

模拟 PEG 的聚多肽融合技术研究进展

陈 荣, 尹 骏, 邵 美, 姚文兵, 高向东*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要 多肽和蛋白质药物特异性高、生物活性高, 但是稳定性差、血浆半衰期短, 限制了其在临床上的应用。PEG 修饰技术是蛋白质长效化的常用手段, 但仍存在一定的缺点, 因此近年来研究者开发了模拟 PEG 的聚多肽融合技术。聚多肽融合技术是通过 DNA 重组技术将蛋白质药物与特殊的氨基酸序列融合, 增加药物的流体动力学体积或产生电荷效应, 从而延缓肾小球滤过, 增加融合蛋白的血浆半衰期。本文对已有的多种聚多肽及其在蛋白质长效化方面的研究进行综述。

关键词 聚多肽融合技术; 治疗蛋白; 血浆半衰期; 流体动力学体积; 肾小球滤过

中图分类号 TQ317 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)06-0648-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160603

引用本文 陈荣, 尹骏, 邵美, 等. 模拟 PEG 的聚多肽融合技术研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(6):648-653.

Cite this article as: CHEN Rong, YIN Jun, SHAO Mei, et al. Advances in recombinant polypeptide mimetics of PEG [J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(6):648-653.

Advances in recombinant polypeptide mimetics of PEG

CHEN Rong, YIN Jun, SHAO Mei, YAO Wenbing, GAO Xiangdong*

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

Abstract Peptide and protein biologics possess high specificity and high biological activity, but their poor stability and short plasma half-life have limited clinical application. One established strategy to increase half-life of therapeutic proteins is chemical conjugation of the biologic with PEG. Nevertheless, PEGylation technology has some drawbacks, so recombinant polypeptide mimetics of PEG have gradually developed in recent years. Pharmaceutically active protein can be fused with specific amino acid sequences using recombinant DNA technology, and then increase hydrodynamic volume or produce charge effect, which retards kidney filtration and eventually prolongs the half-life. This article mainly reviews kinds of polypeptides and the research progress in half-life extension of therapeutic proteins.

Key words polypeptide fusion technology; therapeutic proteins; plasma half-life; hydrodynamic volume; glomerular filtration

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81430082)

随着生物技术的快速发展, 多肽和蛋白质药物已成为药物研发和临床治疗的热点。目前已上市或进入临床试验的蛋白类药物已达数百种, 涉及的病症也超过 200 种^[1]。蛋白质类药物具有特异性高、生物活性高等优点, 但消化系统和血液中存在大量蛋白酶会使蛋白质快速降解, 同时相对分子质量较小的蛋白质易被肾小球滤过而快速清除, 所以

大多数蛋白质药物的体内半衰期较短, 严重限制其临床应用。

PEG 修饰技术是蛋白质长效化的常用技术, 目前已有 12 种 PEG 化蛋白药物被 FDA 批准上市^[2-4]。PEG 修饰能增加药物溶解性、降低免疫原性、减少蛋白酶降解、增加药物流体动力学体积, 但仍存在成本高、纯化工艺复杂、长期给药易产生抗

PEG抗体^[5-7]、肾脏中易聚集等缺点^[8]。为了解决这些问题,近年来研究者开发了模拟PEG的聚多肽融合技术,利用DNA重组技术将治疗蛋白与特殊的氨基酸序列融合,增加蛋白质的流体动力学体积或产生电荷效应,从而延缓肾滤过。本文将对各种聚多肽融合技术进行综述。

1 聚多肽融合技术延长半衰期的原理

减少肾小球清除率可有效地延长蛋白类药物的循环半衰期,而肾小球滤过率取决于药物的大小和电荷。模拟PEG修饰的聚多肽呈无规则卷曲构

象,使聚多肽融合蛋白具有较大的流体动力学体积,从而减少肾小球滤过(图1)。另外,有些聚多肽带大量负电荷,会与基底膜发生静电排斥进而减慢肾小球滤过。

与PEG修饰技术相比,聚多肽融合技术具有以下优点:①聚多肽具有生物可降解性,可避免在器官或细胞中蓄积;②可通过基因工程技术将聚多肽和蛋白质融合表达,避免了体外化学偶联和修饰后纯化步骤;③可通过调整多肽链长度来调节融合蛋白半衰期;④使用范围广,原核和真核系统都可用于表达融合蛋白(表1)。

