

DOI: 10.13376/j.cbls/2015165

文章编号: 1004-0374(2015)09-1197-09

· 技术与应用 ·

人血清白蛋白融合技术在药物长效化改造中的应用

王芙蓉*, 杜艳涛, 刘海雄
(宁波市医学科学研究所, 宁波 315020)

摘要: 人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 融合技术是蛋白质药物长效化改造的一种通用技术, 也是目前国内外生物制药研究的热点。在 HSA 融合技术的研究中, 不同融合方式的融合蛋白活性的差异, 提高 HSA 融合蛋白的表达产量以及 HSA 融合蛋白在表达过程中所出现的降解问题成为制约该技术发展的关键。现就人血清白蛋白融合技术在药物长效化改造应用中所涉及的融合方式以及融合蛋白的高效表达和降解问题进行了综述, 希望为 HSA 融合技术的广泛应用提供一定的技术参考。

关键词: 人血清白蛋白; 融合技术; 半衰期; 长效化改造; 基因工程

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A

Applications of human serum albumin fusion technique in drug half-life extension

WANG Fu-Rong*, DU Yan-Tao, LIU Hai-Xiong
(Ningbo Institute of Medical Sciences, Ningbo 315020, China)

Abstract: Human serum albumin fusion technique is a popular technology in extending half life of protein and polypeptide drugs. The fusion technique has recently become an effective tool in biological pharmacy. The distinct activity between fusion proteins of various fusion patterns, how to improve the yields of fusion proteins and the degradation question of fusion proteins are three key points of human serum albumin fusion technique. In this review, we briefly summarize the fusion pattern, high expression and degradation of fusion proteins in drug half-life extension, to provide some technical references for the wide application of human serum albumin fusion technology in the future.

Key words: human serum albumin; fusion technology; half life; prolonged reform; genetic engineering

自 DNA 重组技术诞生以来, 基因工程技术得到了飞速的发展。迄今为止, 已经有 200 多种基因工程药物上市, 数千种处于研发状态。基因工程药物解决了传统的生物制药带来的材料来源困难、免疫原性问题, 以及生产过程中的病毒感染等问题, 产生了不可估量的社会效益和经济效益。但是, 很多重组蛋白质 / 多肽类药物在临床应用上仍存在着半衰期短、生物利用度差等问题。临床上使用的细胞因子类、激素类药物也由于相对分子质量较小, 在体内循环时易被肾小球滤过而排出体外。药物代谢动力学性质不佳限制了这些药物在临床上的应用, 迫切需要对其进行二次改造。

人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 融合技术是指利用基因工程技术, 将目的蛋白基因与 HSA 基因融合后, 选择合适的系统进行表达, 最终获得半衰期更长的药物。HSA 是由 585 个氨基酸残基组成的蛋白质, 相对分子质量约为 66.5×10^3 , 是血浆的主要成分, 也是许多内源因子和外源药物的载体。由于正常情况下不易透过肾小球, 在血浆中的半衰期较长 (可达 14~20 d), 而且体内分布极

收稿日期: 2015-04-15; 修回日期: 2015-06-03

基金项目: 宁波市自然科学基金项目(2013A610277)

*通信作者: E-mail: wangfurongnb@163.com

广, 没有酶学和免疫学活性, 因而是一种理想的生物活性蛋白载体。HSA 融合技术已经发展成为蛋白质药物长效化改造的一个通用技术, 近年来在长效干扰素、粒细胞生长因子以及白介素等药物的研制上得到了广泛的应用^[1-3]。随着 HSA 融合技术的深入研究, 也产生了一些共性问题, 如融合蛋白的表达产物活性有所降低, 融合蛋白的稳定性不够, 出现的降解问题, 以及在商业化生产上如何提高融合蛋白的表达产量等问题。

1 HSA与蛋白质/多肽药物的融合

HSA 融合技术将 HSA 与目标蛋白质/多肽药物融合后进行重组表达。将两个不同结构和功能的蛋白质融合在一起, 蛋白质本身的结构可能对彼此造成一定的空间位阻, 从而影响其稳定性和功能。目前所报道的 HSA 融合蛋白的体外生物学活性均有不同程度的降低, 说明 HSA 对所融合的蛋白质/多肽的活性位点有干扰, 从而影响临床应用的疗效。构建 HSA 融合蛋白时, 按照融合方式的不同, 可以直接把 HSA 和蛋白质/多肽药物的编码基因首尾相连, 也可以在两个编码基因中加入一段被称为连接肽的序列; 按照融合方向的不同, 蛋白质可以融合在 HSA 的 N 端, 也可以融合在 HSA 的 C 端, 或者融合在 HSA 的两端^[4]。不同的融合方式和融合方向对融合蛋白的表达和活性都有影响, 因此, 在 HSA 融合蛋白的开发中有必要考察不同的融合方向以及连接肽的有无、长短和序列对融合蛋白活性、稳定性的影响, 从而选择一种最优的融合方式。

1.1 蛋白质药物与HSA直接融合

药物融合在 HSA 的 N 末端或者 C 末端均可以在保留活性的同时延长其作用的半衰期。将野生型的和突变型的人源化粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) 融合到 HSA 的 C 末端, 得到的两种融合蛋白都保留了 G-CSF 的生物活性, 并且在体内的半衰期得到显著地延长^[1]。内源性蛋白质硫氧还蛋白 (Trx) 被融合到 HSA 的 C 末端, 活性检测发现, HSA-Trx 能显著地减弱乙酰氨基酚诱导的肝炎小鼠血浆中的转氨酶类^[5]。单链抗体可变区基因片段 (single-chain antibody fragment, scFv) 和重组人白细胞介素 (recombinant human interleukin-2, rhIL-2) 也被融合在 HSA 的 N 末端, 所产生的融合蛋白在保留活性的同时半衰期被显著延长^[2,7]。除此之外, HSA 还可以与多种激

