温度响应性高分子偶联干扰素-α有效提高抗肿瘤功效*

刘欣宇 胡 瑾 郭建文 王贵林 高卫平**

(清华大学医学院 北京 100084)

摘 要利用定点原位生长技术,合成了一种温度响应性的干扰素-聚(2-甲基-2-丙烯酸-2-(2-甲氧基乙氧基) 乙酯)偶联物(IFN-PDEGMA). 当温度低于22 ℃时,IFN-PDEGMA处于溶解状态;当温度高于22 ℃时, IFN-PDEGMA则会发生聚集.由于小鼠体温高于22 ℃,因此,将IFN-PDEGMA原位注射到小鼠肿瘤组织处 之后,它会在肿瘤组织处聚集驻留.体外实验结果显示,IFN-PDEGMA有效保持了干扰素的结构和活性;动 物实验结果显示,相比于原药IFN-a,非温敏性IFN-POEGMA、商业化的长效干扰素PEGASYS以及 IFN-PDEGMA可以更好地聚集驻留在肿瘤处,荷黑色素瘤小鼠的生存时间得以显著延长,分子量为10 kDa、 30 kDa、60 kDa、100 kDa的IFN-PDEGMA所治疗的小鼠,其生存时间分别为36.5、31、29.5、28天,其中, 10 kDa和30 kDa的IFN-PDEGMA的治疗效果均要优于PEGASYS.同时,生物安全性实验显示IFN-PDEGMA 对正常组织器官不存在显著的毒副作用.

关键词 干扰素,蛋白质-高分子偶联物,原子转移自由基聚合,药物递送,温度响应

蛋白药物由于其特异强、活性高、生物相容 性好的特点,目前已被广泛应用于癌症等重大疾 病的治疗,但也因为其较差的稳定性、短的循环 时间以及免疫原性的问题,其在临床上的进一步 发展受到制约^[1,2].

重组人干扰素α (interferon-α, IFN-α)是一种 非常重要的药用蛋白,目前在各种病毒性疾病, 诸如乙型肝炎、丙型肝炎、生殖器疣等,以及癌 症治疗上,诸如白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、肾 癌、卡波西肉瘤等,都表现出了优异的治疗效果^[3]. 然而,IFN-α是一个分子量约20 kDa的外源蛋白, 在体内容易被肾脏排出,或者被体内免疫系统清 除和降解,循环半衰期只有4~8 h,这限制了其 药效在体内的充分发挥.通过频繁注射高浓度药 物(每日1次或每周3次)有可能实现治疗效果,而 这又会导致严重毒副作用和耐药性的产生^[4].

目前针对IFN-α循环半衰期短的问题,主要 有2种解决方法,一种是聚乙二醇化(PEG化)^[5], 即用聚乙二醇修饰IFN-α的赖氨酸或半胱氨酸残 基(特定情况下也可能是组氨酸残基);另一种方 法是将IFN-α与长半衰期的人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)基因融合表达IFN-HSA融合 蛋白,这种方法通常被称为HSA融合 (albufusion)^[6].第1种方法的主要应用是先灵葆 雅公司的佩乐能和罗氏公司的派罗欣^[7,8],这2个 产品分别将IFN的半衰期延长至35和77 h.但这 种方法由于非特异性修饰而极大降低了药物活 性,并且存在反应效率低、难以分离和纯化的缺 点^[9-11].通过Albufusion策略获得的IFN-HSA虽 然比PEG化的IFN-α具有更长的半衰期(144 h)^[12], 但是其需要真核表达系统导致成本增加,而且其 生物活性仅保留IFN本身的1%^[13],在临床治疗上 并没有展现更好的治疗效果.

因此,开发一种既能更好地保留IFN活性又 能提高其体内半衰期的方法,就显得尤为重要. 在之前的研究中,本课题组利用类弹性蛋白多肽 融合(ELPfusion)和定点原位生长(site-specific *in situ* growth, SIG)的方法,分别合成了IFN-ELP^[14]、 IFN-POEGMA^[15]和IFN-PMPC^[16]等偶联物,将 IFN-a的体内半衰期分别延长到了8.6、53.3和 51.6 h,并且其治疗效果在不同程度上均优于 IFN-a. 但在这些研究中,均通过静脉注射的方式

^{*} 聚氨基酸专辑; 2017-07-21收稿, 2017-08-16修稿; 国家自然科学基金(基金号 21534006)资助项目.

