

蛋白质药物的分子设计

袁杰 靳征 苏冬梅 姜竞

沈阳三生制药有限责任公司，辽宁沈阳，110027；

摘要：随着 X 射线晶体学、核磁共振光谱学及生物信息学的发展，蛋白质分子结构测定速度加快，PDB 蛋白质结构数据库已收录 18 万个生物大分子晶体结构数据，为蛋白质药物分子设计提供基础。蛋白质药物分子设计基于蛋白质静态与动态结构分析及功能关联，现有策略包括提高活性、稳定性、特异性，降低免疫原性，延长体内半衰期等，方法有一级结构改造、化学修饰、翻译后修饰、融合蛋白等，且 AI 技术与生物信息学软件推动了改造后蛋白质结构预测与评价，助力新型药物开发。在设计优势方面，通过对半胱氨酸改造、优化分子内相互作用、降低蛋白酶水解敏感性等可提高药物稳定性；通过置换游离半胱氨酸、翻译后与化学修饰、突变表面氨基酸、增加短肽等能增加溶解性；借助糖基化修饰、聚乙二醇化修饰（分随机与定点修饰）、融合蛋白等可改善药代动力学性质；合理设计可改变蛋白质与相互作用分子的亲和力和特异性以改善生物学活性；通过人源化改造（嵌合抗体、改型抗体）、聚乙二醇化、改善溶液性质等能降低免疫原性。在现状上，2012-2021 年 FDA 批准新药中蛋白质药物占比 24.18%，2021 年 FDA、欧盟、日本批准新药中蛋白质药物或抗体类靶向药物占比均较高，未来药品需求将增长，审批改革与 AI 技术应用将推动蛋白质药物分子设计发展。

关键词：蛋白质药物分子设计；AI 技术；FDA 批准

DOI：10.69979/3029-2808.25.12.041

1 蛋白质药物分子设计的概况

随着 X 射线晶体学和核磁共振光谱学的不断发展，蛋白质分子结构的测定速度不断加快，到目前为止 PDB 蛋白质结构数据库共收录了 18 万个生物大分子的晶体结构数据。该数据库是美国 Brookhaven 国家实验室在 1971 年成立的，由结构生物信息学研究合作组织进行维护^[1-2]。随着测定结构的不断增加和对结构数据分析的逐步深入，生物信息学也得到了长足的发展，利用生物信息学软件对无晶体结构的蛋白质空间结构的预测也越来越准确。现阶段蛋白质分子设计技术就是基于对蛋白质静态空间结构与模拟环境下的动态结构分析与功能相关联，为蛋白质药物的合理设计提供理论依据。各种对蛋白质分子设计的策略也已经被报道，如提高活性、提高稳定性、增加特异性、降低免疫原性和延长体内半衰期等。分子设计的方法包括对蛋白质一级结构的改造、增加化学修饰、翻译后修饰以及融合蛋白等^[3]。最常见的优化方式是定点突变，早期这种方法一般采用试错的方式进行，成功率较低。近几年，该方法更多通过对目标蛋白质的高分辨率晶体结构进行分析，采用合理的结构设计的方式对蛋白质进行定点突变、序列替换和插入、序列截短、蛋白融合和翻译后修饰等。现在随着计算机 AI 技术的不断普及，生物信息学软件的不成熟，对改造后蛋白质分子模拟结构预测的日趋准确，对模拟结构

