

资峻, 宁丽, 周小青, 等. 评价白蛋白相关药物动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1374-1380.
Zi Y, Ning L, Zhou XQ, et al. Advances in animal models for albumin-related drug studies [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1374-1380.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.016

评价白蛋白相关药物动物模型的研究进展

资峻, 宁丽, 周小青, 唐成程*

(广东省医学大动物模型重点实验室, 华南生物医药大动物模型研究院,
生物科技与大健康学院, 五邑大学, 广东 江门 529000)

【摘要】 许多肽或蛋白质药物治疗的一个主要挑战是血浆半衰期短。通过将该类药物与白蛋白结合获得的药物称为白蛋白相关药物, 有效延长血浆半衰期。动物模型作为研究药物药代动力学的重要工具是药物研究中不可或缺的一部分。本综述概括了两大类动物模型: 啮齿类(野生型小鼠、大鼠模型, 基因修饰小鼠模型) 与非啮齿(猴) 在白蛋白相关药物药代动力学研究中的应用与发展, 为其进一步研究发展提供参考。

【关键词】 白蛋白相关药物; 血浆半衰期; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1374-07

Advances in animal models for albumin-related drug studies

ZI Yin, NING Li, ZHOU Xiaoqing, TANG Chengcheng*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Large Animal Models for Biomedicine, South China Institute of Large Animal Models for Biomedicine, School of Biotechnology and Health Science,
Wuyi University, Jiangmen 529000, China)

Corresponding author: TANG Chengcheng. E-mail: wyuchemtcc@126.com

【Abstract】 The main challenge of therapeutic peptides and proteins is their short plasma half-life due to rapid protease degradation. Drugs combining such peptides and proteins with albumin are defined as albumin-related drugs. Such a combination effectively prolongs their plasma half-life. Animal models are an important and indispensable tool to study drug pharmacokinetics. This review summarizes the two main animal models, rodents (wildtype mice, gene-modified mouse models, and rat models) and non-human primates (monkeys), and their development and application in albumin-related drugs. This review provides a reference for further studies on albumin-related drugs.

【Keywords】 albumin-related drugs; plasma half-life; animal model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)是血浆中含量最丰富的蛋白质, 占血浆蛋白总量的40%, 与脂肪酸、激素和化学药物在内的多种物质进行可逆结合, 调节这些物质在体内的运输, 因此也是一种天然的运输载体^[1]。白蛋白体内半衰期为19 d^[2-4], 远高于除免疫球蛋白 G (immunoglobulin

G, IgG) 以外的其他血浆蛋白, FcRn 受体(neonatal Fc receptor, FcRn) 是白蛋白半衰期的主要调节因子^[5-8]。FcRn 受体最初发现于肠道, 功能主要为新生幼体提供被动免疫。随后发现 FcRn 是血液中 IgG 和白蛋白的特异性受体, 几乎表达在所有细胞表面^[9-11]。FcRn 与白蛋白的结合具有 pH 依赖性,

【基金项目】 广东省自然科学基金(2019A1515110283), 江门市科技计划项目(2021030101230004833, 2021030101220004887)。

Funded by Natural Science Foundation of Guangdong Province of China (2019A1515110283), Science and Technology Planing Project of Jiangmen (2021030101230004833, 2021030101220004887).

【作者简介】 资峻(1998—), 男, 硕士, 研究方向: 基因编辑和大动物模型。Email: 15271856007@139.com

【通信作者】 唐成程, 女, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 基因编辑与大动物模型。Email: wyuchemtcc@126.com

弱酸性环境下结合,中性或碱性条件下解离^[12-13]。血管内皮细胞是 FcRn 介导白蛋白再循环的主要场所,包含白蛋白的细胞外液被血管内皮细胞非特异性胞饮后,白蛋白与含有 FcRn 的酸化内体结合形成复合物,随后该复合物被转运至细胞膜表面,暴露于血液中,由于血液中 pH 值为微碱性,复合物解离,白蛋白再次被释放至血液循环。而在酸化内体中未能与 FcRn 相结合的蛋白则会被运送至溶酶体中降解^[7]。

