

## REVISIÓN

### Péptidos, lagartos y diseño de fármacos. Agentes antidiabéticos relacionados con las incretinas

José Carlos Menéndez<sup>1,2\*</sup>, Mercedes Villacampa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040, Madrid. <sup>2</sup>Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

\*e-mail: josecm@farm.ucm.es

Recibido el 22 de noviembre de 2013

An. Real Acad. Farm. Vol. 79, Nº 4 (2013), pag. 580-612

#### RESUMEN

La diabetes de tipo 2 se ha descrito como una epidemia de ámbito mundial y constituye uno de los mayores desafíos terapéuticos actuales. Las incretinas, en especial GLP-1, son hormonas peptídicas intestinales que estimulan la secreción de insulina y presentan otras acciones beneficiosas, incluyendo una disminución de masa corporal, pero plantean los problemas habituales de los fármacos peptídicos: reducida biodisponibilidad oral y duración de acción muy breve. Se describen en esta revisión los avances recientes en el diseño de antidiabéticos basados en las incretinas, que permiten la superación de dichas limitaciones, así como de inhibidores de su degradación hidrolítica.

**Palabras clave:** Diabetes; Incretinas; Dipeptidil peptidasa IV.

#### ABSTRACT

*Peptides, lizards and drug design. Incretin-related antidiabetic agents*

Type II diabetes has been described as a world epidemic and constitutes one of the major therapeutic challenges nowadays. Incretins, and GLP-1 in particular, are intestinal peptide hormones that stimulate insulin secretion and show other beneficial actions, including weight loss, but they suffer from the limitations common to most peptide drugs, namely poor oral bioavailability and a very short duration of action. In the present review, we describe recent advances in the design of incretin-based antidiabetic drugs that overcome these limitations, as well as recent work on inhibitors of their hydrolytic degradation.

**Keywords:** Diabetes; Incretins; Dipeptidyl peptidase IV.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La diabetes, en especial la de tipo 2, es una enfermedad crónica y progresiva que se caracteriza por la resistencia de los tejidos periféricos a los efectos metabólicos de la insulina.

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 consecuencias más serias en términos de salud pública. Pese a ello, hasta hace unos años no se disponía de alternativas terapéuticas a los fármacos tradicionales.

Las terapias convencionales de la diabetes de tipo 2 se han centrado en elevar los niveles plasmáticos de insulina, bien por administración directa de esta 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.

Estos fármacos tradicionales no son óptimos y 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 en el número o funcionalidad de las células  $\beta$  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. P

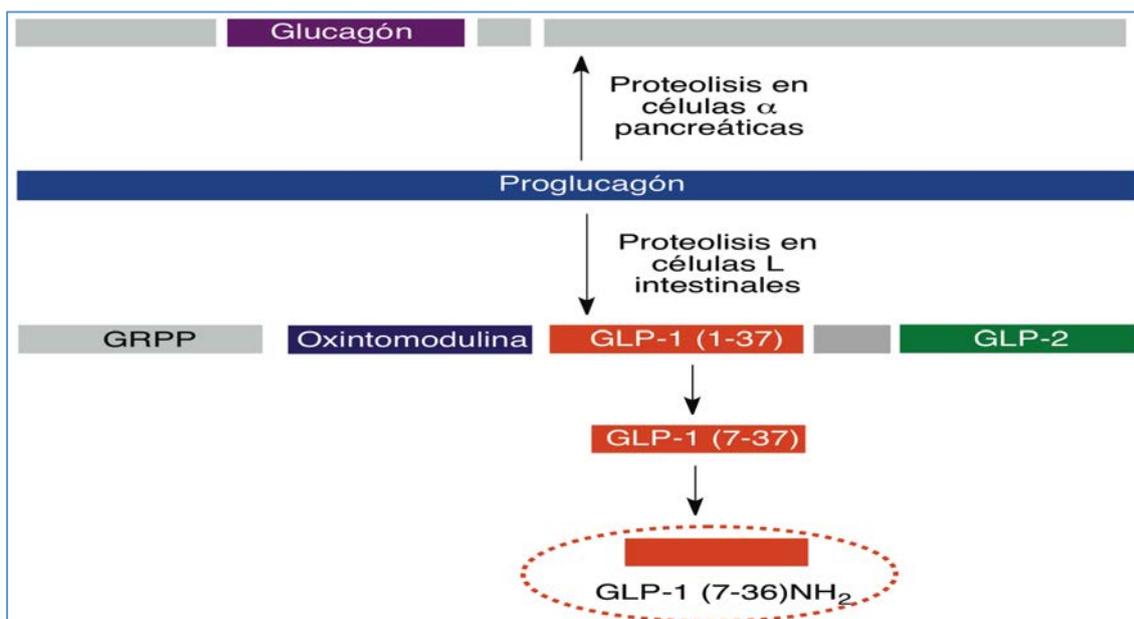
Por todos estos motivos, el desarrollo de nuevos fármacos antidiabéticos se puede considerar de una importancia crucial (1, 2). Para poner el presente artículo en su contexto, resumimos en la Tabla 1 las principales aproximaciones actuales al tratamiento de la diabetes de tipo 2 (3).

De ellas, vamos a centrar nuestra atención en los fármacos relacionados con las incretinas, principalmente en los agonistas del receptor de GLP-1 y en los inhibidores de dipeptidil peptidasa IV (4).

**Tabla 1.-** Terapias actuales de la diabetes de tipo 2.

Grupo de fármacos	Diana molecular	Sitio de acción principal
<b>1. Secretagogos de insulina</b>		
<b>Sulfonilureas</b>	Receptor de sulfonilureas (SUR)	Páncreas
<b>Meglitinidas</b>	Canal K-ATP	Páncreas
<b>Análogos y miméticos de GLP-1</b>	Receptor GLP-1	Páncreas
<b>Inhibidores de DPP-IV (gliptinas)</b>	Dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV)	Intestino, páncreas
<b>2. Sensibilizadores a insulina</b>		
<b>Metformina</b>	Desconocida	Hígado, intestino, páncreas
<b>Tiazolidinonas (glitazonas)</b>	PPAR $\gamma$	Intestino, páncreas
<b>3. Otros</b>		
<b>Insulina</b>	Receptor de insulina	Hígado, músculos
<b>Inhibidores de <math>\alpha</math>-glucosidasas</b>	$\alpha$ -Glucosidasas	Páncreas, intestino delgado
<b>Inhibidores de SGLT2</b>	Cotransportador 2 de sodio-glucosa (SGLT2)	Riñón

Se sabe desde 1964 que la administración oral de glucosa produce una respuesta insulínica superior a una dosis idéntica administrada por 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 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 (5). Entre estas hormonas, es de especial interés el péptido GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*), que es producido por las células intestinales L. Su biosíntesis se lleva a cabo a partir de una proteína de 160 aminoácidos llamada proglucagón, que recibe este nombre porque su degradación hidrolítica en las células  $\alpha$  pancreáticas genera la hormona hiperglucemiante glucagón. En cambio, su hidrólisis en las células intestinales  $\alpha$  conduce, entre otros péptidos, a un fragmento de 37 aminoácidos conocido como GLP-1-(1-37). La posterior escisión de una cadena correspondiente a los seis primeros aminoácidos de este péptido conduce a una de las hormonas activas, llamada GLP-1-(7-37), pero más del 80% de la bioactividad corresponde a otra hormona, conocida como GLP-1-(7-36)NH<sub>2</sub>, en la que falta la glicina 37 y el nuevo residuo C-terminal, una arginina, está en forma de amida (6).

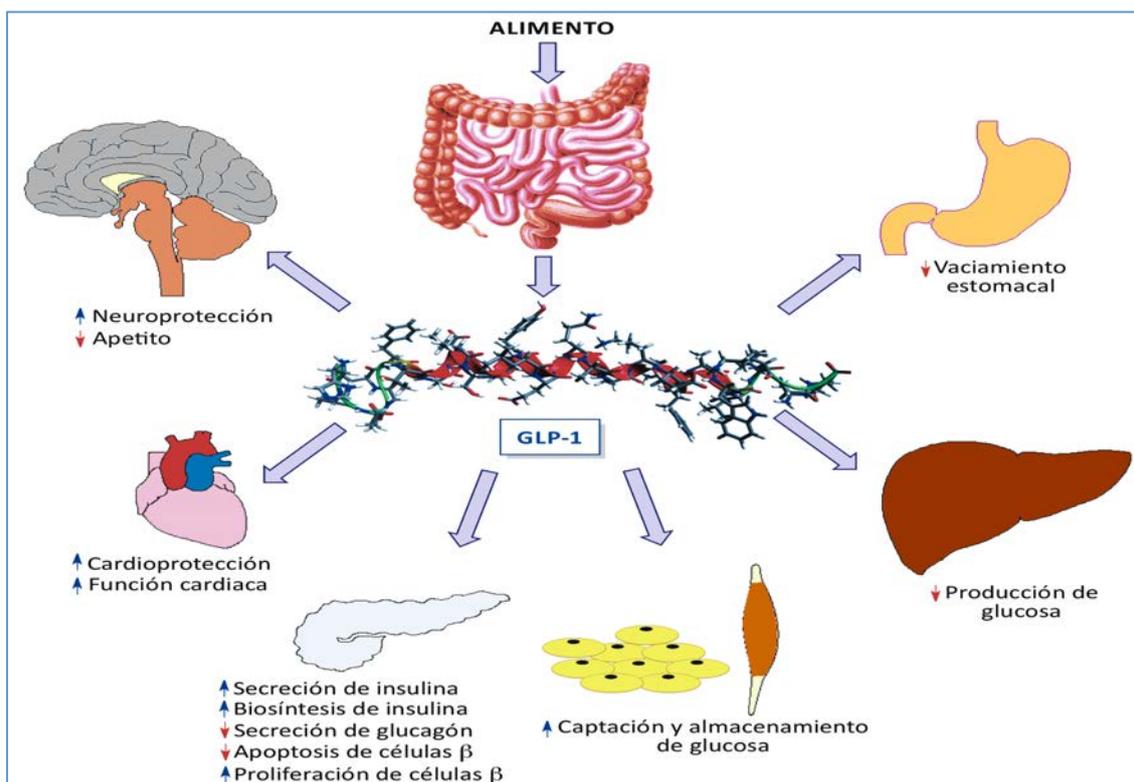


**Figura 1.-** Esquema de la biosíntesis de la hormona GLP-1 y de otros péptidos relacionados a partir de proglucagón (en gris, fragmentos peptídicos inactivos o de actividad poco conocida).

Estas hormonas disminuyen la glucemia a través de varios mecanismos, principalmente un estímulo de la secreción de insulina por el páncreas y una inhibición de la secreción del glucagón, otra hormona peptídica capaz de elevar los niveles de glucosa en plasma (Figura 2).

Además, produce otros efectos beneficiosos para los pacientes diabéticos por conducir a una pérdida de peso, que se debe a un aumento de la sensación de saciedad por retraso en el vaciamiento gástrico y a la disminución del apetito por un mecanismo central. También son beneficiosos otros efectos, que incluyen una disminución en la producción de glucosa por el hígado, un incremento en la captación y almacenamiento de glucosa por los músculos y los adipocitos y propiedades cardio y neuroprotectoras (8, 9).

Desde el punto de vista de su posible empleo en el tratamiento de la diabetes, la activación de los receptores de GLP-1 presenta algunas ventajas adicionales sobre los agentes de uso habitual, ya que corrige la hiperglucemia en ayunas pero no induce hipoglucemia, uno de los principales problemas asociados a la medicación antidiabética tradicional. Por otra parte, la proliferación de células β pancreáticas contribuye al efecto antidiabético, al mejorar la funcionalidad del páncreas, pero conduce también a un incremento del riesgo de que se desarrollen casos de pancreatitis como efecto no deseado. Por la misma razón, se ha planteado la necesidad de considerar la posibilidad de que tratamientos prolongados incrementen el riesgo de cáncer de páncreas (10).



**Figura 2.-** Principales efectos fisiológicos de la hormona GLP-1. La estructura de esta procede del Protein Data Bank (1D0R, DOI:10.2210/pdb1d0r/pdb). Esta y todas las proteínas que aparecen en figuras posteriores han sido descargadas del RCSB Protein Data Bank ([www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)) y visualizadas con la versión para Mac OSX de Avogadro 1.01 (7), salvo que se indique otra cosa.

Existen dos estrategias principales para el diseño de fármacos antidiabéticos basados en el aprovechamiento de la acción hipoglucemiante de las incretinas (Figura 3). Por un lado, se están desarrollando agonistas del receptor de GLP-1, que en la actualidad son péptidos análogos de la hormona natural.

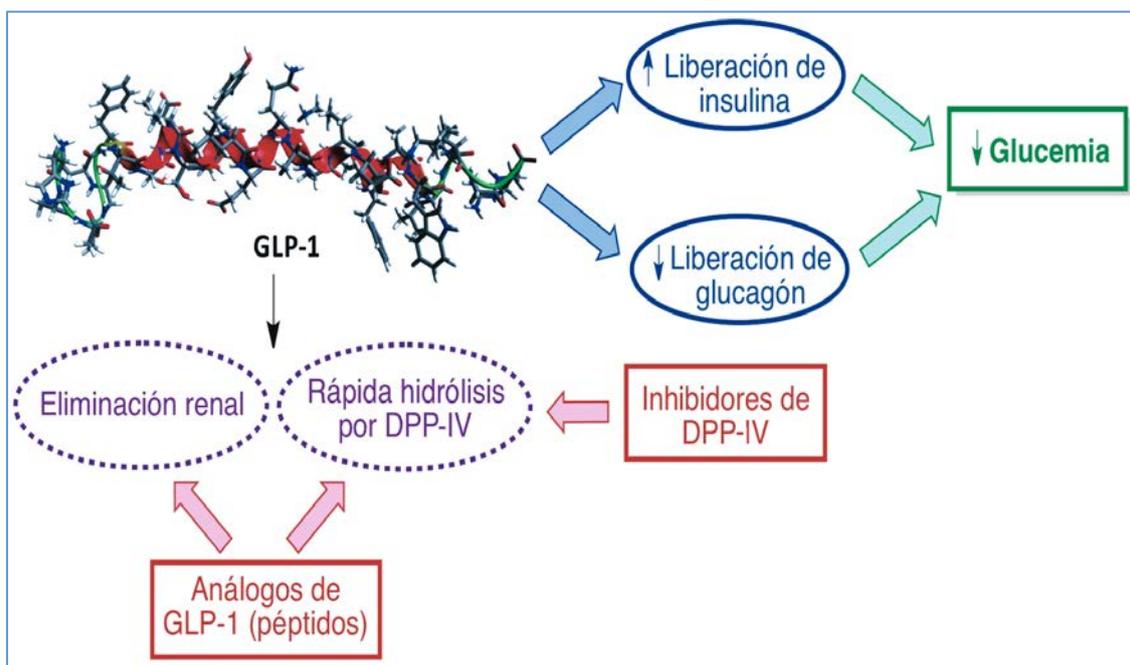
El principal factor que condiciona su diseño es la extremadamente breve semivida plasmática de GLP-1 (2 minutos, aproximadamente), que hace inviable su empleo como fármaco. Esta fugaz duración de acción se debe a dos factores:

(a) Una rápida eliminación renal, debida a su peso molecular relativamente bajo.

