

提高多肽体内稳定性的有效策略

何佳彧¹, 梁菊^{1*}, 宣茂松¹, 吴文澜²

(河南科技大学 1. 化工与制药学院, 2. 医学院, 河南 洛阳 471023)

摘要: 多肽在基因/药物递送和疾病靶向治疗领域应用广泛, 但天然多肽在体内容易被蛋白酶水解, 半衰期短。很多研究致力于对多肽结构进行一定程度的改造或修饰, 希望能够提高多肽的递送和治疗效果。本文总结了近几年文献报道中关于多肽稳定性的研究报道, 根据多肽结构改造方式的不同进行文献分类, 介绍了各种结构改造和修饰方法对提高多肽的体内循环稳定性和半衰期的作用, 有针对性地分析了影响体内多肽稳定性的相关因素, 以期对多肽的进一步体内研究和应用提供数据和理论参考。

关键词: 多肽; 稳定性; 半衰期; 环肽; D-型氨基酸

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)01-0025-08

Effective strategies for improving the stability of peptides *in vivo*

HE Jia-yu¹, LIANG Ju^{1*}, XUAN Mao-song¹, WU Wen-lan²

(1. Chemical Engineering and Pharmaceutics School, 2. Medical School, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

Abstract: Peptides have been extensively used in the fields of gene/drug delivery and disease targeting therapy. However, natural peptides are sensitive to protease digestion with short circulatory half-lives *in vivo*. Many studies on structural modifications of peptides have been reported to improve the delivery or therapeutic effect. In this review we focus on the recent literature on peptide stability in accordance with different structural modifications and summarize the methods and influential factors that are involved in the improvement of stability and half-life *in vivo*. This review will provide the scientific basis and theoretical references for further investigations and applications *in vivo*.

Key words: peptide; stability; half-life; cyclic peptide; D-amino acid

多肽作为新型的治疗分子和优良的药物载体, 近年来被广泛应用到癌症治疗、肿瘤成像和免疫治疗等多个领域^[1]。作为基因/药物载体, 多肽具有低毒性、低免疫原性、高的组织渗透性和容易合成及修饰等优点^[2]。但由于多肽容易被多种蛋白酶所降解, 并且具有很高的血液、肾脏清除率, 导致其体内稳定性差, 在实际应用中存在许多局限性^[3,4]。因此, 研究者尝试多种方法来提高多肽在生物体内参与循环的稳定性。本

论文旨在总结目前提高多肽稳定性的方法, 以期对多肽的应用提供参考。

1 多肽结构的改造

多肽之所以在生物体内不稳定, 是因为其特殊的分子结构。多肽主链上容易发生脱酰胺反应, 特别是位于分子表面的酰胺基团容易被蛋白酶识别和水解。侧链上氨基酸残基容易发生构象变化, 例如 α -螺旋的解离和盐桥的断裂等。这些因素都导致多肽在体内不能长期稳定存在。为了解决多肽在结构上的不稳定性, 许多研究者致力于对多肽的结构进行改造^[5]。这些改造主要思路是降低多肽结构参与降解反应的活泼性, 例如将多肽首尾相连或侧链与侧链相连形成环肽,

收稿日期: 2019-08-29; 修回日期: 2019-09-30.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (51403055); 国家自然科学基金联合基金项目 (U1704150).

*通讯作者 Tel: 13838467989, E-mail: liangju@haust.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0696

将天然的 *L*-型氨基酸替换为蛋白酶不容易识别的 *D*-型氨基酸, 改变多肽中氨基酸的序列等。

1.1 形成环肽 与直链肽相比, 环肽具有更好的结构稳定性。通过二硫键将多肽首尾相连形成环肽或者利用半胱氨酸形成分子内小环, 使肽链失去游离的氨基和羧基, 避免被特异性识别端基氨基和羧基的蛋白酶降解。而且, 成环的多肽分子内会形成二硫键或者盐桥, 这些相互作用会进一步提高多肽的稳定性。Bogdanowich-Knipp 等^[6]对比了直链 RGD 与环状 RGD 的稳定性发现, 天冬氨酸是 RGD 肽的降解位点, 其侧链容易与肽链的 C-端或 N-端发生分子内反应。当 RGD 为线性时分子柔性较大导致参与反应的两个原子之间距离较短, 容易发生降解反应。当 RGD 成环以后, 分子结构的刚性得到增强, 使得参与反应的原子之间的距离增大, 不能发生降解反应。另一个使环状 RGD 稳定性增加的原因是精氨酸中的胍基与天冬氨酸的羧基之间形成了盐桥, 盐桥的存在也可以防止天冬氨酸的侧链参与降解反应。直链 RGD 与环状 RGD 的结构如图 1 所示。

Gomesin 是一种由 18 个氨基酸组成的肽链, 其序列为 ZCRRLCYKQRCVTYCRGR, 其中, Z 为焦谷氨酸。该肽链具有抗肿瘤、抗病原微生物、抗真菌、抗利什曼原虫和抗疟疾作用。为了改善 Gomesin 在胃蛋白酶中的稳定性, Chan 等^[7]将 Gomesin 中处于 N-末端的焦谷氨酸用甘氨酸替代, 然后将 Gomesin 首尾相连形成环肽。研究发现环肽折叠时半胱氨酸之间生成了二硫键使多肽结构更加稳定, 环化的 Gomesin 对 HaLa 细胞的毒性增加 3 倍, 并且抗疟原虫和抗菌活性都有显著提高。

Hymenochirin-1B 是一种具有 α -螺旋结构的多肽, 具有广泛的生物活性, 如抗病原微生物、抗癌、免疫调节和抗糖尿病活性。天然 α -螺旋线性肽通常不能保持其预期的构象和与预期靶标的结合能力。Li 等^[8]利用钌催化的烯烃复分解的方法共价连接两个氨基酸的侧链使多肽形成分子内小环, 达到了使多肽 hymenochirin-1B

