

蛋白质的聚乙二醇修饰及其在医药研究中的应用

郑宝胜 徐明波 姚志建

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

提 要

生物工程的发展使许多蛋白质类药物的广泛使用成为可能,但仍存在免疫原性、毒副作用等问题。蛋白质的化学修饰从某种程度上克服了上述不足,如消除抗原性、延长体内作用时间等,从而提高了药物蛋白质的效率。文章主要介绍聚乙二醇对蛋白质的修饰及其在抗肿瘤蛋白质、调节代谢酶类、溶血栓因子、抗炎酶及血浆蛋白研究中的一些进展。

关键词 聚乙二醇, 化学修饰, 蛋白药物

蛋白质类药物在人类健康中发挥着日益重要的作用。这类药物具有作用专一、高效等特点,通常是经非胃肠途径用药,如肌肉注射、静脉注射等途径。外源物质进入体内易引起免疫反应,严重者可造成死亡。这就要求用作药物的蛋白质是人体自身蛋白或同源的其他哺乳动物中提取的蛋白质,但这类蛋白质在体内含量低、来源困难、成本高、产量低,从而限制了它的广泛使用。随着基因工程技术的发展,人们可以将目的基因在原核生物中表达,再通过一系列表达产物的下游处理工艺获得大量重组蛋白质。近几年世界上已有几百种蛋白质药物进入I期临床试验,且已有数十种获美国食品药品监督管理局(FDA)批准进入市场销售。异源蛋白质进入体内易引起毒副作用,为此人们利用化学物质修饰蛋白质掩盖异源蛋白质在人体内的抗原部位,避免在体内应用中的免疫反应,取得了有益的效果。可以用作蛋白质药物修饰剂的分子很多,主要是聚合分子,如聚乙二醇、肝素、聚丙烯酰胺等。研究证明:聚乙二醇应用效果较好,应用聚乙二醇修饰的许多酶、蛋白质在体内应用中抗原性显著降低,体内作用时间明显延长,药效也有了很大提高,目前美国FDA已批准聚乙二醇修饰的腺苷脱氨酶(PEG-ADA)在临床上治疗由于该酶缺陷而造成的严重综合免疫缺陷症(SCID)^[1],从而确定

了化学修饰在医药研究中的地位。

1 聚乙二醇修饰蛋白质

聚乙二醇分子是线状排列的高分子聚合物,分子量依其聚合数的变化而异,用作修饰蛋白质的聚乙二醇实际上应为单甲氧基聚乙二醇,分子式为 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{OH}$,该化合物水溶性好,不挥发、无味、体内应用无抗原性,体内代谢稳定,长期静脉注射无不良反应^[2],由于其分子中羟基可以被活化并与蛋白质的氨基相连接形成复合物。常用作联结活化剂的化合物有N-羟基丁二酰胺(N-hydroxysuccinimid)、三聚氰氯(cyanuric chloride)等,图1表示聚乙二醇修饰蛋白质过程反应式。

这一反应就是在较温和的条件下进行^[3],温度在4—25℃范围内,pH值接近中性条件。这样的条件下不会影响蛋白质的高级结构及其活性。聚乙二醇主要是修饰蛋白质表面氨基如赖氨酸残基的侧链氨基,修饰率取决于活化聚乙二醇与蛋白质的分子数比等条件。一般说来,修饰率越高,蛋白质抗原性降低越明显,活性损失也越大。不同分子量的聚乙二醇的修饰结果不同,研究证明分子量为5000(聚合数为150)

