

## 口服新型降糖多肽 ODA 的设计及其口服降糖活性

安东贤, 姚文兵, 高向东, 田 洪\*

(中国药科大学生命科学与技术学院 江苏省生物药物成药性研究重点实验室, 南京 211198)

**摘要** 肠促胰岛素分泌肽胰高血糖素样肽-1(GLP-1)和葡萄糖依赖性促胰岛素释放多肽(GIP)能通过血糖依赖机制促进胰岛素分泌, 其特异性结合受体 GLP-1R 和 GIPR 是治疗 2 型糖尿病的良好靶点。以本实验室前期设计的口服降糖多肽 OHP2 为基础, 设计了可口服的新型降糖多肽——ODA。ODA 较 OHP2 的亲脂性提高, 在 Caco-2 细胞中的胞吞能力及跨细胞转运能力更强。ODA 保留了 OHP2 对 GLP-1R 的激活能力, 增强了与 GIPR 的结合能力。口服低剂量 ODA(0.53 mg/kg)即可达到与口服 OHP2(1.06 mg/kg)相当的降糖水平。研究结果显示, ODA 是治疗 2 型糖尿病极具潜力的口服药物。

**关键词** 肠促胰岛素分泌肽; 胰高血糖素样肽-1; 葡萄糖依赖性促胰岛素释放多肽; 2 型糖尿病; 口服降糖活性

中图分类号 TQ936 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2023)04-0511-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023032703

引用本文 安东贤, 姚文兵, 高向东, 等. 口服新型降糖多肽 ODA 的设计及其口服降糖活性[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(4): 511–518.

Cite this article as: AN Dongxian, YAO Wenbing, GAO Xiangdong, et al. Design and oral hypoglycemic activity of novel oral hypoglycemic peptide ODA[J]. J China Pharm Univ, 2023, 54(4): 511–518.

## Design and oral hypoglycemic activity of novel oral hypoglycemic peptide ODA

AN Dongxian, YAO Wenbing, GAO Xiangdong, TIAN Hong\*

Jiangsu Provincial Key Laboratory of Druggability of Biopharmaceuticals, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

**Abstract** Incretin promotes insulin secretion through a glucose-dependent mechanism, involving glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP). Therefore, their correspondingly specific receptors GLP-1R and GIPR are suitable targets for the treatment of type 2 diabetes. Based on the oral hypoglycemic peptide OHP2 designed by our team, we further designed a new oral hypoglycemic peptide, ODA to reduce glucose. Compared with OHP2, ODA exhibited better lipophilicity as well as the enhanced endocytosis and transcytosis in Caco-2 cells. In addition, ODA remained the ability to activate GLP-1R and enhanced the binding ability to GIPR. The hypoglycemic efficacy of the low-dose ODA (0.53 mg/kg) is comparable to that of OHP2 (1.06 mg/kg). These results indicated that ODA could be a new oral drug with potential for the treatment of type 2 diabetes.

**Key words** incretin; glucagon-like peptide-1; glucose-dependent insulinotropic peptide; type 2 diabetes; oral hypoglycemic activity

This study was supported by the Key Research and Development Project of Xinjiang Autonomous Region (No. 2020B03003)

GLP-1 由小肠 L 细胞分泌产生, 经 GLP-1R 介导, 以葡萄糖依赖的方式作用于胰岛  $\beta$  细胞, 促进胰岛素分泌<sup>[1]</sup>, 刺激  $\beta$  细胞的增殖和分化, 抑制  $\beta$  细胞的凋亡, 从而增加胰岛  $\beta$  细胞的数量<sup>[2]</sup>, 抑制胰

收稿日期 2023-03-27 \*通信作者 Tel: 025-83271543 E-mail: tinahew@139.com

基金项目 新疆维吾尔自治区重点研发计划项目资助(No. 2020B03003)

岛 $\alpha$ 细胞分泌胰高血糖素<sup>[3]</sup>,降低肝脏糖异生<sup>[4]</sup>和肝脏脂肪贮存量<sup>[5]</sup>,还能减少肠蠕动、抑制胃排空<sup>[6]</sup>、降低食欲,有助于控制摄食,减轻体重<sup>[7]</sup>。GIP由小肠K细胞合成和分泌,与GIPR结合后发挥生物学效应<sup>[8]</sup>。GIP既可以在高血糖条件下促进胰岛素分泌,也可以在低血糖条件下促进胰高血糖素分泌,因此可作为双功能多肽对血糖水平进行调控,防止血糖过度波动<sup>[9]</sup>。GIP还能促进糖尿病模型鼠的胰岛 $\beta$ 细胞生长分化与存活<sup>[10]</sup>。长期使用GIP受体激动剂或者过表达GIP的小鼠糖代谢得到改善,且无体重增加的不良反应<sup>[11-12]</sup>。GLP-1和GIP也被称为肠促胰岛素分泌肽,简称肠促肽<sup>[13]</sup>。目前认为,GLP-1和GIP这两种内源性多肽发挥了餐后促胰岛素分泌的大部分作用<sup>[14]</sup>,使得GLP-1R和GIPR成为了治疗2型糖尿病的良好靶点。

