

УДК 57.084.1: 615.357

Специфическая активность рекомбинантного модифицированного глюкагоноподобного пептида-1 человека (рмГПП-1)

© 2018 Е.П. САННИКОВА¹, Н.В. БУЛУШОВА¹, С.Э. ЧЕПЕРЕГИН¹, И.А. ЗАЛУНИН¹, Ф.А. КЛЕБАНОВ¹, Т.С. ГРАЧЕВА¹, В.Л. ЮРИН¹, Н.В. РЫКАЛИНА¹, Е.В. АСКЕРОВА¹, С.В. ЯРОЦКИЙ¹, О.Г. ТАТАРНИКОВА², Н.В. БОБКОВА², Д.Г. КОЗЛОВ^{1*}

¹ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»–ГосНИИГенетика), 117545 Москва

²ФГБУН Институт биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН), 142290 Пущино

*e-mail: dg_kozlov@genetika.ru

Поступила 10.05.2018 г.

Принята в печать 04.06.2018 г.

Для лечения сахарного диабета типа II разработан оригинальный препарат Глипин, активным фармацевтическим ингредиентом которого является полностью биосинтетический рекомбинантный модифицированный глюкагоноподобный пептид-1 человека (рмГПП-1), получаемый в процессе биосинтеза в клетках *E. coli*. Помимо целевого пептида ГПП-1, содержащего известную замену Ala8Gly, белок рмГПП-1 включает вспомогательную аминокислотную последовательность, составной частью которой является гепарин-связывающий пептид белка HB-EGF человека. Проведено доклиническое исследование специфической активности глипина. Для сравнения использовали аптечный препарат Ликсумия. Показано, что Глипин и Ликсумия обладают сходной эффективностью и длительностью действия при подкожном или внутримышечном введении, а также сравнимой терапевтической эффективностью при длительном применении. На основании полученных данных основным способом применения препарата Глипин выбрана подкожная инъекция. Установлена минимальная эффективная доза Глипина для доклинических исследований – 100 мкг/кг и для терапевтического использования человеком – 0,75 мг и 1,5 мг. При интраназальном введении установлено достоверное позитивное влияние Глипина на когнитивные способности животных с моделью болезни Альцгеймера. Сходство большинства изученных характеристик Глипина и Ликсумии позволяет прогнозировать наличие у этих препаратов одинаковой терапевтической эффективности при применении с частотой 1 раз в сутки.

Ключевые слова: агонист рецепторов ГПП-1, антигликемический препарат, глюкагоноподобный пептид-1, Ликсумия, сахарный диабет.

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-4-37-50

Список сокращений: АФИ – активный фармацевтический ингредиент; БЭ – бульбэктомированные животные; в/бр, п/к, в/м – способы введения препаратов внутривенно, подкожно, внутримышечно, соответственно; ГЛФ – готовая лекарственная форма; ГПП-1 – глюкагоноподобный пептид-1 человека; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ЛО – ложнопериорированные животные; ЛС – лекарственное средство; НВ пептид – гепарин-связывающий пептид; ОЛ – обонятельные луковицы; рмГПП-1 – рекомбинантный модифицированный глюкагоноподобный пептид-1 человека; СД2 – сахарный диабет типа II; ТТГ – тест на толерантность к глюкозе.

В настоящее время большое внимание уделяется изучению широко распространенного в клинической практике явления коморбидности заболеваний, различающихся синдромами, но связанных доказанным единым патогенетическим механизмом. Выявление таких групп заболеваний способствует существенному расширению спектра назначений соответствующих лекарственных средств (ЛС) и оказывается экономичным для разработчиков и потребителей ЛС.

Сегодня ожирение, в том числе детское¹, занимает лидирующие позиции по распространенности среди населения большинства развитых стран мира. Ему сопутствуют сахарный диабет 2-го типа (СД2) и сердечно-сосудистые заболевания [1]. В свою очередь СД2 признается одним из основных факторов риска развития болезни Альцгеймера [2–4]. Таким образом, сегодня с уверенностью можно говорить о том, что ожирение, СД2 и болезнь Альцгеймера формируют группу коморбидных заболеваний. Причем помимо тесной физиологической взаимосвязанности этим заболеваниям свойственна также очевидная возрастная общность. В связи с этим перспективной становится разработка ЛС, оказывающих профилактическое и терапевтическое действие в отношении всех заболеваний данной группы одновременно. Именно к таким ЛС относятся препараты на основе агонистов гормональных рецепторов семейства инкретинов, а именно, рецепторов глюкогаionoподобного пептида-1 (ГПП-1), глюкозо-зависимого инсулинотропного полипептида и глюкагона [3–8].

К настоящему времени на мировой фармрынок уже вышел ряд ЛС на основе аналогов ГПП-1 человека для лечения СД 2. В его число входят: эксенатид (exenatide), торговые марки «Баета» (Byetta), «Байдьюрон» (Bydureon) [9]; ликсисенатид (lixisenatide), торговая марка «Ликсумия» (Lixumia) [10, 11], лираглутид, торговая марка «Виктоза» (Victoza) [12], дулаглутид (dulaglutide), торговая марка «Трулисити» (Trulicity) [13] и альбиглутид (albiglutide), торговая марка «Танзеум» (Tanzeum) [14].

Перечисленные препараты действуют как агонисты рецепторов ГПП-1 и предназначены в первую очередь для терапии начальных стадий СД 2. Однако их применение сопровождается достоверным снижением жировой массы и веса тела [15], а эффективность не уступает пре-

паратам иной природы [16]. Более того, из числа перечисленных ЛС препарат Саксенда на основе лираглутида разработан именно для лечения ожирения и обеспечивает снижение веса на 5–10% за 56 недель применения (<http://www.saxenda.com>). Одновременно с действием в отношении СД 2 и ожирения препараты данного семейства (в том числе находящиеся в разработке) демонстрируют также достоверную эффективность на моделях болезни Альцгеймера, стимулируя восстановление когнитивных способностей животных [2–4].

В ГосНИИгенетика разработан оригинальный препарат Глипин на основе рекомбинантного модифицированного ГПП-1 (рмГПП-1) человека. Препарат предназначен, прежде всего, для осуществления многовекторного воздействия на систему гликемического контроля в организме человека. Его ключевыми особенностями являются полностью биосинтетическая природа, определяющая относительно низкую себестоимость, а также присутствие в его составе гепарин-связывающего пептида (НВ) из состава белка НВ-EGF человека [17].

Целью настоящей работы было выявление и анализ базовых показателей специфической активности Глипина в сравнении с известными препаратами, применяемыми на практике.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Получение субстанции рмГПП-1

Штамм-продуцент *Escherichia coli* ВКПМ В-12555 является производным реципиентного штамма *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, ВКПМ В-10189). Клетки штамма *E. coli* ВКПМ В-12555, содержат плазмиду рЕТ28-Glp20, являющуюся производной вектора рЕТ28b+ (Novagen), включающую структурный ген слитого белка – ПРЕ-рмГПП-1 – под контролем сильного промотора, узнаваемого РНК полимеразой фага Т7 *E. coli* [18]. Функцию ПРЕ-области в составе слитого белка выполняла последовательность модифицированного интеина Pch PRP8 *Penicillium chrysogenum*, содержащего мутации Cys1Ala, Cys11Tyr и Leu93Pro [19]. Целевой частью молекулы являлась последовательность рекомбинантного модифицированного глюкогаionoподобного пептида-1 человека рмГПП-1 (рис.1, [18]).