^{**} 通讯联系人, E-mail: gaoweiping@tsinghua.edu.cn

doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2018.17195

91

对荷瘤小鼠进行治疗,药物分子尚不能完全作用 于肿瘤组织.如何进一步提高药物分子在肿瘤组 织的富集,将是改善治疗效果同时降低毒副作用 的关键.

利用响应性聚合物修饰蛋白是赋予蛋白质 新的功能的有效手段[17~20],而聚(2-甲基-2-丙烯 酸-2-(2-甲氧基乙氧基)乙酯) (poly(di(ethylene glycol) methyl ether methacrylate), PDEGMA)是 一种具有温度响应性的类PEG聚合物,由于其良 好的生物相容性和相转变温度可调性, 被认为是 替代聚N-异丙基丙烯酰胺(poly(N-isopropylacrylamide), PNIPAM)的新型温敏性高分子^[21~23], 并已被用于蛋白的修饰[24,25],但是尚鲜见用于药 用蛋白的位点特异性修饰.因此,本文设计一种 温度响应性的位点特异性干扰素-聚(2-甲基-2-丙 烯酸-2-(2-甲氧基乙氧基)乙酯)偶联物(IFN-PDEGMA). 这种新型偶联物通过瘤内注射的方 法注射到小鼠肿瘤处时,可以在小鼠正常体温 (37℃)下发生聚集,从而实现药物分子在肿瘤组 织处的有效驻留和缓慢释放,在提高药效的同时 减少药物对其他正常组织的毒副作用.

本文利用定点原位生长技术设计并合成了 从IFN-α碳-末端生长的化学计量比为1:1的 IFN-PDEGMA偶联物.如图1所示,这种温度响 应性的偶联物在低温(低于22 ℃)时处于溶解状 态,在高温(高于22 ℃)时会发生聚集,因此通过 原位注射的方法可以有效提高药物分子在肿瘤 组织处的聚集和缓慢释放,发挥药效.进一步地, 通过调整单体和蛋白引发剂的比例获得了一系 列不同分子量的IFN-PDEGMA,并对其理化性 质、体外抗细胞增殖活性,体内抗肿瘤疗效和生 物安全性进行表征.

1 实验部分

1.1 主要原料

本实验所用到的所有生物化学试剂(包括二 水 合氯 化铜 (CuCl₂·2H₂O),氯 化亚铜 (CuCl), 1,1,4,7,10,10-六甲基三亚乙基四胺(HMTETA),2-甲基-2-丙烯酸-2-(2-甲氧基乙氧基)乙酯 (DEGMA),三羟甲基氨基甲烷(tris),考马斯蓝 G-250,磷酸盐缓冲液(PBS))均购于Sigma-Aldrich 公司或百灵威公司.派罗欣(PEGASYS)购于上海 罗氏制药有限公司.所有细胞培养试剂和培养基 均购于Gibco或Hyclone公司.实验中所需要的人 类伯基利B淋巴瘤细胞(Daudi B细胞)和人黑色素 瘤细胞(A375细胞)来自于中国医学科学院的细 胞 库.雌性 Balb/c-nu裸鼠购于 Vital River Laboratories (北京,中国),并且饲养在清华大学 实验动物中心.

1.2 IFN-PDEGMA偶联物的合成与纯化

本文所用的IFN-α, IFN-Br引发剂以及IFN-POEGMA根据之前的文献[15]合成.利用原子转 移自由基聚合(ATRP)制备IFN-PDEGMA偶联物 的过程如下:在4 mL含有50 µmol/L IFN-Br的PBS 溶液中分别加入300、500、1000、2000 µmol DEGMA单体,反应体系通氮气15 min后,加入 溶有5 µmol CuCl, 15 µmol CuCl₂,和25 µmol 1,1,4,7,10,10-六甲基三亚乙基四胺的2 mL已除氧 水溶液.整个聚合反应在氮气保护下于冰水浴中 反应1.5 h,最后通入空气中止反应.产物通过脱 盐柱和阴离子交换柱进行分离纯化,除去小分子 铜盐和未反应的IFN-Br引发剂和DEGMA单体,



Fig. 1 Scheme of temperature responsive property of IFN-PDEGMA

得到纯净的IFN-PDEGMA偶联物,保存在 10 mmol/L PBS (pH = 7.4)溶液中并分装后置于 -80 ℃冰箱备用.

