

不同分子量聚乙二醇单修饰重组人干扰素 α -2a

张霖琳^{1,2}, 郑春杨¹, 雷建都¹, 马光辉¹, 苏志国¹

(1. 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; 2. 北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083)

摘要: 利用 N-羟基琥珀酰亚胺活化制备不同分子量的聚乙二醇修饰剂(NHS-mPEG, 分子量 5000, 10000, 20000), 考察三者水解动力学性质的差异, 结合正交实验确定了不同分子量修饰剂制备单条 PEG 链修饰重组人干扰素 α -2a(rhIFN- α -2a)的最佳反应条件, 用离子交换法对产物进行分离纯化. 研究了不同分子量聚乙二醇干扰素结合物的体外活性, 比较其蛋白收率. 实验结果表明, 修饰剂分子量增大, 应选择蛋白与修饰剂的反应活性高的修饰反应条件, 体外活性虽然降低, 但同时单修饰聚乙二醇干扰素结合物收率更高, 产品质量更易控制.

关键词: 聚乙二醇; 重组人干扰素 α -2a; 化学修饰

中图分类号: Q511

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2006)04-0619-04

1 前言

干扰素 α -2a(IFN- α -2a)是临床用于抗肿瘤、抗肝炎病毒的重要药物^[1],但在临床应用中由于循环半衰期短,易被肾脏清除,故给药频繁,用药后出现“峰-谷”效应,同时也存在血小板减少、流感样症状和精神症状等毒副作用,主要是由外源性蛋白在人体内产生免疫反应而引起的^[2].为了减少毒副作用,延长半衰期,降低免疫源性,国内外的研究机构将聚乙二醇修饰技术应用于制药,开发长效的干扰素药物.2000年欧盟批准的美国先灵公司的聚乙二醇修饰的干扰素 α -2b(Peginterferon alfa-2b,商品名 PEG-Intron)和2002年FDA批准的瑞士罗氏公司的聚乙二醇修饰的干扰素 α -2a(Peginterferon alfa-2a,商品名 PEGASYS)先后上市,两者均用于治疗成人慢性丙肝感染,与未修饰的干扰素相比,临床剂量从每周皮下注射3次减少到1次^[3].

但目前聚乙二醇修饰干扰素也存在下述一些问题:

(1) 修饰剂与蛋白表面特定基团反应时,由于聚乙二醇为链状高分子,不可避免地会在一定程度上破坏或遮蔽蛋白表面的活性位点,且分子量越大其体外生物活性丧失越多,药物自血液向靶点的输送速度受到限制.可应用于临床的理想聚乙二醇干扰素应当是在保持干扰素原有的生物活性的基础上,尽量加大聚乙二醇的分子量,延长其半衰期.但分子量增大时,活化PEG分子的水解速度及其与蛋白的反应速度与分子量低时完全不同,从而需要采取不同的反应条件;(2) 偶联蛋白异构体之间除了分子量和表面电荷的细小差别之外,其他的理化性质非常接近,修饰产物的分离纯化一直是聚乙二醇化修饰的难点之一.

本研究的策略是:第一,考虑到在聚乙二醇修饰的产物中单修饰比多修饰能够更好地保持其天然活性,且有利于制备时的质量控制和保证批次稳定性,故从修饰反应上控制单修饰,即获得连接一条PEG链的蛋白,在保证高转化率的同时简化分离步骤,减少活性损失,便于大规模制备;第二,通过比较不同分子量的修饰剂修饰后产物的活性和收率,确定理想分子量的修饰剂,为放大制备奠定基础.

2 实验

2.1 材料与仪器

原料:单甲氧基聚乙二醇 mPEG(Union Carbide),重组人干扰素 rhIFN- α -2a(沈阳三生制药公司).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),甲叉丙烯酰胺(Sigma),丙烯酰胺(Sigma),SDS,标准蛋白(中国科学院上海生化研究所),其余试剂均为国产分析纯或生化纯.

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),SuperdexTM200 HR 10/30凝胶色谱柱(GE Healthcare Biosciences),实验用水均采用 Rios超纯水系统处理.

2.2 方法

2.2.1 mPEG的活化

以分子量为5000,10000和20000的单甲氧基聚乙

收稿日期:2005-09-22,修回日期:2005-12-05

基金项目:国家重大科技专项基金资助项目(编号:2004AA2Z3401)

作者简介:张霖琳(1980-),女,辽宁省沈阳市人,硕士研究生,生物化工专业;马光辉,通讯联系人, E-mail: ghma@home.ipe.ac.cn.

