

# 前 言

蛋白质、多肽等生物技术药物是我国优先发展、重点支持的高技术产业之一。生物技术药物因其结构特点，在具备活性高、毒性低、特异性强和生物功能明确等优势的同时，却也存在半衰期短、免疫原性强的局限性，因而往往会给患者带来较大的身心和经济负担，从而严重限制它们的广泛应用。因此，如何解决这些关键问题，发展副作用小、作用时间长的长效生物药物制剂是有效推动生物技术药物产业发展而必须考虑的重要方向。聚乙二醇化学修饰正是这样一种解决上述关键问题的有效方法和技术。它将聚乙二醇高分子链化学偶联到蛋白质分子上，通过增大药物分子体积以有效延长其体内半衰期，同时遮蔽其免疫位点以显著降低免疫原性，是国际上公认的最为有效的长效蛋白质制剂化技术之一。

到目前为止，国际上专门系统讲述聚乙二醇修饰蛋白质研究的书只有两部。第一部是 1992 年 Plenum Press 出版 J. Milton Harris 主编的 *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*，这是世界上首部对聚乙二醇化学修饰进行系统介绍的专著，主要包括了聚乙二醇修饰剂的制备和蛋白质聚乙二醇修饰产物的应用。第二部则是 2009 年 Francesco M. Veronese 主编的 *PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications*，着重于介绍聚乙二醇化学修饰新技术的进展及具体的聚乙二醇修饰药物品种。而我国由于相关研究起步相对较晚，无论是修饰剂和修饰技术还是修饰产品的市场化，都滞后于国际前沿研究，迄今为止仍没有专门关于蛋白质的聚乙二醇化学修饰研究的专著。

本书是作者 20 多年从事聚乙二醇修饰蛋白质研究的成果总结，并结合数十年的教学经验和国内外相关研究的最新进展，系统拟定并编著了本书的内容组成。

本书从聚乙二醇化学修饰所涉及的全过程来设计，涉及从修饰所使用的聚乙二醇修饰剂的设计和制备、蛋白质聚乙二醇修饰过程的实现和控制、蛋白质修饰产物的分离纯化及目标修饰产物在各种适应证中的实际应用效果。其中包括：作为该领域核心组成的聚乙二醇修饰剂，第 1 章“单甲氧基聚乙二醇的合成”和第 2 章“单甲氧基聚乙二醇的活化”对其设计思想及选择进行了阐述；第 3 章“聚乙二醇修饰蛋白质的反应控制”探讨了如何通过反应过程控制来制备目标修饰产物，并重点描述了定点修饰的策略；第 4 章“聚乙二醇-蛋白质偶联物的分离纯化”和第 5 章“聚乙二醇-生物大分子偶联物的分析与质量鉴定”对目标修饰产物的分

离纯化方法和定性定量检测进行了系统讨论,尤其是针对 PEG 化蛋白质分离和检测的难点阐述了解决策略;第 6 章“聚乙二醇化药物的药代动力学”和第 7 章“PEG 修饰长效药物”则是对蛋白质的聚乙二醇修饰产物进行了体内药代动力学分析和应用于各种适应证治疗的介绍。作者认为上述 7 章的内容可以比较全面和深入地概括蛋白质聚乙二醇化学修饰领域的相关内容和最新进展。

多数读者对于一些传统的药物制剂化技术,如片剂、散剂、胶囊剂、注射剂等已经比较熟悉,本书不再赘述,而只专于论述聚乙二醇化学修饰技术制备长效蛋白质制剂的原理及相关应用研究。

本书以新颖、实用、深入、系统为基本宗旨,结合作者在科研和教学中积累的成果和经验而编写,很多内容和实例直接来自于作者自己的科研成果,并取材于国内外科技期刊的最新进展和国外的专著。为使各章节内容更完整,本书还列入了一些未发表的或正在印制过程中有关论文的内容。为便于查阅各种论点、数据的出处,在各章之后均列有参考文献。本书在编写时贯彻了理论和实际相结合的原则,既有原理和理论、工艺与技术,又有质量评价和应用实例,充分反映最新成果和进展,在阐述方面力求深入浅出,能兼顾不同层次读者的要求。

本书可作为从事生物化工、药学、医学等学科研究生及相关研究人员的参考书。本书各章的内容既有联系,又有其独立性。读者可以依据自己的兴趣和需要选读其中的一章或几章。

感谢“重大新药创制”科技重大专项“十一五”计划“生物技术药新型载体及制剂研究关键技术(2009ZX09503-027)”和“生物技术新药中试放大及分离纯化技术平台(2009ZX09306-005)”项目对本书的支持。

在撰写本书的过程中,对于合著者顾景凯教授、胡涛研究员、雷建都教授、张竞副研究员、黄永东副研究员、赵永江助理研究员为本书所付出的努力,我们表示最诚挚的感谢。还对在过去十年里我们研究生和研究小组成员在该领域工作中对本书研究成果内容的贡献、对于科学出版社朱丽编辑以及为本书做文字加工录入的有关同志等在此一并致以诚挚的谢意!

