

长效FGF23抑制剂的设计及其在毕赤酵母中的制备

张秀美¹, 崔家俊¹, 姜银杰¹, 付南燕¹, 杨婧¹, 周智兴¹, 张宁园¹, 钱凯^{1,2*}

(1. 宜春学院医学院, 江西 宜春 336000; 2. 温州大学生命科学研究院, 浙江 温州 325000)

摘要: 低磷血症是人类磷代谢失常的常见疾病, 成纤维细胞生长因子23 (fibroblast growth factor-23, FGF23) 可以作用于肾曲小管减少肾脏对无机磷重吸收。保留C端73个氨基酸的FGF23^{C-tail}作为FGF23的抑制剂, 可以增加肾脏对无机磷重吸收, 因此FGF23^{C-tail}在低磷血症的药物开发中显得尤为重要。本文首次将FGF23^{C-tail}与人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 融合, 并尝试在毕赤酵母表达系统制备表达。融合PCR构建重组基因, 经克隆株的抗性筛选和表达量筛选, 获得一株毕赤酵母高产量的表达菌株, 摇瓶的表达量为43.7 mg·L⁻¹。5 L发酵罐的研究表明, 表达量可高达265.6 mg·L⁻¹。经三步纯化步骤后, 获得纯度大于95%的FGF23^{C-tail}-HSA融合蛋白。经宜春学院伦理委员会批准, 蛋白的体内大鼠实验显示, FGF23^{C-tail}-HSA具有FGF23抑制剂的功能, 且能显著地提高大鼠的血磷水平。本研究为FGF23^{C-tail}-HSA生理学活性的深入研究和FGF23^{C-tail}的药物开发提供基础。

关键词: 成纤维细胞生长因子23; 抑制剂; 人血清白蛋白; 低磷血症

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)02-0380-06

Design and expression of FGF23 inhibitor in *Pichia pastoris*

ZHANG Xiu-mei¹, CUI Jia-jun¹, JIANG Yin-jie¹, FU Nan-yan¹, YANG Jing¹,
ZHOU Zhi-xing¹, ZHANG Ning-yuan¹, QIAN Kai^{1,2*}

(1. Medical College, Yichun University, Yichun 336000, China; 2. Life Sciences College, Wenzhou University, Wenzhou 325000, China)

Abstract: Hypophosphatemia is a common metabolism disease in humans. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) inhibits phosphate reabsorption by targeting on the renal tubules. FGF23^{C-tail} contains 73 amino acids from C-terminus of FGF23, serves as an inhibitor of FGF23, and can increase phosphate reabsorption. Therefore, FGF23^{C-tail} is an important drug for hypophosphatemia. In this paper, we constructed a fusion protein of FGF23^{C-tail} with HSA, and investigated the expression of the fusion protein in the *Pichia pastoris* system. The recombinant gene was constructed by fusion PCR. A high-yield strain was selected by G418 resistance and fermentation yield, and the expression yield was 43.7 mg·L⁻¹ in flask. In 5 L fermenters, the highest expression yield could reach 265.6 mg·L⁻¹. FGF23^{C-tail}-HSA could be used as an inhibitor for FGF23, and could significantly increase blood phosphorus levels in rats. The procedures for care and use of animals were approved by the Ethics Committee of YiChun University. This paper provided a basis research for further studying physiological activity of FGF23^{C-tail}-HSA.

Key words: FGF23; inhibitor; human serum albumin; hypophosphatemia

收稿日期: 2018-10-23; 修回日期: 2018-11-16.

基金项目: 浙江省科技厅公益基金资助项目 (LGF18H300005); 江西省教育厅青年基金资助项目 (GJJ170920).

