

聚乙二醇修饰对木瓜凝乳蛋白酶酶学及 药物生物学性质的影响

舒 薇¹, 贺丽萍¹, 崔堂兵², 郭 勇²

(1 华南农业大学 测试中心, 广东 广州 510642 2 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 采用活化的单甲氧基聚乙二醇 (mPEG-5000) 对木瓜凝乳蛋白酶 (Cp) 进行了共价修饰, 修饰产物经毛细管电泳检测与分析表明: 主产物为平均每分子 Cp 偶联 3~4 个 mPEG₁ 长链的低修饰度修饰酶。以此修饰酶为研究对象, 进行了 Cp 在修饰前后的主要酶学、药物生物学性质的比较研究。结果表明: Cp 经 mPEG₁ 修饰后, K_m^{app} (酪蛋白为底物) 有所增加, 但与 Cp 相比, mPEG₁ 修饰酶的 pH 稳定性、热稳定性以及抗胰蛋白酶的水解能力却均有增强; 药代动力学结果还显示, mPEG-Cp 的体内活性半衰期延长, 修饰酶体内半衰期是原酶的 1.6 倍, 表明 mPEG₁ 修饰酶具有更好的临床应用前景。

关键词: 木瓜凝乳蛋白酶; 单甲氧基聚乙二醇; 化学修饰; 酶学及药物生物学性质

中图分类号: Q 55 R964 R969.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2006) 01-0065-04

Effects of Modification with 2-(O-Methoxypolyethylene glycol)-4- 6-Dichloro-s-Triazine on the Main Enzymological and Pharmacobiological Properties of Chymopain

SHU Wei¹, HE Liping¹, CUI Tangbing², GUO Yong²

(1 Test Center South China Agric. Univ., Guangzhou 510642 China)

2 College of Biological Sciences and Engineering South China Univ. of Tech., Guangzhou 510640 China)

Abstract Chymopain (Cp) was covalently modified with activated monomethoxypolyethylene glycol (mPEG-5000), and capillary electrophoresis of the modification product showed that the poorly conjugated Cp (3-4 mPEG₁ chains per molecule Cp) was the major product. This modified Cp was the object of this research and the main enzymological and pharmacobiological properties of the Cp before and after modification were subjected to comparative study. The results showed that the K_m^{app} value of the modified Cp (casein as substrate) was increased but the pH stability, thermostability and the resistance to trypsin hydrolysis of the modified Cp were increased in comparison with the native Cp. The pharmacokinetics showed that the half life of the mPEG-modified Cp *in vivo* was prolonged being 1.6 times that of the native Cp and which implied that the modified Cp would have better prospects in clinical application.

Key words chymopain; 2-(O-methoxypolyethylene glycol)-4, 6-dichloro-s-triazine; chemical modification; enzymological and pharmacobiological properties

目前, 木瓜凝乳蛋白酶 (Chymopain, EC3.4.22.6 Cp) 已成为一种重要的医药用酶^[1-5]。然而该酶在临床应用过程中存在体内半衰期短、多次注射易引发免疫过敏反应等不良效果^[6,7]。国内外诸多研究

结果表明, 采用酶化学修饰技术可有效克服以上不足和缺陷^[8,9]。迄今, Cp 的化学修饰研究国内外鲜见报道。为此作者以单甲氧基聚乙二醇 (monomethoxypolyethylene glycol, mPEG, $M_r=5000$) 为修饰剂对 Cp

收稿日期: 2005-06-29

作者简介: 舒薇 (1968), 女, 博士, 讲师, Email: shuwei@scau.edu.cn

基金项目: 广东省重点科研项目 (G11707)

进行了共价修饰、修饰效果的比较及修饰剂的筛选(另文发表),进而对 C_p 与筛选出的单链单甲氧基聚乙二醇($mPEG_1$)的共价修饰产物($mPEG_1-C_p$)进行了检测与分析研究^[10]. 本文在此基础上,进一步对 $mPEG_1$ 修饰酶的主要酶学和药物生物学性质进行研究,旨在通过一些主要参数的测定与比较来判断修饰效果的优劣及药效性,这将为 C_p 的 $mPEG$ 修饰酶的药品研发和今后的实际应用提供重要参考.

