

ПРОДУЦЕНТЫ, БИОЛОГИЯ,
СЕЛЕКЦИЯ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

УДК 57.084.1:615.357

АГОНИСТЫ И АНТАГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРОВ
GIP И GLP-1: РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ
ВАРИАНТЫ И ВЗАИМНАЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИЯ АКТИВНОСТИ

© 2022 г. М. Ю. Копаева¹, Е. П. Санникова¹, Е. С. Бобров¹,
И. И. Губайдуллин^{1,2}, Н. В. Булушова¹, Д. Г. Козлов^{1,*}

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

²НИЦ “Курчатовский институт” – ГосНИИгенетика, Курчатовский геномный центр, Москва, 117545 Россия

*e-mail: Kozlov_DG@rrcki.ru

Поступила в редакцию 09.06.2022 г.

После доработки 31.07.2022 г.

Принята к публикации 08.08.2022 г.

В рамках проекта по созданию прототипа двухкомпонентного лекарственного препарата проведена разработка рекомбинантных модифицированных производных глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (gmGIP) и глюкагоноподобного пептида-1 (gmGLP-1) человека. Преследовались цели повышения активности производных GIP и получения антагонистов рецепторов GIP и GLP-1 для избирательной нейтрализации активности соответствующих компонентов перспективного лекарственного препарата. Для этого в структуру базового варианта gmGIP(1–42)h человека вносили хорошо известные мутации: делецию остатков 32–42, а также замену H18R, видоспецифичную для гормонов мыши/крысы. Сахароснижающую активность препаратов измеряли в тесте на толерантность к глюкозе на здоровых мышах. В большинстве случаев сконструированные мутации оказались неожиданно малоэффективными или вообще не влияли на сахароснижающую активность производных GIP. Максимальное двукратное увеличение активности зафиксировано только для модифицированного варианта gmGIP(1–31)rat, содержавшего обе мутации одновременно. “Инактивированные” производные gmGIP(3–31)rat и gmGLP-1(3–31), содержавшие делецию двух N-концевых остатков, специфическую для антагонистов рецепторов GIPR и GLP-1R, по отдельности показали ожидаемую дозозависимую антагонистическую активность. В то же время их эквимольная смесь вместо ожидаемого аддитивного эффекта полностью теряла сахароповышающую активность. На основании полученного результата мы сформулировали гипотезу о способности метаболитов производных инкретинных гормонов GIP и GLP-1 к взаимодействию друг с другом в процессе регуляции гликемии. Данное явление необходимо учитывать при изучении механизмов гликемического контроля и разработке лекарственных препаратов на основе агонистов и антагонистов рецепторов GIP и GLP-1.

Ключевые слова: глюкагоноподобный пептид-1, GLP-1, глюкозозависимый инсулинотропный полипептид, GIP, противогликемический препарат, антагонисты рецепторов

DOI: 10.56304/S0234275822050076

В предыдущих публикациях нашей лаборатории были представлены результаты разработки прототипа оригинального лекарственного препарата (ЛП), получившего неофициальное название “глипин”, для контроля за уровнем глюкозы в крови [1–3]. Это однокомпонентный препарат, прояв-

ляющий специфическую сахароснижающую активность при подкожном или интраназальном применении [1, 3]. Действующее вещество глипина – рекомбинантный гормон gmGLP-1, содержащий последовательность модифицированного глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) человека, фланкированного искусственным полипептидом, улучшающим фармакокинетику препарата. Такая формула действующей молекулы позволила улучшить фармакологические (продолжительное действие, интраназальное применение) и технологические (универсальный способ очистки) характеристики глипина [1, 3].

Список сокращений: ЛП – лекарственный препарат; GIP (Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide, Gastric Inhibitory Polypeptide) – глюкозозависимый инсулинотропный полипептид; GLP-1 (Glucagon-Like Peptide 1) – глюкагоноподобный пептид-1; gmGIP – рекомбинантный модифицированный GIP; gmGIPh – gmGIP человека, gmGIPrat – gmGIP крысы; gmGIP(1–42)gh – gmGIP “крыса–человек”; gmGLP-1 – рекомбинантный модифицированный GLP-1.

