

Humant serumalbumin: genteknologiske muligheder

Lektor Ulrich Kragh-Hansen

Aarhus Universitet, Institut for Medicinsk Biokemi

Resume

Genteknologien vil snart gøre det muligt at fremstille rekombinant humant serumalbumin til klinisk brug samt at fremstille albuminer med forskellige biologiske levetider og isoformer med så høj specifik bindingsaffinitet, at de kan bruges som modgift. Mutanter med øget affinitet for bestemte celletyper kan designes og anvendes til *drug targeting*. Albumin-ligand-komplekser med nye egenskaber kan konstrueres. Levetiden af peptidterapeutika kan forlænges ved fremstilling af albuminhybrider. Med disse muligheder kan man højst sandsynligt skræddersy albuminer til individuel brug.

Humant serumalbumin (HSA) er et vigtigt og hyppigt anvendt lægemiddel. *Plasma Protein Therapeutics Association* har en løbende opdateret hjemmeside om den kliniske anvendelse af HSA (www.albumin.nl). Det årlige forbrug af HSA i Danmark fremgår af indberetninger fra sygehuskommunerne til Lægemiddelstyrelsen. Ifølge disse brugte sygehuse 847 kg HSA i 2003 og 823 kg i 2004. Proteinet anvendes som 5%- eller 20%-opløsninger. Al HSA var udvundet fra plasma; intet af det brugte protein var rekombinant. For at nedsætte risikoen for smitte med bakterier, virus eller prioner bliver HSA varmebehandlet. Behandlingen består hyppigt i opvarmning til 60 °C i 10 timer. For at beskytte proteinet mod varmedenaturering og oxidativ stress under behandlingen tilsættes caprylat (octanoat) og som regel også acetyl-L-tryptophan [1]. Liganderne fjernes ikke før anvendelsen, hvilket betyder, at de formentlig påvirker HSAs bindende egenskaber in vivo. Ud over at indeholde de tilsatte ligander, er præparaterne ofte heterogene. Heterogeniteten kan skyldes forekomst af albuminisoformer eller kovalent modificeret albumin, eller den kan være forårsaget af den industrielle forarbejdning. *Bar-Or et al* [2] undersøgte præparater fra seks forskellige producenter med massespektrometri og fandt at forskellige ligander, som cystein og nitrogenoxid, havde blokeret 50-60% af HSA's enlige frie cysteinsidekæde, at 4-8% manglede de to N-terminale aminosyrer, og at 3-6% manglede den C-terminale aminosyre. Blokering af cysteinsidekæden kan reducere HSA's antioxidantegenskaber, og mangelen på de N-terminale aminosyrer nedsætter proteinets evne til at binde metalioner som Cu⁺⁺, Ni⁺⁺ og Co⁺⁺ [3]. Endvidere kan nitrogenoxid have forskellige biologiske effekter. I en anden in vitro-undersøgelse

fandt *Bar-Or et al* [4], at HSA præparaterne havde en immunosuppressiv effekt på aktiverede humane T-lymfocytter og aktiverede humane leukocytter af den mononukleære type.

En eller flere af ovennævnte forhold kan tænkes at resultere i bivirkninger, som kan blive alvorlige hos kritisk syge patienter. Derfor har man i flere år brugt mange resurser på at blive i stand til at producere rekombinant HSA (rHSA) til klinisk brug. Dette arbejde lettes af, at proteinet er en monomer, som ikke er glykosyleret. Nogle af fordelene ved rHSA vil være, at varmebehandling ikke er nødvendig, og at præparationerne højst sandsynlig er mere homogene. Desuden ville man blive uafhængig af plasmaforsyningen, som jo kan variere med tid og sted. I bestræbelserne på at finde et velegnet ekspressionssystem har man afprøvet transgene dyr, planter, bakterier og gærceller [5]. Resultaterne viste, at gærcellerne *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* og især *Pichia pastoris* ser ud til at være de mest velegnede, idet de kan syntetisere store mængder rHSA. Cellerne secernerer proteinet ud i det omgivende medium, hvorfra det forholdsvist nemt kan isoleres og oprensnes [6, 7]. På nuværende tidspunkt bruges rHSA og mutanter heraf i mange forskellige laboratoriesammenhænge [5], men det er endnu ikke tilgængeligt til klinisk anvendelse. Det varer dog nok ikke så længe, inden dette bliver muligt. *Pichia pastoris* kan nemlig producere så meget rHSA, at den kan anvendes til industriel produktion [5, 7]. Der er allerede udført kliniske fase III-forsøg med dette produkt, og resultaterne var meget løfterige [7].

