

Received: 15.02.2017
Accepted: 24.01.2018
Published: 17.05.2018

Dipeptydylopeptydaza IV – atrakcyjny cel do opracowywania skutecznych strategii terapeutycznych i diagnostycznych

Dipeptidyl peptidase IV: An attractive target for the development of effective diagnostic and therapeutic strategies

Agata Jackiewicz, Joanna Katarzyńska

Instytut Chemii Organicznej, Politechnika Łódzka

Streszczenie

Dipeptydylopeptydaza IV jest enzymem z klasy proteaz o aktywności zarówno katalitycznej, jak i wiążącej - zdolnym do wiązania białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Uczestniczy w metabolizmie glukozy, wpływa na motorykę przewodu pokarmowego i regulację apetytu, oddziałuje na funkcje układu immunologicznego oraz pośredniczy w powstawaniu bólu i stanów zapalnych. Różnorodność działania DPP IV, związana z szeroką ekspresją w tkankach nabłonkowych i śródbłónka sprawia, że enzym wydaje się obiecującym narzędziem do zastosowań diagnostycznych i prognostycznych. Naturalne inhibitory i substraty peptydowe DPP IV stały się inspiracją do poszukiwania nowych związków o znaczeniu terapeutycznym, selektywnie hamujących aktywność enzymu. Uzyskanie oczekiwanej skuteczności terapeutycznej wymagało wprowadzenia wielu zmian do struktury macierzystych cząsteczek celem polepszenia ich profilu farmakokinetycznego i farmakodynamicznego. Obecnie kilka związków określanych mianem gliptyn ma zastosowanie kliniczne w leczeniu cukrzycy typu 2. Niedawne badania wskazują, że inhibitory gliptynowe są obiektem wzrastającego zainteresowania ze względu na możliwość wykorzystania w terapii innych schorzeń, a także do projektowania nowych terapeutyków w chorobach nowotworowych, stanach zapalnych i zwyrodnieniowych, zaburzeniach metabolicznych i neurologicznych czy dysfunkcji układu odpornościowego.

Słowa kluczowe:

dipeptydylopeptydaza IV (DPP IV) • białko różnicowania dopełniacza 26 (CD26) • białko wiążące deaminyzę adenozyne (ADA) • inhibitory DPP IV • peptydomimetyki • gliptyny

Summary

DPP IV is a peptidase with a catalytic activity and the ability to bind extracellular matrix proteins. It participates in the metabolism of glucose, gastrointestinal motility, the regulation of appetite and affects the function of the immune system. It is also involved in the formation of pain and inflammation. The variety of activities due to extensive expression in endothelial and epithelial cells makes the enzyme a promising tool for diagnostic and prognostic applications. The natural DPP IV peptide inhibitors and substrates have inspired the search for new, therapeutically important compounds that selectively inhibit the enzyme activity. A number

of changes to the structure of the parent molecules have been required to improve their pharmacokinetic and pharmacodynamic profile to achieve therapeutic efficacy. The several synthetic scaffold mimetics, known as gliptins, are now in clinical use in the treatment of diabetes mellitus type 2. Recent studies indicate that gliptin inhibitors may be of therapeutic interest or inspiration for the development of new drugs for other diseases such as cancer, inflammatory, degenerative diseases, metabolic and neurological disorders or dysfunctions of the immune system.

Keywords: adenosine deaminase binding protein (ADAbp) • DPP IV inhibitors • peptidomimetics • gliptins

GICID 01.3001.0012.0538
DOI: 10.5604/01.3001.0012.0538
Word count: –
Tables: 4
Figures: 19
References: 94

Adres autorki: dr inż. Joanna Katarzyńska, Instytut Chemii Organicznej, Politechnika Łódzka, ul. S. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź; e-mail: j.katarzynska@outlook.com

Wykaz skrótów: **ADAbp** – białko wiążące deaminazę adenozy, **CSC** – nowotworowe komórki macierzyste, **GLP** – peptyd glukagonopodobny, **GIP** – glukozależny polipeptyd insulinotropowy, **FAPα** – białko aktywujące fibroblasty α, **IL** - ogólnie: interleukina, cytokina biorąca udział w odpowiedzi immunologicznej i procesach krwiotwórczych, **mysz NOD** – model do badań obciążony wysokim ryzykiem zachorowania na cukrzycę (od 4 tygodnia po urodzeniu pojawia się autoimmunologiczne zapalenie trzustki), **Mysz STZ** – model do badań obciążony cukrzycą indukowaną streptozotocyną, **NPY** – neuropeptyd Y, **PACAP** – polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylanową, **RANTES (CCL5)** – chemokina β syntetyzowana przez limfocyty T, wykazująca działanie prozapalne, **SDF-1** – czynniki pochodzenia stromalnego, chemokina CXCL12.

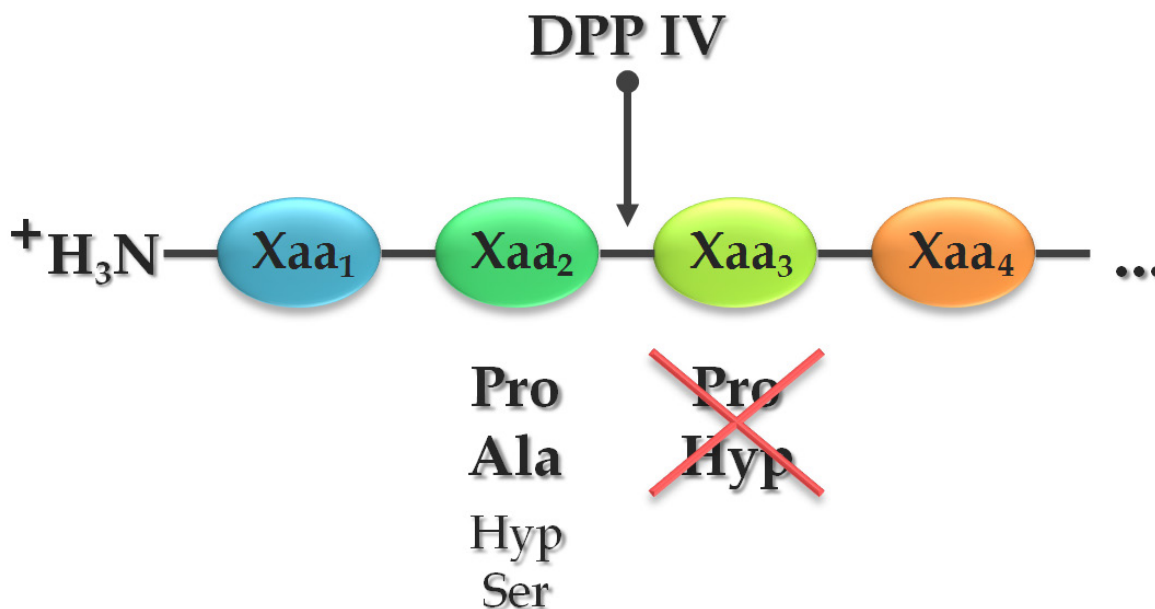
WPROWADZENIE

Proteazy są zaangażowane w wiele fizjologicznych procesów komórkowych, obejmujących m.in. wzrost, różnicowanie, odżywianie, programowaną śmierć komórek, uczestniczą też w migracji białek, diapedezie oraz w procesie zapłodnienia i zagnieżdżenia zygoty. Pośredniczą również w procesach patofizjologicznych, prowadzących do rozwoju zmian nowotworowych, neurodegeneracyjnych, chorób układu oddechowego, układu krążenia, infekcji pasożytniczych, wirusowych i grzybiczych. Ze względu na szerokie zaangażowanie w różnorodne procesy komórkowe, proteazy są interesującym celem terapeutycznym. Wynika to głównie z tego, że możliwe jest projektowanie oraz synteza ich swoistych inhibitorów. Inhibitory proteaz obejmują zarówno już stosowane, jak i potencjalne terapeutyki chorób nowotworowych, stanów zapalnych, zakażeń wirusowych (HIV, HCV), chorób układu sercowo-naczyniowego, układu oddechowego, odpornościowego, choroby Alzheimera czy cukrzycy typu 2 oraz 1 [83].

Najlepiej scharakteryzowaną rodziną proteaz są proteazy serynowe, badane od ponad pół wieku pod

względem właściwości chemicznych i fizycznych, mechanizmów działania, szlaków metabolicznych, a od ponad dekady również pod kątem ekspresji genetycznej. Znakomitym przykładem proteaz jest DPP IV, należąca do prolilooligopeptydaz, znana również jako białko różnicowania dopełniacza 26 (CD26) bądź białko wiążące deaminazę adenozy (ADAbp). Zidentyfikowano kilka proliloswoistych proteaz, ale w zastosowaniach klinicznych są obecnie jedynie inhibitory DPP IV.

DPP IV ulega ekspresji na powierzchni niemalże wszystkich komórek ssaków, bakterii, roślin i grzybów. W organizmie ludzkim można ją znaleźć w komórkach nabłonkowych wątroby, przewodu pokarmowego, jednak największą aktywność obserwuje się w nerwach [44]. Poza tym, rozpuszczalne izoformy DPP IV są obecne także w wielu płynach ustrojowych: ślinie, żółci oraz płynie nasiennym. Ekspresja DPP IV regulowana jest przez limfocyty B i T oraz komórki NK (natural killers), stąd zamienna nazwa i symbol CD26, podkreślające szczególną rolę tego białka w układzie immunologicznym [2].



Ryc. 1. Swoistość substratowa DPP IV - schemat (wg [3] zmodyfikowano)

CHARAKTERYSTYKA DPP IV

Dipeptydylopeptydaza IV (**di**peptidyl **pe**ptidase **IV**, DPP IV, EC 3.4.14.4) to ektoproteaza serynowa, zgodnie z klasyfikacją hydrolaz peptydowych należąca do rodziny oligopeptydaz proliłowych S9, podrodziny S9B [61]. Po raz pierwszy została opisana w 1966 r. przez Hopsu-Havu i Glennera jako glicyloproliło- β -naftyloamidaza użyteczna w procesie pozyskiwania amylazy I z wątroby szczura [4]. W literaturze występuje również jako białko wiążące deaminazę adenozyiny ADAbp (**a**denosine **d**eaminase **b**inding **p**rotein) oraz jako białko CD26 aktywujące limfocyty T [3].

Uwzględniając rodzaj aktywności enzymatycznej, DPP IV jest egzopeptydazą, a dokładniej aminopeptydazą, gdyż w wyniku hydrolizy odszczepia od N-końca substratu dipeptyd o budowie Xaa-Pro, Xaa-Ala lub rzadziej Xaa-Hyp bądź Xaa-Ser, przy czym resztą aminokwasu poprzedzającego nie może być ani reszta Pro, ani reszta Hyp (ryc. 1). Naturalnymi substratami enzymu są bioaktywne peptydy, pełniące funkcje chemokin, hormonów oraz neuromodulatorów. Tak wiele różnorodnych substratów wskazuje na plejotropową funkcję DPP IV w organizmie [3,81].

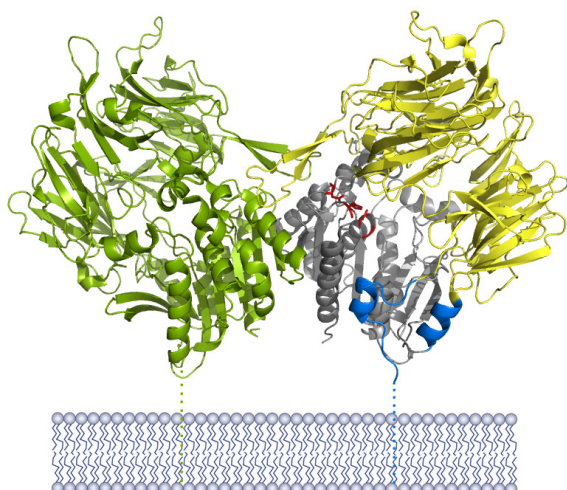
Ekspresja DPP IV występuje niemal we wszystkich tkankach organizmu ludzkiego. Ludzki gen DPP IV znajduje się na dłuższym ramieniu chromosomu 2 (2q24.3), obejmuje około 70 kb, składa się z 16 eksonów oraz domen wiążących czynnik transkrypcyjny genów konstytutywnych. Mimo zidentyfikowania pojedynczego mRNA DPP IV, stwierdzono znaczną niejednorodność białka, która

jest spowodowana prawdopodobnie modyfikacjami potranskrypcyjnymi. Po biosyntezie DPP IV zawiera liczne jednostki glikozyłowe i stanowi integralną część typu II błony komórkowej. Mechanizm uwalniania DPP IV z błony jest nieznan, choć przyjmuje się, że odbywa się za pośrednictwem proteolizy poczynawszy od reszty seryny 39 (Ser39). Naturalna, rozpuszczalna DPP IV występuje w postaci dimerycznej o masie cząsteczkowej 220-240 kDa [1].

STRUKTURA PRZESTRZENNA DPP IV

Funkcjonalny enzym zwykle jest zakotwiczony w błonie komórkowej dzięki transmembranowym odcinkom o strukturze helikalnej, znajdującym się na N-końcach łańcuchów polipeptydowych dwóch podjednostek. Fragment zewnątrzkomórkowy każdej z podjednostek jest zbudowany z 766 reszt aminokwasowych i obejmuje dwie domeny: domenę α/β (reszty aminokwasowe 506-766) o aktywności hydrolazy peptydowej (domena katalityczna) i ośmiocłonową domenę β (reszty aminokwasowe 55-497) o strukturze przypominającej śmigło (domena wiążąca), w której każdy człon – „łopatka”, tworzony jest przez cztery naprzeciwległe arkusze β (ryc. 2) [3,81].

Centrum aktywne enzymu współtworzą reszty aminokwasowe obu domen, a trzy najważniejsze, tworzące triadę katalityczną, czyli reszty Ser630, Asp708 oraz His740, należą do domeny α/β . Są ulokowane w miejscu „ostrego” skreślenia łańcucha polipeptydowego zlokalizowanego w przestrzeni między obydwoma domenami enzymu. Miejsce to jest określane mianem „nukleofilo-



Ryc. 2. Homodimeryczna struktura DPP IV zakotwiczona w błonie cytoplazmatycznej z zaznaczonymi domenami α/β (kolor szary) i β (kolor żółty) oraz triadą katalityczną (kolor czerwony) (wg [80] zmodyfikowano)

wego łokcia” (nucleophile elbow), ponieważ wszystkie trzy tworzące go reszty aminokwasowe zawierają nukleofilowe grupy funkcyjne łańcuchów bocznych, bezpośrednio odpowiedzialne za funkcję katalityczną enzymu. Substrat może dotrzeć do centrum aktywnego DPP IV bądź przez tunel o średnicy 15 Å, utworzony przez skrzydła domeny β bądź przez szczelinę o szerokości około 21 Å, która znajduje się między obiema domenami i umożliwia dostęp większym polipeptydom. Rozmiar substratu mogącego ulec hydrolizie zależy od jego struktury trzeciorzędowej. Znane są np. polipeptydy zbudowane z ponad 80 reszt aminokwasowych, będące substratami DPP IV [2,81].

BUDOWA CENTRUM AKTYWNEGO DPP IV

Swoistość substratowa, jak również możliwość inhibicji DPP IV, są związane z budową centrum aktywnego, a właściwie obecnością w jego obrębie określonych reszt aminokwasów katalitycznych i wiążących, tworzących trzy kieszenie: S1, S2 i S3 [10,33,70].

Silnie hydrofobową kieszeń S1, oprócz reszt aminokwasowych triady „nukleofilowego łokcia”, tworzą Tyr631, Val656, Trp659, Tyr662, Tyr666 oraz Val711. Utworzona wnęka, umożliwiająca idealne wpasowanie pierścienia pirolidynowego reszty proliny obecnej w substracie, jest dodatkowo stabilizowana przez oddziaływania typu stacking z równolegle ułożonym pierścieniem aromatycznym Tyr662 oraz prostopadle ulokowanym pierścieniem Tyr666. W przestrzeń kieszeni S1 możliwe jest również wpasowanie innych reszt aminokwasowych o niewielkich rozmiarach, a mianowicie Hyp, Ala, Ser i Gly, jednak nie jest ono tak optymalne jak w przypadku Pro. Wiązanie amidowe reszty Pro umiejscowionej w kieszeni S1 z resztą aminokwasu poprzedzającego występuje w konfiguracji trans. Łańcuchy boczne reszt aminokwasowych,

zarówno poprzedzającej (Xaa1) oraz występującej bezpośrednio za Pro (Xaa3), nie oddziałują z białkiem enzymatycznym, co tłumaczy niemal całkowitą dowolność sekwencyjną substratu w tych pozycjach. Jedyne ograniczenie to to, że w pozycji Xaa3 nie może występować amina drugorzędowa, czyli reszta proliny oraz hydroksyproliny. Dla czynności katalitycznej DPP IV ważna jest również obecność wolnej i protonowanej grupy aminowej na N-końcu substratu. Oddziałuje z diadą Glu205 i Glu206 (kieszeń S2), a także grupą hydroksylową Tyr662 (kieszeń S1). Oznacza to, że rozpoznanie N-terminalnej części substratu determinuje jego odpowiednie umiejscowienie w centrum aktywnym, a tym samym selektywność substratową i jest warunkiem następczej hydrolizy prowadzącej do odszczepienia właściwego dipeptydu. Natomiast z punktu widzenia możliwości inhibicji DPP IV, ważną rolę odgrywa obecność trzeciej kieszeni S3, tworzonej przez reszty Val207, Ser209, Arg358 oraz Phe357, która nie występuje w strukturze żadnej ze spokrewnionych ewolucyjnie z DPP IV peptydaz prolinowych. Należy więc oczekiwać, że związek, który mógłby wypełnić kieszeń S3, będzie bardzo skutecznym i selektywnym inhibitorem DPP IV. Warto dodać, że żaden z naturalnych substratów enzymu nie wiąże się z tym fragmentem enzymu [10,33,70].

NATURALNE SUBSTRATY DPP IV

W organizmie ludzkim zidentyfikowano wiele peptydów i białek, które mogą być substratami DPP IV. Jak już wspomniano, pełnią funkcje chemokin, hormonów oraz neuromodulatorów [3] (tabela 1).

