

PEPTIDNI AGONISTI RECEPTORJA ZA GLUKAGONU PODOBNI PEPTID-1 TER NJIHOVA UPORABA PRI ZDRAVLJENJU SLADKORNE BOLEZNI TIPA 2 IN DEBELOSTI

GLUCAGON LIKE PEPTIDE-1
RECEPTOR AGONISTS AND THEIR
APPLICATION IN TREATMENT
OF DIABETES MELLITUS TYPE 2
AND OBESITY

AVTOR / AUTHOR:

Matjaž Deželak, dipl. univ. biol.¹,
prof. dr. Aljoša Bavec, dipl. univ. biol.²,

¹ Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta,
Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000, Ljubljana

² Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta,
Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000, Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: aljosa.bavec@mf.uni-lj.si

POVZETEK

Vse od začetkov farmacevtskih, farmakoloških in farmakoterapevtskih znanosti so glavno vlogo igrale majhne molekule, saj so bili kemijska sinteza, čiščenje in dostava na tarčno mesto relativno enostavni, kemijska stabilnost in biološka dostopnost pa relativno visoki. Z napredovanjem tehnologij načrtovanja sinteze, proizvodnje, čiščenja, shranjevanja in dostave do tarčnega mesta se je odprla možnost uporabe večjih polimernih molekul pri zdravljenju obolenj. Takšni so predvsem peptidi in proteini, ki opravljajo najrazličnejše naloge v organizmu. V tem preglednem članku so obravnavana peptidna zdravila na splošno. Sledi opis njihove uporabe, s poudarkom na glukagonu podobnem peptidu-1 (GLP-1), pri zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2 in debelosti. Ker peptidna zdravila za zdravljenje teh dveh bolezni uporabljamo relativno malo časa, ima zdravljenje kot tako še nekaj pomanjkljivosti, zato je na koncu predstavljena še možnost razvoja učinkovitejših načinov zdravljenja na temelju naših nedavnih raziskav.

KLJUČNE BESEDE:

peptidne učinkovine, sladkorna bolezen tipa 2, debelost, glukagonu podoben peptid-1, mono-ADP-ribozilacija

ABSTRACT

In the beginnings of pharmaceutical, pharmacological, and pharmacotherapeutical sciences small molecules played the main role as chemical synthesis, purification, and drug delivery and targeting were relatively simple. Moreover, high degree of chemical stability and biological availability both worked in their favour. Later on, technologies for achieving the appropriate degree of above mentioned limiting factors improved, and larger, polymeric molecules became useful. Among them, the most important are peptides and proteins, which have crucial natural role in organism's physiology. This review article discusses peptide drugs in general and it continues with glucagon like peptide-1 (GLP-1) being used for treatment of diabetes mellitus type 2 and obesity. Because of the fact that the peptide drug-based therapy of these two illnesses is relatively new it still has quite some imperfections. That is why directions to achieve a better treatment effi-



cacy – which are based on our latest research – are presented at the end.

KEYWORDS:

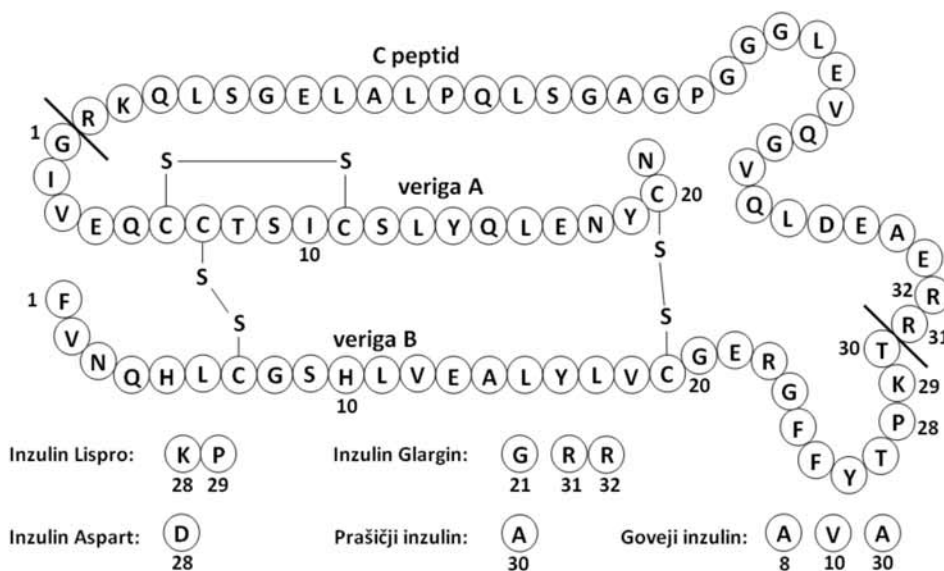
peptide drugs, type 2 diabetes mellitus, obesity, glucagon-like peptide-1, mono-ADP-ribosylation

