[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61K 31/198
A61P 5/50

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00813316.6

[45] 授权公告日 2005 年 6 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1208055C

[22] 申请日 2000.8.23 [21] 申请号 00813316.6
[30] 优先权
[32] 1999. 8.27 [33] FR [31] 99/10874
[86] 国际申请 PCT/FR2000/002361 2000.8.23
[87] 国际公布 WO2001/015689 法 2001.3.8
[85] 进入国家阶段日期 2002.3.25
[71] 专利权人 因诺迪亚公司
地址 法国蒙彼利矣
[72] 发明人 G·里比斯 M·陶伊斯
P·R·派提特 C·布罗卡
Y·索瓦里 B·保
审查员 邓声菊

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 唐伟杰

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 11 页

[54] 发明名称 氨基酸用于制备治疗胰岛素抗性药物的用途

[57] 摘要

本发明涉及用单羟基或多羟基氨基酸及其内酯形式制备对胰岛素外周靶组织具有胰岛素模拟和/或胰岛素敏化作用的药物的用途，更具体地说是它们制备用来治疗和预防胰岛素抗性药物的用途。

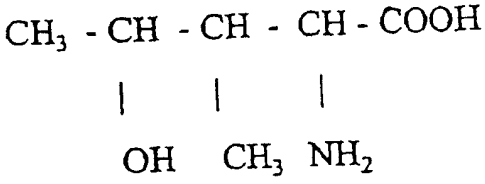
ISSN1008-4274

1.选自单羟基化氨基酸、多羟基化氨基酸及这些酸的内酯形式的化合物用于制备具有胰岛素模拟和/或胰岛素敏化作用的药物的用途。

2.权利要求 1 中所述的用途，其特征在于所述药物是用来在胰岛素的外周靶组织水平上发挥胰岛素模拟和/或胰岛素敏化作用的。

3.权利要求 1 或 2 中所述的用途，其特征在于所述化合物降低了与胰岛素受体信号途径有关的磷酸酶活性，和/或刺激在 IRS-1 和/或 IRS-2 上的 PI 3-激酶活性。

4.权利要求 1 或 2 所述的用途，其特征在于所述化合物是通式为



的 4-羟基异亮氨酸和/或该氨基酸的内酯形式。

5.权利要求 4 所述的用途，其特征在于 4-羟基异亮氨酸是以其 2S,3R,4S 异构体或相应的内酯形式存在的。

6.权利要求 1 或 2 所述的用途，所述的药物是用于治疗胰岛素抗性的药物。

7.权利要求 1 或 2 所述的用途，所述的药物是用于抵抗与胰岛素抗性有关综合征的药物。

8.权利要求 1 或 2 所述的用途，所述的药物是用于抵抗血胰岛素增多的药物。

9.权利要求 1 或 2 所述的用途，所述的药物是用于抵抗与老化有关的胰岛素抗性的药物。

10.权利要求 1 或 2 所述的用途，所述的药物是用于抵抗与肥胖有关疾病的药物。

11.权利要求 1 或 2 所述的用途，所述的药物是用于抑制与癌症发

生危险有关的细胞系增殖的药物。

12.权利要求 1 或 2 所述的用途，所述的药物是用于预防胰岛素抗性的药物。

13.权利要求 1 或 2 所述的用途，所述的药物是用于降低对外源胰岛素需求的药物。

14.药物组合物，其含有胰岛素和选自单羟基化氨基酸、多羟基化氨基酸及这些酸的内酯形式的化合物。

15.试剂盒，其含有胰岛素和选自单羟基化氨基酸、多羟基化氨基酸及这些酸的内酯形式的化合物。

氨基酸用于制备治疗胰岛素抗性药物的用途

本发明涉及氨基酸用于制备对胰岛素外周靶组织具有胰岛素模拟和/或胰岛素敏化作用的药物的用途，更具体地说是氨基酸用于制备治疗和预防胰岛素抗性药物的用途。

在近几年，对胰岛素如何工作的分子机理方面的理解已有相当进展。图 1 显示了表示胰岛素信号转导的主要途径的图解。胰岛素受体是具有内在酪氨酸激酶活性的转膜受体(Combettes-Souverain M.和 Issad T.,Diab. Metab.,24, 477,1998)。胰岛素与其受体结合造成受体在其酪氨酸残基上自身磷酸化，其刺激了该受体对特定数目的细胞内底物如胰岛素受体底物 1(IRS-1)、胰岛素受体底物 2(IRS-2)和 Src 同源胶原蛋白或 Shc 的酪氨酸激酶活性。这种酪氨酸激酶活性在传递胰岛素信号方面起着决定性作用，在许多胰岛素抗性的情况中这种活性都被改变了(Ricort J.M.等，Diabetologia,38,1148,1995)。胰岛素抗性的全部细胞机理可以在激素与其受体的结合或与受体更远端的结合后阶段的结合中发现。正如图 1 中的图解所示，胰岛素受体在 IRS 和 Shc 的酪氨酸上的磷酸化激活了细胞信号的两种主要途径，MAP 激酶(MAPK)途径和磷脂酰肌醇 3-激酶(PI 3-K)途径。磷酸酪氨酸的磷酸酶(PTP)在调节这些途径方面起作用。

本发明人过去已报导过胰岛素分泌者的作用，在胰细胞中由羟基化的葫芦巴种子(Trigonella foenum graecum L.)的氨基酸提取物、尤其是由 4-羟基异亮氨酸(4-OH-Ile)和/或相应的内酯发挥这种作用(专利 FR 2 695 317 和 2 745 718 和优先权下的相应专利)。

而且，本发明人现在已经显示这种化合物在胰岛素靶细胞水平、即外周组织如肝和肌肉也能够通过在胰岛素受体水平上发挥活性和/或触发该受体活化的信号级联来起作用。在这些外周组织所观察到的作用整体上相应于胰岛素模拟作用或胰岛素敏化作用。

正如实施例中所详细描述的，所进行的研究实际上已经表明了这些化合物在受体下启动的磷酸化级联水平上的作用，即在胰岛素信号传递中所涉及的主要蛋白的磷酸化显著增加。由磷酸化的 IRS-1 激活的并在葡萄糖运输因子 GLUT 4 的易位中起主要作用的 PI 3-激酶(磷脂酰肌醇 3-激酶)在这类化合物的作用下也在增加。在与使用这些化合物相同的条件下，与胰岛素受体信号途径有关的磷酸酶活性(PTP 活性)下降，这与上述磷酸化的增加相一致。所以这类化合物不管是通过激酶的激活和/或磷酸酶的抑制都能够作用于一般由胰岛素触发的信号途径上。

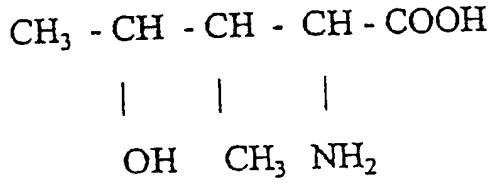
本发明的主题将得益于所得到的这些结果，因此涉及这类氨基酸或其衍生物作为胰岛素模拟剂或胰岛素敏化剂的任何用途。特别是它涉及用这类化合物制备具有胰岛素模拟作用和/或胰岛素敏化作用的药物的用途。这些作用在胰岛素外周靶组织中可以观察到。因为这些化合物对一般由胰岛素触发的信号途径起作用，所以实际上它们能够作为胰岛素的底物、补体、增强剂(potentializers)和致敏剂使用。