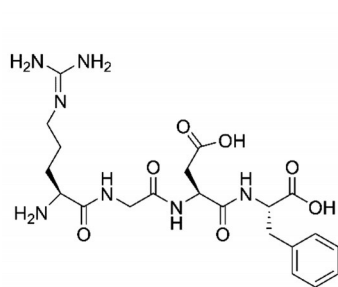


Figure 1 Molecular structures of linear RGD and cyclic RGD

稳定的目的。研究者共合成了 10 种 hymenochirin-1B 肽类似物, 在胰蛋白酶环境中检测其稳定性。结果发现所有含有环形肽的序列显示出比 hymenochirin-1B 原序列更好的蛋白酶稳定性, 其中, H-10 的蛋白酶抗性最好, 半衰期为 3.5 h, 并且 H-10 显示出更好的肿瘤细胞抑制活性。hymenochirin-1B 和 H-10 的序列如图 2 所示。



Figure 2 Sequence of hymenochirin-1B and H-10 [S₅ = (S)-*N*-Fmoc-2-(4'-pentenyl)alanine]

多肽分子内或分子间的二硫键、 α -螺旋和疏水缔合作用对于多肽的蛋白酶稳定性具有非常重要的影响。Chen 等^[9]尝试将多肽中距离相等的两个位置引入半胱氨酸, 通过两个二硫键将两条 α -螺旋肽中相对应的半胱氨酸平行或反平行连接, 成为一个 α -螺旋二聚体 (图 3)。这种结构不仅能够将多肽维持在 α -螺旋构象, 并且可以调节 α -螺旋二聚体之间的疏水相互作用。研究者使用胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶检测多肽的稳定性。结果发现所有单体肽在 0.02 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶中被快速降解, 半衰期为 0.1~1 h。研究者们增加了蛋白酶浓度, 发现即使在 7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白酶浓度中 2 h, 7=7 二聚体仍然保持活性。整体来说 6=6、7=7 和 8=8 三个二聚体的稳定性都得到了明显的改善。

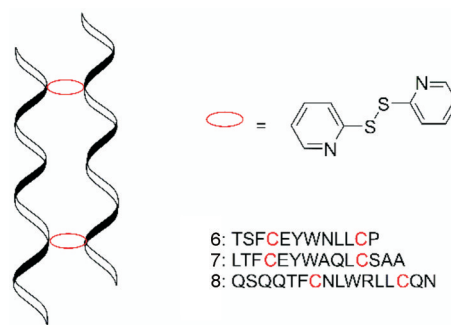
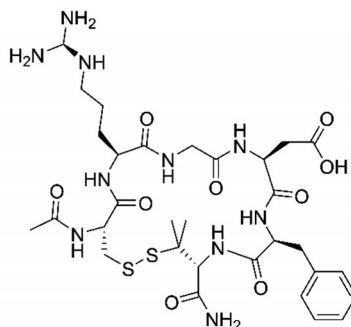


Figure 3 Structure of alpha-helical dimer and the sequence of peptides (No. 6, 7, 8)



有趣的是, 本研究并没有观察到肽链的 α -螺旋构象与稳定性之间存在关系。但是发现7=7和8=8的二聚体的水溶性明显增加, 也许是由于肽链的疏水性残基被掩埋在两条肽链之间的界面处导致的。由此可以推断, 疏水相互作用对二聚体在蛋白酶中的稳定性具有重要作用。研究者进一步探讨了7=7具有如此优异的稳定性的原因。观察到反平行7=7分子二聚时, 容易被胰凝乳蛋白酶识别的苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)3个裂解位点位于二硫键同侧, 也就是二聚体的内侧, 规避了胰凝乳蛋白酶的降解。

1.2 使用D-型氨基酸 由于体内蛋白酶所能识别的氨基酸为天然的L-型氨基酸, 所以研究者们尝试用D-型氨基酸来替代多肽链中的L-型氨基酸^[10]。有些研究者仅将多肽链的C端和N端的氨基酸用D-型氨基酸替代, 而有的则将多肽链中所有氨基酸改变为D-型氨基酸。Tugyi等^[11]选取MUC2黏蛋白中的一段抗原决定簇(¹⁵TPTPTGTQTPT²⁵), 分别将C端和N端3个氨基酸替换为D-型氨基酸或者将两端3个氨基酸同时替换为D-型氨基酸, 研究它们在人血清中的稳定性。结果发现N端替换成D-型氨基酸(Pep2和Pep3)后对多肽的稳定性具有很大提升。如Pep2, 在10%和50%血清中的降解率分别为16%和45%。在N和C末端同时具有3个D-型氨基酸的肽链即使在50%人血清中96h后也是稳定的。其中Pep4和Pep5这两条肽链既具有很高的蛋白酶稳定性, 又具有很好的特异性识别抗体的能力。¹⁵TPTPTGTQTPT²⁵的两端替换情况如表1所示。

另有研究发现, 由天然L-型氨基酸组成的七肽GICP(SSQPFWS)对在胶质瘤细胞中高表达的VAV3蛋白具有高亲和力。由于其独特的氨基酸序列, 不能对其进行D-型氨基酸取代, 但是将其与D-型肽相连可以

改善肽的蛋白酶稳定性。^DA7R(^DR^DP^DP^DL^DW^DT^DA)是血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2)和神经纤毛蛋白-1(NRP-1)的配体。Zhang等^[12]设计将GICP与^DA7R通过几个甘氨酸相连形成多肽结合体DA7R-GICP(^DR^DP^DP^DL^DW^DT^DAGGGCGGGSSQPFWS)。通过对比GICP、^DA7R和^DA7R-GICP三种肽, 发现^DA7R-GICP是一种既不影响两种肽各自的结合位点又能改善其蛋白酶稳定性的靶向肽。

