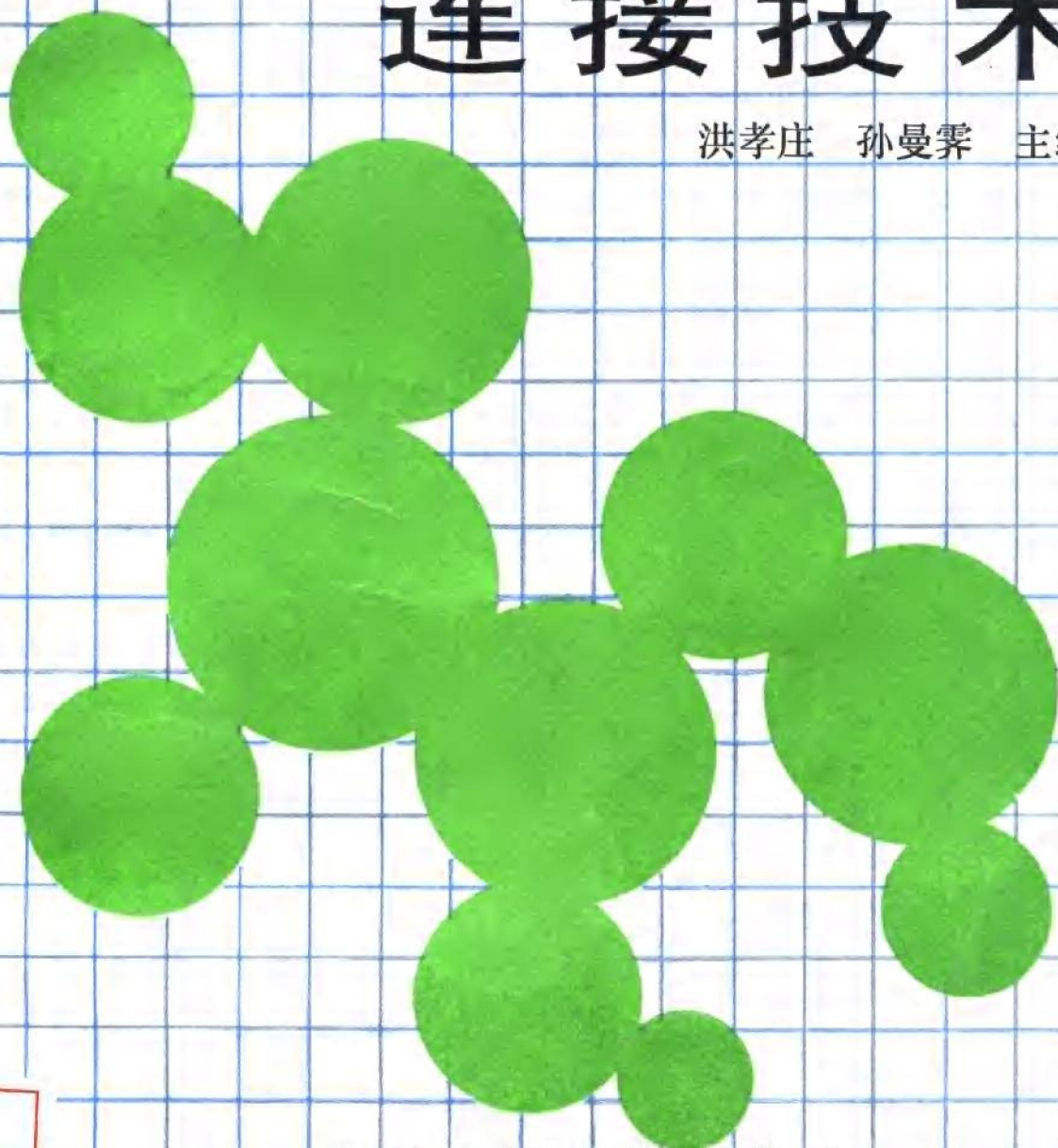


# 蛋白质 连接技术

洪孝庄 孙曼霁 主编



中国医药科技出版社

1  
5-3  
IX2

# 蛋白质连接技术

主 编

洪孝庄 孙曼霁

编 著 者

洪孝庄 孙曼霁 龚雄麒

仲伯华 沈倍奋 陈泮藻

李春海 卢秀桂 何云汉

中国医药科技出版社

登记证号:(京)075号

### 内 容 提 要

蛋白质连接技术是将小分子物质(如药物、毒物、激素等)或大分子物质(如酶、毒素等)以共价键的方式与蛋白质载体连接的技术,用以制备人工抗原、标记半抗原或抗体、导向药物、免疫毒素和载体释放药物等,可作为各种免疫分析(RIA、EIA、FIA、LIA)、受体分析(RRA、ERA)、基因探针、肿瘤标志和诊断的研究工具。本书重点介绍蛋白质交联方法的化学反应类型,各种交联或标记原则及其在各有关领域的实际应用和操作方法等,内容丰富,实用性很强。

## 蛋 白 质 连 接 技 术

洪孝庄 孙曼霁 主编

中国医药科技出版社 出版

(北京海淀区文慧园北路甲22号)

(邮政编码:100088)

