重组人粒细胞集落刺激因子的可溶性表达与纯化工艺研究

黄 昊[1]，王亚鹏[1,2]，冯俊武[1]，路建光[3]，冯 军[1*]

（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 复旦大学药学院，上海 201203；3. 上海多米瑞生物技术有限公司，上海 201203）

摘要：重组人粒细胞集落刺激因子（**1**）在临床上主要用于辅助治疗恶性肿瘤患者因放疗、化疗引起的中性粒细胞减少症。**1**在大肠埃希菌中表达时，主要以无活性的包涵体形式沉积在细胞中，而包涵体变性、复性收率低的问题制约了整体制备工艺的收率。该研究采用小分子泛素相关修饰物蛋白与**1**融合表达技术，实现了**1**的胞内可溶性表达，表达量为2.19 g/L。经提取、酶切、澄清的预处理工艺，阴离子交换色谱、阳离子交换色谱和硫酸铵沉淀的纯化工艺，获得了纯度为99.3%的**1**，整体工艺收率为44.2%。经HPLC保留时间对比、质谱、肽图、二硫键定位、体外生物活性检测等手段证明自制**1**的结构和功能正确。最后，采用50 L规模的工艺放大试验证明该工艺具有工业化生产的可行性。该研究为**1**的工业生产和后续结构改造奠定了基础。

关键词：重组人粒细胞集落刺激因子；融合表达；可溶性表达；纯化

中图分类号：Q816；R973^{+}.4　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)09-1155-10

引用：黄 昊，王亚鹏，冯俊武，等. 重组人粒细胞集落刺激因子的可溶性表达与纯化工艺研究[J]. 中国医药工业杂志，2025, **56**(9): 1155-1164. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.09.006

Investigation on Soluble Expression and Purification Process of Recombinant Human Granulocyte Colony-stimulating Factor

HUANG Hao[1], WANG Yapeng[1,2], FENG Junwu[1], LU Jianguang[3], FENG Jun[1*]

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Fudan University, Shanghai 201203; 3. Shanghai Duomirui Biotech Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor(**1**) is clinically used to treat neutropenia caused by chemotherapy or radiotherapy in cancer patients. When expressed in *Escherichia coli*, **1** predominantly accumulates as inactive inclusion bodies. So, the low yield of inclusion body denaturation and refolding limits the overall process yield. In this study, soluble expression of **1** was achieved by employing a fusion expression strategy with the small ubiquitin-related modifier protein, with an expression level of 2.19 g/L. Further steps including extraction, enzymatic cleavage, clarification, anion exchange chromatography, cation exchange chromatography, and ammonium sulfate precipitation yielded **1** with a purity of 99.3% and a recovery rate of 44.2% . The structure and function of the self-produced **1** were confirmed through HPLC retention time comparison, mass spectrometry, peptide mapping, disulfide bond localization, and *in vitro* biological activity assays. Finally, a 50 L scale-up test demonstrated the feasibility of industrial-scale manufacturing for this process. This study provides a robust foundation for the industrialization and subsequent structural optimization of **1**.

Key Words: recombinant human granulocyte-colony stimulating factor; fusion expression; soluble expression; purification

粒细胞集落刺激因子（granulocyte-colony stimulating factor，G-CSF）是一种内源性造血生长因子，可诱导粒系造血祖细胞增殖分化为中性粒细胞，并增加成熟中性粒细胞的存活率和活性。采用大肠埃希菌（*Escherichia coli*）表达的重组人粒细胞集落刺激因子（recombinant human granulocyte-colony stimulating factor，rhG-CSF，**1**），保持了与天然G-CSF

收稿日期：2025-03-03

作者简介：黄 昊，硕士研究生，专业方向：微生物与生化药学。

通信作者：冯 军，博士，研究员，从事药物创新与产业化开发。

一致的体内外生物活性[1]。目前，**1** 已在国内外获批上市[2]，主要用于化疗和造血干细胞移植的辅助治疗[3]。

1 含 2 对二硫键（C36—C42 和 C64—C74）和 1 个游离半胱氨酸（C17）[4]。二硫键结构对 **1** 的活性至关重要，是 **1** 重组表达制备工艺中的关键因素[5]。然而，*E. coli* 胞内的还原环境不利于二硫键的形成，且 **1** 溶解度不佳，直接表达 **1** 时易形成无生物活性的包涵体[6]，必须经过变性和复性的工艺步骤才能获得具有生物活性的 **1**[7]。而变性和复性工艺的复杂性会降低产品的制备效率和收率。

与形成包涵体相比，可溶性表达的蛋白更接近其天然活性状态，从而能避免生产过程中复杂的变性和复性步骤，显著提高产量和活性，降低时间和经济成本[8]。研究[9]表明，**1** 在 *E. coli* 周质空间中可溶，但表达量较低，发酵终产量仅有 110 mg/L。小分子泛素相关修饰物蛋白（small ubiquitin-related modifier protein，SUMO）标签具有促进蛋白在 *E. coli* 胞内正确折叠、提高融合蛋白溶解性、抑制蛋白降解，以及提高融合蛋白稳定性的功能，而且可被泛素样蛋白酶（ubiquitin-like protease 1，ULP1）高效切除，所以在多肽和蛋白质表达研究中的应用广泛[10]。采用 ULP1 切除 SUMO 标签后，**1** 的 N 端不含甲硫氨酸残基，与天然 G-CSF 更接近[11]。然而，可溶性表达的蛋白与胞内杂质经均质后会共同释放到发酵液中，导致后处理困难。因此，本研究重点开发 **1** 的下游纯化工艺，解决可溶性蛋白与胞内杂质混合导致的纯化难题，为 **1** 和同类产品的工业化生产提供新的工艺选择。

1　仪器与试药

5BG-900 型 5 L 机械搅拌发酵罐（上海保兴生物设备工程有限公司）；SCG-100 型蛋白纯化系统（苏州赛普仪器有限公司）；Powerpac Basic 型垂直电泳仪（美国 Bio-Rad 有限公司）；ZHWY-2112B 型振荡培养箱（上海知楚仪器有限公司）；Avanti J-25 型离心机、Microfuge 20R 型离心机（美国 Beckman 公司）；Alliance e2695-2489 型高效液相色谱仪、ACQUITY UPLC 系统、QDa 质谱检测器、Xevo G2-XS QTof 型高分辨质谱仪均购自美国 Waters 公司；Vanquish 型液相色谱仪、Orbitrap HF-X 型质谱仪均购自美国 Thermo Fisher 公司；SpectraMax i3x 型多功能酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）。

