

两步连续离子交换制备色谱分离纯化聚乙二醇化重组人粒细胞集落刺激因子

Separation and Purification of PEGylated rhG-CSF by Two-step Ion-exchange Chromatography

陈 婷^{1,2}, 俞 强², 闭静秀², 马光辉², 苏志国^{2*}

CHEN Ting^{1,2}, YUN Qiang², BI Jing-Xiu², MA Guang-Hui² and SU Zhi-Guo^{2*}

1. 北京科技大学土木与环境工程学院, 北京 100083

2. 中国科学院过程工程所生化工程国家重点实验室, 北京 100080

1. Civil & Environmental Engineering School, University of Science and Technology of Beijing, Beijing 100083, China

2. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

摘 要 建立了两步连续离子交换制备色谱分离、纯化聚乙二醇与重组人粒细胞集落刺激因子(Recombinant human granulocyte stimulating factor, rhG-CSF)偶联物的方法。首先用阳离子交换色谱将偶联蛋白质和非偶联蛋白质分开,然后使用阴离子交换色谱去除过量的游离聚乙二醇杂质,并分离纯化偶联蛋白异构体分别得到单聚乙二醇化、双聚乙二醇化和三聚乙二醇化的 rhG-CSF。它们经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析均为单带。采用基质辅助激光解吸离子化-飞行时间质谱(MALDI-TOF)分析三种偶联蛋白质的分子量,分别为 23.8kD、28.6kD、33.8kD。用噻唑蓝(MTT)比色法,以粒细胞集落刺激因子的依赖细胞株 NFS-60 为靶细胞,测定重组人粒细胞集落刺激因子及其与聚乙二醇的偶联物的体外细胞生物学活性,单聚乙二醇化、双聚乙二醇化和三聚乙二醇化的 rhG-CSF 体外活性保留率分别为 92%、75%、43%。

关键词 聚乙二醇,重组人粒细胞集落刺激因子,蛋白质聚乙二醇化,离子交换色谱

中图分类号 Q81 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)02-0284-05

Abstract In order to separate and purify the PEGylated recombinant human granulocyte stimulating factor (rhG-CSF) at large laboratory-scale level, a two-step ion-exchange chromatographic separation procedure was designed. Cation-exchange chromatography was applied first to separate PEGylated rhG-CSF from un-reacted rhG-CSF, followed by anion-exchange chromatography to dissolve individual PEG-rhG-CSF species (mono-, di- and tri-PEGylated rhG-CSF) and remove the free PEG. The molecular weight of individual PEGylated rhG-CSF was determined by MALDI-TOF and SDS-PAGE. MALDI-TOF mass spectrometry revealed that the molecular weights of mono-, di- and tri-PEGylated rhG-CSF are 23.8kD, 28.6kD and 33.8kD, respectively. Cell proliferation activity was detected by MTT assay using NFS-60 cell. The *in vitro* residual bioactivity of mono-, di- and tri-PEGylated rhG-CSF were 90%, 75% and 43% respectively, comparing with the un-conjugated rhG-CSF. These results indicated that the un-conjugated rhG-CSF and excess free PEG can be removed completely and the three conjugate species can be purified into homogeneity by the two consecutive ion-exchange chromatographic steps. The purification procedure is easy to scale-up, high in performance and recovery.

Key words polyethylene glycol, rhG-CSF, protein PEGylation, ion-exchange chromatograph

Received: September 21, 2004; Accepted: November 10, 2004.

This work was supported by Grant from the National Natural Sciences Foundation of China (No. 20136020 & 20125616).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62561817; E-mail: zgsu@home.ipe.ac.cn

国家自然科学基金资助项目(No.20136020 和 20125616)。

粒细胞集落刺激因子是刺激骨髓细胞集落形成的细胞因子之一,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良好的疗效^[1]。但是,无论是天然的或基因重组的人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)在人体内的循环半衰期都非常短($t_{1/2} = 1.3 \sim 4.2\text{h}$),大大限制了它们的临床应用^[2]。蛋白质聚乙二醇化技术被广泛地用于改善各种多肽和蛋白质类生物药物的代谢动力学和药效学性质,并取得了良好的效果^[3]。