北京市卫顺印刷厂 印刷

全国各地新华书店经销

开本787×1092mm<sup>1</sup>/<sub>16</sub> 印张6<sup>3</sup>/<sub>4</sub>

字数153千字 印数 1—1500

1993年6月第1版 1993年6月第1次印刷

ISBN 7-5067-0768-3/R·0683

定价: 6.00元

## 前 言

随着生物医学研究的迅速发展,在其相应的研究领域中也出现许多新颖的应用技术,蛋白质连接技术即是其一。蛋白质连接技术的出现最早是在本世纪20年代,在化学免疫研究中,首次合成人工抗原时已开始使用。此后,在免疫学研究中,特别是在免疫标记技术中广为应用并迅速发展。从40~50年代的免疫荧光技术,60年代的放射免疫技术,到70年代的酶免疫技术,及在此前后出现的发光免疫技术、胶体金免疫技术和稀土元素免疫标记技术等都大大丰富和发展了蛋白质连接技术。更为突出的是在1975年单克隆抗体的研制成功,以及化学家们新合成的多种异型双功能交联剂的出现,更将蛋白质连接技术的应用推向新天地。近些年来,在国内外非常活跃的研究领域——导向药物、免疫毒素和载体释放药物的研究中,亦广泛采用此类蛋白质连接技术。如将某种药物(例如抗肿瘤药物)或毒素与载体分子(如单克隆抗体或受体)进行交联组成导向药物,人们誉之为“生物导弹”。应用这种技术,将抗肿瘤药物(如多诺霉素、丝裂霉素、氨甲蝶呤等)或毒素(如白喉毒素、蓖麻毒素、红豆毒素等)作为弹头药物与肿瘤单克隆抗体作导向载体所制成的导向药物,对相应肿瘤细胞的杀伤力大大超过一般抗肿瘤药物。毒素大多都是蛋白质,所以,上述蛋白质连接技术则可选用于导向药物的制备。更为可喜的是,近些年来,在分子生物学研究中,特别是在核酸探针的研究与应用中,蛋白质连接技术也大显身手,有人称其为分子生物学的支撑技术。随着这一技术的应用及其在相关研究领域的不断开拓,蛋白质交联方法也不断改进和渐趋完善,使其在生物医学领域中得到广泛的应用和重视。

目前,蛋白质连接技术不仅广泛应用于人工抗原的合成,而且在小分子物质(如毒物、药物、激素等)和生物大分子的标记免疫分析(放射免疫分析RIA、酶免疫分析EIA、荧光免疫分析FIA、发光免疫分析CIA、时间分辨免疫分析TrFIA)、标记受体分析(放射受体分析RRA、酶受体分析ERA)及竞争蛋白结合分析等配体结合分析方法中,普遍用作标记配体的制备方法。此外,在基因探针标记、肿瘤标志和诊断研究中也广为采用。

蛋白质连接技术是一种具有理论研究和实际应用价值的新技术,近几年来快速发展和更趋成熟。但是,在实际应用中,它所涉及的问题较多,无论从理论上或在实践中都还存在一些需要进一步阐明和有待解决的问题。现在,涉及这一技术的国内外文献及著述不少见,也是大家非常熟悉的。然而,至今未见到对此类技术较为全面系统的论述。为满足有关科技研究工作的需要,我们几位作者,根据多年科研实践之所得,并参阅有关文献,从介绍化学反应的主要类型出发,以生物医学研究中的实际应用为目的编写本书,愿为同行提供有用的研究工具。

由于本书涉及内容较广,作者水平有限,经验不足,书中难免有谬误之处,敬请读者批评指正。

洪 孝 庄

军事医学科学院毒物药物研究所

1992年5月

## 目 录

|     |                        |    |
|-----|------------------------|----|
| 第一章 | 蛋白质交联方法及其应用.....       | 1  |
| 第二章 | 配体结合分析中的蛋白质连接技术.....   | 17 |
| 第三章 | 单克隆抗体与毒素结合物的制备及应用..... | 43 |
| 第四章 | 稀土元素标记免疫分析技术及应用.....   | 52 |
| 第五章 | 胶体金标记技术及其应用.....       | 70 |
| 第六章 | 蛋白质及多肽的放射性同位素标记.....   | 83 |
| 第七章 | 酶的固定化技术.....           | 94 |

# 第一章 蛋白质交联方法及其应用

仲伯华 龚雄麒

(军事医学科学院毒物药物研究所)

蛋白质交联系指将小分子物质(如药物、半抗原等)或大分子物质(如酶、蛋白毒素等)以共价键的方式连接于蛋白质分子,以制备人工抗原、酶标抗体、载体释放药物、抗体导向药物和免疫毒素等。随着放射免疫分析法、酶标免疫技术、载体药物学和导向药物学的发展,蛋白质交联技术的方法和手段也不断改进和完善,并且在生物学和医学领域得到愈来愈广泛的应用。

蛋白质交联方法首先发展于人工抗原的制备研究。自70年前Landsteiner第一次合成人工抗原以来,人们将许多没有抗原性的小分子物质(半抗原)如化学药物、神经递质和激素等与蛋白质或多糖等载体大分子共价结合,使其具备抗原性,以诱发动植物产生特异性抗体,用于放射免疫分析等。为了使放射免疫分析达到灵敏度高、特异性强的要求,前人对半抗原和蛋白质连接的方法进行了大量的研究,建立了重氮化法、戊二醛法、混合酸酐法、二异氰酸酯法及卤代硝基苯法等交联技术。

近10多年来发展起来的酶标免疫检测技术,要求制备保持酶的生物活性和抗体的免疫结合活性的酶-抗体偶合物。常用的交联方法如戊二醛法、碳二亚胺法和混合酸酐法不可避免地要产生酶或抗体的自身交联产物或多聚物,致使交联效率降低、结合物活性减弱。为了克服这一不足,人们发展了异型双功能交联试剂,如*N*-羧基琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫)-丙酸酯,以实现控制交联,提高交联反应的选择性和交联产物的均一性。

将药物与大分子载体连接,制备药物-载体结合物,以改善和控制药物在体内的转运和代谢,实现缓释给药和定向给药,提高生物利用度和治疗指数。这是现代药物研究领域一个崭新的分支。载体药物必须能够在体内定量、定位释放原型药物,因此要求设计pH敏感或特定酶敏感的偶联键。

导向药物的发展对蛋白质交联方法提出了更高的要求。早在1906年,Ehrlich就提出了靶向给药的设想。随着生物医学的发展,这一设想不断得到具体的实现。单克隆抗体作为导向载体的出现,更使导向药物的研究成为当代药物研究中最活跃和最引人注目的领域之一,而其中研究得最广泛的是肿瘤治疗的抗体导向研究。其载体主要有针对肿瘤细胞表面相关抗原的抗体及其片断,肿瘤细胞表面受体的模拟配基。这些载体与药物或毒素分子连接而成的偶合物,能够选择性地杀伤肿瘤细胞,被誉为“生物导弹”。为了最大限度地保持导向载体和药物弹头的生物活性,同时实现最大的药物载运量,人们不断创新交联剂,改进交联方法,发展了一批新的各具特性的异型双功能交联剂,提高了导向药物的有效性和实用性。

随着新的交联试剂和交联方法的出现,使得放射免疫、酶标免疫和导向药物的研究不断深入;而后者的发展又反过来促进蛋白交联技术趋于成熟。目前的交联方法可以将任一个半抗原或细胞毒分子以一定方式与载体交联,获得所需的偶合物。下面分别介