的评价逐渐完善，新型的蛋白质药物将不断被开发出来。

2 蛋白质药物分子设计的优势

2.1 提高蛋白质药物的稳定性

蛋白质药物暴露于非稳态的环境下会导致去折叠或降解。使用合理的优化方法，实现对蛋白质的分子改造，使其在蛋白酶、氧化、温度变化和 pH 值改变等条件下更加稳定。一种常规提升蛋白质稳定策略是对半胱氨酸的改造，其中包括突变游离的半胱氨酸，防止形成分子间或分子内二硫键。还包括把氨基酸突变成半胱氨酸，形成分子间或分子内二硫键，使分子结构更加稳定。Xia 等人研究发现，将人成纤维细胞生长因子-1（FGF-1）66 位的 Ala 突变为 Cys，使其与 83 位 Cys 形成二硫键，可以有效的提高 FGF-1 的整体稳定性^[4]，而将 16 位、83 位和 117 位的 Cys 都突变成 Ser 也可以显著的提升 FGF-1 的稳定性和体内半衰期^[5]。Ishikawa 等人通过对重组人粒细胞集落刺激因子（rhG-CSF）研究发现，将 17 位的游离的 Cys 突变为 Ala 可以将稳定性提高 5 倍，而将该位突变成 Ser，rhG-CSF 的稳定性没有得到提升^[6]。对于抗体大分子，将重链的 CDRH3 区域的某些 Cys 突变为 Ala，可以有效的提升稳定性。同时，抗体衍生物的稳定性的也取决于 CDRs 区域中 Cys 的位置^[7]。通过优化分子内相互作用，也可以显著提高蛋白质的整体

稳定性。通过计算机对重组人生长激素(hGH)的静电相互作用和极性氢的隐藏情况进行计算,选择了45个核心残基,利用电位修饰功能进行优化,对其中的6~10个氨基酸进行突变,结果显示突变体的变性温度提升到16℃,同时生物学活性也得到了提高^[8]。另一种提升蛋白质稳定性的策略是降低蛋白酶的水解敏感性。如果已知蛋白质中的某个特定位点容易发生蛋白质水解,则可以对其进行修饰,使其不再与假定的蛋白酶的底物相匹配。蛋白酶酶切位点通常位于蛋白质柔性环内,因此对该处的突变将降低蛋白质结构的灵活性。例如,凝血酶对凝血VIIIa因子(FVIIIa)的372位、740位和1689位Arg后的酶切位点进行切割并激活促凝活性,其中372位和1689位Arg后的酶切是激活的关键因素。通过突变凝血酶酶切所需的两个Arg,可以产生对蛋白酶水解抵抗力增强的FVIIIa工程突变体^[9]。

2.2 增加蛋白质药物的溶解性

蛋白质药物通常采用高浓度表达、纯化和制剂配方,因此在生理条件下避免蛋白质药物形成聚集,提高溶解度可以促进新药的研发。其中更为重要的是蛋白质药物获得良好的溶解度,可以有效的避免聚集,进而导致药物活性下降,生物利用度降低和免疫原性增加等不良风险。目前发现的几种有效策略已成功应用于减少蛋白质药物的聚集和提高溶解度。如前所述,置换游离的半胱氨酸残基可以有效的防止形成分子间二硫键导致的聚集。另外翻译后修饰和化学修饰也有助于提高蛋白质药物的溶解性,这将在后面的章节中进行讨论。将蛋白质表面的疏水氨基酸突变为亲水氨基酸可以有效的提升溶解性。Du等人对与表皮生长因子受体(EGFR)结合的Gp2结构域研究发现,将结构域表面的5个疏水氨基酸突变为亲水氨基酸可以有效的提高溶解性,同时对结合活性、表达量和热稳定性没有产生影响^[10]。在蛋白质的末端增加短肽,也是一个提高蛋白质药物的溶解度的有效方法。单链可变区片段(ScFv)由于其分子体积小和生产成本低已成为一种有效的替代全长单克隆抗体的药物候选物,但溶解度低仍然是限制其广泛应用的一个主要因素。Nautiyal等人通过在抗EGFR的ScFv的C端增加12个氨基酸残基的可溶性增强肽(SEP)使得85%的表达产物实现了可溶性表达,同时表达量提升了3倍^[11]。烟草腐蚀病毒(TEV)蛋白酶通过在C端连入SEP使得表达量提升了6.5倍,最适pH范围达到5~8,在60℃条件下拥有更长时间的稳定性,同时生物学活性没有受到影响^[12]。目前为止,对于蛋白质药物溶解性的提升更多是优化制剂配方而开展的研究。但对蛋白质结构

的研究和优化是从根本上解决药物溶解性的关键所在,后续随着研究的不断深入,更好的系统结构优化策略将会被发现,进而在改善溶解度的同时,最小的影响蛋白质的结构和功能。

2.3 改善蛋白质药物的药代动力学性质

随着对蛋白质结构的理解逐渐提高,对分子结构进行修饰,使调整蛋白质药代动力学参数成为可能。适当的调节治疗性生物制品的血清药物浓度可以提升疗效并减少副作用。改善蛋白质药物的药代动力学特性对提升疗效至关重要,因此有时以牺牲生物学活性为代价。除了去除蛋白酶水解位点,现在常用的几种改善策略分别为聚乙二醇修饰、糖基化和融合蛋白质等。

