

聚乙二醇对干扰素 α -2b 的初步化学修饰研究*

田 宏 姚文兵 吴梧桐 沈子龙

(中国药科大学生物制药学院, 南京 210009)

摘 要 以几种不同方法活化的聚乙二醇 5000 对干扰素进行化学修饰, 并对修饰条件、修饰后干扰素生物活性进行了初步比较。相同反应条件下, 单甲氧基聚乙二醇甲酸琥珀酰亚胺酯(SC-mPEG)的选择性较单甲氧基聚乙二醇琥珀酸琥珀酰亚胺酯(SS-mPEG)高, 聚乙二醇甲酸琥珀酰亚胺酯(BSC-PEG)由于有两个活性基团, 选择性与 SS-mPEG 相近。以聚乙二醇活化的修饰剂会使干扰素分子见形成交联, 修饰后生物活性损失较大, 而单甲氧基聚乙二醇活化的修饰剂修饰干扰素, 修饰率保持在 30% 以内时生物活性较好。

关键词 聚乙二醇; 重组人干扰素 α -2b; 化学修饰

rhIFN α -2b 是多功能细胞因子, 它可以在细胞表面与特殊的受体结合而发挥某些细胞活性, 诱导产生特异性蛋白质, 增强吞噬细胞的吞噬活性和淋巴细胞对靶细胞的细胞毒作用, 从而起到抗病毒作用和免疫调节作用。临床上广泛应用于治疗慢性乙型、丙型肝炎, 多发性骨髓瘤, 卡波济氏肉瘤, 恶性黑色素瘤, 毛细胞白血症等肿瘤和癌症。随着基因工程技术的日益成熟, 人们已将人干扰素 α -2b 的基因转入大肠杆菌系统内进行表达, 用于大规模工业生产。目前, 重组基因工程人干扰素 α -2b 已是国际上大量生产和广泛应用的抗病毒和抗肿瘤多肽药物。但是由于基因工程类药物缺乏天然蛋白质所具有的糖基, 其体内半衰期较短且有抗原性, 因而大大限制了其临床应用。而使用可溶性高分子聚合物对蛋白质类药物进行化学修饰, 可以有效改变其体内分布和药动学性质^[1]。本文以几种不同方法活化的聚乙二醇 5000 对 rhIFN α -2b 进行化学修饰研究, 并对修饰条件、修饰后干扰素生物活性进行了初步比较。

1 仪器与试剂

752 紫外光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂), pH3-5 型 pH 计(上海雷磁仪器厂), 美国 Bio-Rad 公司凝胶扫描仪, 美国 Sigma 公司恒温 CO₂ 细胞培养箱。三光气(由本校药化教研室提供); TNBS(美国 Sigma 公司); 聚乙二醇(PEG 上海生化试剂一厂); 单甲氧基聚乙二醇(mPEG 美

国 Sigma 公司); 单甲氧基聚乙二醇琥珀酸琥珀酰亚胺酯标准品(SS-mPEG 美国 Sigma 公司)。

2 实验方法

2.1 聚乙二醇的活化

2.1.1 单甲氧基聚乙二醇甲酸琥珀酰亚胺酯(SC-mPEG)的制备 称取单甲氧基聚乙二醇 5000 6 g, 三光气 0.56 g, 溶于甲苯 18 ml 和二氯甲烷 10 ml 中, 逐滴加入无水三乙胺 1 ml, 搅拌反应过夜。将反应液抽真空, 挥去大部分溶剂, 将所得残渣重新溶解于甲苯 8 ml 和二氯甲烷 10 ml 中。加入羟基琥珀酰亚胺 0.21 g, 取三乙胺 0.3 ml, 用二氯甲烷 3 ml 稀释, 逐滴加入反应液中, 继续反应约 4 h。反应完全后, 将反应液过滤并抽真空, 所得残渣溶解于 50℃ 三乙胺 600 ml 中, 过滤, 冷却后所得结晶即 SC-mPEG 粗品。将所得产物用三乙胺反复重结晶, 得到产品 4.97 g。测定产品的红外光谱, 有如下特征峰: 1812, 1789(C=O, 琥珀酰亚胺); 1742(C=O, 羧基); 1114(CH₂OCH₂)。测定产品的核磁共振光谱(¹H-NMR, CDCl₃), 有如下特征峰: 4.35(m, 4H, CH₂OCO₂); 3.55(s, ~500H, PEG); 2.74(s, 8H, CH₂C=O)。可以初步确定产品为 SC-mPEG。