二醇(mPEG)为原料,按照文献[4]的方法加以适当改进,合成3种不同分子量的修饰剂N-羟基琥珀酰亚胺碳酸酯[NHS(N-Hydroxysuccinimide)-mPEG].

2.2.2 修饰剂的性质考察

为了合理地设计修饰反应的条件,考察不同pH值和PEG分子量对修饰剂活性的影响,在pH 8.0, 9.0, 10.0的缓冲液中,分别加入等量的NHS-mPEG20000,振荡溶解后立即放入分光光度计中,紫外260 nm波长测其水解动力学.同样方法比较不同分子量的NHS-mPEG在pH 9.0缓冲液中的水解动力学性质.

2.2.3 蛋白浓度的测定

按生物制品化学及其他检定方法中微量法(Lowry)的要求测定蛋白质浓度^[5].

2.2.4 重组人干扰素 α -2a的修饰反应

4℃下用动态透析方法,将rhIFN- α -2a置换到不同pH值的缓冲液中,稀释蛋白到实验所需的浓度,按摩尔配比(PEG/蛋白质)加入修饰剂,混合均匀,按正交实验设计的温度和时间进行反应.

2.2.5 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rhIFN- α -2a与未修饰的rhIFN- α -2a.SP-Sephacrose Fast Flow阳离子交换介质色谱柱(1.6 cm \times 18 cm),流动相是10 mmol/L, pH 4.5的乙酸-乙酸钠缓冲液(缓冲液A).上样前先将色谱柱用5倍柱体积的缓冲液A平衡,样品透析到缓冲液A中,上样1 mL.然后用缓冲液B(缓冲液A加入1 mol/L NaCl)洗脱,流速1 mL/min,检测波长280 nm.所有操作均在室温下进行.收集洗脱峰,用SDS-PAGE电泳检测.

2.2.6 SDS-PAGE 检测

按Laemmli^[6]方法,浓缩胶5%,分离胶15%,银染^[7].

2.2.7 体外生物活性的测定

采用MTT方法^[8]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(50 μ L/孔);将rhIFN- α -2a标准品和纯化后的单修饰rhIFN- α -2a样品系列稀释,各50 μ L加入96孔培养板中,设阳性对照、阴性对照(不含rhIFN- α -2a)和空白对照(只含培养液),37℃,5% CO₂培养36~48 h,加MTT溶解液100 μ L/孔,次日分光光度计测定各孔570 nm波长的吸收值A₅₇₀.

3 结果和讨论

3.1 NHS-mPEG 水解动力学

NHS-mPEG的水解反应如下:

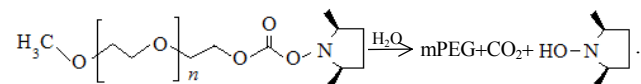


图1是NHS-mPEG20000在pH值为8.0, 9.0和10.0条件下的水解动力学图,可以看出碱性越强水解速度越快.当pH值过高,修饰剂水解副反应速度快,修饰剂与蛋白质的结合率低;而pH值太低修饰剂不容易水解,修饰反应很难进行.因此修饰反应的正交实验中选用pH值为6.0, 7.0, 8.0和9.0的4种缓冲液.

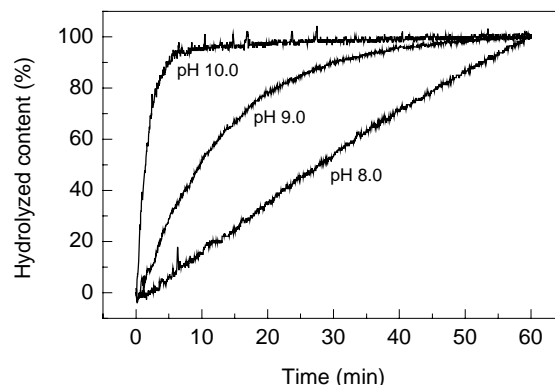


图1 pH对NHS-mPEG20000水解量的影响

Fig.1 Effect of pH value on hydrolyzed content of NHS-mPEG20000

NHS-mPEG5000, 10000和20000在pH值9.0的缓冲液中的水解动力学见图2.随着分子量的增加,修饰剂水解速度逐渐减慢,但总体趋势保持一致,曲线接近平衡水解完全,在修饰反应中即达到修饰剂与蛋白作用完全.

