

聚乙二醇定点修饰重组人粒细胞集落刺激因子突变体的研究 Study of Target Pegylated Recombinant Mutant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor

黄岩山¹, 金荣², 刘晓妮², 王昌梅², 戎亚雯², 陈智^{1*}

HUANG Yan-Shan¹, JIN Rong², LIU Xiao-Ni², WANG Chang-Mei², RONG Ya-Wen² and CHEN Zhi^{1*}

1 浙江大学医学院附属第一医院传染病研究所 杭州 310003

2 杭州九源基因工程有限公司 杭州 310018

1 Institute of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital of Medical College, Zhejiang University, Hang Zhou 310003, China

2 Hang Zhou Jiuyuan Gene Engineering Co. Ltd., Hang Zhou 310018, China

摘要 研究了重组人粒细胞集落刺激因子突变体(rmhG-CSF)的聚乙二醇化修饰、分离纯化和活性鉴定。通过对人重组粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)第1, 3, 4, 5, 17位氨基酸进行突变,并在C末端加了一个半胱氨酸,获得了体外活性为原型rhG-CSF 150%以上的重组人粒细胞集落刺激因子突变体(rmhG-CSF)。然后用分子量为20kD的甲氧聚乙二醇马来酸酐(mPEG-Mal)修饰rmhG-CSF,反应混合物经离子交换和凝胶过滤柱纯化,得到纯化的聚乙二醇重组人粒细胞集落刺激因子突变体(PEG-rmhG-CSF)。SDS-PAGE电泳分析表明纯化后的PEG-rmhG-CSF的纯度大于95%,体外活性分析表明PEG-rmhG-CSF活性优于目前临床使用的聚乙二醇重组人粒细胞集落刺激因子(PEG-rhG-CSF, Neulasta[®])。药代动力学研究表明PEG-rmhG-CSF体内半衰期约为14h,比修饰前延长了7倍。

关键词 聚乙二醇化修饰, 重组人粒细胞集落刺激因子突变体, 纯化, 鉴定

中图分类号 Q5 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0919-05

Abstract Recombinant mutant human granulocyte colony stimulating factor (rmhG-CSF) was pegylated, purified and characterized. rhG-CSF was mutated in position 1, 3, 4, 5, 17, and cysteine was added in C-terminal. rmhG-CSF was pegylated by PEG-Mal 20000 and separated by ion-exchange chromatography, gel filtration chromatography. Analysis of SDS-PAGE showed that the purity of the separated PEG-rmhG-CSF was greater than 95%. and in vitro and in vivo bioactivity study showed that target modified PEG-rmhG-CSF kept full bioactivity which was better than traditional pegylation method, and longer half-life was proved in mice.

Key words pegylation, recombinant mutant human granulocyte colony stimulating factor, purification, characterization

重组人粒细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rhG-CSF)分子量为19kD,可诱导造血干细胞的增值和分化,导致血液中的中性粒细胞数增加;另外还能刺激成熟中性粒

细胞数从骨髓中释出并激活中性粒细胞的功能^[1,2]。因此自1991年起rhG-CSF已经广泛用于治疗癌症化疗导致的骨髓抑制,可以显著改善化疗所引起的中性粒细胞减少症的严重性和持续时间^[3]。

Received: January 24, 2007; Accepted: March 20, 2007.

This work was supported by a grant from the Key Scientific and Technological Subject of Zhejiang Province (No. 2005C13025).

* Corresponding author. Tel: +86-571-86879130; Fax: +86-571-86911688; E-mail: protein.huang@gmail.com

浙江省重大科技攻关项目(No. 2005C13025).