Naturalne substraty DPP IV z grupy chemokin

Wśród zidentyfikowanych substratów enzymu najliczniejszą grupę tworzą chemokiny – białka uczestniczące w procesach migracji komórek układu odpornościowego poprzez wiązanie się z odpowiednimi receptorami obecnymi bądź na ich powierzchni lub na powierzchni komórek nabłonkowych narządów. Niejednokrotnie N-terminalny fragment cząsteczki chemokiny jest konieczny do wystąpienia ważnych oddziaływań ligand-receptor [3,51].

Chemokiną, wobec której DPP IV wykazuje najwyższą selektywność, jest czynnik pochodzenia stromalnego 1 SDF-1 (stromal derived factor-1, CXCL12). SDF-1 jest chemoatraktantem dla spoczynkowych limfocytów T i monocytów, odpowiadającym za prawidłowy rozwój komórek krwiotwórczych. W chwili odłączenia N-końcowego dipeptydu, białko SDF-1 traci aktywność biologiczną z powodu zaniku zdolności oddziaływania z receptorem CXCR4. Udostępnienie niezwiązanego receptora CXCR4 dla innych ligandów może być w tym przypadku wyjątkowo niebezpieczne, gdyż zwiększa możliwość zainfekowania komórek układu odpornościowego jedną z odmian ludzkiego wirusa upośledzenia odporności – HIV-1, który na etapie wnikania do komórki gospodarza wykorzystuje CXCR4 jako koreceptor [26,60].

Tabela 1. Wybrane naturalne substraty DPP IV

Peptyd / Białko	Liczba aminokwasów	N-terminalna sekwencja
Chemokiny		
SDF-1 (CXCL12)	68	KP↓VSL-
RANTES (CCL5)	68	SP↓YSSD-
MDC (CCL22)	69	GP↓YG↓AN-
Eotaksyna (CCL11)	74	GP↓ASVP-
IP-10 (CXCL10)	77	VP↓LSRT-
Neuromodulatory		
Neuropeptyd Y (NPY)	36	YP↓SKPD-
Substancja P (SP)	11	RP↓KP↓QE-
Endomorfina-1 (EM-1)	4	YP↓WF
Endomorfina-2 (EM-2)	4	YP↓FF
Hormony		
Peptyd YY (PYY)	36	YP↓IKPE-
GLP-1	30	HA↓EGTF-
GLP-2	35	HA↓DGSF-
GIP	42	YA↓EGTF-
PACAP	27 lub 38	HS↓DGIF-
VIP	28	DA↓VFTD-
GRH	44	YA↓DAIF-

↓ - hydrolizowane wiązanie peptydowe.

Drugą chemokina, której hydroliza z udziałem DPP IV ma wpływ na proces infekcji HIV-1, jest RANTES (**regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted**) – białko indukujące migrację limfocytów, monocytów, komórek dendrytycznych, eozynofiliów, bazofilów oraz komórek NK (**natural killer**). Utrata N-terminalnego fragmentu Ser-Pro zmniejsza zdolność oddziaływania chemokiny RANTES z receptorami CCR1 i CCR3, co znacznie osłabia jej wpływ na wymienione komórki. Jednocześnie jednak wzrasta powinowactwo białka względem receptora CCR5, stanowiącego drugi z koreceptorów wirusa HIV-1, czyniąc go niedostępnym dla patogenu [26,60].

MDC (**macrophage-derived chemokine**) to następna, po SDF-1, chemokina, wobec której DPP IV wykazuje bardzo dużą selektywność. W wyniku reakcji enzymatycznej są usuwane aż cztery N-końcowe aminokwasy białka w postaci dwóch dipeptydów o sekwencjach Gly-Pro i Tyr-Gly. MDC jest chemoatraktantem monocytów, komórek dendrytycznych, aktywowanych limfocytów oraz komórek NK, a w następstwie hydrolizy obserwuje się jedynie zmniejszenie aktywności biologicznej chemokiny, a nie jej zupełny zanik [60].

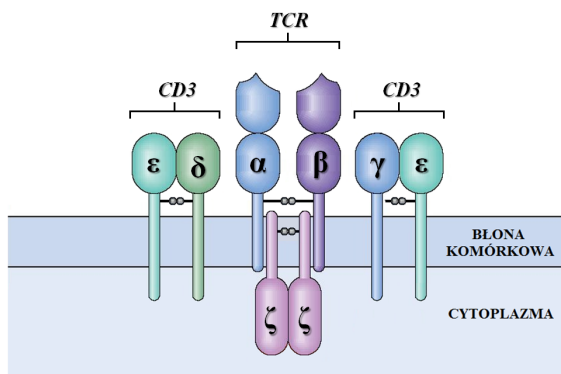
Innym przykładem chemokiny będącej substratem DPP IV jest eotaksyna, która wiążąc się z receptorem CCR3, występującym na powierzchni eozynofiliów i bazofilów, determinuje ich taksję w kierunku stanów zapalnych, wywołanych głównie reakcjami alergicznymi. Hydroliza

białka prowadzi do utraty jego aktywności biologicznej na skutek zaniku zdolności wiązania się z receptorem [3,31].

Natomiast w przypadku chemokiny IP-10 reakcja hydrolizy z udziałem DPP IV prowadzi do powstania produktu, który nadal wykazuje zdolność łączenia się z odpowiednim receptorem, jednak oddziaływanie to nie indukuje dalszej ścieżki sygnałowej. Tym samym białko nie może pełnić swej funkcji, polegającej na kierowaniu aktywowanych limfocytów T do miejsc zapalenia [3,18].

Naturalne substraty DPP IV z grupy neuromodulatorów

Najlepiej poznanym substratem DPP IV pełniącym funkcję neuromodulatora jest neuropeptyd Y (NPY). Uczestniczy w regulacji ciśnienia krwi, bierze udział w gospodarce energią oraz wpływa na lanknienie przez oddziaływanie z receptorami występującymi na powierzchni neuronów umiejscowionych w obrębie synapsy. Obecność receptorów NPY stwierdzono również na powierzchni komórek układu odpornościowego z grupy leukocytów, a jego wpływ na te komórki okazał się bimodalny. Oddziałując z komórkami prezentującymi antygen (antigen presenting cells, APC), NPY pobudza je do wytwarzania cytokin prozapalnych, natomiast wchodząc w interakcję z limfocytami T – wywołuje sekrecję cytokin przeciwzapalnych. Hydroliza peptydu prowadzi



Ryc. 3. Budowa kompleksu TCR (wg [16] zmodyfikowano)

do utraty jego całkowitej bądź częściowej zdolności wiązania z odpowiednimi receptorami [60,74].

Substrat DPP IV tworzy substancja P (SP), która uczestniczy w przekazywaniu sygnałów związanych ze skurczem mięśni gładkich, a także pełni funkcję immunoregulatora. Struktura N-terminalnej sekwencji peptydowej determinuje odcienie nie jednego, a dwóch dipeptydów o sekwencjach Arg-Pro i Lys-Pro, w wyniku czego powinowactwo SP względem receptora NK1 zmniejsza się [60].

Substratami DPP IV są również peptydy opioidowe, zwłaszcza dwa endogenne tetrapeptydy: endomorfina-1 (EM-1) i endomorfina-2 (EM-2), będące ligandami receptora μ opioidowego, których aktywność biologiczna przejawia się uśmierzaniem odczuwanego bólu [3]. Hydroliza peptydów opioidowych jest niepożądana z punktu widzenia możliwości zastosowania ich jako potencjalnych analgetyków. Wystarczy wspomnieć, że katalizowana przez DPP IV degradacja endomorfina w organizmie zachodzi wyjątkowo szybko – nawet w ciągu 1 minuty może dojść do całkowitego zaniku ich aktywności [72].

Naturalne substraty DPP IV z grupy hormonów

DPP IV odgrywa istotną rolę w inaktywacji bioaktywnych peptydów należących do nadrodziny PACAP/glukagon. Obejmuje dziewięć hormonów peptydowych, spośród których sześć to substraty enzymu. Są to:

- glukagonopodobny peptyd-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1);
- glukagonopodobny peptyd-2 (glucagon-like peptide-2, GLP-2);
- glukozależny polipeptyd insulinotropowy (glucose-dependent insulinotropic polypeptide lub gastric inhibitory peptide, GIP);
- polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylatową (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, PACAP);
- wazoaktywny peptyd jelitowy (vasoactive intestinal peptide, VIP);

- hormon uwalniający hormon wzrostu (growth hormone-releasing hormone, GRH).

Umieszczenie oraz funkcja poszczególnych hormonów w organizmie są różnorodne. Każdy z wymienionych peptydów oddziałuje ze swoistym dla siebie typem receptora, a zdolność interakcji i tym samym aktywność biologiczna, zanikają w chwili hydrolizy katalizowanej przez DPP IV [60,77].

Opisane wyżej bioaktywne peptydy i białka to wybrane przykłady cząsteczek zidentyfikowanych dotychczas jako naturalne bądź potencjalne substraty DPP IV. Część polipeptydów poddanych badaniom biologicznym nie wykazuje podatności na działanie enzymu w warunkach *in vitro*, mimo obecności reszty Pro lub Ala w przedostatniej pozycji łańcucha peptydowego. Nie oznacza to oczywiście, że *in vivo* nie ulegają hydrolizie [3]. Jest wiele substratów DPP IV wciąż niedokładnie poznanych. Nie tak dawno ustalono chociażby, że substratami dipeptydylopeptydazy mogą być tzw. peptydy bogate w prolinę PRP (proline rich peptides), jak również agregujące peptydy amyloidu β (A β) [4].

FUNKCJE DPP IV W ORGANIZMIE

Ze względu na wielość substratów oraz możliwość wiązania na swej powierzchni dodatkowych białek, DPP IV przypisuje się wiele funkcji w organizmie, z czego nie wszystkie zostały jeszcze dokładnie poznane.

Rola DPP IV w regulacji stężenia glukozy we krwi

DPP IV bierze udział w regulacji stężenia glukozy we krwi przez hydrolizę dwóch peptydowych hormonów inkretynowych, GLP-1 i GIP. Inkretyny są wydzielane przez komórki jelita w odpowiedzi na spożycie pokarmu i powodują zwiększone, posiłkowe wydzielanie insuliny, zmniejszając stężenie glukozy we krwi. Inaktywacja GLP-1 i GIP następuje w wyniku hydrolizy przez DPP IV już po około 2 minutach od chwili ich wydzielania. GLP-1 jest zdolny do przenikania bariery krew-mózg. Ponadto, pobudzając odpowiednie receptory, zmniejsza apetyt oraz zwiększa uczucie sytości, wpływa na motorykę jelit i wydzielanie soku żołądkowego oraz promuje przeżycie komórek β trzustki w warunkach stresu metabolicznego. Ustalono, że hamowanie aktywności enzymu wydłuża czas aktywności GLP-1 i GIP, co jest niezwykle korzystnym i pożądanym efektem w terapii cukrzycy typu 2 (choroba charakteryzuje się m.in. odpornością tkanek obwodowych na działanie insuliny i/lub niedoborem insuliny na skutek defektu jej sekrecji). Do tej pory opracowano wiele syntetycznych inhibitorów DPP IV, tzw. gliptyn, spośród których część jest już dostępna na rynku farmaceutycznym [34]. Wybrane z nich zostaną omówione w dalszej części pracy.

Rola DPP IV w funkcjonowaniu układu immunologicznego

Ważną funkcją DPP IV jest udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej z wykorzystaniem zarówno aktywności katalitycznej enzymu, jak i jego właściwości wiązania

innych białek. Katalityczna aktywność DPP IV w regulowaniu odpowiedzi immunologicznej może się przejawiać, m.in. przez hydrolizę bioaktywnych peptydów i białek (SDF-1, RANTES, MDC, eotaksyna czy NPY), związanych z układem odpornościowym. Właściwości wiążące enzymu umożliwiają jego oddziaływanie z kolagenem oraz fibronektyną, będącymi składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej ECM (extracellular matrix), dzięki czemu modulowany jest proces migracji limfocytów [32,81]. Ponadto, DPP IV wykazuje zdolność wiązania deaminazy adenozy (ADA), czym przyczynia się do nasilenia proliferacji limfocytów T. ADA katalizuje przekształcenie cząsteczki adenozy w inozynę, zmniejszając tym samym zewnątrzkomórkowe stężenie adenozy, która hamuje proliferację limfocytów [37]. Jednak główną funkcją DPP IV w odpowiedzi obronnej organizmu na działanie patogenów wydaje się indukcja sygnału kostymulującego, prowadząca do aktywacji komórek T układu odpornościowego [3].

Udział DPP IV w aktywacji limfocytów T

Jak już wspomniano, glikoproteina DPP IV oznaczana symbolem CD26, występuje na powierzchni komórek układu immunologicznego. Pierwotnie była określana jako antygen różnicowania komórek T, obecnie otrzymała miano markera aktywacji limfocytów T. W niewielkiej ilości znajduje się na powierzchni spoczynkowych limfocytów T, natomiast liczba limfocytów niosących CD26, jak i liczba cząsteczek białka na ich powierzchni, wyraźnie wzrastają w wyniku aktywacji komórek układu odpornościowego. Ponadto, CD26 pojawia się także na powierzchni aktywowanych limfocytów B oraz komórek NK [37].

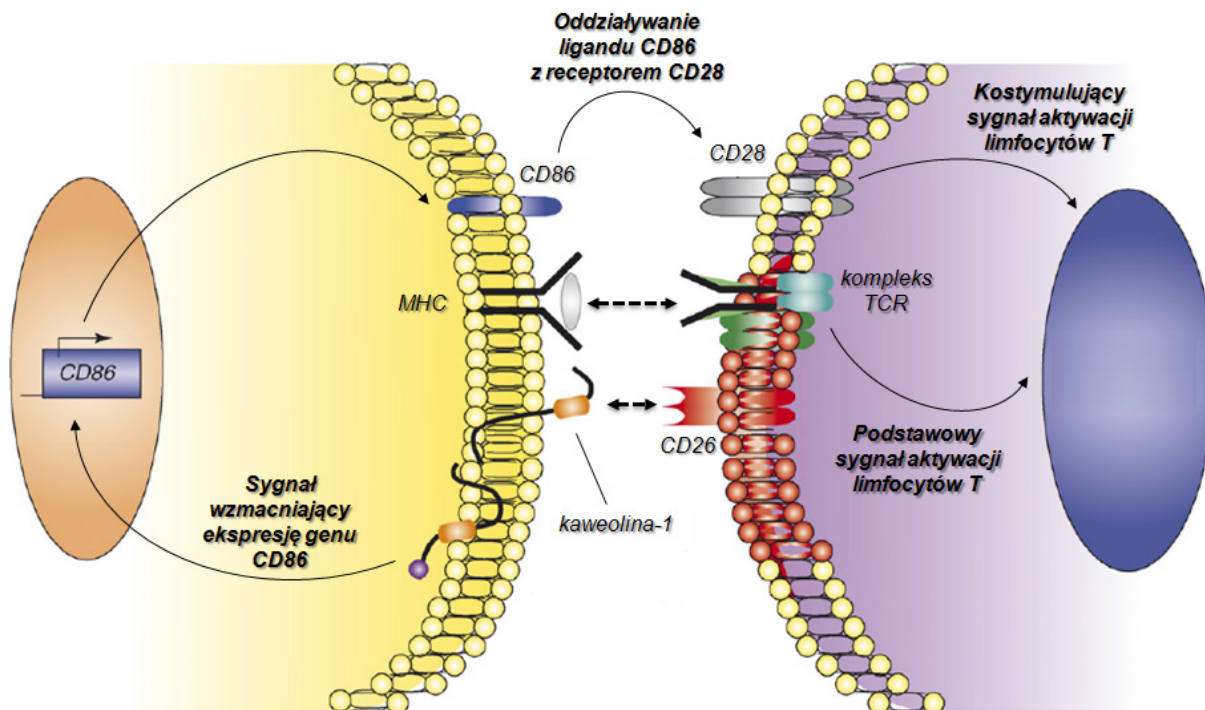
DPP IV (CD26) pełni funkcję kostymulatora aktywacji limfocytów T, indukując dodatkowy sygnał komórkowy wzmacniający sygnał podstawowy. Główny szlak sygnałowy, aktywujący limfocyty T, inicjuje rozpoznanie antygeny prezentowanego na powierzchni komórki APC. Antygen, najczęściej będący krótkim polipeptydem (8–18 reszt aminokwasowych), zostaje umieszczony przez APC na cząsteczce głównego układu zgodności tkankowej MHC (major histocompatibility complex) i w tej postaci jest rozpoznawany przez kompleks TCR (T-cell receptor) obecny na powierzchni limfocytu T. W skład kompleksu TCR wchodzi receptor (zbudowany z łańcuchów α i β), koreceptory CD3 oraz łańcuchy ζ (ryc. 3). W chwili rozpoznania antygeny, inicjowane są wewnątrzkomórkowe reakcje, które uaktywniają odpowiednie czynniki transkrypcyjne. W aktywowanej komórce T zachodzi ekspresja licznych białek powierzchniowych (tzw. markerów aktywacji limfocytów), których obecność umożliwia przeprowadzenie ataku na komórki patogenu [37,59].

Dokładny mechanizm generowania sygnału kostymulującego przez DPP IV (CD26) nie został jeszcze całkowicie wyjaśniony. Dowiedziono jednak, że indukcja sygnału przez enzym wymaga utworzenia kompleksu TCR-antygen-MHC. Obecność dodatkowego sygnału intensyfikuje

odpowiedź limfocytu T na antygen przez zwiększenie sekrecji cytokin, nasilenie proliferacji i zapoczątkowanie różnicowania w kierunku komórek efektorowych oraz stymulowanie ich migracji do tkanek docelowych. Wzmacnia również sygnały aktywujące limfocyty B oraz limfocyty T cytotoksyczne CTL (cytotoxic T lymphocytes) [37,66]. Sugeruje się, że DPP IV (CD26) oddziałuje z innym białkiem powierzchniowym CD45, wykazującym aktywność fosfatazy tyrozynowej, co może skutkować regulacją CD45 przez DPP IV (CD26). Fosfataza tyrozynowa odgrywa ważną rolę w transdukcji sygnałów komórkowych prowadzących do aktywacji limfocytów T, katalizując defosforylację wewnątrzkomórkowych fragmentów koreceptorów CD3 oraz łańcuchów ζ kompleksu TCR [24,37].

