

# TPO 模拟肽与人 IgG1 Fc 片段的融合表达及其生物学特性研究

李越希<sup>2\*</sup> 李朝<sup>1</sup> 陶开华<sup>2</sup> 贾向红<sup>1</sup> 程度胜<sup>1</sup> 黄培堂<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

<sup>2</sup>(南京军区军事医学研究所,南京 210002)

**摘 要** 依据本室获得的人 TPO 模拟肽序列,合成了该模拟肽的 DNA 序列,分别连接至 4 种不同长度的人 IgG1 Fc 基因片段的 5'端,并克隆至质粒表达载体 pET28a(+)转化大肠杆菌 BL21(DE3),筛选获得了 4 种重组工程菌,其中 3 种分别高效表达了 3 种不同长度的融合蛋白,而第 4 种工程菌未表达。表达的 3 种融合蛋白的分子量分别约为 28kD、12kD 和 12kD,表达量约占菌体蛋白总量的 30%左右,纯化获得了 3 种 TPO 模拟肽融合蛋白。3 种融合蛋白均有较好的体外活性,维持 TPO 依赖细胞 Ba/F3-mp1 生长的 EC50 分别为:13、10、10 nmol/L。用血小板减少症小鼠动物模型,测定了它们的体内活性,3 种融合蛋白均有升高血小板和缩短血小板恢复时间的功能,分别比 TPO 模拟肽活性提高了 18、8、8 倍,而对白细胞及红细胞无显著影响。分别用 3 种融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠,均未刺激小鼠产生抗 TPO 模拟肽抗体,并显示了较好的应用潜力。

**关键词** 人 TPO 模拟肽,融合表达,纯化,体内外活性,免疫原性

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0424-07

很多用于治疗肿瘤的化学药物(如卡铂等)可引起骨髓抑制<sup>[1]</sup>,导致血液中白细胞和血小板数量的减小,这些肿瘤化疗引起的副作用导致病人产生自发性出血等症状,并有较高的死亡率。多种重组人细胞因子(包括 IL-1,IL-3,IL-6 等)具有一定的促进血小板增生的作用,对治疗血小板减少症有一定的治疗作用,人促血小板生成素(Thrombopoietin,TPO)是促进血小板生成最主要的细胞因子<sup>[2-4]</sup>,可用于由于化疗等原因引起的血小板减少症。但是它们大部分会产生头痛、发热和高血压等症状<sup>[5-10]</sup>,这些副作用影响了其临床应用前景。从肽库内筛选细胞因子模拟肽已成为筛选代替细胞因子药物的一个有效途径,现已筛选出多个细胞因子模拟肽<sup>[11,12]</sup>。本室设计合成的一个 TPO 模拟肽具有刺激血小板生成的功能,并且其二聚体体外刺激细胞增殖的活性与重组人 TPO 的活性基本相近。有希望代替重组 TPO 用于治疗化疗或其它原因引起的血小板减少症。

我们利用基因工程技术将 TPO 模拟肽分别与人 IgG1 Fc 的 4 个不同长度的截短片段融合表达,构

建了 4 种工程菌,其中 3 种工程菌高表达了 TPO 模拟肽融合蛋白。表达的 3 种融合蛋白均有较好的体内外活性,并且没有刺激机体产生抗 TPO 模拟肽抗体,显示有较好的应用潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种和质粒

宿主菌 BL21(DE3)和表达质粒载体 pET28a(+)(Novagen 公司产品)由本实验室保存。全长人 IgG1 Fc 基因由本院五所王海涛教授赠送。

### 1.2 试剂与引物

限制酶 EcoR I、BamH I、Hind III、Nco I、T4 DNA 连接酶,dNTP 及 Taq 耐热 DNA 聚合酶为大连 TaKaRa 公司产品。质粒提取试剂盒(QIA Prep Spin Miniprep)和从琼脂糖凝胶内回收 DNA 片段的试剂盒(QIA Quick Gel Extraction Kit)为德国 QIAGEN 公司产品。DEAE-Sepharose FF 凝胶和 S-Sepharose FF 凝胶和 Sephacryl S-200 凝胶为瑞典 Pharmacia 公司产品。其它试剂为进口或国产分析纯以上级试剂。基

收稿日期 2002-01-29,修回日期 2002-04-15。

基金项目:全军“九五”重点攻关课题基金资助(No. Z951106)。

\* 通讯作者。Tel: 86-25-4802403 E-mail: liyxi@163.net

因片段及引物的合成 :由本所或 TaKaRa 公司合成。

### 1.3 合成 TPO 模拟肽基因的复性

将合成的 TPO 模拟肽基因的正负链分别溶于 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.5) 溶液内 ,使两链的终浓度均为 10  $\mu$ mol/L。取正、负链各 20  $\mu$ L,置同一 1.5mL 离心管内 ,加 4.4  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer (TaKaRa),100 $^{\circ}$ C 煮沸 3 min,置室温自然冷却,即得复性的双链 TPO 模拟肽基因。

