

Nuove classi di farmaci per il diabete tipo 2. Modulazione dell'azione del glucagone

Agostino Consoli

Dipartimento di Medicina Interna e Scienze dell'Invecchiamento e Centro Scienze dell'Invecchiamento, Università d'Annunzio, Chieti

Il glucosio è un substrato necessario per la sopravvivenza e la sua concentrazione in circolo è fisiologicamente regolata in maniera molto stretta da una serie di fattori metabolici, ormonali e umorali (1). In ogni momento la concentrazione plasmatica del glucosio è il risultato del bilancio netto fra il glucosio che viene immesso in circolo e quello che abbandona il circolo perché captato da cellule e tessuti o (in particolari situazioni per lo più patologiche) perché eliminato attraverso l'emuntorio renale. Nello stato post-assorbitivo (quando cioè non vi è ingresso in circolo di glucosio esogeno assorbito attraverso l'intestino) la pressoché unica fonte di glucosio per il circolo è la produzione di glucosio da parte del fegato (2) (in condizioni fisiologiche il contributo netto renale è estremamente modesto (3)). In effetti, un aumento della produzione epatica di glucosio è il momento fisiopatologico essenziale per il determinarsi dell'iperglicemia a digiuno nel diabete mellito tipo 2 (DMT2). Nella stessa patologia il deficit della fisiologica soppressione della produzione epatica di glucosio

nel periodo post-prandiale rappresenta la causa principale di iperglicemia post-prandiale (2, 4). La produzione epatica di glucosio è regolata da una serie di meccanismi ma, in particolare, è molto efficacemente soppressa dall'insulina ed è invece incrementata dall'azione del glucagone. A parità di altri fattori, quindi, il rapporto insulina/glucagone è un fondamentale fattore di regolazione della produzione epatica di glucosio (5). Ne deriva che, se l'insulina è ovviamente (e giustamente) considerata il "principale controllore" della omeostasi glicemica e della concentrazione plasmatica di glucosio, un ruolo rilevante nella regolazione della glicemia spetta anche al glucagone, con un eccesso dell'ormone che tende a causare iperglicemia e un deficit di azione dello stesso che può teoricamente essere associato a un miglioramento della tolleranza ai carboidrati. In effetti, topi KO per il recettore del glucagone (e nei quali quindi l'azione dell'ormone è assente) mostrano dopo somministrazione di glucosio una curva glicemica più bassa rispetto a topi *wild-type* (6). Per contro, in soggetti con DMT2 è stato dimostrato che le concentrazioni di glucagone tendono a essere inappropriatamente elevate (rispetto alla glicemia prevalente) a digiuno e che nella fase post-prandiale la glucagonemia plasmatica, invece di subire il fisiologico calo, paradossalmente aumenta, contribuendo verosimilmente in maniera importante all'iperglicemia post-prandiale (7). Concentrazioni eccessive di glucagone, quindi, sono tra i responsabili dell'iperglicemia nel DMT2. Di conseguenza, ridurre la secrezione di glucagone e/o modularne l'azione in periferia diventa un target attraente per strategie terapeutiche volte a contenere l'iperglicemia nel DMT2. La sintesi dello stato attuale delle conoscenze sullo sviluppo di terapie per il DMT2 basate sulla modulazione della secrezione/azione del glucagone è l'argomento del presente articolo.

FAD ECM "il Diabete"

Questa rassegna fa parte di un **percorso di formazione a distanza** accreditato a livello nazionale e disponibile gratuitamente nell'aula virtuale della SID (<http://sidfad.accmed.org>).

Per partecipare al corso occorre:

1. Leggere la rassegna (disponibile anche on-line)
2. Registrarsi all'aula e iscriversi al corso "il Diabete"
3. Rispondere on-line ai quiz di verifica e compilare il questionario di valutazione dell'evento FAD.

Una volta eseguito con successo il test di valutazione e compilato il questionario di valutazione dell'evento, sarà cura della Segreteria ECM della SID far pervenire l'attestato ECM del corso ai diretti interessati nei tempi e nelle modalità stabiliti dalla regolamentazione vigente.