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

木瓜凝乳蛋白酶(C_p),自制,经 SDS-PAGE 检测电泳纯;三聚氰氯(cyanuric chloride),Fluka 公司产品;单甲氧基聚乙二醇($mPEG$)、酪蛋白(casein),Signa 公司产品;N-乙酰-L-酪氨酸乙酯(N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester, ATEE),进口试剂,购于广州威佳生物技术有限公司;Sephadex G-75 Pharmacia 产品;两性电解质 Servalyt® pH2.0~9.0 Serva 产品;牛磺酸(Taurine)、考马斯亮蓝 R250、G250 进口分装,上海博奥生物科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯.

1.2 试验动物

新西兰大耳兔,雄性健康,体质量 2.5~3.0 kg 由南方医科大学(原第一军医大学)实验动物中心提供.

1.3 方法

1.3.1 $mPEG_1$ 对 C_p 的化学修饰及修饰产物的分离纯化 $mPEG_1$ 对 C_p 的化学修饰及对产物组分的检测与分析参见文献[10],进一步将修饰反应物经浓缩后上 Sephadex G-75 层析柱,以 0.05 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液(PBS)洗脱,收集低修饰度产物峰,并以此为研究对象,进行 $mPEG_1-C_p$ 与 C_p 在主要酶学、药物生物学性质方面的比较研究.

1.3.2 酶水解活力测定(以酪蛋白为底物) 参照文献[11]方法测定酶活力.以测定条件下[pH7.0 (37 ± 0.2)℃],每分钟水解酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸所需的酶量为 1 个酶活力单位(U).

1.3.3 修饰酶表观米氏常数(K_m^{app})与原酶米氏常数(K_m)的测定 以酪蛋白为作用底物,采用 Lineweaver Burk 作图法分别求出修饰酶 K_m^{app} 与原酶 K_m 值.

1.3.4 $mPEG_1-C_p$ 与 C_p 最适 pH、pH 稳定性的测定与比较 分别将 $mPEG_1-C_p$ 和 C_p 溶于 0.05 mol/L pH 为 3.0(柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液)、4.0(柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液)、5.0(柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液)、6.0(柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液)、7.0($Na_2HPO_4-NaH_2PO_4$ 缓冲液)、8.0(TrisHCl 缓冲液)、9.0(TrisHCl 缓冲液)、10.0(硼砂-NaOH 缓冲液)、11.0

(Na_2HPO_4-NaOH 缓冲液)的缓冲体系中(酶质量浓度均为 2 mg/mL),37℃保温下分别取样测定酶活力;保温 120 min 后分别将 pH 调至 pH7.0 并分别取样按酶活性测定方法测定酶活力.以 120 min 后的酶活力与其相应初始酶活力之比计算相对酶活力.

1.3.5 $mPEG_1-C_p$ 与 C_p 最适反应温度及热稳定性的测定与比较 分别将 $mPEG_1-C_p$ 和 C_p 溶于 0.05 mol/L pH7.0 的 PBS 中(酶质量浓度均为 2 mg/mL),将此酶液分置于 30、40、50、60、70 和 80℃ 水浴保温并测定酶活力;以上各温度下保温 120 min 后流水冷却,再按酶活力测定方法测定酶活力.以 120 min 后的酶活力与其相应初始酶活力之比计算相对酶活力.

1.3.6 $mPEG_1-C_p$ 与 C_p 抗胰蛋白酶水解能力的比较 分别将 $mPEG_1-C_p$ 和 C_p 溶于 0.05 mol/L pH7.0 的 PBS 中(酶质量浓度均为 2 mg/mL),按 $n(C_p):n(\text{胰蛋白酶})=45:1$ 的比例加入胰蛋白酶,37℃保温,定时取样测定酶活力.

1.3.7 $mPEG_1-C_p$ 与 C_p 体内活性半衰期比较 分别将 $mPEG_1-C_p$ 和 C_p 按体质量 1 mg/kg 的注射量由耳缘静脉注入新西兰大耳兔体内,给药后隔时采血每只约 1 mL,低温离心(4℃,5000 r/min,5 min)分离血清,测定酶活力.用 MCPKP 药代动力学程序计算药代动力学各参数.

1.3.8 $mPEG_1-C_p$ 与 C_p 等电点 pI 值比较 采用超薄等电聚焦电泳技术进行 $mPEG_1-C_p$ 与 C_p 等电点 pI 值的测定与比较.将 $mPEG_1-C_p$ 和 C_p 分别溶于双蒸水中(酶质量浓度分别为 1.0 和 0.5 mg/mL),点样带中每孔点样量为 20 μ L,在 10℃、2000 V 电压下电泳 70 min,聚焦后的胶片经三氯乙酸固定 20 min,考马斯亮蓝溶液染色 50 min 及经脱色液脱色 20 min 后,在室温下干燥过夜,并于凝胶成像系统中拍照.