素 (胰岛素、人生长激素) 和细胞因子 (干扰素- α 、干扰素- β 和白细胞介素-2) 融合, 产生有活性的融合蛋白^[8]。

尽管上述 N 端和 C 端 HSA 融合蛋白都被证实能提高治疗效果, 而且从技术上来说, 蛋白质是可以融合在 HSA 两端的, 但是在实际研究中发现: HSA 两端都融合蛋白质时表达有异常。Wang 等^[9] 将生长激素片段同时融合于 HSA 的 N 端和 C 端, 融合蛋白没有表达产物。而 Evans 等^[4] 在研究 scFv 的时候也发现, 将 scFv 融合在 HSA 分子的两端所得到的融合蛋白表达量非常低, 只有 0.57~0.82 g/L。可见, 当 HSA 分子的两端都连接上蛋白质之后, 融合蛋白的产生和分泌表达是受到影响的。Schröder^[10] 对近年来真核细胞折叠加工外源蛋白质分子机制的研究表明, 蛋白质折叠、加工及分泌是一个相当复杂的多因素相互协调的系统过程。到目前为止, 对该机制的了解仍十分有限, 还不清楚 HSA 的两端都融合了蛋白之后, 是对融合蛋白的折叠加工过程还是分泌表达过程产生了影响。

药物分子与 HSA 融合后活性会有所下降, 但是下降的程度各不相同。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 165b 与 HSA 融合后仅保留了 VEGF 165b 生物活性的 9%^[11], 而胸腺素 $\alpha 1$ (thymosin $\alpha 1$, T $\alpha 1$) 与 HSA 融合后的活性和未融合时相差不大^[12], Trx 与 HSA 融合后则保留了 Trx 活性的 60%^[13]。Müller 等^[14] 同时将重组的双特异性抗体与 HSA 融合时也发现, 将单链双体分子 (single chain diabodies, scDb) 与 HSA 融合后活性差别不大, 而 scFv2 与 HSA 融合后活性显著下降。不同的药物分子与 HSA 融合后活性下降的程度不同, 相同的药物分子与 HSA 的融合方向和方式不同所产生的融合蛋白活性也不同, 有的甚至会导致目标蛋白功能的丧失或表达的失败^[15]。Ding 等^[16] 研究了 2 个重复序列的人脑钠肽 (human brain natriuretic peptide, hBNP) 与 HSA 融合的蛋白质活性, BNP 融合于 HSA 的 C 端的活性远高于融合在 N 端的活性。将白细胞介素-28B (interleukin-28B, IL-28B) 融合在 HSA 的 N 末端和 C 末端, 活性研究发现: 只有将 IL-28B 融合在 HSA 的 C 末端时, 其生物活性才得以保留^[17]。融合表达时, 一方面, HSA 和目标药物结构域的 N 端和 C 端首尾相连, 可能会影响其结构域在这些区域的折叠和天然构象, 导致功能受影响^[3,9]; 另一方面, 直接融合的时候, 目标药物与底物的结合可能在空间上受到 HSA 结构域的屏

蔽和阻碍, 导致药物的活性降低^[15]。由于药物分子与 HSA 直接融合会导致折叠、表达和活性降低等问题, 一些研究者们试图在 HSA 和目标蛋白之间引入连接肽来缓解蛋白质的结构对彼此功能造成的影响。

1.2 蛋白质药物与HSA通过连接肽融合

连接肽是指两个被融合的蛋白质或者结构域之间存在的一段多肽, 通常与两者的活性没有直接关系, 其长度从几个到上百个氨基酸残基不等^[18-19]。目前已经有多种多肽序列被用作连接肽, 并且在实际应用中能够成功避免不同结构域在折叠过程中的相互干扰^[20-21]。其中研究比较多的主要有两种, 即以无规卷曲形式存在的柔性连接肽和以螺旋形式存在的连接肽。聚甘氨酸或者富含甘氨酸的连接肽是典型的柔性连接肽, 这种连接肽能够提供目标药物作用过程中所需的柔性, 使各个结构域不相互干扰, 因此, 得到非常广泛的应用^[22-23]。最为经典的柔性连接肽是 Huston 等^[24]提出的 $(GGGG)_n$ (一般 $n \leq 6$), 已经几乎成为一种“通用连接肽”。多种蛋白质与 HSA 通过该柔性连接肽融合表达后, 得到具有稳定表达和活性的融合蛋白^[12,25]。

以螺旋形式存在的连接肽主要是 $[A(EAAAK)_n]_A$ 序列, 能形成相对稳定的二级结构, 给两个相连的结构域提供相对稳定且可控的隔离效果。通过进一步研究 $(EAAAK)_n$ 在融合蛋白中的构象证实, $(EAAAK)_n$ 能形成螺旋结构, 而且随着 $(EAAAK)_n$ 中结构单元数目 n 的增多, 两个被相连的结构域之间的距离增大^[26-27]。Amet 等^[28]在不同融合蛋白中引入 $(EAAAK)_2$, 发现蛋白质的表达量能分别提高 1.7~11.2 倍。

另外, 重组人白介素-1受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1Ra)通过刚性连接肽 PAPAP 连接在 HSA 的 N 末端, 活性研究发现 IL-1Ra-HSA 能够成功保留 IL-1Ra 的拮抗活性^[29]。

