

干扰素 α -2b 的聚乙二醇修饰

吴影新^{1,2}, 翟艳琴^{1,2}, 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 中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要: 采用分子量为 20 kD 的单甲氧基聚乙二醇丙醛(mPEG-ALD)修饰重组人干扰素 α -2b(IFN α -2b), 建立了修饰反应及分离纯化工艺。考察了修饰反应各因素对单修饰转化率以及单修饰产物体外活性的影响, 获得了优化的修饰反应条件, 即在 pH 6.5, 20 mmol/L 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液中, 干扰素 α -2b 的浓度为 4 mg/mL, PEG 与 IFN α -2b 的摩尔比为 8:1, 4°C 时反应 20 h; 在优化的反应条件下, 单修饰 PEG-IFN α -2b 的转化率达到 55%。并且, 采用离子交换层析对修饰产物进行分离纯化, 单修饰产品纯度达到 97%, 体外活性保留达到未修饰干扰素 α -2b 的 13.4%, 其在 SD 大鼠体内的循环半衰期得到了较大的延长, 且具有较好的水溶液稳定性。

关键词: 干扰素 α -2b, 聚乙二醇, 化学修饰

Interferon α -2b Modified with Polyethylene Glycol

Yingxin Wu^{1,2}, Yanqin Zhai^{1,2}, Jiandu Lei¹, Guanghui Ma¹, and Zhiguo Su¹

1 National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China

Abstract: In order to obtain a more stable PEGylated interferon α -2b, and prolong its half life, interferon α -2b(IFN α -2b) was modified with monomethoxy polyethylene glycol propionaldehyde (mPEG-ALD) 20000. It was found that the optimized reaction condition for the maximum bioactivity and highest PEGylation degree of the mono PEGylated interferon α -2b was as follows: in 20 mmol/L, pH 6.5, citric acid and sodium dihydrogen phosphate buffer, the concentration of IFN α -2b was 4 mg/mL, and the molar ratio of PEG/IFN α -2b was 8:1, and the reaction time was 20 h at 4°C. Under the optimized reaction condition, the mono PEGylation degree reached to 55%. Ion exchange chromatography was used to separate and purify mono PEGylated interferon α -2b from the reaction mixture. The purity of mono PEGylated interferon α -2b was higher than 97% characterized by HPLC. The bioactivity of the mono PEGylated interferon α -2b was 13.4% of the native IFN α -2b, while its half life in SD rat is much longer than the native IFN α -2b. The mono PEGylated interferon α -2b is also stable in aqueous.

Keywords: interferon α -2b, PEG-ALD, chemical modification, PEGylation

干扰素 α -2b(Interferon α -2b)是干扰素的一种, 产生的一种低分子量的糖蛋白。具有抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等生物学活性^[1]。干扰素 α -2b 主要用是机体感染病毒时, 白细胞通过抗病毒应答反应而

Received: February 2, 2007; **Accepted:** March 20, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 20506026), the National High Technology Research and Development Program of China (No. 2007AA02104).

Corresponding author: Jiandu Lei. Tel: +86-10-82623692; Fax: +86-10-82627072; E-mail: jdlei@home.ipe.ac.cn
国家自然科学基金(No. 20506026)和国家 863 高技术项目 (No. 2007AA021604)资助。

于治疗肝炎, 在临床应用中, 存在体内循环半衰期短, 具有免疫原性和抗原性, 易被循环系统清除, 需要多次给药等问题, 给患者的日常生活带来很大的不便。聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG)化学修饰能够有效延长药物半衰期, 是解决上述问题的一种重要的有效途径^[2]。

自上个世纪 80 年代以来, PEG 修饰技术在长效药物的制备研究中已经取得了很大的进展, 成为近年来医药领域研究的热点之一。目前, 已经上市的聚乙二醇药物包括聚乙二醇修饰的酰苷脱氨酶(PEG-ADA)^[3]、天冬酰胺酶(PEG-L-asparaginase)^[4], 以及重组人粒细胞集落刺激因子(Pegfilgrastim)等蛋白质药物^[5]。

