

先导化合物结构优化策略 (七) —— 肽类分子结构修饰与改造

彭晶晶^{1,2}, 王江^{1,2}, 戴文豪¹, 谢雄^{1,2}, 柳红^{1,2*}

(1. 中国科学院上海药物研究所, 新药研究国家重点实验室, 上海 201203; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 多肽分子大多为天然的内源性配体, 与受体的亲和力强, 选择性好, 是一类比较容易成为先导化合物及药物的分子。许多药物都是从多肽分子进行结构优化改造而得, 如降压药物卡托普利、抗丙肝药物特拉匹韦等。目前多肽分子开发面临的主要问题包括稳定性差、半衰期短、血浆清除率高等成药性缺陷; 通常只能注射使用, 患者的依从性较差; 生产工艺复杂, 生产成本较高。因此, 对多肽分子进行合理的修饰和改造既可以降低肽类分子的生产成本, 又可以改善肽类分子的成药性。本文从改善肽类分子成药性的角度综述了肽类分子结构修饰与改造策略, 根据是否对肽链骨架进行修饰, 将修饰策略分为两类: 一类是针对肽链骨架的改造, 包括非天然氨基酸修饰、伪肽化策略、逆肽策略、环化策略、末端结构修饰等; 另一类是在多肽骨架不变的基础上, 引入其他基团进行结构优化和性能改造, 包括高级脂肪酸修饰、聚乙二醇修饰、蛋白融合策略、胆固醇修饰等。

关键词: 多肽; 结构改造; 药物设计; 先导化合物

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)03-0427-19

Lead compound optimization strategy (7) —— modification strategies for peptides

PENG Jing-jing^{1,2}, WANG Jiang^{1,2}, DAI Wen-hao¹, XIE Xiong^{1,2}, LIU Hong^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Most peptides have high binding affinity and good selectivity for endogenous receptors and are good lead compounds to develop into drugs. Many approved drugs are derived from the structural optimization of peptide molecules, such as the antihypertensive drug captopril and the anti-hepatitis C drug telaprevir. At present, the main problems in the development of peptide drugs include poor stability, short half-life, and high plasma clearance rate; lack of oral availability and poor patient compliance, a complex production process, and high production cost. Therefore, rational modification of peptides can not only reduce the production cost, but also improve the druggability of the peptides. Here we review structural modification strategies for peptides from the perspective of improving their physicochemical properties. These modification strategies are divided into two parts: one is modification of the peptide backbone, including unnatural amino acid modification, pseudopeptide strategy, inverse-peptide strategy, cyclization strategy, and terminal structure modification. Another is modification of the side chains of peptides, including fatty acid conjugation, polyethylene glycol conjugation, protein fusion strategy, and cholesterol conjugation.

Key words: peptide; structure optimization; drug design; lead compound

收稿日期: 2019-11-06; 修回日期: 2019-12-04.

基金项目: 国际(地区)合作与交流基金资助项目(81620108027).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-50807042, E-mail: hliu@simm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0877

多肽是由各种氨基酸分子之间脱水形成肽键相连的有机物, 其分子质量在 1~10 kDa, 介于小分子和生物大分子之间。存在于体内的诸多信号分子都属于肽或蛋白质, 疾病的发生发展离不开这些肽或蛋白质。

就目前已知的活性肽而言, 大部分都是由机体分泌或代谢转化而来。因此, 按照活性肽的来源可以将肽分为两类: 第一类是来源于生物体本身的蛋白质及活性肽, 称为内源性活性肽。内源性活性肽在体内含量少、分布广、效应极强。第二类是来源于动植物的活性多肽以及抗生素等, 称为外源性活性肽。外源性活性肽作用强、分布广泛。内源性活性肽和外源性活性肽构成的多肽库为药物研发提供了新颖的结构骨架, 许多上市药物都源自多肽化合物的发现。

但是经典的多肽结构对体内蛋白酶的稳定性较差, 进入体内很快会被降解; 此外, 大多生物活性肽生物利用度比较差, 无法口服, 需要通过改变剂型进而研发获取适合的给药途径。基于以上这些因素, 需要对活性肽进行结构修饰与化学改造^[1]。活性肽改造的目的多种多样, 主要包括提高活性肽与受体的亲和力及选择性; 增强多肽分子的药代稳定性, 降低活性肽在体内的降解或者减少活性肽在体内的消除; 提高活性肽的透膜能力; 改善疏水肽的水溶性等。本文针对不同改造目的总结归纳了肽类分子结构修饰改造策略, 根据是否对肽链骨架进行修饰, 将这些修饰策略分为两类: 一类是针对肽链骨架的改造, 包括非天然氨基酸修饰、伪肽化策略、逆肽策略、环化策略、末端结构修饰等; 另一类是在多肽骨架不变的基础上, 引入其他基团进行结构优化和性能改造, 包括高级脂肪酸修饰、聚乙二醇修饰、蛋白融合策略、胆固醇修饰等。通过综合运用这些先导化合物结构修饰策略, 能够显著提高多肽类化合物的成药性, 为开发多肽类创新药物提供理论指导和实践经验。

1 提高肽类分子活性

药物的化学结构与药理活性之间的关系一直都是药物化学领域的重要研究内容。活性是化合物开发成药物的前提, 多肽也是如此。部分天然肽类分子或人工合成的肽生物活性差, 需要通过化学修饰提高肽类分子与受体的亲和力, 改善肽的活性。提高肽类分子活性的主要方法包括末端结构修饰、拼接策略、环化策略、非天然氨基酸修饰、伪肽策略以及胆固醇修饰等。

1.1 肽链骨架改造

对肽链骨架进行修饰和改造以提高肽类分子活性的主要方法包括末端结构修饰、拼接策略、环化策略、非天然氨基酸修饰、伪肽策略等。

1.1.1 N-Cap 结构修饰 N端裸露和C端裸露的多肽容易受到肽链外切酶的识别, 从而被切割降解失去活性。而将N末端和C末端进行结构修饰, 一方面可以提高肽类分子的代谢稳定性, 另一方面可以保持甚至提高肽类分子的活性。Stoermer等^[2]报道了三肽

(KKR序列) 醛类化合物作为西尼罗病毒 (west Nile virus, WNV) 蛋白酶抑制剂; 尹正课题组报道了三肽 (KRR序列) 醛类化合物作为登革热病毒 (Dengue virus, DENV) 蛋白酶抑制剂, 并且相较于其他四肽醛类化合物活性显著提高^[3]。基于此类研究报道, Andreas等^[4]认为不同氨基末端结构修饰的三肽醛类化合物对活性有不同影响, 因此他们对N端Cap区进行考察, 得到不同酰基化修饰的三肽醛类化合物, 并且发现不同酰基化修饰对化合物的抗病毒活性有较大影响(表1)^[4], 可以看出N端苯乙酰基修饰的三肽醛**2**对登革热病毒和西尼罗病毒都有较好的抑制活性, 而N端4-苯基苯乙酰基修饰的三肽醛**11**相比于**2**对西尼罗病毒的抑制活性提高近7倍。这一点表明氨基末端的结构修饰对肽类化合物的活性有一定影响, 可以作为肽类化合物改造的一种策略。

Table 1 N-cap structure modification to affect anti-viral activity against viral protease^[4]

Compd.	Peptide inhibitor	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	
		DENV2	WNV
1	Benzoyl-n-K-R-R-H	9.5 ± 0.21	2.6 ± 0.02
2	Phenylacetyl-K-R-R-H	6.7 ± 1.1	0.39 ± 0.21
3	Phenylacetyl-K-K-R-H	167 ± 47	0.70 ± 0.04
4	4-Aminobenzoyl-K-R-R-H	201 ± 33	22.4 ± 4.6
5	4-Aminobenzoyl-K-K-R-H	>300	33.5 ± 0.62
6	Acetyl-K-R-R-H	58 ± 7.2	2.4 ± 0.02
7	Acetyl-K-K-R-H	115 ± 23	0.97 ± 0.64
8	Propionyl-K-R-R-H	218 ± 18	8.5 ± 0.40
9	Propionyl-K-K-R-H	>300	0.85 ± 0.11
10	4-Phenylphenylacetyl-K-R-R-H	23.4 ± 1.4	0.99 ± 0.04
11	4-Phenylphenylacetyl-K-K-R-H	12.2 ± 0.38	0.056 ± 0.004
12	4-Aminophenylacetyl-K-R-R-H	11.2 ± 0.28	1.9 ± 0.03
13	2-Naphthoyl-K-R-R-H	26.7 ± 0.11	1.8 ± 0.03
14	Cinnamoyl-K-R-R-H	15.8 ± 4.5	1.4 ± 0.11
15	Phenylpropionyl-K-R-R-H	>300	19.7 ± 1.29
16	Benzoyl-K-K-R-H	127 ± 2.1	0.42 ± 0.18
17	Cyclopropionyl-K-K-R-H	172 ± 10	0.38 ± 0.02
18	Trifluoroacetyl-K-K-R-H	274 ± 27	1.8 ± 0.21

1.1.2 C-末端结构修饰 与氨基末端结构修饰相对应, 羧基末端结构修饰在肽类分子的修饰改造也具有广泛应用, C-末端结构修饰策略成功地在各类病毒蛋白酶抑制剂的结构改造中使用。丙肝病毒NS3/4A蛋白酶是一种丝氨酸蛋白酶, 目前大部分丝氨酸蛋白酶抑制剂都含有亲电基团, 与催化三联体的丝氨酸羟基形成共价键。研究人员从十肽底物出发经过肽链的简化以及羧基末端结构修饰得到活性肽醛**19**, 其对HCV NS3/4A蛋白酶的结合常数为12 μmol·L⁻¹, 但醛基的化学和代谢稳定性较差。因此, 研究人员对醛基末端进行结构修饰, 以α-卤代酮、杂代酮、α-二酮和α-酮酰胺替换醛基, 得到的酮酰胺化合物**20**对丝氨酸蛋白酶NS3/4A的结合常数提高了12倍。分析酮酰胺**20**与丝氨酸

蛋白酶的相互作用(图1), 研究人员发现酮酰胺结构既可以与139位丝氨酸形成共价结合, 又可以与附近的137位谷氨酸和138位丝氨酸残基形成氢键作用, 增强了化合物与NS3/4A蛋白酶的结合, 因而其抗病毒活性提高^[5]。

EV71 3C蛋白酶是一种半胱氨酸蛋白酶。尹正等^[6]发现了对EV71病毒具有较好抑制活性的肽醛分子**21** ($EC_{50} = 0.11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 考虑到醛基的稳定性较差, 成药性质不佳。他们在进一步的结构修饰中, 针对醛基进行结构优化, 得到羟基氰类化合物**22**, 该化合物对EV71的活性为 $0.056 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过分子对接, 分析化合物**22**与EV71 3C蛋白酶的相互作用, 分子对接结果表明(图2), 相比于醛基, 羟基氰结构中的氰基与146位谷氨酰胺和24位谷氨酸通过水分子形成氢键, 增强了化合物与EV71 3C蛋白酶的结合, 因而活性得以提高^[6,7]。

1.1.3 拼接策略 在肽类化合物的改造中, 往往需要对不同位点同时进行优化和改造, 拼接策略是一个高效的结构优化方法。首先, 分别对N端和C端结构修饰改造得到活性较优的化合物, 然后将优势片段进行

拼接, 即可快速获得活性更高的化合物。拟肽化合物**23**是一个登革热病毒蛋白酶抑制剂, 其抑制活性 IC_{50} 为 $13.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在对该化合物改造的过程中, 研究人员就采用了分别优化N端和C端的研究策略。在N端结构改造中, 研究人员发现肽类分子**24**, 即N端Cap结构修饰的化合物, 活性提升, 其 IC_{50} 达到 $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在C端侧链改造过程中研究人员也发现将正丁基侧链替换为苯基得到化合物**25**, 同样可以提高化合物对登革热病毒的抑制活性, 活性提升近4倍。考虑到这两个修饰策略都可以提高化合物的活性, 研究人员将两个优势片段组合拼接, 得到化合物**26**, 其对登革热病毒的抑制活性为 $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 活性提高了近20倍(图3)^[8]。

