

DOI: 10.13376/j.cbls/2024097

文章编号: 1004-0374(2024)07-0951-11

重组蛋白药物长效化策略

夏玲慧, 龙睿灵, 赛乃外尔古丽·吾斯曼, 丁明*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要: 与传统小分子药物相比, 重组蛋白药物具有高活性、高亲和性、低毒性等显著优势, 但蛋白酶降解、肾脏清除、肝脏代谢和免疫清除等因素造成的短血浆半衰期, 严重限制了其临床应用, 因此发展相应的长效化策略尤为重要。其中, 构建突变体、环化和钉合肽等结构修饰策略, 可增加药物结构稳定性, 屏蔽蛋白酶识别位点; 以聚乙二醇修饰为代表的化学聚合物修饰, 可增加药物流体动力学体积; 以Fc融合为代表的天然蛋白融合策略, 可通过相应受体介导的机制减少肝脏代谢。本文将结合实例, 对一些经典的蛋白药物长效化策略如结构修饰、化学聚合物修饰、天然蛋白融合等进行总结与讨论。

关键词: 蛋白药物; 血浆半衰期; 结构修饰; 化学聚合物; 非结构多肽; 糖基化
中图分类号: Q51; R915 **文献标志码:** A

Half-life extension strategies for recombinant protein drugs

XIA Ling-Hui, LONG Rui-Ling, WUSIMAN Sainaiwaierguli, DING Ming*

(School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Compared with traditional small molecule drugs, recombinant protein drugs have significant advantages, such as higher activity and affinity, and lower toxicity. However, the short plasma half-life caused by factors such as protease degradation, renal elimination, liver metabolism and immune clearance severely limits clinical application of recombinant protein drugs. Therefore, developing corresponding half-life extension strategies is particularly important. Structural modification strategies such as mutants, cyclization, and stapled peptide can increase structural stability of drugs and shield protease recognition sites. Chemical polymer modification represented by polyethylene glycol modification can increase the volume of fluid dynamics of drugs. The natural protein fusion strategy represented by Fc fusion can reduce liver metabolism through corresponding receptor mediated mechanisms. In this paper, we summarize and discuss some classic half-life extension strategies for recombinant protein drugs combined with specific applications, such as structural modification, chemical polymer modification and natural protein fusion.

Key words: protein drugs; plasma half-life; structural modification; chemical polymer; unstructured polypeptides; glycosylation

重组蛋白药物由于生物活性高、溶解性强和毒性低等优点, 在治疗某些疾病方面有不可替代的优势。重组蛋白药物生产系统主要包括技术研发、生产制造、质量控制和销售流通环节。大肠杆菌、酵母、哺乳动物 CHO 细胞系等表达系统的改造, 补料分批生产技术的研发, 单柱色谱、多维色谱分离和多柱逆流溶剂梯度纯化 (multicolumn countercurrent solvent gradient purification, MCSGP) 等纯化技术的发展, 以及基于肽谱液相色谱 - 质谱 (liquid chromato-

graph-mass spectrometer, LC-MS) 的质量检测技术的进步, 为重组蛋白药物的发展提供了广阔的前景。然而, 人体中存在的多种蛋白酶和肽酶, 以及肝脏、肾脏等药物代谢场所, 可对蛋白质和肽类进行降解

收稿日期: 2024-02-28; 修回日期: 2024-04-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82173393)

*通信作者: E-mail: mingding@cpu.edu.cn; Tel: 13236589169

和消除, 导致其半衰期缩短。在临床应用上, 较短的半衰期意味着需要频繁给药, 导致患者的依从性差。因此, 通过长效化延长重组蛋白药物的半衰期, 改善药代动力学和药效学特性, 是蛋白及多肽药物发展的必经途径。基于体内存在的主要清除机制, 人们已发展出大量延长重组蛋白药物血浆半衰期的策略。如构建突变体以增加结构稳定性、保护蛋白酶识别位点; 通过化学聚合物修饰或非结构多肽聚合物修饰以降低肾脏清除率; 通过与天然蛋白融合以改善肝脏代谢和肾脏清除、降低免疫原性等(图1)。本文对影响重组蛋白药物半衰期的主要因素进行了说明, 并结合部分实例对几种经典的半衰期延长策略进行总结和讨论。

1 影响重组蛋白药物血浆半衰期的主要因素

1.1 蛋白酶降解

人体内存在多种蛋白酶, 可将进入人体的重组蛋白药物催化分解为肽或氨基酸, 因此蛋白酶降解是影响蛋白药物血浆半衰期的重要因素。胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 可通过促进葡萄糖刺激的胰岛素分泌、减缓胃排空和抑制胰高血糖素分泌的方式调节血糖, 输注外源性 GLP-1 可用于治疗2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM)^[1]。

但由于二肽基肽酶-4 (dipeptidyl peptidase-4, DPP-4) 的降解, GLP-1 的血浆半衰期较短, 这限制了 GLP-1 的临床应用^[2]。

人体的血浆、肝脏和肾脏含有多种肽酶和蛋白酶, 是涉及药物蛋白酶降解的重要场所。可通过一系列策略降低这些酶的作用, 如环化、化学聚合物修饰、脂肪酸修饰等, 或替换易受蛋白酶降解影响的氨基酸, 以延长重组蛋白药物的半衰期。

1.2 肝脏代谢和肾脏清除

肝脏代谢和肾脏清除也是导致蛋白药物血浆半衰期缩短的重要原因。肝脏是药物代谢的重要场所, 含有细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 酶等多种药物代谢相关酶, 重组蛋白药物经肝细胞摄取后, 会被各类酶催化分解^[3]。肾脏过滤系统易清除小于肾脏过滤截止尺寸且不与血浆蛋白结合的物质, 重组蛋白药物大多体积较小, 易被肾脏清除^[4]。除分子量大小, 物质所带电荷也是影响肾脏清除的重要因素, 由于肾脏基底膜带负电, 在同样情况下, 阳离子多肽往往更快被清除^[5]。

通过一系列策略降低肝脏代谢和肾脏清除对药物的影响, 可延长重组蛋白药物的血浆半衰期。在人体内存在多种内源性蛋白质, 可通过特异性受体介导的再循环机制避免肝脏代谢, 将重组蛋白药物

