

聚乙二醇定点修饰蛋白质药物中巯基的研究进展

汪进良, 冯泽旺, 赵 宣

天津键凯科技有限公司, 天津 300462

摘 要: 聚乙二醇 (PEG) 修饰是解决蛋白质药物溶解度低、稳定性差、半衰期短、具有免疫原性等问题有效方法, 通常在氨基上进行修饰, 但在巯基上进行定点修饰更有利于获得结构明确、组成稳定的修饰产物。综述了聚乙二醇定点修饰蛋白质药物中巯基, 包括在游离巯基、二硫键和引入的巯基上进行修饰的研究进展。

关键词: 聚乙二醇定点修饰; 蛋白质药物; 巯基

中图分类号: R914

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2017)12-2534-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.12.053

Research progress on site-specific PEGylation on thiol in protein drugs

WANG Jin-liang, FENG Ze-wang, ZHAO Xuan

Tianjin JenKem Technology Co. Ltd., Tianjin 300462, China

Abstract: Pegylation (PEG) is an effective way to overcome problems of protein drugs, such as low solubility, bad stability, short half-life, and having immunogenicity. Usually the modification is executed on amino, while the reaction based on thiol is more likely to obtain a product with clear structure and stable composition. Research progress on site-specific PEGylation on thiol in protein drugs, which included modifications on free thiol, double-sulfide bond, and imported thiol are reviewed in this paper.

Key words: site-specific PEGylation; protein drugs; thiol

蛋白质药物是一类常见的、具有一定生物活性、用于防治和诊断疾病的蛋白质产品, 与小分子药物相比, 具有疗效明确、活性高、特异性强的特点。随着生物技术的迅猛发展, 越来越多的蛋白质药物在临床中得到应用, 但溶解度低、稳定性差、半衰期短、具有免疫原性等不足使得该类药物的应用受到一定限制。解决这些问题的一种方法为聚乙二醇修饰。起源于 20 世纪 70 年代, 经过 40 多年的发展, 聚乙二醇修饰已经成为修饰、改进药物, 包括蛋白质药物等大分子药物和小分子药物不足的有效手段, 国内外已有近 20 个聚乙二醇修饰药物上市, 还有不少药物陆续进入临床^[1-2]。

在聚乙二醇修饰过程中, 氨基作为一种最常见的官能团, 一直是药物分子寻求聚乙二醇修饰的首选对象, 但蛋白质药物上通常具有多个氨基, 使得一般的聚乙二醇修饰得到的产物成分复杂, 分离困难, 还有可能导致活性降低。聚乙二醇定点修饰则

可以避免这种随机修饰的盲目性, 达到既不影响蛋白质活性, 又能选择性地连接到蛋白质的特定部位, 获得结构明确、组成稳定的修饰产物, 成为近年来聚乙二醇修饰研究的热点^[3-5]。由于蛋白质中巯基比氨基数量少, 而且亲和活性一般大于氨基、羧基和羟基, 所以在巯基上进行聚乙二醇定点修饰能达到较好的定点修饰结果。蛋白质药物中的巯基通常存在于蛋白质的二硫键中和活性位点上, 如果蛋白质药物中不含半胱氨酸, 则可通过基因工程方法或用 Traut 试剂在特定区域引入巯基。本文综述了聚乙二醇定点修饰蛋白质药物中巯基, 包括在游离巯基、二硫键和引入的巯基上进行修饰的研究进展。

1 游离巯基上的定点修饰

对蛋白质药物中含有的游离巯基, 可用呈一定反应活性的聚乙二醇衍生物, 如聚乙二醇-马来酰亚胺 (PEG-MAL) 对其进行定点修饰, 得到预期产物。对巯基进行聚乙二醇化的试剂还有聚乙二醇-

收稿日期: 2017-09-04

基金项目: 天津市科技计划项目 (15PTSJC00220)

作者简介: 汪进良, 男, 工程师, 研究方向为新药研发。Tel: (022)25616890 E-mail: jinliangwang@jenkem.com

邻吡啶二硫醚 (PEG-OPSS), 聚乙二醇-乙烯基砜 (PEG-VS) 等, 此外, 还有新近研究的聚乙二醇-硒 (PEG-Se) 试剂和聚乙二醇-多巴醌 (PEG-DAQ)。