Как известно, развитие современных рекомбинантных препаратов против диабета не ограничивается только агонистами рецепторов GLP-1 [4]. Большой интерес вызывают также производные глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIP) [5], играющего доминирующую роль в контроле за уровнем гликемии у здоровых людей [6, 7]. Низкая активность GIP у больных диабетом [8], долгое время препятствовавшая его терапевтической разработке, в последние годы подверглась значительному переосмыслению [5, 9, 10]. Одновременно с этим на передний план вышла другая, требующая решения, особенность GIP, а именно – высокая видоспецифичность гормона у разных животных [11, 12].

В предыдущей работе [13], используя формулу глипина, мы сконструировали рекомбинантный модифицированный GIP (rmGIP) человека и провели разработку прототипа двухкомпонентного ЛП, включавшего рекомбинантные производные GIP и GLP-1 (rmGIP и rmGlp-1 соответственно). Высокая эффективность подобных двухкомпонентных ЛП была продемонстрирована ранее [12]. Важным итогом этой разработки стала демонстрация принципиальной возможности объединения процессов выделения и очистки обоих компонентов ЛП на ранней технологической стадии [13].

В то же время высокая видоспецифичность GIP и его производных [11] ограничивала возможности исследования двухкомпонентного препарата, предназначенного для применения в человеческой популяции, на мышах. Так, испытание на мышах препарата, включавшего компоненты с равной сахароснижающей активностью, требовала использования rmGIP в дозе, в 20 раз превышавшей дозу глипина (rmGLP-1) [13]. Это обстоятельство привело к необходимости структурной оптимизации rmGIP и проведения систематического изучения полученных производных.

В представленной работе на основании опубликованных данных сконструирован ряд модифицированных производных GIP и проанализирована их сахароснижающая активность. Их перечень был дополнен “инактивированными” производными GLP-1 и GIP, содержащими N-концевые делеции, с целью использования в качестве антагонистов соответствующих рецепторов, например при изучении активности прототипа двухкомпонентного ЛП. В результате исследования получены данные, расширяющие представления о взаимодействии гормонов GLP-1 и GIP в процессе контроля гликемии.

Целью работы был поиск рекомбинантных производных GIP с повышенной активностью для создания прототипа двухкомпонентного ЛП и разработка антагонистов рецепторов GLP-1 и GIP для

изучения активности отдельных компонентов этого препарата.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Генетические конструкции, наработка и очистка опытных препаратов

Генетические конструкции для биосинтеза производных GLP-1 и GIP получали, как описано ранее [1, 13]. Сайтнаправленный мутагенез проводили, как описано в руководстве QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Inc., USA, Revision E.0, 2015). Нарработку и очистку опытных препаратов проводили по опубликованной методике [13]. Структуру молекул подтверждали с использованием масс-спектрометрии [14].

Определение сахароснижающей активности препаратов

Сахароснижающую активность препаратов определяли с использованием теста на толерантность к глюкозе. Тест и анализ результатов проводили, как описано ранее [13], за исключением того, что в эксперименте вместо самок использовали самцов линейных мышей C57Bl/6 весом 20–27 г, полученных из питомника “Столбовая” (Россия). В качестве контроля использовали физиологический раствор (отрицательный контроль) и глипин в дозе 100 мкг/кг (2 мкг/20 г веса животных). Препараты вводили мышам подкожно за 1 ч до внутрибрюшинной инъекции глюкозы. Уровень гликемии в крови животных анализировали непосредственно перед введением глюкозы (точка 0 мин) и через 30 и 60 мин после инъекции. На всех рисунках представлен прирост уровня глюкозы в крови животных в точках 30 и 60 мин относительно базального уровня в точке 0 мин.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программных возможностей Microsoft Office Excel и GraphPad Prism 6.01 (La Jolla, США). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнительного анализа применяли непараметрический однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса ANOVA с последующим *post-hoc* анализом по критерию Данна для множественных сравнений. Результаты представлены как медиана \pm среднеквадратичное отклонение (SD). Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

