•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。

以GLP-1受体为靶标研制的降糖药利拉鲁肽和司美格鲁肽是丹麦诺和诺德公司分别在2010和2017年上市的降血糖药, 本刊在2019年9期和2022年7期 (名为塞马鲁肽) 叙述了这两个GLP-1类似物的研制过程。本品作为GLP-2受体激动剂, 是日本武田公司2012年研制成功的, 是治疗罕见病短肠综合征的首创性药物。虽然两个靶标的天然配体都源自人体内胰高血糖素原, 却因是组成同一内分泌肽的不同片段, 结构与功能迥异。本品靶标的基础性研究和功能的发现是在20世纪90年代初, 发现胰高血糖素原产生的一组内分泌肽中有促进肠细胞增长的成分, 揭示出GLP-2的生理学功能。在结构变换研制新药的过程中用氨基酸扫描手段优化了药效和药代性质。本品的研制体现了由基础研究的发现过渡到应用研究的转化过程。 (编者按)

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0665

治疗罕见病短肠综合征的替度格鲁肽研制

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 引言: 必要的生物学知识

哺乳类动物消化系统的胰高血糖素原 (proglucagon) 是由158个氨基酸组成的多肽, 作为底物在具有组织特异性的转化酶 (PC) 作用下, 产生一组胰高血糖素原的肽类激素 (PGDPs), 因而这些肽类激素具有组织特异性: 转化酶PC1和PC3在肠分泌细胞中催化生成胰高血糖素样肽1和2 (GLP-1和GLP-2)。转化酶PC2在胰岛细胞产生胰高血糖素 (glucagon)。当血液中葡萄糖水平和 (或) 营养物发生变化时, 内分泌细胞就分泌PGDPs, 例如胰岛产生胰高血糖素, 肠细胞产生GLP-1和GLP-2, 通过刺激相应的受体 (都是GPCR) 以多途径方式调控葡萄糖平衡和能源的吸收。图1简要说明PGDPs与胰高血糖素原的组成关系 (Sinclair EM, Drucker DJ. Proglucagon-derived peptides: mechanisms of action and therapeutic potential. Physiology, 2005, 20: 285−365)。

功能性实验证明这些肽类受体是研制药物的靶标, 胰高血糖素受体拮抗剂和GLP-1受体激动剂都已有上市药物治疗糖尿病和肥胖病。而GLP-2受体激动剂首创性药物替度格鲁肽则有完全不同的适应症。本文简述它的研制过程。

2 好奇心和研究精神促进了GLP-2的功能发现

20世纪80年代在哈佛作访学的Drucker与其导师Habener发现肠胰高血糖素原 (proglucagon) 可产生两种肽, 并证明其中一个是强效促进胰岛分泌胰岛素以调节血糖的多肽, 并定名为胰高血糖素样肽-1 [GLP-1 (7-37)] 和 [GLP-1(7-36-酰氨)] (Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, et al. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84: 3434−3438)。当时还明确阐述GLP-1能够降低血糖而申请了专利。但对另一肽分子没有进一步研究。

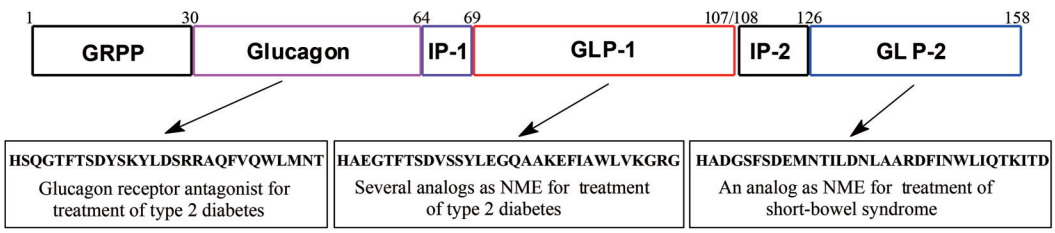


Figure 1 Structural organization of proglucagon and the proglucagon-derived peptides

