

Incretine e trattamento del diabete mellito tipo 2

Gloria Formoso, Agostino Consoli

Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento - Università "G. D'Annunzio", Chieti - Pescara

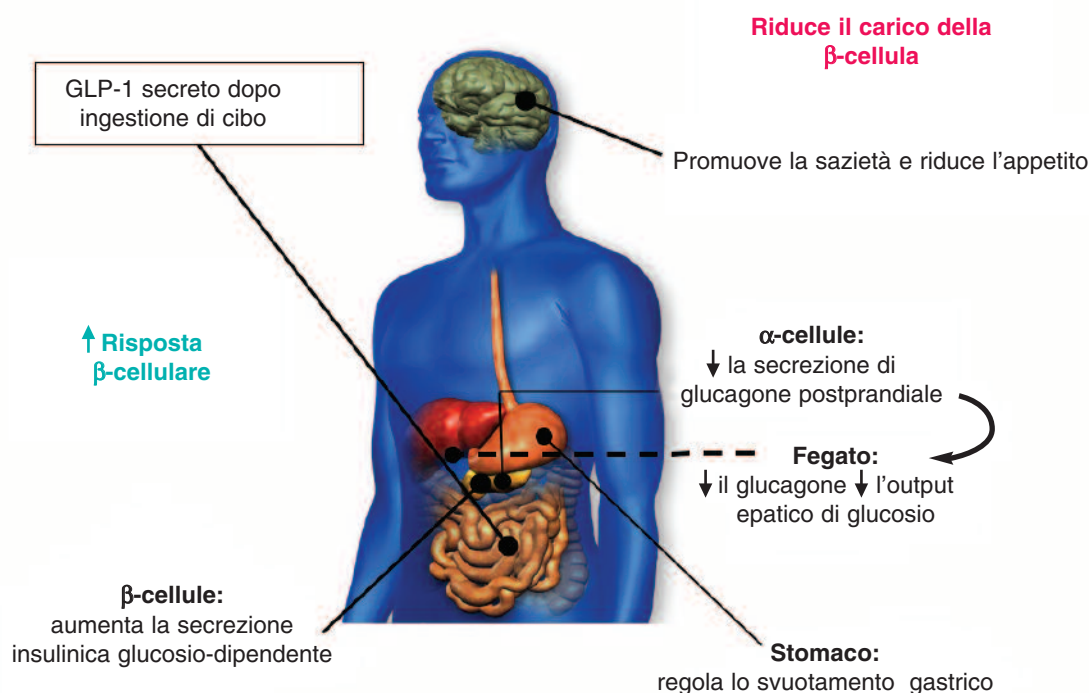
Introduzione

Il concetto di "incretine", ovvero di ormoni intestinali in grado di stimolare la secrezione di insulina, nasce dalla osservazione che una determinata quantità di glucosio ingerita per via orale produce una risposta insulinemica sicuramente superiore a quella indotta dalla stessa quantità di glucosio somministrata per via endovenosa (1) suggerendo, quindi, la partecipazione di un "fattore intestinale" potenziante la secrezione insulinica. In realtà, già nel 1930 era stato riportato che estratti intestinali potevano indurre ipoglicemia e LaBarre aveva definito "incretine" le sostanze, allora non identificate, presenti negli estratti intestinali che avevano questo effetto. Per 30 anni di incretine non si parlò più fino a che, nel 1963, McIntyre propose che, in risposta all'ingestione di glucosio, il digiuno rilasciava alcune sostanze umorali che, insieme al glucosio, contribuivano a favorire la secrezione beta-cellulare di insulina e nel 1969 Unger ed Eisentrout introdussero il concetto di "asse entero-insulare". Quest'asse si è arricchito nel tempo di diverse componenti (glucagone, somatostatina, ecc.) fino a che, all'inizio degli anni '80, fu scoperto il *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) come un prodotto del gene del pro-glucagone. Tale gene fu clonato da due diversi gruppi di ricerca (2, 3) e si notò che, a valle della sequenza del glucagone, erano presenti due sequenze nucleotidiche molto simili tra loro che vennero chiamate GLP-1 e GLP-2 proprio per la loro somiglianza con la sequenza del glucagone. Tali sequenze erano in grado di essere clivate dalla sequenza originaria del pro-glucagone nelle cellule L del digiuno (secretrici di quello che una volta veniva definito "*gut-glucagon*") ma non nelle cellule alfa delle isole pancreatiche. Successivamente veniva scoperto

che una forma troncata del GLP-1 (la sequenza 7-37) aveva un potente effetto insulino-stimolante (4) e da qui nasceva una vasta serie di esperimenti volti a studiare gli effetti di questo "nuovo" ormone intestinale.

Il GLP-1 (**Figura 1**) ha diretti effetti funzionali sulle cellule delle isole del Langherans e influenza la secrezione sia delle cellule β sia di quelle α e δ . Uno dei suoi effetti più importanti è proprio la stimolazione della secrezione insulinica. Questa stimolazione, tuttavia, è "glucosio-dipendente" e, in presenza di concentrazioni di glucosio al di sotto di quelle fisiologiche, l'azione insulinogoga del GLP-1 è totalmente abolita. Il GLP-1 regola anche la secrezione di glucagone, che da esso è soppressa; questa azione avviene in parte attraverso un effetto diretto sulla alfa-cellula e, in parte, attraverso la stimolazione della secrezione di somatostatina che, a sua volta, inibisce la secrezione di glucagone (5). Il GLP-1 ha tuttavia anche effetti "extra-pancreatici" che partecipano fisiologicamente alla regolazione del metabolismo e che sono potenzialmente importanti per le applicazioni terapeutiche dell'ormone. Flint et al. (6) hanno sottoposto volontari sani a infusione endovenosa di GLP-1 che cominciava pochi minuti prima dell'ingestione di un pasto standard e hanno riscontrato che l'infusione di GLP-1, rispetto a quella di placebo, aumentava la sensazione di pienezza e di sazietà e riduceva di circa il 12% le calorie ingerite quando il pasto proposto era *ad libitum*. Inoltre, Nauck et al. (7) hanno dimostrato che, sia in soggetti non diabetici sia in soggetti con diabete tipo 2, l'infusione di GLP-1 induce un ritardo dello svuotamento gastrico. Un aumento del senso di sazietà e uno svuotamento gastrico più lento (con conseguente ritardo nell'assorbimento dei carboidrati) sono ovviamente effetti "utili" nel trattamento di soggetti con diabete dove spesso è

Figura 1 Il ruolo regolatorio delle incretine



Mod. da: Dahlquist (32)

auspicabile una restrizione calorica e dove i picchi iperglicemici post-prandiali rappresentano spesso un ostacolo al raggiungimento di un controllo metabolico ottimale.

