

· 综述 ·

## 聚乙二醇衍生物及其蛋白药物修饰研究进展

张羽<sup>1,2</sup>, 连治国<sup>2</sup>, 徐明波<sup>2</sup>, 冯芳<sup>1</sup> (1. 中国药科大学, 江苏南京 210009; 2. 北京双鹭药业股份有限公司, 北京 100041)

**[摘要]** 聚乙二醇及其衍生物因其出色的亲水性、生物相容性、生物学惰性等特性而被广泛应用于蛋白药物修饰, 其修饰可有效降低蛋白药物的免疫原性并延长体内半衰期。聚乙二醇衍生物的发展经历了第一代随机修饰, 第二代特异性和功能性修饰, 以及第三代分支型结构的应用。其应用也从简单的药物修饰扩展到生物传感、药物传输等方面。

**[关键词]** 聚乙二醇衍生物; 聚乙二醇修饰; 蛋白药物; 长效

**[中图分类号]** R914 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)04-0301-07

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.04.004

## Advances in the development of PEG derivatives and pegylated protein drugs

ZHANG Yu<sup>1,2</sup>, LIAN Zhiguo<sup>2</sup>, XU Mingbo<sup>2</sup>, FENG Fang<sup>1</sup> (1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Beijing SL Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 100041, China)

**[Abstract]** Polyethylene glycol and its derivatives are widely used in protein drug modification due to the excellent hydrophilicity, biocompatibility and bioinertia. The pegylation makes it possible that protein has lower immunogenicity and longer half-life. PEG derivatives had undergone three generations, from random modifications, to site-specific and functional modifications, and then branched structures. The application of PEG derivatives also extends to biosensing and drug delivery. Advances in the development of PEG derivatives and pegylated protein drugs were reviewed in this paper.

**[Key words]** PEG derivatives; pegylation; protein drugs; long-acting

随着生物技术的发展, 蛋白类生物药物因其高活性、强特异性、生物功能明确、低毒性等优势正越来越广泛地被开发和应用。然而, 诸如半衰期短、稳定性差、水溶性差、存在免疫原性、肾清除速率快等问题却限制了其进一步发展。为了解决这些问题, 研究者们进行了多方面的尝试, 蛋白药物的聚乙二醇修饰是其中最重要的化学修饰技术之一。聚乙二醇修饰又称 PEG 化(PEGylation), 是将聚乙二醇聚合物连接到一些生物分子(比如肽, 蛋白质和抗体片段)上的过程<sup>[1]</sup>, 旨在改善上述蛋白药物的问题, 为此诞生了一系列聚乙二醇衍生物。本文主要对聚乙二醇衍生物及其蛋白药物修饰研究进展进行综述。

### 1 聚乙二醇的结构与特性

常见的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)是由重复的氧乙烯基组成的直链或具有支链的聚醚, 有 2 个末端羟基, 其分子式为  $H-(O-CH_2-$

$CH_2)_n-CH_2-CH_2-OH$ , 可由环氧乙烷开环聚合而成。PEG 虽然是一种聚合物, 但其特殊的线性原子排列方式使其具有其他同系物所没有的一些性质<sup>[2]</sup>, 其中最主要的是亲水性。由于分子中含有大量乙氧基, PEG 能够与水形成氢键, 因而具有良好的亲水性。经聚乙二醇修饰的药物分子可明显增加水溶性。

药用聚乙二醇修饰剂分子量通常在 5kDa~60kDa 之间, 在此范围内的 PEG 修饰剂还具有无毒性、生物相容性、低免疫原性、生物学惰性等多种特点。经 PEG 修饰的药物分子的生物学活性主要由结合物部分产生, 且能够在提高稳定性的同时不降低疗效。PEG 可在被其修饰的药物分子周围产生空间屏障, 保持蛋白活性, 降低免疫原性, 延长体内半衰期<sup>[3]</sup>; 增加药物分子量, 降低肾脏清除率<sup>[4]</sup>。