2 结果与分析

2.1 $mPEG_1$ 修饰对酶 K_m^{app} 的影响

在临床应用中 C_p 的 K_m 值是决定其发挥催化水解髓核中大分子糖蛋白药效性的因素之一,通过对 C_p 修饰前后 K_m 的测定比较,可判断修饰前后酶与作用底物结合作用的变化,进而判断修饰酶的临床应用效果.按酶活性测定方法,分别测定 C_p 和 $mPEG_1-C_p$ 在系列底物(酪蛋白)浓度下的酶活力,以 Lineweaver Burk 法作图(图 1),分别求出原酶 C_p 的 K_m 为 2.18 mg/mL,修饰酶 $mPEG_1-C_p$ 的 K_m^{app} 为 2.97 mg/mL. C_p 在修饰后 K_m 有所增加,表明经 $mPEG$ 修饰后 C_p 对大分子底物的亲和力有所减弱,这可能是由于 $mPEG$ 长链对底物的空间位阻效应所致.

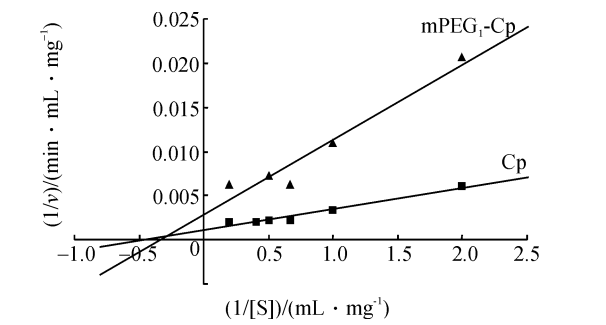


图 1 mPEG₁-Cp 和 Cp 的 K_m 比较 (酪蛋白为底物)

Fig 1 Comparison of K_m of mPEG₁-Cp and Cp (casein as substrate)

2.2 mPEG₁-Cp 与 Cp 最适 pH 及 pH 稳定性比较

图 2 表明: ①原酶 Cp 的最适 pH 为 7.0 而 mPEG₁-Cp 的最适 pH 在 8.0~9.0 可见 Cp 经 mPEG 修饰后最适 pH 向碱性偏移; ② 120 min 后, Cp 与 mPEG₁-Cp 的水解活力均呈下降趋势, 其中 mPEG₁-Cp 在 pH 4.0~11.0 范围内的相对酶活力均在 75% 以上, 而 Cp 只在 pH 3~5 时相对酶活力较高 (75%), 表明 Cp 经 mPEG 修饰后 pH 稳定范围变宽、pH 稳定性增强。由此可见, mPEG 与 Cp 共价结合后, 其在 Cp 分子表面所形成的缓冲外层在一定程度上维持了酶活性部位微环境的相对稳定, 从而拓展了 pH 稳定范围和增强了 pH 稳定性。

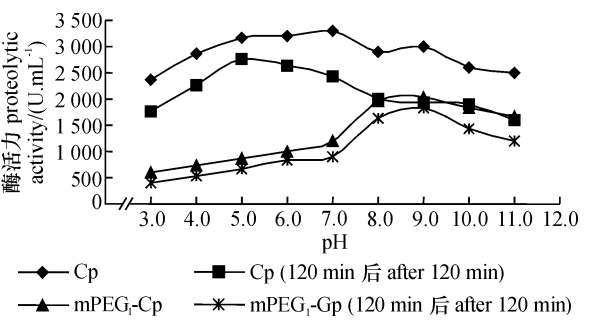


图 2 mPEG₁-Cp 和 Cp 的最适 pH 及 pH 稳定性比较

Fig 2 Optimum pH and the pH stability of mPEG₁-Cp and Cp

2.3 mPEG₁-Cp 与 Cp 最适温度及热稳定性比较

图 3 表明: ① Cp 在 30~50 °C 范围内酶活力最高, 当温度超过 60 °C 时酶活力随温度升高而急剧下降, 最适温度为 40~50 °C; mPEG₁-Cp 最适温度有所提高, 为 60 °C; ②在 120 min 后, Cp 和 mPEG₁-Cp 的酶活力均有所下降, 在 30~80 °C 之间随温度升高 Cp 的相对酶活力下降到 50% 以下, 而 mPEG₁-Cp 在各温度下的相对酶活力却始终保持在 70% 以上, 可见修饰酶的耐热稳定性增强。这种稳定化效果可能与 mPEG₁ 和 Cp 多点交联后稳固了酶分子构象同时减少了酶分子内部基团的热振动有关。

