



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110545822 A

(43)申请公布日 2019.12.06

(21)申请号 201880027339.7

(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

(22)申请日 2018.05.01

责任公司 11287

(30)优先权数据

代理人 林斯凯

62/508,730 2017.05.19 US

(51)Int.Cl.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 31/7076(2006.01)

2019.10.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/030371 2018.05.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/212980 EN 2018.11.22

(71)申请人 全技术公司

地址 美国肯塔基州

(72)发明人 Z-J·蓝 R·鲍尔

A·扬尼库里斯

T·R·耶拉姆雷迪

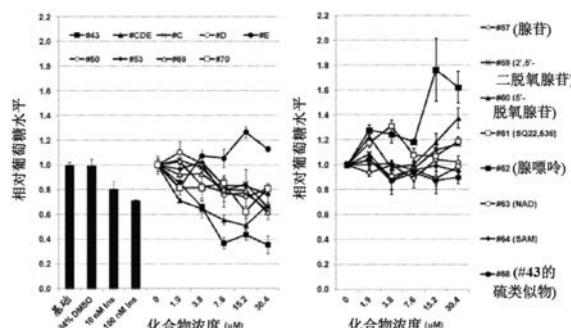
权利要求书5页 说明书70页 附图20页

(54)发明名称

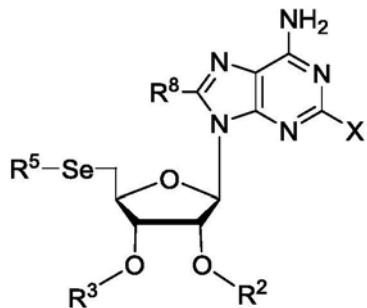
药剂、组合物及其相关方法

(57)摘要

本公开提供了式(1)-(3)的化合物及其组合物和使用方法。本公开还提供了制备所提供的化合物和组合物的方法，以及表征所提供的化合物和组合物的方法。



1. 一种式(1)的化合物：



(1)

或其药学上可接受的盐、前药或异构体，其中

R²和R³中的每一者独立地为H或-C(0)-R，其中每个R独立地为C₁₋₆烷基或3-8元碳环或杂环，其中R²和R³不能都是H；或者R²与R³一起形成-(CH₂)_n-C(0)-(CH₂)_m-，其中n和m中的每一者独立地为0-3，且n+m≤3；R⁵是-C₁₋₆烷基或-C₁₋₆烷基-CH(NH₂)COOH；R⁸是H或卤素；且

X是H或卤素，

其中所述碳环、杂环、-(CH₂)_n-和-(CH₂)_m-部分中的每一者独立地可任选被-OH、卤素、NH₂、CN或C₁₋₆烷基取代1-3次；且每个C₁₋₆烷基部分独立地可任选被-OH、卤素、NH₂或CN取代1-3次。2. 如权利要求1所述的化合物，其中R⁸是H。

3. 如权利要求1或2所述的化合物，其中X是H。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的化合物，其中R⁵是可任选被-OH、卤素、NH₂或CN取代1-3次的-C₁₋₆烷基。5. 如权利要求4所述的化合物，其中R⁵是未取代的-C₁₋₆烷基。6. 如权利要求5所述的化合物，其中R⁵是甲基。7. 如权利要求1至3中任一项所述的化合物，其中R⁵是-C₁₋₆烷基-CH(NH₂)COOH，其中C₁₋₆烷基可任选被-OH、卤素、NH₂或CN取代1-3次。8. 如权利要求7所述的化合物，其中R⁵是-C₁₋₆烷基-CH(NH₂)COOH，其中C₁₋₆烷基是未取代的。9. 如权利要求8所述的化合物，其中R⁵是-CH₂CH₂-CH(NH₂)COOH。10. 如权利要求1至9中任一项所述的化合物，其中R²是H，且R³是-C(0)-R，其中R是C₁₋₆烷基或3-8元碳环或杂环，其中所述碳环和杂环部分中的每一者独立地可任选被-OH、卤素、NH₂、CN或C₁₋₆烷基取代1-3次；且每个C₁₋₆烷基独立地可任选被-OH、卤素、NH₂或CN取代1-3次。11. 如权利要求1至9中任一项所述的化合物，其中R³是H，且R²是-C(0)-R，其中R是C₁₋₆烷基或3-8元碳环或杂环，其中所述碳环和杂环部分中的每一者独立地可任选被-OH、卤素、NH₂、CN或C₁₋₆烷基取代1-3次；且每个C₁₋₆烷基独立地可任选被-OH、卤素、NH₂或CN取代1-3次。12. 如权利要求10或11所述的化合物，其中R是3-8元碳环或杂环，其中所述碳环和杂环部分中的每一者独立地可任选被-OH、卤素、NH₂、CN或C₁₋₆烷基取代1-3次；且每个C₁₋₆烷基独

独立地可任选被-OH、卤素、NH₂或CN取代1-3次。

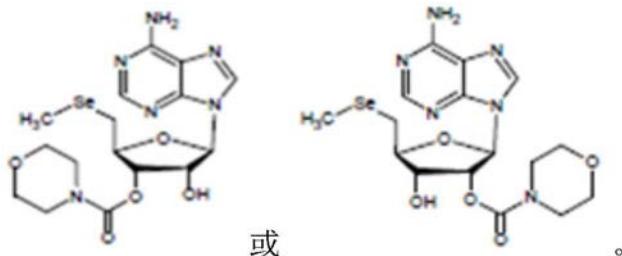
13. 如权利要求12所述的化合物,其中R是3-8元未取代的碳环或未取代的杂环。

14. 如权利要求13所述的化合物,其中R是6元未取代的碳环或未取代的杂环。

15. 如权利要求14所述的化合物,其中R是未取代的杂环。

16. 如权利要求15所述的化合物,其中R是—N—(环己基)。

17. 如权利要求16所述的化合物,其中所述化合物具有下式:



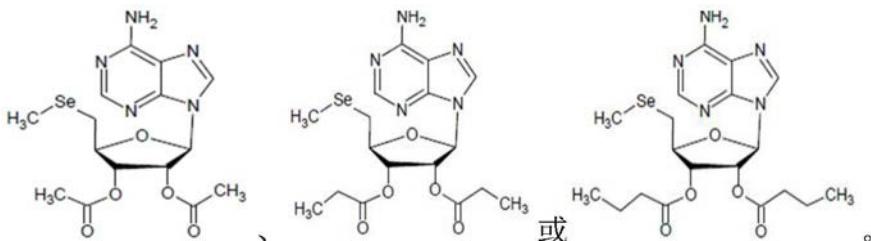
18. 如权利要求1至9中任一项所述的化合物,其中R²和R³中的每一者独立地为C(0)-R,其中每个R独立地为C₁₋₆烷基或3-8元碳环或杂环,其中所述碳环和杂环部分中的每一者独立地可任选被-OH、卤素、NH₂、CN或C₁₋₆烷基取代1-3次;且每个C₁₋₆烷基独立地可任选被-OH、卤素、NH₂或CN取代1-3次。

19. 如权利要求18所述的化合物,其中每个R独立地为可任选被-OH、卤素、NH₂或CN取代1-3次的C₁₋₆烷基。

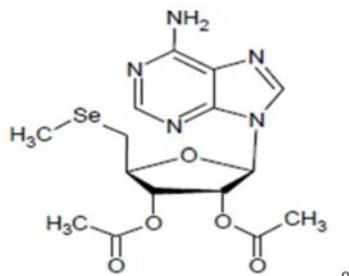
20. 如权利要求19所述的化合物,其中每个R独立地为未取代的C₁₋₆烷基。

21. 如权利要求20所述的化合物,其中R是CH₃。

22. 如权利要求20所述的化合物,其中所述化合物具有下式:



23. 如权利要求21所述的化合物,其中所述化合物具有下式:

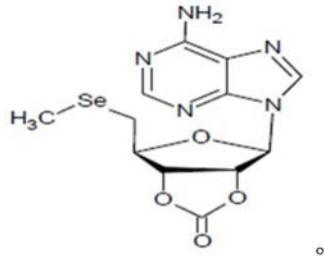


24. 如权利要求1至9中任一项所述的化合物,其中R²与R³一起形成-(CH₂)_n-C(0)-(CH₂)_m-,其中n和m中的每一者独立地为0-3,且n+m≤3,其中所述-(CH₂)_n-和-(CH₂)_m-部分中的每一者独立地可任选被-OH、卤素、NH₂、CN或C₁₋₆烷基取代1-3次;且每个C₁₋₆烷基独立地可任选被-OH、卤素、NH₂或CN取代1-3次。

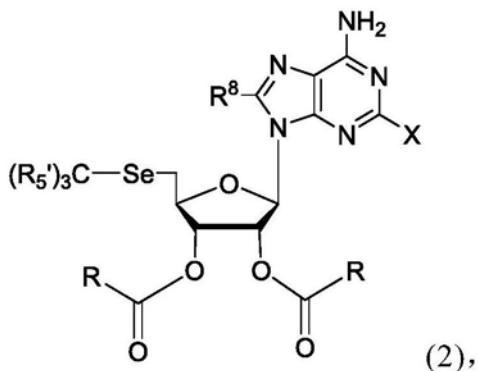
25. 如权利要求24所述的化合物,其中所述-(CH₂)_n-和-(CH₂)_m-部分是未取代的。

26. 如权利要求24所述的化合物,其中n=m=0。

27. 如权利要求26所述的化合物,其中所述化合物具有下式:



28. 如权利要求1所述的化合物,或其药学上可接受的盐、前药或异构体,其中所述化合物具有式(2):



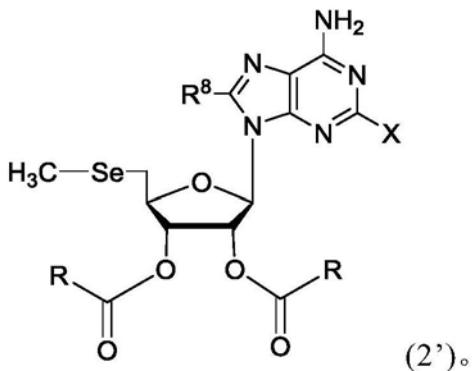
其中R⁸是H或卤素;

X是H或卤素;

每个R_{5'}独立地为H或卤素;且

每个R独立地为C₁₋₆烷基,其中的每一者独立地可任选被卤素取代1-3次。

29. 如权利要求28所述的化合物,其中所述化合物具有式(2'):



30. 如权利要求28或29所述的化合物,其中R⁸是H。

31. 如权利要求28至30中任一项所述的化合物,其中X是H。

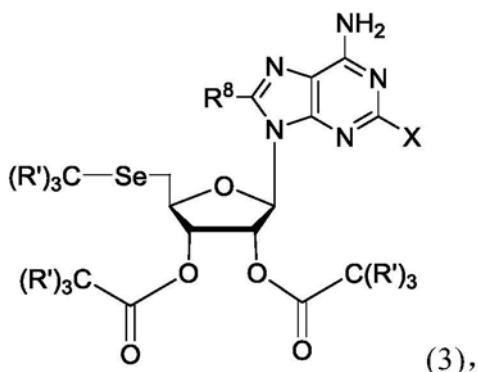
32. 如权利要求28至31中任一项所述的化合物,其中每个R独立地为未取代的C₁₋₆烷基。

33. 如权利要求28至32中任一项所述的化合物,其中每个R独立地为C₁₋₃烷基,其中的每一者独立地可任选被卤素取代1-3次。

34. 如权利要求28至33中任一项所述的化合物,其中每个R独立地为未取代的C₁₋₃烷基。

35. 如权利要求34所述的化合物,其中每个R独立地为-CH₃、-CH₂CH₃或-CH₂CH₂CH₃。

36. 如权利要求1所述的化合物,或其药学上可接受的盐、前药或异构体,其中所述化合物具有式(3) :

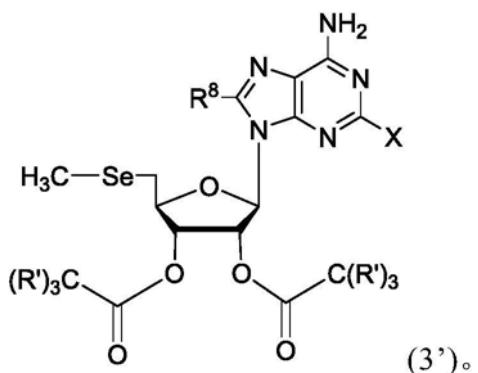


其中R⁸是H或卤素;

X是H或卤素;且

每个R' 独立地为H或卤素。

37. 如权利要求36所述的化合物,其中所述化合物具有式(3') :



38. 如权利要求36或37所述的化合物,其中R⁸是H。

39. 如权利要求36至38中任一项所述的化合物,其中X是H。

40. 如权利要求36至39中任一项所述的化合物,其中每个C(R')₃独立地为CF₃、CHF₂或CH₂F或CH₃。

41. 如权利要求40所述的化合物,其中每个C(R')₃是CH₃。

42. 一种药物组合物,其包含权利要求1至41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

43. 如权利要求42所述的药物组合物,其中所述组合物仅包含单一的式(1)的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

44. 一种治疗胰岛素相关病症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的权利要求1至41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

45. 一种治疗胰岛素抵抗病症的方法,所述方法包括施用治疗有效量的权利要求1至41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

46. 如权利要求44或45所述的方法,其中所述病症是高血糖症、视网膜病变、神经病变、肾病变、高胰岛素血症、多囊卵巢综合征(PCOS)或II型糖尿病相关的血管病症。

47. 一种治疗糖尿病的方法,所述方法包括施用治疗有效量的权利要求1至41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

48. 如权利要求47所述的方法,其中所述糖尿病是I型糖尿病或II型糖尿病。
49. 一种治疗线粒体相关疾病的方法,所述方法包括施用治疗有效量的权利要求1至41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。
50. 如权利要求49所述的方法,其中所述线粒体相关疾病是选自阿尔茨海默氏病、帕金森氏病和肌肉减少症的退行性疾病。
51. 一种抑制葡萄糖产生的方法,所述方法包括施用权利要求1至41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。
52. 一种降低血清HbA1c水平的方法,所述方法包括施用权利要求1至41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。
53. 一种提高葡萄糖耐量的方法,所述方法包括施用权利要求1至41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。
54. 一种抑制G6pc表达的方法,所述方法包括施用权利要求1至41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。
55. 一种增强肝脏中和/或骨骼肌中Pdk1、Akt、AS160和Foxo1的磷酸化的方法,所述方法包括施用权利要求1至41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。
56. 一种增加G1ut4表达的方法,所述方法包括施用权利要求1至41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。
57. 一种在呈胰岛素抵抗状态的受试者中激活和/或恢复胰岛素信号传导的方法,所述方法包括施用权利要求1至41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。
58. 如权利要求57所述的方法,其中所述受试者的特征在于循环胰岛素的显著水平。
59. 如权利要求57所述的方法,其中所述胰岛素抵抗状态的特征在于所述受试者中恰当或适当磷酸化的胰岛素受体减少。
60. 如权利要求57所述的方法,其中所述受试者患有糖尿病和/或糖尿病相关疾病、病症或病状。
61. 一种增强向受试者细胞中的葡萄糖摄取的方法,所述方法包括施用权利要求1至41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。
62. 如权利要求61所述的方法,其中所述细胞是骨骼肌细胞和肝细胞。
63. 一种增强葡萄糖转运蛋白(GLUT)从胞质囊泡向质膜易位以用于葡萄糖摄取的方法,所述方法包括施用权利要求1至41中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。
64. 如权利要求44至63中任一项所述的方法,其中所述施用的步骤包括根据实现施用所述治疗有效量的方案施用包含和/或递送所述化合物的组合物。
65. 如权利要求64所述的方法,其中所述组合物是包含活性药物成分和一种或多种载体或赋形剂的药物组合物,其中所述活性药物成分包含式I的化合物或由式I的化合物组成。
66. 如权利要求64所述的方法,其中所述活性药物成分由所述化合物组成。

药剂、组合物及其相关方法

[0001] 优先权要求

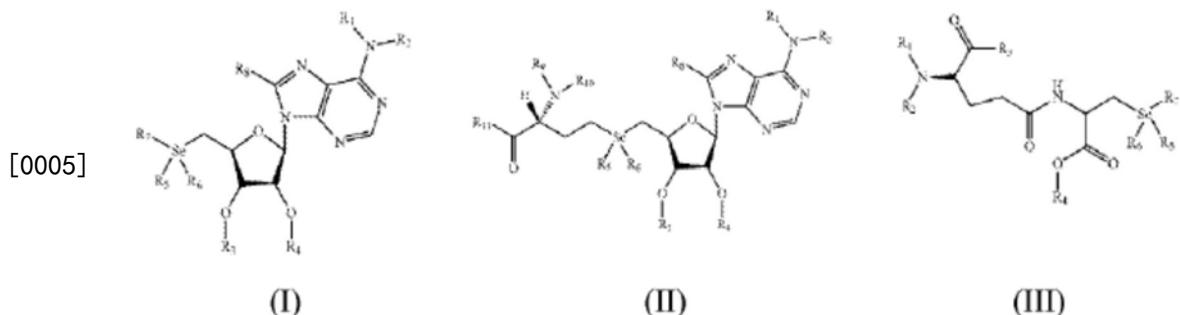
[0002] 本申请要求2017年5月19日提交的系列号为62/508,730的美国临时专利申请的优先权。此优先权申请的全部内容以引用的方式并入本文。

背景技术

[0003] 糖尿病是一组代谢性疾病，其中高血糖水平是长期性的。有各种类型的糖尿病。I型糖尿病起因于胰腺不能产生足够的胰岛素。II型糖尿病始于胰岛素抵抗，胰岛素抵抗是这样一种病状，其中细胞不能对胰岛素适当地做出反应，并且随着疾病的进展可能会导致胰岛素缺乏。全世界有约4亿糖尿病患者，其中II型糖尿病占病例的约90%。胰岛素或胰岛素类似物通常用于治疗I型糖尿病。通常推荐二甲双胍为II型糖尿病的一线疗法。

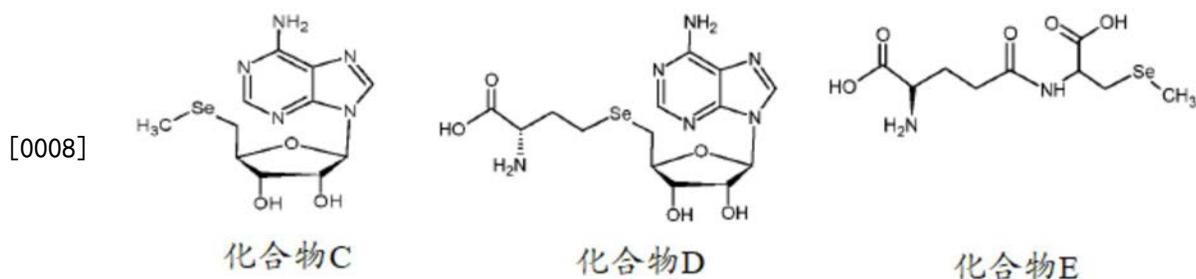
发明内容

[0004] 先前的工作(参见WO2015/137983、US2016/0045533(授权美国专利#9,642,874)和US2016/0082033,它们中的每一者以引用的方式并入本文)已经确定了某些硒有机化合物，这些硒有机化合物在某些疾病模型系统中显示出值得关注和有价值的活性。具体而言，这项工作已经确定了下面所示的式I、II和III的化合物：



[0006] 对此报道称：

[0007] 1.以下三种化合物的组合：5'-甲基硒代腺苷(化合物C,其是式I的化合物)、Se-腺苷基-L-高半胱氨酸(化合物D,其是式II的化合物)和γ-谷氨酰基-甲基硒代-半胱氨酸(化合物E,其是式III的化合物)，



[0009] 但不是单独的化合物,可显著地减弱G6pc表达,从而代表了一种减少肝脏葡萄糖输出的新颖方法(参见WO2015/137983)；

[0010] 2.化合物C和D各自单独地能够提高小鼠骨骼肌成肌细胞C2C12细胞中的线粒体

(MT) 电位,这表明化合物C和D有可能适用于T2DM研究和控制领域(参见W02015/137983) ;

[0011] 3. 化合物C、D和E的组合可在胰岛素抵抗的糖尿病小鼠模型中减少肝脏葡萄糖输出并提高葡萄糖耐量,因此化合物C、D和E的组合可适用于治疗肥胖症、高血糖症和糖尿病(参见US20160045533);

[0012] 4. 化合物C和D可适用于治疗由肾脏或骨骼肌中MT功能的逐渐丧失引起的肌肉减少症(参见W02015/137983);

[0013] 5. 化合物C可增强脑细胞中的糖异生,这可有益于AD中的脑细胞的存活(参见US20160082033);且

[0014] 6. 化合物C和D可抑制AD脑中的Tau过度磷酸化(参见US20160082033)。

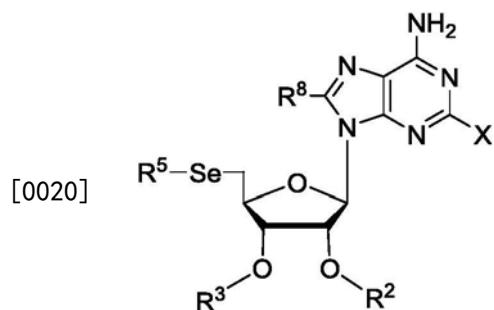
[0015] 因此,先前的工作表明化合物C、D和E可适用于某些情况;具体的教导是,在一些情况下(例如,抑制AD脑中的Tau过度磷酸化,以及增强脑细胞中的糖异生),化合物C或化合物D可能是单独适用的。在其它情况下(例如,减少肝脏葡萄糖输出、提高葡萄糖耐量和/或以其它方式有效治疗肥胖症、高血糖症和/或糖尿病),显示这些化合物不是单独适用的,而是组合有效的。

[0016] 本公开提供与上式I和II的化合物(且具体地是与化合物C和D)共有一定的结构关系的新的含硒化合物,它们意外地在多种情况下单独显示出有效的活性。

[0017] 本公开尤其表明,所提供的化合物在减少胰岛素抵抗的糖尿病受试者的肝脏葡萄糖输出和/或提高葡萄糖耐量方面表现出与CDE组合相当或比其更好的生物活性。本公开还教导所提供的化合物在增强糖异生(例如,在脑细胞中)和/或抑制Tau过度磷酸化(例如,在AD脑中)方面可能具有与化合物C和/或D相当或比其更好的生物活性。

[0018] 本公开提供含有和/或递送这类化合物(和/或其一种或多种降解物和/或活性代谢物)的组合物,以及与这类所提供的化合物有关的各种方法(例如,制备、表征和/或使用)和/或材料(例如,中间体、降解物、代谢物[特别是活性代谢物]等)。在一些实施方案中,所提供的技术涉及和/或特别适用于调节葡萄糖代谢;增强AS160磷酸化以将葡萄糖转运蛋白(GLUT)从胞质囊泡向质膜易位以用于葡萄糖摄取;和/或增进肝脏和骨骼肌两者中的葡萄糖摄取。在一些实施方案中,所提供的技术涉及和/或特别适用于治疗高胰岛素血症、肥胖症、糖尿病、高血糖症、多囊卵巢综合征(PCOS)、阿尔茨海默氏病(AD)和/或肌肉减少症。在一些实施方案中,所提供的技术涉及和/或特别适用于治疗II型糖尿病相关病症,如糖尿病性视网膜病变、肾病变、神经病变和血管病症。

[0019] 在一些实施方案中,本公开提供式(1)的化合物:



[0021] 或其药学上可接受的盐、前药或异构体,其中

[0022] R^2 和 R^3 中的每一者独立地为H或 $-C(O)-R$,其中每个R独立地为C₁₋₆烷基或3-8元碳环或杂环,其中 R^2 和 R^3 不能都是H;

[0023] 或者 R^2 与 R^3 一起形成 $-(CH_2)_n-C(O)-(CH_2)_m-$,其中n和m中的每一者独立地为0-3,且 $n+m \leqslant 3$;

[0024] R^5 是-C₁₋₆烷基或-C₁₋₆烷基-CH(NH₂)COOH;

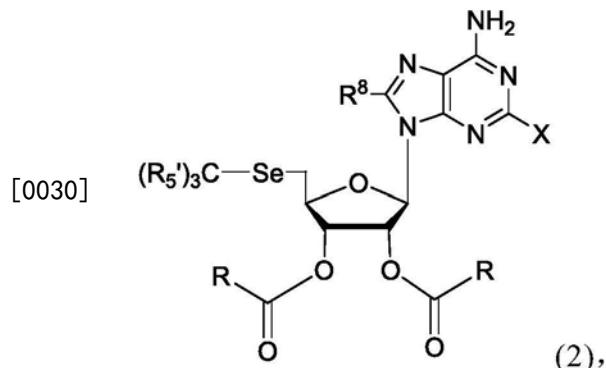
[0025] R^8 是H或卤素;且

[0026] X是H或卤素,

[0027] 其中所述碳环、杂环、 $-(CH_2)_n-$ 和 $-(CH_2)_m-$ 部分中的每一者独立地可任选被-OH、卤素、NH₂、CN或C₁₋₆烷基取代1-3次;且

[0028] 每个C₁₋₆烷基部分独立地可任选被-OH、卤素、NH₂或CN取代1-3次。

[0029] 在一些实施方案中,本公开提供式(2)的化合物:



[0031] 或其药学上可接受的盐、前药或异构体,

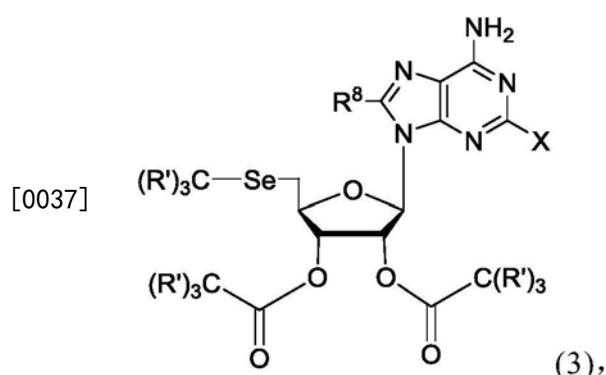
[0032] 其中 R^8 是H或卤素;

[0033] X是H或卤素;

[0034] 每个 R_5' 独立地为H或卤素;且

[0035] 每个R独立地为C₁₋₆烷基,其中的每一者独立地可任选被卤素取代1-3次。

[0036] 在一些实施方案中,本公开提供式(3)的化合物:



[0038] 或其药学上可接受的盐、前药或异构体,

[0039] 其中 R^8 是H或卤素;

[0040] X是H或卤素;且

[0041] 每个 R' 独立地为H或卤素。

[0042] 在一些实施方案中,本公开提供包含或递送式(1)-(3)中任一者的化合物的组合物。在一些实施方案中,本公开提供包含式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的

盐、前药或异构体的组合物。在一些实施方案中,本公开提供递送式(1)-(3)中任一者的化合物的活性部分的组合物。

[0043] 在一些实施方案中,本公开提供通过施用如本文所述的化合物或组合物来治疗疾病、病症或病状的方法。在一些实施方案中,所提供的方法增强AS160磷酸化以将葡萄糖转运蛋白(GLUT)从胞质囊泡向质膜易位以用于葡萄糖摄取。在一些实施方案中,所提供的方法增进肝脏和骨骼肌两者中的葡萄糖摄取。在一些实施方案中,所提供的方法减轻高胰岛素血症而不损害肾功能和/或导致肝损伤。

[0044] 在一些实施方案中,本公开提供治疗胰岛素相关病症的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0045] 在一些实施方案中,本公开提供治疗胰岛素抵抗病症的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0046] 在一些实施方案中,本公开提供治疗葡萄糖代谢病症的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。在一些实施方案中,葡萄糖代谢病症涉及不在正常范围内的血糖水平。在一些实施方案中,葡萄糖代谢病症与葡萄糖摄取和/或转运缺陷有关。在一些实施方案中,葡萄糖代谢病症是糖尿病、甘油醛-3-磷酸脱氢酶缺乏症、糖尿病、高血糖症、高胰岛素血症或低血糖症。

[0047] 在一些实施方案中,本公开提供治疗葡萄糖转运的病症的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。在一些实施方案中,葡萄糖转运的病症是葡萄糖-半乳糖吸收不良、Fanconi-Bickel综合征或De Vivo病(GLUT1缺陷综合征(GLUT1DS))。

[0048] 在一些实施方案中,本公开提供治疗肥胖症的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0049] 在一些实施方案中,本公开提供治疗糖尿病的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0050] 在一些实施方案中,本公开提供治疗高血糖症的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0051] 在一些实施方案中,本公开提供治疗多囊卵巢综合征(PCOS)的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0052] 在一些实施方案中,本公开提供治疗阿尔茨海默氏病(AD)的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0053] 在一些实施方案中,本公开提供治疗肌肉减少症的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0054] 在一些实施方案中,本公开提供抑制葡萄糖产生的方法,包括施用式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0055] 在一些实施方案中,本公开提供提高葡萄糖耐量的方法,包括施用式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0056] 在一些实施方案中,本公开提供在呈胰岛素抵抗状态的受试者中激活和/或恢复胰岛素受体功能及其下游信号传导的方法,包括施用式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0057] 在一些实施方案中,本公开提供治疗线粒体相关疾病(例如,由线粒体功能失调引起)的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。在一些实施方案中,线粒体相关疾病可以是退行性疾病(例如,癌症、心血管疾病和心力衰竭、2型糖尿病、阿尔茨海默氏和帕金森氏病、脂肪肝病、白内障、骨质疏松症、肌肉萎缩如肌肉减少症、睡眠障碍和炎性疾病,如银屑病、关节炎和结肠炎)。在一些实施方案中,本公开提供增强线粒体功能的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0058] 在一些实施方案中,本公开提供增强脑中的糖异生的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。在一些实施方案中,所提供的方法增加脑中的葡萄糖摄取。在一些实施方案中,所提供的方法用于维持或恢复脑功能(包括记忆和学习)。

[0059] 在一些实施方案中,本公开提供制备式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体的方法。

[0060] 在一些实施方案中,本公开提供表征式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体的方法。

[0061] 在一些实施方案中,本公开提供制备如本文所述的组合物的方法。

[0062] 在一些实施方案中,本公开提供表征如本文所述的组合物的方法。

附图说明

[0063] 图1.胰岛素和纯化合物(表1中所列)对HepG2细胞中的葡萄糖产生的影响。在无血清葡萄糖产生培养基中用0.24%DMSO(测试化合物溶剂的最大体积)、胰岛素或所列化合物处理细胞48小时。如上所述通过细胞数将数据标准化,并以每组至少3个样品的平均值±SEM给出。

[0064] 图2.化合物#43和二甲双胍在HepG2和H4IIE细胞两者中的效力比较。在无血清葡萄糖产生培养基中用0.24%DMSO(化合物#43溶剂的最大体积)、胰岛素、化合物#43和二甲双胍处理HepG2细胞48小时,同时处理大鼠肝细胞24小时。通过每个样品中的细胞数将培养基中的葡萄糖水平标准化。数据以每组3个与8个之间的样品的平均值±SEM给出。

[0065] 图3.化合物#C、#50和#43对长期处理后Lepr^{db/db}小鼠中的血糖水平和血清HbA1c水平的差别影响。从38日龄开始,每天以每千克体重25μg每种化合物的硒的剂量对Lepr^{db/db}小鼠腹膜内注射盐水(含有0.2%化合物溶剂DMSO)、化合物#C、#50和#43。在小鼠81日龄时,使用血糖仪测定过夜空腹小鼠的血糖水平。出生90天时对小鼠测定血清HbA1c水平。将经化合物#C、#50和#43处理的小鼠中的HbA1c水平除以经盐水处理的小鼠中的平均HbA1c水平后得到相对HbA1c水平。数据以指示动物数的平均值±SEM给出。通过比较处理与对照/盐水组得出P值。

[0066] 图4.化合物#43及其硫类似物#68对长期处理后Lepr^{db/db}小鼠中的血糖水平和HbA1c水平的影响。从38日龄开始每天对Lepr^{db/db}小鼠腹膜内注射盐水(含有0.2%化合物溶剂DMSO)、化合物#43和#68,剂量是每千克体重25μg硒或硫(分别为化合物#43(0.136mg)或化合物#68(0.298mg))。在小鼠128日龄时,测定过夜空腹小鼠的血糖和HbA1c水平。将经化合物#43和#68处理的小鼠中的HbA1c水平除以经盐水处理的小鼠中的平均HbA1c水平得到

相对HbA1c水平。数据以指示动物数的平均值±SEM给出。由实验室中的4月龄野生型C57雄性小鼠得到非糖尿病/肥胖小鼠(在条形图中以符号#指示)中的空腹血糖水平。条形图中的不同字母指示小于0.05的P值。

[0067] 图5.化合物#43、#69和#70对长期处理后的Lepr^{db/db}小鼠中的空腹血糖和HbA1c水平的差别影响。对雄性41日龄Lepr^{db/db}小鼠每天以每千克体重25μg每种化合物的硒的剂量腹膜内注射盐水(含有0.2%化合物溶剂DMSO)、化合物#43(0.136mg)、#69(0.145mg)和#70(0.153mg),持续43天(用于血糖测定)和90天(用于HbA1c测定),空腹过夜,然后进行血糖分析(使用血糖仪)或血液HbA1c测定。数据以指示动物数的平均值±SEM给出。通过比较处理与对照/盐水组得出P值。

[0068] 图6.化合物#43急性处理导致Lepr^{db/db}雄性小鼠中的血糖水平降低。使8-10周龄Lepr^{db/db}雄性小鼠空腹过夜,然后腹膜内注射盐水(含有0.2%DMSO,化合物#43储备溶剂的最大注射体积);0.0054、0.054、0.54和5.4mg化合物#43/kg体重。检查Lepr^{db/db}小鼠临注射前及注射后1、2、3、5和8小时(在空腹条件下,但可自由饮水)的血糖水平。个别小鼠中降低的葡萄糖水平是通过从注射后每个时间段的血糖水平中减去临注射前的葡萄糖水平得到的。数据以指示动物数的平均值±SEM给出。当与DMSO/盐水注射的相应时间点相比时,除了所示的与0.0054mg/kg BW处理的早期时间点有关的P值以外,所有其它的减少都是显著的(P<0.05)。

[0069] 图7.化合物#43急性处理降低随意喂养条件下的Lepr^{db/db}雄性小鼠中的血糖水平。在以5.4mg/kg体重的剂量腹膜内注射盐水(含有0.2%化合物溶剂DMSO)或化合物#43之前和之后24小时测定可自由获取食物和水的6周龄Lepr^{db/db}雄性小鼠的血糖水平。通过组内所有五只小鼠的平均葡萄糖水平将i.p.注射前的相对血糖水平标准化,并称之为100%。24小时注射后,将每只小鼠中的相对血糖水平通过其注射前的葡萄糖水平来标准化。不同的字母代表组间的统计学显著差异(P<0.05)。

[0070] 图8.化合物#43长期处理提高Lepr^{db/db}小鼠中的葡萄糖耐量。A-B.每天对38日龄Lepr^{db/db}小鼠腹膜内注射(A)盐水(含有0.2%化合物溶剂DMSO)、化合物#43、化合物#C和化合物#50,持续43天,或者注射(B)化合物#68或化合物#43,持续60天。C.每天对雄性41日龄Lepr^{db/db}小鼠腹膜内注射盐水(含有0.2%化合物溶剂DMSO)、化合物#43、化合物#69和化合物#70,持续43天。所有列出的化合物的每日注射剂量是每千克体重每种测试化合物为25μg硒或硫。在治疗结束时,使这些小鼠空腹过夜,注射葡萄糖(2g/kg体重),并使用最大读数为600mg/dL的血糖仪测量临葡萄糖注射前(被称为零时间点)及葡萄糖注射后0.25小时、0.5小时、1小时和2小时的血糖水平。超过此限值的葡萄糖水平被记录为600mg/dL。数据以指示动物数的平均值±SEM给出。当与在相同时间点(A、C)经盐水处理或(B)经化合物#68处理的小鼠相比时,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。

[0071] 图9.用化合物#43长期处理后Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中减弱的G6pc mRNA。每天以每千克体重25μg每种化合物的硒的剂量对出生后第38天的Lepr^{db/db}小鼠腹膜内注射盐水(含有0.2%化合物溶剂DMSO)、化合物#50和#43,持续52天。对从这些经化合物处理的小鼠中分离的肝脏RNA进行QRT-PCR。通过Actb mRNA水平将每个样品中的G6pc mRNA水平标准化,并以每组五只小鼠的平均值±SEM给出数据。P值是相对于盐水组。

[0072] 图10.化合物#43抑制AML-12和人HepG2细胞中的基础G6pc/G6PC表达,以及化合

物#43和胰岛素两者在抑制AML-12细胞中的G6pc表达方面的协同作用。(A) 在无血清条件下硒化合物对AML-12细胞中的G6pc表达的影响。将AML-12细胞在无血清的补充胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠(ITS)且不含地塞米松(Dex)的培养基中不用(对照)或用化合物CDE组合、化合物#C、化合物#D、化合物#50和化合物#43以十亿分之300份(ppb)硒(相当于每种化合物3.8uM)的剂量处理24小时。(B) 化合物#43抑制人HepG2细胞中的G6PC表达。将HepG2细胞与100nM胰岛素或600ppb的化合物#43一起在无血清培养基中温育40小时。(C) 化合物#43抑制G6pc表达,以及化合物#43和胰岛素两者在抑制用化合物#43预处理的AML-12细胞中的G6pc表达方面的协同作用。将AML-12细胞用化合物#43在含有FBS但不含ITS/Dex的培养基中预处理24小时,接着将化合物#43在存在或不存在10nM胰岛素下在无血清/ITS/Dex的培养基中再处理6小时。通过Actb mRNA水平将每个样品中的G6pc mRNA水平标准化,并以每组中指示样品数的平均值±SEM给出数据。将图片A-B中的P值与对照组进行比较。图片C中的不同字母代表这两组之间的统计学显著性($P<0.05$)。

[0073] 图11. 化合物#43抑制G6pc表达,以及化合物#43和胰岛素两者在抑制用糖尿病刺激物刺激的AML-12细胞中的G6pc表达方面的协同作用。将AML-12细胞用化合物#43在含有10%FBS但不含ITS/Dex的培养基中预处理24小时,接着将化合物#43在存在或不存在胰岛素连同8-CPT/Dex(糖尿病刺激物)下在无血清且无ITS的培养基中再处理6小时。通过Actb mRNA水平将每个样品中的G6pc mRNA水平标准化,并以每组中指示样品数的平均值±SEM给出数据。每列顶部上的数字是通过非经8-CPT/Dex处理的组(列#1)中的水平标准化的G6pc mRNA水平的平均值。条中的不同字母代表这两组之间的统计学显著性($P<0.05$)。

[0074] 图12. 通过蛋白质印迹分析,化合物#43长期处理增强胰岛素抵抗Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中的Pdk1/Akt/Foxo1信号传导的磷酸化。每天以每千克体重25μg硒的剂量对出生后第38天的Lepr^{db/db}小鼠腹膜内注射盐水(含有0.2%化合物溶剂DMSO)或化合物#43,持续52天。对来自经盐水或化合物#43处理的小鼠的肝组织进行蛋白质印迹分析(每条泳道100ug蛋白质)。(A) 蛋白质印迹图像。通过Gapdh水平将每个样品中的蛋白质水平标准化,并以(B)中每组五只小鼠的平均值±SEM给出数据。将P值与盐水组进行比较。

[0075] 图13. 化合物#43在人肝脏HepG2细胞中短暂激活PDK1和AKT并随后使FOX01失活。将HepG2细胞血清饥饿过夜,不与或与化合物#43(600ppb)一起温育指定的时间,然后进行蛋白质印迹分析。(A) 代表性蛋白质印迹。(B-F) 蛋白质印迹中的(B) pPDK1、(C) pAKT、(D) 总AKT、(E) pFOX01T24和(F) 总FOX01的蛋白质表达的定量数据以3个样品的平均值±SEM给出。当与在0分钟(临化合物处理前)或其对照组在每个时间点的蛋白质水平相比时,*P小于0.05。

[0076] 图14. 在模拟糖尿病条件下培养的小鼠肝脏AML-12细胞中,化合物#43短暂激活Pdk1和Akt并增强Foxo1磷酸化。将AML-12细胞在10%FBS但不含ITS/Dex的DMEM/F12培养基中培养24小时,然后在普通DMEM/F12培养基中血清饥饿过夜。将这些血清饥饿的AML12细胞不与(对照)或与10nM胰岛素或化合物#43(300ppb)组合用糖尿病刺激物、8-CPT(0.1mM)和Dex(0.5μM)在普通DMEM/F12培养基中在指定的时间点进行处理,然后进行蛋白质印迹分析。(A) 代表性蛋白质印迹。(B-E) 蛋白质印迹中的蛋白质表达的定量数据以3个样品的平均值±SEM给出。当在每个时间点与对照(无胰岛素/化合物#43处理)相比时,*P<0.05。(E) 中的不同字母代表这两组之间的统计学显著性($P<0.05$)。

[0077] 图15. 化合物#43和化合物#50对Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中的Glut4基因的表达的影响。每天以每千克体重25μg每种化合物的剂量对出生后第38天的Lepr^{db/db}小鼠腹膜内注射盐水(含有0.2%化合物溶剂DMSO)、化合物#50或化合物#43,持续52天。对从经这些化合物处理的Lepr^{db/db}小鼠中分离的肝脏RNA样品进行QRT-PCR分析。通过Actb mRNA水平将每个样品中的Glut4mRNA水平标准化,并以每组四至五只小鼠的平均值±SEM给出数据。计算处理组相比对照盐水组的P值。

[0078] 图16. 化合物#43增强小鼠肝脏AML-12细胞中的Glut4mRNA表达。(A) AML-12细胞中的基础Glut4表达的QRT-PCR。将AML-12细胞扩增,接种在24孔板上,并在10%FBS无ITS/Dex的DMEM/F12培养基中培养过夜。然后将这些细胞与媒介物(0.024%DMSO)或化合物#43(300ppb)一起在无血清DMEM/F12培养基中温育24小时(hr)。(B) 在模拟糖尿病条件下培养的AML-12细胞中的Glut4表达的QRT-PCR。将扩增的AML-12细胞在10%FBS但不含ITS/Dex的DMEM/F12培养基中的24孔板上培养24小时,然后在普通DMEM/F12培养基中血清饥饿过夜。然后将血清饥饿的AML-12细胞与媒介物(0.024%DMSO)或与化合物#43(300ppb)一起在糖尿病刺激物、0.1mM 8-CPT和0.5μM Dex存在下在无血清普通DMEM/F12培养基中温育6和24小时。通过Actb mRNA水平将每个样品中的Glut4mRNA水平标准化,并以3个样品的平均值±SEM给出数据。

[0079] 图17. 在胰岛素和化合物#43处理1.5小时后AML-12细胞中增进的葡萄糖摄取。数据以每组指示样品数的平均值±SEM给出。*与基础组相比,P值小于0.05。

[0080] 图18. 响应于用化合物#43处理,在胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中的下游信号传导分子-Pdk1、Akt和Foxo1-的增强磷酸化。每天以每千克体重0.136mg化合物#43的剂量对出生后第38天的Lepr^{db/db}小鼠腹膜内注射盐水(含有0.2%化合物溶剂DMSO)或化合物#43,持续52天。对从经盐水或化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠中分离的骨骼肌蛋白质提取物(每条泳道100μg蛋白质)进行蛋白质印迹分析。(A) 蛋白质印迹的图像。(B) 定量蛋白质水平(通过每个样品中的β-微管蛋白水平标准化)。数据以五只小鼠的平均值±SEM给出。通过与对照(盐水)组比较得出P值。

