

聚乙二醇修饰重组人粒细胞集落刺激因子反应过程的优化

杨瑞娥^{1,2}, 贡强², 陈婷³, 谭天伟¹, 马光辉², 苏志国²

(1. 北京化工大学化学工程学院, 北京 100029; 2. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080;
3. 北京科技大学生物工程系, 北京 100083)

摘要: 采用单甲氧基聚乙二醇(*m*PEG)修饰重组人粒细胞集落刺激因子 rhG-CSF, 考察了各因素对蛋白质平均修饰度及体外生物活性的影响, 并对修饰产物的稳定保存条件进行了初步探讨. 通过四因素四水平正交法和单因素实验结合, 优化修饰条件为: PEG与G-CSF摩尔比为25:1, pH 7.6的硼酸盐缓冲环境, 反应时间40 min, 反应温度22℃. 在此条件下, PEG-G-CSF的平均修饰度为50%, 活性可保留40%左右. 研究还发现, 不同的添加剂影响PEG-G-CSF的保存稳定性, 人血清白蛋白和甘露醇是两种效果最好的保护剂, 在它们的存在下, PEG-G-CSF溶液在4℃放置一个月后活性保留92%, 三个月后保留51%.

关键词: 粒细胞集落刺激因子(G-CSF); 单甲氧基聚乙二醇(*m*PEG); 化学修饰; 生物活性

中图分类号: Q511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2005)01-0086-04

1 前言

1977年, Abuchowski等^[1]用单甲氧基聚乙二醇(CH₃O-[CH₂-CH₂-O]_{*m*}CH₂CH₂-OH, 简称为*m*PEG)对牛血清白蛋白和过氧化氢酶(小牛肝脏)进行化学修饰后, 发现用聚乙二醇偶联之后的蛋白质免疫原性和抗原性大大降低, 表观分子量和在体内的循环半衰期明显增加. 随后人们用*m*PEG对L-天冬酰胺酶、超氧化物歧化酶、α-干扰素、粒细胞集落刺激因子等多种药物蛋白进行了化学修饰, 表明用*m*PEG修饰后的蛋白可以减少人体对药物蛋白的免疫反应, 延长药物在体内的循环时间, 同时达到减少注射频率和药物毒副作用的目的^[2].

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, 它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, 对于各种原因引起的中性粒细胞减少症具有潜在的、巨大的应用价值^[3]. 但是重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)在体内循环半衰期短, *t*_{1/2}仅为1.3~4.2 h^[4], 作用时间短暂, 限制了疗效. 2002年FDA批准美国Amgen公司用PEG-G-CSF治疗中性粒细胞减少症, 注射次数大大减少, 只需两周注射1次, 而未修饰前G-CSF要天天注射.

药用蛋白所偶联的*m*PEG个数与蛋白的相对分子质量有一适宜的比例, 即每种蛋白质药物均有其最佳的平均修饰度. 而最佳修饰度的获得需要控制反应条件, 对于分子量为19600的G-CSF分子, 这方面的研究工作还较少. 本实验采用正交法对PEG修饰G-CSF的反

应条件进行优化, 探讨了各因素对修饰度大小和G-CSF生物活性的影响以及修饰度和生物活性之间的关系, 同时确定了PEG-G-CSF偶联物的稳定保存条件.

2 材料和方法

2.1 仪器与材料

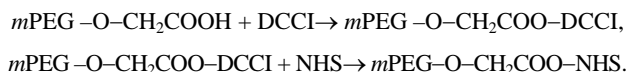
F-4500 荧光仪(日本 Hitachi 公司), 450 型酶联免疫检测仪(美国 Bio-Rad 公司).

荧光胺(Sigma), MTT(Sigma), RPMI1640 (Gibco BRL 公司), 96 孔细胞培养板(Costar 公司), rhG-CSF 效价测定用参考品(中国药品生物制品检定所), rhG-CSF(北医联合生物工程公司). 标准蛋白购自上海丽珠东风生物技术有限公司. 试剂均为分析纯或生化纯, 细胞系为 NFS-60 细胞株(中国药品生物制品检定所).

