[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480031719.6

[51] Int. Cl.
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61K 31/64 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 2 月 28 日

[11] 公开号 CN 1921881A

[22] 申请日 2004.10.27
[21] 申请号 200480031719.6
[30] 优先权
[32] 2003.10.27 [33] US [31] 60/514,738
[86] 国际申请 PCT/CA2004/001883 2004.10.27
[87] 国际公布 WO2005/039626 英 2005.5.6
[85] 进入国家阶段日期 2006.4.27
[71] 申请人 因诺迪亚公司
地址 加拿大魁北克
[72] 发明人 F·贝利尼 C·韦泽奥 G·里布 N·沙帕尔 M·普伦特克
[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 袁志明
权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 4 页

[54] 发明名称

羟基化氨基酸用于治疗糖尿病的用途

[57] 摘要

本发明涉及治疗糖尿病的方法和组合物，它包括使用羟基化氨基酸，例如 4 - 羟基异亮氨酸和一种或多种其它的抗糖尿病药剂。

1. 一种治疗患者糖尿病的方法，该方法包括给所述患者施用羟基化氨基酸和一种或多种其它的抗糖尿病药剂。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述羟基化氨基酸为 4-羟基异亮氨酸。

3. 权利要求 2 的方法，其中 4-羟基异亮氨酸为 4-羟基异亮氨酸的 2S,3R,4S 异构体。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述其它的抗糖尿病药剂为胰岛素。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述其它的抗糖尿病药剂为双胍。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述双胍为二甲双胍。

7. 权利要求 1 的方法，其中所述其它的抗糖尿病药剂为磺酰脲类药物。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述其它的抗糖尿病药剂为列奈类。

9. 权利要求 1 的方法，其中所述其它的抗糖尿病药剂为噻唑烷二酮。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述噻唑烷二酮为马来酸罗格列酮或吡格列酮。

11. 权利要求 1 的方法，其中所述其它的抗糖尿病药剂为胰高血糖素样肽 1 受体激动剂。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述胰高血糖素样肽 1 受体激动剂为 Exenatide®。

13. 权利要求 1 的方法，其中所述羟基化氨基酸在与其它的抗糖尿病药剂相同或大约相同的时间对患者施用。

14. 权利要求 1 的方法，其中所述糖尿病为 2 型糖尿病。

15. 一种药物试剂盒，它包含羟基化氨基酸和一种或多种其它的抗糖尿病药剂。

16. 权利要求 15 的药物试剂盒，其中所述羟基化氨基酸为 4-羟基异亮氨酸。

17. 权利要求 16 的药物试剂盒，其中 4-羟基异亮氨酸为 4-羟基异

亮氨酸的 2S,3R,4S 异构体。

18. 权利要求 15 的药物试剂盒，其中所述其它的抗糖尿病药剂为胰岛素。

19. 权利要求 15 的药物试剂盒，其中所述其它的抗糖尿病药剂为双胍。

20. 权利要求 19 的药物试剂盒，其中所述双胍为二甲双胍。

21. 权利要求 15 的药物试剂盒，其中所述其它的抗糖尿病药剂为磺酰脲类药物。

22. 权利要求 15 的药物试剂盒，其中所述其它的抗糖尿病药剂为列奈类。

23. 权利要求 15 的药物试剂盒，其中所述其它的抗糖尿病药剂为噻唑烷二酮。

24. 权利要求 23 的药物试剂盒，其中所述噻唑烷二酮为马来酸罗格列酮或吡格列酮。

25. 权利要求 15 的药物试剂盒，其中所述其它的抗糖尿病药剂为胰高血糖素样肽 1 受体激动剂。

26. 权利要求 25 的药物试剂盒，其中所述胰高血糖素样肽 1 受体激动剂为 Exenatide®。

27. 权利要求 15 的药物试剂盒，其中所述羟基化氨基酸和其它的抗糖尿病药剂被配制为单一组合物。

28. 权利要求 27 的药物试剂盒，其中所述单一组合物为片剂或胶囊剂。

羟基化氨基酸用于治疗糖尿病的用途

发明领域

本发明涉及用于治疗糖尿病的方法和组合物。

发明背景

糖尿病是一种碳水化合物代谢障碍，并且在身体不能有效地控制血糖水平时发生。该病的特征为胰岛素分泌或利用不足、血和尿中高葡萄糖水平、并且过度口渴、饥饿、体重减轻和尿产生。它能导致许多严重的并发症，包括心血管病、肾脏病、失明、神经损伤和四肢缺血。

糖尿病分为 1 型和 2 型两个型，后者占病例的大约 90％。在 1 型糖尿病中，身体毁坏了胰的生产胰岛素的 β 细胞，导致身体不能生产胰岛素。1 型糖尿病典型地发生于儿童或年轻的成人，并通常通过施用胰岛素、严格的饮食和锻炼来处理。在治疗 2 型糖尿病失败后的年长的成人中也观察到 1 型糖尿病。2 型糖尿病的特征为由于 β 细胞功能改变，胰岛素分泌减少，以及正常胰岛素敏感组织（例如肝脏和肌肉）对胰岛素反应的能力降低。2 型糖尿病通常在那些超过 45 岁的人中发生，但最近也在更年青的人中检测到。该病与危险因素例如年龄、家族史、肥胖、缺少有规律的锻炼、高血压和高血脂有关。治疗包括严格饮食和锻炼方案、口服药物（例如增加胰岛素分泌和/或胰岛素敏感性的药物），并且在一些病例中施用胰岛素。

在西方世界中，2 型糖尿病其重要性快速增加，成为重要的所关心的公共卫生问题。尽管 100 年前，它是相对罕见的疾病，但现在全世界有大约 2 亿 2 型糖尿病患者，并且估计到 2025 年，该数量增加至超过大约 3 亿。2 型糖尿病发病率戏剧性的增长与西方文化中肥胖的流行增加相平行。更进一步，随着更多的文化采用西方的饮食习惯，很

可能全世界 2 型糖尿病将达到流行比例。鉴于与该病相关的并发症的严重性以及其快速增加的发病率，有效治疗方法的开发是医药领域中首要关心的事情。

发明概述

本发明提供了治疗患者糖尿病(1 型糖尿病或 2 型糖尿病)的方法，该方法包括对患者施用羟基化氨基酸（例如，4－羟基异亮氨酸，例如 4-羟基异亮氨酸的 2S,3R,4S 异构体）以及一种或多种其它的抗糖尿病药剂，以获得提高的（例如，协同或相加）效应。可以用于本发明的其它的抗糖尿病药剂的实例包括双胍类（例如二甲双胍）、磺酰脲类药物、列奈类(glinides)、列酮类（glitazones）（例如噻唑烷二酮，如马来酸罗格列酮）、胰高血糖素样肽 1 受体激动剂（例如 Exenatide®）和胰岛素。根据本发明，可以用于与羟基化氨基酸组合的抗糖尿病(和其它）药剂的其它实例在下面列出。在一个实施例中，4－羟基异亮氨酸与胰岛素和/或二甲双胍组合，而在另一个实施例中，4－羟基异亮氨酸与二甲双胍和/或噻唑烷二酮组合。羟基化氨基酸和其它抗糖尿病药剂可以彼此在相同或大约相同的时间或在不同的时间给药。还包括在本发明的是药物试剂盒和组合物（例如片剂或胶囊），它们包括本文和别处所述的药剂的组合。

