

• 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多重性质。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2019年No.9和2022年No.7分别叙述了利拉鲁肽和索马鲁肽的研制过程,丹麦诺和诺德公司开创的这两个GLP-1受体激动剂,为治疗2型糖尿病提供了新的疗法。本品替尔泊肽是礼来公司研制的GIP和GLP-1受体双重激动剂,虽有一定程度的跟随性,但更多富有创新色彩:调节多肽的一级序列,使对两个靶标有相近相适的活性,不因活性差别大而“无过无不及”,有利于治疗窗口的设定,这是双靶标分子设计的难点;在肽链上缀合了亲脂-亲水链,既能确保本品较好地结合于白蛋白,保障了一周一剂的长效性,也赋予肽分子的溶解性,实现有利于生物药剂学的性质;还在序列的两处换成非天然氨基酸,活性依然在,稳定性提高。这诸多创新,确保了在头对头的临床试验中,显示出替尔泊肽的优势。当然由于上市不久(2022年5月),尚需在真实世界作进一步的广泛验证。(编者按)

DOI:10.16438/j.0513-4870.2022-0679

作用于双靶标的降糖减肥药替尔泊肽的研制

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)

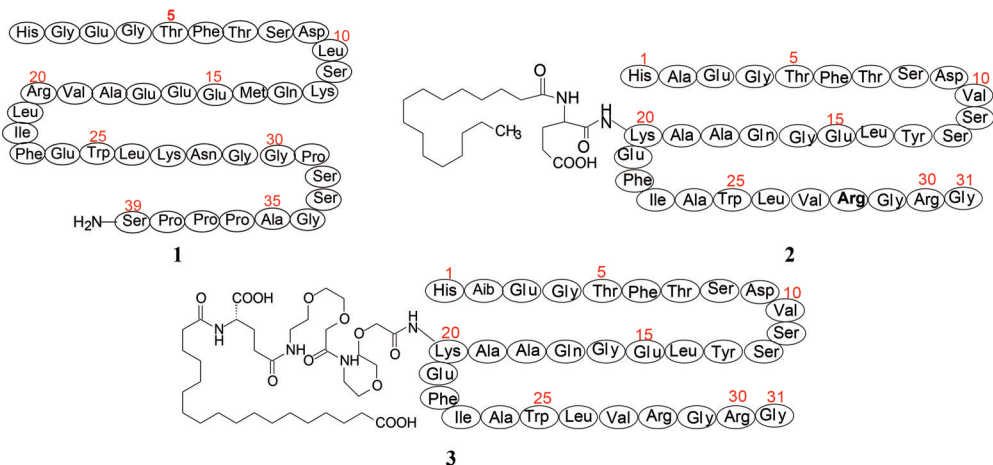
1 背景

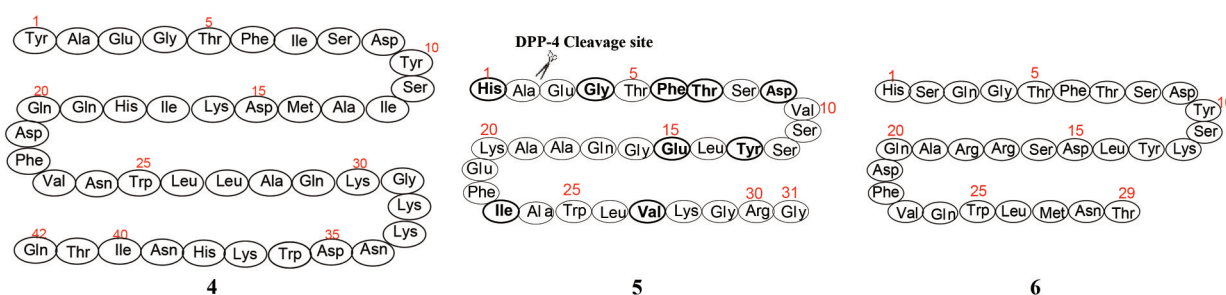
人体有多种生理环节调节糖和脂肪代谢,并作为研制治疗2型糖尿病和降低体重的药物靶标,其中之一是胰高血糖素样肽-1受体(GLP-1R)的激动剂。作为药物已有数个上市应用,例如礼来公司2005年上市的艾塞那肽(1, exenatide),是从北美毒蜥体内分离的外泌肽(exendin-4)的合成产物。丹麦诺和诺德公司2010年研制的利拉鲁肽(2, liraglutide)是从GLP-1出发,变换个别氨基酸,并且缀合脂肪链的药物,是每日注射一剂的降血糖药。2017年诺和诺德又研制出长效产品索马鲁肽(3, semaglutide),进一步优化了药效与药代。每