1.1.4 环化策略 许多情况下, 直链肽的分子柔性造成构象发生变化, 使其与受体结合的程度及选择性下降。此外, 生物体内的氨肽酶及羧肽酶也易于从直链肽两个端基逐步切割肽链, 使之降解。因此肽链的环化改造, 使其构象限定是改善肽类分子生物稳定性、提高生物活性的重要结构改造策略^[9]。研究表明, 从直链肽改为环肽后, 许多化合物的生物活性提高十几倍至几万倍。许多具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、免疫调节等

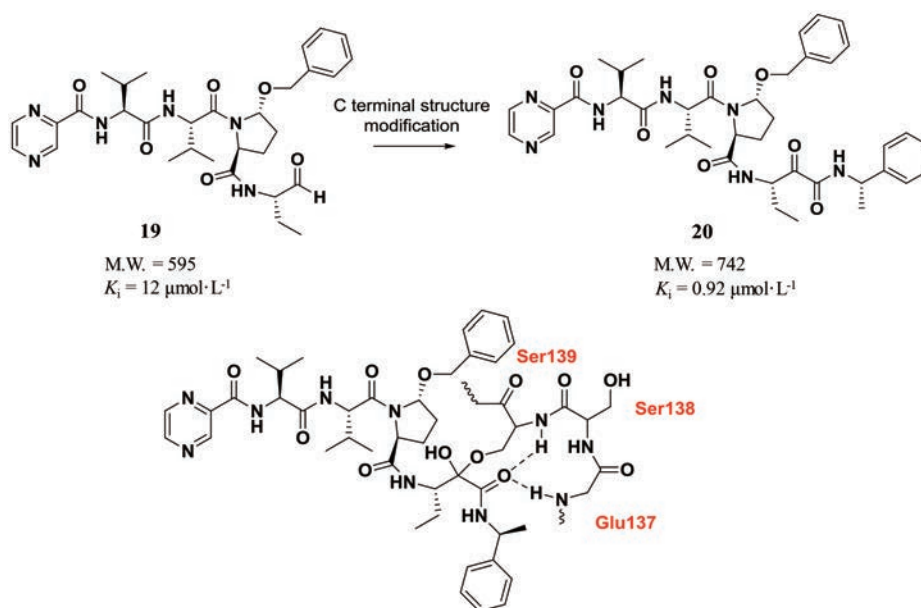


Figure 1 C-terminal structure modification to improve activity against serine protease

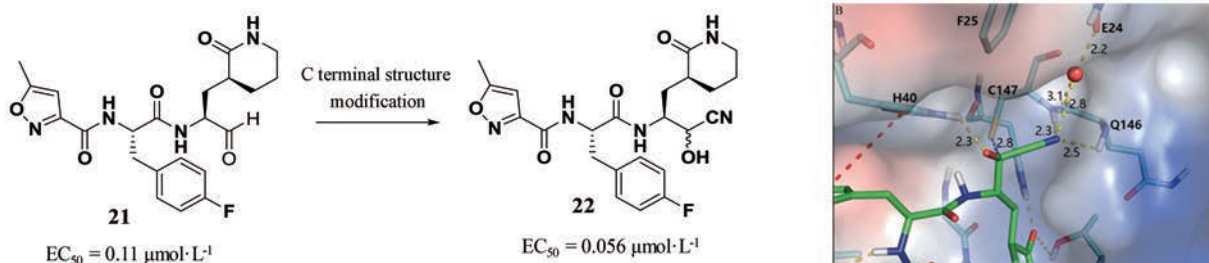


Figure 2 C-terminal structure modification to improve activity against EV71 3C protease. Figure derived from Zhai Y, et al^[6]

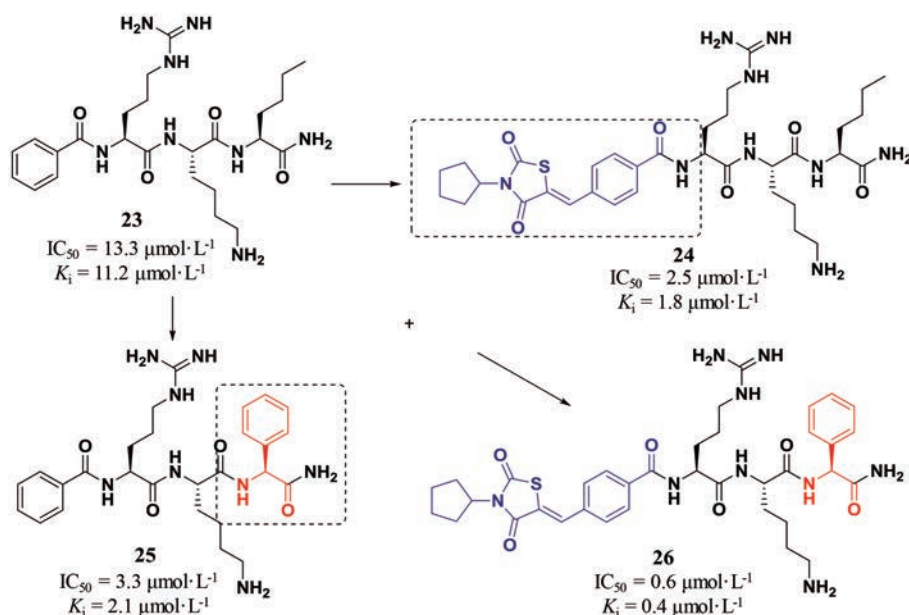


Figure 3 Splicing strategy to improve DENV inhibitory activity

活性的天然产物肽往往含有不同类型的主链环化结构。因此, 环化策略是多肽结构修饰改造的一个重要策略。

线性八肽化合物 **27** 对登革热病毒 NS2B-NS3 蛋白酶有较弱的结合活性 ($K_i = 42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。Xu 等^[10]推测线性肽结合活性较差的原因可能是线性肽占用的空间较大, 无法与蛋白酶有效地结合; 而用环肽则可以改变线性肽所占用的空间, 提高化合物对 NS2B-NS3 蛋白酶的结合活性。他们设计合成了系列环肽结构, 并且对这类环肽的结合活性进行测试。发现环肽 **28** 的构象使得其可以较好地与登革热病毒 NS2B-NS3 蛋白酶结合, 相较于线性肽活性提高近 20 倍, K_i 值达到 $2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 4)。

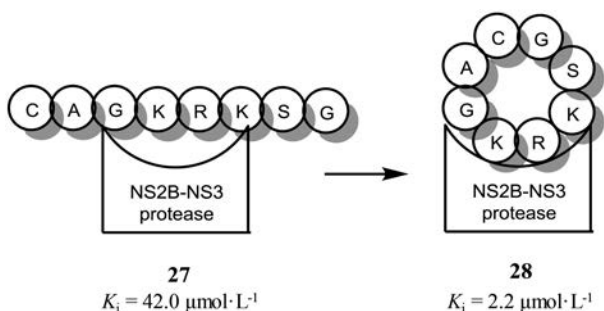


Figure 4 Cyclization strategy to improve activity against NS2B-NS3 protease. Figure derived from Xu SQ, et al^[10]

除了首尾相连的大环化策略, 局部环化往往能够局限定环化区域的肽类化合物构象, 稳定肽类化合物与受体的相互作用, 提高肽类化合物的活性。信号传导及转录激活因子 STAT3 是一种直接将细胞外受体的信号传递至核内的转录因子。STAT3 的持续激活

会促进细胞增殖从而形成肿瘤并且抑制肿瘤细胞凋亡^[11-13]。美国密歇根大学王少萌等^[14]早期发现 gp130 pYLPQTV 肽 **29** 与 STAT3 受体有较强的亲和力。研究表明, gp130 磷酸肽中的苏氨酸和缬氨酸可以被苄胺替代而不改变肽和 STAT3 之间的结合活性, 因此, 研究人员切断苏氨酸和缬氨酸并用苄胺封闭碳端, 得到了截断磷酸肽 **30**, **30** 与 STAT3 受体的结合力 K_i 为 $350 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过分子对接, 他们发现亮氨酸侧链异丁基和脯氨酸五元环可以并环形成双环内酰胺结构而不破坏肽 **30** β 转角的构象。因此, 采用局部环化策略, 他们设计合成了构象限制的双环内酰胺肽类化合物 **31**, 其与 STAT3 受体的结合力 K_i 为 $17 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 活性提高了近 20 倍。分子对接结果表明, 双环内酰胺结构可以很好保持 **30** 的 β 转角构象。为了验证 Cbz 保护基是否和肽 **31** 与 STAT3 受体结合相关, 他们将苄氧羰基替换为乙酰基, 得到的肽 **32** 与 STAT3 受体的结合力 K_i 值为 $15 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 与肽 **31** 活性相当, 说明 Cbz 并非活性必须。随后, 他们评价了肽 **32** 对两种含有高磷酸化 STAT3 受体的人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 的抑制活性, 但 **32** 在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平下对这两种肿瘤细胞并没有表现出抑制活性, 可能是磷酸肽的极性太大, 无法通过细胞膜。为了增强 **32** 对肿瘤细胞的抑制活性, 他们将高级脂肪酸引入磷酸肽的氮端, 得到了脂肪酸修饰的磷酸肽 **33**, **33** 与 STAT3 受体的结合力 K_i 值为 $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而且肽 **33** 对两种细胞的抑制活性 IC_{50} 分别为 25 和 $35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在细胞水平显示了一定的抑制活性, 也表明脂肪酸修饰可以改变肽类化合物的性质, 提高肽类化合物的透膜性 (图 5)^[15]。

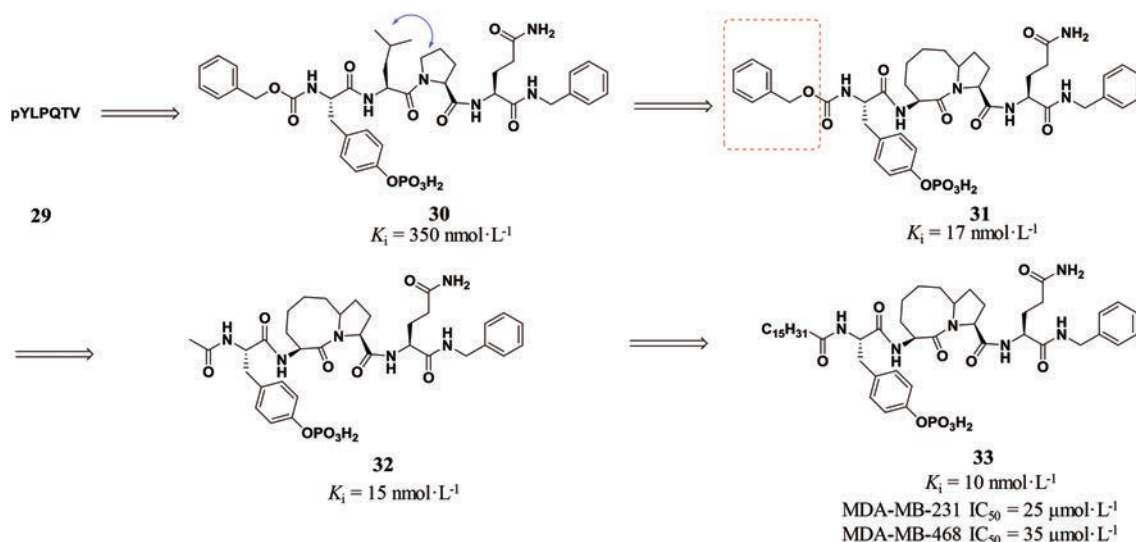


Figure 5 Partial cyclization strategy to improve peptide binding affinity with STAT3 receptor