*通讯作者 Tel: 86-795-3202923, E-mail: qqkkqian@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0959

X连锁低磷酸盐血症 (X-linked hypophosphatemia, XLH) 是常见的低磷血症类疾病, 该疾病的全球患病率是1:20 000^[1], 该病的特点是患者血清磷酸盐水平低下并导致骨骼矿化水平低下。XLH患者在儿童时期的鉴别和诊断特征是患者髌骨内翻并表现X形腿,

因为儿童软骨矿化水平低下且承受能力不足。该疾病的其他表现形式还包括生长迟缓、骨骼变形和骨骼易碎等^[2]。近几年, 临床研究发现 XLH 患者血清中含有较高水平的成纤维细胞生长因子 23 (fibroblast growth factor-23, FGF23)。FGF23 通过近曲小管上皮细胞刷状缘膜上的钠-磷协同转运蛋白 NPT2a 和 NPT2c 的内移和降解增加尿磷的排泄, 减少肾脏无机磷重吸收从而调节磷的排泄^[3]。大量的研究也证实肾近曲小管中过高的 FGF23 是导致磷酸盐代谢紊乱和相关后遗症的关键原因^[4]。

FGF23 是成纤维细胞生长因子家族 (FGFs) 的成员, 是一种重要的内分泌磷稳态调节因子。FGF23 通过与受体细胞的 FGFR1c/ α -klotho 受体复合物结合^[5], 其中 FGF23 的 C 端的 73 个氨基酸 (FGF23^{C-tail}) 是与受体复合物结合的结合位点, FGF23 的 N 端 (N-tail) 是受体复合物的激活位点, 将信号进一步传导到胞内。Goetz 等^[6]研究发现, 保留 C 端 73 个氨基酸的 FGF23^{C-tail} 可以与 FGF23 竞争性结合 FGFR1c/ α -klotho 受体复合物, 且 FGF23^{C-tail} 不会激活受体复合物。在健康和磷代谢紊乱的动物模型中发现, 体外注射 FGF23^{C-tail} 可以有效抑制 FGF23 的功能, 提高肾脏对血磷的重吸收。因此, FGF23^{C-tail} 作为拮抗剂抑制 FGF23, 可以有效地降低 FGF23 对患者血磷的调节功能, 对于 XLH 和其他低磷血症疾病的治疗具有重要的研究价值和应用前景。

但在药物开发应用过程中, 73 个氨基酸的 FGF23^{C-tail} 与很多其他重组功能蛋白一样存在稳定性差、体内半衰期短的缺陷。研究表明 FGF23^{C-tail} 体内的半衰期仅为 11.5 min, 这就意味着临床需要频繁给药才能维持该药物的体内有效性, 这将会进一步加重病人的痛苦及其家庭经济负担^[7]。目前, FGF23^{C-tail} 的药物长效性改造还处于研究初期阶段, 国内尚未见 FGF23^{C-tail} 的长效改造的文献报道, 国外只有辉瑞公司对 FGF23^{C-tail} 与 Fc 抗体片段融合进行长效改造, 改造

后 FGF23^{C-tail}-Fc 可以有效地抑制 FGF23 的生物学活性^[8]。人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 是人体血清中的主要蛋白, 因其与人体的相容性好、免疫原性低、半衰期长而得到广泛的应用^[9]。白蛋白融合研究从上世纪 90 年代开始至今已得到广泛的研究, 截止目前为止, HSA 融合蛋白共有 11 种处于临床前的研究^[10]。针对 FGF23^{C-tail} 的长效改造, 尚未见有与 HSA 融合的报道。本文首次将 FGF23^{C-tail} 与载体蛋白 (HSA) 通过基因工程的手段构建融合蛋白 FGF23^{C-tail}-HSA, 并在毕赤酵母菌株中进行表达。制备高纯度的 FGF23^{C-tail}-HSA 融合蛋白并检测蛋白的生物学活性, 为融合蛋白的进一步开发和应用奠定基础。

材料与方法

质粒与菌株 毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 菌株 GS115、大肠杆菌 DH5 α 来自本实验室保存, 表达质粒 pPIC9K 由江南大学金坚实验室馈赠。