1.3 IFN-PDEGMA偶联物的物理化学性质表征 1.3.1 IFN-PDEGMA偶联物的凝胶电泳表征

十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)分析样品由含有5%β-巯基乙醇的 Laemmli样品缓冲液配制,95℃下加热5 min后, 10 μL样品装载到预制的Tris·HCl凝胶(10%)中, 垂直电泳90 V电压下运行90 min. 凝胶用考马斯 蓝G-250染色处理后观察条带位置.

1.3.2 IFN-PDEGMA偶联物分子量的测定

IFN-PDEGMA的分子量和多分散性(dispersity) 用凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)测定,所用仪器为Waters GPC系统连接紫外 检测器(Waters 2489,检测波长280 nm). 色谱柱为 Asahipak GS-530 HQ,流动相为50 mmol/L Tris·HCl缓冲液(pH = 7.4),检测条件为15℃,流 速0.5 mL/min. 不同分子量的窄分布PEG标准样 生成的标准曲线用来计算分子量和多分散性. 1.3.3 IFN-PDEGMA偶联物水合半径的测定

使用Malvern公司的Zetasizer Nano-zs90动态 光散射(dynamic light scattering, DLS)纳米粒度仪 测定样品的水合半径.其中,测定温度为20℃,激 光波长为633 nm,散射角为90°.样品分析前需用 Millipore公司的0.22 µm水系滤膜进行过滤.

1.3.4 IFN-PDEGMA偶联物二级结构的测定

将样品用水溶液稀释至0.15 mg/mL,使用 Applied Photophysics公司的Pistar π -180型圆二色 谱仪器,扫描波长范围200~260 nm.

1.3.5 IFN-PDEGMA偶联物相转变温度的测定

将样品分别稀释至2、1、0.2、0.1和0.02 mg/mL,使用纳米粒度仪测定样品在激光波长为 633 nm、散射角为90°时粒径随温度变化的情况. 其中,测定温度为15~30 ℃,温度间隔为1℃, 测定样品在不同温度下的粒径大小并作图,确定 样品的相转变温度.

1.4 体外活性测试

使用Promega公司的细胞增殖测定试剂盒对 细胞增殖活性进行表征.在含有15% FBS、1%青 霉素和1%链霉素的RMPI-1640中培养Daudi B细 胞,至对数生长期,在96孔板中接种50 μL (10⁴ 个细胞/孔)细胞,用新配制的培养基将IFN、IFN-POEGMA、PEGASYS和分子量分别为10 kDa、 30 kDa、60 kDa、100 kDa的IFN-PDEGMA样品 系列稀释至4,10,20,40,100,200,1.0×10³, 2.0×10³,2.0×10⁴,2.0×10⁵ pg/mL,之后各取 50 μL加入96孔培养板中,设阴性对照(不含IFN-*a*) 和空白对照(只含培养液).所有样品在37 ℃、5% CO₂环境中孵育96 h后,加入20 μL MTS试剂,于 37 ℃孵育4 h后,测定490 nm处的吸光值.

1.5 体内实验

本研究中使用的所有动物方案均获得了清 华大学动物护理和使用委员会的批准.

1.5.1 体内药效学评价

利用Balb/c-nude小鼠,于背部皮下注射10⁶ 个A375细胞,构建皮下移植黑色素瘤模型,待肿 瘤大小达到20 mm³左右时,将小鼠随机分成8组 (每组6~8只小鼠).每周1次原位注射生理盐水、 IFN-α、PEGASYS、IFN-POEGMA和分子量分别 为10 kDa、30 kDa、60 kDa、100 kDa的IFN-PDEGMA,注射剂量为1 mg/kg,直到对照组小 鼠(生理盐水、IFN-α组)全部死亡.1周测量体重和 肿瘤大小2次,肿瘤体积计算公式为:体积 = (宽度 × 宽度 × 长度)/2.如果肿瘤大小超过 1000 mm³或体重减轻超过其初始体重的15%,则 对小鼠实施安乐死.