Un altro importante aspetto relativo agli effetti del GLP-1 è il fatto che diversi studi hanno dimostrato che l'ormone ha un ruolo importante nel "mantenere" la salute della beta-cellula. In studi su modelli animali è stato dimostrato che il GLP-1 aumenta la massa beta-cellulare attraverso la stimolazione della neogenesi di beta-cellule, nonché della loro crescita e proliferazione. Quest'ultima avviene attraverso la divisione e la differenziazione di beta-cellule già esistenti, mentre la neogenesi avviene attraverso la differenziazione in cellule insulino-secrnenti di cellule precursori nell'epitelio duttale pancreatico (8). Inoltre, in uno studio su isole pancreatiche umane isolate, si è dimostrato che 5 giorni di trattamento *in vitro* con GLP-1 erano in grado di ridurre significativamente l'apoptosi cellulare nei preparati (9). Queste osservazioni circa un'aumentata massa beta-cellulare e una diminuita apoptosi, in seguito a trattamento con GLP-1, sono di particolare

rilievo relativamente al trattamento del diabete tipo 2, in cui una progressiva disfunzione beta-cellulare rappresenta uno dei principali meccanismi fisiopatologici della malattia.

Volendo riassumere quanto esposto sinora (Tabella 1), il GLP-1 è una molecola che possiede le seguenti proprietà: 1) stimola la secrezione di insulina in maniera glucosio dipendente, 2) inibisce la secrezione di glucagone, 3) ritarda lo svuotamento gastrico, 4) ha un effetto anoressizzante, 5) esercita un'azione di protezione sulla massa beta-cellulare. Queste caratteristiche

Tabella 1 Effetti del GLP-1

- stimolo della secrezione di insulina
- inibizione della secrezione di glucagone
- ritardo dello svuotamento gastrico
- anoressizzante
- aumento massa beta-cellulare (?)

ne fanno una molecola di estremo interesse ai fini della terapia del diabete tipo 2. A questo bisogna poi aggiungere che i soggetti con diabete tipo 2 mostrano un “effetto incretinico” ridotto rispetto ai soggetti non diabetici [la differenza tra le curve di insulinemia dopo ingestione di glucosio o dopo somministrazione endovenosa di glucosio è meno marcata che nei non diabetici, e nei soggetti con diabete tipo 2 la secrezione di GLP-1 in risposta a un pasto è ridotta (10)].

Invero, la somministrazione di GLP-1 per infusione continua si è dimostrata in grado di aumentare la secrezione insulinica e di normalizzare sia la glicemia a digiuno sia quella post-prandiale in soggetti affetti da diabete tipo 2 che presentavano un fallimento secondario al trattamento con sulfonilurea. Vilsboll et al. (5) hanno somministrato GLP-1 o GIP (*glucose-dependent insulinotropic polypeptide*) in infusione continua in 8 soggetti con diabete tipo 2 durante un clamp iperglicemico e hanno dimostrato che entrambi gli ormoni erano in grado di ripristinare la prima fase di secrezione insulinica in questi soggetti, anche se l'effetto del GLP-1 era più pronunciato e più sostenuto. Rachman et al. (11) hanno somministrato GLP-1 in infusione continua endovenosa dalle ore 22 alle ore 17 del giorno successivo in soggetti con diabete tipo 2 e hanno osservato che quest'infusione, rispetto a quella di soluzione fisiologica, era in grado di migliorare notevolmente il profilo glicemico, riportandolo a livelli comparabili a quelli osservati in pazienti non diabetici di controllo. In uno studio successivo (12) il GLP-1 è stato somministrato in infusione continua sottocutanea mediante microinfusore per 6 settimane. Al termine del periodo di infusione i 10 pazienti in trattamento attivo mostravano, rispetto ai controlli nei quali era stata infusa fisiologica, una diminuzione di 77 mg/dL della glicemia a digiuno e di 1,3 punti percentuali dell'emoglobina glicosilata (HbA_{1c}). Inoltre, i soggetti in trattamento attivo riferivano una cospicua diminuzione dell'appetito e avevano perso in media 1,9 kg rispetto all'inizio del trattamento.

Tuttavia, anche se il trattamento in somministrazione continua di GLP-1 per via endovenosa o sottocutanea appare, sulla base dei dati sopra esposti, ragionevolmente efficace e vantaggioso, l'effetto di una singola dose sottocutanea di GLP-1 sui valori glicemici e sulla secrezione insulinica in pazienti con diabete tipo 2 è estremamente deludente (13). Ciò è dovuto all'emivita plasmatica di questa incretina che è estremamente breve. Il GLP-1 è infatti metabolizzato nell'arco di pochi minuti dalla dipeptidil-peptidasi-IV (DPP-IV) che è un enzima di

membrana, presente in un gran numero di tessuti (rene, intestino, endotelio capillare ecc.), in grado di clivare il di-peptide NH₂-terminale dei peptidi che presentano come penultimo aminoacido un residuo di prolina o alanina. L'enzima è pertanto in grado di clivare la molecola del GLP-1 tra la posizione 8 (alanina) e la posizione 9 (glicina), ed essendo il residuo terminale 7-9 fondamentale per l'attivazione da parte del GLP-1 del proprio recettore, l'azione della DPP-IV inattiva il GLP-1, regolandone quindi l'attività biologica (14).

Perché il GLP-1 potesse diventare un presidio utile per il trattamento del diabete tipo 2 occorreva quindi utilizzare delle strategie che potessero aumentarne la “sopravvivenza” in circolo e tre approcci sono stati praticati a questo scopo: 1) la somministrazione del GLP-1 in infusione continua per via sottocutanea (vedi sopra), 2) lo sviluppo di analoghi del GLP-1 resistenti alla degradazione enzimatica da parte della DPP-IV e 3) l'uso di inibitori selettivi della DPP-IV in grado di prevenire la degradazione della incretina e di aumentare i livelli circolanti di GLP-1 intatto e biologicamente attivo.

La somministrazione continua di GLP-1 per via sottocutanea (al pari dell'infusione continua sottocutanea di insulina) presenta severe limitazioni di applicabilità e un rapporto costo/beneficio sicuramente molto superiore a quello dell'infusione continua di insulina. L'interesse della comunità scientifica si è quindi spostato verso gli altri due approcci sopra riportati. Questi sono stati entrambi sperimentalmente perseguiti e hanno portato allo sviluppo di principi farmacologici che si trovano a oggi nelle fasi finali di sperimentazioni cliniche o, come in alcuni casi, hanno da poco ottenuto la approvazione delle autorità regolatorie o che addirittura, nel caso dell'exenatide, sono già disponibili in commercio su alcuni mercati per la terapia del diabete tipo 2. Queste molecole sono rappresentate dagli analoghi del GLP-1 e dagli inibitori della DPP-IV e di esse verrà trattato nei paragrafi successivi.