试剂 FGF23^{C-tail} 基因、引物委托上海生工生物工程有限公司合成。FGF23、FGF23^{C-tail} 由分子生物学教研室馈赠。分子构建所使用的试剂 *EcoR* I 和 *Not* I、DNA marker、protein marker、T4 ligase 等购自 Thermo Scientific 公司。PCR 产物纯化试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、酵母基因组 DNA 抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、遗传霉素 (G418)、蛋白胍、酵母粉等试剂购买于上海生工生物工程有限公司。尿微量白蛋白检测试剂盒购买于上海名典生物试剂有限公司。实验所用抗体购自 Abcam 公司。其余的化学试剂来源于上海国药化学试剂有限公司。

重组基因和重组质粒的构建 委托上海生工生物工程有限公司全基因合成 FGF23^{C-tail} 片段序列, HSA 基因为本实验室保存的 pPIC9K/HSA。融合 PCR 构建 FGF23^{C-tail}-HSA 重组基因序列, 引物序列见表 1, 使用 *pfu* DNA 聚合酶扩增基因片段。按照表 2 的反应过程进行扩增。DNA 回收试剂盒回收 1st、2nd 的基因片段,

Table 1 List of primers for amplification target gene

Number	Describe	Primer sequence	Site
F5p	FGF5'primer	5'-CCGGAATTCGGAGCGCCGAGGACGACTCGGA	EcoR I
fF3p	Fusion FGF3'primer	5'-ACCTCACTCTTGTGTGCATCGATGAATTTGGCGAAGGGGC	-
fH5p	Fusion HSA5'primer	5'-GCCCTTCGCCAAATTCATCGATGCACACAAGAGTGAGGT	-
H3p	HSA3'primer	5'-ATAAGAAATGCGGCCGCTTATTATAAGCCTAAGGCA	Not I

Table 2 Conditions and primer sets for fusion PCR

Number	PCR fragment	Primer	PCR condition
1st	FGF23C-tail	F5p/fF3p	95 °C 3 min, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 cycles, 72 °C 10 min
2nd	HSA	fH5p/H3p	95 °C 3 min, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 cycles, 72 °C 10 min
3rd	Fusion PCR	-	95 °C 3 min, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 4 min, 10 cycles, 72 °C 10 min
4th	Fusion gene	F5p/H3p	95 °C 3 min, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 3 min, 30 cycles, 72 °C 10 min

调整摩尔数比为1:1,不添加引物,融合具有互补片段的两个基因。获得的融合基因经 *EcoR* I、*Not* I 双酶切后回收酶切片段,然后与经相同酶切位点剪切后的 pPIC9K 质粒连接。连接好的质粒转化到 DH5 α 菌株中,并在 LB 固体培养基 (0.5% 酵母粉、1% 蛋白胨、0.5% NaCl 加 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Amp) 中培养 16 h。挑选单菌落,筛选获得的阳性质粒经 PCR 验证和测序验证正确后用于下一步的实验。

重组毕赤酵母菌株的构建 提取重组质粒。验证正确的质粒经 *Sal* I 线性化酶切后,与 GS115 感受态细胞混合电击 (1.5 kV, 40 μF , 180 Ω) 转化。毕赤酵母 GS115 的感受态细胞经标准方法制备获得^[11]。在 MD 平板 (20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖、10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸铵、3.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 YNB、15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂粉) 培养 4 天。待重组菌株形成菌落后挑选 30 株阳性克隆株至含 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ G418 抗性的 YPD 平板中继续培养两天。挑选 10 株菌落明显的阳性克隆株至 BMGY 液体培养基培养 2 天,第 3 天离心换为 BMMY 培养基并隔天补加 2% 的甲醇连续培养 3 天^[12]。收集上清液用尿微量白蛋白检测试剂盒检测上清液中 FGF23^{C-tail}-HSA 的蛋白含量,并挑选高表达的克隆菌株。具体的步骤可参考 Invitrogen 公司的 pPIC9K 表达手册。

菌株的验证 酵母基因组抽提试剂盒抽提重组菌株的基因组 DNA。以基因组为模板,用 F5p/H3p 为引物检测目标基因。制备好 12% 的 SDS-PAGE 胶^[13],离心收集发酵上清液,150 V、80 min 蛋白胶中分离,并转化到硝酸纤维素膜上。制备两份,并分别用鼠源 FGF23 多抗和 HSA 多抗杂交,用羊抗鼠的二抗孵育,用 ECL 显色液显色。