[0081] 图19. 胰岛素及化合物#43对分化小鼠C2C12(骨骼肌)细胞中的葡萄糖摄取的影响。将等数量的C2C12细胞接种在96孔板(5000个细胞/孔)上,在10%FBS DMEM培养基中培养5天,在含有0.5%马血清的DMEM培养基中分化7天。将完全分化的C2C12细胞在无血清/葡萄糖的DMEM培养基中不用或用化合物#43(300或600ppb)预处理过夜,然后不与(基础)或与胰岛素、化合物#43或两者一起在无葡萄糖的DMEM培养基中在37℃下温育1.5小时。处理后,将细胞与1mM 2-脱氧葡萄糖(2DG)一起在室温下温育30分钟,然后使用Promega的Glucose Uptake-Glo测定试剂盒进行发光分析。数据以每组指示样品数的平均值±SEM给出。通过与基础组比较得出P值。

[0082] 图20. 用化合物#43长期处理后在胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中胰岛素受体功能的恢复(由在酪氨酸1146处Insrβ的提高的磷酸化指示)。每天以每千克体重0.136mg化合物#43的剂量对出生后第38天的Lepr^{db/db}小鼠腹膜内注射盐水(含有0.2%化合物溶剂DMSO)或化合物#43,持续52天。对从经盐水或化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠中分离的骨骼肌蛋白质提取物(每条泳道100μg蛋白质)进行蛋白质印迹分析。(A) 蛋白质印迹的图像。(B-C) 定量蛋白质水平(通过每个样品中的β-微管蛋白水平标准化)。数据以五只小鼠的平均值

±SEM给出。通过将治疗值与对照/盐水组中的值进行比较来计算P值。

[0083] 图21. 化合物#43在分化小鼠C2C12(骨骼肌)细胞中激活Insr并刺激Pdk1/Akt/AS160的磷酸化。将等数量的C2C12细胞接种在12孔板(60,000个细胞/孔)上,在10%FBS DMEM培养基中培养5天,在含有0.5%马血清的DMEM培养基中分化7天。将完全分化的C2C12细胞血清饥饿过夜,然后不用或用化合物#43(600ppb)或胰岛素(200nM)在无血清DMEM培养基中在37°C下处理(A-B)5分钟或(C-D)30分钟,然后进行蛋白质印迹分析。(A、C)蛋白质印迹的图像。(B、D)定量蛋白质水平(通过每个样品中的β-微管蛋白水平标准化)。数据以每组三个样品的平均值±SEM给出。当与对照组(不用化合物#43处理)相比时,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。

[0084] 图22. 用化合物#43长期处理后在胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中胰岛素受体功能的恢复(由Insrβ的提高的酪氨酸磷酸化指示)。每天以每千克体重0.136mg化合物#43的剂量对出生后第38天的Lepr^{db/db}小鼠腹膜内注射盐水(含有0.2%化合物溶剂DMSO)或化合物#43,持续52天。对从经盐水或化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠中分离的肝脏蛋白质提取物进行(A)Y1146处的磷酸-Insrβ和(B)Y1150/1151处的磷酸-Insrβ的ELISA测定以及β-微管蛋白的蛋白质印迹分析。(A)Y1146处的磷酸-Insrβ的蛋白质水平(通过每个样品中的β-微管蛋白水平标准化)。(B)Y1150/1151处的磷酸-Insrβ的蛋白质水平(通过每个样品中的β-微管蛋白水平标准化)。数据以指示小鼠数的平均值±SEM给出。通过将治疗值与盐水组中的值进行比较来计算P值。

[0085] 图23. 化合物#43在人肝脏HepG2细胞中激活INSR并刺激AS160磷酸化。将HepG2细胞接种在6孔板(7 X 10⁵个细胞/孔)上,在10%FBS EMEM培养基中培养30小时,然后血清饥饿过夜。然后将这些血清饥饿的HepG2细胞用化合物#43(600ppb)在37°C下处理30和60分钟(min),然后进行蛋白质印迹分析。(A)蛋白质印迹的图像。(B)定量蛋白质水平(通过每个样品中的ACTB蛋白质水平标准化)。数据以每组三个样品的平均值±SEM给出。当与对照组(0分钟组,化合物#43处理前)相比时,**P<0.01。

[0086] 图24. 化合物#43长期处理导致Lepr^{db/db}小鼠中的血清胰岛素和丙氨酸转氨酶(ALT)但不是肌酸酐水平的降低。以稀释在无菌生理盐水中的每千克体重0.136mg的剂量对38日龄的雄性Lepr^{db/db}小鼠每天腹膜内(ip)注射含有0.2%DMSO或化合物#43的生理盐水(0.09%NaCl),持续52天。还收集了来自3月龄野生型(非糖尿病)C57小鼠的血清。收集这些血清样品并进行(A)胰岛素、(B)ALT和(C)肌酸酐测定。(A)中每列顶部上的数字是胰岛素水平的平均值。条中的不同字母代表这两组之间的统计学显著性。

[0087] 图25. 化合物#43针对I和II型糖尿病的作用方式。

[0088] 图26. 在无细胞系统中化合物#43和胰岛素直接激活胰岛素受体。将等量的含有α和β亚基两者的天然胰岛素受体蛋白质与0.003%DMSO(化合物#43溶剂)、化合物#43或胰岛素(Ins,0.5μM)一起在ATP存在下温育,然后进行蛋白质印迹分析以检测Y1146、1150和1151处磷酸化的Insrβ(激活的Insr)。条中的不同字母表示这些组之间的统计学显著变化。

[0089] 图27. 化合物#68在激活无细胞系统中的胰岛素受体方面不如化合物#43有效。将等量的天然胰岛素受体与0.003%DMSO(化合物#43溶剂)、化合物#43或化合物#68一起在ATP存在下温育。通过在Y1146、1150和1151处的磷酸化的Insrβ的蛋白质印迹分析检测激活的Insr蛋白。条形图中的不同字母表示在这些组之间发生了统计学显著变化。

[0090] 图28.化合物#43急性处理后STZ诱导的T1D小鼠中降低的血糖水平。使非空腹血糖水平在500–550mg/dL之间的STZ诱导的T1D小鼠空腹过夜，并以5.4mg/kg体重的剂量腹膜内注射化合物#43，或者注射含有2%DMSO(化合物#43储备溶剂，称为对照组)的生理盐水，持续1、2和3小时。然后对小鼠进行血糖测量。通过在每个时间点将化合物#43处理与对照/盐水组进行比较得出P值。

具体实施方式

[0091] 定义

[0092] 下面更详细地描述具体官能团及化学术语的定义。出于本公开的目的，根据元素周期表(CAS版本,Handbook of Chemistry and Physics,第75版,内封面)来确认化学元素，并且具体的官能团通常如其中所述定义。另外,Organic Chemistry,Thomas Sorrell, University Science Books,Sausalito:1999中描述了有机化学的一般原理以及具体的官能部分和反应性，该文献的全部内容以引用的方式并入本文。

[0093] 如本文和权利要求中所用的单数形式“一个(种)”和“该(所述)”包括复数指代项，除非上下文另有明确指示。因此，例如提到“一种化合物”包括多种这类化合物。

[0094] 约:本文中关于值使用术语“约”时是指在上下文中与所提到的值类似的值。一般来说，熟悉背景的本领域技术人员将理解在该上下文中由“约”所涵盖的相关方差度。例如，在一些实施方案中，术语“约”可涵盖所提到的值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更少以内的值的范围。

[0095] 施用:如本文所用，术语“施用”通常是指对受试者或系统施用组合物。本领域普通技术人员将会意识到在适当情况下多种途径可用于对受试者(例如人)施用。例如，在一些实施方案中，施用可以是眼部、口服、肠胃外、局部施用等。在一些特定的实施方案中，施用可以是支气管(例如，通过支气管滴注)、口腔、皮肤(其可以是或包括例如真皮的局部、皮内、皮间、透皮等中的一者或者多者)、肠、动脉内、皮内、胃内、髓内、肌肉内、鼻内、腹膜内、鞘内、静脉内、心室内、在特定器官内(例如肝内)、粘膜、鼻、口腔、直肠、皮下、舌下、局部、气管(例如，通过气管内滴注)、阴道、玻璃体施用等。在一些实施方案中，施用可涉及间歇性的给药(例如，在时间上分开的多个剂量)和/或定期(例如，由普通的时间段分开的单个剂量)给药。在一些实施方案中，施用可涉及持续选定的时间段连续给药(例如，灌注)。

[0096] 阿尔茨海默氏病:如本文所用，术语“阿尔茨海默氏病”或“AD”是指人中枢神经系统的进行性疾病。脑胰岛素信号传导对于学习和记忆很重要，脑中的胰岛素抵抗是AD的主要风险因素。胰岛素信号传导的恢复已成为AD的潜在疗法(White MF,Science 2003;302: 1710-1;De Felice DG等人,Alzheimer's & Dementia 2014;10:S26-S32)。在某些实施方案中，其表现为典型在老年人中的痴呆；定向障碍；记忆丧失；语言、计算或视觉空间技能困难；以及精神病学表现。在某些实施方案中，其与脑的若干区域中的退化神经元相关。如本文所用的术语“痴呆”包括但不限于有或没有精神病症状的阿尔茨海默氏痴呆。在某一实施方案中，本文提供的治疗方法有效治疗受试者的轻度、中度和重度阿尔茨海默氏病。阿尔茨海默病的阶段进一步包括：“中重度认知减退”，也称为“中度或中期阿尔茨海默氏病”；“重度认知减退”，也称为“中重度或中期阿尔茨海默氏病”；和“极重度认知减退”，也称为“重度

或晚期阿尔茨海默氏病”。中重度认知减退的特征在于记忆出现重大差距，并且认知功能出现缺陷。在此阶段，帮助进行一些日常活动变得至关重要。在重度认知减退中，记忆困难继续恶化，可能出现显著的人格改变，并且受影响的个体每天惯常活动需要大量的帮助。晚期阿尔茨海默氏病或极重度认知减退是该疾病的最后阶段，此时个体丧失了对其环境做出反应的能力、说话的能力，并且最终丧失控制运动的能力。

[0097] 生物活性：如本文所用，术语“生物活性”是指通过所关注的试剂或实体实现的可观察的生物学效果或结果。例如，在一些实施方案中，特异性结合相互作用是生物活性。在一些实施方案中，生物学途径或事件的调节（例如，诱导、增强或抑制）是生物活性。在一些实施方案中，通过检测由所关注的生物学途径或事件产生的直接或间接产物来评估生物活性的存在与否或程度。

[0098] 组合疗法：如本文所用，术语“组合疗法”是指其中使受试者同时暴露于两种或更多种治疗方案（例如，两种或更多种治疗剂）的那些情况。在一些实施方案中，可同时施用两种或更多种方案；在一些实施方案中，可顺序地施用这类方案（例如，施用第一方案的所有“剂量”，之后才施用第二方案的任何剂量）；在一些实施方案中，按重叠给药方案施用这类试剂。在一些实施方案中，“施用”组合疗法可涉及对接受组合中的其它试剂或药征的受试者施用一种或多种试剂或药征。为了清楚起见，组合疗法不要求将单独的试剂在单一组合物中一起施用（或甚至必须同时施用），尽管在一些实施方案中，可将两种或更多种试剂或其活性部分在组合组合物或甚至在组合化合物（例如，作为单一化学复合物或共价实体的一部分）中一起施用。

[0099] 相当的：如本文所用，术语“相当的”是指两种或更多种试剂、实体、情况、条件集等，它们可能彼此不完全相同，但足够相似以允许在它们之间进行比较，以使本领域技术人员将理解，基于所观察到的差异或相似性可合理地得出结论。在一些实施方案中，条件、环境、个体或群体集的特征在于多个基本上相同的特征和一个或少数不同的特征。本领域普通技术人员在上下文中将会理解在任何给定的情况下需要何种程度的一致性才会认为两种或更多种这类试剂、实体、情况、条件集等是相当的。例如，本领域普通技术人员将认识到，当情况、个体或群体集的特征在于有足够数量和类型的基本上相同的特点保证得出合理的结论时，它们是彼此相当的，所述结论即在不同的情况、个体或群体集或以不同的情况、个体或群体集得到的结果或观察到的现象的差异是由变化的那些特征的变化引起的或指示变化的那些特征的变化。

[0100] 糖尿病：糖尿病的主要特征是 β 细胞功能受损。I型和II型糖尿病两者的疾病进展早期发生的一种异常是丧失进食诱导的快速胰岛素响应。因此，肝脏继续产生葡萄糖，这增加了从膳食的基本成分中摄入和吸收的葡萄糖。

[0101] II型糖尿病：II型糖尿病的一个特征是胰岛素作用受损，被称为胰岛素抵抗。胰岛素抵抗表现为最大葡萄糖消除速率(GERmax)降低和达到GERmax所需的胰岛素浓度增加两者。因此，为处理给定的葡萄糖负荷，需要更多的胰岛素，并且必须更长时间段地维持增加的胰岛素浓度。因此，糖尿病患者也持续很长的时间段暴露于升高的葡萄糖浓度，这进一步加剧了胰岛素抵抗。另外，长时间升高的血糖水平本身对 β 细胞有毒性。II型糖尿病患者的另一特征是对血糖水平增加的响应延迟。虽然正常个体在食物消耗后2-3分钟内开始释放胰岛素，但II型糖尿病患者在血糖开始升高之前可能不会分泌内源性胰岛素，然后是以二

期动力学升高,即浓度缓慢升高到延长的稳定期。结果是,耗食后内源性葡萄糖产生不被切断并继续进行,且患者经历高血糖症(血糖水平升高)。II型糖尿病由不同且人们了解较少的情况引起。早期胰岛素释放的早期损失以及随后持续的葡萄糖释放促成葡萄糖浓度升高。高葡萄糖水平促进胰岛素抵抗,且胰岛素抵抗引起血清葡萄糖浓度的长时间升高。这种情况可导致自放大循环,其中越来越大的胰岛素浓度在控制血糖水平方面不太有效。此外,如上所述,升高的葡萄糖水平对β细胞有毒性,从而减少了功能性β细胞的数量。损害滋养胰岛的微脉管系统的生长或维持的遗传缺陷也可在其恶化中发挥作用(Glee,S.M.等人,Nature Genetics 38:688-693,2006)。最终,胰腺变得不堪重负,且个体进展为产生胰岛素缺乏症,类似于患I型糖尿病的人。

[0102] I型糖尿病:I型糖尿病的发生是由于身体的自身免疫系统破坏了胰腺的产生胰岛素的细胞(β细胞)。这最终导致完全的胰岛素激素缺乏。

[0103] 剂型或单位剂型:如本文所用,术语“剂型或单位剂型”是指用于对受试者施用的活性剂(例如,治疗或诊断剂)的物理分立单位。在一些实施方案中,每个这种单位含有预定量的活性剂。在一些实施方案中,这种量是适于根据给药方案施用的单位剂量(或其全分数),所述给药方案已被确定为当对相关群体施用时与所需或有益的结果相关(即,与治疗性给药方案相关)。本领域普通技术人员理解的是,对特定受试者施用的治疗组合物或治疗剂的总量由一名或多名主治医师确定,并且可涉及施用多种剂型。

[0104] 给药方案:如本文所用,术语“给药方案”是指通常由时间段分开单独对受试者施用的一组单位剂量(通常多于一个)。在一些实施方案中,给定的治疗剂具有可涉及一个或多个剂量的建议给药方案。在一些实施方案中,给药方案包括多个剂量,每个剂量在时间上与其它剂量分开。在一些实施方案中,个别剂量由相同长度的时间段彼此分开;在一些实施方案中,给药方案包括多个剂量和将个别剂量分开的至少两个不同的时间段。在一些实施方案中,给药方案内的所有剂量具有相同单位剂量的量。在一些实施方案中,给药方案内的不同剂量具有不同的量。在一些实施方案中,给药方案包括第一剂量的量的第一剂量,接着是不同于第一剂量的量的第二剂量的量的一个或多个附加剂量。在一些实施方案中,给药方案包括第一剂量的量的第一剂量,接着是与第一剂量的量相同的第二剂量的量的一个或多个附加剂量。在一些实施方案中,当在相关群体中施用(即,是治疗性给药方案)时,给药方案与所需或有益的结果相关。

[0105] 赋形剂:如本文所用,术语“赋形剂”是指可包括在药物组合物中例如以提供或促成所需稠度或稳定效果的非治疗剂。在一些实施方案中,合适的药物赋形剂可包括例如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。

[0106] 蜜月期:如本文所用,术语I型糖尿病的“蜜月期”是指该疾病的早期阶段,其特征在于早期胰岛素释放损失,且剩余的β细胞功能产生一些以二期动力学释放的胰岛素。

[0107] 高血糖症:如本文所用,术语“高血糖症”是指特征在于空腹血糖浓度高于正常值的疾病、病症或病状。在一些实施方案中,高血糖症的特征在于血糖浓度为126mg/dL或更高。在一些实施方案中,高血糖症的特征在于血糖浓度为280mg/dL(15.6mM)或更高。

[0108] 低血糖症:如本文所用,术语“低血糖症”是指特征在于血糖浓度低于正常值的疾病、病症或病状。在一些实施方案中,低血糖症的特征在于血糖浓度为63mg/dL(3.5mM)或更

低。在一些实施方案中,低血糖症引起诸如认知障碍、行为改变、脸色苍白、发汗低张、脸红和虚弱的症状,这些是低血糖症的公认症状,并且随着适当的热量摄取而消失。在一些实施方案中,低血糖症是重度的,因此需要胰高血糖素注射、葡萄糖输注或另一方帮助。

[0109] 提高、增加、抑制或减少:如本文所用,术语“提高”、“增加”、“抑制”和“减少”或其语法等同表述指示相对于基线或其它参考测量值的值。在一些实施方案中,适当的参考测量值可以是或包括在特定系统中(例如,在单一个体中)在没有特定试剂或治疗(例如,之前和/或之后)的存在的其它方面相当的条件下或在适当的相当参考试剂存在下的测量值。在一些实施方案中,适当的参考测量值可以是或包括已知或预期在相关试剂或治疗存在下以特定方式响应的相当系统中的测量值。

[0110] 胰岛素相关病症:如本文所用,术语“胰岛素相关病症”是指涉及哺乳动物中的胰岛素产生、调节、代谢和作用的病症。胰岛素相关病症包括但不限于糖尿病前期、I型糖尿病、II型糖尿病、低血糖症、高血糖症、胰岛素抵抗、分泌功能障碍、肌肉减少症、胰腺β细胞功能丧失和胰腺β细胞损失。

[0111] 患有胰岛素相关病症的非胰岛素依赖型患者:如本文所用,术语“患有胰岛素相关病症的非胰岛素依赖型患者”是指患有经诊断采用外源性提供的胰岛素的疗法不是当前标准治疗的病症的患者。患有未用外源性施用的胰岛素治疗的胰岛素相关病症的非胰岛素依赖型患者包括早期II型糖尿病、蜜月期的I型糖尿病、糖尿病前期和产生胰岛素的细胞移植接受者。

[0112] 胰岛素抵抗:如本文所用,术语“胰岛素抵抗”是指患者的细胞不能适当或有效地对胰岛素做出反应。胰腺通过产生更多的胰岛素而在细胞水平上应对这一问题。最终,胰腺跟不上身体对胰岛素的需求,并且在血流中积聚过多的葡萄糖。患有胰岛素抵抗的患者通常在其血液中同时具有循环的高血糖水平和高胰岛素水平。

[0113] 胰岛素抵抗病症:如本文所用,术语“胰岛素抵抗病症”是指由胰岛素抵抗引起或促成的任何疾病或病状。实例包括:糖尿病、肥胖症、代谢综合征、胰岛素抵抗综合征、X综合征、胰岛素抵抗、血压高、高血压、高血胆固醇、血脂异常、高脂血症、血脂紊乱、动脉粥样硬化病(包括中风、冠状动脉疾病或心肌梗塞)、高血糖症、高胰岛素血症和/或高前胰岛素血症、葡萄糖耐量受损、胰岛素释放延迟、糖尿病并发症(包括冠心病)、心绞痛、充血性心力衰竭、中风、痴呆认知功能、视网膜病变、神经病变、肾病变、肾小球肾炎、肾小球硬化症、肾病综合征、高血压性肾硬化一些类型的癌症(如子宫内膜癌、乳腺癌、前列腺癌和结肠癌)、妊娠并发症、女性生殖健康不良(如月经失调、不孕、排卵不规律、多囊卵巢综合征(PCOS))、脂肪营养不良、胆固醇相关病症(如胆石症、胆囊炎和胆结石)、痛风、阻塞性睡眠呼吸暂停和呼吸问题、骨关节炎以及骨质流失(例如骨质疏松症)的预防和治疗。

[0114] 异构体:如本领域中已知的那样,许多化学实体(特别是许多有机分子和/或许多小分子)可以多种结构(例如,几何、构象、同位素)和/或光学异构形式存在。例如,任何手性中心可以R和S构型存在,双键可以Z和E构象异构体存在,某些结构元素可采取两种或更多种互变异构形式,某些结构可被一个或多个同位素富集原子取代(例如,氘或氚取代氢、¹²C或¹⁴C取代¹³C、¹³¹I取代¹²⁹I等)。在一些实施方案中,本领域技术人员根据上下文将清楚的是,描述或提到本文中的特定化合物结构可代表其所有的结构和/或光学异构体。在一些实施方案中,本领域技术人员根据上下文将清楚的是,描述或提到本文中的特定化合物结构

旨在仅涵盖所描述或提到的异构形式。在一些实施方案中，包括可以多种异构形式存在的化学实体的组合物包括多种这类形式；在一些实施方案中，这类组合物仅包括单一形式。例如，在一些实施方案中，包括可作为多种光学异构体（例如，立体异构体、非对映体等）存在的化学实体的组合物包括这类光学异构体的外消旋群体；在一些实施方案中，这类组合物仅包括单一光学异构体和/或包括多种光学异构体，所述多种光学异构体一起保持光学活性。

[0115] 肠胃外：如本文所用，术语“肠胃外施用”和“以肠胃外方式施用”是指除肠和局部施用以外的施用方式，通常是通过注射施用。在一些实施方案中，肠胃外施用可以是或包括静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、角质层下、关节内、包膜下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和/或输注。

[0116] 部分不饱和：如本文所用，术语“部分不饱和”是指包括至少一个双键或三键的环部分。术语“部分不饱和”旨在涵盖具有多个不饱和位点的环，但不旨在包括如本文所定义的芳基或杂芳基部分。

[0117] 药物组合物：如本文所用，术语“药物组合物”是指其中活性剂与一种或多种药学上可接受的载体一起配制的组合物。在一些实施方案中，活性剂以适于在治疗方案中施用的单位剂量存在，当对相关群体施用时，所述治疗方案显示出实现预定治疗效果的统计学显著可能性。在一些实施方案中，药物组合物可具体配制成用于以固体或液体形式施用，包括适于以下的那些：口服施用，例如浸液（水性或非水溶液或悬浮液），片剂，例如针对口腔、舌下和全身吸收的那些，用于对舌施用的大丸剂、粉末、颗粒、糊剂；肠胃外施用，作为例如无菌溶液或悬浮液或缓释制剂例如通过皮下、肌肉内、静脉内或硬膜外注射；局部施加，例如作为施加于皮肤、肺或口腔的霜剂、软膏或控释贴剂或喷雾剂；阴道内或直肠内，例如作为阴道栓、霜剂或泡沫；舌下；眼部；透皮；或经鼻、肺部以及到其它粘膜表面。本领域技术人员将了解的是，一般来说，为对人或动物受试者施用而配制的任何组合物在一些实施方案中都可以被认为是药物组合物，无论其施用是否需要医学处方。因此，例如在一些实施方案中，食品或食品补充剂组合物（例如，液体或固体可消费组合物，如奶昔或运动饮料或营养补充剂粉末）可以被认为是药物组合物。作为选择或另外，在一些实施方案中，药物组合物可以是由适当的政府机构（举例如美国食品和药物管理局）特别监管和批准用于对相关受试者施用的制剂。在一些实施方案中，药物组合物是在没有来自执业医师的处方的情况下不能合法施用的药物组合物。

[0118] 药学上可接受的：如本文所用，应用于配制如本文公开的组合物所使用的载体、稀释剂或赋形剂的术语“药学上可接受的”意指载体、稀释剂或赋形剂必须与组合物的其它成分相容，并且对其接受者无害。

[0119] 药学上可接受的载体：如本文所用，术语“药学上可接受的载体”是指参与携带主题化合物或将主题化合物从身体的一个器官或部分运送到身体的另一器官或部分的药学上可接受的物质、组合物或媒介物，如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封物质。每种载体必须在与制剂的其它成分相容并且对患者无害的意义上是“可接受的”。可用作药学上可接受的载体的物质的一些实例包括：糖，如乳糖、葡萄糖和蔗糖；淀粉，如玉米淀粉和马铃薯淀粉；纤维素及其衍生物，如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素；粉状黄蓍胶；麦芽；明胶；滑石；赋形剂，如可可脂和栓剂蜡；油，如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄

榄油、玉米油和大豆油；二醇，如丙二醇；多元醇，如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇；酯，如油酸乙酯和月桂酸乙酯；琼脂；缓冲剂，如氢氧化镁和氢氧化铝；海藻酸；无热原水；等渗盐水；林格氏溶液；乙醇；pH缓冲溶液；聚酯、聚碳酸酯和/或聚酸酐；以及药物制剂中使用的其它无毒相容性物质。

[0120] 糖尿病前期：如本文所用，术语“糖尿病前期”是指患者空腹葡萄糖受损和/或葡萄糖耐量受损的疾病、病症或病状。在一些实施方案中，糖尿病前期患者的空腹血糖水平在100mg/dL (5.5mmol/L) 与126mg/dL (7.0mmol/L) 之间。在一些实施方案中，糖尿病前期患者的餐后2小时血糖水平在140mg/dL (7.8mmol/L) 与200mg/dL (11.1mmol/L) 之间。

[0121] 前药：如本文所用，术语“前药”是指通过代谢转化转化成药理学活性剂的药理学活性或更典型地无活性的化合物。通过如下方式制备如本文所述的任何化学式的化合物的前药，即将任何所述化学式的化合物中存在的官能团改性，改性方式使得改性物可在体内裂解以释放出母体化合物。在体内，前药在生理条件下容易经历化学变化（例如，被天然存在的酶水解或作用），导致释放药理学活性剂。前药包括如本文所述的任何化学式的化合物，其中羟基、氨基或羧基与可在体内裂解以分别再生游离羟基、氨基或羧基的任何基团键合。前药的实例包括但不限于如本文所述的任何化学式的化合物的酯（例如，乙酸酯、甲酸酯和苯甲酸酯衍生物）或在达到生理pH或通过酶作用后转化为活性母体药物的任何其它衍生物。本领域中有关于选择和制备合适前药衍生物的常规程序的描述（参见例如，Bundgaard. Design of Prodrugs. Elsevier, 1985）。

[0122] 增殖病状：如本文所用，术语“增殖病状”是指与细胞增殖相关的疾病或病症。在一些实施方案中，增殖疾病或病症是癌症或包括癌症。在一些实施方案中，增殖疾病或病症是炎性疾病或病症。在一些实施方案中，增殖疾病或病症是自身免疫疾病或病症。在一些实施方案中，增殖疾病或病症是微生物感染（例如，细菌感染）。

[0123] 参考：如本文所用，术语“参考”是指相对于其进行比较的标准或对照。例如，在一些实施方案中，将所关注的试剂、动物、个体、群体、样品、序列或值与参考或对照试剂、动物、个体、群体、样品、序列或值进行比较。在一些实施方案中，基本上与所关注的测试或测定同时进行参考或对照的测试和/或测定。在一些实施方案中，参考或对照是历史参考或对照，任选体现在有形介质中。典型地，如本领域技术人员所理解的那样，在与评估所处相当的条件或情况下对参考或对照进行测定或表征。本领域技术人员将会了解何时存在足够的相似性以证明依赖特定可能的参考或对照和/或与特定可能的参考或对照进行比较是合理的。

[0124] 风险：如本文所用，疾病、病症和/或病状的“风险”是指特定个体将发展成疾病、病症和/或病状的可能性。在一些实施方案中，以百分比表示风险。在一些实施方案中，风险为0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%直到100%。在一些实施方案中，风险被表示为相对于与参考样品或参考样品组相关的风险的风险。在一些实施方案中，参考样品或参考样品组具有已知的疾病、病症、病状和/或事件风险。在一些实施方案中，参考样品或参考样品组来自与特定个体相当的个体。在一些实施方案中，相对风险为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更大。

[0125] 固体形式：如本领域中已知的那样，许多化学实体（特别是许多有机分子和/或许多小分子）可采取多种不同的固体形式，举例如无定形形式和/或结晶形式（例如，多晶型

物、水合物、溶剂合物等)。在一些实施方案中,可以单一的这种形式(例如,以单一多晶型物的纯制剂)利用这类实体。在一些实施方案中,可以这类形式的混合物利用这类实体。

[0126] 受试者:如本文所用,术语“受试者”是指生物体,通常是哺乳动物(例如人,在一些实施方案中包括出生前的人形式)。在一些实施方案中,受试者罹患相关的疾病、病症或病状。在一些实施方案中,受试者易患疾病、病症或病状。在一些实施方案中,受试者显示出疾病、病症或病状的一种或多种症状或特征。在一些实施方案中,受试者不显示疾病、病症或病状的任何症状或特征。在一些实施方案中,受试者是具有易患疾病、病症或病状或有疾病、病症或病状所特有的一种或多种特征的受试者。在一些实施方案中,受试者是患者。在一些实施方案中,受试者是接受和/或已接受诊断和/或治疗的个体。

[0127] 易患:“易患”疾病、病症或病状(例如,流感)的个体有发展成所述疾病、病症或病状的风险。在一些实施方案中,易患疾病、病症或病状的个体不显示疾病、病症或病状的任何症状。在一些实施方案中,易患疾病、病症或病状的个体尚未被诊断患有所述疾病、病症和/或病状。在一些实施方案中,易患疾病、病症或病状的个体是已经被暴露于与发展成所述疾病、病症或病状相关的条件的个体。在一些实施方案中,发展成疾病、病症和/或病状的风险是基于群体的风险(例如,罹患所述疾病、病症或病状的个体的家庭成员)。

[0128] 治疗有效量:术语“治疗有效量”是指产生所需的施用效果的量。在一些实施方案中,该术语是指当根据治疗给药方案对罹患或易患疾病、病症和/或病状的群体施用时足以治疗所述疾病、病症和/或病状的量。在一些实施方案中,治疗有效量是降低疾病、病症和/或病状的一种或多种症状的发病率和/或严重程度和/或延迟其发作的量。本领域普通技术人员将了解的是,术语“治疗有效量”实际上不要求在特定个体中实现成功的治疗。而是,治疗有效量可以是当对需要这种治疗的患者施用时在相当多的受试者中提供特定所需的药理学响应的量。在一些实施方案中,提到治疗有效量可以是提到如在一种或多种特定组织(例如,受疾病、病症或病状影响的组织)或流体(例如,血液、唾液、血清、汗液、眼泪、尿液等)中测量的量。本领域普通技术人员将了解的是,在一些实施方案中,可以以单剂量配制和/或施用治疗有效量的特定试剂或疗法。在一些实施方案中,可以多剂量配制和/或施用治疗有效试剂,例如作为给药方案的一部分。

[0129] 治疗:如本文所用,术语“治疗”(treatment/treat/treating)是指施用疗法,所述疗法部分或完全地减轻、改善、缓解、抑制特定疾病、病症和/或病状、延迟其发作(例如,相对于确定的发作时间或时段)、降低其严重程度和/或减少其一种或多种症状、特征和/或病因的发生率。在一些实施方案中,治疗可针对没有表现出相关疾病、病症和/或病状的体征或症状的受试者,和/或针对未被诊断患有相关疾病、病症和/或病状的受试者,和/或针对仅表现出疾病、病症和/或病状的早期体征的受试者。作为选择或另外,在一些实施方案中,治疗可针对表现出相关疾病、病症和/或病状的一种或多种确定体征的受试者。在一些实施方案中,治疗可针对已被诊断为罹患相关疾病、病症和/或病状的受试者。在一些实施方案中,治疗可针对已知具有一种或多种与发展成相关疾病、病症和/或病状的风险增加统计学相关的易感因素的受试者。在一些实施方案中,这种治疗是指降低发展成所述疾病、病症和/或病状的风险和/或延迟所述疾病、病症或病状的一种或多种特征或症状的发作。在一些实施方案中,治疗是根据方案施用疗法,已证明所述方案当应用于相关群体或系统(例如,模型系统)时以统计学显著性获得相关结果(例如,部分或完全地减轻、改善、缓解、抑制

特定疾病、病症和/或病状、延迟其发作、降低其严重程度和/或减少其一种或多种症状、特征和/或病因的发生率。在一些实施方案中，在诊断和/或一种或多种症状发作后施用的治疗被视为“治疗性”治疗，而在诊断和/或症状发作之前施用的治疗被视为“预防性”治疗。

[0130] 单位剂量：如本文所用，术语“单位剂量”是指作为单剂量和/或以药物组合物的物理分立单位施用的量。在许多实施方案中，单位剂量含有预定量的活性剂。在一些实施方案中，单位剂量含有试剂的整个单剂量。在一些实施方案中，施用超过一个单位剂量以获得总单剂量。在一些实施方案中，需要或预期需要施用多个单位剂量以获得预计效果。单位剂量可以是例如含有预定量的一种或多种治疗剂的一定体积的液体（例如，可接受的载体）、预定量的一种或多种固体形式的治疗剂、含有预定量的一种或多种治疗剂的缓释制剂或药物递送装置等。将会了解的是，单位剂量可存在于包括除治疗剂之外多种组分中的任意者的制剂中。例如，如下文所述可包括可接受的载体（例如，药学上可接受的载体）、稀释剂、稳定剂、缓冲剂、防腐剂等。本领域技术人员将会了解在许多实施方案中，特定治疗剂的总适当日剂量可包含单位剂量的一部分或多个单位剂量，并且可例如由主治医师在合理的医学判断范围内决定。在一些实施方案中，任何特定受试者或生物体的具体有效剂量水平可取决于多种因素，包括所治疗的病症和病症的严重程度；所使用的具体活性化合物的活性；所使用的基本组合物；受试者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食；施用时间和所使用的具体活性化合物的排泄速率；治疗持续时间；与所使用的具体化合物组合或同时使用的药物和/或附加疗法，以及医学领域中熟知的类似因素。

[0131] 烷基：如本文所用，术语“烷基”是指直链或支链烷基。示例性C₁₋₆烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基和己基。

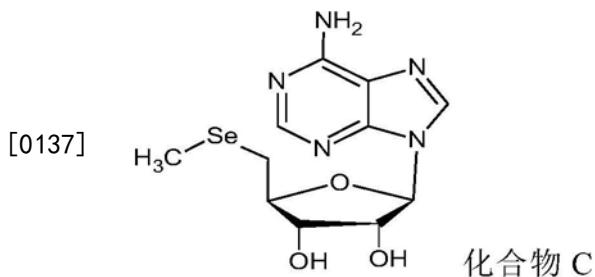
[0132] 杂原子：如本文所用，术语“杂原子”是指氧、硫、氮、磷或硅中的一者或多者（包括氮、硫、磷或硅的任何氧化形式；任何碱性氮的季铵化形式或；杂环的可取代氮，例如N（如3,4-二氢-2H-吡咯基中）、NH（如吡咯烷基中）或NR⁺（如N-取代的吡咯烷基中））。

[0133] 碳环：如本文所用，术语“碳环”是指完全饱和或含有一个或多个不饱和单元但不是芳族的单环烃，其与分子的其余部分有单个连接点。

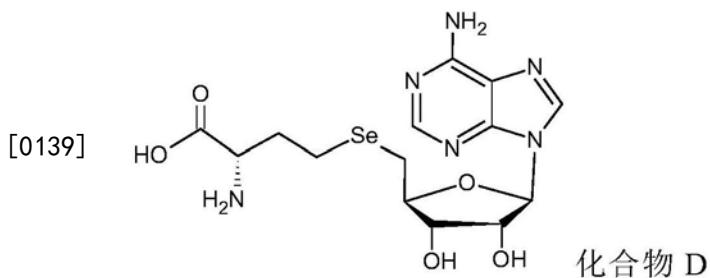
[0134] 杂环：如本文所用，术语“杂环”是指稳定的单环杂环部分，其是饱和的或部分不饱和的，并且除碳原子外还具有一个或多个、优选一至四个如上所定义的杂原子。当用于指杂环的环原子时，术语“氮”包括取代的氮。作为实例，在具有0-3个选自氧、硫或氮的杂原子的饱和或部分不饱和环中，氮可以是N（如3,4-二氢-2H-吡咯基中）、NH（如吡咯烷基中）或⁺NR（如N-取代的吡咯烷基中）。杂环可以在任何杂原子或碳原子上与其侧基连接，其产生稳定的结构，并且任何环原子可任选被取代。3-8元杂环的实例包括四氢呋喃基、四氢噻吩基、吡咯烷基、哌啶基、吡咯啉基、噁唑烷基、哌嗪基、二噁烷基、二氧戊环基、二氮杂环庚三烯基、氧氮杂环庚三烯基、硫氮杂环庚三烯基和吗啉基。

[0135] 卤素：如本文所用，术语“卤素”和“卤代”是指F、Cl、Br或I。

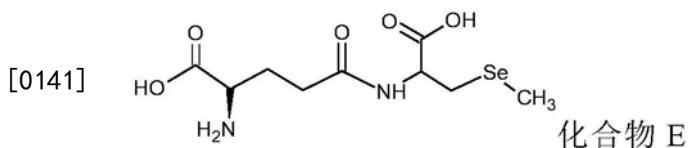
[0136] 化合物C：如本文所用的术语“化合物C”是指5'-甲基硒代腺昔；也称为(2R,4S,5S)-2-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-5-((甲基硒基)甲基)四氢呋喃-3,4-二醇，CAS登记号5135-40-0，并且包括其任何药学上可接受的盐。



[0138] 化合物D:如本文所用的术语“化合物D”是指5’-硒代腺苷基高半胱氨酸;也称为(2R)-2-氨基-4-(((2S,3S,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲基)硒基)丁酸,CAS登记号4053-91-2,并且包括其任何药学上可接受的盐。



[0140] 化合物E:如本文所用的术语“化合物E”是指 γ -谷氨酰基-甲基硒代-半胱氨酸或 γ -L-谷氨酰基-Se-甲基-L-半胱氨酸;也称为N5-(1-羧基-2-(甲基硒基)乙基)-L-谷氨酰胺,或其任何药学上可接受的盐。



[0142] 化合物CDE:如本文所用的术语“化合物CDE”是指化合物C、化合物D和化合物E或其药学上可接受的盐的混合物。

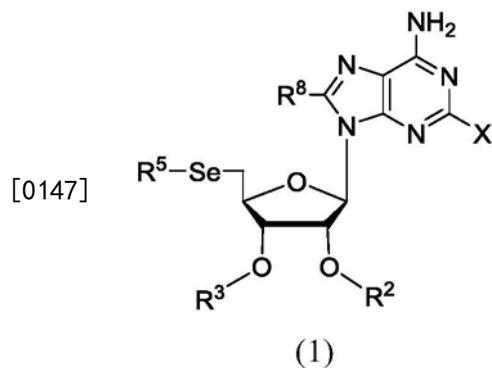
[0143] 化合物

[0144] 本公开提供许多示例性化合物,在用单一化合物治疗后,其能够在糖尿病小鼠、培养的肝脏和/或骨骼肌细胞中降低葡萄糖水平、提高葡萄糖耐量、恢复或激活胰岛素受体功能及其下游信号传导、增强AS160磷酸化以将葡萄糖转运蛋白(GLUT)从胞质囊泡向质膜易位以用于葡萄糖摄取、刺激葡萄糖摄取并减轻高胰岛素血症,而不会导致肾功能受损和/或肝损伤。例如,实施例2显示化合物43、50、53、69和70中的每一者都降低HepG2细胞中的葡萄糖产生。特别地,化合物43表现出比化合物CDE更高的效力。当与HepG2和大鼠H4IIE细胞中的抗糖尿病药物二甲双胍相比时,化合物43显示出更大的效力和更低的细胞毒性。还显示化合物#43在抑制糖尿病小鼠的肝脏中的G6pc(一种用于肝脏葡萄糖产生的关键酶基因)的表达方面比化合物50更有效,并且在小鼠肝脏AML-12细胞中比化合物CDE、化合物C、化合物D和化合物50更有效(实施例4)。进一步地,本公开表明化合物43针对糖尿病小鼠的高血糖症比化合物C、化合物50、化合物69和化合物70更有效(实施例3);化合物43在胰岛素抵抗的糖尿病Lepr^{db/db}小鼠的肝脏和骨骼肌中显著提高葡萄糖耐量(实施例3)并增强/恢复胰岛素受体功能及其下游信号传导(实施例5和7-8);化合物43在糖尿病小鼠中引发对葡萄糖激发的响应,其类似于野生型小鼠中的响应(实施例3)。此外,本公开表明化合物#43处理可在肝

脏和骨骼肌细胞两者中增强AS160的磷酸化(以促进GLUT从细胞囊泡向质膜易位)以用于葡萄糖摄取(实施例8),刺激糖尿病小鼠的肝脏和培养的小鼠肝细胞中的GLUT4表达(实施例6),增强和/或加强胰岛素作用以刺激肝细胞和骨骼肌细胞中的葡萄糖摄取(实施例6-7),并在胰岛素抵抗的糖尿病小鼠中减轻高胰岛素血症而不导致肾功能受损和/或肝损伤(实施例9)。

[0145] 本公开还提供硒化合物的特征,这些特征可有助于其活性。例如,据显示虽然硒化合物#43在抑制葡萄糖产生方面效力高,但其硫类似物化合物68的效力低(实施例2);并且化合物#43在胰岛素抵抗的糖尿病小鼠中降低血糖和HbA1c水平以及提高葡萄糖耐量方面比化合物#68更有效(实施例3)。还显示在硒化合物处理后观察到葡萄糖产生的抑制,所述硒化合物在2' 和3' 位置包含二乙酰基酯(#43)、环状碳酸酯(化合物#50)、吗啉代羧酸酯(#53)、二丙酰基酯(#69)或二丁酰基酯(#70),其中化合物43处理后观察到最高效力(实施例2)。进一步地,据显示包含5' 甲基硒代基团和5' 硒代高半胱氨酸基团的化合物在抑制HepG2细胞中的葡萄糖产生方面具有类似的效力(实施例2中的化合物C对比化合物D)。体内研究也揭示化合物#43在胰岛素抵抗的糖尿病小鼠中降低血糖水平和提高葡萄糖耐量方面比化合物#69和#70更有效(实施例3)。

[0146] 在一些实施方案中,本公开涉及式(1)的化合物:



[0148] 或其药学上可接受的盐、前药或异构体,其中

[0149] R²和R³中的每一者独立地为H或-C(O)-R,其中每个R独立地为C₁₋₆烷基或3-8元碳环或杂环,其中R²和R³不能都是H;

[0150] 或者R²与R³一起形成-(CH₂)_n-C(O)-(CH₂)_m-,其中n和m中的每一者独立地为0-3,且n+m≤3;