但是作为重组蛋白药物, rhG-CSF 血清半衰期短, 只有 2~4h, 每个化疗周期需要每天注射 1~2 次, 持续注射 5~7d^[4]。通过对其 N 端进行聚乙二醇(PEG)修饰, 增大了 rhG-CSF 蛋白的分子量, 可以显著提高其在体内的半衰期, 每个化疗周期只需注射给药一次。现有临床应用的 PEG-rhG-CSF 产品是利用活化的 20kD PEG 丙醛试剂对 rhG-CSF 中 N 端的 α -氨基进行修饰^[5]。然而, 这种修饰方式对 rhG-CSF 来说并非最优, 因为 rhG-CSF 结构中 N 端与其受体结合有关。因此, 用现有方法进行 PEG 修饰以后, rhG-CSF 的生物学活性都会下降, 根据不同修饰位点和修饰数目, 其体外活性可能下降几倍到几十倍。而且 rhG-CSF 结构中存在多个 α -氨基, 因此所获得最终产物可能是不同修饰位点的混合物, 还可能有多位点修饰产物。这些对于 PEG-rhG-CSF 的临床应用都是不利的。因此, 制备一种活性更高更均一的 PEG 化 rhG-CSF 产物, 具有很重要的临床和经济意义。我们构建了一种 rhG-CSF 突变体(recombinant mutant human granulocyte colony stimulating factor rnhG-CSF), 该突变体突变了 rhG-CSF N 端的 5 个氨基酸^[6]以提高生物学活性, 并在其 C 末端引入一个游离的半胱氨酸(Cys)以提供一个 PEG 修饰位点, 然后用巯基反应试剂 PEG-MAL 对 Cys 进行定点修饰, 获得了结构均一且活性更高的长效 PEG-rnhG-CSF。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂: pGEM-T 克隆载体、pET32a 表达载体、DNA 聚合酶、柱式质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒及 X-gal(购自上海生工生物工程技术服务有限公司); 大肠杆菌 DH5 α 、BL21、G-CSF 基因(本实验室保存); T4 DNA 连接酶及 IPTG(Gibco BRL 公司); PEG-MAL 20000(Nektar), rhG-CSF 活性标准品(中国药品生物制品检定所); 重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)(杭州九源基因工程有限公司), PEG-rhG-CSF(Neulasta[®])(Amgen, USA), Folin 酚(Sigma), 牛血清白蛋白(BSA, Sigma), 丙烯酰胺(Sigma), 甲叉丙烯酰胺(Sigma), Human G-CSF ELISA 试剂盒(R&D Systems), 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。

1.1.2 主要仪器: PCR 仪(PE), VDS 电泳扫描分析系统(Amersham Pharmacia); ÄKTA explorer 100 液相色谱系统(GE Healthcare Biosciences), Resource S 色谱柱(GE Healthcare Biosciences), 电泳仪 Mini protein III(Bio-Rad), 凝胶扫描系统 VDS Image system

(Pharmacia), Agilent 1100 HPLC, Model 630 酶标仪(Bio-Rad), CA(150mm \times 4.6mm)(柱)(Vydac)。

1.2 方法

1.2.1 rnhG-CSF 的构建: rnhG-CSF 是把 rhG-CSF 第 1、3、4、5、17 位氨基酸分别突变为 Ala、Thr、Tyr、Arg 和 Ser^[6], 并且在 C 末端额外引入了一个半胱氨酸(Cys)。为了得到 rnhG-CSF 的基因, 以本实验室保存的 rhG-CSF 基因为模板 PCR 获得。设计引物如下: 上游引物 5'-ACTAGCCATATGGCACCAACATACCGTGCCAGCTCCCCTGCCCCAGAGCTTCTGCTCAAGTCC TTAGAGCAAGTGAGG-3'; 下游引物 5'-AAAGGATCCTTAACAGGGCTGGGCAAGG-3'(上海生工生物工程技术服务有限公司合成), 用常规 PCR 方法进行目的基因的扩增。PCR 产物经回收、纯化, 装到 pGEM-T 载体, 转化 DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选, 将阳性克隆送测序检测。将测序正确的克隆基因用 *Nde*I 和 *Bam*H I 从 pGEM-T 上切割回收, 然后装到经同样酶切处理的 pET32a 上, T4 DNA 连接酶, 12.5 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化 BL21 感受态细胞, 挑选单菌落, 用柱式质粒小提试剂盒小提质粒, 然后用 *Nde*I 和 *Bam*H I 酶切鉴定。构建成功的菌株参考文献[6]进行表达和纯化, 并且在蛋白复性的条件上做了适当的改进, 简述如下: rnhG-CSF 的包含体溶解于 200mL 增溶液中(8mol/L 尿素、10mmol/L DTT、25mmol/L 半胱氨酸, 20mmol/L Tris-HCl, pH 8.0), 室温搅拌 30min 后用复性缓冲液(15% 甘油, 40 μ mol/L 硫酸铜, 40mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 8.0)稀释到 1000mL, 4 $^{\circ}$ C 搅拌复性 48h。然后用稀盐酸调节 pH 到 4.0, 经 Resource S 离子交换柱层析, 以 0~0.5 mol/L NaCl(含 20mmol/L NaAc, pH 4.0)梯度洗脱, 目标峰在 0.3mol/L NaCl 时被洗脱。