(b) Su metabolismo por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), que ataca el extremo N-terminal de la hormona e hidroliza el fragmento formado por los dos últimos aminoácidos. Resulta así el péptido GLP-1-(9-36)NH<sub>2</sub>, que es el que se encuentra en mayor concentración en plasma y que tiene una afinidad 100 veces menor por el receptor GLP-1r que la hormona completa.

Para superar estos problemas, se han sintetizado numerosos análogos peptídicos de GLP-1 con modificaciones destinadas a superar estas limitaciones, muchos de los cuales están inspirados en la estructura de la exendina 4, un péptido natural que muestra resistencia a DPP-IV (11-14)

En una estrategia alternativa, se han desarrollado también moléculas pequeñas que actúan como inhibidores de DPP-IV (15-17) y por tanto incrementan los niveles de la hormona GLP-1 endógena.

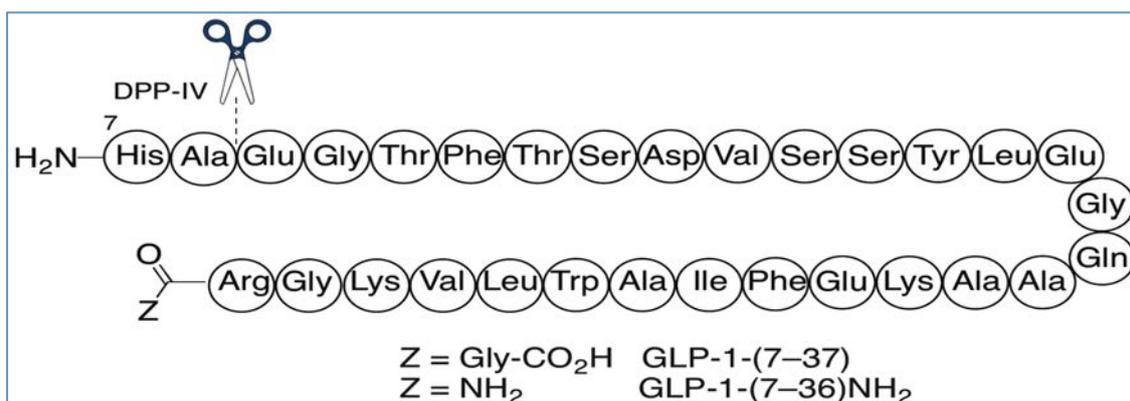


**Figura 3.-** Estrategias para el diseño de fármacos antidiabéticos basados en la acción hipoglucémica de las incretinas.

## 2. AGONISTAS NATURALES DEL RECEPTOR DE GLP-1

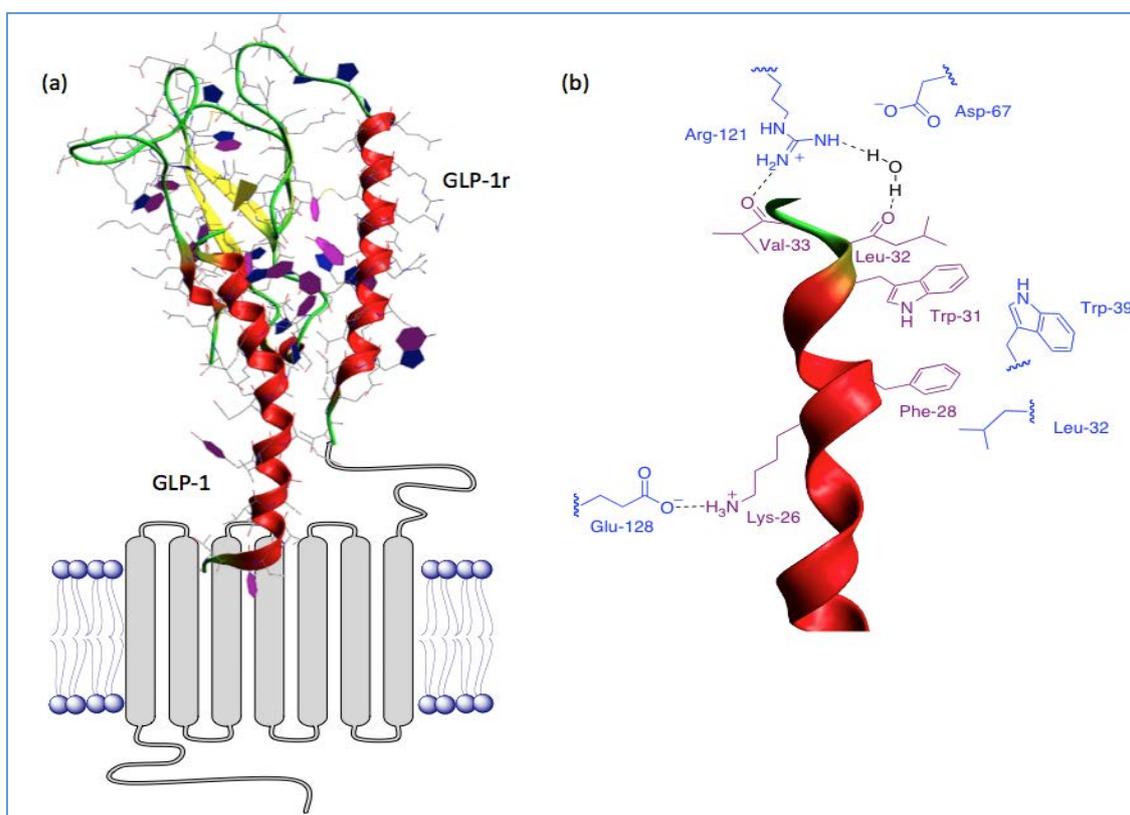
### 2.1. GPL-1

Las estructuras de las hormonas GLP-1-(7-36)NH<sub>2</sub> y GLP-1-(7-37) se representan en la Figura 4, en la que se ha indicado también el punto de ataque por DPP-IV. Como ya se ha indicado, su corta duración de acción hace inviable su empleo como fármacos, que sólo sería posible si se administraran por infusión continua. Por ser la principal hormona activa en humanos, a partir de aquí simplificaremos GLP-1-(7-36)NH<sub>2</sub> como GLP-1.



**Figura 4.-** Secuencia aminoacídica de las hormonas GLP-1, con indicación del enlace hidrolizado por DPP-IV.

Se ha determinado por difracción de rayos X la estructura del complejo que forman GLP-1 y el dominio extracelular de su receptor (18), que se muestra en la Figura 5a. Las principales interacciones polares afectan a los residuos de leucina 32 y valina 33 de la hormona, que interactúan con la arginina 121 del receptor a través de sus grupos carbonilo pertenecientes al esqueleto del péptido, y a la lisina 26, que interactúa con el glutámico 128 del receptor. Además, son significativas algunas interacciones hidrofóbicas que afectan a los residuos triptófano 31 y fenilalanina 28 del péptido (Figura 5b). Cabe esperar que estos datos puedan emplearse en el futuro como base para el diseño de agonistas no peptídicos del receptor de GLP-1, un ámbito de investigación que está en sus inicios.

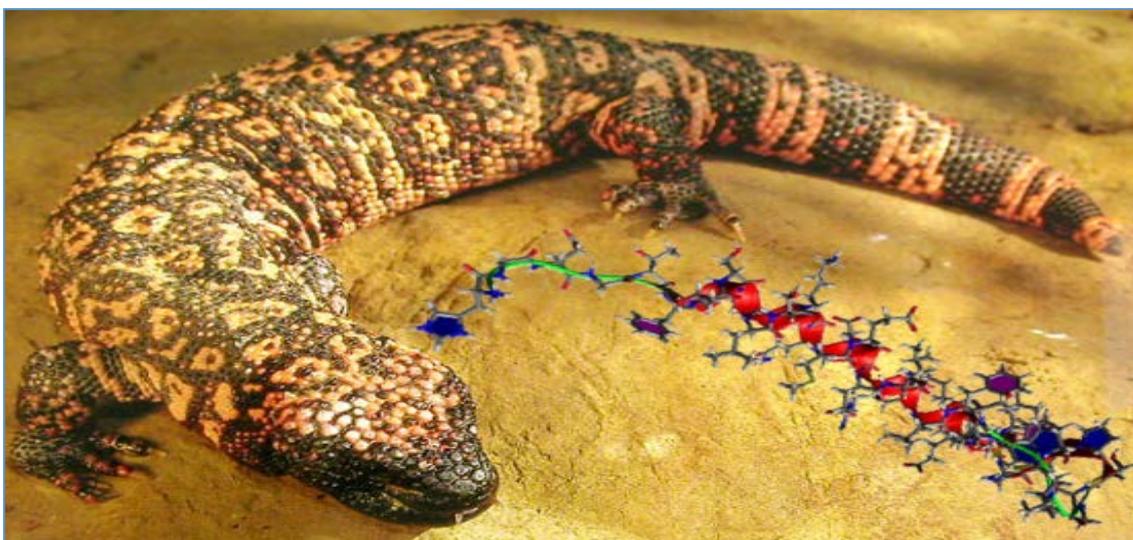


**Figura 5.-** (a) Estructura esquemática del complejo formado por GLP-1 y la porción extracelular de su receptor (pdb 3IOL, DOI:10.2210/pdb3iol/pdb). (b) Resumen de las principales interacciones entre GLP-1 y su receptor (**¡Error! Marcador no definido.**).

## 2.2. Exenatida (exendina 4)

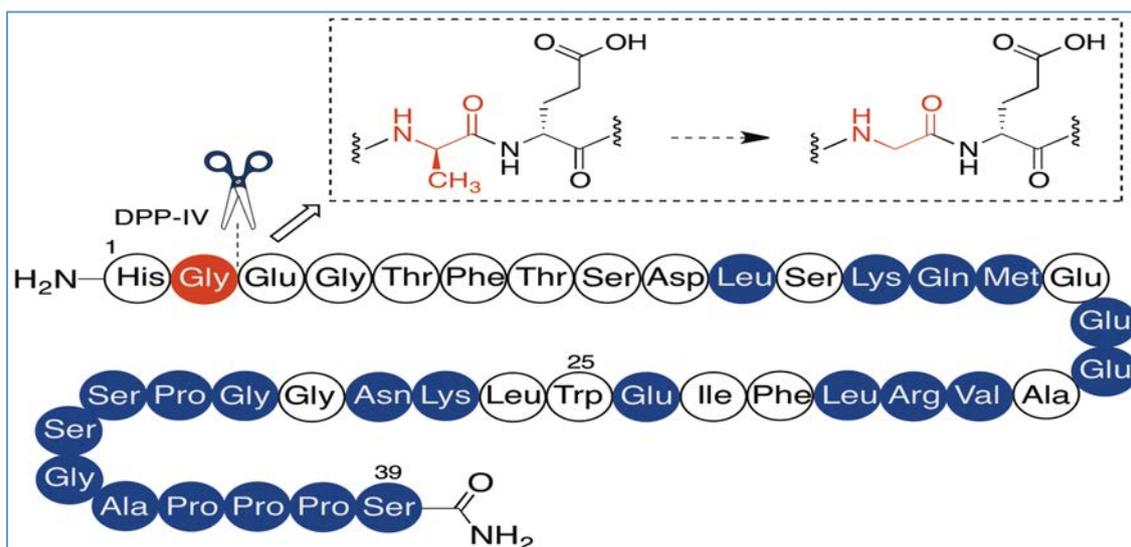
Existe otro péptido natural capaz de activar el receptor de GLP-1, la exendina 4. Este compuesto se aisló de la saliva del lagarto *Heloderma suspectum*, conocido como “monstruo de Gila” (Figura 6) (19). Se trata de una de las dos especies conocidas de lagartos venenosos y habita zonas desérticas del sur de Estados Unidos y el norte de México, tomando su nombre del valle del río Gila, en Arizona, donde fue muy abundante. El monstruo de Gila se alimenta con muy poca frecuencia (entre 5 y 10 veces al año, en su hábitat natural), y entre dos comidas sucesivas tiene la capacidad de ralentizar su metabolismo y desactivar su páncreas. Cuando llega el momento de alimentarse de nuevo, segrega la hormona exendina 4,

que reactiva el páncreas y estimula la secreción de insulina. En 2005, la FDA aprobó el uso de la exenatida (nombre que recibió la exendina 4 de origen sintético) para el tratamiento de la diabetes de tipo 2 que no pudiera controlarse con antidiabéticos orales, y fue comercializada como Byetta® por Amylin Pharmaceuticals. Esta hormona se administra dos veces al día por vía subcutánea, generalmente por inyección abdominal. Además de sus efectos en los niveles de glucosa en sangre, la exenatida tiene la ventaja de producir una significativa pérdida de peso, que es muy beneficiosa en la mayoría de los pacientes de diabetes de tipo 2 y se debe a que retrasa el vaciamiento gástrico e induce una sensación de saciedad.



**Figura 6.-** El monstruo de Gila y la estructura tridimensional de la exendina 4 (pdb 1JR), DOI:10.2210/pdb1jrj/pdb).

La razón por la que la exendina 4 puede emplearse como fármaco, a diferencia de la hormona humana GLP-1, es que su semivida plasmática es de varias horas, lo que se debe a que es menos sensible a la hidrólisis por la DPP-IV que GLP-1. La comparación de las estructuras de ambos péptidos (Figura 7) revela una homología del 53%, y una diferencia crucial en el segundo aminoácido, que en la exendina 4 es glicina en lugar de alanina, lo que causa una interacción menos eficaz con el sitio activo de la dipeptidasa, probablemente como consecuencia de un cambio conformacional.



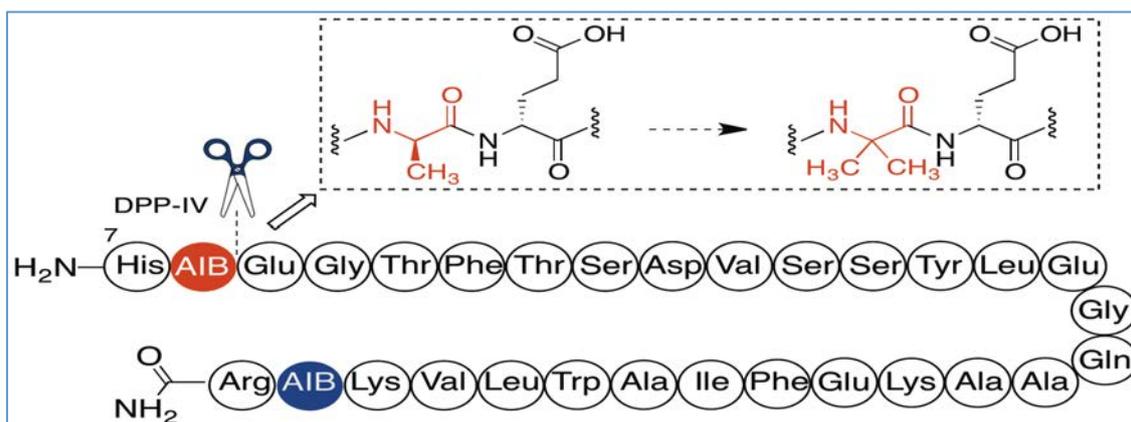
**Figura 7.- Secuencia aminoacídica de la exendina 4 (exenatida).** En rojo, la modificación respecto a GLP-1 que dificulta la hidrólisis por DPP-IV. En azul, otras diferencias existentes con GLP-1.