Fremtiden for rHSA ser således lovende ud. Genteknologien vil også gøre det muligt at fremstille albuminer med specielle egenskaber. For eksempel vil man kunne fremstille

Genteknologiske muligheder

Produktion af normalt (vildtype-) albumin uafhængig af plasmaforsyning og uden risiko for smitte med bakterier, vira og prioner.

Isoformer med modificerede plasmahalveringstider og biotilgængelighed.

Cellespecifik lægemiddelbehandling.

Albuminmutanter som modgift.

Nye albumin-ligand-komplekser med specielle egenskaber.

Proteinhybrider.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

rHSA med modificeret plasmahalveringstid og dermed biotilgængelighed samt rHSA-mutanter og rHSA-ligand-komplekser med specielle egenskaber. Endelig har man allerede nu fremstillet protein- og peptidhybrider med rHSA.

Metode

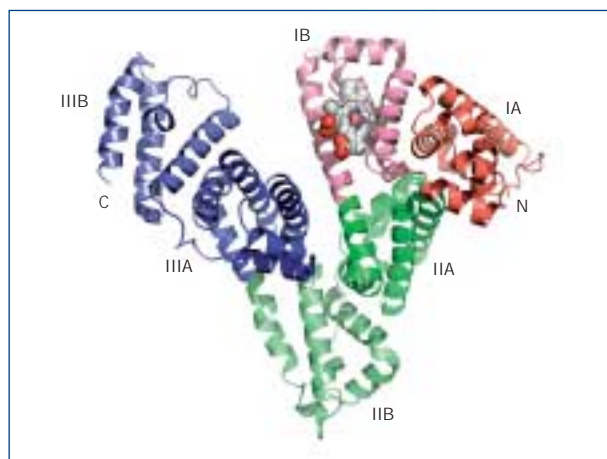
Denne artikel er baseret på egne arbejder samt på database-søgninger i PubMed. Som søgeord er brugt *albumin* kombineret med *recombinant*, *mutagenesis*, *mutant* eller *gene fusion*.

rHSA med modificeret plasmahalveringstid

I klinikken bliver HSA mest anvendt til at opretholde det kolloidosmotiske tryk i blodbanen og til at øge plasmavolumen. Det ville derfor være en gevinst, hvis man kunne fremstille en albuminform, som havde en længere plasmahalveringstid end normalt HSA. Dette kunne opnås ved at producere en proteinform, som har en lav vaskulær permeabilitet og/eller ikke så let blev optaget i celler og nedbrudt i deres lysosomer. I et forsøg på at opnå den førstnævnte effekt fremstillede *Matsushita et al* [8] en rekombinant rHSA-dimer. Farmakokinetiske studier og biofordelingsstudier i normale rotter og i mus med induceret fodødem viste, at dimeren har en forlænget plasmahalveringstid (ca. 1,5 gange) og et mindre fordelingsvolumen end monomer rHSA. Forfatterne mente, at dimeren kunne blive velegnet til at behandle patienter med udbredt kapillærutæthed. Deres resultater er i overensstemmelse med fund gjort af *Komatsu et al* [9]. Disse forfattere dannede dimerer ad kemisk vej og studerede dimerernes farmakokinetik i rotter. I modsætning til de to japanske gruppers arbejder havde *McCurdy et al* [10] tidligere fundet, at en rekombinant dimer, der er dannet af kaninalbumin forsvinder hurtigere fra blodbanen end den tilsvarende monomer. Dimerens farmakokinetikk blev studeret i kaniner, og dens kortere levetid i blodet blev forklaret med øget optag i det retikuloendoteliale system. Forskellen på effekten af dimerisation skyldes formentlig artsforskelle i albumin og forsøgsdyrene [8, 9]. Om rHSA-dimerer med tiden kan udvide indikationsområdet for albumin er således uafklaret på nuværende tidspunkt.