2.2 方法

2.2.1 羧甲基化单甲氧基聚乙二醇的制备及活化

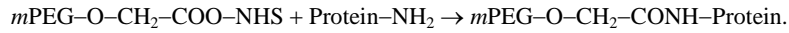
以分子量为5000的单甲氧基聚乙二醇为原料, 通过Williamson方法制备羧甲基化单甲氧基聚乙二醇, 再按照Gaertner的方法活化PEG, 详细步骤见文献[5]. PEG的活化反应式如下:



其中DCCI为二环己基碳二亚胺, NHS为*N*-羟基琥珀酰亚胺.

2.2.2 PEG修饰G-CSF

修饰反应式如下:



将 G-CSF 经凝胶色谱柱 Sephadex G-25(柱体积 5 mL)置换到不同 pH 值的缓冲液中,测定蛋白浓度. 按摩尔比(PEG:蛋白质)加入 PEG,混匀,按实验所需温度和时间反应后,加入甘氨酸终止反应. 取样测定蛋白质氨基平均修饰度和体外生物活性,以 M (平均修饰度)和 V (生物活性保留百分数)2 个无因次参数来表示.

2.2.3 蛋白质浓度的测定

按“生物制品化学及其它检定方法”中微量法(Lowry)的要求测定蛋白质浓度^[6].

2.2.4 荧光胺法测定蛋白氨基平均修饰度

以未修饰的 G-CSF 为对照样,按照 Stocks 等^[7]的方法测定修饰后 G-CSF 的修饰度. 取 0.02 mL 修饰完但未加入甘氨酸终止反应的 G-CSF,用硼酸-硼砂缓冲液(0.1 mol/L, pH 8.0)稀释到 1.5 mL,在剧烈振荡的同时加入 0.5 mL 荧光胺(0.3 g/L, 丙酮溶液), 10 s 后,放置反应 7 min,以 390 nm 为激发波长, 475 nm 为发射波长,测定荧光值,计算蛋白质中已修饰氨基的百分数.

2.2.5 体外生物活性测定

采用 MTT 方法^[8]并稍加修改,具体步骤为:在 96 孔细胞培养板中接种一定浓度的细胞悬浮液(50 μL /孔);将 G-CSF 标准品和修饰 G-CSF 样品系列稀释,各 50 μL 加入 96 孔培养板中,设阳性对照、阴性对照(不含 G-CSF)和空白对照(只含培养液),37 $^\circ\text{C}$ 下用 5% CO_2 培养 36~48 h,加 MTT 溶解液 100 μL /孔,次日测定各孔 $A_{570/630}$ 值.

2.2.6 PEG-G-CSF 偶联物的稳定性

采用离子交换色谱分离纯化后的 PEG-G-CSF 偶联物,用凝胶色谱柱 Sephadex G-25(26/10)置换到醋酸缓冲液(0.02 mol/L, pH 5.0)中保存. 在保存缓冲液中分别加入 30 g/L 甘露醇、20 g/L 人血清白蛋白及两种混合物,在 4 $^\circ\text{C}$ 中保存一个月、三个月后测定生物活性,结果以活性的保留百分数表示.

2.2.7 修饰产物的 SDS-PAGE 电泳鉴定

按 Laemmli^[9]方法进行. 浓缩胶为 5%,分离胶 15%.

3 结果和讨论

3.1 正交实验结果

采用 $L_{16}(4^4)$ 正交表,通过四因素四水平正交实验法确定最佳修饰条件,见表 1. 根据正交实验数据处理方法得到表 2. 由表可以看出 M 和 V 在 D 中的极差最大, A 中的极差其次, B 和 C 中的极差较小. 说明摩尔比对修饰度和生物活性影响最大, pH 的影响其次, 温度和 时间影响较小.

