

生物分子化学修饰用聚乙二醇衍生物的合成及应用

姜忠义^{*}, 许松伟, 高 蓉
(天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要:聚乙二醇衍生物由于具有良好的生物相容性和免疫原性而被广泛应用于生物分子的化学修饰。本文就聚乙二醇衍生物的合成以及在生物医学和生物技术领域中的应用进行综述, 主要包括聚乙二醇衍生物的分类, 常用的聚乙二醇衍生物的合成方法及其性能, 以及聚乙二醇衍生物的应用等。

关键词:聚乙二醇(PEG)衍生物; 生物大分子; 化学修饰; 合成; 应用

引言

化学修饰作为提高多肽(包括蛋白质)、核酸和多糖等生物分子的临床和生物学性能的重要手段得到了日益广泛的研究和应用^[1,2]。化学修饰的效果好坏很大程度上取决于化学修饰剂的性能优劣。为此, 化学修饰剂的合成近年来一直吸引着世界范围内生物、医学和化学工作者的研究兴趣^[3]。

迄今, 已经有许多种类的修饰剂被相继合成出来。代表性的修饰剂^[4]有乙酰咪唑、卤代乙酸、*N*-乙基马来酰亚胺、碳化二亚胺、焦碳酸二乙酯、四硝基甲烷、*N*-卤代琥珀酰胺、乙二醇/丙二酸的共聚物、羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、乙烯/顺丁烯二酰肼共聚物、多聚唾液酸^[5]、聚氨基酸、葡聚糖、环糊精^[6]及其衍生物、聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)及其衍生物等。其中聚乙二醇及其衍生物由于具有下述的优良性能而在化学修饰中应用最多^[7]。

(1) PEG 具有两亲性, 既可以溶解于水, 又可以溶解于绝大多数的有机溶剂。

(2) PEG 无毒, 免疫原性低, 其生物相容性也已经通过美国 FDA 认证。

(3) PEG 的分子量范围很宽, 从几百到数十万, 选择余地大。

(4) PEG 可以将它的许多优良性质赋予修饰后的生物分子。

本文综述了生物分子化学修饰用聚乙二醇衍生物, 主要包括聚乙二醇衍生物的分类, 常用聚乙二醇衍生物的合成方法及其性能比较, 以及聚乙二醇衍生物在生物医学和生物技术领域中的应用等。

1 聚乙二醇衍生物的分类

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。

1.1 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^[8]。将 PEG 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,

作者简介:姜忠义(1966 年—), 博士, 副教授, 研究方向: 酶与蛋白质工程。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

则称为异端单功能基遥爪聚乙二醇。由于 PEG 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。

1.2 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^[9]。亲电类聚乙二醇衍生物比较常用,种类也很多,如 SS-PEG (PEG Succinimidyl Succinate), SCM-PEG (Succinimidyl ester of carboxymethylated PEG), BTC-PEG (Benzotriazole carbonate of PEG), SPA-PEG (PEG succinimidyl propionate), SBA-PEG (PEG succinimidyl butanoate), PEG₂NHS (PEG₂succinimide), EPOX-PEG (PEG glycidyl ether), CDI-PEG (PEG-Oxycarbonylimidazole), NPC-PEG (PEG nitrophenyl carbonate), ALD-PEG (PEG-aldehyde), NCO-PEG (PEG-isocyanate) 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、聚乙二醇巯基类衍生物 PEG-O-CH₂CH₂-SH 等。

1.3 按链结构形状分类

按链结构形状的不同,聚乙二醇衍生物有线形、星形和梳形^[10]。线形聚乙二醇衍生物只包含一个聚乙二醇线形结构单元。星形聚乙二醇衍生物中包含若干个呈辐射状的聚乙二醇结构单元。其结构一般为 $[X-(CH_2CH_2O)_n]_a-Z-[(CH_2CH_2O)_n-OH]_b$ ^[6], X 可以是胺基、羟基、羧基、醛基、巯基、卤素和环氧化物等; Z 可以是酰胺、氨基甲酸酯和酯类等; m、n 一般为 10~2000, a 一般为 1~5; b 一般为 1~100。星形的 PEG 一般只有一个相对活泼性较高的端基,这个活性端基可以在 PEG 的一端,也可以在 Z 上。聚乙二醇与马来酸酐等化合物形成的共聚物具有多个反应位点,呈现梳形结构,因而被称为梳形聚乙二醇衍生物,结构如图 1^[7]所示。

