

聚乙二醇定点修饰 haFGF 突变体

黄志锋 郑青* 苏志坚 吴晓萍 黄亚东

许华 赵文 李校坤 曲红艳 于平野

(暨南大学药学院医药生物技术研究开发中心 广州 510632)

摘要 将 mPEG5000 偶联到人酸性成纤维细胞生长因子(haFGF)突变体的第 31 位 cys 残基上, 对 haFGF_{Ser98,132} 突变体进行定点修饰, 修饰反应条件以马来酰亚胺-6-氨基己酸-mPEG5000 酯和 aFGF_{Ser98,132} 摩尔比 30/1、反应温度 25 °C、反应时间 4h 为佳。经反相高效液相色谱和 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 修饰率达到 30% 以上, 修饰后产物表观分子量为 27kD, 修饰产物的比活性保留 55.53%。

关键词 人酸性成纤维细胞生长因子突变体 聚乙二醇 定点修饰

haFGF Mutant Site-directed Modified by PEG

Huang Zhifeng, Zheng Qing*, Su Zhijian, Wu Xiaoping, Huang Yadong,

Xu Hua, Zhao Wen, Li Xiaokun, Qu Hongyan, Yu Pingye

(Biopharmaceutical R&D Center of Jinan University, Guangzhou 510630)

Abstract mPEG5000 was site-directed coupling to the 31st Cysteine residue of human acid fibroblast growth factor mutant, of which the 98th and the 132nd cysteine residue was replaced by Serine residue. The modified reaction was conducted at 25 °C for 4h. The optimal mol ratio of maleimide-6-aminocaproyl-mPEG5000 ester vs haFGF_{Ser98,132} was 30/1. The modified products were analysed by reversed-phase HPLC and SDS-PAGE. The result indicated that the modification rate was up to 30% and the apparent molecular weight of the PEG-haFGF conjugate was 27kD. The final product PEG-haFGF was purified to homogeneity by Heparin affinity chromatography. The activity of the purified PEG-haFGF remained 55.53% of the activity of the haFGF mutant.

Key words Human acid fibroblast growth factor mutant, PEG, Site-directed modification

人酸性成纤维细胞生长因子(haFGF)是一类对来源于中胚层和神经外胚层的多种类型的细胞具有广泛生物学活性的细胞生长因子, 在临床上可用于治疗心脑血管和神经系统疾病以及各种体表创伤、溃疡等疾病。但是, 蛋白质类药物普遍存在稳定性差、体内半衰期短和具有免疫原性等缺点, 限制了其临床应用, haFGF 也同样存在类似问题。为了提高蛋白质类药物的稳定性、延长体内半衰期、降低免疫原性^[1], 近年来蛋白质修饰技术获得了快速发展。聚乙二醇作为修饰剂, 具有无毒、生物相容性好等优点, 已被广泛用于蛋白质药物的修饰研究。据报道, 由 Enzon

黄志锋 男, 24 岁, 硕士生, 现从事蛋白质结构和修饰研究。 *联系人, E-mail: qz01cn@163.com

广东省自然科学基金(010424)、国家 863 计划(2001AA215131, 2002AA2Z3318)资助项目

2003-09-22 收稿, 2004-02-20 接受

公司研制的 PEG-门冬酰胺酶、PEG-腺苷脱氨酶和 PEG-干扰素已相继面市。在国内,已开展了应用此项技术对干扰素 $\alpha 2b$ 、白介素-2、天冬酰胺酶、天花粉蛋白等的修饰研究^[2~4]。

在 haFGF 一级结构中,第 31、98、132 位为半胱氨酸(Cys)残基,该残基对 haFGF 活性不是必须甚至是有害的,将 Cys 突变为 Ser、Ala 等中性氨基酸有助于提高 aFGF 的稳定性,同时活性也有一定提高^[5]。笔者将 98、132 位处的 Cys 突变为丝氨酸,保留 31 位上的 Cys,采用马来酰亚胺-6-氨基己酸-mPEG5000 酯定点修饰 31 位 Cys,这是利用马来酰亚胺末端的双键与半胱氨酸的巯基发生加成反应,实验结果表明,修饰产物较好地保持了 haFGF 的生物学活性。

