



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



KATARINA T. TOMOVIĆ

**INHIBICIJA DIPEPTIDIL PEPTIDAZE-4
HETEROCIKLIČNIM JEDINJENJIMA
*IN VITRO***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2020.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



KATARINA T. TOMOVIĆ

***IN VITRO* INHIBITION
OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE-4
BY HETEROCYCLIC COMPOUNDS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2020.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:

др Андрија Шмелцеровић, редовни професор, Универзитет у Нишу,
Медицински факултет

Наслов:

Инхибиција дипептидил пептидазе-4 хетероцикличним једињењима
in vitro

Резиме:

Дипептидил пептидаза-4 је циљни макромолекул у терапији дијабетеса. Утицај моно-, би- и трицикличних деривата имидазола, тиазола, пиридина, пирана, пиримидина и морфолина на активност рекомбиноване хумане дипептидил пептидазе-4 испитан је спектрофотометријским тестом *in vitro*, и упоређен са ситаглиптином и дипротином А као референтним инхибиторима, уз разјашњавање механизма инхибиције и односа структура-активност најефикаснијих инхибитора. Деривати бензимидазол-2-имина, бис(бензимидазол-2-ил)амин, 6-(фенилкарбонил)-[1,3]тиазоло[3,2-*a*]бензимидазол-3-она, бензо[4,5]тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-амин и -фталимида инхибирани су дипептидил пептидазу-4 са $IC_{50} < 200 \mu M$. 2-(2-(3-Хлоробензил)-5,6,7,8-тетрахидробензо[4,5]тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-ил)изоиндолин-1,3-дион је показао око два пута мањи инхибиторни потенцијал у односу на дипротин А, са некомпетитивним типом инхибиције, што може бити објашњено одсуством интеракција са Glu205, Glu206 и S₁ доменом дипептидил пептидазе-4.

1-Пропил-*N*-(1-пропил-1*H*-бензимидазол-2-ил)-1*H*-бензимидазол-2-амин и 1-метил-*N*-(1-пропил-1*H*-бензимидазол-2-ил)-1*H*-бензимидазол-2-амин су показали око три односно један и по пута већи инхибиторни потенцијал, редом, док је 1-етил-*N*-(1-пропил-1*H*-бензимидазол-2-ил)-1*H*-бензимидазол-2-амин показао око три пута мању ефикасност инхибиције у поређењу са дипротином А. Део S₂ проширеног домена дипептидил пептидазе-4 учествује у

интеракцијама са овим структурама, што, претпоставља се, доприноси већој активности инхибитора.

2-[2-Имино-5-нитро-3-(2-оксо-2-фенилетил)-2,3-дихидро-1*H*-бензимидазол-1-ил]-1-фенилетанон и 2-(4-флуоробензилиден)-6-(фенилкарбонил)[1,3]тиазоло[3,2-*a*]бензимидазол-3(2*H*)-он су, поред дипептидил пептидазе-4, инхибирани и ксантин оксидазу са $IC_{50} < 150 \mu M$, у спектрофотометријском тесту *in vitro*. Разматрани су потенцијално израженији кардиоваскуларни протективни ефекти дуалних инхибитора дипептидил пептидазе-4 и ксантин оксидазе.

Није забележена израженија цитотоксичност ефикасних деривата бензо[4,5]тиено[2,3-*d*]пиримидина и дуалних инхибитора у концентрацијама мањим од 250 μM на Сасо-2 ћелијама МТТ тестом.

Значај и механизми вишеструких биохемијских ефеката инхибиције дипептидил пептидазе-4 и плејотропни ефекти постојећих и нових, међу којима и оних пронађених у оквиру ове дисертације, инхибитора разматрани су у циљу процене могућности проширења спектра индикација, при чему је указано на протективне ефекте у кардиоваскуларној и патологији бубрега утицајем на медијаторе инфламације, оксидативног стреса, фиброзе и апоптозе, на повољне ефекте у пост-исхемијској ангиогенези превенцијом разградње фактора-1 стромалних ћелија, уз указивање и на плућну хипертензију као потенцијалну индикацију инхибитора ефикасних у ирверзибилној фази ремоделовања.

Научна област:

Фармацеутске науке

Научна
дисциплина:

Фармацеутска хемија

Кључне речи:

Дипептидил пептидаза-4, Инхибиција, Хетероциклична једињења,
Плејотропни ефекти

УДК:

577.15:547.7/.8:[615.07:543(043.3)

CERIF
класификација:

В 740 Фармаколошке науке, фармакогнозија, фармација,
токсикологија

Тип лиценце
Креативне
заједнице:

CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral
Supervisor:

Dr. Andrija Šmelcerović, Full Professor, University of Niš, Faculty of
Medicine

Title:

In Vitro Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 by Heterocyclic
Compounds

Abstract:

Dipeptidyl peptidase-4 is a target in diabetes therapy. The impact of mono-, bi- and tricyclic derivatives of imidazole, thiazole, pyridine, pyran, pyrimidine and morpholine on the activity of recombinant human dipeptidyl peptidase-4 was evaluated by spectrophotometric method *in vitro* compared with sitagliptin and diprotin A as reference inhibitors, clarifying the mechanism of inhibition and structure-activity relationship of the most effective inhibitors. Derivatives of benzimidazol-2-imine, bis(benzimidazol-2-yl)amine, 6-(phenylcarbonyl)-[1,3]thiazolo[3,2-*a*]benzimidazol-3-one, benzo[4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-amine and -phthalimide inhibited dipeptidyl peptidase-4 with $IC_{50} < 200 \mu M$.

2-(2-(3-Chlorobenzyl)-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4-yl)isoindoline-1,3-dione was about two times less effective than diprotin A, with noncompetitive type of inhibition, what might be explained by absence of interactions with Glu205, Glu206 and S_1 pocket of dipeptidyl peptidase-4.

1-Propyl-*N*-(1-propyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)-1*H*-benzimidazol-2-amine and 1-methyl-*N*-(1-propyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)-1*H*-benzimidazol-2-amine showed about three and one and a half times higher effectiveness, respectively, while 1-ethyl-*N*-(1-propyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)-1*H*-benzimidazol-2-amine was about three times less effective than diprotin A. The S_2 extensive subsite of dipeptidyl peptidase-4 participates in interactions with these structures, what presumably contributes to their higher activity.

Besides dipeptidyl peptidase-4, 2-[2-imino-5-nitro-3-(2-oxo-2-phenylethyl)-2,3-dihydro-1*H*-benzimidazol-1-yl]-1-phenylethanone and 2-(4-fluorobenzylidene)-6-(phenylcarbonyl)[1,3]thiazolo[3,2-*a*]benzimidazol-3(2*H*)-one inhibited xanthine oxidase *in vitro* with $IC_{50} < 150 \mu M$, in spectrophotometric assay. Potential pronounced cardiovascular protective effects of dual dipeptidyl peptidase-4 and xanthine oxidase inhibitors were considered.

Effective benzo[4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimidine derivatives and dual inhibitors were not cytotoxic to a greater extent at concentrations below 250 μM , assessed on Caco-2 cells by MTT assay.

The significance and mechanisms of multiple biochemical effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibition and pleiotropis effects of existing and new, including those found in this dissertation, inhibitors were considered in order to assess possible broadening of range of indications, pointing to protective effects in cardiovascular and renal pathology by affecting mediators of inflammation, oxidative stress, fibrosis and apoptosis, to beneficial effects on postischemic angiogenesis mediated by prevention of stromal cell-derived factor-1 cleavage, and to pulmonary hypertension as possible indication of inhibitors effective in irreversible phase of remodeling.

Scientific
Field:

Pharmaceutical Sciences

Scientific
Discipline:

Pharmaceutical Chemistry

Key Words:

Dipeptidyl Peptidase-4, Inhibition, Heterocyclic Compounds, Pleiotropic Effects

UDC:

577.15:547.7/.8:[615.07:543(043.3)

CERIF
Classification:

B 740 Pharmacological sciences, pharmacognosy, pharmacy, toxicology

Creative

Commons

License Type:

CC BY-NC-ND

Ova doktorska disertacija je rađena na Katedri Farmacija Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu u okviru istraživanja projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (naziv projekta: Dobijanje, fizičko-hemijska karakterizacija, analitika i biološka aktivnost farmakološki aktivnih supstanci; evidencioni broj: OI 172044; rukovodilac: prof. dr Andrija Šmelcerović), i Internog projekta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu (naziv projekta: Dizajn, sinteza i biološka evaluacija novih inhibitora medicinski značajnih enzima; evidencioni broj: INT-MFN-4; rukovodilac: prof. dr Jelena Lazarević).

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru dr Andriji Šmelceroviću, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, za priliku da zavirim u svet nauke, za savete, za odlučno i stručno usmeravanje, za konstruktivnu pomoć i svesrdnu podršku, za vrata uvek otvorena za moja pitanja, za ukazano poverenje.

Zahvalnost dugujem i dr Gordani Kocić, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, za nesebičnu pomoć, dr Nataši Milić, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, za konstruktivne komentare i savete.

Zahvaljujem dr Budimiru Iliću, docentu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, za pomoć u izvođenju studija molekuskog dokinga, i dr Mariji Miljković, naučnom saradniku Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, za pomoć u izvođenju testa citotoksičnosti.

Zahvaljujem dr Denisi Jančevoj, profesoru Instituta za organsku hemiju sa Centrom za fitohemiju Bugarske akademije nauka u Sofiji, i dr Bojanu Bondžiću, višem naučnom saradniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu, za date sintetisane supstance koje su ispitivane u ovoj doktorskoj disertaciji.

Neizmerno hvala mojoj Porodici za ogromnu podršku, razumevanje, za bezbrojne sate strpljivog slušanja, za visoka očekivanja, stalno podizanje lestvice i ohrabrenje za izlazak na crtu novim izazovima.

Skraćenice

ADA - adenzin deaminaza

AGE - krajnji produkti glikacije

AMP - adenzin monofosfat

AMPK - protein kinaza aktivirana adenzin monofosfatom

cAMP - ciklični adenzin monofosfat

cGMP - ciklični guanozin monofosfat

CRP - C-reaktivni protein

CXCR4 - CXC hemokin receptor 4

DMEM - Dulbekov modifikovan *Eagle* medijum

DPP-4 - dipeptidil peptidaza-4

eNOS - endotelna sintaza azot monoksida

ERK - ekstracelularnim signalima regulisana kinaza

ET-1 - endotelin-1

GIP - glukoza-zavistan insulinotropni polipeptid

GLP-1 - glukagonu sličan peptid-1

GSHPx - glutation peroksidaza

IC₅₀ - koncentracija inhibitora koja uzrokuje 50% inhibicije enzimske aktivnosti

ICAM-1 - intracelularni adhezioni molekul-1

IFN- γ - interferon gama

IL - interleukin

LDL - lipoprotein niske gustine

MAPK - protein kinaza aktivirana mitogenima

MCP-1 - monocitni hemotaktični protein-1

MDA - malondialdehid

MMP - matriks metaloproteaza

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NF- κ B - nuklearni faktor kapa B

NO - azot monoksid

PDGF - trombocitni faktor rasta

PKA - protein kinaza A

PKC - protein kinaza C

RAGE - receptor za krajnje produkte glikacije

RIP - relativni inhibitorski potencijal

ROS - reaktivne kiseonične vrste

SDF-1 - faktor-1 stromalnih ćelija

SOD - superoksid dismutaza

TGF- β - transformišući faktor rasta beta

TNF- α - faktor nekroze tumora alfa

VCAM-1 - vaskularni ćelijski adhezioni molekul-1

VIP - vazoaktivni intestinalni peptid

SADRŽAJ

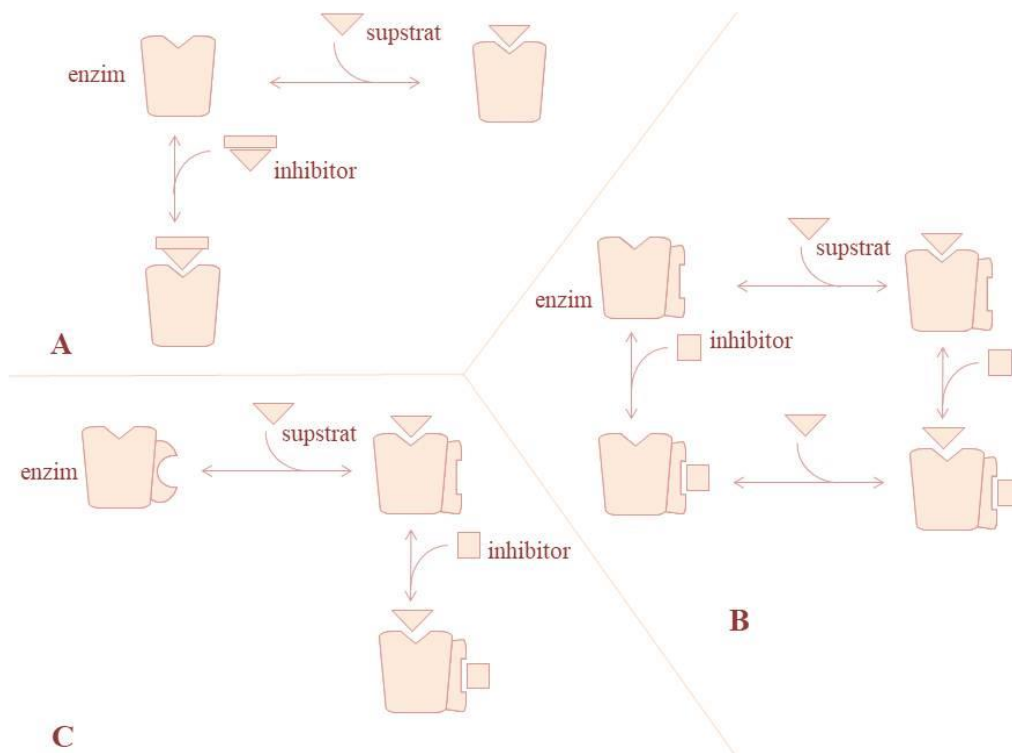
1. UVOD.....	1
1.1. Enzimi i inhibicija njihove aktivnosti.....	1
1.2. Proteaze.....	6
1.3. Dijabetes.....	7
1.4. Dipeptidil peptidaza-4.....	9
1.5. Inhibitori dipeptidil peptidaze-4: mehanizam delovanja i terapijski potencijal	13
1.6. Pregled inhibitora dipeptidil peptidaze-4	17
1.6.1. Derivati pirolidina	17
1.6.2. Derivati pirazola.....	41
1.6.3. Derivati tiazolidina	45
1.6.4. Derivati piridina	55
1.6.5. Derivati pirimidina	58
1.6.6. Biciklični derivati.....	66
1.6.7. Triciklični derivati.....	93
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	98
3. MATERIJAL I METODE.....	99
3.1. Ispitivana jedinjenja	99
3.2. Test inhibicije dipeptidil peptidaze-4.....	112
3.3. Test inhibicije ksantin oksidaze.....	113
3.4. Molekulski doking	113
3.5. Test citotoksičnosti	114
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	115
4.1. Inhibitorski potencijal ispitivanih jedinjenja na dipeptidil peptidazi-4.....	115
4.2. Uticaj inhibitora dipeptidil peptidaze-4 na aktivnost ksantin oksidaze	131
4.3. Benzo[4,5]tieno[2,3- <i>d</i>]pirimidin-4-ftalimid derivat, jedan od retkih nekompetitivnih inhibitora dipeptidil peptidaze-4	135
4.4. Bis(benzimidazol-2-il)amini, inhibitori dipeptidil peptidaze-4 veće efikasnosti od diprotina A	138
4.5. Dualni inhibitori dipeptidil peptidaze-4 i ksantin oksidaze i inhibicija ksantin oksidaze kao mehanizam doprinosa vaskularnim protektivnim efektima inhibitora dipeptidil peptidaze-4	139

4.6. Citotoksičnost inhibitora dipeptidil peptidaze-4.....	146
4.7. Teorijska razmatranja plejotropnih efekata inhibicije dipeptidil peptidaze-4.....	148
4.7.1. Anti-inflamatorni efekti inhibitora dipeptidil peptidaze-4 u vaskularnom sistemu, miokardu i bubrezima	148
4.7.2. Dipeptidil peptidaza-4 i faktor-1 stromalnih ćelija u reparaciji miokarda	155
4.7.3. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4: plućna hipertenzija, nova terapijska indikacija?	158
5. ZAKLJUČAK.....	164
6. LITERATURA	166
BIOGRAFIJA AUTORA	204
BIBLIOGRAFIJA AUTORA.....	205
IZJAVE AUTORA	209

1. UVOD

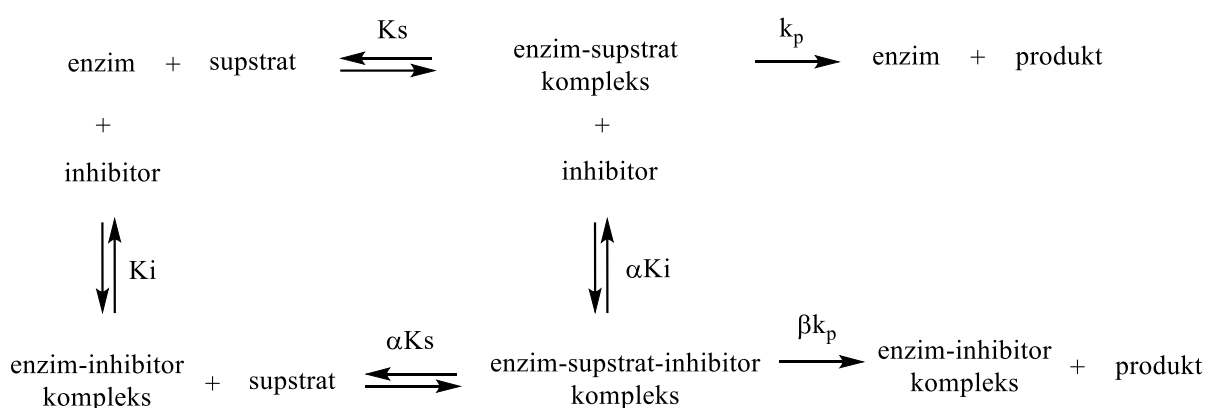
1.1. Enzimi i inhibicija njihove aktivnosti

Energija aktivacije reakcija kontrolisanih vitalnih procesa biva snižena enzimima. Na osnovu reakcija koje katalizuju, enzimi su klasifikovani u šest kategorija: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze. U enzimskoj nomenklaturi, u četvorocifrenom broju enzima, prva cifra predstavlja klasu enzima, druga specifičnije ukazuje na tip supstrata, dok su trećom i četvrtom cifrom definisani enzimi individualno. Enzimi predstavljaju ciljne makromolekule u humanoj medicini i veterini, sa velikim brojem struktura, kandidata i već odobrenih lekova, koje deluju tako što njihovu katalitičku aktivnost inhibiraju (Copeland, 2000). Inhibicija se definiše kao negativan uticaj liganda (inhibitora) na aktivnost enzima specifičnim vezivanjem za definisani katalitički ili regulatorni centar (Bisswanger, 2002). Stepenom uticaja jednog liganda (supstrata ili inhibitora) na vezivanje drugog liganda definišu se različiti načini interakcija inhibitora sa enzimom i tipovi inhibicije. Kompetitivna inhibicija se dešava kada se inhibitor i supstrat vezuju za isto mesto na enzimima, i vezuju se ili jedan ili drugi, ne oba simultano. Odlika kompetitivne inhibicije je da može biti nadjačana većim koncentracijama supstrata. U nekompetitivnoj inhibiciji inhibitor se vezuje i za slobodan enzim i za enzim-supstrat kompleks istim afinitetom, ne pokazuje kompetitivnost sa supstratom, ne vezuju se za aktivno mesto, i nema promena povećanjem koncentracije supstrata. Inhibitori sa mešovitim tipom inhibicije pokazuju različit afinitet za slobodan i enzim u kompleksu sa supstratom. Akompetitivni inhibitori se vezuju za enzim-supstrat kompleks, bez afiniteta za slobodan enzim (Slika 1). Grafička determinacija tipa inhibicije se može vršiti duplo recipročnim *Lineweaver-Burkovim* dijagramom (Copeland, 2000).



Slika 1. Prikaz tipova interakcije inhibitora i enzima: A) kompetitivna, B) nekompetitivna, C) akompetitivna inhibicija (adaptirano iz Copeland, 2000)

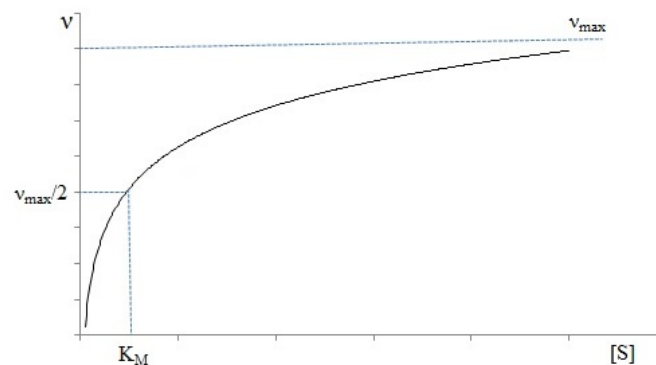
Enzimaska kataliza se odvija postepeno, formiranjem kompleksa enzima i supstrata, preko prelaznih stanja, do nastajanja produkta (Böhm i Schneider, 2003).



Ako je konstanta disocijacije enzim-supstrat kompleksa označena kao K_s , konstanta disocijacije enzim-inhibitor kompleksa K_i i konstanta formiranja produkta iz enzim-supstrat i enzim-supstrat-inhibitor kompleksa k_p , onda se faktorom α reflektuje uticaj inhibitora na

afinitet enzima za supstrat i efekat supstrata na afinitet enzima za inhibitor, dok faktor β ukazuje na modifikaciju brzine formiranja produkta uzrokovanu inhibitorom. Inhibitor koji kompletno blokira aktivnost enzima imaće vrednost $\beta = 0$. Inhibitor koji parcijalno blokira formiranje produkta se karakteriše vrednostima $0 < \beta < 1$. Aktivatori enzima, sa druge strane, pokazuju $\beta > 1$. Faktorom α se modifikuju vrednosti K_s inhibitorom i K_i supstratom. Kompetitivna inhibicija se karakteriše vrednostima $\alpha = \infty$. Kada je $\alpha = 1$ inhibitor pokazuje isti afinitet prema slobodnom i enzimu u kompleksu sa supstratom. Akompetitivna inhibicija se karakteriše vrednostima $\alpha \ll 1$ (Copeland, 2000).

Brzina reakcije katalizovane enzimom se računa *Michaelis-Mentenovom* jednačinom. Grafički prikazana zavisnost brzine reakcije (v) od koncentracije supstrata ($[S]$) (Slika 2) ukazuje na to da u nižim koncentracijama supstrata, brzina reakcije raste proporcionalno sa koncentracijom, dok u višim koncentracijama supstrata brzina postaje konstantna i dostiže maksimalnu nepromenljivu vrednost, nezavisnu od koncentracije. Tada, koncentracija supstrata prevazilazi dostupnost aktivnih mesta enzima i dalji porast koncentracije pokazuje, ne značajan, mali uticaj na brzinu reakcije (Patrick, 2013).

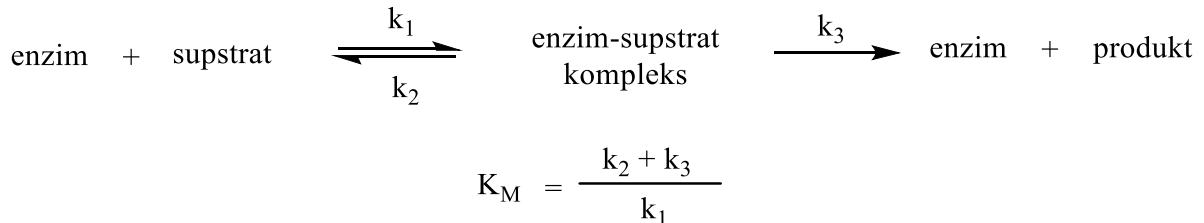


Slika 2. Zavisnost brzine reakcije od koncentracije supstrata

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Michaelis Mentenova konstanta, K_M , predstavlja koncentraciju supstrata kada je polovina aktivnih mesta enzima zauzeta, i predstavlja meru koncentracije supstrata neophodnu za

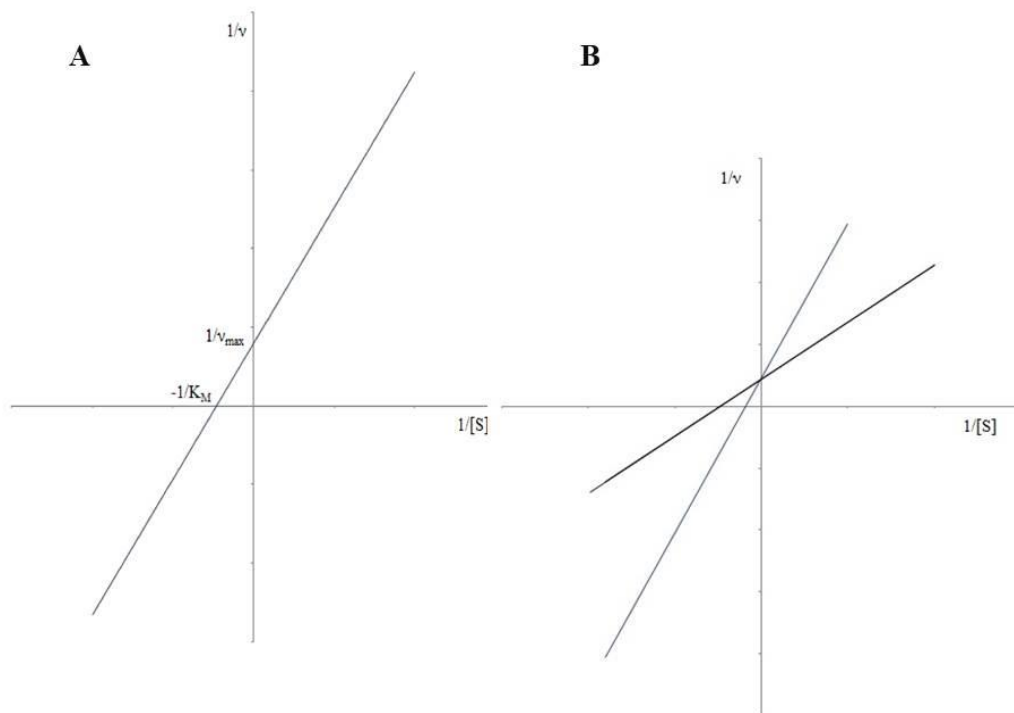
značajnu katalizu. Ova konstanta može predstavljati meru jačine interakcija supstrata sa enzimom, pri čemu niža vrednost ukazuje na jaču vezu supstrata i enzima. Njena vrednost zavisi od supstrata, uslova, pH, temperature, jonske jačine (Patrick, 2013).



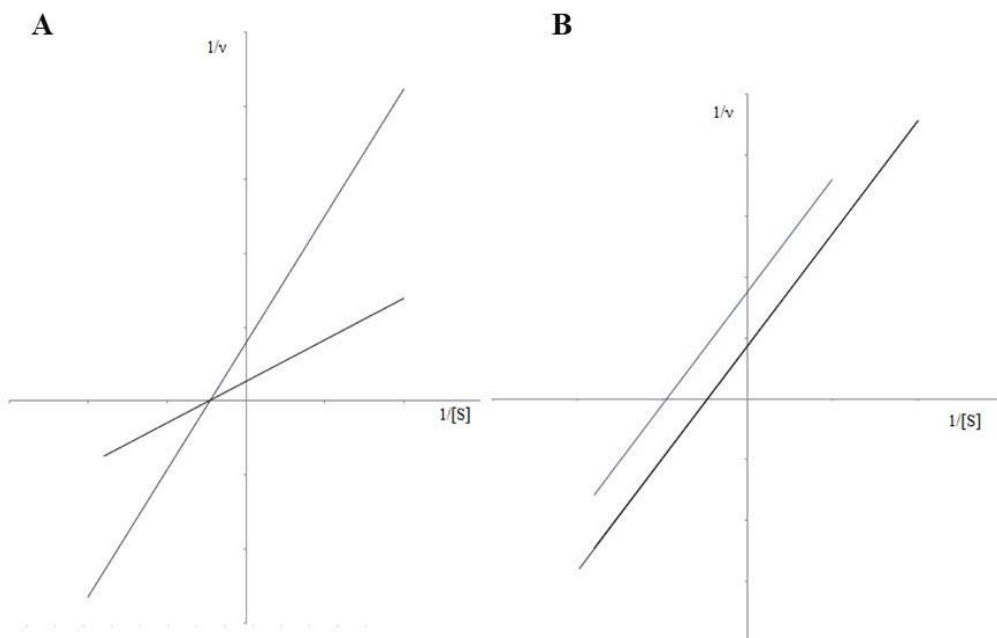
k_{1-3} – konstante brzine reakcija

Michaelis Mentenova kinetika ne daje dovoljno podataka da bi se sa sigurnošću moglo tvrditi da li je maksimum brzine dosegnut ili ne. *Lineweaver-Burkovim* dijagramom zavisnosti recipročnih vrednosti koncentracije supstrata i brzine reakcije ovaj nedostatak može biti uklonjen. Ovim dijagramom je moguće odrediti tip inhibicije. U kompetitivnom tipu inhibicije maksimalna brzina enzimom katalizovane reakcije se ne menja, ali se menja koeficijent pravca prave usled povećanja vrednosti K_M (Slika 3). U nekompetitivnom tipu inhibicije K_M vrednost ostaje nepromenjena, ali je maksimalna brzina smanjena. U akompetitivnom tipu i maksimalna brzina i K_M vrednost bivaju podjednako smanjene, a koeficijent pravca prave ostaje nepromenjen (Slika 4) (Patrick, 2013).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$



Slika 3. *Lineweaver-Burkov* dijagram (A) i *Lineweaver-Burkov* grafik kompetitivne inhibicije (B)



Slika 4. *Lineweaver-Burkov* grafik nekompetitivne (A) i akompetitivne inhibicije (B)

Među regulatorima aktivnosti enzima, veoma su značajni inhibitori hidrolitičkih enzima. Treća klasa enzima, hidrolaze, katalizujući hidrolizu C-O, C-N, C-C i P-O veza proteina, ugljenih hidrata i lipida, učestvuje u regulaciji digestije, imunološkog odgovora, koagulacije i homeostaze glukoze (Ekinci, 2012).

1.2. Proteaze

Post-translaciona modifikacija peptida proteazama, sekretovanim, eksprimiranim na površini ćelija ili intracelularnim, predstavlja najizraženiji oblik regulacije biološki aktivnih peptida. Peptidaze mogu aktivirati, inaktivirati, modulisati aktivnost bioloških peptida. Poslednjih decenija zabeležen je porast broja proteaza u ulozi značajnih ciljnih makromolekula delovanja leka. Veliki broj inhibitora ovih enzima je već u primeni u kliničkoj praksi, ili se nalaze u različitim fazama kliničkih ispitivanja (Juillerat-Jeanneret, 2013; Vizovišek i saradnici, 2016). Na osnovu katalitičkog mehanizma, proteaze mogu biti klasifikovane na serin, cistein, metalo, aspartatne, treonin, glutamatne proteaze, i one sa nepoznatim mehanizmom delovanja. Proteaze mogu biti podeljene na endopeptidaze (koje razgrađuju protein u unutrašnjosti polipeptidnog lanca) i egzopeptidaze (koje razgrađuju N i C terminus, amino- i karboksipeptidaze). Efikasnost katalize *in vivo* determinisana je brojnim faktorima. Aktivnost proteaza *in vivo* fino je regulisana na više nivoa, transkripcijom, aktivacijom zimogena, alosterijskim efektorima, inhibicijom endogenim inhibitorima. Identifikacija fizioloških supstrata, razumevanje njihove aktivnosti i lokalizovanosti u proteolitičkoj mreži je značajno (Vizovišek i saradnici, 2016). Razumevanje kompleksnosti signalne kaskade proteaza predstavlja izazov i značajan deo izdvajanja proteaza kao meta leka (Turk, 2006).

Mnoge proteaze ne mogu da katalizuju hidrolizu peptidnih veza u kojima je jedna od aminokiselina prolin, zbog specifične strukture ove ciklične sekundarne aminokiseline i njenog uticaja na osnovni skelet peptida. Ostaci prolina se javljaju u blizini N-terminusa mnogih biološki aktivnih peptida, i doprinose zaštiti od degradacije. Specifične peptidaze mogu prepoznati ostatke prolina i uspešno hidrolizovati X-Pro peptidnu vezu. Mnogi od ovih enzima imaju značajne fiziološke uloge i predstavljaju mete dizajna lekova.

Protiloligopeptidaze među serin proteazama obuhvataju i dipeptidil peptidazu-4 (DPP-4) (E.C. 3.4.14.5) (García-Horsman i saradnici, 2007; Cunningham i O'Connor, 1997).

1.3. Dijabetes

Razvoj leka za terapiju metaboličkih bolesti - pogoditi metu, lakše je reći nego učiniti. Globalna epidemija gojaznosti i dijabetesa nastavlja sa porastom neumoljivo (Moller, 2012). Prognoza je da će do 2045. godine do 629 miliona ljudi biti obolelo od dijabetesa (Kanasaki, 2018). Prema ranijim procenama Svetske zdravstvene organizacije, do 2030. godine dijabetes će biti sedmi uzrok smrti globalno. Najviša stopa mortaliteta uzrokovanog dijabetesom je zabeležena u Africi, istočnom Mediteranu i jugo-istočnoj Aziji, dok je u ostalim regijama (u Evropi, Americi i zapadnom Pacifiku) znatno niža (Kerru i saradnici, 2018). Dijabetes melitus je metaboličko oboljenje okarakterisano visokim koncentracijama glukoze u plazmi, hiperglikemijom natašte ili u testu opterećenja glukozom. Svetska zdravstvena organizacija razlikuje dve kliničke forme dijabetesa, tip 1 i 2. Tip 1 dijabetesa, juvenilni, insulin zavistan je dijagnostikovao kod dece i mladih odraslih, indukovano destrukcijom insulin produkujućih beta ćelija Langerhansovih ostrvaca pankreasa, što vodi deficijenciji insulina, koji posreduje u preuzimanju glukoze u jetri, mišićima i adipoznom tkivu. Tip 2 ili insulin nezavistan dijabetes melitus je najčešći oblik dijabetesa i karakteriše se rezistencijom ili smanjenom osetljivošću na insulin, kombinovano sa smanjenom sekrecijom insulina i hiperglikemijom. Pacijenti oboleli od dijabetes melitusa tipa 2 imaju visok rizik za razvoj mikro- i makrovaskularnih komplikacija, kao što su nefropatija, neuropatija, retinopatija, koronarna arterijska bolest, infarkt, hipertenzija, periferne vaskularne bolesti (Havale i Pal, 2009; Kerru i saradnici, 2018).

Vaskularne komplikacije, koje nastaju kao rezultat hroničnom hiperglikemijom uzrokovanog oksidativnog stresa i inflamacije, vodeći su uzrok mortaliteta pacijenata sa dijabetes melitusom tipa 1 i 2 (Domingueti i saradnici, 2016; Madonna i saradnici, 2017). Inicijalni okidač nepovoljnog uticaja povećane koncentracije glukoze na funkciju endotela je poremećaj balansa biorasploživosti azot monoksida (NO) i akumulacije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). Hiperglikemija indukuje generisanje superoksid anjona aktivacijom protein kinaze C (PKC) i posledičnim porastom aktivnosti nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze. Superoksid anjon inaktivira NO formirajući peroksinitrit koji lako

penetrira kroz fosfolipidne membrane i vrši nitrovanje supstrata. Nitrozilovani proteini suprimiraju aktivnost antioksidativnih enzima i endotelne sintaze azot monoksida (eNOS). Reaktivne kiseonične vrste potenciraju nuklearnu translokaciju p65 subjedinice nuklearnog faktora kapa B (NF- κ B), transkripciju pro-inflamatornih gena, monocitnog hemotaktičnog proteina-1 (MCP-1), vaskularnog (VCAM-1) i intracelularnog adhezionog molekula-1 (ICAM-1), što pozitivno reguliše adheziju monocita za endotel i dijapedezu, uz formiranje penastih ćelija. Sekretija interleukina (IL)-1 i faktora nekroze tumora alfa (TNF- α) iz aktiviranih makrofaga održava pozitivnu regulaciju adhezionih molekula potenciranjem NF- κ B signalizacije u endotelu, promovišući i vijablnost i proliferaciju glatko-mišićnih ćelija (Paneni i saradnici, 2013).

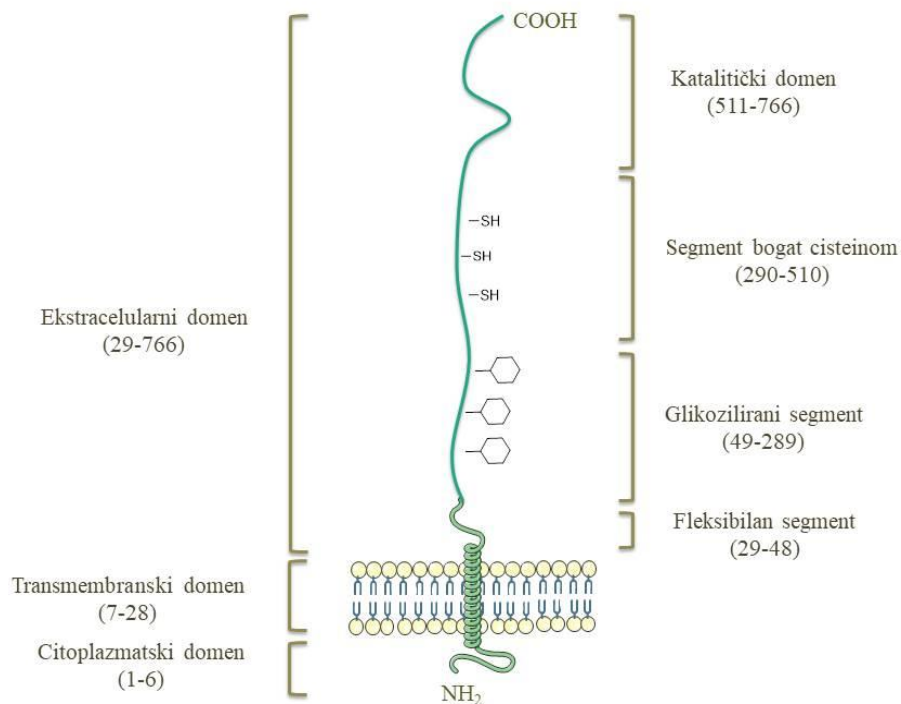
Prekomerna izloženost fluktuacijama koncentracija glukoze i insulina značajno doprinosi smanjenju broja beta ćelija, poremećaju osetljivosti na insulin, aktivaciji medijatora inflamacije, generisanju slobodnih radikala, i promenama strukture i funkcije biomolekula. Jedan od primarnih mehanizama kontrole sekrecije insulina je sekretija inkretina (glukagonu sličan peptid-1, GLP-1, i glukoza-zavistan insulinotropni polipeptid, GIP) na unos hrane. Insulinotropni efekti inkretina progresivno opadaju tokom razvoja dijabetesa, usled njihove smanjene sekrecije i porasta aktivnosti DPP-4 koja ih razgrađuje. Kapacitet održavanja signalizacije insulina je značajan, jer glikemijska kontrola nije obavezno dovoljna u prevenciji kardiovaskularnih bolesti kod pacijenata sa dijabetesom (Harcourt i saradnici, 2013).

Za primenu u terapiji dijabetesa tipa 2 odobreni su: sulfonilurea derivati i meglitinidi koji stimulišu produkciju insulina, sa hipoglikemijom kao neželjenim efektom; derivati bigvanida koji smanjuju produkciju glukoze u jetri, sa gastrointestinalnim sporednim efektima; derivati tiazolidindiona koji povećavaju osetljivost na insulin i smanjuju produkciju glukoze u jetri, uz mogućnost pojave otoka i povećanja telesne mase; inhibitori α -glukozidaze koji smanjuje apsorpciju ugljenih hidrata, uz gastrointestinalne sporedne efekte; inhibitori DPP-4 koji potenciraju efekte inkretina, uz nazofaringitis, glavobolju i urogenitalne infekcije kao neželjene efekte; agonisti GLP-1 receptora koji su mimetici inkretina, uz glavobolju, infekcije gornjih respiratornih puteva i gastrointestinalne sporedne efekte; inhibitori natrijum-glukoza kotransportera 2 koji potenciraju eliminaciju glukoze urinom, uz urogenitalne infekcije i hiperkalijemiju kao neželjeni efekat (Kerru i saradnici, 2018; Ahmed i saradnici, 2015).

Rezultati prve kliničke studije o efektima inhibicije DPP-4 objavljeni su 2002. godine i od tada su brojne randomizirane kontrolisane studije ukazivale na efikasnost, bezbednost i dobru podnošljivost DPP-4 inhibitora, na protektivne efekte u kardiovaskularnom sistemu i bubrezima, uz naglašavanje potencijala za proširenje spektra indikacija ovih agenasa, pored dijabetes melitusa tipa 2 (Deacon, 2018).

1.4. Dipeptidil peptidaza-4

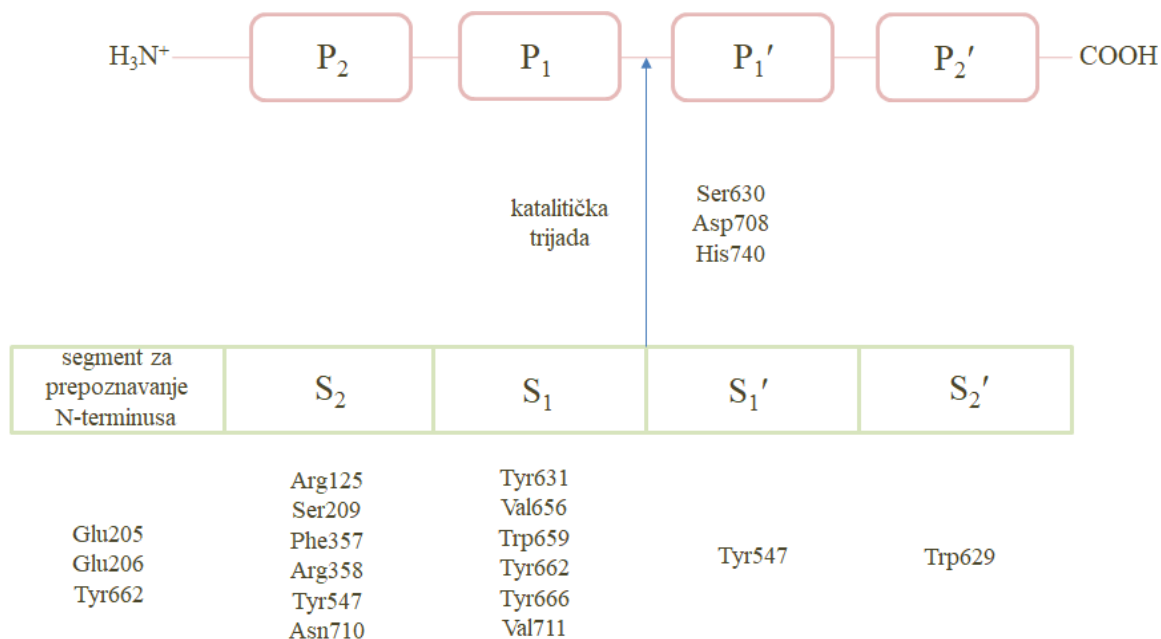
Dipeptidil peptidaza-4 pripada familiji prolin specifičnih proteaza, serin peptidaza sekretovanih, eksprimiranih na membrani ili intracelularno, čiji su članovi i DPP-2, -8 i -9 (Juilleraat-Jeanneret, 2013). Dipeptidil peptidaza-4 je regulatorna proteaza koja učestvuje u digestiji oligopeptida sa prolinom/alaninom na preposlednjoj poziciji *N*-terminusa (Juilleraat-Jeanneret, 2013), sa prioritetom ostataka prolin > alanin > serin, dok manje efikasno uklanja i dipeptide sa hidroksiprolinom, dehidroprolinom, glicinom, valinom, treoninom i leucinom na preposlednjem položaju *N*-terminusa (McIntosh i saradnici, 2005). Ova aminopeptidaza je membranski glikoprotein tipa II, aktivan u obliku dimera, koji se sastoji od 766 aminokiselina, sa kratkim citoplazmatskim (6 *N*-terminalnih aminokiselina), transmembranskim (22 aminokiseline) i ekstracelularnim delom (aminokiseline β -propeler i α/β -hidrolaza domena), koji sadrži aktivno mesto (Juilleraat-Jeanneret, 2013; Zhong i saradnici, 2015) (Slika 5). Katalitičko mesto je lokalizovano u šupljini između α/β hidrolaza i β -propeler domena (Juilleraat-Jeanneret, 2013).



Slika 5. Prikaz strukture humane dipeptidil peptidaze-4 (adaptirano iz Mentlein, 1999; Lambeir i saradnici, 2003)

Pored aminokiselina u S_2 , S_1 , S_1' i S_2' domenu katalitičkog centra, značajne su i aminokiseline ove proteaze u delu za prepoznavanje *N*-terminusa supstrata koji sadrži Glu205, Glu206 i Tyr662 ostatke (gde Glu205 i Glu206 interaguju sa amino grupom peptida). Značajan je oksianjon domen, formiran amino grupom Tyr631 i hidroksilnom grupom Tyr547, kojim biva stabilizovan negativno naelektrisan intermedijer, oksianjon generisan u prelaznom stanju katalize, i katalitička trijada Ser630, Asp708 i His740 (sa Ser630 koji katalizuje kidanje veze peptida između P_1 i P_1' segmenta nukleofilnim napadom). U literaturi ima podataka o S_2 proširenom ili S_3 domenu ove proteaze koji se sastoji od aminokiselina Val207, Ser209, Phe357 i Arg358, u kom se vezuju inhibitori, ali ne i supstrati, čime inhibitorna aktivnost i selektivnost inhibitora u odnosu na druge slične proteaze biva potencirana (Ojeda-Montes i saradnici, 2018; Nabeno i saradnici, 2013; Patel i Ghate, 2014) (Slika 6).

Dve glutaminske kiseline na pozicijama 205 i 206 su identifikovane kao esencijalne za aktivnost humane DPP-4, odgovorne za prepoznavanje *N*-terminusa supstrata i restrikciju katalize na dipeptide (Abbott i saradnici, 1999a; Thoma i saradnici, 2003).



Slika 6. Šematski prikaz katalitičkog centra dipeptidil peptidaze-4 sa obeleženim segmentima enzima (S₂, S₁, S₁' i S₂') i odgovarajućim segmentima strukture supstrata (P₂, P₁, P₁' i P₂') (adaptirano iz Ojeda-Montes i saradnici, 2018)

Egzopeptidaza DPP-4 ciljni je makromolekul u terapiji dijabetesa (Havale i Pal, 2009). Inkretin hormoni, GLP-1 i GIP, su endogeni fiziološki supstrati DPP-4 (Kirby i saradnici, 2010). Inkretin hormon GLP-1 je sekretovan u distalnim intestinalnim L ćelijama. Aktivan oblik GLP-1 je sačinjen od 30 aminokiselina, vezuje se za GLP-1 receptore na beta ćelijama pankreasa, stimuliše biosintezu i glukoza-zavisnu sekreciju insulina, suprimirajući postprandijalni porast glikemije. Ovaj inkretin inhibira sekreciju glukagona, usporava motilitet i sekreciju u gastrointestinalnom traktu, fiziološki je regulator apetita i unosa hrane, povoljno utiče na vijabilnost i proliferaciju beta ćelija pankreasa, doprinoseći efektivno održavanju homeostaze glukoze (Havale i Pal, 2009; Holst, 2007; Ahrén, 2007). Aktivan oblik GLP-1 biva brzo ($t_{1/2} \sim 1-1,5$ min) inaktiviran u plazmi dipeptidil peptidazom-4. Primenu u terapiji dijabetesa nalaze i GLP-1 analozi, agonisti GLP-1 receptora rezistentni na DPP-4. Drugi inkretin hormon, GIP, je peptid sačinjen od 42 aminokiseline, sekretovan u K ćelijama intestinuma. Aktivacijom GIP receptora na beta ćelijama pankreasa, adenilatna ciklaza biva aktivirana, što je praćeno porastom cikličnog adenzin monofosfata (cAMP) i intracelularnog kalcijuma, aktivacijom protein kinaze A (PKA) i sekrecijom insulina. Kao GLP-1, i GIP biva brzo inaktiviran u plazmi dipeptidil peptidazom-4. Glukoza-zavistan insulinotropni polipeptid nije efektivan u terapiji dijabetes melitusa tipa 2, usled zabeležene

rezistencije na efekte ovog inkretina u dijabetesu (Havale i Pal, 2009; Ahrén, 2007). Insulintropna aktivnost GLP-1 u poređenju sa GIP je izraženija, dok je polu-vreme GIP duže od polu-vremena GLP-1 (Fisman i Tenenbaum, 2015; Patel i Ghate, 2014).

Inkretini su jedna od mnogih meta dipeptidil peptidaze-4 (Zhong i saradnici, 2015). Ova peptidaza modifikuje biološku aktivnost i hemokina, faktora rasta, neuro- i vazoaktivnih peptida (Abbott i saradnici, 1999a; Lambeir i saradnici, 2003). Zbog brojnih supstrata/liganada, pored regulacije homeostaze glukoze, ova proteaza pokazuje i druge sistemske efekte (Avogaro i saradnici, 2014; Fadini i Avogaro, 2011; Kim i saradnici 2014; Gorrell, 2005; Mulvihill i Drucker, 2014; Augustyns i saradnici, 2005; Andersen i saradnici, 2018; Boonacker i Van Noorden, 2003).

Dipeptidil peptidaza-4 je i vezujući protein za kolagen tipa I i III (cistein bogatim domenom, nezavisno od enzimske aktivnosti), receptor je i za adenozin deaminazu (ADA) (Juillerat-Jeanneret, 2013). Domen vezivanja ADA obuhvata aminokiseline od Leu340 do Arg343 i Thr440/Lys441 proteaze (Abbott i saradnici, 1999b). Ova peptidaza eksprimirana na makrofagima, posebno u visceralnom adipoznom tkivu, vezuje ADA i učestvuje u proliferaciji i aktivaciji T ćelija (Zhong i saradnici, 2013a). Kostimulatorni je molekul za limfocite (CD26 u imunološkom kontekstu). Široko je eksprimirana u epitelnim i ne-epitelnim tkivima, cirkulaciji, sa najizraženijom ekspresijom u proksimalnim tubulima bubrega i na luminalnoj membrani epitelnih ćelija intestinuma (Juillerat-Jeanneret, 2013; Gorrell i saradnici, 2001). Široka distribucija ove proteaze obuhvata epitelne, endotelne ćelije, leukocite, hepatocite, fibroblaste, acinusne ćelije egzokrinog pankreasa, limfne čvorove, uterus, placentu, nadbubrežne, parotidnu i mlečne žlezde, slezinu, pluća, mozak (Kirby i saradnici, 2010; Hildebrandt i saradnici, 2000; Augustyns i saradnici, 2005). Interferon gama (IFN- γ) može indukovati ekspresiju ove proteaze na humanim glomerularnim epitelnim ćelijama (Stefanovic i saradnici, 1993). Aktivnost DPP-4 se beleži i u serumu, urinu, amnionskoj tečnosti (Hildebrandt i saradnici, 2000). Katalitički aktivna DPP-4 bez transmembranskog i intracelularnog domena predstavlja solubilnu formu ove proteaze. Ćelije, tkiva, izvori solubilnog oblika DPP-4 *in vivo*, mehanizmi i regulacija nastajanja, nedovoljno su razjašnjeni (Shi i saradnici, 2016). Iako se epitel jetre i limfociti navode, pokazano je da je adipozno tkivo značajan izvor solubilne DPP-4, i da insulin i TNF- α mogu povećati nivo solubilnog oblika (Aroor i saradnici, 2014; Lamers i saradnici, 2011). Matriks metaloproteaza (MMP)-1, -2 i -14 učestvuju u nastajanju solubilnog oblika ove peptidaze sa vaskularnih glatko-mišićnih ćelija, i MMP-9 sa adipocita. Hipoksija pozitivno

reguliše nastajanje solubilnog oblika DPP-4 sa glatko-mišićnih ćelija, što je povezano sa povećanjem ekspresije MMP-1 (Röhrborn i saradnici, 2014).

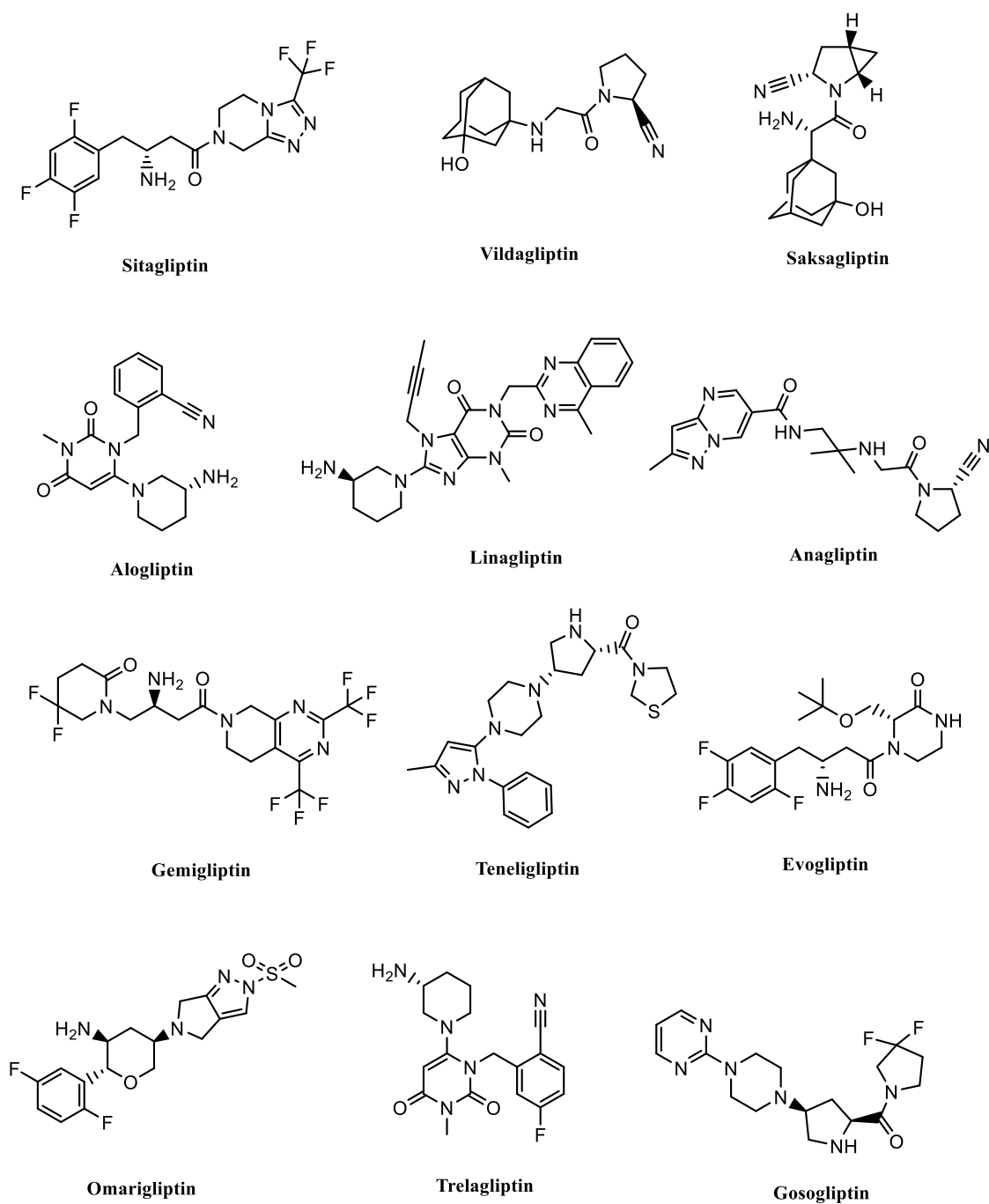
Dipeptidil peptidaza-4 u cirkulaciji može negativno uticati na vaskularnu reaktivnost i vazodilataciju, što doprinosi endotelnoj disfunkciji. Solubilna DPP-4 promovise oslobađanje vazokonstriktora tromboksana A2 (Romacho i saradnici, 2016). Solubilna oblika ove proteaze, u zavisnosti od koncentracije, aktivira ekstracelularnim signalima regulisanu kinazu (ERK) 1/2, indukuje fosforilaciju subjednice p65 NF- κ B, povećava ekspresiju i sekreciju pro-inflamatornih citokina, IL-6, -8 i MCP-1, stimuliše proliferaciju vaskularnih glatko-mišićnih ćelija (Wronkowitz i saradnici, 2014). Solubilna CD26 učestvuje u transendotelnoj migraciji T ćelija (Ikushima i saradnici, 2002). Obe, i solubilna i vezana za membranu DPP-4 poseduju katalitičko mesto i, teorijski, aktivnost obe može biti inhibirana DPP-4 inhibitorima. Farmakološke razlike između dva navedena oblika DPP-4 ostaju predmet detaljnijeg razmatranja (Hasan i Hocher, 2017).

1.5. Inhibitori dipeptidil peptidaze-4: mehanizam delovanja i terapijski potencijal

Pronađeni su brojni inhibitori DPP-4 različitih struktura. Prvi efikasni inhibitori ovog enzima bili su kompetitivni tripeptidi diprotin A (Ile-Pro-Ile) i diprotin B (Val-Pro-Leu). Prva klasa inhibitora bili su analozi supstrata sa pirolidinom. Prva biološka validacija DPP-4 kao terapijske mete bila je sa Val-Pyr, a kasnije su sintetisani analozi sa petočlanim heterociklusom oponašajući prolin u P₁ položaju supstrata (Juillerat-Jeanneret, 2013).

Prvi DPP-4 inhibitor odobren za primenu u terapiji dijabetes melitusa tipa 2 bio je sitagliptin (2006. godine), reverzibilan inhibitor sa doziranjem 100 mg jednom dnevno. Vildagliptin (odobren 2008. godine) formira reverzibilno kovalentnu vezu između cijano grupe i Ser630 proteaze, hidrolizom biva brzo transformisan u neaktivan metabolit, i zahteva doziranje 50 mg dva puta dnevno. Rezultat uvođenja sternih smetnji u cilju poboljšanja hemijske stabilnosti cijanopirolidina bio je i saksagliptin (odobren 2009. godine), koji u organizmu biva transformisan u aktivan metabolit, sa dozom 5 mg jednom dnevno. Alogliptin (odobren 2010. godine) bio je pronađen u težnjama za povećanjem metaboličke stabilnosti jedinjenja sa osnovom hinazolina zamenom hinazolina pirimidindionom, sa dozom 25 mg jednom dnevno. Linagliptin (odobren 2011. godine) je metilksantinski selektivni inhibitor, sa bilijarnom sekrecijom, i dozom 5 mg jednom dnevno. I gemigliptinu (odobren 2012. godine)

farmakokinetičke i farmakodinamičke karakteristike omogućavaju doziranje jednom dnevno u monoterapiji dijabetesa (Juillerat-Jeanneret, 2013). Pored gemigliptina, 2012. godine su odobreni i anagliptin i teneligliptin. Evogliptin, omarigliptin i trelagliptin su odobreni za primenu 2015. godine, a gosogliptin 2016. godine. Trelagliptin i omarigliptin su novi DPP-4 inhibitori koji se aplikuju jednom nedeljno, bez specifičnih sporednih efekata (Li i saradnici, 2018a) (Slika 7).



Slika 7. Inhibitori dipeptidil peptidaze-4 odobreni za primenu u terapiji

Inhibitore DPP-4 karakteriše strukturalna raznolikost, uz posledično različite tipove interakcija sa enzimom. Načini vezivanja odobrenih inhibitora sa enzimom su determinisani i poredeni (Nabeno i saradnici, 2013; Kim i saradnici, 2016; Watanabe i saradnici, 2015; Grimshaw i saradnici, 2016; Biftu i saradnici, 2014; Lee i saradnici, 2017; Ammirati i saradnici, 2009; Schnapp i saradnici, 2016).

S₁ i domen za prepoznavanje *N*-terminusa supstrata su od značaja za vezivanje inhibitora za proteazu. Nekovalentne interakcije sa Glu205 i Glu206 stabilizovane vodoničnim vezama sa Tyr662 su značajne, i pretpostavka je da bi farmakofora trebalo da bude sa pozitivnim naelektrisanjem i/ili donorom vodonične veze, kako bi interakcija sa *N*-terminus prepoznajućim domenom bila omogućena. Deo S₂ domena, Arg125, je esencijalan za koordinisanje sa karbonilnom grupom P₂ ostatka supstrata/inhibitora, i sa Glu205 i Glu206 ova aminokiselina optimizuje položaj supstrata za nukleofilni napad Ser630. Negativno naelektrisanje u blizini Arg358 i potenciranje π - π interakcija sa Phe357 (deo S₂ proširenog domena) značajno povećava bioaktivnost liganda. Još jedan od načina da se poveća bioaktivnost liganda mogu biti interakcije hidrofobnih supstituenata u maloj šupljini između Arg358 i Ser209. Interakcije u S₂ proširenom domenu rezultuju nanomolarnom aktivnošću inhibitora i selektivnošću u odnosu na DPP-8 i -9, usled razlika aminokiselina u ovom domenu srodnih proteaza. Hidroksilna grupa Tyr547 (u S₂/S₁' domenu) učestvuje u oksianjon stabilizaciji, i neophodna je za katalitičku aktivnost enzima. Uz fenil grupu Phe357, interakcijom sa fenil grupom Tyr547 može biti postignuta nanomolarna aktivnost, π - π ili hidrofobnim interakcijama sa većim alifatičnim grupama liganda. Simulacijama molekulske dinamike je pokazano da interakcijama sa Tyr547 može biti prevenirano da inhibitor za kratko vreme napusti aktivno mesto enzima. Tyr547 je delom odgovoran i za selektivnost inhibitora za DPP-4 u odnosu na srodne proteaze. Još jedan od načina povećanja aktivnosti DPP-4 inhibitora je uspostavljanje interakcija sa Lys554. I povećanje, ali i smanjenje aktivnosti inhibitora je zabeleženo uspostavljanjem interakcija sa Trp629 (deo S₂' domena), što može biti posledica njegovih konformacionih promena (Ojeda-Montes i saradnici, 2018).

Generalno, gliptini pokazuju dobru *per os* bioraspoloživost i podnošljivost, bez uticaja na telesnu masu, sa niskim rizikom razvoja hipoglikemije, srednje ili visoke selektivnosti, opsega doza 5-100 mg jednom ili dva puta dnevno, brzo bivaju apsorbavani, delimično biotransformisani, do aktivnih metabolita u slučaju saksagliptina, uglavnom ekskretovani preko bubrega, ili bilijarno eliminisani kao linagliptin, sa okvirno 70-90% inhibicije enzima

24 h nakon unosa (Patel i Ghate, 2014; Havale i Pal, 2009). Linagliptin ima najveći volumen distribucije, dublje penetrira u bubrege, obuhvatajući i delove u kojima je DPP-4 eksprimirana u najvećem obimu, i pokazuje veći potencijal i izraženije plejotropne renoprotektivne efekte u odnosu na ostale gliptine (Kanasaki, 2018). Gliptini ne pokazuju tendenciju ka izraženijim interakcijama sa drugim lekovima i ne pokazuju potrebu za inicijalnom titracijom doze u cilju smanjenja rizika od neželjenih efekata (Ahmed i saradnici, 2015). Nastavak evaluacije efikasnosti i bezbednosti primene ovih hipoglikemijskih agenasa kontrolisanim studijama dužeg trajanja, kao i u kliničkoj praksi, je neophodan za detaljniju procenu njihovog profila, prednosti i nedostataka u poređenju sa postojećom terapijom i protokolima (Amori i saradnici, 2007). Osim hipoglikemijskog, pokazano je da DPP-4 inhibitori pokazuju protektivne efekte u kardiovaskularnoj i patologiji bubrega (Aroor i saradnici, 2014; Avogaro i saradnici, 2014; Fadini i Avogaro, 2011; Fadini i Avogaro, 2013; Kim i saradnici 2014; Shi i saradnici, 2016; Avogaro i Fadini, 2014; Panchapakesan i saradnici, 2013a; Arruda-Junior i saradnici, 2016; Alam i saradnici, 2015; Balakumar i Dhanaraj, 2013; Dai i saradnici, 2013; Aroor i saradnici, 2013; Gong i saradnici, 2015; Hocher i saradnici, 2012; Remm i saradnici, 2016; Ahmed i saradnici, 2015; Bonora i Cigolini, 2016; Duvnjak i Blaslov, 2016; Hirano i Mori, 2016; Coppolino i saradnici, 2018; Esaki i saradnici, 2017; Penno i saradnici, 2016). Inhibitori DPP-4 pokazuju mnogobrojne povoljne efekte u kardiovaskularnom sistemu, uključujući poboljšanje endotelne funkcije, smanjenje markera inflamacije, ishemija/reperfuzija oštećenja, krvnog pritiska i lipidemije, smanjenje incidence velikih kardiovaskularnih oštećenja (Fisman i Tenenbaum, 2015; Noda i saradnici, 2013; Matheussen i saradnici, 2012). Sigurnost terapije sitagliptinom (Engel i saradnici, 2013; Green i saradnici, 2015), linagliptinom (Johansen i saradnici, 2012; von Eynatten i saradnici 2013) i alogliptinom (Shimada i saradnici, 2016; White i saradnici, 2013) po kardiovaskularni sistem pacijenata je potvrđena studijama i meta-analizama, ali ima i onih koje ukazuju na povećan rizik od srčane insuficijencije kod pacijenata obolelih od dijabetesa na terapiji DPP-4 inhibitorima, sa još uvek nedovoljno razjašnjenom vezom uzrok-posledica (Savarese i saradnici, 2015; Scirica i saradnici, 2013; Guo i saradnici, 2017). Moguće objašnjenje za izostanak pozitivnih rezultata može biti to da su povoljni efekti DPP-4 inhibitora izraženiji u ranoj fazi metaboličkog oštećenja, pre razvoja ozbiljnijih kardiovaskularnih bolesti (Wronkowitz i saradnici, 2014). Potencijalno postoje objašnjenja i za rezultat da terapija saksagliptinom u prosečnom trajanju od 2 godine nije dovela do smanjenja stepena ishemijskih poremećaja. Moguće je da terapija ovim gliptinom nije trajala

dovoljno dugo za ispoljavanje povoljnog efekta na proarteriosklerotske procese kod pacijenata sa dijagnozom dijabetes melitusa tipa 2 u prosečnom trajanju od preko 10 godina. Ni rizik ni povoljni efekti duže terapije saksagliptinom nisu isključeni (Scirica i saradnici, 2013). Nedovoljno je rezultata kliničkih studija dužeg trajanja. Studije koje su u toku i one koje su u planu mogu ponuditi bolji uvid u sigurnost i povoljne efekte ovih agenasa u kardiovaskularnom sistemu (Cobble i Frederich, 2012; Fisman i Tenenbaum, 2015; Solun i saradnici, 2013).

