

使用中空纤维膜反应器进行蛋白质连续高选择性单 PEG 修饰

简介

PEG 修饰通过将聚乙二醇 (PEG) 偶联到蛋白质, 从而增加蛋白药物的治疗效力, 其作用主要体现在: 1. 通过增加水力学尺寸, 延长体内半衰期; 2. 降低给药频率, 提高患者舒适性; 3. 以无免疫原性 PEG “遮蔽” 抗原位点, 降低药物免疫原性; 4. 亲水性 PEG 成分稳定 PEG 修饰蛋白, 降低蛋白质聚集。目前已有数种治疗性 PEG 修饰蛋白药物获得 FDA 批准。

PEG 修饰过程通常使用均相反应器批处理进行, 常规的偶联模式是将 PEG 偶联到蛋白质赖氨酸残基的 ϵ -氨基基团上, 但一个蛋白质中一般有多个 ϵ -氨基基团, 且由于反应物、产物及副产物的共存, 反应液中会混合存在多种不同程度 PEG 修饰的蛋白质, 包括单、双、三及多 PEG 修饰蛋白质及其同分异构体。从稳定治疗活性及产物精确鉴定方面来讲, 需要的产物为特定位点单个 PEG 分子修饰的蛋白质, 而由于不同 PEG 修饰蛋白的理化性质十分相似, 所以从混合液中纯化单 PEG 修饰蛋白相当困难。随着对新型 PEG 修饰蛋白药物质量要求的严格化, 蛋白质 PEG 修饰过程的选择性要求日益提高。

对于提高 PEG 修饰过程选择性的关注大多集中于位点特异性的新反应技术, 包括 N-端 PEG 修饰、半胱氨酸 PEG 修饰、组氨酸亲和标签及谷氨酸的 PEG 修饰等, 但这些方法都无法避免多 PEG 修饰蛋白的形成。另一类方法是通过“物理”途径来提高 PEG 修饰过程的选择性, 包括体积排阻反应色谱及固相(“在柱”) PEG 修饰, 前者将反应物以不同的脉冲注入色谱柱, 各反应物及产物因尺寸差异而被“隔开”, 且以不同时间洗脱; 后者将反应物先后注入固定床, 先注入反应物固定在吸附物上, 再与后注入反应物反应, 然后以特定洗脱方式获得高纯度产物, 两种方法均可提高反应的选择性, 但都局限于小规模批量处理, 不适于规模放大和工业化生产。

本文旨在介绍一种提高蛋白质单 PEG 修饰选择性和程度的新技术, 其原理可解释如下: 多数 PEG 试剂都是“单功能性”的, 即一个 PEG 分子只能偶联到一个蛋白质分子, 而一个蛋白质分子具有多个结合位点, 从而偶联多个 PEG。所以, 当反应混合物中的 PEG 含量高于蛋白质含量时, 虽然蛋白质的 PEG 修饰程度会提高, 但多 PEG 修饰蛋白副产物的合成也会提高; 而当蛋白质过量时, 单 PEG 修饰的选择性会提高 (选择性定义为转化为单 PEG 修饰蛋白质在所有形式 PEG 修饰蛋白质中的比例), 但蛋白质修饰转化率降低 (转化率定义为转化为任一 PEG 修饰形式的蛋白质的量), 即造成蛋白质浪费。在传统批量反应中, 如采用补料分批模式, 该情况可有所缓解; 但本实验决定测试一种新型的管状反应器, 即蛋白质在管状通道内流动, 而 PEG 轴向分散添加 (图 1)。如果限制 PEG 的添加量, 且保证蛋白质过量, 则可有效提高单 PEG 修饰蛋白合成的选择性, 并抑制多 PEG 修饰形式的合成, 此外, 蛋白质和 PEG 的添加模式会在管道内形成径向物质浓度梯度, 进一步提高选择性。与传统等量液相批量反应模式相比, 该模式的单 PEG 修饰选择性和程度均可显著提升。

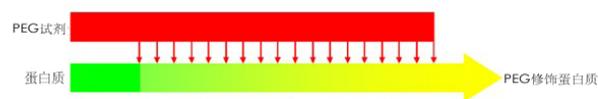


图 1. 在管状反应器内, 通过在蛋白质溶液轴线分散添加 PEG 试剂, 以增加单 PEG 修饰选择性的模式图。

基于以上理论, 实验使用中空纤维膜反应器 (HMR), 其原理如图 2 所示。蛋白质溶液从一端泵入纤维内腔, PEG 试剂注入壳腔 (纤维外腔), 沿纤维散状分布。PEG 修饰蛋白合成后, 与未反应蛋白和 PEG 一起, 从出口流出。实验模式蛋白为溶菌酶 (MW 14,100; pI 11), PEG 为甲氧基-PEG-(CH₂)₅COO-NHS (5kD PEG 等量)。偶联过程基于酰化作用形成酰胺键, 即蛋白质置换 NHS 基团。

