

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480025194.5

A61K 31/40 (2006.01)
A61K 31/426 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 10 月 11 日

[11] 公开号 CN 1845731A

[22] 申请日 2004.9.2

[21] 申请号 200480025194.5

[30] 优先权

[32] 2003.9.2 [33] US [31] 60/499,535

[86] 国际申请 PCT/IB2004/003082 2004.9.2

[87] 国际公布 WO2005/020983 英 2005.3.10

[85] 进入国家阶段日期 2006.3.2

[71] 申请人 普罗西迪恩有限公司

地址 英国牛津

[72] 发明人 汉斯-乌尔里希·德穆特

康拉德·格隆德 马蒂亚斯·霍夫曼

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 张晓威

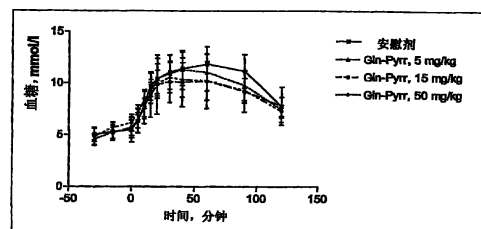
权利要求书 3 页 说明书 45 页 附图 6 页

[54] 发明名称

用于血糖控制的联合治疗

[57] 摘要

本发明涉及一种治疗方法，具体地涉及糖尿病尤其是非胰岛素依赖型糖尿病 (NIDDM) 或 2 型糖尿病和糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖的治疗方法，并涉及用于这种方法的组合物。



1. 一种用于哺乳动物如人的血糖控制的方法，该方法包括给予需要其的哺乳动物有效量的谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和另一种抗糖尿病药。
2. 谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和另一种抗糖尿病药用于血糖控制的用途。
3. 谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐在药物生产中的用途，所述药物用于与另一种抗糖尿病药联合用于血糖控制。
4. 谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和另一种抗糖尿病药在药物生产中的用途，所述药物用于血糖控制。
5. 一种用于治疗哺乳动物中糖尿病和糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖的方法，该方法包括给予需要其的哺乳动物有效量的谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和另一种抗糖尿病药。
6. 谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和另一种抗糖尿病药用于治疗糖尿病和糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖的用途。
7. 谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐在药物生产中的用途，所述药物用于与另一种抗糖尿病药联合用于治疗糖尿病和糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖。
8. 根据前述权利要求之任一项的方法或用途，用于治疗2型糖尿病。
9. 根据前述权利要求之任一项的方法或用途，其中所述谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和所述另一种

抗糖尿病药联合给药或序贯或单独给药。

10. 根据前述权利要求之任一项的方法或用途，其中所述谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和所述另一种抗糖尿病药口服给予。

11. 根据前述权利要求之任一项的方法或用途，其中所述谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐是谷氨酰胺酰噻唑烷盐酸盐。

12. 根据前述权利要求之任一项的方法或用途，其中所述另一种抗糖尿病药选自 α 葡萄糖苷酶抑制剂、双胍类、胰岛素促分泌剂或胰岛素增敏剂。

13. 根据权利要求 12 的方法或用途，其中所述 α 葡萄糖苷酶抑制剂选自阿卡波糖、乙格列酯、米格列醇和伏格列波糖。

14. 根据权利要求 13 的方法或用途，其中所述 α 葡萄糖苷酶抑制剂是阿卡波糖。

15. 根据权利要求 12 的方法或用途，其中所述双胍类选自二甲双胍、丁福明和苯乙双胍。

16. 根据权利要求 15 的方法或用途，其中所述双胍类是二甲双胍。

17. 根据权利要求 12 的方法或用途，其中所述胰岛素促分泌剂选自格列本脲、格列吡嗪、格列齐特、格列美脲、妥拉磺脲和甲苯磺丁脲、醋磺己脲、氨磺丁脲、氯磺丙脲、格列波脲、格列喹酮、格列生脲、格列索脲、格列派特、格列吡脲、格列环脲、格列戊脲、瑞格列奈和那替格列。

18. 根据权利要求 12 的方法或用途，其中所述胰岛素增敏剂是 PPAR γ 激动剂型胰岛素增敏剂。

19. 根据权利要求 12 的方法或用途，其中所述胰岛素增敏剂选自曲格列酮、环格列酮、匹格列酮、恩格列酮和罗格列酮。

20. 一种用于治疗哺乳动物中糖尿病和糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖的方法，该方法包括给予需要其的哺乳动物有效量的谷氨酰胺酰噻唑烷盐酸盐和二甲双胍。

21. 谷氨酰胺酰噻唑烷盐酸盐和二甲双胍用于治疗糖尿病和糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖的用途。

22. 谷氨酰胺酰噻唑烷盐酸盐在药物生产中的用途，所述药物用于与二甲双胍联合用于治疗糖尿病和糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖。

23. 一种药物组合物，所述药物组合物包含谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和另一种抗糖尿病药以及药学可接受的载体。

24. 根据权利要求 23 的药物组合物，其中所述谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐是谷氨酰胺酰噻唑烷盐酸盐。

25. 根据权利要求 23 或 24 的药物组合物，其中所述另一种抗糖尿病药是如权利要求 12-19 之任一项中定义的。

26. 一种药物组合物，所述药物组合物包含谷氨酰胺酰噻唑烷盐酸盐和二甲双胍。

用于血糖控制的联合治疗

技术领域

本发明涉及用于血糖控制的治疗，具体地涉及糖尿病尤其是非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)或2型糖尿病和糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖的治疗方法，并涉及用于这种方法的组合物。

背景技术

血糖控制在诸如糖尿病及相关病症的病症治疗中具有治疗学上的重要性。临床糖尿病可分为四种基本亚型，包括(1) 1型或胰岛素依赖型糖尿病(IDDM) (由 β 细胞破坏所致并以绝对胰岛素缺乏为特征)，(2) 2型或非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM) (以胰岛素抵抗和相对胰岛素缺乏为特征)，(3) 其它特殊类型糖尿病(与各种可确认的临床病症或综合征例如 β 细胞功能的遗传缺陷和线粒体DNA点突变相关，其中与 β 细胞功能的遗传缺陷相关的糖尿病例如青春晚期糖尿病[MODY] 1-3型)，及(4) 妊娠糖尿病。

2型糖尿病是至今该病最常见的形式，发现其占糖尿病患者人群的90%以上。这些患者保持显著水平的内源性胰岛素分泌能力。不过，胰岛素水平相对于胰岛素抵抗的量和环境葡萄糖水平是低的。2型患者近期生存不依赖于胰岛素且酮症很少发生，除非是在重大机体应激情况下。尽管如此，这些患者可能需要胰岛素治疗以控制高血糖。2型糖尿病一般起病于40岁以后，具有与特异性免疫应答(HLA)基因不相关的高遗传外显率，且与肥胖有关。

除了这些临床类型，其它病症即葡萄糖耐受不良和空腹葡萄糖不良是介于正常葡萄糖稳态平衡和显性糖尿病(分别在进食和空腹情况下)之间的代谢状态。这些病症显著增加后期糖尿病危险，在一些情

况下可能是其自然病史的一部分。

另一个相关病症是以高于正常范围但未高至符合 2 型糖尿病诊断标准的血糖水平来定义的葡萄糖代谢不良(IGM)。IGM 的发生率各国不同,但通常以高于显性糖尿病 2-3 倍的频率发生。患有 IGM 的个体中,大约 58%患有葡萄糖耐受不良(IGT),另外 29%患有空腹葡萄糖不良(IFG),还有 13%同时患有该两种异常(IFG/IGT)。

多年来没有实质性变化的对 2 型糖尿病的现有治疗中的许多已经有局限性,例如它们可能具有不希望的副作用、低效或在长期治疗中随时间功效降低。

通过给予刺激胰腺 β 细胞分泌更多胰岛素的磺酰脲类(例如甲苯磺丁脲和格列吡嗪)或格列奈类,和/或当磺酰脲类或格列奈类变得无效时通过注射胰岛素以增加胰岛素的血浆水平,可导致胰岛素浓度高至足以刺激胰岛素抵抗组织。不过,引起危险的低血浆葡萄糖水平可由给予胰岛素或胰岛素促分泌剂(磺酰脲类或格列奈类)导致,而且由于甚至更高的血浆胰岛素水平可发生增加的胰岛素抵抗水平。增加胰岛素敏感性使得高血糖得到一些矫正的 α 葡萄糖苷酶抑制剂抗高血糖药(或 α 葡萄糖苷酶抑制剂)和双胍类抗高血糖药(或双胍类)通常用于 2 型糖尿病的治疗。阿卡波糖、伏格列波糖、乙格列酯、米格列醇为 α 葡萄糖苷酶抑制剂的实例。1,1-二甲基双胍(或二甲双胍)和苯乙双胍为双胍类的具体实例,二甲双胍具有比苯乙双胍小的副作用。

格列酮(即 5- α -基噻唑烷-2,4-二酮)为最近描述的具有改善 2 型糖尿病多种症状潜能的一类化合物。这些活性剂在几种 2 型糖尿病动物模型中显著地增加肌肉、肝和脂肪组织的胰岛素敏感性,导致部分或完全矫正升高的血浆葡萄糖水平而不发生低血糖。目前市售的格列酮类为过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)主要是 PPAR- γ 亚型的激动剂。通常认为 PPAR- γ 激动是在格列酮的情况中观察到的胰岛素增敏改善的原因。正在试验的用于治疗 2 型糖尿病的新的 PPAR 激动剂

是 α 、 γ 或 δ 亚型的激动剂或它们的组合，且在许多情况下化学上不同于格列酮类。一些格列酮例如曲格列酮已经出现副作用(例如肝毒性)。

最近介绍的或仍处在开发中的治疗 2 型糖尿病的新方法包括使用 α 葡萄糖苷酶抑制剂(例如阿卡波糖)和蛋白酪氨酸磷酸酶-1B (PTP-1B)抑制剂进行治疗。

胰岛素促分泌剂为通过胰腺 β 细胞促进胰岛素分泌增加的化合物。磺酰脲类为胰岛素促分泌剂的公知实例。磺酰脲类作为降血糖药并用于 2 型糖尿病的治疗。磺酰脲类的实例包括格列本脲(或优降糖)、格列吡嗪、格列齐特、格列美脲、妥拉磺脲和甲苯磺丁脲。

欧洲专利申请 0306228 公开了某些噻唑烷二酮衍生物，其作为具有抗高血糖和降血脂活性公开，例如 5-[4-[2-(N-甲基-N-(2-吡啶基)氨基)乙氧基]苄基]噻唑烷-2,4-二酮(罗格列酮)。WO 94/05659 公开了该化合物的某些盐，包括其马来酸盐。5-[4-[2-(N-甲基-N-(2-吡啶基)氨基)乙氧基]苄基]噻唑烷-2,4-二酮是称作“胰岛素增敏剂”的一类抗高血糖药的实例。具体地，该化合物为噻唑烷二酮胰岛素增敏剂。5-[4-[2-(N-甲基-N-(2-吡啶基)氨基)乙氧基]苄基]噻唑烷-2,4-二酮也是过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR γ)激动剂型胰岛素增敏剂。

欧洲专利申请 0008203、0139421、0032128、0428312、0489663、0155845、0257781、0208420、0177353、0319189、0332331、0332332、0528734 和 0508740；国际专利申请 WO 92/18501、WO 93/02079 和 WO 93/22445 和美国专利 5,104,888 和 5,478,852 也公开了某些噻唑烷二酮胰岛素增敏剂。

另一系列一般认为具有胰岛素增敏剂活性的化合物是以国际专利申请 WO 93/21166 和 WO 94/01420 中公开的化合物为代表的那些化合物。这些化合物在本文中称作“无环胰岛素增敏剂”。无环胰岛素增敏剂的其它实例在美国专利 5,232,945 和国际专利申请 WO

92/03425 和 WO 91/19702 中公开。其它胰岛素增敏剂的实例在欧洲专利申请 0533933、日本专利申请 05271204 和美国专利 5,264,451 中公开。

二肽基肽酶 IV (DP IV)是一种从肽链中切割 N-末端二肽的丝氨酸蛋白酶,该肽链优选在次末端位含有脯氨酸残基。尽管 DP IV 在哺乳动物系统中的生物作用尚未完全确定,但认为它在神经肽代谢、T 细胞活化、癌细胞附着于内皮和 HIV 进入淋巴样细胞中发挥重要作用。

另外,发现 DP IV 是胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)和也称为肠抑胃肽(GIP)的葡萄糖依赖性促胰岛素肽失活的原因。由于 GLP-1 为胰腺胰岛素分泌的主要刺激物且对葡萄糖处置具有直接有益的作用,因此表明 WO 97/40832 和 US 6,303,661 中 DP IV 和 DP IV 样酶活性的抑制代表一种有吸引力的例如用于治疗非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)的方法。

已知 DP IV 抑制剂可以用于治疗葡萄糖耐受不良和糖尿病(国际专利申请 WO 99/61431, Pederson RA 等, Diabetes. 1998 Aug; 47 (8): 1253-8 和 Pauly RP 等, Metabolism 1999 Mar; 48 (3): 385-9)。

WO 99/61431 公开了包含氨基酸残基和噻唑烷或吡咯烷基团的 DP IV 抑制剂及其盐特别是 L-苏-异亮氨酰噻唑烷、L-别-异亮氨酰噻唑烷、L-苏-异亮氨酰吡咯烷、L-别-异亮氨酰噻唑烷、L-别-异亮氨酰吡咯烷及其药学可接受的盐。WO 03/072556 公开了 DP IV 抑制剂谷氨酰胺酰噻唑烷和谷氨酰胺酰吡咯烷及其药学可接受的盐。

本发明的目的是提供例如在糖尿病尤其是非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)或 2 型糖尿病、糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖的治疗中用于血糖控制的新疗法,该疗法可表现更好的功效和/或安全性。具体地,本发明提供 DP IV 抑制剂谷氨酰胺酰噻唑烷和谷氨酰胺酰吡咯烷和其它抗糖尿病药(antidiabetic agent)联合,例如在糖

尿病尤其是非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)或2型糖尿病、糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖的治疗中用于血糖控制的用途。