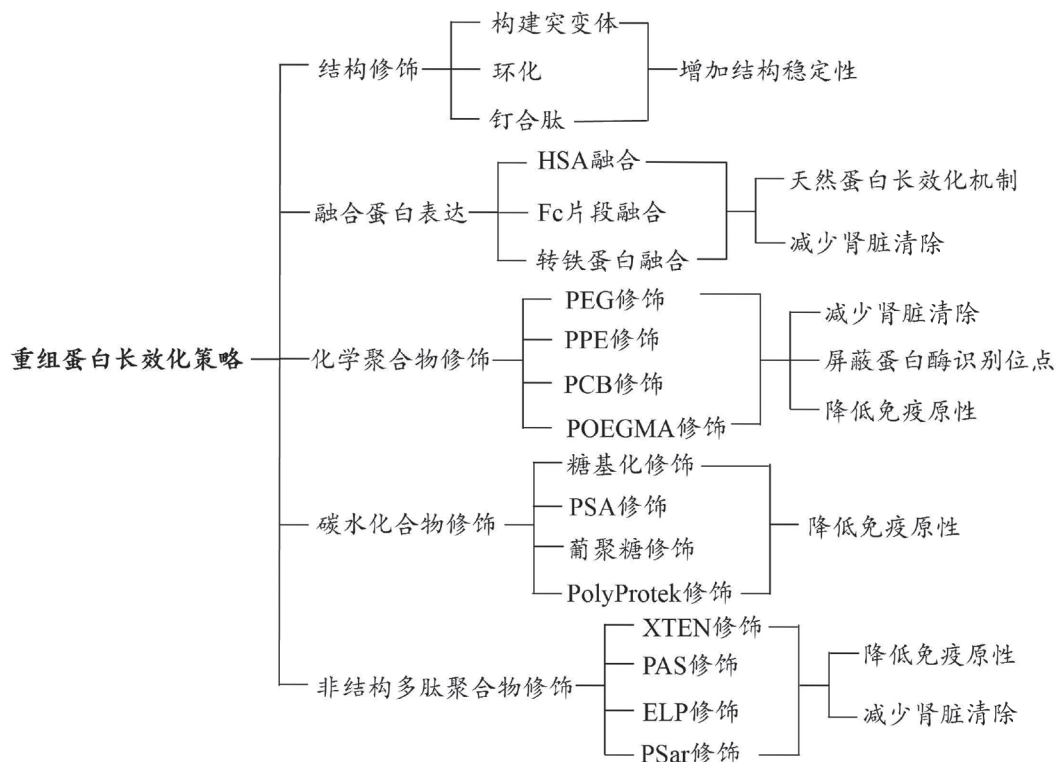


图1 重组蛋白长效化策略

与这些内源性蛋白融合表达, 可减少肝脏对药物的代谢以延长半衰期。还可将重组蛋白药物与化学聚合物或非结构多肽聚合物结合以增加流体动力学体积, 或与表面具有负电荷的分子结合, 通过排斥基底膜的表面负电荷来避免肾脏清除。

1.3 免疫清除

重组蛋白药物作为一类外源物质, 常被机体免疫系统识别并被多种免疫手段清除。重组蛋白药物的免疫原性不仅会诱导抗药物抗体(anti-drug antibodies, ADAs)的产生, 导致药代动力学改变以及药物疗效降低, 还可能引发严重过敏或超敏反应。因此, 重组蛋白药物的去免疫化至关重要。除聚乙二醇修饰、非结构多肽聚合物修饰、糖基化等非特异性屏蔽方法外, 通过计算机预测重组蛋白药物潜在的免疫表位并进行定点突变修饰, 也是一种有前景的去免疫方法^[6]。

2 通过结构修饰延长血浆半衰期

结构修饰是指对重组蛋白药物的氨基酸组成或结构进行编辑, 通过减少不稳定氨基酸数量、屏蔽蛋白酶识别位点、增加结构稳定性等多种方式, 达到延长血浆半衰期的效果。用于延长重组蛋白药物血浆半衰期的结构修饰策略有多种, 主要包括构建突变体、环化和钉合肽构建等。

2.1 构建突变体

构建突变体是指定点突变重组蛋白药物的一个或多个氨基酸位点, 减少不稳定氨基酸数量, 加强结构稳定性以延长血浆半衰期。某些氨基酸序列的定点突变还可增强蛋白酶抗性, 进一步延长血浆半衰期。胰岛素治疗是控制糖尿病患者血糖最有效的方法, 然而天然人胰岛素半衰期较短, 导致注射给药频率高, 患者依从性差。甘精胰岛素(insulin glargine)是一种长效胰岛素类似物, 与天然胰岛素相比, 它由甘氨酸取代胰岛素A链21位的天冬氨酸, 同时在B链的30位添加两个精氨酸获得, 甘精胰岛素于2000年获得美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准, 2003年获得原中国食品药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)批准, 用于临床治疗糖尿病^[7]。由于DPP-4的降解和肾脏消除, GLP-1的体内半衰期很短, Li等^[8]开发了一个包含二硫键的GLP-1突变体簇, 显著提高了GLP-1的体内半衰期, 可能作为治疗T2DM的有效药物。关键位点的定点突变或许可以有效改变蛋白药物的

性质, 但通过随机突变寻找关键位点是一种相对低效和不确定的方案。

2.2 环化

环化作用可以消除多肽链中的末端电荷、增加对蛋白酶的抗性, 因此重组蛋白类药物的环化也是一种降低蛋白酶降解、增加结构稳定性以延长血浆半衰期的方法^[9]。生长抑素(somatostatin, SST)是一种由胰腺 δ 细胞释放的肽类激素, 参与抑制与神经递质、生长激素、胰岛素、胰高血糖素等相关的许多代谢过程, 由于蛋白酶的催化降解作用, 天然SST的血浆半衰期仅有1~3 min, 需要连续注射才能产生治疗效果, 这极大地限制了SST的临床应用^[10]。奥曲肽(Octreotide)是SST的一种环状八肽类似物, 是通过环化作用延长半衰期的成功案例, 于1988年被FDA批准用于治疗肢端肥大症。奥曲肽在结构上保留了对生物活性至关重要的四个氨基酸序列, 但分子内的环化使其可以抵抗代谢降解, 从而延长了血浆半衰期^[10]。奥曲肽通过皮下给药的半衰期为90~120 min, 药效作用时间持续8~12 h, 在抑制生长激素(growth hormone, GH)分泌方面的效力是SST的40倍^[10]。蛋白共价环化作为一种改善理化性质的方法已引起广泛关注, 但由于不同的环化方案有各自的优缺点, 所形成的产物也是不同的, 因此对特定蛋白的改造需要选择合适的环化策略^[11]。

2.3 钉合肽

具有如 α -螺旋、 β -折叠之类的高级结构是大多数多肽或蛋白质发挥生物活性的必要条件, 其中高疏水性的 α -螺旋结构对多肽或蛋白质穿过细胞膜发挥着重要作用。钉合肽(stapled peptide)是指利用化学键将不同区域的片段“装订”在一起, 折叠形成的带有多级结构的多肽。钉合肽的螺旋结构将蛋白酶识别位点隐藏在内部, 可增加蛋白酶抗性, 还有助于细胞对蛋白药物的摄取, 实现了药物靶向胞内靶点的需要^[12]。ALRN-5281是人生长激素释放激素激动剂的钉合肽形式, 可用于治疗生长激素缺乏症, 目前已完成其在健康受试者中的1期安全性研究(<https://classic.clinicaltrials.gov/>)。ALRN-6924是P53蛋白激动剂的钉合肽, 在ER⁺乳腺癌细胞模型中具有抗肿瘤功效, 并与紫杉醇(paclitaxel)和艾瑞布林(eribulin)有协同作用^[13]。Li等^[14]报道了一系列模拟SOS1(son of sevenless 1) α 螺旋的碳氢化合物钉合肽的设计和合成, 可作为泛Ras抑制剂, 其中SSOSH-5维持良好的 α -螺旋结构, 并以类似