由于在血浆中含量丰富、结合位点多、半衰期长、不会产生免疫原性等诸多优势使得白蛋白被广泛应用于药物载体研究,以延长药物的半衰期,改善药物的药代动力学特征^[14-15]。目前基于白蛋白的药物研发主要有两种:(1)重组白蛋白药物:重组白蛋白药物又包括两类,一类是通过共价键作用针对白蛋白的氨基酸进行修饰,如目前正处于三期临床实验用于治疗癌症和关节炎疾病的人血清白蛋白偶联甲氨蝶呤(methotrexate-human serum albumin, MTX-HSA)^[16];另一类是通过基因融合技术^[17]将治疗性多肽或者蛋白与白蛋白融合,这些治疗性多肽或者蛋白包括凝血因子^[18]、干扰素^[19]等。(2)白蛋白结合药物,即将药物进行脂肪酸化或亲白蛋白有机小分子修饰后,药物通过脂肪酸或有机小分子与内源性白蛋白结合位点结合,如已经上市的用于治疗糖尿病的药物 Levemir^[20]和 Victoza^[21-22],用于治疗癌症的 Abraxane^[23]等。

建立用于评价白蛋白相关药物的动物模型是白蛋白相关药物开发与研究中的重要环节。随着对白蛋白认识的深入、实验动物学的不断发展以及基因编辑等技术的高速进步,用于评价白蛋白相关药物动物模型种类也更加全面。本综述概括了用于评价白蛋白相关药物药代动力学的啮齿类与非啮齿类动物模型,为白蛋白相关药物进一步研究发展提供一定参考。

1 白蛋白相关药物啮齿类动物模型

啮齿类动物模型因其操作简便、获得容易、繁殖周期短,具有经济、可重复性高等优势,被广泛应用于药物临床前药效评价。目前,白蛋白相关药物啮齿类动物模型主要包括野生型鼠模型和基因修饰小鼠模型两大类。

1.1 野生型小鼠模型

野生型(wild type, WT)小鼠(表 1)具有遗传背

景明确、品系多、价格便宜等优势,此外,鼠与人类有大约 90% 的相似基因,许多生理通路在临床上相关的^[24],成为早期白蛋白相关药物药代动力学研究的一线模型^[25]。例如,研究人员通过将锚蛋白重复结构域(designed ankryrin repeat proteins, DARPins)^[26-29]与鼠白蛋白(mouse serum albumin, MSA)共价结合后注入到野生型小鼠中,使其血浆半衰期从原来的几分钟延长到 50 h 左右,而在进一步将与白蛋白结合的 DARPins 结构域与其他 DARPins 结构域结合时,白蛋白相关药物在小鼠的半衰期进一步提高了 48%^[30-31]。除此之外,在 WT 小鼠中检测白蛋白结合多肽融合到其他蛋白质结构域的体内代谢,如将链球菌蛋白 G 结构域(albumin-binding domain, ABD)与 Herceptin 的 Fab(fragment of antigen binding, Fab)片段、二抗或者小螺旋蛋白结合,在小鼠体内检测发现血浆半衰期分别从 2.1 h 延长到 20.9 h、5.6 h 延长到 47.5 h 和 30 min 延长到 41 h^[32-36]。

FcRn 是白蛋白长半衰期的主要调节因子,体外研究表明小鼠 FcRn(mouse FcRn, mFcRn)对 MSA 的结合能力比对 HSA 的结合能力高 25 倍^[17,37]。因此,虽然白蛋白相关药物体内血浆半衰期延长在 WT 小鼠模型中被成功模拟,但 mFcRn 对于体内 MSA 的高结合力可能会使与 mFcRn 结合的白蛋白相关药物明显减少,导致用野生型小鼠评价重组白蛋白药物的半衰期所获得的数据可能低于实际值。已经证明,在低白蛋白患者中注射重组人白蛋白的循环半衰期相较于正常患者增加了 4 ~ 5 倍,这可能是由于患者中内源性白蛋白对 FcRn 受体的竞争较少^[38],导致注射的重组人白蛋白与 FcRn 受体的结合增加,从而导致其半衰期相较于正常患者有所增加。

mFcRn 对于 MSA 及 HSA 结合力的高差异性,使得 WT 小鼠模型用于评价白蛋白相关药物受到质疑,为此科学家开发了一系列的基因修饰动物模型用于白蛋白相关药物的药代动力学评价。

1.2 基因修饰小鼠模型

基因修饰小鼠模型是指通过基因编辑对小鼠特定基因进行改造而获得表达目的基因的小鼠,该类模型广泛应用于各类药物临床前研究。目前用于评估白蛋白相关药物药代动力学的基因修饰小鼠包括以下 3 类:(1)人 FcRn(human FcRn, hFcRn)单基因修饰(hFcRn^{+/+})小鼠;(2)hFcRn、小鼠白蛋

白基因 (mouse *albumin*, *mAlb*) 敲除双基因修饰 (*hFcRn*^{+/+}, *mAlb*^{-/-}) 小鼠; (3) *hFcRn*、人白蛋白 (human *albumin*, *hAlb*) 双基因修饰 (*hFcRn*^{+/+}, *hAlb*^{+/+}) 小鼠。