1 PEPTIDNA ZDRAVILA

Peptidna zdravila so postala prva izbira pri zdravljenju alergij, mikrobnih bolezni, rakavih tvorbo, sladkorne bolezni, srčno-žilnih obolenj, debelosti, artritisa in drugih (1). Še posebej v zadnjem desetletju njihova uporaba in popularnost še vedno naraščata, predvsem zaradi napredka v sintezni kemiji, nanotehnologiji, tehnologiji čiščenja in strategijah pri dostavi zdravil (2). Peptidi so sestavljeni iz 2 do 50 aminokislin, ki se v procesu kemijske kondenzacije med seboj povežejo s peptidno vezjo. Od proteinov se razlikujejo le v številu aminokislinskih ostankov. Zgornja meja za peptid je približno 50 aminokislinskih ostankov, poudariti pa je potrebno, da je ta omejitev zgolj arbitrarna saj natančne definicije ni. Kot zdravilne učinkovine uporabljamo naravne peptide, npr. inzulin (slika 1), s tehnologijo rekombinantne DNA spremenjene peptide, npr. inzulin aspart, inzulin lispro in inzulin glargin (slika 1) ter kemijsko spremenjene peptide, npr. heksil-inzulin monokonjugat 2 (Nobex Corp., ZDA).

Najobičajnejše spremembe so dodajanje, odzemanje ali zamenjava standardnih aminokislin, lahko pa poleg slednjih peptidi vsebujejo še druge aminokisliline in/ali imajo kovalentno vezane razne organske spojine oz. funkcionalne skupine (3). V splošnem peptidna zdravila povzročajo manj stranskih učinkov kot nizkomolekularne učinkovine. Njihove prednosti pred ostalimi skupinami zdravil so predvsem visoka aktivnost in specifičnost, visoka učinkovitost, minimalne interakcije zdravilo–zdravilo, nizka raven kopičenja v tkivih in posledično nizka toksičnost, nudijo pa tudi veliko biološko in kemijsko raznolikost (1).

Da pa razvoj in uporaba peptidnih zdravil nista še večja, so v prvi vrsti krive še nerešene pomanjkljivosti, vezane na stabilnost peptidov, ki se kažejo kot kratek razpolovni čas, težavna dostava do mesta delovanja ter zahtevna in draga proizvodnja (1). Obstajata dva glavna načina proizvodnje vsak s svojim naborom prednosti. Metode na osnovi tehnologije rekombinantne DNA so v določenih primerih proizvodnje velikih količin lahko cenovno najugodnejše (4). Biotehnološki postopek je zelo učinkovit tudi pri daljših aminokislinskih zaporedjih npr. 100 in več aminokislinskih ostankov (4). Vendar je lahko razvoj učinkovitega rekombinantnega programa proizvodnje drag in zamuden, pogosto so potrebni kompleksni proizvodni koraki (4). Nasprotno je kemijska sinteza bolj prilagodljiva in ni omejena na uporabo zgolj proteinogenih aminokislin (4). Primerna je za proizvodnjo različnih količin peptidne učinkovine, saj je stroškovno ugodna od ranga velikosti nekaj gramov do več kilogramov (4).



Slika 1: Zgradba človeškega proinzulina in komercialno dostopni inzulinski analogi z navedbo mesta in tipa spremembe glede na naravni inzulin. Inzulin je prikazan kot verigi A in B (5).
 Figure 1: Structure of human proinsulin and commercially available insulin analogs. Insulin is shown as the peptide chains, A and B (5).

1.1 MESTO IN NAČIN VNOSA

Mesto in način vnosa sta zelo pomembna dejavnika, saj vplivata tako na kemijsko in fizikalno obliko zdravila kot tudi na sestavo in obliko pomožnih snovi. Peroralni vnos, na primer, pogojuje obliko, ki je stabilna pri različnih vrednostih pH in odporna na proteolizo, medtem ko vnos preko mukoznih membran nosne votline zahteva velikost delcev več μm ter večjo stopnjo lipofilnosti. Intravenski vnos je seveda najbolj učinkovit, saj vnesemo zdravilo neposredno v sistemski krvni obtok, hkrati pa tudi najmanj praktičen in sprejemljiv za bolnika. Možen je za večino zdravil. Problemi pri drugih načinih vnosa peptidnih zdravil so relativno velika molekulska masa, električni naboj, relativna hidrofilna narava (zato oteženo prehajanje skozi membrane) in nestabilnost v okoljih s proteolizno aktivnostjo ter nizkimi in visokimi vrednostmi pH (6). Glavna mesta vnosa zdravila v telo poleg intravenskega so pljuča, sluznice in koža (6).