因此本申请涉及任何氨基酸或氨基酸衍生物作为胰岛素模拟剂或胰岛素敏化剂的用途，它能够实现磷酸酶 PTP 活性的降低和/或 PI 3-激酶活性的增加，这种作用等同于或高于分别由胰岛素所引起的降低或增加。任何能够表明这种降低 PTP 活性或增加 PI3-激酶活性作用的方法（means）都是合适的。下列实施例对此进行详细说明。

这类化合物以显著的方式相当于在其结合部位不识别胰岛素受体但在实施例所提到的 4-OH-Ile 条件下的受体后水平起作用的氨基酸，也相当于可保留，至少在实质上，其结合部位上的胰岛素受体非识别特性以及所述衍生物的亲本氨基酸呈现的受体后水平上的活性的这些氨基酸的衍生物。

有利地是，本发明用途的特征在于它涉及选自由单羟基化氨基酸、多羟基化氨基酸及这些单或羟基化氨基酸的内酯形式组成的组的化合物。

特别是本发明涉及通式为



的4-羟基异亮氨酸和/或其内酯形式的用途。

特别是，本发明涉及4-羟基异亮氨酸（简称为4-OH-Ile）的2S,3R,4S异构体或相应的内酯形式的用途。

考虑到所观察到的这些作用，根据本发明所生产的药物特别适合于治疗胰岛素抗性、抵抗或预防与胰岛素抗性相关综合征以及预防胰岛素抗性。

而且，众所周知在西方国家体重增长过多、缺少运动、饮食低劣和日益增加的老年人口是经常面临的社会-经济因素。这些因素都会促使胰岛素抗性和常伴有肥胖的补偿性血胰岛素增多的发展，并且它们是潜在致糖尿病的。所以，游离脂肪酸是所提出的试图用来解释胰岛素抗性、肥胖和血胰岛素增高之间密切联系的第一个候选者(Mac Garry J.D.,J.Cell. Biochem.,555,29,1994)。

目前这种联系已经成为关系公众健康的主要现象。联系高胰岛素血与未来心血管疾病危险、致动脉粥样硬化或致糖尿病危险的大量临床和流行病学证据已经能够绘制出一致的Reaven's X综合征表（高胰岛素血、胰岛素抗性、血清三甘油酯增加、动脉高血压）和与其有关的致病危险（Reaven G.M.,糖尿病，37，1595,1988）。另外，按照最近的调查，促使某些上皮细胞（明显地是结肠中的那些）增生的高胰岛素血似乎与癌症的危险有关（Hu F.B.等,J. Natl.Cancer Inst.,91,542,1999）。

本申请也涉及所述氨基酸和衍生物用于制备用来抵抗胰岛素抗性和胰岛素抗性综合征特别是抗血胰岛素增多、与老化有关的胰岛素抗性以及与肥胖有关的疾病的药物的任何用途。

本申请也涉及所述氨基酸和衍生物用于制备用来预防胰岛素抗性

药物的任何用途，特别是制备用来降低对外源性胰岛素需求的药物的用途。由于这类药物的胰岛素模拟特性和胰岛素敏化特性，对于内源胰岛素缺乏、甚至在1型糖尿病出现丧失胰岛素的患者而言，它们实际上具有降低对外源胰岛素需求的作用。患有1型糖尿病的患者实际上忍受着限制全部胰岛素外源供应的胰岛素分泌的总缺失（生产细胞的损坏）的痛苦。除了这种给药原有的代价外，这种情况还经常导致胰岛素抗性的出现。为了预防和治疗这些问题，为了治疗内源胰岛素的缺乏，特别是缺少内源胰岛素如1型糖尿病以及为了制备用于这种治疗的药物，本发明建议使用至少一种所述氨基酸或衍生物。它们与胰岛素的结合使用有利于降低患者对外源胰岛素的需求（胰岛素必需供应的减少），并因此降低了治疗费用同时预防了胰岛素抗性及其副作用的出现。

根据本发明所生产的药物也有助于抑制与癌症出现危险有关的某些细胞系的增生。

本发明也涉及所述衍生物特别是 4-羟基异亮氨酸和/或其内酯形式用于制备可通过降低与胰岛素受体的信号途径有关的磷酸酶活性和/或通过促进在 IRS-1 和/或 IRS-2 上的 PI 3-激酶活性来起作用的药物的用途。

本发明也涉及以组合方式含有胰岛素和至少一种上述所定义的氨基酸化合物或衍生物的任意药物组合物、任意药用试剂盒和任意药剂。这种组合可以是物理性的（胰岛素和氨基酸或衍生物在相同组合物中）。或者它可以相应于物理上性质不同的组合物的形式提供，其中一个含有胰岛素，另一个含有氨基酸或其衍生物，但它们是为了组合应用而组合出现的（分部分的试剂盒(kit-of-parts)）。这种组合使用可以是在同一时间或在不同时间。

本发明药物主要通过口腔途径给药，但也可以通过静脉或肌肉内途径给药，并含有按照选定的盖伦剂型选用的赋型剂。

剂量将与所治病症相适应。

在下列实施例中通过附图2到11详细说明本发明的其他特征和优

点（图 1 和上文有关并显示了胰岛素信号转导的主要途径的图解），图 2 到 11 分别表示:

- 图 2, 4-OH-Ile 对大鼠肝脏中胰岛素受体及其底物磷酸化的作用,

- 图 3, 4-OH-Ile 对肝脏 PI 3-激酶活性的作用,

- 图 4, 在肝 LMH 肝系中胰岛素在其受体上的结合,

- 图 5 到 11, 4-OH-Ile 对下列方面的作用:

·肌肉的 PI 3-激酶活性（图 5）,

·大鼠的基础血胰岛素和糖血（图 6）,

·2 型糖尿病大鼠肝脏的（图 7）和肌肉的（图 8）PI 3-激酶活性（图 7）

·肥胖的 Zucker 大鼠(fa/fa)的 PI 3-激酶活性（图 9）,

· 在正常大鼠的肝脏中与 PDGF 受体或与胰岛素受体有关的 PI 3-激酶活性（图 10）, 以及

·在正常大鼠的肝脏中与 IRS-1 有关的磷酸酶活性（图 11）.

PI 3-激酶活性的测定

在用抗-IRS-1 抗体进行的免疫沉淀物上测定 PI 3-激酶活性. 这样能够测定与胰岛素作用有关的酶活性并将其与 4-OH-Ile 所诱导的作用进行比较.

试验方法

正常雄性 Wistar 大鼠(IFFA CREDO 菌株,法国)经腹膜内注射接受普通胰岛素(100U/kg)或者 4-OH-Ile(18mg/kg), 或者以相同剂量与 4-OH-Ile 组合的胰岛素. 对照大鼠通过腹膜内途径接受 9‰氯化钠. 注射后 15 分钟, 处死动物, 马上取下外周组织（肝脏, 肌肉）并将其冷冻在液氮中.