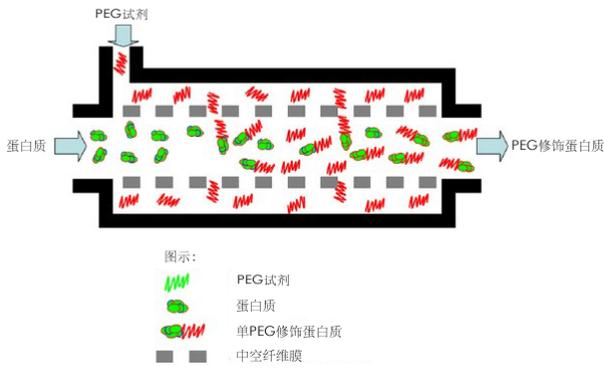


图 2. 使用中空纤维膜反应器进行蛋白质 PEG 修饰的模式图。

实验

HMR 使用 MicroKros 中空纤维膜组件, 产品编号 X15S-300-04N, 聚砜材质, MWCO 50kD, 纤维数量 6 根, 纤维长度 20cm, 纤维内径 0.5mm, 有效膜表面积 20cm²。膜 MWCO 选择 50kD, 可允许 5kD 的 PEG 自由通过。所有 PEG 修饰反应在室温下进行, 反应 pH 为 8.0。

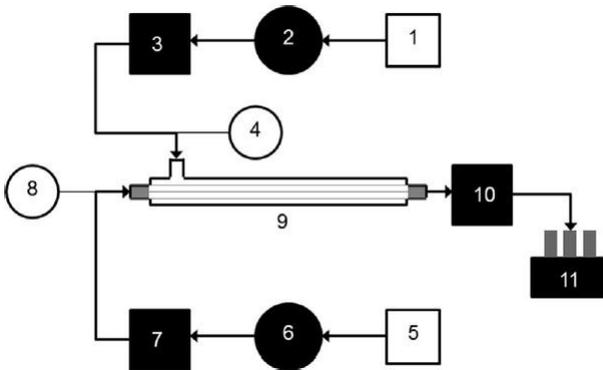


图 3. 中空纤维膜反应器实验设置: 1) PEG 试剂容器, 2) 泵, 3) 流量计, 4) 压力传感器, 5) 蛋白质容器, 6) 泵, 7) 流量计, 8) 压力传感器, 9) 中空纤维组件, 10) UV 检测器, 11) 样品采集器。

实验使用了批次液相 PEG 修饰反应作为对照, 并测试了不同 PEG: 溶菌酶摩尔比对反应结果的影响。使用 HMR 系统进行溶菌酶 PEG 修饰的过程采用连续模式进行 (图 3), 同时打开两个泵, 将蛋白质和 PEG 试剂以恒定流速分别泵入纤维内腔和壳腔, 起始反应, 产物从出口流出, 经 UV 检测器后, 收集样品并经 SDS-PAGE 分析。

讨论

批量液相 PEG 修饰反应通常使用过量的 PEG 试剂, 以提高蛋白质 PEG 修饰程度, 但往往导致副产物合成增加; 而当蛋白质过量时, 虽然单 PEG 合成的选择性提高了, 修饰转化率却显著降低。结果显示, 在批量液相模式中 (PEG: 蛋白质摩尔比为 4), 单 PEG 修饰蛋白质合成较快 (15min 以内转化率 0.364, 选择性 0.583), 但随反应时间延长, 多 PEG 修饰蛋白质逐渐形成, 单 PEG 修饰蛋白转化率和选择性均下降。而如提高蛋白质含量, 单 PEG 修饰蛋白质合成选择性提高, 但转化率显著下降; 如提高 PEG 含量, 则转化率提高, 选择性下降, 增加后期纯化难度。

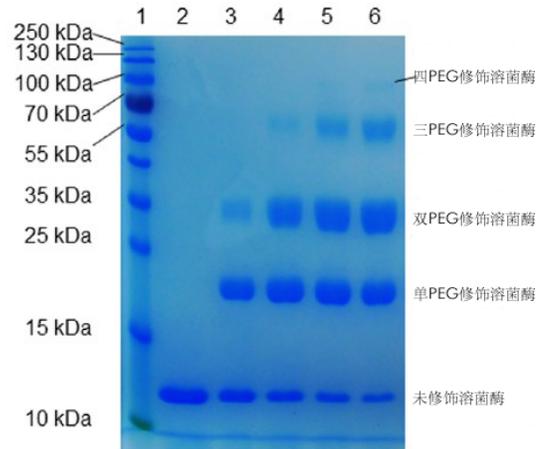


图 4. 批量液相反应法制备产物 SDS-PAGE 图, PEG: 溶菌酶摩尔比为 4, 可见单 PEG 修饰的选择性较低。

实验测试了 HMR 模式的不同操作条件, 如不同 PEG: 蛋白质摩尔比、反应 (滞留) 时间等。在均质液相批量反应器中, 反应器内不同部位的反应物及产物浓度不会有显著差异, 而在 HMR 中, 由于设备构造 (管状) 和操作模式 (分散添加) 的原因, 会形成反应物/产物浓度梯度, 所以反应器内溶菌酶浓度应表示为总表观浓度 (C_{app}):

$$C_{app} = C_{lys} \left(\frac{Q_{lys}}{Q_{lys} + Q_{PEG}} \right)$$

(1), PEG: 溶菌酶摩尔比应表示为总表观摩尔比

$$(R_{app}): R_{app} = \left(\frac{C_{PEG} Q_{PEG}}{C_{lys} Q_{lys}} \right) \quad (2)$$

