

# 重组人睫状神经营养因子突变体的制备及 PEG 修饰\*

韩莉<sup>1</sup>, 蔡志华<sup>1</sup>, 陶红梅<sup>1</sup>, 王进<sup>2</sup>

(1. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 400047; 2. 重庆寰瑞生物技术有限公司, 重庆 400030)

**摘要** 通过大肠杆菌重组表达人睫状神经营养因子突变体(CNTFm), 并进行 PEG 修饰, 旨在降低免疫原性。该突变体将天然 CNTF 的 C 端 15 个氨基酸删除, 大肠杆菌表达的 CNTFm 以包含体形式存在, 经复性、纯化获得纯度达到 95% 的目的蛋白。体内生物学活性测定结果显示, 给药 10 d, 小鼠最大体重减少率达 31%, 产生的最高中和抗体滴度达到 1:6 400; 经 PEG 修饰, CNTF 突变体的生物学活性降低了 34%, 但最高中和抗体滴度降低到 1:800。该 PEG 修饰后的 CNTFm 制备工艺有望为 CNTF 的临床应用开辟道路。

**关键词** 睫状神经营养因子; 原核表达; 突变体; PEG 修饰; 肥胖

**中图分类号** Q786; R392.11

**文献标识码** A

**文章编号** 1672-6693(2009)02-0111-04

睫状神经营养因子(Ciliary neurotrophic factor, CNTF)最初从鸡胚睫状体中提取, 以可维持鸡胚睫状神经节的存活而得名<sup>[1]</sup>。在以后的研究中, CNTF 作为一种重要的神经营养因子, 在神经修复、治疗神经萎缩性疾病方面受到重视。在将 CNTF 用于运动神经元疾病——肌肉萎缩性脊髓侧索硬化症的治疗中意外发现病人的体重显著减轻, 这一发现预示 CNTF 可以作为一种生物减肥药被开发<sup>[2-3]</sup>。美国 Regeneron 公司开发的新型减肥药 Axokine 是 CNTF 的突变体, 但因严重的免疫原性, 使该新药的临床应用受阻。聚乙二醇(PEG)具有良好的生物相容性、无毒性和抗原性, 经 PEG 修饰后的蛋白和多肽类药物大多表现为免疫原性降低、稳定性提高、体内循环半衰期延长, 其药代动力学和药效学性质得到显著改善<sup>[4-6]</sup>。本文介绍了大肠杆菌表达 CNTF 突变体制备工艺, 并通过 PEG 修饰降低了免疫原性, 为 CNTF 的进一步开发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pBV220 质粒、*E. coli* 表达菌株 BL21 均为重庆大学生物工程学院提供; 所有蛋白层析操作在 AKTA explorer 100 上进行; 层析柱填料为 Amersham Biosciences(Uppsala, Sweden) 产品; HPLC 分析在 Waters 600(Waters, USA) 上进行; 昆明种小鼠和新西兰大白兔购自第三军医大学动物实验中心; 分子

量 5 k 的单甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺丙酸酯(mPEG-SPA)是 Sigma 公司产品; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔多克隆抗体购自武汉博士德生物工程公司。

### 1.2 重组 CNTF 突变体的制备

参考 CNTF 全长 cDNA 序列(GenBank, No. NM000614), 设计大肠杆菌偏爱密码子, 去除 C 端 15 个 aa, 通过化学合成 CNTFm 编码序列。将其插入 pBV220 温控质粒, 转化大肠杆菌 BL21, 挑取阳性克隆接种到含 100 U/mL Amp 的 LB 培养基(LA)中 25 °C、200 r/min 培养, 通过检测 OD<sub>600</sub> 值, 控制细菌密度在 OD 值在 0.6, 42 °C 培养诱导重组蛋白表达。