1.6. Pregled inhibitora dipeptidil peptidaze-4

Godinama, hemija heterocikličnih jedinjenja je polje istraživanja usled širokog spektra bioloških aktivnosti ovih struktura i primene mnogih u terapiji (Ajani i saradnici, 2016).

Strukturno raznolikih DPP-4 inhibitora je veliki broj, od kojih je u nastavku dat pregled onih ispitanih *in vitro* na humanom enzimu sa IC₅₀ vrednostima (koncentracija inhibitora koja uzrokuje 50% inhibicije enzimske aktivnosti) manjim od 100 μM i procenom relativnog inhibitornog potencijala (RIP) računatog u odnosu na aktivnost referentnog inhibitora u testu.

1.6.1. Derivati pirolidina

Inhibitorni potencijal *N*- i *C*-supstituisanih-glicil-2-cijanopirolidin derivata je ispitan na DPP-4, pri čemu su derivati sa cikloheksil i izopropil grupom kao *C*-supstituentima pokazali značajnu efektivnost (Villhauer i saradnici, 2003) (Tabela 1).

Tabela 1. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 *N*- i *C*-supstituisanim-glicil-2-cijanopirolidin derivatima (Villhauer i saradnici, 2003)

R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
H		0,612	0,04 ^b 0,01 ^c	H		0,338	0,07 ^b 0,01 ^c
H		0,08	0,28 ^b 0,04 ^c		H	0,002	11 ^b 1,75 ^c
H		0,054	0,41 ^b 0,06 ^c	H		0,064	0,34 ^b 0,05 ^c
H		0,026	0,85 ^b 0,13 ^c			18,6	0,001 ^b 0,0002 ^c
H		0,104	0,21 ^b 0,03 ^c	CH(CH ₃) ₂	H	0,002	11 ^b 1,75 ^c
H		0,063	0,35 ^b 0,06 ^c	H	CH(CH ₃) ₂	0,192	0,11 ^b 0,02 ^c
H		0,053	0,42 ^b 0,07 ^c	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	9,61	0,002 ^b 0,0004 ^c

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: NVP-DPP728, IC₅₀ = 0,022 μM; vildagliptin, IC₅₀ = 0,0035 μM)

^bRIP_n = IC₅₀ NVP-DPP728 / IC₅₀ jedinjenja

^cRIP_v = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Wang i saradnici su ispitivali inhibitorski potencijal derivata 1-propanoil- α -amino-pirolidin-2-karbonitrila na DPP-4 (Tabela 2). Derivati sa fluorom u *para* položaju fenil supstituenta su pokazali veći inhibitorski potencijal, pretpostavlja se, usled formiranja vodoničnih veza fluora sa Phe357 proteaze. Fluor u položaju 4 pirolidina doprinosi povećanju efektivnosti. 4-Fluoropirolidin-2-karbonitril fragment se vezuje u S₁ domenu enzima, sa interakcijama fluora vodoničnim vezama sa Ser630, His740 i Tyr547. Uvođenje većih grupa,

fenil ili *terc*-butil grupe, u benzenov prsten vodi smanjenju stepena inhibicije (Wang i saradnici, 2013).

Tabela 2. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 1-propanoil- α -amino-pirolidin-2-karbonitrila (Wang i saradnici, 2013)

R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
H	H	0,027	0,74	H	3-CN	0,063	0,32
H	2-F	0,018	1,11	H	3-CF ₃	0,209	0,1
H	3-F	0,248	0,08	F	H	0,017	1,18
H	4-F	0,011	1,82	F	4-F	0,003	6,67
H	4-CH ₃	0,017	1,18	F	4-CH ₃	0,004	5
H	4-OCH ₃	0,029	0,69	F	4-OCH ₃	0,015	1,33
H	4-NH ₂	0,075	0,27	F	4-NO ₂	0,292	0,07
H	4-NO ₂	0,02	1	F	4-CN	0,005	4
H	4-CN	0,021	0,95	F	4-CF ₃	0,006	3,33
H	4-CF ₃	0,031	0,65	F	4-C(CH ₃) ₃	0,125	0,16
H	4-Cl	0,004	5	F	4-C ₆ H ₅ CH ₂ O	0,094	0,21
H	4-Br	0,004	5	F	2-CN	0,022	0,91
H	4-C ₆ H ₅	0,145	0,14	F	2-CF ₃	0,02	1
H	2-CH ₃	0,042	0,48	F	2,4- <i>di</i> -F	0,006	3,33
H	2-CN	0,027	0,74	F	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,017	1,18
H	2-CF ₃	0,046	0,43	F	2,3,4- <i>tri</i> -F	0,023	0,87
				F	2,3,5- <i>tri</i> -F	0,06	0,33

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: vildagliptin, IC₅₀ = 0,02 μM)

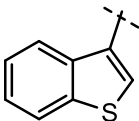
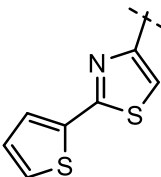
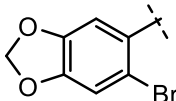
^bRIP_v = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Supstituisani derivati 1-propanoil-pirolidin-2-karbonitrila sa hetero mono- i bicikličnim fragmentima su dizajnirani i sintetisani na osnovu rezultata analize odnosa struktura-aktivnost prethodno sintetisanih pirolidin-2-karbonitril inhibitora DPP-4 (Tabela 3).

Porast lipofilnosti strukture je pokazao pozitivan uticaj na inhibitorski potencijal. Pirolidin-2-karbonitril fragment se vezuje u S₁ hidrofobnom domenu proteaze, nitril grupa interaguje sa Ser630 i His740. Karbonilna grupa formira vodoničnu vezu sa Arg125, dok α-amino grupa gradi vodonične veze sa Glu205 i Glu206. Uvođenje fluora u položaj 4 pirolidin-2-karbonitrila povećava efikasnost inhibitora. Fluor gradi vodoničnu vezu sa Tyr547, što značajno doprinosi porastu inhibitorskog potencijala. Na miševima sa dijabetesom je pokazano da najaktivniji derivat, koji deluje kao kompetitivni inhibitor DPP-4, pokazuje i hipoglikemijski efekat *in vivo* (Ji i saradnici, 2014a).

Tabela 3. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 1-propanoil-pirolidin-2-karbonitrila sa hetero mono- i bicikličnim fragmentima (Ji i saradnici, 2014a)

R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
H		0,17	0,12	F		0,004	5
H		0,03	0,67	F		0,04	0,5
H		0,33	0,06	F		0,39	0,05
H		0,52	0,04	F		0,05	0,4
F		0,005	4	F		0,05	0,4

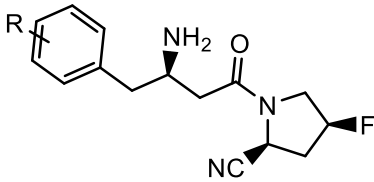
F		0,05	0,4	F		0,12	0,17
				F		0,01	2

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,02 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Ji i saradnici su ispitivali inhibični potencijal 1-butanoil-β-amino-4-fluoro-pirolidin-2-karbonitril derivata na DPP-4 (Tabela 4). Derivat sa nesupstituisanim fenil fragmentom je pokazao umerenu efektivnost. U cilju povećanja efikasnosti, elektron donor i akceptor grupe su uvedene u *orto*, *meta* i *para* položaj benzena. 2,4,5-Trifluoro derivat je pokazao visok inhibični potencijal *in vitro*, i hipoglikemijski efekat *in vivo* na miševima. 2,4,5-Trifluorofenil fragment se vezuje u S₁ hidrofobnom domenu enzima, fluor interaguje vodoničnom vezom sa Ser630. 4-Fluoropirolidin-2-karbonitril deo se vezuje u S₂ domenu proteaze. Azot cijano grupe interaguje sa Tyr547, dok β-amino grupa gradi vodonične veze sa Tyr662, Glu205 i Glu206 (Ji i saradnici, 2014b).

Tabela 4. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 1-butanoil-β-amino-4-fluoro-pirolidin-2-karbonitrila (Ji i saradnici, 2014b)

					
R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
H	0,45	0,04 ^b 0,16 ^c	4-CF ₃	0,64	0,03 ^b 0,11 ^c
2-Cl	0,22	0,09 ^b 0,32 ^c	4-OCH ₃	0,77	0,03 ^b 0,09 ^c
2-CH ₃	0,16	0,12 ^b 0,44 ^c	2,4- <i>di</i> -Cl	0,04	0,5 ^b 1,75 ^c

3-F	0,22	0,09 ^b 0,32 ^c	3,4- <i>di</i> -Cl	0,53	0,04 ^b 0,13 ^c
4-F	0,32	0,06 ^b 0,22 ^c	3,5- <i>di</i> -F	1,58	0,01 ^b 0,04 ^c
4-I	0,43	0,05 ^b 0,16 ^c	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,05	0,4 ^b 1,4 ^c
			H ((<i>S</i>)-NH ₂)	1,94	0,01 ^b 0,04 ^c

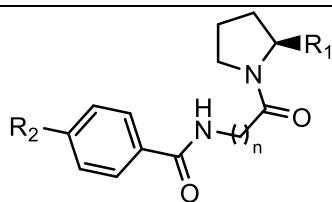
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,02 µM; vildagliptin, IC₅₀ = 0,07 µM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPv = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Derivati supstituisanog pirolidina povezanog različitim vezujućim grupama sa aromatičnim sistemom pokazuju dobar potencijal inhibicije DPP-4 (Tabele 5 i 6). Jedinjenja sa elektron donor grupama u *para* položaju benzamida su pokazala manju efektivnost u poređenju sa nesupstituisanim derivatima, dok su derivati sa elektron akceptor grupama pokazali veći stepen inhibicije. Vezujući fragment između pirolidina i aromatičnog prstena, bilo da je to alifatičan niz od 2-3 C atoma ili aromatičan prsten, ne utiče značajno na aktivnost, što može biti posledica fleksibilnosti S₂ domena proteaze. Pretpostavlja se da susptituenti u *para* položaju benzamida interaguju sa Ser209, Arg358 i Phe357. U poređenju sa pirolidinkarboksamidima značajno povećanje efikasnosti je zabeleženo za derivate pirolidinkarbonitrila, koji pokazuju i interakcije u S₁ domenu enzima. Najaktivnije jedinjenje od pirolidinkarbonitrila pokazuje kovalentnu interakciju cijano grupe sa hidroksilnom grupom Ser630, vodonične veze amidne grupe sa karbonilnom grupom Glu205 i Glu206 i NH grupom gvanidina Arg358, i π - π interakcije *para*-nitril fenil fragmenta sa Phe357. Najaktivnije jedinjenje je pokazalo i dobar hipoglikemijski efekat na miševima (Jadav i saradnici, 2012).

Tabela 5. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 2-supstituisanog pirolidina sa alifatičnim nizom kao vezujućim fragmentom između pirolidina i aromatičnog sistema (Jadav i saradnici, 2012)



n	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	n	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
2		H	0,32	0,01 ^b 0,02 ^c	3		OH	0,843	0,004 ^b 0,01 ^c
2		OCH ₃	0,89	0,004 ^b 0,01 ^c	3		F	0,074	0,04 ^b 0,1 ^c
2		OH	0,863	0,004 ^b 0,01 ^c	3		CN	0,026	0,12 ^b 0,28 ^c
2		F	0,093	0,03 ^b 0,08 ^c	3		CF ₃	0,019	0,17 ^b 0,38 ^c
2		CN	0,031	0,1 ^b 0,23 ^c	3		CH ₃	0,694	0,005 ^b 0,01 ^c
2		CF ₃	0,028	0,11 ^b 0,26 ^c	3		C ₆ H ₅	0,104	0,03 ^b 0,07 ^c
2		CH ₃	0,715	0,004 ^b 0,01 ^c	2	CN	CN	0,0103	0,31 ^b 0,7 ^c
2		C ₆ H ₅	0,107	0,03 ^b 0,07 ^c	2	CN	CF ₃	0,0132	0,24 ^b 0,55 ^c
3		H	0,298	0,01 ^b 0,02 ^c	3	CN	CN	0,0023	1,39 ^b 3,13 ^c
3		OCH ₃	0,869	0,004 ^b 0,01 ^c	3	CN	CF ₃	0,0038	0,84 ^b 1,89 ^c

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: vildagliptin, IC₅₀ = 0,0032 μM; NVP-DPP728, IC₅₀ = 0,0072 μM)

^bRIP_v = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIP_n = IC₅₀ NVP-DPP728 / IC₅₀ jedinjenja

Tabela 6. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 2-supstituisanog pirolidina sa aromatičnim prstenom kao vezujućim fragmentom između pirolidina i aromatičnog sistema (Jadav i saradnici, 2012)

R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
	H	0,311	0,01 ^b 0,02 ^c		CF ₃	0,031	0,1 ^b 0,23 ^c
	OCH ₃	0,879	0,004 ^b 0,01 ^c		CH ₃	0,723	0,004 ^b 0,01 ^c
	OH	0,863	0,004 ^b 0,01 ^c		C ₆ H ₅	0,116	0,03 ^b 0,06 ^c
	F	0,1	0,03 ^b 0,07 ^c	CN	CN	0,0116	0,28 ^b 0,62 ^c
	CN	0,034	0,09 ^b 0,21 ^c	CN	CF ₃	0,0143	0,22 ^b 0,5 ^c

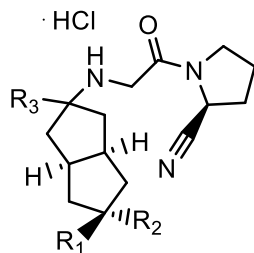
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: vildagliptin, IC₅₀ = 0,0032 μM; NVP-DPP728, IC₅₀ = 0,0072 μM)

^bRIP_v = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIP_n = IC₅₀ NVP-DPP728 / IC₅₀ jedinjenja

Derivati 2-cijano-pirolidina sa biciklo[3.3.0]oktan fragmentom su se pokazali kao efektivni inhibitori DPP-4 (Tabela 7). Derivat sa 5-β-metoksi grupom je najaktivniji. Pokazano je da što je 5-β-supstituent sterno veći, efikasnost je manja. Dva jedinjenja sa najvišim stepenom inhibicije u *in vitro* testu su i na miševima pokazala povoljan efekat u regulaciji glikemije (Cho i saradnici, 2010a).

Tabela 7. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 2-cijano-pirolidina sa biciklo[3.3.0]oktan fragmentom (Cho i saradnici, 2010a)



R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
OH	H	H(α)	0,012	0,75	OCNHCH(CH ₃) ₂	H	H(α)	0,204	0,04
OCH ₃	H	H(α)	0,008	1,12	OCONHC(CH ₃) ₃	H	H(α)	0,326	0,03
OC ₂ H ₅	H	H(α)	0,059	0,15	OCONHC ₆ H ₅	H	H(α)	0,121	0,07
OCON(CH ₃) ₂	H	H(α)	0,065	0,14	OCOCH ₃	H	H(α)	0,032	0,28
OCON(C ₂ H ₅) ₂	H	H(α)	0,08	0,11	H	OCH ₃	H(β)	0,027	0,33
					OCH ₃	H	H(α)	0,047	0,19

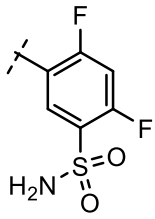
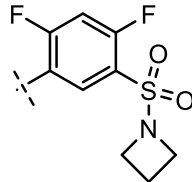
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: vildagliptin, IC₅₀ = 0,009 μM)

^bRIP_v = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Među 2-aminometil-pirolidin analogima β-homofenilalanina (Tabela 8), zamena fenil ostatka piridinom značajno povećava inhibicioni potencijal. Sulfonil grupa, koja može da interaguje sa aminokiselinama proteaze vodoničnim vezama, ili uvođenje fluora kao supstituenta fenil ostatka, povećava stepen inhibicije. Hipoglikemijski efekat tri najaktivnija derivata je ispitan *in vivo* na miševima, pri čemu je derivat koji je bio drugi po efikasnosti inhibicije, pokazao najpovoljniji efekat u regulaciji glikemije (Jiang i saradnici, 2015).

Tabela 8. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 2-aminometil-pirolidin analogizma β -homofenilalanina (Jiang i saradnici, 2015)

R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
	0,0339	0,56		0,0082	2,32
	0,0263	0,72		0,00699	2,72
	0,00513	3,7		0,00348	5,46
	0,00106	17,92		0,0011	17,27
	0,00172	11,05		0,00426	4,46
	0,0014	13,57		0,00395	4,81

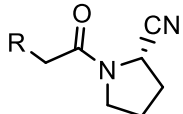
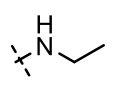
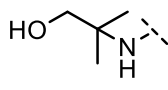
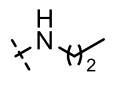
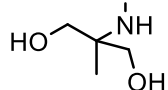
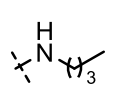
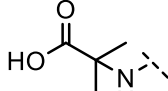
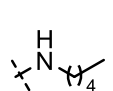
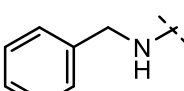
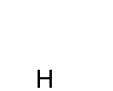
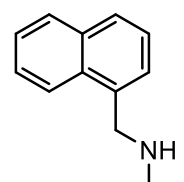
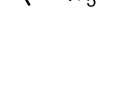
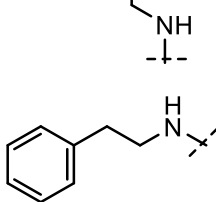
	0,00087	21,84		0,00552	3,44
---	---------	-------	--	---------	------

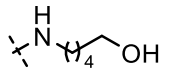
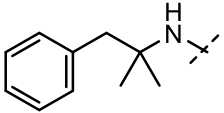
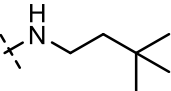
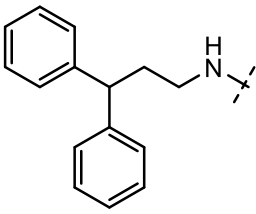
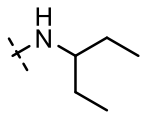
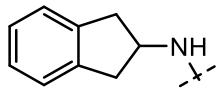
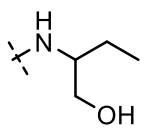
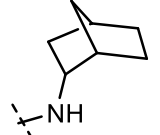
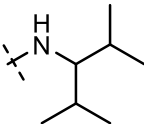
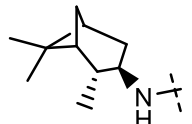
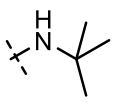
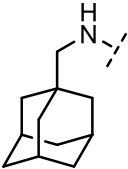
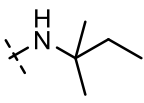
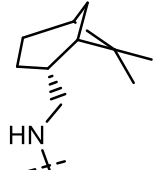
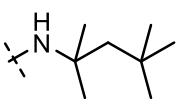
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,019 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Villhauer i saradnici su sintetisali i ispitali inhibitorni potencijal 2-cijano-pirolidin derivata (Tabela 9). Ispitan je uticaj lipofilnih ciklusa različite veličine, linearnih acikličnih supstuenata različite dužine, bicikličnih i tricikličnih fragmenata na aktivnost (Villhauer i saradnici, 2003).

Tabela 9. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 2-cijano-pirolidina sa cikličnim i acikličnim supstituentima različitih veličina (Villhauer i saradnici, 2003)

					
R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
	0,444	0,05 ^b 0,01 ^c		0,218	0,1 ^b 0,02 ^c
	0,475	0,05 ^b 0,01 ^c		0,372	0,06 ^b 0,01 ^c
	0,261	0,08 ^b 0,01 ^c		10,9	0,002 ^b 0,0003 ^c
	0,266	0,08 ^b 0,01 ^c		0,988	0,02 ^b 0,004 ^c
	0,282	0,08 ^b 0,01 ^c		0,436	0,05 ^b 0,01 ^c
	0,291	0,08 ^b 0,01 ^c		0,305	0,07 ^b 0,01 ^c

	0,346	0,06 ^b 0,01 ^c		0,024	0,92 ^b 0,15 ^c
	0,466	0,05 ^b 0,01 ^c		0,377	0,06 ^b 0,01 ^c
	0,398	0,06 ^b 0,01 ^c		0,133	0,17 ^b 0,03 ^c
	0,256	0,09 ^b 0,01 ^c		0,015	1,47 ^b 0,23 ^c
	10,9	0,002 ^b 0,0003 ^c		0,016	1,38 ^b 0,22 ^c
	0,035	0,63 ^b 0,1 ^c		0,598	0,04 ^b 0,01 ^c
	0,105	0,21 ^b 0,03 ^c		0,242	0,09 ^b 0,01 ^c
	0,123	0,18 ^b 0,03 ^c			

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: NVP-DPP728, IC₅₀ = 0,022 μM; vildagliptin, IC₅₀ = 0,0035 μM)

^bRIP_n = IC₅₀ NVP-DPP728 / IC₅₀ jedinjenja

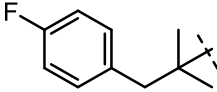
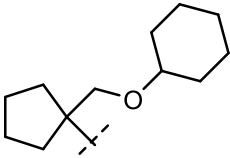


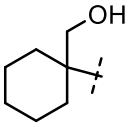
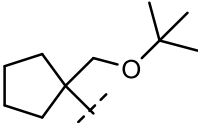
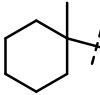
^cRIP_v = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Wright i saradnici su ispitivali inhibitorski potencijal *cis*-2,5-dicijanopirolidin α -amino amida na DPP-4 (Tabela 10). 1-([1-(Hidroksimetil)ciklopentil]amino)acetilpirolidin-2,5-*cis*-dikarbonitril je izdvojen zbog dobre oralne bioraspodivnosti i *in vivo* efektivnosti dokazane na miševima. Analizom odnosa struktura-aktivnost determinisana je kovalentna

interakcija jedne nitril grupe i Ser630, dok druga nitril grupa formira vodoničnu vezu sa Tyr666. Piroolidin prsten je lokalizovan u S₁ domenu proteaze. Sekundarna amino grupa interaguje sa Glu205, Glu206, Asn710 i Tyr662 (Wright i saradnici, 2006).

Tabela 10. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima *cis*-2,5-dicijanopiroolidin α -amino amida (Wright i saradnici, 2006)

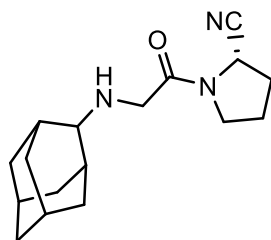
R	IC ₅₀ (μ M) ^a	RIP ^b	R	IC ₅₀ (μ M) ^a	RIP ^b
	0,072	1388,89		1,11	90,09
	0,074	1351,35		1,16	86,21
	0,104	961,54		0,064	1562,5
	0,106	943,4		0,084	1190,48
	0,164	609,76		0,091	1098,9
	0,208	480,77		0,123	813,01
	0,237	421,94		0,201	497,51
	0,261	383,14		0,454	220,26

	0,651	153,61		0,702	142,45
	0,663	150,83		0,955	104,71
	0,687	145,56		1,86	53,76
	0,689	145,14			

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: diprotin A, IC₅₀ = 100 μM)

^bRIPd = IC₅₀ diprotina A / IC₅₀ jedinjenja

Villhauer i saradnici su sintetisali i ispitali inhibitorski potencijal i derivata 2-cijano-pirolidina sa adamantil grupom (Villhauer i saradnici, 2003) (Slika 8, Tabela 11).



IC₅₀^a = 0,013 μM

RIP^b = 1,69

RIP^c = 0,27

Slika 8. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatom 2-cijano-pirolidina sa adamantil grupom (Villhauer i saradnici, 2003)

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: NVP-DPP728, IC₅₀ = 0,022 μM; vildagliptin, IC₅₀ = 0,0035 μM)

^bRIPn = IC₅₀ NVP-DPP728 / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPv = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Tabela 11. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 2-cijano-pirolidina sa adamantil grupom (Villhauer i saradnici, 2003)

n	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	n	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
1	CN	H	H	0,003	7,33 ^b 1,17 ^c	1	CN		H	0,022	1 ^b 0,16 ^c
1	H	H	H	7	0,003 ^b 0,0005 ^c	1	CN		H	0,149	0,15 ^b 0,02 ^c
0	H	H	H	24,2	0,001 ^b 0,0001 ^c	1	CN		H	0,062	0,35 ^b 0,06 ^c
2	H	H	H	52,6	0,0004 ^b 0,0001 ^c	1	CN		H	0,183	0,12 ^b 0,02 ^c
1	CN	C ₂ H ₅	H	0,007	3,14 ^b 0,5 ^c	1	CN		H	0,064	0,34 ^b 0,05 ^c
1	CN	CH ₃	CH ₃	0,017	1,29 ^b 0,21 ^c	1	CN		H	0,07	0,31 ^b 0,05 ^c

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: NVP-DPP728, IC₅₀ = 0,022 μM; vildagliptin, IC₅₀ = 0,0035 μM)

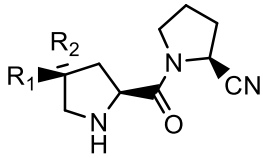
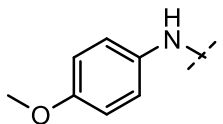
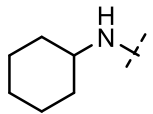
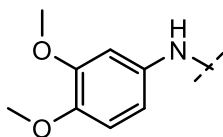
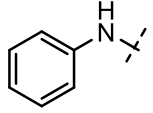
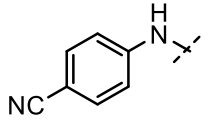
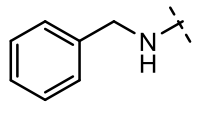
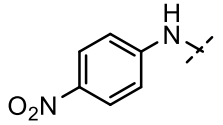
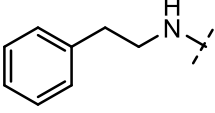
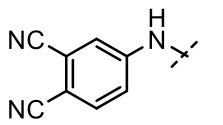
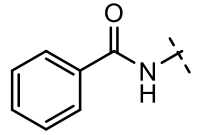
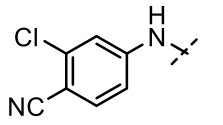
^bRIP_n = IC₅₀ NVP-DPP728 / IC₅₀ jedinjenja

^cRIP_v = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

1-(γ-Supstituisani prolil)-2-cijanopirolidini su dizajnirani i sintetisani na osnovu mehanizma vezivanja referentnog inhibitora NVP-DPP728 (Tabela 12). Razmatran je uticaj elektron donor i akceptor supstituenata fenil ostatka γ supstituenta i dužine fragmenta između benzena i pirolidina. Modifikacije γ supstituenata su vršene sa ciljem komplementarnijeg vezivanja ovog dela strukture u S₂ domenu proteaze. (S)-stereoizomeri su pokazali veću

efikasnost u odnosu na antipode. Od ovih jedinjenja, (3,4-dicijanofenil)amino- i (3-hloro-4-cijanofenil)amino- derivati pokazali su najveći inhibitorski potencijal (Sakashita i saradnici, 2005).

Tabela 12. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 1-(γ -supstituisanih prolin)-2-cijanoprolidina (Sakashita i saradnici, 2005)

							
R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μ M) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μ M) ^a	RIP ^b
NH ₂	H	0,0097	0,14		H	0,00033	4,24
	H	0,003	0,47		H	0,00028	5
	H	0,00053	2,64		H	0,00019	7,37
	H	0,0046	0,3		H	0,00018	7,78
	H	0,0019	0,74		H	0,00013	10,77
	H	0,0055	0,25		H	0,00013	10,77

	H	0,0015	0,93		H	0,00025	5,6
	H	0,0067	0,21	H		0,0066	0,21
	H			H	H	0,0029	0,48

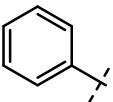
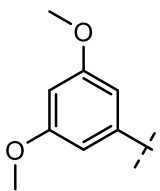
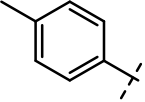
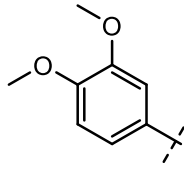
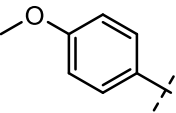
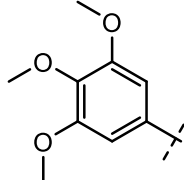
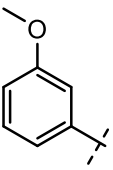
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: NVP-DPP728, IC₅₀ = 0,0014 μM)

^bRIP_n = IC₅₀ NVP-DPP728 / IC₅₀ jedinjenja

Wang i saradnici su sintetisali 2-cijanopirolidin derivate sa imidazolidinom kao supstuentom (Tabela 13). Najveći inhibitorski potencijal je pokazao (S)-1-(2-(2-(3-(3,4-dimetoksifenil)-2-oksoimidazolidin-1-il)etil-amino)-acetil)pirolidin-2-karbonitril. Zamenom fenil grupe kao supstuenta imidazolidina cikloheksil, *tert*-butil, *n*-butil i izopropil grupom, efikasnost je smanjena (Wang i saradnici, 2009).

Tabela 13. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 2-cijanopirolidina sa imidazolidinom kao supstuentom (Wang i saradnici, 2009)

R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
(CH ₂) ₃ CH ₃	0,0535	0,31		0,0258	0,64
C(CH ₃) ₃	0,0681	0,24		0,0445	0,37
CH(CH ₃) ₂	0,0478	0,35		0,0601	0,28
	0,0686	0,24		0,1336	0,12

	0,0348	0,48		0,0204	0,81
	0,0293	0,57		0,002	8,3
	0,0824	0,2		0,1656	0,1
	0,0651	0,25			

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: vildagliptin, IC₅₀ = 0,0166 μM)

^bRIP_v = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Sintetisani su 2-cijano-pirolidin derivati sa 2-aril-ciklopropilamin fragmentom i ispitan je njihov inhibitorni potencijal na DPP-4 (Tabela 14). Jedinjenje koje je pokazalo najveći stepen inhibicije *in vitro*, 3-({2-[(2*S*,4*S*)-2-cijano-4-fluoropirolidin-1-il]-2-oksoetil}amino)-3-metil-*N*-[(1*S*,2*R*)-2-(3-hlorofenil)ciklopropil]butanamid, pokazalo je i hipoglikemijski efekat *in vivo* na miševima. Supstituisani 2-fenil-ciklopropilamin derivati su pokazali veću efektivnost u poređenju sa nesupstituisanim fenil analogom, sa sličnom efikasnošću diastereoizomera međusobno (Tsai i saradnici, 2009).

Tabela 14. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 2-cijano-pirolidin derivatima sa 2-aril-ciklopropilamin fragmentom (Tsai i saradnici, 2009)

R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
	H	H	0,085	0,35 ^b 0,6 ^c		H	H	0,056 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	0,54 ^b 0,91 ^c
	H	H	0,054	0,56 ^b 0,94 ^c		H	H	0,047 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)	0,64 ^b 1,09 ^c
	H	H	0,064	0,47 ^b 0,8 ^c		F	H	0,027 (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i>)	1,11 ^b 1,89 ^c
	H	H	0,084	0,36 ^b 0,61 ^c		F	H	0,015 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)	2 ^b 3,4 ^c
	H	H	0,075	0,4 ^b 0,68 ^c		F	H	0,019 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)	1,58 ^b 2,68 ^c
	H	H	0,062	0,48 ^b 0,82 ^c		F	H	0,021 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)	1,43 ^b 2,43 ^c
	H	H	0,085	0,35 ^b 0,6 ^c		F	H	0,022 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)	1,36 ^b 2,32 ^c

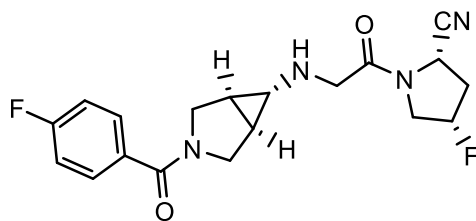
	H	H	0,06	0,5 ^b 0,85 ^c		F	H	0,026 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)	1,15 ^b 1,96 ^c
	H	H	0,073	0,41 ^b 0,7 ^c		F	H	0,017 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)	1,76 ^b 3 ^c
	H	H	0,086	0,35 ^b 0,59 ^c		F	H	0,02 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)	1,5 ^b 2,55 ^c
	H	H	0,042	0,71 ^b 1,21 ^c		F	H	0,024	1,25 ^b 2,12 ^c
	H	H	0,068	0,44 ^b 0,75 ^c		F	H	0,016	1,88 ^b 3,19 ^c
	H	H	0,101	0,3 ^b 0,5 ^c		F	F	0,026 (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i>)	1,15 ^b 1,96 ^c

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,03 μM, vildagliptin, IC₅₀ = 0,051 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPv = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Singh i saradnici su sintetisali novi kompetitivni DPP-4 inhibitor (2*S*,4*S*)-4-fluoro-1-(*N*-{(1*R*,5*S*,6*S*)-3-[(4-fluorofenil)karbonil]-3-azabiciklo[3.1.0]heks-6-il} glicil)pirolidin-2-karbonitril (Slika 9). Ovo jedinjenje je pokazalo i hipoglikemijski efekat na miševima *in vivo* (Singh i saradnici, 2011).



$$IC_{50}^a = 0,032 \mu\text{M}$$

$$RIP^b = 0,38$$

$$RIP^c = 0,09$$

Slika 9. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 azabiciklo[3.1.0]heksan derivatom pirolidin-2-karbonitrila (Singh i saradnici, 2011)

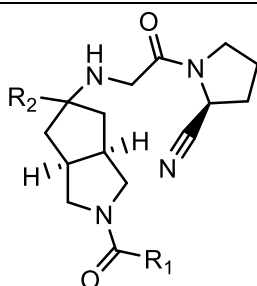
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,012 μM; vildagliptin, IC₅₀ = 0,003 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPv = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Seriya azabiciklo[3.3.0]oktan derivata pirolidin-2-karbonitrila je sintetisana i ispitana u testu inhibicije DPP-4 (Tabela 15). Jedinjenje sa dimetilamino grupom kao R₁ supstituentom i β konfiguracijom u položaju 5 azabiciklo[3.3.0]oktan osnove je pokazalo najveći inhibitorski potencijal. Farmakokinetičkim studijama na pacovima pokazano da jedinjenje sa 5α-metil grupom pokazuje najbolji farmakokinetički profil. Na majmunima je pokazano da je veći procenat inhibicije aktivnosti DPP-4 u serumu postignut 5β-metil derivatom (Cho i saradnici, 2010b).

Tabela 15. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 azabiciklo[3.3.0]oktan derivatima pirolidin-2-karbonitrila (Cho i saradnici, 2010b)



R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
N(CH ₃) ₂	H(α)	0,009	1	OCH ₃	H(α)	0,024	0,38
NHCH(CH ₃) ₂	H(α)	0,12	0,08	CH ₂ OH	H(α)	0,014	0,64
N(CH ₂) ₄	H(α)	0,039	0,23	N(CH ₃) ₂	H(β)	0,083	0,11

N(CH ₂) ₅	H(α)	0,069	0,13	N(CH ₃) ₂	CH ₃ (α)	0,013	0,69
N(CH ₂ CH ₂) ₂ O	H(α)	0,05	0,18	N(CH ₃) ₂	CH ₃ (β)	0,013	0,69

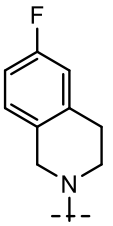
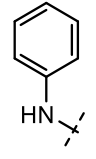
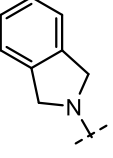
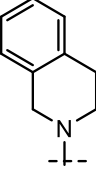
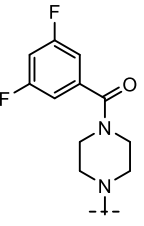
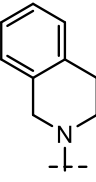
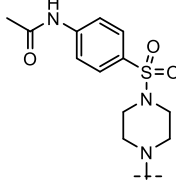

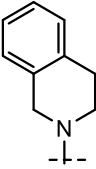
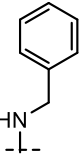
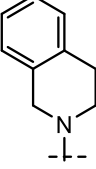
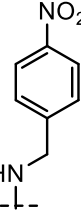
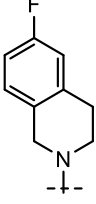
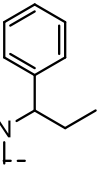
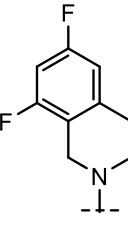
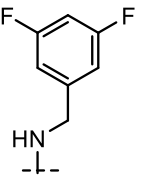
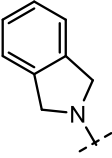
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: vildagliptin, IC₅₀ = 0,009 μM)

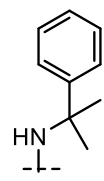
^bRIP_v = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Derivati 2-[3-[[2-[2-cijano-1-pirolidinil]-2-oksoetil]amino]-1-oksopropil]-1,2,3,4-tetrahydrozohinolina ispitani su u testu inhibicije DPP-4 (Tabela 16). Razmatran je efekat promene dužine alkil niza između amino i karboksilnog fragmenta, pri čemu je i skraćenje i produžavanje niza početnog 2-[3-[[2-[2-cijano-(S)-pirolidin-1-il]-2-oksoetil]amino]-1-oksopropil]-1,2,3,4-tetrahydrozohinolina smanjilo inhibitorski potencijal. *Gem*-dimetil derivati sa 6-fluoro i 6,8-difluoro supstituisanom fenil grupom su pokazali veći stepen inhibicije. Razmatran je i uticaj izmene izohinolina fenil fragmentom, piperazinom, izoindolom, pri čemu je *gem*-dimetil derivat sa izoindolom pokazao visoku efikasnost (Tsu i saradnici, 2006).

Tabela 16. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 2-[3-[[2-[2-cijano-1-pirolidinil]-2-oksoetil]amino]-1-oksopropil]-1,2,3,4-tetrahydrozohinolin derivatima (Tsu i saradnici, 2006)

n	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	n	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
0	H	H		3,236	0,02 ^b 0,02 ^c	1	H	H		0,784	0,07 ^b 0,07 ^c
1	H	H		0,116	0,46 ^b 0,44 ^c	1	H	H		0,119	0,45 ^b 0,43 ^c
1	H	H		0,651	0,08 ^b 0,08 ^c	1	H	H		0,564	0,09 ^b 0,09 ^c

1	H	H		0,083	0,64 ^b 0,61 ^c	1	H	H		0,298	0,18 ^b 0,17 ^c
1	H	H		0,132	0,4 ^b 0,39 ^c	2	H	H		0,428	0,12 ^b 0,12 ^c
1	H	H		0,676	0,08 ^b 0,08 ^c	1	CH ₃	H		0,054	0,98 ^b 0,94 ^c
1	H	H		1,418	0,04 ^b 0,04 ^c	1		H		0,811	0,07 ^b 0,06 ^c
1	H	H		0,452	0,12 ^b 0,11 ^c	1	CH ₃	CH ₃		0,049	1,08 ^b 1,04 ^c
1	H	H		0,317	0,17 ^b 0,16 ^c	1	CH ₃	CH ₃		0,03	1,77 ^b 1,7 ^c
1	H	H		0,447	0,12 ^b 0,11 ^c	1	CH ₃	CH ₃		0,022	2,41 ^b 2,32 ^c
1	H	H		0,369	0,14 ^b 0,14 ^c	1	CH ₃	CH ₃		0,015	3,53 ^b 3,4 ^c

	1	CH ₃	CH ₃		1,108	0,05 ^b 0,05 ^c
--	---	-----------------	-----------------	---	-------	--

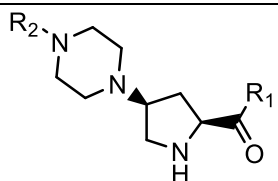
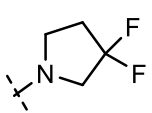
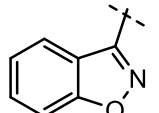
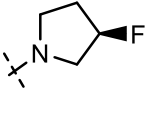
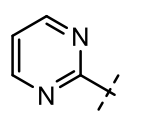
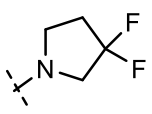
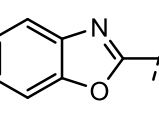
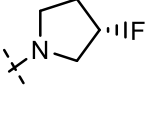
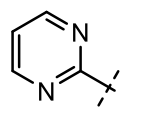
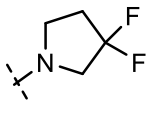
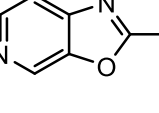
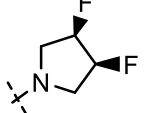
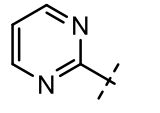
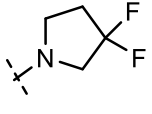
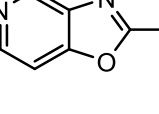
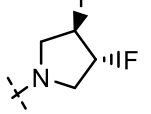
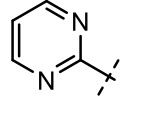
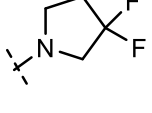
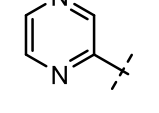
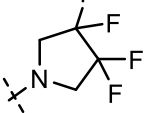
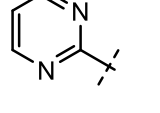
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: NVP-DPP728, IC₅₀ = 0,053 μM; vildagliptin, IC₅₀ = 0,051 μM)

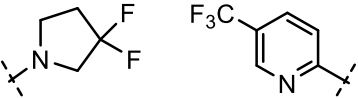
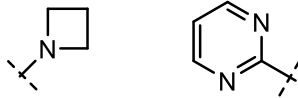
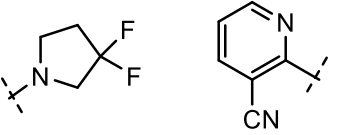
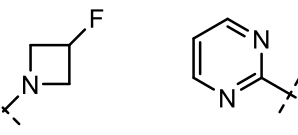
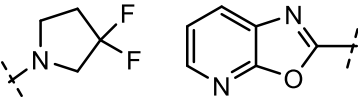
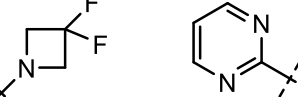

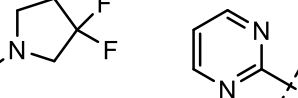
^bRIPn = IC₅₀ NVP-DPP728 / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPv = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Ammirati i saradnici su sintetisali derivate [4-(piperazin-1-il)-pirolidin-2-il]-metanona i ispitali ih u testu inhibicije DPP-4, u poređenju sa strukturno sličnim gosogliptinom (Ammirati i saradnici, 2009) (Tabela 17).

Tabela 17. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima [4-(piperazin-1-il)-pirolidin-2-il]-metanona (Ammirati i saradnici, 2009)

							
R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
		0,0087	1,48			0,051	0,25
		0,0082	1,57			0,031	0,42
		0,0074	1,74			0,013	0,99
		0,0058	2,22			0,309	0,04
		0,0056	2,3			0,025	0,52

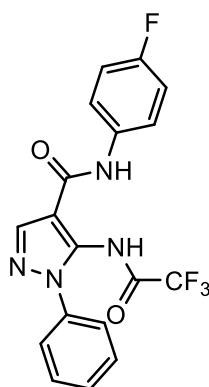
	0,0052	2,48		0,309	0,04
	0,0048	2,69		0,041	0,31
	0,0052	2,48		0,134	0,1
	0,031	0,42		0,338 (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	0,04

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: gosogliptin, IC₅₀ = 0,0129 μM)

^bRIPg = IC₅₀ gosogliptina / IC₅₀ jedinjenja

1.6.2. Derivati pirazola

Sagar i saradnici su uz dizajn i sintezu pirazolo[3,4-*d*]pirimidinona sintetisali i derivate pirazola kao DPP-4 inhibitore (Slika 10). Aktivan derivat pirazol-4-karboksamida reaguje sa enzimom posredstvom interakcija NH grupe sa Glu205, i trifluorometil grupe sa Tyr547 i Arg358 (Sagar i saradnici, 2015).



IC₅₀^a = 1,25 μM

RIP^b = 0,01

Slika 10. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 pirazol-4-karboksamidom (Sagar i saradnici, 2015)

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,018 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Wu i saradnici su ispitali uticaj derivata pirazol-3-karbohidrazona na aktivnost DPP-4 (Tabela 18). Derivati sa naftalenom u strukturi su pokazali dobar inhibitorski potencijal. Odnos struktura-aktivnost je analiziran za tri najefikasniji predstavnika. 4,5,6,7-Tetrahydroindazol se vezuje u hidrofobnom S₁ domenu proteaze, amino grupa karbohidrazona gradi vodoničnu vezu sa Glu205, 2-hidroksi grupa naftalena sa Glu206 i Arg669, dok naftalen formira hidrofobne interakcije sa Phe357 (Wu i saradnici, 2012).

Tabela 18. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima pirazol-3-karbohidrazona (Wu i saradnici, 2012)

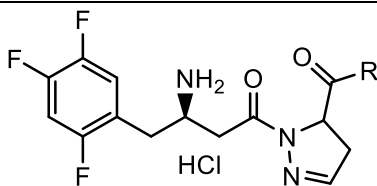
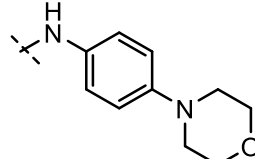
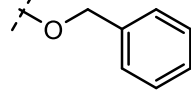
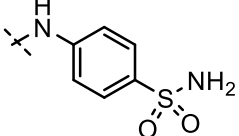
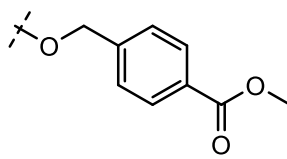
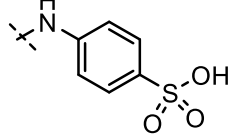
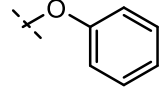
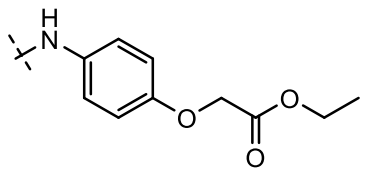
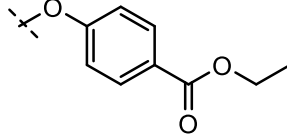
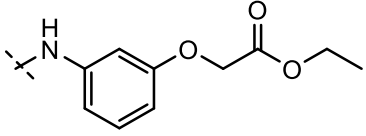
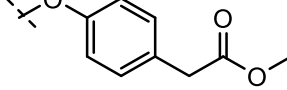
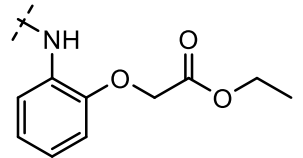
R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
-(CH ₂) ₄ -		H	2,12	0,07	-(CH ₂) ₃ -		H	43,65	0,003
-(CH ₂) ₄ -		CH ₃	70,8	0,002	-(CH ₂) ₅ -		H	19,5	0,01
-(CH ₂) ₄ -		H	52,48	0,003			H	16,59	0,01
-(CH ₂) ₄ -		H	3,44	0,04			H	35,62	0,004
-(CH ₂) ₄ -		H	18,2	0,01			H	18,61	0,01


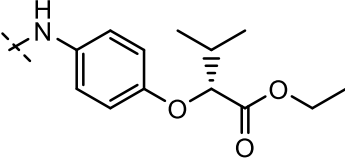
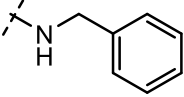
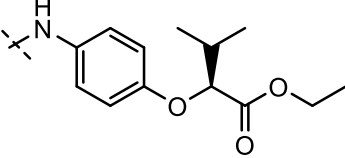
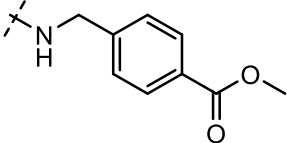
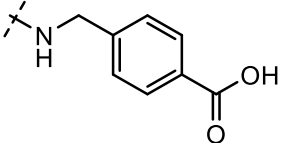
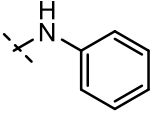
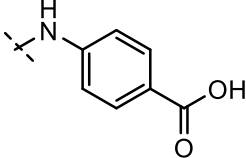
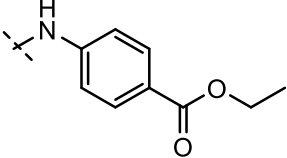
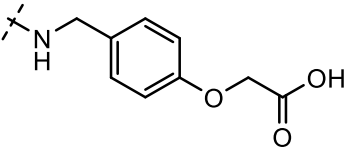
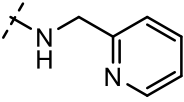
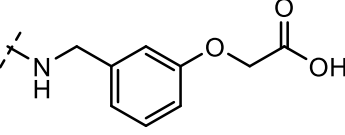
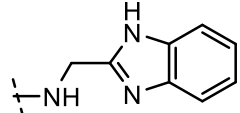
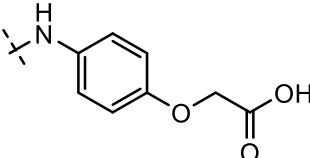
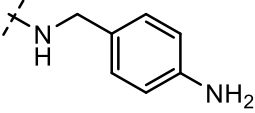
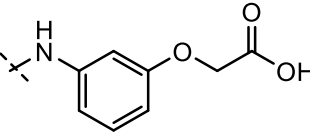
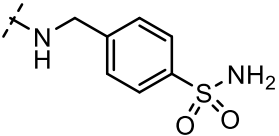
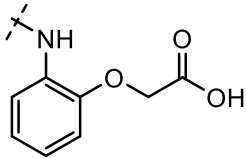
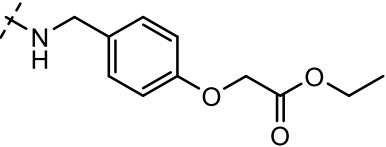
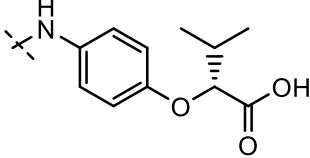
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: P32/98, IC₅₀ = 0,14 μM)

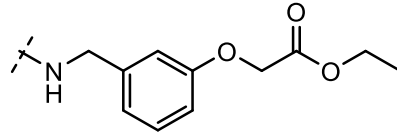
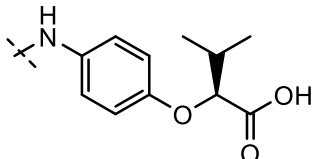
^bRIPp = IC₅₀ P32/98 / IC₅₀ jedinjenja

Uticaj analoga pirazolina sa β -amino-acil grupom na aktivnost DPP-4 su ispitali Jun i saradnici (Tabela 19). *Para* supstituisani fenil analozi su pokazali veći inhibitorni potencijal *in vitro*, u odnosu na derivate sa supstitucijom u *orto* i *meta* položaju (Jun i saradnici, 2008).

Tabela 19. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima pirazolina sa β -amino-acil grupom (Jun i saradnici, 2008)

					
R	IC ₅₀ (μ M) ^a	RIP ^b	R	IC ₅₀ (μ M) ^a	RIP ^b
OH	1,4	0,08		1,6	0,07
	0,71	0,15		9,1	0,01
	2,7	0,04		8,9	0,01
	2,2	0,05		0,69	0,16
	1,6	0,07		1,9	0,06
	1,9	0,06		4,8	0,02

	5,6	0,02		2,6	0,04
	1,6	0,07		3,6	0,03
	3	0,04		1,4	0,08
	1,6	0,07		5,9	0,02
	0,77	0,14		2,5	0,04
	7,4	0,01		2,8	0,04
	3,7	0,03		0,51	0,22
	1,3	0,08		4,3	0,03
	3,1	0,04		8,5	0,01
	2,1	0,05		2,7	0,04

	2	0,06		2,2	0,05
---	---	------	--	-----	------

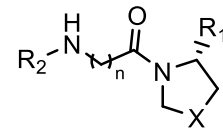
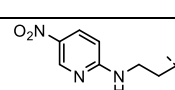
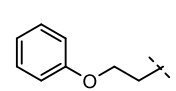
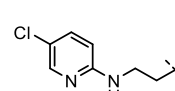
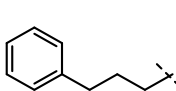
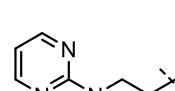
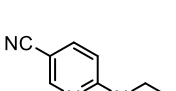
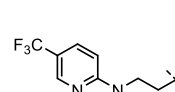
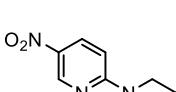
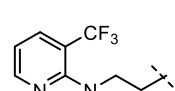
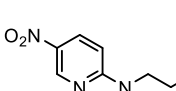
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,11 μM)

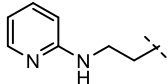
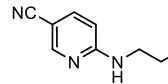
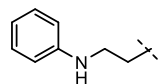
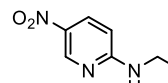
^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

1.6.3. Derivati tiazolidina

Villhauer i saradnici su sintetisali i ispitali inhibitorski potencijal pirolidina i tiazolidina derivata, modifikacijama počev od supstituisanog glicin-2-cijano-pirolidina (Villhauer i saradnici, 2003) (Tabela 20).

Tabela 20. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima pirolidina i tiazolidina sintetisanih modifikacijama supstituisanog glicin-2-cijano-pirolidina (Villhauer i saradnici, 2003)

											
X	R ₁	n	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	X	R ₁	n	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
CH ₂	CN	1		0,008	2,75 ^b 0,44 ^c	CH ₂	CN	1		0,635	0,03 ^b 0,01 ^c
CH ₂	CN	1		0,036	0,61 ^b 0,1 ^c	CH ₂	CN	1		0,491	0,04 ^b 0,01 ^c
CH ₂	CN	1		0,163	0,13 ^b 0,02 ^c	CH ₂	(R) CN	1		1,17	0,02 ^b 0,003 ^c
CH ₂	CN	1		0,083	0,27 ^b 0,04 ^c	CH ₂	H	1		7,4	0,003 ^b 0,0005 ^c
CH ₂	CN	1		0,989	0,02 ^b 0,004 ^c	S	H	1		3	0,007 ^b 0,001 ^c

CH ₂	CN	1		0,033	0,67 ^b 0,11 ^c	CH ₂	CN	1		0,102	0,22 ^b 0,03 ^c
CH ₂	CN	1		0,298	0,07 ^b 0,01 ^c	CH ₂	CN	2		18,7	0,001 ^b 0,0002 ^c

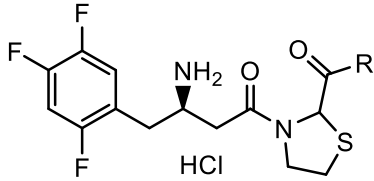
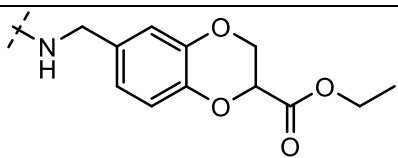
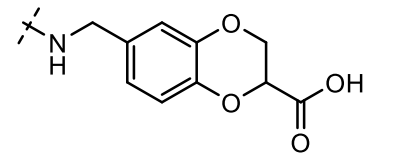
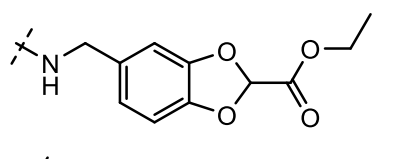
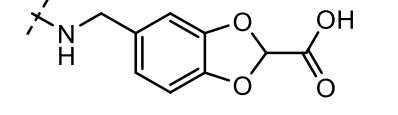
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: NVP-DPP728, IC₅₀ = 0,022 μM; vildagliptin, IC₅₀ = 0,0035 μM)

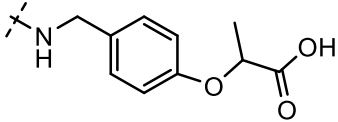
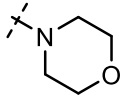
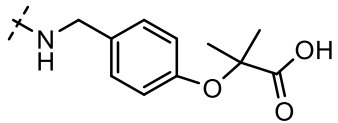
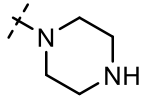
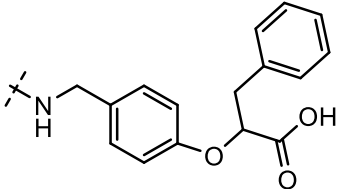
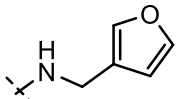
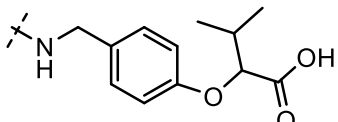
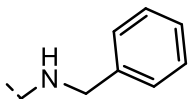
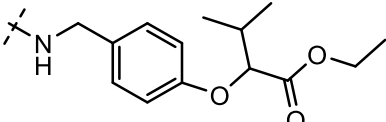
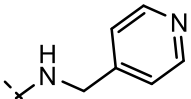
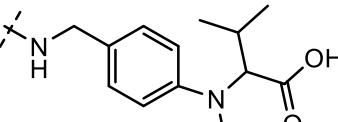
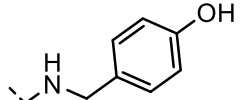
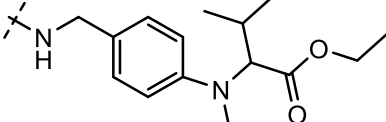
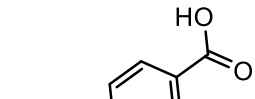
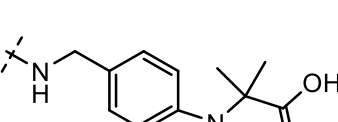
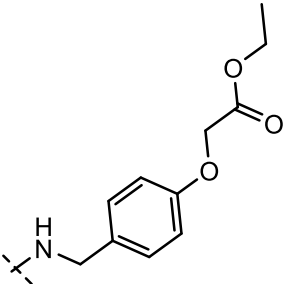
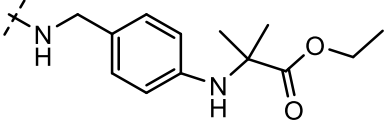
^bRIP_n = IC₅₀ NVP-DPP728 / IC₅₀ jedinjenja

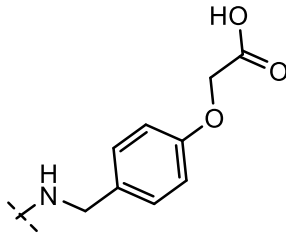
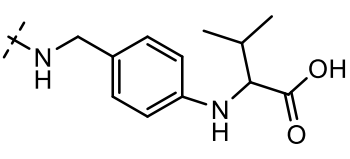
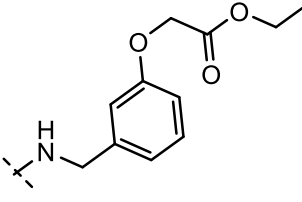
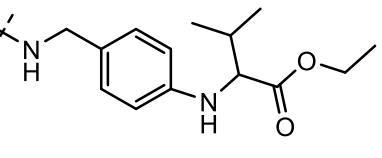
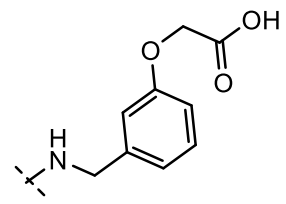
^cRIP_v = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Park i saradnici su sintetisali seriju β-aminoacil tiazolidina i ispitali uticaj ovih struktura na aktivnost DPP-4 (Tabele 21 i 22). Derivati sa *para* supstituisanim benzil ostatkom su pokazali veći inhibitorni potencijal u poređenju sa *meta* supstituisanim derivatima (Park i saradnici, 2011).

Tabela 21. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima β-aminoacil tiazolidina (Park i saradnici, 2011)

					
R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
OH	0,601	0,03		0,112	0,18
OCH ₃	0,204	0,1		0,192	0,1
NHCH ₂ COOH	0,212	0,09		0,064	0,31
NHCH ₂ COOC ₂ H ₅	0,101	0,2		0,064	0,31

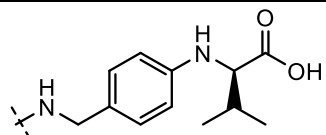
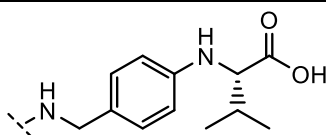
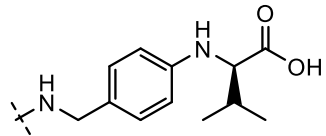
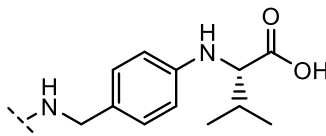
$N(CH_3)_2$	1,7	0,01		0,216	0,09
	0,807	0,02		0,056	0,36
	0,68	0,03		0,028	0,71
	0,088	0,23		0,006	3,33
	0,077	0,26		0,077	0,26
	0,357	0,06		0,08	0,25
	0,328	0,06		0,08	0,25
	0,229	0,09		0,013	1,54
	0,041	0,49		0,068	0,29

	0,051	0,39		0,003	6,67
	0,095	0,21		0,05	0,4
	0,102	0,2			

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,02 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Tabela 22. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 diastereoizomerima β-aminoacil tiazolidin derivata (Park i saradnici, 2011)

		I		II			
I/II	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	I/II	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
I		0,001	20	I		0,0012	16,67
II		0,01	2	II		0,013	1,54

I		0,017	1,18	I		0,025	0,8
II		0,175	0,11	II		0,309	0,06

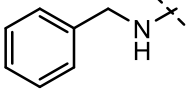
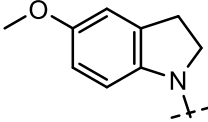
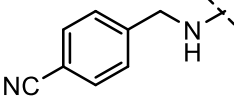
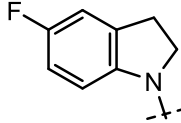
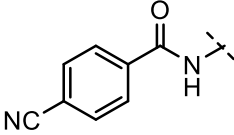
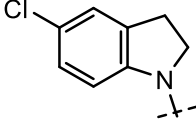
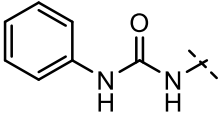
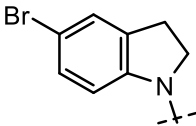
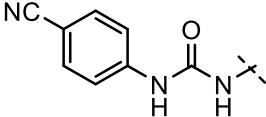
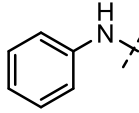
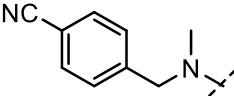
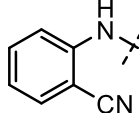
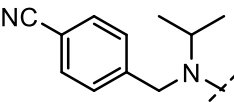
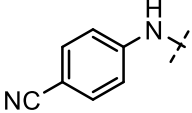
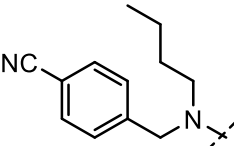
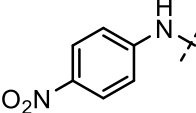
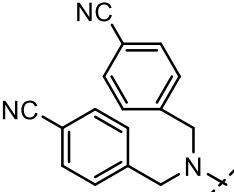
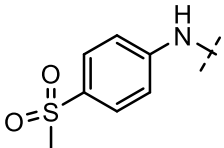
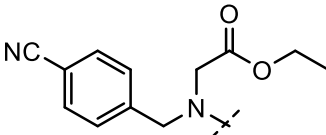
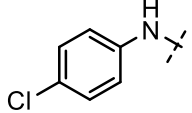
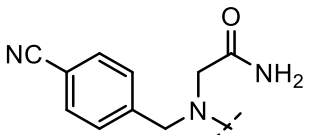
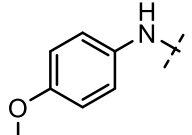
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,02 μM)

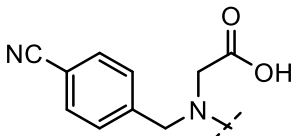
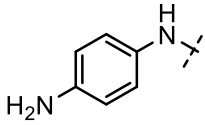
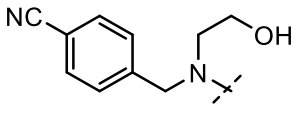
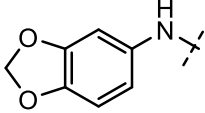
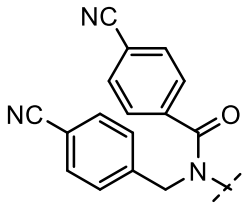
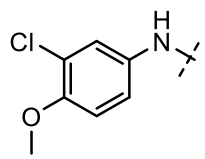
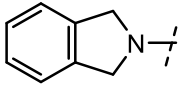
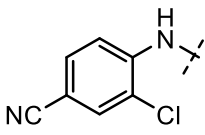
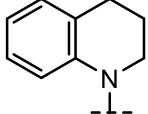
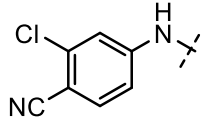
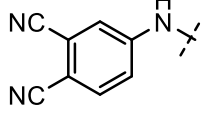
^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Sakashita i saradnici su sintetisali derivate [γ-(arilamino)prolin]tiazolidina, kao tiazolidin analoge [γ-(arilamino)prolin]-2-cijanopirolidina, sa optimizovanim γ-supstuentom u cilju povećanja kompatibilnosti sa S₂ domenom proteaze (Tabela 23). 3-[(2*S*,4*S*)-4-(5-Metoksi-1-indolinil)-2-pirolidinilkarbonil]-1,3-tiazolidin dihidrohlorid je pokazao najveći inhibični potencijal. Indolin supstuent u γ položaju je pokazao veću efektivnost u poređenju sa derivatima sa fenilamino supstuentom. Aromatičan sistem indolinil i fenilamino grupe gradi π-π interakcije sa Phe357. Smanjenje efikasnosti uklanjanjem elektrofilne nitril grupe može biti kompenzovano uvođenjem indolina u γ položaj pirolidina (Sakashita i saradnici, 2006; Sakashita i saradnici, 2007).