Per ulteriori informazioni: <http://sidfad.accmed.org>

Molecole che modulano la secrezione e/o l'azione del glucagone

Le classi di molecole che agiscono sulla secrezione o sull'azione del glucagone e che sono state più o meno estensivamente studiate sono riassunte nella **Tabella 1**. Esse comprendono in primo luogo le terapie basate sulle incretine (sia gli analoghi recettoriali delle incretine sia gli inibitori della dipeptidil-peptidasi (DPP)-4), molecole che, seppure sviluppate per un "movente" diverso, riconoscono comunque nella soppressione della secrezione di glucagone un non trascurabile meccanismo d'azione per la loro efficacia terapeutica. Oltre ai farmaci basati sull'asse delle incretine, sono state scoperte e sviluppate altre molecole capaci di antagonizzare o modulare l'azione del glucagone, sia della classe degli antagonisti recettoriali dell'ormone, sia della classe di peptidi ibridi *glucagon-like peptide* (GLP)-1/glucagone (con possibile duplice meccanismo di azione di inibizione della secrezione e blocco dell'azione dell'ormone), sia molecole che interferiscono con la trasduzione del segnale del glucagone. Tutte queste verranno brevemente descritte.

Tabella 1 Molecole che modulano la secrezione e/o l'azione del glucagone

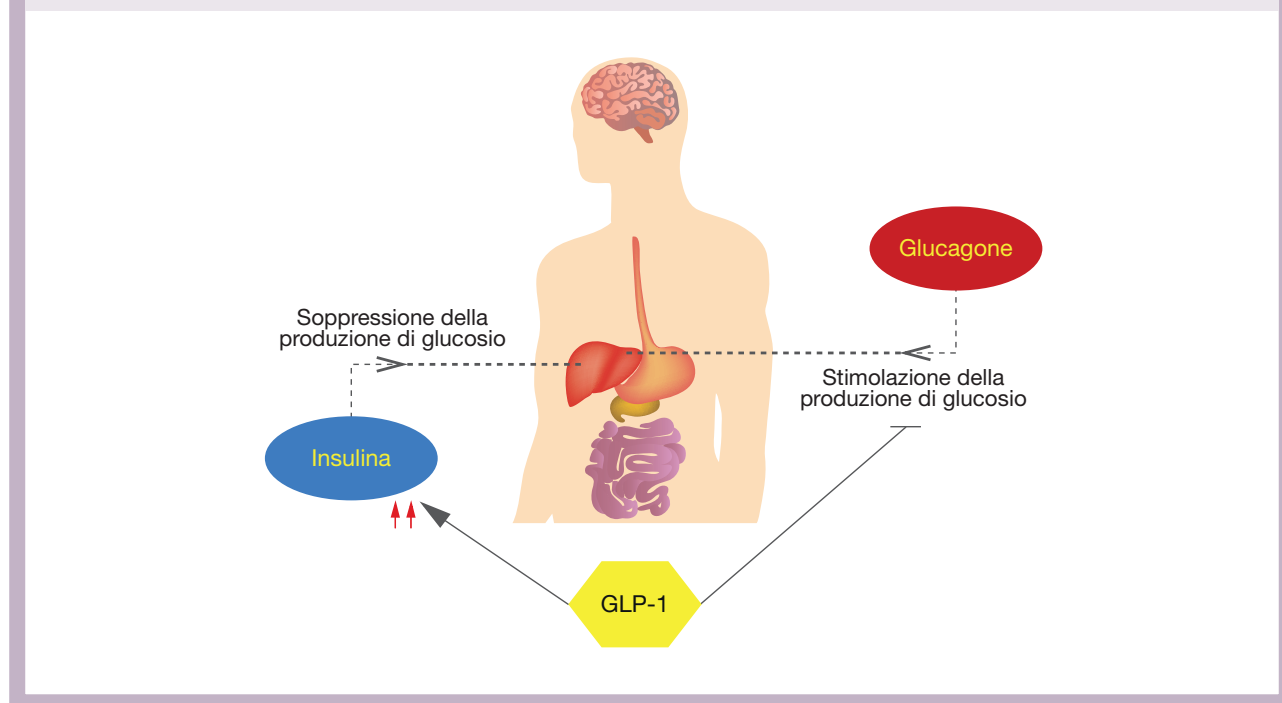
- GLP-1, analoghi del GLP-1, DPP-4 inibitori
- Antagonisti recettoriali del glucagone
- Peptidi ibridi GLP-1/glucagone
- Inibitori della trasduzione del segnale