1.2 CILJANJE (ANG. »TARGETING«)

V ta namen izkoriščamo specifične fizikalne in/ali kemijske značilnosti tkiv oz. organov, kot so prisotnost specifičnih receptorjev, povišan pretok krvi, izbirna prepustnost membran, površinski električni naboj, idr., ali pa si pomagamo z njihovimi svojstvenimi fiziološkimi parametri, kot so na primer nizke in visoke vrednosti pH (6). V določenih primerih, pri katerih (še) ni razvitih načinov za ciljanje, zdravila vnašamo v sistemski krvni obtok, s čimer se nespecifično in bolj ali manj enakomerno razporejajo po celem telesu. S tem je seveda nevarnost stranskih učinkov večja in učinkovitost zdravila manjša. Pri sistemskem vnosu je zelo pomembno doseči čim manjšo odstranitev zdravila iz krvi preko ledvic ter zmanjšati biotransformacijo v jetrih (6, 7). Mnogi peptidi, kot na primer inzulin, že zaradi svoje narave ciljajo specifičen receptor oz. makromolekulo, medtem ko drugi peptidi niso selektivno specifični oz. se vežejo na celične strukture z manjšo afiniteto. Slednjim lahko z ustreznimi kemijskimi spremembami strukture in/ali tehnikami dostave, s pomočjo katerih jih usmerimo čim bližje mestu delovanja, močno povečamo učinkovitost. Tudi peptide z že obstoječo specifično vezavo lahko naredimo učinkovitejše, če jim afiniteto povečamo (6). Najuporabnejši so trije splošni pristopi: fuzijski kompleks peptida s protitelesom ali delom protitelesa (npr. fuzija peptida z enojno verigo variabilne regije imunoglobulina, scFv), fuzija peptida z drugimi proteini, ki se specifično vežejo z receptorji (npr. fuzija peptida z transformirajočim rastnim faktorjem α , TGF α) in fuzija peptida z ogljikovimi hidrati, ki se vežejo z receptorji, ki prepoznajo specifične monosaharide (npr. fuzija peptida z oligosaharidi, ki vsebujejo manozo) (6).

1.3 IZBOLJŠANJE DOSTAVE IN CILJANJA S FIZIKALNO-KEMIJSKIMI SPREMEMBAMI

Cilj fizikalno-kemijskih sprememb peptidne učinkovine je predvsem zagotovitev minimalne lipofilnosti (za membransko prepustnost) in odpornost proti proteolitičnim encimom (8). Spremenjenim molekulam pravimo predzdravila (če se aktivirajo v organizmu oz. na samem mestu delovanja) ali analogi (če zdravilo učinkuje spremenjeno). Primera uspešne spremembe sta kovalentna vezava hidrofilne polietilen glikolne molekule (9) in lipofilne alkilne verige na β -verigo inzulinske molekule (10, 11). Podjetje Emisphere Technologies testira nove pristope dostave in ciljanja. Z uporabo majhnih hidrofobnih organskih molekul, ki so nekovalentno povezane z makromolekulami lahko dosežemo povečano lipofilnost in izboljšano prepustnost skozi biološke membrane. Majhne hidrofobne molekule se povežejo s peptidom, ki ga prenašajo tako, da reverzibilno spremenijo njegovo sekundarno strukturo. Spremenjena struktura omogoči peptidu, da lažje prehaja skozi membrano. V celici pa se majhna hidrofobna molekula razveže in peptidu se zopet povrne izvorna sekundarna struktura in aktivnost (12). Na zdravilno učinkovino lahko kovalentno vežemo tudi večje molekule oz. makromolekule in polimere. Njihova pomembna lastnost je, da jih prepoznajo endogene sestavine celičnega transporta v prebavnem epitelu, tj. ali membranski transporterji ali receptorji endocitoze (8). Slednji so za peptidna zdravila še posebej zanimivi, saj receptorsko posredovana endocitoza ni omejena z velikostjo privzete molekule (8). Primeri takšnih receptorsko-prepoznanih ligandov so lektini, razni toksini, virusni hemaglutinini, invazini, transferini in nekateri vitamini (13). Posebno zanimivi pa so dostavni peptidi (ang. »cell-penetrating peptides«), ki lahko neinvazivno prehajajo plazmalemo in so pregledno opisani drugje (14).

Peptidno zdravilo lahko tudi obdamo s polimerom ali makromolekulo (torej ne gre za kovalentno vezavo), s čimer ga zaščitimo pred fizikalno-kemijskimi vplivi okolja, pogosto pa tudi pospešimo prehod v epitelne celice (8). Uspešno uporabljeni so polimerni dostavni sistemi na osnovi hidrogelov, nanodelcev, mikrosfer (mikrodelcev) in lipidov (liposomi, mikroemulzije, trdni lipidni delci) (8). Med njimi je vredno izpostaviti nanodelce, ki so najmlajši in trenutno najbolj raziskovani. Nanodelec je vsaka majhna struktura, ki se obnaša kot ena entiteta v smislu transporta in funkcije. Nekaj primerov nanodelcev je zbranih v tabeli 1 (8).