### 1.4 PCR 反应

扩增人 IgG1 Fc 的 4 种不同长度 DNA 片段及检测连接有 TPO 模拟肽基因的 Fc 片段时,采用的 PCR 反应条件相同,扩增条件:94 $^{\circ}$ C 4 min,94 $^{\circ}$ C 30s,56 $^{\circ}$ C 20s,72 $^{\circ}$ C 40s,扩增 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

### 1.5 一般基因克隆及表达方法

DNA 的酶切、连接、电泳、质粒的提取转化、蛋白的 SDS-PAGE 分析等一般基因克隆方法均参照“Molecular Cloning”一书<sup>[13]</sup>进行,其它试剂盒按说明书进行操作。

### 1.6 表达 TPO + Fc 融合蛋白的纯化

工程菌按已优化确定的培养条件培养、诱导、收获菌体。将菌体悬浮于超声液(50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0,10 mmol/L EDTA,0.5 mmol/L DTT)内,置冰浴内超声破菌 20min。离心收集沉淀包涵体,包涵体用 8mol/L 尿素溶液(用 50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0,0.5 mmol/L EDTA,0.5 mmol/L DTT 平衡液配制)悬浮,溶解 30min。离心吸取上清溶液,过滤后直接上样至 DEAE -Sephrose FF 凝胶柱,用不同浓度的 NaCl 溶液(0.05、0.1、0.2、0.3、1.0 mol/L,用平衡液配制)洗脱,SDS-PAGE 检测穿流峰和各洗脱峰蛋白,收集目的蛋白峰,透析后上 S-Sephrose FF 阳离子柱纯化。同样用上述不同浓度的 NaCl 溶液洗脱,分部收集各峰蛋白,进行 SDS-PAGE 检测,确定目的蛋白峰。

### 1.7 MTT 法检测模拟肽的体外活性

用依赖 TPO 的 Ba/F3-mP1 细胞测定模拟肽的活性。取生长旺盛的对数期 Ba/F3-mp1 细胞,用培养基将细胞配成  $1.2 \times 10^5$  细胞/mL 的悬液。按每孔 80 $\mu$ L 的量将上述细胞悬液加到 96 孔培养板中,然后每孔加入用于培养稀释的待测样品 20 $\mu$ L,每个稀释度做 3 个孔,以培养基为对照。96 孔培养板置含 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱内,37 $^{\circ}$ C 湿润培养 48h 后,每孔加入 10 $\mu$ L 5mg/mL 的 MTT 溶液(溶于 PBS 中),继续培养。4h 后取出培养板,小心地从每孔中吸出 80 $\mu$ L 上清并弃去,然后加入 100 $\mu$ L 二甲亚砜,振荡均匀后

以 630nm 处吸光值作对照,检测 492nm 处的吸光值。

### 1.8 TPO 模拟肽的体内活性测定

由于受试样品拟用于化疗后血小板减少症,故本试验采用化疗药致小鼠血小板减少症模型。依照文献和预试验的结果,选择小鼠 1 次腹腔注射卡铂(135 mg/kg)致血小板计数减少症动物模型。使用 KM 种小鼠,体重 22~26g,雌雄各半,军事医学科学院医学实验动物中心繁殖。按体重和性别均衡的原则随机分组,每组 10 只。

于化疗后第 2 天开始注射试验品,每天 1 次,连续皮下注射 4d,注射试验品容量为 0.1 mL/10 g 体重。于化疗后 6、9、12、15、18 和 21d 检测外周血小板计数、红细胞计数、血红蛋白、血细胞比容和白细胞计数等指标。实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。用 student *t* 检验进行组间均数差异的显著性检验。

### 1.9 动物免疫

实验动物用 BALB/c 小鼠,体重 20~24g,雌雄各半,购自南京军区总医院。随机分成 6 组,每组 6 只,雌雄各半。第 1 次免疫时,将免疫原与福氏完全佐剂充分混匀乳化,小鼠腹腔注射,每只 0.1~0.2 mL。15d 后进行第 2 次免疫,将免疫原与福氏不完全佐剂混匀乳化,腹腔注射 0.1~0.2 mL。第 3 次和第 4 次免疫分别在第 1 次免疫后 30d 和 45d,仅用免疫原,不加佐剂。第 4 次免疫后 7d,摘除眼球取血制备血清。

## 2 结 果

### 2.1 合成的 TPO 模拟肽基因片段序列

根据 TPO 模拟肽的氨基酸序列,选择细菌偏爱的密码子合成其 DNA 序列,在 5'端增加了起始密码子 ATG,在 3'端增加 5 个甘氨酸的密码子,使其与人 IgG1 Fc 片段连接后,能保持较好的柔性。分别合成 TPO 模拟肽 DNA 序列的正负链,均在 5'端进行磷酸化。合成的 2 个 DNA 片段为:

正链(TPOP1):

5'-P-catg atc cac ggt ccg act ctg cgt cag tgg ctg gct gca cgt gct ggt gga ggt gga ggt g-3';

负链(TPOP2):

5'-P-ga tcc ace tcc acc tcc acc agc acg tgc agc cag cca ctg acg cag agt cgg acc ttg gat-3'。

二条链退火后形成的双链 DNA,其 5'端产生粘性 *Nco* I 位点(包含超密码子 ATG),3'端产生了 *Eco*R I 粘性末端。

## 2.2 PCR 扩增人 IgG1 Fc 基因片段的引物

为了扩增人 IgG1 Fc 的 4 种不同长度 DNA 片段,合成了 5 个引物(在 Fc DNA 上的位置见图 2),一个为上游引物 P<sub>1</sub>,另外 4 个引物(P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>4</sub>、P<sub>5</sub>)为下游引物。通过 P<sub>1</sub> 分别与 P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>4</sub>、P<sub>5</sub> 引物组合,可扩增 4 种不同长度的 IgG1 Fc 基因片段。这 5 个引物(P<sub>1</sub> - P<sub>5</sub>)为:

P<sub>1</sub>: 5'- CGC GGA TCC CCG TCA GTC TTC CTC TTC -3',

P<sub>2</sub>: 5'- CTC GAA TTC TTA TTT ACC CGG AGA CAG -3',

P<sub>3</sub>: 5'- GCC GAA TTC TTA GCA CTT GTA CTC CTT GCC -3',

P<sub>4</sub>: 5'- GTC AAG CTT TTA CTT GTA CTC CTT GCC ATT-3',

P<sub>5</sub>: 5'- GCC AAG CTT TTA GC TGT GAC CTC AGG GGT C-3'。在上游引物 P<sub>1</sub> 增加了 *Bam*H I 酶切位点,在 4 个下游引物上分别增加了 *Eco*R I 或 *Hind* III 酶切点(方框内序列),以便于 PCR 扩增产物直接酶切后与 TPO 模拟肽的 DNA 片段及质粒载体连接。

## 2.3 IgG1 Fc 片段的扩增

以含有全长人 IgG1 Fc DNA 片段的质粒为模板,用引物 P<sub>1</sub> 分别与 P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>、P<sub>4</sub>、P<sub>5</sub> 组合,扩增出 4 种长度的人 IgG1 Fc 基因片段:Fc1(P<sub>1</sub> + P<sub>2</sub>):648 bp; Fc2(P<sub>1</sub> + P<sub>3</sub>):270 bp; Fc3(P<sub>1</sub> + P<sub>4</sub>):267 bp; Fc4(P<sub>1</sub> + P<sub>5</sub>):90 bp。Fc1 基因片段编码全长人 IgG1 Fc 蛋白片段,含有 4 个 Cys;Fc2 基因片段编码 86 个氨基酸,含有 2 个 Cys,去掉了 C 端的 126 个氨基酸;Fc3 基因片段编码 85 个氨基酸,含有 1 个 Cys,去掉了 C 端的 127 个氨基酸;Fc4 基因片段编码 26 个氨基酸,C 端最后 1 个氨基酸为 Cys,去掉了 C 端的 186 个氨基酸。将扩增的 4 种 PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,证实分别扩增出与目的基因大小相符合的基因片段(见图 1)。

## 2.4 TPO 模拟肽与人 IgG1 Fc 片段的融合表达

首先将 TPO 模拟肽基因片段与全长的人 IgG1 Fc DNA (Fc1) 进行连接,克隆至质粒表达载体 pET28a(+),将复性的 TPO 模拟肽基因、*Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切的 Fc1 基因片段、*Nco*I 和 *Eco*R I 双酶切的质粒 pET28a(+ )均电泳回收,然后在同一离心管内用 T4 DNA 连接酶连接。获得重组质粒含

有 TPO 模拟肽和 Fc1 基因片段,并且两段基因的翻译框架已调整一致,可表达 TPO 模拟肽和人 IgG1 Fc1 片段的融合蛋白(构建流程见图 2)。将连接产物转化大肠杆菌 BL21( DE3 ),提取质粒测定 DNA 序列,证实插入的 TPO 模拟肽和 Fc1 片段的 DNA 完全正确。

