

PEG 在线定点修饰水蛭素及其修饰位点的理论预测与分析

赵 军, 李雪芹, 修志龙

(大连理工大学环境与生命学院生物科学与工程系, 大连 116024)

摘要 比较了液相和固相修饰水蛭素的实验结果, 并在实验的基础上对水蛭素以及水蛭素/凝血酶复合物进行分子动力学模拟, 分析了容易被修饰的水蛭素赖氨酸残基的位点. 结果表明, 在液相修饰的时候, 水蛭素在水溶液中可被修饰的赖氨酸残基除 Lys47 外, 都容易被修饰. 而在固相修饰的时候, 水蛭素仅 Lys35 和 Lys27 容易被修饰.

关键词 水蛭素; 分子动力学模拟; 聚乙二醇(PEG)修饰; 溶液可及表面积

中图分类号 O643 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2009)07-1410-07

水蛭素是 65 个氨基酸残基的单链多肽, 具有良好的抗凝血性质^[1]. 水蛭素分子可分为 N 和 C 两个功能域. N 域有 3 个二硫键, 结构紧密, C 域的柔性很大. 水蛭素的 N 域与凝血酶的活性位点作用, 而柔性很大的 C 域则与凝血酶的纤维蛋白酶原识别位点作用. C 域和 N 域与凝血酶不同部位的协同作用使得水蛭素/凝血酶复合体很稳定^[2]. 水蛭素是迄今为止发现的特异性最好的凝血酶抑制剂, 但由于其血浆半衰期很短, 严重限制了其在临床上的应用. 聚乙二醇(PEG)修饰是常用的提高蛋白和多肽类药物血浆半衰期的方法, 关于水蛭素的聚乙二醇修饰, 已开展了一些研究工作^[3,4]. 目前所用修饰方法可分为液相修饰和固相修饰. 液相修饰即在溶液中对水蛭素进行 PEG 修饰. PEG 修饰水蛭素的位点通常是赖氨酸残基, 但由于水蛭素的赖氨酸残基较多, 在液相修饰中, 各修饰位点暴露在溶液中, 导致修饰产物比较杂. 固相修饰利用离子交换树脂将水蛭素吸附在树脂表面, 然后再加入活化的 PEG, 使其与水蛭素进行反应, 由于空间位阻屏蔽一些潜在的反应位点, 从而达到定点修饰的目的.

水蛭素的 65 个氨基酸残基中有 18 个是侧链可电离的带电氨基酸, 而且 C 域(49 ~ 65 位)带负电荷的残基分布很密, 这样的残基分布使水蛭素在不同 pH 下产生构象变化, 构象的不同会影响修饰的效果, 从而得到不同的修饰产物. 分析不同 pH 条件下水蛭素可能被修饰的位点, 有助于确定定点修饰的条件, 获得更多的单修饰产物. 然而研究蛋白质分子在溶液中的结构和动力学性质非常困难, 而新近发展起来的计算化学、计算机辅助药物设计和模拟提供了有力的研究手段. 其中, 用分子动力学研究蛋白质的性质已经成为研究的热点, 并且得出很多有意义的结果^[5].

本文在比较液相和固相修饰水蛭素的实验结果基础上, 运用分子动力学模拟的方法分析和预测液相和固相修饰的位点, 为理解两种不同修饰方法所得结果的差异以及通过实验确定修饰产物的组成和修饰位点提供理论依据.

1 实验与计算方法

1.1 实验样品

重组水蛭素购于重庆科润生物医药研发有限公司.

单甲氧基琥珀酰亚胺聚乙二醇 5000(SC-mPEG5000)、PEG35000、PEG12000 和 PEG10000 购自北京键凯科技有限公司, 凝血酶购自浙江杭康医药有限公司, 血纤维蛋白酶原购自 Sigma 公司, 甘氨酸

收稿日期: 2008-03-28.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20176005)资助.