2.1.2 聚乙二醇甲酸琥珀酰亚胺酯(BSC-PEG)的制备 称取聚乙二醇 4000 5 g, 三光气 1.2 g, 溶于甲苯 18 ml 和二氯甲烷 10 ml 中, 逐滴加入无水三乙胺 2 ml, 搅拌反应过夜。将反应液抽真

空, 挥去大部分溶剂, 将所得残渣重新溶解于甲苯 12.5 ml 和二氯甲烷 6.25 ml 中。加入羟基琥珀酰亚胺 0.5 g, 取三乙胺 0.8 ml, 用二氯甲烷 3 ml 稀释, 逐滴加入反应液中, 继续反应约 4 h。反应完全后, 将反应液过滤并抽真空, 所得残渣溶解于 50℃三乙胺 60 ml 中, 过滤, 冷却后所得结晶即粗品。将所得产物用三乙胺反复重结晶, 得到产品 3.82 g。测定产品的红外光谱, 有如下特征峰: 1802, 1791($\text{C}=\text{O}$, 琥珀酰亚胺); 1740($\text{C}=\text{O}$, 羧基); 1104(CH_2OCH_2)。测定产品的核磁共振光谱(^1H -NMR, CDCl_3), 有如下特征峰: 4.38(m, 4H, CH_2OCO_2); 3.64(s, ~500H, PEG); 2.85(s, 8H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$)。可以初步确定产品为 BSC-PEG。

2.1.3 PEG 对干扰素的化学修饰 取干扰素冻干粉(3MIU)3 支, 分别加入磷酸缓冲液 1.5 ml 溶解, 再分别加入 SS-mPEG、SC-mPEG、BSC-PEG 各 1 mg, 在室温下振荡反应 4 h。反应完成后, 加入甘氨酸 0.5 ml 中止反应。将反应液置于真空干燥器中抽真空浓缩。对反应产物进行 SDS-PAGE 电泳^[2]。

2.3 反应条件对化学修饰作用的影响

2.3.1 反应时间对修饰率的影响 取干扰素冻干粉两支, 加入 pH 7.5 磷酸缓冲液 2 ml 溶解, 取 0.4 ml 分别置于 5 支带塞试管中。每支试管分别加入 SS-MPEG 反应 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h 后加入茚三酮溶液 0.5 ml, 沸水浴 20 min, 放置冷却后分别加入 Diluent 溶液(正丙醇和水之比为 1:1)5 ml 稀释, 放置 15 min 后, 以蒸馏水和未修饰的干扰素溶液进行相同的反应作为对照, 在

570 nm 处测定吸光度, 计算修饰率。SC-mPEG 和 BSC-PEG 以相同的方法进行测定。

2.3.2 pH 值对修饰率影响 取干扰素冻干粉 2 支, 加入 pH 7.5 磷酸缓冲液 2 ml 溶解, 取 0.4 ml 分别置于 5 支带塞试管中, 调节 pH 分别为 7.5、7.9、8.3、8.8、9.2。每支试管分别加入 SS-MPEG 0.5 mg, 反应 1 h 后加入茚三酮溶液 0.5 ml, 沸水浴 20 min, 放置冷却后分别加入 Diluent 溶液(正丙醇与水之比为 1:1)5 ml 稀释, 以蒸馏水和未修饰的干扰素溶液进行相同的反应作为对照, 在 570 nm 处测定吸光度, 计算修饰率。SC-mPEG (反应 2 h) 和 BSC-PEG (反应 1 h) 以相同的方法进行测定。

2.4 修饰后干扰素生物活性的测定 取干扰素冻干粉(3MIU)3 支, 分别加入 pH 7.4 磷酸缓冲液 1.5 ml 溶解, 再按 1:5(M_{IFN} : M_{PEG})的比例分别加入 SS-MPEG、SC-mPEG、BSC-PEG, 在室温下振荡反应 0.5 h, 每只样品各取 0.5 ml, 分别以 TNBS 法测定修饰率^[3]。同时, 在剩余反应液中分别加入 1 mol/L 甘氨酸 0.5 ml 中止反应。将剩余反应液按四倍比稀释, 以未修饰的干扰素为标准品, 以 VSV-Wish 细胞系统测定修饰前后的干扰素生物学活性的变化^[4]。按相同方法测定反应 1 h 后干扰素活性的变化及其修饰率。