Serumalbumin består af tre globulære domæner, som er meget ens med hensyn til aminosyresekvens og rumlig struktur (**Figur 1**). Domænerne udviser så stor autonomi, at man kan lave stabile rekombinante udgaver af dem – og forskellige kombinationer af dem [11, 12]. *Sheffield et al* [12] har lavet rekombinante versioner af kaninalbumins domæne I, I + II og III og studeret deres in vivo-clearance i kaniner. De tre »mini-proteiner« blev hurtigt udskilt via nyrerne; deres halveringstider var mindre end 0,072 dag, hvorimod normalt rekombinant kaninalbumin forsvandt fra blodbanen med en halveringstid på 4,03 dage.

Mindre drastiske ændringer af strukturen kan også modificere albumins plasmahalveringstid. *Sheffield* og medarbejdere har udført farmakokinetiske forsøg med rekombinante



Figur 1. Krystalstrukturen af rekombinant humant serumalbumin med bundet hæmin. Albumin er et globulært molekyle, der er dannet af en enkelt polypeptidkæde, som består af 585 aminosyrer [3]. Proteinets molekylvægt er ca. 66.500. 67% af proteinet er udformet som α -helix; til gengæld indeholder proteinet ikke foldebladsstruktur. Albumin kan inddeles i tre domæner, som her er angivet med farverne rød (I), grøn (II) og blå (III); A-subdomænerne har en mørkere farve end de tilsvarende B-subdomæner. N og C repræsenterer henholdsvis den N-terminale og den C-terminale ende. I modsætning til hæmin bindes de fleste farmaka med høj affinitet i subdomæne IIA eller IIIA [3]. Figuren er lavet med PyMol på basis af atomkoordinaterne i filen 1o9x hos Brookhaven Protein Data Bank.

versioner af kaninalbumin i kaniner [10,12]. Resultaterne viste bl.a., at glycosylering af proteinet kan reducere plasmahalveringstiden. Virkningen er dog afhængig af, hvor i molekylet modifikationen har fundet sted, fordi glycosylering af en mutant, hvor valin i position 14 var blevet skiftet ud med threonin, ikke havde nogen effekt, hvorimod den samme type glykosylering af en mutant, hvor aspartat i position 494 var blevet erstattet med asparagin, formindskede halveringstiden fra 4,32 dage til 2,87 dage [12].

Iwao et al [13] har studeret farmakokinetikken af seks rekombinante rHSA-mutanter i mus. Isoformerne adskilte sig fra normalt albumin ved enkelt-aminosyre-substitutioner. Mutation af arginin i position 410 til alanin (R410A) havde størst effekt, og aminosyreændringen formindskede proteinets halveringstid fra 272 min til 162 min. Denne udtalte ændring var forårsaget af en kraftig øget leverclearance, nemlig fra 16 mikroliter/time til 426 mikroliter/time. Til gengæld var optagelsen i andre organer ikke signifikant påvirket.