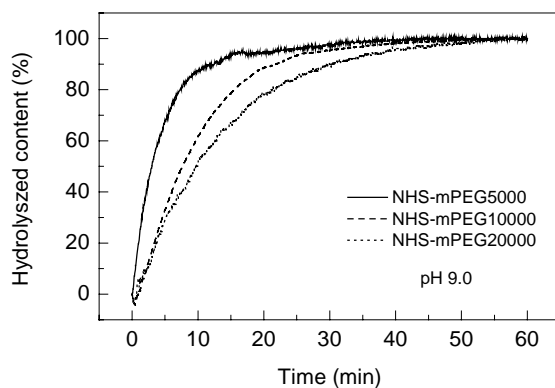
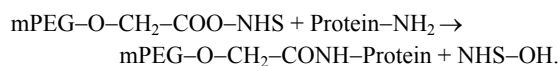


图2 不同分子量NHS-mPEG在pH 9.0时的水解动力学

Fig.2 Hydrolyzed contents of the NHS-mPEG under different molecular weights at pH 9.0 with reaction time

3.2 修饰反应正交实验结果

聚乙二醇修饰反应一般总是尽可能在蛋白稳定的条件下进行,反应式如下:



反应的最终结果是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

须不引起蛋白质的不可逆变性和有利于选择性地修饰蛋白质. 反应物的配比、pH 值、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 L16(4³) 正交表, 通过四因素四水平正交实验法确定不同分子量修饰剂单修饰干扰素的最佳条件, 见表 1.

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Factors and levels for orthogonal tests

Level	A, pH	B, temp. (°C)	C, protein (mg/mL)	D, PEG:rhIFN- α -2a (molar ratio)
1	6.0 (0.1 mol/L PBS)	4	0.1	5:1
2	7.0 (0.1 mol/L PBS)	18	0.2	10:1
3	8.0 (0.1 mol/L borate)	25	0.3	20:1
4	9.0 (0.1 mol/L borate)	37	0.4	30:1

根据正交实验数据处理方法, 以 SDS-PAGE 电泳和体外生物活性的测定为依据, 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, 蛋白的转化率有所提高, 但也容易得到多条 PEG 链修饰的蛋白, 给分离带来很大不便. 分子量小的修饰剂反应活性高, 蛋白转化率高, 要想得到单修饰产品, 必须选择温和的反应条件; 分子量大的修饰剂反应活性相对较低, 单修饰较易控制, 但蛋白转化率不高, 要选择蛋白与修饰剂反应活性较高的条件. 因此, 为了优化反应得到单修饰和高转化率的蛋白, 确定 NHS-mPEG 单修饰 rhIFN- α -2a 的最佳反应条件见表 2.

表 2 不同分子量 PEG 修饰 rhIFN- α -2a 的最佳反应条件

Table 2 The optimized reaction conditions of PEGylated rhIFN- α -2a with different molecular weight

PEG molecular weight	pH	Temperature (°C)	Concentration (mg/mL)	PEG:rhIFN- α -2a (molar ratio)
5000	7.0	4	0.2	5:1
10000	7.0	18	0.3	5:1
20000	8.0	25	0.3	10:1

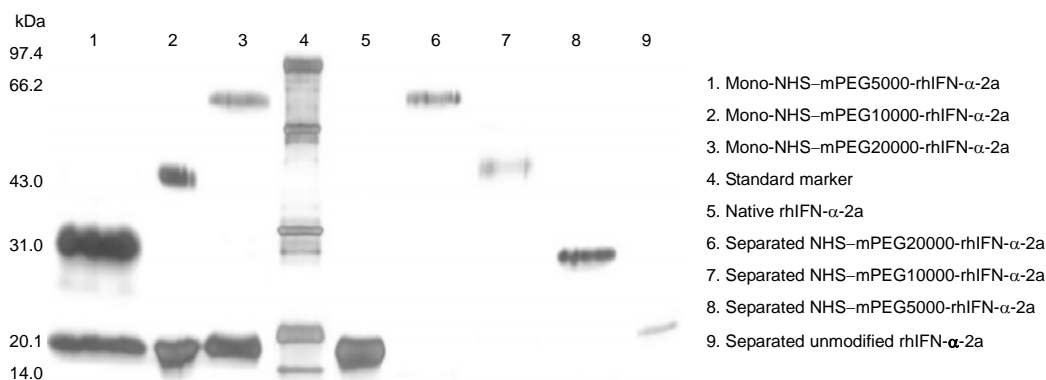


图 4 分离前后的 PEG 修饰 rhIFN- α -2a 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE profiles of PEGylated rhIFN- α -2a products before and after separation using ion exchange chromatography