Aunque por el momento no han tenido una repercusión inmediata en el diseño de fármacos, mencionaremos que existen estudios tanto computacionales (20) como de difracción de rayos X (21) de la interacción de la exenatida con su receptor.

### 3. ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE GLP-1

#### 3.1. Taspoglutida

Inspirada en el modelo natural proporcionado por la exendina 4, una de las estrategias empleadas para incrementar la vida media de GLP-1 se basa en la sustitución del resto de alanina implicado en la hidrólisis por DPP-IV por otros aminoácidos. En este caso, se utilizó ácido 2-aminoisobutírico (AIB), el  $\alpha$ -metil derivado de la alanina, que también reemplazó a la glicina 36 (Figura 8), lográndose un incremento en la estabilidad metabólica. Además, la taspoglutida se desarrolló como una formulación de liberación sostenida en la que estaba asociada a cloruro de zinc de forma que tras la inyección subcutánea se originaba un depósito a partir del cual se liberaba lentamente el fármaco, lo que permite administrarlo una vez por semana. Aunque los ensayos clínicos iniciales parecían indicar una buena efectividad en el tratamiento de la diabetes de tipo 2 y una aceptable tolerancia, el estudio de fase III mostró que el tratamiento a largo plazo inducía en algunos pacientes reacciones en el lugar de inyección, problemas de hipersensibilidad y trastornos gastrointestinales de suficiente gravedad para que en 2010 se decidiera la suspensión del desarrollo de este compuesto, que no ha vuelto a reanudarse (22).



**Figura 8.- Secuencia aminoacídica de la taspoglutida.** En rojo, la modificación respecto a GLP-1 que dificulta la hidrólisis por DPP-IV. En azul, otra diferencia con GLP-1.

### 3.2. Conjugados de GLP-1 con albúmina

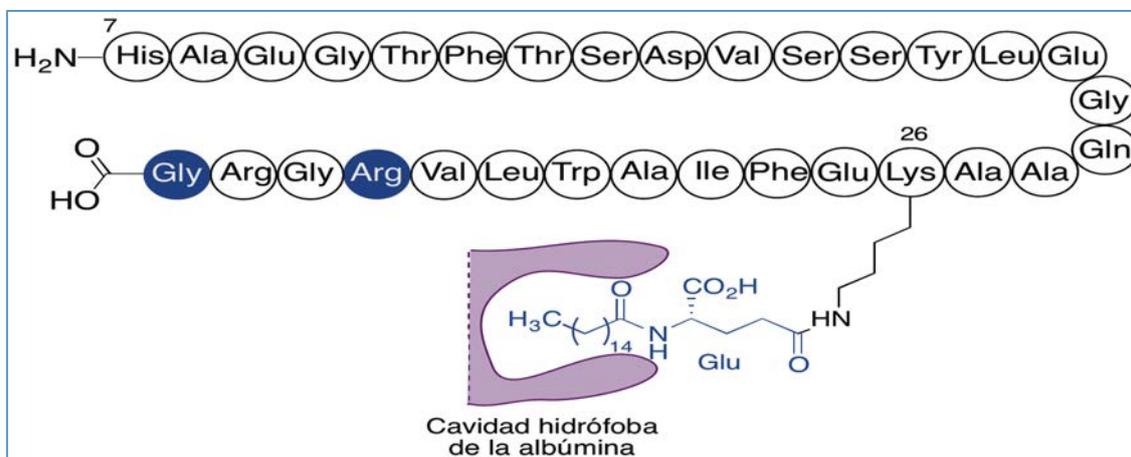
La mayor parte de las modificaciones de GLP-1 se han orientado a su asociación con moléculas de proteínas, principalmente albúmina (23). La albúmina es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo, y una de sus funciones es el transporte de sustancias poco solubles en el plasma, como por ejemplo las hormonas tiroideas y los ácidos grasos, que se unen a una serie de bolsillos lipófilos existentes en las moléculas de albúmina. La existencia de estas zonas capaces de reconocer cadenas hidrocarbonadas de elevada longitud se ha aprovechado en el diseño de fármacos peptídicos de acción prolongada, especialmente derivados de insulina para el tratamiento de la diabetes. Mencionaremos como ejemplo la insulina detemir (Levemir®), en la cual se ha unido una cadena de ácido mirístico (C14) al grupo  $\epsilon$ -amino del resto de Lys-29 de la hormona, y cuya acción prolongada se debe a que dicha cadena lipófila se enlaza de forma no covalente a alguno de los bolsillos lipófilos de la albúmina destinados al transporte de ácidos grasos. Por otra parte, la albúmina contiene numerosos aminoácidos portadores de grupos nucleófilos, como la lisina y la cisteína, lo que permite su unión covalente a grupos espaciadores adecuados, unidos a su vez al fármaco peptídico que se desea enlazar (24).

Ambas estrategias se han empleado en el diseño de análogos de GLP-1 de acción prolongada. En este caso concreto, además de retrasar la hidrólisis por dificultar el acceso de DPP-IV, la unión del péptido a moléculas de albúmina retrasa su eliminación renal, por dificultar la filtración glomerular al incrementarse la masa molecular.

#### 3.2.1. Liraglutida y semaglutida

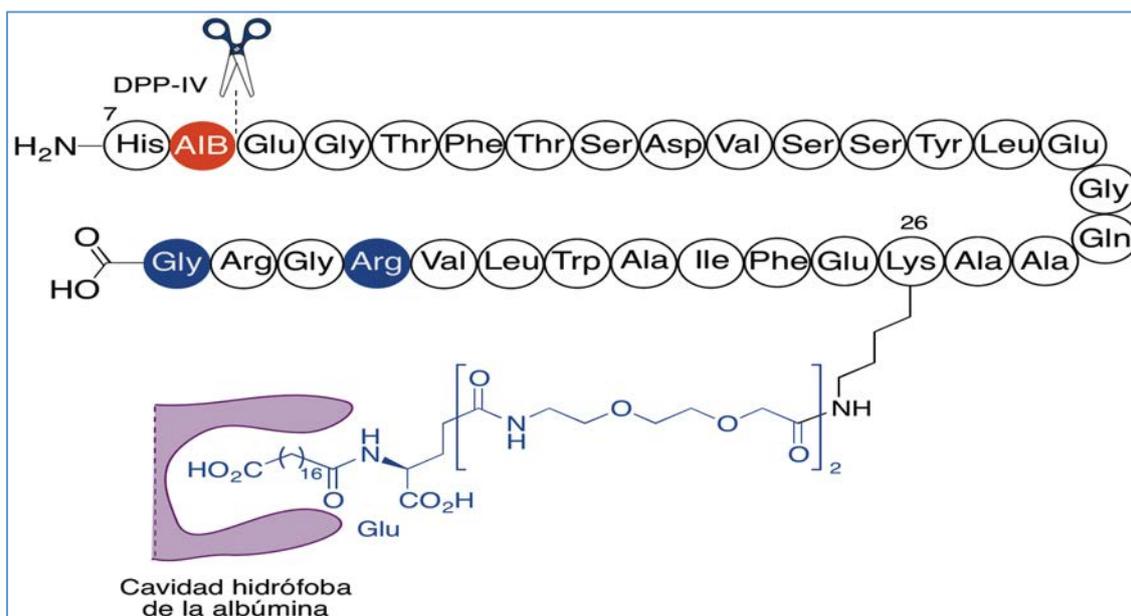
La liraglutida (NN2211), comercializada por Novo Nordisk como Victoza®, es un primer ejemplo de un derivado de GLP-1 estabilizado por unión a seroalbúmina, lo que permite administrarla una vez al día. En este caso, la unión con la albúmina es de tipo no covalente, y tiene lugar gracias a la incorporación a la cadena lateral de la lisina 26 de una unidad de ácido palmítico a través de un

espaciador de ácido glutámico (Figura 9). El mecanismo de la prolongación de la acción es múltiple, ya que por un lado, tras su administración por vía subcutánea, el péptido experimenta un fenómeno de auto-asociación en el lugar de inyección, liberándose lentamente a partir del agregado formado. Por otra parte, una vez en plasma, la liraglutida se asocia con la seroalbúmina en más del 99%, gracias al reconocimiento de su cadena lipófila por cavidades hidrófobas de la albúmina, reduciendo su vulnerabilidad hacia DPP-IV y reduciendo su aclaramiento renal. La liraglutida ha demostrado algunas ventajas sobre otros tratamientos, ya que es menos inmunogénica que la exenatida. Sin embargo, también plantea algunos problemas de seguridad ya que se ha demostrado que en ratas, aunque probablemente no en humanos, está asociada a un incremento de riesgo de tumores de células C tiroideas, y también se han observado algunos casos de pancreatitis.



**Figura 9.- Representación esquemática de la estructura de la liraglutida.** En azul, sus diferencias con GLP-1 y la estructura de la cadena lipófila que permite su asociación con cavidades hidrófobas de la albúmina.

La semaglutida, también de Novo Nordisk, es un análogo de la liraglutida que se encuentra en fase III de desarrollo clínico y que presenta dos diferencias con el compuesto de referencia. En primer lugar, igual que se hizo en el caso de la taspoglutida, se ha reemplazado la segunda alanina por ácido 2-aminoisobutírico para aumentar la estabilidad frente a DPP-IV. Además, se ha alargado el espaciador como se indica en la Figura 10. La semivida plasmática de este fármaco es de 160 h., lo que permite administrarlo una vez por semana (25).



**Figura 10.- Representación esquemática de la estructura de la semaglutida.** En rojo, la modificación respecto a GLP-1 que dificulta la hidrólisis por DPP-IV. En azul, sus diferencias con GLP-1 y la estructura de la cadena lipófila que permite su asociación con cavidades hidrófobas de la albúmina.

### 3.2.2. Albiglutida (GSK716155, albugon)

La albiglutida es un fármaco antidiabético desarrollado inicialmente por Human Genome Sciences y adquirido posteriormente por GlaxoSmithKline, que contiene dos unidades de una GLP-1 modificada mediante la sustitución de alanina por glicina (la misma que existe en la exenatida). Estas unidades se encuentran unidas covalentemente y conjugadas con una molécula de albúmina por el extremo N-terminal de esta (Figuras 11 y 12). El motivo que llevó a emplear dos unidades de GLP-1 fue compensar la disminución en afinidad por el receptor GLP-1 que acompaña a la conjugación con albúmina, actuando la molécula de GLP-1 unida directamente a la albúmina como espaciador. Además, este tipo de estructura hace que la absorción de la albiglutida desde el lugar de inyección sea más lenta que otros conjugados con albúmina, posibilitando una administración semanal. La albiglutida se prepara por fusión del gen que expresa la albúmina humana dos copias del que expresa la hormona GLP modificada, y se encuentra en fase III de ensayo clínico.



Figura 11.- Secuencia aminoacídica de la albiglutida. En rojo, las diferencias con GLP-1.

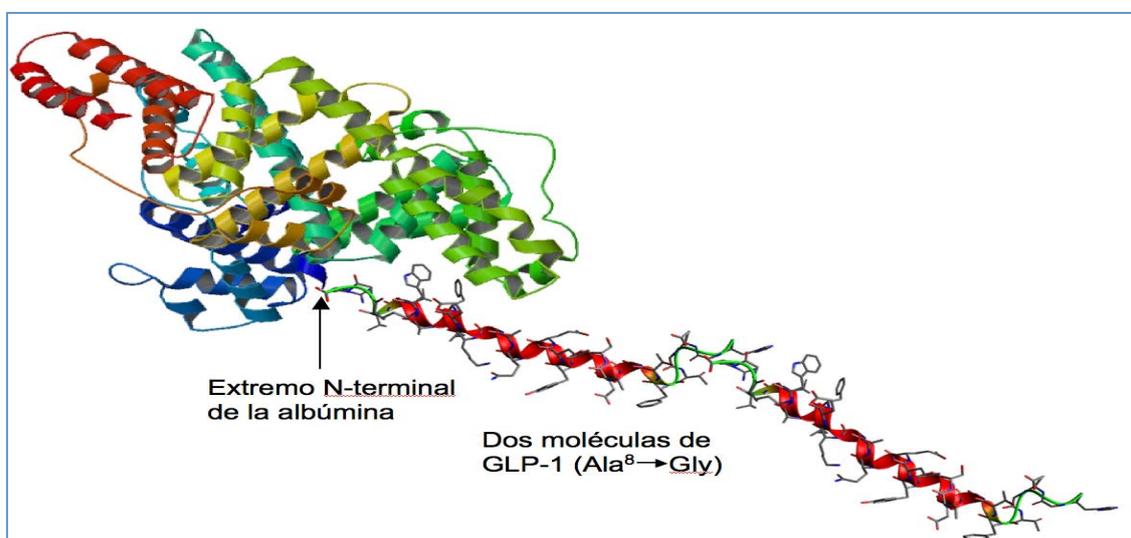
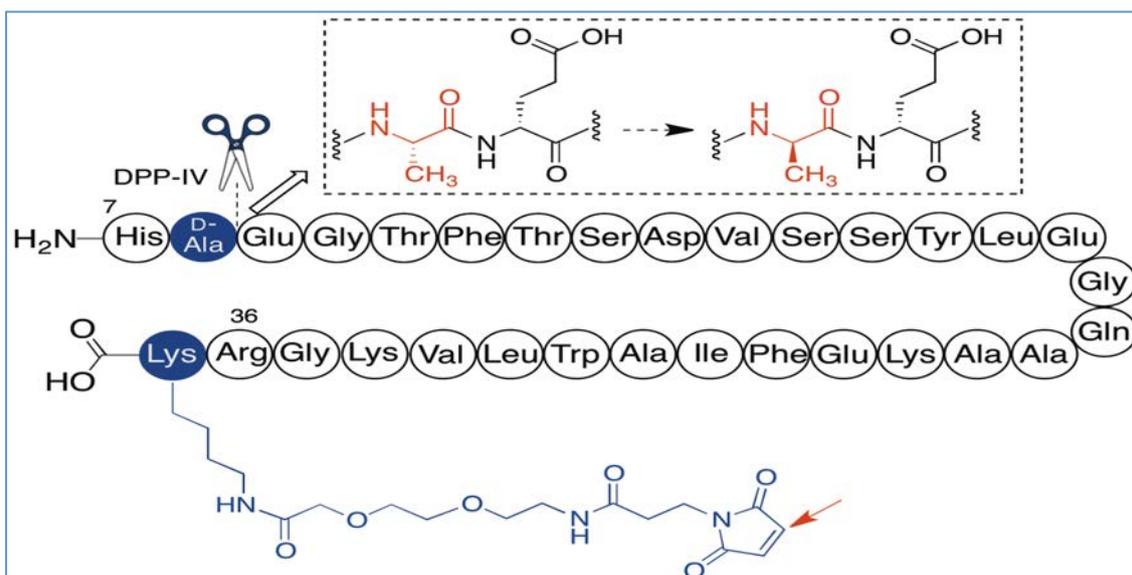


Figura 12.- Estructura tridimensional de la albiglutida, construida a partir de una molécula de albúmina humana (pdb 1E7I, DOI:10.2210/pdb1e7i/pdb) y dos de GLP-1 modificada.