(1)在增加糖基化修饰程度方面,Song等人将重组人干扰素 β 1a(rhIFN- β 1a)氨基酸序列的第27位Arg突变为Thr,在25位增加了一个N糖基化位点,该位点糖基化修饰的增加,使分子中大量的 α 螺旋得到了保留,而分子间的 β 折叠减少。通过加速稳定性实验证实突变后稳定性提升3~6倍,同时减少了聚体的产生,并提升了药物在小鼠体内的半衰期^[13]。Amgen公司研制Aranesp®为新型的促红细胞生成素(EPO),该产品是在天然EPO氨基酸序列上增加了两个N糖基化位点,这两个N连接寡糖的修饰使药物在人体内半衰期从8.5h提高到25.3h,增加了约3倍,但体外结合活性下降了4倍。临床数据显示每周给予一次Aranesp®和每周给予三次EPO,对提升血红蛋白的效果是相似的^[14-18]。中裕新药研发的治疗艾滋病的人源化单克隆抗体Trogarzo®获得FDA批准上市,该药物与HIV关键受体人CD4结合,可阻断病毒的感染^[19-21]。然而,HIV-1病毒突变导致gp120包膜糖蛋白V5环的N连接寡糖缺失,对该药物产生了耐药性。结构分析表明该寡糖的缺失,使得gp120蛋白V5环与Trogarzo®单抗轻链之间产生了空隙,导致单抗无法破坏病毒。Song等人通过在Trogarzo®单抗轻链中一个接近gp120蛋白V5的位置添加一个N连接寡糖,将该空隙重新填充。实验研究表明突变体在体外活性检测中可以100%的中和118种不同的HIV-1毒株,包括10个对Trogarzo®单抗耐药的毒株,同时也延长了药物在人体内的半衰期^[22-23]。

(2)在聚乙二醇化修饰方面,现在主要分成两类。第一类为随机修饰,主要针对蛋白质表面具有亲核活性的氨基酸。Horizon公司获得FDA批准的Krystexxa®是此类修饰的代表,该药物为聚乙二醇化尿酸氧化酶,适用于常规治疗无效的成人慢性痛风患者。Krystexxa®为猪源尿酸氧化酶,使用分子量为10kDa的mPEG对酶表

面的 Lys 进行修饰, 每两周给药一次, 每次静脉注射 8 mg^[24-26]。Zhang 等人使用 5kDa 的 mPEG 对犬源的尿酸氧化酶进行修饰, 每个亚基修饰 7-11 个 mPEG, 使用三种不同动物对尿酸性肾病和尿酸引起的急性关节炎模型进行评价, 显示具有显著的治疗和预防作用。由于采用饱和式的修饰方法, 在食蟹猴体内的药物半衰期可达到 191.48h^[27-29]。另一类为定点修饰, 主要包括对蛋白质 N 末端和自由巯基的修饰。其中 N 端修饰的代表为 Amgen 公司研发的 Neulasta®, 聚乙二醇分子通过还原烷基化与 GCSF 的 N 端进行共价连接, 实现定点偶联, 使药物在人体内的半衰期从 3.6h 提高到 42h。在化疗周期内, 给药一次 Neulasta®与每天给药的 GCSF 相比, 有效的减少了不良反应严重中性粒细胞减少症的持续时间。在临床实验中, 由于中性粒细胞减少导致发热等不良反应的发生率明显降低^[30-31]。对自由巯基修饰的代表为 UCB 公司开发的 Cimzia®, 该药物为人源化抗 TNF α 结合片段 (Fab) 与 40kDa 的聚乙二醇通过 C 端的游离 Cys 进行定点修饰, 主要用于治疗类风湿性关节炎和克罗恩氏病^[32-35]。临床试验显示在 12 周的给药周期内, Cimzia®每 2 周给予 400mg 的疗效要优于 Enbrel®推荐的最高给药剂量。由于 Cimzia®缺乏单克隆抗体的 Fc 片段, 在药代动力学方面更具优势, 同时其胎盘转运量较低, 在母乳喂养期间传递给婴儿的剂量相对更低^[36-38]。

