

УДК 57.084.1:615.357

АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТАГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРОВ GIP И GLP-1 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХРОМАТОГРАФИИ

© 2023 г. Е. С. Бобров¹, Е. П. Санникова¹, Н. В. Булушова¹, Д. Г. Козлов¹, *

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

*e-mail: Kozlov_DG@rrcki.ru

Поступила в редакцию 05.09.2023 г.

После доработки 23.10.2023 г.

Принята к публикации 02.11.2023 г.

Проведен экспериментальный и теоретический анализ потенциальных механизмов, способных обеспечить обнаруженную нами взаимную нейтрализацию активности антагонистов рецепторов GLP-1R и GIPR. Гель-проникающая хроматография не выявила признаков взаимодействия между исследуемыми лигандами, что косвенно свидетельствовало в пользу биологических механизмов наблюдаемого эффекта. Представлена гипотеза, связывающая нейтрализацию активности с известными механизмами биологического взаимодействия лигандов семейства инкретинов с рецепторами GLP-1R и GIPR.

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

DOI: 10.56304/S0234275823050046

Настоящая работа продолжает серию исследований, нацеленных на разработку ЛП на основе рекомбинантных производных инкретинов GLP-1 и GIP [1–4]. С целью создания двухкомпонентного лекарственного препарата (ЛП) были получены рекомбинантные модифицированные гормоны gmGIP(3–31)rat и gmGLP-1(3–31). Вводимые животным по отдельности они демонстрировали активность рекомбинантных антагонистов рецепторов GIPR и GLP-1R, соответственно. В то же время, при совместном применении гормоны полностью нейтрализовали друг друга [4]. Расшифровка этого удивительного явления представляла интерес как с точки зрения уточнения фундаментальных механизмов гликемического контроля, так и в плане разработки новых ЛП на основе агонистов и антагонистов рецепторов GIP и GLP-1.

Мы предполагали два принципиальных механизма обнаруженного эффекта. В его основе могли лежать либо контакты между гормонами, основанные на их межмолекулярном сродстве друг к другу, либо гораздо более сложные биологиче-

ские взаимодействия, например, опосредуемые рецепторами. В этой связи любые результаты, которые позволяли надежно исключить из рассмотрения один из двух механизмов, автоматически могли быть учтены как свидетельствующие в пользу другого. Опираясь на данный подход, для текущего исследования был выбран поиск свидетельств межмолекулярного взаимодействия между модифицированными гормонами gmGIP(3–31)rat и gmGLP-1(3–31).

Исследования возможного взаимодействия между гормонами проводили *in vitro* с помощью гель-проникающей хроматографии. Растворы гормонов с концентрацией 500 мкг/мл в буфере PBS инкубировали совместно при температуре 24 и 37°C в течение 30 мин. Результаты взаимодействия анализировали на колонке PackDiol-120 (8.0 × 300 mm, S–5 µm, 12 nm) (YMC, Япония) на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Dionex, Германия) в буфере PBS со скоростью потока 0.5 мл/мин. Разрешающая способность метода позволяет регистрировать образование димеров и других продуктов взаимодействия между молекулами гормонов.

Результаты анализа представлены на рис. 1.

Согласно результатам анализа, в условиях *in vitro* признаков взаимодействия между модифицированными гормонами gmGIP(3–31)rat и gmGLP-1(3–31) обнаружить не удалось. Наличие замены H18R в

