Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

FACULTAD DE FARMACIA. UCM

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

DISEÑO DE FÁRMACOS INHIBIDORES DE ENZIMAS O SISTEMAS DE TRANSPORTE EN LA DIABETES MELLITUS TIPO II

Autores:

Raúl Alberto Pérez Magán

Andrés Sainz de Vicuña Sánchez de Ocaña

Tutor: **Carmen Pedregal Freire**

Convocatoria: **Junio 2016**

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo II (DM2) es un complejo síndrome metabólico que se caracteriza por una hiperglucemia duradera, debida a la escasez en la secreción de insulina y/o a la resistencia a la misma. Respecto al diseño de fármacos inhibidores de enzimas o sistemas de transporte de DM2, las incretinas, hormonas peptídicas segregadas en el intestino como respuesta a la ingesta de alimentos y que presentan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasia de la glucosa, se convirtieron en una posible vía de desarrollo de nuevos fármacos para la DM2. La estrecha relación entre estas hormonas y la dipeptidil dipeptidasa (DPP-4), permitió el desarrollo de diferentes inhibidores de la enzima para la síntesis de nuevos tratamientos. Las cianopirrolidinas como inhibidor peptidomimético, fueron las precursoras en el desarrollo de síntesis de nuevos medicamentos en el arsenal terapéutico, que presentaban ventajas terapéuticas respecto a la incidencia de hipoglucemias, y a la supervivencia de células β-pancreáticas que no trataba ninguna familia terapéutica del momento. Otra familia empleada dentro de los inhibidores no peptidomiméticos, fue los derivados de la β-homofenilalanina como la sitagliptina (Januvia®), que presentó buen perfil farmacocinético y buena selectividad, redujo significativamente la glucosa en sangre y presentó una eficacia superior en la antihiperglucemia y una buena tolerabilidad, siendo la molécula precursora de numerosos estudios para desarrollar análogos.

Palabras clave: diabetes mellitus II, DPP-IV, incretinas, cianopirrolidinas, β-homofenilalanina, sitagliptina, Januvia®, antihiperglucemia.

INTRODUCCION

La diabetes tipo 2 (DM2, diabetes no insulinodependiente) es una enfermedad crónica y progresiva que se caracteriza por la resistencia de los tejidos periféricos a los efectos metabólicos de la insulina o por un defecto en la secreción de insulina por parte del páncreas o la suma de ambos factores. Cursa con un elevado nivel de glucosa de forma permanente en sangre (hiperglucemia).

Requiere tratamiento de por vida y se ha descrito como una epidemia de ámbito mundial que actualmente afecta a unos 250 millones de personas. El coste humano, económico y social asociado a sus complicaciones, hace que esta enfermedad sea una de las que plantea

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

consecuencias más serias en términos de salud pública, causa importante de morbilidad, incapacidad y/o muerte. Pese a ello, hasta hace unos años no se disponía de alternativas terapéuticas a los fármacos tradicionales[1].

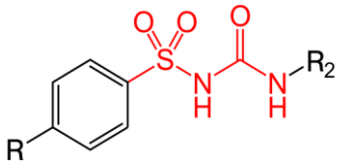
TERAPIA CONVENCIONAL

Se han centrado en elevar los niveles plasmáticos de insulina, bien por administración directa de ésta o mediante el empleo de fármacos capaces de incrementar su secreción (antidiabéticos orales), incrementar la sensibilidad a la insulina de determinados tejidos o reducir la absorción de carbohidratos en el tracto gastrointestinal.

A. Fármacos secretagogos que estimulan la liberación de insulina por parte de la célula beta-pancreática:

- **Sulfonilureas.** Se empezaron a usar en los años cincuenta como hipoglucemiantes. Contienen un núcleo central compuesto por una *S*-fenilsulfonilurea con sustituciones *para* en el benceno y en el *N* terminal de la urea (figura 1).

Fig.(1) Sulfonilureas.



Se fijan al canal de potasio dependiente de ATP en las células β pancreáticas, provocan su cierre (bloqueantes del canal) incrementando la concentración intracelular de potasio, que despolariza la membrana produciendo la entrada de calcio y así, promueven la liberación de insulina[2]. Entre sus efectos secundarios se encuentran la hiperinsulinemia, reacciones de hipersensibilidad, el aumento de peso y la hipoglucemia[3].

- **Glinidas (meglitinidas)**. La meglitinida es la secuencia no sulfonílica de la sulfonilurea glibenclamida. Presentan mecanismo de acción similar a las sulfonilureas[4] aunque actúan con mayor rapidez, son más selectivas y producen mejor control de la hiperglucemia postpandrial.

B. Fármacos que aumentan la sensibilidad a la insulina: Aumentan la sensibilidad tisular a los efectos de la insulina, pero no van a producir un aumento de su secreción.

- **Biguanidas:** Su principal representante es la metformina. Activan una proteincinasa dependiente de AMP a nivel muscular que aumenta la entrada de glucosa a las células, y a nivel hepático, disminuye la producción de glucosa como se observa en la figura. El principal

riesgo de las biguanidas es la posibilidad de que produzcan una acidosis láctica que puede llegar a ser mortal[5].

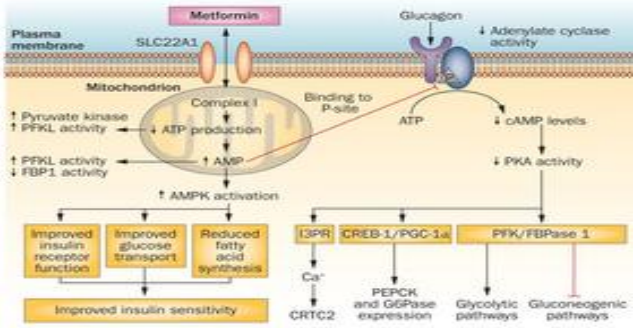


Fig.(2) Mecanismo de acción de la Metformina

- **Tiazolidindionas** (**glitazonas**): Actúan sobre uno de los subtipos del receptor nuclear activado por el proliferador de peroxisomas γ (PPARγ) provocando aumento de la captación de glucosa a nivel periférico, de la actividad de la glucógeno sintasa en el músculo cardíaco y de la captación de ácidos grasos y su conversión en derivados de acil-CoA; por otro lado, reducen la gluconeogénesis hepática y la síntesis de VLDL y TG[6].

C. **Fármacos que inhiben la absorción de glucosa: Inhibidores de α-glucosidasas** como la acarbosa[7] y el miglitol. Al inhibir las α-glucosidasas, reducen la formación de monosacáridos y la disponibilidad de la glucosa y otras hexosas para ser absorbidas en el intestino.

NUEVAS ESTRATEGIAS FRENTE A DM2

Los fármacos tradicionales dejan sin tratar muchos aspectos importantes de la diabetes, tales como la reducción de la sensibilidad de las células beta a la glucosa, la disminución de su número o funcionalidad o el incremento de la producción de glucosa por la vía de la gluconeogénesis, a causa de un incremento en la secreción de glucagón. Además, los tratamientos convencionales suponen un serio riesgo de inducir episodios de hipoglucemia. Por lo tanto, era necesario investigar nuevas vías de tratamiento. Era conocido desde 1964 que la administración oral de glucosa produce una respuesta insulínica superior a su administración vía intravenosa, lo cual sugería la existencia de factores digestivos capaces de estimular la secreción de insulina. La identificación posterior de estos factores con las *incretinas*, un grupo

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

de hormonas peptídicas segregadas en el intestino como respuesta a la ingesta de alimentos, condujo a denominar "efecto incretina" a la diferente respuesta a la glucosa oral y parenteral[8].

Las incretinas tienen un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasia de la glucosa. Las hormonas GLP-1(*glucagón like peptide*) y GIP (*glucose-dependent insulinitropic polypeptide*) se segregan en las células L y K de la mucosa intestinal respectivamente hacia el intestino en respuesta a la llegada de nutrientes. Mediante diferentes mecanismos van a regular los niveles plasmáticos de glucosa. El GLP-1 activo y el GIP activan la producción y liberación de insulina promoviendo el buen funcionamiento de las células B-pancreáticas. Se calcula que alrededor del 60% de la insulina postprandial liberada se debe a la acción de éstas hormonas.

El problema de las incretinas es su corta vida media de escasos minutos (7-36min). Nada más ser liberadas, GLP-1 y GIP se degradan por acción de la dipeptidilpeptidasa 4 (DPP-4) en el resto del aminoácido *N*-terminal. Por estos motivos, la investigación se ha centrado en la estrategia de inhibir dicha enzima y así preservar la acción de las incretinas endógenas[9].