¹<http://www.who.int/end-childhood-obesity/facts/en/>

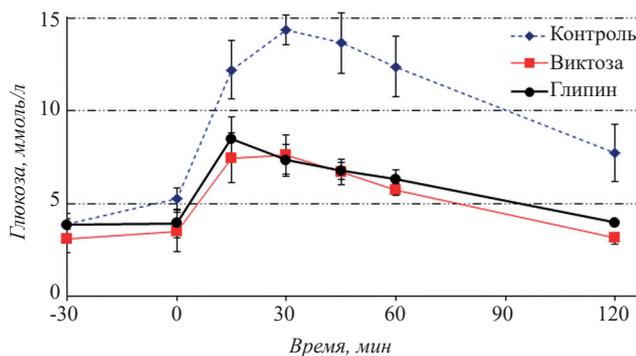


Рис. 2. ТТГ для определения специфической активности препаратов рмГПП-1 и виктозы при внутрибрюшинном введении в дозе 5 мкг. Представлены средние значения содержания глюкозы в крови животных и стандартные отклонения.

Fig. 2. Test for glucose tolerance to determine specific activity of rmGLP-1 and Victose preparations at intraperitoneal administration in a dose of 5 µg. Mean glucose contents in animal blood and standard deviations are represented

ТТГ на диабетических животных (см. далее) проводили аналогичным образом.

Все эксперименты повторяли 2–3 раза. Для статистической обработки использовали данные, полученные от 8–12 животных.

Получение диабетических животных

Диабетических животных получали по [22] с модификациями. Использовали половозрелых мышей самцов Balb/c массой 24–26 г, содержащихся в индивидуальных клетках на стандартном рационе со свободным доступом к воде и корму. Аллоксан (U2244113, «Диаэм», Россия) вводили натошак после 18 ч голода, однократно, в/бр в дозе 15 мг на 100 г веса животных. На 3, 10 и 17-е сутки после применения аллоксана, у мышей измеряли содержание глюкозы в крови. Диабетическими считали животных, оказавшихся чувствительными к действию аллоксана, показавших на 17-е сутки содержание глюкозы в крови на уровне 30 ± 3 ммоль.

Тест длительного применения препаратов

Тест длительного применения препаратов выполняли следующим образом. В группы отбирали по шесть диабетических животных. Препараты Глипин в дозе 5 мкг и Ликсумия в дозе 0,5 мкг вводили животным п/к дважды в сутки, утром и вечером, в течение 30 календарных дней, за исключением выходных. Контрольной группе жи-

вотных вводили воду. С установленной заранее периодичностью определяли текущие показатели веса животных и уровень глюкозы в крови.

Индукция инсулина у крыс

Эксперименты выполняли на здоровых самках крыс линии Wistar [23, 24]. Препараты Глипин, виктозу, Ликсумия и раствор глюкозы готовили на буфере PBS (pH 7,4) из расчета 25 нМ белка и 7,0 г на 1 кг веса животных, соответственно. Перед началом опыта определяли вес животных. Крыс рассаживали в клетки по группам, по три особи в группе, и содержали без корма (с постоянным доступом к воде) в течение 12–14 ч. Тестируемые препараты вводили животным в/бр в объеме 1 мл. Раствор глюкозы вводили в/бр в объеме 1 мл через 30 мин после введения тестируемых препаратов. Индивидуальные образцы крови брали у животных из хвостовой вены непосредственно перед введением препаратов и глюкозы, в моменты времени «-30» и «0», соответственно, а также через 5, 10, 15, 30 и 45 мин после введения раствора глюкозы. Концентрацию инсулина определяли в сыворотках крови крыс с помощью оригинальной ИФА тест-системы «Ins1-Ins2(PO)» на основе моноклональных антител (В.Л. Юрин с соавт., неопубл. результаты).

Тестирование пространственной памяти животных в водном лабиринте Морриса

Обучение и тестирование памяти животных проводили в водном лабиринте Морриса [25] (при обучении спасательная площадка находилась в 3-м секторе).

Эксперимент проводили, как описано в работе [26], с использованием бульбэктомированных (БЭ) мышей линии NMRI, разбитых случайным образом на две группы по шесть особей в каждой. Двухстороннее удаление обонятельных луковиц (ОЛ) проводили под нембуталовым наркозом (40 мг/кг, в/б) и локальным обезболиванием при скальпировании с использованием 0,5% новокаина. Отсос ОЛ осуществлялся через трепанационное отверстие в черепе с помощью пластмассового наконечника с ограничителем, соединенного с водяным насосом, по стереотаксическим координатам AP – 3, L – 0; Н – 2.5. Одну группу БЭ животных оставляли без лечения (отрицательный контроль, К), БЭ животным другой группы через две недели после операции интраназально вводили Глипин. Положительным контролем служили ложноперирированные (ЛО) животные того же возраста (шесть особей).

Эксперимент проводили в два этапа. На первом этапе Глипин вводили ежедневно, интраназально, раз в день в дозе 2 мкг в объеме 4 мкл в течение трех недель (две недели до обучения и одна неделя во время обучения). На 3-й неделе применения в течение пяти дней проводили обучение животных в присутствии спасательной платформы, размещенной в 3-м секторе лабиринта под водой, забеленной сухим молоком. Предварительное тестирование животных в лабиринте с видимой платформой не выявило у них нарушений зрения или способности к плаванию, что могло бы отрицательно повлиять на способность к обучению в данном тесте. По завершении обучения проводили однократное тестирование памяти в течение 1 мин в условиях отсутствия спасательной платформы.

Второй этап эксперимента начинали без перерыва с использованием тех же групп животных. При этом животным, ранее получавшим Глипин в дозе 2 мкг, в течение дополнительной недели вводили Глипин раз в день в увеличенной дозе – 20 мкг. По окончании введений проводили напоминание в 3-х сессиях, после чего проводили тестирование памяти. По окончании поведенческих экспериментов животных декапитировали под глубоким наркозом и проводили морфологический контроль их мозга для определения полноты удаления ОЛ.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программных возможностей Microsoft Office Excel и ANOVA (Statistica 06). Результаты представляли в виде среднего \pm SEM. Значение достоверности указывалось как $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Структура рмГПП-1 и способ получения Глипина

рмГПП-1 содержит 72 аминокислотных остатка (рис. 1) и представляет собой бифункциональный белок, включающий активную и вспомогательную части.

Активная N-концевая часть рмГПП-1 идентична пептиду ГПП-1(7-37) человека, в состав которого с целью повышения протеолитической стабильности введена хорошо известная замена Ala8Gly, инактивирующая сайт узнавания дипептидилпептидазы-4, но оказывающая минимальное влияние на специфическую активность ГПП-1 [27, 28];

Вспомогательная часть представляет собой сложный полипептид, в составе которого последовательно слиты:

- аминокислотная последовательность S(G₄S)₄, выполняющая линкерную функцию;
- гепарин-связывающий (НВ) пептид KRK-KKGKGLGKKR из состава природного белка НВ-EGF человека [17], имеющий ярко выраженные катионные свойства;
- аминокислотная последовательность GS(G₄S) на С-конце молекулы с целью защиты белка от карбоксипептидаз крови.

Предполагалось, что НВ-пептид в составе рмГПП-1 сможет обеспечить депонирование рмГПП-1 на поверхности клеток и внеклеточного матрикса, опосредованное взаимодействием белка с отрицательно-заряженными мишенями, что позволит улучшить его фармакокинетику, как это наблюдалось в отношении НВ-содержащих белков и гормонов крови (для обзора см. [29, 30]). Будучи дополнительным неспецифическим сайтом связывания, НВ-пептид мог бы усилить взаимодействие рмГПП-1 с клетками-мишенями и увеличить его удельную активность.