Drucker 回到多伦多大学, 继续阐明 DNA 序列和负责调控胰高血糖素原基因转录进行实验研究。为了构建能够表达肠道源自胰高血糖素原的多肽 (PGDPs) 的稳定细胞系, 使用转基因小鼠选择性靶向 SV40 T 抗原, 构建了 PGDPs 在脑、胰岛细胞以及小肠和大肠的一些内分泌细胞中转基因表达。这种胰高血糖素 SV40 (GLUTag) 小鼠在饲养中体重减轻, 停止进食。尸检表明, 多数小鼠出现胰腺内分泌细胞增生, 并且都在大肠中出现内分泌肿瘤 (Lee YC, Asa SL, Drucker DJ. Glucagon gene 5′-flanking sequences direct expression of SV40 large T antigen to the intestine producing carcinoma of the large bowel in transgenic mice. J Biol Chem, 1992, 267: 10705−10708)。GLUTag 肿瘤细胞可用于体外克隆 PGDPs 的肠内分泌细胞系, 该细胞系不仅高表达胰高血糖素原, 还可以调节 GLP-1 和 GLP-2 的分泌。

3 阐明 GLP-2 促肠增长作用

更重要的是, 在裸鼠皮下接种 GLUTag 细胞发生肿瘤的过程中, 发现内源性胰腺 PGDPs 基因表达受到抑制, 而小肠和大肠却显著增大。即使将产生 PGDPs 的细胞系接种传代, 肠道的增大可代代发生, 从而发现了 PGDPs 的发生和肠道生长之间存在着密切关联。

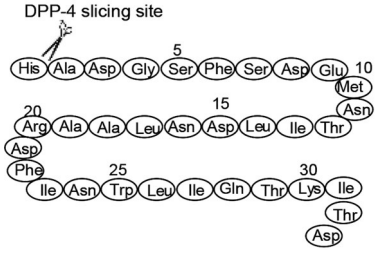
研究者建立了与产生 PGDPs 相关的肠道快速生长模型, 与 Allelix 公司合作, 研制治疗某些肠道疾病的药物。

首先要确定的是, 由胰高血糖素原、GLP-1、GLP-2、胰高血糖素 (69 肽) 和中间肽等组成的 PGDPs, 究竟哪 (几) 个组分是促进肠道增长因素。遂将上述这些单体分别注射到小鼠体内, 发现只有 GLP-2 能够促进各种品系小鼠的肠道生长, 而且所有年龄段的小鼠都存在剂量依赖的促肠道营养作用, 因而聚焦了 GLP-2 具有促进肠道生长和治疗某些肠道疾患的这种作用 (Tsai CH, Hill M, Drucker DJ. Biological determinants of intestinotrophic properties of GLP-2 *in vivo*. Am J physiol, 1997, 272: G662−G668)。

4 GLP-2 的生理功能和序列结构

胰高血糖素样肽-2 (**1**, GLP-2) 是由肠上皮 L 细胞分泌的 33 肽。输注 GLP-2 后 30～60 min 内, 可增加大鼠和猪的肠道已糖转运并减少胃排空。啮齿类动物连续数天服用 GLP-2, 由于刺激隐窝细胞增殖和抑制绒毛肠细胞凋亡, 可使小肠上皮扩张。GLP-2 还可预防与肠外营养相关的肠道发育不全, 并增强大鼠小肠切除后对肠切除的内源性适应性反应。在肠道炎症模型中 GLP-2 也呈现修复作用, 并且对实验性肠炎小鼠小肠和大肠中的上皮损伤有改善作用。这些实验为制定 GLP-2 类药物的适应症提供了启示和依据。

GLP-2 的作用靶标是 GLP-2 受体 (GLP-2R), 是由 7 跨膜结构域组成的 G 蛋白偶联受体, 细胞外的 N 端有较大的结合域与 GLP-2 结合, 经信号转导该激动作用增加了环磷酸腺苷 (cAMP) 的表达。此外, 研究表明在不同的组织中 GLP-2R 的序列有所不同, 因而与 GLP-2 的不同构象 (杂泛性) 结合的模式有区别, 产生不同的效应。GLP-2 与 GLP-1 虽然都源自胰高血糖素原, 但两个激素出自不同的区段, 序列差异较大 (图 2), 因而生理功能和药理效用不同。人体 GLP-2 (hGLP-2) 与大鼠 rGLP-2 的差异只是 Ala^{19} 与 Thr^{19} 之别。