Ohnuma i wsp. zaproponowali mechanizm procesu wspomagającego aktywację komórek T, zakładający oddziaływanie DPP IV (CD26) z zewnątrzkomórkowym, N-terminalnym fragmentem cząsteczki kaweoliny-1 – transbłonowego białka, prawdopodobnie obecnego w błonie cytoplazmatycznej komórek APC [66]. W wyniku tych oddziaływań kaweolina-1 ulega hydrolizie, a to uruchamia szlak sygnałowy wewnątrz komórki prezentującej antygen, powodujący nasilenie ekspresji CD86. CD86 jest białkiem powierzchniowym komórek APC oraz ligandem receptora CD28 limfocytów T, a ich oddziaływanie indukuje sygnał stymulujący aktywację komórek T (ryc. 4) [66].

Badania wyjaśniające funkcjonowanie DPP IV (CD26) w układzie odpornościowym jako kostymulatora trwają nadal. Pewne jest, że CD26 promuje aktywację limfocytów T i przyczynia się do odpowiedzi zapalnej organizmu. U pacjentów cierpiących na choroby o podłożu autoimmunologicznym, takie jak reumatoidalne zapalenie stawów, choroba Gravesa-Basedowa czy stwardnienie rozsiane, zidentyfikowano zwiększony poziom limfocytów T CD26+ w obrębie zaangażowanych tkanek. Z tego też powodu zwrócono uwagę na DPP IV (CD26) jako na potencjalny cel terapeutyczny w terapii chorób o podłożu autoimmunologicznym. Zarówno nieselektywne inhibitory DPP IV, jak i selektywne inhibitory supresji proliferacji komórek T DP8/DP9 hamują proliferację komórek T splenocytów mysich stymulowanych mitogenem i to zarówno myszy dzikich, jak i pozbawionych genu. Selektywne inhibitory enzymu DPP IV stosowane w monoterapii nie wykazują tego rodzaju hamującej aktywności. Traktując myszy NOD agonistycznymi inhibitorami receptora Toll-podobnego typu 2 (TLR2) i inhibitorami DPP IV, można zwiększyć masę β komórek bez zmiany proporcji regulatorowych komórek T i komórek pomocniczych T oraz makrofagów [14,23,65]. Zastosowanie syntetycznych inhibitorów DPP IV (Lys[Z(NO2)]-pirolidyny, Lys[Z(NO2)]-tiazolidyny oraz Ala-Pro-nitrobenzylhydroksyloaminy) przyniosło pozytywne rezultaty w badaniach przeprowadzonych na modelach zwierzęcych w reumatoidalnym zapaleniu stawów, stwardnieniu rozsianym oraz terapii zapobiegającej odrzuceniu przeszczepów [66].



Ryc. 4. Schemat powstawania kostymulującego sygnału aktywacji limfocytów T, zaproponowany przez Ohnuma i wsp. [66]

Rola DPP IV w funkcjonowaniu układu psychoneuroendokrynnego

Wiele różnorodnych substratów DPP IV, obejmujących m.in. bioaktywne peptydy z grup neuromodulatorów i hormonów, wskazuje na znaczenie enzymu w funkcjonowaniu układu psychoneuroendokrynnego [17]. Analiza aktywności DPP IV niezwiązanej z błoną komórkową, obecnej w surowicy krwi u osób cierpiących na choroby o podłożu psychicznym oraz psychosomatycznym wykazała istotne różnice w wartościach w porównaniu z osobami zdrowymi [28,42].

U pacjentów, u których zdiagnozowano głęboką depresję obserwowano znacznie obniżoną aktywność enzymu. Maes i wsp. [58] uważali, iż mogło to być przyczyną zaburzeń układu immunologicznego, które towarzyszą chorobie i przejawiają się wystąpieniem stanów zapalnych, nawet w odpowiedzi na stres psychiczny. Cytokiny prozapalne, takie jak IL-1 β i IL-6, są potencjalnymi substratami DPP IV, a obniżone tempo ich degradacji może być przyczyną występowania odczynów zapalnych [58].

Natomiast zwiększoną aktywność enzymu obserwowano u osób cierpiących na zaburzenia odżywiania o podłożu psychicznym, takie jak anoreksja i bulimia. Uwagę lekarzy zwrócił fakt, iż mimo niedożywienia, organizm osoby chorej pozostawał immunokompetentny, a podwyższoną aktywność DPP IV podaje się jako możliwe wyjaśnienie tego zjawiska [43].

Opisane obserwacje zachęciły badaczy do rozważenia DPP IV jako potencjalnego markera diagnostycznego i/lub prognostycznego dla różnych zaburzeń neuropscychoiatrycznych. Stwierdzono bowiem, że jeśli zmiany w stężeniach DPP IV wpływają na aktywność neuropeptydów i hormonów zaangażowanych w regulację nastroju i zachowania, to DPP IV może być predyktorem objawów chorobowych. Może też być wskaźnikiem stanu pacjenta, ułatwiającym jego przypisanie do jednostki chorobowej według obowiązującej w psychiatrii klasyfikacji ICM-10 (International Classification of Diseases: tenth revision), która obecnie opiera się jedynie na kryteriach behawioralnych [7,28]. Brak mierzalnych parametrów biochemicznych utrudnia diagnozę psychiatryczną. Znane są np. przypadki nieprawidłowego rozróżniania schizofrenii dziecięcej i autyzmu [20]. W ostatnich latach zintensyfikowano badania nad etiologią autyzmu. Wykazano zmiany stężenia DPP IV w osoczu u osób autystycznych w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast znaczącej różnicy nie wykryto w surowicy [13]. Ustalono, że podwyższony poziom DPP IV pozytywnie korelował z problemami uwagi oraz agresywnymi i ekstremalnymi zachowaniami oszacowanymi według podskali CBCL (Child Behavior Check-list) [35].

Wiele prac dotyczących zaburzeń w autyzmie opisuje rolę peptydów pochodzących z rozkładu żywności (zwłaszcza z niekompletnej hydrolizy kazeiny i glutenu) w etiologii choroby [21,85]. Peptydy z pożywienia mogą się wiązać z DPP IV i indukować wytwarzanie przeciw-

ciał, inicjując w ten sposób autoimmunizację i permanentny stan zapalny w mózgu. Ponadto, przeciwciała anti-DPP IV mogą inaktywować enzym i doprowadzić do kumulacji gluteomorfin i kazomorfin w jelitach i przyczynić się do dysregulacji neuroimmunologicznej i nieprawidłowej neurotransmisji. Te same przeciwciała anti-DPP IV wykryto również w reumatoidalnym zapaleniu stawów, toczeniu rumieniowatym układowym, zawale mięśnia sercowego przy jednocześnie obniżonym poziomie niezwiązanego enzymu [85]. Hipoteza wpływu peptydów opioidowych na zaburzenia związane z autyzmem oraz autoimmunizacją ma zwolenników i przeciwników, bo doniesienia na temat stężeń niezwiązanego DPP IV, jak i jej ekspresji na powierzchni błony komórkowej są niejednoznaczne i wymagają dalszych badań.

Rola DPP IV w rozwoju nowotworów

Oddziaływanie z białkami (ADA, CD45), wiązanie składników ECM i proteolityczna degradacja wielu substratów wskazują na plejotropową funkcję DPP IV w organizmie, w tym na prawdopodobieństwo udziału w rozwoju chorób nowotworowych. Dokładna rola enzymu w procesie nowotworzenia nie została dotychczas wyjaśniona. Zależna od DPP IV regulacja proteolitycznego rozkładu ligandów peptydowych, jako cząstek sygnałowych, wpływa na promowanie bądź hamowanie wzrostu komórek. Dipeptydylopeptydaza IV wspomaga funkcjonowanie układu immunologicznego, a także, występując na powierzchni komórek zmienionych chorobowo, przyczynia się do kształtowania mikrośrodowiska rozwijającego się guza, na co ma również wpływ rodzaj i stężenie substratów w otoczeniu tego guza. Istotne znaczenie odgrywa ponadto umiejscowienie i typ komórek podlegających transformacji. Sugeruje się, że DPP IV ulega ekspresji głównie na powierzchni komórek z tzw. obszaru niedotlenienia, gdzie uczestniczy w degradacji neuropeptydu Y, odpowiedzialnego za aktywację receptorów uruchamiających proces angiogenezy [40,78].

W kilku typach nowotworów zaobserwowano utratę lub brak ekspresji DPP IV i jej ligandów w sąsiednich komórkach nowotworowych, co może być wyznacznikiem progresji i przerzutów. Ekspresja DPP IV jest np. obniżona w czerniaku, raku płuc, stercza i jelita grubego, a stopniowo maleje w gruczolakoraku endometrium. Przeciwnie działanie wykazano w innych typach nowotworów, takich jak: pierwotne nowotwory płuc, stercza, jajników, tarczycy, podstawnokomórkowy rak skóry, gruczolakorak przełyku, przewlekła białaczka komórek B oraz w niektórych rodzajach nowotworów limfocytów T (chłoniak limfoblastyczny i anaplastyczny czy ostra białaczka szpikowa) [6,15].

Wykazano znaczenie i udział DPP IV w oddziaływaniach komórek nowotworowych z pozakomórkowymi składnikami macierzy, które może zachodzić dzięki swojej strukturze przestrzennej enzymu - śmigła tworzącego domenę wiążącą, zdolną do oddziaływania z innymi

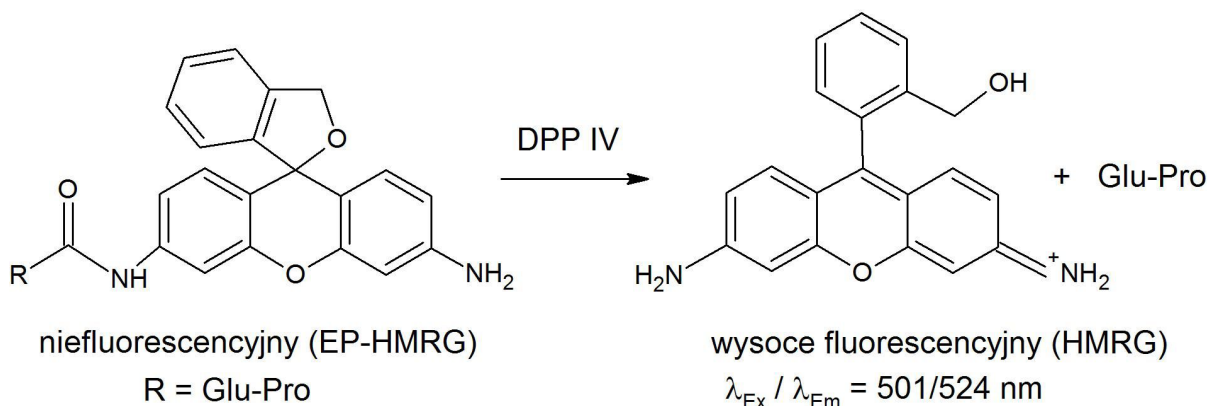
białkami (fibronektyną, kolagenem, deaminazą adenyzy). Warto przytoczyć przykład kompleksu DPP IV z plazminogenem II-(Pg2), który odpowiada za jednoczesną regulację stężeń Ca^{2+} , Na^+ , H^+ , warunkującą zmianę cytosolowego pH, w następstwie czego wyzwana jest kaskada przemian inicjujących proliferację i inwazję komórek nowotworowych stercza [36].

To, że istnieje związek między wysokim poziomem ekspresji DPP IV a opornością macierzystych linii komórkowych na stosowaną chemioterapię czy radioterapię, stwarza potencjalną możliwość zastosowania DPP IV jako narzędzia do identyfikacji CSC (cancer stem cells) w różnych typach nowotworów. DPP IV może być markerem CSC, ponieważ wpływając na własności macierzystych komórek nowotworowych, takie jak zdolność do tworzenia sfer i proliferacji oraz do inwazji i inicjowania nowotworzenia, pozwala zarazem ocenić ich oporność, jak i możliwość zaistnienia przerzutu do innych organów, a więc również nawrotu choroby. W związku z tym gliptyny i przeciwciała anti-CD26 mogą być alternatywą w terapii antynowotworowej tam, gdzie klasyczne leczenie nie przynosi spodziewanych rezultatów [25].

Reasumując, dotychczasowe badania wskazują, że DPP IV może pełnić funkcję biomarkera postępu choroby nowotworowej na dwa sposoby:

- jako supresor nowotworowy może służyć do badań przesiewowych oraz do oceny skuteczności leczenia,
- jako wyznacznik agresywności guza może pomagać w określaniu stopnia jego złośliwości, oceniając inwazyjność komórek rakowych, ujawnioną w postaci wzmożonej migracji (przerzutów).

Niestety, jak dotąd nie udało się określić jednoznacznych parametrów kwalifikujących się do klinicznych zastosowań diagnostycznych i prognostycznych. Przyczyny można upatrywać m.in. w braku wystandaryzowanych metod do pomiaru i ilościowego oznaczania aktywności enzymów i ekspresji białek (ważne są np. rodzaj użytych substratów, przeciwciał czy warunki prowadzonych oznaczeń, w tym pH, stosowane bufony itp.). Heterogeniczność dotychczasowych doświadczeń ogranicza ich tłumaczenie kliniczne. Poza tym, na co również zwraca uwagę wielu autorów, brak solidnych, dobrze zaprojektowanych, wielośrodkowych badań klinicznych dla dużych kohort badawczych utrudnia translację wyznaczanych parametrów jako klinicznie użytecznych w przewidywaniu postępu choroby. Małe grupy pacjentów i brak spójności metodologicznej to główne przeszkody utrudniające wyciągnięcie rzeczowych wniosków. Ponadto, wydaje się obecnie mało prawdopodobne, że DPP IV będzie miała zastosowanie jako pojedynczy biomarker, może jednak dostarczyć dodatkowych aplikacji do już istniejących i powstających markerów, zwłaszcza w odniesieniu do chorób zapalnych i nowotworowych [90].



Ryc. 5. Schemat działania sondy EP-HMRG [67]

SONDY MOLEKULARNE AKTYWOWANE DPP IV

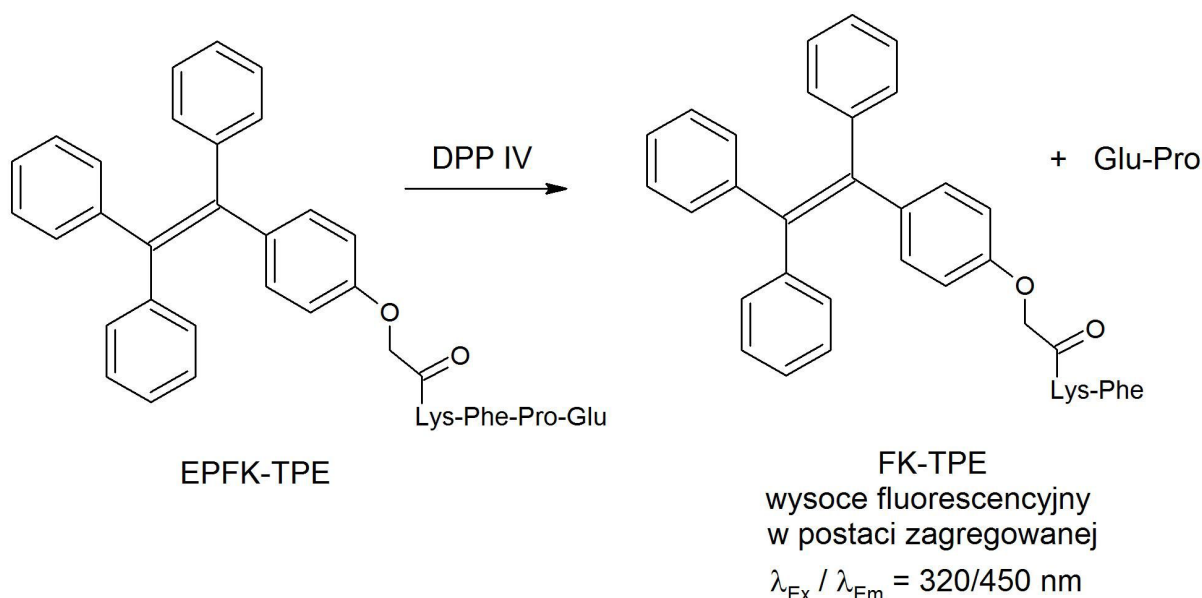
Z powodu szerokiego rozpowszechnienia w komórkach nabłonkowych wielu tkanek organizmu ludzkiego, w tym również układu pokarmowego są prowadzone badania oceniające potencjał aplikacyjny dipeptydylopeptydazy IV w diagnostyce zaburzeń chorobowych górnego i dolnego odcinka przewodu pokarmowego. Zmiany w przewodzie pokarmowym są niejednokrotnie trudne do wizualizacji za pomocą konwencjonalnej endoskopii, zwłaszcza w początkowej fazie rozwoju.

Podstawowe znaczenie ma zwłaszcza wykrywanie płaskonabłonkowego raka przełyku (ESCC, esophageal squamous cell carcinomas) na wczesnym etapie, gdyż stwarza możliwość wyboru minimalnie inwazyjnych, oszczędzających metod leczenia choroby. W diagnostyce ESCC stosuje się obecnie kilka technik endoskopowych, które mają jednak pewne ograniczenia. Na przykład chromoendoskopia lugolowa, o czułości, swoistości i dokładności diagnostycznej wynoszącej odpowiednio 94,2, 64,0 i 68,0%, może powodować dyskomfort (uczucie pieczenia przełyku), ryzyko skurczu oskrzeli, jak i reakcję alergiczną na jod. Dokładna diagnoza jest ponadto trudna ze względu na dużą zmienność wzorów, a to może spowodować zastawanie niepotrzebnych biopsji [69]. Natomiast technika obrazowania wąskopasmowego (NBI, narrow-band imaging) – w wąskim paśmie spektralnym światła widzialnego – oferuje nieinwazyjną obserwację z czułością, swoistością i dokładnością diagnostyczną odpowiednio 88,3, 75,2 i 77,0%. Jednak interpretacja wyników, ze względu na słaby kontrast między tkankami zdrowymi a chorobowo zmienionymi w świetle widzialnym, szczególnie przy powiększeniu, jest bardzo uzależniona od umiejętności i doświadczenia specjalisty prowadzącego badanie [46].