在目前的糖尿病治疗中,肠促肽类降糖药物占据了重要地位,其中以GLP-1R激动剂为主<sup>[15]</sup>。由于糖尿病是一种复杂的综合代谢性疾病,针对单一靶点的治疗药物往往具有局限性,而能够靶向多种靶点以实现协同效应的治疗药物不仅能使疗效最大化,还能降低不良反应<sup>[16]</sup>。礼来制药公司研发的Tirzepatide(LY3298176)是1周注射1次的GLP-1R/GIPR双激动剂,已经获得FDA批准上市,用于治疗2型糖尿病。在与索马鲁肽头对头的临床试验比较中,高、中、低剂量组Tirzepatide的降糖效果均优于索马鲁肽<sup>[17]</sup>。在减重方面,高剂量的Tirzepatide效果优于索马鲁肽<sup>[18]</sup>。然而Tirzepatide和市场上绝大多数治疗2型糖尿病的受体激动剂药物一样,通过皮下注射给药,降低了患者的依从性<sup>[19]</sup>。目前,丹麦诺和诺德公司研制的口服索马鲁肽(oral semaglutide,Rybelsus<sup>®</sup>)是市面上唯一一款可口服的GLP-1R激动剂,但是其在人体内的绝对生物利用度只有1%<sup>[20]</sup>,因此开发患者依从性较高的口服肠促肽受体激动剂具有良好的应用前景。

本实验室前期基于GLP-1R激动剂Exendin-4的结构特征,利用计算机辅助设计得到了具有降糖活性的口服GLP-1R激动剂OHP2<sup>[21]</sup>。与口服索马鲁肽不同,OHP2无促吸收剂单独给药即可被口服吸收,在糖尿病小鼠模型中表现出了良好的药效,如降低血糖、减少体质量和缓解高血脂等<sup>[22]</sup>。本研究为进一步优化OHP2的治疗潜力,在保留了

其降糖活性和口服吸收能力的基础上,引入了GIP的活性位点,以期为临床提供更多的可口服降糖多肽候选分子。

## 1 材料

### 1.1 试剂

DMEM高糖培养基、DMEM/F-12培养基(美国Gibco公司);胰蛋白酶、G418(美国Sigma-Aldrich公司);胎牛血清(FBS,美国CLARK Bioscience公司);Exendin-4(上海吉尔生化有限公司);OHP2(南京金斯瑞生物科技有限公司);ODA(合肥森尔生物科技有限公司);异硫氰酸荧光素(异构体I,FITC,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);Pierce BCA法蛋白测定试剂盒(美国Thermo Scientific公司);牛血清白蛋白(BSA,广州赛国生物科技有限责任公司);氨苄青霉素、链霉素、潮霉素(上海生工生物工程有限公司);Steady-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System(美国Promega公司);RIPA(强)裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)。其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 动物

C57BL/6JGpt雄性小鼠(5周龄),SPF级,购自杭州子源实验动物科技有限公司,合格证号:SCXK(浙)2019-0004。所有动物实验均符合中国药科大学动物伦理委员会标准。

### 1.3 细胞株

CHO-GLP-1R-Luc(A11A)细胞株、人结直肠腺癌细胞株Caco-2由中国药科大学江苏省生物医药成药性研究重点实验室保存。

### 1.4 仪器

AccuriC6 Plus流式细胞仪(美国BD公司);Infinite 200Pro多功能荧光酶标仪(瑞士Tecan公司);ERS-2细胞电阻仪(美国Merck Millipore公司);血糖仪(三诺生物传感股份有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 ODA序列设计和结构特征

2.1.1 ODA序列设计 基于OHP2的结构,引入GIP活性位点,同时OHP2耐酶解位点保持稳定,得到增强GIP激动活性的ODA序列(由合肥森尔生物科技合成)。从RCSB PDB蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org>)获取Exendin-4和GLP-1受

体胞外结构域的 PDB 文件(5OTT)、GIP 和 GIP 受体胞外结构域的 PDB 文件(2QKH), 利用 MOE(Molecular Operating Environment)分子操作系统和 Rosetta Design 在线设计服务系统(<http://rosettadesign.med.unc.edu>)进行亲和力打分计算。

**2.1.2 圆二色光谱(CD)检测 ODA 的二级结构** 使用去离子水溶解样品至 0.5 mg/mL, 用圆二色光谱仪 Jasco J-810, 在室温下以 1 nm 分辨率, 50 nm/min 的扫描速度在 190 ~ 250 nm 范围内对样品进行检测。

**2.1.3 SWISS-MODEL 模拟 ODA 的三级结构** 利用蛋白质结构服务器 SWISS-MODEL(<http://swiss-model.expasy.org>)进行同源建模, ODA 和 OHP2 均以 Exendin-4 为模板序列, 选择全球性模型质量估测(GMQE)值最高的建模结果。