但是,由于大部分聚乙二醇与蛋白质的偶联反应都是随机性亲核反应,因此偶联产物往往都是由多种不同的偶联蛋白异构体组成的混合物^[4]。这样的混合物是不能够直接作为药物使用的,必须将其分离纯化为均匀的单一性组分。由于这些偶联蛋白异构体除了分子量和表面电荷的细小差别之外,其它的理化性质非常接近,因此偶联产物的分离纯化一直是蛋白质聚乙二醇化技术的难点之一。虽然尺寸排阻色谱可以有效地将各种偶联蛋白异构体分开,但是其有限的载量限制了它在大规模制备过程中的应用^[5]。疏水相互作用色谱对个别偶联蛋白的分离纯化取得了成功,但是由于其分离机理取决于目标蛋白质和聚乙二醇的相对疏水性质,因此也没有得到广泛的应用^[6]。在一般情况下,蛋白质与聚乙二醇偶联之后表面电荷将会发生变化,利用这种电荷差异可以将偶联蛋白分离。目前国内外的报道中广泛采用一步离子交换色谱分离,但效果并不理想。本文采用阳离子和阴离子交换色谱相结合的方法对琥珀酰亚胺甲酯-单甲氧基聚乙二醇(SCM-mPEG)与 rhG-CSF 的偶联反应混合物进行分离纯化,获得各种均匀的单一组分的偶联产物。

1 材料和方法

1.1 材料

单甲氧基聚乙二醇 5000 (mPEG5000) (Union Carbide, USA)、氮基琥珀酰亚胺(NHS) (Aldrich)、450型酶联免疫检测仪 (Bio-Rad, USA)、噻唑蓝 (thiazolylblue, MTT) (SIGMA)、RPMI1640 培养基 (GibcoBRL 公司)、96孔细胞培养板 (Costar 公司)、G-CSF 效价测定用标准品和 NFS-60 细胞株 (中国药品生物制品检定所)、rhG-CSF (北医联合生物工程公司)、蛋白质分子量标准品 (上海丽珠东风生物技术有限公司)、SP-Sepharose FF、Source-Q30 色谱介质和 ÄKTA Explorer 100 液相色谱系统 (GE Healthcare,

Sweden)。实验用超纯水采用 Rios 系统制备 (Millipore, USA)。其他试剂均为分析纯或生化纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 琥珀酰亚胺甲酯-单甲氧基聚乙二醇 (SCM-mPEG) 的制备:以 mPEG5000 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 Hubert F. Gaertner 的方法进行活化,详细步骤见参考文献[7]。

1.2.2 SCM-mPEG 和 rhG-CSF 的偶联反应:将 rhG-CSF 溶于 100mmol/L pH7.6 硼酸-硼砂缓冲液中,蛋白质浓度为 2mg/mL。然后将 SCM-mPEG 加入蛋白溶液中,PEG 与蛋白质的摩尔比为 10:1。在 4℃ 条件下反应 1h,然后加入 2g 甘氨酸以终止反应。在 4℃ 条件下,用截留分子量为 5000 的透析袋对 50mmol/L 的醋酸钠缓冲液透析除去游离的 NHS 和过量的甘氨酸。

1.2.3 阳离子交换色谱分离偶联蛋白质与非偶联蛋白质:色谱条件:将 SP-Sepharose FF (2.6 cm × 10 cm) 阳离子交换色谱柱连接到 ÄKTA Explorer 100 液相色谱系统上,然后用相当于 5 倍柱体积的 50mmol/L pH4.5 醋酸钠缓冲液 (缓冲液 A) 充分平衡色谱柱。用进料泵以 2mL/min 将大约 200mL 样品 (约含 400mg 蛋白) 加到色谱柱中。然后在 8mL/min 的流速下,用大约 5 倍柱体积的缓冲液 A 冲洗色谱柱,以除去不与色谱介质发生静电吸附的物质。随后用缓冲液 B (缓冲液 A + 1mol/L NaCl) 进行洗脱,35 ~ 95min 缓冲液中 NaCl 的浓度从 0 增加到 0.45mol/L,95min 后 NaCl 浓度保持不变,洗脱体积约为 9 倍柱体积。整个分离过程在常温下进行,检测器波长为 280nm。手工收集各洗脱组分,测定其生物活性并用 SDS-PAGE 电泳进行分析。