(3) 融合蛋白方面, Nikravesh 等人通过将白蛋白结合域 (ABD) 融合到 GCSF 氨基酸序列的 N 端并在 *E. coli* 中表达。圆二色谱和荧光光谱显示 ABD 融合 GCSF 对分子的二级和三级结构没有显著影响。动态光散射和 SEC-HPLC 分析显示无聚体形成。ABD-GCSF 对 NFS-60 细胞在 72h 增殖显示 EC50 值为 75.76 pg/ml, GCSF 为 73.1 pg/ml, PEG-GCSF 为 44.6 pg/ml。在大鼠体内, ABD-GCSF 的血清半衰期为 9.3 \pm 0.7h, 显著优于 GCSF 的 1.7 \pm 0.1 h, 但略低于 PEG-GCSF^[39]。

对蛋白质药物的代谢途径的了解可以有效的帮助我们选择设计策略。对于低分子量蛋白质药物候选物, 肾脏的清除作用占主导地位, 一般采用增加有效分子量的方式进行设计。在配体与受体系统中, 药物的清除为受体介导与肾脏两种方式的相互影响。亲和力和特异性修饰是许多药物候选物优化的核心策略, 但有些受体介导的清除机制没有被完全阐明, 其在体内药物有效性方面扮演重要角色。

2.4 改善生物学活性

合理的分子设计可以改变蛋白质与其相互作用分子的亲和力和特异性。在某些情况下, 增加目标蛋白质

的亲和力可以增加生物学活性。但在某些情况下, 可以通过降低非目标分子的亲和力来减少不需要的生物学活性。亲和力增强的一个例子, Venkateswarlu 等人发现将 FVIIIa 的 519 位 Asp 和 665 位 Glu 突变为 Val 或 Ala 可以增强与 A2 区域的亲和力。并对 8 个疏水突变体进行研究发现, 将 666 位 Asp 突变为 Val、Tyr、Met 和 Phe 都可以最大限度的提升与 A2 结构域的亲和力^[40]。降低非目标分子的亲和力的例子, 比如 hGH 包含两个不同的受体结合位点, 并在结合时使受体二聚化。Clackson 等人研究发现将 hGH 的第二个受体结合区域的 120 位 Gly 突变为 Arg, 可以阻断受体二聚化, 进而实现对 hGH 的拮抗作用。在第一个受体结合区域的功能表位之外, 对多个 Ala 进行突变可使该区域的亲和力提高 10 倍^[41]。在这种情况下, 合理的设计可以将蛋白质药物推向治疗所需的状态。

2.5 降低免疫原性

蛋白质药物可能产生有害的免疫反应, 这也是开发蛋白质药物不得不面对的一个重大挑战。免疫反应通常对非人类蛋白质最为严重, 例如 Sanofi-Synthelabo 公司研制的 Elitek®, 是来源于 *Aspergillus flavus* 的尿酸氧化酶是重组蛋白制剂, 通过酵母表达系统生产。其批准的适应症是预防和治疗血液肿瘤 (例如白血病和淋巴瘤) 和实体瘤病人化疗后, 由于肿瘤溶解导致高尿酸血症时的降尿酸治疗, 尤其当肿瘤溶解对患者具有潜在的生命危险的情况, 该药物与传统药物相比具有更高的效率^[42-44]。后来也试验用于治疗痛风和风湿性关节炎病人的高尿酸血症, 由于该产品极强的免疫原性和较短半衰期, 只能用于急性高尿酸血症的治疗, 无法对慢性高尿酸血症及痛风患者进行用药, 进而极大的限制了药物的使用范围^[45-46]。解决这种情况最有效的办法是进行人源化改造, 在单克隆抗体的人源化改造策略中, 将外源单抗的可变区保留, 其他区域替换为人源单抗, 该类抗体被称为嵌合抗体, 可以使人源化程度提升到 70%。而将外源单抗的互补决定区 (CDR) 保留, 这类抗体称为改型抗体, 人源化程度可提升到 90%以上。强生公司开发的 Remicade®是嵌合抗体的代表, 该药物采用了鼠源单抗的可变区序列, 恒定区使用人源单抗进行替换, 抗体保持了亲本鼠源单抗的全部亲和力和特异性。Remicade®可以阻断促炎症细胞因子 TNF α 对机体的作用, 对于银屑病和类风湿性关节炎具有快速和显著的疗效。Strand 等人对 21000 份出版物进行筛选, 其中 443 份报道过使用不同蛋白质药物产生抗药物抗体 (ADA) 的情况, Remicade®的抗体产生率为 0~83%^[47], 并且随着 ADA 的形