## 2.2 ODA 的入胞能力研究

**2.2.1 流式细胞术法检测 ODA 在 Caco-2 细胞中的入胞能力** 细胞铺板: Caco-2 细胞密度为每毫升  $1 \times 10^5$  个细胞。细胞给药: 每孔加入 FITC 标记的 ODA 5  $\mu\text{g}$ , 孵育 2 h。细胞清洗: 获取细胞并清洗后用 200 目细胞过滤网过滤。流式细胞术检测: 经阴性对照管确定细胞群所在位置后, 检测阴性对照管的荧光强度, 并据此设立 FITC 阴性门和 FITC 阳性门。

**2.2.2 荧光酶标仪法检测 ODA 在 Caco-2 细胞中的入胞能力** 细胞培养铺板和给药方法同“2.2.1”项。细胞裂解: 每孔加入 RIPA 细胞裂解液 30  $\mu\text{L}$ , 室温置于摇板机上 350 r/min 裂解 5 min。FITC 标记 ODA 含量测定: 使用多功能荧光酶标仪测定 FITC 标记的 ODA 荧光强度, 条件为激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm。细胞总蛋白含量测定: BCA 试剂盒检测每孔内总蛋白浓度。计算每孔 FITC 标记的 ODA 的含量与细胞总蛋白含量的比值。

## 2.3 ODA 的跨膜转运能力研究

**2.3.1 细胞培养** 细胞铺板: Caco-2 细胞密度为每毫升  $1 \times 10^5$  个细胞, 每孔接种单细胞悬液 250  $\mu\text{L}$  于 Transwell 上室, 下室加完全培养基 1.5 mL, 培养 21 d。细胞给药: 使用细胞电阻仪测定细胞跨膜电阻, 选取跨膜电阻在 200 ~ 1 000  $\Omega/\text{cm}^2$  的孔<sup>[23]</sup>, 在上室加入 FITC 标记的 ODA(0.2 mg/mL)。孵育

8 h, 每隔 1 小时从下室取样 100  $\mu\text{L}$ , 然后向下室补充 HBSS 缓冲液 100  $\mu\text{L}$ 。

**2.3.2 跨膜转运量测定** 使用多功能荧光酶标仪测定下室中 FITC 标记的 ODA 荧光强度, 检测条件为激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm。

## 2.4 ODA 的体外生物活性研究

**2.4.1 荧光素酶报告基因法评价 ODA 对 GLP-1R 的激活能力** 细胞培养: 使用含 10% 胎牛血清、潮霉素 B、G418 的 DMEM/F12 培养基培养 A11A 细胞。细胞铺板: A11A 细胞密度为每毫升  $2 \times 10^5$  个细胞, 培养 4 h。细胞给药: ODA 初始浓度为 4 800 nmol/L, 按 4 倍倍比梯度稀释得到 9 个浓度, 每孔加入药物 20  $\mu\text{L}$ , 孵育 4 h。化学发光强度测定: 每孔加入 Steady-Glo 100  $\mu\text{L}$ , 350 r/min 振荡 15 min。振荡结束后每孔吸取样品 180  $\mu\text{L}$  转移至全白酶标板, 使用多功能酶标仪测定化学发光强度。

**2.4.2 分子对接模拟 ODA 与 GIPR 结合能力** 靶标分子预处理: 从 RCSB PDB 蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org>)下载 GIP 和 GIP 受体胞外结构域的 PDB 文件(2QKH), 选择 Quick Prepare 对分子进行加氢去水并赋予电荷, 修正 PDB 结构缺陷。定义活性位点(site)以确定配体分子结合部位。配体分子预处理: 通过 MOE 同源建模获得配体分子的 PDB 文件, 加氢去水并赋予电荷。分子对接: 选择蛋白-蛋白对接以半柔性对接方法计算结果。

## 2.5 ODA 在小鼠体内的降糖活性研究

**2.5.1 实验动物** 选取 5 周龄的 C57BL/6J 雄性小鼠饲养一个星期适应环境。正式实验前小鼠需禁食 16 h, 并将小鼠随机分组并称重标记。

**2.5.2 药物配制** 3% 碳酸氢钠溶液, Exendin-4 溶液(0.02 mg/mL), 葡萄糖溶液(0.2 g/mL), OHP2 溶液(0.424 mg/mL), ODA 溶液(0.848 mg/mL, 0.424 mg/mL, 0.212 mg/mL)。

**2.5.3 给药测定** 阳性对照组皮下注射给药 Exendin-4 溶液(0.10 mg/kg), 实验组 OHP2 溶液(0.424 mg/mL) 和 ODA 溶液(0.848 mg/mL, 0.424 mg/mL, 0.212 mg/mL) 用 3% NaHCO<sub>3</sub> 溶液稀释 4 倍, 口服灌胃给药。每组小鼠给药时刻记为 -30 min, 0 min 时按 2 g/kg 的剂量给每组小鼠腹腔注射葡萄糖溶液, 用血糖仪测量小鼠血糖值。