为了测定 PI 3-激酶的活性, 将组织在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂以及增溶剂 (Triton) 的缓冲液中研磨, 正如 Taouis 等在 J. Biol. Chem., 269, 14912, 1994 中所述. 增溶后, 用抗-IRS-1 免疫沉淀上清液并在免疫沉淀物中测定 PI 3-激酶的活性. 实际上, 该反应

是通过加入酶的人工底物：磷酯酰肌醇(PI)和(^{33}P)gamma ATP 启动的．将反应产物进行薄层色谱（TLC 平皿），并通过 STORM 磷酸-显影剂(Molecular Dynamics)测定 PI 的磷酸化水平．该活性是以仪器所给定的任意单位表示的（通过激光束进行放射活性向发光的转化）．

与胰岛素信号途径有关的磷酸酶活性的测定

在用抗-IRS-1 抗体和胰岛素抗-受体进行的免疫沉淀物上进行磷酸酶活性的测定．

增溶方法与 Taouis 等所述的用于 PI 3-激酶的方法相同（J.Biol.Chem.,269, 14912,1994）．免疫沉淀后，按照 Chen 等所述的方法（J.Biol.Chem.,272,8026,1997）测定磷酸酶活性．

实施例 1：胰岛素和 4-OH-Ile 对正常大鼠肝脏中胰岛素受体和 IRS-1 的磷酸化作用的比较

图 2 中的结果清楚地显示了通过单独注射 4-OH-Ile(200μg/kg I.P.)的动物治疗能够在体内诱导胰岛素受体(IR)及其底物(IRS-1)的活化．4-OH-Ile(4OH)的作用与胰岛素(Ins)的作用是可比的．

这些结果显示了在对于效应蛋白如 PI3-激酶的激活来说是必需的胰岛素受体磷酸化和 IRS-1 磷酸化活化方面 4-OH-Ile 的胰岛素模拟作用．

实施例 2：胰岛素和 4-OH-Ile 对肝脏的 PI 3-激酶活性的作用比较

图 3 中以直方图给出了结果．在该图中，可以看到胰岛素但也包括单独的 4-OH-Ile 显著激发（$p<0.05$）肝的 PI 3-激酶活性．当一起给予两种物质时，显示了更好的作用．

这些观察证实了 4-OH-Ile 在肝脏中具有胰岛素模拟作用．另外，当两种物质共同注射时，客观化的更大的作用促进了协同活化机制．

胰岛素和 4-羟基异亮氨酸对肝细胞胰岛素膜受体作用的对比研究证实了：4-羟基异亮氨酸没有与该受体结合．

在图 4 中，给出了有关异亮氨酸和 4-OH-Ile 结合的对比结果．在这些试验中所用的 LMH 细胞来自于鸡的肝癌（Kawaguchi T.等，癌症研究，47，4460，1987）．

实施例 3: 胰岛素和 4-OH-Ile 对肌肉的 PI 3-激酶活性作用的比较

图 5 中以直方图显示了结果. 在该图中, 可以看到不仅胰岛素清楚地激发了 PI 3-激酶活性, 而且 4-OH-Ile 也具有可比的作用. 这样, 在肌肉水平证实了在肝脏水平所观察到的 4-OH-Ile 的胰岛模拟素作用。

所以, 在实施例 1 和 2 结果的检查中看到了在肝脏和肌肉水平, 4-羟基异亮氨酸独立于胰岛素激发了 IRS-1/PI 3-激酶途径, 这一途径是控制胰岛素代谢和致有丝分裂作用的主要途径。另外, 4-羟基异亮氨酸不识别胰岛素受体, 或者至少不参与胰岛素结合受体的竞争。

实施例 4

在长期给予(一个月)植物氨基酸(25mg/kg/天, 通过腹膜内途径)期间, 在共同注射烟酰胺和链脲霉素所诱导的非胰岛素依赖糖尿病(2 型糖尿病)的大鼠体内研究了 4-羟基异亮氨酸抗相对血胰岛素增高的有益作用(Masiello 等,糖尿病, 47,224,1998)。在下午 5.30 进行该产物的注射, 15 小时后, 从能够使用放射-免疫方法(Herbert 等, J.Clin.Endocr.,25. 1375,1965)评价血浆胰岛素水平的大鼠的尾静脉中抽取定期的血样。在这些相同样品中, 使用酶促法测定血浆葡萄糖水平(Trinder P., J. Clin. Pathol.22,158,1969)。

图 6 中显示了所获得的结果。

可观察到每日给予 4-羟基异亮氨酸具有显著降低($p>0.05$)所治动物胰岛素血的作用。

另外, 停止治疗后, 可以看到血浆胰岛素再次升高达到接近于治疗前所观察的数值。在这些条件下, 在治疗结束时观察到糖血微微下降。

在用 4-羟基异亮氨酸长期治疗大鼠后所观察到的胰岛素血下降从体内证实了体外试验中所观察到的胰岛素模拟作用和/或胰岛素敏化作用。

实施例 5: 胰岛素和 4-OH-Ile 对从患有 2 型糖尿病取出的肌肉和肝脏的 PI 3-激酶活性作用的比较

图 7 和 8 以直方图显示了结果。从中可以看到如果胰岛素激活肝脏的 PI 3-激酶（图 7）和肌肉 PI 3-激酶（图 8），它是与 4-OH-Ile 相同的。在病理状态中的 4-OH-Ile 诱导了与相同强度胰岛素的相同作用。

此外，可以看到，4-OH-Ile 在肌肉($p<0.01$)比在肝脏($p<0.05$)更清楚地显著刺激了 IRS-1/PI 3-激酶途径。

实施例 6

在对肥胖 Zucker 大鼠(fa/fa)长期给予 4-OH-Ile(50mg/kg，经腹膜内)4 周过程中，治疗结束时测定肝脏的 PI 3-激酶活性。图 9 以直方图显示了结果。它们表明在受治疗动物中 PI 3-激酶的基础活性(最后给予 4-OH-Ile 17 小时后处死的动物)增加。

实施例 7

4-OH-Ile 能够激活与胰岛素受体有关的而不是与 PDGF 受体(血小板衍生生长因子）有关的 PI 3-激酶。

按照已经描述过的方法比较在有或无 4-OH-Ile(18mg/kg，腹膜内注射)存在下 PDGF 受体与胰岛素受体的 PI 3-激酶活性。

图 10 以直方图显示了结果。它们清楚地显示了 4-OH-Ile 在大鼠肝脏水平作用途径的特异性，也就是说，只有与胰岛素受体有关的 PI 3-激酶活性增加了($p<0.05$)。