1.2.2 rnhG-CSF 的 PEG 修饰和纯化: 5mL 1.0 mg/mL rnhG-CSF(含 100mmol/L Bicine, pH 8.5)加入 5 倍摩尔比的 PEG-MAL₂₀₀₀₀, 在室温下搅拌反应 24h, 并用 RP-HPLC 对修饰过程进行监控。修饰反应结束后用水稀释到蛋白浓度为 0.1mg/mL, 稀盐酸调 pH 至 4.0, 经 Resource S 离子交换柱层析, 以 0~0.5mol/L NaCl(含 20mmol/L NaAc, pH 4.0)梯度洗脱, 修饰的 PEG-rnhG-CSF 在 0.1mol/L NaCl 时被洗脱, 目标峰再经 Sephadex G25 脱盐层析。

1.3 分析和鉴定

1.3.1 SDS-PAGE 电泳检测: 按 Laemmli 方法^[7]进行, 浓缩胶为 5%, 分离胶为 15%, 考马斯亮蓝 R250 染色。

1.3.2 蛋白浓度的测定: 按《中国药典》2005 版“生

物制品化学及其他检定方法”中微量 Lowry 法的要求测定蛋白质浓度。

1.3.3 RP-HPLC 法检测：采用 Vydac C4(150mm × 4.6mm) 柱，流动相 A 为 0.1% 三氟乙酸 (W/V)，流动相 B 为乙腈：水：三氟乙酸 (90:9.9:0.1) 溶液，流速为 0.8mL/min，梯度为 30min 内流动相 B 由 25% 增至 80%，检测波长为 280nm。

1.3.4 高效凝胶过滤色谱检测：采用 Superdex 200 HR10/30 凝胶色谱柱，流动相为 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液中，0.1mol/L 硫酸钠，流速 0.4mL/min，检测波长为 280nm。

1.3.5 质谱分析：用 AutoFlex MALDI-TOF-MS 质谱测定 rhmG-CSF 和 PEG-rhmG-CSF 的分子量。

1.3.6 体外生物学活性的测定：采用 G-CSF 依赖细胞株 NFS60 测定活性^[8]。具体步骤为：在 96 孔细胞培养板中接种一定浓度的 NFS60 细胞悬液 (50 μL/孔) 将 rhG-CSF 标准品和修饰 rhG-CSF 样品系列稀释，各 50μL 加入培养板相应孔中。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 A₅₇₀/A₆₃₀ 值。

1.3.7 小鼠体内半衰期测定：18 ~ 22g 雄性 SPF 级 ICR 小鼠，分两组，每组 39 只。皮下给药，给药剂量为 1mg/kg。rhG-CSF 组按 0, 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24h 间隔处死 3 只采血；PEG-rhmG-CSF 组按 0, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168h 间隔处死 3 只采血。血样离心 30min 后分离血清，-20℃ 保存待测。用 Human G-CSF DuoSet 试剂盒 (R&D Systems) ELISA 法检测 rhG-CSF 和 PEG-rhmG-CSF 的浓度。数据用 MicroCal Origin 软件分析并用 3P87 软件进行曲线拟合并计算主要药代动力学参数。

