

高活力、长效和速效胰岛素类似物的研究进展

范剑华* 冯佑民

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

提 要

本文介绍了高活力、长效和速效胰岛素类似物的研究进展, 包括它们的分子特点, 生物活性, 并讨论了高生物活力, 长效和速效的可能分子基础, 以及它们在临床上应用的前途。

关键词 高活力胰岛素类似物, 长效胰岛素类似物, 速效胰岛素类似物, 胰岛素

胰岛素 (INS) 是一多功能的蛋白质激素, 除了对糖、脂肪和蛋白质的代谢起着重要的调节作用外, 还具有刺激 DNA 和蛋白质的合成, 促进细胞生长的作用。INS 结构与功能关系的研究长期以来吸引着人们从不同的角度进行探讨, 积累了丰富的知识, 已有很多有关这一领域的综述^[1-3]。本文主要对近年来发现的高活力、长效和速效 INS 类似物的结构特点及临床应用的前途做一概括的讨论。

一、高活力 INS 类似物及其结构特点

1. 高活力 INS 类似物

不同种属动物的 INS 中, 唯有鸡或火鸡 INS 是高活力的, 它的生物活力与受体结合能力分别为人胰岛素 (HI) 的 200—300%。和 HI 相比其分子中有 6 个氨基酸残基不同, 但 A₈His 起重要作用。化学合成法获得的 [A₈His] HI 促脂肪细胞氧化葡萄糖和促脂解活力与猪胰岛素 (PI) 相比分别提高了 2.4 和 2.6 倍^[4]。多种 A₈氨基酸残基改变了的 INS 类似物已合成, 其中 A₈LysHI 和受体的结合能力及促脂解活力比 PI 提高了 2.3 和 1.53 倍^[5]。

INS 分子中含 4 个酪氨酸残基, 它们分别位于 A₁₄, A₁₉, B₁₆ 和 B₂₆。INS 和 NaI 在催化剂

存在下 4 个酪氨酸残基都可被碘化。其中 B₂₆, B₁₆ 和 A₁₄ 碘化的单碘 INS 类似物具有高活力, 它们在不同组织、细胞中所表现的活力略有不同^[5,6]。(表 1)

表 1 高活力碘化胰岛素类似物的相对生物活性(受体结合力)

碘化酪氨酸残基	和 INS 相比相对活力(受体结合力)	分 析 组 织
B ₁₆	1.14	大鼠脂肪细胞
	1.15	肝细胞
	1.80	人 IM-19 淋巴细胞
	1.37	HT-29 肾肿瘤细胞
B ₂₆	1.83	大鼠脂肪细胞
	1.02	肝细胞
	2.26	人 IM-19 淋巴细胞
	2.13	HT-29 肾肿瘤细胞
	2.80	肌肉细胞胰岛素受体
A ₁₄	1.30	肝胰岛素受体
	1.25	大鼠脂肪细胞

去 B 链 C 端五肽 INS(DPI) 的生物活力和 INS 受体结合能力都下降了 50% 和 75%, 但 B 链 C 端酰胺化后的类似物 DPI-NH₂ 与受体结合能力及生物活力比 PI 提高了 1.6—1.8

* 浙江省医学科学院药物研究所。

倍^[7]。继高活力 DPI-NH₂ 发现后几家实验室相继获得了几个生物活力，它们与受体结合能力均高于 PI 的 DPI-NH₂ 类似物⁽⁸⁻¹⁰⁾。其中 [B₁₀Asp, B₂₅Tyr]DPI-NH₂ 是目前活力最高的 INS 类似物(表 2)。

表 2 高活力 DPI-NH₂ 类似物及其相对生物活性与受体结合力

类 似 物	相对生物活力	相对受体结合力
INS	1	1
DPI-NH ₂	1.6	1.9
[B ₂₅ Ala]DPI-NH ₂	1	1
[B ₂₅ Tyr]DPI-NH ₂	2.7	3.3
[B ₂₅ His]DPI-NH ₂	3	3
[B ₁₀ Asp, B ₂₅ Tyr]DPI-NH ₂	12	10

酶促半合成获得的 B₂₄-D-phe HI 是较早发现的高活力 INS 类似物^[11]，与 PI 相比它的受体结合能力为 180%，刺激脂肪细胞对 α-葡萄糖的摄取活力为 140%。