实施例 8: 4-OH-Ile 对与胰岛素受体信号途径有关的磷酸酶活性的作用

为了更好地给 4-OH-Ile 的作用部位定位，研究了它对磷酸酶活性的影响。测定了与 IRS-1 有关的磷酸酶活性。

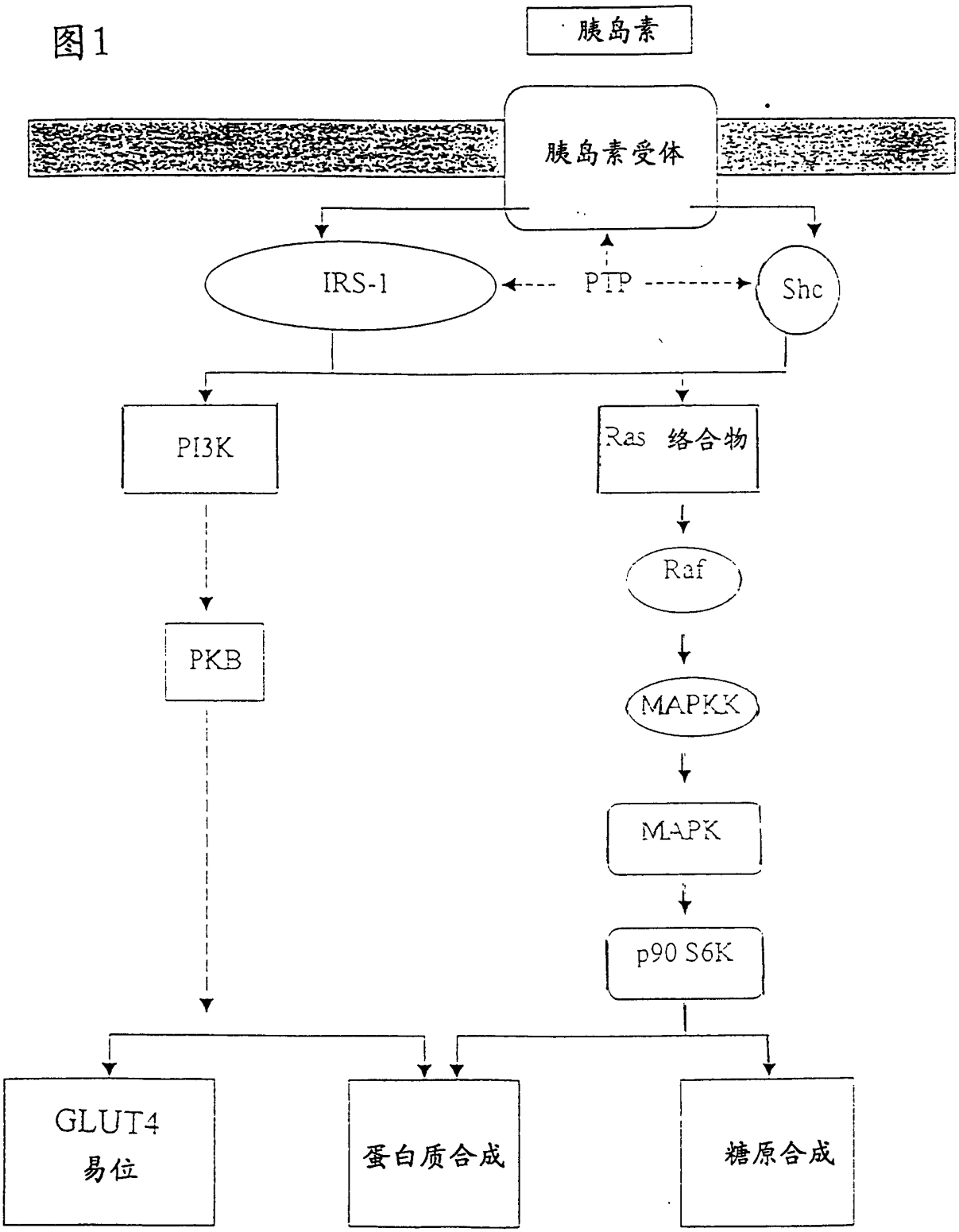
图 11 显示了 4-OH-Ile(200μmol/l)显著抑制($p<0.05$) 正常大鼠的肝脏中的这种活性。

实施例 9

本发明药物特别适合于胰岛素抗性状态尤其是与伴有肥胖的胰岛素抗性状态的症状治疗。它能够使用本领域技术人员已知的任何适当技术从单-或多羟基化氨基酸和/或其内酯形式制得。它特别是从 4-羟

基异亮氨酸制得。因为这种产物是水溶性的，所以这类药物容易被制成溶液形式（例如在生理血清中），或者固体盖伦形式如片或胶囊。由于靶向疾病是慢性的，所以口服给药似乎最适合。因此这类药物可以容易地每日多剂量给药，以适应所涉及的患者个体情况，例如大约每天 2 到 3 次。本发明药物也可以含有胰岛素。

图1


胰岛素
胰岛素受体
IRS-1
PTP
Shc
PI3K
Ras 络合物
Raf
PKB
MAPKK
MAPK
p90 S6K
GLUT4
易位
蛋白质合成
糖原合成

