

聚乙二醇修饰蛋白质的活化与检测方法

秦海娜 修志龙*

(大连理工大学生物工程系 大连 116012)

摘 要 聚乙二醇共价修饰蛋白质药物可以消除蛋白质药物的抗原性及免疫原性, 延长小分子多肽在体内的半衰期。本文对该项技术最近的制备、分离、分析方法及各种方法的优缺点作一介绍, 并对不同蛋白质需采用的分析方法提出了一点建议。

关键词 聚乙二醇 修饰 活化 分离 分析

Methods of Polyethylene Glycol(PEG) Activation and Analysis Methods for Polyethylene glycolated Protein

Qin Haina, Xiu Zhilong*

(The Department of Biotechnology of Dalian University of Technology Dalian 116023)

Abstract Polyethylene Glycol(PEG) modification of protein drugs is a practical method to reduce the immunogenicity and to prolong the half life of protein in plasma. In this article, we introduce the methods of preparation, analysis and separation of modified proteins, and put forward some advices about the appropriate methods for different protein analysis.

Key words Polyethylene glycolated, Modification, Activation, Separation, Analysis

近年来随着基因工程技术的发展, 用于疾病治疗的多肽、酶、细胞因子等蛋白类药物越来越多地被研究开发, 这类药物具有专一性强、时效高等优点, 但也有许多不尽人意的地方, 如(1)大多数药物具有抗原性及免疫原性; (2)容易从循环系统中被快速清除; (3)定位给药困难; (4)不稳定, 容易被酶类降解, 且来源稀少等^[1]。为了克服基因工程蛋白类药物的上述缺陷, 许多研究人员正设法对蛋白质进行结构改造或化学修饰^[2~4]。

化学修饰法是指在分子水平上对蛋白质进行改造, 即在体外将蛋白质的侧链基团通过人工方法与一些化学基团, 特别是具有生物相容性的大分子进行共价连接, 从而改变蛋白质的性质。其主要优点是可以延长蛋白质在体内的半衰期、降低免疫原性和抗原性; 另外还可以减弱蛋白酶的水解作用, 增加蛋白分子的可溶性等。蛋白质的免疫原性是由于其分子表面的抗原簇所决定的, 应用线性、亲水、惰性的高分子与蛋白质的非活性必需基团结合, 在其表面形成屏蔽, 使其不被识别, 不产生相应抗体, 从而抑制相应的免疫反应; 而连接大分子聚合物后, 药物的分子量显著增大, 不易被肾小球所过滤, 从而延长在体内的半衰期; 另外, 由于大分子亲水性聚合物的表面遮蔽作用在一定程度上减少了蛋白药物与蛋白酶的相互作用, 使药物的稳定性进一步提高。用于蛋白质修饰的大分子很多, 常见的有如下类型: 聚乙二醇(包括聚乙二醇 PEG

秦海娜 女, 23 岁, 硕士生, 目前从事聚乙二醇修饰水蛭素的研究工作。*联系人 E-mail: zlxu@mail.dlptt.ln.cn
2003-01-13 收稿

和单甲基聚乙二醇 mPEG); 多糖类, 如葡聚糖、右旋糖酐、淀粉等; 同源蛋白质及人工合成的多肽, 如聚丙氨酸等, 其中聚乙二醇由于其良好的生物相容性、反应简单、价格低廉等优点受到较多的重视^[1]。本文着重介绍聚乙二醇修饰蛋白质的活化方法、分离纯化及其分析方法等。

1 聚乙二醇的活化

聚乙二醇修饰蛋白质主要通过聚乙二醇的末端羟基与蛋白质的氨基酸残基反应而实现，但聚乙二醇的末端羟基活性很差，很难在温和的环境中与蛋白质进行偶联反应，所以必须使用活化剂活化该羟基，使活化的聚乙二醇能在温和的环境中对蛋白质进行共价修饰。近年来聚乙二醇的活化方法已成为该领域的研究热点之一。

1.1 非特异性活化方法

1.1.1 溴化氰法 色谱或层析的固相载体最早的活化方法之一即溴化氰活化法, 高 pH 时, 溴化氰与载体内部的羟基反应转化成氰酸酯和亚氨基碳酸酯, 后来该方法也应用于带羟基的高分子聚合物的活化。其方法操作简单, 容易重复, 而且反应环境温和, 但其偶联后的配基(包括蛋白质 $R-NH_2$)很容易脱落, 这种脱落主要是由于活化载体和含氨基配基之间形成不稳定的异脲键所引起的^[5]。加之溴化氰有毒, 操作须在通风橱中进行, 该方法逐渐被其它方法所取代。

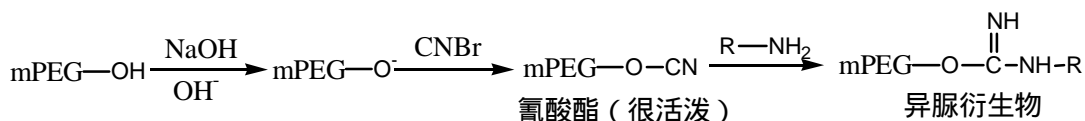


图 1 溴化氰活化与偶联反应图示^[5]

