

抗蛋白酶降解肽类药物的结构修饰研究进展

付慧君^{1,2}综述 周 宁²,周 英¹,刘克良^{2*} 审校

(1. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要:多肽类药物的蛋白酶降解稳定性是决定该药物是否长效的重要因素。本文综述了近年来用以提高多肽药物蛋白酶降解稳定性的主要策略,尤其对特定位置如N端、C端及氨基酸侧链等的化学结构修饰进行了分类和概述,探讨了这些修饰方法对发展多肽药物的贡献及不足。

关键词:肽类药物;蛋白酶;降解;结构修饰

中图分类号:R914.5 文献标识码:A 文章编号:1001-0971(2006)04-0269-04

近年来,生物活性肽类药物以其高效、低毒的优点倍受药物化学家的青睐,但其发展却因为多肽本身的物理及生物化学性质受到限制,如难以通过细胞膜、在体内蛋白酶作用下快速降解等因素导致了肽类药物的体内半衰期短、口服生物利用度低等缺点,不利于将其用于临床治疗。因此寻找体内半衰期长、生物利用度高的生物活性长效肽成为多肽药物研究的重点。

许多肽类药物与受体的亲和力已经得到了较大幅度的提高,但往往在未达到靶点之前就已经被蛋白酶降解,不能产生药效。而蛋白酶对多肽的降解可以发生在吸收、分布及排泄等各个阶段,直接影响了药物的半衰期、生物利用度、血浆清除率等参数,这些都跟药物的作用周期密切相关。因此,多肽药物的蛋白酶降解稳定性是决定药物是否长效的重要因素。

目前用以提高肽类药物蛋白酶降解的稳定性的主要策略有(1)与蛋白酶抑制剂的联合运用:蛋白酶抑制剂与肽类药物的联合运用明显提高了几种口服肽的生物利用度,抑制了蛋白酶的降解^[1]。该策略的缺点是酶抑制剂易引起其他的毒副作用。(2)改变药物剂型:纳米颗粒,微米颗粒或脂质体等药物剂型可以使肽类药物免于胃肠道和血液中蛋白酶的降解。(3)化学结构修饰抑制蛋白酶降解:对多肽药物进行化学结构修饰,使水解肽键的蛋白酶不能识别修饰后的多肽分子,从而达到延长多肽药物体内

半衰期的目的。本文着重综述抗蛋白酶降解的多肽化学结构修饰方法,依据修饰基团和修饰位点的不同,将分别介绍这些修饰方法。

1 聚合物缀合

将大分子聚合物以共价键的形式连接到多肽上,聚合物缀合形成的三维结构遮住了肽的表面,减少了蛋白酶对酰胺键的进攻,从而可以提高多肽药物的稳定性,减少清除率,延长体内半衰期^[2]。聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰^[3]是常用的修饰方法之一。PEG既可以是直链结构也可以是支链结构,将其直接缀合到多肽的N端、C端及某些氨基酸侧链上(如赖氨酸的氨基、半胱氨酸的巯基、酪氨酸的羟基等^[4])或者通过前药的形式缀合到多肽上,在理论上不改变生物活性的前提下,不仅可以提高多肽的蛋白酶降解稳定性,还可以改善多肽的多种药代动力学性质,如提高物理和热稳定性、溶解性等。研究发现,脂肽DPDPE用2 ku PEG偶联到端基的酪氨酸以后,静脉注射产生比DPDPE强3.3倍的镇痛效果,同时半衰期延长2.5倍以上。DPDPE经PEG偶联后减少了清除率和血浆蛋白结合率等,使进入脑中的DPDPE的量有所增加,因此镇痛效果增强,半衰期有所延长^[5]。另外,聚苯乙烯马来酸/酐(polystyrene-co-maleic acid/anhydride, SMA)等也可用于多肽的大分子修饰^[6]。大分子聚合物缀合修饰后,保护了肽键,也不可避免地遮住了多肽的活性位点,容易导致肽类药物的生物活性降低甚至消失。