1.3 改变多肽中单个或多个氨基酸 多肽链主链与主链之间、侧链与侧链之间主要靠静电作用维系结构稳定, 可以通过替换掉其中几个氨基酸来增强多肽链之间的静电作用。Chen等^[13]将裂解肽PTP-7中部分或所有赖氨酸替换为组氨酸, 合成了4种肽, 分别是PTP-7(FLGALFKALSKLL)、PTP-7a(FLGALFHLSKLL)、PTP-7b(FLGALFKALSHLL)和PTP-7c(FLGALFHALSHLL)。研究发现将两个赖氨酸全部替换为组氨酸的PTP-7c肽在100%人血清中的半衰期最长, 为11h。与PTP-7相比, 所有含组氨酸的肽对正常细胞的毒性显著降低。含有组氨酸的肽PTP-7a和PTP-7b对癌细胞保持了良好活性。可以推测组氨酸的存在对于改善肽的稳定性以及降低肽的细胞毒性起到了关键作用。

将多肽的N-端和C-端进行结构改造可以躲避氨肽酶和羧肽酶的识别。Seebach等^[14]对神经降压素(NT)的两端进行了同系化改变。将多肽N-端和C-端分别插入一个-CH₂基团, 将 α -氨基酸替换为 β -氨基酸, 并且改变两端氨基酸中心碳原子的(R)/(S)构型。研究发现, 其中一个NT类似物(H-(S)- β -hR-RPYI- β ³hL-OH)在人血清中显示出独特的、优异稳定性, 可以在人血清中保持7天的生物活性。NT和NT类似物的分子结构如图4所示。

Table 1 Amino acid residue substitution at terminals of TPTPTGTQTPT peptide

Peptide	C-terminal	N-terminal	N- and C-terminal
Pep1	TPTPTGTQ ^D T ^D P ^D T		
Pep2		^D T ^D P ^D TPTPTGTQTPT	
Pep3			^D T ^D P ^D TPTPTGTQ ^D T ^D P ^D T
Pep4			^D TPTPTGTQT ^D P ^D T
Pep5			^D T ^D P ^D TPTPTGTQ ^D T ^D P ^D T

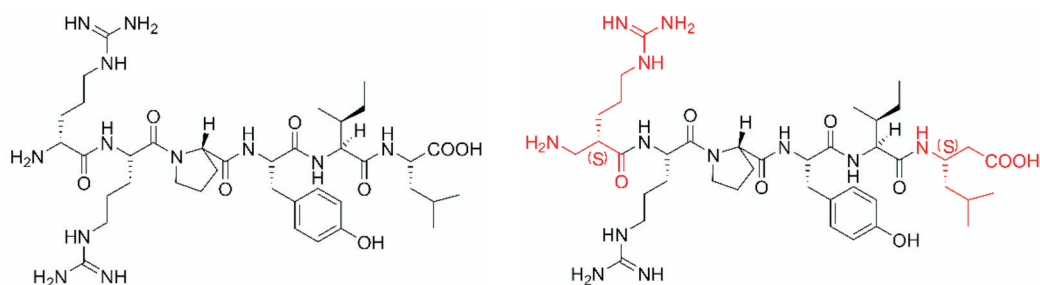


Figure 4 Molecular structures of NT and NT analogues

CTT 肽 (CTTHWGFTLC) 是一种明胶酶抑制肽, 研究发现 CTT 肽具有特异性靶向肿瘤的能力^[15]。Björklund 等^[16]利用丙氨酸逐个替换 CTT 肽中氨基酸残基来寻找影响明胶酶抑制活性的关键残基, 发现色氨酸对于明胶酶抑制活性至关重要。用色氨酸类似物 5-羟色氨酸、5F-色氨酸和 6F-色氨酸来替代色氨酸。结果发现, 5F-CTT 在血清中半衰期为 3 h, 显示出比天然 CTT 高出 6 倍的血清稳定性。同时, 5F-CTT 还具有更加优良的抑制肿瘤细胞迁移的能力。5F-CTT 在血清中更稳定可能是由于疏水性氟原子引起的肽的聚集使其构象变得更紧凑。色氨酸及其类似物的分子结构如图 5 所示。

2 多肽两端进行修饰

将多肽两端进行修饰是保护多肽免于蛋白酶降解的有效策略。将多肽两端进行脂肪链修饰, 由于疏水作用的增加, 可以增强多肽的结构稳定性。用 PEG 来修饰多肽, 则可以让多肽达到隐形的目的。将多肽与无机化合物结合并自组装成纳米粒子则可以隐藏多肽的 C-端和 N-端, 从而具有抗氨肽酶和羧肽酶降解的作用。

2.1 对多肽进行疏水修饰 胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 是治疗 II 型糖尿病的一种有效激素, 但在生理条件下容易被代谢酶如二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 和中性内肽酶 (NEP) 快速灭活^[17,18]。近年来, 研究者们致力于开发长效 GLP-1 衍生物。Han 等^[19]首先将半胱氨酸引入第 8 位上含有甘氨酸的 GLP-1 (7-36)-NH₂ (HGEGT-FTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR) 中, 然后将带有马来酰亚胺的多条脂肪链与半胱氨酸的巯基相连, 生成多个脂肪链修饰的多肽衍生物。研究发现, 37 °C 时, G₈-GLP-1 (7-36)-NH₂ 在大鼠血浆中的半衰期仅有约 0.5 h。多数衍生物的半衰期都有所增加。实验进一步发现脂肪链的长度与半衰期有密切关系。同样条件下, C8 脂肪链的半衰期为 5.9 h, C12 脂肪链为 24 h, C16 脂肪链为 45.4 h。研究者分析体外稳定性实验和白蛋白结合实验后得出 G₈-GLP-1 (7-36)-NH₂ 衍生物的体外稳定性与其白蛋白结合能力有关, 推测脂肪链

