

# 人干扰素 $\alpha 2b$ 和 IgG Fc 片段融合蛋白显著延长体内半衰期

王磊, 何剑, 肖卫华

合肥微尺度物质科学国家实验室, 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027

**摘要:** 重组人干扰素  $\alpha$  (rHuIFN $\alpha$ ) 已被广泛用于临床治疗多种人类病毒性疾病和肿瘤。但 IFN $\alpha$  在体内半衰期较短从而导致 IFN $\alpha$  在用药后数小时即从血浆中被清除。目前常用化学修饰和构建融合蛋白的方法来延长 IFN $\alpha$  的半衰期。在本研究中, 构建了 IFN $\alpha 2b$  与人 IgG 免疫球蛋白 Fc 片段的融合基因 (IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma$ ) 并在毕赤酵母中以二聚体形式分泌表达, 并有部分糖基化。不同亚型 Fc $\gamma$  片段的融合蛋白对 IFN $\alpha 2b$  抗病毒活性均有一定影响。其中 IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  所受影响最小, 较单纯的 IFN $\alpha 2b$  降低了 2.3 倍, 抗病毒活性可达  $4.29 \times 10^7$  IU/mg, 大鼠皮下注射后循环血液中半衰期达 65 h, 血液中存留时间 120 h 以上, 比商品重组干扰素的体内半衰期延长约 8 倍, 血液存留时间延长 10 倍, 显示了其良好的临床应用前景。

**关键词:** 干扰素  $\alpha 2b$ , 免疫球蛋白, 融合蛋白, 半衰期, 毕赤酵母

## Enhanced Circulation Half-life for Human IFN $\alpha 2b$ and IgG Fc Fusion Protein

Lei Wang, Jian He, and Weihua Xiao

Hefei National Laboratory for Physical Sciences at Microscale, School of Life Sciences, University of Science & Technology of China, Hefei 230027, China

**Abstract:** Recombinant human interferon alpha (rHuIFN $\alpha$ ) has been successfully used in antiviral and antitumor treatment. However, it degrades rapidly *in vivo*, resulting in the disappearance of cytokine in the plasma within several hours after administration. Strategies including chemical modification and fusion proteins have been used to improve the half-life of IFN $\alpha$  *in vivo*. In the present study, we constructed fusion proteins with IFN $\alpha 2b$  and the IgG Fc region from various subtypes of human IgG and expressed them in methylotropic yeast, *Pichia pastries*. The fusion proteins were secreted to the culture medium as the active form of disulfide-linked homodimer with a single glycosylation modification on each molecule. Regardless of the subtype of Fc $\gamma$ , fusing Fc $\gamma$  fragments to IFN $\alpha 2b$  showed impaired antiviral activities than the control IFN $\alpha 2b$  *in vitro*. With the highest antiviral activity, IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  was measured as  $4.29 \times 10^7$  IU/mg, which decreased 2.3 times compared to the control IFN $\alpha 2b$ . The half-life of IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  in blood circulation extended to 65 hours and was still detectable until 120 hours, which was 8 times longer for circulation half-life and 10 times longer for metabolic kinetic time than the control IFN $\alpha 2b$ . The results demonstrated that fusing IgG Fc region with IFN $\alpha 2b$  could improve the pharmacokinetic properties of the fusion proteins, which has the potential in clinical therapy.

**Keywords:** IFN $\alpha 2b$ , IgG, fusion protein, circulation half-life, *Pichia pastoris*

Received: March 26, 2007; Accepted: April 26, 2007

Corresponding author: Weihua Xiao. Tel: +86-551-3600535; E-mail: xiaow@ustc.edu.cn

$\alpha$  干扰素(IFN $\alpha$ )是一组能够诱导一系列细胞内蛋白表达,继而发挥抗病毒、抗细胞增殖和调节免疫应答作用的细胞因子。许多重组的天然结构 I 型 IFN $\alpha$ (包括 IFN $\alpha$ 1、IFN $\alpha$ 2b、IFN $\alpha$ 1b 等)以及重组的非天然结构的 I 型干扰素(IFN-con)已广泛用于临床,并能有效的治疗多种人类病毒性疾病和肿瘤<sup>[1,2]</sup>。作为小分子量蛋白,IFN $\alpha$ 从血浆中清除的速度较快,从而导致在临床治疗中需要重复多次用药才能达到治疗效果,半衰期短及用药的频繁已经成为长期使用干扰素治疗的一个主要问题<sup>[3]</sup>。为解决这一问题,PEG 修饰被用于延长干扰素的半衰期,较之未修饰的 IFN $\alpha$ ,半衰期延长了 10~20 倍,从而减少了治疗时注射给药次数<sup>[4,5]</sup>。另一种提高蛋白半衰期的方法是构建 IFN $\alpha$  与人血清白蛋白的融合蛋白,IFN $\alpha$  与人血清白蛋白的融合蛋白半衰期在动物体内较之 PEG 修饰的 IFN $\alpha$  提高 3 倍,比未修饰的 IFN $\alpha$  提高 18 倍<sup>[6]</sup>。目前已有 40 kD PEG 修饰的 IFN $\alpha$ 2a (派罗欣, Roche)<sup>[5,7]</sup>和 12 kD PEG 修饰的 IFN $\alpha$ 2b (佩乐能, Schering-Plough)<sup>[4,8]</sup>应用于临床,这两类产品均可明显延长 IFN $\alpha$  在体内的半衰期。然而,无论是 PEG 修饰的 IFN $\alpha$  还是人血清白蛋白融合 IFN $\alpha$ ,他们在体外的抗病毒活性较之未经修饰的 IFN $\alpha$  都有所降低<sup>[6,9]</sup>,但可能是由于这些修饰后的蛋白有较长的半衰期,体内数据显示其治疗效果仍较天然 IFN $\alpha$  好。

人 IgG 免疫球蛋白是体内的主要抗体,它在人体内的半衰期约为 20 d<sup>[10]</sup>,其稳定性是由于 IgG 的 Fc 片段可与新生 Fc 受体(FcRn)结合,避免 IgG 进入溶酶体中被降解<sup>[11-13]</sup>。因此, IgG 的 Fc 片段被用来与活性蛋白连接构成融合蛋白,以提高活性蛋白的体内半衰期,达到长效的目的。IgG 可通过 Fc 片段上的补体结合位点激活补体,起到细胞杀伤作用。根据铰链区的长短及 Fc 片段氨基酸序列的不同,人 IgG 分为 4 个亚型,其中 IgG Fc $\gamma$ 2 具有较低的诱导细胞毒性作用,而 IgG Fc $\gamma$ 1 最强。IgG 融合蛋白的构建方式大多是将 IgG 的 Fc (Hinge-CH2-CH3)片段或 CH(CH1-Hinge-CH2-CH3)片段的 N 端与活性蛋白的 C 端相连,以避免构建融合蛋白可能对活性蛋白生物活性造成的影响。另外,如果活性蛋白以同源二聚体的形式发挥其生物活性, Fc $\gamma$  片段及铰链区的半胱氨酸构成的分子间二硫键可增强和稳定融合

