

高比活人睫状神经营养因子突变体基因的构建 及其在巴斯德毕赤酵母中的表达

赵洪亮 薛 冲 熊向华 张 伟 刘志敏*

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 人睫状神经营养因子(hCNTF)及其突变体有望成为治疗肥胖症的新型药物。为了减少 hCNTF 的副反应,提高其疗效,在 hCNTF 四重突变体 AX15(R13K)的基础上引入 S165D/Q166H 突变,构建了高比活的 DH-AX15(R13K)突变体。体外和体内实验表明 DH-AX15(R13K)的活性约是 AX15(R13K)的 5 倍。同时体内实验还发现 DH-AX15(R13K)的作用比 AX15(R13K)更为持久。这种更为持久的作用可能是由于活性提高而非半衰期延长引起的。高比活的 hCNTF 突变体一方面可以在保证疗效的前提下减少蛋白用量,减少副反应;另一方面可以在不增加副反应的前提下增加最大耐受剂量,提高疗效,在临床应用上具有潜在的优势。

关键词 睫状神经营养因子,高比活突变体,巴斯德毕赤酵母

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)03-0392-05

睫状神经营养因子(Ciliary neurotrophic factor, CNTF)最初由于其具有促进鸡胚睫状体神经节副交感神经元的存活而被发现和得名^[1]。最近研究表明 CNTF 可以作为一种天然的 Leptin 类似物(模拟物),从而有效地绕过 Leptin 耐受,在治疗肥胖症上显示出了良好的应用前景^[2]。

但是临床研究发现 CNTF 的副反应较大:在治疗运动性神经元疾病肌萎缩侧索硬化症(ALS)时,高剂量组(30 μ g/kg)中大约有 60% 的病人因不能耐受副反应而必须终止治疗或减少用药剂量^[3]。临床实践证明提高重组蛋白药物的比活性是减少副反应和提高药物耐受性的一种有效手段。以干扰素为例,常人对常规干扰素的最大耐受剂量为 1000 万单位,而对比活为常规干扰素 5~10 倍的复合干扰素的最大耐受剂量可达 3000 万单位。

为了减少 CNTF 的副反应,研究人员采用不同的策略对天然人 CNTF 分子进行了改造,获得了不同的 CNTF 高比活突变体。Panayotatos 等利用大鼠 CNTF 的活性比人 CNTF 高的性质,对人 CNTF 进行了“鼠源化”改造,发现将人 CNTF 的 62 位 Q 替换为大鼠 CNTF 分子相应位置的 R 后比活即可提高 4~5 倍。Regeneron 公司在此基础上用 Ala 替换 16 位的 Cys,并缺失了 C 末端的 15 个氨基酸,发明了 hCNTF

的一个三重突变体 AX15。与天然 hCNTF 相比,AX15 具有更高的生物学活性,更好的稳定性和可溶性^[1]。目前 AX15 已完成肥胖症的 III 期临床实验,并取得了统计学上具有显著性差异的结果^[4]。AX15(R13K)是本实验室构建的 KEX2 蛋白酶抗性的 AX15 突变体^[5]。AX15(R13K)比 AX15 更适合在酵母表达系统中进行表达。Saggio 等利用盒式突变、噬菌体表面展示及受体亲和力筛选等方法发现 S165D/Q166H 突变能使 CNTF 的比活提高 5 倍,并把此高比活的突变体命名为 DH-CNTF^[6]。为了进一步提高 hCNTF 的比活,在 hCNTF 四重突变体 AX15(R13K)的基础上引入 S165D/Q166H 突变,构建了 DH-AX15(R13K)突变体,并对其体外和体内活性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株、细胞株 表达载体 pPIC9-AX15(R13K)由本课题组构建,巴斯德毕赤酵母宿主菌(*Pichia pastoris*)GS115 购自 Invitrogen 公司,大肠杆菌(*Escherichia coli*)TG1 为本室保存。hCNTF 突变体测活细胞 TF-1 由本室保存。

1.1.2 培养基 BMGY 培养基:1%酵母抽提物,2%

基金项目 国家 863 计划(2002AA22345B)