促进了多肽衍生物与血清白蛋白之间的非共价结合, 提高了多肽的稳定性。

抗菌肽 (antimicrobial peptide, AMP) 作为新型抗肿瘤药物具有重要价值, 该多肽具有很高的细胞特异性和对肿瘤细胞抗多药耐药 (multiple drug resistance, MDR) 的特性。将脂肪酸与 AMP 结合可以增加多肽的疏水性, 使多肽的螺旋结构更稳定, 并且有助于提高多肽的抗菌活性。B1 (VKRFKKFFRKLKKS) 属于 AMP 的一种, 具有对抗 MCF-7 乳腺癌和 K562 白血病细胞系的活性, 对正常细胞系 GES-1 的毒性低。Deng 等^[20]将脂肪酸与 B1 相连后设计出了 B1-C16 和 B1-GG-C16 两种脂肪酸缀合肽。对比 3 种肽的稳定性发现, 与 B1 相比, B1-C16 和 B1-GG-C16 在血清中的半衰期明显得到改善, 分别为 3 h 和 3.5 h。B1-C16 和 B1-GG-C16 显示出比 B1 更好的抗肿瘤活性, 对正常细胞的毒性更小。此外, 缀合肽不仅保持了对 MDR 细胞的敏感性, 并且还表现出对 MDR 细胞的逆转活性。

构建肽纳米颗粒是提高多肽生物利用度的有效方法^[21]。C16Y (DFKLFVYIKYR) 是一种整合素靶向肽。Ding 等^[22]将 C16Y 设计为两亲性嵌合肽 DEAP-C16Y。DEAP-C16Y 的疏水端由 4 个功能性 DEAP (3-二乙氨基丙基异硫氰酸酯) 疏水分子和 8 个亮氨酸残基组成, 利用 3 个赖氨酸提供与 DEAP 连接的伯氨基, C16Y 作为亲水端, 其两端连接甘氨酸来消除末端电荷。DEAP-C16Y 的结构如图 6 所示。在生理 pH 条件下, DEAP-C16Y 可以组装成纳米胶束。在肿瘤部位 pH 值约 6.8 时, 胶束结构解离释放出 C16Y 肽。DEAP-C16Y 胶束比游离的 C16Y 肽具有更好的抑制血管生成、肿瘤生长和转移的作用, 原因可能是疏水性的 DEAP 与亮氨酸出现在 C16Y 肽的 N-端, 增强了 C16Y 肽的稳定性。

RWR (RGDWR) 是一种新型的抗血栓肽, 在体外非常容易被蛋白酶降解, 半衰期短。Yang 等^[23]在 RWR 的 N-端连接 ω -氨基辛酸, 得到 ω RWR (H₂N(CH₂)₇-CO-RGDWR)。研究发现, 在大鼠血浆中 4 h 后, RWR 的浓