Tabela 23. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima [γ-(arilamino)prolin]tiazolidina (Sakashita i saradnici, 2006; Sakashita i saradnici, 2007)

R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
H	0,558	0,003		0,011	0,13
	0,0254	0,06		0,0079	0,18

	0,181	0,01		0,0048	0,29
	0,034	0,04		0,0058	0,24
	0,0372	0,04		0,007	0,2
	0,154	0,01		0,0065	0,22
	0,0859	0,02		0,147	0,01
	0,0096	0,15		0,0241	0,06
	0,0071	0,2		0,0252	0,06
	0,0091	0,15		0,0192	0,07
	0,0064	0,22		0,0523	0,03
	0,0136	0,1		0,0454	0,03
	0,0139	0,1		0,0515	0,03

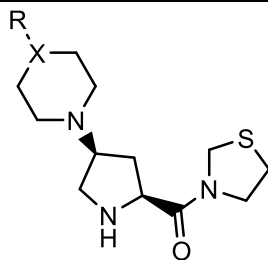
	0,0168	0,08		0,105	0,01
	0,017	0,08		0,029	0,05
	0,228	0,01		0,0199	0,07
	0,0264	0,05		0,0182	0,08
	0,112	0,01		0,0111	0,13
				0,0084	0,17

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: NVP-DPP728, IC₅₀ = 0,0014 μM)

^bRIPn = IC₅₀ NVP-DPP728 / IC₅₀ jedinjenja

Yoshida i saradnici su radili na razvoju novih DPP-4 inhibitora bez elektrofilne nitril grupe, u težnji za povećanjem hemijske stabilnosti, fokusirajući se na supstituciju γ položaja prolina prolil-tiazolidin osnove u cilju povećanja afiniteta za S₂ domen proteaze (Tabela 24). Modifikacijama arilpiperazina 3-[[4-(piperazin-1-il)-pirolidin-2-il]karbonil]tiazolidina dobijeni su efikasni inhibitori DPP-4, i primećeno je da aril supstituent interaguje sa S₂ i proširenim S₂ domenom proteaze (Yoshida i saradnici, 2012).

Tabela 24. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 3-[[4-(piperazin-1-il)-pirolidin-2-il]karbonil]tiazolidina (Yoshida i saradnici, 2012)



X	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	X	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
N		0,0027	0,14	N		0,00032	1,16
N		0,0031	0,12	CH		0,0056	0,07
N		0,0016	0,23	N		0,0029	0,13
N		0,0016	0,23	N		0,0003	1,23
N		0,0022	0,17	N		0,00085	0,44
N		0,00095	0,39	N		0,0034	0,11

N		0,0045	0,08	N		0,012	0,03
N		0,00026	1,42	N		0,005	0,07
N		0,0002	1,85	N		0,00062	0,6
CH		0,004	0,09	N		0,00063	0,59
N		0,0043	0,09	N		0,015	0,02
N		0,00094	0,39	N		0,0063 (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	0,06

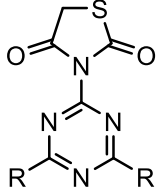
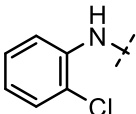
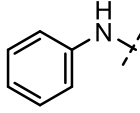
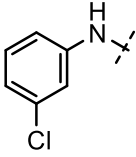
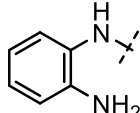
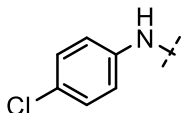
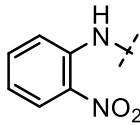
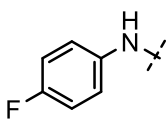
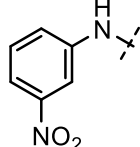
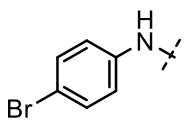
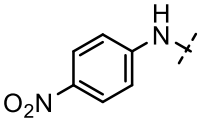
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: teneligliptin, IC₅₀ = 0,00037 μM)

^bRIPt = IC₅₀ teneligliptina / IC₅₀ jedinjenja

Derivati tetrahidrotriazina pokazuju hipoglikemijski efekat delovanjem na mitohondrije, učestvujući u očuvanju mase i funkcije beta ćelija pankreasa. Među derivatima tiazolidin-2,4-diona ima onih koji pokazuju povoljan anti-hiperglikemijski efekat suprimirajući insulinsku rezistenciju. Novi hibrid derivati 3-(1,3,5-triazin-2-il)tiazolidin-2,4-diona su sintetisani i ispitan je njihov inhibitorski potencijal na DPP-4 (Tabela 25). Lipofilni tiazolidin-2,4-dion fragment najaktivnijeg derivata, 3-(4,6-dihidrazinil-1,3,5-triazin-2-il)tiazolidin-2,4-diona, biva smešten u hidrofobnom S₁ domenu proteaze. Jedna od amino

grupa gradi vodoničnu vezu sa Glu205, dok druga amino grupa interaguje sa Ser630 i Tyr631, uz formiranje vodonične veze sa Tyr547. π -Katjon interakcije bivaju formirane između 1,3,5-triazina i Arg125 (Srivastava i saradnici, 2015).

Tabela 25. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 3-(1,3,5-triazin-2-il)thiazolidin-2,4-diona (Srivastava i saradnici, 2015)

					
R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
NHNH ₂	6,35	0,39		27,32	0,09
	12,11	0,21		23,25	0,11
	10,76	0,23		29,53	0,08
	14,64	0,17		38,37	0,07
	15,38	0,16		49,21	0,05
	17,85	0,14			

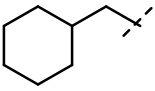
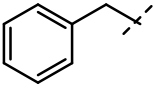
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: P32/98, IC₅₀ = 2,5 μM)

^bRIPp = IC₅₀ P32/98 / IC₅₀ jedinjenja

1.6.4. Derivati piridina

Uticaj derivata 3-aminometil-2-(2,4-dihlorofenil)-4-[(1,2,4-triazol-1-il)metil]piridina na aktivnost DPP-4 su ispitali Zhu i saradnici (Tabela 26). Uvođenje supstituenata na metilen grupu između piridina i triazola vodi smanjenju inhibitornog potencijala i manjoj kompatibilnosti sa S₂ domenom proteaze. Razmatran je uticaj supstituenata u položaju 6 piridina, pri čemu je dokazano da derivat sa karboksilnom grupom pokazuje najveći stepen inhibicije, uz efikasnost estarskih i amidnih derivata. 2,4-Dihlorofenil fragment se vezuje u hidrofobnom S₁ domenu enzima. Primarna amino grupa u položaju 3 piridina biva lokalizovana u blizini Glu205, Glu206 i Tyr662. Karboksilna grupa u položaju 6 piridina gradi vodonične veze sa Arg125, dok 1,2,4-triazol formira π-π interakcije sa Tyr547 (Zhu i saradnici, 2017).

Tabela 26. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 3-aminometil-2-(2,4-dihlorofenil)-4-[(1,2,4-triazol-1-il)metil]piridina (Zhu i saradnici, 2017)

R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
H	CH ₃	0,0025	6	H	H	0,0026	5,77
CH ₃	CH ₃	0,0054	2,78	H	COOC ₂ H ₅	0,002	7,5
C ₂ H ₅	CH ₃	0,0043	3,49	H	COOH	0,00057	26,32
	CH ₃	0,028	0,54	H	CONHCH ₃	0,0085	1,76
	CH ₃	0,0129	1,16	H	CONH ₂	0,0065	2,31

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,015 μM)

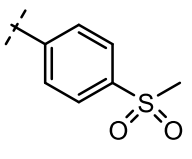
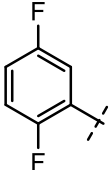
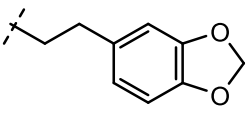
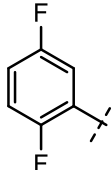
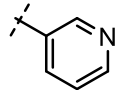
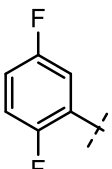
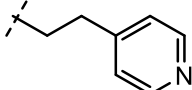
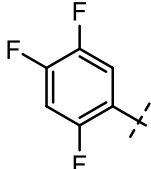
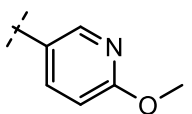
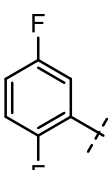
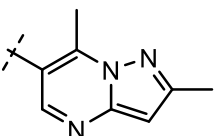
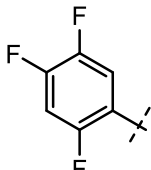
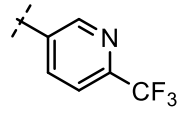
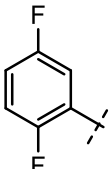
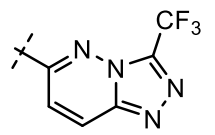
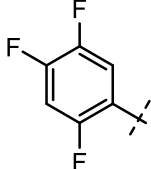
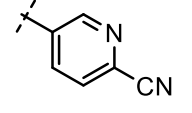
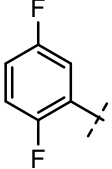
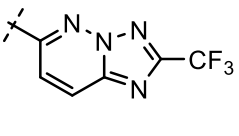
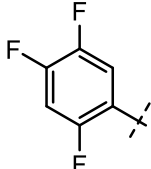
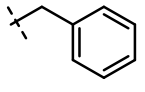
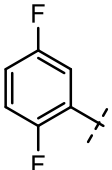
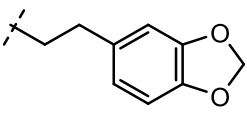
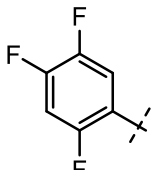
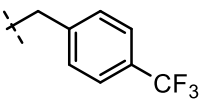
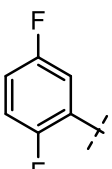
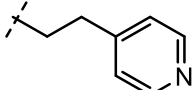
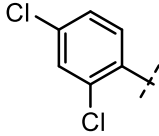
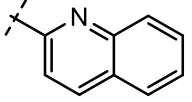
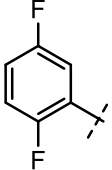
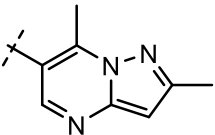
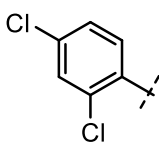
^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

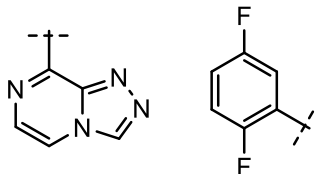
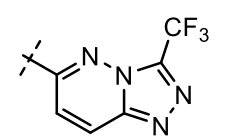
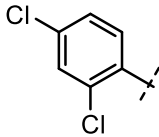
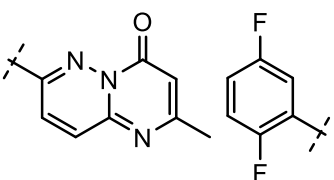
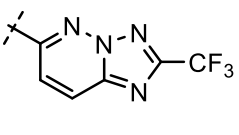
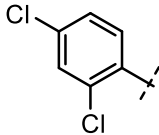
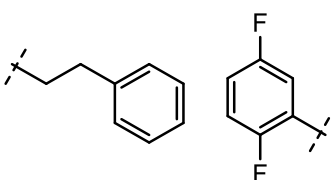
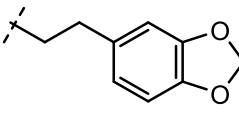
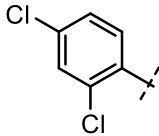
Dizajnirana je serija 5-(aminometil)-piperidin-2-on derivata, i ispitan inhibitorni potencijal ovih struktura na DPP-4 (Tabela 27). (4*S*,5*S*)-5-(Aminometil)-1-(2-(benzo[*d*][1,3]dioksol-5-il)etil)-4-(2,5-difluorofenil)piperidin-2-on je pokazao najveći stepen

inhibicije u *in vitro* testu, i hipoglikemijski efekat *in vivo* na miševima. Difluorofenil grupa interaguje sa S₁ domenom proteaze. U S₂ domenu aminometil grupa piperidona gradi vodoničnu vezu sa Glu205 i Glu206 (Jadav i saradnici, 2014).

Tabela 27. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 5-(aminometil)-piperidin-2-ona (Jadav i saradnici, 2014)

R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
		1,436	0,01			0,084	0,21
		0,378	0,05			0,0776	0,23
		0,382	0,05			0,122	0,15
		0,342	0,05			0,079	0,23
		0,217	0,08			0,074	0,24

		0,193	0,09			0,0085	2,12
		1,388	0,01			0,157	0,11
		0,452	0,04			0,119	0,15
		0,443	0,04			0,125	0,14
		0,404	0,04			0,111	0,16
		0,885	0,02			0,019	0,95
		0,91	0,02			0,197	0,09
		1,034	0,02			0,148	0,12

	1,023	0,02			0,134	0,13
	0,997	0,02			0,137	0,13
	0,119	0,15			0,043	0,42

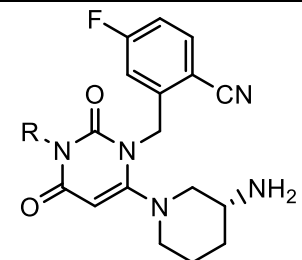
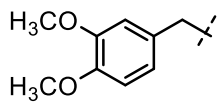
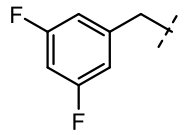
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,018 μM)

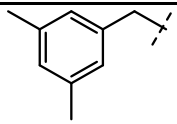
^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

1.6.5. Derivati pirimidina

Li i saradnici su ispitivali uticaj derivata 1-(2-cijano-5-fluoro-benzil)-6-(3-aminopiperidin-1-il)-pirimidin-2,4-diona na aktivnost DPP-4 (Tabela 28). Najaktivnije jedinjenje je pokazalo i hipoglikemijski efekat *in vivo* na miševima. Pokazano je da fluorocijanobenzil supstituent značajno doprinosi inhibitorynom potencijalu, gradeći vodoničnu vezu sa Arg125 (Li i saradnici, 2018b).

Tabela 28. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 1-(2-cijano-5-fluoro-benzil)-6-(3-aminopiperidin-1-il)-pirimidin-2,4-diona (Li i saradnici, 2018b)

					
R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
	0,06447	0,59		0,06536	0,58

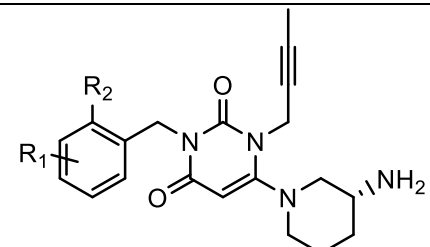
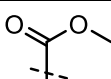
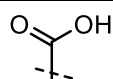
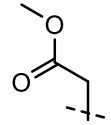
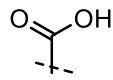
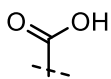
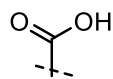
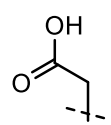
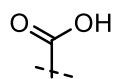
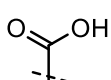
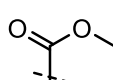
	0,1887	0,2
---	--------	-----

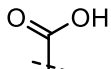
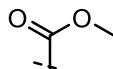
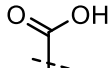
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,03796 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

U cilju povećanja površine koja se vezuje u S₂' domenu DPP-4 i ostvarenja interakcija sa Trp629 i Lys554 u ovom domenu, novi 2-((6-(3-aminopiperidin-1-il)-1-(but-2-in-1-il)-2,4-dioekso-pirimidin-3-il)metil) derivati benzoeeve kiseline su dizajnirani (Tabela 29). Fenil grupa obrazuje π-π interakcije sa Trp629, dok karboksilna grupa interaguje sa primarnom amino grupom Lys554. (*R*)-2-((6-(3-Aminopiperidin-1-il)-1-(but-2-in-1-il)-2,4-dioekso-pirimidin-3-il)metil)-6-fluorobenzoeva kiselina je pokazala najveći inhibitorni potencijal na enzimu *in vitro* i hipoglikemijski efekat na miševima (Huang i saradnici, 2019).

Tabela 29. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 2-((6-(3-aminopiperidin-1-il)-1-(but-2-in-1-il)-2,4-dioekso-pirimidin-3-il)metil) derivatima benzoeeve kiseline (Huang i saradnici, 2019)

							
R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
H		0,0746	0,04 ^b 0,09 ^c	5-Br		0,0046	0,59 ^b 1,5 ^c
H		0,0566	0,05 ^b 0,12 ^c	4-Br		0,0025	1,08 ^b 2,76 ^c
H		0,0075	0,36 ^b 0,92 ^c	4-OCH ₃		0,004	0,68 ^b 1,72 ^c
H		0,0898	0,03 ^b 0,08 ^c	4-CN		0,0035	0,77 ^b 1,97 ^c
5-F		0,0076	0,36 ^b	6-F		0,0932	0,03 ^b

			0,91 ^c				0,07 ^c
6-F		0,0017	1,59 ^b	4-Br		0,395	0,01 ^b
			4,06 ^c				0,02 ^c
5-Cl		0,0039	0,69 ^b				
			1,77 ^c				

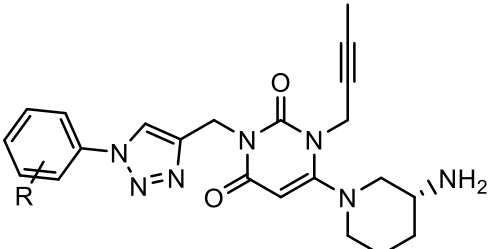
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: alogliptin, IC₅₀ = 0,0027 μM; sitagliptin, IC₅₀ = 0,0069 μM)

^bRIPa = IC₅₀ alogliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Alogliptin i linagliptin pokazuju slične interakcije u S₁, S₂ i S₁' domenu proteaze. Novi 3-((1,2,3-triazol-4-il)metil)-pirimidin-2,4-dion derivati su dizajnirani na osnovu analize odnosa struktura-aktivnost dva navedena gliptina. 1,2,3-Triazol formira π-π interakcije sa Trp629. Ispitan je uticaj supstituenata u N1 položaju triazola, pri čemu se derivat sa 2-fluoro-fenil supstituentom pokazao kao najefikasniji inhibitor (Li i saradnici, 2016a) (Tabela 30).

Tabela 30. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 3-((1,2,3-triazol-4-il)metil)pirimidin-2,4-dion derivatima (Li i saradnici, 2016a)

					
R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
H	0,18524	0,04 ^b	3-Cl	0,16863	0,04 ^b
		0,01 ^c			0,01 ^c
2-F	0,06405	0,11 ^b	2-OCH ₃	0,21942	0,03 ^b
		0,02 ^c			0,01 ^c
4-F	0,13545	0,05 ^b	3-OCH ₃	0,08853	0,08 ^b
		0,01 ^c			0,01 ^c
2,4-di-F	0,24367	0,03 ^b			
		0,01 ^c			

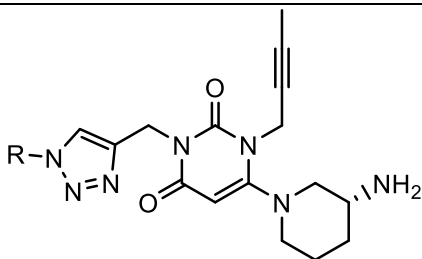
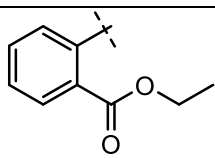
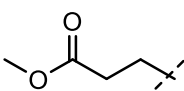
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: alogliptin, IC₅₀ = 0,00685 μM; linagliptin, IC₅₀ = 0,00125 μM)

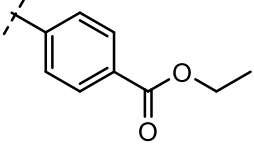
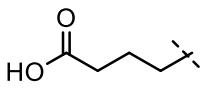
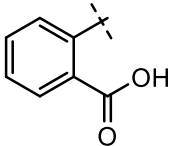
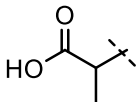
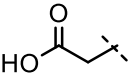
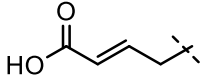
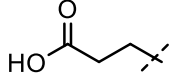
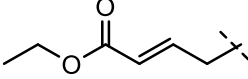
^bRIPa = IC₅₀ alogliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPi = IC₅₀ linagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Od novosintetisanih derivata (4-((6-(3-aminopiperidin-1-il)-1-(but-2-in-1-il)-2,4-diokso-pirimidin-3-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il) karboksilnih kiselina, hidrohlorid (*R*)-3-(4-((6-(3-aminopiperidin-1-il)-1-(but-2-in-1-il)-2,4-diokso-pirimidin-3-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-propanske kiseline gradi vodonične veze između karboksilne grupe i Arg125 u S₂ domenu proteaze. Produžavanjem ugljovodoničnog niza karboksilne kiseline formiraju se nove konformacije u S₂' domenu enzima, i karboksilna grupa interaguje sa Tyr752 vodoničnim vezama, dok višestruka veza nezasićenog ugljovodoničnog niza kiseline interaguje sa Trp629. Hidrohlorid (*R,E*)-4-(4-((6-(3-aminopiperidin-1-il)-1-(but-2-in-1-il)-2,4-diokso-pirimidin-3-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il)-but-2-enske kiseline je najaktivniji derivat usled formiranja više vodoničnih veza i hidrofobnih interakcija u S₂' domenu proteaze. Modifikovanje supstituenata koji interaguju sa S₂' domenom može biti efikasno za povećanje potencijala inhibicije DPP-4. Metil estar propanske kiseline je pokazao veći hipoglikemijski efekat *in vivo* na miševima u poređenju sa propanskom kiselinom. Pretpostavlja se da je razlog veće efikasnosti estra manja membranska permeabilnost kiseline usled formiranja cviter jona, dok je estar lipofilniji i može biti i prolek kiseline. But-2-enska kiselina i njen etil estar su *in vivo* pokazali sličnu efektivnost, pri čemu je metil estar propanske kiseline pokazao veću efikasnost u poređenju sa etil estrom but-2-enske kiseline (Li i saradnici, 2016a) (Tabela 31).

Tabela 31. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima (4-((6-(3-aminopiperidin-1-il)-1-(but-2-in-1-il)-2,4-diokso-pirimidin-3-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il) karboksilnih kiselina (Li i saradnici, 2016a)

					
R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
	0,34532	0,03 ^b 0,004 ^c		0,06431	0,14 ^b 0,02 ^c

	0,17253	0,05 ^b 0,01 ^c		0,02681	0,33 ^b 0,05 ^c
	0,06563	0,13 ^b 0,02 ^c		0,07162	0,12 ^b 0,02 ^c
	0,08472	0,1 ^b 0,02 ^c		0,00956	0,93 ^b 0,15 ^c
	0,01245	0,71 ^b 0,12 ^c		0,10556	0,08 ^b 0,01 ^c

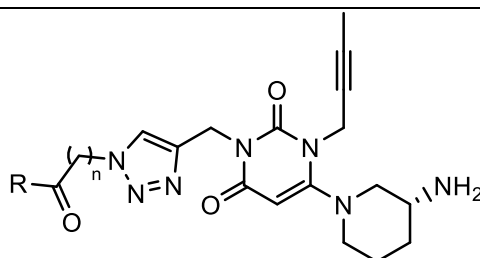
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: alogliptin, IC₅₀ = 0,00885 μM; linagliptin, IC₅₀ = 0,00147 μM)

^bRIPa = IC₅₀ alogliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPi = IC₅₀ linagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Nakon sinteze derivata (4-((6-(3-aminopiperidin-1-il)-1-(but-2-in-1-il)-2,4-dioksopirimidin-3-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il) karboksilnih kiselina, koji su pokazali dobar inhibitorski potencijal na DPP-4 *in vitro*, ali slabiji hipoglikemijski efekat *in vivo*, amidovanje ostataka karboksilnih kiselina je izvršeno u cilju poboljšanja *in vivo* efektivnosti, sprečavanjem formiranja cviter jona kojim je permeabilnost kroz membranu bila smanjena. Od amida, (*R*)-2-(4-((6-(3-aminopiperidin-1-il)-1-(but-2-in-1-il)-2,4-dioksopirimidin-3-il)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-*N,N*-dimetilacetamid hidrohlorid je pokazao najveću hipoglikemijsku aktivnost na miševima obolelim od dijabetesa (Tabela 32). Dimetil amid acetatne kiseline pored π-π interakcija uracila i Tyr547, formira π-katjon interakcije sa Arg125. 2-Butinil grupa ovog amida gradi hidrofobne interakcije u S₁ domenu enzima, amino grupa (3*R*)-aminopiperidina gradi vodonične veze sa Glu205, Glu206 i Tyr662, dok triazol formira π-π interakcije sa Trp629. Dimetil amid propanske kiseline ne gradi vodonične veze sa Arg125, kojih je bilo kod karboksilne grupe, što se pretpostavlja da je jedan od razloga smanjenja efikasnosti amida u odnosu na kiselinu (Deng i saradnici, 2017).

Tabela 32. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 amidima (4-((6-(3-aminopiperidin-1-il)-1-(but-2-in-1-il)-2,4-dioksopirimidin-3-il)metil)-1,2,3-triazol-1-il) karboksilnih kiselina (Deng i saradnici, 2017)



n	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	n	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
2	NH ₂	0,17523	0,04 ^b 0,01 ^c	1	NH ₂	0,11831	0,06 ^b 0,01 ^c
2		0,20534	0,03 ^b 0,01 ^c	1		0,02862	0,24 ^b 0,04 ^c
2		0,18248	0,04 ^b 0,01 ^c	1		0,08043	0,09 ^b 0,02 ^c
2		0,19481	0,04 ^b 0,01 ^c	1		0,13272	0,05 ^b 0,01 ^c
2		0,16532	0,04 ^b 0,01 ^c				

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: alogliptin, IC₅₀ = 0,00685 μM; linagliptin, IC₅₀ = 0,00127 μM)

^bRIPa = IC₅₀ alogliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPi = IC₅₀ linagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Lai i saradnici su dizajnirali i sintetisali hibrid jedinjenja linagliptina i alogliptina (Tabela 33). (*R*)-6-(3-Aminopiperidin-1-il)-1-(but-2-inil)-3-[(4-metilhinazolin-2-il)metil]pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion je pokazao najveći inhibitorski potencijal u *in vitro* testu i značajan hipoglikemijski efekat *in vivo* na miševima obolelim od dijabetesa. Pored vodoničnih veza sa Glu205 i Glu206 i π - π interakcija sa Tyr547, ovo jedinjenje gradi i π - π interakcije sa Trp629 (Lai i saradnici, 2014).

Tabela 33. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima pirimidin-2,4-diona sa (hinazolin-2-il)metil i benzil supstituentom u položaju 3 (Lai i saradnici, 2014)

R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
			0,00031	2,48 ^b 8,48 ^c				0,0076	0,1 ^b 0,35 ^c
			0,00035	2,2 ^b 7,51 ^c				0,0664	0,01 ^b 0,04 ^c
			0,0127	0,06 ^b 0,21 ^c				0,0308	0,02 ^b 0,09 ^c
			0,0036	0,21 ^b 0,73 ^c				0,0025	0,31 ^b 1,05 ^c
			0,0659	0,01 ^b 0,04 ^c				0,0114	0,07 ^b 0,23 ^c
								0,0038	0,2 ^b 0,69 ^c

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: linagliptin, IC₅₀ = 0,00077 μM; alogliptin, IC₅₀ = 0,00263 μM)

^bRIP₁ = IC₅₀ linagliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIP_a = IC₅₀ alogliptina / IC₅₀ jedinjenja

Strukturnim modifikacijama alogliptina, počev od zamene cijanobenzil grupe butinil grupom (koje ima u strukturi linagliptina), sintetisana je nova grupa derivata pirimidin-2,4-diona sa bi- i tricikličnim supstituentima u položaju 3 i ispitana u testu inhibicije DPP-4 (Tabela 34). Najaktivnije jedinjenje, (*R*)-6-(3-aminopiperidin-1-il)-1-(but-2-in-1-il)-3-((7-hlorohinolin-2-il)metil)pirimidin-2,4(1*H*,3*H*)-dion, interaguje sa Ser630, Glu205 i Glu206 proteaze (Xie i saradnici, 2013).

Tabela 34. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima pirimidin-2,4-diona sa bi- i tricikličnim supstuentima u položaju 3 (Xie i saradnici, 2013)

R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
	2,1775	0,001		0,0066	0,23
	0,0034	0,44		0,002	0,75
	0,022	0,07		0,0091	0,16
	0,0031	0,48		0,0019	0,79
	0,0313	0,05		0,0004	3,75
	0,0108	0,14		0,0007	2,14
				0,0012	1,25

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: alogliptin, IC₅₀ = 0,0015 μM)

^bRIP_a = IC₅₀ alogliptina / IC₅₀ jedinjenja

1.6.6. Biciklični derivati

Ji i saradnici su dizajnirali i sintetisali 1-butanoil- β -amino-ciklopenta[*b*]pirol-2-karbonitril derivate (Tabela 35). Derivat sa 2,4,5-trifluoro-fenil fragmentom je pokazao najveći inhibitorski potencijal *in vitro* i hipoglikemijski efekat *in vivo* na miševima. 2,4,5-Trifluorofenil fragment se vezuje u S₁ hidrofobnom domenu enzima, dok se ciklopenta[*b*]pirol-2-karbonitril vezuje u S₂ domenu (Ji i saradnici, 2014b).

Tabela 35. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 1-butanoil- β -amino-ciklopenta[*b*]pirol-2-karbonitrila (Ji i saradnici, 2014b)

R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
H	0,44	0,05 ^b	4-CF ₃	1,98	0,01 ^b
		0,16 ^c			0,04 ^c
2-Cl	0,07	0,29 ^b	2,4- <i>di</i> -Cl	0,07	0,29 ^b
		1 ^c			1 ^c
2-CH ₃	0,36	0,06 ^b	3,4- <i>di</i> -Cl	47,44	0,0004 ^b
		0,19 ^c			0,001 ^c
3-F	0,13	0,15 ^b	3,5- <i>di</i> -F	9,65	0,002 ^b
		0,54 ^c			0,01 ^c
4-F	0,27	0,07 ^b	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,01	2 ^b
		0,26 ^c			7 ^c
4-I	8,8	0,002 ^b			
		0,01 ^c			

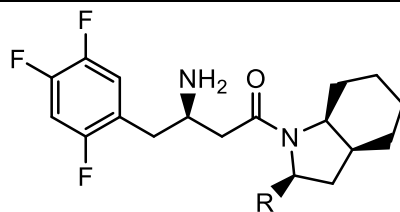
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,02 μM; vildagliptin, IC₅₀ = 0,07 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

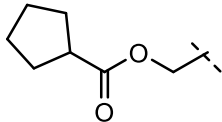
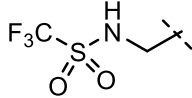
^cRIPv = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Serijski 3-amino-1-(indol-1-il)-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butan-1-on derivati su pokazali dobar inhibitorski potencijal na DPP-4 (Wang i saradnici, 2014) (Tabela 36).

Tabela 36. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 3-amino-1-(indol-1-il)-4-(2,4,5-trifluorofenil)-butan-1-ona (Wang i saradnici, 2014)



R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
	5,81	0,003		0,32	0,06
	0,34	0,06		0,51	0,04
	0,38	0,05		0,29	0,07
	0,76	0,03		0,54	0,04
	0,07	0,29		0,33	0,06
	3,66	0,01		0,43	0,05
	0,07	0,29		0,61	0,03
	0,08	0,25		0,14	0,14
	0,07	0,29		0,43	0,05

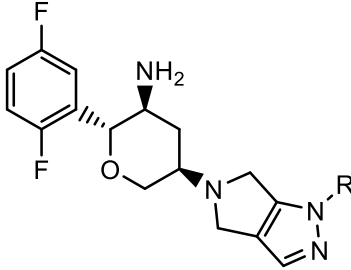
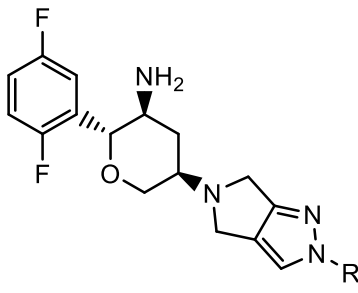
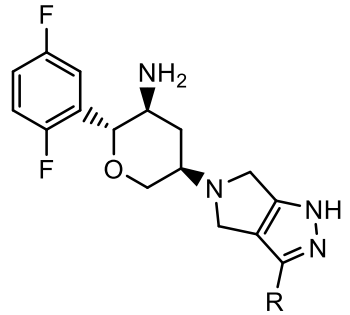
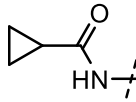
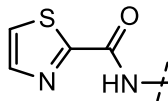
	0,18	0,11		0,17	0,12
---	------	------	--	------	------

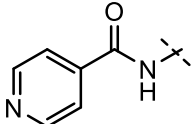
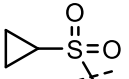
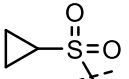
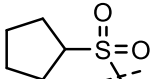
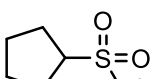
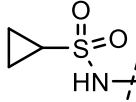
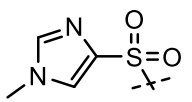
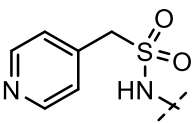
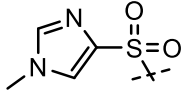
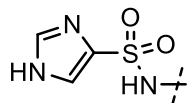
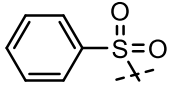
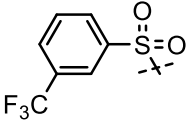
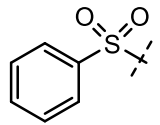
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,02 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Inhibitorski potencijal supstituisanih pirolo[3,4-*c*]pirazol derivata je ispitan na DPP-4 u poređenju sa omarigliptinom (Tabela 37). Uvođenje sulfonil grupe u položaj 1 ili 2 pirazola daje efektivne inhibitore DPP-4. Među alkilsulfonamid analogima, izopropil analog je pokazao najveći inhibitorski potencijal, dok je *n*-propilsulfonamid najmanje efektivan. Izomeri ciklopropilsulfonamida pokazuju podjednaku efikasnost. Analizi sa amid, sulfonamid i sulfonskom grupom u položaju 3 pirazola pokazuju stepen inhibicije sličan prethodno navedenim derivatima sa supstituentima u položaju 1 i 2. Od sulfonamid derivata, imidazol-sulfonamid je pokazao značajno veći stepen inhibicije u odnosu na metilsulfonamid derivat (Chen i saradnici, 2015).

Tabela 37. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 supstituisanim pirolo[3,4-*c*]pirazol derivatima (Chen i saradnici, 2015)

											
R	Izomer	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R	Izomer	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R	Izomer	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
CF ₃ SO ₂	B	0,0023	1,13	C ₂ H ₅ CONH	C	0,0014	1,86				
C ₂ H ₅ SO ₂	B	0,0018	1,44		C	0,0016	1,62				
CH ₃ (CH ₂) ₂ SO ₂	B	0,0057	0,46		C	0,0043	0,6				

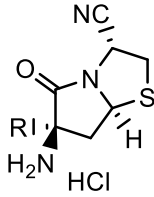
$(\text{CH}_3)_2\text{CHSO}_2$	B	0,0007	3,71		C	0,0037	0,7
	A	0,0016	1,62	$\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}$	C	0,0032	0,81
	B	0,0016	1,62	$\text{C}_2\text{H}_5\text{SO}_2\text{NH}$	C	0,0011	2,36
	A	0,0026	1	$\text{CF}_3\text{CH}_2\text{SO}_2\text{NH}$	C	0,0013	2
	B	0,0016	1,62		C	0,0018	1,44
	A	0,0049	0,53		C	0,0018	1,44
	B	0,0019	1,37		C	0,0003	8,67
	B	0,0023	1,13	CH_3SO_2	C	0,0017	1,53
	B	0,0019	1,37	$(\text{CH}_3)_2\text{CHSO}_2$	C	0,0017	1,53
					C	0,0004	6,5

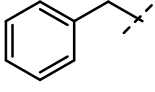
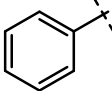
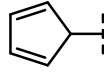
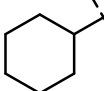
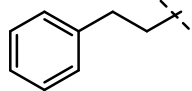
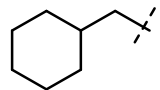
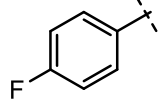
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: omarigliptin, IC₅₀ = 0,0026 μM)

^bRIP₀ = IC₅₀ omarigliptina / IC₅₀ jedinjenja

Supstituisani pirolo[2,1-*b*]tiazol derivati su pokazali umeren do izraženiji potencijal inhibicije DPP-4, sa najefikasnijim predstavnikom sa fenil grupom kao supstituentom. Uvođenje halogena kao supstituenta fenil ostatka pokazuje nepovoljan uticaj (Betancort i saradnici, 2009) (Tabela 38).

Tabela 38. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 supstituisanim pirolo[2,1-*b*]tiazol derivatima (Betancort i saradnici, 2009)



R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
H	0,105	0,03		0,109	0,03
	0,026	0,12		0,089	0,03
C ₂ H ₅	0,056	0,05		0,059	0,05
(CH ₃) ₂ CH	0,033	0,09		0,205	0,01
CH ₂ CH(CH ₃) ₂	0,063	0,05		0,118	0,03
(<i>S</i>)-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	0,053	0,06		0,152	0,02

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: vildagliptin, IC₅₀ = 0,003 μM; saksagliptin, IC₅₀ = 0,003 μM)

^bRIP_v = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja; RIP_s = IC₅₀ saksagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Od ispitivanih derivata pirido[2,3-*d*]imidazolona, jedinjenje sa IC₅₀ vrednošću 0,008 μM je pokazalo značajnu efikasnost *in vitro* i *in vivo* (Tabela 39). Pirido[2,3-*d*]imidazon je postavljen u blizini hidrofobnih Phe357 i Tyr574, i gradi π-π interakcije sa proteazom. Karbonilni kiseonik imidazolona gradi vodoničnu vezu sa Tyr631, benzil grupa π-π interakcije sa Trp659 i Tyr666, azot benzil cijano grupe gradi vodoničnu vezu sa Arg125, dok amino grupa piperidina biva protonovana na fiziološkoj pH vrednosti i interaguje sa Glu205 i Glu206 (Shu i saradnici, 2014).

Tabela 39. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima pirido[2,3-*d*]imidazolona (Shu i saradnici, 2014)

R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
		H	0,013	2,23 ^b 0,54 ^c			H	0,43	0,07 ^b 0,02 ^c
		H	88	0,0003 ^b 0,0001 ^c			OCH ₃	0,032	0,91 ^b 0,22 ^c
		H	0,11	0,26 ^b 0,06 ^c			CH ₃	0,009	3,22 ^b 0,78 ^c
		H	2,5	0,01 ^b 0,003 ^c			C ₂ H ₅	0,019	1,53 ^b 0,37 ^c
		H	16	0,002 ^b 0,0004 ^c			CF ₃	0,013	2,23 ^b 0,54 ^c
		H	20	0,001 ^b 0,0004 ^c			CH ₂ OH	0,016	1,81 ^b 0,44 ^c
		H	0,022	1,32 ^b 0,32 ^c			CONH ₂	0,01	2,9 ^b 0,7 ^c
		H	0,53	0,05 ^b 0,01 ^c			COOH	0,008	3,62 ^b 0,88 ^c

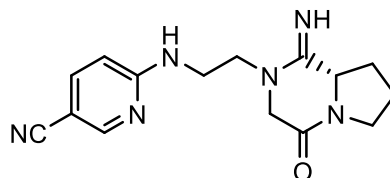
		H	23	0,001 ^b 0,0003 ^c				0,037	0,78 ^b 0,19 ^c
		H	5,2	0,006 ^b 0,001 ^c				0,019	1,53 ^b 0,37 ^c

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,029 μM; alogliptin, IC₅₀ = 0,007 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPa = IC₅₀ alogliptina / IC₅₀ jedinjenja

Villhauer i saradnici su sintetisali i ispitali inhibitorski potencijal derivata pirolo[1,2-*a*]pirazina na DPP-4 (Villhauer i saradnici, 2003) (Slika 11).



IC₅₀^a = 1,54 μM

RIP^b = 0,01

RIP^c = 0,002

Slika 11. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatom pirolo[1,2-*a*]pirazina (Villhauer i saradnici, 2003)

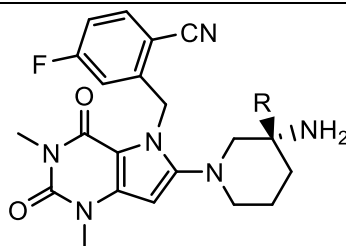
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: NVP-DPP728, IC₅₀ = 0,022 μM; vildagliptin, IC₅₀ = 0,0035 μM)

^bRIPn = IC₅₀ NVP-DPP728 / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPv = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Nishio i saradnici su od derivata pirolo[3,2-*d*]pirimidina izdvojili 2-((6-((3*R*)-3-amino-3-metilpiperidin-1-il)-1,3-dimetil-2,4-dioksa-1,2,3,4-tetrahidro-5*H*-pirolo[3,2-*d*]pirimidin-5-il)metil)-4-fluorobenzonitril kao dobar DPP-4 inhibitor sa *in vivo* efikasnošću dokazanom na pacovima (Nishio i saradnici, 2011) (Tabela 40).

Tabela 40. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima pirolo[3,2-*d*]pirimidina (Nishio i saradnici, 2011)



R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
		10,29 ^b			3,18 ^b
H	0,00034	1,71 ^c	CH ₃	0,0011	0,53 ^c
		2,94 ^d			0,91 ^d
			C ₂ H ₅	0,026	0,13 ^b
					0,02 ^c
					0,04 ^d

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,0035 μM; vildagliptin, IC₅₀ = 0,00058 μM; alogliptin, IC₅₀ = 0,001 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPv = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

^dRIPa = IC₅₀ alogliptina / IC₅₀ jedinjenja

Deaza(hipo)ksantin DPP-4 inhibitori su sintetisali Sutton i saradnici (Tabele 41 i 42). Zamenom piperazina, kao supstituenta deazahipoksantina, 3-aminopiperidinom postignuto je povećanje inhibitornog potencijala. (*S*)-aminopiperidin derivati 7-cijanodeazahipoksantina su efikasniji u odnosu na (*R*) enantiomere. Deazahipoksantin formira π interakcije sa Tyr547. Karbonilni kiseonik deazahipoksantina gradi vodoničnu vezu sa Tyr631. Poređenjem inhibitornog potencijala derivata deazahipoksantina i deazaksantina sa (*S*)-aminopiperidin supstituentom, pokazano je da su derivati deazaksantina sa istim R₁/R₂ supstituentima efektivniji. (*R*)-enantiomeri but-2-inil derivata 7-cijanodeazaksantina su efikasniji od (*S*)-enantiomera. Dodavanje cijano grupe R₂ supstituentu omogućava uspostavljanje vodonične veze sa Lys554, bez značajnog uticaja na aktivnost (Sutton i saradnici, 2012).

Tabela 41. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 7-cijanodeazahipoksantina (Sutton i saradnici, 2012)

X/Y	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	X/Y	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
NH/H		CH ₃	2,1	0,00005	CH ₂ / (R)-NH ₂			0,004	0,02
NH/H			0,4	0,0002	CH ₂ / (S)-NH ₂			0,001	0,1
NH/H			0,023	0,004	CH ₂ / (S)-NH ₂			0,004	0,02
NH/H			0,01	0,01	CH ₂ / (S)-NH ₂			0,0005	0,2
CH ₂ / (S)-NH ₂		CH ₃	0,02	0,005	CH ₂ / (S)-NH ₂			0,003	0,03
CH ₂ / (R)-NH ₂			0,025	0,004	CH ₂ / (S)-NH ₂			0,008	0,01
CH ₂ / (S)-NH ₂			0,004	0,02	CH ₂ / (S)-NH ₂		CH ₃	0,009	0,01
CH ₂ / (S)-NH ₂			0,017	0,01	CH ₂ NH/ H			0,06	0,002
CH ₂ / (R)-NH ₂			0,06	0,002	CH ₂ NH/ H			0,007	0,01

CH ₂ / (S)-NH ₂		0,015	0,01	CH ₂ NH/ H		0,006	0,02
CH ₂ / (S)-NH ₂		0,01	0,01	CH ₂ NH/ H		0,009	0,01
CH ₂ / (S)-NH ₂		0,005	0,02	CH ₂ NH/ H		0,045	0,002

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: linagliptin, IC₅₀ = 0,0001 μM)

^bRIP1 = IC₅₀ linagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Tabela 42. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 7-cijanodeazaksantina (Sutton i saradnici, 2012)

X/Y	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	X/Y	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
CH ₂ / (S)-NH ₂			0,0015	0,07	CH ₂ / (S)-NH ₂			0,25	0,0004
CH ₂ / (S)-NH ₂			0,004	0,02	CH ₂ NH/ H			0,002	0,05
CH ₂ / (S)-NH ₂		CH ₃	0,01	0,01	CH ₂ NH/ H			0,003	0,03
CH ₂ / (S)-NH ₂			0,0005	0,2	CH ₂ NH/ H			0,002	0,05
CH ₂ / (S)-NH ₂			0,001	0,1	CH ₂ NH/ H			0,01	0,01

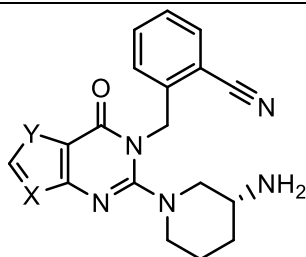
CH ₂ / (S)-NH ₂		0,002	0,05	CH ₂ NH/ H		0,001	0,1
CH ₂ / (S)-NH ₂		0,009	0,01	CH ₂ NH/ H		0,0055	0,02
CH ₂ / (S)-NH ₂		0,025	0,004	CH ₂ NH/ H		0,005	0,02
CH ₂ / (S)-NH ₂		0,002	0,05	CH ₂ NH/ H		0,0075	0,01
CH ₂ / (S)-NH ₂		0,004	0,02	CH ₂ NH/ H		0,001	0,1
CH ₂ / (R)-NH ₂		0,02	0,005	CH ₂ NH/ H		0,002	0,05

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: linagliptin, IC₅₀ = 0,0001 μM)

^bRIP1 = IC₅₀ linagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Po modelu strukture alogliptina, sintetisani su derivati tieno[2,3-*d*]pirimidina i tieno[3,2-*d*]pirimidina, od kojih ima struktura aktivnijih od alogliptina u testu inhibicije DPP-4. Jedinjenje bez supstituenata na tiofenu je pokazalo visoku efikasnost, dok je dodavanje metil grupe u položaj 3 tiofena uzrokovalo smanjenje stepena inhibicije. Trifluorometil grupa umesto metil grupe je dodatno smanjila efektivnost. Pokazano je da orijentacija tiofenil osnove ne utiče značajno na aktivnost, dok supstituenti pokazuju uticaj (Tabela 43). (*R*)-2-((2-(3-aminopiperidin-1-il)-4-oksotieno[3,2-*d*]pirimidin-3(4*H*)-il)metil)benzonitril, kao najefikasniji od ispitivanih struktura, je i *in vivo* na pacovima pokazao hipoglikemijski efekat (Deng i saradnici, 2011).

Tabela 43. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima tieno[2,3-*d*]pirimidina i tieno[3,2-*d*]pirimidina (Deng i saradnici, 2011)



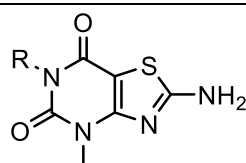
X	Y	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	X	Y	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
S	CH	0,00087	3,91	CH	S	0,00033	10,3
S	CCH ₃	0,00132	2,58	CCH ₃	S	0,00172	1,98
S	CCF ₃	0,08882	0,04				

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: alogliptin, IC₅₀ = 0,0034 μM)

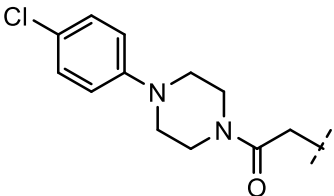
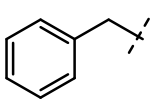
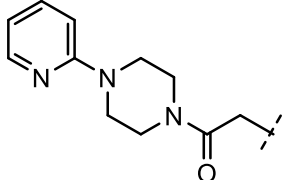
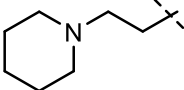
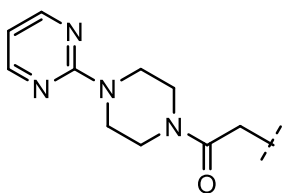
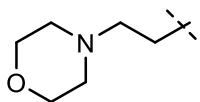
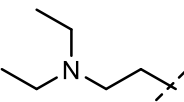
^bRIPa = IC₅₀ alogliptina / IC₅₀ jedinjenja

Tiazolo[4,5-*d*]pirimidin derivati su ispitani *in vitro* u testu inhibicije DPP-4 (Tabela 44). Derivati sa acetamidom povezanim piperazinom su pokazali najveću efektivnost *in vitro* i hipoglikemijsku aktivnost na pacovima obolelim od dijabetesa. Aril ostatak najefikasnijih jedinjenja se vezuje u S₂ domenu i interaguje sa Tyr662 i Tyr666 proteaze π-π interakcijama (Sharma i saradnici, 2012).

Tabela 44. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima tiazolo[4,5-*d*]pirimidina (Sharma i saradnici, 2012)



R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
H	11,87	0,21		38,27	0,07
	0,98	2,55		91,18	0,03

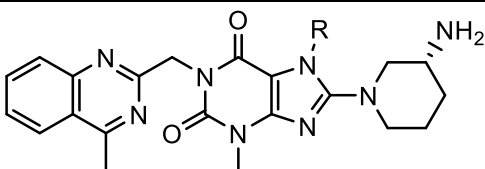


	0,489	5,11		34,61	0,07
	0,329	7,6		32,69	0,08
	1,49	1,68		67,21	0,04
				2,42	1,03

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: P32/98, IC₅₀ = 2,5 μM)

^bRIPp = IC₅₀ P32/98 / IC₅₀ jedinjenja

Lai i saradnici su dizajnirali i sintetisali hibrid jedinjenja linagliptina i alogliptina, derivate purina, i ispitali njihov inhibitorski potencijal na DPP-4 (Lai i saradnici, 2014) (Tabela 45).

Tabela 45. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima purina (Lai i saradnici, 2014)

					
R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
	0,00133	0,58 ^b 1,98 ^c		0,00377	0,2 ^b 0,7 ^c

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: linagliptin, IC₅₀ = 0,00077 μM; alogliptin, IC₅₀ = 0,00263 μM)

^bRIPi = IC₅₀ linagliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPa = IC₅₀ alogliptina / IC₅₀ jedinjenja

Sagar i saradnici su dizajnirali, sintetisali i ispitali uticaj derivata pirazolo[3,4-*d*]pirimidinona na aktivnost DPP-4 (Tabela 46). 6-Metil-5-(4-metilpiridin-2-il)-1-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4(5*H*)-on je pokazao najveću efikasnost inhibicije *in vitro*, i hipoglikemijski efekat *in vivo* na pacovima. Azot pirimidinona gradi vodoničnu vezu sa Arg125, dok prsten učestvuje u π - π interakcijama u S₂ domenu proteaze. Karbonilna grupa se vezuje u S₁ domenu. Slobodan azot pirazola interaguje sa His740. Fenil supstituent pirazola se vezuje u hidrofobnom S₁ domenu proteaze. 4-Metilpiridin grupa vodoničnim vezama interaguje sa Asn710. Na osnovu analize odnosa struktura-aktivnost, u cilju povećanja inhibitornog potencijala, supstituenti koji se vezuju u S₂ domenu predstavljaju predmet modifikacija (Sagar i saradnici, 2015).

Tabela 46. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima pirazolo[3,4-*d*]pirimidinona (Sagar i saradnici, 2015)

R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
		1,32	0,01			1,06	0,02
		4	0,004			11	0,002
		24	0,001			2,23	0,01

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,018 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

DPP-4 inhibitora ima i među pirazolo[1,5-*a*]pirimidinon derivatima (Tabela 47). Supstitucija osnove u položaju 4 benzil grupom omogućava interakcije u S₁ domenu enzima. Cijano grupa u *orto* položaju benzil supstituenta formira vodoničnu vezu sa Arg125 i povećava stepen inhibicije. Uvođenjem (3-aminopiperidin-1-il) ili piperazin-1-il supstituenta

u položaj 5 osnove pokazano je da derivati sa piperazin-1-il grupom daju veću efikasnost. 2-((7-Okso-5-(piperazin-1-il)pirazolo[1,5-*a*]pirimidin-4(7*H*)-il)metil)benzonitril, najefikasniji derivat, obrazuje vodonične veze sa Glu205 i Glu206, π -katjon interakcije sa Arg125, i pokazuje povoljan efekat na toleranciju na glukozu *in vivo* na miševima obolelim od dijabetesa (Deng i saradnici, 2018).

Tabela 47. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima pirazolo[1,5-*a*]pirimidinona (Deng i saradnici, 2018)

R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
	2-CN	1,3	0,003		4-NO ₂	11,5	0,0003
	2-CN	0,08	0,05		4-NO ₂	17,2	0,0002
	H	46,5	0,0001		4-COOC ₂ H ₅	10,4	0,0004
	H	2,5	0,002		4-COOH	59,9	0,0001
	4-CH ₃	2	0,002		2-F	21,5	0,0002
	4-CH ₃	0,4	0,01		2-NO ₂	1,2	0,003

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: alogliptin, IC₅₀ = 0,004 μM)

^bRIP_a = IC₅₀ alogliptina / IC₅₀ jedinjenja

Derivati imidazo[1,5-*a*]pirazinona su ispitani na DPP-4 *in vitro* (Tabela 48). (2*R*)-4-Okso-4-[2-(3-karbamoilbenzil)-heksahidro-3-oksoimidazo[1,5-*a*]pirazin-7(8*H*)-il]-1-(2,4,5-trifluorofenil)butan-2-amin je pokazao najveći inhibitorski potencijal. 2,4,5-Trifluorofenil fragment se vezuje u S₁ hidrofobnom domenu enzima i interaguje sa Tyr662 π - π interakcijama. (3*R*)- β -amino grupa gradi vodikove veze sa Glu205 i Tyr662. Karbonilna grupa imidazopirazinona interaguje sa Ser209 vodikovom vezom. Vodikove veze uspostavljaju se i sa Tyr585 (Zhu i saradnici, 2010).

Tabela 48. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima imidazo[1,5-*a*]pirazinona (Zhu i saradnici, 2010)

trans-C₄H₄O₄

X	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	X	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
O	-	2,3	0,005	N		1,236	0,01
N	H	1,06	0,01	N		0,36	0,03
N	CH ₃	1,24	0,01	N		0,101	0,11
N	C ₂ H ₅	0,46	0,02	N		0,124	0,09
N		0,3	0,04	N		0,114	0,1
				N		0,078	0,14

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,011 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Difluorofenil analog sitagliptina pokazao je manji inhibitorni potencijal. Zamena triazolopiperazina imidazolonom i piperazinom nepovoljno je uticala na efektivnost, dok je uvođenje diazapanona dalo veću efikasnost. Trifluorofenil diazapanon je pokazao veći stepen inhibicije od difluorofenil analoga. Nesupstituisani diazapanon je pokazao manju efektivnost u odnosu na supstituisane. (3*R*)-4-[(3*R*)-3-amino-4-(2,4,5-trifluorofenil)butanoil]-3-(2,2,2-trifluoroetil)-1,4-diazepan-2-on je pokazao efikasnost i u testu tolerancije na glukozu na miševima. Amino grupa gradi vodoničnu vezu sa Glu205 i Glu206 proteaze. 2-F atom gradi vodoničnu vezu sa Asn710, dok karbonilna grupa interaguje sa hidroksilnom grupom Tyr547 enzima. Sedmočlani prsten biva smešten u hidrofobnom domenu iznad Phe357 proteaze (Biftu i saradnici, 2007a) (Tabela 49).

Tabela 49. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima triazolopiperazina, imidazolona, piperazina i diazapanona (Biftu i saradnici, 2007a)

R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
H		0,027	0,67	F		0,14	0,13
H		0,0072	2,5	F		0,016	1,12
H		0,16	0,11	F		0,0026	6,92
H		0,089	0,2	F		0,00091	19,78

H		0,014	1,29	F		0,00049	36,73
F		0,0066	2,73	F		0,00029	62,07

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,018 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Analizom odnosa struktura-aktivnost β-amino-amid derivata triazolo[4,3-*a*]pirazina dizajnirani su i sintetisani analozi sitagliptina. Pored ispitivanja uticaja halogena kao supstituenata na benzenovom prstenu β-amino-amida, uticaj supstituenata na triazolo[4,3-*a*]pirazinu je ispitivan u cilju povećanja efektivnosti i poboljšanja farmakokinetičkih karakteristika, pri čemu su se aril i heteroaril supstituenti pokazali efikasnim kao alkil ili perfluoroalkil supstituenti (Kim i saradnici, 2007) (Tabela 50).

Tabela 50. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 β-amino-amid triazolo[4,3-*a*]pirazin derivatima sa alikl i aril supstituisanim triazolom (Kim i saradnici, 2007)

R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
2-F	CF ₃	0,098	0,18	3,4- <i>di</i> -Cl	CF ₃	1,58	0,01
3-F	CF ₃	0,135	0,13	2,4- <i>di</i> -Cl	CF ₃	0,023	0,78
4-F	CF ₃	0,272	0,07	2,5- <i>di</i> -Cl	CF ₃	0,18	0,1
3,4- <i>di</i> -F	CF ₃	0,128	0,14	2-F, 5-Cl	CF ₃	0,021	0,86
2,4- <i>di</i> -F	CF ₃	0,082	0,22	2,5- <i>di</i> -F, 4-Cl	CF ₃	0,076	0,24

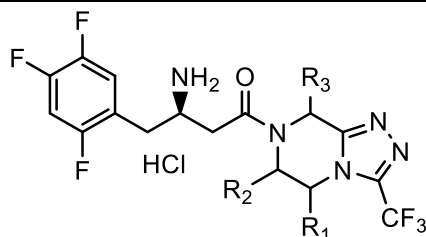
2,5- <i>di</i> -F	CF ₃	0,027	0,67	2-Cl, 4,5- <i>di</i> -F	CF ₃	0,084	0,21
2,3,5- <i>tri</i> -F	CF ₃	0,805	0,02	2,5- <i>di</i> -F		0,06	0,3
2,3,6- <i>tri</i> -F	CF ₃	0,151	0,12	2,5- <i>di</i> -F		0,03	0,6
2,4,6- <i>tri</i> -F	CF ₃	0,087	0,21	2,5- <i>di</i> -F		0,065	0,28
2,3,4,5,6- <i>penta</i> -F	CF ₃	1,018	0,02	2,5- <i>di</i> -F		0,19	0,09
2-CF ₃	CF ₃	0,486	0,04	2,5- <i>di</i> -F	CH ₂ OH	0,069	0,26
3-CF ₃	CF ₃	0,366	0,05	2,4,5- <i>tri</i> -F	C ₂ H ₅	0,037	0,49
4-CF ₃	CF ₃	0,511	0,04	2,4,5- <i>tri</i> -F		0,03	0,6
2-Cl	CF ₃	0,145	0,12	2,4,5- <i>tri</i> -F		0,029	0,62
3-Cl	CF ₃	0,059	0,31	2,4,5- <i>tri</i> -F		0,219	0,08
4-Cl	CF ₃	0,264	0,07	2,4,5- <i>tri</i> -F		0,234	0,08

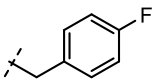
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,018 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Od β-amino-amid triazolo[4,3-*a*]pirazin derivata sa supstituisanim pirazinom, 4-fluorobenzil-supstituisan pirazin derivat je pokazao najveći potencijal inhibicije (Tabela 51). 2,4,5-Trifluorofenil grupa se vezuje u S₁ hidrofobnom domenu proteaze, dok (*R*)-β-amino grupa gradi vodonične veze sa Tyr662, Glu205 i Glu206. Karbonilni kiseonik interaguje sa Tyr547, triazolo[4,3-*a*]pirazin je postavljen naspram Phe357, trifluorometil grupa interaguje sa Arg358 i Ser209, dok (*R*)-4-fluorobenzil-grupa interaguje sa Tyr547, Arg125 i Ser630 proteaze (Kim i saradnici, 2008).

Tabela 51. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 β -amino-amid triazolo[4,3-*a*]pirazin derivatima sa supstituisanim pirazinom (Kim i saradnici, 2008)



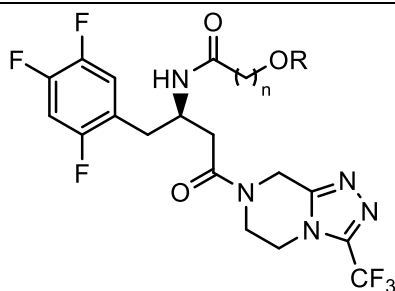
R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μ M) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μ M) ^a	RIP ^b
(<i>S</i>)-CH ₃	H	H	0,023	0,78	H	H	(<i>R</i>)-CH ₃	0,0043	4,19
(<i>R</i>)-CH ₃	H	H	0,014	1,29	<i>di</i> -CH ₃	H	H	0,092	0,2
H	(<i>S</i>)-CH ₃	H	0,091	0,2	H	H	<i>di</i> -CH ₃	0,175	0,1
H	(<i>R</i>)-CH ₃	H	0,042	0,43	H	H		0,00018	100
H	H	(<i>S</i>)-CH ₃	0,088	0,2					

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,018 μ M)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Disfunkcija azot monoksida je značajan faktor u razvoju i progresiji vaskularnih komplikacija dijabetesa. Multifunkcionalna jedinjenja sa hipoglikemijskim i vaskularno protektivnim efektom su od značaja u terapiji dijabetesa i komplikacija. Novi NO donor derivati sitagliptina, β -amino-amid triazolo[4,3-*a*]pirazin derivati sa supstituisanom β -amino grupom, su sintetisani i ispitani kao potencijalni multifunkcionalni hipoglikemijski agensi (Tabela 52). Sva sintetisana jedinjenja su pokazala dobar potencijal inhibicije DPP-4 *in vitro* i hipoglikemijski efekat *in vivo* na miševima sa dijabetesom, uz antioksidativne efekte, povećanje nivoa NO i suprimiranje agregacije trombocita. 2,4,5-Trifluorofenil fragment najefikasnijeg DPP-4 inhibitora vezuje se u S₁ domenu proteaze. Fluor u položaju 5 trifluorofenil ostatka interaguje sa Arg125 vodoničnim vezama. 3-(*R*)-amid grupa interaguje sa Glu206, dok triazolo[4,3-*a*]pirazin prsten interaguje sa Tyr547 π - π interakcijama. Duži alkil niz između fragmenta sitagliptina i nitrata daje derivate sa povoljnijim efektom na produkciju NO. Sva jedinjenja, i nitro estri i alkoholi, su pokazala sličan hipoglikemijski efekat (Xie i saradnici, 2018).

Tabela 52. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 β -amino-amid triazolo[4,3-*a*]pirazin derivatima sa supstituisanom β -amino grupom (Xie i saradnici, 2018)

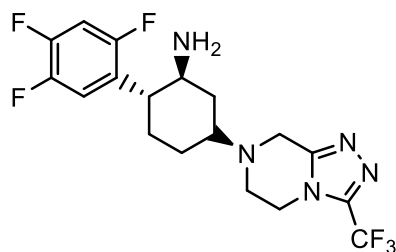


n	R	IC ₅₀ (μ M) ^a	RIP ^b	n	R	IC ₅₀ (μ M) ^a	RIP ^b
1	NO ₂	0,19	0,63	1	H	0,217	0,55
3	NO ₂	0,197	0,61	3	H	0,208	0,58
4	NO ₂	0,17	0,71	4	H	0,226	0,53
5	NO ₂	0,06	2	5	H	0,223	0,54

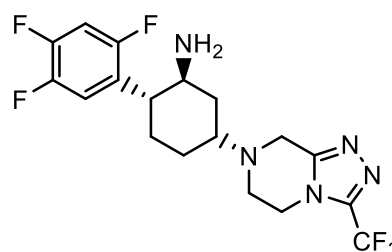
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,12 μ M)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

U strukturi sitagliptina trifluorofenil grupa je β -amino-butanoil grupom povezana sa triazolo[4,3-*a*]pirazinom. Zamenom β -amino-butanoil grupe rigidnim analogom, ciklohesilaminom, dobijen je novi DPP-4 inhibitor slične efikasnosti kao sitagliptin (Slika 12). Azot cikloheksilamina formira vodoničnu vezu sa Glu205, Glu206 i Tyr662. Triazolo[4,3-*a*]pirazin je postavljen iznad Phe357, trifluorometil grupa interaguje sa Arg358 i Ser209. Jedan od azota triazola vodoničnim vezama interaguje sa His126 i Glu205. Efikasniji konformer novog DPP-4 inhibitora je pokazao značajan dozno-zavistan hipoglikemijski efekat na miševima (Biftu i saradnici, 2007b).