Preglednica 1: Nanodelci kot prenašalci peroralnih peptidnih zdravil (8).

Table 1: Oral nanoparticle drug carrier (8).

Nano-prenašalec	Zdravilo	Velikost [nm]
Poli(izobutilcianokrilat)	Inzulin	220
Hitosan	Inzulin	250-400
S hitosanom obložen lipid	Kalcitonin lososa	537
S hitosanom obložena poli(mlečna-ko-glikolična kislina)	Elkatonin	650
Poli(mlečna-ko-glikolična kislina)	Kalcitonin lososa	172-315
Poli(N-izopropil akrilamid)	Kalcitonin lososa	148-895
Akrilni kopolimeri	Inzulin	200 (pH 2)

2 PEPTIDNA ZDRAVILA PRI ZDRAVLJENJU SLADKORNE BOLEZNI TIPA 2 IN DEBELOSTI

Med sladkorno boleznijo tipa 2 in debelostjo obstaja patogeni in epidemiološka povezava, za kar so vsaj delno odgovorni pleiotropni učinki endogenih inkretinskih hormonov (15). Inkretini so skupina gastrointestinalnih hormonov, ki se izločijo iz celic prebavil kot posledica zaužitja hranilnih snovi (15). Odgovorni so za t.i. »inkretinski učinek«, za katerega je značilno mnogo višje izločanje inzulina iz β -celic po peroralni aplikaciji glukoze v primerjavi z intravensko (16). Obema boleznima je skupno nepravilno delovanje inkretinskih hormonov, zato je primerno, da ju obravnavamo skupaj. Najpomembnejša inkretinska hormona sta glukagonu podoben peptid-1 (GLP-1), ki ga izločajo L-celice distalnega dela tankega črevesa in od glukoze odvisev inzulintropični polipeptid (GIP), ki ga izločajo K-celice proksimalnega dela tankega črevesa. Učinek delovanja obeh hormonov hkrati je z vidika izločanja inzulina pri zdravih ljudeh enak vsoti učinkov delovanja obeh posameznih hormonov (15). Podroben pregled obeh peptidov je objavljen drugje (17).

2.1 DEBELOST

Debelost je značilna težava modernega časa in posredno ali neposredno vpliva na številne zdravstvene probleme, kot so srčno-žilne bolezni, psiho-socialne in psihične motnje, težave s sklepi, apnejo med spanjem in druge (15). Svetovna zdravstvena organizacija debelost definira kot stanje posameznika, ko je njegov indeks telesne mase (ITM) večji od 30,0 kg/m². Morda najpomembnejšo vlogo pri uravnavanju telesne mase imajo ravno inkretini (15). Danes je jasno, da ima GLP-1 neposreden (zaviranje poobednega sproščanja glukagona iz α -celic, povečanje poobednega sproščanja inzulina iz β -celic, inhibitor vpliv na

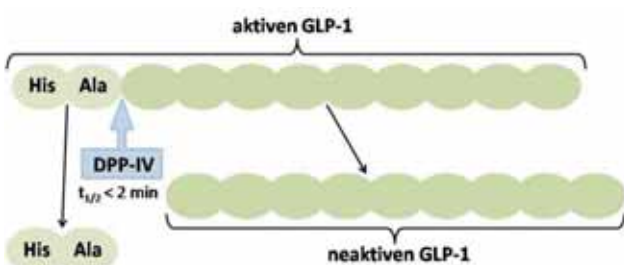
center za apetit v hipotalamusu) in posreden vpliv (zaviranje apetita preko zakasnjene praznjenja želodčne vsebine) na prehranjevalno obnašanje posameznika (15). Debelost zdravimo predvsem z ne-peptidnimi zdravilnimi učinkovinami, npr. z orlistatom (18). Vendar pa k zmanjšanju prevelike telesne mase prispevajo tudi peptidna zdravila, ki jih primarno uporabljamo za zdravljenje sladkorne bolezni, npr. eksenatid in pramlintid (18).