Hvis det med tiden skulle lykkes at konstruere en isoform med forlænget levetid i blodbanen, ville det være en klinisk gevinst. Effekten skal højst sandsynligt opnås ved at fremstille en isoform, der bedre kan modstå endocytose og efterfølgende nedbrydning i cellers lysosomer. Man skal dog ikke helt afskrive muligheden for, at dimerer kan blive et brugbart alternativ. Isoformer med kortere halveringstider ville også være terapeutisk interessante, vel at mærke hvis reduktionen skyldes øget optagelse i en bestemt organ- eller celletype, som det tilsyneladende er tilfældet med ovennævnte mutant R410A. Hvis en isoform fik en høj affinitet for en bestemt

celletype, ville den nemlig kunne bruges til at målrette indgift af stoffer i denne celletype (*drug targeting*): Proteinet med kovalent eller reversibelt bundet lægemiddel optages i cellen, hvorefter lægemidlet frigives og kan udøve en effekt. En sådan behandling ville ikke bare kunne målrettes mod forskellige celletyper, men også eksempelvis mod, blod-hjernebarrieren med det formål, at lægemidlet lettere ville kunne passere barrieren [5].

Nye typer albumin-ligand-komplekser

Ved indgift eller indtag af for meget eller af et forkert farmakon ville man kunne hæmme dets virkning ved at indgive en albuminform, som har en høj affinitet for stoffet. Denne neutraliserende effekt kan også opnås over for endogene ligander. For eksempel vil man sikkert kunne modvirke tyreotoksiske kriser ved at indgive en mutant, hvor arginin i position 218 er blevet udskiftet med en mindre aminosyre som alanin. Denne albuminform har nemlig en meget høj affinitet for tyroksin [14].

Med genteknologiske metoder vil man også kunne fremstille albumin-ligand-komplekser med nye egenskaber. Disse komplekser ville med fordel kunne gives til patienter. Følgende to eksempler tjener til at illustrere tanken. HSA (og rHSA) kan binde et molekyle hæmin med høj affinitet; associationskonstanten er ca. 10^8 M^{-1} [3]. Bindningen finder sted i en overvejende hydrofob lomme i proteinets subdomæne IB (Figur 1), hvor jernionen (Fe^{2+}) i hæmin interagerer med OH-gruppen i tyrosin i position 161 [15]. Hvis det albuminbundne hæmin bliver omdannet til hæm, vil komplekset i modsætning til myoglobin og hæmoglobin ikke være i stand til at binde molekylært ilt på en stabil og reversibel måde. Dette skyldes, at strukturen af bindingslommen i rHSA adskiller sig væsentligt fra de tilsvarende bindingssteder i de to andre proteiner. Ved at modificere albumins bindingslomme og/eller hæmgruppen kan man dog få et brugbart, kunstigt hæmprotein. *Komatsu et al* [16] har således muteret forskellige aminosyrer i bindingsstedet og studeret mutationernes effekt på det bundne hæms egenskaber. De udførte bindingsforsøgene i en argonatmosfære. Hvis de satte ilt til en opløsning, der indeholdt et kompleks af hæm og normalt rHSA, blev hæm hurtigt omdannet til hæmin (Fe^{2+} blev til Fe^{3+}). Hvis de imidlertid muterede isoleucin i position 142 til histidin og tyrosin i position 161 til leucin eller phenylalanin fik de et stabilt kompleks af hæmalbumin og O_2 (tilsvarende kunne opnås med CO). Stabiliteten skyldes, at Fe^{2+} i hæmgruppen nu kan koordinere til imidazolgruppen i den nye His-142. Mutanternes affinitet for O_2 var ca. en tiendedel af hæmoglobins og myoglobins affinitet. Til gengæld var affiniteterne for CO sammenlignelige. *Komatsu et al* [17] har fokuseret på hæmgruppen og syntetiseret to forskellige former af denne. De har brugt dem til at danne to forskellige hæmoproteiner bestående af rHSA og fire molekyler af hæmformerne. Hæmalbuminernes ilttransporterende evner blev studeret i bedøvede rotter, som