蛋白二聚体的形成。例如人白细胞功能抗原 3 (LFA-3)<sup>[14]</sup>, 肿瘤坏死因子受体 II(TNFR II)<sup>[15,16]</sup>, 白细胞介素 12(IL-12)<sup>[17]</sup>等,这些融合蛋白在保留细胞因子生物功能的同时在动物实验中明显延长细胞因子的半衰期。此外, IgG 的融合蛋白可以通过 Protein A 亲和层析得到高效便捷的纯化。因此尽管很多细胞因子与 IgG 的融合蛋白还处于研究的前期阶段,但是由于其高效性、半衰期长及纯化方便的特点已经引起广泛的关注。

本实验利用重叠 PCR 技术将 IFN $\alpha$ 2b 与 IgG 的 Fc 片段融合,构建了 IFN $\alpha$ 2b 与四种 Fc $\gamma$ (Fc $\gamma$ 1、Fc $\gamma$ 2、Fc $\gamma$ 1-mut、Fc $\gamma$ 2-mut)片段的融合蛋白,其中 Fc $\gamma$ 1 突变片段(Fc $\gamma$ 1-mut)由 Fc $\gamma$ 1 片段第 234 位 Leu、235 位 Leu、331 位 Pro 分别被 Val、Ala 及 Ser 替代获得; Fc $\gamma$ 2 突变片段(Fc $\gamma$ 2-mut)由 Fc $\gamma$ 2 片段第 331 位 Pro 被 Ser 替换获得。在构建毕赤酵母表达质粒时,分别使用保留 Kex2 及 Ste13 两个酶切位点及只保留单一 Kex2 酶切位点的  $\alpha$  因子分泌信号,以期获得具有 IFN $\alpha$ 2b 天然 N 端的融合蛋白。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验动物与细胞株: Sprague-Dawley (SD)大鼠购自安徽省实验动物中心, Wish 细胞由安徽安科公司惠赠, Hela 细胞为本室保存, Wish 细胞及 Hela 细胞以含 10% 小牛血清的 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)培养基, 5%CO<sub>2</sub>, 37℃ 培养。

质粒载体及菌株: 毕赤酵母菌株 G/S115 及毕赤酵母表达载体 pPIC9K 由中国科学技术大学王玉珍教授惠赠, 含人 IFN $\alpha$ 2b 基因的质粒 pGEM-7Z/IFN $\alpha$ 、含人 IgG Fc- $\gamma$ 1 基因的质粒 pEF6/V5-His-TOPO-IGH1、含人 IgG Fc- $\gamma$ 2 基因的质粒 pEF6/V5-His-TOPO-IGH2、含人 IgG Fc- $\gamma$ 1-mut 基因的质粒 pEF6/V5-His-TOPO-IGH1-mut、含人 IgG Fc- $\gamma$ 2-mut 基因的质粒 pEF6/V5-His-TOPO-IGH2-mut 及 *E. coli* DH5 $\alpha$  由本室保存。

酶及主要试剂: 酵母抽提物、胰蛋白胍购自 Oxoid 公司, YNB、D-biotin、DMEM、RPMI-1640、Protein A agarose 购自 Invitrogen 公司, 胎牛血清购自四季青公司, 限制性内切酶购自 Promega, Pfu 酶、T4DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, Endo-N-acetyl-

glucosaminidase H 购自 Sigma, 人 IFN- $\alpha$  ELISA 试剂盒购自 Bender 公司, 抗 HuIFN- $\alpha 2b$  抗体由安科公司惠赠, HRP 偶联抗人 IgG(H+L)抗体、HRP 偶联羊抗小鼠抗体购自钟杉生物公司, 引物由上海生物工程技术有限公司合成。

## 1.2 方法

### 1.2.1 表达质粒的构建(引物序列见表 1)

分别用引物  $\alpha$ -Factor-Fw 及  $\alpha$ -Factor-K/S-Rv、 $\alpha$ -Factor-Fw 及  $\alpha$ -Factor-K-Rv 扩增带有 Kex2 及 Ste13 信号肽酶切位点的  $\alpha$  因子分泌信号及仅有 Kex2 信号肽酶切位点的  $\alpha$  因子分泌信号片段; 分别用引物 IFN $\alpha 2b$ -K/S-Fw 及 IFN $\alpha 2b\gamma 1$ -Rv、IFN $\alpha 2b$ -K/S-Fw 及 IFN $\alpha 2b\gamma 2$ -Rv、IFN $\alpha 2b$ -K-Fw 及 IFN $\alpha 2b\gamma 1$ -Rv、IFN $\alpha 2b$ -K-Fw 及 IFN $\alpha 2b\gamma 2$ -Rv 扩增相应的 IFN $\alpha 2b$  片段; 分别使用引物 HuIgG Fc $\gamma 1$ -Fw 及 HuIgG Fc $\gamma$ -Rv、HuIgG Fc $\gamma 2$ -Fw 及 HuIgG Fc $\gamma$ -Rv 扩增 Fc $\gamma$  片段。

使用引物  $\alpha$ -Factor-Fw 及 IFN $\alpha 2b\gamma 1$ -Rv、 $\alpha$ -Factor-Fw 及 IFN $\alpha 2b\gamma 2$ -Rv, 以上述扩增的  $\alpha$  因子分泌信号片段及 IFN $\alpha 2b$  片段为模板扩增相应

$\alpha$ -Factor-IFN $\alpha 2b$  融合基因片段。

使用引物  $\alpha$ -Factor-Fw 及 HuIgG Fc $\gamma$ -Rv, 以上述扩增的  $\alpha$ -Factor-IFN $\alpha 2b$  和 Fc $\gamma$  片段为模板扩增  $\alpha$ -Factor-IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma$  全长片段,  $\alpha$  因子分泌信号位于 IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma$  融合片段 N 末端, 分别保留了 Kex2 及 Ste13 两个酶切位点或 Kex2 单一酶切位点。

将  $\alpha$ -Factor-IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma$  全长片段及 pPIC9K 质粒用 BamHI 及 EcoRI 双酶切后, 在 T4 连接酶的催化下进行连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 提取阳性转化子的重组质粒 DNA 测序鉴定。

### 1.2.2 表 1 质粒转化

提取表达质粒约 10  $\mu$ g, 以 Sal I 线性化后转化酵母菌 GS115, 电激参数为 1.5 kV, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ 。电激后立即加入 1 mL 冰冷的山梨醇, 经温育后取适量涂布于组氨酸缺乏的 MD 平板, 30  $^{\circ}$ C 培养 48~72 h, 挑取生长速度较快的转化子涂布于含 0.5 mg/mL G418 的 YPD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 72~96 h, 挑取生长速度较快的克隆接种于 5 mL MGY 培养基中, 30 $^{\circ}$ C, 250r/min 振荡培养至  $OD_{600}$  约 2~6, 室温下离心收集菌体, 无菌水漂洗, 离心弃上清, 菌体转至 10 mL