已经上市的用于治疗 2 型糖尿病药物 albiglutide 也是将 2 个胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 串联后与 HSA 融合。中间的 GLP-1 有点类似于连接肽的作用, 可以缓和 GLP-1 单体融合所导致的活性降低^[30-31]。Kim 等^[32]也构建了两种方式的融合蛋白 GLP-1/HSA 和 AGLP-1-L/HSA, 其中连接肽的序列为 $(GGGGSGGGGSGGGAS)$, 与 GLP-1/HSA 相比 AGLP-1-L/HSA 能够显著降低血浆中葡萄糖的水平。

连接肽的有无和序列的差异对融合蛋白的表达

和活性有一定的影响, 但并不是所有的连接肽都能提高融合蛋白的表达量和生物活性。de Bold 等^[33]将心钠素 (atrial natriuretic factor, ANF) 与 HSA 融合, 构建了 3 种融合方式的融合蛋白: H6HSA-ANF、ANF-HSA H6 和 H6HSA-G6-ANF, 检测发现 H6HSA-G6-ANF 的表达量是最高的。将不同拷贝数的生长抑素 (somatostatin, SS) 28 通过 3 种方式与 HSA 融合得到的融合蛋白 $(SS28)_2$ -HSA、 $(SS28)_3$ -HSA 和 HSA- $(SS28)_2$, 多融合的一个拷贝的 SS28 也可被认为可以起到连接肽的作用, 结果发现 $(SS28)_3$ -HSA 的表达水平远远低于 $(SS28)_2$ -HSA 和 HSA- $(SS28)_2$, 3 种融合蛋白都能够抑制血液中生长激素的分泌, 但是 $(SS28)_2$ -HSA 的活性是最高的^[34]。同样, 将不同拷贝的 SS14 与 HSA 融合得到 $(SS14)_2$ -HSA、 $(SS14)_3$ -HSA 和 HSA- $(SS14)_3$, 由于拷贝数量的增加, $(SS14)_3$ -HSA 和 HSA- $(SS14)_3$ 的表达水平远远低于 $(SS14)_2$ -HSA。不管是生物活性还是表达产量, $(SS14)_2$ -HSA 都是 3 种融合方式中效果最好的^[35]。因此, 在融合时引入连接肽或者提高融合的小分子蛋白质的拷贝数量不一定能提高融合蛋白的表达量和生物活性, 这主要取决于所融合分子的性质和结构特征。

在 HSA 融合蛋白的构建和应用过程中, 之所以会出现融合蛋白的表达和活性受到损失, 甚至丧失等问题, 主要是由于对融合蛋白各个结构域之间的相互影响及其分子机理还缺乏足够的认识。目前, 还没有一个通用的方法可以解决这一问题。只能通过不断的尝试, 选择不同的融合方式, 在一定程度上调整结构域之间的空间关系, 从而改变各结构域之间的相互作用。随着分子模拟技术的迅速发展, 可以利用分子动力学模拟对融合蛋白的分子设计进行优化筛选, 进而为实验提供可行性方案设计。虽然目前还难以对大分子进行精确的模拟, 但其在预测和研究结构域相互作用中将会发挥越来越重要的作用, 为融合蛋白构建策略提供理论指导。另一方面, HSA 分子包含 3 个结构域, 为了减少 HSA 对所融合的小分子药物的空间影响, 可以考虑将 HSA 分子的第三个结构域与药物分子融合。除了蛋白质与蛋白质融合, 在保留功能的前提下, 也可以把结构域与结构域之间融合。

2 融合蛋白的高效表达

随着基因工程技术的发展, 很多重组蛋白得到了有效地外源表达。目前, 用来表达研究蛋白质的系统可以分为原核表达系统和真核表达系统, 按细

胞类别分,可以分为大肠杆菌表达系统、昆虫细胞表达系统、酵母表达系统、哺乳动物细胞表达系统^[36]。HSA融合蛋白可以通过不同的表达系统被表达,这主要取决于需要表达的融合蛋白本身的性质,简单的分子GLP-1、干扰素 α -2b、G-CSF还有一些抗体片段等可以通过毕赤酵母或酿酒酵母来表达,而一些需要翻译后进行特别修饰的复杂分子,如凝血因子,则需要通过哺乳动物细胞培养来获得^[37]。经过一系列的研发和实践,酵母表达系统被认为是一种表达HSA融合蛋白的强有力工具。

毕赤酵母表达系统自1969年由Ogata等^[38]首次发掘,后经研究和开发,实现了外源基因在该体系中的高效表达^[39]。随着美国Invitrogen公司推出的毕赤酵母表达体系商业化试剂盒,外源蛋白在毕赤酵母中的表达变得简便易行,近10年来,毕赤酵母表达系统的利用率大幅增长。迄今为止,已有1000多种外源蛋白在该系统中获得成功表达,涉及植物、无脊椎动物、非人类脊椎动物、人类、细菌、真菌、病毒等多个物种^[40],主要以非糖蛋白为主^[41]。此外,近年来毕赤酵母的类人糖基化改造研究取得了巨大进展,更是开辟了毕赤酵母在糖蛋白重组表达中的应用前景^[42-43]。首个由毕赤酵母表达系统生产的药用蛋白Ecallantide (KALBITOR[®])已获FDA批准^[44],说明该表达系统的生物安全性已经得到了认可。总之,毕赤酵母表达系统兼具了原核表达系统操作简单、易于工业化高密度培养的优点以及真核表达系统对外源蛋白进行糖基化、磷酸化等翻译后修饰的特点。同时,表达的外源蛋白可通过信号肽的介导分泌到胞外,而酵母内源性蛋白较少分泌,大大简化了后续的分离纯化处理。它既具有原核生物一样易于大批量培养的特点,又有哺乳动物细胞一样近似于天然蛋白的表达修饰形式,还有成本低廉的培养条件,都成为酵母表达系统不可比拟的优势。

