



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105555275 B

(45) 授权公告日 2021. 04. 20

(21) 申请号 201480045577.2

专利权人 高丽大学校产学协力团

(22) 申请日 2014.06.17

(72) 发明人 车大龙 姜永仙 车珍宙 李池垠
金贤旭 李美和 金珽恩 金美庆
孙文虎 金舜会

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105555275 A

(43) 申请公布日 2016.05.04

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

(30) 优先权数据
10-2013-0073711 2013.06.26 KR

代理人 安琪 张晓威

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016.02.16

(51) Int.Cl.
A61K 31/4965 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2014/005302 2014.06.17

(56) 对比文件
CN 101663282 A, 2010.03.03
CN 1905876 A, 2007.01.31

(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/208921 KO 2014.12.31

(73) 专利权人 东亚ST株式会社
地址 韩国首尔

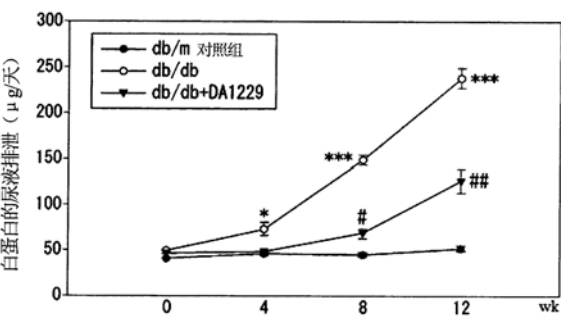
审查员 魏永燕
权利要求书1页 说明书13页 附图16页

(54) 发明名称

含有DPP-IV抑制剂的用于预防和治疗肾脏疾病的组合物

(57) 摘要

本发明涉及一种用于预防或治疗肾脏疾病的组合物。本发明的组合物改善脂类代谢、预防包括肾脏纤维化在内的组织学损伤、缓解微量白蛋白尿,并维持肾小球的去氧肾上腺素。因此,所述组合物用于治疗肾脏疾病。



1. 化合物(R)-4-{(R)-3-氨基-4-(2,4,5-三氟苯基)丁酰基}-3-(叔丁氧基甲基)哌嗪-2-酮或者其药学上可接受的盐在制备用于预防或治疗肾小球肾病或糖尿病肾病的药物组合物中的用途。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述药学上可接受的盐选自乙酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、柠檬酸、乙磺酸、富马酸、葡糖酸、谷氨酸、氢溴酸、盐酸、羟乙磺酸、乳酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、硝酸、扑酸、泛酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、酒石酸、对甲苯磺酸和己二酸的盐。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述化合物或者其药学上可接受的盐是二肽基肽酶-IV抑制剂。

4. 根据权利要求1所述的用途,所述药物组合物还包含抗糖尿病剂。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述抗糖尿病剂选自双胍、胰岛素增敏剂、胰岛素促分泌剂、 α -葡糖苷酶抑制剂和大麻素受体1拮抗剂。

6. 根据权利要求1所述的用途,所述药物组合物还包含血管紧张素转化酶抑制剂或血管紧张素II受体阻断剂。

含有DPP-IV抑制剂的用于预防和治疗肾脏疾病的组合物

【技术领域】

[0001] 本发明涉及一种用于预防或治疗肾脏疾病的组合物。

【背景技术】

[0002] 肾脏是一种维持身体稳态的重要器官。其控制体液体积、血液离子浓度和pH;分泌废弃物,特别是例如代谢废物、毒素和药物;并进行血压控制、代谢和内分泌功能。并且,其通过激活维生素D来促进小肠内的钙吸收,且其参与多种激素合成。

[0003] 肾脏疾病意指一种由于肾脏不能正常执行分泌、控制、代谢和内分泌功能而导致的肾脏整体功能降低或异常的状态。由肾脏损伤导致的功能减退特别会引起肾脏增大和相关结构、肾脏萎缩、体液体积改变、电解质失衡、代谢性酸中毒、气体交换紊乱、抗感染功能障碍和尿毒素积累。

[0004] 根据其进展,肾脏疾病被分类为急性肾衰竭和慢性肾衰竭;或者根据病因,肾脏疾病被特别分类为由于血管复合物(vascular complex)的沉积而导致的肾小球肾炎、伴随糖尿病的糖尿病肾病或伴随高血压的高血压性肾病、由于药物给药例如给药抗生素或抗癌药以及细菌感染而导致的中毒性肾病。

[0005] 与肾脏疾病起因的类型无关,当由于肾脏病症的慢性进展而导致的肾小球滤过率降低至低于50%时,在多数情况下肾小球滤过率持续减少,最终发生晚期肾衰竭,并且在严重情况下由于并发症(特别例如血液异常、神经并发症、胃肠道并发症、感染或骨发育不全)而可能导致死亡。

[0006] 肾脏疾病在世界范围内每年都有增加,并且因为没有症状或症状难以识别而常在疾病发展到晚期肾衰竭时才被发现。根据向USRDS(United States Renal Data System,美国肾数据系统)报告的对医疗保障(Medicare)受益者的分析,晚期肾衰竭的流行率从2000年的2.7%增加到了2009年的8.5%。在韩国,据报道晚期肾衰竭的患者在2010年总共为37.1%,与2006的数据比较其以每年平均8.2%的速度增加。这些现象与由于肥胖患者和糖尿病患者的增加而导致的糖尿病肾病的增加密切相关。

[0007] DPP-IV(二肽基肽酶-IV)是一种蛋白质,其也被称为腺苷脱氨酶复合蛋白2或CD26,并且其由DPP-IV基因编码。DPP-IV被报道参与免疫应答,且已知其通过参与GLP-1(胰高血糖素样肽-1)的降解而在糖代谢中发挥重要作用,所述GLP-1促进胰岛素分泌并抑制胰高血糖素分泌。据报道DPP-IV在肾近端小管细胞、肾小球基底膜和足细胞中分布较多。DPP-IV抑制剂具有通过抑制GLP-1的降解以维持其活性来降低血糖水平的功能,并且DPP-IV抑制剂目前被用作抗糖尿病剂,因为其没有诱发低血糖症的副作用。

【发明内容】

[0008] 【技术问题】

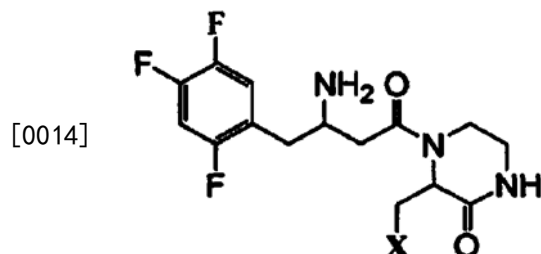
[0009] 本发明提供一种用于预防或治疗肾脏疾病的有效组合物。

[0010] 【技术方案】

[0011] 本发明人发现一种DPP-IV抑制剂DA1229表现出预防或治疗肾脏疾病的效果,并完成了本发明。

[0012] 本发明提供一种用于预防或治疗肾脏疾病的药物组合物,其包含:作为活性成分的由以下化学式1所表示的化合物、其光学异构体、其药学上可接受的盐或者其水合物或溶剂合物。

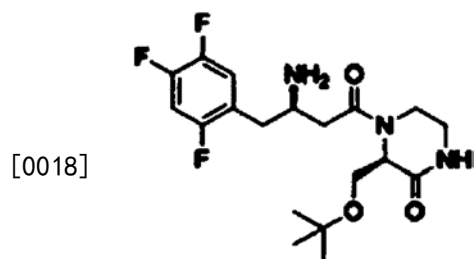
[0013] [化学式1]



[0015] (其中,分别地,X是OR¹,且R¹是C₁-C₅低级烷基)

[0016] 化学式1中的R¹可以是叔丁基。这个化合物被称为(R)-4-{(R)-3-氨基-4-(2,4,5-三氟苯基)丁酰基}-3-(叔丁氧基甲基)哌嗪-2-酮或DA1229,结构示于以下化学式2。

[0017] [化学式2]



DA-1229

[0019] 通常,DPP-IV抑制剂仅被认为是控制血糖的抗糖尿病剂,但本发明人通过实验确认,除了血糖控制作用,DPP-IV抑制剂对肾脏具有直接的保护作用,并因此完成了本发明。本发明的DPP-IV抑制剂通过抑制DPP-IV活性并促进脂类代谢而减少血浆和肝脏中的脂浓度。此外,DPP-IV具有改善肾脏功能;改善微量白蛋白尿;减少肾脏纤维化;改善肾肥大;增加去氧肾上腺素表达;和抑制去氧肾上腺素排泄的作用。可由本发明的组合物预防或治疗的肾脏疾病包括:表现出由不同原因诱发的不同临床症状的疾病;以及其发生与糖尿病无关的肾脏疾病,即,非糖尿病肾病以及糖尿病肾病。

[0020] 可由本发明的组合物预防或治疗的肾脏疾病可以特别是糖尿病肾病、肾小球肾炎、高血压性肾病、多囊肾病、炎性肾病(特别是肾小球肾炎)、以及由药物或多种毒素诱发的中毒性肾病。临床上,肾脏疾病从广义上说可以特别是起因于与蛋白尿相关的肾小球异常的肾小球肾病以及起因于肾小管系膜异常的肾小管间质性疾病。

[0021] 本发明的药学上可接受的盐特别包括乙酸、苯磺酸、苯甲酸、樟脑磺酸、柠檬酸、乙磺酸、富马酸、葡糖酸、谷氨酸、氢溴酸、盐酸、羟乙磺酸、乳酸、马来酸、苹果酸、扁桃酸、甲磺酸、粘酸、硝酸、扑酸、泛酸、磷酸、琥珀酸、硫酸、酒石酸、对甲苯磺酸和己二酸的盐。所述药学上可接受的盐可以选自乙酸、柠檬酸、盐酸、苹果酸、磷酸、琥珀酸、酒石酸和己二酸的盐,但不限于上述。

[0022] 由化学式1所表示的本发明的化合物、其光学异构体或药学上可接受的盐的水合

物可以包含通过非共价分子间力结合的化学计量量或非化学计量量的水。所述水合物可以包含1当量或更多的水,优选1-5当量的水。这些水合物可以通过从水或包含水的溶剂中结晶由本发明的化学式1或2表示的化合物,其光学异构体或其药学上可接受的盐来制备得到。

[0023] 由化学式1所表示的本发明的化合物、其光学异构体或药学上可接受的盐的溶剂合物可以包含通过非共价分子间力结合的化学计量量或非化学计量量的溶剂。优选地,所述溶剂是不挥发性的、无毒的,并且适用于人类的溶剂的实例特别包括乙醇、甲醇、丙醇和二氯甲烷。

[0024] 由化学式1所表示的化合物、其光学异构体、其药学上可接受的盐或者其水合物或溶剂合物是DPP-IV(二肽基肽酶-IV)抑制剂。DPP-IV抑制剂具有通过抑制GLP-1的降解以维持其活性来降低血糖水平的能力。

[0025] 除了化学式1的化合物外,本发明的药物组合物可以包含其他额外的活性成分。所述额外的活性成分可以具有与化学式1相同或不同的活性。

[0026] 举例来说,所述额外的活性成分可以是抗糖尿病药。因此本发明的药物组合物可以进一步包含其他抗糖尿病药。所述抗糖尿病药可以选自双胍、胰岛素增敏剂(insulin sensitizer)、胰岛素促分泌剂(insulin secretagogue)、 α -葡萄糖苷酶抑制剂和大麻素受体1拮抗剂,但不限于上述。

[0027] 本发明的双胍是一种包括双胍结构的药物,其特别具有促进无氧酵解;在外围区域增强胰岛素活性;抑制葡萄糖从肠道的吸收;以及抑制在肝脏的糖原异生的作用。所述双胍可以选自二甲双胍、丁基双胍、苯乙双胍,但不限于上述。

[0028] 本发明的胰岛素增敏剂是一种通过改善胰岛素机能障碍来起到降低血糖水平的作用的药物,并且其特征在于具有共同的TZD(噻唑烷-二酮)结构。所述胰岛素增敏剂对PPAR(过氧化物酶体增殖蛋白激活受体)起作用。所述胰岛素增敏剂可选自曲格列酮、环格列酮、罗格列酮、吡格列酮和恩格列酮,但不限于上述。

[0029] 本发明的胰岛素促分泌剂是一种促进胰腺的 β -细胞的胰岛素分泌的药物。其可以是一种具有磺酰脲或非磺酰脲结构的药物。优选地,所述胰岛素促分泌剂可以是:具有磺酰脲结构的药物,其选自优降糖(又称为格列本脲)、格列吡嗪、格列齐特、格列美脲、妥拉磺脲、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、glycylamide和格列戊脲;或者具有瑞格列奈或那格列奈的非磺酰脲结构的药物,但不限于上述。

[0030] 本发明的 α -葡萄糖苷酶抑制剂是一种特别通过竞争性地抑制 α -葡萄糖苷酶而具有抑制淀粉和多糖的消化和吸收的功能的药物,所述 α -葡萄糖苷酶是一种肠道内消化酶。所述 α -葡萄糖苷酶抑制剂可以选自阿卡波糖、伏格列波糖、乙格列酯和米格列醇,但不限于上述。