Analoghi stabili del GLP-1

Studi preliminari avevano dimostrato che il GLP-1 poteva essere per gran parte protetto dall'azione degradante della DPP-IV, senza alcuna perdita di attività biologica, semplicemente attraverso la sostituzione del residuo aminoacidico n° 2 (alanina) con altri aminoacidi a catena più corta quali glicina, serina, treonina o acido alfa-amino-isobutirrico (15). Questo però esten-

deva la vita media della molecola di soli pochi minuti, un tempo ancora largamente insufficiente affinché il GLP-1 potesse essere efficacemente adoperato in somministrazione sottocutanea per la terapia del diabete (16). Ciò è in gran parte dovuto alla *clearance* renale del GLP-1 che è molto elevata, con un tasso di estrazione superiore al 70%. Tuttavia, nel 1992 veniva scoperta, in maniera del tutto casuale, una molecola, agonista completo del recettore del GLP-1, che presentava il 53% di omologia con il GLP-1 nativo e che risultava essere resistente all'azione clivante della DPP-IV (grazie alla presenza di una glicina al posto di un'alanina nella parte NH₂-terminale della molecola); la caratteristica principale di questa molecola, denominata exendin-4, era l'emivita significativamente più lunga rispetto a quella del GLP-1 (17). Exendin-4 fu isolata per la prima volta da J. Raufman e J. Eng dalla saliva del *Gila Monster* (*Heloderma Suspectum*), una lucertola velenosa originaria dell'Arizona (17). Successivamente R. Goke (18) dimostrò che exendin-4 agiva come un agonista estremamente potente del recettore del GLP-1 e che, come il GLP-1, era estremamente efficace nello stimolare la secrezione insulinica da parte della beta-cellula pancreatica. È stato successivamente dimostrato che exendin-4 non è il GLP-1 del *Gila Monster* (19) (il quale possiede il proprio GLP-1 molto simile a quello umano) e, soprattutto, che nei mammiferi non sembrerebbe esistere una molecola equivalente. Resta quindi ancora non chiarita l'esatta funzione biologica dell'exendin-4 nella saliva del *Gila Monster* e, tuttavia, la molecola, ricostruita in laboratorio attraverso la tecnologia del DNA ricombinante, presenta delle caratteristiche che, come sotto descritto, la rendono efficace nella terapia del diabete tipo 2.

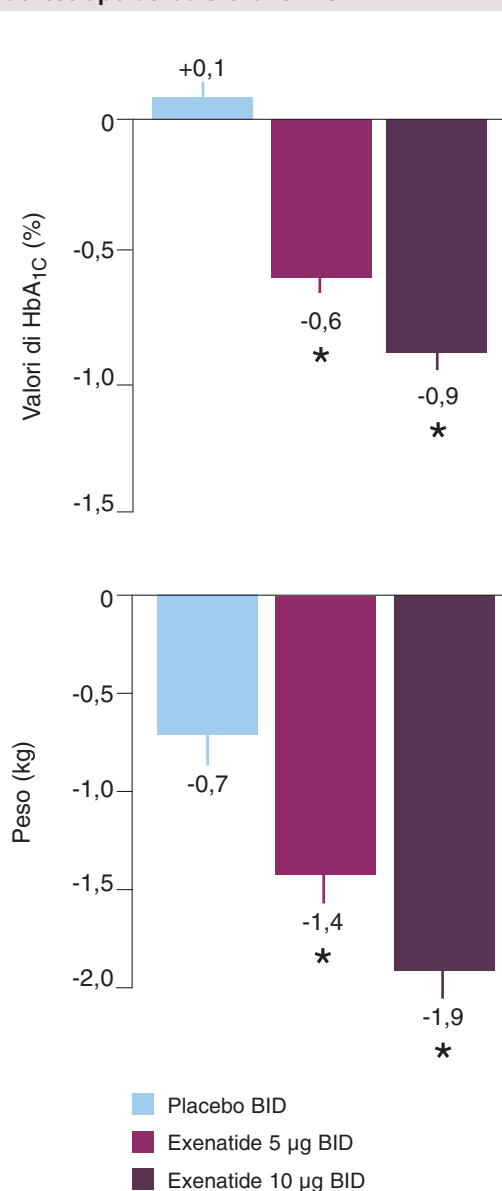
Una singola iniezione sottocutanea di 10 µg di exendin-4 esercita nell'uomo un effetto biologico per un periodo che va dalle 5 alle 7 ore (20). In soggetti sani, l'infusione intravenosa di exendin-4 mostra effetti insulinotropici e riduce sia la glicemia a digiuno sia quella post-prandiale (21). Inoltre, una serie di studi hanno dimostrato che la molecola esercita un effetto "protettivo" sulla beta-cellula. Ad esempio, in ratti con difetti genetici della massa beta-cellulare, il trattamento con exendin-4 durante la prima settimana di vita è in grado di indurre un aumento della massa beta-cellulare con un successivo miglioramento del controllo glicemico nell'età adulta (22). Inoltre, in topi db/db, il trattamento con exendin-4 durante il periodo precedente la comparsa del diabete conclamato aumenta la

massa beta-cellulare funzionante grazie a un effetto positivo sulla proliferazione e negativo sull'apoptosi, ritardando quindi lo sviluppo della malattia diabetica (23). Quando somministrato in epoca neonatale, exendin-4 previene lo sviluppo di diabete in ratti con sviluppo intrauterino ritardato, normalizzando i livelli di PDX (un fattore di crescita pancreatico) e prevenendo la progressiva riduzione della massa beta-cellulare che solitamente si verifica in questo modello murino (24).