1 注射液［齐鲁制药有限公司，商品名为瑞白®，规格 6.0×10^6 IU（100 μg）：0.6 mL，批号 202401001KBQ］；15 % SDS-PAGE 快速制备试剂盒、双色预染蛋白质 Marker（M，相对分子质量 10 000 ～ 250 000）均购于上海雅酶生物医药科技有限公司；RPMI-1640 培养基、胎牛血清、青霉素 - 链霉素溶液均购于美国 Thermo Fisher 公司；细胞增殖试剂（瑞士 Roche 公司）；ULP1 由本实验室自制；V8 酶［生工生物工程（上海）股份有限公司］；0.22 μm 水系微孔滤膜（天津市津腾实验设备有限公司）；再生纤维素滤膜（德国 Merck 公司，截留分子量 10 000）；其他试剂购于国药集团化学试剂有限公司。

SUMO-rhG-CSF 由生工生物工程（上海）股份有限公司合成并测序；*E. coli* DMR753 工程菌株由本实验室构建保存；小鼠髓性白血病淋巴细胞（NFS-60 细胞株）购于武汉普诺赛生命科技有限公司。

2　方法与结果

2.1　培养基与分析方法

微量元素母液：七水硫酸亚铁 67.2 g/L，七水硫酸锌 20.0 g/L，四水氯化锰 24.4 g/L，五水硫酸铜 7.5 g/L，六水氯化钴 1.8 g/L；用 2.5 mol/L 浓盐酸溶解后定容，于 4 ℃冷藏保存。

高细胞密度发酵（high cell density fermentation，HCDF）*培养基*：甘油 30 g/L，二水合枸橼酸钠 5.9 g/L，硫酸铵 5.2 g/L，十二水合磷酸氢二钠 8.6 g/L，二水合磷酸二氢钠 4.4 g/L，氯化钾 4.0 g/L，无水硫酸镁 1.0 g/L，无水氯化钙 0.25 g/L；再加入上述微量元素母液 3 mL，用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 7.0；121 ℃灭菌 30 min。

以 15 % SDS-PAGE 分析鉴定所得蛋白，纯度采用 HPLC 法测定。

色谱条件：色谱柱 ACE C_4 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；*流动相* A 为体积分数 0.05 % 的 TFA 水溶液，B 为体积分数 0.05 % 的 TFA 乙腈溶液，梯度洗脱程序如表 1 所示；*流速* 1 mL/min；*检测波长* 215 nm；*柱温* 50 ℃；*进样量* 10 μL。

使用上市制剂作为外标，计算所得 **1**（HPLC 纯度大于 99.5 %）的质量浓度。以 2 倍质量浓度梯度稀释 **1**

表 1 梯度洗脱程序

Tab.1 Gradient Elution Procedure

t/min	A/%	B/%
0	80.0	20.0
5	80.0	20.0
13	50.0	50.0
21	30.0	70.0
29	24.0	76.0
32	80.0	20.0

的上市制剂，以峰面积（*A*）为横坐标、质量浓度（*c*）为纵坐标绘制标准曲线。结果显示，**1** 质量浓度为 0.10 ～ 2.08 mg/mL 时与峰面积线性关系良好，所得回归方程为 $c=8\times10^{-8}A+0.018\ 4$，$R^2=0.999\ 5$（$n=5$）。方法学验证结果显示，该方法专属性、精密度、准确度和稳定性均符合要求，可按此回归方程计算自制 **1** 的质量浓度。

2.2 高细胞密度发酵

将活化后的工程菌株按体积分数为 3%的接种量接种于 HCDF 培养基 3 L 中，补料为已灭菌的体积分数为 75%的甘油溶液。在 37 ℃、pH 7.0 的条件下培养至光密度（$OD_{600\ nm}$）值为 60 ～ 70 时，加入终浓度为 0.2 mmol/L 的异丙基 -*β*-D- 硫代半乳糖苷进行诱导，分别于 0、2、4、6 h 时取样备用。6 h 后结束诱导发酵，离心（6 500×*g*）15 min，收集沉淀的菌体。

2.3 活性 1 的获得与澄清

2.3.1 提取与酶切

将上述菌体按体积比 1 ∶ 10 用缓冲液［含 25 mmol/L 三（羟甲基）氨基甲烷（Tris）和 5 mmol/L EDTA，pH 8.0］重悬，在 80 ～ 90 MPa 高压下均质 3 次，释放融合蛋白。均质液中加入终酶活为 6 IU/L 的 ULP1，在 30 ℃水浴中搅拌 30 min，酶切 SUMO 标签，释放 **1**。

用纯水 5 倍稀释“**2.2**”项下收集的菌体，取 10 μL；另取上述所得的均质液和酶切后的 **1** 悬液各 10 μL，分别进行 15% SDS-PAGE 检测。与未诱导发酵的对应样品相比，诱导 2 h 后在相对分子质量 30 000 附近出现蛋白条带（图 1），经酶切后该条带消失，并出现 SUMO 标签和 **1** 的电泳条带。

按“**2.1**”项下色谱条件进行 HPLC 分析。均质液与酶切液的分析结果与电泳结果相一致（图 2），由此判断该蛋白为目的融合蛋白。上述结果说明工程菌的发酵实现了 **1** 的胞内可溶性表达，酶切后 **1** 的表达量为 2.19 g/L。另外，由图 2 可见，酶切产物的保留时间介于氧化型和还原型 **1** 之间，提示该产物为二硫键未完全配对的中间体，所以需要继续开发二硫键配对的工艺。

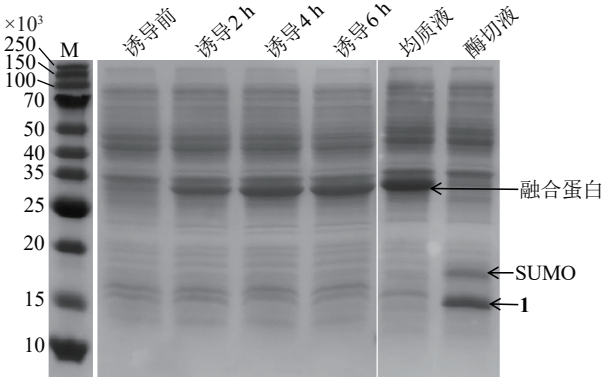


图 1 HCDF 样品的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.1 SDS-PAGE Analysis Results of HCDF Samples