本发明提供了几个优点。例如，因为使用在此描述的药物组合以获得提高的（例如，协同或相加）效应，考虑施用较少的每种药物，导致患者对药物的总暴露减少以及任意药物的任何不合适的副作用的减少是可能的。另外，因为药物可以通过不同的机理对抗疾病，所以可以获得疾病的更大控制。

从下面详细的说明书和权利要求中，本发明其它的特征和优点将是显而易见的。

附图简要说明

图 1 为显示胰岛素和 ID 1101 组合对 3T3-L1 分化的脂肪细胞中葡

萄糖摄取的相加刺激作用图。

图 2 为显示在口服葡萄糖耐量试验期间，血浆葡萄糖水平从基线变化的系列图。

图 3 为显示 ID 1101 与格列本脲组合对 INS-1 β 细胞中胰岛素分泌的作用图。

图 4 为显示 ID 1101 与 Exendin-4 组合对 INS-1 β 细胞中胰岛素分泌的作用图。

发明详述

本发明提供了用于治疗糖尿病和相关疾病或病症，例如代谢综合征的方法和药物试剂盒或组合物。本发明基于对患者施用羟基化氨基酸，例如 4-羟基异亮氨酸和一种或多种其它的抗糖尿病药剂，以便获得提高的（例如，协同或相加）效应。如下面所进一步讨论的，根据本发明，可以与羟基化氨基酸，例如 4-羟基异亮氨酸一起施用的药剂的实例包括胰岛素、双胍类、磺酰脲类、列奈类、列酮类、胰高血糖素样肽-1（GLP-1）及其激动剂、减缓碳水化合物吸收的药剂、胰高血糖素拮抗剂、葡萄糖激酶激活剂和其它在此提及的药剂。本发明的方法和组合物进一步详细描述如下。

羟基化氨基酸

本发明基本的是对患者施用与一种或多种其它抗糖尿病药剂组合的一种或多种羟基化氨基酸（例如，单羟基化氨基酸、多羟基化氨基酸或这样的羟基化氨基酸的内酯形式）。可以用于本发明的羟基化氨基酸的具体实例是 4-羟基异亮氨酸（例如，2S,3R,4S 异构体），它已显示出既以葡萄糖依赖方式刺激胰岛素分泌，又降低胰岛素抗性（见例如美国专利 No. 5,470,879; WO 01/15689; Broca 等 Am. J. Physiol. 277: E617-E623 1999; 上述每篇的讲授在此通过参考被并入本申请）。

用于本发明的 4-羟基异亮氨酸可以通过，例如化学合成的方法获得。然而，该化合物天然地大量存在于豆科植物胡卢巴(*Trigonella*

foenum-graecum L.)的种子中，从中它可以用例如那些在美国专利 No. 5,470,879、WO97/32577、WO 01/72688 和 Wang 等 Eur. J. Org. Chem. 834-839, 2002 中描述的方法进行纯化，上述每篇的讲授在此通过参考被并入本申请。4-羟基异亮氨酸优选经口施用，但也能通过包括例如皮下、肌肉内和静脉内途径的其它途径施用。该药可以例如以 0.5 到 200mg/kg/天的剂量施用。如可以由那些本领域中的技术人员所确定的，当与使用其它的抗糖尿病药剂组合进行施用时，如在此所描述，施用羟基化氨基酸的量可以减少，以获得提高的（例如，协同或相加）效应。

根据本发明，可以与羟基化氨基酸，例如 4-羟基异亮氨酸组合施用的药剂的实例，在下面进一步描述。

胰岛素

如上所讨论的，2 型糖尿病特征为胰岛素分泌异常和主要靶组织，例如肌肉、肝脏和脂肪组织的胰岛素抗性。这种疾病通常通过使用口服抗糖尿病药剂，例如促胰岛素药和胰岛素敏化药剂进行治疗。1 型糖尿病特征为胰腺 β 细胞的大量破坏，导致剧烈的低胰岛素血症。因此，施用外源的胰岛素是治疗该疾病的基本方法。胰岛素抗性也发生于 1 型糖尿病，但与 2 型糖尿病对比，1 型糖尿病中胰岛素抗性不是主要现象，而是通过适当的胰岛素治疗，通常可以倒转的次要事情。然而，有时通过施用胰岛素控制糖血难以达到目的，并且胰岛素剂量需要增加很多。更进一步，在这样的患者中，高血糖症促进了胰岛素作用损伤。

胰岛素与其受体的结合启动了涉及胰岛素受体底物 IRS1，IRS2 等等的信号转导级联。胰岛素受体底物的主要功能是活化在胰岛素信号通道中起中心作用的磷脂酰肌醇 3-激酶。在胰岛素受体或早期胰岛素信号元件中的缺陷在胰岛素抗性的发生中起重要作用。确实，在伴有胰岛素抗性的 1 型糖尿病患者的病例中，已经发现靶组织中的细胞缺陷，它包括在胰岛素结合和涉及 PI3 激酶活化的细胞内胰岛素信号

转导中的变化。

如上面所讨论，4-羟基异亮氨酸是一种既显示出促胰岛素又显示出胰岛素敏化活性的药物。该药的胰岛素敏化活性涉及肌肉和肝脏中PI3-激酶的活化。因此，使用羟基化氨基酸（例如 4-羟基异亮氨酸）与胰岛素疗法组合能导致 PI3-激酶活化增加并因此降低胰岛素抗性。

使用羟基化氨基酸与胰岛素疗法组合可以因此能够使用降低剂量的胰岛素。因此本发明包括在 1 型糖尿病治疗中使用羟基化氨基酸，例如 4-羟基异亮氨酸。

更进一步，本发明也包括涉及组合胰岛素和羟基化氨基酸疗法与一种或多种其它的治疗方法，例如在本文别处描述的那些方法（例如，涉及使用一种或多种双胍类、磺酰脲类、列奈类、胰岛素敏化剂（例如列酮类）、GLP-1 受体激动剂、减缓碳水化合物吸收的药剂（例如阿卡波糖）、胰高血糖素拮抗剂、葡萄糖激酶激活剂和其它药剂的疗法）。

双胍类

二甲双胍（Glucophage®, Bristol-Myers Squibb 公司，美国；Stagid®，Lipha Santè,欧洲）是一种广泛用于 2 型糖尿病的治疗的双胍化合物。它是用于肥胖患者(BMI>27)治疗的第一线药物，除非为例如损伤的肾功能所禁忌。二甲双胍治疗，通过几个不同的机理，包括减少肠的葡萄糖吸收、减少食欲、增强外周肝脏利用（胰岛素敏化作用）、以及减少肝脏输出，导致血糖水平降低。该药标准地在从 500-2550mg/天，例如 850、1000、1500、2000 或 2500mg 的剂量范围内施用，典型地以 1、2 或 3 个剂量服用，例如每个剂量 500、850、或 1000mg。如在本文别处进一步讨论的，当在本发明的组合中使用时，这些量可以降低。