周注射一次,也可以每日口服用药。这三个肽类药物作用靶标相同,都是GLP-1R完全激动剂。

2 研制双靶标激动剂的依据

人体内调节糖、脂肪和能量的代谢与平衡有多种肽类激素,除熟知的胰岛素外,还有葡萄糖依赖性促胰岛素释放多肽(4, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, GIP)和胰高血糖素样肽-1(5, glucagon-like peptide-1, GLP-1), GIP和GLP-1又称肠促胰岛素。此外还有胰高血糖素(6, glucagon, GCG)调节糖、脂肪和氨基酸代谢。这些多肽通过结合并激活相应的受体,调节体内糖和脂肪的平衡。GLP-1的功能是刺激胰岛





素分泌, 保护胰腺 β 细胞, 抑制胰高血糖素分泌、胃排空和纳食。GIP是双功能激素, 在高血糖下, GIP促进胰岛素分泌, 降低血糖; 低血糖时刺激胰岛 α 细胞释放胰高血糖素, 提高血糖水平, 所以GIP是维持血糖稳态的激素。

目前研制GIP受体拮抗剂的报道较少, 而多是激动剂, 因为激动GIP受体可增强GLP-1受体的活性, 显示出治疗肥胖症和糖尿病方面的疗效。本项目不同于上述单一受体的3个肽类激动剂, 而是GIP和GLP-1两个受体的双重激动剂。表1列出了调节糖、脂肪和能量代谢的重要肽类激素。

3 活性与选择性评价

3.1 评价GIP、GLP-1和受试物对GIPR和GLP-1R的结合作用 评价化合物对离体GIP受体和GLP-1受体的亲和力是用GIP受体的cDNA转染中国仓鼠卵巢细胞(CHO), 用CHO细胞膜, 测定结合常数(K_i)。细胞溶解后, 匀浆, 反复离心, 使上清液澄清, 细胞膜颗粒置缓冲液中低温保存。GIP用 ^{125}I -乳过氧化物酶作放射性碘标记, 比活性 $2\,200\text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$, 用无标记的GIP作同源竞争结合实验, 闪烁接近实验测定GIP对GIPR的 K_d 值。化合物的结合性能是用不同浓度的受试物测定竞争性结合数据, 经非线性回归计算出 IC_{50} 值, 再经Cheng-Prusoff方程换算成结合活性 K_i 值。

用类似的原理和方法在293HEK细胞高表达人GLP-1受体, 测定GLP-1对GLP-1受体的 K_d 值。也按上述类似方法测定受试物的结合活性 K_i 值。表2列出了天然配体GIP和GLP-1对GIPR和GLP-1R的结合常数。表中列出的归一化因子(normalization factor)4.53是两个天然配体结合常数的比值, 其用途是将各个受试物激动双靶的摩尔比作归一化, 作为受试物双

Table 2 The binding affinity of GIP and GLP-1 to receptors

Compound	K_d /GIPR /nmol·L ⁻¹	K_d /GLP-1R /nmol·L ⁻¹	Absolute ratio of K_d s	Norm. factor
4 (GIP)	0.175	>175	>1 000	4.53
5 (GLP-1)	>100	0.793	<0.008	