表 1 实验所需引物的序列

Table 1 The list of the oligonucleotide primers used in this study

| Primer                      | Sequence   |
|-----------------------------|--|
| $\alpha$ -Factor-Fw         | 5'-ATGGATCCAAACGATGAGATTTC-3'                      |
| $\alpha$ -Factor-K/S-Rv     | 5'- <u>GAGGCAGATCACA</u> AGCTTCAGCCTCTCTTTTCTCG-3' |
| $\alpha$ -Factor-K-Rv       | 5'- <u>GCAGATCACA</u> ICTTTTCTCGAGAGATACC-3'       |
| IFN $\alpha 2b$ -K/S-Fw     | 5'-GAGGCTGAAGCT <u>TTGTGATCTGCCCTCAAACCCAC</u> -3' |
| IFN $\alpha 2b$ -K-Fw       | 5'-CTCGAGAAAAGA <u>TTGTGATCTGCCCTCAAACCCAC</u> -3' |
| IFN $\alpha 2b\gamma 1$ -Rv | 5'- <u>GATTTGGGCTO</u> ITCCTTACTTCTTAAACTTTCTTG-3' |
| IFN $\alpha 2b\gamma 2$ -Rv | 5'- <u>CATTTGCGCTO</u> ITCCTTACTTCTTAAACTTTCTTG-3' |
| HuIgG Fc $\gamma 1$ -Fw     | 5'- <u>GAAGTAAGGAA</u> GAGCCCCAAATCTTGTGACCAAAA-3' |
| HuIgG Fc $\gamma 2$ -Fw     | 5'- <u>GAAGTAAGGAA</u> GACGCAAATGTTGTGTCGAGTG-3'   |
| HuIgG Fc $\gamma 2$ -Rv     | 5'-CTGAATTCCTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTTC-3'      |

The restriction enzyme sites for EcoRI (GGATCC) and BamHI (GAATTC) included in the PCR primers are indicated by underlining. The start coding ATG and terminator TAG are shown as boldfaced. The solid down arrows indicate the Kex2 cleavage site and the up arrows indicate the Ste13 cleavage sites. The sequences from IFN $\alpha 2b$  are indicated by rectangle and the sequences from Fc $\gamma$  are indicated as elliptical.

BMMY 中, 甲醇含量 0.5%, 30°C, 250 r/min 振荡培养培养 96 h 后, 离心收集上清, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。

### 1.2.3 表达产物的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

取适量蛋白培养上清样品进行 SDS-PAGE 及 Western blot 分析, 具体操作按文献[18]进行, Western blot 所用一抗分别为抗 IFN $\alpha$ 2b 抗体及 HRP 偶联抗 HuIgG 抗体, 其中抗 IFN $\alpha$ 2b 抗体以 HRP 偶联羊抗小鼠抗体作为二抗。

### 1.2.4 表达产物的纯化

酵母培养液 10 000 r/min 离心 10 min, 收取离心上清液, 用 MILLIPORE 超滤系统对离心上清液进行超滤, 将上清浓缩 10 倍左右, 每毫升超滤浓缩液中加入 20  $\mu$ L Protein A agarose, 将装有浓缩液及 Protein A agarose 的 EP 管置于脱色摇床以 50 r/min 转速旋转, 室温孵育 2 h 后, 将 EP 管静置 5 min, 待 Protein A agarose 沉降于 EP 管底部后, 小心弃除上清, 用预冷的 TBS(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4; 150 mmol/L NaCl)溶液洗涤 Protein A agarose 3 次后, 弃除 TBS 溶液, 在 EP 管中加入 2 mL 蛋白洗脱溶液(50 mmol/L Glycine-HCl, pH3.0), 室温孵育 1 min 以洗脱结合到 Protein A agarose 上的融合蛋白, 静置 EP 管待 Protein A agarose 沉降, 吸取洗脱液上清, 立即按上清体积 1/10 向上清中加入中和溶液(1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1.5 mol/L NaCl; 1 mmol/L EDTA)使融合蛋白溶液达到约 pH 7.0。用 Superdex 200 分子筛对蛋白进一步纯化, 首先使用 Tris 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 0.4 mol/L NaCl)以 1 mL/min 的流速对 Superdex 200 柱进行预平衡, 蛋白样品以 0.5 mL/min 的流速上样, 用上述的 Tris 缓冲液以 1 mL/min 的流速洗脱, 收集洗脱蛋白主峰进行 SDS-PAGE 电泳分析。

### 1.2.5 定量 ELISA

使用 IFN $\alpha$  ELISA 试剂盒检测融合蛋白含量, 方法参照 IFN $\alpha$  ELISA 试剂盒使用说明。

### 1.2.6 融合蛋白 N-糖基化分析

纯化的融合蛋白样品用 endo-N-acetylglucosaminidase H 酶切, 方法参照 endo-N-acetylglucosaminidase H 使用说明书。

### 1.2.7 抗病毒活性分析

采用细胞病变抑制法<sup>[19]</sup>测定融合蛋白抗病毒活

性, 将 Wish 细胞稀释成  $2 \times 10^5$  cells/mL, 加入 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ L, 将四倍稀释的融合蛋白样品及 IFN $\alpha$ 2b 样品依次加入, 37 °C 二氧化碳培养箱中继续培养 18 h 后加入 100 TCID<sub>50</sub> VSV 继续培养 24 h, 用 MTT 染色法测定残留活细胞数量, 570 nm 测吸光值。

### 1.2.8 抗增殖活性分析

用 HeLa 细胞测定融合蛋白抗增殖活性<sup>[20]</sup>, 将 HeLa 细胞稀释成  $1 \times 10^5$  cells/mL, 加入 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ L。将四倍稀释的融合蛋白样品、IFN $\alpha$ 2b 及 HuIgG 样品依次加入, 37 °C 二氧化碳培养箱中继续培养 72 h 后用 MTT 染色法测定活细胞数量, 570 nm 测吸光值。

### 1.2.9 药物动力学试验

从皮下给 SD 大鼠单剂量注射 IFN $\alpha$ 2b 或 IFN $\alpha$ 2b-Fc $\gamma$ 2 样品, 注射剂量分别为 2.5  $\mu$ g/Kg、5  $\mu$ g/Kg。选取不同的时间点抽取 SD 大鼠的血液样品, 肝素抗凝, 离心后用人 IFN $\alpha$  ELISA 试剂盒测定血浆中融合蛋白的量。