1.1.5 非天然氨基酸修饰 卡托普利是第一个报道的血管紧张素转化酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 抑制剂, 1981 年被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准用于治疗高血压。临床研究表明, 卡托普利的巯基可能会引起患者皮疹和食欲减退等不良反应。为了解决这一问题, 研究人员研发新型 ACE 抑制剂作为降压药物。在卡托普利研发早期, 活性化合物 **34** 具有一定的 ACE 抑制活性, 其 IC_{50} 为 $4.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对 **34** 的亚甲基用氮原子进行生物电子等排, 得到二肽先导化合物 **35**, 其活性提高 1 倍^[16]。由于氮原子的引入, 化合物的亲水性有所增强; 为了平衡氮原子引起的亲水性增强, 研究人员尝试在氨基酸的 α 位引入烷基侧链平衡亲水性变化, 结果得到的化合物 **36** 活性进一步增强至 $0.09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。随后, 研究人员对 α 位烷基侧链进行了详细的构效关系考察, 最终确定苯乙基取代时, 活性最优^[17], 将羧基乙酯化开发获得前药依那普利 **37**, 依那

普利于 1985 年被美国 FDA 批准用于高血压和心力衰竭的治疗。**37** 对 ACE 的抑制活性相比于 **36** 活性提高了 74 倍, 表明非天然氨基酸的引入可以增强肽类分子的药理活性 (图 6)。

1.1.6 伪肽策略 伪肽则是通过模拟多肽水解的过渡态, 利用生物电子等排原理对易水解的酰胺键进行替换, 使多肽免于蛋白酶的水解切割从而保留甚至提高肽类化合物的药理活性。图 7 列出了一些伪肽的代表结构^[18]。

片段 **38** (羟基亚甲基) 是众多 HIV 蛋白酶抑制剂、肾素抑制剂和 β -分泌酶抑制剂^[19] 共有的结构片段。其基本的设计原理就是利用伪肽策略, 模拟酰胺键水解过程中的过渡态, 替换易水解的酰胺键。Szelke 等^[20] 通过在肾素底物 **42** 的亮氨酸-缬氨酸 (Leu-Val) 片段中采用羟基亚甲基替换酰胺键, 得到伪肽抑制剂 **43**, 对 HIV-1 蛋白酶抑制活性显著提高 (图 8), 其 IC_{50}

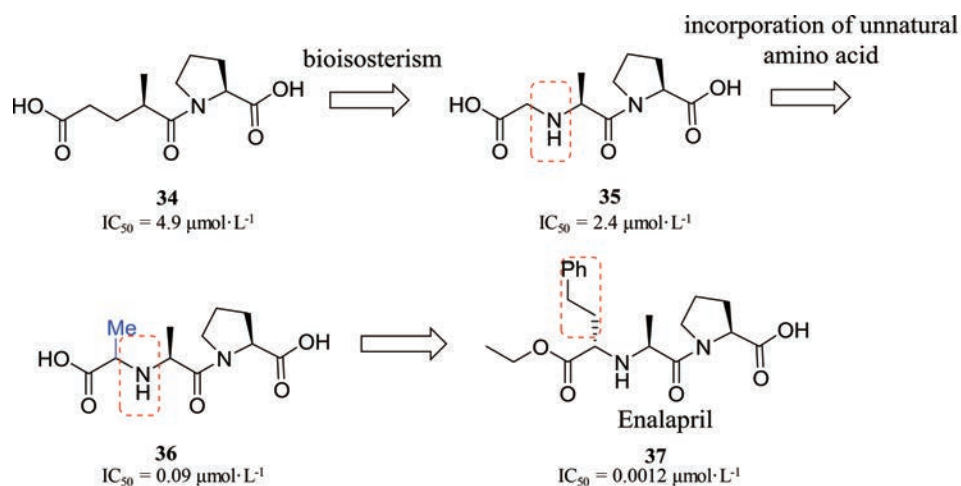


Figure 6 Introduction of unnatural amino acids to improve ACE inhibitory activity

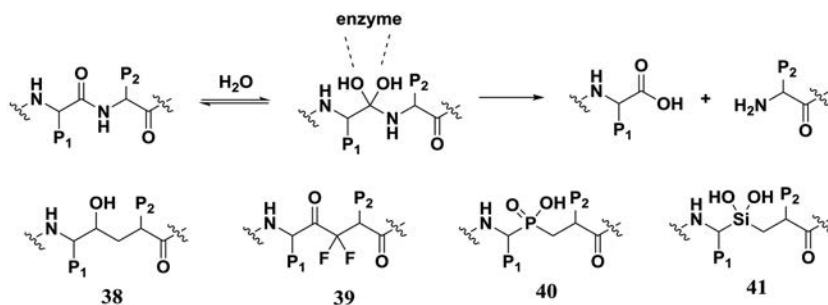


Figure 7 Representative structures of pseudopeptides

值为 $0.0007 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

其中缩硅酮片段 **41** 也有广泛应用, 由于碳原子和硅原子同属一个主族, 两个原子的性质十分相似, 而硅原子相比碳原子更倾向于 sp^3 杂化, 片段 **41** 不容易发生消除反应生成硅酮, 缩硅酮的稳定性要高于缩酮, 因此在设计和改造活性肽的时候引入 **41** 片段既可以增强与酶活性中心的相互作用, 又具有一定的化学稳定性, 在药物化学化合物设计中具有广泛应用 (图9)。片段 **41** 在很多活性肽类似物分子上显示出良好活性, 例如含有片段 **41** 的 ACE 抑制剂 **44**, 其对 ACE 酶的抑制活性达到了 $3.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 而含有片段 **41** 的 HIV 蛋白酶抑制剂 **45** 对蛋白酶的抑制活性也达到 $2.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 表明该类结构在活性肽结构改造中有重要意义^[21]。

1.2 外接基团修饰

外接基团修饰以提高肽类分子活性的主要方法是胆固醇修饰。

胆固醇修饰也是多肽类分子的重要结构修饰策略。胆固醇的引入常常可以在提高其在体内半衰期的同时增强多肽的药理活性。Wang 等^[22]用细胞-细胞融合实验评价多肽分子的抗病毒活性, 发现多肽 m4HR 具有一定抗 HIV-1 活性 ($\text{IC}_{50} = 36910 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

当在 m4HR C 末端外接胆固醇分子得到化合物 **46**, 其抗病毒活性提高 200 倍 ($\text{IC}_{50} = 57.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。进一步在 N 端修饰, 得到的肽类化合物对 HIV-1 的抑制活性进一步提升 (表 2)。其中活性最好的是肽类分子 **47**, 其 IC_{50} 达到 $8.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 该类化合物结构优化的实例进一步证明了胆固醇修饰在多肽药物活性优化的重要应用。

Table 2 Cholesterol conjugation to improve anti-viral activity against HIV-1

Compd.	Structure	$\text{IC}_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$
m4HR	Ac-IEELIKKSEELIKKIEQIKKQE ESIKK-NH ₂	36910 ± 2047
46	Ac-m4HR- β Ala-C(Chol)-NH ₂	57.2 ± 15.9
47	Aoc- β Ala-m4HR- β Ala-C(Chol)-NH ₂	8.3 ± 2.6
48	Noc- β Ala-m4HR- β Ala-C(Chol)-NH ₂	8.9 ± 1.8
49	Apc- β Ala-m4HR- β Ala-C(Chol)-NH ₂	17.0 ± 11.3
50	Npc- β Ala-m4HR- β Ala-C(Chol)-NH ₂	15.8 ± 0.9

2 增强多肽分子的药代稳定性

多肽的基本组成单元是氨基酸, 其本质与蛋白质相同, 因而多肽类分子是许多蛋白酶水解的底物, 而这一特点严重限制了多肽类药物的开发研究。一般而言, 大部分多肽类药物无法口服, 否则就会被胃蛋白酶

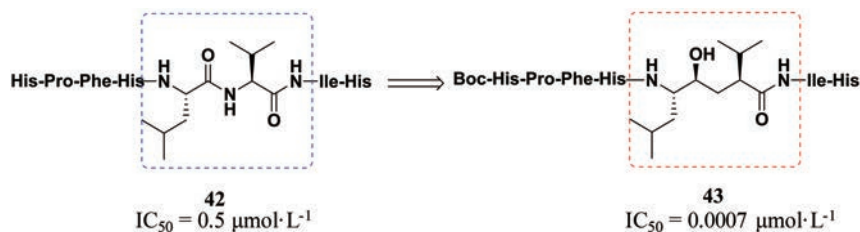


Figure 8 Pseudopeptide strategy to improve anti-HIV-1 protease activity

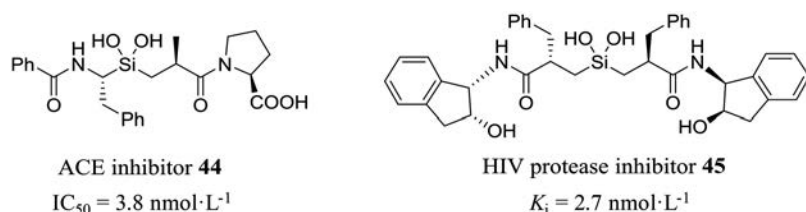


Figure 9 Representative silicon containing pseudopeptide inhibitors

以及胰蛋白酶等消化破坏;其次,即使通过注射给药,多肽类药物也有可能血液以及组织中被蛋白酶降解失活,因此多肽类药物的生物利用度很低,以至于多肽类分子在临床治疗中受到很大限制^[23]。为了减弱或避免蛋白酶对多肽类分子的降解,必须要利用化学方法或其他方法对多肽分子进行修饰改造,以提高多肽的代谢稳定性,为新药研发中解决多肽的代谢稳定性问题提供一些思路和参考。增强多肽分子代谢稳定性的主要方法包括非天然氨基酸修饰、伪肽化策略、逆肽策略、环化策略以及高级脂肪酸修饰、蛋白融合策略、聚乙二醇修饰等。

2.1 肽链骨架改造

对肽链骨架进行修饰和改造以增强多肽分子代谢稳定性的主要方法包括非天然氨基酸修饰、伪肽化策略、逆肽策略、环化策略等。

2.1.1 非天然氨基酸修饰

天然活性肽的组成常常都是天然氨基酸。天然活性肽容易受到体内蛋白酶降解,从而降低其在体内的半衰期,导致天然活性肽在体内发挥药效时间缩短,不利于成药。 β 氨基酸作为非天然氨基酸,在体内不易被蛋白酶识别水解,在活性肽的结构改造与修饰中发挥重要作用。

化合物**51**是一个神经降压素,其作用于神经降压素受体1和2(NTSR1和NTSR2)两个亚型。神经降压素及其受体与痛觉缺失的调节、食物摄取以及肿瘤生长具有密切关系^[24]。研究人员对神经降压素**51**进行结构优化,经过截断策略得到了含有第八位到第十三位氨基酸序列的简化肽**52**(NTSR1 $K_i = 0.24 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; NTSR2 $K_i = 1.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),其对NTSR1和NTSR2受体的活性均比神经降压素**51**有所提高。然而,简化肽**52**容易受到体内酶代谢作用,因此其在体内半衰期很短。针对这一特点,研究人员尝试引入 β 氨基酸(图10),得到

活性肽**53**,其对NTSR1和NTSR2受体的活性虽然下降(NTSR1 $K_i = 8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; NTSR2 $K_i = 25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),但半衰期延长至32 h。之后研究人员又将N端的精氨酸替换为 β -精氨酸得到肽**54**。**54**相比于**53**活性略有提高(NTSR1 $K_i = 6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; NTSR2 $K_i = 12 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),而且**54**的半衰期大于7天^[25,26],极大地提高了活性肽在体内的停留时间,增强了活性肽在体内的药代稳定性。

肽类小分子**55**是一个广泛研究的金属蛋白酶EP24.15(endopeptidase)抑制剂。EP24.15与下丘脑对垂体功能的调节及血压调节有重要关联,文献报道EP24.15还可能与A β 蛋白的聚集和阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)相关,因此EP24.15是神经系统疾病的研究热点。虽然肽类小分子**55**对EP24.15的抑制活性很强($\text{IC}_{50} = 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),但它容易受到与EP24.15相关的蛋白酶——中性内肽酶EP24.11水解。因此,研究人员的主要研发目标是提高**55**对中性内肽酶EP24.11的稳定性。他们尝试将**55**中的丙氨酸、酪氨酸和羧基末端分别用 β -丙氨酸、 β -苯丙氨酸和 β -氨基丙酸替换,得到 β 肽**56**对EP24.15的抑制活性虽然有所下降($\text{IC}_{50} = 2.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),但对中性内肽酶EP24.11的稳定性显著提高(图11),几乎不受其降解影响^[27]。