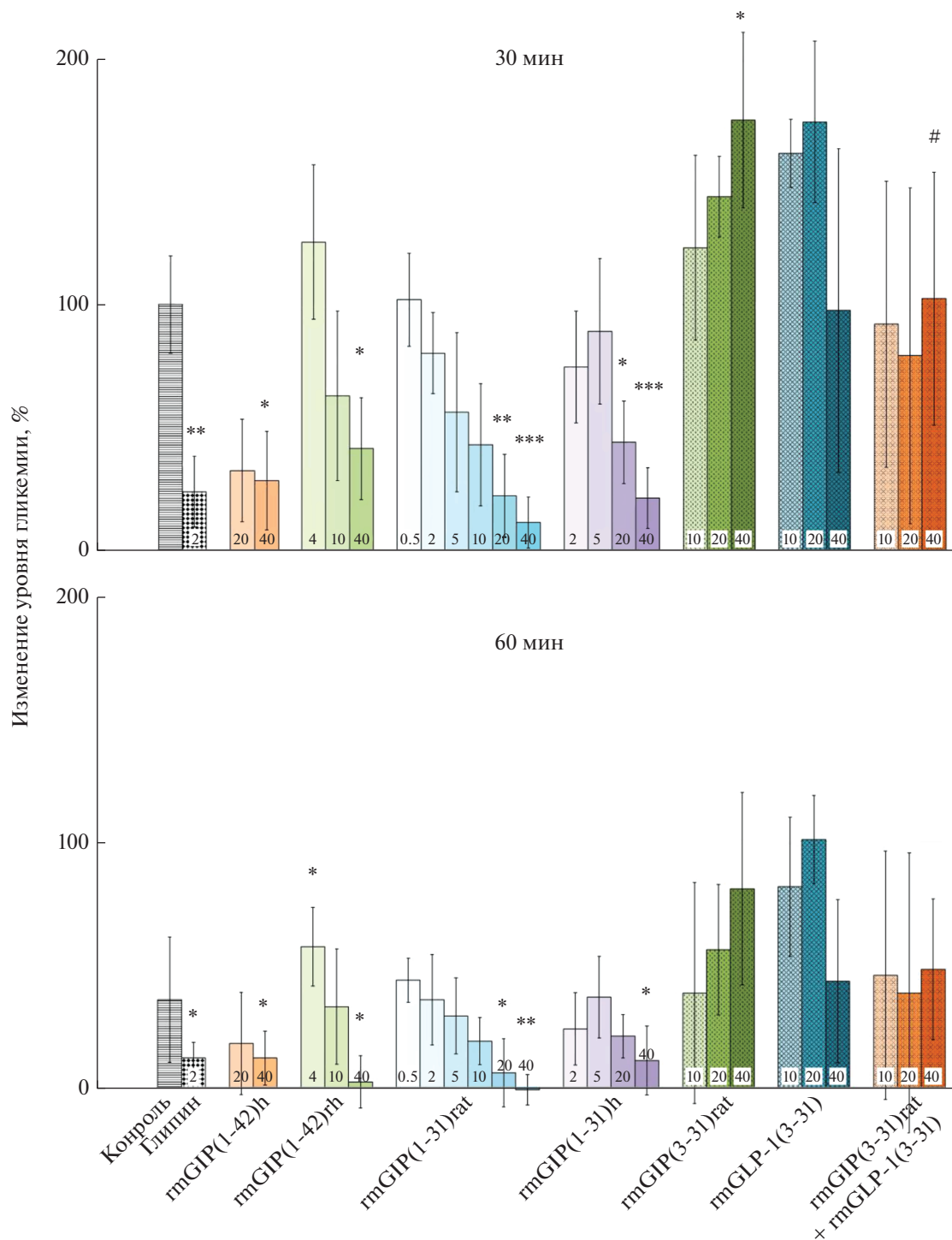


Рис. 2. Динамика уровня гликемии в крови животных через 30 и 60 мин после инъекции глюкозы. Опытные препараты вводили животным подкожно в указанных цифрами дозах (мкг/20 г веса) за 1 ч до инъекции глюкозы. За 100% принимали показатель гликемии отрицательного контроля через 30 мин после введения глюкозы. Данные представлены как медиана \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (по сравнению с отрицательным контролем), # $p < 0.05$ (по сравнению с 40 мкг rmGLP-1(3-31), анализ Краскела–Уоллиса ANOVA с анализом post-hoc по критерию Данна).

Fig. 2. Changes in the level of glycemia in the blood of animals 30 and 60 min after glucose administration. Experimental drugs were administered to animals subcutaneously in the indicated doses ($\mu\text{g}/20$ g of weight) 1 h before the glucose injection. The glyce-mic index of negative control was taken for 100% 30 min after glucose administration. The data are presented as median \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (compared to the negative control), # $p < 0.05$ (compared to 40 μg of rmGLP-1(3-31), ANOVA Kraskal–Wallis test with post-hoc analysis according to the Dunn criterion).

веденная замена превращала укороченный гормон gmGIP(1–31)h не в гибридный, а в истинно крысиный (идентичен мышиному) вариант – gmGIP(1–31)rat (рис. 1). Как показал анализ, начиная с дозы 10 мкг, сахароснижающая активность препаратов gmGIP(1–31)rat примерно в два раза превышала показатели gmGIP(1–31)h, обеспечивая уровень гликемии, характерный для высокоактивного глипина (рис. 2). В частности, как видно на рис. 2, для достижения одинакового сахароснижающего эффекта в указанном диапазоне требовались двукратно меньшие дозы