først havde fået deres blod kraftigt fortyndet (isovolumetrisk) og derefter fået 30% af deres blodvolumen erstattet med forskellige medier. Effekten af medierne blev vurderet ved at måle en lang række kliniske parametre. Det viste sig, at indgift af opløsninger med den ene eller den anden hæmalbuminform ikke påvirkede blodcellerne og var lige så effektiv eller næsten lige så effektiv til at genoprette de forskellige parameterværdier som rottefuldblod. Til gengæld døde de dyr, som havde fået rHSA uden hæm, ret hurtigt. Den samme gruppe forskere [18] har for nylig udført in vitro-forsøg med humant blod og plasma/serum og den ene hæmalbuminform. Resultaterne viste, at hæmalbumin ikke påvirker det humane komplementsystem eller aktiverer blodplader. Endelig har *Huang et al* [19] modificeret den anden hæmalbuminform ved kovalent at koble seks polyethylenglykolgrupper til proteinet. Effekten blev studeret i den akut-anæmiske rottemodel, der er skitseret ovenfor, og resultaterne viste, at modifikationen øger stabiliteten af det oxygenerede kompleks og forlænger dets tilstedeværelse i blodbanen. Når det er lykket at designe et hæmalbumin, der kan bruges som iltransportør i klinikken, vil det være en stor gevinst, for så bliver man, i hvert tilfælde delvist, uafhængig af blodforsyning og dens risiko for kontaminering. Den største gevinst vil dog nok være, at man kan bruge stoffet i akutte tilfælde, fordi man ikke behøver at teste for blodforlig.

HSA er et vigtigt cirkulerende depot for nitrogenoxid (NO). Molekylet bindes ved at danne en S-nitrosiotil med proteinets enlige frie cysteinsidekæde i position 34. Bindningen bevirker, at albumin får helt nye egenskaber. Dette skyldes formentlig, at NO i de fleste tilfælde, måske alle, overføres direkte fra albumin til målmolekylet (transnitrosation) og ikke passerer en vandopløst, fri tilstand. *Ishima et al* [20] fandt for nylig, at komplekset har antibakteriel aktivitet og modvirker celleapoptose (celledød) in vitro. Endvidere havde det en beskyttende effekt på leverceller i rotter, hvis disses lever havde været udsat for iskæmi efterfulgt af reperfusion. Resultaterne blev markant forbedrede, da det normale arginin i position 410 blev skiftet ud med cystein, som også blev S-nitrosyleret. Der er endnu ikke udført kliniske forsøg med denne albuminform, men måske kan den med tiden finde anvendelse eksempelvis ved organtransplantation.

Ovennævnte typer arbejder sigter mod, at man med tiden ikke »bare« giver albumin for at stabilisere blodcirkulationen, men giver skræddersyede albumin-ligand-komplekser, som kan hjælpe den individuelle patient yderligere.

Proteinhybrider dannet ved fusion med rHSA

Mange terapeutika er peptider eller proteiner, som har en kort plasmahalveringstid på grund af hurtig udskillelse via nyrerne eller hurtigt optag og katabolisering i forskellige celletyper, som ikke nødvendigvis er målet for behandlingen. Disse lægemidler skal derfor indtages forholdsvis hyppigt og/eller i ret store doser. Eftersom stofferne gives ved injektion eller lige-

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

Tabel 1. Eksempler på terapeutika, der er genetisk fusioneret med rekombinant humant serumalbumin (rHSA).