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

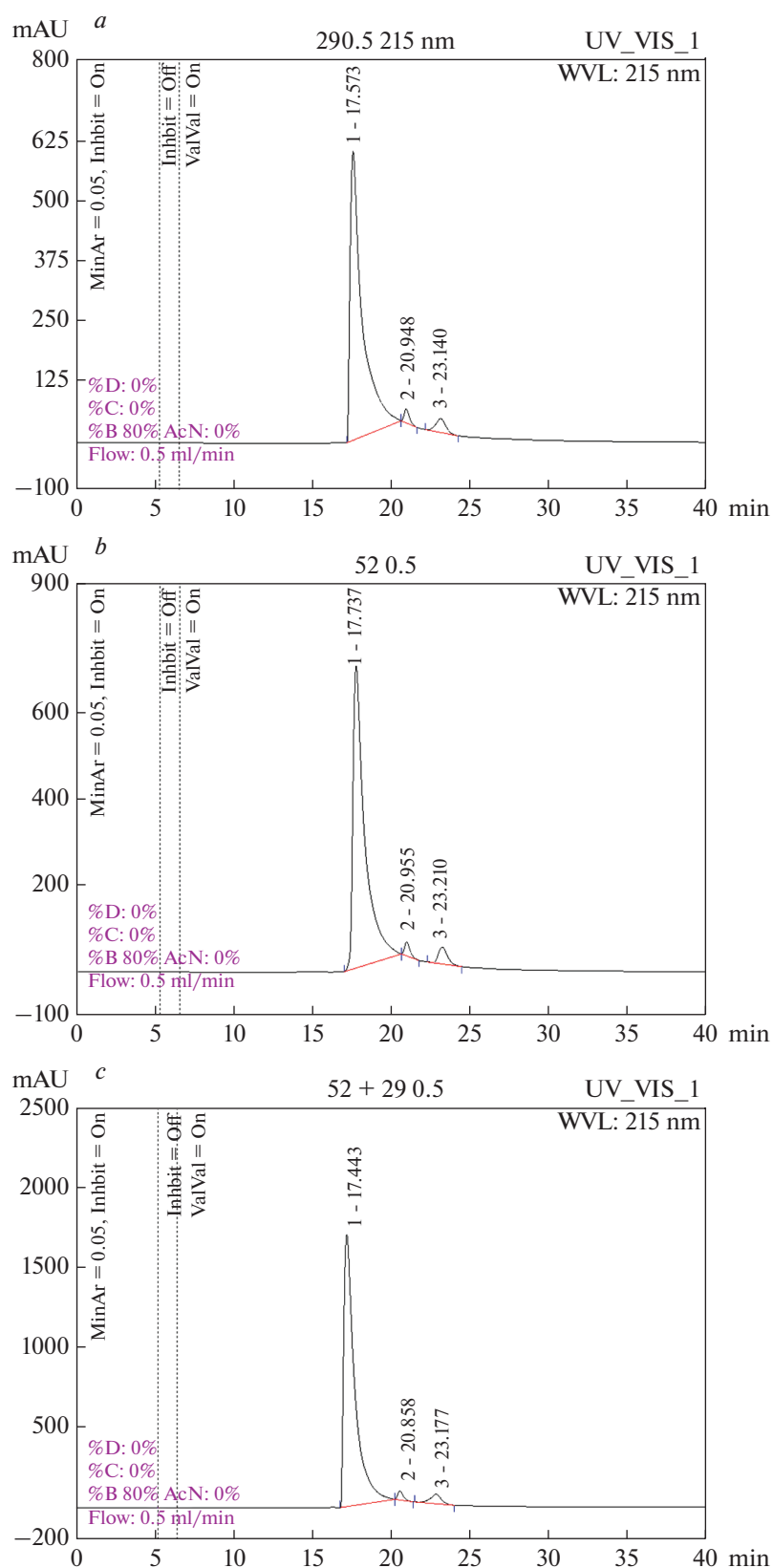


Рис. 1. Хроматограммы очищенных препаратов: *a* – rmGLP1(3–31), *b* – rmGIP(3–31)rat, *c* – [rmGLP1(3–31) + rmGIP(3–31)rat].

Fig. 1. Chromatograms of purified preparations: *a* – rmGLP1(3–31), *b* – rmGIP(3–31)rat, *c* – [rmGLP1(3–31) + rmGIP(3–31)rat].

gmGIP(3–31)rat, отличающей гормон человека gmGIP(3–31)hum от гормона крысы, не повлияло на результат (данные не приведены). Исследуемые пары гормонов не проявили склонности к образованию комплексов в концентрации 500 мкг/мл. Данная величина намного превышает не только нормальное содержание гормонов GIP и GLP-1 в крови животных (максимум, 0.1 мкг/л для GLP-1 и 2.5 мкг/л для GIP [5]), но также и теоретическую величину, ожидаемую в результате применения модифицированных гормонов в обоснованной дозировке. Полученные результаты позволили исключить теорию о непосредственном взаимодействии между гормонами *in vitro* и *in vivo*, в том числе — как основу механизма взаимной нейтрализации активности гормонов gmGIP(3–31)rat и gmGLP-1(3–31).

Таким образом, данное заключение резко повысило интерес к биологическим рецептор-опосредованным механизмам взаимодействия гормонов.

Известно, что сигнальная активность гормонов GLP-1 и GIP обеспечивается их взаимодействием с рецепторами GLP-1R и GIPR [5]. Вероятным элементом этого процесса является димеризация активированных лигандами рецепторов, причем непосредственными проводниками активности могут выступать как гомо-, так и гетеродимеры [6–8]. При этом рецептор-опосредуемый процесс передачи гормонального сигнала характеризуется негативной кооперативностью [7]. Как было показано (авторами [9], а также в нашей работе [1]), агонисты рецепторов GLP-1 и GIP реализуют присущую им активность как по отдельности, так и в композиции, не обнаруживая никаких признаков эффекта взаимной нейтрализации. Согласно имеющимся представлениям, антагонистическое действие протеолитически инактивированных производных инкретин и их аналогов основано на конкурентном ингибировании соответствующих рецепторов [10]. В то же время механизм ингибирования остается до конца непонятен и более того, его анализ сопровождается массой противоречивых эффектов [5].

