

# 长效多肽药物研究进展

王秀贞<sup>1,2</sup> 吴 军<sup>1\*</sup> 孟宪军<sup>2</sup>

(1 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071 2 沈阳农业大学食品科学院 沈阳 110161)

**摘要** 重组蛋白药物在体内存留时间的长短,极大地影响到药物的使用剂量和治疗效果。防止多肽在体内迅速降解、延长半衰期成为蛋白质工程药物改造的重要课题之一。经过许多学者多年来的不懈研究,不少长效多肽药物已经上市,还有一些正在进行临床研究。综述了几种多肽药物常用的长效改造方法如化学修饰、基因融合、点突变以及药物制剂释放系统的改造。

**关键词** 多肽药物 半衰期

生物技术的发展极大地促进了多肽、蛋白药物的研制开发,目前已有 40 种以上重要的治疗药物上市,720 多种生物技术药物正进行 I ~ III 期临床试验或接受 FDA 审评,其中 200 种以上的药物进入最后的批准阶段(III 期临床与 FDA 评估)。多肽因子、蛋白药物主要通过降解、排泄、以及受体介导的内吞等作用在体内被清除。其中分子量小于 20kDa 的多肽因子在代谢过程中易由肾小球滤过;通过肾小管时多肽因子又被其中的蛋白酶部分降解并从尿中排出,因而半衰期短。为维持一定的疗效需要大剂量反复用药,长期的频繁注射不仅增加了病人的痛苦而且易引发一系列副反应。近几年各国学者主要从化学修饰、基因融合、点突变以及制剂改造等方面着手进行长效多肽药物的研究。

## 1 化学修饰

化学修饰是延长蛋白药物半衰期的一个有效途径,其中应用最为广泛的修饰剂是单甲氧基聚乙二醇(methoxypoly ethylene glycol, mPEG),其次是多糖类如葡聚糖、聚蔗糖、淀粉等;同源蛋白质、人工合成多肽类如白蛋白、聚丙氨酸等;长链脂肪酸类以及聚烯属烃基化合物、聚酸酐等<sup>[1]</sup>。PEG 是惰性、两亲、不带电荷的柔性聚合物,分子量随聚合程度而变化(1 ~ 50kDa),有线性 and 支链两种构型,其中线性单甲氧基聚乙二醇(mPEG)已经 FDA 批准作为许多药物的安全载体。mPEG 通过共价键与蛋

白质连接,对蛋白表面氨基进行修饰以有效地改变多肽、蛋白药物在体内的分布和药理学特性。目前 mPEG 修饰已应用于 40 多种不同蛋白的修饰如猪血清白蛋白(BSA)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、白介素-2(IL-2)等。PEG 修饰后血浆半衰期一般可延长几倍至几十倍甚至是上百倍(表 1),但大部分蛋白的免疫原性也有所降低,而蛋白的生物活性也有不同程度降低。这可能是由于 PEG 大分子在蛋白分子周围形成一层外壳阻碍了免疫细胞与蛋白的接触保护了蛋白,掩盖了蛋白酶识别位点避免蛋白酶降解的发生,但同时也使蛋白的活性位点受到影响。中国药科大学田泓等<sup>[2]</sup>用聚乙二醇修饰干扰素  $\alpha_2$  的研究表明活性损失与修饰率有关,修饰率保持在 30% 以内时生物活性保持较好 Motoo Yamasaki 等<sup>[3]</sup>在 PEG 修饰重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)中发现修饰位点的多少(即 1 分子 rhG-CSF 与几分子 PEG 结合)对半衰期的延长方面并无多大影响,但修饰位点少活性损失就相对少一些;为保持蛋白的生物活性,采取位点特异性修饰即将蛋白功能结构域中易与 PEG 结合的氨基酸残基换成功能相似不干扰蛋白与 PEG 结合的氨基酸残基如赖氨酸替换成精氨酸<sup>[4]</sup>。PEG 修饰应用十分广泛,它对酶、多肽、受体、抗体片段等均能实现偶联以延长半衰期,抗体药物是继疫苗之后的第二大生物技术药物产业,但是异体抗体容易产生免疫识别而被清除,经 PEG 修饰后就可得到明显改善<sup>[5]</sup>,从而为抗体更广泛地应用于疾病的治疗提供了基础。随着研究的不断深入,不少 PEG 修饰蛋白药物已经上市或者进入临床(表 2)。