会引起药物的血清浓度下降,降低疗效,提高输液反应的发生率^[48]。改型抗体的代表为 Genentech 公司开发的 Herceptin®,该单抗仅保留了鼠源单抗的互补决定区(CDR),其余部分全部为人源抗体。Herceptin®可以靶向识别人表皮生长因子受体 2 (HER-2),用于对晚期 HER-2 阳性的乳腺癌患者的治疗。Padron 等人对 51 位非转移性 HER-2 阳性的乳腺癌患者进行研究,这些患者通过静脉和皮下给予 Herceptin®,没有检测到 ADA 的产生^[49]。

在某些情况下,聚乙二醇化可以通过空间位阻效应阻断免疫细胞对抗原表位的接触,降低患者产生中和抗体的比例。Richette 等人报道聚乙二醇可以显著的增加尿酸氧化酶的体内半衰期,降低药物抗原性和免疫原性^[50]。临床实验表明,Krystexxa®在针对慢性难治性痛风治疗过程中,91%的患者引发了不同程度的免疫原性反应,其中输注反应发生率为 26%,过敏反应发生率为 6.5%^[51]。改善治疗蛋白溶液性质的合理设计方法也可能降低免疫原性,因为聚体通常比可溶性蛋白更具有免疫原性。

3 分子设计蛋白质药物的现状

蛋白质的分子设计不仅是药物新的研究手段,也是先进的生产技术,它在新药的研究开发中起着重要的作用。2012-2021 年的 10 年期间,FDA 共批准了 430 个新药,蛋白质药物为 104 个,占比为 24.18%。2021 年 FDA 共批准 50 个新药,其中蛋白质药物 14 个,占比为 28%。2021 年欧盟批准了 49 个新药,其中抗体类的靶向药物 13 个,占比为 26.53%。日本批准了 52 个新药,蛋白质药物也具有较高的占比。未来 5 年,随着疫情的影响,2022 年全球对药品的需求将达到 11000 亿美元。随着审批制度的改革,越来越多新药将采用加速审批的渠道获得批准,进而大幅提升新药开发进度并降低临床实验的研究费用。同时,随着 AI 技术的突破,越来越多的制药企业和科研机构在新药开发中广泛使用,比如在新药靶点的发现、药物候选物筛选、药物分子设计、有效性和安全性的预测以及精准医疗的实施等,表 1 为已批准上市的蛋白质分子设计药物的代表。未来 10 年,随着越来越多的药物靶点的发现和对已上市药物结构和功能研究的不断深入,蛋白质的分子设计一定会取得良好的结果和广泛的应用。

表 1 已批准上市的蛋白质分子设计药物

产品名称	所属家族	公司	分子改造	改造优势
Proleukin	IL-2	Chiron	突变游离 Cys	减少聚体;提高活性
Betaseron	IFN- β	Berlex	突变游离 Cys	减少聚体
Humalog	Insulin	Eli Lilly	Lys 与 Pro 对换	快速起效
Adynovate	FVIII	Baxalta	PEG 修饰	延长半衰期
Plegridy	IFN- β	Biogen	PEG 修饰	延长半衰期
Omontys	EPO	Takeda	PEG 修饰	延长半衰期
Krystexxa	Uricase	Savient	PEG 修饰	降低免疫原性
Cimzia	Antibody	UCE	PEG 修饰	延长半衰期
Mircera	EPO	Roche	PEG 修饰	延长半衰期
Enbrel	TNF receptor	Amgen	Fc 融合蛋白	延长半衰期
Ontak	IL-2	Amgen	融合蛋白	延长半衰期
Aranesp	EPO	Amgen	增加糖基化位点	延长半衰期

