

# Preparation process and quality control of stable polypeptide drugs

Ziyuan Zhou Juan Hong Jing Zuo Ning Du Jun Meng\*

National Cancer Center / National Medical Clinical Research Center for Oncology / Department of Pharmacy, Cancer Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Shenzhen, Guangdong, 518116, China

## Abstract

This paper analyzes the preparation process and quality control core technology of stable polypeptide drugs, combined with the stable polypeptide project targeting the receptor binding region of the COVID-19 virus spike protein, and reports that the stable polypeptide of the linear polypeptide has a stronger binding ability to the COVID-19 virus spike protein. In view of the poor biological stability and membrane penetration of peptides, easy hydrolysis, the systematic research aims to comprehensively improve the stability and biological activity of peptides, and ensure their safety and effectiveness. Based on polypeptide characteristics and cutting-edge biotechnology, innovative preparation processes and quality control strategies are proposed, so as to lay a solid theoretical and practical foundation for the development and production of polypeptide drugs.

## Keywords

polypeptide drug; preparation process; quality control

# 稳定多肽药物的制备工艺与质量控制研究

周子原 洪娟 左靖 杜宁 孟珺\*

国家癌症中心 / 国家肿瘤临床医学研究中心 / 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院深圳医院药学部, 中国·广东·深圳 518116

## 摘要

本文剖析稳定多肽药物的制备工艺与质量控制核心技术, 结合靶向新冠肺炎病毒刺突蛋白受体结合区域的稳定多肽项目, 报告了对线性多肽进行闭环构建的稳定多肽对新冠肺炎病毒刺突蛋白有更强的结合能力。鉴于多肽类生物稳定性和穿膜性差, 易水解等问题对成药性的限制, 系统性的研究旨在全面提升多肽药物稳定性与生物活性, 保障其安全性和有效性。综合多肽特性与前沿生物技术, 提出创新制备工艺与质量控制策略, 为多肽药物研发生产筑牢理论与实践根基。

## 关键词

多肽药物; 制备工艺; 质量控制

## 1 引言

多肽药物, 因其独特的高生物活性和对靶点的高度特异性, 在众多疾病治疗中展现出非凡潜力。从糖尿病治疗中调节血糖相关生理过程的利拉鲁肽, 到针对新冠病毒(SARS-CoV-2)刺突蛋白(Spike protein)受体结合区域

(Receptor Binding Domain, RBD)的多肽类药物以及单抗类药物的开发<sup>[1,2]</sup>, 其应用范围不断拓展。然而, 多肽药物自身稳定性差这一关键短板, 如易受环境因素影响发生降解, 极大地制约了其在临床实践中的广泛应用。因此, 深入探究稳定多肽药物的制备工艺和质量控制技术, 对于突破当前瓶颈、充分挖掘多肽药物的医疗价值、提高其在治疗过程中的疗效和保障患者用药安全, 具有不可忽视的重要意义。

**【基金项目】**国家自然科学基金(项目编号: 22107045、82472934); 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院深圳医院课题(项目编号: E010221005、CFA202201006)。

**【作者简介】**周子原(1989-), 男, 中国广东深圳人, 博士, 副研究员, 从事临床药学研究。

**【通讯作者】**孟珺(1971-), 女, 中国广东深圳人, 硕士, 主任医师, 从事药学管理研究。

## 2 多肽药物的制备工艺

多肽的制备工艺主要分为化学合成法和生物合成法。

### 2.1 化学合成法

#### 2.1.1 固相合成

化学合成法作为多肽药物制备的核心方法之一, 固相合成凭借其显著优势逐渐占据主流地位。合适的固相载体应具备优良的化学稳定性、与多肽链的可靠连接能力以及在反应条件下不发生不必要的副反应等特性。通过将起始氨基酸

与固相载体牢固连接，为后续的多步缩合反应奠定基础，如图 1<sup>[1]</sup>。修饰步骤则是根据多肽药物的设计要求，对合成过程中的多肽链进行功能化修饰，如添加特定的化学基团以增强其稳定性或生物活性，或者通过关环增强多肽的稳定性，