IC₅₀^a = 0,021 μ M
RIP^b = 0,86



IC₅₀^a = 0,14 μ M
RIP^b = 0,13

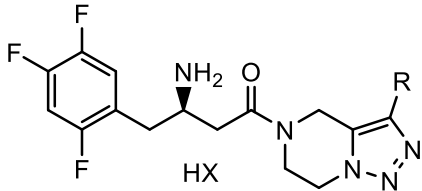
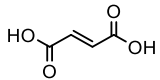
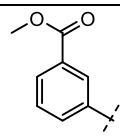
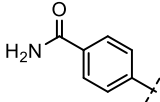
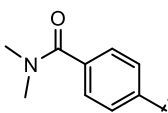
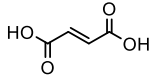
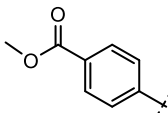
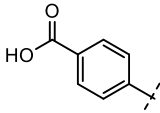
Slika 12. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatom triazolo[4,3-*a*]pirazina povezanim ciklohesilaminom sa trifluorofenil fragmentom (Biftu i saradnici, 2007b)

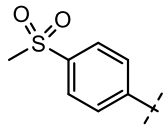
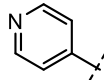
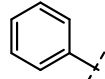
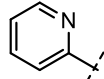
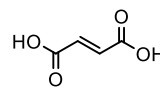
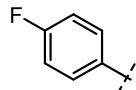
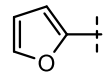
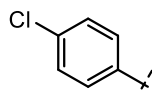
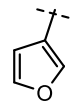
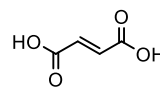
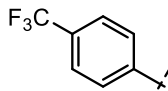
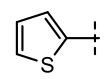
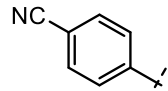
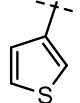
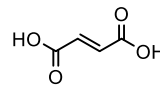
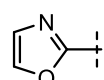
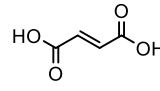
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,018 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Shan i saradnici su sintetisali [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]pirazin derivate i ispitali ih u testu inhibicije DPP-4. 4-Nesupstituisani derivat je pokazao najmanji stepen inhibicije. Uvođenje metoksikarbonil grupe u položaj 4 [1,2,3]triazola dalo je derivate efektivnije od onih sa alkil grupama. Ispitan je inhibicioni potencijal derivata sa supstituisanim fenil grupama i heteroaril supstituentima (Shan i saradnici, 2011) (Tabela 53).

Tabela 53. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]pirazin derivatima (Shan i saradnici, 2011)

							
R	HX	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R	HX	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
H		0,0895	0,22		HCl	0,04661	0,42
CH ₃	HCl	0,07706	0,25		HCl	0,03643	0,53
CF ₂ H	HCl	0,02253	0,86		HCl	0,02664	0,73
CF ₃		0,05066	0,38		H ₃ PO ₄	0,0124	1,56
COOCH ₃	HCl	0,01509	1,29		HCl	0,03378	0,57

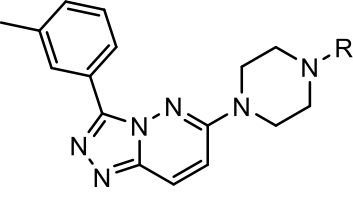
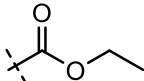
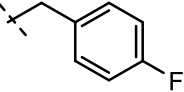
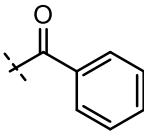
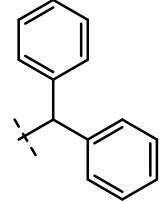
COONH ₂	HCl	0,02992	0,65		HCl	0,03317	0,58
COON(CH ₃) ₂	HCl	0,05234	0,37		HCl	0,0286	0,68
	H ₃ PO ₄	0,03754	0,52			0,03325	0,58
	H ₃ PO ₄	0,0452	0,43		HCl	0,0158	1,23
	HCl	0,04689	0,41			0,02617	0,74
	HCl	0,07535	0,26		HCl	0,02276	0,85
	HCl	0,03003	0,65			0,04727	0,41
						0,01783	1,09

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,0194 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptin / IC₅₀ jedinjenja

Sintetisana je serija 6-(piperazin-1-il)-3-(3-metil-fenil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina i ispitan njihov inhibitorni potencijal na DPP-4. Trp215 i Ser212 proteaze učestvuju u interakcijama ovih struktura sa enzimom vodoničnim vezama. Četiri efikasna DPP-4 inhibitora od sintetisanih derivata pokazala su i dobru insulinotropnu aktivnost na INS-1 ćelijama (Bindu i saradnici, 2020) (Tabela 54).

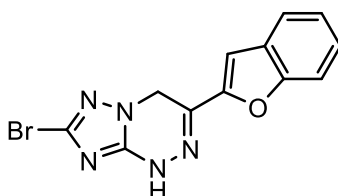
Tabela 54. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 6-(piperazin-1-il)-3-(3-metil-fenil)-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]piridazina (Bindu i saradnici, 2020)

					
R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
	0,00075	1,67		0,002	0,62
	0,00225	0,56		0,00175	0,71

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: linagliptin, IC₅₀ = 0,00125 μM)

^bRIP^b = IC₅₀ linagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Na osnovu analize heterocikličnih osnova ranije otkrivenih DPP-4 inhibitora Patel i saradnici su dizajnirali i sintetisali [1,2,4]triazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazin derivate i isptali njihov uticaj na aktivnost DPP-4 *in vitro*. Značajno na inhibitorni potencijal utiče veličina aromatičnog ciklusa kao P₁ fragmenta u položaju 3 [1,2,4]triazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazina. Usled nedovoljno interakcija fenil ostatka u S₁ domenu proteaze, veća efektivnost je postignuta uvođenjem benzofurana. Najefikasniji derivat je 3-(benzofuran-2-il)-7-bromo-1,4-dihidro-[1,2,4]triazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazin, koji je pokazao i hipoglikemijski efekat *in vivo* na pacovima (Patel i saradnici, 2017) (Slika 13).



IC₅₀^a = 28,05 μM

RIP^b = 0,001

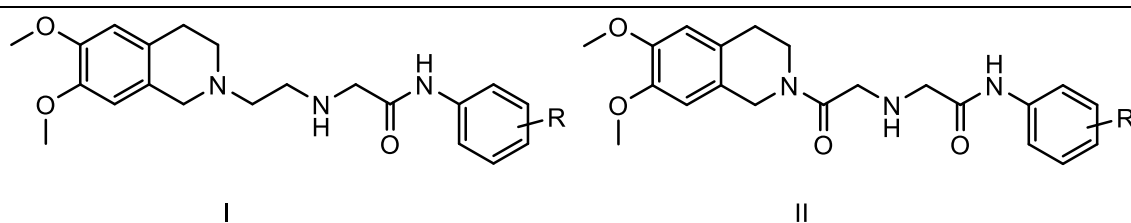
Slika 13. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatom [1,2,4]triazolo[5,1-*c*][1,2,4]triazina (Patel i saradnici, 2017)

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,018 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Na osnovu farmakofornog modela, derivati izohinolina su sintetisani i ispitan je njihov uticaj na aktivnost DPP-4 (Tabela 55). Rezultati ukazuju da acilovanje azota tetrahidroizohinolina pokazuje povoljan uticaj na stepen inhibicije. Derivat sa metil grupom u *meta* položaju acilovanih derivata je pokazao najveću efikasnost *in vitro* i hipoglikemijski efekat *in vivo* na miševima (Xing i saradnici, 2014).

Tabela 55. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima izohinolina (Xing i saradnici, 2014)

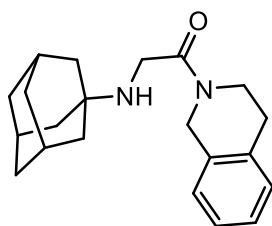


I/II	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	I/II	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
I	H	0,271	0,08	II	H	0,148	0,15
I	4-F	0,387	0,06	II	4-F	0,226	0,1
I	4-Cl	0,267	0,08	II	4-Cl	0,156	0,14
I	3-Cl-4-F	0,298	0,07	II	3-Cl-4-F	0,245	0,09
I	4-CN	0,494	0,04	II	4-CN	0,133	0,17
I	2,4- <i>di</i> -Cl	0,182	0,12	II	2,4- <i>di</i> -Cl	0,092	0,24
I	3-CH ₃	0,178	0,12	II	3-CH ₃	0,078	0,28

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,022 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Villhauer i saradnici su sintetisali i derivat izohinolina sa adamantil fragmentom koji je pokazao umereni inhibicioni potencijal na DPP-4 (Villhauer i saradnici, 2003) (Slika 14).



$$IC_{50}^a = 26,1 \mu M$$

$$RIP^b = 0,001$$

$$RIP^c = 0,0001$$

Slika 14. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatom izohinolina sa adamantil fragmentom (Villhauer i saradnici, 2003)

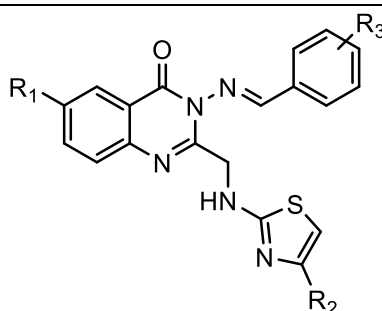
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: NVP-DPP728, IC₅₀ = 0,022 μM; vildagliptin, IC₅₀ = 0,0035 μM)

^bRIP_n = IC₅₀ NVP-DPP728 / IC₅₀ jedinjenja

^cRIP_v = IC₅₀ vildagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Ali i saradnici su dizajnirali i sintetisali seriju derivata hinazolin-4-ona, i ispitali njihov inhibitorni potencijal na DPP-4 (Tabela 56). (*E*)-3-(4-Hidroksibenzilidenamino)-6-metil-2-[(4-metiliazol-2-ilamino)-metil]-hinazolin-4(3*H*)-on je najefikasniji od ispitivanih struktura, i obrazuje vodoničnu vezu između azota hinazolina i Tyr631 enzima, interaguje sa Glu205 i Glu206, i gradi vodonične veze sa Arg125, Hie740 (His740 tautomer), Ser630 i Trp629. Ovo jedinjenje pokazuje i hipoglikemijski efekat na pacovima sa dijabetesom (Ali i saradnici, 2017a).

Tabela 56. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima hinazolin-4-ona (Ali i saradnici, 2017a)



R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
H	H	3-NO ₂	0,0158	0,05	I	CH ₃	4-OH	0,0163	0,05
H	H	4-OH	0,00152	0,5	CH ₃	H	H	0,0302	0,03

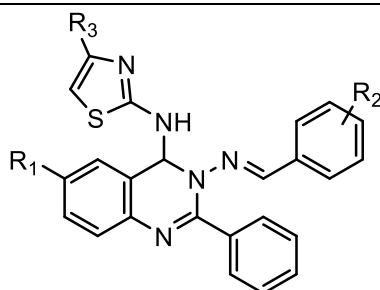
H	CH ₃	H	0,00149	0,51	CH ₃	H	2-CN	0,00132	0,58
H	CH ₃	2-CN	0,00125	0,61	CH ₃	H	4-OH	0,00168	0,45
H	CH ₃	3-NO ₂	0,00154	0,49	CH ₃	CH ₃	2-CN	0,00165	0,46
H	CH ₃	4-OH	0,00145	0,52	CH ₃	CH ₃	3-NO ₂	0,0173	0,04
I	H	4-OH	0,0194	0,04	CH ₃	CH ₃	4-OH	0,00112	0,68

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: linagliptin, IC₅₀ = 0,00076 μM)

^bRIP1 = IC₅₀ linagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Ali i saradnici su dizajnirali i sintetisali i hinazolin-3,4-diamin derivate (Tabela 57). 6-Jodo-*N*3-(3-nitrobenziliden)-2-fenil-*N*4-(tiazol-2-il)-hinazolin-3,4-(4*H*)-diamin je inhibirao aktivnost DPP-4 sa najnižom IC₅₀ vrednošću od svih ispitivanih struktura, sa najznačajnijim stepenom smanjenja glikemije kod pacova sa dijabetesom. Najefikasniji inhibitor interaguje vodoničnim vezama sa Arg125 i Arg699 enzima, π-interakcijama sa Phe357 i Tyr547, i hidrofobnim interakcijama koje bivaju uspostavljene sa Glu205, Tyr662, Tyr631, Asn710, Trp659, Ser630, Gly632, Val546, Hie740 i Lys554 (Ali i saradnici, 2017b).

Tabela 57. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima hinazolin-3,4-diamina (Ali i saradnici, 2017b)



R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
H	H	H	0,01367	0,02	H	H	CH ₃	0,00817	0,04
H	3-NO ₂	H	0,00133	0,24	H	3-NO ₂	CH ₃	0,00219	0,15
H	4-OCH ₃	H	0,00282	0,11	H	4-OCH ₃	CH ₃	0,00242	0,13
H	4-N(CH ₃) ₂	H	0,00864	0,04	H	4-N(CH ₃) ₂	CH ₃	0,00672	0,05
H	2-OCH ₃	H	0,00651	0,05	H	2-OCH ₃	CH ₃	0,00421	0,08
I	H	H	0,01226	0,03	I	H	CH ₃	0,00724	0,04
I	3-NO ₂	H	0,00076	0,42	I	3-NO ₂	CH ₃	0,00122	0,26
I	4-OCH ₃	H	0,00162	0,2	I	4-OCH ₃	CH ₃	0,00182	0,18

I	4-N(CH ₃) ₂	H	0,00783	0,04	I	4-N(CH ₃) ₂	CH ₃	0,00653	0,05
I	2-OCH ₃	H	0,00348	0,09	I	2-OCH ₃	CH ₃	0,00398	0,08

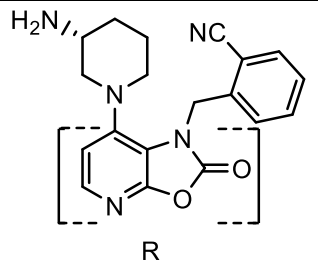
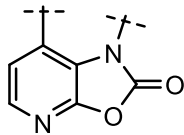
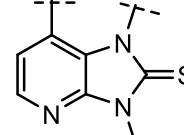
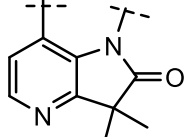
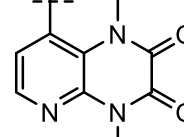
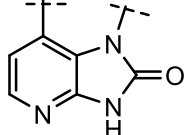
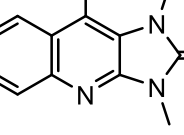
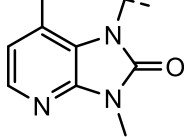
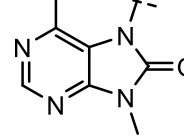
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: linagliptin, IC₅₀ = 0,00032 μM)

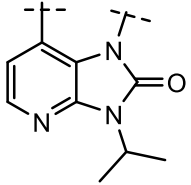
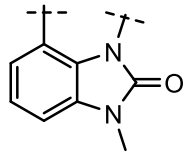
^bRIP1 = IC₅₀ linagliptina / IC₅₀ jedinjenja

1.6.7. Triciklični derivati

Shu i saradnici su ispitali inhibitorni potencijal bicikličnih i tricikličnih jedinjenja dobijenih modifikacijama pirido[3,2-*d*]oksazolona (Shu i saradnici, 2014) (Tabela 58).

Tabela 58. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 bicikličnim i tricikličnim jedinjenjima dobijenim modifikacijama pirido[3,2-*d*]oksazolona (Shu i saradnici, 2014)

					
R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
	0,1	0,29 ^b 0,07 ^c		38	0,001 ^b 0,0002 ^c
	3,4	0,01 ^b 0,002 ^c		55	0,001 ^b 0,0001 ^c
	0,045	0,64 ^b 0,16 ^c		1,1	0,03 ^b 0,01 ^c
	0,013	2,23 ^b 0,54 ^c		0,01	2,9 ^b 0,7 ^c

	0,48	0,06 ^b 0,01 ^c		0,045	0,64 ^b 0,16 ^c
---	------	--	--	-------	--

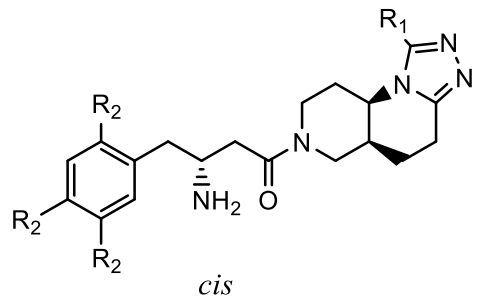
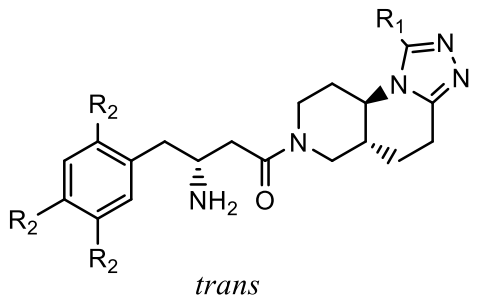
^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,029 μM; alogliptin, IC₅₀ = 0,007 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPa = IC₅₀ alogliptina / IC₅₀ jedinjenja

Schwehm i saradnici su sintetisali nove derivate tricikličnih [1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,6]naftiridina. Među ispitanim analogima *cis* izomeri su pokazali veći inhibicioni potencijal u poređenju sa *trans* izomerima. Odsustvo fluora kao supstituenta fenil fragmenta je smanjilo stepen inhibicije (Schwehm i saradnici, 2015) (Tabela 59).

Tabela 59. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima [1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,6]naftiridina (Schwehm i saradnici, 2015)

 <p style="text-align: center;"><i>cis</i></p>					 <p style="text-align: center;"><i>trans</i></p>				
<i>cis/trans</i> izomer	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b	<i>cis/trans</i> izomer	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
<i>cis</i>	CF ₃	H	0,695	0,03	<i>trans</i>	C ₂ H ₅	F	0,108	0,2
<i>trans</i>	CF ₃	H	2,801	0,01	<i>cis</i>	CF ₂ CF ₃	F	0,067	0,33
<i>cis</i>	C ₂ H ₅	F	0,085	0,26	<i>trans</i>	CF ₂ CF ₃	F	0,258	0,09

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,022 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Na osnovu struktura sitagliptina, alogliptina i linagliptina Wu i saradnici su dizajnirali i sintetisali nove imidazo[1,2-*a*]purin derivate i ispitali njihov inhibicioni potencijal na DPP-4 (Tabela 60). Najaktivnije jedinjenje je pokazalo hipoglikemijski efekat *in vivo* na miševima. Amino grupa interaguje sa Glu205 i Glu206. Nitril grupa gradi

vodoničnu vezu sa Arg125. Tricikličan fragment interaguje sa Tyr547, uz formiranje vodoničnih veza sa Tyr631, Trp629 i Lys554 (Wu i saradnici, 2016a).

Tabela 60. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima imidazo[1,2-*a*]purina (Wu i saradnici, 2016a)

R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
CH ₃		0,123	0,06 ^b 0,001 ^c	CH ₃		0,1561	0,05 ^b 0,001 ^c
CH ₃		0,0106	0,72 ^b 0,01 ^c	C ₂ H ₅		0,0135	0,56 ^b 0,01 ^c
CH ₃		0,0017	4,47 ^b 0,06 ^c	C ₂ H ₅		0,0112	0,68 ^b 0,01 ^c
CH ₃		0,0274	0,28 ^b 0,004 ^c	C ₂ H ₅		0,625	0,01 ^b 0,0002 ^c

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: alogliptin, IC₅₀ = 0,0076 μM; linagliptin, IC₅₀ = 0,0001 μM)

^bRIPa = IC₅₀ alogliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPi = IC₅₀ linagliptina / IC₅₀ jedinjenja

Počevši od izodafnetina, serija novih 2-fenil-benzo[*f*]hromen-3-amin derivata je dizajnirana i sintetisana. Za komplementarnost vezivanja sa proteazom elektron donor supstituenti su pogodni u R₁ položaju benzo[*f*]hromena, dok su elektron akceptor grupe povoljnije u R₂ položaju. Metoksi grupu u R₁ položaju, i metoksi/metilsulfonyl grupu u R₂ položaju imaju dva najaktivnija derivata. Van der Valsovim interakcijama i vodoničnim vezama kiseonik metoksi grupe u R₁ položaju interaguje sa Ser209, a kiseonik metilsulfonyl

grupe gradi vodonične veze sa Trp985 proteaze. Dva najaktivnija jedinjenja pokazuju i hipoglikemijski efekat na miševima (Li i saradnici, 2016b) (Tabela 61).

Tabela 61. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 2-fenil-benzo[f]hromen-3-amin derivatima (Li i saradnici, 2016b)

R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
H	H	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,1101 ^d	0,06 ^b 0,02 ^c	H		2,4,5- <i>tri</i> -F	0,07042 ^d	0,09 ^b 0,03 ^c
OCH ₃	H	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,06061 ^d	0,1 ^b 0,04 ^c	H		2,4,5- <i>tri</i> -F	0,0109 ^d	0,57 ^b 0,2 ^c
OCH ₃	H	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,01495 ^e	0,42 ^b 0,15 ^c	H		2,4,5- <i>tri</i> -F	0,00891 ^e	0,7 ^b 0,25 ^c
OCH ₃	H	2,4,5- <i>tri</i> -F	2,93 ^f	0,002 ^b 0,001 ^c	H		2,4,5- <i>tri</i> -F	0,01071 ^d	0,58 ^b 0,21 ^c
Br	H	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,2162 ^d	0,03 ^b 0,01 ^c	H		2,4,5- <i>tri</i> -F	0,0058 ^e	1,08 ^b 0,38 ^c
CN	H	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,2052 ^d	0,03 ^b 0,01 ^c	OCH ₃	OCH ₃	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,00206 ^e	3,03 ^b 1,08 ^c
	H	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,0146 ^d	0,43 ^b 0,15 ^c	OCH ₃		2,4,5- <i>tri</i> -F	0,00613 ^e	1,02 ^b 0,36 ^c
H	OCH ₃	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,04973 ^d	0,13 ^b 0,04 ^c	OCH ₃		2,4,5- <i>tri</i> -F	0,0019 ^e	3,28 ^b 1,17 ^c
H	OCH ₃	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,01964 ^e	0,32 ^b 0,11 ^c	OCH ₃	H	2,4- <i>di</i> -F	0,07833 ^d	0,08 ^b 0,03 ^c
H	OCH ₃	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,81344 ^f	0,01 ^b 0,003 ^c	OCH ₃	H	2-F	0,5639 ^d	0,01 ^b 0,004 ^c

H	Br	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,0392 ^d	0,16 ^b 0,06 ^c	OCH ₃	H	2,5- <i>di</i> -F	0,03264 ^d	0,19 ^b 0,07 ^c
H	CN	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,00842 ^d	0,74 ^b 0,26 ^c	OCH ₃	H	3-F	0,12156 ^d	0,05 ^b 0,02 ^c
H	CN	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,00517 ^e	1,21 ^b 0,43 ^c	OCH ₃	H	2-Cl	0,3378 ^d	0,02 ^b 0,01 ^c
H	COOH	2,4,5- <i>tri</i> -F	0,01765 ^d	0,35 ^b 0,13 ^c					

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,00624 μM; omarigliptin, IC₅₀ = 0,00222 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPo = IC₅₀ omarigliptina / IC₅₀ jedinjenja

^dracemat

^e(2*R*,3*S*)

^f(2*S*,3*R*)

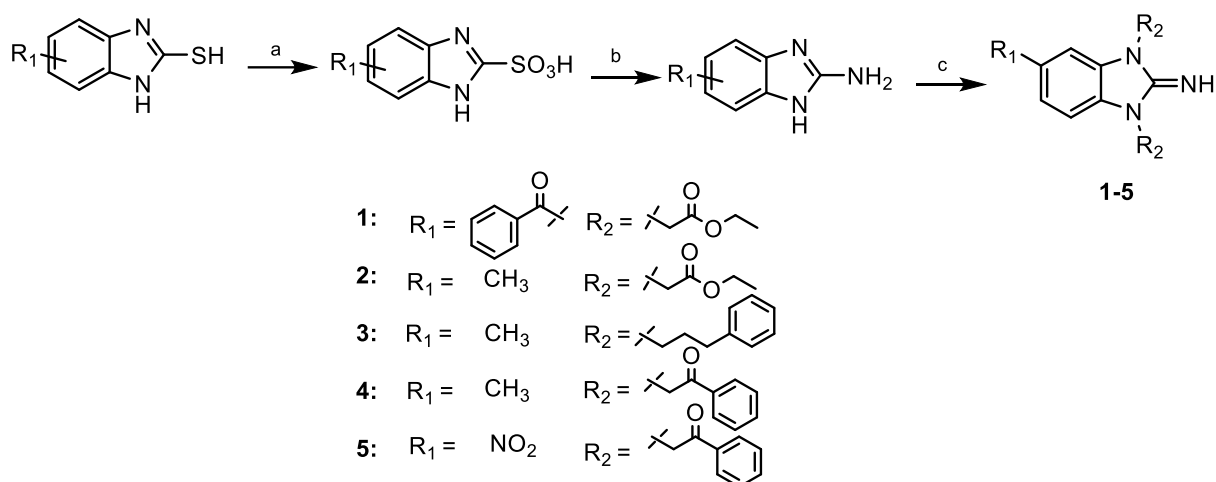
2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje inhibitornog potencijala mono-, bi- i tricikličnih derivata imidazola, tiazola, piridina, pirana, pirimidina i morfolina na dipeptidil peptidazi-4 *in vitro*, razjašnjavanje kinetike, mehanizma inhibicije proteaze i odnosa struktura-aktivnost najefikasnijih inhibitora. U cilju procene potencijalne toksičnosti, efikasni inhibitori su podvrgnuti testu citotoksičnosti na Caco-2 ćelijama. Nakon ispitivanja uticaja struktura koje inhibiraju dipeptidil peptidazu-4 na aktivnost i ksantin oksidaze u cilju izdvajanja predstavnika potencijalnih dualnih inhibitora, razmatrani su značaj, mehanizmi i putevi višestrukih biohemijskih efekata inhibicije dipeptidil peptidaze-4, plejotropni efekti postojećih i novih, među kojima i onih pronađenih u ovoj disertaciji, inhibitora ove multifunkcionalne proteaze u cilju procene mogućnosti proširenja spektra indikacija.

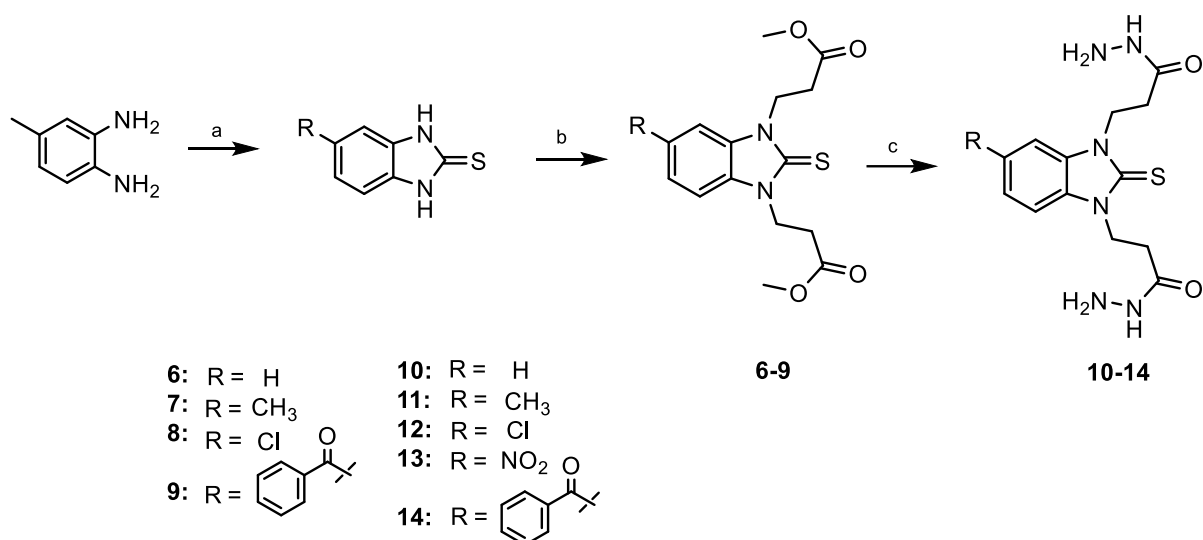
3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitivana jedinjenja

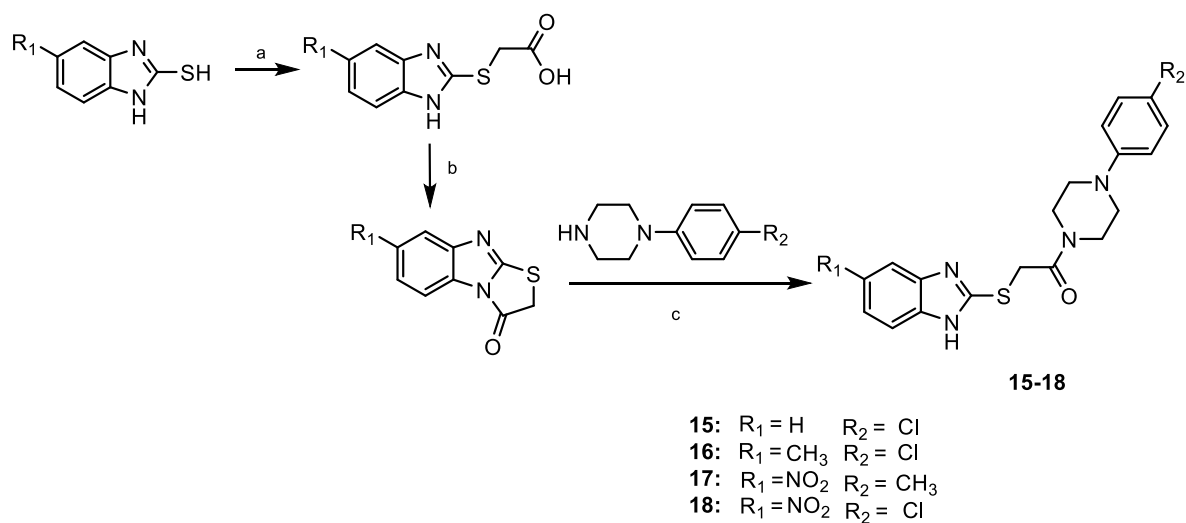
Ispitivani mono-, bi- i triciklični derivati imidazola, tiazola, piridina, pirana, pirimidina i morfolina (**1-117**) sintetisani su objavljenim sintetičkim putevima (Šeme 1-23) (Mavrova i saradnici, 2015; Anastassova i saradnici, 2018; Mavrova i saradnici, 2006; Mavrova i saradnici, 2007; Mavrova i saradnici, 2005; Kolarević i saradnici, 2019; Stojanović i saradnici, 2011; Marković i saradnici, 2006; Džambaski i saradnici, 2013; Bondžić i saradnici, 2012; Marković i saradnici, 2003; Mavrova i saradnici, 2014; Mavrova i saradnici, 2016; Mavrova i saradnici, 2018; Cherneva i saradnici, 2017; Yancheva i saradnici, 2015; Smelcerovic i saradnici, 2011).



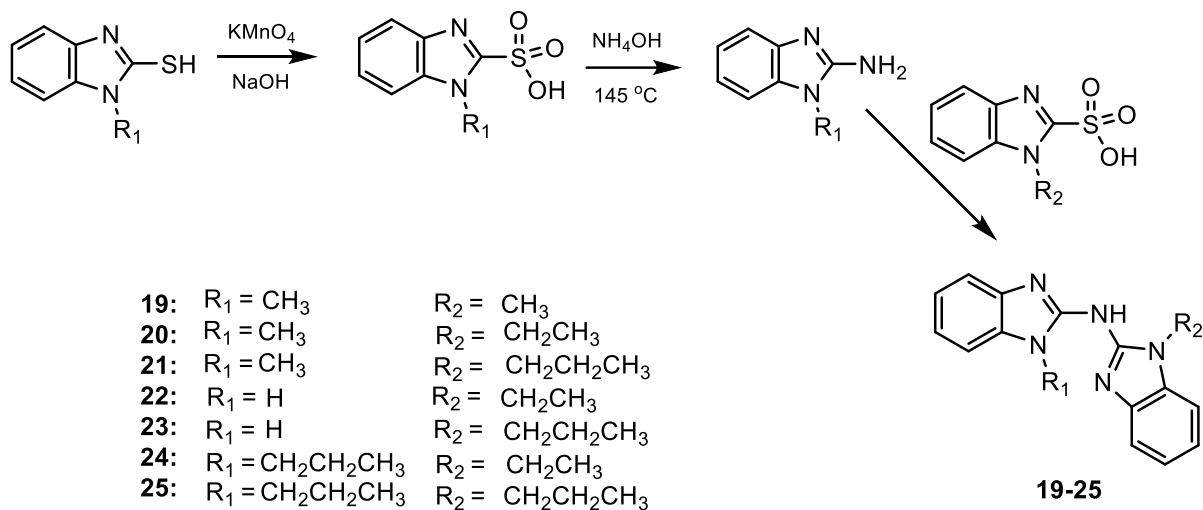
Šema 1. Sinteza derivata benzimidazol-2-imina (**1-5**). Reagensi i uslovi: a) KMnO₄, NaOH rastvor u vodi, refluks; b) NH₄OH, 150 °C; c) tetra-*n*-butilamonijum bromid, suvi K₂CO₃, halogeni derivat, 25 °C, acetonitril (Mavrova i saradnici, 2015)



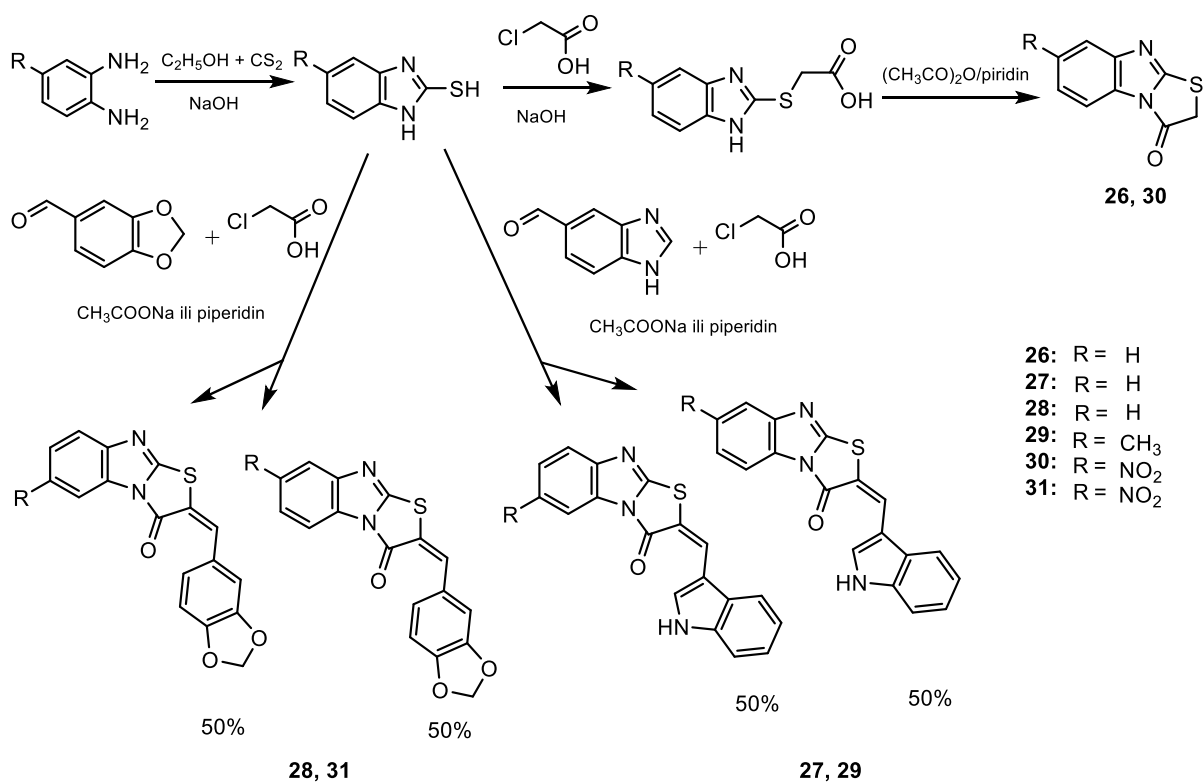
Šema 2. Sinteza derivata benzimidazol-2-tiona (**6-14**). Reagensi i uslovi: a) CS₂, KOH rastvor u etanolu, refluks; b) metil akrilat, dimetilformamid, refluks; c) hidrazin hidrat, rastvor u etanolu, refluks (Anastassova i saradnici, 2018)



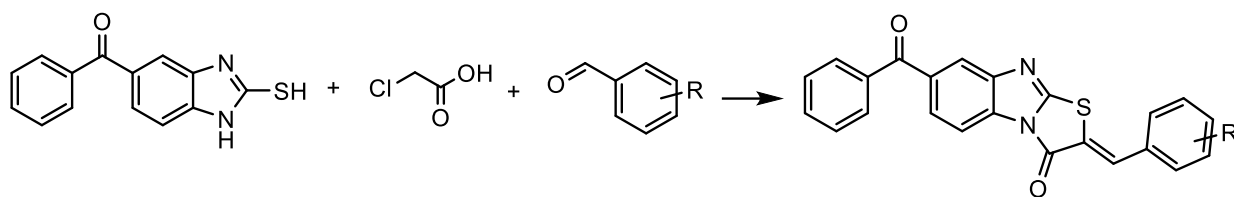
Šema 3. Sinteza derivata benzimidazol-2-il-tioacetilpiperazina (**15-18**). Reagensi i uslovi: a) ClCH₂COOH, NaOH, etanol; b) (CH₃CO)₂O/piridin, refluks; c) etanol, refluks (Mavrova i saradnici, 2006)



Šema 4. Sinteza derivata bis(benzimidazol-2-il)amina (**19-25**) (Mavrova i saradnici, 2007)

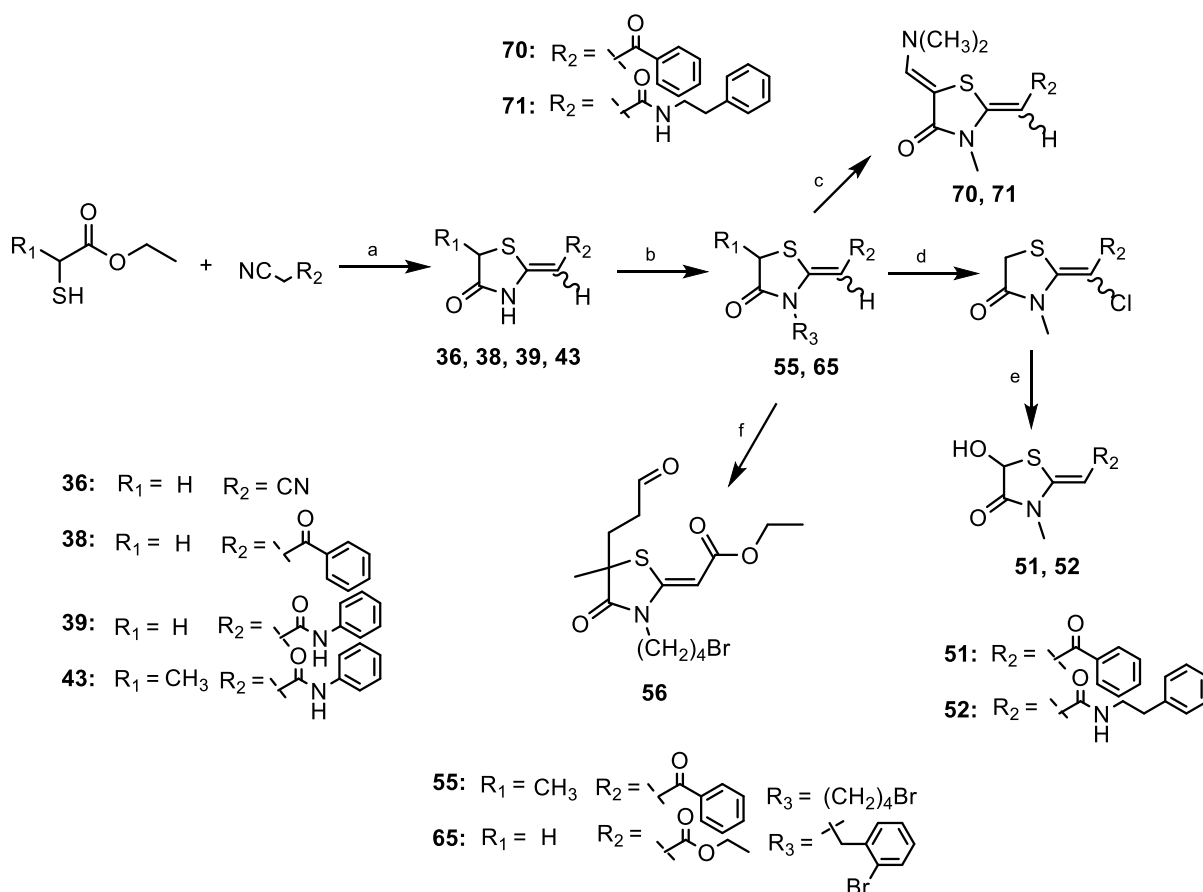


Šema 5. Sinteza derivata [1,3]tiazolo[3,2-a]benzimidazol-3-ona (**26-31**) (Mavrova i saradnici, 2005)

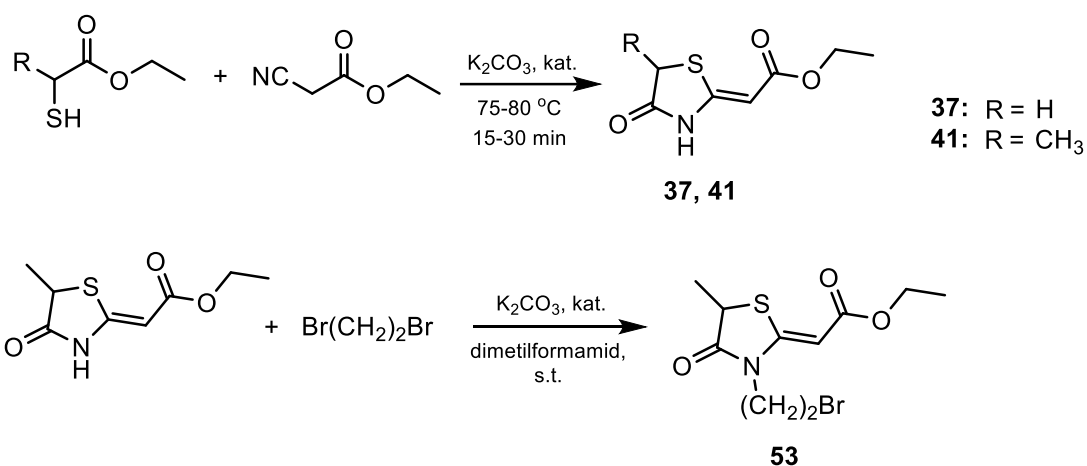


- 32:** R = *o*-OCH₃ **32-35**
33: R = *o*-F
34: R = *p*-F
35: R = 1,3-dioksolil

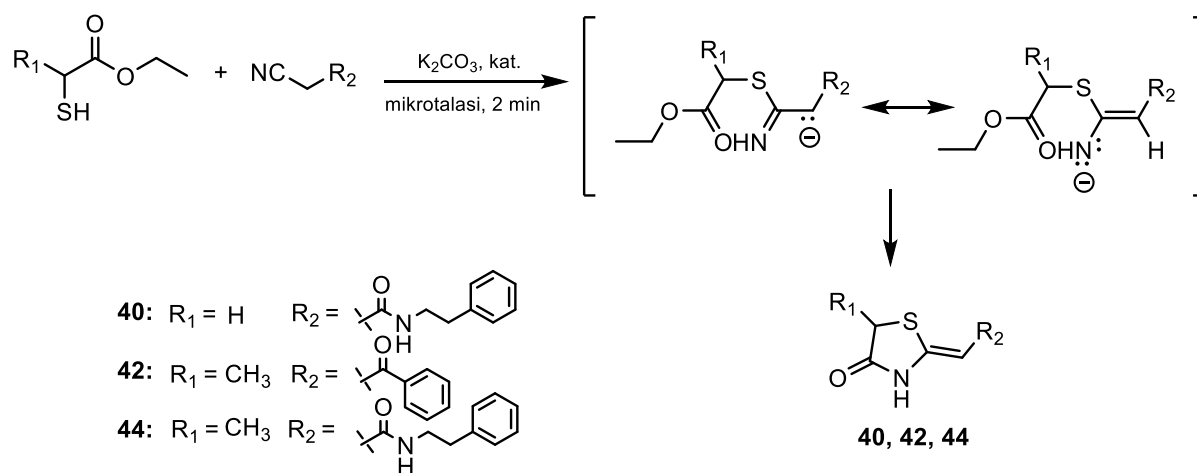
Šema 6. Sinteza derivata 6-(fenilkarbonil)-[1,3]tiazolo[3,2-*a*]benzimidazol-3-ona (**32-35**) (Mavrova i saradnici, 2015)



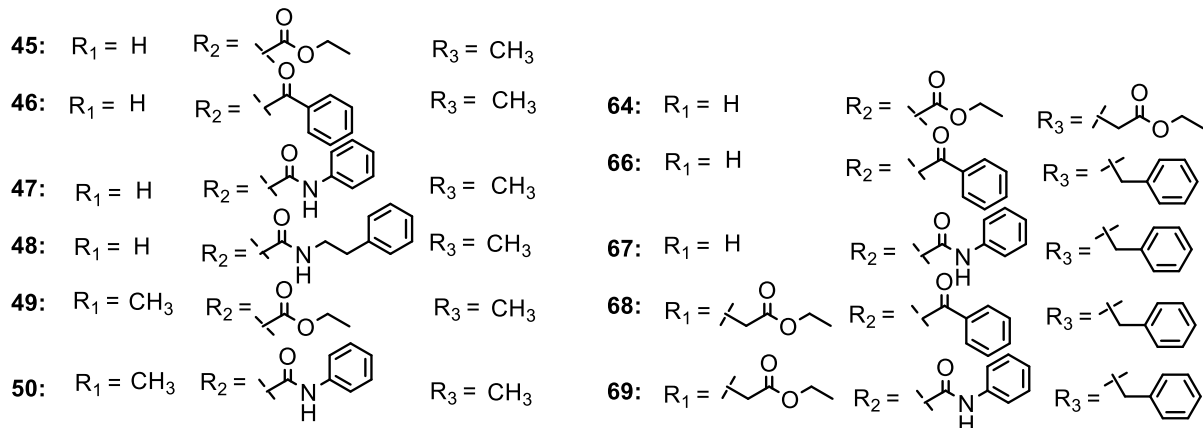
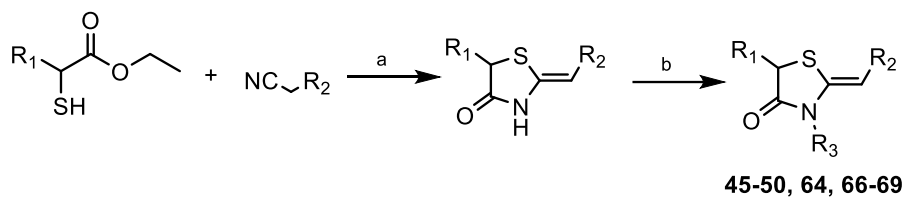
Šema 7. Sinteza derivata tiazolidin-4-ona (**36, 38, 39, 43, 51, 52, 55, 56, 65, 70, 71**). Reagens i uslovi: a) K₂CO₃ (kat.), etanol, refluks; b) CH₃I, *o*-BrC₆H₄CH₂Br, ili Br(CH₂)₄Br, (1,1-1,5 ekv.), K₂CO₃ (1-1,2 ekv.), dimetilformamid, s.t.; c) C(CH₃)₃OCH(N(CH₃)₂)₂ (1,5 ekv.), toluen, 110 °C; d) (i) *meta*-hloroperoksibenzoeva kiselina (1,2-2 ekv.), CH₂Cl₂, 0 °C; (ii) SOCl₂ (1,1 ekv.), CH₂Cl₂, -10 °C → s.t.; e) dimetil sulfoksid, 70 °C; f) K₂CO₃ (0,1 ekv.), akrolein (1,2 ekv.), dimetilformamid, s.t. (Kolarević i saradnici, 2019)



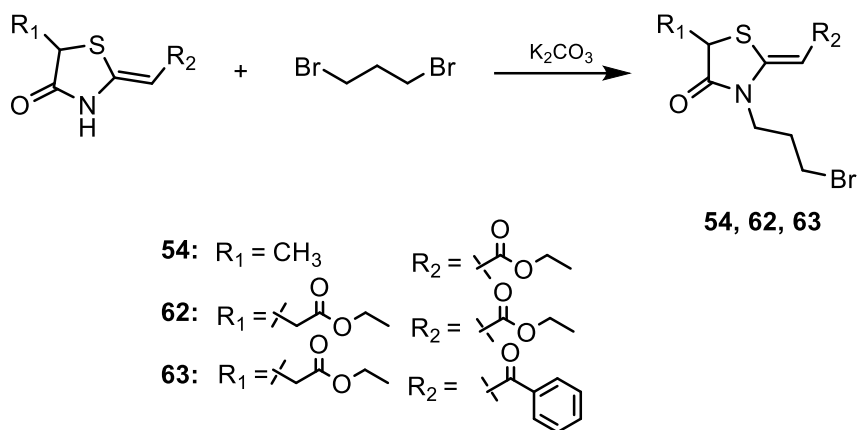
Šema 8. Sinteza derivata tiazolidin-4-ona (**37, 41, 53**) (Stojanović i saradnici, 2011)



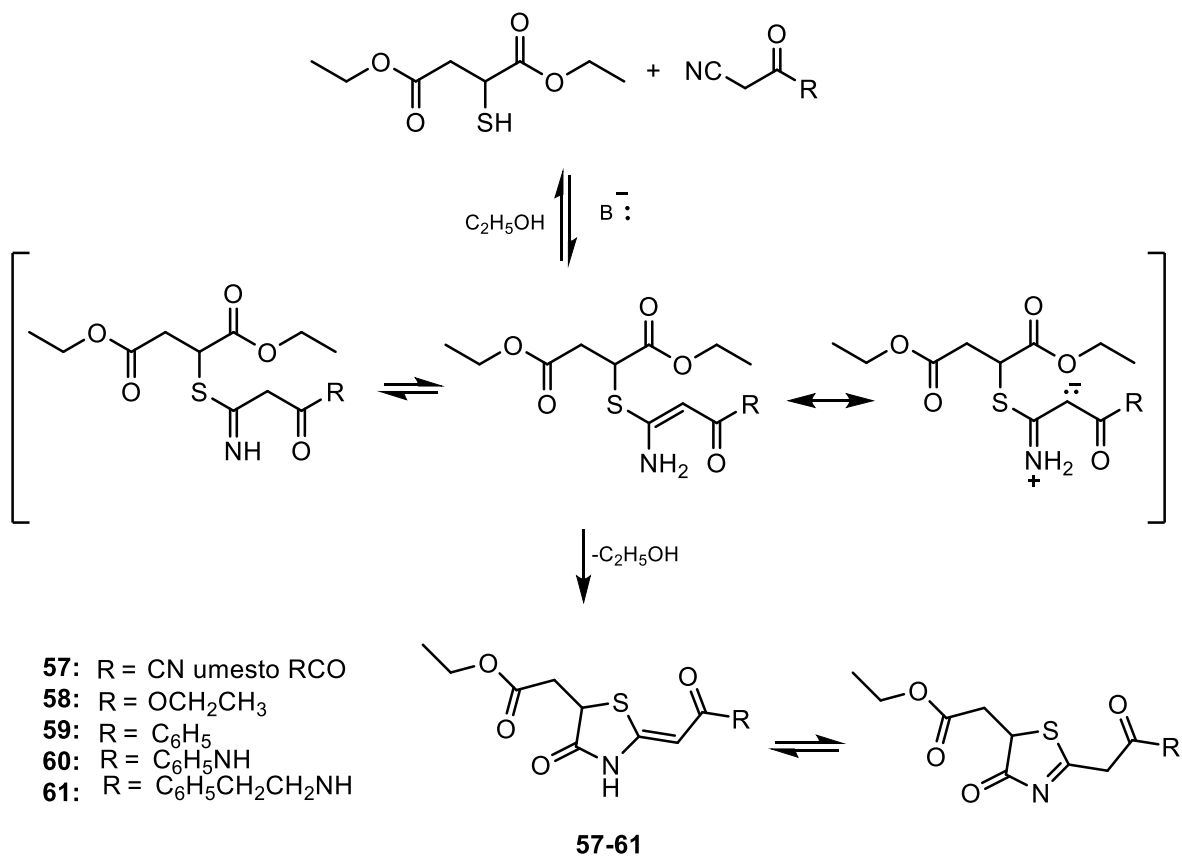
Šema 9. Sinteza derivata tiazolidin-4-ona (**40, 42, 44**) (Marković i saradnici, 2006)



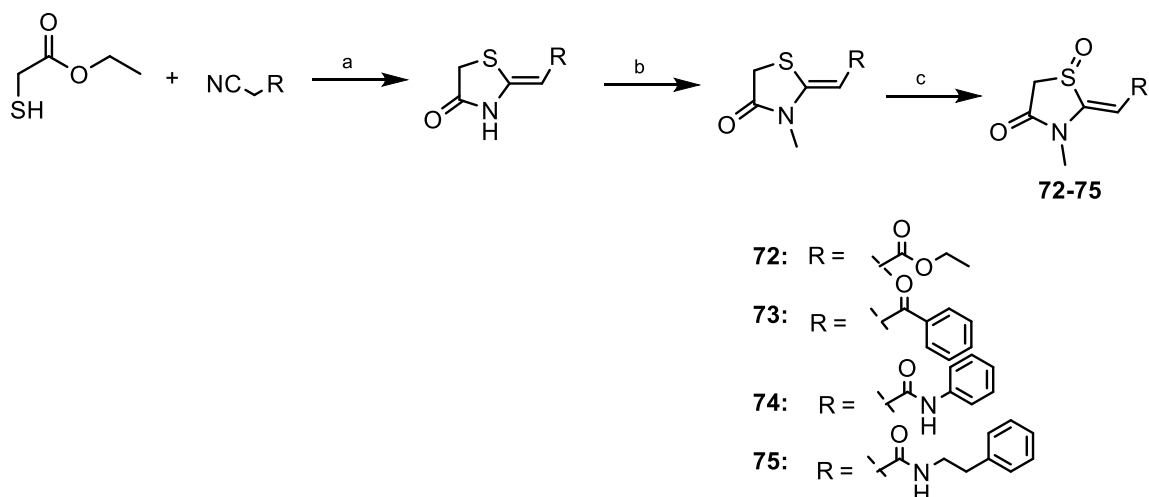
Šema 10. Sinteza derivata tiazolidin-4-ona (**45-50, 64, 66-69**). Reagensi i uslovi: a) K_2CO_3 (kat.), etanol, refluks; b) CH_3I , $C_6H_4CH_2Br$, $Br(CH_2)_3Br$, ili $BrCH_2COOC_2H_5$ (1,1-1,5 ekv.), K_2CO_3 (1 ekv.), dimetilformamid, s.t. (Džambaski i saradnici, 2013)



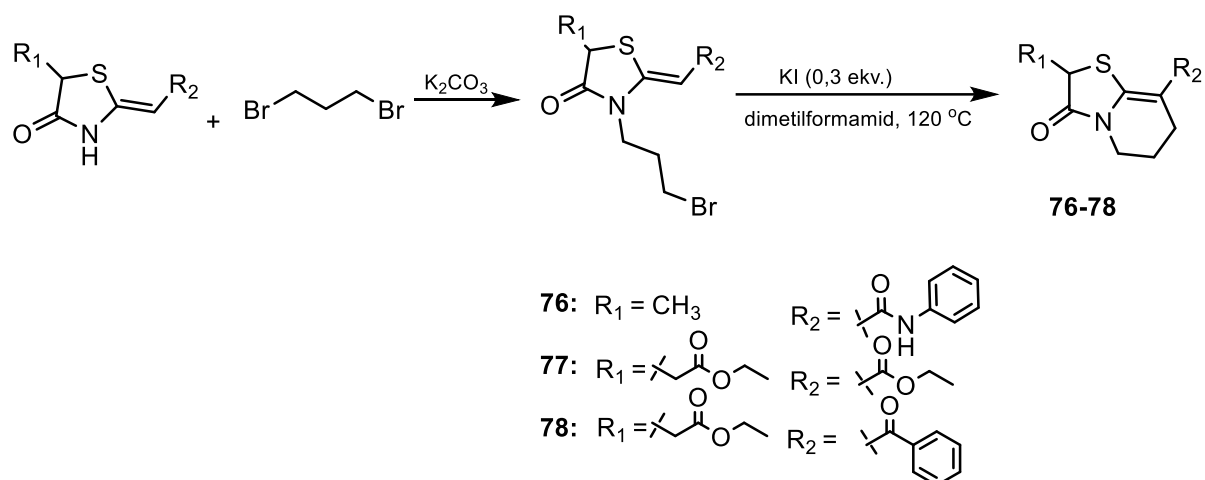
Šema 11. Sinteza derivata tiazolidin-4-ona (**54, 62, 63**) (Bondžić i saradnici, 2012)



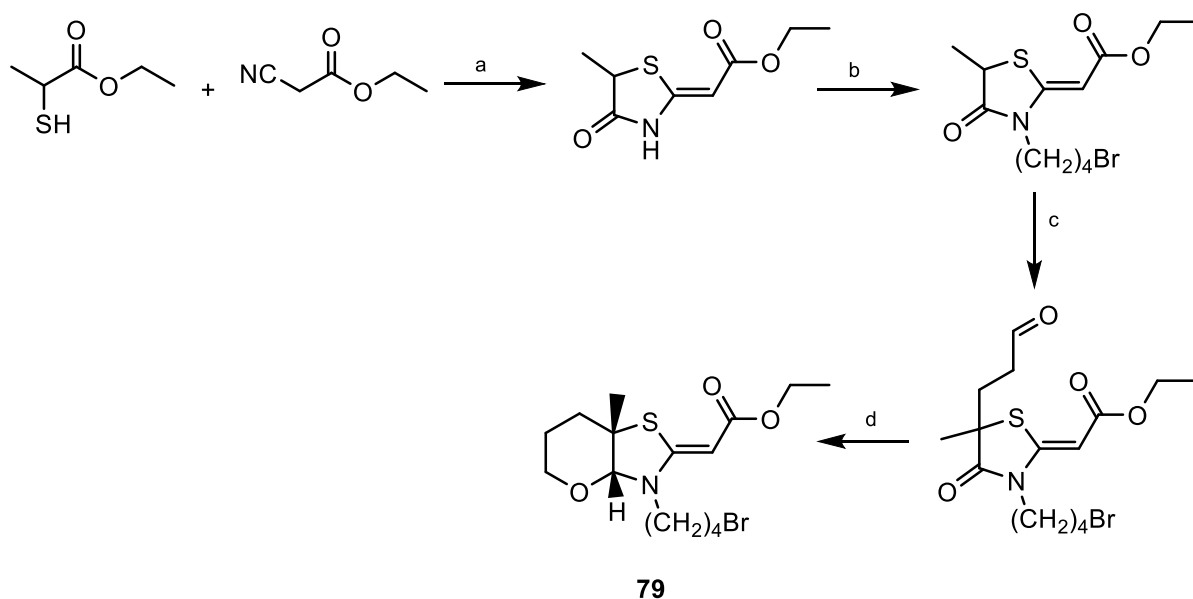
Šema 12. Sinteza derivata tiazolidin-4-ona (**57-61**) (Marković i saradnici, 2003)



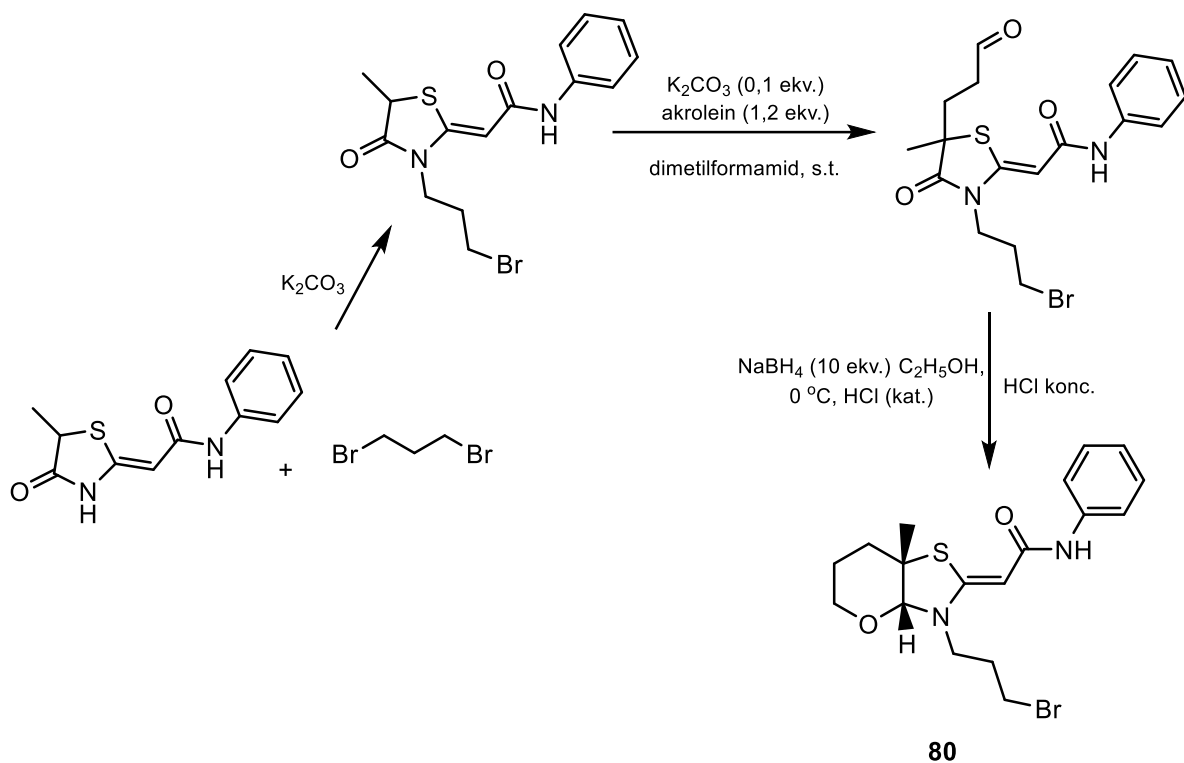
Šema 13. Sinteza derivata 4-oksotiazolidin-S-oksida (**72-75**). Reagensi i uslovi: a) K₂CO₃ (kat.), etanol, refluks; b) CH₃I, C₆H₄CH₂Br, Br(CH₂)₃Br, ili BrCH₂COOC₂H₅ (1,1-1,5 ekv.), K₂CO₃ (1 ekv.), dimetilformamid, s.t.; c) *meta*-hloroperoksibenzoeva kiselina (1,5-2 ekv.), CH₂Cl₂, 0 °C (Džambaski i saradnici, 2013)



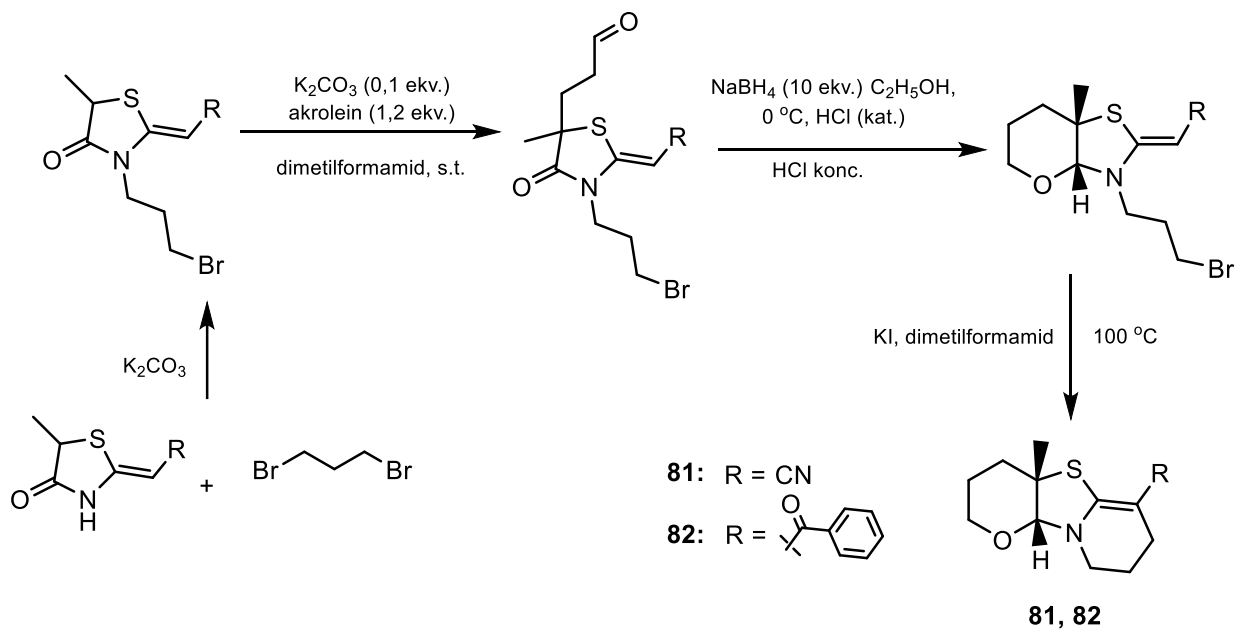
Šema 14. Sinteza derivata tiazolo[3,2-*a*]piridina (**76-78**) (Bondžić i saradnici, 2012)