4 结论与展望

蛋白质药物分子设计已形成较为系统的理论与技术体系,其以蛋白质结构分析为核心,借助 X 射线晶体学、核磁共振光谱学及生物信息学等技术,实现了对蛋白质药物多方面性能的优化。从提高稳定性、增加溶解性,到改善药代动力学性质、生物学活性以及降低免疫原性,均有明确且有效的设计策略与方法,如半胱氨酸改造、糖基化修饰、聚乙二醇化修饰、人源化改造等,这些策略和方法在众多药物研发实例中得到验证,为蛋

白质药物的性能提升提供了可靠保障。

蛋白质药物在新药市场中占据重要地位,2012-2021 年 FDA 批准的新药中蛋白质药物占比超两成,2021 年多个地区批准新药中蛋白质类药物占比也较为可观,且已有多款经过分子设计的蛋白质药物成功上市(如 Proleukin、Aranesp、Herceptin 等),并在临床治疗中发挥重要作用,充分体现了蛋白质药物分子设计的实际应用价值与市场潜力。

市场与需求层面,受疫情影响,2022 年全球药品需求已呈现增长趋势,未来随着人口老龄化加剧、疾病谱

变化等因素,对高效、安全蛋白质药物的需求将持续上升,为蛋白质药物分子设计领域带来广阔的市场空间。

政策与技术层面,药品审批制度改革将使更多新药通过加速审批渠道上市,缩短研发周期、降低研发成本,为蛋白质药物研发提供更有利的政策环境;同时,AI技术在新药靶点发现、候选物筛选、分子设计、有效性与安全性预测及精准医疗实施等方面的广泛应用,将大幅提升蛋白质药物分子设计的效率与准确性,推动该领域技术革新。

研究与应用层面,随着对蛋白质结构与功能研究的不断深入,以及更多药物靶点的发现,蛋白质药物分子设计将朝着更精准、更高效的方向发展。未来有望开发出性能更优、适应症更广的蛋白质药物,进一步拓展其在临床治疗中的应用范围,为人类健康事业做出更大贡献。预计未来 10 年,蛋白质药物分子设计将在理论研究、技术创新与实际应用上取得更多突破,实现更广泛的推广与应用。

参考文献

- [1] Burley SK, Berman HM, Kleywegt GJ, et al. Protein Data Bank (PDB): the single global macromolecular structure archive[J]. *Methods in molecular biology*, 2017,1607:627-641.
- [2] Burley SK, Bhikadiya C, Bi C, et al. RCSB Protein Data Bank: celebrating 50 years of the PDB with new tools for understanding and visualizing biological macromolecules in 3D[J]. *Protein science: a publication of the protein society*, 2022, 31(1):187-208.
- [3] Marshall SA, Lazar GA, Chirino AJ, et al. Rational design and engineering of therapeutic proteins[J]. *Drug discovery today*, 2003,8(5): 212-221.
- [4] Xia X, Kumru OS, Blaber SI, et al. Engineering a cysteine-free form of human fibroblast growth factor-1 for “second generation” therapeutic application[J]. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2016, 105(4):1444-1453.
- [5] Xia X, Longo LM, Blaber M. Mutation choice to eliminate buried free cysteines in protein therapeutics[J]. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2015,104(2):566-576.
- [6] Ishikawa M, Iijima H, Statake-Ishikawa R, et al. The substitution of cysteine 17 of recombinant human G-CSF with alanine greatly enhanced its stability[J]. *Cell structure and function*, 1992,17(1):61-65.
- [7] Ma H, O'Fagain C, O'Kennedy R. Unravelling enhancement of antibody fragment stability-role of format structure and cysteine modification[J]. *Journal of immunological methods*, 2019, 464:57-63.
- [8] Filikov AV, Hayes RJ, Luo P, et al. Computational stabilization of human growth hormone [J]. *Protein science: a publication of the protein society*, 2002,11(6):1452-1461.
- [9] Pipe SW, Kaufman RJ. Characterization of a genetically engineered inactivation-resistant coagulation factor VIIIa[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 1997, 94(22):11851-11856.
- [10] Du F, Kruziki MA, Zudock EJ, et al. Engineering an EGFR-binding Gp2 domain for increased hydrophilicity[J]. *Biotechnology and bioengineering*, 2019,116(3):526-535.
- [11] Nautiyal K, Kibria MG, Akazawa-Ogawa Y, et al. Design and assessment of an active anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) single chain variable fragment (ScFv) with improved solubility[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2019,508(4): 1043-1049.
- [12] Nautiyal K, Kuroda Y. A SEP tag enhances the expression, solubility and yield of recombinant TEV protease without altering its activity[J]. *New biotechnology*, 2018,42:77-84.
- [13] Song K, Yoon IS, Kim NA, et al. Glycoengineering of interferon- β 1a improves its biophysical and pharmacokinetic properties[J]. *Plos one*, 2014,9(5): e96967.
- [14] Ibbotson T, Goa KL. Darbepoetin alfa[J]. *Drugs*, 2001,61(14):2097-2104.
- [15] Locatelli F, Vecchio LD. Darbepoetin alfa.