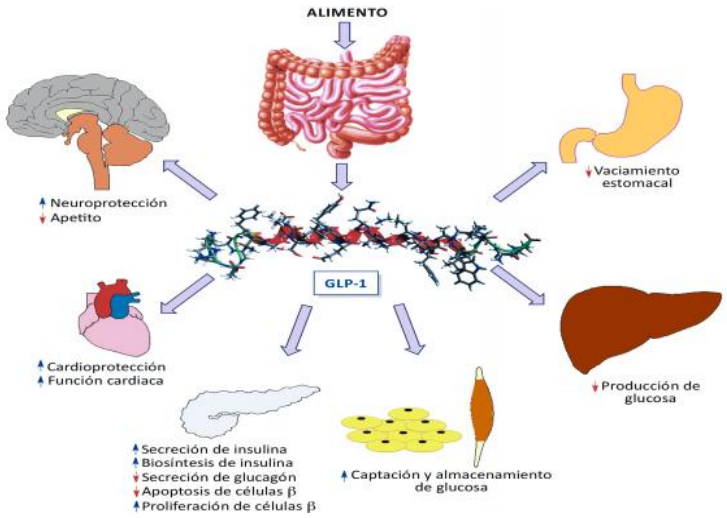


Fig.(3) Acciones del GLP-I sobre efectos de la DM2

Existen dos estrategias principales para el diseño de fármacos antidiabéticos basados en el aprovechamiento de la acción hipoglucemiante de las incretinas. Por un lado, agonistas del receptor de GLP-1, que en la actualidad son péptidos análogos de la hormona natural, y por otro, el desarrollo de fármacos que actúan como inhibidores de DPP-4 que incrementan los niveles de GLP-1 endógena. Nos centraremos en esta última estrategia.

ENZIMA DPP-4

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

La DPP-4 es una proteasa de serina ampliamente distribuida en células y tejidos en mamíferos. Es idéntica al *antígeno activador CD26* en células T y a la *adenosina desaminasa binding protein*, por ello se define también como DPP-4/CD26. Existe como un dímero formado por 766 aminoácidos con una región citoplasmática de seis residuos, una región transmembrana de veintidós residuos, y la parte extracelular con los 738 residuos restantes. La parte extracelular se compone de un dominio poco frecuente de ocho b-hélices en láminas y un dominio catalítico que contiene la triada catalítica Ser630-Asp708-His740 localizada en la región *C*-terminal de la enzima. Lleva a cabo la degradación de péptidos que tienen una prolina o alanina en la penúltima posición del extremo *N*-terminal por escisión de un fragmento correspondiente a los dos últimos aminoácidos.

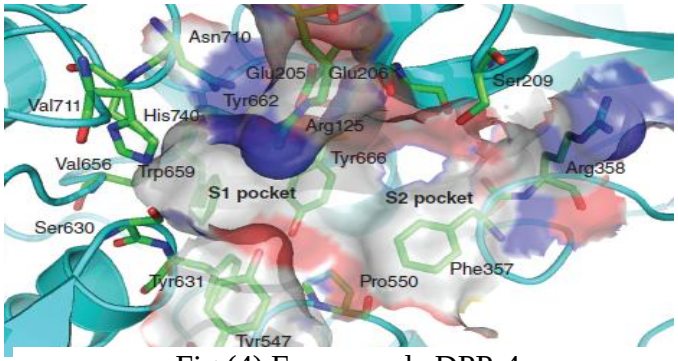


Fig.(4) Esquema de DPP-4

Los estudios cristalográficos con rayos X de varios inhibidores formando el complejo con la DPP-4 demuestra que el lugar de unión con la DPP-4 se constituye por tres partes principalmente: los bolsillos hidrofóbicos *S1* formado por residuos de Tyr631, val656, Trp659, Tyr666 y Val711 y *S2*, mayor que *S1*, por los residuos de Arg125, Phe357, Arg358, Tyr547, Pro550 y Asn710, y la zona de reconocimiento *N*-terminal por los residuos de Glu205, Glu206 y Tyr 662. Además, el residuo Ser630 catalítico y el hueco oxianiónico creado por la Tyr631 y Tyr547 están también involucrados en la unión de los inhibidores con la DPP4. Basándonos en los análisis cristalográficos y los conocimientos sacados del SAR, queda demostrado que tanto el bolsillo hidrofóbico S1 y la región de reconocimiento *N*-Terminal son cruciales en la inhibición de la DPP-4[10].

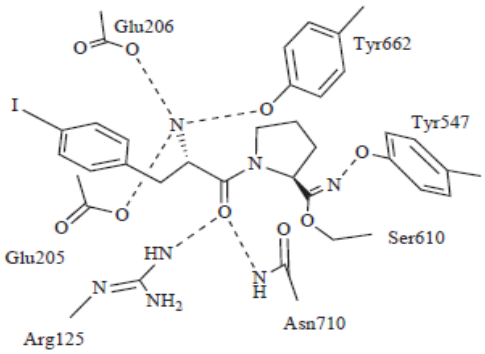


Fig.(5) Esquema de unión de una cianopirrolidina en el centro activo de la DPP4.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

TIPOS DE INHIBIDORES DE DPP-4

1- **Inhibidores peptidomiméticos**
2- **Inhibidores no peptidomiméticos**

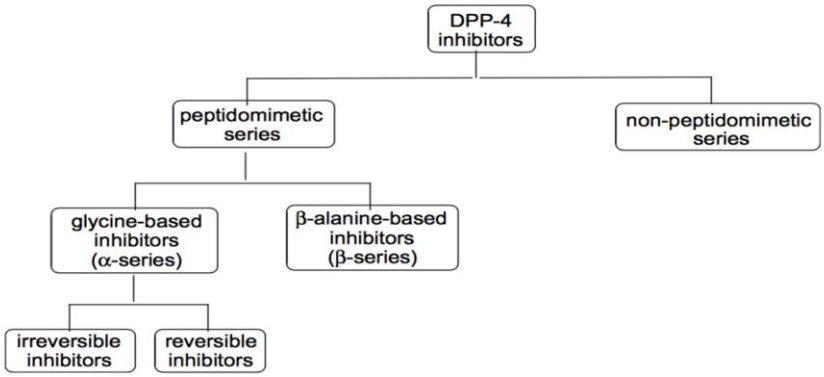


Figure 1. Classification of DPP-4 inhibitors.

Fig.(6) Clasificación de los inhibidores DPP-4

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado un proceso de documentación y revisión bibliográfica a través de PubMed (motor de búsqueda de libre acceso a la base de datos MEDLINE de citaciones y resúmenes de artículos de investigación biomédica), en referencia a la inhibición de la enzima DPP-4 para el estudio del diseño de los diferentes tipos de inhibidores, y las diferentes rutas que condujeron a la obtención de las moléculas que posteriormente fueron comercializadas.

Entre nuestros **objetivos** se encuentran:

- Destacar la importancia de la diabetes como problema sanitario a nivel mundial.
- Explicar las posibilidades que ofrecen las incretinas para el tratamiento de la diabetes tipo II.
- Explicar los distintos pasos seguidos en la investigación de la síntesis de nuevos fármacos con la DPP-4 como diana.

RESULTADOS. (Todas las estructuras referidas quedan representadas en el anexo 1)

1-DISEÑO DE INHIBIDORES PEPTIDOMIMÉTICOS DE DPP-4 (iDPP4). PEPTIDILNITRILOS.

En la década de los 90 se empezaron a publicar estudios de iDPP4 derivados de aminoacilprolina, con grupos electrofílicos tipo borónicos, fosfonatos y diacilhidroxilamina que se unen a la serina pero de baja potencia o poca estabilidad química[11].

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Debido a la similitud entre la DPP-4 y PEP, Sherwin Wilk introdujo un nitrilo como grupo que interactuara con la serina. Estas cianopirrolidinas resultaron tener buena potencia y una estabilidad aceptable y además fueron selectivas frente a otras enzimas. En 1994 investigadores de Zeria Pharmacéuticals descubrieron la primera cianopirrolidina, la sitagliptina, cuyo grupo nitrilo forma un enlace covalente imidato con la serina del centro catalítico.

Originalmente, estos compuestos estaban siendo investigados como inmunomoduladores[12] y su descubrimiento como tratamiento de la diabetes tipo II las hizo muy populares durante los siguientes años lo que condujo al descubrimiento de NVP-DPP728, con efecto antidiabético en humanos (**1**), la vidagliptina[13] (**3**), la saxagliptina (**4**) y recién aprobada por la FDA la omarigliptina para tratamiento una vez a la semana.