活性的一种量度。

3.2 评价GIP、GLP-1和化合物的功能活性 用HEK293细胞系分别高表达GIPR、GLP-1R和胰高血糖素受体(GCGR), 评价不同浓度下GIP、GLP-1和受试物的功能活性, 是测定诱导细胞的环磷酸腺苷(cAMP)生成量, 并以GIP、GLP-1产生的最大量为基准, 转化成百分含量, 经非线性回归计算出的半数有效浓度 EC_{50} 和最大激动效应 E_{max} (%)。表3列出了GIP和GLP-1激动上述单个受体, 诱导细胞产生cAMP的 EC_{50} 和 E_{max} (%)。此外, 为评价受试物的脱靶作用, 还在HEK293细胞系克隆高表达GLP-2R, GLP-2诱导产生cAMP的 EC_{50} 值为 $1.71\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 后面叙述的受试物对高表达GLP-2R细胞产生cAMP的活性都低于100~1 000倍(对GLP-2R物脱靶作用)。

Table 3 The functional activity of GIP, GLP-1 and GCG for cAMP production of HEK293 cell lines

Compound	hGIPR		hGLP-1R		hGCGR	
	EC_{50} /nmol·L ⁻¹	E_{max} /%	EC_{50} /nmol·L ⁻¹	E_{max} /%	EC_{50} /nmol·L ⁻¹	E_{max} /%
4 (GIP)	0.135	100	-	-	-	-
5 (GLP-1)	-	-	0.176	102	-	-
6 GCG	-	-	-	-	0.020 8	115

3.3 评价受试物激活GLUTag细胞产生cAMP的功能 小鼠小肠中有一种称作GLUTag细胞, 其细胞膜上特异性表达GIP受体, 但没有GLP-1受体。将GLUTag

Table 1 The typical human peptide hormone related to modulation of sugar, lipid, and energy metabolism

Ligand	Production	Pathway	Effect	Composition
4 (GIP)	Intestine	Increase of insulin secretion	Reduce blood sugar and lose body weight	42-peptide
5 (GLP-1)	Intestine	Increase of insulin secretion	Reduce blood sugar and lose body weight	37-peptide and activated form as 31-peptide
6 (GCG)	Pancreas α cell	Stimulate liver to liberate glucose	Elevate blood sugar	29-peptide
GLP-2	Pancreas α cell	Promote intestinal epithelial cell proliferation	Potential cancer risk	32-peptide
Insulin	Pancreas β cell	Activate a series of kinases	Increase glucose utilization and glycogen synthesis	51-peptide

细胞与 GIP 或本项目的双功能激动剂温孵, 细胞内可产生剂量依赖性的 cAMP, 而 GLP-1 和 GLP-1 样功能的化合物对 GLUTag 细胞没有激活作用。该实验是测定受试物单独对 GIPR 的功能。

3.4 评价受试物刺激胰岛分泌胰岛素的作用 在大鼠或小鼠的胰岛细胞中加入不同浓度的受试物温孵, 测定产生的胰岛素量(阳性对照物是 $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GLP-1), 经回归分析确定。

3.5 评价受试物的免疫原性 由于某些多肽化合物具有免疫原性, 产生不良反应, 本项目还评价了受试物因免疫原性而可能引发的过敏反应。一种方法是用 EpiVax 免疫信息软件预测, 按照 9 个氨基酸组成的肽片段对人白细胞抗原 (HLA) 做虚拟结合, 然后用这些 Epi-Bars 经外延矩阵 (Epi-matrix) 打分。低打分的受试物预示有较低免疫原性。另一方法是用半体内 (*ex-vivo*) 测定受试物的免疫原性, 是从世界范围内的 50 个有代表性的健康人采集的 T 细胞与受试物温孵, 测定 CD4^+ T 细胞的增值和白细胞介素 2 (IL2) 的分泌量。