由于聚乙二醇修饰蛋白质是一个新兴的研究领域,作者能力有限,错误和不妥之处,敬请读者批评指正。

马光辉 苏志国  
2015 年仲夏于北京

# 目 录

## 前言

写在前面——关于聚乙二醇修饰	1
<b>第 1 章 单甲氧基聚乙二醇的合成</b>	<b>6</b>
1.1 聚乙二醇的结构及性质	7
1.1.1 聚乙二醇链的空间结构	7
1.1.2 聚乙二醇的物理性质	8
1.1.3 聚乙二醇的生物学性质	10
1.1.4 聚乙二醇的化学性质	11
1.2 聚乙二醇的合成	11
1.2.1 链引发	12
1.2.2 链增长	16
1.2.3 链终止/链转移	17
1.2.4 单甲氧基聚乙二醇的聚合	17
1.3 环氧乙烷阴离子聚合制备聚乙二醇的实验技术	19
1.3.1 单体的储存、纯化与转移操作技术	19
1.3.2 溶剂的储存、预处理及使用	20
1.3.3 引发剂的制备及分析	21
1.3.4 聚合设备	21
1.4 具有空间结构的聚乙二醇的合成	23
1.4.1 分枝型聚乙二醇	23
1.4.2 分叉型聚乙二醇	25
1.4.3 异端基双官能团聚乙二醇	26
1.4.4 树状聚乙二醇	28
1.4.5 多价聚乙二醇	30
1.5 聚乙二醇及其衍生物的特征	31
1.5.1 核磁共振	31
1.5.2 红外光谱	32

1.5.3	液相色谱/凝胶渗透色谱	34
1.5.4	基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱	36
1.5.5	显色反应	37
1.5.6	电泳	38
1.6	结论与展望	38
	参考文献	39
<b>第2章</b>	<b>单甲氧基聚乙二醇的活化</b>	<b>44</b>
2.1	聚乙二醇羟基的转化	45
2.1.1	卤化、磷酸酯化和光延反应	45
2.1.2	羟基的氧化	49
2.1.3	以醚键偶联的功能性衍生物	55
2.1.4	以酯、碳酸酯、氨基甲酸酯偶联的功能性衍生物	56
2.1.5	其他衍生策略	58
2.2	用于生物大分子修饰的聚乙二醇衍生物合成	58
2.2.1	氨基修饰剂的合成	58
2.2.2	羧基修饰剂的合成	69
2.2.3	巯基修饰剂的合成	70
2.2.4	用于精氨酸修饰的聚乙二醇修饰剂	74
2.2.5	用于二硫键修饰的聚乙二醇修饰剂	75
2.2.6	可逆聚乙二醇修饰剂	76
2.2.7	羰基修饰剂的合成	77
2.3	工业化规模的单甲氧基聚乙二醇衍生物合成	78
2.3.1	反应系统的设计和搭建	78
2.3.2	产品的开发	80
2.4	结论与展望	80
	参考文献	81
<b>第3章</b>	<b>聚乙二醇修饰蛋白质的反应控制</b>	<b>84</b>
3.1	氨基酸侧链基团的反应控制	84
3.1.1	赖氨酸	85
3.1.2	半胱氨酸	86
3.1.3	天冬氨酸和谷氨酸	87
3.1.4	精氨酸	88
3.1.5	组氨酸	89

---

3.1.6	糖蛋白的糖基	90
3.2	聚乙二醇修饰反应的优化	91
3.2.1	聚乙二醇修饰剂的选择	91
3.2.2	蛋白质的聚乙二醇修饰条件	92
3.2.3	聚乙二醇的分子量	95
3.2.4	通过反应工程控制聚乙二醇修饰	96
3.3	氨基酸侧链的聚乙二醇定点修饰	98
3.3.1	酶学催化的聚乙二醇定点修饰	99
3.3.2	二硫键的聚乙二醇定点修饰	100
3.3.3	马来酸酐可逆保护蛋白质的氨基	102
3.3.4	高碘酸钠氧化 N-末端具有丝氨酸或苏氨酸的蛋白质	104
3.3.5	蛋白质的 N-末端定点修饰	104
3.4	化学反应基团的引入与聚乙二醇修饰	106
3.4.1	基因工程方法引入半胱氨酸	106
3.4.2	化学合成方法引入半胱氨酸	107
3.4.3	对天然包埋半胱氨酸的利用	108
3.4.4	还原抗体的二硫键	109
3.4.5	化学方法引入巯基	110
3.4.6	基因工程方法引入非天然氨基酸	111
3.4.7	基因工程方法引入醛基	112
3.4.8	基因工程方法缺失赖氨酸	113
3.5	保护蛋白质活性中心的聚乙二醇修饰方法	114
3.5.1	保护亲和素亲和位点的修饰方法	114
3.5.2	保护酶底物结合位点的修饰方法	115
3.5.3	保护血红蛋白 Cys-93 ( $\beta$ ) 的修饰方法	116
3.5.4	控制修饰剂比例和分离纯化制备高活性修饰产物	117
3.6	固相吸附辅助的 PEG 修饰	117
3.6.1	离子交换介质辅助的 PEG 修饰反应	118
3.6.2	亲和层析介质辅助的 PEG 修饰反应	119
3.6.3	分子排阻反应层析	121
3.6.4	共价层析介质辅助的 PEG 修饰	122
3.6.5	微孔疏水相互作用膜辅助的 PEG 修饰	123
	参考文献	124