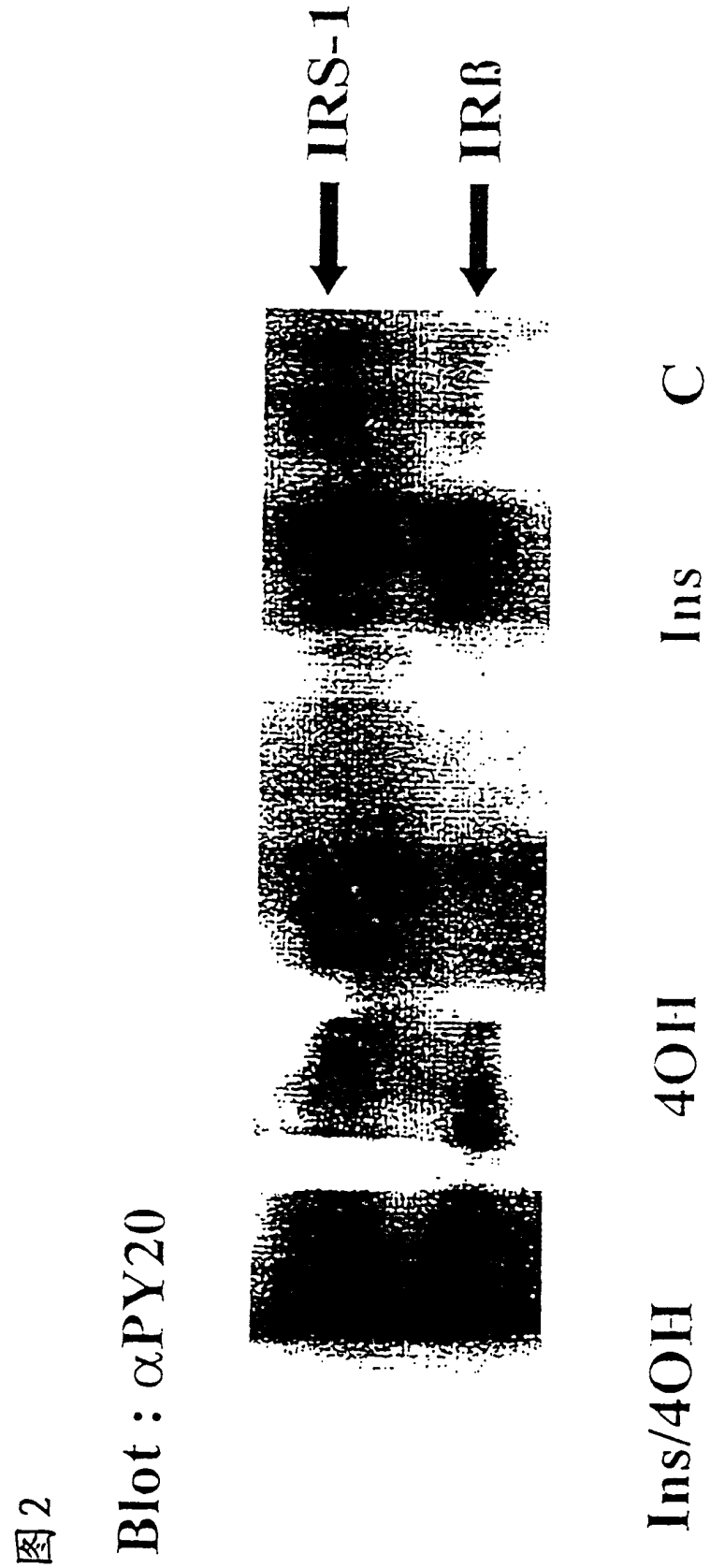


图2

图3

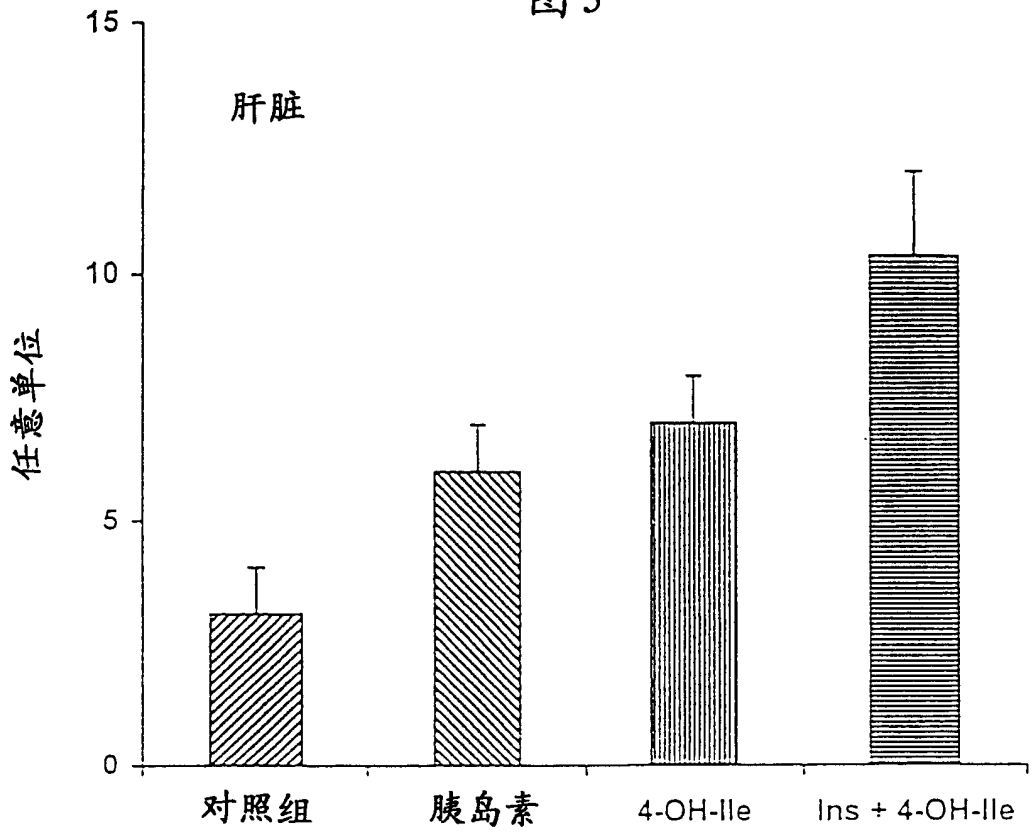


图3

图4

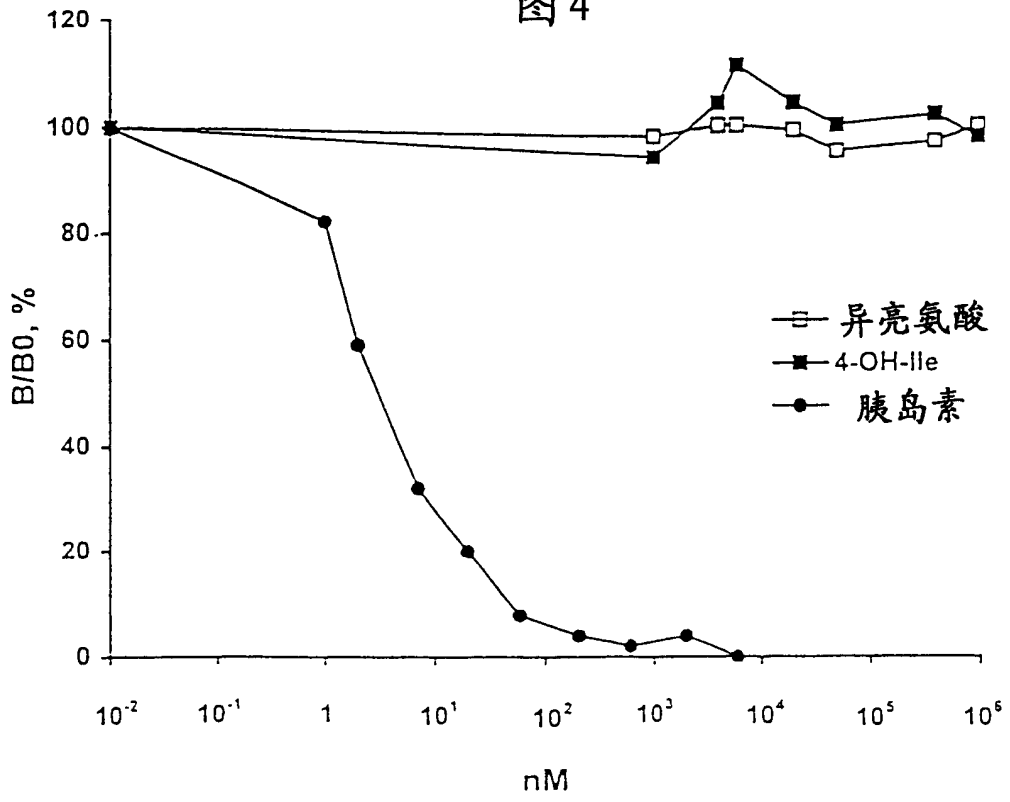

120
100
80
60
40
20
0
B/B0, %
异亮氨酸
4-OH-Ile
胰岛素
10-2
10-1
1
101
102
103
104
105
106
nM