2 前药策略

前药是将一个能够加强药物输送的分子连接到药理活性基团上,在作用位点或接近作用位点时,连

收稿日期:2005-12-20

作者简介:付慧君,女,在读硕士研究生,研究方向:生物有机化学, Tel: 010-66931644-5, E-mail: huijunfuer@126.com

* 通讯作者:刘克良,男,博士生导师,研究员,研究方向:生物有机化学, Tel: 010-66931601, E-mail: keliangliu@yahoo.com

接分子可以在生理条件下或在蛋白酶作用下自动切割下来,恢复原药的活性。前药的设计同样可以提高肽类药物的蛋白酶降解稳定性。

酯化已经在针对脑部运输设计的前药中显示出特殊的应用价值:一方面,通过酯化反应,将配体分子中的羟基屏蔽或增加酶解作用部位的立体位阻都能在一定程度上克服原药分子易被代谢酶进攻失活的缺点^[7];另一方面,含有氨基、羟基或羧基的药物的酯化极大提高了脂溶性,加强了穿透血脑屏障的能力,芳香苯酯和带侧链的叔丁基酯酯化生成的前药显示出高的血浆稳定性,而大脑中枢神经系统中含有丰富的酯酶,可以将前药转变为母体药^[8]。

亮氨酸脑啡肽和甲硫氨酸脑啡肽的 *N*-4-咪唑啉酮衍生物^[9](图 1)可以有效抑制氨肽酶对肽的水解,使其在体内半衰期明显延长。肽羧端与醛或酮形成的咪唑啉酮衍生物^[10](图 2)在体内可以定量降解为原来的肽,半衰期从 4 min 延长到 1 500 h,结果显示,这种咪唑啉酮衍生物的形成不仅避免了羧肽蛋白酶对羧端肽键的水解,而且可以保护相邻的肽键被蛋白酶切割,表现出高的血浆代谢稳定性。

通过一个连接分子将肽的羧基端和氨基端同时

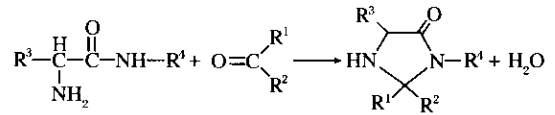


图 1 脑啡肽的咪唑啉酮类前药衍生物

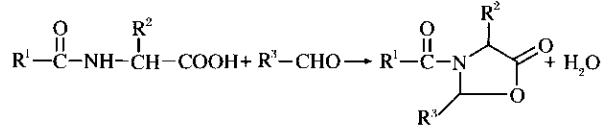


图 2 脑啡肽的咪唑啉酮类前药衍生物

进行结构修饰,制成与香豆酸或邻羟基取代苯丙酸通过酰胺键和酯键相连接的环状前药也可以提高在细胞膜等位置的代谢稳定性。如用邻羟基苯丙酸类化合物[3-(2'-羟基-4',6'-二甲基苯基)-3,3-二甲基丙酸]与阿片肽 H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu-OH(DADLE)连接起来的环化前药在 Caco-2 细胞单层模型的实验中,酶代谢稳定性至少是线性肽的 5 倍。此前药经生物转化通过前药载体的分子内环化反应释放出原药而发挥作用,其作用机制如图 3 所示:前药在酯酶的作用下,N 端的酯键断裂,而 N 端裸露的中间体一旦生成,就会迅速释放出线性肽^[11]。

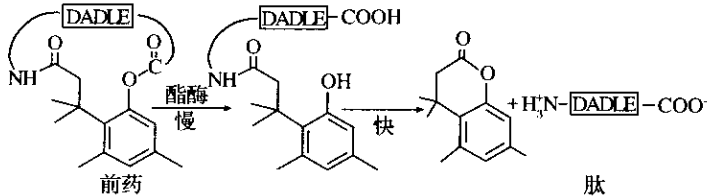


图 3 从环状前药 3-(2'-羟基-4',6'-二甲基苯基)-3,3-二甲基丙酸为连接桥释放出线性肽的示意图

环状前药不仅显示出更好的膜渗透性,而且在溶液中具有独特的 β -转角结构,减少了氢键的形成,使其对内、外肽蛋白酶的代谢稳定性都大大加强。

前药策略的缺点是需要足够的药代动力学数据证明其在体内的变化过程。

3 拟肽

肽键的任意取代(除了酯键外)都可以提高蛋白酶降解稳定性,因此在模拟肽的生物活性的基础上,通过肽的骨架修饰,改变肽的主体结构,是拟肽设计的目标。酰氨基被烯基、羟基乙烯基、羟基乙基氨基、硫代酰氨基等基团(图 4)取代形成的拟肽均能有效抑制蛋白酶的降解^[12,13]。另外,亚磺酰基、亚磷酸基、二羟硅烷^[14]等的替代也可以不同程度地抑制蛋白酶降解。