诱导结束后, 离心收获菌体。将菌体在 -20、37 °C 反复冻融两次, 然后 1:10 的质量/体积比重悬在 Buffer A(50 mmol/L Tris-HCl, pH 9.5、5 mmol/L EDTA、0.2 g/L lysozyme)中, 37 °C 缓慢搅动 30 min, 再将获得的粘稠物置于冰上分批进行超声破菌。超声至破菌溶液不再粘稠, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 沉淀和上清分别进行 SDS-PAGE 分析, 表明重组蛋白以包含体形式存在。

### 1.3 重组蛋白的分离纯化和鉴定

将离心获得的包含体沉淀用 Buffer B(25 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0、5 mmol/L EDTA、2 mol/L 尿素、1% TritonX-100)洗涤一次。洗涤后离心得沉淀, 用 Buffer C(25 mmol/L Tris-HCl, pH 9.5、8 mol/L 尿

\* 收稿日期 2008-12-17 修回日期 2009-02-17

资助项目: 重庆市科委自然科学基金项目(No. 71105)

作者简介: 韩莉, 女, 硕士研究生, 研究方向为生物制药; 通讯作者: 蔡志华, E-mail: shigusa@163.com。

素、5 mmol/L EDTA)溶解,离心去除不溶成分。蛋白变性溶液通过 Buffer D(25 mmol/L Tris-HCL、pH 8.0、0.1% Tween-80)4倍稀释复性,复性液进行阴离子交换层析,层析柱 Q Sepharose FF 先用 Buffer E(25 mmol/L Tris-HCL、pH 8.0)平衡,上样结束,继续用 Buffer E 复平衡去除非特异性结合蛋白,结合蛋白用补加了 0.3 mol/L NaCl 的 Buffer E 洗脱;Q 柱洗脱峰上 Sephadex G-25 脱盐,流动相为 20 mmol/L PB(pH 7.4);收集到的目的蛋白用于 HPLC 分析纯度。

#### 1.4 PEG 修饰

在 pH 7.5、离子强度 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲体系中,调整 CNTFm 的浓度为 1 g/L,加入的 PEG-SPA 和 CNTF 化学配比为 3:1,于 4 °C 过夜反应后,加入反相 HPLC 的 A 液(0.1% TFA、20% 乙腈)终止反应,并进一步通过 C18 反相层析技术,分离 PEG-CNTFm。流动相 A 为 0.1% TFA、20% 乙腈;流动相 B 为 0.1% TFA、80% 乙腈。SDS-PAGE 和 HPLC 检测 PEG 修饰结果。

#### 1.5 体内生物活性评价

将平均体重为 20 g 左右的昆明小鼠,分为 3 组,每组 10 只,雌雄各半,腹腔给药,一日 1 次。第一组为平行对照,注射生理盐水;第二组给药 CNTFm;第三组给药 PEG-CNTFm,剂量 200  $\mu$ g/(kg·d)。连续注射 10 d,每天定时称量小鼠体重,实验期间随时观测小鼠的饮食情况和精神状态,10 d 的体重减少率按如下公式计算

$$10\text{ d 的体重减少率} = (\text{对照组 } 10\text{ d 的体重} - \text{给药组 } 10\text{ d 的体重}) / \text{对照组 } 10\text{ d 的体重} \times 100\%$$

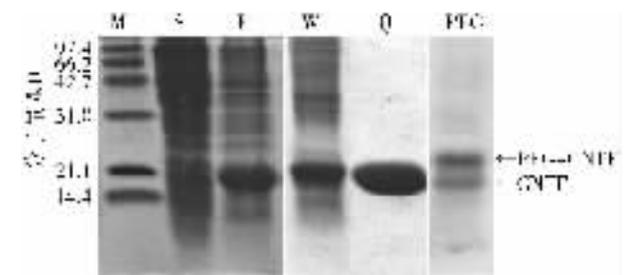
#### 1.6 CNTF 与其修饰物免疫原性检测

取 1.5 kg 雄兔 9 只,随机分为 3 组,每组 3 只。间隔 7 d 皮下注射 CNTFm、PEG-CNTFm 和生理盐水,连续 3 周给药,每次给药剂量为 400  $\mu$ g/kg。分别于给药后的第 0~7 周于耳缘静脉取血,离心分离血清,冷冻保存待测。CNTF 包被酶标板,采用 ELISA 间接法测定待测血清抗体的效价。将上述取得的血清用 PBS 稀释成 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600 的滴度梯度作为一抗,以空白血清为阴性对照,HRP 标记羊抗兔二抗。OPD 显色,并于酶标仪 490 nm 检测每孔吸收度(A<sub>490</sub>),比较样本孔与阴性对照孔的 A<sub>490</sub>,若两者比值达到或超过 2.1,则判断该样本抗体呈阳性。