* 通讯作者。Tel 86-10-66948823 E-mail: liuzm@vip.sina.com

作者简介 赵洪亮(1976-)男,浙江东阳人,助理研究员,博士,研究方向为基因工程药物。E-mail: hlzhao@vip.sina.com

收稿日期 2004-09-20,修回日期 2005-01-10

胰蛋白胨, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % 生物素, 1% 甘油, 0.1mol/L pH6.0 磷酸钾缓冲液;BMMY 培养基:1% 酵母抽提物, 2%胰蛋白胨, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % 生物素, 0.5% 甲醇, 0.1mol/L pH6.0 磷酸钾缓冲液;发酵罐基础盐培养基:35% 磷酸 26.7mL, CaSO₄ 0.93g, K₂SO₄ 18.2g, MgSO₄ · 7H₂O 14.9g, KOH 4.13g, 甘油 40g, 定容至 1L;PTM₁ 微量元素:CuSO₄ · 5H₂O 6.0g, NaI 0.08g, MgSO₄ · H₂O 3.0g, 二水合钼酸钠 0.2g, 硼酸 0.02g, CoCl₂ 0.5g, ZnCl₂ 20.0g, FeSO₄ · 7H₂O 65.0g, 生物素 0.2g, 硫酸 5.0mL, 定容至 1L。

1.1.3 主要试剂和仪器:限制性内切酶 *EcoR* I, *Xho* I, *Bgl* II 为 TaKaRa 公司产品; *Taq* DNA 聚合酶购自华美生物工程公司; *pfu* DNA 聚合酶购自上海生工生物工程有限公司;酵母抽提物、蛋白胨购自 Oxiod 公司;酵母基本氮源 YNB 购自 Difco 公司;重组人 CNTF(rhCNTF)及羊抗人 CNTF 多克隆抗体购自 R&D systems 公司;其余试剂为国产或进口分析纯试剂。Prostar 层析仪为 Varian 公司产品; Superdex75 prep grade (26/60)层析柱为 Pharmacia 公司产品; VivaFlow50 超滤膜包(截留分子量为 10kD)购自 Vivascience 公司。

1.1.4 引物:(1) 5'-CCCTCGAGAAAAGAGCTTTCA CAGAGCATTACCGCTGACCCCTCACCGTAAGGAC-3'; (2) 5'-GGGAATTCCTATTACCCAGTCTGATGAGAAG AAATGAAACGAAGGTCATGGATGGACCTTACTGTCCA GTGGTCAAGCTC-3'。

1.2 DH-AX15(R13K)基因克隆和表达载体构建

用引物 1、2 以 AX15(R13K)基因为模板扩增出 DH-AX15(R13K)基因。PCR 反应体系(50μL):AX15(R13K)基因(1pmol/L)1μL, dNTP(10mmol/L each) 1μL, 引物 1 和 2 (30μmol/L)各 2μL, 10× 缓冲液 5μL, *pfu* 酶 5U, ddH₂O 40μL。PCR 反应条件: 94℃ 30s,

60℃ 30s, 72℃ 1min, 30 个循环。PCR 扩增的 DH-AX15(R13K)基因经 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切后克隆至经同样双酶切的 pPIC9 载体中, 构建表达载体 pPIC9/DH-AX15(R13K)。

1.3 酵母宿主菌的转化、表达菌株的筛选及工程菌发酵实验

按 INVITROGEN 公司说明进行。

1.4 DH-AX15(R13K)的纯化

先用超滤膜包把培养上清浓缩 10 倍, 然后用 Superdex75 进行凝胶过滤层析。凝胶过滤所用缓冲液为 PBS, 0.1% Tween80。

1.5 AX15(R13K)的促细胞存活活性测定

利用 TF-1 细胞测定 DH-AX15(R13K)的促细胞存活活性, 具体方法参考文献[6], 但最后不是用³H 掺入法而是用 MTT 检测存活的细胞数量。

1.6 动物实验

10-12 周昆明小鼠用鼠蛋白料饲养至连续 3d 体重恒定后随机分组, 每组 5 只, 分别接受 AX15(R13K)及 DH-AX15(R13K)治疗。各组经皮下注射不同剂量的 AX15(R13K)和 DH-AX15(R13K), 每只小鼠每次注射 0.2mL。每隔 24h 测量小鼠体重及摄食。