gmGIP(1–31)rat по сравнению с gmGIP(1–31)h или gmGIP(1–42)h. В то же время достигнутый эффект был слабее ожидаемого, так как ранее Р. Mroz и соавт. [12], экспериментируя на рецепторах мыши, сообщали о пятикратном увеличении сродства производных GIP мыши/крысы по сравнению с производными GIP человека.

Таким образом, на основании полученных данных можно говорить о том, что известные модификации GIP, будучи интегрированными в состав рекомбинантного белка gmGIP, в условиях *in vivo* оказывали неожиданно слабый эффект на сахароснижающую активность препаратов или не влияли на нее вообще. Возможно, этот результат также обусловлен особенностями структуры рекомбинантных производных GIP, в частности наличием в их составе С-концевой вспомогательной последовательности, улучшающей фармакокинетику препаратов.

На этом фоне значительный интерес вызвали результаты “инактивированных” производных gmGIP(3–31)rat и gmGLP-1(3–31), содержащих делецию двух N-концевых остатков. Эти пептиды были сконструированы в качестве перспективных антагонистов рецепторов GIP и GLP-1 соответственно (рис. 1). Их природные аналоги, GIP(3–31) и GLP-1(9–37), относятся к известным продуктам сайтспецифической деградации соответствующих природных гормонов, происходящей под действием дипептидиламинопептидазы-4 [16–18]. Как показано, они сохраняют сродство к рецепторам и лишены активности нативных гормонов, то есть “работают” как антагонисты соответствующих рецепторов [19–22]. Каждый из антагонистов способен нейтрализовать действие соответствующего гормона и тем самым вызвать повышение уровня гликемии. Однако такого эффекта можно достигнуть только при использовании высоких доз антагонистов, значительно превышающих их физиологические концентрации [19, 21, 22].

