

• 新药发现与研究实例简析 •

新药创制是复杂的智力活动,涉及科学研究、技术创造、产品开发和医疗效果等多维科技活动。每个药物都有自身的研发轨迹,而构建化学结构是最重要的环节,因为它涵盖了药效、药代、安全性和生物药剂学等性质。本栏目以药物化学视角,对有代表性的药物的成功构建,加以剖析和解读。

本刊在2015年第8期曾解析了治疗易激性大肠炎药物依卢多林的研制,依卢多林是由多肽演变成非肽化合物,与靶标经局部作用而起效的。本文同时叙述利那洛肽和普卡那肽两个新药,不仅因都是口服经肠以局部作用治疗慢性便秘的肽类药物,而且作用靶标和治疗机制相同,激动鸟苷酸环化酶C的正常生理功能,达到促进便秘患者肠道运动和分泌的治疗效果。纯肽类化合物口服用药而不被水解失活,是由于两个分子都有二硫键,形成的环肽对酸和消化液稳定,也因为不吸收进入循环避免了全身暴露的脱靶作用。两个药物研制的起始物不同,一是基于大肠杆菌耐热毒素改造而成,另一是以内源性配体为先导物优化而得,异途同归,结构相似。本文的另一特点是试图从专利的内容进行解析。

(编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0801

口服治疗慢性便秘的肽类药物利那洛肽和普卡那肽

郭宗儒

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所,北京 100050)

1 引言

肠易激综合征 (IBS) 和慢性特发性便秘 (CIC) 是中老年人消化道易发性疾病,患者痛苦且生活质量下降。本文叙述的两个治疗药物都是肽类化合物,同一个靶标,作用机制相同。在研发策略和理念上也有类似特点:利用对靶标鸟苷酸环化酶C (GC-C) 的激动作用,引起肠蠕动,促进排便;每日用药一次,无需持续性药理作用;都是含有二硫键的环肽,对酸和消化液稳定,便于口服;也因局部作用于肠上皮细胞,不吸收进入循环,减少了脱靶的不良反应。从化学结构分析,首创药物利那洛肽 (linaclotide) 于2012年上市,是基于大肠杆菌分泌的肠毒素 (ST_a) 的结构,经简化得到 (由十九肽变换为十四肽);跟随性药物普卡那肽 (plecanatide) 于2017年上市,是基于内源性肽尿鸟苷素 (uroguanylin) 优化而得。其实肠毒素和尿鸟苷素的作用靶标相同,都是鸟

苷酸环化酶C激动剂,异途同归。

2 首创性药物利那洛肽

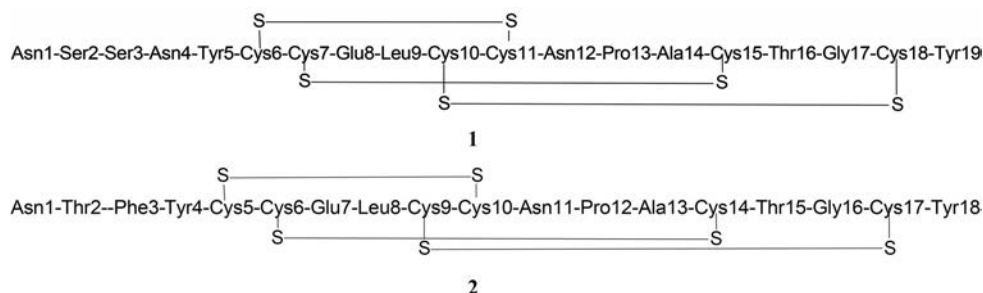
2.1 大肠杆菌耐热肠毒素

儿童和卫生条件差的人群常发生腹泻,多由于致病性大肠杆菌感染,所分泌的肠毒素所致。毒素中有一类是热稳定肠毒素 (ST),ST 在 95 °C 下 60 min 仍保持结构和功能稳定。ST 中的 ST_a 结合于 GC-C 是引起腹泻之源 (机制见下节)。

致腹泻的 ST_a 中有两个重要的多肽: ST_n (1) 是含十九个氨基酸的多肽; ST_p (2) 是十八肽,同源性很强,各含有 6 个半胱氨酸残基,形成三对分子内二硫键,是维持热稳定的结构因素。从 N 端的 Tyr5 (或 Tyr4) 到 C 端两个肽的序列完全相同,同源性很强。