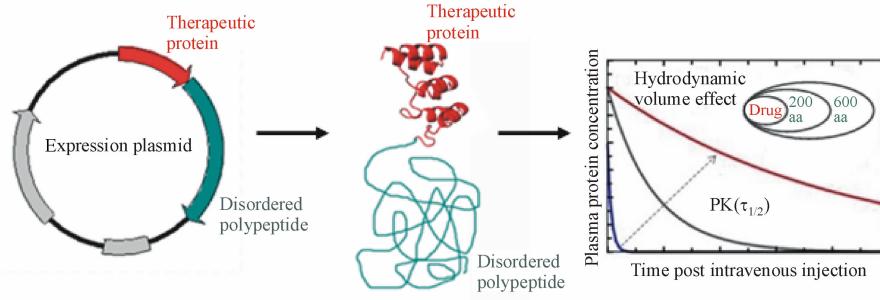


图1 聚多肽融合技术延长半衰期的原理示意图(聚多肽与蛋白融合表达,随着聚多肽长度增加,融合蛋白流体动力学体积逐步增大,使得血浆半衰期大大提高)

表1 PEG及各种聚多肽性质的比较

性能	PEG	HRM	GLK	ELP	PG	Genetic polymer	HAP	XTEN	PAS
基因融合	否	是	是	是	是	是	是	是	是
生物可降解	否	是	是	是	是	是	是	是	是
延长半衰期	++	+	+	+	+	+	+	++	++
无/低免疫原性	否	是	是	是	是	?	?	是	是
均一产物	否	是	是	是	是	否	是	是	是
带电荷	否	是	是	是	是	是	否	是	否
生物活性损失	是	?	否	是	?	?	否	是	否
临床产品	有	无	无	有	有	无	无	有	无
上市产品	有	无	无	无	无	无	无	无	无

++:大大延长半衰期;+:可延长半衰期;?:未有报道

PEG:聚乙二醇;HRM:人工重复序列;GLK:明胶样蛋白聚多肽;ELP:弹性蛋白样聚多肽;PG:聚谷氨酸;Genetic polymer:Cell Therapeutics公司开发的一种聚多肽;HAP:富含Gly的聚多肽;XTEN:Amunix公司开发的一种聚多肽;PAS:由Pro、Ala和Ser组成的聚多肽

2 聚多肽种类及应用

2.1 天然来源的聚多肽

反式唾液酸酶是克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)的主要毒力因子^[9],其催化区域的C端是一个被称为“shed acute phase antigen (SAPA)”的区域。SAPA是由亲水的、带负电的基序(DSSAHSTPSTPA)组成的重复序列,它能提高唾液酸酶在血液中的稳定性。研究表明,C端含13个该基序的唾液酸酶在小鼠体内的半衰期是不含SAPA的唾液酸酶的5

倍。另外,在*T. cruzi*抗原Tc13中发现带13个负电荷的重复序列[EPKSA]_n,将唾液酸酶的催化区域与其融合后,具有类似的半衰期延长作用^[10]。天然聚多肽改善融合蛋白半衰期的确切机制并不清楚,但可能由于这些重复序列无二级结构且带负电荷,能减缓肾小球滤过。因SAPA和Tc13有很高的免疫原性,Alvarez等^[11]在此基础上设计了基序为PSTAD的人工重复序列(hybrid repetitive motif, HRM)。克氏锥虫反式唾液酸酶和大鼠酪氨