菌株的发酵罐制备表达 发酵罐选用上海保兴的 5 L 发酵罐,初始装液量为 3 L。初始培养基 [20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白胨、10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母粉、100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸铵、3.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 无氨基酵母氮源、100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH 6.0) 磷酸钾缓冲液、20 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油]。在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.0、400 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 发酵培养。通过 35% 的磷酸和 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钾自动控制 pH。培养基中的甘油消耗完全后,溶氧值会升高,当反弹至 30% 时,降低发酵温度至 25 $^{\circ}\text{C}$ 并将转速提高至 600 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。补加甲醇,甲醇补加速度与溶氧 (30%) 呈负反馈相关,以 12 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 补加降解培养基 (100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白胨、50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母粉)。每 4 h 取样检测菌体干重浓度 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和甲醇消耗量,并用尿微量白蛋白检测试剂盒检测发酵液中 FGF23^{C-tail}-HSA 的蛋白含量。

重组蛋白的纯化 发酵液经 8 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 12 min 后收集上清,用 0.45 μm 的滤膜过滤,再经超滤

仪浓缩 10 倍。浓缩液稀释 5 倍后,再次浓缩至原体积。Blue 柱先经 I 液 (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl) 平衡后将浓缩的样品上样,淋洗平衡后以 45% II 液 (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液, pH 7.0, 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl) 和 100% II 液梯度洗脱。收集 100% II 液上样于 Phenyl 柱,经淋洗平衡后以 100% 的 III 液 (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, pH 7.0) 洗脱。收集 Phenyl 柱的洗脱液上样于 Q 柱,淋洗平衡后用 40% 的 IV 液 (1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl pH 7.0) 和 100% 的 IV 液洗脱。收集 40% 的 IV 液即为目标蛋白的纯化液。

重组蛋白的活性检测 购自上海斯莱克实验动物有限公司的 Sprague-Dawley 大鼠作为实验动物,参照动物实验管理和宜春学院伦理委员会的要求开展实验。每组 5 只,设置对照组、FGF23 全长蛋白组 (给药剂量为 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、FGF23^{C-tail} (给药剂量为 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和 FGF23^{C-tail}-HSA 融合蛋白组 (给药剂量为 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。静脉注射给药,对照组注射同体积的生理盐水。在给药前和给药 3 h 后采取尾尖取血法收集血液约 1 mL,血液凝固后收集血清,血清中血磷含量采用血磷浓度检测试剂盒 (Solarbio, BC1655) 检测。

结果

1 重组基因和重组质粒的构建

FGF23^{C-tail} 基因片段委托上海生工合成, HSA 基因片段为本实验室保存。利用表 1 的引物设计,按照表 2 的反应进行第一次和第二次 PCR,此时各自基因片段多扩增出一部分互补的基因序列。胶回收后调整 PCR 产物的摩尔数比,进行第三次的融合 PCR,再扩增获得融合基因 (FGF23^{C-tail}-HSA) 序列 (流程图见图 1A)。融合基因经双酶切后连接到 pPIC9K 质粒上,连接产物转化到 DH5 α 中。获得的重组质粒经 PCR 鉴定和基因测序鉴定与预期重组质粒 (图 1B) 一致。

2 毕赤酵母重组菌株的筛选及验证

GS115 是毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 菌株的一种。参照说明书制作 GS115 感受态细胞,重组质粒经 *Sal* I 线性化后,与感受态细胞混合并电击转化。将转化后的 GS115 均匀涂布到 MD 平板中,经 4 天培养后形成大约 120 个单菌落。随机挑选 30 个菌落继续在 YPD 抗性平板 (含 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 G418) 中继续培养两天。抗性压力下生长出 11 个克隆株,并将其全部接种到摇瓶中,并进行连续 3 天的诱导表达。尿微量白蛋白试剂盒是医院用于检验人体尿液白蛋白含量的试剂盒,检测范围为 20~200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。融合蛋白 FGF23^{C-tail}-HSA 有白蛋白的抗原性,检测发酵液白蛋白的含量来