1.2.4 阴离子交换色谱纯化不同的偶联蛋白异构体:色谱条件:将 Source-Q30 (1.6cm × 10cm) 阴离子交换介质色谱柱连接到 ÄKTA Explorer 100 液相色谱系统上,然后用 50mmol/L pH8.5 的磷酸盐 (缓冲液 A) 充分平衡色谱柱。用系统上样泵以 2mL/min 将大约 100mL 样品 (约含 80 ~ 120mg 蛋白) 加到色谱柱中。然后在 5mL/min 的流速下,用大约 5 倍柱体积的缓冲液 A 冲洗色谱柱,以除去不与色谱介质发生静电吸附的物质。随后用缓冲液 B (缓冲液 A + 1mol/L NaCl) 进行梯度洗脱,洗脱体积约为 9 倍柱体积,NaCl 梯度如下:25 ~ 50min 时洗脱缓冲液中 NaCl 的浓度从 0 增加到 0.25mol/L;50 ~ 60min 时保持在

0.25mol/L;60~100min时洗脱缓冲液中NaCl的浓度从0.25mol/L增加到0.45mol/L。整个分离过程在常温下进行,检测器波长为280nm。手工收集各洗脱组分,测定其生物活性并用SDS-PAGE电泳进行分析。

1.2.5 MALDI-TOF 质谱分析修饰产物分子量的分布:按照文献所述的方法⁸,用Voyager-Elite质谱仪(Perseptive Biosystem)分析聚乙二醇化rhG-CSF的分子量的分布。

1.2.6 SDS-PAGE:具体方法参考Laemmli的方法⁹,浓缩胶为5%,分离胶为15%。

1.2.7 体外生物活性测定:采用MTT方法¹⁰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 μ L/孔);将G-CSF标准品和纯化后的偶联G-CSF样品以10倍稀释度做梯度稀释后,分别加入96孔培养板中(50 μ L/孔),设阳性对照、阴性对照(不含G-CSF)和空白对照(只含培养液),37 $^{\circ}$ C,5%CO₂条件下孵化培养36~48h,加MTT溶解液(100 μ L/孔),继续孵化培养24h测定各孔A₅₇₀/A₆₃₀值。

2 结果和讨论

2.1 结果

2.1.1 阳离子交换色谱分离偶联蛋白质和非偶联蛋白质:反应混合物经过阳离子交换色谱后被分成了两部分(如图1所示)。峰1为穿透峰,峰2是在梯度洗脱过程中氯化钠浓度从0.25mol/L增加到0.50mol/L时的洗脱峰。分别收集这两个组分并用MTT法和SDS-PAGE进行分析。经检测这两个组分都具有G-CSF活性;SDS-PAGE电泳结果表明洗脱峰1是分子量从28.5kD到67.2kD的混合物(见图3,第3泳道);洗脱峰2是分子量为18.8kD的蛋白质(见图3,第4泳道)。电泳结果证实了阳离子交换色谱的洗脱峰1是具有不同分子量的偶联产物的混合物,峰2是未反应的rhG-CSF。经过这一步离子交换层析,已经有效地将PEG化的G-CSF与未反应的G-CSF分开。

2.1.2 阴离子交换色谱纯化不同的偶联蛋白异构体:在阳离子交换色谱分离步骤中收集的P1组分进一步用Source-Q30阴离子交换色谱进行分离,混合物被分成了三个不同的组分(如图2所示)。

用含0~0.25mol/L氯化钠的缓冲液梯度洗脱时出现第1个峰,接着用含0.25~0.45mol/L氯化钠的缓冲液梯度洗脱时出现第2和第3个峰,进一步增

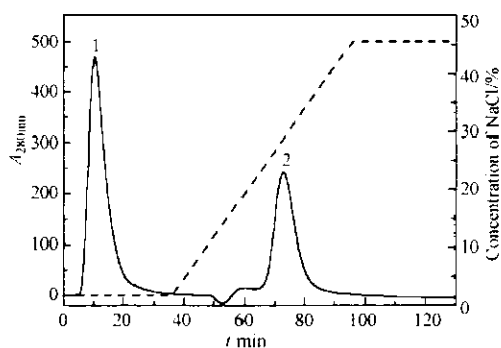


图1 SP-Sepharose FF 阳离子交换色谱分离聚乙二醇化的rhG-CSF和未反应的rhG-CSF

Fig.1 Separation of PEGylated rhG-CSF from un-conjugated proteins by cation-exchange chromatography of SP-Sepharose FF media

Peak 1: the mixture of conjugated protein; Peak 2: rhG-CSF.