Как показал проведенный анализ, профиль активности рекомбинантных производных “инактивированных” гормонов gmGIP(3–31)rat

и gmGLP-1(3–31) соответствовал ожидаемому. В наименьшей из исследованных доз, 10 мкг, оба препарата проявляли сахароповышающую активность, что хорошо согласуется с представлениями об антагонистической природе обоих гормонов и аддитивности вклада природных GIP и GLP-1 в результирующий уровень гликемии (рис. 2) [6, 7]. Одновременно с увеличением дозы для обоих препаратов наблюдали увеличение сахароповышающей активности. Для gmGIP(3–31)rat эта тенденция наблюдалась вплоть до дозы 40 мкг, для gmGLP-1(3–31) – до 20 мкг (рис. 2). Снижение сахароповышающей активности gmGLP-1(3–31) в дозе 40 мкг, может быть связано с наличием у антагониста (аналога GLP-1(9–37)/(9–36)NH₂) низкой, независимой от рецепторов GLP-1, инсулиноподобной активности и способности влиять на гликемию крови путем супрессии продукции глюкозы гепатоцитами [23–25].

Проявление производными gmGIP(3–31)rat и gmGLP-1(3–31) сахароповышающей активности, опосредуемой нейтрализацией соответствующих компонентов системы гликемического контроля, позволяло рассчитывать на еще большее увеличение уровня гликемии под действием смеси обоих антагонистов. Однако этого не произошло. Более того, независимо от дозы смесь антагонистов gmGIP(3–31)rat и gmGLP-1(3–31) детерминировала гликемию на уровне отрицательного контроля (рис. 2), что свидетельствовало о нулевой активности смеси препаратов. Другими словами, при одновременном введении обоих антагонистов сахароповышающая активность каждого из них была полностью подавлена. Этот результат указывает на способность gmGIP(3–31)rat и gmGLP-1(3–31) к взаимодействию, которое вызывает взаимную нейтрализацию их активности.

Применительно к природной ситуации обнаруженный феномен может означать, что, несмотря на быструю “инактивацию” под действием дипептидиламинопептидазы-4, инактивированные производные GIP и GLP-1 не ингибируют сахароснижающую активность нативных гормонов не только в силу сниженного сродства к рецепторам, но также из-за взаимной нейтрализации их активности.

Однако в настоящее время невозможно сказать, в какой степени обнаруженный феномен отражает природную ситуацию или детерминирован специфическими свойствами рекомбинантных белков gmGIP(3–31)rat и gmGLP-1(3–31). Эффект может иметь универсальный характер, а его проводниками могут оказаться рецепторы GIPR и GLP-1R, которые обладают известной способностью к гомо- и гетеродимеризации и проявлению латеральных аллостерических эффектов [26–28],

или иные рецепторы, также участвующие во взаимодействии с GIP и GLP-1 [23–25].

Межгормональное взаимодействие может существенно дополнить и усложнить физиологию инкретинов GIP и GLP-1, контролируемых не только механизм поддержания уровня гликемии, но и другие физиологические процессы [10]. Открытие взаимодействия между производными антагонистов рецепторов GIP и GLP-1 в случае его расширения на природные формы гормонов может повлечь за собой необходимость пересмотра требований к ЛП на основе инкретинов. Очевидно, что доступные лекарственные средства на основе агонистов рецепторов GLP-1, применяемые в настоящее время для контроля за уровнем гликемии, такие как виктоза, ликсумия, альбиглютид, дулаглютид и другие, не обеспечивают адекватного гормонального взаимодействия между производными эндогенного GIP и экзогенного GLP-1, а это может приводить к потенциальному регуляторному дисбалансу и появлению побочных эффектов. Корректное взаимодействие и полноту природных регуляторных эффектов могут обеспечить только многокомпонентные ЛП или ЛП на основе мультиагонистов.

В любом случае требуются дополнительные исследования, которые позволят раскрыть механизмы и особенности обнаруженного взаимодействия метаболитов GIP и GLP-1.