一例家族性高胰岛素原糖尿病患者的胰岛素原 B₁₀ 残基为 Asp，它在体内不能转化为 [B₁₀Asp]HI，为了了解该突变胰岛素原如果能转化为突变 INS 后的活力，Katsyannis 实验室用化学法合成了 [B₁₀Asp]HI，并测定了它的生物活力及与受体结合能力，它促脂肪合成及与受体结合能力分别为牛 INS 的 435% 和 534%^[12]。

2. 高活力 INS 类似物的结构特点

INS 分子作用机理仍不清楚，但 INS 发挥生物功能时先和膜 INS 受体结合。膜受体由 α, β 亚基组成，INS 和其中 α 亚基结合，在受体配体复合物内吞同时 β 亚基自我磷酸化，激活 β 亚基酪氨酸激酶，最后导致一系列生物效应。胰岛素分子与其受体结合的结合部位主要存在于 INS 分子的表面^[13]，这个表面由二部分组成。其中一个是有相当面积的疏水核区，由 B₂₄phe, B₂₅phe, B₁₉Tyr, B₁₆Tyr, B₁₂Val, A₂ILe 和 B₂₆Tyr 组成，另一个区域为分散在疏水区周围的一些带电荷基团组成。INS 及其类似物的二个区域符合特定构型时其活性才能表现。不同 INS 类似物与受体结合时自由能 (ΔG) 相

差 4—8kJ/mol，它们与受体的结合常数 K_d 变化达 2—3 倍，INS 类似物构型发生细小变化后再和受体结合时仅几个氢键发生变化就能引起 ΔG 的变化。INS 分子中 A₈Thr 残基由 His 代替后它与受体的结合能力及生物活力均提高了，最初被认为 His 分子比 Thr 大，因此更容易和受体紧密结合。测定了化学合成的 A₈Phe 和 A₈Lys HI 生物活力及与受体结合能力后，发现尽管 [A₈Phe]HI 中 A₈Phe 很大，但它与受体结合力及生物活力没有提高，而 [A₈Lys]HI 分子中由于 A₈ 引入带正电荷氨基酸残基，它的生物活力及与受体结合能力都提高了。A₈ 所带的正电荷可能是 [A₈Lys]HI 和 [A₈His]HI 表现高活力的原因。[B₁₀Asp]HI 在反相 HPLC 中的行为表明它的疏水性比天然 HI 强，可能 B₁₀ 中引入 Asp 使 HI 分子中的疏水核充分暴露，因此更容易与受体结合^[12]。

INS 分子表面的结合部位是 INS 分子与其受体相互识别的基础，INS 与其受体作用时它的分子构象发生变化，这与其和受体结合及其传递信息有关。INS 类似物和受体结合能力的表现可能是它们与受体作用时分子识别程度及构象变化的难易程度相互统一的结果。INS 分子 B 链 C 端是研究的比较清楚的部位，B₂₄₋₃₀ 在分子中处于较伸展区域，其中 B₂₅Phe 可能是 INS 受体识别 INS 分子的部位。Tager 等人^[14]认为 INS 和受体相互作用时，二者都发生了构象的变化(图 1)，INS 分子中的疏水核可以充分与受体结合产生生物活性，B₂₅ 位具有 α-芳香性是 INS 和受体结合的必要条件，当 B₂₅ 不具有 α-芳香性时它不能充分识别受体，在与受体作用时它的构象变化受阻，疏水核不能充分与受体结合，因此它和受体的结合能力明显下降^[6]。DPI 是至今唯一以单体形式存在于晶体中而三维结构已被解析的 INS 类似物，它分子中的疏水基团象 A₃Val, B₁₆Leu, B₁₅Leu, B₁₁Leu 暴露在原来的疏水核上^[14]。因此 DPI 具备了与受体结合能力比 INS 强的条件。但 B 链羧端与 A₂₁Asp 侧链间有一新的氢键形成，这个氢键使分子自身刚性增强，可能分子柔性不够，与

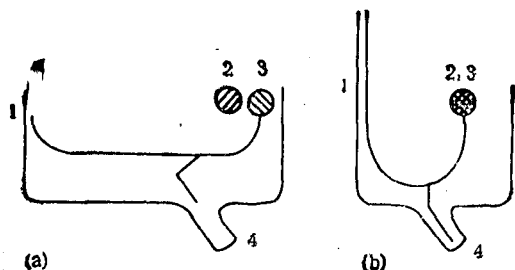


图1 INS 与其受体作用简图

1 为 INS 受体中在 INS 与其作用时构象发生变化的部位, 2 为受体中能和 INS 结合部位相结合的部位, 3 为 INS 分子的结合部位(包括 A 和 B 链), 4 为受体容纳 B_{21} 位氨基酸残基的部位, 当 B_{21} 具有 α -芳香性时才能与 4 结合