### 3 结 果

#### 3.1 ODA序列设计和结构特征

基于GLP-1(HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFI-AWLVKGRG)、GIP(YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLALLAQKGKKNDWKHNITQ)、Exendin-4(HGEGTFTSDLSSKQMEEAVRLFIEWLKNGGPSS-GAPPPS)和OHP2(HGEGTFTSDLSSQMEEAVKEFIEWLVNGGPSSGAPPPSC)的分子结构,在保留OHP2良好的抗酶解活性以及口服GLP-1R激动活性的前提下,通过进一步引入GIP的活性位点,本实验设计了一条新型口服降糖多肽——ODA。通过Rosetta Design评估其对GLP-1和GIP两个受体的亲和力,亲和力强度与打分绝对值呈正相关。打分结果显示,与OHP2相比,ODA保留了GLP结合能力,同时提高了GIP受体亲和力。(表1)。

为了得到ODA的二级结构信息,本实验对ODA的CD谱进行分析。如图1-A所示,与Exendin-4和OHP2的谱线相似,ODA的谱线在193 nm附近处出现明显的正峰,在208 nm和222 nm处出

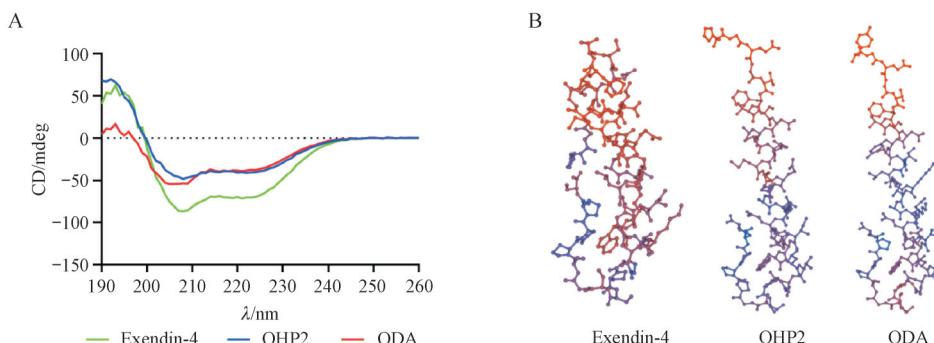
**Table 1** Affinity values of ODA and related peptides for GLP-1R and GIPR

Peptides	Score	
	GLP-1R	GIPR
Exendin-4	-21.6	N/A
GIP(1-42)	N/A	-16.8
OHP2	-21.6	-15.3
ODA	-22.5	-15.8

N/A: Not applicable; OHP2: Oral hypoglycemic peptide 2; ODA: Oral dual agonist

现2个负峰,表明这3种分子的二级结构以 $\alpha$ 螺旋为主。此外,ODA的谱线向短波长方向移动,即发生蓝移,表明ODA的疏水性增加,亲水性降低。提示ODA有较好的亲脂性,能够较容易地与细胞膜产生接触。

本实验通过SWISS-MODEL模拟预测ODA的三级结构,由于序列的同源相似性,ODA和OHP2的三级结构模拟均以Exendin-4为模板序列。Exendin-4,OHP2和ODA的GMQE分别为0.71,0.73和0.68。如图1-B所示,ODA的三级结构在突变位点处与Exendin-4,OHP2均有一定差异。



**Figure 1** Determination of Exendin-4, OHP2 and ODA

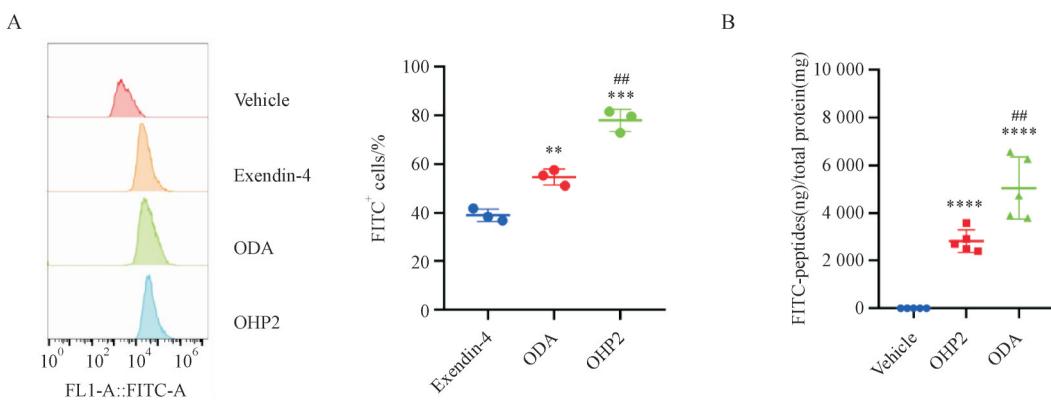
A: Analysis of the secondary structure of ODA by CD spectroscopy; B: Simulation of the tertiary structure of ODA based on SWISS-MODEL

#### 3.2 ODA的胞吞能力优于OHP2

为了评价ODA的胞吞能力,对ODA进行了流式细胞术和荧光酶标仪法分析。如图2-A所示,与阴性对照Exendin-4相比,ODA组的FITC<sup>+</sup>细胞率显著提高( $P < 0.01$ )。荧光酶标仪结果显示,孵育2 h后每毫克细胞总蛋白中FITC标记的ODA含量( $5.055.0 \pm 1.299.1 \text{ ng}/\text{mg}$ )显著高于OHP2组( $2.836.4 \pm 471.1 \text{ ng}/\text{mg}$ )( $P < 0.01$ )(图2-B)。这些结果表明,在Caco-2细胞中,ODA比OHP2的入胞能力更强。