[0151] R⁵是-C₁₋₆烷基或-C₁₋₆烷基-CH(NH₂)COOH;

[0152] R⁸是H或卤素;且

[0153] X是H或卤素;

[0154] 其中所述碳环、杂环、-(CH₂)_n-和-(CH₂)_m-部分中的每一者独立地可任选被-OH、卤素、NH₂、CN或C₁₋₆烷基取代1-3次;且

[0155] 每个C₁₋₆烷基部分独立地可任选被-OH、卤素、NH₂或CN取代1-3次。

[0156] 在式(1)的一些实施方案中,R⁸是H。在式(1)的一些实施方案中,式(1)的R⁸是卤素。在式(1)的一些实施方案中,式(1)的R⁸是F。

[0157] 在式(1)的一些实施方案中,X是H。在式(1)的一些实施方案中,X是卤素。在式(1)的一些实施方案中,X是F。

[0158] 在式(1)的一些实施方案中, R^5 是可任选被-OH、卤素、 NH_2 或 CN 取代1-3次的- C_{1-6} 烷基。在式(1)的一些实施方案中, R^5 是可任选被卤素取代1-3次的- C_{1-6} 烷基。在式(1)的一些实施方案中, R^5 是未取代的- C_{1-6} 烷基。在式(1)的一些实施方案中, R^5 是未取代的直链- C_{1-6} 烷基。在式(1)的一些实施方案中, R^5 是甲基。在式(1)的一些实施方案中, R^5 是乙基。在式(1)的一些实施方案中, R^5 是丙基。

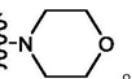
[0159] 在式(1)的一些实施方案中, R^5 是- C_{1-6} 烷基- $CH(NH_2)COOH$, 其中 C_{1-6} 烷基可任选被-OH、卤素、 NH_2 或 CN 取代1-3次。在式(1)的一些实施方案中, R^5 是- C_{1-6} 烷基- $CH(NH_2)COOH$, 其中 C_{1-6} 烷基可任选被卤素取代1-3次。在式(1)的一些实施方案中, R^5 是- C_{1-6} 烷基- $CH(NH_2)COOH$, 其中 C_{1-6} 烷基是未取代的。在式(1)的一些实施方案中, R^5 是- $CH_2CH_2-CH(NH_2)COOH$ 。在式(1)的一些实施方案中, R^5 是- $CH_2-CH(NH_2)COOH$ 。在式(1)的一些实施方案中, R^5 是- $CH_2CH_2CH_2-CH(NH_2)COOH$ 。

[0160] 在式(1)的一些实施方案中, R^2 是H, 且 R^3 是- $C(O)-R$, 其中R是 C_{1-6} 烷基或3-8元碳环或杂环, 其中所述碳环和杂环部分中的每一者独立地可任选被-OH、卤素、 NH_2 、 CN 或 C_{1-6} 烷基取代1-3次; 且每个 C_{1-6} 烷基独立地可任选被-OH、卤素、 NH_2 或 CN 取代1-3次。

[0161] 在式(1)的一些实施方案中, R^3 是H, 且式(1)的 R^2 是- $C(O)-R$, 其中R是 C_{1-6} 烷基或3-8元碳环或杂环, 其中所述碳环和杂环部分中的每一者独立地可任选被-OH、卤素、 NH_2 、 CN 或 C_{1-6} 烷基取代1-3次; 且每个 C_{1-6} 烷基独立地可任选被-OH、卤素、 NH_2 或 CN 取代1-3次。

[0162] 在式(1)的一些实施方案中, R^2 和 R^3 中的每一者独立地为C(O)-R, 其中每个R独立地为 C_{1-6} 烷基或3-8元碳环或杂环, 其中所述碳环和杂环部分中的每一者独立地可任选被-OH、卤素、 NH_2 、 CN 或 C_{1-6} 烷基取代1-3次; 且每个 C_{1-6} 烷基独立地可任选被-OH、卤素、 NH_2 或 CN 取代1-3次。

[0163] 在式(1)的一些实施方案中, 每个R独立地为3-8元碳环或杂环, 其中所述碳环和杂环部分中的每一者独立地可任选被-OH、卤素、 NH_2 、 CN 或 C_{1-6} 烷基取代1-3次; 且每个 C_{1-6} 烷基独立地可任选被-OH、卤素、 NH_2 或 CN 取代1-3次。在式(1)的一些实施方案中, 每个R独立地为3-8元碳环或杂环, 其中所述碳环和杂环部分中的每一者独立地可任选被卤素取代1-3次。在式(1)的一些实施方案中, 每个R独立地为3-8元未取代的碳环或未取代的杂环。在式(1)的一些实施方案中, 每个R独立地为6元未取代的碳环或未取代的杂环。在式(1)的一些实施方案中, 每个R独立地为未取代的杂环。在式(1)

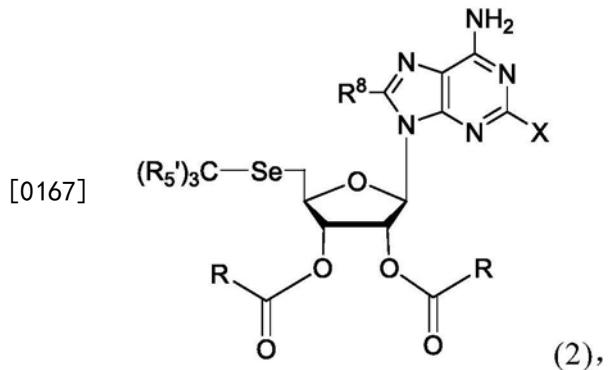
的一些实施方案中, R是。

[0164] 在式(1)的一些实施方案中, 每个R独立地为 C_{1-6} 烷基, 且每个 C_{1-6} 烷基独立地可任选被-OH、卤素、 NH_2 或 CN 取代1-3次。在式(1)的一些实施方案中, 每个R独立地为 C_{1-6} 烷基, 且每个 C_{1-6} 烷基独立地可任选被卤素取代1-3次。在式(1)的一些实施方案中, 每个R独立地为未取代的 C_{1-6} 烷基。在式(1)的一些实施方案中, 每个R独立地为未取代的直链 C_{1-6} 烷基。在式(1)的一些实施方案中, 每个R独立地为甲基、乙基或丙基。在式(1)的一些实施方案中, R是CH₃。

[0165] 在式(1)的一些实施方案中, R^2 与 R^3 一起形成-(CH_2)_n-C(O)-(CH₂)_m-, 其中n和m中的每一者独立地为0-3, 且n+m≤3, 其中所述-(CH_2)_n-和-(CH₂)_m-部分中的每一者独立地可任

选被-OH、卤素、NH₂、CN或C₁₋₆烷基取代1-3次；且每个C₁₋₆烷基独立地可任选被-OH、卤素、NH₂或CN取代1-3次。在式(1)的一些实施方案中，所述-(CH₂)_n-和-(CH₂)_m-部分中的每一者独立地可任选被卤素取代1-3次。在式(1)的一些实施方案中，所述-(CH₂)_n-和-(CH₂)_m-部分是未取代的。在一些实施方案中，n=m=0。

[0166] 在一些实施方案中，本公开涉及式(2)的化合物：



[0168] 或其药学上可接受的盐、前药或异构体，

[0169] 其中R⁸是H或卤素；

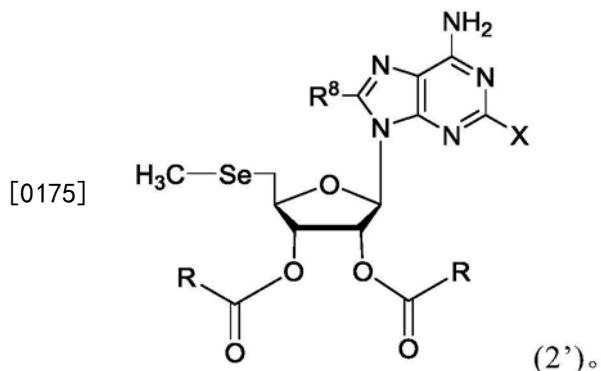
[0170] X是H或卤素；

[0171] 每个R_{5'}独立地为H或卤素；且

[0172] 每个R独立地为C₁₋₆烷基，其中的每一者独立地可任选被卤素取代1-3次。

[0173] 在式(2)的一些实施方案中，C(R_{5'})₃是CF₃、CHF₂、CH₂F或CH₃。

[0174] 在式(2)的一些实施方案中，所述化合物具有式(2')：

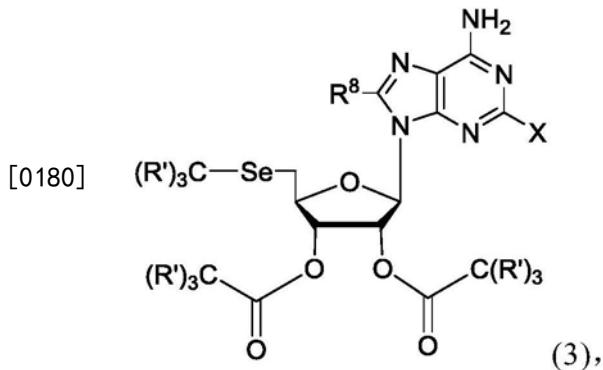


[0176] 在式(2)或(2')的一些实施方案中，R⁸是H。在式(2)或(2')的一些实施方案中，R⁸是卤素。在式(2)或(2')的一些实施方案中，R⁸是F。

[0177] 在式(2)或(2')的一些实施方案中，X是H。在式(2)或(2')的一些实施方案中，X是卤素。在式(2)或(2')的一些实施方案中，X是F。

[0178] 在式(2)或(2')的一些实施方案中，R各自独立地为未取代的C₁₋₆烷基。在式(2)或(2')的一些实施方案中，R各自独立地为C₁₋₃烷基，其中的每一者独立地可任选被卤素取代1-3次。在式(2)或(2')的一些实施方案中，R各自独立地为未取代的C₁₋₃烷基。在式(2)或(2')的一些实施方案中，R各自独立地为-CH₃、-CH₂CH₃或-CH₂CH₂CH₃。

[0179] 在一些实施方案中，本公开涉及式(3)的化合物：



[0181] 或其药学上可接受的盐、前药或异构体，

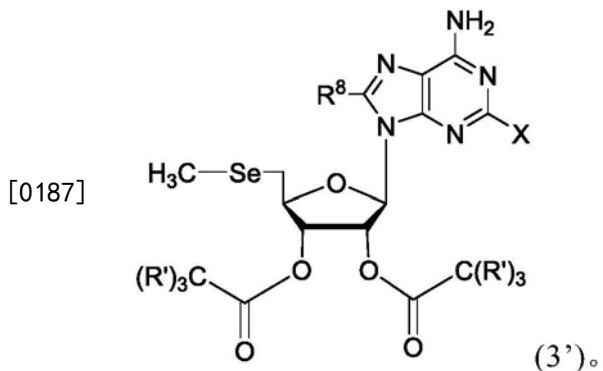
[0182] 其中R⁸是H或卤素；

[0183] X是H或卤素；且

[0184] 每个R' 独立地为H或卤素。

[0185] 在式(3)的一些实施方案中,-Se-C(R')₃是-Se-CH₃、-Se-CHF₂、-Se-CH₂F或-Se-CF₃。

[0186] 在式(3)的一些实施方案中,所述化合物具有式(3')：

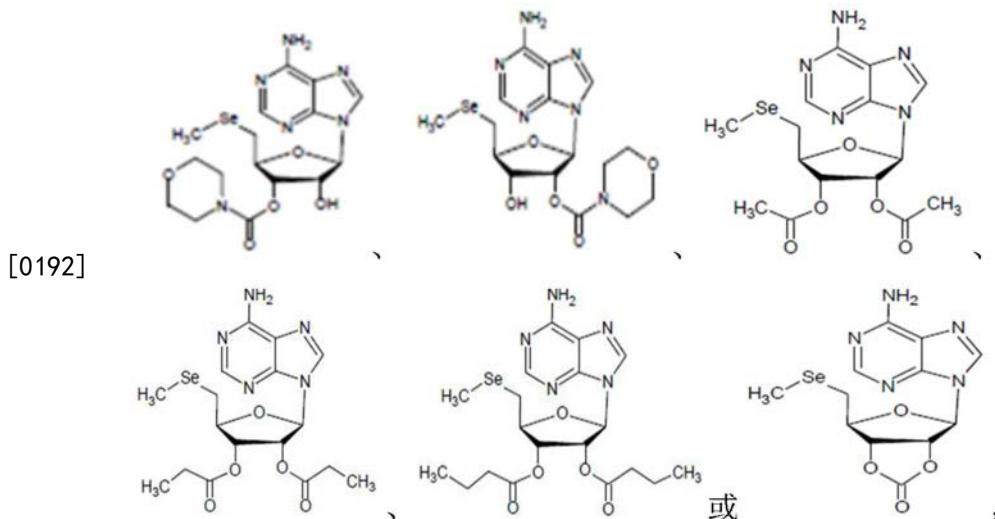


[0188] 在式(3)或(3')的一些实施方案中,R⁸是H。在式(3)或(3')的一些实施方案中,R⁸是卤素。在式(3)或(3')的一些实施方案中,R⁸是F。

[0189] 在式(3)或(3')的一些实施方案中,X是H。在式(3)或(3')的一些实施方案中,X是卤素。在式(3)或(3')的一些实施方案中,X是F。

[0190] 在式(3)或(3')的一些实施方案中,每个C(R')₃独立地为CF₃、CHF₂或CH₂F或CH₃。在式(3)或(3')的一些实施方案中,每个C(R')₃独立地为CH₂F或CH₃。在式(3)或(3')的一些实施方案中,每个C(R')₃是CH₃。

[0191] 在一些实施方案中,本公开涉及下式的化合物:



[0195] 在一些实施方案中,本公开提供包含和/或递送(即,在对系统或受试者施用后)式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体的组合物。在一些实施方案中,本公开提供仅包含式(1)-(3)中任一者的单一化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体的组合物。在一些实施方案中,本公开提供包含一种或多种式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体以及适于根据本公开对人或动物受试者施用的一种或多种载体或赋形剂的组合物。

[0196] 在一些实施方案中,本公开提供递送式(1)-(3)中任一者的化合物的活性部分的组合物。在一些实施方案中,所述组合物包含式(1)-(3)中任一者的化合物的活性代谢物。在一些实施方案中,所述组合物包含在施用所述组合物后形成式(1)-(3)中任一者的化合物的代谢物的化合物,所述代谢物保持相关的生物活性。

[0197] 在一些实施方案中,本公开提供组合物,所述组合物是药物组合物,因为它们含有活性药物成分(API)和一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,API是或包含式(1)-(3)中任一者的化合物。在一些实施方案中,API由式(1)-(3)中任一者的化合物组成。在一些实施方案中,API由式(1)-(3)中任一者的单一化合物组成。

[0198] 在一些实施方案中,本公开提供制备所提供的组合物的方法,例如通过将一种或多种适当的(即,药学上可接受的)载体或赋形剂与式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体合并。在一些实施方案中,一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂适合口服施用,并将混合物配制成口服制剂。在一些实施方案中,药物组合物是固体剂型。在一些实施方案中,固体剂型是片剂、胶囊或锭剂。在一些实施方案中,药物组合物是液体剂型(例如,饮料)。

[0199] Remington's Pharmaceutical Sciences,第十六版,E.W.Martin(Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1980)公开了用于配制药物组合物的各种载体及其制备的已知技术。在一些实施方案中,本公开提供包含药学上可接受的量的如本文所述的化合物的药物组合物。在一些实施方案中,可与载体物质合并以产生单一剂型的活性成分的量可根据被治疗的宿主和/或特定的施用方式而变化。可与载体物质合并以产生单一剂型的活性成分的量通常将是产生治疗效果的化合物的量。一般地,此量的范围将是约1%至约99%的

活性成分、约5%至约70%或约10%至约30%。

[0200] 在一些实施方案中,组合物中也可存在湿润剂、乳化剂和润滑剂(如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁)以及着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂。

[0201] 药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基茴香醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;以及金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0202] 在一些实施方案中,本发明的制剂包括适合口服、鼻、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道和/或肠胃外施用的那些。在一些实施方案中,制剂可方便地呈单位剂量型,并且可通过药学领域中熟知的任何方法制备。在一些实施方案中,如本文所述的制剂包含:选自环糊精、脂质体、胶束形成剂(例如,胆汁酸)和聚合物载体(例如,聚酯和聚酰酐);和如本文所述的化合物。在一些实施方案中,如本文所述的制剂使得如本文所述的化合物是可口服生物利用的。

[0203] 在一些实施方案中,制备这类制剂的方法可包括使如本文所述的化合物与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂及任选一种或多种辅助成分结合的步骤。在一些实施方案中,通过使如本文所述的化合物与液体载体或细碎的固体载体或两者均匀且紧密地结合,然后如果必要的话,使产物成形,由此制备所述制剂。

[0204] 在一些实施方案中,如本文所述适合口服施用的制剂的形式可以是胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基质,通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、粉末、颗粒,或者作为在水性或非水液体中的溶液或悬浮液,或者作为水包油或油包水乳液,或者作为酏剂或糖浆,或者作为软锭剂(使用惰性基质,如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为漱口水、饮料等,各自含有预定量的如本文所述的化合物作为活性成分。在一些实施方案中,如本文所述的化合物可作为选择或另外以大丸剂、药糖剂或糊剂形式施用。

[0205] 在一些实施方案中,在如本文所述用于口服施用的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、粉末、颗粒等)中,活性成分与一种或多种药学上可接受的载体(如柠檬酸钠或磷酸二钙)和/或任何以下物质混合:填充剂或增量剂,如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和/或硅酸;粘结剂,举例如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;保湿剂,如甘油;崩解剂,如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;溶液阻滞剂,如石蜡;吸收促进剂,如季铵化合物;润湿剂,举例如鲸蜡醇、单硬脂酸甘油酯和非离子表面活性剂;吸收剂,如高岭土和膨润土;润滑剂,如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠,及其混合物;和着色剂。在一些实施方案中,在胶囊、片剂和丸剂的情况下,药物组合物还可包含缓冲剂。在一些实施方案中,相似类型的固体组合物也可用作使用诸如乳糖或奶糖以及诸如高分子量聚乙二醇等的载体的软壳和硬壳明胶胶囊中的填充剂。

[0206] 在一些实施方案中,可通过任选与一种或多种辅助成分一起压缩或模制来制成片剂。在一些实施方案中,可使用粘结剂(例如,明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如,羟基乙酸淀粉钠或交联羧甲基纤维素钠)、表面活化剂或分散剂来制备压缩片剂。在一些实施方案中,模制片剂可在合适的机器中制成,粉状化合物的混合物在其中被惰性液体稀释剂润湿。

[0207] 在一些实施方案中,如本文所述的药物组合物的片剂及其它固体剂型如糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒可任选被刻划或制成具有包衣和壳,如肠溶包衣和药物配制领域中熟知的其它包衣。在一些实施方案中,可使用例如不同比例的羟丙基甲基纤维素(以提供所需的释放曲线)、其它聚合物基质、脂质体和/或微球体将它们配制成提供活性成分在其中的缓释或控释。在一些实施方案中,可将它们配制成快速释放,例如冷冻干燥。在一些实施方案中,可通过例如经细菌截留过滤器过滤或者通过掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂来将它们灭菌,可将所述灭菌剂在临使用前溶解在无菌水或一些其它无菌可注射介质中。在一些实施方案中,这些组合物还可任选含有乳浊剂,并且可以是这样的组合物,即它们仅在或优先在胃肠道的某一部分中任选以延迟方式释放活性成分。可使用的包埋组合物的实例包括聚合物质和蜡。在一些实施方案中,活性成分可呈微胶囊包封形式,在适当情况下含有一种或多种上述赋形剂。

[0208] 在一些实施方案中,用于口服施用如本文所述的化合物的液体剂型包括药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。在一些实施方案中,除了活性成分之外,液体剂型还可含有本领域中常用的惰性稀释剂,举例如水或其它溶剂,增溶剂和乳化剂,如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯,以及其混合物。

[0209] 在一些实施方案中,除惰性稀释剂之外,口服组合物还可包括佐剂,如湿润剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。

[0210] 在一些实施方案中,悬浮液除了活性化合物外还可含有悬浮剂,例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶及其混合物。

[0211] 在一些实施方案中,如本文所述用于直肠或阴道施用的制剂可作为栓剂提供,其可通过将一种或多种如本文所述的化合物与一种或多种合适的无刺激性赋形剂或载体混合来制备,所述赋形剂或载体包括例如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸酯,其在室温下是固体,但在体温下是液体,因此在直肠或阴道腔中将会融化并释放出活性化合物。

[0212] 在一些实施方案中,如本文所述适合阴道施用的制剂包括含有诸如本领域中已知适当的载体的阴道栓、棉塞、霜剂、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂。

[0213] 在一些实施方案中,用于局部或透皮施用如本文所述的化合物的剂型包括粉末、喷雾剂、软膏、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。在一些实施方案中,可在无菌条件下将活性化合物与药学上可接受的载体以及与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0214] 在一些实施方案中,除了如本文所述的化合物之外,软膏、糊剂、霜剂和凝胶还可含有赋形剂,如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌或其混合物。

[0215] 在一些实施方案中,除了如本文所述的化合物之外,粉末和喷雾剂还可含有赋形剂,如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末,或这些物质的混合物。在一些实施方案中,喷雾剂可另外含有常规的推进剂(如氯氟烃)和挥发性未取代的烃(如丁烷和丙烷)。

[0216] 在一些实施方案中,透皮贴剂具有向身体受控递送如本文所述的化合物的附加优点。在一些实施方案中,将化合物溶解或分散在适当的介质中可制成这类剂型。在一些实施方案中,吸收促进剂可用于增加化合物穿过皮肤的流量。在一些实施方案中,提供速率控制膜或将化合物分散在聚合物基质或凝胶中都能控制这种流的速率。

[0217] 在一些实施方案中,本公开提供眼科制剂、眼膏、粉末、溶液等。

[0218] 在一些实施方案中,如本文所述适合肠胃外施用的药物组合物包含一种或多种如本文所述的化合物与一种或多种药学上可接受的无菌等渗水溶液或非水溶液、分散液、悬浮液或乳液或无菌粉末组合,所述无菌粉末可在临使用前重构成无菌可注射溶液或分散液,其可含有糖、醇、抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质或悬浮剂或增稠剂。

[0219] 可用在如本文所述的药物组合物中的合适水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油(如橄榄油)和可注射的有机酯(如油酸乙酯)。在一些实施方案中,可例如通过使用包衣材料(如卵磷脂)、在分散液的情况下通过保持所需的粒度以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。

[0220] 在一些实施方案中,如本文所述的组合物可含有佐剂,如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。在一些实施方案中,可通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂来确保防止微生物对主题化合物发生作用,例如包含对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等。在一些实施方案中,可取的是在组合物里包括等渗剂,如糖、氯化钠等。在一些实施方案中,可通过包含延迟吸收的试剂(如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射药物形式的延长吸收。

[0221] 在一些实施方案中,例如为了延长药物的效果,可取的是减缓从皮下或肌肉内注射的药物的吸收。在一些实施方案中,这可通过使用水溶性差的结晶或无定形物质的液体悬浮液来实现。在一些实施方案中,药物的吸收速率则取决于其溶解速率,而溶解速率又可取决于晶粒大小和晶形。在一些实施方案中,胃肠外施用的药物形式的延迟吸收是通过将药物溶解或悬浮在油媒介物中来实现的。

[0222] 在一些实施方案中,通过在可生物降解的聚合物(如聚丙交酯-聚乙交酯)中形成主题化合物的微胶囊基质来制备可注射的储库形式。在一些实施方案中,根据药物与聚合物的比例以及所使用的特定聚合物的性质,可以控制药物释放的速率。其它可生物降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。在一些实施方案中,通过将药物包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备储库可注射制剂。

[0223] 在一些实施方案中,药物洗脱形式包括涂覆或含药的支架和可植入装置。在一些实施方案中,药物洗脱支架及其它装置可涂有化合物或药物制剂,并且可进一步包含设计用于定时释放的聚合物。

[0224] 在一些实施方案中,口服施用化合物或药物制剂。在一些实施方案中,静脉内施用化合物或药物制剂。在一些实施方案中,经由可裂解的连接基使化合物连接于固体载体,所述固体载体与导管一起施用。在一些实施方案中,施用途径包括舌下、肌肉内和透皮施用。

[0225] 在一些实施方案中,将如本文所述的化合物作为药物对人和动物施用,它们可本身或作为药物组合物给药,所述药物组合物含有例如0.1%至99.5%或0.5%至90%的活性成分与药学上可接受的载体组合。

[0226] 在一些实施方案中,可口服、肠胃外、局部或直肠给予本文所述的化合物。在一些

实施方案中,它们当然以适合每种施用途径的形式给予。在一些实施方案中,它们以片剂或胶囊形式、通过注射、吸入、眼用洗剂、软膏、栓剂等施用;通过注射、输注或吸入施用;通过洗剂或软膏局部施用;以及通过栓剂直肠施用。

[0227] 在一些实施方案中,可通过任意合适的施用途径对人及其它动物施用如本文所述的化合物以用于治疗,包括口服、鼻施用,如通过例如气雾剂、喷雾剂、直肠、阴道内、肠胃外、脑池内和局部施用,如通过粉末、软膏或滴剂施用,包括口腔和舌下施用。

[0228] 在一些实施方案中,通过本领域技术人员已知的常规方法将如本文所述的可以合适的水合形式使用的化合物和/或如本文所述的药物组合物配制成药学上可接受的剂型。

[0229] 在一些实施方案中,可以改变如本文所述的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平,以便获得对特定的患者、组合物和施用方式有效实现所需治疗响应而对患者无毒的活性成分的量。

[0230] 在一些实施方案中,选定的剂量水平将取决于多种因素,包括如本文所述的特定化合物的活性、施用途径、施用时间、所使用的特定化合物的排泄或代谢速率、治疗持续时间、与所使用的特定化合物组合使用的其它药物、化合物和/或物质、所治疗的患者的年龄、性别、体重、状态、总体健康状况和既往病史以及医学领域中熟知的类似因素。

[0231] 具有本领域普通技能的医师或兽医可确定出所需药物组合物的有效量并开出药方。在一些实施方案中,医师或兽医可使药物组合物中如本文所述的化合物的开始剂量低于实现所需治疗效果所需的水平,然后逐渐增加剂量,直到实现所需的效果。

[0232] 在一些实施方案中,对受试者长期提供如本文所述的化合物或药物组合物。在一些实施方案中,长期处理包括任何形式的长时间段反复施用,如持续一个月或多个星期、在一个月与一年之间、一年或多年或更长的时间反复施用。在一些实施方案中,长期处理涉及终生对受试者反复施用如本文所述的化合物或药物组合物。在一些实施方案中,长期处理涉及定期施用,例如一天一次或多次、一周一次或多次或者一个月一次或多次。在一些实施方案中,如本文所述的化合物的合适剂量(如日剂量)将是有效产生治疗效果的最低剂量的化合物的量。这种有效剂量通常将取决于本文所述的因素。在一些实施方案中,当就所指示的效果而言时,如本文所述的化合物用于患者的剂量将在每天每kg体重约0.0001至约100mg的范围内。在一些实施方案中,日剂量将在每kg体重0.001至50mg化合物的范围内。在一些实施方案中,日剂量将在每kg体重0.01至10mg化合物的范围内。然而,可采用更低或更高的剂量。在一些实施方案中,在受试者的生理状况由于年龄、疾病进展、体重或其它因素而发生变化时,可以改变对受试者施用的剂量。

[0233] 在一些实施方案中,活性化合物的有效日剂量可作为整天中按适当的间隔分开放用的两个、三个、四个、五个、六个或更多个亚剂量施用,任选以单位剂型施用。

[0234] 在一些实施方案中,单独施用如本文所述的化合物。在一些实施方案中,作为如本文所述的药物制剂(组合物)施用如本文所述的化合物。

[0235] 在一些实施方案中,通过与其它药物的类比,可将如本文所述的化合物配制成以任何方便的方式施用以用于人医学或兽医学。

[0236] 化合物和/或组合物的制备

[0237] 在一些实施方案中,可全部或部分地通过化学合成制备式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体;在一些实施方案中,部分地通过化学合成制备

的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体是采用半合成方法制备的。在一些实施方案中,可通过分离制备式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0238] 在一些实施方案中,本公开提供制备如本文所述的化合物和/或组合物的方法,包括测定一个或多个样品(例如)以检测其中的生物活性。在一些实施方案中,一个或多个样品包含式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。在一些实施方案中,本文提供的方法包括检测和/或确认一个或多个样品中可检测的生物活性的存在的步骤。在一些实施方案中,本文提供的方法包括确认一个或多个样品中可检测的生物活性不存在的步骤。

[0239] 在一些实施方案中,生物活性是葡萄糖产生的抑制。在一些实施方案中,在HepG2细胞中测试生物活性。在一些实施方案中,在H4IE细胞中测试生物活性。

[0240] 在一些实施方案中,生物活性是血清HbA1c水平的降低。在一些实施方案中,在胰岛素抵抗且有糖尿病的小鼠中测试生物活性。

[0241] 在一些实施方案中,生物活性是增强的葡萄糖耐量。在一些实施方案中,在胰岛素抵抗且有糖尿病的小鼠中测试生物活性。

[0242] 在一些实施方案中,生物活性是G6pc表达的抑制。在一些实施方案中,在AML-12细胞中测试生物活性。在一些实施方案中,在用糖尿病刺激物刺激的AML-12细胞中测试生物活性。在一些实施方案中,在人HepG2细胞中测试生物活性。在一些实施方案中,在胰岛素抵抗且有糖尿病的小鼠的肝脏中测试生物活性。

[0243] 在一些实施方案中,生物活性是Pdk1、Akt、Foxo1和AS160的增强磷酸化。在一些实施方案中,在肝脏中测试生物活性。在一些实施方案中,在骨骼肌中测试生物活性。

[0244] 在一些实施方案中,生物活性是增强的Glut4表达。在一些实施方案中,在小鼠肝脏AML-12细胞中测试生物活性。在一些实施方案中,在胰岛素抵抗且有糖尿病的小鼠的肝脏中测试生物活性。

[0245] 在一些实施方案中,生物活性是呈胰岛素抵抗状态的受试者中的胰岛素信号传导的激活和/或恢复。在一些实施方案中,受试者的特征在于显著水平的循环胰岛素。在一些实施方案中,胰岛素抵抗状态的特征在于受试者中磷酸化胰岛素受体的降低的水平和/或活性。在一些实施方案中,受试者患有糖尿病和/或糖尿病相关疾病、病症和/或病状。

[0246] 在一些实施方案中,生物活性是增进的葡萄糖摄取。在一些实施方案中,细胞是肝细胞和骨骼肌细胞。在一些实施方案中,生物活性是血清胰岛素水平的降低。在一些实施方案中,在胰岛素抵抗且有糖尿病的小鼠中测试生物活性。

[0247] 化合物和/或组合物的确认和/或表征

[0248] 在一些实施方案中,本公开提供确认和/或表征如本文所述的化合物和/或组合物的方法。在一些实施方案中,这种方法包括测试多个样品其中的生物活性的步骤,样品中的每一个包含式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体;并且确定一个或多个这类样品中的所述生物活性的存在和/或水平。在一些实施方案中,所提供的方法包括检测与式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体的存在和/或水平相关的所述生物活性。在一些实施方案中,所提供的方法包括确认和/或表征特定的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体的步骤,方式是通

过检测所述化合物的所述生物活性。

[0249] 在一些实施方案中,生物活性是葡萄糖产生的抑制。在一些实施方案中,在HepG2细胞中测试生物活性。在一些实施方案中,在H4IIE细胞中测试生物活性。

[0250] 在一些实施方案中,生物活性是血清HbA1c水平的降低。在一些实施方案中,在胰岛素抵抗且有糖尿病的小鼠中测试生物活性。

[0251] 在一些实施方案中,生物活性是增强的葡萄糖耐量。在一些实施方案中,在胰岛素抵抗且有糖尿病的小鼠中测试生物活性。

[0252] 在一些实施方案中,生物活性是G6pc表达的抑制。在一些实施方案中,在AML-12细胞中测试生物活性。在一些实施方案中,在用糖尿病刺激物刺激的AML-12细胞中测试生物活性。在一些实施方案中,在人HepG2细胞中测试生物活性。在一些实施方案中,在胰岛素抵抗且有糖尿病的小鼠的肝脏中测试生物活性。

[0253] 在一些实施方案中,生物活性是Pdk1、Akt、Foxo1和AS160的增强磷酸化。在一些实施方案中,在肝脏中测试生物活性。在一些实施方案中,在骨骼肌中测试生物活性。

[0254] 在一些实施方案中,生物活性是增强的Glut4表达。在一些实施方案中,在小鼠肝脏AML-12细胞中测试生物活性。在一些实施方案中,在胰岛素抵抗且有糖尿病的小鼠的肝脏中测试生物活性。

[0255] 在一些实施方案中,生物活性是呈胰岛素抵抗状态的受试者中胰岛素信号传导的激活和/或恢复。在一些实施方案中,受试者的特征在于显著水平的循环胰岛素。在一些实施方案中,胰岛素抵抗状态的特征在于受试者中磷酸化胰岛素受体的降低的水平和/或活性。在一些实施方案中,受试者患有糖尿病和/或糖尿病相关疾病、病症或病状。

[0256] 在一些实施方案中,生物活性是向受试者细胞中的增强的葡萄糖摄取。在一些实施方案中,生物活性是向肝细胞和骨骼肌细胞中增强的葡萄糖摄取。在一些实施方案中,生物活性是血清胰岛素水平的降低。在一些实施方案中,在胰岛素抵抗且有糖尿病的小鼠中测试生物活性。

[0257] 用途

[0258] 本公开提供的是,如本文所述的化合物(例如化合物43)可模拟胰岛素以抑制葡萄糖产生(参见例如,实施例2);降低血糖和HbA1c水平,在胰岛素抵抗的糖尿病受试者中减轻高血糖症的发展并提高葡萄糖耐量(参见例如,实施例3);抑制胰岛素抵抗的糖尿病受试者的肝脏中的G6pc表达,模拟但绕过胰岛素以抑制培养的小鼠和人肝细胞中的G6pc表达,并加强胰岛素作用(参见例如,实施例4);模拟但绕过胰岛素以在肝脏中激活Pdk1和Akt并增强Foxo1磷酸化(参见例如,实施例5);增强胰岛素抵抗的糖尿病受试者的肝脏中的Glut4表达,并且模拟但绕过胰岛素以增强小鼠肝细胞中的Glut4表达(参见例如,实施例6)、人肝细胞中的AS160的磷酸化(GLUT4从胞质囊泡向质膜转运以促进葡萄糖摄取的关键事件)(参见例如,实施例8)和小鼠肝细胞中的葡萄糖摄取(参见例如,实施例6);增强和/或恢复胰岛素抵抗的糖尿病受试者的骨骼肌中的胰岛素信号传导Pdk1/Akt/Foxo1(参见例如,实施例7),通过绕过胰岛素模拟以在骨骼肌细胞中激活Akt并增强AS160的磷酸化(GLUT4从胞质囊泡向质膜转运的关键事件)(参见例如,实施例8),并加强胰岛素作用以刺激骨骼肌细胞中的葡萄糖摄取(参见例如,实施例7);激活和/或恢复胰岛素抵抗的糖尿病受试者的骨骼肌和肝脏中以及培养的小鼠骨骼肌和人肝细胞中的胰岛素受体(Insr)功能(参见例如,实施例

8) ;并且减轻高胰岛素血症而不损害肾功能和/或导致肝损伤(实施例9)。因此,本公开清楚地表明,如本文所述的化合物适用于调节葡萄糖代谢和治疗如本文所述的胰岛素相关病症。

[0259] 在一些实施方案中,本公开提供调节葡萄糖代谢和/或治疗葡萄糖代谢病症的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。在一些实施方案中,葡萄糖代谢病症涉及不在正常范围内的血糖水平。在一些实施方案中,葡萄糖代谢病症与葡萄糖摄取和/或转运缺陷有关。在一些实施方案中,葡萄糖代谢病症是糖尿病、甘油醛-3-磷酸脱氢酶缺乏症、糖尿病、高血糖症、高胰岛素血症或低血糖症。

[0260] 在一些实施方案中,本公开提供治疗葡萄糖转运的病症的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。在一些实施方案中,葡萄糖转运的病症是葡萄糖-半乳糖吸收不良、Fanconi-Bickel综合征或De Vivo病(GLUT1缺陷综合征(GLUT1DS))。

[0261] 在一些实施方案中,本公开提供增强AS160磷酸化以将葡萄糖转运蛋白(GLUT)从胞质囊泡向质膜易位以用于葡萄糖摄取的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0262] 在一些实施方案中,本公开提供增强肝脏和骨骼肌两者中的葡萄糖摄取的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0263] 在一些实施方案中,本公开提供治疗胰岛素相关病症的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。在一些实施方案中,胰岛素相关病症选自糖尿病前期、I型糖尿病、II型糖尿病、低血糖症、高血糖症、胰岛素抵抗、分泌功能障碍、胰腺 β 细胞功能丧失和胰腺 β 细胞损失。在一些实施方案中,胰岛素相关病症的患者是患有胰岛素相关病症的非胰岛素依赖型患者。

[0264] 在一些实施方案中,本公开提供治疗胰岛素抵抗病症的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。上面描述了胰岛素抵抗病症的某些实例。在一些实施方案中,所提供的方法用于治疗II型糖尿病、高胰岛素血症、高前胰岛素血症、视网膜病变、神经病变或肾病变。在一些实施方案中,所提供的方法减轻高胰岛素血症而不损害肾功能和/或导致肝损伤。

[0265] 在一些实施方案中,本公开提供治疗肥胖症的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0266] 在一些实施方案中,本公开提供治疗糖尿病的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。在一些实施方案中,所述糖尿病是I型糖尿病。在一些实施方案中,所述糖尿病是II型糖尿病。

[0267] 在一些实施方案中,本公开提供治疗高血糖症的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0268] 在一些实施方案中,本公开提供抑制葡萄糖产生的方法,包括施用式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0269] 在一些实施方案中,本公开提供降低血清HbA1c水平的方法,包括施用式(1)-(3)

中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0270] 在一些实施方案中,本公开提供提高葡萄糖耐量的方法,包括施用式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0271] 在一些实施方案中,本公开提供抑制G6pc表达的方法,包括施用式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0272] 在一些实施方案中,本公开提供增强肝脏和/或骨骼肌中Pdk1、Akt和Foxo1的磷酸化的方法,包括施用式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0273] 在一些实施方案中,本公开提供增加Glut4表达的方法,包括施用式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0274] 在一些实施方案中,本公开提供激活和/或恢复呈胰岛素抵抗状态的受试者中的胰岛素信号传导的方法,包括施用式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。在一些实施方案中,受试者的特征在于显著水平的循环胰岛素。在一些实施方案中,胰岛素抵抗状态的特征在于受试者中磷酸化胰岛素受体的降低的水平和/或活性。在一些实施方案中,受试者患有糖尿病和/或糖尿病相关疾病、病症或病状。在一些实施方案中,受试者患有II型糖尿病。

[0275] 在一些实施方案中,本公开提供增强向受试者细胞中的葡萄糖摄取的方法,包括施用式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。在一些实施方案中,所述细胞是骨骼肌细胞。

[0276] 已显示化合物#43可模拟但绕过胰岛素以激活肝脏和骨骼肌中的胰岛素受体信号传导,并且可恢复胰岛素受体功能,即使是在胰岛素抵抗的糖尿病受试者中也如此。这些观察结果表明,化合物#43可用于治疗以胰岛素信号传导缺陷为特征的疾病或综合征,如多囊卵巢综合征(PCOS)、阿尔茨海默氏病(AD)和肌肉减少症。

[0277] 在一些实施方案中,本公开提供治疗多囊卵巢综合征(PCOS)的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。PCOS是可导致月经不调、不需要的毛发生长和痤疮的激素失衡。患有PCOS的年轻女性往往具有升高的胰岛素水平,这可导致卵巢产生较多的雄激素激素,导致体毛增多、痤疮和月经不调或月经稀少。患PCOS可导致胰岛素抵抗并发展成2型糖尿病。二甲双胍是常为患有PCOS的女性开的药物,用以提高胰岛素敏感性并防止发展成2型糖尿病。结果表明化合物#43在抑制培养的肝细胞中的葡萄糖产生方面比二甲双胍更有效,并且可恢复胰岛素抵抗的糖尿病小鼠中的胰岛素受体功能。因此,化合物#43有可能适用于治疗PCOS。

[0278] 在一些实施方案中,本公开提供治疗阿尔茨海默氏病(AD)的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。脑胰岛素信号传导对于学习和记忆很重要,并且脑中的胰岛素抵抗是AD的主要风险因素。恢复胰岛素信号传导已成为AD的潜在疗法(White MF, Science 2003;302:1710-1;De Felice DG等人, Alzheimer's & Dementia 2014;10:S26-S32)。鉴于上述结果显示化合物#43表现出胰岛素样活性,并且能够恢复胰岛素抵抗的受试者中的胰岛素受体功能,因此其有可能适用于治疗AD。

[0279] 在一些实施方案中,本公开提供治疗肌肉减少症的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。肌肉减少症的特征在

于骨骼肌质量随着年龄的增长而逐渐流失,导致肌肉力量下降,活动能力和功能下降,疲劳增多,与跌倒相关的损伤的风险增大,并且经常虚弱(Candow和Chilibeck,2005;Sakuma和Yamaguchi,2012)。肌肉生物学的最新进展表明,胰岛素信号传导(Insr/PI3K/Akt)对于肌肉蛋白的合成以及肌肉蛋白降解的抑制(通过Akt/Foxo1介导的对两个萎缩基因Fbxo32和Trim63的表达的抑制)至关重要。最佳的胰岛素信号传导减弱肌肉萎缩过程,包括肌肉减少症(Glass和Roubenoff,2010;Ryall等人,2008;Sakuma和Yamaguchi,2012)。如此,胰岛素信号传导的刺激剂、氨基酸补充剂(以改善蛋白质合成)和蛋白酶体蛋白质降解的抑制剂正在成为治疗肌肉减少症的新策略。如本文所述,即使是在胰岛素抵抗的糖尿病小鼠中,化合物#43在骨骼肌中的Insr/Pdk1/Akt/Foxo1信号传导的激活中的胰岛素样活性表明此化合物在治疗肌肉中的萎缩病状方面有潜在用途。

[0280] 本公开还教导了所提供的化合物有可能增强线粒体功能,因此适用于治疗线粒体疾病和/或功能障碍。在一些实施方案中,本公开提供治疗线粒体相关疾病(例如,由功能失调的线粒体引起)的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。在一些实施方案中,线粒体相关疾病可以是退行性疾病(例如,癌症、心血管疾病和心力衰竭、2型糖尿病、阿尔茨海默氏和帕金森氏病、脂肪肝病、白内障、骨质疏松症、肌肉萎缩、睡眠障碍和炎性疾病,如银屑病、关节炎和结肠炎)。在一些实施方案中,本公开提供增强线粒体功能的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

[0281] 在一些实施方案中,本公开提供增强脑中的糖异生的方法,包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。在一些实施方案中,所提供的方法增加脑中的葡萄糖摄取。在一些实施方案中,所提供的方法用于维持或恢复脑功能,包括记忆和学习。