1.2.1 *hFcRn* 单基因修饰 (*hFcRn*^{+/+}) 小鼠

已有研究表明 *mFcRn* 对 MSA 及 HSA 的结合能力存在明显差异,为了更好地模拟白蛋白与 *FcRn* 之间的相互作用,科研工作者构建了 *hFcRn*^{+/+} 小鼠模型,主要包括 Tg276 和 Tg32^[39-40]。这两类小鼠都是通过向 *mFcRn* 第一外显子处插入 Neomycin 破坏小鼠内源性 *mFcRn* 的完整表达。并且用 *hFcRn* 替换小鼠 *mFcRn* 基因。Tg276 小鼠在 CAG 启动子的控制下表达 *hFcRn* 基因 cDNA,而 Tg32 小鼠则在 *hFcRn* 启动子的控制下表达含有完整 *hFcRn* 基因组 DNA 序列^[41]。HSA 的血浆半衰期对比于 WT 小鼠 62.4 ± 2.4 h,在 Tg32 的血浆半衰期为 139.2 ± 12 h^[42-44],与 HSA 在人类中的血浆半衰期更加接近,说明该模型相较于 WT 小鼠能够很好地模拟 HSA 在人体中的代谢情况。Tg32 小鼠高 *FcRn* 亲和力白蛋白变体 (K573P) 的血浆半衰期与 WT 小鼠相比,从 30.6 h 延长到了 95.2 h^[43];具有 3 种氨基酸取代的白蛋白突变体 QMP (E505Q/T527 M/K573P) Tg32 小鼠中的血浆半衰期 (4.8 d) 比 WT HSA 在该小鼠模型中 (2 d) 的两倍还多^[12]。在 *hFcRn*^{+/+} Tg276 小鼠中,也观察到了相似的结果。Schmidt 等^[42]采用另外两种对 *FcRn* 具有高亲和力的白蛋白突变体:HSA5 (V547A) 和 HSA7 (V547A/E505 G) 于 Tg276 小鼠中检测相应的血浆半衰期,发现这两种 HSA 突变体的半衰期分别为 46.2 h 和 44.9 h,相较于 WT HSA 的半衰期 (29.2 ~ 31.4 h) 均延长了 1.5 倍左右。以上结果表明 *hFcRn*^{+/+} 小鼠能更好地模拟对 *hFcRn* 具有较高亲和力的 HSA 变体在人体内的代谢情况。除此之外,*hFcRn*^{+/+} 小鼠对比于 WT 小鼠也能够更好地模拟重组白蛋白在人体内的药代动力。例如,Lombardi 等^[45]利用 QMP 与凝血因子 VII 结合,并在 Tg32 小鼠中检测,发现对比于与 HSA 结合的凝血因子 VII (2 d),其显著延长了血浆半衰期 (7 d)。

尽管 *hFcRn*^{+/+} 小鼠增强了其对 HSA 的结合能力,能够更好地模拟包括 HSA 变体及重组白蛋白药物在人体内的代谢,但是已有研究表明 MSA 对 *hFcRn* 的结合力是 HSA 的 5 倍^[25,37,43]。因此,*hFcRn*^{+/+} 小鼠中内源性 MSA 会与 HSA 竞争性地结

合 *hFcRn*,从而 影响白蛋白药物药代动力学评估^[17]。

1.2.2 *hFcRn*、*mAlb* 双基因修饰 (*hFcRn*^{+/+}, *mAlb*^{-/-}) 小鼠

为了克服内源性 MSA 与 HSA 竞争性的结合 *hFcRn* 对白蛋白药物药代动力学评价带来的负面影响,Roopenian 等^[44]通过 TALEN 技术在 *FcRn* 人源化 (Tg32) 小鼠的基础上进一步构建缺乏自身白蛋白表达的品系 (Tg32-*Alb*^{-/-}),即在 Tg32 小鼠的基础上敲除小鼠内源性 MSA 基因 4 号外显子 2bp,使其过早形成终止密码子来实现自身白蛋白表达的缺陷,该小鼠模型排除了内源性 MSA 的影响,更加适合用于评估 HSA 药代动力学。借助该小鼠模型发现 HSA 的血浆半衰期为 24 d,与在人体中的半衰期 (19 d) 相当。因此,认为这种 *hFcRn*^{+/+}、*mAlb*^{-/-} (Tg32-*Alb*^{-/-}) 小鼠模型是一种能够很好地模拟人体评估白蛋白药物药代动力学的啮齿类动物模型,这也说明了 *hFcRn* 的存在和缺乏竞争的内源性 MSA 竞争可有效地保护 WT HSA,防止被降解。

