



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110141663 A

(43)申请公布日 2019.08.20

(21)申请号 201910123083.6

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2013.10.30

A61K 45/06(2006.01)

(30)优先权数据

12306354.7 2012.10.30 EP

A61K 31/438(2006.01)

61/720,156 2012.10.30 US

A61K 31/196(2006.01)

(62)分案原申请数据

201380069483.4 2013.10.30

A61K 31/44(2006.01)

(71)申请人 法奈克斯公司

A61K 31/519(2006.01)

地址 法国伊西勒布林诺

A61K 31/155(2006.01)

(72)发明人 丹尼尔·科恩 伊利亚·丘马克威

A61P 3/10(2006.01)

赛尔格·纳比洛克基恩

A61P 5/50(2006.01)

鲁道夫·哈吉

(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理

有限责任公司 11290 权利要求书2页 说明书40页 附图12页

代理人 孙雪 张淑珍

(54)发明名称

通过控制血糖水平用于治疗糖尿病及相关
病症的组合物、方法以及用途

(57)摘要

本发明涉及用于对有需要的哺乳动物中的
血糖进行控制的组合物和方法。本发明涉及用于
治疗糖尿病和相关紊乱的组合物和方法。具体而
言，本发明涉及糖尿病和相关紊乱的新的疗法或
组合疗法，所述新的疗法或组合疗法基于控制血
糖水平的组合物。

1. 包含芬司匹利或其盐或缓释制剂的组合物在制备用于对有需要的哺乳动物受试者中的糖尿病或相关紊乱进行治疗的药物中的用途,所述相关紊乱选自糖耐量受损、空腹血糖受损、胰岛素抵抗、代谢综合征和餐后高血糖。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中,所述组合物包含选自下述化合物中的另外的化合物或它们的盐、或缓释制剂:阿坎酸、阿米三嗪、氨来咕诺、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、非索非那定、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、托拉塞米、氨苯蝶啶、吡贝地尔、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌和利美尼定。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中,所述另外的化合物选自:阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、托拉塞米和氨苯蝶啶,或它们的盐、或缓释制剂。

4. 根据权利要求1或2所述的用途,其中,所述组合物包含以下化合物或它们的盐、或缓释制剂的组合中的至少一种:

- 芬司匹利和托拉塞米;
- 芬司匹利和氨苯蝶啶;或
- 芬司匹利和托芬那酸。

5. 根据权利要求1或2所述的用途,其中,所述组合物进一步包含至少一种另外的抗糖尿病药剂。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中,所述至少一种另外的抗糖尿病药剂选自:阿卡波糖、醋磺己脲、阿格列汀、小檗碱、苯扎贝特、溴隐亭、丁双胍、氨磺丁脲、氯磺丙脲、吡啶甲酸铬、环丙贝特、氯贝丁酯、考来维仑、右芬氟拉明、度格列汀、艾塞那肽、非诺贝特、吉非罗齐、吉格列汀、格列本脲、格列波脲、格列他尼、格列齐特、格列美脲、格列吡嗪、格列喹酮、格列生脲、格列吡脲、咪达普利、胰岛素、菊粉、硫辛酸、利拉利汀、利拉鲁肽、甲钴胺、二甲双胍、米格列醇、米格列奈、那格列奈、奥利司他、苯乙双胍、吡格列酮、普兰林肽、瑞格列奈、罗格列酮、沙格列汀、西他列汀、妥拉磺脲、甲苯磺丁脲、维格列汀或伏格列波糖,或它们的盐、或缓释制剂。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中,所述组合物包含以下化合物或它们的盐、或缓释制剂的组合中的至少一种:

- 芬司匹利和二甲双胍;
- 芬司匹利、托拉塞米和二甲双胍;
- 芬司匹利、氨苯蝶啶和二甲双胍;或
- 芬司匹利、托芬那酸和二甲双胍。

8. 根据权利要求1或2所述的用途,其中,所述组合物用于控制所述有需要的哺乳动物受试者中的血糖水平。

9. 根据权利要求1或2所述的用途,其中,所述组合物在所述哺乳动物受试者中增加或刺激脂肪细胞和/或肌细胞中的葡萄糖摄取。

10. 根据权利要求1或2所述的用途,其中,所述组合物在哺乳动物受试者中减少胰腺 β 细胞的细胞凋亡。

11. 根据权利要求1或2所述的用途,其中,所述组合物在所述哺乳动物受试者中降低胰岛素抵抗。

12. 根据权利要求1或2所述的用途,其中,所述受试者患有2型糖尿病。
13. 根据权利要求1或2所述的用途,其中,所述组合物进一步包含药学上可接受的载体或赋形剂。
14. 根据权利要求2或3所述的用途,其中,所述组合物中的化合物共同配制或给予、分别配制或给予、或者依次配制或给予。
15. 根据权利要求1或2所述的用途,其中,将所述组合物重复给予所述受试者。