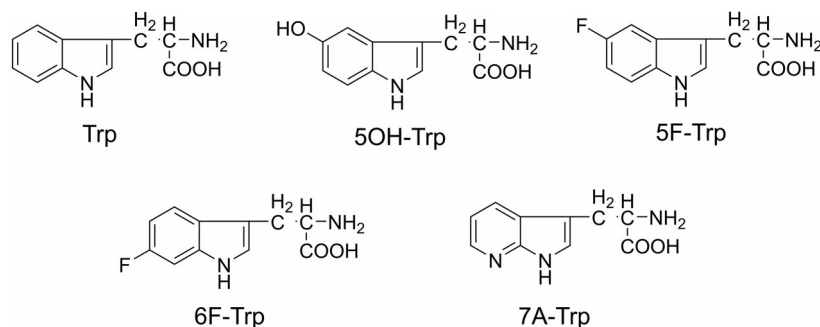


Figure 5 Molecular structures of Trp and Trp analogues

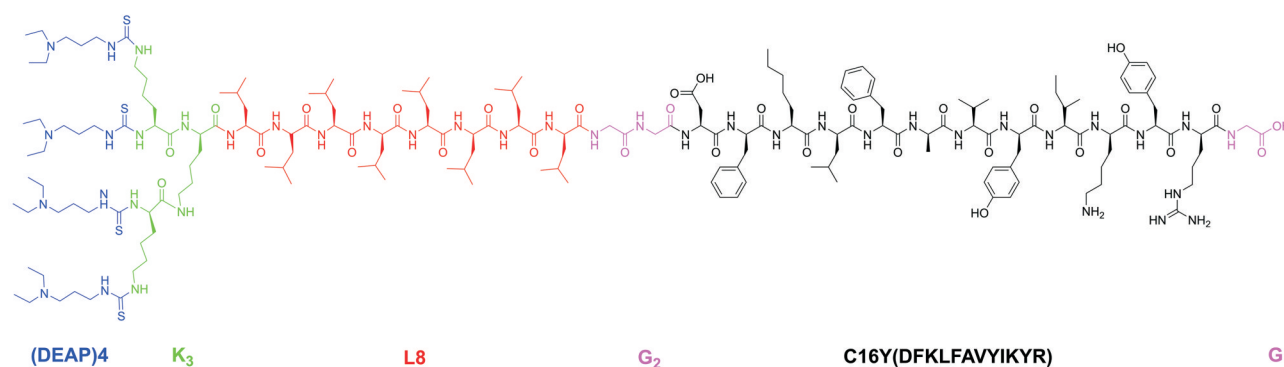


Figure 6 Molecular structure of DEAP-C16Y

度降低了32%至48%, ω RWR的浓度变化仅在6.2%以内。连接 ω -氨基辛酸后的小分子肽可以避免被氨肽酶识别和降解,并且不影响其抗血小板聚集活性。

2.2 对多肽进行亲水修饰 肿瘤相关巨噬细胞(TAM)是辅助癌症治疗的潜在靶标,因为它们可以促进癌细胞增殖、血管生成和转移中具有重要的作用。M2巨噬细胞属于TAM的一种。巨噬细胞靶向肽(M2pep)可以与M2细胞特异性结合,但由于M2pep的水溶性差,不易在体内发挥效力。为了提高M2pep在体内的稳定性,Ngambenjwong等^[24]将M2pep连接到一种聚合物上。该聚合物主要由N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺(HPMA)和N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺(APMA)组成。HPMA具有较好的亲水性和生物相容性,而APMA的作用主要是提供可以与多肽相结合的氨基。研究者将3种M2pep肽类似物与聚合物连接,分别形成M2pep-SH、(Ac)M2pep(RY)-SH和DFBP-cyclized M2pep(RY)-Alkyne。研究后发现,与聚合物相结合后,多肽在血清中即使是24 h后也保持稳定,而3种游离肽类似物在相同时间内活性减半。特别是将环化的M2pep(RY)与聚合物相结合后既保留了靶向性,又增强了多肽在体内的稳定性。

R_8 (RRRRRRRR)是典型的细胞穿膜肽,它可以介导药物、核酸和高分子纳米颗粒等进入细胞。但由于 R_8 序列是由带正电荷的氨基酸构成,导致其容易与血浆蛋白结合,稳定性差^[25]。Zhang等^[26]将 R_8 与PEG相连,PEG可以屏蔽 R_8 上的正电荷,防止其与血浆蛋白结合,提高了 R_8 的稳定性,使其可以顺利到达特定部位。Cheng等^[27]将KLAK肽与PEG相连,保护多肽免于酶降解。Wu等^[28]通过PEG将穿膜肽 R_8 /环状RGD与磷脂DSPE相连,然后嵌入负载麦角甾醇(ERG)和顺铂(DDP)的脂质体上。研究发现RGD/ R_8 -DDP/ERG-LIP在体内的半衰期达到24 h。稳定性如此好的原因可能是PEG屏蔽了穿膜肽 R_8 的正电荷,而且环状RGD不容易被蛋白酶识别。

3 生物大分子对多肽的修饰

与其他蛋白质相比,血浆中的白蛋白和IgG的半衰期相对较长,因此将多肽与这些蛋白结合后能够延长多肽的半衰期。Tian等^[29]设计将两个白蛋白连接形成一个空腔,再将GLP-1激动剂exendin-4肽与空腔部分连接形成白蛋白-多肽-白蛋白的夹心结构。Exendin-4肽含有一个精氨酸和两个赖氨酸残基,它们是胰蛋白酶的切割位点,这样的结构可以保护多肽免于酶促降解。研究者使用Evans Blue(EB)衍生物作为连接两个白蛋白和多肽的枢纽,设计了两种缀合物N(tEB)₂-exendin-4和NtEB-exendin-4。胰蛋白酶消化研究结果显示,10 min后exendin-4-白蛋白复合物完全被降解,即使是50 min后,N(tEB)₂-exendin-4-白蛋白复合物仍然有70%的保留。Osborn等^[30]将人血清白蛋白与干扰素- α (IFN- α)连接来改善IFN- α 的药代动力学。未修饰的IFN- α 在人体中的半衰期为2~3 h。人血清白蛋白修饰的IFN- α 半衰期延长18倍。

有研究发现,当GLP-1与免疫球蛋白的Fc结构域融合时,GLP-1的血浆半衰期将大大延长^[31]。因此,Glaesner等^[32]开发了具有增强的药代动力学和活性的GLP-1免疫球蛋白G(IgG4)Fc融合蛋白。测其在动物体内的半衰期得出GLP-1-Fc融合蛋白在大鼠体内半衰期约为1.5天,在食蟹猴体内半衰期约为2天。而游离GLP-1肽在体内的半衰期一般只有几分钟。

4 对多肽进行物理包裹

除了对多肽本身进行修饰,还可以使用高分子物质包裹多肽,在多肽与蛋白酶之间形成屏障从而保护其免于蛋白酶切割。Qu等^[33]设计了一种纳米级药物传递系统,用于口服递送GLP-1。其策略是将肽附着在固体纳米颗粒二氧化硅上,然后再用pH敏感聚合物丙烯酸树脂包裹(SPN-GLP-1)。当pH为7.4时GLP-1释放了80%,而当pH为1.0时GLP-1也只有30%左右的释放,因此pH敏感丙烯酸树脂很好的保护了GLP-1在胃等酸性条件下的稳定性。在肠酶稳定性方面,研

研究者将游离 GLP-1 和 SPN-GLP-1 与肠液混合。由于存在高浓度的消化酶和刷状缘肽酶, GLP-1 迅速降解, 半衰期为 (2 ± 0.02) min, 即使在第 4 min, SPN-GLP-1 还有 70% 完整的 GLP-1。Zhao 等^[34]的策略是使用具有自组装活性的疏水蛋白将 GLP-1 分子包裹在自组装腔内, 从而防止 GLP-1 被蛋白酶降解。疏水蛋白包裹 GLP-1 的过程如图 7 所示。为了研究疏水蛋白形成的壳是否保护 GLP-1 免受蛋白酶降解, 研究者向雄性大鼠皮下注射 pPIC 9-hgfl/GLP-1 和 pPIC-hgfl E24K/GLP-1 两种复合物, 在不同的时间节点取静脉血测 GLP-1 含量。4 h 后, 游离 GLP-1 组检测不到完整 GLP-1 的存在。96 h 后, pPIC 9-hgfl/GLP-1 组仍能检测到 GLP-1 存在, 但 pPIC-hgfl E24K/GLP-1 组未检测到。这些数据表明, pPIC 9-hgfl/GLP-1 复合物能够显著延长大鼠体内 GLP-1 的半衰期。