收稿日期:2003-03-21 修回日期:2003-08-22

\*通讯作者,电子信箱:wqmxjr@sohu.com

表 1 蛋白药物经 PEG 修饰后半衰期的变化

蛋白药物	半衰期 (PEG 修饰前)	半衰期 (PEG 修饰后)
超氧化物歧化酶	5min	4. 2h
尿激酶原	5. 28min	69. 8h
粒细胞集落刺激因子	1. 5h	12h
精氨酸酶	1. 0h	12h
干扰素 2a	3 ~ 8h	65h
白介素-6	2. 1min	206min
白介素-2	44min	256min
链激酶	4min	20min

多糖和白蛋白作为化学修饰剂也有成功范例,用于治疗血栓的葡聚糖—链激酶已在俄罗斯面市;

白蛋白已作为多种蛋白药物的载体<sup>[6]</sup>,白蛋白-SOD 半衰期由 5min 提高到 6h;白蛋白-GH 半衰期由 5min 提高 2 ~ 3h,Aimme Guider Paige 等将 rhG-CSF 通过异双功能试剂聚乙二醇与白蛋白共价偶联,使 G-CSF 的体内清除速度降低约 6 倍。也有将蛋白药物与抗体偶联来延长药物半衰期的报道<sup>[7]</sup>。但是化学修饰是完全随机的,带来的产物不均一性及药物活性的降低似乎是不可避免的,为此有人提出采用酶法进行位点特异性修饰。对于修饰剂的活化方法、修饰位点、修饰率、修饰反应时间等都需要深入研究。

表 2 部分 PEG 修饰药物研究进展状况

蛋白药物	研究进展	所属公司	商标/商品名
粒细胞集落刺激因子	上市	Amgen	SD/01
干扰素 2b	上市	Schering Plough	PEG Intron
干扰素 2a	上市	Hoffman-La Roche	Pegasy
超氧化物歧化酶	临床	Pharmacia	
尿酸酶	临床	Pharmacia	
蜂毒	临床	Pharmacia	
人生长激素拮抗剂	临床	Pharmacia	
白介素-2	期临床	Pharmacia	
重组链激酶	期临床	Diosynth RTP Inc	
天冬酰胺酶	美国和俄罗斯上市	Enzon	ONCASPAR
腺苷脱氨酶	上市	Enzon	ADAGEN

## 2 基因融合

通过基因融合技术增加多肽和蛋白药物分子量或改变与受体的亲和性等原理延长药物半衰期。人血清白蛋白(HSA)是现有天然载体蛋白之一,并且是血液中含量最高的单一蛋白(达 40g/L),是人体血浆的主要成分,在体内有维持血液渗透压,运输营养和其它重要生物物质的作用,具有无免疫原性,人体相容性好,分子量大(约为 66kDa),半衰期长(达两周)等稳定剂和多肽运载蛋白的必需性质,它已成功地在哺乳动物细胞和酵母中实现高效表达。日本 Green Cross 公司酵母表达的 HSA 已完成期临床实验和规模化生产的准备,临床实验证明酵母表达的 HSA 与天然的 HSA 在效果和安全性方面完全一致<sup>[8]</sup>。1990 年英国 delta 公司首先将白蛋白用于基因融合提高多肽、蛋白药物的半衰期,1997 年申请了 HSA 与人生长激素(HGS)的融合蛋白的专利。美国 Yeh 等将 CD4 与 HSA 融合表达,HSA-CD4 融合蛋白在小鼠体内半衰期较 CD4 延

长 140 倍,使其半衰期与 HSA 相似<sup>[9]</sup>。2001 年美国 HGS 公司研制的 HSA 与  $\gamma$ -干扰素、人生长激素、IL-2 的融合蛋白分别进入临床试验,其中人生长激素临床前数据表明其体内清除速率较融合前降低了 50 倍<sup>[10]</sup>。用于治疗血小板凝集的 73 个氨基酸的毒液肽 Barbourin 与白蛋白融合后清除率较 Barbourin 明显降低且活性保持较好<sup>[11]</sup>,水蛭素融合白蛋白后不仅延长了药效,且增强了其生物学活性<sup>[12]</sup>。