1.1 聚乙二醇-马来酰亚胺修饰巯基

人血浆白蛋白 (HSA) 是一种含 585 个氨基酸残基的单链无糖基化蛋白质, 是人血浆中最丰富的蛋白质, 约占血浆总蛋白的 60%, 在人体内具有维持血容量和血液胶体渗透压等重要生理功能, 是临床上常用的一种天然血液制品, 主要用于治疗失血、烧伤及创伤等引起的休克、脑水肿、大脑损伤所致的颅内压升高, 以及低蛋白血症和肝硬化或肾病引起的水肿和腹水。但烧伤、感染或手术等某些病理条件下, 毛细血管通透性增加, 导致 HSA 向血管外泄漏, 且从血管渗出的 HSA 常在敏感组织聚集, 从而加重或引起组织水肿。另外, HSA 适应症广泛, 且用量大 (每个患者每天 HSA 用量达几克), 拥有巨大的市场需求量。但近年来, 由于血液来源紧张等原因致使 HSA 供应十分紧张, 如何解决当前白蛋白紧缺的问题成为目前白蛋白研究的热点。

对蛋白质药物中含有的游离巯基可用呈一定反应活性的聚乙二醇衍生物, 如聚乙二醇-马来酰亚胺 (PEG-MAL) 对其进行定点修饰, 得到预期产物, 见图 1。针对以上人血白蛋白来源短缺及在某些病理条件下大量输注血管保留率低, 易引起或加重组织水肿的问题, 采用线性或支链型的马来酰亚胺活化的 PEG 20000 共价连接到白蛋白分子上游离半胱氨酸 (Cys-34) 位点上, 制成 PEG 修饰的 HSA 样品, 增大白蛋白的相对分子质量, 赋予白蛋白分子较大的水化体积, 从而减少 HSA 分子透过血管内皮细胞间隙进入周围组织, 提高 HSA 的血管保留率, 减少其引起组织水肿的副反应^[6-7]。PEG-HSA 的 CD 光谱与 HSA 的极为相似, 二者的二级结构基本相同, 提示定点 PEG 修饰并未影响 HSA 的二级结构。小鼠体内的药动学研究结果显示 PEG-HSA 的血浆半衰期延长为原来的 2.2 倍, 同时总体清除率和稳态分布体积有所降低。在急性肺损伤实验中测得每克肺组织中透过血管的白蛋白为 (0.057±

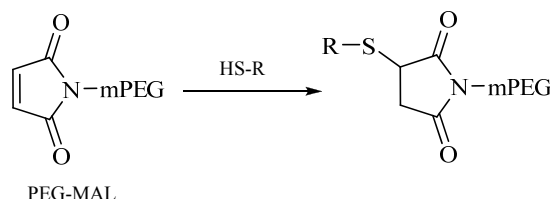


图 1 聚乙二醇-马来酰亚胺对巯基的修饰

Fig. 1 Modification of PEG-MAL to thiol

0.017) mmol, 而 PEG-HSA 的透过量仅为 (0.034±0.007) mmol, 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示聚乙二醇修饰的人血清白蛋白能改善人血清白蛋白的药动学性质, 延长人血清白蛋白的体内半衰期, 聚乙二醇的高黏性和高渗性分别有助于增加微血管的灌注和减轻肺部缺血再灌注损伤, 在血管透过率增加的炎症条件下能显著提高白蛋白的血管保留率, 有助于白蛋白发挥其扩充血容量的药理作用, 有望成为一种优良的血容量扩充药。