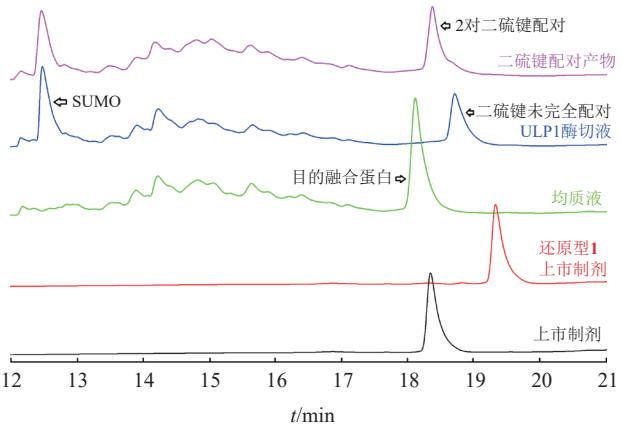


图 2 活性 1 的 HPLC 分析

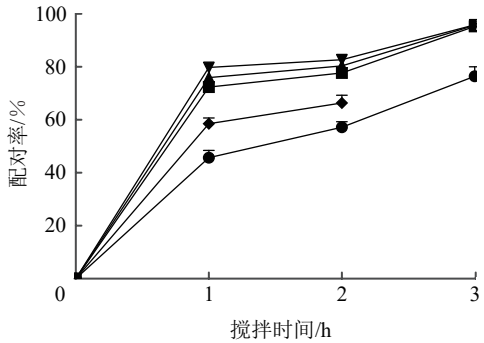
Fig. 2 HPLC Analysis of the Active **1**

2.3.2 二硫键配对

pH 中性及碱性环境更利于二硫键的形成[12]。因此，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液将酶切液调至 pH 8.0 ～ 10.0，考察不同 pH 值对二硫键配对的影响。将配对后 **1** 峰的峰面积与 0 h 时峰面积的比值作为配对率。结果显示，搅拌 3 h 后，在 pH 8.5、9.0 和 9.5 的溶液中，

1 的配对率均大于 95.0%（图 3），而蛋白在 pH 10.0 的溶液中会发生沉淀。据报道[13—14]，高 pH 值会导致蛋白的天冬酰胺残基脱酰胺；而脱酰胺过程会造成蛋白疏水性和电性的变化，进而影响蛋白的自缔合和聚集。这一机制或可解释上述现象。

选择 pH 8.5 的条件，尝试稀释样品质量浓度以缩短配对时间。结果显示，加入等体积纯化水搅拌 1 h 的配对率为 (87.6±1.2) %，搅拌 2 h 可达到 (96.2±0.8) %，产物的 HPLC 保留时间 (18.4 min) 与上市制剂一致（图 2），因此二硫键的配对工艺选择该条件。



●—pH 8.0；■—pH 8.5；▲—pH 9.0；▼—pH 9.5；◆—pH 10.0。

图 3　不同 pH 值溶液中二硫键配对率随时间的变化曲线（*n*=3）

Fig.3　Change Curves of Disulfide Bond Pairing Rate with Time in Different pH Solutions (*n*=3)

2.3.3　澄清

采用等电点 (pI) 沉淀的方式进行澄清。用 1 mol/L 盐酸将二硫键配对后样品溶液的 pH 值分别调至 6.0 ～ 2.0，搅拌 1 h 后离心，取所得上清液进行 15% SDS-PAGE 分析。结果显示，当 pH 值从 6.0 降至 4.0，上清液中残留的杂质逐渐减少；pH 值低于 4.0 后，部分杂质又重新溶解，导致上清液中杂质增多；**1** 和 SUMO 标签始终在上清液中（图 4）。这说明澄清时 pH 值设置为 4.0，即可去除大量杂蛋白及高分子杂质，且所得溶液澄清，可用于后续柱色谱纯化。

2.4　阴离子交换色谱初步纯化

经澄清后，溶液中存在的主要杂质是 SUMO

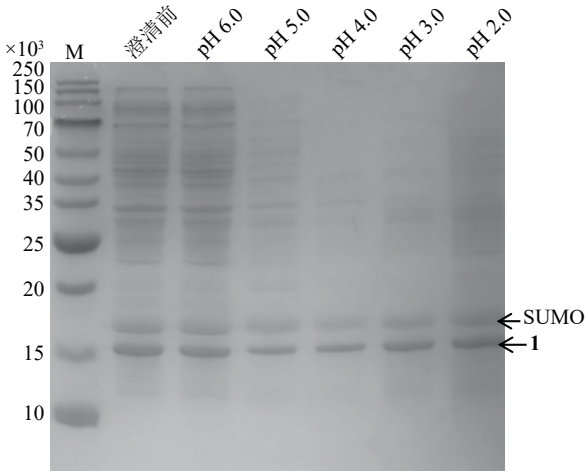


图 4　不同 pH 值条件下澄清所得上清液的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.4　SDS-PAGE Analysis Results of Supernatant Obtained after Clarification at Different pH Values

标签，其理论 pI 值为 4.92，而 **1** 的理论 pI 值为 5.65（由 Eepasy 数据库预测得到）。因此，采用阴离子交换色谱去除标签。依次考察色谱填料 (Capto Q、Capto DEAE、Polar MC-Q、Poly PEI、Q FF)、pH 值 (7.0 ～ 9.0) 和上样量 (50 ～ 150 mg) 这 3 个因素对纯化效果的影响。在阴离子交换色谱纯化中，流动相 A 为对应 pH 值的 25 mmol/L Tris 溶液，流动相 B 为含有 1 mol 氯化钠的 25 mmol/L Tris 溶液。预装柱经流动相 A 平衡后上样，再经流动相 A 淋洗后梯度洗脱 (0—4 CV，B 0—100%)。收集各洗脱步骤的样品，按“**2.1**”项下色谱条件进行 HPLC 分析。