### 3.2.3. CJC-1131 (DAC-GLP-1)

Este fármaco no se administra conjugado con albúmina, sino que constituye un ejemplo de aplicación de la metodología conocida como DAC (*Drug Affinity Complex*), desarrollada por la empresa Conjuchem. El péptido que se administra es GLP-1 humana de origen sintético, modificada por sustitución del segundo residuo de L-Ala por D-Ala, con objeto de dificultar su hidrólisis por DPP-IV. Además, se añadió al aminoácido C-terminal una lisina, cuyo grupo  $\epsilon$ -amino se enlazó a través de un espaciador a un anillo de maleimida. Tras la administración subcutánea del fármaco y su llegada a sangre, se une covalentemente a una molécula de albúmina a través de una adición de Michael de un grupo nucleófilo de la proteína al doble enlace electrófilo de la maleimida (Figura 13). La semivida plasmática de este compuesto se estimó en 15-19 días, lo que hubiera permitido acciones muy prolongadas. Sin embargo, Conjuchem interrumpió el desarrollo clínico de este

compuesto en favor de CJC-1134, un conjugado de exenatida que se comentará más adelante.

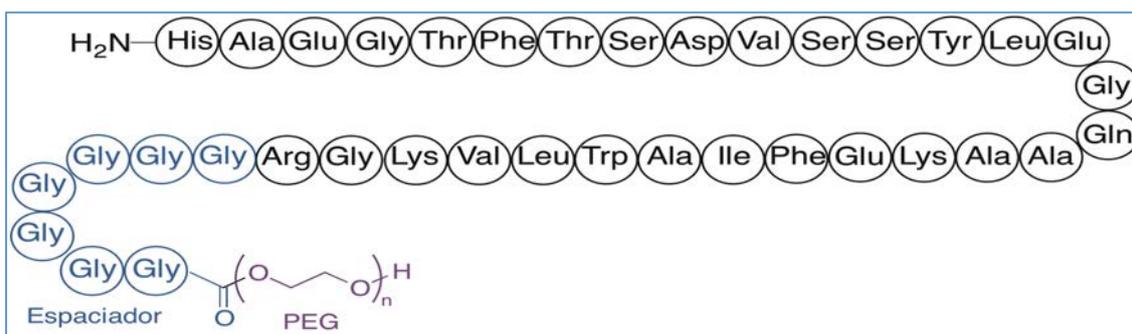


**Figura 13.- Secuencia aminoacídica de CJC-1131.** En rojo y azul se indican las diferencias con GLP-1. La flecha roja indica el átomo por el que se une a la albúmina mediante una adición de Michael, tras alcanzar el fármaco el torrente sanguíneo.

### 3.3. Otros conjugados de GLP-1

#### 3.3.1. Conjugados con polietilenglicol: GLP-1 PEG (LY 2428757)

El polietilenglicol se ha utilizado a menudo para incrementar la semivida plasmática de fármacos peptídicos, ya que forma con ellos conjugados hidrófilos que ocupan un gran volumen en comparación con proteínas de peso molecular semejante y, a causa de este gran tamaño, no están sujetos a filtración glomerular. Por este motivo, Eli Lilly está estudiando un fármaco llamado GLP-1 PEG (LY 2428757), que es un derivado pegilado de GLP-1 (26) y que se encuentra en ensayos clínicos de fase II. Este fármaco requiere administración semanal y presenta la ventaja sobre otros conjugados de ser altamente hidrosoluble, lo que facilita su inyección. Su estructura, representada en la Figura 14, incluye el péptido GLP-1, un espaciador formado por siete aminoácidos y el polietilenglicol.

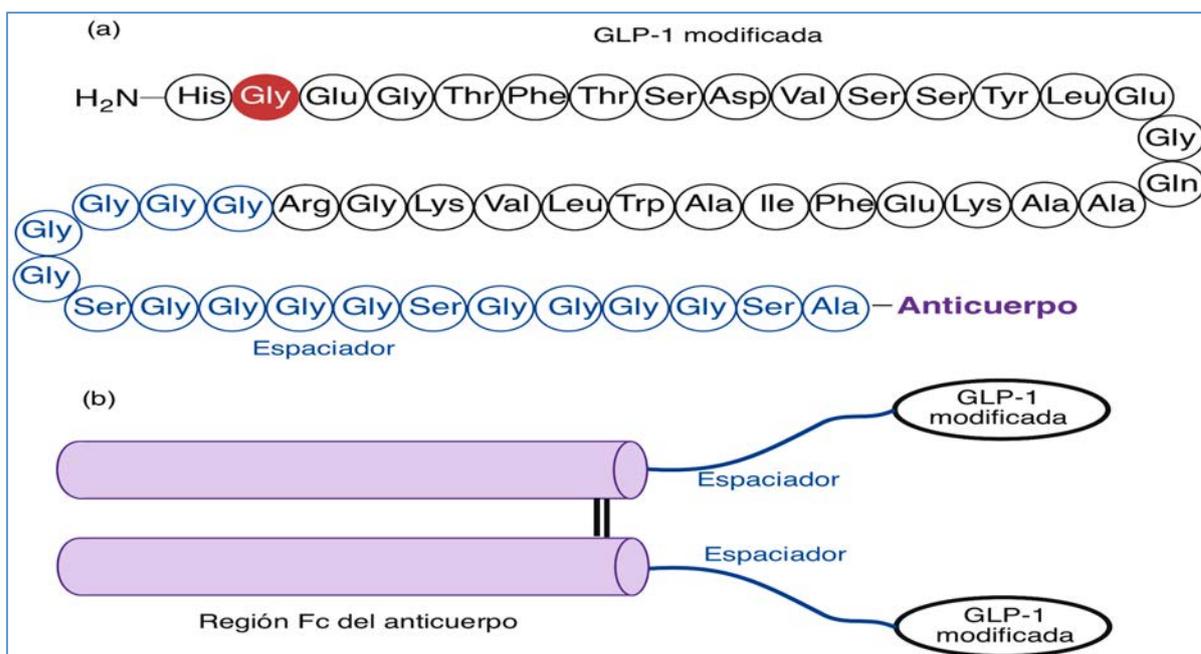


**Figura 14.- Estructura de GLP-1 PEG (LY 2428757).**

### 3.3.2. Conjugados con fragmentos Fc de inmunoglobulinas. Dulaglutida (GLP-Fc, LY2189265)

El tallo de las inmunoglobulinas está formado por proteínas conocidas como fracción constante (Fc). Esas proteínas pueden utilizarse para preparar conjugados con fármacos peptídicos, dando lugar a una duración de acción incrementada debido a disminución del aclaramiento renal asociada a un mayor peso molecular, así como a la interacción de las proteínas Fc con diversos receptores (27).

La aplicación de esta técnica de diseño a GLP-1 por parte de la empresa Lilly ha dado lugar a la dulaglutida, una proteína recombinante en la que el fragmento Fc de la inmunoglobulina Ig4 humana, a través de su región bisagra (*hinge*), está unido a dos moléculas de GLP-1 modificada, una por cada cadena Fc, a través de un espaciador peptídico formado por tres unidades de (Gly)<sub>5</sub>Ser y una Ala terminal (Figura 15). La dulaglutida tiene una semivida plasmática de 4 días y está en fase II de ensayos clínicos como tratamiento de la diabetes por inyección subcutánea una vez a la semana (28).



**Figura 15.-** (a) Secuencia aminoacídica de los fragmentos activos de la dulaglutida y las cadenas espaciadoras. (b) Representación esquemática de la estructura de la dulaglutida, donde se indica la unión de dos moléculas activas a la región bisagra de las cadenas Fc del anticuerpo.

## 4. ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE EXENATIDA

### 4.1. Lixisenatida (ZP-10A, AVE-0010)

Es un análogo sintético de la exenatida, desarrollado por Sanofi/Zealand, cuyo extremo C-terminal se ha manipulado reemplazando los residuos Pro-38 y Ser-39 por Ser-38 y Lys-39, respectivamente, y además añadiendo un fragmento final de pentalisina (Figura 16). Este compuesto tiene una acción lo bastante prolongada para permitir su administración una vez al día, y ha demostrado en varios ensayos clínicos su eficacia como agente antidiabético, en monoterapia o en combinación con otros fármacos, así como producir pérdidas de peso significativas. Desde Febrero de 2013, está autorizada su comercialización por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) como Lyxumia®, y la solicitud para su comercialización en Estados Unidos se encuentra en estudio por la FDA.

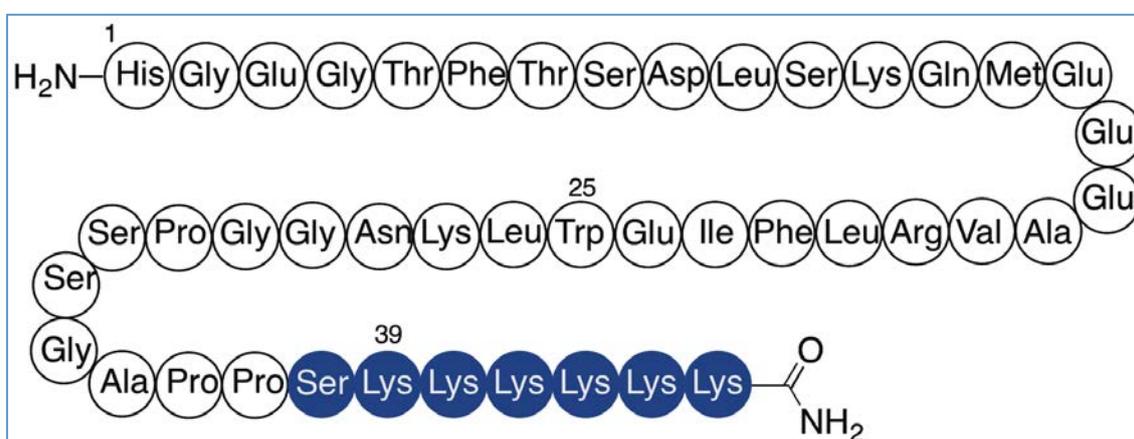


Figura 16.- Secuencia aminoacídica de la lixisenatida.

### 4.2. Conjugados de exenatida con proteínas

Análogamente a lo descrito para GLP-1, se han desarrollado varios conjugados de exenatida con macromoléculas, fundamentalmente proteínas, para protegerla de la hidrólisis por DPP-IV y retrasar su eliminación renal.

#### 4.2.1. Conjugados con albúmina: CJC-1134-PC

Desarrollado por la empresa Conjuchem, este fármaco contiene una molécula de exenatida a la que se ha incorporado una lisina en el extremo C-terminal, de modo que su grupo ε-amino se utiliza para enlazar la hormona covalentemente a una cadena espaciadora que termina en un anillo de maleimida. Finalmente, la reacción del doble enlace electrófilo de este anillo con una molécula de albúmina tiene lugar específicamente por el residuo Cys-25, dando lugar a la especie conjugada que se administra (Figura 17). CJC-1134-PC se está ensayando en clínica para el tratamiento de la diabetes, con administración semanal.

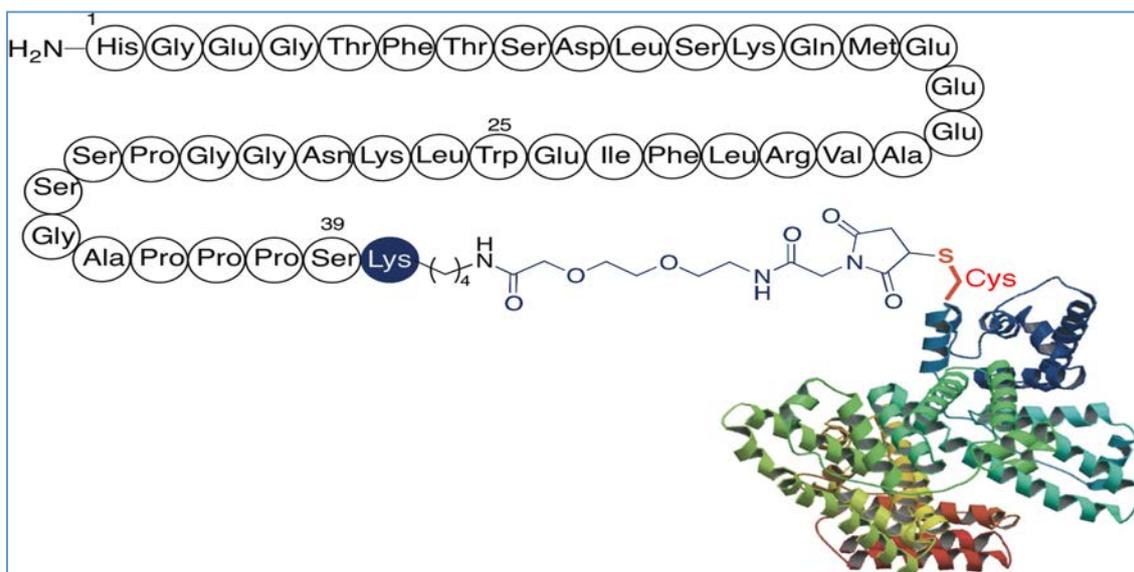


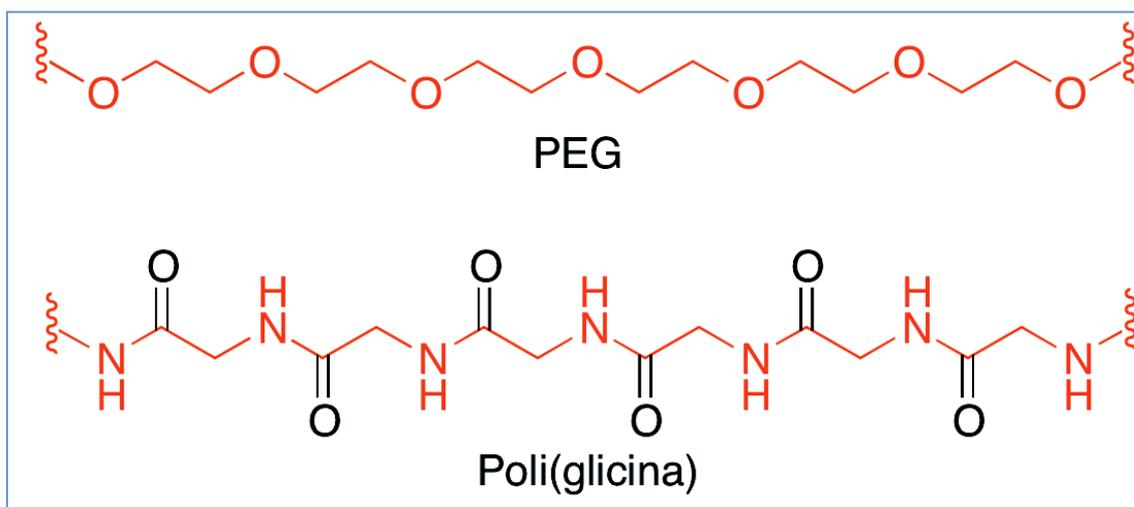
Figura 17.- Representación esquemática de la estructura de CJC-1134-PC.

#### 4.2.2. Exenatida-XTEN (VRS-859)

El uso de polietilenglicol para incrementar la semivida de fármacos peptídicos, ya mencionado, tiene la desventaja de que no es fácilmente biodegradable por lo cual tiende a vacuolizarse en diversos tejidos, especialmente en los túbulos renales. Además, el polietilenglicol no es una especie química única, por lo cual los fármacos tratados de esta manera son mezclas de compuestos, lo que complica su caracterización.