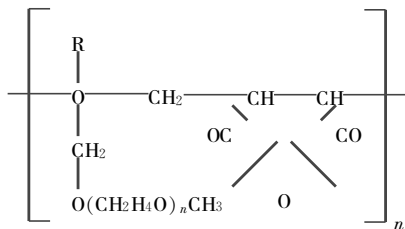


图 1 梳形 PEG 结构

2 常用的聚乙二醇衍生物的合成及其性能比较

常用的聚乙二醇衍生物如图 2 所示。以下分别介绍它们的合成方法,并比较它们在生物分子修饰时的性能。

2.1 PEG 三嗪类衍生物

这类修饰剂包括活化的 PEG₁[2-(O-methoxypolyethyleneglycol)-4,6-dichloro-s-triazine]和 PEG₂[2,4-bis(O-methoxypolyethyleneglycol)-6-dichloro-s-triazine]^[11]。三聚氰胺上的氯原子与 MPEG (甲氧基聚乙二醇)上的羟基反应可以得到活化的 PEG₁ 和 PEG₂ (分子式如图 2 中 2 和 1)。PEG₁ 和 PEG₂ 上的游离氯原子可以分别在 pH 8~9 和 pH 9.5~10 与蛋白质的氨基反应。由于 PEG₂ 上有两个 PEG 链,在修饰反应后能够更好地起到保护蛋白质的作用,故修饰效果要比 PEG₁ 好一些。Olsen 等^[7]采

用如下方法制备出 PEG₂:4A 分子筛和 MPEG⁵⁰⁰⁰ 加入苯中回流干燥,然后向上述混合物中加入氧化锌和三聚氰氯在 80℃ 下搅拌反应 2d 左右,冷却到室温后再加入一定体积的苯。所得悬浮液进行过滤,滤液经旋转蒸发浓缩至干,即得 PEG₂。

Abuchowski 等同时还研究了 PEG₂ 的制备方法:MPEG⁵⁰⁰⁰ 溶解在无水二氯甲烷中,加入冷的三乙基胺反应 90min 后加入乙醚搅拌 3min,过滤出黄色沉淀,用乙醚洗涤后用乙酸乙酯除去其中的盐,缓慢冷却至室温,放入冰箱中进一步冷却,即得产品。