通过控制血糖水平用于治疗糖尿病及相关病症的组合物、方法以及用途

[0001] 本申请是申请日为2013年10月30日、发明名称为“通过控制血糖水平用于治疗糖尿病及相关病症的组合物、方法以及用途”的申请号为201380069483.4的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于对有需要的哺乳动物中的血糖进行控制的组合物和方法。具体而言，本发明涉及糖尿病及相关紊乱的新的疗法或组合疗法，所述新的疗法或组合疗法基于控制血糖水平的组合物。

背景技术

[0003] 糖尿病是指其中的患者具有高的血糖水平的成组的代谢疾病。由于全世界有1.71亿人、相当于2000年总人口的2.8%为糖尿病患者，因而受影响的患者众多，所以，糖尿病是重大的公共卫生问题。目前，认为糖尿病是流行病：到2030年，患者的数据将几乎翻一番。主要有两类糖尿病。1型糖尿病的主要特征在于胰岛素依赖性患者，1型糖尿病被称为自身免疫性疾病，有时通过感染因素引发。I型糖尿病通常起始于年龄小于30岁的患者，并占所有糖尿病病例的约5-10% [1]。2型糖尿病的主要特征在于胰岛素非依赖性，2型糖尿病比1型糖尿病发病晚，因此称作成人-发病糖尿病。2型糖尿病占所有糖尿病病例的约90%-95%。许多因素可潜在地引起或加剧2型糖尿病。这些因素包括高血压、高胆固醇、代谢综合征以及超重/肥胖。作为实例，约90%的2型糖尿病患者超重/肥胖 [2]。糖尿病的其它形式包括妊娠糖尿病、先天性糖尿病、囊性纤维化相关的糖尿病、类固醇糖尿病以及多种形式的单基因糖尿病。目前的治疗在于向1型糖尿病给予的胰岛素和/或向2型糖尿病给予的降糖药物或胰岛素增敏剂。胰岛素是与胰高血糖素一起参与葡萄糖稳态的激素。作为对升高的血糖水平的响应，胰岛素由位于胰岛的胰腺 β 细胞产生。因此，葡萄糖通过肝细胞、肌细胞和脂肪细胞从血液中摄取，并用作能量源或储存为糖原和甘油三酯。胰岛素还抑制脂解作用，阻止脂肪组织释放脂肪酸。相比之下，低血糖水平造成胰岛素的产生和释放减少。随着胰高血糖素作用，使得葡萄糖释放至血流中。在病理状况下，通过 β 细胞产生的胰岛素并不足够(1型糖尿病)和/或细胞对胰岛素的产生响应不良(胰岛素抵抗；2型糖尿病)，导致血糖处于持久高水平。涉及这些病理学的确切机制尚未完全了解。

[0004] 以胰岛素产生减少为特征的1型糖尿病归因于由自身免疫过程造成的 β 细胞的破坏，所述自身免疫过程在于自身抗体的产生、自身反应性淋巴细胞的激活和胰腺浸润，从而破坏 β 细胞。认为2型糖尿病是复杂的代谢紊乱。2型糖尿病起因于由 β 细胞功能障碍引起的胰腺胰岛素分泌受损、胰岛素抵抗以及受损的胰高血糖素分泌的组合。受损的葡萄糖刺激的胰岛素产生包括胰腺 β 细胞的渐进性丧失以及胰岛细胞功能的下降。胰岛素抵抗在于例如导致增高的游离脂肪酸循环的外周器官/组织(肝脏、肌肉和脂肪组织)中的胰岛素的抑制或减少作用、或脂肪细胞中的增强的脂解作用。由于降低的胰岛素受体表达、胰岛素的受