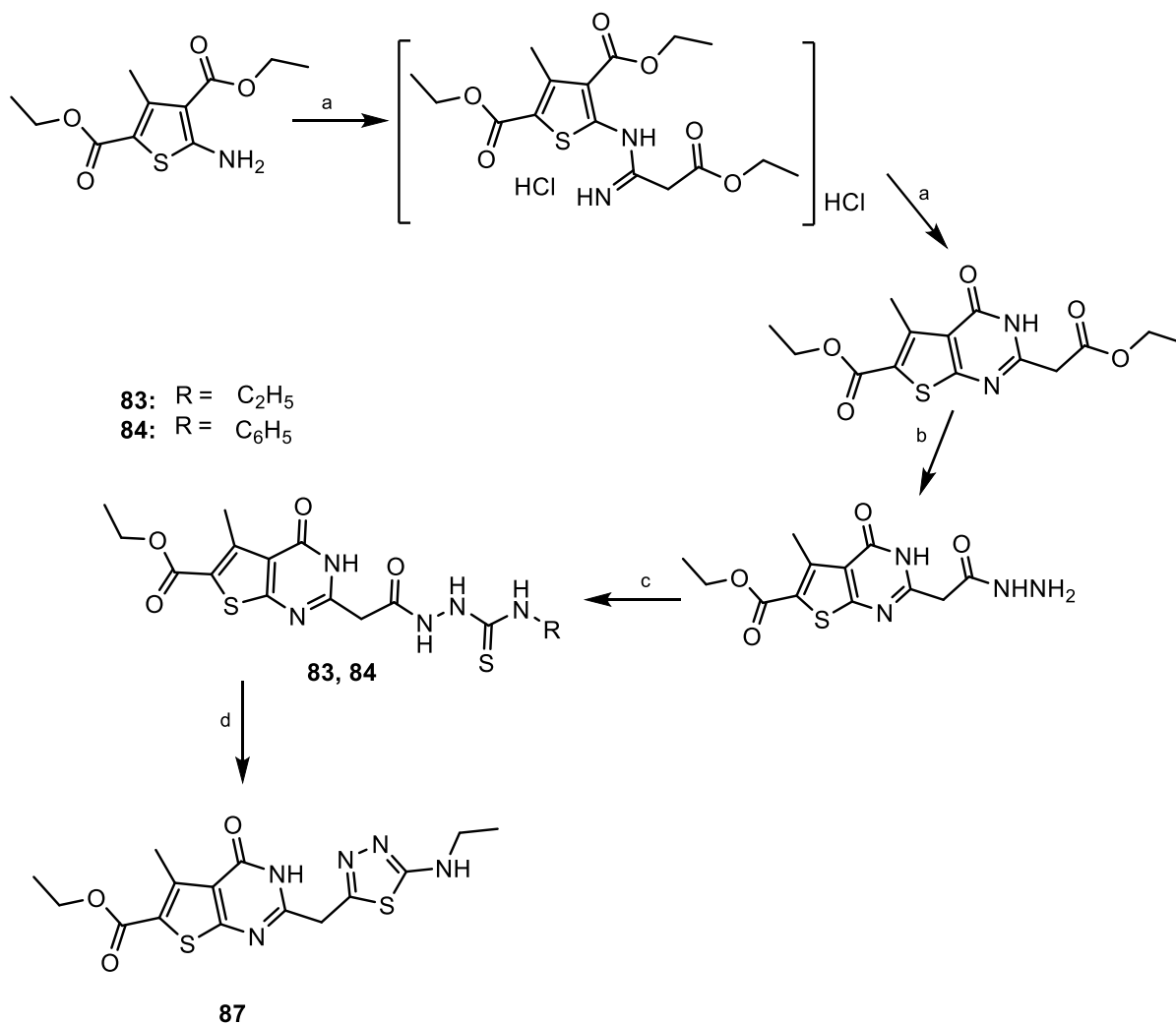
Šema 15. Sinteza derivata pirano[2,3-*d*]tiazola (**79**). Reagensi i uslovi: a) K_2CO_3 (kat.), etanol, refluks; b) CH_3I , $\text{o-BrC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{Br}$, ili $\text{Br}(\text{CH}_2)_4\text{Br}$, (1,1-1,5 ekv.), K_2CO_3 (1-1,2 ekv.), dimetilformamid, s.t.; c) K_2CO_3 (0,1 ekv.), akrolein (1,2 ekv.), dimetilformamid, s.t.; d) i) NaBH_4 (10 ekv.), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, $0\text{ }^\circ\text{C}$, HCl (kat.); ii) HCl konc. (Kolarević i saradnici, 2019)



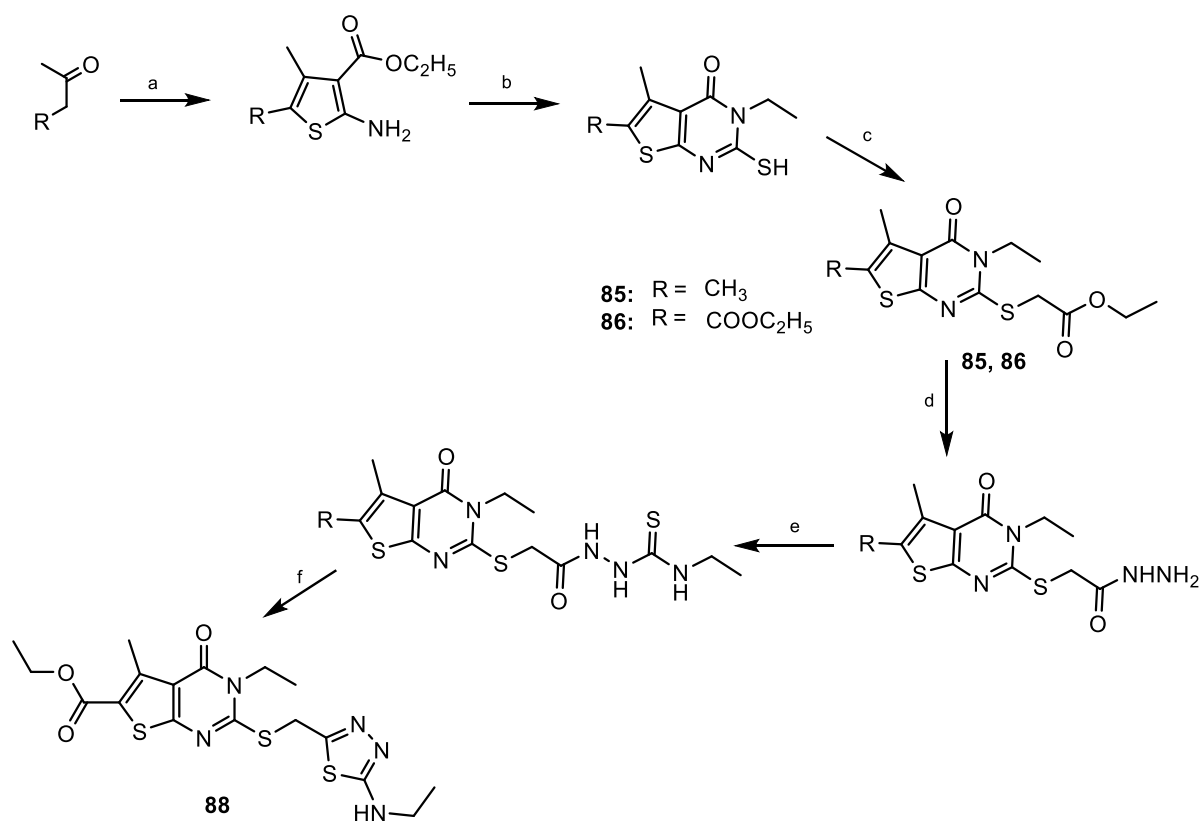
Šema 16. Sinteza derivata pirano[2,3-*d*]tiazola (**80**) (Bondžić i saradnici, 2012)



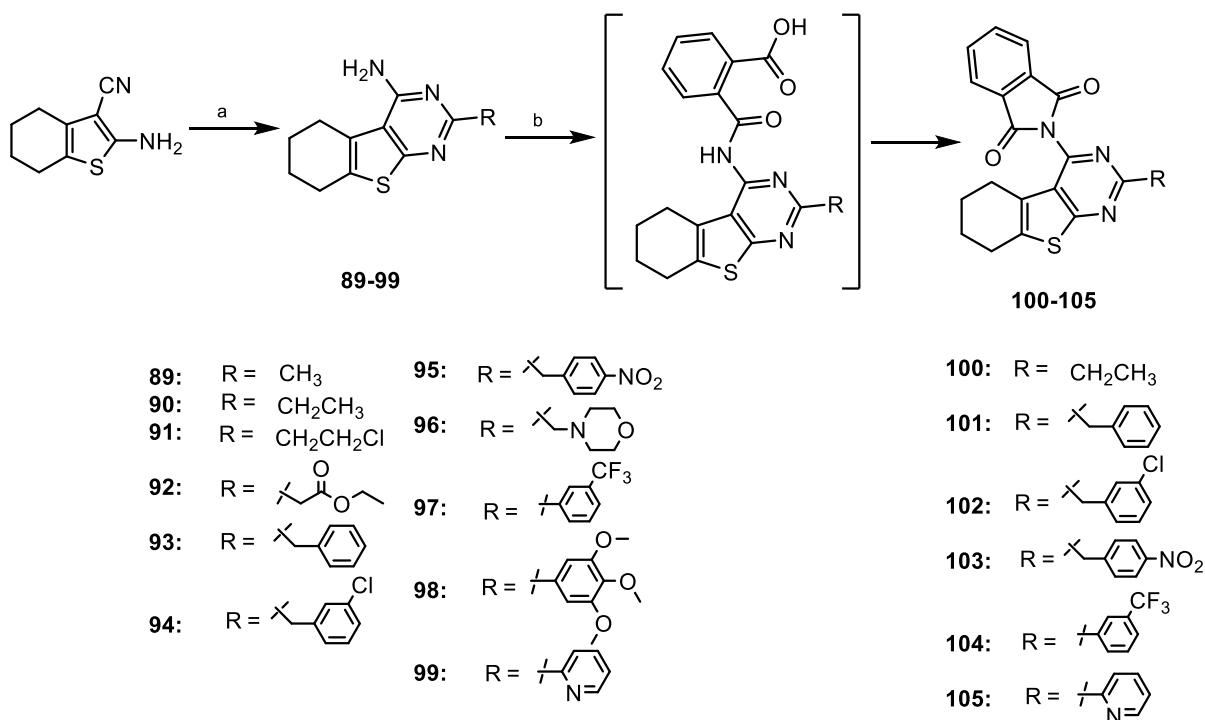
Šema 17. Sinteza derivata pirano[2',3':4,5]tiazolo[3,2-*a*]piridina (**81**, **82**) (Bondžić i saradnici, 2012)



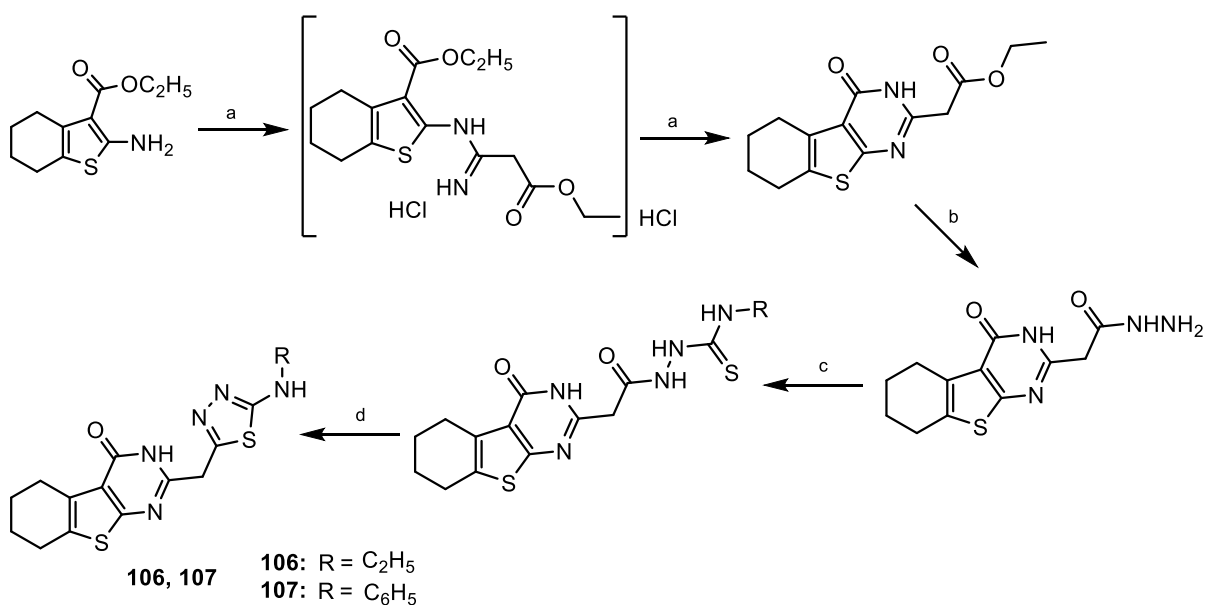
Šema 18. Sinteza derivata tieno[2,3-*d*]pirimidina (**83**, **84**, **87**). Reagensi i uslovi: a) etil cijanoacetat, suvi HCl gas, etanol; b) hidrazin hidrat, etanol, refluks; c) izotiocijanat, etanol, refluks; d) H₂SO₄, 0 °C, NH₄OH (Mavrova i saradnici, 2014)



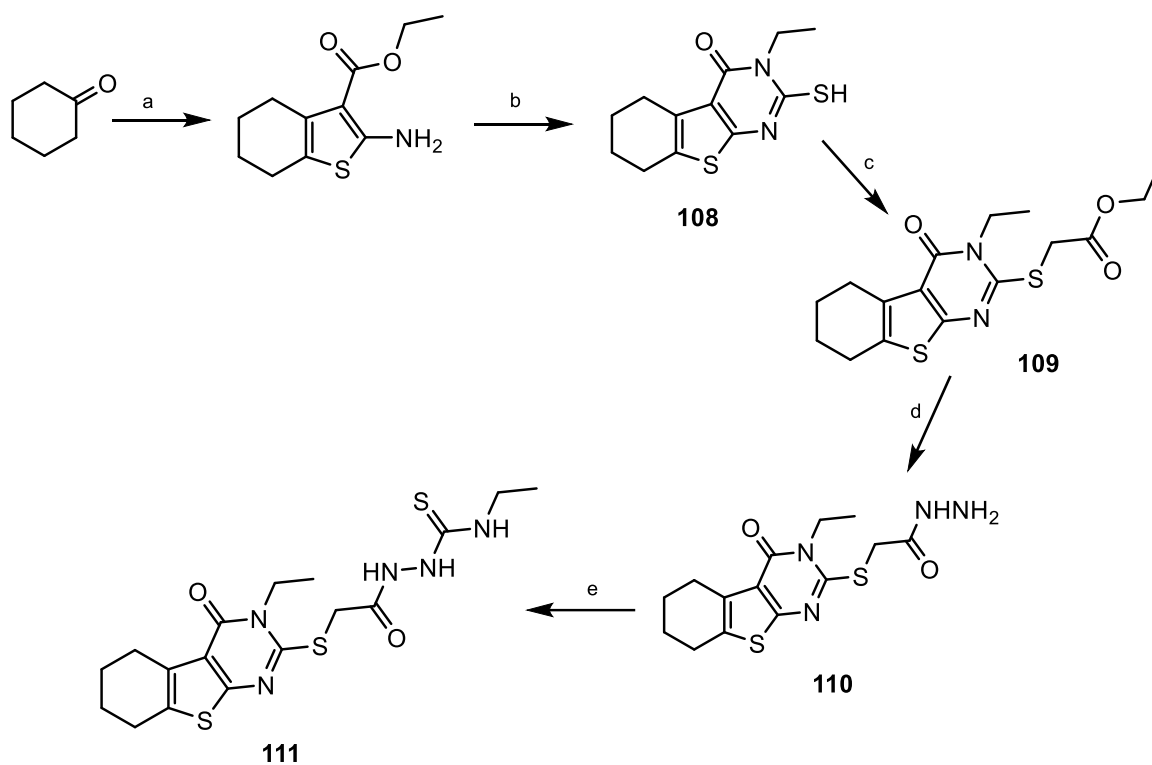
Šema 19. Sinteza derivata tieno[2,3-*d*]pirimidina (**85**, **86**, **88**). Reagensi i uslovi: a) etil cijanoacetat, HN(C₂H₅)₂, S₈, etanol; b) etil izotiocijanat, NaOH, dimetilformamid; c) etil 2-hloroacetat, N(C₂H₅)₃, benzen, refluks; d) hidrazin hidrat, etanol, refluks; e) etil izotiocijanat, etanol, refluks; f) 98% H₂SO₄, 0 °C, NH₄OH (Mavrova i saradnici, 2016)



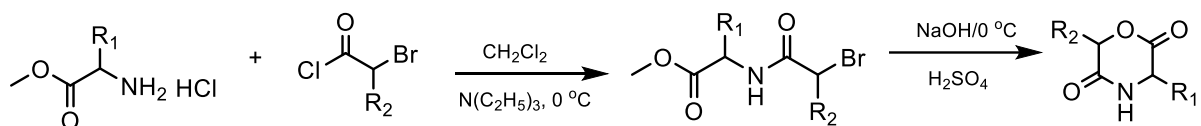
Šema 20. Sinteza derivata benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina i -ftalimida (**89-105**). Reagensi i uslovi: a) RCN, suvi HCl gas, dioksan, 6 h; b) anhidrid ftalne kiseline, CH₃COOH, refluks (Mavrova i saradnici, 2018)



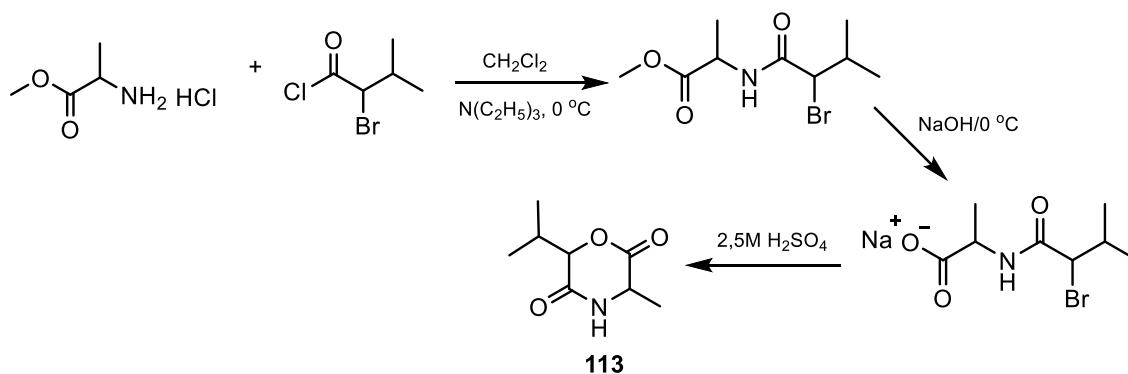
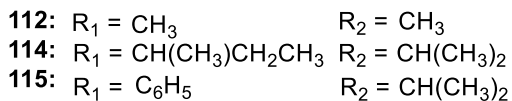
Šema 21. Sinteza derivata benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-ona (**106, 107**). Reagensi i uslovi: a) etil cijanoacetat, suvi HCl gas, etanol; b) hidrazin hidrat, etanol, refluks; c) izotiocijanat, etanol, refluks; d) H₂SO₄, 0 °C, NH₄OH (Mavrova i saradnici, 2014)



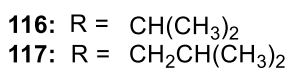
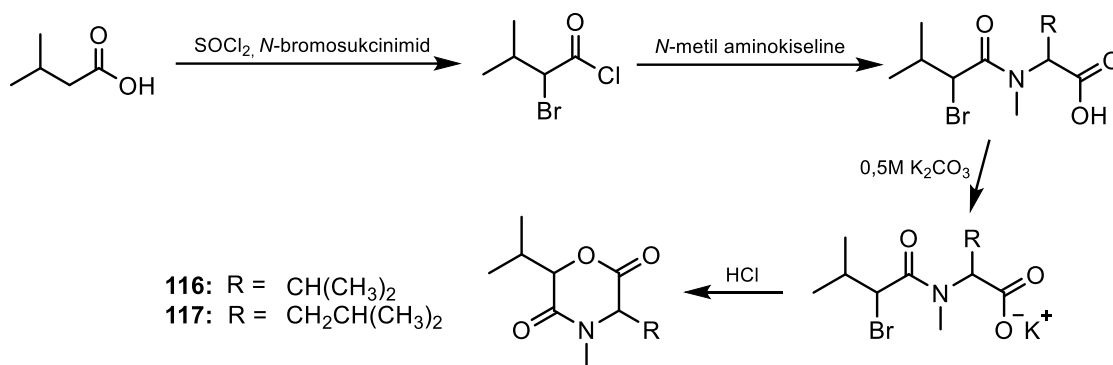
Šema 22. Sinteza derivata benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-ona (**108-111**). Reagensi i uslovi: a) etil cijanoacetat, $\text{HN}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, S_8 , etanol; b) etil izotiocijanat, NaOH , dimetilformamid; c) etil 2-hloroacetat, $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$, benzen, refluks; d) hidrazin hidrat, etanol, refluks; e) etil izotiocijanat, etanol, refluks (Mavrova i saradnici, 2016)



112, 114, 115



113



116, 117

Šema 23. Sinteza derivata morfolin-2,5-diona (**112-117**) (Cherneva i saradnici, 2017; Yancheva i saradnici, 2015; Smelcerovic i saradnici, 2011)

3.2. Test inhibicije dipeptidil peptidaze-4

Uticaj mono-, bi- i tricikličnih derivata imidazola, tiazola, piridina, pirana, pirimidina i morfolina na aktivnost dipeptidil peptidaze-4 ispitivan je *in vitro*. Rekombinovana humana

dipeptidil peptidaza-4 (Sigma-Aldrich) (0,005 jedinica) u Tris-HCl puferu (90 mM, pH 7,60) tretirana je rastvorima ispitivanih jedinjenja u dimetil sulfoksidu (finalna koncentracija dimetil sulfoksida u testu bila je 5% v/v). Posle 15 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, reakcija je inicirana dodavanjem supstrata Gly-Pro-*p*-nitroanilid *p*-toluensulfonata (Sigma-Aldrich) (260 μ M), i trajala je 60 minuta na 37 °C. Početna koncentracija jedinjenja bila je 200 μ M. Procenat inhibicije aktivnosti enzima determinisan je merenjem razlika apsorbanci na 385 nm (UV/Vis spektrofotometar BK-UV1800, Biobase Biodustry), sa odgovarajućim blank uzorcima za analize i kontrolu rastvarača. Sitagliptin i diprotin A (Sigma-Aldrich) su korišćeni kao referentni inhibitori (Tomovic i saradnici 2020a; Tomovic i saradnici, 2020b). *Lineweaver-Burkovim* dijagramom je determinisan tip inhibicije najefikasnijih inhibitora sa opsegom koncentracija supstrata od 0,1 do 1 mM, u odsustvu i prisustvu inhibitora u dve koncentracije (Tomovic i saradnici 2020a).

3.3. Test inhibicije ksantin oksidaze

Inhibitorski potencijal jedinjenja koja su se pokazala kao inhibitori dipeptidil peptidaze-4 sa IC₅₀ vrednostima nižim od 200 μ M, ispitan je i na ksantin oksidazi *in vitro*. Ksantin oksidaza iz goveđeg mleka (Sigma-Aldrich) (0,01 jedinica) u Tris-HCl puferu (46,5 mM, pH 7,80) tretirana je rastvorima ispitivanih jedinjenja u dimetil sulfoksidu (finalna koncentracija dimetil sulfoksida u testu bila je 4,65% v/v). Posle 15 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, reakcija je inicirana dodavanjem supstrata ksantina (Sigma-Aldrich) (232,5 μ M), i trajala je 15 minuta na 37 °C. Početna koncentracija jedinjenja bila je 150 μ M. Procenat inhibicije aktivnosti enzima je determinisan merenjem razlika apsorbanci na 293 nm (UV/Vis spektrofotometar BK-UV1800, Biobase Biodustry), sa odgovarajućim blank uzorcima za analize i kontrolu rastvarača. Alopurinol (Sigma-Aldrich) je korišćen kao referentni inhibitor (Smelcerovic i saradnici, 2015).

3.4. Molekulski doking

Za procenu mesta i načina vezivanja aktivnih struktura i enzima korišćeni su *Schrödinger* (Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-1, Schrödinger, LLC, New York,

NY, 2015) i *Molecular Operating Environment* softver (Molecular Operating Environment (MOE) 2019.0102, Chemical Computing Group ULC, Montreal, QC, Canada), kojim su prediktivni modeling i analitički podaci u istraživanju hemijskog prostora integrisani, sa validirano jakim pristupima.

3.5. Test citotoksičnosti

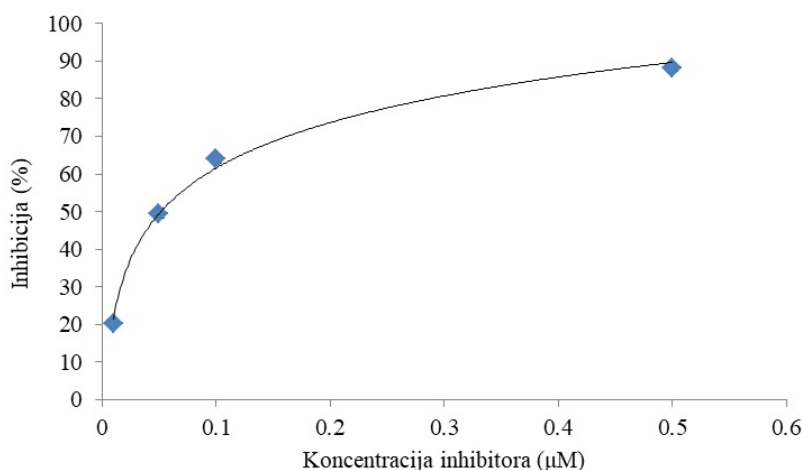
Citotoksičnost benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina i -ftalimida aktivnih u testu inhibicije DPP-4 sa predstavnikom nekompetitivnog tipa inhibicije (jedinjenja **94**, **97**, **101**, **102** i **104**) i dualnih inhibitora DPP-4 i XO (jedinjenja **5** i **34**) determinisana je na Caco-2 ćelijama MTT testom (Tomovic i saradnici 2020a; Tomovic i saradnici, 2020b).

Ćelije su uzgajane u Dulbekovom modifikovanom *Eagle* medijumu (DMEM) sa 10% fetalnog goveđeg seruma inaktiviranog temperaturom, 1% *L*-glutamina, 100 µg/ml streptomocina i 100 U/ml penicilina, na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Sađene su u mikrotitar ploče sa 24 mesta (2 × 10⁵ ćelija) i kultivisane do konfluentnosti i diferenciranih monoslojeva. Dvadeset četiri sata pre inkubacije sa rastvorima ispitivanih jedinjenja u dimetil sulfoksidu, prethodno dodat medijum je zamenjen medijumom sa 5% fetalnog goveđeg seruma inaktiviranog temperaturom i 1% *L*-glutamina. Rastvori ispitivanih jedinjenja su dodati u različitim koncentracijama (31,25 µM, 62,50 µM, 125 µM i 250 µM) i inkubirani 24 h na 37 °C. Na kraju inkubacije, ćelije su tretirane sa 200 µl MTT rastvora (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2*H*-tetrazolijum-bromid) (10 × razblažen MTT *stock* rastvor koncentracije 5 mg/ml, u medijumu) i inkubirane 4 h na 37 °C. Nakon inkubacije, ljubičasti formazan je rastvoren dodavanjem 200 µl 10% rastvora natrijum dodecil sulfata u 0,01 M HCl, i apsorbancija je merena na 570 nm (čitač mikroploča, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) (Tomovic i saradnici, 2020a; Tomovic i saradnici, 2020b).

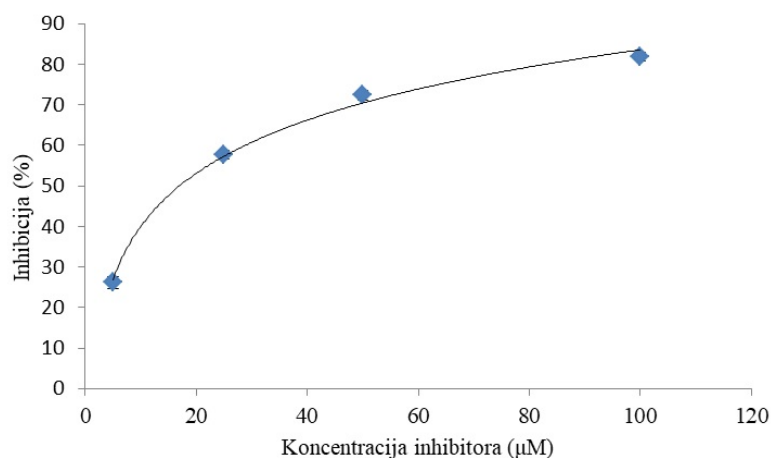
4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Inhibitorski potencijal ispitivanih jedinjenja na dipeptidil peptidazi-4

Od ispitivanih jedinjenja u testu inhibicije dipeptidil peptidaze-4, struktura sa IC_{50} vrednostima manjim od $200 \mu\text{M}$ ima među derivatima benzimidazol-2-imina (jedinjenje **5**), bis(benzimidazol-2-il)amina (jedinjenja **21**, **24** i **25**), 6-(fenilkarbonil)-[1,3]tiazolo[3,2-*a*]benzimidazol-3-ona (jedinjenje **34**), benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina i -ftalimida (jedinjenja **94**, **97**, **101**, **102** i **104**) (Tabele 62-76). Referentni inhibitori sitagliptin i diprotin A su inhibirali dipeptidil peptidazu-4 sa IC_{50} vrednostima $0,05 \pm 0,02 \mu\text{M}$ i $17 \pm 5,15 \mu\text{M}$, redom (Slike 15 i 16).



Slika 15. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 sitagliptinom

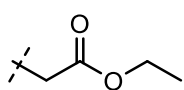
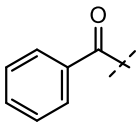
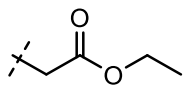
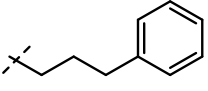
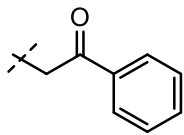
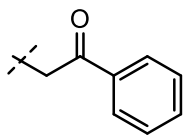


Slika 16. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 diprotinom A

Strukture sa najnižom IC₅₀ vrednošću od svih ispitivanih struktura u radu, 1-propil-*N*-(1-propil-1*H*-benzimidazol-2-il)-1*H*-benzimidazol-2-amin (jedinjenje **25**, IC₅₀ = 5,01 ± 0,66 μM) i 1-metil-*N*-(1-propil-1*H*-benzimidazol-2-il)-1*H*-benzimidazol-2-amin (jedinjenje **21**, IC₅₀ = 11,04 ± 0,69 μM), pokazale su oko tri i jedan i po puta veću efikasnost inhibicije u odnosu na diprotin A, redom, dok su od ostalih struktura sa efikasnošću bliskom referentnom inhibitoru,

2-(2-(3-hlorobenzil)-5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il)izoindolin-1,3-dion (jedinjenje **102**, IC₅₀ = 34,17 ± 5,11 μM) i 1-etil-*N*-(1-propil-1*H*-benzimidazol-2-il)-1*H*-benzimidazol-2-amin (jedinjenje **24**, IC₅₀ = 49,88 ± 2,99 μM) pokazali oko dva i tri puta manju efikasnost u odnosu na diprotin A, redom (Slike 17-26).

Tabela 62. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima benzimidazol-2-imina

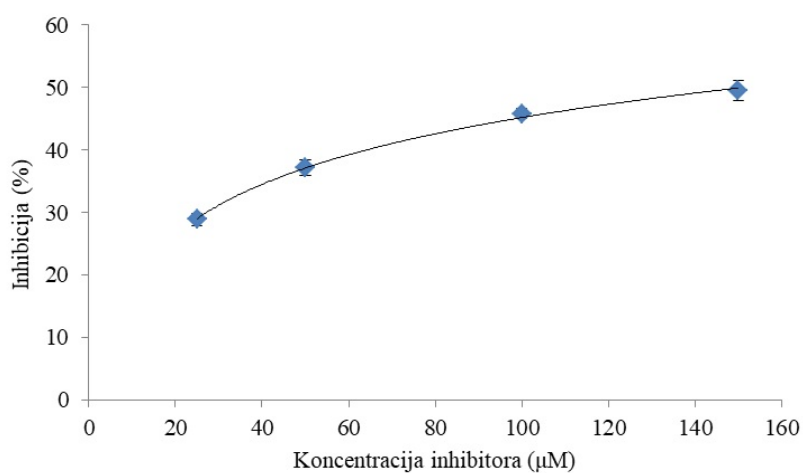
Jedinjenje	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP
1			> 200	
2		CH ₃	> 200	
3		CH ₃	> 200	
4		CH ₃	> 200	
5		NO ₂	151,04 ± 3,84	0,0003 ^b 0,11 ^c

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja

(pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,05 ± 0,02 μM; diprotin A, IC₅₀ = 17 ± 5,15 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

^cRIPd = IC₅₀ diprotina A / IC₅₀ jedinjenja



Slika 17. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 jedinjenjem 5

Tabela 63. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima benzimidazol-2-iona

Jedinjenje	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (µM)
6		H	> 200
7		CH ₃	> 200
8		Cl	> 200
9			> 200
10		H	> 200
11		CH ₃	> 200

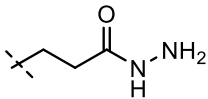
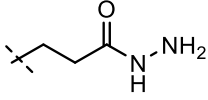
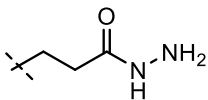
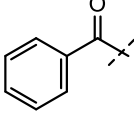
12		Cl	> 200
13		NO ₂	> 200
14			> 200

Tabela 64. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima benzimidazol-2-il-tioacetilpiperazina

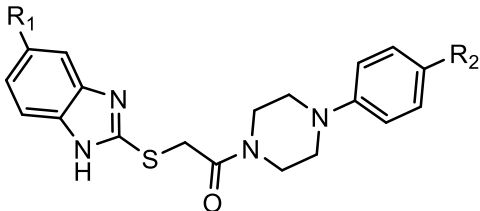
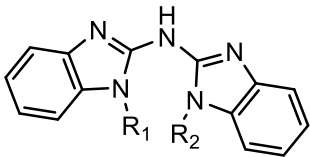
			
Jedinjenje	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM)
15	H	Cl	> 200
16	CH ₃	Cl	> 200
17	NO ₂	CH ₃	> 200
18	NO ₂	Cl	> 200

Tabela 65. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima bis(benzimidazol-2-il)amina

				
Jedinjenje	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM)	RIP
19	CH ₃	CH ₃	> 200	
20	CH ₃	CH ₂ CH ₃	> 200	
21	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	11,04 ± 0,69	0,005 ^b 1,54 ^c
22	H	CH ₂ CH ₃	> 200	
23	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	> 200	
24	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	49,88 ± 2,99	0,001 ^b 0,34 ^c

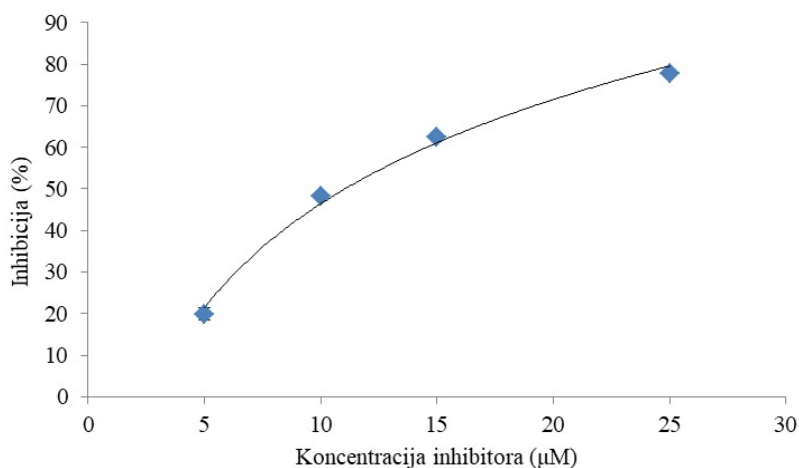
25	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	$5,01 \pm 0,66$	$0,01^b$ $3,39^c$
-----------	-------------------------------------	-------------------------------------	-----------------	----------------------

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja

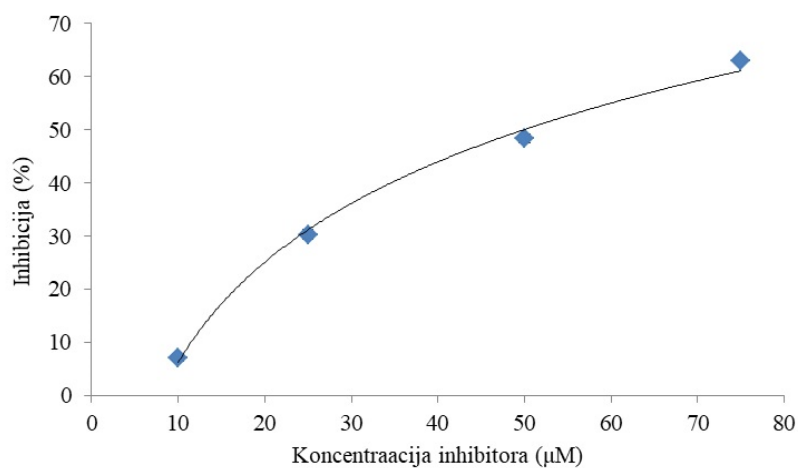
(pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = $0,05 \pm 0,02 \mu\text{M}$; diprotin A, IC₅₀ = $17 \pm 5,15 \mu\text{M}$)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

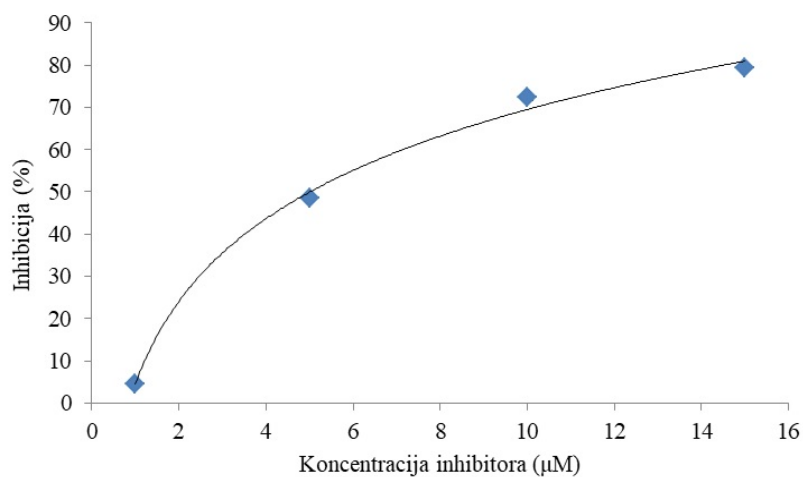
^cRIPd = IC₅₀ diprotina A / IC₅₀ jedinjenja



Slika 18. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 jedinjenjem **21**



Slika 19. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 jedinjenjem **24**

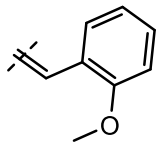
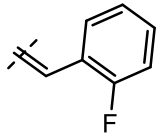
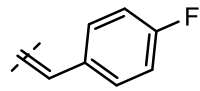
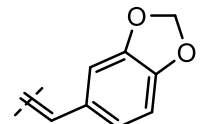


Slika 20. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 jedinjenjem **25**

Tabela 66. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima [1,3]tiazolo[3,2-*a*]benzimidazol-3-ona

Jedinjenje	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (µM)
26	H	H	> 200
27		H	> 200
28		H	> 200
29		CH ₃	> 200
30	H	NO ₂	> 200
31		NO ₂	> 200

Tabela 67. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 6-(fenilkarbonil)-[1,3]tiazolo[3,2-*a*]benzimidazol-3-ona

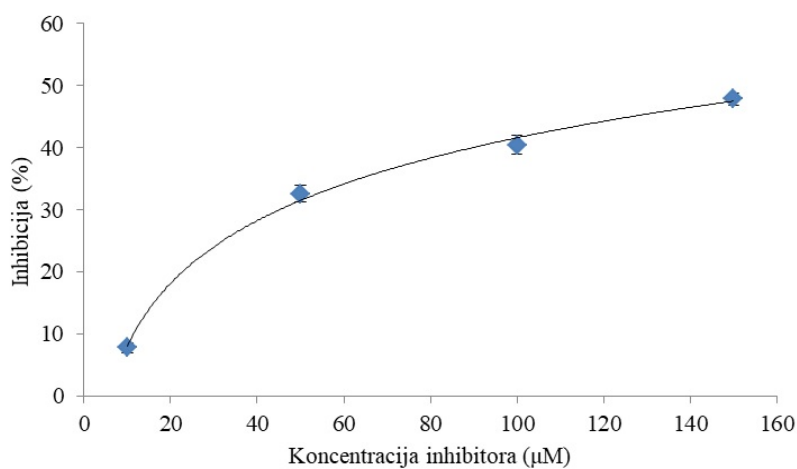
Jedinjenje	R	IC ₅₀ (μM)	RIP
32		> 200	
33		> 200	
34		177,96 ± 4,56	0,0003 ^b 0,1 ^c
35		> 200	

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja

(pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,05 ± 0,02 μM; diprotin A, IC₅₀ = 17 ± 5,15 μM)

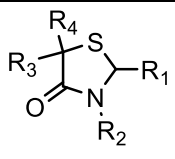

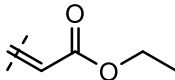
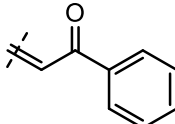
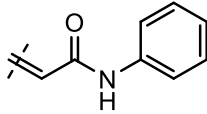
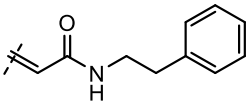
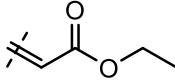
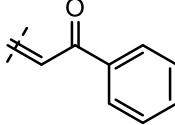
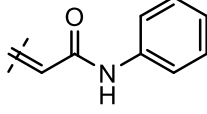
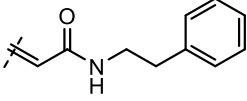
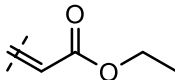
^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

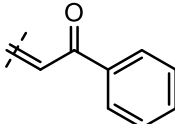
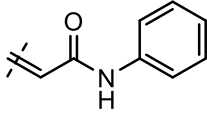
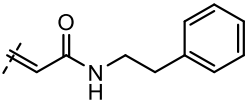
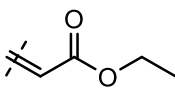
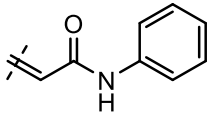
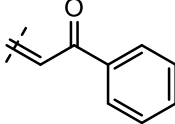
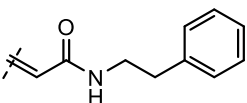
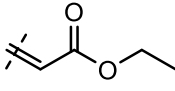
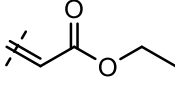
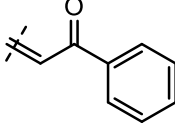
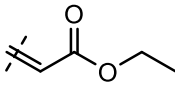
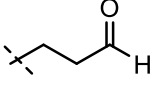

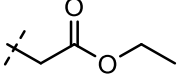
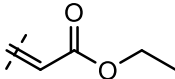
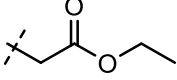
^cRIPd = IC₅₀ diprotina A / IC₅₀ jedinjenja

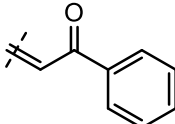
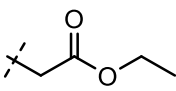
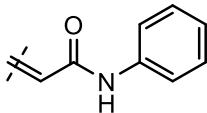
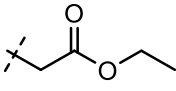
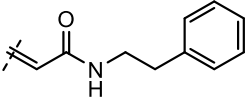
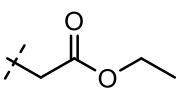
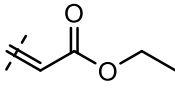
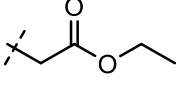
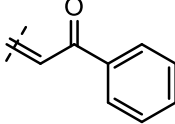
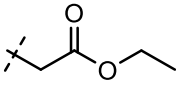
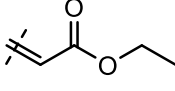
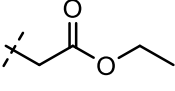
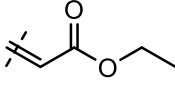
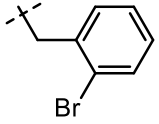
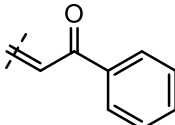
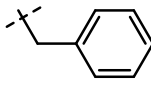
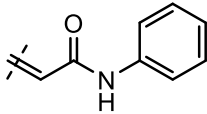
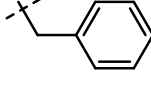
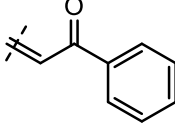
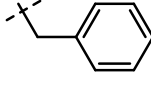
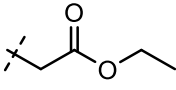
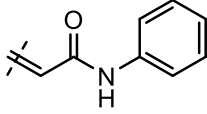
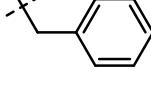
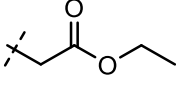
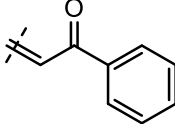
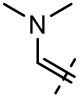


Slika 21. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 jedinjenjem 34

Tabela 68. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima tiazolidin-4-ona

					
Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ (μM)
36		H	H	H	> 200
37		H	H	H	> 200
38		H	H	H	> 200
39		H	H	H	> 200
40		H	H	H	> 200
41		H	CH ₃	H	> 200
42		H	CH ₃	H	> 200
43		H	CH ₃	H	> 200
44		H	CH ₃	H	> 200
45		CH ₃	H	H	> 200

46		CH ₃	H	H	> 200
47		CH ₃	H	H	> 200
48		CH ₃	H	H	> 200
49		CH ₃	CH ₃	H	> 200
50		CH ₃	CH ₃	H	> 200
51		CH ₃	OH	H	> 200
52		CH ₃	OH	H	> 200
53		CH ₂ CH ₂ Br	CH ₃	H	> 200
54		CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br	CH ₃	H	> 200
55		CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br	CH ₃	H	> 200
56		CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br	CH ₃		> 200
57		H		H	> 200
58		H		H	> 200

59		H		H	> 200
60		H		H	> 200
61		H		H	> 200
62		CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br		H	> 200
63		CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br		H	> 200
64			H	H	> 200
65			H	H	> 200
66			H	H	> 200
67			H	H	> 200
68				H	> 200
69				H	> 200
70		CH ₃		-	> 200

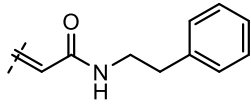
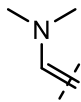
71		CH ₃		-	> 200
----	---	-----------------	--	---	-------

Tabela 69. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima 4-oksotiazolidin-*S*-oksida

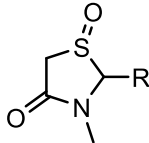
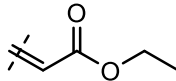
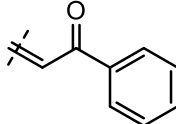
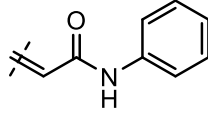
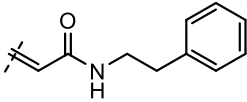
			
Jedinjenje		R	IC ₅₀ (μM)
72			> 200
73			> 200
74			> 200
75			> 200

Tabela 70. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima tiazolo[3,2-*a*]piridina

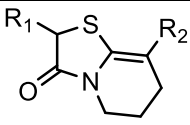
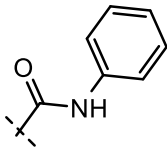
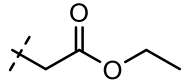
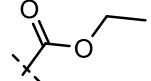
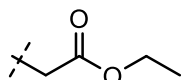
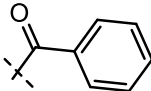
			
Jedinjenje	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM)
76	CH ₃		> 200
77			> 200
78			> 200

Tabela 71. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima pirano[2,3-*d*]tiazola

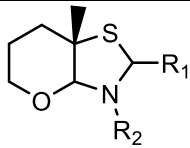
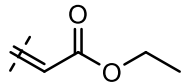
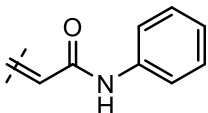
				
Jedinjenje	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM)	
79		CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br	> 200	
80		CH ₂ CH ₂ CH ₂ Br	> 200	

Tabela 72. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima pirano[2',3':4,5]tiazolo[3,2-*a*]piridina

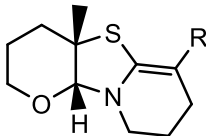
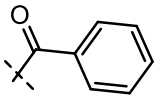
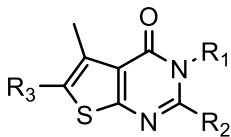
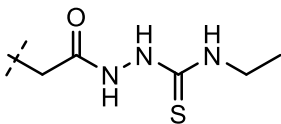
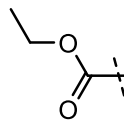
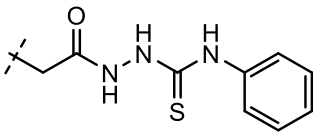
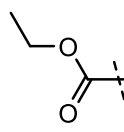
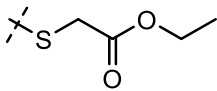
				
Jedinjenje	R		IC ₅₀ (μM)	
81	CN		> 200	
82			> 200	

Tabela 73. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima tieno[2,3-*d*]pirimidina

				
Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM)
83	H			> 200
84	H			> 200
85	CH ₂ CH ₃		CH ₃	> 200

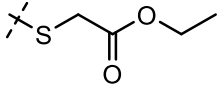
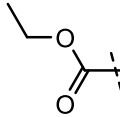
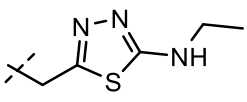
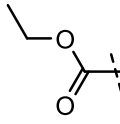
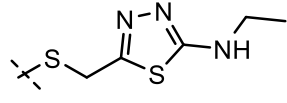
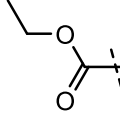
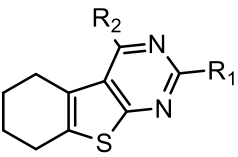
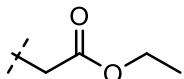
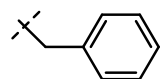
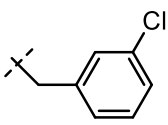
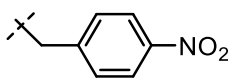
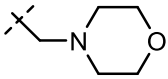
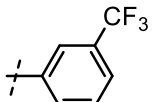
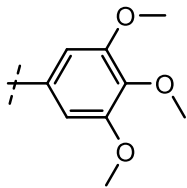
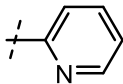
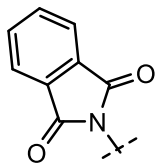
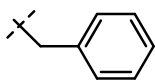
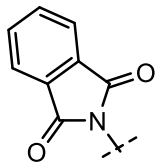
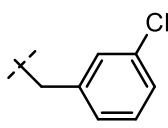
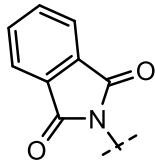
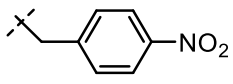
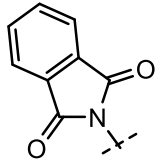
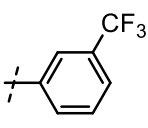
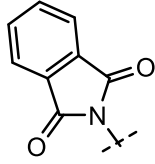
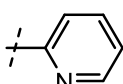
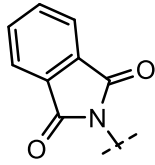
86	CH ₂ CH ₃			> 200
87	H			> 200
88	CH ₂ CH ₃			> 200

Tabela 74. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina i -ftalimida

				
Jedinjenje	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM)	RIP
89	CH ₃	NH ₂	> 200	
90	CH ₂ CH ₃	NH ₂	> 200	
91	CH ₂ CH ₂ Cl	NH ₂	> 200	
92		NH ₂	> 200	
93		NH ₂	> 200	
94		NH ₂	166,82 ± 7,14	0,0003 ^b 0,1 ^c
95		NH ₂	> 200	
96		NH ₂	> 200	
97		NH ₂	199,51 ± 6,32	0,0003 ^b 0,09 ^c

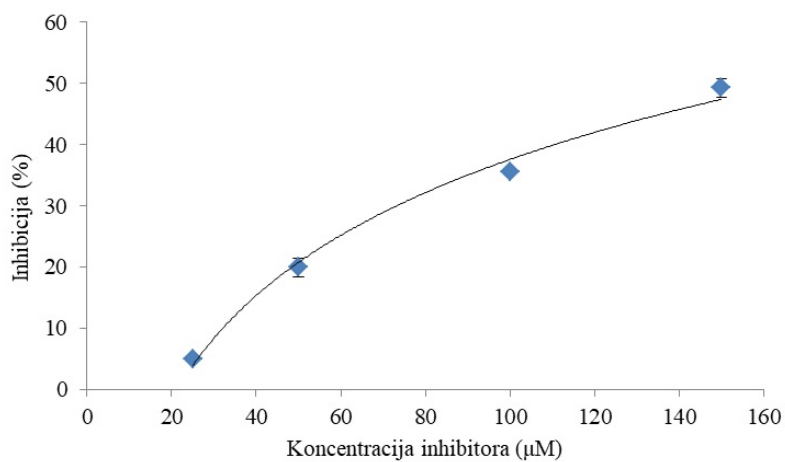
98		NH ₂	> 200	
99		NH ₂	> 200	
100	CH ₂ CH ₃		> 200	
101			159,02 ± 2,96	0,0003 ^b 0,11 ^c
102			34,17 ± 5,11	0,001 ^b 0,5 ^c
103			> 200	
104			155,63 ± 2,30	0,0003 ^b 0,11 ^c
105			> 200	

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja

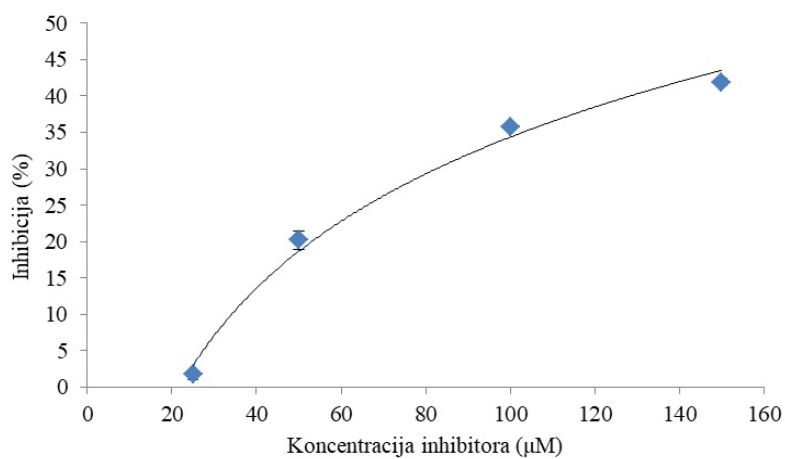
(pozitivna kontrola: sitagliptin, IC₅₀ = 0,05 ± 0,02 μM; diprotin A, IC₅₀ = 17 ± 5,15 μM)

^bRIPs = IC₅₀ sitagliptina / IC₅₀ jedinjenja

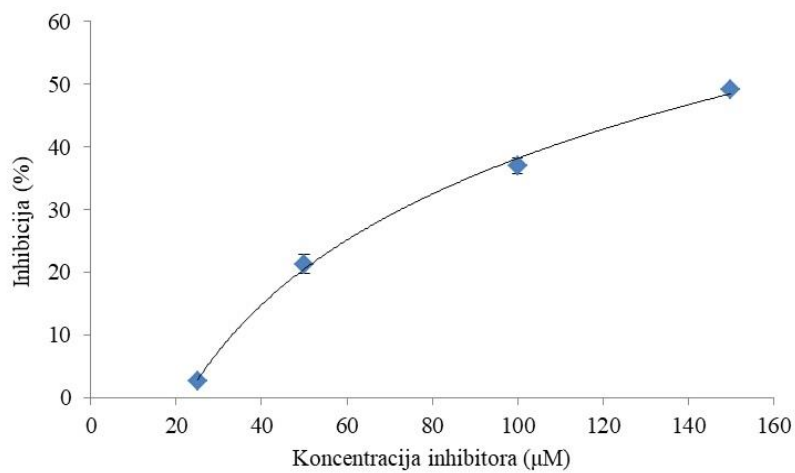
^cRIPd = IC₅₀ diprotina A / IC₅₀ jedinjenja



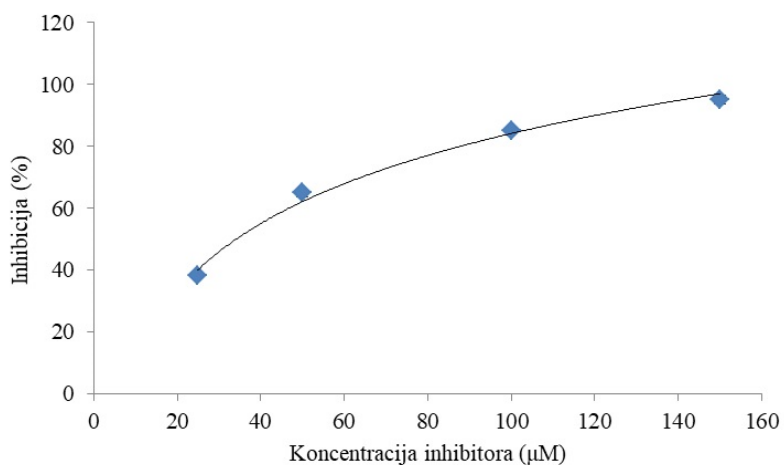
Slika 22. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 jedinjenjem **94**



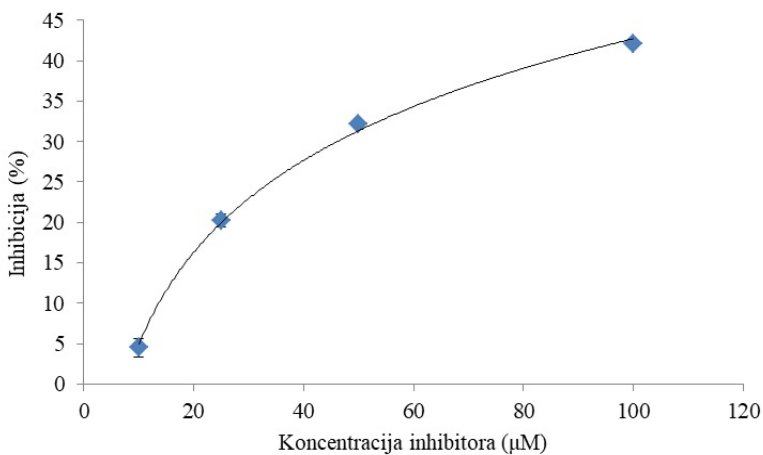
Slika 23. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 jedinjenjem **97**



Slika 24. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 jedinjenjem **101**

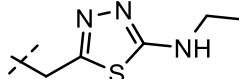


Slika 25. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 jedinjenjem **102**



Slika 26. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 jedinjenjem **104**

Tabela 75. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-ona

Jedinjenje	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (µM)
106	H		> 200

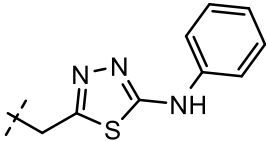
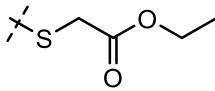
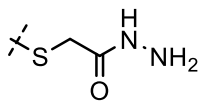
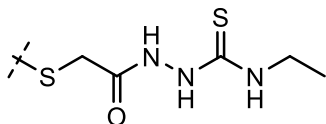
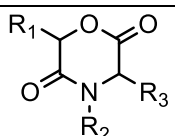
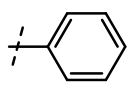
107	H		> 200
108	CH ₂ CH ₃	SH	> 200
109	CH ₂ CH ₃		> 200
110	CH ₂ CH ₃		> 200
111	CH ₂ CH ₃		> 200

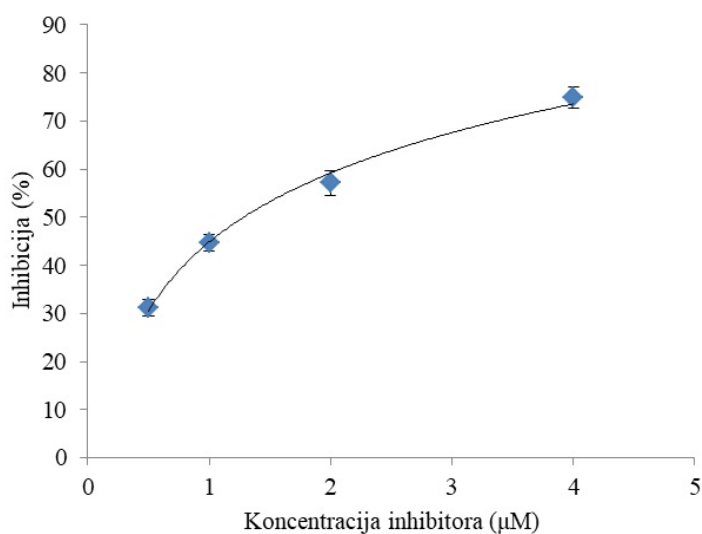
Tabela 76. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4 derivatima morfolin-2,5-diona

				
Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM)
112	CH ₃	H	CH ₃	> 200
113	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃	> 200
114	CH(CH ₃) ₂	H	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	> 200
115	CH(CH ₃) ₂	H		> 200
116	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	> 200
117	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	> 200

4.2. Uticaj inhibitora dipeptidil peptidaze-4 na aktivnost ksantin oksidaze

Od struktura koje su se pokazale kao inhibitori dipeptidil peptidaze-4 sa IC₅₀ vrednostima nižim od 200 μM, 2-[2-imino-5-nitro-3-(2-okso-2-feniletil)-2,3-dihidro-1*H*-benzimidazol-1-il]-1-feniletanon (jedinjenje **5**) i 2-(4-fluorobenziliden)-6-(fenilkarbonil)[1,3]tiazolo[3,2-*a*]benzimidazol-3(2*H*)-on (jedinjenje **34**) pokazali su efikasnost i u testu inhibicije ksantin oksidaze, sa IC₅₀ vrednostima manjim od 150 μM

(Tabele 77-80). Alopurinol ($IC_{50} = 1,28 \pm 0,17 \mu M$), korišćen kao referentni inhibitor ksantin oksidaze, bio je efikasniji od jedinjenja **5** i **34** (Slike 27-29).



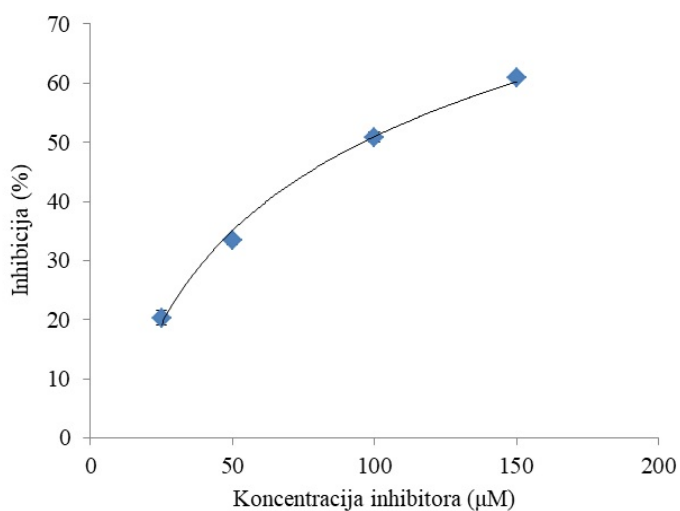
Slika 27. Inhibicija ksantin oksidaze alopurinolom

Tabela 77. Inhibicija ksantin oksidaze derivatom benzimidazol-2-imina

Jedinjenje	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^a	RIP ^b
5		NO ₂	95,94 ± 3,16	0,01

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: alopurinol, IC₅₀ = 1,28 ± 0,17 μM)

^bRIP_a = IC₅₀ alopurinola / IC₅₀ jedinjenja



Slika 28. Inhibicija ksantin oksidaze jedinjenjem **5**

Tabela 78. Inhibicija ksantin oksidaze derivatima bis(benzimidazol-2-il)amina

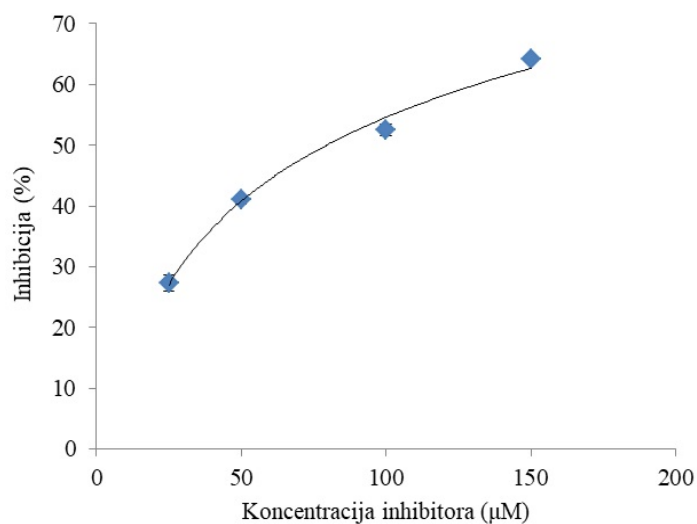
Jedinjenje	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (µM)
21	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	> 150
24	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	> 150
25	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	> 150

Tabela 79. Inhibicija ksantin oksidaze derivatom 6-(fenilkarbonil)-[1,3]tiazolo[3,2-*a*]benzimidazol-3-ona

Jedinjenje	R	IC ₅₀ (µM) ^a	RIP ^b
34		79,44 ± 7,97	0,02

^aIC₅₀ vrednost jedinjenja (pozitivna kontrola: alopurinol, IC₅₀ = 1,28 ± 0,17 µM)

^bRIP_a = IC₅₀ alopurinola / IC₅₀ jedinjenja

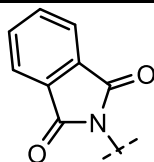
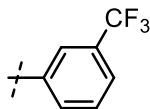


Slika 29. Inhibicija ksantin oksidaze jedinjenjem **34**

Tabela 80. Inhibicija ksantin oksidaze derivatima benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina i -ftalimida

Jedinjenje	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (µM)
94		NH ₂	> 150
97		NH ₂	> 150
101			> 150
102			> 150

104

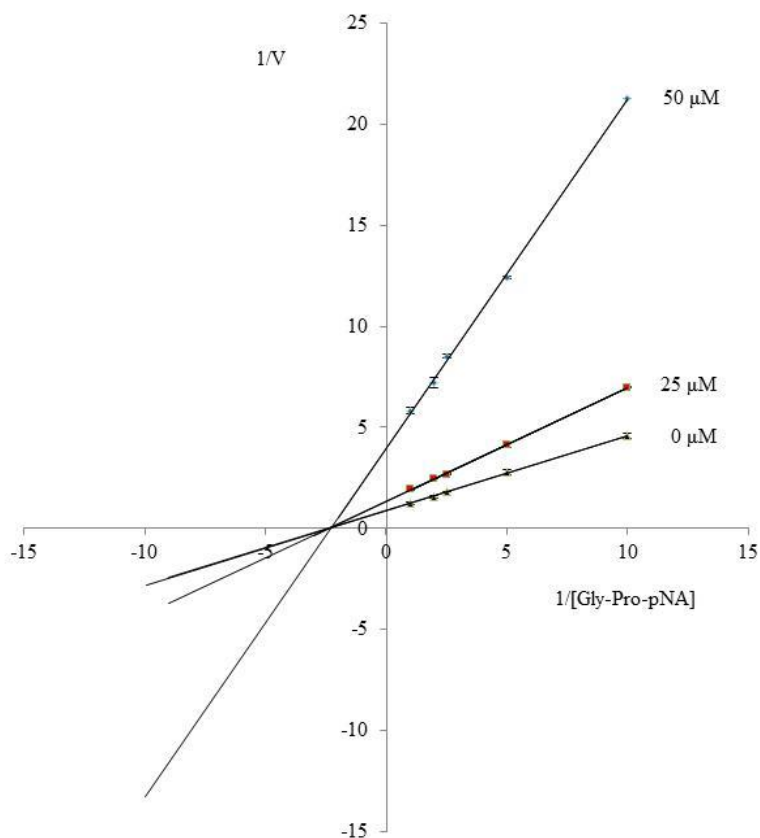


> 150

4.3. Benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-ftalimid derivat, jedan od retkih nekompetitivnih inhibitora dipeptidil peptidaze-4

Deng i saradnici su dizajnirali nove DPP-4 inhibitore, derivate tieno[2,3-*d*]pirimidina i tieno[3,2-*d*]pirimidina, inkorporiranjem tiofena u strukturu alogliptina, sa boljim inhibitornim potencijalom većeg broja ovih derivata u poređenju sa alogliptinom. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da položaj sumpora nije značajan za inhibiciju, dok su supstituenti pokazali uticaj na aktivnost (Deng i saradnici, 2011). Od benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina i -ftalimida ispitivanih u ovom radu (jedinjenja **89-105**), dva amin i tri ftalimid derivata, 2-(3-hlorobenzil)-5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amin, 2-(3-(trifluorometil)fenil)-5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amin, 2-(2-benzil-5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il)izoindolin-1,3-dion, 2-(2-(3-hlorobenzil)-5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il)izoindolin-1,3-dion i 2-(2-(3-(trifluorometil)fenil)-5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il)izoindolin-1,3-dion (jedinjenja **94**, **97**, **101**, **102** i **104**, redom), inhibirala su DPP-4 sa IC₅₀ vrednostima manjim od 200 μM. Ftalimid derivati su pokazali veći inhibitorni potencijal u poređenju sa amino prekursorima. Derivati 2-fenil/benzil pirimidina sa elektrofilnim grupama u *meta* položaju pokazali su visok stepen inhibicije. Predstavnicu sa hlorom u *meta* položaju fenil supstituenta pokazali su veću efikasnost od trifluorometil analoga i derivata sa nesupstituisanim fenil ostatkom (Tomovic i saradnici, 2020a).