Существовала вероятность повышения проникающей способности Глипина, в том числе способности пересекать ГЭБ [31–33], за счет функциональной активности катионных СРР типа ТаТ и др. Это опосредует: а) улучшение доставки Глипина к мишеням, расположенным в разных частях и тканях организма; б) возможность разработки ЛС с более удобными способами применения; в) усиление нейропротекторного действия Глипина, актуального для лечения болезней Альцгеймера, Паркинсона и др., основанного на способности пептида-1 пересекать ГЭБ.

Способ получения рмГПП-1 был основан на биосинтезе целевого белка в составе слитого белка-предшественника ПРЕ-рмГПП-1, содержащего в качестве ПРЕ-области оригинальный температурно-чувствительный мутантный вариант интеина Int4bPro [19]. Уникальные свойства Int4bPro обусловлены наличием мутации Leu93Pro, детерминирующей способность к формированию тельца включения и делающей его С-концевой автокаталитический процессинг температурно-зависимым. Благодаря этим свойствам Int4bPro при температуре +37 °С в клетках *E. coli* белок ПРЕ-рмГПП-1 эффективно формировал тельца включения и накапливался до уровня свыше 40% от суммарного белка клеток. Расщепление слитого белка и получение зрелого рмГПП-1 осуществляли путем автокаталитического процессинга

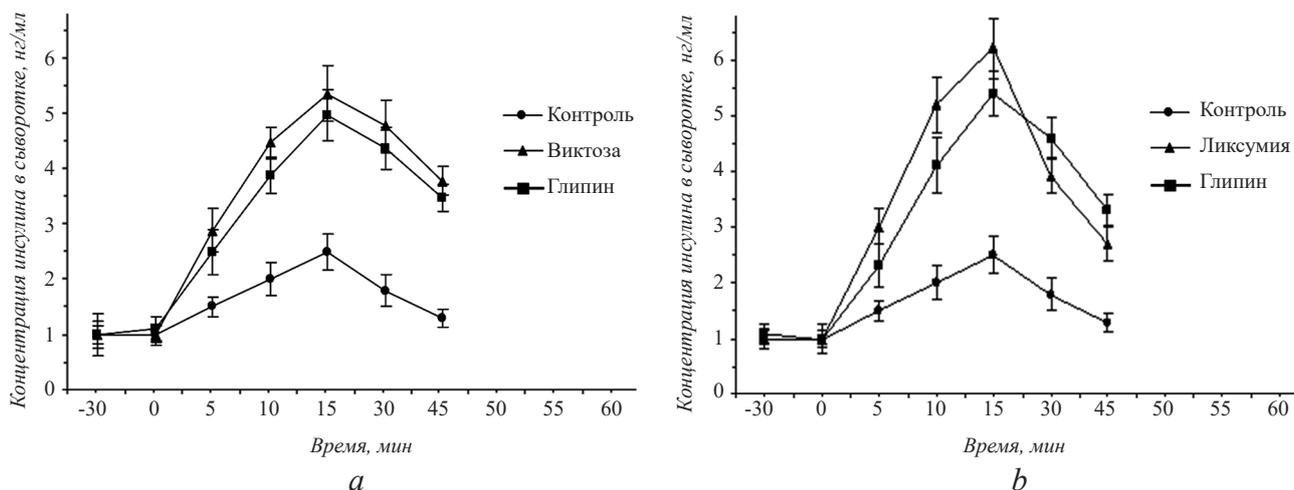


Рис. 3. Индукция инсулина у крыс под действием препаратов Глипина и Виктозы (a) или Глипина и Ликсумии (b)

Fig. 3. Induction of insulin in rats under the influence of Glypin and Victose preparations (a) or Glypin and Lixumia (b)

предшественника в денатурации–ренатурации при пониженной температуре. При этом гидролизу подвергалась пептидная связь на стыке ПРЕ-области и рмГПП-1, предшествующая первому N-концевому остатку ГПП-1, что позволило высвободить нативный N-конец рмГПП-1 [19].

Ранее для реализации сходной технологии получения производных ГПП-1 использовался мини-интеин Ssp DnaB [34–36].

Стимулирование секреции инсулина *in vivo* под действием Глипина

Как известно, антигликемическая активность ГПП-1, выявляемая в ТТГ, опосредуется усилением глюкозо-зависимого выброса в кровь инсулина [37], который может быть зарегистрирован с использованием ИФА

Изучение эффекта секреции инсулина под действием Глипина проводили *in vivo* в дизайне сравнительного исследования. Препаратами сравнения служили Виктоза и Ликсумия.

Результаты определения инсулина в крови крыс, представленные на рис. 3, показали, что все три протестированных препарата обладали сходным инсулинотропным действием. На фоне характерного для контроля постепенного увеличения концентрации инсулина от начальных (~1 нг/мл) до максимальных (2–2,5 нг/мл) значений действие препаратов к 15-й минуте теста вызывало резкий, почти 5-кратный рост уровня инсулина (до 5–6 нг/мл). При этом, если кривые инсулинотропного действия Глипина и Виктозы практически совпадали, то кривые Глипина и Ликсумии обнаруживали некоторые различия. Так, в начале теста (на 5–15-й минуте после вве-

дения глюкозы) Ликсумия опосредовала более высокие уровни инсулина по сравнению с Глипином, однако на 30–45-й минуте после введения глюкозы уже инсулинотропное действие Глипина можно с определенной осторожностью расценивать как «более активное и продолжительное».

Таким образом, проведенный тест с очевидностью подтвердил наличие у Глипина инсулинотропной активности, профиль проявления которой оказался сходен с профилями действия препаратов сравнения Виктоза и Ликсумия.

Эффективность и длительность действия Глипина у здоровых животных при однократном применении. Выбор эффективной дозы и оптимального пути введения

Для исследования сравнительной активности Глипина и Виктозы использовали ТТГ. Препараты вводили здоровым мышам *в/бр* в дозе 0,05, 0,5 и 5 мкг. Результаты ТТГ представлены на рис. 2 и рис. 4.

Во всех случаях при выполнении ТТГ максимум содержания глюкозы в крови животных обнаруживался вблизи точки 30 мин, в связи с чем уровень глюкозы в этой точке, безусловно, следует считать важнейшим показателем эффективности действия препаратов, в то время, как уровень глюкозы в другой точке (60 мин) играл вспомогательную роль (рис. 2).

В то же время ТТГ позволил не только выявить специфическую активность Глипина, но и показал, что в низких дозах 0,05 и 0,5 мкг эффективность препарата достоверно ($p < 0,05$) превышала эффективность Виктозы, тогда как в дозе 5 мкг показатели эффективности обоих препаратов были равны (рис. 4). Все это указывает

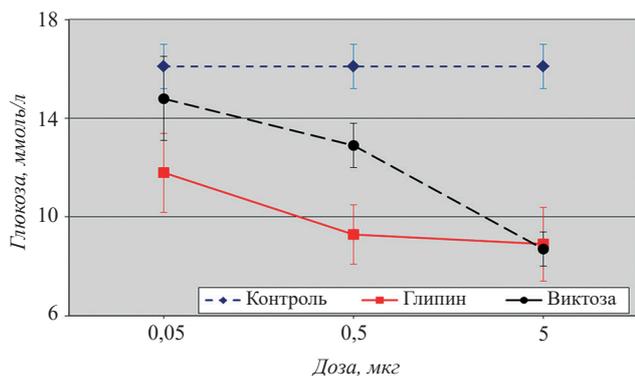


Рис. 4. Зависимость содержания глюкозы в крови животных от дозы препаратов Глипин и Виктоза при внутривентральном применении. Приведены средние значения содержания глюкозы в крови животных через 30 мин после начала ТТГ и доверительные интервалы.