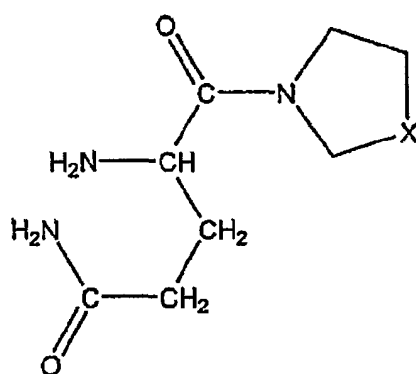
发明内容

本发明提供一种用于哺乳动物例如人的血糖控制的方法，该方法包括给予需要其的哺乳动物有效量的谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和另一种抗糖尿病药。

本发明还提供谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和另一种抗糖尿病药用于血糖控制的用途。

本发明还提供谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐在药物生产中的用途，所述药物用于与另一种抗糖尿病药联合用于血糖控制。

谷氨酰胺酰噻唑烷和谷氨酰胺酰吡咯烷具有如下结构：



(I)

其中对于谷氨酰胺酰噻唑烷 $X = S$ ，而对于谷氨酰胺酰吡咯烷 $X = CH_2$ 。

这些化合物在下文中称为式(I)的化合物。

上述组合用于治疗糖尿病尤其是2型糖尿病和糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖特别有用。特别地，治疗2型糖尿病。

附图简述

图 1 是对于安慰剂和谷氨酰胺酰吡咯烷的三种给药水平,血糖水平随时间变化的曲线。

图 2 是对于安慰剂和谷氨酰胺酰噻唑烷的三种给药水平,血糖水平随时间变化的曲线。

图 3 为谷氨酰胺酰噻唑烷的化学结构。

图 4 为谷氨酰胺酰吡咯烷的化学结构。

图 5 为谷氨酰胺酰噻唑烷和焦谷氨酸噻唑烷的每秒计数随时间变化的曲线。

图 6 显示不同给药组合物的葡萄糖 AUC。

图 7 显示不同给药组合物的葡萄糖 AUC。

具体实施方式

本发明提供一种用于哺乳动物例如人的血糖控制的方法,该方法包括给予需要其的哺乳动物有效量的谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和另一种抗糖尿病药。

该组合对于治疗糖尿病尤其是 2 型糖尿病和糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖特别有用。特别地,治疗 2 型糖尿病。

这些组合提供对血糖控制尤其有益的作用,且优选提供改善的血糖调节而不引入不可接受的副作用。

本发明还提供用于治疗哺乳动物例如人的糖尿病尤其是 2 型糖尿病和糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖的方法,特别是 2 型糖尿病的治疗方法,该方法包括给予需要其的哺乳动物有效量的谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和另一种抗糖尿病药。

本发明还提供谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和另一种抗糖尿病药用于治疗糖尿病尤其是 2 型糖尿病和糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖的用途,特别是治疗 2

型糖尿病的用途。

本发明还提供谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐在药物生产中的用途，所述药物用于与另一种抗糖尿病药联合用于治疗糖尿病尤其是2型糖尿病和糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖，特别是治疗2型糖尿病。

式(I)的化合物和所述另一种抗糖尿病药可联合给药或序贯或单独给药。

联合给药包括给予包含式(I)的化合物或其药学可接受的盐和所述另一种抗糖尿病药的制剂，或基本上同时给予每种活性剂的单独制剂。在式(I)的化合物或其药学可接受的盐和所述另一种抗糖尿病药的药理学特征(profile)允许的情况下，优选两种活性剂联合给药。

本发明还提供谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和另一种抗糖尿病药在药物生产中的用途，所述药物用于血糖控制。

本发明还提供谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和另一种抗糖尿病药在药物生产中的用途，所述药物用于治疗糖尿病尤其是2型糖尿病和糖尿病相关病症、前驱糖尿病状态和/或肥胖，特别是治疗2型糖尿病。

本发明还提供一种药物组合物，所述药物组合物包含谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐和另一种抗糖尿病药以及药学可接受的载体。本发明还包括这些组合物在上述方法中的用途。

本发明包括根据本发明的任一实施方案的式(I)的化合物及其药学可接受的盐和下述物质联合的用途：

- 胰岛素增敏剂，其选自PPAR激动剂、双胍类和蛋白酪氨酸磷酸酶-1B (PTP-1B)抑制剂；

- 胰岛素和胰岛素模拟物；

- 磺酰脲类和其它胰岛素促分泌剂;
 - α 葡糖苷酶抑制剂;
 - 胰高血糖素受体激动剂;
 - GLP-1; GLP-1 模拟物例如 NN-2211 (来自 Novo Nordisk 的 liraglutide)和 GLP-1 受体激动剂;
 - GLP-2; GLP-2 模拟物例如 ALX-0600 (来自 NPS Allelix Corp. 的 teduglutide)和 GLP-2 受体激动剂;
 - exendin-4 和 exendin-4 模拟物例如 exenatide (AC-2993, 来自 Amylin/Eli Lilly 的合成 exendin-4);
 - GIP、GIP 模拟物和 GIP 受体激动剂;
 - PACAP、PACAP 模拟物和 PACAP 受体 3 激动剂;
 - 降胆固醇药, 其选自 HMG-CoA 还原酶抑制剂、螯合剂、烟醇、烟酸及其盐、PPAR α 激动剂、PPAR α/γ 双重激动剂、胆固醇吸收抑制剂、脂酰辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶抑制剂和抗氧化剂; 和
 - PPAR δ 激动剂;
- 以及任选的其它活性剂, 例如:
- 抗肥胖化合物;
 - 回肠胆汁酸转运体抑制剂; 和
 - 抗炎药。

合适地, 所述另一种抗糖尿病药包含 α 葡糖苷酶抑制剂、双胍类、胰岛素促分泌剂或胰岛素增敏剂中的一种或多种, 通常一种或两种, 尤其是一种。

另一合适的抗糖尿病药为胰岛素。

合适的 α 葡糖苷酶抑制剂为阿卡波糖。

其它合适的 α 葡糖苷酶抑制剂为乙格列酯和米格列醇。另一合适的 α 葡糖苷酶抑制剂为伏格列波糖。

合适的双胍类包括二甲双胍、丁福明或苯乙双胍, 尤其是二甲双

胍。

合适的胰岛素促分泌剂包括磺酰脲类。

合适的磺酰脲类包括格列本脲、格列吡嗪、格列齐特、格列美脲、妥拉磺脲和甲苯磺丁脲。其它磺酰脲类包括醋磺己脲、氨磺丁脲、氯磺丙脲、格列波脲、格列喹酮、格列生脲、格列索脲、格列派特、格列吡脲和格列环脲。还包括的有磺酰脲类格列戊脲。

另一合适的胰岛素促分泌剂为瑞格列奈。另外的胰岛素促分泌剂为那替格列。

胰岛素增敏剂包括 PPAR γ 激动剂型胰岛素增敏剂，其包括 WO 97/31907 中公开的化合物，尤其是 2-(1-羧基-2-{4-[2-(5-甲基-2-苯基噁唑-4-基)乙氧基]苯基乙氨基}苯甲酸甲酯和 2(S)-(2-苯甲酰基苯氨基)-3-{4-[2-(5-甲基-2-苯基-噁唑-4-基)乙氧基]苯基}丙酸。

胰岛素增敏剂还包括噻唑烷二酮胰岛素增敏剂。

其它合适的噻唑烷二酮胰岛素增敏剂包括(+)-5-[[4-[(3,4-二氢-6-羟基-2,5,7,8-四甲基-2H-1-苯并吡喃-2-基)甲氧基]苄基]甲基]-2,4-噻唑烷二酮(或曲格列酮)、5-[4-[(1-甲基环己基)甲氧基]苄基]噻唑烷-2,4-二酮(或环格列酮)、5-[4-[2-(5-乙基吡啶-2-基)乙氧基]苄基]噻唑烷-2,4-二酮(或匹格列酮)或 5-[(2-苄基-2,3-二氢苯并吡喃)-5-基甲基]噻唑烷 2,4-二酮(或恩格列酮)。

特别的噻唑烷二酮胰岛素增敏剂为 5-[4-[2-(5-乙基吡啶-2-基)乙氧基]苄基]噻唑烷-2,4-二酮(或匹格列酮)和(+)-5-[[4-[(3,4-二氢-6-羟基-2,5,7,8-四甲基-2H-1-苯并吡喃-2-基)甲氧基]苄基]甲基]-2,4-噻唑烷二酮(或曲格列酮)。

优选的噻唑烷胰岛素增敏剂为 5-[4-[2-(N-甲基-N-(2-吡啶基)氨基)乙氧基]苄基]噻唑烷-2,4-二酮(或罗格列酮)及其盐。

另外的抗糖尿病药包括其它的 DP IV 抑制剂。特别的 DP IV 抑制剂包括 WO 99/61431 中公开的特定实例，例如 L-苏-异亮氨酰吡咯

烷化物(pyrrolidide)、L-别-异亮氨酰噻唑烷化物(thiazolidide)、L-别异亮氨酰吡咯烷化物及其盐。特别的 DP IV 抑制剂为异亮氨酸噻唑烷化物及其盐。

另外的 DP IV 抑制剂包括缬氨酸吡咯烷化物(Novo Nordisk)、Hughes 等, Biochemistry, 38 (36), 11597-11603, 1999 公开的 NVP-DPP728A (1-[[[2-[[5-氰基吡啶-2-基]氨基]乙基]氨基]乙酰基]-2-氰基-(S)-吡咯烷) (Novartis)、Hughes 等, Meeting of the American Diabetes Association 2002, Abstract no. 272 或(Novartis)公开的 LAF-237 (1-[(3-羟基-金刚烷-1-基氨基)乙酰基]吡咯烷-2(S)-腈、Yamada 等, Bioorg. & Med. Chem. Lett. 8 (1998), 1537-1540 公开的 TSL-225 (色氨酸-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸)、Asworth 等, Bioorg. & Med. Chem. Lett., 6, No. 22, pp 1163-1166 和 2745-2748 (1996)公开的 2-氰基吡咯烷化物和 4-氰基吡咯烷化物、Sudre 等, Diabetes 51 (5), pp 1461-1469 (2002) (Ferring)公开的 FE-999011 ([[(2S)-1-[(2'S)-2'-氨基-3',3'-二甲基丁酰基]吡咯烷-2-腈]])和 WO 01/34594 (Guilford)中公开的化合物, 使用上述参考文献中列出的剂量。

为避免疑问, 上述每个出版物中公开的实例均明确地以其全部内容引入本文作为参考, 对于单个公开的化合物, 特别涉及它们的结构、它们的定义、用途以及它们的生产。

本发明的优选实施方案包括根据本发明任一实施方案的式(I)的化合物或其药学可接受的盐与下述物质联合的用途:

- 与阿卡波糖联合, 或
- 与二甲双胍联合; 或
- 与阿卡波糖和二甲双胍联合; 或
- 与胰岛素增敏剂例如 PPAR γ 激动剂型胰岛素增敏剂联合。

根据本发明尤其优选式(I)的化合物或其药学可接受的盐特别是谷氨酰胺噻唑烷盐酸盐与二甲双胍联合例如用于治疗糖尿病、糖

尿病相关病症和前驱糖尿病状态相关病症的用途。优选式(I)的化合物或其药学可接受的盐和二甲双胍联合给药。

本发明另一优选方面是包含谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷或其药学可接受的盐特别是谷氨酰胺酰噻唑烷盐酸盐和二甲双胍以及药学可接受的载体的药物组合物。药物制剂优选适于口服给药,且特别是适于每日给药一次、两次或三次,优选两次或三次的单元剂型。

式(I)的化合物或其药学可接受的盐特别是谷氨酰胺酰噻唑烷盐酸盐与胰岛素增敏剂例如 PPAR γ 激动剂型胰岛素增敏剂联合的用途代表了本发明另一优选方面。特别的胰岛素增敏剂包括格列酮类如曲格列酮、环格列酮、匹格列酮、恩格列酮和罗格列酮,尤其是罗格列酮。

应理解式(I)的化合物或其药学可接受的盐和其它抗糖尿病药各自以药学可接受的形式包括其药学可接受的衍生物如药学可接受的盐、酯和溶剂合物形式作为合适的相应药物活性剂给予。在本文的某些实例中,所述另一种抗糖尿病药所用的名称可能涉及该相关活性剂的具体药物形式。应理解这些活性剂本身的所有药学可接受形式的用途均包括在本发明之中。

式(I)的化合物及其药学可接受的盐与现有技术中已知的其它 DP IV 抑制剂相比具有一些意想不到的特征,当根据本发明与其它抗糖尿病药联合给予时,其可为它们提供某些优势。这些特征包括例如:

- 针对非 DP IV 和非 DP IV 样酶,例如 DP I、脯氨酰寡肽酶、氨酰基脯氨酸二肽酶没有活性(参见实施例 12);

- 体外在分离人血浆中具有高稳定性(参见实施例 13);

- 体内谷氨酰胺部分失活/代谢为相应的焦谷氨酰化合物的全新和可控机制,导致比其它 DP IV 抑制剂更短的半衰期(参见实施例 8);

和

-推测的体内非肝依赖性半衰期。

式(I)的化合物的药学可接受的盐包括酸加成盐,即其中氨基酸碱性侧链被无机或有机酸质子化。代表性的有机或无机酸包括盐酸、氢溴酸、高氯酸、硫酸、硝酸、磷酸、乙酸、丙酸、羟基乙酸、乳酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、扁桃酸、甲磺酸、羟基乙磺酸、苯磺酸、草酸、双羟萘酸、2-萘磺酸、对甲苯磺酸、环己烷氨基磺酸、水杨酸、糖精酸、三氟乙酸、亚磺酸和3,5-二-叔丁基苯甲酸。式(I)的化合物的所有药学可接受的酸加成盐形式的用途均包括在本发明的范围内。

式(I)的化合物的优选酸加成盐为富马酸盐、苯甲酸盐、马来酸盐、草酸盐、3,5-二-叔丁基苯甲酸盐、水杨酸盐、乙酸盐和盐酸盐(参见实施例14)。式(I)的化合物的最优选酸加成盐为盐酸盐。优选的式(I)的化合物为谷氨酰胺酰噻唑烷盐酸盐。