La forma sintetica di exendin-4, oggi nota come Exenatide, possiede le stesse attività glucoregatorie del GLP-1, compreso l'incremento della secrezione insulinica glucosio-dipendente, la soppressione glucosio-dipendente dell'eccessiva secrezione di glucagone, il rallentamento dello svuotamento gastrico e la riduzione dell'assunzione di cibo (12, 25-31). Exenatide ha inoltre dimostrato di essere in grado di indurre un recupero della prima fase della secrezione insulinica in soggetti con diabete tipo 2 (32) e di promuovere la proliferazione beta-cellulare e la neogenesi isulare da cellule precursori sia *in vitro* sia *in vivo* (33). Diversi trial clinici hanno indagato l'efficacia di exenatide nel trattamento del diabete tipo 2. I più recenti sono tre studi di fase III in cui si è valutato l'effetto di exenatide vs placebo in soggetti con diabete tipo 2 già in trattamento con ipoglicemizzanti orali. Così exenatide è stata somministrata, in pazienti affetti da diabete tipo 2 con controllo metabolico non adeguato, in aggiunta a sulfonilurea (28), a metformina (34) o ai due farmaci in combinazione (35). In totale, quasi 1000 soggetti sono stati randomizzati nei diversi bracci dei 3 studi in questione. Dopo un periodo pari a 30 settimane di trattamento, in tutti e 3 gli studi, nei gruppi randomizzati a ricevere exenatide per iniezione sottocutanea 2 volte al giorno, si osservava un significativo miglioramento sia della glicemia a digiuno sia della HbA_{1c}. Analizzando insieme i risultati dei 3 studi, exenatide 10 µg x 2 era in grado di indurre una riduzione media della HbA_{1c} di circa 0,9 punti percentuali (Figura 2); inoltre, in più del 40% dei pazienti era possibile raggiungere un controllo metabolico soddisfacente, ovvero una HbA_{1c} inferiore a 7,0%. Questo significativo miglioramento del controllo metabolico non si associava (come spesso accade in soggetti in trattamento ipoglicemizzante) a un aumento di peso ma, al contrario, l'analisi a 30 settimane di trattamento permetteva di individuare, in tutti e 3 gli studi, un significativo calo ponderale associato al trattamento con exenatide. Il calo ponderale risultava progressivo e dose-dipendente; ammontava a quasi 2 kg nei soggetti nei quali il farma-

co era associato a sulfonilurea o a sulfonilurea + metformina e raggiungeva i 3 kg nei pazienti nei quali il farmaco era associato a metformina (Figura 2). Nel prolungamento dello studio sino a 82 settimane, gli effetti su HbA_{1c} e sul peso venivano mantenuti. Un altro dato di rilievo che emergeva dagli studi descritti era che, nei pazienti trattati con exenatide, si osservava un significativo incremento dell'HOMA-B (un indice indiretto di

Figura 2 **Effetto di 30 settimane di trattamento con exenatide sui valori di HbA_{1c} e sul peso corporeo. Dati estrapolati da 3 trial clinici**



funzionalità beta-cellulare) e un decremento del rapporto proinsulina/insulina (32): questo decisamente suggerisce un'importante azione da parte dell'analogo del GLP-1 di "protezione" sulla beta-cellula e di almeno parziale ripristino della sua funzione in pazienti con diabete tipo 2. A riprova di questo, il trattamento con exenatide era seguito da un aumento dei livelli di insulina plasmatica durante sia la prima sia la seconda fase di secrezione glucosio-stimolata, aumento che correlava con il miglioramento del controllo metabolico (32). Un altro elemento importante emerso dagli studi clinici citati è che la exenatide è risultata molto ben tollerata. L'unico evento collaterale di un qualche rilievo era infatti un senso di nausea da modesto a moderato che era accusato da circa un terzo dei pazienti trattati e che, tuttavia, non esitava generalmente in vomito, non interferiva in maniera significativa con la capacità dei pazienti di condurre normalmente le proprie abituali attività quotidiane e tendeva a decrescere, fino a scomparire, col perdurare del trattamento. Inoltre, un certo numero di ipoglicemie non severe, più frequenti di quelle che si verificavano nel gruppo trattato con placebo, venivano rilevate solo nei pazienti trattati, insieme a exenatide, con sulfoniluree (da sole o in associazione a metformina), a suggerire che, nei pazienti nei quali il compenso metabolico migliorava in virtù del trattamento con exenatide, erano in realtà le sulfoniluree (non *down-titolate* in maniera adeguata) ad essere responsabili del calo eccessivo della glicemia. Infine, solo pochi pazienti sviluppavano anticorpi anti-exenatide e questi, comunque, non influenzavano in alcun modo né l'efficacia dell'analogo né il controllo metabolico (34, 35). Dagli studi registrativi emerge quindi che, in pazienti con diabete tipo 2, exenatide somministrata 2 volte al giorno per via sottocutanea alla dose di 10 µg è efficace nel migliorare il compenso metabolico, è ben tollerata, non induce ipoglicemia ed è capace di indurre un discreto calo ponderale. Sulla base di questi dati la *Food and Drug Administration* (FDA) ha nel 2005 approvato exenatide per uso clinico e il farmaco è attualmente in commercio negli Stati Uniti con il nome commerciale di Byetta®.

Un altro analogo del GLP-1 in avanzata fase di sperimentazione clinica è il Liraglutide. Esso è un analogo sintetico del GLP-1 con due modificazioni strutturali della molecola: la lisina in posizione 26 è acilata da un residuo di acido palmitico e la lisina in posizione 34 è sostituita con una arginina. Queste modificazioni promuovono la auto-aggregazione della molecola, aumentandone il tempo di rilascio dal tessuto sottocutaneo;

inoltre, rendono più difficile l'accesso della DPP-IV al sito NH_2 -terminale e permettono alla molecola di complessarsi con l'albumina. Il risultato è un aumento dell'emivita plasmatica della molecola e la prevenzione della eliminazione da parte del rene (36). Questo rende il liraglutide un analogo stabile del GLP-1 e conferisce alla molecola un profilo farmacocinetico caratterizzato da una emivita plasmatica di circa 12 ore, permettendone l'utilizzazione in monosomministrazione (37). Il liraglutide ha una azione sui meccanismi di regolazione della glicemia sovrapponibile a quella del GLP-1; quindi induce una riduzione della glicemia nei pazienti diabetici tipo 2 mediante stimolazione della secrezione insulinica, induce una soppressione della secrezione di glucagone, rallenta lo svuotamento gastrico e "protegge" la beta-cellula favorendo un miglioramento della funzione e della massa beta-cellulare (38). In modelli murini, il trattamento con liraglutide è risultato associato a un incremento della massa e della proliferazione beta-cellulare dopo solo 2-4 settimane di trattamento (39). Nell'uomo, studi di fase I e II hanno dimostrato che una singola iniezione di liraglutide in soggetti affetti da diabete tipo 2 portava a una riduzione della glicemia a digiuno con limitazione delle escursioni giornaliere del glucosio plasmatico e riduzione del tempo di svuotamento gastrico dopo i pasti (40). Inoltre, il trattamento con liraglutide si dimostrava capace di migliorare la prima fase della secrezione insulinica post-prandiale e di limitare la secrezione post-prandiale di glucagone. Si osservava, inoltre, un miglioramento dose-dipendente dei valori di HbA_{1c} e l'analisi del HOMA-B e del rapporto insulina/proinsulina suggeriva un significativo effetto positivo sulla funzione beta-cellulare a digiuno (41). Al trattamento con liraglutide, infine, seguiva un significativo calo ponderale che non si osservava nei gruppi di controllo (42). Al pari di quello che accade con exenatide, il trattamento con liraglutide non causava ipoglicemia: la frequenza di ipoglicemia risultava infatti la stessa nel gruppo dei trattati e in quello dei controlli. D'altra parte, in uno studio dettagliato, nel quale la capacità di liraglutide di stimolare la secrezione di insulina veniva valutata a diversi livelli di glicemia, mantenuta stabile attraverso la tecnica del clamp glicemico, si dimostrava che l'effetto di stimolazione sulla secrezione di insulina era presente solo in presenza di valori di glicemia superiori a 67 mg/dL (21). Infatti quando la glicemia dei soggetti veniva mantenuta al di sotto di questo valore, la stimolazione della secrezione di insulina da