联系人简介: 修志龙, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物催化转化与生物分离研究. E-mail: zhixiu@dlut.edu.cn

购自 Amresco 公司, 丙烯酰胺以及 TEMED 由 Biomol 公司提供, 离子交换柱 HiTrap Q HP 购自法玛西亚生物医疗科学公司, 其它试剂和药品均为分析纯。

1.2 液相修饰水蛭素

将 2 mg HV2 与 SC-mPEG5000 以摩尔比(1:3)于 4 mL 20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液中(PBS)反应。反应 pH 值为 8.0, 温度 298 K, 反应 1 h。反应结束后样品立即用 HiTrap Q HP 分离。A 液为 20 mmol/L PBS, pH = 8.0, B 液为 20 mmol/L PBS, pH = 8.0, 含 1 mol/L NaCl。洗脱梯度为 0 ~ 30% B 液, 流速 1 mL/min, 洗脱时间 100 min。检测波长 280 nm。手动收集洗脱组分并进行 SDS-PAGE 分析、蛋白含量及活性检测。

1.3 固相修饰水蛭素

将 4 mL 1.5 mg/mL HV2 溶液(PBS 20 mmol/L, pH = 8.0, A 液)以 1 mL/min 流速, 上样于用 A 液平衡的 HiTrap Q HP 离子交换柱。当全部 HV 2 与离子柱结合后, 接着将溶于 4 mL 20 mmol/L PBS (pH = 8.0)中的 SC-mPEG 5000 在柱中上样。SC 与 -mPEG 5000 的摩尔比为 1:3。当溶液充满柱中时, 将流速降为 0.1 h。用 A 液洗 5 个柱体积, 之后洗脱。洗脱梯度 0 ~ 30% B 液(20 mmol/L PBS, pH = 8.0, 含 1 mol/L NaCl), 流速 1 mL/min, 洗脱时间 100 min。检测波长 280 nm。手动收集洗脱组分, 进行 SDS-PAGE, 蛋白含量以及活性检测。

1.4 PEG 化水蛭素的电泳检测

按文献[6]方法, 以 PEG35000, PEG20000, PEG12000 和 PEG10000 的混合物作为指示标记, 不同分子量 PEG 浓度为 10 ~ 4 g/mL。DYY-2C 系统被用于 SDS-PAGE, 15% 浓缩胶, 4% 分离胶。电泳时电流设为 45 mA, 时间 130 min。采用含 5% 氯化钡的 0.1 mol/L 碘液对 PEG 进行染色。各修饰产物上样量为 20 μ L。

1.5 生物活性测定

参照文献[7]方法, 测定修饰后水蛭素的活力。以生理盐水作为对照组。蛋白浓度用 Lowry 法测定^[8]。比活 = 活力/蛋白浓度。活力保留率为修饰后产物占原蛋白比活分数。

1.6 计算方法

水蛭素的结构数据从蛋白质数据库^[9]中下载得到(PDB Entry code: 4HTC)。所有的模拟和分析都用 GROMACS Version 3.3.1^[10,11]进行, 力场为 GROMOS96 53a6, 温度为 298 K, pH = 8.0。通过改变残基的质子化状态得到水蛭素在不同 pH 下的带电状况。通过 PROPKA^[12~15]预测出不同带电氨基酸残基的 pK_a , 然后在 pH = 8.0 条件下得到残基的带电状况。体系采用周期性立方体盒子, 水蛭素的外围以水分子填充 0.75 nm, 溶剂模型采用显式模型 SPC216。在 pH = 8.0 条件下体系带电荷分别为 -7, 带有补偿离子。水蛭素/凝血酶复合体的分子动力学模拟条件为 pH = 8.0, $T = 298$ K。

首先进行 4000 步的最速下降法能量最小化, 得到的体系从 0 K 逐渐升高到 343 K, 步长为 1 fs, 体系的温度用 Berendsen 算法^[16]模拟, 耦合常数为 0.1 ps。然后进行约束优化, 等温等压体系, 分别约束水蛭素所有分子、水蛭素的碳原子和 C-alpha 原子。压力调整采用 Berendsen 算法^[17], 耦合常数为 0.5 ps。然后进行 50 ps 的平衡模拟, 体系为等温等体积体系, 最后进行 500 ps 的模拟, 等温等压体系。长程静电相互作用采用 PME 法^[18,19]。范德华(vdW)相互作用的截断值为 1.4 nm, 库仑相互作用的截断值为 0.9 nm。键长用 SHAKE 算法^[20]约束。最后进行分子动力学模拟, 没有约束, 模拟时间为 3 ns, 时间步长为 2 fs。体系中各原子的坐标每 1 ps 收集 1 次。当供体-氢-受体所成的角度比 120°大, 而且供体-受体的距离比 0.35 nm 小, 则认为此时形成氢键。