Fig.1 Activate mPEG with CNBr and conjugate to protein^[5]

1.1.2 羰基二咪唑法 该方法最早用于多肽的合成，被证明是形成酰胺键的良好试剂。含羟基的载体可与羰基二咪唑(CDI)反应得到活泼的酰基咪唑，蛋白中赖氨酸残基的伯氨基可与其迅速反应形成稳定的酰胺键。这种化学键比较稳定，偶联上的蛋白不易脱落^[5]。

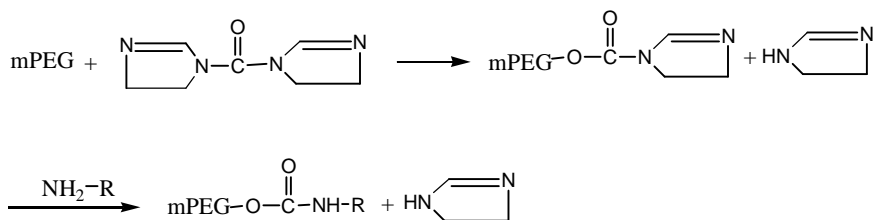
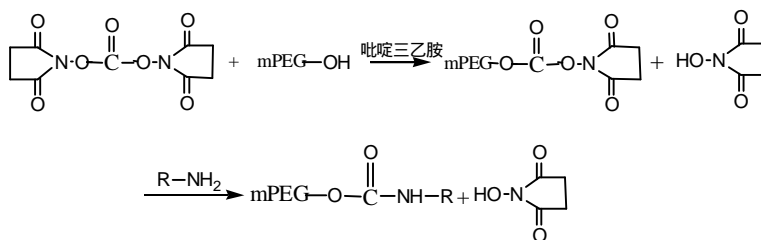


图 2 CDI 活化与偶联反应图示

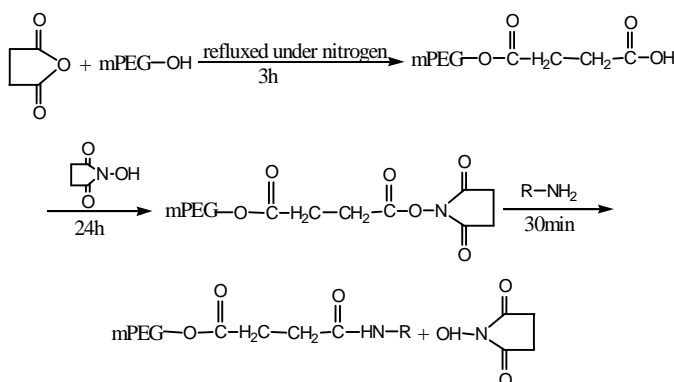
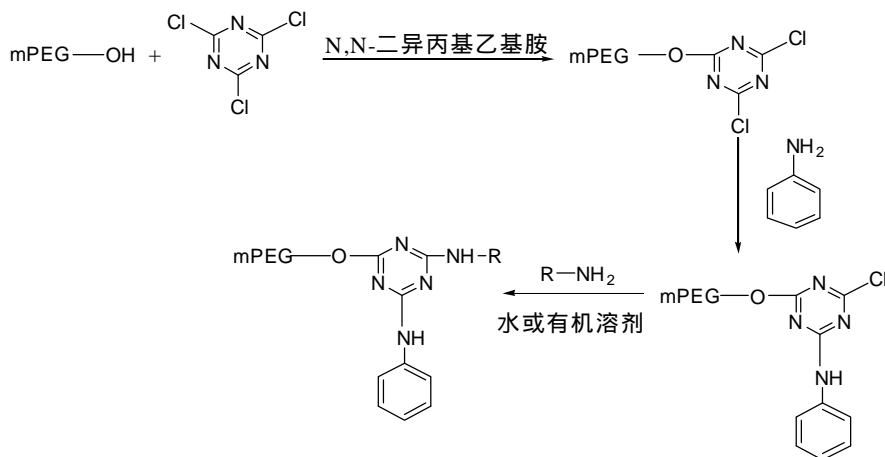
Fig.2 Activate mPEG with CDI and conjugate to protein

CDI 活化 PEG 需注意: (1) CDI 遇水生成 CO_2 和咪唑, 所以活化反应宜在有机溶剂中进行, 且溶剂不能含水; (2) 活化后的聚乙二醇最好在低温下洗涤, 以保持高反应活性; (3) 活化后的聚乙二醇应用冷冻干燥法除去残留的有机溶剂, 以免使偶联的蛋白失效; (4) 偶联蛋白质的缓冲液中勿含有胺类(如 Tris 或甘氨酸), 否则它将与待连接的蛋白分子竞争偶联。