对于干扰素 α -2b 的聚乙二醇修饰研究, 已经取得了很大成果和进展。目前上市的产品有美国先灵葆雅公司生产的佩乐能(Pegintron), 为 12 kD 线形单甲氧基聚乙二醇琥珀酰亚胺碳酸酯(NHS-mPEG)修饰的干扰素 α -2b^[6], 其体外活性保留为未修饰蛋白的 28%, 半衰期为未修饰蛋白的 10 倍, 偏短, 在注射药物后第 5 天几乎检测不到干扰素 α -2b 的体内活性, 难以满足每周注射 1 次的要求; 此外, 该产品主要采用 PEG 修饰在干扰素 α -2b 的组氨酸位点上得到, 而组氨酸咪唑基的氨基与 NHS-PEG 所形成的脲烷键在溶液中不稳定, 因此其只能做成粉针剂保存, 这不仅增加了成本, 而且给药物的使用带来了不便。

影响修饰产物循环半衰期和体外生物学活性的主要因素之一是 PEG 修饰剂的分子量。在一定范围内, PEG 修饰剂的分子量越大, 修饰产物的循环半衰期越长。随着 PEG 化学的发展, 高分子量(>12 kD), 能与蛋白质形成稳定化学键的第二代 PEG 修饰剂的制备已经成为可能。其中, 单甲氧基聚乙二醇丙醛(mPEG-ALD)与蛋白质反应所形成的碳氮单键具有较好的水解稳定性。因此, 有必要采用这种新型 PEG 修饰剂对干扰素 α -2b 进行修饰, 从而得到稳定性好、半衰期更长的修饰产物。

另一方面, 在聚乙二醇修饰化学中, 修饰的位点主要集中在蛋白的 Lys、Cys 以及蛋白末端的一些氨基酸。对于干扰素 α -2b 来说, 其可修饰的位点较多, 单修饰产物通常也是修饰于不同位点的混合物。但是不同的修饰位点其体内活性也有所不同, 因此通过修饰反应条件的控制实现修饰产物活性的

控制也是聚乙二醇化学修饰中非常重要的一面。

针对以上问题, 本研究采用分子量更大、反应条件温和的 20 kD 单甲氧基聚乙二醇丙醛(mPEG-ALD)修饰剂对干扰素 α -2b 进行了修饰, 并通过控制反应条件, 期望获得半衰期更长、更稳定, 且体外活性保留较高的 PEG 化干扰素 α -2b 产物。作为研究的第一步, 以高单修饰产物活性保留和高修饰转化率为目标, 对修饰反应各影响因素分别进行了考察, 优化出最佳修饰条件, 并采用离子交换层析对修饰产物进行分离纯化, 得到了纯度高于 97% 的单修饰产物。且对该单修饰产物进行了纯度、体外活性、循环半衰期等性质检测, 为进一步考察其药代动力学和药效学性质奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

原料: 单甲氧基聚乙二醇丙醛(Shearwater Polymers), 重组人干扰素 α -2b(*Escherichia coli* 表达, 活性、纯度达到药典要求)。

主要试剂: 牛血清白蛋白(SIGMA), Folin 酚, 丙烯酰胺(Merck), 甲叉丙烯酰胺(Merck), 标准蛋白(中科院上海生化研究所), 其余试剂均为国产分析纯试剂。

主要仪器: 浓缩罐(Milipore), 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(六一仪器厂), 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), 试验用水均采用 Rios 超纯水系统处理。

1.2 方法

修饰反应: 采用在 4°C 下浓缩置换缓冲液的办法, 将重组人干扰素 α -2b 置换到所需缓冲溶液中。Lowry 法测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度至实验所需值, 按照摩尔配比(修饰剂/蛋白质)加入修饰剂及还原剂, 混合均匀, 4°C 反应所需时间后, 加入过量甘氨酸终止反应。

蛋白质浓度的测定: 按照《中华人民共和国药典 2005 版》中微量法(Lowry)的要求测定蛋白质浓度^[7]。

修饰产物的分离纯化: SP-Sepharose FF 色谱柱

连接到 ÄKTA explorer 100 液相色谱系统上, A 相: 乙酸-乙酸钠缓冲溶液(20 mmol/L, pH 4.5); B 相: 在 A 相中加入 1 mol/L 的氯化钠。梯度洗脱, 流速 3 mL/min。