如图 2 展示的靶向新冠肺炎病的刺突蛋白的多肽，适当的关环修饰可以增强结合能力。最后，分离纯化环节利用高效的色谱技术，将目标多肽从复杂的反应混合物中精确分离出来，获得高纯度的多肽产物。<sup>[3]</sup>

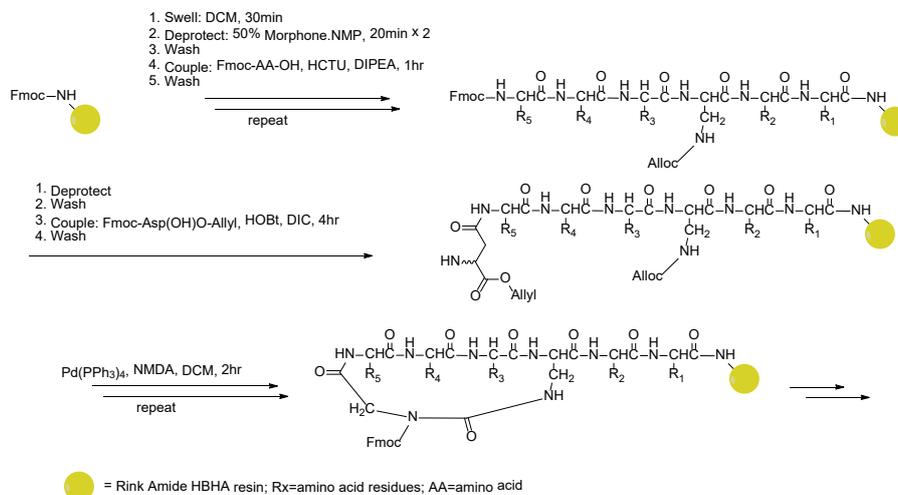


图 1. 稳定多肽的固相合成及关环步骤<sup>[4]</sup>

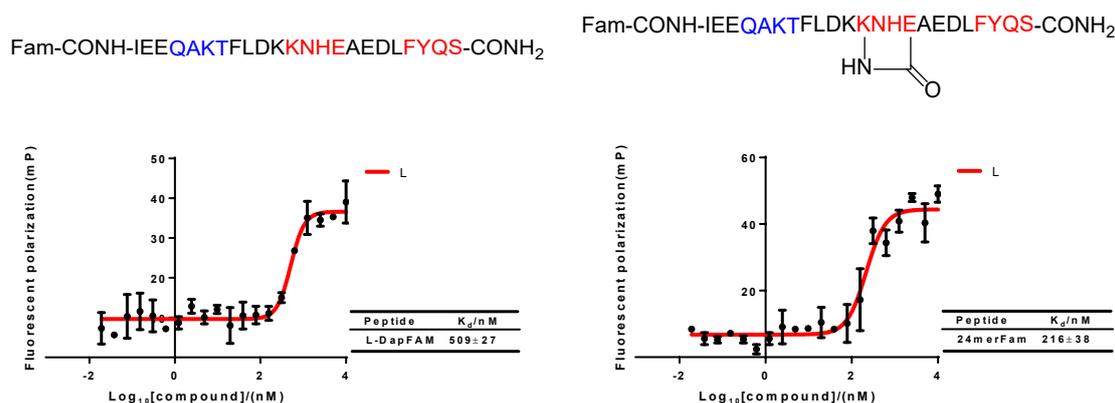


图 2. 对线性多肽进行关环构建的稳定多肽对新冠肺炎病毒刺突蛋白有更强的结合能力

### 2.1.2 液相合成

液相合成在短链肽的制备中仍有一定应用价值。但反应体系相对复杂，容易引入更多的杂质。随着反应步骤的增加，副反应增多，产物纯化难度呈指数级上升。

## 2.2 生物合成法

### 2.2.1 天然提取法

天然提取法是从天然生物来源中获取多肽的方法。然而，这种方法受到资源限制，且提取过程复杂，获得的多肽产量有限，同时还可能受到生物体内其他成分的干扰，需要复杂的分离纯化步骤<sup>[5]</sup>。