1.1.3 *N*-羟基琥珀酰亚胺法 (a) *N,N*-琥珀酰亚胺碳酸酯活化, 此反应也需要在无水条件下进行。

图 3 *N,N*-琥珀酰亚胺碳酸酯活化与偶联反应原理图^[5]Fig.3 Activate mPEG with *N,N*-succinimide carbonate and conjugate to protein

(b)琥珀酸酐及 *N*-羟基琥珀酰亚胺活化，该方法活化得到的聚乙二醇活性较高，最好是在非水环境中进行蛋白的偶联，但对于多数生物大分子来说都是优先考虑水溶液系统，而且在 4℃，pH=8 时活化聚乙二醇在水中的半衰期为 20min 左右，所以偶联反应最好在低温下，20min 内完成。周笑艳等用该方法对天冬酰胺酶进行修饰，取得了较好的效果^[4]。

图 4 *N*-羟基琥珀酰亚胺活化与偶联反应原理图Fig4 Activate mPEG with *N*-hydroxysuccinimide and conjugate to protein图 5 三氯化嗪活化与偶联反应原理图^[5]Fig.5 Activate mPEG with TST and conjugate to protein^[5]

1.1.4 氰脲酰氯法 氰脲酰氯又名三氯化嗪(TST)，是对称杂环化合物，含有三个活性酰氯键，广泛应用于染料行业。TST 上的三个氯原子很容易发生亲核取代反应，而且一个氯原子的取代

可以稳定其它酰氯键, 所以, 第一个氯原子在 4°C 就可以反应, 第二个在 25°C 反应, 第三个在 80°C 才反应。David 等利用 TST 与聚乙二醇上的羟基反应, 只有一个氯原子被取代, 其它的氯原子与蛋白质的氨基反应。为抑制氯原子的亲核活性以控制反应的速度及修饰度可先加入苯胺取代其中一个氯原子, 剩下的氯原子用于蛋白质的偶联。该反应虽说简单易行, 但由于 TST 的毒性以及卤原子过强的亲核活性使其应用受到限制。

1.1.5 光气参与的活化方法 Kurfuerst 等在其专利中提到一些方法^[6], 分别用 *N*-羟基琥珀酰亚胺钾盐、硝基苯酚及三氯苯酚与光气反应制备活化聚乙二醇, 活化主要分两步, 如图 6 所示:

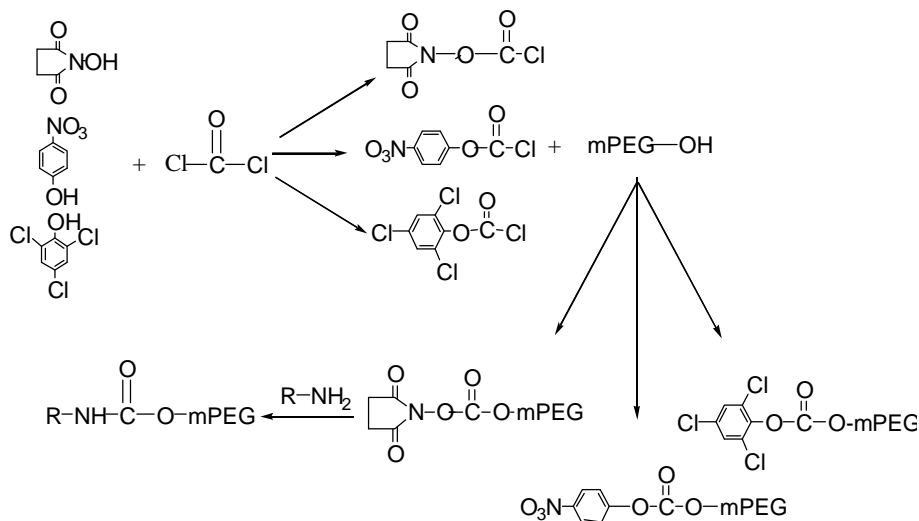


图 6 *N*-羟基琥珀酰亚胺钾盐、硝基苯酚及三氯苯酚活化与偶联反应原理

Fig.6 Activate mPEG with *N*-hydroxysuccinimide potassium salt and Nitro-Phenyl carbonate, 2,4,5-trichlorophenyl carbonate and link to protein

这些活化剂都应与聚乙二醇在有机相反应, 操作方法类似, 活化效果和配基偶联效果还没有具体评价。但该反应由于有光气参与, 毒性极强, 增加了操作的复杂性。

1.1.6 改变聚乙二醇结构以提高修饰效果 改变聚乙二醇的结构, 将聚乙二醇的结构由线状改为叉状或梳状也可以起得到更好的修饰效果。

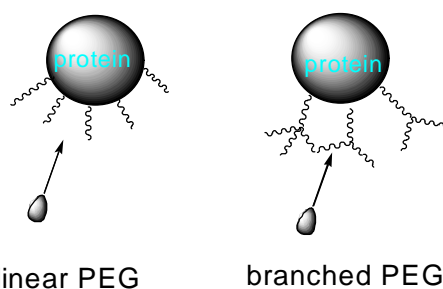


图 7 叉状聚乙二醇与线状聚乙二醇比较

Fig.7 The difference between linear PEG and branched PEG

其优点主要体现在:

- (1) 叉状聚乙二醇可以减少蛋白酶与蛋白质的接触, 以减弱其水解作用;
- (2) 聚乙二醇结构变化造成的空间位阻效应减少了聚乙二醇与蛋白质的结合位点, 减少蛋白

质失活:

(3)聚乙二醇对蛋白质的屏蔽效应更为显著,更好地降低蛋白药物的抗原性和免疫原性。

Schiavon 等用线状和叉状聚乙二醇分别修饰尿酸酶^[8],结果如表 1:

表 1 叉状聚乙二醇和线状聚乙二醇修饰尿酸酶
Tab.1 Uricase conjugated to linear and branched PEG

	NH ₂ 修饰率/%	保留酶活/%	血浆半衰期/min
Linear PEG	46	40	3930
Branched PEG	35	76	3450
Native			470

由表 1 可以看出,叉状聚乙二醇修饰蛋白质可以很好地保留蛋白的生物活性。

另外,通过增长活化端与聚乙二醇链之间的距离,或在 α -C 上增加支链,可以延长活化的聚乙二醇在水中的水解半衰期,从而有望提高修饰效果。如表 2:

表 2 不同的活化聚乙二醇的水解半衰期比较
Tab.2 The comparison of hydrolysis $t_{1/2}$ between different PEG derivatives

分子式	$T_{1/2}/\text{min}$
$\text{PEG}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{N}-\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2$	16.5
$\text{PEG}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{N}-\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2$	23
$\text{PEG}-\text{O}-\text{CH}_2\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-\text{N}-\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2$	33

1.2 特异性活化方法

以上的活化方法虽经常使用,但有很多缺陷。它只限于使用低分子量的聚乙二醇,因为单甲氧基聚乙二醇中一般含有 15%左右的双羟基聚乙二醇,使反应后的产物可能形成交联大分子,高分子的聚乙二醇可能使产物出现沉淀;修饰后的连接键不稳定,容易水解;对修饰位点没有选择性,副反应很多,反应后的产物十分复杂。Harris 等在以往活化方法的基础上发展了聚乙二醇第二代活化方法,可望一定程度上解决以上的缺陷^[7]。新一代的聚乙二醇活化方法主要解决两个问题:(1)提高修饰位点的选择性;(2)延长活化后聚乙二醇的水解半衰期。

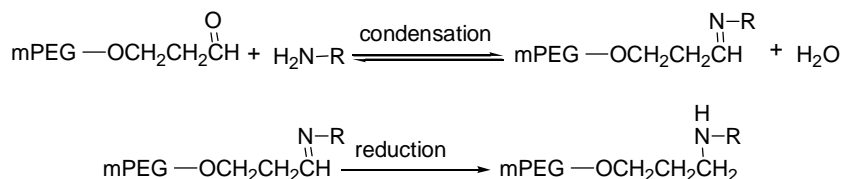


图 8 PEG-醛合成示意图

Fig.8 PEG-aldehyde conjugate to protein

1.2.1 PEG-醛水合法 在酸性条件下(pH=5), 醛基与 *N*-端 α -氨基能进行特异反应, 选择性很好, 大大减少了反应物的多样性, 而且可以长时间稳定保存。

1.2.2 聚乙二醇对蛋白质的半胱氨酸残基的化学修饰 对蛋白质的半胱氨酸残基—SH 进行聚乙二醇修饰, 可以提高修饰的选择性^[22]。这是因为与—SH 特异反应的试剂有很多, 而且蛋白质中游离的—SH 要比赖氨酸残基的自由氨基要少的多。如果蛋白质中不存在自由—SH, 可以通过基因工程手段加入, 但这可能会引起错误的蛋白质折叠。

图 9 表示各种活化的 PEG 对巯基进行特定修饰, 活化剂也各有其优缺点:

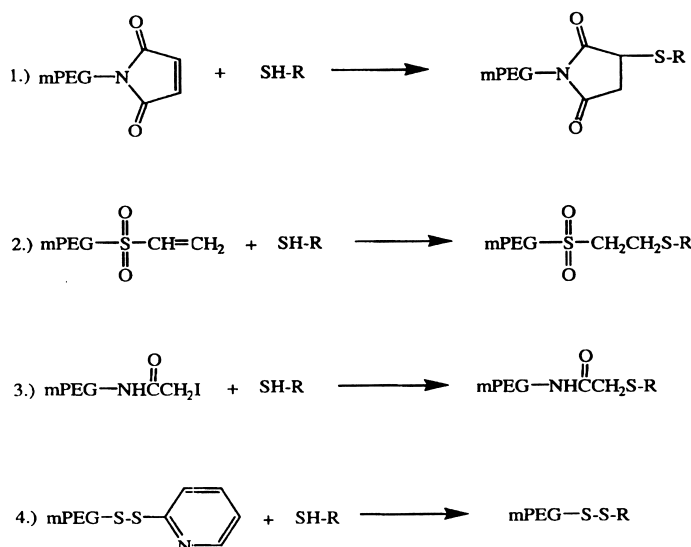


图 9 PEG 修饰巯基示意图

Fig.9 PEG derivatives for modification of cysteine

(1)为 PEG-maleimide, 该试剂与巯基在酸性条件下(pH=6~7)即可反应, 但在水中不稳定, 容易开环或与水加成, 与巯基反应形成化合键较为稳定, 但在水中会缓慢水解; (2)为 PEG-vinyl sulfone, 该试剂在水中较为稳定, 但与巯基反应缓慢, 如果提高反应环境的 pH(pH=7~8), 反应速度会加快, 但同时 PEG-VS 也会与赖氨酸残基发生反应; (3)为 PEG-iodoacetamine, 巯基与该试剂发生亲核取代反应, 反应缓慢但形成的化学键很稳定, 但该反应需在黑容器中进行, 以免反应生成的碘与其它氨基酸反应; (4)为 PEG-orthopyridyl disulfide, 该试剂在酸性和碱性条件下(pH=3~10)都会与巯基特异反应而生成稳定的二硫键, 除非在还原条件下被还原为巯基。

1.2.3 聚乙二醇对蛋白质中的羟基的化学修饰 通过氧化糖蛋白的糖类残基或蛋白质中丝氨酸或苏氨酸的羟基也是对蛋白质进行特异修饰的一个途径。

糖和氨基酸上的羟基被高碘酸钠或葡萄糖氧化酶氧化为醛基, 然后与连接了酰肼或氨基的 PEG 可进行特异反应, 生成的席夫碱双键可通过硼氢氰化钠还原形成稳定的 C—N 键。

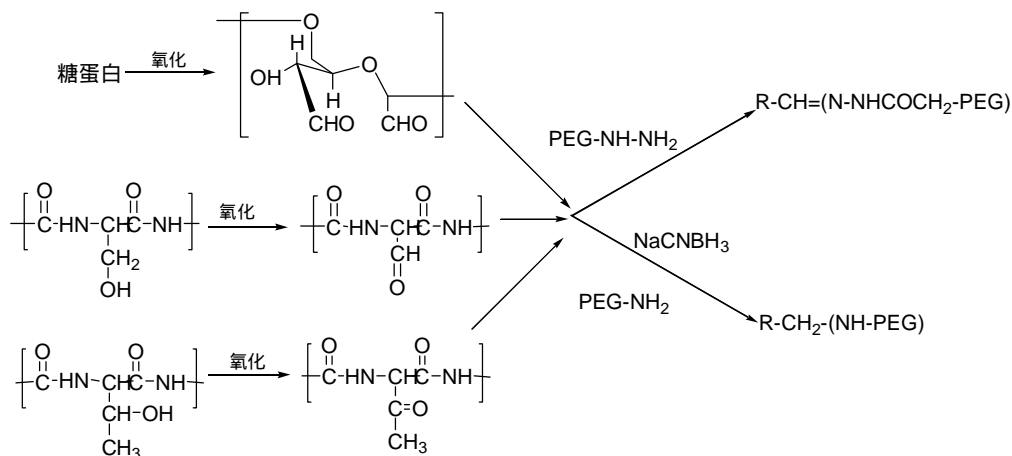
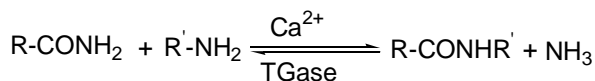


图 10 氧化羟基定位修饰示意图

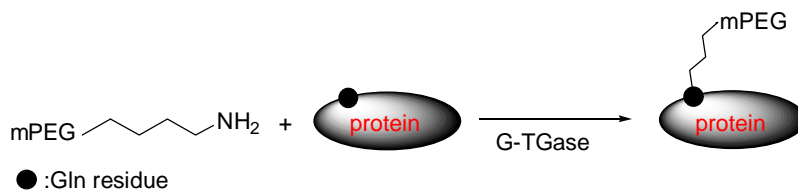
Fig.10 PEGylation of glycoproteins by oxidized carbohydrates

1.2.4 酶法定点连接聚乙二醇 除了传统的化学修饰方法，也可以通过其它途径，如酶催化来达到修饰的目的。转谷氨酰胺酶(transglutaminase, TGase)的结构和序列特点决定了它对谷氨酰胺残基有特异催化作用，但底物谷氨酰胺残基须暴露在溶剂中或处在蛋白质活动性大的区域，以让谷氨酰胺酶容易接近。TGase 对于烷基胺没有太强的选择性，大多数烷基胺都可以被催化反应，但 TGase 对有 6 个碳原子的脂肪族烷基胺选择性稍高，反应按以下反应式进行。