[0031] 本发明的大麻素受体1拮抗剂是一种通过抑制内源性大麻素的过分活性来控制葡萄糖和脂类代谢以及体重和能量平衡的药物。所述大麻素受体1拮抗剂可以选自利莫纳班、奥太纳班、ibinabant和舒立纳班,但不限于上述。

[0032] 并且,举例来说,本发明的组合物的额外的活性成分可以是能够抑制血管紧张素的作用的成分。因此,本发明的药物组合物可以进一步包括血管紧张素转化酶抑制剂或血管紧张素II受体阻断剂。

[0033] 所述血管紧张素转化酶抑制剂可以选自卡托普利、依那普利、贝那普利、咪达普利、赖诺普利、prinosin、雷米普利、莫昔普利、福辛普利和喹那普利,但不限于上述。

[0034] 所述血管紧张素II受体阻断剂可以选自坎地沙坦、依普罗沙坦、厄贝沙坦、氯沙坦、替米沙坦和缬沙坦,但不限于上述。

[0035] 并且,举例来说,本发明的组合物的额外的活性成分可以是抗高血压药。因此,本发明的药物组合物可以进一步包括CCB(钙通道阻断剂)、 β 阻断剂或利尿剂,但不限于上述。

[0036] 在本发明中使用的术语‘药学上可接受的’是指当被给药至包括人类在内的哺乳动物时是生理学上可接受的,并且通常不产生不合适的反应的组合物的分子体和其他成分。

[0037] 本发明的组合物可以进一步包含载体(carrier)。在本发明中所述的术语‘载体’是指与活性化合物一起给药的稀释剂、赋形剂或媒介物(vehicle)。这些药物载体可以是:水;盐水;右旋葡萄糖水溶液;甘油水溶液;和无菌液体例如油,包括石油、动物油、植物油或合成油,例如花生油、大豆油、矿物油和芝麻油。合适的药物载体公开在下述文献中:E.W.Martin著的“Remington’s Pharmaceutical Sciences”,第18版。对于本发明的最优选的载体是进行速释的那些载体,换言之,那些在短时间例如60分钟或更短时间内释放全部或大部分活性成分同时能够快速吸收药物的载体。

[0038] 优选地,由化学式1表示的本发明的化合物、其光学异构体、其药学上可接受的盐或者其水合物或溶剂合物以基于所述组合物总重量的0.1-50.0wt%被包含,但不限于以上。当临床给药时,本发明的组合物可以用于口服或肠道外给药的不同剂型来给药。通常使用的稀释剂或添加剂特别是例如填充剂、增充剂(extender)、粘合剂、润湿剂、崩解剂和表面活性剂可以用于配制。

[0039] 用于口服给药的固体剂型特别包括片剂、丸剂、散剂、颗粒剂和胶囊剂,并且这些固体剂型可以通过向本发明的药物组合物添加至少一种添加剂(特别例如淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖和明胶)来制备。此外,也可以使用润滑剂例如硬脂酸镁和滑石。

[0040] 用于口服给药的液体剂型包括混悬剂、用于内服的液体剂、乳剂和糖浆剂。此外,除了简单的稀释剂例如水和液体石蜡,也可以含有多种添加剂例如湿润剂、甜味剂、调味剂和防腐剂。

[0041] 用于肠胃外给药的剂型包括无菌水溶液剂、非水溶液剂、混悬剂、乳剂、冻干制剂和栓剂。丙二醇、聚乙二醇、植物油例如橄榄油、可注射酯例如油酸乙酯可用作非水溶剂和乳剂。Witepsol、聚乙二醇(macrogol)、吐温61、可可脂、laurinum、甘油和明胶可以用作栓剂的原材料。本发明的药物组合物在肠胃外给药的情况下可以皮下、静脉或肌肉内给药。

[0042] 基于体重70kg的成人,本发明的药物组合物的剂量可以在每日0.5mg到100mg的范围内调整。然而,最佳给药剂量可由本领域技术人员容易地确定,且其可以基于多种因素调整,所述因素特别包括:疾病及其严重程度;组合物中所含的活性成分和其他活性成分的含量;制剂的类型;患者的年龄、体重、健康状况、性别、饮食;给药途径和给药时间;组合物的排泄率;治疗期;同时使用的药物。

[0043] 本发明提供了一种通过向需要治疗的个体给药治疗有效量的由化学式1表示的化合物、其光学异构体、其药学上可接受的盐或者其水合物或溶剂合物来预防或治疗肾脏疾病的方法。

[0044] 术语‘需要治疗的个体’是指包括人类在内的哺乳动物,并且‘给药’是指通过任意合适的方法向患者提供期望的物质。术语‘治疗有效量’是指诱导动物或人的生物学反应或医学反应的活性成分或药物组合物的量,其由研究者、兽医、医生或其他临床医师来考虑。其包括可由此诱导被治疗的疾病或病症的症状缓解的量。对本领域技术人员来说很明显,本发明的活性成分的治疗有效量和给药频率可以根据期望的效果而改变。

[0045] 本发明提供了由化学式1表示的化合物、其光学异构体、其药学上可接受的盐或者其水合物或溶剂合物在制备用于治疗肾脏疾病的药物中的用途。

[0046] **【有益效果】**

[0047] 本发明的用于预防或治疗肾脏疾病的药物组合物包含由化学式1表示的化合物、其光学异构体、其药学上可接受的盐或者其水合物或溶剂合物作为活性成分,具有改善脂类代谢;预防包括肾脏纤维化在内的组织学损伤;和缓解微量白蛋白尿的作用。因此,所述组合物用于治疗肾脏疾病。

【附图说明】

[0048] 图1显示了证明根据糖尿病的阶段,血浆中DPP-IV的活性变化的示意图。

[0049] 图2显示了证明根据糖尿病的阶段,肾脏、肝脏、心脏和脂肪组织中DPP-IV的活性变化的示意图。

[0050] 图3显示了证明在给药DPP-IV抑制剂后,肾脏、肝脏、心脏和脂肪组织中DPP-IV的活性变化的示意图。

[0051] 图4显示了证明在给药DPP-IV抑制剂后,脂类代谢变化的示意图。

[0052] 图5图示了在给药DPP-IV抑制剂后,对脂肪肝(hepatic steatosis)的观察结果。

[0053] 图6是显示在给药DPP-IV抑制剂后微量白蛋白尿变化的示意图。

[0054] 图7显示了在给药DPP-IV抑制剂后肾脏系膜增大的视图;和显示计分结果的图。

[0055] 图8图示了在给药DPP-IV抑制剂后肾脏纤维蛋白的沉积。

[0056] 图9是显示图8中组织学变化的计分的示意图。

[0057] 图10是显示在给药DPP-IV抑制剂后肾脏纤维蛋白表达的示意图。

[0058] 图11是显示在给药DPP-IV抑制剂后肾脏脂类代谢蛋白的表达的示意图。

[0059] 图12图示了在给药DPP-IV抑制剂后肾脏脂类代谢蛋白的PCR结果。

[0060] 在图13中,左侧的示意图显示了在糖尿病肾病的小鼠模型中给药DPP-IV抑制剂后去氧肾上腺素的尿排泄;并且右侧图示了通过免疫染色观察的DPP-IV抑制剂对肾小球的去氧肾上腺素表达的作用。

[0061] 图14显示了证明在诱导肾脏疾病并同时向非糖尿病肾病的小鼠模型给药DPP-IV抑制剂后,对微量白蛋白尿(A)和去氧肾上腺素排泄(B)的作用的示意图。

[0062] 图15显示了证明在诱导肾脏疾病并随后向非糖尿病肾病的小鼠模型给药DPP-IV抑制剂后,对微量白蛋白尿(A)和去氧肾上腺素排泄(B)的作用的示意图。

[0063] 图16图示了用高葡萄糖(high-glucose)、血管紧张素II和脂肪酸刺激肾脏足细胞、近端小管细胞和系膜细胞后,对DPP-IV基因表达的观察结果。

[0064] 图17是显示常规DPP-IV抑制剂(利格列汀(linagliptin)、沙格列汀(saxagliptin)和西格列汀(sitagliptin))和本发明的DPP-IV抑制剂之间的DPP-IV活性抑

制作用的比较的示意图。

[0065] 图18图示了在用高葡萄糖和血管紧张素II刺激肾脏足细胞后,常规DPP-IV抑制剂(利格列汀、沙格列汀和西格列汀)和本发明的DPP-IV抑制剂对去氧肾上腺素表达的作用。

[0066] 【实施方案】

[0067] 参考所附的实施例,会在下文中更全面地描述本发明。然而,本发明可以许多不同形式实施,而不应被解释为受限于本文给出的实施方案。

[0068] 另外,除非另外说明,下文所述的样品和溶剂均购自Sigma-Aldrich Korea。

【实施例】

[0069] <实施例1>评估体重、食物摄入、水摄入、空腹血糖、尿排出量、血红蛋白A1c(HbA1c)值和血压

[0070] (1) 非糖尿病对照组,糖尿病组和DA1229给药组的准备

[0071] 使用6周龄的小鼠。将db/m小鼠设置为非糖尿病对照组(每阶段7只, $n=28$),并将db/db小鼠分为糖尿病组(每阶段7只, $n=28$)和DA1229给药组($n=8$)。将0.3% (W/W, 300mg/kg/日)的DA1229(一种DPP-IV抑制剂)混合到食物中并提供给DA1229给药组,而对糖尿病组仅提供食物。

[0072] (2) 测量体重、食物摄入、水摄入、空腹血糖、尿排出量、血红蛋白A1c值和血压

[0073] 在给药的第0、4、8和12周测量非糖尿病对照组(db/m对照组)和糖尿病组(db/db)的体重、食物摄入、水摄入、空腹血糖、尿排出量、血红蛋白A1c值(HbA1c)和血压(即收缩压, SBP);并在第12周测量DA1229给药组的值。使用DCA2000+ (BayerHealthcare, Wuppertal, Germany)分析仪来测量HbA1c。

[0074] 结果显示在下表1中。

[0075] [表1]

[0076]

参数	周	db/m 对照组	db/db	db/db+DA1229
体重 (g)	0	24.3±0.5	36.1±1.0 ^{***}	N.A.
	4	27.4±1.2	47.2±2.0 ^{***}	N.A.
	8	30.7±0.9	54.9±1.2 ^{***}	N.A.
	12	33.5±1.1	58.9±2.1 ^{***}	57.2±2.5 ^{***}
每日食物摄入 (g)	0	2.36±0.14	5.44±0.34 ^{***}	N.A.
	4	3.36±0.04	7.42±0.09 ^{***}	N.A.
	8	3.90±0.15	7.15±0.09 ^{***}	N.A.
	12	3.02±0.27	6.01±0.03 ^{***}	5.67±0.08 ^{***}
每日水摄入 (g)	0	5.5±0.3	12.9±0.6 ^{***}	N.A.
	4	4.6±0.2	14.8±0.5 ^{***}	N.A.
	8	4.7±0.1	15.1±0.0 ^{***}	N.A.
	12	4.1±0.2	16.8±0.4 ^{***}	8.6±0.4 ^{**#}
空腹血糖 (ml/日)	0	163±15	248±13	N.A.
	4	190±11	472±43 ^{***}	N.A.
	8	168±6	458±22 ^{***}	N.A.
	12	153±6	562±53 ^{***}	466±66 [#]
尿排出量 (ml/日)	0	0.30±0.09	0.42±0.07	N.A.
	4	0.23±0.05	1.84±0.28 ^{***}	N.A.
	8	0.19±0.02	1.04±0.16 [*]	N.A.
	12	0.21±0.02	1.25±0.36 ^{**}	1.07±0.29 ^{**}
HbA1c (%)	0	3.32±0.84	6.18±0.19 ^{**}	N.A.
	4	4.56±0.09	8.90±0.36 ^{***}	N.A.