### 2.2.2 酶催化法

酶催化法利用特定的酶作为催化剂来合成多肽。酶具有高度的选择性和催化效率，能够在温和的反应条件下实现多肽的合成。但酶的来源、成本以及酶的稳定性等问题限制了其大规模应用，并且需要精确控制反应条件以确保酶的活

性和反应的选择性。

### 2.2.3 发酵法

发酵法通过微生物发酵来生产多肽。微生物的代谢途径可以被设计和调控，以实现特定多肽的合成。但发酵过程容易受微生物菌株特性、发酵条件（如温度、pH、溶氧等）的影响，需要严格的过程控制来保证多肽的产量和质量。

### 2.2.4 基因重组法

基因重组法是基于现代合成生物学技术的先进方法，尤其适用于长链肽和复杂肽的制备。通过对基因序列的设计和重组，可以实现多肽的定向表达。这种方法具有表达定向的优势，能够按照预期合成具有特定结构和功能的多肽。基因重组法相对更加安全环保，减少了化学合成过程中可能产生的有害物质。然而，其研发过程涉及复杂的基因工程技术，研发难度大，周期长，而且在表达过程中可能会遇到产率低等问题。

## 3 多肽药物的质量控制

### 3.1 纯度检测

纯度检测是多肽药物质量控制的关键环节。高效液相色谱 (HPLC) 联合质谱 (MS) 是多肽药物纯化和纯度监控的重要手段。多级质谱联用技术更是能够深入剖析多肽的结构信息<sup>[5]</sup>。

### 3.2 结构确证

多肽药物的结构正确与否直接决定其生物活性。Edman 降解法作为一种经典的测序方法, 对于短肽和中等长度肽的 N 端测序具有较高的准确性。其原理是基于苯异硫氰酸酯 (PITC) 与多肽 N 端氨基酸的特异性反应, 通过逐步降解和分析反应产物, 可以确定多肽 N 端的氨基酸序列。质谱法在结构确证方面具有独特优势, 通过多级质谱联用技术, 如串联质谱 (MS/MS), 可以对多肽进行裂解和分析, 从裂解碎片的质量信息中推断出整个多肽的氨基酸序列。核磁共振 (NMR) 法是一种能够提供丰富结构信息的技术, 它可以测定原子间的距离、角度以及动力学参数等。通过对这些参数的分析, 可以精确确定多肽的三维结构, 从而全面确证多肽的结构完整性和正确性。

### 3.3 活性与稳定性评估

多肽药物的活性与稳定性评估是保障其疗效和安全性的核心步骤。表面等离子共振 (SPR) 技术可以实时监测多肽与靶标蛋白之间的相互作用, 精确测定其亲和力常数。这种对活性的准确评估能够确保多肽药物在体内能够准确地发挥其治疗作用。在稳定性评估中, 需要考虑多肽药物在不同储存条件 (如温度、湿度等)、运输过程中的振动和温度变化以及使用过程中的各种环境因素下的稳定性变化。通过加速稳定性试验、长期稳定性试验等方法, 模拟实际应用场景, 观察多肽药物的降解情况、活性变化等, 从而全面评估其稳定性, 为多肽药物的合理储存、运输和使用提供科学依据。

## 4 稳定多肽药物的制备工艺优化

为了克服多肽药物稳定性差的问题, 修饰与保护策略在多肽药物研发中得到了广泛应用。糖基化和 PEG 化是两种常见且有效的修饰方法<sup>[5]</sup>。

糖基化是在多肽分子上引入糖基, 通过改变多肽的亲水性、空间构象和电荷分布等性质, 提高多肽的稳定性。糖基可以作为一种保护基团, 减少多肽与酶的接触, 从而降低酶解的可能性。同时, 糖基化还可以影响多肽的药代动力学性质, 如增加其在血液中的循环时间, 提高生物利用度。在糖基化过程中, 需要选择合适的糖基供体和反应条件, 以确保糖基能够准确地连接到多肽的特定位置, 并且不影响多肽的生物活性。