利用抗体 Fc 段所特有的生物学功能与某些多肽或蛋白融合可增加该蛋白的血浆半衰期,一般采用引入重链稳定区(C 2 或 C 4)构建融合蛋白,例如 IL-10 是一种抗炎症因子,制备重组 IL-10/IgG<sub>2</sub> Fc 融合蛋白能明显延长 IL-10 的半衰期<sup>[13]</sup>。Chamow 等<sup>[14]</sup>制备了 CD4/IgG,包括 CD4 的 V1,V2 结构域,人 Ig 重链铰链区及 Fc 段,已进入 I 期临床试验。酵母表达的抗体单链 Fv 段(scFv)与抗体 Fc(人 IgG1 片断)融合蛋白以二聚体形式在培养上清中,scFv 段分子量由原来的 25kDa 增至 106kDa,小

鼠体内试验表明血浆半衰期由 3.5 h 延长至 93 h<sup>[15]</sup>。据报道 scFv 片段具有抗蛋白酶降解的作用,与 L-天冬酰胺酶融合后 L-天冬酰胺酶半衰期由 2 h 延长至 9 h<sup>[16]</sup>。IL-2, GM-CSF, TNF, CD4, TNFR 等与抗体片段融合后半衰期都有不同程度的增加,其中 TNFR 与 IgG1 (C1) 融合蛋白已经美国和欧洲批准上市。

除了利用蛋白载体基因融合外有些细胞因子之间融合也可以实现药效的延长,促血小板生成素(Tpo)富糖基化的 C 端在体内可能有稳定分子、延长半衰期以提高分子效率的作用,汪治清等<sup>[17]</sup>构建了红细胞生成素(Epo)-Tpo 融合蛋白,初步试验结果显示 Epo 半衰期由 8h 增至 12h。中国专利 01104265 用基因工程方法生产增强其生物活性的红细胞生长因子二联体/三联体融合蛋白,不仅延长了蛋白体内半衰期而且增强了生物功效,减少用药次数,有望提高红细胞刺激因子的临床实用价值。

融合蛋白基因稳定性高,可调控表达且制备简单,产物均一,对蛋白、多肽药物活性影响小等,是目前研究长效多肽、蛋白药物的良好途径。

### 3 点突变技术

利用寡核苷酸引物、PCR 介导的定点突变及盒式突变等方法使蛋白药物中影响活性或稳定性的氨基酸发生突变可以有效提高蛋白稳定性,增加药物半衰期。例如白介素-2 是一条 133 个氨基酸组成的多肽链,其中呈游离状态的 Cys-125 易形成错误的二硫键配对或形成分子之间的二聚体影响活性和稳定性,将 Cys-125 用 Ser 或 Ala 取代后生物活性比正常高 1 倍,体内半衰期由数分钟提高到 1.2h<sup>[18]</sup>。重组组织型纤溶酶原激活剂(rtPA)能高效特异地溶解血栓,目前两种新型 tPA (K2-tPA、TNK-tPA)已被欧洲和美国批准上市。K2-tPA 保留了 tPA1-3 及 176~527 位氨基酸的肽段,缺失 KI 区、E 区和 F 区使之成为单链多肽,无糖基侧链,半衰期延长 4~5 倍;TNK-tPA 突变体是将 tPA 103 位 Thr 变成 Asn;117 位 Asn 变成 Gln;Lys296-His297-Arg298-Arg299 替换成 4 个 Ala,该突变体血清清除速率降低 4 倍左右,已获得美国 FDA 批准进入市场。自然界中亦存在天然突变体,使其具有更高的生物学活性和更长的血浆半衰期,如载脂蛋白 AI

(apoAI)的米兰突变体(AIM),即 apoAI 的 Arg<sup>173</sup>突变为 Cys<sup>173</sup>,两个 AIM 单体通过 Cys<sup>173</sup>之间的二硫键形成同源二聚体,血浆半衰期得到进一步延长。