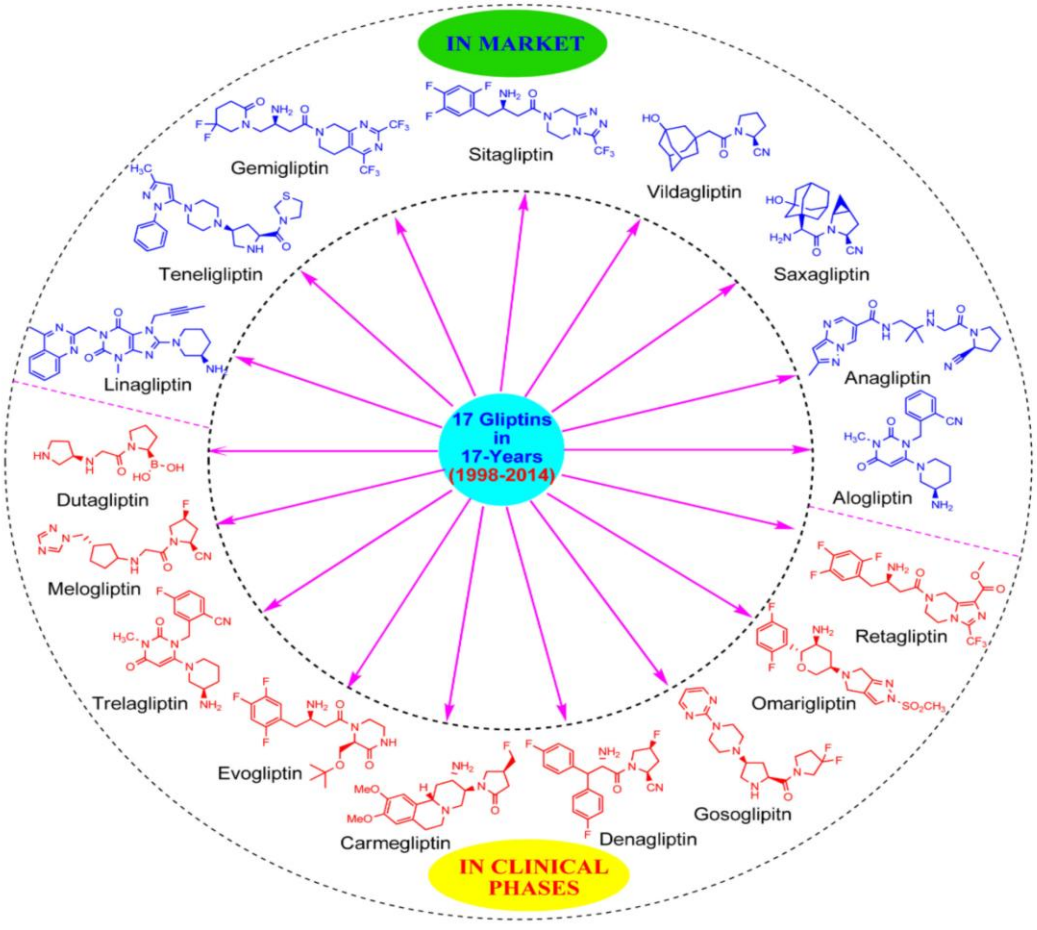


Fig.(7) Cianoprirrolidinas aprobadas y en desarrollo clínico

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

1.1-Relación estructura-actividad de cianopirrolidinas como IDPP-4

Las cianopirrolidinas son análogos al sustrato peptídico de la DPP-4, con el nitrilo en la posición de la zona de escisión[14]. Es importante el grupo nitrilo para la actividad inhibitoria, análogos estructurales pero sin el nitrilo resultaron ser del orden de dos o tres veces menos activos. Sin embargo, el enlace covalente formado es reversible y las cianopirrolidinas son inhibidores competitivos con baja cinética de disociación.

Otra interacción clave en la actividad es el enlace de hidrógeno entre el grupo amino protonado y la región cargada negativamente formada por Glu205, Glu206 y Tyr662. Esta interacción mimetiza el reconocimiento de la zona *N*-Terminal del sustrato con la DPP4. Cualquier compuesto incapaz de formar este enlace resulta inactivo[15] (**5-11**).

Respecto al anillo de pirrolidina, tras diversos estudios se vio que sólo admite pequeñas modificaciones. El cambio de la pirrolidina por una tiazolina produce un aumento de cinco veces la potencia, pero también un gran aumento de la inestabilidad[16] (**12**). Sin embargo, el cambio por una oxazolina disminuye muchísimo la actividad. El modificar el anillo con un *cis*-3,4-metano, disminuye también la actividad pero aumenta mucho la estabilidad, lo que culminó con el descubrimiento de la saxagliptina. Este es el único cambio del anillo en cuanto aumento de carbonos puesto que el biciclo (5+1) se acepta pero un anillo simple de seis carbonos no ejerce acción inhibitoria. Un flúor en posición 4S demostró ser beneficioso para la actividad. El compuesto **14** demostró ser más potente que el **13** y tenía mejores concentraciones plasmáticas[17]. Más adelante, se introdujeron modificaciones en la posición 5 del anillo y se vio que sustituyentes como alquinos (**15**) proporcionaban selectividad frente a DPP8 y DPP9[18].

Una gran variedad de sustituyentes son bien tolerados en la posición P2. La enzima puede acomodar sustituyentes voluminosos en la P2. Por ejemplo, un terc-butil-glicina en esta posición llevo al compuesto FE 999011 (**16**), con excelentes propiedades en cuanto a actividad y estabilidad *in-vitro*[19]. En comparación con **1** tiene mayor vida plasmática en ratas Zucker (ZDF). FE 999011 reduce los niveles de glucosa incluso administrado 8 horas antes de la ingesta de glucosa. En un estudio crónico en ratas ZDF que normalmente se volvían diabéticas a las 6-10 semanas pospuso 16 días la enfermedad respecto a las que no tomaban el medicamento. Este

resultado aumenta la esperanza de que la progresión de la intolerancia a la glucosa a diabetes pueda ser evitada con la inhibición de la DPP4[20].

Los compuestos con la posición 2 pueden ser optimizados en inhibidores de gran potencia. Los compuestos **17-23** presentan sustituyentes voluminosos en P2 que les confieren no sólo mayor actividad frente a DPP4 si no que también selectividad frente a DPP8 como es el caso del compuesto **19**.

El hecho de que DPP4 reconoce la *N*-metilglicina como un *N*-terminal aminoácido llevó a Edwin B. Villhauer en 1995 a investigar las glicinil-cianopirrolidinas *N*-sustituídas. Los sustituyentes cíclicos eran más favorables que los lineales alquílicos y fueron ampliamente estudiados por las compañías, que elaboraron sustituyentes muy elaborados. Sin embargo, los sustituyentes terciarios se volvieron importantes para mejorar la estabilidad química[21]. Además, estudios paralelos dieron con la molécula **38**, con una gran potencia, que al modificar el grupo nitro por un nitrilo, dio como resultado el descubrimiento de **1**, con una mejorada selectividad hacia DPP4 frente a DPP2. Al final, se desechó la molécula debido a su corta vida media a favor de otras de mayor semivida plasmática como la vidagliptina.

Tanto los α-C-sustituyentes de la molécula **24** y el N-sustituyente de 1 ocupan una posición similar en la región S2 de la enzima[22] pero la combinación de ambos en una misma molécula no produce un aumento de la actividad. Existe una excepción a esta situación que es el compuesto como el **25**, en el que se forma un anillo entre ambos sustituyentes, pero con requerimientos muy estrictos, deben ser anillos levógiros de 5C.

1.2-Relación estructura-estabilidad de cianopirrolidinas como iDPP4

Cualquier inhibidor que tenga una amina nucleofílica y un grupo electrófilo interactuante con la serina es propenso a ciclarse intramolecularmente. Aunque el nitrilo como grupo electrófilo tiene buenas vidas medias desde horas a días, se sospecha que su limitada estabilidad contribuye a la limitada duración de efecto en algunas moléculas por lo que se han centrado estudios de diseño en mejorar la estabilidad[23].

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Se demostró que las cianopirrolidinas ciclan intramolecularmente dando como resultado un compuesto inactivo[24] (**26-28**). Una de las modificaciones estudiadas fue la de hacer un profármaco enmascarando la amina en forma de carbamato como en el caso de la molécula.**29**.