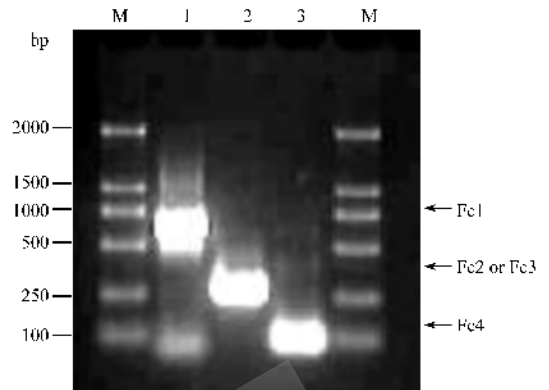


图 1 PCR 扩增人 IgG1 Fc 基因片段的电泳检测

Fig.1 Amplified human IgG1 Fc gene fragments by PCR  
M. DNA markers (Takara: 2000, 1000, 750, 500, 250, 100bp)

1. Fc1 PCR product of P<sub>1</sub> + P<sub>2</sub>

2. Fc2 PCR products of P<sub>1</sub> + P<sub>3</sub> and P<sub>1</sub> + P<sub>4</sub>

3. Fc4 PCR product of P<sub>1</sub> + P<sub>5</sub>

用 *Bam*H I 和 *Eco*R I (或 *Hind* III) 双酶切含 TPO + Fc1 基因的重组质粒,切除重组质粒内的 Fc1 基因,分别插入用 *Bam*H I 和 *Eco*R I (或 *Hind* III) 双酶切的 Fc2、Fc3 及 Fc4 DNA 片段,分别构建成含 TPO 模拟肽与 3 种截短的 Fc DNA 片段的重组质粒 (TPO + Fc2, TPO + Fc3, TPO + Fc4, 见图 2)。

挑取上述 4 种重组质粒的转化子,培养后加 IPTG 至终浓度 1mg/mL,诱导表达 4h, SDS-PAGE 检测结果 3 种重组子高表达了目的融合蛋白,表达量约占菌体蛋白的 30%;而含 TPO + Fc4 的重组子未表达目的蛋白(见图 3)。

## 2.5 表达 TPO 模拟肽融合蛋白的纯化

表达的 3 种融合蛋白均以包涵体的形式存在,用 8 mol/L 尿素溶液溶解后分别上 DEAE-Sepharose FF 柱纯化,3 种融合蛋白 TPO + Fc1、TPO + Fc2 和 TPO + Fc3 均存在于穿流峰内。将穿流峰蛋白上 S-Sepharose FF 阳离子柱纯化,TPO + Fc1 存在于 100 mol/L NaCl 溶液的洗脱峰内,而 TPO + Fc2 和 TPO + Fc3 仍存在于穿流峰内。纯化获得的蛋白 SDS-PAGE 检测显示单一条带(图 4)。

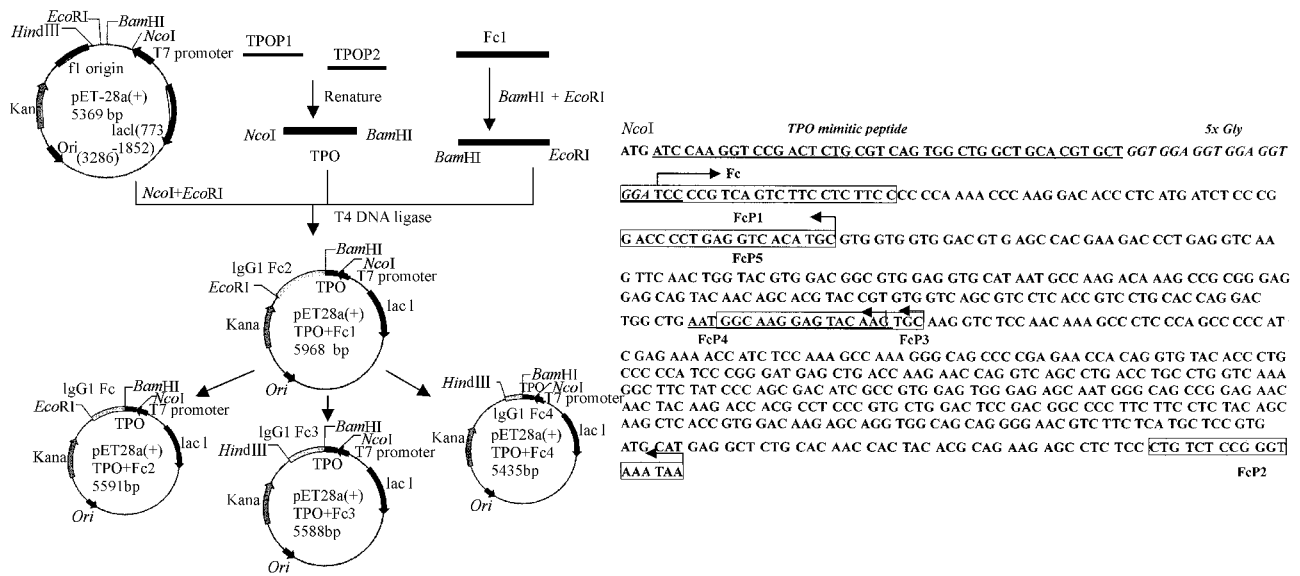


图 2 4 种重组质粒构建流程图及基因序列

Fig. 2 Construction of the 4 kinds of recombinant plasmids and DNA sequence of human IgG1 Fc