2 结果与讨论

2.1 液相和固相修饰水蛭素的比较

液相 PEG 修饰反应后, 采用 HiTrap Q HP 离子交换柱将反应产物和未反应的水蛭素进行分离, 通过 SDS-PAGE 定性和定量比较; 在固相修饰反应中, HiTrap Q HP 离子交换柱既是水蛭素的吸附介质, 又是修饰后产物分离的介质, 因此这种修饰方法也被称为“在线修饰”。

图 1 是液相修饰(A)和固相修饰(B)产物和水蛭素的离子交换色谱图. 从图 1 可以看出, 除了未反应的水蛭素(HV2)外, 两种修饰方法至少可以得到 3 种不同的产物(峰 1, 2, 3). 相对于液相修饰, 固相修饰产物的分离效果更好, 而且峰 3 明显多于峰 1 和 2.

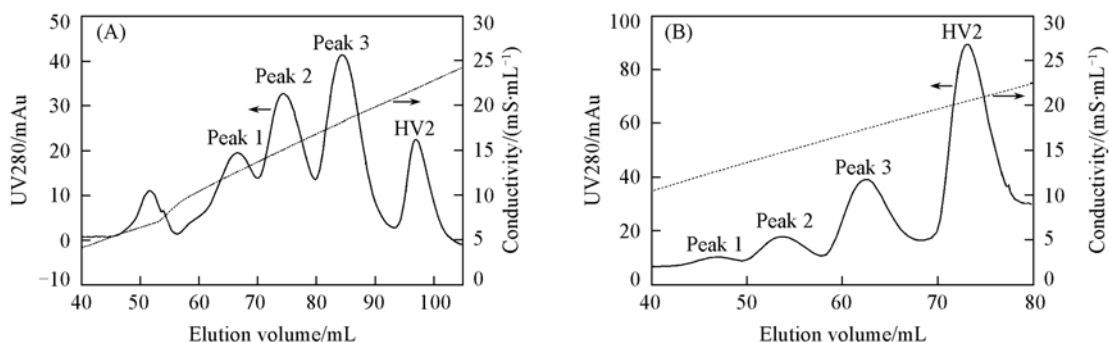


Fig. 1 Ion exchange chromatography of PEGylated HV2

The column was equilibrated with buffer A solution (20 mmol/L PBS, pH 8.0), samples were eluted with an ascending linear gradient 0—30% buffer solution B. The flow rate was 1 mL/min and the detection was performed at 280 nm. (A) PEGylated HV2 prepared with SC-mPEG5000 in solution phase, elution time: 100 min; (B) PEGylated HV2 prepared with SC-mPEG5000 on column, elution time: 80 min.

图 2 是两种不同修饰方法所得产物经分离后的各峰(图 1 中的峰 1, 2, 3)的 SDS-PAGE 图. 由图 2 可见, 每个峰都含一个主要产物, 其电泳条带与相应的标准 PEG 相比, 3 个产物分别是 PEG5000 的三修饰、二修饰和单修饰产物, 因为它们的计算分子量分别为 22000, 17000 和 12000. 水蛭素分子中有 4 个赖氨酸残基, 在 pH = 8.0 的弱碱性条件下易于与活化的 PEG 反应形成多种产物, 但两种修饰方式均未见四修饰产物的生成. 尽管在液相修饰产物的分离中峰 1 前有 1 个峰, 但该峰不是产物峰, 可能是洗脱液形成的波动峰.

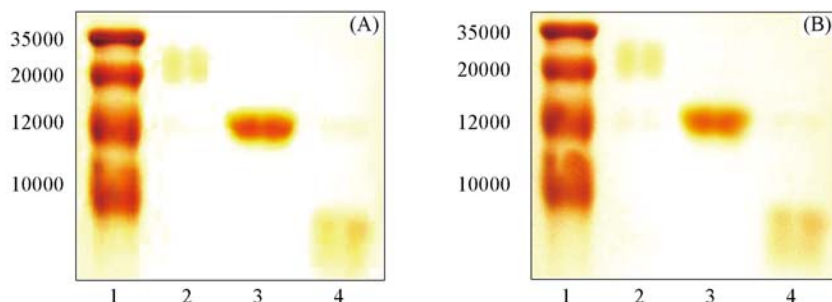


Fig. 2 SDS-PAGE of peaks collected from Fig. 1

(A) Peaks collected from Fig. 1(A). Lane 1: PEG marker; lane 2: peak 1; lane 3: peak 2; lane 4: peak 3;

(B) peaks collected from Fig. 1(B). Lane 1: PEG marker; lane 2: peak 1; lane 3: peak 2; lane 4: peak 3.