4 化合物的设计

GLP-1 和 GIP 都属于肠降血糖素, 餐后经小肠分泌, 作用于各自的受体, 导致胰腺分泌胰岛素, 但二者的生理强度不同。患者服用 GLP-1 受体激动剂的药物如 **1**、**2** 和 **3** 产生的不良反应是恶心与呕吐, 限制了用药剂量和疗效, 而迄今还没有 GIP 的激动剂上市。

研制 GLP-1 和 GIP 受体双重激动剂, 从生理功能看, 具有相同与相似性; 从二者的氨基酸组成看, GLP-1 和 GIP 与各自受体的特异性结合主要处于 N 端, 分析和比较 N 端的序列, 有较多相同的氨基酸残基 (图 1)。

比较 1~31 个氨基酸序列, N 端 Ala2~Ser11 片段中在相同位置有 8 个氨基酸是相同的, 预示这些氨基酸所处的空间位置是相似的。基于以上考虑, 并借鉴索马鲁肽提高稳定性的成功经验, 设计了通式 **7** 的三十九肽, 内容要点是: ① 保留了在 GIP 和 GLP-1 序列中相同位置的相同氨基酸, 如同红色标出的 9 个氨基酸, 其中 7 个集中在 N 端。② 其余位置与 GIP 相同的 8 个氨基酸用蓝色标出, 多数也出现在 N 端; 与 GLP-1 序列相同的 5 个氨基酸用粗体黑字母标出。所以设计的双重激动剂与 GIP 和/或 GLP-1 序列相同的氨基酸共有 22 个, 在三十九肽中占比 56%, 氨基酸一级序列的相似或相同预示二/三级结构和空间取向具有相似性。③ 通式 **7** 的 C 端 Gly30 到 Ser39 的氨基酸完全“照搬”

天然多肽艾塞那肽 (**1**) 的序列。这段序列对双靶标的活性贡献不得而知, 但至少临床已证实有较低免疫原性, 应是有益无害的。④ 序列变换的位点有 3 处 (X_1 , X_2 , X_3), 旨在提高分子的代谢稳定性, 尤其 Ala2-Glu3 是二肽基肽酶 (DPP-4) 的剪切位点。⑤ 借鉴索马鲁肽的设计策略, 修饰 Lys20 表明不影响与受体的结合, 因而也在 Lys20 的 ζ -氨基上连接氨基醇和二乙醇片段 (亲水性) 再缀合长链脂肪二羧酸 (亲脂性)。

5 化合物的活性和稳定性

5.1 目标化合物的设计 基于上述的整合性设计原则, 通式 **7** 变换的位点是将 Ala2 变换为 2-氨基异丁酸 (Aib2), 嵌入非天然氨基酸避免了 DPP4 酶的位点识别和裂解; 13 号氨基酸也换作 Aib13, 还将 Phe22 的苯基变换为 1-萘基, 探索增大体积和疏水性对活性的影响。此外, 在 Lys20 的 ζ -氨基经亲水性片段缀合不同碳原子数的二元酸以及连接 1 或 2 个谷氨酸残基, 目的是与血浆中白蛋白发生疏水性结合, 也调节分子的溶解性, 同时避免被 DPP4 酶的裂解破坏。二元脂肪酸的亲脂性/(乙二醇、乙醇胺和谷氨酸) 的亲水性之间的比例, 旨在优化肽分子的稳定性和溶解性。合成的目标化合物列于表 4。

5.2 目标化合物对 GIP 和 GLP-1 双受体的结合作用 课题研制的目标是化合物能够同时激活两个受体, 要求作用强度上相互匹配, 即在有效剂量下同时结合并激活 GIPR 和 GLP-1R。表 5 列出了化合物与 GIPR 和 GLP-1R 的结合强度和比值, 也列出了阳性对照物 GIP 和 GLP-1 的结合力。结果提示化合物 **8** (C_{20} , Glu₁, Phe22)、**9** (C_{20} , Glu₁, Naph22) 和 **12** (C_{20} , Glu₂, Phe22) 对两个受体的结合强度较强, 而且相对摩尔比值也接近于 1。