为避免疑问,不管本文中何时提到式(I)的化合物,应理解它指游离碱和相应的盐,条件是它们在这些情况下是可能或合适的。

本发明在其范围内进一步包括式(I)的化合物的前药的用途。通常,这些前药应是在体内容易转化为所需治疗活性化合物的化合物的功能性衍生物。因而,在这些情况,本发明的治疗方法中,术语“给药”应包括用式(I)的化合物的前药形式治疗所述的各种疾病,该前药在给予个体后在体内转化为所述化合物。用于选择和制备合适的前药衍生物的方法在例如“Design of Prodrugs”, ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985 中有描述。具体的前药在专利申请 DE 198 28 113、DE 198 28 114、WO 99/67228 和 WO 99/67279 中有描述。

当式(I)的化合物具有至少一个手性中心时,它们可以相应地以对映异构体存在。在这些化合物例如前药具有两个或更多个手性中心的情况下,它们还可以以非对映异构体存在。应理解所有这些异构体及其混合物均包含在本发明的范围之内。

当式(I)的化合物的制备方法产生立体异构体混合物时, 这些异构体可通过常规技术例如制备色谱分离。这些化合物可以以外消旋形式制备, 或者单个对映异构体可以通过对映特异性合成或通过拆分来制备。例如, 可以通过例如以下的标准技术将所述化合物拆分成它们的成分对映体: 通过与旋光酸例如(-)-二对甲苯酰-d-酒石酸和/或(+)-二对甲苯酰-l-酒石酸形成盐而形成非对映异构体, 之后分步结晶和再生游离碱。所述化合物还可以通过形成非对映体酯或酰胺, 然后进行色谱分离并除去手性辅剂来拆分。或者, 所述化合物可使用手性HPLC柱拆分。

其中式(I)的化合物优选具有 L- α -谷氨酰胺衍生物。

在制备式(I)的化合物的任何方法中, 可能需要和/或期望保护相关的任何分子上的敏感基团或活性基团。这可通过例如 Protective Groups in Organic Chemistry, ed. J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973 和 T.W. Greene & P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 1971 中所述的常规保护基的方法实现。保护基可在方便的后续阶段使用本领域已知的常规方法除去。

另外, 式(I)的化合物的一些结晶形式可以以多晶型物存在并同样包括在本发明内。另外, 一些化合物可与水(即水合物)或常见有机溶剂形成溶剂合物, 且这些溶剂合物也包括在本发明的范围之内。

式(I)的化合物及其药学可接受的盐也可以以其水合物形式得到, 或包含用于其结晶的其它溶剂。

如上所述, 式(I)的化合物及其药学可接受的盐可用于抑制 DP IV 和 DP IV 样酶活性。式(I)的化合物及其药学可接受的盐抑制 DP IV 和 DP IV 样酶活性的能力可采用 DP IV 活性测定法测定体外和人血浆中的 K_i 值来证明, 如实施例 4 和 5 所述。本发明化合物针对猪肾 DP IV 的 K_i 值测定为: 对于谷氨酰胺酰噻唑烷, $K_i=3.12 \times 10^{-7} \text{ M} \pm 5.11 \times 10^{-10} \text{ M}$, 而对于谷氨酰胺酰吡咯烷, $K_i=1.30 \times 10^{-6} \text{ M} \pm 8.49 \times 10^{-8}$

M。本发明化合物在人血浆中 K_i 值测定为：对于谷氨酰胺酰噻唑烷预，预温育 5 分钟后 $K_i=4.03 \times 10^{-7} \text{ M} \pm 2.19 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、22 小时后 $K_i=5.13 \times 10^{-7} \text{ M} \pm 1.26 \times 10^{-8} \text{ M}$ ，而对于谷氨酰胺酰吡咯烷，预温育 5 分钟后 $K_i=1.30 \times 10^{-6} \text{ M} \pm 4.89 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、22 小时后 $K_i=1.36 \times 10^{-6} \text{ M} \pm 3.21 \times 10^{-8} \text{ M}$ 。

式(I)的化合物及其药学可接受的盐体内抑制 DP IV 的能力可通过口服或血管内给予 Wistar 大鼠来证明，如实施例 9 所述。所述化合物在口服和血管内给予 Wistar 大鼠后均抑制 DP IV 活性。

式(I)的化合物及其药学可接受的盐在体内能够抑制 DP IV。

式(I)的化合物及其药学可接受的盐通过降低对口服葡萄糖攻击反应而升高的血糖水平来改善葡萄糖耐量，因而用于治疗非胰岛素依赖型糖尿病。式(I)的化合物及其药学可接受的盐改善对口服葡萄糖攻击反应的葡萄糖耐量的能力可在糖尿病 Zucker 大鼠中测定。该方法在实施例 6 和 7 中描述。口服给予 5 mg/kg b.w.、15 mg/kg 和 50 mg/kg b.w.的谷氨酰胺酰噻唑烷或谷氨酰胺酰吡咯烷导致升高的血糖水平剂量依赖性降低，从而改善糖尿病 Zucker 大鼠的葡萄糖耐量。

令人惊奇地，式(I)的化合物及其药学可接受的盐给予哺乳动物后在体内以可控的方式降解。式(I)的化合物及其药学可接受的盐在体内被降解的能力可使用 Wistar 大鼠模型和随后的 LC/MS 分析来测定(参见实施例 8)。发现谷氨酰胺酰噻唑烷和谷氨酰胺酰吡咯烷在口服给予 Wistar 大鼠后分别被降解为焦谷氨酰胺酰噻唑烷(图 3)和焦谷氨酰胺酰吡咯烷(图 4)。

本发明的另一实施方案包括根据上述的本发明的任一实施方案的式(I)的化合物及其药学可接受的盐与如下物质联合的用途：

-与包含病毒载体的 GLP-1 基因治疗表达系统联合，所述病毒载体包含：

a) 编码 GLP-1 (胰高血糖素样肽-1)的多核苷酸序列；和

- b) 编码(a)的信号序列上游的多核苷酸序列；和
- c) (a)的多腺苷酸化信号下游；和
- d) 位于编码 GLP-1 的多核苷酸序列和编码该信号序列的多核苷酸序列之间的编码蛋白酶切割位点的多核苷酸序列；和
- e) 其中 GLP-1 的表达在组成型启动子的控制下或由可调节型启动子控制；
- f) 其中任选地，病毒载体包含编码 GIP (葡萄糖依赖性促胰岛素肽)的多核苷酸序列；
- g) 其中任选地，病毒载体由哺乳动物细胞包裹。

和/或

-与包含病毒载体的 GIP 基因治疗表达系统联合，所述病毒载体包含：

- a) 编码 GIP (葡萄糖依赖性促胰岛素肽)的多核苷酸序列；和
- b) 编码(a)的信号序列上游的多核苷酸序列；和
- c) (a)的多腺苷酸化信号下游；和
- d) 位于编码 GIP 的多核苷酸序列和编码该信号序列的多核苷酸序列之间的编码蛋白酶切割位点的多核苷酸序列；和
- e) 其中 GIP 的表达在组成型启动子的控制下或由可调节型启动子控制；
- f) 其中任选地，病毒载体包含编码 GLP-1 (胰高血糖素样肽-1)的多核苷酸序列；
- g) 其中任选地，病毒载体由哺乳动物细胞包裹。

本发明的另一实施方案包括根据上述的本发明的任一实施方案式(I)的化合物及其药学可接受的盐与 GIP 和/或 GIP 基因治疗表达系统联合的用途，其中：

-目标(GLP-1； GIP)基因的信号序列上游为鼠免疫球蛋白 κ 信号序列或 glia monster exendin 信号序列；和/或

-目标(GLP-1; GIP)基因的多腺苷酸化信号下游源于猿猴病毒 40 (SV 40); 和/或蛋白酶切割位点被 furin 蛋白酶 (preotease) 切割; 和/或

-用于目标基因表达的基因传输载体为腺病毒、逆转录病毒、leniviral、腺相关病毒载体; 和/或

-组成型启动子为巨细胞病毒(CMV)启动子或劳斯肉瘤长末端重复(LTR)序列和 SV 40 早期基因启动子; 且诱导型启动子为可购自 Clontech 的 Tet-On™/Tet-Off™ 系统; 和/或

-哺乳动物细胞为灵长类动物或啮齿类动物细胞, 优选人细胞, 更优选人肝细胞。

本文所用的术语“个体”指作为治疗、观察或实验的对象的动物, 优选哺乳动物, 最优选人。

本文所用的术语“治疗有效量”指研究员、兽医、医生或其它临床人员寻求的在组织系统、动物或人中引起生物或药物反应包括正在治疗的疾病或病症的缓解的活性化合物或药物活性剂的量。

本文所用的术语“糖尿病相关病症”包括前驱糖尿病状态相关病症、糖尿病本身相关病症和糖尿病相关并发症。

本文所用的术语“前驱糖尿病状态相关病症”包括诸如胰岛素抵抗、葡萄糖耐受不良和高胰岛素血症的病症, 所述胰岛素抵抗包括遗传性胰岛素抵抗。

“糖尿病相关病症”本身包括高血糖症、包括获得性胰岛素抵抗在内的胰岛素抵抗和肥胖。其它糖尿病本身相关病症包括高血压和心血管疾病尤其是动脉粥样硬化以及胰岛素抵抗相关病症。胰岛素抵抗相关病症包括多囊卵巢综合征和类固醇诱导的胰岛素抵抗和妊娠糖尿病。

“糖尿病相关并发症”包括肾病尤其是 2 型糖尿病相关肾病、神经病变和视网膜病变。

2型糖尿病相关肾病包括肾病、肾小球性肾炎、肾小球硬化、肾病综合征、高血压肾硬化和末期肾病。

如本文所用，术语“药学可接受的”包括人和兽医使用：例如术语“药学可接受的”包括兽医可接受的化合物或人医药卫生保健中可接受的化合物。

为了制备本发明的药物组合物，式(I)的化合物及其药学可接受的盐，任选地与至少一种其它抗糖尿病药联合，可用作活性成分。根据常规药物复合技术，将该活性成分与药物载体充分混合，所述载体可根据给药所需的制剂形式例如口服或肠胃外如肌肉内而采用多种形式。在制备口服剂型的组合物中，任何常用的药物介质均可使用。因此，对于液体口服制剂例如混悬剂、酏剂和溶液剂，合适的载体和添加剂包括水、乙二醇、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂等；对于固体口服制剂例如散剂、胶囊剂、胶囊锭(gelcap)和片剂，合适的载体和添加剂包括淀粉、糖、稀释剂、造粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。由于片剂和胶囊剂易于给药，因此它们代表最有利的口服单元剂型，在这种情况下显然使用固体药物载体。如果需要，片剂可通过标准技术进行包糖衣或包肠溶衣。对于肠胃外给药，载体通常包含无菌水，不过也可包含其它成分例如为例如有助于溶解或用于保存的目的。

也可制备注射用混悬剂，在这种情况下可使用合适的液体载体、助悬剂等。本文的药物组合物每剂量单元如每片、每粒胶囊、每包散剂、每支注射剂、每茶匙量等包含递送上述有效剂量所需的活性分量。本文的药物组合物每剂量单元例如每片、每粒胶囊、每包散剂、每支注射剂、每茶匙量等包含约0.03 mg-100 mg/kg (优选0.1-30 mg/kg)的每种活性成分或其组合，且可以以约0.1-300 mg/kg/日(优选1-50 mg/kg/日)的剂量给予。不过，剂量可根据患者需要、治疗病症的严重程度和使用的化合物而改变。可采用每日给药或周期后

(post-periodic) 给药。

优选地，这些组合物为例如以下的单元剂型：片剂、丸剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、无菌肠胃外溶液或混悬剂、计量气雾剂或液体喷雾剂、滴剂、安瓿、自我注射器装置或栓剂；用于口服、肠胃外、鼻内、舌下或直肠给药，或用于吸入或吹入给药。或者，该组合物可以以适于每周一次或每月一次给药的形式存在；例如活性化合物的不溶盐如癸酸盐可适于提供用于肌肉注射的贮存制剂。对于制备固体组合物例如片剂，将主要活性成分与药物载体例如常规制片成分如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨糖醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树胶和其它药物稀释剂如水相混合，以形成包含本发明的化合物或其药学可接受的盐的均匀混合物的固体预制剂组合物。当提及这些预制剂组合物为均一时，其意指活性成分均匀分散于组合物中使得该组合物易于细分成等效剂型如片剂、丸剂和胶囊剂。然后该固体预制剂组合物细分为上述类型的单元剂型，每单元剂型中包含 0.1-约 500 mg 的本发明的每种成分或其组合物。

本发明组合物的片剂或丸剂可被包衣或复合以提供具有长效作用优点的剂型。例如，片剂或丸剂可包含内部剂量和外部剂量成分，后者为前者上的包膜形式。这两种成分可由肠溶衣层分开，该肠溶衣层用以抵抗胃中崩解并允许内部成分完整地进入十二指肠或延迟释放。多种材料可用于这种肠溶衣层或包衣，这些材料包括许多聚合酸和如虫胶、鲸蜡醇和乙酸纤维素的材料。

可引入本发明的组合物以用于口服或注射给药的液体剂型包括水溶液剂、合适的调味糖浆剂、含水或油混悬剂和用可食用油如棉籽油、芝麻油、椰子油或花生油调味的乳剂，以及酞剂和类似的药物载体。用于含水混悬剂的合适的分散剂或助悬剂包括合成和天然树胶如黄蓍胶、阿拉伯树胶、藻酸盐、葡聚糖、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮或明胶。

如本发明所述,治疗糖尿病、糖尿病相关病症和前驱糖尿病状态相关病症的方法还可使用包含式(I)的化合物或其药学可接受的盐和任选地至少一种其它抗糖尿病药或本文所定义的任何其它化合物以及药学可接受的载体的药物组合物来进行。该药物组合物可包含约0.01 mg-100 mg,优选约5-50 mg的每种化合物,并可组成任何适于所选的给药形式的剂型。载体包括必要的和惰性的药物赋形剂,包括但不限于粘合剂、助悬剂、润滑剂、食用香料、甜味剂、防腐剂、染料和包衣。适于口服给药的组合物包括固体形式例如丸剂、片剂、囊片、胶囊剂(每种包括速释、定时释放和缓释制剂)、颗粒剂和散剂,液体形式例如溶液剂、糖浆剂、酏剂、乳剂和混悬剂。适于肠胃外给药的形式包括无菌溶液剂、乳剂和混悬剂。