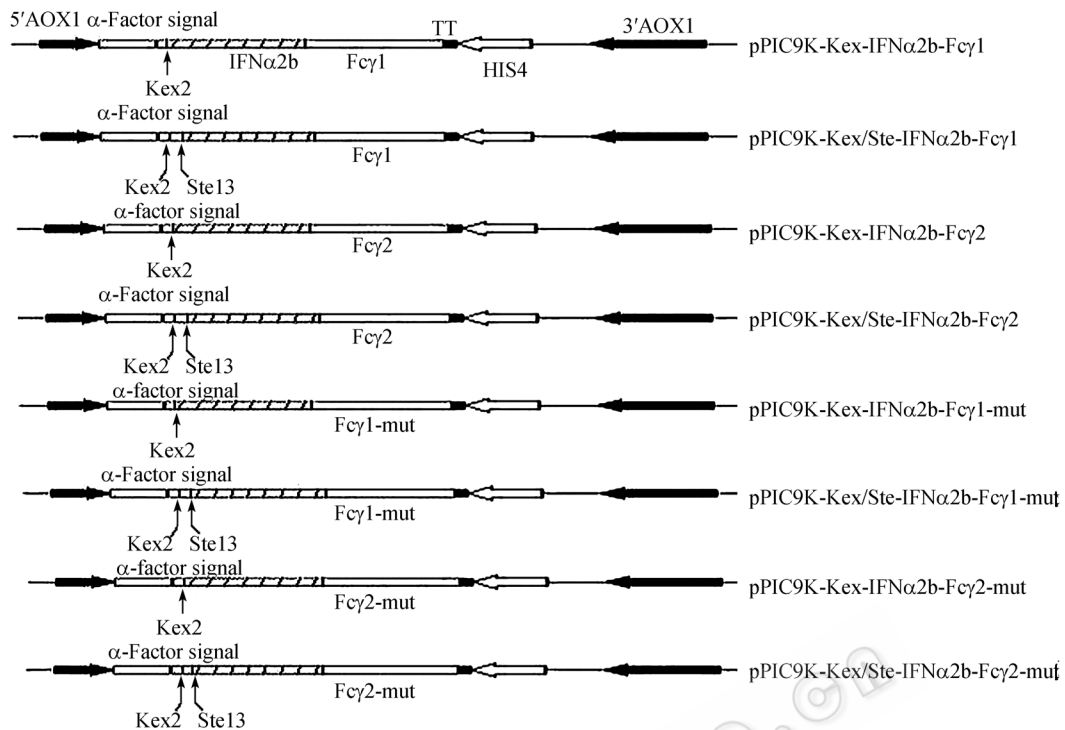
## 2 结果

### 2.1 融合蛋白表达质粒的构建

构建得到一系列 IFN $\alpha$ 2b-Fc $\gamma$  融合蛋白表达质粒。其中  $\alpha$  因子分泌信号只具有 Kex2 酶切位点的质粒分别被命名为: pPIC9K-Kex-IFN $\alpha$ 2b-Fc $\gamma$ 1、pPIC9K-Kex-IFN $\alpha$ 2b-Fc $\gamma$ 2、pPIC9K-Kex-IFN $\alpha$ 2b-Fc- $\gamma$ 1-mut 及 pPIC9K-Kex-IFN $\alpha$ 2b-Fc $\gamma$ 2-mut;  $\alpha$  因子分泌信号具有 Kex2、Ste13 酶切位点的质粒分别被命名为: pPIC9K-Kex/Ste-IFN $\alpha$ 2b-Fc $\gamma$ 1、pPIC9K-Kex/Ste-IFN $\alpha$ 2b-Fc $\gamma$ 1-mut、pPIC9K-Kex/Ste-IFN $\alpha$ 2b-Fc $\gamma$ 2 及 pPIC9K-Kex/Ste-IFN $\alpha$ 2b-Fc $\gamma$ 2-mut(图 1), 进一步的测序结果表明构建的质粒完全正确(测序数据略)。

### 2.2 IFN $\alpha$ 2b-Fc $\gamma$ 融合蛋白的表达

取上述 8 种质粒转化菌培养基上清进行还原性 SDS-PAGE 电泳显示, 在上清电泳条带中均有有一分子量约 45 kD 的条带, 大小与预期中的还原条件下的融合蛋白单体大小一致, 对照 GS115(只带有 pPIC9K 空载体)培养上清中没有条带出现, 8 种酵母融合蛋白表达量没有明显差异(图 2A)。分别用抗 IFN $\alpha$ 2b 抗体及 HRP 偶联抗 HuIgG 抗体进行 Western blot 鉴定, 免疫印迹结果显示表达产物与抗 IFN $\alpha$ 2b

图 1 pPIC9K-IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma$  质粒示意图Fig. 1 Histograms of IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma$  fusion proteins

The histograms of a series of IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma$  fusion proteins with various combinations of subtype IgG Fc $\gamma$  fragments and signal peptides are illustrated in Fig. 1. The different shapes represent each of the elements within the protein and are labeled as following: 5' AOX1: 5' alcohol oxidase 1 promoter fragment; 3' AOX1: 3' AOX1 fragment;  $\alpha$ -Factor signal:  $\alpha$ -Factor secretion signal; TT: 3' AOX1 transcription termination; HIS4: histidinol dehydrogenase; Kex: Kex2 cleavage site; Ste13: Ste13 cleavage site. The yeast expression vector pPIC9K is used for expressing the recombinant fusion proteins and a name is assigned to each protein as indicated on the right

抗体(图 2 B)、抗 HuIgG 抗体(图 2C)均能发生特异性结合, 进一步证实表达产物为 IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma$  的融合蛋白。由于  $\alpha$  因子分泌信号 Kex2 单一酶切位点可保证分泌蛋白的天然 N 端, 选择 pPIC9K-Kex/Ste-IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 1$ 、pPIC9K-Kex/Ste-IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 1$ -mut、pPIC9K-Kex/Ste-IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  及 pPIC9K-Kex/Ste-IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$ -mut 4 种质粒转化菌株用于进一步的研究。取上述 4 种酵母培养基上清做还原性和非还原性 SDS-PAGE 电泳显示, 在非还原条件下目的条带位置落后于还原条件下目的条带位置, 而且前者的分子量为后者的二倍(图 2D)。说明融合蛋白获得了分泌表达, 且以二聚体形式存在于表达上清中。在 BMMY 培养基 pH 7.0, 甲醇浓度 1%条件下, 30 诱导表达 96 h, 用 IFN $\alpha$  ELISA 试剂盒测定培养液中融合蛋白表达量可以达到 370 mg/L 以上。如按 IFN $\alpha 2b$  和 Fc $\gamma$  分子重量比率折算, 其中 IFN $\alpha 2b$  含量约为 150 mg/L(图 3)。