研究人员用图12的示意图解释引入 β 氨基酸可以提高肽类分子对中性内肽酶的稳定性。对于天然 α 多肽,在特异性的蛋白酶切割位点,水分子首先与酰胺键形成氢键作用,从而有利于水分子对酰胺键的进攻最后完成酰胺键的切割;对 β 多肽而言,由于增加了一个亚甲基,多肽整体的构象发生变化,原本蛋白酶切割中心的水分子无法与酰胺键形成氢键,不利于蛋白酶对酰胺键的切割,因而 β 多肽比 α 多肽具有更强的抗水解能力^[28]。

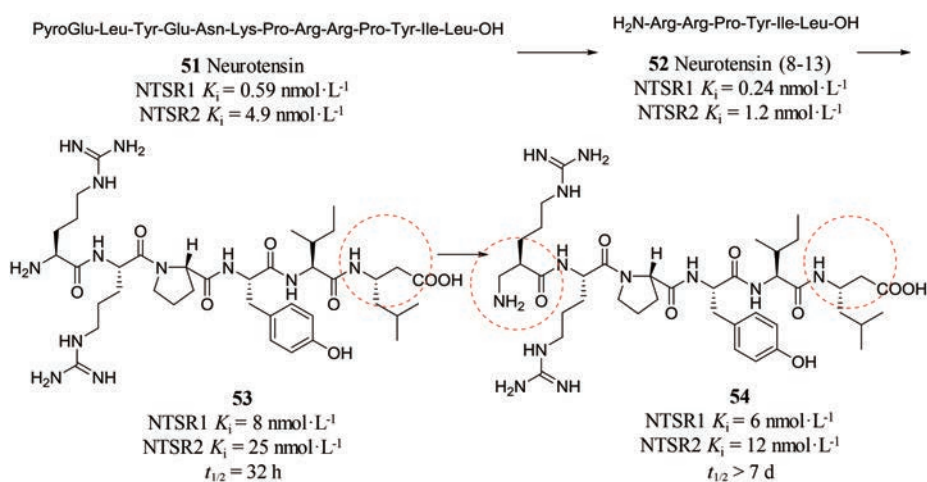


Figure 10 Introduction of β -amino acids to improve the metabolic stability of peptides

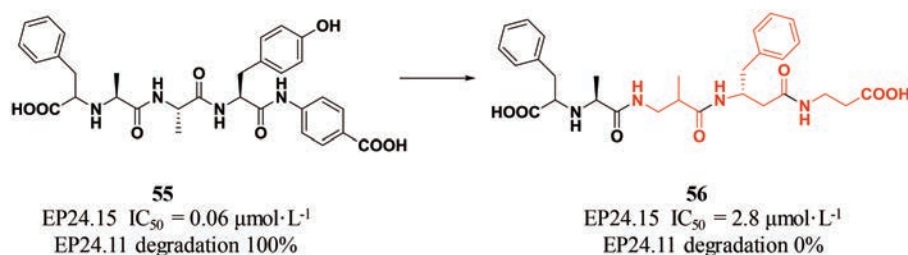


Figure 11 Modification of **55** with β -amino acids to yield an inhibitor with complete stability against EP24.11

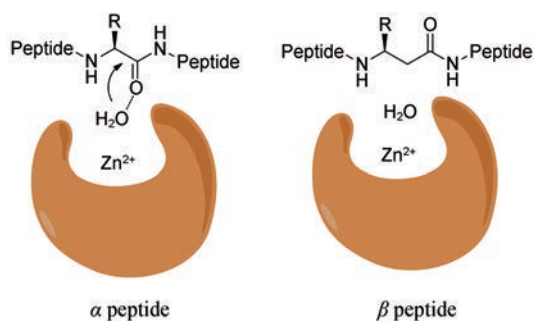


Figure 12 Schematic diagram of how a β -peptide may not be cleaved by the peptidase

阿片受体与疼痛密切相关,主要包括 μ 受体、 δ 受体和 κ 受体等几种亚型。阿片肽则是一种内源性神经递质,通过与这些受体结合发挥药理作用。研究人员发现内啡肽**57**是 μ 受体的内源性底物肽,具有较强的药理活性,其对 μ 受体的激动活性为 $14.40 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,相较于吗啡不会产生严重的不良反应;而且,内啡肽在有效剂量下不易诱发呼吸抑制和心血管疾病。因此,内啡肽引起了科学家的广泛关注。然而,内啡肽仍存在问题,其中之一就是其代谢稳定性较差,半衰期仅为 16.9 min 。兰州大学王锐团队发现含有非天然氨基酸的内啡肽类似物具有较强的代谢稳定性(图13),而且可以在一定程度上进一步提高内啡肽对 μ 受体的活性。他们首先将C末端苯丙氨酸替换为非天然氨基酸,得到化合物**58**,其对 μ 受体的激动活性为 $0.0334 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,相比于内啡肽**57**提高了430倍;而且该化合物在脑膜匀浆中的半衰期延长至 85.9 min ,与内啡肽相比提高了近4倍^[29];随后,他们在此工作的基础上进一步把酪氨酸和脯氨酸片段用非

天然氨基酸替换,得到化合物**59**,其对 μ 受体的活性进一步提高,达到 $0.0420 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。而且化合物**59**在脑膜匀浆中的半衰期超过 600 min ^[30],解决了内源性吗啡肽半衰期短的问题。因此,非天然氨基酸的引入对改善肽类化合物的代谢稳定性具有重要意义。

天然多肽大多由L型氨基酸组成,容易受到各种蛋白酶的降解而失去活性。蛋白酶的水解反应一般都是立体专一的,引入D型氨基酸使多肽的构型发生变化,进而使得修饰的多肽不易被蛋白水解酶水解,因此D型氨基酸修饰的多肽可以提高对蛋白酶的降解作用。

黄体激素释放激素(luteinizing hormone releasing hormone, LHRH)是由下丘脑分泌的具有调节生殖功能的十肽,该激素与垂体前叶的黄体激素释放激素受体(gonadotropin-releasing hormone receptor, GnRHR)结合,可以调控黄体激素的合成和分泌。除此之外,在人类多种恶性肿瘤中,LHRH与其他生长因子一起调节肿瘤细胞生长。LHRH及类似物可以通过抑制垂体-性腺轴的功能从而抑制激素依赖性肿瘤细胞的增殖,因此LHRH及类似物目前在临床上用于治疗激素依赖性肿瘤如前列腺癌和乳腺癌等。然而天然的LHRH第5、6位以及第6、7位氨基酸残基间肽键稳定性较差,在体内极易受到肽链内切酶的作用而裂解,LHRH在体内的半衰期仅有 $2\sim 4 \text{ min}$ 。为了提高LHRH在体内的稳定性,研究人员尝试在6位引入不同种类的D型氨基酸,得到上市药物如那法瑞林**60**和曲普瑞林**61**,半衰期相较于LHRH均有不同程度的提高,其半衰期分别为 3 h 和 4 h (表3)^[31]。



Figure 13 Introduction of unnatural amino acids to improve the stability of endomorphin and its potent analogues

Table 3 Introduction of *D* amino acids to improve the stability of peptides

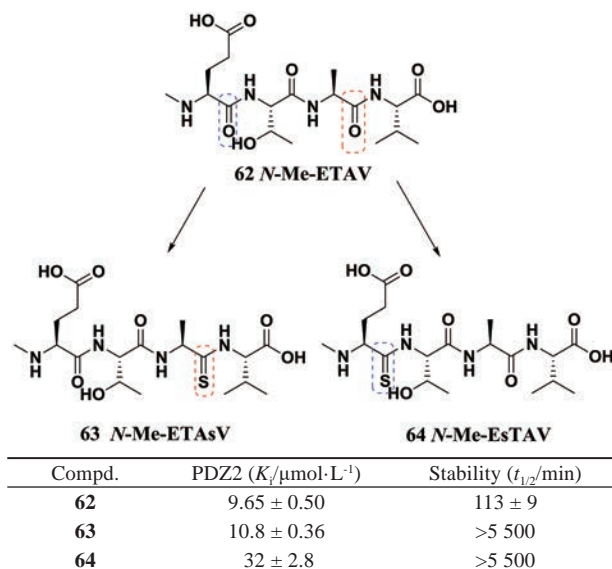
Compd.	Sequence	$t_{1/2}$
LHRH	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	2-4 min
Nafarelin 60	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr- D-Nal -Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	3 h
Triptorelin 61	pGlu-His-Trp-Ser-Tyr- D-Trp -Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	> 4 h

2.1.2 伪肽化策略 肽键 (-CONH₂-) 是肽类分子的特征, 而肽键在体内容易被蛋白酶识别降解, 这是肽类分子稳定性差的原因之一。伪肽则是利用生物电子等排原理将肽键中的一种或两种以上的原子用其他原子替代。由于伪肽从本质上改变了酰胺键的化学结构, 与蛋白或多肽同源结构不同, 因此可以避免体内蛋白酶的识别和水解, 从而提高肽类分子的稳定性及活性。

N-甲基-*D*-天冬氨酸 (*N*-methyl-*D*-aspartate, NMDA) 受体与其胞内突触后致密蛋白 (postsynaptic density protein-95, PSD-95) 的蛋白-蛋白相互作用是治疗缺血性脑病、神经疼痛以及阿尔兹海默症的一种潜在策略^[32]。Bach 等^[33]报道, *N*-烷基化的谷氨酸-苏氨酸-丙氨酸-缬氨酸四肽化合物 (*N*-甲基-ETAV) **62** 是 NMDA/PSD-95 蛋白-蛋白相互作用抑制剂 ($K_i = 9.65 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 他们通过结构修饰得到一系列活性较强的四肽衍生物, 但是研究人员在改造过程中发现这类化合物的血浆稳定性较差, 例如, 化合物 **62** 在人血浆中的半衰期只有 113 min, 较差的代谢稳定性限制了该类化合物的进一步开发。为了改善化合物的血浆稳定性, Bach 等对该类化合物进行伪肽化结构修饰, 将酰胺键的氧原子用硫原子进行替换, 得到不易被蛋白酶识别并水解的硫杂酰胺键。比较含硫杂酰胺键的伪肽 **63**、**64** 和含有酰胺键的化合物 **62**, 可以发现含硫杂酰胺键的化合物虽然活性有所下降, 但血浆稳定性显著提高 (图 14), 尤其是化合物 **63**, 在活性基本不变 ($K_i = 10.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的同时血浆半衰期提高了 50 倍。研究结果表明, 硫杂酰胺键的伪肽化修饰是提高肽类化合物血浆稳定性的有效策略。

2.1.3 逆肽策略 蛋白质、激素、活性肽以及天然产物多肽是各种蛋白酶降解的底物, 因此存在着易受蛋白酶降解以及半衰期较短的特点。除了之前介绍的策略可以有效耐受蛋白酶的水解, 肽键方向的改变同样可以改变蛋白酶对底物的识别作用, 从而达到抗降解的作用。这类改变肽键方向的多肽结构修饰策略称为逆肽化修饰, 相关的肽称为逆肽或逆反肽。

β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 沉积物的形

**Figure 14** Thionamide pseudopeptides to improve stability of peptides

成可能是引起 AD 的重要过程。研究表明 A β 可溶性寡聚体有细胞毒性, 并且对大脑的记忆能力和学习能力具有潜在影响。在 A β 聚集的早期进行抑制可有效治疗 AD。Taylor 等^[34]报道了能有效抑制 A β 聚集的九肽 **65**, 尽管 **65** 对 A β 寡聚体的聚集有较强的抑制作用, 但 **65** 存在多个水解位点, 因此需要对 **65** 进行结构修饰以提高其代谢稳定性。对 **65** 进行逆肽修饰, 得到逆肽 **66**, 理论上逆肽可以保持与 **65** 相似的三维结构从而使活性得到保持, 实验结果也表明逆肽 **66** 对 A β 寡聚体的聚集抑制活性并没有发生显著变化。Taylor 等用蛋白质降解实验评价 **65** 和 **66** 的代谢稳定性, 即将肽与人血浆或脑提取物共孵育 24 h, 通过高效液相色谱法 (HPLC) 测定溶液中原型肽含量。可以发现无论血浆还是脑提取物中, 逆肽 **66** 的含量均远远高于 **65**, 而且 **65** 的含量接近 100%, 表明逆肽可以一定程度上提高化合物的代谢稳定性 (图 15)。