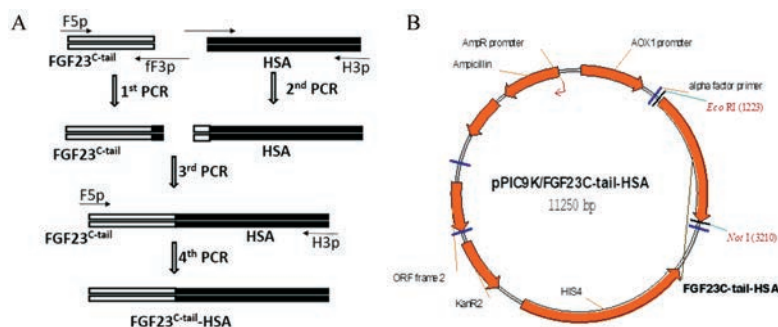


Figure 1 Construction of the recombinant plasmid. A: Fusion gene FGF23^{C-tail}-HSA constructed by fusion of PCR. B: Schematic of the recombinant plasmid

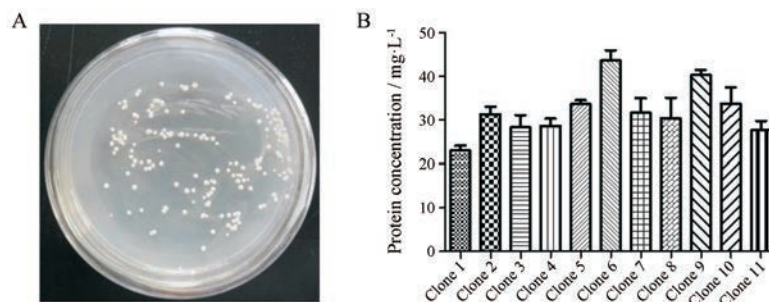


Figure 2 Construction and screening of recombinant *P. pastoris* strains

指示融合蛋白的含量^[12]。产量的结果显示,有4株菌株的表达量低于 30 mg·L⁻¹,6 号菌株的表达量最高,为 43.7 mg·L⁻¹ (图 2B)。

3 重组菌株的 5 L 发酵罐表达

利用 5 L 发酵罐研究重组菌株的发酵表达。发酵到 28 h 时,菌体干重浓度达到 50.6 g·L⁻¹,此后菌体干重增加不大,结果显示 28 h 已进入细菌培养的平台期 (图 3)。且 28 h 时,发酵罐的溶氧水平已触底反弹至 43%,与溶氧 (30%) 负关联的方式开始补加甲醇 (诱导培养基)。28~44 h 甲醇消耗速度较低,重组蛋白的积累量也不大,此后甲醇消耗速度明显增加,且重组蛋白的产量显著增加,这与理论相符。培养至 76 h,重组蛋白的浓度最大至 265.6 mg·L⁻¹。随后甲醇消耗速度明显下降,且重组蛋白浓度也下降,这可能与菌体的活率下降而导致重组蛋白的降解相关。因此,根据发酵参数分析,重组菌株的最佳的发酵时间为 76 h,此时重组蛋白的表达量最高。

4 重组蛋白的纯化

发酵罐在 76 h 停止发酵,离心收集上清并过滤除菌,超滤浓缩仪获得浓缩上清液。浓缩上清液经 Blue Sepharose 柱纯化,50% 的 II 液洗脱除杂,100% 的 II 液洗脱收集。收集的 Blue 洗脱液再经 Phenyl Sepharose 柱纯化,淋洗平衡去除大部分色素和部分杂蛋白,

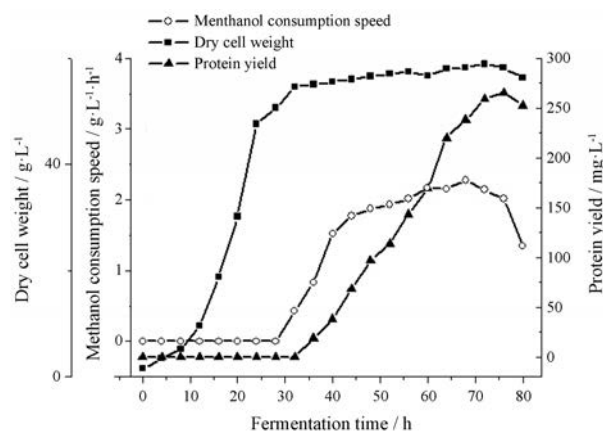


Figure 3 The process in 5 L-fermentation. Cell density, protein concentration, and rate of glucose consumption were measured every 4 h

