

天花粉蛋白的聚乙二醇定点修饰 及其性质的初步研究

安群星^{1,2}, 雷迎峰², 杨敬², 黎志东², 穆士杰¹, 徐志凯²

(1. 第四军医大学西京医院输血科, 西安 710032; 2. 第四军医大学微生物学教研室, 西安 710033)

摘要 用聚乙二醇(PEG)定点修饰天花粉蛋白(TCS), 并比较了修饰前后 TCS 的生物活性、免疫原性及药代动力学等诸多性质. 选择 TCS 分子上可能的抗原决定簇位点 KR173-174 进行定点突变, 并将所构建的突变体 TCS_{KR173-174CG} 在大肠杆菌中表达及纯化. 通过该突变体第 173 位引入的半胱氨酸残基进行 PEG 定点修饰. 通过比较研究, 分析所构建的 PEG 修饰型 TCS 的 DNA 酶活性、致核糖体失活活性、免疫原性、急性毒性以及药代动力学性质, 研究表明, 所构建的突变型 TCS(mTCS)的活性与野生型 TCS(wTCS)活性几乎相当, 而免疫原性已显著降低. PEG 修饰型 TCS 虽有活性下降, 但其免疫原性、急性毒性以及药代动力学性质得到显著提升. 表明通过基因工程及化学修饰方法改造 TCS 是可行的, 所构建的突变型及 PEG 修饰型 TCS 值得进一步研究.

关键词 天花粉蛋白; 聚乙二醇定点修饰; 免疫原性; 药代动力学; 人类免疫缺陷病毒

中图分类号 O629.73; Q518.2

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)08-1586-06

天花粉蛋白(Trichosanthin, TCS)是中草药天花粉的有效成分, 入药已有两千多年历史, 传统中医主要将其用于中期妊娠引产以及胎物残留、异位妊娠和葡萄胎等妇科疾病的治疗. 近年来, 随着人们对 TCS 结构和功能的深入研究, 发现它属于 I 型核糖体失活蛋白(Ribosome-inactivating proteins, RIPs), 具有多种生物活性和药理特性. 其生物活性主要包括: 具有类似 DNA 酶活性, 可以切割超螺旋 DNA 产生开环和线性 DNA^[1]; 具有 RNA *N*-糖苷酶活性, 可以裂解核糖体 28S rRNA 上第 4324 位腺嘌呤碱基与核糖之间的 *N*-糖苷键, 从而使真核细胞核糖体失活^[2]; 近期研究表明, TCS 还可诱导细胞凋亡和增强趋化因子作用^[3,4]. 它可抑制某些肿瘤的生长, 对乙型肝炎病毒、麻疹病毒以及单纯疱疹病毒等都具有显著抑制作用, 其较强的抗 HIV 活性引起人们的广泛关注. 1989 年, McGrath 等^[5]首次报道了 TCS 在体外能选择性地抑制急性感染的淋巴细胞和慢性感染的巨噬细胞内 HIV-1 的复制, 有些方面甚至优于美国 FDA 批准的第一个 AIDS 临床用药 AZT, 从而引起世界关注. 可见 TCS 在临床, 特别是在 AIDS 治疗方面具有潜在的应用价值.

然而, TCS 在临床试验及应用中也存在一些问题, 其中最主要的就是其强烈的免疫原性和短暂的血浆半衰期, 这也是 TCS 至今未能成为治疗 AIDS 临床用药的根本原因. 作为人体的一种异己蛋白, TCS 具有很强的免疫原性, 在临床试验中会产生一些如过敏反应、神经和肾脏毒性等副作用. 据文献[6,7]报道, 体内注射 TCS 会产生破坏性的 IgG 和 IgE 抗体, 反复注射可导致严重的过敏反应甚至死亡. 此外, 在 TCS 的动物及人体试验中也遇到过如肌痛、发烧、肾毒性及神经毒性等副反应^[8,9]. 作为一种分子量不到 27000 的蛋白质, TCS 在体内的半衰期相对较短. 在体内注入 TCS 后, 很快被肾小球过滤, 丢失在尿液中. 加之反复注射 TCS 产生抗体的破坏作用, 以及血液内蛋白酶的降解作用, 其在体内的半衰期只有 8.4 ~ 12.7 min^[9]. 要达到其在体内的有效治疗浓度, 必须大剂量反复注射.