2.1.4 环化策略 肽去甲酰基酶 (peptide deformylase, PDF) 是参与细菌蛋白质生物合成和成熟的重要酶, 在细菌和真核生物的细胞器中, 蛋白质的合成始于 *N*-甲酰蛋氨酸, 因此新合成的多肽都含有甲酰化的 *N* 末端。PDF 催化这些多肽的去甲酰化过程。PDF 在细菌细胞中发挥的重要作用使其成为设计新型抗生素, 治疗耐药性病原体的新靶标。研究人员在前期工作基础上发现化合物 **67** 具有一定的抗菌活性, 其对大肠杆菌 PDF 抑制活性 K_i 值为 $92 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。但 **67** 在大鼠血浆中容易受到类胰蛋白酶的降解作用而失活。从图 16 中可以发现, **67** 在大鼠血浆中孵育 5 h 约 25% 被降解。为了提高血浆稳定性, 研究人员将 P1' 与 P3' 进行

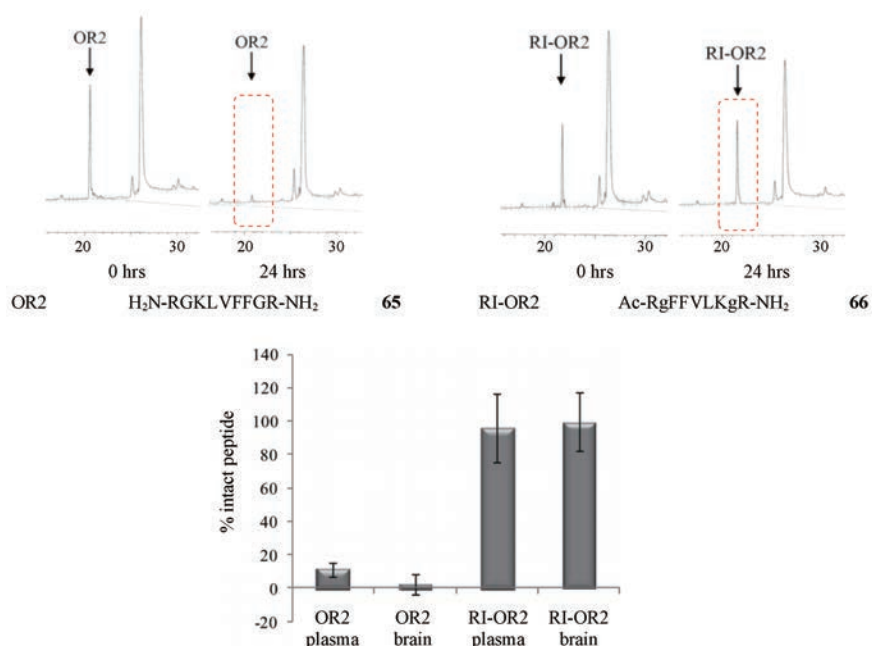


Figure 15 Inverse-peptide strategy to improve stability of peptides. Figure derived from Taylor M, et al^[34]

环化,设计合成环肽类似物**68**。研究表明,相比于**67**,环肽类似物**68**的抗菌活性有所提高, K_i 值为 $74 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,而且血浆稳定性大幅提高,将**68**与大鼠血浆孵育5 h基本不被降解^[35]。

α 螺旋是大部分多肽分子都具有的二级结构特征,然而人工合成的多肽分子在水溶液中并不能保持稳定的 α 螺旋结构^[36],因此科研人员开发了一种以碳-碳键或其他连接链为支撑的骨架稳定多肽 α 螺旋结构,由这类方法得到的多肽称为订书肽(stapled peptide),该方法本质上属于环化修饰策略的一种。线性肽柔性大,在舒展的构象下,容易暴露出更多酶解位点,增加了多肽被水解的概率,从而导致多肽稳定性降低^[37]。形成订书肽可以约束线性多肽的构象,减少

多肽被降解的概率。

β 连环蛋白-B细胞淋巴瘤9(B-cell lymphoma, BCL9)蛋白-蛋白相互作用对 β 连环蛋白的转录活性至关重要,而这一相互作用是由BCL9蛋白中25个残基的螺旋片段和 β 连环蛋白的结合槽介导。王少萌等发现,372位突变的BCL9肽**69**具有一定抑制 β 连环蛋白的活性($K_i = 0.94 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),然而**69**稳定性较差,在细胞培养液中1 h降解75%(图17)。因此王少萌等设计了一类结构稳定,不容易被代谢的BCL9肽^[38]。在设计过程中,他们采用了点击化学(click chemistry)形成的三氮唑为支撑结构,合成订书肽**70**和**71**。订书肽**70**和**71**对 β 连环蛋白的抑制活性分别为 $0.61 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.19 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,活性保持。同时提高了线性肽的稳

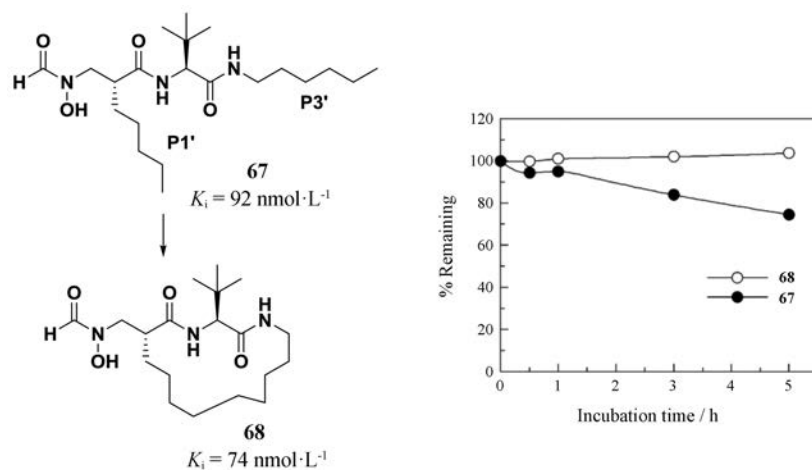


Figure 16 Cyclization strategy to improve stability of peptides. Figure derived from Hu XB, et al^[35]

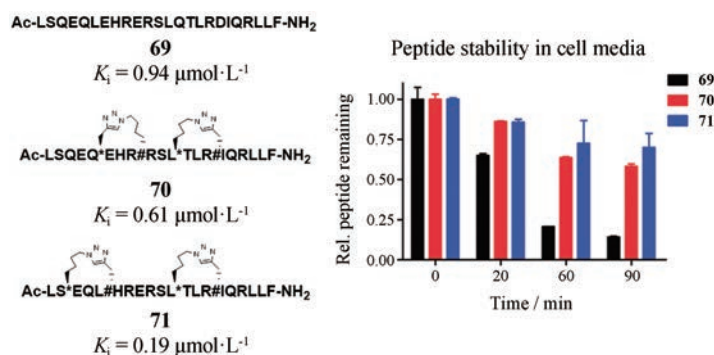


Figure 17 Click chemistry mediated stapled peptide to improve stability of peptides. Figure derived from Kawamoto KA, et al^[38]

定性, **70** 和 **71** 在细胞培养液中 1 h 仅分别降解 30% 和

2.2 外接基团修饰

外接基团修饰以增强多肽分子代谢稳定性的主要方法包括高级脂肪酸修饰、蛋白融合策略、聚乙二醇修饰等。

2.2.1 高级脂肪酸修饰

高级脂肪酸修饰是指在肽类药物的特定位点通过化学方法以其价键的形式引入高级脂肪酸以改善肽类药物的性质, 延长半衰期。一般认为, 高级脂肪酸修饰可以稳定其结构, 提高多肽的稳定性, 从而延长多肽药物在体内的半衰期。同时, 高级脂肪酸与细胞膜表面的磷脂结构类似。因此, 脂肪酸修饰的多肽药物往往也可以提高多肽药物的脂溶性, 改善药物在肠道内的吸收以及黏膜透过性。此外, 高级脂肪酸可以与血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 结合, 结合后的复合体因分子过大而不容易转运, 从而可以延长多肽在体内的循环时间^[39]。目前, 高级脂肪酸作为修饰结构的研究发展仍然比较缓慢, 但高级脂肪酸作为体内的一种内源性物质, 一直吸引了研究人员的广泛关注。根据水蛭素结构简化得到的水蛭肽比伐卢定 **72** (Bivalirudin) 是由 The Medicines Company 开发的抗凝药物, 于 2000 年 12 月年被 FDA 批准上市, 作为抗凝剂用于经皮冠状动脉腔内成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 治疗中出现的不稳定型心绞痛和经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI)。但是作为多肽类药物, **72** 在体内的暴露量较低 (AUC_{0-t} 为 $23.7 \text{ nmol}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$), 半衰期短 ($t_{1/2} = 15.1 \text{ min}$), 药代动力学性质较差。在进行经皮冠状动脉介入治疗之前, 需要先进行静脉注射, 随后静脉滴注至手术结

束。

患者依从性差。针对这一缺点, 研究人员对比伐卢定类似物 **73** 进行化学修饰, 主要的策略是用高级脂肪酸对氨基酸侧链进行修饰。对比肽 **73** 和 **74**, 其药理活性基本保持不变, 而高级脂肪酸修饰的多肽 **74** 暴露量 (AUC_{0-t} 为 $1371.7 \text{ nmol}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和半衰期 ($t_{1/2} = 212.2 \text{ min}$) 相较于未修饰的多肽 **73** (AUC_{0-t} 为 $25.7 \text{ nmol}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$, $t_{1/2} = 13.5 \text{ min}$) 明显改善 (表 4), 暴露量和半衰期分别提高了 58 倍和 14 倍^[40]。

上市的降糖多肽药物利拉鲁肽^[41]和索马鲁肽^[42]也都引入了高级脂肪酸修饰, 高级脂肪酸的引入增加了药物的疏水性, 掩盖二肽基肽酶 4 (DPP-4) 的结合位点, 降低肾排泄, 提高半衰期。利拉鲁肽是由诺和诺德公司研发的长效 GLP-1 受体激动剂, 其与天然 GLP-1 有 97% 的氨基酸序列相似性, 仅在 34 位将赖氨酸替换为精氨酸, 同时在 26 位赖氨酸侧链引入由谷氨酸作为 linker 的 16 碳棕榈酸侧链。皮下注射利拉鲁肽后, 其可在注射部位形成稳定的七聚体, 在皮下组织缓慢吸收; 另外, 由于引入了长链脂肪酸修饰, 掩盖了 DPP-4 结合位点; 同时, 长链脂肪酸的引入还使利拉鲁肽与血清白蛋白形成可逆复合物, 极大地延长了利拉鲁肽在体内的吸收时间, 提高了多肽类药物的体内半衰期。天然的 GLP-1 半衰期极短, 只有 2 min 左右; 而棕榈酸修饰的利拉鲁肽半衰期延长至 13 h, 提高了 390 倍 (图 18)^[43,44]。索马鲁肽则是 GLP-1(7-37) 的第 8 位丙氨酸用氨基异丁酸替换, 34 位的赖氨酸用精氨酸替换, 同时在 26 位赖氨酸侧链由谷氨酸作为 linker 引入十八烷酸, 疏水性也更强, 同时经过短链的聚乙二醇修饰, 其半衰期大大延长至一周。

Table 4 Introduction of fatty acid to improve the pharmacokinetic properties of bivalirudin analogs

Peptide	Sequence	$K_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$		PK parameter	
		Rat	Human	$AUC_{0-t}/\text{nmol}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{min}$
Bivalirudin (72)	D-FPRP-GGGG-QGDFEIPPEEYL	20.50 ± 0.62	11.77 ± 0.09	23.7 ± 2.8	15.1 ± 1.3
73	D-FPRP-GGGG-QGDFEIPEDAYDE	13.40 ± 0.46	5.80 ± 0.55	25.7 ± 2.6	13.5 ± 2.6
74	D-FPRP-GK(stearic acid)GG-QGDFEIPEDAYDE	15.24 ± 0.18	11.75 ± 0.46	1371.7 ± 207.8	212.2 ± 58.4