(a) INS 与受体结合前, (b) INS 与受体结合以后

受体结合能力比 INS 低。DPI-NH₂ 和 DPI 相比, B 链 C 端氮原子的电负性比氧强, 导致 B 链末端酰胺基与 A₂₁Asp 侧链形成的氢键的能力大大减弱, 分子柔性恢复, 它和 INS 受体结合时可能比 INS 分子多二个有利条件: (a) 有更多疏水核露在分子表面 (b) 与受体作用时不需象 INS 一样提供 B₂₆₋₃₀ 构象变化所需的能量, 这可能是它与受体的结合能力比 HI 强的原因。图 2 为 DPI-NH₂ 与 INS 受体相互作用简图。其它高活力 DPI-NH₂ 类似物可能通过同样的方式来增加与 INS 受体结合的能力。

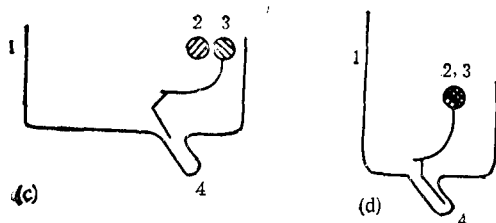


图2 DPI-NH₂ 与 INS 受体作用简图

(图中说明同图 1)

C: DPI-NH₂ 与受体作用前

D: DPI 与受体作用后

总之, 高活力 INS 类似物的分子结构可能需符合二个必要条件: (a) 分子内疏水核外露或有能增强与受体结合的带电荷基团的存在; (b) 与受体作用时分子构象变化不受阻, 即分子具有一定的柔性。

二、长效 INS 类似物的研究

INS 在体内的半衰期约为 40min, 普通 INS 制剂一次注射只能维持 3h 降低血糖效果。为了临床上使用方便, 需要研究一次注射能维持较长降低血糖时间的长效 INS 或类似物。目前主要采取 2 种方法: (a) 寻找抗降解 INS 类似物; (b) 在不改变 INS 活性前提下制备以多聚体形式存在的 INS 及其类似物。

在 INS 中加入球蛋白、鱼精蛋白, 调 pH 至 3, 使之成为可溶性溶液, 这种 INS 溶液是较原始的长效 INS 制剂。其缺点是刺激性大, 加入外源性蛋白具有抗原性。市场上供应的长、中效 INS 制剂都是含有 INS 晶体的悬浮液, 这些制剂一次给药后可以维持五到十几小时的降血糖效果, 但使用不方便。

胰岛素原是研究的较透彻的抗代谢长效类似物, 它的生物活力为 HI 的 20% 左右, 由于它主要在肾脏中代谢和排泄, 代谢速度比 INS 慢, 体内半衰期是 INS 的 4 倍^[15]。它在临床上比较有应用前途。

丹麦 NOVO 公司利用蛋白质工程, 酶促半合成法制备出大量可溶性长效 INS 类似物^[16-18]。

INS 分子的等电点为 5.4, 用酶促转肽法可对 PI 的 B 链 C 端进行各种不同的修饰, 获得一系列等电点接近人体液 pH 的 INS 类似物。如 [B₃₀Lys-NH₂] HI, [B₃₀Lys, B₃₁Lys-NH₂] HI, [B₃₀Arg-NH₂] HI 和 [B₃₁Lys-NH₂] HI。这些类似物即便是在锌离子存在下也能较好地溶解在微酸溶液中。微酸性溶液进入人体组织后能迅速形成晶体或无定型沉淀。和传统长效 INS 一样, 这些晶体或沉淀缓慢溶解成单体或二聚体进入血液, 使血液中 INS 浓度在较长时间内不会下降, 这些晶体的溶解度随给药前溶液中锌离子浓度的增加而减少。其中 [B₃₀Lys-NH₂] HI 31 锌六聚体溶液, 一次注射后在血液中所维持的浓度及其降血糖效果与市场上试用的长效制剂无区别, 它注射到组织中时, 在形成晶体之前一部分马上以单体或二聚体形式进入血液, 因