2.6 体外活性测定结果

用 TPO 依赖的细胞 Ba/F3-mp1 测定了 3 种融合蛋白、TPO 模拟肽及 PEG4000 修饰的 TPO 模拟肽体外活性,并用人 rhTPO 做为对照。结果显示,3 种融合蛋白均有较好的活性(见表 1)。3 种长度人 IgG1Fc 片段与 TPO 模拟肽融合蛋白的体外活性基本相同,比 TPO 模拟肽活性提高了 5 倍。

表 1 TPO 模拟肽与各种表达 TPO + Fc 蛋白的 EC50 值  
Table 1 EC50 of TPO mimetic peptide and the expressed TPO + Fc proteins

	TPO mimetic peptide	PEG-TPO peptide	TPO + Fc1	TPO + Fc2	TPO + Fc3	rhTPO
EC50/(nmol/L)	50	25	13	10	10	0.25

2.7 TPO 模拟肽对卡铂致血小板减少症小鼠的治疗作用

试验样品包括 5 种:本研究表达的 3 种 TPO 模拟肽融合蛋白(TPO + Fc1、TPO + Fc2 和 TPO + Fc3)、化学合成的 TPO 模拟肽及 PEG4000 修饰的 TPO 模拟肽,试验样品均分成低剂量(200μg/kg)组和高剂量(1000μg/kg)。另设阴性对照组和阳性对照组(人 rhTPO 50μg/kg)。

各组实验动物治疗前后外周血小板数量的变化见图 5。卡铂腹腔注射后,阴性对照组小鼠外周血小板逐渐下降,到第 9 天时达到最低值,下降了 95%,此后缓慢回升。各实验组外周血小板数量变化趋势与阴性对照组相似,同样是在卡铂注射后第 9 天降到最低点,但是各实验组在最低点以后各检

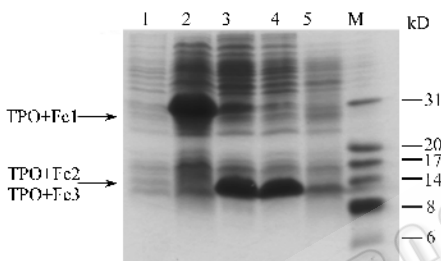


图 3 IPTG 诱导 4 种重组菌的 15% SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of the 4 kinds of engineering E. coli with 15% SDS-PAGE

1. Negative control BL21(DE3) harboring plasmid pET28a;
2. pET28a + TPO + Fc1;
3. pET28a + TPO + Fc2;
4. pET28a + TPO + Fc3;
5. pET28a + TPO + Fc4;

M. Marker (Promega 31, 20, 17, 14, 8, 6kD)

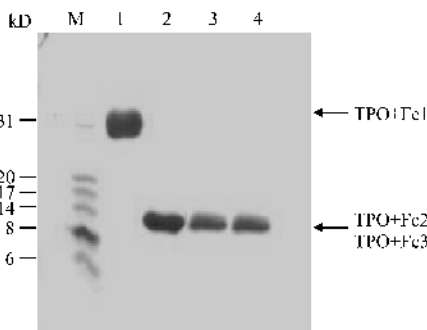


图 4 12% SDS-PAGE 检测纯化的 3 种 TPO + Fc 融合蛋白

Fig. 4 Analysis of the purified TPO + Fc proteins with 12% SDS-PAGE

M. Standard protein markers (Promega 31, 20, 17, 14, 8, 6kD);

1. Purified TPO + Fc1;
2. Purified TPO + Fc2;
3. Purified TPO + Fc3

测点的血小板数量显著高于阴性对照组。

在低剂量组,5种试验样品升高血小板的效果很相近,都处于起效浓度。在高剂量组,各试验组血小板计数均高于低剂量组,尤其在第9~18天,血小板数量较低剂量组增高最显著;在第6~15天,TPO + Fc1升高血小板的功能远高于其它组,其第9天血小板计数是对照组的9倍多,第21天时血小板已恢复正常。这些结果说明,5种试验样品均有升