图5

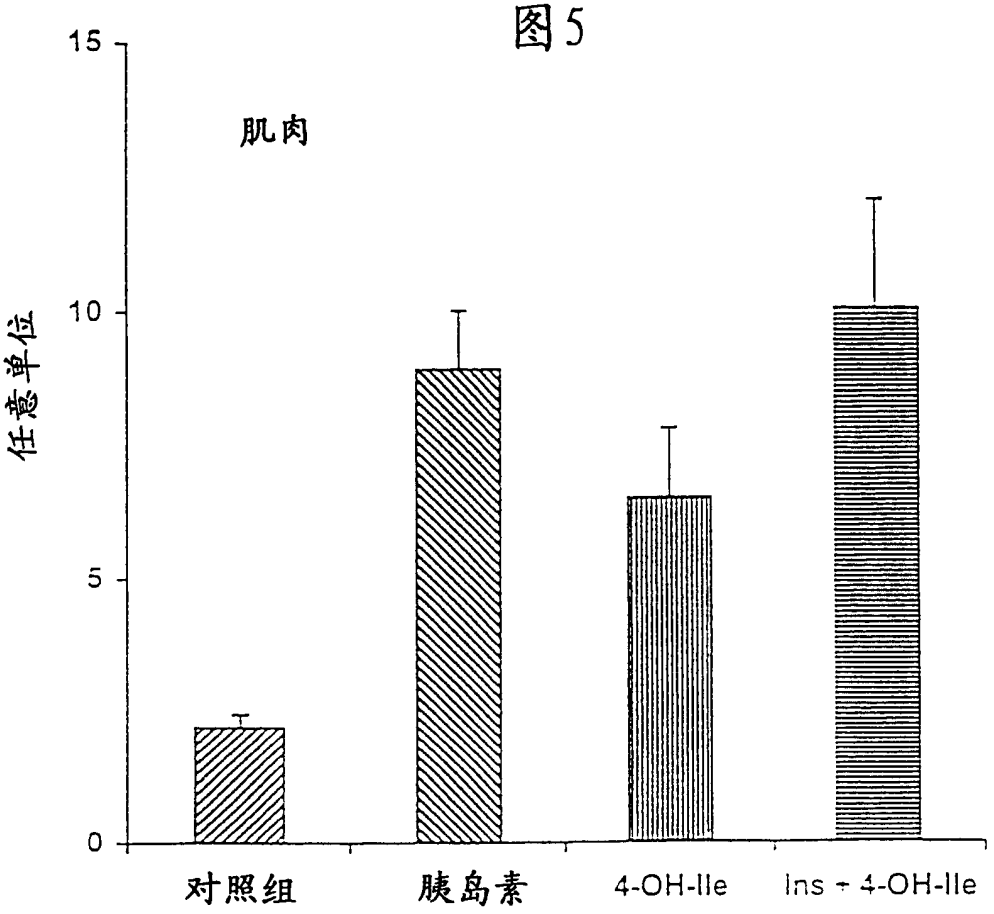


图6

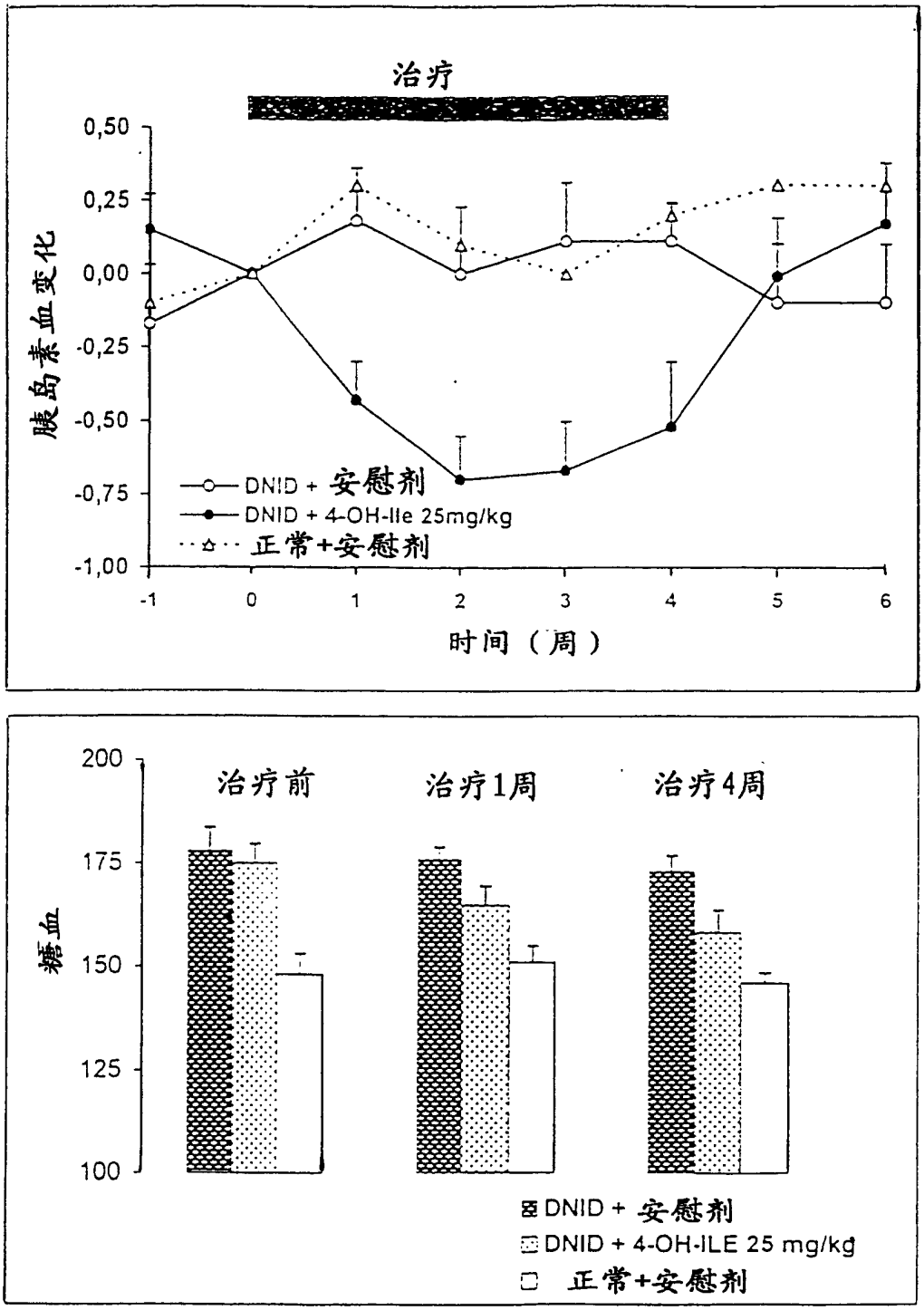

治疗
0,50
0,25
0,00
-0,25
-0,50
-0,75
-1,00
胰岛素血变化
DNID + 安慰剂
DNID + 4-OH-Ile 25mg/kg
正常+安慰剂
-1
0
1
2
3
4
5
6
时间（周）
200
175
150
125
100
糖血
治疗前
治疗1周
治疗4周
DNID + 安慰剂
DNID + 4-OH-ILE 25 mg/kg
正常+安慰剂