体后作用中的缺陷[3]、肝葡萄糖生产过剩或胰岛素信号传导通路的阻断[4]，这些事件导致由肝脏产生的内源性葡萄糖增加，同时葡萄糖摄取减少。胰岛素抵抗是称作代谢综合征的更复杂的综合征的标志，是冠心病和糖尿病的一组危险因素，包括腹部肥胖、升高的甘油三酯水平、降低的高密度脂蛋白水平、升高的血压以及升高的空腹血浆葡萄糖水平[5]。75%的2型糖尿病患者患有代谢综合征。

[0005] 持续的高血糖同时导致急性并发症和慢性并发症，所述并发症可能是非常致残的、甚至对糖尿病患者而言是致命的，例如心脏病和中风是糖尿病对生命最具威胁的影响。长期持续升高的血糖损害了血管，导致微血管血管病和大血管血管病，所述血管病时与该疾病相关的升高的发病率和死亡率的主要原因。微血管并发症对如下负责：糖尿病性心脏病和肾病，同时，有时导致器官衰竭、视网膜病，所述视网膜病可导致严重的视力丧失和神经病变。大血管并发症还涉及心血管损伤，所述心血管损伤对冠状动脉疾病负责，所述冠状动脉疾病最终引发心绞痛或心肌梗塞、糖尿病性肌坏死、外周血管疾病和中风。大血管并发症更加常见，高达80%的2型糖尿病患者将发展为大血管疾病或死于大血管疾病。

[0006] 不幸的是，因为 β 细胞功能随时间而减退，现有的治疗方法不能成功地长期恢复正常血糖[6]。此外，目前并没有能够逆转该疾病的所有的单一药物。

[0007] 在1型糖尿病中，因为患者不再产生胰岛素，几乎仅依靠注射外源性胰岛素实现对血糖的控制。当降糖药物和饮食不能控制血糖时，还可将胰岛素给予2型糖尿病患者[7]。因为胰岛素延缓了并发症的发展和进程，目前更频繁地将胰岛素给予这些患者。但是胰岛素的使用包含副作用，所述副作用包括剂量不合适时的低血糖、增高的发展为结直肠癌的风险[8]和增重，因此不推荐将胰岛素用于糖尿病患者、尤其是肥胖患者。

[0008] 2型糖尿病的渐进性质暗示了许多患者最终将需要抗糖尿病药物的组合（可能是与胰岛素的组合）[9]。除延缓葡萄糖经胃肠道吸收的特殊机制外，已开发抗糖尿病药物以对抗2型糖尿病中涉及的主要机制：胰岛素抵抗（双胍和噻唑烷二酮）和胰岛素分泌（磺酰脲、列奈、二肽基肽酶-4抑制剂、胰高血糖素样肽-1受体激动剂）。然而，这些药物中的大多数已显示出有害的副作用，例如体重增加、外周水肿或充血性心脏衰竭、以及在长期使用中丧失疗效[9]。

[0009] 尽管与糖尿病相关的治疗选项的数量增多，但没有一种治疗选项能够逆转该疾病的所有方面，包括 β 细胞功能的渐进性丧失以及对所有并发症的控制。因此，需要替代和改进的药物以用于治疗糖尿病及相关病症。

发明内容

[0010] 本发明提供了用于治疗糖尿病及相关紊乱、特别是2型糖尿病的新的组合物和方法。

[0011] 本发明还提供了使有需要的哺乳动物受试者中的血糖正常化的组合物和方法。

[0012] 本发明还涉及用于对哺乳动物受试者、特别是患有糖尿病或相关紊乱的哺乳动物受试者中的血糖水平进行控制的组合物和方法。

[0013] 本发明还涉及用于增加或刺激哺乳动物受试者、特别是患有糖尿病或相关紊乱的哺乳动物受试者中的脂肪细胞和/或肌细胞中的葡萄糖摄取的组合物和方法。

[0014] 本发明还涉及用于降低患有2型糖尿病或相关紊乱的哺乳动物受试者中的胰岛素

抵抗的组合物和方法。

[0015] 本发明还涉及用于减少哺乳动物受试者、特别是患有糖尿病或相关紊乱的哺乳动物受试者中的胰腺β细胞凋亡的组合物和方法。

[0016] 本发明公开了通过本发明人对如下的药物进行的鉴别和确证：所述药物单独或以组合形式有效地影响参与血糖水平控制的一个或多个相关通路，并代表用于治疗糖尿病及相关紊乱的新的且有效的疗法。因此，本发明公开了糖尿病（1型或2型）及相关病症的新的疗法，以及对于此类病症特别有效的新的药物和药物组合物。本发明可应用至任何哺乳动物、特别是人类受试者。本发明特别适合用于治疗与血糖水平异常升高有关的2型糖尿病或代谢综合征。本发明所述的治疗可与此类病症的其它疗法组合使用或交替使用。