表 1 因素水平表

Table 1 Factor and level table

Level	A, pH	B, temp. ($^\circ\text{C}$)	C, time (min)	D, PEG:G-CSF (molar ratio)
1	5.2 (0.1 mol/L acetate)	4	5	5:1
2	7.0 (0.1 mol/L PBS)	22	15	10:1
3	7.6 (0.1 mol/L borate)	37	30	25:1
4	9.6 (0.05 mol/L borate)	50	60	50:1

表 2 $L_{16}(4^4)$ 正交实验设计与结果

Table 2 Arrangement and results of $L_{16}(4^4)$ orthogonal experiment

No.	A	B	C	D	M_i (%)	V_i (%)
1	1	1	1	1	0	95
2	1	2	2	2	3	88
3	1	3	3	3	8	84
4	1	4	4	4	20	65
5	2	1	2	3	50	28
6	2	2	1	4	55	20
7	2	3	4	1	3	68
8	2	4	3	2	15	55
9	3	1	3	4	58	34
10	3	2	4	3	50	40
11	3	3	1	2	20	73
12	3	4	2	1	5	85
13	4	1	4	2	3	70
14	4	2	3	1	0	93
15	4	3	2	4	50	38
16	4	4	1	3	22	70
	ΣM	ΣV	ΣM	ΣV	ΣM	ΣV
$K_1^{(1)}$	31	332	111	227	97	258
K_2	123	171	108	241	108	239
K_3	133	271	81	263	81	266
K_4	75	232	62	275	76	243
$R^{(2)}$	102	161	49	48	32	27
					ΣM	ΣV
					362	1006

Note: 1) The sum of experimental results(M or V) at level i ; 2) $R = K_{i,max} - K_{i,min}$; M_i : Modification degree; V_i : Residual bioactivity one week later.

从实验结果还可看出,在修饰度相同的条件下,生物活性保留值有很大差异,如修饰度为 50%时,实验 5, 10, 15 的修饰产物活性分别保留了 28%, 40%, 38%。

由正交实验结果可见,实验 10 是较理想的修饰方案,其反应条件为:PEG 和 G-CSF 摩尔比为 25:1, pH 7.6, 反应时间 40 min, 反应温度 22℃, 平均修饰度 50%, 生物活性为未修饰前原蛋白的 40%。

3.2 不同因素对产物平均修饰度和生物活性的影响

为确定各因素对产物生物活性的影响程度,固定反应温度 22℃、反应时间 40 min, 设计了缓冲液 pH 值、修饰剂与蛋白质摩尔比和溶液离子类型 3 个单因素实验,并以不同条件下 G-CSF 原蛋白的生物活性作为对照。

3.2.1 缓冲液 pH 值

图 1 为 pH 与平均修饰度和生物活性的关系。随着 pH 值的升高,平均修饰度逐渐增大,生物活性保留则降低。在 pH=5~10 范围内原蛋白生物活性并未因为缓冲液 pH 值的变化而有显著变化。