此 $[B_{30}Lys-NH_2]HI$ 比传统长效制剂更能迅速地发挥降低血糖作用。

用蛋白质工程已生产出一批 $A_{17}, B_{13}, B_{27}, B_{30}$ 位氨基酸残基被改变了的 INS 类似物,通过筛选确定了其中的 $[B_{27}Arg, B_{30}Thr-NH_2]HI$, $[B_{27}Arg, B_{13}Gln, B_{30}Thr-NH_2]HI$, $[B_{27}Arg]HI$, $[B_{27}Lys, B_{30}Thr-NH_2]HI$ 既保留了生物活性又具有长效性。这和通过酶促转肽所获得的长效 INS 一样,它们进入体内以后能迅速形成晶体,但它形成晶体的机理可能不一样。INS 形成六

聚体时 $B_{27}Thr$ 位于六聚体的表面, $B_{13}Glu$ 残基簇于六聚体中心。 $B_{27}Thr$ 被 Lys 和 Arg 碱性氨基酸残基代替后,在中性条件下可以促进六聚体间的相互聚集。而以 Gln 代替 $B_{13}Glu$ 则可以减少六聚体内带电荷基团 Glu 之间的相互排斥,使六聚体难以解离成单体或二聚体(图 3)。除此之外 B 链 C 端酰胺化以及碱性基团的引入,这些类似物的等电点有所提高。这一系列类似物降低血糖的长效指标随锌离子浓度增加而提高,其中 $[B_{13}Gln, B_{27}Arg, B_{30}Thr-$

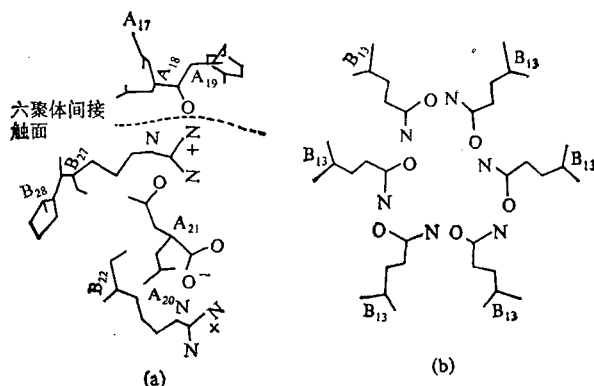


图 3 INS 类似物六聚体的结构

a: $[B_{27}Arg]HI$ 六聚体间接接触面 b: $[B_{13}Gln]HI$ 六聚体的中心

$NH_2]HI$ 既使在低锌离子浓度下也能明显延长降血糖时间。

另一类疏水性比 HI 强的 INS 类似物 $[B_{30}Thr-OBu]HI$ 和 $[B_{30}Lys(Boc)-NH_2]HI$ 在 pH7 及高锌离子浓度下不能形成晶体或无定型沉淀,但它们能明显延长降血糖作用时间,皮下注射后可能迅速与肌肉以非共价结合,然后缓慢解离成单体或二体进入血液,延长降血糖时间。

最近 NOVO 公司又研制出一批可溶性,酸稳定性的长效 INS 类似物。除了改变 B_{27}, B_{13} 和 B_{30} 位氨基酸残基外,对 $A_{21}Asn$ 也进行了修饰。人或猪 INS 的 $A_{21}Asn$ 残基在酸性条件下易脱酰胺形成二体 INS 而失活。以 Ser , Gly 代替 $A_{21}Asn$ 后的 INS 类似物酸稳定性增强。 $[A_{21}Gly, B_{27}Arg, B_{30}Thr-NH_2]HI$, $[A_{21}Ser, B_{27}Arg, B_{30}Thr-NH_2]HI$ 和 $[A_{21}Asp,$

$B_{27}Arg, B_{30}Thr-NH_2]HI$ 的生物活性与 HI 相比保持不变。其中 $[A_{21}Gly, B_{27}Arg, B_{30}Thr-NH_2]HI$ 在体内的半衰期可达 25h,注射到皮下后以一级动力学进入血液,吸收速率与溶液中锌离子浓度无关。这类 INS 类似物皮下注射后吸收到血液的速度每天之间的波动性比其它 INS 类似物小。

研究长效 INS 类似物是一项很有意义的工作,在国内外开展的时间不长。胰岛素代谢规律的假设较多,因此,有时根据假设设计出的类似物没有抗代谢能力。这部分工作仍处于摸索阶段。INS 晶体结构研究的比较详细,因此,用计算机模拟预测 INS 类似物之间的聚集状态可能更有效。

三、速效 INS 类似物的研究

在中性,酸性条件下、INS 浓度超过 10^{-10}

mol/L 时主要以单体、二聚体和六聚体的形式可逆地存在于溶液中。当其较久置于溶液中时会形成分子量比六聚体大得多的多聚体。这种多聚体形成的量跟溶液中 INS 浓度成正比。脱锌 INS 与含锌 INS 的聚集行为基本一致,但锌离子可以促进多聚体的形成。