Estas desventajas, y la similitud estructural entre el PEG y los polipéptidos (Figura 18), han llevado al desarrollo de péptidos artificiales con un comportamiento biológico similar al de PEG (desestructurados, elevado volumen hidrodinámico, buena estabilidad en plasma), pero que tienen la ventaja de ser biodegradables y de poder prepararse en estado puro.

Estos péptidos se conocen con el nombre de XTEN, y están formados por secuencias no repetitivas en las que se emplean preferentemente Ser, Ala, Pro, Thr, Glu y Gly, y se excluyen los aminoácidos con cadenas hidrofóbicas porque se considera que pueden favorecer plegamientos compactos y fenómenos de inmunogénesis a través de interacciones con anticuerpos (29), aunque las secuencias exactas de estos péptidos no han sido reveladas por Versartis, la empresa que los desarrolla. La aplicación de estas ideas ha dado lugar al fármaco VRS-859, un conjugado exenatida-XTEN desarrollado por Diartis Pharmaceuticals, que se administra una vez al mes y acaba de completar los ensayos clínicos de fase I.



**Figura 18.-** Analogía entre la estructura del polietilenglicol y la de la poliglicina.

#### 4.2.3. Conjugados con fragmentos Fc de inmunoglobulinas

De forma análoga a lo descrito para GLP-1, esta técnica se ha aplicado a la exenatida por Hanmi Pharmaceuticals. Dicha empresa ha diseñado un sistema de transporte al que denomina LAPS, basado en la conjugación de la hormona a un fragmento Fc humano mediante un espaciador constituido por una cadena corta de polietilenglicol. Esta técnica ha sido aplicada tanto a la exenatida como a una hormona modificada llamada CA exenatida, dando lugar, respectivamente, a la langlenatida (exenatida-LAPS, HM11260C) y a HM11260A (30). Estos conjugados se diferencian de los desarrollados por Lilly para el caso de GLP-1 en la naturaleza del espaciador y en que en este caso solamente se utiliza una de las dos proteínas Fc, quedando la otra libre.

## 5. NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA FORMULACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE INCRETINAS

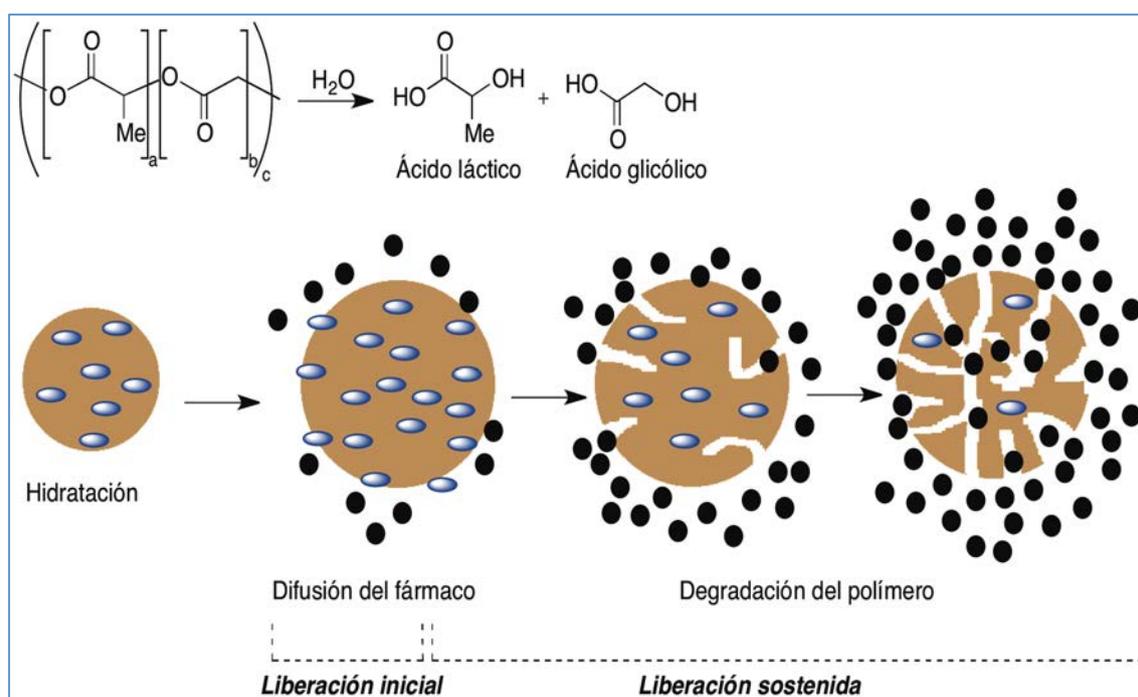
Además de la manipulación estructural de GLP-1 y exenatida y su conjugación con albúmina u otras proteínas, se están desarrollando en la actualidad otras formulaciones de estas hormonas, muchas de las cuales se encuentran en fase de ensayo clínico (31,32,33).

Recientemente se ha comercializado una formulación de liberación sostenida de la exenatida, conocida como exenatida LAR (*Exenatide Long-Acting Release*) o Bydureon®, que permite la administración del fármaco una vez por semana (34). Se basa en la encapsulación del principio activo en microesferas de un diámetro aproximado de 0,1 mm, fabricadas con un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico (35,36). Una suspensión de estas microesferas se inyecta por vía subcutánea y, en contacto con el agua del tejido, se hidratan e hinchan, liberando

ya en esa fase pequeñas cantidades de hormona desde la superficie de las partículas.

Las microesferas empiezan entonces a degradarse por hidrólisis, liberando su contenido de forma lenta y sostenida (Figura 19). Los productos de la hidrólisis del polímero son biocompatibles y de hecho el ácido láctico se produce en el metabolismo humano y el metabolismo oxidativo del ácido glicólico (ácido 2-hidroxiacético) conduce a ácido glioxílico y posteriormente a ácido oxálico, otro intermedio metabólico habitual.

Se están investigando nuevas modificaciones en la formulación de las microesferas de exenatida. Así, el empleo de un diluyente formado por triglicéridos ha permitido la formulación de dosis mayores, lográndose prolongar aún más su duración de acción y pasar a una administración mensual, que está actualmente en fase II de ensayo clínico (37). Esta variante de la exenatida se conoce como ExQM, para diferenciarla de la de administración semanal (ExQW).



**Figura 19.-** Liberación sostenida de exenatida a partir de microesferas de un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico.

Intarcia Therapeutics investiga un implante subcutáneo llamado ITCA 650, que está basado en el dispositivo DUROS® (38). Consiste en un depósito cilíndrico de una aleación de titanio que en un extremo está cerrado por una membrana semipermeable a través de la cual, una vez insertado el dispositivo, entra agua y penetra en una disolución salina (“motor osmótico”).

Esta se expande y mueve un pistón que a su vez lleva a cabo la administración del fármaco a través de un moderador de la difusión existente en el otro extremo del dispositivo (Figura 20). El dispositivo se inserta de forma subcutánea, normalmente en el espacio entre el bíceps y el tríceps, y es capaz de liberar su contenido a velocidad constante durante tiempos prolongados, por lo cual en la actualidad se está estudiando en clínica su empleo para la administración de exenatida en períodos de hasta un año (39).



**Figura 20.-** El dispositivo DUROS®.

Otra importante línea de investigación actual es el desarrollo de *formas de administración oral de las incretinas*. En el caso de GLP-1, Novo Nordisk está investigando un fármaco llamado NN9924, que se encuentra en fase I de desarrollo clínico y está basado en la tecnología Eligen®, de la que se conocen pocos detalles pero implica la inhibición de la degradación química y enzimática del péptido en el tracto digestivo, así como una interacción con la hormona que supone una “mejora transitoria de las propiedades de partición” de esta (40). En el caso de la exenatida, Oramed está estudiando ORMD-0901, cuya preparación se basa en el uso de una serie excipientes (no descritos por el fabricante) que al parecer protegen al ingrediente activo de la proteólisis intestinal y favorecen su absorción. Esta formulación, además de presentar las ventajas generales asociadas a la vía oral, no parece inducir náuseas, a diferencia de la exenatida inyectada, y se encuentra en fase II de ensayo clínico.

Como resumen de lo tratado hasta aquí, se reúnen en la Tabla 2 los principales datos de los principales agonistas peptídicos del receptor de GLP-1.

**Tabla 2.-** Resumen de los agonistas peptídicos del receptor de GLP-1.

Fármaco	Empresa	Situación	Nombre comercial	Periodicidad de inyección
Exenatida (exendina 4)	Amylin Pharmaceuticals-Eli Lilly	Comercializado	Byetta®	2 dosis/día
Taspoglutida	Roche	Abandonado en Fase III	--	1 dosis/semana (con ZnCl <sub>2</sub> )
Liraglutida	Novo Nordisk	Comercializado	Victoza®	1 dosis/día
Semaglutida	Novo Nordisk	Fase III	--	1 dosis/semana
Albiglutida	GlaxoSmithKline	Fase III	--	1 dosis/semana
CJC-1131	Conjuchem	Abandonado en Fase II	--	--
GLP-1 PEG	Eli Lilly	Fase II	--	1 dosis/semana
Dulaglutida	Eli Lilly	Fase II	--	1 dosis/semana
Lixisenatida	Sanofi/Zealand	Comercializado (Europa)	Lyxumia®	1 dosis/día
CJC-1134-PC	Conjuchem	Fase II	--	1 dosis/semana
Exenatida-XTEN	Versartis-Diartis Pharmaceuticals	Fase I	--	1 dosis/mes
Exenatida-LAPS	Hanmi Pharmaceuticals	Preclínico	--	--
Exenatida LAR (ExQW)	Bristol-Myers Squibb y AstraZeneca	Comercializado	Bydureon®	1 dosis/semana
Exenatida ExQM	Amylin Pharmaceuticals- Eli Lilly	Fase II	--	1 dosis/mes
Exenatida en DUROS® (ITCA 650)	Intarcia Therapeutics	Fase II	--	1 implante/año
NN9924	Novo Nordisk	Fase I	--	GLP-1 oral
ORMD-0901	Oramed	Fase II	--	Exenatida oral

## 6. INHIBIDORES DE DIPEPTIDIL PEPTIDASA IV

La dipeptidil dipeptidasa IV es una glicoproteína de membrana que presenta actividad de dipeptidil aminopeptidasa, llevando 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. Está expresada en la superficie de las células de la mayoría de los tejidos, siendo muy abundante en la médula espinal, en el intestino delgado y en el túbulo proximal del riñón.

Su ruptura proteolítica en la superficie de las células da origen a la forma soluble circulante. Es una proteasa de serina, en cuyo dominio C-terminal se encuentra la triada catalítica Ser630-Asp708-His740 (41). Está implicada en

numerosas funciones fisiológicas, además de la regulación de la glucemia a través de la hidrólisis de las incretinas, ya que también interviene en la degradación de otros péptidos biológicos importantes como los péptidos pancreáticos (neuropéptidos Y, péptido YY), gran variedad de quimioquinas (CXCL9, CXCL11, CCL5) y la sustancia P, entre otros. Es parte de una familia de proteínas a la que pertenecen otras isoformas conocidas como DPP-VII, VIII y IX, cuya inhibición conduce a numerosos efectos secundarios, por lo que la inhibición selectiva de la isoforma IV es importante como criterio de diseño (42).

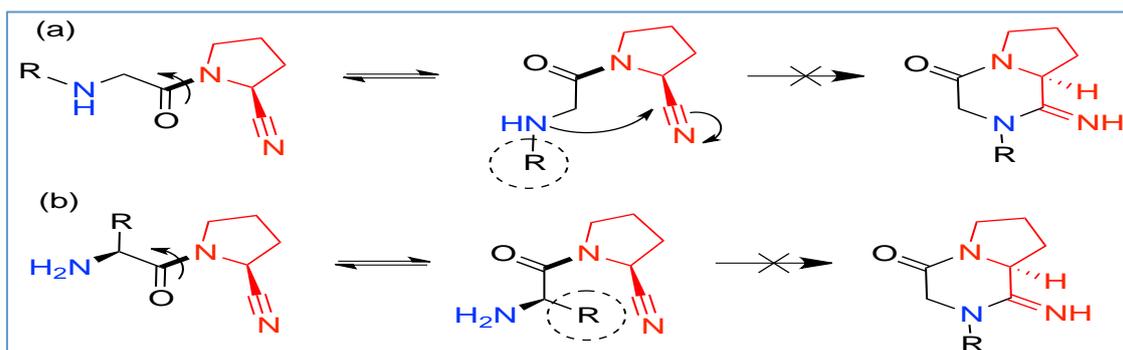
Los inhibidores de DPP-IV se clasifican según su estructura en dos grandes grupos: análogos al sustrato y no análogos al sustrato. Los primeros presentan generalmente estructuras semejantes a péptidos y se pueden unir a la enzima de manera covalente (cianopirrolidinas) o no covalente, mientras que los segundos se unen siempre de forma no covalente (43).

Al tratarse de moléculas no proteicas, su principal ventaja sobre los agonistas del receptor GLP-1 es que son activas por vía oral. Una diferencia importante entre ambos grupos es que los inhibidores de DPP-IV no afectan al peso corporal.

### ***6.1. Derivados de pirrolidina***

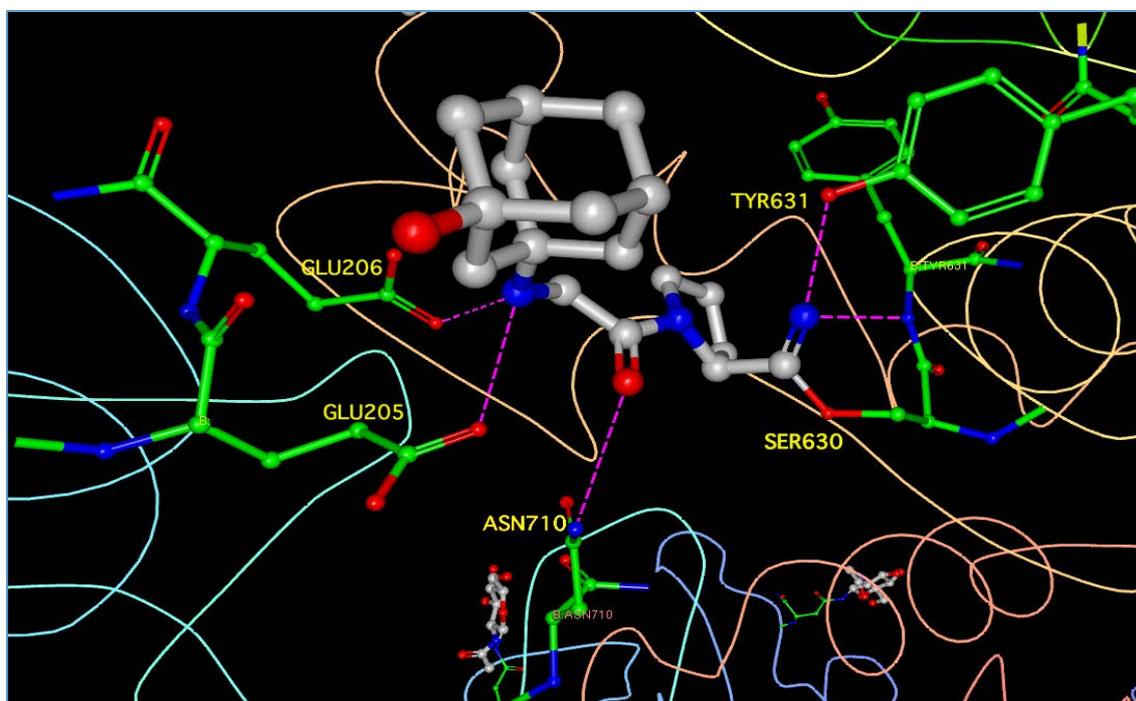
Los primeros inhibidores estudiados fueron los derivados de pirrolidina, debido a que la enzima muestra una gran especificidad por sustratos con un resto de prolina en la penúltima posición de la secuencia. El anillo de pirrolidina es portador de un sustituyente en su posición 2, cuya naturaleza determina que la unión a la enzima sea reversible o irreversible. Así, la presencia en dicha posición de grupos ciano, ácido borónico o hidrógeno proporciona inhibidores reversibles, mientras que grupos difenilfosfonato o restos de ácido O-acilhidroxámico hacen que la unión del inhibidor a la enzima sea irreversible (43).