Тем не менее, приняв за основу принципиальное взаимодействие агонистов и антагонистов (лигандов) с рецепторами GLP-1R и GIPR, мы попытались объяснить обнаруженный эффект. Для этого в схему взаимодействия пришлось внести одно радикальное уточнение. Мы предположили, что сродство протомеров рецепторов GLP-1R и GIPR друг к другу и, следовательно, их склонность к образованию сигнальных гомо- и гетеродимеров, может зависеть от лигандов, участвующих в их активации, причем наивысшим уровнем сродства обладают протомеры GLP-1R и GIPR, формирующие гетеродимерные пары. Другим, менее значимым

условием сродства может оказаться активация протомеров лигандами одного класса — агонистов или антагонистов рецепторов GLP-1R и GIPR. Все остальные взаимодействия между протомерами, реализуемые путем гомодимеризации или, особенно под влиянием активации лигандами разных классов, могут характеризоваться существенно более низкой эффективностью.

На основании гипотезы следует ожидать, что активированные агонистами и антагонистами протомеры рецепторов GLP-1R и GIPR преимущественно и в первоочередном порядке будут формировать именно гетеродимерные, а не гомодимерные пары. Специфическая сигнальная активность таких пар может отражать, в том числе, уровень сродства между протомерами, участвующими в их образовании. Как следствие, применение сбалансированных комплексов агонистов и/или антагонистов рецепторов GLP-1R и GIPR будет стимулировать повышенное вовлечение соответствующих лигандов в образование гетеродимерных пар и снижение синтеза всех других, менее аффинных продуктов межлигандного взаимодействия. Это может проявляться в виде эффекта нейтрализации антагонистической активности. Однако в случае существенного избытка какого-либо лиганда следует ожидать истощения потенциала гетеродимеризации рецепторов GLP-1R и GIPR и появления их гомодимерных пар, в том числе активированных лигандами сразу двух разных классов, агонистов и антагонистов. Таким образом, в соответствии с гипотезой, антагонистические эффекты являются результатом несбалансированного применения антагонистов рецепторов GLP-1R и GIPR, тогда как их сбалансированное применение будет приводить к их рецептор-опосредованной изоляции и, как возможное следствие, к эффекту взаимной нейтрализации активности. Таким образом, гипотеза полностью и непротиворечиво объясняет эффекты, связанные с индивидуальной активностью антагонистов рецепторов GLP-1R и GIPR и активностью их комплекса, зафиксированные в нашей работе [4].

Данная гипотеза имеет, как минимум, два существенных следствия.

Известно, что агонисты рецепторов GLP-1R и GIPR обладают множественной сигнальной активностью [5, 11]. При этом, ни одна из известных нам работ не раскрывает, какие именно пары рецепторов, гомо- или гетеродимерные, служат истинными проводниками гормональной активности. Это, однако, не подвергает сомнению роль этих рецепторов в соответствующих биологических процессах. В то же время функция рецепторов и их гипотетических гетеродимерных пар, активированных с участием антагонистов, в осо-

бенности — сразу обоих антагонистов рецепторов GLP-1R и GIPR, остается загадкой. Предложенная гипотеза предсказывает эффективное образование таких гетеродимерных пар, но не раскрывает их специфическую активность, которая может отличаться от антагонистической. Ряд известных публикаций и в особенности работы последних лет говорят о том, что комплексы агонистов и антагонистов, способные, согласно гипотезе, стимулировать эффективное формирование гетеродимерных пар рецепторов, могут обладать такой же сахароснижающей активностью, как и комплексы агонистов [5, 10].

Второе. В случае ее подтверждения гипотеза способна изменить подход к использованию инкретинов или их аналогов при разработке ЛС. Согласно гипотезе, именно комплексный состав ЛС определяет, будет ли влияние ЛС на гликемию осуществляться сбалансированным образом. Нельзя исключить, что длительное применение или действие несбалансированных ЛС будет нарушать гармоничную “работу” систем, активируемых агонистами и антагонистами рецепторов GLP-1R и GIPR, что может привести к непредсказуемым последствиям.