3 结果与讨论

3.1 PEG 修饰后干扰素检测的电泳图谱

从图 1 可以看出, SS-mPEG, SC-mPEG 修饰后的干扰素分别多出一条分子量约为 23000 左右的条带, 可能是连接了一条聚乙二醇长链的产

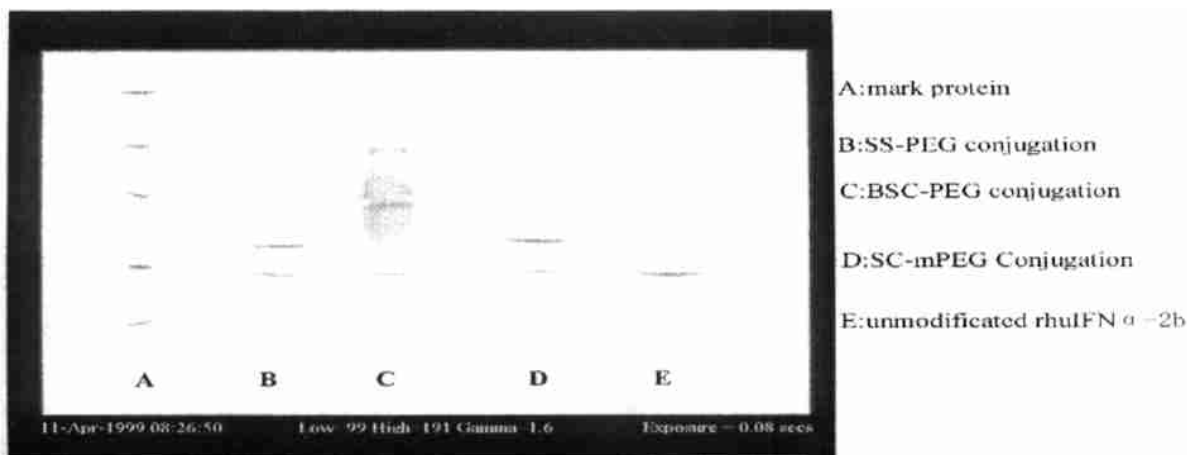


Fig 1. Non-reduce SDS-PAGE pattern of IFN modified by SS-mPEG, SC-mPEG, BSC-PEG respectively

物。BSC-PEG 修饰的干扰素条带分界不明显,且分子量较大,可能是由于 BSC-PEG 两端均有活性基团,使干扰素分子之间发生交联而导致修饰产物不均一。因为干扰素形成聚合体后会影 响生物活性,所以用单甲氧基聚乙二醇活化的修饰剂修饰效果较好。

3.2 反应条件对修饰作用的影响

3.2.1 反应时间对修饰率的影响 从图 2 可以看出,SS-mPEG 作用较快,2 h 内修饰率及达到 80%以上,3 h 基本上反应完全。SC-mPEG 反应较慢,反应 4 h 修饰率仍然不到 90%,BSC-PEG 含有双活性基团,相同反应时间内修饰率较高。

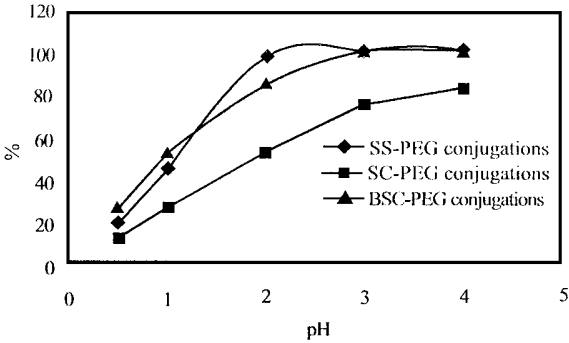


Fig 2. Effect of time on reaction of activated PEG with IFN

3.2.2 pH 值对修饰率的影响 从图 3 可以看出,SC-mPEG, SS-mPEG 可以在生理条件下和自由氨基发生反应。SS-mPEG 在 pH 7.5 ~ pH 8.5 之间反应活性较高,超过 pH 8.5 时修饰率明显下降。而 SC-mPEG 在 7.5 ~ 9.2 之间均能进行