SDS-PAGE 电泳检测: 参照 Laemmli^[8]的方法, 浓缩胶为 4.5%, 分离胶为 13.5%, 银染^[9]以及碘染^[10]染色。

高效凝胶过滤色谱检测: 高效液相色谱系统 Agilent1100, Superdex™ 200 凝胶色谱柱, 洗脱缓冲液为 50 mmol/L 的磷酸缓冲液加入 0.1 mol/L 硫酸钠, 流速 0.5 mL/min, 检测波长为 280 nm。色谱柱先用缓冲液充分平衡后再上样。

体外活性检测: 细胞病变抑制法。按照《中华人民共和国药典 2005 版》中干扰素生物学活性测定方法测定^[11]。

修饰转化率的计算: 高效凝胶过滤色谱检测修饰反应样品, 软件计算各产物峰面积。修饰转化率=目的产物峰面积/各组分峰面积之和。

循环半衰期的测定: 采用 SD 大鼠皮下注射, 静脉采血, 不同时间取样, 细胞病变抑制法测定其生物学活性。半衰期为血液的生物学活性降低至最高值一半的时间。

2 结果与讨论

为确定修饰反应各因素对单修饰产物(Mono PEG-IFN)体外生物学活性以及单修饰产物转化率的影响, 固定反应温度为 4°C, 探讨了 pH 值对单修饰产物体外活性保留的影响, 以及离子类型、离子强度、蛋白质浓度、修饰剂/蛋白质配比、反应时间等条件对修饰转化率的影响, 并建立了修饰产物分离纯化工艺, 测定了单修饰蛋白的体外活性保留。

2.1 修饰反应条件对单修饰产物体外活性保留的影响

在修饰剂类型、分子量固定的情况下, 修饰蛋白的活性取决于修饰位点。只有修饰位点远离蛋白质活性部位的时候, 修饰蛋白才能得到较高的活性保留。mPEG-ALD 的醛基和蛋白质的氨基反应为亲核反应, 反应的难易程度取决于氨基的亲核性。不同氨基酸残基, 其 pK_a 值不同, 因而在不同的 pH 值条件下, 其亲核性有较大差别。因而溶液的 pH 值影响了蛋白质的修饰位点, 是影响修饰产物活性的最主要因素。

本实验探讨了 pH 对单修饰产物活性保留的影响, 结果如图 1 所示。在同一 96 孔板上测定未修饰蛋白和各修饰蛋白的体外生物学活性, 活性保留为修饰蛋白与未修饰蛋白体外活性的比值(%)。由图可以看出, 单修饰产物体外活性随着 pH 值的增大先增大后减小, 在 pH 6.5 时单修饰产物活性最高。这与 Wang YS 等的报道^[12]一致。推测可能由于在 pH=6.5 的条件下, mPEG-ALD 主要修饰在 His³⁴上, 从而保留了较高的体外生物学活性。对此, 仍需进行进一步实验验证。

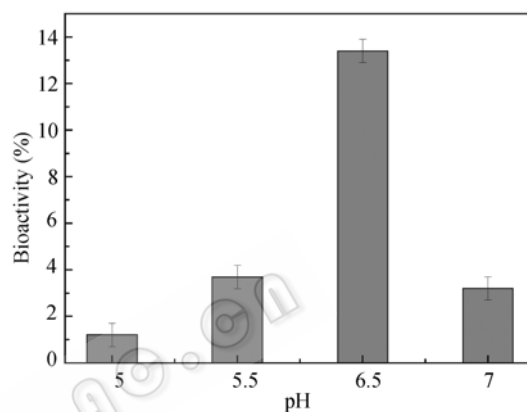


图 1 pH 值对单修饰产物体外活性的影响
Fig. 1 The effect of pH on retained bioactivity

2.2 修饰反应条件对单修饰产物转化率的影响

2.2.1 离子类型和离子强度

实验在相同 pH 值下(pH 6.5), 考查了不同离子类型对单修饰转化率的影响。选取了磷酸缓冲液、磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 3 种缓冲体系, 发现离子类型对单修饰转化率的影响并不明显, 在磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲体系中, 修饰转化率略大于其它两种溶液。推测是由于磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲体系的缓冲范围为 pH 2.2~8.0, 而磷酸缓冲体系的缓冲范围为 pH 5.8~8.0, 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲体系的缓冲范围为 pH 3.0~6.6, 后二者对 pH 6.5 的缓冲能力不及前者所造成的。又因为有文献报道^[13], 干扰素 α -2b 在磷酸氢二钠-柠檬酸体系中的稳定性较好, 故选择该体系作为反应体系。