[0282] 组合疗法

[0283] 在一些实施方案中,本公开提供如本文所述的化合物和/或组合物用于如本文所述的疾病、病症或病状的组合疗法的用途。在一些实施方案中,本公开提供治疗患有疾病、病症或病状且已经接受过、正在接受或将要接受所述疾病、病症或病状的一种或多种不同疗法的患者的方法,其中所述方法包括施用治疗有效量的式(1)-(3)中任一者的化合物或其药学上可接受的盐、前药或异构体。

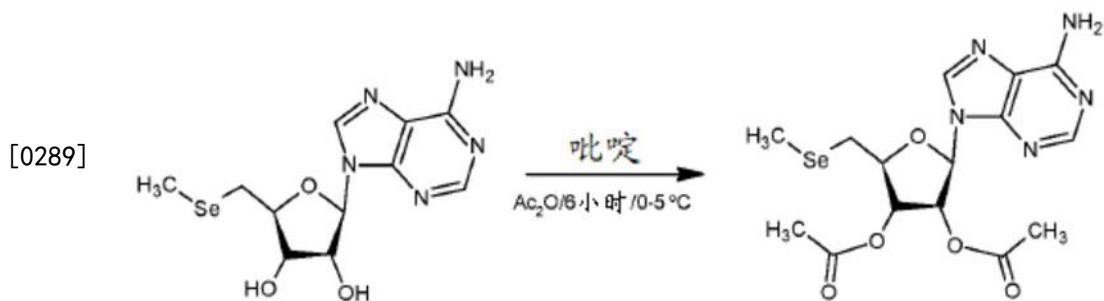
[0284] 在一些实施方案中,对患有胰岛素相关病症的患者的一种或多种疗法选自胰岛素疗法,例如用于I型糖尿病;饮食和锻炼,例如用于初期II型糖尿病;口服抗糖尿病药,例如用于早期II型糖尿病;二甲双胍;胰岛素促分泌素,例如磺酰脲;格列酮;长效基础胰岛素;中效胰岛素;和短(速)效胰岛素。在一些实施方案中,胰岛素疗法涉及皮下(SC)、静脉内和/或通过吸入施用。在一些实施方案中,对患有胰岛素相关病症的患者的一种或多种疗法可以是目前正在开发的疗法,例如胰岛素-富马酰基二酮哌嗪(FDKP)。

[0285] 实施例

[0286] 实施例1:化合物#43、#50、#53、#69、#70和#68的合成

[0287] 1a. 腺苷,5'-Se-甲基-5'-硒代-,2',3'-二乙酸酯(化合物#43)的合成

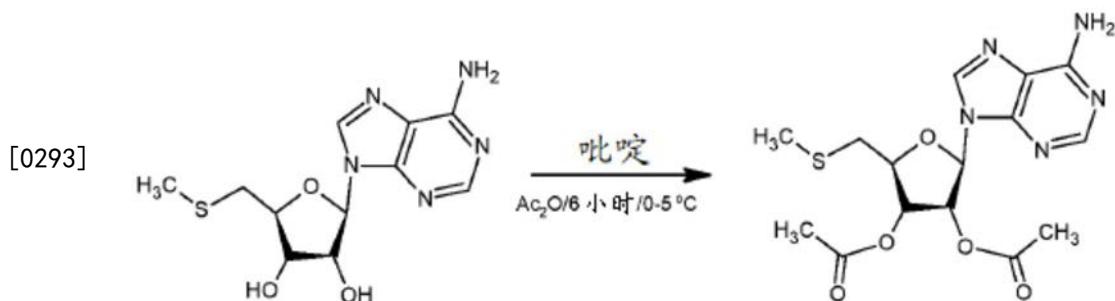
[0288] 方案:



[0290] 合成程序: 将5'-Se-甲基-5'-硒代-腺苷(1.0克, 0.0029摩尔, 1.0摩尔当量)和无水吡啶(10ml)置于配有滴液漏斗、惰性气体入口/出口和温度计的烘箱干燥的50ml三颈烧瓶中。将反应装置置于冰/盐浴中并开始搅动。当溶液的温度降至0°C时, 滴加乙酸酐(10ml, 0.105摩尔, 36.47摩尔当量)持续15分钟, 并在乙酸酐添加期间保持反应混合物的温度低于5°C。将反应混合物在5-10°C下搅拌6小时。通过添加冰冷水(100ml)淬灭过量的乙酸酐, 然后通过添加10重量%NaHCO₃水溶液将pH调节至7。用乙酸乙酯(2 x 100ml)萃取水性混合物。将合并的乙酸乙酯萃取物经无水Na₂SO₄(1克)干燥, 过滤到250ml圆底烧瓶当中。在35-40°C下减压浓缩滤液至干, 得到粗产物, 为淡黄色糖浆状液体, 然后借助于通过硅胶柱利用乙酸乙酯和己烷(1:3v/v)的混合物得到纯产物, 为灰白色晶体(1.12克, 收率: 90.3%, HPLC纯度:>99%)。

[0291] 1b. 腺苷, 5'-S-甲基-5'-硫代-, 2', 3'-二乙酸酯(化合物#68)的合成:

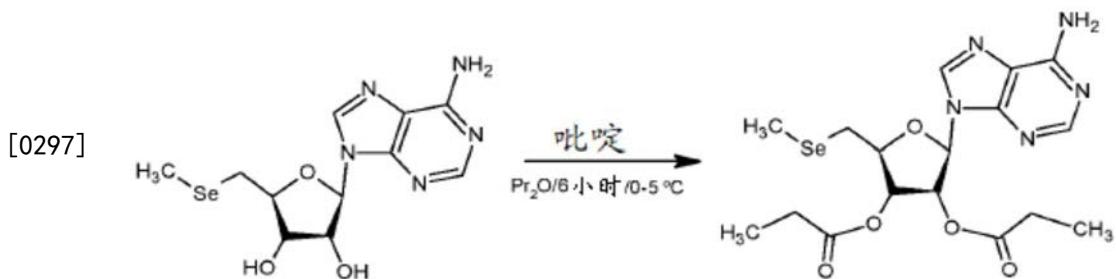
[0292] 方案:



[0294] 合成程序: 将5'-S-甲基-5'-硫代-腺苷(1.0克, 0.0033摩尔, 1.0摩尔当量)和无水吡啶(10ml)置于配有滴液漏斗、惰性气体入口/出口和温度计的烘箱干燥的50ml三颈烧瓶中。将反应装置置于冰/盐浴中并开始搅动。当溶液的温度降至0°C时, 滴加乙酸酐(10ml, 0.105摩尔, 31.8摩尔当量)持续15分钟, 并在乙酸酐添加期间保持反应混合物的温度低于5°C。将反应混合物在5-10°C下搅拌6小时。通过添加冰冷水(100ml)淬灭过量的乙酸酐, 然后通过添加10重量%NaHCO₃水溶液将pH调节至7。用乙酸乙酯(2 x 100ml)萃取水性混合物。将合并的乙酸乙酯萃取物经无水Na₂SO₄(1克)干燥, 过滤到250ml圆底烧瓶当中。在35-40°C下减压浓缩滤液至干, 得到粗产物, 为淡黄色糖浆状液体, 然后借助于通过硅胶柱利用乙酸乙酯和己烷(1:3v/v)的混合物得到纯产物, 为灰白色晶体(1.08克, 收率: 87%, HPLC纯度:>99%)。

[0295] 1c. 腺苷, 5'-Se-甲基-5'-硒代-, 2', 3'-二丙酸酯(化合物#69)的合成:

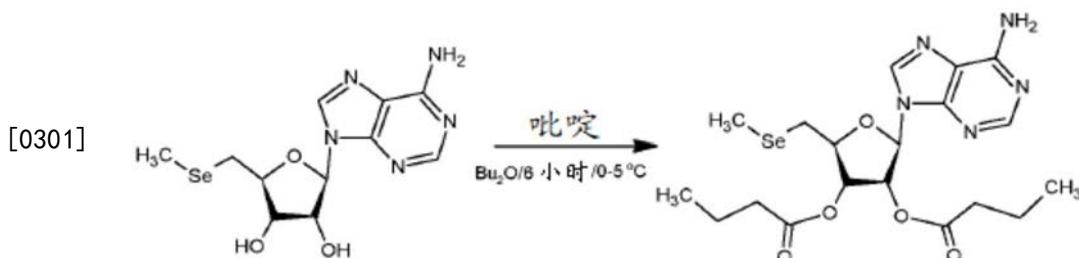
[0296] 方案:



[0298] 合成程序: 将5'-Se-甲基-5'-硒代-腺苷(1.0克, 0.0029摩尔, 1.0摩尔当量)和无水吡啶(10ml)置于配有滴液漏斗、惰性气体入口/出口和温度计的烘箱干燥的50ml三颈烧瓶中。将反应装置置于冰/盐浴中并开始搅动。当溶液的温度降至0°C时, 滴加丙酸酐(10ml, 0.078摩尔, 27.0摩尔当量)持续15分钟, 并在丙酸酐添加期间保持反应混合物的温度低于5°C。将反应混合物在5-10°C下搅拌6小时。通过添加冰冷水(100ml)淬灭过量的丙酸酐, 然后通过添加10重量% NaHCO₃水溶液将pH调节至7。用乙酸乙酯(2 x 100ml)萃取水性混合物。将合并的乙酸乙酯萃取物经无水Na₂SO₄(1克)干燥, 过滤到250ml圆底烧瓶当中。在35-40°C下减压浓缩滤液至干, 得到粗产物, 为淡黄色糖浆状液体, 然后借助于通过硅胶柱利用乙酸乙酯和己烷(1:3v/v)的混合物得到纯产物, 为灰白色晶体(1.18克, 收率: 89.3%, HPLC纯度:>99%)。

[0299] 1d. 腺苷, 5'-Se-甲基-5'-硒代-, 2', 3'-二丁酸酯(化合物#70)的合成:

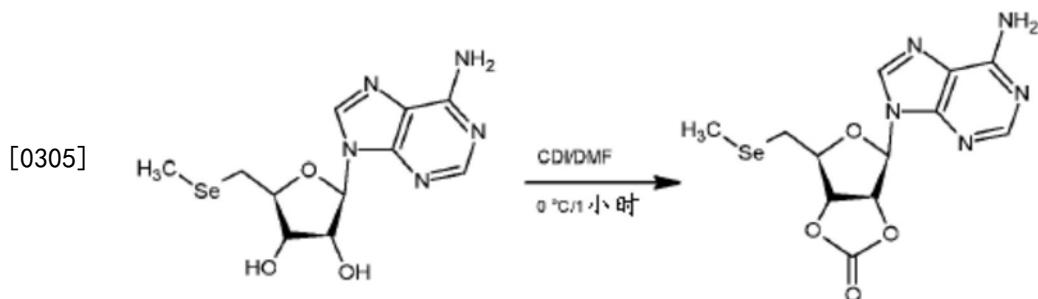
[0300] 方案:



[0302] 合成程序: 将5'-Se-甲基-5'-硒代-腺苷(1.0克, 0.0029摩尔, 1.0摩尔当量)和无水吡啶(10ml)置于配有滴液漏斗、惰性气体入口/出口和温度计的烘箱干燥的50ml三颈烧瓶中。将反应装置置于冰/盐浴中并开始搅动。当溶液的温度降至0°C时, 滴加丁酸酐(10ml, 0.078摩尔, 27.0摩尔当量)持续15分钟, 并在丁酸酐添加期间保持反应混合物的温度低于5°C。将反应混合物在5-10°C下搅拌6小时。通过添加冰冷水(100ml)淬灭过量的丁酸酐, 然后通过添加10重量% NaHCO₃水溶液将pH调节至7。用乙酸乙酯(2 x 100ml)萃取水性混合物。将合并的乙酸乙酯萃取物经无水Na₂SO₄(1克)干燥, 过滤到250ml圆底烧瓶当中。在35-40°C下减压浓缩滤液至干, 得到粗产物, 为淡黄色糖浆状液体, 然后借助于通过硅胶柱利用乙酸乙酯和己烷(1:3v/v)的混合物得到纯产物, 为灰白色晶体(1.20克, 收率: 85.7%, HPLC纯度:>99%)。

[0303] 1e. 腺苷, 5'-Se-甲基-5'-硒代-, 环状2', 3'-碳酸酯(化合物#50)的合成:

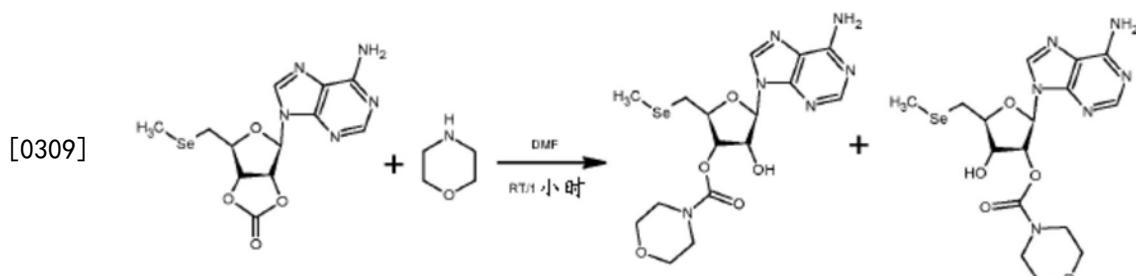
[0304] 方案:



[0306] 合成程序: 将5'-Se-甲基-5'-硒代-腺苷(1.0克, 0.0029摩尔, 1.0摩尔当量)和无水二甲基甲酰胺(20ml)置于配有滴液漏斗、惰性气体入口/出口和温度计的烘箱干燥的50ml三颈烧瓶中。将反应装置置于冰/盐浴中并开始搅动。当溶液的温度降至0°C时, 在低于5°C下添加羰基二咪唑(CDI, 0.57克, 0.0035摩尔, 1.21摩尔当量)。将反应混合物缓慢升温至室温, 然后在相同温度和氩气氛下将反应混合物搅拌4小时。在减压下移除溶剂, 得到残留物, 将其溶解在氯仿(5ml)和乙醇(几滴)的混合物中, 得到澄清溶液, 用1%乙酸水溶液(2 x 1ml)洗涤有机层, 经无水Na₂SO₄(1克)干燥, 过滤到250ml圆底烧瓶当中。在25–30°C下减压浓缩滤液至干, 得到粗产物, 为淡黄色糖浆状液体。将粗产物溶解在乙醇/水混合物(1:1v/v)中, 然后在45–50°C下减压浓缩至干, 得到残留物, 添加己烷(25ml)并搅拌10分钟, 然后在30–35°C下减压浓缩至干, 得到所需产物, 为灰白色晶体(1.02克, 收率: 95.3%, HPLC纯度: >99%)。

[0307] 1f. 腺苷, 5'-Se-甲基-5'-硒代-, 2'-吗啉代氨基甲酸酯和腺苷, 5'-Se-甲基-5'-硒代-, 3'-吗啉代氨基甲酸酯的区域异构体混合物(化合物#53)的合成:

[0308] 方案:



[0310] 合成程序: 将腺苷, 5'-Se-甲基-5'-硒代-, 环状2', 3'-碳酸酯(1.0克, 0.0027摩尔, 1.0摩尔当量)和无水二甲基甲酰胺(10ml)置于配有滴液漏斗、惰性气体入口/出口和温度计的烘箱干燥的50ml三颈烧瓶中。在20–25°C下添加吗啉(0.26克, 0.0029摩尔, 1.1摩尔当量)。在室温下搅拌反应混合物1小时, 然后在45–50°C下减压浓缩至干, 得到残留物, 添加己烷(25ml)并搅拌10分钟以沉淀出所需的区域异构体混合物产物, 为灰白色固体(1.12克, 收率: 91%, HPLC纯度: >99%)。

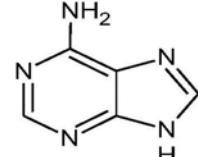
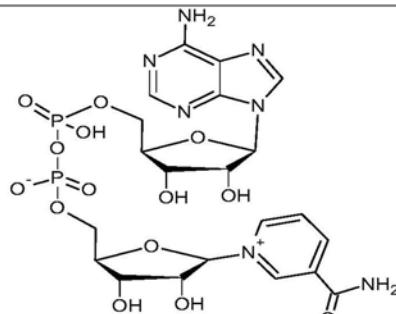
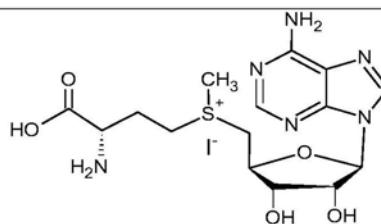
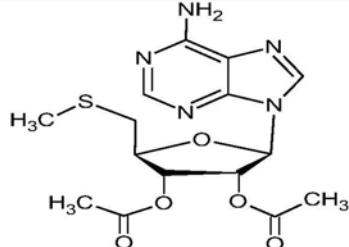
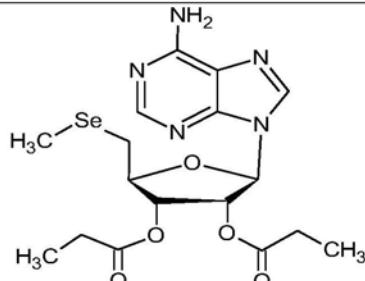
[0311] 实施例2.

[0312] 在本文所述的实施例中, 在细胞培养物中(体外)测试表1中列出的合成化合物对葡萄糖产生和细胞活力的影响。特别地, 测试的细胞是人肝癌HepG2和大鼠肝脏H4IIIE肝细胞。

[0313] 表1.

缩写化合物 名称	化合物名称	化合物结构	分子量	溶剂	
[0314]	化合物-C	5'-甲基硒代腺苷		344.22	DMSO
	化合物-D	5'-硒代腺苷基高半胱氨酸		431.30	DMSO
	化合物-E	γ -L-谷氨酰基-Se-甲基-L-硒代半胱氨酸		311.19	水

化合物#43 (化合物-C 的 二乙酰酯)	甲基硒代腺苷 的二乙酰酯		428.30	DMSO
化合物#50	甲基硒代腺苷 的环状碳酸酯		370.22	DMSO
化合物#53 [0315]	甲基硒代腺苷 与吗啉的氨基 甲酸酯类似物		457.34	DMSO
化合物#57	腺苷		267.24	DMSO
化合物#59 (细胞渗透性 腺苷酸环化 酶抑制剂)	2',5'-二脱氧腺 苷		235.24	DMSO
化合物#60	5'-脱氧腺苷		251.24	水

	化合物#61 (腺昔酸环化 酶抑制剂) 22,536)	9-(四氢呋喃 -2-yl)-9h-嘌呤 -6-胺 (SQ 22,536)		205.21	DMSO
	化合物#62	腺嘌呤		135.12	DMSO
[0316]	化合物#63	烟酰胺腺嘌呤 二核苷酸 (NAD)		664.43	水
	化合物#64	S-(5'-腺昔 基)-L-蛋氨酸碘 化物(SAM)		526.35	水
	化合物#68 (化合物#43 的硫类似物)	甲基硫代腺昔 的二乙酰酯		381.40	DMSO
	化合物#69 (化合物-C 的 二丙酰酯)	甲基硒代腺昔 的二丙酰酯		456.35	DMSO

[0317]	化合物#70 (化合物-C 的 二丁酰酯)	甲基硒代腺苷 的二丁酰酯		484.40	DMSO
--------	-----------------------------	-----------------	--	--------	------

[0318] 材料和方法

[0319] 细胞系和化合物

[0320] 人肝癌HepG2和大鼠肝癌H4IIE细胞购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection) (ATCC, Manassas, Virginia)。在补充有10%FBS的伊格尔最低必需培养基(EMEM)中培养HepG2细胞和H4IIE细胞。

[0321] 化合物#43和表1中列出的其它化合物要么是合成的,要么得自商业来源(如果有的话)。如通过HPLC测定,所有测试化合物的纯度经证实 $\geq 99\%$ 。将所有这些化合物要么溶解在DMSO中,要么溶解在水中,得到用于实验的126.7或12.67mM储备溶液。二甲双胍和胰岛素购自Sigma。

[0322] 葡萄糖产生测定

[0323] 将等数量的人HepG2或大鼠H4IIE细胞($1-1.5 \times 10^5$ 个细胞/孔)接种在含有10%FBS的培养基中的96孔板上持续24小时。然后将细胞用PBS洗涤两次,并在37°C下用在100μl葡萄糖产生培养基(补充有20mM乳酸钠、2mM丙酮酸钠和5mM HEPES的不含葡萄糖、不含酚红的DMEM培养基)中的各种浓度的化合物、二甲双胍或胰岛素处理,持续24小时(仅H4IIE细胞)或48小时(仅HepG2细胞)。还将细胞与0.24%DMSO(实验中使用的DMSO溶剂的最大体积)一起温育。

[0324] 在上述处理后,收集50μl培养基,并使用Molecular Probes Amplex Red葡萄糖测定试剂盒(目录号A22189)根据制造商的方案进行葡萄糖分析。使用Promega的CellTiter96® AQueous One Solution细胞增殖测定试剂盒根据制造商的方案和说明测定在上述化合物处理后的培养板中的细胞数或活力。简言之,在取出50μl用于葡萄糖测定的培养基后,将细胞与AQueous One溶液(25μl储备溶液和50μl预温热PBS/每孔)一起在37°C下温育1小时,并通过Bio-Tek微孔板读板仪测定每个样品中的OD490nm吸光度。通过用普通培养基(无细胞接种)中的OD490nm减去培养细胞中的OD490nm确定培养孔中的细胞活力。通过由每个孔中的细胞活力将培养基中的葡萄糖浓度标准化来得到培养细胞中的葡萄糖产生。上述分析每次处理检查至少3个样品。数据以这些样品的平均值±SEM给出。实验重复至少两次。

[0325] 使用ED50 Plus v1.0在线软件确定化合物#43或二甲双胍抑制葡萄糖产生的半最大抑制浓度(IC50值)。

[0326] 结果和讨论

[0327] 1.胰岛素和化合物溶剂DMSO对HepG2细胞中的葡萄糖产生的影响

[0328] 如图1的左图片中所示,分别用10nM和100nM胰岛素处理导致HepG2细胞中的葡萄糖产生减少20%和30%,而使用最大体积的化合物溶剂DMSO不影响培养的HepG2细胞中的葡萄糖水平。这些结果表明在葡萄糖产生的抑制中,HepG2细胞对胰岛素有反应,并且观察

到的测试化合物对葡萄糖产生的影响不是由于DMSO的潜在影响。这些结果确定HepG2细胞构成用于筛选具有胰岛素样活性并且可抑制肝细胞中的葡萄糖产生的化合物的适当细胞系统。

[0329] 2. 化合物#43可模拟胰岛素以抑制HepG2细胞中的葡萄糖产生

[0330] 如图1中所示,HepG2细胞与测试剂量的化合物#43在无血清条件下一起温育导致培养基中的葡萄糖水平降低。在用化合物#43 (3.8 μ M) 处理后观察到的HepG2细胞使葡萄糖产生的减少与使用胰岛素 (100nM) 时所达到的相当,而更高剂量的化合物#43 (7.6、15.2和30.4 μ M) 远比100nM胰岛素更有效。此外,在所有测试剂量下的化合物#43处理后,在HepG2细胞中没有观察到细胞活力的显著降低(数据未显示)。这些结果表明,化合物#43是可抑制HepG2细胞中的葡萄糖产生的胰岛素模拟物。

[0331] 3. 化合物#43本身在抑制HepG2细胞中的葡萄糖产生方面显示出比三种化合物组合CDE更高的终点效力

[0332] 在所有测试剂量 (C/D/E的1:1:1比例) 下用化合物CDE处理HepG2细胞也抑制葡萄糖产生,效力与100nM胰岛素相当。3.8 μ M剂量的化合物#43在抑制HepG2细胞中的葡萄糖产生方面与CDE组合产物(其含有3.8 μ M的每种单独化合物)一样有效。然而,7.6 μ M或更高剂量的化合物#43在抑制HepG2细胞中的葡萄糖产生方面比CDE更有效。这些结果表明,化合物#43本身在抑制HepG2细胞中的葡萄糖产生方面显示出比三种化合物组合CDE更高的终点效力。要注意的是,在每个剂量点下化合物CDE中的硒浓度是化合物#43中的三倍,这些结果可能表明化合物#43的一个或多个结构特征(除了其硒分子之外)可能至少在某些情况下有助于其活性。

[0333] 4. 当硫取代化合物#43中的硒分子时,HepG2中的葡萄糖产生的抑制被消除

[0334] 如图1的右图片中所示,用含硫化合物化合物#68(化合物#43的硫类似物)或化合物#64(SAM)以及其它列出的非硒化合物处理细胞对降低HepG2细胞中的葡萄糖产生影响最小。化合物#43与#68之间在抑制葡萄糖产生方面的突出差异表明,化合物#43中的硒分子有助于其在抑制HepG2细胞中的葡萄糖产生方面的功能。

[0335] 5. 硒化合物对抑制HepG2细胞中的葡萄糖产生的差别影响

[0336] 如上所述,含硒化合物C、D和E的等摩尔混合物(CDE)在指示剂量下抑制人HepG2细胞中的葡萄糖产生。要注意的是,图1的X轴上指示的化合物浓度是指混合物中每种含Se化合物的Se浓度,总Se浓度实际上是X轴上指示的三倍。这样做是为了便于将混合物组分与这些实验中测试的单分子候选物中的每一者进行直接比较。

[0337] 如果葡萄糖产生的抑制仅仅是由于硒,则可预期CDE因为含有三倍于化合物#43的硒,其将产生比后者更强劲的响应。情况显然不是这样。

[0338] 图1(左侧图片)显示化合物C、D、43、50、53、69和70中的每一者都抑制葡萄糖产生,其中化合物43最有效。进一步地,发现化合物E刺激HepG2细胞中的葡萄糖产生。

[0339] 综合起来,这些结果表明:

[0340] (i) 化合物中的硒分子是有效抑制葡萄糖产生所需的(比较图1的左侧图片中的化合物#43与其恰当硫类似物,即右侧图片中的化合物#68)。

[0341] (ii) 然而,硒分子单独可能不足以抑制葡萄糖产生(在一些情况下,含硒的结构类似的化合物表现出较低或相反的效果);

[0342] (iii) 单独增加硒分子的浓度可能不会提高效力 (CDE的硒浓度是化合物#43的三倍,但还是不那么有效) ;

[0343] (iv) 在测试的化合物当中,化合物#43在抑制肝细胞中的葡萄糖产生方面表现出最高的效力。

[0344] 6. 分析所列硒化合物的结构特征以确定可能有助于其活性的化学基团

[0345] 化合物C和D的比较表明5' 甲基硒代基团和5' 硒代高半胱氨酸可提供类似的葡萄糖产生的抑制。化合物43、50、53、69和70的比较表明,在2' 和3' 位置的二乙酰酯 (#43) 提供比环状碳酸酯 (化合物#50)、吗啉代羧酸酯 (#53)、二丙酰酯 (#69) 和二丁酰酯 (#70) 更高的葡萄糖产生的抑制。腺嘌呤、腺苷及腺昔的若干化学变体不抑制HepG2细胞中的葡萄糖产生。此外,两种腺苷酸环化酶抑制剂 (#59和61) 也不抑制葡萄糖产生,表明化合物#43在抑制葡萄糖产生方面的作用不太可能是由于细胞AMP水平的降低 (Hardie DG. Cell Metabolism 2013;17 (3) :313-314)。总之,结果表明除了腺嘌呤和硒分子之外,一个或多个特征可能至少在某些情况下有助于活性。

[0346] 7. 化合物#43和二甲双胍(熟知的抗糖尿病药)在抑制HepG2和大鼠H4IIE细胞中的葡萄糖产生方面的比较研究

[0347] 如上所述,在化合物#43处理后观察到HepG2细胞中葡萄糖产生的强力抑制。将此化合物的效果与熟知的抗糖尿病药二甲双胍进行比较。如上所述和图2的上图片中所示,观察到在化合物#43处理后HepG2细胞中葡萄糖水平的剂量依赖性降低,并且IC50(半最大抑制浓度)值为15.5μM。可以看到,500μM剂量的二甲双胍不抑制HepG2细胞中的葡萄糖产生,反而显示出一些刺激效果。更高剂量的二甲双胍 (0.5-4mM) 对这些细胞显示出细胞毒性(数据未显示)。这些结果表明,与胰岛素类似,化合物#43可抑制HepG2细胞中的葡萄糖产生。

[0348] 已报道大鼠H4IIE肝细胞可对二甲双胍做出反应,导致葡萄糖产生降低。因此,此大鼠肝细胞系用于进一步证实化合物#43对葡萄糖产生的抑制活性,并将化合物#43的效力与二甲双胍进行比较。如图2中所示,分别用化合物#43和二甲双胍处理导致在无血清条件下H4IIE细胞中葡萄糖产生的剂量依赖性减少。在测试剂量下没有观察到这些化合物对细胞活力的毒性作用(数据未显示)。化合物#43的IC50为17.8μM,这几乎与其在HepG2细胞中的IC50相同。相比之下,36.25μM剂量的二甲双胍显示几乎没有或没有抑制活性,且此实验中的二甲双胍的IC50为275μM。这些结果表明化合物#43在抑制培养的大鼠肝细胞中的葡萄糖产生方面比二甲双胍更有效(至少15倍有效)。

[0349] 总之,化合物#43、50、53、69和70在抑制培养的肝细胞中的葡萄糖产生方面均显示出活性。然而,化合物#43是迄今针对葡萄糖产生测试抑制剂活性最有效的单一化合物,抑制剂活性超过HepG2细胞中的高胰岛素剂量 (100nM) 的活性。

[0350] 此外,化合物#43被证明在测试的两个肝细胞系中都远比双胍类药物二甲双胍更有效。二甲双胍目前是用于治疗2型糖尿病的一线药物。

[0351] 实施例3:化合物#43和密切相关的硒代有机化合物 (#C、#50、#69和#70) 连同化合物#43的硫类似物 (化合物#68) 在胰岛素抵抗且有糖尿病的瘦素受体 (Lepr) 自发无效突变小鼠中调节血流中的葡萄糖和/或HbA1c水平以及提高葡萄糖耐量方面的研究

[0352] 材料和方法

[0353] 化合物

[0354] 在Alltech, Inc的化学实验室中合成化合物#43、#C、#50、#68、#69和#70。如通过HPLC测定,所有测试化合物的纯度经证实均≥99%。

[0355] 动物

[0356] 5-10周龄雄性糖尿病自发突变(瘦素受体突变)Lepr^{db/db}小鼠(C57BL/6J品系)购自Jackson Laboratory(Bar Harbor, Maine),并在无病原体的饲养箱中饲养,可自由获取食物和水。

[0357] 用化合物#43及其它化合物进行长期处理

[0358] 对38日龄的雄性Lepr^{db/db}小鼠每天腹膜内(ip)注射含有0.2%DMSO的生理盐水(0.09%NaCl)、化合物#C、化合物#50、化合物#68和/或化合物#43(每千克体重25μg硒或硫当量的每种化合物,稀释在无菌生理盐水中),持续43-90天的时段。使用天平每天记录上述经处理的小鼠的体重,并且每天监测任何可见的异常动物总体形态和行走行为。治疗后,使动物空腹过夜,然后进行血糖或HbA1c测定、葡萄糖耐量测试或组织收集。

[0359] 为了对化合物#43、#69和#70的任何潜在抗糖尿病效果进行比较研究,对41日龄雄性Lepr^{db/db}小鼠每天腹膜内(ip)注射含有0.2%DMSO的生理盐水(0.09%NaCl)、化合物#43、化合物#69或化合物#70(每千克体重25μg每种化合物的硒,稀释在无菌生理盐水中)。治疗43天后,使动物空腹过夜,然后进行血糖和葡萄糖耐量测试。用这些化合物每天进行处理持续90天后,收集来自这些动物的血清,然后进行血液HbA1c测定。

[0360] 化合物#43急性处理

[0361] 空腹过夜后,对8-10周龄Lepr^{db/db}小鼠腹膜内注射含有0.2%DMSO的生理盐水(0.09%NaCl)或化合物#43(0.0054、0.054、0.54或5.4mg化合物#43(在无菌生理盐水中稀释化合物储备)/千克体重。注射盐水或化合物之后,使小鼠返回它们的笼子,自由饮水,但不进食,持续1、2、3、5和8小时。在注射后的每个时间点,从每只小鼠的尾部收集一小滴血用于葡萄糖测定。

[0362] 对非空腹条件下的另外的6周龄Lepr^{db/db}小鼠腹膜内注射含有0.2%DMSO的生理盐水(0.09%NaCl)或单剂量的化合物#43(5.4mg化合物/kg体重)。注射后,使动物返回它们的笼子,自由饮水和进食。24小时后,收集来自小鼠尾部的一小滴血用于葡萄糖测定。

[0363] 血糖测定

[0364] 在用生理盐水或化合物处理后或在团注葡萄糖后,通过剪断小鼠尾尖收集来自每只小鼠的一小滴血。使用最大能测量600mg/dL葡萄糖的血糖仪测定血糖水平。

[0365] 葡萄糖耐量测试

[0366] 如先前所述进行葡萄糖耐量测试(Li等人,Int J Biol Sci 2008;4:29-36)。简言之,对盐水或化合物处理后空腹过夜的Lepr^{db/db}小鼠腹膜内注射2克/kg体重的20%D-葡萄糖。使用最大能测量600mg/dL葡萄糖的血糖仪测定在0时间(临注射葡萄糖前)、注射葡萄糖后0.25、0.5、1和2小时的血糖水平。因此,在数据分析中将超过600mg/dL的血糖水平计为600mg/dL。

[0367] 血液和血清HbA1c测定

[0368] 在盐水或化合物处理后,将来自小鼠尾部的一小滴血收集在涂覆EDTA的eppendorf管中(以防止血液凝固)(Fisher Scientific),然后使用Crystal Chem或Kamiya的小鼠糖化血红蛋白A1c ELISA试剂盒根据制造商的方案进行HbA1c测定。还在最终处理

后,收集小鼠血清,并使用Kamiya Biomedcal Company的小鼠HbA1c试剂盒根据制造商的方案进行HbA1c测定。

[0369] 统计分析

[0370] 在适用的情况下,采用Student t检验来确定经盐水处理的组与经化合物处理的组之间的差异的统计学显著性,P值小于0.05被认为是显著的。数据以图中指示的小鼠数的平均值±SEM给出。

[0371] 结果和讨论

[0372] $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠缺乏瘦素受体基因 (Lepr) 的所有已知同种型。此纯合小鼠模型是具有受损的葡萄糖耐量、降低的胰岛素敏感性、高血糖症和高胰岛素血症的侵袭性II型糖尿病小鼠模型。这些小鼠在3至4周龄时显示出严重的肥胖,10至14天血浆胰岛素开始升高,并且在约4-8周龄时发展成高血糖症(即,高血糖水平) (Coleman DL. 1978 Diabetologia 14: 141-8)。

[0373] 体外研究显示化合物#43可模拟但绕过胰岛素以抑制葡萄糖产生,其效力远大于密切相关的化合物,如化合物#C或#50。此外,化合物#43的含硫类似物(化合物#68)对HepG2细胞中的葡萄糖产生几乎没有或没有抑制效果(图1-2)。因此,胰岛素抵抗的 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠是一种理想的体内模型系统,用于研究实验化合物在潜在降低血流中的葡萄糖以及针对严重糖尿病背景提高胰岛素敏感性和葡萄糖耐量方面的用途。

[0374] 1. 在长期处理后,三种测试的硒代有机化合物 (#C、#50、#43) 当中,化合物#43是对抗 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠中的高血糖症最有效的化合物

[0375] 如在 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠中所示,采用化合物的施用方案来研究测试化合物在高血糖症的治疗中的潜在作用。通过大致在高血糖症发作时(出生后约4-8周发展成)腹膜内注射化合物来对小鼠每天施用治疗。每天注射三种化合物(即,递送相同浓度硒的化合物#43、化合物#C和化合物#50),以研究这些硒代有机化合物针对胰岛素抵抗的小鼠的高血糖症是否有可测量的效果。

[0376] 据发现用所有测试的化合物治疗均不影响这些突变小鼠的体重增加(数据未显示),表明测试化合物可能对 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠中显示的对食物消耗异常增加的食欲几乎没有或没有抑制效果。另外,在治疗期间,在经盐水处理的(对照)与经化合物处理的 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠之间没有动物总体形态和行走行为方面的可见差异(数据未显示)。这些结果表明,这些化合物在测试剂量下对动物行为或活动没有毒性作用。

[0377] 化合物#C、#50和#43当中,用化合物#43处理导致 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠的血流中葡萄糖水平下降最显著,与对照相比降低约45%(参见图3左图片),尽管经化合物#43处理的 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠中的血糖水平仍然比同龄正常野生型小鼠高(约100mg/dL,数据未显示)。此外,这些结果清楚地表明,化合物#43可显著降低这种严重II型糖尿病小鼠模型的血流中的葡萄糖水平,表明此化合物可能用于预防高血糖症。此外,这些结果为硒代有机化合物对抗高血糖症的差别效果提供了良好的证据,并且显示化合物#43是用于治疗高血糖症最有效的化合物(这三种测试化合物当中)。

[0378] 此外,收集来自经化合物#C、#50和#43处理的 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠的血清并进行HbA1c测试。HbA1c水平代表过去2至3个月中血糖浓度的长期指数,并且该测试广泛用于临床医学以监测糖尿病患者的血糖水平历史。如图3中所示,化合物#C、#50和#43当中,与盐水处理组相

比,化合物#43处理导致仅血清HbA1c水平的显著下降(降低约20%)。这些结果与上面观察到的这三种化合物对小鼠空腹葡萄糖水平(图3中的左图片)以及对体外葡萄糖产生(HepG2细胞,图1)的差别影响一致。

[0379] 因此,所述结果提供了体内证据,即硒代有机化合物对高血糖症有差别效果,并且化合物#43是这三种含硒化合物(#C、#50和#43)当中最有效的化合物,具有治疗胰岛素抵抗的受试者的高血糖症的明显潜力。

[0380] 2.在测试剂量下用硫分子替换化合物#43中的硒分子对长期处理后的Lepr^{db/db}小鼠的高血糖症没有显著影响。

[0381] 体外研究显示,化合物#43但不是化合物#68强力抑制HepG2细胞中的葡萄糖产生(图1)。上述研究显示,化合物#43可降低Lepr^{db/db}小鼠中的葡萄糖输出和HbA1c水平(图3)。为进一步证实化合物#43在Lepr^{db/db}小鼠中的抗糖尿病效果,并研究化合物#43中的硒分子是否是这种抗高血糖症效果所需的,通过腹膜内注射化合物#43及其直接含硫类似物化合物#68中的等量的硒或硫来对38日龄雄性Lepr^{db/db}小鼠每天施用治疗,持续3个月。

[0382] 再次地,在用化合物处理3个月的时间后,在Lepr^{db/db}小鼠中没有可见的形态、行走行为异常或体重变化,表明化合物#43或#68在测试剂量下对这些小鼠没有明显的毒性作用。然而,持续3个月时间注射化合物#43导致空腹血糖水平的统计学显著降低,而化合物#68不显著降低血糖水平(图4,左图片)。更显著地,化合物#43处理3个月后的空腹葡萄糖水平降至约135mg/dL,这接近了正常非糖尿病/肥胖小鼠的报告血糖水平(约100mg/dL)。与这些血糖水平降低一致的是,与对照(盐水处理)组相比,在化合物#43处理3个月后来自Lepr^{db/db}小鼠的血液样品中的HbA1c水平也显著降低(约30%)。然而,化合物#68处理不影响Lepr^{db/db}小鼠中的血液HbA1c水平。用化合物#43处理这个90天后Lepr^{db/db}小鼠中HbA1c水平降低的程度(图4)似乎比化合物#43处理42天之后的Lepr^{db/db}小鼠更明显(图3)。

[0383] 总之,这些体内结果进一步证实了这样的结果,即化合物#43可显著降低侵袭性II型糖尿病的小鼠模型中的血糖和HbA1c水平,表明化合物#43在治疗糖尿病患者的高血糖症方面有潜力。此外,结果还证实,在用硫原子替换化合物#43中的硒原子后,化合物#43的抗糖尿病潜力丧失。

[0384] 3.化合物#43在长期处理后的Lepr^{db/db}小鼠中表现出比化合物#69和#70更高的抗高血糖症潜力

[0385] 体外研究显示,用二丙酰基(化合物#69)或丁酰基(化合物#70)替换化合物#43的2'、3'位置处的二乙酰基减弱了化合物#43抑制HepG2细胞中的葡萄糖产生的活性(图2)。上述研究显示,化合物#43可显著降低Lepr^{db/db}小鼠中的葡萄糖输出和HbA1c水平(图3-4)。为进一步证实化合物#43在Lepr^{db/db}小鼠中的抗糖尿病效果,并研究化合物#43中的二乙酰基对这种抗高血糖症效果的贡献,通过持续43和90天腹膜内注射化合物#43、#69和#70中的等量硒来对41日龄雄性Lepr^{db/db}小鼠每天施用治疗。

[0386] 再次地,在用这三种化合物处理90天后,Lepr^{db/db}小鼠中没有可见的形态、行走行为异常或体重变化,表明化合物#43、#69或#70在测试剂量下对这些小鼠没有明显的毒性作用。据发现持续43天注射化合物#43导致空腹血糖水平的统计学显著降低(从盐水组中的约290mg/dL下降约35%至188mg/dL)(图5左侧图片)。用二丁酰基替换化合物#43中的二乙酰基(化合物#70)也导致Lepr^{db/db}小鼠中的空腹血糖水平降低,但不如化合物#43显著(图5左

侧图片)。用二丙酰基替换化合物#43中的二乙酰基(化合物#69)导致 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠中的空腹血糖水平略有增加(图5左侧图片)。为进一步证实上述观察结果,通过再47天腹膜内注射化合物#43、#69和#70中的等量硒来继续每天对这些 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠施用治疗(每天进行化合物处理,总共90天),收集血清并进行血液HbA1c测定。如图5的右侧图片中所示,化合物#43处理导致HbA1c水平显著降低(图5,右侧图片)。初步评估表明,化合物#70处理也导致HbA1c水平降低约50%(图5,右侧图片),而化合物#69处理未导致HbA1c水平显著降低(图5,右侧图片);进一步审查这些数据确定,化合物#69和化合物#70都没有任何显著的效果(图5,右侧图片)。总之,这些结果表明化合物#43在治疗胰岛素抵抗的受试者的高血糖症方面有很大潜力。此外,结果表明化合物#43中的2'、3'位置处的二乙酰基有助于其体内抗高血糖症功能,并且将二乙酰基延长一个或两个碳原子在某些情况下可能对葡萄糖稳态有负面影响。

[0387] 4. 化合物#43急性处理导致 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠中的血糖水平的剂量依赖性降低

[0388] 上述研究表明,用化合物#43长期处理可显著降低血糖和HbA1c水平。为确定有效剂量范围并确定对化合物#43的响应持续时间,使8-10周龄 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 雄性小鼠空腹过夜,然后腹膜内注射盐水(含有0.2%DMSO,化合物#43储备溶剂的最大注射体积)、0.0054、0.054、0.54和5.4mg化合物#43(通过用盐水稀释储备化合物制备)/kg体重。检查临注射前及注射后1、2、3、5和8小时(在空腹条件下,但可自由饮水) $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠中的血糖水平,并将每只单独动物在每个时间点的所得血糖水平作图。

