

## 特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2024-061

## 蛋白质工程在医药产业中的应用

温艳华<sup>1,2</sup>, 刘合栋<sup>3</sup>, 曹春来<sup>2,3</sup>, 巫瑞波<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中山大学药学院, 广东 广州 510006; <sup>2</sup> 珠海联邦制药股份有限公司, 广东 珠海 519040; <sup>3</sup> 联邦生物科技(珠海横琴)有限公司, 广东 珠海 519031)

**摘要:** 蛋白质工程, 通过定向进化、半理性或理性设计、计算机辅助设计等手段, 实现对蛋白质特定功能的设计和改造, 获得的工程化蛋白质在食品、医药、能源、材料等行业具有重要的应用价值。在医药化工领域, 工程化酶可作为化学原料药及其中间体合成的高效生物催化剂, 实现医药工业绿色制造。在生物制药领域, 多肽或蛋白修饰酶的改造可显著提升候选药物的制备效率, 诊断酶的改造则可以大幅增强检测的准确性和灵敏度。此外, 蛋白质工程在提升治疗性酶和治疗性抗体等生物制剂的生物活性、增强药物稳定性、降低免疫原性等方面也发挥重要作用, 从而提高药物的可开发性、安全性和有效性。因此, 本文简要回顾了蛋白质工程的发展历程, 具体阐述了其在化学原料药合成和生物制药两大产业中的一系列应用实例, 旨在剖析蛋白质工程在科技成果转化及医药产业应用中存在的问题与挑战, 并展望医药产业中蛋白质工程的未来发展方向, 以期为促进产学研一体化发展提供借鉴。

**关键词:** 蛋白质工程; 生物催化; 医药化工; 生物制药; 人工智能

**中图分类号:** Q816 **文献标志码:** A

## Applications of protein engineering in pharmaceutical industry

WEN Yanhua<sup>1,2</sup>, LIU Hedong<sup>3</sup>, CAO Chunlai<sup>2,3</sup>, WU Ruiibo<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, Guangdong, China; <sup>2</sup> Zhuhai United Laboratories Co., Ltd, Zhuhai 519040, Guangdong, China; <sup>3</sup> The United Biotechnology (Zhuhai Hengqin) Co., Ltd., Zhuhai 519031, Guangdong, China)

**Abstract:** Protein engineering performs specific designs and modifications on proteins through directed evolution, semi-rational or rational design, computer-assisted design, and so on. The engineered proteins, with improved properties, have significant applications in food, medicine, fuel, and material industries. For the chemical and pharmaceutical industry, engineered enzymes can serve as efficient biocatalysts for the synthesis of active pharmaceutical ingredients (API) and their intermediates, aligning with the concepts and principles of green chemistry and manufacturing. For the biopharmaceutical industry, the engineering of peptide or protein modifying enzymes can

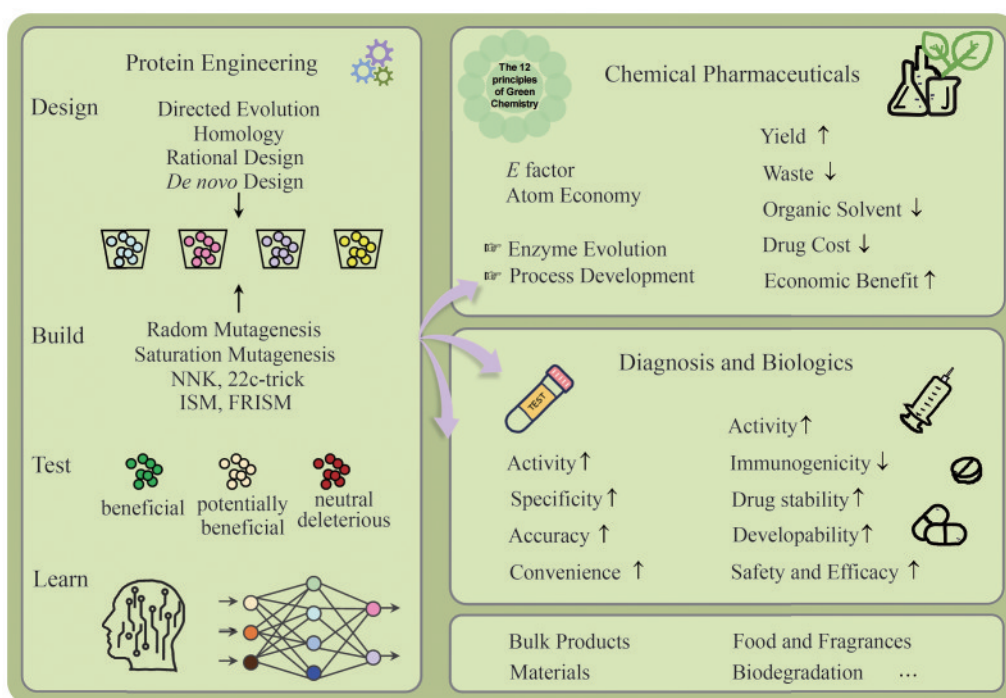
收稿日期: 2024-08-05 修回日期: 2024-10-16

基金项目: 国家自然科学基金 (22473118, 82430108)

引用本文: 温艳华, 刘合栋, 曹春来, 巫瑞波. 蛋白质工程在医药产业中的应用[J]. 合成生物学, 2025, 6(1): 65-86

Citation: WEN Yanhua, LIU Hedong, CAO Chunlai, WU Ruiibo. Applications of protein engineering in pharmaceutical industry[J]. Synthetic Biology Journal, 2025, 6(1): 65-86

boost the efficiency in preparing drug candidates, while engineered diagnostic enzymes can make detection more accurate and sensitive. Moreover, protein engineering can improve the bioactivities of biological drugs such as therapeutic enzymes and antibodies, increase stability, and mitigate immunogenic response for their safety and efficacy. Here, we review the tremendous progress in protein engineering, elucidate its importance in the research and development of chemically derived drugs and biologics, and provide examples of its applications. These examples encompass the discovery of enzymes or antibodies, the process of protein engineering, and the subsequent economic advantages. We aim to showcase the practical implementation of protein engineering in the pharmaceutical industry and facilitate technology transfer, thereby fostering seamless integration between research, development, and industrial production. Furthermore, we discuss challenges such as cost-effectiveness and market changes in the synthesis of API, and multi-target optimization, long cycle and high risk in the discovery and development of biopharmaceuticals. Finally, we look forward to the prospects of protein engineering in pharmaceutical industry. In the future, automated pipelines consisting artificial intelligence and self-driving laboratories will accelerate the design-build-test-learn cycle, leading to rapid progress in molecular design and discovery.



**Keywords:** protein engineering; biocatalysis; chemical and pharmaceutical industry; biopharmaceutical industry; artificial intelligence

随着DNA合成、测序技术、生物信息学和人工智能 (artificial intelligence, AI) 的发展, 生物催化引领了一轮又一轮的技术革新浪潮<sup>[1]</sup>, 医药产业也迎来了快速的发展和升级。酶作为合成生物学重要的催化元件, 被视为生物制造产业的“芯片”, 在大宗产品、精细化工、化学原料药合

成以及生物制药产业中均有广泛应用<sup>[2]</sup>。

在医药化工领域, 生物催化能够在温和条件下实现水溶液中区域选择性和立体选择性的手性化合物的合成, 且通常具有更高的反应速率、特异性、产品收率、产品质量和操作安全性。为了释放生物催化的潜力, 必须采取有效策略尽可能

地把酶催化整合到整个化学转化过程中,以此来减少合成步骤,提高原材料的利用率,减少环境不友好的操作过程<sup>[3]</sup>。然而,野生型的酶可能由于以下原因无法满足工业生产的需求:①对非天然底物的催化效率较低,②对映体选择性不够高,③在极端条件(包括pH和温度等)下易失活,④对有机溶剂的耐受性不佳,⑤存在底物抑制或产物抑制等<sup>[4]</sup>。因此,需要通过酶工程改善上述特性以满足工业生产的要求,这包括:快速发现新功能或性质更优的酶;选择合适的策略如定向进化、半理性设计或蛋白从头设计构建或生成突变库;在接近工业生产条件下筛选性质提升的突变体并进行多轮迭代。多维度优化后的生物催化剂使得化学原料药及其中间体的合成工艺遵循绿色化学原则,环境友好,并且节约生产成本,经济效益明显。

近年来,生物制品如多肽药物、抗体药物、疫苗、细胞疗法和活体生物药等发展势头迅猛。在生物制药领域,酶具有修饰、诊断和治疗的重要价值,对于抗体药物研发也已经发展出了系统的抗体工程。整体来讲,蛋白质工程在生物制药行业的应用包括两方面。一类是生物催化,比如通过酶工程提高多肽和蛋白修饰酶的区域和立体选择性,加速候选药物分子的制备;提高诊断酶的反应特异性和检测准确性,增加酶的稳定性并将其开发为可居家使用的试剂盒。另一类是生物药(大分子药物)研发,治疗酶和治疗性抗体等的改造要达到更高的标准。除了催化或结合以及激动或阻断活性之外,还需要考虑免疫原性、给药方式和药代动力学性质等因素来进行蛋白质改造,以提高药物的可开发性、安全性和有效性。比如,结合人工智能预测和实验来删除或遮蔽T细胞和B细胞表位以降低免疫原性;通过位点改造或生物偶联延长药物的半衰期,减少给药频率;若采用口服给药,需要将药物开发成耐受胃肠道蛋白酶的形式。蛋白质工程加快了生物制药的创新,为业界开发出更多生物制品提供了技术保障。

因此,本文简要回顾了蛋白质工程的发展历程和技术革新,聚焦于化学原料药合成和生物制药两大工业应用领域,从产业化的角度展示了蛋白质工程在医药产业中的应用,阐述了蛋白质工

程如何赋能医药原料及中间体的绿色制造,如何助力生物制药加速创新。旨在展示蛋白质工程在医药产业中的应用和科技成果转化,促进产学研深度融合。

## 1 蛋白质工程的发展历程

20世纪80~90年代,由于对蛋白质改造的巨大需求,定向进化应运而生,Frances H. Arnold团队在这一领域作出了杰出贡献<sup>[5]</sup>。通过易错PCR(error-prone PCR)和DNA改组(DNA shuffling)等技术构建突变文库<sup>[6]</sup>,定向筛选特定突变体,重复数轮突变和筛选连续积累有益突变,最终实现具有新功能或功能提升的蛋白质。这种方法构建的突变文库通常较大,因此需要合适且灵敏可靠的高通量筛选方法<sup>[7]</sup>。传统的筛选技术包括琼脂平板筛选和孔板筛选法,通量偏低。近十年来,荧光激活细胞分选技术(fluorescence-activated cell sorting, FACS)<sup>[8]</sup>、液滴微流控分选(droplet-based microfluidic sorting, DMFS)<sup>[9]</sup>等方法的开发极大地提高了筛选通量,也减少了筛选试剂的用量。这些筛选技术的原理、应用场景及案例已被详细综述<sup>[10]</sup>。

随着结构生物学的发展,人们对蛋白结构-活性关系的认识逐渐加深,半理性设计在蛋白质工程中逐渐占据了重要地位。基于已掌握的序列、结构和活性信息,选定特定位置进行改造,结合密码子的合理选用<sup>[11-13]</sup>,构建“小而精”的突变体文库深受青睐。Manfred T. Reetz和孙周通等提出的组合活性中心饱和和突变策略(combinatorial active-site saturation test, CAST)<sup>[14]</sup>、迭代饱和突变技术(iterative saturation mutagenesis, ISM)<sup>[15]</sup>、CAST/ISM和聚焦理性迭代定点诱变策略(focused rational iterative site-specific mutagenesis, FRISM)<sup>[16-17]</sup>,在扩展底物范围、区域选择性和立体选择性改造等方面得到了很好的应用。

随着机器学习(machine learning, ML)<sup>[18-19]</sup>和深度学习(deep learning, DL)<sup>[20]</sup>的蓬勃发展,计算机辅助蛋白质设计越来越多地被应用于蛋白质工程<sup>[21]</sup>。例如,类似于在药物研发中的定量构效关系(quantitative structure-activity relationship,

QSAR), 在蛋白质定向进化领域发展出了蛋白质序列-活性关系 (protein sequence-activity relationship, ProSAR) 算法<sup>[22]</sup>。ProSAR 适合用来同时改善酶的多种生化特性, 已成功应用于几种酶的定向进化。相对于巨大的蛋白质序列空间, 结合了高通量筛选的传统定向进化仍然是局部采样, 是对蛋白质适应度景观 (fitness landscape)<sup>[23]</sup> 的局部探索, 因此 Frances H. Arnold 团队提出了 ML 辅助的定向进化 (machine learning-assisted directed evolution, MLDE) 概念, 并介绍了 MLDE 的工作流程和应用案例<sup>[24-25]</sup>。在传统定向进化中性质未提升的序列被舍弃, 而 MLDE 可以利用这些数据学习序列-功能关系, 加速蛋白质进化过程, 有更大概率达到全局最优。除了对天然蛋白质进行改造之外, 蛋白质的从头设计也发展迅速, 其目标是创造自然界不存在但具有特定功能的蛋白质<sup>[26-27]</sup>。比如, David Baker 团队成功从头设计了能够催化 Retro-Aldol 反应<sup>[28]</sup>、Kemp 消除反应<sup>[29]</sup> 和 Diels-Alder [4+2] 环加成反应<sup>[30]</sup> 的酶。