结果显示，经 2 款弱阴离子交换填料 (Capto DEAE 和 Poly PEI) 纯化后的样品，纯度低于强阴离子填料 (Capto Q 和 Q FF) 所得样品（图 5A），可能的原因是前二者结合能力较弱，导致大部分杂质与 **1** 共同流穿。填料 Q FF 较 Capto Q 有更高的离子交换能力和更宽的粒度分布，纯化后样品的纯度和收率都高于 Capto Q。而 Polar MC-Q 无法吸附 SUMO 标签，导致 SUMO 标签与 **1** 共同流穿，不能实现纯化目的。综上所述，最终选择 Q FF 填料并进行后续优化。

在 pH 7.0 ～ 9.0 的范围内，主要杂质 SUMO 结合在色谱柱上，**1** 纯度和收率的变化趋势呈负相关

（图 5B）。综合考虑样品的纯度和收率，选择 pH 8.0 的条件，继续进行上样量的考察。

由于 **1** 存在先吸附、后因 SUMO 竞争结合位点而被洗脱的过程，上样量为 50 mg 时有少量蛋白吸附在柱上。而当上样量为 100 mg 时有杂质与目的蛋白同时流穿，导致 **1** 的纯度下降（图 5C），此时已达到该杂蛋白的最大载量。与上样量 75 mg 相比，上样量为 100 mg 时的收率并没有明显提高（P>0.05），所以上样量确定为 75 mg，即动态结合载量（dynamic binding capacity，DBC）为 15 mg/mL。

2.5 阳离子交换色谱精制

pH 值、电导率和上样量是阳离子交换色谱中的关键影响因素。根据单因素试验结果，选择 pH 4.0 ～ 5.0、电导率 2 ～ 4 mS/cm 和上样量 50 ～ 150 mg 进行响应面分析，按三因子复合中心面法设计试验，具体试验方案和结果如表 2 所示。

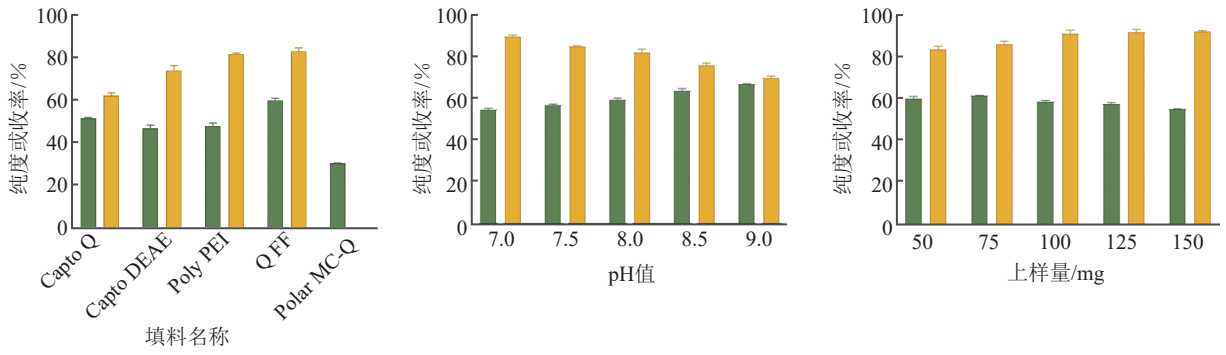
采用 MODDE 12.1 软件对数据进行分析和拟合。各参数对纯度和收率的影响如图 6 所示。对纯度影响较显著（P<0.05）的因素分别为 pH 值、电导率和上样量的平方项，对收率影响较显著（P<0.05）的是 pH 值和上样量。对模型进行评估，纯度和收率对各因素拟合模型的 R^2 均大于 0.75，Q^2 均大于 0.5，说明所得拟合模型适配度较好并具有良好的预测能力。

因 pH 值对纯度和收率都有显著影响，所以固定模型预测所得的较优 pH 值（即 pH 4.3），分析电导率和上样量对纯度和收率的影响。当 pH 4.3 时，电导率和上样量对应的纯度响应面陡峭，等高线密集。**1** 的纯度与电导率呈正相关，并随着上样量的增加呈先上升后下降的趋势。设置目标纯度大于 85%且收率大于 80%，拟合模型模拟得到的设计空间中心点为 pH 4.3、电导率 3.8 mS/cm 和上样量 60 mg。该条件下纯度的预测值为 85.8%，收率为 81.3%。按优化条件重复 3 次试验进行验证，实测得 **1** 平均纯度为（87.5±0.6）%，平均收率为（82.5±0.8）%，说明

表 2 响应面试验设计和结果

Tab.2 Experimental Design and Results of Response Surface Methodology

序号	pH 值	电导率 /(mS·cm^{-1})	上样量 /mg	纯度 /%	收率 /%
1	4.0	2	50	83.9	73.2
2	5.0	2	50	72.0	90.2
3	4.0	4	50	87.9	77.8
4	5.0	4	50	75.5	94.0
5	4.0	2	150	81.3	72.4
6	5.0	2	150	71.4	75.0
7	4.0	4	150	85.8	74.7
8	5.0	4	150	76.9	78.1
9	4.5	3	100	83.3	83.7
10	4.5	3	100	84.1	82.5
11	4.5	3	100	83.8	82.4
12	4.0	3	100	88.0	76.9
13	5.0	3	100	77.0	89.2
14	4.5	2	100	81.5	79.2
15	4.5	4	100	85.7	83.2
16	4.5	3	50	80.5	81.2
17	4.5	3	150	79.7	74.0



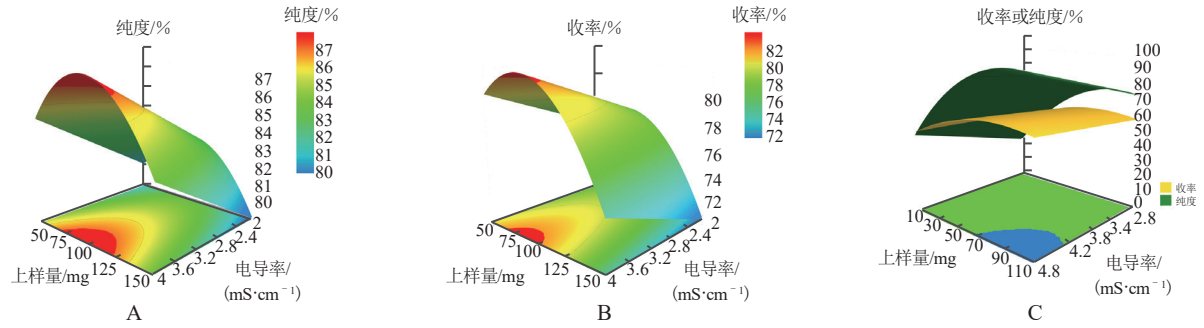
A B C

A—色谱柱填料；B—pH 值；C—上样量。

■—纯度；■—收率。

图 5 阴离子交换色谱纯化条件的优化（n=3）

Fig.5 Optimization of Purification Conditions of Anion Exchange Chromatography (n=3)