[0389] 急救单次注射上述剂量的化合物#43不会对总体形态和行走行为产生任何可见的毒性作用。在经盐水处理的 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠中,在8小时测试时间段期间血糖水平仅略有下降(约50-70mg/dL)(图6),这与这些 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠显示出有缺陷的葡萄糖清除能力的事实一致。然而,在所有测试剂量下用化合物#43处理导致血糖水平显著降低(当与其在每个时间段的盐水组相比时),在注射后2或3小时的最低剂量的化合物#43处理除外(其中降低的葡萄糖水平接近于统计学显著)(图6)。结果显示,化合物#43在所有测试剂量下均有效降低单次注射后1小时的血糖水平。这表明化合物#43可在短时间段(即,1小时)内到达体内相关靶组织以引发其降低葡萄糖的效果。化合物#43在空腹条件下降低血糖水平的活性在施用后2至5小时达到峰值,并且此效果会再维持至少3小时。由于测试动物(其已经空腹过夜并且在测试的8小时时间段中持续空腹)不能进一步空腹,因此由这些实验不能确定化合物#43作用的最长有效持续时间。

[0390] 结果表明,在广泛使用的胰岛素抵抗和2型糖尿病的动物模型中,用1000倍浓度范围内的化合物#43急性处理显著降低了血糖水平。化合物#43是速效的(处理后≤1小时),并且保持活性至少8小时。

[0391] 5. 化合物#43急性处理削弱年轻 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠的高血糖症的进展

[0392] 如上面所讨论的那样, $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠在10至14日龄时开始显示升高的血浆胰岛素,并且在大约4-8周龄时显示高血糖症(即,高血糖水平)(Coleman DL. 1978 Diabetologia 14: 141-8)。为测试化合物#43是否具有削弱高血糖症发展的潜力,经由急救注射在较年轻的小鼠中施用单剂量的化合物#43。简言之,对正常喂养条件下的6-周龄 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 雄性小鼠一次腹膜内注射含有0.2%DMSO的盐水或5.4mg/kg体重剂量的化合物#43。处理后24小时,在这些小鼠可随意获取食物和水的同时测定它们的血糖水平。

[0393] 如图7中所示,这些年轻 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠在盐水处理后24小时的血糖水平显著增加

(增加约20%)，表明这些小鼠仍处于发展成高血糖症的过程中。相反，化合物#43处理导致Lepr^{db/db}小鼠血糖水平显著降低(约20%) (图7)。

[0394] 这些结果表明化合物#43具有削弱高血糖症发展的潜力。此外，这些研究还表明，在喂养条件下，化合物#43在这些糖尿病小鼠中降低葡萄糖输出的有效性有可能持续至少24小时。

[0395] 6. 施用化合物#43后糖尿病Lepr^{db/db}小鼠的葡萄糖耐量增强

[0396] 葡萄糖耐量测试确认血糖快速升高后(例如，通常在餐后)身体处理葡萄糖的方式的异常。胰岛素不仅在抑制肝脏中的葡萄糖产生方面起着关键作用，而且在肌肉、肝脏和脂肪细胞中的葡萄糖摄取、储存和代谢方面起着关键作用，导致血流中的葡萄糖水平较低。

[0397] 糖尿病患者的葡萄糖耐量非常低，这要么是因为他们无法产生胰岛素，要么是因为无法对胰岛素有效地做出反应以维持葡萄糖稳态。本文所述的体外研究表明，化合物#43不仅可模拟胰岛素，而且还可绕过胰岛素以抑制葡萄糖产生(图1-2)。考虑到在这些突变小鼠中显示出葡萄糖耐量受损和胰岛素抵抗的事实，Lepr^{db/db}小鼠是用于研究化合物#43在维持葡萄糖稳态方面的作用的理想的小鼠II型糖尿病模型。因此，研究了化合物#43及其它结构上类似的相关硒和硫化合物在向小鼠腹膜内注射相应化合物后对Lepr^{db/db}小鼠的葡萄糖耐量提高的影响。

[0398] 对这些雄性小鼠在38日龄时腹膜内注射生理盐水(含有0.2%DMSO)、化合物#C、#43或#50(每千克体重25μg每种化合物的硒)，持续43天。在治疗结束时，使这些小鼠空腹过夜，注射葡萄糖(2g/kg体重)，并在葡萄糖注射后0.25小时(15分钟)、0.5小时(30分钟)、1小时(60分钟)和2小时(120分钟)测量血糖水平。还记录了临葡萄糖注射前(被称为零时间点)的血糖水平。

[0399] 如图8A中所示，在经盐水处理的Lepr^{db/db}小鼠中在注射葡萄糖后观察到在0.25小时开始以及在所有随后测试的时间点的血糖水平的显著增加。如本文所述，用于这些分析的血糖仪的葡萄糖测量限为600mg/dL。因此，将超过此限度的葡萄糖水平记录为600mg/dL。因此，特别是对于经盐水处理的动物来说，在葡萄糖注射后的测试时间点的某些测量值很可能代表对真实血糖浓度的低估。

[0400] 在经化合物#C处理的小鼠中，在葡萄糖注射后的所有测试时间点的血糖水平保持非常高，类似于盐水处理组(图8A)。这些结果表明，在这些胰岛素抵抗的糖尿病小鼠中，化合物#C在测试剂量下并不提高葡萄糖耐量。

[0401] 当与盐水处理组相比时，化合物#50处理导致在葡萄糖注射后2小时的时间点的葡萄糖水平显著降低，尽管图8A中在葡萄糖注射后0.25、0.5或1小时没有明显的下降。这些结果表明，化合物#50有可能在提高这些糖尿病小鼠的葡萄糖耐量方面有一些效果。

[0402] 相比之下，在经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠中，在葡萄糖注射后0.25、0.5和1小时的血糖水平明显比经盐水、化合物#C或#50处理的小鼠低(图8A)。由于血糖仪的测量限原因，经化合物#43处理的小鼠相对于其它处理而言在葡萄糖注射后的这些时间点的葡萄糖水平降低程度有可能比图8A中所示的要显著得多。在葡萄糖注射后2小时，经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠中的血糖水平远低于经盐水、化合物#C或化合物#50处理的同窝小鼠(参见图8A)，并且几乎完全回到注射前的葡萄糖水平。当与经盐水或化合物#C处理的小鼠相比时，经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠在葡萄糖注射后2小时的葡萄糖水平降低显著不同($P <$

0.001)。这些结果表明,如通过葡萄糖耐量提高所评估,化合物#43但不是化合物#C在测试剂量下几乎可完全恢复这些胰岛素抵抗的糖尿病小鼠中的胰岛素作用,而化合物#50还在提高葡萄糖清除率方面有一些有益效果。

[0403] 为进一步证实化合物#43在提高Lepr^{db/db}小鼠的葡萄糖清除率方面的巨大潜力,并研究化合物#43中的硒原子是否是这种效果所需的,分别通过腹膜内注射化合物#43或#68中的等量的硒或硫来对38日龄雄性Lepr^{db/db}小鼠每天施用治疗,持续2个月。在治疗结束时,如上所述使这些小鼠空腹过夜并进行葡萄糖耐量测试。

[0404] 如图8B中所示,在经化合物#68处理的Lepr^{db/db}小鼠中在注射葡萄糖后0.25小时开始以及在所有随后测试的时间点观察到血糖水平显著增加。在葡萄糖注射后2小时的时间点的血糖水平没有明显降低(当与在0.25、0.5和1小时时间段的水平相比时),表明化合物#68在测试剂量下对提高这些胰岛素抵抗的糖尿病小鼠中的葡萄糖耐量几乎没有或没有效果。

[0405] 在经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠中,在葡萄糖激发注射前的血糖水平显著低于经化合物#68处理的小鼠($P<0.05$)。这些结果与上述观察结果一致,即在此糖尿病小鼠模型中,化合物#43在降低空腹血糖水平方面比化合物#68更有效(图4)。经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠在葡萄糖注射后0.25、0.5和1小时的血糖水平低于经化合物#68处理的小鼠。在葡萄糖注射后2小时,经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠中的血糖水平显著低于经化合物#68处理的同窝小鼠(参见图8B, $P<0.001$)。此实验中经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠的葡萄糖清除曲线(图8B)几乎与在上述第一次葡萄糖耐量测试中观察到的曲线相同(图8A)。再次地,由于血糖仪的测量限原因,经化合物#43处理的小鼠相对于经化合物#68处理的小鼠在葡萄糖注射后的这些时间点的葡萄糖水平降低有可能比图8B中所示的要显著得多。无论如何,上述结果进一步证实,化合物#43在测试剂量下显著提高葡萄糖耐量,并且用硫替换化合物#43中的硒原子几乎完全破坏了其在这些胰岛素抵抗的糖尿病Lepr^{db/db}小鼠中促进葡萄糖清除的能力。

[0406] 最后,研究了用丙酰基或丁酰基替换化合物#43的核糖基团的2' 和3' 两个位置处的乙酰基是否能在Lepr^{db/db}小鼠中提高葡萄糖清除率。分别通过腹膜内注射化合物#43、#69或#70中的等量的硒来对雄性41日龄雄性Lepr^{db/db}小鼠每天施用治疗,持续43天。在治疗结束时,如上所述使这些小鼠空腹过夜并进行葡萄糖耐量测试。

[0407] 如图8C中所示,在经盐水处理的Lepr^{db/db}小鼠中观察到在注射葡萄糖后0.25小时开始以及所有随后测试的时间点的血糖水平显著增加。在葡萄糖注射后的1小时时间点之前血糖水平没有明显降低(当与0.25和0.5小时时间段的葡萄糖水平相比时),而在这些胰岛素抵抗的糖尿病小鼠中,在葡萄糖注射后2小时的葡萄糖水平略有下降。

[0408] 当与盐水处理组相比时,化合物#69处理在葡萄糖注射后2小时时间点导致葡萄糖水平略微但不显著降低,尽管图8C中在葡萄糖注射后0.25、0.5或1小时的血糖水平没有明显降低。这些结果表明化合物#69在提高这些糖尿病小鼠的葡萄糖耐量方面可能有一些效果。

[0409] 在经化合物#70处理的小鼠中,葡萄糖注射前的空腹血糖水平低于盐水处理组(图8C)。在葡萄糖注射后,特别是在2小时时间点,当与经盐水处理的小鼠相比时,经化合物#70处理的小鼠中的血糖水平略微但不显著降低。这些结果表明,化合物#70在测试剂量下像化

合物#69一样,也有可能在提高这些胰岛素抵抗的糖尿病小鼠的葡萄糖耐量方面有一些效果。

[0410] 相比之下,经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠在葡萄糖注射后0.25和0.5小时的血糖水平明显低于经盐水、化合物#69或#70处理的小鼠(图8C)。在葡萄糖注射后1小时,经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠中的血糖水平显著低于经盐水、化合物#69或化合物#70处理的同窝小鼠(图8C)。在葡萄糖注射后2小时,经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠中的血糖水平也远低于经盐水、化合物#69或化合物#70处理的小鼠。当与经盐水处理的小鼠相比时,经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠在葡萄糖注射后2小时的葡萄糖水平的降低显著不同($P<0.05$)。再次地,由于血糖仪的测量限原因,经化合物#43处理的小鼠相对于其它处理而言在葡萄糖注射后的每个时间点的葡萄糖水平降低程度有可能比图8C中所示的要显著得多。无论如何,结果进一步证实,化合物#43在测试剂量下可显著提高这些胰岛素抵抗的糖尿病小鼠的葡萄糖耐量。这些结果还表明,化合物#69和#70在提高葡萄糖清除率方面可能有一些有益效果。比较化合物#43与化合物#69和#70的化学结构,显然化合物#43的核糖基团的2'和3'两位置处的乙酰基对于最佳葡萄糖清除活性是必需的,并且用二丙酰基或二丁酰基替换化合物#43中的这些二乙酰基显著减弱其在这些胰岛素抵抗的糖尿病Lepr^{db/db}小鼠中促进葡萄糖清除的能力。

[0411] 总之,上述研究表明,化合物#43在测试剂量下可显著提高Lepr^{db/db}小鼠的葡萄糖耐量。化合物#43在此过程中的作用有可能是通过在清除骨骼肌、肝脏和脂肪组织中的葡萄糖中胰岛素敏感性的提高介导的。此外,虽然硒对于化合物#43的作用是必需的,但其存在本身不足以赋予糖尿病受试者以葡萄糖清除能力。硒原子必须以非常特殊的化学形式存在。这可由化合物#50活性较低和化合物C缺乏活性得到证明;这两者在结构上都非常类似于化合物#43。此外,化合物#43的核糖基团的2'和3'两位置处的乙酰基也是维持其在葡萄糖清除中的活性所需的。

[0412] 实施例4:化合物#43处理后在糖尿病瘦素受体(Lepr)自发无效突变小鼠的肝脏中和在培养的肝细胞中的糖异生酶基因G6pc的表达的抑制以及在抑制培养的肝细胞中的G6pc表达中胰岛素作用的加强

[0413] 肝脏是用于产生葡萄糖以维持血流中的正常葡萄糖水平的主要器官。葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基(G6pc)是用于肝脏中的糖异生的必需酶。以体内和体外两种方式研究了化合物#43对调节G6pc表达的影响。

[0414] 材料和方法

[0415] 化合物

[0416] 在Alltech, Inc的化学实验室中合成化合物#43、#C、#D、#E和#50。如通过HPLC测定,所有测试化合物的纯度经证实均 $\geq 99\%$ 。

[0417] 在Lepr^{db/db}小鼠中用化合物#43和#50进行体内处理

[0418] 对38日龄雄性Lepr^{db/db}小鼠(C57BL/6J品系,购自The Jackson Laboratory)每天腹膜内注射含有0.2%DMSO的生理盐水(0.09%NaCl)、化合物#50或化合物#43(每千克体重25 μ g硒当量的每种化合物,稀释在无菌生理盐水中),持续52天。处理后,收集肝脏并进行RNA分析。

[0419] 细胞系和细胞扩增

[0420] 人肝癌HepG2和小鼠肝脏AML-12细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, Virginia)。在补充有10%FBS的伊格尔最低必需培养基(EMEM)中扩增HepG2细胞。在达尔伯克改良伊格尔培养基和补充有10%胎牛血清(FBS)、40ng/ml地塞米松(Dex, Sigma)和1X ITS(含有0.01mg/ml牛胰岛素、0.0055mg/ml人转铁蛋白、5ng/ml亚硒酸钠)溶液(Sigma)的Ham's F12(DMEM/F12)培养基中扩增AML-12细胞。

[0421] 用于RNA分析的细胞处理

[0422] 为了进行基础G6pc表达的RNA分析(不存在糖尿病刺激物:8-CPT/Dex),分别在10%FBS无ITS和Dex的DMEM/F12培养基以及10%FBS EMEM培养基中将扩增的AML-12和HepG2细胞在24孔板(0.5-2 X 10⁵个细胞/孔)上培养过夜。将这些细胞用PBS冲洗两次以移除残留的血清。然后,将经PBS洗涤的HepG2细胞在无血清EMEM培养基中不用或用胰岛素或化合物#43处理40小时。在一些实验中,将经PBS洗涤的AML-12细胞不与或与化合物#43或其它硒化合物一起在无血清DMEM/F12培养基中温育24小时。在其它实验中,将扩增的AML-12细胞在10%FBS但不含ITS/Dex的DMEM/F12培养基中不用或用化合物#43(150或300ppb)预处理24小时。24小时处理后,将AML-12细胞用PBS洗涤两次(以移除培养物中的任何残留血清),然后在无血清DMEM/Dex培养基中用胰岛素、化合物#43或两者处理6小时。

[0423] 为了进行糖尿病刺激物诱导的G6pc表达的RNA分析,将AML-12细胞在10%FBS但不含ITS/Dex的DMEM/F12培养基中不用或用化合物#43(150或300ppb)预处理24小时。然后将这些细胞用PBS洗涤两次以移除任何残留的血清,并与化合物#43(150或300ppb)一起在存在或不存在胰岛素(10或100nM)或0.1mM 8-CPT(Sigma)和0.5μMDex下在无血清普通DMEM/F12培养基中再温育6小时。

[0424] RNA分离和实时PCR分析

[0425] 使用Qiagen RNAeasy RNA分离试剂盒根据制造商的方案分离来自经盐水或硒化合物处理的Lepr^{db/db}小鼠的总RNA。使用Trizol(Invitrogen)根据制造商的方案分离来自培养的细胞的总RNA,然后与DNA酶I一起温育以移除任何潜在的污染基因组DNA。如先前所述,使用Applied-Bioscience的RT试剂盒及预先设计的Taqman探针(Invitrogen)对RNA样品进行实时PCR(QRT-PCR)分析(Lan等人,EMBO J 2003)。通过每个样品中的肌动蛋白B(Actb)mRNA水平将数据标准化,并以3-5个样品的平均值±SEM给出。

[0426] 统计分析

[0427] 在适用的情况下,Student t检验用于确定处理组之间的差异的统计学显著性,P值小于0.05被认为是统计学显著的。

[0428] 结果:

[0429] 1. Lepr^{db/db}小鼠肝脏中的G6pc mRNA表达的分析

[0430] 先前的实验显示了化合物#43和#50在抑制Lepr^{db/db}小鼠中的血糖水平和HbA1c水平方面的不同效果(图3)。不希望受任何特定假设的束缚,这种不同的效果可能至少部分地归因于这些化合物对体内糖异生G6pc基因的表达的潜在差别作用。因此,在这两种化合物长期处理后测量Lepr^{db/db}小鼠中的G6pc mRNA表达。

[0431] 如图9中所示,化合物#50处理后在Lepr^{db/db}小鼠肝脏中的G6pc mRNA水平略微但不显著降低。然而,当与经盐水处理的对照相比时,化合物#43处理导致Lepr^{db/db}小鼠肝脏中的G6pc mRNA水平显著降低(下降约56%) (图9)。

[0432] 总之,结果提供了这样的体内证据,即这些硒化合物在抑制G6pc表达方面可能有差别效果,并且化合物#43是这些严重II型糖尿病小鼠肝脏中的G6pc表达的有效抑制剂。这些结果表明在化合物#43处理后Lepr^{db/db}小鼠中的血糖和HbA1c水平降低(图3)至少部分是由于G6pc mRNA表达减弱。此外,因为G6pc表达响应于胰岛素信号传导而被调节,并且鉴于Lepr^{db/db}小鼠是胰岛素抵抗的,所以结果表明化合物#43可绕过胰岛素或恢复胰岛素作用以调节这些糖尿病小鼠中的G6pc表达。

[0433] 2. 在化合物#43处理后的小鼠和人肝细胞中的G6pc表达的抑制中抑制G6pc mRNA表达和加强胰岛素作用

[0434] 上述研究揭示化合物#43可显著抑制胰岛素抵抗条件下的糖尿病小鼠中的G6pc表达。培养的肝细胞用于研究(a)硒化合物对G6pc表达是否存在差别影响,(b)化合物#43对肝脏中的G6pc表达是否具有直接影响,以及(c)化合物#43是否能提高胰岛素在调节G6pc表达中的作用。实施两种处理方案(在无血清条件下对肝细胞进行直接化合物处理,以及在含有血清的培养基中用化合物对肝细胞进行预处理,接着在无血清条件下进行化合物再处理)以检查化合物#43对这些肝细胞中的G6pc表达的影响。

[0435] 首先,将小鼠肝脏AML-12细胞不处理(对照)、在无血清的补充胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠(ITS)且不含地塞米松(Dex)的培养基中以十亿分之300份(ppb)硒(相当于3.8μM的每种化合物)的剂量用化合物CDE组合、化合物#C、化合物#D、化合物#50和化合物#43进行处理,持续24小时,以研究这些硒化合物对G6pc表达是否有差别影响。如图10A中所示,化合物CDE(每种化合物300ppb)导致G6pc mRNA表达显著降低。然而,化合物#C、#D或#50在测试剂量下不显著抑制AML-12细胞中的G6pc表达。相比之下,用相同硒剂量下的化合物#43处理导致AML-12细胞中的G6pc表达强烈降低(当与对照组相比时降低约60%)(图10A)。化合物#43处理后G6pc表达降低的程度(60%)比用化合物CDE组合处理更明显(降低约40%)。这些结果表明,这些硒代有机化合物对体外G6pc表达的抑制可能有差别影响,并且化合物#43是该过程的所有测试化合物当中最有效的化合物。这与上述体内小鼠研究一致(图9)。由于此实验是在完全无血清条件下(即不存在胰岛素或任何其它生长因子)在AML-12细胞中进行的,因此结果表明化合物#43可模拟但绕过胰岛素以直接抑制AML-12细胞中的G6pc表达,效力高于化合物CDE组合。

[0436] 接下来,将另一种肝细胞系即人HepG2细胞与100nM胰岛素或600ppb化合物#43一起在无血清培养基中温育40小时,以进一步验证化合物#43对G6PC表达的直接抑制效果。如图10B中所示,胰岛素处理导致G6PC表达显著降低,表明胰岛素信号传导在HepG2细胞中起作用。进一步地,当与对照组相比时,化合物#43在完全无血清条件下处理后,HepG2细胞中的G6PC mRNA水平显著减弱(图10B)。化合物#43处理后HepG2细胞中的G6PC表达降低与图1中观察到的葡萄糖产生减少一致。因此,结果进一步表明化合物#43可模拟但绕过胰岛素以直接下调G6PC表达,从而抑制HepG2细胞中的葡萄糖产生。

[0437] 最后,将AML-12细胞用化合物#43在含血清但不含ITS/Dex的培养基中预处理24小时,接着以此化合物在无FBS/ITS/Dex的培养基中存在或不存在胰岛素下再处理6小时,以进一步研究化合物#43是否可抑制G6pc表达,以及在G6pc表达的下调中,胰岛素与化合物#43之间存在累加还是协同效果。如图10C中所示,当与对照组相比时,10nM胰岛素处理导致G6pc mRNA水平显著降低(约65%)(图10C中的第1个条)。像胰岛素一样,化合物#43处理

(以150和300ppb)也导致G6pc表达显著降低,降低水平与10nM胰岛素相当。此外,相比于单独使用化合物#43或胰岛素处理,在用化合物#43预处理,接着以化合物#43和胰岛素两者共同处理后,AML-12中G6pc mRNA水平的降低更显著。这些结果进一步支持上述观察结果,即化合物#43可模拟但绕过胰岛素以抑制AML-12细胞中的G6pc表达。结果还表明,在下调AML-12细胞中的G6pc表达中,化合物#43可加强胰岛素作用。

[0438] 3. 在于模拟糖尿病条件下(通过8-CPT和Dex两者刺激)培养的AML-12细胞中进行化合物#43处理后,在G6pc表达的调节中抑制G6pc表达和提高胰岛素作用

[0439] 环AMP(8-CPT)和Dex是肝脏中的G6pc表达和葡萄糖产生的熟知刺激物,其在体内模拟糖尿病条件。为进一步研究化合物#43对G6pc表达的影响,检查用细胞渗透性8-(4-氯苯硫基)cAMP(8-CPT)和地塞米松(Dex)共同处理的AML-12细胞中的G6pc mRNA表达。简言之,将AML-12肝细胞不用或用150ppb或300ppb化合物#43在10%FBS但不含ITS/Dex的DMEM/F12培养基中预处理24小时。用PBS洗涤两次后,将这些细胞用这些硒化合物在存在或不存在10nM或100nM胰岛素、0.1mM 8-CPT和0.5μM Dex下在无血清培养基中再处理6小时。在这些处理后,收集细胞并进行QRT-PCR分析。

[0440] 如图11中所示,用8-CPT/Dex处理的AML-12肝细胞导致G6pc mRNA的表达的41.5倍增加(柱#1对#2)。当与8-CPT/Dex组相比时,用两种剂量的胰岛素处理显著降低AML-12细胞中8-CPT/Dex诱导的G6pc表达(图11中的柱#3-4对柱#2)。进一步地,150和300ppb剂量的化合物#43也显著减弱8-CPT/Dex诱导的G6pc表达(从柱#2中的41.5降至柱#5中的13和柱#8中的13.5,图11),效力与10nM胰岛素(柱#3,图11)相当。这些研究表明,像胰岛素一样,单独的化合物#43在测试剂量下可抑制8-CPT/Dex诱导的G6pc表达(当与8-CPT/Dex组相比时减少约68%,图11中的柱#5和#8对#2)。

[0441] 此外,当与无胰岛素/化合物#43处理(柱#2)、单独的胰岛素(柱#3-4)或单独的化合物#43(图11中的柱#5和#8)相比时,化合物#43与胰岛素组合处理(图11中的柱#6-7和柱#9-10)进一步抑制AML-12细胞中8-CPT/Dex诱导的G6pc表达。更显著的是,在用150ppb的化合物#43与100nM胰岛素连同8-CPT/Dex组合处理(柱#7)中以及在用300ppb的化合物#43与100nM胰岛素连同8-CPT/Dex组合处理(柱#10)中,G6pc mRNA水平从单独8-CPT/Dex处理的水平(柱#2)强降到接近无8-CPT/Dex对照组(图11中的柱#1)的水平(柱#7、#10)。换言之,化合物#43(150或300ppb)与100nM胰岛素共同处理几乎完全消除了AML-12细胞中8-CPT/Dex诱导的G6pc表达。

[0442] 总之,这些结果表明,像胰岛素一样,单独的化合物#43在测试剂量下可抑制8-CPT/Dex诱导的G6pc表达,胰岛素和化合物#43两者的组合在抑制由AML-12细胞中的8-CPT/Dex处理引起的G6pc的表达增加方面甚至比单独的胰岛素或单独的化合物#43更有效。

[0443] 上述响应于硒化合物而减少G6pc表达的效果不是由于这些硒化合物对细胞存活的潜在毒性作用,因为这些化合物在测试剂量下不影响AML-12或HepG2细胞在相同实验条件下的活力(数据未显示)。

[0444] 总之,这些结果表明化合物#43和#50对肝脏中的G6pc表达的抑制有差别影响。至少,数据表明化合物#43是在体内和体外抑制肝脏中的G6pc表达的有效化合物。研究进一步揭示化合物#43可模拟但绕过胰岛素以直接抑制在正常条件和模拟糖尿病的条件(即,用8-CPT/Dex处理细胞)下培养的小鼠和人肝细胞中的G6pc表达。此外,化合物#43可提高胰岛素

作用以抑制在正常和模拟糖尿病条件下培养的AML-12细胞中的G6pc表达。总之,这些结果提供了化合物#43可在体内和体外抑制肝脏中的G6pc表达的分子证据,因此可对治疗I型和II型糖尿病患者有价值。

[0445] 实施例5:化合物#43模拟但绕过胰岛素以在体内和体外激活磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(PDK1)和蛋白激酶B(AKT)信号传导以增强肝脏中的Forkhead盒蛋白01(FOX01)的磷酸化

[0446] Forkhead转录因子FOX01在肝脏中的代谢、糖异生和胰岛素敏感性中起关键作用。FOX01的细胞内活性受翻译后修饰的严格调节。特别地,FOX01的磷酸化将FOX01排除在细胞核之外,从而阻止其接近其靶基因,如肝脏中用于葡萄糖产生的G6pc。在胰岛素抵抗或糖尿病个体中,没有信号将FOX01排除在细胞核之外,因此其仍存在于细胞核中并刺激G6pc的转录。G6pc表达的增加驱动糖异生,从而导致高血糖症。

[0447] 如上所述,体内和体外的结果表明,化合物#43可模拟但绕过胰岛素作用以抑制G6pc表达,并且可提高过程中的胰岛素作用。由于FOX01是肝脏中糖异生和胰岛素敏感性的主要信号传导分子,并且PDK1和AKT是FOX01上游的两个主要中间信号传导分子,因此研究了关于在Lepr^{db/db}小鼠、人肝脏HepG2和小鼠肝脏AML-12细胞中化合物#43是否像胰岛素一样将靶向FOX01及其上游信号传导分子PDK1和AKT的问题。

[0448] 材料和方法

[0449] 化合物

[0450] 在Alltech, Inc的化学实验室中合成化合物#43。如通过HPLC测定,此测试化合物的纯度经证实≥99%。

[0451] 化合物#43在Lepr^{db/db}小鼠和肝脏蛋白质制剂中的体内处理

[0452] 对出生后第38天的雄性Lepr^{db/db}小鼠(C57BL/6J品系,购自The Jackson Laboratory)每天腹膜内注射含有0.2%DMSO的生理盐水(0.09%NaCl)、化合物#43(每千克体重25μg硒或硫当量的每种化合物,稀释在无菌生理盐水中),持续52天。治疗后,收集肝脏并在-80°C下储存。

[0453] 将冷冻的肝脏组织在含有完全蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Thermo-Fisher Scientific,Waltham,MA)的无菌冰冷PBS中切碎,并使用组织匀化器(Thermo-Fisher Scientific,Waltham,MA)进行均化。将这些组织匀浆在含有完全蛋白酶/磷酸酶抑制剂的Themo-Fisher预制RIPA缓冲液中稀释(1份匀浆/2份RIPA缓冲液)以提取蛋白质。在4°C下将匀浆中的蛋白质在RIPA缓冲液中提取过夜。将这些过夜提取的蛋白质裂解物在4°C下以12000x g离心30分钟,并使用Pierce Micro-BCA蛋白质测定试剂盒(Thermo Scientific-Pierce Biotechnology,Rockford,IL)根据制造商的方案测定这些组织裂解物的上清液中的蛋白质水平。

[0454] 细胞培养物

[0455] 人肝癌HepG2和小鼠肝脏AML-12细胞系购自美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, Virginia)。在补充有10%FBS的伊格尔最低必需培养基(EMEM)中培养HepG2细胞。在达尔伯克改良伊格尔培养基和补充有10%胎牛血清(FBS)、40ng/ml地塞米松(Dex, Sigma)和1X ITS(含有0.01mg/ml牛胰岛素、0.0055mg/ml人转铁蛋白、5ng/ml亚硒酸钠)溶液(Sigma)的Ham's F12(DMEM/F12)培养基中扩增AML-12细胞。

[0456] 用于蛋白质分析的细胞处理

[0457] 将HepG2细胞接种在6孔板(7×10^5 个细胞/孔)上,并在10%FBS EMEM培养基中培养30小时。然后将这些细胞用PBS洗涤两次以移除残留的血清,并在普通EMEM培养基中血清饥饿过夜。将这些血清饥饿的HepG2细胞不用或用化合物#43(600ppb)处理0分钟(临处理前)、30分钟、60分钟、90分钟、24小时、30小时和40小时。

[0458] AML-12细胞用于研究在用糖尿病刺激物诱导之后化合物#43是否可调节肝细胞中的Pdk1/Akt/Foxo1信号传导分子。将扩增的AML-12细胞接种在6孔(1×10^6 个细胞/孔)板上,并在10%FBS但不含ITS/Dex的DMEM/F12培养基中培养24小时。然后将这些细胞用PBS洗涤两次以移除残留的血清,并在普通DMEM/F12培养基中血清饥饿过夜。将这些血清饥饿的AML12细胞用糖尿病刺激物8-CPT(0.1mM)和Dex(0.5μM)不与(对照组)或与10nM胰岛素或化合物#43(300ppb)组合在无血清普通DMEM/F12培养基中分别处理60分钟、90分钟和6小时。

[0459] 在上述处理后,在冰上将培养的HepG2和AML-12细胞用冰冷的PBS冲洗两次,并在含有完全蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Thermo-Fisher Scientific,Waltham,MA)的冰冷RIPA缓冲液中裂解30分钟。使用细胞刮刀和转移移液管收集细胞裂解物,然后在4°C下以12000x g离心30分钟以移除DNA沉淀并得到蛋白质提取物。使用Pierce Micro-BCA蛋白质测定试剂盒(Thermo Scientific-Pierce Biotechnology,Rockford,IL)根据制造商的方案测定这些细胞裂解物的上清液中的蛋白质水平。

[0460] 蛋白质印迹分析

[0461] 如前所述(Reddy等人,2008Science),对一百微克肝脏组织蛋白质或五微克来自经对照和化合物处理的HepG2或AML-12细胞的总蛋白质进行SDS-PAGE凝胶分离,然后转移到PVDF膜上。将膜在含有5% (w/v)牛血清白蛋白(Sigma,St.Louis,MO)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中封闭,并与特异性一级抗体一起温育,接着与HRP缀合的抗小鼠或抗兔二级抗体(1:5000稀释,Cell Signaling Inc.)一起温育。除了Gapdh(Li-COR,Lincoln,Nebraska)以外的所有一级抗体购自Cell Signaling Inc.使用Amersham的增强型化学发光蛋白质印迹初级检测试剂(GE Healthcare Lifescience,Pittsburgh,PA)检测膜印迹上的正信号。使用LI-COR Odyssey Fc图像系统(Lincoln,Nebraska)捕获膜印迹上的这些发光信号的图像。如GE WB ECL初级检测方案(GE healthcare Lifescience,Pittsburgh,PA)中所述,剥离相同的膜印迹并用另一种抗体再印迹。使用NIH ImageJ软件测定蛋白质印迹中的蛋白质条带密度,然后通过每个样品中的Gapdh或Actb/ACTB水平标准化。数据以每组三个样品的平均值±SEM给出。

[0462] 统计分析

[0463] 在适用的情况下,进行Student t检验以确定两组间的统计差异。P值小于0.05被认为是显著的。

[0464] 结果:

[0465] 1.用化合物#43长期处理后胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中Pdk1、Akt和Foxo1的磷酸化增强

[0466] 动物研究揭示化合物#43可在Lepr^{db/db}小鼠中降低血糖和HbA1c水平并抑制肝脏G6pc表达(图3-7、9)。降低的空腹葡萄糖水平和血液HbA1c水平至少部分归因于Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中的糖异生G6pc基因的表达减弱。肝脏中的G6pc表达受胰岛素信号传导Pdk1/

Akt/Foxo1级联控制。因此,本申请研究了化合物#43长期处理是否可在这些胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中至少在一定程度上恢复胰岛素信号传导(即,增强Pdk1/Akt/Foxo的磷酸化)。

[0467] 对出生后第38天的Lepr^{db/db}小鼠每天腹膜内注射盐水或化合物#43(剂量为每千克体重25μg硒),持续52天。在上述处理后,收集肝脏组织,并使用针对胰岛素信号传导分子的特异性抗体进行蛋白质印迹分析。如图12A中所示,经化合物#43处理的小鼠的肝脏中的苏氨酸308处的磷酸化Pdk1、磷酸化Akt和丝氨酸256处的磷酸化Foxo1的蛋白质信号明显比经盐水处理的小鼠中的那些更丰富。这些蛋白质印迹的定量分析显示,在用化合物#43处理后,Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中pPdk1、pAkt和pFoxo1的蛋白质水平显著升高(图12B)。相比之下,在经化合物#43处理的小鼠中,总Akt水平没有显著变化。Pdk1、Akt和Foxo1的磷酸化增加强烈地表明,在用化合物#43长期处理后,胰岛素下游信号传导级联在Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中是活跃的,尽管已知Lepr^{db/db}小鼠不能对胰岛素做出反应。换言之,结果表明化合物#43可至少部分地恢复胰岛素作用,绕过胰岛素,或者兼而有之,以刺激Pdk1/Akt/Foxo1的磷酸化,导致这些胰岛素抵抗的糖尿病小鼠肝脏中的G6pc表达和葡萄糖产生减弱。

[0468] 2. 在于无血清培养基中培养的人HepG2细胞中,化合物#43模拟但绕过胰岛素以短暂激活PDK1/AKT,并随后使FOXO1失活

[0469] 为研究化合物#43在肝脏中是否有调节PDK1、AKT和FOXO1的磷酸化的胰岛素依赖性但为胰岛素样的效果,将血清饥饿的人HepG2细胞用对照和600ppb化合物#43在无血清培养基中处理30分钟至48小时不等的时间。对经处理的细胞进行蛋白质印迹分析。

[0470] 如图13A中所示,在用化合物#43处理30、60和90分钟后,HepG2细胞中磷酸化PDK1的蛋白质信号有明显增加,但在更长的处理时间点(24小时处理后)没有。定量研究显示在化合物#43处理后,HepG2细胞中的pPDK1有显著且短暂的增加,峰值增加是在化合物处理后约60-90分钟(图13B)。类似地,在化合物#43处理30、60、90分钟和24小时后,在HepG2细胞中也观察到T308处磷酸化AKT的显著且短暂的增加,峰值增加是在60和90分钟(图13A、C)。相比之下,在化合物#43处理后,在HepG2细胞中所有测试时间点的总AKT蛋白质水平没有显著改变(图13A、D)。

[0471] 在用化合物#43处理90分钟及更长时间后,HepG2细胞中T24处的磷酸化FOXO1的蛋白质水平显著增加(图13A、E)。观察到增加的FOXO1磷酸化晚于pPDK1和pAKT增加事件(图13A、13E对比13B-C)。用化合物#43处理不到24小时后,HepG2细胞中的总FOXO1蛋白质水平没有显著变化(图13A、13F)。然而化合物#43延长处理(30小时或48小时)导致HepG2细胞中总FOXO1蛋白的轻微但统计学显著的降低(图13A、F),这可能是由于HepG2细胞中的磷酸化FOXO1持续升高引起FOXO1的蛋白酶体蛋白质降解潜在增加。磷酸化FOXO1被排除在细胞核之外,意味着直接结果是核FOXO1较少且G6pc表达较少。另外,在经化合物#43处理的HepG2细胞中观察到显著降低的葡萄糖产生(图1)和G6pc表达(图10B),以及在经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠中降低的高血糖症和减弱的G6pc表达(图3-7、9)。

[0472] 总之,上述结果表明,在人肝脏HepG2细胞中,化合物#43可模拟但绕过胰岛素以短暂激活PDK1和AKT,并随后使FOXO1失活。

[0473] 3. 在于模拟糖尿病条件(通过8-CPT和Dex两者刺激)下培养的AML-12细胞中,化合物#43模拟但绕过胰岛素以短暂激活Pdk1/Akt并随后使Foxo1失活

[0474] 如前面的实施例中所述,化合物#43可模拟但绕过胰岛素以抑制AML-12细胞中8-CPT/Dex诱导的G6pc表达(图11)。这种效果可能是由于化合物#43使这些小鼠肝细胞中的Foxo1失活的潜在胰岛素样活性。因此,本申请检查在模拟糖尿病条件(用8-CPT和Dex刺激)下培养的AML-12细胞中的胰岛素信号传导分子的蛋白质表达。

[0475] 如图14A中所示,胰岛素处理在60和90分钟时增强了Pdk1、Akt和Foxo1的磷酸化,表明在模拟糖尿病条件下培养的AML-12细胞对胰岛素有响应。像胰岛素一样,在60分钟的化合物处理后,化合物#43也显著诱导这些经8-CPT/Dex处理的AML-12细胞中的Pdk1、Akt和Foxo1的磷酸化(图14A-B)。在化合物处理后90分钟时,在这些AML-12细胞中观察到pFoxo1蛋白质水平的显著增加,而在化合物#43处理后,包括pPdk1、pAkt、Akt和Foxo1在内的所有其它测试分子的蛋白质水平没有显著改变(图14A、C)。在化合物#43处理6小时的时候,pFoxo1水平仍有显著的增加,并且总Foxo1蛋白质水平有略微但显著的降低(图14A、D)。在用10nM胰岛素处理后,在AML-12细胞中也观察到在6小时处理时增加的pFoxo1和略微降低的总Foxo1蛋白质水平(图14A、E)。再次地,在6小时处理时的总Foxo1的略微降低可能是由于已经受糖尿病刺激的这些AML-12细胞的胞质中的Foxo1持续磷酸化引起Foxo1蛋白质的靶向蛋白酶体蛋白质降解。化合物#43处理后增强的Foxo1磷酸化可导致图11中观察到的核Foxo1减少及8-CPT/Dex诱导的G6pc表达减弱。总之,结果表明在于模拟糖尿病条件下培养的AML-12细胞中,化合物#43像胰岛素一样可短暂诱导Pdk1和Akt的磷酸化,然后诱导Foxo1磷酸化。

[0476] 总之,上述体外和体内研究表明,化合物#43可模拟但绕过胰岛素以在肝脏中短暂激活Pdk/Akt,然后使Foxo1失活。

[0477] 实施例6:在化合物#43处理后,在Lepr^{db/db}小鼠的肝脏和培养的肝细胞中的Glut4(SLC2A4)表达增强,并且在培养肝细胞中的葡萄糖摄取增强

[0478] 体内研究揭示在胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠中,化合物#43可降低血糖水平并提高葡萄糖清除率(图3-8)。这部分是由于肝脏中的葡萄糖产生减弱,但也可能是由于从血流到包括肝脏在内的外周组织的葡萄糖摄取增加所致。响应于全身胰岛素刺激,Glut4是肝脏中关键的葡萄糖转运蛋白和用于葡萄糖摄取的间接Foxo1靶基因。因此,用化合物#43处理Lepr^{db/db}小鼠和培养的小鼠肝脏AML-12细胞以测试其对肝脏中的Glut4表达和葡萄糖摄取的潜在影响。

[0479] 材料和方法

[0480] 化合物

[0481] 在Alltech, Inc的化学实验室中合成化合物#43和化合物#50。如通过HPLC测定,所有这些化合物的纯度经证实均≥99%。

[0482] 在Lepr^{db/db}小鼠中以化合物#43和#50体内处理

[0483] 对出生后第38天的雄性Lepr^{db/db}小鼠(C57BL/6J品系,购自The Jackson Laboratory)每天腹膜内注射含有0.2%DMSO的生理盐水(0.09%NaCl)、化合物#43或化合物#50(每千克体重25μg每种化合物的硒,稀释在无菌生理盐水中),持续52天。处理后,收集肝脏并进行RNA分析。

[0484] 细胞培养物

[0485] 小鼠肝脏AML-12细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, Virginia)。

在达尔伯克改良伊格尔培养基和补充有10%胎牛血清(FBS)、40ng/ml地塞米松(Dex, Sigma)和1X ITS(含有0.01mg/ml牛胰岛素、0.0055mg/ml人转铁蛋白、5ng/ml亚硒酸钠)溶液(Sigma)的Ham's F12(DMEM/F12)培养基中扩增这些细胞。

[0486] 用于RNA分析的细胞处理

[0487] 为了进行基础Glut4(S1c2a4)表达的RNA分析(在不存在糖尿病刺激物8-CPT/Dex的情况下),在10%FBS无ITS和Dex的DMEM/F12培养基中将扩增的AML-12细胞在24孔(1×10^5 个细胞/孔)板上培养过夜。将这些细胞用PBS洗涤两次以移除残留的血清,然后与媒介物(0.024%DMSO)或与化合物#43(300ppb)一起在无血清DMEM/F12培养基中温育24小时。

[0488] 为了对在模拟糖尿病条件下培养的AML-12细胞中的Glut4表达进行RNA分析,在10%FBS无ITS和Dex的DMEM/F12培养基中将扩增的AML-12细胞在24孔(2×10^5 个细胞/孔)板上培养过夜。然后将这些细胞用PBS洗涤两次以移除任何潜在的残留血清,然后在普通DMEM/F12培养基中血清饥饿过夜。然后将这些血清饥饿的AML-12细胞与媒介物(0.024%DMSO)或与化合物#43(300ppb)一起在糖尿病刺激物0.1mM 8-CPT(Sigma)和0.5μM Dex存在下在无血清普通DMEM/F12培养基中温育6和24小时。