对于没有或不能暴露出谷氨酰胺的蛋白质可以通过基因工程手段加入，图 9 表示针对不同的蛋白质提出的两种修饰方案^[9]。

(1)谷氨酰胺催化连接含有谷氨酰胺残基的蛋白质：



(2)谷氨酰胺催化连接没有谷氨酰胺残基的蛋白质

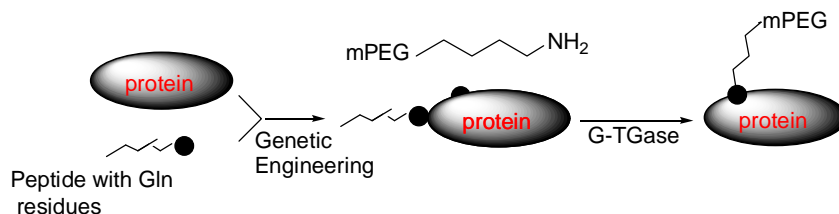


图 11 酶法连接示意图

Fig.11 The flow chart of PEGylation of protein by G-Tase

酶法催化连接 PEG 与传统的化学修饰相比在许多方面有优越性。首先，这种方法的修饰产

物活性保留很高, Sato 等用该方法将 PEG3000 和白细胞素进行修饰连接, 其活性保留可达 100%, 用 PEG10000 修饰得到的白细胞素活性也保持在 69% 以上; 其次, 该反应特异性好, 不会引起太多的副反应; 最后, 该方法可以通过设计底物序列在特定位点加入谷氨酰胺, 使定点修饰成为可能, 如图 11(2)所示; 另外, 由于暴露于溶剂中的谷氨酰胺残基更容易被转谷氨酰胺酶催化, 所以可在一定程度上控制 PEG 的修饰位点, 避免修饰破坏蛋白质的活性中心。Sato 等修饰得到的白细胞素在人体内的半衰期由原来的 2.2~11min 延长到 8.8~75min, 较为显著地提高了其疗效。

2 PEG 化蛋白质的分离纯化

经 PEG 修饰后的蛋白质是十分复杂的混合物, 这是由于(1)PEG 聚合物分子量分布较宽, 如: PEG5000 的分子量分布在 5000 ± 500 道尔顿范围内; (2)由于被修饰蛋白质上待连接的活性位点的活性不同, 空间位阻不同, 导致每个蛋白分子上连接的 PEG 数和 PEG 连接的位置不同, 如超氧化物歧化酶(SOD)有 20 个可能的 PEG 连接位点, 理论上大约有 20^{20} 种不同的反应产物; (3)活化的聚乙二醇中还残留未反应的活化剂、未活化的 mPEG 等。因此, 经 PEG 修饰后的蛋白质必须进行分离纯化。

一般用色谱方法纯化 PEG 化蛋白质。连接 PEG 后, 蛋白质的分子量有了不同程度的提高, 要想将其逐一分开, 体积排阻色谱(SEC)就成了首选的方法, 但 SEC 分离同一数量级的物质效果不好, 所以对于分子量小且修饰位点少的多肽和小分子蛋白质该方法也不是很理想; 由于 PEG 为弱疏水性长链, 连接 PEG 后, 蛋白质分子的疏水性有所增强, 所以也可以用反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离, 但其分离条件的摸索较为烦琐; 再者, 由于连接了 PEG, 蛋白质分子上的氨基等活性位点减少, 其等电点、pH 都发生了变化, 所以用离子交换色谱(IEC)理论上也可以将其分离。

Malik 等的研究表明, PEG 化蛋白质的纯化难度很大, 且纯化产量很低^[10]。Busby 和 Ingham 认为, 分离难度大的原因在于 PEG 在水溶液中具有伸展构象, 其流体动力学体积远远大于同样分子量的蛋白质。例如: mPEG6000 不能通过截留分子量为 12KD 的半透膜, 在体积排阻色谱中, PEG6000 的行为类似于分子量 25~35KD 的球状蛋白质^[11]。采用切割分子量为 30000Da 或 50000Da 的超滤膜过滤可有效去除 mPEG, 但该方法不适用于小分子多肽。

迄今为止, 常用的分离方法是先用超滤或透析去除咪唑等小分子活化剂残余物, 然后再用各种色谱法分离。如: Snider 等用各种色谱法考察 PEG-SOD 的多态性^[12]; Mcgoff 等用体积排阻色谱和离子交换色谱对 PEG-SOD 进行分离及分析^[13]。唐微等先利用硫酸铵对反应后的混合物进行蛋白质沉淀, 有效地去除了溶液中的 PEG, 然后再对离心出的蛋白质进行体积排阻色谱分离, 分离效果较以前好^[11], 但该方法同样也不适于小分子多肽, 因为小分子多肽不容易被盐析沉淀。另外, Zhao 等用异丙醇沉淀活化后的聚乙二醇分子, 可有效去除反应时的极性溶剂和副产物, 活化聚乙二醇的收率达 90% 以上^[23]。