parte del liraglutide era completamente assente (21). Questo, così come la dimostrazione che a bassi livelli di glicemia viene persa anche la capacità dell'analogo di sopprimere la secrezione di glucagone, rende ragione del bassissimo rischio di ipoglicemia associato al trattamento con gli analoghi del GLP-1. Infine, almeno negli studi registrativi fino ad ora portati a conclusione, il trattamento con liraglutide, al pari di quello con exenatide, non appare gravato da eventi avversi maggiori e gli unici effetti collaterali riportati sono dei modesti sintomi a carico dell'apparato gastrointestinale (sensazione di nausea) che tendono a diminuire o a scomparire man mano che continua il trattamento.

In definitiva, quindi, gli analoghi del GLP-1 sono molecole che hanno dimostrato in maniera convincente, in pazienti con diabete tipo 2, di essere efficaci nel migliorare il compenso metabolico e nell'indurre, al contempo, un significativo calo ponderale esercitando anche, verosimilmente, una funzione di protezione beta-cellulare; inoltre non sono associati a un significativo aumento del rischio di ipoglicemia e hanno effetti collaterali relativamente modesti e limitati all'apparato gastro-intestinale. Queste caratteristiche ne fanno molecole di grande potenzialità nel trattamento del diabete tipo 2 e strumenti che potrebbero rivelarsi preziosi nel raggiungimento, in questi pazienti, dei target di controllo metabolico proposti dalle Società Scientifiche. Devono, tuttavia, essere somministrati per via iniettiva sottocutanea in almeno, allo stato attuale, una o due somministrazioni giornaliere.

Inibitori della DPP-IV

Un altro possibile approccio alla terapia del diabete tipo 2 che sfrutti le proprietà delle incretine è quello della inibizione della DPP-IV. La DPP-IV è una glicoproteina multifunzionale con attività serin dipeptidasi-*ca* N-terminale presente sia in circolo sia sulla membrana cellulare. DPP-IV è implicata in processi cellulari pleiotropici che coinvolgono funzioni immuni, infiammatorie ed endocrine e ha la capacità di clivare numerosi ormoni e chemochine *in vitro*. Tra le molecole riconosciute come substrati di quest'enzima *in vivo* si possono annoverare i peptidi della famiglia del glucagone, tra i quali appunto GLP-1 e GIP, che vengono inattivati dall'enzima attraverso clivaggio del residuo aminoacidico seguente alla penultima lisina della catena peptidica (43).

L'idea di un possibile utilizzo terapeutico di inibitori della DPP-IV nel trattamento del diabete tipo 2 risale al 1995 e si fonda sull'osservazione della rapida inattivazione del GLP-1 da parte della DPP-IV. Si ragionò che l'inibizione di questo processo potesse prolungare l'azione del GLP-1, con un successivo miglioramento della secrezione insulinica e quindi della tolleranza ai carboidrati (44, 45). Da allora, diversi studi hanno dimostrato che il trattamento con inibitori della DPP-IV migliora la tolleranza glucidica in modelli di ratti obesi e preserva la funzione beta-cellulare sia in modelli murini di controllo sia in modelli murini di insulino-resistenza e/o di ridotta tolleranza ai carboidrati (46, 47). Questi effetti sono stati attribuiti, almeno in parte, all'aumento dei livelli di GLP-1 integro circolante che segue al trattamento con questa classe di molecole. L'aumento dei livelli di GLP-1 potrebbe, inoltre, essere implicato nel miglioramento della funzione delle isole pancreatiche osservata nei modelli murini di insulino-resistenza e di intolleranza ai carboidrati. Un'ulteriore conferma dell'effetto positivo relativo all'inibizione della DPP-IV veniva da studi effettuati su altri due modelli animali: ratti Fischer, che presentano una inattivazione di questo enzima e topi CD26 *knock-out* per il gene che codifica per la DPP-IV. Questi animali presentavano un miglioramento della tolleranza ai carboidrati quando confrontati con la controparte *wild-type* (38). Inoltre, entrambi i modelli erano protetti nei confronti dello sviluppo di insulino-resistenza e di ridotta tolleranza ai carboidrati a seguito di una dieta ad alto contenuto di grassi (38). Ancora una volta questo effetto veniva attribuito all'aumento del GLP-1 endogeno. Sulla base di questi risultati, diverse molecole sono state sviluppate e avviate alla sperimentazione clinica (Tabella 2). Di

queste una, il sitagliptin, è stata recentemente approvata per uso clinico dalla FDA e registrata con il nome di Januvia® e un'altra, il vildagliptin è attualmente all'analisi delle autorità regolatorie per l'approvazione per uso clinico ed è stata registrata con il nome di Galvus®. Nei primi studi effettuati sull'uomo, una singola dose di inibitori della DPP-IV si dimostrava in grado di ridurre le escursioni della glicemia sia in soggetti sani sia in soggetti affetti da diabete tipo 2 (21). Successivamente, studi clinici in pazienti con diabete tipo 2, hanno dimostrato che il trattamento con inibitori della DPP-IV si associa a un miglioramento del controllo metabolico, a un aumento della secrezione insulinica, a una ridotta secrezione di glucagone e a una buona tollerabilità e sicurezza (48). La validità della terapia con inibitori della DPP-IV è stata confermata dagli studi registrativi eseguiti sia con molecole a breve durata d'azione (come il vildagliptin) (49), sia con molecole a durata d'azione più prolungata (come il sitagliptin). Così, la somministrazione di vildagliptin due o tre volte al giorno per 4 settimane in pazienti affetti da diabete tipo 2 portava a un miglioramento della glicemia a digiuno e postprandiale con un conseguente significativo miglioramento della HbA_{1c}. Il farmaco era generalmente ben tollerato con eventi avversi di minore entità (come, ad esempio, prurito e faringiti) che non richiedevano, tuttavia, la sospensione della terapia (50). Gli effetti positivi del vildagliptin perduravano almeno sino a 1 anno in uno studio dove il farmaco (50 mg una volta al giorno) veniva somministrato in aggiunta alla metformina e confrontato vs placebo in aggiunta alla metformina in 71 pazienti con diabete tipo 2. Dopo 1 anno di trattamento i pazienti in trattamento attivo avevano valori di HbA_{1c} inferiori in media di 1,1 punti percentuali rispetto ai controlli (Figura 3A). Inoltre, la secrezione insulinica postprandiale rimaneva inalterata nel gruppo di studio mentre si riduceva significativamente nel gruppo trattato con placebo (51) e i livelli di glucagone risultavano significativamente ridotti (50), suggerendo che l'inibizione della secrezione del glucagone GLP-1 mediata, insieme all'effetto insulinotropo, contribuiscono agli effetti positivi osservati sul controllo glicemico durante il trattamento con questa classe di farmaci.