[0489] RNA分离和实时PCR分析

[0490] 使用Qiagen RNAeasy RNA分离试剂盒根据制造商的方案分离来自经盐水或化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠的总肝脏RNA。使用Trizol(Invitrogen)根据制造商的方案分离来自培养的细胞的总RNA,然后与DNA酶I一起温育以移除任何潜在的污染基因组DNA。如先前所述,使用Applied-Bioscience的RT试剂盒及预先设计的Taqman探针(Invitrogen)对RNA样品进行实时PCR分析(Lan等人,EMBO J 2003)。通过每个样品中的肌动蛋白B(Actb)mRNA水平将数据标准化,并以3-5个样品的平均值±SEM给出。

[0491] 葡萄糖摄取测定

[0492] 将等数量的扩增AML-12细胞接种在96孔板(1.5×10^5 /孔)上,并在10%FBS但不含ITS/Dex的DMEM/F12培养基中培养过夜。然后将这些细胞用PBS洗涤两次(以移除任何潜在的残留血清),并在普通DMEM/F12培养基中血清饥饿过夜。在37°C下在无葡萄糖/酚红的DMEM培养基中将这些血清饥饿的AML-12细胞不用(基础)、用胰岛素(10和100nM)或化合物#43(150、300和600ppb)处理1.5小时。处理后,取出培养基,将细胞用PBS洗涤一次,并在室温下与1mM 2-脱氧葡萄糖(2DG)一起温育30分钟。然后使用Promega的Glucose Uptake-Glo测定试剂盒根据制造商的方案对经2DG处理的细胞进行葡萄糖摄取测量。使用Bio-Tek光度计记录发光信号。

[0493] 统计分析

[0494] 在适用的情况下,采用Student t检验来确定不同处理组间差异的统计学显著性,采用小于0.05的P值来表示显著结果。

[0495] 结果:

[0496] 1. 用化合物#43和化合物#50长期处理后Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中的Glut4mRNA表达的分析

[0497] 对出生后第38天的雄性Lepr^{db/db}小鼠每天腹膜内注射含有0.2%DMSO的生理盐水(0.09%NaCl)、化合物#43或化合物#50(每千克体重25μg硒当量的每种化合物,稀释在无菌生理盐水中),持续52天。在这些化合物处理后,收集肝脏并进行Glut4和ActbmRNA的RNA分

析。

[0498] 如图15中所示,化合物#50处理在数值上增加了Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中的Glut4mRNA水平(当与盐水处理组相比时)。然而,化合物#43处理引起Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中的Glut4mRNA表达水平的很大和显著的增加(5倍;P=0.048)(图15)。这些结果表明,这两种硒化合物在刺激肝脏中的Glut4表达方面有明显的差异,并且在此器官中化合物#43是Glut4表达的有效增强剂。这些结果还表明,在经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠中观察到的血糖水平降低和葡萄糖耐量提高(图3-8)可能部分是由于Glut4表达增强,导致从糖尿病受试者的血流到肝脏的葡萄糖摄取增加。

[0499] 2. 化合物#43处理后在有或没有糖尿病刺激物(8-CPT/Dex)刺激的小鼠肝脏AML-12细胞中Glut4mRNA表达增强

[0500] 上述体内研究揭示,化合物#43可显著地刺激胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中的Glut4表达。这可能是由于化合物#43的潜在全身作用或化合物#43对肝脏组织的潜在直接作用。为测试后一种情况,使用培养的肝细胞来检查化合物#43是否可直接调节肝脏中的Glut4表达。

[0501] 研究了化合物#43是否可调节正常AML-12细胞(不施加糖尿病刺激物)中的基础Glut4表达。简言之,将AML-12细胞用媒介物(0.024%DMSO)和化合物#43(300ppb)在无血清且不含ITS/Dex的培养基中处理24小时,并进行Glut4和Actb表达的RNA分析。如图16A中所示,化合物#43(300ppb)处理导致AML-12细胞中的Glut4mRNA表达显著增加(约2.1倍增加)。考虑到本实验是对在完全无血清条件下培养的AML-12细胞进行的,结果表明在化合物#43处理后,在AML-12细胞中增强的Glut4表达与胰岛素、血清或任何生长因子无关。

[0502] 为进一步测试化合物#43是否可调节Glut4表达,使用已经受了糖尿病刺激的AML-12细胞。简言之,将AML-12细胞血清饥饿过夜,然后与媒介物(0.024%DMSO)或与化合物#43(300ppb)一起在糖尿病刺激物0.1mM 8-CPT(Sigma)和0.5μM Dex存在下在无血清普通DMEM/F12培养基中温育6和24小时。如图16B中所示,化合物#43处理6小时和24小时均导致用糖尿病刺激物8-CPT和Dex共同处理的这些AML-12细胞中的Glut4mRNA表达显著增加。因此,这些结果表明化合物#43可直接调节在模拟糖尿病条件下培养的AML-12细胞中的Glut4表达。

[0503] 3. 化合物#43模拟但绕过胰岛素以增进小鼠肝脏AML-12细胞中的葡萄糖摄取

[0504] 增强的Glut4表达表明,化合物#43有可能模拟但是绕过胰岛素以增进肝脏中的葡萄糖摄取。为了测试这一点,对小鼠肝脏AML-12细胞进行葡萄糖摄取实验。简言之,将等数量的AML-12细胞接种在96孔板上,在10%FBS但不含ITS/Dex的DMEM/F12培养基中培养24小时,然后在普通DMEM/F12培养基中血清饥饿过夜。在37°C下将这些血清饥饿的AML-12细胞在无葡萄糖/酚红/血清的DMEM培养基中用胰岛素(10和100nM)或化合物#43(150、300和600ppb)处理1.5小时。处理后,将细胞与1mM 2-脱氧葡萄糖(2DG)一起在室温下温育30分钟,然后使用Promega的Glucose Uptake-Glo测定试剂盒进行发光分析。检测到的发光信号代表向培养的细胞中的葡萄糖摄取。

[0505] 如图17中所示,用10nM胰岛素处理不增进葡萄糖摄取。然而,100nM胰岛素处理导致AML-12细胞中的葡萄糖摄取显著增加。进一步地,在所有三个测试剂量下的化合物#43处理均导致葡萄糖摄取显著增加,并且在用600ppb化合物#43处理的AML-12细胞中葡萄糖摄

取增加的程度与100nM胰岛素相当(图17)。由于是在无血清条件下用化合物#43处理AML-12细胞,因此结果表明,像胰岛素一样,化合物#43可快速起作用(不到1.5小时)以直接刺激肝细胞中的葡萄糖摄取。肝脏中的葡萄糖摄取增加可能是化合物#43可在胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠中降低血糖水平和提高葡萄糖清除率的原因之一(图3-8)。

[0506] 实施例7:在胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中,胰岛素信号传导的关键下游分子磷酸化Pdk1、Akt和Foxo1的表达增强,以及胰岛素和化合物#43两者在刺激分化的C2C12(骨骼肌)细胞中的葡萄糖摄取中的协同作用

[0507] 材料和方法

[0508] 化合物

[0509] 在Alltech, Inc的化学实验室中合成化合物#43。如通过HPLC测定,此测试化合物的纯度经证实≥99%。

[0510] Lepr^{db/db}小鼠中的化合物#43体内处理

[0511] 对38日龄的雄性Lepr^{db/db}小鼠(C57BL/6J品系,购自The Jackson Laboratory)每天腹膜内注射含有0.2%DMSO的生理盐水(0.09%NaCl)或稀释在无菌生理盐水中的每千克体重0.136mg的化合物#43,持续52天。处理后,收集腓肠肌骨骼肌样品并在-80°C下储存。

[0512] 骨骼肌蛋白质制剂和蛋白质印迹分析

[0513] 将冷冻的骨骼肌在含有完全蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Thermo-Fisher Scientific,Waltham,MA)的无菌冰冷PBS中切碎,并使用组织匀化器(Thermo-Fisher Scientific,Waltham,MA)进行均化。将这些组织匀浆在含有完全蛋白酶/磷酸酶抑制剂的Themo-Fisher's RIPA缓冲液中稀释(1份匀浆/2份RIPA缓冲液)以提取蛋白质。在4°C下将匀浆中的蛋白质在RIPA缓冲液中提取过夜。将这些过夜提取的蛋白质/组织裂解物在4°C下以12000x g离心30分钟,并使用Pierce Micro-BCA蛋白质测定试剂盒(Thermo Scientific-Pierce Biotechnology,Rockford,IL)根据制造商的方案测定这些组织裂解物的上清液中的蛋白质水平。

[0514] 如前所述(Reddy等人,2008Science),对一百微克骨骼肌蛋白质进行SDS-PAGE凝胶分离,然后转移到PVDF膜上。将膜在含有5%(w/v)牛血清白蛋白(Sigma,St.Louis,MO)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中封闭,并与特异性一级抗体一起温育,接着与HRP缀合的抗小鼠或抗兔二级抗体(1:5000稀释,Cell Signaling Inc.)一起温育。除了针对β-微管蛋白的抗体(LI-COR bioscience)以外的所有一级抗体购自Cell Signaling Inc.使用Amersham的增强型化学发光蛋白质印迹初级检测试剂(GE Healthcare Lifescience,Pittsburgh,PA)检测膜印迹上的正信号。使用LI-COR Odyssey Fc图像系统(Lincoln,Nebraska)捕获膜印迹上的这些发光信号的图像。如GE WB ECL初级检测方案(GE healthcare Lifescience,Pittsburgh,PA)中所述,剥离相同的膜印迹并用另一种抗体再印迹。使用NIH ImageJ软件测定蛋白质印迹中的蛋白质条带密度,然后通过每个样品中的β-微管蛋白水平标准化。数据以5个动物样品的平均值±SEM给出。

[0515] C2C12细胞培养、C2C12细胞的分化和葡萄糖摄取分析

[0516] 小鼠成肌细胞C2C12细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC,Manassas, Virginia)。在补充有10%FBS的DMEM培养基中扩增这些细胞。然后将等数量的C2C12细胞接种在96孔板(5000个细胞/孔)上,并在37°C下在10%FBS DMEM培养基中培养5天。每天给细

胞补充新鲜的10%FBS DMEM培养基。如前所述(Misu等人,Cell Metabolism 12,483-495,2010),在培养的第5天,使用含有0.5%马血清(Sigma)的DMEM培养基(分化培养基)分化C2C12细胞,持续7天,每天更换新鲜的分化培养基。在分化后第7天,将分化的C2C12细胞用PBS冲洗两次,并不用或用0.006%DMSO(化合物#43溶剂)或化合物#43(300或600ppb)在无血清无葡萄糖DMEM培养基中预处理过夜。然后将这些细胞用PBS洗涤一次,然后在37℃下不用(基础)或用胰岛素(200nM)、化合物#43(300和600ppb)或胰岛素和化合物#43两者在无葡萄糖/酚红的DMEM培养基中处理1.5小时。处理后,取出培养基,将细胞用PBS洗涤一次,并在室温下与1mM 2-脱氧葡萄糖(2DG)一起温育30分钟。然后使用Promega的Glucose Uptake-Glo测定试剂盒根据制造商的方案对经2DG处理的细胞进行葡萄糖摄取。使用Bio-Tek光度计记录发光信号。

[0517] 统计分析

[0518] 在适用的情况下,采用Student t检验来确定不同处理组间差异的统计学显著性,P值小于0.05。

[0519] 结果:

[0520] 1.在化合物#43长期处理后,胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中的胰岛素下游信号传导分子Pdk1、Akt和Foxo1的磷酸化增加

[0521] 除了肝脏外,骨骼肌是对响应于全身胰岛素的葡萄糖稳态至关重要的另一主要器官。骨骼肌中的葡萄糖摄取在维持血流中的正常葡萄糖水平方面起着关键作用。动物研究揭示,在胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠中,化合物#43可降低血糖和HbA1c水平,而且显著提高葡萄糖耐量(图3-8)。这些效果可能是由于骨骼肌中的胰岛素信号传导(即,Pdk1/Akt)恢复,刺激葡萄糖摄取。因此,研究了化合物#43长期处理是否能部分地修复这些胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中受损的胰岛素信号传导。

[0522] 对出生后第38天的Lepr^{db/db}小鼠每天腹膜内注射盐水(含有0.2%DMSO)或化合物#43(剂量为每千克体重0.136mg化合物#43),持续52天。在上述处理后,收集骨骼肌,并使用针对那些胰岛素信号传导分子的特异性抗体进行蛋白质印迹分析。

[0523] 如图18A中所示,经化合物#43处理的小鼠的骨骼肌中的苏氨酸308处的磷酸化Pdk1、磷酸化Akt和丝氨酸256处的磷酸化Foxo1但不是总Akt或Foxo1的蛋白质条带密度明显比经盐水处理的小鼠的骨骼肌中的更高。这些蛋白质印迹的定量分析显示,当与经盐水处理的小鼠相比时,在化合物#43处理后,Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中的pPdk1蛋白质水平增加(图18B)。经化合物#43处理的小鼠的骨骼肌中增加的pPdk1水平接近统计学显著性($P=0.11$)。进一步地,在用化合物#43处理后的Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中,两种胰岛素/Pdk1下游信号传导分子pAkt和pFoxo1的蛋白质水平显著升高(图18B)。相比之下,经化合物#43处理的小鼠的骨骼肌中总Akt和Foxo1蛋白质水平没有显著变化。Pdk1的磷酸化增加以及磷酸化Akt和磷酸化Foxo1的显著增加表明,在化合物#43长期处理后,在Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中胰岛素下游信号传导级联是活跃的,尽管已知Lepr^{db/db}小鼠不能对胰岛素做出反应。换言之,结果表明化合物#43可恢复胰岛素作用,绕过胰岛素,或兼而有之,以激活PI3K而诱导骨骼肌中Pdk1/Akt的磷酸化,从而使它们在这些严重的胰岛素抵抗II型糖尿病小鼠中发挥调节葡萄糖稳态的关键作用。

[0524] 2.在胰岛素和化合物#43两者处理后,分化的小鼠C2C12(骨骼肌)细胞中增进的葡

葡萄糖摄取

[0525] 在人及其它哺乳动物中,通常全身胰岛素刺激的葡萄糖摄取的75%归因于骨骼肌。骨骼肌对胰岛素做出响应的能力受损会严重破坏全身葡萄糖稳态。有大量文献证明,骨骼肌中的葡萄糖摄取过程主要是通过响应于胰岛素的PI3K/Pdk1/Akt信号传导级联介导的。胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中PI3K/Pdk1/Akt信号传导分子的激活(图18)表明,化合物#43有可能直接调节骨骼肌中的葡萄糖摄取,并加强该过程中的胰岛素作用。为测试这些可能性,对分化的小鼠C2C12(骨骼肌)细胞进行葡萄糖摄取实验。

[0526] 简言之,将等数量的C2C12细胞接种在96孔板(5000个细胞/孔)上,并在37°C下在10%FBS DMEM培养基中培养5天。如前所述(Misu等人,Cell Metabolism 12, 483-495, 2010),使用含0.5%马血清(Sigma)的DMEM培养基使这些细胞分化7天以成为骨骼肌细胞。将完全分化的C2C12细胞在无血清无葡萄糖的DMEM培养基中不用或用0.006%DMSO(化合物#43溶剂)或化合物#43(300或600ppb)预处理过夜。然后在37°C下将这些细胞不与(基础)或与胰岛素(200nM)、化合物#43(300和600ppb)或胰岛素和化合物#43两者一起在无葡萄糖/酚红的DMEM培养基中温育1.5小时。处理后,将细胞与1mM 2-脱氧葡萄糖(2DG)一起在室温下温育30分钟,然后使用Promega的Glucose Uptake-Glo测定试剂盒进行发光分析。检测到的发光信号代表向培养的分化C2C12细胞中的葡萄糖摄取。

[0527] 如图19中所示,用单独200nM胰岛素或600ppb化合物#43但不是300ppb化合物#43处理导致这些培养的骨骼肌细胞中的葡萄糖摄取增加16-19%(尽管当与基础组相比时不是统计学显著的)。由于在较高剂量(600ppb)的化合物#43处理后这些培养的骨骼肌细胞中的葡萄糖摄取有增加的趋势(效力类似于200nM胰岛素),因此化合物#43在高于600ppb的剂量下有可能直接和显著地增进这些分化的肌肉细胞中的葡萄糖摄取。无论如何,结果显示化合物#43在600ppb的测试剂量下可刺激葡萄糖摄取,效力与200nM胰岛素相当。

[0528] 胰岛素(200nM)和化合物#43(300ppb)两者共同处理导致分化的C2C12细胞的葡萄糖摄取的强劲和显著增加(63%)(图19)。在200nM胰岛素和600ppb化合物#43共同处理后,在这些分化的细胞中观察到更显著的葡萄糖摄取增加(79%)。在胰岛素和化合物#43两者共同处理后的分化C2C12细胞中的葡萄糖摄取增加程度远高于单独的胰岛素或化合物#43,表明在胰岛素与化合物#43之间有协同作用。因此,上述研究表明,化合物#43可与胰岛素配合以显著增进分化的骨骼肌细胞中的葡萄糖摄取。

[0529] 总之,上述研究表明,化合物#43可激活或恢复胰岛素抵抗的糖尿病Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中的胰岛素信号传导(如由Pdk1/Akt/Foxo1的增强磷酸化所指示),并且可加强胰岛素作用以增进培养的骨骼肌(分化的C2C12)细胞中的葡萄糖摄取。这些结果提供了化合物#43可在胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠中降低血糖水平并提高葡萄糖耐量的进一步的分子证据(图3-8)。

[0530] 实施例8:在化合物#43处理后,胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌和肝脏中以及培养的小鼠骨骼肌和人肝细胞中的胰岛素受体(InsR)信号传导的激活,以及化合物#43对分化的小鼠C2C12(骨骼肌)细胞和人肝脏HepG2细胞中的AS160(对于GLUT4从细胞囊泡向质膜易位以用于葡萄糖摄取是关键的)磷酸化的胰岛素样作用

[0531] 有大量文献证明,在胰岛素与InsR的α亚基结合后,InsRβ在Y1146开始然后在Y1150/51处经历酪氨酸自磷酸化,其随后激活PI3K/Pdk1以诱导肝脏和骨骼肌中的Akt磷酸

化。AS160也称为TBC1结构域家族成员4 (TBC1D4) ,是在将GLUT4蛋白质保持于胞质囊泡中起关键作用的Akt底物。Insr/PI3k/Pdk1/Akt信号传导响应于胰岛素的激活使AS160磷酸化,促进GLUT4蛋白质从胞质囊泡向质膜易位,从而促进骨骼肌细胞中的葡萄糖摄取以及向肝细胞中的葡萄糖摄取。因此,在胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌和肝脏中并且在分化的小鼠C2C12(骨骼肌)细胞中以及人肝脏HepG2细胞中研究了化合物#43引起Insrβ的酪氨酸磷酸化的可能性。此外,研究了化合物#43是否可模拟但绕过胰岛素以激活分化的小鼠C2C12细胞中的胰岛素受体的下游信号传导分子Akt。进一步地,在分化的小鼠C2C12和人肝脏HepG2细胞两者中研究了化合物#43对Akt靶底物AS160的磷酸化的影响。

[0532] 材料和方法

[0533] 化合物

[0534] 在Alltech, Inc的化学实验室中合成化合物#43。如通过HPLC测定,此测试化合物的纯度经证实≥99%。

[0535] Lepr^{db/db}小鼠中的化合物#43体内处理

[0536] 对出生后第38天的雄性Lepr^{db/db}小鼠 (C57BL/6J品系, 购自The Jackson Laboratory) 每天腹膜内注射含有0.2%DMSO的生理盐水 (0.09%NaCl) 或稀释在无菌生理盐水中的每千克体重0.136mg的化合物#43,持续52天。处理后,收集腓肠肌骨骼肌和肝脏样品并在-80℃下储存。

[0537] 骨骼肌和肝脏蛋白质制剂

[0538] 将冷冻的骨骼肌和肝脏组织在含有完全蛋白酶和磷酸酶抑制剂 (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA) 的无菌冰冷PBS中切碎,并使用组织匀化器 (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA) 进行均化。将这些组织匀浆在含有完全蛋白酶/磷酸酶抑制剂的 Thermo-Fisher 预制RIPA缓冲液中稀释 (1份匀浆/2份RIPA缓冲液) 以提取蛋白质。在4℃下将匀浆中的蛋白质在RIPA缓冲液中提取过夜。将这些过夜提取的蛋白质/组织裂解物在4℃下以12000x g离心30分钟,并使用Pierce Micro-BCA蛋白质测定试剂盒 (Thermo Scientific-Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 根据制造商的方案测定这些组织裂解物的上清液中的蛋白质水平。

[0539] HepG2和C2C12细胞的细胞培养,C2C12细胞的分化,细胞处理和培养的细胞蛋白质提取物的制备

[0540] 人肝癌HepG2细胞和小鼠成肌细胞C2C12细胞系购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC, Manassas, Virginia)。在补充有10%FBS的伊格尔最低必需培养基 (EMEM) 中培养 HepG2细胞,而在补充有10%FBS的DMEM培养基中扩增C2C12细胞。

[0541] 将HepG2细胞接种在6孔板 (7 X 10⁵个细胞/孔) 上,并在10%FBS EMEM培养基中培养30小时。然后将这些细胞用PBS洗涤两次以移除残留的血清,并在普通EMEM培养基中血清饥饿过夜。将这些血清饥饿的HepG2细胞不用或用化合物#43 (600ppb) 在无血清培养基中处理0分钟(临处理前)、30分钟和60分钟。

[0542] 为分化C2C12细胞,首先将等数量的这些成肌细胞接种在12孔板 (60,000个细胞/孔) 上,并在37℃下在10%FBS DMEM培养基中培养5天。每天给这些细胞补充新鲜的10%FBS DMEM培养基。在培养后第5天,使用含有0.5%马血清 (Sigma) 的DMEM培养基 (分化培养基) 分化C2C12细胞,持续7天,每天更换新鲜的分化培养基,类似于先前所述 (Misu等人, Cell

Metabolism 12, 483-495, 2010)。在分化后第7天,将分化的C2C12细胞用PBS冲洗两次,并在无血清DMEM培养基中温育过夜。然后在37℃下将这些血清饥饿的细胞在无血清DMEM培养基中不用(基础)或用胰岛素(200nM)、化合物#43(600ppb)或胰岛素和化合物#43两者处理5和60分钟。

[0543] 在上述处理后,将培养的HepG2细胞或分化的C2C12细胞用冰冷的PBS冲洗两次,并在冰上的含有完全蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Thermo-Fisher Scientific,Waltham,MA)的冰冷RIPA缓冲液中裂解30分钟。使用细胞刮刀和转移移液管收集细胞裂解物,然后在4℃下以12000x g离心30分钟以移除DNA沉淀并得到蛋白质提取物。使用Pierce Micro-BCA蛋白质测定试剂盒(Thermo Scientific-Pierce Biotechnology,Rockford,IL)根据制造商的方案测定这些细胞裂解物的上清液中的蛋白质水平。

[0544] 蛋白质印迹分析

[0545] 如前所述(Reddy等人,2008Science),对一百微克骨骼肌或肝脏组织蛋白质、五微克HepG2细胞蛋白质提取物或八微克分化的C2C12细胞蛋白质提取物进行SDS-PAGE凝胶分离,然后转移到PVDF膜上。将膜在含有5% (w/v)牛血清白蛋白(Sigma,St.Louis,MO)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中封闭,并与特异性一级抗体一起温育,接着与HRP缀合的抗小鼠或抗兔二级抗体(1:5000稀释,Cell Signaling Inc.)一起温育。除了针对β-微管蛋白的抗体(LI-COR bioscience)以外的所有一级抗体购自Cell Signaling Inc.。使用Amersham的增强型化学发光蛋白质印迹初级检测试剂(GE Healthcare Lifescience,Pittsburgh,PA)检测膜印迹上的正信号。使用LI-COR Odyssey Fc图像系统(Lincoln,Nebraska)捕获膜印迹上的这些发光信号的图像。如GE WB ECL初级检测方案(GE healthcare Lifescience,Pittsburgh,PA)中所述,剥离相同的膜印迹并用另一种抗体再印迹。使用NIH ImageJ软件测定蛋白质印迹中的蛋白质条带密度,然后通过每个样品中的β-微管蛋白或ACTB蛋白质水平标准化。数据以每组3-5个样品的平均值±SEM给出。

[0546] Y1146或Y1150/51处的磷酸-Insrβ的酶联免疫吸附测定(ELISA)

[0547] 使用PathScan Phospho-胰岛素受体β(Tyr1146或Tyr1150/1151)Sandwich ELISA试剂盒(Cell Signaling Technology,Danvers,MA)根据制造商的方案对来自经盐水或化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠的肝脏蛋白质样品进行ELISA测定,但除外的是在4℃下将蛋白质提取物与捕获pInsrβY1146或pInsrβY1150/1151抗体一起温育过夜(而不是如方案中所述在37℃下温育2小时)。四百微克肝脏蛋白质提取物用于检测Y1146处的磷酸-Insrβ,并且六百微克肝脏蛋白质提取物用于检测Y1150/1151处的磷酸-Insrβ。使用Bio-tek微孔板读板仪记录测试样品的450nm吸光度(OD450)。使用100μg蛋白质提取物和特异性β-微管蛋白单克隆抗体通过蛋白质印迹分析测定每个样品中的内部蛋白质对照β-微管蛋白的水平,接着使用NIH Image J软件定量分析蛋白质印迹中的β-微管蛋白蛋白质条带密度。然后将每个测试样品的OD450通过其β-微管蛋白蛋白质水平标准化以得到Y1146或Y1150/1151处的磷酸-Insrβ的水平。

[0548] 统计分析

[0549] 在适用的情况下,采用Student t检验来确定处理组间差异的统计学显著性,P值小于0.05被认为是显著的。

[0550] 结果:

[0551] 1. 化合物#43长期处理后胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中Insrβ的酪氨酸磷酸化增强

[0552] 如上面所讨论的那样,骨骼肌对响应于全身胰岛素的葡萄糖稳态是绝对必需的。动物研究揭示化合物#43可在胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠中降低血糖和HbA1c水平并提高葡萄糖耐量(图3-8)。这些效果可能是由于骨骼肌中胰岛素受体功能的潜在恢复,从而允许在这些胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠中发生葡萄糖摄取。经化合物#43处理的胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中Pdk1和Akt的磷酸化增强(图18)表明,化合物#43可绕过但模拟胰岛素或恢复胰岛素作用以激活骨骼肌中Pdk1/Akt级联上游的胰岛素信号传导级联分子。Y1146处的Insrβ的酪氨酸磷酸化反映了胰岛素与Insrα结合之后激活的胰岛素受体信号传导的第一步,并且这是骨骼肌中PI3K/Pdk1/Akt信号传导的上游的关键事件。因此,研究了用化合物#43长期处理是否可调节这些胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中Insrβ的磷酸化。

[0553] 对出生后第38天的Lepr^{db/db}小鼠每天腹膜内注射盐水(含有0.2%化合物溶剂DMSO)或化合物#43(剂量为每千克体重0.136mg化合物#43),持续52天。在上述处理后,收集骨骼肌样品,并使用针对前述胰岛素信号传导分子的特异性抗体进行蛋白质印迹分析。

[0554] 如图20A中所示,在经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中,酪氨酸1146处的磷酸化Insrβ但不是总Insrβ的蛋白质条带密度比经盐水处理的小鼠中的高得多。这些蛋白质印迹的定量分析显示,当与经盐水处理的小鼠相比时,在用化合物#43处理后,Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中磷酸化Insrβ蛋白质水平强烈增加(约2.5倍增加)(图20B)。相比之下,经化合物#43处理的小鼠的骨骼肌中的总Insrβ蛋白质水平没有显著变化(图20C)。这些结果与在经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中Insr下游的关键胰岛素信号传导分子Pdk1和Akt的磷酸化增加的观察结果一致(图18)。总之,结果清楚地表明,用化合物#43长期处理后,胰岛素受体在Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌中被激活,尽管Lepr^{db/db}小鼠被工程改造为不能对胰岛素做出反应。换言之,结果表明化合物#43可恢复胰岛素作用,绕过胰岛素,或兼而有之,以刺激Insrβ的酪氨酸磷酸化,从而随后激活这些严重的II型胰岛素抵抗的糖尿病小鼠的骨骼肌中的PI3K/Pdk1/Akt信号传导。

[0555] 这些发现连同血流中的葡萄糖清除率提高、空腹血糖水平降低、HbA1C的水平降低以及与胰岛素协同的骨骼肌中葡萄糖摄取增进的观察结果强烈地表明化合物#43可有效治疗I型和II型糖尿病两者。

[0556] 2. 在分化的小鼠C2C12(骨骼肌)细胞中,化合物#43模拟但绕过胰岛素以刺激Y1146处的Insrβ、Pdk1、Akt和AS160的磷酸化

[0557] 为进一步研究化合物#43是否可直接激活骨骼肌中的胰岛素受体信号传导,将血清饥饿的分化小鼠C2C12(骨骼肌)细胞不与或与化合物#43(600ppb)、胰岛素(200nM,阳性对照)或两者一起在无血清且无葡萄糖的DMEM培养基中温育非常短的一段时间(即,5分钟)和60分钟。然后,进行蛋白质印迹分析以检查这些分化的骨骼肌细胞中的激活Insr(即,Y1146处的pInsrβ)及其下游信号传导分子(包括磷酸化Pdk1、Akt和As160)的蛋白质表达水平。

[0558] 在胰岛素或化合物#43处理后测量这些培养的骨骼肌细胞中的激活Insr的蛋白质表达。如所预期的那样,用胰岛素处理5分钟导致在分化的C2C12细胞中Y1146处的pInsrβ但

不是总Insr β 显著增加(图21A-B),表明这些分化的C2C12细胞对胰岛素快速做出反应。进一步地,用600ppb化合物#43处理也导致在这些培养的骨骼肌细胞中Y1146处的pInsr β 但不是总Insr β 显著增加(图21A-B)。用胰岛素和化合物#43共同处理5分钟倾向于增加这些分化的C2C12细胞中的pInsr β 蛋白质水平(图21A-B),表明化合物#43或胰岛素处理后的Insr β 的刺激是短暂事件。实际上,用胰岛素、化合物#43或两者长时间处理(60分钟)导致pInsr β 水平降低(图21C-D),进一步表明胰岛素或化合物#43处理后的Insr的激活确实是短暂事件,并且存在负反馈来调节骨骼肌细胞中的Insr β 酪氨酸磷酸化。无论如何,化合物#43短时间(5分钟)处理后在这些培养的骨骼肌细胞中观察到的Y1146处的Insr β 的增强酪氨酸磷酸化与上述胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠中的Insr β 的激活一致(图20)。由于这些分化的C2C12细胞在完全无血清条件下经血清饥饿、培养和用化合物#43处理,因此结果表明化合物#43可模拟但绕过胰岛素以直接并快速地激活这些分化的骨骼肌细胞中的Insr β 。

[0559] 由于Insr β 的酪氨酸磷酸化将激活PI3K/Pdk1信号传导以响应于胰岛素而增强Akt的磷酸化,因此研究了化合物#43是否可模拟胰岛素以调节这些分化的C2C12骨骼肌细胞中的Akt磷酸化。如图21A中所示,胰岛素处理5分钟导致磷酸化Akt但不是总Akt蛋白质水平显著增加。然而,在胰岛素处理60分钟后,在这些分化的C2C12细胞中没有观察到Akt的磷酸化增加(图21C-D)。相比之下,化合物#43处理5分钟没有引起这些C2C12细胞中的磷酸化Akt蛋白质水平显著增加,而在化合物#43处理60分钟后,在这些细胞中观察到磷酸化Akt蛋白质水平的强增加(图21C-D)。胰岛素和化合物#43两者共同处理导致在两个测试时间点(6分钟和60分钟,图21)的pAkt蛋白质水平均显著增加。胰岛素和化合物#43共同处理组中Akt增加的磷酸化的水平与单独的胰岛素在5分钟时相当,而在胰岛素和化合物#43两者共同处理后60分钟时的磷酸化Akt的蛋白质水平几乎与化合物#43单独处理后的水平相同。这些结果表明胰岛素可短暂激活这些骨骼肌细胞中的Insr下游信号传导分子Akt。进一步地,结果揭示化合物#43可模拟但绕过胰岛素以激活这些细胞中的Akt,尽管不像胰岛素那样快。此外,结果还表明在这些分化的骨骼肌细胞中刺激Akt磷酸化方面,胰岛素与化合物#43之间没有协同作用。然而,结果揭示化合物#43和胰岛素两者共同处理可延长激活的Akt信号传导的持续时间。

[0560] 如上面所讨论的那样,AS160是Akt靶底物,并且是将GLUT4蛋白质保持在骨骼肌细胞内的囊泡中所需的。响应于胰岛素/Insr β /PI3K/Akt信号传导在S588处AS160的磷酸化将导致GLUT4蛋白质从胞质囊泡向质膜易位以促进葡萄糖摄取。体内研究揭示化合物#43可在胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠糖尿病小鼠中降低血糖水平并提高葡萄糖耐量(图3-8)。此外,在培养的骨骼肌细胞中,在化合物#43处理之后,特别是在用胰岛素和化合物#43两者共同处理后,观察到了葡萄糖摄取增加(图19)。因此,有可能化合物#43可通过AS160的磷酸化调节骨骼肌细胞中的GLUT4易位以用于葡萄糖摄取。因此,在胰岛素、化合物#43或两者在无血清培养基中处理5和60分钟后在分化的C2C12(骨骼肌)细胞中测量在S588处磷酸化AS160的蛋白质水平。

[0561] 如图21A-B中所示,用胰岛素处理5分钟不影响AS160的蛋白质表达,但在这些分化的C2C12细胞中导致在S588处AS160的磷酸化显著增加(约2倍)。然而,胰岛素处理60分钟后没有观察到磷酸化AS160的明显增加(图21C-D)。这些结果表明,胰岛素可短暂增强AS160的磷酸化,以用于骨骼肌细胞中的GLUT4易位。

[0562] 相比之下,单独用化合物#43处理5分钟不影响这些分化的C2C12细胞中的磷酸化AS160和总AS160的蛋白质水平(图21A-B)。然而,在用化合物#43处理60分钟后,在骨骼肌细胞中观察到在S588处磷酸化AS160水平的强增加(约6倍)(图21C-D)。这些结果表明化合物#43可模拟胰岛素(尽管不像胰岛素那么快)以诱导AS160的磷酸化以用于这些培养的骨骼肌细胞中的GLUT4易位。

[0563] 用胰岛素和化合物#43两者共同处理在两个测试时间点(5和60分钟)导致磷酸化AS160蛋白质水平的显著增加(图21)。在5分钟时共同处理组中AS160的增加的磷酸化水平与单独的胰岛素相当(图21A-B),表明在共同处理组中观察到的AS160磷酸化主要是由于在此时间点的胰岛素的影响。类似地,在处理后60分钟,共同处理组中磷酸化AS160的蛋白质水平几乎与单独的化合物#43处理后的水平相同(图21C-D),表明此时间点在共同处理组中观察到的AS160磷酸化主要是由于单独的化合物#43的影响。这些结果表明,化合物#43和胰岛素两者共同处理可延长AS160的磷酸化的持续时间以促进GLUT4易位,用于这些分化的胰岛素反应性细胞中的葡萄糖摄取。

[0564] 总之,结果表明化合物#43可在分化的C2C12细胞中模拟但绕过胰岛素以直接并快速地激活Ins β (由Ins β 的酪氨酸磷酸化指示)。这与在胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}糖尿病小鼠的骨骼肌中观察到的Ins β 的激活一致(图20)。激活的Ins β 然后可激活骨骼肌中的PI3K/Pdk1/Akt信号传导(这得到了图18中所示的体内研究的进一步支持)以随后使AS160(已知的Akt靶底物)磷酸化,导致从胞质囊泡向细胞膜的GLUT4易位增强,用于葡萄糖摄取。事实上,在化合物#43处理后,特别是在胰岛素和化合物#43两者共同处理后,在培养的骨骼肌细胞中观察到葡萄糖摄取的增加(图19)。在化合物#43处理后的骨骼肌中增进的葡萄糖摄取可在糖尿病小鼠中降低血糖水平并提高葡萄糖耐量(图3-8)。简言之,这些结果表明化合物#43可模拟但绕过胰岛素以直接激活Ins β /PI3K/Pdk1/Akt信号传导,从而使骨骼肌细胞中的AS160磷酸化,导致从胞质囊泡向质膜的GLUT4易位增强以促进向骨骼肌中的葡萄糖摄取,从而对抗1型和2型糖尿病两者的关键特征和病理。

[0565] 3. 用化合物#43长期处理后在胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中Ins β 的酪氨酸磷酸化增强

[0566] 实施例6中所述的研究揭示,化合物#43可在体内和体外增强肝脏中的Pdk1/Akt/Foxo1的磷酸化(图12-14)。所有这些效果可归因于在化合物#43处理后在肝细胞中其上游信号传导分子Ins β 的激活,类似于上述骨骼肌细胞中的那些。如上面所讨论的那样,在Y1146处以及随后在Y1150/1151处Ins β 的酪氨酸磷酸化反映了胰岛素与Ins α 结合之后激活的胰岛素受体信号传导的前几个步骤,并且是肝脏中的PI3K/Pdk1/Akt/Foxo1信号传导上游的关键事件。因此,研究了用化合物#43长期处理是否可调节这些胰岛素抵抗的Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中的Ins β 的酪氨酸磷酸化。

[0567] 对出生后第38天的Lepr^{db/db}小鼠每天腹膜内注射盐水(含有0.2%化合物溶剂DMSO)或化合物#43(剂量为每千克体重0.136mg化合物#43),持续52天。在上述处理后,收集肝脏样品并进行Y1146处的磷酸-Ins β 和Y1150/1151处的磷酸-Ins β 的ELISA测定(以得到OD450)以及内部对照β-微管蛋白的蛋白质印迹分析。在每个样品中的OD450通过其β-微管蛋白蛋白质水平标准化后得到每个样品中Y1146处或Y1150/1151处的磷酸-Ins β 的水平。

[0568] 如图22A中所示,当与经盐水处理的小鼠相比时,在用化合物#43处理后的Lepr^{db/db}

小鼠的肝脏中,酪氨酸1146处的磷酸化Insr β 的蛋白质水平显著增加(约2.9倍增加)。类似地,当与经盐水处理的小鼠相比时,在用化合物#43长期处理后的Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中,酪氨酸1150/1151处的磷酸化Insr β 的蛋白质水平也显著增加(约2.95倍增加)(图22B)。这些结果与在经化合物#43处理的Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中的Insr下游的关键胰岛素信号传导分子Pdk1和Akt的磷酸化增加的观察结果一致(图12)。总之,结果清楚地表明,在用化合物#43长期处理后,胰岛素受体在Lepr^{db/db}小鼠的肝脏中被激活,尽管Lepr^{db/db}小鼠被工程改造为不能对胰岛素做出响应。换言之,结果表明化合物#43可恢复胰岛素作用,绕过胰岛素,或兼而有之,以刺激Insr β 的酪氨酸磷酸化,从而随后激活这些严重的II型胰岛素抵抗的糖尿病小鼠的肝脏中的PI3K/Pdk1/Akt信号传导。

[0569] 4. 化合物#43模拟但绕过胰岛素以刺激人肝脏HepG2细胞中Y1146处的Insr β 和S588处的AS160的磷酸化

[0570] 为进一步研究化合物#43是否可模拟但绕过胰岛素以直接激活肝细胞中的胰岛素受体,使人肝脏HepG2细胞血清饥饿过夜,然后与化合物#43(600ppb)一起在无血清且无葡萄糖的DMEM培养基中温育30和60分钟。进行蛋白质印迹分析以检查这些人肝细胞中激活INSR(即,Y1146处的pINSR β)的蛋白质表达水平。如图23中所示,用600ppb化合物#43处理30和60分钟导致在这些培养的肝细胞中Y1146处的磷酸化INSR β 但不是总INSR β 显著增加。这些结果与在相同时间段的化合物#43处理后HepG2细胞中的INSR下游信号传导分子PDK1和AKT的磷酸化增加一致(图13)。由于这些肝细胞经血清饥饿,并且化合物#43处理是在完全无血清条件下进行的,因此结果表明化合物#43可模拟但绕过胰岛素以直接刺激INSR β 的酪氨酸磷酸化,导致PI3K/PI3K/AKT的激活以使FOX01失活,用于抑制用于葡萄糖产生的G6PC表达,并刺激用于肝细胞中的葡萄糖摄取的GLUT4的表达。

[0571] 除了FOX01以外,AS160是另一种AKT靶底物,其在胰岛素靶组织(如脂肪细胞和骨骼肌)中对从细胞囊泡向质膜的葡萄糖易位起关键作用。体内和体外研究显示,化合物#43可在糖尿病小鼠中降低血糖水平并提高葡萄糖耐量(图3-8),并且可在培养的AML-12肝细胞中增进葡萄糖摄取(图17),表明肝脏中增进的葡萄糖摄取可能是化合物#43对抗I型和II型糖尿病降低血糖水平和提高葡萄糖耐量的机制之一。化合物#43处理后引起的葡萄糖摄取增进很可能由增强的GLUT4表达(由图15-16指示)、潜在增强的GLUT4易位或这两者引起,以刺激向肝细胞中的葡萄糖摄取。为解决后一种情况,在经化合物#43处理的HepG2细胞中测量磷酸化AS160(AKT靶向底物)蛋白质水平。

[0572] 如图23中所示,用600ppb化合物#43处理30和60分钟导致在这些培养的人肝细胞中S588处的磷酸化AS160但不是总AS160蛋白质水平显著增加。这些结果与在用化合物#43处理相同时间段后在HepG2细胞中的AS160上游的两种关键的信号传导分子PDK1和AKT的磷酸化增加一致(图13)。由于AS160的磷酸化可增强从细胞囊泡向细胞膜的GLUT4易位以用于葡萄糖摄取,因此结果表明化合物#43可模拟但绕过胰岛素以刺激从胞质囊泡向质膜的GLUT4易位以用于人肝细胞中的葡萄糖摄取。为了支持这一点,将回顾在化合物#43处理1.5小时后,在培养的AML-12肝细胞中观察到葡萄糖摄取增进(图17)。因此在肝细胞中,化合物#43不仅将刺激通过Insr/PI3k/Pdk1/Akt/Foxo1信号传导介导的GLUT4表达(由图12-17指示),而且还增强通过Insr/PI3K/Pdk1/Akt/AS160介导的从胞质囊泡向质膜的GLUT4易位(由图12-17、23指示),从而增进葡萄糖摄取。

[0573] 总之,所有上述研究揭示化合物#43可在胰岛素抵抗的糖尿病Lepr^{db/db}小鼠的骨骼肌和肝脏两者中恢复胰岛素受体功能(如由Insrβ的增强酪氨酸磷酸化指示)。体外研究进一步表明化合物#43可接近地模拟胰岛素以激活骨骼肌细胞和人肝细胞两者中的胰岛素受体。此外,结果表明化合物#43像胰岛素一样可激活Pdk1/Akt信号传导以诱导培养的骨骼肌细胞和人肝细胞两者中的AS160 (AKT靶底物)的磷酸化。AS160的增强磷酸化促进从胞质囊泡向质膜的GLUT4易位以增进肝脏和骨骼肌细胞两者中的葡萄糖摄取,从而导致糖尿病情况下的血糖水平降低和葡萄糖耐量提高。

[0574] 应该强调的是,肝脏和骨骼肌这两种组织迄今在II型糖尿病的发展和发病机制中是最为关键的。化合物#43凭借其在这些组织中恢复胰岛素信号传导级联的能力而可能在II型糖尿病的治疗中具有巨大的治疗价值。

