

蛋白质 PEG 修饰技术概述

聚乙二醇具有较广的分子量分布，随着平均分子量的不同，性质也产生差异，当分子量小于 1000Da 时，聚乙二醇是无色无臭粘稠的液体，高分子量的聚乙二醇则是蜡状白色固体，固体聚乙二醇的熔点正比于分子量，逐渐接近 67℃ 的极限。毒性随分子量的增加而减少，小于 400Da 的 PEG 在体内会经乙醇脱氢酶降解成有毒的代谢物，而分子量大于 1000 Da 的 PEG 经过多年应用于食品业、化妆品业和制药业证明没有毒性。

聚乙二醇分子中含有大量乙氧基，能够与水形成氢键，因而具有良好的水溶性，同时又可溶于除乙醚、己烷、乙二醇以外的大部分有机溶剂。大多数蛋白质经聚乙二醇修饰后，除保留或增加其水溶性外，还可以获得在一些有机溶剂中的溶解性。在蛋白质溶液中，聚乙二醇无论是处于游离还是结合形式，即使浓度很高，对蛋白质分子都没有副作用。聚乙二醇修饰的蛋白质一般构象不会改变，其结合物的生物学活性主要由结合物的蛋白质部分产生。

聚乙二醇具有免疫学惰性，即使分子量高达 5.9×10^6 Da，本身的免疫原性也很低。临床上使用聚乙二醇修饰蛋白治疗未发现抗聚乙二醇抗体产生。

在 20 种构成蛋白质的常见氨基酸中，只有具有极性的氨基酸残基的侧链基团才能够进行化学修饰。常用的反应氨基酸包括赖氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、

酪氨酸，N-端氨基和 C-端羧基。这些氨基酸残基上的反应性基团多呈亲核性，其亲核活性通常按下列顺序依次递减：巯基>氨基>氨基>羧基(羧酸盐)>羟基。根据化学修饰剂与蛋白质之间反应性质的不同，修饰反应主要分为酰化反应、烷基化反应、氧化还原反应、芳香环取代反应等类型，对蛋白质进行氨基、巯基和羧基等侧链基团进行化学修饰。巯基通常存在于蛋白质的二硫键和活性位点上，而羧基如果不与蛋白质上的氨基发生分子间或分子内中和反应，也很难活化。因此，蛋白质或多肽分子最容易与修饰剂发生作用的位点是分子表面赖氨酸残基上的氨基。

聚乙二醇修饰又称分子的 PEG 化 (PEGylation)，是 20 世纪 70 年代后期发展起来的修饰方法。将活化的聚乙二醇与蛋白质分子相偶联，影响蛋白质的空间结构，最终导致蛋白质各种生物化学性质的改变：化学稳定性增加，抵抗蛋白酶水解的能力提高，免疫原性和毒性降低或消失，体内半衰期延长，血浆清除率降低等。

聚乙二醇修饰反应类型

在 20 种构成蛋白质的常见氨基酸中，只有具有极性的氨基酸残基的侧链基团才能够进行化学修饰。常用的反应氨基酸包括赖氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸，N-端氨基和 C-端羧基。这些氨基酸残基上的反应性基团多呈亲核性，其亲核活性通常按下列顺序依次递减：巯基> α 氨基> ϵ 氨基>羧基(羧酸盐)>羟基。根据化学修饰剂与蛋白质之间反应性质的不同，修饰反应主要分为酰化反应、烷基化反应、氧化还原反

应、芳香环取代反应等类型，对蛋白质进行氨基、巯基和羧基等侧链基团进行化学修饰。巯基通常存在于蛋白质的二硫键和活性位点上，而羧基如果不与蛋白质上的氨基发生分子间或分子内中和反应，也很难活化。因此，蛋白质或多肽分子最容易与修饰剂发生作用的位点是分子表面赖氨酸残基上的氨基，包括 α 氨基或 ϵ 氨基。