绍蛋白质交联中常用的试剂、方法及其应用。

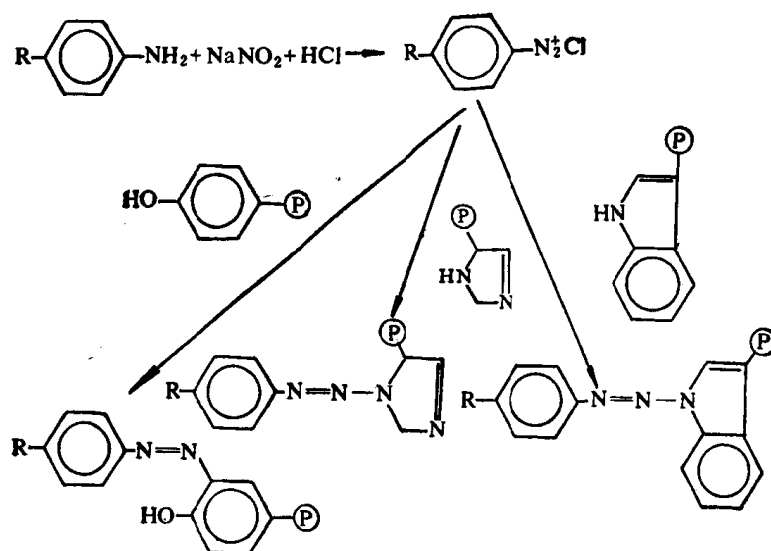
## 一、交联方法

一般说来, 蛋白分子中可以用于交联的活性基团有游离氨基 (如赖氨酸的 $\epsilon$ -氨基或末端氨基)、游离羧基 (如天冬氨酸残基, 谷氨酸残基及末端羧基)、苯基 (苯丙氨酸、色氨酸或酪氨酸)、酚基 (酪氨酸)、巯基 (半胱氨酸)、羟基 (丝氨酸或苏氨酸)、咪唑基 (组氨酸)、吡啶基 (色氨酸) 或胍基 (精氨酸) 等。

为了避免蛋白质变性及其生物活性的损失, 药物或半抗原等与蛋白的交联应采用具有中等反应活性的试剂, 在温和的条件 (如接近中性的 pH、室温、水溶液中) 进行。

### (一) 重氮化法

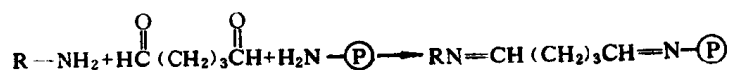
含芳香胺的化合物, 可以与亚硝酸反应形成重氮盐, 然后直接连接于蛋白质分子中酪氨酸残基上酚羟基的邻位, 即得以偶氮键相联的结合物。这种重氮盐也能与组氨酸残基上的咪唑环或色氨酸残基的吡咯环反应:



本方法副反应较多, 故一般限于人工抗原的制备。

### (二) 戊二醛法

同型双功能交联剂戊二醛的两个醛基可以分别与两个相同或不同分子上的伯氨基形成 Schiff 氏碱, 将两分子以五碳链的桥连接起来。

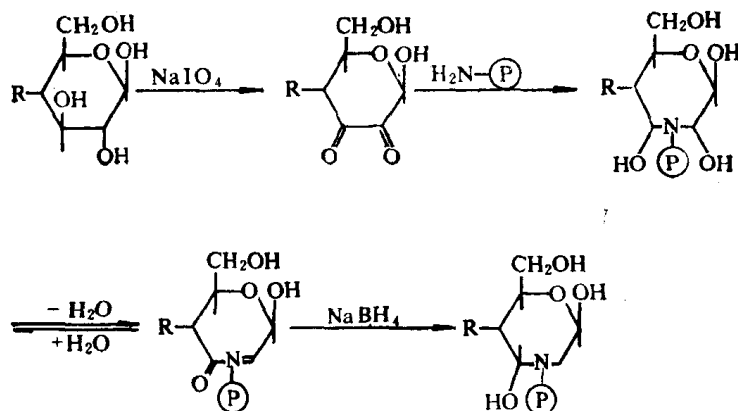


戊二醛连接反应是最温和的交联反应之一, 可在  $4 \sim 40^\circ\text{C}$  温度范围, pH6.0~8.0 的缓冲水溶液中进行, 但是缓冲组份中不得含有氨基化合物。以硼氢化钠或氰基硼氢化钠还原 Schiff 氏碱可以形成稳定的单键; 根据对偶联键的不同要求, 还原步骤也可省略。

但是，本交联方法易形成相同蛋白间的连接，产物的均一性较差。因此，多用于酶标抗体的制备。

### (三) 过碘酸盐氧化法<sup>[1]</sup>

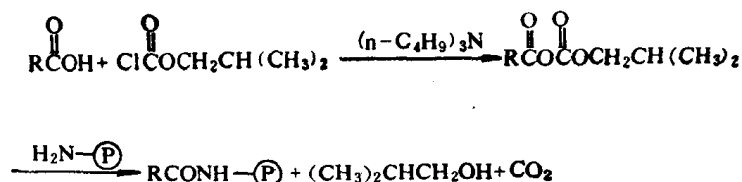
糖类或含糖基化合物分子中的邻二醇结构可被过碘酸钠氧化为醛基，然后与蛋白分子中的氨基形成 Schiff 氏碱：



与戊二醛的交联反应相似，过碘酸钠氧化法比较温和，可在常温和中性 pH 的条件下进行。这是一个两步反应，第一步生成醛基衍生物后，过量的过碘酸盐必须除去或消耗后，方可进行与蛋白交联的第二步反应。

### (四) 混合酸酐法

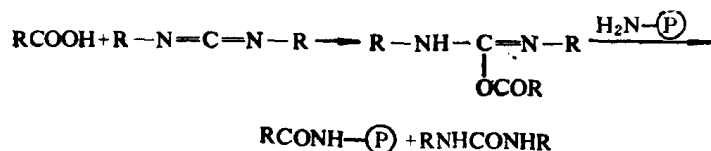
半抗原或药物及其衍生物分子中的羧基可以在三级胺存在下与氯甲酸异丁酯反应，生成活泼中间体混合酸酐，然后与蛋白载体上的伯氨基反应，形成酰胺交联键：