- Amgen[J]. Current opinion in investigational drugs, 2001,2(8):1097-1104.
- [16] Macdougall IC, Padhi D, Jang G. Pharmacology of darbepoetin alfa[J]. Nephrology, dialysis, transplantation, 2007,22(4): iv2-iv9.
- [17] Cases A. Darbepoetin alfa: a novel erythropoiesis-stimulating protein[J]. Drugs of today, 2003,39(7):477-495.
- [18] Joy MS. Darbepoetin alfa: a novel erythropoiesis-stimulating protein[J]. The annals of pharmacotherapy, 2002,36(7-8):1183-1192.
- [19] Markham A. Ibalizumab: first global approval[J]. Drugs, 2018,78(7):781-785.
- [20] Chahine EB, Durham SH. Ibalizumab: the first monoclonal antibody for the treatment of HIV-1 infection[J]. The annals of pharmacotherapy, 2021,55(2):230-239.
- [21] Rizza RA, Bhatia R, Zeuli J, et al. Ibalizumab for the treatment of multidrug-resistant HIV-1 infection[J]. Drugs today, 2019,55(1):25-34.
- [22] Song R, Oren DA, Franco D, et al. Strategic addition of an N-linked glycan to a monoclonal antibody improves its HIV-1 neutralizing activity[J]. Nature biotechnology, 2013,31(11):1047-1052.
- [23] Toma J, Weinheimer SP, Stawiski E, et al. Loss of asparagine-linked glycosylation sites in variable region 5 of human immunodeficiency virus type 1 envelope is associated with resistance to CD4 antibody ibalizumab[J]. Journal of virology, 2011,85(8):3872-3880.
- [24] Majjhoo A, Kumar A, Zdains M, et al. Comparison of two corticosteroid pre-infusion regimens for pegloticase in the United States: a retrospective analysis in community rheumatology practices[J]. Drugs - real world outcomes, 2019,6(4):165-171.
- [25] Hershfield MS, Ganson NJ, Kelly SJ, et al. Induced and pre-existing anti-polyethylene glycol antibody in a trial of every 3-week dosing of pegloticase for refractory gout, including in organ transplant recipients[J]. Arthritis research & therapy, 2014,16(2): R63.
- [26] Sherman MR, Saifer MG, Perez-Ruiz F. PEG-uricase in the management of treatment-resistant gout and hyperuricemia[J]. Advanced drug delivery reviews, 2008,60(1):59-68.
- [27] Zhang C, Fan K, Luo H, et al. Characterization, efficacy, pharmacokinetics, and biodistribution of 5kDa mPEG modified tetrameric canine uricase variant[J]. International journal of pharmaceuticals, 2012,430(1-2):307-317.
- [28] Zhang C, Fan K, Ma X, et al. Impact of large aggregated uricases and PEG diol on accelerated blood clearance of PEGylated canine uricase[J]. Plos one, 2012,7(6): e39659.
- [29] Li H, Huo J, Sun D, et al. Determination of PEGylation homogeneity of polyethylene glycol-modified canine uricase[J]. Electrophoresis, 2021,42(6):693-699.
- [30] Molineux G. The design and development of pegfilgrastim (PEG-rmethHuG-CSF, Neulasta) [J]. Current pharmaceutical design, 2004,10(11):1235-1244.
- [31] Crawford J. Once-per-cycle pegfilgrastim (Neulasta) for the management of chemotherapy-induced neutropenia[J]. Seminars in oncology, 2003,30(4 Suppl 13):24-30.
- [32] Lee A, Scott LJ. Certolizumab pegol: a review in moderate to severe plaque psoriasis[J]. Biodrugs, 2020,34(2):235-244.
- [33] Goel N, Stephens S. Certolizumab pegol[J]. Mabs, 2010,2(2):137-147.
- [34] Deeks ED. Certolizumab pegol: a review in inflammatory autoimmune diseases[J]. Biodrugs, 2016,30(6):607-617.
- [35] Acosta-Felquer ML, Rosa J, Soriano ER. An evidence-based review of certolizumab pegol in the treatment of active psoriatic arthritis: place in therapy[J]. Open access rheumatology, 2016,30(8):37-44.