虽然 *hFcRn*^{+/+}、*mAlb*^{-/-} 小鼠模型能够使 HSA 的血浆半衰期延长至与在人体中相当,且在白蛋白药物评估中发挥着巨大作用,但是给白蛋白药物后,外源性白蛋白与内源性 HSA 会竞争性结合 *FcRn* 受体,而 *hFcRn*^{+/+}、*mAlb*^{-/-} 小鼠不能正常模拟内源性竞争,致使该类模型用于白蛋白药物评价受到质疑。

1.2.3 *hFcRn*、*hAlb* 双基因修饰 (*hFcRn*^{+/+}, *hAlb*^{+/+}) 小鼠

虽然 *hFcRn*^{+/+} 小鼠模型及 *hFcRn*^{+/+}、*mAlb*^{-/-} 小鼠可以模拟 *hFcRn* 对 HSA 的结合能力,但是 *hFcRn*^{+/+} 小鼠 MSA 对 *hFcRn* 的亲和力远高于 HSA 对 *hFcRn* 的亲和力^[25],使内源性 MSA 比 HSA 更易结合 *hFcRn* 受体^[17],*hFcRn*^{+/+}、*mAlb*^{-/-} 小鼠缺乏内源性白蛋白与外源性白蛋白竞争性结合 *hFcRn* 受体。为了更加真实地模拟人体内白蛋白药物及 HSA 与 *hFcRn* 受体的竞争结合,Viuff 等^[25]于 2016 年建立了第一个由内源性启动子控制并且同时携带 *hFcRn* 和 HSA 基因 (*hFcRn*^{+/+}, *hAlb*^{+/+}) 的双转基因小鼠模型,通过将 *hFcRn* cDNA 定点插入到鼠 *mFcRn* 基因的 2 号外显子处,同时将编码 HSA 的 cDNA 序列定点插入小鼠 MSA 基因 1 号外显子处,因此,*hFcRn* 和 HSA 的表达都受到小鼠对应基因内源性启动子的控制。该小鼠模型的血清 HSA 浓度

为 17 mg/mL,而另外 30 种血清成分的水平与野生型小鼠相当,体外实验发现来源于该基因修饰小鼠的血清白蛋白(501.9 ± 101.2 nmol/L)、来源于人的血清白蛋白(641.1 ± 89.7 nmol/L)和天然序列的重组人血清白蛋白(797.9 ± 155.0 nmol/L)对 hFcRn 有着相似的结合能力。进一步采用 *hFcRn*^{+/+},*hAlb*^{+/+}小鼠进行体内实验,发现与 FcRn 具有低结合能力的低结合蛋白(low binding protein, LB)血清半衰期为 29 ± 3 h,高结合蛋白(high binding protein, HB)的半衰期为 80 ± 18 h,重组白蛋白半衰期为 57 ± 13 h^[45],当中 LB 的血浆半衰期最短,HB 的血浆半衰期最长。

该模型同时克服了 FcRn 和白蛋白结合存在物种差异及外源性与内源性白蛋白与 FcRn 结合存在竞争这两个难题,能更好地模拟人类生理条件,是白蛋白关联药物的药代动力学研究中较好的模型。

2 白蛋白相关药物非啮齿类动物模型

啮齿类动物虽然在药物药代动力学临床前研究中发挥着巨大作用,为白蛋白药物临床前研究提供了良好模型,但是啮齿类动物在生理特征上与人类之间差异较大,与之相对应的非啮齿类动物具有

与人类更加接近的生理特征,可以更好地反映药物在体内的药代动力学特征。目前,用于研究白蛋白相关药物的非啮齿类动物主要为食蟹猴、犬儒猴、猕猴等非人灵长类动物(nonhuman primates, NHPs)。

NHPs(食蟹猴、犬儒猴、猕猴等)在生理、病理等多方面与人类高度相似,其遗传物质最高可以与人类达到 98.5%的同源性^[46-47],因此,NHPs 能够更好地模拟人类体内代谢条件,有望促进各种 HSA 药物药代动力学研究进展。

在食蟹猴中,HSA 的半衰期为 131 ~ 169 h,而食蟹猴白蛋白在食蟹猴中的血浆半衰期为 144 h^[2,42-43],说明 HSA 在食蟹猴体内有着与食蟹猴白蛋白相似的竞争力。例如,Steiner 等^[30]将 DARPins 结构域与白蛋白结合,使其在食蟹猴中的血浆半衰期相较于在 WT 小鼠中(3.42 d)延长至 20.7 d,这与类比到人体中的 50.3 d 更加接近,另一项报道中通过将凝血因子Ⅷ(FⅧ)与人白蛋白融合后静脉注射到犬儒猴中,发现重组 FⅧ的半衰期达到 56.1 ~ 66.1 h,比未重组的 FⅧ增加 2.6 ~ 5.0 倍^[48]。