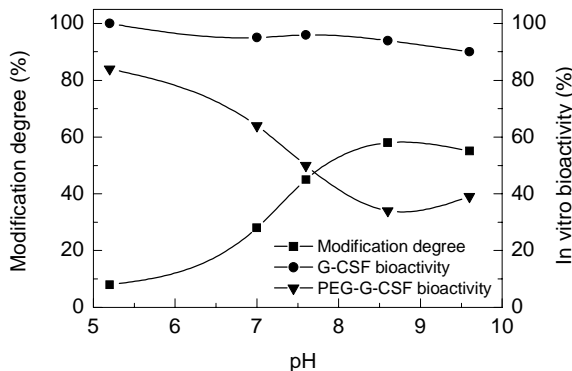


图 1 pH 对修饰度和生物活性的影响

Fig.1 Effect of pH on modification degree and *in vitro* bioactivity

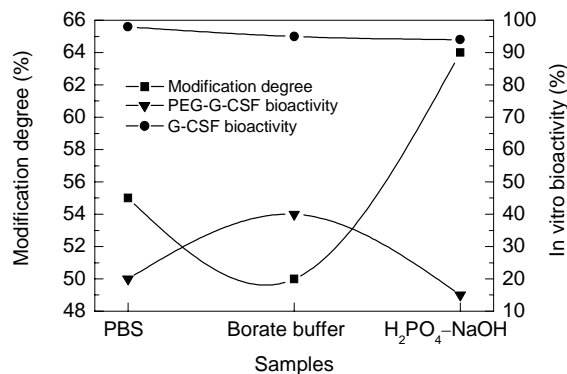


图 3 溶液离子类型对修饰度和生物活性的影响

Fig.3 Effect of ion types on modification degree and *in vitro* bioactivity

3.2.2 修饰剂与蛋白质摩尔配比

由图 2 可看出,原蛋白的生物活性并未因 PEG 的加入而有所变化,PEG 和 G-CSF 摩尔比从 5:2 到 25:1,修饰剂量和修饰度几乎成正比,与生物活性的保留则呈负相关,表明活性的降低是由于 G-CSF 连上了 PEG;当摩尔比达到 50:1 时,修饰度并未等比增加。

3.2.3 溶液离子类型

从图 3 可见,在相同的 pH 值下,采用不同的缓冲体系进行修饰反应,修饰度和生物活性有很大差别,在硼酸盐中反应修饰度为 50%,但其生物活性保留了 40%。

3.3 修饰产物的 SDS-PAGE 电泳图

从图 4 可知,在电泳图上除了未被修饰的蛋白带之外,在 30k, 43k, 67k 附近出现了新的蛋白带,可以断定该蛋白带是连上了不同 PEG 个数的 G-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 G-CSF 出现在比实际分子量大的位置,并且连上不同 PEG 的修饰产物难以分开。

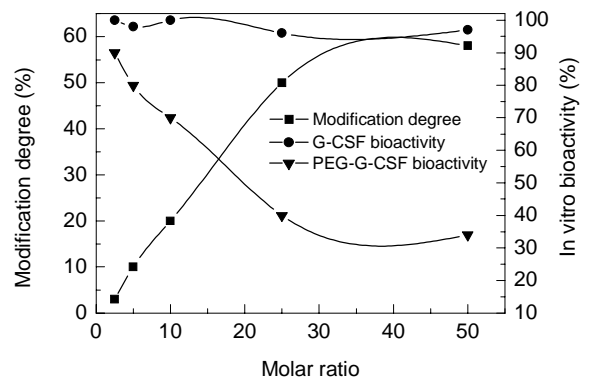


图 2 G-CSF 与 PEG 比对修饰度和生物活性的影响

Fig.2 Effect of molar ratio of G-CSF/PEG on modification degree and *in vitro* bioactivity

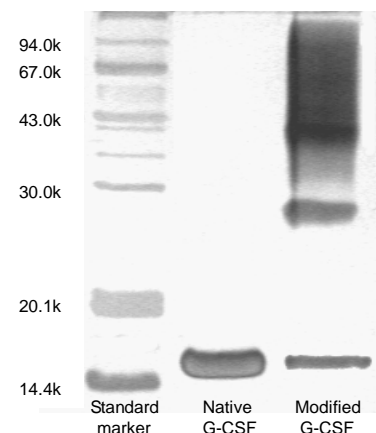


图 4 PEG-G-CSF 和天然 G-CSF 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE profile of G-CSF and modified G-CSF

3.4 PEG-G-CSF 偶联物的稳定性

从图 5 可知,在 PEG-G-CSF 保存缓冲液中无添加物时,生物活性完全丧失;1 个月加入两种混合物时活性保留了 90%;3 个月后加入甘露醇时活性无保留,加入人血清白蛋白时活性保留了 30%,而加入两种混合物活性则保留了 51%,表明加入两种稳定剂的 PEG-G-CSF 偶联物活性保留值较高。

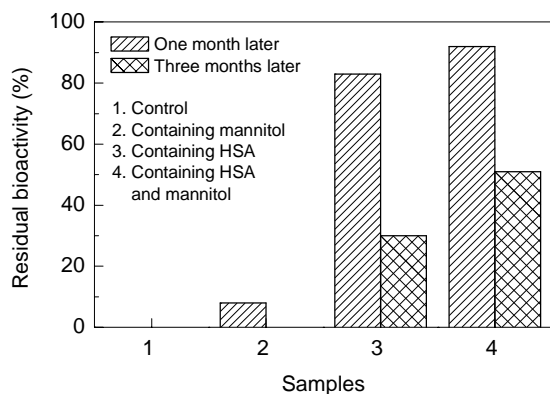


图 5 PEG-G-CSF 偶联物放置 1 和 3 个月后的生物活性
Fig.5 Residual bioactivity of PEG-G-CSF one month and three months later (Bioactivities are expressed using percentage of modified rhG-CSF)