3 PEG 化蛋白质的表征与分析

PEG 化蛋白质的检测与分析至少应该有三个方面的: (1)蛋白的平均修饰度; (2)PEG 修饰的

位点及特定位点被修饰程度；(3)不同修饰度的蛋白质的相对含量^[14]。其中 PEG 修饰的特定位点及特定位点被修饰程度的检测目前尚未见报道。现将几种常用的检测分析方法介绍如下。

3.1 色谱法

如果用色谱法可以将聚乙二醇反应后的混合物逐一分离，则可以绘制随浓度变化的工作曲线，根据工作曲线来为各个组分定性及定量，从而确定混合物的平均分子量和平均修饰度。但由于 PEG 化蛋白质的多样性以及 PEG 在溶液中影响蛋白质的色谱行为，色谱法分析并不是最好的分析方法，其分辨率很低，谱带宽且包含多种混合成分，另外由于蛋白质的多样性，定性及定量也会有困难。

Snider 等分别利用高效离子交换色谱、高效体积排阻色谱、高效反相液相色谱等对 PEG-SOD 作分析，结果显示其分辨率很低，不能将各种分子逐一分析，谱带宽且杂乱^[12]。Mcgoff 用体积排阻色谱对 PEG 化的 SOD 进行分析，SOD 为一尖锐的峰，而 PEG 化的 SOD 则为一宽峰，而且不能分离完全^[13]。但对于修饰位点少的蛋白质或多肽而言色谱法效果较好，如 Brian Fenton 等用 RP-HPLC 对 PEG-Hirudin(水蛭素)分析，由于水蛭素只有三个修饰位点，其产物较少，可以很清楚的看出有三个峰，分别为 PEG-Hirudin、(PEG)₂-Hirudin、(PEG)₃-Hirudin^[15]。

凝胶渗透色谱(GPC)属于凝胶色谱的一种。凝胶色谱以多孔性填料为固相，填料上有许多大小不一的孔径，据样品的尺寸大小实现分离。以有机溶剂(如：甲苯，四氢呋喃等)为流动相的称为凝胶渗透色谱，以水溶液为流动相的称为凝胶过滤色谱。有机相能很好的溶解大分子 PEG，Bullock 等用碱水解使蛋白质与 PEG 分离，再对水解下来的 PEG 进行凝胶渗透层析，通过测定 PEG 的量以测修饰度^[16]，但该方法可能因为水解不彻底和样品中含有游离的 PEG 而受干扰。

3.2 SDS-PAGE 凝胶电泳法

凝胶电泳是蛋白质分析中十分常用的方法，其分辨率高且可以测定分子量，但该法在测定 PEG 化蛋白质的分子量方面却存在很多缺陷。由于 PEG 在蛋白质表面的屏蔽作用和 PEG 分子与凝胶分子的缠绕作用使 PEG 化的蛋白质在凝胶中的迁移速度减慢，测出的分子量偏大。Kurfurst 用常规的电泳法测定 PEG 修饰后的水蛭素分子量，结果比理论值大一倍以上。用碘化钡将 PEG 染色，根据 PEG 标准曲线测定分子量，其值要准确的多。Kurfurst 还用等电聚焦法分析 PEG 修饰后的水蛭素，证明有三种物质：Hirudin，PEG-Hirudin，(PEG)₂-Hirudin^[17]。

另外，用毛细管区带电泳对 PEG 化蛋白质的分析也屡见报道。由于蛋白质的疏水作用、静电作用和其它多种两相分配机制，毛细管中的蛋白质容易吸附在管壁上，尤其是碱性蛋白质的静电吸附最为突出，这样使毛细管电泳的分离效率下降，峰高降低甚至不出峰。为克服蛋白吸附，常采用化学方法来消除或覆盖管壁上的硅羟基，使石英表面转化成高分子涂层^[18]。Cunico 等通过改性剂使毛细管柱内壁带正电荷，电渗流从通常的正极到负极方向变为负极到正极方向，减少了蛋白在毛细管内壁的吸附，同时也提高了分离度^[19]。

3.3 分光光度法

自从 1960 年 Satake 等介绍用 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)法测定蛋白质氨基浓度以来，该方法已成为测蛋白质修饰度最常用的方法。TNBS 与蛋白质反应，蛋白质的赖氨酸残基的氨基末

端进攻 TNBS 的磺酸基,并将其取代,形成的复合物有特定的光吸收,以此测定其含量。该方法简单易行,因此得到广泛应用。但该方法存在如下缺陷:(1)TNBS 与蛋白质反应受 pH 影响较大,所以实验前应先测定最佳 pH;(2)对于较小的蛋白质,该方法精确度不高。但 Snyder 等在此基础上对 TNBS 法进行改造,使该法精确性又有所提高^[20]。

Stock 等采用荧光胺法测定修饰度。荧光胺与蛋白质赖氨酸残基的氨基末端发生反应,生成的产物有特定的光吸收,通过测定蛋白质混合物所激发的荧光值来测定其平均修饰度。该方法灵敏性很高,仅需纳克级的蛋白质就能完成。但这类方法所用的 PEG 衍生物较昂贵,不适于常规分析^[21]。