1.2 聚乙二醇-硒试剂修饰巯基

Kunstelj 等^[8]报道了一种可以选择性修饰自由巯基的聚乙二醇化试剂, 由线性聚乙二醇-*N*-羟基琥珀酰亚胺 (PEG-NHS) 和硒基半胱氨酸连接生成, PEG-Se 试剂的合成路线见图 2。该反应速度很快, 转换率可达 95%。这种新的 PEG-Se 试剂的活性基团是二硒键, 通过巯基/二硒键交换和巯基反应。以 18 位含有未成对半胱氨酸的重组人粒细胞集落刺激因子 (Cys18-rhG-CSF) 为模型蛋白, 用 PEG-Se 试剂和商品化的 PEG 化试剂 (PEG-MAL、PEG-OPSS) 做聚乙二醇化对比实验, 发现聚乙二醇化产率最高的是 PEG-MAL, 其次是 PEG-OPSS 和 PEG-Se; PEG-MAL 和 PEG-Se 的反应速度相当, 而 PEG-OPSS 的反应速度很慢。将 PEG-rhG-CSF 结合物纯化后做了表征和比较, 尽管所有的结合物都含有连在 Cys18 上的 PEG 20000, 但活性、稳定性及体内表现都各不相同。用 PEG-MAL 生成的结合物有微小的构象变化, 这些变化也反映在低体外活性和马来酰亚胺结合物的聚集态上。PEG-Se 试剂制备的结合物体外活性最高, 而 PEG-OPSS 试剂制备的结合物体内表现最好。

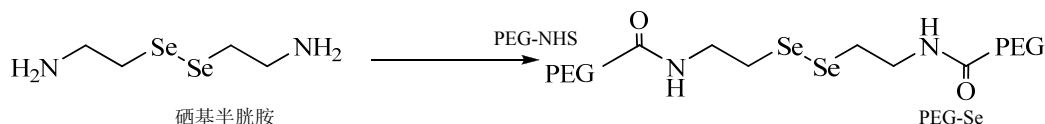


图 2 PEG-Se 的合成路线

Fig. 2 Synthesis route of PEG-Se

1.3 聚乙二醇-多巴醌试剂修饰巯基

Xu 等^[9]描述了一种基于儿茶酚衍生的反应性醌的巯基上进行聚乙二醇定点修饰的方法。儿茶酚衍生的聚乙二醇由线性聚乙二醇琥珀酰亚胺(PEG-NHS)和多巴胺偶联后氧化得到聚乙二醇多巴醌(PEG-DAQ), PEG-DAQ 用于修饰两种模型蛋白, 即截短鞭毛蛋白(CBLB502)和人重组睫状节神经细胞营养因子(rhCNTF)上的半胱氨酸, 证实了它的巯基特异性, 在中性 pH 值条件下, PEG-DAQ-rhCNTF 的收率为 87.5%, 而 PEG-MAL 和 PEG-VS 的收率分别为 92.3%、17.6%, 在含水溶剂中孵育 96 h 后, PEG-DAQ 保留了大约 95% 的反应活性, 说明试剂在水中稳定性好, 而且聚乙二醇化反应必须用过量的半胱氨酸来淬灭才能得到更多稳定的结合物, 所得到的 PEG-DAQ-rhCNTF 在存放 14 d 后保持了 93.5% 的活性, 而 PEG-MAL-rhCNTF 只有 71.2%。这些结果表明, PEG-多巴醌具有高度选择性和半胱氨酸巯基反应性, 试剂本身和偶联产物稳定性好, 是巯基选择性修饰的良好试剂。

2 二硫键上的定点修饰

很多蛋白质中半胱氨酸都是以二硫键的形式存在, 将二硫键还原为两个游离的巯基, 再用双反应性的聚乙二醇化试剂进行修饰, 可形成一种三碳桥结构(图 3)^[10-11], 能替代二硫键起稳定修饰产物空间结构的作用, 对活性影响很小。用该方法修饰干扰素 α -2b (IFN) 时, 发现修饰产物 PEG-IFN 的生物活性与 PEG 的长度无关, 比其他位点的聚乙二醇修饰收率高, 成本低。

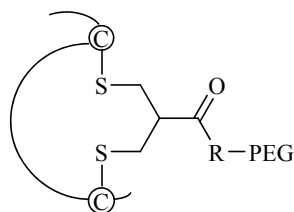


图 3 三碳桥结构

Fig. 3 Structure of three carbon bridge

抗原结合片段(Fab)在血液循环中迅速消除, 是聚乙二醇化修饰的良好对象。Khalili 等^[12]合成了 PEG-双碘试剂, 能特异性地将二硫键末梢定位到 Fab 的结合区。对贝伐珠单抗、雷珠单抗、曲妥珠单抗等水解得到的 Fab 进行 PEG 化, 离子交换色谱纯化后得到纯的 PEG-Fab 产品, 十二烷基硫酸钠聚

丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)未检测到 PEG 损失。用表面等离子体共振(SPR)进行比较结果表明: (1) Fab 和用于定点聚乙二醇修饰的 PEG 双烷基化试剂匹配良好; (2) PEG-Fab 只在表面亲和力下降了 2 倍, 而解离速率没有任何变化; (3) PEG 相对分子质量变化时, 表面结合速率和亲和力保持不变。

3 引入巯基后进行的修饰

有的蛋白质中不含半胱氨酸, 可用单点突变和多点突变的基因工程方法或用 Traut 试剂引入巯基, 再进行相应的修饰。

3.1 单点突变引入巯基后的修饰

何燕等^[13]将比伐卢定(BVLD)多肽链 7-甘氨酸(Gly)用半胱氨酸(Cys)取代, 用聚乙二醇定点修饰巯基, 采用多肽固相合成法制得[Cys]7-BVLD, 其与不同相对分子质量的 mPEG-MAL 偶联合成了 3 个聚乙二醇化比伐卢定衍生物: [Cys(mPEG 2000-MAL)]7-BVLD、[Cys(mPEG 5000-MAL)]7-BVLD 和 [Cys(mPEG 10 000-MAL)]7-BVLD, 这些衍生物的结构经 MS 确证。凝血酶原时间和凝血酶时间评价结果表明, 3 个衍生物均表现出良好的抗凝活性, 尤其是[Cys(mPEG 5 000-MAL)]7-BVLD 的抗凝活性优于比伐卢定。

安群星等^[14]选择天花粉蛋白(TCS)分子上可能的抗原决定簇位点 KR173-174 进行定点突变, 并将所构建的突变体 TCS KR173-174 在大肠杆菌中表达及纯化。通过该突变体第 173 位引入的半胱氨酸残基进行 PEG 定点修饰。结果表明, 所构建的突变型 TCS (mTCS) 的活性与野生型 TCS (wTCS) 活性相当, 而免疫原性已显著降低。PEG 修饰型 TCS 虽活性稍低, 但其免疫原性、急性毒性以及药动学性质得到显著提升。表明通过基因工程及化学修饰方法改造 TCS 可行, 所构建的突变型及 PEG 修饰型 TCS 值得进一步研究。

黄湘鹭等^[15]利用蛋白质分子同源模建, 选择在集成干扰素分子 IIFN 的第 72 位引入半胱氨酸残基构成集成干扰素突变体 IIFN72C。诱导表达后经包涵体变复性和柱色谱纯化, 与 mPEG-MAL 定点偶联。结果表明, IIFN72C 以包涵体形式表达, 表达量占菌体总蛋白的 30% 以上, 比活性与突变前相当, 修饰产物大多数为单修饰体, 纯化后质量分数大于 98%, 比活性保留约为修饰前的 8%。

治疗严重痛风的一种方法是注射非人类尿激

酶,以减少体内尿酸水平。pegloticase 是一种聚乙二醇化的猪-狒狒嵌合尿酸酶,用于慢性难治性痛风,但会产生较多的过敏反应,此外,还有一些皮肤红肿、恶心、便秘、胸痛和呕吐等副反应,这些限制了它的应用和效果。Nyborg 等^[16]研制了一种治疗性的尿酸酶,在 200 个代表不同 HLA 单体的人体样本中,免疫原性较低,将半胱氨酸设计到该序列中,用聚乙二醇定点修饰,效率能达到 95%。聚乙二醇尿酸酶在体外,中性 pH 值条件下,在人体血浆中以及鼠类和犬类体内的酶活性保持不变。在犬身上,皮下注射能使血浆中尿酸水平降低 85%。这种聚乙二醇化的非免疫原性尿酸酶将为痛风患者带来极大的帮助。