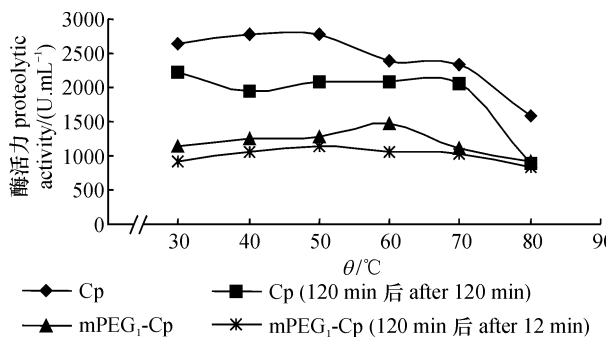


图 3 mPEG₁-Cp 与 Cp 最适温度及热稳定性比较

Fig 3 The optimum temperature and heat stability of mPEG₁-Cp and Cp

2.4 mPEG₁ 修饰对 Cp 抗胰蛋白酶水解能力的影响

从图 4 可见, 在胰蛋白酶处理的各时间, mPEG₁-Cp 的相对酶活力都相应地比 Cp 高。经胰蛋白酶水解 120 min 后, mPEG₁-Cp 仍具有近 90% 的酶活力, 而 Cp 酶活力只保留 73%。修饰酶抗胰蛋白酶的水解能力比原酶显著增强, 这可能也是由于 mPEG₁ 屏蔽层存在的结果, 即 mPEG₁ 长链在屏蔽了 Cp 表面抗原决定簇的同时, 也屏蔽了蛋白酶解位点, 因而阻碍了各种蛋白水解酶对 Cp 的接近和作用, 而使其更有利于在临床上的实际应用。

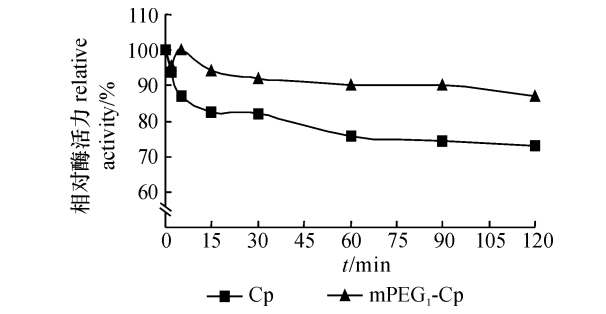


图 4 mPEG₁-Cp 与 Cp 抗胰蛋白酶水解能力的比较

Fig 4 Stability of mPEG₁-Cp and Cp against trypsin

2.5 mPEG₁-Cp 与 Cp 体内活性半衰期比较

经 Cp 和 mPEG₁-Cp 分别进行兔静脉注射后, 通过计算机拟合, Cp 结果符合一级消除动力学二室模型, 其消除相半衰期 $T_{1/2\beta}$ 为 220.6 min; mPEG₁-Cp 结果符合一级消除动力学一室模型, 其消除相半衰期 $T_{1/2}$ 为 360.4 min (其余药代动力学参数略), 可见 mPEG₁-Cp 的体内活性半衰期延长, 修饰酶体内半衰期是原酶的 1.6 倍。半衰期延长的可能机理为: ①由于 mPEG₁-Cp 解除了免疫原性, 因而注入体内后不会通过免疫反应而被清除; ②偶联的 mPEG 长链减弱了各种水解酶对其的降解及自水解, 从而有效地延长了其在体内的保留时间; ③修饰后的酶由于增加了分子量及分子体积, 而降低了肾小球的排除速率。

2.6 mPEG₁-Cp 与 Cp 等电点 pI 的测定与比较

从图 5 可见, Cp 与 mPEG₁-Cp 等电聚焦电泳(经考马斯亮蓝染色)时,只出现 Cp 一条电泳带,其 pI>9.0 约在 10.0 的位置,而 mPEG₁-Cp 未显出电泳带。这一现象与 Cp 经 mPEG₁ 修饰后在常规 SDS-PAGE 电泳时(经考马斯亮蓝染色及硝酸银染色)出现的情况相类似,这一现象有待进一步研究。

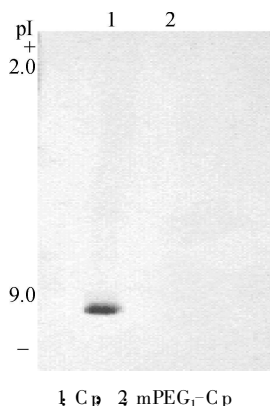


图 5 mPEG₁-Cp 与 Cp 的超薄等电聚焦电泳分析

Fig 5 Ultrathin layer isoelectric focusing of mPEG₁-Cp and Cp on a pH 2.0~9.0 gradient gel