#### 3.3 ODA的转胞吞能力优于OHP2

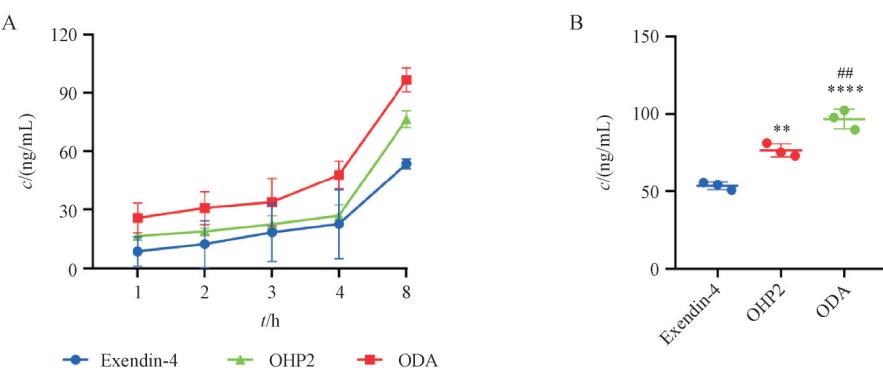
本实验通过Transwell法考察ODA在单层细胞模型上的跨膜转运水平。结果如图3-A所示,在1、2、3、4和8 h的5个采样点,ODA组在下室中的浓度明显高于Exendin-4组和OHP2组。孵育8 h后,下室中ODA的质量浓度为( $96.7 \pm 6.3 \text{ ng}/\text{mL}$ ),显著高于Exendin-4组( $53.6 \pm 2.5 \text{ ng}/\text{mL}$ )( $P < 0.0001$ )和OHP2组( $76.6 \pm 4.3 \text{ ng}/\text{mL}$ )( $P < 0.01$ )(图3-B)。这些结果显示,在Caco-2细胞的Transwell单层细胞模型中,ODA具有更强的跨膜转运能力。



**Figure 2** Endocytosis of Exendin-4, OHP2 and ODA in Caco-2 cells

A: Percentages of FITC<sup>+</sup> cells incubated with FITC-labelled Exendin-4, OHP2 and ODA, measured by flow cytometry ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ); B: Proportion of FITC-labelled Exendin-4, OHP2 and ODA to total proteins in cells, measured by fluorescence microplate reader ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs Exendin-4 group; # $P < 0.01$  vs OHP2 group



**Figure 3** Transcytosis of Exendin-4, OHP2 and ODA in Caco-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

A: Concentration-time profiles of FITC-labelled drugs at the basolateral side of the Transwell model during 8 hours incubation; B: Concentration of FITC-labelled drugs at the basolateral side of Transwell model in the 8th hour

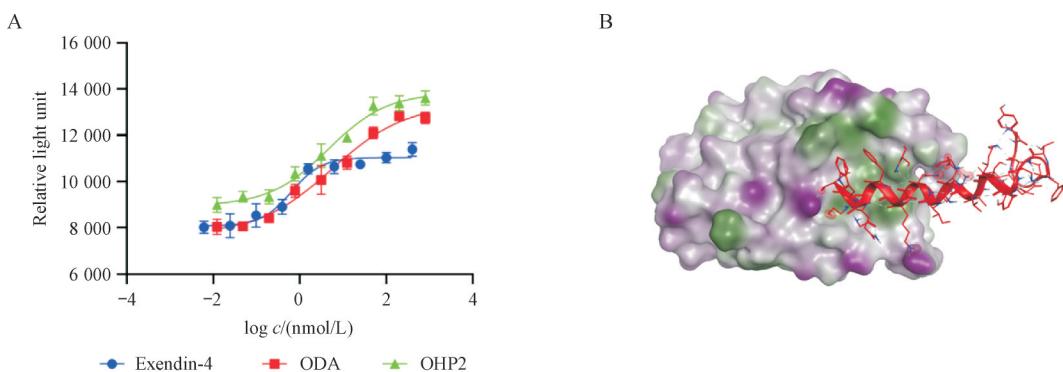
\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.0001$  vs Exendin-4 group; # $P < 0.01$  vs OHP2 group

### 3.4 ODA 保留了 GLP-1R 激活活性并可结合 GIPR

本实验采用荧光素酶报告基因法评估了 ODA 对 GLP-1R 的激活能力, 结果如图 4-A 所示, Exendin-4、OHP2 和 ODA 均呈剂量依赖性地激活 GLP-1R 下游信号通路, 促进了荧光素酶的表达。OHP2 和 ODA 激活 GLP-1R 的 EC<sub>50</sub> 分别为 4.540 和 5.506 nmol/L, 虽然 ODA 的 EC<sub>50</sub> 比 OHP2 略高, 但和其处在同一数量级上, 表明 ODA 保留了对 GLP-1R 的激动活性。利用 MOE 将 ODA 与 GIPR 胞外结构域进行分子对接模拟, 预测 ODA 与 GIPR 的结合模式与相互作用。结果如图 4-B 所示, GIPR 分子表面以亲水亲脂性展示, ODA 序列中的<sup>15</sup>Asp, <sup>16</sup>Lys, <sup>19</sup>Gln, <sup>20</sup>Lys, <sup>24</sup>Gln, <sup>26</sup>Leu 与 GIPR 形成了较强的氢键, 稳定了 ODA 与 GIPR 的结合, 提示 ODA 具有潜在的 GIPR 激动能力。