Agonisti recettoriali del GLP-1 e DPP-4 inibitori

È stato diffusamente dimostrato che il GLP-1 è in grado di sopprimere la secrezione di glucagone in isole pancreatiche isolate e nel pancreas perfuso di diverse specie animali (8). Questo, concordemente con l'azione di stimolo della secrezione insulinica, fa sì che l'ormone sia capace di modificare il rapporto insulina/glucagone modulando anche, in questo modo, la produzione epatica di glucosio (**Figura 1**). Come la stimolazione della secrezione insulinica, anche la soppressione della secrezione di glucagone da parte del GLP-1 appare essere "glucodipendente" e studi effettuati mediante la tecnica del *clamp* ipoglicemico hanno mostrato che durante l'ipoglicemia la secrezione di glucagone è

addirittura più pronunciata nel corso della somministrazione di agonisti recettoriali del GLP-1 piuttosto che durante la somministrazione di placebo (9). A questo proposito, secondo alcune interpretazioni il GLP-1 potrebbe perfino essere in grado di migliorare il *glucose-sensing* della α -cellula, inibendo una eccessiva secrezione di glucagone in condizioni di iperglicemia, ma addirittura potenziando la secrezione dell'ormone in condizioni di ipoglicemia. In effetti, in soggetti trattati per 4 settimane con il DPP-4 inibitore vildagliptin l'incremento rispetto al basale della glucagonemia durante ipoglicemia indotta era maggiore rispetto ai controlli (10). In ogni caso, l'inibizione della secrezione del glucagone che si osserva nei soggetti con DMT2 in trattamento con agonisti recettoriali del GLP-1 o con inibitori della DPP-4 fa di queste terapie le prime in assoluto ad avere tra i propri target l'inappropriata secrezione di glucagone tipica del DMT2.

A questo punto è lecito chiedersi quanto dell'effetto ipoglicemizante (o meglio normoglicemizante) di queste terapie sia dovuto proprio alla loro azione sulla inibizione della secrezione di glucagone. In realtà, Hare et al., in uno studio dal disegno sperimentale molto complesso basato sulla esecuzione del *clamp* pancreatico in diverse occasioni nello stesso soggetto, hanno convincentemente dimostrato *in vivo* nell'uomo che circa il 50% dell'azione ipoglicemizante del GLP-1 può essere attribuito all'inibizione della secrezione di glucagone, con il restante 50% dato dall'azione di stimolazione della secrezione di insulina esercitata dall'ormone (11). Per quanto riguarda il meccanismo molecolare attraverso il quale il GLP-1 e i suoi analoghi recettoriali inibiscono la secrezione di glucagone, questo non sembrerebbe essere il risultato di una azione diretta, dal momento che, almeno fino ad oggi, non è stata convincentemente documentata la capacità delle α -cellule pancreatiche di esprimere il recettore per il GLP-1. D'altra parte, la soppressione del glucagone indotta dal GLP-1 non può essere ascritta all'aumento della secrezione di insulina stimolata dal peptide, in quanto il GLP-1 si è mostrato capace di inibire la secrezione di glucagone causata da arginina anche in soggetti diabetici tipo 1 C-peptide negativi e quindi insulino-privi (12). Tuttavia, nel pancreas isolato perfuso è stato osservato che il GLP-1 era in grado, oltre a sopprimere la secrezione di glucagone, di determinare un incremento della secrezione di somatostatina. In un esperimento separato gli autori riscontravano che si annullava la capacità del GLP-1 di sopprimere il glucagone

Figura 1 **Insulina, glucagone e GLP-1 nella regolazione della produzione epatica di glucosio**

gone perfondendo il pancreas isolato con un antagonista recettoriale della somatostatina (13). È verosimile quindi che l'azione di soppressione sulla secrezione di glucagone esercitata dalle terapie basate sulle incretine sia indiretta e mediata da una modulazione della secrezione di somatostatina. Resta il fatto che gli agonisti recettoriali del GLP-1 e i DPP-4 inibitori rappresentano a tutt'oggi l'unico esempio di farmaci capaci di modulare la secrezione di glucagone già disponibili per la terapia del DMT2.