A—上样量和电导率对纯度的影响；B—上样量和电导率对收率的影响；C—pH 值优化点（pH 4.3）处的响应面变化预测图。

图 6　阳离子交换色谱精制效果的响应面图

Fig. 6　Response Surface Plots of the Effects of Purification by Cation Exchange Chromatography

模型预测性能良好。

2.6　硫酸铵沉淀

样品经阳离子交换色谱精制后依然还残留少量与 **1** 等电点相近的杂质，因此尝试根据疏水性的差异进行分离。采用硫酸铵沉淀法，在硫酸铵 33％饱和度的状态下，使目的蛋白沉淀，而杂质留在上清液中。再用保存液（20 mmol/L 磷酸二氢钠 - 磷酸氢二钠缓冲液，pH 7.4）复溶，可将 **1** 的纯度从 87.5％提高至（99.3±0.1）％（*n*=3）。该方法可快速处理大批量溶液，收率为（86.7±0.3）％（*n*=3）。沉淀用保存液复溶后采用截留分子量为 10 000 的再生纤维素膜超滤、换液 2 次，可去除残留的硫酸铵。

2.7　工艺总结与放大

对工艺中关键步骤的样品进行电泳分析，结果如图 7 所示。随后进行了 50 L 规模的中试放大，所得 **1** 的纯度、收率等结果如表 3 所示。其中，发酵表达量为 2.27 g/L，略优于小试 5 L 规模的 2.19 g/L。在放大的工艺过程中，各步骤基本重现了小试工艺的杂质去除效果，总体收率达到 44.2％。

2.8　表征

2.8.1　纯度分析和质谱鉴定

取放大试验所制备的 **1** 进行了 SDS-PAGE、HPLC 和 LC-MS 检测。其中，HPLC 法采用“**2.1**”项下色谱条件，LC-MS 检测方法如下。

色谱条件：色谱柱　YMC Triart Bio C_4 柱（3.0 mm×100 mm，1.9 μm）；流动相　A 为体积分数 0.1％的甲酸水溶液，B 为体积分数 0.1％的甲酸乙腈溶液，

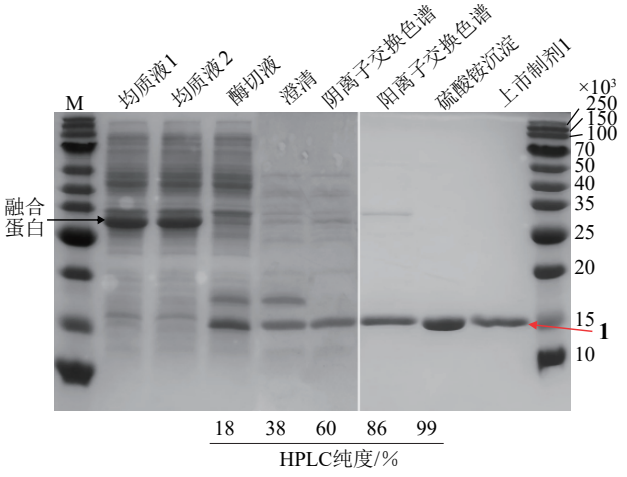


图 7　整体工艺电泳分析结果

Fig.7　SDS-PAGE Analysis Results of Total Process

表 3　工艺放大结果

Tab. 3　Scale-up Process Results

工艺步骤	体积 /L	质量浓度 /(g·L⁻¹)	含量 /g	纯度 /％	收率 /％
匀浆	72.3	—	—	—	—
酶切	72.3	1.00	72.30	18.3	100
二硫键配对	149.1	0.43	64.11	16.4	88.7
澄清	138.3	0.35	48.41	38.5	75.5
阴离子交换色谱	117.2	0.38	44.54	60.2	92.0
阳离子交换色谱	22.1	1.66	36.69	85.7	82.4
硫酸铵沉淀	9.1	3.51	31.94	99.3	87.1

梯度洗脱（0—2 min，A 90％；2—13 min，A 90％—10％；13—14 min，A 10％；14—15 min，A 10％—90％）；检测波长　全波长检测；柱温　50 ℃；流速 0.5 mL/min；进样量 5 μL。

质谱条件：离子源　电喷雾电离源；检测模式　正

离子模式；质量扫描范围 *m/z* 100 ～ *m/z* 3 000；离子源温度 120 ℃；锥孔电压 40 V；毛细管电压 正极 3.0 kV；碰撞气 Ar；脱溶剂气 N_2；碰撞电压 30 eV。

检测数据采用 UniDec 8.0 软件进行去卷积化分析。

SDS-PAGE 结果如图 7 所示，自制 **1** 的电泳条带与上市制剂条带位置一致，且泳道内无其他条带。如图 8 所示，HPLC 分析结果为单一峰，积分纯度为 99.3％；高分辨质谱数据经去卷积化分析得 **1** 的相对分子质量为 18 666.5，与理论相对分子质量 18 667 相近。

2.8.2 肽图分析与二硫键定位

在 **1** 溶液中加入终浓度为 6 mol/L 的盐酸胍，反应 30 min 进行变性，再加入终浓度为 30 mmol/L 的碘乙酰胺进行烷基化，脱盐处理后加入质量比为 1 ∶ 40 的 V8 酶进行酶切，反应 14 h 后进行 LC-MS/MS 检测。