2 结果

2.1 rhmG-CSF 的构建和表达纯化

按文献资料 [6]，为提高 hG-CSF 生物活性，将其第 1, 3, 4, 5, 17 位氨基酸分别变为 Ala, Thr, Tyr, Arg 和 Ser，为了方便对其定点 PEG 修饰，在 C 末端引入了一个 Cys (图 1)。构建的 pET32a 表达质粒经 *Nde* I / *Bam* H I 酶切分析 (图 2)，双酶切得到了大小约为 5.4kb 和 540bp (rhmG-CSF-Cys 基因) 的条带 (泳道 2)，与理论值大小相符，重组质粒并经 DNA 测序验证 (资料未显)，转化筛选后在大肠杆菌 BL₂₁(DE₃) 获得了高效表达 (图 3，泳道 3)。将表达产物经改进的方法进行复性，再经过 Resouse S 离子交换进行纯化，纯化后的 rhmG-CSF 可达到 95% 以上的纯度 (图

3 泳道 4)。最终制备获得的 rhmG-CSF 生物活性比 rhG-CSF 提高了 50% (图 4)。

```

ATG GCA CCA ACA TAC CGT GCT TCT TCT CTG CCG CAA AGC TTT CTG
M  A  P  T  Y  R  A  S  S  L  P  Q  S  F  L
CTG AAA TCT CTG GAA CAG GTT CGT AAA ATC CAG CGT GAC GGT GCT
L  K  S  L  E  Q  V  R  R  I  Q  G  D  G  A
.....TAC CGT GTT CTG CGT CAT CTG GCT CAG CCG TGC TAA TAG
.....Y  R  V  L  R  H  L  A  Q  P  C  *  *
    
```

图 1 rhmG-CSF 的 cDNA 和氨基酸序列示意图，加外方框的表示突变 (N 端) 和引入 (C 末端) 的氨基酸
Fig. 1 cDNA and protein sequence of rhmG-CSF

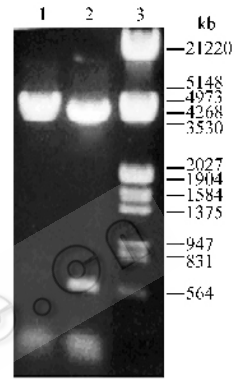


图 2 rhmG-CSF 基因鉴定的琼脂糖电泳图
Fig. 2 Identification of the gene of rhmG-CSF detected by agarose gel electrophoresis

1: the vector pET32a was digested by *Bam* H I; 2: the recombinant expression plasmid pET32a-rhmG-CSF was digested by *Nde* I / *Bam* H I; 3: DNA marker λDNA (*Eco* R I + *Hind* III).

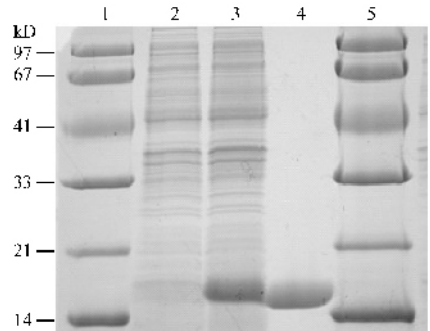


图 3 rhmG-CSF 表达和纯化的 SDS-PAGE 电泳图
Fig. 3 Expression and purification of rhmG-CSF detected by SDS-PAGE

1, 5: marker; 2, 3: expression of rhmG-CSF-Cys without and with IPTG-inducing; 4: eluent from Resource S.

2.2 rhmG-CSF 的 PEG 修饰与纯化

将纯化的 rhmG-CSF，采用 PEG-MAL20000 在其羧基末端 Cys 进行定点修饰，其修饰过程如图 5 所示，PEG 修饰后的 PEG-rhmG-CSF，由于疏水性发生变化，可与未修饰的 rhmG-CSF 相分离，经 Resouse S 离子交换层析分离 (图 6)，PEG-rhmG-CSF 在低盐浓度下被洗脱 (Peak A)，rhmG-CSF 在高盐下被洗脱 (Peak B)，最终可获得纯度 > 95% 的 PEG-RhmG-CSF。