5.3 化合物对 GIP 和 GLP-1 双受体的激动活性和对 GCG 受体的脱靶作用 进一步评价目标化合物激活两个受体 GIPR 和 GLP-1R 的功能, 同时考察对胰高血糖素受体 (GCGR) 是否有脱靶作用, 结果列于表 6。数据提示化合物激活两个受体的功能都弱于天然配体, 尤其弱于 GLP-1 数十倍。但由于同时可激活两个受体, 并且对胰高血糖素受体未显示活性, 仍具有期待的前景。

5.4 受试物单独对 GIPR 的激动活性 不同浓度的受试物与 GLUTag 细胞温孵, 测定细胞内 cAMP 的产生量, 经回归计算化合物的 EC_{50} , 由于 GLUTag 细胞只表达 DIP 受体, 所以 cAMP 的生成量表征了受试物激动



Figure 1 The composition comparison of GLP and GLP-1. The red color indicates the same amino acid at the sequence

Table 4 The structures of prepared 39-peptides with altered amino acid residues and conjugated aliphatic acids at Lys20

Compound	X ₁	X ₂	Lys20-lipophilic side chain	X ₃
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				

Table 5 The binding affinity of compounds to GIPR and GLP-1R

Compound	K_i <i>h</i> GIPR /nmol·L ⁻¹	K_i <i>h</i> GLP-1R /nmol·L ⁻¹	Absolute ratio of GLP-1R/GIPR	Molar ratio of GLP-1R/GIPR
4	0.175	>175	>1 000	—
5 (-NH ₂)	>100	0.793	<0.008	—
8	34.4	232	6.7	1.48
9	63.9	344	5.4	1.19
10	26.7	427	16	1.53
11	40.7	714	17.5	3.86
12	17.8	158	8.9	1.96
13	44.2	365	8.3	1.83
14	46.1	352	7.6	1.68
15	67.5	307	4.5	0.99

GIP 受体的功能。表 7 列出的化合物的活性, 也低于 GIP 逾百倍, 其中活性最强的是化合物 8。

5.5 化合物诱导胰腺分泌胰岛素的活性 雄性小鼠胰腺经一系列处理得到纯化的胰岛细胞, 与不同浓度的受试物温孵, 一定时间后终止实验, 以 30 nmol·L⁻¹ 的 GLP-1 为阳性对照物, 测定培养液中的胰岛素含量, 回归分析计算化合物的半数有效浓度 EC₅₀。表 8 列出了化合

Table 6 The agonist function of compounds on GIPR and GLP-1R and off-targeting on GCGR

Compound	<i>h</i> GIPR		<i>h</i> GLP-1R		<i>h</i> GCGR	
	EC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	E _{max} /%	EC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	E _{max} /%	EC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	E _{max} /%
4	0.135	100	—	—	—	—
5	—	—	0.176	102	—	—
6	—	—	—	—	0.028	115
8	11.0	97.9	71.2	85.2	>1 000	Not detect
9	17.5	94.7	75.7	98.2	>1 000	Not detect
10	31.5	106	33.9	96.2	>1 000	Not detect
11	3.76	102	66.9	100	>1 000	Not detect
12	8.76	105	70.9	105	>1 000	Not detect
13	4.40	106	28.4	104	>1 000	Not detect
14	8.07	106	35.5	97.2	>1 000	Not detect
15	21.1	108	57.9	88.4	>1 000	Not detect

物的活性。用大鼠胰岛细胞还测定了化合物 8 和 10 的 EC₅₀。

5.6 化合物的药代动力学性质 用雄性猕猴评价化合物的药代动力学性质, 皮下一次注射 0.2 mg·kg⁻¹ 的受试物, 测定主要参数的均值列于表 9。结果提示, 化合物 8 的半衰期显著长于其他化合物, 而且清除率 (CL)

Table 7 The agonist potency of compounds against GLUTag cells

Compound	EC ₅₀ /nmol·L ⁻¹
4 (GIP)	11.62
8	1 494
9	2 917
10	1 610
11	2 186
14	2 746