第4章 聚乙二醇-蛋白质偶联物的分离纯化	130
4.1 PEG-蛋白质偶联物的理化特性	132
4.2 PEG-蛋白质偶联物的分离纯化方法	134
4.2.1 基于分子量、分子大小的分离纯化方法	136
4.2.2 基于电荷的分离纯化方法	149
4.2.3 基于疏水性的分离	153
4.2.4 基于亲和作用的分离方法	158
4.2.5 基于溶解度的分离	159
4.2.6 最新研究进展	160
4.3 结论与展望	173
参考文献	174
第5章 聚乙二醇-生物大分子偶联物的分析与质量鉴定	180
5.1 分子量和大小(水力学半径)的检测	181
5.1.1 电泳法	181
5.1.2 高效液相-尺寸排阻色谱法	183
5.1.3 质谱法	185
5.2 浓度的测定	187
5.2.1 微量凯氏定氮法	188
5.2.2 双缩脲法	188
5.2.3 Folin-酚试剂法	189
5.2.4 考马斯亮蓝法	189
5.2.5 BCA法	190
5.2.6 紫外吸收法	190
5.3 蛋白质二级结构的检测	191
5.3.1 荧光光谱法	191
5.3.2 圆二色谱法	192
5.3.3 核磁共振法	193
5.4 荷电性质的测定	197
5.5 免疫性质的测定	198
5.5.1 蛋白质印迹法	198
5.5.2 表面等离子体共振法	199
5.6 位点异构体及修饰位点的检测	202
5.6.1 PEG-IFN 位点异构体及修饰位点的检测	202

---

5.6.2	PEG-G CSF 修饰位点的检测	208
5.7	游离 PEG 残留量的检测	209
5.7.1	分光光度法	209
5.7.2	液相色谱-蒸发光散射检测	210
5.7.3	SDS-PAGE 法	213
5.8	修饰度的检测	215
5.9	纯度分析	216
5.9.1	高效液相-尺寸排阻色谱法	216
5.9.2	反相高效液相色谱法	217
5.9.3	毛细管电泳结合 MALDI-TOF MS 法	218
5.10	结论与展望	219
	参考文献	220
第 6 章	聚乙二醇化药物的药代动力学	224
6.1	PEG 化药物药代动力学研究分析方法	230
6.1.1	放射性同位素标记法	231
6.1.2	生物活性分析法	234
6.1.3	酶联免疫标记法	235
6.1.4	电化学发光免疫分析法	237
6.1.5	比色法	238
6.1.6	高效液相色谱法	238
6.1.7	液相色谱-串联质谱法	239
6.1.8	电泳方法	245
6.1.9	PEG 化药物分析方法的瓶颈与展望	245
6.2	PEG 化药物的药代动力学	246
6.2.1	直接 PEG 化药物的药代动力学	246
6.2.2	PEG 化脂质体	258
6.2.3	PEG 化的聚合物胶束	267
6.2.4	纳米颗粒的 PEG 化	273
6.3	结论与展望	277
	参考文献	278
第 7 章	PEG 修饰长效药物	293
7.1	PEG 修饰药物上市及在研情况	293
7.1.1	修饰药物的种类	293

7.1.2	修饰产物结构与性质	294
7.2	上市 PEG 修饰长效药物简介	299
7.2.1	PEG-腺苷脱氨酶(Adagen <sup>®</sup> )	299
7.2.2	PEG-天冬酰胺酶(Oncaspar <sup>®</sup> )	301
7.2.3	PEG-干扰素 $\alpha$ -2a(Pegasys <sup>®</sup> )	302
7.2.4	PEG-干扰素 $\alpha$ -2b(Pegintron <sup>®</sup> )	305
7.2.5	PEG-集落刺激因子(Neulasta <sup>®</sup> )	306
7.2.6	PEG-生长激素受体拮抗剂(Somavert <sup>®</sup> )	306
7.2.7	PEG-抗血管内皮生长因子适配体(Macugen <sup>®</sup> )	308
7.2.8	PEG-促红细胞生成素 $\beta$ (Mircera <sup>®</sup> )	310
7.2.9	PEG-抗肿瘤坏死因子 $\alpha$ 抗体 Fab' 片段(Cimzia <sup>®</sup> )	312
7.2.10	PEG-重组人尿酸氧化酶(Krystexxa <sup>®</sup> )	313
7.2.11	PEG- inesatide 合成肽(Omontys <sup>®</sup> )	314
7.3	临床期 PEG 修饰长效药物简介	316
7.3.1	PEG-小分子难溶药物	316
7.3.2	PEG-酶	319
7.3.3	PEG-细胞因子	323
7.3.4	PEG-多肽	325
7.3.5	其他 PEG 修饰的长效制剂	326
7.4	PEG 修饰药物研究中存在的局限性及解决方向	329
7.4.1	PEG 修饰位点及修饰度的确定	329
7.4.2	PEG 的高分子结构	330
7.4.3	PEG 分子量的大小对药物代谢方式的影响	330
7.4.4	PEG 长效制剂的载药量及释放效率	330
7.5	结论与展望	331
	参考文献	331
附录	常见 PEG 修饰剂的合成操作	337

彩图

# 写在前面——关于聚乙二醇修饰

## 1. 聚乙二醇修饰的起源

20世纪70年代,美国罗杰斯(Rutgers)大学的图书馆,经常可以见到生化教授Frank F. Davis的身影。那时还没有计算机,他不得不在一排排书架中搜索。幸运的是已经有了复印机,他充分利用这一条件,复制了大量的文献。当时,Davis教授正在准备申请美国国家科学基金会的基金,但却需要找到一个创新的课题。他苦苦思考和调研的课题是怎样把来自动物、植物和微生物的蛋白质做成适合于人体应用的药物。当时并没有DNA重组技术,动物、植物和微生物成了蛋白质药物的主要来源,但是直接使用这些蛋白质却产生了人体的免疫反应。Davis教授认为,解决这一难题的途径是将一个亲水的大分子连接到蛋白质分子上,利用亲水性大分子的屏蔽作用,避免或减少外源蛋白质产生的免疫反应。