Таким образом при изучении эффекта взаимной нейтрализации активности антагонистов рецепторов GLP-1R и GIPR, обнаруженного ранее, получены экспериментальные результаты, свидетельствующие в пользу представленной гипотезы о неизвестном ранее механизме взаимодействия рецепторов GLP-1R и GIPR.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена при финансовой поддержке тематического плана НИЦ “Курчатовский Институт” на 2022 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sannikova E.P., Bulushova N.V., Cheperegin S.E., Zalunin I.A., Klebanov F.A., Gracheva T.S., Yurin V.L., Rykalina N.V., Askerova E.V., Yarotskii S.V., Tarnikova O.G., Bobkova N.V., Kozlov D.G. Specific activity of recombinant modified human glucagon-like peptide-1. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2019, 55(7), 722–732. <https://doi.org/10.1134/S0003683819070068>
2. Rykalina 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. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine (Pharmacology and Toxicology)*, 2020, 169(1), 53–56. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04822-9>
3. Bobrov E.S., Gorbunova A.Yu., Sannikova E.P., Gubaidullin I.I., Ignatova O.M., Kopaeva M.Yu., Bulushova N.V., Kozlov D.G. Copurification of a recombinant modified glucagon-like and glucose-dependent insulinotropic peptide to create a two-component drug for the treatment of type 2 diabetes mellitus and obesity. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2022, 58(9), 976–983. <https://doi.org/10.1134/S0003683822090034>
4. Kopaeva M.Yu., Sannikova E.P., Bobrov E.S., Gubaidullin I.I., Bulushova N.V., Kozlov D.G. Рекомбинантные антагонисты глюкозозависимого инсулинотропного пептида (ГИП) и глюкагоноподобного пептида 1 (ГПП-1) обладают способностью к взаимной нейтрализации активности. *Биотехнология*, 2022, 38(5), 17–24. <https://doi.org/10.56304/S0234275822050076>
5. 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>
6. Harikumar K.G., Wootten D., Pinon D.I. et al. Glucagon-like peptide-1 receptor dimerization differentially regulates agonist signaling but does not affect small molecule allostery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, 109, 18607–18612.
7. Song X., Yu Yi, 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>
8. Mayendraraj A., Rosenkilde M.M., Gashbjerg L.S. GLP-1 and GIP receptor signaling in beta cells — A review of receptor interactions and co-stimulation. *Peptides*, 2022, 151, 170749. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170749>
9. 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>
10. 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>
11. Graaf C., Donnelly D., Wootten D., Lau J., Sexton P.M., Miller L.J., Ahn J.-M., Liao J., Fletcher M.M., Yang D., Brown A.J.H., Zhou C., Deng J., Wang M.-W. Glucagon-Like Peptide-1 and Its Class B G Protein-Coupled Receptors: A Long March to Therapeutic Successes. *Pharmacol. Rev.*, 2016, 68, 954–1013. <https://doi.org/10.1124/pr.115.011395>

Interaction Analysis of Recombinant GIP and GLP-1 Receptor Antagonists Using Chromatography

E. S. Bobrov^a, E. P. Sannikova^a, N. V. Bulushova^a, and D. G. Kozlov^{a, #}

^a*NRC "Kurchatov Institute", Moscow, 117545 Russia*

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

Abstract—An experimental and theoretical analysis of potential mechanisms capable of ensuring mutual neutralization of the activity of GLP-1R and GIPR receptor antagonists identified in previous work was carried out. Gel-filtration chromatography did not reveal signs of physical interaction between the studied ligands, which indirectly indicated the biological mechanisms of the effect. A hypothesis is presented that links the neutralization of activity with the known mechanisms of biological interaction of incretin family ligands with GLP-1R and GIPR receptors.

Keywords: Glucagon-like peptide-1, GLP-1, Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide, GIP, antiglycemic drug, receptor antagonists, glycemia

Свидетельство о регистрации средства массовой информации
ПИ № ФС77-75946 от 13 июня 2019 г., выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Подписано к печати 15.09.2023 г. Дата выхода в свет 20.09.2023 г. Формат 60 × 88¹/₈ Усл. печ. л. 14.76 Уч.-изд. л. 15.0
Тираж 117 экз. Зак. 6498 Цена договорная

Учредители: Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Издатель: НИЦ "Курчатовский институт", 123182, Россия, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1
Исполнитель по контракту № 35-3-23-44-139 от 03.08.2023 г. ООО "СИС",
129164, г. Москва, Ракетный б-р, д. 16, пом. XXXI, пом. 23
Отпечатано в типографии «Book Jet» (ИП Коняхин А.В.),
390005, г. Рязань, ул. Пушкина, 18, тел. (4912) 466-151

16+