100% 的 III 液直接洗脱。Phenyl Sepharose 柱的洗脱液为低盐溶液,可直接上样于 Q Sepharose 柱进行纯化,分别用 40% 和 100% 的 IV 液进行洗脱。40% 的 IV 液洗脱液为纯化的最终溶液。发酵罐的发酵上清液、每步纯化收集的样品电泳图 (图 4) 显示,样品经三步纯化后,纯度得到明显的提升。空载的质粒未见目标蛋白的表达 (图 4)。最终收集的纯化样品浓度为 0.92 g·L⁻¹,总回收率为 24.5%,批次纯化的参数详见表 3。纯化后的样品经 SEC-HPLC 检测和 SDS-PAGE 检测纯度为 95.3% (图 5),可用于后续的生物活性检测。

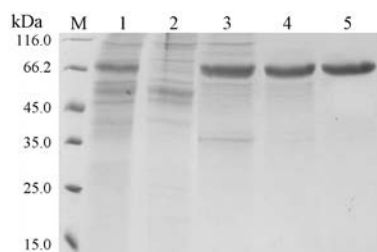


Figure 4 Protein purity assessed by SDS-PAGE. M: Protein molecular weight marker; Lanes 1: Supernatant after fermentation by *P. pastoris*/pPIC9K-FGF23^{C-tail}-HSA; Line 2: Supernatant after fermentation by *P. pastoris*/pPIC9K (empty plasmid); Lanes 3: Samples after blue sepharose purification; Lanes 4: Samples after phenyl sepharose purification; Lanes 5: Samples after Q sepharose purification

Table 3 Purification process for the fusion protein FGF23^{C-tail}-HSA produced by *P. pastoris*

Purification step	Volume /mL	FGF23 ^{C-tail} -HSA/mg	Step recovery/%	Total recovery/%
Culture supernatant	380	100.9	100.0	100.0
Ultrafiltration	39	94.1	93.3	93.3
Blue sepharose	36	45.0	47.8	44.5
Phenyl sepharose	32	38.6	85.8	38.1
Q sepharose	27	24.8	64.3	24.5

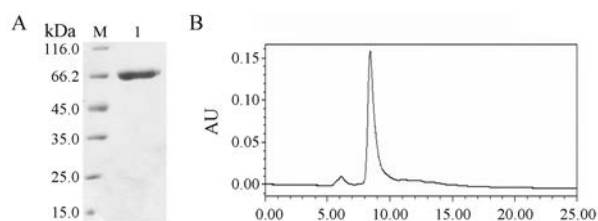


Figure 5 Protein purity assessed by HPLC and 12% SDS-PAGE. A: SDS-PAGE of final purified protein; M: Protein molecular weight marker; Lanes 1: Samples of final purified protein. B: HPLC of final purified protein. The purity was 95.3%

5 重组蛋白的活性检测

为检测 FGF23^{C-tail}-HSA 的生物学活性, 以 Sprague-Dawley 大鼠作为实验动物。设置对照组、FGF23 全长蛋白组、FGF23^{C-tail} 组和 FGF23^{C-tail}-HSA 融合蛋白组, 每组 5 只静脉给药。分别在给药前和给药后 3 h 取样检测血清中血磷的浓度。结果显示, 给药 3 h 后, FGF23 实验组的血磷浓度从 $0.644 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 降低到 $0.518 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, FGF23 可以显著地降低血磷的水平。FGF23^{C-tail}-HSA 实验组的血磷浓度从 $0.632 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上升到 $0.764 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 血磷浓度显著地升高, 且与阳性对照组 (FGF23^{C-tail}) 的趋势一致。空白对照组的大鼠注射同体积生理盐水, 血磷含量几乎没有变化 (图 6)。FGF23^{C-tail} 作为 FGF23 的抑制剂, 具有抑制 FGF23 的