Antagonisti del recettore del glucagone

Come ricordato, il tentativo di ridurre la glicemia antagonizzando l'azione del glucagone non è nuovo ed è stato perseguito da oltre 25 anni tramite immunodelezione, *down-regulation* genetica del recettore o molecole capaci di antagonizzare il recettore dell'ormone (14). Come antagonisti recettoriali dapprima si cercò di impiegare peptidi (che non sarebbero stati comunque somministrabili per via orale), fino all'identificazione di molecole molto più piccole, in grado comunque di bloccare il recettore dell'ormone. Una di queste molecole, individuata nei laboratori MSD, si è dimostrata capace di attenuare sensibilmente la glicogenolisi indotta da glucagone nel fegato di topo perfuso, nonché di smus-

sare significativamente il picco glicemico successivo a somministrazione di glucagone in topi transgenici che esprimevano la variante umana del recettore del glucagone (15). Un composto simile, identificato da Novo-Nordisk, è stato testato nel cane dove si è mostrato in grado di neutralizzare in parte l'effetto sulla glicogenolisi provocato da concentrazioni largamente sopra fisiologiche di glucagone, ma non di ridurre sufficientemente la gluconeogenesi basale (16). Infine, un altro agonista del recettore del glucagone (di sintesi Bayer) è stato sperimentato anche *in vivo* nell'uomo, in soggetti non diabetici, dove è apparso capace di diminuire l'incremento della produzione epatica di glucosio indotto dalla infusione di glucagone (17). I potenziali problemi dell'impiego di farmaci di questo tipo in terapia sono legati alle conseguenze del cronico blocco del recettore del glucagone e sono relativi a iperglucagonemia, marcata iperplasia delle α -cellule e predisposizione all'ipoglicemia. Tutto ciò è stato osservato in topi transgenici KO per il recettore del glucagone (18). È vero tuttavia che del tutto recentemente Mu et al. (19) hanno riportato che in topi transgenici che esprimevano la variante umana del recettore del glucagone ed erano sottoposti a dieta grassa il trattamento con un antagonista recettoriale del glucagone per 82 giorni era associato a un tra-

scurabile incremento delle concentrazioni di glucagone e a una iperplasia solo modesta delle α -cellule mentre, per converso, aumentava la tolleranza glicidica. Nello stesso studio gli autori dimostravano anche che l'antagonista recettoriale del glucagone era efficace nel migliorare il controllo glicemico negli stessi animali resi diabetici mediante streptozotocina e che, in questa azione, il composto aveva un effetto additivo all'azione del sitagliptin (19). È anche vero però che, dal profilo polioimico del metabolismo epatico in topo KO per il recettore del glucagone, emerge che la trasformazione genetica in questione si associa a significative alterazioni metaboliche nel fegato, con una *up*-regolazione della glicolisi, una severa inibizione della gluconeogenesi e una *up*-regolazione della sintesi di acidi grassi liberi, del colesterolo e degli acidi biliari (20). Studi di fase II sono in corso nell'uomo con composti di questa classe che, tra l'altro, sembrerebbero confermare un effetto negativo sul profilo lipidico (21).

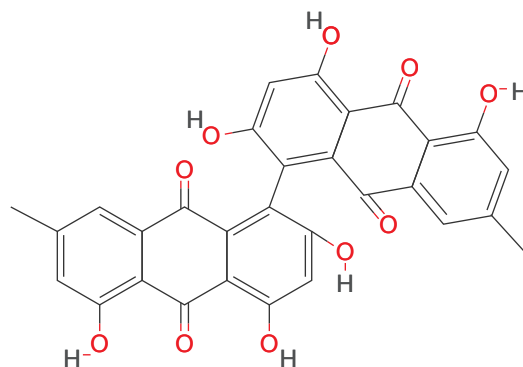
Peptidi ibridi GLP-1/glucagone

Il GLP-1 e il glucagone sono peptidi con un'alta omologia (58% di identità) e legano entrambi recettori della famiglia dei recettori accoppiati alla proteina G. La stimolazione dei loro rispettivi recettori ha effetti opposti sul metabolismo glicidico, ma l'elevata omologia tra le due proteine rende possibile la creazione di peptidi ibridi che possano legare ambedue i recettori. Se questo legame dovesse risultare in agonismo per il recettore del GLP-1 e antagonismo per il recettore del glucagone, l'ibrido in questione avrebbe la possibilità di essere usato per la terapia del DMT2 (22). In realtà, una serie di questi ibridi è stata generata e alcuni di questi composti sono stati studiati con qualche successo in modelli animali. Claus et al. (23), ad esempio, hanno utilizzato l'ibrido GLP-1/glucagone ANC7K2, peghilato per prolungarne la emivita, nel topo db/db e hanno osservato che il composto aveva la capacità di stimolare la secrezione di insulina e di migliorare il profilo glicemico successivo alla somministrazione di glucosio per via intragastrica accompagnandosi, al contempo, a un aumento solamente molto modesto della concentrazione del glucagone. Almeno nell'animale, il composto appariva ben tollerato e, sulla base di questo e dei dati metabolici riscontrati, gli autori proponevano nelle conclusioni del loro articolo che il tipo di approccio usato era sicuramente meritevole di essere ulteriormente approfondito nell'ambito della ricerca di nuove terapie per il DMT2.