氨基修饰

蛋白质分子表面的游离氨基具有较高的亲核反应活性，一般不处于活性中心部位，因而成为化学修饰中最常用的被修饰基团。主要修饰氨基是赖氨酸的 ϵ -、 α -氨基和末端氨基。游离氨基在蛋白质分子中含量较高，亲电性活化聚乙二醇和氨基酸的游离氨基反应时，多为随机修饰，常有几个氨基被修饰，导致多态混合物的产生，即使只结合一个聚乙二醇，也可能结合在不同的氨基位点上，产生位点异构体。由于蛋白质只有一个末端氨基，因此对它的修饰可以减少多态混合物和位点异构体的产生，但修饰末端氨基的聚乙二醇反应时需使用硼氢氰化钠，有一定的毒性。氨基修饰最常用的修饰剂为 SS-PEG、SC-PEG、SPA-PEG、NHS-PEG2 和 ALD-PEG 等。

巯基修饰

活化半胱氨酸的巯基往往处于蛋白质的活性中心部位，位于蛋白质表面的自由巯基远少于氨基，因此修饰效率低下，修饰后蛋白活性损失较大，但其优点是修饰专一性高于氨基修饰。若天然蛋白中不含半胱氨酸，则可通过基因工程改造方法在蛋白的特定区域引入一个或一个以上的自由半胱氨酸，对蛋白质进行定点修饰，从而

使生物活性损失最小化，但也可能导致蛋白形成二聚或多聚体。最常用的修饰剂为 MAL-PEG。

羧基修饰

羧基的修饰位点包括天冬氨酸、谷氨酸及末端羧基。首先将聚乙二醇分子中的羧基转化为氨基，再在羧二亚胺存在的条件下与蛋白质的羧基结合，但同时也易产生其它的交联反应。目前使用较少。

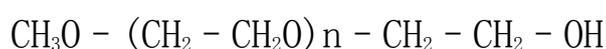
聚乙二醇衍生物的分类

聚乙二醇末端的羟基是其在化学修饰反应中的功能基团，但它的反应活性较低，只有在较为强烈的条件下才能与其它基团反应，而这样的条件通常是蛋白质无法耐受的，因此必须先对聚乙二醇进行活化，使其在温和的反应条件下以高反应速率与蛋白质偶联。根据活化方式、电性、结构和端基等的不同，聚乙二醇衍生物可有不同的分类方法。

按活化方式的分类

按照活化方式的不同分为同端基遥爪聚乙二醇和异端基遥爪聚乙二醇。将聚乙二醇两端的羟基用不同的基团取代，得到异端基遥爪聚乙二醇，如果两端的取代基团均为活性基团，则称为异端双功能基遥爪聚乙二醇，如果两个取代基团中一个为不活泼或者惰性基团，另外一个为活泼基团，则称为异端单功能基遥爪聚乙二醇。由于聚乙二醇两端同时活化不但要消耗较多的活化试剂，而且在化学修饰过程中容易发生蛋白交联，有些情况下还不得不加入其它化合物来阻止或抑制交联反应的发生，所以同端基遥爪聚乙二醇目前已

经很少使用。异端双功能基遥爪聚乙二醇较难合成，并且在用于化学修饰时也会象同端基遥爪聚乙二醇那样发生不期望的交联反应，因此实际应用也较少。相比之下，异端单功能基遥爪聚乙二醇由于容易合成，很少或不发生交联反应而得到了广泛的应用。通常采用一端羟基被甲基封闭，不能参与反应的单甲氧基聚乙二醇（mPEG）进行活化，通用分子式为：



按端基的电性分类

根据端基电性的不同，聚乙二醇衍生物可以分为亲电和亲核两大类。亲电类聚乙二醇衍生物比较常用，种类也很多，如琥珀酰亚胺琥珀酸酯聚乙二醇 (PEG Succinimidyl Succinate, SS-PEG)，苯并三唑甲酯聚乙二醇 (PEG Benzotriazole carbonate, BTC-PEG)，琥珀酰亚胺丙酸酯聚乙二醇 (PEG Succinimidyl Propionnate, SPA-PEG)，琥珀酰亚胺二聚乙二醇 (PEG2 Succinimide, NHS-PEG2)，醛类聚乙二醇 (PEG Aldehyde, ALD-PEG)、N, N' -羰基二咪唑聚乙二醇 (PEG Oxycarbonyl imidazole, CDI-PEG) 等。亲核类聚乙二醇衍生物有聚乙二醇胺类衍生物 (PEG-O-CH₂CH₂-NH₂, PEG-NH₂)、马来酰亚胺聚乙二醇 (PEG Maleimide, MAL-PEG) 等。