## 2 结果

### 2.1 重组蛋白 rhCNTFm 的表达

经过测序表明,CNTFm 编码序列去除了 C 端 15 个 aa 的编码序列,与预期相符(序列图未显示)。通过 OD 监测,控制诱导时间在细菌的对数生长期。结果显示 42 °C 下培养 4 h,细胞的生长速度明显降低,收获菌体湿重约 20 g/L,破菌溶液经 SDS-PAGE 分析,在分子量标准 20.1 kD 附近有明显的特异条带产生(图 1);rhCNTF 理论分子量为 21.17 kD,可初步确定该特异条带即为目的蛋白,约占细菌总蛋白的 40%,目的蛋白主要位于离心沉淀中,说明蛋白以包含体形式存在。



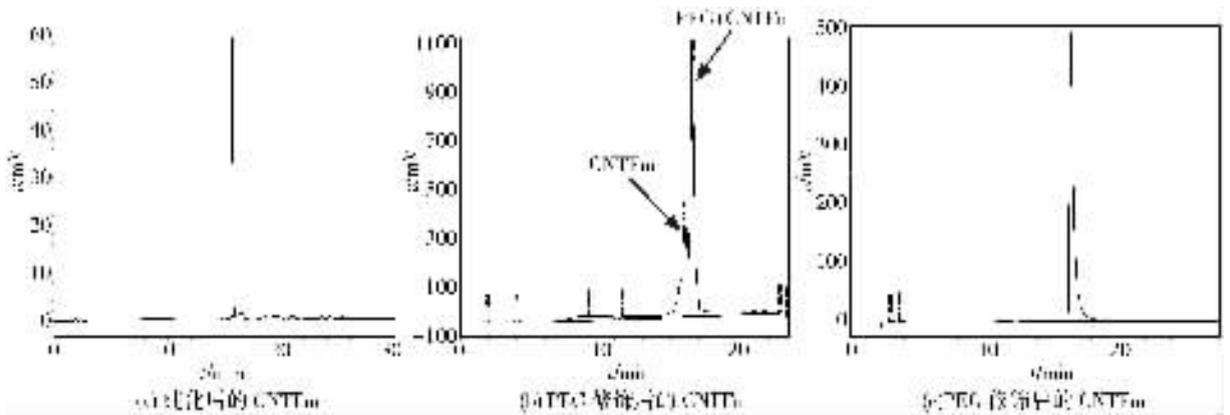


图 2 纯化后的 CNTFm 以及 PEG-CNTFm 的 HPLC 分析

2.4 免疫原性分析

免疫家兔后,每周采血并分离血清,作 Elisa 分析。结果显示,CNTFm 给药动物体内迅速产生抗体,给药后一周血清中抗体滴度达 1:100,第三周抗体滴度最高达到 1:6400;PEG-CNTFm 给药诱导抗体的能力明显下降,给药第二周开始产生可检测出的抗体,最高抗体滴度出现在给药第四周达到 1:800;可见 PEG 修饰可显著降低 CNTFm 的免疫原性,且产生抗体的时间延迟。

表 1 用药后小鼠体重变化

组别	用药 0 d 后的 体重/g	用药 10 d 后的 体重/g	体重减少 率/%
对照	25.31 ± 0.48	34.65 ± 0.57	0.00
CNTFm	24.63 ± 0.97	23.83 ± 0.69	31.23
PEG-CNTFm	24.55 ± 0.83	27.52 ± 0.82	20.58