Obiecującym podejściem diagnostycznym wydaje się obecnie wizualizacja zmian nowotworowych oparta na fluorescencji. Onoyama i wsp. opracowali sondę fluorescencyjną do wczesnego wykrywania ESCC [67]. Sonda

wykorzystuje wspomnianą już wcześniej prawidłowość, że aktywność dipeptydylopeptydazy IV (DPP IV) jest podwyższona w wielu rodzajach tkanek nowo tworzących. Doniesienia literaturowe wskazują, że nadekspresja DPP IV występuje również w raku płaskonabłonkowym przełyku [9]. Sondę zaprojektowano w oparciu o strukturę hydroksymetylorodaminy (HMRG). Spośród zsyntezowanych połączeń wybrano analog spirocyklicznej postaci barwnika modyfikowany glutamylproliną (EP-HMRG) – dipeptydem łatwo odcinającym przez enzym. Związek EP-HMRG wykazywał najwyższe powinowactwo do DPP IV. Gdy został rozpylony podczas zabiegu endoskopowej dyssekcji podśluzówkowej (ESD, endoscopic submucosal dissection) na zmienioną chorobowo tkankę, guz był wizualizowany w ciągu 5 min, a gdy spryskano nim próbki pobrane podczas biopsji, czułość, swoistość i dokładność testu oszacowano na 96,9, 85,7 i 90,5%. Warto podkreślić, że wizualizacja tkanek nowotworowych była możliwa dzięki uwalnianiu na skutek katalizy enzymatycznej z udziałem DPP IV, wysocie fluorescencyjnego produktu hydrolizy – hydroksymetylorodaminy (HMRG, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 501/524 \text{ nm}$) (ryc. 5).

Metoda zaproponowana przez japońskich badaczy jest stosunkowo prosta i wygodna. Jej główną zaletą jest miejscowy sposób nanoszenia sondy w niskiej dawce (0,5 mg/jeden pacjent) oraz krótki czas trwania testu (5 min). Ma to niezaprzeczną zaletę w porównaniu do dotychczas używanych sond fluorescencyjnych, wstrzykiwanych dożylnie, które wymagają nie tylko większych dawek (0,1-0,3 mg/kg m.c.) oraz dłuższych okresów wykrywania (2-8 godzin), ale przede wszystkim odpowiednich testów bezpieczeństwa. Nowa sonda wydaje się niezwykle korzystna do rutynowych zastosowań klinicznych podczas badania endoskopowego, w tym kontroli przesiewowych. Szybka aktywacja fluorescencji umożliwia łatwe włączenie tej techniki do procedur chirurgicznych lub endoskopowych resekcji, np. do oceny marginesu chirurgicznego podczas ESD i operacji chirurgicznej. Prowadzone są dalsze badania oceniające bezpieczeństwo i biokinetykę sondy.



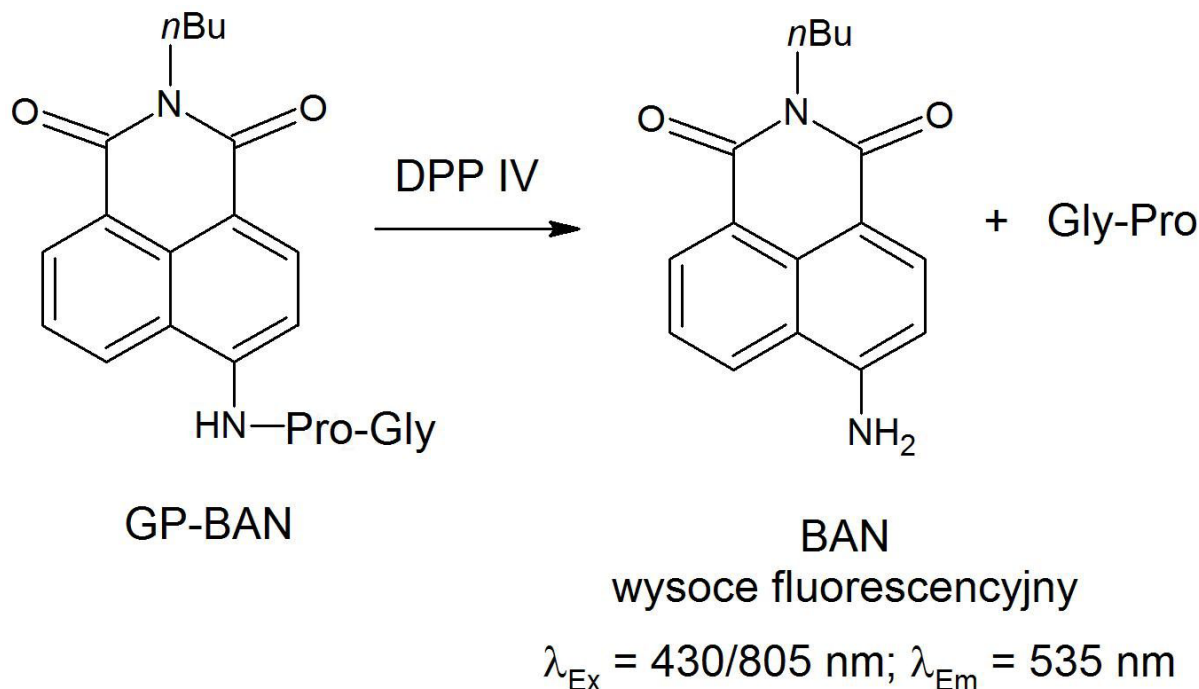
Ryc. 6. Schemat działania sondy EPFK-TPE [86]

Wang i wsp. opracowali sondę bazującą na matrycy tetrafenyletylenu (TPE), do którego dołączyli hydrofilowy peptyd Glu-Pro-Phe-Lys, stanowiący substrat dla DPP IV (enzym odcina dipeptyd Glu-Pro; ryc. 6) [54]. Wybór matrycy tetrafenyletylenowej był podyktowany właściwością cząsteczki TPE, która nie jest emisyjna w roztworze, ale staje się wysoce emisyjna w stanie zagregowanym. Oznacza to, że emisja TPE indukowana jest agregacją ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 320/450 \text{ nm}$). Przez wprowadzenie swoistego dla enzymu peptydu do rdzenia TPE, sonda opracowana przez chińskich badaczy wykazuje doskonałą czułość w wykrywaniu aktywności DPP IV zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, również dzięki łatwości przenikania przez warstwę fosfolipidową błony komórkowej. Może być z powodzeniem wykorzystana do pomiaru redukcji emisji fluorescencji w obecności inhibitorów DPP IV, co ułatwia badanie przesiewowe tej klasy leków w żywych komórkach.

Inne rozwiązanie do obrazowania aktywności DPP IV zaproponowali Zou i wsp. [94]. Opracowali sondę fluorescencyjną indukowaną przez dwufotonowe wzbudzenie falami IR, która wykazuje dużą selektywność, doskonałą swoistość i czułość. Większość sond fluorescencyjnych do monitorowania aktywności DPP IV bazuje na mikroskopii jednofotonowej. Technika ta pozwala wprawdzie na śledzenie aktywności DPP IV przez określanie intensywności sygnału fluorescencji, ale jednocześnie obserwowany sygnał, najczęściej zależny od stężenia sondy, może łatwo interferować z matrycą biologiczną i warunkami środowiskowymi. W przeciwieństwie do tradycyjnej mikroskopii jednofotonowej, zastosowanie sondy fluorescencyjnej indukowanej przez dwufotonowe wzbudzenie w zakresie spektralnym odpowiadającym bliskiej podczerwieni, prowadzi do zminimalizowania tła fluorescencji, czyli zwiększa rozdzielczość obrazowania,

gdyż światło podczerwone nie ulega tak silnemu rozpraszaniu. Ponadto, dwufotonowe sondy fluorescencyjne są mniej fototoksyczne oraz nie uszkadzają obrzeży próbki biologicznej, mogą też lepiej penetrować tkanki, dzięki czemu są bardziej odpowiednie do bioobrazowania w warstwach głębokich, jak i obrazowania 3D w systemach żywych.

Wrażliwość detekcji DPP IV w złożonych układach biologicznych w obecności innych hydrolaz autorzy osiągnęli dzięki skonstruowaniu struktury sondy opartej na właściwościach katalitycznych i preferencji substratowej enzymu (ryc. 7). Jako matrycę zastosowano N-butylo-4-amino-1,8-naftalimid (BAN) ze względu na jego pożądane właściwości fotofizyczne ($\lambda_{ex1}/(\lambda_{ex2}/\lambda_{em} = 430/805/535 \text{ nm})$). Następnie fluorofor zmodyfikowano dipeptydem Gly-Pro w celu uzyskania swoistości substratowej wobec DPP IV. Tak otrzymany związek okazał się idealnym do wykrywania DPP IV. Sonda GP-BAN jest bowiem szybko hydrolizowana w reakcji katalizowanej DPP IV z uwolnieniem barwnego produktu (BAN), co wywołuje znaczne zmiany w intensywności fluorescencji. Zarówno GP-BAN, jak i BAN wykazują doskonałe właściwości do dwufotonowego wzbudzenia pod wpływem światła podczerwonego, dzięki czemu otrzymuje się obraz o wysokiej rozdzielczości bez ingerencji matrycy biologicznej i fotozniszczenia żywej próbki. Otrzymana sonda swoista izoformowo została z powodzeniem wykorzystana do monitorowania rzeczywistej aktywności DPP IV w różnych próbkach biologicznych: płynach ustrojowych i żywych komórkach, w tym w mikrosomach nerek, jelita, wątroby, osoczu, a także w tkankach głębokich żywych komórek.



Ryc. 7. Schemat działania sondy GP-BAN [94]

Podsumowując, sondy fluorescencyjne aktywowane w oparciu o DPP IV są translatablewnymi, wygodnymi narzędziami do zastosowań klinicznych. Umożliwiają szybką i dokładną diagnozę wczesnych zmian chorobowych podczas zabiegów endoskopowych lub chirurgicznych. Wadą może być to, że sygnał fluorescencji w obrębie zmian nowotworowych nie zawsze jest jednolity, gdyż poziom ekspresji DPP IV może różnić się w zależności od stanu różnicowania się linii komórkowych, czy też zależeć np. od stopnia złośliwości lub inwazyjności nowotworu. Sondy te są ważnymi narzędziami do diagnostycznych zastosowań klinicznych.

INHIBITORY DPP IV

Zdecydowana większość znanych obecnie inhibitorów DPP IV to substancje syntetyczne o różnorodnej strukturze chemicznej. Powstały głównie z myślą o zastosowaniu w terapii cukrzycy typu 2. Obecnie na światowym rynku farmaceutycznym dostępnych jest kilkanaście związków będących inhibitorami DPP IV (w tym 5 zarejestrowanych w USA i Europie, pozostałe – w Japonii lub Korei), znacznie więcej znajduje się na różnych etapach badań klinicznych [10,12,27,29,48,57,70].

Jedną z najważniejszych cech inhibitora, zarówno z punktu widzenia jego zastosowania w terapii, jak i w badaniach naukowych, jest selektywność. W inhibitorach DPP IV ma wyjątkowo duże znaczenie, gdyż znanych jest wiele enzymów o sekwencji oraz budowie przestrzennej bardzo zbliżonych do budowy omawianego enzymu. Można wśród nich wymienić DPP 2 (DPP

7), DPP 6, DPP 8, DPP 9, białko aktywujące fibroblasty α FAP α (fibroblast activation protein α) czy oligopeptydazę proliową POP (prolyl oligopeptidase). Enzymy te ulegają ekspresji w wielu tkankach organizmu, a funkcja części z nich nie została jeszcze poznana. Niemniej jednak, wiele inhibitorów DPP IV wykazuje w mniejszym bądź większym stopniu zdolność wiązania się z kilkoma z wymienionych białek, co w terapii może spowodować różne działania niepożądane [10,70].

ENDOGENNE INHIBITORY PEPTYDOWE DPP IV

Peptydy pochodzenia endogenne, będące kompetycyjnymi inhibitorami DPP IV, należą do grupy hemorfin. Hemorfiny to atypowe peptydy opioidowe, powstałe w wyniku hydrolizy segmentu (32-41) łańcucha β ludzkiej hemoglobiny. Spośród nich selektywnymi inhibitorami enzymu są hemorfina-7 (Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe, H7) oraz VV-hemorfina-7 (Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe, VVH7). Zarówno H7 jak i VVH7 są substratami DPP IV, jednak ich hydroliza zachodzi znacznie wolniej w porównaniu do innych naturalnych substratów enzymu. Prawdopodobnie jest to związane z ich strukturą pierwszo- i drugorzędową, które sprawiają, że peptydy umiejscowione w centrum aktywnym przyjmują konformację uniemożliwiającą szybki przebieg reakcji enzymatycznej. Sugeruje się, że jest to wynikiem występowania oddziaływań między resztami Gln, Arg i Phe a resztami aminokwasów umiejscowionymi w kieszeni katalitycznej. H7 oraz VVH7 uznaje się za endogenne regulatory aktywności DPP IV [3,22].

EGZOGENNE INHIBITORY PEPTYDOWE DPP IV

Wśród egzogennych inhibitorów peptydowych DPP IV najbardziej znane są diprotyna A (Ile-Pro-Ile, $K_i = 2,2 \mu\text{M}$) oraz diprotyna B (Val-Pro-Leu, $K_i = 7,6 \mu\text{M}$), wyizolowane po raz pierwszy z przesączu po hodowli bakterii *Bacillus cereus* BMF673-RF1. Hydroliza obu tripeptydów, podobnie jak H7 i VVH7, przebiega bardzo wolno. Jest to związane z tworzeniem trwałego tetraedrycznego stanu przejściowego, w wyniku czego tripeptydowe łańcuchy przez dłuższy czas pozostają uwięzione w centrum aktywnym enzymu [3,84].

Innym przykładem inhibitora DPP IV jest białko Tat (transcription anti-termination protein), uczestniczące w transkrypcji genów wirusa HIV-1. Jest ono potrzebne do wystąpienia replikacji wirusowego genomu w warunkach *in vitro*. W 1994 r. Gutheil i wsp. po raz pierwszy dowiedli, że zbudowane z 86 reszt aminokwasowych białko Tat wykazuje wysokie powinowactwo do DPP IV, skutecznie obniżając proteolityczną aktywność enzymu [63]. Przypuszczano ponadto, że fakt wiązania Tat z DPP IV może tłumaczyć również jego właściwości immunosupresyjne, co potwierdzili Reinhold i wsp. dwa lata później [75]. Wprowadzenie białka Tat do hodowli komórek ludzkiego chłoniaka, wykazujących wysoki poziom ekspresji powierzchniowego CD26, w chwili ich aktywacji, zahamowało proces syntezy DNA i cytokin prozapalnych oraz wytwarzanie cytokin przeciwzapalnych. Podobne skutki obserwowano dla komórek jednójdrzastych krwi obwodowej, w tym limfocytów T. Obecność Tat nie miała natomiast żadnego wpływu na komórki ludzkiego chłoniaka wykazujące niski poziom ekspresji CD26 [75,88].

Dowiedziano również, że Tat obniża proteolityczną aktywność DPP IV także przy fizjologicznym stężeniu soli. Poszukiwania fragmentu białka odpowiedzialnego za właściwości inhibujące doprowadziły do wskazania N-terminalnej części Tat, złożonej z trzech reszt aminokwasowych Xaa-Xaa-Pro jako najważniejszej do zachowania aktywności. Analiza kilku innych peptydów, zawierających w strukturze wspomniany motyw, doprowadziła do wniosku, że zdolność inhibicji DPP IV jest także związana z długością łańcucha peptydowego, który do utrzymania właściwości inhibicyjnych musi być zbudowany z co najmniej 6 reszt aminokwasowych. W celu lepszego zrozumienia wpływu struktury N-koń-

cowego fragmentu Tat na zdolność i siłę hamowania DPP IV otrzymano wiele analogów nonapeptydu Tat(1-9) (tabela 2) [75,88].

Warto podkreślić, że zgodnie z pierwotnymi ustaleniami, dotyczącymi najbardziej optymalnej struktury inhibitora DPP IV, zarówno Tat(1-9), jak i jego analogi nie powinny wpasowywać się do centrum aktywnego enzymu z powodu obecności reszty Pro w pozycji 3 od N-końca, a nie 2. Niemniej jednak badania wykazują, że hamowanie aktywności DPP IV przez Tat(1-9) i jego analogi ma charakter kompetycyjny, co wskazuje, że ich interakcja z enzymem następuje w centrum katalitycznym bądź blisko niego. Analiza z wykorzystaniem komputerowego modelu centrum aktywnego DPP IV potwierdziła lokowanie Tat(1-9) ($K_i = 267 \mu\text{M}$) w miejscu aktywnym enzymu i wykazała wiele oddziaływań o charakterze hydrofobowym między peptydem a resztami aminokwasów tworzącymi kieszeń S1, w których uczestniczą reszty Met¹, Asp², Pro³, Val⁴ oraz Pro⁶. Zmiany sekwencji peptydowej przez substytucje reszt aminokwasowych w pozycjach 1 i 4 nie miały znaczącego wpływu na właściwości inhibujące Tat(1-9). Zastąpienie reszty Met¹ mniej rozbudowanymi przestrzennie resztami aminokwasowymi (Gly, Ala, Pro) nieznacznie zmniejszyło zdolności analogów do obniżania aktywności DPP IV, a substytucja reszty Val⁴ resztą Pro spowodowała niewielkie jej zwiększenie. Natomiast zastąpienie hydrofilowej, obdarzonej ładunkiem ujemnym reszty Asp⁵ hydrofobową resztą Ile spowodowało istotny spadek właściwości inhibujących Ile⁵-Tat(1-9). Przyczyną mogła być zmiana konformacyjna, uniemożliwiająca prawidłowe ułożenie analogu w kieszeni katalitycznej z powodu oddziaływań hydrofobowych łańcucha bocznego Ile⁵ z resztą Gly629 enzymu, co wykluczyło możliwość zaistnienia ważnych oddziaływań hydrofobowych między Pro³ a Tyr632 oraz Pro⁶ a Trp630 w centrum aktywnym enzymu. Podobnie wpływała substytucja reszty Pro⁶ przez Leu, jednak w tym przypadku nie obserwowano znaczącej zmiany konformacji przestrzennej Leu6-Tat(1-9). Za zanik zdolności hamowania aktywności DPP IV odpowiadał rozbudowany łańcuch boczny Leu, który był zawadą steryczną, powodującą negatywne interakcje z resztą Trp630 enzymu. Wzrost właściwości inhibujących uzyskano w przypadku substytucji reszty Asp² szeregiem innych reszt aminokwasowych, a mianowicie Pro, Gly, Lys, Phe, Ala oraz Trp, przy czym analog Trp²-Tat(1-9) wykazywał niemal całkowitą zdolność hamowania enzymu. Przyczyną tego było wystąpienie pozytywnych, hydrofobowych oddziaływań między resztą Trp² a resztami

Tabela 2. Najaktywniejsze analogi peptydu Tat(1-9) [25,90]

Nazwa peptydu	Sekwencja peptydu
Tat(1-9)	H-Met-Asp-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Ile-Glu-OH
Ile ⁵ -Tat(1-9)	H-Met-Asp-Pro-Val-Ile-Pro-Asn-Ile-Glu-OH
Leu ⁶ -Tat(1-9)	H-Met-Asp-Pro-Val-Asp-Leu-Asn-Ile-Glu-OH
Trp ² -Tat(1-9)	H-Met-Trp-Pro-Val-Asp-Pro-Asn-Ile-Glu-OH

Tabela 3. Przykładowe sekwencje hydrolizatów białkowych inhibujących DPP IV [29,57,86,94]

Substrat	Sekwencja peptydu
Żelatyna ze skóry łosia atlantyckiego	H-Gly-Pro-Gly-Ala-OH
	H-Gly-Pro-Ala-Gly-OH
Żelatyna ze skóry wieprzowej	H-Gly-Pro-Hyp-OH
	H-Gly-Pro-Ala-Gly-OH
Ser gouda	H-Leu-Pro-Gly-Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-OH
	H-Leu-Pro-Gly-OH
β-Laktoglobulina (główne białko mleka)	H-Ile-Pro-Ala-OH
	H-Ile-Pro-Ala-Val-Phe-OH
Białka mleka	H-Trp-Val-OH
Alga <i>Palmaria palmata</i>	H-Ile-Leu-Ala-Pro-OH

hydrofobowych aminokwasów kieszeni S1 centrum aktywnego DPP IV.