Los inhibidores con estructura de 2-cianopirrolodina han sido los más estudiados, no sólo por su semejanza con la prolina sino porque muestran una potencia del orden nanomolar y, además, pueden ser administrados por vía oral (44). Tienen como principal inconveniente su falta de estabilidad en solución, ya que el compuesto experimenta un proceso de ciclación intramolecular que origina compuestos inactivos por ataque intramolecular del nitrógeno exocíclico al grupo ciano. Esto obliga a introducir sustituyentes voluminosos que dificulten este ataque, bien en el nitrógeno exocíclico o bien en el carbono  $\alpha$  (Figura 21). Otra manera de aumentar la estabilidad es fusionar un anillo de ciclopropano a la pirrolidina como en el caso de la saxagliptina, que se comentará más adelante.

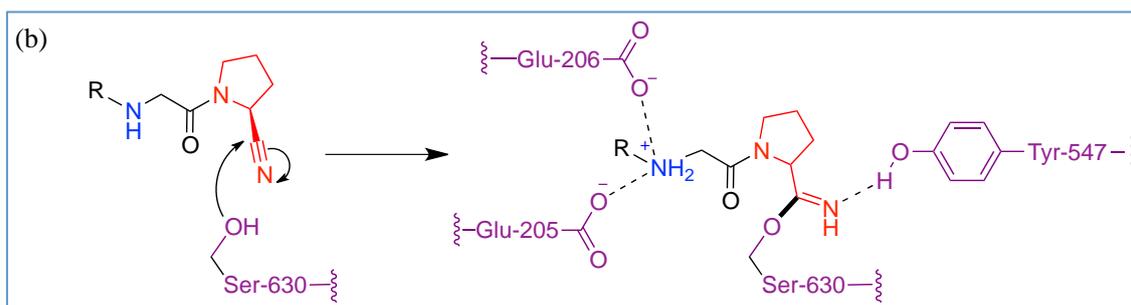


**Figura 21.-** Estabilización de las 2-cianopirrolidinas por introducción de sustituyentes voluminosos.

Las 2-cianopirrolidinas se unen de manera covalente al sitio activo de la DPP-IV mediante la formación de un imidato con el grupo OH de la Ser-630 que, además, está estabilizado por un enlace de hidrógeno con la Tyr-547. A pesar de ser covalente, esta unión es reversible debido a la baja estabilidad del imidato frente a la hidrólisis. Además, el grupo amino, ionizado a pH fisiológico, establece enlaces electrostáticos con los restos de Glu-205 y 206 (Figura 22). Los aminoácidos implicados en la interacción son esenciales para la actividad de la enzima, ya que el extremo N-terminal del péptido es fijado por interacciones con Glu-205 y 206 y a continuación Ser-630 ataca como nucleófilo al penúltimo enlace amídico del péptido.

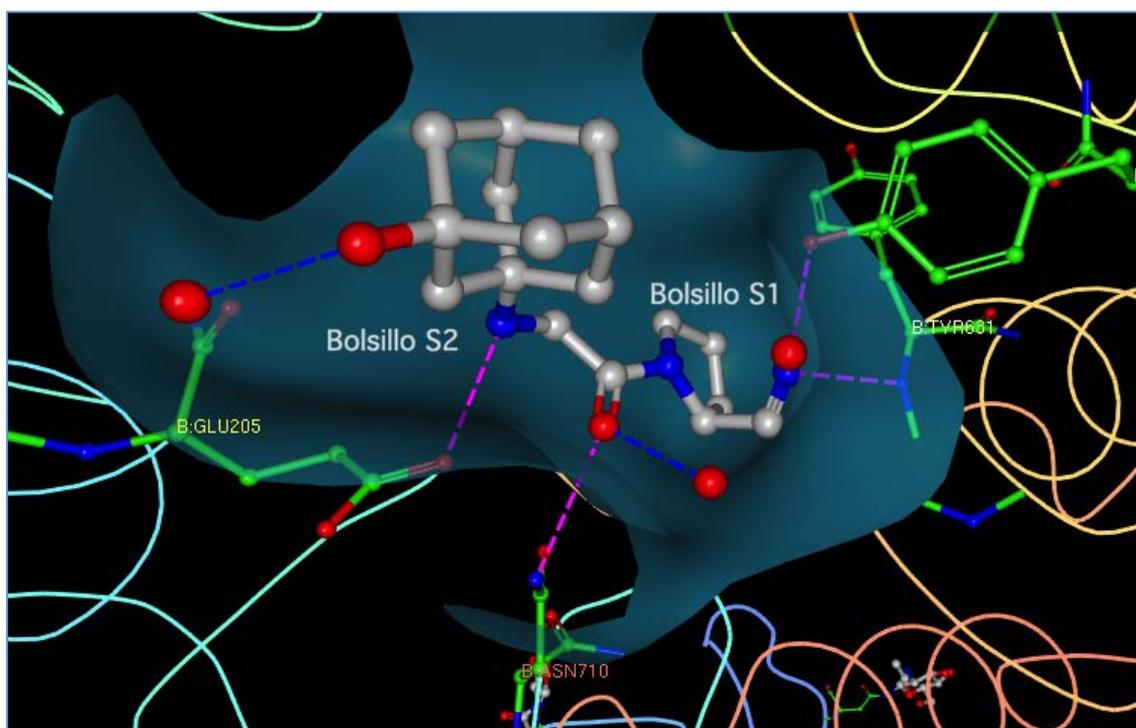


**Figura 22 (a).-** Interacciones de la vildagliptina con el sitio activo de DPP-IV. Representación realizada con el programa Ligand Explorer a partir de una estructura de difracción de rayos X (pdb 3W2T).



**Figura 22 (b).**- Formación de un enlace covalente entre las 2-cianopirrolidinas y el residuo Ser-630 deDPP-IV.

La tríada catalítica (Ser630, Asp708y His740) está contenida en una región conocida como bolsillo S1, que es relativamente pequeña e impide, en general, la presencia de sustituyentes voluminosos en la prolina. Además, existe una zona llamada bolsillo S2, próximo a los dos restos de glutámico 205 y 206 y formada por Val-207, Ser-209, Phe-357 y Arg-358, que permite alojar sustituyentes lipófilos voluminosos como los empleados para estabilizar la estructura frente a la ciclación (45). En la Figura 23 se indica la interacción de la vildagliptina con dichos bolsillos.



**Figura 23.**- Interacciones de la vildagliptina con el sitio activo de DPP-IV. Representación realizada con el programa Ligand Explorer a partir de una estructura de difracción de rayos X (pdb 3W2T).

Las principales cianopirrolidinas de uso terapéutico o en ensayo clínico avanzado se resumen en la Figura 24.

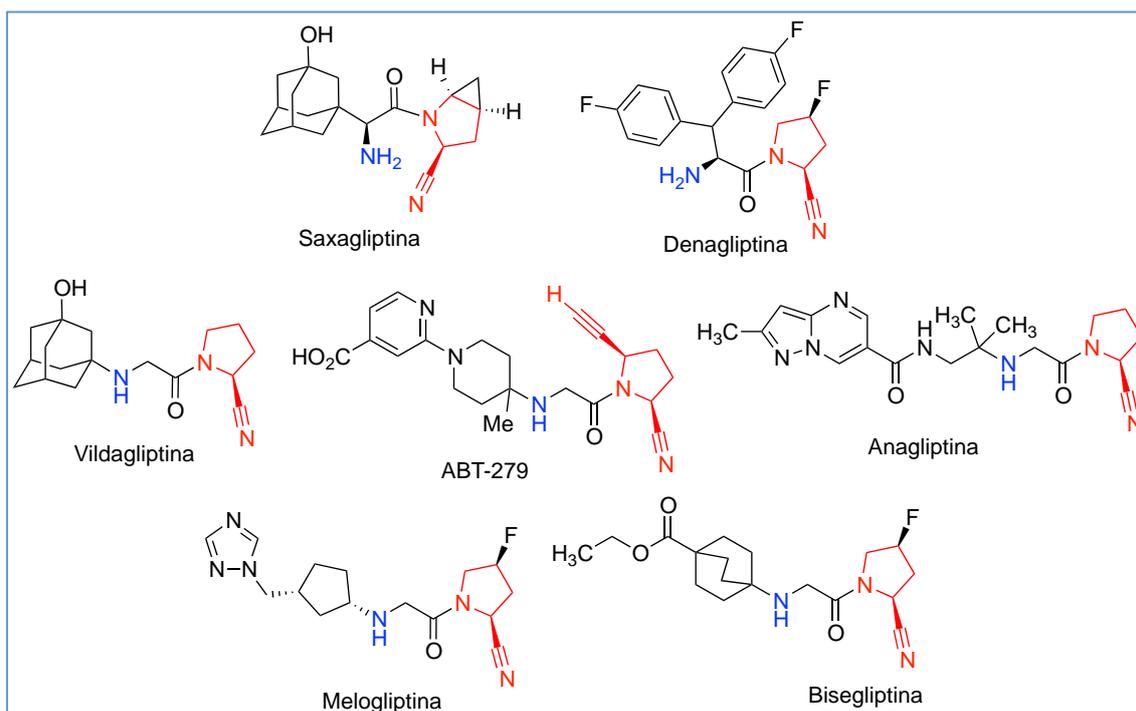


Figura 24.- Principales inhibidores de DPP-IV derivados de 2-cianopirrolidina.

Existe una segunda familia de derivados de pirrolidina en la que ya no está presente el grupo ciano, por lo que, en general, su unión es no covalente. La dutogliptina constituye una excepción, ya que su grupo de ácido borónico forma un enlace covalente, aunque reversible, con la serina 630. En la teneligliptina, el anillo de pirrolidina ha sido reemplazado por una tiazolidina bioisótera (Figura 25). Los inhibidores no análogos al sustrato comprenden un amplio grupo de compuestos con estructuras muy diversas, que han surgido de programas de *high-throughput screening*. Todos ellos presentan un anillo aromático en lugar del anillo de pirrolidina y se unen de manera no covalente a la enzima. Se resumen los más importantes en la Figura 26.

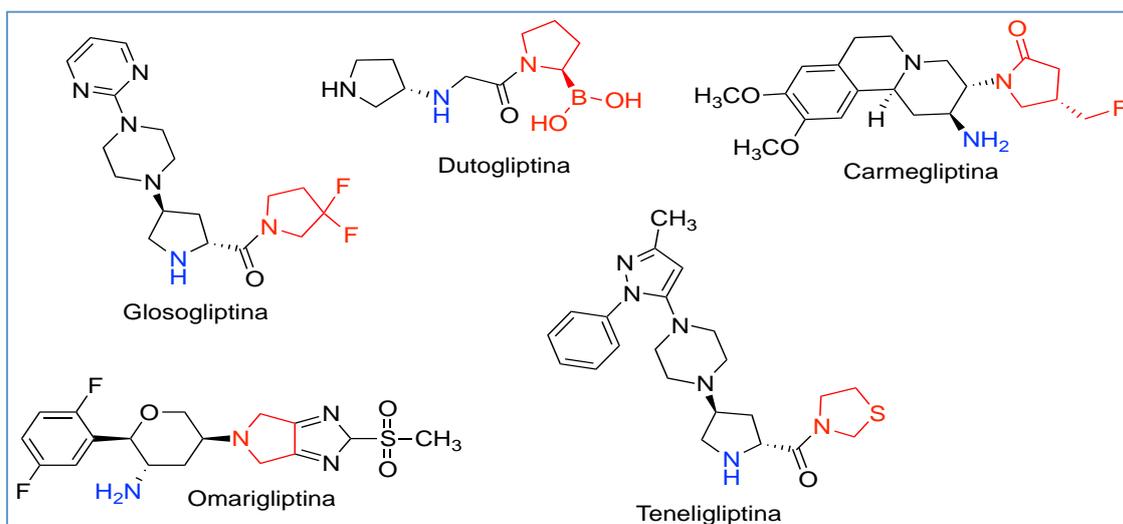
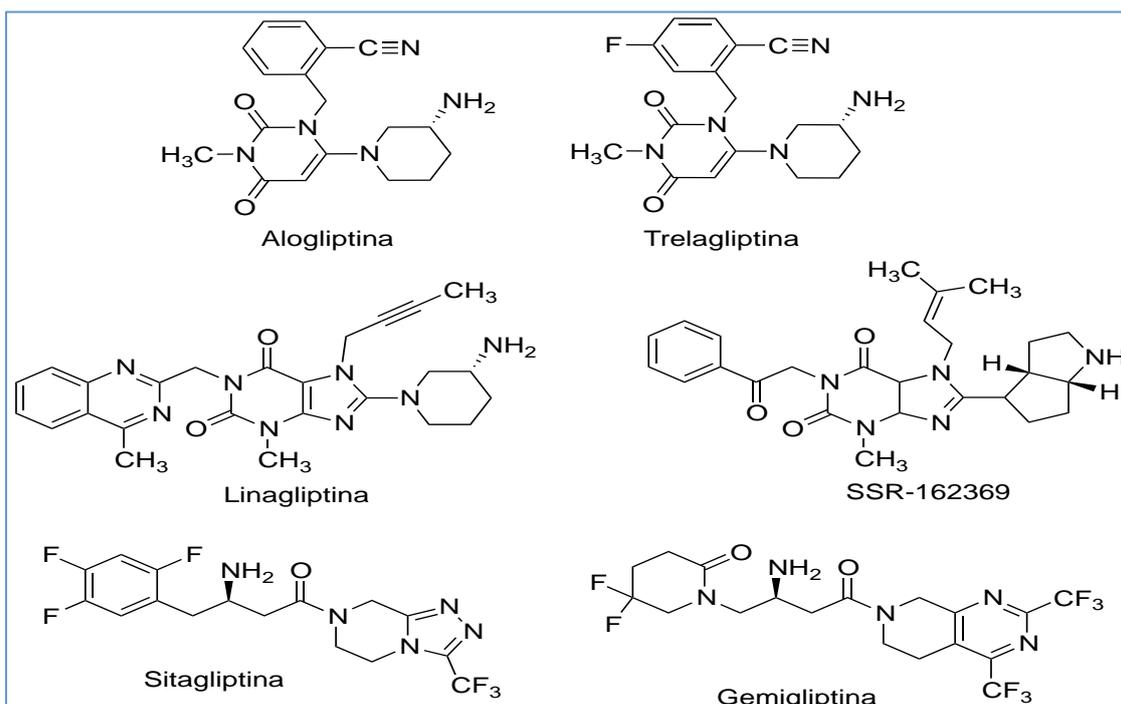
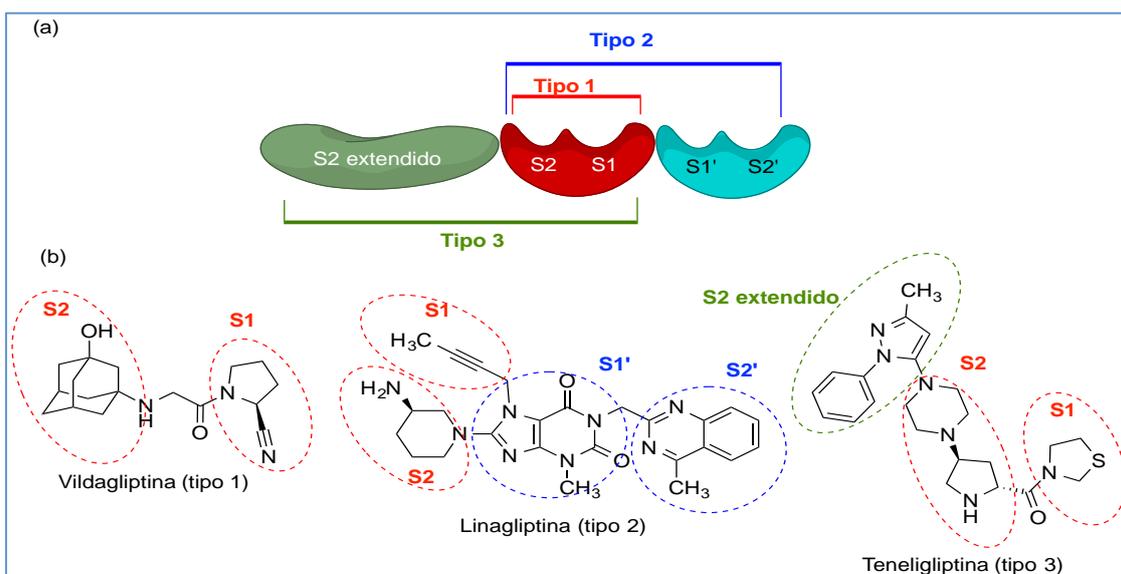