有利地,式(I)的化合物及其药学可接受的盐可以单次日剂量给药,或总日剂量以每日两、三或四次分开的剂量给药。此外,所述化合物可通过局部使用合适的鼻内载体以鼻内形式或通过本领域技术人员熟知的透皮药贴给药。为以透皮递送系统的形式给药,在整个给药方案中,剂量的给药当然应是连续的而非间断的。

例如,对于以片剂或胶囊形式的口服给药,可以将活性药物成分与口服、无毒的药学可接受的惰性载体如乙醇、甘油、水等组合。而且,当期望或必需时,还可以将合适的粘合剂、润滑剂、崩解剂和着色剂引入该混合物中。合适的粘合剂包括但不限于淀粉、明胶、天然糖类如葡萄糖或 β 乳糖、玉米甜味剂、天然和合成树胶如阿拉伯树胶、黄蓍胶或油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等。崩解剂包括但不限于淀粉、甲基纤维素、琼脂、膨润土、黄原胶等。

液体形式在合适的调味助悬剂或分散剂例如合成和天然树胶如黄蓍胶、阿拉伯树胶、甲基纤维素等中。对于肠胃外给药,需要无菌悬浮液和溶液。当需要静脉给药时,使用一般含有合适的防腐剂的等

渗制剂。

本发明的式(I)的化合物和组合还可以以脂质体递送系统例如小单层囊泡、大单层囊泡和多层囊泡的形式给予。脂质体可由多种磷脂如胆固醇、硬脂酰胺或磷脂酰胆碱形成。

本发明的式(I)的化合物和组合还可通过使用单克隆抗体作为该化合物分子偶联的单独载体来递送。本发明的化合物还可以与作为靶向药物载体的可溶性聚合物相偶联。这些聚合物可包括聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、聚羟丙基甲基丙烯酸酰胺、聚羟乙基天冬酰胺或棕榈酸残基取代的聚环氧乙烷聚赖氨酸。另外，本发明的化合物可与一类用于实现药物控释的可生物降解的聚合物偶联，这些聚合物例如聚乳酸(polyactic acid)、聚 ϵ -己内酯、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚缩醛、聚二氢吡喃、聚氰基丙烯酸酯以及水凝胶交联或两亲嵌段共聚物。

在所述疾病需要治疗的任何时候，式(I)的化合物和本发明的组合可以以任何前述组合物的形式并根据本领域确定的给药方案给予。

产品的日剂量可以在 0.01-1.000 mg/哺乳动物/日的大范围内变化。对于口服给药，所述组合物优选以片剂形式提供，所述片剂包含 0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100、150、200、250 和 500 毫克的每种活性成分或其组合以用于根据症状调整患者的剂量。药物的有效量通常以约 0.1 mg/kg-约 300 mg/kg 体重/日的剂量水平提供。优选地，该范围是约 1-约 50 mg/kg 体重/日。这些化合物或组合可按每日 1-4 次的方案给药。

给药的最佳剂量可由本领域技术人员容易地确定，且根据所用的具体化合物、给药方式、制剂强度、给药方式和病症的进展而改变。另外，治疗的具体患者的相关因素，包括患者年龄、体重、饮食和给药时间将导致需要调整剂量。

式(I)的化合物及其药学可接受的盐和其它抗糖尿病药优选口服给药。

合适地,本发明的治疗提供的对血糖控制的尤其有益作用是与单独且以提供与本发明的组合等效的剂量使用所述组合中的一种化合物的治疗比率相比,本发明的组合的治疗比率改善。

优选方面,本发明的治疗提供的对血糖控制的尤其有益作用可显示为与单个活性剂作用预期的对照相比有协同作用。

本发明的另一方面,式(I)的化合物及其药学可接受的盐和其它抗糖尿病药的组合剂量可产生比以所述组合中所用活性剂的两倍剂量单独使用的任何该活性剂所获得的更有益的作用。

血糖控制可采用常规方法例如通过测量通常使用的血糖控制指数如口服血浆葡萄糖或糖基化血红蛋白(HbA1c)来表征。这些指数可采用标准方法例如 Tüeschel A, Richterich P., Schweiz. med. Wschr. 101 (1971), 345 和 390 和 Frank P., 'Monitoring the Diabetic Patient with Glycosolated Hemoglobin Measurements', Clinical Products 1988 中所述的那些进行测定。

根据本发明的方法使用的每种活性剂的剂量水平可以少于血糖控制的纯相加作用所需的剂量水平。

本发明的方法相对于单个活性剂而言还实现对晚期糖基化终末产物(AGE)和血清脂质包括总胆固醇、HDL-胆固醇、LDL-胆固醇水平的改善,包括其比率的改善,特别是血清脂质包括总胆固醇、HDL-胆固醇、LDL-胆固醇的改善,包括其比率的改善。

另一方面,本发明还提供了制备包含式(I)的化合物或其药学可接受的盐、另一种抗糖尿病药和其药学可接受的载体的药物组合物的方法,所述方法包括混合式(I)的化合物或其药学可接受的盐、另一种抗糖尿病药和药学可接受的载体。

该组合物优选为适于相应日剂量的量的单元剂型。

式(I)的化合物或其它抗糖尿病药的合适剂量尤其包括单元剂量,包括已知的剂量,该已知剂量包括参考文献例如英国和美国药典、

Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.)、Martindale The Extra Pharmacopoeia (London, The Pharmaceutical Press) (例如参见第 31 版 341 页和本文引用页)或上述的出版物中描述或提及的那些化合物的单元剂量。

因而，式(I)的化合物的合适剂量包括其中所公开的那些，例如 0.01-30 mg/日或 0.01-10 mg/千克体重。另外，本文所述的 DP IV 抑制剂的合适剂量包括上述相关出版物提及的那些。

对于 α 糖苷酶抑制剂，阿卡波糖的合适量为 25-600 mg，包括 50-600 mg，例如 100 mg 或 200 mg。

对于双胍类，二甲双胍的合适剂量为 100-3000 mg，例如 250、500 mg、850 mg 或 1000 mg。

对于胰岛素促分泌剂，格列本脲的合适剂量为 2.5-20 mg，例如 10 mg 或 20 mg；格列吡嗪的合适剂量为 2.5-40 mg；格列齐特的合适剂量为 40-320 mg；妥拉磺脲的合适剂量为 100-1000 mg；甲苯磺丁脲的合适剂量为 1000-3000 mg；氯磺丙脲的合适剂量为 100-500 mg；格列喹酮的合适剂量为 15-180 mg。另外格列美脲的合适剂量为 1-6 mg，格列戊脲的合适剂量为 2.5-20 mg。

瑞格列奈的合适剂量为 0.5 mg-20 mg，例如 16 mg。另外那替格列的合适剂量为 90-360 mg，例如 270 mg。

在一具体方面，该组合物包含 2-12 mg 的 5-[4-[2-(N-甲基-N-(2-吡啶基)氨基)乙氧基]苄基]噻唑烷-2,4-二酮。

其它胰岛素增敏剂的合适单元剂量包括 100-800 mg 的曲格列酮，例如 200、400、600 或 800 mg 或 5-50 mg 的匹格列酮，包括 10-40 mg 例如 20、30 或 40 mg，还包括 15、30 和 45 mg 的匹格列酮。

其它 PPAR γ 激动剂型胰岛素增敏剂的合适剂量包括上述的申请中对相应的激动剂所公开的那些剂量，例如根据 WO 97/31907 公开的剂量合适地给予 2-(1-羧基-2-{4-{2-(5-甲基-2-苯基噁唑-4-基)乙氧

基}苯基}乙氨基)苯甲酸甲酯和 2(S)-(2-苯甲酰基苯氨基)-3-{4-[2-(5-甲基-2-苯基噁唑-4-基)乙氧基]苯基}丙酸的剂量。

另外,任何给定组合物中的每种具体活性剂的剂量可在就对于该化合物接受的给药方案方面已知的所要求的剂量范围内根据需要改变。每种活性剂的剂量也可根据需要加以改变以考虑与本文所述活性剂组合的有利作用。

式(I)的化合物或本发明的组合物可于饭前、饭时或饭后服用。

当饭前服用时,式(I)的化合物或本发明的组合物可于饭前 1 小时,优选 30 或甚至 15 或 5 分钟服用。

当饭时服用时,式(I)的化合物或本发明的组合物可混于饭中或以上述的单独剂型服用。

当饭后服用时,式(I)的化合物或本发明的组合物可于饭后 5、15 或 30 分钟或甚至 1 小时服用。

预期本发明的组合物或方法在上述的剂量范围内无副性毒性反应。

本说明书中所引用的包括但不限于专利和专利申请的所有出版物均引入本文作为参考,如同每个单独的出版物如本文中全部阐述的那样被明确且单个地指出引入本文作为参考。

实施例

实施例 1: 谷氨酰胺酰吡咯烷游离碱的合成

将 N-苄氧羰基谷氨酰胺(2.02 g, 7.21 mmol)溶于 35 mL THF 中,冷却至-15℃。加入 CAIBE (氯甲酸异丁酯) (0.937 mL, 7.21 mmol)和 4-甲基吗啉(0.795 mL, 7.21 mmol),并将溶液搅拌 15 分钟。将所形成的混合酸酐用 TLC (洗脱液: 氯仿/甲醇: 9/1)检测。暖至-10℃后加入吡咯烷(0.596 mL, 7.21 mmol)。将混合物置于室温,搅拌过夜。滤去所形成的沉淀并蒸发溶剂。所得油状物用乙酸乙酯(20 mL)吸收,

并用饱和硫酸氢钠溶液、之后用饱和碳酸氢钠溶液、水和盐水洗涤。分离有机层，干燥并蒸发。所得产物用 TLC (洗脱液：氯仿/甲醇：9/1) 检测纯度。产量：1.18 g。将该产物溶于无水乙醇(40 mL)中。向溶液中加入约 20 mg 炭载钯(10%，FLUKA)，在氢气氛下振摇该悬浮液 3 小时。反应进程用 TLC (洗脱液：氯仿/甲醇：9/1)监测。反应完成后除去催化剂和溶剂，得到标题化合物。用 TLC 检测纯度：正丁醇/乙醇/水/乙酸乙酯：1/1/1/1， $R_f=0.4$ 。反应产物用 NMR 分析鉴定。

实施例 2：谷氨酰胺酰噻唑烷盐酸盐的合成

将 N-叔丁氧羰基谷氨酰胺(2.0 g, 8.12 mmol)溶于 THF (5 mL)中，冷却至-15℃。加入 CAIBE (氯甲酸异丁酯) (1.06 mL, 8.12 mmol)和 4-甲基吗啉(0.895 mL, 8.12 mmol)，并将溶液搅拌 15 分钟。将所形成的混合酸酐用 TLC (洗脱液：氯仿/甲醇：9/1)检测。暖至-10℃后加入另一当量的 4-甲基吗啉(0.895 mL, 8.12 mmol)与噻唑烷盐酸盐(1.02 g, 8.12 mmol)。将混合物置于室温，搅拌过夜。滤去所形成的沉淀并蒸发溶剂。所得油状物用氯仿(20 mL)吸收，并用饱和硫酸氢钠溶液、之后用饱和碳酸氢钠溶液、水和盐水洗涤。分离有机层，干燥并蒸发。所得产物用 TLC (洗脱液：氯仿/甲醇：9/1)检测纯度。产量：1.64 g。将部分该产物(640 mg)溶于在二噁烷(12.98 M, 20 当量)中的 3.1 mL 冰 HCl 中，并置于冰上。反应进程用 TLC (洗脱液：氯仿/甲醇：9/1)监测。反应完成后除去溶剂，将所得的残余物用甲醇吸收并再次蒸发。将所得油状物通过五氧化二磷干燥并用乙醚研磨 2 次，得到标题化合物(0.265 g)。通过 HPLC 检测纯度。反应产物用 NMR 分析鉴定。

实施例 3：谷氨酰胺酰吡咯烷盐酸盐的合成

将 N-叔丁氧羰基谷氨酰胺(3.0 g, 12.18 mmol)溶于 THF (7 mL)

中, 冷却至 -15°C 。加入 CAIBE (氯甲酸异丁酯) (1.6 mL, 12.18 mmol) 和 4-甲基吗啉(1.3 mL, 12.18 mmol), 并将溶液搅拌 15 分钟。将所形成的混合酸酐用 TLC (洗脱液: 氯仿/甲醇: 9/1)检测。暖至 -10°C 后加入一当量的吡咯烷(1.0 mL, 12.18 mmol)。将混合物置于室温, 搅拌过夜。滤去所形成的沉淀并蒸发溶剂。所得残余物用氯仿(20 mL)吸收, 并用饱和硫酸氢钠溶液、之后用饱和碳酸氢钠溶液、水和盐水洗涤。分离有机层, 干燥并蒸发。所得产物用 TLC (洗脱液: 氯仿/甲醇: 9/1)检测纯度。将所得固体(2.7 g)溶于在二噁烷(12.98 M, 20 当量)中的 13.0 mL 冰 HCl 中, 并置于冰上。反应进程用 TLC (洗脱液: 氯仿/甲醇: 9/1)监测。反应完成后除去溶剂, 将所得的残余物用甲醇吸收并再次蒸发。将所得残余物通过五氧化二磷干燥并用乙醚研磨 2 次, 得到标题化合物(980 mg)。通过 HPLC 检测纯度。反应产物用 NMR 分析鉴定。

实施例 4: K_i 值的测定

对于谷氨酰胺酰吡咯烷和谷氨酰胺酰噻唑烷的 K_i 值测定, 使用 37.5 U/mg 对甘氨酸脯氨酸-4-硝基苯胺有特异活性的猪肾二肽基肽酶 IV, 储备液中酶浓度为 1.41 mg/ml。