为继续考查离子强度对对单修饰产物转化率的影响, 选取了 5、20、35、50 mmol/L 四个离子强度, 发现单修饰产物的转化率随着离子强度变化较小, 20 mmol/L 之后基本不变。由于高离子强度不利于后续的离子交换色谱分离, 故采用 20 mmol/L 作为反

应的最佳离子强度。

2.2.2 蛋白浓度和修饰配比

图 2 为蛋白浓度和修饰比对单修饰转化率的影响。由图 2 可以看出, 随着蛋白质浓度的增加以及修饰剂/蛋白配比的增加, 单修饰产物的转化率也随之增大。但是由于过高浓度下蛋白质很不稳定, 容易聚集沉淀, 故选择蛋白浓度 4 mg/mL 作为最佳反应条件, 而对修饰剂/蛋白配比进行了进一步的探讨, 结果如图 3 所示。由图 3 可以看出, 随着修饰剂/蛋白配比的逐渐增加, 多修饰蛋白的转化率逐渐增加, 单修饰产物转化率先增大后减小, 在 8:1 的条件下存在最大值。这是由于蛋白质浓度以及修饰剂/蛋白质配比的增加, 使得蛋白质和修饰剂分子的碰撞机会增大, 从而促进了修饰反应的进行。但修饰剂/蛋白质配比过高时, 大大增加了修饰剂和蛋白质分子的碰撞机会, 从而促进了多修饰产物的生成。

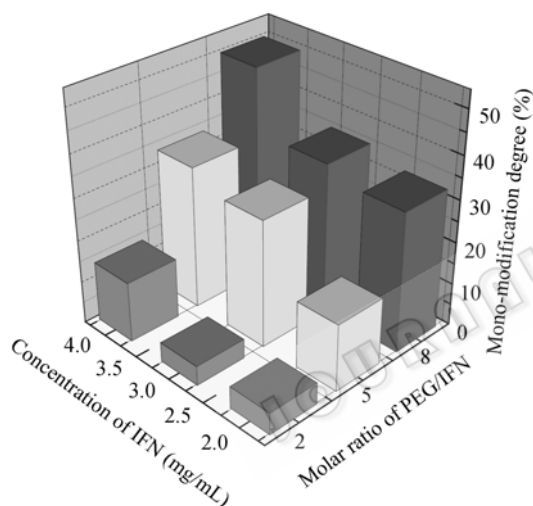


图 2 蛋白浓度和修饰剂/蛋白比对单修饰转化率的影响

Fig. 2 The effect of IFN concentration and PEG/IFN molar ratio on mono-modification degree

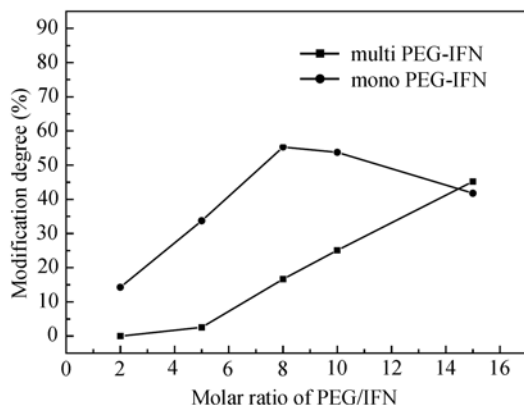


图 3 修饰剂/蛋白比对修饰转化率的影响

Fig. 3 The effect of PEG/IFN molar ratio on modification degree

2.2.3 反应时间

图 4 为反应时间对修饰转化率的影响。由图 4 可得, 随着反应时间的增大, 单修饰和多修饰产物均逐渐增加, 但 20 h 后, 单修饰产物的增加趋于平缓, 多修饰产物仍在持续快速增加。推测由于反应开始阶段, 单修饰产物的含量较少, 故多修饰反应的速率也较低; 当反应进行到一定程度, 单修饰产物的含量达到一定值的时候, 多修饰反应速率也随之增大。反应到 20 h 的时候, 单修饰产物的生成速率和多修饰产物的生成速率(即单修饰产物的减少速率)相等, 故单修饰产物的含量不再增加, 而多修饰产物的含量仍在继续增长。因此, 选择 20 h 作为最佳反应条件。