Il sitagliptin è una molecola con una durata d'azione più lunga del vildagliptin. Anche il trattamento con questo farmaco (100 mg/die in monosomministrazione) si è rivelato efficace nella terapia del diabete tipo 2. Il

Tabella 2 Inibitori della DPP-IV in fase di studio

Nome	Company	Fase
Vildagliptin	Novartis	FDA Submitted
Sitagliptin	MSD	FDA Approved
Saxagliptin	BMS	III
PSN9301	Prosidion	III
SYR-322	Takeda	IIb
??	GSK	I

sitagliptin è efficace in monoterapia (HbA_{1c} = -0,94 punti percentuali rispetto ai controlli in oltre 300 pazienti trattati per 24 settimane) (52), in aggiunta alla terapia con metformina (Figura 3B) (HbA_{1c} = -0,65 punti percentuali rispetto ai controlli in oltre 300 pazienti trattati per 24 settimane) (53) e in aggiunta alla terapia con pioglitazone (HbA_{1c} = -0,70 punti percentuali rispetto ai controlli in oltre 100 pazienti trattati per 24 settimane) (54). Gli effetti collaterali del farmaco sono praticamente nulli e, a giudicare dal miglioramento del rapporto insulina/proinsulina e dell'HOMA-B che si ottiene a seguito del trattamento, il farmaco dovrebbe avere una distinta azione di protezione beta-cellulare. A oggi non ci sono dati che suggeriscano che i farmaci inibitori della DPP-IV siano in grado di indurre un calo ponderale, come è il caso per gli analoghi del GLP-1. Tuttavia, il trattamento con questi farmaci non è seguito dall'aumento ponderale che si verifica, invece, quasi invariabilmente durante il trattamento con sulfoniluree, tiazolidinedioni o insulina.

Gli inibitori della DPP-IV sono quindi farmaci che, assunti per via orale in monosomministrazione, sono capaci, in pazienti con diabete tipo 2, di indurre un significativo miglioramento del compenso metabolico

(riduzione della HbA_{1c} dell'ordine di 1,0-1,5 punti percentuali), senza indurre rischio di ipoglicemia, aumento ponderale e con minimi effetti collaterali. Questo li rende farmaci potenzialmente molto interessanti per la terapia del diabete tipo 2. Il dibattito resta tuttavia aperto circa l'esatto meccanismo di azione di questi farmaci: nonostante il razionale per l'utilizzo degli inibitori della DPP-IV si basi sulla capacità di queste molecole di prolungare l'azione del GLP-1, questo potrebbe non essere sufficiente a spiegarne l'efficacia. La DPP-IV è un enzima ubiquitario, in grado potenzialmente di clivare numerosi peptidi oltre al GLP-1 e al GIP (48), ed è quindi possibile che l'effetto positivo che segue l'inibizione della DPP-IV nel diabete non sia unicamente attribuibile alla maggiore emivita di queste incretine ma sia in realtà mediato anche dall'inibizione di altri peptidi. A supporto di questo, in pazienti con diabete tipo 2, la somministrazione di inibitori della DPP-IV è seguita da un raddoppio della concentrazioni post-prandiali di GLP-1 e da un significativo miglioramento del compenso metabolico; al contrario, la stessa concentrazione di GLP-1 ottenuta mediante infusione esogena dell'ormone non sortisce alcun effetto sul controllo metabolico (51). È vero, tuttavia, che il GLP-1

Figura 3A Effetti del trattamento con vildagliptin + metformina sui valori di HbA_{1c} in pazienti con diabete tipo 2

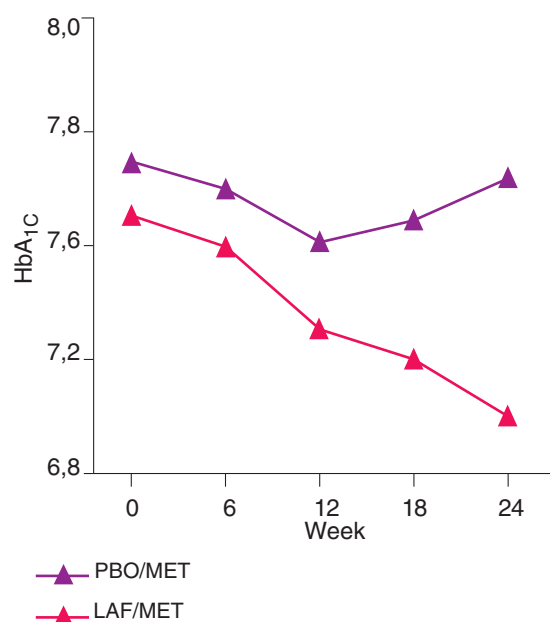
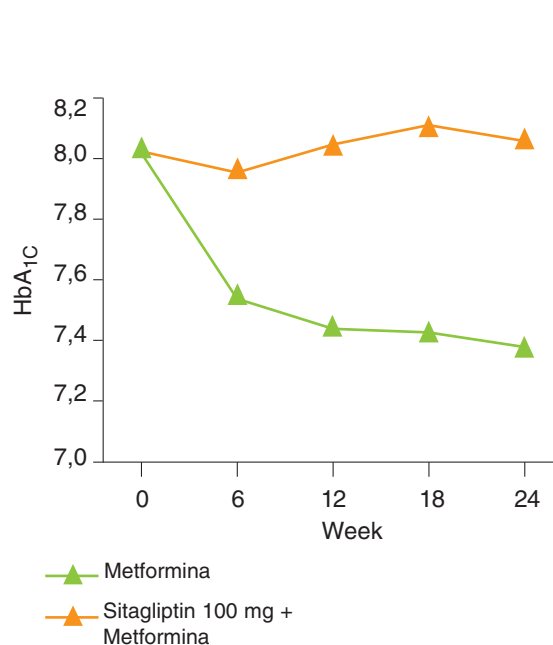