本发明包括组合疗法，涉及使用双胍，例如二甲双胍，与羟基化氨基酸，例如 4-羟基异亮氨酸。还包括本发明中的是涉及使用双胍类和羟基化氨基酸类（例如 4-羟基异亮氨酸）与包括例如在本文别处描

述的那些的其它抗糖尿病疗法（例如，包括使用胰岛素、磺酰脲类、列奈类、胰岛素敏化剂（例如列酮类）、GLP-1 受体激动剂、减缓碳水化合物吸收的药剂（例如阿卡波糖）、胰高血糖素拮抗剂、葡萄糖激酶激活剂和其它药剂的疗法）组合的方法。

磺酰脲类和列奈类

控制膳食相关的葡萄糖峰失败是 2 型糖尿病中糖血控制丧失的关键因素。膳食血糖过多控制的失败起因于直接受损的胰腺 β 细胞分泌功能和胰岛素敏感性的胰腺外缺陷（也就是胰岛素抗性）。磺酰脲类药物，通常是非肥胖 2 型患者（BMI<27）的第一线治疗药物，增加由胰腺生产胰岛素的量，并因此有助于补偿身体对胰岛素的抗性。磺酰脲类药物具体的实例包括格列齐特（Diamicron®）、格列本脲、格列吡嗪（Glucotrol® 和 Glucotrol XL®, Pfizer）、格列美脲（Amaryl®,Aventis）、氯磺丙脲（例如 Diabinese®, Pfizer）、甲苯磺丁脲和格列本脲（例如 Micronase®, Glynase®和 Diabeta®）。如上面所讨论，4-羟基异亮氨酸具有胰岛素刺激和胰岛素敏化作用。因此，使羟基化氨基酸，例如 4-羟基异亮氨酸与磺酰脲药物组合在 2 型糖尿病中可以用于饮食控制。

用羟基化氨基酸（例如 4-羟基异亮氨酸）和磺酰脲药物的组合的治疗可以用使用一种或多种其它的治疗药物，例如在此描述的抗糖尿病药剂的治疗来补充。例如，一种或多种下列类型的药剂可以用于这样的组合：胰岛素、双胍类、胰岛素敏化剂（例如列酮类）、GLP-1 受体激动剂、减缓碳水化合物吸收的药剂（例如阿卡波糖）、胰高血糖素拮抗剂、葡萄糖激酶激活剂和其它药剂。

与磺酰脲类相似，氯茴苯酸类（也就是列奈类）是也刺激胰腺 β 细胞释放胰岛素的药物。作为特定的实例，瑞格列奈（Prandin® 或 NovoNorm®;Novo Nordisk）通过关闭胰腺 β 细胞的钾-ATP 通道起作用，导致细胞膜去极化，引起钙入流，依次引发胰岛素分泌。它是快速和短暂起作用，使其成为有用的餐前治疗。

除了瑞格列奈以外，能用于本发明的氯茴苯酸类药物的实例包括ormitiglinide、那格列奈、色那列奈和BTS-67582，每一个可以在餐前服用（同样见WO 97/26265，WO 99/03861和WO 00/37474）。纳格列奈 (Starlix®)可以特别地适用于减少餐后血糖偏移，因为它提高了第一期胰岛素分泌。

用羟基化氨基酸（例如4-羟基异亮氨酸）和列奈类组合的治疗可以用使用任何下列药剂的组合的治疗来补充：胰岛素、双胍类、胰岛素敏化剂（例如列酮类）、GLP-1受体激动剂、减缓碳水化合物吸收的药剂（例如阿卡波糖）、胰高血糖素拮抗剂、葡萄糖激酶激活剂和其它药剂。

胰岛素敏化剂

如上面所讨论的，血液中葡萄糖和脂类水平的增加是糖尿病的基本特征。导致的葡萄糖毒性和脂类毒性能导致β细胞功能改变。列酮类，例如噻唑烷二酮类，为胰岛素敏化剂并且在减少血液中游离脂肪酸和甘油三酯浓度方面也是有效的。如上面所提到的，4-羟基异亮氨酸具有葡萄糖依赖的促胰岛素活性，也具有胰腺外胰岛素敏化作用。因此，使用噻唑烷二酮与羟基化氨基酸，例如4-羟基异亮氨酸组合的治疗，对葡萄糖毒性和脂类毒性两方面具有有益效果。

可以用于本发明的噻唑烷二酮的一个实例是马来酸罗格列酮(Avandia®, Glaxo Smith Kline)。另一个实例是吡格列酮（Actos®, Eli Lilly, Takeda）。可以用于本发明的噻唑烷二酮药物另外的实例包括曲格列酮、环格列酮、isaglitazone、达格列酮、恩格列酮、CS-O11/CI-1037、T174和在WO 97/41097(DRF-2344)、WO97/41119、WO 97/41120、WO 98/45292和WO 00/41121中公开的化合物，上述每一篇的内容在此通过参考被并入本申请。

涉及组合使用羟基化氨基酸，例如4-羟基异亮氨酸和噻唑烷二酮类，例如罗格列酮的治疗也可以包括其它药剂，例如胰岛素、双胍类、磺酰脲类、列奈类、其它胰岛素敏化剂、GLP-1受体激动剂、减缓碳

水化合物吸收的药剂（例如阿卡波糖）、胰高血糖素拮抗剂、葡萄糖激酶激活剂和其它药剂。

根据本发明，可以用于与羟基化氨基酸组合的胰岛素敏化剂的另外实例包括 GI 262570、YM-440、MCC-555、JTT-501、AR-H039242、KRP-297、GW-409544、CRE-16336、AR-H049020、LY510929、MBX-102、CLX-0940、GW-501516 和在 WO99/19313（NN622/DRF-2725）、WO 00/23415、WO 00/23416、WO 00/23417、WO 00/23425、WO 00/23445、WO 00/23451、WO 00/50414、WO 00/63153、WO 00/63189、WO 00/63190、WO 00/63191、WO 00/63192、WO 00/63193、WO 00/63196 和 WO 00/63209 中描述的化合物，上述每一篇的内容在此通过参考被并入本申请。