色谱条件：色谱柱 Waters Acquity Premier CSH C_{18} 柱（2.1 mm×150 mm，1.7 μm）；流动相 A 为 0.1％甲酸水溶液，B 为 0.1％甲酸乙腈溶液，梯度洗脱（0—3 min，B 2 ％；3—100 min，B 2 ％ —38 ％；100—105 min，B 38％—90％；105—110 min，B 90％；110—111 min，B 90％—2％；111—120 min，B 2％）；流速 0.2 mL/min；柱温 50 ℃；进样量 2 μL；检测波长 214 nm。

质谱条件：离子源 电喷雾电离源；电离模式 正离子模式；扫描范围 *m/z* 150 ～ *m/z* 2 000；喷雾电压 3.8 kV；毛细管温度 320 ℃；辅气加热温度 350 ℃；全质谱 微扫描 1；分辨率 60 000；自动增益目标值 3×10^6；最大注入时间 100 ms。

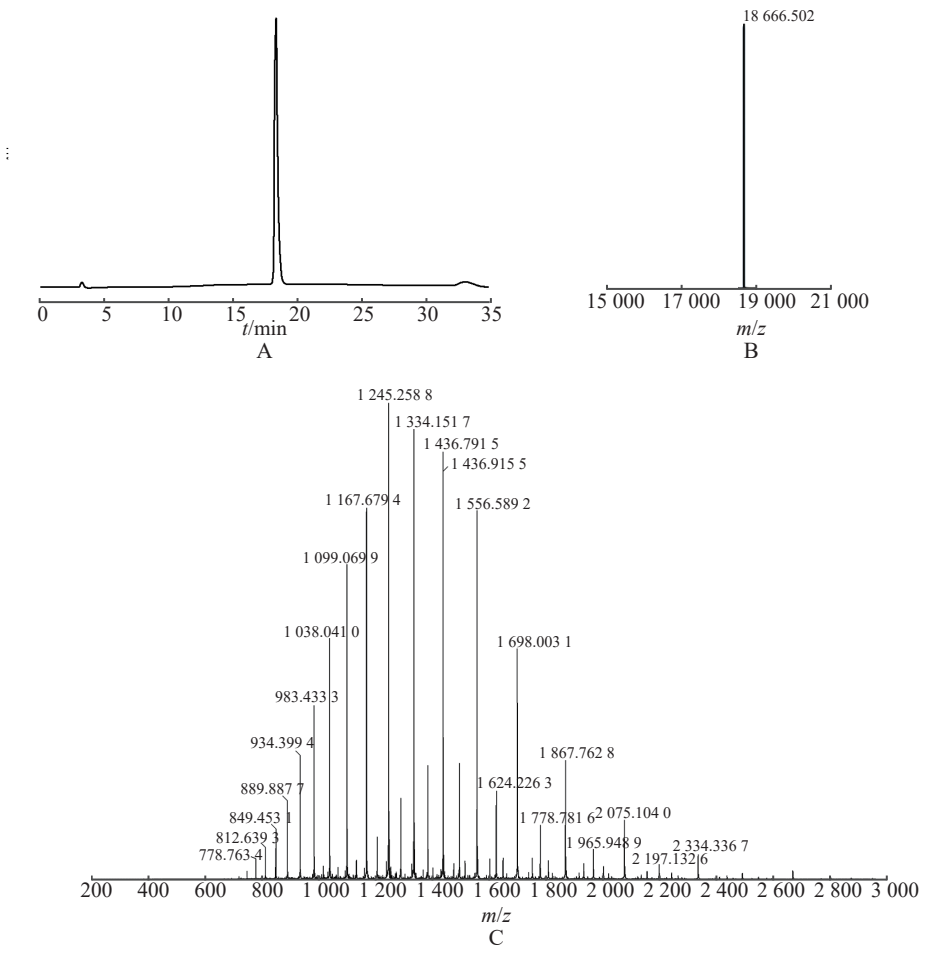


图 8 1 的 HPLC 图谱（A）、质谱数据去卷积处理结果（B）和质谱图（C）

Fig.8 HPLC Chromatogram (A), Mass Spectral Deconvolution Result (B) and Mass Spectrum (C) of **1**

二级质谱：微扫描 1；分辨率 15 000；自动增益目标值 1×10^5；最大注入时间 100 ms；循环数 5；固定第一质谱分数 110；归一碰撞能量 27；最小自动增益目标值 1×10^3；多肽匹配 首选（preferred）。

采用 BioPharma Finder 5.0 软件对采集的数据进行肽图和二硫键分析。其中一级质谱共检测到片段峰 106 个，均是 **1** 的相关片段，根据各片段的质荷比进行肽图匹配，确认 **1** 的氨基酸覆盖率为 100%（图 9）。

1 经过变性、烷基化和 V8 酶酶解处理后产生含链内二硫键的肽段 K34—E46 和肽段 L47—E93。其中，肽段 K34—E46 中的二硫键断裂时理论质荷比为 1 533.732 0，实测值为 1 531.713 6，相差 2。对该肽段的二级质谱数据进行分析，质谱图与匹配图如图 10 所示，鉴定到包含二硫键 C36—C42 的 y 离子 y_{11}^{2+} 质荷比为 646.283 8，与理论值 647.283 7 同样相差 2，可以证明 C36—C42 的正确配对。同样，肽段 L47—E93 实测值为 4 939.625 5，比理论值少 2，表明 C64—C74 的二硫键配对正确。

2.8.3　体外活性测定

用细胞培养基（含体积分数为 10%的胎牛血清、1%链霉素 - 青霉素溶液的 RPMI-1640 培养基）将上市制剂和自制 **1** 的质量浓度稀释至 100.0 ng/mL，再进行 5 倍梯度稀释。NFS-60 细胞株用细胞培养基洗涤 3 遍后重悬至每 1 mL 含 2.0×10^5 个细胞。在 96 孔板的每孔中加入上市制剂或自制 **1** 和细胞悬液各 50 μL，在 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养 48 h。然后加入细胞增殖试剂（5 mg/mL）10 μL，继续培养 4 h 后利用酶标仪检测，测定波长和参比波长设定为 450