通过计算图 1 中各产物峰的面积可以得到液相反应和固相反应各修饰产物的比例, 同时通过活性测定也可以得到单修饰产物比活相对于原始水蛭素的保留率, 结果列于表 1. 从表 1 可以看出, 相对于液相修饰, 固相在线修饰的单修饰产物占总修饰产物的百分比高, 单修饰产物与二修饰产物的比率也较高(4.5:1.4), 而且单修饰产物的活性大大提高(91.67%:27.78%), 这说明在线修饰有一定的选择性.

Table 1 Products distribution and reserved specific activity of mono-PEG HV2 to native HV2 in solution phase PEGylation and on-column PEGylation

Species	Solution phase	On-column
Tri-PEGylated HV2 (%)	12.8	0.8
Di-PEGylated HV2 (%)	30.2	5.2
Mono-PEGylated HV2 (%)	40.9	23.2
Native HV2 (%)	16.1	70.8
Ratio of mono- to di-PEGylated HV2	1.4	4.5
Reserved specific activity of mono-PEG HV2 to native HV2 (%)	27.78	91.67

2.2 水蛭素的带电特性与赖氨酸残基分布

水蛭素的带电性质很独特,水蛭素的 65 个氨基酸残基中有 18 个是带电氨基酸,而且 C 域(49 ~ 65 位)的带负电荷残基分布集中.运用 PROPKA,预测了水蛭素残基在特定构象下的 pK_a 值[图 3 (A)],图中 y 轴的值是每个氨基酸残基的 pK_a 值减去 8(实验中的 pH 值),得到的值反映了残基的带电状态:大于 0 的代表带正电,小于 0 的带负电, N 末端, His51 不带电.可见在 $pH = 8.0$ 的条件下,水蛭素的赖氨酸全部带正电,而其它残基都带负电.

水蛭素的带电氨基酸残基的空间分布与水蛭素的强抗凝血能力有关.经过分析发现,水蛭素的 C 域尾巴全部带负电[图 3(B)蓝色残基表示带负电,红色代表带正电],而且侧链的朝向与 N 域的活性中心残基[图 3(B),即水蛭素的前 3 个残基,用绿色表示]的朝向相同.这样在固相修饰的时候, C 域与阴离子交换树脂作用,水蛭素被固定在树脂上,活性中心就会朝向树脂方向,那些与活性中心朝向相同的赖氨酸残基的侧链也朝向树脂方向,导致这些赖氨酸残基被树脂遮挡,避免了其被修饰,继而,活性中心与凝血酶结合的方向空间位阻增加而导致水蛭素难于和凝血酶结合降低水蛭素的活性.

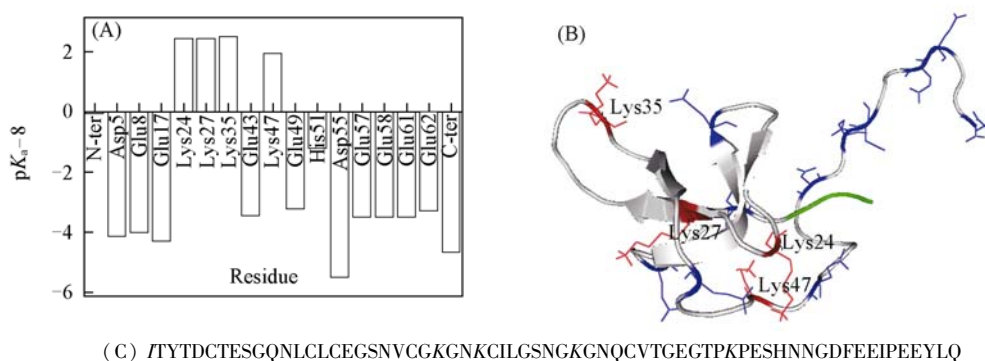


Fig. 3 Electrostatic states of residues of hirudin at $pH = 8.0$ (A), spatial distribution of ionizable residues of hirudin (B) and peptides sequences of hirudin (C)

在水蛭素 HV2 中, 4 个可被 PEG 化的赖氨酸残基 (Lys24, 27, 35, 47) 和 N 端氨基酸残基分布在水蛭素 N 域里面[图 3(B)和(C)].我们发现 Lys27 和 Lys35 两个残基的侧链朝向与水蛭素的活性中心相反,而且远离活性中心.