### 3.5 ODA 在小鼠体内的降糖活性优异

选取健康 C57BL/6J 小鼠, 通过腹腔注射葡萄糖耐量试验(IPGTT)考察口服不同剂量 ODA 对血糖的控制作用, 以皮下注射 Exendin-4 组为阳性对照, ODA 单次口服给药的糖耐量试验结果如图 5-A 所示, 与 PBS 组相比, 口服高、中、低剂量的 ODA 后, 小鼠血糖值相对于基础值的偏移显著降低, 血糖时间曲线中峰值明显变低, 曲线下面积显著减小。各组血糖时间曲线下面积计算结果显示, 高剂量组 ( $922.6 \pm 93.7 \text{ mmol/L} \cdot \text{min}$ )、中剂量组 ( $1021.9 \pm 84.8 \text{ mmol/L} \cdot \text{min}$ ) 和低剂量组 ( $1035.1 \pm 152.0 \text{ mmol/L} \cdot \text{min}$ ) 的 AUC 同样显著低于 PBS 组 ( $1322.3 \pm 99.5 \text{ mmol/L} \cdot \text{min}$ ) ( $P < 0.0001$ ) (图 5-B)。另一方面, 口服 ODA 高、中、低剂量组与口服 OHP2 组 ( $952.1 \pm 81.5 \text{ mmol/L} \cdot \text{min}$ ) 相比, 曲线下面积无显著性差异。这些结果

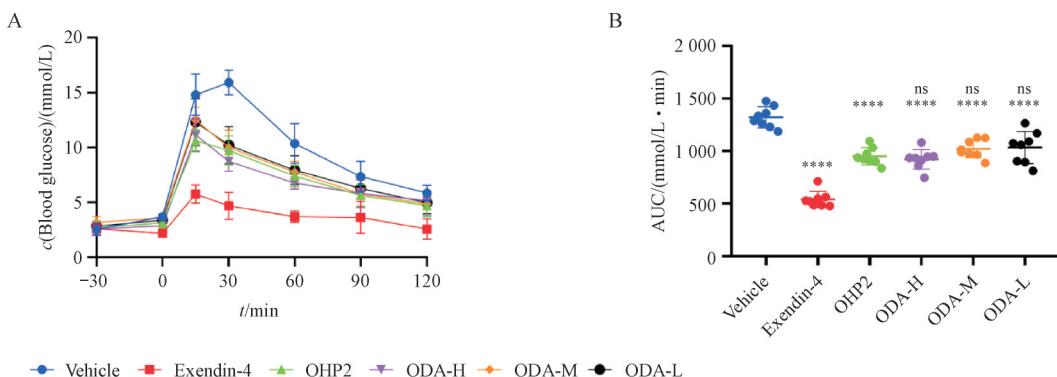


**Figure 4** ODA binding ability to GLP-1R and GIPR *in vitro*

A: Evaluation of the ability of Exendin-4, OHP2 and ODA to activate GLP-1R by A11A cellular luciferase reporter gene assays ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ); B: Binding of ODA to GIPR, simulated by MOE molecular docking

表明,口服低剂量ODA( $0.53\text{ mg/kg}$ )能达到与口服OHP2( $1.06\text{ mg/kg}$ )相当的降糖水平,提示ODA具

有较好的血糖控制能力。



**Figure 5** IPGTT of ODA in healthy mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

A: Fasting blood glucose versus time curve of IPGTT in healthy mice with Exendin-4 (sc,  $0.10\text{ mg/kg}$ ), OHP2 (ig,  $1.06\text{ mg/kg}$ ), ODA-H (ig,  $2.12\text{ mg/kg}$ ), ODA-M (ig,  $1.06\text{ mg/kg}$ ) and ODA-L (ig,  $0.53\text{ mg/kg}$ ) respectively; B: The area under the glucose levels curve (AUC) of IPGTT

\*\*\* $P < 0.0001$  vs vehicle group; ns: no significance vs OHP2 group

#### 4 讨 论

口服索马鲁肽是目前市场上唯一一款可口服的GLP-1R激动剂,依赖促吸收剂N-[8-(2-羟基苯甲酰基)-氨基]辛酸钠(SNAC)才能实现口服吸收。SNAC可在胃部升高局部区域的pH,通过短期局部缓冲作用保护索马鲁肽防止胃蛋白酶的降解<sup>[24]</sup>。同时SNAC具有亲脂性,能够有效地插入到上皮细胞膜中,轻微改变细胞膜的流动性,促进索马鲁肽的跨细胞转运<sup>[25]</sup>。因此SNAC只能短暂地促进吸收,口服索马鲁肽的绝对生物利用度依然较低,仅有 $0.4\% \sim 1\%$ <sup>[26]</sup>。本实验室前期工作中设计得到的OHP2与之相比更有优势,单独给药即有 $1.31\%$ 的绝对生物利用度,并且结构简单,无非天然氨基