2.2 鸟苷酸环化酶 C 及其配体

人体肠道和肾脏等多种组织器官存在有称作鸟苷素家族的多肽,其中尿鸟苷素 (3, uroguanylin) 为含有 4 个半胱氨酸的十六



肽,形成两对二硫键,也是构成稳定环肽的结构因素。另外还有鸟苷素(guanylin)和淋巴鸟苷素(lympho-guanylin)是十五肽,也是环肽。鸟苷素家族的重要功能是调节肠道和肾脏上皮细胞对水和电解质代谢。

尿鸟苷素是内源性的配体,肠毒素ST是外源性配体,都是受体GC-C的激动剂。肠细胞上的GC-C为跨膜蛋白,作为配体的肠毒素或鸟苷素与膜外结合域作用,通过跨膜多肽链传递到胞内GC的催化域,导致细胞内环磷酸鸟苷(cGMP)升高,后者主要通过囊性纤维化跨膜传导调节蛋白(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)诱导膜通道开启,促进氯离子和碳酸氢根分泌,降低了肠道对水分的吸收,水分充盈引起腹泻。利用这个机制于治疗上,激动GC-C受体增加了肠中水量,可促进肠运动和排便,缓解肠易激综合征和慢性特质性便秘的症状。这是一种反向思维的应用策略。利那洛肽就是以ST为先导物研制成功的。

研究表明,ST_h(1)肽链中从Cys6到Cys18或ST_p(2)的Cys5到Cys17是引起腹泻的毒性域(toxic domain),认为是激动GC-C的必需结构。用光敏性氨基酸(*p*-N₃-Phe)残基替换ST_p的N端、中部或C端的非Cys残基,表明中部区段(Asn12或Asn11)与受体有密切结合(Hasegawa M, Kawano Y, Matsumoto K, et al. Identification of a binding region on *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to intestinal guanylyl cyclase C. Lett Peptide Sci, 1997, 4: 1-11),推测是重要的结合因素,反映在结构修饰中,专利中的化合物该Asn未作变换。

2.3 肽合成和活性评价 用固相合成方法制备肽库,缩合剂为DCC-HOBt,合成中半胱氨酸巯基用三苯甲基保护。反应完毕后脱保护剂是TFA,游离出的巯基在空气中自动氧化环合成二硫键。

活性评价方法是用人结肠癌细胞T84,在24孔板上温孵生成单层细胞,加入放射性标记的大肠杆菌ST肽和不同浓度的受试化合物,然后洗涤细胞,加入NaOH溶液

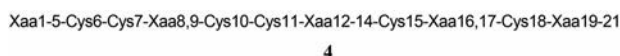
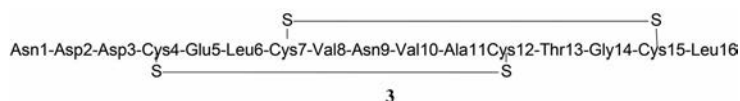
使细胞溶解,测定溶液中的放射性,计算受试物的活性。

2.4 肽结构的优化 分析美国专利US2005/0020811A1(Currie MG, Mahajan-Miklos S. Methods and compositions for the treatment of gastrointestinal disorders),是以肠毒素ST_h为先导物,制备了145个多肽,通式为4。

测定了目标肽化合物体外对GC-C的活性,解析如下:① Xaa主要代表的是天然氨基酸,包括酸性、碱性、芳香与疏水氨基酸。Xaa也可以是非天然氨基酸。② 含有6个Cys残基,并保持所在位置与肠毒素(1)对应相同。③ N端Xaa1-5或C端19-21的残基可以部分或全部删除,因而目标肽可成为十四肽到二十肽。④ 体外评价对小肠GC-C受体的激动作用,专利突出申请了5个肽的专利要求,即化合物5~9。⑤ 化合物5是将ST_h(1)的N端去除了前5个氨基酸的简化物,为十四肽,其余氨基酸序列都没有改变。化合物6是将5中的Leu4换成Tyr4,化合物7是将5中的Thr11换成Trp11。化合物8是ST_h(1)N端去除了前3个氨基酸的十六肽。9是将ST_h(1)的Leu9变换为Tyr9,其余的氨基酸不变。应强调的是,分子中6个半胱氨酸残基和中间的Asn是相同的,推测对维持药效构象和与GC-C结合是非常必要的。从专利要求内容看,这5个肽是优选出的激动剂。