1

5 GLP-2 的结构变换

5.1 活性评价 从两个方面评价 GLP-2 及其类似物的药理活性: 一是与 GLP-2 受体 (GLP-2R) 结合作用, 另一是对 GLP-2R 激动作用而导致 cAMP 生成量。测定结合作用的材料是用大鼠 GLP-2 受体稳定转染的 BHK 细胞膜。缓冲液中加入 10×10^7 个 BHK 细胞, 匀浆后离心, 上清液 (富含膜受体) 蛋白质浓度用 Lowry 法测定,储存于−80 ℃待用。

一定量的 ^{125}I 标记 His^1-rGLP-2 (示踪剂) 溶于孵育缓冲液中, 加入新鲜解冻的膜蛋白 (GLP-2R) 缓冲液, 混合, 振荡孵育 2 h。离心终止反应。用 Tris 缓冲液洗涤膜沉淀 3 次, 测定沉淀部分中结合的放射性蛋白量。为了消除 ^{125}I 标记的 rGLP-2 与 GLP-2R 非特异性结合, 要测定含有 1.3% ^{125}I 标记的 1 μmol·L^{-1} 非标记的受试肽的放射性, 扣除非特异性结合的放射性经计算得到受试物对 DLP-2R 的结合活性。

测定 cAMP 生成量是评价受试物对 GLP-2R 激动作用所产生的功能强度。用表达 rGLP-2R 的 BHK 细胞测定 cAMP 水平。将受试肽、含有 100 μmol·L^{-1} 的



Figure 2 Comparison of sequences of hGLP-$2^{1\text{-}33}$ and GLP-$1^{7\text{-}37}$

3-异丁基-1-甲基黄嘌呤缓冲液与细胞在 37 ℃孵育 10 min, 每个实验同时进行无受试物的对照实验。无水乙醇终止反应, 将细胞匀浆, 用 cAMP 放射免疫试剂盒测定 cAMP 含量, 计算 EC_{50}。

5.2 纵向和横向氨基酸扫描及构效关系 鉴于 GLP-2 的 2-位氨基酸是生物活性和体内降解 (DPP-4 剪切) 的关键位点, 用天然氨基酸和合成的非天然氨基酸置换 Ala[2], 序列中其他位置的残基不变, 合成一系列 2 位不同氨基酸的 GLP-2, 测定对 GLP-2 受体结合强度和信号转导能力。非天然氨基酸包括有 l-戊氨基酸、*β*-丙氨酸、*D*-丙氨酸、磷酸酪氨酸、*α*-氨基丁酸、去甲基缬氨酸和苯甘氨酸等。

结果表明, 多数目标物都有较强的结合 GLP-2R 作用, 如图 3a 所示。然而对受体激活的强度 (cAMP 生成量) 表明, 变换 2 位氨基酸大都效果较差, 只有天然氨基酸 Gly、Ile 和 Pro 以及非天然的 *α*-氨基丁酸、*D*-Ala 和 nor-Val 增强了 GLP-2R 功能性活性 (图 3b)。因此说明 2 位的氨基酸虽然不是受体结合的关键位点, 但对激动 GLP-2R 和 cAMP 的生成有重要影响。图 3a、b 显示的强结合性与高激动活性的化合物之间相关性不高。

用丙氨酸分别替换 GLP-2 序列中的氨基酸残基 (丙氨酸扫描), 除了 Gly2 和在位置 18 和 19 原本是 Ala 残基外, Ala 依此取代 h[Gly2]GLP-2 中所有位置的天然氨基酸。结果表明, 序列的第 5、6、17、20、22、23、25、26、30 和 31 位氨基酸被丙氨酸置换导致 GLP-2R 结合减弱 (图 4a), 这与 2 位变换氨基酸大都保持结合作用是不同的。然而 Thr12Ala 和 Asp21Ala 的变换仍保持正常的 GLP-2R 结合, 但明显减少了 cAMP 的产生 (图 4b)。此外, His1Ala 和 Asp3Ala 对受体结合作用影响不大, 但显著降低了受体激活。GLP-2 的 N 端游离氨基对于信号转导也至关重要。