2.2 SLADKORNA BOLEZEN TIPA 2

Sladkorna bolezen tipa 2 je v razvitem svetu prav tako v porastu. Pri tej bolezni gre za inzulinsko neobčutljivost perifernih tkiv (npr. skeletnih mišic) in moteno izločanje samega inzulina, dejavniki tveganja za razvoj bolezni pa so predvsem debelost, telesno neaktiven način življenja in starost (19). Uveljavljeno zdravljenje izvajamo z dieto, telesno aktivnostjo in farmakološkimi učinkovinami, kot so inzulin, bigvanidi, derivati sulfonil uree in tiazolidindioni (19). Vendar imajo ta zdravila kar nekaj stranskih učinkov, npr. hipoglikemija, porast telesne mase in edem. Pri zdravljenju je po navadi potrebna kombinacija več različnih zdravil hkrati, zato je potreba po novih načinih zdravljenja velika (19). Kot uporabno se je že izkazalo zdravljenje z inkretini, predvsem z GLP-1, saj le-ta stimulira izražanje inzulinskega gena, posredno poveča inzulinsko občutljivost, stimulira proliferacijo obstoječih in zorenje izvornih β -celic ter zavira njihovo apoptozo (20).

2.3 NA GLP-1 OSNOVANO ZDRAVLJENJE DEBELOSTI IN SLADKORNE BOLEZNI TIPA 2

GLP-1 ima pozitivne učinke tako pri zdravljenju debelosti kot tudi sladkorne bolezni tipa 2, vendar njegova uporaba ni učinkovita, saj ga že po eni do dveh minutah (razpolovni čas $t_{1/2} < 2$ min) inaktivira encim dipeptidil peptidaza IV (DPP-



Slika 2: Proces z DPP-IV posredovane deaktivacije GLP-1 (18).
Figure 2: The inactivation process of GLP-1 by DPP-IV (18).

IV) (slika 2) (19). Z odcepitvijo histidina in alanina na N-koncu peptida nastane GLP-1(9-36)amid, ki je šibek antagonist za receptor GLP-1 (19). Na GLP-1 temelječe zdravljenje zato poteka z učinkovinami, ki jih delimo v dve skupini: peptidni agonisti receptorja GLP-1, ki niso substrat DPP-IV in inhibitorji DPP-IV (19). Ker inhibitorji DPP-IV niso peptidi, temveč običajno majhne molekule, jih na tem mestu ne bomo obravnavali, podrobneje pa so pregledno opisani drugje (19, 20, 21). Omenimo naj le tri bistvene razlike med tema dvema skupinama: (a) agonisti receptorja GLP-1 vplivajo na zmanjšanje telesne mase, medtem ko so inhibitorji DPP-IV glede tega nevtralni in zato primerni le za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 (22); (b) inhibitorji DPP-IV načeloma niso zelo selektivni, inhibirajo lahko tudi DPP-II, DPP-VIII, DPP-IX, prolilendopeptidazo (PEP) in fibroblaste-aktivirajoči protein α (FAP- α) (19); (c) DPP-IV je pleiotropen encim (inaktivacija nekaterih peptidnih hormonov, neuropeptidov in kemokinov, vezava fibronektina in adenozin deaminaze), katerega inhibicija ima lahko stranske učinke, ki pri agonistih receptorja GLP-1 niso mogoči (19).

Pri načrtovanju agonistov receptorja GLP-1 lahko izhajamo iz strukture samega GLP-1 (t.i. analogi GLP-1) ali pa iz ekSENDINA-4 (peptid, izoliran iz žleze slinavke kuščarja *Heloderma suspectum*) (19). Bistvena pogoja, ki ju mora analog oz. peptidomimetik izpolnjevati, je odpornost proti encimskemu delovanju DPP-IV in čim manjše izločanje preko ledvic, pri čemer si pogosto pomagamo z vezavo na albumin (22). Subkutani vnos se izvrši dvakrat (eksENATID) ali enkrat (LIRAGLUTID in LIKSISENATID) na dan oz. enkrat na teden (TASPOGLUTID in ALBIGLUTID) (22).

EksENATID je bil prvi agonist receptorja GLP-1 na tržišču, odobren za klinično uporabo leta 2005. Je sintezen ekvivalent ekSENDINA-4 in kljub temu, da kaže le 53% homologijo z GLP-1 (preglednica 2), se na receptor veže s primerljivo afiniteto (22). Razpolovni čas je občutno daljši (okrog 2 uri) v primerjavi z GLP-1 (1-2 min). Učinkovita terapevtska koncentracija pa se v telesu ohrani od 6 do 8 ur (22), predvsem zaradi zmanjšane ledvičnega izločanja (19). Neželjeni učinki eksENATIDA, ki se pojavljajo pri približno 40 % bolnikov, so predvsem občutek slabosti in bruhanje (ta dva sčasoma oslabita), neke v enakem deležu pa bolniki razvijejo protitelesa proti zdravilu (22). Najhujši domnevni stranski učinek pa je akutni pankreatitis, a je vzročno-posledično povezavo težko pripisati zgolj eksENATIDU, saj je ta bolezen pri sladkornih bolnikih *per se* trikrat pogostejša (21).