影响外源蛋白在酵母中分泌表达效率的因素包括:外源基因的拷贝数和自身特性、启动子及信号肽效率、外源蛋白在内质网上的加工,以及外源蛋白的分泌效率等^[41,45]。其中外源基因的拷贝数量对胞内蛋白质的表达有着明显的影响^[46-47]。而对分泌表达的蛋白质来说情况就复杂得多,分泌蛋白相对胞内表达蛋白来说还有着信号肽切割效率、蛋白质折叠效率和分泌效率等可能的限制因素。因此,增加拷贝数量有时不但不会提高表达量,反而会降低表达量^[48]。虽然外源基因多拷贝对HSA融合蛋白

表达量影响程度有所不同,但是所有结果都表明HSA融合蛋白表达量与基因的拷贝数并不成线性关系。因此,增加外源基因拷贝数对HSA融合蛋白表达量的影响还十分复杂。

选择强有力的启动子与增加目的基因的转录水平直接相关,有助于提高外源蛋白的分泌表达量^[49],但同时也加重了内质网上蛋白质正确折叠加工的负担,容易导致分泌途径的过载^[50]。在外源蛋白的分泌表达过程中,新生肽首先要在内质网分子伴侣的辅助下,在内质网中进行正确的折叠与组装,才会被输往高尔基体进行进一步的修饰并最终通过运输小泡转运到胞外^[41,45]。没有形成正确空间结构的蛋白质会被降解或聚集在内质网上。大量的研究表明,新生肽在内质网内的折叠加工受限是影响外源蛋白高效分泌表达的最主要的限速步骤^[51-52]。内质网中辅助新生多肽进行正确折叠加工的分子伴侣主要包括:结合免疫球蛋白蛋白(binding immunoglobulin protein, BiP)、蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)和ERO(endoplasmic reticulum oxidoreductin)^[53-55]。Shen等^[47]将多拷贝的IL-1ra与PDI共表达,分泌到胞外的IL-1ra-G-HSA蛋白量提高了约2.3倍。Inan等^[48]将PDI与Na-ASP1共表达后,胞外分泌的Na-ASP1和胞内积聚的Na-ASP1量都表现为增加。同时,也有研究报道在酿酒酵母中共表达BiP相关的蛋白后,HSA融合蛋白的表达量有所提高^[56]。

总之,毕赤酵母表达系统已发展成为一个较为理想的蛋白质表达系统,被国内外广泛应用于生产外源蛋白。目前在宿主菌的选择、载体的启动子和信号肽选择,发酵条件的优化等方面已经进行了深入的研究,但是立足基因水平的研究仍不多见,如果能在蛋白质合成和分泌的限速步骤中找出某些规律,将会从本质上显著提高蛋白质的表达水平。

3 融合蛋白表达过程中的降解

随着越来越多的蛋白质在毕赤酵母系统中被表达,该系统的一些缺点和不足也逐渐显露出来。其中最普遍的一个问题是分泌表达过程中的降解问题。重组蛋白在毕赤酵母中高密度发酵表达,均会出现不同程度的降解,这不但会降低目的蛋白的产量和生物活性^[57],还会给下游纯化带来困难^[58]。对于重组蛋白发生降解的原因,目前普遍的观点认为是:高密度发酵过程中,随着培养时间的延长、发酵液中代谢物积累、营养物质逐渐耗尽,形成不利于酵母生存的环境,促进了酵母自身蛋白水解酶

的活化、分泌或因菌体自溶释放到发酵液中, 从而造成重组蛋白的降解^[74]。

针对蛋白酶水解所采取的措施主要涉及培养水平、细胞水平、蛋白质水平等3个方面^[40]。现已发现, 酵母细胞内各种蛋白水解酶的量会随着培养过程中营养条件的改变而发生变化, 如培养过程中的饥饿胁迫、碳源、氮源改变等。在高密度发酵过程中, 当毕赤酵母从甘油生长阶段转到甲醇诱导阶段时, 培养基中各种蛋白酶的含量显著增加, 并且随着诱导时间的延长而增加^[59]。

3.1 在培养水平上

因蛋白水解酶的活性受温度、pH、离子等环境因素的影响较大, 所以, 选择适当的发酵参数, 通过培养条件的优化, 能够在一定程度上降低重组蛋白的降解, 其主要措施包括: (1) 改变培养的pH、温度或时间, 降低蛋白酶的活性^[60-62]; (2) 添加一些特定氨基酸或者酪蛋白水解物作为蛋白酶的竞争底物或者添加特异性的蛋白酶抑制剂^[63-64]。另外, 还可以通过控制生长速率和使用蛋白酶抑制剂来抑制蛋白酶的活性。这些方法能够在一定程度上减少因蛋白酶水解而造成的目的蛋白的降解, 但效果有限, 并且不是对所有的重组蛋白都适用。

毕赤酵母的遗传背景会影响目的基因的转录水平、翻译效率、分泌途径、质粒稳定性及拷贝数等多个方面^[65]。

3.2 在细胞水平上

利用基因工程手段, 将宿主细胞内的特定蛋白水解酶编码基因敲除, 是一种从根本上解决重组蛋白降解问题的有效方法, 这一方法已经在酵母表达系统中有所应用^[66-68]。其中涉及的蛋白水解酶主要包括液泡蛋白酶和分泌途径中的蛋白酶^[69]。