能而提高血磷的作用^[6], 本研究设计的新颖融合蛋白 FGF23^{C-tail}-HSA 也具有抑制 FGF23 而提高血磷的良好生物活性。

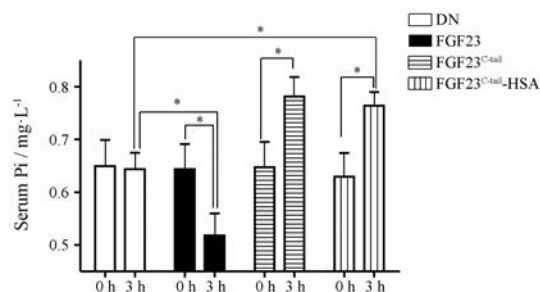


Figure 6 Bioactivity of fusion protein in rat. FGF23 or FGF23^{C-tail}-HSA were injected i. v. into Sprague-Dawley rats. Serum parameters were measured and calculated before and 3 h after injection

讨论

磷元素是人体遗传物质核酸的重要组分, 在能量代谢、信号传导、细胞结构组成、离子转运等基本生命过程中都发挥着重要的作用^[14]。低磷可引起细胞能量代谢的广泛紊乱、骨骼矿质化不足、肌肉收缩和心肌功能衰退的症状^[15,16]。FGF23 作为体内血磷调节激素, 以 FGF23 作为药物靶点开发血磷调节药物成为越来越多的学者研究的方向^[17]。

美国科学院院报的研究报道表明^[6], 保留 FGF23 的 C 端的 73 个氨基酸的片段的 FGF23^{C-tail} 作为拮抗剂抑制 FGF23 的生物学功能, 从而降低 FGF23 对患者的血磷调节功能, 对于低磷血症疾病的治疗具有重要的研究价值和应用前景。FGF23^{C-tail} 的药物开发, 特别是长效性药物的开发还处于研究初期阶段。目前, 国内尚未见 FGF23^{C-tail} 长效改造的文献报道, 国外也只有辉瑞公司对 FGF23^{C-tail} 与 Fc 抗体片段融合进行长效改造, 改造后 FGF23^{C-tail}-Fc 可以有效的抑制 FGF23 的信号传导^[8]。本文将 FGF23^{C-tail} 与 HSA 融合, 并尝试在毕赤酵母表达系统制备表达, 结果表明 FGF23^{C-tail}-HSA 具有很好的生物活性, 为 FGF23^{C-tail} 的长效化改造和应用提供基础。

融合 PCR 将 FGF23^{C-tail} 与 HSA 基因链接为融合基因 FGF23^{C-tail}-HSA, 进一步构建表达质粒 pPIC9K/FGF23^{C-tail}-HSA。表达质粒电转至毕赤酵母中, 经克隆株的抗性筛选和表达量筛选, 获得一株高产的毕赤酵母表达菌株。在快速检测 FGF23^{C-tail}-HSA 的产量时, 利用融合蛋白的人血清白蛋白的免疫原性^[18], 利用 HSA 检测试剂盒测定发酵液中 HSA 的含量来反映融合蛋白的 FGF23^{C-tail}-HSA 含量, 检测的结果特异性高、

可靠性强。毕赤酵母的表达, 需要利用甲醇作为诱导剂诱导外源蛋白的表达。但甲醇作为次级碳源, 需要在初始的甘油消耗完全后加入酵母才会被利用。因此在 5 L 发酵罐中, 前 28 h 利用甘油作为 C 源, 之后利用甲醇作为 C 源融合蛋白表达。甲醇的添加速度与融氧负反馈相关, 可以降低因甲醇浓度过高导致的对酵母的毒副作用。发酵到 76 h 时, 融合蛋白的表达量最高, 能达到 $265.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。纯化获得高纯度 FGF23^{C-tail}-HSA 的体内实验显示, FGF23^{C-tail}-HSA 具有 FGF23 抑制剂的功能, FGF23^{C-tail}-HSA 实验组的血磷从 $0.632 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上升到 $0.764 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 能显著地提高大鼠的血磷水平。本文将 FGF23^{C-tail} 与 HSA 融合并在毕赤酵母中进行高效表达, 且 FGF23^{C-tail}-HSA 可以显著地提高大鼠的血磷水平, 这将为 FGF23^{C-tail}-HSA 生理学活性的深入研究和 FGF23 抑制剂的药物开发提供基础。