图7

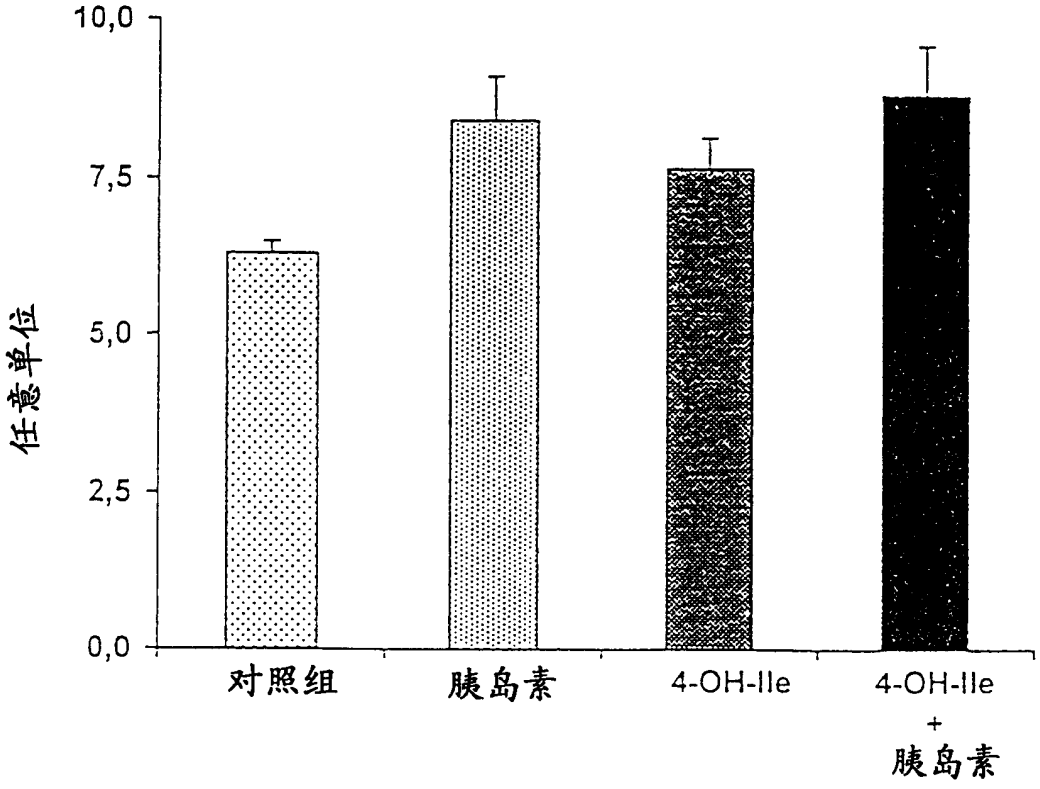


图8

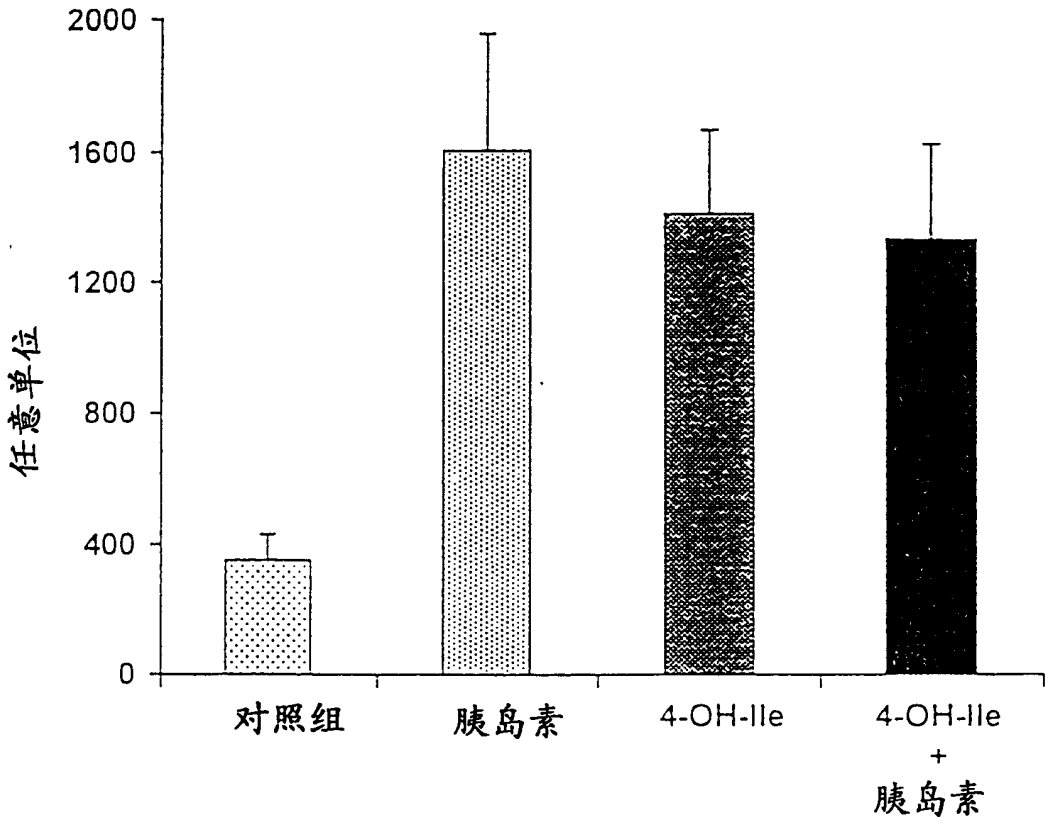


图9

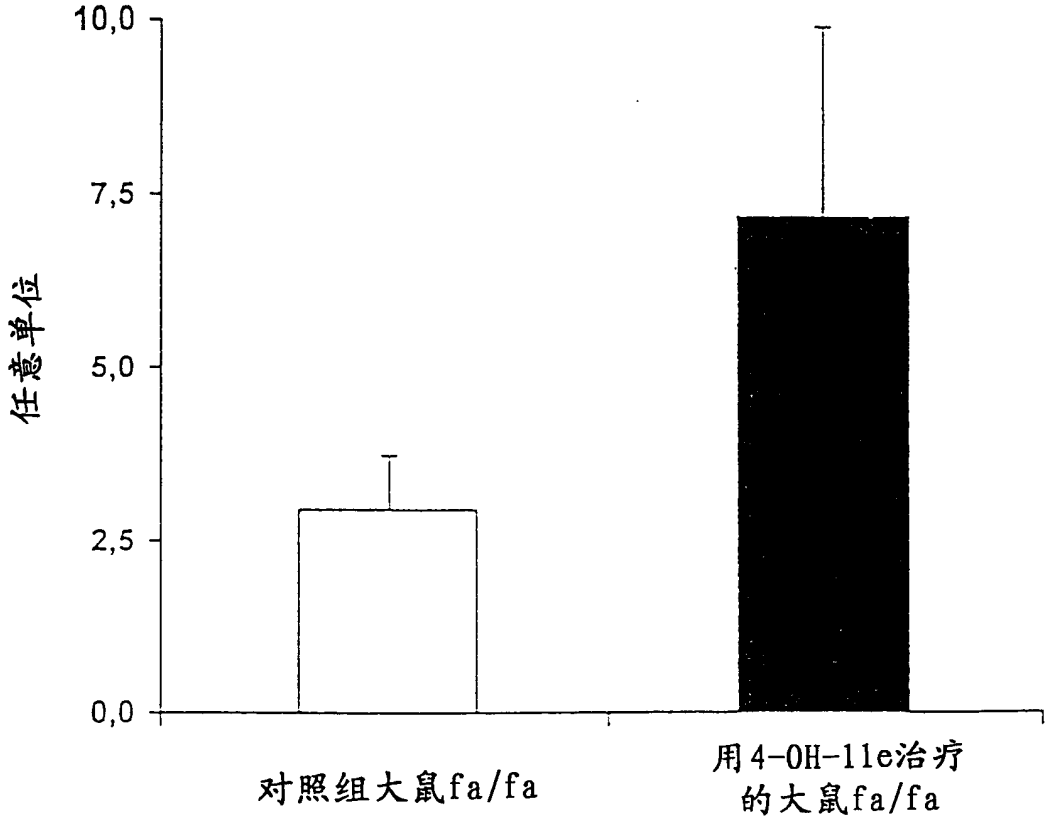