在进一步的专利US2006/0258593A1中(Currie MG, Mahajan-Miklos S, Fretzen A, et al. Methods and compositions for the treatment of gastrointestinal disorders),合成并评价了1600多个肽化合物,不仅对氨基酸又作广泛变换,而且在N或C端进行多肽修饰,评价对GC-C的激动活性和体内活性,表明化合物6是优胜化合物。

2.5 候选化合物和利那洛肽上市 对化合物6作广泛的体内外活性评价,遴选为候选物,定名为利那洛肽(linaclotide)。体外对小肠GC-C有非常高的亲和作用, $K_i = 1.23 \sim 1.64 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $EC_{50} = 99 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。大鼠实验模型表明,在 $\geq 5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下,对消化道传动和小肠分泌有剂量依赖性的促进作用。利那洛肽对酸性介质



是稳定的,在模拟胃液 pH = 1 环境中 3 h 未见发生变化,对胃蛋白酶也是稳定不变的(三对分子内的二硫键所形成的环肽是化学稳定性的主要因素)。药代实验表明,小鼠灌胃利那洛肽,用 LC-MS 测定血浆中浓度,口服利用度低于 0.11%,提示本品基本不被吸收,因而是经肠道的局部作用,避免了全身暴露可能造成脱靶的不良反应 (Busby RW, Bryant AP, Bartolini WP, et al. Linaclotide, through activation of guanylate cyclase C, acts locally in the gastrointestinal tract to elicit enhanced intestinal secretion and transit. *Eur J Pharmacol*, 2010, 649: 328-335)。

经三期临床研究,表明每日一次口服利那洛肽 145~290 μg (不到 1 mg!),对便秘性肠易激综合征或慢性特发性便秘是安全有效的,作为首创药物于 2012 年经美国 FDA 批准上市。

普卡那肽是基于内源性肽尿鸟苷素 (3) 的结构进行修饰的,研发的策略、方法和手段是相似的。

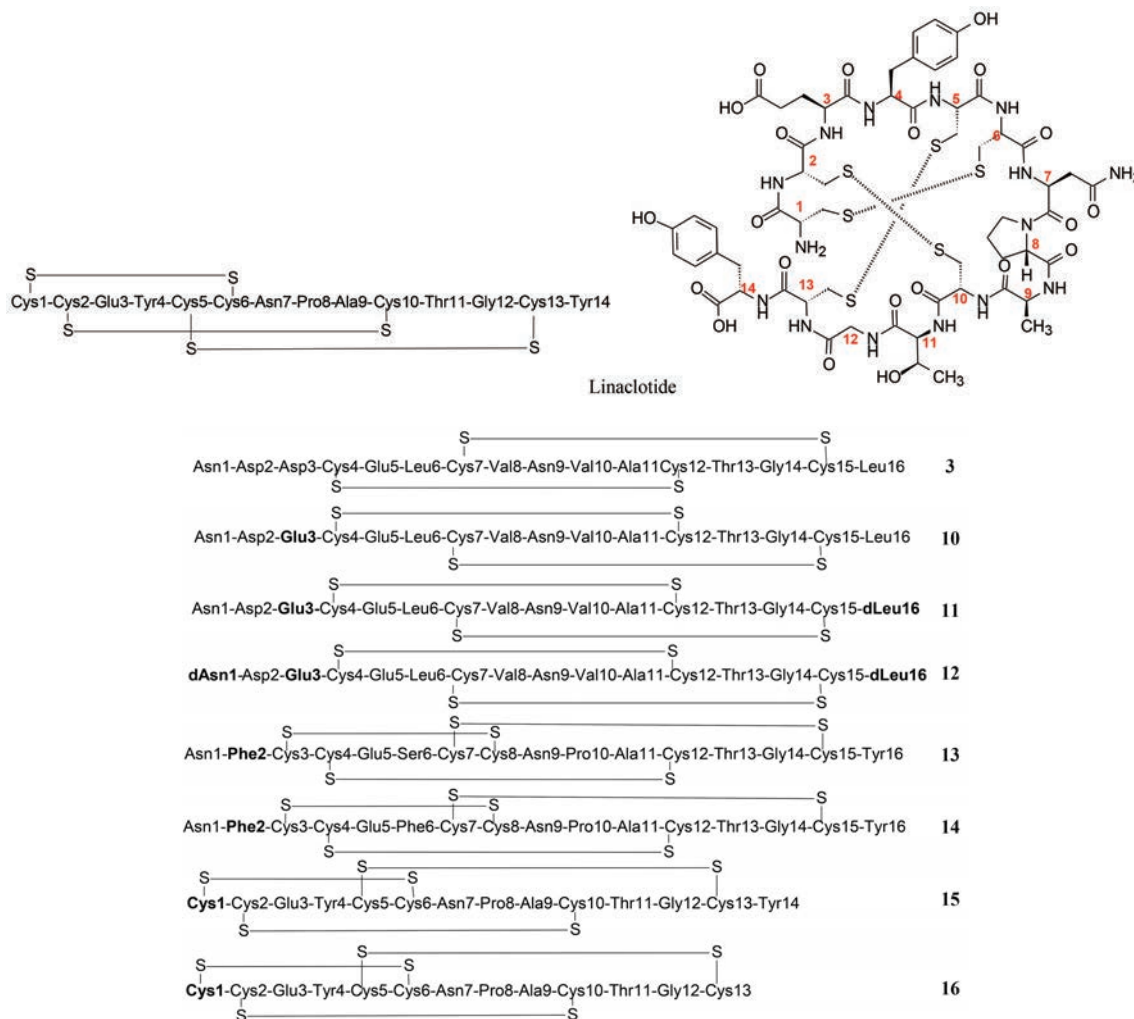
3 普卡那肽 (plecanatide)