### 2 聚乙二醇衍生物

聚乙二醇的末端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, 必须先对聚乙二醇进行活化, 将末端羟基转化为高反应活性的官能团, 使其能在温和的条件下与蛋白质进行偶联。而活化的聚乙二醇产物, 就是聚乙二醇衍生物。早期为了

**[作者简介]** 张羽, 硕士研究生, 研究方向: 药物分析学, Tel: 13814286700, Email: zy245450296@163.com

**[通讯作者]** 冯芳, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药物质量研究与评价, Email: yaoxuefengfang@163.com

避免与蛋白发生交联反应,常采用一端羟基被甲基封闭的单甲氧基聚乙二醇(mPEG)进行活化,通用分子式为:CH<sub>3</sub>O-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH。但随着生物技术的发展,异双功能聚乙二醇(两端为不同活性基团)也开始在第二代PEG修饰中得到了广泛的应用。以下按发展历史举例简述聚乙二醇衍生物。

### 2.1 第一代PEG衍生物

PEG衍生物的活化官能团选择主要取决于蛋白表面游离的具有反应活性的基团类型。蛋白表面的反应性基团多呈亲核性,亲核活性从大到小为:巯基>α-氨基>ε-氨基>羧基>羟基。羧基与羟基较难活化,而巯基和氨基的亲核活性较高,理应是最佳反应位点,但巯基通常处于蛋白质的二硫键和活性位点上,修饰巯基易导致蛋白失活。故第一代PEG衍生物<sup>[5]</sup>主要是针对氨基进行随机修饰的低分子量mPEG(<20kDa),包括PEG-二氯三嗪衍生物(PEG-dichlorotriazine),PEG-三氟乙基磺酸酯(PEG-tresylate),PEG-琥珀酰亚胺琥珀酸酯(SS-PEG),PEG-琥珀酰亚胺碳酸酯(SC-PEG)等,主要通过酰化反应修饰药物分子。

mPEG-琥珀酰亚胺碳酸酯(mPEG-SC)<sup>[6,7]</sup>与mPEG-琥珀酰亚胺琥珀酸酯(mPEG-SS)是两种最常用的第一代PEG衍生物,都可与赖氨酸残基的ε-氨基反应。但蛋白表面的赖氨酸残基较多,可修饰位点过多,导致修饰产物不均一。此外SC-PEG除了赖氨酸残基外,还可与组氨酸和酪氨酸残基发生副反应;而SS-PEG在与蛋白结合后,其聚合物骨架中残留的酯键易水解断裂,蛋白上残留的琥珀酸末端也易诱发免疫原性<sup>[8]</sup>。这些也是第一代PEG衍生物普遍存在的问题,第一代PEG修饰药物因此表现出多副反应产物<sup>[9]</sup>或降解产物<sup>[10]</sup>且修饰产物不易分离<sup>[11]</sup>、不稳定性、较大的毒性和免疫原性、均一性差等问题。

### 2.2 第二代PEG衍生物

第二代PEG衍生物中,如醛,酯,酰胺等更有效的官能团也可作为反应活性基团,也不再局限于低分子量的PEG衍生物(可大于20kDa)。蛋白表面的赖氨酸残基较多,这使得第一代PEG修饰产物不均一,且修饰剂有可能覆盖蛋白的活性位点,影响蛋白活性。故第二代PEG衍生物开始着眼于特异性、功能性的化学修饰。

#### 2.2.1 对N-末端定点修饰的PEG衍生物

最早的对N-末端定点修饰是对N-末端的α-氨基修饰,PEG-醛类衍生物可以实现。通常N端α-

氨基的pKa值在8.0左右,赖氨酸ε-氨基的pKa值在10.0左右,而亲核反应通常只在溶液pH值接近或略高于蛋白的pKa时才会发生。因此可以通过控制pH在酸性条件下,使PEG-醛类衍生物实现对N端α-氨基的定点修饰<sup>[12]</sup>,最早由Kinstler等<sup>[13,14]</sup>发现。常用的PEG-醛类衍生物有mPEG-丙醛(mPEG-ALD),mPEG-丁醛(mPEG-bALD)等。