Molecole interferenti con la trasduzione del segnale del glucagone

Il *signaling* intracellulare che si sviluppa a valle dell'attivazione del recettore del glucagone coinvolge l'attivazione della adenilatociclastasi, con conseguente aumento delle concentrazioni intracellulari di AMP ciclico. Il bisantroquinone fungino skyrina inibisce la capacità del glucagone di stimolare la produzione di AMP ciclico in membrane cellulari di epatociti di ratto. Questo effetto della skyrina non sembra dovuto a un meccanismo di competizione con l'ormone per il *binding* recettoriale, ma piuttosto a un antagonismo funzionale che sembra disaccoppiare specificamente il recettore del glucagone dall'attivazione della adenilatociclastasi. Composti con questa attività "disaccoppiante" potrebbero rappresentare una via alternativa per contrastare l'azione iperglicemizzante del glucagone, senza interferire direttamente con il legame con il recettore e possibilmente senza portare a un aumento delle concentrazioni plasmatiche dell'ormone. La skyrina è stata testata in linee cellulari di epatociti umani, dove la sua aggiunta al mezzo di coltura ha ridotto di oltre il 50% la sintesi di AMP ciclico e di quasi il 30% la glicogenolisi susseguente alla stimolazione con glucagone (Figura 2) (24). È interessante notare che la molecola non interferiva con le modificazioni degli stessi parametri indotte da epinefrina o GLP-1, a dimostrazione di uno specifico effetto "disaccoppiante" sulla *pathway* di segnale del glucagone. La potenza della skyrina, anche *in vitro*, non appare sufficiente perché il composto possa avere una propria utilità futura in clinica.

Figura 2 **Struttura della skyrina, bisantroquinone fungino estratto dal *Talaromyces wortmanni***



Tuttavia, i dati di Parker et al. mostrano che la inibizione della trasduzione del segnale del recettore del glucagone è un obiettivo potenzialmente perseguibile per lo sviluppo di farmaci per la terapia del DMT2.

Conclusioni

Un approccio terapeutico moderno al DMT2, che abbia tra le ambizioni quella di intervenire sui meccanismi della malattia modificandone il decorso, non può prescindere dai momenti fisiopatologici fondamentali della malattia stessa che devono essere tra i target del trattamento. Come proposto da Ralph DeFronzo nella sua *Banting Lecture* (25), alla base del DMT2 esiste un “ottetto mortale” costituito da:

1. insufficiente secrezione insulinica per danno funzionale e strutturale delle cellule β -pancreatiche;
2. eccessiva secrezione di glucagone per iperattività delle cellule α -pancreatiche;
3. aumentata produzione epatica di glucosio;
4. diminuita secrezione intestinale di incretine;
5. insulino-resistenza a livello del muscolo;
6. insulino-resistenza e disendocrinia a livello del tessuto adiposo;
7. alterata regolazione centrale (cervello) del flusso dei nutrienti;
8. aumentato riassorbimento di glucosio da parte del rene.

I diversi meccanismi patogenetici rappresentati nell’ottetto mortale hanno ovviamente un grado gerarchico diverso. Tuttavia, ancorché il deficit di secrezione insulinica appaia sempre di più come l’elemento sufficiente e necessario perché si instauri il DMT2, l’esatto “peso individuale” degli altri fattori è difficile da determinare, anche perché un ruolo fondamentale è giocato dall’interazione tra di essi. In ogni caso, l’inappropriata secrezione di glucagone è sicuramente importante per una eccessiva produzione epatica di glucosio e può contribuire ad antagonizzare l’azione insulinica in periferia. Per questo, se saranno sviluppate molecole in grado di modulare in basso la secrezione e/o l’azione del glucagone in maniera reversibile e sicura, esse potranno sicuramente diventare un’ulteriore utile freccia all’arco della terapia del DMT2, specialmente considerando il fatto che, riconoscendo la malattia molteplici aspetti patogenetici, sicuramente sempre di più in futuro sarà trattata con approcci multipli che possano ampliare il numero dei meccanismi di malattia target del trattamento.