1.5.2 体内生物安全性评价

在分别接受生理盐水、IFN-α、PEGASYS、 IFN-POEGMA和分子量分别为10 kDa、30 kDa、 60 kDa、100 kDa的IFN-PDEGMA治疗3次后(第20 天)对小鼠实施安乐死,收集包括肿瘤、心脏、肝 和肾,并用4%的中性多聚甲醛固定.石蜡包埋 后,切成5 µm厚的切片,根据标准方法进行H&E 染色, Nikon Eclipse 90成像. 在分别接受生理盐 水、IFN-a、PEGASYS、IFN-POEGMA和分子量 分别为10 kDa、30 kDa、60 kDa、100 kDa的 IFN-PDEGMA治疗6次(第41天)后,采集小鼠血 样,分析全血液学参数(白细胞(WBC)、红细胞 (RBC)、血小板(PLT)数目和血红蛋白(HGB))和血 清临床生物化学指标(乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激 酶同工酶(CK-MB)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙 氨酸氨基转移酶(ALT)、肌酸酐(CRE)、尿素氮 (BUN)).

2 结果与讨论

2.1 IFN-PDEGMA偶联物的合成

通过已发表的文献[15]所报道的转肽酶A介导的蛋白质连接技术,合成大分子引发剂 IFN-Br,随后在PBS溶液中进行ATRP聚合.反应中止 后,通过脱盐柱将ATRP反应液中铜离子、配体 以及未反应的单体除去.利用SDS-PAGE凝胶电 泳分析反应液的组成.如图2所示,IFN-Br对应的 条带在聚合后明显变淡,与此同时,在高分子量 区域出现了典型的聚合物弥散条带.通过阴离子 交换柱纯化后,可以得到纯净的IFN-PDEGMA. 这表明,利用ATRP可以在IFN-Br上成功生长出 PDEGMA,并且反应产率较高,同时易于纯化.



Fig. 2 SDS-PAGE analysis of ATRP of DEGMA from IFN-Br: lane 1, IFN-Br; lane 2, ATRP mixture (10 kDa); lane 3, ATRP mixture (30 kDa); lane 4, ATRP mixture (60 kDa); lane 5, ATRP mixture (100 kDa); lane 6, marker; lane 7, purified IFN-PDEGMA 10 kDa; lane 8, purified IFN-PDEGMA 30 kDa; lane 9, purified IFN-PDEGMA 60 kDa; lane 10, purified IFN-PDEGMA 100 kDa

2.2 IFN-PDEGMA偶联物的物理化学性质表征

2.2.1 IFN-PDEGMA偶联物的分子量表征

通过凝胶渗透色谱(GPC)对偶联物的分子量 进行了表征.如图3所示,通过使用PEG标准品生 成标准曲线计算IFN-PDEGMA的分子量,4种大 小的IFN-PDEGMA偶联物的分子量参数总结于 表1中.根据分子量不同,将4种IFN-PDEGMA 偶联物分别命名为IFN-PDEGMA 10 kDa、IFN-PDEGMA30 kDa、IFN-PDEGMA 60 kDa、IFN-PDEGMA 100 kDa.

2.2.2 IFN-PDEGMA偶联物水合半径表征

利用动态光散射(DLS)对偶联物的粒径进行 了表征. 如图4所示,在20℃,IFN-α的水合半径 为2.8 nm, 10 kDa、30 kDa、60 kDa、100 kDa IFN-PDEGMA的水合半径分别为7.1、9.1、11.6和13.2 nm. 由此可见,随着IFN-PDEGMA偶联物分子量 的增大,其水合半径也随之增大.



Fig. 3 GPC trace of IFN- α and IFN-PDEGMA conjugates with UV detection at 280 nm

 Table 1
 Parameters of IFN-PDEGMA conjugates

Sample	$M_{ m n}$ $^{ m a} imes 10^{-3}$	Dispersity (D)
IFN-PDEGMA 10 kDa	10.1	1.35
IFN-PDEGMA 30 kDa	31.2	1.31
IFN-PDEGMA 60 kDa	63.3	1.45
IFN-PDEGMA 100 kDa	98.5	1.39

^a Number-average molecular weight



Fig. 4 DLS analysis of IFN- α and IFN-PDEGMA conjugates, where R_h represents hydrodynamic radius

2.2.3 IFN-PDEGMA偶联物二级结构表征

通过圆二色谱对IFN-PDEGMA偶联物二级 结构进行了表征.如图5所示,当温度低于 PDEGMA的相变温度(20 ℃)时,不同分子量的 IFN-PDEGMA的二级结构与IFN-α十分类似,这 表明连接在IFN-α上的PDEGMA对IFN-α二级结 构无明显影响.但当温度高于其相变温度(38 ℃) 时,不同分子量的IFN-PDEGMA的二级结构相对 于 IFN-α有了明显的改变,这是因为IFN-PDEGMA会在高温下发生聚集,从而引起其二级 结构的变化.