3.3 离子交换分离修饰产物

rhIFN- α -2a 的等电点在 5~6, PEG 修饰后等电点有所下降. 实验采用穿透式离子交换层析方法, 在起始缓冲液中使 PEG 修饰的蛋白首先随穿透峰穿出, 未修饰的蛋白吸附在介质上, 收集穿透峰得到 PEG 单修饰的 rhIFN- α -2a, 再经高盐缓冲液洗脱分离出未修饰的蛋白.

不同分子量的 PEG 修饰产物的分离条件基本相同, 分离图谱如图 3 所示, 上样 3 次分别为 NHS-mPEG20000, 10000 和 5000 修饰 rhIFN- α -2a 的样品, 收集 3 个穿透峰, 然后将吸附的蛋白用梯度为 100% 的缓冲液 B 洗脱, 收集洗脱峰. 通过 SDS-PAGE 电泳检测显示, 峰 a, b, c 均是 PEG 单修饰的 rhIFN- α -2a, d 是未修饰的 rhIFN- α -2a. 此穿透式离子交换的分离模式稳定, 通透量高, 时间短, 总蛋白回收率可达到 90%, 产物纯度高, 无需使用昂贵的层析介质, 便于放大制备.

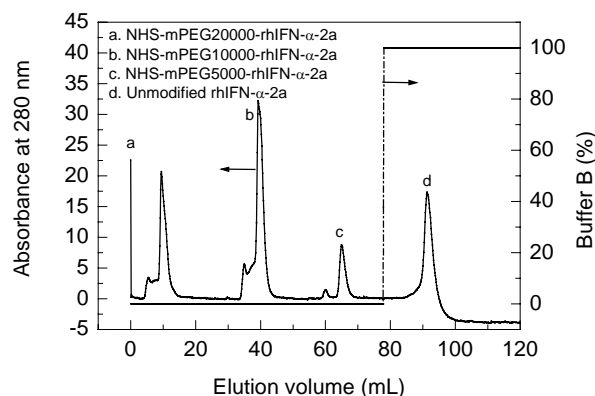


图 3 离子交换分离 PEG 修饰 rhIFN- α -2a 产物图谱

Fig.3 Spectrum of PEGylated rhIFN- α -2a products with different molecular weights separated by ion exchange chromatography

3.4 SDS-PAGE 电泳

按照正交实验确定的最佳修饰条件, 不同分子量的 NHS-mPEG 修饰剂的修饰反应和分离后得到的产物经 SDS-PAGE 电泳检测结果如图 4 所示.

图中,第1,2,3道为正交实验确定的单修饰反应条件下3种不同分子量 NHS-mPEG 修饰的 rhIFN- α -2a。第6,7,8道分别为修饰产物经离子交换收集到的穿透峰 a, b, c。电泳结果显示在分子量接近 30, 40 和 60 kDa 处出现蛋白带。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 rhIFN- α -2a 出现在比实际分子量大的位置,故为 3 种不同分子量 PEG 单修饰的 rhIFN- α -2a。第9道显示的是洗脱峰 d,在分子量接近 20 kDa 处出现蛋白带,与天然 rhIFN- α -2a 相同,表明该峰是未修饰的 rhIFN- α -2a。

3.5 体外活性的结果

采用 MTT 方法分别测定每种偶联产物的体外活性,见表3。rhIFN- α -2a 经过 PEG 修饰后,聚乙二醇分子在干扰素分子外面形成 1 个分子屏障,对蛋白与受体结合造成了一定阻碍,降低其免疫原性,保护其免受酶的分解。 α -干扰素结合的聚乙二醇分子越大,分子量越大,其理化性质越稳定,半衰期越长, α -干扰素的体外活性丧失越多。但已有研究^[9]表明,修饰后的蛋白尽管体外活性有所下降,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,延长了药用蛋白的作用时间,增加了生物利用率,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。