什么样的大分子能够满足这一条件? Davis教授通过大量的文献调研,把注意力聚焦在多糖类生物大分子上。一些多糖分子不仅水溶性好,而且生物亲和性好,不易引起免疫反应。但是,多糖分子大都结构复杂,反应位点太多,很难做到反应产物的均一、可控,而且文献上已经有前人进行了这方面的研究,再去研究并不具备新颖性和创新性,而且前人研究的结果也没有解决根本的问题。

一天,他正在翻阅一本医疗期刊,忽然发现一篇将聚乙二醇和聚丙二醇嵌段共聚物溶液输入人体血液的论文,其目的是在器官手术中避免脂肪栓塞。这篇论文很有意思,因为聚乙二醇和聚丙二醇在人们的印象中是化工产品,和药物治疗几乎没有什么关系。但现在医生把它用于输液,并且取得了初步的成功,说明这种化合物的生物安全性。于是,Davis教授立即把着眼点放在聚乙二醇这一亲水性化合物上,开始进行新的调研。随着调研的深入,他对聚乙二醇分子越来越感兴趣。

聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)是一种线型的高分子,由环氧乙烷聚合而成。分子式简写为 $\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ ,其中 $n$ 表示乙氧基单元的数量。PEG不仅溶解于水,而且还溶解于一部分有机溶剂,而当加入另一些有机溶剂时,又能从原来的溶液中沉淀出来。

和多糖不同,PEG只有末端的羟基可以活化并与蛋白质反应,可以避免反应的复杂性和产物复杂性。但PEG也有两个羟基,如果和蛋白质反应,也可能形成不同交联程度的“PEG-蛋白质-PEG-蛋白质”的偶联物,甚至可以出现沉淀。是否可

以找到一种只有一个末端羟基的聚乙二醇？Davis 教授又进行了调研。他翻阅了大量的文献，没有结果；他又查找化工厂的产品目录，终于使他眼睛一亮：在一个工厂的产品目录上有单甲氧基聚乙二醇(mPEG)。mPEG 和普通 PEG 的区别是，一个末端为单甲氧基，而另一个末端为羟基，分子式为 $\text{CH}_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ 。对这个羟基进行活化引入活化基团并与蛋白质反应，就只能在羟基末端形成 PEG-蛋白质偶联物，而不会形成交联物。教授迅速和该厂家联系，获得了单甲氧基聚乙二醇。他从图书馆兴冲冲地赶回实验室，带领他的学生开展了实验研究。

20 世纪 70 年代，是 Davis 教授课题组迅速崛起的时期。他们获得了美国国家科学基金会(NSF)的资助。实验取得了非常理想的结果，证明经过 PEG 修饰以后，牛血清白蛋白和牛肝过氧化氢酶在动物体内的免疫原性大大降低，而且延长了其在体内的半衰期。随后，更多的蛋白质被他们用于 PEG 修饰，全都显示了免疫原性下降、体内半衰期增加的结果。他们在国际期刊 *J. Biological Chem.* 上连续发表的学术论文，引起了学术界的重视。

1977 年，Davis 教授申请了美国发明专利，内容为聚乙二醇或聚丙二醇修饰蛋白质和多肽，所用的聚乙二醇或聚丙二醇的分子量范围为 500~20 000，修饰产物在注射到动物体内后没有免疫原性。

## 2. 坎坷的产业化之路

尽管这项技术具有巨大的商业价值，但却没有引起产业界的重视。直到 1983 年，Davis 教授的博士毕业生 Abuchowski 找到了投资方，建立了 Enzon 公司。Davis 教授作为共同建立者进入公司的董事会。于是，Enzon 公司成为国际上第一个把聚乙二醇修饰技术作为主营的生物技术公司，目标是开发一系列的高效蛋白质药物。然而，产业化道路并不平坦。当时，美国食品药品监督管理局(FDA)对蛋白质药物的审查非常严格。从公司建立到第一个产品被 FDA 批准，用了整整七年的时间。即 FDA 终于在 1990 年批准了 Enzon 公司生产的聚乙二醇修饰的腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)上市，作为治疗 ADA 缺乏导致的免疫缺陷症的药物，药品名为 Adagen。腺苷脱氨酶是从牛肠黏膜中提取的。如果不进行 PEG 修饰，这个酶很快就会被体内清除，根本达不到治疗效果，而 PEG 修饰的产物则可以在体内存留几天，达到了治疗的效果。ADA 免疫缺陷症患者需要终生依赖治疗，每周注射一次，费用为每年六万美元，尽管价格昂贵，但由于病例比较少，销售额并不高，并未给公司带来巨大的利润。

1994 年，FDA 批准了 Enzon 公司生产的第二个药物——PEG 修饰的天冬酰胺酶，用于治疗急性淋巴性白血病，商品名为 Oncaspar。所用的天冬酰胺酶(asparaginase)，来自于微生物，能够清除血浆中白血病细胞生存需要的天冬酰胺，

从而使白血病细胞死亡。如果没有被修饰，这个酶同样很快会被体内清除，而且由于来自微生物，*asparaginase* 也会引起免疫反应。美国每年大约有 1500 人死于急性淋巴性白血病，大多数是 3~8 岁的儿童。*Oncaspar* 的成功，无疑给该病的治疗带来了一种选择，但与其竞争的治疗手段——化疗和骨髓移植，仍然被医生应用。因此，*Oncaspar* 也没有被市场广泛接受。