另一个对N-末端定点修饰的方法是将N-末端氧化为羰基基团(如醛基或酮基),再和PEG-肼/胺反应,达到修饰目的。如丝氨酸和苏氨酸上的N-末端可用高碘酸盐氧化为乙醛酸衍生物<sup>[15]</sup>。PEG-酰肼(PEG-hydrazide)是此类PEG衍生物的代表之一。蛋白表面的氨基与PEG-酰肼的氨基性质类似,但在酸性条件下(pH4.5~5),蛋白表面的氨基发生质子化,无法参与反应,而酰肼基团极低的pKa值使得它仍然可以与羰基基团结合,达到特异性修饰的目的。PEG-肼/胺类衍生物同样适用于糖类残基(氧化生成醛基)与羧基的定点修饰。

#### 2.2.2 对巯基定点修饰的PEG衍生物

前述说到巯基是亲核反应活性最高的基团,但巯基大多处于二硫键和活性位点,蛋白质表面游离的巯基数量极少。为了使PEG衍生物能够对巯基进行特异性修饰,可在不影响蛋白三级结构的情况下对二硫键进行定点修饰<sup>[16]</sup>,或通过基因工程手段将一些不影响蛋白活性的氨基酸突变为半胱氨酸<sup>[17,18]</sup>。

常用的巯基修饰PEG衍生物<sup>[19]</sup>有PEG-马来酰亚胺(MAL-PEG)、PEG-乙烯砜(VS-PEG)、PEG-碘代乙酰胺(IA-PEG)以及PEG-正吡啶基二硫化物(OPSS-PEG)等。MAL-PEG是应用最为广泛的巯基修饰PEG衍生物,能在酸性条件下与巯基稳定连接。VS-PEG在酸性条件下或有机溶剂存在时,与氨基的副反应会增加。IA-PEG在反应时要过量,同时反应要避光进行,以避免产生游离碘与氨基酸反应。OPSS-PEG在酸性或碱性条件下均能与巯基反应生成稳定的二硫键。

#### 2.2.3 可控制释放的PEG衍生物

第一代PEG衍生物因连接不稳定可导致修饰产物不稳定、存在免疫原性及副产物较多等问题。为了解决以上问题,第二代PEG衍生物则开始致力于使PEG衍生物与蛋白药物形成稳定的连接键。然而PEG衍生物的分子量会影响蛋白药物的活性,通常分子量越大则体外活性越低<sup>[20]</sup>,且即使利用定点修饰,大分子量的PEG衍生物仍然有可能会掩蔽蛋白药物的活性位点。可控释放的PEG衍生物实



表1 FDA已批准上市的聚乙二醇修饰蛋白药物(截至2017年8月)

商品名	适应证	活性成分	年份	生产厂家
Adagen	严重联合免疫缺陷病(SCID)	PEG-腺苷脱氨酶	1990	Enzon
Oncaspar	急性淋巴细胞白血病(ALL)	PEG 修饰的 L-天冬酰胺酶	1994	Enzon
PegIntron	慢性丙型肝炎和乙型肝炎	PEG 化干扰素 $\alpha$ -2b	2000	Schering-Plough /Enzon
Pegasys	慢性丙型肝炎和乙型肝炎	PEG 化干扰素 $\alpha$ -2a	2001	Roche
Somavert	肢端肥大症	PEG-人生长激素突变蛋白拮抗剂	2002	Pfizer
Neulasta	癌症化疗诱导的中性粒细胞减少症	PEG 化重组甲硫氨酸人粒细胞集落刺激因子	2002	Amgen
Macugen	湿性年龄相关性黄斑变性	PEG 化选择性血管内皮生长因子抑制剂	2004	Pfizer
Mircera	慢性肾脏疾病相关的贫血	PEG 化红细胞生成素	2007	Roche
Cimzia	中度至重度类风湿性关节炎和克罗恩病	PEG 结合单克隆抗体	2008	Nektar / UCB Pharma
Krystexxa	痛风	PEG 化尿酸酶	2010	Savient
Omontys	慢性肾脏疾病的因透析引起的成人贫血	PEG 化促红细胞生成素	2012	Affymax/Takeda pharmaceuticals
Plegridy	复发型多发性硬化症	PEG 化干扰素 $\beta$ -1a	2014	Biogen
Adynovate	A 型血友病	PEG 化抗血友病因子Ⅷ	2015	Baxalta

tron<sup>®</sup>和 Neulasta<sup>®</sup>等。Neulasta 是销售最成功的 PEG 化蛋白药物之一,至 2016 年为止,Amgen 的 Neulasta 销售额仍能保持在每年 45 亿美元以上<sup>[33]</sup>。