本反应过程简单，毋需制备和分离中间产物。

### (五) 碳二亚胺法

碳二亚胺是一类很强的脱水剂，能使羧基和氨基脱水形成酰胺键。在反应时，一种分子中的羧基先与碳二亚胺反应生成一个加成中间产物，再与另一分子上的氨基反应形成酰胺键，实现两者的交联：

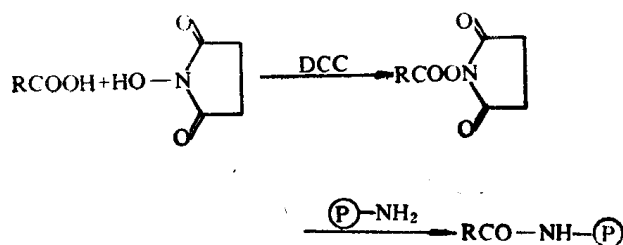


除戊二醛外，碳二亚胺是常见的另一类交联试剂，最早用于药物化学和有机化学领

域。脂溶性的二环己基碳二亚胺至今仍被广泛用于多肽合成领域，但其反应必须在有机溶剂中进行，不适用于蛋白质交联。水溶性的 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺 (EDC) 等的出现，使这一缩合反应成功地用于蛋白质交联中。本交联反应条件温和，即使在冷却 (0℃) 条件下，也能于中性 pH 中进行。但是，由于碳二亚胺的缩合反应没有选择性，易形成蛋白分子间的自身聚合，产生非均一性产物；先将含羧基的药物或半抗原分子与 EDC 反应，活化羧基后，再加入蛋白反应物，可以减少蛋白分子间的交联。

## (六) 活泼酯法<sup>[2]</sup>

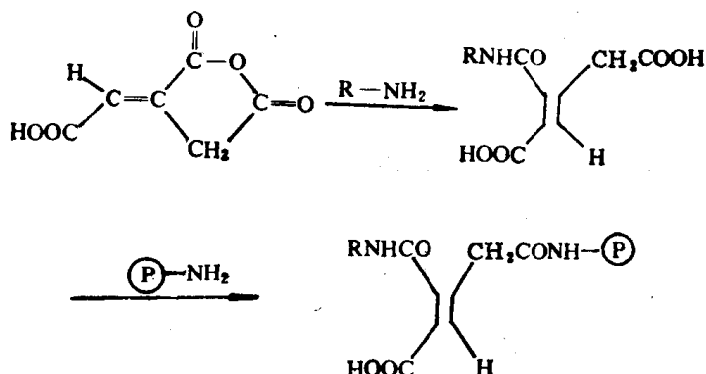
含有羧基的半抗原或药物在二环己基碳二亚胺 (DCC) 的作用下，与 *N*-羟基琥珀酰亚胺反应，生成活泼酯衍生物，后者与载体蛋白上的氨基反应，形成以酰胺键连接的偶合物：



本法是对碳二亚胺法的改进：由于避免了碳二亚胺对蛋白的直接作用，从而避免了蛋白分子间的交联。活泼酯法在导向药物的研究中得到广泛的应用。

## (七) 多元酸酐法<sup>[3]</sup>

半抗原或药物分子中的羟基或氨基与琥珀酸酐、顺-乌头酸酐等在水吡啶催化下反应，形成单酯或单酰胺衍生物，引入游离羧基，然后以活泼酯法或碳二亚胺法与蛋白交联：

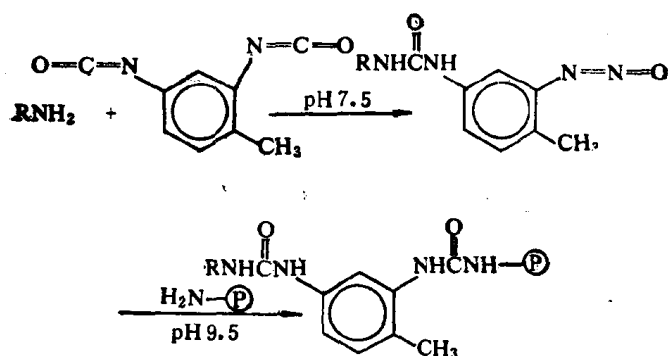


多元酸酐法可以十分方便地将小分子中的羟基或氨基转变为含游离羧基的衍生物，具有较广的应用范围。但是，与羟基形成的酯键在血浆中不稳定；而与氨基形成的酰胺键又往往不能充分降解，释放游离药物，影响导向药物的效价。有趣的是，药物通过顺-乌头酸与蛋白形成的偶合物，在中性 pH 介质（如血浆中）稳定，而在酸性 pH 介质中充分解离，释放活性药物。由此产生的溶酶体内降解性复合物，经细胞内化后，进入溶酶体内，在酸性条件下解离。

## (八) 二异氰酸酯法

二异氰酸酯类双功能试剂中的两个异氰酸基分别与两个不同分子上的氨基反应，介

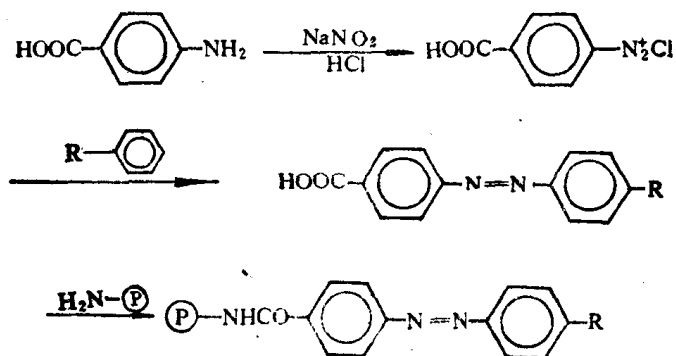
以不同碳链长度的桥将两者偶联：



这类试剂除了能与氨基反应形成取代脲外，（在  $\text{pH} > 7$  时为主要反应），尚能与羟基反应形成氨基甲酸酯衍生物；水溶液中的副反应（如第二个异氰酸酯基水解产生的胺，能与另一异氰酸酯分子连接），可能通过疏水作用导致蛋白的聚合。