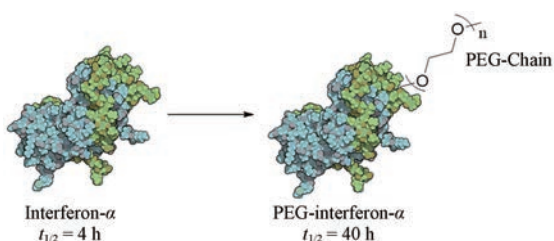


Figure 20 PEG modification to improve half-life of interferon- α

子渗透性的方法包括引入卤素原子、去除极性侧链、手性策略、*N*-烷基化、高级脂肪酸修饰和其他方法等。

3.1 引入卤素原子

在小分子药物的化学修饰中,往往采用引入卤素的修饰策略以提高小分子药物的亲脂性。在肽类分子的修饰改造中,卤素的引入也可以提高肽类分子的脂溶性。神经多肽内吗啡肽具有很强的镇痛活性,然而内吗啡肽**57**作为一种肽类分子,很难通过血脑屏障进入大脑发挥药效。通常药物分子进入血脑屏障需要一定的亲脂性,兰州大学王锐等采用了引入卤素原子的策略,将2位脯氨酸变换为*D*-丙氨酸,4位苯丙氨酸上引入卤素以提高整体肽分子的脂溶性^[50],通过该策略可以明显提高内吗啡肽类似物的渗透性,可以通过血脑屏障。内吗啡肽**57**的脂水分配系数*D*仅有12.5,而引入卤原子,内吗啡肽类似物的*D*值上升至120,提升了近9倍(图21)。通过动物实验,脑实质中检测到了肽**77**,进一步验证了通过引入卤素原子可以使肽类分子通过血脑屏障^[51]。

3.2 去除极性侧链

肽类分子中常含有极性的羧基片段,这些富含谷氨酸和天冬氨酸的肽细胞渗透性比较差,针对这类肽分子的改造一般采用去除极性侧链的策略。一方面,去除极性侧链可以缩小肽分子的尺寸,降低肽链多肽的性质,使其更具有类似有机小分子的性质;同时也可以改善肽类分子的细胞渗透性,有利于其进入细胞发挥药效。比较典型的案例就是抗丙肝病毒药物特拉匹韦的研发(图22)。Vertex公司早期发现了底物十肽**78**

的活性为 $0.89 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,然而该化合物的分子量大,需要首先对分子大小进行优化。研究人员考察了去除不同氨基酸片段对化合物抗病毒活性的影响,研究表明去除P4'氨基酸片段对活性影响较大,而去除P2'和P3'氨基酸片段对酶的亲和力几乎无影响。去除P5和P6两个含有酸性侧链的氨基酸片段,活性明显降低。另外,去除P3和P4两个疏水性氨基酸片段也会导致活性的下降。同时考虑到对丝氨酸蛋白酶的结合能力,研究人员在C末端引入亲电性的醛基作为弹头,得到了跨越S6~S1的六肽醛**79**,其活性与底物十肽相同,但是分子量显著降低。

虽然P5和P6两个酸性氨基酸片段对活性很重要,但是由于两个羧基的存在,六肽醛**79**的极性很大,不利于化合物进入病毒感染的细胞,因此下一步结构改造的重点是提高分子的透膜性。研究人员进一步切断P5和P6两个氨基酸片段,并以杂环进行替换得到四肽醛**19**,其抗病毒活性明显下降,但是相比于底物十肽**78**,分子量减小一半,整个分子的成药性更好^[52]。由于醛基的代谢性质较差,因此醛弹头被其他弹头替换得到酰胺化合物**20**,其抗病毒活性与稳定性俱佳,至此,肽类分子的透膜性问题得以解决。

化合物**20**的活性仍有提高的空间,因此研究人员对P1~P4片段进行了系统性优化。他们发现脯氨酸的疏水性基团对酶的亲和力影响很大,因此首先对P2片段进行改造,通过比较不同的疏水基团如醚、酯以及氨基甲酸酯等衍生物,最后得到的含有四氢异喹啉氨基甲酸酯衍生物**80**,其对NS3/4A酶的抑制活性提高至 $0.22 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。进一步优化P1,发现S1口袋仅能容纳尺寸较小的疏水性基团,最终确定乙基侧链为最优;同时优化P3和P4,得到的化合物**81**活性与**80**相当,但是**81**的cLog*P*(5.5)更符合Linpinski五规则,因而对**81**进一步研究。将P2乙基侧链与脯氨酸环化,进一步考察最终确定化合物**82**,其对丙肝病毒NS3/4A蛋白酶的抑制活性为 $44 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,是一个活性很高的丝氨酸蛋白酶抑制剂,被命名为特拉匹韦^[53]。特拉匹韦于

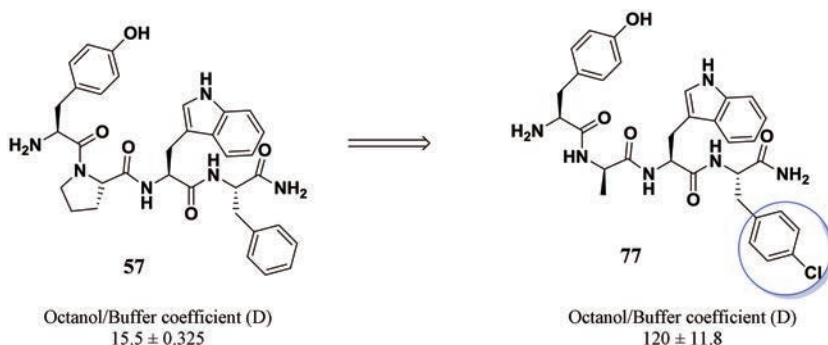


Figure 21 Introduction of halogen to improve permeability of endomorphin

2011年被FDA批准上市,用于治疗丙型肝炎病毒感染。

3.3 手性策略

环肽类化合物的二级结构与其理化性质和药理学性质密切相关。北京大学深圳研究院李子刚等提出了一种假设——在约束肽的连接链上引入一个手性中心以改变肽类分子的理化性质和二级结构,从而影响肽类分子的透膜性。为验证这一策略的合理性,他们设计合成了两条FITC标记的含有手性中心的环肽化合物**83**和**84**。由于手性中心的存在,环肽**83**和**84**存在一对非对映异构体,分离出这些异构体**83a/b**和**84a/b**并且将之与HEK293T细胞于37 °C共孵育2 h,用荧光共聚焦显微镜成像(图23)。研究结果表明,其中一种构型的异构体**83b**和**84b**可以穿入HEK293T细胞,而另一构型的异构体**83a**和**84a**无法穿入细胞。说明手性中心的引入可以使肽的螺旋结构发生变化,从而影响肽类分子的透膜性^[54]。

3.4 N-烷基化

N-烷基化的酰胺键往往可以改变肽类分子内或分子间的氢键相互作用,从而影响肽类分子的空间结构进而改变其物理化学性质。柔性肽类分子中的分子内氢键是被动扩散中的决定性因素。通过在特定的酰胺键进行烷基化,可以使肽类分子以最优势的构象穿过细胞膜^[55]。Beck等^[56]对丙氨酸环六肽进行N-甲基化修饰以考察N-甲基化对丙氨酸环六肽透膜性的影响。实验结果表明,在1,5位、1,6位或1,2,4,5位酰胺氮原子进行甲基化修饰可以明显提高肽类分子对Caco-2细胞的渗透性,其渗透性与对照鞣酮(细胞透膜性标志物)相当。分析1,6位N-甲基化修饰的环六肽的空间构象发现,2位酰胺氢与5位酰胺羰基可以形成分子内氢键,而3位4位氨基酸所形成的 β 转角也形成了分子内氢键,整个分子以疏水的构象存在(图24),因而细胞渗透性提高。

3.5 高级脂肪酸修饰

提高肽类分子透膜性的常用策略是对多肽进行高级脂肪酸修饰。脂肪酸包括饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸,目前有一些饱和脂肪酸修饰的多肽药物已经上市用于疾病的治疗,或者开发处于临床研究阶段。脂肪酸是构成磷脂双分子层以及人体脂肪的重要成分,因此对多肽进行脂肪酸修饰可以提高多肽与细胞膜表面的亲和能力,从而提高肽类分子的透膜性,促进上皮细胞对肽类分子的吸收。Hashizume等^[57]对胰岛素分子的侧链进行棕榈酸修饰,棕榈酸酰化胰岛素的亲脂性提高。研究人员用同位素标记胰岛素,并通过测定给药后6 h内血浆中的放射性推断胰岛素在血浆中的含

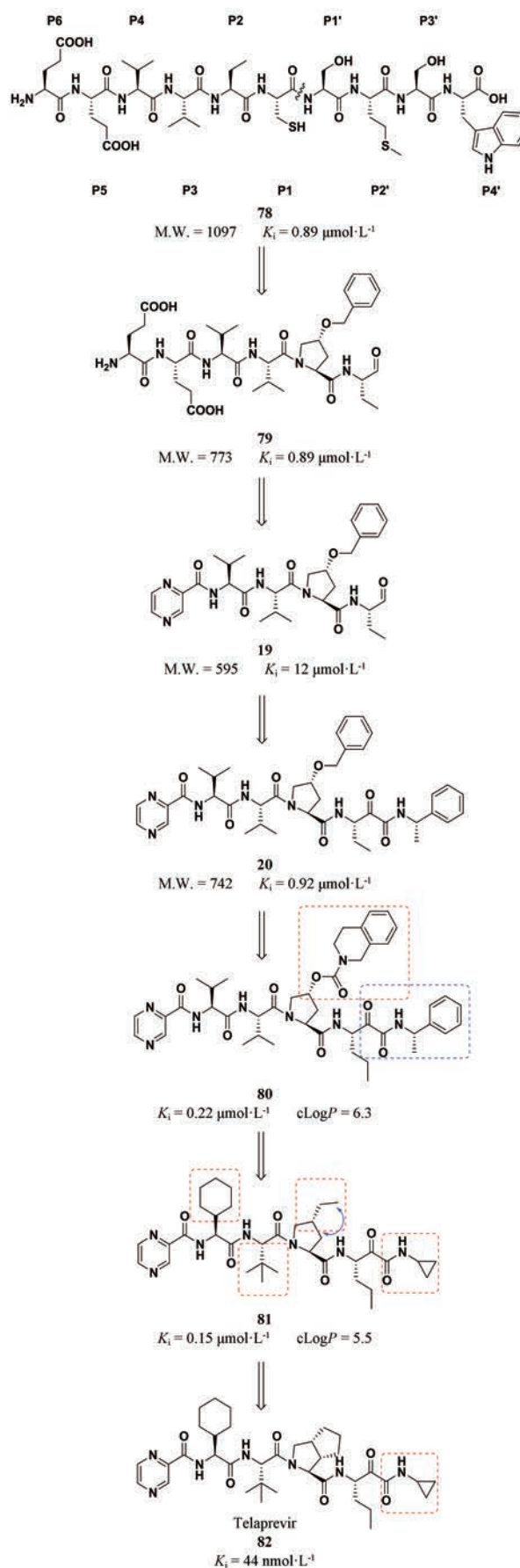


Figure 22 Optimization of anti-HCV drug telaprevir

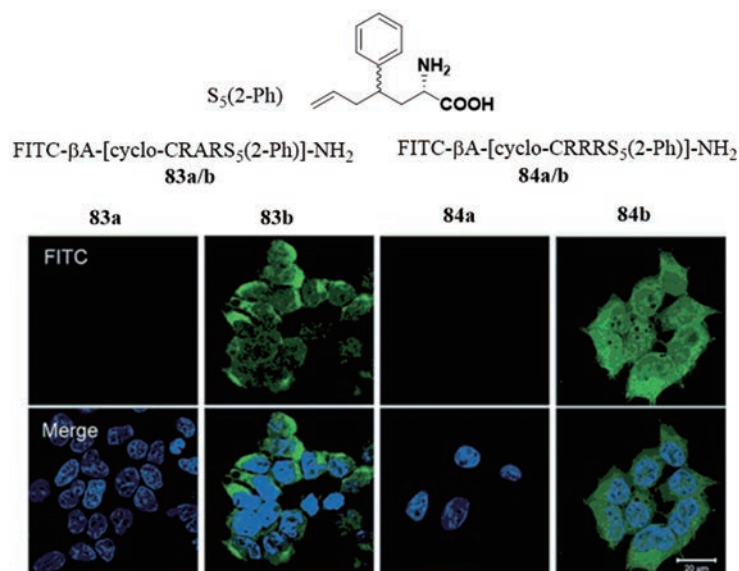


Figure 23 Introduction of chiral center in cyclopeptide linker to change permeability of peptide. Figure derived from Hu K, et al^[54]