将 100 μL 浓度分别为 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ - $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ (谷氨酰胺酰吡咯烷)和 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ - $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ (谷氨酰胺酰噻唑烷)的谷氨酰胺酰吡咯烷或谷氨酰胺酰噻唑烷与 50 μL 不同浓度(0.4 mM、0.2 mM、0.1 mM、0.05 mM)的甘氨酸脯氨酸-4-硝基苯胺及 100 μL HEPES (40 mM, pH 7.6; 离子强度=0.125)混合。将该测试混合物在 30°C 下预温育 30 分钟。预温育后, 加入 20 μL DP IV (1:600 稀释), 并使用平板读数器(HTS7000 plus, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany)于 30°C 和 $\lambda = 405 \text{ nm}$ 下测定 10 分钟, 检测因 4-硝基苯胺释放产生的黄色显色。使用 Graphit 4.0.15 (Erithacus Software, Ltd, UK)基于谷氨酰胺酰吡咯烷或谷氨酰胺

胺酰噻唑烷对 DP IV 竞争性抑制来计算 K_i 值。对于谷氨酰胺酰噻唑烷它们测定为 $K_i=3.12 \times 10^{-7} \text{ M} \pm 5.11 \times 10^{-10} \text{ M}$ ，而对于谷氨酰胺酰吡咯烷测定为 $K_i=1.30 \times 10^{-6} \text{ M} \pm 8.49 \times 10^{-8} \text{ M}$ 。

实施例 5：人血浆 K_i 值的测定

人血浆具有 N-末端 Xaa-Pro 释放活性。将 70 μL 浓度分别为 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ - $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ (谷氨酰胺酰吡咯烷)和 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ - $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ (谷氨酰胺酰噻唑烷)的谷氨酰胺酰吡咯烷或谷氨酰胺酰噻唑烷与 50 μL 不同浓度(0.4 mM、0.2 mM、0.1 mM、0.05 mM)的甘氨酸脯氨酸-4-硝基苯胺及 100 μL HEPES (40 mM, pH 7.6)混合。将测试混合物在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下分别预温育 5 分钟和 22 小时。预温育后，加入 50 μL 人血浆，并使用平板读数器(HTS7000 plus, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany)于 30 $^{\circ}\text{C}$ 和 $\lambda = 405 \text{ nm}$ 下测定 10 分钟，检测因 4-硝基苯胺释放产生的黄色显色。使用 Graphit 4.0.15 (Erithacus Software, Ltd, UK)基于谷氨酰胺酰吡咯烷或谷氨酰胺酰噻唑烷对 DP IV 竞争性抑制来计算 K_i 值。对于谷氨酰胺酰噻唑烷，预温育 5 分钟后它们测定为 $K_i=4.03 \times 10^{-7} \text{ M} \pm 2.19 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、预温育 22 小时后 $K_i=5.13 \times 10^{-7} \text{ M} \pm 1.26 \times 10^{-8} \text{ M}$ ，而对于谷氨酰胺酰吡咯烷，预温育 5 分钟后测定为 $K_i=1.30 \times 10^{-6} \text{ M} \pm 4.89 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、预温育 22 小时后 $K_i=1.36 \times 10^{-6} \text{ M} \pm 3.21 \times 10^{-8} \text{ M}$ 。

实施例 6：口服给予谷氨酰胺酰吡咯烷后肥胖 Zucker 大鼠中的剂量渐增研究

N=30 只平均年龄 11 周(5-12 周)、平均体重 350 克(150-400 g)的雄性 Zucker 大鼠(fa/fa)购自 Charles River (Sulzfeld, Germany)。送到后，饲养>12 周直至几乎所有的肥胖 Zucker 大鼠具有明显的糖尿病特征。使用 N=8 只动物测试 3 种渐增剂量的谷氨酰胺酰吡咯烷与安慰剂(盐水)相比。动物在控制温度($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$)，12/12 小时光照/黑暗周

期(光照自 06:00 AM 开始)的标准条件下单笼饲养。自由饮食无菌标准丸状食粮(ssniff® Soest, Germany)和 HCl 酸化的自来水。适应饲养条件的 24-31 周龄(平均 25 周)的肥胖 Zucker 大鼠为该研究进行充分的准备。在全身麻醉(i.p.注射 0.25 mL/kg b.w. Rompun® [2%], Bayer Vital, Germany 和 0.5 mg/kg b.w. Ketamin 10, Atarost GmbH & Co., Twistringen, Germany)下将导管植入肥胖 Zucker 大鼠颈动脉中。允许动物恢复一周。导管用肝素-盐水(100 IU/ml)每周冲洗 3 次。

向 N=8 只的肥胖 Zucker 大鼠给予安慰剂(1 mL 盐水, 0.154 mol/l)或渐增剂量的谷氨酰胺酰吡咯烷(5、15 和 50 mg/kg b.w.)。将 375 mg 谷氨酰胺酰吡咯烷溶于 1000 µL DMSO (E. Merck, Darmstadt; Germany [Dimethyl sulfoxide p.a.] ([二甲基亚砷 p.a.]))中。加入 10 mL 盐水和 1 mL 每份含有 34.09 mg 谷氨酰胺酰吡咯烷的等分试样储存于 -20°C 下。为制备测试物质, 用盐水稀释剂量依赖性等分试样。过夜禁食后, 在 -10 分钟时经饲管(15 G, 75 mm; Fine Science Tools, Heidelberg, Germany)向肥胖 Zucker 大鼠口服给予安慰剂或测试物质。在 ±0 分钟时经另一根饲管给予 2g/kg b.w. 葡萄糖(40%溶液, B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany)进行口服葡萄糖耐受测试(OGTT)。在 -30 分钟、-15 分钟、±0 分钟以及在 5、10、15、20、30、40、60、90 及 120 分钟时用 20 µL 玻璃毛细管从尾静脉采集静脉血样, 将这些玻璃毛细管置于含有 1 mL 用于测定血糖的溶液的标准试管中。所有的血样均标上编码、动物号、取样日期和取样时间。

用葡萄糖氧化酶方法(Super G Glucose analyzer; Dr. Müller Gerätebau, Freital, Germany)测定葡萄糖水平。

使用 PRISM® 3.02 (GraphPad Software, Inc)进行统计学评价及制图。所有的参数以描述性方式包括均值和标准差进行分析。

用安慰剂处理的糖尿病 Zucker 大鼠显示出显著增高的血糖偏移, 表明具有明显的糖尿病的葡萄糖耐受不良。给予 5 mg/kg b.w. 谷氨酰

胺酰吡咯烷使得糖尿病 Zucker 大鼠的葡萄糖耐受有限改善。给予 15 mg/kg 和 50 mg/kg b.w.谷氨酰胺酰吡咯烷后获得升高的血糖水平的显著降低以及葡萄糖耐受的显著改善(见图 3)。

实施例 7: 口服给予谷氨酰胺酰噻唑烷后肥胖 Zucker 大鼠中的剂量渐增研究

N=30 只平均年龄 11 周(5-12 周)、平均体重 350 克(150-400 g)的雄性 Zucker 大鼠(fa/fa)购自 Charles River (Sulzfeld, Germany)。送到后,饲养>12 周直至几乎所有的肥胖 Zucker 大鼠具有明显的糖尿病特征。使用 N=8 只动物测试 3 种渐增剂量的谷氨酰胺酰噻唑烷与安慰剂(盐水)相比。动物在控制温度($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), 12/12 小时光照/黑暗周期(光照自 06:00 AM 开始)的标准条件下单笼饲养。自由饮食无菌标准丸状食粮(ssniff® Soest, Germany)和 HCl 酸化的自来水。适应饲养条件的 24-31 周龄(平均 25 周)的肥胖 Zucker 大鼠为该研究进行充分的准备。在全身麻醉(i.p.注射 0.25 mL/kg b.w. Rompun® [2%], Bayer Vital, Germany 和 0.5 mg/kg b.w. Ketamin 10, Atarost GmbH & Co., Twistringen, Germany)下将导管植入肥胖 Zucker 大鼠颈动脉中。允许动物恢复一周。导管用肝素-盐水(100 IU/ml)每周冲洗 3 次。

向 N=8 只的肥胖 Zucker 大鼠给予安慰剂(1 mL 盐水, 0.154 mol/l)或渐增剂量的谷氨酰胺酰噻唑烷(5、15 和 50 mg/kg b.w.)。将各自量的谷氨酰胺酰噻唑烷溶于 1000 μL 盐水中。过夜禁食后, 在-10 分钟时经饲管(15G, 75 mm; Fine Science Tools, Heidelberg, Germany)向肥胖 Zucker 大鼠口服给予安慰剂或测试物质。在 ± 0 分钟时经另一根饲管给予 2g/kg b.w.葡萄糖(40%溶液, B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany)进行口服葡萄糖耐受测试(OGTT)。在-30 分钟、-15 分钟、 ± 0 分钟以及在 5、10、15、20、30、40、60、90 及 120 分钟时用 20 μL 玻璃毛细管从尾静脉采集静脉血样, 将这些玻璃毛细

管置于含有 1 mL 用于测定血糖的溶液的标准试管中。所有的血样均标上编码、动物号、取样日期和取样时间。

用葡萄糖氧化酶方法(Super G Glucose analyzer; Dr. Müller Gerätebau, Freital, Germany)测定葡萄糖水平。

使用 PRISM[®] 3.02 (GraphPad Software, Inc)进行统计学评价及制图。所有的参数以描述性方式包括均值和标准差进行分析。

用安慰剂处理的糖尿病 Zucker 大鼠显示出显著增高的血糖偏移,表明具有明显的糖尿病的葡萄糖耐受不良。给予 5 mg/kg b.w.、15 mg/kg 和 50 mg/kg b.w.谷氨酰胺酰噻唑烷导致糖尿病 Zucker 大鼠升高的血糖水平剂量依赖性降低并使葡萄糖耐受改善(见图 4)。

实施例 8: 口服给予 Wistar 大鼠后谷氨酰胺酰噻唑烷的体内灭活

口服给予 Wistar 大鼠谷氨酰胺酰噻唑烷。在施用安慰剂或谷氨酰胺酰噻唑烷后,在 2.5、5、7.5、10、15、20、40、60 和 120 分钟时从意识清醒无限制的大鼠的颈动脉插管中采集动脉血样以测定谷氨酰胺酰噻唑烷降解产物的生成。为分析,采用 C18 柱以简单固相萃取法从血浆中分离所需化合物。萃取液用 Lichrospher 60 RP Select B 柱上反相液相色谱串连 APCI 正模式工作的质谱进行分析。采用内标法定量。

Wistar 大鼠口服给予谷氨酰胺酰噻唑烷后,发现了化合物的降解。使用 LC/MS,可确定该降解产物为焦谷氨酰胺酰噻唑烷。参见图 3 和 5。

实施例 9: 谷氨酰胺酰吡咯烷和谷氨酰胺酰噻唑烷血管内和口服给予 Wistar 大鼠后的 DP IV 抑制活性的测定

体重 250-350 g 的雄性 Wistar 大鼠(Shoe: Wist(Sho))购自 Tierzucht Schönwalde (Schönwalde, Germany)。在控制温度(22 ± 2°C)、12/12

小时光照/黑暗周期(光照自 06:00 AM 开始)的常规条件下单笼饲养。允许自由饮食标准丸状食粮(ssniff® Soest, Germany)和 HCl 酸化的自来水。适应饲养条件 ≥ 1 周后, 在全身麻醉(i.p.注射 0.25 mL/kg b.w. Rompun® [2%], Bayer Vital, Germany 和 0.5 mg/kg b.w. Ketamin 10, Atarost GmbH & Co., Twistringen, Germany)下将导管植入 Wistar 大鼠颈动脉中。允许动物恢复一周。导管用肝素-盐水(100 IU/ml)每周冲洗 3 次。如果导管功能不良, 则在该大鼠的相反一侧的颈动脉第二次插管。术后恢复一周后, 该动物再参与研究。如果第二根导管功能不良, 该动物退出研究。补充一只新的动物, 并且按照计划的顺序继续进行实验, 实验在导管植入最少 7 天后开始。

经口服和血管内(动脉内)途径向导管功能完好的大鼠给予安慰剂(1 mL 盐水, 0.154 mol/l)或 100 mg/kg b.w.谷氨酰胺酰吡咯烷或 100 mg/kg b.w.谷氨酰胺酰噻唑烷。过夜禁食后, 在-30、-5 和 0 分钟时采集 100 μ L 肝素化动脉血样品。将测试物质新鲜溶于 1.0 mL 盐水(0.154 mol/l)中, 并在 0 分钟时经饲管(75 mm; Fine Science tools, Heidelberg, Germany)口服或经血管内途径给予。在口服给药的情况下, 向颈动脉插管中注射另外 1 mL 体积的盐水。在动脉内给药的情况下, 立即用 30 μ L 盐水冲洗导管, 并经饲管口服给予另外 1 mL 盐水。在施用安慰剂或测试物质后, 在 2.5、5、7.5、10、15、20、40、60 和 120 分钟时从意识清醒无限制的大鼠的颈动脉插管中采集动脉血样。所有血样收集在装有 10 μ L 1 M 柠檬酸钠缓冲液(pH 3.0)的冰冷却的 Eppendorf 管(Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Germany)中用于测定血浆 DP IV 活性。将 Eppendorf 管立即离心(12000 rpm, 2 分钟, Hettich Zentrifuge EBA 12, Tuttlingen; Germany)。将血浆部分保存在冰上直至分析或冻存于-20°C 下直至分析。所有的血浆样本均标上编码、动物号、取样日期和取样时间。

用于测定血浆 DP IV 活性的测定混合物由 80 μ L 试剂和 20 μ L 血

浆样品组成。30℃下预温育 2 分钟后，在相同的温度下于 309 nm 处进行 1 分钟从底物甘氨酸脯氨酸-4-硝基苯胺生成黄色产物 4-硝基苯胺的动力学测定。DP IV 活性用 mU/ml 表示。