2.3 水蛭素液相修饰位点的预测与分析

水蛭素在液相条件下进行 3 ns 的分子动力学模拟.水蛭素分子均方根偏差(Root mean square deviation, RMSD),在整个模拟时间的波动幅度在 0.1 nm 范围之内.整个体系的总能量和势能也 3 ns 之内保持稳定,因此可以判断体系的分子动力学模拟达到平衡(图 4).

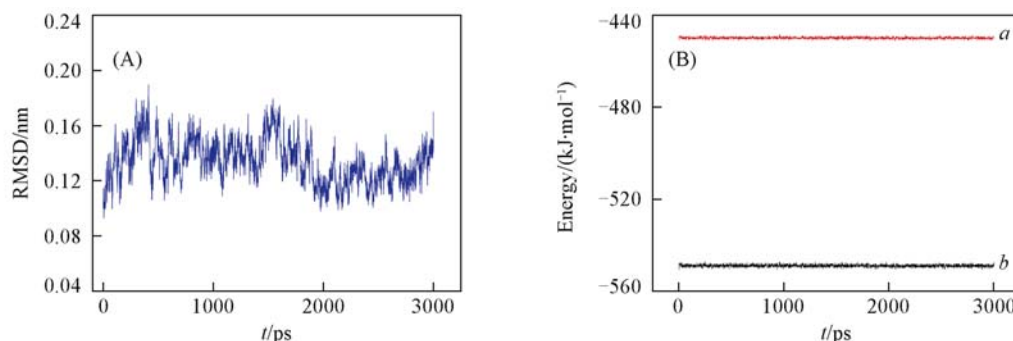


Fig. 4 Root mean square deviation (RMSD) of hirudin (A) and energy distribution (B) during the simulation
a. Total energy; b. potential energy.

相同的残基,其暴露程度越大,它与溶剂分子接触的面积越大,与溶液中反应物反应的可能性也越大.赖氨酸的反应活性部位仅集中于侧链末端的 ϵ -氨基上.而且 ϵ -氨基在 $pH = 8.0$ 的时候带正电荷,活化的 PEG 末端带负电荷,两个反应基团都是亲水的,所以 ϵ -氨基的溶剂可及表面积越大,它与活化的 PEG 末端反应的机会越大.这样,依据 Lys 的 ϵ -氨基的可及表面积大小可判断 Lys 被修饰的可

能性的大小.

在整个 3 ns 的模拟时间内, 水蛭素 4 个赖氨酸残基 Lys24, Lys27, Lys35, Lys47 的 ϵ -氨基的平均可及表面积分别为 0.21033, 0.20781, 0.21955 和 0.10609 nm^2 . 由图 5 可以看出, 在模拟过程中, 只有 Lys47 的 NH_2 的溶剂可及表面积比较低, 其它 3 个赖氨酸的 NH_2 残基的溶剂可及表面积大致相等, 说明游离的水蛭素在水溶液中除 Lys47 外其它 3 个赖氨酸的 NH_2 残基都很容易被修饰.

在 $\text{pH} = 8.0$, 温度为 298 K 的条件下用分子量大约为 5000 的 PEG 对水蛭素分别进行液相修饰和固相修饰. 修饰结果表明(表 1), 水蛭素的 PEG 修饰产物中, 单修饰、双修饰以及三修饰产物都存在, 唯独未见四修饰产物, 这也从实验角度证明了, 水蛭素在液相修饰的时候 Lys47 很难被修饰.

为了进一步验证水蛭素残基的被修饰难易程度, 选取动力学模拟结束后的构象来分析水蛭素不同赖氨酸残基的空间结构. Lys24, Lys27 和 Lys35 这 3 个赖氨酸残基都伸展于水溶液中, 与水溶液的接触面积很大, 所以容易被 PEG 修饰[图 6(A), (B)].