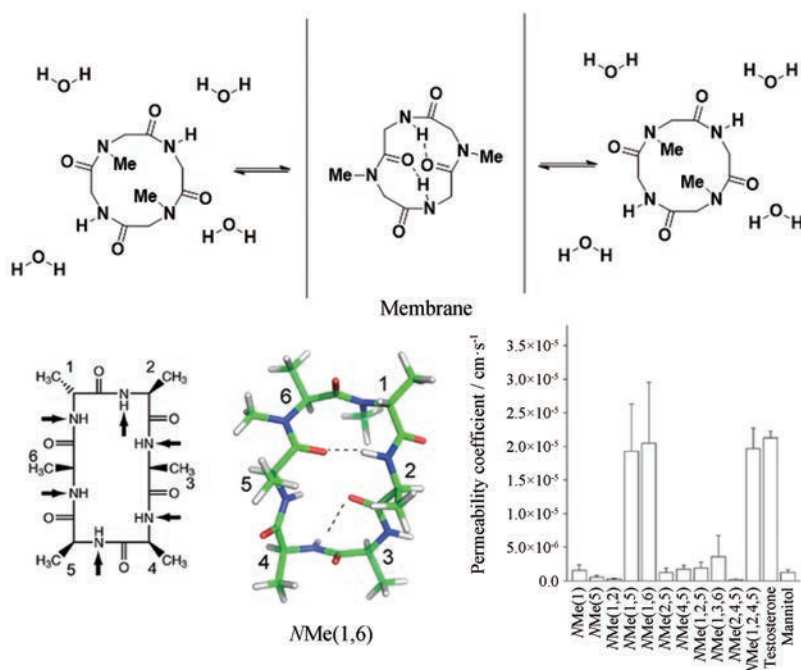


Figure 24 *N*-alkylation to improve permeability of peptides. Figure derived from Beck JG, et al^[56]

量。结果表明,双棕榈酰胰岛素的含量最高时是天然胰岛素的6倍,单棕榈酰胰岛素的含量是天然胰岛素的3倍(图25)。这也说明高级脂肪酸修饰可以提高肽类分子的透膜性。

3.6 其他方法

除了化学方法,某些制剂手段也可以影响肽类化合物的渗透和吸收。*N*-[8-(2-羟苯基)氨基]辛酸钠(sodium *N*-[8-(2-hydroxybenzyl)amino]caprylate, SNAC)是由Emisphere开发的一种基于各种促吸收剂的大分子递送技术。SNAC能够递送0.5~150 kDa的大分子,且

不会影响大分子的高级结构,不影响药物释放。同时SNAC还具有很高的安全性,不影响胃肠黏膜结构。

吸收促进剂与药物分子存在较弱的非共价相互作用,可形成暂时稳定的中间体。促进剂一般是疏水性物质,通过与药物分子相互作用形成的药物促进剂复合体具有更强的亲脂性,从而促进药物分子透过上皮细胞膜。由于复合体只存在较弱的非共价相互作用,随着复合体透过细胞进入血液循环,药物与促进剂解离释放出药物(图26)^[58]。

2017年,诺和诺德便宣布FDA批准了索马鲁肽改

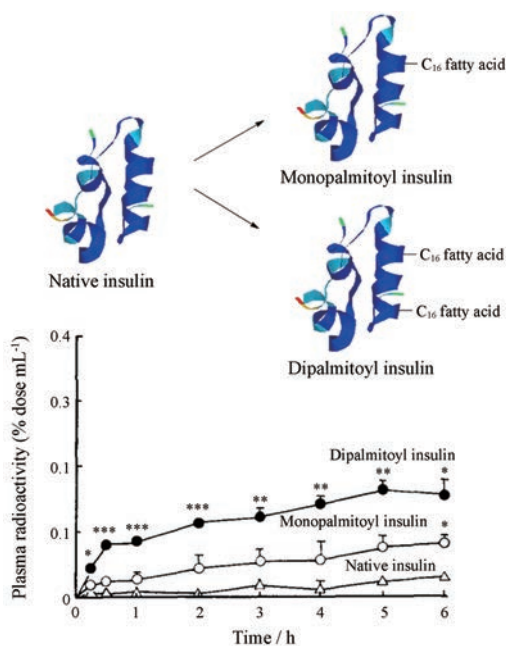


Figure 25 Introduction of fatty acid to improve the permeability of insulin. Figure derived from Hashizume M, et al^[57]

善 II 型糖尿病患者的血糖控制。虽然索马鲁肽是长效的 GLP-1 激动剂, 但糖尿病患者仍需每周注射一次。为了提高患者的依从性, 诺和诺德很早就开始了口服索马鲁肽的研究。研究人员将索马鲁肽与吸收促进剂 SNAC 制成口服配方。SNAC 与索马鲁肽结合使得其在胃部吸收, 而且溶解的 SNAC 在胃部形成局部相对较高的 pH 环境, 既可以增加索马鲁肽的溶解度, 在该环境下索马鲁肽受胃肽酶的影响很小, 又促进了索马鲁肽的吸收^[59]。从图 27 中可以看出, 口服索马鲁肽在胃部可以充分吸收并快速释放。2019 年 9 月 20 日, 口服索马鲁肽被 FDA 批准用于结合饮食和运动以改善 II 型糖尿病患者的血糖控制。

4 增强肽类分子的水溶性

含有疏水侧链的多肽往往水溶性较差, 而含有极性侧链的多肽水溶性相对较好。不同的多肽因其组成不同而具有不同的溶解性。有些临床使用的多肽药物常常含有芳香性氨基酸如苯丙氨酸、酪氨酸等, 但是这类含有芳香性氨基酸的多肽常常溶解性很差。胰高血糖素含有半数以上疏水性侧链, 且含有多个芳香性氨基酸, 因此, 其在水溶液中溶解性差。

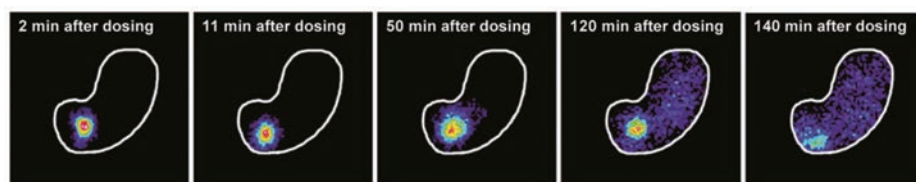


Figure 27 Absorption and release of oral semaglutide. Figure derived from Knudsen LB, et al^[59]

Transport Mechanism

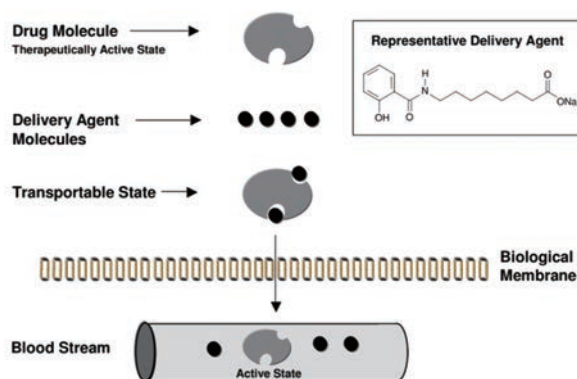
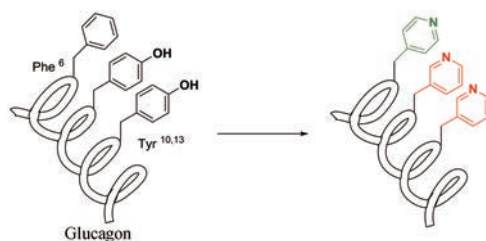


Figure 26 Mechanism of absorption enhancer. Figure derived from Arbit E, et al^[58]

临床上通常使用胰高血糖素治疗急性低血糖。临床使用的胰高血糖素通常以冻干粉的形式保存, 使用时需要用无菌酸性溶剂溶解, 但溶解时常产生不溶性纤维^[60,61]。因此, 通过合适的修饰改造策略提高胰高血糖素的溶解性对胰高血糖素的临床使用有重要意义。天然的胰高血糖素 **85** 在 PBS 中的溶解度很小, Morz 等^[62]将胰高血糖素中的苯丙氨酸或酪氨酸替换为吡啶基丙氨酸 3-pal 或 4-pal, 尤其是多个位点替换 (表 5), 得到的肽在 PBS 溶液中的溶解性有了一定程度提高, 其中肽 **87** 和 **88**, 在保持胰高血糖素活性的同时, 溶解度提高, 大于 $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。这也表明引入吡啶基团可以提高多肽分子的水溶性。Mayer 等^[63]也报道了利用吡啶基替换苯丙氨酸或酪氨酸中的苯环以提高多肽类降钙素基因相关肽受体拮抗剂的水溶性。

5 总结与展望

随着全球小分子药物研发的难度增加以及生物大分子药物研发速度的不断加快, 介于两者之间的多肽类药物也成为全球制药公司关注的焦点, 多肽药物的销售额也在逐年稳步上升。目前全球批准上市的多肽药物已超过 80 多种, 进入临床的多肽分子数量也在不断增加, 疾病领域涉及肿瘤、代谢性疾病、感染性疾病、免疫、心血管疾病以及泌尿生殖系统疾病等, 其中还有诸如甘精胰岛素和利拉鲁肽这种重磅炸弹级的多肽药物, 因此多肽药物的前景非常广阔。

Table 5 Replacing Phe/Tyr with pyridine motif to improve water-solubility of glucagon (Aib, aminoisobutyric acid)

Peptide	Structure	EC ₅₀ /pmol·L ⁻¹ (SDV)	Solubility/mg·mL ⁻¹
85	Glucagon	21.2 (13.7)	<1
86	HSQGTFTSDYSKYLD(Aib)SRRAQDFVQWLMNT	39.9 (11.3)	<1
87	HSQGTFTSD(3-pal)SK(3-pal)LD(Aib)SRRAQDFVQWLMNT	35.9 (19.3)	>15
88	HSQGTFTSD(4-pal)SK(4-pal)LD(Aib)SRRAQDFVQWLMNT	30.9 (10.1)	>15
89	HSQGT(3-pal)TSD(3-pal)SK(3-pal)LD(Aib)SRRAQDFVQWLMNT	71.4 (52.8)	>15
90	HSQGT(4-pal)TSD(4-pal)SK(4-pal)LD(Aib)SRRAQDFVQWLMNT	84.3 (33.4)	>15

多肽药物均衡了小分子药物和生物药的优点, 具有活性强、选择性好、安全性高, 不容易在体内蓄积、与其他药物相互作用少、代谢途径可预测等优点, 是一类理想的可用于开发成为药物的先导化合物。然而多肽药物本身也存在着半衰期短、血浆清除率高、不容易透过细胞膜、大多数药物不能口服, 通常需要注射给药, 患者依从性差以及生产成本较高等问题, 这些问题制约了多肽类药物的发展。采用多种化学修饰策略如末端结构修饰、拼接策略、环化策略、非天然氨基酸修饰、伪肽策略以及胆固醇修饰等可以提高肽类分子的活性; 除了上述部分方法可以提高肽的稳定性, 还可采用逆肽策略以及高级脂肪酸修饰、蛋白融合策略、聚乙二醇修饰等策略提高肽类分子的代谢稳定性; 采用引入卤素原子、去除极性侧链、手性策略、*N*-烷基化、高级脂肪酸修饰等策略可以改善肽类分子的渗透性。许多成功上市的多肽药物都用到了这些改造策略中的一种或几种。