两个聚乙二醇修饰蛋白质药物的上市，没有给公司带来巨大的利益，但是却引起了大型制药厂的注意。20 世纪 90 年代，正值基因工程蛋白质药物飞速发展的阶段，其中干扰素已经成为治疗肝炎等传染病的主要药物。重组人干扰素与人体似乎没有免疫原性的问题，但注射后却被人体各种清除机制清除，导致半衰期只有几个小时。美国制药公司巨头先灵葆雅 (*Schering-Plough*) 公司为了解决干扰素半衰期短的问题，主动与 *Enzon* 公司合作，开展了干扰素的 PEG 修饰研究。事实证明，将 PEG 修饰技术与现代基因工程产品结合是非常成功的。两个公司开发的聚乙二醇修饰的干扰素，于 2001 年获得了美国 FDA 批准上市，使用药由原来一天注射一次，改为一周注射一次，而且药效比以前也有了提高。因此，聚乙二醇修饰干扰素迅速占领了市场，成为治疗丙型肝炎的主导药物，给 *Enzon* 公司带来了巨大的收益。尽管最近又有治疗丙肝的新药上市，而且据说疗效更佳，但聚乙二醇修饰干扰素的贡献永载史册。

今天，*Enzon* 公司已经成为国际著名的聚乙二醇修饰技术公司，已有十几个药物先后上市或处于临床阶段，总资产达到六亿美元。从 *Abuchowski* 博士和 *Davis* 教授白手起家，到 *Enzon* 公司辉煌的今天，已经是天翻地覆的变化。然而，这一变化也是一条充满坎坷的路。由于某些原因，*Davis* 教授和 *Abuchowski* 博士都先后离开了 *Enzon* 公司，但他们带来的技术和创新精神，却带动了美国乃至世界各国生物制药界对 PEG 修饰技术的大量投资和研发。迄今为止，世界各国已有多种 PEG 修饰药物上市，产品已从蛋白质扩展到多肽、核酸甚至小分子化合物药物。

### 3. 聚乙二醇修饰带来的益处

对蛋白质进行化学修饰的历史已经很长了。从研究蛋白质结构开始，生物化学家就采用各种化学方法对蛋白质的氨基酸侧链基团如巯基、氨基、咪唑基、胍基、吡啶基进行修饰，连接各种化学基团考察蛋白质结构和功能的变化。因此，当 *Davis* 教授 PEG 修饰蛋白质的研究内容发表后，并没有在生物化学界引起多大的反响。而且当对酶进行修饰以后，测得的催化活性都下降，甚至很大。从这点出发，有人对 PEG 修饰持否定的态度。尽管修饰可以降低蛋白质的免疫原性，但生物活性的大幅度下降使得研究者常常放弃了进一步的探索。然而，当人们将修饰后的蛋白质输入动物，测量其体内生物活性时，却发现体内的生物活性出乎意外地高，

而且持续很长时间。这个发现使生物技术公司振奋了，因为他们可以借助这项技术发展长效的基因工程蛋白质药物。体外活性低，体内活性高，成为 PEG 修饰蛋白质的普遍现象，也是很多人之前没有想到的。

通过进一步研究发现，体内活性的提升与 PEG 的分子量相关：分子量增加通常能够增加体内的药物半衰期(或半寿期)，由此促进了聚乙二醇生产企业去合成更高分子量的 mPEG，从 1 万增加到 2 万、3 万甚至 4 万。分枝化的 PEG 也被合成出来，并表现出比相同分子量的直线型 PEG 更好的延长体内半衰期的作用。到目前为止，上市的聚乙二醇修饰蛋白质药物都比原药的半衰期提高几倍以上，使用药由原来的每天 1 针改为每周 1 针，极大地方便了患者，同时也提高了药效。例如聚乙二醇修饰干扰素用于治疗丙肝，其效果就优于未修饰的干扰素。因此聚乙二醇修饰从原来的克服免疫原性的初衷，已经发展为延长药效、提高治疗效果的主要手段。

#### 4. 聚乙二醇修饰是否安全

PEG 修饰药物是否安全？经常有人问这样的问题。虽然这项技术已经有 30 多年的历史，药物上市也已 20 多年，但像任何药物一样，从严谨、科学的角度出发都不能回答说“没问题”。一种药物的副作用，特别是隐匿的、长期使用的副作用，常常需要经过许多年后才知道。目前可以说的是，现在还没有关于 PEG 修饰药物出现重大事故的报道，但人们，特别是医药领域的专家们，都在关注、研究这些药物可能出现的副作用。

聚乙二醇(PEG)作为医用辅料有更长的历史。早期美国 FDA 批准的人血丙种球蛋白冻干粉制剂中就有 PEG 作为配方之一。不过这里添加的 PEG 是双端为羟基的聚乙二醇，也就是常规的 PEG。关于常规的 PEG, 20 世纪 40 年代就有人做过动物安全性试验(Smyth et al., 1947)，并对其代谢进行了探讨(Schaffer et al., 1950)。试验表明，分子量较小，例如只有几百的 PEG，有一定的肾毒性；当分子量大于 1000 以后，毒性不够明显，例如分子量 1450、3350、6000 的 PEG 对兔子静脉注射给药，总剂量高达 10g/kg，没有发现动物有毒性反应。关于代谢的试验表明，肾排除是低分子量 PEG 从体内被清除的主要方式，随着分子量增加，粪便排除亦是体内清除的一种方式。

由于单甲氧基聚乙二醇(mPEG)和 PEG 极为相像，仅仅是末端一个羟基被替换，因此人们最初从早年 PEG 动物试验数据推论 mPEG 也具有生物安全性。也有文章表明分子量 4 万 mPEG 修饰的干扰素是通过肝脏代谢(Modi et al., 2000)经粪便排出体外的。但是近年来已有研究发现，mPEG 修饰的蛋白质药物会引起机体产生对 PEG 的抗体，从而加速了药物的清除。这种抗体的产生可能与其末端的单甲