酸氨基转移酶与 HRM 融合后,半衰期延长 4.5~6 倍,且在动物实验中显示较低的免疫原性。

2.2 明胶样蛋白聚多肽

明胶是动物胶原蛋白的水解产物,包含一段 Gly-Xaa-Yaa 重复序列,其中 Xaa 和 Yaa 主要分别为脯氨酸和 4-羟基脯氨酸^[12],其伸展的构象及亲水性使明胶具有较大的流体动力学半径。Huang 等^[13]将明胶中除 Pro 外的疏水残基全部替换为亲水残基,设计了由 Gly、Pro、Glu、Gln、Asn、Ser、Lys 组成的长度为 116 个氨基酸的明胶样单体(gelatin-like monomers, GLKm),4 个相同的 GLKm 组成明胶样蛋白(gelatin-like protein, GLK)。在粒细胞集落刺激因子(G-CSF)的 C 端融合 GLK 并在毕赤酵母中分泌表达,GLK/G-CSF 保留了 G-CSF 的生物活性,40 °C 孵育 48 h 后融合蛋白形成的聚集体较 G-CSF 减少,且大鼠皮下注射 GLK/G-CSF 后半衰期提高 5.7 倍。对小鼠每周进行 4 次免疫接种,未检测到抗 GLK 抗体。GLK 聚多肽改善融合蛋白半衰期的原因可能是:GLK 的延伸结构减少融合蛋白酶解;融合蛋白流体动力学体积增加从而减缓肾清除速率;GLK 的负电荷减少融合蛋白的外渗。

2.3 弹性蛋白样聚多肽

弹性蛋白原是弹性蛋白的可溶性前体,它由富含 Lys/Ala 的亲水区和具有重复序列的疏水弹性区域组成。根据疏水区域的氨基酸序列,人工设计一系列弹性蛋白样聚多肽(elastin-like polypeptides, ELPs)。最常见的 ELPs 为(VPGXG)_n,其中 X 为除 Pro 外的任意氨基酸^[14-15]。ELP 具有临界相转变温度(inverse transition temperature, T_i),当溶液温度低于 T_i 时,ELP 高度可溶;当温度高于 T_i 时,ELP 聚集成不溶性微团聚体;当温度再次低于 T_i 时,ELP 发生复溶^[16]。改变 X 残基和链长度可调节 ELP 的 T_i ^[17-18],利用该性质选择合适的 ELP,在 *E. coli* 中与蛋白药物融合表达,使其在室温可溶而在哺乳动物体内聚集成微团聚体,延缓药物释放;另外,其较大流体动力学体积可延缓肾清除。IFN-ELP 的血浆半衰期(8.6 h)是 IFN- α (0.3 h)的 27.7 倍,且抗肿瘤活性增强^[19]。抗 TNF 的单克隆抗体 V(H)H 与 ELP 融合后,半衰期显著增加 24 倍^[20]。免疫系统通常难以区分天然弹性蛋白和 ELPs,所以 ELPs 具有良好的生物相容性和低免疫原性。另外,ELPs 可被内源胶原酶降解,有效避免

体内蓄积。PhaseBio 公司正在开发 ELP 融合蛋白药物,其中长效化 GLP-1 类似物 GlymeraTM 已进入临床Ⅱ期^[21]。

2.4 聚阴离子聚多肽

聚阴离子聚多肽的负电荷可增加药物水溶性,其在水溶液中的无规卷曲构象^[22]可增加流体动力学半径,从而延长融合蛋白的循环半衰期。OPAX-IOTM 是 Cell Therapeutics 公司开发的紫杉醇靶向制剂,将紫杉醇负载于聚谷氨酸(polyglutamate, PG)载体,形成的复合物在循环系统和正常组织中稳定存在,到达肿瘤部位经组织蛋白酶 B 降解后释放出紫杉醇,达到减毒增效目的,研究表明 OPAX-IOTM 在人体内半衰期较未修饰的紫杉醇提高 3~14 倍^[23]。Leung 等^[24]在 G-CSF 的 N 端融合 175 个残基的 PG 或在 IFN α -2 的 C 端融合 84 个残基的 PG,并在 *E. coli* 细胞质中可溶表达。聚谷氨酸 G-CSF 和聚谷氨酸 IFN α -2 在细胞实验中仍表现相应的生物活性,但目前还没有相关药代动力学研究数据。

2.5 Genetic PolymersTM 聚多肽

蛋白质经 N-连接糖基化修饰后,溶解性增大、对蛋白酶的敏感性降低、流体动力学体积增大、体内生物活性提高、免疫原性降低^[25-26]。Cell Therapeutics 公司开发了一种无结构的聚多肽 Genetic PolymerTM,该聚多肽由 2~500 个氨基酸基序构成,这些基序包含 3~6 种氨基酸,其中 Gly、Asn、Gln 占大部分,Ala、Ser、Thr、Asp、Glu 占少数。在真核表达系统中,Asn-Xaa-Ser/Thr 基序(Xaa 为除 Pro 外的任意氨基酸)的 Asn 侧链会发生 N-连接糖基化修饰。将治疗蛋白与该聚多肽在真核宿主中融合表达,一方面聚多肽增加了蛋白的流体动力学体积,另一方面蛋白质翻译后的糖基化修饰可进一步增加分子大小并阻碍蛋白酶的酶解。在 G-CSF 的 C 端融合由 155 个 NNT 组成的 Genetic PolymerTM 并在 CHO 细胞中分泌表达。融合蛋白 G-CSF-(NNT)₁₅₅ 糖基化程度高,并且未发现(NNT)₁₅₅ 被蛋白酶降解,将该融合蛋白静脉或皮下注射到小鼠体内可增加白细胞和中性粒细胞的数量,表明融合蛋白仍具有相应活性。此外,单次给药后,其在小鼠体内的半衰期增加 4 倍^[27]。