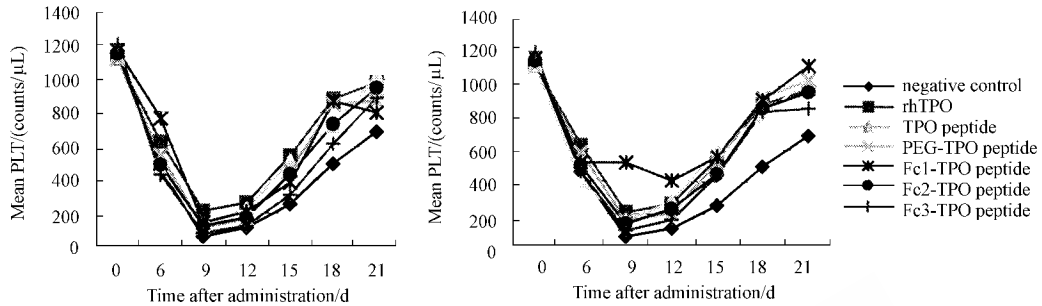


图5 7组实验动物的外周血小板数量变化趋势

Fig.5 Mean platelet counts in mice following carboplatin and s.c. administration of the tested TPO peptides or proteins

A. The low dosage groups ;B. The high dosage groups

## 2.8 免疫原性分析

为了观察 TPO 模拟肽与人 IgG1 片段融合前后的免疫原性,分别用它们免疫小鼠,检测血清中的抗体。5种免疫原为:本研究表达的3种 TPO 模拟肽融合蛋白(TPO + Fc1、TPO + Fc2 和 TPO + Fc3),化学合成的 TPO 模拟肽及 PEG4000 修饰的 TPO 模拟肽。免疫用量前3种为5mg/kg,后2种为2mg/kg。设置1组对照,免疫时仅用佐剂。共用6组实验小鼠。

免疫结束后,用 TPO 模拟肽(用包被液稀释成10 $\mu$ g/mL)包被酶联板,间接 ELISA 法检测各组免疫血清内的抗体,每份免疫血清均梯度稀释(1:20 - 1:10000)测定。6组实验动物的免疫血清均为阴性(数据未列出),说明血清内均未有抗 TPO 模拟肽抗体。而分别用各个免疫原包被酶联板检测对应免疫组血清抗体,结果显示,TPO + Fc1、TPO + Fc2 和 TPO + Fc3 免疫组均检出高效价抗体,效价分别为1:5000、1:2000、1:2000,说明其产生的抗体是抗人 IgG1 Fc 抗体,并非抗 TPO 模拟肽抗体。

为进一步证实免疫血清内无 TPO 模拟肽抗体,进行了阻断试验。向 TPO + Fc1 免疫组抗体阳性血清内加入 TPO 模拟肽,终浓度为1mg/mL,37 $^{\circ}$ C反应1h后再用 TPO + Fc1 作抗原检测血清内抗体,同时用不加 TPO 模拟肽的相应血清作对照。结果(表1)两组无显著差异,说明 TPO 不能阻断抗体反应,证实这些抗体阳性血清内无 TPO 模拟肽抗体。

高血小板的功能,以 TPO + Fc1 融合蛋白作用最强。

而5个试验样品,不论是高剂组和低剂组都未出现明显的升高白细胞的作用,仅在个别测试点出现白细胞略微升高的现象(数据未列出);各实验组的外周红细胞计数、血红蛋白、红细胞比容等均与阴性对照组及正常对照组无异差(数据未列出),说明这些试验样品对红细胞系无明显作用。

表2 TPO + Fc1 组免疫小鼠血清抗体阻断试验结果(OD<sub>450</sub>)

Table 2 Block test of antibodies with TPO mimetic peptide(OD<sub>450</sub>)

Sera dilution	1:100	1:1000	1:5000
No blocking with TPO peptide	0.967	0.826	0.146
Blocking with TPO peptide	0.986	0.818	0.176
Negative control sera	0.051	0.043	0.028

## 3 讨论

本室筛选合成的 TPO 模拟肽有较好的活性,但是化学合成多肽的成本较高,并且在体内的半衰期较短,对其应用有一定影响。本研究利用基因工程技术将 TPO 模拟肽与人 IgG1 Fc 片段融合表达,开辟了制备药用多肽的新途径,并且建立了表达的 TPO 模拟肽融合蛋白的纯化方法,获得了高纯度的表达蛋白。将 TPO 模拟肽与4种不同长度的人 IgG1 Fc 片段融合表达,主要目的是通过增加分子大小及形成二聚体,以减小其在肾脏内的滤出,在血液内保持较长的半衰期。同时考虑到分子太大有可能使 TPO 模拟肽产生抗原性,因此决定观察不同不同长度的人 IgG1 Fc 片段对 TPO 模拟肽活性及抗原性等特性的影响,再通过综合比较选择出最适宜与 TPO 模拟肽融合表达的人 IgG1 Fc 片段。