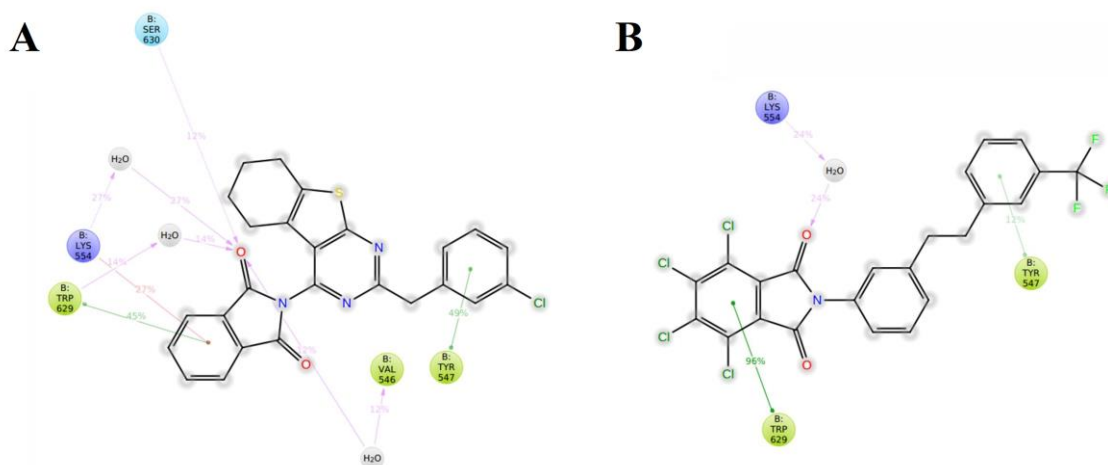
Lineweaver–Burkovim dijagramom je determinisan nekompetitivan tip inhibicije najaktivnijeg ftalimid derivata (jedinjenje **102**, IC₅₀ = 34,17 ± 5,11 μM) (Slika 30). Nekompetitivni inhibitori DPP-4 su retki u literaturi u poređenju sa kompetitivnim predstavnicima. Strukturno sličan jedinjenju **102** je fenetilfenilftalimid derivat, nekompetitivan inhibitor DPP-4, koji su sintetisali Motoshima i saradnici (2011) (jedinjenje **28a** po numeraciji u originalnom radu) (Tomovic i saradnici, 2020a).



Slika 30. *Lineweaver–Burkov* dijagram inhibicije dipeptidil peptidaze-4 jedinjenjem **102** (Tomovic i saradnici, 2020a)

Interakcije DPP-4 i jedinjenja **102** i **28a** (Motoshima i saradnici, 2011) analizirane su programom Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015. Profil interakcija ovih nekompetitivnih DPP-4 inhibitora karakterišu prevashodno π – π interakcije sa Trp629 i Tyr547, što je praćeno i interakcijama sa Lys554.

Najaktivniji benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-ftalimid derivat, 2-(2-(3-hlorobenzil)-5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il)izoindolin-1,3-dion (jedinjenje **102**), sa nekompetitivnim tipom inhibicije, pokazuje π – π interakcije ftalimid grupe i Trp629 proteaze, i fenil grupe i Tyr547, sa potencijalnim hidrofobnim interakcijama, i vodoničnim vezama sa Lys554, uz formiranje vodonične veze sa Ser630. Ove interakcije su slične interakcijama najaktivnijeg nekompetitivnog DPP-4 inhibitora sa fenetilfenilftalimid osnovom koji su sintetisali Motoshima i saradnici (2011) (jedinjenje **28a** po numeraciji u originalnom radu) (Slika 31) (Tomovic i saradnici, 2020a).



Slika 31. Interakcije dipeptidil peptidaze-4 i jedinjenja **102** (A) i **28a** (Motoshima i saradnici, 2011) (B), tokom 10 ns simulacije molekulske dinamike (prikazane su interakcije zastupljene više od 10% trajanja simulacije) (Tomovic i saradnici, 2020a)

Vezivanje inhibitora u S_2' domenu DPP-4 može rezultovati smanjenjem inhibitornog potencijala, pretpostavlja se, zbog konformacionih promena Trp629, koje uzrokuju sterne smetnje. Preglednim radom Ojeda-Montes i saradnika (2018) ukazano je na to da sedam od deset najaktivnijih DPP-4 inhibitora u literaturi obuhvaćenoj tim radom ostvaruju interakcije u hidrofobnom S_1 domenu (Tyr662, Tyr666, Val711) i elektrostatičke i vodonične veze sa Glu205 i Glu206, dok je prošireni S_2 domen proteaze (Phe357, Arg358) učestvovao u interakcijama sa pet od deset najaktivnijih inhibitora. Interakcije sa S_1 domenom i dve glutaminske kiseline mogu biti kompenzovane na manje uspešan način interakcijama sa Trp629 i S_2 domenom (Arg125, Ser209, Phe357, Tyr547). Dakle, više IC_{50} vrednosti ova dva nekompetitivna inhibitora (jedinjenja **102** i **28a** (Motoshima i saradnici, 2011)) mogu biti rezultat odsustva jačih veza, interakcija sa glutaminskim kiselinama i S_1 domenom proteaze (Tomovic i saradnici, 2020a).

Inhibitori koji se vezuju u aktivnom centru enzima mogu pokazati nekompetitivan tip inhibicije, što je dokazano i na proteazama koje pored aktivnog mesta u kom se dešava kataliza poseduju i mesto za prepoznavanje i inicijalno vezivanje supstrata. Kod ovih enzima, vezivanje supstrata ne utiče na vezivanje nekompetitivnih inhibitora u aktivnom centru (Blat, 2010). Kako je pokazano da su dve glutaminske kiseline DPP-4 u pozicijama 205 i 206, pored katalitičke trijade, esencijalne za prepoznavanje N -terminusa supstrata i njegovo inicijalno vezivanje (Abbott i saradnici, 1999a; Thoma i saradnici, 2003), nekompetitivan tip

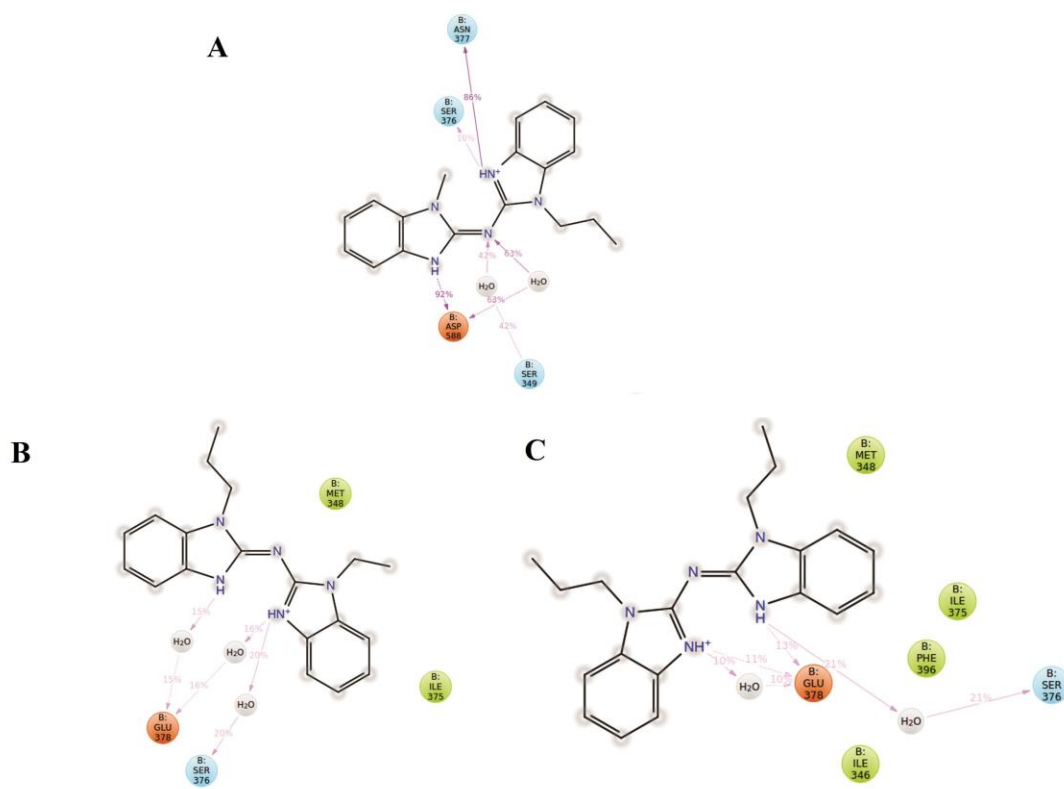
inhibicije jedinjenja **102** i **28a** (Motoshima i saradnici, 2011) može biti objašnjen odsustvom interakcija sa Glu205 i Glu206 (Tomovic i saradnici, 2020a). Moguća prednost nekompetitivne u poređenju sa kompetitivnom inhibicijom je odsustvo zasićenja kompeticije supstrata i potrebe za većim dozama (Turk, 2006).

4.4. Bis(benzimidazol-2-il)amini, inhibitori dipeptidil peptidaze-4 veće efikasnosti od diprotina A

Od ispitivanih bis(benzimidazol-2-il)amina (jedinjenja **19-25**), tri derivata, 1-metil-*N*-(1-propil-1*H*-benzimidazol-2-il)-

1*H*-benzimidazol-2-amin (jedinjenje **21**), 1-etil-*N*-(1-propil-1*H*-benzimidazol-2-il)-1*H*-benzimidazol-2-amin (jedinjenje **24**), i 1-propil-*N*-(1-propil-1*H*-benzimidazol-2-il)-1*H*-benzimidazol-2-amin (jedinjenje **25**), pokazala su aktivnost u testu inhibicije DPP-4 sa IC₅₀ vrednostima manjim od 200 μM. Pored jedinjenja **25**, koje je pokazalo najveći inhibitorni potencijal (IC₅₀ = 5,01 ± 0,66 μM), i jedinjenje **21** (IC₅₀ = 11,04 ± 0,69 μM) je pokazalo veću efikasnost u odnosu na diprotin A, dok je jedinjenje **24** (IC₅₀ = 49,88 ± 2,99 μM) bilo oko tri puta manje efektivno u poređenju sa diprotinom A.

Interakcije DPP-4 i tri aktivna bis(benzimidazol-2-il)amina (jedinjenja **21**, **24** i **25**) su analizirane (Molecular Operating Environment (MOE) 2019.0102, Chemical Computing Group ULC, Montreal, QC, Canada) i ukazano je na značaj aminokiselina Ile346, Met348, Ser349, Ile375, Ser376, Asn377, Glu378, Phe396 i Asp588 proteaze u formiranju enzim-inhibitor kompleksa. Jedinjenje **21** interaguje sa proteazom formiranjem vodoničnih veza sa Asp588, Asn377 i Ser376, uz interakcije sa Ser349. Jedinjenja **24** i **25** interaguju sa enzimom jonskim i vodoničnim vezama sa Glu378, Ser376 i hidrofobnim interakcijama sa Ile346, Met348, Ile375 i Phe396 (Slika 32). Domen vezivanja ovih struktura obuhvata i aminokiseline Phe357 i Arg358 koje su deo S₂ proširenog domena proteaze. Interakcije sa ovim domenom doprinose većem afinitetu i aktivnosti inhibitora (Ojeda-Montes i saradnici, 2018).



Slika 32. Interakcije dipeptidil peptidaze-4 i jedinjenja **21** (A), **24** (B) i **25** (C) tokom 10 ns simulacije molekulske dinamike (prikazane su interakcije zastupljene više od 10% trajanja simulacije)

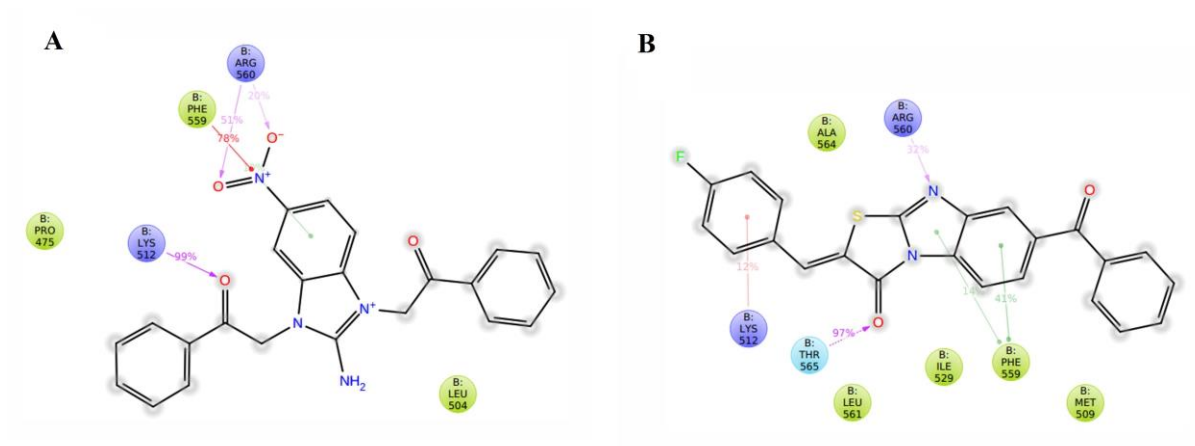
4.5. Dualni inhibitori dipeptidil peptidaze-4 i ksantin oksidaze, inhibicija ksantin oksidaze kao mehanizam doprinosa vaskularnim protektivnim efektima inhibitora dipeptidil peptidaze-4

Ima predstavnika dualnih inhibitora dipeptidil peptidaze-4 i ksantin oksidaze među aminokiselinama i dipeptidima. Identifikovani kao inhibitori ova dva enzima, Trp i Trp-Val primer su peptida iz hrane sa značajnim suprimirajućim efektom na generisanje ROS i protektivnim efektom na degradaciju inkretin hormona (Nongonierma i saradnici, 2013). Pored aktivnosti XO, raspoloživost njenih supstrata, pogođena modulacijom aktivnosti ADA, determiniše produkciju mokraćne kiseline, i potencijalni hipourikemijski agensi sa više ciljnih biomolekula mogu predstavljati povoljan terapijski pristup. Na osnovu rezultata ispitivanja inhibitorynog potencijala linagliptina na DPP-4 i XO, postoji mogućnost da DPP-4

inhibitori purinske osnove (Eckhardt i saradnici, 2007; Lin i saradnici, 2013; Lai i saradnici, 2014; Czechtizky i saradnici, 2013; Costante i saradnici, 2015; Mo i saradnici, 2015; Chyan i Chuang, 2007; Li i saradnici, 2016c; Eckhardt i saradnici, 2008) pokazuju hipourikemijski i antioksidativni efekat istim dualnim mehanizmom kao linagliptin, inhibiranjem aktivnosti DPP-4 i vezivanja ove proteaze sa ADA uz posledični porast koncentracije adenzina i smanjenje raspoloživosti supstrata XO, kao i inhibiranjem aktivnosti XO, sa finalnim smanjenjem produkovanja mokraćne kiseline i ROS (Tomović i saradnici, 2019a).

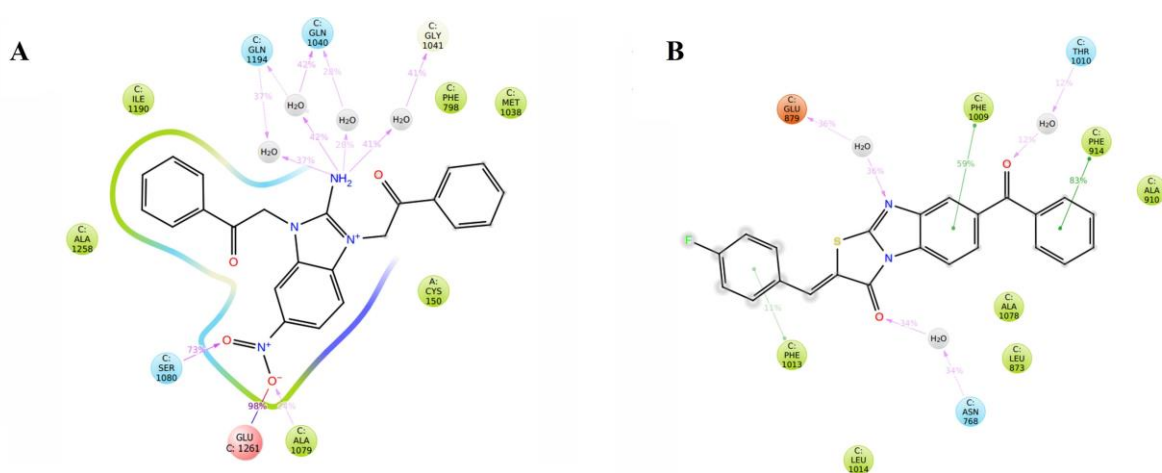
Wallace i saradnici (2008) su pokazali da derivati benzimidazola pokazuju značajan inhibicioni potencijal na DPP-4 sa učešćem biciklične osnove (prstena benzimidazola) u interakcijama sa aminokiselinama proteaze, dok su Nile i saradnici (2013) pokazali da su derivati benzimidazola efikasni i kao XO inhibitori. U ovom radu, inhibicioni potencijal jedinjenja aktivnih u testu inhibicije DPP-4, derivata benzimidazol-2-imina (jedinjenje **5**), bis(benzimidazol-2-il)amina (jedinjenja **21**, **24** i **25**), 6-(fenilkarbonil)[1,3]tiazolo[3,2-*a*]benzimidazol-3-ona (jedinjenje **34**) i benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina i -ftalimida (jedinjenja **94**, **97**, **101**, **102** i **104**) ispitan je i na XO. 2-[2-Imino-5-nitro-3-(2-okso-2-feniletil)-2,3-dihidro-1*H*-benzimidazol-1-il]-1-feniletanon (jedinjenje **5**) i 2-(4-fluorobenziliden)-6-(fenilkarbonil)[1,3]tiazolo[3,2-*a*]benzimidazol-3(2*H*)-on (jedinjenje **34**) su, pored DPP-4, inhibirali i aktivnost XO (Tomovic i saradnici, 2020b).

Interakcije DPP-4 i jedinjenja **5** i **34** su analizirane (Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015). Profil interakcija ovih DPP-4 inhibitora karakteriše se prevashodno vodoničnim vezama sa Lys512, Arg560 i/ili Thr565, što je praćeno hidrofobnim interakcijama sa Phe559 proteaze (Slika 33) (Tomovic i saradnici, 2020b).



Slika 33. Interakcije dipeptidil peptidaze-4 i jedinjenja **5** (A) i **34** (B) tokom 10 ns simulacije molekulske dinamike (prikazane su interakcije zastupljene više od 10% trajanja simulacije) (Tomovic i saradnici, 2020b)

Interakcije XO i jedinjenja **5** su prevashodno jonske sa Glu1261, praćene vodoničnim vezama sa Ala1079. Jedinjenje **34** se vezuje za XO hidrofobnim interakcijama sa Phe914, Phe1009 i Phe1013, udruženim sa interakcijama sa Asn768 i Thr1010 (Slika 34) (Tomovic i saradnici, 2020b). Domen oksidaze u kom se vezuju i supstrat i alopurinol obuhvata aminokiseline Phe649, Asn768, Glu802, Leu873, Arg880, Phe914, Phe1009, Thr1010, Leu1014 i Glu1261 (Šmelcerović i saradnici, 2017). Pored interakcija sa katalitičkim, pokazano je da jedinjenja **5** i **34** uspostavljaju interakcije i sa nekatalitičkim aminokiselinama oksidaze (Tomovic i saradnici, 2020b).



Slika 34. Interakcije ksantin oksidaze i jedinjenja **5** (A) i **34** (B) tokom 10 ns simulacije molekulske dinamike (prikazane su interakcije zastupljene više od 10% trajanja simulacije) (Tomovic i saradnici, 2020b)

Potencijalno izraženiji kardiovaskularni protektivni efekti dualnih inhibitora DPP-4 i XO razmatrani su u našem radu Tomovic i saradnici (2020b).

Povećanje kompleksnosti bolesti i proširenje znanja/razumevanja višestrukih patofizioloških mehanizama promovišu razvoj agenasa sa više ciljnih biomolekula (Proschak i saradnici, 2018; Zhou i saradnici, 2019). Pored proteazne aktivnosti, multifunkcionalna DPP-4 deluje i kao vezujući protein za ADA. Kompleks DPP-4 i ADA katalizuje deaminaciju adenozina do inozina, koji biva konvertovan u hipoksantin (Lee i saradnici, 2015). Adenozin deluje kao homeostatski regulator posredstvom receptor zavisnih i nezavisnih puteva (Cortés i saradnici, 2015). Kostimulatorni signal interakcije ADA sa CD26 na limfocitima vodi i povećanju ekspresije IL-6, IFN- γ i TNF- α , potencirajući inflamatorni odgovor (Pacheco i saradnici, 2005). Ksantin oksidaza konvertuje hipoksantin u ksantin, a ksantin u mokraćnu kiselinu, krajnji produkt katabolizma purina u humanom organizmu. Najveća aktivnost XO je u jetri i intestinumu. Ekspimirana je u citoplazmi i na membrani, aktivna i u cirkulaciji, miokardu, plućima, bubrezima i mozgu. Produkujući slobodne radikale i mokraćnu kiselinu, XO uzima učešće u generisanju endotelne disfunkcije, hipertenzije, srčane insuficijencije (Berry i Hare, 2004; Pacher i saradnici, 2006; Battelli i saradnici, 2018). Ova oksidaza se smatra najvećim izvorom slobodnih radikala u oksidativnom reperfuzija oštećenju u postishemičnom tkivu, što može biti kontrolisano raspoloživošću njenih supstrata zavisnom od degradacije adenin nukleotida. Inhibicija ADA se pokazala efikasnom u suprimiranju

generisanja hipoksantina i ksantina (Xia i Zweier, 1995; Xia i saradnici, 1996). Pokazano je na pacovima sa infarktom miokarda da terapija DPP-4 inhibitorom sitagliptinom u dozi 5 mg/kg *per os* 4 nedelje povećava nivo intersticijalnog adenozina, smanjuje nivo supstrata XO i mokraćne kiseline, i suprimira oksidativni stres. Povoljni efekti sitagliptina bili su slični efektima inhibitora ADA i mogu biti poništeni antagonistima A1 adenzin receptora i egzogenim ksantinom (Lee i saradnici, 2015). Endogeni adenzin pokazuje višestruke protektivne efekte u ishemičnom miokardu, smanjenju produkcije ROS, prevenciji endotelnog oštećenja, i pretpostavlja se da je jedan od mehanizama i potenciranje resinteze adenzin trifosfata (Ely i Berne, 1992). Usled onemogućene deaminacije adenozina inhibicijom DPP-4, adenzin biva refosforilisan do 5' adenzin monofosfata (AMP) adenzin kinazom (Lee i saradnici, 2015). Dipeptidil peptidaza-4 stimuliše ekspresiju ksantin dehidrogenaze, promovišući produkciju mokraćne kiseline. Pokazano je da DPP-4 inhibitor teneligliptin suprimira ekspresiju ksantin dehidrogenaze u epididimalnom adipoznom tkivu pacova na visoko masnoj ishrani u peroralnoj dozi 4 mg/kg dnevno 4 nedelje, i u 3T3-L1 adipocitima u koncentraciji 10 μ M 24 h (Moriya i Satoh, 2016). Kako je linagliptin derivat ksantina, antioksidativna aktivnost ovog DPP-4 inhibitora može biti pripisana najvećim delom inhibiciji XO, što je dokazano na enzimu u serumu zdravih dobrovoljaca *in vitro* (u opsegu koncentracija od 0,5 μ M do 1 mM) i u serumu pacijenata obolelih od dijabetesa na terapiji linagliptinom u peroralnoj dozi 5 mg dnevno 24 nedelje, uz smanjenje nivoa mokraćne kiseline (Yamagishi i saradnici, 2014).

Povezanost povećane koncentracije mokraćne kiseline sa kardiovaskularnim oboljenjima je epidemiološki dokazana, bez utvrđene njene jasne patofiziološke uloge. I ksantin oksidazom generisan oksidativni stres ima značajnu ulogu u razvoju kardiovaskularnih oboljenja. Ima podataka o povoljnim efektima strategija inhibicije XO i smanjenja nivoa mokraćne kiseline kod pacijenata (Pacher i saradnici, 2006; Dawson i Walters, 2006; Doehner i saradnici, 2016). Povećana koncentracija mokraćne kiseline je rizik faktor (koji je izraženiji u već razvijenoj patologiji, u odnosu na asimptomatsku hiperurikemiju (Strazzullo i Puig, 2007)) i marker, i doprinosi razvoju kardiovaskularne i patologije bubrega (Hahn i saradnici, 2017; Kutzing i Firestein, 2008; Levantesi i saradnici, 2013; Liu i saradnici, 2012a). Hiperurikemija predstavlja jednu od metaboličkih i hemodinamskih abnormalnosti u okviru metaboličkog sindroma, koji se karakteriše intolerancijom na glukozu, rezistencijom na insulin, dislipidemijom i hipertenzijom. Generisanjem ROS i mokraćne kiseline, XO učestvuje u patološkim mehanizmima

metaboličkog sindroma uključujući signalizaciju inflamacije, modulaciju biorasploživosti NO interferiranjem sa aktivnošću NADPH oksidaze i NO sintaze, doprinoseći regulaciji endotelne funkcije (El Din i saradnici, 2017; Battelli i saradnici, 2018; Lima i saradnici, 2015). Oksidativni stres uzima učešće u arteriosklerozi, inicijaciji i progresiji endotelne disfunkcije, delujući i pro-trombotski. Slobodni radikali to rade delom smanjenjem aktivnosti eNOS, koja pored regulacije vaskularnog tonusa, inhibira proliferaciju, inflamaciju i trombozu. Reaktivne kiseonične vrste utiču na transkripciju pro-inflamatornih gena, NF- κ B, ICAM-1, VCAM-1, što povećava influks inflamatornih ćelija, uključujući makrofage, koji su sada novi izvor ROS u vaskularnom zidu, rezultujući oštećenjem tkiva (Okafor i saradnici, 2017). Hroničan stres je povezan sa metaboličkim sindromom, dijabetesom, hiperurikemijom, i tromboembolijom. Stres utiče na visceralno adipozno tkivo indukujući lipolizu, produkciju inflamatornih adipokina, metabolička oštećenja, kao što je insulinska rezistencija i tromboza. Na miševima izloženim stresu je dokazano da terapija XO inhibitorom febuksostatom u dozi 1 ili 5 mg/kg dnevno *per os* 2 nedelje smanjuje aktivnost ksantin oksidoreduktaze u visceralnom adipoznom tkivu, i posledično lipolizu, akumulaciju ROS i mokraćne kiseline, aktivnost NADPH oksidaze, ekspresiju MCP-1, TNF- α i IL-6, uz povoljne efekte na osetljivost na insulin, protrombotsku tendenciju i povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima (Yisireyili i saradnici, 2017). Mokraćna kiselina može delovati i kao antioksidans u plazmi reagujući sa superoksid anjonom (uz održavanje aktivne superoksid dismutaze (SOD) (Hink i saradnici, 2002)), vodonik peroksidom, hidroksil radikalom, i peroksinitrit anjonom koji suprimira dalje generisanje NO. Kasnije je dokazano da u reakciji sa peroksinitritom mokraćna kiselina generiše intermedijerne slobodne radikale, delujući onda pro-oksidativno, uz posledično povećanje ekspresije markera inflamacije C-reaktivnog proteina (CRP), IL-1, -6 i TNF- α (Puddu i saradnici, 2012; Ruggiero i saradnici, 2006). Ova kiselina može da reaguje i direktno sa NO (Gersch i saradnici, 2008). Pokazano je na pacovima sa hiperurikemijom i na goveđim endotelnim ćelijama aorte da smanjenje nivoa NO može biti suprimirano inhibiranjem aktivnosti XO i snižavanjem nivoa mokraćne kiseline (Khosla i saradnici, 2005). Eksprementima na životinjama je dokazano da povećanje koncentracije mokraćne kiseline potencira aktivaciju renin-angiotenzin sistema, razvoj oksidativog stresa aktivacijom NADPH oksidaze, disfunkciju mitohondrija, epitel-mezenhim tranziciju, endotelnu disfunkciju, sa razvojem arterioskleroze, glomeruloskleroze, hipertenzije i metaboličkog sindroma (Johnson i saradnici, 2013). Na miševima je pokazano da smanjenje ekspresije i aktivnosti ksantin oksidoreduktaze alopurinolom aplikovanim

intraperitonealno u dozi 50 mg/kg pre reperfuzije pokazuje povoljne efekte u ishemija/reperfuzija oštećenju bubrega uz smanjenje ekspresije pro-inflamatornih faktora TNF- α i MCP-1 (Haga i saradnici, 2017). Na pacijentima sa hroničnom bolešću bubrega je dokazano da je terapija alopurinolom u dozi 100 mg dnevno 2 godine suprimirala progresiju bolesti i smanjila rizik od razvoja kardiovaskularnih oboljenja i hospitalizacije (Goicoechea i saradnici, 2010). Rezultati jedne meta-analize ukazuju na povoljne efekte terapije smanjenja koncentracije mokraćne kiseline u suprimiranju progresije bolesti bubrega (Liu i saradnici, 2018). I pored jakih biohemijskih i dokaza na ćelijskim i životinjskim modelima, i pored epidemioloških podataka, još uvek su otvorena pitanja kompleksne uloge mokraćne kiseline u patogenezi, i prospektivne adekvatno dizajnirane kliničke studije dovoljno dugog trajanja sa ciljem determinisanja značaja hipourikemijske terapije, uopšte tretiranja asimptomatske hiperurikemije i korišćenja mokraćne kiseline kao biomarkera u terapijskim vodičima pomenutih oboljenja, su neophodne (Kanellis i saradnici, 2004; Nakagawa i saradnici, 2006; Pontremoli, 2017; Volterrani i saradnici, 2016; Borghi i saradnici, 2015; Borghi i saradnici, 2018; Viazzi i saradnici, 2006). Koncentracija mokraćne kiseline u serumu se može smatrati markerom rizika za kardiovaskularna oboljenja, ali nema dovoljno dokaza i podrške specifičnom ciljanju ovog markera u terapiji. Razmatranjem mehanizama ukazano je na povoljne efekte inhibicije XO u vaskulaturi, pre nego smanjenja koncentracije mokraćne kiseline u serumu *per se* (Wu i saradnici, 2016b; Duan i Ling, 2008; Higgins i saradnici, 2012).

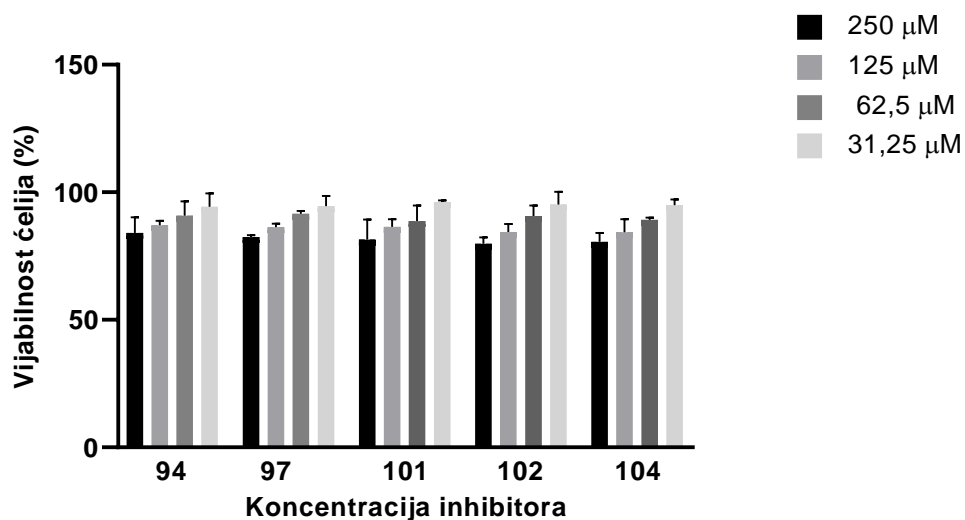
Oksidativni stres igra značajnu ulogu u patogenezi vaskularnih komplikacija dijabetesa. Ciljanje enzima koji učestvuju u generisanju ROS, uključujući XO, i tretman endotelne disfunkcije mogu da suprimiraju progresiju vaskularnih komplikacija dijabetesa (Rochette i saradnici, 2014; Sena i saradnici, 2013; Desco i saradnici, 2002; Rajesh i saradnici, 2009; Robson i saradnici, 2018; Volpe i saradnici, 2018). Prospektivnom kohort studijom dokazano je da je povećana ekspresija XO u pozitivnoj korelaciji sa rizikom za razvoj dijabetes melitusa tipa 2 (Li i saradnici, 2018b). Ksantin oksidaza može da predstavlja novu metu u terapiji vaskularnih komplikacija povezanih sa rezistencijom na insulin i dijabetesom. Pretpostavljeni mehanizmi kojima inhibicija XO ublažava disfunkciju i ishemiju miokarda u insulinskoj rezistenciji mogu biti nishodna regulacija hiperurikemije, oksidativnog stresa, inflamacije i angiotenzin sistema (El-Bassossy i Watson, 2015; Battelli i saradnici, 2014; Butler i saradnici, 2000). Na miševima sa dijabetesom je pokazano da inhibicija XO alopurinolom datim sa vodom u koncentraciji 1mM 10 nedelja može da

suprimira dijabetesom indukovani porast aktivnosti XO u miokardu, jetri i serumu, koncentraciju ROS u miokardu, apoptozu smanjenjem ekspresije i aktivnosti kaspaze-3 i -7, i fibrozu smanjenjem ekspresije transformišućeg faktora rasta beta (TGF- β) i akumulacije kolagena, sa povoljnim efektima na disfunkciju miokarda (Rajesh i saradnici, 2009). Kod pacova sa insulinskom rezistencijom uzrokovanom fruktozom bogatom hranom 12 nedelja, alopurinol je u dozi 20 mg/kg dnevno *per os* 4 nedelje smanjio hiperurikemiju, ekspresiju TNF- α , angiotenzina 2, angiotenzin receptora 1 i laktat dehidrogenaze u miokardu (El-Bassossy i Watson, 2015). Alopurinol je u terapiji 30 mg/kg dnevno 8 nedelja suprimirao tubulointersticijalno oštećenje kod miševa sa dijabetesom smanjujući infiltraciju inflamatornih ćelija, makrofaga, ekspresiju ICAM-1 na tubularnim epitelnim ćelijama, nivo MCP-1 u serumu, i ekspresiju TGF- β (Kosugi i saradnici, 2009). Na pacovima obolelim od dijabetesa dokazano je da terapija feboksostatom u dozi 5 mg/kg dnevno 18 nedelja pokazuje protektivan efekat na razvoj nefropatije smanjenjem koncentracije mokraćne kiseline, suprimiranjem oksidativnog stresa i TGF- β pro-fibrotske signalizacije (Komers i saradnici, 2016). Alopurinol je u dozi 300 mg dnevno mesec dana poboljšao endotelnu funkciju i smanjio nivo malondialdehida (MDA) u krvi pacijenata obolelih od dijabetesa (Butler i saradnici, 2000).

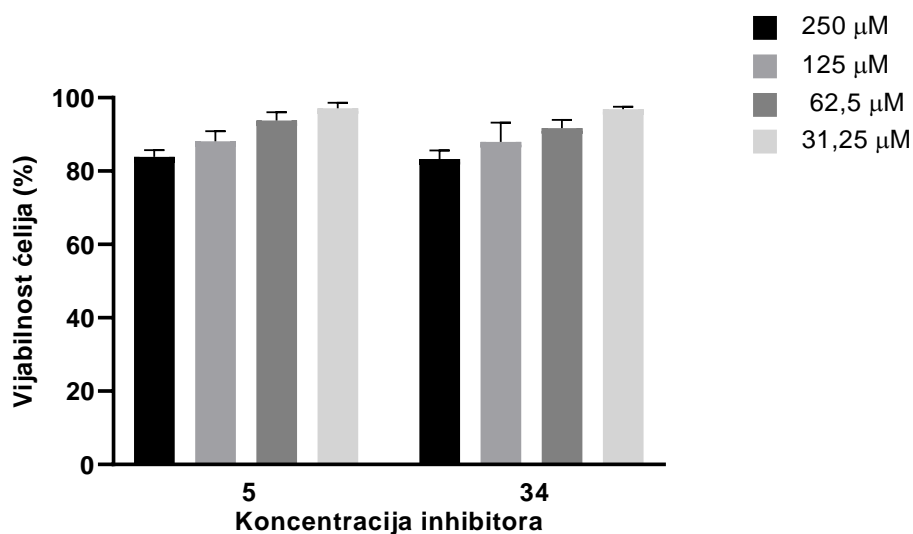
Dakle, hipoglikemijski agensi kao što su DPP-4 inhibitori koji inhibiraju i XO imaju prednosti sa aspekta terapijske efikasnosti, u odnosu na DPP-4 inhibitore koji ne inhibiraju XO, zbog izraženijih kardiovaskularnih protektivnih efekata (Tomovic i saradnici, 2020b).

4.6. Citotoksičnost inhibitora dipeptidil peptidaze-4

Citotoksičan potencijal pet aktivnih benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amin i -ftalimid derivata (jedinjenja **94**, **97**, **101**, **102** i **104**) (Slika 35) i dualnih DPP-4 i XO inhibitora (jedinjenja **5** i **34**) (Slika 36) ispitan je na Caco-2 ćelijama. Jedinjenja nisu pokazala izraženiji citotoksičan efekat u koncentracijama manjim od 250 μ M nakon 24 h inkubacije (Tomovic i saradnici, 2020a; Tomovic i saradnici, 2020b).



Slika 35. Citotoksičnost aktivnih benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina i -ftalimida (jedinjenja **94**, **97**, **101**, **102** i **104**) na Caco-2 ćelijama (Tomovic i saradnici, 2020a)



Slika 36. Citotoksičnost dualnih inhibitora dipeptidil peptidaze-4 i ksantin oksidaze (jedinjenja **5** i **34**) na Caco-2 ćelijama (Tomovic i saradnici, 2020b)

4.7. Teorijska razmatranja plejotropnih efekata inhibicije dipeptidil peptidaze-4

Dipeptidil peptidaza-4 katalitičkom aktivnošću i interakcijom sa brojnim supstratima i ligandima učestvuje u modulacijama ekspresije medijatora oksidativnog stresa, inflamacije, fibroze i apoptoze. Višestruki efekti inhibicije dipeptidil peptidaze-4 razmatrani su u našim radovima (Tomovic i saradnici, 2019b; Anderluh i saradnici, 2016; Anderluh i saradnici, 2019), što predstavlja doprinos razjašnjavanju značaja inhibicije, multifunkcionalnosti ove proteaze i plejotropnih efekata njenih inhibitora, postojećih i novih, među kojima su i oni pronađeni u ovoj disertaciji.

4.7.1. Anti-inflamatorni efekti inhibitora dipeptidil peptidaze-4 u vaskularnom sistemu, miokardu i bubrezima

Inhibicija DPP-4 doprinosi protektivnim efektima u endotelu i supresiji inflamacije perzistentno prisutne u vaskulaturi u kardiovaskularnim bolestima (Avogaro i Fadini, 2014; Daiber i saradnici, 2017; Steven i saradnici, 2015a). Lee i Jun su 2016. godine objavili odličan pregled anti-inflamatornih efekata GLP-1-bazirane terapije. Pomenuti pregled je dao primere anti-inflamatornih efekata GLP-1 receptor agonista i DPP-4 inhibitora u dijabetesu tipa 1 i 2, arteriosklerozi, dijabetesnoj nefropatiji, neurodegenerativnim bolestima, astmi, steatohepatitisu, i psorijazi (Lee i Jun, 2016). Pregledom su obuhvatili neke od odobrenih gliptina i neke od mogućih mehanizama njihovih anti-inflamatornih efekata u kardiovaskularnoj i patologiji bubrega. U cilju fokusiranja na anti-inflamatorne efekte DPP-4 inhibicije u vaskularnom sistemu, miokardu i bubrezima, detaljan pregled ćelijskih i molekulskih mehanizama anti-inflamatorne aktivnosti DPP-4 inhibitora u kardiovaskularnom sistemu i bubrezima dat je u našem radu Tomovic i saradnici (2019b). Ovi efekti mogu biti GLP-1 zavisni ili nezavisni, i zavisni od brojnih faktora, tipa ćelija, tkiva, regionalne ekspresije citokina, tipa i obima oštećenja (Zhong i saradnici, 2013b). Protektivni efekti DPP-4 inhibitora u kardiovaskularnom sistemu i bubrezima, supresivni efekti na medijatore inflamacije, oksidativnog stresa, fibroze i apoptoze, dokazani su *in vitro* na ćelijskim linijama i *in vivo* na eksperimentalnim životinjama i humanim subjektima (Slika 37). Detaljniji mehanizmi ovih efekata, porast ili smanjenje ekspresije i aktivnosti različitih markera, ostaju predmet razjašnjavanja.

Efekti na ćelijskim linijama životinja - Sitagliptin je suprimirao proliferaciju, aktivaciju NF- κ B, ekspresiju MMP-2 i -9 u glatko-mišićnim ćelijama aorte pacova u koncentracijama 25-200 μ M 24 h (Lim i saradnici, 2012). Gemigliptin je u vaskularnim glatko-mišićnim ćelijama pacova u opsegu koncentracija 100-500 μ M 24 h suprimirao TNF- α indukovanu NF- κ B translokaciju u nukleus i smanjio ekspresiju MCP-1, VCAM-1, i aktivnost MMP-2 (Choi i saradnici, 2015). U kardiomiocitima pacova ovaj gliptin je suprimirao ekspresiju TNF- α , IL-1 β i -6, fosforilaciju p38 protein kinaze aktivirane mitogenima (MAPK) u koncentraciji 250 μ M 30 minuta (Hwang i saradnici, 2014), dok je u mezangijalnim i epitelnim ćelijama proksimalnih tubula pacova u koncentracijama 100, 200 i 400 μ g/ml 9 h suprimirao TGF- β signalizaciju (Jung i saradnici, 2016). Vildagliptin je u kulturi makrofaga miša u koncentracijama 0,01-10 μ M 2 h smanjio aktivaciju NF- κ B (Lee i saradnici, 2016).

Efekti u vaskularnom sistemu životinja - Vildagliptin dat peroralno 3 mg/kg jednom dnevno 12 nedelja smanjio je ekspresiju receptora za krajnje produkte glikacije (RAGE) delom preko GLP-1 receptor/cAMP aktivacije, i suprimirao efekte krajnjih produkata glikacije (AGE), uključujući smanjenje ekspresije MCP-1, VCAM-1, NF- κ B, TGF- β , i dve subjedinice NADPH oksidaze u torakalnoj aorti pacova obolelih od dijabetesa (Matsui i saradnici, 2011). Linagliptin je u dozi 2 mg/kg *per os* dnevno 4 nedelje povećao aktivnost eNOS i nivo NO, a smanjio ekspresiju NADPH oksidaze u mezenteričnoj arteriji pacova obolelih od dijabetesa tipa 1 (Salheen i saradnici, 2015). Aplikovan u dozi 5 mg/kg dnevno subkutano 3 dana pre indukovanja endotoksemije, ovaj gliptin je normalizovao nivo IL-6, ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 i TNF- α kod pacova sa endotoksemijom, posredstvom signalnog puta protein kinaze aktivirane adenzin monofosfatom (AMPK) u DPP-4/GLP-1 kaskadi (Steven i saradnici, 2015b). Alogliptin je prevenirao povećanje ekspresije MMP-2 i -9 smanjenjem generisanja ROS, suprimirajući formiranje aneurizme na modelu aneurizme abdominalne aorte pacova dozno-zavisno nakon 7 dana terapije dozom 1 ili 3 mg/kg *per os* jednom dnevno (Bao i saradnici, 2014). Vildagliptin je u dozi 5 mg/kg datoj intraezofagealno u trajanju od 6 nedelja kod pacova sa hipertenzijom smanjio aktivnost NADPH oksidaze u torakalnoj aorti, povećao aktivnost eNOS u mezenteričnoj arteriji i levoj komori miokarda, smanjio nivo triglicerida i CRP u krvi, smanjio aktivaciju NF- κ B i ekspresiju VCAM-1 u mezenteričnoj arteriji, suprimirao ekspresiju faktora vaskularne inflamacije TNF- α i MCP-1, a povećao nivo lipoproteina visoke gustine (Renna i saradnici, 2014). Sitagliptin je u dozi 10

mg/kg *per os* dnevno 2 nedelje posredstvom GLP-1/GLP-1 receptor/AMPK signalizacije smanjio produkciju ROS u bubrežnim arterijama pacova sa hipertenzijom (Liu i saradnici, 2014). Kod apolipoprotein E deficijentnih miševa des-fluoro sitagliptin, u peroralnoj dozi 200 mg/kg dnevno 16 nedelja, suprimirao je ekspresiju IL-1 β , -6, TNF- α , MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 u aorti i povećao eNOS fosforilaciju. Ovaj gliptin je pokazao anti-aterogene efekte povećanjem nivoa GLP-1 u makrofagima i endotelu (Matsubara i saradnici, 2012). Teneligliptin dat *per os* u dozi 60 mg/kg jednom dnevno 20 nedelja normoglikemijskim apolipoprotein E deficijentnim miševima, smanjio je depoziciju lipida, ekspresiju TNF- α i MCP-1 u abdominalnoj aorti, i akumulaciju makrofaga u arteriosklerotskom plaku suprimirajući vaskularnu inflamaciju. Smanjio je ekspresiju ICAM-1, VCAM-1 i subjedinicu NADPH oksidaze, generisanje ROS u perivaskularnom adipoznom tkivu oko luka aorte, što je značajno s obzirom na to da inflamacija perivaskularnog adipoznog tkiva predstavlja pokretač vaskularne inflamacije i aterogeneze (Salim i saradnici, 2017). Alogliptin je smanjio inflamaciju, proliferaciju vaskularnih glatko-mišićnih ćelija, ekspresiju TNF- α , MCP-1, IL-1 β i NF- κ B u oštećenim arterijama miševa deficijentnih za receptor lipoproteina niske gustine (LDL), u peroralnoj dozi 20 mg/kg jednom dnevno 14 dana (Akita i saradnici, 2015). Ovaj gliptin aplikovan u dozi 15 ili 45 mg/kg dnevno *per os* 2 nedelje smanjio je stresom indukovani povišeni nivo MCP-1, TNF- α i IL-6 u plazmi, i suprimirao inflamaciju adipoznog tkiva kod miševa (Yisireyili i saradnici, 2016).

Efekti u miokardu životinja - Sitagliptin je, preko GLP-1 stabilizacije, smanjio fibrozu miokarda i ekspresiju TGF- β , kod pacova sa dijabetesom nakon 10 nedelja terapije dnevnom dozom 10 mg/kg *per os* (Picatoste i saradnici, 2013). U peroralnoj dozi 3 mg/kg jednom dnevno 3 nedelje, vildagliptin je poboljšao funkciju mitohondrija miokarda, prevenirao depolarizaciju mitohondrijalnih membrana, smanjio produkciju ROS i ekspresiju markera lipidne peroksidacije, MDA, u miokardu pacova sa insulinskom rezistencijom izazvanom visoko masnom hranom (Apaijai i saradnici, 2012; Apaijai i saradnici 2013). Linagliptin je u dozi 5 mg/kg dnevno dat *per os* 4 nedelje suprimirao ekspresiju TGF- β i MMP-2 u marginalnoj zoni i fibroblastima miokarda pacova nakon infarkta (Yamaguchi i saradnici, 2019). U ishemija/reperfuzija oštećenju miokarda pacova sitagliptin je u peroralnoj dozi 400 mg/kg 3 dana smanjio veličinu infarkta i produkciju ROS, ekspresiju NADPH oksidaze, TNF- α , NF- κ B, MMP-9, ICAM-1, Bax proteina, kaspaze-3, dok je ekspresiju Bcl-2 proteina, citohroma C, faktora-1 stromalnih ćelija (SDF-1), CXC hemokin receptora 4 (CXCR4) i

antioksidativnih enzima povećao, suprimirajući oksidativni stres, inflamaciju i apoptozu uz očuvanje integriteta mitohondrija i povećanu ekspresiju faktora angiogeneze (Chua i saradnici, 2014). U ishemijskoj/reperfuzijskoj oštećenju miokarda pacova terapija sitagliptinom intraperitonealno injektovanim u dozi 300 mg/kg dnevno 2 nedelje smanjila je laktat dehidrogenazu, kreatin kinazu MB i nivo MDA, Bax/Bcl-2 odnos, dok je povećala ekspresiju SOD i glutation peroksidaze (GSHPx), mehanizmom posredovanim aktivacijom GLP-1 receptor signalizacije (Chang i saradnici, 2013). Pored TNF- α i IL-6 ovaj gliptin je smanjio i ekspresiju RAGE u ventrikulama pacova sa hipertenzijom u peroralnoj dozi 10 mg/kg dnevno 4 nedelje (Lee i saradnici, 2013). Kod pacova sa hipertenzijom linagliptin je u peroralnoj dozi 3 mg/kg dnevno 4 nedelje suprimirao hipertrofiju miokarda, fibrozu, ekspresiju MCP-1 i infiltraciju makrofaga, ekspresiju kolagena I i III, remodelovanje koronarne arterije i oksidativni stres nishodnom regulacijom subjedinic NADPH oksidaze (Koibuchi i saradnici, 2014). U indukovanom oksidativnom stresu miokarda, inflamaciji, i fibrozi kod miševa, linagliptin aplikovan u peroralnoj dozi 8 mg/kg 4 meseca smanjio je aktivaciju NF- κ B i p38 MAPK, suprimirao ekspresiju pro-inflamatornih i pro-fibrogenih citokina, uključujući IL-6, -18 i MCP-1, a povećao ekspresiju anti-inflamatornog IL-10 (Aroor i saradnici, 2017).

Efekti u bubrezima životinja - Kod pacova obolelih od dijabetesa saksagliptin je u dozi 10 mg/kg dnevno *per os* nakon 12 nedelja terapije povećao nivo SDF-1, što je dalje uzrokovalo aktivaciju PKA, smanjenje ekspresije NADPH oksidaze, generisanja ROS, fosforilacije ERK 1/2, i posledično suprimiranje TGF- β posredovane epitel-mezenhim tranzicije podocita (Chang i saradnici, 2017). Vildagliptin je suprimirao glomerulosklerozu, oštećenje glomerularne bazalne membrane, albuminuriju, ekspresiju TGF- β i tubularnu nekrozu, pretpostavlja se posredstvom GLP-1, kod pacova sa dijabetesnim oštećenjem bubrega u dozi 4 ili 8 mg/kg *per os* dnevno 24 nedelje (Liu i saradnici, 2012b). Kod pacova sa dijabetesom sa ishemijskoj/reperfuzijskoj oštećenjem bubrega sitagliptin je u dozi 5 mg/kg *per os* jednom dnevno 2 nedelje smanjio nivo MDA, dok su nivo glutationa i aktivnost GSHPx, katalaze i SOD bili povećani. Ovaj gliptin je smanjio aktivnost mijeloperoksidaze, enzima koji inicira oksidativno oštećenje kao katalizator formiranja hipohlorne kiseline, prevenirao generisanje ROS i aktivaciju neutrofila, inhibirao XO, suprimirao apoptozu i smanjio nivo TNF- α (Vaghasiya i saradnici, 2011). Sitagliptin, dat u dozi 600 mg/kg *per os* 1 h nakon ishemijskoj/reperfuzijskoj oštećenja smanjio je ekspresiju biomarkera inflamacije ICAM-1, TNF- α , NF- κ B, MMP-9, IL-1 β , Bax/Bcl-2 odnos, ekspresiju NADPH oksidaze, produkciju ROS, dok

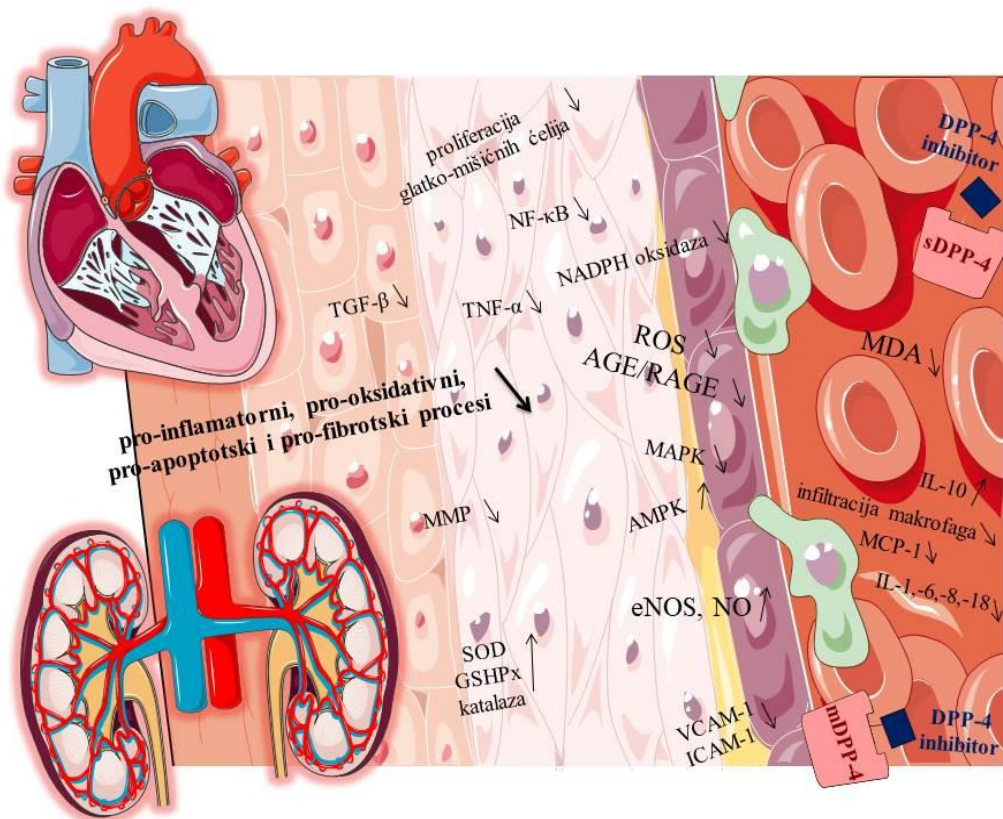
je povećao ekspresiju GLP-1 (potencirajući njegove protektivne efekte u inflamaciji i oksidativnom stresu), GSHPx, SOD, katalaze, IL-10 i eNOS u akutnom ishemijskom/reperfuzijskom oštećenju bubrega pacova (Chen i saradnici, 2013). Terapija sitagliptinom u dozi 10 mg/kg dnevno *per os* 2 nedelje pokazala je povoljan efekat na relaksaciju endotela bubrežnih arterija kod pacova sa hipertenzijom, pretpostavlja se povećanjem nivoa GLP-1 koji, aktivirajući GLP-1 receptore, povećava nivo cAMP, PKA, AMPK, eNOS i NO (Liu i saradnici, 2012c). U dijabetesu kod miševa, u odgovoru na AGE mikroRNK-29 je suprimirana, što je povezano sa progresivnim dijabetesnim oštećenjem bubrega, uključujući mikroalbuminuriju, TGF- β posredovanu fibrozu i NF- κ B indukovanu inflamaciju (Chen i saradnici, 2014). Nekodirajući kratki polinukleotidni lanci mikroRNK-29 su potencijalni regulatori DPP-4 u bubregu i endotelnim ćelijama. Kod miševa obolelih od dijabetesa linagliptin je u peroralnoj dozi 5 mg/kg dnevno 4 nedelje povoljno delovao u fibrozi bubrega pozitivnom regulacijom mikroRNK-29 (Kanasaki i saradnici, 2014). Inhibicija integrina β 1 ili DPP-4 rezultuje suprimiranjem TGF- β indukovane formiranja heterodimera TGF- β receptora, indukovane Smad3 fosforilacije i endotel-mezenhim tranzicije, što je dokazano u bubrezima miševa obolelih od dijabetesa tretiranih linagliptinom u dozi 5 mg/kg dnevno *per os* 4 nedelje (Shi i saradnici, 2015). U bubrezima miševa obolelih od dijabetesa je dokazano da DPP-4, integrin- β 1 i kaveolin-1 igraju značajnu ulogu u epitel-mezenhim tranziciji. Teneligliptin je, u dozi 30 mg/kg dnevno *per os* u trajanju od 2 nedelje, inhibicijom DPP-4, negativno regulisao interakciju ove proteaze sa integrinom i kaveolinom, i suprimirao epitel-mezenhim tranziciju (Takagaki i saradnici, 2019). Dat *per os* u dozi 100 mg/kg jednom dnevno 12 nedelja, gemigliptin je u bubrezima miševa sa dijabetesnom nefropatijom suprimirao ekspresiju RAGE i akumulaciju produkata oksidacije proteina, koji interaguju sa RAGE i daju slične biološke odgovore kao AGE (Jung i saradnici, 2015). Kod apolipoprotein E deficijentnih miševa, sitagliptin u dozi 200 mg/kg dnevno dat sa hranom 16 nedelja značajno je povećao fosforilaciju AMPK u bubrezima, što je suprimiralo progresiju oštećenja bubrega, smanjilo nivo TGF- β , njegovih efekatora i fosforilaciju p38 i ERK (Li i saradnici, 2014).

Efekti na humanim ćelijskim linijama - Alogliptin je indukovao aktivnost eNOS i povećao raspoloživost NO u endotelnim ćelijama humane umbilikalne vene fosfoinozimid 3-kinaza/protein kinaza B zavisnom fosforilacijom ove sintaze, u koncentraciji 50 μ M (Shah i saradnici, 2011). Linagliptin je smanjio aktivnost NADPH oksidaze, DPP-4 indukovanu produkciju ROS, ekspresiju RAGE i ICAM-1, AGE/RAGE indukovani inflamatorni i

trombogeni odgovor u endotelnim ćelijama humane umbilikalne vene u koncentracijama 10 nM i 0,5 μ M 4 h. Signalizacija AGE/RAGE može da promoviše proteolitičku razgradnju membranski vezane DPP-4 u endotelnim ćelijama, generisanjem superoksida (Ishibashi i saradnici, 2013). Inkretini, GLP-1 i GIP, suprimiraju AGE indukovano oštećenje endotelnih ćelija antioksidativnim efektima posredovanim povećanjem nivoa cAMP koji učestvuje u smanjenju aktivnosti NADPH oksidaze. Signalizacijom GLP-1/cAMP su ekspresija RAGE, produkcija ROS i ekspresija VCAM-1 u endotelnim ćelijama suprimirane (Ishibashi i saradnici, 2010). U endotelnim ćelijama humane umbilikalne vene sitagliptin je u opsegu koncentracija od 20 nM do 5 μ M 16 h smanjio TNF- α indukovanu ekspresiju ICAM-1, VCAM-1 i NF- κ B, zavisno i nezavisno od povećanja raspoloživosti GLP-1 (Hu i saradnici 2013). Sitagliptin je smanjio ekspresiju MMP-2 i -9 u endotelnim ćelijama humane umbilikalne vene u opsegu koncentracija 25-200 μ M 24 h (Lim i saradnici, 2012). Ekspresija NF- κ B, TNF- α , MCP-1, IL-1 β i -6 i VCAM-1 bila je značajno smanjena, AMPK fosforilacija povećana u endotelnim ćelijama humane umbilikalne vene gemigliptinom u koncentraciji 250 μ M 1 h, bez efekata na ekspresiju ICAM-1. Aktivacija AMPK signalnog puta prevenira apoptozu endotelnih ćelija i ovaj signalni put se može smatrati protektivnim u endotelnoj disfunkciji. Ova kinaza suprimira aktivnost NF- κ B i pokazuje povoljan efekat na formiranje penastih ćelija indukovano LDL oksidacijom (Hwang i saradnici, 2015). Diprotin A je u koncentraciji 100 μ M, nakon inkubacije 24 i 48 h, suprimirao apoptozu endotelnih ćelija humane umbilikalne vene uzrokovanu hipoksijom. Signalni put SDF-1/CXCR4 učestvuje u mehanizmu citoprotektivnih efekata DPP-4 inhibicije (Nagamine i saradnici, 2017). Des-fluoro sitagliptin je u koncentraciji 2 μ M nakon inkubacije u trajanju od 1 h povećao fosforilaciju eNOS posredstvom GLP-1/cAMP/PKA signalnog puta i aktivnost SOD i GSHPx, dok je apoptoza endotelnih ćelija humane koronarne arterije bila suprimirana (Matsubara i saradnici, 2012). Alogliptin je u koncentraciji 1 nM inhibirao ERK fosforilaciju i posledično MMP-1 ekspresiju indukovanu lipopolisaharidom u humanim makrofagima. Pored MMP-1, ovaj gliptin je inhibirao ekspresiju i MMP-9, -12 i -15 (Ta i saradnici, 2010). Sitagliptin (25 μ M) i NVP-DPP728 (270 μ M) su nakon 24 h inkubacije suprimirali ekspresiju IL-1 β u humanim makrofagima inhibirajući aktivnost PKC, aktivacijom GLP-1 receptora (Dai i saradnici, 2014). Linagliptin je u koncentraciji 30 nM 72 h suprimirao aktivaciju TGF- β u humanim ćelijama proksimalnih tubula bubrega (Panchapakesan i saradnici, 2013b).

Efekti na humanim subjektima - Na pacijentima obolelim od dijabetes melitusa tipa 2 na terapiji DPP-4 inhibitorima, vildagliptinom 50 mg dva puta dnevno i sitagliptinom 100 mg jednom dnevno, 3 meseca, dokazano je da ovi gliptini mogu prevenirati progresiju arterioskleroze smanjenjem oksidativnog stresa i inflamacije, i suprimirajući dnevne fluktuacije glikemije, a pokazano je da dnevne fluktuacije glikemije više doprinose razvoju arterioskleroze u odnosu na hroničnu hiperglikemiju (Barbieri i saradnici, 2013). U dozi 50 mg dva puta dnevno 12 nedelja vildagliptin je smanjio nivo markera oksidativnog stresa i sistemske inflamacije u plazmi, uključujući IL-6, -18, i TNF- α kod pacijenata sa dijabetes melitusom tipa 2 (Rizzo i saradnici, 2012). Terapijom sitagliptinom u dozi 100 mg dnevno 6 nedelja, pored IL-6 i -18, nivo CRP i solubilnog ICAM-1 smanjen je u plazmi pacijenata sa dijabetes melitusom tipa 2, što je, pretpostavlja se, posledica povećanja raspoloživosti GLP-1 (Tremblay i saradnici, 2014). Teneeligliptin je u dozi 20 mg jednom dnevno 6 meseci smanjio VCAM-1 ekspresiju i suprimirao progresiju aterotromboze kod pacijenata sa dijabetes melitusom tipa 2 (Okuda i saradnici, 2016). Sitagliptin u dozi 50 mg dnevno 3 meseca povećao je ekspresiju anti-inflamatornog IL-10 u serumu i monocitima periferne krvi pacijenata sa dijabetesom (Satoh-Asahara i saradnici, 2013). Alogliptin, dat u dozi 25 mg jednom dnevno 12 nedelja suprimirao je AGE/RAGE efekte u cirkulaciji i smanjio albuminuriju kod pacijenata sa dijabetesom (Sakata i saradnici, 2013).