2.6 富含 Gly 的聚多肽

富含 Gly 的聚多肽(glycine-rich homo-amino-

acid polymers, HAPs)是最简单的基因编码的 PEG 模拟肽。化学合成的多聚 Gly 难溶于水,因此,需引入含羟基的 Ser 或带负电的 Glu 来增加亲水性。目前开发最成熟的 HAP 是(Gly₄Ser)_n,其在溶液中呈无规卷曲且免疫原性低。Schlapschy 等^[28]在治疗性抗体 Trastuzumab (Herceptin[®]) 的重组 Fab 片段轻链的 C 端融合(Gly₄Ser)₂₀和(Gly₄Ser)₄₀,并在大肠杆菌周质中可溶表达,通过亲和纯化获得融合蛋白 Fab-(Gly₄Ser)₂₀和 Fab-(Gly₄Ser)₄₀。Fab 片段的轻重链比例为 1:1,表明 HAP 不会影响轻重链间二硫键的形成,且融合蛋白保留了与 Her2 抗原的结合能力。Fab-(Gly₄Ser)₄₀的血浆半衰期延长约 3 倍,该融合蛋白适合特定的医疗用途,比如在体成像。但是,更长的(Gly₄Ser)_n水溶性差、易聚集,不利于 HAP 融合蛋白的生产和储存,限制了该类聚多肽的应用。

2.7 XTEN 聚多肽

Amunix 公司开发了一系列可溶的、化学稳定的、无结构的非重复重组聚多肽。在其设计过程中,排除了疏水氨基酸 Phe、Ile、Leu、Met、Val、Trp 和 Tyr(易导致蛋白质聚集,且易引起 HLA/MHL-II 介导的免疫应答)、带酰胺基团的氨基酸 Asn 和 Gln(化学不稳定、易水解)、带正电的氨基酸 His、Lys 和 Arg(与细胞膜相互作用)以及易形成二硫键的氨基酸 Cys,最终选择 Pro、Glu、Ser、Thr、Ala 和 Gly 6 种氨基酸。Schellenberger 等^[29]构建了编码 36 个氨基酸基序的非重复基因库,将这些基因随机连接并在 *E. coli* 中表达一系列聚多肽,通过考察基因稳定性、蛋白稳定性、热稳定性和聚集倾向,最终获得一条含 864 个残基的聚多肽,该聚多肽及其不同长度的衍生物统称为 XTEN。XTEN 有较大的流体动力学体积且带负电,通过基因工程方法将肽或蛋白药物与 XTEN 融合,能够增强药物的稳定性和溶解性。XTEN 融合蛋白还具有可生物降解、免疫原性低和纯度高等特点。

Exenatide 是含 39 个氨基酸的短肽,用于治疗 2 型糖尿病。其相对分子质量小,易被肾清除,人体内半衰期只有 2.4 h,每天需注射两次。将 XTEN864 融合在该肽的 C 端并在 *E. coli* 中可溶表达,获得融合蛋白 VRS-859^[29]。临床 I 期研究表明,VRS-859 的人体半衰期为 128 h,即对病人进行单次给药,其控制血糖作用可维持 1 个月,且未发

现不良反应^[30]。调整 XTEN 长度可调控药物的半衰期。低血糖是糖尿病治疗中常见的并发症,胰高血糖素(glucagon, Gcg)能将肝糖原转化为葡萄糖,但是溶解性差且半衰期只有 8~18 min,故不适于治疗夜间低血糖。Gcg-XTEN144 的溶解度较 Gcg 提高 60 倍,其作用能维持 10~12 h,有望成为预防夜间低血糖的有效药物^[31]。