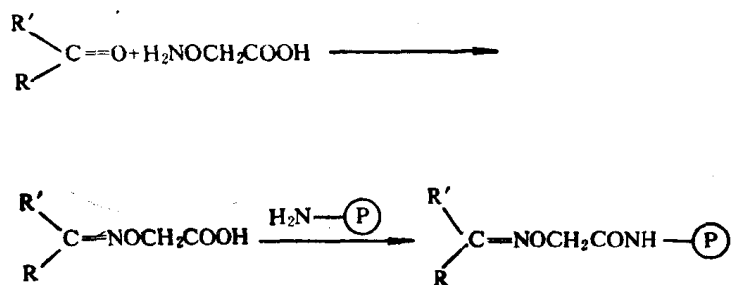
### （九）偶氮苯甲酸法

对氨基苯甲酸重氮化后，与带苯环的半抗原偶联引入羧基，再利用羧基的反应连接于蛋白上：



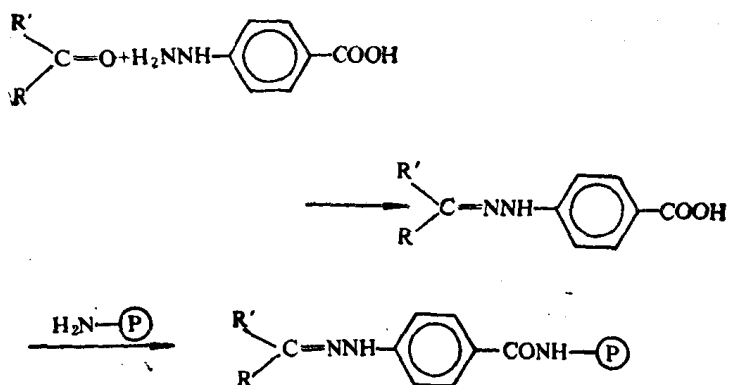
### （十）O-羧甲基羟胺法

半抗原上的酮基与O-羧甲基羟胺反应，制备羧甲基肟衍生物。引入的羧基再与载体蛋白的氨基反应，形成半抗原-蛋白偶合物：



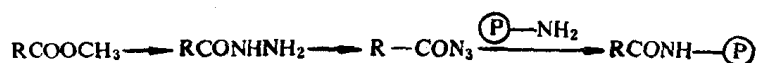
### （十一）对-胍基苯甲酸法

带酮基的半抗原也可以与对-胍基苯甲酸反应，引入羧基，再按常法与载体蛋白交联：



## (十二) 叠氮化法<sup>[4]</sup>

羧酸甲酯衍生物经胼解、亚硝化, 转变为叠氮化物, 再与载体蛋白上的氨基反应:



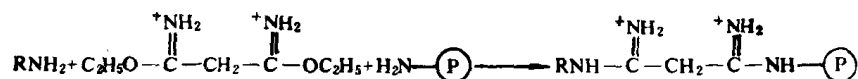
## (十三) 氯乙酸钠法

半抗原的羟基与氯乙酸钠反应, 形成羧甲基醚衍生物, 再通过羧基与蛋白交联:



## (十四) 亚胺酸酯法

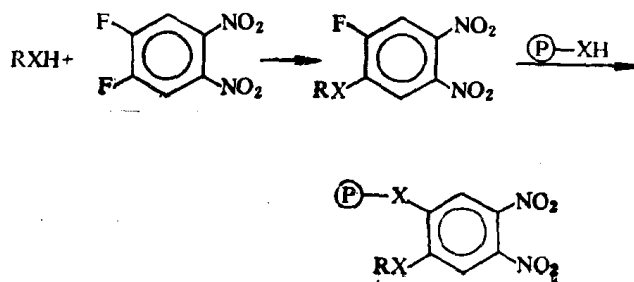
双功能试剂亚胺酸酯类如丙双亚胺酸二乙酯双盐酸盐可以与半抗原和载体蛋白的氨基交联, 中间介以一个三碳桥:

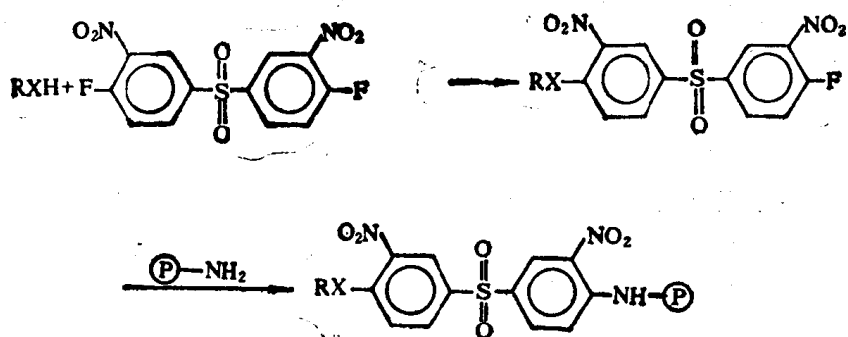


亚氨酸酯类水溶性良好, 反应条件温和, 与氨基的反应选择性高, 这类试剂的最大特点是, 可与蛋白分子上的赖氨酸残基广泛反应, 而不影响蛋白分子的净电荷改变。具有不同碳链长度的亚氨酸酯可将半抗原间以一定距离与蛋白连接。

## (十五) 卤代硝基苯法

双功能试剂二硝基二氟苯或二氟二硝基苯砒分子中的氟原子, 由于邻近硝基的活化作用, 易和半抗原或载体蛋白上的亲核基团如氨基、羟基、巯基等反应:

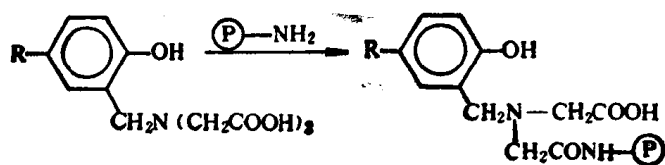
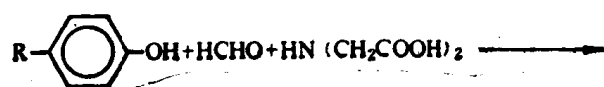




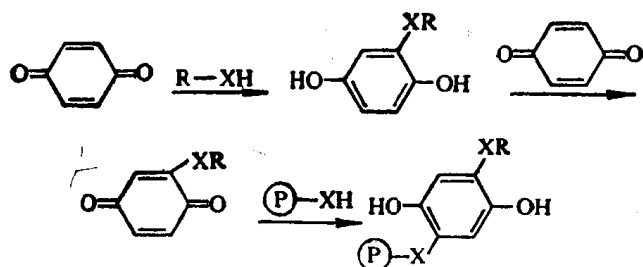
其中, X=N,O,S

## (十六) Mannich 反应法

酮、酚类半抗原, 可以用 Mannich 反应引入羧基, 然后与常法与蛋白交联;



