

· 药咖论坛 ·

INSIDERS FORUM



· 评述 ·

多肽/蛋白质类药物的人工设计与优化改造 ——结构、功能与精准治疗

华子春^{1,2,3}

(1. 江苏省产业技术研究院医药生物技术研究所 / 常州南京高新技术研究院, 江苏 常州 213164; 2. 中国药科大学生物药物学院, 江苏 南京 210009; 3. 南京大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

多肽/蛋白质类药物一般都源于内源性的生物活性分子, 因此通常都具有亲和力较高、选择性较好、靶点清晰、机制清楚、功能明确、作用明显、安全性较高等优点, 能够真正实现“分子靶向”。因此, 多肽/蛋白质类药物正日益成为新药研发的“新星”和“翘楚”, 受到制药业和临床的高度重视。但是, 内源性的多肽/蛋白质是机体为了满足正常的生理功能和需求而自主产生的, 药物则是通过外部干预以治疗或缓解机体的失衡或病理的状态, 因此, 天然的、满足生理需求的内源性多肽/蛋白质并不能完全满足药用或临床治疗的需求。例如, 作为药物使用的多肽/蛋白质存在稳定性差、易聚集、半衰期较短、血浆清除率较高、给药不便等缺陷。内源性的多肽/蛋白质通常是药物发现的可行而有效的先导化合物, 临床应用的需求期望多肽/蛋白质类药物能够“源于

自然、优于自然”。重大疾病的精准治疗对多肽/蛋白质类药物提出了更高的要求。自 20 世纪 80 年代初基因工程药物问世后, 多肽/蛋白质类药物的人工设计与优化改造即在临床精准治疗和患者实际需求的呼唤下应运而生。多肽/蛋白质类药物的人工设计与优化改造首先立足于多肽/蛋白质的结构与功能的关系且基于其作用机制。基于多肽/蛋白质的功能和作用机制, 开展作用于多靶点的多肽/蛋白质类药物研发; 基于多肽/蛋白质的结构与功能关系, 进行多肽/蛋白质类药物的结构优化和精简, 达到“扬长避短”的效果和目的; 利用多肽导向分子的靶向性、穿膜等性能, 可以研发多功能集成的多肽/蛋白质类药物。针对多肽/蛋白质存在稳定性差、半衰期较短、血浆清除率较高、给药不便等缺陷, 通过增强多肽/蛋白质抗酶解能力、增加流体力学半径等长效化策



【本期栏目主编】华子春: 南京大学教授、博士生导师, 国家杰青、教育部长江学者特聘教授, 江苏省产业技术研究院医药生物技术研究所所长, 《药学进展》编委。分别于 1986、1989、1994 年在南京大学获学士、硕士、博士学位, 1994—1996 年在美国纽约州卫生部从事博士后研究, 2000—2003 年在美国加州 Berkeley 大学任 Berkeley 学者。1989 年 7 月起在南京大学任教, 1995 年 3 月破格晋升南京大学生物化学系教授。1996 年 7 月至 2015 年 4 月担任医药生物技术国家重点实验室主任, 1999 年 1 月至 2017 年 8 月历任南京大学生命科学学院副院长、执行院长。先后创立或主持建设国家重点实验室、省级研究所、省级重点实验室、省级国际合作联盟、市级创新中心、市级工程研究中心各 1 个。先后获百万人才工程国家级人选、国家级有突出贡献中青年专家、全国优秀科技工作者、国家首届青年教师奖、教育部跨世纪优秀人才、江苏省第五期“333 工程”第一层次培养对象等称号。长期开展蛋白质结构与功能关系、新药物靶点和创新药物的基础和应用研究, 发表 SCI 论文 300 多篇, 中英文专著 28 部; 获国内外发明专利 47 件, 有 27 件专利(含 3 个创新药物)在国内外 30 家机构转让或实施。作为第一或主要完成人先后获国家技术发明二等奖(2013 年)、国家自然科学基金二等奖(2000 年)各 1 项; 获江苏省一等奖 4 项(2004、2011、2014、2017 年), 教育部一等奖 2 项(1998、2018 年), 获中国国际工业博览会银奖, 中国国际多肽学术会议多肽应用杰出贡献奖, 中国产学研合作创新成果一等奖, 发明创业成果奖一等奖, 首届江苏创新创业大赛一等奖等奖励。