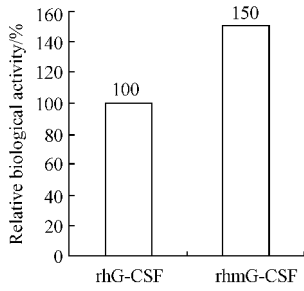


图 4 rhG-CSF 和 rhmG-CSF 的生物学活性相对值
Fig. 4 The relative biological activity of rhG-CSF and rhmG-CSF

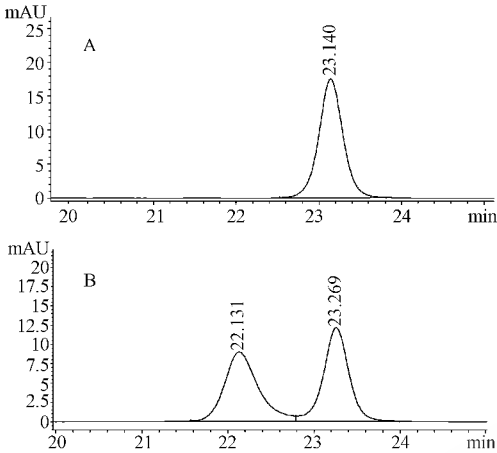


图 5 RP-HPLC 监测 rhmG-CSF 修饰过程
Fig. 5 Pegylating of rhmG-CSF monitored by RP-HPLC
A : rhmG-CSF ; B : analyzed at 24h after pegylation.

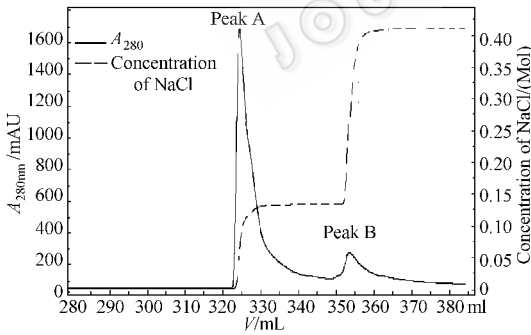


图 6 Resource S 分离纯化 PEG-rhmG-CSF 色谱图
Fig. 6 Chromatograph of PEG-rhmG-CSF on Resource S

(图 7)。PEG-rhmG-CSF 分子量以 SDS-PAGE 分析, 约为 40kD (图 7, 泳道 4), 以 MALDI-TOF-MS 质谱测定, rhmG-CSF 修饰前分子量为 18 901 (图 8a), 修饰后 PEG-rhmG-CSF 为 40 715 (图 8b), 与理论预测值基本相一致。

2.3 PEG-rhmG-CSF 的生物学活性

经生物学活性测定显示(表 1)修饰前的 rhmG-CSF 为 1.23×10^8 IU/mg, 而修饰后的 PEG-rhmG-CSF 为 1.25×10^8 IU/mg 未见经 PEG 修饰后对活性产生影响, 而 N 端 PEG 修饰的阳性对照 PEG-rhG-CSF

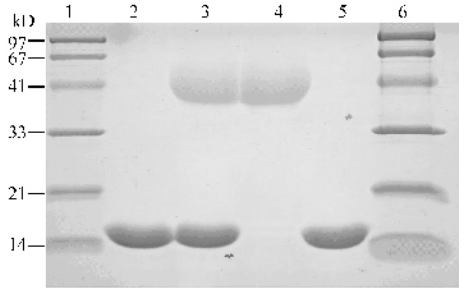


图 7 rhmG-CSF PEG 修饰和纯化过程中
的非还原 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 7 Pegylation of rhmG-CSF and purification of PEG-rhmG-CSF detected by non-reduced SDS-PAGE
1:6 marker; 2: purified rhmG-CSF; 3: mixture of pegylation reaction; 4: Peak A of Resource S; 5: Peak B of Resource S.