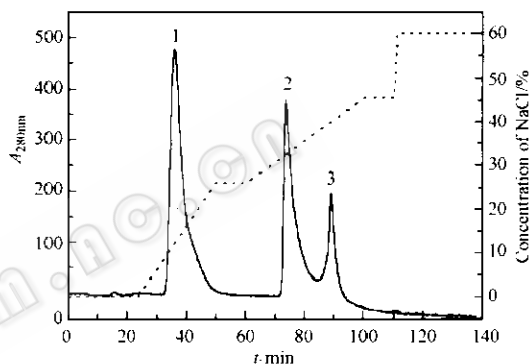


图2 Source Q30 阴离子交换色谱分离不同的修饰组分

Fig.2 Fractionation of individual PEGylated proteins by anion-exchange chromatography of Source Q30 media

Peak 1: mono-PEGylated rhG-CSF; Peak 2: di-PEGylated rhG-CSF; Peak 3: tri-PEGylated rhG-CSF.

加盐浓度洗脱时无蛋白峰出现。分别收集这三个组分并用MTT法和SDS-PAGE电泳进行分析。经检测这三个组分都具有G-CSF活性;SDS-PAGE电泳结果表明,洗脱峰1、2和3的分子量分别为67.2kD(见图3,第5泳道),38.1kD(见图3,第6泳道),28.5kD(见图3,第7泳道)。由于PEG在水溶液中每个乙氧基重复基团可以结合2~3个水分子导致其流体力学半径远远大于同分子量的球状蛋白,因此用SDS-PAGE电泳和HPSEC测量的聚乙二醇化蛋白分子量要大于其真实的分子量¹¹。MALDI-TOF质谱是最有效的测定偶联蛋白准确分子量的方法,结果(见图4)表明反应混合物中共有三种分子量不同的偶联蛋白异构体,即单聚乙二醇化rhG-CSF(mono-PEGylated rhG-CSF, 23.8kD);双聚乙二醇化rhG-CSF(di-PEGylated rhG-CSF, 28.6kD);三聚乙二醇化rhG-CSF

(tri-PEGylated rhG-CSF, 33.8kD)。因此,综合 SDS-PAGE 和 MALDI-TOF 的结果可以判定阴离子交换色谱的 3 个洗脱峰分别是单聚乙二醇化 rhG-CSF(峰 3)、双聚乙二醇化 rhG-CSF(峰 2)和三聚乙二醇化 rhG-CSF(峰 1)。虽然 PEG 在 280nm 没有紫外吸收,但是可以采用比色法检测 PEG^[12],即用 5% BaCl₂(溶于 1mol/L HCl 中)和 I₂/KI 混合液滴定的方法来检测洗脱液中是否存在游离 PEG,结果表明 PEG 不与色谱介质发生静电吸附作用,而以穿透峰的形式被洗脱下来。洗脱大约 0.5 个柱体积之后检测的穿透峰中开始有 PEG 出现;1.5 个柱体积后 PEG 的量明显减少,洗脱 3 个柱体积之后 PEG 基本完全除去。

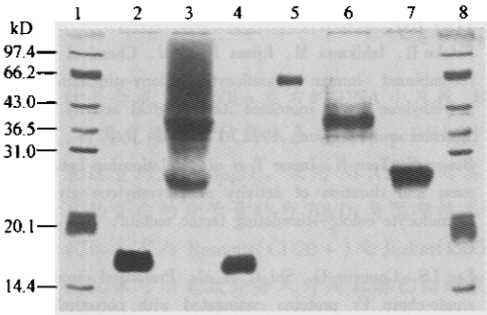


图 3 SDS-PAGE 分析聚乙二醇化 rhG-CSF
Fig.3 SDS-PAGE analysis of PEGylated rhG-CSF

1: molecular weight markers; 2: rhG-CSF standard;
3: peak 1 of Fig. 1; 4: peak 2 of Fig. 1; 5: peak 1 of Fig. 2;
6: peak 2 of Fig. 2; 7: peak 3 of Fig. 2; 8: molecular weight markers.