Fig. 4. Dependency of glucose content in animal blood on dose of Glypin and Victose preparations at intraperitoneal administration. Mean values of glucose blood concentration 30 min after beginning of test for glucose tolerance and confidence intervals are given

на более высокую удельную активность Глипина, максимум эффективности рмГПП-1 достигался в дозе 0,5 мкг, и дальнейшее увеличение дозы не приводит к усилению эффекта.

ТТГ был использован для сравнительной оценки эффективности и продолжительности действия препарата Глипина и препарата сравнения Ликсумия при трех способах применения, включая практически значимые п/к и в/м пути введения. На рис. 5 представлены результаты обработки полученных данных. Доза Ликсумии 0,5 мкг

была выбрана на основании предварительных экспериментов, как наименьшая из доз, обладавших максимальной эффективностью и длительностью действия (данные не приведены).

Результаты ТТГ показали, что при каждом способе применения показатели эффективности и длительности действия Глипина практически не зависели от примененной дозы. В частности, одинаково эффективными оказались следующие дозы: при в/бр применении – 0,5 и 5 мкг, при п/к – 1 и 5 мкг, при в/м – 2 и 5 мкг. При п/к и в/м

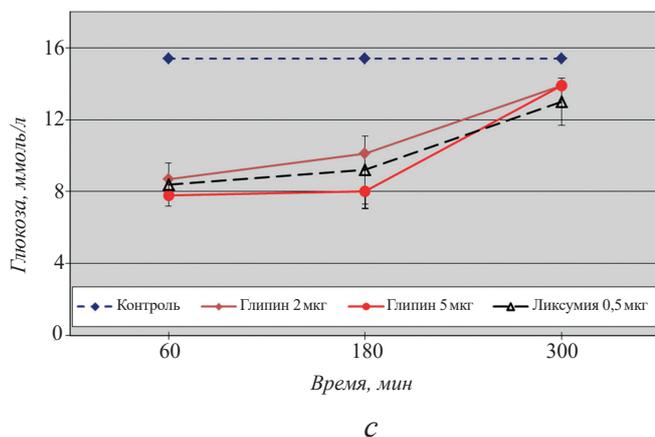
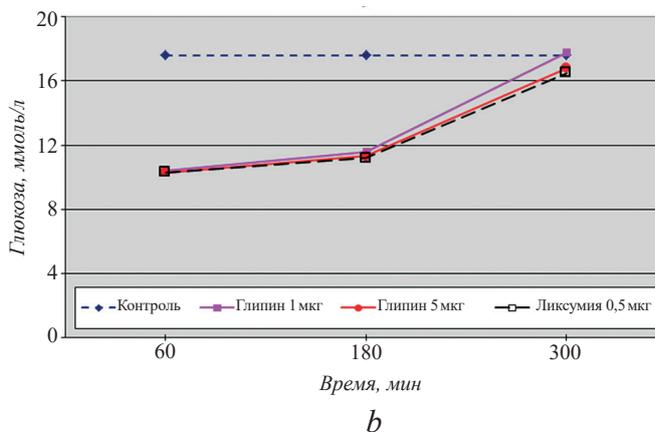
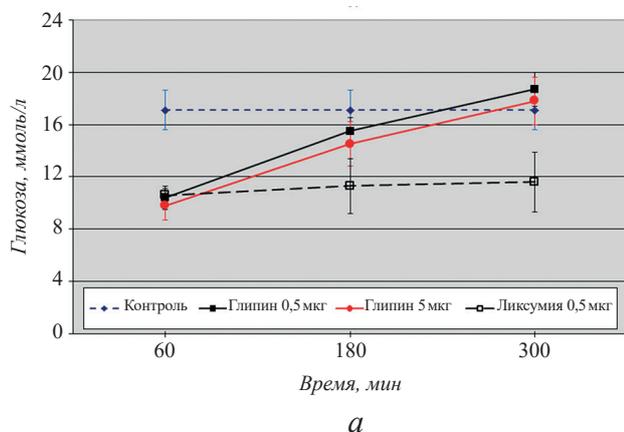


Рис. 5. Зависимость эффективности действия препаратов Глипина и Ликсумии от дозы при трех способах введения препаратов – внутривентральном (а), подкожном (b) или внутримышечном (c). ТТГ начинали через 60, 180 и 300 мин после введения препаратов. Содержание глюкозы в крови животных измеряли через 30 мин после начала ТТГ. Приведены средние значения содержания глюкозы в крови животных и доверительные интервалы

Fig. 5. Efficiency of the effect of Glypin and Lixumia preparations as dependant on dosage at three ways of administration, intraperitoneal (a), subcutaneous (b) and intramuscular (c). GTT was started 60, 180 and 300 min after the introduction of preparations. Glucose content was measured 30 min after GTT started. Mean values of glucose content in animal blood and confidence intervals are represented

способах применения наблюдалось практически полное совпадение фармакодинамики Глипина и Ликсумии: оба препарата сохраняли высокую эффективность действия на протяжении первых 3 ч и утрачивали ее в течение следующих 2 ч эксперимента. В то же время в/бр применение выявило принципиальную разницу между препаратами: Ликсумия сохраняла практически полную эффективность на протяжении 5 ч эксперимента, в то время как эффективность Глипина снижалась до остаточных величин уже через 3 ч после введения. Установление причин этого различия требует проведения дополнительных исследований.

На основании полученных данных была установлена минимальная доза Глипина, равная 2 мкг (100 мкг/кг), обеспечившая при п/к- и при в/м-применении показатели эффективности Глипина на уровне показателей Ликсумии. Эта доза была выбрана в качестве однократной терапевтической дозы для проведения доклинических исследований. Также на основании полученных данных в качестве основного способа применения Глипина было выбрано п/к-введение, а в качестве дополнительного – в/м-введение.

Следует отметить, что отличительной особенностью ликсисенатида является увеличенное сродство с рецепторам, в 4 раза превосходящее

показатель нативного ГПП-1 человека [38]. В этой связи с учетом молекулярных весов рмГПП-1 и ликсисенатида близость их доз, показавших равную эффективность и длительность действия при п/к-введении, может рассматриваться как указание на возможную близость их удельных характеристик, в том числе показателей сродства с молекулярными мишенями.

Эффективность и длительность действия Глипина у диабетических животных при однократном применении

Основным назначением препаратов-аналогов ГПП-1, включая Глипин, является терапия при СД 2. В этой связи представлялось необходимым охарактеризовать эффективность применения Глипина на соответствующей модели.

Такой моделью послужили диабетические животные, полученные с использованием аллоксана (см. Методики). На 17-е сутки после введения аллоксана стационарный уровень глюкозы в крови модельных животных, при неограниченном доступе к корму, составлял $30,0 \pm 3,3$ ммоль. Эти же значения фиксировались у контрольных животных через 30 мин после введения глюкозы натощак (рис. 6). ТТГ использовался для оценки эффективности Глипина на диабетической модели.