Otro intento de estabilizar la molécula fue el mantener el rotámero *trans*, el cual es el que tiene actividad frente a DPP-IV, debido a que el primer paso de la ciclación es el paso del rotámero *trans* al *cis*. Las moléculas resultantes a este intento fueron fluoroolefinas y olefinas (**30-33**), muy poco activas debido a su incapacidad de formar enlace de Hidrógeno con la Asn710 y Arg125[25]. Otra manera de hacer más rigido el rotámero *trans* fue añadirle un ciclo a la estructura como en la molécula **34** y **35**, que además resultaron ser mucho más estereoselectivos sobre DPP-4 frente a DPP-7, DPP-8 y FAP[26].

Últimamente, las líneas de investigación se han orientado hacia añadir grupos voluminosos unidos a N- o α-C. Estos grupos voluminosos combinan una mayor estabilidad frente a la ciclación debido a que producen impedimento estérico en el paso de isómero *cis* a *trans* con una mayor actividad inhibitoria porque se unen en el bolsillo hidrofóbico S2 de la enzima. Además, se investigó la utilización de aminas terciarias y cuaternarias para evitar dicha ciclación. Los compuestos más representativos son la vidagliptina y la saxagliptina.

1.3-Descubrimiento de la Vidagliptina

En el proceso de estudios SAR, los científicos de Novartis investigaron derivados del adamantano como los de la molécula **36** y **37**, siendo el **36** la más potente de los dos. Se vio que era resistente a la metabolización y descubrieron que tenía un metabolito primario tan activo como el compuesto en sí, por lo que se supuso que una hidroxilación en el anillo de adamantano tendría buena tolerancia. Probaron entonces con la vidagliptina (**3**), y vieron que tenía una potencia similar a **36**[27]. También vieron que tenía un tiempo de ciclación 30 veces mayor que el NVP-Dpp728 y mayor efecto farmacodinámico. Si comparamos la vidagliptina con la molécula **39** como ejemplo de cianopirrolidina primitiva, aumentó la selectividad frente a DPP-8 y mantuvo la selectividad frente a DPP-II y otras serín proteasas.

2. INHIBIDORES NO PEPTIDOMIMETICOS DE LA DIPEPTIDIL PEPTIDASA-4

2.1- Interacción con la diana

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Se ha descrito por T.Liu y col.[28], que los inhibidores de tipo no peptidomiméticos tienen una interacción común con los residuos aminoacídicos de la DPP-4, aunque varíen en su estructura.La interacción del inhibidor con la DPP-4 es la siguiente:

- Enlaces iónicos de un grupo amino primario o secundario con los residuos Glu250, Glu206 y Tyr662.
- Una interacción hidrofóbica entre el anillo aromático y el *bolsillo S1* de la enzima (Tyr 631,Val 656,Trp 659,Tyr 662,Tyr 666 y Val 711).
- El resto de sustituyentes con el *bolsillo S2* de la enzima(los principales sitios de unión son: Phe 357, Ser 209 y Arg 358).

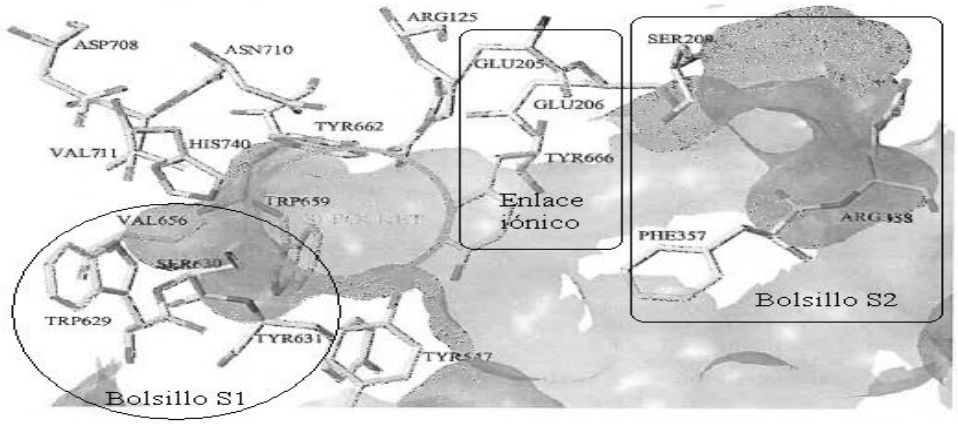


Fig.(8) Interacción entre los inhibidores no peptidomiméticos con la DPP-IV.

2.2- Clases de Inhibidores no-peptidomiméticos

De acuerdo a su estructura, los inhibidores no peptidomiméticos, se clasifican en 7 grupos: Análogos de xantina, Análogos de quinazolinonas y pirimidinonas., Derivados de la β-homofenilalanina, Derivados de la fenetilamina, Análogos de la arilmetilamina., Análogos de α-aminobenzo quinolizidina, Análogos de *sulphostin.* Se ha elegido para el estudio del diseño a los **derivados de la β-homofenilalanina,** grupo del que deriva un importante fármaco actualmente en el mercado, la **sitagliptina.**

2.3. Descubrimiento/diseño de la sitagliptina[29].

En referencia a los inhibidores no peptidomiméticos de la DPP-4, los laboratorios Merk (MSD) consiguieron en el 2006 la aprobación de la sitagliptina con el nombre comercial de Januvia®,

un potente inhibidor altamente selectivo de la DPP-4 utilizado en el tratamiento de la diabetes Mellitus tipo 2 tipo II(DM2)[30].

El descubrimiento del péptido similar al glucagón, el GLP-1que puede ser adecuado para el tratamiento de DM2 y la validación preclínica de la inhibición de la DPP-4 como una alternativa, permitió al laboratorio sospechar que a partir del estudio de la estructura del GLP1, podrían crear un programa para el descubrimiento de nuevas moléculas.

Al inicio del estudio, los dos compuestos que ya estaban siendo estudiados en ensayos clínicos en humanos[31] eran el profármaco isoleucil-tiazolidida (**40)** y el NVP-DPP728 (**41)** de Novartis, por lo que para el inicio del estudio, Merck eligió patentar la licencia del L-treo-isoleucil-tiazolidida y su estereoisómero L-alo-isoleucil-tiazolidida (**42)**.

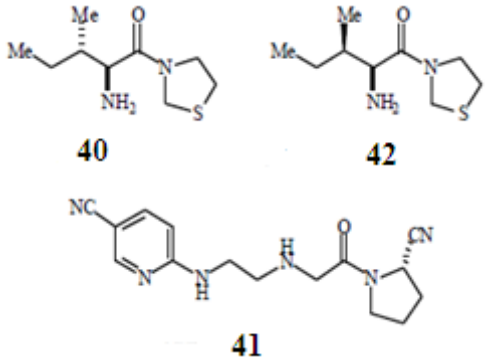


Fig.(9) Primeros inhibidores de la DPP-IV

En estudios farmacodinámicos de dosis única, P32/98 **(40)** demostró una buena tolerancia, un aumento de la actividad de la GLP-1 y una reducción de la glucemia después de la comida o la ingesta de glucosa en pacientes. Además, el profármaco mostró una mejora en la secreción de insulina y una mejor tolerancia a la glucosa en los estudios de dosis única realizados con un pequeño número de pacientes diabéticos.

Las toxicidades observadas en los compuestos L-treo y su estereoisómero L-alo, profundizaron la preocupación por la seguridad potencial de este mecanismo; sin embargo, el hallazgo de que el isómero L-alo fue aproximadamente 10 veces más tóxico en ratas y perros, a pesar de que tienen actividad farmacodinámica y farmacocinética comparable en ambas especies, sugirieron que estas toxicidades no eran debidas probablemente a la inhibición de la DPP-4, y sí a una actividad desviada.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Atendiendo a la inhibición de la DPP-8/9, se descubrió que el potencial de inhibición sobre estas enzimas era 5-10 veces más alto en comparación con la DPP-IV, y ante la posibilidad de que la inhibición de DPP8/9 fuera la responsable de los efectos tóxicos, se realizaron estudios preclínicos identificando compuestos selectivos de la DPP-4 **(43)**, DPP-8/9 **(44)** y prolindipeptidasa (QPP) **(45)**, y se evaluaron sus perfiles[32].

En referencia a los inhibidores de la QPP, solo se observó en ratas reticulocitopenia y no se observaron toxicidades en ninguna de las especies en los inhibidores selectivos de la DPP-4, mientras que los efectos producidos por los inhibidores selectivos de la DPP-8/9 fueron en ratas trombocitopenia o alopecia, y en perros toxicidad gastrointestinal; por lo tanto, se evidenció científicamente que las toxicidades eran fruto de una inhibición selectiva de las dipeptidilpeptidasas 8/9 y de una inhibición no selectiva de la DPP-4, centrándose así los estudios en la inhibición selectiva de la DPP-4.