С использованием теста на толерантность к глюкозе здоровых животных (мышей) выполнен анализ сахароснижающей активности производных GIP и GLP-1, сконструированных по формуле глипина, включая “инактивированные” варианты. К наиболее значимым из обнаруженных эффектов следует отнести следующие: 1) отсутствие или относительно низкий эффект ряда известных модификаций GIP при их интеграции в состав рекомбинантных производных gmGIP; 2) полная нейтрализация сахароповышающей активности при смешивании рекомбинантных антагонистов рецепторов GIP и GLP-1: gmGIP(3–31)rat и gmGLP-1(3–31) соответственно. Фактически, впервые выявлена способность производных инкретиновых гормонов GIP и GLP-1 к взаимодействию в процессе регуляции гликемии, что необходимо учитывать при изучении механизмов гликемического контроля и разработке лекарственных препаратов на основе агонистов и антагонистов рецепторов GIP и GLP-1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Санникова Е.П., Булушова Н.В., Чеперегин С.Э., Залуни И.А., Клебанов Ф.А., Грачева Т.С., Юрин В.Л., Рыкалина Н.В., Аскерова Е.В., Яроцкий С.В., Татарникова О.Г., Бобкова Н.В., Козлов Д.Г. Специфическая активность рекомбинантного модифицированного

глюкагоноподобного пептида-1 человека (рмГПП-1). *Биотехнология*, 2018, 34(4), 37–50.

2. Трещалин И.Д., Голибродо В.А., Трещалин М.И., Козлов Д.Г., Яроцкий С.В., Переверзева Э.Р. Исследование на крысах хронической токсичности рекомбинантного модифицированного глюкагоно-подобного пептида человека рмГПП-1, обладающего пролонгированным действием. *Экспериментальная и клиническая фармакология*, 2018, 81(S), 246. <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2018-81-5s-1-306>
3. Rykalyina N.V., Askerova E.V., Bulushova N.V., Kozlov D.G. Intranasal human recombinant modified glucagon-like peptide-1: high antihyperglycemic activity and duration of action in mice. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2020, 169, 53–56. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04822-9>
4. Булушова Н.В., Залуни И.А., Аскаркулова А.С., Козлов Д.Г. Аналоги инкретинов в терапии сахарного диабета типа 2 и ожирения. Агонизм или антагонизм? *Биотехнология*, 2021, 37(3), 53–64. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-3-53-64>
5. Flatt P.R., Conlon J.M. Editorial: GIP renaissance. *Peptides*, 2020, 125, 170266. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170266>
6. Gashbjerg L.S., Gabe M.B.N., Hartmann B., Christensen M.B., Knop F.K., Holst J.J., Rosenkilde M.M. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor antagonists as anti-diabetic agents. *Peptides*, 2018, 100, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.11.021>
7. Nauck M.A., Meier J.J. GIP and GLP-1: stepsiblings rather than monozygotic twins within the incretin family. *Diabetes*, 2019, 68, 897–900. <https://doi.org/10.2337/dbi19-0005>
8. Gashbjerg L.S., Helsted M.M., Hartmann B., Jensen M.H., Gabe M.B.N., Sparre-Ulrich A.H., Veedfald S., Stensen S., Lanng A.R., Bergmann N.C., Christensen M.B., Vilsbøll T., Holst J.J., Rosenkilde M.M., Knop F.K. Separate and combined glucometabolic effects of endogenous glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide 1 in healthy individuals. *Diabetes*, 2019, 68, 906–917. <https://doi.org/10.2337/db18-1123>
9. Nauck M.A., Heimesaat M.M., Orskov C., Holst J.J., Ebert R., Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7–36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, 1993, 91(1), 301–307. <https://doi.org/10.1172/JCI116186>
10. Boer G.A., Holst J.J. Incretin hormones and type 2 diabetes – mechanistic insights and therapeutic approaches. *Biology*, 2020, 9(12), 473. <https://doi.org/10.3390/biology9120473>
11. Sparre-Ulrich A.H., Hansen L.S., Svendsen B., Christensen M., Knop F.K., Hartmann B., Holst J.J., Rosenkilde