虽然 NHPs 对比于非啮齿类动物与人之间有着更加接近的亲缘关系,体型更大更便于监测,但是

表 1 白蛋白相关药物评价实验动物比较
Table 1 Comparison of albumin-related drugs in laboratory animals

实验动物 Laboratory animal	优点 Advantage	缺点 Shortcoming	参考文献 Reference
野生型小鼠 Wild type mice	成本相对较低、操作便捷、生长繁殖周期短、获取容易 Relatively low cost, convenient operation, short growth and breeding cycle, easy access	与人类的关系较远,白蛋白与 FcRn 受体结合存在明显物种差异 Relatively distant from humans, obvious species differences between albumin and FcRn binding	[25,49-51]
<i>hFcRn</i> ^{+/+} 小鼠模型 <i>hFcRn</i> ^{+/+} mouse	成本相对较低、生长繁殖周期短、人源化 FcRn 受体 Relatively low cost, short growth and reproduction cycle, humanized FcRn receptor	增强内源性 MSA 对 FcRn 受体的结合,存在内源性 MSA 会与 HSA 竞争 FcRn 受体从而影响药物评价结果 The binding force to MSA is improved. Endogenous MSA competes with HSA for FcRn, affecting the efficacy evaluation	[12,52]
<i>hFcRn</i> ^{+/+} , <i>mAlb</i> ^{-/-} 小鼠模型 <i>FcRn</i> humanized,MSA knock-out mouse	成本相对较低、生长繁殖周期短、敲除 MSA,HSA 在 MSA 敲除模型小鼠中的半衰期与在人体中的相当 Relatively low cost, the growth and reproduction cycle are short, the MSA is knocked out, the half-life of HSA in MSA knock-out model mice is equivalent to that in humans	人类 HSA 未敲除,与该模型不一致 HSA in human are not knocked out, which is inconsistent with this model	[44]
<i>hFcRn</i> ^{+/+} , <i>hAlb</i> ^{+/+} 小鼠模型 <i>hFcRn</i> ^{+/+} , <i>hAlb</i> ^{+/+} mouse	生长繁殖周期短,同时人源化 MSA 与 FcRn 受体 Short growth and reproduction cycle, humanized MSA and FcRn	生理条件与人类差异较大 Physiological conditions differ greatly from human	[53]
非人灵长类 Nonhuman primates	与人的关系相对更加紧密,遗传物质与人类高度同源,其生理特性与人接近 The relationship with human is closer, the genetic material is highly homologous with human, physiological characteristics are close to human	成本相对较高、繁殖周期较长,通常单胎繁殖,存在较严格的伦理问题 Relatively high cost, long breeding cycle, general singleton reproduction, ethical and moral issues	[43,46]

有研究表明,食蟹猴血清白蛋白对猴 FcRn 的亲合力高于人血清白蛋白对猴 FcRn 的亲合力^[25],这在一定程度上阻碍了猴 FcRn 与 HSA 的结合,同时由于伦理和经济的限制,猴子在非临床试验的广泛应用受到一定限制。

3 总结与展望

白蛋白作为药物载体的主要优势是通过与 FcRn 受体的相互作用来延长药物的血浆半衰期。动物模型作为研究药物药代动力学的重要工具是药物研究中不可或缺的一部分,目前用于评估白蛋白相关药物药代动力学的动物模型包括啮齿类(野生型小鼠、基因修饰小鼠模型)与非啮齿(猴)两大类。由于白蛋白与 FcRn 的结合存在物种差异,导致无论是使用野生型小鼠还是 *hFcRn*^{+/+} 小鼠得到的药代动力学数据都不能很好地模拟白蛋白相关药物在人体内的药代动力学。因为内源性的小鼠白蛋白也会竞争性地与 FcRn 受体结合,为了更加真实地模拟人体内白蛋白药物及 HSA 与 *hFcRn* 受体的竞争结合,制备 *FcRn* 和白蛋白双人源化的动物模型至关重要,因此,Howard 团队建立了 FcRn 和白蛋白双人源化的小鼠模型,为白蛋白相关药物研究提供了较好的小鼠模型^[25]。