Figura 25.- Otras pirrolidinas y heterociclos relacionados que inhiben DPP-IV.

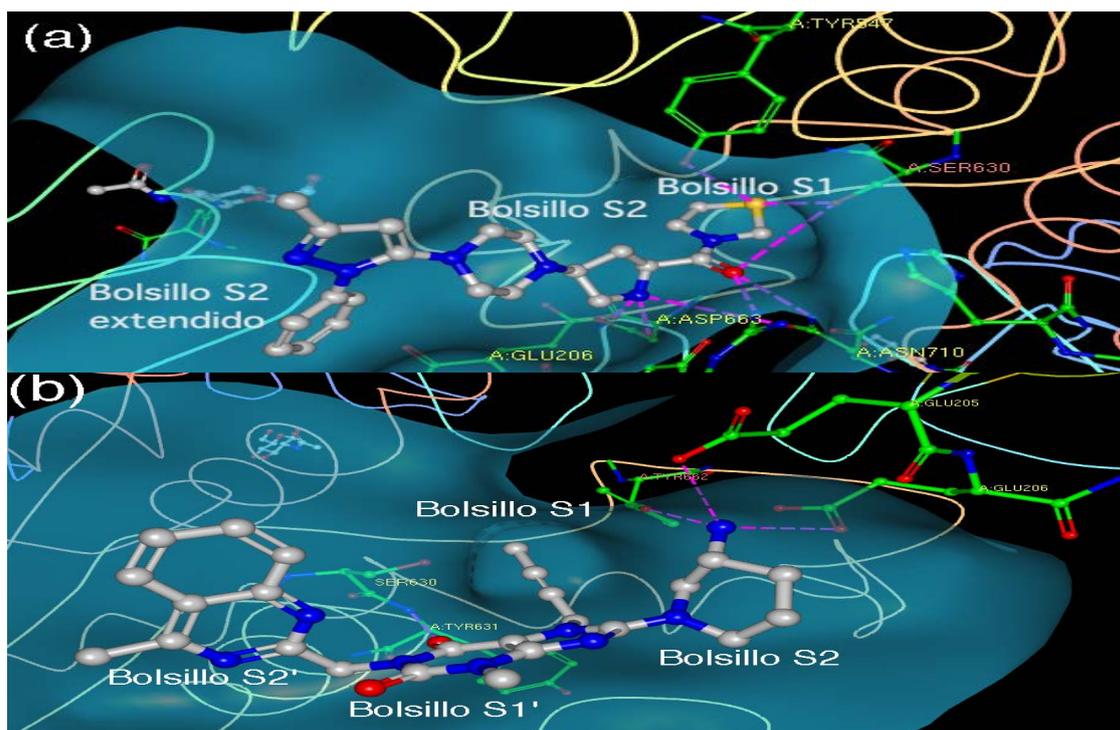


**Figura 26.-** Inhibidores de DPP-IV sin analogía con su sustrato endógeno.

El estudio de la interacción de estas nuevas familias de inhibidores ha llevado a la conclusión de que todos los inhibidores se unen a los bolsillos S1 y S2 previamente descritos para el caso de las cianopirrolidinas, pero existen algunos sitios de unión adicionales, llamados bolsillos S1', S2' y S2 extendido (46). En función de los sitios ocupados, se han descrito tres modos diferentes de unión, que se resumen en la Figura 27 junto con un ejemplo representativo de cada uno. En la Figura 28 se representa la estructura de rayos X de un complejo entre la enzima e inhibidores representativos de los tipos 2 y 3.



**Figura 27.-** (a) Clasificación de los inhibidores de DPP-IV en función de sus sitios de unión a la enzima. (b) Ejemplos representativos de cada uno de los tipos de inhibidores



**Figura 28.-** Interacción de la teneligliptina (a) y la linagliptina (b) con las cavidades del sitio activo de DPP-IV. Representación realizada con el programa Ligand Explorer a partir de las correspondientes estructuras de difracción de rayos X (pdb 3WJK y 2RGU, respectivamente).

En la Tabla 3 se resumen algunos datos de los principales inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV.

**Tabla 3.-** Resumen de los principales inhibidores de DPP-IV.

Fármaco	Empresa	Situación	Nombre comercial
<b>1. Derivados de 2-cianopirrolidina</b>			
Vildagliptina	Novartis (2007)	Comercializado	Galvus®, Zomelis®
Saxagliptina (clorhidrato)	Bristol-Myers Squibb/AstraZeneca (2010)	Comercializado	Onglyza®
Anagliptina	Sanwa Kagaku Kenkyusho/ Kowa (2012)	Comercializado (Japón)	Suiny®
Melogliptina (GRC-8200)	Glenmark	Fase III	--
Bisegliptina (KRP-104)	Kyorin/ActiveX	Fase II	--
Denagliptina (GW823093C)	GlaxoSmithKline	Abandonado en Fase III	--
ABT-279	Abott	--	--
<b>2. Otras pirrolidinas</b>			
Teneligliptina (bromhidrato)	Mitsubishi Tanabe Pharma/Daiichi Sankyo	Comercializado	Tenelia®
Glosogliptina (PF 00734200)	Pfeizer	Fase III	--
Dutogliptina (PHX1149)	Phenomix Corporation/Forest Labs	Abandonado en Fase III	--

Fármaco	Empresa	Situación	Nombre comercial
Carmegliptina (R1579)	F Hoffman-La Roche	Fase II	--
Omarigliptina (MK-3102)	Merck	Fase III	--
<b>3. Inhibidores sin analogía con el sustrato</b>			
Sitagliptina (fosfato)	Merck	Comercializado	Januvia®
Linagliptina	Boehringer Ingelheim Eli Lilly	Comercializado	Trajenta®, Tradjenta®
Gemigliptina	LG Life Sciences	Comercializado (Corea)	Zemiglo®
Alogliptina (benzoato)	Takeda	Comercializado	Nesina®
Trelagliptina (SYR-472)	Takeda	Fase III	--

## 7. TENDENCIAS FUTURAS

Además de que se deben esperar nuevos avances en las aproximaciones comentadas en los apartados anteriores, existen algunas líneas de investigación adicionales que probablemente conduzcan en el futuro a nuevos agentes antidiabéticos mejorados, y que se estudiarán brevemente en este apartado.

### 7.1. Agonistas no peptídicos del receptor de GLP-1

Una aproximación terapéutica que permitiría superar las limitaciones asociadas a la naturaleza peptídica de los fármacos actuales es el desarrollo de agonistas no peptídicos del receptor de GLP-1. Este receptor pertenece al tipo B<sub>1</sub> de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, *G protein-coupled receptors*) que se caracterizan por poseer siete lazos de transmembrana y que, a diferencia de los del tipo A, en los que actúan alrededor del 40% de los fármacos en el mercado (47), no son fáciles de explotar como dianas en el descubrimiento de fármacos. No obstante, se han identificado algunas moléculas pequeñas capaces de activar el receptor de GLP-1 (48), de los que se representan dos ejemplos en la Figura 29. La primera de ellas fue T-0623, pero el más avanzado de estos compuestos parece ser Boc5, que ha demostrado actividad antidiabética *in vivo* (49).

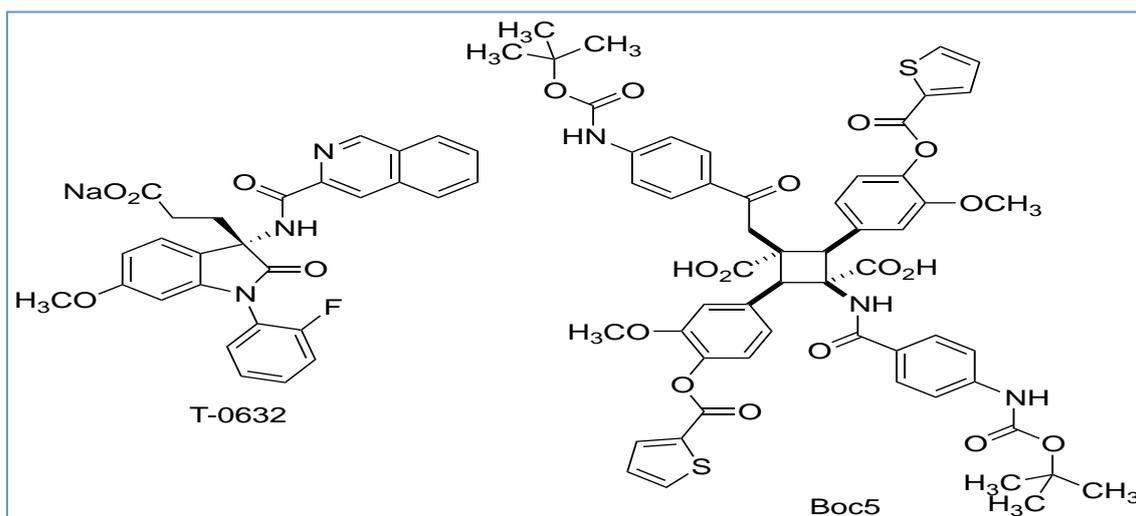


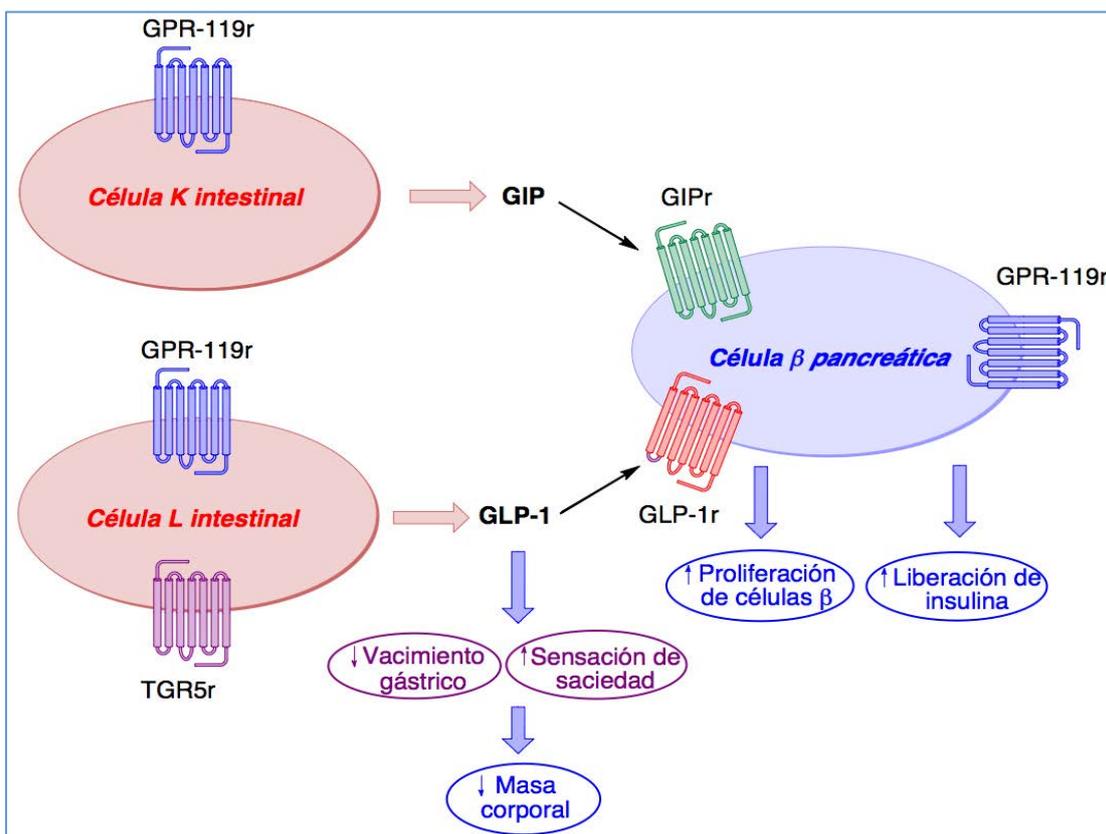
Figura 29.- Algunos agonistas no peptídicos de GLP-1.

### 7.2. Hormonas peptídicas multidiaria

Además de GLP-1, existen otras hormonas digestivas capaces de regular la homeostasis de la glucosa y la ingesta de alimento, especialmente la oxintomodulina (un péptido formado por los 29 aminoácidos del glucagón más 8 residuos adicionales en el extremo C-terminal), la incretina GIP (*Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide*) y el péptido YY (PYY). Esto ha conducido a la idea de combinar los efectos de dos o tres de esas hormonas en un solo péptido. Citaremos como ejemplo Mar-701 (RO-6807952) y Mar (RO-6811135), derivados pegilados de fármacos peptídicos cuyas secuencias reúnen las de GLP-1 y GIP (50).