略, 利用环化策略或者利用富含二硫键的微型蛋白或套索肽作为载体, 利用氨基酸或多肽理化性质进行纳米自组装, 利用化学修饰和改造技术, 针对多肽/蛋白质的缺陷开展药物制剂和剂型研发, 都可以有效克服或改善多肽/蛋白质药物的稳定性差、半衰期短、给药便利性不足等难题。此外, 人工智能和大数据的发展还为提高多肽/蛋白质类药物人工设计的准确率和优化改造的成功率提供了有力的工具。

1 基于作用机制的多靶点多肽/蛋白质类药物研发

复杂性疾病通常是多基因疾病, 涉及多个信号途径的异常, 因此, 具有协同作用机制或靶向多个信号途径的多靶点药物无疑将具有更好的疗效。基于作用机制协同的多靶点药物的设计和研发是近年来多肽/蛋白质类的一个重要方向。该类药物有以下作用方式: 其一, 一个药物分子作用于具有协同作用的多个靶点, 例如, 靶向 μ 阿片受体/孤啡肽受体的多靶点镇痛分子 (BU08028、AT121 和 BU10038) 的阿片样副作用均大大降低^[1-3]; 其二, 将针对具有不同作用机制的不同药物靶点的多个药物联合应用, 从而产生协同作用的治疗效果, 例如, 胰高血糖素样肽-1 受体激动剂艾塞那肽和葡萄糖依赖性促胰岛素肽 (GIP) 受体激动剂 N-AcGIP 的组合可以改善葡萄糖耐量, 并减少食物摄入量和减轻体质量^[4]; 其三, 将针对具有不同作用机制的不同药物靶点的多个多肽/蛋白质融合成为一个新的药物分子, 从而产生更好的、协同的治疗效果, 例如, 包含了 GIP 活性基序和艾塞那肽活性基序的 tirzepatide 对 2 型糖尿病患者具有极显著的降糖和减轻体质量的效果。

2 基于结构与功能关系的多肽/蛋白质类药物研发

多肽/蛋白质类药物人工设计与改造中的常用策略是通过对多肽/蛋白质的结构与功能关系的研究, 在了解和解析各功能结构域或功能片段与多肽/蛋白质的药效、代谢或副作用等的关系的基础上, 对多肽/蛋白质类药物的结构进行改造以达到“扬长避短”

的目的。FVIII 蛋白质工程改造的核心是对 B 结构域的简化和截短^[5]。例如, B 区截短的重组 FVIII 产品 NovoEight[®] 具有与全长重组 FVIII 产品相似的药理学特性^[6], 对血友病 A 患者出血事件具有预防和治疗效果, 患者体内未产生抑制物。在高储存温度和湿度条件下, NovoEight[®] 仍能保持效价, 较好地解决了储存难题。

3 靶向性多肽/蛋白质类药物研发

重大疾病精准治疗的临床需求期待药物能够跨越生理屏障 (如血脑屏障、口服吸收屏障等)、能靶向病灶、能对多个不同靶标均具有靶向性等。多肽/蛋白质类药物的特点是都具有生物学靶点, 因此, 多肽还能够作为导向分子。其与病灶部位靶标的特异性结合可介导小分子药物或递药系统更有效地被靶细胞摄取, 有望实现高效低毒的治疗。例如, 肿瘤归巢肽可作为肿瘤相关诊断试剂或靶向分子引导抗肿瘤药物进入肿瘤部位发挥抗肿瘤效果。穿膜肽则可通过受体介导的内吞等机制进入细胞^[7], 使得多肽能够作用于细胞内的靶点发挥功能。多功能集成是多肽/蛋白质类药物的发展趋势之一。

4 多肽/蛋白质类药物长效化策略

多肽/蛋白质类药物的缺陷是半衰期较短、血浆清除率较高。增强多肽抵抗酶解的能力以提高其体内稳定性、增加其流体力学半径以减少肾小球的滤过作用, 这些都不失为延长该类药物体内半衰期的主要策略。其中, 多肽抵抗酶降解的稳定性可通过改造其氨基酸序列而获得, 或通过乙酰化修饰、引入 D 构型氨基酸等方法而实现。增加多肽/蛋白质类药物的流体力学半径则可以通过采用基因工程方法或化学法增加多肽的相对分子质量而实现。此外, 人血浆白蛋白在血浆中含量丰富, 且相对分子质量大、体内半衰期长, 可作为体内运输多肽药物的有效载体, 因此也可将多肽药物偶联白蛋白亲和肽或脂肪酸修饰以达到延长半衰期的目的^[8-9]。利用上述策略开发出的 MEDI0382 可使治疗组患者的葡萄糖耐量和体质量减轻效果更好^[10]。集 B 结构域简化、定点糖基化及聚乙二醇 (PEG) 化修饰的改造方案