3.4 其它方法

质谱法是测定物质结构的重要手段,近年来,一种新型的质谱方法-基体辅助激光解析电离质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization MS, MALDI-MS)被成功地用于 PEG 修饰蛋白组分的定性与定量分析。该质谱最大特点是可以分析高分子量的生物大分子,被测分子量可达 50 万道尔顿。红外光谱也是鉴别化合物、确定分子结构常用的手段之一,对单一组分或混合物中各组分也可以进行定量分析。由于拉曼散射光的频率位移对应于分子的能级跃迁,因此拉曼光谱也成为人们研究分子结构新的手段之一。

Bullock 等报道,红外光谱测定相对而言较为快速直接,不需要对样品进行预处理,可以根据 C—O—C 键的吸收强度给聚乙二醇定量,但必须假设连接了 SOD 和没有连接 SOD 的聚乙二醇的 C—O—C 键的吸收强度相同。另外,由于红外光谱对 PEG-SOD 中的 PEG 没有特征吸收,所以游离 PEG 的量需要用 GPC 法检测并扣除。而且,该方法确定修饰度还需要知道精确的蛋白质含量,这也可能成为误差来源。拉曼光谱样品制作简单,检验灵敏,但同红外光谱有相同的缺点。MALDI-MS 光谱与毛细管电泳谱十分相似,但精确性比毛细管电泳差,而且与红外光谱和拉曼光谱有同样的缺点^[16]。

4 蛋白质修饰展望

PEG 修饰技术在蛋白质药物的应用上起着越来越重要的作用。目前已上市的药物有 Enzon 和 Rhone-Poulenc Rorer 公司的抗癌药 Oncaspar(PEG-L-ASP, 天冬酰胺酶),罗氏公司治疗丙肝病毒的 PEG-Intron(PEG-IFN- α -2a),已获 FDA 批准用于多种严重免疫缺陷治疗的 PEG-ADA(腺苷脱氨酶),还有 PEG-水蛭素等多种药物正处于临床实验阶段。针对不同的酶、多肽或蛋白选择适宜的 PEG 活化和偶联方式以及相应的产物分离与检测方法,各种方法都有其适用范围和局限性,至今还没有通用的方法可供选择。随着 PEG 修饰技术研究的不断深入,各种修饰特异性好、修饰率高、操作简便、偶联产物稳定的活化剂不断涌现,必将进一步提高聚乙二醇修饰蛋白质的特异性,从而使产物的分离、纯化和分析检测更加简单易行,这是 PEG 修饰技术发展的必然要求。

参考文献

- [1] J M Harris. Polyethylene Glycol Chemistry Biotechnical and Biomedical Applications Plenum, New York, NY, 1992.
- [2] O BCharles, L G Steven, P M David et al. Anal. Biochem., 1983, 131: 25~33.
- [3] H U Esslinger, H Sylvia, R Maurer et al. Thrombosis and Haemostasis, 1997, 5: 911~919.

- [4] 周笑艳, 刘景晶. 中国药科大学学报, 2000, 31(3): 230~233.
- [5] 张津辉, 蒋中华. 生物分子固定化技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 1998. 7.
- [6] Kurfuerst. USP: WO91/08229, 1991.
- [7] M J Roberts, M D Bentley, J M Harris. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 54: 459~476.
- [8] O Schiavon, P Caliceti, P Ferruti et al. IL Farmaco, 2002, 55: 264~269.
- [9] S Haruya. Advanced Drug Delivery Review, 2002, 54: 487~504.
- [10] F Malik. Exp. Hematol., 1982, 20(8): 1028~1035.
- [11] 唐 微, 常 远, 邱雪贞 等. 生物化学杂志, 1996, 12(1): 73~76.
- [12] S Jeffery, N Christopher, L C Yuan et al. J. of Chromatography, 1992, 599: 141~155.
- [13] P McGoff, C B Antonia, R Maskiewicz. Chem. Pharm. Bull., 1988, 36(8): 3079~3091.
- [14] 李伟军, 林炳承, 苏志国. 分析化学评述与进展, 2001, 29: 228~231.
- [15] F Brian, K Lauziere, W Jeffery et al. BASF Bioresearch Corporation, Worcester, MA 01605.
- [16] J Bullock, C Swanpan, A Severdia et al. Anal. Biochem., 1997, 254: 254~262.
- [17] M M Kurfurst. Anal. Biochem., 1992, 200: 244~248.
- [18] 陈 义. 毛细管电泳技术及应用. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [19] R L Cunico, V Gruhn, L Kresin et al. J. Chromatogr., 1991, 599: 467~477.
- [20] Snyder. Anal. Biochem., 1975, 64: 284~288.
- [21] S J Stocks, A J Joens, C W Ramey et al. Anal. Biochem., 1986, 154: 232~234.
- [22] M J Roberts, M D Bentley, J M Harris. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 54: 459~476.
- [23] X Y Zhao, A M William, F Sieber et al. Tetrahed. Lett., 1998, 39: 8433~8436.