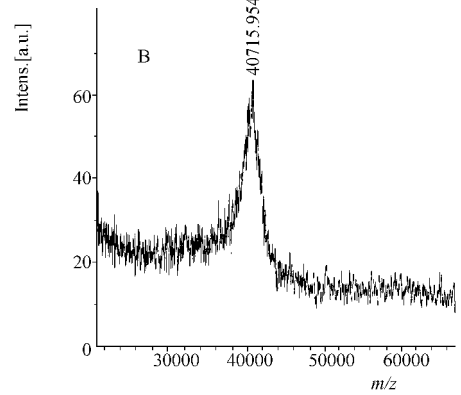
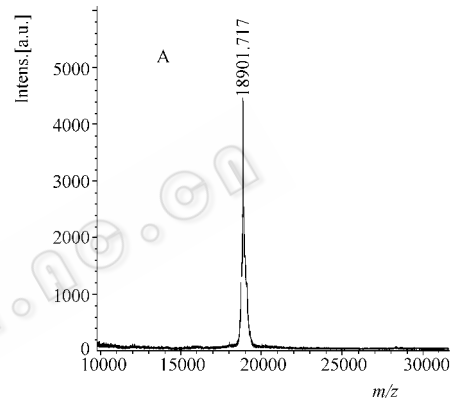


图 8 MALDI-TOF-MS 质谱测定 rhmG-CSF 和 PEG-rhmG-CSF 的分子量

Fig. 8 Analysis of rhmG-CSF and PEG-rhmG-CSF by MALDI-TOF-MS
A is rhmG-CSF, B is PEG-rhmG-CSF.

(Neulasta) 生物活性为 0.58×10^8 /mg, 表明 C 末端定点修饰较 N 端优越, 它不影响生物活性。

对于 PEG-rhmG-CSF 在体内半衰期, 经小鼠对其与 rhmG-CSF 进行了血药浓度-时间曲线对比测定(图 9), 药代动力学主要参数列于表 2, 可见 PEG-rhmG-CSF 在血清中滞留时间长达 100h 以上, 半衰期 $t_{1/2}$ 为 14.6h, 较 rhG-CSF 延长了 7 倍, 而血清清除率 CL 降低了 18 倍。

表 1 PEG 修饰前后 rhmG-CSF 的体外生物学活性比较

Table 1 *In vitro* bioactivity of of rhmG-CSF-Cys before and after pegylation

	Specific bioactivity ($\times 10^8$ IU/mg)	Relative bioactivity /%
rhmG-CSF	1.23	100
PEG-rhmG-CSF	1.25	102
PEG-rhG-CSF(Neulasta [®])	0.58	47

表 2 小鼠皮下给药后 rhG-CSF 和 PEG-rhmG-CSF 的药代参数

Table 2 Mean pharmacokinetic parameter values after single-dose subcutaneous administration of rhG-CSF and PEG-rhmG-CSF in mice

Parameter	Value	
	rhG-CSF	PEG-rhmG-CSF
Lag time/h	0.035 \pm 0.005	1.457 \pm 0.027
$T_{1/2}$ /h	2.143 \pm 0.025	14.578 \pm 0.369
T_{peak} /h	1.388 \pm 0.235	20.349 \pm 0.894
C_{max} (ng/mL)	1854.623 \pm 253.125	2832.169 \pm 369.250
AUC (ng·h/mL)	8881.870 \pm 524.57	139712.236 \pm 25672.354
(CL/F) (L/h·kg)	0.113 \pm 0.023	0.006 \pm 0.001
(V/F) (L/kg)	0.349 \pm 0.035	0.152 \pm 0.025

$T_{1/2}$ = terminal half-life; T_{peak} = time of maximum concentration; C_{max} = maximum concentration; AUC = area under the curve; CL/F = clearance over bioavailability; V/F = volume of distribution using the terminal phase.