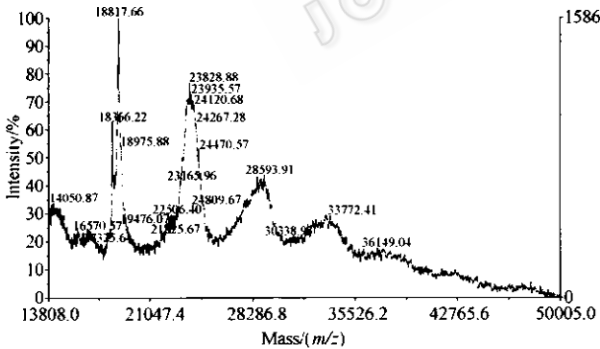


图 4 聚乙二醇化 rhG-CSF 的 MALDI-TOF 质谱分析
Fig.4 MALDI-TOF mass spectrometry of the PEGylated proteins

2.1.3 偶联物的体外生物活性:用 G-CSF 依赖性细胞系 NFS-60 细胞测定分离得到的各种分子量不同的 PEG 与 rhG-CSF 偶联物的体外生物活性(见图 5)。结果表明, rhG-CSF 的聚乙二醇化程度越高其体外生物活性越低,例如单聚乙二醇化 rhG-CSF 的活性保留率为 92%;双聚乙二醇化 rhG-CSF 的活性保留率为 75%;三聚乙二醇化 rhG-CSF 的活性保留率

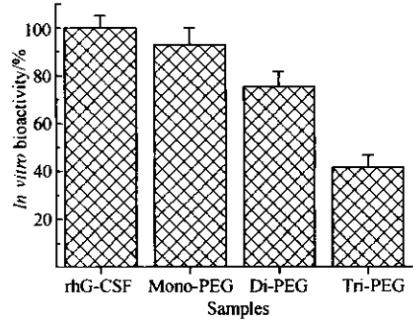


图 5 PEG-rhG-CSF 偶联物的分子量与体外生物活性的关系

Fig.5 In vitro bioactivity of the conjugates

rhG-CSF (Mw18.8kD); Mono-PEGylated rhG-CSF (Mw23.8kD);
Di-PEGylated rhG-CSF (Mw28.6kD);
Tri-PEGylated rhG-CSF (Mw33.8kD).

为 43%。据推测这种活力的下降是由于偶联的聚乙二醇分子产生的空间位阻效应阻碍了 rhG-CSF 与它的受体结合而造成的^[13]。虽然多聚乙二醇化 rhG-CSF 的体外生物活性明显下降,但是 Satake-Ishikawa 等人^[14]用 mPEG 修饰 G-CSF 发现偶联产物尽管体外生物活性下降,但在血浆中的半衰期从 1.79h 延长到 7.05h,同时体内平均保留时间也明显延长,因此体内活性并未受到影响。其他人的研究也得到了类似的结果,蛋白质 PEG 化后,体外生物活性下降,但体内活性却明显升高^[15,16]。因此今后还需要进一步研究三种偶联的聚乙二醇化 rhG-CSF 在体内的药物代谢动力学和药效学性质。

2.2 结论

针对蛋白质聚乙二醇化技术中各种偶联蛋白异构体理化性质接近、难于分离纯化的问题,本实验设计了两步连续的离子交换色谱分离纯化聚乙二醇和重组人粒细胞集落刺激因子偶联物的方法。rhG-CSF 与 PEG 偶联之后,可解离氨基数目的减少导致偶联蛋白表面电荷发生变化,是离子交换色谱的基础。在阳离子交换色谱上,偶联蛋白与介质之间的静电吸附作用力减小,因此在合适的洗脱条件下很容易与非偶联蛋白分离;理论上蛋白质的聚乙二醇化程度越高,偶联蛋白的等电点就越低,偶联物在阴离子交换色谱上的静电吸附作用力就越强。但是,实验结果与理论预测恰好相反,即蛋白质的聚乙二醇化程度越高越容易被洗脱下来。推测跟 PEG 的“电荷屏蔽”效应有关,即聚乙二醇化程度越高的偶联物,PEG 阻碍蛋白质与介质的静电吸附作用越强,因此越容易被洗脱。PEG 的“电荷屏蔽”效应对聚乙二醇化蛋白质的离子交换色谱行为的影响在其他人的研究工作中也有报道^[17]。利用本实验的方法,我

