 所述,利用 Ni^{2+} 金属螯合层析和 SephadexG75 凝胶过滤对 IL-1ra 及三个突变体进行纯化, SDS-PAGE 分析结果见 Fig.4。

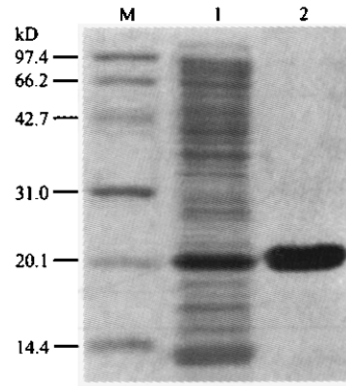


图4 纯化后的 IL-1ra 的 SDS-PAGE 检测结果

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified IL-1ra

M: low molecular weight protein marker; 1: supernatant protein of BL21(DE3)/pTIG-Trx-IL-1ra; 2: purified IL-1ra.

2.5 IL-1ra 及突变体的体外细胞活性测定

试验结果表明随着 IL-1ra 和突变体浓度的加大,存活的 CTLL-2 细胞逐渐减少,说明重组人 IL-1ra 及其突变体确实具有与 EL-4 细胞膜表面上的 IL-1 受体结合的活性,其与 IL-1 受体的结合降低了 IL-1 与受体结合的机会,使得 IL-2 的合成减少,造成 IL-2 依赖的 CTLL-2 细胞死亡。根据 570nm 处测定的光吸收值绘制柱状图,比较不同样品对 CTLL-2 细胞存活的影响(Fig.5),统计学分析结果显示,3 个突变体与 IL-1ra 的生物活性之间无显著性差别($P = 0.2248$)。

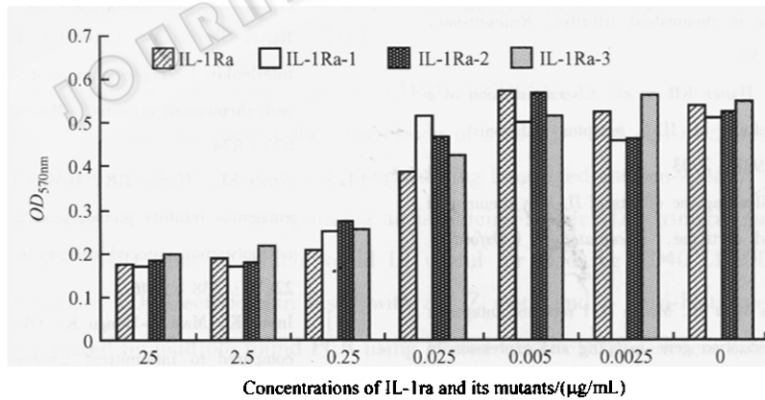


图5 不同剂量的 IL-1ra 及突变体对 CTLL-2 细胞存活率影响的比较

Fig.5 Comparison of the effect of IL-1ra and its mutants on survival rate of CTLL-2 at different concentrations($P = 0.2248$)

2.6 初步的药代动力学分析

利用直接 ELISA 计算出各时间段血浆中的样品浓度,灵敏度为 100ng/mL,这个值以下默认为零,血浆中的样品浓度与时间相对应绘制出血药浓度-时间曲线(Fig.6)。如 Fig.6 所示,皮下注射约 3h 后血浆中样品的浓度达到最高,随后逐渐降低,到 24h 后,除 3 号突变体外,其余样品均已检测不到。初步的药代动

力学分析结果显示其药代动力学模型为单室模型,符合一级动力学消除,具体参数见 Table 2。IL-1ra-1 和 IL-1ra-2 与 IL-1ra 的消除半衰期 $T_{1/2}(K_e)$ 无明显差别,但 IL-1ra-3 的消除半衰期高达 (5.98 ± 0.38) h,与 IL-1ra 相比提高了 2.26 倍,证实其代谢稳定性有了一定程度的提高。另外的参数如吸收速度常数(K_a),吸收半衰期, T_{max} , C_{max} 无显著性差别。

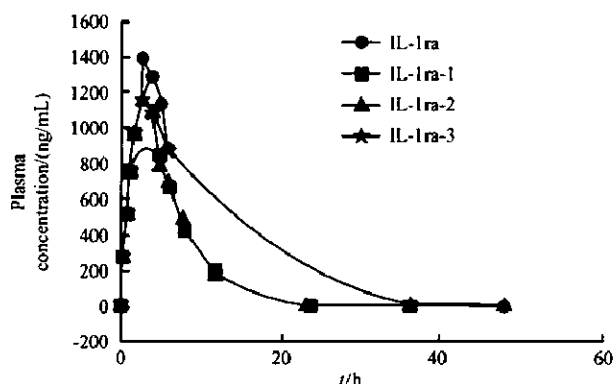


图6 IL-1ra及其突变体的血药浓度-时间曲线图

Fig.6 Plasma concentration-time profiles of IL-1ra and its mutants

表2 IL-1ra及其突变体的药代动力学参数

Table 2 Pharmacokinetic parameters of IL-1ra and its mutants administered to rabbit