- [36] Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, et al. Molecular mechanisms of action of anti-TNF- α agents - comparison among therapeutic TNF- α antagonists[J]. Cytokine, 2018,101(1):56-63.
- [37] Gottlieb AB, Blauvelt A, Thaci D, et al. Certolizumab pegol for the treatment of chronic plaque psoriasis: results through 48 weeks from 2 phase 3, multicenter, randomized, double-blinded, placebo-controlled studies (CIMPASI-1 and CIMPASI-2) [J]. Journal of the American academy of dermatology, 2018,79(2):302-314.
- [38] Lebwohl M, Blauvelt A, Paul C, et al. Certolizumab pegol for the treatment of chronic plaque psoriasis: result through 48 weeks of a phase 3, multicenter, randomized, double-blind, etanercept and placebo-controlled study (CIMPACT), 2018,79(2):266-276.
- [39] Nikraves F, Shirkhani S, Bayat E, et al. Extension of human GCSF serum half-life by the fusion of albumin binding[J]. Scientific reports, 2022,12(1):667.
- [40] Venkateswarlu D. Role of hydrophobic mutations on the binding affinity and stability of blood coagulation factor VIIa: a computational molecular dynamics and free-energy analysis [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2014,450(1):735-740.
- [41] Clackson T, Ultsch MH, Wells JA, et al. Structural and functional analysis of the 1:1 growth hormone: receptor complex reveals the molecular basis for receptor affinity[J]. Journal of molecular biology, 1998,277(5):1111-1128.
- [42] Campara M, Shord SS, Haaf CM. Single-dose rasburicase for tumour lysis syndrome in adults: weight-based approach[J]. Journal of clinical pharmacy and therapeutics, 2009,34(2):207-2013.
- [43] Knoebel RW, Lo M, Crank CW. Evaluation of a low, weight-based dose of rasburicase in adult patients for the treatment or prophylaxis of tumor lysis syndrome[J]. Journal of oncology pharmacy practice, 2011,17(3):147-154.
- [44] Tatay VS, Castilla JD, Ponce JM, et al. Rasburicase versus allopurinol in the treatment of hyperuricaemia in tumour lysis syndrome[J]. Randomized controlled trial, 2010,72(2):103-110.
- [45] Allen KC, Champlain AH, Cotliar JA, et al. Risk of anaphylaxis with repeated courses of rasburicase: a research on adverse drug events and reports (RADAR) project[J]. Drug safety, 2015,38(2):183-187.
- [46] Cheuk DK, Chiang AK, Chan GC, et al. Urate oxidase for the prevention and treatment of tumour lysis syndrome in children with cancer [J]. The cochrane database of systematic reviews, 2017,3(3): CD006945.
- [47] Strand V, Balsa A, Al-Saleh J, et al. Immunogenicity of biologics in chronic inflammatory diseases: a systematic review[J]. Biodrugs, 2017,31(4):299-316.
- [48] Gorovits B, Baltrukonis DJ, Bhattacharya I, et al. Immunoassay methods used in clinical studies for the detection of anti-drug antibodies to adalimumab and infliximab[J]. Clinical and experimental immunology, 2018,192(3):348-365.
- [49] Padron IM, Garcia JG, Diaz RR, et al. Anti-drug antibodies anti-trastuzumab in the treatment of breast cancer[J]. Journal of oncology pharmacy practice, 2021,27(6):1354-1356.
- [50] Richette P, Garay R. Novel drug discovery strategies for gout[J]. Expert opinion on drug discovery, 2013,8(2): 183-189.
- 作者简介: 袁杰 (1982), 男, 汉, 辽宁沈阳, 高级工程师, 博士研究生, 沈阳三生制药有限责任公司, 研究方向: 蛋白质分子设计。