酵母液泡中含有大量的非特异性蛋白水解酶, 在蛋白质翻译后修饰过程中起着重要的作用。目前已知的酵母液泡蛋白酶主要包括内切蛋白酶、羧肽酶、氨肽酶和二肽氨肽酶等, 多数液泡蛋白酶以无活性酶原的形式存在。但是, Protease A (PrA) 和 Protease B (PrB) 两个内切蛋白酶的酶原具有自我催化、剪切形成活性蛋白酶的功能, 介导了多数其他液泡蛋白酶酶原的激活^[69-70], 是两个上游调控的关键酶。PEP4 编码 PrA, PRB1 编码 PrB, 由于 PrA 可以加工许多包括 PrB 在内的下游水解酶, 从无活性的前体变成有剪切活性的水解酶, 因此, 将毕赤酵母的 PrA 敲除后的宿主体内的水解酶整体活性将大大降低^[71]。对毕赤酵母中 PrA 敲除的研究也证实:

利用 PrA 缺陷型宿主明显提高了完整蛋白质的纯化得率^[72-73]。PrB 水解酶与 PrA 一样也是一种上游的水解酶^[74]。Cereghino 和 Cregg^[75] 研究发现, 将 PrA 敲除的宿主中仍然有 50% 的 PrB 活性, 要彻底除去 PrA 和 PrB 的活性, 必须将 PEP4 基因和 PRB1 基因同时敲除。目前已经有 3 种液泡蛋白酶缺陷型宿主商品化: SMD1168 (PrA 缺陷)、SDM1165 (PrB 缺陷) 和 SDM1163 (PrA 和 PrB 双重缺陷)。

分泌途径的蛋白酶主要分布在细胞质膜以及高尔基体, 主要是用于对蛋白前体的处理, 如切除蛋白质的 pre-、pro- 序列。分泌途径中主要的蛋白酶包括: 信号肽切割酶、KEX2 蛋白酶、KEX1 蛋白酶、二肽氨肽酶 A 和 yapsin(YPS)^[69]。在酵母表达系统中, YPS 的存在也导致了多种外源蛋白的不同程度的降解^[76-77]。在酿酒酵母中表达 HSA 时发现相对分子质量为 4.5×10^4 大小的降解条带产生, Balance 等^[78] 证明该降解主要是由于 YPS 水解的作用, 将酿酒酵母中的 YPS1 基因敲除后全长蛋白相对于降解片段的比例明显上升。Werten 和 de Wolf^[79] 于 2005 年首次克隆并表征了毕赤酵母中的 YPS1。Silva 等^[80] 发现将毕赤酵母 GS115 中的 YPS1 基因敲除有利于分泌表达一种胶原蛋白聚合物。Yao 等^[81] 后来也报道了利用 YPS1 缺失型的毕赤酵母 GS115 宿主可使 HSA-AX15 (R13K) 融合蛋白的降解大大改善。2009 年毕赤酵母的基因组序列测定完成后, 人们又发现其他 6 种 YPS^[82]。Wu 等^[83] 利用同源重组的方式将毕赤酵母中的 7 种 YPS 基因进行单一敲除, 构建了 7 种单一 YPS 缺陷型宿主并分析了它们对改善 HSA/PTH (1~34) 融合蛋白降解的作用, 结果表明, YPS1 敲除对降解的改善程度最大。Cho 等^[77] 将酿酒酵母中的 5 种 YPS 按照不同组合进行多重敲除, 结果发现, 同时敲除 YPS1、YPS2 和 YPS3 可以使 PTH (1~84) 的降解较 YPS1 单一敲除有明显的改善, 并且将 5 种 YPS 全部敲除对降解的改善最大。Wu 等^[83] 在研究 HSA/PTH (1~34) 融合蛋白的重组表达过程中发现, 除了 YPS 之外, PrA 也是导致 HSA/PTH (1~34) 融合蛋白降解产生的主要因素, 与单纯 PEP4 敲除或者 YPS1 敲除相比, PEP4 和 YPS1 双重敲除的降解程度最低, 完整蛋白的产率最高。

理论上, 将导致外源蛋白降解的所有关键蛋白酶同时敲除, 能够最大程度降低外源蛋白的降解, 但是将蛋白酶敲除有可能会影响酵母的正常生理状态, 如宿主细胞活力降低, 生长速率减慢, 甚至影

响外源蛋白的表达效率,虽然可以使降解程度降低,但同时也降低了表达量^[72]。然而,Brankamp等^[84]在重组表达 ghilanten 时发现,PrA 缺陷型宿主不仅表达量比野生型宿主高,而且细胞生长速率也相对较高。因此,是否要利用蛋白酶缺陷型宿主作为表达宿主仍需根据目的蛋白的性质综合考量。

3.3 蛋白质水平上

目的蛋白以及融合蛋白的连接肽中存在的易受蛋白水解酶攻击的脆弱位点,也是目的蛋白不稳定因素之一。实际应用中,可以将非活性位点的氨基酸进行突变,消除蛋白酶水解作用位点^[85]。另外,可以通过定点突变和基团化修饰改善蛋白质的疏水性和刚性,来提高其热稳定性。目的基因中最好不要含有 pro-glu-ser-thr 这样的序列,因为这个序列是激活蛋白水解酶的作用底物,会影响表达;也不要含有 x-phe-x-arg-gln 和 gln-arg-x-phe-x 这样的序列(x = 任何氨基酸),因为这些序列容易受到溶酶体的切割。还可将目的蛋白与一种在毕赤酵母中稳定的蛋白伴侣融合表达,通过改变目的蛋白的性质来提高稳定性,但这种改善会带来后期酶切的问题。