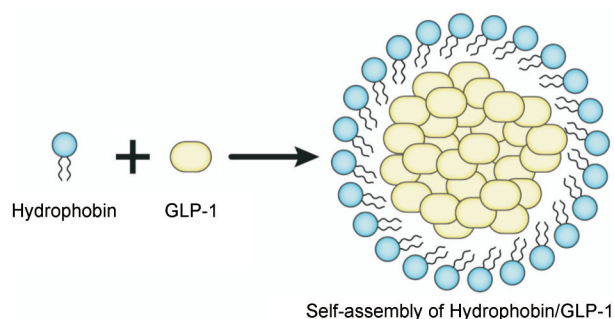


Figure 7 Composite process between GLP-1 and hydrophobin

GB 病毒 C (GBV-C) 中的 E1 片段被发现可以抑制 HIV 的复制, 因此研究者使用 E1 来开发对抗 HIV-1 的新策略。然而 E1 与其他肽一样, 也存在口服生物利用度低、半衰期短和清除率快等缺点。Ariza-Sáenz 等^[35]使用双乳液法制备一种 W/O/W 的载药体系, 将 E1 封装在内部, 以达到提高 E1 的血清稳定性的目的。油相载体为聚 (*D, L*-乳酸-乙醇酸共聚物) (PLGA), 最外层水相载体为乙二醇壳聚糖 (GC)。研究者对比了 E1 和 E1NPs 在血清中的稳定性得出, 游离的 E1 肽的半衰期约为 8 h, 然而, 对于包裹在 NP 中的 E1 肽, 观察到增强

的稳定性, 半衰期延长至 24 h。分析原因得出, 与肽从体系中缓慢释放有关。Wang 等^[36]则设计了一种 W/O/O 体系, 外层油相为硅油, 内层油相为 PLGA, 将艾塞那肽包封在中间。比较了艾塞那肽组和艾塞那肽微球组的血浆药物浓度后发现, 艾塞那肽组在药物注射后 0.75 h 后浓度达到最大值, 随后在 2 h 后消失。而艾塞那肽微球组血浆药物能持续 30 天。将多肽包封在微囊内部可以避免多肽暴露在血浆环境中, 同时控制多肽的释放, 从而达到长效的目的。

5 多种修饰联合使用

联合使用多种方法对多肽结构进行改造, 不仅可以改善多肽的稳定性, 而且可以增强多肽的细胞结合能力、抗肿瘤能力以及克服血脑屏障的能力。

M2 肽 (YEQDPWGVKWWYGGGSKK (K-Biotin)) 可以在 CT-26 结肠癌模型中成功的靶向 M2 巨噬细胞。但是, M2 肽的血清稳定性差, 这限制了 M2 肽在体内的作用。研究者发现, M2 肽血清稳定性差主要是因为其肽链 N 末端的溶解性切割和 W10/W11 和 S16/K17 位点的内切裂解。Ngambenjwong 等^[37]对 M2 肽进行 N-末端乙酰化、*D*-氨基酸取代和环化等改变后, 合成了一种 M2 肽的衍生物 Cyclic-M2pep (RY)Biotin 肽 (CGYEQDPWGVRYWYGC^DK^DK^DK (K-Biotin))。此肽通过将 M2 肽进行环化来消除 N-末端的切割, 将末端 3 个赖氨酸替换为 *D*-型氨基酸, 改善了 S16/K17 位点处的血清稳定性。改造后的 M2 肽在血清中即使是 48 h 后仍可被检测到, 显示出非常好的血清蛋白酶稳定性, 并且与受体结合的能力也得到了很好的改善。

CTT2 肽是参与肿瘤血管生成和迁移的明胶酶和基质金属蛋白酶 MMP-9 和 MMP-2 的选择性抑制剂。由于 MMP-9 和 MMP-2 几乎只存在于肿瘤血管生成中并起着重要作用, 所以这些蛋白酶是肿瘤靶向药的靶标^[15,38]。Haikola 等^[39]将环状 CTT2 肽的 N-端与聚乙二醇 (PEG) 化的脂链羧基端相连, 形成一个两亲性的结构 DSPE-PEG (3400)-CTT2^[40], 其分子结构式如图 8 所示。DSPE-PEG (3400)-CTT2 的半衰期得到了明显改善。

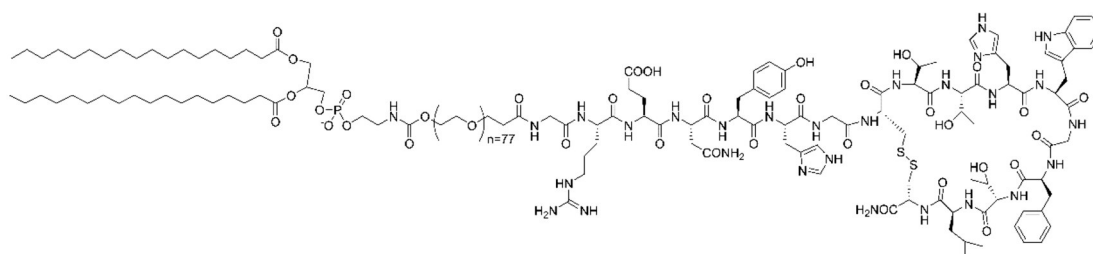


Figure 8 Molecular structure of DSPE-PEG (3400)-CTT2

^DCDX 是能够绕过血脑屏障 (BBB) 的尼古丁乙酰胆碱受体 (nAChRs) 的 D-肽配体, ^DA7R 是血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR-2) 和神经毡蛋白-1 (NRP-1) 在血管生成中过表达的 D-肽配体。D-型氨基酸组成的多肽 ^DCDX 相较于 CDX 在蛋白酶中具有明显的稳定性^[2,41]。Ying 等^[42]将 ^DCDX 和 ^DA7R 和 PEG 相连, 然后再与 DSPE 连接形成两亲性单体, 将该单体嵌入脂质体中。研究发现, 脂质体在体内的稳定性得到了改善, 并且成功绕过了血脑屏障 (BBB) 和血脑肿瘤屏障 (BBTB)。该课题组还研究了 CDX、^DCDX 和 c(RGDyK) 的血清稳定性, 发现 L-型多肽在血清蛋白中的半衰期只有约 0.25 h, D-型 CDX 和 c(RGDyK) 即使在 24 h 后依然保持 90% 以上的活性。