若能设法降低 TCS 可能引起的毒副作用, 增加其在体内的半衰期, 同时保持其活性不受或少受影

收稿日期: 2009-03-11.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30571675)和西京医院学科助推计划(批准号: XJZT07M09)资助.

联系人简介: 徐志凯, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病毒研究. E-mail: zhikaixu@fmmu.edu.cn

穆士杰, 男, 博士, 教授, 主要从事输血相关病毒研究. E-mail: bestar01@163.com

响,使其成为具有实际应用价值的 AIDS 临床用药. 现代分子生物学等技术的发展给改造蛋白多肽类药物提供了可能. 通过分子生物学软件分析,可预测蛋白多肽类分子上可能的抗原决定簇位点,并可通过多种方法对其抗原性较强的位点进行突变,以降低其免疫原性,减少体内副反应. 对于诸如体内半衰期短等问题,可通过采用多种药物传递技术来提高蛋白多肽类药物的体内疗效,这其中最为成功的方法是 PEG 修饰技术. 目前已有多种不同的 PEG 分子可供选择,也有多种不同的 PEG 修饰方法可供利用. 其中,PEG 定点修饰法,特别是巯基修饰法最为常用. 通过 PEG 修饰,可降低的蛋白多肽类药物免疫原性,改善药动学性质,降低体内毒性以及增加药物稳定性等^[10,11].

本文对 TCS 分子上可能的抗原决定簇位点 KR173-174 进行定点突变,并对产生的突变体 TCS_{KR173-174CG}进行了聚乙二醇定点修饰(Site-directed PEGylation). 初步研究显示,经 PEG 修饰后,TCS 的免疫原性、急性毒性以及药代动力学性质均得到进一步改善. 这些工作为基因工程及化学修饰方法改造 TCS 提供了一条可行的途径.

1 实验部分

1.1 材 料

菌株 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3) 为本室保存,质粒 pRSET-A 和 pUC19 由张海博士惠赠;植物基因组提取试剂盒购自鼎国公司,胶回收试剂盒购自宝信公司,质粒快速提取试剂盒购自美国 Promega 公司, Ni-NTA 纯化试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶以及限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 均购自日本 TaKaRa 公司; PEG-maleimide(mPEG5000)购自美国 Fluka 公司;抗 TCS 兔血清由本室自制;兔网织红细胞裂解液购自美国 Promega 公司;³H-Leucine 购自上海核技术开发公司;各种 HRP 标记的 IgG 和 IgE 均购自宝信公司.

1.2 方 法

1.2.1 TCS 的定点突变、表达与纯化 按照前期研究报道的方法^[12,13],借助计算机预测,选择 TCS 分子上可能的抗原决定簇位点 KR173-174 进行定点突变(Lys173-Arg174 突变为 Cys173-Gly174),并将所产生的突变体命名为 TCS_{KR173-174CG}. 随后将该突变型 TCS 在大肠杆菌内表达并通过 Ni-NTA 亲和层析柱加以纯化.

1.2.2 TCS 突变体蛋白的 PEG 定点修饰 将纯化得到的突变体蛋白(TCS_{KR173-174CG})与 mPEG5000 在 PBS 缓冲液中按 1:10 摩尔比混合,于 25 °C 反应 8 h. 用 20 倍体积的 Buffer A(含 20 mmol/L Tris-HCl/1 mmol/L EDTA, pH = 7.5)稀释反应混合物,终止反应. 将反应产物上样于预先用 Buffer A 平衡的 CM-Sepharose CL-6B(Pharmacia)柱内,以含 0 ~ 0.2 mol/L NaCl 的 Buffer A 线性梯度洗脱,收集样品进行 12% SDS-PAGE 鉴定.