使用 PRISM® 3.02 (GraphPad Software, Inc)进行统计学评价及制图。所有的参数以描述性方式包括均值和标准差进行分析。

与安慰剂相比，100 mg/kg b.w.剂量的化合物谷氨酰胺酰吡咯烷和谷氨酰胺酰噻唑烷口服和血管内给予后抑制血浆 DP IV 活性。

实施例 10：在患有葡萄糖耐受不良的饮食诱导的肥胖大鼠中谷氨酰胺酰噻唑烷盐酸盐和二甲双胍单独或组合对血糖控制的作用

从繁殖群体中选出选择性繁殖的、5-6 周龄、显示出增加的发生饮食诱导的肥胖(DIO)的可能性的雄性大鼠。该研究中总共包括 40 只 DIO 动物。选择 DIO 大鼠是因为它们很可能反应人群中接触高能富含脂肪饮食时发生肥胖和迟发型糖尿病的那部分人群。

当进入实验后，大鼠在控制温度条件(22-24℃)、12/12 小时光照-黑暗周期(光照从 06:00 至 18:00)下单个(1 只大鼠/笼)饲养。在此时，给大鼠提供高脂肪(HF)饮食(4.41 kcal/g-能量%：碳水化合物 51.4 kcal %、脂肪 31.8 kcal %、蛋白质 16.8 kcal %；饮食#12266B；Research Diets, New Jersey, USA；the HF-diet ensure sufficient intake of vitamins and trace elements))并自由饮食和饮水。适应环境一周后，每周两次重量分析测量 24 小时的食物和水的摄入量以及体重(在清晨 8-10 am 之间进行)。HF 喂养三周后，计算全部大鼠的平均日食物消费量。平均食物摄入量包括一个平台(platform)，根据其实施计划的喂养方案。从 8:00-12:00 AM 给动物提供日平均食物消耗量的 75%，而从 4:00 PM-8:00 PM 给动物提供日平均食物消耗量的 25%。

计划喂养三周后，将动物按重量进行分层。在第 0 日，将动物随机(每组 n=10)分配入下述药物处理组之一中：

A 组: 载体(蒸馏水)

B 组: 谷氨酰胺酰噻唑烷盐酸盐(60 mg/kg BID)

C 组: 二甲双胍(125 mg/kg BID)

D 组: 谷氨酰胺酰噻唑烷盐酸盐(60 mg/kg BID) + 二甲双胍(125 mg/kg BID)。

所有的药物均通过管饲法口服给予。体积为 200 μ l, 每日两次(8:00 AM 和 4:00 PM)。这种给药方式保证所有的动物不论是否进食均接受相同量的药物, 从而确保食粮喂养组和高脂饮食喂养组之间更准确的比较。动物接受每日两次剂量的每种化合物, 总共 42 日(第 1-第 42 日)。在第 6 日和第 40 日时, 对动物进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT)。二天后, 在第 42 日时, 中止给药且动物再一日不给药(仍遵循计划的喂养方案)。在第 43 日, 在半饥饿状态下处死动物, 因为从前一日 12: AM 它们仅可得到它们日能量需要量的 25%。在早上时间(8-12 AM), 通过 CO₂ 吸入麻醉动物并采集血样。任选地, 取组织样品, 并迅速在液氮中冷冻以用于以后的组织特异性基因表达和脂质含量的分析。血和组织取样将在接近持久稳定的房间进行, 以确保最小的可能应激水平。称量脂肪样品并冻存以使得可对脂肪库进行准确的分析。脂肪库分析可以通过去除隔膜、腹膜后、附睾和皮下腹股沟的脂肪来进行。

分析方法:

口服葡萄糖耐量试验(GTT):

在第 6 日和第 42 日的 8:00 AM 进行该试验。动物轻度禁食, 因为它们在先前的 20 小时(前一日的 12:00 AM 开始)内仅可得到它们日能量需要量的 25%。口服 1 g/kg 葡萄糖(使用 1 g/ml dH₂O)后, 在时间点: -60、-30、0、15、30、60、120 和 180 分钟处从动脉导管内取得血样, 并在自动分析仪(Roche Diagnostics)上测定 P-葡萄糖。经与注射器连接的置于十二指肠部位的管子经管饲给予口服葡萄糖负荷, 确

保准确的给药剂量。在时间点：0、15、30、60、120 分钟处使用 ultra-sensitive ELISA (Shibayagi, Japan)测定 P-胰岛素。

采血和血浆测量

在第-7 日所有的大鼠均安装动脉内导管。动脉内导管经股动脉置于腹主动脉中，并在全部取样过程末通过注射肝素化盐水保持通畅。所有的血样放在 EDTA Vacutainer 管中，血浆葡萄糖和总胆固醇以及甘油三酯一起测定。任选地，作为脂解的反映，我们可测定血浆中的甘油水平。在处死当日，心脏穿刺取得的血收集在三个试管中：vacutainer-EDTA ； Vacutainer-EDTA+1% NaF ； Vacutainer EDTA+Aprotinin (750 KIU)。

使用多种血样“包装”：

A) 血糖特征 (profile)：禁食 P-葡萄糖、P-胰岛素和 HbA1c

B) 24 小时血糖特征：每隔 3 小时(8:00、11:00、14:00、17:00、20:00、23:00、02:00、05:00)的 B-葡萄糖。或者，相同时间特征的 P-葡萄糖和 P-胰岛素

C) 进餐相关葡萄糖：早餐前后(8:00 AM 和 12:00 AM 的 B-葡萄糖

D) 禁食葡萄糖&脂质：禁食-P-葡萄糖、P-甘油三酯、P-总胆固醇

E) OGTT：细节参见上述。

使用标准酶测定试剂盒在全自动分析仪(Roche Diagnostics)上测定血浆-葡萄糖、HbA1c、血浆-总胆固醇、血浆-甘油三酯。通过分光光度计使用基于脂酰辅酶 A 氧化酶的比色试剂盒((NEFA-C, WAKO pure chemicals, Osaka, Japan) 测定血浆非酯化游离脂肪酸(NEFA)。置于 Vacutainer-EDTA+1% NaF 中的样品用于 FFA 分析。

用基于 ultra-sensitive ELISA 的测定法(Shibayagi, Japan)测量血浆胰岛素。用 Linco multiple ELISA kit (Linco Research Immunoassay,

St. Charles, MO)测定有生物活性的 GLP-1 (7-37)和总 GLP-1 的免疫反应活性。

数据、报告和统计学评价:

全部数据输入 Excel 97 或 2000 棋盘式分析表中, 随后进行相关的统计学分析(Statview 或 Graph Pad software)。除非另有说明, 结果以均值 $\pm$ SEM (平均标准误)表示。使用单因素方差分析(ANOVA)和适当的 post-hoc 进行数据的统计学评价, post-hoc 分析在对照和处理组之间如果统计学显著性被确定($p < 0.05$)的情况下进行。

使用谷氨酰胺酰噻唑烷和谷氨酰胺酰噻唑烷与二甲双胍联合这一类型的实验方案均导致改善的口服葡萄糖耐量。

实施例 11: DP IV 样酶-二肽基肽酶 II 的抑制

如果 N-末端未被质子化, 则 DP II (3.4.14.2)从寡肽释放 N-末端二肽(McDonald, J.K., Ellis, S. & Reilly, T.J., 1966, J. Biol. Chem., 241, 1494-1501)。P₁ 位的 Pro 和 Ala 是优选的残基。该酶活性被描述为 DP IV 样活性, 不过 DP II 具有酸性最适 pH 值。所用的酶从猪肾中纯化。将 100 μ L 浓度为 1×10^{-4} M- 5×10^{-8} M 的谷氨酰胺酰吡咯烷或谷氨酰胺酰噻唑烷与 100 μ L 缓冲液(40 mM HEPES, pH 7.6, 0.015% Brij, 1 mM DTT)、50 μ L 赖氨酰丙氨酰氨基甲基香豆素溶液(5 mM)以及 20 μ L 猪 DP II (在缓冲液中稀释 250 倍)混合。使用平板读数器(HTS7000 plus, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany)于 30°C 和 $\lambda_{\text{激发}} = 380$ nm、 $\lambda_{\text{发射}} = 465$ nm 下进行荧光测定 25 分钟。使用 Graphit 4.0.15 (Erithacus Software, Ltd., UK)计算 K_i 值, 对于谷氨酰胺酰吡咯烷测定为 K_i = 8.52×10^{-5} M $\pm$ 6.33×10^{-6} M, 而对于谷氨酰胺酰噻唑烷, K_i = 1.07×10^{-5} M $\pm$ 3.81×10^{-7} M。

实施例 12: 交叉反应酶

测试谷氨酰胺酰吡咯烷或谷氨酰胺酰噻唑烷针对二肽基肽酶 I、脯氨酰寡肽酶和氨酰基脯氨酸二肽酶的交叉反应效能。

二肽基肽酶 I (DP I, 组织蛋白酶 C):

DP I 或组织蛋白酶 C 是一种从其底物的 N-末端切割二肽的溶酶体半胱氨酸蛋白酶(Gutman, H.R. & Fruton, J.S., 1948, J. Biol. Chem., 174, 851-858)。它归类为半胱氨酸蛋白酶。所用的酶购自 Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)。为了得到完全活性的酶, 将酶在 pH 5.6 的 MES 缓冲液(40 mM MES、4 mM DTT、4 mM KCl、2 mM EDTA、0.015% Brij)中稀释 1000 倍, 并在 30°C 下预温育 30 分钟。将 50 μ L 浓度为 1×10^{-5} M- 1×10^{-7} M 的谷氨酰胺酰吡咯烷或谷氨酰胺酰噻唑烷与 110 μ L 缓冲液-酶-混合物混合。将测试混合物于 30°C 下预温育 15 分钟。预温育后, 加入 100 μ L 组氨酰丝氨酰对硝基苯胺(2×10^{-5} M), 并使用平板读数器(HTS7000 plus, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany)于 30°C 和 $\lambda_{\text{激发}} = 380$ nm、 $\lambda_{\text{发射}} = 465$ nm 下测定因对硝基苯胺释放产生的黄色 10 分钟。使用 Graphit 4.0.15 (Erithacus Software, Ltd., UK)计算 IC₅₀ 值。没有发现谷氨酰胺酰吡咯烷或谷氨酰胺酰噻唑烷对 DP I 酶活性的抑制。

脯氨酰寡肽酶(POP)

脯氨酰寡肽酶(EC 3.4.21.26)是一种在 Xaa-Pro 键的 N-末端部分切割肽的丝氨酸型内切蛋白酶(Walter, R., Shlank, H., Glass, J.D., Schwartz, I.L. & Kerenyi, T.D., 1971, Science, 173, 827-829)。底物是分子量达到 3000 Da 的肽。所用的酶是重组人脯氨酰寡肽酶。重组表达在标准条件下在大肠杆菌(*E. coli*)中进行, 如现有技术中其它地方所述。将 100 μ L 浓度为 1×10^{-4} M- 5×10^{-8} M 的谷氨酰胺酰吡咯烷或谷氨酰胺酰噻唑烷与 110 μ L 缓冲液(40 mM HEPES, pH 7.6, 0.015% Brij, 1 mM DTT)和 20 μ L POP 溶液混合。将测试混合物在 30°C 下预

温育 15 分钟。预温育后，加入 50 μL 甘氨酸脯氨酸-4-硝基苯胺溶液(0.29 mM)，并使用平板读数器(sunrise, Tecan, Crailsheim, Germany)在 30°C 和 $\lambda=405\text{ nm}$ 下测定因 4-硝基苯胺释放产生的黄色。10 分钟。使用 Graphit 4.0.15 (Erithacus Software, Ltd., UK)计算 IC_{50} 值。没有发现谷氨酰胺酰吡咯烷或谷氨酰胺酰噻唑烷对 POP 活性的抑制。

氨酰基脯氨酸二肽酶(X-Pro 二肽酶)

氨酰基脯氨酸二肽酶(EC 3.4.13.9)首次被 Bergmann & Fruton 描述(Bergmann, M. & Fruton, JS, 1937, J. Biol. Chem. 189-202)。氨酰基脯氨酸二肽酶从 Xaa-Pro 二肽释放 N-末端氨基酸，最适 pH 值为 6-9。将猪肾氨酰基脯氨酸二肽酶(ICN Biomedicals, Eschwege, Germany)溶于(1 mg/mL)测试缓冲液(20 mM $\text{NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 3 mM MnCl_2 , pH 7.6)中。为得到完全活性的酶，将溶液在室温下预温育 60 分钟。将 450 μL 浓度为 $5 \times 10^{-3}\text{ M}$ - $5 \times 10^{-7}\text{ M}$ 的谷氨酰胺酰吡咯烷或谷氨酰胺酰噻唑烷与 500 μL 缓冲液(20 mM $\text{NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})_2$, pH 7.6)和 250 μL Ile-Pro-OH (0.5 mM, 在测试混合物中)混合。将测试混合物在 30°C 下预温育 5 分钟。预温育后，加入 75 μL 氨酰基脯氨酸二肽酶(在测试缓冲液中 1:10 稀释)，并使用 UV/Vis 光度计，UV1 (Thermo Spectronic, Cambridge, UK)在 30°C 和 $\lambda=220\text{ nm}$ 下测定 20 分钟。使用 Graphit 4.0.15 (Erithacus Software, Ltd., UK)计算 IC_{50} 值。对于谷氨酰胺酰噻唑烷，测定为 $\text{IC}_{50} > 3\text{ mM}$ ，而对于谷氨酰胺酰吡咯烷，测定为 $\text{IC}_{50} = 3.4 \times 10^{-4}\text{ M} \pm 5.63 \times 10^{-5}$ 。