[0017] 具体而言，本发明的目的涉及用于治疗糖尿病或相关紊乱的组合物，所述组合物包含至少一种、优选至少两种化合物，所述化合物选自：阿坎酸、阿米三嗪、氨来咕诺、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、非索非那定、艾芬地尔、美西律、尼麦角林、托哌酮、托拉塞米、氨苯蝶啶、托芬那酸、吡贝地尔、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌或利美尼定。

[0018] 在优选的实施方式中，所述至少一种、优选至少两种化合物选自：阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、艾芬地尔、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、托拉塞米或氨苯蝶啶。

[0019] 在另一具体的实施方式中，所述化合物选自：阿米三嗪、氮卓斯汀、阿坎酸、巴氯芬、喷托维林、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、艾芬地尔、美西律、尼麦角林或托哌酮。

[0020] 如实施例中所示，当单独使用上述化合物时，所述化合物提供了实质性影响，而当组合使用上述化合物时，将进一步特别有效。实施例事实上表明了，为调节血糖水平、特别是葡萄糖摄取和葡萄糖产生，以及为降低胰岛素抵抗，组合疗法甚至更优选，并且提供了最有效的临床受益。

[0021] 因此，本发明的进一步的目的涉及如下组合物以及此类组合物在治疗糖尿病或相关紊乱中的用途，所述组合物至少包含：

[0022] -选自如下化合物的第一化合物：阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、艾芬地尔、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、托拉塞米或氨苯蝶啶；以及

[0023] -与第一化合物不同的第二化合物，所述第二化合物选自：阿坎酸、阿米三嗪、氨来咕诺、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、非索非那定、艾芬地尔、美西律、尼麦角林、托哌酮、托拉塞米、氨苯蝶啶、托芬那酸、吡贝地尔、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌或利美尼定。

[0024] 本发明的另一目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途，所述组合物包含选自如下化合物中的至少两种化合物：阿坎酸、阿米三嗪、氨来咕诺、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、非索非那定、艾芬地尔、美西律、尼麦角林、托哌酮、托拉塞米、氨苯蝶啶、托芬那酸、吡贝地尔、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌或利美尼定。

[0025] 至少两种化合物更优选选自：阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、艾芬地尔、左西孟旦、美西律、尼麦角林、

托芬那酸、托哌酮、托拉塞米或氨苯蝶啶。

[0026] 本发明的药物组合物还可进一步与另外的抗糖尿病药剂或治疗剂组合使用,从而提供改善的临床效果和/或减轻此类抗糖尿病药物或治疗的潜在的副作用。

[0027] 因此,本发明的进一步的目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含:

[0028] -选自如下的化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、艾芬地尔、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、托拉塞米或氨苯蝶啶;以及

[0029] -选自于由以下化合物所组成的组中的化合物:阿卡波糖、醋磺己脲、阿格列汀、小檗碱、苯扎贝特、溴隐亭、丁双胍、氨磺丁脲、氯磺丙脲、吡啶甲酸铬、环丙贝特、氯贝丁酯、考来维仑、右芬氟拉明、度格列汀、艾塞那肽、非诺贝特、吉非罗齐、吉格列汀、格列本脲、格列波脲、格列他尼、格列齐特、格列美脲、格列吡嗪、格列喹酮、格列生脲、格列吡脲、咪达普利、胰岛素、菊粉、硫辛酸、利拉利汀、利拉鲁肽、甲钴胺、二甲双胍、米格列醇、米格列奈、那格列奈、奥利司他、苯乙双胍、吡格列酮、普兰林肽、瑞格列奈、罗格列酮、沙格列汀、西他列汀、妥拉磺脲、甲苯磺丁脲、维格列汀或伏格列波糖。