酸引入和侧链脂肪酸修饰等<sup>[22]</sup>。

综合代谢性疾病如肥胖和糖尿病等通常具有异质性和并发性等特点,单一靶点药物治疗有一定局限性<sup>[27]</sup>。因此本研究利用RCSB PDB蛋白数据库,MOE和Rosetta Design软件在OHP2的结构基础上引入了GIP的活性位点,得到新型口服降糖多肽ODA。通过CD光谱和SWISS-MODEL研究了ODA的分子结构,发现ODA与Exendin-4和OHP2相比,其亲水性降低,亲脂性增加,三级结构也有一定差异。通过流式细胞术和荧光酶标仪研究ODA的入胞能力,虽然ODA入胞的阳性细胞率小于OHP2组,但是入胞量即每毫克总蛋白中的ODA含量却几乎是OHP2的两倍,结果表明ODA的胞

吞作用更强。并且通过 Caco-2 细胞构建 Transwell 单层细胞肠道吸收模型研究 ODA 的跨细胞转运能力,与入胞能力研究实验结果一致,ODA 的跨细胞转运量显著高于 Exendin-4 组和 OHP2 组。这些结果表明 ODA 的口服吸收能力显著优于 OHP2。利用基于 A11A 细胞的荧光素酶报告基因法研究 ODA 对 GLP-1R 的激动活性,虽然 ODA 的 EC<sub>50</sub> 比 OHP2 略高,但仍处于同一数量级,表明 ODA 较好地保留了对 GLP-1R 的激活能力。利用 MOE 进行了 ODA 与 GIPR 的分子对接,模拟了二者结合的空间状态和相互作用,ODA 序列中多个氨基酸位点与 GIPR 形成了较强的氢键,表明 ODA 能与 GIPR 结合且较为稳定。通过 IPGTT 实验研究 ODA 在健康小鼠体内的血糖控制能力,结果表明,口服低剂量 ODA 即可发挥优异的降糖活性,展现出口服 ODA 治疗 2 型糖尿病的巨大潜力。

综上所述,本研究设计得到的口服 ODA 保留了 OHP2 对 GLP-1R 的激活能力,增强了与 GIPR 的结合能力,从而服用小剂量 ODA 即可达到降糖疗效。此外,简单的分子结构不仅更易于工业化生产,还能避免过度修饰带来的生物安全隐患。未来,口服 ODA 将为糖尿病患者提供更安全、更便利、更有效的用药选择。

## References

- [1] Festa A, Haffner SM, Wagenknecht LE, et al. Longitudinal decline of  $\beta$ -cell function: comparison of a direct method vs a fasting surrogate measure: the insulin resistance atherosclerosis study[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, **98**(10): 4152-4159.
- [2] Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP[J]. *Gastroenterology*, 2007, **132**(6): 2131-2157.
- [3] Cariou B. Harnessing the incretin system beyond glucose control: potential cardiovascular benefits of GLP-1 receptor agonists in type 2 diabetes[J]. *Diabetes Metab*, 2012, **38**(4): 298-308.
- [4] Ip W, Shao WJ, Chiang YT, et al. GLP-1-derived nonapeptide GLP-1(28-36)amide represses hepatic gluconeogenic gene expression and improves pyruvate tolerance in high-fat diet-fed mice[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, **305**(11): E1348-E1358.
- [5] Sisley S, Gutierrez-Aguilar R, Scott M, et al. Neuronal GLP1R mediates liraglutide's anorectic but not glucose-lowering effect [J]. *J Clin Invest*, 2014, **124**(6): 2456-2463.
- [6] Trahair LG, Horowitz M, Hausken T, et al. Effects of exogenous glucagon-like peptide-1 on the blood pressure, heart rate, mesenteric blood flow, and glycemic responses to intraduodenal glucose in healthy older subjects[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, **99**(12): E2628-E2634.
- [7] Burmeister MA, Ayala JE, Smouse H, et al. The hypothalamic glucagon-like peptide 1 receptor is sufficient but not necessary for the regulation of energy balance and glucose homeostasis in mice[J]. *Diabetes*, 2017, **66**(2): 372-384.
- [8] Inagaki N, Seino Y, Takeda J, et al. Gastric inhibitory polypeptide: structure and chromosomal localization of the human gene [J]. *Mol Endocrinol*, 1989, **3**(6): 1014-1021.
- [9] Christensen M, Vedtofte L, Holst JJ, et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide: a bifunctional glucose-dependent regulator of glucagon and insulin secretion in humans[J]. *Diabetes*, 2011, **60**(12): 3103-3109.
- [10] Gault VA, Flatt PR, O'Harte FPM. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide analogues and their therapeutic potential for the treatment of obesity-diabetes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **308**(2): 207-213.
- [11] Kim SJ, Nian CL, Karunakaran S, et al. GIP-overexpressing mice demonstrate reduced diet-induced obesity and steatosis, and improved glucose homeostasis[J]. *PLoS One*, 2012, **7**(7): e40156.
- [12] Martin CMA, Irwin N, Flatt PR, et al. A novel acylated form of (d-Ala(2)) GIP with improved antidiabetic potential, lacking effect on body fat stores[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, **1830**(6): 3407-3413.
- [13] Holst JJ. The incretin system in healthy humans: the role of GIP and GLP-1[J]. *Metabolism*, 2019, **96**: 46-55.
- [14] Nauck MA, Meier JJ. The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2016, **4**(6): 525-536.
- [15] Wu YX, Tian H, Gao XD. Research progress of drugs for treatment of diabetes based on incretin[J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2022, **29**(6): 624-628.
- [16] Knerr PJ, Mowery SA, Finan B, et al. Selection and progression of unimolecular agonists at the GIP, GLP-1, and glucagon receptors as drug candidates[J]. *Peptides*, 2020, **125**: 170225.
- [17] Jastreboff AM, Aronne LJ, Ahmad NN, et al. Tirzepatide once weekly for the treatment of obesity[J]. *N Engl J Med*, 2022, **387**(3): 205-216.
- [18] Dimitrios P, Christodoulous P, Michael D. Tirzepatide versus semaglutide once weekly in type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2022, **386**(7): e17.
- [19] Aroda VR. A review of GLP-1 receptor agonists: evolution and advancement, through the lens of randomised controlled trials [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2018, **20**(Suppl 1): 22-33.
- [20] Overgaard RV, Navarria A, Ingwersen SH, et al. Clinical pharmacokinetics of oral semaglutide: analyses of data from clinical