于一身的重组 FVIII 产品 Esperoct[®] 在临床研究中显示出良好的耐受性、预防作用 and 安全性^[11-12]; 其在儿童、青少年或成人患者体内的半衰期提高了 1.6~1.9 倍^[13-14]。

5 基于环化策略的多肽/蛋白质类药物稳定化策略

多肽/蛋白质类药物除了半衰期较短、血浆清除率较高, 还具有稳定性差、易聚集且可能存在免疫原性等缺陷。通过环化以增强多肽类药物的稳定性是一个有效策略, 环化策略包括简单的氨基酸间的环化反应、订书肽环化技术、含多对二硫键的微型蛋白、套索肽类药物载体等。例如, 订书肽可将处于 α 螺旋中同一平面的 2 个氨基酸进行订合, 从而对该 α 螺旋结构发挥加固作用。天然生物毒素富含二硫键, 该类多肽/微型蛋白因多对二硫键的连接和固定而具有高级结构, 因此与靶受体结合能力强, 生物稳定性优于线性多肽。套索肽是一类含有套索结构的多肽类天然产物, 其对化学、热和蛋白酶降解具有高度的稳定性^[15], 可作为多种肽表位的载体, 在多肽/蛋白质类药物开发中展示出巨大的潜力^[16-17]。

6 基于纳米自组装技术的多肽/蛋白质类药物研发

多肽/蛋白质具有降解性能好、生物相容性好的特点, 是良好的纳米材料。自组装多肽是利用氨基酸或肽链之间的非共价键自组装成具有高度有序的纳米结构的一类多肽, 可作为药物载体用于改善药物特性, 起到缓释和靶向作用。基于肽纳米材料的药物递送系统由于其良好的生物功能性和可再生性在再生医学和临床应用中具有光明的应用前景。具有抗肿瘤活性的自组装肽 RADA-KLA 不仅克服了其前体 KLA 多肽免疫原性强、细胞穿透性差、体内快速降解等缺点, 还能抑制肝癌细胞的黏附和迁移并诱导肝癌细胞死亡^[18]。

7 基于化学修饰和改造的多肽/蛋白质类药物研发

化学方法能够弥补生物学方法的局限, 两者相

互补充, 达到“相得益彰”的效果。例如, 在多肽/蛋白质中用硒代半胱氨酸替代半胱氨酸, 形成更为稳定的硒硫键或二硒键, 能增强多肽/蛋白质对还原性环境的耐受能力。用硒硫键替换胰岛素中二硫键获得半衰期较长的硒化胰岛素 (Se-Ins), 其活性与胰岛素类似, 降解速度明显减慢 (Se-Ins 降解半衰期约 8 h, 牛胰岛素仅为约 1 h)^[19]。近年来涌现出的噬菌体展示双环肽库是在含有 3 个半胱氨酸的直链肽库上引入能与巯基反应的连接体, 后者同时与 3 个巯基共价化学连接形成双环结构。双环肽的靶亲和力和对蛋白酶的耐受力往往更强。双环肽多肽配体的靶亲和力有的已达皮摩尔水平, 具有良好的应用前景^[20-22]。镜像噬菌体展示肽库技术筛选获得的 D 型多肽配体特异性好, 稳定性强^[23-25]。利用逆序策略获得的 D 型多肽与原来的多肽具有相似的侧链拓扑学结构, 可以替代原来的 L 型多肽。经逆序设计获得的烟碱型乙酰胆碱受体 (nAChR) 特异性结合的 D 肽分子 DCDX 不仅提升了 L 型肽原有的活性, 还将其血清稳定性提高了近 50 倍, 并大大提高了其在胞内溶酶体中的稳定性, 使其在递送过程中能够维持活性, 有效跨越血脑屏障^[26]。

8 剂型研发推动多肽/蛋白质类药物的临床应用

多肽/蛋白质类药物主要的给药途径为静脉注射、肌肉注射、皮下注射等方式, 并且以静脉给药为主, 虽然注射给药体内分布迅速、吸收较快, 但生物利用度和患者依从性都较差。与小分子药物相比, 多肽/蛋白质类药物严重存在剂型单一、给药不便的瓶颈。注射剂药物递送系统能够通过改变制剂方法将药物在一定时间内递送到特定组织部位, 提高药物的靶向性并减少多肽注射给药产生的毒副作用^[27-28]。艾塞那肽微球制剂是采用生物可降解材料聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 包裹艾塞那肽制备而成, 可以大大降低注射频率, 减少注射部位的疼痛性和刺激性。相较于注射给药方式, 口服给药一直是多肽药物研究者努力的目标, 但多肽的口服给药生物利用度低, 寻找合理有效的口服递送策略也成为多肽药物发展所面临的难题。多肽类药物活性容易受到温度和酸碱度等因素影响, 多肽口服给