们成功地获得了均匀的单一组分的聚乙二醇化 rhG-CSF。与其他的分离方法相比,该方法具有更广泛的应用范围,例如不受色谱载量和目标蛋白的疏水性的限制,另外从过程的角度,第一步阳离子交换色谱的穿透峰包含目标产物可以直接进入下一步工艺。因此我们希望本研究能为聚乙二醇化 rhG-CSF 产品走向临床实际应用提供参考。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Hsieng SL, Christ LC, Linda ON *et al.* Folding and oxidation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor produced in *E. coli*. *J Biol Chem*, 1992, **267**(13):8770 - 8779
- [2] Layton JE, Hockman H, Sheridan WP *et al.* Evidence for a novel *in vivo* control mechanism of granulopoiesis; mature cell-related control of a regulatory growth factor. *Blood*, 1989, **74**(4):1303 - 1307
- [3] Richard BG, Greenwald, Yun HC *et al.* Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, **55**:217 - 250
- [4] Zalipsky S. Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates. *Bioconjug Chem*, 1995, **6**:150 - 165
- [5] Snider J, Neville C, Yuan LC *et al.* Characterization of the heterogeneity of polyethylene glycol-modified superoxide dismutase by chromatographic and electrophoretic techniques. *J Chromatogr*, 1992, **599**:141 - 155
- [6] Katre NV. The conjugation of proteins with polyethylene glycol and other polymers altering properties of proteins to enhance their therapeutic potential. *Adv Drug Deliv Rev*, 1993, **10**:91 - 114
- [7] Zalipsky S, Seltzer R, Menon-Rudolph S. Evaluation of a new reagent for covalent attachment of polyethylene glycol to proteins. *Biotech App Biochem*, 1992, **15**(1):100 - 114
- [8] Inouye S, Nakamura M. Identification of biotinylated lysine residues in the photoprotein aequorin by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry peptide mapping after lysine-specific endopeptidase digestion. *Anal Biochem*, 2003, **316**:216 - 222
- [9] Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**:680 - 685
- [10] Okabe M, Asano M, Kuga T *et al.* *In vitro* and *in vivo* hematopoietic effect of mutant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, 1990, **75**:1783 - 1788
- [11] Zimmerman SB, Murphy LD. Electrophoresis of polyethylene glycols and related materials as sodium dodecyl sulfate complexes. *Anal Biochem*, 1996, **234**:190 - 193
- [12] Nag A, Mitra G, Ghost PC. A colorimetric assay for estimation of polyethylene glycolated protein using ammonium ferrioxalate. *Anal Biochem*, 1996, **237**:224 - 237
- [13] Banci L, Bertini I, Caliceti P *et al.* Spectroscopic characterization of polyethyleneglycol modified superoxide dismutase proton NMR studies on its cobalt copper derivative. *J Inorg Biochem*, 1990, **39**:149 - 160
- [14] Satake R, Ishikawa M, Iijima H *et al.* Chemical modification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor by polyethylene glycol increases its biological activity *in vivo*. *Cell Structure and Function*, 1992, **17**:157 - 160
- [15] Bowen S, Tare N, Inoue T *et al.* Relationship between molecular mass and duration of activity of polyethylene glycol conjugated Granulocyte colony-stimulating factor mutein. *Exp Hematol*, 1999, **27**:272
- [16] Lee LS, Conover C, Shi C *et al.* Prolonged circulating lives of single-chain Fv proteins conjugated with polyethylene glycol: a comparison of conjugation chemistries and compounds. *Bioconjug Chem*, 1999, **10**:973 - 981
- [17] Clark R, Olson K, Fuh G *et al.* Long-acting growth hormones produced by conjugation with polyethylene glycol. *J Biol Chem*, 1996, **271**:21969 - 21977