Figura 3B Effetti di 24 settimane di trattamento con sitagliptin + metformina vs metformina sui valori di HbA_{1c}



potrebbe indirettamente modulare il sistema nervoso autonomo (48) attraverso l'attivazione di terminazioni nervose periferiche. In questo caso i livelli plasmatici di GLP-1 sarebbero di scarsa rilevanza, divenendo invece fondamentali le concentrazioni di GLP-1 attivo in prossimità delle terminazioni nervose. Infine, alcuni neuropeptidi potrebbero essere coinvolti nel meccanismo d'azione degli inibitori della DPP-IV nel diabete. Esistono, infatti, peptidi biologicamente attivi localizzati a livello di terminazioni nervose terminali delle isole pancreatiche, potenzialmente in grado di influenzare la funzione insulare, che possono essere clivati da diverse isoforme della DPP-IV e la cui emivita potrebbe quindi essere profondamente modulata dagli inibitori dell'enzima. Il dibattito su queste problematiche nell'ambito della comunità scientifica è lungi dall'essere concluso e appare chiaro come ulteriori studi siano necessari. Nonostante questo, gli inibitori della DPP-IV promettono oggi di essere uno strumento efficace ed estremamente maneggevole e sicuro per la terapia del diabete tipo 2.

Conclusioni

Dalla scoperta che il tratto intestinale produce sostanze di grande rilevanza per il metabolismo dei carboidrati e il mantenimento della omeostasi glucidica sono derivate 2 classi di agenti terapeutici che hanno enorme potenzialità per il trattamento del diabete tipo 2. L'una, la classe degli inibitori della DPP-IV, comporta la somministrazione orale di una singola compressa di un farmaco che, almeno fino ad oggi, non sembra avere alcun effetto collaterale. Questo rende i farmaci di questa classe così sicuri che, al di là della loro efficacia, – peraltro dimostrata – sul compenso metabolico in pazienti diabetici tipo 2, essi si potrebbero rivelare estremamente utili per la prevenzione di questa patologia. In virtù anche della loro azione protettiva nei confronti della beta-cellula questi farmaci potrebbero essere usati un domani per trattare non solo individui con diabete tipo 2, ma anche soggetti a rischio di sviluppare diabete. L'altra classe di farmaci, gli analoghi del GLP-1, è costituita da principi attivi che devono essere somministrati attraverso iniezione sottocutanea ma che, rispetto agli inibitori della DPP-IV, consentono di raggiungere livelli molto più alti di GLP-1. Hanno una azione forse ancora più importante di protezione beta-cellulare e, soprattutto, inducono un significativo calo

ponderale. Considerato che anche per questa classe di farmaci gli effetti collaterali sono molto modesti, le loro caratteristiche li rendono sicuramente decisamente utili nel trattamento di pazienti con diabete tipo 2 manifesto, specialmente di quelli con obesità o sovrappeso. Inoltre, lo sviluppo di ulteriori analoghi ad azione ritardo (già in avanzata fase di sperimentazione) che consentirebbero la somministrazione sottocutanea una volta ogni 15–30 giorni facilitandone l'impiego, potrebbe contribuire a far annoverare questi agenti tra i trattamenti di prima scelta per il diabete tipo 2. In ogni caso, la terapia basata sulla azione delle incretine ha sicuramente aggiunto nuove potenti frecce all'arco della terapia del diabete tipo 2.

Bibliografia

1. Nauck M, Stockmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 29: 46-52, 1986.
2. Lund PK, Goodman RH, Habener JF. Pancreatic preproglucagons are encoded by two separate mRNAs. *J Biol Chem* 256: 6515-6518, 1981.
3. Bell GI, Santerre RF, Mullenbach GT. Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature* 302: 716-718, 1983.
4. Mojsov S, Weir GC, Habener JF. Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest* 79: 616-619, 1987.
5. Vilsboll T, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ. Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45: 1111-1119, 2002.
6. Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest* 101: 515-520, 1998.
7. Nauck MA, Niedereichholz U, Ettler R, Holst JJ, Orskov C, Ritzel R, Schmiegel WH. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol* 273: E981-988, 1997.
8. Bulotta A, Hui H, Anastasi E, Bertolotto C, Boros LG, Di Mario U, Perfetti R. Cultured pancreatic ductal cells undergo cell cycle re-distribution and beta-cell-like differentiation in response to glucagon-like peptide-1. *J Mol Endocrinol* 29: 347-360, 2002.
9. Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Li Calzi S, Khoury N, Noshmehr H, Bertolotto C, Di Mario U, Harlan DM, Perfetti R. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology* 144: 5149-5158, 2003.
10. Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK, Holst JJ. Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3717-3723, 2001.