Protein fusioneret med rHSA	Celletype brugt til ekspresion af det fusionerede gen	Produkt navn	Virkning af terapeutika	Reference
CD4-antigen	<i>Kluyveromyces</i>		Anti-hiv	[21]
Apolipoprotein E	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			[22]
Granulocytkoloni-stimulerende faktor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Albugranin	Øger antallet af neutrofile celler	[23]
Væksthormon	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Albutropin	Fremmer vækst og påvirker stofskifte	[24]
B-type natriuretisk peptid	Humane embryonale nyreceller (293F-celler)	AlbuBNP	Vasodilatation	[25]
Enkeltkædet insulin	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> og kinesiske hamsterovarieceller	Albulin	Antidiabetikum	[26]
Interferon alfa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Albuferon alfa	Antiviral og antineoplastisk	[27, 28]
Interferon beta	Musemyelomaceller	Albuferon beta	Antiviral og immunregulerende	[29]
Vævshæmmer af metalloproteinase-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Hæmmer tumorvækst	[30]
Interleukin-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Albuleukin	Hæmmer tumorvækst	[31]
Barbourin	<i>Pichia pastoris</i>		Antitrombotisk	[32] ^a
Hirudin	<i>Pichia pastoris</i>		Antitrombotisk	[32] ^a

a) I dette arbejde brugte man kaninalbumin i stedet for rHSA.

frem intravenøst, er det forbundet med ubehag for patienten, og risikoen for bivirkninger øges ved indgift af store doser. Man er derfor interesseret i at kunne forlænge disse lægemidlers biotilgængelighed. Dette kan blandt andet opnås ved at koble stoffet til albumin, som har en plasmahalveringstid i mennesker på ca. 19 dage. Koblingen kan være i form af en kovalent binding. Kemiske manipulationer kan imidlertid påvirke strukturen og dermed funktionen af den ene eller begge reaktanter. Endvidere kan denne fremgangsmåde resultere i heterogene præparationer. En anden mulighed er at koble lægemidlet kovalent til en ligand, som så sørger for reversibel binding af komplekset til HSA. Endelig kan man fusionere genet for lægemidlet med albumingenet, og så få konjugatet udtrykt i en celletype, der både kan syntetisere og secernere proteinhybridet. Nogle eksempler på dette er givet i **Tabel 1**.

En af fordelene ved at fremstille fusionerede proteiner er, at man kan opnå homogene præparationer. Desuden kan fusion til albumingenet fremme produktionen af det ønskede terapeutikum. Effekten af forskellige proteinpar er blevet undersøgt i forskellige forsøgsdyr, og den generelle konklusion er, at lægemidlerne har bevaret deres biologiske og terapeutiske egenskaber – i nogle tilfælde endog med øget styrke. Der er ikke rapporteret om nye bivirkninger, f.eks. er der ikke rapporteret om immunologiske effekter. Kobling til albumin bevirker typisk, at plasmahalveringstiden for lægemidlet bliver forøget med en faktor på 5 til 10. I enkelte tilfælde er effekten meget mere udtalt: Kobling af CD4-antigenet (*cluster of differentiation 4*) til rHSA bevirker, at dets plasmahalve-

ringstid i kaniner bliver forøget ca. 140 gange [21], og kobling af B-type natriuretisk peptid til rHSA ændrede dets halveringstid i mus fra ca. 3 minutter til ca. 12 timer ved intravenøs administration og til ca. 19 timer ved subkutan injektion [25].

Bortset fra Albuferon alfa er der tilsyneladende ikke lavet kliniske forsøg med de konjugerede proteiner. *Bain et al* [27] har udført et fase II-studie med patienter, som havde hepatitis C af genotype 1. Patienterne blev inddelt i grupper, der fik forskellige mængder af Albuferon alfa injiceret subkutan to gange med 14 dages mellemrum. Studiet viste signifikant antiviral aktivitet af stoffet, serumkoncentrationen var dosisafhængig men i alle tilfælde målbar selv efter 42 dage efter sidste injektion, og endelig blev stoffet tålt godt. Forfatterne foreslår, at behandling med Albuferon alfa kan udføres ved at give én subkutan injektion hver anden eller fjerde uge [27]. Ifølge *Chemmanur & Wu* [28] påbegyndtes fase III-studier med stoffet i slutningen af 2006.