定义 HMR 系统的滞留时间也相对困难, 因出口净流速 (溶菌酶及 PEG 流速之和) 高于入口流速 (溶菌酶流速)。中空纤维内腔的入口压力高于出口压力, 而壳腔 (纤维外腔)

内的压力相对均一,所以中空纤维不同部位的跨膜压会有变化,导致 PEG 在纤维不同部位的渗透性不同,由于这种渗透性的不均一性, HMR 系统的滞留时间

应以其对数平均值表示 (τ_{lm}): $\tau_{lm} = \frac{(\tau_i - \tau_0)}{\ln(\tau_i/\tau_0)}$ (3)。

图 5 所示为 HMR 实验样品的 SDS-PAGE 图,可见单 PEG 修饰蛋白质的转化率和选择性均显著优化,且选择性系数接近 1,即无多 PEG 修饰蛋白质合成。

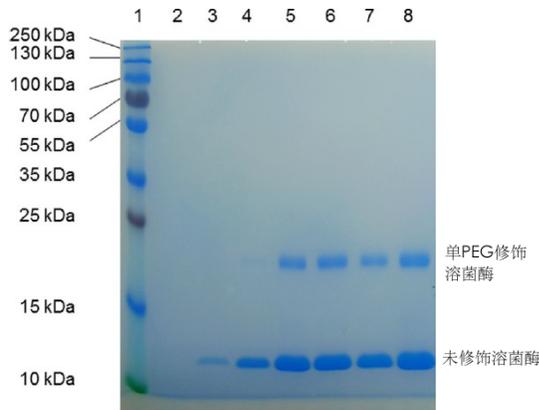


图 5. 中空纤维膜反应器法制备产物 SDS-PAGE 图, R_{app} 为 0.65, τ_{lm} 为 13.7min, 可见单 PEG 修饰选择性较高。

实验结果说明, PEG 试剂沿中空纤维膜分散添加了单 PEG 修饰的程度和选择性。溶菌酶、PEG 试剂及 PEG 修饰溶菌酶在单根中空纤维内的分布如图 6 所示,中空纤维内反应物和产物的轴向和径向浓度梯度均有利于提高单 PEG 修饰的程度和选择性。由于 PEG 穿过膜进入膜内腔,其在纤维内壁边缘流动区域的浓度最高;而溶菌酶在中轴线附近浓度最高,膜内腔液流以“层流”模式流动,故反应物与产物的传输主要以扩散方式进行,溶菌酶径向向外扩散,PEG

轴向向内扩散,两者在某位点相遇并反应,单 PEG 修饰蛋白质合成后再从该区域向两个方向扩散。但如上所述,由于流动模式为层流,反应区与中轴线之间的液体流速高于反应区与纤维壁之间的流速,所以单 PEG 修饰蛋白更多地倾向于“向内”扩散流动,该过程将单 PEG 修饰蛋白带离反应区,从而提高反应的选择性,进而提高转化率。

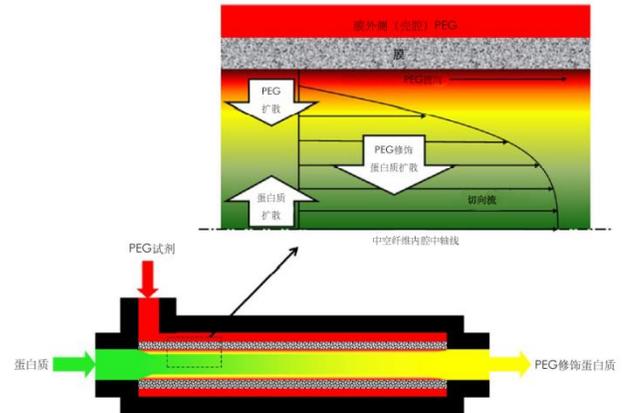


图 6. HMR 系统内反应物与产物的轴向及径向浓度梯度分布。

由讨论可知,使用 HMR 进行蛋白质 PEG 修饰相比批次反应釜处理,具有明显优势,不仅单 PEG 修饰的选择性和程度明显提高,还可以连续模式进行操作,且规模放大更简单,即更适于工业化生产。HMR 系统也可用于其他需要控制选择性的化学偶联反应。

文献来源:

Shang X., Ghosh, R., Membrane reactor for continuous and selective protein mono-PEGylation. Journal of Membrane Science, 2014, 451:177-184.