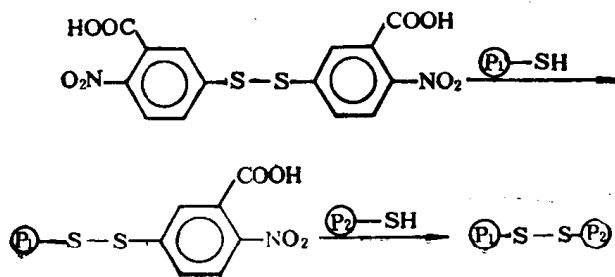
## (十七) 苯醌法



交联过程分两步进行, 第一步反应完成后, 分离除去过量试剂, 再进行第二步反应。

## (十八) Ellman试剂法 [5]

Ellman 试剂即 5,5'-二硫-2,2'-双硝基苯甲酸(DTNB), 该试剂可以与巯基作用, 交联反应分两步进行:

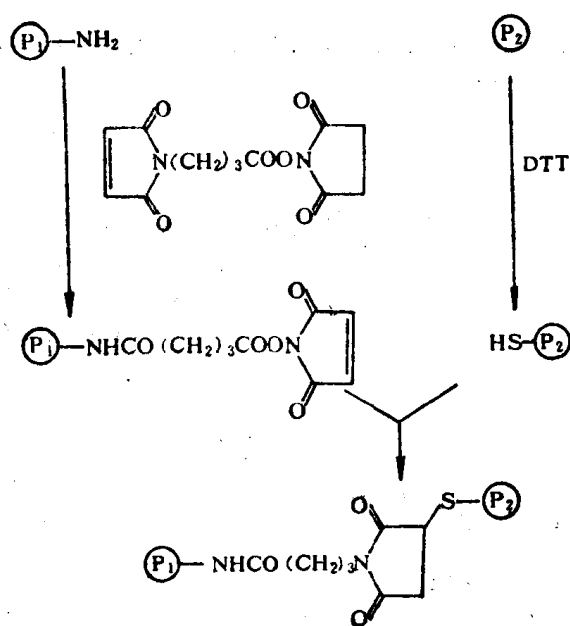


本法用于游离巯基的保护和活化,以便与游离巯基的另一蛋白分子进行巯基交换反应。

### (十九) 马来酰亚胺基类活泼酯法

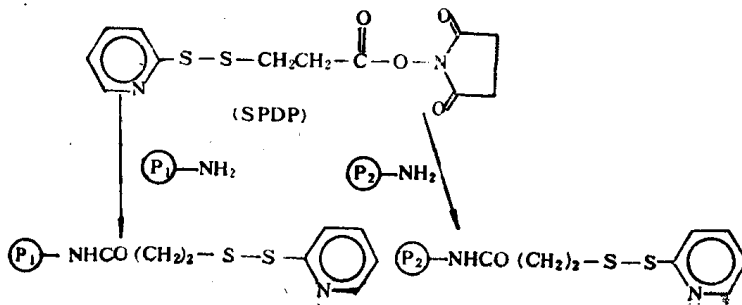
马来酰亚胺基结构中的双键比较活泼,可与游离巯基进行选择加成反应。马来酰亚胺基取代羧酸衍生物的 *N*-羧基琥珀酰亚胺酯试剂与含氨基的药物或蛋白反应,引入马来酰亚胺基,与另一含有游离巯基的分子通过巯基对双键的加成反应连接起来。

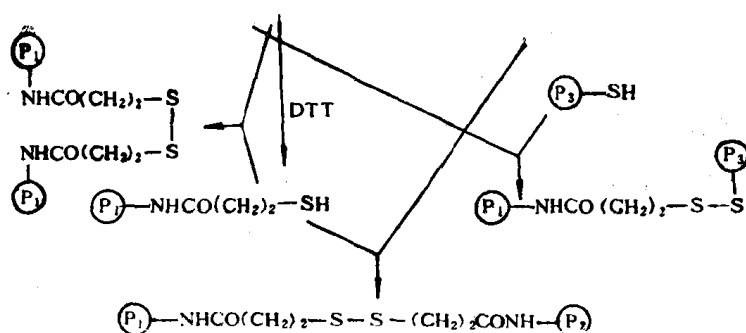
这是一组异型双功能交联剂,常用的有 *N*-羧基琥珀酰亚胺基-间-(*N*-马来酰亚胺基)-苯甲酸酯 (SMB)、*N*-羧基琥珀酰亚胺基-4-(对-马来酰亚胺基)-苯丁酸酯 (SMPB) 等。



### (二十) SPDP 试剂法<sup>[6]</sup>

异型双功能交联剂 *N*-羧基琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)-丙酸酯 (SPDP) 可以通过其分子中的活泼酯组份与氨基反应,也可以通过 2-吡啶二硫基团与脂肪硫醇反应。SPDP 能够于蛋白分子中引入巯基,然后利用巯基交换反应或巯基加成反应与另一分子交联。

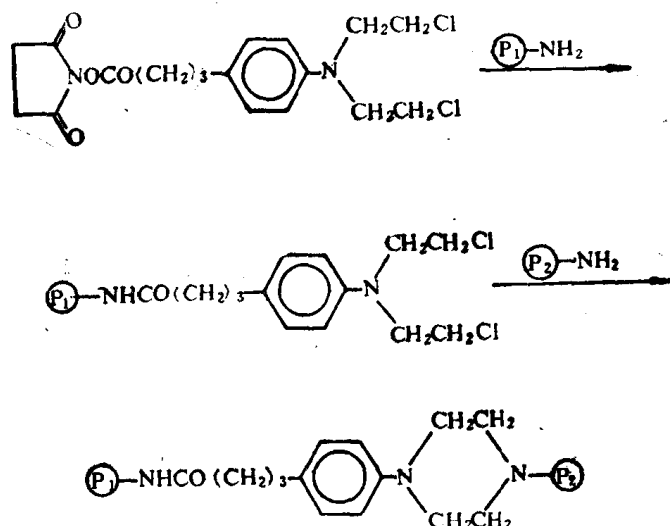




这是目前较为常用的一种交联剂，交联反应条件温和，副反应较少，能够定量地于蛋白分子中引入保护的巯基，且能够方便地测定其含量。同类的交联剂尚有 *N*-羟基琥珀酰亚胺-(4- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -(2-吡啶基-二硫代甲基)-苯甲酸酯 (SMPT)<sup>[7]</sup> 和 *N*-羟基琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫)-丁酸酯 (SPDB<sup>[8]</sup>)。通过在二硫键的  $\alpha$ -位引入位阻性基团如甲基，可以增加交联物中二硫键的稳定性。