Afsluttende bemærkninger

I de senere år har man fået megen ny og detaljeret viden om albumins struktur og funktioner, og det står stadig mere klart, at albumin er et multifunktionelt protein [3]. Meget af den ny viden er opnået ved at anvende røntgenkrystallografi og rekombinante mutanter. Genteknologien kan også bruges til at fremstille isoformer, der f.eks. kan anvendes som modgift eller til *drug targeting*, og til at fremstille albumin-ligand-komplekser eller proteinhybrider. Man kan kombinere de forskellige muligheder, så man kan få albuminer eller albuminkom-

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

plekser målrettet bestemte patienttyper. For eksempel kunne man tænke sig et rHSA-molekyle kombineret med et bestemt lægemiddel målrettet en bestemt celletype og med en bestemt levetid i blodcirkulationen. Så selvom HSA er en gammel bekendt, har den en lys farmakologisk og farmaceutisk fremtid.

Korrespondance: *Ulrich Kragh-Hansen*, Institut for Medicinsk Biokemi, Aarhus Universitet, DK-8000 Århus C. E-mail: ukh@biokemi.au.dk

Antaget: 23. maj 2008
Interessekonflikter: Ingen

Taksigelse: Tak til *Kim Langmach Hein* for hjælp ved udarbejdelsen af Figur 1.