早期因 PEG 修饰技术显著改善了部分蛋白药物的体内半衰期及免疫原性,经 FDA 批准上市的 PEG 化蛋白药物不少,但多为对蛋白分子表面游离氨基进行随机修饰的产品。而随着 PEG 衍生物及 PEG 修饰技术的研究越来越深入,随机修饰的弊端也逐渐暴露, FDA 对于商品化的 PEG 化蛋白药物要求也越来越严格,逐渐开始着眼于定点修饰的药物。以下简单介绍部分采用定点修饰技术的 PEG 化蛋白药物。

培非格司亭(Neulasta<sup>®</sup>)是经 FDA 批准上市的 PEG 化蛋白药物中首个采用 PEG 定点修饰技术<sup>[34]</sup>的产品,用于治疗癌症化疗诱导的中性粒细胞减少症。Neulasta 是利用酸性条件下赖氨酸的质子化,将 20kDa 线型 PEG-ALD 结合到 rhG-CSF 的 N 端  $\alpha$ -氨基得到的。传统 rhG-CSF 的半衰期与用药剂量有关,通常在 1~5h。经 PEG 修饰后的 Neulasta 半衰期可延长至 48h,生物活性为传统 rhG-CSF 的 92%,且单次给药后可提升中性粒细胞绝对值,效果比传统 rhG-CSF 多次给药更强,维持的时间也更长,一个化疗周期仅需给药一次。而且由于分子量较大,药物的生物稳定性增强,不易被酶解,其免疫原性与抗原性降低<sup>[35]</sup>。

赛妥珠单抗(Cimzia<sup>®</sup>)是于 2008 年上市的另一采用 PEG 定点修饰技术的蛋白药物,用于治疗类风湿性关节炎和克罗恩病。采用 40kDa 的 Y 型 PEG 对 TNF- $\alpha$ (抗肿瘤坏死因子- $\alpha$ )的人源化单克隆抗体

Fab'片段的 C 端游离半胱氨酸定点修饰,是首个用 PEG 修饰的抗 TNF 抗体。与传统的抗 TNF 抗体相比,经 PEG 修饰的 Cimzia 半衰期从 8 d 左右(英夫利昔单抗为 7.9~9.5 d,阿达木单抗为 3.1~7.8 d)延长到了 14 d,可实现每 4 周注射 1 次。由于修饰位点距离抗原结合位点较远,故不影响药物活性,且对于对英夫利昔单抗失去应答或不耐受的患者同样有效。

Adynovate<sup>®</sup>用于治疗重度 A 型血友病,是 Baxter 公司对其已上市的 ADVATE(rh-FVIII,注射用重组人凝血因子 VIII)的一次改良。ADVATE 于 2003 年上市,用于治疗 1~16 岁 A 型血友病患者,其 B 结构域为非 rh-FVIII 活性区域,Baxter 使用新型 PEG 对 ADVATE 的 B 结构域定点修饰,在不影响药物的生物活性的情况下显著改善了药效学和药代动力学性质<sup>[36]</sup>。修饰后 Adynovate 的半衰期是 ADVATE 的 1.4~1.5 倍,给药频次从 ADVATE 的每两天注射 1 次降低为每周注射 2 次,显著降低患者出血率。

目前为止,已上市的 PEG 化蛋白药物多是非定点修饰,少部分为定点修饰。这些药物大多具有更长的半衰期,可降低给药频率,减轻患者痛苦和经济负担,且不良反应较少,安全性也更高。随着科学技术的发展,处于实验或理论阶段的更前沿的 PEG 修饰药物也会陆续进入临床研究当中,蛋白药物的 PEG 修饰将具有更广泛的应用和更好的发展前景。