93

2.2.4 IFN-PDEGMA偶联物相变温度的测定

通过动态光散射(DLS)对IFN-PDEGMA偶联 物的相变温度进行表征.如图6所示,同一分子量 的IFN-PDEGMA偶联物,其相变温度随浓度的降 低而略有升高,而同一浓度的IFN-PDEGMA偶联 物,其相变温度随偶联物分子量的增加也略有降 低,但是总体均保持在21~24 ℃之间.

2.3 IFN-PDEGMA偶联物的体外活性

IFN-α是一种非常重要的细胞因子,在抗病毒、 抗肿瘤细胞增殖和免疫调节等方面表现尤为突 出.我们使用Daudi B细胞评估IFN-PDEGMA的 体外抗肿瘤细胞增殖活性^[3].如图7所示,IFN- PDEGMA偶联物的细胞活性相对于IFN-α本身有 所降低,并且呈现出随分子量增大而减小的趋势. 当PDEGMA的分子量分别为10 kDa, 30 kDa, 60 kDa, 100 kDa时,其活性分别为18.31% (IC₅₀ = 78.70 pg/mL)、11.75% (IC₅₀ = 122.6 pg/mL)、4.77% (IC₅₀ = 301.8 pg/mL)、2.36% (IC₅₀ = 610.3 pg/mL).这可 能是由于PDEGMA的空间位阻,一定程度上干扰 了IFN与Daudi B细胞的作用位点,并且PDEGMA 的空间位阻效应与其分子量呈正相关.尽管如 此,IFN-PDEGMA 10 kDa, IFN-PDEGMA 30 kDa 的活性依然优于商业化的PEGASYS(活性为





Fig. 5 CD traces of IFN- α and IFN-PDEGMA conjugates (a) below and (b) above the phase transition temperature



Fig. 6 Hydrodynamic radius was monitored during heating to determine phase transition behaviour of (a) IFN-PDEGMA 10 kDa, (b) IFN-PDEGMA 30 kDa, (c) IFN-PDEGMA 60 kDa and (d) IFN-PDEGMA 100 kDa



Fig. 7 Antiproliferative activity of IFN-PDEGMA Statistical significance was calculated by Student's t-test: ***P < 0.001, **P < 0.01.

IFN-a的碳-末端合成IFN-PDEGMA偶联物的体外 生物活性与非特异性PEG化修饰的PEGASYS相 比,仍具有一定的优势.

2.4 体内药效学评价和生物安全性评价

本文进一步评价了不同分子量的IFN-PDEGMA在荷人黑色素瘤小鼠体内的抗肿瘤效 果. 如图8所示,分别用10kDa、30kDa、60kDa、 100 kDa IFN-PDEGMA治疗小鼠24天后,其平均 肿瘤大小分别为505.3、711.2、856.2、982.8 mm³, 治疗效果优于生理盐水(1324 mm³)和IFN-α (1219 mm³), 且与PEGASYS (740.3 mm³)和IFN-POEGMA (663.3 mm³)相当. 小鼠的生存曲线也 显示,用生理盐水治疗的小鼠生存中值为21天; 而用IFN-α治疗的小鼠生存中值略微增加至24 天; PEGASYS和IFN-POEGMA均具有很好的治 疗效果,将小鼠生存时间进一步延长至29.5天; 与此同时,分子量分别为10 kDa、30 kDa、60 kDa、 100 kDa的IFN-PDEGMA所治疗的小鼠,其生存 中值分别为36.5、31、29.5、28天, 其中, 10 kDa 和30 kDa的IFN-PDEGMA的治疗效果均要优于 IFN-POEGMA和商业化的PEGASYS.