En la ruta del desarrollo/búsqueda de un inhibidor selectivo no peptidomimético, se abordaron tres posibles vías, a partir de[2]: un derivado de xantina (**46**), un derivado de prolinamida (**47**) y un derivado de piperazina (**48**).

1.-El derivado de xantina no generó resultados positivos y se abandonó esta vía[33].

2.- El derivado de prolinamida se preparó originalmente como inhibidor de la trombina, debido a que presenta una mayor potencia que sobre la DPP-4 (CI_{50}=52 nm y CI_{50}=1900nm, respectivamente). El grupo amida podría ser sustituida por el ácido sin generarse una pérdida de potencia[34]. Modificaciones llevadas a cabo:

A- Sustitución del grupo amida por un derivado del acido fenilacético[35] **(49)** con IC_{50}=510 nM.

B- Posteriormente, se adoptó la estrategia observada anteriormente en el derivado de la xantina (aunque en su caso no generase compuestos útiles en nuestro estudio), y se adicionó un sustituyente 2-fluor al anillo de fenilo dando lugar a un aumento de la potencia **(50)**.

C- Se continuó aumentando la potencia con la sustitución del resto de acido acético en acido láctico **(51)** con una IC_{50}=12 nM.

D- Modificar el resto metilo del grupo ácido con grupos más lipófilos, siendo el resto isopropilo el seleccionado, y la adición de un segundo fluor al anillo fenilo en la posición 5.

El compuesto resultante **(52)**, se convirtió en el representante de una clase única de inhibidores, traduciéndose esto en la ausencia de problemas respecto a las patentes, y presentaba una excelente selectividad; su problema radicó en la pobre biodisponibilidad que presentaba.

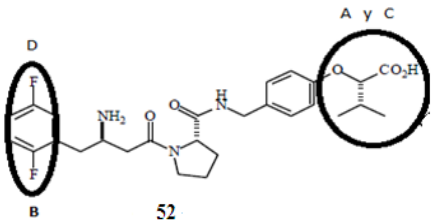


Fig. (10). Mólecula obtenida a partir del desarrollo del derivado de prolinamida.

3.-**El derivado de piperazina (48)**. Este nuevo inhibidor de la DPP-4[36] presentaba IC_{50} =11µm, y se estudió inicialmente como candidato para ser un agonista del receptor de melanocortina 4 (MC4-R), descubriéndose más adelante la ausencia de dicha actividad.

Cuando los estudios SAR sobre el lado derecho de la molécula no generó mejoras substanciales en la potencia, comenzó el estudio sobre el lado izquierdo:

A- Al igual que en la serie anterior, se buscó un incremento de la potencia con la adicción de dos radicales fluor en las posiciones 3 y 4, con la consiguiente IC_{50}=4100 nM (**53**).

B- El siguiente paso, fue la sustitución del derivado de fenilalanina por la correspondiente amida de homofenilalanina, que mostró una potencia 100 veces superior (**54**).

C- Se modificaron los sustituyentes fluor, diseñando una nueva molécula con un solo sustituyente fluor en la posición 2 (**55**).

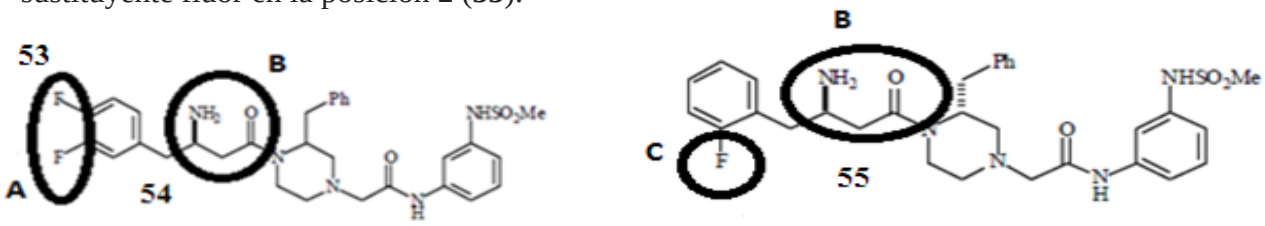


Fig. (11). Desarrollo del derivado de piperazina.

A partir de los datos obtenidos de los estudios SAR del lado derecho de la molécula y de los dos cabezas de serie descubiertos por el laboratorio Merck, se obtuvo una nueva molécula prometedora **(56)** con un menor peso molecular y una mejor actividad in vitro (IC_{50}=19nM) como se observa en la figura 6.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

La β-amidoacil amida procedente del derivado de prolinamida **(47)** y la piperazina procedente de los derivados de piperazina **(48),** se presentaron como inhibidores potentes de la DPP-4 con unos valores de IC_{50}=19µM y 11µM.

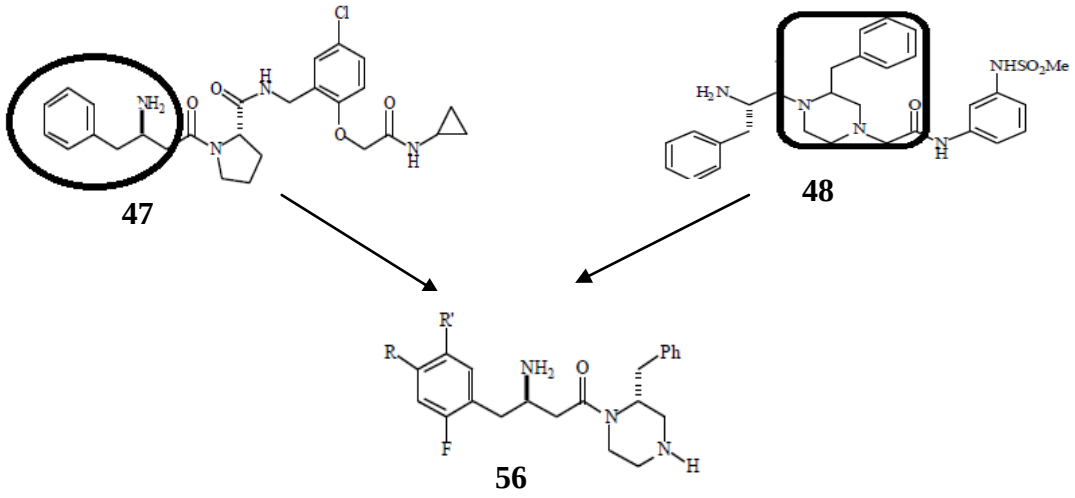


Fig.(12). Combinación de los productos finales de ambas vías en el desarrollo de nuevos inhibidores de la DPP-IV.

Frente al extenso metabolismo sufrido en el anillo de piperazina pese al bajo peso molecular y con la consiguiente baja biodisponibidad, los estudios SAR del compuesto **17**, revelaron que la distancia entre el grupo beta homofenilo y el grupo amino era crucial para el mantenimiento del potencial inhibidor de la DPP-4; acortándola y alargándola no era tolerada. Por lo tanto, para mejor la estabilidad metabolica del anillo de piperazina, una gran variedad de heterociclos metabólicamente estables fueron introducidos reemplazando el resto piperazina, siendo la estrategia empleada las piperazinas fusionadas[37].

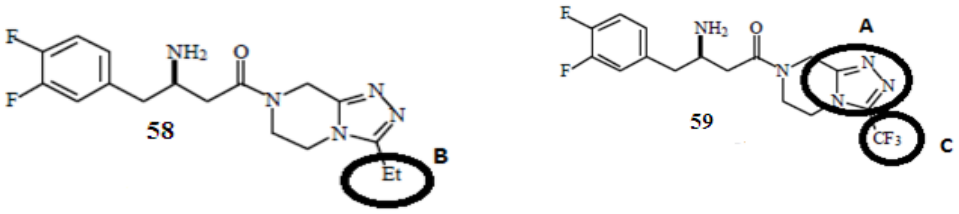
En el desarrollo de esta serie para estabilizar el anillo de piperazina en referencia al metabolismo, se realizaron las siguientes modificaciones:

A- La formación de la triazolopiperidina como piperazina fusionada, lo que llevó a un aumento en la potencia **(57).**

B- En busca de la mejora de la biodisponibilidad, se introdujo inicialmente un grupo etilo como radical en la piperizina fusionada **(58)**; se observó en un fracaso en la mejora de la biodisponibilidad oral en los animales de ensayo, debido a una baja extracción hepática (10-20%) y un aumento de la estabilidad hepática.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

C- La solución final a la biodisponibilidad resulto ser bastante simple, aunque totalmente empírica; la sustitución del grupo etilo por un trifluorometilo **(59)** aumentó la biodisponibilidad oral.