4 肽 N 端和 C 端的修饰

N-乙酰化、苯基化以及烷基化是 *N* 端修饰的常用策略。通过与蛋白酶或蛋白酶-底物复合物的结合,Ac-Met-enk(脑啡肽)能够抑制 Met-enk 的体外水解,*N* 端的乙酰化加强了亮氨酸脑啡肽和甲硫氨酸脑啡肽对氨肽酶的降解稳定性^[15]。*N* 端苯基化修饰的 TE 类似物在血清中代谢半衰期为未修饰化合物的 4 倍^[16]。Bernkop Schnürch 研究小组发现,*N* 端甲基化与未修饰的细胞毒性 T 淋巴细胞表位肽,相同条件下分别与亮氨酸氨肽酶孵育 3 h 后,修饰过的肽仍有 90% 未被该酶降解,而未经修饰的肽只剩 50%^[17]。另外,甲酰化、乙基化、*N*-苄氧羰基(Fmoc)衍生化,以及 *N*-焦谷氨酸残基修饰等可以降低氨肽酶 M 的活性。

C 端转化为酯、酰胺、醇、甲基酮、腈、四唑等可以抑

制羧肽蛋白酶的水解。C端和N端延长(C-Ile-Tyr, N-D-

Arg)也可以抑制氨肽蛋白酶和羧肽蛋白酶的水解^[18]。

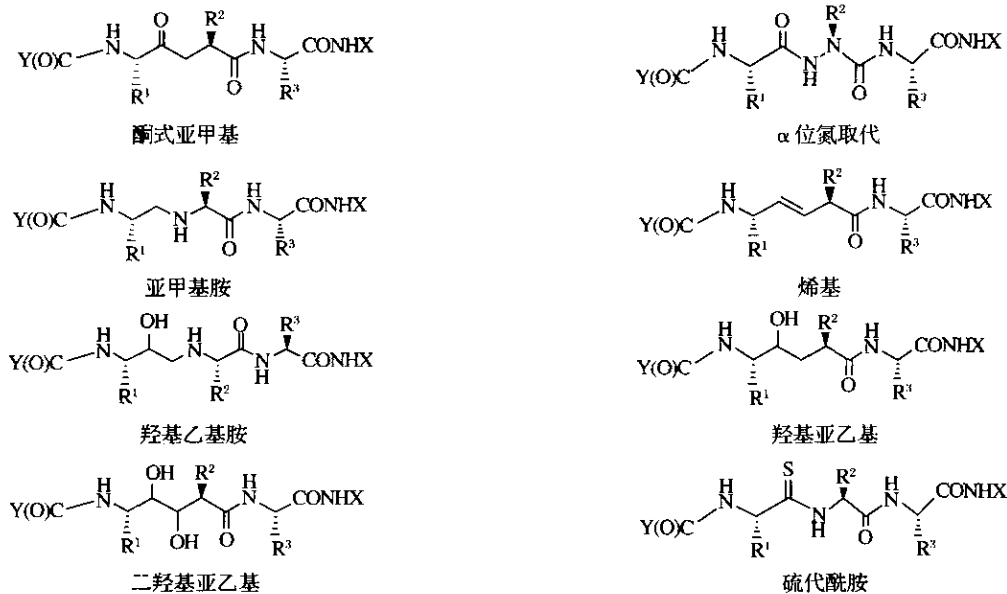


图4 对肽键进行化学修饰的实例

注:图中R¹和R²之间的酰胺键被各种不易被蛋白酶识别、降解的化学键取代

5 侧链修饰

包括O-磷酸化、烷基化、N-烷基化等。N端酪氨酸残基的磷酸化对提高甲硫氨酸脑啡肽和亮氨酸脑啡肽在氨肽蛋白酶M作用下的稳定性有重要影响,磷酸化后其半衰期从1 min分别提高到7.3和8.8 min^[19],Hoffmann等^[20]研究了未磷酸化、单磷酸化及二磷酸化肽在稀释的人类血浆中的稳定性,发现9个单磷酸化肽中的7个显示与未磷酸化相比稳定性增强,所有在免疫决定位点的磷酸化肽显示出更高的血浆稳定性,降解产物分析发现主要是氨肽酶的作用,磷酸基仍保留在丝氨酸和苏氨酸上。