判断氢键是否存在, 可以依据以下规则: (1) 受体-氢原子-配体之间的夹角大于 120° , (2) 受体配体之间的距离小于 0.35 nm, (3) 氢键存在时间大于整个模拟时间的 50%. 在整个 3 ns 的模拟过程中, Lys47 与 Thr4 之间形成了稳定氢键(占整个模拟时间的 56%). 另外, 模拟过程还发现 Lys47 与 Thr4 可能形成另一个氢键, 但是存在时间很短, 可以忽略掉. Lys47 残基与 Thr4 产生氢键, 而且 Lys47 的 NH_2 基团被包围在疏水环境中, 不容易与外界水溶液接触, 所以被 PEG 修饰的机会很小[图 6(C)].



Fig. 6 Conformations of Lys24(A), Lys27, Lys35(B) and Lys47(C) in the liquid-phase PEGylation

2.4 水蛭素固相修饰位点的预测与分析

在线固相修饰与液相修饰的实验结果表明, 在线修饰的位点存在一定的专一性, 单修饰产物比例较高, 并且保留了非常高的活性(表 1). 高活性的单修饰产物表明在线修饰对水蛭素与凝血酶的结合没有太大影响, 可能是水蛭素的活性区域与离子交换树脂结合, 反应过程中得到一定程度的保护. 如果对水蛭素/凝血酶复合体进行分子动力学模拟, 可能有助于说明在线修饰的实质.

水蛭素在液相条件下进行 3 ns 的分子动力学模拟. 水蛭素分子 RMSD, 在整个模拟时间的波动幅度在 0.1 nm 范围之内. 整个体系的总能量和势能也在 3 ns 之内保持稳定, 因此可以判断体系的分子动力学模拟达到平衡(图 7).

在 3 ns 的动力学模拟过程中, 水蛭素/凝血酶复合体中水蛭素 4 个赖氨酸残基 Lys24, Lys27, Lys35 和 Lys47 的 ϵ -氨基的可及表面积分别为: 0.14056, 0.20452, 0.20744 和 0.09874 nm^2 .

Lys27 和 Lys35 的 NH_2 的溶剂可及表面积比 Lys24 和 Lys47 的大[图 8(A)]. Lys47 被包裹水蛭素分子内部, 与游离的水蛭素的情况相似, 而 Lys24 的溶剂可及表面积相比于 Lys27 和 Lys35 的小, 说明了 Lys24 可能距凝血酶比较近, 导致它的溶剂可及表面积变小.

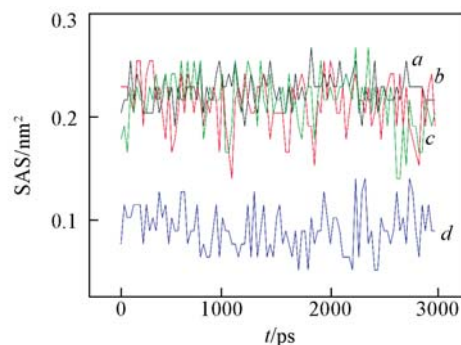


Fig. 5 Solvent accessible surface(SAS) of NH_2 group of Lys24 (a), Lys27 (b), Lys35 (c), Lys47 (d) in the liquid-phase PEGylation

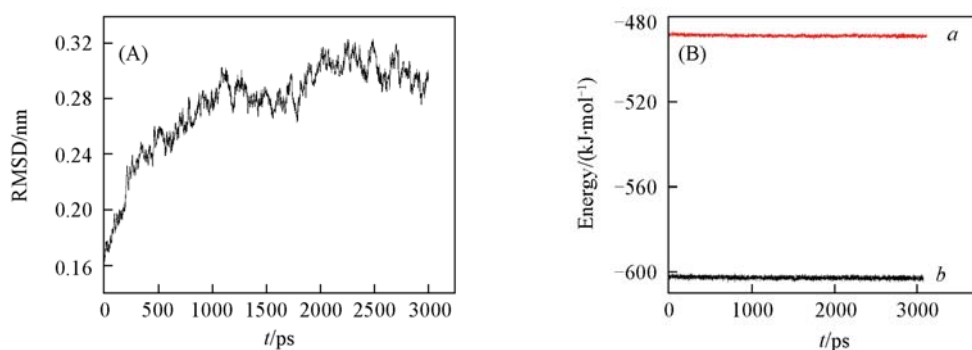


Fig. 7 RMSD of hirudin/thrombin complex(A) and energy distribution(B) during the simulation

a. Total energy; *b.* potential energy.