IFN-PDEGMA在抗癌功效方面的优越性可 通过肿瘤组织H&E染色进一步证实.如图9(a)所 示,注射生理盐水的小鼠的肿瘤细胞结构典型, 形态完整,实质多间质少;IFN-α治疗的小鼠的 肿瘤显示出轻微空泡化和细胞破裂,表明存在部 分肿瘤细胞凋亡.而PEGASYS,IFN-POEGMA 和不同分子量的IFN-PDEGMA治疗小鼠的肿瘤 细胞出现更多的空泡和间质,引起更多肿瘤细胞 的凋亡.其中,10 kDa的IFN-PDEGMA的治疗效 果最显著,从图中可以看出,其胞浆和细胞核形态不明显,细胞坏死,大块细胞膜脱落,与对照 组差异明显.

实验结果表明,与生理盐水相比,IFN-α几 乎不能有效抑制肿瘤生长,而各组干扰素-高分子 偶联物均能够不同程度上抑制肿瘤生长.这说明 高分子修饰能够有效提高干扰素在体内的作用 时间,从而提高药效.并且,与非温度响应性的 PEGASYS和IFN-POEGMA相比,温度响应性的 IFN-PDEGMA (10 kDa和30 kDa)展现更优异的治



Fig. 8 In vivo antitumor activity of IFN-PDEGMA The animals were acquired by intratumoral injection once a week at a dose of 1 mg/kg IFN- α , 1 mg/kg IFN equivalent of conjugates or saline until the mice of control groups (saline and IFN- α groups) were all sacrificed. (a) Inhibition of tumor growth (P < 0.01 for IFN-PDEGMA 10 kDa, IFN-PDEGMA 30 kDa and IFN-POEGMA versus IFN- α ; P < 0.05 for IFN-PDEGMA 60 kDa and PEGASYS versus IFN- α ; P < 0.05 for IFN-PDEGMA 10 kDa versus PEGASYS, statistical significance was calculated by Student's t-test). (b) Cumulative survival of mice (n = 6 - 8) (P < 0.01 for IFN-PDEGMA 10 kDa versus IFN- α ; P < 0.05 for IFN-PDEGMA 30 kDa, 60 kDa, IFN-POEGMA and PEGASYS versus IFN- α ; P < 0.05 for IFN-PDEGMA 10 kDa and 30 kDa versus IFN-POEGMA and PEGASYS, statistical significance was calculated by the log-rank test)



Fig. 10 Hematological parameters for mouse 56 day-post administration

(a, b) WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; PLT, platelets; HGB, hemoglobin. Clinical biochemistry parameters for mouse 56 day-post administration. (c, d, e) Heart function markers: LDH, lactate dehydrogenase; CK-MB, creatine kinase isoenzymes. Kidney function markers: CRE, creatinine; BUN, blood urea nitrogen. Liver function markers: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase. Statistical significance was calculated by Student's t-test: NS, not significant

疗效果,说明通过温度响应性能够使药物在肿瘤 部位聚集驻留从而提高药效,而非温度响应性的 偶联物则会很快扩散离开肿瘤部位.此外,随着 PDEGMA分子量的减少,IFN-PDEGMA偶联物 的抗肿瘤效果逐渐增强,这可能有三方面原因: 一是因为PDEGMA分子量越小,IFN-PDEGMA 生物活性越高;二是因为随着PDEGMA分子量的 减少,IFN-PDEGMA聚集之后高分子链间缠结程 度降低,释放效果更好,能够在肿瘤附近长时间 维持较高水平的血药浓度;三是分子量越小的偶 联物在肿瘤中的组织渗透性也更好.

最后,本文通过在治疗期间监测小鼠的体重、 组织形态学、临床生物化学参数和血液学指标变 化评估IFN-PDEGMA的体内生物安全性. IFN-α、 PEGASYS、IFN-POEGMA或IFN-PDEGMA处理 的小鼠没有观察到小鼠体重明显减轻(数据未展 示),表明它们在该剂量下可耐受.如图9(b)~9(d) 所示,治疗3周后,各小组小鼠主要组织,例如 心脏, 肝脏和肾脏细胞形态完整, 无明显细胞坏 死,与对照组形态学不存在明显差异,表明这些 药物治疗不会对主要组织产生组织学上显著性 的损伤. 如图10所示,治疗6周后小鼠的临床生化 重要指标包括乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工 酶(CK-MB)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸氨 基转移酶(ALT)、肌酸酐(CRE)、尿素氮(BUN), 血液学指标包括白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、 血小板(PLT)数目和血红蛋白(HGB)浓度均与对

照组无明显差异,这表明IFN-PDEGMA在治疗过程中比较安全,不存在明显的系统性毒性.