Leta 2009 je sledil LIRAGLUTID, ki je za razliko od eksENATIDA analog GLP-1 (22). Od slednjega se razlikuje po (a) palmitoil acilni verigi, ki je preko γ -glutaminske kisline vezana na lizin 20, (b) po argininu, ki na mestu 28 zamenjuje lizin in (c) po dodanem glicinu na C terminalnem koncu (pregled-

Preglednica 2. Strukture agonistov receptorja GLP-1, ki so na tržišču ali v končnih fazah kliničnih študij. Za primerjavo je prikazano aminokislinsko zaporedje nativnega GLP-1 (22).

Table 2. Structures of the GLP-1 receptor agonists that are in the market or in very late clinical development. For comparison the amino acid sequence of native GLP-1 is also shown (22).

Peptid	Struktura	EC ₅₀ (nM)
GLP-1	HAEGTPTSDVSSYLEGQAAKEPIAWLVKGR	1,0
Liraglutid	HAEGTPTSDVSSYLEGQAAKEPIAWLVGRG E-C16 maščobnakislina	*
Albiglutid	(HGEPTSDVSSYLEGQAAKEPIAWLVKGR) ₂ – genetska fuzija na človeški albumin	*
Taspoglutid	HXEGTPTSDVSSYLEGQAAKEPIAWLVKXR (X = 2-aminoizobutirinska kislina)	*
EksENDIN-4 (EksENATID™)	HGEPTSDLSKQMEEEAVRLPIEWLKNGGPSSGAPPPS	0,5
LiksISENATID	HGEPTSDLSKQMEEEAVRLPIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK	*

*Podatki niso dostopni.



nica 2). Acilna veriga omogoča nekovalentno vezavo na človeški albumin, kar podaljša razpolovni čas na 11-15 ur (22). Stranski učinki so podobni tistim pri eksenatidu, z izjemo nižje koncentracije protiteles v krvi (22).

Preostali trije peptidi iz preglednice 3 so v poznih fazah kliničnih testiranj, zato zanesljivih podatkov še ni. Strukturno liksisenatid izhaja iz eksendina-4, kateremu je prolin 38 odstranjen, molekula pa je podaljšana s šestimi lizini na C-koncu (22). Albiglutid in taspoglutid sta derivata GLP-1; prvi je rezultat genetske fuzije spremenjenega GLP-1 (alanin na drugem mestu zamenjan z glicinom) dimera in človeškega albumina, drugi pa ima glede na GLP-1 drugo (alanin) in devetindvajseto (glicin) aminokislino zamenjano z 2-aminoizobutirino kislino. Sicer slednja sprememba podaljša razpolovni čas le na približno 5 minut, vendar če zdravilo subkutano injiciramo kot formulacijo s cinkovim kloridom, le-to precipitira in se počasi sprošča z mesta vnosa (22).

Omejitve in slabosti agonistov receptorja GLP-1

Glavne omejitve in slabosti agonistov receptorja GLP-1 so (19):

- Mesto vnosa: Potreba po subkutanem oz. intravenskem vnosu omejuje njihovo uporabo. Najprimernejša bi bila peroralna uporaba.
- Kemijska stabilnost: GLP-1 je v raztopini stabilen le kratek čas. Neoptimalni pogoji (pH, temperatura) pospešujejo racemizacijo, hidrolizo peptidnih vezi, deamidacijo in oksidacijo aminokislin. Eksenatid in liraglutid naj bi bila zadovoljivo stabilna.
- Imunogenost: Pri eksenatidu in liraglutidu se razvijejo protitelesa proti zdravilu. Čeprav se še noben od ostalih novih testiranih peptidov ni izkazal za imunogenega, jih moramo potencialno smatrati kot take.
- Neželene učinki: Občutek slabosti in bruhanje sta pričakovana in logična neželena učinka, saj agonisti receptorja GLP-1 upočasnijo praznjenje želodca, pojavita se lahko povišan srčni utrip in krvni tlak, povečano pa je tudi tveganje za razvoj akutnega pankreatitisa.

3 NAJNOVEJŠA SPOZNANJA: KOMPETITIVNA INHIBICIJA MONO-ADP-RIBOZILTRANSFERAZE

V naših preteklih raziskavah smo preučevali prenos signala preko receptorja GLP-1. Ugotovili smo, da (a) je tretja znotrajcelična zanka receptorja GLP-1 odgovorna za prenos

signala, drugi dve pa sta odgovorni za specifično sklopitev s posameznimi vrstami G-proteinov (23) ter (b) pokazali, da pride do mono-ADP-ribozilacije peptida IC₃, katerega zaporedje ustreza aminokislinskemu zaporedju tretje znotrajcelične zanke v *in vitro* pogojih (24). Slednja ugotovitev nakazuje na verjeten obstoj novega načina regulacije aktivnosti receptorja, neodvisno od tega pa tudi na zmožnost uporabe IC₃ za učinkovitejše zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 in debelosti. V nadaljevanju sledi teoretična razprava, kako to učinkovitost doseči.