1.2.3 DNA 酶活性测定 在 20 μ L 反应体系(包含 50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L CaCl₂, 100 mmol/L NaCl, pH = 8.0)内分别加入 2 μ g 野生型、突变型或 PEG 修饰型 TCS,然后加入 1 μ g 超螺旋质粒 pUC19,于室温反应 1 h. 反应结束后将各反应产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析,观察是否将超螺旋质粒切割为开环及线性 DNA.

1.2.4 致核糖体失活活性测定 分别将不同浓度的野生型、突变型或 PEG 修饰型 TCS 与 11.5 μ L 的兔网织红细胞裂解物混合(反应体系包括 1.48×10^8 Bq/L ³H-leucine, 20 mmol/L Tris-HCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L DTT 和 50 mmol/L KCl),于 30 °C 反应 1.5 h. 然后用 25% 的三氯乙酸沉淀反应混合物,将其收集至玻璃纤维滤纸上. 红外烤干后,置于液体闪烁计数器的计数管中,测定放射性.

1.2.5 免疫原性分析 将 6 ~ 8 周龄的 BALB/c 小鼠分为 3 组,每组 6 只. 分别用 8 μ g 野生型、突变型或 PEG 修饰型 TCS 通过背部皮下注射免疫. 间隔 14 d 后,用同样剂量的该型 TCS 加强免疫,共 2 次. 间隔 7 d 后,采集血液分离血清后待检. 小鼠血清内特异性 IgG 和 IgE 水平采用 ELISA 法测定. 将 50 μ L 天然 TCS(10 μ g/mL)包被于 ELISA 板上,置于 4 °C 过夜. 次日用 PBST 洗板后,在每孔中加入 50 μ L 经适当稀释的待检血清. 经孵育及洗板后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 或 IgE 抗体. 孵育及洗板后,加入 50 μ L OPD 显色,再加入 50 μ L H₂SO₄(2.5 mol/L)终止反应,最后在酶标仪 490 nm 波长下读

取吸光度值。

1.2.6 急性毒性试验 将 BALB/c 小鼠按体重随机分为 6 个剂量组, 分别给予野生型、突变型或 PEG 修饰型 TCS. 6 组小鼠的受试剂量分别为 45.00, 31.50, 22.05, 15.44, 10.80 和 7.56 mg/kg, 按不同浓度同容积(0.025 mL/g)一次性静脉给药. 连续观察 10 d, 记录动物出现的症状和死亡数。

1.2.7 药代动力学试验 将 SD 大鼠随机分组后按 0.8 mg/kg 一次性静脉给予不同种类的 TCS. 分别在 2, 5, 15, 30, 45, 90, 135 和 180 min 时间点采血, 分离血清后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 待检. 血药浓度采用间接夹心 ELISA 法测定. 将 100 μL 的抗 His mAb(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 包被于 ELISA 板上, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜; 次日用 PBST 洗板后, 在每孔中加入 100 μL 封闭液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 洗板后, 在每孔中加入 100 μL 经适当稀释的待检血清, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 洗板后, 加入 100 μL 抗 TCS 兔血清, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 洗板后, 加入经 HRP 标记的鼠抗兔 IgG, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 洗板后, 加入 100 μL OPD, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min; 再在每孔中加入 50 μL H_2SO_4 (2.5 mol/L) 终止反应. 最后在酶标仪 490 nm 波长下读取吸光度值。

1.2.8 统计学分析 数据均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 方式表示. 用 SPSS 11.0 软件进行方差分析, 用 LSO 法进行多组均数间比较进行。

2 结果与讨论

2.1 TCS 的定点突变、表达、纯化及 PEG 修饰

以枯楼基因组为模板, 用重组 PCR 技术获得 TCS_{KR173-174CG} 基因. 将其克隆入 pRSET-A 载体, 转化 *E. coli* BL21(DE3), 得到该突变型 TCS 在宿主菌内的大量融合表达. 经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化后, 获得均一的突变型蛋白(图 1 中 Lane 3). 经 PEG 修饰后, 所得 PEG-TCS_{KR173-174CG} 分子量明显增加(约 40000), 高于 PEG5000 与 TCS 的分子量之和(图 1 中 Lane 4). 推测原因可能在于线状的 PEG 分子伸展在蛋白质表面, 使其泳动速率降低; 另一方面原因可能在于 PEG 的水化程度非常高, 使得 PEG 化蛋白在 SDS-PAGE 中的泳动行为反常。