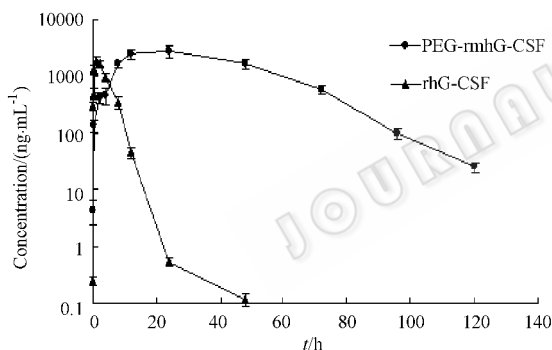


图 9 小鼠皮下给药后 rhG-CSF 和 PEG-rhmG-CSF 的血药浓度-时间图

Fig. 9 Concentration-time curve of PEG-rhG-CSF and rhG-CSF after SC in mice

3 讨论

已经证明用 PEG 进行蛋白质修饰是延长蛋白药物体内半衰期的一个有效的方法,目前已有多种产品应用于临床^[9]。但是,现有的修饰技术一般都是修饰在 Lys 和 N 端氨基酸的-NH₂ 位点上,由于大部分蛋白药物都存在数个 Lys,修饰产物往往是不均一的,而且这些 Lys 往往位于活性位点或者受体结合部位,经 PEG 修饰后都将产生生物学活性的下降,而且修饰产物往往是不均一的,因此修饰后蛋白虽然增加了半衰期,但由于活性下降,因此往往需要增大使用剂量,而且不均一的反应产物,不仅增加了分离纯化的处理难度,也难以获得均一制品。

鉴于 rhG-CSF 的 N 端是其受体结合部位,与其生物学活性密切相关。因此在其 N 端进行 PEG 修饰,必然会降低其生物学活性。目前常规应用的 N 末端 PEG 修饰,经修饰后它的生物学活性仅保留了 60% 左右^[5]。为了获得高活性的 PEG 修饰的 rhG-CSF,我们参考文献,在 G-CSF 的 N 端编码氨基酸进行了突变,以提高生物学活性,并在其 C 末端引入一个游离的半胱氨酸(Cys)用于 PEG 定点修饰。通过以上改造,我们成功获得了高活性的 PEG-rhmG-CSF 制品。我们的研究表明通过采取活性更高的 rhG-CSF 蛋白,并在 C 末端进行定点 PEG 修饰,可以避免上述弊端。经过改构的 rhmG-CSF,由于只存在 C 末端 Cys 一个 PEG-MAL 结合位点,因此反应产物均是 1:1 定点修饰的产物,避免了反应位点不一和多位点修饰的产生;此外,由于 PEG 是结合在 rhmG-CSF 活性区以外的 C 末端,因此修饰后的蛋白活性基本未受影响。经体外活性分析表明,我们所制备的 PEG-rhmG-CSF,活性比现在用于临床的 PEG-rhG-CSF(Neulasta(r))体外活性要高 1 倍,经小鼠的药代动力学研究表明 PEG-rhmG-CSF 的半衰期延长了近 7 倍,血清廓清率下降了 18 倍,表明我们为制备 PEG-rhmG-CSF 的设计、构建和工艺是成功的,为制备长效的 rhG-CSF 奠定了重要基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 1986, **67**:257 - 267.
- [2] Welte K, Platter EL, Lu H, et al. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Nat Acad Sci*, 1985, **82**:1526 - 1530.
- [3] Souza L M, Boone TC, Gabilove J, et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemia myeloid cells. *Science*, 1986, **232**:61 - 65.
- [4] Frampton JE, Lee CR, Faulds D. Filgrastim: A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in Neutrogena. *Drugs*, 1994, **48**(5):731 - 60.
- [5] Kinstler OB, Berns DN, Lauren SL, et al. Characterization and stability of N-terminally PEGylated rhG-CSF. *Pharm Res*, 1996, **13**:996 - 1002.
- [6] Yamasaki M, Asano M, Okabe M, et al. Modification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and its derivative ND28 with polyethylene glycol. *J Biochem*, 1994, **115**(5):814 - 819.
- [7] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**:680 - 685.
- [8] Xie YH (谢异泓), Ma H (马红). MTT colorimetric method for recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF). *Chinese Journal of Immunology*, 1997, **13**(4):225 - 227.
- [9] Harris JM, Martin NE, Modi M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*, 2001, **40**:539 -