## 4 长效制剂

对于半衰期短的多肽、蛋白药物也可以采取改变剂型或包埋的形式延缓其在体内的释放来延长药物作用时间。许多学者在这方面进行了深入的研究和开发,并取得了一定的成果。

### 4.1 埋植剂和缓释注射剂

国外已有不少将胰岛素、肝素、神经生长因子等生物药物作为模型药物在动物体内外研究的报道。将药物灌入埋植剂空腔内,通过手术植入人体皮下,药物通过开口处缓慢释放,药物释完后再经手术取出,对于需长期用药的患者来说无疑具有特别重要的意义。但是这种非生物降解骨架材料必须经手术途径植入和取出,对局部组织有刺激与不适感。因此国内外学者大力研究可生物降解聚合物骨架材料和可注射型缓释剂。可生物降解聚合物包括天然聚合物如明胶、葡聚糖、壳聚糖等和合成聚合物如聚乳酸、聚丙交酯、聚乳酸-羟乙酸(PLGA)、聚乙内酯等。聚合物在体内降解为乳酸、羟乙酸,羟乙酸进一步降解为水和二氧化碳,除具有良好的生物相容性、无免疫原性、安全性高外,合成聚合物还可以通过改变两单体比例及聚合条件调节聚合物在体内的降解速度,从而达到延长药效的目的。Zenica 公司研制成功商品名为 Zoladex 的可注射埋植剂,是将多肽药物戈舍瑞林(goserelin)与 PLGA 在熔融状态混匀后经一多孔装置挤出,挤出物直径 1mm,经切割成一定长度的条状物,单剂量 3.6mg,灭菌后直接密封于一次性注射器待用。该制剂可直接注射于皮下或肌肉,基质材料在体内可逐渐降解。聚原酸酯(POE)在上世纪 60 年代初合成,因其性能良好得到了迅速发展,已经过 FDA 审批阶段,半固态聚原酸酯作为药物载体的突出优点是固体药物和聚合物可直接通过机械方法混合均匀,不用加热亦无需溶剂协助,减少了因加入其他附加剂可能引起的副作用,保护了药物活性<sup>[19]</sup>,通过表面溶蚀可以达到恒速释放,容易控制药物释放速度。

可降解埋植剂骨架材料的酸性降解产物(乳酸、羟乙酸)在埋植剂内部蓄积,多肽、蛋白质的稳定性可能会受影响,故近来研究的重点转向注射微

球。采用生物可降解聚合物为骨架材料包裹多肽、蛋白质药物制成可注射微球制剂,使其在体内达到缓释的目的是目前各国学者大力研究的新领域。在诸多多肽缓释制剂中黄体素释放激素(LHRH)类似物微球的研究最为成功。此外,也有不少用微囊化手段使胰岛素、神经生长因子、内皮生长因子等缓释的研究报道。

微囊化技术制备多肽、蛋白质药物可注射微球是生物技术药物推广应用十分重要的方向,可注射微球注射剂具有可靠的缓释效果,可延长药效,减少用药次数。另外缓释剂型要根据药物稳定性和理化特性设计,还要考虑人体生理规律选择剂型和释药模式,此外其载体特性要求高,制备工艺复杂,生产成本相对较高。

## 4.2 非注射剂型

针对不同的作用目的,采用不同的给药途径不仅可以提高药物生物利用度还可以减少副作用的发生。多肽和蛋白药物在常规给药途径如口服时会遇到很多问题如胃肠道的酶解,肝脏的首过效应消除等,因此多肽和蛋白药物的传统给药途径是皮下注射和静脉注射,但是由于半衰期短,给病人带来不便等原因促使许多学者努力寻找其他更有效的给药途径包括“屏护”口服给药和电转运经皮释放。如胰岛素除注射外开发了肺部吸入、口服或口腔黏膜吸收等剂型。但无论是剂型改变还是包埋植入或注射均不是从本质上改变药物的动力学特性而是通过缓慢释放延长药效,提高生物利用度。