Fig(13). Mecanismos para estabilizar el anillo de piperazina frente al metabolismo.

Finalmente, se ajustaron los sustituyentes fluor en las posiciones 2, 4, 5 para conseguir la potencia óptima y obtener así la molécula final, la **SITAGLIPTINA (60)**:

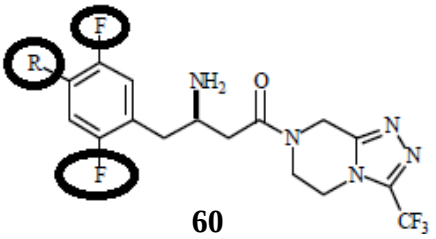


Fig.(14). Molécula final: SITAGLIPTINA

La sitagliptina presentó una IC_{50}=18 nM en contra de la DPP-4 humana, y alta selectividad frente otras peptidasas como la DPP-8 (IC_{50}=48µM) y la DPP-9 (IC_{50}=100µM). Además, perfiles de actividad frente a otras enzimas, canales iónicos y receptores mostraron una actividad insignificante por su parte. La sitagliptina presentó un buen perfil farmacocinético en múltiples especies preclínicas: ratas (F=76%,$t_{1/2}$=1.7h,Cl_p=3.6 L/kg/h), perros (F=100%, $t_{1/2}$=4.9h, Cl_p=0.36 L/kg/h) y monos (F=68%, $t_{1/2}$=3.7 h, Cl_p=1.68 L/kg/h)..

La actividad plasmática de la DPP-4 fue inhibida en un 80% y un 47%, a las 2 y 24 horas (respectivamente) siguientes a la administración de 25 mg de sitagliptina, y un 96% y 80% (2h y 24 h respectivamente) en una administración de 200 mg en un estudio cruzado de dosis única en pacientes diabéticos; el test de respuesta a tolerancia oral a la glucosa mostró un aumento de 2 veces, en términos de la relación de la actividad total de la GLP-1, a las dos horas, y de un 1.3-1.9 veces a las 24 horas.

La sitagliptina redujo significativamente la glucosa en sangre y la HbA1c en pacientes con DM2 y no mostró efectos secundarios comunes. Sobre la base de estos resultados positivos en los ensayos clínicos, la sitagliptina (con nombre comercial Januvia) fue aprobada por la FDA[2].

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Desde el descubrimiento de la sitagliptina empezaron numerosos estudios para desarrollar análogos de sitagliptina con un mejor perfil, siendo el grupo de las triazolopiperazinas la mejor diana para realizar modificaciones.

CONCLUSIÓN

El tratamiento de DM2 siguiendo la línea de las incretinas presenta importantes ventajas respecto a los hipoglucemiantes orales, como la baja incidencia de episodios de hipoglucemia, la pérdida de peso, la regeneración de las células β-pancreáticas que mejora la resistencia del organismo de pacientes a la insulina y la reducción en la gran mayoría de los casos de HbA1c que implica que su eficacia a medio y largo plazo. En vista de su vida media prolongada[38], los iDPP- 4 pueden administrarse en dosis únicas diarias (de forma subcutánea), sin tener relación con las comidas pero necesario un ajuste en pacientes con insuficiencia renal y hepática.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Stewart G. Diabetes mellitus: classification, pathophysiology, and diagnosis. Medwave 2009 Dic;9(12):e4315 doi:10.5867/medwave.2009.12.4315.

(2) Bryan J et al. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. Science. 1995; 268(5209): 423-26.

(3) Tessier D, Dawson K, Tétrault JP, Bravo G, Meneilly GS. Glibenclamide vs gliclazide in type 2 diabetes of the elderly. Diabet Med. 1994; 11(10): 974-80.

(4) Fuhlendorff J, Rorsman P, Kofod H, Brand CL, Rolin B, MacKay P et al. Stimulation of insulin release by repaglinide and glibenclamide involves both common and distinct processes. Diabetes. 1998; 47(3): 345-51.

(5) Jackson RA, Hawa MI, Jaspan JB, Sim BM, Disilvio L, Featherbe D et al. Mechanism of metformin action in non-insulin-dependent diabetes. Diabetes. 1987; 36(5): 632-40.

(6) Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones. N Engl J Med. 2004; 351(11): 1106-18.

(7) McCulloch DK, Kurtz AB, Tattersall RB. A new approach to the treatment of nocturnal hypoglycemia using alpha-glucosidase inhibition. Diabetes Care. 1983 6(5): 483-87.

(8) Menéndez J, Villacampa, M. Péptidos y diseño de fármacos. Agentes antidiabéticos relacionados con las incretinas. An. Real Acad. Farm. Vol. 79, No 4 (2013), pag. 580-612.

(9) Kazakos, K. (2011). Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. Diabet. Res. Clin. Pr. 93S, S32–S36.

(10) Novel DPP-4 inhibitors against diabetes Yang Liu1 & Yongzhou Hu*, Zhejiang Province Key Laboratory of Anti-Cancer Drug Research, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University.

(11) Li, J.; Wilk, E.; Wilk, S. Aminoacylpyrrolidine-2-nitriles: potent and stable inhibitors of dipeptidyl-peptidase IV (CD 26). Arch. Biochem. Biophys. 1995, 323(1), 148-154.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

(12) Schoen, E.; Born, I.; Demuth, H. U.; Faust, J.; Neubert, K.; Steinmetzer, T.; Barth, A.; Ansorge, S. Effects of specific enzyme inhibitors on activity of dipeptidyl peptidase IV and proliferation of human lymphocytes. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 1991, 372(5), 305-311.

(13) Villhauer, E. B.; Brinkman, J. A.; Naderi, G. B.; Burkey, B. F.; Dunning, B. E.; Prasad, K.; Mangold, B. L.; Russell, M. E.; Hughes, T. E. 1-[[(3-Hydroxy-1-adamantyl)amino] acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine: A Potent, Selective, and Orally Bioavailable Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor with Antihyperglycemic Properties. J. Med. Chem. 2003, 46(13), 2774-2789.

(14) Pueschel, G.; Mentlein, R.; Heymann, E. Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta. Europ. J. Biochem. 1982, 126(2), 359-365.

(15) Lautar, S. L.; Rojas, C.; Slusher, B. S.; Wozniak, K. M.; Wu, Y.; Thomas, A. G.; Waldon, D.; Li, W.; Ferraris, D.; Belyakov, S. DPPIV inhibitor blocks mescaline-induced scratching and amphetamine-induced hyperactivity in mice. Brain Res. 2005, 1048(1-2), 177-184.

(16) Ashworth, D. M.; Atrash, B.; Baker, G. R.; Baxter, A. J.; Jenkins, P. D.; Jones, D. M.; Szelke, M. 4-Cyanothiazolidides as very potent, stable inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Bioorg. Med.Chem. Lett. 1996, 6(22), 2745-2748.13: 79art.

(17) Fukushima, H.; Hiratate, A.; Takahashi, M.; Saito, M.; Munetomo, E.; Kitano, K.; Saito, H.; Takaoka, Y.; Yamamoto, K. Synthesis and structure-activity relationships of potent 3- or 4-substituted-2-cyanopyrrolidine dipeptidyl peptidase IV inhibitors. Bioorg. Med. Chem. 2004, 12(23), 6053-6061.

(18) Madar, D. J.; Djuric, S. W.; Michmerhuizen, M. J.; Kopecka, H.A.; Li, X.; Longenecker, K. L.; Pei, Z.; Pireh, D.; Sham, H. L.; Stewart, K. D.; Szczepankiewicz, B. G.; Wiedeman, P. E.; Yong, H. Preparation of cyanopyrrolidine derivatives and pharmaceutical compositions thereof as inhibitors of dipeptidyl peptidase-iv (dpp-iv). U.S. Pat. Appl. Publ. US2005215784 A1, 2005.

(19) Jenkins, P. D.; Jones, D. M.; Szelke, M. Preparation of peptide analog DP-IV serine protease inhibitors. PCT Int. Appl.WO9515309, 1995.16: 96art.