但小鼠与人类在生长发育、生理代谢、体型大小等方面都相差较大,获得的实验数据不能真实反映蛋白药物在人体内的代谢过程。我国的《化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则》要求:新药临床前药代动力学研究应选用至少两种动物,包括啮齿类和非啮齿类。然而,迄今为止,基于白蛋白和 *FcRn* 双人源化的非啮齿类动物模型尚未建立,严重阻碍了白蛋白药物研究。双人源化小鼠模型为白蛋白评估模型提供了新的思路,该模型在一定程度上模拟了 HSA 与 FcRn 在人体内的相互作用及白蛋白相关药物进入人体后与源性 HSA 竞争性结合 FcRn 受体的生理状态。NHPs 与人有着极高的相似性,包括生理代谢水平等,在未来是否可以在伦理道德允许的范围构建 HSA 与 *FcRn* 双人源化的 NHPs 模型,理论上这种双人源化 NHPs 模型可以作为最理想的评价白蛋白相关药物药代动力学的动物模型。

总之,对于药物临床前研究,动物模型发挥着巨大作用,建立能够更好地模拟人类生理学特征的药物模型是任重道远的。随着各种实用技术的发

展与检测水平的提高,评价白蛋白相关药物动物模型将会更加完善,也能更真实地模拟临床特征,推进白蛋白药物更进一步的研究与发展。

参 考 文 献 (References)

- [1] Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems [J]. J Control Release, 2012, 157(2): 168-182.
- [2] Peters T. Serum albumin [J]. J Biol Chem, 1985, 37: 161-245.
- [3] Nilsen J, Sandlie I, Roopenian DC, et al. Animal models for evaluation of albumin-based therapeutics [J]. Curr Opin Chem Eng, 2018, 19: 68-76.
- [4] Zhang Y, Sun T, Jiang C. Biomacromolecules as carriers in drug delivery and tissue engineering [J]. Acta Pharm Sin B, 2018, 8(1): 34-50.
- [5] Chaudhury C, Brooks CL, Carter DC, et al. Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction [J]. Biochemistry, 2006, 45(15): 4983-4990.
- [6] Pyzik M, Sand KMK, Hubbard JJ, et al. The neonatal fc receptor (FcRn): a misnomer? [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1540.
- [7] Bern M, Sand KM, Nilsen J, et al. The role of albumin receptors in regulation of albumin homeostasis: implications for drug delivery [J]. J Control Release, 2015, 211: 144-162.
- [8] Howard KA. Albumin: the next-generation delivery technology [J]. Ther Deliv, 2015, 6(3): 265-268.
- [9] Li T, Balthasar JP. FcRn expression in wildtype mice, transgenic mice, and in human tissues [J]. Biomolecules, 2018, 8(4): 115.
- [10] Latvala S, Jacobsen B, Otteneder MB, et al. Distribution of FcRn across species and tissues [J]. J Histochem Cytochem, 2017, 65(6): 321-333.
- [11] Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age [J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(9): 715-725.
- [12] Bern M, Nilsen J, Ferrarese M, et al. An engineered human albumin enhances half-life and transmucosal delivery when fused to protein-based biologics [J]. Sci Transl Med, 2020, 12(565): eabb0580.
- [13] Sand KM, Dalhus B, Christianson GJ, et al. Dissection of the neonatal Fc receptor (FcRn)-albumin interface using mutagenesis and anti-FcRn albumin-blocking antibodies [J]. J Biol Chem, 2014, 289(24): 17228-17239.
- [14] Karimi M, Bahrami S, Ravari SB, et al. Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2016, 13(11): 1609-1623.
- [15] Spada A, Emami J, Tuszyński JA, et al. The uniqueness of albumin as a carrier in nanodrug delivery [J]. Mol Pharm, 2021, 18(5): 1862-1894.
- [16] Bolling C, Graefe T, Lübking C, et al. Phase II study of MTX-HSA in combination with cisplatin as first line treatment in patients with advanced or metastatic transitional cell carcinoma