由于各大产业通常需要热稳定性好、有机溶剂耐受强等结构稳定的催化酶, 因此在蛋白稳定性改造方面已经形成了一系列的理论和设计方法<sup>[31]</sup>。其中包括基于进化分析、结构分析和折叠自由能 ( $\Delta\Delta G$ ) 计算<sup>[32]</sup> 的蛋白质稳定性设计, 也开发出了综合多种稳定性计算策略的一站式蛋白设计工具 PROSS2 (protein repair one stop shop)<sup>[33-34]</sup>、FRESCO<sup>[35]</sup> 和 FireProt<sup>[36]</sup> 等。总之, 近半个世纪以来, 蛋白质工程的发展历程已在其他多个综述中有详尽的阐述<sup>[37-39]</sup>, 在此我们仅作上述简要概述, 而正是蛋白质工程的飞速发展, 为医药产业的升级迭代奠定了重要的技术支撑。

## 2 蛋白质工程在化学原料药合成中的应用

我国科技部长期以来将“绿色生物制造”作为国家重点研发计划的重要组成部分, 已连续多年给予滚动支持。这种持续性的支持不仅体现了国家对绿色、可持续发展理念的重视, 也反映了我国在生物制造领域的战略眼光和长远规划。在

全球范围内, “绿色生物制造”也受到了广泛的关注和重视。随着环保意识的不断提高和可持续发展的需求日益迫切, 越来越多的国家和地区开始将生物制造作为实现绿色转型的重要途径。例如, 欧美一些国家已经制定了详细的生物经济发展蓝图, 通过政府引导和市场驱动相结合的方式, 推动生物制造技术的创新和应用。同时, 许多公司也在积极布局生物制造领域, 以积极态度拥抱“绿色生物制造”这一新兴的产业形态和技术模式, 在化学原料药合成领域其应用尤为显著。

化学合成通常存在多个反应位点, 需要通过官能团的保护和脱保护来避免形成副产物, 因而导致反应步骤变多, 收率下降。一些化学合成反应需要采用极端温度、极端 pH 或高压等剧烈的反应条件, 造成了大量的能源消耗。此外, 大量有机溶剂的使用 (通常占标准批量化学操作质量的 50%~80%) 不仅不够环保, 增加成本, 还存在操作安全的问题。自 20 世纪末绿色化学概念诞生以来<sup>[40]</sup>, *E* 因子 (*E*-factor)<sup>[41]</sup> 和原子经济性 (atom economy) 概念的提出和应用使我们对一个反应总效率的评价更为真实, 而不再是仅仅关注产率。药品生产质量管理规范 (Good Manufacturing Practices, GMP) 和国际人用药品注册技术协调会 (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) 指导原则中关于可持续性工艺开发的部分内容与绿色化学的 12 项原则一致<sup>[42]</sup>。由于生物催化很好地契合了“绿色化学 12 项原则”, 因此在这几十年间迅速发展并越来越多地应用在化学原料药的合成中, 极大地减少了化学品和能源消耗。

在小分子药物的新药研发中, 美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 和中国国家药品监督管理局 (National Medical Products Administration, NMPA) 以及大部分国家的卫生机构都要求提供手性候选药物两种对映体的毒性和其他生物学数据, 且只允许活性形式上市<sup>[43]</sup>。制药公司通常需要获得这两种立体异构体, 因此不对称催化合成一直是医药化工领域的研究热点, 也是生物催化领域的重要研究方向。通过酶改造获得立体选择性好的酶在不对称催化合成领域具有十分明显的优势。而对于已上市小分子

药物的生产工艺优化,需要催化活性高、区域和立体选择性好、稳定性佳的生物催化剂来匹配生产流程,降低生产成本。一般来说,如果通过筛选发现已有的酶对目标反应的底物仅有弱催化活性甚至无催化活性,则需要从环境样品中挖掘新酶或从现有的酶库中筛选出最合适的起始酶,其次通过改造实现特定区域和立体选择性<sup>[44]</sup>的催化,提高催化活性;之后需要考虑活性、选择性和稳定性等多种性质的同步提升,并将工艺反映在生物催化剂筛选条件中,根据实际需要进行多轮迭代。

本节选取部分在化学原料药产业中实现绿色制造的酶改造范例,从酶的发现、酶改造过程以及由此带来的经济效益等多个方面进行剖析。

## 2.1 转氨酶合成手性胺

胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 是一种肠促胰岛激素,能抑制胰高血糖素分泌、减少食欲和减缓胃排空。然而活性形式的 GLP-1 半衰期仅数分钟,这是由于丝氨酸蛋白酶二肽基肽酶 IV (dipeptidyl peptidase IV, DPP-4) 会

将其迅速降解成非活性形式<sup>[45-46]</sup>。西格列汀 (sitagliptin) 是第一个上市的口服 DPP-4 抑制剂,可单独使用或与其他药物联合使用治疗 II 型糖尿病,已上市的药物有 JANUVIA<sup>®</sup>、JANUMET<sup>®</sup> 和 JANUMET<sup>®</sup> XR 等。

基于绿色化学和原子经济性的原则,西格列汀的化学合成工艺经过了多次优化改良,从用手性辅基控制引入手性中心到通过不对称的催化氢化引入手性<sup>[47-50]</sup>。其中,采用以铑盐为手性催化剂的第二代化学合成路线<sup>[51]</sup>生产西格列汀减少了合成步骤,提高了对映体过剩率 (enantiomeric excess, ee),减少了 80% 以上的废弃物,并完全消除了工业废水<sup>[50]</sup> (图 1)。Merck 公司的西格列汀化学工艺团队因此荣获美国环境保护署 (United States Environmental Protection Agency, EPA) 颁发的“总统绿色化学挑战: 2006 年更绿色合成途径奖”<sup>[52]</sup>。然而,该工艺仍然存在一定的缺陷,反应需要高压设备,而且铑作为一种极为罕见的金属,稀缺不可再生,价格波动大。因此,Merck 公司和 Codexis 公司借助于 CodeEvolver<sup>®</sup> 平台<sup>[53]</sup> 合作开发了通过转氨酶引入手性氨基的生物催化路线<sup>[54]</sup>。

转氨酶 (transaminases, EC 2.6.1) 催化氨基

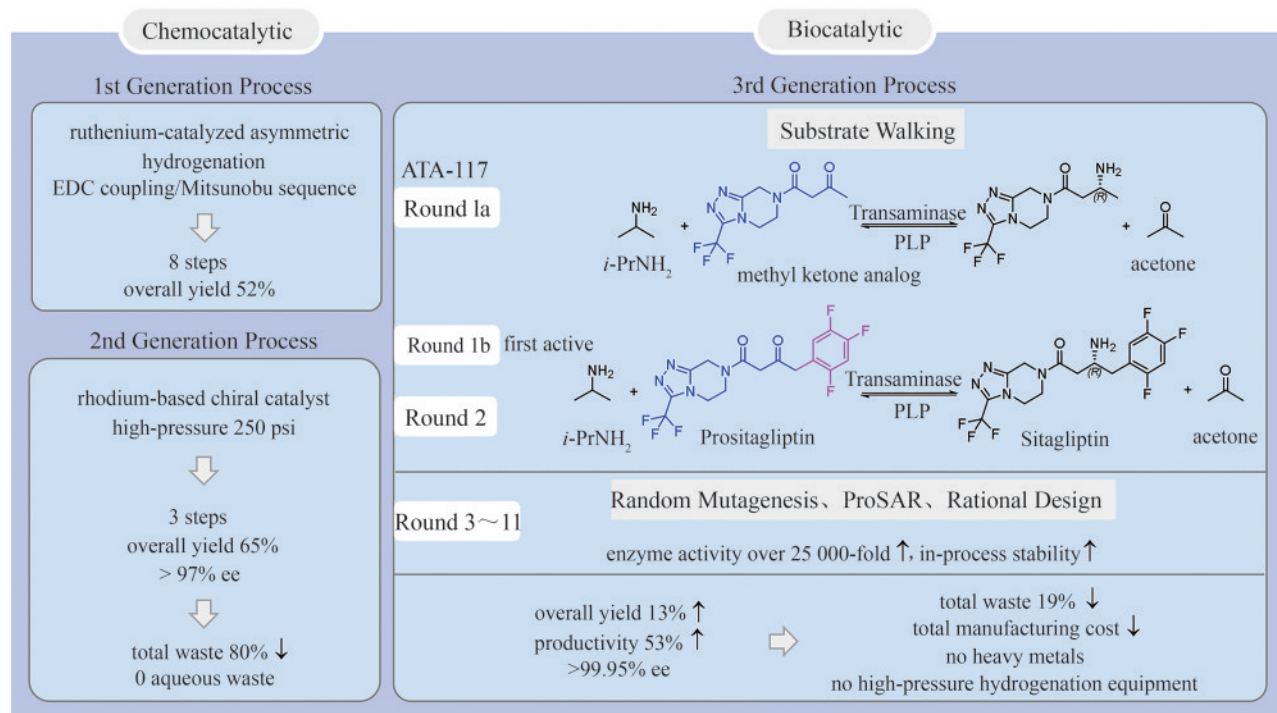


图1 西格列汀的生产工艺优化及ATA-117的定向进化

Fig. 1 Optimization of the manufacturing process of sitagliptin and the directed evolution of ATA-117

从胺供体到酮受体的可逆转移，产生手性胺<sup>[55]</sup>或氨基酸<sup>[56-57]</sup>。转氨酶都需要相同的辅酶，5'-磷酸吡哆醛（pyridoxal 5'-phosphate, PLP），所有的转氨酶都催化同一类型的反应，但具有不同的底物特异性，大部分转氨酶仅能催化酮羰基的邻位取代基比甲基更小的底物。研究团队测试了各种商业化的转氨酶，没有酶对西格列汀酮（prositagliptin ketone）表现出可检测的转氨活性。*Arthrobacter* sp. 来源的转氨酶 ATA-117 对甲基酮和小环酮具有 R 构型选择性的转氨活性<sup>[58]</sup>，适合作为酶工程的起始酶。同源建模和分子对接分析发现，ATA-117 的活性腔不具备结合底物西格列汀酮的能力，因此研究团队首先使用底物游走（substrate walking）策略<sup>[59]</sup>对 ATA-117 进行改造，先以截短的西格列汀酮为底物（图 1 中结构式蓝色部分）进行生物催化，将大活性口袋中与其有相互作用的氨基酸残基饱和突变建库，使转氨酶的活性向所需目标底物方向进化；之后再设计三氟苯基侧（图 1 中结构式红色部分）的突变文库打开小的活性口袋。将上述获得的所有有益突变组合，最终首次获得对西格列汀酮有催化活性的转氨酶 ATA-117<sup>Rd1b</sup>。第二轮基本完成了对活性腔形状的改造，获得的 ATA-117<sup>Rd2</sup> 的活性相比于 ATA-117<sup>Rd1b</sup> 提高了 75 倍。基于 ProSAR、随机突变和理性设计等策略的 3~11 轮改造侧重于提高酶活性和过程稳定性以满足生产工艺要求。具体实施方式为在越来越有挑战性的反应条件下进行筛选：增加底物负载，增加 *i*-PrNH<sub>2</sub> 浓度，增加有机溶剂浓度，提高 pH 和温度等。最终获得的含 27 个突变的 ATA-117<sup>Rd11</sup> 在底物转化率、有机溶剂的耐受程度、耐受氨基供体的浓度、高温下的稳定性和产物的对映体纯度等多个维度均实现了性能提升。

相比于铑催化的工艺路线，生物催化工艺避免了高压加氢操作和金属催化剂回收，总收率增加了 10%~13%，增产 53% [以 kg/(L·d) 计]，降低了生产成本，还减少了 19% 的废料产生<sup>[54]</sup>。Merck 公司和 Codexis 公司因此获得 EPA 颁发的“总统绿色化学挑战：2010 年更绿色反应条件奖”<sup>[60]</sup>。2009 年，Merck 已将新工艺扩大到中试规模，2012 年，Codexis 和 Merck 签订了该酶的供应协议，又于 2015 年签署了一项多年延长协议。

2021 年 9 月，两家公司再次修订并延长了用于西格列汀生产酶的供应协议。

用于治疗急性偏头痛的口服降钙素基因相关肽（calcitonin gene-related peptide, CGRP）受体拮抗剂 rimegepant 的制备过程涉及类似的立体选择性转氨反应，其化学合成也涉及过渡金属催化的两步高压还原氨化反应。2022 年，凯莱英生物合成技术研发中心使用底物游走、定向进化和迭代饱和突变等策略，得到了活性提高近 50 000 倍的转氨酶突变体 M20，其在优化的工艺条件下对底物的转化率达 99%<sup>[61]</sup>。

上述两个转氨酶的改造过程对转氨酶在手性胺合成中的应用具有重要价值，Brendan F. Gilmore 等<sup>[62]</sup>对转氨酶的机制、转氨酶的改造、工艺优化（包括去除丙酮酸以减少产物抑制）以及与其他酶的级联反应进行了综述，本文在此不再详细展开。

## 2.2 酰基转移酶利用硫酯合成酰基酯衍生物

洛伐他汀（lovastatin）是 20 世纪 70 年代从丝状真菌中分离得到的天然产物，其作为羟甲戊二酰辅酶 A（hydroxymethylglutaryl-CoA, HMG-CoA）还原酶抑制剂，在 1987 年被美国 FDA 批准成为首个上市的他汀降脂药物<sup>[63]</sup>。在其基础上改造的非天然产物辛伐他汀（simvastatin，商品名为 Zocor<sup>®</sup>）是 Merck 公司销售的一种降胆固醇药物，其疗效和安全性优于洛伐他汀<sup>[64]</sup>。常用的辛伐他汀化学合成路线为：将洛伐他汀水解得到莫那可林 J（monacolin J），之后经过内酯化、羟基的保护、二甲基丁基侧链酰化、脱保护多步反应得到辛伐他汀<sup>[65]</sup>。化学合成路线反应步骤多且能耗高，因此辛伐他汀的价格曾经几乎是洛伐他汀的 5 倍<sup>[66]</sup>。