目前, 通过对肽类分子的修饰和改造解决多肽药物的缺点, 仍然是最直接和有效的策略。熟悉了解多肽药物的基本改造策略, 对于多肽类药物的研究和开发具有重要意义。虽然多肽药物的发展仍然面临着一些挑战, 但随着未来药物化学改造策略的完善以及新型药物递送系统以及吸收促进剂的不断发展, 这些技术都将会应用到多肽药物的开发之中, 为多肽药物的开发提供更合理更丰富的思路。

References

- [1] Scognamiglio PL, Natale CD, Perretta G, et al. From peptides to small molecules: an intriguing but intricate way to new drugs [J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20: 3803-3817.
- [2] Stoermer MJ, Chappell KJ, Liebscher S, et al. Potent cationic inhibitors of West Nile virus NS2B/NS3 protease with serum stability, cell permeability and antiviral activity [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 5714-5721.
- [3] Yin Z, Patel SJ, Wang WL, et al. Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 2: SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 40-43.
- [4] Schuller A, Yin Z, Brian Chia CS, et al. Tripeptide inhibitors of dengue and West Nile virus NS2B-NS3 protease [J]. *Antiviral Res*, 2011, 92: 96-101.
- [5] Leung D, Abbenante G, Fairlie DP. Protease inhibitors: current status and future prospects [J]. *J Med Chem*, 2000, 43: 305-341.
- [6] Zhai Y, Zhao XS, Cui ZJ, et al. Cyanohydrin as an anchoring group for potent and selective inhibitors of enterovirus 71 3C protease [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 9414-9420.
- [7] Ma YY, Shang CY, Yang P, et al. 4-Iminooxazolidin-2-one as a bioisostere of the cyanohydrin moiety: inhibitors of enterovirus 71 3C protease [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 10333-10339.
- [8] Behnam MA, Nitsche C, Vecchi SM, et al. C-terminal residue optimization and fragment merging: discovery of a potent peptide-hybrid inhibitor of dengue protease [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2014, 5: 1037-1042.
- [9] Driggers EM, Hale SP, Lee J, et al. The exploration of macrocycles for drug discovery--an underexploited structural class [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7: 608-624.
- [10] Xu SQ, Li H, Shao XX, et al. Critical effect of peptide cyclization on the potency of peptide inhibitors against Dengue virus NS2B-NS3 protease [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 6881-6887.
- [11] Darnell JE. Transcription factors as targets for cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 740-749.
- [12] Bromberg J, Darnell JE. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function [J]. *Oncogene*, 2000, 19: 2468-2473.
- [13] Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 97-105.
- [14] Gomez C, Bai LC, Zhang J, et al. Design, synthesis, and evaluation of peptidomimetics containing Freidinger lactams as STAT3

- inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 1733-1736.
- [15] Chen JY, Bai LC, Bernard D, et al. Structure-based design of conformationally constrained, cell-permeable STAT3 inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2010, 1: 85-89.
- [16] Patchett AA, Harris E, Tristram EW, et al. A new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors [J]. *Nature*, 1980, 288: 280-283.
- [17] Natesh R, Schwager SL, Evans HR, et al. Structural details on the binding of antihypertensive drugs captopril and enalaprilat to human testicular angiotensin I-converting enzyme [J]. *Biochemistry*, 2004, 43: 8718-8724.
- [18] Chen CA, Sieburth SM, Glekas A, et al. Drug design with a new transition state analog of the hydrated carbonyl: silicon-based inhibitors of the HIV protease [J]. *Chem Biol*, 2001, 8: 1161-1166.
- [19] Mark WH, Francesco GS, Daniel HR. Synthetic and enzyme inhibition studies of pepstatin analogues containing hydroxyethylene and ketomethylene dipeptide isosteres [J]. *J Med Chem*, 1987, 30: 374-383.
- [20] Blundell TL, Cooper J, Foundling SI, et al. On the rational design of renin inhibitors: X-ray studies of aspartic proteinases complexed with transition-state analogues [J]. *Biochemistry*, 1987, 26: 5585-5590.
- [21] Sieburth SM, Chen CA. Silanediol protease inhibitors: from conception to validation [J]. *Eur J Org Chem*, 2006, 2006: 311-322.
- [22] Wang C, Shi WG, Cai LF, et al. Artificial peptides conjugated with cholesterol and pocket-specific small molecules potently inhibit infection by laboratory-adapted and primary HIV-1 isolates and enfuvirtide-resistant HIV-1 strains [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69: 1537-1545.
- [23] Wang DX. *Peptides and Drug Development (活性多肽与药物开发)* [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2008: 5.
- [24] Mustain WC, Rychahou PG, Evers BM. The role of neurotensin in physiologic and pathologic processes [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2011, 18: 75-82.
- [25] Seebach D, Lukaszk A, Komisarska KP, 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
- [26] Sparr C, Purkayastha N, Yoshinari T, et al. Syntheses, receptor bindings, *in vitro* and *in vivo* stabilities and biodistributions of DOTA-neurotensin (8-13) derivatives containing bamino acid residues - a lesson about the importance of animal experiments [J]. *Chem Biodiv*, 2013, 10: 2101-2121.
- [27] Aguilar ML, Purcell AW, Devi R, et al. β -Amino acid-containing hybrid peptides—new opportunities in peptidomimetics [J]. *Org Biomol Chem*, 2007, 5: 2884–2890.
- [28] Steer DL, Lew RA, Perlmutter P, et al. β -Amino acids: versatile peptidomimetics [J]. *Curr Med Chem*, 2002, 9: 811-822.
- [29] Wang Y, Xing YH, Liu X, et al. A new class of highly potent and selective endomorphin-1 analogues containing alpha-methylene-beta-aminopropanoic acids (map) [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 6224-6236.
- [30] Liu X, Wang Y, Xing YH, et al. Design, synthesis, and pharmacological characterization of novel endomorphin-1 analogues as extremely potent mu-opioid agonists [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 3102-3114.
- [31] Wang DX. *Peptides and Drug Development (活性多肽与药物开发)* [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2008: 573.
- [32] Gardoni F, Di Luca M. New targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 545: 2-10.
- [33] Bach A, Eildal JN, Stuhr-Hansen N, et al. Cell-permeable and plasma-stable peptidomimetic inhibitors of the postsynaptic density-95/*N*-methyl-*D*-aspartate receptor interaction [J]. *J Med Chem*, 2011, 54: 1333-1346.
- [34] Taylor M, Moore S, Mayes J, et al. Development of a proteolytically stable retro-inverso peptide inhibitor of beta-amyloid oligomerization as a potential novel treatment for Alzheimer's disease [J]. *Biochemistry*, 2010, 49: 3261-3272.
- [35] Hu XB, Nguyen KT, Jiang VC, et al. Macrocyclic inhibitors for peptide deformylase: a structure-activity relationship study of the ring size [J]. *J Med Chem*, 2004, 47: 4941-4949.
- [36] Keri GR, Toth IN. *Molecular Pathomechanisms and New Trends in Drug Research* [M]. London and New York: Taylor & Francis, 2003.
- [37] Tyndall JD, Nall T, Fairlie DP. Proteases universally recognize beta strands in their active sites [J]. *Chem Rev*, 2005, 105: 973-999.
- [38] Kawamoto SA, Coleska A, Ran X, et al. Design of triazole-stapled BCL9 α -helical peptides to target the β -catenin/B-cell CLL/lymphoma 9 (BCL9) protein-protein interaction [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 1137-1146.
- [39] 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]. *Arch Biochem Biophys*, 2015, 579: 18-25.
- [40] Liu ZG, Yu Z, Huang YY, et al. A novel stearic acid-modified hirudin peptidomimetic with improved pharmacokinetic properties and anticoagulant activity [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14349-14360.
- [41] Sjöholm A. Liraglutide therapy for type 2 diabetes: overcoming unmet needs [J]. *Pharmaceuticals*, 2010, 3: 764-781.
- [42] Lau J, Bloch P, Schaffer L, et al. Discovery of the once-weekly glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue semaglutide [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 7370-7380.
- [43] Iepsen EW, Torekov SS, Holst JJ. Liraglutide for type 2 diabetes and obesity: a 2015 update [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2015, 13: 753-767.

- [44] Fujioka K, Sparre T, Sun LH, et al. Usability of the novel liraglutide 3.0 mg pen injector among overweight or obese adult patients with or without prior injection experience [J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2015, 10: 164-174.
- [45] Yang WQ, Xiao QQ, Wang D, et al. Evaluation of pharmacokinetic interactions between long-acting HIV-1 fusion inhibitor albuvirtide and lopinavir/ritonavir, in HIV-infected subjects, combined with clinical study and simulation results [J]. *Xenobiotica*, 2017, 47: 133-143.
- [46] Beck A, Reichert JM. Therapeutic Fc-fusion proteins and peptides as successful alternatives to antibodies [J]. *MAbs*, 2011, 3: 415-416.
- [47] Jimenez-Solem E, Rasmussen MH, Christensen M, et al. Dula-glutide, a long-acting GLP-1 analog fused with an Fc antibody fragment for the potential treatment of type 2 diabetes [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2010, 12: 790-797.
- [48] O'Connor-Semmes RL, Lin J, Hodge RJ, et al. GSK2374697, a novel albumin-binding domain antibody (AlbudAb), extends systemic exposure of exendin-4: first study in humans—PK/PD and safety [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2014, 96: 704-712.
- [49] Wang YS, Youngster S, Grace M, et al. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54: 547-570.
- [50] Hong Y, Zhou Y, Wang J, et al. Lead compound optimization strategy (4) —— improving blood-brain barrier permeability through structural modification [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 789-799.
- [51] Liu HM, Liu XF, Yao JL, et al. Utilization of combined chemical modifications to enhance the blood-brain barrier permeability and pharmacological activity of endomorphin-1 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319: 308-316.
- [52] Perni RB, Britt SD, Court JC, et al. Inhibitors of hepatitis C virus NS3/4A protease I. Non-charged tetrapeptide variants [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 4059-4063.
- [53] Perni RB, Farmer LJ, Cottrell KM, et al. Inhibitors of hepatitis C virus NS3/4A protease. Part 3: P2 proline variants [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14: 1939-1942.
- [54] Hu K, Geng H, Zhang QZ, et al. An in-tether chiral center modulates the helicity, cell permeability, and target binding affinity of a peptide [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 8013-8017.
- [55] White TR, Renzelman CM, Rand AC, et al. On-resin *N*-methylation of cyclic peptides for discovery of orally bioavailable scaffolds [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 810-817.
- [56] Beck JG, Chatterjee J, Laufer B, et al. Intestinal permeability of cyclic peptides: common key backbone motifs identified [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 12125-12133.
- [57] Hashizume M, Douen T, Murakami M, et al. Improvement of large intestinal absorption of insulin by chemical modification with palmitic acid in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1992, 44: 555-559.
- [58] Arbit E, Goldberg M, Gomez-Orellana I, et al. Oral heparin: status review [J]. *Thromb J*, 2006, 4: 6-12.
- [59] Knudsen LB, Lau J. The discovery and development of liraglutide and semaglutide [J]. *Front Endocrinol*, 2019, 10: 155-186.
- [60] Onoue S, Ohshima K, Debari K, et al. Mishandling of the therapeutic peptide glucagon generates cytotoxic amyloidogenic fibrils [J]. *Pharm Res*, 2004, 21: 1274-1283.
- [61] Pedersen JS, Dikov D, Flink JL, et al. The changing face of glucagon fibrillation: structural polymorphism and conformational imprinting [J]. *J Mol Biol*, 2006, 355: 501-523.
- [62] Mroz PA, Perez-Tilve D, Liu F, et al. Pyridyl-alanine as a hydrophilic, aromatic element in peptide structural optimization [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 8061-8067.
- [63] Yan LZ, Johnson KW, Rothstein E, et al. Discovery of potent, cyclic calcitonin gene-related peptide receptor antagonists [J]. *J Pept Sci*, 2011, 17: 383-386.