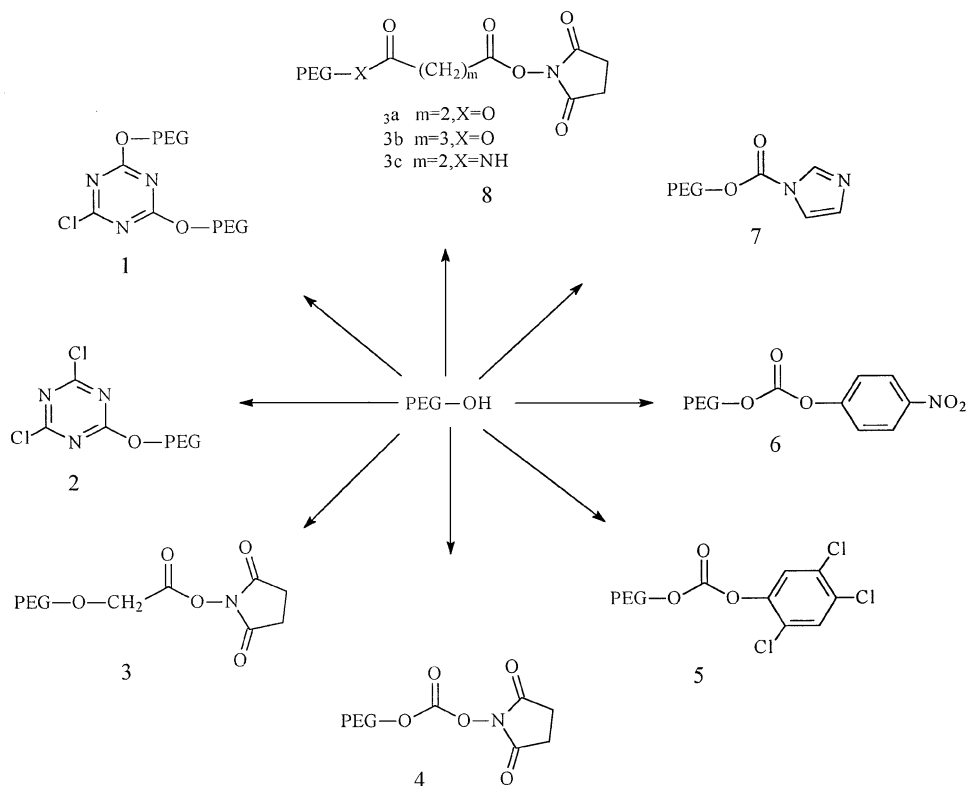


图 2 常见的 PEG 衍生物

2.2 PEG 氨基酸类衍生物

由于氨基酸本身就是构成蛋白质和多肽分子的重要组分,因此用氨基酸类物质作为 PEG 的端基,将赋予 PEG 修饰剂更好的生物相容性。Yamasaki^[12] 等人通过 MPEG 酸与正亮氨酸上的 α -氨基或赖氨酸上的 α -氨基和 ϵ -氨基的反应制备出 PEG 的氨基酸类衍生物。PEG 的氨基酸类衍生物可以通过 *N*-羟基琥珀酰胺进一步活化。根据该思想,通过下述步骤制备出 PEG₂-GABA-NHS: 将 PEG₂(图 2 中所示)加入到硼酸盐缓冲溶液中,加入 γ -氨基丁酸在 4℃ 下反应过夜,用盐酸酸化后,用三氯甲烷萃取出 PEG₂-GABA,重结晶两次后,用二氯甲烷溶解,加入 *N*-羟基琥珀酰胺(NHS)和环己基碳二亚胺(DCC),在室温下反应过夜,得到 PEG₂-GABA-NHS。PEG₂-GABA-NHS 相对于 PEG₂ 有更高的生物活性,用修饰 SOD 来比较它们的活性。在 pH=7.2, $T=4^\circ\text{C}$ 下,PEG₂ 不发生反应,只有在 pH=11.0, $T=4^\circ\text{C}$ 条件下在 16h 内完成所需的修饰反应。而在相同的实验条件下

PEG₂-GABA-NHS 能在 4h 内完成 95% 的反应, 2/7 的氨基残基发生反应; 并且用 PEG₂-GABA-NHS 进行修饰时, 不会产生毒副产物。

2.3 PEG 酰胺类衍生物

PEG 的 *N*-羟基琥珀酰胺酯类衍生物在 pH 7~9 范围内可以直接与蛋白质上的氨基反应^[13]。将 PEG 上的羟基衍生为羧基的最常用途径是通过羟基与琥珀酸酐之间的反应, 所得衍生物为 PEG 琥珀酰胺、琥珀酸酯, 如 SS-PEG。Abuchowski^[14] 等人报道了 SS-PEG 的制备过程: MPEG5000 加入到无水甲苯中, 然后加入丁二酸酐, 将混合物加热至 150℃, 控温反应 5h。减压下蒸馏将甲苯蒸出, 蒸馏残液用二氯甲烷洗涤, 然后加入乙醚沉淀产物。产物用二氯甲烷和乙醚重结晶, 得到丁二酰化的甲氧基聚乙二醇。丁二酰化的甲氧基聚乙二醇溶解到无水二氯甲烷中, 加入 NHS 和 DCC, 在冰浴中溶解, 然后在室温下反应 20h。副产物为固体, 可通过过滤除去, 滤液加入乙醚后形成沉淀, 离心分出, 重结晶后得到产品 SS-PEG, 过程涉及的主要化学反应如下:



此外, 有关 PEG 的羧甲基或羧乙基的琥珀酰胺衍生物如 SC-PEG (图 2 中 4 所示) 的制备, Zalipsky^[15] 等人开展了一些研究工作, 得到了如下制备方法: MPEG5000 溶于苯 (或者二氯甲烷) 中, 将光气溶于甲苯中, 与上述液体混合反应过夜, 将反应混合物蒸干, 剩余的光气在减压条件下蒸出, 蒸馏残物重新溶于苯或二氯甲烷中, 加入 *N*-羟基琥珀酰胺, 然后加入三乙苯胺, 将反应液过滤后重新溶于 500℃ 下的乙酸乙酯中, 过滤出少量不溶物, 降温结晶得到产品。其主要反应过程如下:



2.4 梳形 PEG 衍生物

聚乙二醇与马来酸酐之间通过共聚反应可以得到具有多个反应位点, 呈现梳形结构 (缩写形式为 PM)。目前, 已经制备出两种活化的 PM 共聚物: 分子量为 13,000 的活化 PM₁₃ 和分子量为 100,000 的活化 PM₁₀₀。蛋白质分子上的氨基酸与 PM 修饰剂上的马来酸酐直接偶合形成酰胺键。这些梳形修饰剂具有独特的性质, 如在蛋白质分子的表面覆盖上一个阴离子基团等。

2.5 其它 PEG 衍生物

除了用于修饰氨基的 PEG 衍生物以外, 还有用于修饰其它基团的 PEG 衍生物。例如, PEG 胺类衍生物可以用来修饰羰基化合物并且可以作为合成其它修饰剂的中间体。一种最有吸引力的途径是把马来酰亚胺 PEG 偶合到蛋白质的巯基上, 因为蛋白质上的游离半胱氨酸残基很少存在于蛋白质分子表面。最近的文献报道^[16], 一类新型的多功能 PEG 衍生物修饰剂通过如下过程合成出: SC-PEG 与溶于硼酸盐缓冲液的赖氨酸盐酸盐在 pH 8.0 和室温下反应 2d 左右的时间后, 用草酸将溶液 pH 值调至 3。然后用二氯甲烷萃取, 用硫酸钠干燥后过滤, 滤液在乙醚中沉淀, 可以得到赖氨酸的两个氨基被两个 PEG 分支所取代的星形 PEG 衍生物 (MPEG-Disubstituted Lysine)。

2.6 各种 PEG 衍生物的性能比较

PEG 衍生物修饰剂的性能的主要评价指标是偶合反应的活性与选择性、修饰剂本身和修饰反应副产物的毒性以及修饰反应产物的生物活性和稳定性^[17]。修饰剂的活性决定着修饰反应的条件, 为了保持生物分子的生物活性, 修饰反应应当在尽可能温和的条件下进行。修饰反应对生物分子上特定的官能团的选择性决定修饰反应的专一性, 也直接影响着修饰产物的其它性能, 如免疫原

性等。修饰反应后生物分子的活性,如酶的催化性能会发生变化,不同的修饰剂对偶合物生物活性的影响不一样。另外,修饰反应往往是可逆反应,由于逆反应的发生,修饰剂分子也会从偶合物上脱落下来。不同的修饰剂与生物分子形成不同类型的键,键能的差异导致偶合物的稳定性也不同。例如,SS-PEG 与赖氨酸氨基形成的是酯键,而 SC-PEG 形成的是尿烷键,相比之下,尿烷键更稳定些^[18],因此其它条件相同的情况下,SC-PEG 与生物分子之间形成的偶合物要比 SS-PEG 与生物分子之间形成的偶合物稳定性好。表 1 列出常见的 PEG 衍生物用作修饰剂时的性能比较。

表 1 常见 PEG 衍生物修饰剂的性能比较^[11、13、17、18]

PEG 衍生物	反应活性	毒性	选择性	修饰产物生物活性	修饰产物稳定性
PEG ₁	中	大	差	差	中
PEG ₂	中	大	差	中	中
SS-PEG	高	小	高	高	差
SC-PEG	高	小	高	中	高
SPA-PEG	高	小	高	高	高
PM ₁₀₀	中	小	中	高	中
PM ₁₃	中	小	中	差	中

3 应用

20 世纪 50 年代,生物化学家利用蛋白质的化学修饰来研究其空间结构和生物学功能^[19~21]。20 世纪 70 年代后期,生物大分子的化学修饰开始引起学术界和应用部门的广泛关注^{22~24}。1977 年,Abuchowski^[11]等人证明 PEG 共价结合到牛血清蛋白或过氧化氢酶上可以降低它们的免疫原性。Sehon 等人也报道了用 PEG 修饰过敏原可以抑制 IgE 类抗体的产生。在生物技术方面,用具有两亲性的 PEG 修饰生物酶可以显著提高酶的催化性能,这些发现拓展了用 PEG 对生物分子进行化学修饰的应用领域。1991 年 PEG 修饰的腺苷脱氨基酶(PEG-ADA)^[25]成为通过美国 FDA 认证的第一种修饰蛋白,它用于治疗因腺苷脱氨基酶缺乏引起的严重综合免疫缺陷症。