YSV 是一种通过阻断细胞周期和抑制组蛋白去乙酰化酶活性的具有抗癌作用的小短肽^[43,44]。Ren 等^[45]将 YSV 与 D-型氨基酸结合并自组装成纳米纤维。通过对比 G^DF^DF^DYGYYSV (D-YSV) 和 GFFYGYYSV (L-YSV) 水凝胶的稳定性以及抗肿瘤能力等发现, 在蛋白酶 K 溶液中, 游离的 YSV 小肽在 0.5 h 后完全降解, GFFYGYYSV (L-YSV) 虽然比游离的 YSV 稳定性稍好, 但在 4 h 后也被完全降解。而 G^DF^DF^DYGYYSV (D-YSV) 即使是在 24 h 后仍然保持初始结构, 表现出了极好的稳定性。

6 展望与发展

多肽作为治疗分子和药物/基因载体, 在多个领域备受关注。但是由于多肽的不稳定性, 许多应用受到限制。目前, 对多肽进行结构改造是提高其稳定性的有效手段。然而, 对多肽进行结构改造也存在一些困难, 例如非天然氨基酸取代和环化在合成上很费力或是难以实施。另一个实际的问题是, 如果只考虑多肽稳定性方面的因素, 容易忽视多肽生物活性方面的影响, 所以需要在改善多肽稳定性的同时保留或提高多肽的生理活性, 这就对结构改造提出了更高的要求。作者认为根据每种肽的特点, 选择合适的改造或修饰方法可能是目前比较可靠、比较理想的策略。

References

- [1] Sarkar S, Bhatt N, Ha YS, et al. High *in vivo* stability of (64)Cu-labeled cross-bridged chelators is a crucial factor in improved tumor imaging of RGD peptide conjugates [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 385-395.
- [2] Wei XL, Zhan CY, Shen Q, et al. A D-peptide ligand of nicotine acetylcholine receptors for brain-targeted drug delivery [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 3023-3027.
- [3] Nischan N, Chakrabarti A, Serwa RA, et al. Stabilization of peptides for intracellular applications by phosphoramidate-linked polyethylene glycol chains [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 11920-11924.
- [4] Ruttekkolk IR, Witsenburg JJ, Glauner H, et al. The intracellular pharmacokinetics of terminally capped peptides [J]. *Mol Pharm*, 2012, 9: 1077-1086.
- [5] Gao DM, Liu JF, Wang FS. Advances in research on structural stability of peptide drugs [J]. *Chin Med Biotechnol*, 2007, 2: 380-382.
- [6] Bogdanowich-Knipp SJ, Jois DS, Siahaan TJ. The effect of conformation on the solution stability of linear vs. cyclic RGD peptides [J]. *J Peptide Res*, 1999, 53: 523-529.
- [7] Chan LY, Zhang VM, Huang YH, et al. Cyclization of the antimicrobial peptide gomesin with native chemical ligation: influences on stability and bioactivity [J]. *ChemBiochem*, 2013, 14: 617-624.
- [8] Li YL, Wu MH, Chang Q, et al. Stapling strategy enables improvement of antitumor activity and proteolytic stability of host-defense peptide hymenochirin-1B [J]. *RSC Adv*, 2018, 8: 22268-22275.
- [9] Chen YQ, Yang CQ, Li T, et al. The interplay of disulfide bonds, alpha-helicity, and hydrophobic interactions leads to ultrahigh proteolytic stability of peptides [J]. *Biomacromolecules*, 2015, 16: 2347-2355.
- [10] Kim JW, Kim TD, Hong BS, et al. A serum-stable branched dimeric anti-VEGF peptide blocks tumor growth via anti-angiogenic activity [J]. *Exp Mol Med*, 2010, 42: 514-523.
- [11] Tugyi R, Uray K, Ivan D, et al. Partial D-amino acid substitution: improved enzymatic stability and preserved Ab recognition of a MUC2 epitope peptide [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 413-418.
- [12] Zhang MF, Lu WY. Enhanced glioma-targeting and stability of (L)GICP peptide coupled with stabilized peptide (D)A7R [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 106-115.
- [13] Chen L, Tu ZG, Voloshchuk N, et al. Lytic peptides with improved stability and selectivity designed for cancer treatment [J]. *J Pharm Sci*, 2012, 101: 1508-1517.
- [14] Seebach D, Lukaszuk A, Patora-Komisarska K, et al. On the terminal homologation of physiologically active peptides as a means of increasing stability in human serum-neurotensin, opiorphin, B27-KK10 epitope, NPY [J]. *Chem Biodiv*, 2011, 8: 711-739.
- [15] Koivunen E, Arap W, Valtanen H, et al. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 768-774.
- [16] Björklund M, Valtanen H, Savilahti H, et al. Use of intein-directed peptide biosynthesis to improve serum stability and bioactivity of a gelatinase inhibitory peptide [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2003, 6: 29-35.
- [17] Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE. Dipeptidylpeptidase-IV hydrolyzes gastric-inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1 (7-36) amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum [J]. *Eur J Biochem*, 1993, 214:

- 829-835.
- [18] HupeSodmann K, Goke R, Goke B, et al. Endoproteolysis of glucagon-like peptide (GLP)-1(7-36) amide by ectopeptidases in RINm5F cells [J]. *Peptides*, 1997, 18: 625-632.
- [19] Han J, Huang X, Sun LD, et al. Novel fatty chain-modified glucagon-like peptide-1 conjugates with enhanced stability and prolonged *in vivo* activity [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86: 297-308.
- [20] Deng X, Qiu QQ, Ma K, et al. Aliphatic acid-conjugated antimicrobial peptides-potential agents with anti-tumor, multidrug resistance-reversing activity and enhanced stability [J]. *Org Biomol Chem*, 2015, 13: 7673-7680.
- [21] Qiao ZY, Lin YX, Lai WJ, et al. A general strategy for facile synthesis and *in situ* screening of self-assembled polymer-peptide nanomaterials [J]. *Adv Mater*, 2016, 28: 1859-1867.
- [22] Ding YP, Ji TJ, Zhao Y, et al. Improvement of stability and efficacy of C16Y therapeutic peptide *via* molecular self-assembly into tumor-responsive nanoformulation [J]. *Mol Cancer Ther*, 2015, 14: 2390-2400.
- [23] Yang L, Zhang L, Yan L, et al. Stability assessment of a new antithrombotic small peptide, Arg-Gly-Asp-Trp-Arg (RGDWR), and its derivative [J]. *Biotechnol Lett*, 2017, 39: 1183-1190.
- [24] Ngambenjawong C, Pun SH. Multivalent polymers displaying M2 macrophage-targeting peptides improve target binding avidity and serum stability [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2017, 3: 2050-2053.
- [25] Tang J, Fu H, Kuang QF, et al. Liposomes co-modified with cholesterol anchored cleavable PEG and octaarginines for tumor targeted drug delivery [J]. *J Drug Target*, 2014, 22: 313-326.
- [26] Zhang L, Wang Y, Gao H, et al. The construction of cell-penetrating peptide R8 and pH sensitive cleavable polyethylene glycols co-modified liposomes [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5: 760-766.
- [27] Cheng DB, Yang PP, Cong Y, et al. One-pot synthesis of pH-responsive hyperbranched polymer-peptide conjugates with enhanced stability and loading efficiency for combined cancer therapy [J]. *Polym Chem*, 2017, 8: 2462-2471.
- [28] Wu MJ, Huang T, Wang J, et al. Antitumor effect of ergosterol and cisplatin-loaded liposomes modified with cyclic arginine-glycine-aspartic acid and octa-arginine peptides [J]. *Medicine*, 2018, 97: e11916.
- [29] Tian R, Zhu SJ, Zeng Q, et al. An albumin sandwich enhances *in vivo* circulation and stability of metabolically labile peptides [J]. *Bioconjug Chem*, 2019, 30: 1711-1723.
- [30] Osborn BL, Olsen HS, Nardelli B, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 303: 540-548.
- [31] Picha KM, Cunningham MR, Drucker DJ, et al. Protein engineering strategies for sustained glucagon-like peptide-1 receptor-dependent control of glucose homeostasis [J]. *Diabetes*, 2008, 57: 1926-1934.
- [32] Glaesner W, Vick AM, Millican R, et al. Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2010, 26: 287-296.
- [33] Qu W, Li Y, Hovgaard L, et al. A silica-based pH-sensitive nanomatrix system improves the oral absorption and efficacy of incretin hormone glucagon-like peptide-1 [J]. *Int J Nanomed*, 2012, 7: 4983-4994.
- [34] Zhao LQ, Xu HJ, Li Y, et al. Novel application of hydrophobin in medical science: a drug carrier for improving serum stability [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 9.
- [35] Ariza-Sáenz M, Espina M, Calpena A, et al. Design, characterization, and biopharmaceutical behavior of nanoparticles loaded with an HIV-1 fusion inhibitor peptide [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15: 5005-5018.
- [36] Wang YT, Sun T, Zhang Y, et al. Exenatide loaded PLGA microspheres for long-acting antidiabetic therapy: preparation, characterization, pharmacokinetics and pharmacodynamics [J]. *RSC Adv*, 2016, 6: 37452-37462.
- [37] Ngambenjawong C, Gustafson HH, Pineda JM, et al. Serum stability and affinity optimization of an M2 macrophage-targeting peptide (M2pep) [J]. *Theranostics*, 2016, 6: 1403-1414.
- [38] Medina OP, Soderlund T, Laakkonen LJ, et al. Binding of novel peptide inhibitors of type IV collagenases to phospholipid membranes and use in liposome targeting to tumor cells *in vitro* [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 3978-3985.
- [39] Haikola M, Hirvonen J, Medina OP, et al. Stability and CMC determinations of amphiphilic (DSPE-PEG(3400)-CTT2) peptide constructs by microtensometry [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2011, 21: 183-188.
- [40] De Cuyper M, Lievens S, Flo G, et al. Receptor-mediated biological responses are prolonged using hydrophobized ligands [J]. *Biosens Bioelectron*, 2004, 20: 1157-1164.
- [41] Zhan CY, Li C, Wei XL, et al. Toxins and derivatives in molecular pharmaceuticals: drug delivery and targeted therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 90: 101-118.
- [42] Ying M, Zhan CY, Wang SL, et al. Liposome-based systemic glioma-targeted drug delivery enabled by All-D peptides [J]. *ACS Appl Mater Interf*, 2016, 8: 29977-29985.
- [43] Zheng M, Lu R, Che XC, et al. Tyroservatide therapy for tumor growth, invasion and metastasis of Lewis lung carcinoma and human lung carcinoma A549 [J]. *Oncology*, 2006, 70: 418-426.
- [44] Huang YT, Zhao L, Fu Z, et al. Therapeutic effects of tyroservatide on metastasis of lung cancer and its mechanism affecting integrin-focal adhesion kinase signal transduction [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10: 649-663.
- [45] Ren CH, Gao Y, Liu JJ, et al. Anticancer supramolecular hydrogel of D/L-peptide with enhanced stability and bioactivity [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14: 1125-1134.