2 结果

2.1 DH-AX15(R13K)基因的克隆和序列分析

合成了一条长引物(引物 2)将 AX15(R13K)C 末端第 165 和 166 位氨基酸从 SQ 变为 DH。用引物 1、2 以 AX15(R13K)基因为模板扩增出 DH-AX15(R13K)基因。将 DH-AX15(R13K)基因克隆至 pPIC9 载体中后, 用 5' AOX 引物对表达载体 pPIC9/DH-AX15(R13K)进行 DNA 测序。将 DH-AX15(R13K)的核苷酸序列翻译为氨基酸序列后与天然 hCNTF 进行了序列比较(图 1)。DH-AX15(R13K)共含有 5 处

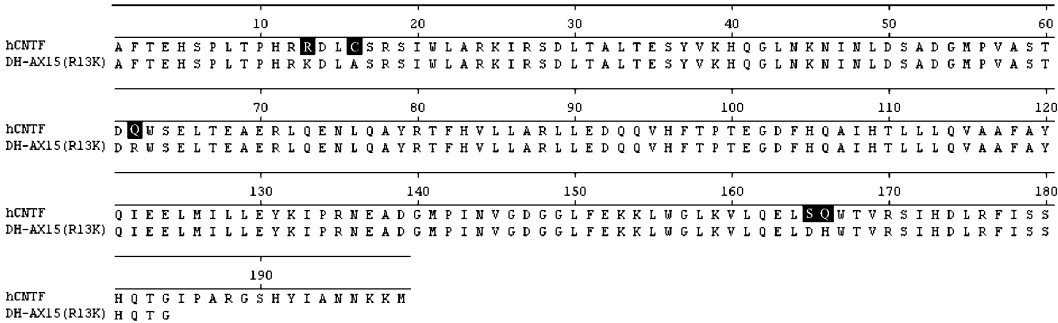


图 1 DH-AX15(R13K)与天然 hCNTF 的序列比较

Fig.1 Sequence alignment of DH-AX15(R13K) and wild type hCNTF

突变 :R13K ,C16A ,Q62R ,S165D/Q166H ,delC15 ,其作用分别是 KEX2 蛋白酶抗性 ,增加稳定性 ,提高活性和增加可溶性。

2.2 DH-AX15(R13K)表达菌株的筛选

表达载体 pPIC9/DH-AX15(R13K)用 *Bgl* II 线性化后 ,经电击转化巴斯德毕赤酵母宿主菌 GS115。随机挑取 3 株转化子在摇瓶中进行了诱导表达实验 ,待诱导至 60h 后取 200 μ L 上清经 TCA 沉淀浓缩后进行 SDS-PAGE ,电泳结果表明(图略) ,3 号转化子在分子量为 20kD 处有明显的表达条带。为了进一步确定该表达条带就是 DH-AX15(R13K)基因的表达产物 ,又进行了 Western blot 验证(图 2)结果表明该分泌蛋白能与抗 hCNTF 多克隆抗体发生免疫反应。

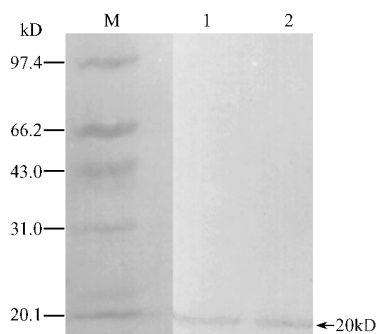


图 2 DH-AX15(R13K)的 Western 印迹分析

Fig.2 Western blot analysis of DH-AX15(R13K)

M. Marker ; 1. AX15(R13K) ; 2. DH-AX15(R13K) .

2.3 AX15(R13K)在 5L 发酵罐上的表达及表达产物的纯化

挑取 3 号转化子接种至 200mL YPD 培养基中 , 30 $^{\circ}$ C 200r/min 培养 24h ,使其 OD_{600} 达到 5 左右 ,然后接种至起始装量为 2.5L 的基础盐培养基的 5L 发酵罐中(在接种以前用氨水将基础盐培养基的 pH 值调至 5.0 ,并加入 11mL PTM₁ 微量元素) 。在温度为 30 $^{\circ}$ C ,pH 值为 5.0 的条件下培养大约 20h 即可观察到溶氧反弹 ,表明基础盐培养基中的甘油已被耗尽。此时以流速 25mL/h 补加 50% 甘油(含 12mL/L PTM₁ 微量元素) ,补加 7h 后 OD_{600} 可达 100 左右 ,此时停止补加甘油 ,以 3mL/h 的流速补加甲醇(含 12mL/L PTM₁ 微量元素) 。补加甲醇 2h 后可观察到溶氧下降 ,表明工程菌的 AOX 启动子已被诱导表达。此后每 2h 使甲醇的流速增加 50% ,直至溶氧下降至 20% 左右 ,并维持此流速直至发酵结束。