亲本线性肽的方式与 H-Ras 高亲和力地结合。这种优化的钉合肽被证明对 pan-Ras 突变的癌细胞表现出强细胞毒性作用，并以剂量依赖性的方式通过调节下游激酶信号来诱导细胞凋亡。

3 通过化学聚合物修饰延长血浆半衰期

化学聚合物修饰一方面通过增加蛋白质的分子大小，降低肾脏清除率来延长血浆半衰期，另一方面还可以通过空间位阻作用屏蔽蛋白质表位和蛋白酶识别位点，以降低免疫原性并增加蛋白酶抗性。化学聚合物修饰可增强蛋白质的稳定性，是延长蛋白质血浆半衰期、开发长效蛋白药物的一种有前途的方法，其中 PEG 以其亲水性和生物相容性，成为化学聚合物修饰的典型代表。

3.1 PEG修饰

聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 是由环氧乙烷与水聚合而成的高分子聚合物，它不带电、无毒、亲水，且具有良好的生物相容性，是用于蛋白质偶联的良好化学聚合物。Adagen[®] 是一种 PEG 修饰的腺苷脱氨酶 (adenosine deaminase, ADA) 药物，于 1990 年被 FDA 批准用于治疗腺苷脱氨酶缺乏症^[15]。此后，PEG 修饰策略被广泛用于延长蛋白质半衰期，大量的 PEG 修饰蛋白药物被批准上市 (表 1)。

PEG 修饰之所以能延长重组蛋白药物的血浆半衰期，一方面是由于其较大的流体动力学体积可降低被修饰蛋白药物的肾脏清除率，另一方面是由于伸展的 PEG 分子附着在被修饰蛋白表面，可屏蔽蛋白质表位以降低免疫原性，还可以遮蔽蛋白酶识别位点以增加蛋白酶抗性^[16]。PEG 与重组蛋白药物的连接可通过多种方式进行，但不同的连接反应得到的产物不同。例如，与蛋白质中广泛存在的赖氨酸 (lysine) 连接是 PEG 修饰蛋白的主要方式之一，但这种反应通常是非特异性的，所得产品批次一致性较差。为了得到一致性较高的 PEG 修饰产物，可选择蛋白质中的特定氨基酸位点进行定点修饰，例如与分子表面的半胱氨酸 (cysteine) 反应，或通过分子克隆技术在蛋白质的分子末端引入半胱氨酸以进行定点修饰。

尽管 PEG 是经 FDA 批准的生物安全分子，且有越来越多的 PEG 修饰蛋白药物被批准上市，但 PEG 修饰在延长重组蛋白药物血浆半衰期的同时也存在着如药物活性降低、稳定性差、不可生物降解和免疫原性高等不容忽视的问题。PEG 在生物体内不可降解是影响修饰药物临床应用的重要问题，这使人们对 PEG 修饰蛋白药物长期治疗的安全问题产生担忧。研究发现，PEG 聚合物会引起脉络丛、垂体、肾和脉络膜的上皮细胞空泡化，且在体内积

表1 部分FDA批准的PEG化修饰蛋白药物

商品名	国际非专利名称	治疗蛋白	半衰期	适应证	批准时间
Adagen	Pegademase	腺苷脱氨酶	3~6 d	腺苷脱氨酶缺乏症	1990年
Oncaspar	Pegaspargase	L-天冬酰胺酶	44 h	急性淋巴细胞白血病	1994年
Neulasta	Pegfilgrastim	重组甲氧基人粒细胞集落刺激因子	42 h	中性粒细胞减少症	2002年
Pegasys	Peginterferon alfa-2a	干扰素 α -2a	164 h	丙型肝炎	2002年
Somavert	Pegvisomant	重组人生长激素	6 d	肢端肥大症	2003年
Pegintron	Peginterferon alfa-2b	干扰素 α -2b	40 h	乙型和丙型肝炎	2008年
Cimzia	Certolizumab pegol	TNF单克隆抗体	14 d	克罗恩病	2008年
Krystexxa	Pegloticase	尿酸酶	300 h	慢性痛风	2010年
Plegridy	Peginterferon beta-1a	干扰素 β -1a	78 h	多发性硬化症	2014年
Adynovate	Rurioctocog alfa pegol	重组人凝血因子 VIII	~14 h	血友病A	2015年
Mircera	Methoxy polyethylene glycol-epoetin beta	重组人红细胞生成素 β	134 h	贫血	2016年
Asparlas	Calaspargase pegol	L-天冬酰胺酶	16.1 d	急性淋巴细胞白血病	2018年
Jivi	Damoctocog alfa pegol	重组人凝血因子 VIII	18.6 h	血友病A	2018年
Palyntiq	Pegvaliase	苯丙氨酸解氨酶	120 h	苯丙酮尿症	2018年
Besremi	Ropeginterferon alfa-2b	干扰素 α -2b	7 d	真性红细胞增多症	2021年
Elfabrio	Pegunigalsidase alfa	人 α -半乳糖苷酶-A	53~134 h	法布里病	2023年

TNF: tumor necrosis factor

聚不易降解^[17]。PEG 修饰重组蛋白药物还可能引发抗药物抗体的产生, 由此产生的免疫反应会导致药物的血液清除, 使药物的治疗效果受损, 更有甚者会导致严重过敏反应^[18]。

出于长期治疗的安全问题考虑, 寻求更安全、经济可行的 PEG 替代品变得尤为重要。目前, 如聚磷酸酯 (polyphosphoesters, PPEs)、XTEN、PAS、聚唾液酸 (polysialic acid, PSA) 等新型可降解材料, 已经被广泛研究用于蛋白质偶联。

3.2 PPE修饰

聚磷酸酯是 2016 年开发的一类可生物降解的生物相容性聚合物, 结合蛋白质形成可完全生物降解的偶联物^[19]。与 PEG 修饰类似, PPE 修饰可通过增加被修饰蛋白的流体动力学体积以降低肾脏清除率。与 PEG 修饰相比, PPE 作为修饰基团的优点是可以水解形成完全无毒的产物, 改善了 PEG 修饰的不可降解带来的问题。Steinbach 等^[19] 在生理温度下通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析 BSA-PPE 缀合物, 证明了该缀合物在碱性、中性和酸性 pH 条件下的可降解性。Pelosi 等^[20] 使用不同摩尔质量和亲水性的 PPEs 和 PEG 对人肌红蛋白进行修饰, 两种修饰均可提高蛋白稳定性与酶降解抗性, PPE 修饰物的活性和代谢动力学特征类似于 PEG 修饰物。这些结果共同表明, 可降解的聚磷酸酯可用于与临床上重要的生物制品偶联以延长其半衰期, 是一种有价值的 PEG 替代品。