临床上使用含锌 INS 制剂主要以六聚体或多聚体形式存在,注射到皮下后解离成单体或二体进入血液,需 90—120min 才能达到最佳降糖效果。正常人饭后体内胰岛素增多,约 60min 后可以达到最高浓度,糖尿病患者要达到正常生理 INS 浓度时需饭前 1h 注射普通 INS 制剂。用蛋白质工程方法生产出的单体 INS 注射到皮下后可以直接吸收到血液,迅速降低血糖^[19,20]。

INS 二体是形成六体、多聚体的基础,单体缔合成二聚体时由单体表面 B₁₂Val, B₂₄B₂₅phe, B₁₆, B₂₆Tyr 组成的疏水面,链间反平行折迭以及其它一些氢键参与作用。改变参与形成二体的氨基酸残基可获得单体 INS 类似物。蛋白质工程已制备出的单体类似物有 [B₁₀Asp]HI, [B₉Asp]HI, [B₁₂Glu]HI, [B₁₂ILe]HI 和 [B₉Asp B₂₇Glu]HI 由于胰岛素分子中 B₁₆, B₁₂, B₂₃₋₂₅ 是它和受体结合有关的^[13], 上述一些类似物的生物活力明显下降,但其中 [B₂₆Glu]HI, [B₂₇Glu]HI, [B₂₈Asp]HI, [B₉Asp, B₂₇Glu]HI 和 [B₁₀Asp]HI 的生物活性保持不变或略有上升。动物实验表明这四种单体 INS 类似物注射到皮下后,进入血液的速度比 HI 快 3 倍。[B₉Asp, B₂₇Glu]HI 被研究得较透彻,它与人肝癌细胞 HEPG-2 受体的结合力只有 HI 的 20%, 但体内降低血糖活性几乎与 HI 相同,它在体内的清除率是 HI 的 30%。它已在正常人体及糖尿病患者中进行试验^[21]。

四、结 束 语

本文所讨论的高活力,长效和速效 INS 类似物是从大量类似物中筛选出来的,对它们的研究可以进一步揭示 INS 结构与功能的关系,也有临床应用价值。然而只有在 INS 结构与功能关系的研究获得实质性突破后才能更有目的地去设计各种满足临床上不同需要的 INS 类似物。

参 考 文 献

- 1 Gammeltofts S *et al.* *Physicol Rev*, 1984; 64: 1321.
- 2 王志珍等. 生物化学杂志, 1985; 1: 9
- 3 Pullen R A *et al.* *Nature*, 1976; 259: 263
- 4 Marki F *et al.* *Hopper-Seyler's Z Physicol Chem*, 1979; 360: 1916
- 5 Linde S *et al.* *Hopper-Seyler's Z Physicol Chem* 1981; 262: 573
- 6 Sonne S *et al.* *Hopper-Seyler's Z Physicol Chem* 1983; 364: 101
- 7 Fisher W H *et al.* *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1985; 366: 521
- 8 Nakagawa S H *et al.* *J Biol Chem*, 1986; 261: 7332
- 9 Casaretto M *et al.* *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1987; 368: 709
- 10 Schwartz G P *et al.* *Proc Natl Acad Sci VSA*, 1987; 86: 457
- 11 Kabayashi M *et al.* *Biochem Biophys Res Comm*, 1982; 107: 326
- 12 Schwatz G P *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 6408
- 13 中国科学院北京动物研究所内分泌室胰岛素组等. *Sintia Sinica*, 1974; 17: 779
- 14 Wang D C *et al.* In: Wunch R ed *Peptide and Protein Chemistry*, Schlob Ringberg am Tegernsee, 1986: 95
- 15 Roska C *et al.* *Horm Metab Res*, 1988; 18 (Suppl): 1
- 16 Markussen J *et al.* *Protein Eng*, 1987; 1: 205
- 17 Markussen J *et al.* *Protein Eng*, 1987; 2: 157
- 18 Markussen J *et al.* *Protein Eng*, 1987; 1: 215
- 19 Brang J *et al.* *Nature*, 1988; 333: 679
- 20 Sprall M *et al.* *Br Med J*, 1988; 279: 1236
- 21 Kang S *et al.* *The Lancet*, 1990; 355: 303

[本文于1990年8月2日收到,1991年1月14日修回]