另外,可在治疗蛋白上融合多个 XTEN 片段。人生长激素(human growth hormone, hGH)可经肾滤过和受体介导的清除两个途径从体内消除,使其在猴体内的半衰期只有 2~3 h。VRS-317 是一种长效化 hGH,它是在 hGH 的 N 端融合 XTEN 912 以减缓肾清除,同时在 C 端融合 XTEN144 以减少受体介导的清除,该药物在兔子和猴体内半衰期分别为 15 和 110 h。目前,VRS-317 已进入Ⅲ期临床,临床数据显示 XTEN 在人体有较低甚至没有免疫原性^[32~33]。此外,GLP-2G^[34]、AnxA5^[35]、抗病毒肽 T-20^[36]、凝血因子Ⅷ^[30]等生物大分子与 XTEN 融合表达后,药代动力学性质都得以改善。

然而,XTEN 并没有完全模拟 PEG, Glu 残基使融合蛋白带显著负电荷。这会降低其受体亲和力,减少受体介导的蛋白药物的清除;并且肾小球基底膜排斥负电荷,可进一步延长血浆半衰期。但是这也会影响融合蛋白的组织分布,降低其与细胞表面靶受体的亲和力进而降低生物活性。

2.8 PASylation 技术

为了获得完全模拟 PEG 的聚多肽, Schlapschy 等^[37]在 XTEN 氨基酸筛选原则的基础上,进一步排除带负电荷的 Glu、易形成 β 片层的 Thr 和形成较长聚合物时易聚集的 Gly,最终由 Pro、Ala 和 Ser 进行合适排列后得到无二级结构的聚多肽 PAS。将编码 20 或 24 个氨基酸的核苷酸序列反复连接形成 PAS 编码基因,在 *E. coli* 中表达并获得了不同长度的 PAS,且都展现稳定的无规卷曲结构。降低 Pro 的比例会使 PAS 不再呈现无规卷曲构象,表明 Pro 数量是维持 PAS 良好生理特性的重要因素。

迄今,已有多种生物活性蛋白与 200~600 个残基的 PAS 融合,如人 IFN α -2b^[37]、人生长激素^[37]、抗 HER2 抗体的 Fab 片段^[38]、IFN β 激动剂 YNS α 8^[39]、小鼠瘦素^[40~41]和人铁蛋白^[42]。这些融合蛋白在 *E. coli* 周质中可溶表达并折叠成活性形式,PAS 聚多肽因电中性和亲水性而能成功跨过细

胞內膜。质谱结果显示纯化获得的融合蛋白是单分散的。SEC结果显示融合PAS(600)后,尽管实际相对分子质量仅增加51 kD,但流体动力学体积增加660 kD。动物实验表明,PAS融合蛋白的循环半衰期有效地延长10~100倍,而且半衰期延长程度与PAS的序列长度成正相关,所以可通过调整PAS的长度来调控药物半衰期。PAS序列本身缺乏T细胞表位,因而在动物中未检测到免疫原性。此外,融合蛋白在肾细胞中被快速清除,故不会在组织中蓄积。

因此,PAS融合技术可以替代PEG修饰技术,且具有更少的副作用。PAS可融合于治疗蛋白的N端或C端,而不与疾病相关的靶受体或信号因子相互作用,所以理论上该技术适合于延长所有蛋白药物的半衰期。目前,XL-protein GmbH公司正在开发PASylation[®]技术。

3 总结和展望

聚多肽融合技术是延长蛋白类药物血浆半衰期的有效策略,除了Genetic PolymerTM需要在真核宿主中进行糖基化修饰,其他聚多肽融合技术均不需要对蛋白质进行翻译后修饰。此外,聚多肽技术都是通过增加分子大小或改变电荷性质来减少肾清除,延长药物半衰期。不同的聚多肽具有不同的氨基酸组成,所以其相应融合蛋白的免疫原性、生物活性等性质也有所不同。

经过多年的发展,最新的聚多肽融合技术XTEN和PAS已经可以解决原有聚多肽免疫原性高、易聚集、不能显著增加半衰期等问题,成为研究热点。目前,聚多肽融合技术还处于发展初期,少数融合蛋白已进入临床试验阶段,如GlymeraTM、VRS-317等。但大量临床前实验的数据还是很鼓舞人心的,未来的研究也将主要集中在药效动力学和免疫原性两方面。随着研究的不断深入,聚多肽技术融合技术将为多肽和蛋白质类药物的长效化提供更好的选择。