取诱导前及不同诱导时间的 20 μ L 上清进行 SDS-PAGE 分析 ,结果见图 3(1 2 3 泳道)。

在发酵罐上由于菌密度的大幅度提高(OD_{600} 可达 200 以上 ,而摇瓶培养时只能达到 20 左右) ,表达量显著增加 ,在诱导 14h 后表达量即达 100mg/L 左右。但是在发酵过程中我们观察到随着诱导时间的延长工程菌的死亡率和表达产物的降解明显增加(结果未显示) 。最近 Laborde 等在毕赤酵母中表达绵羊 Leptin 时也观察到了类似的现象 ,并认为是由于 Leptin 的表达对工程菌的代谢压力(Metabolic stress)使菌体裂解^[7]。Laborde 等通过将发酵过程的 pH 值降为 3.2 来防止降解的发生 ,使表达量达到 402mg/L。但是我们现在在如此低的 pH 值下 DH-AX15(R13K)的表达量只能达到 20mg/L 左右 ,这说明了虽然 CNTF 和 Leptin 具有相似的结构与功能 ,但两者在低 pH 值下的稳定性却有较大差异。为了尽量减少降解 ,我们将诱导时间控制在 14h。发酵实验一方面表明了巴斯德毕赤酵母高表达的潜力 ,另一方面也表明了高密度高表达时发酵过程控制的难度。

由于毕赤酵母在分子量为 20kD 左右的分泌背景蛋白较少 ,用超滤浓缩和凝胶过滤对 DH-AX15(R13K)进行了分离纯化 ,结果见图 3(4 5 泳道)。

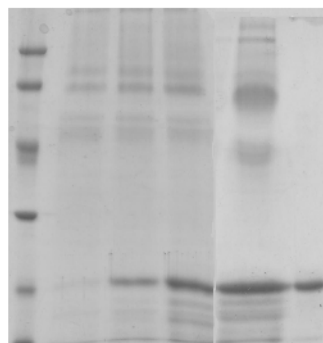


图 3 DH-AX15(R13K)在 5L 发酵罐上的表达及表达产物的纯化

Fig.3 Expression of DH-AX15(R13K) in 5L fermentor and its purification
M. LMW Protein Marker ; 1. Before induction ; 2 and 3. 4h ,14h post-induction ; 4. Concentrated supernatant ; 5. Eluent from Superdex75 gel filtration chromatography .

2.5 DH-促 TF-1 细胞存活活性的测定

在含有 50ng/mL 的 hCNTF 受体胞外区的测活体系中分别测定了 DH-AX15(R13K) 和 AX15(R13K) 的促 TF-1 细胞存活活性 ,结果表明(图 4)DH-AX15(R13K) 的活性在 AX15(R13K) 的基础上又提高了大约 5 倍。

2.6 动物实验

每天注射不同剂量的 DH-AX15(R13K) 和 AX15

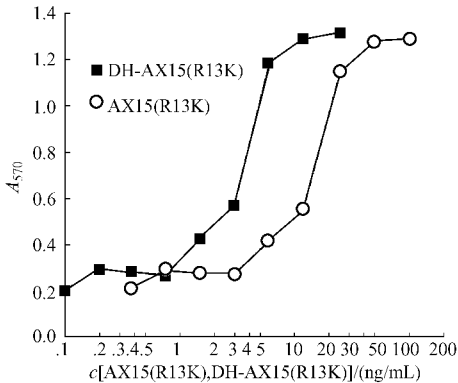
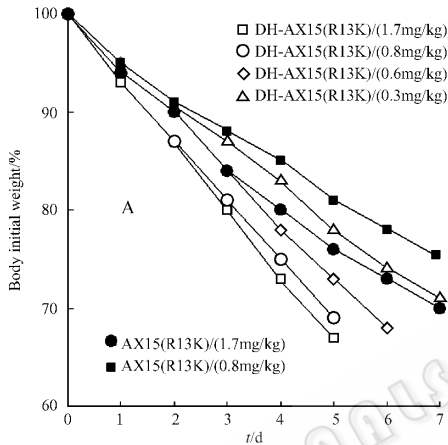