葡激酶(SAK)是一种细菌来源的、具有良好靶向性和溶栓活性的蛋白,拥有极大应用潜力,但在生物体内产生严重免疫反应,血浆半衰期短(仅 3 min)。根据 SAK 晶体结构及抗原位点选择突变位点,构建突变质粒,并在大肠杆菌中表达半胱氨酸(Cys)突变蛋白 S-cys;对目的蛋白在不同条件下进行聚乙二醇修饰^[17],纯化后得到较高纯度的修饰蛋白 PEG-S-cys,通过纤维蛋白平板溶圈实验和动物栓塞模型的构建初步对其生物活性进行验证。结果表明所得 PEG-S-cys 蛋白质量分数大于 90%,PEG-S-cys 具有溶栓活性,这为葡激酶的改造提供了一种新的方法与思路。

3.2 多点突变引入巯基后的修饰

梁凌宇等^[18]采用分子生物学技术经点突破得到 rhCNTF 突变体 CN10,运用 mPEG-MAL 对 CN10 进行定点修饰,每 2 天 ip 一次 PEG 化的 CN10,对小鼠体质量的增长抑制率可达 50%,与每天注射 2 次 rhCNTF 的体质量增长抑制作用相当,说明 CN10 蛋白在 PEG 化修饰后,其减重效应持续时间可明显延长。冯翠等^[19]则采用 mPEG-MAL 对 rhCNTF 的第 17 位半胱氨酸巯基进行定点修饰,实验结果表明,在 pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液中,蛋白质与修饰剂的比例为 1:3,4℃下反应 12 h,修饰率可达到 90%以上,修饰混合物通过一步阴离子交换色谱可获得质量分数 98%以上的单修饰产物。荧光光谱和圆二色图谱显示 mPEG-CNTF-C17 与原蛋白二、三级结构一致。细胞增殖活性检测表明, mPEG-CNTF-C17 的比活达到了 6.51×10^5 IU/mg,体内循环半衰期相对原蛋白提高了 30.3 倍。该研究为开发 CNTF 长效产品提供了基础。

为获得高抗菌活性聚乙二醇定点修饰的溶葡萄球菌酶(Lysn),根据该酶的高级结构,在它的催化域和结合域上优选 8 个位点(Q9、N13、N40、T172、N174、G197、V240 和 T244),分别突变成半胱氨酸,纯化后的溶葡萄球菌酶突变体经二硫苏糖醇(DTT)处理后与 mPEG-MAL 进行定点修饰反应^[20],RP-HPLC 分析显示 PEG 修饰率大于 70%,修饰产物经 MacroCapSP 阳离子交换层析纯化后,PEG 化溶葡萄球菌酶的质量分数大于 95%。比浊法和最小抑菌浓度(MIC)实验表明 20K-PEG-LysnV240C 和 20K-PEG-LysnT244C 的抗菌活性维持在原来的 50%左右。研究结果为溶葡萄球菌酶全身给药治疗金黄色葡萄球菌感染奠定了基础。

3.3 通过 Traut 试剂引入巯基后的修饰

为了构建 trastuzumab(TMAB)-聚乙二醇-PARAM 靶向递药系统,马鹏凯等^[21]以双功能聚乙二醇为连接子,并在 trastuzumab 上通过 Traut 试剂引入巯基。通过琥珀酸酐共价连接在 PAMAM 表面,由于酯键比较稳定,药物缓慢释放;随后再在 PAMAM 表面共价结合双功能聚乙二醇 NHS-PEG-MAL,延长其在血液循环的时间,增强 EPR 效应,提高药物在肿瘤部位的浓度,最后 PEG 末端连接巯基化的 TMAB,利用与 HER2 受体的作用提高进入肿瘤细胞的药物浓度,达到持续、有效、安全的肿瘤治疗策略。

4 结语

定点修饰有助于保持大分子活性,获得基于特定定位点的均一产物,简化或避免了复杂的分离纯化过程,有利于产率和产品质量的提高,在增加药物疗效的同时,生产成本也有望降低。

本文按游离巯基上、双硫键上及引入巯基后 3 种定点修饰策略对聚乙二醇定点修饰蛋白质药物中巯基进行了综述,介绍了不同的巯基引入方法和巯基的修饰试剂,为聚乙二醇定点修饰蛋白质药物中的巯基提供了思路。这些研究表明蛋白质上定点修饰技术,包括定点修饰巯基的技术仍在不断发展中,基于针对巯基这种单一基团的定点修饰可以更好地控制蛋白质药物的质量和药效,相信随着蛋白质药物和基因工程的发展,聚乙二醇定点修饰蛋白质药物中巯基将会有更广泛的应用。

参考文献

- [1] Pasut G, Veronese F M. State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research [J].