蛋白酶降解是酵母表达系统的一个共同的缺陷,几乎所有在酵母中表达的重组蛋白都存在表达蛋白质降解的问题,只是程度不同而已。蛋白质发生降解的原因可能是复杂和多方面的,没有单一的策略可以解决所有降解的问题,上述策略可以给我们提供参考,但应用时不能绝对解决降解问题,只是降低了降解的程度,甚至对于个别重组蛋白没有任何效果。需要根据表达的重组蛋白的不同,尝试不同的策略,或者将几种策略组合,来最大程度地降低重组蛋白的降解。

4 展望

总之,半衰期短和生物利用度差限制了许多药物的临床应用。利用 HSA 融合技术延长药物的半衰期,改善药物的代谢动力学性质具有非常重要的意义。虽然 HSA 融合技术也已经发展成为蛋白质药物长效化改造的一个通用技术,但是在药物蛋白与 HSA 的融合设计以及后期融合蛋白的生产和纯化过程中仍然存在着诸多问题。目前对于融合策略的选择尚没有可靠的理论指导,只能采取试错办法。随着分子动力学模拟技术的发展,今后可以预测和研究药物蛋白与 HSA 的结构域相互作用,为 HSA 融合蛋白的构建策略提供理论指导。另外,后基因组时代的各种组学方法研究的应用,也将有助于进

一步了解毕赤酵母的生理学特性代谢机制和蛋白分泌表达的分子机制,从一个系统水平综合考虑各种限制因素,为毕赤酵母表达系统的优化改造和 HSA 融合技术的应用带来新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] Huang YS, Wen XF, Yang ZY, et al. Development and characterization of a novel fusion protein of a mutated granulocyte colony-stimulating factor and human serum albumin in *Pichia pastoris*. PLoS One, 2014, 9(12): e115840
- [2] Guan B, Chen F, Lei J, et al. Constitutive expression of a rhIL-2-HSA fusion protein in *Pichia pastoris* using glucose as carbon source. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 171(7): 1792-804
- [3] Zhao HL, Xue C, Wang Y, et al. Circumventing the heterogeneity and instability of human serum albumin-interferon- α b fusion protein by altering its orientation. J Biotechnol, 2007, 131: 245-52
- [4] Evans L, Hughes M, Waters J, et al. The production, characterisation and enhanced pharmacokinetics of scFv-albumin fusions expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Protein Expr Purif, 2010, 73(2): 113-24
- [5] Tanaka R, Ishima Y, Maeda H, et al. Albumin fusion prolongs the antioxidant and anti-inflammatory activities of thioredoxin in mice with acetaminophen-induced hepatitis. Mol Pharm, 2014, 11(4): 1228-38
- [6] Lei J, Guan B, Li B, et al. Expression, purification and characterization of recombinant human interleukin-2-serum albumin (rhIL-2-HSA) fusion protein in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 2012, 84(1): 154-60
- [7] Berger V, Richter F, Zettlitz K, et al. An anti-TNFR1 scFv-HSA fusion protein as selective antagonist of TNF action. Protein Eng Des Sel, 2013, 26(10): 581-7
- [8] Sharkey RM, Karacay H, Litwin S, et al. Improved therapeutic results by pretargeted radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a new recombinant, trivalent, anti-CD20, bispecific antibody. Cancer Res, 2008, 68(13): 5282-90
- [9] Wang F, Wu M, Liu W, et al. Expression, purification, and lipolytic activity of recombinant human serum albumin fusion proteins with one domain of human growth hormone in *Pichia pastoris*. Biotechnol Appl Biochem, 2013, 60(4): 405-11
- [10] Schröder M. Engineering eukaryotic protein factories. Biotechnol Lett, 2008, 30(2): 187-96
- [11] Zhu RY, Xin X, Dai HY, et al. Expression and purification of recombinant human serum albumin fusion protein with VEGF165b in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 2012, 85(1): 32-7
- [12] Chen JH, Zhang XG, Jiang YT, et al. Bioactivity and pharmacokinetics of two human serum albumin-thymosin α 1-fusion proteins, rHSA-T α 1 and rHSA-L-T α 1, expressed in recombinant *Pichia pastoris*. Cancer Immunol Immunother, 2010, 59(9): 1335-45