- de M.M. Species-specific action of (Pro3)GIP – a full agonist at human GIP receptors, but a partial agonist and competitive antagonist at rat and mouse GIP receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 2016, 173(1), 27–38. <https://doi.org/10.1111/bph.13323>
12. Mroz P.A., Finan B., Gelfanov V., Yang B., Tschöp M.H., DiMarchi R.D., Perez-Tilve D. Optimized GIP analogs promote body weight lowering in mice through GIPR agonism not antagonism. *Mol. Metab.*, 2019, 20, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.12.001>
13. Боброев Е.С., Горбунова А.Ю., Санникова Е.П., Губайдуллин И.И., Игнатова О.М., Конаева М.Ю., Булушова Н.В., Козлов Д.Г. Соочистка рекомбинантных модифицированных глюкагоноподобного и глюкозозависимого инсулинотропного пептидов для создания двухкомпонентного препарата для лечения сахарного диабета типа 2. *Биотехнология*, 2021, 37(6), 74–83. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-6-74-83>
14. Санникова Е.П., Чеперегин С.Э., Козлов Д.Г. Убиквитин-специфичная протеиназа *E. coli* не нуждается в обязательном наличии дипептида GlyGly в сайте процессинга. *Биотехнология*, 2019, 35(2), 25–29. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-2-25-29>
15. Widenmaier S.B., Kim S.-J., Yang G.K., De Los Reyes T., Nian C., Asadi A., Seino Y., Kieffer T.J., Kwok Y.N., McIntosh C.H.S. A GIP receptor agonist exhibits β -cell anti-apoptotic actions in rat models of diabetes resulting in improved β -cell function and glycemic control. *PLoS One*, 2010, 5(3), e9590. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009590>
16. Kieffer T.J., McIntosh C.H., Pederson R.A. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide-1 *in vitro* and *in vivo* by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology*, 1995, 136, 3585–3596. <https://doi.org/10.1210/endo.136.8.7628397>
17. Deacon C.F. Circulation and degradation of GIP and GLP-1. *Horm. Metab. Res.*, 2004, 36(11–12), 761–765. <https://doi.org/10.1055/s-2004-826160>
18. Baggio L.L., Drucker D.J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 2007, 132, 2131–2157. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.054>
19. Hansen L.S., Sparre-Ulrich A.H., Christensen M., Knop F.K., Hartmann B., Holst J.J., Rosenkilde M.M. N-terminally and C-terminally truncated forms of glucose-dependent insulinotropic polypeptide are high-affinity competitive antagonists of the human GIP receptor. *Br. J. Pharmacol.*, 2016, 173(5), 826–838. <https://doi.org/10.1111/bph.13384>
20. Knudsen L.B., Pridal L. Glucagon-like peptide-1-(9–36) amide is a major metabolite of glucagon-like peptide-1-(7–36) amide after *in vivo* administration to dogs, and it acts as an antagonist on the pancreatic receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 1996, 318(2–3), 429–435. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(96\)00795-9](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(96)00795-9)
21. Rolin B., Deacon C.F., Carr R.D., Ahrén B. The major glucagon-like peptide-1 metabolite, GLP-1-(9–36)-amide, does not affect glucose or insulin levels in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 2004, 494(2–3), 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.05.013>
22. Deacon C.F., Plamboeck A., Rosenkilde M.M., Heer J.D., Holst J.J. GIP-(3–42) does not antagonize insulinotropic effects of GIP at physiological concentrations. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2006, 291(3), E468–E475. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00577.2005>
23. Elahi D., Egan J.M., Shannon R.P., Meneilly G.S., Khatri A., Habener J.F., Andersen D.K. GLP-1 (9–36) amide, cleavage product of GLP-1 (7–36) amide, is a glucoregulatory peptide. *Obesity* (Silver Spring), 2008, 16(7), 1501–1509. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.229>
24. Tomas E., Stanojevic V., Habener J.F. GLP-1 (9–36) amide metabolite suppression of glucose production in isolated mouse hepatocytes. *Horm. Metab. Res.*, 2010, 42(9), 657–662. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1253421>
25. Kuc R.E., Maguire J.J., Siew K., Patel S., Derksen D.R., Jackson V.M., O’Shaughnessey K.M., Davenport A.P. Characterization of [¹²⁵I]GLP-1(9–36), a novel radio-labeled analog of the major metabolite of glucagon-like peptide 1 to a receptor distinct from GLP1-R and function of the peptide in murine aorta. *Life Sci.*, 2014, 102(2), 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.03.011>
26. Vrecl M., Drinovec L., Elling C., Heding A. Opsin oligomerization in a heterologous cell system. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.*, 2006, 26(5–6), 505–526. <https://doi.org/10.1080/10799890600932253>
27. Schelshorn D., Joly F., Mutel S., Hampe C., Breton B., Mutel V., Lutjens R. Lateral allosterism in the glucagon receptor family: glucagon-like peptide 1 induces G-protein-coupled receptor heteromer formation. *Mol. Pharmacol.*, 2012, 81, 309–318. <https://doi.org/10.1124/mol.111.074757>
28. Song Yi.Yu., Shen C., Wang Y., Wang N. Dimerization/oligomerization of the extracellular domain of the GLP-1 receptor and the negative cooperativity in its ligand binding revealed by the improved NanoBiT. *FASEB J.*, 2020, 34(3), 4348–4368. <https://doi.org/10.1096/fj.201902007R>