## 5 结 语

生物技术药物的发展已进入蛋白质药物新时期,通过蛋白质工程手段可以提高重组蛋白的活性,改善制品的稳定性,提高生物利用度,延长在体内的半衰期等。水溶性大分子对蛋白质的化学修饰,不仅能明显延长蛋白质的循环半衰期,还能有效降低或解除其免疫原性。化学修饰与基因工程、蛋白质工程相结合将会有更好的应用前景。如 Goodson 等<sup>[20]</sup>用定点突变技术获得 Thr<sup>3</sup> Cys<sup>3</sup>-IL-2,并通过巯基用 PEG 进行修饰,结果延长了生物体内半衰期,增加产物稳定性。通过在融合蛋白 TGF-PE38 中插入含有可修饰的一段肽段,同时突变去掉融合蛋白功能部位可修饰位点,然后进行 PEG 修饰,所得到的融合蛋白体内存留时间延长了

10 倍,提高了体内抗肿瘤活性<sup>[21]</sup>。随着各种技术手段的不断提高,相信未来多肽、蛋白药物具有不可估量的应用前景。

## 参考文献

- [1] 王树枝,金晶,马淑哲.蛋白质的化学修饰与生化药物.中国药学杂志,1998,19(5):224~227
- [2] 田泓,姚文兵,吴梧桐,等.聚乙二醇对干扰素-2b 的初步化学修饰研究.中国药科大学学报,2001,31(1):74~77
- [3] Motoo Yamasaki, Makoto Asano, Masami Okabe, et al. Modification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and its derivative ND28 with polyethylene glycol. J Biochem, 1994, 115: 814~819
- [4] Gombotz, et al. Prolonged release of GM-CSF, 2001, US6274175
- [5] Breton J, Gurevich V. Characterization of a natural disulfide-linked conjugate of pro-utopians (pro-utopians) with albumin. Fibrinolysis, 1990, 3(4):160
- [6] Chuang VT, Kragh-Hansen U, Otagiri M, et al. Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin. Pharmaceutical Research, 2002, 19(5):569~577
- [7] Stephen D, Gillies, Kir-Ming Lo, et al. Improved circulating half-life and efficacy of an antibody-interleukin 2 immunocytokine based on reduced intracellular proteolysis. Clinical Cancer Research, 2002, 8:210~216
- [8] Kobayashi K, Nakamura N, Sumi A, et al. The development of recombinant human serum albumin. Ther Apher, 1998, 2(4):257~262
- [9] Patrice Yeh, Didier Landais, Marc Lemaitre, et al. Design of yeast-secreted albumin derivatives for human therapy: Biological and antiviral properties of a serum albumin-CD4 genetic conjugate. Proc Natl Acad Sci. USA, 1992, 89:1904~1908
- [10] Balance D J. 重组人生长激素和人血清白蛋白融合蛋白. 1999, CN1207131
- [11] Marques J A, George J K, Smith II, et al. A barbourin-albumin fusion protein that is slowly cleared *in vivo* retains the ability to inhibit platelet aggregation *in vitro*. Thromb Haemost, 2001, 86(3):902~908
- [12] Sheffield W P, Smith I J, Syed S, et al. Prolonged *in vivo* anticoagulant activity of a hirudin-albumin fusion protein secreted from *Pichia pastoris*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2001, 12(6):433~443
- [13] 孙凯,冯琦. Ig 融合蛋白临床应用前景. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2000, 7(3):229~231
- [14] Chamow SM, Duliege AM, Ammann A, et al. CD4 immunoadhesins in anti-HIV therapy: New developments. Int J Cancer, 1992, 7:69
- [15] Powers D B, Amersdorfer P, Bul M, et al. Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris*. J Immunol Methods, 2001, 251(1-2):123~135
- [16] Guo L, Wang J, Qian S, et al. Construction and structural modeling of a single-chain Fv-asparaginase fusion protein resistant to