#### 4 聚乙二醇修饰蛋白药物在质量控制方面的重点及难点

传统的蛋白药物质量控制项目中最重要有分

子量、纯度、效价等,但这些指标和分析并不足以对 PEG 化蛋白药物进行全面、有效的质量控制,这主要取决于 PEG 本身的性质以及 PEG 对蛋白的修饰方式。PEG 作为聚合物的多分散度会直接影响修饰后的蛋白药物分子量分布,影响产品的均一性,从而影响药物的安全性与疗效。此外,PEG 对蛋白表面不同位点的修饰可使蛋白具有更复杂的结构。因此,必须对每个产品都有针对性地开发出各自适用的质量控制标准。其中最能衡量产品安全性和有效性的两项即为 PEG 的修饰位点和平均修饰率,世界卫生组织(WHO)也明确提出了需要着重关注这些与 PEG 有关的项目<sup>[37]</sup>。

#### 4.1 PEG 的修饰位点

对于 PEG 的修饰位点来说,直接对修饰后蛋白药物进行修饰位点检测所得到的信号极其繁复且难以解析,因此通常先将蛋白降解,再通过对降解片段逐一解析来确定修饰位点。常用胰蛋白酶对蛋白进行酶解,而后与氨基酸分析、HPLC-MS 等技术联合对修饰位点进行分析<sup>[38]</sup>。

目前对于单位点修饰的小分子药物基本可以通过以上方法做到精确分析,例如胡涛课题组<sup>[39]</sup>采用胰蛋白酶将 rhIFN- $\omega$  及其 PEG 修饰产物在相同条件下进行酶解,将所得的肽段混合物通过 HPLC-MS 进行分析,比较修饰前后酶解产物中各肽段的含量变化发现,修饰产物酶解后 T1(1~14, LGC-DLPQNHGLLSR)段缺失。由于 Arg<sup>14</sup> 无法被修饰,由此推测出修饰位点为 rhIFN- $\omega$  的 N 末端(Leu<sup>1</sup>)。

多位点随机修饰的药物则是由不同修饰位点及不同修饰数目的修饰产物组成的混合物,且 PEG 本身是由一系列不同分子量的物质组成的混合物,导致修饰位点测定较为困难。应用串联质谱法等最新的分析方法应该是未来的研究方向,包括 CID-MS/MS(碰撞诱导解离串联质谱)、reISD-MALDI-MS(反射式源内衰减-基质辅助激光解吸电离串联质谱)等。

#### 4.2 PEG 的平均修饰率

PEG 的平均修饰率是指每个蛋白分子上实际偶联的 PEG 数目与理论可偶联数目最大值的比值,是衡量工艺稳定性的一个重要参数。修饰率不同,会影响修饰后蛋白药物的生物活性及产品的均一性。目前应用最广泛的 PEG 修饰率测定方法是光度法,通过测定修饰前后蛋白表面游离  $\epsilon$ -氨基/巯基数目的变化来计算 PEG 修饰率,包括测定  $\epsilon$ -氨基的 TNBS 法、荧光胺法以及测定巯基的 DTNB 法等。

对于大分子的修饰产物常采用 MALDI-TOF-MS(基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱)测定,通过修饰前后分子量的差值与 PEG 相对分子量的比值来计算平均修饰率。

虽然光度法操作简单,但易受环境影响,要求样品纯度较高,且需要保持适宜的环境温度、pH 等。而 MALDI-TOF 脉冲式的离子化方式所得的图谱解析信息有限,无法精确定量,对于多位点随机修饰的蛋白药物很难精确测定平均修饰率<sup>[40]</sup>。所以实践中常采用光度法辅以 MALDI-TOF-MS 对平均修饰率进行多方位评估。李晶等<sup>[41]</sup>采用荧光胺法测得 3 种 PEG-rhGH 的平均修饰率均为 10%,并通过 MALDI-TOF-MS 对 PEG-rhGH 的质谱信号进行扫描,发现除了在 PEG-rhGH 二聚体( $[2M + 1]^+$ )处有少量信号峰外,在 rhGH 结合 2 个、3 个 PEG 的位置处均无响应信号,由此推断 3 种 PEG-rhGH 均为单位点修饰。