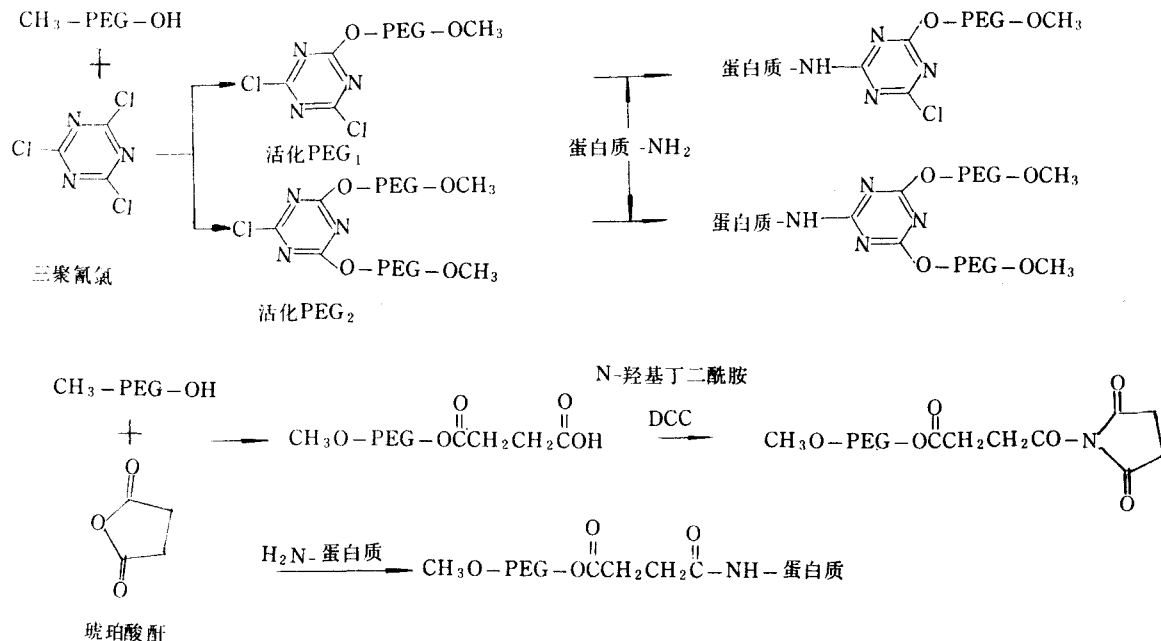


图1 聚乙二醇与蛋白偶联反应

的聚乙二醇对保留活性，消除抗原性，提高药效较好。聚乙二醇与蛋白质，酶联结后可以在蛋白质表面形成一个可变化的保护层，由于聚乙二醇分子特有的线性及柔性，可以很好地掩盖蛋白质表面的抗原决定区，同时也增加了蛋白质对体内胰蛋白酶消化的抵抗力，聚乙二醇的修饰也会使蛋白质分子的体积增大，在肾脏的代谢中可以避免很快被清除，使蛋白质在体内的有效作用时间加长。另外，由于聚乙二醇自身的一些性质，也会影响被修饰蛋白质的一些理化性质及酶蛋白的一些特征常数。以下分类介绍聚乙二醇修饰蛋白质及在医药研究中的应用。

2 抗肿瘤蛋白质的应用

2.1 PEG-重组人白细胞介素-2 (rhIL-2)

人白细胞介素-2 是 T 细胞产生的一种淋巴因子，对免疫应答的产生及调节有很大作用。它作用于各种含其受体的细胞而起作用：a. 在体外，它可以维持 T 细胞的长期存活及增殖；

在体内，它可以加强 T 细胞的免疫应答。b. 使自然杀伤细胞成为淋巴细胞激活的杀伤细胞 (LAK)，使白细胞介素-2 依赖的细胞形成肿瘤浸润细胞。c. 促进 γ -干扰素的产生。以上功能对肿瘤的防治均有重要的作用。但利用培养细胞生产 IL-2 产量低、成本高，不能满足社会需求。利用基因重组技术人们可以在大肠杆菌中表达，并纯化出有很高活性的重组人白细胞介素-2，但在应用中遇到了半衰期短、反复注射引起免疫反应等问题，从而限制了其临床疗效。IL-2 是分子量 17.5kD 左右的糖蛋白，而 rhIL-2 分子量为 15kD，没有糖基化修饰。因此人们利用 PEG (5 000) 修饰 rhIL-2^[3,4] 形成复合物，改变了其原有的理化性质使其由疏水性变为亲水性，分子量增加，体内半衰期显著加长，抗原性消失，而活性基本不变。如此，PEG 对 rhIL-2 的修饰提高了应用效率。

2.2 PEG-天门冬酰胺酶

天门冬酰胺酶能专一地催化天门冬酰胺形成天门冬氨酸及氨。天门冬酰胺是肿瘤细胞代

谢中的一个重要环节,一旦破坏会引起细胞内蛋白质、核酸代谢紊乱而抑制肿瘤细胞生长、分裂,从而可以抑制肿瘤的生长及恶化^[5].人们利用这一点开展了用L-天门冬酰胺酶治疗肿瘤的研究,这在70年代是人们研究的一个热点.天门冬酰胺酶对淋巴细胞白血病,尤其是对儿童的淋巴细胞白血病有很好疗效.大肠杆菌来源的L-天门冬酰胺酶在体内作用时间短,反复注射会在血液产生抗体,发生免疫排斥反应.为此人们采用化学修饰方法克服这一困难,将PEG与此酶联结后,在体内的作用时间由18h提高到2周,免疫反应消失,保持原来20%左右的活性^[6].当底物存在时进行修饰,底物会保护酶的活性部位不被修饰,可以提高修饰后酶的活性及对胰酶的抵抗能力^[7].