药需要克服胃肠道消化酶的酶解作用和肠道细胞对水溶性物质的低通透性两大壁垒。因此,在多肽口服药物的研发中,人们通常使用蛋白酶抑制剂和促吸收剂来增加多肽药物的口服生物利用度。此外,将多肽药物包裹在高分子纳米微球中不但可防止胃肠道的酸性环境和消化酶对药物的降解作用,还可以达到长效释药或靶向治疗的目的^[29]。

9 结语

在多肽/蛋白质结构生物学,尤其是多肽/蛋白质复合物结构与功能关系研究取得巨大进展,基因组学、转录组学、代谢组学、蛋白质组学、细胞信号网络等研究突飞猛进,数学、信息学、物理、化学、材料学等学科与生物学、药学、临床医学不断深入

的交叉和融合的推动下,以及在精准治疗的临床需求的召唤下,多肽/蛋白质类药物的人工设计与优化改造无论是在理论和方法上、技术手段上,还是在产品研发上都取得了显著的进展,产生了一批“源于自然、优于自然”人工设计与优化改造的多肽/蛋白质类新药。过去几十年已经积累并正在不断产出和持续积累的海量数据,以及新兴的人工智能技术必将能够将多肽/蛋白质类药物的人工设计水平与优化改造的精准度提升到一个新的水平。适应证更广、靶向更精准、靶点更集成、疗效更好、毒性更低、稳定性更高、半衰期更理想、给药更方便、依从性更好、成本更低、储存运输更方便,无疑是多肽/蛋白质类药物的人工设计与优化改造需要继续努力的目标。

[参考文献]

- [1] Ding H, Czoty P W, Kiguchi N, *et al.* A novel orvinol analog, BU08028, as a safe opioid analgesic without abuse liability in primates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113 (37): E5511-5518.
- [2] Ding H, Kiguchi N, Yasuda D, *et al.* A bifunctional nociceptin and mu opioid receptor agonist is analgesic without opioid side effects in nonhuman primates [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10 (456): eaar3483[2019-08-20]. <https://stm.sciencemag.org/content/10/456/eaar3483.short>. Doi: 10.1126/scitranslmed.aar3483.
- [3] Kiguchi N, Ding H, Cami-Kobeci G, *et al.* BU10038 as a safe opioid analgesic with fewer side-effects after systemic and intrathecal administration in primates [J]. *Br J Anaesth*, 2019, 122 (6): e146-e156.
- [4] Irwin N, Hunter K, Frizzell N, *et al.* Antidiabetic effects of sub-chronic activation of the GIP receptor alone and in combination with background exendin-4 therapy in high fat fed mice[J]. *Regul Pept*, 2009, 153(1/2/3): 70-76.
- [5] Sandberg H, Almstedt A, Brandt J, *et al.* Structural and functional characterization of B-domain deleted recombinant factor VIII[J]. *Semin Hematol*, 2001, 38(2 Suppl 4): 4-12.
- [6] Jimenez-Yuste V, Lejniece S, Klamroth R, *et al.* The pharmacokinetics of a B-domain truncated recombinant factor VIII, turoctocog alfa (NovoEight®), in patients with hemophilia A[J]. *J Thromb Haemost*, 2015, 13(3): 370-379.
- [7] Dissanayake S, Denny W A, Gamage S, *et al.* Recent developments in anticancer drug delivery using cell penetrating and tumor targeting peptides[J/OL]. *J Control Release*, 2017, 250: 62-76[2019-06-11]. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365917300603>. Doi: 10.1016/j.jconrel.2017.02.006.
- [8] Li R, Yang H, Jia D, *et al.* Fusion to an albumin-binding domain with a high affinity for albumin extends the circulatory half-life and enhances the in vivo antitumor effects of human TRAIL[J]. *J Control Release*, 2016, 228: 96-106[2019-06-11]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916301286>. Doi: 10.1016/j.jconrel.2016.03.004.
- [9] Rizzuti B, Bartucci R, Sportelli L, *et al.* Fatty acid binding into the highest affinity site of human serum albumin observed in molecular dynamics simulation[J/OL]. *Arch Biochem Biophys*, 2015, 579: 18-25[2019-06-11]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003986115002647>. Doi: 10.1016/j.abb.2015.05.018.
- [10] Henderson S J, Konkar A, Hornigold D C, *et al.* Robust anti-obesity and metabolic effects of a dual GLP-1/glucagon receptor peptide agonist in rodents and non-human primates[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2016, 18(12): 1176-1190.