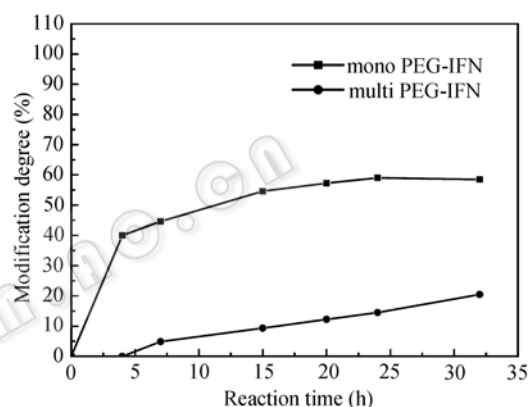


图 4 反应时间对修饰转化率的影响

Fig. 4 The effect of reaction time on modification degree

综上所述, 得到 20 kD 聚乙二醇丙醛修饰干扰素 α -2b 的优化修饰条件, 即在 4°C 下, 在 20 mmol/L, pH 6.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液中, 蛋白浓度为 4 mg/mL 时, 修饰剂/蛋白摩尔配比为 8:1 的情况下, 反应 20 h。该种条件下, 单修饰产物的转化率可达 55%。

2.3 修饰产物的分离纯化

干扰素 α -2b 的等电点在 6.1 左右, 经聚乙二醇修饰后, 等电点有所降低, 因此可采用离子交换层析的方法对反应产物进行分离纯化, 结果如图 5 所示。将穿透峰 P0, 洗脱峰 P1、P2、P3 收集, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 用银染检测含有蛋白的组分(未修饰蛋白、单修饰和多修饰蛋白), 碘染检测含有 PEG 的组分(游离的 PEG、单修饰和多修饰蛋白), 结果如图 6 所示。由图 6 可以看出, P0 为未参加反应的游离的修饰剂, P1 为多修饰蛋白, P2 为单修饰蛋

白, P3 为未被修饰的原蛋白。各洗脱峰纯度均较高, 离子交换层析可以将各组分较好地分开。

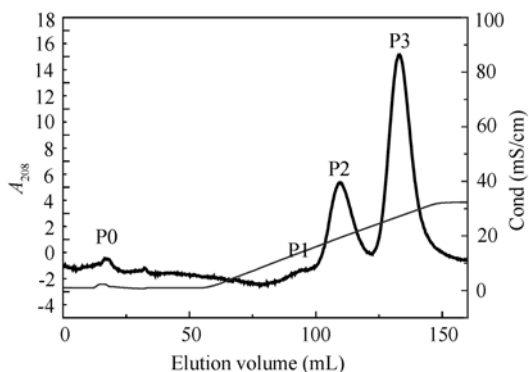


图5 离子交换色谱分离 PEG 修饰干扰素 α -2b 图谱
Fig. 5 Ion exchange chromatography of PEGylated Interferon α -2b

收集各洗脱峰测定蛋白浓度, 计算得总蛋白回收率为 99.1%, 单修饰产物占总蛋白的 52%, 即单修饰产物的得率可达到 93%。可见, 对于 PEG 修饰的干扰素 α -2b 体系, 离子交换分离对蛋白质的损失较小, 回收率较高。

2.4 单修饰产物的性质检测

2.4.1 纯度和活性

图 7 为未修饰的 IFN α -2b 以及单修饰 PEG-IFN

α -2b 高效凝胶过滤色谱图。图中 19.3 mL 处所出峰为未修饰的干扰素 α -2b, 13.5 mL 处所出峰为单修饰的 PEG-IFN α -2b。计算峰面积可得, 经离子交换分离聚乙二醇丙醛修饰得干扰素 α -2b 产物所得的单修饰产物, 其纯度可达 97%以上。采用细胞病变抑制法测定体外活性, 得到单修饰产物的比活为 1.96×10^7 IU/mg, 未修饰的 IFN α -2b 比活为 1.48×10^8 IU/mg, 单修饰产物活性保留达到了 13.4%。