- [J]. Invest New Drugs, 2006, 24(6): 521–527.
- [17] Andersen JT, Cameron J, Plumridge A, et al. Single-chain variable fragment albumin fusions bind the neonatal Fc receptor (FcRn) in a species-dependent manner; implications for *in vivo* half-life evaluation of albumin fusion therapeutics [J]. J Biol Chem, 2013, 288(33): 24277–24285.
- [18] Astermark J, Wojciechowski P, Aballéa S, et al. Efficacy of rFIXFc versus rIX-FP for the treatment of patients with hemophilia B: matching-adjusted indirect comparison of B-LONG and PROLONG-9FP trials [J]. J Blood Med, 2021, 12: 613–621.
- [19] Morales J. Defining the role of insulin detemir in Basal insulin therapy [J]. Drugs, 2007, 67(17): 2557–2584.
- [20] Jacobsen LV, Flint A, Olsen AK, et al. Liraglutide in type 2 diabetes mellitus: clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics [J]. Clin Pharmacokinet, 2016, 55(6): 657–672.
- [21] Gianni L, Mansutti M, Anton A, et al. Comparing neoadjuvant nab-paclitaxel vs paclitaxel both followed by anthracycline regimens in women with ERBB2/HER2-negative breast cancer-the evaluating treatment with neoadjuvant abraxane (ETNA) trial: a randomized phase 3 clinical trial [J]. JAMA Oncol, 2018, 4(3): 302–308.
- [22] Liu H, Luo B, Chen X, et al. Preserved pharmacokinetics and pharmacodynamics of insulin degludec and liraglutide when administered as insulin degludec/liraglutide in a Chinese population [J]. J Diabetes Investig, 2022, 13(4): 652–656.
- [23] Pilati D, Howard KA. Albumin-based drug designs for pharmacokinetic modulation [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2020, 16(9): 783–795.
- [24] 周利润, 崔晓兰. 慢性阻塞性肺疾病相关动物模型研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1121–1127.
- Zhou LR, Cui XL. Development of an animal model for chronic obstructive pulmonary-related disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1121–1127.
- [25] Viuff D, Antunes F, Evans L, et al. Generation of a double transgenic humanized neonatal Fc receptor (FcRn)/albumin mouse to study the pharmacokinetics of albumin-linked drugs [J]. J Control Release, 2016, 223: 22–30.
- [26] Rasool M, Malik A, Hussain M, et al. DARPin bioengineering and its theranostic approaches: emerging trends in protein engineering [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(11): 1610–1615.
- [27] Shilova ON, Deyev SM. DARPin: promising scaffolds for theranostics [J]. Acta Nat, 2019, 11(4): 42–53.
- [28] Schilling J, Jost C, Ilie IM, et al. Thermostable designed ankyrin repeat proteins (DARPin) as building blocks for innovative drugs [J]. J Biol Chem, 2022, 298(1): 101403.
- [29] Sleep D, Cameron J, Evans LR. Albumin as a versatile platform for drug half-life extension [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(12): 5526–5534.
- [30] Steiner D, Merz FW, Sonderegger I, et al. Half-life extension using serum albumin-binding DARPin® domains [J]. Protein Eng Des Sel, 2017, 30(9): 583–591.
- [31] Stumpp MT, Amstutz P. DARPins: a true alternative to antibodies [J]. Curr Opin Drug Discov Devel, 2007, 10(2): 153–159.
- [32] Schlapschky 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.
- [33] Stork R, Müller D, Kontermann RE. A novel tri-functional antibody fusion protein with improved pharmacokinetic properties generated by fusing a bispecific single-chain diabody with an albumin-binding domain from streptococcal protein G [J]. Protein Eng Des Sel, 2007, 20(11): 569–576.
- [34] Tolmachev V, Orlova A, Pehrson R, et al. Radionuclide therapy of HER2-positive microxenografts using a ¹⁷⁷Lu-labeled HER2-specific affibody molecule [J]. Cancer Res, 2007, 67(6): 2773–2782.
- [35] Andersen JT, Pehrson R, Tolmachev V, et al. Extending half-life by indirect targeting of the neonatal Fc receptor (FcRn) using a minimal albumin binding domain [J]. J Biol Chem, 2011, 286(7): 5234–5241.
- [36] Mester S, Evers M, Meyer S, et al. Extended plasma half-life of albumin-binding domain fused human IgA upon pH-dependent albumin engagement of human FcRn *in vitro* and *in vivo* [J]. MAbs, 2021, 13(1): 1893888.
- [37] Andersen JT, Daba MB, Berntzen G, et al. Cross-species binding analyses of mouse and human neonatal Fc receptor show dramatic differences in immunoglobulin G and albumin binding [J]. J Biol Chem, 2010, 285(7): 4826–4836.
- [38] Shen BQ, Xu K, Liu L, et al. Conjugation site modulates the *in vivo* stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates [J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(2): 184–189.
- [39] Ko S, Jo M, Jung ST. Recent achievements and challenges in prolonging the serum half-lives of therapeutic IgG antibodies through fc engineering [J]. BioDrugs, 2021, 35(2): 147–157.
- [40] Sanches M, D'Angelo I, Jaramillo M, et al. AlbuCORE: an albumin-based molecular scaffold for multivalent biologics design [J]. MAbs, 2020, 12(1): 1802188.
- [41] Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ, et al. The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs [J]. J Immunol, 2003, 170(7): 3528–3533.
- [42] Schmidt MM, Townson SA, Andreucci AJ, et al. Crystal structure of an HSA/FcRn complex reveals recycling by competitive mimicry of HSA ligands at a pH-dependent hydrophobic interface [J]. Structure, 2013, 21(11): 1966–1978.
- [43] Andersen JT, Dalhus B, Viuff D, et al. Extending serum half-life of albumin by engineering neonatal Fc receptor (FcRn) binding [J]. J Biol Chem, 2014, 289(19): 13492–13502.
- [44] Roopenian DC, Low BE, Christianson GJ, et al. Albumin-deficient mouse models for studying metabolism of human albumin