氧基有关 (Armstrong et al., 2007; Sherman et al., 2012)。到目前为止, PEG 抗体的发现还仅限于所报道的 PEG 修饰蛋白质药物如尿酸氧化酶, 在某种程度上影响了药效, 但是否会产生对人体的负面影响则需要进一步的研究。

### 5. 聚乙二醇修饰的前景

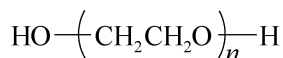
关于其药物副作用或潜在问题的研究, 标志着 PEG 修饰药物技术及其应用在走向稳定和成熟。如今, 几乎所有的生物制药公司都有人在研究 PEG 修饰技术: 从 PEG 修饰延伸到其他修饰, 如白蛋白修饰、脂肪酸修饰、多糖修饰等。作为生物修饰技术最典型、最受重视、已取得巨大经济效益且在某些疾病治疗如丙型肝炎上作用突出的代表, 聚乙二醇修饰仍然是我们研制新药、去除药物副作用、提升已有药物疗效的重要方法。

## 参 考 文 献

- Armstrong J K, Hempel G, Kolling S, et al. 2007. Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer*, 110(1): 103-111
- Modi M W, Fulton J S, Buckmann D K, et al. 2000. Clearance of pegylated (40kDa) interferon alfa-2a (Pegasys<sup>TM</sup>) is primarily hepatic. *Hepatology*, 32(4): 371A
- Schaffer C, Critchfield F, Nair J. 1950. The absorption and excretion of a liquid polyethylene glycol. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, 39: 340-344
- Sherman M R, Williams L D, Sobczyk M A, et al. 2012. Role of the methoxy group in immune responses to mPEG-protein conjugates. *Bioconjugate Chem.*, 23(3): 485-499
- Smyth H G, Carpenter C P, Shaffer C B. 1947. The toxicity of high molecular weight polyethylene glycols; chronic oral and parenteral administration. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 36: 157-160

# 第 1 章 单甲氧基聚乙二醇的合成

聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 是一种链体呈化学惰性的直链状聚醚类高分子, 分子量范围通常在数万以下。当分子量相对较高, 达到数十万甚至上百万时, 亦可被称为聚环氧乙烷 (polyethylene oxide, PEO) 或者聚氧乙烯 (polyoxyethylene, POE)。聚乙二醇的基本结构通常表示为:



由于聚乙二醇可同时溶于水和多种有机溶剂, 具有低毒性、极低的免疫原性和抗原性的特点, 而且在体内表现出优良的药代动力学性质和生物分布行为, 如具有高度的血液相容性和肝脾内的低累积 (Harris et al., 2003; Greenwald, 2003), 因此被普遍应用于医学和生物学领域, 并成为学术界和产业界广泛研究的课题。

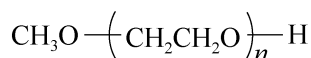
从 20 世纪 50 年代以来, 聚乙二醇由于它的亲水特性就已经被利用来和其他水溶性高分子或者盐类形成双水相体系, 应用于蛋白质特别是胞内蛋白质的分离纯化 (Walter et al., 1985); 聚乙二醇另一个突出的特性是它可以通过破坏相互接触的细胞膜的磷脂双分子层和促使细胞凝结来介导不同基因型的细胞或原生质体融合形成一个杂种细胞, 被广泛应用于细胞乙醇、细胞免疫等领域 (罗立新, 2003); 同样, 由于聚乙二醇在水中溶解度非常大, 空间位阻也远大于分子量类似的分子, 它还被广泛用作生物大分子如蛋白质、核酸、其他生物大分子和病毒颗粒的沉淀剂 (张焱等, 2006)。

由于聚乙二醇可以将其良好的两亲性和生物相容性等这些性质很好地传递到与之通过共价键相连的分子上, 它也被广泛地应用于各种分子或者材料的化学偶联, 对它们的功能或性质进行调整和改善。例如对酶进行修饰, 制备应用于工业过程的能在有机体系中完成催化功能的 PEG-酶偶联物 (Yoshinaga et al., 1987); 进行血液接触设备、动脉替换和诊断设备等的表面修饰, 形成具有生物相容性的保护性涂层 (Needham et al., 1992); 通过化学交联制备用于创口外敷的水凝胶 (Harris, 1992); 对脂质类药物释放体系进行 PEG 化学修饰以克服其易被肾脏和肝脏快速清除的缺陷 (Lasic et al., 1995); 诸如此类。

在这些应用中, 我们最关注的是 PEG 在生物医药领域化学偶联的应用及发展。它主要是通过通过对各种药物分子尤其是蛋白质药物进行化学偶联和修饰来制备长效给药系统, 在显著延长药物半衰期的同时, 还可以降低药物的免疫原性、抗原性及毒性作用, 给病患的治疗带来极大的福音。