酰基转移酶（acyltransferase, EC 2.3.1.X）催化酰基从供体分子转移到受体分子的羟基、氨基或巯基上，从而产生酰基酯衍生物。2006 年，唐奕课题组<sup>[67]</sup>发现洛伐他汀生物合成基因簇编码的 LovD 对酰基载体、酰基底物和十氢萘酰基受体有一定的杂泛性。以 DMB-S-NAC 和 DMB-S-MMP 等多种硫酯作为酰基供体，用全细胞催化对莫那可林 J 的 C-8 位羟基实现了区域选择性的酰基化<sup>[66]</sup>（图 2）。这意味着从洛伐他汀到辛伐他汀的合成过

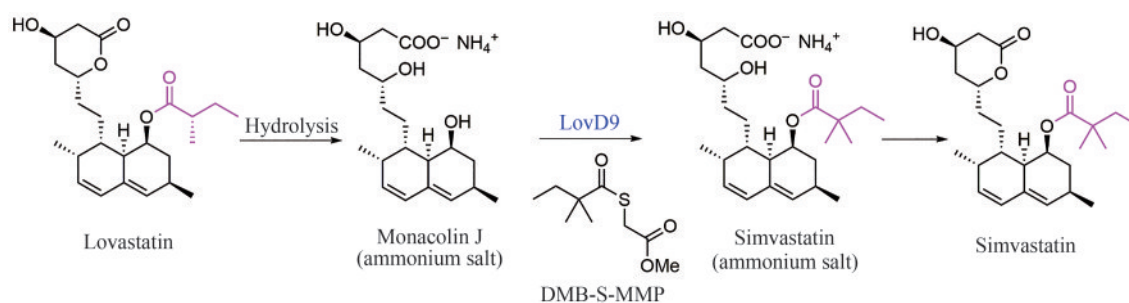


图2 LovD9利用非天然酰基供体DMB-S-MMP催化monacolin J的酰化合成辛伐他汀

Fig. 2 LovD9 catalyzing the acylation of monacolin J to produce simvastatin with the non-natural acyl donor DMB-S-MMP

程被极大简化。2009年, 该课题组通过有限的突变将LovD催化辛伐他汀合成这一非天然反应的 $k_{cat}$ 提高了5倍<sup>[68]</sup>。Codexis研究团队获得了工艺许可之后进一步对酶和工艺进行了优化, 基于ProSAR对LovD进行了9轮定向进化<sup>[69-71]</sup>, 建库216个, 筛选突变体61 779个, 最终获得了含有29个突变的LovD9。LovD9催化辛伐他汀合成的 $k_{cat}/K_m$ 是野生型LovD的330倍, 产生辛伐他汀的效率是LovD的1000倍。一些企业使用该酶和工艺实现了辛伐他汀的大规模生产。Codexis公司和唐奕教授因此获得EPA颁发的“总统绿色化学挑战: 2012年更绿色合成途径奖”<sup>[72]</sup>。LovD9对天然底物 $\alpha$ -甲基丁基-酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, ACP) 的活性完全丧失。LovD被改造为了一个能够接受小的游离酰基硫酯, 而不再需要ACP的酶。分析突变体晶体结构发现, 在进化过程中底物通道逐渐变窄使得LovF的ACP结构域无法进入活性位点。通过较长时间尺度(1~1.5  $\mu$ s)的分子动力学模拟发现, 突变显著改变了催化残基的构象动力学<sup>[71]</sup>。此外该研究团队还从理性设计的角度对LovD9定向进化的路径进行了阐释<sup>[73]</sup>, 为这类酶的改造提供了宝贵经验。

### 2.3 酮还原酶合成手性醇

酮还原酶 (ketoreductase, KRED) 可以催化链状酮、环酮、脂肪酮和芳香酮等的不对称还原, 引入1~2个手性中心<sup>[74]</sup>, 因此在医药工业的手性醇合成中应用广泛。

辉瑞的Lipitor<sup>®</sup>是世界上第一个年销售额超过100亿美元的药品, 其活性成分为阿托伐他汀 (atorvastatin)<sup>[75]</sup>。据估计, 阿托伐他汀的中间体羟

基腈 (hydroxynitrile, HN) 的年需求量接近20万千克。传统的商业化HN工艺需要动力学拆分 (最大收率50%) 并且涉及溴化学或不对称氢化的手性池前体合成<sup>[76]</sup>。由于副产物多, 需要高真空蒸馏来纯化最终产品, 导致产量更低。使用腈酶、脂肪酶等的化学酶法合成并未商业化, 这类工艺需要用的酶量较多使得产物难以分离, 也增加了成本<sup>[75]</sup>。因此, Codexis开发了二步三酶法制备HN<sup>[76]</sup> (图3), 第一步使用KRED (EC 1.1.1.184) 将羰基立体选择性地还原为羟基, 并组合NADP依赖的葡萄糖脱氢酶 (glucose dehydrogenase, GDH, EC 1.1.1.47) 用于辅因子再生; 第二步使用卤代醇脱卤酶 (halohydrin dehalogenase, HHDH, EC 3.8.1.5) 将氯取代为氰基<sup>[77-78]</sup>。由于这三个酶均不能满足大规模制备HN的需求, 因此研究团队使用DNA shuffling构建突变库, 在接近生产工艺的条件下进行高通量筛选, 催化性质提高的突变体被用于下一轮进化, 最终提高了所用KRED和GDH的活性和稳定性, 同时保持了天然KRED近乎完美的对映选择性, 提高了HHDH的活性并在很大程度上解除了底物抑制。新的生产工艺满足绿色化学的12项原则。不包含工艺用水时, 整个工艺的E因子 (每千克产物对应废弃物的质量) 为5.8, 如果包含工艺用水, E因子为18。在生物催化剂的基础上, 这三种酶将还原反应的体积生产率 (volumetric productivity, VP)<sup>[79]</sup>提高了约100倍, 将氰化反应的VP提高了约4000倍。这极大地改善了Lipitor<sup>®</sup>的关键中间体的生产, Codexis公司因此获得EPA颁发的“总统绿色化学挑战: 2006年更绿色反应条件奖”<sup>[80]</sup>。

工程化KRED在医药工业中的应用实例还有很多, 关于KRED的挖掘、通过改造提升其催化

活性和热稳定性<sup>[81]</sup>、各种辅因子再生方法的优劣以及还原时遵从Prelog规则或反Prelog规则的改造已有文献综述<sup>[82]</sup>，在此不做赘述。

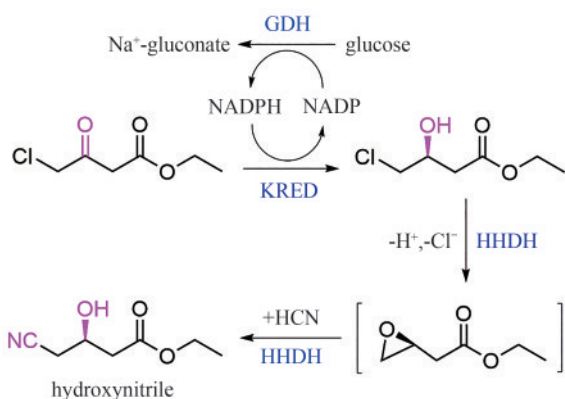


图3 二步三酶法制备阿托伐他汀的中间体羟基腈

Fig. 3 Process for producing hydroxynitrile through the catalysis of three enzymes (GDH, KRED, and HHDH)

## 2.4 酰胺酶水解酰胺生成羧酸

酰胺酶 (amidase, EC 3.5.1.X) 对酰胺化合物 (包括脂肪酰胺、杂环酰胺和芳香酰胺等) 的 C—N 键具有水解和酰基转移的活性<sup>[83]</sup>，是合成手性羧酸、 $\alpha$ -氨基酸和酰胺的多功能生物催化剂。酰胺酶因其高活性和优异的对映体选择性而被广泛开发和研究，在制药和农药工业具有广泛应用。研究发现，不同物种来源酰胺酶的底物谱差异较大，根据底物偏好性，可以将酰胺酶分为几个亚家族：青霉素酰胺酶 (3.5.1.11)、烟酰胺酶 (3.5.1.19)、甲酰胺酶 (3.5.1.49) 等<sup>[84]</sup>。

2-氯烟酸是一种重要的医药和农药中间体，应用范围广，市场需求大。在医药行业，2-氯烟酸作为中间体可用于生产人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 逆转录酶抑制剂奈韦拉平 (nevirapine)、非甾体抗炎药尼氟灭酸 (niflumic acid) 和抗抑郁药物米氮平 (mirtazapine)；在农药行业，2-氯烟酸可作为生产除草剂烟嘧磺隆 (nicosulfuron) 和吡氟草胺 (diflufenican) 的中间体<sup>[85]</sup>。

其中一种具有吸引力的2-氯烟酸生产方式是用酰胺酶催化2-氯烟酰胺 (图4)，但是过去已有的酰胺酶对该反应的催化活性均较低。郑裕国院士团队致力于筛选和改造催化该反应的酰胺酶。

2018年，团队从 *Pantoea* sp. 中筛选出新的酰胺酶 Pa-Ami，对烟酰胺及其氯代衍生物具有较好的活性，其催化2-氯烟酰胺产生2-氯烟酸的酶活为16.4 U/mg<sup>[85]</sup>，比之前从 *Delftia tsuruhatensis* ZJB-05174<sup>[86]</sup>、*Brevibacterium epidermidis* ZJB-07021<sup>[87]</sup> 和 *Rhodococcus erythropolis*<sup>[88]</sup> 中鉴定的酰胺酶的活性更好，且对底物的耐受程度更高。通过适当降低反应温度使产物析出解除产物抑制，Pa-Ami 对底物的转化率可达94.2%，产生370 mmol/L的2-氯烟酸，但其活性仍然偏低。

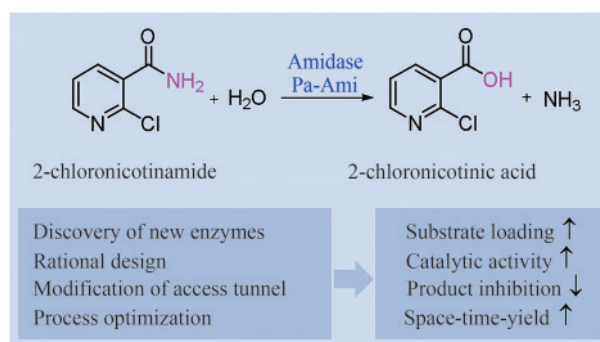


图4 酰胺酶 Pa-Ami 催化2-氯烟酰胺生成2-氯烟酸

Fig. 4 Transformation of 2-chloronicotinamide to 2-chloronicotinic acid catalyzed by the amidase Pa-Ami

Pa-Ami 具有保守的催化三联体 Ser177-Ser153-Lys80，通过分子对接分析发现，吡啶环上2位氯取代基改变了亲核进攻残基 Ser177 与底物之间的距离，也影响了 Ser153 对底物的质子化，而氯的电子效应又增加了反应的活化能。这种由于邻位氯取代引起的强空间位阻和电子效应导致 Pa-Ami 催化2-氯烟酰胺的  $k_{cat}/K_m$  只有催化烟酰胺  $k_{cat}/K_m$  的0.79%<sup>[85]</sup>。为了解决这一问题，该团队基于结构分析，选定底物周围的三个非严格保守氨基酸 Thr172、Thr174 和 Gly175，以及涉及底物进入通道的 Ala305、Ser309、Leu398 和 Asn400 进行突变<sup>[89]</sup>。实验结果表明，单突变体 Pa-Ami<sup>G175A</sup> 和双突变体 Pa-Ami<sup>G175A/A305T</sup> 催化2-氯烟酰胺的  $k_{cat}/K_m$  相比野生型分别提高了3.1倍和10倍。以 Pa-Ami<sup>G175A+A305T</sup> 作为催化剂，可产生1220 mmol/L的2-氯烟酸，时空收率 (space-time yield) 达到575 g/(L·d)。分子对接和通道分析发现，突变 G175A 拉近了 Ser177 与底物之间的距离，亲核进攻的方向更合适，而 A305T 突变重塑了通道使得底物的进入和产物的

释放更加容易。

酶的门控指的是一个动态系统，其可以在酶的开放和封闭构象之间可逆切换，从而控制底物、产物、离子和溶剂分子进出蛋白质<sup>[90]</sup>，因此对门控残基的改造也是一种有效的理性设计策略。2023年，研究团队基于经典分子动力学模拟和通道分析选定候选改造残基，继续对底物进入和产物释放通道进行重点改造，实验筛选获得的四突变体 Pa-Ami<sup>G175A+A378V+V402L+L403V</sup>对2-氯烟酰胺的催化活性为127.4 U/mg，在2 h内积累了1330 mmol/L产物，时空收率达到2515 g/(L·d)<sup>[91]</sup>。通道分析发现，V402L和L403V将扭曲的通道变得更加平滑。拉伸分子动力学模拟(steered molecular dynamics, SMD)和量子力学计算结果显示，相比野生型，在四突变体中底物进入和产物释放的活化能均明显降低，因此具有更高的催化效率。

这项持续了约十年的系统性工作为2-氯烟酸的工业化生产奠定了基础，也为其他酰胺酶的理性设计和工程化改造提供了很好的示范。

## 2.5 其他

口服抗病毒药物波塞普韦(boceprevir)被批准上市用于慢性丙型肝炎的治疗。其中间体双环[3.1.0]脯氨酸(P2部分)的合成涉及去对称化，传统的拆分方法收率很低。Codexis和Schering-Plough(现属于Merck)研究团队对黑曲霉来源的单胺氧化酶(monoamine oxidase, EC 1.4.3.4) MAON进行了四轮进化，获得的突变体MAON401活性提高了8倍，稳定性也明显增加。相比于拆分方法，酶法合成工艺的产品收率提高了150%，原材料使用量减少了59.8%，用水量减少了60.7%，总工艺浪费减少了63.1%，该工艺已成功用于波塞普韦的商业生产<sup>[92]</sup>。