按发展历史分类

根据发展历史可分为第一代和第二代聚乙二醇。第一代聚乙二醇局限于应用低分子量的 mPEG (<20000Da)。常用的修饰剂有 SS-PEG、琥珀酰亚胺甲酸酯聚乙二醇 (PEG Succinimidyl Carbonate, SC-PEG)

等，其中大部分通过酰基化反应修饰蛋白质。第一代 PEG 修饰药物通常表现出不稳定性、较大的毒性和免疫原性，生物活性、药代动力学的性质与原型药物没有本质的改变。第二代聚乙二醇分子量可大于 20000Da，在二醇污染、稳定性、活性保留、专一性等方面均优于第一代聚乙二醇，常用的修饰剂有 SPA-PEG、BTC-PEG、NHS-PEG2、ALD-PEG、MAL-PEG 等

PEG 修饰产物纯化难主要是由于 PEG 分子在水溶液中具有伸展的构象，其流体动力学体积远远大于同样分子量的球状蛋白质，使得球状蛋白质与 PEG 的分离非常困难

虽然有人用 SEC 分离出 PEG 修饰的单点产物，但这只是个别情况，因为 PEG 线性分子并不像蛋白质的球形，PEG 在 SEC 中运行的轨迹很复杂，不像蛋白质那么简单，这点从 PEG 的 SDS-PAGE 电泳也能看出来，在 SDS-PAGE 电泳上表现得是很糊的一片，光从这个角度来看，SEC 是不适合分离 PEG 修饰的蛋白的，何况还有多点，单点和未修饰蛋白表观分子量差别情况

反相虽然分离度高，但缺点正如 vicardin 所说，用反相分离无活性的小肽倒是可能，但分离活性蛋白不是很好

我推荐用离子交换，我们做过好几种蛋白，不论是碱性蛋白还是酸性蛋白，用离子交换一步就能得到纯品，现在很多活化的 PEG 都是修饰氨基，氨基在蛋白质中是带正电的，PEG 修饰后会出现正电荷减少的情况，另外还有 PEG 的封闭作用，使得 PEG 修饰的蛋白等电点都靠近中性。基于这些情况，选用阳离子交换柱是比较好的选

择，但不全按照离子交换的原理来进行的

PEG 修饰条件

影响 PEG 修饰蛋白的反应条件一般有修饰剂用量、反应 pH 值、反应时间、反应温度等，某些种类的 PEG 需要加入其它试剂（如 mPEG-ALD 需加入硼氢氰化钠）时，也应考虑所加试剂的反应条件。

修饰剂用量：PEG 用量越大，修饰率和修饰多态性越高，一般增加 PEG 分子量可延长药物的循环半衰期，但除个别蛋白的 PEG 修饰对蛋白质活性影响不大外，大多数蛋白质的活性随着修饰 PEG 数目和分子量的增加而降低，因此在修饰率、修饰多态性、活性保留率和成本之间需寻求平衡点。

就应 pH 值：PEG 衍生物在不同的 pH 值条件下反应活性和修饰位点有明显差异，亲电性的琥珀酰亚胺在碱性环境下反应活性较高，主要与赖氨酸残基的 ε 氨基反应，而在酸性环境下反应活性较低，主要与组氨酸的咪唑基反应。虽然先灵葆雅公司采用 pH6.5 的反应条件制备 PEG 修饰的干扰素 PEG Intron A，但从修饰效率考虑，大多数亲电性 PEG 衍生物采用碱性条件反应。