- and pharmacokinetics of albumin-based drugs [J]. *MAbs*, 2015, 7(2): 344–351.
- [45] Lombardi S, Aaen KH, Nilsen J, et al. Fusion of engineered albumin with factor IX Padua extends half-life and improves coagulant activity [J]. *Br J Haematol*, 2021, 194(2): 453–462.
- [46] Yan G, Zhang G, Fang X, et al. Genome sequencing and comparison of two nonhuman primate animal models, the cynomolgus and Chinese rhesus macaques [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(11): 1019–1023.
- [47] 田朝阳, 杨守凯. 非人灵长类动物在医学科学实验中的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 19(6): 74–77.
Tian CY, Yang SK. The use of non-human primates in medical scientific experiments [J]. *Chin J Comp Med*, 2009, 19(6): 74–77.
- [48] Pestel S, Beltz HW, Claar P, et al. FVIII half-life extension by coadministration of a D' D3 albumin fusion protein in mice, rabbits, rats, and monkeys [J]. *Blood Adv*, 2020, 4(9): 1870–1880.
- [49] Merten H, Brandl F, Zimmermann M, et al. Half-life extension of efficiently produced DARPIn serum albumin fusions as a function of FcRn affinity and recycling [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2021, 167: 104–113.
- [50] 王琳, 沈嘉艳, 谢招虎, 等. 高尿酸血症动物模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(1): 112–119.
Wang L, Shen JY, Xie ZH, et al. Progress of hyperuricemia animal model research [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(1): 112–119.
- [51] Ward ES, Ober RJ. Chapter 4: Multitasking by exploitation of intracellular transport functions the many faces of FcRn [J]. *Adv Immunol*, 2009, 103: 77–115.
- [52] Day YS, Myszkowski DG. Characterizing a drug's primary binding site on albumin [J]. *J Pharm Sci*, 2003, 92(2): 333–343.
- [53] Sheng J, Wang Y, Turesky RJ, et al. Novel transgenic mouse model for studying human serum albumin as a biomarker of carcinogenic exposure [J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 29(5): 797–809.

[收稿日期] 2023-04-23

一种动物联合模型测定生长猪在不同粗纤维水平下大肠挥发性脂肪酸的净吸收量

厌氧微生物在动物胃肠道中发酵一系列碳水化合物从而生成有机酸和气体等产物,而单胃动物主要在大肠(盲肠、结肠)中进行微生物厌氧发酵产生挥发性脂肪酸(VFAs)和乳酸等。有研究发现:猪大肠利用发酵产生的 VFAs 能满足自身约 5% ~ 20% 能量维持需求,除此之外,这部分 VFAs 还为动物肠道和动物健康提供营养。然而,大肠内微生物发酵生成 VFAs 的产量和模式受到多种因素的影响,如何监控大肠内内源性 VFAs 的产生情况是一大难点问题,这也是难以对动物进行精准营养调控的原因。

基于上述背景,武汉轻工大学湖北省动物营养与饲料科学重点实验室赵胜军团队研究构建“血管瘘-肠瘘”结合“同位素标记法”的动物联合模型,测定生长猪在不同粗纤维水平下大肠 VFAs 的净吸收量情况。其中为了动态检测 VFAs 吸收情况采用手术造肠系膜、门静脉、股左动脉血管瘘,来测定单位时间门静脉对 VFAs 的吸收量。为消除前肠道以及外源性 VFAs 的干扰,手术构建回肠瘘管并在测定期间灌注碳 13 标记的 VFAs(¹³C-VFAs),通过检测门静脉血液和大肠组织中¹³C-VFAs 含量来计算大肠对 VFAs 的动态净吸收量。

总的来说,本研究构建了一种新方法来探索动物大肠对 VFAs 的净吸收量,对精准监控大肠的营养吸收提供了新的思路并为进一步的研究奠定了基础。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(4): 375–380. <http://doi:10.1002/ame2.12329>)。