- [13] Ikuta S, Chuang VT, Ishima Y, et al. Albumin fusion of thioredoxin--the production and evaluation of its biological activity for potential therapeutic applications. *J Control Release*, 2010, 147(1): 17-23
- [14] Müller D, Karle A, Meissburger B, et al. Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin. *J Biol Chem*, 2007, 282(17): 12650-60
- [15] 黄子亮, 张翀, 吴希, 等. 融合酶的设计和应用研究进展. *生物工程学报*, 2012, 28(4): 393-409
- [16] Ding Y, Peng Y, Deng L, et al. The effects of fusion structure on the expression and bioactivity of human brain natriuretic peptide (BNP) albumin fusion proteins. *Curr Pharm Biotechnol*, 2014, 15(9): 856-63
- [17] Zhao J, Si Y, Cheng M, et al. Albumin fusion of interleukin-28B: production and characterization of its biological activities and protein stability. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64301
- [18] George RA, Heringa J. An analysis of protein domain linkers: their classification and role in protein folding. *Protein Eng*, 2002, 15(11): 871-9
- [19] Wriggers W, Chakravarty S, Jennings PA. Control of protein functional dynamics by peptide linkers. *Biopolymers*, 2005, 80(6): 736-46
- [20] Osborn BL, Sekut L, Corcoran M, et al. Albutropin: a growth hormone albumin fusion with improved pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats and monkeys. *Eur J Pharmacol*, 2002, 456(1-3): 149-58
- [21] Duttaroy A, Kanakaraj P, Osborn BL, et al. Development of a long-acting insulin analog using albumin fusion technology. *Diabetes*, 2005, 54(1): 251-8
- [22] Wang YS, Yongster S, Grace M, et al. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon α -2b and its therapeutic applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(4): 547-70
- [23] Spahr C, Shi SD, Lu HS. O-Glycosylation of glycine-serine linkers in recombinant Fc-fusion proteins: attachment of glycosaminoglycans and other intermediates with phosphorylation at the xylose sugar subunit. *MAbs*, 2014, 6(4): 904-14
- [24] Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(16): 5879-83
- [25] Tian S, Li Q, Yao W, et al. Construction and characterization of a potent, long-lasting recombinant human serum albumin-interferon α 1 fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2013, 90(2): 124-8
- [26] Arai R, Ueda H, Kitayama A, et al. Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein. *Protein Eng*, 2001, 14(8): 529-32
- [27] Arai R, Wriggers W, Nishikawa Y, et al. Conformations of variably linked chimeric proteins evaluated by synchrotron X-ray small-angle scattering. *Proteins*, 2004, 57(4): 829-38
- [28] Amet N, Lee HF, Shen WC. Insertion of the designed helical linker led to increased expression of tf-based fusion proteins. *Pharm Res*, 2009, 26(3): 523-8
- [29] 黄毅, 胡磊, 杨艳群, 等. IL-1Ra-HSA融合蛋白的构建、生物学活性和药动学分析. *药学学报*, 2012, 47(9): 1210-8
- [30] Matthews JE, Stewart MW, De Boever EH, et al. Pharmacodynamics, pharmacokinetics, safety, and tolerability of albiglutide, a long-acting glucagon-like peptide-1 mimetic, in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(12): 4810-7
- [31] Bush MA, Matthews JE, De Boever EH, et al. Safety, tolerability, pharmacodynamics and pharmacokinetics of albiglutide, a long-acting glucagon-like peptide-1 mimetic, in healthy subjects. *Diabetes Obes Metab*, 2009, 11(5): 498-505
- [32] Kim YM, Lee SM, Chung HS. Novel AGLP-1 albumin fusion protein as a long-lasting agent for type 2 diabetes. *BMB Rep*, 2013, 46(12): 606-10
- [33] de Bold MK, Sheffield WP, Martinuk A, et al. Characterization of a long-acting recombinant human serum albumin-atrial natriuretic factor (ANF) expressed in *Pichia pastoris*. *Regul Pept*, 2012, 175(1-3): 7-10
- [34] Ding Y, Fan J, Li W, et al. The effect of albumin fusion structure on the production and bioactivity of the somatostatin-28 fusion protein in *Pichia pastoris*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(6): 997-1006
- [35] Ding Y, Fan J, Li W, et al. The effect of albumin fusion patterns on the production and bioactivity of the somatostatin-14 fusion protein in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 170(7): 1637-48
- [36] Krensky AM, Clayberger C. Granulysin: a novel host defense molecule. *Am J Transplant*, 2005, 5(8): 1789-92
- [37] Sleep D, Cameron J, Evans LR. Albumin as a versatile platform for drug half-life extension. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(12): 5526-34
- [38] Ogata K, Nishikawa H, Ohsugi M. A yeast capable of utilizing methanol. *Agric Biol Chem*, 1969, 33: 1519-20
- [39] Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 2000, 16(1): 23-52
- [40] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, 22(4): 249-70
- [41] Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93 (1): 31-9
- [42] Hamilton SR, Gerngross TU. Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18 (5): 387-92
- [43] Jacobs PP, Geysens S, Vervecken W, et al. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nat Protoc*, 2009, 4 (1): 58-70
- [44] Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks. *Nat Biotechnol*, 2010, 28 (9): 917-24
- [45] Idiris A, Tohda H, Kumagai H, et al. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86 (2): 403-17