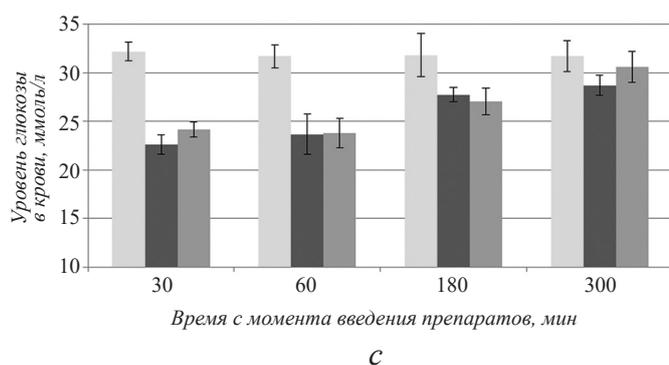
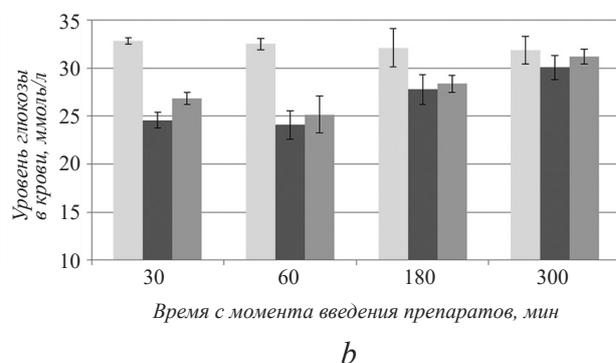
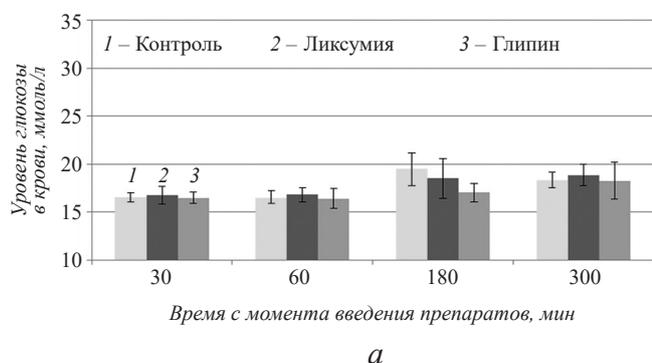


Рис. 6. Зависимость уровня глюкозы в крови животных в ТТГ от времени с момента введения препаратов. ТТГ начинали через 30, 60, 180 и 300 мин после подкожного введения препаратов. Измерения уровня глюкозы в крови животных проводили непосредственно перед введением глюкозы – «0 минут» (а), через полчаса после введения – «30 минут» (б) и через час – «60 минут» (с)

Fig. 6. Dependency of glucose level in animal blood on time from preparation administration in GTT. GTT was started 60, 180 and 300 min after the subcutaneous introduction of preparations. Glucose level in animal blood was determined at the moment of introduction (0 min (a)), 30 min after (b) and 60 min after (c) glucose introduction

Препаратом сравнения служила Ликсумия. Препараты вводили животным п/к однократно за 30, 60, 180 и 300 мин до начала ТТГ. Глипин вводили в дозе 5 мкг, Ликсумию – в дозе 0,5 мкг. Результаты определения уровня глюкозы в крови диабетических животных представлены на рис. 6.

Полученные данные однозначно показали, что оба препарата опосредовали достоверное снижение уровня глюкозы в крови диабетических животных, т.е. проявляли специфическую активность. Это свидетельствовало о высоком качестве полученных модельных животных. Поскольку токсическое действие аллоксана было направлено против инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы, их полная гибель в ответ на неправильно подобранную дозу токсичного агента означала бы получение модели диабета 1-го типа, не восприимчивой к действию ГПП-препаратов. Очевидно, этого удалось избежать.

Оба препарата в течение часа после введения модельным животным обеспечивали примерно полуторакратное снижение уровня глюкозы (рис. 6). Пониженный уровень определялся через 30 и 60 мин после начала ТТГ. Однако по мере увеличения интервала времени с момента введения препаратов, эффективность их действия ослабевала и через 5 ч после введения практически не выявлялась. Аналогичная фармакодинамика ранее была зафиксирована на здоровых животных.

Эффективность длительного применения Глипина на диабетических животных

Как известно, ГПП-1 способен индуцировать размножение инсулин-продуцирующих β -клеток поджелудочной железы и восстановление их функций [38], что ведет к нормализации продукции инсулина, снижению стационарного уровня глюкозы в крови, улучшению индекса гликирования гемоглобина и др. эффектам. Однако все эти эффекты опосредуются длительным применением ЛС.

Для того чтобы оценить эффективность длительного применения Глипина, был разработан оригинальный тест. Препаратом сравнения в этом тесте служила Ликсумия. Экспериментальное моделирование ситуации длительного лечения проводилось на тех же диабетических животных, на которых ранее выполнялись ТТГ. С учетом относительно короткого времени действия обоих препаратов при выбранном п/к-способе применения (рис. 6) протокол лечения предусматривал инъекции Глипина и Ликсумии дважды в день в дозах 5 мкг и 0,5 мкг, соответственно, на протяжении 30 сут (исключая выходные дни). Контрольная ко-

рта мышей получала физраствор. С периодичностью не реже одного раза в неделю у животных измеряли текущий уровень глюкозы в крови и вес. С целью изучения устойчивости и обратимости достигнутых эффектов после отмены курса введенных препаратов наблюдения за животными были продолжены на протяжении последующих трех недель. На всем протяжении эксперимента контрольные животные сохраняли высокий уровень глюкозы в крови (рис. 7a), с которым коррелировала отчетливая тенденция к снижению веса (рис. 7b), т.е. на всем протяжении эксперимента контрольные животные сохраняли диабетический статус.

В то же время в группах, получавших Ликсумию (группа «л» из шести особей) или Глипина (группа «р» из пяти особей), наблюдалось появление особей, чувствительных к проводимой терапии. В частности, у двух мышей (1р и 2р) из пяти, получавших Глипина, и у трех (2л, 5л и 6л) из шести, получавших Ликсумию, наблюдалось неуклонное снижение уровня глюкозы в крови (рис. 7a), и отсутствовало снижение веса (рис. 7b). Остальные животные в обеих группах оказались нечувствительными к терапии, и их показатели оставались на уровне показателей отрицательного контроля.

Таким образом, в ходе эксперимента были зафиксированы позитивные эффекты оздоровления диабетических животных, у 50% животных наблюдалась устойчивая ремиссия диабетического состояния, продолжавшаяся и после отмены препаратов (рис. 7). При этом, хотя наблюдаемые эффекты находились в соответствии с предполагаемым действием, их появление при столь кратковременном курсе лечения было неожиданным. Наиболее вероятно, что в основе «терапевтического» эффекта препаратов лежит известная обратимость химически-индуцированного «аллоксанового» диабета [22, 26]. В этой связи выбор «аллоксановой» модели представляется удачным, поскольку она позволила оценить сравнительную эффективность Глипина и ликсумии при длительном применении. При этом известная из литературы [22] и выявленная в наших экспериментах гетерогенность модели «аллоксанового» диабета не имеет достоверного объяснения.