[0077]

	8	4.50±0.18	9.90±0.37 ^{***}	N.A.
	12	5.14±0.19	9.21±0.43 ^{***}	8.58±0.79 ^{***}
SBP (mmHg)	12	118±16	115±15	124±11

[0078] 在表1中,各值均表示为平均值±SEM,并且在相同时期对各组进行统计分析。*P<0.05;**P<0.01;***P<0.001,与db/m对照组比较;#P<0.05,与db/db比较。

[0079] 与非糖尿病对照组相比,糖尿病组中体重增加;并且食物摄入、水摄入、空腹血糖、尿排出量明显增加。

[0080] 关于其中将DA1229给药12周的DA1229给药组,与糖尿病组相比,在体重、食物摄入和尿排出量方面未显示显著差异。然而,水摄入和空腹血糖明显减少。

[0081] 可以理解为DA1229执行降低血糖和减少葡萄糖排泄的功能。

[0082] <实施例2>评估DPP-IV活性

[0083] DPP-IV(二肽基肽酶IV)是一种肠降血糖素降解酶。肠降血糖素是一种分泌自小肠并促进胰岛素分泌的激素。当DPP-IV活性受到抑制时,肠降血糖素活性得以维持且胰岛素分泌得以促进。

[0084] 因此,评价在血浆和每个器官中的DPP-IV活性,以便确认DPP-IV的活性是否被DA1229有效抑制。按照实施例1(1)的相同方法准备非糖尿病对照组、糖尿病组和DA1229给药组,并用于实验。

[0085] 通过使用荧光光度分析方法(J.Med.Chem.2005,48,141-151)来测量DPP-IV活性,其在之前已经报道。图1显示了血浆中的DPP-IV活性。在糖尿病进展的每个阶段,非糖尿病对照组和糖尿病组的DPP-IV活性未显示显著差异(见图1A)。然而,与非糖尿病对照组和糖尿病组比较,在DPP-IV抑制剂给药组中,在给药第20周观察到DPP-IV活性的明显降低(见图1B)。

[0086] 图2显示了在糖尿病进展的每个阶段,非糖尿病对照组和糖尿病组在肾脏、肝脏、心脏和脂肪组织内的DPP-IV活性。证明在每个器官中DPP-IV活性较高。对于非糖尿病对照组和糖尿病组,在肝脏、心脏和脂肪组织中的DPP-IV活性互相比没有很大不同(见图2B-2D),但在肾脏中,糖尿病组的DPP-IV随糖尿病进展而显著增加。

[0087] 图3显示了在给药第20周时,非糖尿病对照组、糖尿病组和DA1229给药组在肾脏、肝脏、心脏和脂肪组织中的DPP-IV活性。与非糖尿病对照组和糖尿病组相比,DA1229给药组的每个器官中的DPP-IV活性都显著降低,且这种降低在肾脏内是显著的(见图3A)。

[0088] 从上述结果可以理解,DA1229在每个器官都抑制DPP-IV活性,特别地,其在肾脏内有效抑制DPP-IV活性。

[0089] <实施例3>评估脂类代谢

[0090] 在糖尿病患者中,由于脂类代谢的失败,导致血脂倾向于增加而脂类倾向于沉积在肝脏内(即脂肪肝)。进行下述实验来确认DA1229是否改善脂类代谢。按照实施例1(1)的相同方法准备非糖尿病对照组、糖尿病组和DA1229给药组,并用于实验。

[0091] (1) 评估血脂浓度

[0092] 总胆固醇包括酯化胆固醇和非酯化(游离)胆固醇。当LDL-胆固醇的浓度增加时,会产生特别诸如动脉硬化的问题。

[0093] 在给药第12周测量非糖尿病对照组、糖尿病组和DA1229给药组的血浆的脂类的浓度,所述脂类为总胆固醇、甘油三酯、HDL-胆固醇和LDL-胆固醇。在使用GPO-Trinder试剂盒(Sigma,St.Louis,MO,USA)后通过使用ELISA读数器(Micro-Quant,Bio-Tek Instruments,Colmar,France)来测量总胆固醇和甘油三酯的浓度;并且使用TBA-200FR NEO(Toshiba,Japan)来测量HDL-胆固醇和LDL-胆固醇。

[0094] 与非糖尿病对照组相比,糖尿病组的总胆固醇、甘油三酯和LDL-胆固醇浓度增加了约2倍或更多,但观察到通过给药DA1229,这种增加恢复到非糖尿病组的水平(见图4)。

[0095] (2) 评估脂肪肝

[0096] 在给药的12周,将从非糖尿病对照组、糖尿病组和DA1229给药组收集的肝脏组织通过切片机切片,并在乙醇脱水后包埋在石蜡中。将这些切片用苏木精-曙红染色,并使用显微镜(STM6-LM Olympus NDT Inc,USA)观察脂类沉积(见图5)。与非糖尿病对照组相比,糖尿病组的肝脏组织的脂类沉积增加,但在DA1229给药组中观察到这种增加恢复到非

糖尿病对照组的水平。

[0097] 从上述结果可以理解,DA1229具有增加由于糖尿病而降低的脂类代谢的作用。

[0098] <实施例4>评估肾脏功能

[0099] 进行下述实验以确认DA1229的给药是否改善了由于肾脏疾病而下降的肾脏功能。

按照实施例1 (1) 的相同方法准备非糖尿病对照组、糖尿病组和DA1229给药组

[0100] (1) 评估血浆肌酸酐

[0101] 肌酸酐是一种由肾脏分泌的物质,并且证明当在肾脏清除率中出现问题时其在血浆中的浓度增高。

[0102] [表2]

[0103]	参数	周	db/m 对照组	db/db	db/db+DA1229
	血浆肌酸酐 ($\mu\text{mol/L}$)	12	35.0 $\pm$ 4.0	45.0 $\pm$ 6.0	29.0 $\pm$ 2.0 [†]

[0104] 在表2中,各值均表示为 $\pm$ SEM,并且在相同时期对各组进行统计分析。[†] $P < 0.01$,与db/db比较。

[0105] 通过改良的Jaffe方法(Kang YS等人,CCR2antagonism improves insulin resistance,lipid metabolism,and diabetic nephropathy in type 2 diabetic mice.Kidney Int.2010年11月;78(9):883-894,Kang YS等,Visfatin is upregulated in type-2 diabetic rats and targets renal cells.Kidney Int.2010年7月;78(2):170-181),使用TBA-200FR NEO(Toshiba Japan)来测量血浆肌酸酐的浓度。

[0106] 在表2中确认了相对于非糖尿病对照组,糖尿病组的血浆肌酸酐增加,并且DA1229给药组的血浆肌酸酐明显减少。

[0107] (2) 对微量白蛋白尿的观察

[0108] 当糖尿病进展时,发生肾小球破坏和蛋白(白蛋白)排泄的现象,并且微量白蛋白尿是指所述排泄的量较少时的情况。微量白蛋白尿是肾脏疾病的一种初始指标,并随着糖尿病进展肾小球破坏变得更严重。因此,蛋白排泄的量会增加。按照实施例1 (1) 的相同方法准备非糖尿病对照组、糖尿病组和DA1229给药组,并用于实验。

[0109] 在给药的第0、4、8和12周,通过测量非糖尿病对照组、糖尿病组和DA1229给药组在24小时期间白蛋白的尿排泄量来观察微量白蛋白尿。在使用ELISA试剂盒(Shibayagi, Shibukawa, Japan)后通过使用ELISA读数器(Micro-Quant, Bio-Tek Instruments, Colmar, France)来测量白蛋白分泌的量。

[0110] 与非糖尿病对照组相比,糖尿病组中的白蛋白排泄量增加,并且随着糖尿病进一步进展这种增加变得显著。然而,在DA1229给药组中直至第4周才观察到微量白蛋白尿。其在第4周之后被观察到,但白蛋白的尿排泄量远远低于糖尿病组的白蛋白的尿排泄量(见图6)。

[0111] 从上述结果可以理解,由于通过给药DA1229改善了肾脏排泄功能,因而减少了蛋白排泄。

[0112] <实施例5>对肾小球系膜扩张的组织学评估

[0113] 当肾脏疾病中的肾脏破坏进展时,在肾脏内发生系膜扩张。因此,观察非糖尿病对

照组、糖尿病组和DA1229给药组中的肾小球系膜扩张。用按照实施例1(1)相同方法准备的非糖尿病对照组、糖尿病组和DA1229给药组进行实验,并在给药的第12周观察。

[0114] 收集肾小球组织,并通过切片机切片并在乙醇脱水后包埋在石蜡中。将切片用PAS(过碘酸-希夫)染色;使用显微镜(STEM6-LM Olympus NDT Inc,USA)观察(见图7B);并由病理学家计分(见图7A)。

[0115] 与非糖尿病对照组相比,在糖尿病组观察到系膜扩张,但在DA1229给药组中其改善到接近非糖尿病对照组的水平。

[0116] 从上述结果可以理解,DA1229改善肾小球破坏。

[0117] <实施例6>评估肾脏纤维化

[0118] 由于肾脏中纤维蛋白的沉积,因而随着肾脏疾病的进展,肾脏疾病表现出肾脏破坏的症状。

[0119] TGF β 1(转化生长因子 β 1)是诱导肾脏纤维化的细胞因子,而IV型胶原是一种形成纤维组织的基质。PAI-1(纤溶酶原激活物抑制剂-1)诱导血栓形成。这3种蛋白质都是肾脏纤维化的指标。

[0120] 进行下述实验来确认DA1229是否具有抑制肾脏纤维化的作用。用按照实施例1(1)相同方法准备的非糖尿病对照组、糖尿病组和DA1229给药组进行实验,并在给药的第12周观察。

[0121] (1)组织学评价

[0122] 收集肾小球组织,并通过切片机切片并在乙醇脱水后包埋在石蜡中。将切片通过免疫组织化学来染色;使用显微镜(STEM6-LM Olympus NDT Inc,USA)观察在肾脏中沉积的TGF β 1、IV型胶原和PAI-1中的每一种(见图8);并由病理学家计分染色的程度和范围(见图9)。

[0123] 与非糖尿病对照组相比,糖尿病组中的TGF β 1增加,但是在DA1229给药组中这种作用明显降低(见图8A和9)。

[0124] 与非糖尿病对照组相比,糖尿病组中的IV型胶原增加,但是在DA1229给药组中其降低到非糖尿病对照组的水平(见图8B和9)。

[0125] 与非糖尿病对照组相比,糖尿病组中的PAI-1增加,但是在DA1229给药组中其降低到非糖尿病对照组的水平(见图8C和9)。

[0126] (2)评估基因表达

[0127] 观察TGF β 1、IV型胶原和PAI-1的mRNA表达,以便了解纤维蛋白的减少是否以基因表达的水平发生,所述纤维蛋白减少由实施例6(1)确认。从肾脏组织样品提取mRNA,并通过使用Light Cycler 1.5系统(Roche Diagnostics Corporation,Indianapolis,IN,USA)实时PCR设备在包含SYBR Green试剂的PCR容器中扩增。将糖尿病组和非糖尿病对照组中的每个靶基因的表达水平除以 β -肌动蛋白的表达水平的值显示在图10中。

[0128] 与非糖尿病对照组相比,糖尿病组中的TGF β 1的mRNA表达增加,但在DA1229给药组中其明显降低。

[0129] 与非糖尿病对照组相比,糖尿病组中的IV型胶原的mRNA表达增加了两倍或更多,但在DA1229给药组中其明显降低。

[0130] 与非糖尿病对照组相比,糖尿病组中的PAI-1的mRNA表达增加了两倍或更多,但在

DA1229给药组中其明显降低。

[0131] 从上述结果可以理解,DA1229表现出优异的抑制肾脏纤维化的作用。

[0132] <实施例7>评估肾脏脂类代谢

[0133] ABCA1是一种参与来自组织的脂类排泄的蛋白质,而HMG-CoA还原酶是一种参与脂类合成的蛋白质。

[0134] 观察ABCA1基因和HMG-CoA还原酶基因的mRNA表达,以便了解在肾脏中的脂类代谢是否减少,以及给药DA1229是否改善了这种现象。用按照实施例1(1)相同方法准备的非糖尿病对照组、糖尿病组和DA1229给药组进行实验,并在给药的第12周观察。

[0135] 从肾脏组织样品提取mRNA,并通过使用Light Cycler 1.5系统(Roche Diagnostics Corporation,Indianapolis,IN,USA)实时PCR设备在包含SYBR Green试剂的PCR容器中扩增。结果显示在图11和12中。

[0136] 与非糖尿病对照组相比,糖尿病组中的ABCA1的mRNA表达减少,但在DA1229给药组中其明显增加。

[0137] 与非糖尿病对照组相比,糖尿病组中的HMG-CoA还原酶的mRNA表达增加,但在DA1229给药组中其降低到非糖尿病对照组的水平。

[0138] 从上述结果可以理解,DA1229抑制肾脏组织中的脂类沉积并减少脂类合成。

[0139] <实施例8>评估对去氧肾上腺素排泄和去氧肾上腺素表达的作用

[0140] 去氧肾上腺素是一种在形成肾小球过滤膜的足细胞的细胞膜上表达的蛋白质。去氧肾上腺素通过结合到邻近足细胞而形成一种过滤屏障。当由于肾小球破坏而发生蛋白尿时,因为在足细胞中去氧肾上腺素表达的减少,去氧肾上腺素屏障被破坏,因此去氧肾上腺素的尿排泄增加。因此,观察非糖尿病对照组、糖尿病组和DA1229给药组中的去氧肾上腺素尿排泄和肾脏中的去氧肾上腺素表达。用按照实施例1(1)相同方法准备非糖尿病对照组、糖尿病组和DA1229给药组,并用于实验。

[0141] (1) 评估去氧肾上腺素排泄

[0142] 收集非糖尿病对照组、糖尿病组和DA1229给药组各自的尿液,并通过使用EIA试剂盒(Exocell Inc.Philadelphia,PA,USA)来定量尿液中的去氧肾上腺素含量。随后通过肌酸酐排泄(其与排尿体积成正比)来归一化(通过改良的Jaffe方法测量),并显示在图13的左侧图中。如图所示,确认了与非糖尿病对照组相比,糖尿病组中尿液内的去氧肾上腺素含量增加,但是在DA1229给药组中明显降低。