亚胺还原酶(imine reductase, IRED)是一类NAD(P)H依赖的氧化还原酶，可催化前手性亚胺的不对称还原合成手性胺<sup>[93]</sup>。IRED具有催化效率高、区域及立体选择性强等优异的特性。孙周通团队<sup>[94]</sup>和瞿旭东团队<sup>[95]</sup>已对亚胺还原酶的机制、多酶级联反应、化学酶法合成及其工业应用作了详尽综述。

魏东芝团队<sup>[96]</sup>对甾体化合物的绿色生物制造进行了详尽的综述，其中包括甾体羟化酶和甾体脱氢酶的挖掘及改造等。

随着越来越多的生物催化剂被整合进化学转化过程，多酶级联反应<sup>[97]</sup>得到了较多的关注和研究。基于逆合成分析和多酶工具箱，以及体外辅酶循环和ATP再生系统，构建协同高效的多酶催化体系可以避免中间产物的纯化，实现复杂的药物的合成。比如，Merck基于多酶级联优化了抗病毒药物LAGEVRIO™(molnupiravir)的生产工艺，开发的第二代合成路线直接使用尿嘧啶和核糖作为构建块，提高了合成效率，减少了废物的产生并将总产量提高了1.6倍<sup>[98-100]</sup>。

综上，在E因子和原子经济性概念以及绿色化学12项原则的指导下，生物催化的价值已被制药公司广泛认可，工程化酶在化学原料药及高附加值产品合成中取得的各项成果振奋人心<sup>[101]</sup>。在酶改造的同时关注工艺优化，可以获得与生产工艺相匹配的优良生物催化剂，增加化学原料及其中间体的产量，减少废弃物，减少有机溶剂使用，降低了药物生产成本，既减轻了患者的用药负担，又提高了制药企业的经济效益(表1)。除了前文提到的CodeEvolver®平台之外，近年来国内企业建立的BioEngine®和ZymeEditor™等蛋白质改造平台在行业内占有举足轻重的地位。这些平台将高通量筛选、理性设计与人工智能有机结合，实现了高效和系统的蛋白质工程，为小分子药物绿色生物制造的快速发展提供了保障。

## 3 蛋白质工程在生物药产业中的应用

近年来，生物药(biopharmaceuticals)如重组蛋白和多肽<sup>[102-104]</sup>、抗体<sup>[105-106]</sup>、生物偶联物、疫苗、治疗性酶和核酸药物<sup>[107]</sup>等，因较高的临床及商业价值得到蓬勃发展，这标志着一直以来由小分子主导的药物研发进入了一个新时代。

出于改善药物分子药代动力学或其他因素的考虑，生物药的制备过程可能涉及非天然氨基酸的引入、特定位点的侧链修饰或生物偶联，通过酶工程提高多肽和蛋白修饰酶催化的区域和立体

表1 蛋白质工程在化学原料药合成中的应用

Table 1 Applications of protein engineering in the synthesis of active pharmaceutical ingredients

酶	来源	蛋白质工程策略	应用	效益
转氨酶 ATA-117	<i>Arthrobacter</i> sp.	底物游走、随机突变、ProSAR、理性设计	西格列汀酮→西格列汀 <sup>[54]</sup>	收率↑,产量↑ 生产成本↓,废料↓
转氨酶 S6	<i>Chromobacterium violaceum</i>	底物游走、迭代饱和和突变、随机突变	CGRP受体拮抗剂 rimegepant 中间体的合成 <sup>[61]</sup>	活性↑,转化率↑
酰基转移酶 LovD	<i>Aspergillus terreus</i>	ProSAR、半理性设计	莫那可林 J→辛伐他汀 <sup>[68, 73]</sup>	活性↑,稳定性↑ 反应步骤↓,有毒试剂↓, 酰基供体用量↓
酮还原酶	<i>Candida magnoliae</i>	DNA shuffling	阿托伐他汀中间体	活性↑,稳定性↑, E因子↑,
葡萄糖脱氢酶	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus megaterium</i>		羟基酮的合成 <sup>[76]</sup>	体积生产率↑
卤代醇脱卤酶	<i>Agrobacterium</i> sp.			
酰胺酶 Pa-Ami	<i>Pantoea</i> sp.	理性设计、通道改造	2-氯烟酰胺→2-氯烟酸 <sup>[85, 89, 91]</sup>	底物载量↑,转化率↑, 时空收率↑
单胺氧化酶 MAON	<i>Aspergillus niger</i>	随机突变、半理性设计	抗病毒药波塞普韦中间体的合成 <sup>[92]</sup>	活性↑,稳定性↑,收率↑ 原材料↓,用水量↓

选择性,可以加速候选药物分子的制备。在生化检测领域,蛋白质工程可以提高诊断酶/抗体的反应特异性和检测准确性,增加其稳定性,加快诊断速度。对于治疗性酶和治疗性抗体,除了要考虑候选药物的催化或结合以及激动或阻断活性外,还需要考虑免疫原性、给药方式和药代动力学性质等因素,以提高药物的可开发性、安全性和有效性。在药物开发阶段,为了减少生物药的免疫原性,需要对重组多肽、重组蛋白和抗体等进行人源化改造,并基于计算和实验遮蔽或消除T细胞和B细胞表位<sup>[108]</sup>,尽可能增加人源化程度<sup>[109]</sup>,避免产生抗药抗体(anti-drug antibody, ADA)。目前生物药大多采用注射的给药方式,开发多肽和蛋白药物的口服制剂可以极大提高患者的依从性。然而,多肽和蛋白药物一般无法耐受极端pH且极易被胃肠道蛋白酶(胃蛋白酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶)消化降解,生物利用度极低。因此,口服多肽和蛋白药物的开发一直是业内的关注重点:开发口服给药的生物制剂不仅要选择适合胃肠道的递送方式(肠溶胶囊、纳米粒等),还需要对分子进行稳定性改造,消除蛋白酶切割位点,提高生物分子对极端pH和蛋白酶的耐受能力<sup>[110-111]</sup>。

因此,本节从修饰酶、诊断酶、治疗性酶和治疗性抗体四个方面阐述蛋白质工程在生物医药产业中的应用。

### 3.1 修饰酶

出于改善药物分子药代动力学或其他原因的考虑,蛋白和多肽等生物大分子通常需要进行修饰或生物偶联<sup>[112]</sup>,且这种修饰是位点特异性修饰,即在维持蛋白和多肽结构的基础上,温和且高度选择性地修饰多个重复官能团中的一个,这是有机化学中的一项重要挑战。采用化学修饰法需要依赖这些重复氨基酸残基的 $pK_a$ 、亲核性和氧化还原电位的细微差异,且选择性差,导致分离纯化较为困难。而采用基因工程法插入非天然氨基酸或者将识别基序预嵌入蛋白中,可能会导致生物分子结构改变,进而影响蛋白功能。因此,需要发展一种稳健的位点特异性的蛋白修饰策略,能够进行大规模的批量反应,以满足候选药物的制备需求。

Merck和Codexis于2022年报道了一项开创性的工作,通过定向进化获得了一系列青霉素G酰化酶(penicillin G acylase, PGA)突变体,实现了胰岛素特定位置的修饰,可以方便地获得各种胰岛素类似物候选药物<sup>[113]</sup>(图5)。大肠杆菌来源的PGA催化肽链上N-苯乙酰水解的活性较低,不能满足特定位点保护和解除保护的需求。团队通过筛选发现来源于*Kluyvera cryocrescens*的KcPGA对A1, B1, B29-苯乙酰基胰岛素的A1、B1、B29位苯乙酰基均有水解能力,当反应时间足够长时,3个

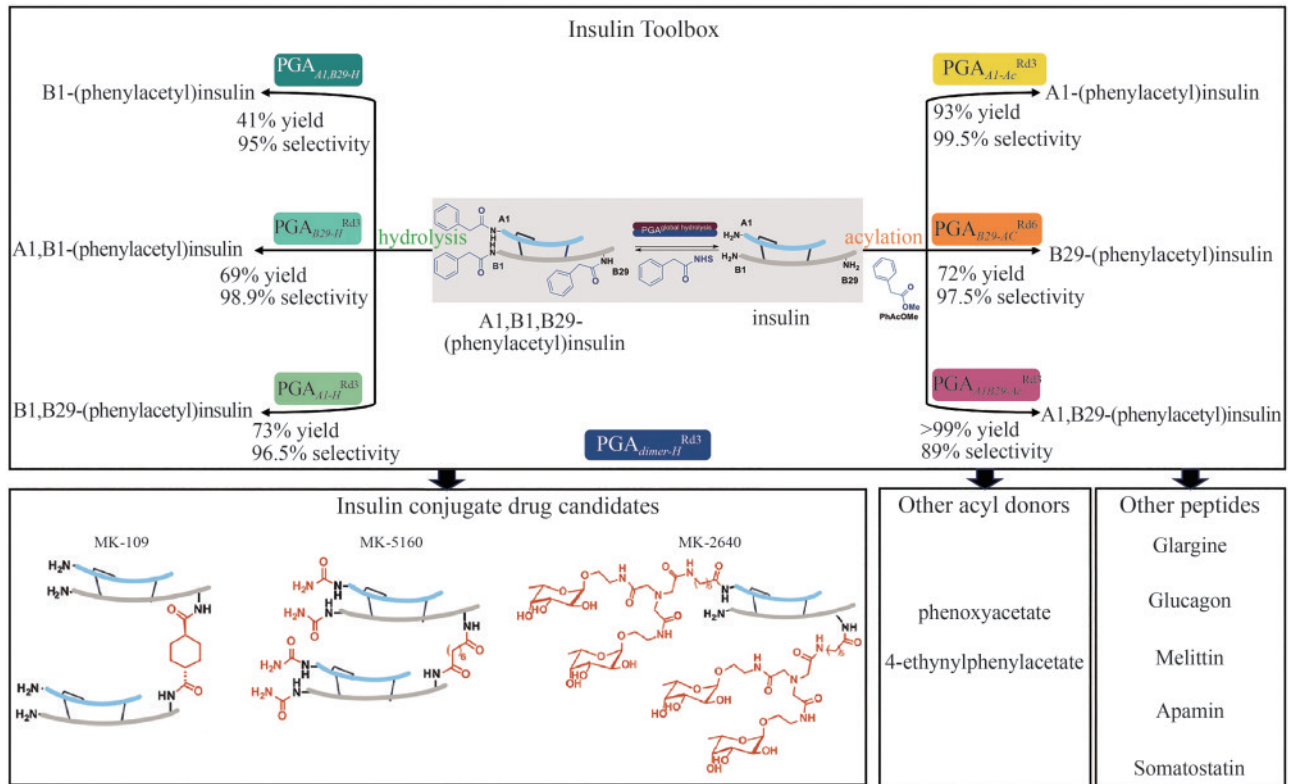


图5 青霉素G酰化酶的定向进化实现胰岛素特定位置的生物偶联

Fig. 5 Directed evolution of penicillin G acylase enables the site-selective bioconjugation of insulin

苯乙酰基均会被水解。此外, *KcPGA* 对3个位置表现出水解速率差异,  $B29 > A1 > B1$ , 这说明通过酶改造实现胰岛素的位置特异性修饰具有可行性。之后通过定向进化获得的一套工具酶实现了胰岛素特定位置的选择性保护和脱保护, 得到了A1、B1和B29三个位置分别具有苯乙酰基保护或未保护的共8种中间体。这个苯乙酰基胰岛素工具箱可以作为基础模块合成由胰岛素衍生的候选药物分子, 缩短了合成路线, 提高了产物的产量和纯度, 加速了药物研发进程。此外, 作者还证明了工程化的PGA可以耐受其他的酰基供体, 也可以拓展至胰高血糖素等其他多肽的生物选择性偶联。

此外还有许多修饰酶在生物医药产业中具有广泛应用。比如, 赖氨酰内切酶 (lysyl endopeptidase, Lys-C, EC 3.4.21.50) 能够特异性酶切赖氨酰肽键, 可用于重组胰岛素类似物及GLP-1受体激动剂的制备和生产<sup>[114]</sup>; 蛋白质、多肽和抗体药物的测序、质谱分析和质量检测等<sup>[115]</sup>。基于酶发现和工程化获得高活性和区域选择性的工具酶对生物医药产业具有重要的意义和价值。

### 3.2 诊断酶

诊断酶也是生物医药产业中一个强劲的发展领域<sup>[116]</sup>, 诊断酶的开发能够极大地增加检测的便利性, 加快检测速度。

糖化血红蛋白 (glycated hemoglobin, GHb) 是指红细胞中的血红蛋白与血清中的糖类相结合的产物。根据结合位置及糖的不同分为多种类型, 其中糖化血红蛋白A1c (hemoglobin A1c, HbA1c) 是由葡萄糖与血红蛋白的 $\beta$ 链氨基末端缬氨酸残基缩合而成, 其含量最多且浓度相对稳定, 因此临床上常以HbA1c代表总的糖化血红蛋白的水平<sup>[117]</sup>。HbA1c可以稳定地反映过去2~3个月的平均血糖水平, 其与糖尿病的慢性并发症相关, 也是糖尿病控制的目标之一。

HbA1c的检测方法有很多, 酶法测定HbA1c不需要色谱或质谱设备, 其基本原理为: 将HbA1c裂解为果糖酰缬氨酰组氨酸 (fructosyl valyl histidine, Fru-ValHis), Fru-ValHis经果糖基肽氧化酶 (fructosyl peptide oxidase, FPOX, EC