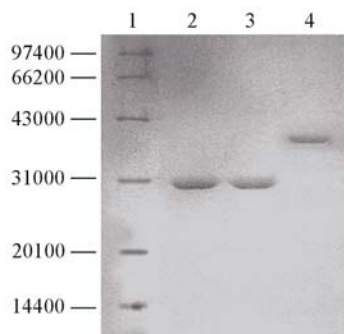


Fig. 1 Analysis of the constructed TCS and its derivatives by SDS-PAGE

Lane 1: molecular weight marker; lane 2: wTCS;
lane 3: TCS_{KR173-174CG}; lane 4: PEG-TCS_{KR173-174CG}.

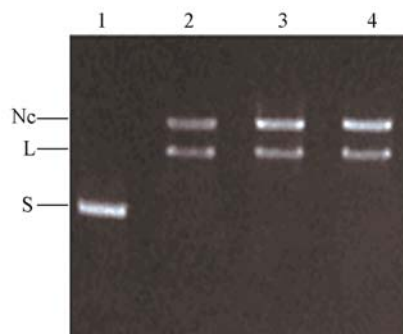


Fig. 2 DNase-like activity of TCS and its derivatives

Lane 1: pUC19; lane 2: pUC19 + wTCS; lane 3: pUC19 + TCS_{KR173-174CG}; lane 4: pUC19 + PEG-TCS_{KR173-174CG}. Nc: Nicked circular DNA; L: linear DNA; S: supercoiled DNA.

2.2 DNA 酶活性测定

在通常酶切条件下, TCS 能够切割超螺旋 DNA 使之产生开环乃至线性 DNA^[3]. 为了验证 PEG 修饰型 TCS 是否也具有类似 DNA 酶活性, 将超螺旋质粒 pUC19 分别与各型 TCS 在一定条件下孵育, 然后进行琼脂糖凝胶电泳分析, 结果见图 2. 与非修饰型 TCS 相似的是, 所构建的 PEG 修饰型 TCS 显示出类似 DNA 酶活性。

2.3 致核糖体失活活性测定

TCS 具有 RNA *N*-糖苷酶活性, 可使真核细胞核糖体失活, 从而抑制细胞内蛋白质的合成^[4]. 为了比较 PEG 修饰型 TCS 的致核糖体失活活性, 采取兔网织红细胞裂解物作为核蛋白体、mRNA 及其它内源性因子, 通过测定³H-leucine 掺入量来了解蛋白质合成的受抑制程度. 结果显示(表 1 和图 3), 所有参与比较的 TCS 均显示有致核糖体失活活性. 但与 wTCS 相比, 所构建突变型 TCS 的活性基本不变

($P > 0.05$), 而 PEG 修饰型 TCS 活性明显下降, 约为 wTCS 的 1/6 ($P < 0.05$).

Table 1 Summary of RI activity and acute toxicity of TCS and its derivatives

Protein species	RI activity (IC ₅₀ , ng/mL)	Acute toxicity (LD ₅₀ , mg/kg)
wTCS	5.06 ± 0.29	13.71
TCS _{KR173-174CG}	5.34 ± 0.32	13.02
PEG-TCS _{KR173-174CG}	31.46 ± 4.71	20.80

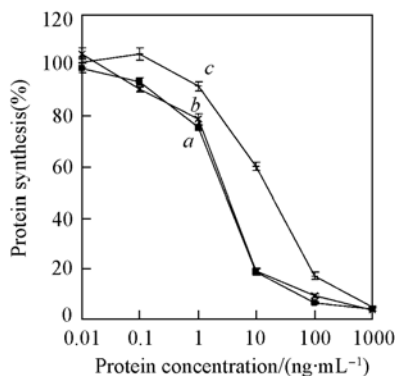


Fig. 3 Ribosome-inactivating (RI) activities of TCS and its derivatives

a. wTCS; b. TCS_{KR173-174CG}; c. PEG-TCS_{KR173-174CG}.