## (二十一) 苯丁酸氮芥衍生物法<sup>[9]</sup>

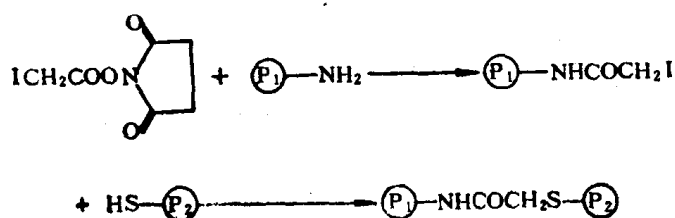
苯丁酸氮芥的 *N*-羟基琥珀酰亚胺基酯或混合酸酐衍生物分子中的活性羧基和氮芥基可以分别与两个蛋白分子中的氨基反应，将两者连接起来：



在中性及微碱性 pH 条件下，氮芥基倾向于与巯基反应，而在较高 pH 时倾向于与氨基反应。

## (二十二) 卤代乙酰衍生物法

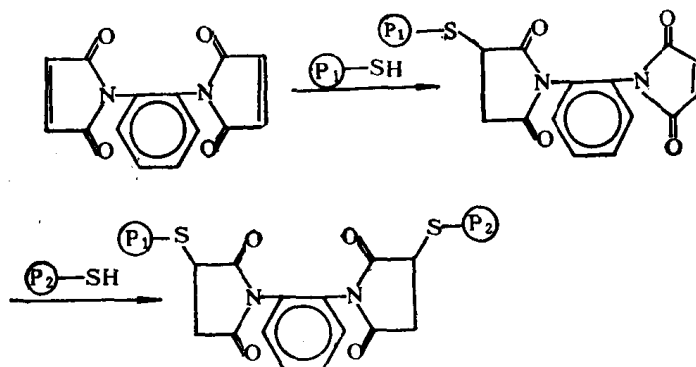
卤代乙酸的活泼酯衍生物如 *N*-羟基琥珀酰亚胺基碘代乙酸酯分子中的活泼酯成分和  $\alpha$ -位活泼卤素可以分别与蛋白分子中的巯基及氨基反应，实现两种分子的交联：



本交联反应迅速, 具有较高选择性, 形成的硫醚键在血浆中十分稳定。

### (二十三) 双马来酰亚胺试剂法<sup>[10]</sup>

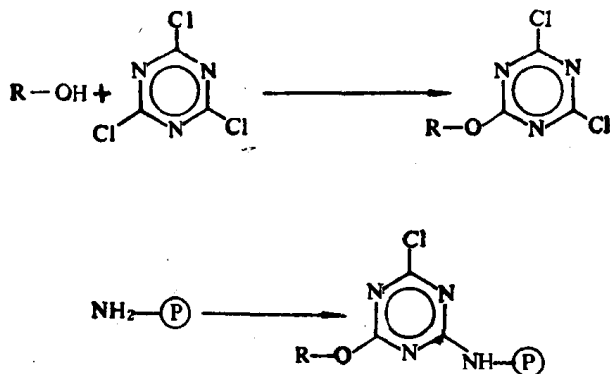
这类试剂的代表为 *N,N'*-邻苯基双马来酰亚胺, 可以连接两个含巯基的分子。



这是一类比较温和的交联剂, 具有较高的反应选择性, 但是易形成同类分子的交联产物。

### (二十四) 三氯三嗪试剂法

三氯三嗪分子可以与含羟基的分子反应, 剩余的第二个氯原子活性稍低, 可为蛋白质上的氨基取代, 实现两分子的交联:



必须注意, 第一个分子中不能含有氨基及巯基等亲核性较强的基团, 否则, 易形成自身聚合。

## 二、交联方法的选择及偶合物的设计

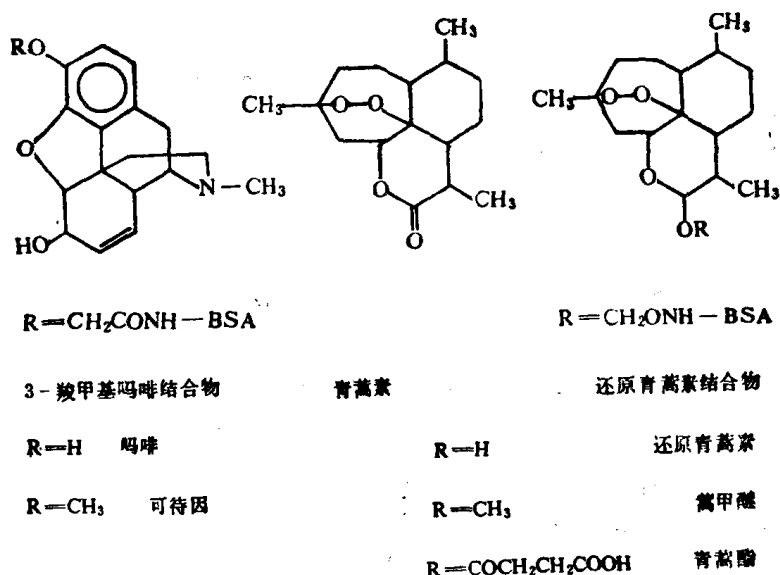
如上所述, 蛋白质交联方法的类型繁多, 虽然能够满足各方面的需要, 但也增加了使用者选择的困难。评价某一交联方法时, 应该考虑以下有关因素: ① 交联反应的效果, 如交联产物组成的均一性; ② 交联反应的产率; ③ 交联过程对生物活性的影响; ④ 交联操作的简便性; ⑤ 交联产物纯化的难易; ⑥ 交联反应结果的可重复性; ⑦ 偶合物的使用目的。理想的交联方法应该保证结合物得率较高, 结合物的组成均一, 结合比合适, 最大限度地保持生物活性, 操作方便, 纯化容易; 在同样条件下, 重复性好。