Generalno, ćelijski i molekularni mehanizmi anti-inflamatorne aktivnosti u protektivnim efektima DPP-4 inhibitora u kardiovaskularnom sistemu i bubrezima obuhvataju uticaj na pro- i anti-inflamatorne medijatore, citokine, ćelije imunološkog sistema, ćelijske adhezione molekule, enzime, transkripcione faktore, pro- i anti-apoptotske medijatore, markere oksidativnog stresa i antioksidativne enzime, receptore. Inhibitori DPP-4 mogu pokazati povoljan efekat u prevenciji, supresiji progresije, poboljšanju prognoze komplikacija dijabetesa u kardiovaskularnom sistemu i bubrezima (Tomovic i saradnici, 2019b). Na osnovu detaljnog sagledavanja ovih efekata, naša pretpostavka je da funkcionalni profil i spektar terapijskih indikacija postojećih i novih DPP-4 inhibitora može biti značajno proširen, iako je nastavak evaluacije studijama dužeg trajanja i kliničkom praksom neophodan kako bi profil ovih agenasa još detaljnije bio razjašnjen.



Slika 37. Medijatori protektivnih efekata inhibitora dipeptidil peptidaze-4 u kardiovaskularnoj i patologiji bubrega (adaptirano iz Tomovic i saradnici, 2019b)

4.7.2. Dipeptidil peptidaza-4 i faktor-1 stromalnih ćelija u reparaciji miokarda

Inhibitori DPP-4 pokazuju povoljne efekte tokom oporavka nakon infarkta miokarda praćenim nekrozom i apoptozom, prevencijom razlaganja hemotaktičnog citokina SDF-1, posledičnim povećanjem broja progenitornih endotelih ćelija, i poboljšanjem endotelne funkcije, na šta je ukazano u našem radu Anderluh i saradnici (2016).

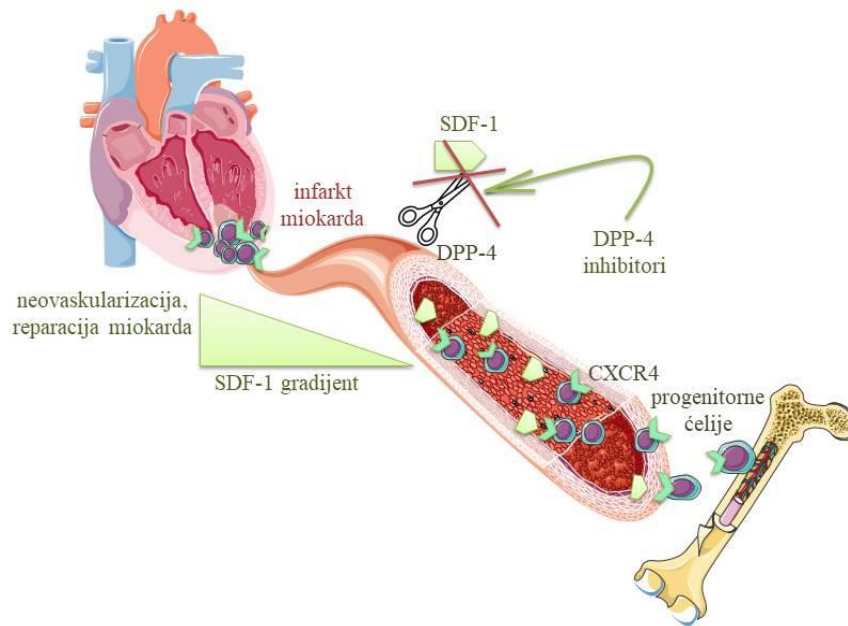
Faktor-1 stromalnih ćelija je inicijalno definisan kao produkt stromalnih ćelija kostne srži, konstitutivno i inducibilno široko eksprimiran u miokardu, jetri, slezini, bubrezima, skeletnim mišićima (Schober i saradnici, 2006; Ghadge i saradnici, 2011). Monomerna forma SDF-1 je primarno odgovorna za kardioprotektivne efekte (smanjenje veličine infarkta, porast rezistencije na ishemija/reoksigenacija oštećenje, potenciranje angiogeneze, strukturna/funkcionalna regeneracija miokarda aktivacijom faktora rasta i signalnih puteva u kardiomiocitima, direktno i mobilizacijom progenitornih ćelija), dok dimerna forma pokazuje

veći afinitet prema receptoru (Veldkamp i saradnici, 2009). Periferni limfociti, monociti, endotelne, glatko-mišićne ćelije, hematopoetske i embrionalne matične ćelije eksprimiraju G-protein kuplovani receptor CXCR4, čiji je ligand SDF-1 (Ganju i saradnici, 1998; Cencioni i saradnici, 2012). Ekspresija SDF-1 je pozitivno regulisana u ishemiji (Chavakis i saradnici, 2008). Fiziološki, kostna srž raspolaže najvišim koncentracijama SDF-1 u poređenju sa drugim tkivima. Ako je koncentracijski gradijent SDF-1 veći u miokardu, progenitorne ćelije iz kostne srži indukovane SDF-1 hemokinom bivaju translocirane u ishemični oštećeni miokard (Liang Tang i saradnici, 2005). Ovaj hemokin modulira adheziju matičnih ćelija za endotelne ćelije, aktivacijom, pre nego indukovanom *de novo* ekspresijom različitih adhezionih molekula. Faktor-1 stromalnih ćelija aktivira integrine, limfocitni funkcionalni antigen-1 i veoma kasni antigen-4 i -5, na humanim hematopoeznim matičnim ćelijama, i indukuje interakciju limfocitnog funkcionalnog antigena-1 sa ICAM-1 i veoma kasnog antigena-4 sa VCAM-1. Ovaj hemokin biva sekretovan i iz matičnih/progenitornih ćelija i učestvuje u autokrinoj/parakrinoj regulaciji njihovog razvoja (Kucia i saradnici, 2005). Povećana koncentracija i delovanje SDF-1 na površini oštećenih kardiomiocita, sa eksprimiranim CXCR4, može suprimirati apoptozu miocita (Zhang i saradnici, 2007).

Connelly i saradnici (2016) su objavili prvu *in vivo* studiju o povoljnim efektima inhibicije DPP-4 nakon eksperimentalno indukovanog infarkta miokarda. Pacovi su bili tretirani DPP-4 inhibitorom saksagliptinom u dozi 10 mg/kg dnevno, GLP-1 receptor agonistom liraglutidom u dozi 0,2 mg/kg subkutano dva puta dnevno i/ili imunostimulansom pleriksafom, koji pozitivno reguliše mobilizaciju matičnih ćelija, u dozi 1 mg/kg dnevno subkutano, 6 nedelja, sa početkom terapije 2 nedelje pre indukovanja infarkta miokarda. Mortalitet nakon infarkta miokarda bio je značajno smanjen i funkcija miokarda obnovljena samo kod pacova tretiranih saksagliptinom, što dokazuje da inhibicija DPP-4 povoljno utiče na funkciju miokarda nakon infarkta, nezavisno od smanjenja glikemije. Iako indirektno, ova studija ukazuje da DPP-4 inhibicijom biva olakšan oporavak miokarda i GLP-1 nezavisnim mehanizmom, pretpostavlja se produžavanjem biološkog polu-vremena SDF-1.

Veliki broj studija ukazuje na povoljne efekte SDF-1 posredovanog terapijskog pristupa nakon infarkta, ishemije miokarda i srčane insuficijencije, pretpostavlja se indukcijom signalnih puteva značajnih za preživljavanje ćelija i promovisanjem neovaskularizacije. Proteolitička degradacija može ograničiti terapijsku efikasnost SDF-1. Protein S4V, rezistentan na DPP-4, sa zadržanim hemotaktičnim potencijalom, dizajniran je i sintetisan. Intramiokardijalno, ovaj protein indukuje mobilizaciju matičnih ćelija i povoljno

utiče na funkciju miokarda nakon infarkta (Ghadge i saradnici, 2011), efikasan u prevenciji insuficijencije miokarda i reparaciji povređenog tkiva (Segers i saradnici, 2007). Neinvazivno degradacija SDF-1 može biti suprimirana inhibicijom DPP-4. Inhibicija DPP-4 stabilizuje aktivan SDF-1, uzrokujući porast mobilizacije CXCR4 pozitivnih progenitornih ćelija u ishemični miokard i poboljšanje funkcije miokarda (Slika 38) (Zaruba i saradnici, 2009).



Slika 38. Mobilizacija progenitornih ćelija u oštećeni miokard indukovana faktorom-1 stromalnih ćelija, potencirana inhibicijom dipeptidil peptidaze-4 (adaptirano iz Zaruba i saradnici, 2009)

I GLP-1 i SDF-1 povećavaju broj progenitornih endotelih ćelija i povoljno utiču na funkciju endotela, što navodi na DPP-4 inhibitore kao kandidate u terapiji i vaskulogenezi (Huang i saradnici, 2012). Povoljni efekti DPP-4 inhibicije u post-ishemijskoj angiogenezi i reparaciji miokarda nakon infarkta, posredovani SDF-1/CXCR4 signalizacijom (Anderluh i saradnici, 2016), daju potporu pretpostavci da gliptini mogu predstavljati dobru terapijsku strategiju u reparaciji miokarda.

4.7.3. Inhibicija dipeptidil peptidaze-4: plućna hipertenzija, nova terapijska indikacija?

Pirozzi i saradnici (2015; 2017) su objavili prikaze slučajeva o primeni DPP-4 inhibitora vildagliptina u dozi 50 mg dva puta dnevno 6 meseci u terapiji pacijenata obolelih od dijabetes melitusa tipa 2 sa plućnom hipertenzijom. Ovi prikazi slučajeva ukazuju na povoljne efekte vildagliptina u plućnoj hipertenziji, uz objašnjenje da inhibicijom DPP-4 raspoloživost GLP-1 biva povećana, što promovise vazorelaksaciju plućnih arterija, uz anti-inflamatorne efekte. Iako GLP-1, pretpostavlja se, ima značajnu ulogu u terapiji plućne hipertenzije, ovaj inkretin može biti jedan od mnogih modulatora pogođenih inhibicijom DPP-4 (Beckers i saradnici, 2017). Višestruki efekti DPP-4 inhibicije u vaskularnom i remodelovanju vezivnog tkiva u plućnoj hipertenziji, i plućna hipertenzija kao potencijalno nova indikacija za gliptine koji mogu biti efikasni i u ireverzibilnoj fazi vaskularnog remodelovanja iniciranoj endotel-mezenhim tranzicijom i proliferacijom/migracijom fibroblasta (Slika 39), obrazloženi su u našem radu Anderlüh i saradnici, 2019.

Vaskularno remodelovanje u plućnoj hipertenziji se karakteriše reverzibilno povećanom proliferacijom glatko-mišićnih ćelija. Kritičan korak i uvođenje u ireverzibilnu fazu može biti oslabljena regulacija apoptoze endotelnih ćelija, što uzrokuje obliteraciju distalnih plućnih arterija (Ranchoux i saradnici, 2018; Sakao i saradnici, 2010). Parakrina komunikacija endotelnih i glatko-mišićnih ćelija je značajna za održavanje homeostaze u plućnoj cirkulaciji, i posredovana je primarno azot monoksidom i endotelinom-1 (ET-1). Azot oksid pokazuje anti-proliferativne efekte u glatko-mišićnim ćelijama aktivacijom ciklični guanozin monofosfat (cGMP) zavisne protein kinaze, praćenom inhibicijom MAPK (Barman, 2005; Gao i saradnici, 2016). Smanjeno generisanje NO može biti obnovljeno inhibicijom p38 MAPK (Weerackody i saradnici, 2009). U plućnoj hipertenziji, eNOS aktivnost i NO u plućnoj vaskulaturi su smanjeni (Giaid i Saleh, 1995). Inkretin GLP-1 može da indukuje vazodilataciju indirektnom fosforilacijom eNOS i povećanjem NO i cAMP nivoa. Receptori za GLP-1 su eksprimirani u plućima, uključujući epitel, alveole i arterijske glatko-mišićne ćelije (Nguyen i saradnici, 2017). Dipeptidil peptidaza-4 je široko eksprimirana u parenhimu pluća, uključujući alveolarne makrofage, bronhijalne epitelne i endotelne ćelije, sa povećanom ekspresijom u patološkim stanjima (Meyerholz i saradnici, 2016). Dipeptidil peptidaza-4 katalizovanom GLP-1 degradacijom povoljni efekti inkretina u homeostazi pluća su smanjeni (Nguyen i saradnici, 2017). Pored GLP-1, povećanje raspoloživosti i drugih DPP-4 supstrata inhibicijom ove proteaze može pokazati povoljan

efekat u plućima. U ishemija/reperfuzija oštećenju transplantiranih pluća miševa inhibicija DPP-4 inhibitorom AB192 u koncentraciji 25 μM 18 h, pokazala je povoljne efekte na funkciju pluća povećanjem ekspresije vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP) u alveolarnim makrofagima (Jungraithmayr i saradnici, 2010). Vazoaktivni intestinalni peptid deluje kao sistemski i vazodilatator u plućima, i suprimira proliferaciju vaskularnih glatko-mišićnih ćelija (Petkov i saradnici, 2003). U kulturi humanih glatko-mišićnih ćelija plućne arterije DPP-4 inhibitor sitagliptin suprimirao je proliferaciju u koncentraciji 20 μM 24 h (Xu i saradnici, 2018). Reaktivne kiseonične vrste aktiviraju MAPK u endotelnim i glatko-mišićnim ćelijama, stimulišući njihovu proliferaciju, kao i proliferaciju adventicijalnih fibroblasta plućnih arterija u plućnoj hipertenziji (Freund-Michel i saradnici, 2013). Endotelin-1 povećava generisanje ROS u glatko-mišićnim ćelijama plućnih arterija i smanjuje nivo NO, promovišući vazokonstrikciju (Gao i saradnici, 2016). Sekretija ET-1 iz endotelnih ćelija može biti indukovana faktorom TGF- β , dok je supresija sekrecije posredovana azot monoksidom (Jeffery i Morrell, 2002). Ekspresija ET-1, koji promovise rast glatko-mišićnih ćelija plućnih arterija i stimuliše proliferaciju humanih fibroblasta pluća, povećana je u plućnoj fibrozi (Jeffery i Morrell, 2002; Nathan i saradnici, 2007). Endotelin-1 deluje kao faktor rasta endotelnih ćelija i miofibroblasta, indukuje fibrogenezu interakcijom sa MMP i inicira epitel-mezenhim tranziciju, indukujući aktivnost TGF- β (Behr i Ryu, 2008; Jain i saradnici, 2007). U glatko-mišićnim ćelijama plućnih arterija TGF- β aktivira NADPH oksidazu. Generisanje ROS je povećano u u plućnoj hipertenziji usled povećanja aktivnosti NADPH oksidaze, što je dokazano *in vitro* i *in vivo* na pacijentima (Freund-Michel i saradnici, 2013). Inflamatorni citokini i nizak nivo NO povećavaju ekspresiju XO u plućima, koja predstavlja dodatan izvor ROS u plućnoj vaskulaturi (Budhiraja i saradnici, 2004; Hassoun i saradnici, 1998; Cote i saradnici, 1996). U plućnoj hipertenziji ROS uzimaju učešće u endotelnoj disfunkciji, inflamaciji (delom aktivacijom NF- κB signalizacije (Lee i Yang, 2012)), uz remodelovanje ekstracelularnog matriksa posredovano aktivacijom MMP-2 i -9 (Freund-Michel i saradnici, 2013). Poremećen oksidans/antioksidans balans potencira fibrogenezu, proliferaciju fibroblasta i sintezu ekstracelularnog matriksa, i suprimira vazodilataciju (Behr i Ryu, 2008). Reaktivne kiseonične vrste stimulišu i aktivaciju receptora pro-fibrogenog trombocitnog faktora rasta (PDGF) (Lee i Yang, 2012), čija je ekspresija značajno povećana u plućnoj hipertenziji (Nathan i saradnici, 2007), i potenciraju indukovanu proliferaciju i migraciju glatko-mišićnih ćelija i fibroblasta (Humbert i saradnici, 2008). Pro-fibrogeni TGF- β i PDGF učestvuju značajno u ekspanziji vezivnog tkiva u plućima (Behr i

Ryu, 2008). Efekti TGF- β su potencirani pro-inflamatornim faktorom TNF- α , a pro-fibrojeni TGF- β povećava aktivnost MMP (Willis i Borok, 2007), NADPH oksidaze (Amara i saradnici, 2010), i indukuje produkciju faktora rasta vezivnog tkiva u fibroblastima pluća (Kucich i saradnici, 2001). Inkretin GLP-1 može smanjiti generisanje slobodnih radikala uticajem na aktivnost NADPH oksidaze posredstvom cAMP/PKA signalizacije, a inhibicija DPP-4 može dodatno suprimirati efekte slobodnih radikala povećanjem ekspresije SOD i GSHPx (Beckers i saradnici, 2017). Na miševima je pokazano da kombinovana terapija DPP-4 inhibitorom linagliptinom (10 mg/kg dnevno) i sintetskim derivatom vitamina D kalcipotriolom (20 μ g/kg dnevno), 6 nedelja nakon indukovane fibroze pluća, značajno smanjuje nivo MDA u plućima, TGF- β , TNF- α i NF- κ B ekspresiju, uz povećanje ekspresije GSHPx i katalaze. Ova kombinovana terapija rezultuje značajnim povoljnim efektima u plućnoj fibrozi (Kabel i saradnici, 2017). Faktor TGF- β indukuje epitel-mezenhim tranziciju alveolarnih epitelnih ćelija do miofibroblasta *in vitro* i *in vivo*, i suprimira NO posredovane protektivne efekte u epitel-mezenhim tranziciji i fibrozi (Hinz, 2012; Vyas-Read i saradnici, 2007). Endotel-mezenhim tranzicija je značajna u vaskularnom remodelovanju i patogenezi fibroze tkiva u plućnoj hipertenziji (Ranchoux i saradnici, 2018). Pokazano je na miševima sa fibrozom indukovanom lipopolisaharidom u plućima da DPP-4 inhibitor vildagliptin (dat intraperitonealno u dozi 10 mg/kg, jednom dnevno 14 dana, sa početkom 1 dan pre prve aplikacije lipopolisaharida) i na humanim mikrovaskularnim endotelnim ćelijama pluća da vildagliptin (10 nM) i linagliptin (100 nM, 4 dana), značajno suprimiraju endotel-mezenhim tranziciju u odsustvu imunoloških ćelija i GLP-1, negativnom regulacijom generisanja ROS kao induktora tranzicije endotelnih ćelija plućne vaskulature (Suzuki i saradnici, 2017). Navedeni rezultati predstavljaju potvrdu povoljnih antioksidativnih, anti-inflamatornih i anti-fibrotskih efekata DPP-4 inhibicije u plućima.

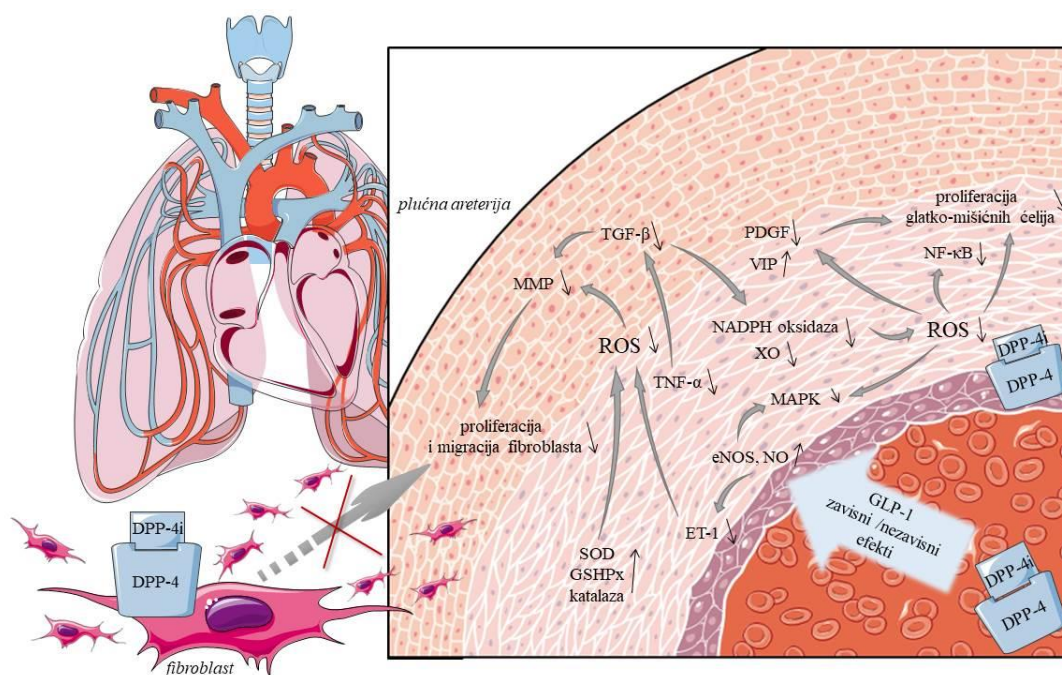
Dipeptidil peptidaza-4 stimuliše proliferaciju humanih fibroblasta i bronhijalnih glatko-mišićnih ćelija (Shiobara i saradnici, 2016). Fibroblasti pluća i kože eksprimiraju konstitutivno DPP-4/CD26 (Nemoto i saradnici, 1999). Rinkevich i saradnici (2015) su identifikovali fibroblaste kože miševa većim delom odgovorne za fibrozu, na osnovu ekspresije CD26/DPP-4 *in vivo*. Soare i saradnici (2016) su pokazali da DPP-4 pozitivni fibroblasti igraju značajnu ulogu u patogenezi fibroze u sistemske sklerozi. Dipeptidil peptidaza-4 na površini fibroblasta može da veže fibronektin i kolagen, učestvujući u remodelovanju ekstracelularnog matriksa (Ghers i saradnici, 2002), a takođe uzima učešće i u inflamatornim procesima regulišući ekspresiju i aktivnost biološki aktivnih peptida

(Nemoto i saradnici, 1999). Pokazano je da je kompleks membranski vezane sepraze i DPP-4 na fibroblastima preduslov za migraciju ćelija i invaziju (Gherzi i saradnici, 2002). Nakon aktivacije adventicijskih fibroblasta u plućnoj vaskulaturi ove ćelije podležu promenama koje promovišu njihovu proliferaciju, migraciju, diferencijaciju i inhibiciju apoptoze. Proliferacija je indukovana aktivacijom MAPK/ERK signalizacije i praćena je sekrecijom citokina, adhezivnih molekula i faktora rasta, kao i produkcijom proteina ekstracelularnog matriksa, ROS i MMP (Stenmark i saradnici, 2011). Inhibicijom DPP-4 može biti suprimirana proliferacija i migracija fibroblasta, i na taj način, prevenirana fibroza.

Epigenetski faktori mogu doprineti fibrozi u plućima, i predstavljaju potencijalne mete u terapiji (Ranchoux i saradnici, 2018; Yu i saradnici, 2018). Funkcionalne studije ukazuju da mikroRNK učestvuju u regulaciji mnogih bioloških procesa, i promene njihove ekspresije opisane su u humanoj patologiji. Kao kratki polinukleotidni transkripti, od oko 22 nukleotida, male regulatorne mikroRNK, nakon kompletnog ili parcijalnog vezivanja za specifične nukleotidne sekvence iRNK (3'UTR, 5'UTR ili kodirajuće regije) mogu suprimirati sintezu ciljnih proteina (Ameres i Zamore, 2013; Filipowicz i saradnici, 2008). Ima dokaza o uticaju mikroRNK u procesu endotel-mezenhim tranzicije (Kim, 2018). Među brojnim mikroRNK, deregulacija mikroRNK-29 je naglašena u kardio-metaboličkim poremećajima, hroničnim komplikacijama dijabetesa i fibrozi pluća (Slusarz i Pulakat, 2015; Widlansky i saradnici, 2018). Nivo mikroRNK-29 je u inverznoj korelaciji sa ekspresijom pro-fibrotskih gena. Ova mikroRNK je suprimirana faktorom TGF- β u humanim fetalnim fibroblastima pluća, i mnogi mikroRNK-29 ciljni geni povezani sa fibrozom, kao što su geni za kolagen ili remodelovanje ekstracelularnog matriksa, derepresirani su u odsustvu mikroRNK-29 (Cushing i saradnici, 2011). MikroRNK-29 suprimira proliferaciju glatko-mišićnih ćelija plućnih arterija (Chen i saradnici, 2018). Hipoteza o mogućoj ulozi DPP-4 inhibitora kao epigenetskih modulatora potiče iz eksperimentalnih rezultata kojima je zabeležena nishodna regulacija DPP-4 iRNK u humanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi nakon terapije DPP-4 inhibitorom sitagliptinom u dozi 100 mg dnevno 12 nedelja (Makdissi i saradnici, 2012). Hipoteza da pozitivna regulacija DPP-4 može biti povezana sa negativnom regulacijom mikroRNK-29 je postavljena nakon *in vitro* insercije mikroRNK-29 antagonista u kulturu humanih dermalnih mikrovaskularnih endotelnih ćelija čiji su efekti neutralisani inhibicijom DPP-4 linagliptinom u koncentraciji 100 nM. Sa druge strane, insercija mikroRNK-29 mimetika smanjila je ekspresiju DPP-4. Pokazano je da 3'UTR region može

biti komplementarna meta iRNK DPP-4. Kanasaki i saradnici su pokazali da linagliptin inhibira TGF- β indukovanu endotel-mezenhim tranziciju, DPP-4 ekspresiju i migraciju endotelnih ćelija *in vitro*, i ovi efekti su posredovani mikroRNK-29 indukcijom. MikroRNK-29 suprimirane faktorom TGF- β su ponovo aktivirane linagliptinom *in vitro*. Inhibicija DPP-4 učestvuje u anti-fibrotskim efektima mikroRNK-29 (Kanasaki i saradnici, 2014). Iako je više eksperimentalnih dokaza potrebno za zaključak, epigenetska komunikacija mikroRNK-29 i DPP-4 inhibitora može dodatno potvrditi i potencirati njihovu efikasnost u terapiji fibroze pluća. Pored fibroblasta pluća, ekspresija mikroRNK-29 je dokazana i u endotelnim ćelijama pluća i vaskularnim glatko-mišićnim ćelijama distalnih malih arterija, delujući kao regulator njihove diferencijacije (Cushing i saradnici, 2015). Pored mikroRNK-29, potencijalna regulatorna uloga mikroRNK-21 u razvoju plućne hipertenzije je dokazana (Parikh i saradnici, 2012). Faktor TGF- β deluje kao induktor ekspresije i maturacije mikroRNK-21 u vaskularnim glatko-mišićnim i endotelnim ćelijama (Davis i saradnici, 2008; Ranchoux i saradnici, 2018). MikroRNK-21 pozitivno reguliše proliferaciju vaskularnih glatko-mišićnih ćelija, što je dokazano na glatko-mišićnim ćelijama aorte pacova (Ji i saradnici, 2007). Njena ekspresija u endotelnim ćelijama i efekat na signalizaciju protein kinaze B su značajni u endotel-mezenhim tranziciji (Guo i saradnici, 2015). MikroRNK-21 je identifikovana kao karika u dugoročnoj memoriji fibrogenog programa mezenhimskih matičnih ćelija. Smatra se pro-fibrotskim regulatorom u različitim tipovima ćelija i organa (Li i saradnici, 2017). Značajna ushodna regulacija mikroRNK-21 je potvrđena u kori bubrega kod pacova sa eksperimentalno indukovanim dijabetesom tipa 2, sa nishodnom regulacijom nakon terapije sitagliptinom u dozi 10 mg/kg dnevno 12 nedelja (Civantos i saradnici, 2017). Efekat DPP-4 inhibicije na mikroRNK-21 u fibrozi pluća ostaje da bude razjašnjen, ali hipotetički, na osnovu prethodno navedenih rezultata, inhibitori DPP-4 mogu nishodno regulisati mikroRNK-21 i u plućima. Ovi odnosi DPP-4 inhibitora i mikroRNK mogu biti potpora, pored pomenute kritične uloge CD26/DPP-4 pozitivnih fibroblasta, u razmatranju inovativnih terapijskih strategija za prevenciju i tretman ireverzibilnih faza plućne hipertenzije (Anderluh i saradnici, 2019).

Ovde definisani i obrazloženi mehanizmi doprinose našim pretpostavkama da DPP-4 inhibicija može biti razmatrana kao novi terapijski pristup u plućnoj hipertenziji (Anderluh i saradnici, 2019) obuhvatajući puteve i medijatore u vaskularnom i remodelovanju vezivnog tkiva pogođene direktno ili indirektno inhibicijom ove proteaze.



Slika 39. Mehanizmi kojima inhibitori dipeptidil peptidaze-4 pokazuju povoljne efekte u vaskularnom remodelovanju u plućnoj hipertenziji (adaptirano iz Anderluh i saradnici, 2019)

5. ZAKLJUČAK

- Od jedinjenja ispitivanih u testu inhibicije humane rekombinovane DPP-4 *in vitro*, derivati benzimidazol-2-imina (jedinjenje **5**), bis(benzimidazol-2-il)amina (jedinjenja **21**, **24** i **25**), 6-(fenilkarbonil)-[1,3]tiazolo[3,2-*a*]benzimidazol-3-ona (jedinjenje **34**), benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina i -ftalimida (jedinjenja **94**, **97**, **101**, **102** i **104**) bili su efektivni sa IC₅₀ vrednostima manjim od 200 μM. Referentni inhibitori sitagliptin i diprotin A inhibirali su DPP-4 sa IC₅₀ vrednostima 0,05 ± 0,02 μM i 17 ± 5,15 μM, redom.
- Najaktivniji derivat benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-ftalimida, 2-(2-(3-hlorobenzil)-5,6,7,8-tetrahidrobenzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-il)izoindolin-1, 3-dion (jedinjenje **102**, IC₅₀ = 34,17 ± 5,11 μM), pokazao je oko dva puta manji inhibicioni potencijal u odnosu na diprotin A, sa nekompetitivnim tipom inhibicije, koji može biti objašnjen odsustvom interakcija sa Glu205 i Glu206 u domenu prepoznavanje *N*-terminusa supstrata, što uz odsustvo interakcija i u S₁ domenu proteaze može biti razlog i više IC₅₀ vrednosti. U literaturi su nekompetitivni inhibitori DPP-4 retki, i ovi rezultati mogu predstavljati doprinos i smernicu u dizajnu novih optimizovanih struktura.
- Jedinjenja sa najnižom IC₅₀ vrednošću od svih ispitivanih u radu su derivati bis(benzimidazol-2-il)amina. Pored 1-propil-*N*-(1-propil-1*H*-benzimidazol-2-il)-1*H*-benzimidazol-2-amina (jedinjenje **25**, IC₅₀ = 5,01 ± 0,66 μM) i 1-metil-*N*-(1-propil-1*H*-benzimidazol-2-il)-1*H*-benzimidazol-2-amina (jedinjenje **21**, IC₅₀ = 11,04 ± 0,69 μM), koji su pokazali oko tri i jedan i po puta veći inhibicioni potencijal u odnosu na diprotin A, redom, 1-etil-*N*-(1-propil-1*H*-benzimidazol-2-il)-1*H*-benzimidazol-2-amin (jedinjenje **24**, IC₅₀ = 49,88 ± 2,99 μM) pokazao je oko tri puta manju efektivnost u odnosu na diprotin A. Domen vezivanja ovih struktura obuhvata i aminokiseline koje su deo S₂ proširenog domena proteaze, što, pretpostavlja se, doprinosi većem afinitetu i aktivnosti inhibitora.
- Od jedinjenja aktivnih u testu inhibicije DPP-4, 2-[2-imino-5-nitro-3-(2-okso-2-feniletil)-2,3-dihidro-1*H*-benzimidazol-1-il]-1-feniletanon (jedinjenje **5**) i 2-(4-fluorobenziliden)-6-(fenilkarbonil)[1,3]tiazolo[3,2-*a*]benzimidazol-3(2*H*)-on (jedinjenje **34**) inhibirali su i XO, sa IC₅₀ vrednostima manjim od 150 μM. Alopurinol (IC₅₀ = 1,28 ± 0,17 μM), kao referentni inhibitor XO, pokazao je veću efikasnost inhibicije u

poređenju sa jedinjenjima **5** i **34**. Inhibitori DPP-4 koji inhibiraju i XO mogu pokazati izraženije kardiovaskularne protektivne efekte.

- Citotoksičan potencijal benzo[4,5]tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-amina i -ftalimida aktivnih u testu inhibicije DPP-4, sa predstavnikom nekompetitivnog tipa inhibicije, (jedinjenja **94**, **97**, **101**, **102** i **104**) i dualnih inhibitora DPP-4 i XO (jedinjenja **5** i **34**) ispitan je na Caco-2 ćelijama, i nije zabeležen izraženiji citotoksičan efekat u koncentracijama manjim od 250 μ M nakon 24 h inkubacije.
- Značaj i mehanizmi višestrukih biohemijskih efekata inhibicije DPP-4, plejotropni efekti postojećih i novih, među kojima i onih pronađenih u okviru ove disertacije, inhibitora ove multifunkcionalne proteaze razmatrani su u cilju procene mogućnosti proširenja spektra indikacija, uz ukazivanje na povoljne efekte inhibitora DPP-4 u kardiovaskularnoj i patologiji bubrega uticajem na medijatore inflamacije, oksidativnog stresa, fibroze i apoptoze, u post-ishemijskoj angiogenezi i reparaciji miokarda nakon infarkta prevencijom razgradnje hemotaktičnog citokina SDF-1, uz izdvajanje plućne hipertenzije kao potencijalne indikacije i naglašavanje efikasnosti inhibitora DPP-4 i u ireverzibilnoj fazi vaskularnog remodelovanja, uz efekte na medijatore u remodelovanju pogođene direktno ili indirektno inhibicijom ove proteaze.

6. LITERATURA

- Abbott CA, McCaughan GW, Gorrell MD. Two highly conserved glutamic acid residues in the predicted β propeller domain of dipeptidyl peptidase IV are required for its enzyme activity. *FEBS Letters* 1999a; 458: 278-284.
- Abbott CA, McCaughan GW, Levy MT, Church WB, Gorrell MD. Binding to human dipeptidyl peptidase IV by adenosine deaminase and antibodies that inhibit ligand binding involves overlapping, discontinuous sites on a predicted β propeller domain. *European Journal of Biochemistry* 1999b; 266: 798-810.
- Ahmed HA, May DW, Fagan SC, Segar L. Vascular protection with dipeptidyl peptidase-IV inhibitors in diabetes: experimental and clinical therapeutics. *Pharmacotherapy* 2015; 35: 277-297.
- Ahrén B. DPP-4 inhibitors. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 21: 517-533.
- Ajani OO, Aderohunmu DV, Ikpo CO, Adedapo AE, Olanrewaju IO. Functionalized benzimidazole scaffolds: privileged heterocycle for drug design in therapeutic medicine. *Archiv der Pharmazie* 2016; 349: 475-506.
- Akita K, Isoda K, Shimada K, Daida H. Dipeptidyl-peptidase-4 inhibitor, alogliptin, attenuates arterial inflammation and neointimal formation after injury in low-density lipoprotein (LDL) receptor-deficient mice. *Journal of the American Heart Association* 2015; 4: e001469.
- Alam MA, Chowdhury MRH, Jain P, Sagor MAT, Reza HM. DPP-4 inhibitor sitagliptin prevents inflammation and oxidative stress of heart and kidney in two kidney and one clip (2K1C) rats. *Diabetology and Metabolic Syndrome* 2015; 7: 107.
- Ali Z, Akhtar MJ, Siddiqui AA, Khan AA, Haider MR, Yar MS. Design, synthesis, and biological evaluation of novel quinazoline clubbed thiazoline derivatives. *Archiv der Pharmazie* 2017a; 350: e1600298.
- Ali Z, Akhtar MJ, Haider MR, Khan AA, Siddiqui AA, Yar MS. Design and synthesis of quinazoline-3,4-(4*H*)-diamine endowed with thiazoline moiety as new class for DPP-4 and DPPH inhibitor. *Bioorganic Chemistry* 2017b; 71: 181-191.
- Amara N, Goven D, Prost F, Muloway R, Crestani B, Boczkowski J. NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic

- pulmonary fibrosis and mediates TGF β 1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts. *Thorax* 2010; 65: 733-738.
- Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013; 14: 475-488.
- Ammirati MJ, Andrews KM, Boyer DD, Brodeur AM, Danley DE, Doran SD, Hulin B, Liu S, McPherson RK, Orena SJ, Parker JC, Polivkova J, Qiu X, Soglia CB, Treadway JL, VanVolkenburg MA, Wilder DC, Piotrowski DW. (3,3-Difluoro-pyrrolidin-1-yl)-[(2*S*,4*S*)-(4-(4-pyrimidin-2-yl-piperazin-1-yl)-pyrrolidin-2-yl)]-methanone: A potent, selective, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2009; 19: 1991-1995.
- Amori RE, Lau J, Pittas AG. Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: Systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2007; 298: 194-206.
- Anastassova NO, Mavrova AT, Yancheva DY, Kondeva-Burdina MS, Tzankova VI, Stoyanov SS, Shivachev BL, Nikolova RP. Hepatotoxicity and antioxidant activity of some new N,N'-disubstituted benzimidazole-2-thiones, radical scavenging mechanism and structure-activity relationship. *Arabian Journal of Chemistry* 2018; 11: 353-369.
- Anderluh M, Kocic G, Tomovic K, Kocic R, Deljanin-Ilic M, Smelcerovic A. Cross-talk between the dipeptidyl peptidase-4 and stromal cell-derived factor-1 in stem cell homing and myocardial repair: Potential impact of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Pharmacology and Therapeutics* 2016; 167: 100-107.
- Anderluh M, Kocic G, Tomovic K, Kocic H, Smelcerovic A. DPP-4 inhibition: A novel therapeutic approach to the treatment of pulmonary hypertension? *Pharmacology and Therapeutics* 2019; 201: 1-7.
- Andersen ES, Deacon CF, Holst JJ. Do we know the true mechanism of action of the DPP-4 inhibitors? *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2018; 20: 34-41.
- Apaijai N, Pintana H, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Cardioprotective effects of metformin and vildagliptin in adult rats with insulin resistance induced by a high-fat diet. *Endocrinology* 2012; 153: 3878-3885.
- Apaijai N, Pintana H, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Effects of vildagliptin versus sitagliptin, on cardiac function, heart rate variability and mitochondrial function in obese insulin-resistant rats. *British Journal of Pharmacology* 2013; 169: 1048-1057.
- Aroor A, McKarns S, Nistala R, DeMarco V, Gardner M, Garcia-Touza M, Whaley-Connell A, Sowers JR. DPP-4 inhibitors as therapeutic modulators of immune cell function

- and associated cardiovascular and renal insulin resistance in obesity and diabetes. *Cardiorenal Medicine* 2013; 3: 48-56.
- Aroor AR, Sowers JR, Jia G, DeMarco VG. Pleiotropic effects of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on the cardiovascular system. *The American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 2014; 307: H477-H492.
- Aroor AR, Habibi J, Kandikattu HK, Garro-Kacher M, Barron B, Chen D, Hayden MR, Whaley-Connell A, Bender SB, Klein T, Padilla J, Sowers JR, Chandrasekar B, DeMarco VG. Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibition with linagliptin reduces western diet induced myocardial TRAF3IP2 expression, inflammation and fibrosis in female mice. *Cardiovascular Diabetology* 2017; 16: 61.
- Arruda-Junior DF, Martins FL, Dariolli R, Jensen L, Antonio EL, dos Santos L, Tucci PJF, Girardi ACC. Dipeptidyl peptidase IV inhibition exerts renoprotective effects in rats with established heart failure. *Frontiers in Physiology* 2016; 7: 293.
- Augustyns K, der Veken PV, Senten K, Haemers A. The therapeutic potential of inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) and related proline-specific dipeptidyl aminopeptidases. *Current Medicinal Chemistry* 2005; 12: 971-998.
- Avogaro A, Fadini GP. The effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibition on microvascular diabetes complications. *Diabetes Care* 2014; 37: 2884-2894.
- Avogaro A, de Kreutzenberg S, Fadini G. Dipeptidyl-peptidase 4 inhibition: Linking metabolic control to cardiovascular protection. *Current Pharmaceutical Design* 2014; 20: 2387-2394.
- Balakumar P, Dhanaraj SA. Cardiovascular pleiotropic actions of DPP-4 inhibitors: A step at the cutting edge in understanding their additional therapeutic potentials. *Cell Signalling* 2013; 25: 1799-1803.
- Bao W, Morimoto K, Hasegawa T, Sasaki N, Yamashita T, Hirata K, Okita Y, Okada K. Orally administered dipeptidyl peptidase-4 inhibitor (alogliptin) prevents abdominal aortic aneurysm formation through an antioxidant effect in rats. *Journal of Vascular Surgery* 2014; 59: 1098-1108.
- Barbieri M, Rizzo MR, Marfella R, Boccardi V, Esposito A, Pansini A, Paolisso G. Decreased carotid atherosclerotic process by control of daily acute glucose fluctuations in diabetic patients treated by DPP-IV inhibitors. *Atherosclerosis* 2013; 227: 349-354.

- Barman SA. Effect of nitric oxide on mitogen-activated protein kinases in neonatal pulmonary vascular smooth muscle. *Lung* 2005; 183: 325-335.
- Battelli MG, Polito L, Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: Not only oxidative stress. *Atherosclerosis* 2014; 237: 562-567.
- Battelli MG, Bortolotti M, Polito L, Bolognesi A. The role of xanthine oxidoreductase and uric acid in metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2018; 1864: 2557-2565.
- Beckers PA, Gielis JF, Van Schil PE, Adriaensen D. Lung ischemia reperfusion injury: the therapeutic role of dipeptidyl peptidase 4 inhibition. *Annals of Translational Medicine* 2017; 5: 129.
- Behr J, Ryu JH. Pulmonary hypertension in interstitial lung disease. *European Respiratory Journal* 2008; 31: 1357-1367.
- Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *The Journal of Physiology* 2004; 555: 589-606.
- Betancort JM, Winn DT, Liu R, Xu Q, Liu J, Liao W, Chen SH, Carney D, Hanway D, Schmeits J, Li X, Gordon E, Campbell DA. Bicyclic cyanothiazolidines as novel dipeptidyl peptidase 4 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2009; 19: 4437-4440.
- Biftu T, Feng D, Qian X, Liang GB, Kieczkowski G, Eiermann G, He H, Leiting B, Lyons K, Petrov A, Sinha-Roy R, Zhang B, Scapin G, Patel S, Gao YD, Singh S, Wu J, Zhang X, Thornberry NA, Weber AE. (3*R*)-4-[(3*R*)-3-Amino-4-(2,4,5-trifluorophenyl) butanoyl]-3-(2,2,2-trifluoroethyl)-1,4-diazepan-2-one, a selective dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2007a; 17: 49-52.
- Biftu T, Scapin G, Singh S, Feng D, Becker JW, Eiermann G, He H, Lyons K, Patel S, Petrov A, Sinha-Roy R, Zhang B, Wu J, Zhang X, Doss GA, Thornberry NA, Weber AE. Rational design of a novel, potent, and orally bioavailable cyclohexylamine DPP-4 inhibitor by application of molecular modeling and X-ray crystallography of sitagliptin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2007b; 17: 3384-3387.
- Biftu T, Sinha-Roy R, Chen P, Qian X, Feng D, Kuethe JT, Scapin G, Gao YD, Yan Y, Krueger D, Bak A, Eiermann G, He J, Cox J, Hicks J, Lyons K, He H, Salituro G, Tong S, Patel S, Doss G, Petrov A, Wu J, Xu SS, Sewall C, Zhang X, Zhang B,

- Thornberry NA, Weber AE. Omarigliptin (MK-3102): a novel long-acting DPP-4 inhibitor for once-weekly treatment of type 2 diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 57: 3205-3212.
- Bindu B, Vijayalakshmi S, Manikandan A. Synthesis and discovery of triazolo-pyridazine-6-yl-substituted piperazines as effective anti-diabetic drugs; evaluated over dipeptidyl peptidase-4 inhibition mechanism and insulinotropic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2020; 187: 111912.
- Bisswanger H, editor. Enzyme Inhibition. In: *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*. Weinheim: Wiley-Vch, Verlag GmbH; 2002. p. 80-106.
- Blat Y. Non-Competitive inhibition by active site binders. *Chemical Biology and Drug Design* 2010; 75: 535-540.
- Böhm HJ, Schneider G, editors. *Protein-ligand interactions from molecular recognition to drug design*. Weinheim: Wiley-Vch, Verlag GmbH; 2003.
- Bondžić BP, Džambaski Z, Bondžić AM, Marković R. π -Annulation reactions of 4-thiazolidinone enamines in the synthesis of fused bi- and tri-cyclic compounds. *Tetrahedron* 2012; 68: 9556-9565.
- Bonora E, Cigolini M. DPP-4 inhibitors and cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus. Expectations, observations and perspectives. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2016; 26: 273-284.
- Boonacker E, Van Noorden CJF. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *European Journal of Cell Biology* 2003; 82: 53-73.
- Borghi C, Rosei EA, Bardin T, Dawson J, Dominiczak A, Kielstein JT, Manolis AJ, Perez-Ruiz F, Mancia G. Serum uric acid and the risk of cardiovascular and renal disease. *Journal of Hypertension* 2015; 33: 1729-1741.
- Borghi C, Rodriguez-Artalejo F, De Backer G, Dallongeville J, Medina J, Nuevo J, Guallar E, Perk J, Banegas JR, Tubach F, Roy C, Halcox JP. Serum uric acid levels are associated with cardiovascular risk score: A post hoc analysis of the EURIKA study. *International Journal of Cardiology* 2018; 253: 167-173.
- Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004; 109: 159-165.
- Butler R, Morris AD, Belch JFF, Hill A, Struthers AD. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension* 2000; 35: 746-751.

- Cencioni C, Capogrossi MC, Napolitano M. The SDF-1/CXCR4 axis in stem cell preconditioning. *Cardiovascular Research* 2012; 94: 400-407.
- Chang G, Zhang P, Ye L, Lu K, Wang Y, Duan Q, Zheng A, Qin S. Protective effects of sitagliptin on myocardial injury and cardiac function in an ischemia/reperfusion rat model. *European Journal of Pharmacology* 2013; 718: 105-113.
- Chang YP, Sun B, Han Z, Han F, Hu SL, Li XY, Xue M, Yang Y, Chen L, Li CJ, Chen LM. Saxagliptin attenuates albuminuria by inhibiting podocyte epithelial-to-mesenchymal transition via SDF-1 α in diabetic nephropathy. *Frontiers in Pharmacology* 2017; 8: 780.
- Chavakis E, Urbich C, Dimmeler S. Homing and engraftment of progenitor cells: A prerequisite for cell therapy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2008; 45: 514-522.
- Chen YT, Tsai TH, Yang CC, Sun CK, Chang LT, Chen HH, Chang CL, Sung PH, Zhen YY, Leu S, Chang HW, Chen YL, Yip HK. Exendin-4 and sitagliptin protect kidney from ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. *Journal of Translational Medicine* 2013; 11: 270.
- Chen HY, Zhong X, Huang XR, Meng XM, You Y, Chung ACK, Lan HY. MicroRNA-29b inhibits diabetic nephropathy in db/db mice. *Molecular Therapy* 2014; 22: 842-853.
- Chen P, Feng D, Qian X, Apgar J, Wilkening R, Kuethe JT, Gao YD, Scapin G, Cox J, Doss G, Eiermann G, He H, Li X, Lyons KA, Metzger J, Petrov A, Wu JK, Xu S, Weber AN, Yan Y, Sinha-Roy R, Biftu T. Structure-activity-relationship of amide and sulfonamide analogs of omarigliptin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2015; 25: 5767-5771.
- Chen J, Li Y, Li Y, Xie L, Wang J, Zhang Y, Xiao T. Effect of miR-29b on the proliferation and apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells by targeting Mcl-1 and CCND2. *BioMed Research International* 2018; 2018: 6051407.
- Cherneva E, Yancheva D, Anastassova N, Mikhova B, Daskalova L, Stanchev S, Djordjevic A, Smelcerovic A. Antibacterial activity of three synthetic cyclodipeptides. *Acta Microbiologica Bulgarica* 2017; 33: 65-73.
- Cho TP, Gang LZ, Long YF, Yang W, Qian W, Lei Z, Jing LJ, Ying F, Ke YP, Ying L, Jun F. Synthesis and biological evaluation of bicyclo[3.3.0] octane derivatives as dipeptidyl peptidase 4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2010a; 20: 3521-3525.

- Cho TP, Long YF, Gang LZ, Yang W, Jun LH, Yuan SG, Hong FJ, Lin W, Liang GD, Lei Z, Jing LJ, Shen GA, Hong SG, Dan W, Ying F, Ke YP, Ying L, Jun F, Tai MX. Synthesis and biological evaluation of azobicyclo[3.3.0] octane derivatives as dipeptidyl peptidase 4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2010b; 20: 3565-3568.
- Choi SH, Park S, Oh CJ, Leem J, Park KG, Lee IK. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition by gemigliptin prevents abnormal vascular remodeling via NF-E2-related factor 2 activation. *Vascular Pharmacology* 2015; 73: 11-19.
- Chua S, Lee FY, Tsai TH, Sheu JJ, Leu S, Sun CK, Chen YL, Chang HW, Chai HT, Liu CF, Lu HI, Yip HK. Inhibition of dipeptidyl peptidase-IV enzyme activity protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Translational Medicine* 2014; 12: 357.
- Chyan YJ, Chuang LM. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitors: an evolving treatment for type 2 diabetes from the incretin concept. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic and Immune Drug Discovery* 2007; 1: 15-24.
- Civantos E, Bosch E, Ramirez E, Zhenyukh O, Egido J, Lorenzo O, Mas S. Sitagliptin ameliorates oxidative stress in experimental diabetic nephropathy by diminishing the miR-200a/Keap-1/Nrf2 antioxidant pathway. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2017; 10: 207-222.
- Cobble ME, Frederich R. Saxagliptin for the treatment of type 2 diabetes mellitus: assessing cardiovascular data. *Cardiovascular Diabetology* 2012; 11: 6.
- Connelly KA, Advani A, Zhang Y, Advani SL, Kabir G, Abadeh A, Desjardins JF, Mitchell M, Thai K, Gilbert RE. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition improves cardiac function in experimental myocardial infarction: role of stromal cell-derived factor-1 α . *Journal of Diabetes* 2016; 8: 63-75.
- Copeland RA, editor. *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. Wiley-VCH, Inc; 2000.
- Coppolino G, Leporini C, Rivoli L, Ursini F, di Paola ED, Cernaro V, Arturi F, Bolignano D, Russo E, De Sarro G, Andreucci M. Exploring the effects of DPP-4 inhibitors on the kidney from the bench to clinical trials. *Pharmacological Research* 2018; 129: 274-294.

- Cortés A, Gracia E, Moreno E, Mallol J, Lluís C, Canela EI, Casadó V. Moonlighting adenosine deaminase: a target protein for drug development. *Medicinal Research Reviews* 2015; 35: 85-125.
- Costante R, Stefanucci A, Carradori S, Novellino E, Mollica A. DPP-4 inhibitors: a patent review (2012-2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2015; 25: 209-236.
- Cote CG, Yu FS, Zulueta JJ, Vosatka RJ, Hassoun PM. Regulation of intracellular xanthine oxidase by endothelial-derived nitric oxide. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* 1996; 271: L869-L874.
- Cunningham DF, O'Connor B. Proline specific peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997; 1343: 160-186.
- Cushing L, Kuang PP, Qian J, Shao F, Wu J, Little F, Thannickal VJ, Cardoso WV, Lü J. MiR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2011; 45: 287-294.
- Cushing L, Costinean S, Xu W, Jiang Z, Madden L, Kuang P, Huang J, Weisman A, Hata A, Croce CM, Lü J. Disruption of miR-29 leads to aberrant differentiation of smooth muscle cells selectively associated with distal lung vasculature. *PLoS Genetics* 2015; 11: e1005238.
- Czechitzky W, Dedio J, Desai B, Dixon K, Farrant E, Feng Q, Morgan T, Parry DM, Ramjee MK, Selway CN, Schmidt T, Tarver GJ, Wright AG. Integrated synthesis and testing of substituted xanthine based DPP4 inhibitors: application to drug discovery. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2013; 4: 768-772.
- Dai Y, Dai D, Mercanti F, Ding Z, Wang X, Mehta JL. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in cardioprotection: A promising therapeutic approach. *Acta Diabetologica* 2013; 50: 827-835.
- Dai Y, Dai D, Wang X, Ding Z, Mehta JL. DPP-4 inhibitors repress NLRP3 inflammasome and interleukin-1beta via GLP-1 receptor in macrophages through protein kinase C pathway. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 2014; 28: 425-432.
- Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev VV, Muzykantov VR, Laher I, Li H, Lamas S, Münzel T. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *British Journal of Pharmacology* 2017; 174: 1591-1619.
- Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 2008; 454: 56-61.

- Dawson J, Walters M. Uric acid and xanthine oxidase: future therapeutic targets in the prevention of cardiovascular disease? *British Journal of Clinical Pharmacology* 2006; 62: 633-644.
- Deacon CF. A review of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. Hot topics from randomized controlled trials. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2018; 20: 34-46.
- Deng J, Peng L, Zhang G, Lan X, Li C, Chen F, Zhou Y, Lin Z, Chen L, Dai R, Xu H, Yang L, Zhang X, Hu W. The highly potent and selective dipeptidyl peptidase IV inhibitors bearing a thienopyrimidine scaffold effectively treat type 2 diabetes. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 46: 71-76.
- Deng X, Han L, Zhou J, Zhang H, Li Q. Discovery of triazole-based uracil derivatives bearing amide moieties as novel dipeptidyl peptidase-IV inhibitors. *Bioorganic Chemistry* 2017; 75: 357-367.
- Deng X, Shen J, Zhu H, Xiao J, Sun R, Xie F, Lam C, Wang J, Qiao Y, Tavallaie MS, Hu Y, Du Y, Li J, Fu L, Jiang F. Surrogating and redirection of pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7(4*H*)-one core, a novel class of potent and selective DPP-4 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2018; 26: 903-912.
- Desco MC, Asensi M, Márquez R, Martínez-Valls J, Vento M, Pallardó FV, Sastre J, Viña J. Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes* 2002; 51: 1118-1124.
- Doehner W, Jankowska EA, Springer J, Lainscak M, Anker SD. Uric acid and xanthine oxidase in heart failure - Emerging data and therapeutic implications. *International Journal of Cardiology* 2016; 213: 15-19.
- Domingueti CP, Dusse LM, das Graças Carvalho M, de Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2016; 30: 738-745.
- Duan X, Ling F. Is uric acid itself a player or a bystander in the pathophysiology of chronic heart failure? *Medical Hypotheses* 2008; 70: 578-581.
- Duvnjak L, Blaslov K. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors improve arterial stiffness, blood pressure, lipid profile and inflammation parameters in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetology and Metabolic Syndrome* 2016; 8: 26.

- Džambaski Z, Marković R, Kleinpeter E, Baranac-Stojanović M. 2-Alkylidene-4-oxothiazolidine S-oxides: synthesis and stereochemistry. *Tetrahedron* 2013; 69: 6436-6447.
- Eckhardt M, Langkopf E, Mark M, Tadayyon M, Thomas L, Nar H, Pfrengle W, Guth B, Lotz R, Sieger P, Fuchs H, Himmelsbach F. 8-(3-(*R*)-aminopiperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydropurine-2,6-dione (BI 1356), a highly potent, selective, long-acting, and orally bioavailable DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry* 2007; 50: 6450-6453.
- Eckhardt M, Huel N, Himmelsbach F, Langkopf E, Nar H, Mark M, Tadayyon M, Thomas L, Guth B, Lotz R. 3, 5-Dihydro-imidazo[4,5-*d*] pyridazin-4-ones: a class of potent DPP-4 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2008; 18: 3158-3162.
- Ekinci D, editor. *Medicinal chemistry and drug design*. Croatia: InTech; 2012.
- El-Bassossy HM, Watson ML. Xanthine oxidase inhibition alleviates the cardiac complications of insulin resistance: effect on low grade inflammation and the angiotensin system. *Journal of Translational Medicine* 2015; 13: 82.
- El Din UAAS, Salem MM, Abdulazim DO. Uric acid in the pathogenesis of metabolic, renal, and cardiovascular diseases: A review. *Journal of Advanced Research* 2017; 8: 537-548.
- Ely SW, Berne RM. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation* 1992; 85: 893-904.
- Engel SS, Golm GT, Shapiro D, Davies MJ, Kaufman KD, Goldstein BJ. Cardiovascular safety of sitagliptin in patients with type 2 diabetes mellitus: a pooled analysis. *Cardiovascular Diabetology* 2013; 12: 3.
- Esaki H, Tachi T, Goto C, Sugita I, Kanematsu Y, Yoshida A, Saito K, Noguchi Y, Ohno Y, Aoyama S, Yasuda M, Mizui T, Yamamura M, Teramachi H. Renoprotective effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in Pharmacology* 2017; 8: 835.
- Fadini GP, Avogaro A. Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition: Beyond GLP-1. *Vascular Pharmacology* 2011; 55: 10-16.
- Fadini GP, Avogaro A. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and vascular repair by mobilization of endogenous stem cells in diabetes and beyond. *Atherosclerosis* 2013; 229: 23-29.

- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics* 2008; 9: 102-114.
- Fisman EZ, Tenenbaum A. Antidiabetic treatment with gliptins: focus on cardiovascular effects and outcomes. *Cardiovascular Diabetology* 2015; 14: 129.
- Freund-Michel V, Guibert C, Dubois M, Courtois A, Marthan R, Savineau JP, Muller B. Reactive oxygen species as therapeutic targets in pulmonary hypertension. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 2013; 7: 175-200.
- Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, Newman W, Groopman JE. The α -chemokine, stromal cell-derived factor-1 α , binds to the transmembrane G-protein coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 23169-23175.
- Gao Y, Chen T, Raj JU. Endothelial and smooth muscle cell interactions in the pathobiology of pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2016; 54: 451-460.
- García-Horsman JA, Männistö PT, Venäläinen JI. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides* 2007; 41: 1-24.
- Gersch C, Palii SP, Kim KM, Angerhofer A, Johnson RJ, Henderson GN. Inactivation of nitric oxide by uric acid. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 2008; 27: 967-978.
- Ghadge SK, Mühlstedt SM, Özcelik C, Bader M. SDF-1 α as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacology and Therapeutics* 2011; 129: 97-108.
- Gherzi G, Dong H, Goldstein LA, Yeh Y, Hakkinen L, Larjava HS, Chen WT. Regulation of fibroblast migration on collagenous matrix by a cell surface peptidase complex. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 29231-29241.
- Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England Journal of Medicine* 1995; 333: 214-221.
- Goicoechea M, García de Vinuesa S, Verdalles U, Ruiz-Caro C, Ampuero J, Rincón A, Arroyo D, Luño J. Effect of allopurinol in chronic kidney disease progression and cardiovascular risk. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2010; 5: 1388-1393.

- Gong Q, Rajagopalan S, Zhong J. Dpp4 inhibition as a therapeutic strategy in cardiometabolic disease: Incretin-dependent and -independent function. *International Journal of Cardiology* 2015; 197: 170-179.
- Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: A multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology* 2001; 54: 249-264.
- Gorrell MD. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clinical Science* 2005; 108: 277-292.
- Green JB, Bethel MA, Armstrong PW, Buse JB, Engel SS, Garg J, Josse R, Kaufman KD, Koglin J, Korn S, Lachin JM, McGuire DK, Pencina MJ, Standl E, Stein PP, Suryawanshi S, de Werf FV, Peterson ED, Holman RR, . Effect of sitagliptin on cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine* 2015; 373: 232-242.
- Grimshaw CE, Jennings A, Kamran R, Ueno H, Nishigaki N, Kosaka T, Tani A, Sano H, Kinugawa Y, Koumura E, Shi L, Takeuchi K. Trelagliptin (SYR-472, Zafatek), novel once-weekly treatment for type 2 diabetes, inhibits dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) via a non-covalent mechanism. *PloS ONE* 2016; 11: e0157509.
- Guo Y, Li P, Bledsoe G, Yang ZR, Chao L, Chao J. Kallistatin inhibits TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition by differential regulation of microRNA-21 and eNOS expression. *Experimental Cell Research* 2015; 337: 103-110.
- Guo WQ, Li L, Su Q, Dai WR, Ye ZL. Effect of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on heart failure: a network meta-analysis. *Value in Health* 2017; 20: 1427-1430.
- Haga Y, Ohtsubo T, Murakami N, Noguchi H, Kansui Y, Goto K, Matsumura K, Kitazono T. Disruption of xanthine oxidoreductase gene attenuates renal ischemia reperfusion injury in mice. *Life Sciences* 2017; 182: 73-79.
- Hahn K, Kanbay M, Lanaspá MA, Johnson RJ, Ejaz AA. Serum uric acid and acute kidney injury: A mini review. *Journal of Advanced Research* 2017; 8: 529-536.
- Harcourt BE, Penfold SA, Forbes JM. Coming full circle in diabetes mellitus: from complications to initiation. *Nature Reviews Endocrinology* 2013; 9: 113-123.
- Hasan AA, Hocher B. Role of soluble and membrane-bound dipeptidyl peptidase-4 in diabetic nephropathy. *Journal of Molecular Endocrinology* 2017; 59: R1-R10.
- Hassoun PM, Yu FS, Cote CG, Zulueta JJ, Sawhney R, Skinner KA, Skinner HB, Parks DA, Lanzillo JJ. Upregulation of xanthine oxidase by lipopolysaccharide, interleukin-1,

- and hypoxia: role in acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1998; 158: 299-305.
- Havale SH, Pal M. Medicinal chemistry approaches to the inhibition of dipeptidyl peptidase-4 for the treatment of type 2 diabetes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2009; 17: 1783-1802.
- Higgins P, Dawson J, Lees KR, McArthur K, Quinn TJ, Walters MR. Xanthine oxidase inhibition for the treatment of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovascular Therapeutics* 2012; 30: 217-226.
- Hildebrandt M, Reutter W, Arck P, Rose M, Klapp BF. A guardian angel: the involvement of dipeptidyl peptidase IV in psychoneuroendocrine function, nutrition and immune defence. *Clinical Science* 2000; 99: 93-104.
- Hink HU, Santanam N, Dikalov S, McCann L, Nguyen AD, Parthasarathy S, Harrison DG, Fukai T. Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2002; 22: 1402-1408.
- Hinz B. Mechanical aspects of lung fibrosis: A spotlight on the myofibroblast. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2012; 9: 137-147.
- Hirano T, Mori Y. Anti-atherogenic and anti-inflammatory properties of glucagon-like peptide-1, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in experimental animals. *Journal of Diabetes Investigation* 2016; 7: 80-86.
- Hocher B, Reichetzeder C, Alter ML. Renal and cardiac effects of DPP4 inhibitors - from preclinical development to clinical research. *Kidney and Blood Pressure Research* 2012; 36: 65-84.
- Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiological Reviews* 2007; 87: 1409-1439.
- Hu Y, Liu HB, Simpson RW, Dear AE. GLP-1-dependent and independent effects and molecular mechanisms of a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor in vascular endothelial cells. *Molecular Biology Reports* 2013; 40: 2273-2279.
- Huang CY, Shih CM, Tsao NW, Lin YW, Huang PS, Wu SC, Lee AW, Kao YT, Chang NC, Nakagami H, Morishita R, Ou KL, Hou WC, Lin CY, Shyu KG, Lin FY. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improves neovascularization by increasing circulating endothelial progenitor cells. *British Journal of Pharmacology* 2012; 167: 1506-1519.

- Huang J, Deng X, Zhou S, Wang N, Qin Y, Meng L, Li G, Xiong Y, Fan Y, Guo L, Lan D, Xing J, Jiang W, Li Q. Identification of novel uracil derivatives incorporating benzoic acid moieties as highly potent Dipeptidyl Peptidase-IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2019; 27: 644-654.
- Humbert M, Montani D, Perros F, Dorfmüller P, Adnot S, Eddahibi S. Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension. *Vascular Pharmacology* 2008; 49: 113-118.
- Hwang HJ, Jung TW, Ryu JY, Hong HC, Choi HY, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Choi KM, Choi DS, Baik SH, Yoo HJ. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitor (gemigliptin) inhibits tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress, apoptosis and inflammation in H9c2 cardiomyocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2014; 392: 1-7.
- Hwang HJ, Chung HS, Jung TW, Ryu JY, Hong HC, Seo JA, Kim SG, Kim NH, Choi KM, Choi DS, Baik SH, Yoo HJ. The dipeptidyl peptidase-IV inhibitor inhibits the expression of vascular adhesion molecules and inflammatory cytokines in HUVECs via Akt-and AMPK-dependent mechanisms. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2015; 405: 25-34.
- Ikushima H, Munakata Y, Iwata S, Ohnuma K, Kobayashi S, Dang NH, Morimoto C. Soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV enhances transendothelial migration via its interaction with mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Cellular Immunology* 2002; 215: 106-110.
- Ishibashi Y, Matsui T, Takeuchi M, Yamagishi SI. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced up-regulation of VCAM-1 mRNA levels in endothelial cells by suppressing AGE receptor (RAGE) expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010; 391: 1405-1408.
- Ishibashi Y, Matsui T, Maeda S, Higashimoto Y, Yamagishi SI. Advanced glycation end products evoke endothelial cell damage by stimulating soluble dipeptidyl peptidase-4 production and its interaction with mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Cardiovascular Diabetology* 2013; 12: 125.
- Jadav P, Bahekar R, Shah SR, Patel D, Johrapurkar A, Kshirsagar S, Jain M, Shaikh M, Sairam KVVM. Long-acting peptidomimetics based DPP-IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2012; 22: 3516-3521.