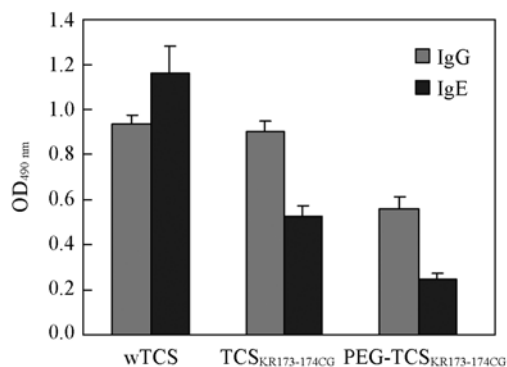


Fig. 4 Specific IgG and IgE antibodies against TCS detected by ELISA

2.4 免疫原性分析

用 ELISA 法分别测定各型 TCS 免疫小鼠血清内特异性 IgG 和 IgE 抗体水平, 结果见图 4. 与 wTCS 相比, 所构建的突变型及 PEG 修饰型 TCS 免疫小鼠后血清内 IgE 水平均有不同程度的降低 ($P < 0.05$), 其中以 PEG 修饰型 TCS 降低更为显著, 约为 wTCS 的 1/5 ~ 1/4. 小鼠血清内 IgG 水平在突变型 TCS 免疫后无显著变化 ($P > 0.05$), 而在 PEG 修饰型 TCS 免疫后则有显著降低 ($P < 0.05$).

2.5 急性毒性试验

经观察, 小鼠在接受不同种类、不同剂量的 TCS 后, 表现出一般中毒症状. 主要表现为毛发蓬松、精神萎靡、嗜睡、活动减少及呼吸急促等状况. 剂量越高, 症状越明显. 表 1 和表 2 分别列出了小鼠注射不同种类、不同剂量 TCS 后的急性毒性观察结果以及由 Excel 2003 计算得出的 LD₅₀ 值. 结果显示, 所构建的 PEG 修饰型 TCS 的 LD₅₀ 值约为 wTCS 的 1.5 倍, 表明其毒性有所降低 ($P < 0.05$); 而突变型 TCS 的 LD₅₀ 值基本与 wTCS 一致 ($P > 0.05$).

Table 2 Acute toxicity of injection of TCS and its derivatives in mice

Protein species	Injected dose/(mg · kg ⁻¹)					
	7.56	10.80	15.44	22.05	31.50	45.00
wTCS	0/7	2/7	5/7	6/7	5/5	
TCS _{KR173-174CG}	0/7	3/7	5/7	6/7	5/5	
PEG-TCS _{KR173-174CG}		0/7	2/7	4/7	4/5	5/5

2.6 药代动力学试验

用 ELISA 法检测大鼠血浆中的 TCS 浓度, 经 Excel 2003 绘制出药物浓度-时间曲线 (图 5), 并由 DAS2.0 软件计算得出主要药代动力学参数 (表 3). 结果显示, 经 PEG 修饰后, TCS 在血液内的平均滞留时间 (MRT) 显著延长 ($P < 0.05$), 约 6 倍之多; 分布半衰期 ($t_{1/2\alpha}$) 和生物半衰期 ($t_{1/2\beta}$) 也均有不同程度增加 ($P < 0.05$); 而血浆清除率 (Cl_p) 则显著减少至 1/3 ~ 1/2 水平 ($P < 0.05$).

借助计算机预测, 定位了 TCS 分子上可能的抗原决定簇位点 KR173-174; 利用重组 PCR 技术, 获得了 TCS 突变体 TCS_{KR173-174CG}; 通过基因工程技术, 实现了目的蛋白在原核系统的可溶性高效表达, 并用 Ni-NTA 亲和层析柱进行了纯化; 应用 PEG 定点修饰技术, 在构建的 TCS 突变体第 173 位引入的半胱氨酸残基上共价连接了一个 PEG 分子, 增加了其分子体积. DNA 酶活性分析显示, 与其它类型 TCS 一样, 所构建的 PEG 修饰型 TCS 也显示出类似 DNA 酶活性; 致核糖体失活活性分析显示, 所构建突