3.1 以尿鸟苷素为先导物 尿鸟苷素是内源性的配

体,与上节所述的外源性肠毒素 ST_b 都是小肠黏膜细胞上的受体 GC-C 的激动剂,通过活化胞内 GC 的催化域,导致细胞内 cGMP 升高,促进了氯离子和碳酸氢根分泌,降低肠道对水分的吸收,引起软便稀便。有控制地利用这个作用,可研究治疗慢性便秘的药物。

3.2 肽化合物库的合成 在美国专利 US 20140155575 (Bai JC, Zhang, RP, Jian J, et al. Process of preparing guanylate cyclase C agonists) 公布了用固相合成方法对鸟尿苷素进行结构变换和修饰,合成了 249 个类似物,包括从 N 端或 C 端截去一个或两个氨基酸合成了少数十二~十五肽,多数是十六肽,在不同位置变换一个或两个氨基酸,在 N 或 C 端残基或用 D 构型氨基酸,或在端基用聚乙二醇修饰。

体外评价肽目标物对 GC-C 的激动作用,发现 N 端第 3 个氨基酸 Asp3 变换成 Glu3,活性和稳定性提高,因而合成的多数肽都是 Glu3 残基。权利要求中突出保护了 7 个活性肽 **10~16**,其中 5 个是十六肽,十四肽和十三肽各一个。分析这些肽的结构特征,要点如下:① 结构中含有 4 个或 6 个半胱氨酸,分别形成两对



或三对分子内二硫键。② N端的 Asp3 多被 Glu3 置换,提示该位置的酸性氨基酸是必要的,该位置 Glu 似乎优于 Asp。③ N端第一个半胱氨酸之前的氨基酸残基还可以换成 *d*Asn 或减少或没有(第一个为半胱氨酸)。④ 无论是4个或是6个半胱氨酸,两端 Cys 之间都是相隔11或12个氨基酸残基,而且序列相同。

3.3 候选化合物和普卡那肽上市 化合物 **10** 的体外和体内活性强于其他多肽,与 GC-C 的结合常数 $K_i = 0.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{EC}_{50} = 1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 动物灌胃给药显著促进肠运动和分泌,而血液中检测不到原形药和代谢物,即使口服治疗量的15倍,血液中也未发现检出量,提示口服不吸收入血循环,因而是局部激动作用。普卡那肽可被肠道的酶降解,C端的 Leu16 被裂解掉,生成十五肽,该代谢物仍具有活性 (Shailubhai K, Comiskey S, Foss JA, et al. Plecanatide, an oral guanylate cyclase c agonist acting locally in the gastrointestinal tract, is safe and well-tolerated in single doses. *Dig Dis Sci*, 2013, 58: 2580-2586)。

化合物 **10** 与尿鸟苷肽 (**3**) 都是十六肽,除用 Glu3 替换 Asp3 外,其他氨基酸序列完全相同。贯彻了对天然配体最小改变的策略(侧链只增加了 CH_2 , 相对分子质量多14)。遂确定 **10** 为候选化合物,进入开发阶段,定名为普卡那肽 (plecanatide), 经三期临床研究,证明是口服治疗慢性特发性便秘患者有效药物,于2017年经美国 FDA 批准上市。