饮食减肥的疗法相比,CNTF 不会发生停药后过量摄入食物而引起体重反弹,因此有望将 CNTF 开发成一种新型高效的减肥药<sup>[2-3]</sup>。众多药物开发公司的研究已充分证明了 CNTF 的有效性,但其高免疫原性使该药临床应用受阻,因此克服免疫原性是目前面临的巨大挑战。本研究采用了序列突变和化学修饰两种方法,希望在不改变 CNTF 生物活性的前提下,提高 CNTF 的表达量,降低免疫原性。

天然 CNTF 在大肠杆菌中的表达量低,对 CNTF 的结构和功能研究表明,去除 C 端 15 个 aa,其生物活性几乎不受影响,而分子量的降低使得该蛋白在大肠杆菌中更容易获得高表达并降低免疫原性<sup>[7]</sup>。本研究结果表明,经过突变的 CNTF 基因在大肠杆菌中的表达明显提高,可达到 40%,高于应莲芳等报道的表达量<sup>[8]</sup>。在此基础上,建立了经济快捷的纯化工艺,包含体经过低浓度变性剂的两次洗涤,然后复性,复性后的蛋白经过强阴离子交换层析,一次性获得纯度达到 95% 的目的蛋白,回收率在 70% 以上,该工艺满足中试规模的放大生长。

在重组蛋白的研究中,PEG 修饰是一种增加蛋白稳定性,降低免疫原性的有效方法,将该技术应用于 CNTF 还未见报道。本研究采用的 mPEG-SPA 带有活性基团 SPA(即琥珀酰亚胺丙酸酯),可以与蛋白质分子中的氨基发生取代反应进而结合在蛋白质分子上。CNTFm 中有多个带侧链氨基的 Arg 和 Lys,但通过调节 PEG-SPA 和 CNTFm 的比例以及 pH 可以控制每个分子结合 PEG 的个数,实验中采用 3:1 的比例,修饰后分子量的变化推测平均每个 CNTF 只结合一个 PEG 分子<sup>[9]</sup>。修饰后的 CNTFm 保持了 66% 的生物活性,活性降低可能是由于 PEG 是链状高分子聚合物,空间位阻效应遮蔽了蛋白的活性位点,因此降低了其生物活性。但 PEG-CNTFm 相比 CNTFm,在动物体内产生抗体的时间延迟,且

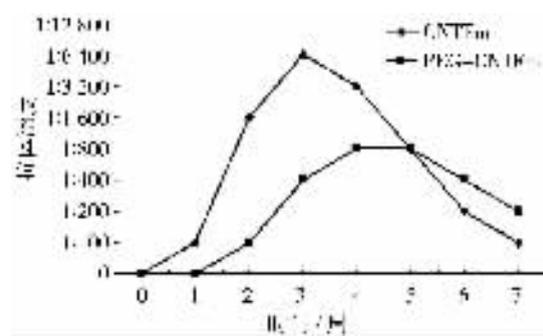


图 3 CNTFm 和 PEG-CNTFm 免疫家兔后的抗体滴度

3 讨论

自从发现 CNTF 具有减轻体重的功能以来,其作用机制也备受关注。目前了解到 CNTF 通过血流到达下丘脑,结合特异性的受体,激活相关的信号转导通路,通过类似瘦素的机制发挥作用。据研究推测,CNTF 可能使丘脑的体重调节点(Weight setpoint)下调,从而抑制食物摄入,与通过严格控制