胍基与吗啡肽(morphiceptin)和内啡肽II(endomorphin)的N端酪氨酸相连,在生理条件下形成了阳离子状态,降低了酯溶性,离体实验表明,这两种肽在血浆及脑中的半衰期都有相应提高,可能是因为阳离子化阻止了氨肽蛋白酶和脯氨酸二肽蛋白酶切割^[21]。但是潜在的毒性限制了这类修饰在临床治疗上的应用。

6 其他结构修饰

将线性肽转化为构型限制的环肽可以抑制氨肽及羧肽蛋白酶的水解,但可能导致结构和构型改变,影响生物活性。酰胺N上烷基化及α-碳上的烷基化因为位阻作用而阻止了蛋白酶对酰胺键的水解。

另外,也有研究表明:脯氨酸取代形成的构型限制的肽提高了血浆半衰期^[21]。其他如D型氨基酸取代、β-氨基酸取代和非天然氨基酸取代等,已经是目前最常用的多肽药物修饰方法。

7 结语

化学结构修饰大大提高了肽类药物的抗蛋白酶降解能力,明显延长了体内、外半衰期,提高了生物利用度,但是仍存在一定的局限和不足,例如大分子聚合物的缀合易导致药物活性降低,而前药策略主要是针对用于中枢神经系统的肽类药物,多肽的侧链修饰又易引起其他毒副作用等。更深入的研究仍在进行中。

参 考 文 献

- [1] 王 萍,陈 钧.酶抑制剂在蛋白质和肽类药物口服制剂中的应用[J].中国医药工业杂志,2005,36(8):510-514.
- [2] Reddy KR. Controlled-release, pegylation, liposomal formulations: new mechanisms in the delivery of injectable drugs[J]. *Ann Pharmacother*, 2000, 34(7/8):915-923.
- [3] Shechter Y, Tsubery H, Mironchik M, et al. Reversible PEGylation of peptide YY3-36 prolongs its inhibition of food intake in mice[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(11):2439-2444.
- [4] Francesco MV, Gianfranco P. PEGylation, successful approach to drug delivery[J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10(22):1451-1458.

(下转第299页)

4.9 国际临床试验与文化问题

现在许多临床试验都在国际间进行,病人来自多个国家。国家之间对症状的内涵和护理者对行为改变的识别能力不同,故进行国际间研究时要考虑这些资料来源的差异。

5 研究方向

开发 NDD 患者使用的精神性药物的研究领域目前有几个重要方向。轻度认知损害(MCI)是正常衰老和痴呆发作特别是 AD 之间的过渡态,识别这些症状可能改善有 MCI 病人的确诊,对这些症状的有效治疗可以减少不良应激和改善生活质量。识别特异分子靶标和开发先导化合物允许药物的介入治

疗可明显缓解疾病的进程。secretare 抑制剂、免疫治疗药物、抑制类淀粉样蛋白聚集的药物,各种神经保护药物都在积极开发中。传统抗精神性疾病化合物中发现具有神经性效应的药物数目在增加,例如抗抑郁治疗增加新神经元的产生,抗抑郁药物的此种效应取决于其潜在的触发神经元再生的能力,此性质对 NDD 的治疗有益。理解行为和神经精神症状的神经生物学基础是有限的,故对人类行为的观察,与有关 NDD 行为变化的动物模型的开发均是需要的。洞察 NDD 的行为表现广泛应用于理解和治疗精神疾病。揭示 NDD 神经生物学标记,开发抗 NDD 行为和精神症状的药物的成功,也有助于改善主要精神疾病的治疗。

(上接第 271 页)