Analiza bioinformatyczna wykazała obecność N-końcowego motywu Met-Trp-Pro w sekwencji jednego z białek występujących w organizmie ludzkim – receptora tromboksanu A2 (TXA2-R). Znajduje się na powierzchni komórek APC, głównie monocytów, a topologia jego zewnątrzkomórkowego fragmentu wskazuje na możliwość oddziaływania receptora z cząsteczką DPP IV w chwili prezentacji antygeny. Dowiedziono, że N-terminalny nonapeptyd TXA2-R(1-9) ($K_i = 5,06 \mu\text{M}$) ma zbliżony stopień hamowania proteazy co Trp2-Tat(1-9) ($K_i = 2,12 \mu\text{M}$). Oznacza to, że receptor tromboksanu A2 jest endogennym regulatorem aktywności DPP IV, a także funkcji układu immunologicznego [87].

Ito i wsp. przeprowadzili skryning biblioteki dipeptydów, na podstawie którego ustalili, że DPP IV jest skutecznie hamowana przez dipeptyd Trp-Arg (ale nie przez sekwencję o odwróconym biegu łańcucha typu Arg-Trp), który budową nie naśladuje struktury substratu [41]. Ponadto kolejne badania dowiodły skuteczności inhibicyjnej triady Trp-Arg-Xaa (gdzie Xaa – dowolna reszta aminokwasowa), przy czym największymi zdolnościami do obniżania aktywności DPP IV cechowały się tripeptydy zawierające na C-końcu kwasowe reszty aminokwasowe – kwas glutaminowy i asparaginowy (Trp-Arg-Glu, Trp-Arg-Asp; $K_i = 130$ i $160 \mu\text{M}$ odpowiednio) [52]. Sugeruje się, że za obserwowane działanie inhibicyjne odpowiada głównie N-terminalna reszta tryptofanu, gdyż wpasowując się do kieszeni S2, przez hydrofobowe oddziaływania pierścieni aromatycznych, łączy się ściśle z resztą Phe357 enzymu. Dodatnio naładowana reszta argininy nie umiejscawia się w kieszeni S1, ale tworzy wiązania jonowe z resztami Glu205 i Glu206, które znajdują się obok Phe357, w wyniku czego zablokowana zostaje funkcja katalityczna DPP IV. Dodatkowe reszty kwasowe (Glu i Asp) w C-końcowym fragmencie peptydu odpowiadają za oddziaływania z dodatnio nałado-

waną resztą Arg125 enzymu, występującą obok Glu295 i Glu206 w kieszeni katalitycznej.

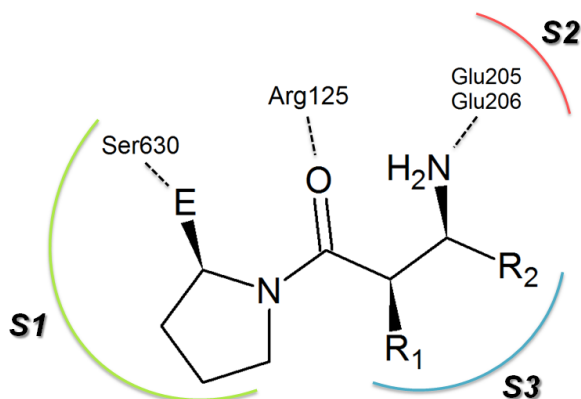
Niezależnie od badaczy z Japonii, Nongonierma i FitzGerald odkryli, że składnikami hydrolizatu białek mleka i nasion soi, odpowiedzialnymi za obniżanie aktywności DPP IV, są także peptydy z resztą tryptofanu w pozycji N-terminalnej [64]. Proces inhibowania dipeptydylopeptydazy przez hydrolizaty białkowe, pochodzące z typowych produktów spożywczych, jest obecnie tematem wielu badań (tabela 3) [39,45,73,91].

Większość peptydów uwzględnionych w tabeli 3, hamujących aktywność DPP IV, zawiera sekwencje zbudowane z 2-7 aminokwasów. Jednocześnie budowa prezentowanych inhibitorów odpowiada wymogom stawianym strukturze substratu DPP IV, co czyni z tych związków także potencjalne substraty enzymu. Pozwala to sądzić, że obniżanie aktywności DPP IV wynika głównie ze współzawodnicstwa wymienionych peptydów z endogennymi substratami (inhibicja kompetycyjna). Hydrolizaty peptydowe o dłuższych sekwencjach, zbudowane nawet z 50 reszt aminokwasowych, oddziałują natomiast z innymi fragmentami cząsteczki enzymu (inhibicja niekompetycyjna), m.in. z obszarami odpowiedzialnymi za dimeryzację. Tym samym uniemożliwiają połączenie podjednostek, co jest konieczne do wystąpienia aktywności proteolitycznej DPP IV.

Poszukiwanie inhibitorów DPP IV wśród hydrolizatów białkowych jest ważne z punktu widzenia schorzeń metabolicznych, np. otyłości, jak i innych chorób układu pokarmowego. Inhibitory DPP IV mogą zmniejszać apetyt, zapobiegając m.in. proteolizie NPY, zaangażowanego w regulację przyjmowania pokarmu: trawienie i wchłanianie [3].

WYBRANE SYNTETYCZNE INHIBITORY DPP IV

Peptydomimetyki



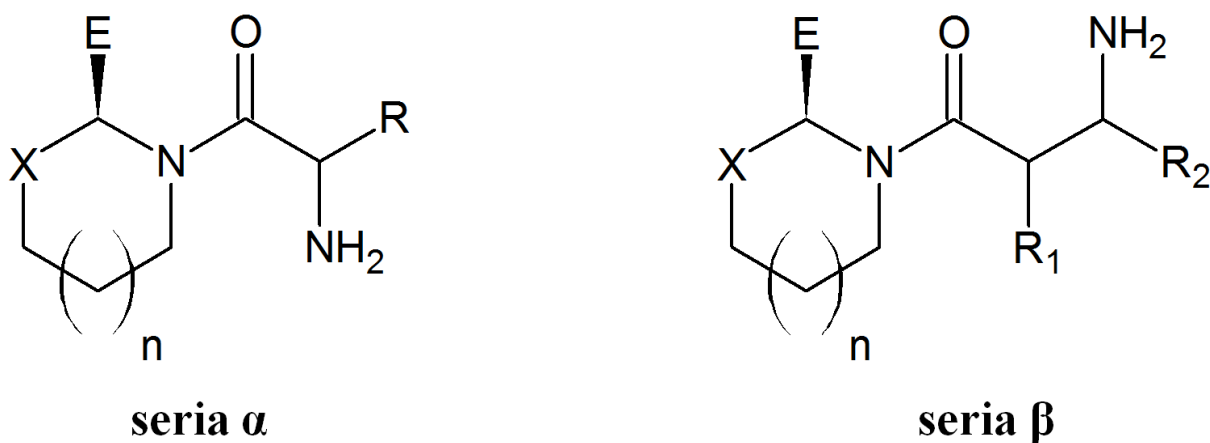
Ryc. 8. Schemat oddziaływań między resztami aminokwasów budujących centrum aktywne DPP IV a cząsteczką inhibitora z klasy peptydomimetyków; **S1, S2, S3** – kieszenie wiążące, **E** – podstawnik elektroakceptorowy (na podstawie [70])

Syntetyczne peptydomimetyki jako inhibitory DPP IV budową chemiczną naśladują naturalne substraty enzymu bądź ich fragmenty. Należy zauważyć, że otrzymanie takich inhibitorów chemicznie jest kłopotliwe ze względu na dużą tendencję sekwencji Xaa-Pro do cyklizacji i tworzenia odpowiednich dike-topiperazyn. Skłonność do cyklizacji jest wynikiem stosunkowo łatwej izomeryzacji cis-trans wiązania N-alkiloamidowego między drugorzędową grupą aminową reszty proliny i funkcją karboksylową reszty aminokwasu poprzedzającego. Procentowy udział konfiguracji cis wiązania Xaa-Pro jest około dwa rzędy wielkości wyższy w porównaniu do N-niealkilowanych wiązań peptydowych. Następstwem większej zawartości izomeru cis jest to, że N- i C-terminalne grupy – odpowiednio, aminowa i karboksylowa – są na tyle do siebie zbliżone, że cyklizacja typu „głowa do ogona” może zachodzić spontanicznie, często wykluczając wyodrębnienie oczekiwanego produktu liniowego. Stąd też poszukiwania cząsteczek naśladu-

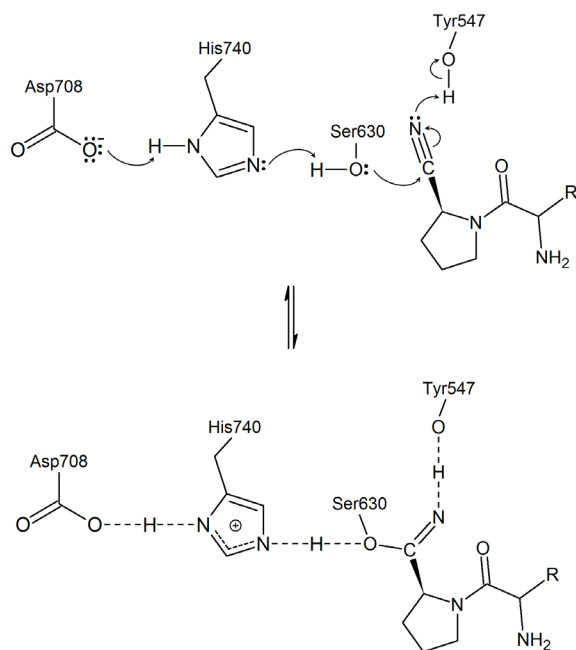
jących topografię produktów hydrolizy naturalnych substratów DPP IV, które nie ulegałyby reakcjom niepożądanym, a jednocześnie byłyby bardziej aktywne i selektywne w porównaniu do cząsteczek macierzystych [10,12,27,29,48,57].

Analiza struktury potencjalnego inhibitora DPP IV pod względem zdolności do hamowania aktywności enzymu wykazała, że oddziaływania jonowe między pierwszo- lub drugorzędową grupą aminową a resztami aminokwasowymi obecnymi w kieszeni wiążącej S2 (Glu205 i Glu206) oraz Tyr662 są kluczowe dla efektywnego oddziaływania enzym-inhibitor. Ponadto, obecność aromatycznych ligandów lub rozbudowanych grup alifatycznych w cząsteczce zwiększa jej powinowactwo do centrum aktywnego enzymu przez wystąpienie oddziaływań typu stacking lub oddziaływań hydrofobowych z resztami Phe357 (kieszona S3) i Tyr547. Poza tym, korzystne jest również wprowadzenie elektroujemnych podstawników do pierścieni aromatycznych, gdyż zwiększają prawdopodobieństwo interakcji z dodatnio naładowaną funkcją guanidynową łańcucha bocznego Arg358, tak jak i inkorporacja podstawników elektroakceptorowych do pierścienia piperolidyny, zdolnych do skutecznego wiązania z grupą hydroksylową Ser630 (ryc. 8). Natomiast problem selektywności inhibitorów w znacznym stopniu można rozwiązać przez zaprojektowanie cząsteczki, której fragment oddziałuje z resztami aminokwasów tworzących kieszeń wiążącą S3, nieobecną w strukturze pozostałych homologicznych enzymów [10,48,70].

W poszukiwaniu struktur o możliwie najwyższej stabilności oraz selektywności zsyntezowano i zbadano bardzo wiele potencjalnych inhibitorów. Uzyskano, m.in. wiele peptydomimetyków, które można zakwalifikować do serii α lub β . Ich wspólną cechą strukturalną jest obecność w strukturze 5-, niekiedy 6-członowych heterocyklicznych pierścieni: piperolidynowego, tiazolidynowego, ale również tiazolowego bądź piperidynowego, których zadaniem jest naśladowanie reszty Pro, zajmującej pozycję C-terminalną w odczepia-



Ryc. 9. Ogólna struktura chemiczna peptydomimetyków serii α i β ; **X** = C lub S, **n** = 0 lub 1; **E** – podstawnik elektroakceptorowy



Ryc. 10. Mechanizm odwracalnej reakcji katalitycznej reszty Ser630 z inhibitorem DPP IV z klasy pochodnych pirolidynonitryli

nym dipeptydzie. Otrzymane związki nie mają jednak funkcji karboksylowej, która czyniłaby z nich fragmenty skłonne do konkurencyjnej wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji. W istocie więc, uzyskane peptydomimetyki to drugorzędowe amidy odpowiednich aminokwasów. Peptydomimetyki serii α są amidami α -aminokwasów, natomiast peptydomimetyki serii β – amidami β -aminokwasów (ryc. 9) [70].

Przykłady peptydomimetyków serii α

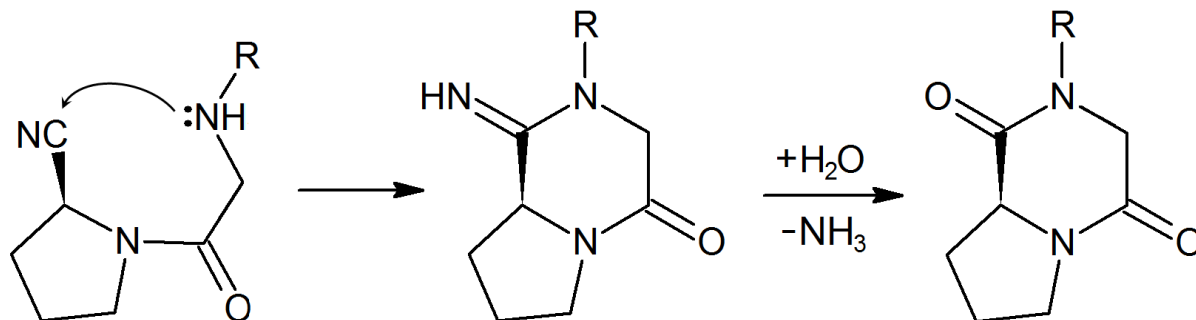
Badania zależności „struktura – aktywność biologiczna” wykazały, że skuteczny inhibitor DPP IV powinien zawierać w pierścieniu podstawnik elektronoakceptorowy, umożliwiający efektywne oddziaływanie z grupą hydroksylową katalitycznej reszty Ser630. Bazując na tej informacji otrzymano związki mające w pozycji dru-

giej pierścienia pirolidynowego grupę nitrylową, która w wyniku wolnej i odwracalnej reakcji z resztą Ser630 tworzy iminoeter (ryc. 10). Zwiększenie nukleofilowości grupy hydroksylowej seryny, konieczne do wystąpienia reakcji, następuje w wyniku jej deprotonacji z udziałem dwóch pozostałych reszt triady katalitycznej – Asp708 i His740. W stabilizacji powstałego kowalencyjnego kompleksu enzym-inhibitor uczestniczy również reszta Tyr547. Kompleks E-I charakteryzuje się niską stałą szybkości rozpadu, dlatego efekt hamowania aktywności enzymu utrzymuje się nawet po całkowitym usunięciu niezwiązanych cząsteczek inhibitora ze środowiska [10,12,27,29,48,57].

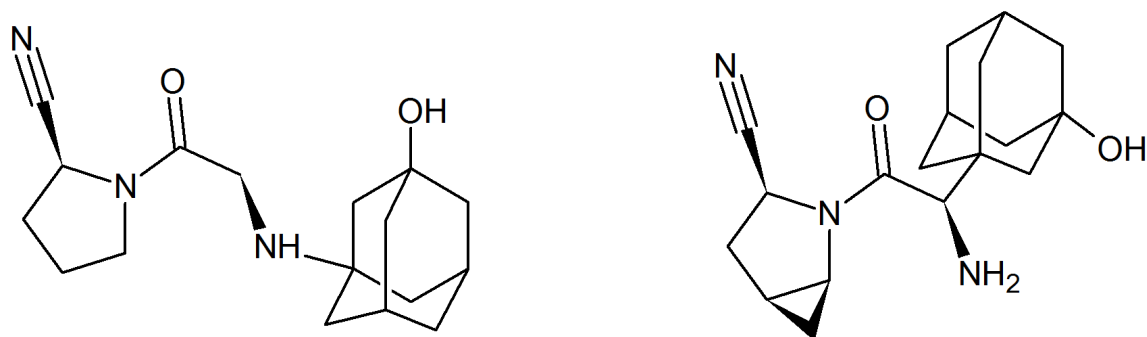
Pierwsze zaprojektowane inhibitory DPP IV z klasy pochodnych pirolidynonitryli zawierały wolną grupę aminową w pozycji N-terminalnej, która ulegała reakcji z elektrofilowym podstawnikiem nitrylowym pierścienia, tworząc w pierwszym etapie odpowiednią amidynę, a w wyniku następczej jej hydrolizy – diketopiperazynę (ryc. 11). Proces w znaczący sposób wpływał na stabilność oraz siłę hamowania aktywności enzymu. Ponadto, w niektórych przypadkach, otrzymane związki wykazywały większą swoistość względem DPP 2 niż DPP IV [10,70].