表达的3种 TPO 模拟肽融合蛋白均显示有较好的体内外活性,并且高于 TPO 模拟肽的活性,说

明融合的人 IgG1 Fc 片段并不掩盖 TPO 模拟肽的活性位点。已有的实验证实 TPO 模拟肽形成二聚体时其活性升高 600 ~ 700 倍,本实验使用的 3 种融合蛋白均为单体,所以体内外活性均较重组人 TPO 的活性低,从本研究的活性测定结果计算,表达的 3 种融合蛋白复性后形成二聚体,活性只须提高 30 ~ 60 倍,即可达到重组人 TPO 的活性。3 种融合蛋白的体内外活性均较 TPO 模拟肽单体活性高,其原因有两个:一是融合蛋白的分子较大,清除相对较慢,体内半衰期较长,二是可能部分融合蛋白氧化形成了二聚体,提高了其活性。理想的小血小板减少症小鼠模型是在血小板下降到最低点时,下降 80% 左右,本实验卡铂的作用稍强了一些,因此血小板下降较多(95%)其恢复相对缓慢。

将小分子肽与载体蛋白融合或交联后会增强其免疫原性,这种免疫原性增加的小分子肽多数情况下具有较好的抗原性,而那些不具备抗原性的小肽即使与大分子交联后也难具有免疫原性。将 TPO 模拟肽与人 IgG1 Fc 融合后增加了分子量,可能会增加 TPO 模拟肽的免疫原性,但研究结果证实三种 TPO 模拟肽融合蛋白均未刺激小鼠产生抗 TPO 模拟肽抗体,而与 TPO 模拟肽融合的 IgG1 Fc 则刺激小鼠产生了高效价抗 IgG1 Fc 抗体,如果融合后的 TPO 模拟肽具备免疫原性,则应该刺激小鼠产生对应的抗体。我们曾将 TPO 模拟肽与小鼠的血清白蛋白等载体交联后加佐剂免疫小鼠制备单抗,但均未成功,也说明了 TPO 模拟肽对小鼠无免疫原性。因此,TPO 模拟肽融合蛋白值得进一步检测它们对其它动物的免疫原性,以进一步评估对人类的免疫原性。

在纯化表达的 TPO 模拟肽融合蛋白时发现,在相同缓冲液 Tris-HCl(pH8.05)条件下,TPO + Fc2 和 TPO + Fc3 蛋白既不吸附至阴离子柱也不吸附至阳离子柱。其原因与使用的缓冲液有关,一般情况下,阳离子柱使用 PBS 作缓冲液而不使用 Tris-HCl 缓冲系统,因为带正电荷的 Tris 碱能与缓冲液内的带正电蛋白竞争结合阳离子树脂,从阴离子柱流出的带较弱正电荷的 TPO + Fc2 和 TPO + Fc3 蛋白难以结合到阳离子柱树脂上,因此上柱时随上样液流出,而带正电荷较多的其它蛋白吸附到柱子上,达到了分离纯化结果。利用这种方式纯化蛋白时缓冲液 pH 值要略低于目的蛋白的等电点,使该蛋白在 Tris-HCl 缓冲系统内既不能接合到阴离子柱上又不能结合到阳离子柱。用同样的方法我们纯化了表达的另外几种蛋白,并获得了满意结果。为了使 TPO 模拟肽

融合蛋白易于纯化和复性,我们正用酵母系统进行分泌性表达,使产生的可溶性蛋白自然形成二聚体,提高其活性。

本研究的结果显示,用基因工程技术制备 TPO 模拟肽是一个较理想的途径,表达 3 种 TPO 模拟肽融合蛋白均有较好的生物活性,活性显著高于合成的 TPO 模拟肽,并且没有增强 TPO 模拟肽的免疫原性,显示了较好的应用潜力。另外,该表达系统亦可用于其它多肽的融合表达。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Foster B J, Clagett-Carr K, Leyland-Jones B *et al.* Results of NCI-sponsored phase I trials with carboplatin. *Cancer Treat Rev*, 1985, **12** (suppl A) 43 ~ 49
- [ 2 ] Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood*, 1995, **86** :419 ~ 431
- [ 3 ] Kato T, Ogami K, Shimada Y *et al.* Purification and characterization of thrombopoietin. *J Biochem*, 1995, **118** :229 ~ 236
- [ 4 ] Harker L A, Hunt P, Marzec U M *et al.* Regulation of platelet production and function by megakaryocyte growth and development factor in nonhuman primates. *Blood*, 1996, **87** :1833 ~ 1844
- [ 5 ] Vadhan-Raj S, Kudelka A P, Garrison L *et al.* Effects of interleukin-1 on carboplatin-induced thrombocytopenia in patients with recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 1994, **12** :707 ~ 714
- [ 6 ] Smith J W, Urba W J, Curti B D *et al.* The toxic and hematologic effects of interleukin-1 alpha administered in a phase I trial to patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol*, 1992, **10** :1141 ~ 1152
- [ 7 ] Biesma B, Willemse P H B, Mulder N H *et al.* Effects of interleukin-3 after chemotherapy for advanced ovarian cancer. *Blood*, 1992, **80** :1141 ~ 1148
- [ 8 ] D'Hondt V, Weynants P, Humblet Y *et al.* Dose-dependent interleukin-3 stimulation of thrombopoiesis and neutropoiesis in patients with small-cell lung carcinoma before and following chemotherapy: a placebo-controlled randomized phase Ib study. *J Clin Oncol*, 1993, **11** :2063 ~ 2071
- [ 9 ] D'Hondt V, Humblet Y, Guillaume T *et al.* Thrombopoietic effects and toxicity of interleukin-6 in patients with ovarian cancer before and after chemotherapy: a multicentric placebo-controlled, randomized phase I b study. *Blood*, 1995, **85** :2347 ~ 2353
- [ 10 ] Weber J, Yang J C, Topalian S L *et al.* Phase I trial of subcutaneous interleukin-6 in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol*, 1993, **11** :499 ~ 506
- [ 11 ] Singer S C, Tansik R L, Dev I K *et al.* Pegylated thrombopoietin (TPO)-mimetic peptides bind human TPO receptor causing proliferation and maturation of megakaryocytes. *Blood*, 1998, **92** :568a
- [ 12 ] Wirla S E, Balasubramanian P, Duffin D J *et al.* Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as the natural cytokine. *Science*, 1997, **276** :1696 ~ 1699
- [ 13 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup>. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory

## Expression of TPO Mimetic Peptide Chimeric Proteins with Human IgG1 Fc Fragments and Their Biological Characters

LI Yue-Xi<sup>2\*</sup> LI Chao<sup>1</sup> TAO Kai-Hua<sup>2</sup> JIA Xiang-Hong<sup>1</sup> CHENG Du-Sheng<sup>1</sup> HUANG Pei-Tang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( Beijing Institute of Biotechnology , Beijing 100071 ,China )

<sup>2</sup>( East-China Institute of Medical Biotechniques , Nanjing 210002 ,China )

**Abstract** Many antineoplastic agents can cause myelosuppression and thrombocytopenia. Thrombopoietin ( TPO ) is believed to be the major cytokine affecting the proliferation and maturation of megakaryocytes and increasing circulating platelet levels. We have designed and synthesized a TPO mimetic peptide , it can increase circulating platelet levels *in vivo* . For increasing half-life and forming dimer , the peptide was expressed as chimeric proteins with human IgG1 Fc fragments. The cDNA of TPO mimetic peptide was synthesized chemically and linked respectively to 5' terminus of human IgG1 Fc cDNA fragments in various length ( Fc1 : Fc 5' 648bp ; Fc2 : Fc 5' 270 bp ; Fc3 : Fc 5' 267 bp ; Fc4 : Fc 5' 90 bp ) , and cloned into expression plasmid pET28a ( + ) for constructing four recombinant plasmids. By transforming the four recombinant plasmids into *E. coli* . BL21( DE3 ) respectively , we got 3 kinds of engineered *E. coli* which express TPO + Fc chimeric proteins( 28kD TPO + Fc1 , 12kD TPO + Fc2 and 12kD TPO + Fc3 ) at high level respectively , the expressed proteins were purified with DEAE-Sepharose FF and S-Sepharose FF column.

The bioactivities of the expressed chimeric proteins( TPO + Fc1 , TPO + Fc2 and TPO + Fc3 ) , TPO mimetic peptide , and PEG4000 coupled TPO mimetic peptide were evaluated with Ba/F3-mp1 *in vitro* and with carboplatin-induced thrombocytopenia mice *in vivo* , the expressed chimeric proteins have higher activity than TPO mimetic peptide both *in vitro* and *in vivo* , the EC50 on Ba/F3-mp1 cells were 13 , 10 , 10 , 50 , and 25nmol/L respectively , all of them can increase circulating platelet counts. Their immunogenicity were evaluated in mice , none of them can elicit mice to produce antibodies to TPO mimetic peptide , meanwhile three TPO + Fc chimeric proteins can elicit mice to produce antibodies to human IgG1 Fc. These studies have laid basis for production of TPO mimetic peptide by genetic engineering .

**Key words** TPO , mimetic peptide , expression , bioactivity , immunogenicity

Received : 01-29-2002

This work was supported by Grant from Key Subject of the Ninth Five Plan of the Army ( No. Z95 1106 ).

\* Corresponding author. Tel 86-25-4802403 ; E-mail liyxi@163.net

### 声 明

为适应我国信息化建设需要 , 扩大作者学术交流渠道 , 本刊已加入《中国学术期刊( 光盘版 )》和“中国期刊网” 。 如作者不同意将文章编入该数据库 , 请在来稿时声明 , 本刊将做适当处理。

《生物工程学报》编辑部