Table 8 The activity of compounds for promoting insulin secretion from mouse and rat islets

Compound	Mouse/EC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	Rat/EC ₅₀ /nmol·L ⁻¹
8	47.2	15.5
9	30.0	Not test
10	58.9	34.9
11	3.5	Not test
13	51.4	Not test
14	11.3	Not test

Table 9 The mean pharmacokinetic parameters following subcutaneous dose of 0.2 mg·kg⁻¹ to cynomolous monkeys

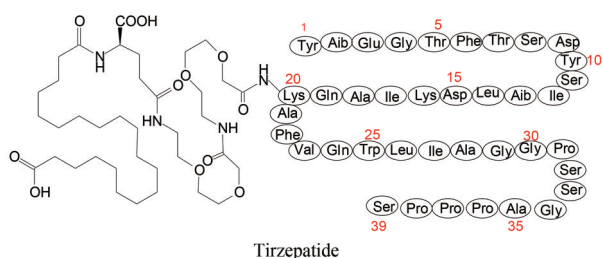
Compound	Mean T _{1/2} /h	Mean T _{max} /h	Mean CL /mL·h ⁻¹ ·kg ⁻¹
8	55	8	0.73
9	43	24	1.2
10	34	8	1.3
13	23	4	2.8
14	32	6	1.5
15	23	10	4.7

也最低,进一步测定生物利用度 $F = 83\%$ (Bokvist BK, Coskun T, Cummins RC, et al. GIP and GLP-1 co-agonist compounds. US 9474780 B2. 2016-10-25)。

6 候选物的确定和替尔泊肽的上市

综合目标化合物的药效、药代和安全性数据(未完全列出),确定了化合物**8**为候选物,定名为替尔泊肽(tirzepatide),三期临床与索马鲁肽头对头的随机双盲试验,为期40周试验治疗1 879名2型糖尿病患者,按照1:1:1:1的比例,随机接受剂量为5、10或15 mg的替尔泊肽或剂量为1 mg的索马鲁肽治疗。结果显示5、10和15 mg试验组糖化血红蛋白水平与基线相比的平均变化分别为-2.01%、-2.24%和-2.30%,而索马鲁肽组为-1.86%,与索马鲁肽组相比,替尔泊肽的各

个剂量组糖化血红蛋白水平变化都具有优势。替尔泊肽治疗组患者的体重减轻幅度大于索马鲁肽组 (Frías JP, Davies MJ, Rosenstock J, et al. Tirzepatide versus semaglutide once weekly in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 2021. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107519>)。美国FDA于2022年5月批准上市,每周注射一次治疗2型糖尿病。



7 后记

理性设计双靶标药物分子的难点在于,构建一个分子同时对两个靶标呈现高选择性亲和力,并避免对第三个受体的脱靶作用(杂泛性);在作用强度上还需要有匹配性,在靶组织部位,受体量和作用强度的适配,达到兼容的协调效果,确保治疗剂量下对两个靶标都得到希冀的效果,不至于发生某一无效或另一出现不良反应的尴尬局面。作用于双靶标的小分子药物是通过优化必要的功能基及其空间分布,达到契合于两个受体的目标;而多肽激动剂药物,是靠氨基酸所在的序列实现双重激活效应。设计本品的策略要素是,尽可能模拟天然配体GIP和GLP-1的序列组成;同时整合了已上市药物艾塞那肽的C端片段;变换个别天然氨基酸为非天然氨基酸,以降低被体内酶的水解作用;还引入长链的亲脂性脂肪酸链以提高与血浆白蛋白的结合能力和达到长效性,并加入乙二醇/乙醇胺/谷氨酸片段以调整多肽的溶解性等。本品作为新一代肽类降糖减肥药,设计上虽然有一定的跟随和借鉴性,但双靶标作用是本品的创新亮点,显著降低了先驱药物只对GLP-1受体的单一靶标,存在潜在的不良反应和剂量限制,因而在临床与已有药物头对头的比较试验治疗中显示出治疗优势。