[0143] (2) 评估去氧肾上腺素表达

[0144] 另外,从各组中分离肾脏;分离肾脏组织,用去氧肾上腺素特异抗体来免疫染色,并使用显微镜观察。结果显示在图13的右侧。其证明,与非糖尿病对照组相比,糖尿病组中几乎没有观察到去氧肾上腺素,而在DA1229给药组中的去氧肾上腺素则较多。

[0145] 从上述结果可以理解,由于肾小球去氧肾上腺素屏障的保护,肾小球的结构得以维持,并且去氧肾上腺素的尿排泄得以减少。

[0146] <实施例9>在非糖尿病肾病小鼠模型中观察微量白蛋白尿并评估对去氧肾上腺素排泄的作用

[0147] 进行下述实验,通过准备非糖尿病肾病小鼠模型来确认与血糖水平或糖尿病无关的DA1229对肾脏的作用。

[0148] (1) 非糖尿病肾病小鼠模型的准备

[0149] 通过在注射阿霉素(下文中称为ADX)时诱导肾小球足细胞破坏来产生非糖尿病肾病,所述阿霉素是一种抗癌剂。

[0150] 在单次静脉内注射13mg/kg的ADX后,将30只6周龄的小鼠分为3组(n=10/组)。对于第一组,立即开始给药DA1229,并在肾脏疾病发生和发展时持续。对于第二组,出于在肾脏疾病进展到某种程度后给药DA1229的目的,在单次ADX注射后3周进行DA1229给药。将第三组设置为对照组,没有任何其他处理。将DA1229以0.3% (W/W, 300mg/kg/日) 的与饮食的混合物的形式给药至第一组和第二组。为对照组仅提供食物。在给药的5周测量各组的微量白蛋白尿和去氧肾上腺素排泄。

[0151] (2) 观察微量白蛋白尿并评估对去氧肾上腺素排泄的作用

[0152] 以与实施例4(2)所述方法相同的方式,在给药第3周观察第一组至第三组的微量白蛋白尿(即在尿液中的白蛋白),并以与实施例8中所述方法相同的方式评估对去氧肾上腺素尿液排泄的作用。

[0153] 诱导肾脏疾病与给药DA1229同时进行的第一组的结果显示在图14中(黑条对应于第三组,即对照组;而白条对应于第一组)。在图14中确认,通过给药DA1229,白蛋白的尿液排泄(A)和去氧肾上腺素的尿液排泄(B)都显著减少。

[0154] 在诱导肾脏疾病之后进行DA1229给药的第三组的结果显示在图15中(黑条对应于第三组,即对照组;而白条对应于第一组)。在图15中确认,通过给药DA1229,白蛋白的尿液排泄(A)和去氧肾上腺素的尿液排泄(B)都显著减少。在图15的上侧确认,通过DA1229来减少白蛋白排泄的作用随着时间流逝而变得更加显著。

[0155] 从上述结果可以理解,在由非糖尿病肾小球损害导致的肾脏疾病以及糖尿病肾病中,DA1229都具有保护肾小球的作用。

[0156] <实施例10>评估发生由糖尿病导致的刺激后的肾脏细胞的DPP-IV表达

[0157] 进行下述实验,以确认在糖尿病中发生的刺激是否会使形成肾脏的细胞中的DPP-IV基因表达增加。

[0158] 将高葡萄糖(30mM)、100nM的血管紧张素II或100uM的游离脂肪酸(即棕榈酸)(其类似于糖尿病中产生的刺激物)添加到足细胞、近端小管细胞和系膜细胞(上述这些细胞是形成肾脏组织的细胞),持续48小时;并随后观察DPP-IV基因表达。从获自每种细胞的样品中提取总RNA,并通过使用Light Cycler 1.5系统(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA)实时PCR设备在包含SYBR Green试剂的PCR容器中扩增mRNA。

[0159] 在系膜细胞中没有观察到DPP-IV基因表达的增加,但在足细胞和近端小管细胞中观察到DPP-IV基因表达的增加(见图16)。从上述结果可以理解,在糖尿病肾病中,包括足细胞在内的肾脏细胞的DPP-IV的表达增加。

[0160] <比较例>对DA1229和其他DPP-IV抑制剂的肾脏保护作用的比较

[0161] 将DA1229的肾脏保护作用与其他DPP-IV抑制剂(例如利格列汀、沙格列汀和西格列汀)的作用比较。

[0162] (1) 对在足细胞中的DPP-IV抑制活性的作用之比较

[0163] 在浓度分别为0nM、1nM、10nM和100nM的含有DA1229、利格列汀、沙格列汀或西格列汀的培养基中培养足细胞72小时。之后移除培养基;用磷酸盐缓冲液洗涤足细胞;并通过使

用已报道的荧光光度分析方法(J.Med.Chem.2005,48,141-151.),以与实施例2相同的方式测量DPP-IV活性。

[0164] 在图17中显示,DA1229在足细胞中以剂量依赖的方式抑制DPP-IV活性;且其作用优于利格列汀和西格列汀,与沙格列汀的作用类似。

[0165] (2) 对与糖尿病相同的刺激物后的去氧肾上腺素表达的作用之比较

[0166] 以下观察了DA1229、利格列汀、沙格列汀和西格列汀在葡萄糖和血管紧张素II刺激物下对去氧肾上腺素表达的作用,所述葡萄糖和血管紧张素II刺激物与在糖尿病中产生的刺激相同。

[0167] 将足细胞在含有30mM葡萄糖、100nM血管紧张素II;以及10nM DA1229、10nM利格列汀、1nM沙格列汀和10nM西格列汀中任一者的培养基中培养72小时。之后移除培养基;将细胞裂解;并通过使用多克隆抗体(SantaCruz,SC-19000)经免疫印迹测量细胞内表达的去氧肾上腺素的改变。

[0168] 在图18中确认,相对于用标准葡萄糖(normoglucose)处理的对照组(NG,左一),由于葡萄糖和血管紧张素II的处理(左二)导致去氧肾上腺素的表达减少,但DA1229使去氧肾上腺素表达维持在与对照组相等(左三)。同时,用利格列汀或沙格列汀处理的组去氧肾上腺素表达高于仅用葡萄糖和血管紧张素II处理的组,但远远低于用DA1229处理的组,并且用西格列汀处理的组去氧肾上腺素表达与仅用葡萄糖和血管紧张素II处理的组相比几乎没有不同。

[0169] 从上述结果可以理解,DA1229具有比市售常规DPP4抑制剂(即利格列汀、沙格列汀和西格列汀)更高的肾脏DPP-IV抑制作用;并且具有更好的在肾小球中维持去氧肾上腺素表达的作用,甚至在与糖尿病中产生的刺激相同的情况下。

[0170] **【工业实用性】**

[0171] 本发明的用于预防或治疗肾脏疾病的药物组合物改善脂类代谢、预防包括肾脏纤维化在内的组织学损伤、缓解微量白蛋白尿、并维持肾小球的去氧肾上腺素。因此,所述组合物用于治疗肾脏疾病。