### 2.3 融合蛋白的纯化

Protein A 亲和层析是常用的纯化 IgG 的方法, 可以用来分离和纯化带有 IgG Fc 片段的蛋白。为得到纯化的 IFN $\alpha 2b$ -Fc 融合蛋白, 首先使用了 Protein A 亲和层析进行初级分离和纯化, 然后用 Superdex 200 分子筛进行了进一步的纯化(具体操作见方法 1.2.4), 并对纯化产物进行了 SDS-PAGE 电泳分析(图 4)。对 Protein A 亲和层析后样品 SDS-PAGE 电泳检测发现, 45 kD 左右显示两条分子量接近的蛋白带, 其中以分子量大的蛋白为主, 及另外一条 35 kD 微弱条带(图 4, 泳道 2)。后经进一步的分析表明, 45 kD 左右的两个蛋白均为目的蛋白, 其中较大分子量蛋白为糖基化产物, 稍小分子量的是非糖基化产物(见结果 2.4)。另外一条位于约 35 kD 的微弱条带被认为是洗脱下来的游离 Protein A。对电泳凝胶扫描及分析, 45 kD 左右两条蛋白带合计约占样品蛋白总量的 92%, 其中大分子量蛋白占 81%, 小分子量蛋

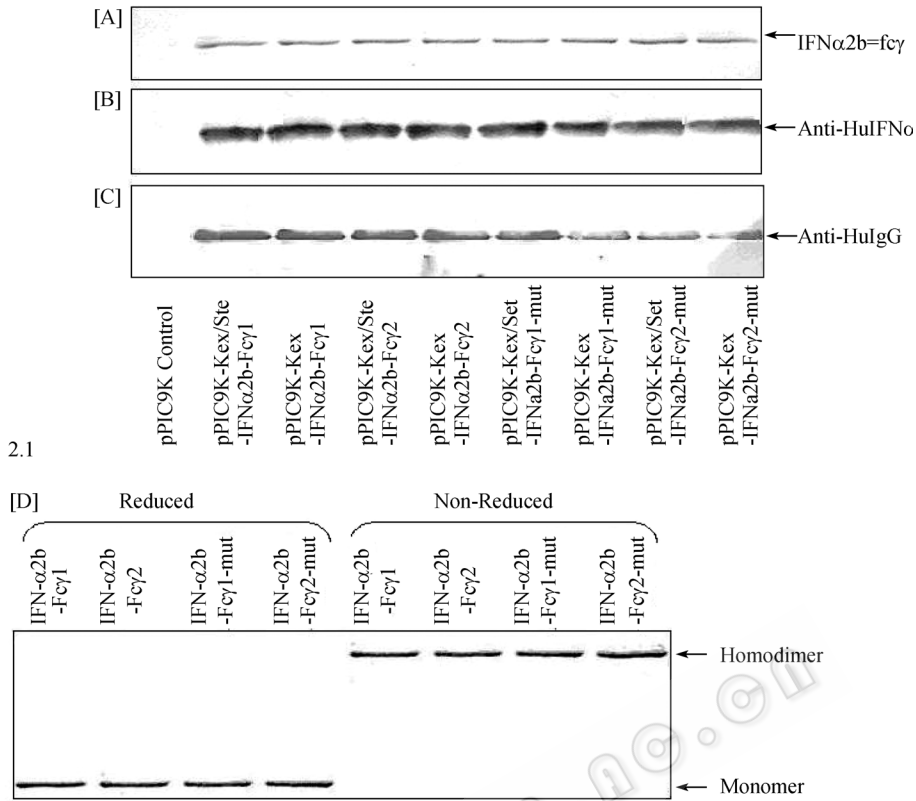


图 2 IFN $\alpha$ 2b-Fc $\gamma$  融合蛋白表达克隆筛选

Fig. 2 Screening IFN $\alpha$ 2b-Fc $\gamma$  fusion protein expression clones

10  $\mu$ L of culture supernatants from each of the eight transformants which express different forms of IFN $\alpha$ 2b-Fc $\gamma$  fusion proteins were loaded on a 12% SDS-PAGE and are detected with Coomassie brilliant blue staining [A], and Western Blotting with either Anti-HuIFN $\alpha$ 2b [B] or Anti-HuIgG [C]. The selected samples as indicated were also run in parallel with reduced (D, lanes 1~4) and non-reduced (D, lanes 5~8) SDS-PAGE

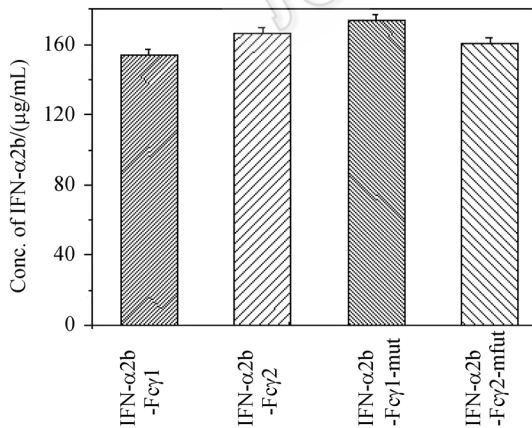


图 3 表达蛋白的定量

Fig. 3 Quantitation of the product yield of recombinant protein

Quantitative IFN $\alpha$  ELISA was used to measure the expression levels of recombinant proteins from the culture medium of selected colonies. The data represents the mean  $\pm$ SEM of quadruplicate tests in different experiments

白占 11%。将 Protein A 纯化后的样品经 Superdex 200

分子筛层析进一步纯化，考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 电泳仅可见 45 kD 左右两条目的蛋白带 (图 4, 泳道 3)，没有明显的杂带，纯度达 98% 以上。上述结果表明 Protein A 亲和层析和分子筛两步层析可有效的分离和纯化目的蛋白，达到要求的标准。另外，SDS-PAGE 电泳直接检测未经浓缩和纯化的培养液仅可见一条 45 kD 大小的目的蛋白带 (图 4, 泳道 1)，显然是由于纯化后样品中所见 45 kD 位置稍小分子量蛋白的相对浓度太低，无法观察到。(SDS-PAGE 凝胶扫描结果用 BandsScan 软件分析)。

#### 2.4 融合蛋白的成分鉴定及糖基化分析

由 Protein A 亲和层析和 Superdex 200 分子筛层析纯化的样品中发现在 45 kD 位置出现大小非常接近的两条蛋白带，Western 检测证实均为目的蛋白 (图 5 泳道 1)。经对编码蛋白的氨基酸分析及以往的文献报道发现，在 IFN $\alpha$ 2b-Fc $\gamma$  分子中第 247 位天冬酰胺是一个潜在的糖基化位点，而该研究中使用毕赤

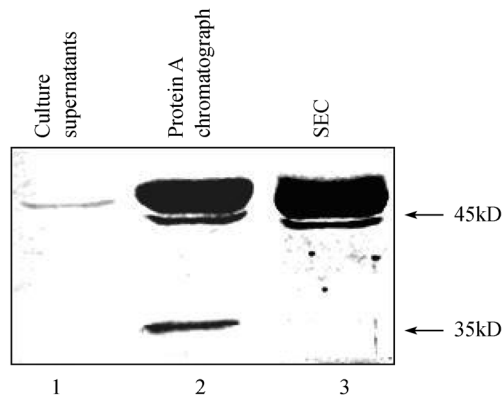


图 4 IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  融合蛋白的纯化

Fig. 4 Purification of the recombinant IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  fusion protein