另外一种已被PEG修饰过的抗肿瘤蛋白是色氨酸酶,三聚氰氨活化的PEG与其联结后也得到类似上述结果.

3 与代谢有关的酶蛋白的修饰

3.1 PEG-腺苷脱氨酶(PEG-ADA)

ADA,对于免疫系统的成长、发育很重要.当此酶缺陷时便阻止了免疫系统的发育,使人对各种感染的抵抗力降低,这种症状被称为严重综合免疫缺陷症(sever combined immunodeficiency disease, SCID).这种病症多发于儿童中,极易造成死亡.目前治疗方法有骨髓移植、基因治疗及补充有缺陷的酶几种方法.体内注射PEG-ADA的治疗方法已获美国FDA通过,由于从牛肠中提取的ADA进入血液后几分钟内会被肝脏等清除而不能修复免疫缺陷,Hershfield^[3]等利用聚乙二醇修饰该酶,修饰后的酶可以在血液中存在1—2周,抗原反应降低,活性可保持原来40%左右,临床应用效果明显提高,可以使患有SCID的儿童免疫系统正常发育,免于各种感染而健康成长,但是由于该酶提取费用高而导致治疗费用高,每年费用6万美元,如能降低ADA的成本,这种疗法会更普及.

其他有关代谢的酶PEG修饰后的主要变

化见表1.

表1 PEG修饰酶及产要变化

	作用时间	免疫原性	活性	应用效率	文献
胆红素氧化酶	↑↑	↓	0	↑↑	[9]
葡萄糖醛酸酶	↑↑	↓↓	↓	↑↑	[10]
α-半乳糖苷酶	↑↑	↓	↓	↑↑	[11]
α-葡萄糖苷酶	↑↑	↓	↓	↑↑	[12]
β-葡萄糖苷酶	↑↑	↓	↓	↑↑	[11]

↑↑, ↓↓显著变化, ↑上升; ↓下降; 0未有报道.

3.2 溶血栓类蛋白质

血栓类疾病是一类发病率较高、危害性较大的疾病.临床上也没有很好的治疗方法,利用各种溶栓蛋白作为药物来治疗是当今人们研究的一个方向,目前已有许多种酶、蛋白质用于这方面的研究.链激酶^[13]、组织型纤溶酶原激活剂^[14]、尿激酶、弹性蛋白酶^[15]、及源于腹蛇中的batroxibin^[16]等都对溶栓有高效特异的作用.PEG修饰后,使这些异源蛋白质在体内的作用明显加强,在体内半衰期明显提高,抗原性降低.

3.3 抗炎症蛋白质

PEG-超氧化物歧化酶(SOD), SOD是细胞内催化清除氧自由基的一种酶.氧自由基在细胞内是由代谢产生的对细胞有一定毒害性的物质,它攻击自身细胞造成溶酶体破坏,水解酶大量释放,而造成细胞死亡,组织损伤.此外,自由基还可以与血浆中的一些物质形成稳定的趋化因子加重炎症.SOD的作用正是清除这些自由基,消除炎症.SOD在临床上与抗肿瘤,调节免疫,辐射保护及组织发育等有关.尽管SOD有上述种种作用,但是以下问题限制了其应用: a. SOD不易进入细胞内, b. SOD在体内作用时间短. J. S. Beckman^[17]等利用聚乙二醇修饰SOD使其在血液中的半衰期由6—10min提高到30—40h,降低了抗原性,酶对胰蛋白酶的消化的抵抗力也有了提高.同时,PEG的修饰使SOD易于进入细胞内,PEG是一种表面联结的活化分子,可以诱导膜变化使SOD