[0030] 本发明的甚至更优选的目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含与二甲双胍组合的选自于由如下化合物所组成的组中的化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、艾芬地尔、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、托拉塞米或氨苯蝶啶。

[0031] 本发明还涉及包含上述公开的药物组合的药物组合物。本发明的药物组合物通常包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。另外,本发明的组合物中的化合物可直接使用,或者以其盐、水合物、酯、醚、酸、酰胺、外消旋体或异构体的形式使用。化合物还可处于缓释制剂的形式。还可使用化合物的前药或代谢物。

[0032] 在实施方式中,本发明涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含选自如下的组合:

[0033] -艾芬地尔和阿坎酸;

[0034] -艾芬地尔和巴氯芬;

[0035] -巴氯芬和阿坎酸;

[0036] -美西律和西那卡塞;

[0037] -美西律和托拉塞米;

[0038] -磺胺异噁唑和托拉塞米;

[0039] -氮卓斯汀和尼麦角林;

[0040] -艾地苯醌和尼麦角林;

[0041] -喷托维林与尼麦角林;

[0042] -阿米三嗪和尼麦角林;

[0043] -西咪替丁和尼麦角林;

[0044] -乙胺嗪和尼麦角林;

[0045] -艾芬地尔和尼麦角林;

- [0046] -氮卓斯汀和艾地苯醌；
- [0047] -阿坎酸和尼麦角林；
- [0048] -氮卓斯汀和喷托维林；
- [0049] -氮卓斯汀和阿米三嗪；
- [0050] -艾地苯醌和喷托维林；
- [0051] -艾地苯醌和阿米三嗪；
- [0052] -氨苯蝶啶和尼麦角林；
- [0053] -D-甘露糖和尼麦角林；
- [0054] -艾地苯醌和乙胺嗪；
- [0055] -艾芬地尔和芬司匹利；
- [0056] -艾芬地尔和托芬那酸；
- [0057] -艾芬地尔和托拉塞米；
- [0058] -艾芬地尔和氨苯蝶啶；
- [0059] -芬司匹利和托拉塞米；
- [0060] -芬司匹利和氨苯蝶啶；
- [0061] -芬司匹利和托芬那酸；
- [0062] -托拉塞米和托芬那酸；
- [0063] -托拉塞米和氨苯蝶啶；
- [0064] -托芬那酸和氨苯蝶啶；或
- [0065] -D-甘露糖和巴氯芬。

[0066] 在另一实施方式中，本发明涉及二甲双胍与至少一种上述的化合物组合的组合，以及该组合在对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途。

[0067] 如将在本申请中进一步公开的，本发明所述的组合物或组合疗法中的化合物可通过不同的途径和方案而共同配制或给予、分别配制或给予、或者依次配制或给予。在优选的实施方式中，将本发明的组合物重复给予受试者。

[0068] 本发明还涉及治疗糖尿病或相关紊乱的方法，该方法包括向有需要的受试者给予上述公开的药物或药物组合物。在具体的实施方式中，该方法进一步包括在给药前或给药后，对来自哺乳动物受试者的血液样品中的血糖水平进行测量的步骤。

[0069] 本发明的进一步的目的涉及治疗糖尿病或相关紊乱的方法，所述方法包括同时、分别或依次向有需要的受试者给予上述公开的药物组合。

[0070] 本发明的进一步的目的涉及上述组合物在制造用于治疗糖尿病或相关紊乱的药物中的用途。

[0071] 本发明可用于任何哺乳动物受试者、特别是人类受试者中。

附图说明

[0072] 对于所有的附图，受试药物均引起了显著不同于参照的影响 (t -检验, $*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$)。