1 实验部分

1.1 仪器试剂

Agilent 反相高效液相色谱仪, MK3 型酶标仪, 电泳仪, 754 型紫外可见分光光度计。haFGF_{Ser98,132} 突变体(自制), 单甲氧基聚乙二醇 5000(美国 Sigma 公司), 二环己基碳二亚胺(DCCI, 常州新华活性材料研究所), *N,N*-二甲基氨基吡啶(DMAP, 常州新华活性材料研究所), Heparin SepharoseTM CL-6B(Pharmacia 公司), 其它化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 马来酰亚胺-6-氨基己酸-mPEG5000 酯的合成

参考文献[6]的方法,将等摩尔的 6-氨基己酸与马来酸酐在 10 倍冰乙酸中加热回流 24h,减压除去冰乙酸,所得产物过硅胶柱分离,将在 254nm 有吸收的组分合并,减压浓缩,将浓缩样与 mPEG5000 以摩尔比 1/10 混合,溶解于二氯甲烷中,向其中加入 1%的 DCCI 和 DMAP 作催化剂,室温下反应过夜,加入相当于上述反应液 0.5 倍体积的乙醚作为沉淀剂,抽滤收集沉淀,乙醇重结晶,即得所要活化酯。

1.3 修饰反应

设计 3 因素 3 水平正交实验,将马来酰亚胺-6-氨基己酸-mPEG5000 酯和 haFGF 突变体以摩尔比 10/1、20/1、30/1 的比例混合,分别于 4、8、25℃下进行反应,反应时间分别取 4、8、12h。取样作 SDS-PAGE 电泳检测,剩余样品-20℃冻存,以备进一步分析和分离。

1.4 修饰产物的分析分离

1.4.1 修饰产物的浓缩 取 10mL 反应液,加入 Vivapore 溶剂吸附浓缩器中,4℃环境下将样品溶液浓缩至 2mL。

1.4.2 修饰产物的 HPLC 分析 色谱条件: Agilent 高效液相色谱仪(C18 柱),自动进样器, DAD 检测器, Agilent chemstation 工作站,采用梯度洗脱的方法,流动相为: V(水)/V(乙腈)(20/80 ~ 80/20),洗脱 20min,上样量为 50 μ L,流速为 1mL/min,检测波长为 280nm。

1.4.3 修饰产物的分离制备 取 30mL 反应液,过 Sephadex G-25 柱除盐,上 20cm \times 1.5cm Heparin SepharoseTM CL-6B 柱,采用 20mmol/L、pH=7.2 的磷酸缓冲液(PB)平衡柱,1mL/min 上样,用 20mmol/L、pH=7.2 的磷酸缓冲液(PB)洗柱,基线平稳后,用 20mmol/L 磷酸缓冲液(PB)+0.2mol/L NaCl、20mmol/L 磷酸缓冲液(PB)+0.6mol/L NaCl 及 20mmol/L 磷酸缓冲液(PB)+1.2mol/L NaCl (pH 均为 7.2)分段洗脱,流速 2mL/min,检测波长为 280nm,收集各洗脱峰,SDS-PAGE 凝胶电泳检测各洗脱峰。