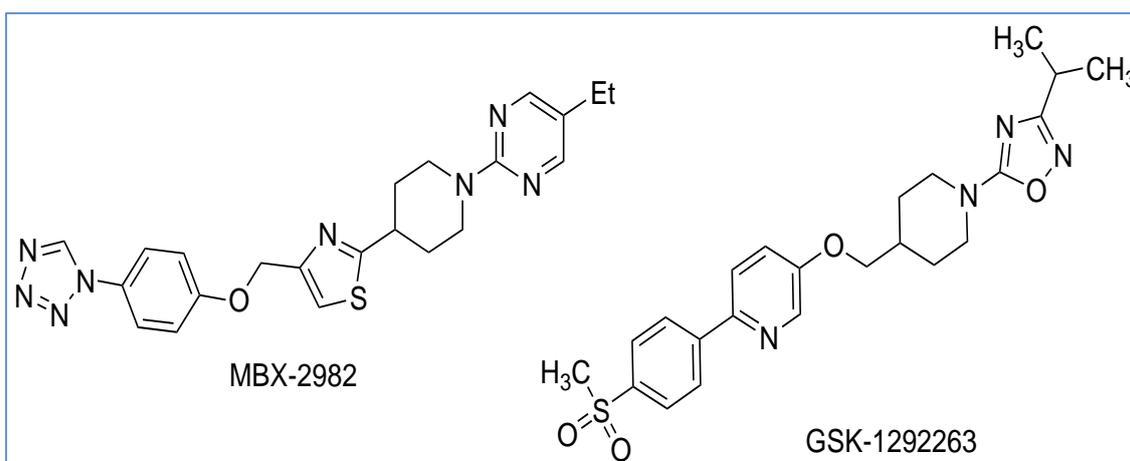
### 7.3. Moléculas pequeñas que estimulan la liberación de GLP-1: Agonistas de los receptores GPR119 y TGR5

Por ultimo, mencionaremos dos vías indirectas para aumentar los niveles de GLP-1 por incremento de su secreción aprovechando varios mecanismos. Uno de ellos consiste en el empleo de agonistas del receptor GPR119 (G-protein coupled receptor 119), que tiene la ventaja respecto al receptor de GLP-1 de pertenecer a la familia A de receptores acoplados a proteínas G y ser, por tanto, más propicio para el desarrollo de agonistas con estructura de molécula pequeña. Estos receptores están presentes en las células K y L intestinales, donde su activación induce, respectivamente, la secreción de GIP y GLP-1. Además, existen también en la membrana de las células  $\beta$  pancreáticas, donde estimulan la secreción de insulina. En una aproximación alternativa, puede recurrirse a la activación de los receptores TGR5 (GPBAR1, M-BAR), que también son miembros de la familia A de receptores acoplados a proteínas G y que parecen tener ácidos biliares como ligandos naturales. Estos receptores están presentes en la membrana de las células L, estimulando también la secreción de GLP-1 (Figura 30).



**Figura 30.-** Mecanismos indirectos para estimular la liberación de GLP-1.

Existen varios tipos de moléculas pequeñas que se comportan como agonistas del receptor GPR119 (51). Entre ellas, destacaremos MBX-2982, de Metabolex, y GSK-122263, de Glaxo Smith Kline, que se encuentran en ensayos clínicos de fase II (Figura 31). También se está investigando la combinación de agonistas de GPR119 con inhibidores de DPP-IV (52). En cuanto a los agonistas de TGR5, mencionaremos XL475, de Exelixis/Bristol-Myers Squibb, cuya estructura no ha sido revelada (53).



**Figura 31.-** Algunos agonistas del receptor GPR119.

## 8. CONCLUSIONES

Aunque existen todavía aspectos sin resolver, la aproximación basada en el incremento de la actividad de las incretinas por vías directas o indirectas constituye una de las vías más prometedoras para el tratamiento futuro de la diabetes de tipo 2, uno de los mayores problemas sanitarios a los que se enfrenta la sociedad actual.

## 9. REFERENCIAS

1. Verspohl, E. J. (2012). Novel pharmacological approaches to the treatment of type 2 diabetes. *Pharmacol. Rev.* 64, 188-237.
2. Pandey, R.; Kumar, N.; Yadav, M.; Nagpal, R.; Jain, S.; Yadav, M. (2013). Anti-diabetic compounds and their patent information: An update. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 7, 35-48.
3. Israili, Z. H. (2011). Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Ther.* 18, 117-152.
4. Drucker, D. J. The web site devoted to the study of the glucagon-like peptides, <http://www.glucagon.com> (consultado el 02-08-2013).
5. Kazakos, K. (2011). Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. *Diabet. Res. Clin. Pr.* 93S, S32-S36.
6. Vahl, T. P.; Paty, B. W.; Fuller, B. D.; Prigeon, R. L.; D'Alessio, D. A. (2003). Effects of GLP-1-(7-36)NH<sub>2</sub>, GLP-1-(7-37), and GLP-1-(9-36)NH<sub>2</sub> on intravenous glucose tolerance and glucose-induced insulin secretion in healthy humans. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 88, 1772-1779.
7. Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminformatics* 2012, 4: 17.
8. Sinclair, E. M.; Drucker, D. J. (2005). Proglucagon-derived peptides: Mechanisms of action and therapeutic potential. *Physiology* 20, 357-365.
9. Drucker, D. J. (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metabol.* 3, 153-165
10. Elashoff, M.; Matveyenko, A. V.; Gier, B.; Elashoff, R.; Butler, P. C. (2011). Pancreatitis, pancreatic, and thyroid cancer with Glucagon-Like Peptide-1-based therapies. *Gastroenterology* 141, 150-156.
11. Cho, Y.-M.; Merchant, C. E.; Kieffer, T. J. (2012). Targeting the glucagon receptor family for diabetes and obesity therapy. *Pharmacol. Ther.* 135, 247-278
12. Meier, J. J. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus (2012). *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 728-742.
13. Yi, F.; Li, D.; Ma, W.; Du, Q. (2013). GLP-1 biology and GLP-1 based antidiabetic therapy. *J. Chin. Pharm. Sci.*, 22, 7-27.
14. Lorenz, M.; Evers, A.; Wagner, M. (2013). Recent progress and future options in the development of GLP-1 receptor agonists for the treatment of diabetes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 4011-4018.
15. Weber, A. E. (2004). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of diabetes. *J. Med. Chem.* 47, 4135-4141.
16. Chyan, Y. J.; Chuang, L. M. (2007). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitors: An evolving treatment for type 2 diabetes from the incretin concept. *Rec. Pat. Endocr. Metabol. Immun. Drug Discov.* 1, 15-24.
17. Pei, Z. From the bench to the bedside: Dipeptidyl peptidase IV inhibitors, a new class of oral antihyperglycemic agents. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 11, 512-532.
18. Underwood, C. R.; Garibay, P.; Knudsen, L. B.; Hastrup, S.; Peters, G. H.; Rudolph, R.; Reedtz-Runge, S. (2010) Crystal structure of Glucagon-Like Peptide-1 in complex with the extracellular domain of the Glucagon-Like Peptide-1 receptor. *J. Biol. Chem.* 285, 723-730.
19. Eng, J.; Kleinman, W. A.; Singh, L.; Singh, G.; Raufman, J. P. (1992). Isolation and characterisation of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom: Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J. Biol. Chem.* 267, 7402-7405.

20. Kirkpatrick, A.; Heo, J.; Abrol, R.; Goddard III, W. A. (2012). Predicted structure of agonist-bound glucagon-like peptide 1 receptor, a class B G protein-coupled receptor. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 19988–19993.
21. Runge, S.; Thøgersen, H.; Madsen, K.; Lau, J.; Rudolph, R. (2008) Crystal structure of the ligand-bound Glucagon-Like Peptide-1 receptor extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 283, 11340-11347.
22. Rosenstock, J.; Balas, B.; Charbonnel, B.; Bolli, G. B.; Boldrin, M.; Ratner, R.; Balena, R. (2013) The fate of taspoglutide, a weekly GLP-1 receptor agonist, versus twice-daily exenatide for type 2 diabetes: The T-emerge 2 trial. *Diabet. Care* 36, 498-504.
23. Garber, A. J. (2011). Long-acting Glucagon-Like Peptide 1 receptor agonists. *Diabet. Care* 34(S2), S-279-S284.
24. Kratz, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles (2008). *J. Control. Release* 132, 171-183.
25. Nauck, M.; Petrie, J. R.; Sesti, G.; Mannucci, E.; Courreges, J.-P.; Atkin, R.; Düring, S.; Jensen, M.; Heller, C. B. (2012). The once-weekly human GLP-1 analogue semaglutide provides significant reductions in HbA1c and body weight in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 55 (Suppl. 1), S7.
26. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00804986> (consultado el 07-08-2013).
27. Czajkowsky, D. M.; Hu, J.; Shao, Z.; Pleass, R. J. (2012). Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives *EMBO Mol. Med.* 4, 1015–1028.
28. Glaesner, W.; Vick, A. M.; Millican, R.; Ellis, B.; Tschang, S. H.; Tian, Y.; Bokvist, K.; Brenner, M.; Koester, A.; Porksen, N.; Etgen, G.; Bumol, T. (2011). Engineering and characterization of the long-acting Glucagon-Like Peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 26, 287–296.
29. Schellenberger, V.; Wang, C. W.; Geething, N. C.; Spink, B. J.; Campbell, A.; To, W.; Scholle, M. D.; Yin, Y.; Yao, Y.; Bogin, O.; Cleland, J. L.; Silverman, J.; Stemmer, W. P. C. (2009). A recombinant polypeptide extends the *in vivo* half-life of peptides and proteins in a tunable manner. *Nat. Biotechnol.* 27, 1186 – 1190.
30. <http://www.abstractsonline.com/plan/ViewAbstract.aspx?mID=3217&sKey=0687e7c8-c97d-442b-92ec-ae505e051854&cKey=66ccf402-dd78-4894-8cae-b259fba97022&mKey=%7B89918D6D-3018-4EA9-9D4F-711F98A7AE5D%7D> (consultado el 12-08-2013).
31. Russell-Jones, D.; Gough, S. (2012). Recent advances in incretin-based therapies. *Clin. Endocrinol.* 77, 489–499.
32. Sivertsen, J.; Rosenmeier, J.; Holst, J. J.; Vilsbøll, V. (2012). The effect of Glucagon-Like Peptide 1 on cardiovascular risk. *Nat. Rev. Cardiol.* 9, 209-222.
33. Cai, Y.; Wei, L.; Ma, L.; Huang, X.; Tao, A.; Liu, Z.; Yuan, W. (2013). Long-acting preparations of exenatide. *Drug Des. Devel. Ther.* 2013:7 963–970.
34. Ballav, C.; Gough, S (2012). Bydureon: long-acting exenatide for once-weekly injection. *Prescriber* 23, 30-33.
35. Krause, A. (2011). Exenatide LAR: A sustained-release formulation of exenatide for the treatment of type 2 diabetes. *Formulary* 45, 43-51.
36. DeYoung, M. B.; MacConell, L.; Sarin, V.; Trautmann, M.; Herbert, P. (2012). Encapsulation of exenatide in poly-(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres produced an investigational long-acting once-weekly formulation for type 2 diabetes. *Diabet. Technol. Ther.* 13, 1145-1154.
37. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01104701> (consultado el 20-08-2013).
38. Rohloff, C. M.; Alessi, T. R.; Yang, B.; Dahms, J.; Carr, J. P.; Lautenbach, S. D. (2008). DUROS® technology delivers peptides and proteins at consistent rate continuously for 3 to 12 months. *J. Diabetes Sci. Technol.* 2, 461-467.
39. Henry, R. D.; Rosenstock, J.; Logan, D. K.; Alessi, T. R.; Luskey, K.; Baron, M. A. (2013). Randomized trial of continuous subcutaneous delivery of exenatide by ITCA 650 versus twice-daily exenatide injections in metformin-treated type 2. *Diabetes Care* 36, doi: 10.2337/dc12-2410.
40. [http://www.emisphere.com/barriers\\_oral\\_delivery.html](http://www.emisphere.com/barriers_oral_delivery.html) (consultado el 02-08-2013).
41. Thoma, R.; Löffler, B.; Stihle, M.; Huber, W.; Ruf, A.; Hennig, M. (2003). Structural basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human Dipeptidyl Peptidase-IV. *Structure* 11, 947–959.

42. Gabhe, N.; Tasgoankar, R.; Dagade, B.; Rao, D.; Sawant, P.; Shirodkar, A. (2013). Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibition: A novel approach for the treatment of type II diabetes mellitus. *Int. J. Pharm. Sci.* 4, 629-637.
43. Gupta, R.; Walung, S. S.; Tokala, R. K.; Parsa, K. V. L.; Singh, S. K.; Pal, M. (2009). Emerging drug candidates of dipeptidyl peptidase IV (DPPP-IV) inhibitor class for the treatment of type II diabetes. *Curr. Drug Targets* 10, 71-87.
44. Peters, J. W. (2007). 11 Years of cyanopyrrolidines as DPP-IV inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 579-595.
45. Thoma, R.; Löffler, B.; Stihle, M.; Huber, W.; Ruf, A.; Hennig, M. (2003). Structural basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV. *Structure*, 11, 947-959.
46. Nabeno, M.; Akahoshi, F.; Kishida, H.; Miyaguchi, I.; Tanaka, Y.; Ishii, S.; Kadowaki, T. (2013). A comparative study of the binding modes of recently launched dipeptidyl peptidase IV inhibitors in the active site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 191-196.
47. Grigoriadis, D. E.; Hoare, S. R. J.; Lechner, S. M.; Slee, D. H.; Williams, J. A. (2009). Drugability of extracellular targets: discovery of small molecule drugs targeting allosteric, functional, and subunit -selective sites on GPCRs and ion channels. *Neuropsychopharmacology* 34, 106-125.
48. Willard, F. S.; Bueno, A. B.; Sloop, K. W. (2012). Small molecule drug discovery at the Glucagon-Like Peptide-1 receptor. *Exptl. Diabet. Res.*, article ID 709893, doi:10.1155/2012/709893.
49. He, M.; Guan, N.; Gao, W. W.; Liu, Q.; Wu, X.-Y.; Ma, D. W.; Zhong, D. F.; Ge, D. B.; Li, C.; Chen, X. Y.; Yang, L.; Liao, J. Y.; Wang, M. W. (2012) A continued saga of Boc5, the first non-peptidic glucagon-like peptide-1 receptor agonist with in vivo activities. *Acta Pharmacol. Sin.* 33, 148-154.
50. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01676584> (consultado el 05-08-2013).
51. Zhu, X.; Huang, W.; Qian, H. (2013). GPR119 agonists: A novel strategy for type 2 diabetes treatment, en Oguntibeju, O. O. *Diabetes mellitus - Insights and perspectives*, capítulo 4. Intech Open Science.
52. Ansarullah, L. Y.; Holstein, M.; DeRuyter, B.; Rabinovitch, A.; Guo, Z. (2013) Stimulating b-Cell regeneration by combining a GPR119 agonist with a DPP-IV inhibitor. *PLoS ONE* 8(1), e53345. doi:10.1371/journal.pone.0053345.
53. Mattei, P. Potent and selective, orally active GPBAR1 agonists as chemical biology probes. <http://www.maggichurhouseevents.co.uk/bmcs/Downloads/GPCRs%20-%20Tue%200905%20Mattei%20Patrizio%20presentation.pdf> (consultado el 05-08-2013).