[0073] 图1:D-甘露糖预处理对 β 细胞凋亡的影响(光密度)。通过剂量低至10nM的D-甘露糖显著预防了细胞凋亡(129%)。

[0074] 图2:氨苯喋啶短期预处理对INS-1细胞中的胰岛素分泌的影响。通过氨苯蝶啶显著提高了胰岛素分泌(+37%)。

[0075] 图3:西那卡塞长期预处理对INS-1细胞中的胰岛素分泌的影响。通过剂量低至 $1\mu M$ 的西那卡塞显著提高了胰岛素分泌(+55%)。

[0076] 图4:阿坎酸短期预处理对H-2Kb细胞中的葡萄糖摄取的影响。通过剂量低至 $0.1\mu M$ 的阿坎酸显著提高了葡萄糖摄取(+45%)。

[0077] 图5:阿米三嗪短期预处理对H-2Kb细胞中的葡萄糖摄取的影响。通过剂量低至 $1\mu M$ 的阿米三嗪显著提高了葡萄糖摄取(+80%)。

[0078] 图6:尼麦角林长期预处理对H-2Kb细胞中的葡萄糖摄取的影响。通过尼麦角林显著提高了葡萄糖摄取(+28%)。

[0079] 图7:喷托维林短期预处理对3T3-L1细胞中的葡萄糖摄取的影响。通过剂量低至 $100nM$ 的喷托维林显著提高了葡萄糖摄取(+58%)。

[0080] 图8:阿米三嗪长期预处理对3T3-L1细胞中的葡萄糖摄取的影响。通过剂量低至 $1\mu M$ 的阿米三嗪显著提高了葡萄糖摄取(+69%)。

[0081] 图9:D-甘露糖短期预处理对由肝细胞生成的葡萄糖的影响。通过D-甘露糖显著减少了葡萄糖生成(-22%)。

[0082] 图10:艾芬地尔长期预处理对由肝细胞生成的葡萄糖的影响。通过剂量低至 $10nM$ 的艾芬地尔显著减少了葡萄糖生成(-22%)。

[0083] 图11:氮卓斯汀长期预处理对由肝细胞生成的葡萄糖的影响。通过氮卓斯汀显著减少了葡萄糖生成(-36%)。

[0084] 图12:毗贝地尔短期预处理对3T3-L1细胞中的葡萄糖摄取的影响。通过剂量低至 $10nM$ 的毗贝地尔显著提高了葡萄糖摄取(+68%)。

[0085] 图13:托拉塞米预处理对人原代糖尿病肌管(human primary diabetic myotubes)中的葡萄糖摄取的影响。在低至 $0.01\mu M$ 、 $0.1\mu M$ 和 $1\mu M$ 的剂量时显著提高了葡萄糖摄取(分别为+24%、+18%和+14%)。

[0086] 图14:芬司匹利预处理对来自糖尿病患者的糖尿病肌管中的葡萄糖摄取的影响。在低至 $0.01\mu M$ 、 $0.1\mu M$ 和 $1\mu M$ 的剂量时显著提高了葡萄糖摄取(分别为+34%、+30%和+27%)。

[0087] 图15:托芬那酸预处理对来自糖尿病患者的人原代肌管中的葡萄糖摄取的影响。在低至 $0.01\mu M$ 、 $0.1\mu M$ 和 $1\mu M$ 的剂量时显著提高了葡萄糖摄取(分别为+13%、+13%和+12%)。

[0088] 图16:艾芬地尔预处理对人原代糖尿病肌管中的葡萄糖摄取的影响。在低至 $0.01\mu M$ 的剂量时显著提高了葡萄糖摄取(+48%)。

[0089] 图17:氨苯喋啶预处理对人原代糖尿病肌管中的葡萄糖摄取的影响。在低至 $0.01\mu M$ 的剂量时显著提高了葡萄糖摄取(+13%)。

[0090] 图18:在TNF- α 诱导的胰岛素抵抗状态下,托拉塞米预处理对通过3T3L1分化脂肪细胞摄取的葡萄糖的影响。当与未处理的胰岛素抵抗细胞(TNF α)相比时,在低至 $0.37nM$ 、 $1nM$ 和 $3.3nM$ 的剂量时分别显著提高了葡萄糖摄取(+121%、+123%和+129%)。

[0091] 图19:在TNF- α 诱导的胰岛素抵抗状态下,艾芬地尔预处理对通过3T3L1分化脂肪

细胞摄取的葡萄糖的影响。当与未处理的胰岛素抵抗细胞 (TNF α) 相比时,在低至1 μ M的剂量时显著提高了葡萄糖摄取 (+140%)。

[0092] 图20:在TNF- α 诱导的胰岛素抵抗状态下,芬司匹利预处理对通过3T3L1分化脂肪细胞摄取的葡萄糖的影响。当与未处理的胰岛素抵抗细胞 (TNF α) 相比时,在低至1nM的剂量时显著提高了葡萄糖的摄取 (+130%)。