3.3 PCB修饰

聚羧基甜菜碱 (polycarboxybetaines, PCBs) 是一种由天然甘氨酸甜菜碱组成的超亲水两性离子聚合物, 可降低蛋白质表面与水的相互作用, 降低水对蛋白质结构的干扰作用, 从而稳定蛋白质, 加强其与底物的亲和作用, 有助于发挥蛋白质的生理活性^[21]。与 PEG 修饰相比, PCB 修饰具有更高的安全系数。PCB 体内内化程度较低, 没有明显的细胞毒性和溶血活性, 且在大鼠中进行三个月的高剂量给药后, 合成的聚合物没有诱导组织变化、异常行为、疾病和死亡^[22]。通过化学反应将尿酸酶分别与相同流体动力学体积的 PepCB 和 PEG 连接, 凝胶渗透色谱法 (gel permeation chromatography, GPC) 分析显示尿酸酶的每个亚基与相似数量的 PEG 或 PepCB 链反应, 活性测定显示两种聚合物修饰的蛋白偶联物相对天然蛋白都保持了相似的酶活性^[22]。

3.4 POEGMA修饰

聚(低聚(乙二醇)甲基醚甲基丙烯酸酯) (poly(oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate), POEGMA) 是一种具有梳状结构的 PEG 类似物。POEGMA 可与蛋白的半胱氨酸侧链位点特异性结合, 通过增加流体动力学体积改善药物血浆半衰期, 与 PEG 修饰相比, POEGMA 蛋白偶联物显示出较低的免疫原性和抗原性。Sun 等^[23] 将 POEGMA 连接在天然或重组蛋白的 N 端, 得到了 POEGMA-Interferon α 缀合物, 与 FDA 批准的聚乙二醇化 IFN PEGASYS 相比, 其循环半衰期与之相当, 是游离 IFN 的 46.2 倍, 但在体外的生物活性是 IFN PEGASYS 的 8.1 倍。Ozer 等^[24] 合成了一种尿酸酶-POEGMA 偶联物, 并将其与 PEG 对应物进行比较, 发现尿酸酶-POEGMA 具有更高的生物活性、更好的药代动力学特性, 且该偶联物不会诱导抗 POEGMA 抗体, 也不会被抗 PEG 抗体识别。

4 基于融合蛋白表达的长效化策略

血浆中存在着一些半衰期较长的天然蛋白, 它们具有多样化的机制免于被机体清除, 将蛋白药物与这些天然蛋白连接可延长其血浆半衰期。这些天然蛋白主要包括通过 pH 依赖的新生儿 Fc 受体 (neonatal Fc receptor, FcRn) 介导的循环机制以达到较长血浆半衰期的 HSA 和 IgG, 以及通过转铁蛋白受体 (Tf receptor, TfR) 介导的循环机制达到较长半衰期的转铁蛋白 (表 2)。

4.1 HSA融合蛋白长效化策略

人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 是人类血浆中含量最丰富的蛋白质, 在人体内发挥着稳定血浆 pH 值、转运代谢产物和脂肪酸, 以及维持血压等作用。HSA 通过 pH 依赖的 FcRn 介导的循环机制可达到较长的半衰期, 已被用于延长治疗性蛋白质的血浆半衰期^[25]。FcRn 是一种异二聚体受体, 在单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞等细胞中广泛表达, 体内 FcRn 的主要功能是将 IgG 从母亲转移到胎儿。HSA 和 IgG (IgG1、IgG2 和 IgG4) 以 pH 依赖性方式结合 FcRn, 当血清蛋白被内皮网状系统的细胞胞饮后, HSA 和 IgG 可以在溶酶体的酸性条件下结合 FcRn 并被转运回细胞表面, 当暴露于细胞表面的中性 pH 环境时, IgG 和 HSA 被释放回循环, 其他不与 FcRn 结合的蛋白则被溶酶体降解。

HSA 作为天然蛋白, 具有稳定性高、安全无毒、

无免疫原性等显著优点,是重组蛋白药物理想的天然修饰物。目前已有多种 HSA 修饰的重组蛋白药物被批准上市。阿比鲁肽 (Albiglutide) 是一种 GLP-1 激动剂,于 2014 年被 FDA 批准上市,用于治疗 T2DM。它是一种与 HSA 融合的 GLP-1 二聚体,具有 DPP-4 抗性,将 GLP-1 的半衰期从天然 GLP-1 的 1~2 min 延长至 4~7 d,且允许每周给药一次^[26]。

药物可以通过基因融合或共价修饰的方式直接结合 HSA,也可以通过结合如脂肪酸等 HSA 配体的方式与其非共价结合,在利用 HSA 的机制延长药物半衰期的同时,还能进一步融合配体的特征和优点。如脂化药物可以自发组装成不易被蛋白酶降解的低聚体,并逐渐释放活性单体形成药物贮库,进一步延长半衰期。用于治疗糖尿病的地特胰岛素 (insulin detemir) 和德谷胰岛素 (insulin degludec) 都是脂肪酸修饰胰岛素,分别于 2005 年和 2015 年获 FDA 批准上市,其半衰期是天然胰岛素的数倍。地特胰岛素的脂肪酸修饰增加了其与白蛋白的可逆结合,使半衰期延长至 5~7 h^[27]。德谷胰岛素则以人胰岛素为基础,通过 γ -L-谷氨酸将十六烷二酸修饰到 LysB29 的 ϵ -氨基上,达到 25 h 的半衰期^[28]。DARPin 是一种通过核糖体展示技术筛选出的 HSA 配体,通过基因融合技术将其与重组蛋白药物结合可延长血浆半衰期,如用于治疗肿瘤的药物 MP0250 已完成 2 期临床试验,半衰期长达 14 d^[29]。

4.2 Fc 片段融合蛋白表达策略

人 IgG 同种型 (IgG1、IgG2 和 IgG4) 以 pH 依赖性方式通过 FcRn 介导的循环机制达到较长半衰期,将重组蛋白药物与 IgG 的 Fc 片段结合,一方面可以通过类似的 FcRn 介导的机制延长半衰期,另一方面也增大了药物的分子量进而减少肾小球过滤。但是 Fc 片段由于结构不完整,往往稳定性较差,半衰期短于 IgG,且可能通过相应受体介导补体所致的免疫反应,如抗体依赖细胞介导的细胞毒作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 和补体依赖性细胞毒作用 (complement-dependent cytotoxic, CDC),因此常通过基因工程手段改造人源化 Fc 片段以改善缺陷。目前,已有多种 Fc 融合蛋白药物被批准上市 (表 2)。