(20) Sudre, B.; Broqua, P.; White, R. B.; Ashworth, D.; Evans, D. M.; Haigh, R.; Junien, J.-L.; Aubert, M. L. Chronic inhibition of circulating dipeptidyl peptidase IV by FE 999011 delays the occurrence of diabetes in male Zucker diabetic fatty rats. Diabetes 2002, 51(5), 1461-1469.

(21) Hughes, T. E.; Mone, M. D.; Russell, M. E.; Weldon, S. C.; Villhauer, E. B. NVP-DPP728(1-[[[2-[(5-Cyanopyridin-2-yl)amino]ethyl]amino]acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine), a Slow-Binding Inhibitor of Dipeptidyl Peptidase IV. Biochemistry 1999, 38(36), 11597-11603.

(22) Engel, M.; Hoffmann, T.; Wagner, L.; Wermann, M.; Heiser, U.; Kiefersauer, R.; Huber, R.; Bode, W.; Demuth, H.-U.; Brandstetter, H. The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2003, 100(9), 5063-5068.19: 63art.

(23) Augeri, D. J.; Robl, J. A.; Betebenner, D. A.; Magnin, D. R.; Khanna, A.; Robertson, J. G.; Wang, A.; Simpkins, L. M.; Taunk, P.; Huang, Q.; Han, S.-P.; Abboa-Offei, B.; Cap, M.; Xin, L.; Tao, L.; Tozzo, E.; Welzel, G. E.; Egan, D. M.; Marcinkeviciene, J.; Chang, S. Y.; Biller, S. A.; Kirby, M. S.; Parker, R. A.; Hamann, L. G. Discovery and Preclinical Profile of Saxagliptin (BMS-477118): A Highly Potent, Long-Acting, Orally Active Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor for the Treatment of Type 2 Diabetes. J. Med. Chem. 2005, 48(15), 5025-5037.

(24) Villhauer, E. B.; Brinkman, J. A.; Naderi, G. B.; Burkey, B. F.; Dunning, B. E.; Prasad, K.;

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

Mangold, B. L.; Russell, M. E.; Hughes, T. E. 1-[[(3-Hydroxy-1-adamantyl)amino] acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine: A Potent, Selective, and Orally Bioavailable Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor with Antihyperglycemic Properties. J. Med. Chem. 2003, 46(13), 2774-2789.

(25) Van der Veken, P.; Senten, K.; Kertesz, I.; De Meester, I.; Lambeir,A.-M.; Maes, M.-B.; Scharpe, S.; Haemers, A.; Augustyns, K. Fluoro-Olefins as Peptidomimetic Inhibitors of Dipeptidyl Peptidases. J. Med. Chem. 2005, 48(6), 1768-1780.

(26) Schoenafinger, K.; Wagner, H.; Jaehne, G.; Gaul, H.; Buning, C.; Tschank, G.; Werner, U. Preparation of 3-cyanopyrrolizidines for the treatment of type 2 diabetes. PCT Int. Appl. WO 2005012308A1, 2005.

(27) Peters, Jens-Uwe. Dscovery Chemistry, F. Hoffmann-La Roche Ltd. 11 Years of Cyanopyrrolidines as DPP-IV Inhibitors.

Fig esquema DPP-IV: Menéndez, J; Villacampa, M.Péptidos y diseño de fármacos. Agentes antidiabéticos relacionados con las incretinas. An. RealAcad. Farm.Vol.79, Nº4(2013), pag.580-612.

(28) Liu H, Hu Y, Liu T. Recent Advances in Non-PeptidomimeticDipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor: Medicinal Chemistry and Preclinical Aspects. Curr Med Chem. 2012; 19(23): 3982-99.

(29) Nancy Thornberry A, Ann Weber E. Discovery of JANUVIA™ (Sitagliptin), a Selective Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor for the Treatment of Type2 Diabetes. Curr Top Med Chem. 2007; 7(6): 557-68.

(30) Deacon CF1, Holst JJ. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: a promising new therapeutic approach for the management of type 2 diabetes. Int J Biochem Cell Biol. 2006; 38(5-6): 831-44.

(31) Glund, K.; Hoffmann, T.; Demuth, H.-U.; Banke-Bochita, J.; Rost,K.-L.; Fuder, H. Single dose-escalation study to investigate the safety and tolerability of the DP IV inhibitor P32/98 in healthy volunteers. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 2002 Apr; 51(4): 943-950.

(32) Leiting B, Roy RS, Eiermann GJ, Beconi MG, Biftu T, Chan CC et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition forthe treatment of type 2 diabetes: potential importanceof selectivity o ver dipeptidyl peptidases 8 and 9. Diabetes. 2005; 54(10): 2988-94. (33)Cushley MJ, Holgate ST. Bronchodilator actions of xanthine derivatives administered by inhalation in asthma. Thorax. 1985; 40(3): 176-79.

(34) Marsilio F, Patel RA, Wu JK, Thornberry NA, Weber AE, Parmee ER et al. Discovery of potent and selective beta-homophenylalanine based dipeptidyl peptidase IV inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2004; 14(18): 4759-62.

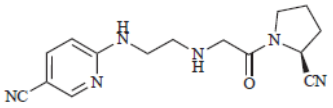
(35) Edmondson SD, Mastracchio A, Beconi M, Colwell LF Jr, Habulihaz B, He H et al. Potent and selective proline derived dipeptidyl peptidase IV inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2004; 14(20): 5151-5.

(36) Brockunier LL, He J, Colwell LF Jr, Habulihaz B, He H, Leiting B et al. Substituted piperazines as novel dipeptidyl peptidase IV inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2004; 14(18): 4763-66.

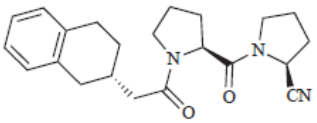
(37) J Med Chem. 2005 Jan 13;48(1):141-51.Kim D1, Wang L, Beconi M, Eiermann GJ, Fisher MH, He H et al.A potent,orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. J Med Chem. 2005; 48(1): 141-51.

(38) Zúñiga-Guajardo S y col. Eficacia de los iDPP-4 actualmente disponibles. Med Int Méx 2015;31:441-453.

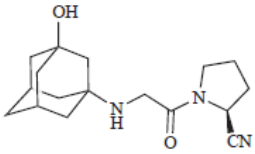
Anexo 1: Representación gráfica de las moléculas.