下面就 PEG 在生物医学领域和生物技术领域中的应用分别加以介绍。

3.1 生物医学领域

迄今为止,在生物医学领域仅 PEG 修饰的蛋白质就有 100 多种已经用于临床用于疾病治疗^[26]。例如,Katre 和 Knauf 等人利用 PEG(5000)修饰 rhIL-2 形成偶合物,改变了其原有理化性能使其疏水性变为亲水性,分子量增加,在体内的半衰期明显增加,抗原性明显消失,且生物活性基本保持不变,提高了 rhIL 应用效率。利用 PEG 修饰血红蛋白进行与血型无关的输血研究,延长血液的保存时间,提高血液中的血红蛋白的寿命,消除输血过程中的传染的疾病。表 2 给出了修饰后的生物大分子在生物医学领域的主要方向和应用实例。在生物医学领域,相关报道的比例大致为抗肿瘤蛋白占 21%,代谢酶占 6%,消炎蛋白占 14%,过敏原占 8%,抗血栓占 5%,血液替代品占 8%,在其他方面,如脂、毒素等占 28%。

3.2 生物技术领域

在生物技术领域,氧化还原酶占 11%,脂酶占 16%,蛋白酶占 16%,糖苷酶占 3%,双水相分配占 26%,其它如 NAD(P)和其它辅酶等占 22%。表 3 说明了 PEG-生物分子偶合物在生物技术领域中的应用方向和应用实例

表 2 修饰蛋白在生物学上的应用⁷

应用方向	应用实例
酶的遗传基因缺失症	腺苷脱氨酶(ADA),胆红素氧化酶,嘌呤核苷磷酸化酶,尿酸酶
肿瘤治疗	抗体,天门冬酰氨酶,集落刺激因子,干扰素,白介素
血液代用品	血清蛋白,血红蛋白,免疫球蛋白,肌红蛋白,蛋白酶抑制剂
消炎	过氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶
抑制免疫反应	卵清蛋白
抗血栓	抗血凝剂,溶栓酶,前凝血酶,胰蛋白酶,尿激酶
其它	碱性磷酸酯酶,胎蛋白酶,核糖核酸酶,大豆胰蛋白酶抑制剂

表 3 PEG 偶合物在生物技术上的应用^[7]

PEG 偶合物	应用领域
氧化还原酶 过氧化氢酶,过氧化物酶 脱氢酶,氧化酶 血红蛋白,肌红蛋白	有机溶剂中的氧化反应 生物反应器和生物传感器 生物传感器
水解酶 脂肪酶 胰凝乳蛋白酶,木瓜蛋白酶,枯草杆菌蛋 白酶,嗜热菌蛋白酶,胰蛋白酶 纤维素酶,α-半乳糖苷酶	酯的合成和交换反应 酰胺键和低聚肽的合成 水解和糖基转移
其它 木质素,黑色素 氯高铁血红素,卟啉,叶绿酸 NAD(P) 二茂铁 氨基酸,核苷,碳水化合物	增强亲水性 氧化和光敏作用 脱氢酶底物 氧化还原作用中间体 液相合成

4 结语

由于聚乙二醇具有前述的独特的物理化学性质,所以聚乙二醇衍生物修饰剂在今后一段时间内仍会在各种化学修饰剂中占据主导地位。目前,聚乙二醇衍生物修饰剂在反应活性和选择性,以及修饰后偶合物分子的稳定性和生物活性等几个方面,往往只在某一或某几个方面具有良好的性能,所以综合性能优良的 PEG 修饰剂的研制和开发今后还有大量的工作要开展。

除了聚乙二醇类的化学修饰剂外,人们正在研究开发新颖多效的单功能低聚体如聚氨基酸,葡聚糖,聚丙烯酰吗啉[poly (N-acryloylmorpholine), PAcM]和聚乙烯基吡咯烷酮[poly (N-vinylpyrrolidone), PVP]等^[9]。另外,研究已经发现非聚乙二醇衍生物修饰剂与生物分子形成的偶合物在性质、器官定向、血液停留时间和免疫原性等方面均与聚乙二醇修饰的偶合物的性质有很大差别^[27,28]。这也是非聚乙二醇衍生物修饰剂值得研究开发的另一个原因^[29]。