1.4.4 蛋白质浓度检测 以牛血清蛋白为标准,按 Lowry 法^[7]测定各洗脱峰的蛋白质浓度。

1.4.5 修饰蛋白的生物学活性检测 活性测定采用 MTT 法。将 3T3 细胞转接于含 10% 小牛血清的 1640 培养液, 置于二氧化碳培养箱, 37 °C 培养 5d, 用 0.25% 的胰酶消化培养瓶中的 3T3 细胞, 再用含 10% 小牛血清的 1640 培养液稀释至细胞浓度为 $10^7 \sim 10^8$ 个/mL, 加入 96 孔细胞培养板中(100 μ L/孔), 37 °C 培养 24h。换含 0.4% 小牛血清的 1640 培养液(100 μ L /孔), 37 °C 继续培养 24h, 去板中培养液, 依次加入 150 μ L 待测样品(用含 0.4% 小牛血清的 1640 培养液稀释, 按第 1 孔浓度为 100ng/mL, 以下各孔依次 4 倍稀释), 37 °C 培养 24h, 每孔各加入 MTT(5mg/mL)20 μ L, 继续培养 4h, 去培养液, 每孔加入二甲基亚砷 100 μ L, 室温放置 30min, MK-3 酶标仪双波长(570、630nm)检测各孔样品的 OD 值, 分别与阴性对照(含 0.4% 小牛血清的 1640 培养液)比较, 计算半数增长率(ED50), 再根据下列公式算出各样品的活性:

$$\text{样品效价} = (\text{样品 ED}_{50} / \text{标准品 ED}_{50}) \times \text{标准品效价} \times \text{样品稀释倍数}$$

2 结果和讨论

2.1 修饰反应条件

mPEG5000-马来酰亚胺和 aFGF 都对 pH 敏感, 所以反应的 pH 设为 7.0, 图 1 为不同反应条件下各反应产物的 SDS-PAGE 检测结果。结果表明, 以马来酰亚胺-6-氨基己酸-mPEG5000 酯与 haFGF_{ser98, 132} 突变体在摩尔比 30/1、25、4h 反应条件下修饰率最高, 经凝胶扫描分析, 修饰率为 37.63%。

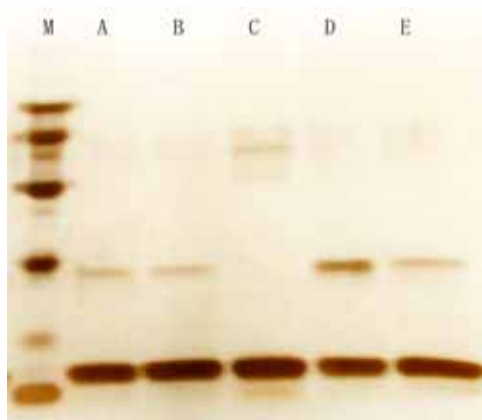


图 1 不同修饰条件对修饰率的影响

Fig.1 Effect of modified condition on the modifying ratio

M: 低分子量蛋白质标准(97kD, 66kD, 43kD, 31kD, 20kD, 14kD); A: 活化酯/haFGF_{ser98,132} 为 30/1, 8 °C, 8h;
B: 活化酯/haFGF 突变体为 20/1, 8 °C, 8h; C: haFGF_{ser98,132} 对照; D: 活化酯/haFGF_{ser98,132} 为 30/1, 25 °C, 4h;
E: 活化酯/haFGF_{ser98,132} 为 20/1, 25 °C, 8h

2.2 修饰后样品的 HPLC 分析

对修饰反应产物进行反相高效液相色谱(C18 柱)分析, 图谱见图 2。在 2.341min 和 3.196min 先后出了两个尖锐峰, SDS-PAGE 证明(图 3)第一个峰(A)为未参加反应的 haFGF 突变体, 第二个峰(B)为修饰产物, 这说明修饰后蛋白的极性发生了变化而且是极性相对降低, 原因可能是 PEG 的疏水基团掩盖了蛋白质分子中的部分亲水基团造成的。