图10

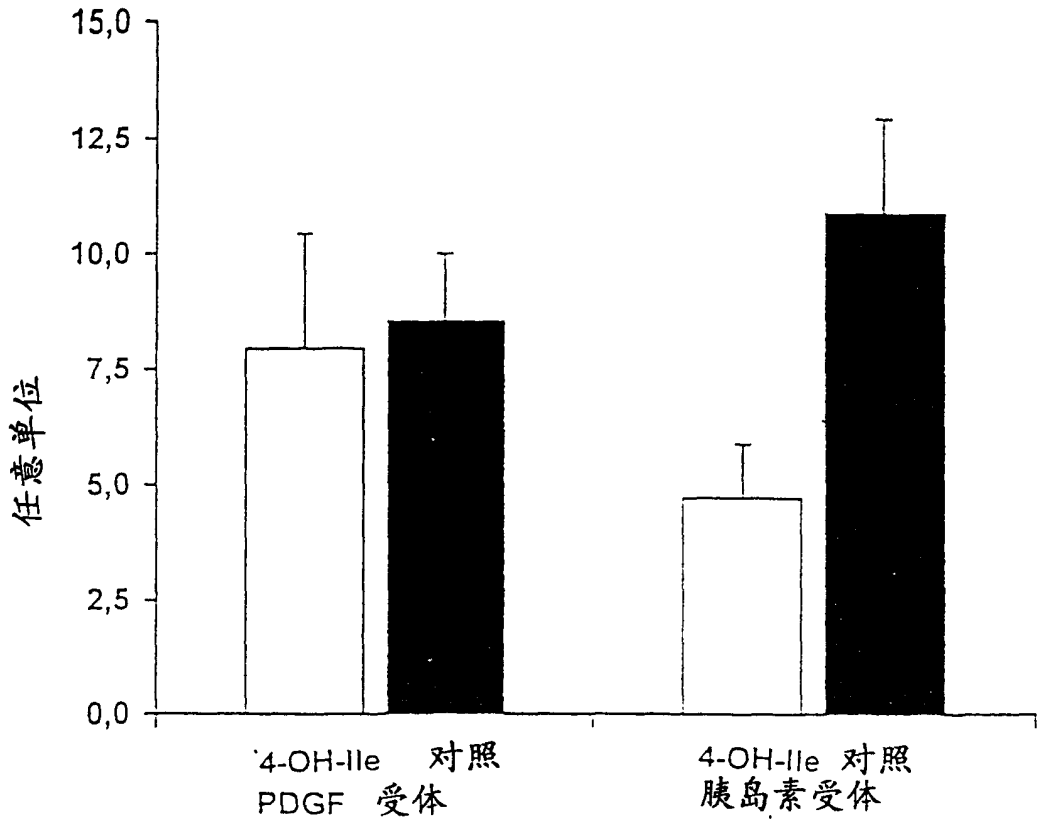
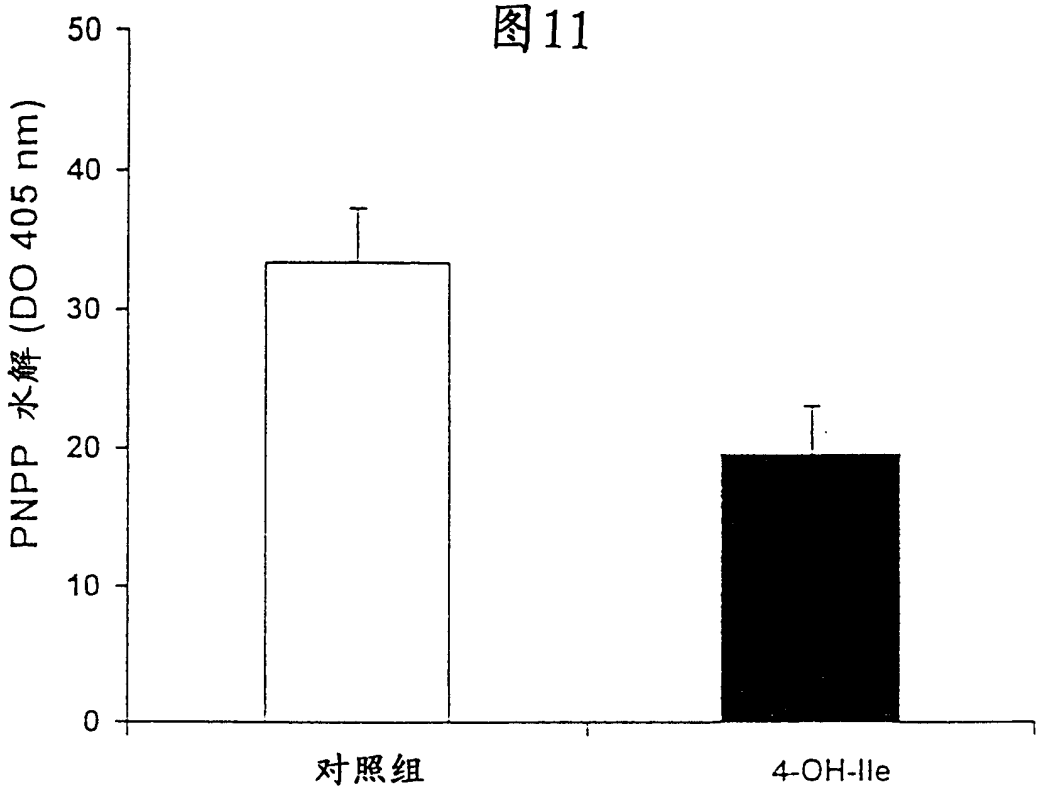


图11



pNPP：对硝基苯基磷酸酯