Protein A affinity column and size exclusion chromatography (SEC) with Superdex 200 were employed for purification of IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  fusion protein from the culture medium as described in Reagents and Methods. SDS-PAGE was used for monitoring the eluted products through out every step of the process. As shown in Fig. 4, lane 1 was loaded with 10  $\mu$ L of culture supernatants, lane 2 was loaded with 10  $\mu$ g of collected product from protein A affinity chromatography and lane 3 was loaded with 10  $\mu$ g of collected products after the size exclusion chromatography. The corresponding positions of the products IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  and protein A found in the gel were indicated as expected at 45 kD and 35 kD, respectively

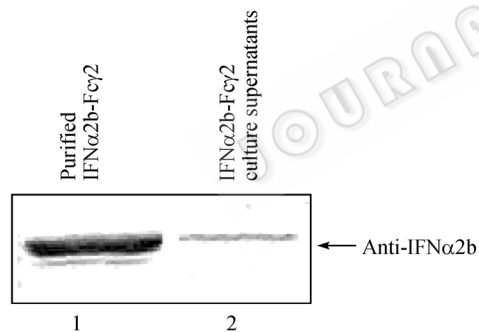


图 5 IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  纯化样品 Western blot 鉴定

Fig. 5 Western blot analyzed the purified IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  fusion protein

Western blot with anti-HuIFN $\alpha 2b$  antibody was performed to verify the identity of IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  fusion protein. As shown in Fig. 5, lane 1 was a collected product from SEC purification and lane 2 was the culture supernatants used in the purification

酵母菌, 具有蛋白糖基化修饰的能力, 因此推测所见到的两个分子量相近蛋白有可能是由于部分表达蛋白受到糖基化修饰的结果。为证实这个猜测, 我们对纯化的蛋白样品进行了 N-糖基化分析(图 6)。经 Endo-N-acetylglucosaminidase H 酶切反应, 在还原性 SDS-PAGE 电泳中发现, 反应前后样品中两个蛋

白的相对量发生了显著的变化: 酶切后分子量较大的条带含量明显减少, 而低分子量条带显著增加(图 6, 泳道 1 和 2)。此结果清楚的证明了大部分表达的目的蛋白是被糖基化修饰。此结果与其它的研究报道相符, 毕赤酵母表达产物多为部分糖基化产物<sup>[21-23]</sup>。

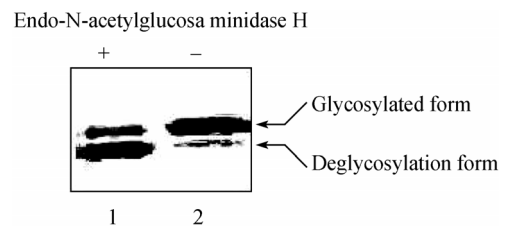


图 6 IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  N-糖基化分析

Fig. 6 Analysis the N-linked glycosylation in the produced IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  fusion protein

To analyze the N-linked glycosylation in IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  fusion protein, the Endo-N-acetylglucosaminidase H reaction was performed followed by SDS-PAGE. The proteins with and without Endo-N-acetylglucosaminidase H digestions are labeled with '+' and '-', respectively. After reactions, the products were run on a SDS-PAGE and detected using Coomassie brilliant blue staining. The corresponding bands for the forms of glycosylation and Deglycosylation are labeled with the arrows

## 2.5 融合蛋白干扰素活性检测

为比较和检测获得的 IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  融合蛋白的干扰素活性, 使用纯化的蛋白产物分别进行了细胞病变抑制法和抗病毒活性测定(图 7, 图 8), 同时以商品化干扰素和正常人 IgG 作为对照。在干扰素保护 VSV 病毒攻击 Wish 细胞的实验结果中显示, IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 1$ , IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$ , IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 1$ -mut, IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$ -mut 几种不同融合蛋白的抗病毒活性相近, 分别为  $1.45 \times 10^7$ ,  $1.72 \times 10^7$ ,  $1.62 \times 10^7$  及  $1.52 \times 10^7$  IU/mg(图 7)。如转换为融合蛋白中 IFN $\alpha 2b$  的含量计算, 则抗病毒活性分别为  $3.63 \times 10^7$ ,  $4.29 \times 10^7$ ,  $4.05 \times 10^7$ ,  $3.79 \times 10^7$  IU/mg IFN $\alpha 2b$ 。其中 IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  的抗病毒活性最高。在抗 HeLa 细胞的增殖实验中, IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 1$ , IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$ , IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 1$ -mut 及 IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$ -mut 抗增殖活性比商品化 IFN $\alpha 2b$  分别低 3.42 倍、4.35 倍、2.48 倍、6.55 倍。抗病毒活性与抗增殖活性的差异可能是由于干扰素抗病毒活性与抗增殖活性作用位点不同, 其中抗病毒活性位点也是抗增殖活性位点, 而干扰素的抗增殖活性作用的发挥可能还有其他位点的参与<sup>[24-26]</sup>。

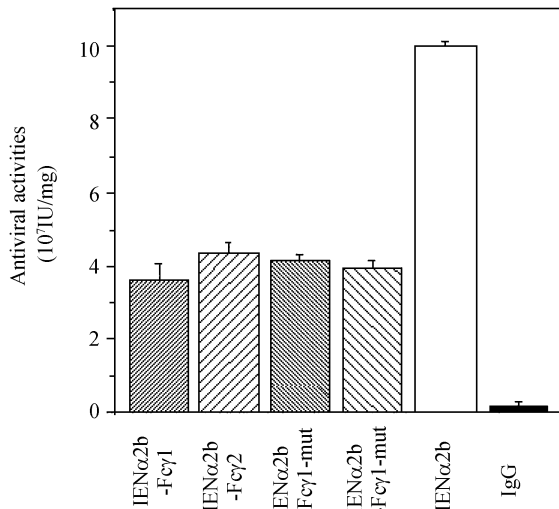


图7 融合蛋白抗病毒活性分析

Fig. 7 Antiviral activity assay

Possessing the antiviral activities of the IFNα2b-Fcγ protein, a standard virus protection assay on Wish cells with VSV was performed. The commercially available IFNα2b (Anke, Anhui) and Human normal IgG were used as the standard and control for the experiments, respectively

## 2.6 IFNα2b-Fcγ 的 药 代 动 力 学

为比较和测定 IFNα2b-Fcγ 融合蛋白体内的代谢, 我们采用了 SD 大鼠皮下注射给药, 不同时间点采取血液样品并特异性检测人源 IFNα2b 的方法(图 8)。SD 大鼠皮下注射 IFNα2b-Fcγ2 融合蛋白 5 μg/kg, 对照组皮下注射 IFNα2b 2.5 μg/kg, 注射后按图 8 所注的时间点采集外周血, ELISA 检测血浆中人 IFNα2b