## 5 结语

PEG 修饰技术在长效蛋白类药物上的应用一直在国内外受到广泛关注,已上市的多种 PEG 修饰药物也充分说明了其药用价值及商业价值。PEG 衍生物也从第一代随机修饰,到第二代特异性和功能性修饰,再到第三代分支型结构的应用,人们对其的应用开发也从简单的药物修饰扩展到生物传感、药物传输等方面。经 PEG 修饰的蛋白药物普遍能在不影响疗效的情况下延长半衰期,降低免疫原性。但结构较为复杂的 PEG 化蛋白药物在修饰位点和平均修饰率等 PEG 相关的质量控制项目上还存在一定的困难。相信今后人们对 PEG 技术的开发也必将会向更加安全、高效和经济的方向发展。

## 【参考文献】

- [1] LAWRENCE P B, PRICE J L. How PEGylation influences protein conformational stability [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 34:88-94.
- [2] PFISTER D, BOURGEOUX E, MORBIDELLI M. Kinetic modeling of protein PEGylation [J]. *Chem Engin Sci*, 2015, 137:816-827.
- [3] YANG Z, WANG J, LU Q, *et al*. PEGylation confers greatly extended half-life and attenuated immunogenicity to recombinant methioninase in primates [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(18):6673-6678.
- [4] RODR GUEZMART NEZ JA, RIVERARIVERA I, SOL RJ, *et al*. Enzymatic activity and thermal stability of PEG- $\alpha$ -chymotrypsin conjugates [J]. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(6):883-887.