参考文献

- [1] Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2014[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(10):992-1000.
- [2] Zundorf I, Dingermann T. PEGylation—a well-proven strategy for the improvement of recombinant drugs[J]. *Pharmazie*, 2014, 69(5):323-326.
- [3] Ginn C, Khalili H, Lever R, et al. PEGylation and its impact on the design of new protein-based medicines[J]. *Fut Med Chem*, 2014, 6(16):1829-1846.
- [4] Turecek PL, Bossard MJ, Schoetens F, et al. PEGylation of biopharmaceuticals: a review of chemistry and nonclinical safety information of approved drugs[J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105(2):460-475.
- [5] Garay RP, El-Gewely R, Armstrong JK, et al. Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents[J]. *Exp Opin Drug Deliv*, 2012, 9(11):1319-1323.
- [6] Ishida T, Kiwada H. Anti-polyethyleneglycol antibody response to PEGylated substances[J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(6):889-891.
- [7] Verhoef JJ, Carpenter JF, Anchordoquy TJ, et al. Potential induction of anti-PEG antibodies and complement activation toward PEGylated therapeutics[J]. *Drug Discov Today*, 2014, 19(12):1945-1952.
- [8] Zhang F, Liu MR, Wan HT. Discussion about several potential drawbacks of PEGylated therapeutic proteins[J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(3):335-339.
- [9] Freire-de-Lima L, Fonseca LM, Oelmann T, et al. The trans-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: three decades of studies[J]. *Glycobiology*, 2015, 25(11):1142-1149.
- [10] Buscaglia CA, Alfonso J, Campetella O, et al. Tandem amino acid repeats from *Trypanosoma cruzi* shed antigens increase the half-life of proteins in blood[J]. *Blood*, 1999, 93(6):2025-2032.
- [11] Alvarez P, Buscaglia CA, Campetella O. Improving protein pharmacokinetics by genetic fusion to simple amino acid sequences[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(5):3375-3381.
- [12] Liu D, Nikoo M, Boran G, et al. Collagen and gelatin[J]. *Annu Rev Food Sci Technol*, 2015, 6:527-557.
- [13] Huang YS, Wen XF, Wu YL, et al. Engineering a pharmacologically superior form of granulocyte-colony-stimulating factor by fusion with gelatin-like-protein polymer[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 74(3):435-441.
- [14] Roberts S, Dzuricky M, Chilkoti A. Elastin-like polypeptides as models of intrinsically disordered proteins[J]. *FEBS Lett*, 2015, 589(19):2477-2486.
- [15] Kowalczyk T, Hnatuszko-Konka K, Gerszberg A, et al. Elastin-like polypeptides as a promising family of genetically-engineered protein based polymers[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 30(8):2141-2152.
- [16] Ukpolor OT, Shah A, Bazov E, et al. Inverse temperature transition of elastin like motifs in major ampullate dragline silk: MD simulations of short peptides and NMR studies of water dynamics[J]. *Soft Matter*, 2014, 10(5):773-785.
- [17] Schipperus R, Eggink G, de Wolf FA. Secretion of elastin-like polypeptides with different transition temperatures by *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnol Prog*, 2012, 28(1):242-247.