这项研究起源于 20 世纪 70 年代。1977 年, Rutgers 大学 Frank F. Davis 教授领导的研究小组发现蛋白质经单甲氧基聚乙二醇 (mPEG) 修饰后体内半衰期明显延长, 免疫原性下降 (Abuchowski et al., 1977)。从 70 年代后期至今, 以 Harris、Greenwald、Veronese、Davis 和 Abuchowski 等为代表的数个研究小组对多种蛋白质药物进行了聚乙二醇修饰研究, 包括各种抗肿瘤蛋白质、治疗代谢缺陷性疾病的蛋白酶、多肽激素和各种细胞因子等。自 1990 年来, 经美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准, 已经有 PEG 化腺苷脱氨酶 (ADAGEN<sup>TM</sup>)、天冬酰胺酶 (ONCASPAR<sup>TM</sup>)、干扰素系列 (PEGINTRON<sup>TM</sup>, PEGASYS<sup>TM</sup>)、粒细胞集落刺激因子 (NEULASTA<sup>TM</sup>)、生长抑素 (SOMAVERT<sup>TM</sup>) 等数种聚乙二醇修饰药物陆续上市, 成功投入市场。

对蛋白质进行化学偶联时, 通常使用的聚乙二醇修饰剂分子量范围为  $10^3 \sim 10^4 \text{Da}$ 。考虑到蛋白质易于失活的特性, 需要将聚乙二醇的末端羟基衍生化为其他活性更高的基团, 再与蛋白质在温和的反应条件下进行化学反应。若是出于对两个不同的目标蛋白或者其他分子进行交联的目的, 则需要以两端都带有相同或者不同活性基团的聚乙二醇为原料。这种聚乙二醇通常以常规的两端都是羟基的聚乙二醇分子为原料进行端基衍生来制备。若是只对目标蛋白本身进行聚乙二醇化学修饰, 那么所需的聚乙二醇必须是一端为活性基团, 另一端封端。这种聚乙二醇修饰剂通常是以一端为惰性基团甲氧基封闭, 另一端为羟基的单甲氧基聚乙二醇为基本原料进行端基衍生来制备。单甲氧基聚乙二醇的基本结构如下所示:



在本章中, 我们将对双羟基聚乙二醇和单甲氧基聚乙二醇原料的结构、制备及表征方法研究进行深入的探讨。

## 1.1 聚乙二醇的结构及性质

### 1.1.1 聚乙二醇链的空间结构

聚乙二醇的基本单元是一种直链状结构, 理论上应形成规则锯齿结构, 每个乙氧基结构单元的尺寸应该是宽  $3.5\text{\AA}$ , 长  $2.5\text{\AA}$ , 如图 1.1 (a) 所示。

但是事实上, 根据 Staudinger (1932) 的研究, 短链 PEG 的结构单元宽为  $1.9\text{\AA}$ , 长为  $4\text{\AA}$ , 推测其实际空间构型应为如图 1.1 (b) 所示的弯折结构。他认为这主要是由于各链节间碳氧原子的共同作用导致了链节发生弯曲, 当链长较短时, 这种作

用力不够强，因此聚合物链基本还是呈现锯齿结构，但当链节超过一定数量后，聚合物链即开始逐渐呈现这种弯折结构。Rösch 对这种结构的产生进行了进一步理论上的解释。在锯齿状结构中， $-C-C-O-$ 形成的斜三角结构与 $-C-O-C-$ 的对称三角结构以 2 : 1 的比例存在，每个乙氧基链节构成一个两极结构，其中  $CH_2$  为正电中心，O 为负电中心，每个单元中的  $CH_2$  对另一个都呈现排斥作用，O 原子则被相邻的  $CH_2$  所吸引，这种作用整体上会导致链长增加，但这种链节结构增加到 11 个时，总的作用则体现为收缩，聚合物链转化为弯折结构，如图 1.2 所示 (Schönfeldt, 1969; Rösch, 1957)。

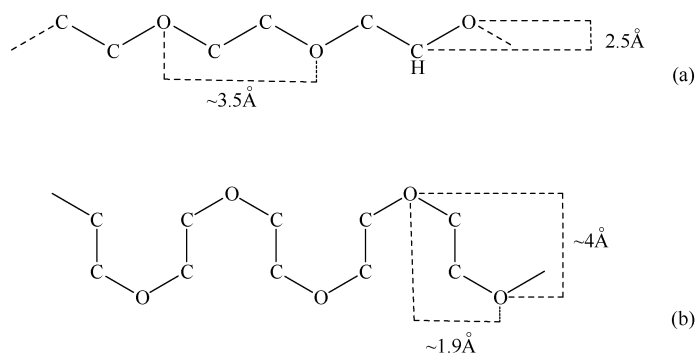


图 1.1 聚乙二醇链的空间结构示意图

当聚乙二醇链进一步增长，Antonsen 等(1992)通过差示扫描量热法(DSC)对其进行研究发现，其每一个乙氧基链节在水溶液中已经能结合 2~3 个水分子，这在某种程度上进一步提高了聚乙二醇链在水相的溶解度，同时，也由于这种高的水合能力，聚乙二醇分子在水溶液中通常会呈现出远高于其实际分子量分子的物理化学行为，如明显超过自身分子量数倍的水力学半径等。

### 1.1.2 聚乙二醇的物理性质

分子量低于 1000 的聚乙二醇是一种黏稠状的无色液体，分子量较高的是蜡状固体，当分子量高至数万时则多为白色粉末状颗粒。它不会水解变质，且无刺激性，是一种非离子型聚合物，具有良好的稳定性、难挥发性、成膜性、润滑性、分散性和增塑性。其熔点与分子量相关，熔点随着分子量的增加而上升，当分子量高到一定程度时，熔点趋于稳定，接近  $67^\circ\text{C}$ 。