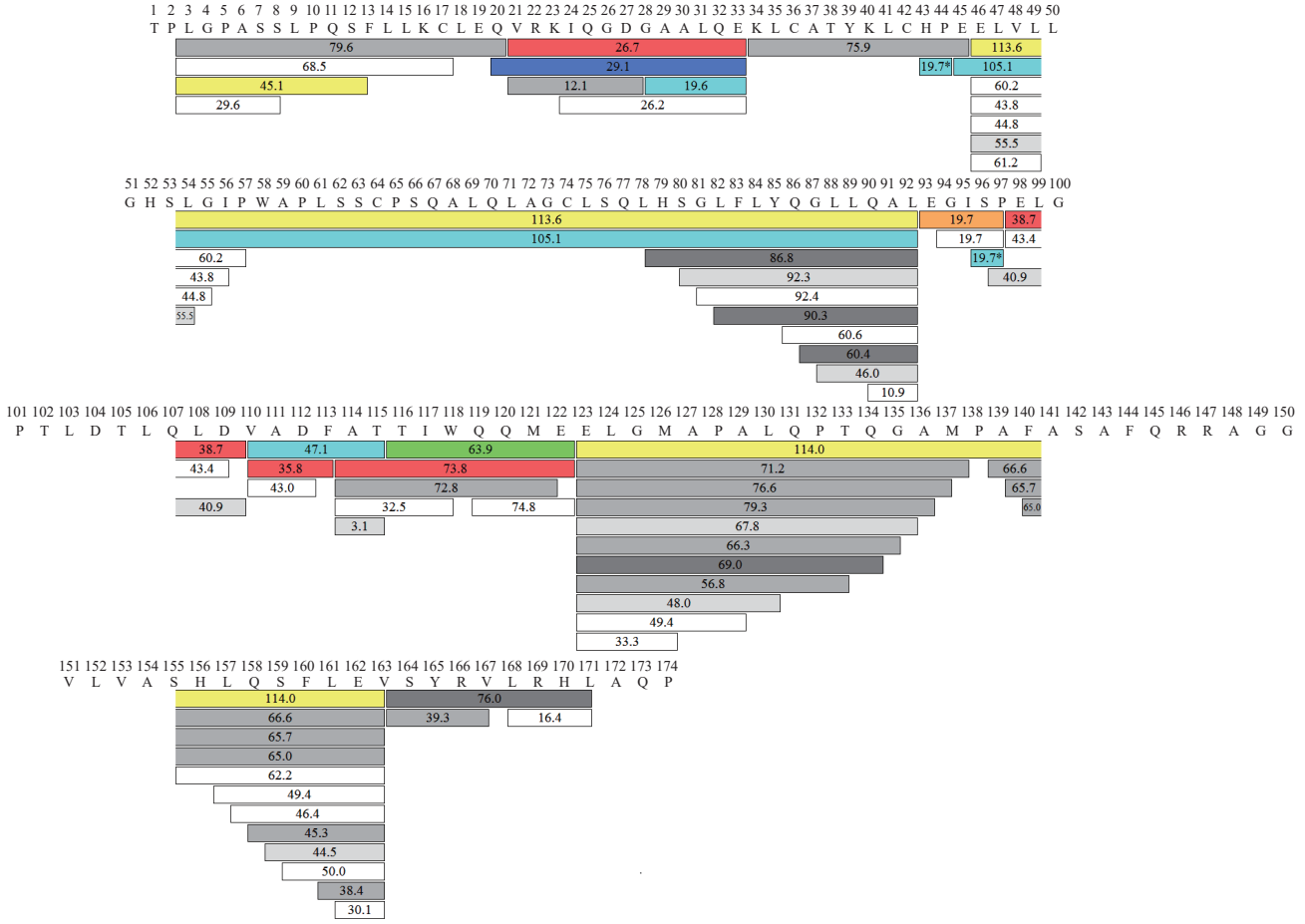
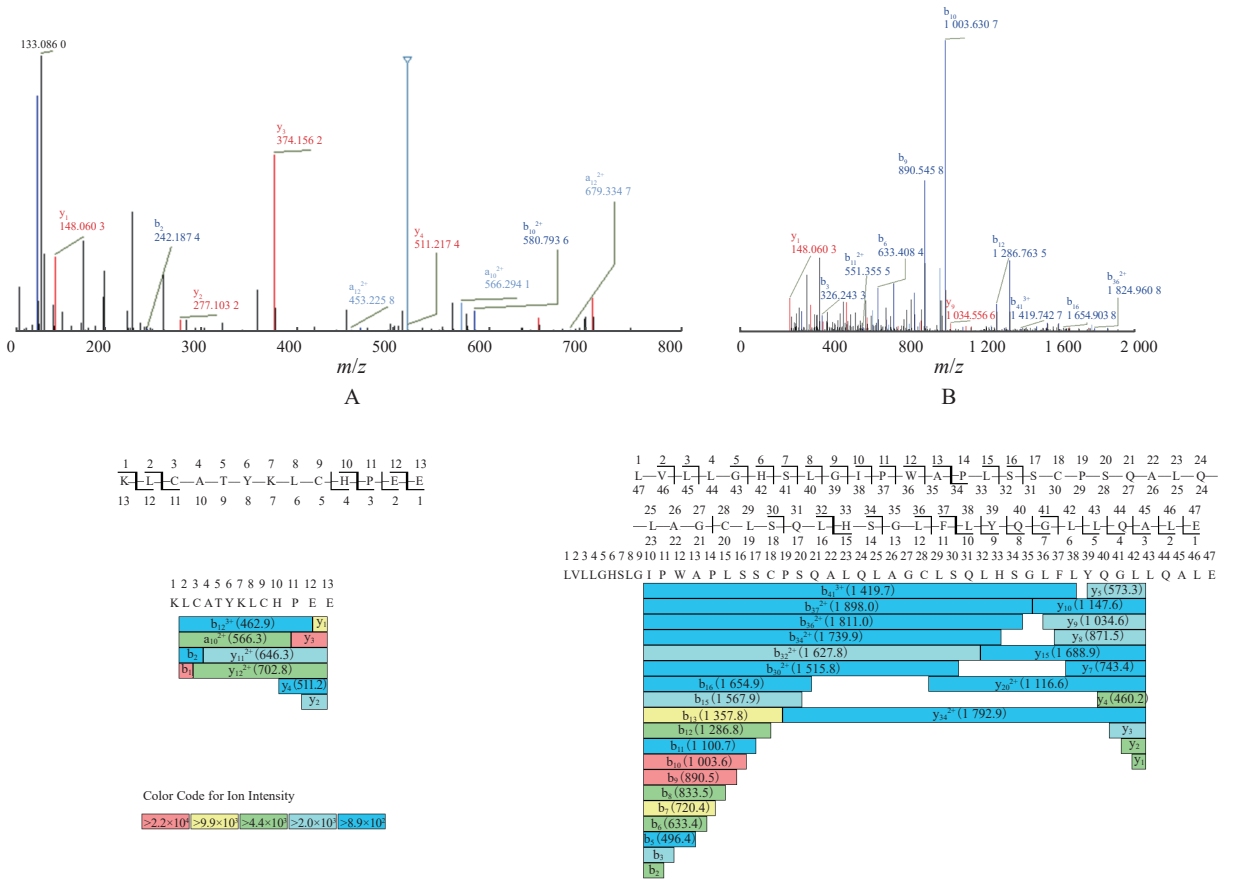