3 讨论

一般认为,PEG 修饰酶是蛋白质与 PEG 的杂合物^[9-12]。由于 PEG 的引入,天然酶的多方面性质均会发生一定程度的改变^[9-13-15]。本研究结果显示,Cp 经 mPEG₁ 修饰后, K_m^{app} (酪蛋白为底物)有所增加,说明 mPEG₁ 修饰酶与底物的亲和力有所减弱,但 mPEG₁ 修饰酶在 pH 稳定性、热稳定性以及抗胰蛋白酶的水解能力等方面都较 Cp 有所增强,体内半衰期延长 1.6 倍,表明 mPEG₁ 修饰酶具有更好的应用前景。这一研究结果将为今后 mPEG-Cp 药物研发和今后的实际应用提供重要参考。

由于本研究中 mPEG 与 Cp 的共价修饰过程为随机修饰,存在修饰位点不确定、修饰后酶活力下降等问题。因此今后在 Cp 抗原决定簇的位点^[16]开展与基因工程技术相结合的定点修饰研究将在有效消除抗原性的同时,能较好地保持天然酶的生物学活性,获得修饰产物均一、易于修饰产物分离纯化的修饰纯酶。这一工作将在今后开展的木瓜凝乳蛋白酶 mPEG 定点修饰研究中深入进行。

参考文献:

- [1] 许伟华. 髓核化学溶核术治疗腰椎间盘突出症[J]. 临床骨科杂志, 1999 2(1): 74-76
- [2] WITTENBERG R H, OPPEL S. Five year results from chemonucleolysis with chymopapain or collagenase A prospective randomized study[J]. Spine, 2001, 26(17): 1835-1841
- [3] WALDM, ZAVADOVA E, POUCKOVA P. Polyzyme preparation WOBEMUGOS inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice[J]. Life Sciences, 1998, 62(3): 43-48
- [4] RAYAN V, THONAR E, J M A. Regional differences in the rise in blood levels of antigenic keratin sulfate and hyaluronan after chymopapain induced knee joint injury[J]. Journal of Rheumatology, 1998, 25(3): 521-526
- [5] STARLEY I E, MOHAMMED P. The treatment of paediatric burns using topical papaya[J]. Burns, 1999, 25(7): 636-639
- [6] 吴显荣, 张耕耘. 木瓜凝乳蛋白酶[J]. 热带作物科技, 1992, 4: 5-7
- [7] KAPSALIS A A, STERN I J, BORNSTEIN I. Correlation between hypersensitivity to parenteral chymopapain and the presence of IgE anti chymopapain antibody[J]. Clin Exp Immunol, 1978, 33(1): 150-158
- [8] GOODSON R T, KATRE N V. Site directed PEGylation of recombinant interleukin 2 at its glycosylation site[J]. Biotechnology, 1990, 8: 343-346
- [9] 姜忠义, 高蓉, 许松伟, 等. 蛋白质和多肽类药物分子化学修饰的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2002, 23(2): 102-104
- [10] 舒薇, 郭勇, 贺丽苹, 等. 木瓜凝乳蛋白酶的单链单甲氧基聚乙二醇修饰产物的检测与分析研究[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(3): 64-68
- [11] 舒薇, 郭勇. 木瓜凝乳蛋白酶的自水解作用及其对分离纯化的影响[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(1): 78-82
- [12] 姜忠义, 高蓉, 许松伟, 等. 蛋白质的化学修饰研究进展[J]. 现代化工, 2001, 21(8): 25-28
- [13] 吴稷. 蛋白质的 PEG 化[J]. 生物工程进展, 1995, 15(4): 48-51
- [14] 毛益斌, 张蓓蕾. 单甲氧基聚乙二醇化学修饰药物酶的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(5): 250-255
- [15] 王树岐, 金晶, 马淑哲. 蛋白质的化学修饰与生化药物[J]. 中国生化药物杂志, 1998, 19(5): 224-227
- [16] FURMONAVIC I E N R, SEWELL H E, SHAKIB E. Comparative molecular modelling identifies a common putative IgE epitope on cysteine protease allergens of diverse sources[J]. Clinical and Experimental Allergy, 2000, 30: 1307-1313

【责任编辑 李晓丹】