- [18] Bataille L, Dieryck W, Hocquellet A, et al. Recombinant production and purification of short hydrophobic Elastin-like polypeptides with low transition temperatures [J]. *Protein Exp Purif*, 2016, **121**: 81–87.
- [19] Hu J, Wang G, Liu X, et al. Enhancing pharmacokinetics, tumor accumulation, and antitumor efficacy by alastin-Like polypeptide fusion of interferon alpha [J]. *Adv Mater*, 2015, **27** (45): 7320–7324.
- [20] Conrad U, Plagmann I, Malchow S, et al. ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock [J]. *Plant Biotechnol J*, 2011, **9** (1): 22–31.
- [21] Ashutosh C. Therapeutic agents comprising a GLP-1 receptor agonist and elastin-like peptide; US, 8178495 [P]. 2012-05-15.
- [22] Muroga Y, Nakaya A, Inoue A, et al. Conformation of poly(gamma-glutamic acid) in aqueous solution [J]. *Biopolymers*, 2016, **105** (4): 191–198.
- [23] Northfelt DW, Allred JB, Liu HS, et al. Phase 2 trial of paclitaxel polyglumex with capecitabine for metastatic breast cancer [J]. *Am J Clin Oncol*, 2014, **37** (2): 167–171.
- [24] Leung DW. Recombinant production of polyanionic polymers, and uses thereof; US, 20020169125 [P]. 2002-10-03.
- [25] Price JL, Culyba EK, Chen WT, et al. N-glycosylation of enhanced aromatic sequons to increase glycoprotein stability [J]. *Biopolymers*, 2012, **98** (3): 195–211.
- [26] Chung HS, Kim JS, Lee SM, et al. Additional N-glycosylation in the N-terminal region of recombinant human alpha-1 antitrypsin enhances the circulatory half-life in Sprague-Dawley rats [J]. *Glycoconj J*, 2016, **33** (2): 201–208.
- [27] Besman M. Conjugates of biologically active proteins having a modified in vivo half-life; US, 8129348 [P]. 2014-06-10.
- [28] Schlapachy M, Theobald I, Mack H, et al. Fusion of a recombinant antibody fragment with a homo-amino-acid polymer: effects on biophysical properties and prolonged plasma half-life [J]. *Protein Eng Des Sel*, 2007, **20** (6): 273–284.
- [29] Schellenberger V, Wang CW, Geething NC, et al. A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, **27** (12): 1186–1190.
- [30] Podust VN, Balan S, Sim BC, et al. Extension of in vivo half-life of biologically active molecules by XTEN protein polymers [J]. *J Control Release*, 2016, **240**: 52–66. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.10.038.
- [31] Geething NC, To W, Spink BJ, et al. Gcg-XTEN: an improved glucagon capable of preventing hypoglycemia without increasing baseline blood glucose [J]. *PLoS One*, 2010, **5** (4): e10175.
- [32] Cleland JL, Geething NC, Moore JA, et al. A novel long-acting human growth hormone fusion protein (VRS-317): enhanced in vivo potency and half-life [J]. *J Pharm Sci*, 2012, **101** (8): 2744–2754.
- [33] Yuen KC, 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]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, **98** (6): 2595–2603.
- [34] Alters SE, McLaughlin B, Spink B, et al. GLP2-2G-XTEN: a pharmaceutical protein with improved serum half-life and efficacy in a rat Crohn's disease model [J]. *PLoS One*, 2012, **7** (11): e50630.
- [35] Haeckel A, Appler F, Figge L, et al. XTEN-annexin A5: XTEN allows complete expression of long-circulating protein-based imaging probes as recombinant alternative to PEGylation [J]. *J Nucl Med*, 2014, **55** (3): 508–514.
- [36] Ding S, Song M, Sim BC, et al. Multivalent antiviral XTEN-peptide conjugates with long in vivo half-life and enhanced solubility [J]. *Bioconjug Chem*, 2014, **25** (7): 1351–1359.
- [37] Schlapachy M, Binder U, Borger C, et al. PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins [J]. *Protein Eng Des Sel*, 2013, **26** (8): 489–501.
- [38] Mendlar CT, Friedrich L, Laitinen I, et al. High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation [J]. *MAbs*, 2015, **7** (1): 96–109.
- [39] Harari D, Kuhn N, Abramovich R, et al. Enhanced in vivo efficacy of a type I interferon superagonist with extended plasma half-life in a mouse model of multiple sclerosis [J]. *J Biol Chem*, 2014, **289** (42): 29014–29029.
- [40] Morath V, Bolze F, Schlapachy M, et al. PASylation of murine leptin leads to extended plasma half-life and enhanced in vivo efficacy [J]. *Mol Pharm*, 2015, **12** (5): 1431–1442.
- [41] Bolze F, Morath V, Bast A, et al. Long-acting PASylated leptin ameliorates obesity by promoting satiety and preventing hypometabolism in leptin-deficient Lep (ob/ob) mice [J]. *Endocrinology*, 2016, **157** (1): 233–244.
- [42] Falvo E, Tremante E, Arcovito A, et al. Improved doxorubicin encapsulation and pharmacokinetics of ferritin-fusion protein nanocarriers bearing proline, serine, and alanine elements [J]. *Biomacromolecules*, 2016, **17** (2): 514–522.