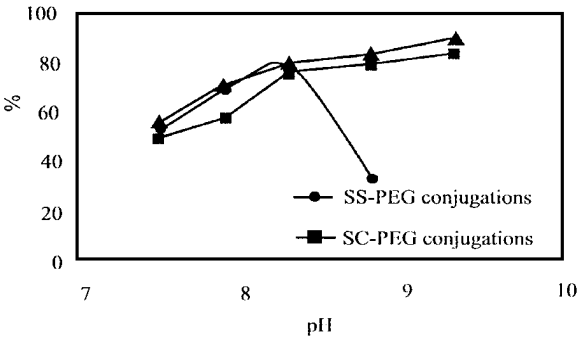


Fig 3. Effect of PH on reaction of activated PEG with INF 反应,在 9.2 的条件下修饰率最高。这可能是由于 SS-mPEG 上的-OCO-CH₂-CH₂-CO-OSu 比 SS-mPEG 上的-OCO₂-Su 更容易水解,在 pH 较高时,SS-mPEG 不仅自身因水解而失去活性基团,连接在干扰素上的聚乙二醇长链也会因-OCO-

CH₂-CH₂-CO-O-的水解从干扰素上脱落下来。因此,在修饰干扰素时选用 SC-mPEG 效果更好。

3.3 修饰后干扰素生物学活性的变化 从表 1 可以看出,相同反应条件下,SC-mPEG 的选择性最高,修饰后的产物能保持较好的生物学活性。而 BSC-PEG 由于可能导致干扰素分子之间的交联,在修饰率相近的条件下,其修饰后的产物生物学活性较低。从修饰后的干扰素与未修饰的干扰素的效价比可以看出,以单甲氧基聚乙二醇活化的修饰剂修饰干扰素,修饰率保持在 30%以内时,可以保持较好的生物学活性。

Tab 1. Biological activities of IFN-PEG conjugations

Examples	Degree of modification	Biological activities(%) ^a
IFN	—	100
SS 1	13.4	52
SS 2	40.2	21
SC1	10.8	75
SC2	28.7	41
BSC1	19.2	14
BSC2	45.6	ND

SC1,SS1,BSC1: IFN reacted with SC-mPEG, SS-mPEG, BSC-PEG for 0.5 h respectively.

SC2,SS2,BSC2: IFN reacted with SC-mPEG, SS-mPEG, BSC-PEG for 1 h respectively.

^a Biology activities are antiviral activity rate of modified IFN with unmodified IFN

由于干扰素是分子量较小的蛋白质,在机体内是通过与受体结合发挥作用,因此连接过多的聚乙二醇长链会影响其与受体的结合,从而影响其生物学活性。从以上实验结果看,单甲氧基聚乙二醇活化的修饰剂比聚乙二醇活化的修饰剂能更好地保持干扰素的生物学活性,而单甲氧基聚乙二醇活化的修饰剂中 SC-mPEG 比 SS-mPEG 有更高的选择性,在温和的反应条件下,修饰后的干扰素能保持 75%的生物学活性。此外,可以通过控制反应条件控制修饰率,使修饰后的干扰素保持较高的活性。从本实验结果看来,在生理条件下,室温下较短的反应时间(0.5 h)可以使干扰素保持较高的活性。修饰后干扰素的抗原性,体内外稳定性的变化及药动学性质等有待进一步研究。

参考文献

1 Mary LN, Robert S Abraham A. The therapeutic balue of poly (ethylene glycol)-modified proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1991, (6): 133

2 J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992. 880 ~ 887

3 Habeeb ASFA. Determination of free amino groups in proteins by

trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal Bioc*, 1966, (14): 328

4 卫生部生物制品标准化委员会. 生物制品检定规程. 北京: 中国人口出版社, 1995. 268 ~ 269

Chemical Modification of Activated Polyethylene Glycol to Recombined Human Interferon α -2b

TIAN Hong, YAO Wen-Bing, WU Wu-Tong, SHENG Zi-Long
Department of Biochemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract Recombined human interferon α -2b is modified by polyethylene glycol which is activated by several different methods. Under the same condition, SC-mPEG has higher selectivity than that of SS-mPEG, selectivity of BSC-PEG is similar to SS-mPEG because of its two active groups. Reagent derived from polyethylene glycol can lead to crosslinkage between molecules of interferon, so modified interferon will lose a majority of biological activity. Interferon, however, modified by reagent derived from monomethoxy (polyethylene glycol) can remain a higher biological activity when degree of modification of primary amines is lower than 30 %.

Key words Polyethylene glycol; rHuIFN α -2b; Chemical modification