Agonists and Antagonists of GIP and GLP-1 Receptors: Recombinant Species-Specific Variants and Mutual Neutralization of Activity

M. Y. Kopaeva^a, E. P. Sannikova^a, E. S. Bobrov^a, I. I. Gubaidullin^{a, b},
N. V. Bulushova^a, and D. G. Kozlov^{a, #}

^a*Kurchatov Institute National Research Center, Moscow, 123182 Russia*

^b*Kurchatov Center for Genome Research, Kurchatov Institute—GOSNIIGENETIKA NRC, Moscow, 117545 Russia*

[#]*e-mail: Kozlov_DG@rrcki.ru*

Abstract—The development of recombinant modified derivatives of human glucose-dependent insulinotropic polypeptide (rmGIP) and glucagon-like peptide 1 (rmGLP-1) has been carried out as part of the project to create a prototype of a two-component drug. The aims were to increase the activity of GIP derivatives and obtain antagonists of GIP and GLP-1 receptors for selective neutralization of the activity of the corresponding components of a promising drug. For this purpose, well-known mutations were introduced into the structure of the basic human rmGIP(1–42)h variant: a deletion of residues 32–42 and a H18R substitution, species-specific for the mouse/rat hormones. The hypoglycemic activity of the drugs was measured using a glucose tolerance test on healthy mice. In most cases, the engineered mutations turned out to be unexpectedly ineffective or did not affect the hypoglycemic activity of GIP derivatives at all. The maximum twofold increase in activity was recorded only in the modified rmGIP(1–31) rat variant, which contained both mutations simultaneously. “Inactivated” derivatives rmGIP(3–31)rat and rmGLP-1(3–31), containing the deletion of two N-terminal residues, specific for natural antagonists of the GIP and GLP-1 receptors (GIPR and GLP-1R, respectively) exhibited individually expected dose-dependent antagonistic activity. At the same time, their equimolar mixture, instead of the expected additive effect, showed a complete loss of sugar-raising activity. Based on the obtained result, we formulated the hypothesis about the ability of metabolites of the derivatives of incretin hormones GIP and GLP-1 to interact with each other in the process of glycemic regulation. This fact should be taken into account when studying the mechanisms of glycemic control and developing drugs based on agonists and antagonists of GIP and GLP-1 receptors.

Keywords: glucagon-like peptide 1, GLP-1, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, GIP, antiglycemic drug, receptor antagonists