PEG 化则是将聚乙二醇 (PEG) 链连接到多肽分子上。PEG 是一种无毒、生物相容性良好的聚合物, 其连接到多肽上可以形成一种空间位阻, 阻碍酶对多肽的接近, 从而减少酶解作用。此外, PEG 化还可以降低多肽的免疫原性,

因为 PEG 可以掩盖多肽分子上的一些抗原决定簇。PEG 的分子量和连接方式对多肽的性质有重要影响, 需要根据多肽的具体特点和应用需求进行优化选择。

除了糖基化和 PEG 化, 还有其他多种修饰方法, 如酰化、烷基化等, 这些修饰方法都可以从不同角度提高多肽药物的稳定性和生物活性, 但在应用过程中需要综合考虑修饰对多肽结构和功能的影响, 确保修饰后的多肽仍然能够发挥预期的治疗作用。

## 5 实践案例分析

本文以靶向新冠刺突蛋白的多肽药物为例, 重点阐述了化学合成采用固相合成法的纯化过程。质量检测环节, 采用 HPLC 和质谱联用技术进行纯度检测, 结果显示多肽纯度达到了 99% 以上。结构确证方面, 通过 Edman 降解法、质谱法和 NMR 法的综合应用, 准确确定了多肽的结构和修饰情况。活性评估实验表明, 该多肽药物对新冠肺炎刺突蛋白具有显著的抑制作用, 其 IC<sub>50</sub> 值达到了纳摩尔级别。稳定性评估结果显示, 稳定多肽药物比线形肽更加稳定, 更加不易水解。<sup>[1]</sup>

## 6 结论

本文探讨了稳定多肽药物的制备工艺与质量控制的关键技术, 提出了一系列创新的制备工艺和质量控制策略。通过实践验证, 这些策略能有效提高多肽药物的稳定性和生物活性, 为其临床应用提供有力支持。未来, 随着生物技术的不断发展, 稳定多肽药物的制备工艺与质量控制技术将进一步完善和优化, 为更多疾病的治疗提供新的药物选择。

### 参考文献

- [1] F. Chen, Z. Liu, W. Kang, F. Jiang, X. Yang, F. Yin, Z. Zhou, Z. Li. Single-domain antibodies against SARS-CoV-2 RBD from a two-stage phage screening of universal and focused synthetic libraries[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2024, 24(1): 199.
- [2] Z. Li, F. Yin, Z. Zhou, K. Qiao, Q. Shi, E. Yan, Stable polypeptide targeting spike protein of SARS-CoV-2 pneumonia virus and its application in medicine for treating SARS-CoV-2 pneumonia virus, Peking University Shenzhen Graduate School, Peop. Rep. China; Shenzhen Bay Laboratory Pingshan Biomedical R&D and Transformation Center. CN112321686A, China, 2022, p. 20pp.
- [3] W. Zhong, C. Wan, Z. Zhou, C. Dai, Y. Zhang, F. Lu, F. Yin, Z. Li. 4-Iodine N-Methylpyridinium-Mediated Peptide Synthesis[J]. *Organic Letters*, 2023.
- [4] X. Qin, X. Shi, L. Tu, Y. Ma, Z. Zhou, R. Zhao, M. Zhan, F. Yin, Z. Li. Autophagy inducing cyclic peptides constructed by methionine alkylation[J]. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)*, 2019, 55(29): 4198-4201.
- [5] K. Hu, F. Yin, Z. Zhou, C. Lian, Y. Liu, C. Sun, W. Li, J. Zhang, Z. Li. Directional assembly of a stapled  $\alpha$ -helical peptide[J]. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)*, 2019, 55(70): 10484-10487.