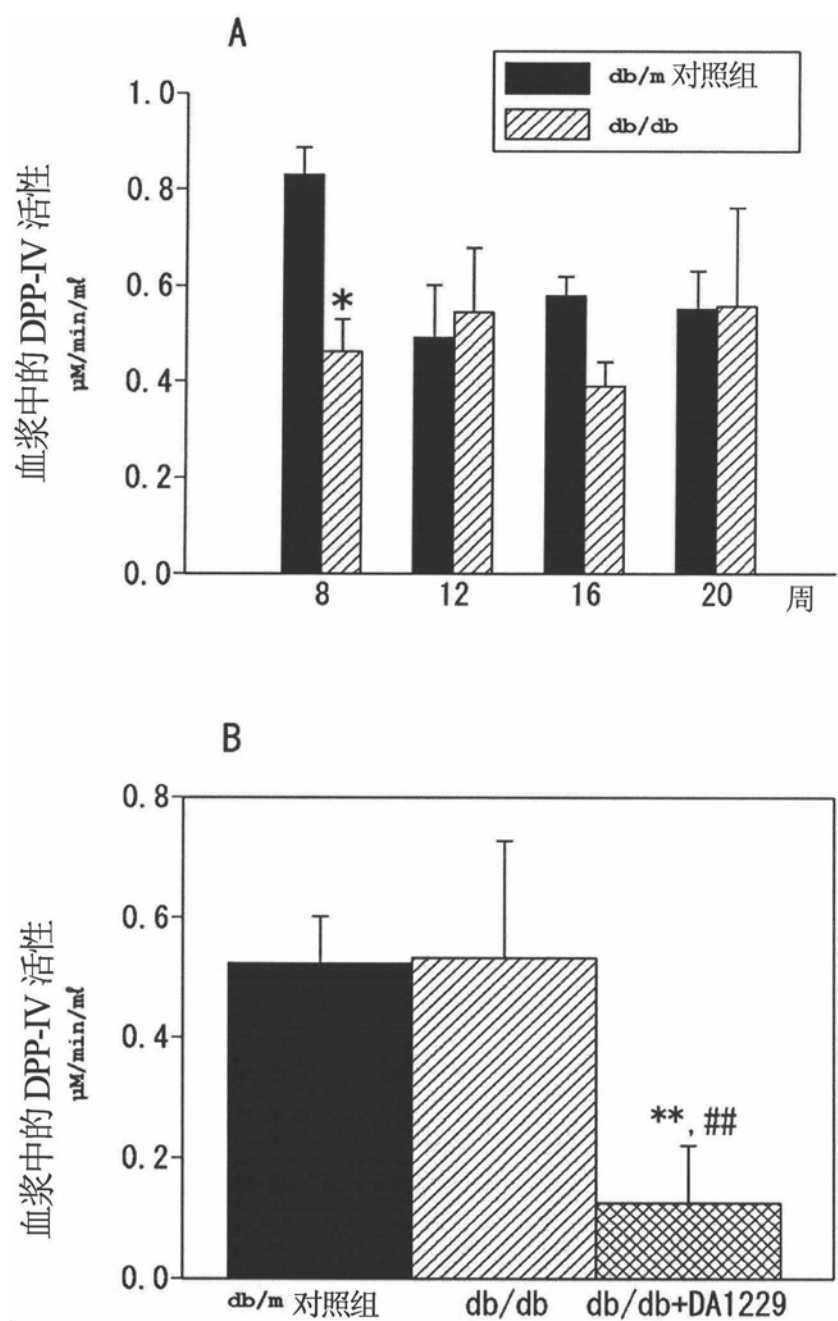


图1

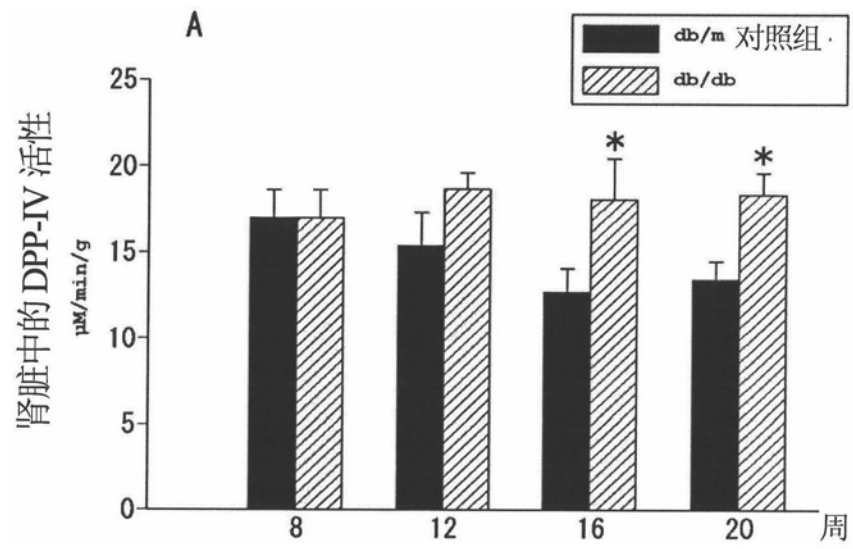


图2a

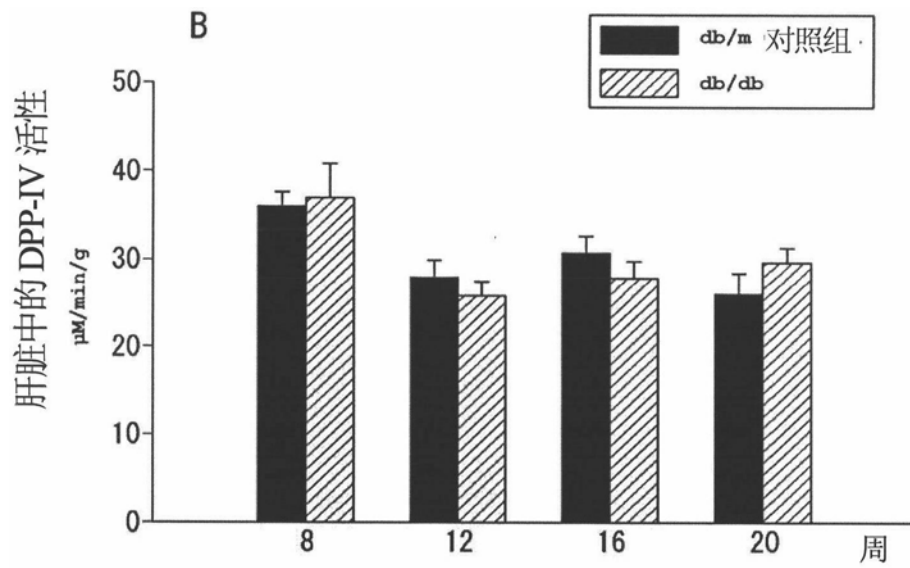


图2b

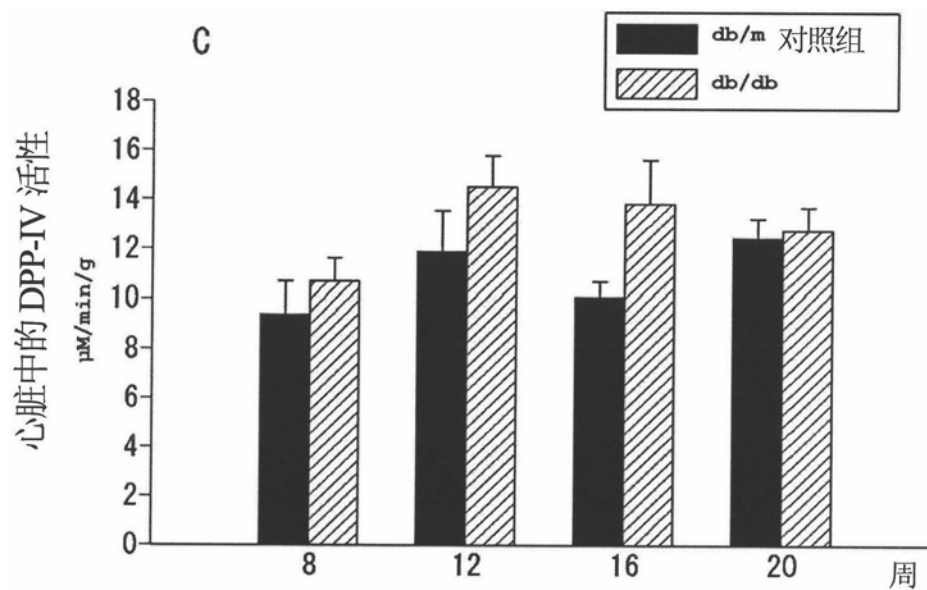


图2c

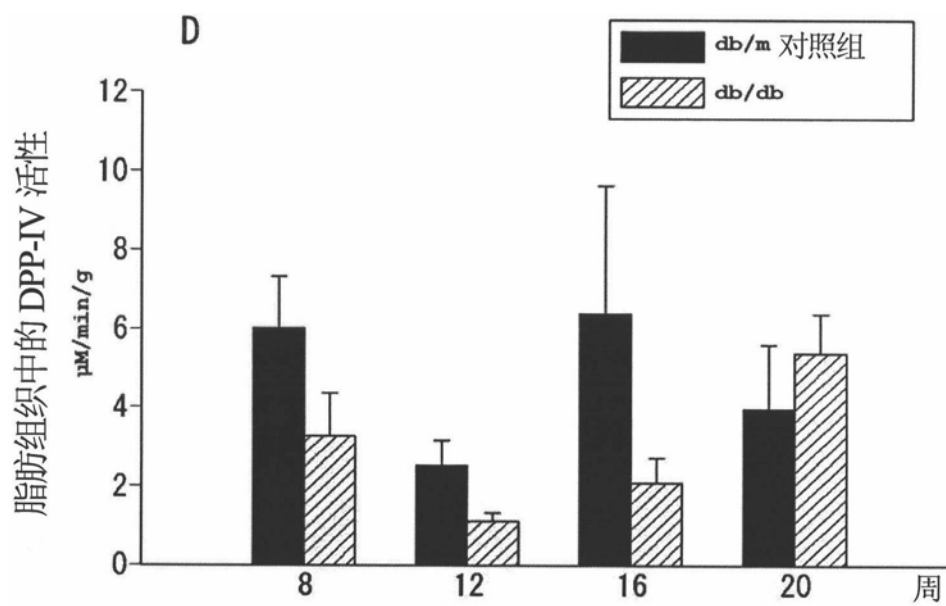


图2d

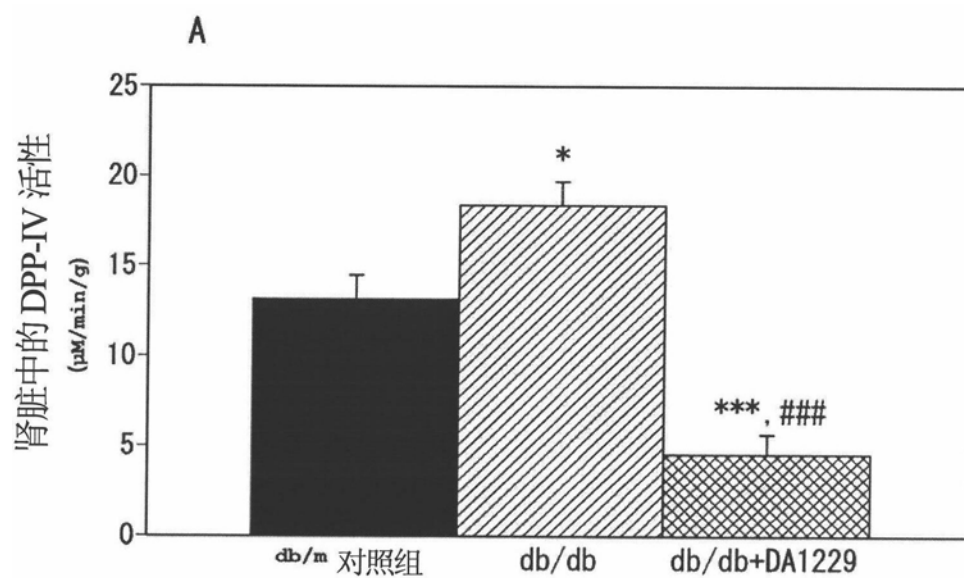


图3a