抗体的最大滴度后者是前者的 8 倍,可见 PEG 对 CNTF<sub>m</sub> 末端修饰 能够有效遮蔽蛋白的部分抗原表位 降低了免疫系统识别<sup>[6]</sup> 这将有利于减少中和抗体的产生,提高 CNTF 的作用时间和稳定性。有关 PEG-CNTF 的药物代谢动力学和生物利用度将开展进一步研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Adler R ,Landa K B ,Manthorpe M ,et al. Cholinergic neurotrophic factors : intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons[ J ]. Science ,1979 ,204( 4400 ) :1434-1436.
- [ 2 ] Vacher C M ,Crepin D ,Aubourg A ,et al. A putative physiological role of hypothalamic CNTF in the control of energy homeostasis[ J ]. FEBS Lett 2008 ,582( 27 ) :3832-3838.
- [ 3 ] Cota D ,Matter E K ,Woods SC ,et al. The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity[ J ]. J Neurosci ,2008 ,28( 28 ) :7202-7208.
- [ 4 ] Lee G K ,Maheshri N ,Kaspar B ,et al. PEG conjugation moderately protects adeno-associated viral vectors against antibody neutralization[ J ]. Biotechnol Bioeng ,2005 ,92 ( 1 ) :24-34.
- [ 5 ] Veronese F M ,Pasut G. PEGylation successful approach to drug delivery[ J ]. Drug Discov Today 2005 ,10( 21 ) :1451-1458.
- [ 6 ] Greenwald R B ,Choe Y H ,Mcguire J ,et al. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates[ J ]. Adv Drug Deliv Rev 2003 ,55( 2 ) :217-250.
- [ 7 ] 张振龙,徐静,郭秀梅,等. 重组人睫状神经营养因子衍生物的构建、表达和活性分析[ J ]. 微生物学免疫学进展 2006 ,34( 4 ) :10-13.
- [ 8 ] 应莲芳,雷清,梁凌宇,等. 重组人睫状神经营养因子突变体的构建、表达及生物活性分析[ J ]. 生物技术 2007 ,17( 4 ) :16-18.
- [ 9 ] Hinds K ,Lewis D ,Schmidt P ,et al. Method for preparation of site-specific protein conjugates[ P ]. European Patent : WO2004091494. 2004-10-28.

## Preparation and PEGylation of Recombinant Human Ciliary Neurotrophic Factor Mutant

HAN Li<sup>1</sup> , CAI Zhi-hua<sup>1</sup> , TAO Hong-mei<sup>1</sup> , WANG Jin<sup>2</sup>

( 1. College of Life Sciences , Chongqing Normal University , Chongqing 400047 ;

2. Chongqing Huanrui Biotechnologies Co. Ltd , Chongqing 400030 , China )

**Abstract :** Human ciliary neurotrophic factor( CNTF ) is a neurotrophic factor( NTF ) not included in NTF family. Recently body weight loss effect of CNTF was discovered in many studies , but clinical application has been limited as immunogenicity. Prepared ciliary neurotrophic factor mutant( CNTF<sub>m</sub> ) with prokaryotic expression and analyzed effect on weight reduction. Chemical synthesis DNA of CNTF<sub>m</sub> , in which polypeptide is truncated 15aa at C-terminus. The DNA is subcloned in temperature and induced vector pBV220 , then the recombinant plasmid is transformed in *E. coli* BL21 and recombination protein expression is induced by culture at 42 °C. The recombination protein is purified with ion exchange chromatography. The normal mice' weight loss tests are used for activity analysis. The expressed level of the CNTF<sub>m</sub> can reach over 40% of the total bacteria protein and exist in a form of inclusion body. After denaturing , refolding and purifying by Q Sepharose-FF , the purity of final product is more than 95% . Activity analysis indicates that the mutant protein obviously reduces body weight of tested mouse , maximal slip of body weight to reach 31. 23% with administration 10 days , but the antibody levels induced by the CNTF<sub>m</sub> are significantly higher. CNTF<sub>m</sub> is modified by methyl polyethylene glycol succinimidyl propionate( mPEG-SPA ). Compared with unmodified CNTF<sub>m</sub> , the pEG-CNTF<sub>m</sub> has 66% biologic activity of unmodified CNTF<sub>m</sub> in vivo , but it has significantly decreased the immunogenicity.

**Key words :** CNTF ; prokaryotic expression ; mutant ; PEGylation ; obesity

( 责任编辑 欧红叶 )