Терапевтический потенциал Глипина на модели болезни Альцгеймера *in vivo*

В исследовании использовали бульбэктомированных (БЭ) мышей с удаленными обонятельными луковицами. Как известно, по многим поведенческим, биохимическим и

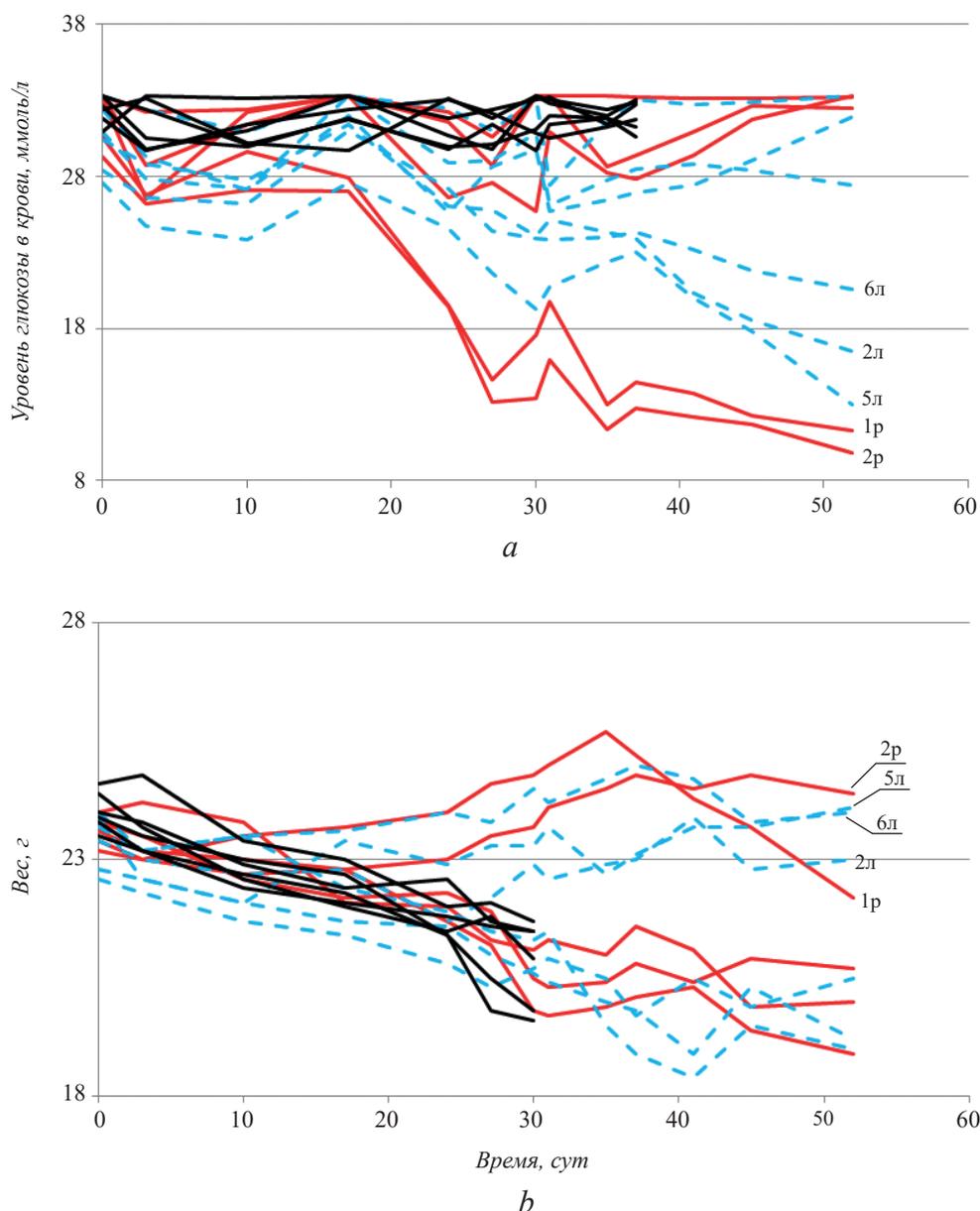


Рис. 7. Изменение уровня глюкозы в крови (a) и веса (b) диабетических животных в процессе лечения (первые 30 суток эксперимента) и по его окончании. Лечение проводили с использованием Глипина (красные сплошные линии) или Ликсумии (голубые пунктирные линии). Данные контрольных животных, не получавших лечения, представлены черными сплошными линиями. 1р и 2р – животные, получавшие Глипин, 2л, 5л и 6л – животные, получавшие Ликсумию

Fig. 7. Dynamics of glucose content in blood (a) and weight (b) of diabetic animals during treatment (first 30 days of experiment) and at its end. Treatment was performed using Glypin (red solid lines) and Lixumia (blue broken lines). Data on control (untreated) animals are represented by black solid lines. 1p and 2p correspond to Glypin-treated animals; 2л, 5л и 6л represent Lixumia-treated animals

морфологическим показателям такие животные воспроизводят картину нейродегенерации, характерную для болезни Альцгеймера, что позволяет рассматривать их как модель спорадической формы данного заболевания [26].

Исследование проводили в два этапа. Группы животных включали по 5 особей. На первом этапе анализировали восстановление памяти модельных животных под действием низких доз

препарата Глипина (2 мкг). Курс лечения составлял три недели. На втором этапе дозу Глипина увеличили в 10 раз и провели дополнительный курс лечения в течение пяти дней. По окончании каждого курса лечения осуществляли обучение мышей и тестирование их памяти в водном лабиринте Морриса. Проводили сравнительный статистический анализ продолжительности пребывания и числа заходов мышей в 3-й сектор, в котором при

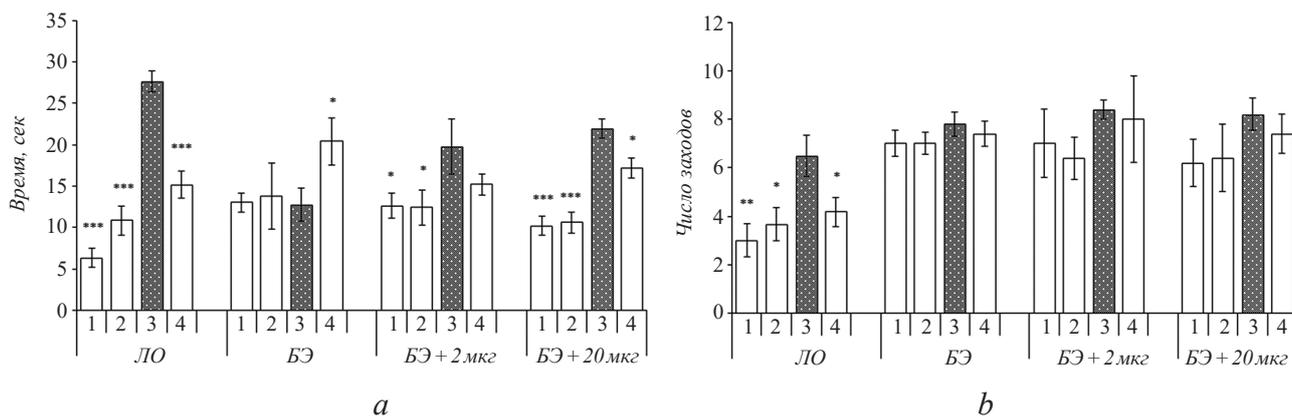


Рис. 8. Оценка терапевтического эффекта Глипина в отношении памяти животных с индуцированной формой болезни Альцгеймера: *a* – время пребывания животных в разных секторах (1–4) водного лабиринта Морриса; *b* – доля общего числа заходов в сектора (%); ЛО – ложнооперированные животные (положительный контроль); БЭ – бульбэктомизированные нелеченные животные с удаленными обонятельными луковицами (отрицательный контроль); БЭ + 2 мкг – БЭ-животные, получавшие лечение глипином в дозе 2 мкг; БЭ + 20 мкг – те же животные с дополнительным курсом лечения Глипином в дозе 20 мкг. Достоверность различий от показателей 3-го сектора: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Fig. 8. Assessment of therapeutic effect of Glypin on memory of animals with induced Alzheimer's disease: (*a*), time of occurrence of animals in various sectors (1–4) of Morris water labyrinth; (*b*), percentage of total number of entries into sectors; ЛО, pseudo-operated animals (positive control); БЭ, bulbectomized untreated animals with removed olfactory bulbs (negative control); БЭ + 2 мкг, bulbectomized animals treated by Glypin (2 μg); БЭ + 20 мкг, bulbectomized animals treated by Glypin (20 μg). Reliability of differences from indicators of the 3rd sector are as follows: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

обучении находилась спасательная платформа, в сопоставлении с аналогичными показателями для других индифферентных секторов.