Enbrel[®] 是第一种上市的 Fc 融合蛋白药物,于 1998 年获 FDA 批准上市,用于治疗类风湿性关节炎和银屑病。它由人 IgG1 的 Fc 片段连接人肿瘤坏死因子受体 2 (tumor necrosis factor receptor 2, TNFR2) 的细胞外区域形成,具有 68 h 的半衰期^[30]。Alprolix[®] 是一种由 rFIX 和 IgG1 的 Fc 片段共价连接形成的一种长效重组融合蛋白,于 2014 年获 FDA 批准上市用于治疗血友病 B^[31]。Eloctate[®] 是一种 rFVIII-Fc 融合蛋白 (rFVIII-Fc fusion protein, rFVIII-Fc), 2016 年被 FDA 批准用于治疗血友病 A,在血友病动物模型中的半衰期比市售的 rFVIII 产品长约 2 倍^[32]。

表2 部分FDA批准的与天然蛋白结合的生物药

商品名	国际非专利名称	治疗蛋白	修饰方式	半衰期	适应证	批准时间
Enbrel	Etanercept	TFN受体2胞外结构域	Fc融合	102 h	类风湿性关节炎	1998年
Amevive	Alefacept	LFA-3	Fc融合	270 h	严重斑块型银屑病	2003年
Levemir	Insulin detemir	胰岛素	脂肪酸结合	5~7 h	糖尿病	2005年
Nplate	Romiplostim	TPO模拟肽	Fc融合	3.5 d	慢性ITP	2008年
Arcalyst	Rilonacept	白细胞介素-1受体	Fc融合	8.6 d	CAPS	2008年
Nulojix	Belatacept	CTLA-4胞外结构域	Fc融合	8~10 d	肾移植排斥反应	2011年
Zaltrap	Aflibercept	VEGFR胞外结构域	Fc融合	7.1 d	结直肠癌	2012年
Eloctate	Efmoroctocog alfa	重组人凝血因子 VIII	Fc融合	20 h	血友病A	2014年
Alprolix	Eftrenonacog alfa	重组人凝血因子 IX	Fc融合	77.6 h	血友病 B	2014年
Tanzeum	Albiglutide	GLP-1二聚体	HSA融合	4~7 d	2型糖尿病	2014年
Tresiba	Insulin degludec	胰岛素	脂肪酸结合	25 h	糖尿病	2015年
Idelvion	Albutrepenonacog alfa	重组人凝血因子 IX	HSA融合	92 h	血友病B	2016年
Reblozyl	Luspatercept	hActRIIB胞外结构域	Fc融合	11 d	贫血	2019年
Altuviiiio	Fc-VWF-XTEN fusion protein-eh1	重组人凝血因子 VIII	Fc-VWF-XTEN 融合	40~48 h	血友病A	2023年

TNF: tumor necrosis factor; LFA: lymphocyte function associated antigen; TPO: thrombopoietin; ITP: idiopathic thrombocytopenic purpura; CAPS: cryopyrin-associated periodic syndromes; CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4; VEGFR: vascular endothelial growth factor receptors; GLP-1: glucagon-like peptide 1; hActRIIB: human activin receptor type IIB

4.3 转铁蛋白作为融合蛋白长效化策略

转铁蛋白 (transferrin, Tf) 是一种高度丰富的血清蛋白, 可通过网格蛋白依赖性转铁蛋白受体介导的机制, 被转铁蛋白受体结合回收循环, 因此 Tf 在血浆中可以达到较长的半衰期^[33]。ProINS-Tf 是一种新型长效肝靶向胰岛素前体药物, 由人胰岛素原 C 端 (ProINS) 与人血清 Tf 的 N 端融合而成, 在链脲佐菌素诱导的 1 型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus, T1DM) 小鼠中, 皮下注射 ProINS-Tf 可产生长达 40 h 的基础血糖降低作用^[34]。由于转铁蛋白的分子量较高, 要达到与非偶联蛋白相当的治疗摩尔浓度则需要更高的药物剂量, 因此, 将转铁蛋白应用于延长治疗性蛋白药物半衰期需注意潜在的副作用^[35]。

5 通过非结构多肽聚合物修饰延长血浆半衰期

将非结构的惰性多肽聚合物与重组蛋白药物融合, 可通过增加流体动力学体积以延长其血浆半衰期, 这种修饰方法可视为化学聚合物修饰和天然蛋白修饰的混合方案。与 PEG 修饰相比, 这种非结构多肽聚合物修饰策略有明显的优势: 一方面它可以通过大肠杆菌直接表达产生, 降低了 PEG 的成本以及将 PEG 与蛋白质连接所需的反应时间和工艺成本; 另一方面非结构多肽聚合物可以在体内缓慢降解。但相较于天然蛋白修饰的策略, 这一方法存在着多肽重复单元或未知因子可能引起的免疫原性。

5.1 XTEN 修饰

Amunix 公司生成了一个包含氨基酸残基 A、E、G、P、S 和 T 的序列库, 并在大肠杆菌中对其稳定性、溶解度和热稳定性等进行测试, 选定了一类被称为“XTEN”序列的非结构多肽聚合物^[36]。XTEN 序列亲水、无毒且稳定, 可以通过多种方法与蛋白质或多肽进行连接, 通过改善流体动力学的方法增加药物的血浆半衰期, 与 PEG 修饰相比, XTEN 的免疫原性明显降低, 且 XTEN 是可生物降解的, 因此可用于延长重组蛋白药物的半衰期^[37]。

Altuviiiio[®] 是一种 rFVIII 类似物融合蛋白, 为了延长 FVIII 的半衰期, 将 FVIII 融合到 Fc 二聚体上, 并与两个 XTEN 多肽连接, 半衰期延长至 40~48 h, 于 2023 年被 FDA 批准用于治疗血友病 A^[38]。VRS-317 是一种正在开发中的长效重组人生长激素 (recombinant human growth hormone, rhGH), 用于治疗生长激素缺乏症, 其中 XTEN 结构域通过

增加 rhGH 的流体动力学体积和延迟受体介导的清除以延长 rhGH 的半衰期^[39], 目前 VRS-317 的 3 期临床研究已完成。

5.2 PAS 修饰

PAS 是一种由脯氨酸 (proline)、丙氨酸 (alanine) 和丝氨酸 (serine) 组成的长度约为 100~200 aa 的重复序列的非结构多肽聚合物, PAS 修饰与 PEG 修饰类似, 可通过增加蛋白药物的流体动力学体积来延长血浆半衰期。与 PEG 修饰相比, PAS 具有可被细胞摄取降解、可被肾脏蛋白酶降解的优点, 避免了 PEG 不可降解产生的体内积累毒性问题^[40]。PAS 可通过基因融合或化学反应结合于重组蛋白药物, 目前已有多种与 PAS 融合的重组蛋白药物进入临床前研究阶段。