SDS-PAGE 分析得到的修饰产物表观分子量比理论值高, 这是因为 PEG 分子伸展在蛋白表

面,使蛋白泳动速率降低,所以以蛋白质标准作为对照,SDS-PAGE 分析得到的表观分子质量比理论值高。

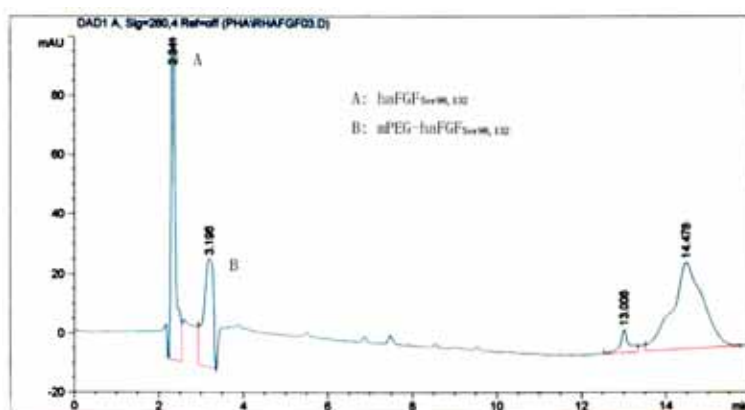


图 2 haFGF 突变体 mPEG-maleimide 修饰产物的 HPLC 色谱图
Fig.2 HPLC chromatography of mPEG-maleimide modified haFGF mutant

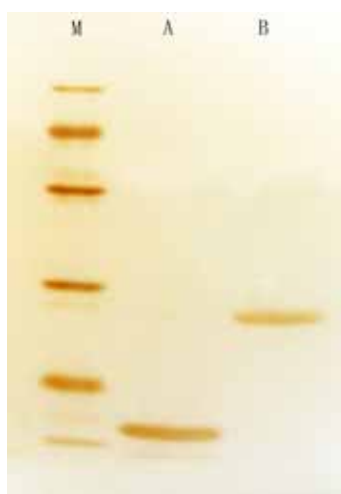


图 3 HPLC 分离物的 SDS-PAGE 图谱
Fig.3 SDS-PAGE of HPLC purified product

M: 低分子量蛋白质标准(97kD, 66kD, 43kD, 31kD, 20kD, 14kD);

A: haFGF 突变体; B: mPEG-haFGF 突变体

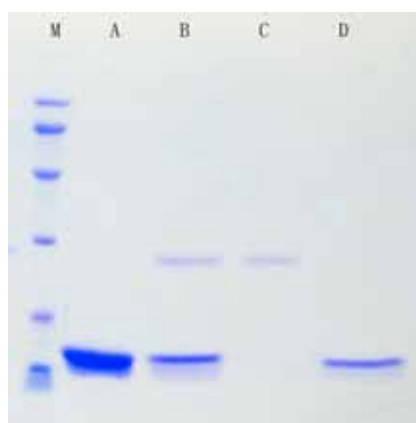


图 4 肝素亲和层析分离物的 SDS-PAGE 图谱
Fig.4 SDS-PAGE of Heparin affinity chromatography purified product

M: 低分子量蛋白质标准(97kD, 66kD, 43kD, 31kD, 20kD, 14kD); A: 未修饰前 haFGF ser98,132; B: 修饰反应产物; C: 0.6mol/L NaCl+20mmol/L 磷酸缓冲液(PB)洗脱物; D: 1.2mol/L NaCl+20mmol/L 磷酸缓冲液(PB)洗脱物

2.3 修饰产物的分离纯化

采用肝素亲和层析柱分离纯化修饰反应产物, 0.6mol/L NaCl+20mmol/L PB 和 1.2mol/L NaCl+20mmol/L 磷酸缓冲液(PB)分段洗脱, SDS-PAGE 检测, 见图 4。

在分离制备中, 先后尝试了离子交换、分子筛层析和亲和层析等几种方法, 最后认为以生长因子修饰前后与肝素特异性结合能力的改变为原理的亲和层析分离效果最为理想, 这是因为 haFGF 的 22~27、113~120、126~136 位氨基酸序列是肝素结合的基本位点^[8], PEG 修饰 31 位 Cys 残基后, 对肝素的亲和能力势必有所降低, 用这种方法分离制备操作简便, 对蛋白活性影响小, 且亲和能力微弱的差别就能获得较为理想的分离。