图 4 DH-AX15(R13K)促 TF-1 细胞存活活性的测定
Fig.4 TF-1 cell survival bioassay of DH-AX15(R13K)



(R13K),发现对昆明小鼠的体重有影响(图 5-A)。1.7mg/kg 剂量组的 AX15(R13K)的治疗效果与 0.3mg/kg 剂量组的 DH-AX15(R13K)的治疗效果相近 因此 DH-AX15(R13K)的减肥效果大约是 AX15(R13K)的 5-6 倍。每隔一天注射 DH-AX15(R13K)和 AX15(R13K)治疗效果见图 5-B。接受 1.7mg/kg 的 AX15(R13K)治疗后 ,小鼠体重在 48h 内开始反弹 而接受相同剂量的 DH-AX15(R13K)治疗后 ,小鼠体重在 48h 内保持持续下降。以上结果表明 DH-AX15(R13K)突变体不但具有比 AX15(R13K)更强的减肥作用 ,而且其作用还更持久。

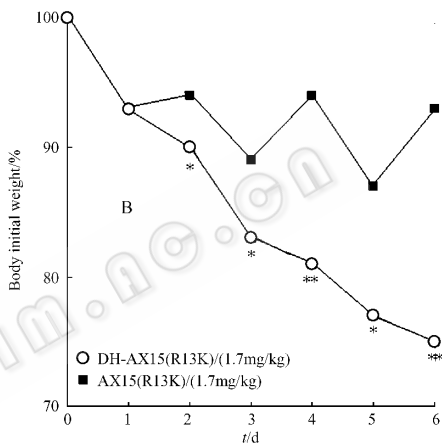


图 5 (A)每天注射不同剂量的 DH-AX15(R13K)和 AX15(R13K)后昆明小鼠体重的变化 ;
(B)隔天注射 DH-AX15(R13K)和 AX15(R13K)后昆明小鼠体重的变化

Fig.5 (A)Effect of daily injection of DH-AX15(R13K)and AX15(R13K) on the body weight of KM mice ;
(B)Effect of every other day injection of DH-AX15(R13K)and AX15(R13K) on the body weight of KM mice
* $P < 0.05$ vs AX15(R13K); * * $P < 0.01$ vs AX15(R13K) .

3 讨论

CNTF 是一个属于 IL-6 家族的具有 4 条螺旋索的细胞因子 ,其受体由 3 个成员组成 ,分别是 CNTFR α gp130 和 LIFR β 。与此相对应 ,CNTF 分子上有 3 个受体结合位点 ,分别是位点 1 ,位点 2 和位点 3。位点 1 由 AB 环的 C-末端及螺旋 D 的 C-末端组成 ,位点 2 由位于 A ,C 螺旋的氨基酸残基组成 ,位点 3 由 A 螺旋的 C-末端 ,AB 环的 N-末端 ,BC 环 ,以及 CD 环的 C-末端和 D 螺旋的 N-末端组成 ,这些位点虽然在一级结构上相隔甚远 ,但都位于螺旋索的同一段^[8]。

Q62R 及 S165D/Q166H 突变分别位于构成位点 1 的 AB 环的 C-末端及螺旋 D 的 C-末端。虽然这两个突变都能提高人 CNTF 对于其特异性的 CNTFR α 受体的亲和力 ,并使其比活提高 5 倍左右 ,两者之间

还是存在细微的差别 :Q62R 能同时提高 CNTFR α 依赖及 CNTFR α 非依赖的活性 ,而且对前者的作用更为明显 ;而 S165D/Q166H 突变仅能提高 CNTFR α 依赖的活性^[9]。两者在性质上的差异提示两者之间在提高 CNTF 活性上可能具有不同的机制。本研究通过体外的细胞水平和实验动物体内实验证明了组合突变体 DH-AX15(R13K)的比活是起始分子之一 AX15(R13K)的 5 倍左右。本研究虽然未对 DH-AX15(R13K)与另一起始分子 DH-CNTF 进行直接的比较 ,但 Gloaguen 等的研究表明 DH-CNTF 的活性与 AX15(R13K)相近 ,都比天然 CNTF 分子提高了 5 倍左右^[10] ,因此 DH-AX15(R13K)的活性比任一起始分子(AX15(R13K)或 DH-CNTF)都高 5 倍左右 ,比天然 hCNTF 分子提高了 20 倍以上。