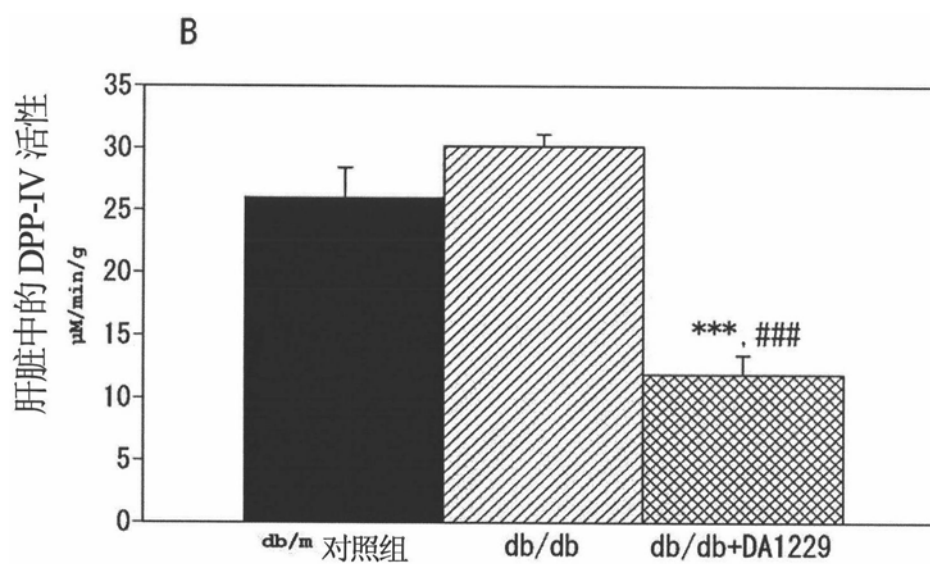


图3b

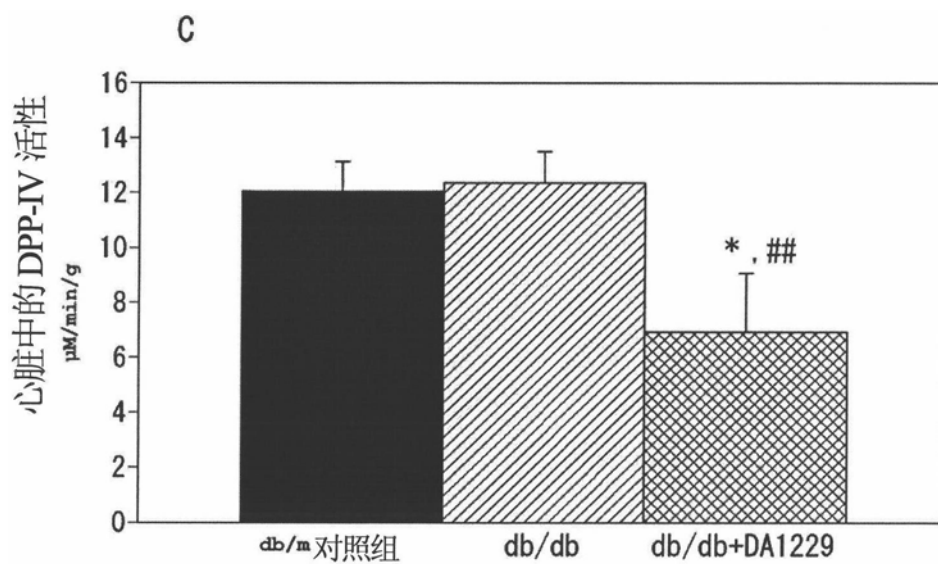


图3c

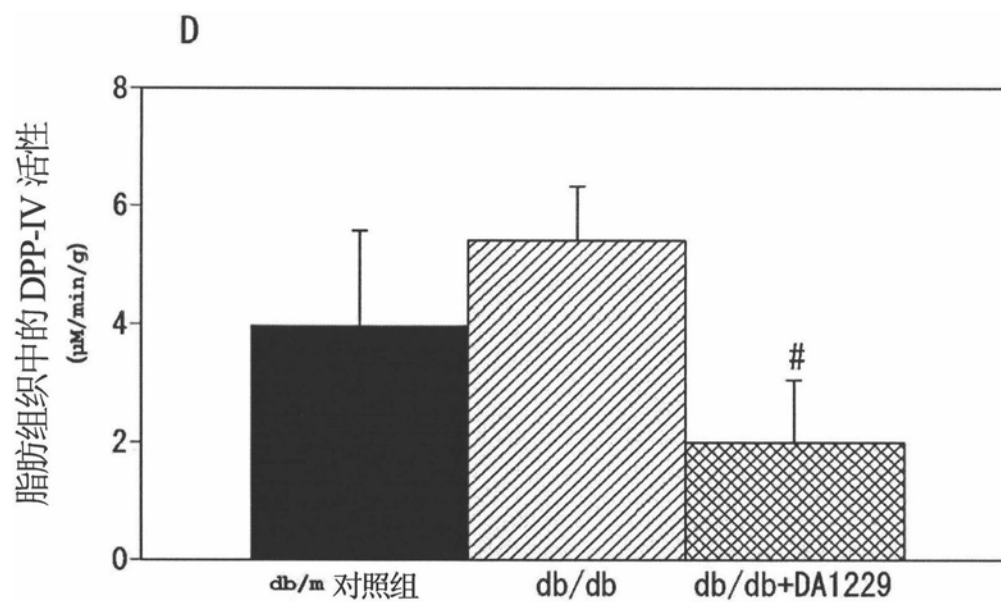


图3d

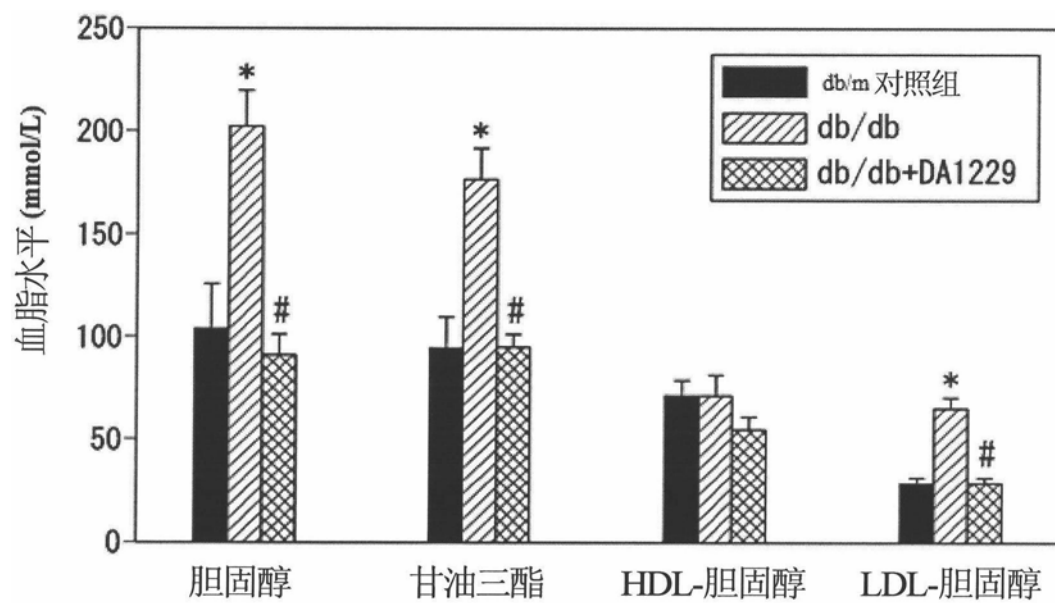


图4

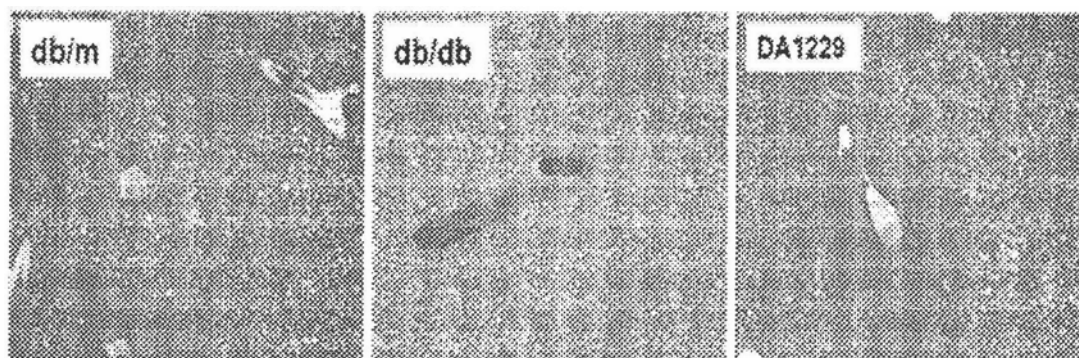


图5

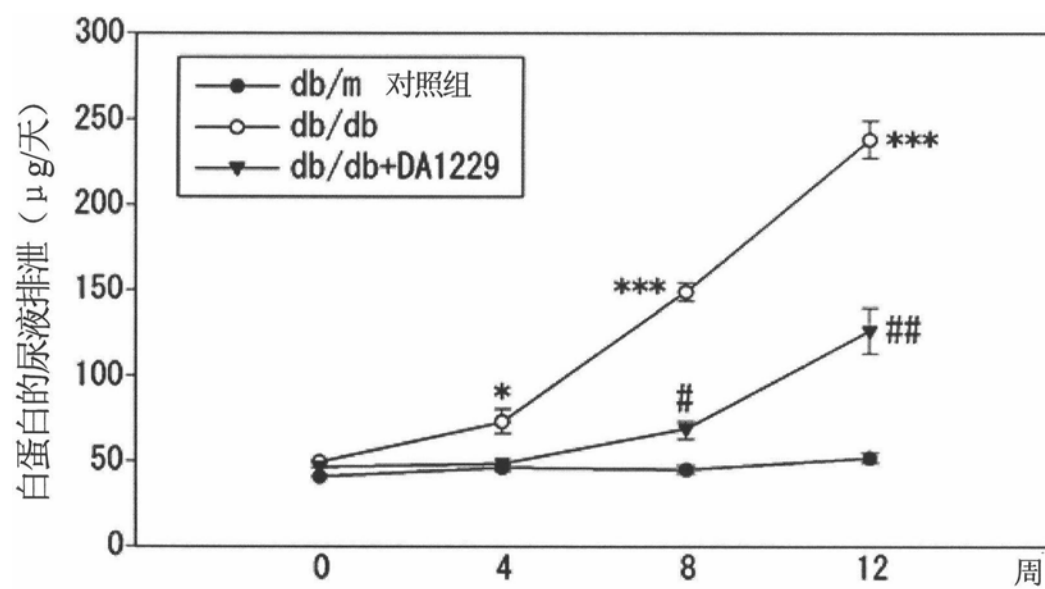


图6