变型 TCS 的活性基本与 wTCS 活性相当, 而 PEG 修饰型 TCS 活性显著下降. 推测这可能是由于 PEG 是一种线性大分子, 与其共价连接后有可能遮蔽这些被修饰分子上的活性位点, 从而造成修饰品活性降低; 免疫原性分析显示, 与 wTCS 相比, 所构建的突变型及修饰型 TCS 刺激 IgE 产生水平均有不同程度降低, 其中以修饰型 TCS 降低更为明显. 刺激小鼠 IgG 产生水平在突变型 TCS 上无显著变化, 而在修饰型 TCS 上有显著降低. 提示本研究所预测的抗原决定簇位点 KR173-174 很可能是 IgE 性质的表位, 可诱导机体产生 IgE, 引发过敏反应. 而 PEG 修饰型 TCS 引起的 IgG 产生水平下降, 推测可能与其上偶联的 PEG 分子遮蔽了附近的 IgG 表位有关, 尚待进一步研究. 急性毒性试验结果显示, 突变型 TCS 的 LD_{50} 值基本与 wTCS 近似, 而 PEG 修饰型 TCS 的 LD_{50} 值显著增加, 表明 PEG 修饰可减低 TCS 毒性; 初步的药代动力学研究结果显示, 经 PEG 修饰后, TCS 在血液内的 MRT, $t_{1/2\alpha}$ 和 $t_{1/2\beta}$ 均有不同程度的增加, 而 Clp 显著减少, 表明 PEG 修饰可改善 TCS 的药代动力学性质, 使其血浆半衰期明显延长, 血浆清除率显著降低. 其主要原因在于: (1) TCS 属于小分子蛋白, 注入机体后可很快地被肾小球过滤而丢失在尿液中; 而 PEG 修饰可使其分子体积显著增加, 因而在血液中的滞留时间延长; (2) TCS 在体内易被蛋白水解酶降解, 半衰期和平均滞留时间较短; 而 PEG 可通过其空间位阻作用降低蛋白水解酶攻击的几率, 从而减少降解; (3) TCS 为非人源性蛋白, 具有较强的免疫原性, 注入机体后易被免疫系统识别与清除; 而 PEG 的空间位阻作用可遮蔽 TCS 分子上的抗原决定簇, 从而减少被免疫系统破坏和清除的几率.

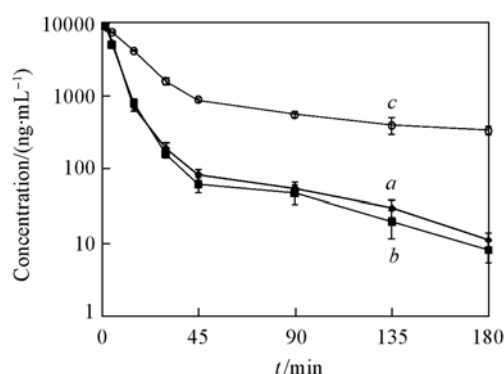


Fig. 5 Plasma concentrations of various forms of TCS detected by ELISA

a. wTCS; b. TCS_{KR173-174CG}; c. PEG-TCS_{KR173-174CG}.

Table 3 Pharmacokinetic parameters of TCS and its derivatives in mice*

Protein species	MRT/min	$t_{1/2\alpha}$ /min	$t_{1/2\beta}$ /min	$V_{ss}/(mL \cdot kg^{-1})$	Clp/[$mL \cdot (min \cdot kg)^{-1}$]
wTCS	10.7 ± 0.6	3.3 ± 0.3	45.4 ± 4.1	61.3 ± 4.0	7.0 ± 0.5
TCS _{KR173-174CG}	11.4 ± 1.1	3.7 ± 0.2	45.1 ± 8.5	65.3 ± 2.5	7.2 ± 0.3
PEG-TCS _{KR173-174CG}	70.0 ± 6.5	8.9 ± 0.6	70.7 ± 3.1	77.7 ± 1.5	3.0 ± 0.2

* MRT means residence time; $t_{1/2\alpha}$ means distribution half-life; $t_{1/2\beta}$ means biological half-life; V_{ss} means distribution volume at steady state; Clp means plasma clearance.