	K_a/h^{-1}	$T_{1/2}(K_a)/h$	K_e/h^{-1}	$T_{1/2}(K_e)/h$	T_{max}/h	$C_{max}/(ng/mL)$	$AUC/(ng \cdot h/mL)$
IL-1ra	0.468 ± 0.004	1.48 ± 0.02	0.262 ± 0.006	2.65 ± 0.06	2.82 ± 0.05	1182 ± 107	9427 ± 691
IL-1ra-1	0.579 ± 0.016	1.20 ± 0.03	0.213 ± 0.008	3.26 ± 0.11	2.73 ± 0.02	928 ± 52	7797 ± 542
IL-1ra-2	0.587 ± 0.016	1.18 ± 0.04	0.233 ± 0.006	2.98 ± 0.07	2.62 ± 0.02	1020 ± 29	8040 ± 271
IL-1ra-3	0.635 ± 0.030	1.09 ± 0.05	0.116 ± 0.008	5.98 ± 0.38	3.27 ± 0.05	1037 ± 20	13083 ± 747

K_a : absorption constant; $T_{1/2}(K_a)$: half life of absorption; K_e : elimination constant; $T_{1/2}(K_e)$: half life of elimination; C_{max} : maximum observed concentration; T_{max} : time at which C_{max} was observed; AUC: area under the concentration-time curve of time 0 to the last detectable concentration.

REFERENCES(参考文献)

- [1] Dinarello CA. Interleukin-1 and Interleukin-1 antagonism. *Blood*, 1991, 77(8): 1627 - 1652
- [2] Cutolo M. IL-1ra: its role in rheumatoid arthritis. *Reumatismo*, 2004, 56(1 Suppl 1): 41 - 55
- [3] Malyak M, Guthridge JM, Hance KR *et al.* Characterization of a low molecular weight isoform of IL-1 receptor antagonist. *J Immunol*, 1998, 161(4): 1997 - 2003
- [4] Abramson SB, Amin A. Blocking the effects of IL-1 in rheumatoid arthritis protects bone and cartilage. *Rheumatology (Oxford)*, 2002, 41(9): 972 - 980
- [5] Zahedi K, Seldin MF, Rits M *et al.* Mouse IL-1 receptor antagonist protein. Molecular characterization gene mapping and expression of mRNA *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol*, 1991, 146(12): 4228 - 4233
- [6] Eastgate JA, Symons JA, Wood NC *et al.* Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 1988, 2: 706 - 709
- [7] Firestein GS, Zvaifler NJ. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis Rheum*, 2002, 46: 298 - 230
- [8] Chandrasekhar S, Harvey AK, Hrubey PS *et al.* Arthritis induced by interleukin-1 is dependent on the site and frequency of intraarticular injection. *Clin Immunol Immunopathol*, 1990, 55: 382 - 400
- [9] Bendele A, McAbee T, Woodward M *et al.* Effects of interleukin-1 receptor antagonist in a slow-release hylan vehicle on rat type II collagen arthritis. *Pharm Res*, 1998, 15(10): 1557 - 1561
- [10] Fiocco U, Vezzu M, Cozzi L *et al.* IL-1ra (recombinant human IL-1 receptor antagonist) in the treatment of rheumatoid arthritis: the efficacy. *Reumatismo*, 2004, 56(1 Suppl 1): 62 - 73
- [11] Barrera P, van der Laken CJ, Boerman OC *et al.* Radiolabelled interleukin-1 receptor antagonist for detection of synovitis in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2000, 39(8): 870 - 874
- [12] Amer EC, Harris RR, DiMeo TM *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist inhibits proteoglycan breakdown in antigen induced but not polyclonal induced arthritis in the rabbit. *J Rheumatol*, 1995, 22(7): 1338 - 1346
- [13] Inoue K, Masuko-Hongo K, Okamoto M *et al.* Efficacy of daily compared to intermittent administration of IL-1ra for protection against bone and cartilage destruction in collagen-challenged mice. *Clin Exp Rheumatol*, 2003, 21(1): 33 - 39
- [14] Bendele A, McAbee T, Sennello G *et al.* Efficacy of sustained blood levels of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of arthritis: comparison of efficacy in animal models with human clinical data. *Arthritis Rheum*, 1999, 42(3): 498 - 506
- [15] Kopp WC, Urba WJ, Rager HC *et al.* Induction of interleukin 1 receptor antagonist after interleukin 1 therapy in patients with cancer. *Clin Cancer Res*, 1996, 2(3): 501 - 506
- [16] Mariotti F, Huneau J, Mahe S *et al.* Protein metabolism and the gut. *Curro Opin Clin Nutr Metab Care*, 2000, 3(1): 45 - 50
- [17] Chang DM, Chang SY, Yeh MK *et al.* The pharmacokinetics of interleukin-1 receptor antagonist in Chinese subjects with rheumatoid arthritis. *Pharmacol Res*, 2004, 50(3): 371 - 376