表3 不同分子量 PEG 单修饰 rhIFN- α -2a 的体外活性回收率
Table 3 Summary of in vitro activity recovery rates of the mono-PEG-rhIFN- α -2a with different molecular weights

Product	Activity recovery rate (%)
Control (unmodified rhIFN- α -2a)	100
NHS-mPEG5000-rhIFN- α -2a	42
NHS-mPEG10000-rhIFN- α -2a	35
NHS-mPEG20000-rhIFN- α -2a	26

4 结论

活化制备了不同分子量的修饰剂 NHS-mPEG,考察了其水解动力学和对 rhIFN- α -2a 进行化学修饰的条件,SDS-PAGE 电泳检测结合体外生物活性的测定,建立了不同分子量修饰剂单修饰条件和分离条件。表明随着修饰剂分子量增大,应选择蛋白与修饰剂反应活性较高的修饰反应条件,体外活性虽然有所降低,但单修饰聚乙二醇干扰素结合物收率更高,产品质量更易控制,且因修饰剂分子量对体内活性的影响不很明显,为延长半衰期,减少给药次数,因此采用 NHS-mPEG20000 修饰剂制备聚乙二醇干扰素结合物更具应用价值。

参考文献:

- [1] 郑宝胜,徐明波,姚志建.蛋白质的聚乙二醇修饰及其在医药研究中的应用[J].生物化学与生物物理进展,1993,20(4):267-270.
- [2] Davis-Daneshfar A, Boni R, Von Wussow P, et al. Adjuvant Immunotherapy in Malignant Melanoma: Impact of Antibody Formation against Interferon-Alpha on Immunoparameters *in vivo* [J]. J. Immunother., 1997, 20(3): 208-213.
- [3] Bailon P, Palleroni A, Schaffer C A, et al. Rational Design of a Potent, Long-lasting Form of Interferon: A 40 kDa Branched Polyethylene Glycol-tonjugated Interferon-2a for the Treatment of Hepatitis C [J]. Bioconjugate Chem., 2001, 12: 195-202.
- [4] Zalipsky S, Barany G. Facile Synthesis of α -Hydroxyl- Ω -carboxymethylpolyethylene Oxide [J]. J. Bioact. Compat. Polym., 1990, 5: 227-237.
- [5] 国家药品监督管理局.中国生物制品规程[S].2000.672.
- [6] Laemmli U K. Cleavage of Structural Protein during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [7] Swain M, Ross N W. A Silver Stain Protocol for Proteins Yielding High Resolution and Transparent Background in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels [J]. Electrophoresis, 1995, 16: 948-951.
- [8] Okabe M, Asano M, Kuga T. *In vitro* and *in vivo* Hematopoietic Effect of Mutant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor [J]. Blood, 1990, 75: 1783-1788.
- [9] Sprial A B, Herik-Oudijk I E, Winkel J G J. A Single Injection of Polyethylene-Glycol Granulocyte Colony-stimulating Factor Strongly Prolongs Survival of Mice with Systemic Candidiasis [J]. Cytokine, 2000, 12(6): 666-670.

Preparation and Characterization of the rhIFN- α -2a Modified by Polyethylene Glycol with Different Molecular Weights

ZHANG Lin-lin^{1,2}, ZHENG Chun-yang¹, LEI Jian-du¹, MA Guang-hui¹, SU Zhi-guo¹

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;
2. School of Civil and Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract: Monomethoxy polyethylene glycol with different molecular weights (mPEG5000, 10000 and 20000) were prepared using activated N-hydroxysuccinimide (NHS). NHS-mPEG was investigated by hydrolysis kinetics. Through the experiments based on orthogonal design, the optimized reaction conditions could be proposed to obtain a single PEG chain attached onto the rhIFN- α -2a. Ion exchange chromatography was used to separate and purify PEGylated rhIFN- α -2a products from unPEGylated rhIFN- α -2a. PEGylated rhIFN- α -2a with different molecular weights was contrasted by in vitro bioactivity and protein recovery rate. It was revealed that with the increase of molecular weight of NHS-mPEG, the modification reaction conditions were higher and the *in vitro* bioactivity was lower, but the protein recovery rate was increased.

Key words: polyethylene glycol; rhIFN- α -2a; chemical modification