[0575] 此外,因为化合物#43可在没有向其中添加胰岛素的胰岛素反应性细胞中起胰岛素模拟物的作用,所以其有效治疗I型糖尿病的可能性也很大。

[0576] 实施例9:化合物#43长期处理导致胰岛素抵抗的糖尿病db/db小鼠中的血清胰岛素和丙氨酸转氨酶(ALT)水平但不是血清肌酸酐水平降低

[0577] 材料和方法

[0578] 化合物

[0579] 在Alltech, Inc的化学实验室中合成化合物#43。如通过HPLC测定,所有测试化合物的纯度经证实均≥99%。

[0580] 动物

[0581] 5-周龄雄性糖尿病自发突变(瘦素受体突变)Lepr^{db/db}小鼠(C57BL/6J品系)购自Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine),并在无病原体的饲养箱中饲养,可自由获取食物和水。3月龄野生型(非糖尿病)C57小鼠也购自Jackson Laboratory。

[0582] 用化合物#43长期处理

[0583] 对38日龄的雄性Lepr^{db/db}小鼠每天腹膜内(ip)注射含有0.2%DMSO的生理盐水(0.09%NaCl)和化合物#43(每千克体重0.136mg,稀释在无菌生理盐水中),持续52天。还收集来自3月龄野生型(非糖尿病)C57小鼠的血清。处理后,收集这些血清样品并进行胰岛素、ALT和肌酸酐测定。

[0584] 血清胰岛素、ALT和肌酸酐测定

[0585] 分别使用Themo-Fisher Scientific的胰岛素小鼠ELISA试剂盒(目录号EMINS)、Sigma的ALT活性测定试剂盒(目录号MAK052)和Abcam的肌酸酐测定试剂盒(目录号Ab65340)根据制造商的方案测定胰岛素、ALT和肌酸酐的血清水平。

[0586] 统计分析

[0587] 在适用的情况下,采用Student t检验来确定经盐水处理的组与经化合物处理的组之间的差异的统计学显著性,P值小于0.05被认为是显著的。数据以图中指示的小鼠数的平均值±SEM给出。

[0588] 结果和讨论

[0589] 如图24A中所示,Lepr^{db/db}小鼠表现出高胰岛素血症,胰岛素水平为约2586μIU/ml(非糖尿病野生型小鼠的约100倍)。然而,化合物#43处理导致血清胰岛素水平显著降低(降低约80%),尽管其水平仍然高于非糖尿病野生型小鼠(图24A)。这些结果表明化合物#43具

有治疗糖尿病患者的高胰岛素血症的潜力。

[0590] 丙氨酸转氨酶(ALT)测试通常用于检测肝脏损伤。如图24B中所示,经盐水处理的Lepr^{db/db}小鼠中的血清ALT水平显著高于非糖尿病小鼠。然而,化合物#43处理导致血清ALT水平显著降低。这些结果表明化合物#43长期处理(持续52天每天进行处理)未显示肝脏毒性;相反,其可能对肝脏损伤有保护作用。

[0591] 血液肌酸酐测试广泛用于评估肾功能,并且肌酸酐水平升高意味着肾功能受损或肾脏疾病。如图24C中所示,化合物#43处理后,Lepr^{db/db}小鼠中的血清肌酸酐水平没有显著变化。这些结果表明化合物#43长期处理(持续52天每天进行处理)可能对肾功能没有毒性作用。

[0592] 总之,上述结果表明了化合物#43对抗糖尿病受试者的高胰岛素血症的潜在用途。此外,上述结果还表明化合物#43对肝脏和肾脏功能几乎没有或没有毒性作用。相反,化合物#43可能对肝脏损伤有一定的保护作用。

[0593] 结论(作用方式;图25)

[0594] 本公开中的实验结果以实线红色箭头表示,而预期结果(基于已发表的文献)以虚线箭头表示。化合物#43可模拟但绕过胰岛素以快速诱导细胞膜内表面上的胰岛素受体β亚基的酪氨酸磷酸化,从而排除了胰岛素在细胞表面结合并激活胰岛素受体的需要。这导致肝脏和骨骼肌两者中的PI3K/PDK1/AKT信号传导级联的激活。换言之,正常的胰岛素信号传导可以被恢复而不需要存在胰岛素或活性细胞表面胰岛素受体。在肝细胞中,AKT的激活导致FOX01磷酸化的强劲增加,导致FOX01-直接靶基因G6PC的表达显著降低;这导致糖尿病受试者的肝细胞中葡萄糖产生的抑制。此外,在化合物#43处理后的肝细胞中,FOX01-间接靶基因GLUT4的表达和AKT靶底物AS160(TBC1D4)的磷酸化(其是从胞质囊泡向质膜的GLUT4易位的关键)增强,导致肝细胞膜中GLUT4转运蛋白更多,并且来自血流的葡萄糖摄取增加。所有这些都指向I型和II型糖尿病受试者的葡萄糖耐量提高。在骨骼肌细胞中,化合物#43也可模拟但是绕过胰岛素以激活INSRβ/PDK1/AKT信号传导,导致AS160(TBC1D4)的磷酸化。再次地,这导致GLUT4从胞质囊泡向质膜的易位增强以促进向骨骼肌细胞中的葡萄糖摄取,最终导致I型和II型糖尿病受试者的血糖显著降低,并且葡萄糖耐量显著提高。如所示,化合物#43可通过抑制肝细胞中的G6pC表达而加强胰岛素作用。肝脏不受控制地产生葡萄糖—由G6pC表达驱动的过程—是2型糖尿病的关键特征和关键问题。抑制糖尿病肝脏中的葡萄糖产生是最广泛使用的一类抗糖尿病药物双胍类药物(例如二甲双胍)的关键作用机制。化合物#43阻断此过程的能力使其潜在地在2型糖尿病的治疗中非常有价值。此外,化合物#43可恢复胰岛素抵抗的糖尿病小鼠的骨骼肌中的胰岛素受体功能,并且可加强胰岛素作用以刺激培养的骨骼肌细胞中的葡萄糖摄取。总之,这些结果表明使用化合物#43对抗人的I型和II型糖尿病有巨大潜力。

[0595] 实施例10:在无细胞系统中,化合物#43直接激活胰岛素受体蛋白质

[0596] 材料和方法

[0597] 化合物

[0598] 在Alltech, Inc的化学实验室中合成化合物#43及其硫类似物化合物#68。如通过HPLC测定,这些测试化合物的纯度经证实≥99%。

[0599] 胰岛素受体(Insr)的体外磷酸化,以及通过蛋白质印迹分析检测激活的Insr(由

Insr β 亚基的1146、1150和1151处的磷酸化酪氨酸残基指示)

[0600] 根据做了以下修改的Sigma方案进行Insr的体外磷酸化。简言之,将含有0.8 μ l原始天然INSR储备溶液(Sigma,目录号I9266;在含有50mM HEPES(pH 7.6)、150mM NaCl和0.1%Triton X-100的酶稀释缓冲液中稀释)的10 μ l天然胰岛素受体溶液与等体积的含有胰岛素(Sigma)、DMSO(化合物#43溶剂)、化合物#43或化合物#68(在50mM HEPES(pH 7.6)和100 μ g/ml牛血清白蛋白中稀释)的溶液一起在冰上温育30分钟。然后将含有0.2mM ATP、50mM HEPES(pH 7.6)、50mM MgCl₂和4mM MnCl₂的20 μ l 2X激酶缓冲液添加到上述反应物中,混合并在冰上温育45分钟。

[0601] 使用针对Insr β 蛋白质的1146、1150和1151处的磷酸化酪氨酸残基的特异性抗体(Cell Signaling Inc.)对五微升上述反应物立即进行蛋白质印迹分析。使用NIH Image J软件测定蛋白质条带密度。

[0602] 统计分析

[0603] 在适用的情况下,采用Student t检验来确定处理组间差异的统计学显著性,P值小于0.05被认为是显著的。

[0604] 结果:

[0605] 1.通过化合物#43和胰岛素在体外无细胞系统中激活自大鼠肝脏组织纯化的天然胰岛素受体蛋白质

[0606] 培养的肝脏和分化的骨骼肌细胞中以及T2D糖尿病小鼠中的研究揭示,化合物#43可在体外和体内激活胰岛素受体。为研究化合物#43是否对Insr的激活具有直接影响,进行天然胰岛素受体蛋白质(自大鼠肝脏组织纯化)的体外无细胞磷酸化测定。使用针对酪氨酸残基1146、1150和1151处的磷酸化Insr β 的特异性抗体检测激活的Insr。如所预期的那样,胰岛素处理能够在此无细胞体外系统中诱导Insr β 在Y1146/1150/1151处磷酸化(图26)。重要的是,化合物#43在1.9和3.8 μ M的剂量下也能够显著增强Insr β 在Y1146/1150/1151处的磷酸化,升高的磷酸化水平直接与0.5 μ M胰岛素相当(图26)。这些结果证实化合物#43可以可靠地模拟胰岛素以直接激活胰岛素受体,从而提供了化合物#43具有替代胰岛素对抗糖尿病(包括I型糖尿病)的潜力的进一步的分子证据。

[0607] 2.在无细胞系统中的Insr的激活方面,化合物#43的硫类似物化合物#68远不如化合物#43有效

[0608] 培养的肝细胞和2型糖尿病(T2D)Lepr^{db/db}小鼠中的研究显示,在体外抑制葡萄糖产生(图1)和减轻T2D小鼠的高血糖症(图4)方面,化合物#68(化合物#43的硫类似物)不如化合物#43有效。为研究化合物#43与化合物#68之间在无细胞系统中的Insr的激活方面是否有差别效果,将等量的天然胰岛素受体蛋白质与相同摩尔浓度(3.8 μ M)的化合物#43或化合物#68一起温育,然后进行体外磷酸化测定。如图27中所示,化合物#43但不是化合物#68在测试剂量下能够激活Insr。这些研究表明在Insr的激活方面,化合物#68在测试剂量下不如化合物#43有效,这可解释化合物#68在T2D小鼠中抑制肝脏葡萄糖产生(图1)和对抗高血糖症(图4)方面效力低的原因。

[0609] 实施例11:在化合物#43急性处理后,链脲佐菌素(STZ)诱导的1型糖尿病(T1D)小鼠的血糖水平降低

[0610] 材料和方法

[0611] 化合物

[0612] 链脲佐菌素(STZ)购自Sigma。在Alltech, Inc的化学实验室中合成化合物#43。如通过HPLC测定,化合物#43的纯度经证实≥99%。

[0613] 1型糖尿病(T1D)小鼠模型和化合物#43对这些T1D小鼠中的血糖水平的影响

[0614] 每天对五周龄C57/BL6雄性小鼠腹膜内注射链脲佐菌素(STZ, 55mg/kg小鼠体重),持续5天,然后在饲养箱中再饲养14天以进行恢复。使用血糖仪测量这些小鼠的血糖水平。血糖水平高于500mg/dL的那些动物被认为有I型糖尿病(T1D)。使非空腹血糖水平在500-550mg/dL之间的这些T1D小鼠空腹过夜,并且腹膜内注射化合物#43(剂量为5.4mg/kg体重)或含有2%DMSO(化合物#43储备溶剂)的生理盐水。在注射后1、2和3小时,使用血糖仪测量这些小鼠中的血糖水平。

[0615] 统计分析

[0616] 采用Student t检验来确定在每个时间点的对照(DMSO)组与化合物#43组之间差异的统计学显著性。P值小于0.05表示这两组之间的差异是统计学显著的。

[0617] 结果

[0618] 为研究化合物#43对抗T1D小鼠的高血糖症的潜力,使血糖水平在500-550mg/dL之间的STZ诱导的T1D小鼠空腹过夜,腹膜内注射含有DMSO的生理盐水或化合物#43(5.4mg/千克体重),持续1、2和3小时,然后进行血糖水平的测量。如图28中所示,在3小时的时间段期间,对照小鼠(注射含有DMSO的盐水)中的血糖水平没有明显变化。然而,在用化合物#43处理1小时后的这些T1D小鼠中观察到血糖水平降低的趋势(图28)。更重要的是,在化合物#43处理2和3小时后的这些T1D小鼠中观察到血糖水平显著降低(图28)。总之,这些结果证实化合物#43减轻T1D小鼠的高血糖症。

[0619] 虽然在实施例中示出了一些实施方案,但显然可对它们进行改动以提供本公开的其它实施方案。因此,要理解的是,本发明的范围由所附权利要求而不是由已借助实施例描述的具体实施方案限定。