- proteolysis. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 70(4): 456 ~ 463
- [17] 汪治清, 侯云德, 杨翔, 等. 融合蛋白 E $\alpha$ -T $\alpha$  (c) 的表达及初步活性检测. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2001, 15(1): 5 ~ 8
- [18] 马清均主编. *生物技术药物*. 北京: 化学工业出版社, 2002. 50 ~ 51
- [19] Heller J. Chemically self-regulated drug delivery system. *J Controlled Release*, 1988, 8: 11
- [20] Godson R T, Katre N V. Site-directed PEGylation of recombinant interleukin-2 at its glycosylation site. *Biol Technology*, 1990, 8: 343 ~ 346
- [21] Phillips PC, Catterall M, Colvin OM, et al. Transforming growth factor- $\alpha$ -Pseudomonas exotoxin fusion protein (TGF- $\alpha$ -PE38) treatment of subcutaneous and intracranial human glioma and medulloblastoma xenografts in athymic mice. *Cancer Research*, 1994, 54(4): 1008 ~ 1015

## The Advance of Reserch of Long Effect Peptides Medine

Wang Xiuzhen<sup>1</sup> Wu Jun<sup>2</sup> Meng Xianjun<sup>1</sup>

(1 Food Science Department of Shenyang Agriculture University Shengyang 110161)

(2 Institute of Biotechnology Academy of Military Medical Science Beijing 100071)

**Abstract** The time of recombinant peptides medine remain *in vivo* effect the dosage and therapeutic effect extremely. So, it become one of important tasks that to reconstitute these drugs for prevention of rapid degradation and short half-life. After many years unremitting efforts, a lot of long effect peptides medicine have been on the market or on clinical trial. To reach this goal, the following ways such as chemical modification, gene fusion, point mutaion and delivery systems revolution are reviewed.

**Key words** Peptides medicine Half-life

## 中国科协 2003 学术年会·生物技术前沿与产业化 研讨会在沈阳举行

中国科协 2003 学术年会于 2003 年 9 月 13 ~ 16 日在沈阳举行, 中国生物工程学会承办了年会的第 15 分会场“生物技术前沿与产业化”研讨会, 来自全国的近百名代表参加了本次研讨会。

中国生物工程学会副理事长、医药生物技术专业委员会主任马清钧教授担任分会场主席并主持会议。在医药生物技术领域, 中国医学科学院血液研究所所长韩忠朝教授就“干细胞与再生医学”的研究开发与应用作了大会专题报告, 辽宁省肿瘤研究所李文欣研究员介绍了 Her-2 单克隆抗体在乳腺癌诊断中的应用性研究工作, 第四军医大学卫克文先生作了“变形链球菌葡糖结合蛋白 B 基因防龋疫苗的构建及其在哺乳动物细胞中的表达”的报告。

在海洋生物技术领域, 中国科学院海洋研究所王广策研究员作了“海洋生物活性蛋白的规模分离及应用”的报告。在农业生物技术方面, 吉林农业大学生物技术学院李海燕副教授作了“水杨酸诱导山葡萄 Class 几丁质酶基因 *VCH3* 启动子在转基因烟草维管组织中的表达”的报告, 汕头大学生物系庄东红副教授作了“根癌农杆菌介导的花生遗传转化影响因素的研究”的报告。

在工业生物技术领域, 长春工业大学生物工程学院副院长薛冬桦教授介绍了生物合成麦角甾醇的工作, 中国化工学会生物化工专业委员会副秘书长戎志梅高级工程师介绍了新世纪蓬勃发展的我国生物化工产业。在组织工程领域, 航天医学工程研究所提供了两篇报告, 它们分别是李莹辉研究员的“模拟微重力条件下新生大鼠心肌细胞三维培养体系的构建”和熊江辉助研的“基因芯片数据分析的新方法与基因调控网络推理”。

在生物技术产业化方面, 上海科技情报研究所王萍高级工程师详细介绍了她们的最新研究成果“国外生物技术发展政策研究及我国政策建议”(将陆续在本刊发表), 辽宁大学药物研究所徐利锋教授介绍了他们在基因工程药物产业化方面的一些探讨, 辽宁卫星药业集团则提出了较为具体的生物技术产业化的对策。

这次研讨会内容涉及生物技术的诸多方面, 进入大会发言的学术报告均是学会从众多来稿中精选出的具有较高的学术水平和交流价值, 同时对辽宁省和沈阳市发展生物技术及实现产业化问题论述得也较为深入, 与会代表普遍反映收获较大, 也希望中国生物工程学会在明年的中国科协学术年会上能组织更多更好的学术报告。

(张宏翔)