Niepożądaną reakcją wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji wyeliminowano przez wprowadzenie do N-końcowej funkcji aminowej sterycznie rozbudowanych podstawników. Korzystnym wyborem okazała się inkorporacja grupy adamantylowej. Uzyskano w ten sposób wildagliptynę (Novartis) oraz saksagliptynę (Bristol-Meyer Squibb, AstraZeneca), które są obecnie wykorzystywane w terapii cukrzycy typu 2 [10,47,70].

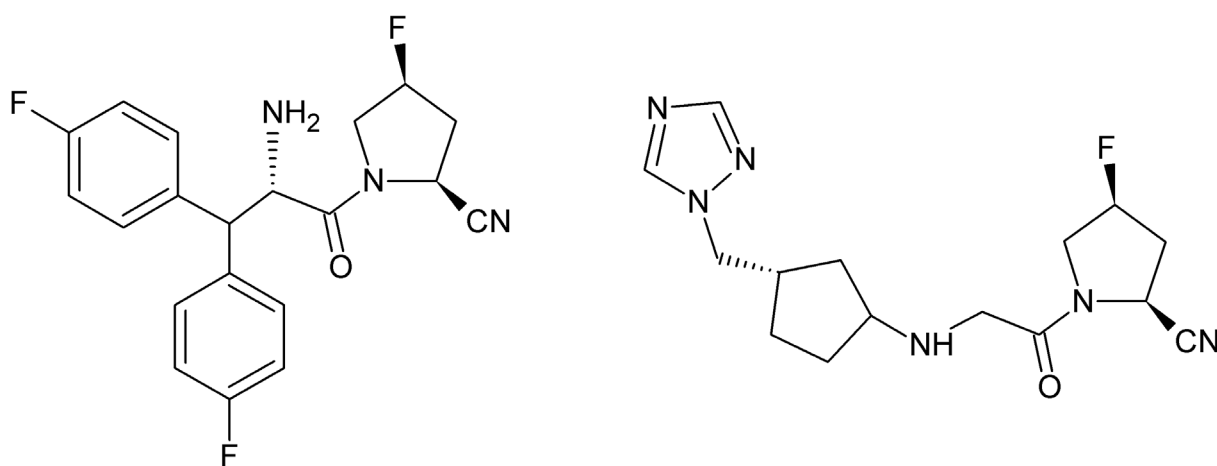
Dalsze badania dowiodły, że aktywność inhibicyjną wobec DPP IV wzmacnia wprowadzenie do pierścienia pirolidyny atomu fluoru, który zwiększa stabilność chemiczną cząsteczki. Obecnie już kilka fluoropirolidynowych pochodnych przechodzi badania kliniczne: denagliptyna (GlaxoSmithKline), melogliptyna (Glenmark), gozoglipityna (Pfizer), TS-021 (Taisho Pharmaceutical Co., Lilly).



Ryc. 11. Wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja inhibitorów DPP IV z klasy pochodnych pirolidynonitryli



Ryc. 12. Struktura wildagliptyny (po lewej) oraz saksagliptyny (po prawej)



Ryc. 13. Struktura denagliptyny (po prawej) i melogliptyny (po lewej)

Innym rozwiązaniem była synteza inhibitorów DPP IV, w których wiązanie amidowe zastąpiono wiązaniem (Z)-fluoroolefinowym (ryc. 14). W strukturze (Z)-fluoroalkenu, elektrojemny atom fluoru zastępuje karbonylowy atom węgla, natomiast wiązanie podwójne naśladuje konfigurację trans wiązania amidowego. Taki izoster wiązania amidowego skutecznie zapobiega izomeryzacji cis-trans, prowadzącej do niepożądanego produktu cyklicznego – diketopiperazyny.

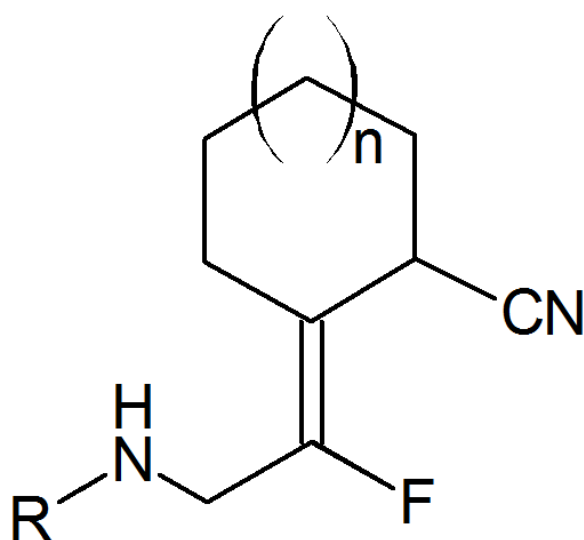
Dużą aktywność inhibującą DPP IV miały również odpowiednie dipeptydowe kwasy boronowe, stanowiące analogi stanu przejściowego reakcji hydrolizy (ryc. 15). Efektywność inhibicji zapewniał atom boru, który dzięki nieobsadzonemu orbitalowi *p* pełni funkcję kwasu Lewisa reagującego z grupą hydroksylową reszty Ser630. Okazało się jednak, że pH miało istotny wpływ na siłę inhibicji. W neutralnym środowisku przeważnie występowała niekorzystna postać cykliczna, podczas gdy w niskim pH faworyzowana była aktywna postać liniowa. Oznacza to, że doustne podanie potencjalnego boroterapeutyku byłoby korzystne dla jego aktywności

inhibicyjnej, ponieważ w kwaśnych warunkach żołądka następowała regeneracja aktywnej struktury liniowej. Dowiedziono ponadto, że niekorzystny wpływ wywierała inkorporacja D-aminokwasów, α,α -dipodstawionych aminokwasów, jak również glicyny w pozycji N-terminalnej. Obecnie w III fazie badań klinicznych znajduje się analog kwasu boronowego – dutogliptyna (Phenomenix).

Zsyntezowano również nieodwracalne inhibitory DPP IV w postaci difenylowych estrów fosfonianowych (ryc. 16). Tego typu połączenie zawiera reaktywne ugrupowanie, które tworzy wiązania kowalencyjne z grupami funkcyjnymi umiejscowionymi w centrum aktywnym enzymu bądź w jego pobliżu, co powoduje nieodwracalną modyfikację enzymu, prowadzącą do utraty jego aktywności (np. fosforylacją reszty Ser630 w przypadku estrów fosfonianowych).

Przykłady peptydomimetyków serii β

Drugą grupę syntetycznych inhibitorów DPP IV są peptydomimetyki serii β , zawierające w strukturze resztę



Ryc. 14. Ogólna struktura inhibitorów DPP IV zawierających izosteryczne wiązanie (Z)-fluoroolefinowe; $n = 0$ lub 1

β -aminokwasu [8,9,56,57,58,59]. W oparciu o wyniki badań przesiewowych stwierdzono, że najbardziej optymalnym aminokwasem, wpasowującym się w przestrzeń kieszeni S1 enzymu jest (R)- β -homofenyloalanina. Sitagliptyna (Merck & Co) zarejestrowana jako lek w terapii cukrzycy typu 2 (ryc. 17) jest przykładem pochodnej (R)- β -homofenyloalaniny. Grupa trifluorofenylowa cząsteczki sitagliptyny wpasowuje się w kieszeń S1 z odwrotną orientacją w porównaniu do α -peptydomimetyków, natomiast funkcja trifluorometylowa jest odpowiedzialna za oddziaływanie z resztami Arg358 oraz Ser209. Natomiast pierścień triazolopiperazyny oddziałuje z pierścieniem reszty Phe357. W Japonii zarejestrowano nowy analog sitagliptyny – omarigliptynę (Merck & Co), zawierającą grupę metylosulfonową oraz pierścień diaminotetrahydropirany. Cechą charakterystyczną tej pochodnej jest zahamowanie

swobody konformacyjnej, a także poprawiona rozpuszczalność, co zapewnia długotrwałą inhibicję DPP IV bez nasilenia działań niepożądanych.

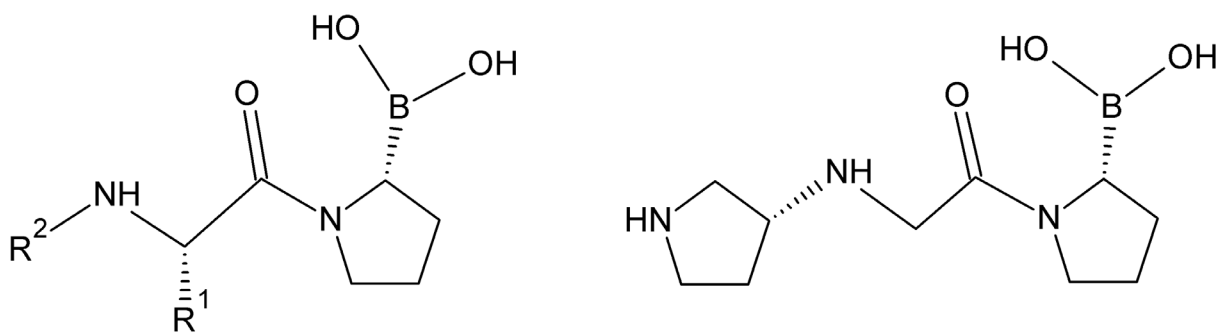
NIEPEPTYDOWE INHIBITORY DPP IV

Inhibitory należące do grupy niepeptydomimetyków to inhibitory niekowalencyjne, które swoją strukturą chemiczną w żaden sposób nie odwzorowują naturalnych substratów DPP IV, a ich właściwości hamujące aktywność enzymu zidentyfikowano głównie w wyniku badań przesiewowych HTS [10,12,27,29,48,57]. Do tej grupy należą: alogliptyna (Takeda) oraz linagliptyna (Boehringer Ingelheim, Lilly), zarejestrowane do stosowania w cukrzycy typu 2 (ryc. 18). Linagliptyna, będąca pochodną ksantyny, jest najefektywniejszym inhibitorem DPP IV spośród zarejestrowanych do tej pory gliptyn. Alogliptyna charakteryzuje się słabszym działaniem inhibicyjnym, jest za to bardziej selektywna i nie oddziałuje z pozostałymi homologicznymi peptydazami serynowymi.

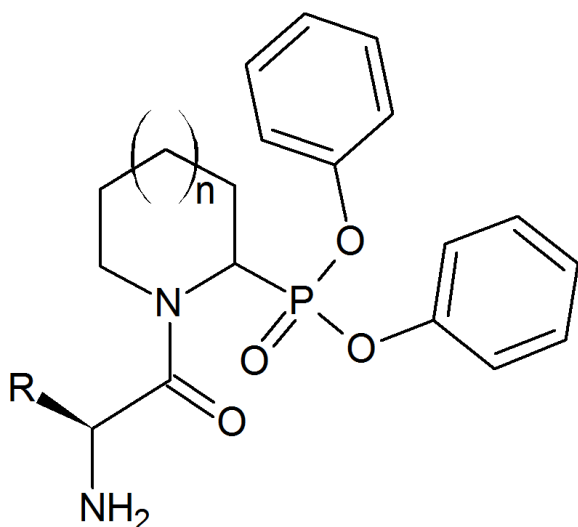
Niepeptydowe inhibitory: trelagliptyna (Takeda) i teneagliptyna (Mitsubishi Tanabe Pharma Co.) zostały zarejestrowane w Japonii.

POTENCJAŁ TERAPEUTYCZNY INHIBITORÓW DPP IV W CUKRZYCY TYPU 1

Najnowsze badania wskazują, że inhibitory DPP IV chronią komórki β trzustki w mysim modelu cukrzycy 1 oraz poprawiają kontrolę glikemii u pacjentów z cukrzycą typu 1, np. zastosowanie sitagliptyny i losartanu - bloker receptora typu 1 angiotensyny II (AT1) - u myszy STZ sprzyjało regeneracji komórek β przez zwiększenie zróżnicowania trzustkowych komórek progenitorowych [55]. Połączenie inhibitora DPP IV z inhibitorem pompy protonowej przywracało stan normoglikemii i znacznie zwiększało stężenie gastryny w surowicy, a peptydu C w osoczu, jak również zawartość insuliny w trzustce u myszy NOD [79]. Ponadto, podanie linaglip-



Ryc. 15. Ogólna struktura dipeptydowych kwasów boronowych inhibujących DPP IV (po lewej) oraz dutagliptyny – przykładowego analogu w badaniach klinicznych (po prawej)

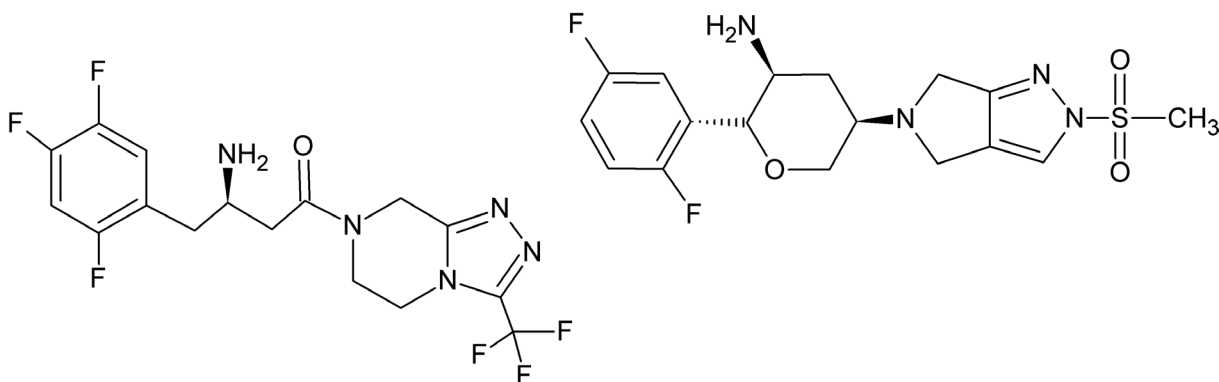


Ryc. 16. Struktura difenylowego estru kwasu fosfonowego, będącego nieodwracalnym inhibitorem DPP IV; $n = 0$ lub 1

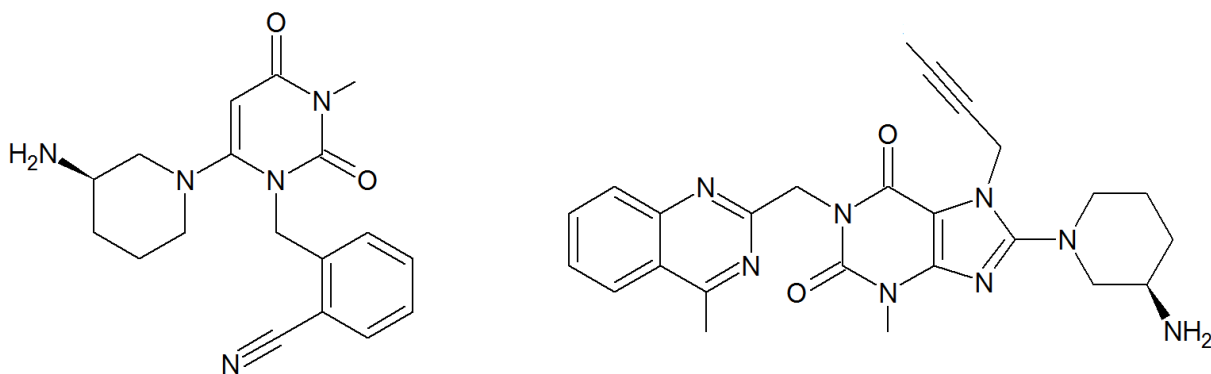
tyny myszom NOD ograniczało częstość występowania cukrzycy oraz autoimmunologicznej destrukcji komórek β trzustki [47]. Zaobserwowano również, że terapia sitagliptyną znacząco zmniejszała zapotrzebowanie na insulinę, ale tylko czasowo poprawiała kontrolę glikemii. Leczenie sitagliptyną pacjenta z cukrzycą autoimmunologiczną oraz z zespołem sztywności uogólnionej po 5 miesiącach obniżyło wartości wskaźnika HbA1c (hemoglobiny glikowanej) oraz istotnie zmniejszyło poziom przeciwciał anti-GAD (przeciwko dekarboksylazie kwasu glutaminowego) o około 85% po upływie 18 miesięcy [49]. Dotychczasowe doniesienia pozwalają przypuszczać, że inhibitory DPP IV, oprócz wpływu na GLP-1 i GIP, mają potencjał do obniżania reakcji autoimmunologicznej i to zarówno poprzez efekt ochronny w stosunku do komórek β trzustki jak i poprzez regulację odpowiedzi immunologicznej.

Istnieje hipoteza, że gliptyny mogą zakłócać tworzenie zaawansowanych produktów końcowych glikacji (w tym N^{ϵ} -karboksymetylolizyny – CML i glikoalbuminy), których postępujące gromadzenie się u pacjentów z przewlekłą hiperglikemią powoduje nadmierną immunoaktywację, jednak mechanizm, według którego dochodzi do regulacji działania układu odpornościowego z udziałem inhibitorów DPP IV nie jest jeszcze dokładnie poznany [68]. Uważa się, że wzrost aktywności DPP IV koreluje z rosnącą odpowiedzią immunologiczną limfocytów Th1, podczas gdy inhibicja DPP IV zwiększa wydzielanie cytokin związanych z aktywacją limfocytów Th2. DPP IV może sprzyjać odpowiedzi Th1, chociaż jej nadekspresja jest też obserwowana na powierzchni komórek Th17. W oparciu o te przypuszczenia sugeruje się, że gliptyny przyczyniają się do wzrostu komórek T regulatorowych (Treg) przez modulowanie migracji patogennych komórek T $CD4^{+}$, co zaobserwowano na przykładzie wydłużenia przeżycia przeszczepu wysepek Langerhansa u myszy NOD [92].