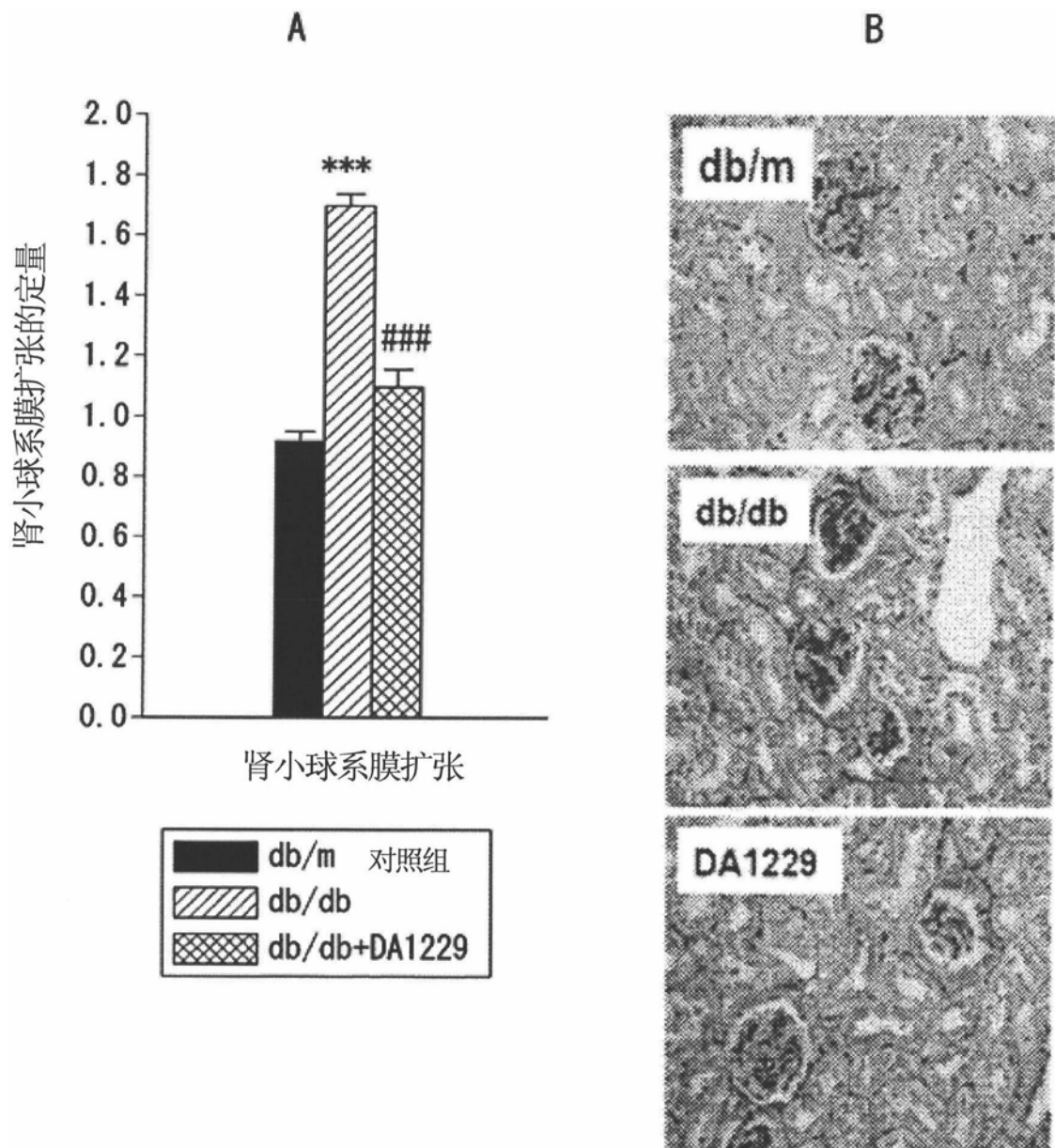


图7

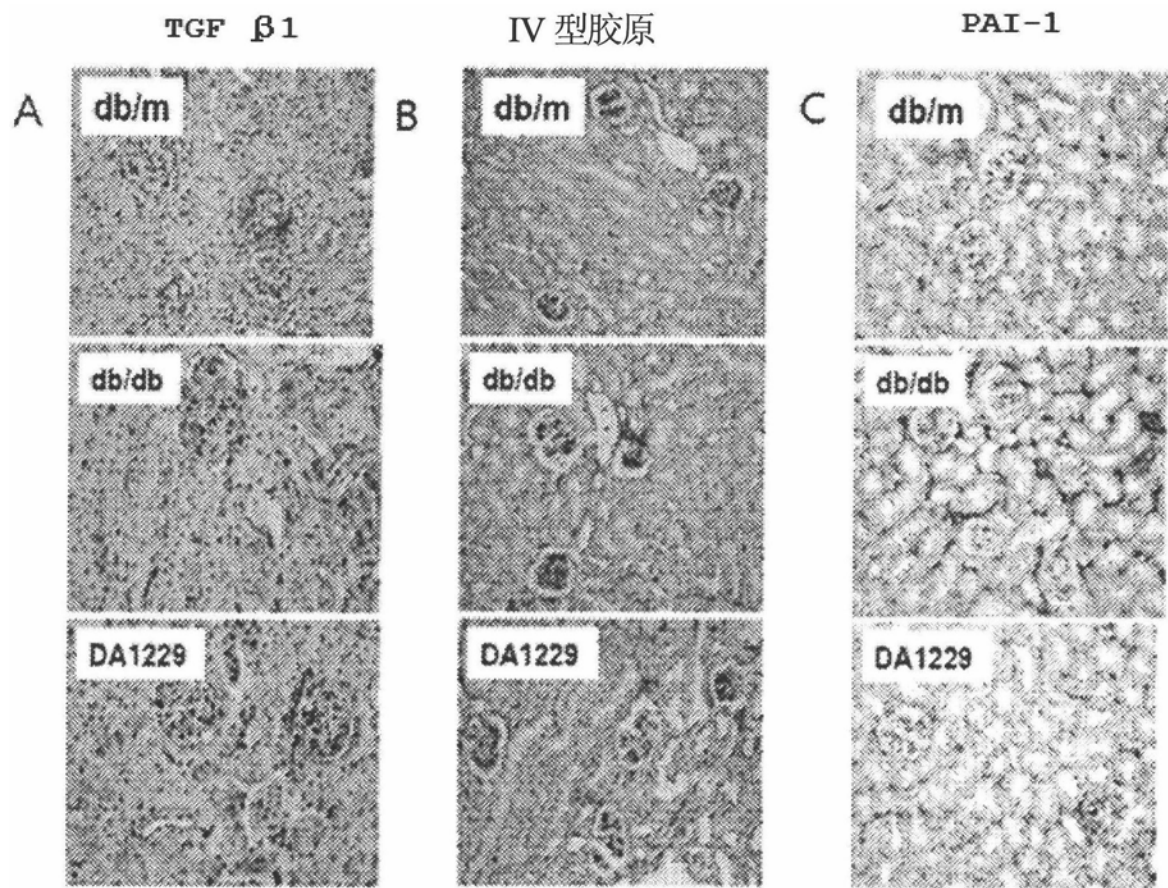


图8

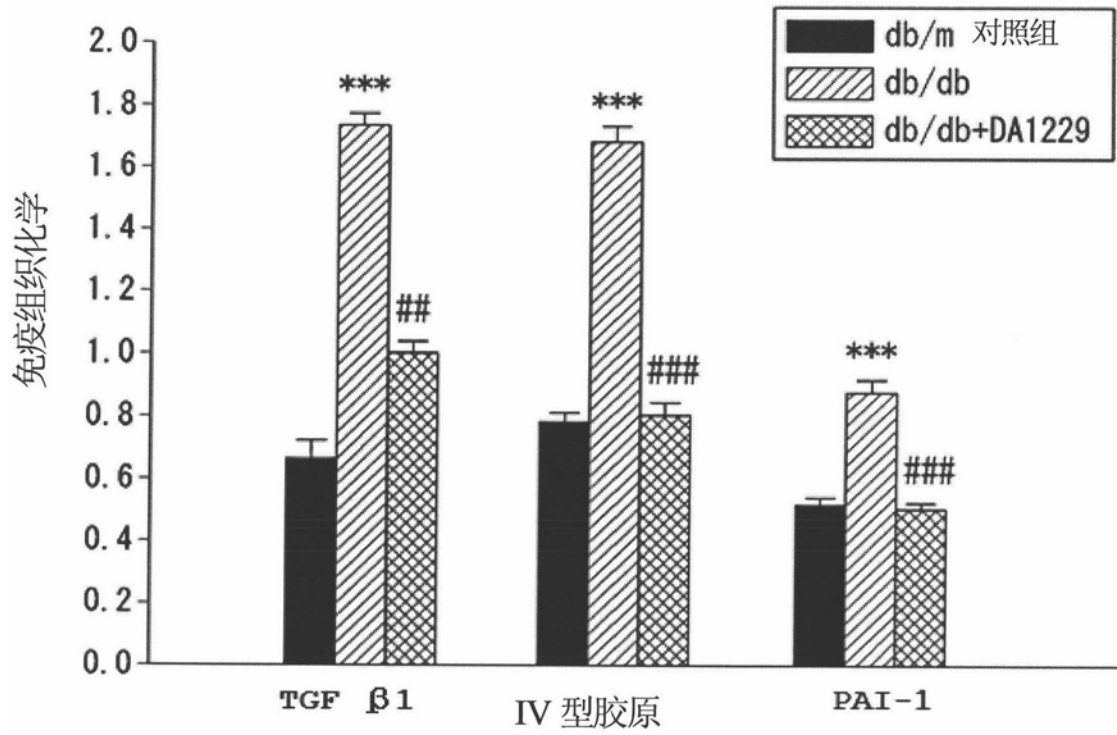


图9

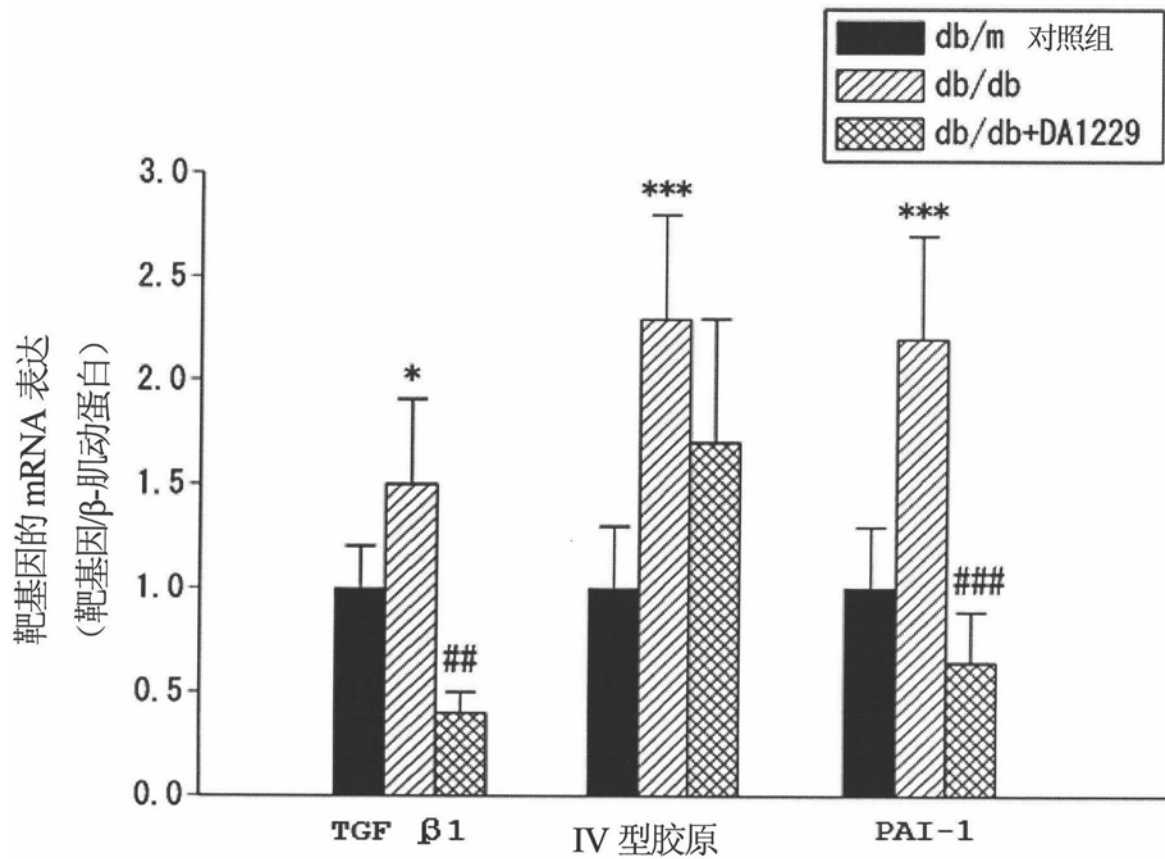


图10

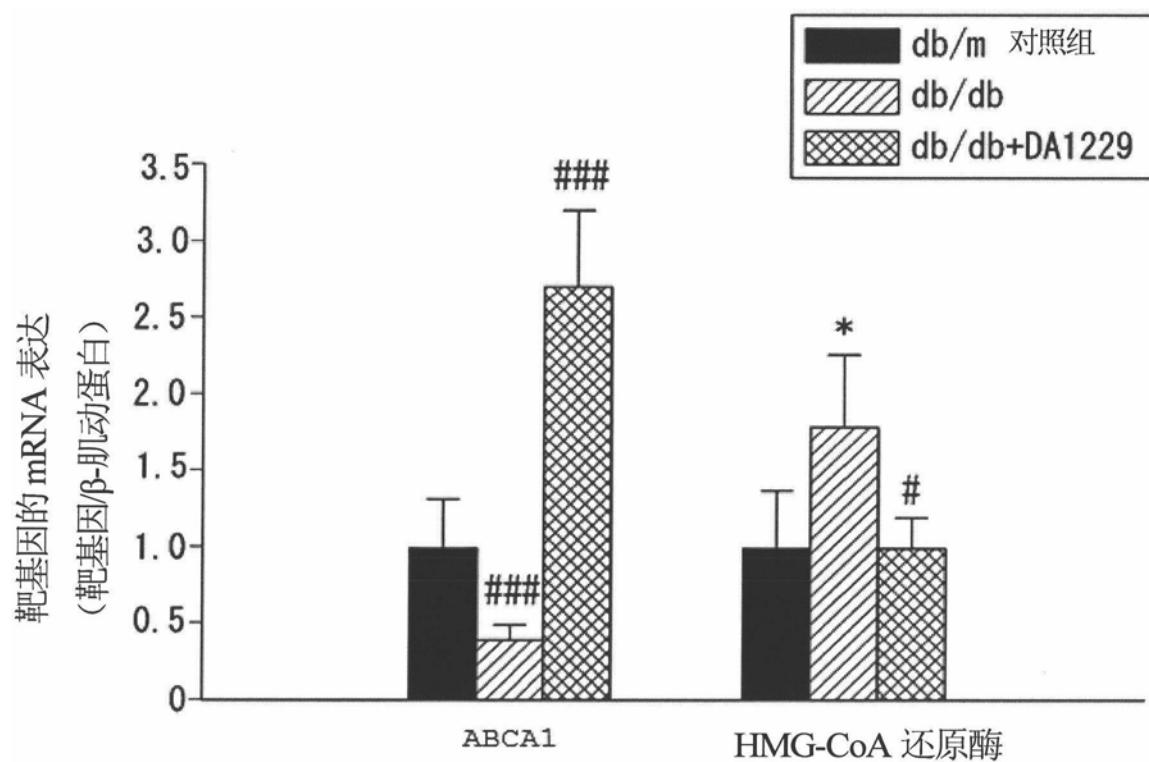


图11

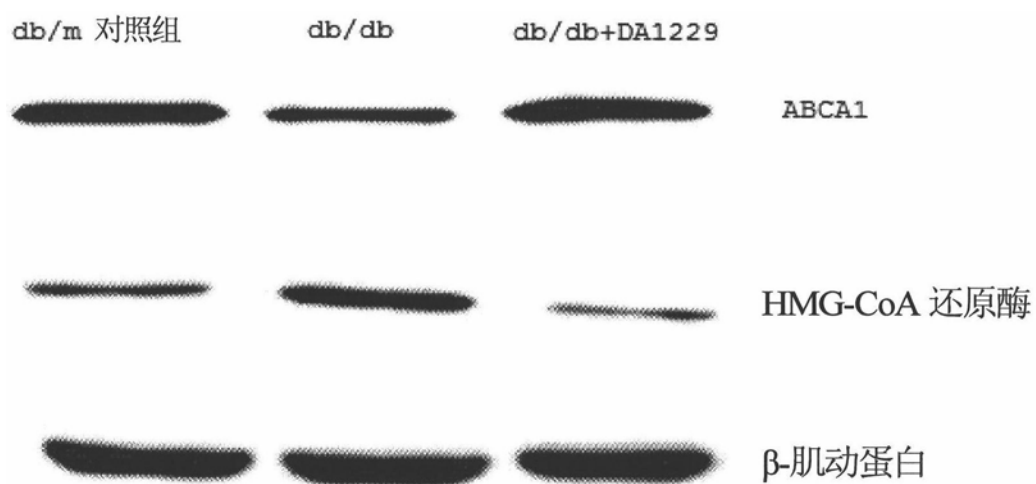


图12