3 结论

本研究通过定点原位生长技术合成具有温度响应性的蛋白质-高分子偶联物IFN-PDEGMA, 表征了它的物理化学性质、抗细胞增殖活性、体 内抗肿瘤活性及生物安全性,同时系统地研究了 PDEGMA的分子量对IFN-PDEGMA偶联物体外 和体内性质影响规律.以上研究获得一些初步的 结论:(1)IFN-PDEGMA能够有效保留IFN的二级 结构,且其分子量对IFN-PDEGMA的相转变温度 无明显影响;(2)增加PDEGMA分子量会降低IFN 的生物活性,并进一步影响药物蛋白的治疗效 果,其中10 kDa和30 kDa IFN-PDEGMA具有最佳 的治疗效果;(3) IFN-PDEGMA具有最佳 的治疗效果;(3) IFN-PDEGMA具有最佳 的治疗效果;(3) IFN-PDEGMA具有温度响应性, 通过瘤内注射可以在肿瘤处实现有效聚集和驻 留,从而达到比商业化的长效干扰素PEGASYS 更优异的疗效.

本研究采用定点原位生长技术制备温度响 应性的蛋白质-高分子偶联物,通过原位给药的方 式实现增强药效,降低毒副作用,为疾病治疗提 供新的思路.利用该技术在药用蛋白表面原位生 长多功能高分子,实现偶联物功能多样化,有望 应用于恶性肿瘤,糖尿病,心脑血管疾病,病毒 性感染等重大疾病的治疗,具有巨大的开发潜力 和广泛的应用前景.

REFERENCES

- 1 Leader B, Baca Q J, Golan D E. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7: 21 39
- 2 Walsh G. Nat Biotechnol, 2010, 28: 917 924
- 3 Pfeffer L M, Dinarello C A, Herberman R B, Williams B R G, Borden E C, Bordens R, Walter M R, Nagabhushan T L, Trotta P P, Pestka S. Cancer Res, 1998, 58: 2489 – 2499
- 4 Wills R J. Clin Pharmacokinet, 1990, 19: 390 399
- 5 Roberts M J, Bentley M D, Harris J M. Adv Drug Deliver Rev, 2002, 54: 459 476
- 6 Subramanian G M, Fiscella M, Lamouse A, Zeuzem S, McHutchison J G. Nat Biotechnol, 2007, 25: 1411 1419
- 7 Zeuzem S, Feinman S V, Rasenack J, Heathcote E J, Lai M Y,Gane E, O'Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A, Hoffman J, Brunda M J. New Engl J Med, 2000, 343: 1666 – 1672
- 8 Heathcote E J, Shiffman M L, Cooksley M G E, Dusheiko G M, Lee S S, Balart L, Reindollar R, Reddy R K, Wright T L, Lin A, Hoffman J, Pamphilis J. New Engl J Med, 2000, 343: 1673 – 1680
- 9 Veronese F M. Biomaterials, 2001, 22: 405 417
- 10 Foser S, Schacher A, Weyer K A, Brugger D, Dietel E, Marti S, Schreitmuller T. Protein Expres Purif, 2003, 30: 78 87
- 11 Wang Y S, Youngster S, Grace M, Bausch J, Bordens R, Wyss D F. Adv Drug Deliver Rev, 2002, 54: 547 570
- 12 Zeuzein S, Yoshida E M, Benhamou Y, Pianko S, Bain V G, Shouval D, Flisiak R, Rehak V, Grigorescu M, Kaita K, Cronin P W, Pulkstenis E, Subramanian G M, McHutchison J G. Hepatology, 2008, 48: 407 417