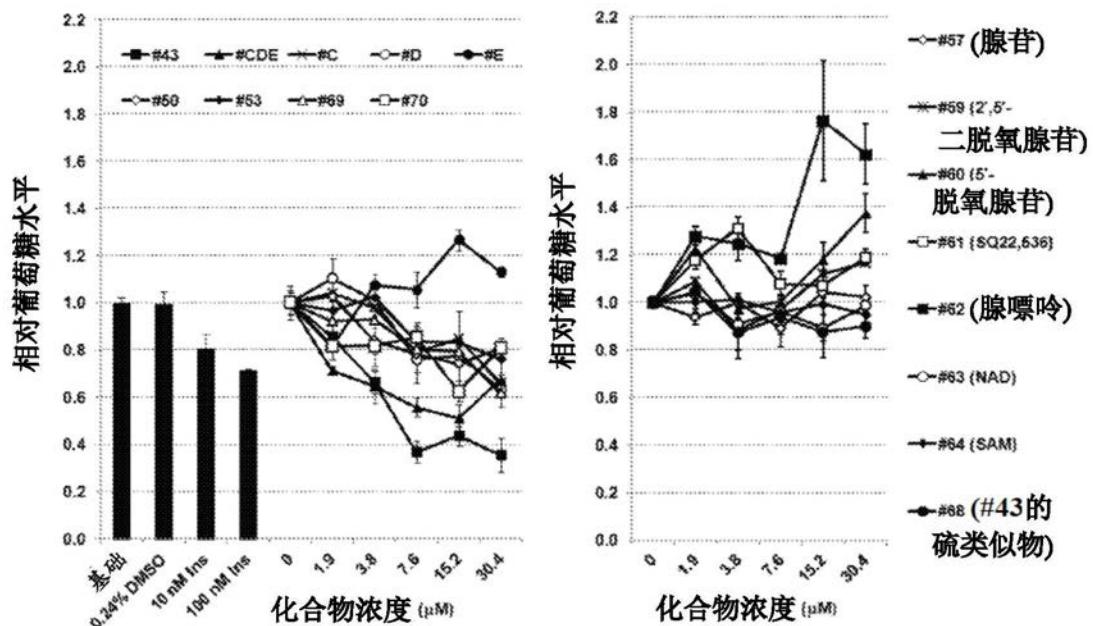


图1

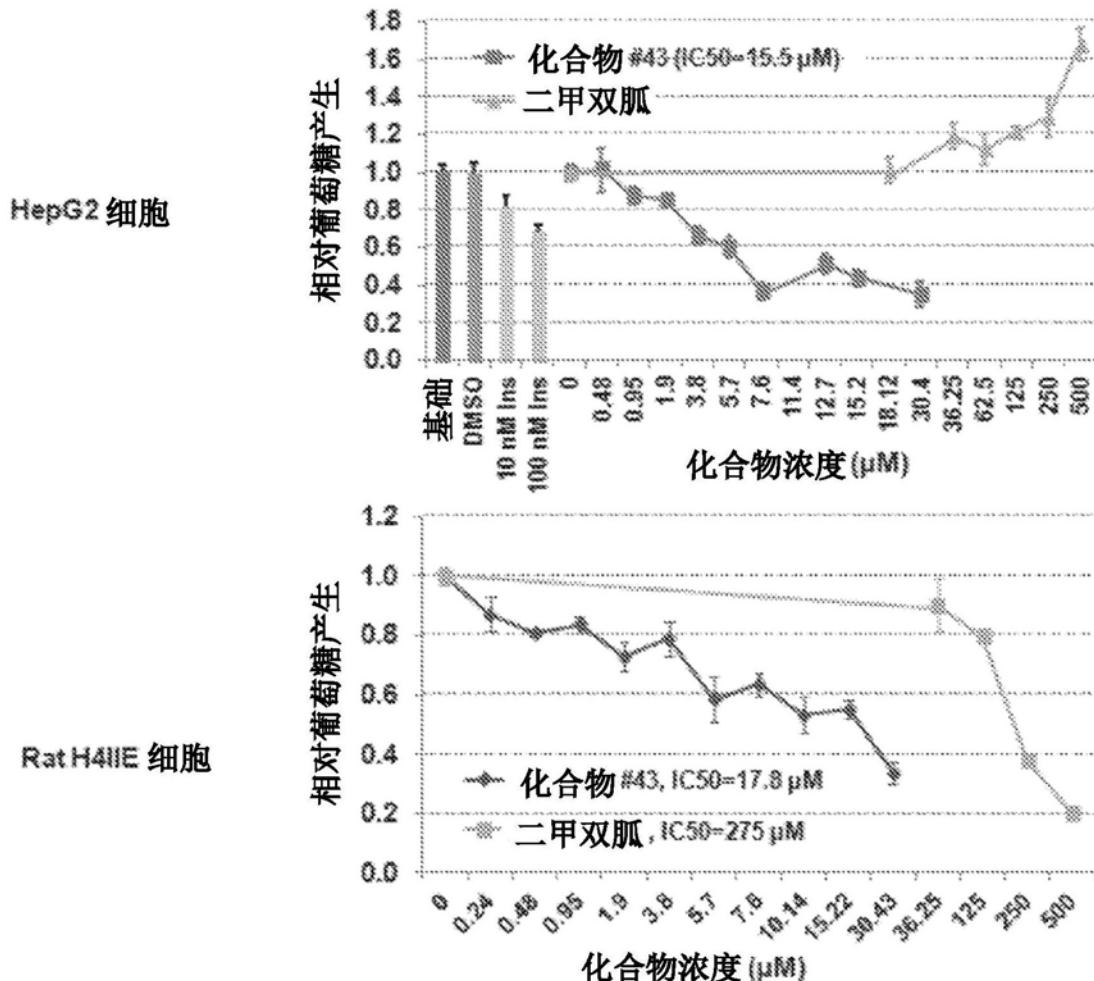


图2

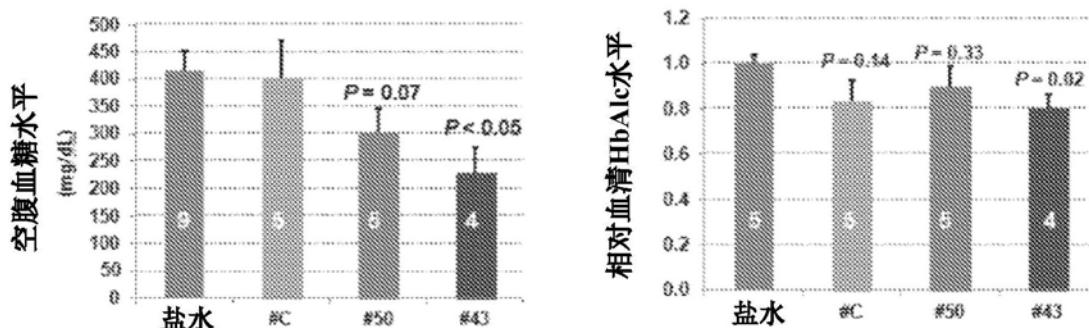


图3

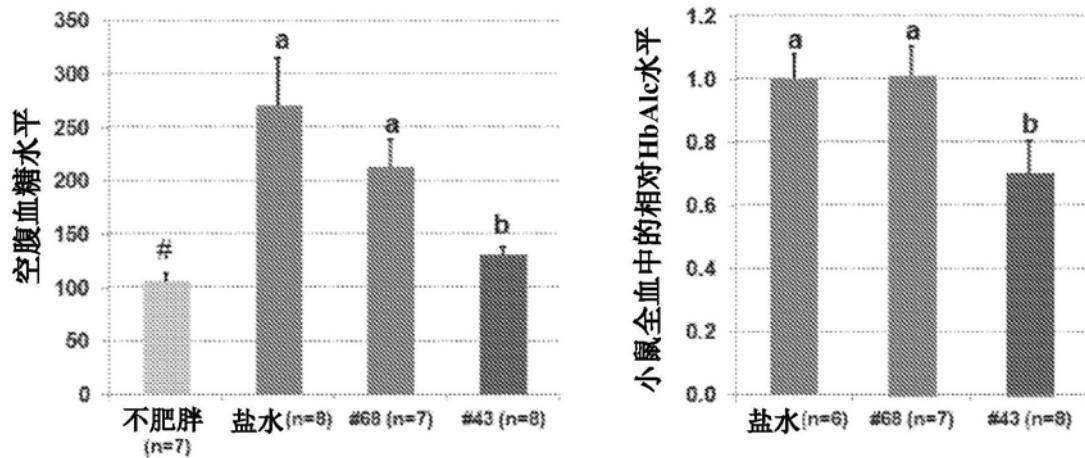


图4

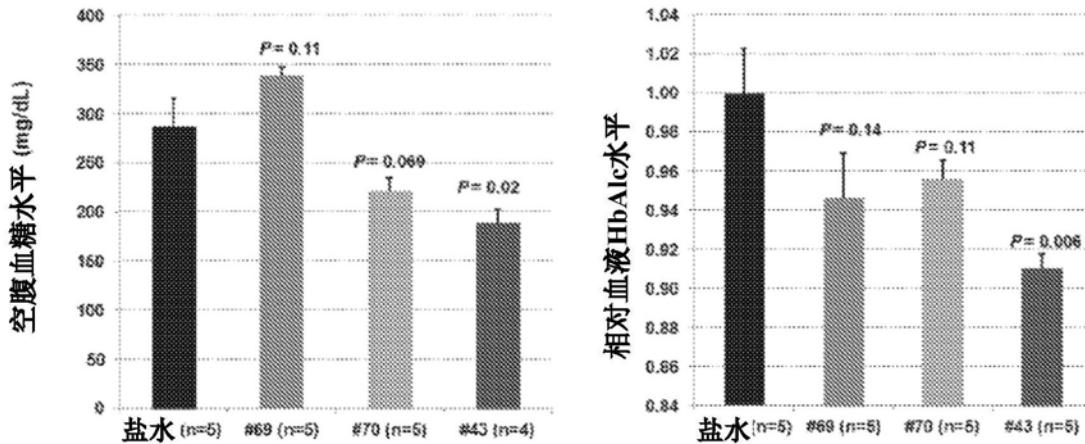


图5

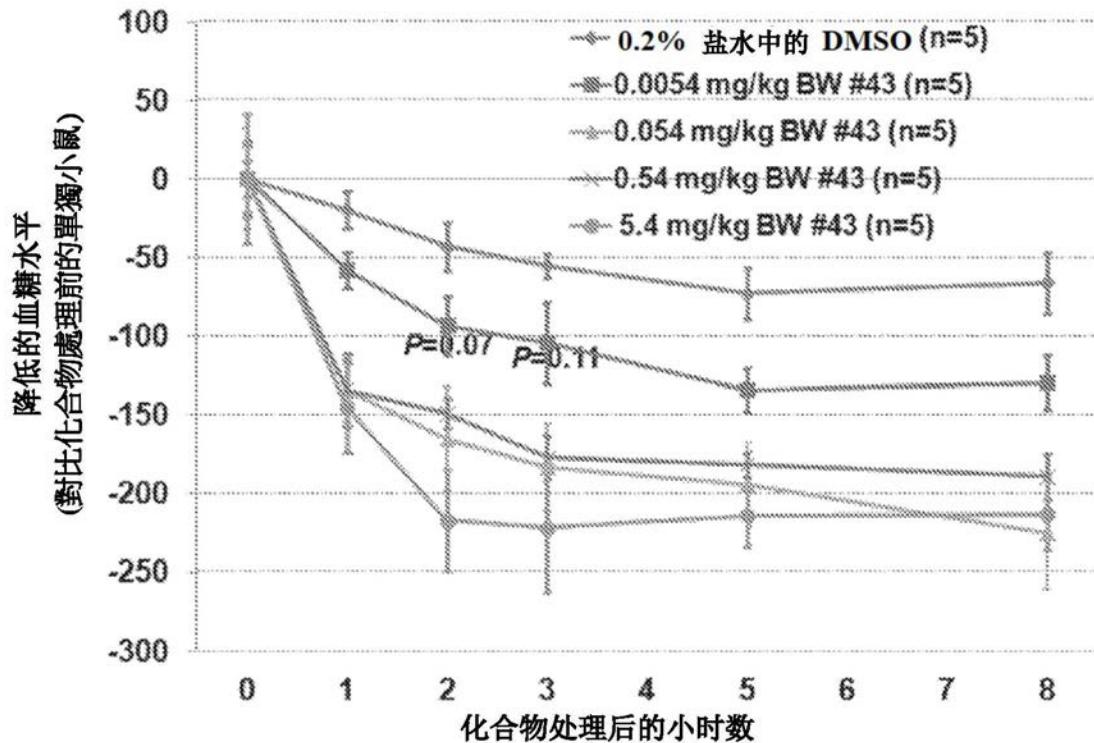


图6

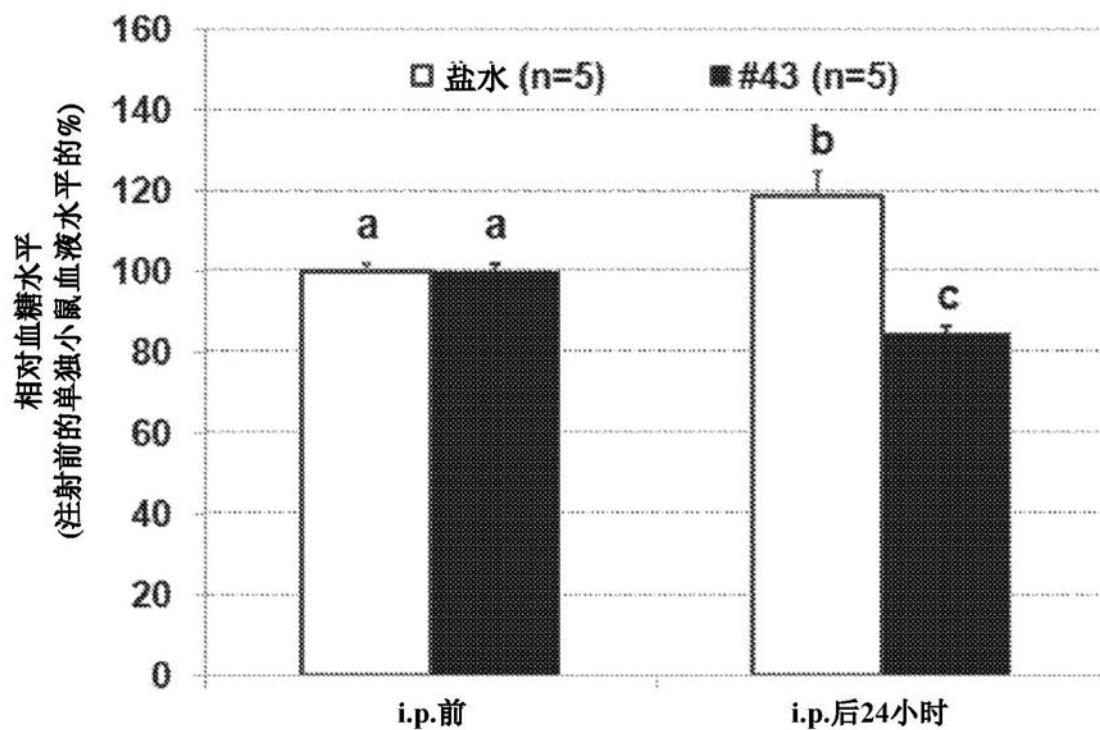


图7

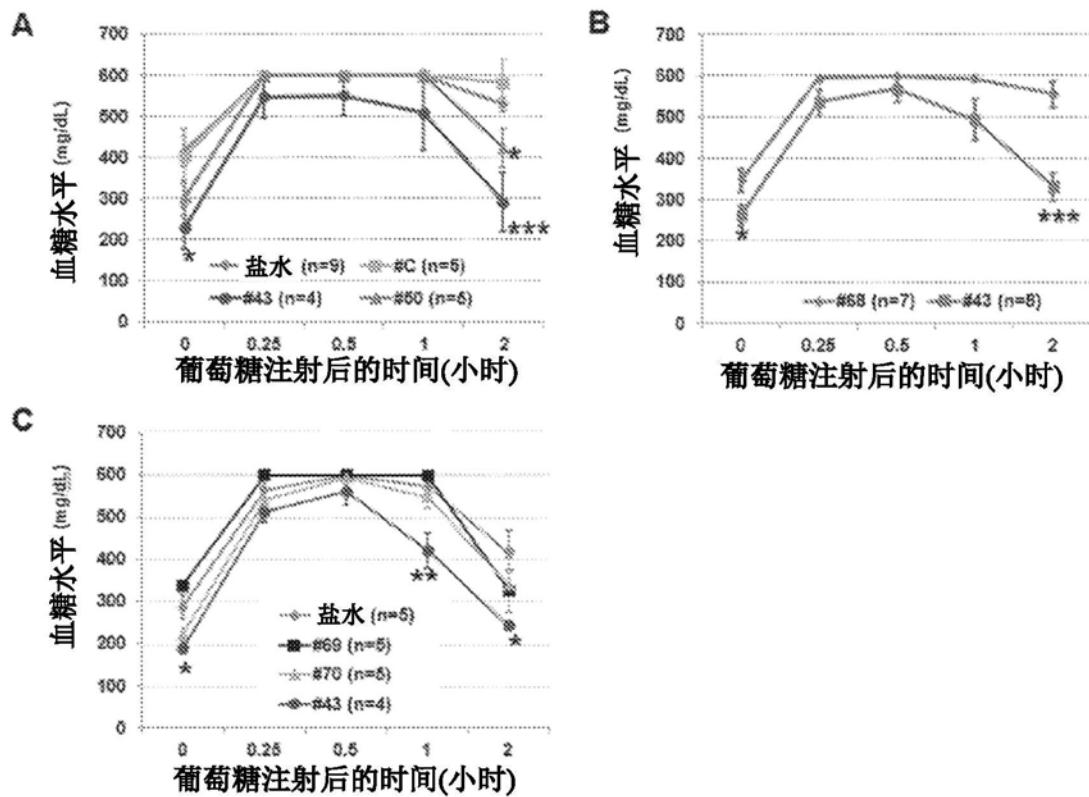


图8

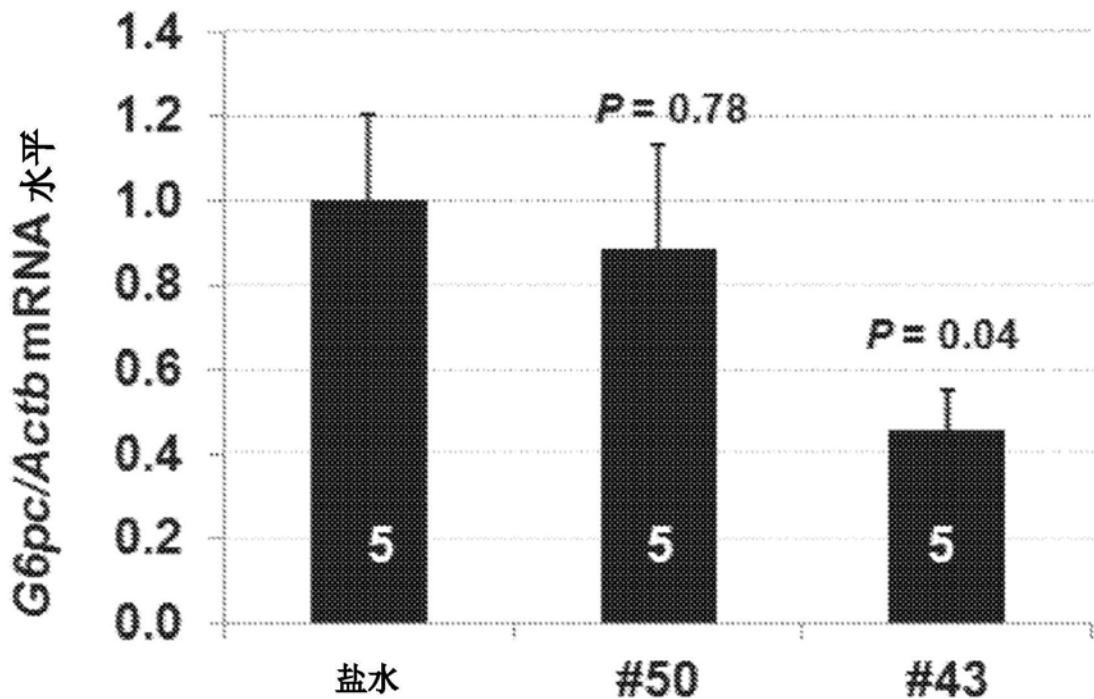


图9

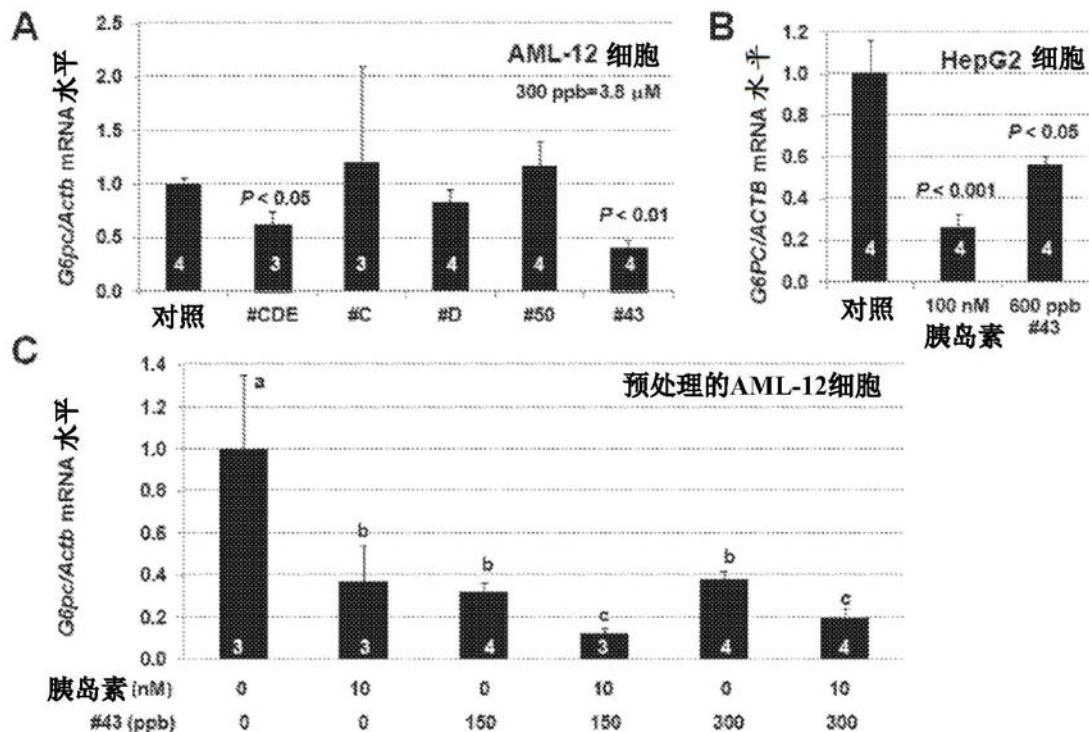


图10

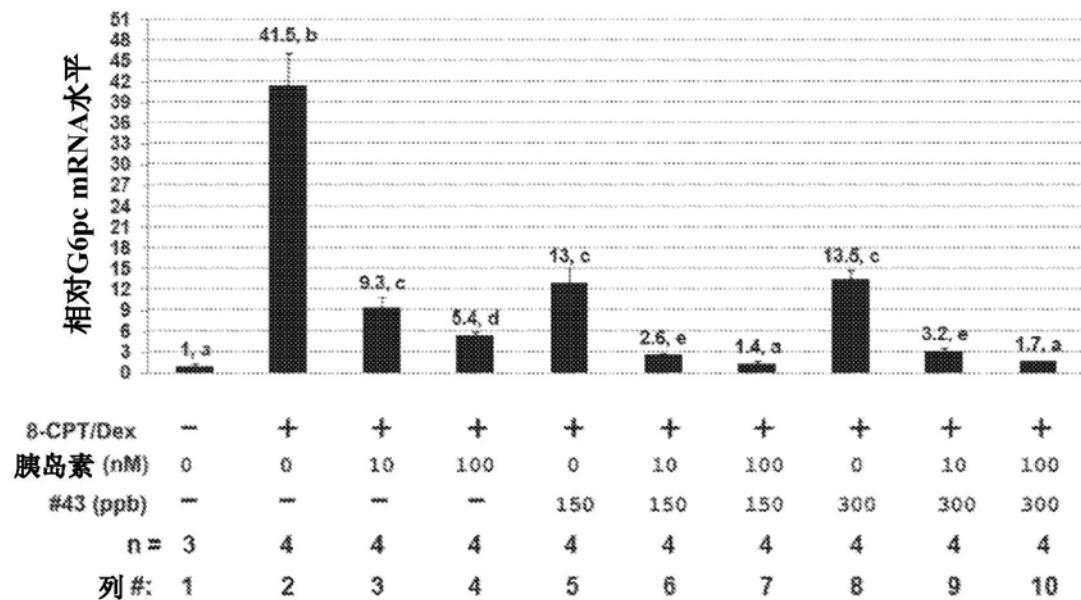


图11

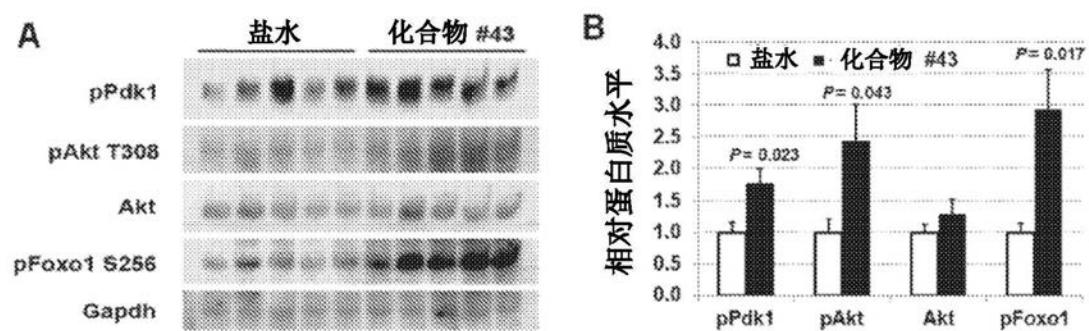


图12

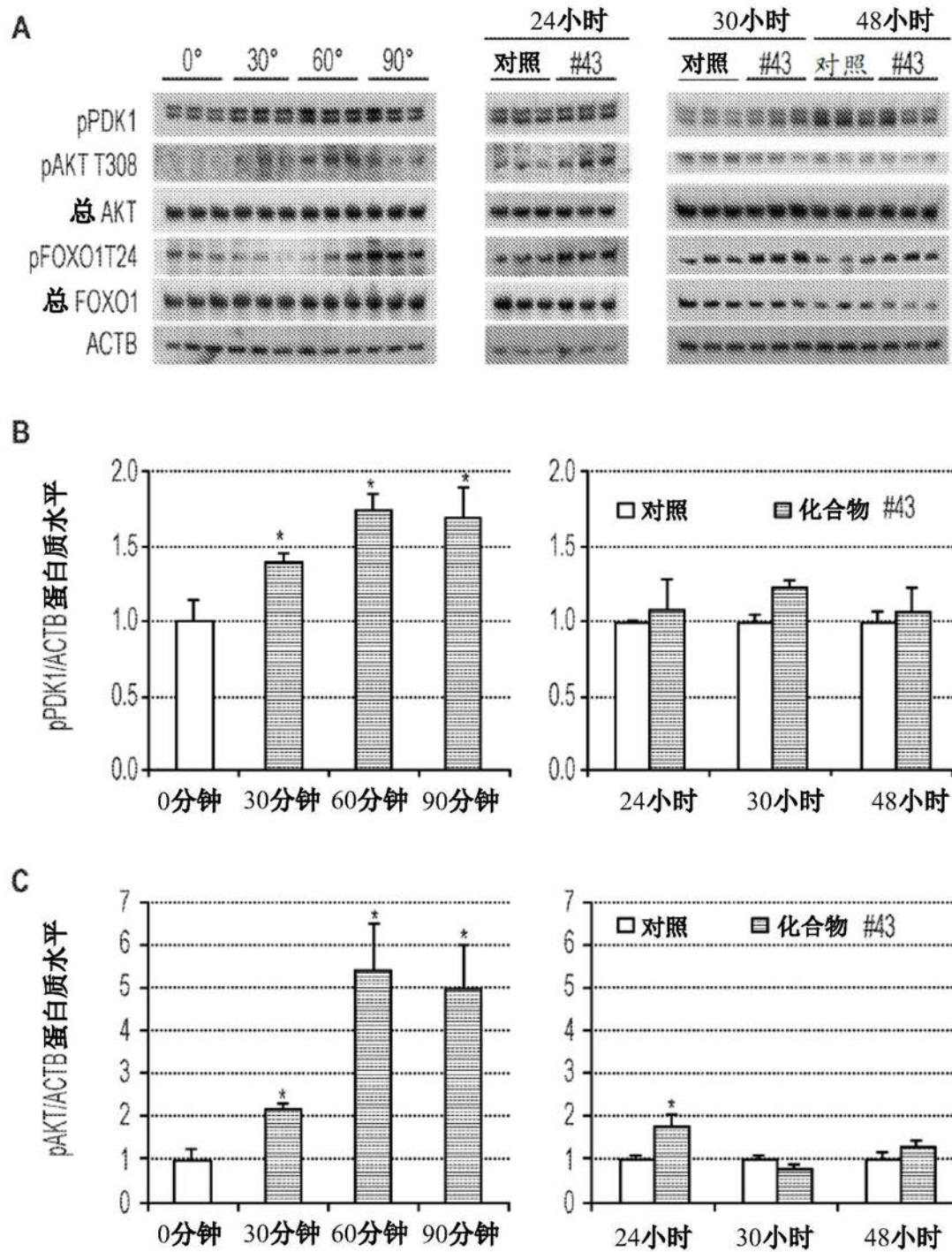


图13

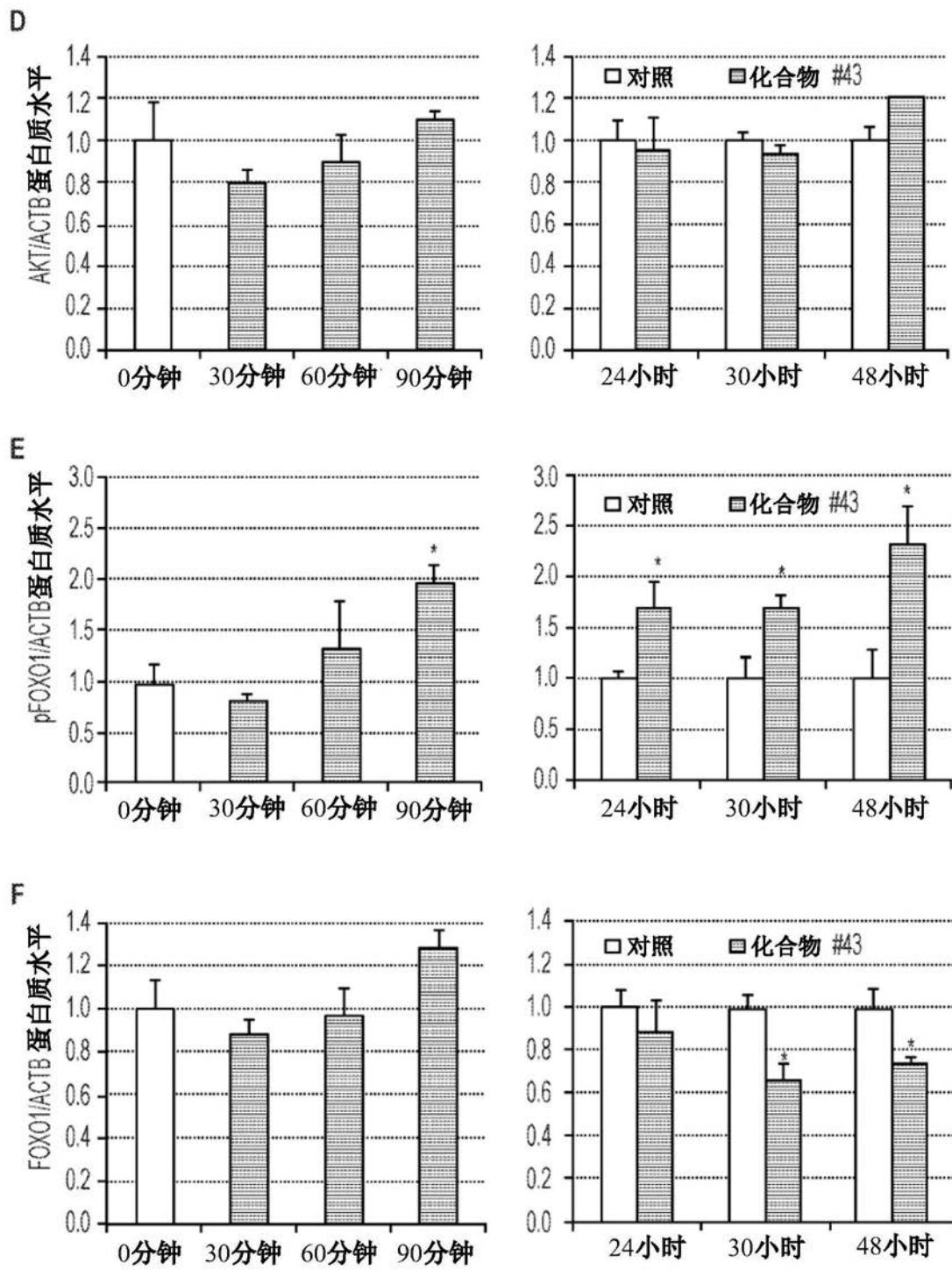


图13续

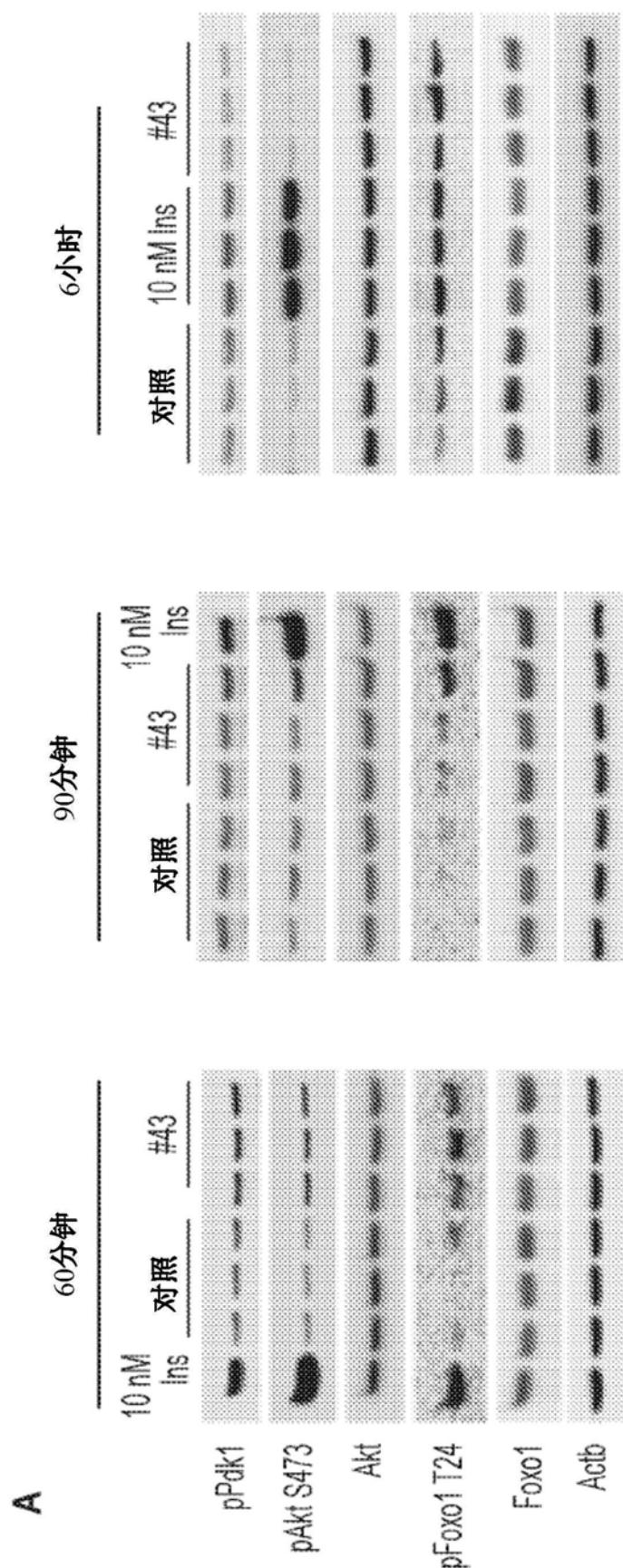


图14

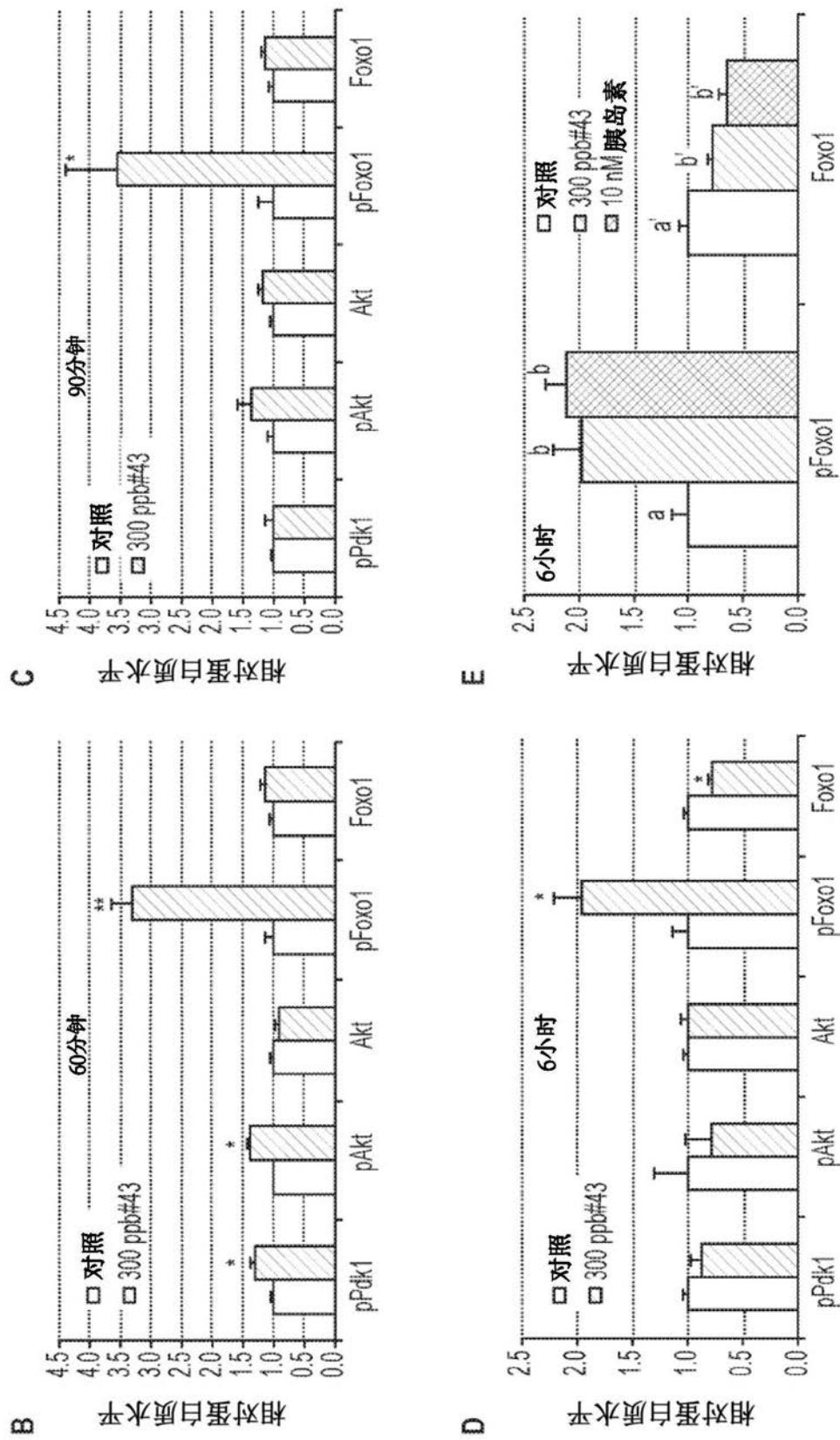


图14续

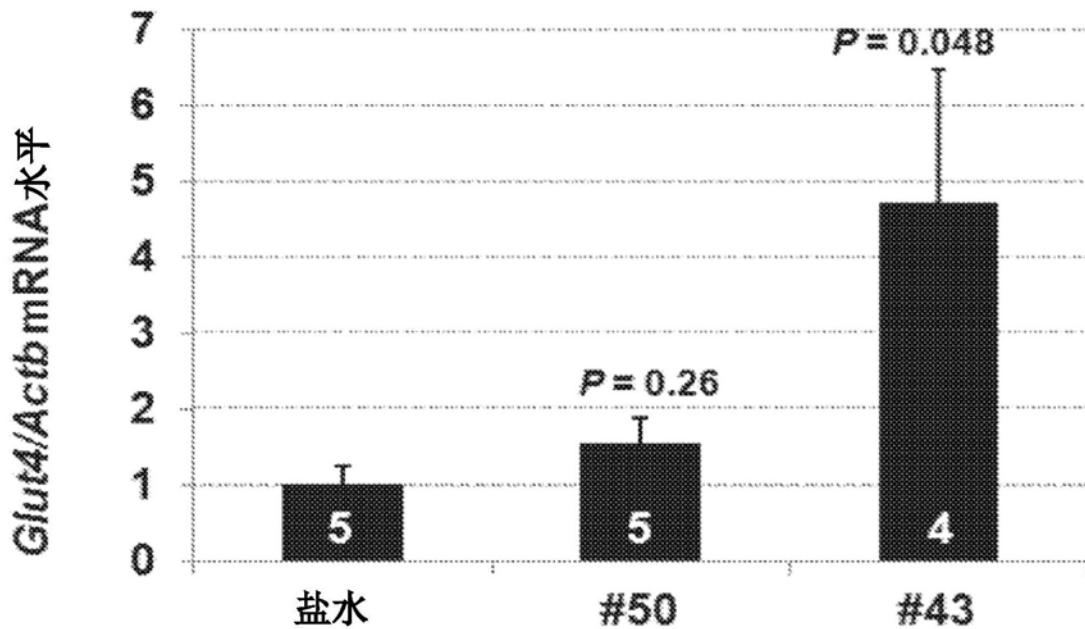


图15

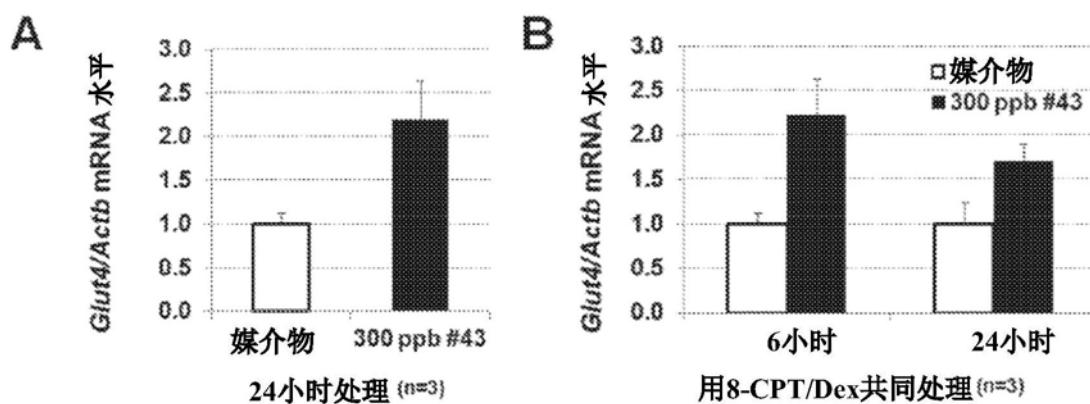


图16

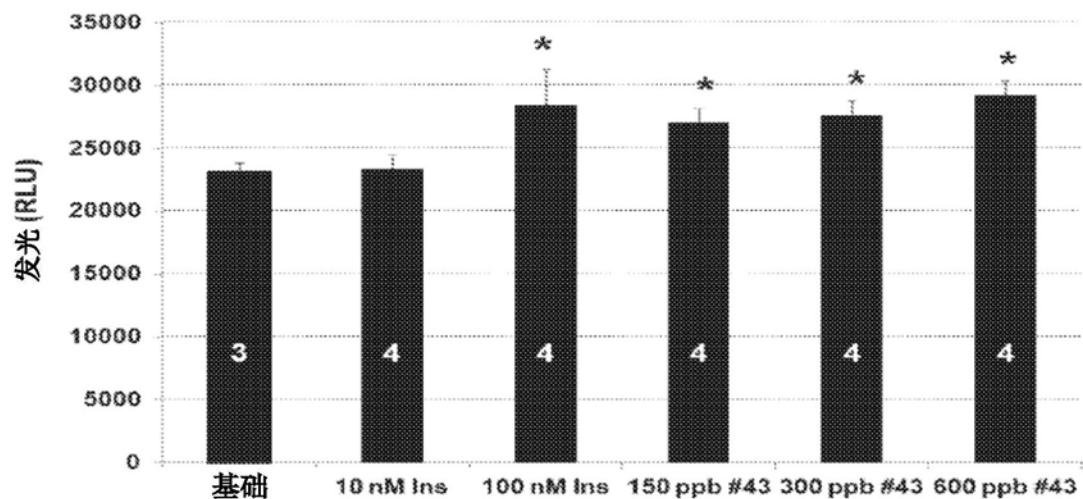


图17

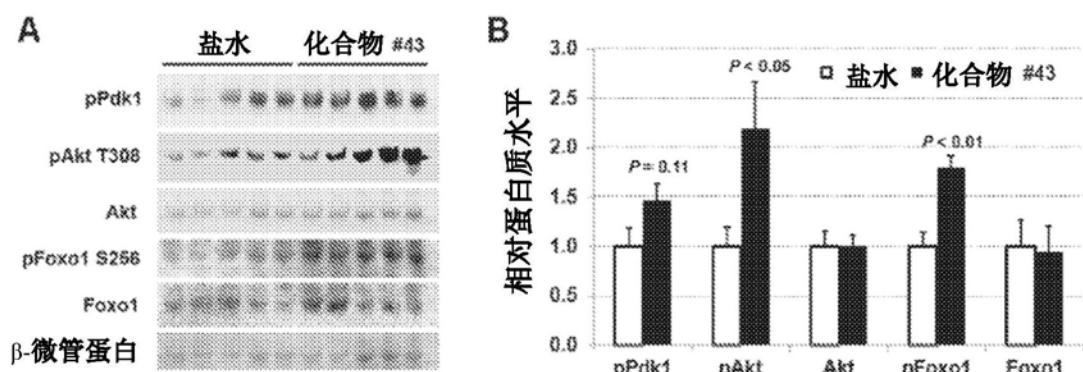


图18

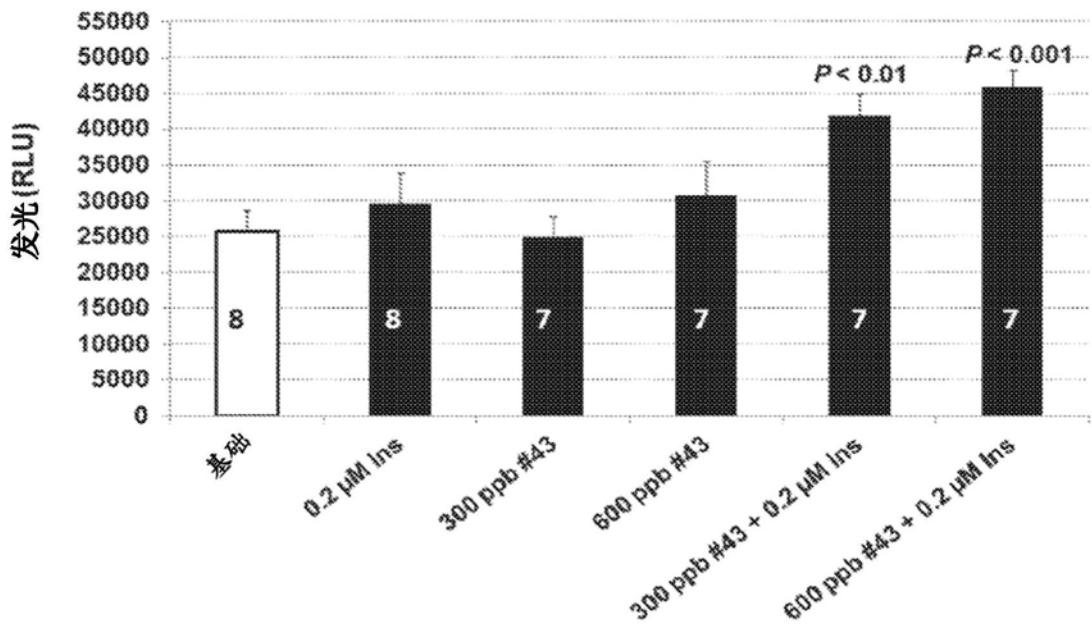


图19

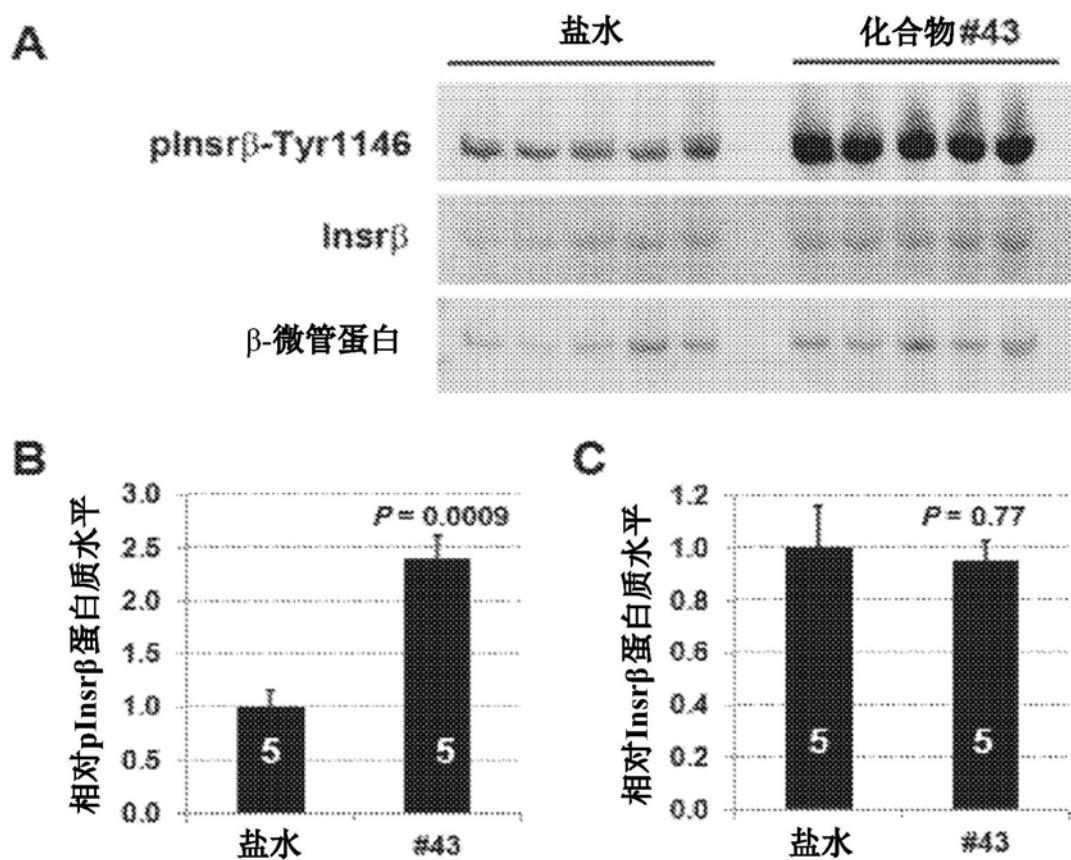


图20

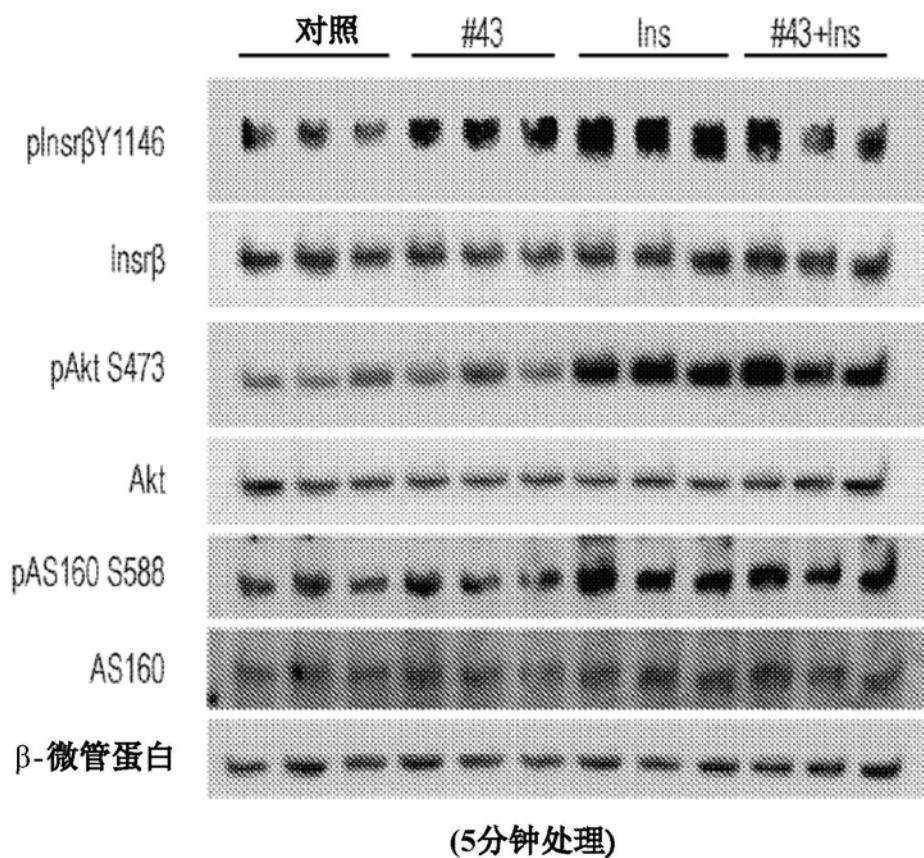
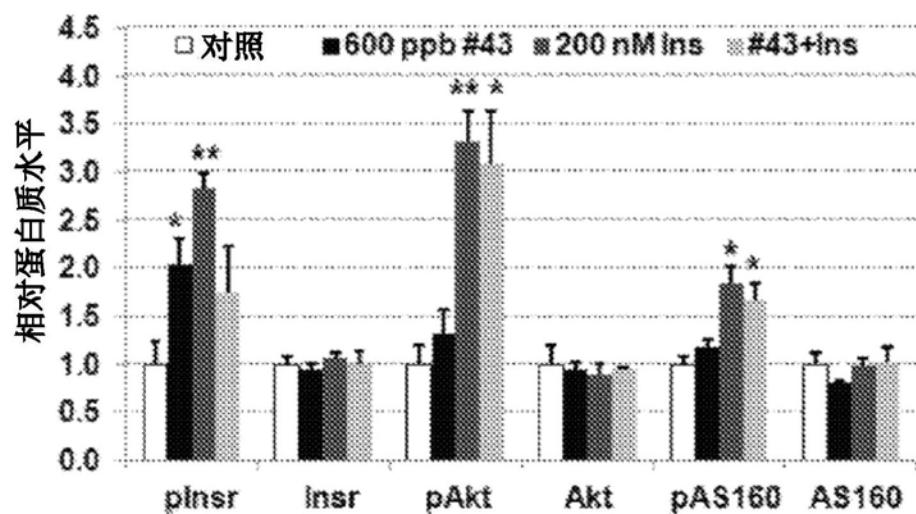
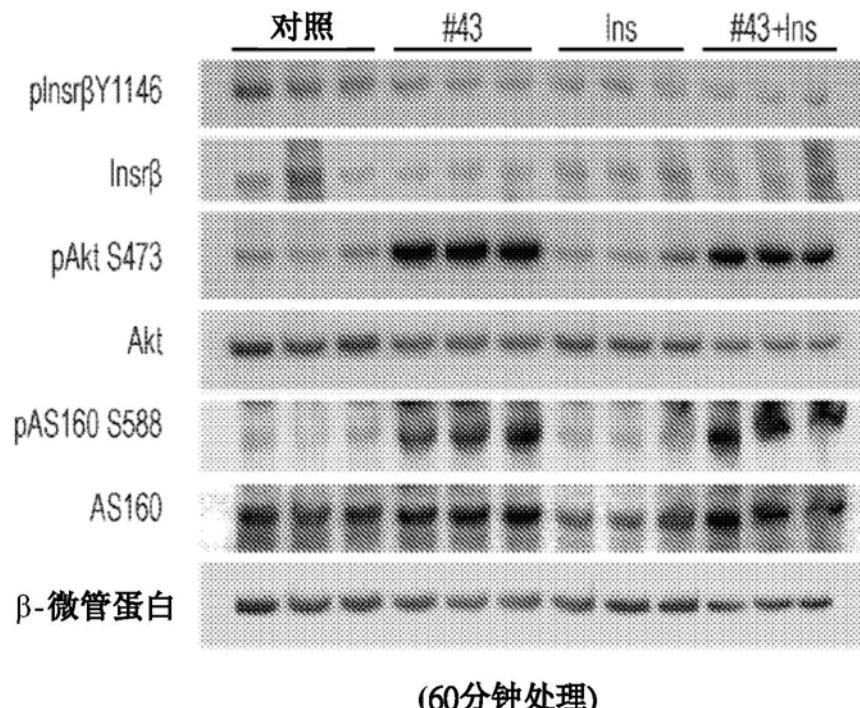
A**B**

图21

C



D

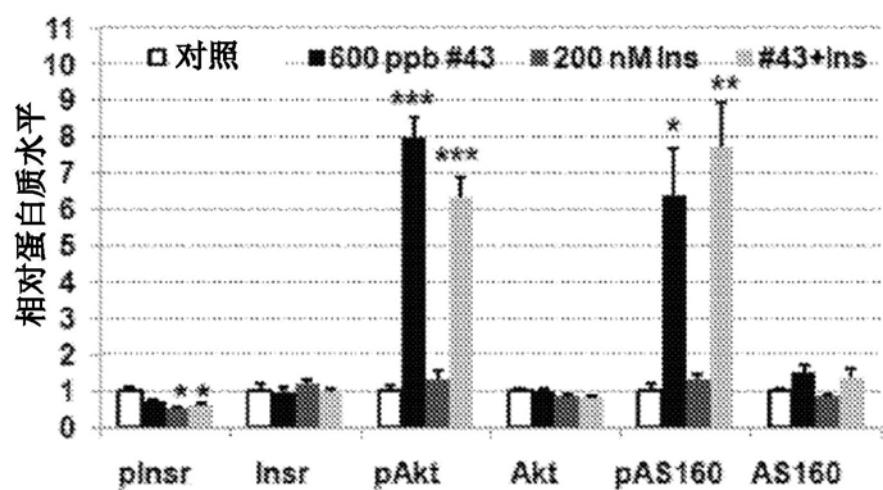


图21续

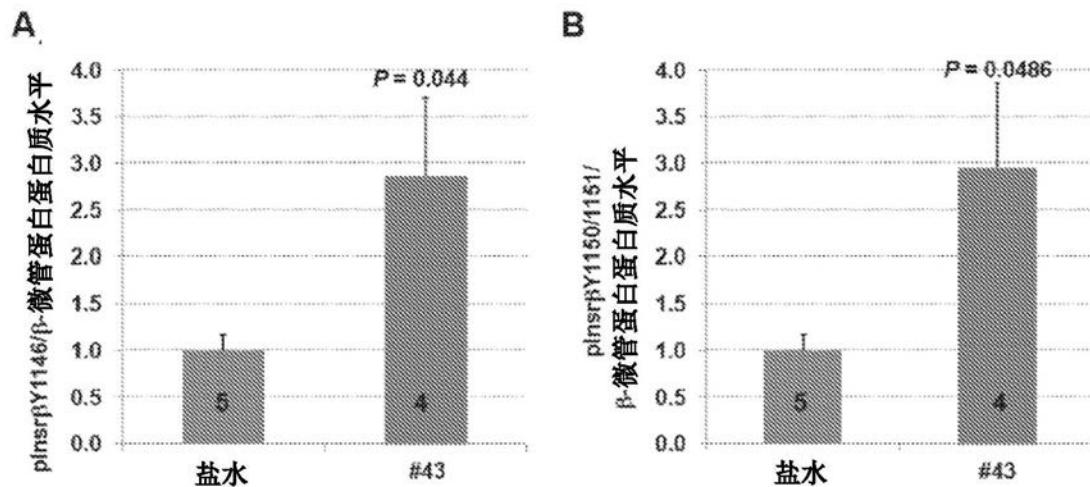


图22

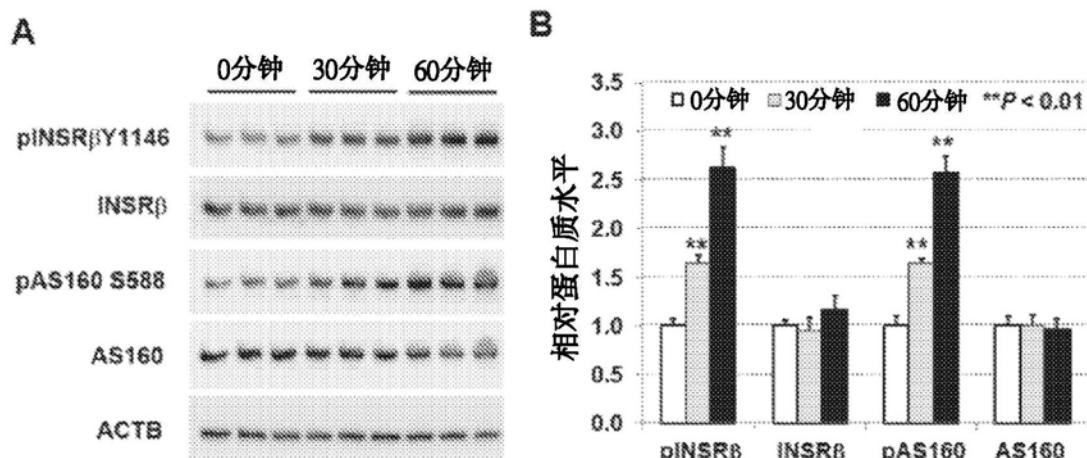


图23

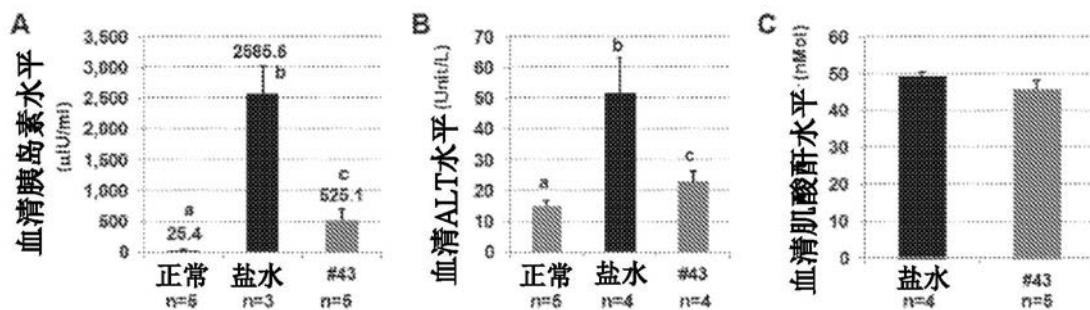


图24

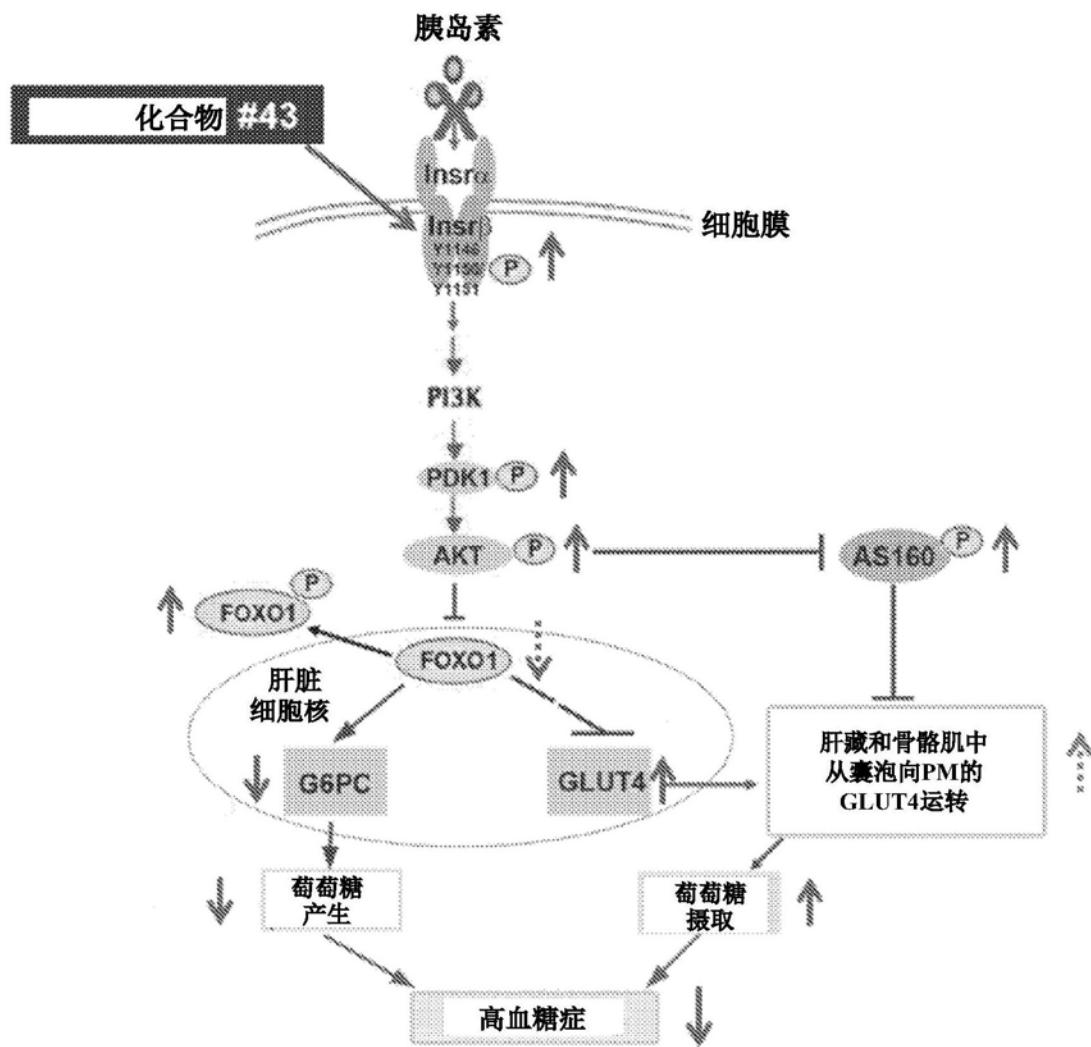


图25

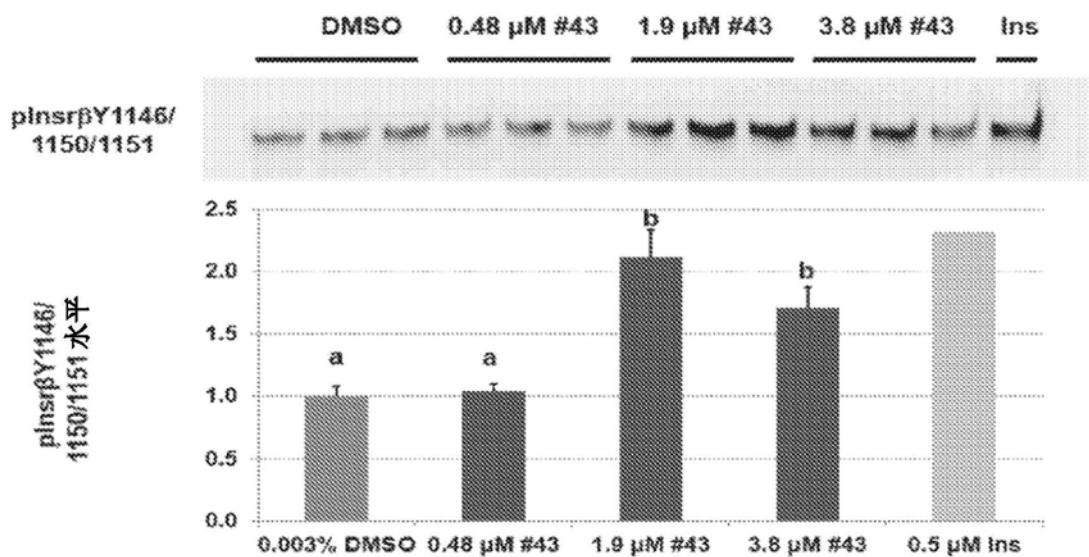


图26

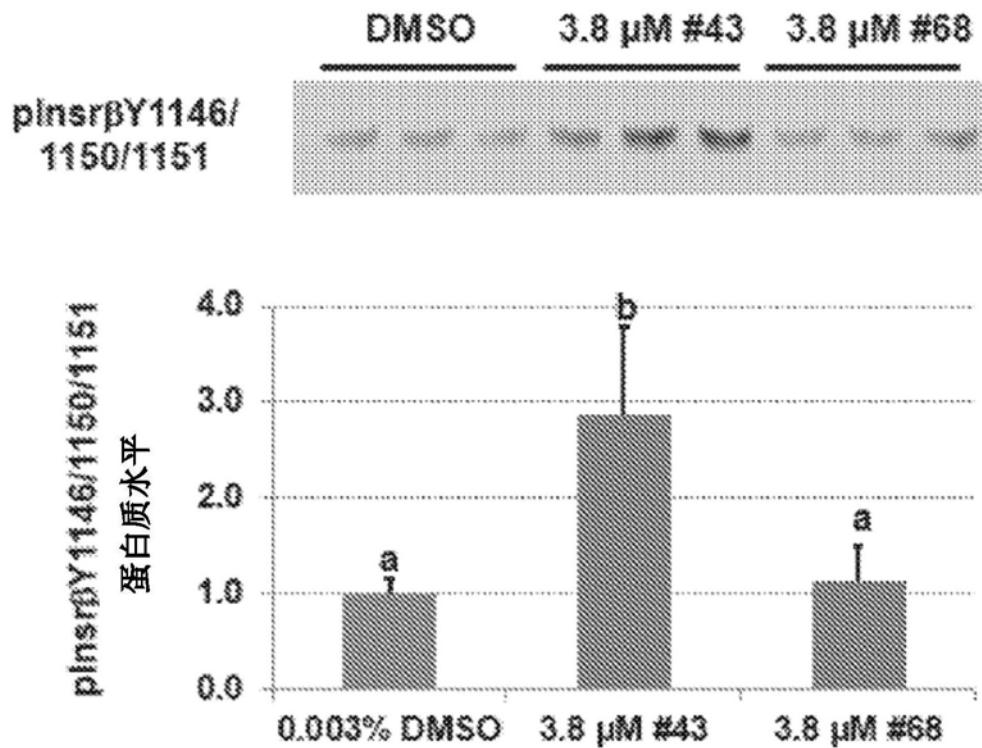


图27

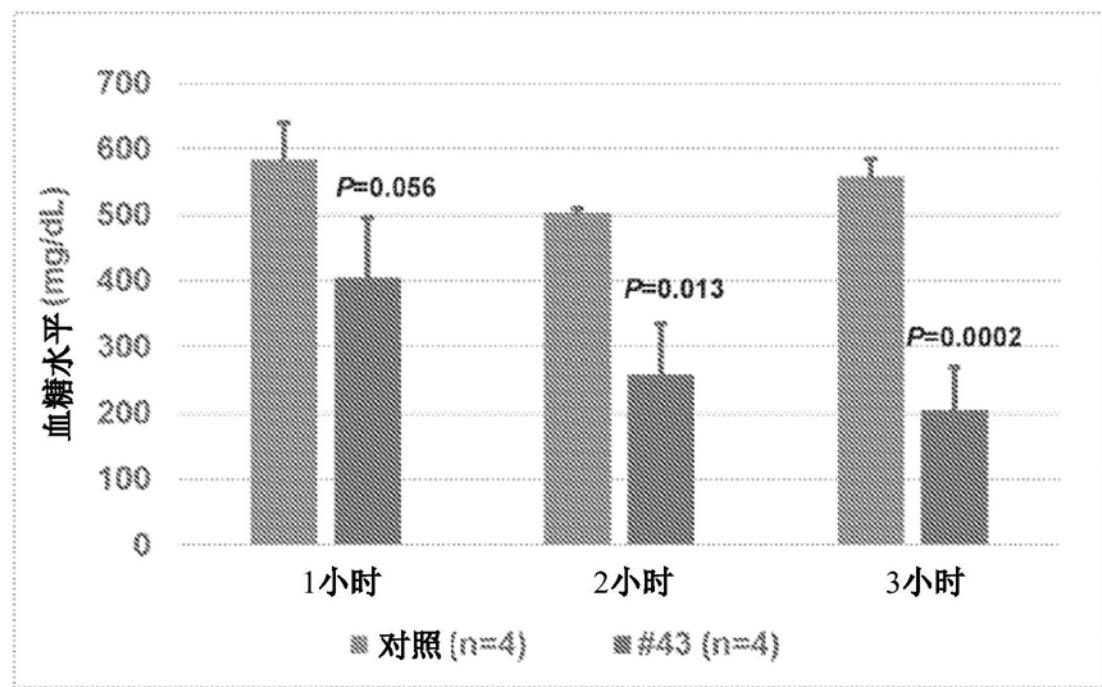


图28