易被细胞吸收。过氧化氢酶也是细胞内清除自由基的一种酶, PEG 对其修饰也显示了类似结果。

3.4 血液成分蛋白质

PEG-血红蛋白, 人们利用 PEG 修饰血红蛋白研究的目的是: a. 进行与血型无关的输血研究, b. 延长血液的保存时间, c. 提高血液中血红蛋白的寿命, d. 消除输血过程中传染的疾病^[18]。利用 PEG 修饰血红蛋白可以制造人工血液用于战争, 急救及短时间代替血液执行运输氧气及二氧化碳的功能。PEG-血红蛋白易于保存, 4℃条件下可保存一年时间, 而且 PEG-血红蛋白在血液中可以起作用的时间是未修饰血红蛋白的 4 倍以上, PEG-血红蛋白的运输氧气的能力与血红蛋白相近。

随着化学修饰方法技术的发展, 会使聚乙二醇对蛋白质的修饰有针对性。基础医学及临床医学的发展也会发现有更多的蛋白质可以用于治疗疾病, 同时, 利用 PEG 修饰药物蛋白也会有更广泛的前景。

参 考 文 献

- 1 Pool R. Hairy enzymes stays in the blood. *Science*, 1990; **248**:305
- 2 Carpenter C P, Woodside M D, Kinkead E R *et al.* Response of dogs to repeated intravenous injection of PEG 4 000 with notes on excretion and sensitization. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1971; **18**:35
- 3 Katre N V, Knauf M J, Laird W J Chemical modification of recombinant interleukin-2 by polyethylene glycol increases its potency in the murine Meth A saroma model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**:1487
- 4 Knauf M J, Beu D J, Hirtzer P *et al.* Relationship of effective molecular size to systemic clearance in rats of recombinant interleukin-2 chemically modified with water-soluble polymers. *J Biol Chem*. 1988; **263**:15064
- 5 Roberts J, Morton D, Bachynsky N. The antitumor activity of *E. coli* L-asparaginase. *Cancer Res*. 1966; **26**:2213
- 6 Ashihara Y Kono T, Yamazaki S *et al.* Modification of *E. coli* L-asparaginase with PEG: disappearance of binding ability to anti-asparaginase serum. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978; **83**:385
- 7 田洁, 曹淑桂, 林雷等. L-天门冬酰胺酶化学修饰中底物对酶活力的保刻作用. *生物化学及生物物理学报*, 1989; **21**:127
- 8 Hershfield M S, Buckley R H, Greenberg M L *et al.* Treatment of adenosine deaminase deficiency with PEG-modified ADS. *New Engl J Med*, 1987; **316**:589
- 9 Kimura M, Matsumura Y, Miyauchi Y *et al.* A new tactic for the treatment of jaundice an injectable polymer-conjugated bilirubin-oxidase. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1988; **188**:364
- 10 Lisi P J, Vanes T, Abachowski A *et al.* Enzyme therapy: PEG-B-glucuronidase conjugates as potential therapeutic agents in acid mucopolysaccharidosis. *J Appl Biochem*. 1982; **4**:19
- 11 Wieder K J, Davis F F. Enzyme therapy: effect of covalent attachment of PEG on biochemical parameters and immunological determinants of B-Glucosidase and 2-Galactosidase. *J Appl Biochem*, 1983; **5**:337
- 12 Naoi M, Kiuchi K, Sato T *et al.* Alteration of the substrate specificity of *Aspergillus Oryzae* B-galactosidase by modification with PEG. *J Appl Biochem*, 1984; **6**:91
- 13 Newmark J, Abuchowski A, Murano G *et al.* Preparation and properties of adducts of streptokinase and streptokinase-plasmin complex with PEG and pluronic polyol F38. *J Appl Biochem*, 1982; **4**:185
- 14 German A J, Kalindjian S B. The preparation and properties of novel reversible polymer-protein conjugates. *FEBS Lett*, 1987; **223**:361
- 15 Koide A, Kobayashi S, Tsukuba E *et al.* modification of amino groups in porcine pancreatic elastase with PEG in relation to binding ability towards anti-serum and to enzymic activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983; **111**:659
- 16 Nshimura J, Takahashi K, Sakurai K *et al.* Modification of batroxobin with activated PEG reduction of binding ability towards anti-batroxobin antibody and retention of defibrinogenation activity in circulation of preimmunized dogs. *Life Sci*, 1983; **33**:1467
- 17 Beckman J S, Minor R L, White C W *et al.* Superoxide dismutase and catalase conjugated to PEG increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J Biol Chem* 1988; **263**:6884
- 18 Abuchowski A McCoy J R, Palczuk NC *et al.* Alteration of immunological properties of bovine serum albumin covalent attachment of PEG. *J Biol Chem* 1977; **252**:3582