1.5.3) 催化氧化生成非糖化氨基酸、葡糖酮醛和 $H_2O_2$ ，再利用过氧化物酶进行显色<sup>[117]</sup>。然而除Fru-ValHis以外，FPOX还能催化果糖酰赖氨酸(fructosyl lysine, Fru-Lys)产生 $H_2O_2$ ，对结果产生干扰，导致诊断不够准确。Hamid Shahbazmohammadi等<sup>[118]</sup>结合分子动力学模拟和突变实验对FPOX进行改造，获得的Y261W突变体对Fru-ValHis的催化活性提高了5.1倍，对Fru-Lys的催化活性降低了13.7倍，提高了FPOX对底物Fru-ValHis的特异性，从而减少了干扰。目前该酶已经商业化用于酶法糖化血红蛋白试剂的研发和大量配制。

### 3.3 治疗性酶

酶在人体的生命活动过程中扮演着十分重要的角色，某种酶的缺乏或其活性的降低会导致身体出现不适症状甚至疾病，治疗性酶(therapeutic enzymes)是指用来治疗这些不适症状或疾病的生物催化剂<sup>[119]</sup>。治疗酶在代谢、消化、抗菌、抗癌、抗凝、抗炎、前药激活等方面具有广泛的应用<sup>[120-121]</sup>。

通常来讲，一种酶需要满足以下条件才能够达到有效的治疗效果：①在生理条件下具有较高的活性；②尽可能小的免疫原性；③呈现合适的药代动力学和生物利用度；④能够被递送到治疗位置；⑤对本身的细胞功能没有干扰或很少干扰<sup>[122]</sup>。然而，自然界中的酶很少能满足上述所有标准，因此治疗酶的改造在生物制药工业中具有十分重要的地位<sup>[123]</sup>。通过酶工程技术(定向进化、理性设计、聚乙二醇化和糖工程等)增加酶的特异性、提高其催化活性、增加对胃肠道蛋白酶的耐受、延长半衰期、减少免疫原性，达到提高临床用药的长期安全性和有效性的目的，这将为治疗酶的蓬勃发展带来更多机会。目前已经有一些工程化的治疗酶被批准上市，还有一些治疗酶的改造研究正在开展。

#### 3.3.1 纤维蛋白溶解酶

血块形成或血管内血栓是全球心血管疾病和中风相关死亡的首要原因<sup>[124]</sup>。目前基于酶的纤维蛋白溶解药物(fibrinolytic enzymes)<sup>[125]</sup>主要包括链激酶(streptokinase, SK)、组织纤溶酶原激活

剂(tissue plasminogen activator, tPA)、尿激酶(urokinase, UK)和纳豆激酶(nattokinase)。其中，tPA是一种丝氨酸蛋白酶，通过裂解Arg-561和Val-562之间的肽键将纤溶酶原转化为活性的纤溶酶并分解血凝块从而发挥溶栓作用<sup>[126]</sup>。因此，tPA被Genentech开发为Alteplase(Activase<sup>®</sup>)用于治疗急性缺血性中风。1987年，Activase<sup>®</sup>作为第一个重组治疗酶被FDA批准上市，但其血浆清除快，半衰期短，需要长时间静脉输液。为了解决这一问题，Genentech通过酶改造在Lys-His-Arg-Arg(296~299)之后引入4个Ala<sup>[127]</sup>，并引入了突变T103N和N117Q<sup>[128]</sup>，获得了Activase<sup>®</sup>的变体Tenecteplase(TNKase<sup>®</sup>)。这些改造降低了内源抑制剂介导的酶失活，增加了酶的特异性和半衰期，提高了临床有效性，TNKase<sup>®</sup>于2000年被FDA批准上市。

#### 3.3.2 尿酸氧化酶

尿酸氧化酶(urate oxidase/uricase, EC 1.7.3.3)能够将尿酸转化为可溶和容易排泄的尿囊素<sup>[129]</sup>，降低血清和尿液中的尿酸水平。然而，在人类进化过程中，尿酸氧化酶发生遗传突变并失活，不能将尿酸氧化为尿囊素。体内过量的尿酸积累会导致高尿酸血症和痛风，临床上常使用非布司他、别嘌醇、苯溴马隆和重组尿酸氧化酶等药物进行治疗。

第一代尿酸氧化酶药物为uricozyme，是直接从小曲霉中提取纯化得到；第二代尿酸氧化酶药物为Sanofi的重组尿酸氧化酶(黄曲霉来源)拉布立海(rasburicase)<sup>[130]</sup>；第三代尿酸氧化酶药物为Crelta的聚乙二醇(PEG)化重组尿酸氧化酶培戈洛酶(pegloticase)，是来自猪和狒狒尿酸氧化酶的嵌合序列<sup>[131]</sup>。这三代药物为微生物来源序列或经过PEG修饰，虽然疗效较好，但多次注射给药后患者体内会产生抗尿酸氧化酶抗体或抗PEG抗体，降低了疗效并导致患者出现过敏反应。因此获得更接近人源尿酸氧化酶基因的高活性和高稳定性序列是很有必要的。有报道以人源尿酸酶基因和野猪的尿酸酶基因为模板，使用DNA shuffling获得了嵌合尿酸酶<sup>[132]</sup>，提高了酶活性，并增加了与人源尿酸酶基因的同源性。为了解决这类药物免疫原性高的问题，还需要在酶的人源

化方面做出更多努力。为了提高患者的依从性,也有一些口服尿酸氧化酶<sup>[133]</sup>进入临床阶段,通过促进肠道中尿酸盐的分解和分泌,用于治疗痛风和晚期慢性肾病患者的高尿酸血症。

### 3.4 治疗性抗体

截至2021年,FDA批准上市的抗体药物已达100种<sup>[105]</sup>,这些药物在肿瘤免疫疗法和自身免疫疾病等领域表现出突出的疗效。常见的抗体药物包括经典免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)抗体、抗体片段、双/多特异性抗体、纳米抗体(nanobody, Nb)和抗体偶联药物(antibody drug conjugate, ADC)。抗体工程指的是通过对抗体分子结构和功能关系的研究,有计划地对抗体的基因序列进行改造,改善抗体某些功能的技术,一般包括:抗体亲和力成熟(增加抗体的互补决定区与抗原表位的相互作用)、抗体可结晶片段(fragment crystallizable, Fc)工程化改造以改变抗体的效应功能或延长半衰期<sup>[134]</sup>、设计重链-重链和重链-轻链配对防止错配、抗体人源化改造降低免疫原性等<sup>[135]</sup>。对于诊断抗体的抗体工程<sup>[136]</sup>,一般只需要关注与抗原的结合活性以及溶解度和稳定性等理化性质。抗体工程常用的方法包括定向进化和理性设计,以抗体亲和力成熟为例,定向进化主要是将抗体的互补决定区进行随机突变,随后表达突变体库,筛选高亲和力的突变体并重复数轮进化筛选;而理性设计主要是基于结构分析,有针对性地设计抗原抗体之间的相互作用,最终获得亲和力明显提升的抗体。

纳米抗体又称单域抗体(single-domain antibody),是在骆驼科动物体内发现的仅重链抗体的重链可变区(VHH)<sup>[137]</sup>,因其具有较高的物理化学稳定性,容易在微生物宿主中进行表达,可被开发成口服制剂和诊断试剂等特点,近年来受到较多关注。仔猪口服高剂量的K609(一种抗大肠杆菌F4菌毛的重组VHH),可减少大肠杆菌引起的仔猪腹泻,而低剂量无效<sup>[138]</sup>。原因是很大一部分K609在胃中被蛋白水解酶降解。Harmsen等<sup>[138]</sup>使用抗原免疫大羊驼(llama)并构建噬菌体文库,通过对文库中克隆的蛋白酶稳定性进行

半定量,挑选出比K609的稳定性提高了7~138倍的7个克隆。之后通过DNA shuffling获得了稳定性进一步提高1.5~3倍的4个克隆。其中最稳定的突变体K922在胃液和空肠液中37℃孵育1h后仍保持41%和90%的活性,有望作为预防仔猪腹泻的候选药物。该研究对其他口服重组抗体片段的改造具有指导意义。

各种生物技术和自动化平台的发展使抗体工程的湿实验效率得到了提升。与此同时,抗体数据库也在不断完善和发展,计算机辅助设计和机器学习已初步应用于抗体结构预测<sup>[139]</sup>、提高抗体亲和力<sup>[140]</sup>、抗体表位预测和结合特定表位抗体的设计<sup>[141-142]</sup>、抗体的人源化<sup>[143]</sup>、可开发性评估和成药性评价<sup>[144-145]</sup>。目前,针对单个模块的抗体工程已经相对成熟,有较好的干湿实验结合基础,但多特异性抗体的改造和设计<sup>[146]</sup>以及多价纳米抗体的组装仍需要开展大量的实验评估。最近,Peter S. Kim团队<sup>[147-148]</sup>使用蕴含结构信息的蛋白语言模型进行抗体设计,实现了抗体病毒中和活性、亲和力以及热力学稳定性的提高。David Baker团队基于重新训练的扩散模型RFDiffusion和逆向折叠模型ProteinMPNN<sup>[149]</sup>首次实现了纳米抗体的从头设计<sup>[150]</sup>,这些基于深度学习的突破将在未来极大简化抗体药物的早期分子发现流程,有望节省抗原免疫动物以及抗体工程化改造的时间和费用。

综上,蛋白质工程不仅能够提升用于结构修饰的工具酶的催化特性,提高诊断酶/抗体的特异性以及生物化学检测的准确性,还可以在一定程度上解决治疗酶和治疗抗体等蛋白药物<sup>[151]</sup>的多目标优化问题,在生物药产业中发挥着十分重要的作用(表2)。蛋白质工程加快了生物制药的创新,为业界开发出更多生物大分子药物提供了技术保障。

## 4 挑战和展望

随着核酸合成、测序技术和生物信息学的发展,转录组和基因组的获得以及基因的功能验证变得十分方便,这极大提升了从自然界挖掘新功能蛋白的效率。为了满足工业化生产的需求或实

表2 蛋白质工程在生物制药产业中的应用

Table 2 Applications of protein engineering in the biopharmaceutical industry

酶/抗体	来源	蛋白质工程策略	应用	效益
青霉素G酰化酶	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	定向进化	胰岛素特定位置的保护和脱保护 <sup>[113]</sup>	位置选择性↑,催化活性↑
果糖胺氧化酶	<i>Eupenicillium terrenum</i>	理性设计、定点突变	糖尿病诊断 <sup>[118]</sup>	催化活性↑,催化特异性↑
纤维蛋白溶解酶	<i>Homo sapiens</i>	丙氨酸扫描 <sup>[152]</sup> 、定点突变、理性设计	治疗急性心肌梗死的抗凝剂 <sup>[127-128]</sup>	纤维蛋白特异性↑,耐受内源蛋白酶降解能力↑,半衰期↑
尿酸氧化酶	mammals	DNA shuffling	治疗高尿酸血症和痛风 <sup>[132]</sup>	活性↑,免疫原性↓,半衰期↑
尿酸氧化酶	<i>Candida utilis</i>	理性设计	治疗高尿酸血症和痛风的候选口服药物 <sup>[133]</sup>	胰酶和肠液稳定性↑,半衰期↑
纳米抗体K922	大羊驼免疫噬菌体文库筛选	DNA shuffling	减少大肠杆菌引起的仔猪腹泻 <sup>[138]</sup>	胃液和肠液稳定性↑

现疾病治疗的目的,野生型蛋白质往往需要工程化改造。因此,本文简要回顾了蛋白质工程的发展历程和技术革新,特别聚焦于化学原料药合成和生物制药两大板块,从产业化的视角出发,展示了蛋白质工程在医药产业中的应用,阐述了蛋白质工程如何赋能医药原料及中间体的绿色制造,以及怎样助力生物制药的加速创新。

生物催化剂赋能的化学原料药及其中间体的合成工艺更符合绿色化学原则,具有环境友好和生产成本节约性,经济效益显著。在酶工程化改造中,通常需要实现多维度的提升,包括非天然底物的适配性、区域和立体选择性、催化活性和稳定性(耐热和有机溶剂)等。这通常需要在多轮改造中舍弃不利突变、保留优良突变,不断迭代最终获得优良的生物催化剂。值得注意的是,生物催化剂的进化和工艺发展是相辅相成的,在筛选、优化生物催化剂时,必须考虑其与生产工艺的适配性。将生物催化技术整合到已上市化学小分子药物的生产工艺中也面临诸多挑战,比如成本效益(由于化学原料药价格通常较低,改进后的工艺需要有绝对的成本优势才能在产业中得到应用)和药物市场变化(因为酶改造的时间跨度有时较长、难度大,得到理想的催化剂时,有些药物可能已经不是一线药物,市场规模变小,前期的投入难以得到回报)。这就需要不断地革新技术以缩短发现-设计-测试的循环周期,并在药物发现早期就考虑更符合绿色化学理念的合成工艺。

蛋白质工程同样也加速了生物大分子药物研发的创新,为生物制药领域开发出更多生物制品

提供了技术保障。对于修饰酶和诊断酶的改造,本质仍然是生物催化过程,方法相对成熟。但对于治疗性酶和治疗性抗体等生物大分子药物,候选分子必须满足多个标准,包括针对生物靶点的活性、合适的生物物理和药代动力学性质以及安全性。蛋白质工程作为大分子药物早期研发中的关键一环,可以在一定程度上提高药物的安全性和有效性。虽然各种生物技术和自动化平台的发展使大分子药物研发中的各种湿实验效率得到了提升,但要解决这样的高度复杂的多目标优化问题,仍然需要开展大量的实验评估候选分子的功能活性、可开发性、免疫原性、药代动力学和药效学,不仅费时费力,药物研发费用也居高不下。因此在临床前研究中也需更多的技术迭代来缩短药物研发周期,提高药物研发效率。