胰高血糖素样肽－1 受体激动剂

胰高血糖素-类似肽 1（GLP-1）是通过胰腺 β 细胞中环腺苷酸介导的机理的葡萄糖依赖胰岛素分泌的强力刺激物。Exendin-4（1-39）(Ex-4)，分离自希拉毒蜥（Gila monster venom），是显示出促胰岛素作用的延长持续时间的高度特异的 GLP-1 受体激动剂。Exenatide®(AC2993; Amylin Pharmaceuticals; Gallwitz 等 Int. J. Clin. Prac. 58(s142): 15-19,2004)，是 Ex-4 的合成形式，并且已显示通过包括胰岛素分泌的葡萄糖依赖的刺激作用、胰高血糖素分泌抑制、减缓胃排空、减少食物摄入并减轻体重的多种作用，改进了糖血控制。也报道了 Ex-4 通过 PI3 激酶依赖的机理，增加胰岛素敏感性。也可以使用持续释放剂型（也就是，Exenatide LAR®；Amylin Pharmaceuticals）。可以在本发明中使用的 GLP-1 激动剂的其它实例在 WO 98/08871 和 WO 00/42026 中进行了描述,上述每一篇的内容在此通过参考被并入本申请。

涉及组合使用羟基化氨基酸，例如 4-羟基异亮氨酸和胰高血糖素-样肽 1 受体激动剂，例如 Exenatide®的治疗，也可以包括使用其它的抗糖尿病药剂，例如胰岛素、双胍类、磺酰脲类、列奈类、胰岛素敏

化剂（例如列酮类）、减缓碳水化合物吸收的药剂（例如阿卡波糖）、胰高血糖素拮抗剂、葡萄糖激酶激活剂和其它药剂。

减缓碳水化合物吸收的药剂

减缓碳水化合物吸收的药剂可以用于控制餐后葡萄糖水平。这种类型药剂的一个实例是α-葡萄糖苷酶抑制剂，它通过阻断来自膳食碳水化合物的寡糖和双糖的分解，因此减缓葡萄糖的吸收而起作用。α-葡萄糖苷酶抑制剂的实例包括阿卡波糖、米格列醇、伏格列波糖和乙格列酯。

其它减缓碳水化合物吸收的药剂是抑制胃排空的那些。特别地，有许多已知抑制胃排空的激素，包括胰高血糖素样肽-1，cholescystokinin 以及胰岛淀粉样多肽，其从胰腺β细胞合成并分泌。已开发合成的胰岛淀粉样多肽类似物（普兰林肽）来治疗糖尿病。可以进行羟基化氨基酸，例如 4-羟基异亮氨酸，其具有促胰岛素和胰岛素敏化特性，和减缓碳水化合物吸收的药剂组合的使用以在控制餐后葡萄糖方面获得提高的（例如协同或附加）效果。

如在此所描述，涉及组合使用羟基化氨基酸，例如 4-羟基异亮氨酸和减缓碳水化合物吸收药剂的治疗也可以包括使用其它的抗糖尿病药剂例如：胰岛素、双胍类、磺酰脲类、列奈类、胰岛素敏化剂（例如列酮类）、GLP-1 受体激动剂、胰高血糖素拮抗剂、葡萄糖激酶激活剂和其它药剂。

胰高血糖素拮抗剂

胰高血糖素是一种与胰岛素关联起作用以调节血液中葡萄糖水平的激素。它主要通过刺激细胞，例如肝细胞起作用，以在血糖水平降低时释放葡萄糖。因此，为了降低糖尿病患者血液中葡萄糖水平，施用胰高血糖素拮抗剂是有用的，根据本发明，其可以与羟基化氨基酸例如 4-羟基异亮氨酸一起施用。

可以用于本发明的胰高血糖素拮抗剂的实例包括喹喔啉衍生物

（例如 2-苯乙烯基-3-[3-(二甲氨基)丙基甲氨基]-6,7-二氯喹喔啉；Collins 等，Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 2(9)：915-918，1992）；酮茜素和酮茜素类似物(见，例如 WO 94/14426)，1-苯基吡唑衍生物（美国专利 No. 4,359,474）；取代的二硅（disila）环己烷（美国专利 No. 4,374,130），取代的吡啶类和联苯类(WO 98/04528)；取代的吡啶基吡咯类(美国专利 No. 5,776,954)；2,4-二芳基-5-吡啶基咪唑类（WO 98/21957、WO 98/22108、WO 98/22109 和美国专利 No. 5,880,139）；2,5-取代的芳香基吡咯类（WO 97/16442 和美国专利 No.5,837,719)；取代的嘧啶酮、吡啶酮和嘧啶化合物类（WO 98/24780、WO 98/24782、WO 99/24404 和 WO 99/32448）；2-(苯并咪唑-2-基硫基)-1-(3,4-二羟苯基)-1-乙基酮(Madsen 等 J. Med. Chem. 41：5151-5157,1998)；亚烷基酰肼类(WO 99/01423 和 WO 00/39088)；和其它化合物例如，在例如 WO 00/69810、WO 02/00612、WO 02/40444、WO 02/40445 和 WO 02/40446 中描述的那些。另外，其它胰高血糖素拮抗剂可以使用例如在美国专利申请公布 US 2003/0138416 Al 中描述的方法进行鉴定，其中的讲授在此通过参考被并入本申请。

涉及组合使用羟基化氨基酸，例如 4-羟基异亮氨酸和胰高血糖素拮抗剂，例如上面提到的那些的治疗，同样可以包括使用其它的抗糖尿病药剂，例如胰岛素、双胍类、磺酰脲类、列奈类、胰岛素敏化剂（例如列酮类）、GLP-1 受体及其激动剂、减缓碳水化合物吸收的药剂（例如阿卡波糖）、葡萄糖激酶激活剂和其它药剂。

葡萄糖激酶激活剂

葡萄糖激酶是一种在糖酵解、葡萄糖摄取和糖原合成中起中心作用的酶。葡萄糖激酶激活剂已被提出用于治疗糖尿病。例如在 WO 00/58293、WO 01/44216、WO 01/83465、WO 01/83478、WO 01/85706 或 WO 01/85707 中可以发现这样的化合物的实例，其中每一个的内容在此通过参考被并入本申请。另外，进一步的葡萄糖激酶激活剂可以

使用例如在美国专利申请公布 US 2003/0138416 A1 中描述的方法鉴定。

根据本发明，葡萄糖激酶激活剂可以与羟基化氨基酸，例如 4-羟基异亮氨酸，使用标准的方法一起施用。更进一步，涉及组合使用羟基化氨基酸，例如 4-羟基异亮氨酸和葡萄糖激酶激活剂，例如上面引用的文件中描述的那些的治疗，也可以包括使用其它的抗糖尿病药剂，例如胰岛素、双胍类、磺酰脲类、列奈类、胰岛素敏化剂（例如列酮类）、GLP-1 受体激动剂、减缓碳水化合物吸收的药剂（例如阿卡波糖）、胰高血糖素拮抗剂和其它药剂。

其它药剂

根据本发明，可以与羟基化氨基酸，例如 4-羟基异亮氨酸（以及在此描述的其它药剂）组合使用的其它抗糖尿病药剂的实例，包括咪唑啉类（例如，益法罗辛、咪唑克生、酚妥拉明和 1-苯基-2-（咪唑啉-2-基）苯并咪唑）；糖原磷酸化酶抑制剂类（见例如 WO 97/09040）；嘧二唑烷二酮类、二肽酰肽酶-IV (DPP-IV)抑制剂类、蛋白质酪氨酸磷酸酶(PTPase)抑制剂、参与刺激糖原异生和/或糖原分解的肝酶的抑制剂、葡萄糖摄取调节剂、糖原合酶激酶-3(GSK-3)抑制剂、改变脂质代谢的化合物（例如抗高血脂药剂和抗脂血症药剂）、过氧化物酶体增殖物-活化受体（PPAR）激动剂、和类视黄醇 X 受体(RXR)激动剂（例如 ALRT-268, LG-1268 和 LG-1069）。