2.4.2 循环半衰期

测定未修饰蛋白和单修饰蛋白在 SD 大鼠体内的循环半衰期, 结果如图 8 所示。由图可以看出, 注射后未修饰蛋白的生物学活性迅速达到最大值, 在 1 h 左右降至一半; 而单修饰蛋白的生物学活性在 8 h 才达到最大值, 24 h 才降至一半。可见, 单修饰蛋白在动物体内的循环半衰期得到了大幅度的延长, 为未修饰蛋白的 20 倍左右。

2.4.3 稳定性

单修饰产物水溶液在 4°C 放置 1、2、3、6 个月, 经高效凝胶过滤色谱及电泳检测, 未见聚集或降解, 经细胞病变抑制法测定其比活仍保留在 10^7 IU/mg。可见本单修饰产物具有较好的水溶液稳定性。

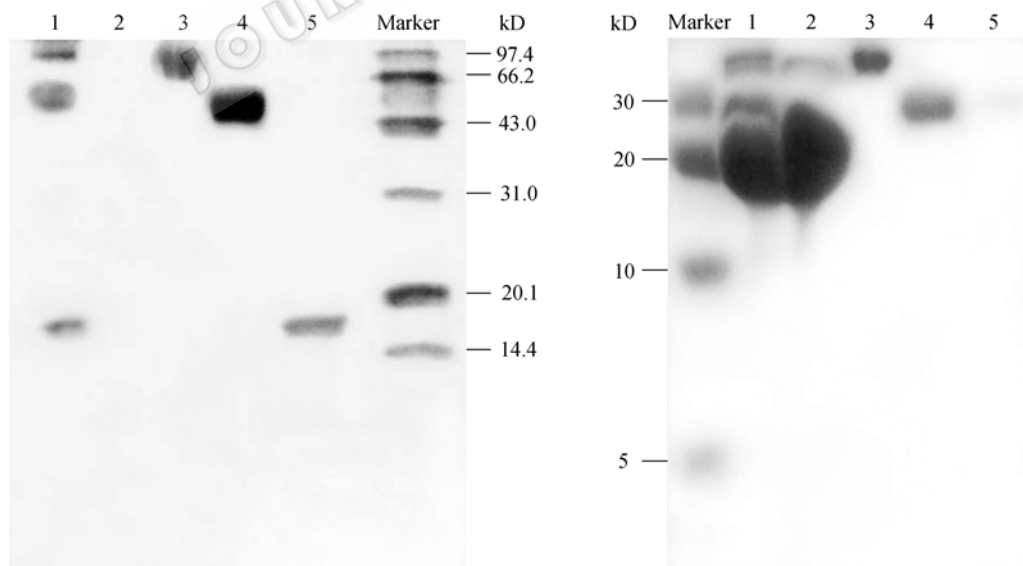


图 6 PEG 修饰 IFN α -2b 产物离子交换分离前后 SDS-PAGE 电泳图(左: 银染; 右: 碘染)

Fig. 6 SDS-PAGE profile of IEC separated PEGylated Interferon α -2b (left: silver staining; right: I_2 staining)

1: reaction mixture; 2: P0, PEG-ALD 20000; 3: P1, multi PEG-IFN α -2b; 4: P2, mono PEG PEG-IFN α -2b; 5: P3, native IFN α -2b

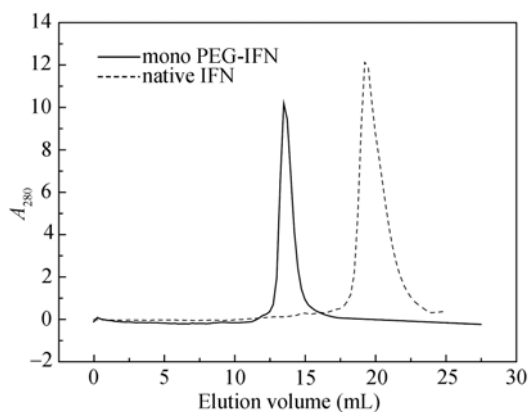


图 7 IFN α -2b 以及离子交换分离 PEG 修饰 IFN α -2b 收集的 P2 峰(单修饰产物)的高效凝胶过滤色谱图

Fig. 7 High performance liquid chromatography of INF α -2b and purified mono PEG-INF α -2b using ion exchange chromatography