图 4 显示有数种化合物比 hGLP-2 受体结合和/或 cAMP 生成活性增强或持平, 例如 h[Gly2]GLP-2、h[d-Ala2] 和 h[Pro2]-GLP-2。代表性的化合物对 GLP-2R 结合作用、激动活性和产生 cAMP 最大效应 (E_{max}) 列于表 1。

分析表 1 构效关系如下: ① 天然配体 GLP-2 与受体发生双位点结合, 两个结合力相差上万倍, 高亲和力 IC_{50}-1 = 2.2 pmol·L^{-1} (太强了), 低亲和力 IC_{50}-2 = 49.2 nmol·L^{-1} (也不低)。cAMP 生成量表征对 rGLP-2 的受体激活功能 EC_{50} 为 14.0 nmol·L^{-1}, 产生最大功能效应 (E_{max}) 的 cAMP 量为 28.4 pmol cAMP/mg 蛋白质。② 序列 2 的 Ala 换作 Gly(h[Gly2]GLP-2), 与 hGLP-2R 结合强度和激活作用与天然配体 GLP-2 大致相同,

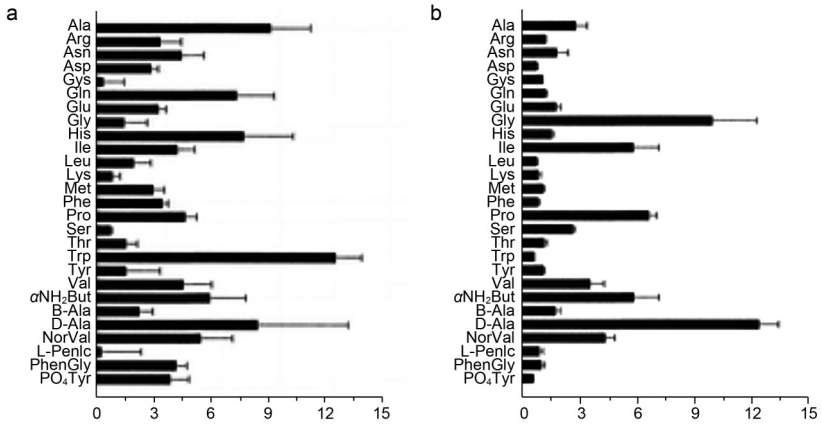


Figure 3 a. GLP-2R binding: as a percent of total specific binding. b. Activation: as the fold increase over basal cAMP production by position 2 analogues of GLP-2

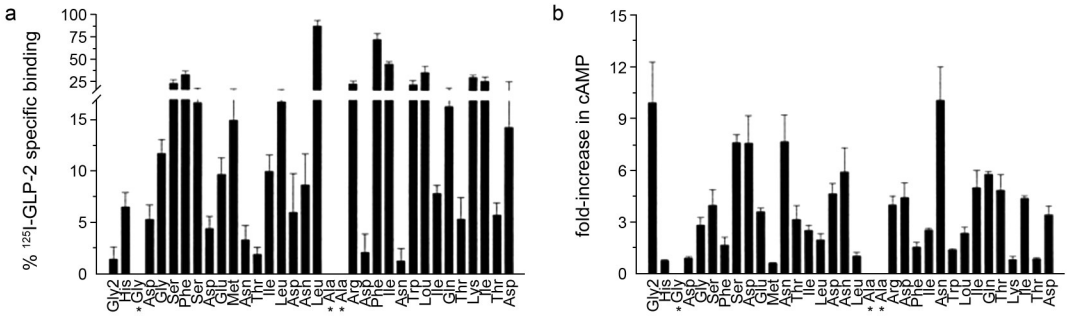


Figure 4 a: rGLP-2R binding as a percent of total specific binding and activation; b: The fold increase over basal cAMP production by alanine-substituted analogues of GLP-2. The asterisk indicates no change at the residue