高脂血症是心血管病的首要危险因素，它在糖尿病患者当中特别流行。因此，根据本发明，羟基化氨基酸，例如 4-羟基异亮氨酸也可以与抗高血脂药或抗脂血症药剂（例如，胆苯烯胺、考来替泊、安妥明、甲苯丙妥明、洛伐他汀、普伐他汀、辛伐他汀、丙丁酚和右旋甲状腺素）联合施用，任选地，与在此描述的其它药剂组合。

更进一步，根据本发明，羟基化氨基酸，例如 4-羟基异亮氨酸，也可以与一种或多种抗高血压药（任选地，与在此描述的其它药剂组合）联合施用，因为已经发现高血压与变化的血液胰岛素水平有关。

可以在本发明中使用的抗高血压药的实例包括β-阻断剂（例如阿普洛尔、氨酰心安、噻吗洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔和美托洛尔）、血管紧张素转化酶（ACE）抑制剂（例如贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利、赖诺普利、喹那普利和雷米普利）、钙通道阻断剂类（例如硝苯吡啶、非洛地平、尼卡地平、依拉地平、尼莫地平、硫氮草酮和戊脉安）、α-阻断剂类（例如多沙唑嗪、呱胺甲尿啶、派唑嗪和特拉唑嗪）。

给药

在此描述的药物可以分开施用（例如，以在相同或大约相同的时间施用的2丸），这在药物以个体形式已经可以从商业上获得的情况下是方便的。作为选择，对于可以在相同时间，通过相同途径（例如口服）服用的药物组合，这些药物可以在相同输送载体（例如片剂、胶囊或其它丸剂）中方便地配制。可以在本发明中使用的配制药物的方法为本领域中所熟知并描述于，例如 **Remington: The Science and Practice of Pharmacy(20th edn., A. R. Gennaro, ed.), Lippincott Williams & Wilkins, 2000** 中。这些方法包括使用例如胶囊、片剂、气溶胶、溶液、悬浮液和用于局部施用的制剂。

口服使用的制剂包括片剂，其含有与无毒的药学上可接受的赋形剂混合的活性成分。这些赋形剂可以是，例如惰性的稀释剂或填充物（例如蔗糖和山梨醇）、润滑剂、助流剂和抗粘着剂（例如硬脂酸镁、硬脂酸锌、硬脂酸、硅石、氢化植物油和滑石粉）。口服使用的制剂也可以提供为咀嚼片剂，或其中活性成分与惰性固体稀释剂混合的硬明胶胶囊剂，或其中活性成分与水或油介质混合的软明胶胶囊剂。用于胃肠外施用的制剂可以包含，例如赋形剂、无菌水或盐水；聚烷撑二醇类例如聚乙二醇；植物来源的油；或氢化萘类。生物相容的、生物可降解的丙交酯聚合体、丙交酯/乙交酯共聚物，或聚氧化乙烯-聚氧化丙烯共聚物可以用于控制这些化合物的释放。纳米微粒制剂（例如生物可降解的纳米微粒、固体脂类纳米微粒和脂质体）可以用于控

制化合物的生物分布。

这些制剂中药剂的浓度将根据许多因素而变化，这些因素包括要施用药剂的剂量、施用途径、药剂特性、施用频率和方式、期望的疗法、药剂施用的形式、药剂的效力、要治疗患者的性别、年龄、体重和一般状况、要治疗病症的特性和严重程度、要治疗的任何伴随的疾病、以及对那些本领域的技术人员来说将是显而易见的其它因素。

通常，在成人的治疗中，可以使用每天每千克体重从大约 0.001 mg 到大约 1000mg（例如大约 0.05-500、0.1-250、0.5-100、1-50 或 2-25mg）剂量的每种活性化合物。典型的口服剂量可以是，例如，在从每天每千克体重大约 0.001mg 到大约 100mg（例如大约 0.01-50 或 0.05-10mg）的范围内，以一个或多个剂量施用，例如 1 到 3 个剂量。剂量可以按需要增加或减少，如可以被那些本领域的技术人员容易地确定的。

例如，当与另外的药剂组合使用时，如果确定合适，特殊药剂的量可以减少。另外，可以参考用于施用在此提到药剂的标准量和方法。在此提到的药物剂量的实例在下面的表 1 中提供。当与羟基化氨基酸（例如 4-羟基异亮氨酸）组合时，可以以这些剂量使用的所述药物，其通常以例如 250mg-1g/天（例如 350-900、450-800、或 550-700mg/day）的范围内的量施用。可以选择地，由于当使用本发明的药物组合获得的提高的（例如协同或改进）效果，施用的表 1 中的量和/或羟基化氨基酸的量可以减少（例如大约 10-70％、20-60％、30-50％、或 35-45％），如被那些本领域的技术人员确定为合适的。

表 1

药物物质	剂量和/或给药
胰岛素	400IU/瓶—40IU/天(平均值)
甲磺吡脲（Diamicron®）	80mg/片—1-4 片/天
格列本脲（Daonil®）或优降糖（Micronase、Glynase、Diabeta）	5mg/片—1-3 片/天（格列本脲） 1.25 到 6mg/片—1-2 片/天（优降糖）
格列甲嗪（Glucotrol®, Glibenese®）	5mg/片—1-4 片/天

格列美脲（Amaryl®, Amarel®）	1 到 4mg/片—最多 6mg/天
氯磺丙脲（Diabinese®）	250mg/片－125-1000mg/天
甲苯磺丁脲	500mg/片－1-4 片/天
瑞格列奈（Prandin®）	0.5-16 mg/天
纳格列奈，色那列奈（Starlix®）	60-120mg/片－3 片/天
甲磺氮卓脲	100-500 mg/片
罗格列酮	2-8mg/片－最多 8mg/天
吡格列酮	15-45mg/片－15 到 45mg/天
曲格列酮	200-400mg/片－200-600mg/天
环格列酮	0.1 mg/片
Exenatide（胰岛淀粉样多肽）	0.09-0.270 mg/天
阿卡波糖	50-100 mg/片－150-600mg/天
米格列醇	50-100 mg/片－150-300mg/天
伏格列波糖	0.1-0.9 mg/天
酚妥拉明	50mg 4-6 次/天
胆苯烯胺（盐酸降胆宁）	4g/unit－12-16g/天
安妥明	500mg/胶囊－1-4 胶囊/天
甲苯丙妥明（Lipur）	450mg/片－2 片/天
洛伐他汀	10 和 20 mg/片
普伐他汀	20mg/片－10-40mg/天
辛伐他汀（Zocor®, Lodales）	5 和 20 mg/片－5-40mg/天
丙丁酚	250 mg/片－1g/天
右旋甲状腺素	2-6mg/天
烯丙心安	50mg/片－4-8 片/天
氨酰心安	50-100 mg/片－100-200mg/天
噻吗心安	10mg/片－10-20mg/天
吲哚洛尔	5 和 15mg/片－5-60mg/天
普萘洛尔	40mg/片－80-160mg/天
美托洛尔	100 和 200mg/片－50-200mg/天
卡托普利	25 和 50mg/片－12.5-150mg/天
依那普利	5 和 20mg/片－5-40mg/天
硝苯吡啶	10mg/胶囊－30-60mg/天
硫氮草酮	60mg/片－3-6 片/天
戊脉安	120 和 240mg/胶囊－240-360mg/天
多沙唑嗪	2-8 mg/天
哌唑嗪	2.5 和 5mg/片－2.5 和 20mg/天