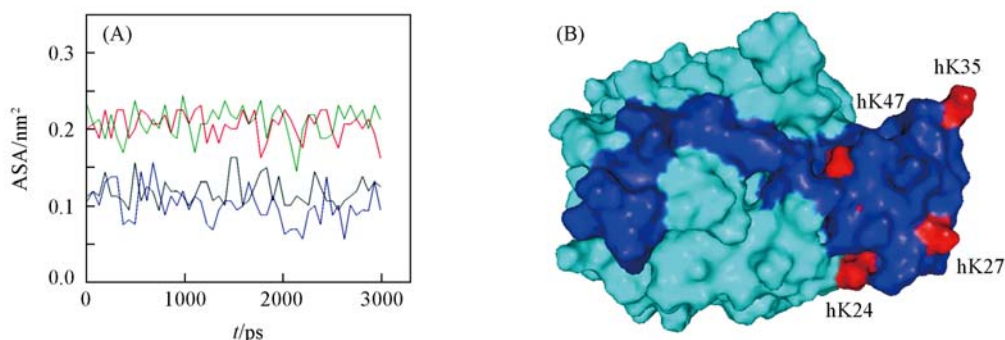


Fig. 8 Solvent accessible surface (SAS) of NH_2 group of Lys27, Lys35(upper two curves), Lys24, Lys47(lower two curves) of hirudin in the solid-phase PEGylation (A) and solvent accessible surface (SAS) presentation of hirudin/thrombin complex (B)

Ball molecule; thrombin, tadpole shape molecule; hirudin.

从水蛭素/凝血酶复合体上看,在不影响水蛭素与凝血酶结合的前提下,修饰 Lys27 和 Lys35 比修饰 Lys24、Lys47 更能保持水蛭素/凝血酶复合体的稳定性.如前文所述,Lys24 和 Lys47 的侧链(ϵ -氨基)是朝向水蛭素/凝血酶复合体的作用中心的,如果 Lys24 和 Lys47 被修饰,PEG 巨大的空间位阻会使得水蛭素分子难以与凝血酶作用.而且 Lys47 是水蛭素与凝血酶结合的关键作用位点,如果被修饰将影响水蛭素与凝血酶的特异性作用.而 Lys27 和 Lys35 的空间位阻相对较小[图 8(B)],远离水蛭素与凝血酶相互作用区域,侧链(ϵ -氨基)是背离水蛭素/凝血酶复合体的作用中心的,对这两个赖氨酸的修饰不会影响水蛭素与凝血酶的结合.

如果 Lys27 被 PEG 修饰,N 域的稳定性的将受到影响,因为 Lys27 位于 N 域的核心部位,靠近 3 个二硫键.而 PEG 是长链的大分子,溶液对 PEG 的扰动会干扰 N 域的稳定性的,因此 PEG 对 Lys27 的修饰会降低水蛭素的活性的.而 Lys35 位于水蛭素的一个柔性很大的伸向溶液的环上,既远离水蛭素/凝血酶作用区,又远离水蛭素的 N 域核心.因此可以推测,得到的活性较高的 PEG 修饰产物应该修饰在 Lys35 上.

在液相修饰时,水蛭素被修饰的百分比高(表 1),而在固相修饰的时候,水蛭素只有一小部分被修饰,说明液相条件下水蛭素的修饰位点比较暴露,容易被修饰,而在固相修饰条件下,由于和柱子结合导致一部分修饰位点不能暴露在溶液中,导致修饰率降低.固相条件下虽然修饰率降低,但是 PEG 修饰产物中,单修饰产物比率大,而且单修饰产物的活性高.这说明水蛭素分子中某些赖氨酸位点(Lys24)的 PEG 修饰降低了水蛭素的抗凝血活性,而固相修饰恰恰把这些位点屏蔽起来,不使它们暴露在水溶液中,从而提高了单修饰产物的活性.此外,实验结果显示固相修饰的时候,水蛭素的单修饰产物的活性很高,说明单修饰产物能稳定地与凝血酶结合,从实验的角度证明 Lys24 和 Lys47 修饰率较低.