4 结论

(1) PEG 的加入量直接决定了修饰度的大小和修饰产物活性的高低, pH 的影响次之。

(2) 缓冲液可改变蛋白质的构象或封闭某些反应部位, 也影响修饰结果, 选择温和、中性的硼酸盐较好。

(3) 在本实验优化的修饰条件下, 蛋白平均修饰度为 50%, 生物活性为未修饰前原蛋白的 40%。

(4) 人血清白蛋白对修饰蛋白活性的保护起主要作用, 甘露醇的加入会使之保护更有效。

参考文献:

- [1] Abuchowski A, McCooy R R, Palczuk N C. Effect of Covalent Attachment of Polyethylene Glycol on Immunogenicity and Circulating Life of Bovine Liver Catalase [J]. J. Biol. Chem., 1977, 252(11): 3578-3586.
- [2] Richard B G, Greenwald, Yun H C, et al. Effective Drug Delivery by PEGylated Drug Conjugates [J]. Adv. Drug Deliv Rev., 2003, 55: 217-250.
- [3] Hsieng S L, Christi L C, Linda O N, et al. Folding and Oxidation of Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor Produced in *E. coli* [J]. J. Biol. Chem., 1992, 267(13): 8770-8779.
- [4] Layton J E, Hockman H, Sheridan W P, et al. Evidence for a Novel in vivo Control Mechanism of Granulopoiesis: Mature Cell-related Control of a Regulatory Growth Factor [J]. Blood, 1989, 74(4): 1303-1307.
- [5] 胡小剑, 何明磊, 谭天伟, 等. 羧甲基化单甲氧基聚乙二醇的制备及其对 α -干扰素的修饰 [J]. 过程工程学报, 2003, 3(2): 146-150.
- [6] 国家药品监督管理局. 中国生物制品规程 [S]. 2000. 672.
- [7] Stocks S J, Jones A J, Ramey C W. A Fluorometric Assay of the Degree of Modification of Protein Primary Amines with Polyethylene Glycol [J]. Anal. Biochem., 1986, 54(1): 232-234.
- [8] Shirafuji N, Asano S, Matsuda S, et al. A New Bioassay for Human Granulocyte Colony Stimulating Factor (H₂-CSF) Using Murine Myeloblastic NFS-60 Cells as Male Healthy Person and Patients with Infectious and Hematological Disorders [J]. Exp. Hematol., 1989, 17: 116-125.
- [9] Laemmli U K. Cleavage of Structure Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685.

Process Optimization in Modification of rhG-CSF with Polyethylene Glycol

YANG Rui-e^{1,2}, YUN Qiang², CHEN Ting³, TAN Tian-wei¹, MA Guang-hui², SU Zhi-guo²

(1. Inst. Chem. Eng., Beijing Univ. Chem. Technol., Beijing 100029, China;

2. State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Process Eng., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

3. School of Biochemical Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract: Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) was chemically modified with *m*PEG. The effects of reaction conditions on modification degree and *in vitro* bioactivity were investigated by orthogonal design of the experiment. The optimized reaction conditions were found to be borate buffer pH 7.6, molar ratio of PEG to G-CSF 25:1, reaction time 40 min and reaction temperature 22 °C. Under the optimized reaction conditions, the bioactivity of PEG-G-CSF retained 40% while the modification degree was 50%. Different formulations had important influence on the storage activity of PEG-G-CSF conjugate. Addition of mannitol and human serum albumin to the solution of PEG-G-CSF could maintain the bioactivity up to 92% for one month and 51% for three months when stored at 4 °C.

Key words: G-CSF; *m*PEG; chemical modification; bioactivity