实施例 13：血浆稳定性

为研究谷氨酰胺酰吡咯烷或谷氨酰胺酰噻唑烷在人血浆中的稳定性，在确定的时间测定血浆中 DP IV 的活性。人血浆中的 DP IV

平均活性测定为 43.69 U/mL。在工作溶液中，血浆用 0.9% NaCl 稀释以固定 DP IV 活性水平在 25 U/ml。血浆与不同浓度(5×10^{-5} 、 2.5×10^{-5} 、 1.25×10^{-5} M，在血浆中)的谷氨酰胺酰吡咯烷或谷氨酰胺酰噻唑烷在 37°C 下温育。在确定的时间点使用自动移液器(pipette roboter) (Gilson 215, Liquid handler, Gilson)取样，并转移至微量滴定板中，该微量滴定板每孔中含有 5×10^{-5} M 于 0.9% NaCl + 0.15% Brjj 中的甘氨酸脯氨酸氨基甲基香豆素。6 分钟后，加入异亮氨酸噻唑烷(5×10^{-5} M，于 0.9% NaCl 溶液中)停止反应。用平板读数器(HTS7000 plus, Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany)针对 0.9% 于血浆中的 NaCl (参比标准)进行荧光测定。谷氨酰胺酰吡咯烷或谷氨酰胺酰噻唑烷抑制活性的半衰期通过以酶活性对反应时间作图计算。对于这两种化合物，半衰期都不能够测出。认为该物质在人血浆中稳定 22 小时以上。

实施例 14：谷氨酰胺酰噻唑烷其它盐形式的合成

将谷氨酰胺酰噻唑烷盐酸盐(1 g, 3.43 mmol)施于强碱离子交换柱(DOWEX[®] 550A, 10 mL 干物质，如上所述预处理)。收集各部分并用 1 N HCl 滴定对抗溴百里酚蓝以估计游离碱的含量。之后加入相应量的所需酸，并将溶液冻干。得到的物质用甲醇/乙醚重结晶。

谷氨酰胺酰噻唑烷的 3,5-二-叔丁基苯甲酸盐和亚磺酸盐是新的，并因此构成本发明的另一方面。

谷氨酰胺酰噻唑烷的不同酸加成盐的特征:

盐	PGT	MP (°C)	外观
盐酸盐	<0.5	167-169	结晶
富马酸盐	0.2	128-131	结晶
苯甲酸盐	0.6	116-118	结晶
马来酸盐	4.6	128-132	结晶
草酸盐	0	宽, 90-110	无定形
3,5-二-叔丁基 苯甲酸盐	1.06	窄, 125	结晶
亚磺酸盐	未知副产物	143-145	结晶
水杨酸盐	0.6	120-127.6	结晶
乙酸盐	0.1	88-89	无定形

PGT 焦谷氨酰胺酰噻唑烷, 面积%, 通过 HPLC 分析测定

MP 熔点

实施例 15: 谷氨酰胺酰噻唑烷和二甲双胍单独或组合对糖尿病 Zucker (fa/fa)大鼠血糖控制的作用

10 或 11 周龄雄性 Zucker (fa/fa)大鼠购自 Charles River (Sulzfeld, Germany)。动物在控制温度($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), 12/12 小时光照/黑暗周期(光照自 06:00 AM 开始)的标准半屏障条件下饲养。自由饮食标准丸状食粮(ssniff[®] Soest, Germany)和 HCl 酸化的自来水。在 12 周龄时将动物(N=42)随机分成 6 个要给药的实验组。各实验组的给药定义如下 (GT=谷氨酰胺酰噻唑烷):

CO 组(N=7): 安慰剂(蒸馏水), b.i.d., 口服

GT 组(N=7): 60 mg/kg b.w. GT, b.i.d., 口服

Met-低组(N=7): 125 mg/kg b.w.二甲双胍, b.i.d., 口服

Met-高组(N=7): 300 mg/kg b.w.二甲双胍, b.i.d., 口服

GT+Met-低组(N=7): 60 mg/kg b.w. GT + 125 mg 二甲双胍, b.i.d., 口服

GT+Met-高组(N=7): 60 mg/kg b.w. GT + 300 mg 二甲双胍, b.i.d., 口服

每千克体重的单独或联合给药量溶于 5 mL 蒸馏水中用于口服给予。

实验步骤:

第一次 OGTT:

使用 12-13 周龄 Zucker (fa/fa)大鼠开始该研究。开始该研究时, 禁食 16 小时后进行 OGTT (2 g 葡萄糖/kg 体重(b.w.); 给药体积: 5 mL/kg 的 40%溶液; B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany)。经饲管(15 g, 75 mm; Fine Science Tools, Heidelberg, Germany)给予葡萄糖。在进行 OGTT 前 t=-5 分钟时通过管饲进行给药。

第一次和第二次 OGTT 的各组特征和所给药物

组	动物 (N)	药物/剂量	注释
CO	7	安慰剂; 5 mL/kg b.w.	0.5 mL/100 g b.w.
GT	7	P93/01; 60 mg/kg b.w.	60 mg/kg P93/01, 溶于 5 mL 蒸馏水中, 0.5 mL/100 g b.w.
Met-低	7	二甲双胍; 125 mg/kg b.w.	125 mg 二甲双胍, 溶于 5 mL 蒸馏水中, 0.5 mL/100 g b.w.
Met-高	7	二甲双胍; 300 mg/kg b.w.	300 mg 二甲双胍, 溶于 5 mL 蒸馏水中, 0.5 mL/100 g b.w.
GT+Met-低	7	GT; 60 mg/kg b.w. + 二甲双胍; 125 mg/kg b.w.	60 mg GT + 125 mg 二甲双胍, 溶于 5 mL 蒸馏水中, 0.5 mL/100 g b.w.
GT+Met-高	7	GT; 60 mg/kg b.w. + 二甲双胍; 300 mg/kg b.w.	60 mg GT + 300 mg 二甲双胍, 溶于 5 mL 蒸馏水中, 0.5 mL/100 g b.w.

相对于给予葡萄糖时间的-15、±0 分钟、15、30、60、90、120 和 180 分钟(后一时间没有胰岛素样品)时从尾静脉取血样测定血糖和血浆胰岛素。

第一次 OGTT 后, 各组动物每日两次分别在 08:00 AM 和 04:00 PM 给予各自的药物。

在给药的两周期间, 在星期一、星期三和星期五的 08:00 AM 给药前测定清晨血糖。

在给药期间每日测定食物摄入量。

所有的动物于 7:30 AM 每周称量体重三次。

在给药两周后(第 15 日), 进行第二次 OGTT。在其前一天 04:00

PM 撤去食物(禁食 16 小时)。OGTT 在-5 分钟时进行前驱给药和在 ± 0 分钟时给予口服葡萄糖负荷的情况下进行。在-15、 ± 0 分钟、15、30、60、90、120 和 180 分钟(后一时间没有胰岛素样品)时从尾静脉取血样测定血糖和血浆胰岛素。

在第 18 日和之前(第 7 日)测定糖基化血红蛋白。

测定:

葡萄糖-为测定葡萄糖, 在-15、 ± 0 分钟(OGTT 前)以及 OGTT 后 15、30、60、90、120 和 180 分钟时采集 20 μL 血。

胰岛素-通过抗体 RIA 方法(Linco Research, Inc. St. Charles, Mo., USA)测定胰岛素浓度。

糖基化血红蛋白-用"DCA 2000R Hämoglobin Alc-Reagenz kit" (Bayer Vital GmbH, Fernwald, Germany)评估糖基化血红蛋白(HbA1c)的百分比。

使用台秤(Scaltec, Heiligenstadt, Germany)测量体重。

将来自尾部的混合静脉血样品收集入 20 μL 玻璃毛细管中, 将毛细管置于装有 1 mL 溶血用溶液的标准管(血糖测定)中以及用于血浆胰岛素的样品管(50 μL 血)中。

尽快地将由 IDK 提供的葡萄糖分析原始数据以 Excel 格式提供给 probiodrug。每种药物和每个参数(葡萄糖、胰岛素)的数据通过描述统计学(均值、SEM)总结。计算 AUC 和基线校正 AUC(基线设定为 $t=0$ 分钟时的 y 值)。通过描述统计学计算和总结相对于基线的变化。

结果

谷氨酰胺酰噻唑烷单独或与二甲双胍联合亚长期(18 天) b.i.d. 给予糖尿病肥胖 Zucker 大鼠(fa/fa)导致改善的葡萄糖耐量。给药在所有实验组中均没有影响食物和水的摄入量。GT 和 Met-低组显示在 OGTT 中显著改善的葡萄糖耐量曲线, 反应性和绝对 G-AUC 显著降低($p<0.05$ vs.对照)。Met-高、GT+Met-低和 GT+Met-高组显示葡萄糖

耐量曲线进一步改善,以及反应性和绝对 G-AUC 再次降低($p<0.05$ vs. 对照)。图 6 显示给药 14 日后在第一次 OGTT 期间安慰剂、Met-低、Met-高、GT+Met-低和 GT+Met-高(在-5 分钟时)以及 OGTT (在 0 分钟时)负荷的禁食 Zucker 大鼠的基线校正葡萄糖 AUC。

实施例 16: 谷氨酰胺酰噻唑烷与其它口服抗糖尿病药联合治疗的作用

雄性 8 周龄雄性 Zucker (falfa)大鼠在控制温度($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), 12/12 小时光照/黑暗周期(光照自 06:00 AM 开始)的标准半屏障条件下饲养。自由饮食标准丸状食粮(ssniff[®] Soest, Germany)和 HCl 酸化的自来水。在 12 周龄时将动物(N=42)随机分成 6 个要给药的实验组。两周给药的实验组如下(GT=谷氨酰胺酰噻唑烷):

CO 组(N=5): 安慰剂(蒸馏水), b.i.d., 在 08.00 AM 和 04.00 PM 口服

GT 组(N=5): 60 mg/kg b.w. GT b.i.d., 在 08.00 AM 和 04.00 PM 口服

罗格列酮+GT 3 mg/kg b.w.罗格列酮, 每日一次, 在 08.00 AM 口服
组(N=5): + 60 mg/kg b.w. GT, b.i.d., 在 08.00 AM 和 04.00 PM 口服

阿卡波糖+GT 40 mg 阿卡波糖/100 g 食粮, 自由饮食 + 60 mg/kg
组(N=5): b.w. GT, b.i.d., 在 08.00 AM 和 04.00 PM 口服

格列本脲+GT 5 mg/kg b.w.格列本脲, b.i.d., 口服+ 60 mg/kg b.w.
组(N=5): GT, b.i.d., 在 08.00 AM 和 04.00 PM 口服

胰岛素+GT 组 2 IU 长效胰岛素 b.i.d., SC + 60 mg/kg b.w. GT,
(N=5): b.i.d., 在 08.00 AM 和 04.00 PM 口服。

每千克体重的单独和联合口服给药量溶于 5 mL 1%于盐水中的

甲基纤维素中。

使用 12 周龄 Zucker (fa/fa)大鼠开始该研究。开始该研究时，禁食 16 小时和急性给药后进行 OGTT (剂量: 2 g 葡萄糖/kg 体重(b.w.); 给药体积: 5 mL/kg 的 40%溶液; B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany)。经饲管(15 g, 75 mm; Fine Science Tools, Heidelberg, Germany)给予葡萄糖。各组相关药物显示如下:

第一次和第二次 OGTT 的各组特征和所给药物

组	动物 (N)	药物/剂量	注释
CO	5	安慰剂; 5 mL/kg b.w.	0.5 mL/100 g b.w. 1%于盐水中的甲基纤维素, 在-5 分钟时
GT	5	GT, 60 mg/kg b.w.	60 mg/kg GT, 溶于 5 mL 1%于盐水中的甲基纤维素中, 0.5 mL/100 g b.w., 在-5 分钟时
罗 格 列 酮 +GT	5	罗格列酮, 3 mg/kg b.w. + P93/01, 60 mg/kg b.w.	3 mg 罗格列酮, 溶于 2.5 mL 1%于盐水中的甲基纤维素中, 0.250 mL/100 g b.w., 在-30 分钟时; 60 mg GT, 溶于 2.5 mL 1%于盐水中的甲基纤维素中, 0.250 mL/100 g b.w., 在-5 分钟时
阿 卡 波 糖 +GT	5	在 OGTT 前无阿卡波糖预负荷; GT, 60 mg/kg b.w.	60 mg GT, 溶于 5 mL 1%于盐水中的甲基纤维素中, 0.50 mL/100 g b.w., 在-5 分钟时
格 列 本 脲 +GT	5	格列本脲, 5 mg/kg b.w. + GT, 60 mg/kg b.w.	5 mg 格列本脲, 溶于 2.5 mL 1%于盐水中的甲基纤维素中, 0.250 mL/100 g b.w., 在-40 分钟时 +

			60 mg GT, 溶于 2.5 mL 1%于盐水中的甲基纤维素中, 0.250 mL/100 g b.w., 在-5 分钟时
胰岛素+GT	5	胰岛素, 2 IU SC + GT; 60 mg/kg b.w.	2 IU 胰岛素 SC Actrapid + 60 mg GT, 溶于 5 mL 1%于盐水中的甲基纤维素中, 0.5 mL/100 g b.w., 在-5 分钟时。

在-15、 ± 0 分钟、15、30、60、90、120 和 180 分钟(后一时间没有胰岛素样品)从尾静脉取血样以测定血糖和血浆胰岛素。

第一次 OGTT 后, 各组动物每日分别在 08:00 AM 和 04:00 PM 给予各自的药物。

在给药的两周期间, 在星期一、星期三和星期五的 08:00 AM 给药前测定清晨血糖。

在给药期间每日测定食物和水的摄入量。

所有的动物于 7:30 AM 每周称量体重三次。

在给药两周后(第 15 日), 进行第二次 OGTT。在前一天 04:00 PM 撤去食物(禁食 16 小时)。OGTT 在给定的时间时进行前驱给药和在 ± 0 分钟给予口服葡萄糖负荷的情况下进行。在-15、 ± 0 分钟、15、30、60、90、120 和 180 分钟(后一时间没有胰岛素样品)从尾静脉取血样测定血糖和血浆胰岛素。

一周的清除时间后, 进行最后的 OGTT (>22 日)。在前一天 04:00 PM 撤去食物(禁食 16 小时)。OGTT 在给定的时间时给予所有组安慰剂(其分别指 1%甲基纤维素和 SC 盐水)和在 ± 0 分钟给予口服葡萄糖负荷的情况下进行。在-15、 ± 0 分钟、15、30、60、90、120 和 180 分钟(后一时间没有胰岛素样品)从尾静脉取血样测定血糖和血浆胰岛素。

在日两次给药>两周后(第 18 日)和之前(第-5 日)测定糖基化血红蛋白。

测定:

葡萄糖-为测定葡萄糖, 在-15、±0 分钟(OGTT 前)以及 OGTT 后 15、30、60、90、120 和 180 分钟时采集 20 µL 血。

胰岛素-通过抗体 RIA 方法(Linco Research, Inc. St. Charles, Mo., USA)测定胰岛素浓度。

糖基化血红蛋白-用"DCA 2000R Hämoglobin Alc-Reagenz kit" (Bayer Vital GmbH, Fernwald, Germany)评估糖基化血红蛋白(HbA1c)的百分比。

使用台秤(Scaltec, Heiligenstadt, Germany)测量体重。

将来自尾部的混合静脉血样品收集入 20 µL 玻璃毛细管中, 将毛细管置于装有 1 mL 溶血用溶液的标准管(血糖测定)中以及用于血浆胰岛素的样品管(50 µL 血)中。将样品管中的血样立即离心(12000 rpm, 2 分钟), 而胰岛素分析用血清将储存于-20℃下直至分析。血样上标有方案号、样品日期、取样时间、动物号以及样品类型。

结果:

给药下的第一次 OGTT 在研究开始时进行。所有实验组的动物在 2 g/kg 葡萄糖的葡萄糖负荷后它们的糖耐量没有显示出差异。对于基线校正葡萄糖 $AUC_{1-180 \text{ min}}$ 获得相同的结果。基线设定为时间 $t=0$ 时的葡萄糖值)。

14 日亚长期给药后 OGTT-2 期间的血糖:

所有处理组与对照组相比, 肥胖 Zucker 大鼠(fa/fa) 14 日亚长期给药导致改善的葡萄糖耐量。图 7 显示在第 14 日给予 2 g/kg 葡萄糖的葡萄糖负荷后基线校正的葡萄糖时间曲线下面积。

总之, 谷氨酰胺酰噻唑烷单独或与罗格列酮、格列本脲、阿卡波糖或胰岛素联合亚长期给药均导致葡萄糖耐量改善。

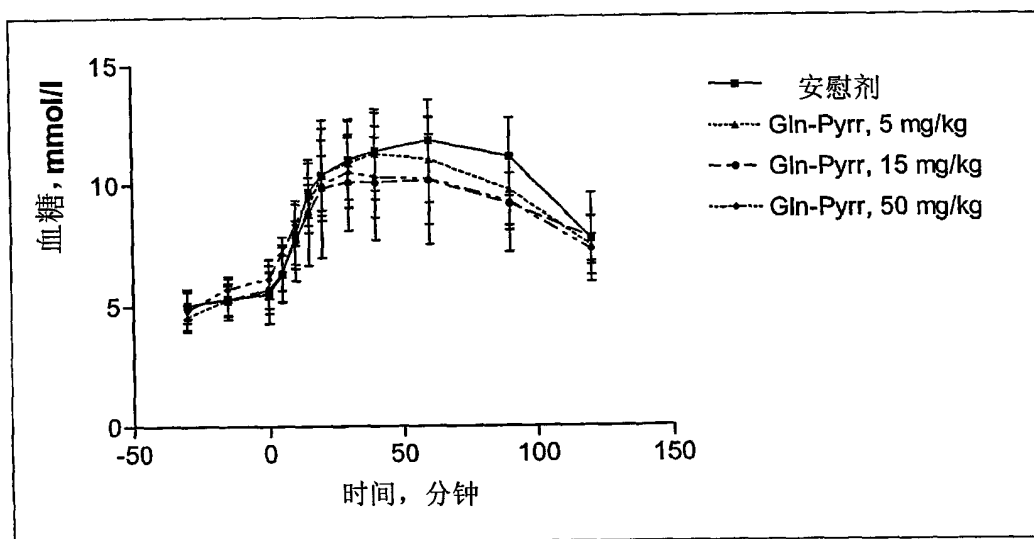


图 1

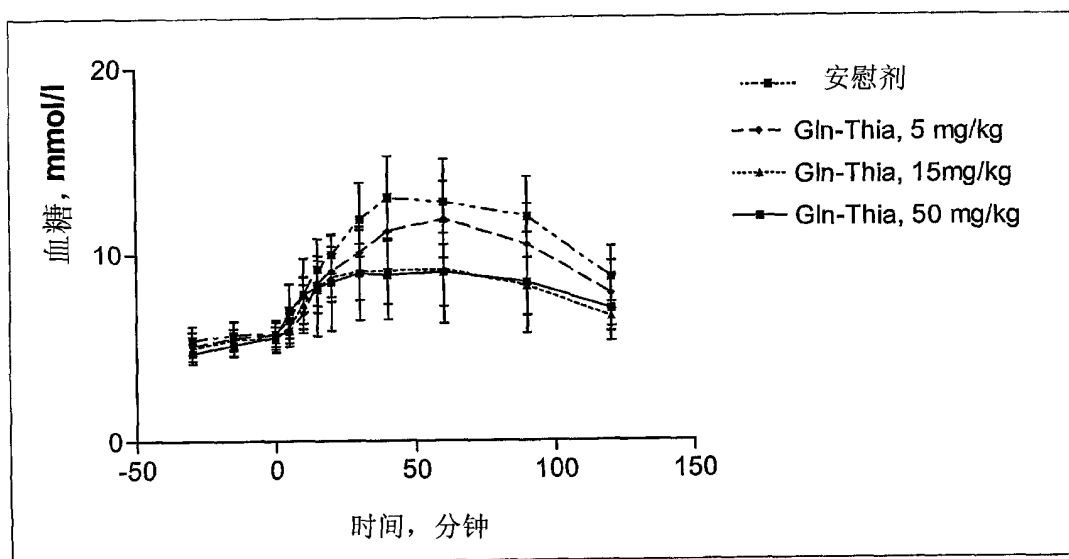


图 2

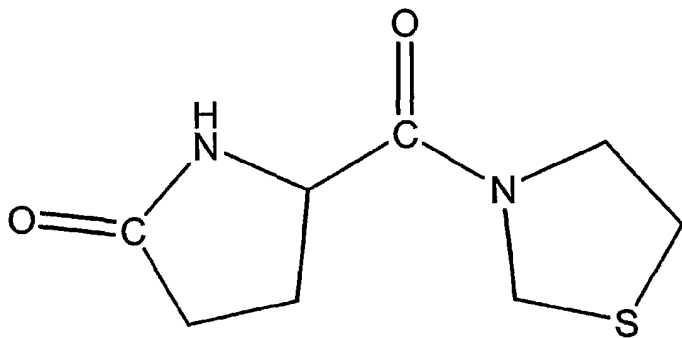


图 3

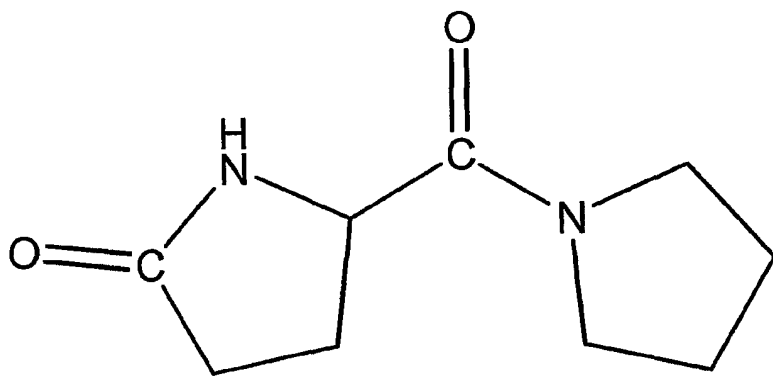


图 4

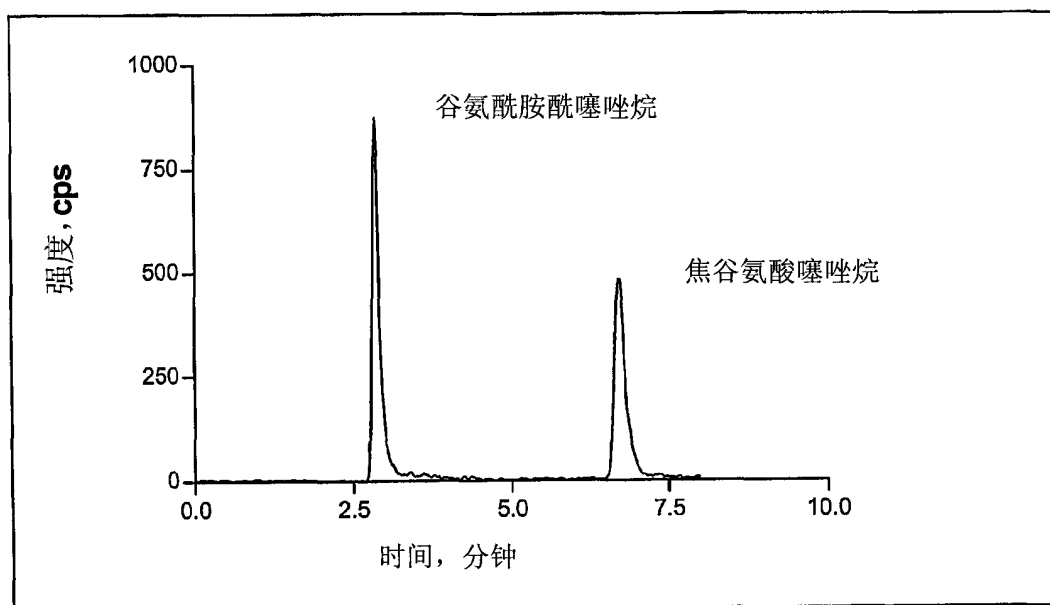


图 5

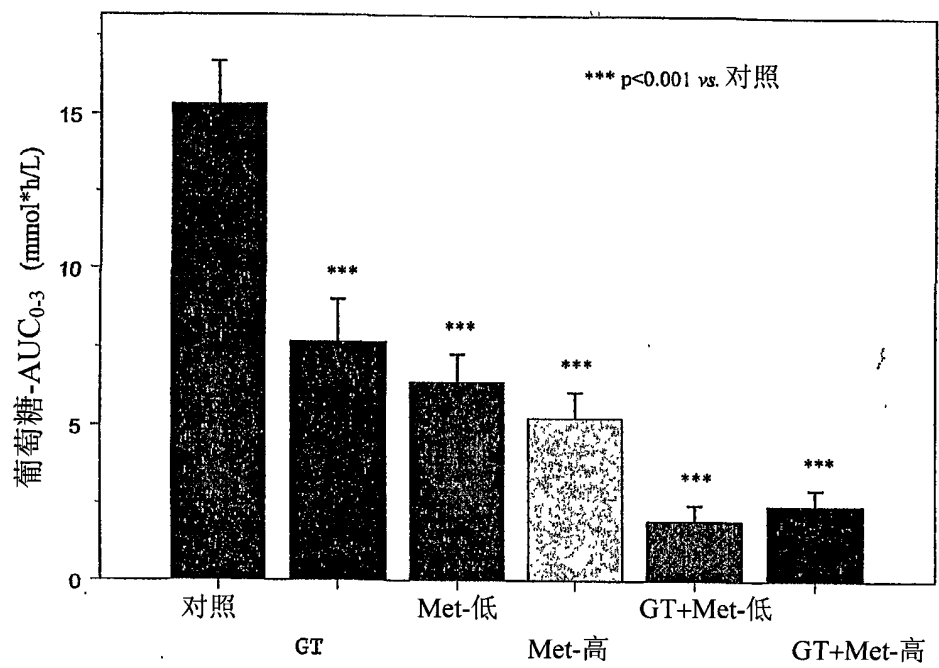


图 6

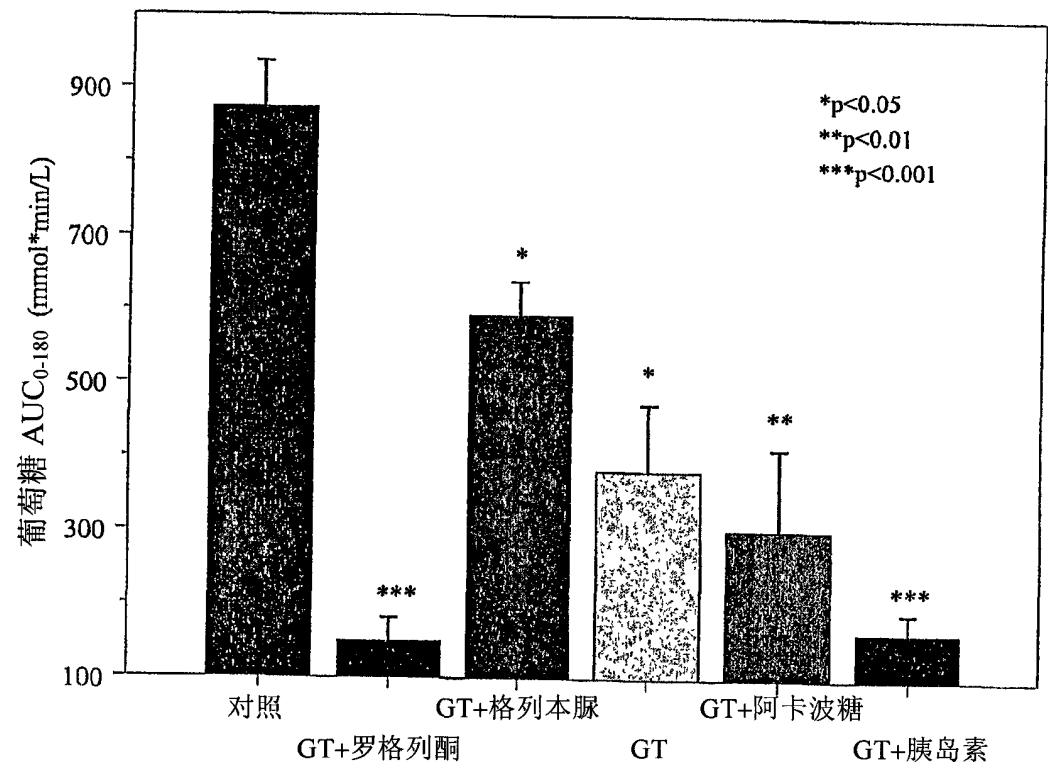


图 7