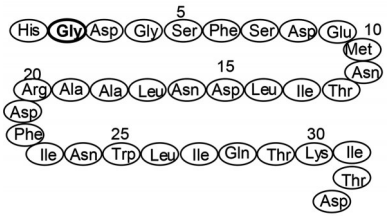
Table 1　Summary of rGLP-2R binding and activation characteristics for rGLP-2, h[Gly2]GLP-2, h[d-Ala2]GLP-2, h[Pro2]GLP-2, h[Gly2,Ala5]GLP-2, and h[Gly2,Ala16]GLP-2 (n = 3−4). a: E_{max} is defined as pmol of cAMP per mg of protein

GLP-2 & anal.	Binding		Activation	
	IC_{50}-1/pmol·L^{-1}	IC_{50}-2/nmol·L^{-1}	EC_{50}/nmol·L^{-1}	E_{max} [a]
rGLP-2	2.2	49.2	14.0	28.4
h[Gly^2]	4.8	42.9	9.2	27.2
h[D-Ala^2]	3.1	46.3	7.2	18.9
h[Pro^2]	6.6	228.0	5.1	21.0
h[Gly^2,Ala^5]	5.7	569.0	5.8	18.0
h[Gly^2,Ala^{16}]	0.2	89.0	1.7	27.2

IC_{50}-1 和-2 值分别为 4.8 pmol·L^{-1} 和 42.9 nmol·L^{-1}, EC_{50} 和 E_{max} 分别为 9.2 nmol·L^{-1} 和 27.2 pmol cAMP/mg 蛋白。③ h[d-Ala2] 和 h[Gly^2,Ala^{16}] 的结合与激活活性虽然略强于天然配体 rGLP-2, 但产生最大效应值 E_{max} 低于 rGLP-2。④ Pro2 置换的 h[Pro2]GLP-2 激活 GLP-2R 强于 rGLP-2, 但产生最大效应量 E_{max} 也不如 rGLP-2。⑤ 变换两个位点的化合物 h[Gly^2,Ala^{16}] GLP-2 结合与激活活性虽然强于 h[Gly^2] GLP-2, 最大效用值却是相同的, 所以未见明显优势 (DaCambra MP, Yusta B, Sumner-Smith M, et al. Structural determinants for activity of glucagon-like peptide-2. Biochemistry, 2000, 39: 8888−8894)。

6　候选化合物的药代动力学和批准上市

h[Gly2]GLP-2 被选定为候选化合物, 这个最初由多伦多大学与英国 Allelix 公司合作的项目, 后由日本武田定名为替度格鲁肽 (teduglutide) 进行研发。这个重组的人胰高血糖素样肽 2 类似物由于在 33 肽中只作了 Ala2Gly 变换, 其与 GLP-2R 的结合强度与激活功能几乎与天然配体 GLP-2 相同, 但也恰恰由于将 DPP-4 酶剪切位点 His^1-Ala^2 改变为 His^1-Gly^2, 显著改变了酶的识别和降解作用, 使得血浆半衰期由天然配体的 $t_{1/2}$ = 7 min 延长到替度格鲁肽 $t_{1/2}$ = 1.3 h, 进入了临床试验。



Teduglutide

研制 GLP-2R 激动剂, 从机制上确定了替度格鲁肽有可能调节胃肠道内衬细胞的功能和维持结构完整性, 因而批准临床试验治疗依赖肠外支持 (PS) 的短肠综合征 (SBS) 患者。所谓短肠综合征是由于不同原因造成小肠吸收面积减少而引起的临床症候群, 例如由于小肠广泛切除、小肠短路手术造成保留肠管过少, 小肠的大量丢失导致维持生命所需的液体和营养吸收障碍、腹泻和营养匮乏等, 严重者危及生命。

替度格鲁肽进行了群体药代动力 PK 和暴露反应分析, 表明具有一级吸收和线性消除的一室模型。SBS 患者服用替度鲁肽学的表观清除率 (CL)、分布容积 (V) 和消除半衰期 ($t_{1/2}$) 分别为 16.0 L·h^{-1}、33.9 L 和 1.47 h。经 III 期临床试验证明替度格鲁肽是治疗短肠综合征的有效药物。作为首创性药物 (FIC) 于 2012 年上市。我国于 2014 年也上市了武田的这一产品。