本发明也提供了包括上面提到的药物组合的药物组合物。这些药

物可以以适当的形式，例如片剂或胶囊剂配制在一起。也包括在本发明的是试剂盒，其包括以单独制剂的药物组合，但有一起使用它们的说明书。本发明的这些方法、组合物和试剂盒可以用于预防和治疗糖尿病（1 型和 2 型），以及用于治疗有相关病症，例如前临床糖尿病（pre-diabetes）、代谢综合征、胰岛素抗性和葡萄糖不耐受的患者。

实施例

I. 4-羟基异亮氨酸 2S,3R,4S 异构体与胰岛素组合对分化的 3T3 脂肪细胞中葡萄糖摄取有相加效应。

目的:

确定单独或组合的 4-羟基异亮氨酸 2S,3R,4S 异构体(ID 1101)或胰岛素在不同孵育条件下，对分化的 3T3-L1 脂肪细胞摄取 ^{3}H-脱氧葡萄糖的作用。

材料和方法:

简要地，3T3-L1 脂肪细胞(ATCC;C1-173)在 12 孔组织培养板中培养 3 天，以便达到汇合（Lakshmanan 等．"Analysis of insulin-stimulated glucose uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes," *Diabetes Mellitus:Methods and Protocols*, (Saire Ozcna, Ed.) Humana Press Inc. Tonowa, New Jersey, 2003，97-103 页）。去掉培养基并用分化培养基替换（Green 等，Cell 3：127-133，1974;Madsen 等，Biochem. J. 375：539-549，2003），并且然后另外孵育细胞 9 天。分化状态通过肉眼检查确认。通过用缺少胎牛血清的培养基替换分化培养基进行细胞饥饿 5 小时。在饥饿期，细胞暴露于 ID 1101(0.5 或 1.0 mM)，达 0.5、1、2、4 或 5 小时。在饥饿期最后 0.5 小时，细胞暴露于胰岛素(0.0167 U/ml; Sigma; 目录号 15534)，单独地或与 ID 1101 组合。洗涤细胞，然后加含有 16μM ^{3}H-脱氧-D-葡萄糖（0.5μCi/ml）和 10μM 2-脱氧-D-葡萄糖的新鲜培养基，并孵育细胞 10 分钟。通过用冰冷的 PBS 洗涤细胞停止葡萄糖摄取。裂解细胞并且确定相对于 ^{3}H-脱氧葡萄糖的本底摄取的裂解物中的比活。结果

在每孔蛋白质含量基础上标准化。

结果:

葡萄糖摄取的最佳刺激发生于细胞暴露于胰岛素或ID 1101(0.5和1.0mM)或组合治疗（图1）5小时饥饿期的最后30分钟。当用作唯一的治疗时,胰岛素或ID 1101(0.5和1.0mM)刺激的葡萄糖摄取为在对照细胞观察到的背景水平(2pmol/mg/分钟)以上大约5pmol/mg/分钟。然而，胰岛素与0.5或1.0mM ID 1101的组合，引起葡萄糖摄取显著的增加($p<0.05$)，超过由任一化合物单独引起的摄取大约6 pmol/mg/分钟。用组合治疗使葡萄糖摄取加倍，这表明在所述检测的条件下，所述化合物活性是相加的。

结论:

在脂肪细胞中葡萄糖的摄取可以同等地通过胰岛素(0.167U/ml)或ID 1101(0.5或1.0mM)来刺激，但当以这些浓度组合使用时，观察到了对葡萄糖摄取的相加效应。

II. 在膳食诱发的肥胖C57B6小鼠中，单独或组合的4-羟基异亮氨酸和罗格列酮 (Avandia®)对葡萄糖耐量的作用:

背景:

尽管作用机理仍在研究之中，但4-羟基异亮氨酸(ID 1101)已显示了在体外和体内诱导葡萄糖依赖的胰岛素分泌(Sauvaire等 Diabetes 47: 206-210, 1998)并降低外周胰岛素抗性(Broca 等 Am. J. Physiol. 277: E617-623，1999)。罗格列酮是通过刺激过氧化物酶体增殖性-胰岛素-活化受体(PPAR)起作用的噻唑烷二酮，其依次对骨骼肌肉和脂肪组织引起胰岛素-敏化作用(Tiikkainen等 Diabetes 53: 2169-2176, 2004)。肝糖原异生同样被抑制。鉴于这些化合物的生理学作用，有兴趣确定是否，当组合使用时，在2型糖尿病动物模型中可能观察到相加的或协同的活性。

目的:

本研究的目的是在由于吃高脂肪饮食造成的高血糖症的小鼠中，

单独或组合的罗格列酮和 ID 1101 的对葡萄糖耐量的作用。

材料和方法:

接收在 7-8 周龄 C57BL6 小鼠，并饲喂高脂肪饮食（45％的卡路里来自脂肪）8 周。检查血糖并将读数在 200 和 220mg/dL 之间的动物随机分为对照组和治疗组。一组接受正常饮食的 C57BL6 小鼠被包括作为对照。治疗组包括通过经口管饲法，接受罗格列酮（1.5 或 5mg/kg），ID 1101（50 或 100mg/kg）,或罗格列酮与 ID 1101（分别 1.5 和 50 mg/kg）的组合，每日两次治疗的那些。

在治疗开始之前进行基线口服葡萄糖耐量试验（OGTT）。该试验在第 7、14 和 21 天重复以确定是否治疗影响葡萄糖耐量。

结果:

如所预料的，基线 OGTT 显示接受高脂肪饮食的动物显示出比正常饮食对照（NDC）动物对葡萄糖攻击更低的耐受量($p<0.05$)（图 2）。在第 7 天，动物接受 OGTT，并且在组间比较结果。用 ID 1101(50mg/kg) 和罗格列酮（1.5mg/kg）组合治疗的动物相对于高脂肪饮食对照动物(DIO)对葡萄糖攻击明显地更为耐受($p<0.05$)。类似地，用 5mg/kg 罗格列酮治疗的动物也比高脂肪饮食对照动物更为葡萄糖耐受($p<0.05$)。虽然存在显示该药物组合可能更加有效的趋势，但结果没有统计学显著性。