Применение Глипина в дозе 2 мкг сопровождалось отчетливой тенденцией к улучшению памяти у БЭ-мышей (рис. 8). Более строгий вывод был невозможен в связи с недостаточным уровнем достоверности выделения целевого 3-го отсека от остальных секторов по показателю времени пребывания животных (рис. 8*a*).

В то же время применение дополнительного курса лечения с использованием 10-кратной дозы Глипина привело к достоверному улучшению памяти животных, что проявилось в статистически достоверном выделении 3-го целевого отсека от остальных по показателю времени пребывания (рис. 8*a*, $p < 0,05$).

При этом необходимо отметить, что по показателю числа заходов в отсеки лабиринта достоверных изменений у БЭ-животных, получавших Глипин в дозе 2 мкг/мышь или в дозе 20 мкг/мышь, не выявлено (рис. 8*b*), что, однако, не ставит под сомнение значимость полученного позитивного эффекта Глипина на показатель времени пребывания в отсеках, т. к. животные могут использовать разную тактику поведения для выделения запомнившегося отсека. Также Глипин не снижал и повышенную двигательную активность, которой характеризуются БЭ-мыши, что

напрямую не связано с их пространственной памятью, а скорее отражает повышенную возбудимость. В целом можно говорить о том, что улучшение памяти животных под действием Глипина наблюдалось на фоне сохранения типичных поведенческих реакций, свойственных этим модельным животным.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что Глипин при п/к и в/м применении обладает эффективностью и длительностью действия, сравнимыми с таковыми у препарата Ликсумия. На основании полученных данных в качестве основного способа применения препарата Глипин было выбрано подкожное введение и рассчитаны величины минимальной и повышенной терапевтической дозы для человека, составившие 0,75 мг и 1,5 мг, соответственно.

Препарат показал терапевтическую эффективность при длительном применении и оказал достоверное позитивное влияние на когнитивные способности животных с моделью спорадической формы болезни Альцгеймера.

По большинству показателей специфической активности Глипин проявил сходство с препаратом сравнения Ликсумия, что позволяет прогнозировать у них сходную терапевтическую эффективность при характерной для Ликсумии интенсивности применения раз в сутки.

Настоящая работа была поддержана грантом Министерства образования и науки РФ. Государственный контракт № 14.N08.12.1038.

ЛИТЕРАТУРА

- Di Cesare M., Bentham J., Stevens G.A., et al. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet*, 2016, 387, 1377–1396. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30054-X
- Hölscher C. The incretin hormones glucagonlike peptide 1 and glucose-dependent insulintropic polypeptide are neuroprotective in mouse models of Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s & Dementia*, 2014, 10 (1 Suppl), S47–S54. doi: 10.1016/j.jalz.2013.12.009
- Shi L., Zhang Z., Li L., Hölscher C. A novel dual GLP-1/GIP receptor agonist alleviates cognitive decline by re-sensitizing insulin signaling in the Alzheimer icv. STZ rat model. *Behav. Brain Res.*, 2017, 327, 65–74. doi: 10.1016/j.bbr.2017.03.032
- Tai J., Liu W., Li Y., et al. Neuroprotective effects of a triple GLP-1/GIP/glucagon receptor agonist in the APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Brain Research*, 2018, 1678, 64–74. doi: 10.1016/j.brainres.2017.10.012
- Day J.W., Ottaway N., Patterson J.T., et al. A new glucagon and GLP-1 coagonist eliminates obesity in rodents. *Nat. Chem. Biol.*, 2009, 5, 749–757. doi: 10.1038/nchembio.209
- Finan B., Ma T., Ottaway N., et al. Unimolecular dual incretins maximize metabolic benefits in rodents, monkeys, and humans. *Sci. Transl. Med.*, 2013, 5(209), 209ra151. doi: 10.1126/scitranslmed.3007218
- Finan B., Yang B., Ottaway N., et al. A rationally designed monomeric peptide triagonist corrects obesity and diabetes in rodents. *Nat. Med.*, 2015, 21(1), 27–36. doi: 10.1038/nm.3761
- Lau J., Bloch P., Schäffer L., et al. Discovery of the once-weekly glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue semaglutide. *J. Med. Chem.*, 2015, 58(18), 7370–7380. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00726
- Painter N.A., Morello C.M., Singh R.F., McBane S.E. An-evidence-based and practical approach to using Bydureon™ in patients with type 2 diabetes. *J. Am. Board Fam. Med.*, 2013, 26(2), 203–210. doi: 10.3122/jabfm.2013.02.120174
- Fonseca V.A., Alvarado-Ruiz R., Raccach D., et al. Efficacy and safety of the once-daily GLP-1 receptor agonist lixisenatide in monotherapy : a randomized double-blind, placebo-controlled trial in patients with type 2 diabetes (GetGoal-Mono). *Diabetes Care*, 2012, 35(6), 1225–1231. doi: 10.2337/dc11–1935
- Rosenstock J., Raccach D., Koranyi L., et al. Efficacy and safety of lixisenatide once-daily versus exenatide twice-daily in type 2 diabetes inadequately controlled on metformin: a 24-week, randomized, open-label, active-controlled study (GetGoal-X). *Diabetes Care*, 2013, 36(10), 2945–2951. doi: 10.2337/dc12-2709
- Ostawal A., Mocevic E., Kragh N., Xu W. Clinical Effectiveness of liraglutide in type 2 diabetes treatment in the real-world setting: a systematic literature review. *Diabetes Ther*, 2016, 7(3), 411–438. doi: 10.1007/s13300-016-0180-0
- Jendle J., Grunberger G., Blevins T., et al. Efficacy and safety of dulaglutide in the treatment of type 2 diabetes: a comprehensive review of the dulaglutide clinical data focusing on the AWARD phase 3 clinical trial program. *Diabetes Metab Res Rev*, 2016, 32(8), 776–790. doi: 10.1002/dmrr.2810
- Rosenstock J., Reusch J., Bush M., et al. Potential of albiglutide, a long-acting GLP-1 receptor agonist, in type 2 diabetes : a randomized controlled trial exploring weekly, biweekly, and monthly dosing. *Diabetes Care*, 2009, 32(10), 1880–1886. doi: 10.2337/dc09-0366
- Sanchez-Garrido M.A., Brandt S.J., Clemmensen C., et al. GLP-1/glucagon receptor co-agonism for treatment of obesity. *Diabetologia*, 2017, 60(10), 1851–1861. doi: 10.1007/s00125-017-4354-8
- Haslam, D. Weight management in obesity – past and present. *Int. J. Clin. Pract.*, 2016, 70(3), 206–217. doi: 10.1111/ijcp.12771
- Thompson S.A., Higashiyama S., Wood K., et al. Characterization of sequences within heparin-binding EGF-like growth factor that mediate interaction with heparin. *J. Biological Chemistry*, 1994, 269(4), 2541–2549.
- Козлов Д.Г., Санникова Е.П., Клебанов Ф.А., Чеперегин С.Э., Булушова Н.В., Залунин И.А., Грачева Т.С., Грачев С.А., Юрий В.Л., Рыкалина Н.В., Аскерова Е.В., Яроцкий С.В. Полипептид для понижения уровня сахара в крови на основе глюкагоноподобного пептида-1 человека, рекомбинантный штамм-продукент и способ получения этого полипептида. Патент РФ № 2642260, 24.01.2018. Заявка № 2016141433, 21.10.2016. Оpubл. 24.01.2018, бюл. №3. Истекает 21.10.2036.
- Козлов Д.Г., Санникова Е.П., Чеперегин С.Э. Температуро-чувствительный мутантный интеин для нерастворимой экспрессии предшественника целевого белка. Патент РФ № 2619217, 12.05.2017. Заявка №2015152071, 04.12.2015. Оpubл. 12.05.2017, бюл. № 14. Истекает 04.12.2035.
- Хоровская Л.А., Черничук О.В., Лобачевская Т.В. Оценка качества измерений глюкозы с помощью прибора диагностики возле пациента Акку-Чек Актив. *Эффективная фармакотерапия*, 2014, 20, 20–26.