- [5] 姜忠义, 许松伟, 王艳强. 蛋白质和肽类分子的聚乙二醇化化学[J]. 有机化学, 2003, 23(12):1340-1347.
- [6] ZALIPSKY S, SELTZER R, MENONRUDOLPH S. Evaluation of a new reagent for covalent attachment of polyethylene glycol to proteins[J]. Biotechnol Appl Biochem, 1992, 15(1):100-114.
- [7] MIRON T, WILCHEK M. A simplified method for the preparation of succinimidyl carbonate polyethylene glycol for coupling to proteins[J]. Bioconjug Chem, 1993, 4(6): 568-569.
- [8] ABUCHOWSKI A, KAZO GM, JR VC, *et al.* Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates[J]. Cancer Biochem Biophys, 1984, 7(2):175-186.
- [9] ABUCHOWSKI A, VAN ES T, PALCZUK NC, *et al.* Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol[J]. J Biol Chem, 1977, 252(11): 3578-3581.
- [10] GAIS H J, RUPPERT S. Modification and immobilization of proteins with polyethylene glycol tresylates and polysaccharide tresylates: Evidence suggesting a revision of the coupling mechanism and the structure of the polymer-polymer linkage[J]. Tetrahedron Lett, 1995, 36(22): 3837-3838.
- [11] ZALIPSKY S, LEE C. Use of functionalized poly(ethylene glycol)s for modification of polypeptides[M]// Poly(Ethylene Glycol) Chemistry. Springer US, 1992:1-15.
- [12] WANG J, HU T, LIU Y, *et al.* Kinetic and stoichiometric analysis of the modification process for N-terminal PEGylation of staphylokinase[J]. Anal Biochem, 2011, 412(1): 114-116.
- [13] KINSTLER OB, BREMS DN, LAUREN SL, *et al.* Characterization and stability of N-terminally PEGylated rhG-CSF[J]. Pharm Res, 1996, 13(7):996-1002.
- [14] KINSTLER OB, GABRIEL NE, FARRAR CE, *et al.* N-terminally chemically modified protein-compositions and method; DE 69509628 D1[P]. 1999.
- [15] FEE C J, DAMODARAN VB. Production of PEGylated proteins [M]// Biopharmaceutical Production Technology. 2012:199-222.
- [16] BROCCINI S, GODWIN A, BALAN S, *et al.* Disulfide bridge based PEGylation of proteins[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(1):3-12.
- [17] TSUTSUMI Y, ONDA M, NAGATA S, *et al.* Site-specific chemical modification with polyethylene glycol of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) improves antitumor activity and reduces animal toxicity and immunogenicity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(15):8548-8553.
- [18] BANGALORE S, KUMAR S, FUSARO M, *et al.* Outcomes with various drug eluting or bare metal stents in patients with diabetes mellitus: mixed treatment comparison analysis of 22 844 patient years of follow-up from randomised trials[J]. BMJ, 2012, 345:e5170.
- [19] PASUT G, VERONESE FM. State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research[J]. J Control Release, 2012, 161(2): 461-472.
- [20] MORGENSTERN J, BAUMANN P, BRUNNER C, *et al.* Effect of PEG molecular weight and PEGylation degree on the physical stability of PEGylated lysozyme[J]. Int J Pharm, 2017, 519(1-2):408-417.
- [21] ROBERTS MJ, HARRIS JM. Attachment of degradable poly(ethylene glycol) to proteins has the potential to increase therapeutic efficacy[J]. J Pharm Sci, 1998, 87(11):1440-1445.
- [22] ANDREW J, GARMAN S, BARRET KALINDJIAN. The preparation and properties of novel reversible polymer-protein conjugates 2-*omega*-Methoxypolyethylene (5000) glycoxymethylene-3-methylmaleyl conjugates of plasminogen activators[J]. Febs Lett, 1987, 223(2): 361-365.
- [23] 田 滋, 金宇灏, 陈阳建, 等. 聚乙二醇氨基酸衍生物的合成及其对紫杉醇的修饰[J]. 中国药科大学学报, 2011, 42(1): 78-82.
- [24] KIZILEL S, SCAVONE A, LIU X, *et al.* Encapsulation of pancreatic islets within nano-thin functional polyethylene glycol coatings for enhanced insulin secretion[J]. Tissue Engin Part A, 2010, 16(7):2217.
- [25] YOO MK, PARK IK, LIM HT, *et al.* Folate PEG superparamagnetic iron oxide nanoparticles for lung cancer imaging[J]. Acta Biomater, 2012, 8(8):3005-3013.
- [26] ZHANG C, YANG XL, YUAN YH, *et al.* Site-specific PEGylation of therapeutic proteins via optimization of both accessible reactive amino acid residues and PEG derivatives[J]. Biodrugs, 2012, 26(4):209-215.
- [27] RYAN SIN AD M, MANTOVANI GIUSEPPE, WANG XUEXUAN, *et al.* Advances in PEGylation of important biotech molecules: delivery aspects[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2008, 5(4): 371-383.
- [28] VUGMEYSTER Y, ENTRICAN C A, JOYCE AP, *et al.* Pharmacokinetic, biodistribution and biophysical profiles of TNF nanobodies conjugated to linear or branched poly(ethylene glycol)[J]. Bioconjug Chem, 2012, 23(7):1452-1462.
- [29] DAVIS FF. The origin of pegnology[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54(4): 457-458.
- [30] DAVIS FF, VAN EST, PALCZUK NC. Non-immunogenic polypeptides: US, US 4179337 A[P]. 1979.
- [31] ABUCHOWSKI A, MCCOY JR, PALCZUK NC, *et al.* Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase[J]. J Biol Chem, 1977, 252(11): 3582-3586.
- [32] LEE CR, MCKENZIE CA, WEBSTER KD, *et al.* Pegademase bovine: replacement therapy for severe combined immunodeficiency disease[J]. DICP, 1991, 25(10): 1092-1095.
- [33] "Amgen 2016 Annual Report to Stockholders"[www.amgen.com/~media/amgen/full/www-amgen-com/downloads/investors/2016-annual-report-letter-and-10k\_restricted.ashx?la=en] 2016-annual-report-letter-and-10.pdf, 2017, p. 55
- [34] DE GRAAF AJ, KOOIJMAN M, HENNINK WE, *et al.* Nonnatural amino acids for site-specific protein conjugation[J]. Bioconjug Chem, 2009, 20(7):1281.