科技创新推动了产业创新,而产业中的需求又反过来加速了科技创新,两者的深度融合形成新质生产力。不管是生物催化剂还是大分子药物的研发,通过技术革新缩短研发循环周期都是行业进步必不可少的。人工智能和实验室自动化可以在生物催化剂和药物研发的设计-制造-测试-分析周期中增强人类的决策、制备工艺和生物活性测试的能力。

最近,以预测(结构、功能、性质),优化(性质)和生成(功能蛋白)为目标的深度学习在医药行业的发展和应用日新月异。结构预测工具如 RoseTTAFold All-Atom (RFAA)、RFdiffusion All-Atom (RFdiffusionAA)<sup>[153]</sup> 以及 AlphaFold3<sup>[154]</sup> 将结构预测能力又提升了一个新台阶,在复杂生

物分子系统的建模和设计中得到广泛应用,为蛋白质-小分子、蛋白质-核酸以及抗体-抗原的相互作用分析提供了技术支撑。由于目前数据库中被注册为酶的大部分蛋白序列都缺少其催化反应的高质量注释,因此通过功能和性质预测掌握酶-底物关系的综合映射可以加速起始酶的发现,基于酶-小分子对 (enzyme-small molecule pairs) 负样例训练的 ESP<sup>[155]</sup> (<https://esp.cs.hhu.de/>) 对酶-底物对的预测准确率超过91%。基于深度学习的  $k_{cat}$  预测工具 TurNuP<sup>[156]</sup> 对于和训练集中的酶一致性小于40%的酶也有比较好的预测准确度。此外,基于深度学习的功能预测工具 PhiGnet<sup>[157]</sup> 不仅可以准确预测蛋白质的功能,还可以精确定位对特定功能重要的残基,指导蛋白质的定向进化和辅助设计。对于蛋白的性质优化,自 MLDE 提出以来,定向进化的速度被大大加快,MLDE 的工作流程也在不断改进,通过对每个步骤做出不同的设计,尤其是减少训练数据中的低适应度蛋白可以明显提高 MLDE 的效率,优化后的算法获得全局适应度最大值的概率是传统定向进化的81倍<sup>[158]</sup>。有研究表明,在某种程度上,突变效应机制、适应度景观的拓扑结构及上位效应模式在不同蛋白之间具有普遍性,这说明使用多种蛋白的突变数据集训练一个有效的模型来加快定向进化是可行的<sup>[159]</sup>。此外,赵惠民等<sup>[160]</sup> 提出了结合 ML 和自动化的连续 MLDE 流程框架,创造了一个闭环的蛋白质进化平台,极大地提升了研究人员改造蛋白的能力。实验室自动化可以提供高质量的数据采集以及快速可重复的实验迭代周期,进一步释放机器学习的全部潜力。Philip A. Romero 等<sup>[161]</sup> 提出了一种用于蛋白质景观探索的自动机器人平台 SAMPLE,该平台可代理学习蛋白质序列-功能关系,设计新蛋白质并将设计发送给全自动机器人系统,之后通过湿实验测试设计的蛋白质并提供反馈以提高代理对系统的理解。该平台预计可在2个月内完成20轮包含设计-测试-学习循环的优化,成本预计5200美元。这种人机协作将把人类的直觉和创造力与智能自主系统执行实验、解释数据和有效搜索大型假设空间的能力结合起来,从而提高分子设计和发现的效率与精度。对于功能蛋白设计的机器学习<sup>[162]</sup>,除了前文提及的重新

设计以增强蛋白现有功能和重新设计使蛋白具有新的功能外,从头生成蛋白质在医药产业中的应用崭露头角。比如,扩散模型 RFdiffusion<sup>[163]</sup> 可以根据所给的目标蛋白质和热点残基从头生成蛋白质结合物 (binder),并解释和预测蛋白质之间的复杂相互作用,这一模型已经成功应用于药物靶点结合物的生成。深度学习语言模型 ProGen<sup>[164]</sup> 可以基于标签 (包括物种信息、蛋白质家族和催化功能等) 生成蛋白质序列,经训练后生成的人工溶菌酶与天然溶菌酶具有相似的催化效果且具有更多样的序列。此外,这些模型还成功应用于从头设计纳米抗体<sup>[150]</sup>,从头设计能够与生物活性螺旋肽高亲和力结合的结合蛋白<sup>[165]</sup>,从头设计细胞因子类似物<sup>[166]</sup> (与细胞因子竞争性结合靶点但不传导下游信号从而达到治疗疾病的目的),以及从头设计抗菌肽<sup>[167]</sup> 等。最近,谷歌 DeepMind 团队发布的 AlphaProteo<sup>[168]</sup> 在高亲和力蛋白结合物设计方面有了新的进展,相比于之前的方法,其设计出的蛋白实验成功率更高,最佳结合亲和力也更优,是首个成功设计出 VEGF-A 靶点结合物的计算方法。对于上述多种模型生成的序列,经过实验验证的计算过滤工具 COMPSS<sup>[169]</sup> 采用基于序列的 ESM-1v 打分和基于结构的 ProteinMPNN 打分的复合指标,可以有效地帮助研究人员选择突变体进行测试,提高实验成功率。以上这些技术将极大简化生物催化剂或药物分子的发现过程,不需要从自然界中挖掘新的酶或使用动物免疫来获得起始蛋白质,有望缩短研发时间并减少研发费用。目前的蛋白质从头设计主要关注亲和力,未来纳入可开发性和免疫原性的生成指引,更新生成框架,将提高药物设计的成功率。

上述新的端到端流程 (end-to-end pipelines) 减少了设计蛋白质所需的时间和精力,降低了设计蛋白质的进入门槛<sup>[170]</sup>,随着技术的不断改进和更多数据的积累,蛋白设计将更加精准和自动化。在未来的药物研发中,AI 赋能的蛋白药物设计-可开发性优化-处方设计,再结合机器学习赋能的生物标志物的选择<sup>[171]</sup>,临床试验设计<sup>[172]</sup> 和数据分析,药物研发的成功率有望得到明显提升,或许可以打破新药研发中的“倒摩尔定律” (Eroom's law)<sup>[172]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] BORNSCHEUER U T, HUISMAN G W, KAZLAUSKAS R J, et al. Engineering the third wave of biocatalysis[J]. *Nature*, 2012, 485(7397): 185-194.
- [2] ABDELRAHEEM E M M, BUSCH H, HANEFELD U, et al. Biocatalysis explained: from pharmaceutical to bulk chemical production[J]. *Reaction Chemistry & Engineering*, 2019, 4(11): 1878-1894.
- [3] TAO J H, XU J H. Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2009, 13(1): 43-50.
- [4] PRASAD S, ROY I. Converting enzymes into tools of industrial importance[J]. *Recent Patents on Biotechnology*, 2018, 12(1): 33-56.
- [5] FASAN R D, JENNIFER KAN S B, ZHAO H M. A continuing career in biocatalysis: Frances H. Arnold[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(11): 9775-9788.
- [6] 曲戈, 赵晶, 郑平, 等. 定向进化技术的最新进展[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(1): 1-11.  
QU G, ZHAO J, ZHENG P, et al. Recent advances in directed evolution[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(1): 1-11.
- [7] HECKO S, SCHIEFER A, BADENHORST C P S, et al. Enlightening the path to protein engineering: chemoselective turn-on probes for high-throughput screening of enzymatic activity[J]. *Chemical Reviews*, 2023, 123(6): 2832-2901.
- [8] TRAXLMAYR M W, OBINGER C. Directed evolution of proteins for increased stability and expression using yeast display[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012, 526(2): 174-180.
- [9] AGRETI J J, ANTIPOV E, ABATE A R, et al. Ultrahigh-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(9): 4004-4009.
- [10] 杨建花, 苏晓岚, 朱蕾蕾. 高通量筛选系统在定向改造中的新进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(7): 2197-2210.  
YANG J H, SU X L, ZHU L L. Advances of high-throughput screening system in reengineering of biological entities[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(7): 2197-2210.
- [11] REETZ M T, KAHAKEAW D, LOHMER R. Addressing the numbers problem in directed evolution[J]. *ChemBioChem*, 2008, 9(11): 1797-1804.
- [12] KILLE S, ACEVEDO-ROCHA C G, PARRA L P, et al. Reducing *Codon* redundancy and screening effort of combinatorial protein libraries created by saturation mutagenesis[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013, 2(2): 83-92.
- [13] SUN Z T, LONSDALE R, WU L, et al. Structure-guided triple-code saturation mutagenesis: efficient tuning of the stereoselectivity of an epoxide hydrolase[J]. *ACS Catalysis*, 2016, 6(3): 1590-1597.
- [14] REETZ M T, BOCOLA M, CARBALLEIRA J D, et al. Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: combinatorial active-site saturation test[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44(27): 4192-4196.
- [15] REETZ M T, CARBALLEIRA J D. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 891-903.
- [16] LI D Y, WU Q, REETZ M T. Focused rational iterative site-specific mutagenesis (FRISM) [M/OL]//*Methods in enzymology: enzyme engineering and evolution: general methods*, 2020, 643: 225-242. (2020-09-04) [2024-06-25]. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.04.055>.
- [17] XU J, CEN Y X, SINGH W, et al. Stereodivergent protein engineering of a lipase to access all possible stereoisomers of chiral esters with two stereocenters[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(19): 7934-7945.
- [18] FOX R. Directed molecular evolution by machine learning and the influence of nonlinear interactions[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2005, 234(2): 187-199.
- [19] 蒋迎迎, 曲戈, 孙周通. 机器学习助力酶定向进化[J]. *生物学杂志*, 2020, 37(4): 1-11.  
JIANG Y Y, QU G, SUN Z T. Machine learning-assisted enzyme directed evolution[J]. *Journal of Biology*, 2020, 37(4): 1-11.
- [20] 康里奇, 谈攀, 洪亮. 人工智能时代下的酶工程[J]. *合成生物学*, 2023, 4(3): 524-534.  
KANG L Q, TAN P, HONG L. Enzyme engineering in the age of artificial intelligence[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4(3): 524-534.
- [21] 曲戈, 朱彤, 蒋迎迎, 等. 蛋白质工程: 从定向进化到计算设计[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(10): 1843-1856.  
QU G, ZHU T, JIANG Y Y, et al. Protein engineering: from directed evolution to computational design[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(10): 1843-1856.
- [22] FOX R J, DAVIS S C, MUNDORFF E C, et al. Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(3): 338-344.
- [23] ROMERO P A, KRAUSE A, ARNOLD F H. Navigating the protein fitness landscape with Gaussian processes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(3): E193-E201.
- [24] WU Z, JENNIFER KAN S B J, LEWIS R D, et al. Machine learning-assisted directed protein evolution with combinatorial libraries[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(18): 8852-8858.
- [25] YANG K K, WU Z, ARNOLD F H. Machine-learning-guided directed evolution for protein engineering[J]. *Nature Methods*,

- 2019, 16(8): 687-694.
- [26] HUANG P S, BOYKEN S E, BAKER D. The coming of age of *de novo* protein design[J]. *Nature*, 2016, 537(7620): 320-327.
- [27] WOOLFSON D N. A brief history of *de novo* protein design: minimal, rational, and computational[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2021, 433(20): 167160.
- [28] JIANG L, ALTHOFF E A, CLEMENTE F R, et al. *De novo* computational design of Retro-Aldol enzymes[J]. *Science*, 2008, 319(5868): 1387-1391.
- [29] RÖTHLISBERGER D, KHERSONSKY O, WOLLACOTT A M, et al. Kemp elimination catalysts by computational enzyme design[J]. *Nature*, 2008, 453(7192): 190-195.
- [30] SIEGEL J B, ZANGHELLINI A, LOVICK H M, et al. Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction[J]. *Science*, 2010, 329(5989): 309-313.
- [31] 阮青云, 黄萃, 孟子钧, 等. 蛋白质稳定性计算设计与定向进化前沿工具[J]. *合成生物学*, 2023, 4(1): 5-29.
- RUAN Q Y, HUANG X, MENG Z J, et al. Computational design and directed evolution strategies for optimizing protein stability[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2023, 4(1): 5-29.
- [32] SCHYMKOWITZ J, BORG J, STRICHER F, et al. The FoldX web server: an online force field[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(Web Server issue): W382-W388.
- [33] WEINSTEIN J J, GOLDENZWEIG A, HOCH S, et al. PROSS 2: a new server for the design of stable and highly expressed protein variants[J]. *Bioinformatics*, 2021, 37(1): 123-125.
- [35] WIJMA H J, FLOOR R J, JEKEL P A, et al. Computationally designed libraries for rapid enzyme stabilization[J]. *Protein Engineering, Design & Selection*, 2014, 27(2): 49-58.
- [36] MUSIL M, STOURAC J, BENDL J, et al. FireProt: web server for automated design of thermostable proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W393-W399.
- [37] CHOWDHURY R, MARANAS C D. From directed evolution to computational enzyme engineering—a review[J]. *AICHe Journal*, 2020, 66(3): e16847.
- [38] BULLER R, LUTZ S, KAZLAUSKAS R J, et al. From nature to industry: harnessing enzymes for biocatalysis[J]. *Science*, 2023, 382(6673): eadh8615.
- [39] REETZ M T, SUN Z T, QU G. Enzyme engineering: selective catalysts for applications in biotechnology, organic chemistry, and life science[M/OL]. Weinheim: Wiley-VCH, 2023. (2023-01-06)[2024-05-01]. <https://doi.org/10.1002/9783527836895>.
- [40] ANASTAS P T, ALLEN D T. Twenty-five years of green chemistry and green engineering: the end of the beginning[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2016, 4(11): 5820.
- [41] SHELDON R A. E factors, green chemistry and catalysis: an odyssey[J]. *Chemical Communications*, 2008(29): 3352-3365.
- [42] BECKER J, MANSKE C, RANDL S. Green chemistry and sustainability metrics in the pharmaceutical manufacturing sector[J]. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2022, 33: 100562.
- [43] HAGEN T J, HELGREN T R. Chirality and drug discovery[M/OL]//Abraham D J. *Burger's medicinal chemistry, drug discovery and development*. Weinheim: Wiley-VCH, 2021: 1-45. (2021-04-26) [2024-05-01]. <https://doi.org/10.1002/0471266949.bmc016.pub3>.
- [44] REETZ M T. Recent advances in directed evolution of stereoselective enzymes[M/OL]//Directed enzyme evolution: advances and applications. Cham: Springer International Publishing, 2017: 69-99. (2017-02-15)[2024-05-01]. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-50413-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-50413-1_3).
- [45] MENTLEIN R, GALLWITZ B, SCHMIDT W E. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 214(3): 829-835.
- [46] VAHL T P, PATY B W, FULLER B D, et al. Effects of GLP-1-(7-36)NH<sub>2</sub>, GLP-1-(7-37), and GLP-1-(9-36)NH<sub>2</sub> on intravenous glucose tolerance and glucose-induced insulin secretion in healthy humans[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2003, 88(4): 1772-1779.
- [47] BROCKUNIER L L, HE J F, COLWELL L F JR, et al. Substituted piperazines as novel dipeptidyl peptidase IV inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2004, 14(18): 4763-4766.
- [48] ANGELAUD R, ZHONG Y L, MALIGRES P, et al. Synthesis of a  $\beta$ -amino acid pharmacophore *via* a  $\beta$ -lactam intermediate [J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2005, 70(5): 1949-1952.
- [49] HANSEN K B, BALSELLS J, DREHER S, et al. First generation process for the preparation of the DPP-IV inhibitor sitagliptin[J]. *Organic Process Research & Development*, 2005, 9(5): 634-639.
- [50] HANSEN K B, HSIAO Y, XU F, et al. Highly efficient asymmetric synthesis of sitagliptin[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(25): 8798-8804.
- [51] DESAI A A. Sitagliptin manufacture: a compelling tale of green chemistry, process intensification, and industrial asymmetric catalysis[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(9): 1974-1976.
- [52] EPA. Presidential green chemistry challenge: 2006 greener synthetic pathways award[EB/OL]. (2023-12-19)[2024-06-10]. <https://www.epa.gov/greenchemistry/presidential-green-chemistry-challenge-2006-greener-synthetic-pathways-award>.
- [53] GEN. Merck & Co. Licenses Codexis' CodeEvolver® Platform [EB/OL]. [2024-06-10]. <https://www.genengnews.com/news/merck-co-licenses-codexis-codeevolver-platform/>.