然而,目前还没有一种交联方法能够同时满足上述要求。因此,必须根据结合物的使用目的,权衡不同方法的优缺点来选择合适的交联方法;最好同时使用几种交联方法进行比较,择其优者而用之。

在人工抗原的制备中,主要要求制备的人工抗原保持半抗原的结构特异性;所用交联方法不要明显改变半抗原结构,要保留抗原决定簇。必要时可在半抗原与载体之间引入一定碳链长度的桥结构,暴露抗原决定簇,以利于产生针对半抗原的抗体。

影响人工抗原的免疫效果的另一重要因素是每分子载体上结合的药物分子数。一般认为药物结合量越大越好,但最佳结合比也取决于半抗原的本质及载体的性质。由于抗体的特异性主要针对半抗原分子中远离偶联键的结构,因此,在设计人工抗原结合物时,应选择远离半抗原特征结构的基团进行交联。例如,与抗-睾酮-17-牛血清白蛋白相比,抗-睾酮-3-牛血清白蛋白能够更好地识别类似结构的甾体化合物。通过桥结构将载体蛋白连接于抗原分子中非生物特异性的位置如雌激素的 C-6 位,黄体酮的 C-6 或 C-11 位,制备的人工抗原结合物具有更好的特异性。由这些结合物产生的抗体能够识别半抗原的所有结构特征。

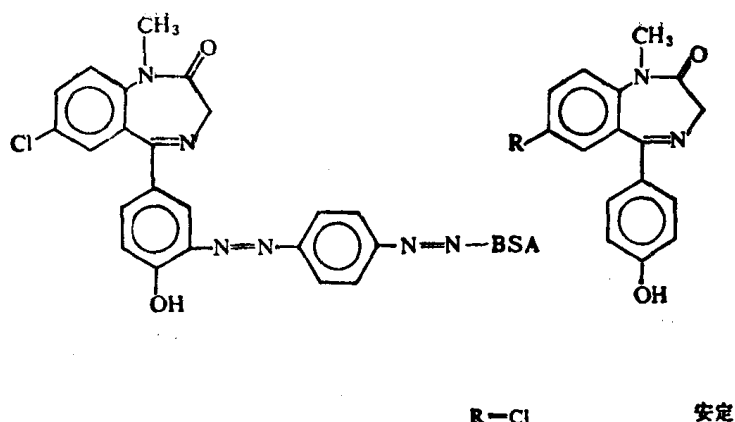
相应地,抗半抗原的抗体对结合部位或邻近结合部位的结构变化是不敏感的,如3-羧甲基吗啡-蛋白结合物诱生的抗体不能区分吗啡和可待因<sup>[11]</sup>。还原青蒿素-蛋白结合物所诱生的抗体可以用于测定青蒿素、蒿甲醚及青蒿酯<sup>[12]</sup>。而通过不同方法制备的安定



的两种蛋白偶合物所产生的抗体,都能特异性地识别安定。这些性质给人工抗原的制备带来极为有利的条件,人们可以适当改变半抗原结合部位的结构或引入交联活性基团,使制备人工抗原的方法更加多样化。

对于酶标抗体的制备,最重要的是同时保持酶和抗体的生物学活性,制备化学组份均一的结合物。异型双功能交联试剂的应用,基本实现了交联反应的控制进行,减少或避免了自身聚合和交叉聚合,保证了交联产物的有效性。

对于载体药物,首先要求其能够在体内定量或定位地释放出具有生物活性的游离药物。为此,连接药物与载体的偶合键必须能够在一定条件下以一定速度解离,而且解离



安定结合物 1

R = N=N—BSA    安定结合物 2

速度能够通过 pH 的改变或体内不同组织小环境的差异(如酶的种类或活性)得到调控, 以达到定向给药的目的; 在制备载体药物结合物时, 对药物分子的结构不宜作永久性的改变, 以免引起生物活性的改变; 其次还要求每一载体能结合足够量的药物分子, 以保证给药效率。

在抗体导向药物的设计和制备中应该考虑以下几点: ① 细胞毒分子-抗体偶合物在到达作用部位以前保持稳定, 在血浆中不被降解; ② 结合物的特异性能够反映载体的特异性, 即具有原载体的专一性识别和结合作用; ③ 结合物到达作用部位以后, 能以某种方式进入细胞, 发挥药理作用, 即结合物本身具有细胞毒活性或结合物进入细胞后能够释放活性形式的药物。

因此, 对细胞毒分子中药物活性所必需的部位不宜作不可逆化学修饰, 而且偶联键要远离活性部位, 以避免立体位阻对生物活性的影响。如甲氨蝶呤分子中的蝶呤部分对二氢叶酸还原酶有高度的亲和性, 是抗代谢活性的必需结构, 对其进行任何改变, 均可导致药物活性的丧失; 但是, 远离蝶呤的谷氨酸残基, 对酶抑制活性影响不大, 可以用作交联基团。又如将细胞毒分子连接于抗体分子中远离抗原结合位点的 Fc 区, 可以最大限度地保持抗体活性<sup>[13]</sup>。

利用血浆与溶酶体 pH 的差别, 设计 pH 敏感的偶联键, 制备药物载体偶合物, 可以实现药物的控制释放<sup>[14,15]</sup>。如柔红霉素通过顺-乌头酸与蛋白形成的结合物, 在生理 pH 时稳定; 而进入细胞后, 可以在溶酶体的酸性条件 (pH4~5) 下解离, 释放柔红霉素原型药物分子, 发挥细胞毒作用<sup>[14]</sup>。

不论使用哪种蛋白载体, 其所能提供的交联基团是相似的。因此, 交联方法的选择以及交联物的设计主要取决于半抗原或药物分子上的功能团结构。下面就根据这些功能团的分类, 分别讨论不同交联方法的应用。

## (一) 羧基

药物或其衍生物分子上的羧基可以通过碳二亚胺法、混合酸酐法等与蛋白分子上的氨基形成酰胺键, 其中碳二亚胺法在这类化合物的偶联反应中的应用最为广泛。血管紧张素和缓激肽、促胃液素、吗啡、前列腺素、托普霉素、1-β-E-阿糖呋喃胞嘧啶、强的松-21-琥珀酸半酯等均可在水溶性碳二亚胺 EDC 的作用下, 与蛋白或多聚氨基酸等载