参 考 文 献

- [1] Markwardt F. , Walsmann P. . Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. [J], 1958, **312**: 85—98
- [2] Rydel T. J. , Ravichandran K. G. , Tulinsky A. , *et al.* . Science[J], 1990, **249**: 277—280
- [3] Abuchowski A. , McCoy J. R. , Palczuk N. C. , *et al.* . J. Biol. Chem. [J], 1977, **252**: 3582—3586
- [4] Qin H. N. , Xiu Z. L. , Zhang D. J. , *et al.* . Chinese J. Chem. Eng. [J], 2007, **15**(4): 586—590
- [5] ZHAO Xi(赵熹) , HUANG Xu-Ri(黄旭日) , SUN Chia-Chung(孙家锺) . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **29**(4): 819—823
- [6] Laemmli U. K. . Nature[J], 1970, **227**: 680—685
- [7] Chen H. Y. , Xing Z. L. , Li Y. Y. . Biotechnology[J], 2002, **12**(6): 24—25
- [8] Lowry O. H. , Rosebrough N. J. , Farr A. L. , *et al.* . J. Biol. Chem. [J], 1951, **193**: 265—275
- [9] Vitali J. , Martin P. D. , Malkowski M. G. , *et al.* . J. Biol. Chem. [J], 1992, **267**: 17670—17678
- [10] Berendsen H. J. C. , van der Spoel D. , van Drunen R. . Comp. Phys. Commun. [J], 1995, **91**: 43—56
- [11] Lindahl E. , Hess B. , van der Spoel D. . J. Mol. Mod. [J], 2001, **7**: 306—317
- [12] Li H. , Robertson A. D. , Jensen J. H. . Proteins[J], 2005, **61**: 704—721
- [13] Powers N. , Jensen J. H. . J. Biomol. NMR[J], 2006, **35**: 39—51
- [14] Porter M. A. , Hall J. R. , Locke J. C. , *et al.* . Proteins[J], 2006, **63**: 621—635
- [15] Davies M. N. , Toseland C. P. , Moss D. S. , *et al.* . BMC Biochem. [J], 2006, **7**: 18—19
- [16] Berendsen H. J. C. ; Eds; Meyer M. , Pontikis V. . Computer Simulations in Material Science[M], Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991: 139—155
- [17] Berendsen H. J. C. , Postma J. P. M. , DiNola A. , *et al.* . J. Chem. Phys. [J], 1984, **81**: 3684—3690
- [18] Darden T. , York D. , Pedersen L. . J. Chem. Phys. [J], 1993, **98**: 10089—10092
- [19] Essmann U. , Perera L. , Berkowitz M. L. , *et al.* . J. Chem. Phys. [J], 1995, **103**: 8577—8593
- [20] Ryckaert J. P. , Ciccotti G. , Berendsen H. J. C. . J. Comp. Phys. [J], 1977, **23**: 327—341

Specific-site PEGylation of Hirudin on Ion-exchange Column and Theoretical Prediction and Analysis of Modified Sites by Molecular Dynamics Simulation

ZHAO Jun, LI Xue-Qin, XIU Zhi-Long*

(Department of Bioscience and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract Hirudin, a remarkably stable molecule with blood anticoagulant activity, is the most potent thrombin inhibitor in nature. But the short half life in blood plasma limits the application of hirudin in medical care. PEGylation is widely used to prolong the half life of proteins and peptides in plasma. However, the potential PEGylation sites of hirudin are numerous and it is difficult to confirm the actual PEGylation sites. In this paper, based on our experiment results of PEGylated hirudin in solution phase PEGylation and on-column PEGylation, hirudin and hirudin/thrombin complex had been simulated using molecular dynamics to predict the Lys PEGylation sites of hirudin. The results show that during the liquid-phase PEGylation, lysine residues are easy to be PEGylated except for Lys47, while during the solid-phase PEGylation, only Lys35 and Lys27 are easy to be PEGylated. And the PEGylation product can be stable when Lys35 is chosen to be the PEGylation site.

Keywords Hirudin; Molecular dynamics simulation; PEGylation; Solvent accessible surface

(Ed. : Y, I)