- [5] Witt KA , Huber JD , Egleton RD , *et al.* Pharmacodynamic and pharmacokinetic characterization of poly(ethylene glycol) conjugation to Met-enkephalin analog [D-Pen2 , D-Pen5]enkephalin(DPDPE) [J]. *J Pharmacol Exp Ther* , 2001 , 298(1 - 3) : 848 - 856 .
- [6] Maeda H. SMANCS and polymer-conjugated macromolecular drugs : advantages in cancer chemotherap[J]. *Adv Drug Deliv Rev* , 2001 , 46(2) : 169 - 185 .
- [7] 李 炜 , 章承继 , 仇缀百 . 阿片类前体药物的研究进展[J]. 中国药物化学杂志 , 2004 , 14(1) : 51 - 55 , 64 .
- [8] Witt KA , Gillespie TJ , Huber JD , *et al.* Peptide drug modification to enhance bioavailability and blood-brain barrier permeability [J]. *Peptides* , 2001 , 22(12) : 2329 - 2343 .
- [9] Bak A , Fich M , Larsen BD , *et al.* N-terminal 4-imidazolidinone prodrugs of leu-enkephalin : synthesis , chemical and enzymatic stability studies[J]. *Eur J Pharm Sci* , 1999 , 7(4) : 317 - 323 .
- [10] Bundgaard H , Rasmussen GJ. Prodrugs of peptides 9. Bioreversible N-alpha-hydroxyalkylation of the peptide bond to effect protection against carboxypeptidase or other proteolytic enzymes[J]. *Pharm Res* , 1991 , 8(3) : 313 - 322 .
- [11] Yang JZ. *In vitro* stability and *in vivo* pharmacokinetic studies of a model opioid peptide H-Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu-OH(DADLE) , and its cyclic prodrugs[J]. *J Pharmacol Exp Ther* , 2002 , 303(2) : 840 - 848 .
- [12] T Borchardt R , Jeffrey Aube , Siahhan TJ , *et al.* Improvement of oral peptide bioavailability : peptidomimetics and prodrug strategies[J]. *Adv Drug Deliv Rev* , 1997 , 27(2/3) : 235 - 256 .
- [13] Bente S , Carsten UN , Sven F. Delivery aspects of small peptides and substrates for peptide transporters [J]. *Eur J Pharm Biopharm* , 2005 , 60(2) : 241 - 245 .
- [14] Kim J , Sieburth SM. Silanediol peptidomimetics . Evaluation of four diastereomeric ACE inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett* , 2004 , 14(11) : 2853 - 2856 .
- [15] Jayawardene DS , Dass C. The effect of N-terminal acetylation and the inhibition activity of acetylated enkephalins on the aminopeptidase M-catalyzed hydrolysis of enkephalins[J]. *Peptides* , 1999 , 20(8) : 963 - 970 .
- [16] Oh HS , Kim S , Cho H , *et al.* Development of novel lipidpeptide hybrid compounds with antibacterial activity from natural cationic antibacterial peptides [J]. *Bioorg Med Chem Lett* , 2004 , 14(5) : 1109 - 1113 .
- [17] Marschutz MK , Zauner W , Mattner F , *et al.* Improvement of the enzymatic stability of a cytotoxic T-lymphocyte-epitope model peptide for its oral administration[J]. *Peptides* , 2002 , 23(10) : 1727 - 1733 .
- [18] Dendorfer A , Waqemann M , Reissmann S , *et al.* Structural requirements for B₂-agonists with improved degradation stability[J]. *Immunopharmacology* , 1999 , 45(3) : 199 - 205 .
- [19] Dass C , Mahalakshmi P. Phosphorylation of enkephalins enhances their proteolytic stability[J]. *Life Sci* , 1996 , 58(13) : 1039 - 1045 .
- [20] Hoffmann R , Vasko M , Otvos Jr L , *et al.* Serum stability of phosphopeptides[J]. *Anal Chim Acta* , 1997 , 353(3) : 319 - 325 .
- [21] Hau VS , Huber JD , Campos CR , *et al.* Effect of guanidine modification and proline substitution on the *in vitro* stability and blood-brain barrier permeability of endomorphin III[J]. *J Pharm Sci* , 2002 , 91(10) : 2140 - 2149 .