2.4 活性测定

采用 MTT 法测定修饰前后 haFGF 活性, 结果见表 1。

表 1 haFGF_{Ser98, 132} 和 mPEG-haFGF_{Ser98, 132} 活性
Tab.1 Activity of haFGF_{Ser98, 132} and mPEG-haFGF_{Ser98, 132}

样品	比活/(u/mg)	活性回收率/%
rhaFGF _{Ser98, 132}	1.963×10^6	100
mPEG-rhaFGF _{Ser98, 132}	1.090×10^6	55.53

haFGF_{Ser98, 132} 突变体修饰后, 活性为修饰前的 55.53%, 相对于文献[2]、[4]报道中其它蛋白质修饰后的活性回收率, 活性回收率较高。

化学修饰是改善蛋白质类物理化学性质和生物学性能的有效方法, 具有灵活多样、简便易行的特点。常用的蛋白质修饰剂主要分为肝素、酸酐等小分子修饰剂以及各种大分子聚合物(如聚氨基酸, 聚乙二醇等)类修饰剂, 其中又以 PEG 类修饰剂最为常用。

PEG 是一种由重复的乙烯氧亚单元聚合而成的大分子化合物, 无毒并具有良好的生物相容性和血液相容性, 当它与蛋白质的非必须基团共价结合时, 分子量明显增加, 肾小球滤过减少, 同时 PEG 衍生物的屏蔽作用保护了蛋白质不易被蛋白酶水解, 从而增加了被修饰药物的体内稳定性, 延长了其生物半衰期。PEG 可作为一种屏障挡住蛋白质分子表面的抗原决定簇, 避免抗体的产生, 或者阻止抗原与抗体的结合从而抑制免疫反应的产生^[9, 10]。

值得注意的是, 直到现在对蛋白质的化学修饰, 氨基仍是最为常用的被修饰基团, 这是因为蛋白质分子表面的氨基有较高的亲核反应活性, 较易实现修饰, 但是蛋白质分子中存在较多的游离氨基, 其修饰存在随机性和偶然性, 修饰后易造成蛋白质活性的损失和最终产品的不均一。本实验中, 采用第 98、132 位处 Cys 突变为丝氨酸的 haFGF 突变体, 使 haFGF 仅存在 31 位上的 Cys 残基, 采用 PEG-马来酸酐修饰剂对其进行定点修饰, 从而尽可能地减少对蛋白质表面活性位点的影响, 较好地保持了 haFGF 的生物学活性, 同时, 修饰产物均一性好, 有利于产物的分离纯化。

参考文献

- [1] G E Francis, D Fisher, C Delgado et al. Int. J. Hematol., 1998, 68: 1~18.
- [2] 田 弘, 姚文兵, 吴梧桐 等. 中国药科大学学报, 2000, 31(1): 74~77.
- [3] 王树歧, 金 晶, 马淑哲 等. 中国生化药物杂志, 1998, 19: 224~227.
- [4] 何贤辉, 聂慧玲, 邵鹏柱 等. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(6): 924~927.
- [5] S Ortega, M T Schaeffer, D Soderman et al. J. Biol. Chem., 1991, 266(9): 5842~5846.
- [6] W Tang, Y Chang, X Y Liu. Tetrahed. Lett., 1994, 35(35): 6515~6516.
- [7] 张龙翔, 张挺芳, 李玲媛. 生化实验和技术. 第二版, 北京: 高等教育出版社, 1997: 137~138.
- [8] 余 瑛, 蔡绍哲, 夏玉先 等. 中国药理学通报, 2002, 18(2): 125~128.
- [9] M J Roberts, M D Bentley, J M Harris. Adv. Drug Deliv. Rev., 2002, 54(4): 459~476.
- [10] F M Veronese, J M Harris. Adv. Drug Deliv. Rev., 2002, 54(4): 453~456.