第 14 天 OGTT 的结果显示了相似但不显著的趋势。然而，到第 21 天，相对于高脂肪饮食对照动物，只有接受罗格列酮(1.5 或 5mg/kg）的小鼠显示显著提高的葡萄糖耐量($p<0.05$)。

结论:

在本研究中检测了仅 1 个药物浓度的组合，然而结果提示用不同药物浓度的组合，可以观察到化合物之间的协同作用。鉴于与噻唑烷二酮相关的毒性问题，在将这类的成员与 ID 1101 的组合中可能存在益处；潜在地可以减少该剂量，因此提高安全性。

III. 在 INS-1 细胞中，ID 1101 与格列本脲组合对胰岛素分泌的

葡萄糖依赖的刺激的相加效应

目的:

进行本研究以确定是否 ID 1101 与格列本脲组合比单独使用任一化合物更大程度地刺激胰岛素分泌。

材料和方法:

以盲法检测 4-羟基异亮氨酸（ID 1101）的旋光异构体 2S,3R,4S，单独或与格列本脲组合，以确定对 INS-1 细胞的促胰岛素作用。简要地，细胞以 $2x10^5$ 密度接种于 12 孔板中，并在有 10％胎牛血清和 11mM 葡萄糖的 RPMI 中孵育 2 天。该培养基在接种后第 3 天去除并用含有 3 mM 葡萄糖。10％胎牛血清的 RPMI 替换。细胞另外孵育 24 小时。在接种后第 4 天，去除培养基并用含有 2mM 葡萄糖的 Krebs-Ringers 碳酸氢盐缓冲液替换。细胞孵育 30 分钟。去除缓冲液并用含有 4.5mM 葡萄糖、单独含有 0.1mM ID 1101、10^{-10}mM 或 10^{-11}mM 格列本脲或两个化合物组合的 Krebs-Ringers 碳酸氢盐缓冲液替换。细胞孵育 1 小时。通过在有 2mM 葡萄糖的缓冲液存在下孵育细胞确定基础胰岛素分泌。以 4.5mM 存在的葡萄糖刺激了胰岛素分泌并作为阳性对照。

结果:

以前已经显示了 ID 1101 具有促胰岛素活性（Broca 等 Eur.J. Pharmacol. 390： 339-345， 2000; Sauvaire 等 Diabetes 47： 206-210,1998）并且再一次刺激胰岛素分泌在背景水平之上（图 3）。格列本脲是一种促分泌素并在 10^{-10}mM 但不是在 10^{-11}mM 同样显示了刺激作用（图 3）。

然而，0.1mM 的 ID 1101 与 10^{-11}mM 格列本脲的组合导致比由单独任一化合物所引起的更大的刺激作用。对于与 10^{-10}mM 格列本脲的组合同样观察到相同的增强刺激作用。

结论

使用基于胰岛素分泌性细胞系的筛选试验，格列本脲与 ID 1101 的组合证明了体外对胰岛素分泌的相加效应。

IV. ID 1101 与 Exendin-4 组合对 INS-1 细胞内胰岛素分泌的葡萄糖依赖的刺激的相加效应。

目的:

进行该研究以确定是否 ID 1101 与 Exendin-4 组合比单独使用任一化合物更大程度地刺激胰岛素分泌。

材料与方法:

检测 4-羟基异亮氨酸(ID 1101)的旋光异构体 2S,3R,4S，单独或与 Exendin-4 组合，以确定对 INS-1 细胞的促胰岛素作用。简要地，细胞以 $2x10^5$ 密度接种于 12 孔板中，并在有 10％胎牛血清和 11mM 葡萄糖的 RPMI 中孵育 2 天。该培养基在接种后第 3 天去除并用含有 3 mM 葡萄糖、10％胎牛血清的 RPMI 替换。细胞另外孵育 24 小时。在接种后第 4 天，去除培养基并用含有 2mM 葡萄糖的 Krebs-Ringers 碳酸氢盐缓冲液替换。细胞孵育 30 分钟。去除缓冲液并用含有 4.5mM 葡萄糖、单独含有 0.01 或 0.05mM ID 1101、10^{-9}mM 或 10^{-10}mM Exendin-4 或该两个化合物的组合的 Krebs-Ringers 碳酸氢盐缓冲液替换。细胞孵育 1 小时。通过在有 2mM 葡萄糖的缓冲液存在下孵育细胞确定基础胰岛素分泌。4.5mM 葡萄糖作用作为对照。

结果:

以前已经显示 ID 1101 具有促胰岛素活性（Broca 等 Eur. J. Pharmacol. 390: 339-345，2000; Sauvaire 等 Diabetes 47: 206-210, 1998）并且再一次刺激胰岛素分泌在背景水平之上（图 4）。Exendin-4 在 10^{-9}mM 和 10^{-10}mM 没有显示出刺激作用（图 4）。然而，0.01mM 和 0.05mM 的 ID 1101 与任一浓度 Exendin-4 的组合导致比由任一化合物单独所引起的更大的刺激作用($p<0.01$)。

结论:

使用基于胰岛素分泌性细胞系的筛选证明，Exendin-4 与 ID 1101 的组合证明了在体外对胰岛素分泌的相加效应。

上面引用的所有出版物通过参考在此将其全部并入本申请。其它的具体实施方式在下面的权利要求中。

图1.胰岛素和ID1101的组合对3T3-L1分化脂肪细胞中葡萄糖摄取的相加刺激作用

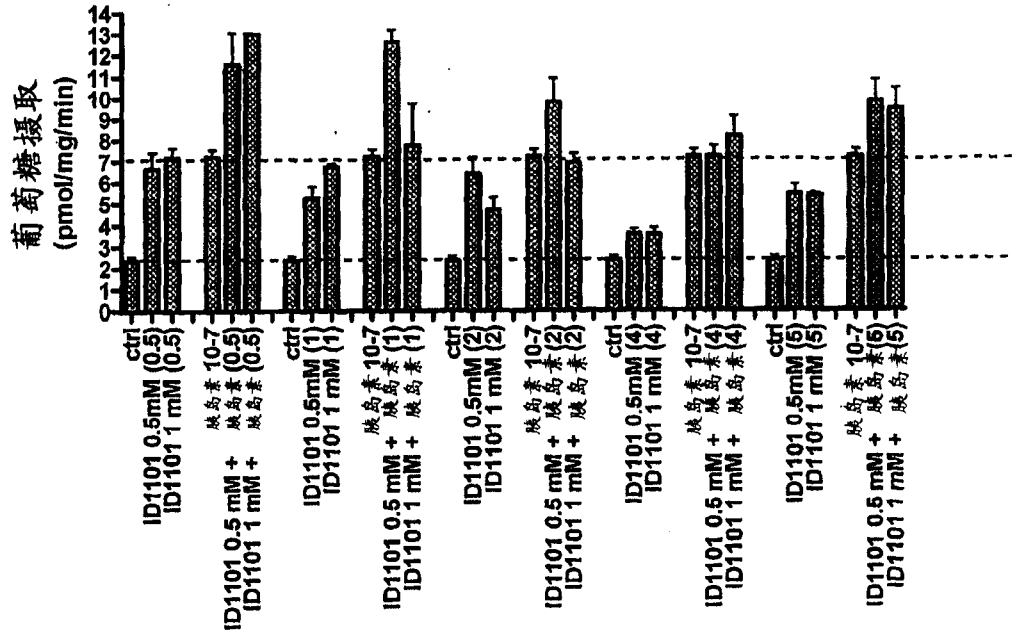


图 2. 口服葡萄糖耐量试验期间血浆葡萄糖水平离基线的变化

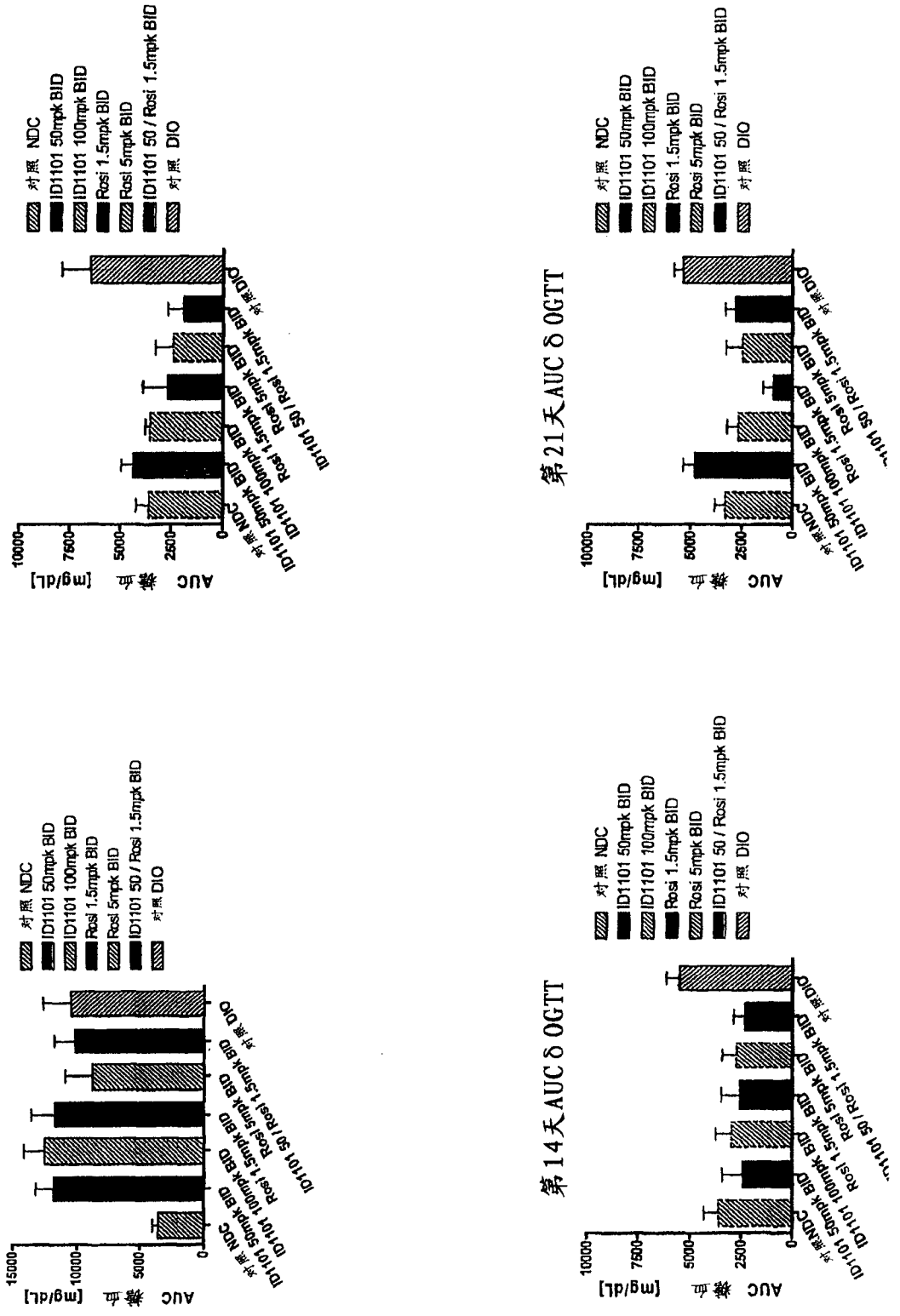


图3. ID1101与格列本脲的组合对INS-1细胞中胰岛素分泌的作用

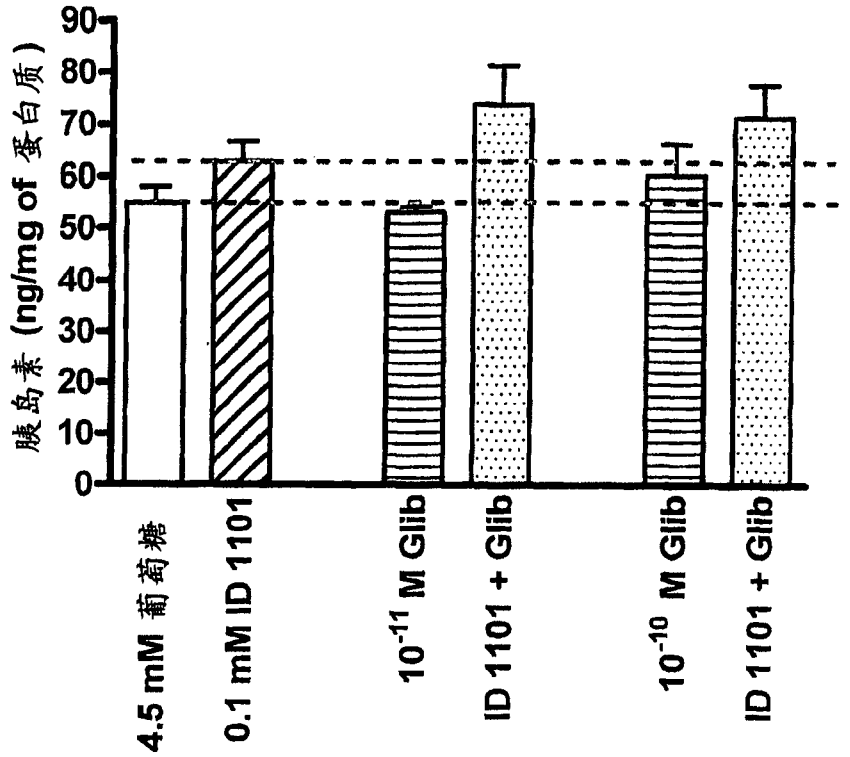


图4. ID1101与Exendin-4的组合对INS-β细胞中胰岛素分泌的作用