参考文献:

[1] Foroutan S M, Watson D G. International Journal of Pharmaceutics 1997, (157): 103~111.
[2] Grace D. J Bryan Jones Current Opinion Biotechnology, 1999, (19): 324~330.
[3] Iphigenia L K, Zahra S, Steven L, et al. International Journal of Pharmaceutics, 2000, (198): 83~95.
(c)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

- [4] 周海梦,王洪睿·蛋白质化学修饰·北京:清华大学出版社,1998,4~43.
- [5] 王颖达,郭丽,钱世钧·生物工程学报,2000,16(4):517~520.
- [6] Veronese F M, Morpurgo M· Il Farmaco, 1999, 54: 497~516.
- [7] Harris J M, Zalipsky S· Poly (ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications· Washinton DC: ACS, 1997.
- [8] 熊成东,王亚辉,袁明龙·高分子通报,2000,(1):39~45.
- [9] Veronese F M· Biomaterials· 2001, 22: 405~417.
- [10] Chio Y K· US, 6 046 305, 2000.
- [11] Abuchowski A, van Es T, Palczuk N C· J Biol Chem, 1977, 252(11): 3578~3581.
- [12] Yamasaki M, Okabe M, Suzawa T· Biotechnology Techniques, 1998, 12(10): 751~754.
- [13] Johanna R, Anna-Lisa S, Eva ? · Bioconjugate Chem, 2000, 11(3): 387~396.
- [14] Abuchowski A, Kazo G M, Verhoest C R· Cancer Biochem· Biophys, 1984, 7: 75~186.
- [15] Zalipsky S, Seltzer R· Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, 1991, 469: 91~100.
- [16] Harris J M, Veronese F M· US, 5, 932, 462, 1999.
- [17] Greenwald R B, Martinez A J· US, 5 919 455, 1999.
- [18] Zalipsky S, Seltzer R, Menon-Rudolph S· Biotech Appl Biochem, 1992, 15: 100~114.
- [19] Kodera Y, Matushima A, Hiroto M· Prog Polym Sci, 1998, 23: 1233~1271.
- [20] Bailon P, Berthold W· PSTT· 1(8): 352~356.
- [21] Lewanski C R, Stewart S· PSTT· 1999, 2(12): 473~477.
- [22] DeSantis G, Jones J B· Current Opinion in Biotechnology· 1999, 10: 324~330.
- [22] He X H, Shaw P C, Tam S C· Life Sciences, 1999, 65(4): 355~365.
- [23] Christakopoulos P, Kourrentzi E, Hatzinikolaou D G· Carbohydrate Research, 1998, 314: 95~99.
- [24] Palaparthi R, Wang H S, Gulati A· Advaned Drug Delivery Reviews, 2000, 40: 185~198.
- [25] Inada Y, Furukawa M, Sasaki H· TIBTECH, 1995, 13: 86~91.
- [26] 郑宝胜,徐明波,姚志建·生物化学与生物物理进展,1993,20(4):267~270.
- [27] Schiavon O, Calicet P, Ferruti P, et al· Il Farmaco, 2000, 55: 264~269.
- [28] Kozlowski A, Harris J M· Journal of Controlled Release, 2001, 72: 217~224.
- [29] Veronese F M· Biomaterials, 2001, 22: 405~417.

Synthesis and Application of Polyethylene Glycol Derivatives for the Chemical Modification of Biornacromolecules

JIANG Zhong-yi, XU Song-wei, GAO Rong

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract: Polyethylene glycol (PEG) and its derivatives, due to their good biocompatibility and low immunogenicity, have been widely used in the chemical modification of biomacromolecules. In this paper, the synthesis of polyethylene glycol derivatives and their utilization in biomedical and biochemical fields are briefly discussed, mainly centering on the classification, the synthesis methods, the performance evaluation, the application of polyethylene glycol derivatives.

Key words: Polyethylene glycol derivatives; Biomacromolecules; Chemical modification; Synthesis; Application