- Jadav P, Bahekar R, Shah SR, Patel D, Joharapurkar A, Jain M, Sairam KVVM, Singh PK. Design, synthesis and biological evaluation of novel aminomethyl-piperidones based DPP-IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2014; 24: 1918-1922.
- Jain R, Shaul PW, Borok Z, Willis BC. Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin type A receptor-mediated production of TGF- β 1. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2007; 37: 38-47.
- Jeffery TK, Morrell NW. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases* 2002; 45: 173-202.
- Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circulation Research* 2007; 100: 1579-1588.
- Ji X, Su M, Wang J, Deng G, Deng S, Li Z, Tang C, Li J, Li J, Zhao L, Jiang H, Liu H. Design, synthesis and biological evaluation of hetero-aromatic moieties substituted pyrrole-2-carbonitrile derivatives as dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014a; 75: 111-122.
- Ji X, Xia C, Wang J, Su M, Zhang L, Dong T, Li Z, Wan X, Li J, Li J, Zhao L, Gao Z, Jiang H, Liu H. Design, synthesis and biological evaluation of 4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile and octahydrocyclopenta[*b*]pyrrole-2-carbonitrile derivatives as dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014b; 86: 242-256.
- Jiang T, Zhou Y, Zhu J, Chen Z, Sun P, Zhang Q, Wang Z, Shao Q, Jiang X, Li B, Wang H, Zhu W, Shen J. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of highly potent and selective dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Archiv der Pharmazie* 2015; 348: 399-407.
- Johansen OE, Neubacher D, von Eynatten M, Patel S, Woerle HJ. Cardiovascular safety with linagliptin in patients with type 2 diabetes mellitus: a pre-specified, prospective, and adjudicated meta-analysis of a phase 3 programme. *Cardiovascular Diabetology* 2012; 11: 3.
- Johnson RJ, Nakagawa T, Jalal D, Sánchez-Lozada LG, Kang DH, Ritz E. Uric acid and chronic kidney disease: which is chasing which? *Nephrology Dialysis Transplantation* 2013; 28: 2221-2228.

- Juillerat-Jeanneret L. Dipeptidyl peptidase IV and its inhibitors: Therapeutics for type 2 diabetes and what else? *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 57: 2197-2212.
- Jun MA, Park WS, Kang SK, Kim KY, Kim KR, Dal Rhee S, Bae MA, Kang NS, Sohn SK, Kim SG, Lee JO, Lee DH, Cheon HG, Kim SS, Ahn JH. Synthesis and biological evaluation of pyrazoline analogues with β -amino acyl group as dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2008; 43: 1889-1902.
- Jung E, Kim J, Kim SH, Kim S, Cho MH. Gemigliptin improves renal function and attenuates podocyte injury in mice with diabetic nephropathy. *European Journal of Pharmacology* 2015; 761: 116-124.
- Jung GS, Jeon JH, Choe MS, Kim SW, Lee IK, Kim MK, Park KG. Renoprotective effect of gemigliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in streptozotocin-induced type 1 diabetic mice. *Diabetes and Metabolism Journal* 2016; 40: 211-221.
- Jungraithmayr W, De Meester I, Matheussen V, Inci I, Augustyns K, Scharpé S, Weder W, Korom S. Inhibition of CD26/DPP IV attenuates ischemia/reperfusion injury in orthotopic mouse lung transplants: The pivotal role of vasoactive intestinal peptide. *Peptides* 2010; 31: 585-591.
- Kabel AM, Elmaaboud MAA, Atef A, Baali MH. Ameliorative potential of linagliptin and/or calcipotriol on bleomycin-induced lung fibrosis: In vivo and in vitro study. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2017; 50: 216-226.
- Kanasaki K, Shi S, Kanasaki M, He J, Nagai T, Nakamura Y, Ishigaki Y, Kitada M, Srivastava SP, Koya P. Linagliptin-mediated DPP-4 inhibition ameliorates kidney fibrosis in streptozotocin induced diabetic mice by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition in a therapeutic regimen. *Diabetes* 2014; 63: 2120-2131.
- Kanasaki K. The role of renal dipeptidyl peptidase-4 in kidney disease: renal effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors with a focus on linagliptin. *Clinical Science* 2018; 132: 489-507.
- Kanellis J, Feig DI, Johnson RJ. Does asymptomatic hyperuricaemia contribute to the development of renal and cardiovascular disease? An old controversy renewed. *Nephrology* 2004; 9: 394-399.
- Kerru N, Singh-Pillay A, Awolade P, Singh P. Current anti-diabetic agents and their molecular targets: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2018; 152: 436-488.

- Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W, Krotova K, Block ER, Prabhakar S, Johnson RJ. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney International* 2005; 67: 1739-1742.
- Kim D, Kowalchick JE, Edmondson SD, Mastracchio A, Xu J, Eiermann GJ, Leiting B, Wu JK, Pryor KD, Patel RA, He H, Lyons KA, Thornberry NA, Weber AE. Triazolopiperazine-amides as dipeptidyl peptidase IV inhibitors: Close analogs of JANUVIA™ (sitagliptin phosphate). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2007; 17: 3373-3377.
- Kim D, Kowalchick JE, Brockunier LL, Parmee ER, Eiermann GJ, Fisher MH, He H, Leiting B, Lyons K, Scapin G, Patel SB, Petrov A, Pryor KD, Sinha Roy R, Wu JK, Zhang X, Wyvratt MJ, Zhang BB, Zhu L, Thornberry NA, Weber AE. Discovery of potent and selective dipeptidyl peptidase IV inhibitors derived from β -aminoamides bearing substituted triazolopiperazines. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008; 51: 589-602.
- Kim NH, Yu T, Lee DH. The nonglycemic actions of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *BioMed Research International* 2014; 2014: 368703.
- Kim SH, Yoo JH, Lee WJ, Park CY. Gemigliptin: an update of its clinical use in the management of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes and Metabolism Journal* 2016; 40: 339-353.
- Kim J. MicroRNAs as critical regulators of the endothelial to mesenchymal transition in vascular biology. *BMB Reports* 2018; 51: 65-72.
- Kirby M, Yu DMT, O'Connor SP, Gorrell MD. Inhibitor selectivity in the clinical application of dipeptidyl peptidase-4 inhibition. *Clinical Science* 2010; 118: 31-41.
- Koibuchi N, Hasegawa Y, Katayama T, Toyama K, Uekawa K, Sueta D, Kusaka H, Ma M, Nakagawa T, Lin B, Kim-Mitsuyama S. DPP-4 inhibitor linagliptin ameliorates cardiovascular injury in salt-sensitive hypertensive rats independently of blood glucose and blood pressure. *Cardiovascular Diabetology* 2014; 13: 157.
- Kolarević A, Ilić BS, Kocić G, Džambaski Z, Šmelcerović A, Bondžić BP. Synthesis and DNase I inhibitory properties of some 4-thiazolidinone derivatives. *Journal of Cellular Biochemistry* 2019; 120: 264-274.
- Komers R, Xu B, Schneider J, Oyama TT. Effects of xanthine oxidase inhibition with febuxostat on the development of nephropathy in experimental type 2 diabetes. *British Journal of Pharmacology* 2016; 173: 2573-2588.

- Kosugi T, Nakayama T, Heinig M, Zhang L, Yuzawa Y, Sanchez-Lozada LG, Roncal C, Johnson RJ, Nakagawa T. Effect of lowering uric acid on renal disease in the type 2 diabetic db/db mice. *American Journal of Physiology: Renal Physiology* 2009; 297: F481-F488.
- Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 2005; 23: 879-894.
- Kucich U, Rosenbloom JC, Herrick DJ, Abrams WR, Hamilton AD, Sebt SM, Rosenbloom J. Signaling events required for transforming growth factor- β stimulation of connective tissue growth factor expression by cultured human lung fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; 395: 103-112.
- Kutzing MK, Firestein BL. Altered uric acid levels and disease states. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2008; 324: 1-7.
- Lai ZW, Li C, Liu J, Kong L, Wen X, Sun H. Discovery of highly potent DPP-4 inhibitors by hybrid compound design based on linagliptin and alogliptin. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 83: 547-560.
- Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2003; 40: 209-294.
- Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, Hartwig S, Lehr S, Ouwens DM, Eckardt K, Kaufman JM, Ryden M, Müller S, Hanisch FG, Ruige J, Arner P, Sell H, Eckel J. Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes* 2011; 60: 1917-1925.
- Lee IT, Yang CM. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochemical Pharmacology* 2012; 84: 581-590.
- Lee TI, Kao YH, Chen YC, Huang JH, Hsu MI, Chen YJ. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor-sitagliptin modulates calcium dysregulation, inflammation, and PPARs in hypertensive cardiomyocytes. *International Journal of Cardiology* 2013; 168: 5390-5395.
- Lee TM, Chen WT, Yang CC, Lin SZ, Chang NC. Sitagliptin attenuates sympathetic innervation via modulating reactive oxygen species and interstitial adenosine in infarcted rat hearts. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2015; 19: 418-429.

- Lee YS, Jun HS. Anti-inflammatory effects of GLP-1-based therapies beyond glucose control. *Mediators of Inflammation* 2016; 2016: 3094642.
- Lee DS, Lee ES, Alam MM, Jang JH, Lee HS, Oh H, Kim YC, Manzoor Z, Koh YS, Kang DG, Lee DH. Soluble DPP-4 up-regulates toll-like receptors and augments inflammatory reactions, which are ameliorated by vildagliptin or mannose-6-phosphate. *Metabolism* 2016; 65: 89-101.
- Lee HK, Kim MK, Kim HD, Kim HJ, Kim JW, Lee JO, Kim CW, Kim EE. Unique binding mode of Evogliptin with human dipeptidyl peptidase IV. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2017; 494: 452-459.
- Levantesi G, Marfisi RM, Franzosi MG, Maggioni AP, Nicolosi GL, Schweiger C, Siletta MG, Tavazzi L, Tognoni G, Marchioli R. Uric acid: A cardiovascular risk factor in patients with recent myocardial infarction. *International Journal of Cardiology* 2013; 167: 262-269.
- Li J, Guan M, Li C, Lyv F, Zeng Y, Zheng Z, Wang C, Xue Y. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin protects against dyslipidemia-related kidney injury in Apolipoprotein E knockout mice. *International Journal of Molecular Sciences* 2014; 15: 11416-11434.
- Li Q, Han L, Zhang B, Zhou J, Zhang H. Synthesis and biological evaluation of triazole based uracil derivatives as novel DPP-4 inhibitors. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2016a; 14: 9598-9611.
- Li S, Xu H, Cui S, Wu F, Zhang Y, Su M, Gong Y, Qiu S, Jiao Q, Qin C, Shan J, Zhang M, Wang J, Yin Q, Xu M, Liu X, Wang R, Zhu L, Li J, Xu Y, Jiang H, Zhao Z, Li J, Li H. Discovery and rational design of natural-product-derived 2-phenyl-3,4-dihydro-2*H*-benzo[*f*]chromen-3-amine analogs as novel and potent dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry* 2016b; 59: 6772-6790.
- Li G, Huan Y, Yuan B, Wang J, Jiang Q, Lin Z, Shen Z, Huang H. Discovery of novel xanthine compounds targeting DPP-IV and GPR119 as anti-diabetic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016c; 124: 103-116.
- Li CX, Talele NP, Boo S, Koehler A, Knee-Walden E, Balestrini JL, Speight P, Kapus A, Hinz B. MicroRNA-21 preserves the fibrotic mechanical memory of mesenchymal stem cells. *Nature Materials* 2017; 16: 379-389.

- Li N, Wang LJ, Jiang B, Li XQ, Guo CL, Guo SJ, Shi DY. Recent progress of the development of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2018a; 151: 145-157.
- Li N, Wang LJ, Jiang B, Guo SJ, Li XQ, Chen XC, Luo J, Li C, Wang Y, Shi DY. Design, synthesis and biological evaluation of novel pyrimidinedione derivatives as DPP-4 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2018b; 28: 2131-2135.
- Liang Tang Y, Qian K, Zhang YC, Shen L, Phillips MI. Mobilizing of haematopoietic stem cells to ischemic myocardium by plasmid mediated stromal cell- derived factor-1 α (SDF-1 α) treatment. *Regulatory Peptides* 2005; 125: 1-8.
- Lim S, Choi SH, Shin H, Cho BJ, Park HS, Ahn BY, Kang SM, Yoon JW, Jang HC, Kim YB, Park KS. Effect of a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, on neointimal formation after balloon injury in rats. *PLoS ONE* 2012; 7: e35007.
- Lima WG, Martins-Santos ME, Chaves VE. Uric acid as a modulator of glucose and lipid metabolism. *Biochimie* 2015; 116: 17-23.
- Lin K, Cai Z, Wang F, Zhang W, Zhou W. Synthesis and biological evaluation of xanthine derivatives on dipeptidyl peptidase 4. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2013; 61: 477-482.
- Liu WC, Hung CC, Chen SC, Yeh SM, Lin MY, Chiu YW, Kuo MC, Chang JM, Hwang SJ, Chen HC. Association of hyperuricemia with renal outcomes, cardiovascular disease, and mortality. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2012a; 7: 541-548.
- Liu WJ, Xie SH, Liu YN, Kim W, Jin HY, Park SK, Shao YM, Park TS. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor attenuates kidney injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2012b; 340: 248-255.
- Liu L, Liu J, Wong WT, Tian XY, Lau CW, Wang YX, Xu G, Pu Y, Zhu Z, Xu A, Lam KSL, Chen ZY, Ng CF, Yao X, Huang Y. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin protects endothelial function in hypertension through a glucagon-like peptide 1-dependent mechanism. *Hypertension* 2012c; 60: 833-841.
- Liu L, Liu J, Tian XY, Wong WT, Lau CW, Xu A, Xu G, Ng CF, Yao X, Gao Y, Huang Y. Uncoupling protein-2 mediates DPP-4 inhibitor-induced restoration of endothelial function in hypertension through reducing oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling* 2014; 21: 1571-1581.

- Liu X, Zhai T, Ma R, Luo C, Wang H, Liu L. Effects of uric acid-lowering therapy on the progression of chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Renal Failure* 2018; 40: 289-297.
- Madonna R, Balistreri CR, Geng YJ, De Caterina R. Diabetic microangiopathy: pathogenetic insights and novel therapeutic approaches. *Vascular Pharmacology* 2017; 90: 1-7.
- Makdissi A, Ghanim H, Vora M, Green K, Abuaysheh S, Chaudhuri A, Dhindsa S, Dandona P. Sitagliptin exerts an antiinflammatory action. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2012; 97: 3333-3341.
- Marković R, Baranac M, Džambaski Z, Stojanović M, Steel PJ. High regioselectivity in the heterocyclization of β -oxonitriles to 4-oxothiazolidines: X-ray structure proof. *Tetrahedron* 2003; 59: 7803-7810.
- Marković R, Pergal MM, Baranac M, Stanisavljev D, Stojanović M. An expedient solvent-free synthesis of (Z)-2-alkylidene-4-oxothiazolidine derivatives under microwave irradiation. *Arkivoc* 2006; 2: 83-90.
- Matheussen V, Jungraithmayr W, De Meester I. Dipeptidyl peptidase 4 as a therapeutic target in ischemia/reperfusion injury. *Pharmacology and Therapeutics* 2012; 136: 267-282.
- Matsubara J, Sugiyama S, Sugamura K, Nakamura T, Fujiwara Y, Akiyama E, Kurokawa H, Nozaki T, Ohba K, Konishi M, Maeda H, Izumiya Y, Kaikita K, Sumida H, Jinnouchi H, Matsui K, Kim-Mitsuyama S, Takeya M, Ogawa H. A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of American College of Cardiology* 2012; 59: 265-276.
- Matsui T, Nishino Y, Takeuchi M, Yamagishi SI. Vildagliptin blocks vascular injury in thoracic aorta of diabetic rats by suppressing advanced glycation end product-receptor axis. *Pharmacological Research* 2011; 63: 383-388.
- Mavrova AT, Anichina KK, Vuchev DI, Tsenov JA, Kondeva MS, Micheva MK. Synthesis and antitrichinellosis activity of some 2-substituted-[1,3]thiazolo[3,2-*a*]benzimidazol-3(2*H*)-ones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2005; 13: 5550-5559.
- Mavrova AT, Anichina KK, Vuchev DI, Tsenov JA, Denkova PS, Kondeva MS, Micheva MK. Antihelminthic activity of some newly synthesized 5(6)-(un)substituted-1*H*-benzimidazol-2-ylthioacetyl piperazine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2006; 41: 1412-1420.

- Mavrova AT, Denkova P, Tsenov YA, Anichina KK, Vutchev DI. Synthesis and antitrichinellosis activity of some bis(benzimidazol-2-yl)amines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2007; 15: 6291-6297.
- Mavrova AT, Wesselinova D, Tsenov JA, Lubenov LA. Synthesis and antiproliferative activity of some new thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones containing 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 86: 676-683.
- Mavrova AT, Yancheva D, Anastassova N, Anichina K, Zvezdanovic J, Djordjevic A, Markovic D, Smelcerovic A. Synthesis, electronic properties, antioxidant and antibacterial activity of some new benzimidazoles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2015; 23: 6317-6326.
- Mavrova AT, Dimov S, Yancheva D, Rangelov M, Wesselinova D, Tsenov JA. Synthesis, anticancer activity and photostability of novel 3-ethyl-2-mercapto-thieno[2,3-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-ones. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016; 123: 69-79.
- Mavrova AT, Dimov S, Yancheva D, Kolarević A, Ilić BS, Kocić G, Šmelcerović A. Synthesis and DNase I inhibitory properties of some 5,6,7,8-tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimidines. *Bioorganic Chemistry* 2018; 80: 693-705.
- McIntosh CHS, Demuth HU, Pospisilik JA, Pederson R. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: how do they work as new antidiabetic agents? *Regulatory Peptides* 2005; 128: 159-165.
- Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) - role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory Peptides* 1999; 85: 9-24.
- Meyerholz DK, Lambertz AM, McCray PB. Dipeptidyl peptidase 4 distribution in the human respiratory tract: Implications for the Middle East Respiratory Syndrome. *The American Journal of Pathology* 2016; 186: 78-86.
- Mo DW, Dong S, Sun H, Chen JS, Pang JX, Xi BM, Chen WH. Synthesis and potent inhibitory activities of carboxybenzyl-substituted 8-(3-(*R*)-aminopiperidin-1-yl)-7-(2-chloro/cyanobenzyl)-3-methyl-3,7-dihydro-purine-2,6-diones as dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2015; 25: 1872-1875.

- MOE (2019). Molecular Operating Environment (MOE) 2019.0102, (Chemical Computing Group ULC, Montreal, QC, Canada). Retrived from <https://www.chemcomp.com/index.htm>
- Moller DE. Metabolic disease drug discovery - "hitting the target" is easier said than done. *Cell Metabolism* 2012; 15: 19-24.
- Moriya C, Satoh H. Teneeligliptin decreases uric acid levels by reducing xanthine dehydrogenase expression in white adipose tissue of male Wistar rats. *Journal of Diabetes Research* 2016; 2016: 3201534.
- Motoshima K, Sugita K, Hashimoto Y, Ishikawa M. Non-competitive and selective dipeptidyl peptidase IV inhibitors with phenethylphenylphthalimide skeleton derived from thalidomide-related α -glucosidase inhibitors and liver X receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2011; 21: 3041-3045.
- Mulvihill EE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Endocrine Reviews* 2014; 3: 992-1019.
- Nabeno M, Akahoshi F, Kishida H, Miyaguchi I, Tanaka Y, Ishii S, Kadowaki T. A comparative study of the binding modes of recently launched dipeptidyl peptidase IV inhibitors in the active site. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013; 434: 191-196.
- Nagamine A, Hasegawa H, Hashimoto N, Yamada-Inagawa T, Hirose M, Kobara Y, Tadokoro H, Kobayashi Y, Takano H. The effects of DPP-4 inhibitor on hypoxia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Pharmacological Sciences* 2017; 133: 42-48.
- Nakagawa T, Kang DH, Feig D, Sanchez-Lozada LG, Srinivas TR, Sautin Y, Ejaz AA, Segal M, Johnson RJ. Unearthing uric acid: an ancient factor with recently found significance in renal and cardiovascular disease. *Kidney International* 2006; 69: 1722-1775.
- Nathan SD, Noble PW, Tuder RM. Idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension: Connecting the dots. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2007; 175: 875-880.
- Nemoto E, Sugawara S, Takada H, Shoji S, Horiuch H. Increase of CD26/dipeptidyl peptidase IV expression on human gingival fibroblasts upon stimulation with cytokines and bacterial components. *Infection and Immunity* 1999; 67: 6225-6233.

- Nguyen DV, Linderholm A, Haczku A, Kenyon N. Glucagon-like peptide 1: A potential anti-inflammatory pathway in obesity-related asthma. *Pharmacology and Therapeutics* 2017; 180: 139-143.
- Nile SH, Kumar B, Park SW. *In vitro* evaluation of selected benzimidazole derivatives as an antioxidant and xanthine oxidase inhibitors. *Chemical Biology and Drug Design* 2013; 82: 290-295.
- Nishio Y, Kimura H, Sawada N, Sugaru E, Horiguchi M, Ono M, Furuta Y, Sakai M, Masui Y, Otani M, Hashizuka T, Honda Y, Deguchi J, Nakagawa T, Nakahira H. 2-((6-[(3*R*)-3-amino-3-methylpiperidine-1-yl]-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-5*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidine-5-yl)methyl)-4-fluorobenzonitrile (DSR-12727): A potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor without mechanism-based inactivation of CYP3A. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2011; 19: 5490-5499.
- Noda Y, Miyoshi T, Oe H, Ohno Y, Nakamura K, Toh N, Kohno K, Morita H, Kusano K, Ito H. Alogliptin ameliorates postprandial lipemia and postprandial endothelial dysfunction in non-diabetic subjects: a preliminary report. *Cardiovascular Diabetology* 2013; 12: 8.
- Nongonierma AB, Mooney C, Shields DC, FitzGerald RJ. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV and xanthine oxidase by amino acids and dipeptides. *Food Chemistry* 2013; 141: 644-653.
- Ojeda-Montes MJ, Gimeno A, Tomas-Hernández S, Cereto-Massagué A, Beltrán-Debón R, Valls C, Mulero M, Pujadas G, Garcia-Vallvé S. Activity and selectivity cliffs for DPP-IV inhibitors: Lessons we can learn from SAR studies and their application to virtual screening. *Medicinal Research Reviews* 2018; 38: 1874-1915.
- Okafor ON, Farrington K, Gorog DA. Allopurinol as a therapeutic option in cardiovascular disease. *Pharmacology and Therapeutics* 2017; 172: 139-150.
- Okuda Y, Omoto S, Taniura T, Shouzu A, Nomura S. Effects of teneligliptin on PDMPs and PAI-1 in patients with diabetes on hemodialysis. *International Journal of General Medicine* 2016; 9: 65-71.
- Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell JM, Gallart T, Mallol J, Lluís C, Franco R. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005; 102: 9583-9588.

- Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological Reviews* 2006; 58: 87-114.
- Panchapakesan U, Mather A, Pollock C. Role of GLP-1 and DPP-4 in diabetic nephropathy and cardiovascular disease *Clinical Science* 2013a; 124: 17-26.
- Panchapakesan U, Gross S, Gangadharan Komala M, Pegg K, Pollock C. DPP4 inhibition in human kidney proximal tubular cells - renoprotection in diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes and Metabolism* 2013b; S9: 007.
- Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *European Heart Journal* 2013; 34: 2436-2443.
- Parikh VN, Jin RC, Rabello S, Gulbahce N, White K, Hale A, Chan SY, Cottrill KA, Shaik RS, Waxman AB, Zhang YY, Maron BA, Hartner JC, Fujiwara Y, Orkin SH, Haley KJ, Barabási AL, Loscalzo J, Chan SY. MicroRNA-21 integrates pathogenic signaling to control pulmonary hypertension: Results of a network bioinformatics approach. *Circulation* 2012; 125: 1520-1532.
- Park WS, Kang SK, Jun MA, Shin MS, Kim KY, Dal Rhee S, Bae MA, Kim MS, Kim KR, Kang NS, Yoo SE, Lee JO, Song DH, Silinski P, Schneider SE, Ahn JH, Kim SS. Discovery of β -aminoacyl containing thiazolidine derivatives as potent and selective dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2011; 21: 1366-1370.
- Patel BD, Ghate MD. Recent approaches to medicinal chemistry and therapeutic potential of dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 74: 574-605.
- Patel BD, Bhadada SV, Ghate MD. Design, synthesis and anti-diabetic activity of triazolotriazine derivatives as dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors. *Bioorganic Chemistry* 2017; 72: 345-358.
- Patrick GL, editor. *An introduction to medicinal chemistry*. 5th ed. Oxford university press; 2013.
- Penno G, Garofolo M, Del Prato S. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition in chronic kidney disease and potential for protection against diabetes-related renal injury. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2016; 26: 361-373.

- Petkov V, Mosgoeller W, Ziesche R, Raderer M, Stiebellehner L, Vonbank K, Funk GC, Hamilton G, Novotny C, Burian B, Block LH. Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *The Journal of Clinical Investigation* 2003; 111: 1339-1346.
- Picatoste B, Ramírez E, Caro-Vadillo A, Iborra C, Egido J, Tuñón J, Lorenzo Ó. Sitagliptin reduces cardiac apoptosis, hypertrophy and fibrosis primarily by insulin-dependent mechanisms in experimental type-II diabetes. Potential roles of GLP-1 isoforms. *PLoS ONE* 2013; 8: e78330.
- Pirozzi FF, Dias MAF, Filho IJZ, De Quadros LG, Júnior RLK, Júnior MF, Faria MAG, da Silva IE. Pulmonary artery relaxation was best with increasing GLP1 than the metabolic improvement in patients with type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and Metabolism* 2015; S13: 013.
- Pirozzi FF, Favaro GL, Favaro DTL, Favaro CR, Faria MAG, de Quadros LG, Júnior RLK. Vildagliptin promotes improvement in pulmonary arterial hypertension: incretin-based therapy at a follow-up of 3 years. *Lung and Breathing* 2017; 1: 1-2.
- Pontremoli R. The role of urate-lowering treatment on cardiovascular and renal disease: evidence from CARES, FAST, ALL-HEART, and FEATHER studies. *Current Medical Research and Opinion* 2017; 33: 27-32.
- Proschak E, Stark H, Merk D. Polypharmacology by design: a medicinal chemist's perspective on multitargeting compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 2018; 62: 420-444.
- Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Vizioli L, Muscari A. The relationships among hyperuricemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular diseases: Molecular mechanisms and clinical implications. *Journal of Cardiology* 2012; 59: 235-242.
- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Mukhopadhyay B, Patel V, Haskó G, Szabó C, Mabley JG, Liaudet L, Pacher P. Xanthine oxidase inhibitor allopurinol attenuates the development of diabetic cardiomyopathy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2009; 13: 2330-2341.
- Ranchoux B, Harvey LD, Ayon RJ, Babicheva A, Bonnet S, Chan SY, Yuan JXJ, de Jesus Perez V. Endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: An evolving landscape (2017 Grover Conference Series). *Pulmonary Circulation* 2018; 8: 1-17.

- Remm F, Franz WM, Brenner C. Gliptins and their target dipeptidyl peptidase 4: implications for the treatment of vascular disease. *European Heart Journal-Cardiovascular Pharmacotherapy* 2016; 2: 185-193.
- Renna NF, Diez EA, Miatello RM. Effects of dipeptidyl-peptidase 4 inhibitor about vascular inflammation in a metabolic syndrome model. *PloS ONE* 2014; 9: e106563.
- Rinkevich Y, Walmsley GG, Hu MS, Maan ZN, Newman AM, Drukker M, Januszyk M, Krampitz GW, Gurtner GC, Lorenz HP, Weissman IL, Longaker MT. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. *Science* 2015; 348: aaa2151.
- Rizzo MR, Barbieri M, Marfella R, Paolisso G. Reduction of oxidative stress and inflammation by blunting daily acute glucose fluctuations in patients with type 2 diabetes: Role of dipeptidyl peptidase-IV inhibition. *Diabetes Care* 2012; 35: 2076-2082.
- Robson R, Kundur AR, Singh I. Oxidative stress biomarkers in type 2 diabetes mellitus for assessment of cardiovascular disease risk. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* 2018; 12: 455-462.
- Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014; 1840: 2709-2729.
- Röhrborn D, Eckel J, Sell H. Shedding of dipeptidyl peptidase 4 is mediated by metalloproteases and up-regulated by hypoxia in human adipocytes and smooth muscle cells. *FEBS Letters* 2014; 588: 3870-3877.
- Romacho T, Vallejo S, Villalobos LA, Indrakusuma I, Sell H, Eckel J, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C. Soluble dipeptidyl peptidase-4 induces microvascular endothelial dysfunction through proteinase-activated receptor-2 and thromboxane A2 release. *Journal of Hypertension* 2016; 34: 869-876.
- Ruggiero C, Cherubini A, Ble A, Bos AJG, Maggio M, Dixit VD, Lauretani F, Bandinelli S, Senin U, Ferrucci L. Uric acid and inflammatory markers. *European Heart Journal* 2006; 27: 1174-1181.
- Sagar SR, Agarwal JK, Pandya DH, Dash RP, Nivsarkar M, Vasu KK. Design, synthesis and biological evaluation of novel pyrazolo-pyrimidinones as DPP-IV inhibitors in diabetes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2015; 25: 4428-4433.

- Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF. Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2010; 43: 629-634.
- Sakashita H, Kitajima H, Nakamura M, Akahoshi F, Hayashi Y. 1-((*S*)- γ -Substituted prolyl)-(*S*)-2-cyanopyrrolidine as a novel series of highly potent DPP-IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2005; 15: 2441-2445.
- Sakashita H, Akahoshi F, Kitajima H, Tsutsumiuchi R, Hayashi Y. [(*S*)- γ -(Arylamino)prolyl]thiazolidine compounds as a novel series of potent and stable DPP-IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2006; 14: 3662-3671.
- Sakashita H, Akahoshi F, Yoshida T, Kitajima H, Hayashi Y, Ishii S, Takashina Y, Tsutsumiuchi R, Ono S. Lead optimization of [(*S*)- γ -(arylamino)prolyl]thiazolidine focused on γ -substituent: Indoline compounds as potent DPP-IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2007; 15: 641-655.
- Sakata K, Hayakawa M, Yano Y, Tamaki N, Yokota N, Eto T, Watanabe R, Hirayama N, Matsuo T, Kuroki K, Sagara S, Mishima O, Koga M, Nagata N, Nishino Y, Kitamura K, Kario K, Takeuchi M, Yamagishi SI. Efficacy of alogliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on glucose parameters, the activity of the advanced glycation end product (AGE) - receptor for AGE (RAGE) axis and albuminuria in Japanese type 2 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research Reviews* 2013; 29: 624-630.
- Salheen SM, Panchapakesan U, Pollock CA, Woodman OL. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin preserves endothelial function in mesenteric arteries from type 1 diabetic rats without decreasing plasma glucose. *PLoS ONE* 2015; 10: e0143941.
- Salim HM, Fukuda D, Higashikuni Y, Tanaka K, Hirata Y, Yagi S, Soeki T, Shimabukuro M, Sata M. Teneligliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, attenuated pro-inflammatory phenotype of perivascular adipose tissue and inhibited atherogenesis in normoglycemic apolipoprotein-E-deficient mice. *Vascular Pharmacology* 2017; 96: 19-25.
- Satoh-Asahara N, Sasaki Y, Wada H, Tochiya M, Iguchi A, Nakagawachi R, Odori S, Kono S, Hasegawa K, Shimatsu A. A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, exerts anti-inflammatory effects in type 2 diabetic patients. *Metabolism* 2013; 62: 347-351.
- Savarese G, Perrone-Filardi P, D'Amore C, Vitale C, Trimarco B, Pani L, Rosano GMC. Cardiovascular effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in diabetic patients: A meta-analysis. *International Journal of Cardiology* 2015; 181: 239-244.

- Schnapp G, Klein T, Hoevels Y, Bakker RA, Nar H. Comparative analysis of binding kinetics and thermodynamics of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and their relationship to structure. *Journal of Medicinal Chemistry* 2016; 59: 7466-7477.
- Schober A, Karshovska E, Zerneck A, Weber C. SDF-1 α -mediated tissue repair by stem cells: a promising tool in cardiovascular medicine? *Trends in Cardiovascular Medicine* 2006; 16: 103-108.
- Schwehm C, Li J, Song H, Hu X, Kellam B, Stocks MJ. Synthesis of new DPP-4 inhibitors based on a novel tricyclic scaffold. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2015; 6: 324-328.
- Scirica BM, Bhatt DL, Braunwald E, Steg G, Davidson J, Hirshberg B, Ohman P, Frederich R, Wiviott SD, Hoffman EB, Cavender MA, Udell JA, Desai NR, Mosenzon O, McGuire DK, Ray KK, Leiter LA, Raz I. Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine* 2013; 369: 1317-1326.
- Segers VFM, Tokunou T, Higgins LJ, MacGillivray C, Gannon J, Lee RT. Local delivery of protease-resistant stromal cell derived factor-1 for stem cell recruitment after myocardial infarction. *Circulation* 2007; 116: 1683-1692.
- Sena CM, Pereira AM, Seca R. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; 1832: 2216-2231.
- Shah Z, Pineda C, Kampfrath T, Maiseyeu A, Ying Z, Racoma I, Deilulis J, Xu X, Sun Q, Moffatt-Bruce S, Villamena F, Rajagopalan S. Acute DPP-4 inhibition modulates vascular tone through GLP-1 independent pathways. *Vascular Pharmacology* 2011; 55: 2-9.
- Shan Z, Peng M, Fan H, Lu Q, Lu P, Zhao C, Chen Y. Discovery of potent dipeptidyl peptidase IV inhibitors derived from β -aminoamides bearing substituted [1,2,3]-triazolopiperidines for the treatment of type 2 diabetes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2011; 21: 1731-1735.
- Sharma M, Gupta M, Singh D, Kumar M, Kaur P. Synthesis, evaluation and molecular docking of thiazolopyrimidine derivatives as dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Chemical Biology and Drug Design* 2012; 80: 918-928.
- Shi S, Srivastava SP, Kanasaki M, He J, Kitada M, Nagai T, Nitta K, Takagi S, Kanasaki K, Koya D. Interactions of DPP-4 and integrin β 1 influences endothelial-to-mesenchymal transition. *Kidney International* 2015; 88: 479-489.

- Shi S, Koya D, Kanasaki K. Dipeptidyl peptidase-4 and kidney fibrosis in diabetes. *Fibrogenesis and Tissue Repair* 2016; 9: 1.
- Shimada YJ, Cannon CP, Liu Y, Wilson C, Kupfer S, Menon V, Cushman WC, Mehta CR, Bakris GL, Zannad F, White WB. Ischemic cardiac outcomes and hospitalizations according to prior macrovascular disease status in patients with type 2 diabetes and recent acute coronary syndrome from the examination of cardiovascular outcomes with alogliptin versus standard of care trial. *American Heart Journal* 2016; 175: 18-27.
- Shiobara T, Chibana K, Watanabe T, Arai R, Horigane Y, Nakamura Y, Hayashi Y, Shimizu Y, Takemasa A, Ishii Y. Dipeptidyl peptidase-4 is highly expressed in bronchial epithelial cells of untreated asthma and it increases cell proliferation alongwith fibronectin production in airway constitutive cells. *Respiratory Research* 2016; 17: 28.
- Shu C, Ge H, Song M, Chen JH, Zhou H, Qi Q, Wang F, Ma X, Yang X, Zhang G, Ding Y, Zhou D, Peng P, Shi CK, Xu J, Wu F. Discovery of imigliptin, a novel selective DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2014; 5: 921-926.
- Singh S, Sethi S, Khanna V, Benjamin B, Kant R, Sattigeri J, Bansal VS, Bhatnagar PK, Davis JA. RBx-0597, a potent, selective and slow-binding inhibitor of dipeptidyl peptidase-IV for the treatment of type 2 diabetes. *European Journal of Pharmacology* 2011; 652: 157-163.
- Slusarz A, Pulakat L. The two faces of miR-29. *Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown)* 2015; 16: 480-490.
- Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
- Smelcerovic A, Yancheva D, Cherneva E, Petronijevic Z, Lamshoeft M, Herebian D. Identification and synthesis of three cyclodipeptides as potential precursors of enniatin B in *Fusarium sporotrichioides*. *Journal of Molecular Structure* 2011; 985: 397-402.
- Smelcerovic Z, Veljkovic A, Kocic G, Yancheva D, Petronijevic Z, Anderluh M, Smelcerovic A. Xanthine oxidase inhibitory properties and anti-inflammatory activity of 2-amino-5-alkylidene-thiazol-4-ones. *Chemico-Biological Interactions* 2015; 229: 73-81.
- Šmelcerović A, Tomović K, Šmelcerović Ž, Petronijević Ž, Kocić G, Tomašič T, Jakopin Ž, Anderluh M. Xanthine oxidase inhibitors beyond allopurinol and febuxostat; an

- overview and selection of potential leads based on *in silico* calculated physico-chemical properties, predicted pharmacokinetics and toxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2017; 135: 491-516.
- Soare A, Rauber S, Wohlfahrt T, Dees C, Liang R, Zhang Y, Chen CW, Ramming A, Distler O, Mihai C, Schett G, Distler JHW. Dipeptidyl-peptidase-4 (DPP4) positive fibroblast subpopulation promotes fibrosis and are a molecular target for treatment of fibrosis [abstract]. *Arthritis and Rheumatology* 2016; 68(Suppl. 10).
- Solun B, Marcovicu D, Dicker D. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and their effects on the cardiovascular system. *Current Cardiology Reports* 2013; 15: 382.
- Srivastava JK, Dubey P, Singh S, Bhat HR, Kumawat MK, Singh UP. Discovery of novel 1,3,5-triazine-thiazolidine-2,4-diones as dipeptidyl peptidase-4 inhibitors with antibacterial activity targeting the S1 pocket for the treatment of type 2 diabetes. *RSC Advances* 2015; 5: 14095-14102.
- Stefanovic V, Ardaillou N, Vlahovic P, Placier S, Ronco P, Ardaillou R. Interferon- γ induces dipeptidylpeptidase IV expression in human glomerular epithelial cells. *Immunology* 1993; 80: 465-470.
- Stenmark KR, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya E, Anwar A, Li M, Riddle S, Frid M. The adventitia: essential role in pulmonary vascular remodeling. *Comprehensive Physiology* 2011; 1: 141-161.
- Steven S, Münzel T, Daiber A. Exploiting the pleiotropic antioxidant effects of established drugs in cardiovascular disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2015a; 16: 18185-18223.
- Steven S, Hausding M, Kröller-Schön S, Mader M, Mikhed Y, Stamm P, Zinßius E, Pfeffer A, Welschhof P, Agdauletova S, Sudowe S, Li H, Oelze M, Schulz E, Klein T, Münzel T, Daiber A. Gliptin and GLP-1 analog treatment improves survival and vascular inflammation/dysfunction in animals with lipopolysaccharide-induced endotoxemia. *Basic Research in Cardiology* 2015b; 110: 6.
- Stojanović M, Marković R, Kleinpeter E, Baranac-Stojanović M. *endo*-Mode cyclizations of vinylogous *N*-acyliminium ions as a route to the synthesis of condensed thiazolidines. *Tetrahedron* 2011; 67: 9541-9554.
- Strazzullo P, Puig JG. Uric acid and oxidative stress: Relative impact on cardiovascular risk. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2007; 17: 409-414.

- Sutton JM, Clark DE, Dunsdon SJ, Fenton G, Fillmore A, Harris NV, Higgs C, Hurley CA, Krintel SL, MacKenzie RE, Duttaroy A, Gangl E, Maniara W, Sedrani R, Namoto K, Ostermann N, Gerhartz B, Sirockin F, Trappe J, Hassiepen U, Baeschlin DK. Novel heterocyclic DPP-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2012; 22: 1464-1468.
- Suzuki T, Tada Y, Gladson S, Nishimura R, Shimomura I, Karasawa S, Tatsumi K, West, J. Vildagliptin ameliorates pulmonary fibrosis in lipopolysaccharide-induced lung injury by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition. *Respiratory Research* 2017; 18: 177.
- Ta NN, Li Y, Schuyler CA, Lopes-Virella MF, Huang Y. DPP-4 (CD26) inhibitor alogliptin inhibits TLR4-mediated ERK activation and ERK-dependent MMP-1 expression by U937 histiocytes. *Atherosclerosis* 2010; 213: 429-435.
- Takagaki Y, Shi S, Katoh M, Kitada M, Kanasaki K, Koya D. Dipeptidyl peptidase-4 plays a pathogenic role in BSA-induced kidney injury in diabetic mice. *Scientific Reports* 2019; 9: 7519.
- Thoma R, Löffler B, Stihle M, Huber W, Ruf A, Hennig M. Structural basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV. *Structure* 2003; 11: 947-959.
- Tomović K, Kocić G, Šmelcerović A. Potential dual mechanism of hypouricemic activity of DPP-4 inhibitors with purine-based scaffold. *Acta Medica Medianae* 2019a; 58: 50-63.
- Tomovic K, Lazarevic J, Kocic G, Deljanin-Ilic M, Anderluh M, Smelcerovic A. Mechanisms and pathways of anti-inflammatory activity of DPP-4 inhibitors in cardiovascular and renal protection. *Medicinal Research Reviews* 2019b; 39: 404-422.
- Tomovic K, Ilic BS, Miljkovic M, Dimov S, Yancheva D, Kojic M, Mavrova AT, Kocic G, Smelcerovic A. Benzo[4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimidine phthalimide derivative, one of the rare noncompetitive inhibitors of dipeptidyl peptidase-4. *Archiv der Pharmazie* 2020a; 353: 1900238.
- Tomovic K, Ilic BS, Smelcerovic Z, Miljkovic M, Yancheva D, Kojic M, Mavrova AT, Kocic G, Smelcerovic A. Benzimidazole-based dual dipeptidyl peptidase-4 and xanthine oxidase inhibitors. *Chemico-Biological Interactions* 2020b; 315: 108873.

- Tremblay AJ, Lamarche B, Deacon CF, Weisnagel SJ, Couture P. Effects of sitagliptin therapy on markers of low-grade inflammation and cell adhesion molecules in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2014; 63: 1141-1148.
- Tsai TY, Hsu T, Chen CT, Cheng JH, Yeh TK, Chen X, Huang CY, Chang CN, Yeh KC, Hsieh SH, Chien CH, Chang YW, Huang CH, Huang YW, Huang CL, Wu SH, Wang MH, Lu CT, Chao YS, Jiaang WT. Novel *trans*-2-aryl-cyclopropylamine analogues as potent and selective dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2009; 17: 2388-2399.
- Tsu H, Chen X, Chen CT, Lee SJ, Chang CN, Kao KH, Coumar MS, Yeh YT, Chien CH, Wang HS, Lin KT, Chang YY, Wu SH, Chen YS, Lu IL, Wu SY, Tsai TY, Chen WC, Hsieh HP, Chao YS, Jiaang WT. 2-[3-[2-[(2*S*)-2-Cyano-1-pyrrolidinyl]-2-oxoethylamino]-3-methyl-1-oxobutyl]-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline: A potent, selective, and orally bioavailable dipeptide-derived inhibitor of dipeptidyl peptidase IV. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006; 49: 373-380.
- Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Reviews Drug Discovery* 2006; 5: 785-799.
- Vaghasiya J, Sheth N, Bhalodia Y, Manek R. Sitagliptin protects renal ischemia reperfusion induced renal damage in diabetes. *Regulatory Peptides* 2011; 166: 48-54.
- Veldkamp CT, Ziarek JJ, Su J, Basnet H, Lennertz R, Weiner JJ, Peterson FC, Baker JE, Volkman BF. Monomeric structure of the cardioprotective chemokine SDF-1/CXCL12. *Protein Science* 2009; 18: 1359-1369.
- Viazzi F, Leoncini G, Ratto E, Pontremoli R. Serum uric acid as a risk factor for cardiovascular and renal disease: an old controversy revived. *The Journal of Clinical Hypertension* 2006; 8: 510-518.
- Villhauer EB, Brinkman JA, Naderi GB, Burkey BF, Dunning BE, Prasad K, Mangold BL, Russell ME, Hughes TE. 1-[[[3-Hydroxy-1-adamantyl)amino]acetyl]-2-cyano-(*S*)-pyrrolidine: a potent, selective, and orally bioavailable dipeptidyl peptidase IV inhibitor with antihyperglycemic properties. *Journal of Medicinal Chemistry* 2003; 46: 2774-2789.
- Vizovišek M, Vidmar R, Fonović M, Turk B. Current trends and challenges in proteomic identification of protease substrates. *Biochimie* 2016; 122: 77-87.

- Volpe CMO, Villar-Delfino PH, dos Anjos PMF, Nogueira-Machado JA. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death and Disease* 2018; 9: 119.
- Volterrani M, Iellamo F, Sposato B, Romeo F. Uric acid lowering therapy in cardiovascular diseases. *International Journal of Cardiology* 2016; 213: 20-22.
- von Eynatten M, Gong Y, Emser A, Woerle HJ. Efficacy and safety of linagliptin in type 2 diabetes subjects at high risk for renal and cardiovascular disease: a pooled analysis of six phase III clinical trials. *Cardiovascular Diabetology* 2013; 12: 60.
- Vyas-Read S, Shaul PW, Yuhanna IS, Willis BC. Nitric oxide attenuates epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells. *The American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* 2007; 293: L212-L221.
- Wallace MB, Feng J, Zhang Z, Skene RJ, Shi L, Caster CL, Kassel DB, Xu R, Gwaltney II SL. Structure-based design and synthesis of benzimidazole derivatives as dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2008; 18: 2362-2367.
- Wang L, Zhang B, Ji J, Li B, Yan J, Zhang W, Wu Y, Wang X. Synthesis and evaluation of structurally constrained imidazolidin derivatives as potent dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009; 44: 3318-3322.
- Wang J, Feng Y, Ji X, Deng G, Leng Y, Liu H. Synthesis and biological evaluation of pyrrolidine-2-carbonitrile and 4-fluoropyrrolidine-2-carbonitrile derivatives as dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2013; 21: 7418-7429.
- Wang S, Su M, Wang J, Li Z, Zhang L, Ji X, Li J, Li J, Liu H. (*R*)-3-Amino-1-((3*aS*,7*aS*)-octahydro-1*H*-indol-1-yl)-4-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-1-one derivatives as potent inhibitors of dipeptidyl peptidase-4: Design, synthesis, biological evaluation, and molecular modeling. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2014; 22: 6684-6693.
- Watanabe YS, Yasuda Y, Kojima Y, Okada S, Motoyama T, Takahashi R, Oka M. Anagliptin, a potent dipeptidyl peptidase IV inhibitor: its single-crystal structure and enzyme interactions. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2015; 30: 981-988.
- Weerackody RP, Welsh DJ, Wadsworth RM, Peacock AJ. Inhibition of p38 MAPK reverses hypoxia-induced pulmonary artery endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 2009; 296: H1312-H1320.

- White WB, Cannon CP, Heller SR, Nissen SE, Bergenstal RM, Bakris GL, Perez AT, Fleck PR, Mehta CR, Kupfer S, Wilson C, Cushman WC, Zannad F. Alogliptin after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine* 2013; 369: 1327-1335.
- Widlansky ME, Jensen DM, Wang J, Liu Y, Geurts AM, Kriegel AJ, Liu P, Ying R, Zhang G, Casati M, Chu C, Malik M, Branum A, Tanner MJ, Tyagi S, Usa K, Liang M. MiR-29 contributes to normal endothelial function and can restore it in cardiometabolic disorders. *EMBO Molecular Medicine* 2018; 10: e8046.
- Willis BC, Borok Z. TGF- β -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *The American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* 2007; 293: L525-L534.
- Wright SW, Ammirati MJ, Andrews KM, Brodeur AM, Danley DE, Doran SD, Lillquist JS, McClure LD, McPherson RK, Orena SJ, Parker JC, Polivkova J, Qiu X, Soeller WC, Soglia CB, Treadway JL, VanVolkenburg MA, Wang H, Wilder DC, Olson TV. *cis*-2,5-Dicyanopyrrolidine inhibitors of dipeptidyl peptidase IV: synthesis and in vitro, in vivo, and X-ray crystallographic characterization. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006; 49: 3068-3076.
- Wronkowitz N, Görgens SW, Romacho T, Villalobos LA, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C, Sell H, Eckel J. Soluble DPP4 induces inflammation and proliferation of human smooth muscle cells via protease-activated receptor 2. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014; 1842: 1613-1621.
- Wu D, Jin F, Lu W, Zhu J, Li C, Wang W, Tang Y, Jiang H, Huang J, Liu G, Li J. Synthesis, structure-activity relationship, and pharmacophore modeling studies of pyrazole-3-carbohydrazone derivatives as dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Chemical Biology and Drug Design* 2012; 79: 897-906.
- Wu WL, Hao J, Domalski M, Burnett DA, Pissarnitski D, Zhao Z, Stamford A, Scapin G, Gao YD, Soriano A, Kelly TM, Yao Z, Powles MA, Chen S, Mei H, Hwa J. Discovery of novel tricyclic heterocycles as potent and selective DPP-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2016a; 7: 498-501.
- Wu AH, Gladden JD, Ahmed M, Ahmed A, Filippatos G. Relation of serum uric acid to cardiovascular disease. *International Journal of Cardiology* 2016b; 213: 4-7.
- Xia Y, Zweier JL. Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 18797-18803.

- Xia Y, Khatchikian G, Zweier JL. Adenosine deaminase inhibition prevents free radical-mediated injury in the postischemic heart. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 10096-10102.
- Xie H, Zeng L, Zeng S, Lu X, Zhao X, Zhang G, Tu Z, Xu H, Yang L, Zhang X, Wang S, Hu W. Highly potent dipeptidyl peptidase IV inhibitors derived from Alogliptin through pharmacophore hybridization and lead optimization. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 68: 312-320.
- Xie Y, Shao L, Wang Q, Bai Y, Chen Z, Li N, Xu Y, Li Y, Yang G, Bian X. Synthesis, nitric oxide release, and dipeptidyl peptidase-4 inhibition of sitagliptin derivatives as new multifunctional antidiabetic agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2018; 28: 3731-3735.
- Xing J, Li Q, Zhang S, Liu H, Zhao L, Cheng H, Zhang Y, Zhou J, Zhang H. Identification of dipeptidyl peptidase IV inhibitors: virtual screening, synthesis and biological evaluation. *Chemical Biology and Drug Design* 2014; 84: 364-377.
- Xu J, Wang J, He M, Han H, Xie W, Wang H, Kong H. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) inhibition alleviates pulmonary arterial remodeling in experimental pulmonary hypertension. *Laboratory Investigation* 2018; 98: 1333-1346.
- Yamagishi SI, Ishibashi Y, Ojima A, Sugiura T, Matsui T. Linagliptin, a xanthine-based dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, decreases serum uric acid levels in type 2 diabetic patients partly by suppressing xanthine oxidase activity. *International Journal of Cardiology* 2014; 176: 550-552.
- Yamaguchi T, Watanabe A, Tanaka M, Shiota M, Osada-Oka M, Sano S, Yoshiyama M, Miura K, Kitajima S, Matsunaga S, Tomita S, Iwao H, Izumi Y. A dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor, linagliptin, attenuates cardiac dysfunction after myocardial infarction independently of DPP-4. *Journal of Pharmacological Sciences* 2019; 139: 112-119.
- Yancheva D, Cherneva E, Quick M, Mikhova B, Shivachev B, Nikolova R, Djordjevic A, Untergehrer M, Jürgenliemk G, Kraus B, Smelcerovic A. Synthesis, crystal structure and biological activity screening of novel *N*-(α -bromoacyl)- α -amino esters containing valyl moiety. *Acta Chimica Slovenica* 2015; 62: 689-699.
- Yisireyili M, Takeshita K, Hayashi M, Wu H, Uchida Y, Yamamoto K, Kikuchi R, Hao CN, Nakayama T, Cheng XW, Matsushita T, Nakamura S, Murohara T. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitor alogliptin improves stress-induced insulin resistance and

- prothrombotic state in a murine model. *Psychoneuroendocrinology* 2016; 73: 186-195.
- Yisireyili M, Hayashi M, Wu H, Uchida Y, Yamamoto K, Kikuchi R, Hamrah MS, Nakayama T, Cheng XW, Matsushita T, Nakamura S, Niwa T, Murohara T, Takeshita K. Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates stress-induced hyperuricemia, glucose dysmetabolism, and prothrombotic state in mice. *Scientific Reports* 2017; 7: 1266.
- Yoshida T, Akahoshi F, Sakashita H, Kitajima H, Nakamura M, Sonda S, Takeuchi M, Tanaka Y, Ueda N, Sekiguchi S, Ishige T, Shima K, Nabeno M, Abe Y, Anabuki J, Soejima A, Yoshida K, Takashina Y, Ishii S, Kiuchi S, Fukuda S, Tsutsumiuchi R, Kosaka K, Murozono T, Nakamaru Y, Utsumi H, Masutomi N, Kishida H, Miyaguchi I, Hayashi Y. Discovery and preclinical profile of teneligliptin (3-[(2*S*,4*S*)-4-[4-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazol-5-yl)piperazin-1-yl]pyrrolidin-2-ylcarbonyl]thiazolidine): A highly potent, selective, long-lasting and orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2012; 20: 5705-5719.
- Yu G, Ibarra GH, Kaminski N. Fibrosis: Lessons from OMICS analyses of the human lung. *Matrix Biology* 2018; 68-69: 422-434.
- Zaruba MM, Theiss HD, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, Fischer R, Krieg L, Hirsch E, Huber B, Nathan P, Israel L, Imhof A, Herbach N, Assmann G, Wanke R, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G, Franz WM. Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 313-323.
- Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, Chacko M, Askari AT, Popovic ZB, Koc ON, Penn MS. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB Journal* 2007; 21: 3197-3207.
- Zhong J, Rao X, Deilulis J, Braunstein Z, Narula V, Hazey J, Mikami D, Needleman B, Sato AR, Rajagopalan S. A potential role for dendritic cell/macrophage-expressing DPP4 in obesity-induced visceral inflammation. *Diabetes* 2013a; 62: 149-157.
- Zhong J, Rao X, Rajagopalan S. An emerging role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) beyond glucose control: Potential implications in cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2013b; 226: 305-314.

- Zhong J, Maiseyeu A, Davis SN, Rajagopalan S. DPP4 in cardiometabolic disease: recent insights from the laboratory and clinical trials of DPP4 inhibition. *Circulation Research* 2015; 116: 1491-1504.
- Zhou J, Jiang X, He S, Jiang H, Feng F, Liu W, Qu W, Sun H. Rational design of multitarget-directed ligands: strategies and emerging paradigms. *Journal of Medicinal Chemistry* 2019; 62: 8881-8914.
- Zhu Y, Xia S, Zhu M, Yi W, Cheng J, Song G, Li Z, Lu P. Synthesis, biological assay *in vitro* and molecular docking studies of new imidazopyrazinone derivatives as potential dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010; 45: 4953-4962.
- Zhu Y, Meng X, Cai Z, Hao Q, Zhou W. Synthesis of phenylpyridine derivatives and their biological evaluation toward dipeptidyl peptidase-4. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* 2017; 53: 350-356.

BIOGRAFIJA AUTORA

Katarina Tomović je rođena 29.07.1991. godine u Prokuplju. Osnovnu školu „Slavoljub Vuksanović - Jajko“ u Blacu i srednju školu „Dr Milenko Hadžić“ u Nišu, smer farmaceutski tehničar, završila je kao nosilac diplome Vuk Karadžić i učenik generacije.

Integrisane akademske studije Farmacije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu upisala je 2010. godine. Na petoj godini studija bila je dobitnik stipendije Fonda za mlade talente - Dositeja. Diplomirala je 2015. godine sa prosečnom ocenom 9,98. Dobitnik je Povelje Univerziteta u Nišu kao najbolji diplomirani student Medicinskog fakulteta u školskoj 2014/15. godini. Doktorske akademske studije iz oblasti farmaceutskih nauka na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu upisala je 2015. godine. Kao doktorand bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije od aprila 2016. do marta 2017. godine.

Dobitnik je nacionalne stipendije „Za žene u nauci“, koju dodeljuje kompanija L'Oréal Balkan u partnerstvu sa Nacionalnom komisijom za saradnju sa UNESCOm i Ministarstvom prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, 2017. godine. Tri publikacije čiji je koautor/autor nagrađene su od Udruženja za kardionefrologiju Srbije prvom nagradom u oblasti kardionefrologije u 2016, 2017. i 2018. godini. Dobitnik je Povelje Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu za najbolji originalni naučnoistraživački rad u školskoj 2017/18. godini.

U zvanje saradnika u nastavi za užu naučnu oblast Farmacija - Osnovi farmaceutske hemije i farmaceutska hemija neorganskih jedinjenja, Farmaceutska hemija organskih jedinjenja 1 i Farmaceutska hemija organskih jedinjenja 2 izabrana je prvi put 2017. godine. U zvanje asistenta za užu naučnu oblast Farmaceutska hemija, analitika lekova i toksikologija izabrana je 2019. godine.

Od 2017. do 2019. godine bila je angažovana na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (OI 172044), i na Internom projektu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu (INT-MFN-4).

BIBLIOGRAFIJA AUTORA

Katarina Tomović je autor jednog i koautor tri rada u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (kategorija M21a), autor jednog i koautor jednog rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorija M21), koautor dva rada u istaknutim međunarodnim časopisima (kategorija M22), autor jednog i koautor tri rada u međunarodnim časopisima (kategorija M23), autor jednog i koautor tri rada u vrhunskim časopisima nacionalnog značaja (kategorija M51), autor tri i koautor jednog saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu (kategorija M34), autor jednog i koautor dva saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampanih u izvodu (kategorija M64).

Zvezdicom su označeni radovi iz doktorske disertacije.

Rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (kategorija M21a)

1. *Anderluh M, Kocić G, **Tomović K**, Kocić H, Smelcerović A. DPP-4 inhibition: A novel therapeutic approach to the treatment of pulmonary hypertension? *Pharmacology and Therapeutics* 2019; 201: 1-7.
2. ***Tomović K**, Lazarević J, Kocić G, Deljanin-Ilić M, Anderluh M, Smelcerović A. Mechanisms and pathways of anti-inflammatory activity of DPP-4 inhibitors in cardiovascular and renal protection. *Medicinal Research Reviews* 2019; 39: 404-422.
3. Šmelcerović A, **Tomović K**, Šmelcerović Ž, Petronijević Ž, Kocić G, Tomašić T, Jakopin Ž, Anderluh M. Xanthine oxidase inhibitors beyond allopurinol and febuxostat; an overview and selection of potential leads based on *in silico* calculated physico-chemical properties, predicted pharmacokinetics and toxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2017; 135: 491-516.
4. *Anderluh M, Kocić G, **Tomović K**, Kocić R, Deljanin Ilić M, Smelcerović A. Cross-talk between the dipeptidyl peptidase-4 and stromal cell-derived factor-1 in stem cell homing and myocardial repair: potential impact of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Pharmacology and Therapeutics* 2016; 167: 100-107.

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (kategorija M21)

1. ***Tomovic K**, Ilic BS, Smelcerovic Z, Miljkovic M, Yancheva D, Kojic M, Mavrova ATs, Kocic G, Smelcerovic A. Benzimidazole-based dual dipeptidyl peptidase-4 and xanthine oxidase inhibitors. *Chemico-Biological Interactions* 2020; 315: 108873.
2. Kocic G, Veljkovic A, Kocic H, Colic M, Mihajlovic D, **Tomovic K**, Stojanovic S, Smelcerovic A. Depurinated milk downregulates rat thymus MyD88/Akt/p38 function, NF- κ B-mediated inflammation, caspase-1 activity but not the endonuclease pathway: *in vitro/in vivo* study. *Scientific Reports* 2017; 7: 41971.

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu (kategorija M22)

1. Smelcerovic A, Lazarevic J, **Tomovic K**, Anastasijevic M, Jukic M, Kocic G, Anderluh M. An overview, advantages and therapeutic potential of non-peptide positive allosteric modulators of glucagon-like peptide-1 receptor. *ChemMedChem* 2019; 14: 514-521.
2. Kocic G, **Tomovic K**, Kocic H, Sokolovic D, Djordjevic B, Stojanovic S, Arsic I, Smelcerovic A. Antioxidative, membrane protective and antiapoptotic effects of melatonin, *in silico* study of physico-chemical profile and efficiency of nanoliposome delivery compared to betaine. *RSC Advances* 2017; 7: 1271-1281.

Rad u međunarodnom časopisu (kategorija M23)

1. Cherneva E, Atanasova M, Buyukliev R, **Tomovic K**, Smelcerovic Z, Bakalova A, Smelcerovic A. 3'-Methyl-4-thio-1*H*-tetrahydropyranspiro-5'-hydantoin platinum complex as novel potent anticancer agent and xanthine oxidase inhibitor. *Archiv der Pharmazie* 2020; 353: e2000039.
2. ***Tomovic K**, Ilic BS, Miljkovic M, Dimov S, Yancheva D, Kojic M, Mavrova AT, Kocic G, Smelcerovic A. Benzo[4,5]thieno[2,3-*d*]pyrimidine phthalimide derivative, one of the rare noncompetitive inhibitors of dipeptidyl peptidase-4. *Archiv der Pharmazie* 2020; 353: 1900238.
3. Damnjanovic I, Kocic G, Najman S, Stojanovic S, **Tomovic K**, Ilic B, Veljkovic A, Pesic S, Smelcerovic A. Possible molecular mechanisms and pathways involved in BH3

mimetic activity of alpha-lipoic acid on human colon cancer cell line. *Farmacia* 2019; 67: 226-234.

4. Vukelić-Nikolić M, Kolarević A, **Tomović K**, Yancheva D, Cherneva E, Najman S, Šmelcerović A. Effects on MC3T3-E1 cells and *in silico* toxicological study of two 6-(propan-2-yl)-4-methyl-morpholine-2,5-diones. *Natural Product Communications* 2015; 10: 1423-1426.

Rad u vrhunskom časopisu nacionalnog značaja (kategorija M51)

1. ***Tomović K**, Kocić G, Šmelcerović A. Potential dual mechanism of hypouricemic activity of DPP-4 inhibitors with purine-based scaffold. *Acta Medica Medianae* 2019; 58: 50-63.
2. Damnjanović I, Kocić G, Najman S, Stojanović S, **Tomović K**, Ilić B, Veljković A, Šmelcerović A. Molecular mechanisms of potential synergistic effect of ketoprofen and meloxicam with conventional cytostatics in human cervix cancer cell line. *Acta Medica Medianae* 2018; 57: 52-59.
3. Šmelcerović A, Šmelcerović Ž, **Tomović K**, Kocić G, Đorđević A. Secondary metabolites of *Hypericum* L. species as xanthine oxidase inhibitors. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* 2017; 34: 275-281.
4. Šmelcerović Ž, **Tomović K**, Yancheva D, Cherneva E, Kocić G, Petronijević Ž. Xanthine oxidase inhibitory properties and *in silico* study of three N-(α -bromoacyl)- α -amino esters. *Acta Medica Medianae* 2016; 55: 14-20.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (kategorija M34)

1. ***Tomović K**, Lazarević J, Šmelcerović Ž, Kocić G, Šmelcerović A. Dipeptidyl peptidase-4 and xanthine oxidase dual inhibition - potentiation of hypouricemic and antioxidative effects. Proceeding of the 4th International Congress of Cardioneurology and Hypertension "KARNEF 2019", Ribarska Banja, Serbia, May 2019, p. 185.
2. ***Tomović K**, Kocić G, Anderluh M, Šmelcerović A. Beneficial effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors on vascular dysfunction. Proceeding of the XXV EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry, Ljubljana, Slovenia, September 2018, p. 258.

3. *Šmelcerović A, Šmelcerović Ž, **Tomović K**, Kocić G, Yancheva D, Ts. Mavrova A. 2-Imino-benzimidazoles and 1,3-thiazolo[3,2-*a*]benzimidazolones as xanthine oxidase inhibitors. Proceeding of the 3rd International Cardioneurology and Hypertension Congress "Cardioneurology Up To Date", Pirot, Serbia, May 2017, p. 156-157.
4. ***Tomović K**, Kocić G, Deljanin-Ilić M, Lazarević J, Anderluh M, Šmelcerović A. DPP-4 inhibitors, not only antidiabetic, but also cardiovascular and renal protective agents. Proceeding of the 3rd International Cardioneurology and Hypertension Congress "Cardioneurology Up To Date", Pirot, Serbia, May 2017, p. 158-159.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu (kategorija M64)

1. Cherneva E, **Tomović K**, Šmelcerović Ž, Šmelcerović A, Buykliev R, Bakalova A. 3'-Methyl-4-thio-*1H*-tetrahydropyran Spiro-5'-hydantoin and its Pt(IV) and Pd(IV) complexes as novel potent xanthine oxidase inhibitors. 7th Congress of Pharmacy with international participation "Pharmaceutical Altitudes", supported by Bulgarian Pharmaceutical Union, Borovets, Bulgaria, November 2019, p. 144-145.
2. Cherneva E, Šmelcerović Ž, **Tomović K**, Šmelcerović A, Buykliev R, Bakalova A. Xanthine oxidase inhibitory activity of thiocyclohexanespiro-5'-hydantoin, 3'-aminothiocyclohexanespiro-5'-hydantoin and their Pt(II) complexes. 7th Congress of Pharmacy with international participation "Pharmaceutical Altitudes" supported by Bulgarian Pharmaceutical Union, Borovets, Bulgaria, November 2019, p. 146-147.
3. ***Tomović K**, Kocić G, Šmelcerović A. GLP-1 dependent/independent effects of DPP-4 inhibitors in the pathobiology of lung vascular injury. First symposium of the Section of pharmaceutical sciences of the Pharmaceutical Association of Serbia "From idea to clinical application: Current pharmaceutical research", Novi Sad, Serbia, September 2019, published in Arhiv za farmaciju 69(Suppl. 4) p. S77-S78.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

ИНХИБИЦИЈА ДИПЕПТИДИЛ ПЕПТИДАЗЕ-4 ХЕТЕРОЦИКЛИЧНИМ ЈЕДИЊЕЊИМА *IN VITRO*

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребила интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Катарина Томовић

Катарина Т. Томовић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**ИНХИБИЦИЈА ДИПЕПТИДИЛ ПЕПТИДАЗЕ-4
ХЕТЕРОЦИКЛИЧНИМ ЈЕДИЊЕЊИМА *IN VITRO***

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предала за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Катарина Томовић

Катарина Т. Томовић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

ИНХИБИЦИЈА ДИПЕПТИДИЛ ПЕПТИДАЗЕ-4 ХЕТЕРОЦИКЛИЧНИМ ЈЕДИЊЕЊИМА *IN VITRO*

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:

Катарина Томовић

Катарина Т. Томовић