蛋白浓度。结果显示, IFNα2b 标准蛋白注射的大鼠在 5.7 h 后血药浓度达到峰值 11.8 ng/mL, 8.3 h 下降为 5.9 ng/mL, 约 15 h 恢复至底线; 而 IFNα2b-Fcγ2 的吸收较为缓慢, 在注射后 12.1 h 达到血药峰值 16.2 ng/mL, 至 65 h 达到半衰期, 血液中可检测到的存留时间直到 120 h 以上。此结果显示, IgG Fcγ 片段可显著延长与其融合的 IFNα2b 蛋白体内半衰期, 与单独的 IFNα2b 标准蛋白相比, 延长了 7.8 倍; 而血液存留时间延长 10 倍以上。另外, IFNα2b-Fcγ2 的血药峰值出现在注射后 12.1 h, 相比 IFNα2b 出现在 5.7 h, IFNα2b-Fcγ2 具有缓慢释放的效果。

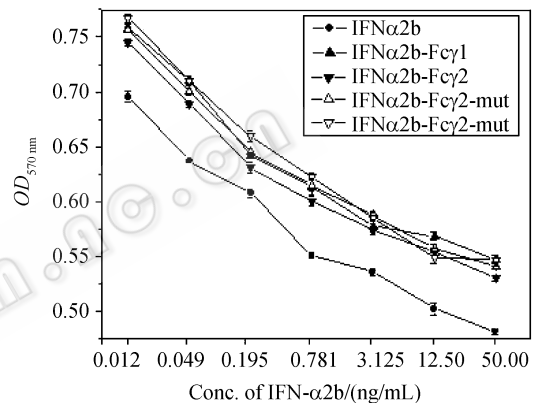


图8 融合蛋白抗增殖活性分析

Fig. 8 Antiproliferation activity assay

The Antiproliferation assay was performed on Hela cells with the IFNα2b-Fcγ fusion proteins as indicated. Each data point represents the mean ±SEM of 3 independent experiments

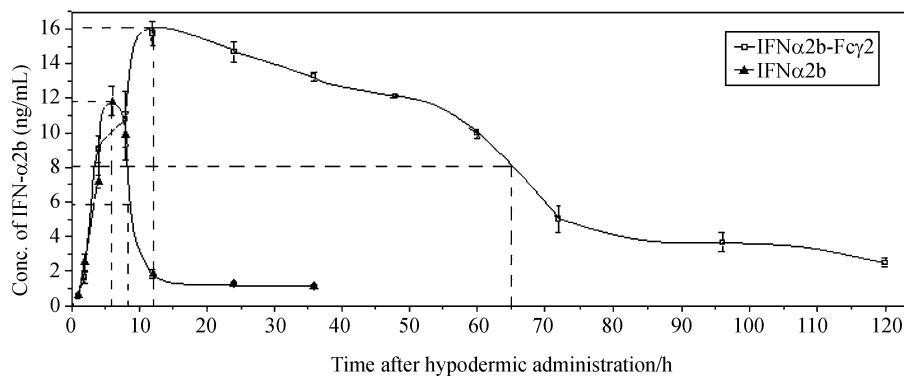


图9 IFNα2b-Fcγ2 药代动力学分析

Fig. 9 Pharmacokinetics assay of IFNα2b-Fcγ2 in SD rat

Groups of SD rat ( $n=3$  for each group) were subcutaneously administered with either IFNα2b (2.5 μg/kg) or IFNα2b-Fcγ2 (5 μg/kg). Blood aliquots were withdrawn at the indicated time points and the concentration of human IFNα was determined with human IFNα ELISA Kit.

Each data point represents the mean ±SEM of triplicate samples in the same experiment ( $P<0.05$ )



### 3 讨论

选择毕赤酵母作为融合蛋白的表达系统是基于该表达系统已经成功表达多种重组蛋白, 且对表达蛋白具有翻译后的加工、修饰, 糖基化修饰程度与哺乳动物相似; 表达产量高; 简单含盐培养基即可培养, 成本较昆虫和哺乳动物表达系统低的多, 适合高密度培养; 背景蛋白质少, 表达产物较易纯化。

IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma$  融合蛋白在毕赤酵母中以糖基化和非糖基化两种形式存在, 这种现象在其他多种以毕赤酵母表达的重组蛋白中也同样存在, 例如人 IL-17, 鼠 IFN $\alpha 1$  和牛胰腺核糖核酸酶 A。人 IFN $\alpha 2b$  是糖蛋白, 虽然似乎糖链对于蛋白的生物活性不是必需的, 但是糖基化似乎对蛋白的稳定性有一定影响<sup>[28]</sup>。

Jones 等用 HEK293 细胞表达 Fc $\gamma$  与 IFN $\alpha$  融合蛋白, 研究了在 Fc $\gamma$  与 IFN $\alpha$  片段中添加连接部分及 IFN $\alpha$  序列改变对融合蛋白抗病毒活性的影响, 结果表明对于天然 IFN $\alpha$ , Fc $\gamma$  及 IFN $\alpha$  之间的连接部分对蛋白的抗病毒及抗增殖能力没有明显影响, 但是 Fc $\gamma$  及突变 IFN $\alpha$  之间的连接部分可以提高融合蛋白的生物活性<sup>[29]</sup>。

抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC)可由抗体 Fc $\gamma$  片段与 NK 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等效应细胞表面受体(Fc $\gamma$ R)结合触发, 其中 Fc $\gamma 1$  与 Fc $\gamma$ R 的亲合力高, 将 Fc $\gamma 1$  中 234Leu, 235Leu 及 331Pro 位氨基酸分别替换为 Val, Ala, Ser, 将 Fc $\gamma 2$  中 331Pro 位氨基酸替换为 Ser 可降低 Fc 片段与 Fc $\gamma$ R 的亲合力<sup>[30,31]</sup>, 构建 IFN $\alpha 2b$  与突变 Fc $\gamma 1$  及突变 Fc $\gamma 2$  的融合蛋白 IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 1$ -mut, IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$ -mut, 希望可以获得 ADCC 毒性及抗原性低的融合蛋白, 但是结果显示融合蛋白 ADCC 毒性没有明显差异, 这可能是由于 Fc $\gamma$  片段与 IFN $\alpha 2b$  连接改变了 Fc $\gamma$  片段的空间结构从而影响 Fc $\gamma$  片段与 Fc $\gamma$ R 的结合。

本研究比较了几种 IFN $\alpha 2b$  和 Fc $\gamma$  亚型所构成融合蛋白的生物活性, 发现 Fc $\gamma 2$  与 IFN $\alpha 2b$  构成的融合蛋白相比其他 Fc $\gamma$  片段融合蛋白保存了更高的抗病毒活性, 及较低的 ADCC 效应。IgG Fc $\gamma$  片段融合蛋白不仅简化了产物的纯化过程, Fc $\gamma$  分子间多个二硫键可增加融合蛋白的稳定性, 有利于储藏、运输, 延长效期。虽然 IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  融合蛋白与商品化的