Wiele dowodów wskazuje, że w cukrzycy autoimmunologicznej głównymi sprawcami niszczenia komórek β wysepek Langerhansa wytwarzających insulinę są właśnie komórki T $CD4^{+}$ oprócz T $CD8^{+}$. Proces chorobowy jest wywołany brakiem równowagi między chorobotwórczymi i regulacyjnymi limfocytami T. U podstaw patogenyzy leży zaburzony profil limfocytów pomocniczych Th1 względem Th2. Bezpośrednio odpowiedzialnym może być interferon- γ (INF- γ), wytwarzający limfocyty pomocnicze Th1 i z jego inicjatywy może dochodzić do niszczenia komórek β wysp trzustkowych. W następnym etapie, w odpowiedzi na działanie INF- γ , cytokiny (IL-4, IL-10), pełniące funkcję ochronną i zapobiegające nadmiernej aktywności Th1, uwalniają limfocyty pomocnicze Th2. W podobny sposób limfocyty regulatorowe Treg tłumią autoimmunizację przez hamowanie proliferacji komórek efektorowych i cytokin, podczas gdy przeciwne do nich komórki pomocnicze Th17 promują stan zapalny, powodujący patogenne zmiany autoimmunizacyjne. Najnowsze badania potwierdzają, że głównym



Ryc. 17. Struktura sitagliptyny (po lewej) oraz omarigliptyny (po prawej)



Ryc. 18. Struktura alogliptyny (po lewej) oraz linagliptyny (po prawej)

czynnikiem wpływającym na rozwój cukrzycy typu 1 jest wadliwe działanie supresorowe limfocytów. Obiecująca wydaje się więc taka interwencja terapeutyczna, która będzie jednocześnie wyciszać działanie Th1 i Th17 oraz wpływać na aktywację Th2 i Treg [92].

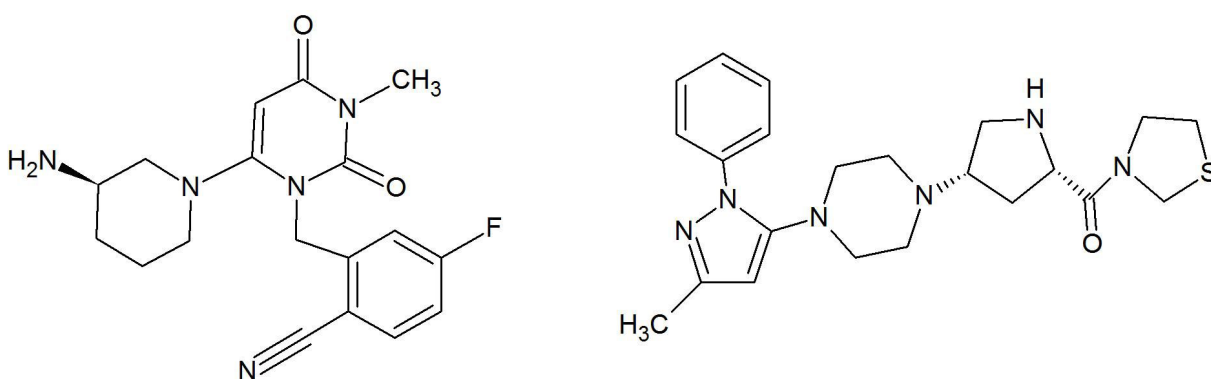
Z dotychczasowych badań wynika, że inhibitory DPP IV mogą pełnić funkcje regulacyjne w układzie immunologicznym. Zakłócając odpowiedź immunologiczną wywołaną za pośrednictwem limfocytów Th1, zwiększają wydzielanie cytokin dla Th2 oraz aktywują limfocyty Treg, uniemożliwiając tym samym wytwarzanie prozapalnej cytokiny IL-17. Gliptyny promują regenerację komórek β , dzięki czemu przyczyniają się do tłumienia autoimmunizacji. Wydaje się więc, że mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu cukrzycy typu 1, której terapia powinna obejmować zarówno mechanizmy immunologiczne, jak i komórkowe, odpowiedzialne za niszczenie i regenerację komórek β .

Wybrane elementy farmakologii gliptyn

Inhibitory DPP IV (zwłaszcza te zarejestrowane w USA i Europie, czyli sitagliptyna, wildagliptyna, saksagliptyna,

alogliptyna, linagliptyna) prawie od dekady są z powodzeniem stosowane w leczeniu cukrzycy typu 2. Stosunkowo dobrze poznano również ich profil farmakokinetyczny i farmakodynamiczny [12,48].

Gliptyny, hamując dipeptydyldipeptydazę IV, wydłużają wydzielanie insuliny z komórek trzustkowych przez przeciwdziałanie rozkładowi peptydów inkretynowych. Inkretyny GLP-1 i GIP są uwalniane w odpowiedzi po spożyciu pokarmów. GLP-1, inicjując wydzielanie insuliny, hamuje wydzielanie glukagonu, opróżnianie żołądka oraz wpływa na zmniejszenie łaknienia. Leczenie gliptynami korzystnie działa na stężenie glukozy we krwi, którego bezpośrednim odzwierciedleniem jest wartość wskaźnika retrospektywnego HbA1c. Pomiar HbA1c ułatwia kontrolę skuteczności leczenia cukrzycy typu 2, gdyż ilość hemoglobiny glikowanej przekłada się na średnie stężenie glukozy we krwi w ciągu minionych 120 dni. Szacuje się, że gliptyny zmniejszają w sposób trwały wartość HbA1c o około 1%. Monoterapia inhibitorami DPP IV nie wywołuje istotnego ryzyka hipoglikemii i zwiększenia masy ciała. Najczęstsze opisane działania niepożądane tej klasy leków dotyczą bólu



Ryc. 19. Struktura trelagliptyny (po lewej) i teneligliptyny (po prawej)

i zawrotów głowy, zaparc, zwiększonego ryzyka infekcji, w tym zapalenia nosogardzieli, w niektórych przypadkach większego prawdopodobieństwa pojawienia się zdarzeń sercowo-naczyniowych oraz możliwości wystąpienia ostrego zapalenia trzustki. Gliptyny nie są polecane kobietom w ciąży, ponieważ badania na zwierzętach wykazały prawdopodobieństwo toksycznego wpływu na rozwijający się płód. Większość inhibitorów DPP IV jest wydalana z organizmu przez drogi moczowe, dlatego też, zwłaszcza w leczeniu sitagliptyną, saksagliptyną lub alogliptyną, konieczne jest dostosowanie ich dawki u pacjentów z umiarkowaną lub ciężką niewydolnością nerek. Linagliptyna jest głównie wydalana przez drogi żółciowe z kałem, a zatem nie wymaga regulacji dawki u pacjentów z zaburzeniami czynności nerek [50]. W tabeli 4 podsumowano najważniejsze parametry farmakologiczne gliptyn, zarejestrowanych przez FDA i EMA do stosowania w leczeniu cukrzycy typu 2.

Spośród wszystkich wykazywanych działań niepożądanych najwięcej kontrowersji budzi obecnie ryzyko pojawienia się i/lub rozwoju chorób kardiologicznych, któremu poświęcono najwięcej uwagi w ramach badań klinicznych IV fazy w zakresie bezpieczeństwa terapii inhibitorami DPP IV [82]. Należy jednak podkreślić, że gliptyny jako pierwsze leki przeciwcukrzycowe, zostały uznane zarówno przez FDA (Food and Drug Administration), jak i EMA (European Medicines Agency) jako mające istotny statystycznie profil bezpieczeństwa kardiologicznego (o górnej granicy przedziału ufności 95% CI dla ryzyka względnego głównych niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych w porównaniu z placebo <1,3). Jednak opublikowane niedawno metaanalizy, obejmujące dotychczasowe badania kliniczne, prowadzone w ostatnich 2-3 latach, dotyczące wpływu gliptyn na układ sercowo-naczyniowy, nie są tak zachęcające.

Powikłania sercowo-naczyniowe są bardzo częstym problemem u osób cierpiących na cukrzycę typu 2, dlatego bezpieczeństwo kardiologiczne jest wnikliwie analizowane podczas wskazań terapeutycznych dla tego schorzenia. Szacuje się, że zarówno ryzyko chorób wieńcowych wzrasta dwukrotnie, jak i zwiększa się prawdopodobieństwo wystąpienia różnych podtypów udaru mózgu. Istnieją silne dowody, że ścisła kontrola glukozy zmniejsza liczbę powikłań mikronaczyniowych, prowadzących do retinopatii, nefropatii i neuropatii, jak również do powstawania powikłań mikronaczyniowych [5]. Ponieważ dipeptydylopeptydaza IV może wpływać na układ naczyniowy przez modulowanie stężenia tlenu azotu, zwiększanie liczby komórek progenitorowych śródbłonna, promowanie angiogenezy, zmniejszenie stresu oksydacyjnego i łagodzenie stanów zapalnych, dlatego sugeruje się, że właśnie inhibitory DPP IV mogą chronić przed mikroangiopatią [76]. Modele *in vitro* i przedkliniczne wskazują na korzystny wpływ gliptyn na funkcje naczyniowe, regenerację komórek śródbłonna i mięśnia sercowego oraz hamowanie miażdżycy tętnic z udziałem szlaku metabolicznego zależnego od chemokiny 12 (CXCL12/SDF-1), substratu DPP IV [11].

Ponadto, podczas terapii inhibitorami DPP IV obserwowano spadek stężenia cytokiny prozapalnej TNF- α , co przy poprawionej kontroli glikemii może ograniczać ryzyko powikłań wątrobowych, nerkowych, a także układu sercowo-naczyniowego [8].

Przeprowadzone analizy porównawcze badań klinicznych wykazały, że inhibitory DPP IV nie miały znaczącego wpływu na ryzyko śmiertelności wśród pacjentów z cukrzycą typu 2 leczonych inhibitorami DPP IV w porównaniu z grupą kontrolną, której podawano placebo [56,89]. Wprawdzie Li i wsp. ustalili, że stosowanie gliptyn może zwiększać ryzyko niewydolności serca, nawet z koniecznością odbycia hospitalizacji z powodu zawału [54], jednak dotyczyło to głównie terapii saksagliptyną i alogliptyną, podczas gdy sitagliptyna została uznana za najbardziej bezpieczny kardiologicznie lek gliptynowy [30,82,93]. Zaobserwowano ponadto, że inhibitory DPP IV były dobrze tolerowane i miały odpowiedni profil bezpieczeństwa. Wprawdzie nie zawsze zapewniały odpowiednią ochronę układu sercowo-naczyniowego, zwłaszcza u chorych bez potwierdzonych współistniejących schorzeń kardiologicznych, to jednak okazało się, że mogą skutecznie obniżyć ryzyko wystąpienia udaru mózgu oraz miażdżycy [8,30,56]. Obecnie, wobec nie zawsze spójnych doniesień, nie można jednoznacznie potwierdzić korzyści wynikających ze stosowania omawianej klasy leków u osób cierpiących na cukrzycę bez względu na współistniejące schorzenia kardiologiczne, ani też potwierdzić jakichkolwiek istotnych zagrożeń dla układu sercowo-naczyniowego związanych z terapią gliptynami [62].

Mankamentem porównywanych badań, jak komentują autorzy, była mała liczebność prób, krótkie okresy obserwacji oraz mało znaczące zdarzenia sercowo-naczyniowe. Ponadto definicja wyników nie zawsze była dostępna lub zrozumiała, a niektóre główne incydenty kardiologiczne oparte były na zdarzeniach niepożądanych zgłaszanych przez klinicystów, a nie na zaślepienych pierwszorzędowych punktach końcowych. Z tego względu opisywane interwencje nie mogą być wystarczające do oszacowania rzeczywistego działania inhibitorów DPP IV na populację bez współistniejącej choroby sercowo-naczyniowej [30,53,54,56,62,89,93].

Reasumując, przedstawione wyniki metaanaliz nie oznaczają definitywnie, że inhibitory DPP IV nie wpływają kardioprotekcyjnie na chorych z cukrzycą typu 2, u których odnotowano np. chorobę wieńcową, ale do wyciągnięcia bardziej jednoznacznych i rzetelnych wniosków potrzebne są dalsze badania, przede wszystkim wieloosrodkowe badania randomizowane, z podwójnie ślepą próbą, kontrolowane placebo, dla populacji o dużych liczebnościach. Cukrzyca jest schorzeniem o ustalonym czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, więc dla każdego indywidualnego pacjenta jeszcze przed rozpoczęciem leczenia należy rozważyć potencjalne ryzyko i korzyści oraz koszty zastosowania określonej terapii.

Tabela 4. Wybrane parametry farmakologiczne gliptyn, zarejestrowanych przez FDA i EMA do stosowania w leczeniu cukrzycy typu 2 [12,48,63]

Gliptyna (nazwa własna i handlowa, podmiot rejestrujący, rok, urząd/ kraj)	Wiązalność z DPP IV (selektywność, % inhibicji, Ki [nM])	Dawka [mg]	Okres półtrwania $t_{1/2}$ [h]	Wchłanianie i dystrybucja	Metabolizm	Wydalenie
Sitagliptyna/ Januvia (Merck 2006, FDA)	wysoka; 97; 9	100 1 x dziennie	8 – 24	glikoproteina P; transporter anionów czynnych (OAT3)	nieznaczny (CYP3A4/ CYP2C8)	79 % z moczem w postaci niezmienionej
Wildagliptyna/ Galvus (Novartis 2007, EMA)	umiarkowana; 95; 17	50 2 x dziennie	1,5 – 45	w niewielkim stopniu wiązanie z białkami osocza (9,3%)	nie jest substratem enzymów cytochromu P450; hydroliza w nerkach do nieaktywnego metabolitu (69%)	85 % z moczem
Saksagliptyna/ Onglyza (BMS, AstraZeneca 2009, FDA)	umiarkowana; 80; 0,6	5 1 x dziennie	2 – 4 (3 – 7 metabolit)	brak wiązania z białkami osocza	wątrobowy do aktywnego metabolitu (CYP3A4/5)	75 % z moczem (12-29% macierzysty lek 21-52% metabolit)
Alogliptyna/ Nesina (Takeda 2010, Japonia, 2013 FDA)	wysoka; 90; –	25 1 x dziennie	12 – 21	wiązanie z białkami osocza (20-30%)	nieznaczny (CYP3A4/ CYP2D6)	76 % z moczem
Linagliptyna/ Trajenta (Boehringer, Lilly 2011, FDA)	umiarkowana; 80; 1	5 1 x dziennie	10 – 40	wiązanie z białkami osocza zależne od stężenia (70-80%)	wątrobowy do nieaktywnego metabolitu (CYP3A4/5)	> 85 % z kałem 6,3 % z moczem

PODSUMOWANIE

DPP IV to enzym o plejotropowej funkcji w organizmie, co wynika z wielości jego substratów. Ze względu na osobliwą trójwymiarową strukturę, warunkującą molekularne i funkcjonalne właściwości, DPP IV odgrywa ważną rolę w różnych procesach zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych bądź przez bezpośrednie w nich uczestnictwo, bądź pośrednio – przez możliwość oddziaływania z innymi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej.

DPP IV jest zaangażowana w utrzymanie homeostazy u ssaków, w związku z tym ma udział w mechanizmach molekularnych wielu różnych schorzeń, zwłaszcza nowotworowych, immunologicznych i neuropsychiatrycznych. Rola DPP IV w etiologii tych chorób jest wciąż niedostatecznie poznana, mimo dowodów na zmiany ekspresji enzymu i zaburzeń jego aktywności w tkankach i płynach ustrojowych. Enzym wydaje się obiecującym narzędziem do zastosowań diagnostycznych i prognostycznych w postaci biomarkera toczącego się procesu chorobowego czy sondy molekularnej do obrazowania zmian chorobotwórczych.

W zastosowaniach medycznych są obecnie inhibitory DPP IV - gliptyny, wykorzystywane w leczeniu cukrzycy typu 2, których zadaniem jest ochrona inkretynowych hormonów peptydowych przed szybką degradacją. Bezpieczeństwo stosowania gliptyn oraz ich korzystny wpływ na degradację inkretyn i kontrolę poziomu glukozy we krwi wykazano w modelach biologicznych i w badaniach klinicznych. Rozważane jest rozszerzenie potencjału aplikacyjnego inhibitorów DPP IV do innych wskazań: wspomagająco w terapii cukrzycy typu 1, niektórych chorób autoimmunologicznych, nowotworowych (przewlekłej białaczki limfocytowej), sercowo-naczyniowych (miażdżycy) czy też przewlekłych chorób wątroby [63].