- [11] Curry N, Albayrak C, Escobar M, *et al.* Once-weekly prophylaxis with glycoPEGylated recombinant factor VIII (N8-GP) in severe haemophilia A: safety and efficacy results from pathfinder 2 (randomized phase VIII trial)[J]. *Haemophilia*, 2019, 25(3): 373-381.
- [12] Giangrande P, Andreeva T, Chowdary P, *et al.* Clinical evaluation of glycoPEGylated recombinant FVIII : efficacy and safety in severe haemophilia A[J]. *Thromb Haemost*, 2017, 117(2): 252-261.
- [13] Tiede A, Brand B, Fischer R, *et al.* Enhancing the pharmacokinetic properties of recombinant factor VIII : first-in-human trial of glycoPEGylated recombinant factor VIII in patients with hemophilia A[J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11(4): 670-678.
- [14] Meunier S, Alamelu J, Ehrenforth S, *et al.* Safety and efficacy of a glycoPEGylated rFVIII (turoctocog alpha pegol, N8-GP) in paediatric patients with severe haemophilia A[J]. *Thromb Haemost*, 2017, 117(9): 1705-1713.
- [15] Hegemann J D, Zimmermann M, Xie X, *et al.* Lasso peptides: an intriguing class of bacterial natural products[J]. *Acc Chem Res*, 2015, 48(7): 1909-1919.
- [16] Knappe T A, Manzenrieder F, Mas-Moruno C, *et al.* Introducing lasso peptides as molecular scaffolds for drug design: engineering of an integrin antagonist[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50(37): 8714-8717.
- [17] Hegemann J D, De Simone M, Zimmermann M, *et al.* Rational improvement of the affinity and selectivity of integrin binding of grafted lasso peptides[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(13): 5829-5834.
- [18] Liu T, Li P, Jin H, *et al.* Influence of designer self-assembling nanofiber scaffolds containing anti-cancer peptide motif on hepatoma carcinoma cells[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2017, 105(8): 2329-2334.
- [19] Arai K, Takei T, Okumura M, *et al.* Preparation of selenoinsulin as a long-lasting insulin analogue[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(20): 5522-5526.
- [20] Deyle K, Kong X D, Heinis C, *et al.* Phage selection of cyclic peptides for application in research and drug development[J]. *Acc Chem Res*, 2017, 50(8): 1866-1874.
- [21] Diderich P, Heinis C. Phage selection of bicyclic peptides binding Her2[J]. *Tetrahedron*, 2014, 70(42): 7733-7739.
- [22] Middendorp S J, Wilbs J, Quarroz C, *et al.* Peptide macrocycle inhibitor of coagulation factor XIII with subnanomolar affinity and high target selectivity[J]. *J Med Chem*, 2017, 60(3): 1151-1158.
- [23] Wiesehan K, Buder K, Linke R P, *et al.* Selection of *D*-amino-acid peptides that bind to Alzheimer's disease amyloid peptide A β_{1-42} by mirror image phage display[J]. *Chembiochem*, 2003, 4(8): 748-753.
- [24] Welch B D, VanDemark A P, Heroux A, *et al.* Potent *D*-peptide inhibitors of HIV-1 entry[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(43): 16828-16833.
- [25] Huang L, Xie J, Bi Q, *et al.* Highly selective targeting of hepatic stellate cells for liver fibrosis treatment using a *D*-enantiomeric peptide ligand of Fn14 identified by mirror-image mRNA display[J]. *Mol Pharm*, 2017, 14(5): 1742-1753.
- [26] Wei X, Zhan C, Shen Q, *et al.* A *D*-peptide ligand of nicotine acetylcholine receptors for brain-targeted drug delivery[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 127(10): 3066-3070.
- [27] Liu D, Yang F, Xiong F, *et al.* The smart drug delivery system and its clinical potential[J]. *Theranostics*, 2016, 6(9): 1306-1323.
- [28] 刘梦, 于彭城, 徐寒梅. 蛋白多肽类药物长效化技术研究进展 [J]. *药学进展*, 2019, 43(3): 209-216.
- [29] 冯地桑, 陈龙楷, 权桂兰, 等. 蛋白多肽类药物口服微粒给药系统的研究进展 [J]. *中国医药工业杂志*, 2016, 47(11): 1464-1469.