图 9　1 的肽图分析

Fig.9　Peptide Mapping Analysis of **1**

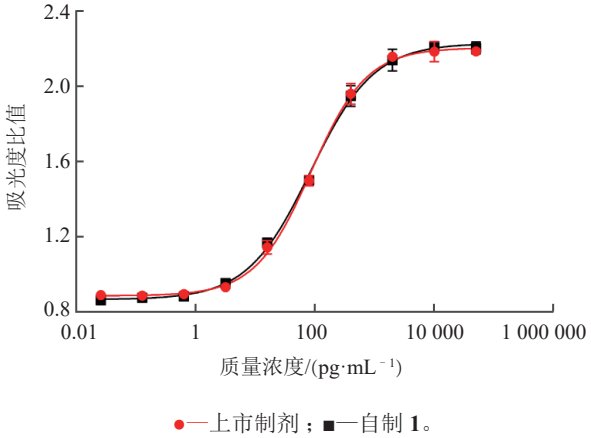


A—肽段 K34—E46 的二级质谱图；B—肽段 L47—E93 的二级质谱图；C—肽段 K34—E46 的碎片匹配图；D—肽段 L47—E93 的碎片匹配图。

图 10　1 的二硫键定位分析

Fig.10　Disulfide Bond Location Analysis of **1**

和 630 nm，计算 2 处吸光度比值，结果如图 11 所示。可见，自制 **1** 与上市制剂具有相似的细胞增殖曲线，其中上市制剂的 EC_{50} 值为 86.03 pg/mL，自制 **1** 的 EC_{50} 值为 84.77 pg/mL，略低于上市制剂，提示自制 **1** 的细胞活性略高于上市制剂。但二者差距较小，总体细胞活性在同一水平，也证明了通过该工艺制备的 **1** 结构正确，对其活性无显著影响。



●—上市制剂；■—自制 **1**。

图 11　细胞增殖 - 浓度曲线（*n*=3）

Fig.11　Cell Proliferation-concentration Curves（*n*=3）

3　讨论

本研究首次报道了一种基于 SUMO 融合技术的可溶性表达工艺，成功实现了 **1** 在 *E. coli* 胞内的高效可溶性表达。与周质空间可溶性表达相比，该方法显著提高了蛋白的表达量。与包涵体表达工艺相

比，本工艺具有二硫键配对简单、操作便捷、收率高等优势。

然而，该工艺仍有进一步优化的空间。例如，在阴离子交换色谱纯化阶段，通过单因素筛选法确定了纯化条件，但未考察各因素之间的交互影响。未来，本实验室将进一步优化工艺参数，提高 **1** 的表达量和纯化收率，进行工艺放大的相关研究，为工业化生产和开展其衍生物的制备研究奠定基础。

参考文献：

[1] YANG B B, KIDO A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pegfilgrastim [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2011, **50**(5): 295-306.

[2] WELTE K. G-CSF: filgrastim, lenograstim and biosimilars [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2014, **14**(7): 983-993.

[3] 冯继峰 , 石远凯 , 沈　波. 肿瘤化疗导致的中性粒细胞减少诊治中国专家共识 [J]. 中华肿瘤杂志 , 2023, **45**(7): 575-583.

[4] SINGH V K, NEWMAN V L, SEED T M. Colony-stimulating factors for the treatment of the hematopoietic component of the acute radiation syndrome (H-ARS): a review [J]. *Cytokine*, 2015, **71**(1): 22-37.

[5] PARK S D, SAUNDERS A S, REIDY M A, *et al*. A review of granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling and regulation with implications for cancer [J]. *Front Oncol*, 2022, **12**: 932608.

[6] GOMES F R, MALUENDA A C, TÁPIAS J O, *et al*. Expression of recombinant human mutant granulocyte colony stimulating factor (Nartograstim) in *Escherichia coli* [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, **28**(7): 2593-2600.

[7] LIU J H, WANG C Z, GENG X D. A new protocol for solubilization, refolding and purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in inclusion bodies [J]. *Chin Chem Letters*, 2006, **17**(6): 799-802.

[8] CHEN J P, GONG J S, SU C, *et al*. Improving the soluble expression of difficult-to-express proteins in prokaryotic expression system via protein engineering and synthetic biology strategies [J]. *Metab Eng*, 2023, **78**: 99-114.

[9] 崔圣喆 , 金镇基 , 吴映学 , 等. 从重组大肠杆菌纯化人粒细胞集落刺激因子的方法 : 中国 , 103228672A [P]. 2013-07-31.

[10] 唐楚煜 , 张耀方 , 王英超 , 等. SUMO 化修饰融合蛋白表达系统研究进展 [J]. 生物化工 , 2020, **6**(4): 135-136.

[11] BUTT T R, EDAVETTAL S C, HALL J P, *et al*. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins [J]. *Protein Expr Purif*, 2005, **43**(1): 1-9.

[12] REN T W, TAN Z J, EHAMPARANATHAN V, *et al*. Antibody disulfide bond reduction and recovery during biopharmaceutical process development: a review [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, **118**(8): 2829-2844.

[13] NOWAK C, K CHEUNG J, M DELLATORE S, *et al*. Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies [J]. *Mabs*, 2017, **9**(8): 1217-1230.

[14] ALAM M E, BARNETT G V, SLANEY R, *et al*. Deamidation can compromise antibody colloidal stability and enhance aggregation in a pH-dependent manner [J]. *Mol Pharm*, 2019, **16**(5): 1939-1949.