Reasumując, DPP IV to istotny enzym do projektowania i opracowania nowych, bardziej skutecznych strategii terapeutycznych i diagnostycznych w onkologii, immunologii, kardiologii, endokrynologii, neurologii, psychiatrii.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abbott C.A., Baker E., Sutherland G.R., McCaughan G.W.: Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene. *Immunogenetics*, 1994; 40: 331-338
- [2] Aertgeerts K., Ye S., Tennant M.G., Kraus M.L., Rogers J., Sang B.C., Skene R.J., Webb D.R., Prasad G.S.: Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation. *Protein Sci.*, 2004; 13: 412-421
- [3] Ansorge S., Reinhold D.: DP IV/CD26 effector peptides. W: Kastin A.J. (red.) *Handbook of biologically active peptides*. 2nd Edition. Academic Press, 2013; 664-670
- [4] Antonyan A.A.: Natural substrates of dipeptidyl peptidase IV. *Proc. Yerevan State Univ. Chem. Biol.*, 2016; 2: 33-42
- [5] Aroda V.R., Henry R.R., Han J., Huang W., DeYoung M.B., Darsow T., Hoogwerf B.J.: Efficacy of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors: Meta-analysis and systematic review. *Clin. Ther.*, 2012; 34: 1247-1258.e22
- [6] Arrebola Y.M., Gómez H., Valiente P.A., de los A Chávez M., Pascua I.: Dipeptidyl peptidase IV and its implication in cancer. *Biotecnol. Apl.*, 2014; 31: 102-110
- [7] Ashwood P., Corbett B.A., Kantor A., Schulman H., Van de Water J., Amaral D.G.: In search of cellular immunophenotypes in the blood of children with autism. *PLoS One*, 2011; 6: e19299
- [8] Atkin S.L., Katsiki N., Banach M., Mikhailidis D.P., Pirro M., Sahebkar A.: Effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on circulating tumor necrosis factor- α concentrations: A systematic review and metaanalysis of controlled trials. *J. Diabetes Complications*, 2017; 31: 1458-1464
- [9] Augoff K., Hryniewicz-Jankowska A., Tabola R., Czaplak L., Szlachowski P., Wierzbicki J., Grabowski K., Sikorski A.F.: Upregulated expression and activation of membrane-associated proteases in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.*, 2014; 31: 2820-2826
- [10] Augustyns K., Van der Veken P., Senten K., Haemers A.: The therapeutic potential of inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) and related proline-specific dipeptidyl aminopeptidases. *Curr. Med. Chem.*, 2005; 12: 971-998
- [11] Avogaro A., Fadini G.P.: The effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibition on microvascular diabetes complications. *Diabetes Care*, 2014; 37: 2884-2894
- [12] Bae E.J.: DPP-4 inhibitors in diabetic complications: role of DPP-4 beyond glucose control. *Arch. Pharm. Res.*, 2016; 39: 1114-1128
- [13] Bashir S., Al-Ayadhi L.: Alterations in plasma dipeptidyl peptidase IV in autism: A pilot study. *Neurol. Psychiatry Brain Res.*, 2014; 20: 41-44
- [14] Basnyat P., Natarajan R., Vistbakka J., Lehtikangas M., Airas L., Matinlauri I., Elovaara I., Hagman S.: Elevated levels of soluble CD26 and CD30 in multiple sclerosis. *Clin. Exp. Neuroimmunol.*, 2015; 6: 419-425
- [15] Beckenkamp A., Davies S., Willig J.B., Buffon A.: DPP-4/CD26: a tumor suppressor or a marker of malignancy? *Tumour Biol.*, 2016; 37: 7059-7073
- [16] Biology Stack Exchange. <http://biology.stackexchange.com/questions/39024/specificity-of-the-adaptive-lymphocytes> (20.12.2015)
- [17] Canneva F., Golub Y., Distler J., Dobner J., Meyer S., von Hörsten S.: DPP4-deficient congenic rats display blunted stress, improved fear extinction and increased central NPY. *Psychoneuroendocrinology*, 2015; 53: 195-206
- [18] Casrouge A., Decalf J., Ahloulay M., Lababidi C., Mansour H., Vallet-Pichard A., Mallet V., Mottez E., Mapes J., Fontanet A., Pol S., Albert M.L.: Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV. *J. Clin. Invest.*, 2011; 121: 308-317
- [19] Centrum Informacji o Leku. <https://www.leki-informacje.pl> (20.07.2017)
- [20] Cheng N., Rho J. M., Masino S.A.: Metabolic dysfunction underlying autism spectrum disorder and potential treatment approaches. *Front. Mol. Neurosci.*, 2017; 10: 34
- [21] Cieślińska A., Sienkiewicz-Szlapka E., Wasilewska J., Fiedorowicz E., Chwała B., Moszyńska-Dumara M., Cieśliński T., Bukalo M., Kostyra E.: Influence of candidate polymorphisms on the dipeptidyl peptidase IV and μ -opioid receptor genes expression in aspect of the β -casomorphin-7 modulation functions in autism. *Peptides*, 2015; 65: 6-11
- [22] Cohen M., Fruitier-Arnaudin I., Piot J.M.: Hemorphins: substrates and/or inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Hemorphins N-terminus sequence influence on the interaction between hemorphins and DPP-IV. *Biochimie*, 2004; 86: 31-37
- [23] Cordero O.J., Varela-Calviño R., López-González T., Calviño-Sampedro C., Viñuela J.E., Mouriño C., Hernández-Rodríguez Í., Rodríguez-López M., Aspe de la Iglesia B., Pego-Reigosa J.M.: CD26 expression on T helper populations and sCD26 serum levels in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One*, 2015; 10: e0139535
- [24] Dang N.H., Morimoto C.: CD26: An expanding role in immune regulation and cancer. *Histol. Histopathol.*, 2002; 17: 1213-1226
- [25] Davies S., Beckenkamp A., Buffon A.: CD26 a cancer stem cell marker and therapeutic target. *Biomed. Pharmacother.*, 2015; 71: 135-138
- [26] De Meester I., Korom S., Van Damme J., Scharpé S.: CD26, let it cut or cut it down. *Immunol. Today*, 1999; 20: 367-375
- [27] Deacon C.F., Holst J.J.: Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: comparison, efficacy and safety. *Expert Opin. Pharmacother.*, 2013; 14: 2047-2058
- [28] Deng J., Lamb J.R., Mckeown A.P., Miller S., Muglia P., Guest P.C., Bahn S., Domenici E.H., Rahmoune H.: Identification of altered dipeptidyl-peptidase activities as potential biomarkers for unipolar depression. *J. Affect. Disord.*, 2013; 151: 667-672
- [29] Drucker D.: Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and the treatment of type 2 diabetes: Preclinical biology and mechanisms of action. *Diabetes Care*, 2007; 30: 1335-1343
- [30] Elgendy I.Y., Mahmoud A.N., Barakat A.F., Elgendy A.Y., Saad M., Abuzaid A., Wayangankar S.A., Bavry A.A.: Cardiovascular safety of dipeptidyl-peptidase IV inhibitors: A meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, 2017; 17: 143-155
- [31] Fal A.M., Rosiek M., Biegus J., Małolepszy J.: Eotaksyna i jej rola w patofizjologii zapalenia eozynofilowego. *Alerg. Astma Immunol.*, 2003; 8: 19-24
- [32] Fan H., Yan S., Stehling S., Marguet D., Schuppaw D., Reutter W.: Dipeptidyl peptidase IV/CD26 in T cell activation, cytokine secretion and immunoglobulin production. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2003; 524: 165-174
- [33] Fan J., Johnson M.H., Lila M.A., Yousef G., de Mejia E.G.: Berry and citrus phenolic compounds inhibit dipeptidyl peptidase IV: Implications in diabetes management. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2013; 2013: 479505
- [34] Filipek B.: Miejsce inkretynomimetyków i inhibitorów dipeptydylopeptydazy 4 w leczeniu cukrzycy typu 2. *Farm. Pol.*, 2010; 66: 55-62
- [35] Frenssen F., Croonenberghs J., Van den Steene H., Maes M.: Prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV are associated with

externalizing and aggressive behaviors in normal and autistic adolescents. *Life Sci.*, 2015; 136: 157-162

[36] Gonzalez-Gronow M., Misra U.K., Gawdi G., Pizzo S.V.: Association of plasminogen with dipeptidyl peptidase IV and Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 regulates invasion of human 1-LN prostate tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 27173-27178

[37] Gorrell M.D., Gysbers V., McCaughan G.W.: CD26: A multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol.*, 2001; 54: 249-264

[38] Gutheil W.G., Subramanyam M., Flentke G.R., Sanford D.G., Munoz E., Huber B.T., Bachovchin W.W.: Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 6594-6598

[39] Harnedy P.A., O'Keefe M.B., FitzGerald R.J.: Purification and identification of dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitory peptides from the macroalga *Palmaria palmata*. *Food Chem.*, 2015; 172: 400-406

[40] Havre P.A., Abe M., Urasaki Y., Ohnuma K., Morimoto C., Dang N.H.: The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front. Biosci.*, 2008; 13: 1634-1645

[41] Hikida A., Ito K., Motoyama T., Kato R., Kawarasaki Y.: Systematic analysis of a dipeptide library for inhibitor development using human dipeptidyl peptidase IV produced by a *Saccharomyces cerevisiae* expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013; 430: 1217-1222

[42] Hildebrandt M., Reutter W., Arck P., Rose M., Klapp B.F.: A Guardian Angel. The involvement of dipeptidyl peptidase IV in psychoneuroendocrine function, nutrition and immune defence. *Clin. Sci.*, 2000; 99, 93-104

[43] Hildebrandt M., Rose M., Mayr C., Schüler C., Reutter W., Salama A., Klapp B.F.: Alterations in expression and in serum activity of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV, CD26) in patients with hyporectic eating disorders. *Scand. J. Immunol.*, 1999; 50: 536-541

[44] Hopsu-Havu V.K., Glenner G.G.: A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl- β -naphthylamide. *Histochemie*, 1966; 7: 197-201

[45] Hsu K.C., Tung Y.S., Huang S.L., Jao C.L.: Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of peptides in porcine skin gelatin hydrolysates. W: *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*, red.: Hernandez-Ledesma B., Hsieh C.C. InTech, 2013; 8: 205-218

[46] Ishihara R., Hanafusa M.: Narrow-band imaging endoscopy for screening of esophageal squamous cell carcinoma. *J. Gastrointestinal Cancer Screen.*, 2010; 48: 419-428

[47] Jelsing J., Vrang N., van Witteloostuijn S.B., Mark M., Klein T.: The DPP-4 inhibitor linagliptin delays the onset of diabetes and preserves β -cell mass in non-obese diabetic NOD mice. *J. Endocrinol.*, 2012; 214: 381-387

[48] Juillerat-Jeanneret L.: Dipeptidyl peptidase IV and its inhibitors: Therapeutics for type 2 diabetes and what else? *J. Med.Chem.*, 2014; 57: 2197-2212

[49] Kandasamy N., Lennox G., Annamalai A.K., Maguire G., Adler A.I.: Sitagliptin in glutamic acid decarboxylase antibody-positive diabetes mellitus. *Endocr. Pract.* 2012; 18: e65-e68

[50] Kawanami D., Matoba K., Sango K., Utsunomiya K.: Incretin-based therapies for diabetic complications: Basic mechanisms and clinical evidence. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016; 17: 1223

[51] Lambeir A.M., Proost P., Durinx C., Bal G., Senten K., Augustyns K., Scharpé S., Van Damme J., De Meester I.: Kinetic investigation of chemokine truncation by CD26/dipeptidyl peptidase IV reveals a striking selectivity within the chemokine family. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 29839-29845

[52] Lan V.T., Ito K., Ito S., Kawarasaki Y.: Trp-Arg-Xaa tripeptides act as uncompetitive-type inhibitors of human dipeptidyl peptidase IV. *Peptides*, 2014; 54: 166-170

[53] Lehrke M., Marx N.: Diabetes mellitus and heart failure. *Am. J. Med.*, 2017; 130 (Suppl. 6): S40-S50

[54] Li L., Li S., Deng K., Liu J., Vandvik P.O., Zhao P., Zhang L., Shen J., Bala M.M., Sohani Z.N., Wong E., Busse J.W., Ebrahim S., Malaga G., Rios L.P., Wang Y., Chen Q., Guyatt G.H., Sun X.: Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and risk of heart failure in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of randomized and observational studies. *Br. Med. J.*, 2016; 352: i610

[55] Liang J., Leung K.K., Lam S.Y., Leung P.S.: Combined treatment with a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor (sitagliptin) and an angiotensin II type 1 receptor blocker (losartan) promotes islet regeneration via enhanced differentiation of pancreatic progenitor cells. *Diabetes Obes. Metab.*, 2012; 14: 842-851

[56] Liu J., Li L., Deng K., Xu C., Busse J.W., Vandvik P.O., Li S., Guyatt G.H., Sun X.: Incretin based treatments and mortality in patients with type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Br. Med. J.*, 2017; 357: j2499

[57] Liu Y., Hu Y., Liu T.: Recent advances in non-peptidomimetic dipeptidyl peptidase 4 inhibitors: Medicinal chemistry and preclinical aspects. *Curr. Med. Chem.*, 2012; 19: 3982-3999

[58] Maes M., De Meester I., Verkerk R., De Medts P., Wauters A., Vanhoof G., Vandoolaeghe E., Neels H., Scharpé S.: Lower serum dipeptidyl peptidase IV activity in treatment resistant major depression: Relationships with immune-inflammatory markers. *Psychoneuroendocrinology*, 1997; 22: 65-78

[59] Meissner J., Bonik M., Majkowski M., Grochowalska R., Machnicka B.: Synapsa immunologiczna i aktywacja komórek T. *Postępy Biol. Kom.*, 2012; 39: 103-114

[60] Mentlein R.: Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) - role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul. Pept.*, 1999; 85: 9-24

[61] MEROPS: The Peptidase Database. <http://merops.sanger.ac.uk/> (20.12.2015)

[62] Mora P.F., Johnson E.L.: Cardiovascular outcome trials of the incretin-based therapies: what do we know so far? *Endocr. Pract.*, 2017; 23: 89-99

[63] Mulvihill E.E., Drucker D.J.: Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Endocr. Rev.*, 2014; 35: 992-1019

[64] Nongonierma A.B., FitzGerald R.J.: Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by tryptophan containing dipeptides. *Food Funct.*, 2013; 4: 1843-1849

[65] O'Leary H., Ou X., Broxmeyer H.E.: The role of dipeptidyl peptidase 4 in hematopoiesis and transplantation. *Curr. Opin. Hematol.*, 2013; 20: 314-319

[66] Ohnuma K., Dang N.H., Morimoto C.: Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol.*, 2008; 29: 295-301

[67] Onoyama H., Kamiya M., Kuriki Y., Komatsu T., Abe H., Tsuji Y., Yagi K., Yamagata Y., Aikou S., Nishida M., Mori K., Yamashita H., Fujishiro M., Nomura S., Shimizu N., Fukayama M., Koike K., Urano Y., Seto Y.: Rapid and sensitive detection of early esophageal squamous cell carcinoma with fluorescence probe targeting dipeptidylpeptidase IV. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 26399

[68] Osawa S., Kawamori D., Katakami N., Takahara M., Sakamoto F., Katsura T., Yasuda T., Kaneto H., Matsuhisa M., Matsuoka T.A., Shimomura I.: Significant elevation of serum dipeptidyl peptidase-4 activity in young-adult type 1 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2016; 113: 135-142

[69] Park J.M., lee I.S., Kang J.Y., Paik C.N., Cho Y.K., Kim S.W., Choi M.G., Chung I.S.: Acute esophageal and gastric injury: Complication of Lugol's solution. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2007; 42: 135-137

[70] Patel B.D., Gbate M.D.: Recent approaches to medicinal chemistry and therapeutic potential of dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, 2014; 74: 574-605

- [71] PDBbind-CN Database. <http://www.pdbbind.org.cn> (20.07.2017)
- [72] Perlikowska R., Fichna J., do-Rego J., Gach K., Janecka A.: Kinetic studies of novel inhibitors of endomorphin degrading enzymes. *Med. Chem. Res.*, 2012; 21: 1445-1450
- [73] Power O., Nongonierma A.B., Jakeman P., FitzGerald R.J.: Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. *Proc. Nutr. Soc.*, 2014; 73: 34-46
- [74] Prod'homme T., Weber M.S., Steinman L., Zamvil S.S.: A neuro-peptide in immune-mediated inflammation, Y? *Trends Immunol.*, 2006; 27: 164-167
- [75] Reinhold D., Wrenger S., Bank U., Bühling F., Hoffmann T., Neubert K., Kraft M., Frank R., Ansorge S.: CD26 mediates the action of HIV-1 Tat protein on DNA synthesis and cytokine production in U937 cells. *Immunobiology*, 1996; 195: 119-128
- [76] Remm F., Franz W.M., Brenner C.: Gliptins and their target dipeptidyl peptidase 4: implications for the treatment of vascular disease. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Pharmacother.*, 2016; 2: 185-193
- [77] Sherwood N.M., Krueckl S.L., McRory J.E.: The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocr. Rev.*, 2000; 21: 619-670
- [78] Stulc T., Sedo A.: Inhibition of multifunctional dipeptidyl peptidase-IV: Is there a risk of oncological and immunological adverse effects? *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2010; 88: 125-131
- [79] Suarez-Pinzon W.L., Cembrowski G.S., Rabinovitch A.: Combination therapy with a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor and a proton pump inhibitor restores normoglycaemia in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*, 2009; 52: 1680-1682
- [80] The Binding Database. <https://www.bindingdb.org/bind/> (20.07.2017)
- [81] Thoma R., Löffler B., Stihle M., Huber W., Ruf A., Hennig M.: Structural basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV. *Structure*, 2003; 11: 947-959
- [82] Thrasher J.: Pharmacologic management of type 2 diabetes mellitus: Available therapies. *Am. J. Med.*, 2017; 130 (Suppl. 1): S4-S17
- [83] Turk B.: Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006; 5: 785-799
- [84] Umezawa H., Aoyagi T., Ogawa K., Naganawa H., Hamada M., Takeuchi T.: Diprotins A and B, inhibitors of dipeptidyl aminopeptidase IV, produced by bacteria. *J. Antibiot.*, 1984; 37: 422-425
- [85] Vojdani A., Bazargan M., Vojdani E., Samadi J., Nourian A.A., Eghbalieh N., Cooper E.L.: Heat shock protein and gliadin peptide promote development of peptidase antibodies in children with autism and patients with autoimmune disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2004; 11: 515-524
- [86] Wang Y., Wu X., Cheng Y., Zhao X.: A fluorescent switchable AIE probe for selective imaging of dipeptidyl peptidase-4 in vitro and in vivo and its application in screening DPP-4 inhibitors. *Chem. Commun.*, 2016; 52: 3478-3481
- [87] Wrenger S., Faust J., Mrestani-Klaus C., Fengler A., Stockel-Maschek A., Lorey S., Kahne T., Brandt W., Neubert K., Ansorge S., Reinhold D.: Down-regulation of T cell activation following inhibition of dipeptidyl peptidase IV/CD26 by the N-terminal part of the thromboxane A2 receptor. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 22180-22186
- [88] Wrenger S., Hoffmann T., Faust J., Mrestani-Klaus C., Brandt W., Neubert K., Kraft M., Olek S., Frank R., Ansorge S., Reinhold D.: The N-terminal structure of HIV-1 Tat is required for suppression of CD26-dependent T cell growth. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 30283-30288
- [89] Xu S., Zhang X., Tang L., Zhang F., Tong N.: Cardiovascular effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitor in diabetic patients with and without established cardiovascular disease: a meta-analysis and systematic review. *Postgrad. Med.*, 2017; 129: 205-215
- [90] Yazbeck R., Jaenisch S.E., Abbott C.A.: Potential disease biomarkers: dipeptidyl peptidase 4 and fibroblast activation protein. *Protoplasma*, 2018; 255: 375-386
- [91] Zhang Y., Chen R., Ma H., Chen S.: Isolation and identification of dipeptidyl peptidase IV-inhibitory peptides from trypsin/chymotrypsin-treated goat milk casein hydrolysates by 2D-TLC and LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, 2015; 63: 8819-8828
- [92] Zhao Y., Yang L., Wang X., Zhou Z.: The new insights from DPP-4 inhibitors: their potential immune modulatory function in autoimmune diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2014; 30: 646-653
- [93] Zhong J., Rao X., Rajagopalan S.: An emerging role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) beyond glucose control: Potential implications in cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 2013; 226: 305-314
- [94] Zou L.W., Wang P., Qian X.K., Feng L., Yu Y., Wang D.D., Jin Q., Hou J., Liu Z.H., Ge G.B., Yang L.: A highly specific ratiometric two-photon fluorescent probe to detect dipeptidyl peptidase IV in plasma and living systems. *Biosens. Bioelectron.*, 2017; 90: 283-289

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.