- 13 Huang Y S, Chen Z, Yang Z Y, Wang T Y, Zhou L, Wu J B, Zhou L F. Eur J Pharm Biopharm, 2007, 67: 301 308
- 14 Hu J, Wang G, Liu X, Gao W. Adv Mater, 2015, 27: 7320 7324
- 15 Hu J, Wang G, Zhao W, Liu X, Zhang L, Gao W. Biomaterials, 2016, 96: 84 92
- 16 Hu J, Wang G, Zhao W, Gao W. J Control Release, 2016, 237: 71 77
- 17 De P, Li M, Gondi S R. J Am Chem Soc, 2008, 130: 11288 11289
- 18 Chilkoti A, Chen G, Stayton P S, Hoffman A S. Bioconjug Chem, 1994, 5: 504 507
- 19 Hoffman A S, Stayton P S. Prog Polym Sci, 2007, 32: 922 932
- 20 Liu X, Gao W. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9: 2023 2028
- 21 Lutz J F, Hoth A. Macromolecules, 2006, 39: 893 896
- 22 Lutz J F, Akdemir Ö, Hoth A. J Am Chem Soc, 2006, 128: 13046 13047
- 23 Guo Yi(郭奕), Liu Hengjiang(刘恒江), Chen Jieqiong(陈洁琼), Shang Yazhuo(尚亚卓), Liu Honglai(刘洪来). Acta Phys-Chim Sin(物理化学学报), 2015, (31): 1914 – 1923
- 24 Zarafshani Z, Obata T, Lutz J F. Biomacromolecules, 2010, 11: 2130 2135
- 25 Fang Qisheng(方奇生), Chen Tao(陈涛), You Qiushi(游秋实), Yu Danni(余丹妮), Wang Jiping(王际平). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2016, (5): 637 – 644

Temperature-responsive Polymer Conjugation of Interferon-α Enhances Antitumor Efficacy

Xin-yu Liu, Jin Hu, Jian-wen Guo, Gui-lin Wang, Wei-ping Gao* (School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract Interferon- α (IFN) has a short circulating half-life, which not only leads to limited clinical efficacy, but also causes severe side effects and poor patient compliance. Previously, we developed ELPfusion and site-specific in situ growth (SIG) methods to prolong the half-life of IFN, while the adopted intravenous administration still could not well concentrate IFN inside tumour tissues. In order to enhance the tumour accumulation and antitumour efficacy of IFN, in this study, we report intratumoural administration of temperature responsive interferon-poly(di(ethylene glycol) methyl ether methacrylate) conjugates (IFN-PDEGMA). First, we employed SIG method to synthesize a series of temperature responsive IFN-PDEGMAs with different molecular weights (10 kDa, 30 kDa, 60 kDa and 100 kDa). The preparation process was monitored by SDS-PAGE, and the molecular weights, hydrodynamic radius and secondary structures of conjugates were characterized by GPC, DLS and CD (circular dichroism), respectively. The phase transition temperatures were determined to be around 22 °C. Thus, IFN-PDEGMA were soluble below 22 °C; and they became insoluble above 22 °C. Since the body temperature of mice is above 22 °C, IFN-PDEGMA injected into the tumour tissue of mice aggregated locally and became a drug depot in the tumour. In vitro characterization demonstrated that the structure and anti-proliferative activity of IFN were well remained for IFN-PDEGMA. In vivo experiments showed that the survival time of A375 melanoma-bearing mice were well extended by IFN-PDEGMA treatment compared with IFN- α . To be specific, the survival times of mice treated by IFN-PDEGMA of 10 kDa, 30 kDa, 60 kDa and 100 kDa were 36.5, 31, 29.5 and 28 days, respectively. IFN-PDEGMA of 10 kDa and 30 kDa both exhibited better anti-melanoma efficacy than commercial long-acting interferon, PEGASYS. Meanwhile, the biological safety experiments also showed that IFN-PDEGMA treatment did not have obvious side effects on normal tissues. In summary, we, for the first time, reported intratumoural administration of temperature responsive IFN-PDEGMA and studied the rule about how the molecular weight impacts on their properties in vitro and in vivo. This study not merely displayed an instance of temperature responsive protein-polymer conjugates and their anti-tumour efficacy, but also provided inspiration to further build a series of smart protein-polymer conjugates and seek for their potential applications in the diagnosis and treatment of major diseases such as cancer, virosis, diabetes and cardiovascular disease.

Keywords Interferon, Protein-polymer conjugate, Atom transfer radical polymerization, Drug delivery, Temperature responsiveness

^{*} Corresponding author: Wei-ping Gao, E-mail: gaoweiping@tsinghua.edu.cn