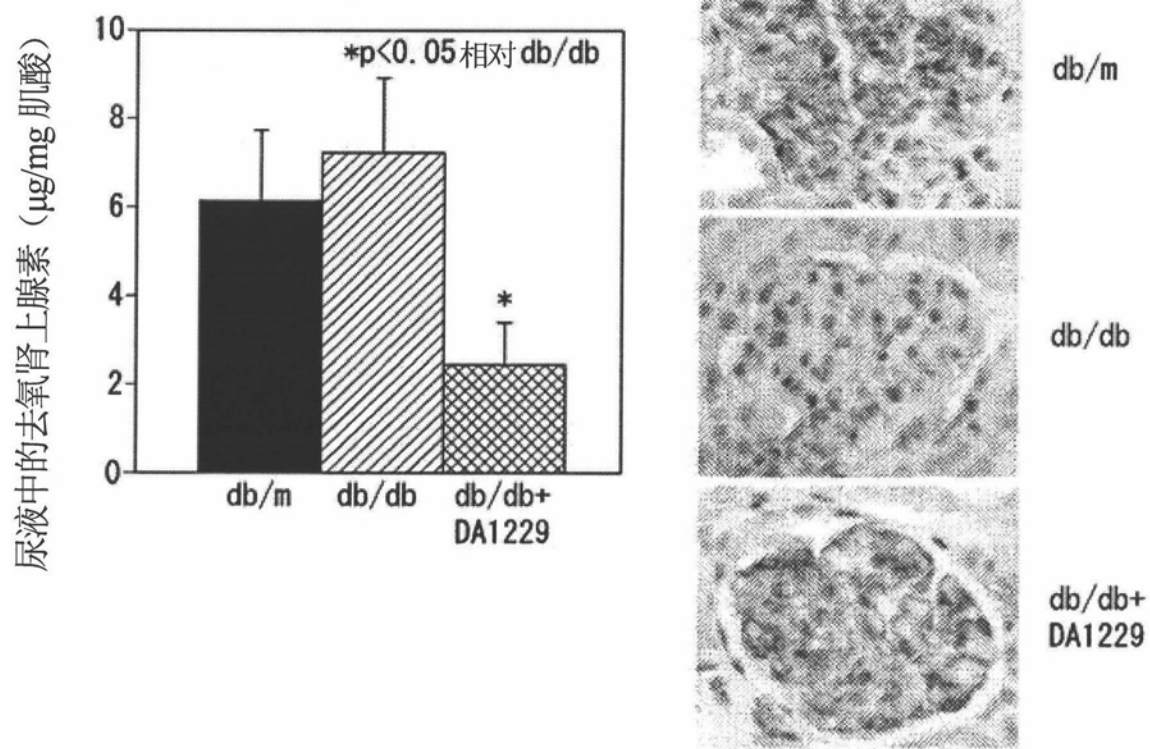


图13

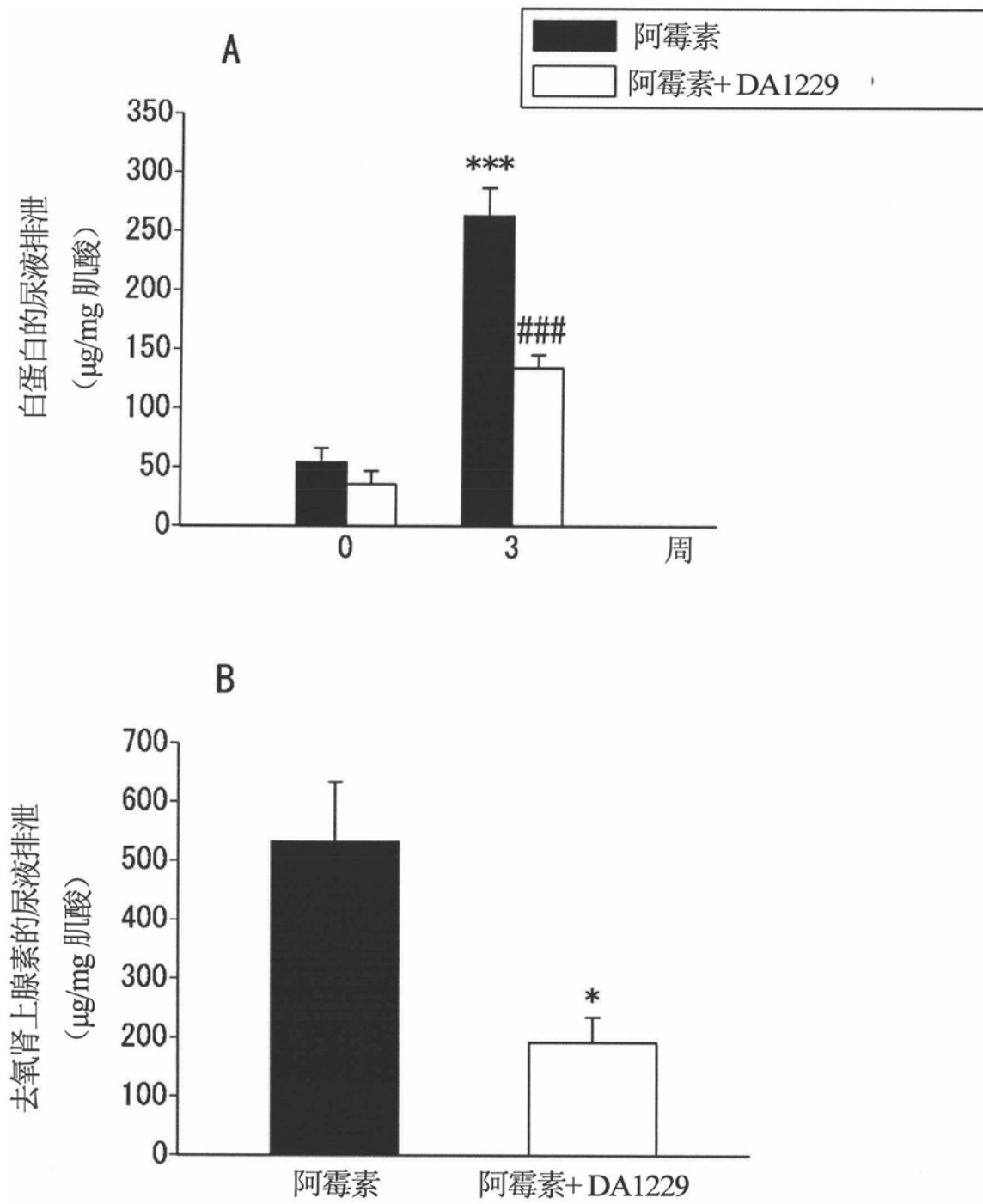


图14

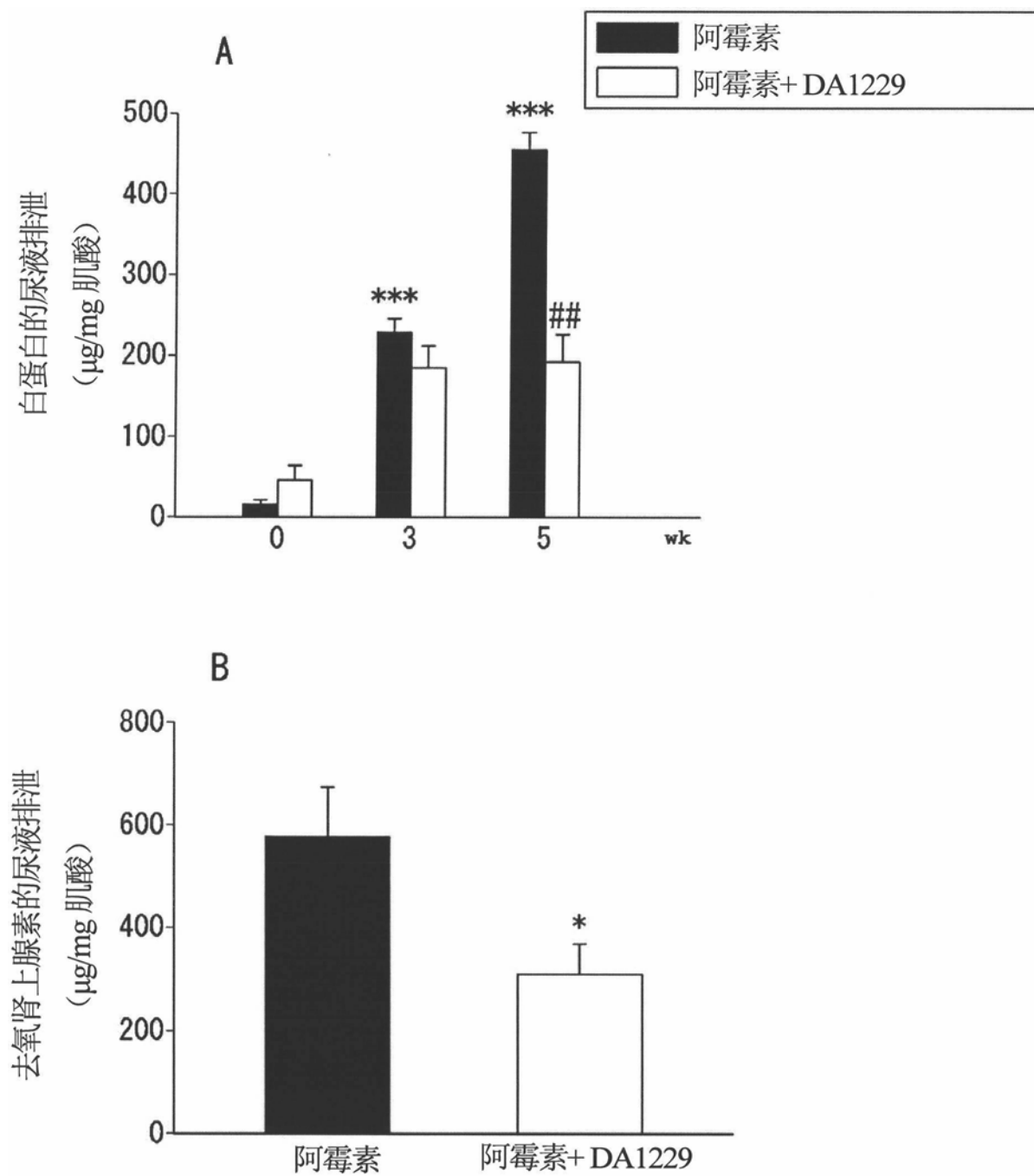


图15

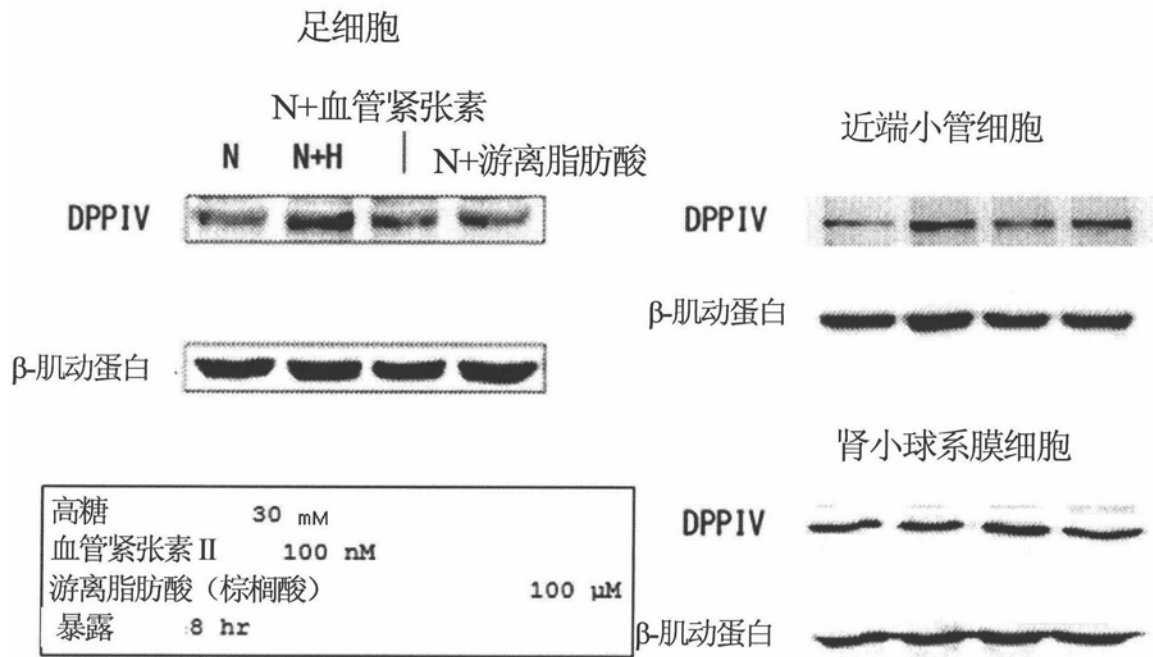


图16

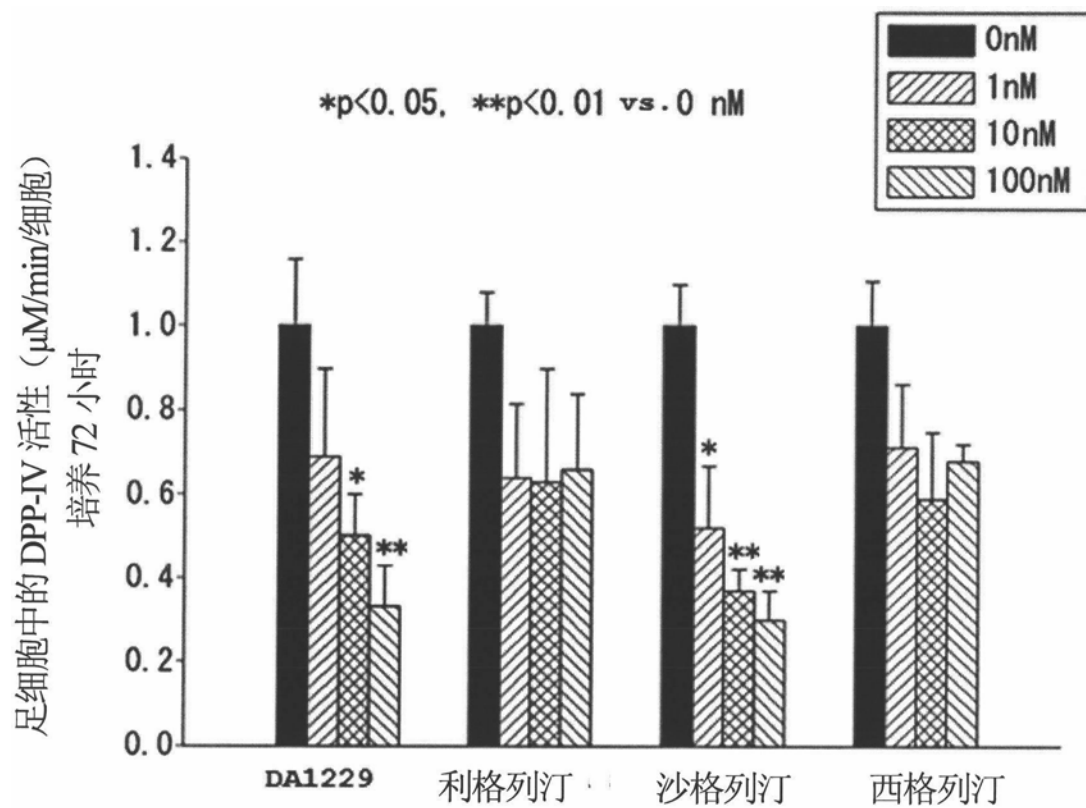


图17

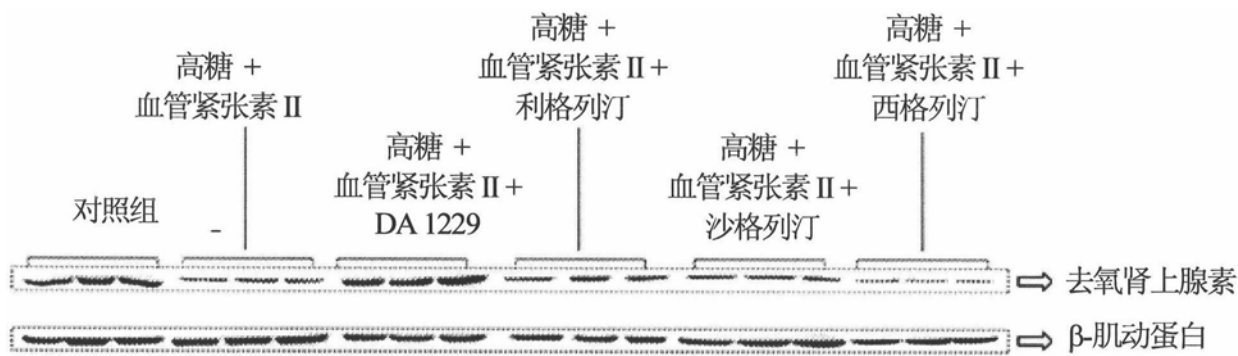


图18