Morath 等^[41]将小鼠瘦素与高达 600 aa 的 PAS 多肽融合, 分析结果显示相对于未修饰的瘦素, 其半衰期从 26 min 延长到 19.6 h, 且与受体具有高结合活性。PAS 修饰的 IFN- β 1b 与未修饰的天然形式相比, 蛋白质的流体动力学体积增加了 4 倍, 体外生物活性增加了 2 倍, 且具有更好的溶解度和稳定性^[42], PAS 修饰也可以改善 IFN α -2a 的稳定性和血浆半衰期^[43]。研究表明, 经 PAS₁₀₀ 修饰的重组尿酸氧化酶 (urate oxidase, UOX) 在大鼠体内的生物半衰期增加至 8.21 h, 且保留了 UOX 大部分的生物活性^[44]。针对水溶性较差的肽药物, 可将脂肪酸修饰与 PAS 修饰相结合, 在增加药物亲水性的同时延长血浆半衰期^[45]。

5.3 ELP 修饰

弹性蛋白样多肽 (elastin-like polypeptides, ELPs) 是一种由 Val-Pro-Gly-X-Gly 的重复序列组成的非结构多肽聚合物, 其中 X 指除了脯氨酸以外的任一氨基酸^[46]。与 PEG 修饰类似, ELP 可通过增大重组蛋白药物的流体动力学体积, 减少肾小球过滤以延长血浆半衰期, 与 PEG 修饰相比, ELP 由于具有与弹性蛋白高度相似的结构, 可以在体内被相关酶降解^[47]。

许多 ELP 修饰的重组蛋白药物正在进行临床前研究 (<https://classic.clinicaltrials.gov/>)。例如, PB1046 是一种血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP) 的长效类似物, 可用于治疗心肌病, 现已完成关于安全性、耐受性和 PK/PD 的 2 期临床研究; PB1023 是一种长效化 GLP-1 类似物, 用于治疗 T2DM, 现已完成 2b 期多中心、随机、双盲、安慰剂和活性对照、平行组研究; PE0139 是一种长效

化胰岛素类似物, 现已完成在 T2DM 受试者中的安全性、耐受性、药代动力学和药效学反应的 1 期多中心、单次递增剂量研究。

5.4 PSar修饰

聚肌氨酸 (polysarcosine, pSar) 是一种由人内源性肌氨酸开环聚合形成的水溶性多肽类化合物, 其中肌氨酸是人体内肌氨酸的结构组分, 也是甘氨酸生物合成的中间产物, 可被肌氨酸酶和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 降解。PSar 与蛋白连接通过提高偶联物的流体动力学体积以延长半衰期, 还可以改善偶联蛋白的热稳定性和酶抗性。2018 年, Hu 等^[48]进行了 PSar-IFN 和对应的 PEG-IFN 的活性比较, 结果表明, 两种缀合物的血浆半衰期相似, 具有相当的胰蛋白酶抗性。但 PSar-IFN 在体外抑制肿瘤细胞增殖方面的能力略强, 全身给药后在肿瘤部位的积累较多, 且多次给药后在血浆中产生的抗 IFN-IgG 抗体较少。因此, PSar 是具有良好生物相容性和低免疫原性的无细胞毒性、可生物降解多肽, 具有替代 PEG 用以延长重组蛋白药物半衰期的潜力^[49]。

6 通过碳水化合物修饰延长血浆半衰期

碳水化合物修饰是一种常见的用于延长重组蛋白药物体内半衰期的修饰方式。其中, 除了常用的糖基化修饰策略外, PSA 修饰、葡聚糖修饰和 Polyprotek 修饰也可以通过增加蛋白的流体动力学体积、降低免疫原性等方式延长药物的血浆半衰期。

6.1 糖基化修饰

糖基化是蛋白质常见的翻译后修饰之一, 可影响蛋白质的免疫原性、溶解性、酶抗性和稳定性, 因此对重组蛋白药物进行糖基化修饰也是延长其血浆半衰期的常用策略。如 Aranesp[®] 是一种高糖基化的人促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 重组形式, 半衰期是重组人 EPO 的 3 倍左右^[50], 于 2001 年被 FDA 批准用于治疗贫血。通过定点诱变 (H:L178N Fab) 在阿达利木单抗 (Adalimumab) Fab H 链恒定区 178 位引入 N-糖基化位点, 降低了其免疫原性, 延长了半衰期^[51]。但是, 糖基化修饰往往需要通过工程化哺乳动物细胞完成, 糖的种类、数量、分子大小、序列和电荷等因素对药物的影响十分复杂, 糖基化药物在应用上仍面临着产率低、控制困难等技术挑战。

6.2 PSA修饰

多聚唾液酸 (polysialic acid, PSA) 是由负电荷

的唾液酸单体聚合而成一种高亲水性、可生物降解的独特碳水化合物, 主要以糖蛋白和糖脂形式存在^[52]。PSA 可通过增加重组蛋白药物的流体动力学体积和自身存在的负电荷来降低肾脏清除率, 与 PEG 相比, PSA 具有更好的生物相容性和生物可降解性, 还可以通过空间屏蔽作用改善被修饰蛋白的酶抗性与免疫原性^[53]。甲硫氨酸 γ -裂解酶 (methionine γ -lyase, MGL) 可以有效抑制恶性细胞的生长, Morozova 等^[54]将 MGL 与 PSA 进行缀合, 与天然酶相比, 缀合酶的半衰期延长了 3~6 倍, 对甲硫氨酸依赖性癌细胞系的细胞毒性作用增加了 2 倍。

6.3 葡聚糖修饰

葡聚糖是一种由 D-葡萄糖通过 α -1,6 糖苷键连接形成的亲水聚合物, 具有良好的生物相容性、无毒、无免疫原性。葡聚糖连接蛋白质通过增加其流体动力学体积以降低肾脏清除率, 从而延长药物的血浆半衰期。sms-D70 是一种葡聚糖修饰的 SST 类似物, 具有 112 h 的半衰期, 已完成其治疗晚期前列腺癌和肾细胞癌的 1 期试验^[55]。

6.4 PolyProtek修饰

PolyProtek 是一类海藻糖糖蛋白, 可以增强治疗蛋白的稳定性和药代动力学特性。与 PEG 修饰相似, PolyProtek 通过增加被修饰蛋白的流体动力学体积以延长半衰期, 还可降低蛋白的免疫原性。与 PEG 相比, PolyProtek 不仅可降解, 还可稳定各种酶和蛋白质, 使其免受温度波动和溶液中冷冻干燥的影响^[56]。