Bibliografia

1. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799–806, 2001.
2. Consoli A. Role of liver in pathophysiology of NIDDM. *Diabetes Care* 15: 430–441, 1992.
3. Gerich JE. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: Therapeutic implications. *Diabet Med* 27: 136–142, 2010.
4. Consoli A, Nurjhan N, Capani F, Gerich J. Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM. *Diabetes* 38: 550–557, 1989.
5. Dunning BE, Gerich JE. The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications. *Endocr Rev* 28: 253–283, 2007.
6. Parker JC, Andrews KM, Allen MR, et al. Glycemic control in mice with targeted disruption of the glucagon receptor gene. *Biochem Biophys Res Comm* 290: 839–843, 2002.
7. Mitrakou A, Kelley D, Veneman T, et al. Contribution of abnormal muscle and liver glucose metabolism to postprandial hyperglycemia in NIDDM. *Diabetes* 39: 1381–1390, 1990.
8. Dunning BE, Foley JE, Ahren B. Alpha cell function in health and disease: Influence of glucagon-like peptide-1. *Diabetologia* 48: 1700–1713, 2005.
9. Degn KB, Brock B, Juhl CB, et al. Effect of intravenous infusion of exenatide (synthetic extendin-4) on glucose-dependent insulin secretion and counterregulation during hypoglycemia. *Diabetes* 53: 2397–2403, 2004.
10. Ahren B, Schweizer A, Dejager S, et al. Vildagliptin Enhances islet responsiveness to both hyper- and hypoglycemia in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 1236–1243, 2009.
11. Hare KJ, Vilsbøll T, Asmar M, et al. The glucagonostatic and insulinotropic effects of glucagon-like peptide-1 contribute equally to its glucose-lowering action. *Diabetes* 59: 1765–1770, 2010.
12. Kielgast U, Asmar M, Madsbad S, Holst JJ. Effect of glucagon-like peptide-1 on alpha- and beta-cell function in C-peptide-negative type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 2492–2496, 2010.
13. de Heer J, Rasmussen C, Coy DH, Holst JJ. Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas. *Diabetologia* 51: 2263–2270, 2008.
14. Loran A. New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21: 587–605, 2007.
15. Qureshi SA, Candelore MR, Xie D, et al. A novel glucagon receptor antagonist inhibits glucagon-mediated biological effects. *Diabetes* 53: 3267–3273, 2004.
16. Rivera N, Everett-Grueter CA, Edgerton DS, et al. A novel glucagon receptor antagonist, NNC25-0926, blunts hepatic glucose production in the conscious dog. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 743–752, 2007.
17. Petersen KF, Sullivan JT. Effects of a novel glucagon receptor antagonist (Bay 27-9955) on glucagon-stimulated glucose production in humans. *Diabetologia* 44: 2018–2024, 2001.
18. Gelling RW, Du XQ, Dichmann DS, et al. Lower blood glucose,

- hyperglucagonemia, and pancreatic alpha cell hyperplasia in glucagon receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1438–1443, 2003.
19. Mu J, Jiang G, Brady E, et al. Chronic treatment with a glucagon receptor antagonist lowers glucose and moderately raises circulating glucagon and glucagon-like peptide 1 without severe alpha cell hypertrophy in diet-induced obese mice. *Diabetologia* 54: 2381–2391, 2011.
 20. Yang J, MacDougall ML, McDowell MT, et al. Polyomic profiling reveals significant hepatic metabolic alterations in glucagon-receptor (GCGR) knockout mice: Implications on anti-glucagon therapies for diabetes. *BMC Genomics* 12: 281–295, 2011.
 21. Engel SS, Hu L, Andryuk PA, et al. Efficacy and tolerability of K-0893, a glucagon receptor antagonist in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 60 (Suppl 1): A85, 2011.
 22. Pan CQ, Buxton JM, Yung SL, et al. Design of a long acting peptide functioning as both a glucagon-like peptide-1 receptor agonist and a glucagon receptor antagonist. *J Biol Chem* 281: 12506–12515, 2006.
 23. Claus TH, Pan CQ, Buxton JM, et al. Dual-acting peptide with prolonged glucagon-like peptide-1 receptor agonist and glucagon receptor antagonist activity for the treatment of type 2 diabetes. *J Endocrinol* 192: 371–380, 2007.
 24. Parker JC, McPherson RK, Andrews KM, et al. Effects of skyrin, a receptor-selective glucagon antagonist, in rat and human hepatocytes *Diabetes* 49: 2079–2086, 2000.
 25. DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 58: 773–795, 2009.