反应时间：不同的 PEG 衍生物和不同的蛋白最佳反应时间各不相同

反应温度：一般为保留蛋白活性多采用低温条件。

PEG 修饰产物的分离纯化方法

沉淀法

蛋白质在一定浓度的盐溶液或有机溶剂中会发生沉淀，而 PEG

由于其两亲性则继续保持溶解状态，通过简单的离心就能将蛋白质与 PEG 分离开来。唐微等采用硫酸氨沉淀法可将 rIL-2 和 PEG 完全分离开。

膜过滤法

透析膜或超滤膜上具有一定孔径大小的微孔，若在膜中加入不同分子量的混合物，则小于孔径的分子会透过膜，而大分子则留在原处。由于分辨率低，一般仅用其除去修饰混合物中的游离 PEG 或浓缩分离产物超滤法适合于分离产物的浓缩和换液，与沉淀法相比活性损失小，无需脱盐，但缺点是成本较高，易吸附蛋白。

凝胶过滤层析法

凝胶过滤层析的分离原理是分离颗粒介质中具有大量孔径均一的网状孔道。分离样品中的小分子物质可以进入颗粒内部，所经历的路程较长，因此流出时间较长，后出峰；大分子物质从颗粒外通过，因此先出峰，据此可以分离不同分子量的物质。PEG 修饰蛋白质的分子量大于天然蛋白质，因此出峰较天然蛋白质早，PEG 偶联越多，修饰蛋白质出峰越早。McGoff 等用 GF 柱分离 PEG 修饰 SOD，可将未修饰、单点、两点修饰 SOD 分开。

离子交换层析法

离子交换层析在分离纯化蛋白质的层析手段中使用最广泛，其分离原理是离子交换树脂结合带有大量电荷的侧链，当溶液 pH 偏离等电点时，蛋白质就会带电荷，若所带电荷与离子交换树脂侧链电荷相反，蛋白质就可与之结合，结合的蛋白质可根据结合力的不同

用不同浓度的盐离子洗脱，从而达到分离纯化效果。影响 PEG 修饰蛋白质带电荷数的因素目前认为有两个，一方面大多数 PEG 修饰的位点是蛋白质表面的游离氨基，由于氨基在酸性和中性环境下结合氢质子而带正电荷，PEG 修饰蛋白质后这些氨基失去与氢质子结合能力，蛋白质的正电荷数会减少，等电点偏酸。另一方面 PEG 自身不带电荷，当 PEG 覆盖于蛋白质表面时可能会阻碍蛋白质与离子交换树脂侧链的结合，从而导致修饰蛋白质的洗脱盐浓度比天然蛋白质低。采用离子交换层析分离 PEG 修饰蛋白质的最大优势在于 PEG 不带电荷保证了它不会吸附于柱上，因而可以很方便的将 PEG 与蛋白质分开。刘丽军等用 CM Sepharose FF 分离 PEG 修饰的 rhIFN-2b，洗脱峰依次为未结合的 PEG、多点修饰产物、单点修饰产物和未修饰的 rhIFN-2b。根据结果分析 PEG 修饰蛋白质在离子交换层析中主要受 PEG 屏蔽作用影响，无论是用阴离子还是阳离子交换层析，蛋白上偶联 PEG 个数越多，结合力越弱，出峰越早；其次受氨基修饰的影响，由于阴离子交换树脂结合的主要是蛋白质的羧基，受氨基修饰影响较小，因而分离效果不如阳离子交换树脂。离子交换层析时缓冲液 pH 值至少应与蛋白质等电点相差一个单位，修饰样品应用缓冲液或水稀释以降低样品的离子强度。

疏水层析和反相色谱法

疏水层析和反相层析的原理是分离介质带有疏水侧链，蛋白质在高盐浓度溶液或有机溶剂中变性，暴露出疏水部位，与分离介质结合，降低盐浓度或有机溶剂浓度可将其洗脱下来。PEG 具有两亲性，

但与蛋白质相比疏水性更强，因此 PEG 修饰蛋白质的疏水性强于天然蛋白，与分离介质的结合力更强，较天然蛋白晚出峰。Katre 等采用疏水层析的梯度洗脱法成功将 rIL-2 与 PEG-rIL-2 分开。反相层析由于使用有机溶剂作为流动相，导致蛋白质失活，一般用来分析而不是分离活性蛋白。