7 总结与展望

重组蛋白药物与传统小分子药物相比, 具有更高的活性、亲和性和特异性, 且随着基因工程和蛋白质纯化等生物技术的发展, 重组蛋白药物迎来了广阔的发展前景。然而, 重组蛋白药物的开发也面临着许多挑战, 半衰期短、稳定性差和易被降解等问题严重限制了其临床应用。由于口服给药的生理障碍, 重组蛋白药物的半衰期短则意味着更高剂量、更频繁的药物注射, 这严重影响了患者的生活质量。因此, 延长重组蛋白药物的血浆半衰期, 提高其药代动力学特征, 是在体内充分发挥重组蛋白药物显著优势的必要过程。本文综述了影响重组蛋白药物血浆半衰期的主要因素: 蛋白酶降解、肾脏清除、肝脏代谢和免疫原性, 从增加药物的流体动力学体积以降低肾脏清除、屏蔽蛋白酶识别位点以避免蛋白酶降解、降低免疫原性以减少体内清除等方面阐

述了一系列重组蛋白药物长效化策略。

目前, 以 PEG 修饰为代表的通过增加药物流体动力学体积以延长血浆半衰期的聚合物修饰策略和以 Fc 融合为代表的利用天然机制防止机体的降解清除的天然蛋白融合策略是最为成功的两个长效化策略。然而, PEG 修饰存在着因为无法生物降解而产生的器官积累问题, Fc 融合的免疫原性也阻碍了相关药物的应用。针对这些问题, 一方面可以寻找可生物降解的 PEG 替代聚合物, 例如 PPE、非结构多肽聚合物 XTEN 等, 它们不仅能与 PEG 相似地增加蛋白的流体动力学体积, 还具有其他独特的优势; 另一方面是基于天然长效蛋白分子机制, 如开发针对 HSA 的配体修饰, 或针对 Tf 载药系统进行研究。

除了与聚合物或天然和非天然蛋白结合以延长半衰期外, 对重组蛋白药物自身结构进行改造也是增加药物稳定性的有效方法。例如针对一级结构的氨基酸位点突变, 和针对高级结构的环化和钉合肽策略等。除以上对蛋白药物本身进行改造外, 开发新的药物递送系统也可以增加药物稳定性, 如纳米颗粒 (nanoparticle, NP) 介导的药物传递系统具有靶向控释能力, 能避免治疗药物在体内过早降解, 从而延长药物体内半衰期^[57]。

长效化的融合蛋白产物可能存在半衰期不够长、活性降低、免疫原性和安全性等问题, 重组蛋白药物长效化这一研究领域仍需深入探索和完善。但随着生物技术和药物研发手段的不断进步和发展, 更加完善和多样的半衰期延长方法将出现, 为蛋白药物的发展作出巨大贡献。

[参 考 文 献]

- [1] Bailey CJ, Flatt PR, Conlon JM. Recent advances in peptide-based therapies for obesity and type 2 diabetes. *Peptides*, 2024, 173: 171149
- [2] Zhang H, Dong M, Yuan S, et al. Oral glucagon-like peptide 1 analogue ameliorates glucose intolerance in db/db mice. *Biotechnol Lett*, 2022, 44: 1149-62
- [3] Kulsharova G, Kurmangaliyeva A. Liver microphysiological platforms for drug metabolism applications. *Cell Prolif*, 2021, 54: e13099
- [4] Granda ML, Huang W, Yeung CK, et al. Predicting complex kidney drug handling using a physiologically-based pharmacokinetic model informed by biomarker-estimated secretory clearance and blood flow. *Clin Transl Sci*, 2024, 17: e13678
- [5] Chen Y, Zelnick LR, Hoofnagle AN, et al. Prediction of kidney drug clearance: a comparison of tubular secretory clearance and glomerular filtration rate. *J Am Soc Nephrol*, 2021, 32: 459
- [6] Zinsli LV, Stierlin N, Loessner MJ, et al. Deimmunization of protein therapeutics-recent advances in experimental and computational epitope prediction and deletion. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 315-29
- [7] Goyal P, Pai HV, Kodali P, et al. Physicochemical and functional characterization of MYL-1501D, a proposed biosimilar to insulin glargine. *PLoS One*, 2021, 16: e0253168
- [8] Li Y, Zheng X, Tang L, et al. GLP-1 analogs containing disulfide bond exhibited prolonged half-life *in vivo* than GLP-1. *Peptides*, 2011, 32: 1303-12
- [9] Sriramoju MK, Ko KT, Hsu STD. Tying a true topological protein knot by cyclization. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 696: 149470
- [10] Haris B, Saraswathi S, Hussain K. Somatostatin analogues for the treatment of hyperinsulinaemic hypoglycaemia. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2020, 11: 2042018820965068
- [11] Purkayastha A, Kang TJ. Stabilization of proteins by covalent cyclization. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2019, 24: 702-12
- [12] Li J, Tan YS, Verma CS. Dissecting the geometric and hydrophobic constraints of stapled peptides. *Proteins*, 2024, doi: 10.1002/prot.26662. Online ahead of print.
- [13] Pairawan S, Zhao M, Yuca E, et al. First in class dual MDM2/MDMX inhibitor ALRN-6924 enhances antitumor efficacy of chemotherapy in TP53 wild-type hormone receptor-positive breast cancer models. *Breast Cancer Res*, 2021, 23: 29
- [14] Li A, Li X, Zou J, et al. SOS1-inspired hydrocarbon-stapled peptide as a pan-Ras inhibitor. *Bioorg Chem*, 2023, 135: 106500
- [15] Dorsey MJ, Rubinstein A, Lehman H, et al. PEGylated recombinant adenosine deaminase maintains detoxification and lymphocyte counts in patients with ADA-SCID. *J Clin Immunol*, 2023, 43: 951-64
- [16] Liu X, Kouassi KGW, Vanbever R, et al. Impact of the PEG length and PEGylation site on the structural, thermodynamic, thermal, and proteolytic stability of mono-PEGylated α -1 antitrypsin. *Protein Sci*, 2022, 31: e4392
- [17] Bendele A, Seely J, Richey C, et al. Renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins. *Toxicol Sci*, 1998, 42: 152-7
- [18] Fu J, Wu E, Li G, et al. Anti-PEG antibodies: current situation and countermeasures. *Nano Today*, 2024, 55: 102163
- [19] Steinbach T, Wurm FR. Degradable polyphosphoester-protein conjugates: "PPEylation" of proteins. *Biomacromolecules*, 2016, 17: 3338-46
- [20] Pelosi C, Duce C, Wurm FR, et al. Effect of polymer hydrophilicity and molar mass on the properties of the protein in protein-polymer conjugates: the case of PPEylated myoglobin. *Biomacromolecules*, 2021, 22: 1932-43