References

- [1] Carpenter TO, Imel EA, Holm IA, et al. A clinician's guide to X-linked hypophosphatemia [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26: 1381-1388.
- [2] Goldsweig BK, Carpenter TO. Hypophosphatemic rickets: lessons from disrupted FGF23 control of phosphorus homeostasis [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2015, 13: 88-97.
- [3] Bergwitz C, Juppner H. Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and FGF23 [J]. *Annu Rev Med*, 2010, 61: 91-104.
- [4] Fajol A, Honisch S, Zhang BB, et al. Fibroblast growth factor (Fgf) 23 gene transcription depends on actin cytoskeleton reorganization [J]. *FEBS Lett*, 2016, 590: 705-715.
- [5] Lindberg I, Pang HW, Stains JP, et al. FGF23 is endogenously phosphorylated in bone cells [J]. *J Bone Miner Res*, 2015, 30: 431-436.
- [6] Goetz R, Nakada Y, Hu MC, et al. Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 407-412.
- [7] Zhang X, Guo K, Xia F, et al. FGF23 (C-tail) improves diabetic nephropathy by attenuating renal fibrosis and inflammation [J]. *BMC Biotechnol*, 2018, 18: 33.
- [8] Johnson K, Levine K, Sergi J, et al. Therapeutic effects of FGF23 C-tail Fc in a murine preclinical model of X-linked hypophosphatemia via the selective modulation of phosphate reabsorption [J]. *J Bone Miner Res*, 2017, 32: 2062-2073.
- [9] Ruan C, Liu L, Lu Y, et al. Substance P-modified human serum albumin nanoparticles loaded with paclitaxel for targeted therapy of glioma [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 85-96.
- [10] Tanaka R, Watanabe H, Kodama A, et al. Long-acting human serum albumin-thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression [J]. *J Pharm Exp Ther*, 2013, 345: 271-283.
- [11] Wang JH, Hung WP, Tsai SH. High efficiency transformation by electroporation of *Yarrowia lipolytica* [J]. *J Microbiol*, 2011, 49: 469-472.
- [12] Qian K, Lei JS, Guan B, et al. Expression and quality control of the recombinant human serum albumin and interferon-alpha2b fusion protein in *Pichia pastoris* [J]. *J Food Sci Biotechnol (食品与生物技术学报)*, 2012, 31: 1269-1274.
- [13] Laemmli UK, Zhao K, Hart C, et al. Chromosomal structural loops and functional domains-sars and boundary elements [J]. *J Cell Biochem*, 1995: 121-121.
- [14] Masuda Y, Ohta H, Morita Y, et al. Expression of FGF23 in activated dendritic cells and macrophages in response to immunological stimuli in mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38: 687-693.
- [15] Dounousi E, Torino C, Pizzini P, et al. Intact FGF23 and -klotho during acute inflammation/sepsis in CKD patients [J]. *Eur J Clin Invest*, 2016, 46: 234-241.
- [16] Zhu PJ, Hou XB, Fang H. Progress of lymphoid-specific tyrosine phosphatase inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 699-705.
- [17] Spichtig D, Zhang H, Mohebbi N, et al. Renal expression of FGF23 and peripheral resistance to elevated FGF23 in rodent models of polycystic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2014, 85: 1340-1350.
- [18] Qian K, Gong XH, Guan B, et al. Efficient expression of glucagon-like peptide-1 analogue with human serum albumin fusion protein in *Pichia pastoris* using the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter [J]. *Biotechnol Bioproc E*, 2015, 20: 694-700.