21. Yang X., Li Y., Wang Y., et al. Long-Acting GLP-1 Analogue in V-Shaped Conformation by Terminal Polylysine Modifications. *Mol. Pharmaceutics*, 2014, 11(11), 4092–4099. doi: 10.1021/mp5002685
22. Rerup, C., Tarding F. Streptozotocin- and alloxan-diabetes in mice. *European J. Pharmacology*, 1969, 7, 89–96.
23. Thorend, B., Waeber G. Glucagon-like peptide-1 and the control of insulin secretion in the normal state and in NIDDM. *Diabetes*, 1993, 42(9), 1219–1225.
24. Ma X., Guang Y., Hua X. Glucagon-like peptide 1-potentiated insulin secretion and proliferation of pancreatic beta-cells. *J. Diabetes*, 2014, 6(5), 304–402. doi: 10.1111/1753-0407.12161
25. Morris R. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 1984, 11(1), 47–60.
26. Александрова И.Ю., Кувичкин В.В., Кашпаров И.А., и др. Повышенный уровень β -амилоида в мозге у бульбэктомированных мышей. *Биохимия*, 2004, 69(2), 176–180.
27. Deacon C.F., Knudsen L.B., Madsen K., et al. Dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1 which have extended metabolic stability and improved biological activity. *Diabetologia*, 1998, 41, 271–278.
28. Green B.D., Gault V.A., O’Harte F.P.M., Flatt P.R. Structurally modified analogues of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) as future antidiabetic agents. *Current Pharmaceutical Design*, 2004, 10, 3651–3662. doi: 10.2174/1381612043382774
29. Козлов Д.Г., Чеперегин С.Э., Санникова Е.П., Губайдуллин И.И., Клебанов Ф.А., Честухина Г.Г., Булушова Н.В., Рябиченко В.В., Залунин И.А., Котлова Е.К., Константинова Г.Е., Покровский В.С., Яроцкий С.В. Гибридный белок на основе L-аспарагиназы *Wolinella succinogenes*, штамм *Escherichia coli* - продуцент гибридного белка (варианты) и способ получения гибридного белка, обладающего противоопухолевой активностью. Патент РФ № 2562166, 10.08.2015. Заявка № 2014140724, 9.10.2014. Оpubл. 10.09.2015, бюл. № 25. Истекает 9.10.2034.
30. Sannikova E.P., Bulushova N.V., Cheperegin S.E., et al. The modified heparin-binding L-asparaginase of *Wolinella succinogenes*. *Molecular Biotechnology*, 2016, 58 (8-9), 528–539. doi: 10.1007/s12033-016-9950-1
31. Schwarze S.R., Ho A., Vocero-Akbani A., Dowdy S.F. *In vivo* transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, 1999, 285, 1569–1572.
32. Zou L.L., Ma J.L., Wang T., et al. Cell-penetrating peptide-mediated therapeutic molecule delivery into the central nervous system. *Current Neuropharmacology*, 2013, 11, 197–208. doi: 10.2174/1570159X11311020006
33. Zhang D., Wang J., Xu D. Cell-penetrating peptides as noninvasive transmembrane vectors for the development of novel multifunctional drug-delivery systems. *J. of Controlled Release*, 2016, 229, 130–139. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.03.020
34. Ma C., Gao M., Liu W., et al. Intein-mediated expression and purification of an analog of glucagon-like peptide-1 in *Escherichia coli*. *Protein & Peptide Lett*, 2010, 17, 1245–1250. doi: 10.2174/092986610792231582
35. Gao M., Tong Y., Tian H., et al. Recombinant production of mGLP-1 by coupling of refolding and intein-mediated self-cleavage (CRIS). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 96, 1283–1290. doi: 10.1007/s00253-012-4163-4
36. Jiang A., Jin W., Zhao F., et al. Split Ssp DnaB mini-intein-mediated production of recombinant human glucagon-like peptide-1/7-36. *Biotechnol Appl Biochem*, 2015, 62 (3), 309–315. doi: 10.1002/bab.1274
37. Doyle M.E., Egan J.M. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther*, 2007, 113 (3), 546–593. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.11.007
38. Thorkildsen C., Neve S., Larsen B.D., et al. Glucagon-like peptide 1 receptor agonist ZP10A increases insulin mRNA expression and prevents diabetic progression in db/db mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307 (2), 490–496. doi: 10.1124/jpet.103.051987

Specific Activity of Modified Human Recombinant Glucagon-Like Peptide 1

E.P. SANNIKOVA¹, N.V. BULUSHOVA¹, S.E. CHEPEREGIN¹, I.A. ZALUNIN¹, F.A. KLEBANOV¹, T.S. GRACHEVA¹, V.L. YURIN¹, N.V. RYKALINA¹, E.V. ASKEROVA¹, S.V. YAROTSKY¹, O.G. TATARNIKOVA², N.V. BOBKOVA², and D.G. KOZLOV^{1*}

¹State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center "Kurchatov Institute" (NRC "Kurchatov Institute" – GOSNIIGENETIKA), 117545, Moscow Russia

²Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Moskovskaya Oblast, Russia

*e-mail: dg_kozlov@genetika.ru

Received May 10, 2018

Accepted June 4, 2018

An original therapeutic Glypin for the medication of human diabetes mellitus type II has been developed. A completely biosynthetic modified human recombinant glucagon-like peptide (rmGlp-1) isolated from *E. coli* cells is an active pharmaceutical substance of Glypin. In addition to the GLP-1 portion with the well-known Ala8Gly substitution, the rmGLP-1 protein contains a helper amino acid sequence on the C-terminus that includes the heparin-binding peptide of human HB-EGF. A commercial preparation of Lixumia served as main reference compound to which the Glypin specific activity was compared. During the preclinical studies of both medicines it was shown that Glypin and Lixumia have the following similar properties: (1) close effectiveness and time of action under the subcutaneous and intramuscular injection; (2) comparable insulinotropic activity confirming the occurrence of the common mechanism of activity of Glypin and the reference preparations; (3) resembling therapeutic effect under long-term use. Based on these data, the subcutaneous injection was chosen as the main therapeutic way for the Glypin introduction; the single dose for Glypin preclinical research was established equal to 100 µg/kg, and that for the human therapy was defined as 0.75 mg and 1.5 mg. A statistically reliable positive effect of Glypin intranasal introduction was found using mouse models with sporadic Alzheimer disease. The similar characteristics of Glypin and Lixumia shown in our studies make it possible to anticipate their equal efficacy under the same once a day therapeutic application.

Key words: agonist of GLP-1 receptors, antiglycemic preparation, glucagon-like peptide, Lixumia, diabetes mellitus.

Acknowledgements – This work was supported by the Ministry of Education and Science of RF (State Contract 14.N08.12.1038).

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-4-37-50