- [54] SAVILE C K, JANEY J M, MUNDORFF E C, et al. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture[J]. *Science*, 2010, 329(5989): 305-309.
- [55] KOHLS H, STEFFEN-MUNSBURG F, HÖHNE M. Recent achievements in developing the biocatalytic toolbox for chiral amine synthesis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 19: 180-192.
- [56] GUO F, BERGLUND P. Transaminase biocatalysis: optimization and application[J]. *Green Chemistry*, 2017, 19(2): 333-360.
- [57] KELLY S A, MIX S, MOODY T S, et al. Transaminases for industrial biocatalysis: novel enzyme discovery[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(11): 4781-4794.
- [58] IWASAKI A, YAMADA Y, KIZAKI N, et al. Microbial synthesis of chiral amines by (*R*)-specific transamination with *Arthrobacter* sp. KNK168[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(5): 499-505.
- [59] CHEN Z L, ZHAO H M. Rapid creation of a novel protein function by *in vitro* coevolution[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 348(5): 1273-1282.
- [60] EPA. Presidential green chemistry challenge: 2010 greener reaction conditions award[EB/OL]. (2024-08-01)[2024-08-10]. <https://www.epa.gov/greenchemistry/presidential-green-chemistry-challenge-2010-greener-reaction-conditions-award>.
- [61] MA Y L, JIAO X C, WANG Z J, et al. Engineering a transaminase for the efficient synthesis of a key intermediate for rimegepant[J]. *Organic Process Research & Development*, 2022, 26(7): 1971-1977.
- [62] KELLY S A, POHLE S, WHARRY S, et al. Application of  $\omega$ -transaminases in the pharmaceutical industry[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(1): 349-367.
- [63] ENDO A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors[J]. *Journal of Lipid Research*, 1992, 33(11): 1569-1582.
- [64] MOL M J T M, WILLEM ERKELENS D, GEVERS LEUVEN J A, et al. Simvastatin (MK-733): a potent cholesterol synthesis inhibitor in heterozygous familial hypercholesterolaemia[J]. *Atherosclerosis*, 1988, 69(2-3): 131-137.
- [65] HOYOS P, PACE V, ALCÁNTARA A R. Biocatalyzed synthesis of statins: a sustainable strategy for the preparation of valuable drugs[J]. *Catalysts*, 2019, 9(3): 260.
- [66] XIE X K, TANG Y. Efficient synthesis of simvastatin by use of whole-cell biocatalysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(7): 2054-2060.
- [67] XIE X K, WATANABE K, WOJCICKI W A, et al. Biosynthesis of lovastatin analogs with a broadly specific acyltransferase[J]. *Chemistry & Biology*, 2006, 13(11): 1161-1169.
- [68] GAO X, XIE X K, PASHKOV I, et al. Directed evolution and structural characterization of a simvastatin synthase[J]. *Chemistry & Biology*, 2009, 16(10): 1064-1074.
- [69] JAMES C S, LING T E, JOLY S, et al. Improved LovD acyltransferase mediated acylation: WO2011041233A1[P]. 2011-04-07.
- [70] LYNNE G, JAMES C S, JOLY S, et al. Variant LovD polypeptides and their uses: WO2011041231A1[P]. 2011-04-07.
- [71] JIMÉNEZ-OSÉS G, OSUNA S, GAO X, et al. The role of distant mutations and allosteric regulation on LovD active site dynamics[J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(6): 431-436.
- [72] EPA. Presidential green chemistry challenge: 2012 greener synthetic pathways award[EB/OL]. (2024-06-06)[2024-06-10]. <https://www.epa.gov/greenchemistry/presidential-green-chemistry-challenge-2012-greener-synthetic-pathways-award>.
- [73] GARCÍA-MARQUINA G, NÚÑEZ-FRANCO R, PECCATI F, et al. Deconvoluting the directed evolution pathway of engineered acyltransferase LovD[J]. *ChemCatChem*, 2022, 14(4): e202101349.
- [74] LI Z N, YANG H D, LIU J Y, et al. Application of ketoreductase in asymmetric synthesis of pharmaceuticals and bioactive molecules: an update (2018—2020)[J]. *The Chemical Record*, 2021, 21(7): 1611-1630.
- [75] PATEL J M. Biocatalytic synthesis of atorvastatin intermediates [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 61(3-4): 123-128.
- [76] MA S K, GRUBER J, DAVIS C, et al. A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate[J]. *Green Chemistry*, 2010, 12(1): 81-86.
- [77] DAVIS S C, GRATE J H, GRAY D R, et al. Enzymatic processes for the production of 4-substituted 3-hydroxybutyric acid derivatives: US7125693B2[P]. 2006-10-24.
- [78] DAVIS S C, GRATE J H, GRAY D R, et al. Enzymatic processes for the production of 4-substituted 3-hydroxybutyric acid derivatives and vicinal cyano, hydroxy substituted carboxylic acid esters: US7132267B2[P]. 2006-11-07.
- [79] BAUSCH M, SCHULTHEISS C, SIECK J B. Recommendations for comparison of productivity between fed-batch and perfusion processes[J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(2): 1700721.
- [80] EPA. Presidential green chemistry challenge: 2006 greener reaction conditions award[EB/OL]. (2024-06-06)[2024-09-26]. <http://www.epa.gov/greenchemistry/presidential-green-chemistry-challenge-2006-greener-reaction-conditions-award>.
- [81] QIAO L, LUO Z Y, CHEN H M, et al. Engineering ketoreductases for the enantioselective synthesis of chiral alcohols[J]. *Chemical Communications*, 2023, 59(49): 7518-7533.

- [82] SHANBHAG A P. Stairway to stereoisomers: engineering short- and medium-chain ketoreductases to produce chiral alcohols[J]. *ChemBioChem*, 2023, 24(6): e202200687.
- [83] SHARMA M, SHARMA N N, BHALLA T C. Amidases: versatile enzymes in nature[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2009, 8(4): 343-366.
- [84] WU Z M, LIU C F, ZHANG Z Y, et al. Amidase as a versatile tool in amide-bond cleavage: from molecular features to biotechnological applications[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 43: 107574.
- [85] ZHENG R C, JIN J Q, WU Z M, et al. Biocatalytic hydrolysis of chlorinated nicotinamides by a superior AS family amidase and its application in enzymatic production of 2-chloronicotinic acid[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2018, 76: 81-87.
- [86] WU Z M, ZHENG R C, ZHENG Y G. Exploitation and characterization of three versatile amidase super family members from *Delftia tsuruhatensis* ZJB-05174[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 86: 93-102.
- [87] RUAN L T, ZHENG R C, ZHENG Y G. Mining and characterization of two amidase signature family amidases from *Brevibacterium epidermidis* ZJB-07021 by an efficient genome mining approach[J]. *Protein Expression and Purification*, 2016, 126: 16-25.
- [88] JIN L Q, LIU Z Q, XU J M, et al. Efficient biocatalytic hydrolysis of 2-chloronicotinamide for production of 2-chloronicotinic acid by recombinant amidase[J]. *Catalysis Communications*, 2013, 38: 6-9.
- [89] TANG X L, JIN J Q, WU Z M, et al. Structure-based engineering of amidase from *Pantoea* sp. for efficient 2-chloronicotinic acid biosynthesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(5): e02471-18.
- [90] GORA A, BREZOVSKY J, DAMBORSKY J. Gates of enzymes[J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(8): 5871-5923.
- [91] WU Z M, XIE F, ZHENG W, et al. Structure-oriented engineering of amidase: modification of twisted access tunnel for efficient synthesis of 2-chloronicotinic acid[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(13): 9078-9089.
- [92] LI T, LIANG J, AMBROGELLY A, et al. Efficient, chemoenzymatic process for manufacture of the Boceprevir bicyclic [3.1.0] proline intermediate based on amine oxidase-catalyzed desymmetrization[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(14): 6467-6472.
- [93] ZHANG J, MA Y Q, ZHU F F, et al. Structure-guided semi-rational design of an imine reductase for enantio-complementary synthesis of pyrrolidinamine[J]. *Chemical Science*, 2023, 14(16): 4265-4272.
- [94] YUAN B, YANG D M, QU G, et al. Biocatalytic reductive aminations with NAD(P)H-dependent enzymes: enzyme discovery, engineering and synthetic applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2024, 53(1): 227-262.
- [95] 杨璐, 瞿旭东. 亚胺还原酶在手性胺合成中的应用[J]. *合成生物学*, 2022, 3(3): 516-529.
- YANG L, QU X D. Application of imine reductase in the synthesis of chiral amines[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2022, 3(3): 516-529.
- [96] 熊亮斌, 宋璐, 赵云秋, 等. 甾体化合物绿色生物制造: 从生物转化到微生物从头合成[J]. *合成生物学*, 2021, 2(6): 942-963.
- XIONG L B, SONG L, ZHAO Y Q, et al. Green biomanufacturing of steroids: from biotransformation to *de novo* synthesis by microorganisms[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(6): 942-963.
- [97] 汤恒, 韩鑫, 邹树平, 等. 多酶催化体系在医药化学品合成中的应用[J]. *合成生物学*, 2021, 2(4): 559-576.
- TANG H, HAN X, ZOU S P, et al. Application of multi-enzyme catalytic system in the synthesis of pharmaceutical chemicals[J]. *Synthetic Biology Journal*, 2021, 2(4): 559-576.
- [98] EPA. Green chemistry challenge: 2022 greener synthetic pathways award[EB/OL]. (2024-05-02) [2024-06-10]. <https://www.epa.gov/greenchemistry/green-chemistry-challenge-2022-greener-synthetic-pathways-award>.
- [99] CRUZ G, ACOSTA J, DEL ARCO J, et al. Enzyme-mediated synthesis of molnupiravir: paving the way for the application of biocatalysis in pharmaceutical industry[J]. *ChemCatChem*, 2022, 14(13): e202200140.
- [100] ROSANGZUALA K, PATLOLLA R R, SHAIKH A, et al. Streamlined chemo-enzymatic synthesis of molnupiravir *via* lipase catalyst[J]. *ACS Omega*, 2024, 9(4): 4423-4428.
- [101] REETZ M T, QU G, SUN Z T. Engineered enzymes for the synthesis of pharmaceuticals and other high-value products[J]. *Nature Synthesis*, 2024, 3: 19-32.
- [102] WANG L, WANG N X, ZHANG W P, et al. Therapeutic peptides: current applications and future directions[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2022, 7(1): 48.
- [103] SHARMA K, SHARMA K K, SHARMA A, et al. Peptide-based drug discovery: current status and recent advances[J]. *Drug Discovery Today*, 2023, 28(2): 103464.
- [104] ROSSINO G, MARCHESE E, GALLI G, et al. Peptides as therapeutic agents: challenges and opportunities in the green transition era[J]. *Molecules*, 2023, 28(20): 7165.
- [105] MULLARD A. FDA approves 100th monoclonal antibody product[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(7): 491-495.
- [106] JIN B K, ODONGO S, RADWANSKA M, et al. NANOBODIES<sup>®</sup>: a review of diagnostic and therapeutic applications[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(6): 5994.
- [107] AL MUSAIMI O, AL SHAER D, ALBERICIO F, et al. 2022