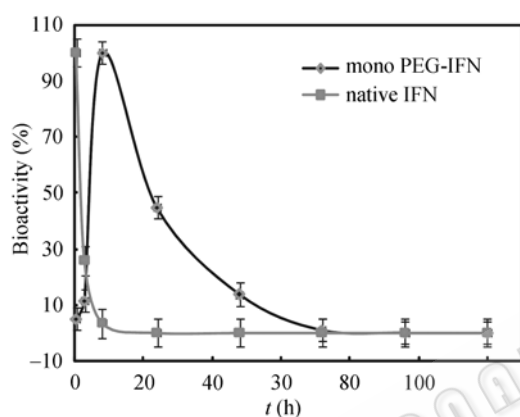


图 8 IFN α -2b 及单修饰 IFN α -2b 在 SD 大鼠体内的循环半衰期

Fig. 8 Half time of IFN α -2b and mono PEG-IFN α -2b in SD rat

3 结论

本研究采用分子量为 20 000 的单甲氧基聚乙二醇丙醛对干扰素 α -2b 进行了修饰, 探讨了各修饰反应条件的影响, 得到优化的反应条件, 即 4 $^{\circ}$ C, 在 20 mmol/L, pH 6.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液中, 蛋白浓度为 4 mg/mL, 修饰剂/蛋白摩尔比为 8:1 的情况下, 反应 20 h。在最佳反应条件下, 单修饰转化率可达到 55%。采用离子交换层析对修饰产物进行分离纯化, 可以将各组分较好的分离, 经高效凝胶过滤色谱检测, 单修饰产物的纯度达到 97%, 体外活性保留达到未修饰蛋白的 13.4%。其在动物体内的循环半衰期得到了较大的延长, 达到未修饰蛋白

的 20 倍, 且水溶液具有较好的稳定性。本研究的修饰反应和分离模式便于放大制备, 为进一步的药代动力学和药效学实验奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Levy DE. Whence interferon? Variety in the production of interferon in response to viral infection. *J Exper Med.* 2002, **195**: 15-18.
- [2] Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv Drug Deli Rev*, 2002, **54**: 459-476.
- [3] Pool R. Hairy enzymes stays in the blood. *Science*, 1990, **248**: 305.
- [4] Abuchowski A, Kazo GM, Verhoest CR. Cancer therapy with chemically modified enzymes. *Cancer Biochem Biophys*, 1984, **7**(2): 175-186.
- [5] Crawford J. Pegfilgrastim administered once per cycle reduces incidence of chemotherapy-induced neutropenia. *Drugs*, 2002, **62**: 89.
- [6] Takacs MA, Jacobs SJ, Bordens RM. Detection and characterization of antibodies to PEG-IFN- α 2b using surface plasmon resonance. *J Interferon Cytokine Res*, 1999, **19**: 781.
- [7] Chinese Pharmacopoeia, appendix 29. Chinese Pharmacopoeia Committee, 2005.
中华人民共和国药典 2005 版, 附录 29. 国家药典委员会, 2005.
- [8] Laemmli UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680-685.
- [9] Swain M, Ross NW. A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electroph*, 1995, **16**: 948-951.
- [10] Kurfurst MM. Detection and molecular weight determination of polyethylene glycol-modified hirudin by staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, 1992, **200**: 244-248.
- [11] Chinese Pharmacopoeia, appendix 56. Chinese Pharmacopoeia Committee, 2005.
中华人民共和国药典 2005 版, 附录 56. 国家药典委员会, 2005.
- [12] Wang YS, Youngster S, Grace M, et al. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications. *Adv Drug Deli Rev*, 2002, **54**: 547-570.
- [13] Jiang RG, Zhang L, Wang CL, et al. Effect of spray drying on stability of recombinant human interferon α -2b, *Chin Pharm J*, 2005, **40**(9): 681-684.
江荣高, 张磊, 王春龙, 等. 喷雾干燥对干扰素 α -2b 稳定性的影响. 中国药学杂志, 2005, **40**(9): 681-684.