单纯 IFN $\alpha 2b$  相比抗病毒活性下降 2.3 倍, 但其大鼠血浆中的半衰期达 65 h。与目前报道的临床大量应用的佩乐能约 40 h 的半衰期及派罗欣 60~80 h 左右的半衰期相当。IFN $\alpha 2b$ -Fc $\gamma 2$  有望成为一个新型的长效干扰素。

### REFERENCES

- [1] Gutterman JU. Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, **91**(4): 1198-1205.
- [2] Garwala SS, Kirkwood JM. Potential uses of interferon alpha 2 as adjuvant therapy in cancer. *Annals of surgical oncology*, 1995, **2**(4): 365-371.
- [3] Thevenot T, Regimbeau C, Ratzin V, et al. Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C in naive patients: 1999 update. *Journal of Viral Hepatitis*, 2001, **8**(1): 48-62.
- [4] Glue P, Fang JW, Rouzier PR, et al. Pegylated interferon alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. hepatitis C intervention therapy group. *Clin Pharmacol Ther*, 2000, **68**(5): 556-567.
- [5] Perry CM, Jarvis B. Peginterferon-alpha-2a (40 kD): a review of its use in the management of chronic hepatitis C. *Drugs*, 2001, **61**(15): 2263-2288.
- [6] Osborn BL, Olsen HS, ardelli B, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2002, **303**(2): 540-548.
- [7] Pedder SC. Pegylation of interferon alpha: structural and pharmacokinetic properties. *Seminars in Liver Disease*, 2003, **23**(Suppl 1): 19-22.
- [8] Kamal SM, El Tawil AA, Nakano T, et al. Peginterferon {alpha}-2b and ribavirin therapy in chronic hepatitis C genotype 4: impact of treatment duration and viral kinetics on sustained virological response. *Gut*, 2005, **54**(6): 858-866.
- [9] Bailon P, Palleroni A, Schaffer CA, et al. Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjugate Chemistry*, 2001, **12**(2): 195-202.
- [10] Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 6th eds, Mosby, 2001.
- [11] Ghetie V, Hubbard JG, Kim JK, et al. Abnormally short serum half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice. *European Journal of Immunology*, 1996, **26**(3): 690-696.
- [12] Israel EJ, Wilsker DF, Hayes KC, et al. Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2-microglobulin: possible protective role of FcRn. *Immunology*, 1996, **89**(4):

- 573–578.
- [13] Gurbaxani B, Dela LL, Chintalacheruvu K, *et al.* Analysis of a family of antibodies with different half-lives in mice fails to find a correlation between affinity for FcRn and serum half-life. *Molecular Immunology*, 2006, **43**(9): 1462–1473.
- [14] Majeau GR, Meier W, Jimmo B, *et al.* Mechanism of lymphocyte function-associated molecule 3-Ig fusion proteins inhibition of T cell responses. Structure/function analysis *in vitro* and in human CD2 transgenic mice. *Journal of Immunology*, 1994, **152**(6): 2753–2767.
- [15] Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, *et al.* Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *Journal of Immunology*, 1993, **151**(3): 1548–1561.
- [16] Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, *et al.* Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *The New England Journal of Medicine*, 1997, **337**(3): 141–147.
- [17] Gillie SD, Lan Y, Wesolowski JS, *et al.* Antibody-IL-12 fusion proteins are effective in SCID mouse models of prostate and colon carcinoma metastases. *Journal of Immunology*, 1998, **160**(12): 6195–6203.
- [18] Zhang WC, Xiao WH, Tian ZG, *et al.* mRNA secondary structure at start AUG codon is a key limiting factor for human protein expression in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, **349**(1): 69–78.
- [19] Rubinstein S, Familletti PC, Pestka S. Convenient assay for interferons. *Journal of Virology*, 1981, **37**(2): 755–758.
- [20] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 1983, **65**(1–2): 55–63.
- [21] Murphy KP, Gagne P, Pazmany C, *et al.* Expression of human interleukin-17 in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, 1998, **12**(2): 208–214.
- [22] Trajanovska S, Owczarek CM, Stanton PG, *et al.* Generation and characterization of recombinant unmodified and phosphorylatable murine IFN- $\alpha$ 1 in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2003, **23**(7): 351–358.
- [23] Chatani E, Tanimizu N, Ueno H, *et al.* Expression of soluble bovine pancreatic ribonuclease A in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, **64**(11): 2437–2444.
- [24] Li J, Roberts RM. Structure-function relationships in the inter-feron- $\tau$ . *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, **269**(40): 24826–24833.
- [25] Wang L, Hertzog P, Galanis M, *et al.* Structure-function analysis of human IFN- $\alpha$ . *Journal of Immunology*, 1994, **152**(40): 705–715.
- [26] Overall ML, Hertzog PJ. Functional analysis of interferon- $\alpha$  subtypes using monoclonal antibodies to interferon- $\alpha$ 4a-subtype reactivity, neutralisation of biological activities and epitope analysis. *Molecular Immunology*, 1992, **29**(3): 391–399.
- [27] Julius D, rack A, Blair L, *et al.* Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- $\alpha$ -factor. *Cell*, 1984, **37**(3): 1075–1089.
- [28] Kontsek P. Human type I interferons: structure and function. *Acta virologica*, 1994, **38**(6): 345–360.
- [29] Jones TD, Hanlon M, Smith BJ, *et al.* The development of a modified human IFN- $\alpha$ 2b linked to the Fc portion of human IgG1 as a novel potential therapeutic for the treatment of hepatitis C virus infection. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2004, **24**(9): 560–572.
- [30] Armour KL, Clark MR, Hadley AG, *et al.* Recombinant human IgG molecules lacking Fc gamma receptor I binding and monocyte triggering activities. *European Journal of Immunology*, 1999, **29**(8): 2613–2624.
- [31] Armour KL, Winkel JG, Williamson LM, *et al.* Differential binding to human Fc $\gamma$ RIIIa and Fc $\gamma$ RIIb receptors by human IgG wild type and mutant antibodies. *Molecular Immunology*, 2003, **40**(9): 585–593.

### 本期广告索引

| 企业               | 版位     | 企业          | 版位    |
|------------------|--------|-------------|-------|
| GE Healthcare 公司 | 封底     | 杭州博日科技有限公司  | 文前、VI |
| Roche 诊断产品有限公司   | 封二, 文前 | 生物谷网站       | 文前、   |
| 富士胶片(中国)投资有限公司   | 封三, 文后 | 镇江东方生物工程公司  | 文前    |
| 美国 Promega 公司    | 文前、    | 赛默飞世尔科技有限公司 | 文中、   |
| 伯乐生命医学产品(上海)有限公司 | 文前     |             |       |