- [21] McMullen P, Luo Zhong S, Tsao C, et al. A low-immunogenic genetically-fusible zwitterionic polypeptide. *Nano Today*, 2022, 47: 101674
- [22] Zhang P, Jain P, Tsao C, et al. Polypeptides with high zwitterion density for safe and effective therapeutics. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, 130: 7869-73
- [23] Sun J, Liu X, Guo J, et al. Pyridine-2, 6-dicarboxaldehyde-enabled N-terminal *in situ* growth of polymer-interferon α conjugates with significantly improved pharmacokinetics and *in vivo* bioactivity. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 13: 88-96
- [24] Ozer I, Kelly G, Gu R, et al. Polyethylene glycol-like brush polymer conjugate of a protein drug does not induce an antipolymer immune response and has enhanced pharmacokinetics than its polyethylene glycol counterpart. *Adv Sci*, 2022, 9: 2103672
- [25] Yang B, Kwon I. Multivalent albumin-neonatal Fc receptor interactions mediate a prominent extension of the serum half-life of a therapeutic protein. *Mol Pharm*, 2021, 18: 2397-405
- [26] Trujillo JM, Nuffer W. Albiglutide: a new GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes. *Ann Pharmacother*, 2014, 48: 1494-501
- [27] Keating GM. Insulin detemir: a review of its use in the management of diabetes mellitus. *Drugs*, 2012, 72: 2255-87
- [28] Haahr H, Heise T. A review of the pharmacological properties of insulin degludec and their clinical relevance. *Clin Pharmacokinet*, 2014, 53: 787-800
- [29] Baird RD, Linossi C, Middleton M, et al. First-in-human phase I study of MP0250, a first-in-class DARPIn drug candidate targeting VEGF and HGF, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 2021, 39: 145
- [30] Korth-Bradley JM, Rubin AS, Hanna RK, et al. The pharmacokinetics of etanercept in healthy volunteers. *Ann Pharmacother*, 2000, 34: 161-4
- [31] Lamb YN, Hoy SM. Eftrenonacog alfa: a review in haemophilia B. *Drugs*, 2023, 83: 807-18
- [32] Frampton JE. Efmoroctocog alfa: a review in haemophilia A. *Drugs*, 2021, 81: 2035-46
- [33] Deng W, Zhao Z, Zou T, et al. Research advances in fusion protein-based drugs for diabetes treatment. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2024, 17: 343-62
- [34] Shao J, Zaro JL, Shen WC. Proinsulin-transferrin fusion protein exhibits a prolonged and selective effect on the control of hepatic glucose production in an experimental model of type 1 diabetes. *Mol Pharm*, 2016, 13: 2641-6
- [35] Kim BJ, Zhou J, Martin B, et al. Transferrin fusion technology: a novel approach to prolonging biological half-life of insulinotropic peptides. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 334: 682-92
- [36] Podust VN, Sim BC, Kothari D, et al. Extension of *in vivo* half-life of biologically active peptides via chemical conjugation to XTEN protein polymer. *Protein Eng Des Sel*, 2013, 26: 743-53
- [37] Mahmood T, Shahbaz A, Hussain N, et al. Recent advancements in fusion protein technologies in oncotherapy: a review. *Int J Biol Macromol*, 2023, 230: 123161
- [38] Konkle A. Efanesoctocog alfa for the prevention and treatment of bleeding in patients with hemophilia A. *Expert Rev Hematol*, 2023: 16: 567-73
- [39] Yuen KCJ, Conway GS, Popovic V, et al. A long-acting human growth hormone with delayed clearance (VRS-317): results of a double-blind, placebo-controlled, single ascending dose study in growth hormone-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98: 2595-603
- [40] Zhang Q, Li S, Wu W, et al. PASylation improves pharmacokinetic of liposomes and attenuates anti-PEG IgM production: an alternative to PEGylation. *Nanomedicine*, 2023, 47: 102622
- [41] Morath V, Bolze F, Schlapschy M, et al. PASylation of murine leptin leads to extended plasma half-life and enhanced *in vivo* efficacy. *Mol Pharm*, 2015, 12: 1431-42
- [42] Zvonova EA, Ershov AV, Ershova OA, et al. PASylation technology improves recombinant interferon- β 1b solubility, stability, and biological activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101: 1975-87
- [43] Shamloo A, Rostami P, Mahmoudi A. PASylation enhances the stability, potency, and plasma half-life of interferon α -2a: a molecular dynamics simulation. *Biotechnol J*, 2020, 15: 1900385
- [44] Najjari A, Shahbazzmohammadi H, Nojoudi SA, et al. PASylated urate oxidase enzyme: enhancing biocatalytic activity, physicochemical properties, and plasma half-life. *ACS Omega*, 2022, 7: 46118-30
- [45] Zhu H, Hua H, Dong Y, et al. Long-term strategies for poorly water-soluble peptides: combining fatty acid modification with PAS fusion. *Bioconjug Chem*, 2023, 34: 2366-74
- [46] Urry DW. Physical chemistry of biological free energy transduction as demonstrated by elastic protein-based polymers. *J Phys Chem B*, 1997, 101: 11007-28
- [47] Gong L, Yang Z, Zhang F, et al. Cytokine conjugates to elastin-like polypeptides. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 190: 114541
- [48] Hu Y, Hou Y, Wang H, et al. Polysarcosine as an alternative to PEG for therapeutic protein conjugation. *Bioconjug Chem*, 2018, 29: 2232-8
- [49] Zhou P, Shen T, Chen W, et al. Biodegradable polysarcosine with inserted alanine residues: synthesis and enzymolysis. *Biomacromolecules*, 2022, 23: 1757-64
- [50] Ibbotson T, Goa KL. Darbepoetin alfa. *Drugs*, 2001, 61: 2097-104
- [51] Nakamura H, Kiyoshi M, Anraku M, et al. Glycosylation decreases aggregation and immunogenicity of adalimumab Fab secreted from *Pichia pastoris*. *J Biochem*, 2021, 169: 435-43
- [52] Guo X, Elkashef SM, Loadman PM, et al. Recent advances in the analysis of polysialic acid from complex biological systems. *Carbohydr Polym*, 2019, 224: 115145
- [53] Zhang Q, Li S, He L, et al. A brief review of polysialic acid-based drug delivery systems. *Int J Biol Macromol*, 2023, 230: 123151

- [54] Morozova E, Anufrieva N, Koval V, et al. Conjugates of methionine γ -lyase with polysialic acid: two approaches to antitumor therapy. *Int J Biol Macromol*, 2021, 182: 394-401
- [55] Joensuu TK, Nilsson S, Holmberg AR, et al. Phase I trial on sms-D70 somatostatin analogue in advanced prostate and renal cell cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1028: 361-74
- [56] Liu Y, Lee J, Mansfield KM, et al. Trehalose glycopolymer enhances both solution stability and pharmacokinetics of a therapeutic protein. *Bioconjug Chem*, 2017, 28: 836-45
- [57] Jia L, Zhang P, Sun H, et al. Optimization of nanoparticles for smart drug delivery: a review. *Nanomaterials*, 2021, 11: 2790