- pharmacology trials[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2021, **60**(10): 1335-1348.
- [21] Sai WB, Tian H, Yang KM, et al. Systematic design of trypsin cleavage site mutated Exendin4-cysteine 1, an orally bioavailable glucagon-like peptide-1 receptor agonist[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(3): 578.
- [22] Lu WS, Tian H, Qian P, et al. An orally available hypoglycaemic peptide taken up by caveolae transcytosis displays improved hypoglycaemic effects and body weight control in db/db mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, **177**(15): 3473-3488.
- [23] Iftikhar M, Iftikhar A, Zhang HJ, et al. Transport, metabolism and remedial potential of functional food extracts (FFE)s in Caco-2 cells monolayer: a review[J]. *Food Res Int*, 2020, **136**: 109240.
- [24] Buckley ST, Bækdal TA, Vegge A, et al. Transcellular stomach absorption of a derivatized glucagon-like peptide-1 receptor agonist[J]. *Sci Transl Med*, 2018, **10**(467): eaar7047.
- [25] Brayden DJ, Gleeson J, Walsh EG. A head-to-head multi-parametric high content analysis of a series of medium chain fatty acid intestinal permeation enhancers in Caco-2 cells[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, **88**(3): 830-839.
- [26] Twarog C, Fattah S, Heade J, et al. Intestinal permeation enhancers for oral delivery of macromolecules: a comparison between salcaprozate sodium (SNAC) and sodium caprate ( $C_{10}$ ) [J]. *Pharmaceutics*, 2019, **11**(2): 78.
- [27] Finan B, Clemmensen C, Müller TD. Emerging opportunities for the treatment of metabolic diseases: glucagon-like peptide-1 based multi-agonists[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, **418**: 42-54.

·征订启事·

欢迎订阅2024年《中国药科大学学报》

《中国药科大学学报》是由国家教育部主管、中国药科大学主办的药学中文核心期刊，主要刊登合成药物化学、天然药物化学、生药学、中医学、药剂学、药物分析、药代动力学、药物生物技术、药理学、药事管理等学科的原创研究论著。

《中国药科大学学报》在药学界享有较高的学术声誉，目前已被国际上多家著名权威数据库(CA, IPA, SCOPUS, JST, IC, EMBASE/Excerpta Medica, CAS)等所收录，被国内权威数据库《中文核心期刊要目总览》(2020年版)、中国科学引文核心数据库(CSCD核心)、中国科技论文统计源数据库等列为药学类核心期刊，屡获原国家新闻出版总署、教育部、科技部等各种优秀期刊奖。

2022年，《中国药科大学学报》被评为中国高校百佳科技期刊，2021年被评为华东地区优秀期刊。根据中国知网《中国学术期刊影响因子年报》的数据显示：《中国药科大学学报》2022年最新复合影响因子突破1，达到1.138，在药学期刊界的学术声誉和影响力持续不断攀升，在高等院校、科研机构、制药企业、医院等单位拥有众多读者。

本刊为双月刊，128页。国际标准开本，国内外公开发行。欢迎到当地邮局订阅，漏订者可直接与编辑部联系。

国内刊号:CN 32-1157/R

ISSN:1000-5048

国内邮发代号:28-115

定 价:40元/期,全年240元

地 址:南京市童家巷24号

邮 政 编 码:210009

电 话:025-83271566

传 真:025-83271279

E-mail:xuebao@cpu.edu.cn

http://www.zgykdxxb.cn