- FDA TIDES (peptides and oligonucleotides) harvest[J]. *Pharmaceuticals*, 2023, 16(3): 336.
- [108] ZINSLI L V, STIERLIN N, LOESSNER M J, et al. Deimmunization of protein therapeutics - recent advances in experimental and computational epitope prediction and deletion [J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 315-329.
- [109] CANTOR J R, PANAYIOTOU V, AGNELLO G, et al. Engineering reduced-immunogenicity enzymes for amino acid depletion therapy in cancer[M/OL]//*Methods in enzymology*. New York, USA: Elsevier Science & Technology, 2012, 502: 291-319. (2011-12-09) [2024-06-25]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416039-2.00015-X>.
- [110] FUHRMANN G, LEROUX J C. Improving the stability and activity of oral therapeutic enzymes-recent advances and perspectives[J]. *Pharmaceutical Research*, 2014, 31(5): 1099-1105.
- [111] LAPUHS P, FUHRMANN G. Engineering strategies for oral therapeutic enzymes to enhance their stability and activity[M/OL]//LABROU N. *Advances in experimental medicine and biology: therapeutic enzymes: function and clinical implications*. Singapore: Springer, 2019, 1148: 151-172. (2019-09-04)[2024-06-25]. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7709-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7709-9_8).
- [112] DEBON A, SIIROLA E, SNAJDROVA R. Enzymatic bioconjugation: a perspective from the pharmaceutical industry [J]. *JACS Au*, 2023, 3(5): 1267-1283.
- [113] FRYSZKOWSKA A, AN C H, ALVIZO O, et al. A chemoenzymatic strategy for site-selective functionalization of native peptides and proteins[J]. *Science*, 2022, 376(6599): 1321-1327.
- [114] MORIHARA K. Enzymatic semisynthesis of human insulin: an update[J]. *Journal of Molecular Recognition*, 1990, 3(5/6): 181-186.
- [115] LIU Y D, BEARDSLEY M I, YANG F. Expanding the analytical toolbox: developing new Lys-C peptide mapping methods with minimized assay-induced artifacts to fully characterize antibodies[J]. *Pharmaceuticals*, 2023, 16(9): 1327.
- [116] SINGH R S, SINGH T, SINGH A K. Enzymes as diagnostic tools[M/OL]//*Advances in enzyme technology*. Amsterdam: Elsevier, 2019: 225-271. (2019-02-15)[2024-06-25]. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00009-1>.
- [117] 周文娟, 吴云翔, 易军. 糖化血红蛋白标准化及其检测技术的发展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2015, 42(5): 443-456.
- ZHOU W J, WU Y X, YI J. Standardization and technology development of measurement of glycated human hemoglobin [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2015, 42(5): 443-456.
- [118] SHAHBAZMOHAMMADI H, SARDARI S, LARI A, et al. Engineering an efficient mutant of *Eupenicillium terenum* fructosyl peptide oxidase for the specific determination of hemoglobin A1c[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(4): 1725-1735.
- [119] TANDON S, SHARMA A, SINGH S, et al. Therapeutic enzymes: discoveries, production and applications[J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2021, 63: 102455.
- [120] HENNIGAN J N, LYNCH M D. The past, present, and future of enzyme-based therapies[J]. *Drug Discovery Today*, 2022, 27(1): 117-133.
- [121] DE LA FUENTE M, LOMBARDEO L, GÓMEZ-GONZÁLEZ A, et al. Enzyme therapy: current challenges and future perspectives[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(17): 9181.
- [122] MICHAILIDOU F. Engineering of therapeutic and detoxifying enzymes[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(46): e202308814.
- [123] VICTORINO DA SILVA AMATTO I, GONSALES DA ROSA-GARZON N, ANTÔNIO DE OLIVEIRA SIMÕES F, et al. Enzyme engineering and its industrial applications[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2022, 69(2): 389-409.
- [124] MENDIS S, DAVIS S, NORRVING B. Organizational update: the World Health Organization global status report on noncommunicable diseases 2014; one more landmark step in the combat against stroke and vascular disease[J]. *Stroke*, 2015, 46(5): e121-e122.
- [125] VACHHER M, SEN A, KAPILA R, et al. Microbial therapeutic enzymes: a promising area of biopharmaceuticals [J]. *Current Research in Biotechnology*, 2021, 3: 195-208.
- [126] CRAIK C S, PAGE M J, MADISON E L. Proteases as therapeutics[J]. *Biochemical Journal*, 2011, 435(1): 1-16.
- [127] PAONI N F, CHOW A M, PEÑA L C, et al. Making tissue-type plasminogen activator more fibrin specific[J]. *Protein Engineering*, 1993, 6(5): 529-534.
- [128] KEYT B A, PAONI N F, REFINO C J, et al. A faster-acting and more potent form of tissue plasminogen activator[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(9): 3670-3674.
- [129] WU X W, LEE C C, MUZNY D M, et al. Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86(23): 9412-9416.
- [130] CAMMALLERI L, MALAGUARNERA M. Rasburicase represents a new tool for hyperuricemia in tumor *Lysis* syndrome and in gout[J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2007, 4(2): 83-93.
- [131] NYBORG A C, WARD C, ZACCO A, et al. A therapeutic uricase with reduced immunogenicity risk and improved

- development properties[J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0167935.
- [132] CHEN J, JIANG N, WANG T, et al. DNA shuffling of uricase gene leads to a more “human like” chimeric uricase with increased uricolytic activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 522-529.
- [133] PIERZYNOWSKA K, DESHPANDE A, MOSIICHUK N, et al. Oral treatment with an engineered uricase, ALLN-346, reduces hyperuricemia, and uricosuria in urate oxidase-deficient mice[J]. Frontiers in Medicine, 2020, 7: 569215.
- [134] CHEN D, ZHAO Y J, LI M Y, et al. A general Fc engineering platform for the next generation of antibody therapeutics[J]. Theranostics, 2021, 11(4): 1901-1917.
- [135] CHIU M L, GILLILAND G L. Engineering antibody therapeutics[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2016, 38: 163-173.
- [136] DUCANCEL F, MULLER B H. Molecular engineering of antibodies for therapeutic and diagnostic purposes[J]. mAbs, 2012, 4(4): 445-457.
- [137] SHEN Z L, SANG Z, SHI Y. Nanobodies as a powerful platform for biomedicine[J]. Trends in Molecular Medicine, 2022, 28(11): 1006-1007.
- [138] HARMSSEN M M, VAN SOLT C B, VAN ZIJDERVELD-VAN BEMMEL A M, et al. Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(3): 544-551.
- [139] CHUNGYOUN M F, GRAY J J. AI models for protein design are driving antibody engineering[J]. Current Opinion in Biomedical Engineering, 2023, 28: 100473.
- [140] LIPPOW S M, WITTRUP K D, TIDOR B. Computational design of antibody-affinity improvement beyond *in vivo* maturation[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(10): 1171-1176.
- [141] SIRCAR A, GRAY J J. SnugDock: paratope structural optimization during antibody-antigen docking compensates for errors in antibody homology models[J]. PLoS Computational Biology, 2010, 6(1): e1000644.
- [142] WEITZNER B D, KURODA D, MARZE N, et al. Blind prediction performance of RosettaAntibody 3.0: grafting, relaxation, kinematic loop modeling, and full CDR optimization [J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2014, 82(8): 1611-1623.
- [143] MARKS C, HUMMER A M, CHIN M, et al. Humanization of antibodies using a machine learning approach on large-scale repertoire data[J]. Bioinformatics, 2021, 37(22): 4041-4047.
- [144] KIM J, MCFEE M, FANG Q, et al. Computational and artificial intelligence-based methods for antibody development [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2023, 44(3): 175-189.
- [145] BAILLY M, MIECZKOWSKI C, JUAN V, et al. Predicting antibody developability profiles through early stage discovery screening[J]. mAbs, 2020, 12(1): 1743053.
- [146] KERI D, WALKER M, SINGH I, et al. Next generation of multispecific antibody engineering[J]. Antibody Therapeutics, 2024, 7(1): 37-52.
- [147] HIE B L, SHANKER V R, XU D, et al. Efficient evolution of human antibodies from general protein language models[J]. Nature Biotechnology, 2024, 42(2): 275-283.
- [148] SHANKER V R, BRUUN T U J, HIE B L, et al. Unsupervised evolution of protein and antibody complexes with a structure-informed language model[J]. Science, 2024, 385(6704): 46-53.
- [149] DAUPARAS J, ANISHCHENKO I, BENNETT N, et al. Robust deep learning-based protein sequence design using ProteinMPNN[J]. Science, 2022, 378(6615): 49-56.
- [150] BENNETT N R, WATSON J L, RAGOTTE R J, et al. Atomically accurate *de novo* design of single-domain antibodies[EB/OL]. bioRxiv, 2024: 2024.03.14.585103. (2024-05-18)[2024-06-25]. <https://doi.org/10.1101/2024.03.14.585103>.
- [151] EBRAHIMI S B, SAMANTA D. Engineering protein-based therapeutics through structural and chemical design[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 2411.
- [152] BENNETT W F, PAONI N F, KEYT B A, et al. High resolution analysis of functional determinants on human tissue-type plasminogen activator[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(8): 5191-5201.
- [153] KRISHNA R, WANG J, AHERN W, et al. Generalized biomolecular modeling and design with RoseTTAFold All-Atom[J]. Science, 2024, 384(6693): ead12528.
- [154] ABRAMSON J, ADLER J, DUNGER J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3[J]. Nature, 2024, 630(8016): 493-500.
- [155] KROLL A, RANJAN S, ENGQVIST M K M, et al. A general model to predict small molecule substrates of enzymes based on machine and deep learning[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 2787.
- [156] KROLL A, ROUSSET Y, HU X P, et al. Turnover number predictions for kinetically uncharacterized enzymes using machine and deep learning[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 4139.
- [157] JANG Y J, QIN Q Q, HUANG S Y, et al. Accurate prediction of protein function using statistics-informed graph networks[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 6601.
- [158] WITTMANN B J, YUE Y S, ARNOLD F H. Informed training set design enables efficient machine learning-assisted directed protein evolution[J]. Cell Systems, 2021, 12(11): 1026-1045.e7.
- [159] CHEN L, ZHANG Z H, LI Z H, et al. Learning protein fitness landscapes with deep mutational scanning data from multiple sources[J]. Cell Systems, 2023, 14(8): 706-721.e5.
- [160] YU T H, BOOB A G, SINGH N, et al. *In vitro* continuous protein evolution empowered by machine learning and automation[J]. Cell Systems, 2023, 14(8): 633-644.

- [161] RAPP J T, BREMER B J, ROMERO P A. Self-driving laboratories to autonomously navigate the protein fitness landscape[J]. *Nature Chemical Engineering*, 2024, 1(1): 97-107.
- [162] NOTIN P, ROLLINS N, GAL Y, et al. Machine learning for functional protein design[J]. *Nature Biotechnology*, 2024, 42(2): 216-228.
- [163] WATSON J L, JUERGENS D, BENNETT N R, et al. *De novo* design of protein structure and function with RFdiffusion[J]. *Nature*, 2023, 620(7976): 1089-1100.
- [164] MADANI A, KRAUSE B, GREENE E R, et al. Large language models generate functional protein sequences across diverse families[J]. *Nature Biotechnology*, 2023, 41(8): 1099-1106.
- [165] VÁZQUEZ TORRES S, LEUNG P J Y, VENKATESH P, et al. *De novo* design of high-affinity binders of bioactive helical peptides[J]. *Nature*, 2024, 626(7998): 435-442.
- [166] SILVA D A, YU S, ULGE U Y, et al. *De novo* design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15[J]. *Nature*, 2019, 565(7738): 186-191.
- [167] AGUILERA-PUGA M D C, CANCELARICH N L, MARANI M M, et al. Accelerating the discovery and design of antimicrobial peptides with artificial intelligence[M/OL]// GORE M, JAGTAP U B. *Methods in molecular biology: computational drug discovery and design*. New York: Humana, 2024, 2714: 329-352. (2023-09-08) [2024-06-25]. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3441-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3441-7_18).
- [168] ZAMBALDI V, LA D, CHU A E, et al. *De novo* design of high-affinity protein binders with AlphaProteo[EB/OL]. *arXiv*, 2024, 2409.08022. (2024-09-12) [2024-10-01]. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2409.08022>.
- [169] JOHNSON S R, FU X Z, VIKNANDER S, et al. Computational scoring and experimental evaluation of enzymes generated by neural networks[J/OL]. *Nature Biotechnology*, 2024. (2024-04-23) [2024-05-01]. <https://doi.org/10.1038/s41587-024-02214-2>.
- [170] CHU A E, LU T Y, HUANG P S. Sparks of function by *de novo* protein design[J]. *Nature Biotechnology*, 2024, 42(2): 203-215.
- [171] KOLLURI S, LIN J C, LIU R, et al. Machine learning and artificial intelligence in pharmaceutical research and development: a review[J]. *The AAPS Journal*, 2022, 24(1): 19.
- [172] HARRER S, SHAH P, ANTONY B, et al. Artificial intelligence for clinical trial design[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2019, 40(8): 577-591.



**通讯作者:** 巫瑞波(1984—),男,教授,博士生导师。研究方向为计算辅助的天然产物药效挖掘与生物合成。

E-mail: wurb3@mail.sysu.edu.cn



**通讯作者:** 曹春来(1979—),男,硕士生导师,制药高级工程师,联邦生物科技(珠海横琴)有限公司总经理,珠海联邦制药股份有限公司生物研究所所长。研究方向为代谢疾病和自身免疫疾病的新药研发。

E-mail: caocl@tul.com.cn



**第一作者:** 温艳华(1995—),女,中山大学药学院和珠海联邦制药股份有限公司联合培养博士后。研究方向为蛋白质工程、生物合成和新药研发。

E-mail: wenyh37@mail.sysu.edu.cn