11. Rachman J, Barrow BA, Levy JC, Turner RC. Near-normalisation of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in subjects with NIDDM. *Diabetologia* 40: 205-211, 1997.
12. Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. Effect of 6-weeks course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet* 359: 824-830, 2002.
13. Nauck MA, Wollschlaeger D, Werner J, Holst JJ, Orskov C, Creutzfeldt W, Willms B. Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia* 39: 1546-1553, 1996.
14. Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology* 140: 5356-5363, 1999.
15. Deacon CF, Knudsen LB, Madsen K, Wiberg FC, Jacobsen O, Holst JJ. Dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1 which have extended metabolic stability and improved biological activity. *Diabetologia* 41: 271-278, 1998.
16. Deacon CF, Pridal L, Klarskov L, Olesen M, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 undergoes differential tissue-specific metabolism in the anesthetized pig. *Am J Physiol* 271: E458-464, 1996.
17. Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem* 267: 7402-7405, 1992;
18. Goke R, Fehmann HC, Linn T, Schmidt H, Krause M, Eng J, Goke B. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide an antagonist at the glucagon-like peptide 1-(7-36)-amide receptor of insulin-secreting beta-cells. *J Biol Chem* 268: 19650-19655, 1993.
19. Chen YE, Drucker DJ. Tissue-specific expression of unique mRNAs that encode proglucagon-derived peptides or exendin 4 in the lizard. *J Biol Chem* 272: 4108-4115, 1997.
20. Kolterman OG, Kim DD, Shen L, Ruggles JA, Nielsen LL, Fineman MS, Baron AD. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of exenatide in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Health Syst Pharm* 62: 173-181, 2005.
21. Deacon CF. Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1. *Diabetes* 53: 2181-2189, 2004.
22. Tourrel C, Bailbe D, Lacorne M, Meile MJ, Kergoat M, Portha B. Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes* 51: 1443-1452, 2002.
23. Wang Q, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia* 45: 1263-1273, 2002.
24. Stoffers DA, Desai BM, DeLeon DD, Simmons RA. Neonatal exendin-4 prevents the development of diabetes in the intrauterine growth retarded rat. *Diabetes* 52: 734-740, 2003.
25. Parkes DG, Pittner R, Jodka C, Smith P, Young A. Insulinotropic actions of exendin-4 and glucagon-like peptide-1 in vivo and in vitro. *Metabolism* 50: 583-589, 2001.
26. Egan JM, Clocquet AR, Elahi D. The insulinotropic effect of acute exendin-4 administered to humans: comparison of nondiabetic state to type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1282-1290, 2002.
27. Kolterman OG, Buse JB, Fineman MS, Gaines E, Heintz S, Bicsak TA, Taylor K, Kim D, Aisporna M, Wang Y, Baron AD. Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3082-3089, 2003.
28. Buse JB, Henry RR, Han J, Kim DD, Fineman MS, Baron AD. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in sulfonylurea-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27: 2628-2635, 2004.
29. Szayna M, Doyle ME, Betkey JA, Holloway HW, Spencer RG, Greig NH, Egan JM. Exendin-4 decelerates food intake, weight gain, and fat deposition in Zucker rats. *Endocrinology* 141: 1936-1941, 2000.
30. Edwards CM, Stanley SA, Davis R, Brynes AE, Frost GS, Seal LJ, Ghatei MA, Bloom SR. Exendin-4 reduces fasting and postprandial glucose and decreases energy intake in healthy volunteers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E155-161, 2001.
31. Degn KB, Brock B, Juhl CB, Djurhuus CB, Grubert J, Kim D, Han J, Taylor K, Fineman M, Schmitz O. Effect of intravenous infusion of exenatide (synthetic exendin-4) on glucose-dependent insulin secretion and counterregulation during hypoglycemia. *Diabetes* 53: 2397-2403, 2004.
32. Nielsen LL. Incretin mimetics and DPP-IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Drug Discov Today* 10: 703-710, 2005.
33. Nielsen LL, Young AA, Parkes DG. Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutic for improved glycemic control of type 2 diabetes. *Regul Pept* 117: 77-88, 2004.
34. DeFronzo RA, Ratner RE, Han J, Kim DD, Fineman MS, Baron AD. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control and weight over 30 weeks in metformin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 28: 1092-1100, 2005.
35. Kendall DM, Riddle MC, Rosenstock J, Zhuang D, Kim DD, Fineman MS, Baron AD. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in patients with type 2 diabetes treated with metformin and a sulfonylurea. *Diabetes Care* 28: 1083-1091, 2005.
36. Knudsen LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, Johansen NL, Madsen K, Pedersen FZ, Thogersen H, Wilken M, Agerso H. Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *J Med Chem* 43: 1664-1669, 2000.
37. Degn KB, Juhl CB, Sturis J, Jakobsen G, Brock B, Chandramouli V, Rungby J, Landau BR, Schmitz O. One week's treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 derivative liraglutide (NN2211) markedly improves 24-h glycemia and alpha- and beta-cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 53: 1187-1194, 2004.
38. Holst JJ. Glucagon-like peptide-1: from extract to agent. The Claude Bernard Lecture, 2005. *Diabetologia* 49: 253-260, 2006.
39. Sturis J, Gotfredsen CF, Romer J, Rolin B, Ribel U, Brand CL, Wilken M, Wassermann K, Deacon CF, Carr RD, Knudsen LB. GLP-1 derivative liraglutide in rats with beta-cell deficiencies: influence of metabolic state on beta-cell mass dynamics. *Br J Pharmacol* 140: 123-132, 2003.
40. Juhl CB, Hollingdal M, Sturis J, Jakobsen G, Agerso H, Veldhuis

- J, Porksen N, Schmitz O. Bedtime administration of NN2211, a long-acting GLP-1 derivative, substantially reduces fasting and postprandial glycemia in type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 424-429, 2002.
41. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419, 1985.
42. Madsbad S, Schmitz O, Ranstam J, Jakobsen G, Matthews DR. Improved glycemic control with no weight increase in patients with type 2 diabetes after once-daily treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 analog liraglutide (NN2211): a 12-week, double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Care* 27: 1335-1342, 2004.
43. Conarello SL, Li Z, Ronan J, Roy RS, Zhu L, Jiang G, Liu F, Woods J, Zycband E, Moller DE, Thornberry NA, Zhang BB. Mice lacking dipeptidyl peptidase IV are protected against obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6825-6830, 2003.
44. Mest HJ, Mentlein R. Dipeptidyl peptidase inhibitors as new drugs for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetologia* 48: 616-620, 2005.
45. Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH2-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* 44: 1126-1131, 1995.
46. Sudre B, Broqua P, White RB, Ashworth D, Evans DM, Haigh R, Junien JL, Aubert ML. Chronic inhibition of circulating dipeptidyl peptidase IV by FE 999011 delays the occurrence of diabetes in male Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* 51: 1461-1469, 2002.
47. Reimer MK, Holst JJ, Ahren B. Long-term inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves glucose tolerance and preserves islet function in mice. *Eur J Endocrinol* 146: 717-727, 2002.
48. Ahren B. What mediates the benefits associated with dipeptidyl peptidase-IV inhibition? *Diabetologia* 48: 605-607, 2005.
49. Ahren B, Simonsson E, Larsson H, Landin-Olsson M, Torgeirsson H, Jansson PA, Sandqvist M, Bavenholm P, Efendic S, Eriksson JW, Dickinson S, Holmes D. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves metabolic control over a 4-week study period in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25: 869-875, 2002.
50. Ahren B, Landin-Olsson M, Jansson PA, Svensson M, Holmes D, Schweizer A. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2078-2084, 2004.
51. Ahren B, Gomis R, Standl E, Mills D, Schweizer A. Twelve- and 52-week efficacy of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor LAF237 in metformin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27: 2874-2880, 2004.
52. Aschner P, KM, Luncford J, Sanchez M, Mickel C, Davies MJ, Herman WD. Sitagliptin monotherapy improved glycemic control in patient with type 2 diabetes. *Diabetologia* 49: 5, 2006.
53. Charbonnel B, KA, Liu J, Wu M, Meehan A, Meininger G. Efficacy and safety of sitagliptin added to ongoing metformin therapy in type 2 diabetes patients who were inadequately controlled on metformin alone. *Diabetologia* 49: 5, 2006.
54. Rosenstock J, BR, Andryuk PJ, McCrary C, Lu K, Stein P. Addition of sitagliptin to pioglitazone improved glycemic control with neutral weight effect over 24 weeks in inadequately controlled type 2 diabetes. *Diabetologia* 49: 26, 2006.