Litteratur

- Anraku M, Tsurusaki Y, Watanabe H et al. Stabilizing mechanisms in commercial albumin preparations: octanoate and N-acetyl-L-tryptophanate protect human serum albumin against heat and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 2004;1702:9-17.
- Bar-Or D, Bar-Or R, Rael LT et al. Heterogeneity and oxidation status of commercial human serum preparations in clinical use. *Crit Care Med* 2005;33:1638-41.
- Kragh-Hansen U. Humant serumalbumin: nyt om en gammel bekendt. *Ugeskr Læger* 2007;169:3467-70.
- Bar-Or D, Thomas GW, Bar-Or R et al. Commercial human albumin preparations for clinical use are immunosuppressive in vitro. *Crit Care Med* 2006;34:1707-12.
- Chuang VTG, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Pharmaceutical strategies utilizing recombinant human serum albumin. *Pharm Res* 2002;19:569-77.
- Watanabe H, Yamasaki K, Kragh-Hansen U et al. In Vitro and in vivo properties of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris* purified by a method of short processing time. *Pharm Res* 2001;18:1775-81.
- Kobayashi K. Summary of recombinant human serum albumin development. *Biologicals* 2006;34:55-9.
- Matsushita S, Chuang VTG, Kanazawa M et al. Recombinant human serum albumin dimer has high blood circulation activity and low vascular permeability in comparison with native human serum albumin. *Pharm Res* 2006;23:882-91.
- Komatsu T, Oguro Y, Teramura Y et al. Physicochemical characterization of cross-linked human serum albumin dimer and its synthetic heme hybrid as an oxygen carrier. *Biochim Biophys Acta* 2004;1675:21-31.
- McCurdy TR, Gataiance S, Eltringham-Smith LJ et al. A covalently linked recombinant albumin dimer is more rapidly cleared in vivo than are wild-type and mutant C34A albumin. *J Lab Clin Med* 2004;143:115-24.
- Dockal M, Carter DC, Rüter F. The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties. *J Biol Chem* 1999;274:29303-10.
- Sheffield WP, Marques JA, Bhakta V et al. Modulation of clearance of recombinant serum albumin by either glycosylation or truncation. *Thromb Res* 2000;99:613-21.
- Iwao Y, Anraku M, Yamasaki K et al. Oxidation of Arg-410 promotes the elimination of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 2006;1764:743-9.
- Kragh-Hansen U. Humant serumalbumin: isoformer og analbuminæmi. *Ugeskr Læger* 2008;170:1638-43.
- Zunszain PA, Ghuman J, Komatsu T et al. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with heme and fatty acid. *BMC Struct Biol* 2003;3:artikel 6.
- Komatsu T, Ohmichi N, Nakagawa A et al. O₂ and CO binding properties of artificial hemoproteins formed by complexing iron protoporphyrin IX with human serum albumin mutants. *J Am Chem Soc* 2005;127:15933-42.
- Komatsu T, Yamamoto H, Huang Y et al. Exchange transfusion with synthetic oxygen-carrying plasma protein "albumin-heme" into an acute anemia rat model after seventy-percent hemodilution. *J Biomed Mater Res* 2004;71A:644-51.
- Komatsu T, Huang Y, Wakamoto S et al. Influence of O₂-carrying plasma hemoprotein »albumin-heme« on complement system and platelet activation in vitro and physiological responses to exchange transfusion. *J Biomed Mater Res* 2007;81A:821-6.
- Huang Y, Komatsu T, Yamamoto H et al. PEGylated albumin-heme as an oxygen-carrying plasma expander: exchange transfusion into acute anemia rat model. *Biomaterials* 2006;27:4477-83.
- Ishima Y, Sawa T, Kragh-Hansen U et al. S-nitrosylation of human variant albumin Lipizzi (R410C) confers potent antibacterial and cytoprotective properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320:969-77.
- Yeh P, Landais D, Lemaître M et al. Design of yeast-secreted albumin derivatives for human therapy: biological and antiviral properties of a serum albumin-CD4 genetic conjugate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1904-8.
- Nomura N, Matsubara N, Horinouchi S et al. Secretion by *Saccharomyces cerevisiae* of human apolipoprotein E as a fusion to serum albumin. *Biosci Biotechnol Biochem* 1995;59:532-4.
- Halpern W, Riccobene TA, Agostini H et al. Albugranin, a recombinant human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) genetically fused to recombinant human albumin induces prolonged myelopoietic effects in mice and monkeys. *Pharm Res* 2002;19:1720-9.
- Osborn BL, Sekut L, Corcoran M et al. Albutropin: a growth hormone-albumin fusion with improved pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats and monkeys. *Eur J Pharmacol* 2002;456:149-58.
- Wang W, Ou Y, Shi Y. AlbuBNP, a recombinant B-type natriuretic peptide and human serum albumin fusion hormone, as a long-term therapy of congestive heart failure. *Pharm Res* 2004;21:2105-11.
- Duttaroy A, Kanakaraj P, Osborn BL et al. Development of a long-acting insulin analog using albumin fusion technology. *Diabetes* 2005;54:251-8.
- Bain VG, Kaita KD, Yoshida EM et al. A phase 2 study to evaluate the antiviral activity, safety, and pharmacokinetics of recombinant human albumin-interferon alfa fusion protein in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2006;44:671-8.
- Chemmanur AT, Wu GY. Drug evaluation: Albuferon-alpha – an antiviral interferon-alpha/albumin fusion protein. *Curr Opin Investig Drugs* 2006;7:750-8.
- Sung C, Nardelli B, LaFleur DW et al. An IFN-beta-albumin fusion protein that displays improved pharmacokinetic and pharmacodynamic properties in nonhuman primates. *J Interferon Cytokine Res* 2003;23:25-36.
- Kang WK, Park E-K, Lee HS et al. A biologically active angiogenesis inhibitor, human serum albumin — TIMP-2 fusion protein, secreted from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* 2007;53:331-8.
- Melder RJ, Osborn BL, Riccobene T et al. Pharmacokinetics and in vitro and in vivo anti-tumor response of an interleukin-2-human serum albumin fusion protein in mice. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:535-47.
- Sheffield WP, Gataiance S, Eltringham-Smith LJ. Combined administration of barbourin-albumin and hirudin-albumin fusion proteins limits fibrin(ogen) deposition on the rabbit balloon-injured aorta. *Thromb Res* 2007;119:195-207.