- [46] Nordén K, Agemark M, Danielson JÅ, et al. Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*. BMC Biotechnol, 2011, 11: 47
- [47] Shen Q, Wu M, Wang HB, et al. The effect of gene copy number and co-expression of chaperone on production of albumin fusion proteins in *Pichia pastoris*. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 96(3): 763-72
- [48] Inan M, Aryasomayajula D, Sinha J, et al. Enhancement of protein secretion in *Pichia pastoris* by overexpression of protein disulfide isomerase. Biotechnol Bioeng, 2006, 93(4): 771-8
- [49] Scorer CA, Clare JJ, McCombie WR, et al. Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. Biotechnology: N Y, 1994, 12 (2): 181-4
- [50] Parekh R, Forrester K, Witttrup D. Multicopy overexpression of bovine pancreatic trypsin inhibitor saturates the protein folding and secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. Protein Expr Purif, 1995, 6 (4): 537-45
- [51] Huang D, Gore PR, Shusta EV. Increasing yeast secretion of heterologous proteins by regulating expression rates and post-secretory loss. Biotechnol Bioeng, 2008, 101 (6): 1264-75
- [52] Xu P, Robinson AS. Decreased secretion and unfolded protein response up-regulation are correlated with intracellular retention for single-chain antibody variants produced in yeast. Biotechnol Bioeng, 2009, 104 (1): 20-9
- [53] Gething MJ. Role and regulation of the ER chaperone BiP. Semin Cell Dev Biol, 1999, 10 (5): 465-72
- [54] Tu BP, Weissman JS. The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. Mol Cell, 2002, 10(5): 983-94
- [55] Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. Biochim Biophys Acta, 2004, 1699 (1-2): 35-44
- [56] Payne T, Finnis C, Evans LR, et al. Modulation of chaperone gene expression in mutagenized *Saccharomyces cerevisiae* strains developed for recombinant human albumin production results in increased production of multiple heterologous proteins. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(24): 7759-66
- [57] Brierley RA. Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I). Methods Mol Biol, 1998, 103: 149-77
- [58] Jahic M. Process techniques for production of recombinant proteins with *Pichia pastoris* [D]. Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology, S-10 691 Stockholm, Sweden: 2003
- [59] Sinha J, Plantz BA, Inan M, et al. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-tau. Biotechnol Bioeng, 2005, 89 (1): 102-12
- [60] 张文明, 洪静, 孙天玮, 等. 长链人胰岛素样生长因子-1在毕赤酵母中表达条件的优化. 中国生物制品学杂志, 2012, 25 (4): 499-501
- [61] Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, et al. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. J Biosci Bioeng, 2000, 89 (1): 55-61
- [62] Jahic M, Gustavsson M, Jansen AK, et al. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. J Biotechnol, 2003, 102 (1): 45-53
- [63] Clare JJ, Romanos MA, Rayment FB, et al. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. Gene, 1991, 105 (2): 205-12
- [64] Shi X, Karkut T, Chamankhah M, et al. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 2003, 28 (2): 321-30
- [65] Eckart MR, Bussineau CM. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. Curr Opin Biotechnol, 1996, 7(5):525-30
- [66] Gonzalez-Lopez CI, Szabo R, Blanchin-Roland S, et al. Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Genetics, 2000, 160 (2): 417-27
- [67] Idiris A, Bi K, Tohda H, et al. Construction of a protease-deficient strain set for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, useful for effective production of protease-sensitive heterologous proteins. Yeast, 2006, 23 (2): 83-99
- [68] Kuroda K, Kitagawa Y, Kobayashi K, et al. Antibody expression in protease-deficient strains of the methylotrophic yeast *Ogataea minuta*. FEMS Yeast Res, 2007, 7 (8): 1307-16
- [69] Zhang Y, Liu R, Wu X. The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Ann Microbiol, 2007, 57(4): 553-60
- [70] Van Den Hazel HB, Kielland-Brandt MC, Winther JR. Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. Yeast, 1996, 12 (1): 1-16
- [71] Ammerer G, Hunter CP, Rothman JH, et al. *PEP4* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. Mol Cell Biol, 1986, 6(7): 2490-9
- [72] Gleeson MG, White C, Meininger D, et al. Generation of protease-deficient strains and their use in heterologous protein expression. Methods Mol Biol 1998, 103: 81-94
- [73] Li Z, Xiong F, Lin Q, et al. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 2001, 21 (3): 438-45
- [74] Moehle CM, Tizard R, Lemmon SK, et al. Protease B of the lysosomelike vacuole of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is homologous to the subtilisin family of serine proteases. Mol Cell Biol, 1987, 7(12): 4390-9
- [75] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(1): 45-66
- [76] Bourbonnais Y, Larouche C, Tremblay GM. Production of full-length human pre-elafin, an elastase specific inhibitor, from yeast requires the absence of a functional yapsin 1 (Yps1p) endoprotease. Protein Expr Purif, 2000, 20 (3):

- 485-91
- [77] Cho EY, Cheon SA, Kim H, et al. Multiple-yapsin-deficient mutant strains for high-level production of intact recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*, 2010, 149 (1-2): 1-7
- [78] Kerry-Williams SM, Gilbert SC, Evans LR, et al. Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* YAP3 gene reduces the proteolytic degradation of secreted recombinant human albumin. *Yeast*, 1998, 14(2): 161-9
- [79] Werten MW, de Wolf FA. Reduced proteolysis of secreted gelatin and Yps1-mediated α -factor leader processing in a *Pichia pastoris* *kex2* disruptant. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71 (5): 2310-7
- [80] Silva CI, Teles H, Moers AP, et al. Secreted production of collagen-inspired gel-forming polymers with high thermal stability in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108 (11): 2517-25
- [81] Yao XQ, Zhao HL, Xue C, et al. Degradation of HSA-AX15(R13K) when expressed in *Pichia pastoris* can be reduced via the disruption of YPS1 gene in this yeast. *J Biotechnol*, 2009, 139 (2): 131-6
- [82] De Schutter K, Lin YC, Tiels P, et al. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(6): 561-6
- [83] Wu M, Shen Q, Yang Y, et al. Disruption of *YPS1* and *PEP4* genes reduces proteolytic degradation of secreted HSA/PTH in *Pichia pastoris* GS115. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013, 40(6): 589-99
- [84] Brankamp RG, Sreekrishna K, Smith PL, et al. Expression of a synthetic gene encoding the anticoagulant-antimetastatic protein ghilanten by the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 1995, 6 (6): 813-20
- [85] Gustavsson M, Lehtiö J, Denman S, et al. Stable linker peptides for a cellulose-binding domain-lipase fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Eng*, 2001, 14(9): 711-5