在本研究中还观察到 DH-AX15(R13K)突变体不但具有比 AX15(R13K)更强的减肥作用 ,而且其

作用还更持久。虽然目前没有药代动力学数据,但通过点突变改变蛋白药物药代动力学性质的可能性不大。因此这种更为持久的作用不是由于半衰期的延长造成的,而是由于 DH-AX1 Δ (R13K)具有更高的比活,在较低的血药浓度下仍然可以发挥生物学活性,因此相对地延长了有效作用时间,从而使其疗效更为持久。

高比活的 hCNTF 突变体一方面可以在保证疗效的前提下减少蛋白用量,减少副反应;另一方面可以在不增加副反应的前提下增加最大耐受剂量,提高疗效,在临床应用上具有潜在的优势。

参 考 文 献

- [1] Sleeman M W , Anderson K D , Lambert P D , *et al.* The ciliary neurotrophic factor and its receptor , CNTFR α . *Pharma Acta Helv* , 2000 **74** :265 – 272.
- [2] Lambert P D , Anderson K D , Sleeman M W , *et al.* Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat , without cachexia or rebound weight gain , even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2001 **98** (8) :4652 – 4657.
- [3] Miller R G , Petajan J H , Bryan W W , *et al.* A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic factor (rhCNTF) in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol* , 1996 **39** :256 – 260.
- [4] Ettinger M P , Littlejohn T W , Schwartz S H , *et al.* Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults. *JAMA* , 2003 **289** (14) :1826 – 1832.
- [5] 赵洪亮 ,薛 冲 ,熊向华 ,等.蛋白酶抗性人睫状神经营养因子突变体基因的构建及其在巴斯德毕赤酵母中的表达. *生物工程学报* , 2004 **20** (3) :394 – 397.
- [6] Saggio I , Gloaguen I , Poiana G , *et al.* CNTF variants with increased biological potency and receptor selectivity defined a function site of receptor interaction. *The EMBO J* , 1995 **14** (13) :3045 – 3054.
- [7] Laborde C , Chemardin P , Bigey F , *et al.* Overexpression of ovine leptin in *Pichia pastoris* : physiological yeast response to leptin production and characterization of the recombinant hormone. *Yeast* , 2004 **21** :249 – 263.
- [8] Butte M J. Neurotrophic factor structures reveals clues to evolution , binding , specificity , and receptor activation. *Cell Mol Life Sci* , 2001 **58** :1003 – 1013.
- [9] Panayotatos N , Radziejewska E , Acheson A , *et al.* Localization of functional receptor epitope on the structure of ciliary neurotrophic factor indicates a conserved , function-related epitope topography among helical cytokines. *J Biol Chem* , 1995 **270** (23) :14007 – 14014.
- [10] Gloaguen I , Costa P , Demartis A , *et al.* Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1997 **94** :6456 – 6461.

Construction of superagonist mutein of human CNTF and its expression in *Pichia pastoris*

ZHAO Hong-liang XUE Chong XIONG Xiang-hua ZHANG Wei LIU Zhi-min*

(Beijing Institute of Biotechnology , Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100071 , China)

Abstract : Human ciliary neurotrophic factor (hCNTF) and its derivatives are promising therapeutics for obesity associated with diabetes. To reduce its side effects and increase its efficacy , superagonist mutein of human CNTF was constructed by the introduction of S165D/Q166H mutation into AX1 Δ (R13K) , which is a mutein of naturally occurring hCNTF , with improved biological activity , stability , solubility and KEX2 resistance. *In vitro* TF-1 cell survival assay and *in vivo* anti-obesity tests showed DH-AX Δ (R13K) was about 5 fold more potent than AX1 Δ (R13K). It was further demonstrated that the anti-obesity effect of DH-AX1 Δ (R13K) was more durable than that of AX1 Δ (R13K). The more durable effects of DH-AX1 Δ (R13K) is ascribed to its higher specific activity , but not to its prolonged half-life. The superagonist mutein of human CNTF would have an improved side effect profile and thus have superior therapeutic potential.

Key words : Superagonist mutein , Ciliary neurotrophic factor , *Pichia pastoris*

Foundation item : National Programs for High Technology Research and Development of China (2002AA2Z345B)

* Corresponding author. Tel 86-10-66948823 ;E-mail :liuzm@vip.sina.com

Received date 09-20-2003