峰,在每个药材单独进样时均在该位置出峰,表明该峰是各个药材中峰的叠加,具体是何种成分或多种成分,将做进一步研究。

综上所述,通过对10批次的清脂胃舒佐餐茶样品进行相似度计算,结果数值介于0.934~0.995。同时4种成分定量结果含量均一稳定且阴性无干扰,表明笔者建立的清脂胃舒佐餐的HPLC指纹图谱方法与含量测定方法,具有良好的分析评价水溶性成分能力,具有简便、稳定可靠、准确等明显优势。因此,该方法可作为本制剂水溶性成分的评价方法。

【参考文献】

[1] 邱蓉丽,吴玉兰,乐巍. 陈皮、青皮中4种黄酮成分的比较研究[J]. 中成药, 2015, 37(1): 149-153.  
 [2] 李晓芳,张健康,王慧鸾,等. 陈皮的研究进展[J]. 江西中医药, 2014, 45(3): 76-78.  
 [3] 楼陆军,罗洁霞,高云. 山楂的化学成分和药理作用研究概述[J]. 中国药业, 2014, 23(3): 92-94.  
 [4] 高颖,张云天,徐以亮,等. 炒麦芽配方颗粒的HPLC指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20): 115-

118.  
 [5] 方向梅,吕红叶. 麦芽的研究进展[J]. 中国伤残医学, 2010, 18(5): 167-169.  
 [6] 刘双,杨静,江振作,等. 中药“神曲”发酵工艺及质量标准研究进展[J]. 天津中医药, 2015, 32(5): 318-320.  
 [7] 李传俊,楚胜. 鸡内金不同辅料炮制品的酶活性和氨基酸的含量测定[J]. 中国现代医生, 2009, 47(15): 74-75.  
 [8] 孙凤娇,李振麟,钱士辉,等. 干姜化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2015, 34(3): 34-37.  
 [9] 黄斯,潘雨薇,蓝海,等. 茯苓酸药理学研究进展[J]. 中成药, 2015, 37(12): 2719-2721.  
 [10] 王兵,王亚新,赵红燕,等. 甘草的主要成分及其药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2013, 34(3): 215-218.  
 [11] 中国药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药, 2000, 22(10): 671-675  
 [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2015年版(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015  
 [13] 张华,周志钦,席万鹏. 15种柑橘果实主要酚类物质的体外抗氧化活性比较[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 64-70.  
 [收稿日期] 2017-11-09 [修回日期] 2018-03-26  
 [本文编辑] 陈盛新

(上接第306页)

[35] YANG BB, KIDO MA, MS MMS, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pegfilgrastim in subjects with various degrees of renal function[J]. J Clin Pharmacol, 2011, 50(5): 295-306.  
 [36] TURECEK PL, BOSSARD MJ, GRANINGER M, et al. BAX 855, a PEGylated rFVIII product with prolonged half-life. Development, functional and structural characterisation [J]. Hamostaseologie, 2012, 32(Suppl 1): S29-S38.  
 [37] WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Guidelines on the Quality, Safety, and Efficacy of Biological Medicinal Products Prepared by Recombinant DNA Technology. Switzerland: WHO Press, 2013. 91-92.  
 [38] LI XL, LIU L, GAO JP, et al. Methods for identification of conjugation site on PEGylated protein[J]. Pharmaceutical Bi-

otechnology, 2013.  
 [39] YU W, YU C, WU L, et al. PEGylated recombinant human interferon- $\omega$  as a long-acting antiviral agent: structure, antiviral activity and pharmacokinetics [J]. Antiviral Res, 2014, 108: 142-147.  
 [40] JOHN B, SWAPAN C, JOHNSTON D. Characterization of poly(ethylene glycol)-modified superoxide dismutase: Comparison of capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 1996, 68(18): 3258-3264.  
 [41] 李晶,何辉,程速远,等. 荧光胺衍生化法测定3种聚乙二醇化重组人生长激素的平均修饰率[J]. 药物分析杂志, 2014(8): 1368-1373.  
 [收稿日期] 2017-11-23 [修回日期] 2018-03-30  
 [本文编辑] 陈盛新