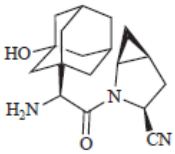
1



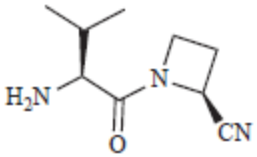
2



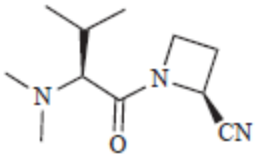
3



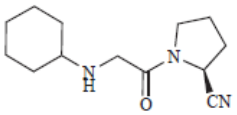
4



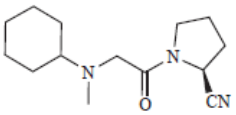
5



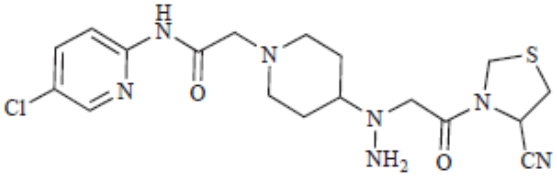
6



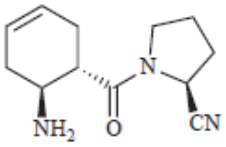
7



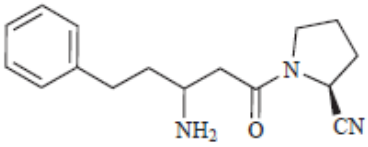
8



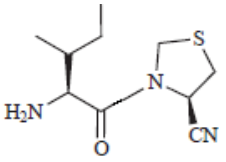
9



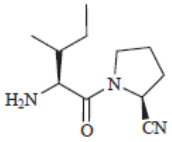
10



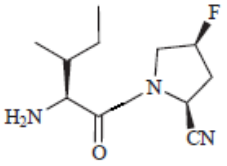
11



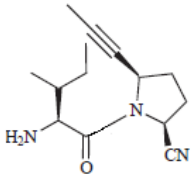
12



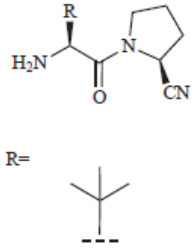
13



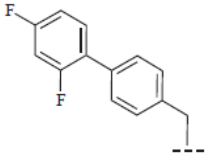
14



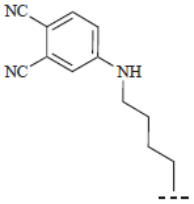
15



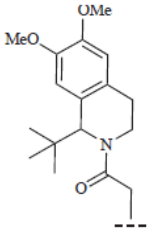
16



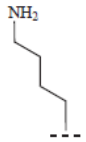
17



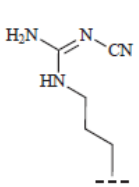
18



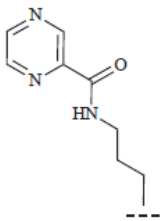
19



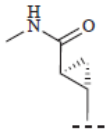
20



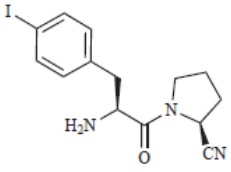
21



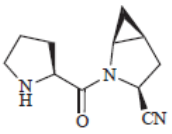
22



23



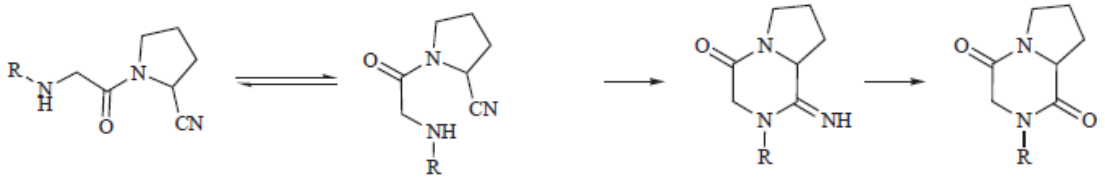
24



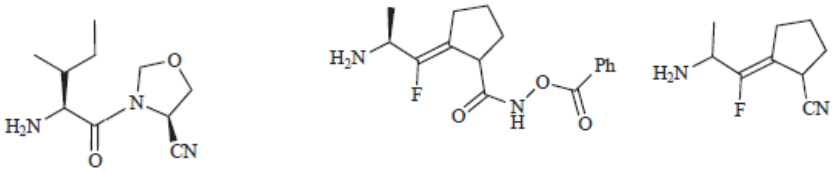
25

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

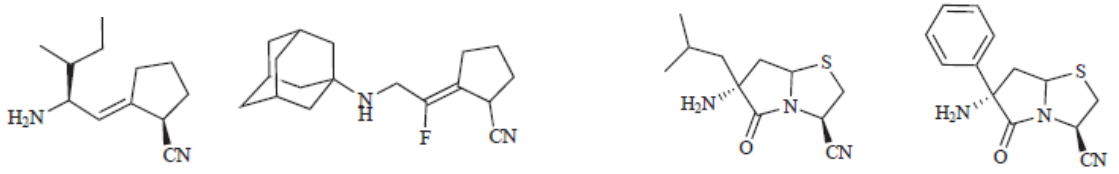
Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.



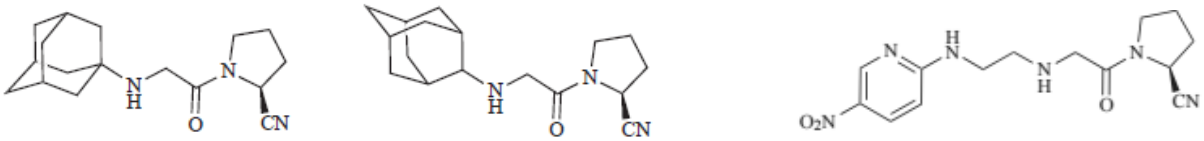
trans-26 **cis-26** **27** **28**



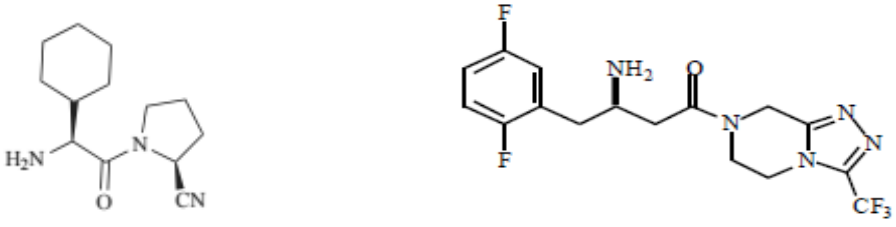
29 **30** **31**



32 **33** **34** **35**



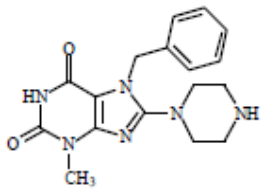
36 **37** **38**



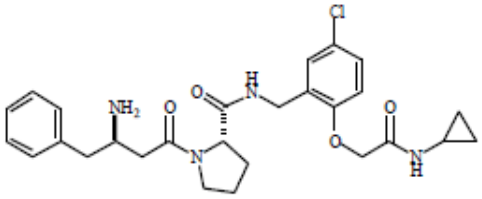
39 **43**

44 **45**

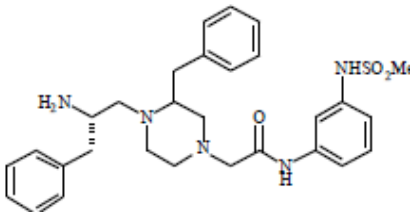
Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.



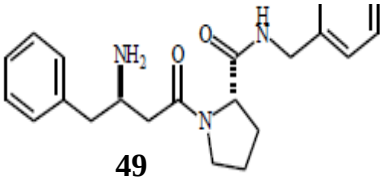
46



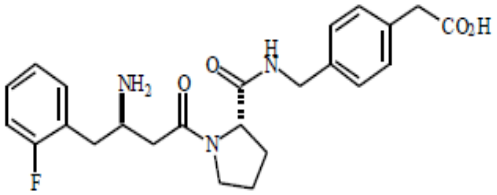
47



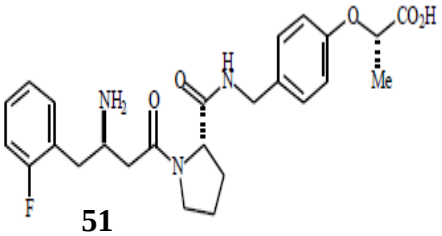
48



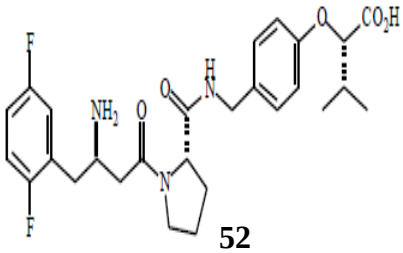
49



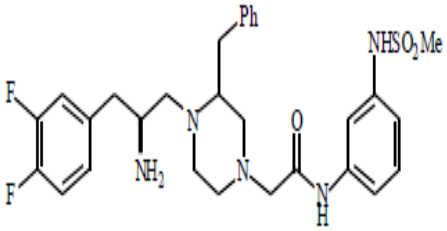
50



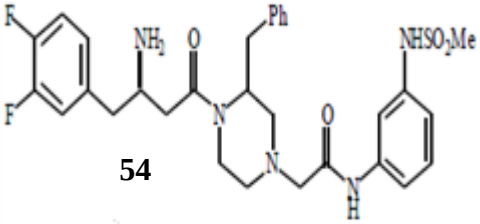
51



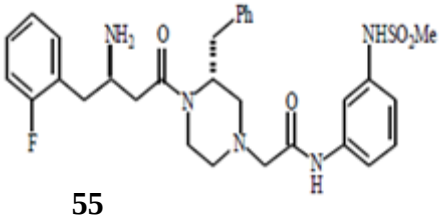
52



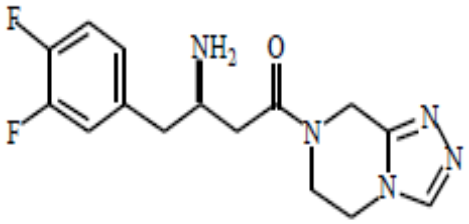
53



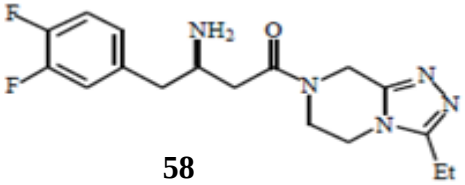
54



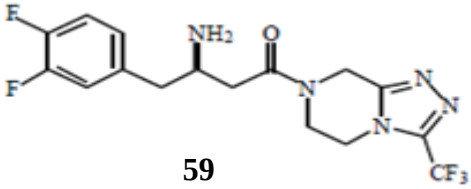
55



57



58



59