综上所述, TCS 的定点突变、高效表达与纯化以及成功的 PEG 修饰, 为基因工程及化学修饰方法改造 TCS 提供了一条可行的途径. 所构建的突变型 TCS 在保持生物活性的同时, 免疫原性显著降低. PEG 修饰型 TCS 的生物活性虽有所下降, 但考虑到由此带来的诸多有利因素, 如免疫原性和毒性显著降低、血浆半衰期明显延长等, 很值得进一步研究.

参 考 文 献

- [1] Li M. X., Yeung H. W., Pan L. P., *et al.*. Nucleic Acids Res. [J], 1991, **19**(22): 6309—6312
- [2] Zhang J. S., Liu W. Y.. Nucleic Acids Res. [J], 1992, **20**(6): 1271—1275
- [3] Wang Y. Y., Ouyang D. Y., Huang H.. Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 2005, **331**(4): 1075—1080
- [4] Li F., Mei Y., Wang Y.. Cell Immunol. [J], 2005, **234**(1): 23—30
- [5] McGrath M. S., Hwang K. M., Caldwell S. E., *et al.*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA [J], 1989, **86**(8): 2844—2848
- [6] Kahn J. O., Gorelick K. J., Gatti G., *et al.*. Antimicrob Agents Chemother [J], 1994, **38**(2): 260—267
- [7] Cai X., Yao G., Xu G., *et al.*. Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 2002, **297**: 510—516
- [8] Garcia P. A., Bredesen D. E., Vinters H. V., *et al.*. Neuropathol Appl. Neurobiol. [J], 1993, **19**(5): 402—405
- [9] Byers V. S., Levin A. S., Malvino A., *et al.*. AIDS Res. Hum. Retroviruses [J], 1994, **10**(4): 413—420
- [10] Veronese F. M., Pasut G.. Drug Discov. Today. [J], 2005, **10**(21): 1451—1458
- [11] SUN Li-Yan(孙丽艳), CHU Tai-Wei(褚泰伟), WANG Yi(王毅), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J],

2007, **28**(4): 621—626

- [12] AN Qun-Xing(安群星), MU Shi-Jie(穆士杰), ZHANG Xian-Qing(张献清), *et al.*. Chinese Journal of Biologicals(中国生物制品学杂志)[J], 2006, **19**(6): 557—559
- [13] AN Qun-Xing(安群星), XU Zhi-Kai(徐志凯), LI Zhi-Dong(黎志东), *et al.*. Letters in Biotechnology(生物技术通讯)[J], 2006, **17**(2): 167—169

Primary Studies on the Properties of Trichosanthin After Site-directed Mutagenesis and PEGylation

AN Qun-Xing^{1,2}, LEI Ying-Feng², YANG Jing², LI Zhi-Dong²,
MU Shi-Jie^{1*}, XU Zhi-Kai^{2*}

- (1. Department of Blood Transfusion, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;
2. Department of Microbiology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

Abstract To construct a PEGylated trichosanthin (TCS) mutein by site-directed PEGylation and analyse its bioactivities, immunogenicity, acute toxicity and pharmacokinetics. By computer modeling, the site KR173-174 was identified as potential antigenic determinant of TCS. Then, a TCS mutein namely TCS_{KR173-174CG} was constructed by site-directed mutagenesis and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). After that, the bioactivities, immunogenicity, acute toxicity and pharmacokinetics of the mutant TCS and PEGylated TCS were examined. It was shown that the bioactivities of the mutant TCS were similar to wild-type TCS (wTCS), but with much lower immunogenicity. The PEGylated TCS show a significant decrease in immunogenicity and acute toxicity, and a marked increase in plasma half-life when compared with unmodified TCS. But there is a problem of activity reduction. The site-directed mutagenesis and PEGylation of TCS provide a new approach for reconstructing TCS.

Keywords Trichosanthin; Site-directed PEGylation; Immunogenicity; Pharmacokinetics; Human immunodeficiency virus

(Ed. : H, J, Z)