Receptor za GLP-1 je podrobno pregledno opisan drugje (17, 25), omenili bomo le bistvene značilnosti, ki so potrebne za razumevanje. Receptor GLP-1 je sklopljen z G_s-proteini in je izražen v mnogih tkivih (22). Aktivacija z agonistom povzroči konformacijske spremembe receptorja, le-te aktivirajo G_s-proteine, ti pa aktivirajo adenilat ciklazo (26). Posledica je lokalno povečana koncentracija cAMP, ta dalje aktivira protein kinazo A ter Epac 1 in 2, leti pa spet prenesejo signal do različnih efektorjev, ki vodijo do sproščanja inzulina (26). Vendar prenos informacije ni odvisen samo od prisotnosti agonista, obstaja še več drugih vmesnih regulacijskih točk, kot sta fosforilacija receptorja (27) in mono-ADP-ribozilacija β-podenote G-proteinov (28, 29). Dosedanji pristopi k zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2 in debelosti temeljijo predvsem na povečanju količine agonista, zelo malo pa je raziskav glede učinkov agonistov pri visokih koncentracijah in/ali daljšem časovnem obdobju. Peptid IC₃ kot kompetitivni inhibitor mono-ADP-riboziltransferaze (25) bi tako bil uporaben v kombinaciji z agonisti receptorja GLP-1, saj bi preprečil mono-ADP-ribozilacijo β-podenote G-proteinov. β-podenota bi bila tako prosta in bi lahko aktivirala adenilat ciklazo II, kar bi v končni fazi privedlo do sproščanja inzulina (28). Posledično bi bila potrebna nižja količina agonista receptorja GLP-1, kar je vsekakor zelo zaželeno zaradi zgoraj naštetih neželenih učinkov. Dodatno, če je mono-ADP-ribozilacija tudi dejansko mehanizem regulacije aktivnosti receptorja GLP-1 *in vivo*, bo ta učinek še močnejši. S peptidom IC₃ bi tako preprečili mono-ADP-ribozilacijo ne samo β-podenote, ampak tudi tretje znotrajcelične zanke receptorja GLP-1, ki je odgovorna za posredovanje informacije do G-proteinov. Pri tem bi določena količina peptida IC₃ zadostovala za daljši čas, saj je mono-ADP-ribozilacija reverzibilen proces in bi se peptid IC₃ obnavljal. V citoplazmi je namreč poleg encima mono-ADP-riboziltransferaze prisoten tudi encim mono-ADP-ribozilhidrolaza, ki odceplja mono-ADP-ribozo (30), kot na primer pri β-podenoti G-proteinov (28, 29). In kot zadnje, IC₃ deluje tudi kot aktivator G_s-proteinov, torej na enak način kot aktiviran receptor (23), s čimer zaobi-

demo tudi deaktivacijo receptorja s fosforilacijo (27). V ta namen bi teoretično lahko uporabili tudi peptida z aminokislinskim zaporedjem prve (IC₁) in druge (IC₂) znotrajcelične zanke receptorja GLP-1, a glede na to, da sta šibkejša aktivatorja G_s-proteinov kot IC₃ (23), to najbrž ne bi bilo smiselno.

Glede načina vnosa in ciljanja je brez eksperimentalnih podatkov težko razpravljati. IC₃ bi bilo smiselno vnesti subkutano ali intravensko skupaj z agonistom receptorja GLP-1 v sistemski krvni obtok, nato pa poiskati način, da IC₃ preide le v celice, ki izražajo receptor GLP-1. Druga možnost bi bila uporaba genskega zdravila. Najprimernejša bi bila uporaba kationskih liposomov, ki omogočajo prenos linearne DNA ali RNA, vnesemo jih lahko *in vivo* (intravensko ali direktno v tkivo) in so sposobni preiti plazmalemo tarčne celice (31).