- J Control Release*, 2012, 161(2): 461-472.
- [2] Turecek P L, Bossard M J, Schoetens F, *et al.* PEGylation of biopharmaceuticals: a review of chemistry and nonclinical safety information of approved drugs [J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105(2): 460-475.
- [3] Dozier J K, Distefano M D. Site-specific PEGylation of therapeutic proteins [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(10): 25831-25864.
- [4] 杨凯睿, 高向东, 徐晨, 等. 聚乙二醇定点修饰蛋白质药物的技术和临床研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(32): 6381-6385.
- [5] 高冰, 欧瑜. 蛋白质药物的聚乙二醇定点修饰 [J]. 药物生物技术, 2016, 23(3): 245-249.
- [6] Zhao T, Cheng Y N, Tan H N, *et al.* Site-specific chemical modification of human serum albumin with polyethylene glycol prolongs half-life and improves intravascular retention in mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(3): 280-288.
- [7] 宋新蕾. 直链和支链 PEG 定点修饰对人血清白蛋白结构和药效学的影响以及 PEG-人血清白蛋白的药代动力学研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [8] Kunstelj M, Fidler K, Skrajnar S, *et al.* Cysteine-specific pegylation of rhG-CSF via selenylsulfide bond [J]. *Bioconjug Chem*, 2013, 24(6): 889-896.
- [9] Xu L, Zhang C, Wang Q, *et al.* Oxidized catechol-derived poly (ethylene glycol) for thiol-specific conjugation [J]. *React Func Poly*, 2017, 117: 97-105.
- [10] Balan S, Choi J W, Godwin A, *et al.* Site-specific PEGylation of protein disulfide bonds using a three-carbon bridge [J]. *Bioconjug Chem*, 2007, 18(1): 61-76.
- [11] Brocchini S, Godwin A, Balan S, *et al.* Disulfide bridge based PEGylation of proteins [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(1): 3-12.
- [12] Khalili H, Godwin A, Choi J W, *et al.* Comparative binding of disulfide-bridged PEG-Fabs [J]. *Bioconjug Chem*, 2012, 23(11): 2262-2277.
- [13] 何燕, 邓言波, 王良友. 比伐卢定的聚乙二醇化修饰 [J]. 合成化学, 2013, 21(1): 99-102.
- [14] 安群星, 雷迎峰, 杨敬, 等. 天花粉蛋白的聚乙二醇定点修饰及其性质的初步研究 [J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(8): 1586-1591.
- [15] 黄湘鹭, 陶杉杉, 徐晨, 等. 集成干扰素突变体 IIFN72C 的构建及其聚乙二醇定点修饰 [J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(4): 44-48.
- [16] Nyborg A C, Ward C, Zacco A, *et al.* A therapeutic uricase with reduced immunogenicity risk and improved development properties [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0167935.
- [17] 白垒, 徐彦颖, 汪德强, 等. 葡激酶聚乙二醇修饰及活性鉴定研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2017, 42(7): 893-897.
- [18] 梁凌宇, 雷清, 高雪峰, 等. 重组人睫状神经营养因子的聚乙二醇化修饰 [J]. 生物技术通讯, 2014, 25(1): 65-67.
- [19] 冯翠, 王祺, 张纯, 等. PEG 定点修饰重组人睫状神经营养因子及其生物活性评价 [J]. 中国生物工程杂志, 2015, 35(5): 15-21.
- [20] 陆海荣, 张宜涛, 黄青山. 重组溶葡萄球菌酶的 PEG 定点修饰 [J]. 生物工程学报, 2016, 32(1): 127-134.
- [21] 马鹏凯, 张雪梅, 李金明, 等. HER2 靶向聚酰胺-胺树枝状聚合物递药系统的构建及评价 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(10): 1171-1175.