众所周知，聚乙二醇是一种两亲性物质，它既可以溶于水，也可以溶于二氯甲烷等多种有机溶剂。事实上，聚乙二醇的链节结构是如图 1.1 所示的醚链结构，

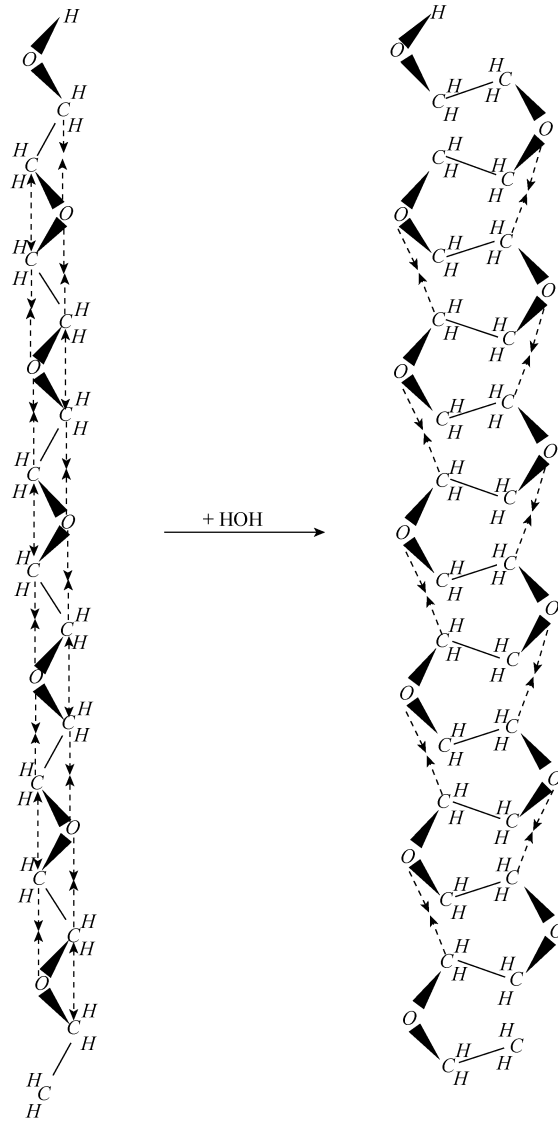


图 1.2 聚乙二醇链中的链节空间结构变化及双极性中心作用示意图

之所以会具有良好的亲水性，主要是由于其强大的水合作用 (Schönfeldt, 1969)。Chwala 和 Maritina (1937, 1939) 的研究认为，在水溶液中，水分子与乙氧基链节中的氧原子通过氢键作用力结合，形成如图 1.3 (a) 所示的结构，从而呈现出一定的负电性；而 Wurzschnitt (1950) 的研究却表明乙氧基链节与水分子之间大部分形成的是一种呈正电性的氧鎓结构，如图 1.3 (b) 所示，少部分形成的是 (a) 结构，两个结构在水溶液中呈现一种平衡状态。随着乙氧基链节的增加，大量的水分子被结

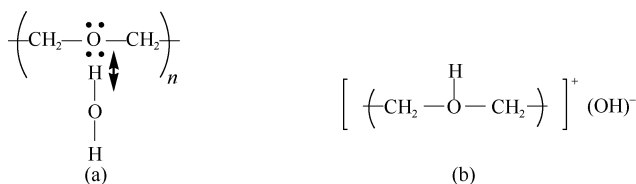


图 1.3 聚乙二醇中乙氧基链节的水合结构示意图

合到聚乙二醇主链的氧原子上,从而使其呈现出良好的亲水性。同时,聚乙二醇同样还表现出了一定的疏水性,这一点主要取决于链结构中亲水性乙氧基链节与疏水性烷基端基的比例,比例越高,其疏水性则越弱。

但值得注意的一点是,PEG 在水溶液中的溶解主要依赖于其与水分子之间的水合作用,但这种氧原子与水分子之间的氢键作用力只有  $7\text{kcal}^{\text{①}}/\text{mol}$ ,并不是很强,当 PEG 的水溶液被逐渐加热到一定的温度时,氢键被破坏,从而发生脱水作用,PEG 反而会逐渐从水溶液中析出。当体系逐渐降温时,它又会重新溶于水。这个温度被称为浊点,一般它会随着体系 PEG 浓度的不同而发生变化;当体系中加入盐,尤其是碱性化合物时,浊点会降低,而加入酸时,则浊点升高。与此同时,当发生这种相变时,体系的黏度也就随之发生较大的变化,通常会突然下降。而且,这种现象更容易发生在端基带有烷基或者其他非羟基的疏水官能团时。

### 1.1.3 聚乙二醇的生物学性质

聚乙二醇是具有良好生物相容性的高分子聚合物,也是经过美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的极少数能够作为体内注射药用的合成高分子之一。

关于 PEG 的毒性研究表明(Working et al., 1997),低分子量的 PEG 在体内会表现出与乙二醇类似但不完全相同的临床特征,主要是分子量 400 以下的 PEG 在体内可被氧化为有毒的二酸和羧酸代谢物,其氧化速度随着 PEG 分子量的增大而急剧减小。而大分子量的 PEG 毒性是非常低的,研究表明其对于猴子的安全剂量甚至高达  $16\text{g}/\text{kg}$ 。

新陈代谢研究表明大分子量的 PEG 也很少被胃肠道吸收,主要是通过肾小球过滤而没有渗透到肾小管。高分子量的 PEG 在血管内的保留时间比低分子量的 PEG 长,且随着尿清除的量也随着 PEG 分子量的增大而急剧减少。与其他大分子相比,PEG 更容易在肌肉、皮肤、骨骼和肝脏中累积,且累积速度与血管通透能力

①  $1\text{cal}=4.1868\text{J}$ 。