4 LITERATURA

1. Ayoub M and Scheidegger D. Peptide drugs, overcoming the challenges, a growing business. *Chemistry today* 2006; 24(4): 46–48.
2. Glaser V. Competition mounting in peptide market. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 2009; 29(13) (<http://www.genengnews.com/gen-articles/competition-mounting-in-peptide-market/2971>)
3. Frokjaer S and Otzen DE. Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 298–306.
4. Peptide Synthesis in Pharmaceutical Manufacturing. *PharmPro* 2009, June 22 (<http://www.pharmpro.com/Articles/2009/06/Peptide-Synthesis-In-Pharmaceutical-Manufacturing/>)
5. Nolte MS, Karam JH. Pancreatic hormones and antidiabetic drugs. In: Katzung BG. *Basic and clinical pharmacology*, 9th ed. The McGraw-Hill Companies 2004: 683–703
6. Pettit DK and Gombotz WR. The development of site-specific drug-delivery systems for protein and peptide biopharmaceuticals. *Trends Biotechnol* 1998; 16: 343–349
7. Okada H, Doken Y, Ogawa Y, Toguchi H. Preparation of three-month depot injectable microspheres of leuprorelin acetate using biodegradable polymers. *Pharm Res* 1994; 11: 1143–1147
8. Morishita M, Peppas NA. Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? *Drug Discovery Today* 2006; 11: 905–910
9. Calceti, P, Salmaso S, Walker G, Bernkop-Schnürch A. Development and *in vivo* evaluation of an oral insulin-PEG delivery system. *Eur J Pharm Sci*. 2004; 22: 315–323
10. Hashimoto, M, Takada K, Kiso Y, Muranishi S. Synthesis of palmitoyl derivatives of insulin and their biological activities. *Pharm. Res.* 1989; 6: 171–176
11. Kipnes M, Dandona P, Tripathy D, Still JG, Kosutic G. Control of postprandial plasma glucose by an oral insulin product (HIM2) in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 421–426
12. Goldberg M and Gomez-Orellana I. Challenges for the oral delivery of macromolecules. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 289–295
13. Russell-Jones GJ. Use of targeting agents to increase uptake and localization of drugs to the intestinal epithelium. *J Drug Target* 2004; 12: 113–123
14. Zorko, M. and Langel, U. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 529–545
15. Barber TM, Begbie H, Levy J. The incretin pathway as a new therapeutic target for obesity. *Maturitas* 2010; 67: 197–202
16. McIntyre N, Holdsworth CD, Turner DS. New interpretation of oral glucose tolerance. *Lancet* 1964; 2: 20–1
17. Baggio LL and Drucker DJ. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007; 132: 2131–2157
18. Igel LI, Powell AG, Apovian CM, Aronne LJ. Advances in medical Therapy for Weight Loss and the weight-centric management of type 2 diabetes mellitus. *Curr Atheroscler Rep* 2012; 14: 60–69
19. Arulmozhi DK, Portha B. GLP-1 based therapy for type 2 diabetes. *Eur J Pharm Sci* 2006; 28: 96–108
20. Holst JJ. Implementation of GLP-1 based therapy of type2 diabetes mellitus using DPP-IV inhibitors. *Adv Exp Med Biol* 2003; 524: 263–279
21. Nauck MA. Incretin-based Therapies for Type 2 Diabetes Mellitus: Properties, Functions, and Clinical Implications. *Am J Med* 2011; 124: S3–S18
22. Ahrén B. GLP-1 for type 2 diabetes. *Exp Cell Res* 2011; 317: 1239–1245
23. Bavec A, Hällbrink M, Langel Ü, Zorko M. Different role of intracellular loops of glucagon-like peptide-1 receptor in G-protein coupling. *Reg Peptides* 2003; 111: 137–144
24. Deželak M, Bavec A. Third intracellular loop of glucagon like-peptide-1 receptor is coupled with endogenous mono-ADP-ribosyltransferase – Novel type of receptor regulation? *Eur J Pharmacol* 2011; 666: 35–42
25. Lund A, Knop FK, Vilsbøll T. Emerging GLP-1 receptor agonists. *Expert Opin Emerg Drugs* 2011; 16: 607–18
26. Doyle ME, Egan JM. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas *Pharmacol Ther* 2007; 113: 549–593
27. Widmann C, Dolci W, Thorens B. Heterologous desensitization of the glucagon-like peptide-1 receptor by phorbol esters requires phosphorylation of the cytoplasmic tail at four different sites. *J Biol Chem* 1996; 271: 19957–19963
28. Lupi R, Corda D, Di Girolamo M. Endogenous ADP-ribosylation of the G protein beta subunit prevents the inhibition of type 1 adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 2000; 275: 9418–9424
29. Lupi R, Dani N, Dietrich A, Marchegiani A, Turacchio S, Berrie CP, Moss J, Gierschik P, Corda D, Di Girolamo M. Endogenous mono-ADP-ribosylation of the free Gβγ prevents stimulation of phosphoinositide 3-kinase-γ and phospholipase C-β2 and is activated by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 2002; 367: 825–832
30. Okazaki IJ, Zolkiewska A, Takada T, Moss J. Characterization of mammalian ADP-ribosylation cycles. *Biochimie* 1995; 77: 319–25
31. Mlinarič-Raščan I. Genska zdravila. *Farm Vestn* 2005; 56: 71–74