[0093] 图21:在TNF- α 诱导的胰岛素抵抗状态下,托芬那酸预处理对通过3T3L1分化脂肪细胞摄取的葡萄糖的影响。当与未处理的胰岛素抵抗细胞 (TNF α) 相比时,在低至10nM的剂量时显著提高了葡萄糖的摄取 (+127%)。

[0094] 图22:在处理4周后,巴氯芬-阿坎酸组合对ZDF雄性大鼠中的血浆CRP浓度的影响。相对于未处理的ZDF大鼠,在处理的ZDF大鼠中巴氯芬-阿坎酸组合显著降低了CRP浓度。

[0095] 图23:在db/db小鼠中,D-甘露糖-巴氯芬-二甲双胍组合(分别为5mg/kg和2mg/kg bid、以及150mg/kg每天一次)短期处理对葡萄糖稳态的影响。当与未处理的db/db小鼠相比时,在处理的db/db小鼠中的空腹血糖 (mg/dL) 显著降低。

具体实施方式

[0096] 本发明提供了用于控制血糖水平的新的治疗方式。本发明公开了新的药物、药物组合和方法,使得能够有效控制血糖水平并可用于患者治疗。

[0097] 因此,本发明涉及用于治疗糖尿病及相关紊乱的组合物和方法。

[0098] 定义

[0099] 在本发明的上下文中,术语“治疗”包括预防性治疗或治病性治疗。术语治疗特别是指受损的葡萄糖稳态的校正、延缓或降低。血液中的葡萄糖水平在全天内波动。葡萄糖水平通常在早晨、一天的第一餐之前较低,并在餐后升高数小时。因此,术语治疗包括根据哺乳动物受试者的状况和一天的时间点,通过提高或降低血糖水平来控制血糖水平,从而达到正常的血糖水平。具体而言,术语治疗包括在患有糖尿病或相关紊乱的受试者中,临时或持久降低血糖水平。术语“治疗”还指改善胰岛素释放(例如,由胰腺B细胞释放)、胰高血糖素释放(例如,由胰腺 α 细胞释放)、葡萄糖利用和/或摄取(例如,由肌细胞或脂肪细胞捕获葡萄糖)、和/或肝的葡萄糖生成。

[0100] 在本发明的上下文中,术语“控制血糖水平”或“血糖水平的控制”是指具有异常水平(即,低于或高于具有正常的葡萄糖稳态的相应哺乳动物受试者的已知的参考值、中值或平均值的水平)的哺乳动物受试者中的血液或血浆葡萄糖水平的正常化或调控。

[0101] 本文中的术语“糖尿病”是指成组的代谢疾病,其中的患者具有高的血糖水平,糖尿病包括1型糖尿病、2型糖尿病、妊娠糖尿病、先天性糖尿病、囊性纤维化相关的糖尿病、类固醇糖尿病以及多种形式的单基因糖尿病。

[0102] 术语“相关紊乱”是指与处于正常范围外的血液或血浆葡萄糖水平相关的任何疾病,优选高血糖症。因此,术语“相关紊乱”包括糖耐量受损(IGT)、空腹血糖受损(IFG)、胰岛素抵抗、代谢综合征、餐后高血糖和超重/肥胖。此类相关紊乱的特征还在于异常的血液和/或血浆胰岛素水平。

[0103] 术语“组合”或“组合疗法”或“组合治疗”是指将至少两种化合物共同给予受试者以引起生物效应的治疗。在本发明所述的组合疗法中,至少两种药物可共同给予或分别给

予、同时给予或依次给予。同时给予并不是必需的，只要药物在生物体内产生组合作用或协同作用以改善患者的身体状况即可。此外，至少两种药物可通过不同的途径和方案给药。作为结果，尽管可将它们配制在一起，组合的药物还可分别进行配制。

[0104] 在本发明的上下文中，由其名称或CAS号标示的术语“化合物”或“药物”意在指用其相应的CAS号标示或具体命名的具有任何化学纯度的化合物，以及其任意的药学上可接受的盐、水合物、异构体、外消旋体、缀合物或衍生物。

[0105] 术语“衍生物”包括任何功能上和结构上相关的化合物，例如羧酸衍生物、酰胺衍生物、酯衍生物、醚衍生物、前药和代谢物。

[0106] 本文使用的术语“前药”是指化合物的任何衍生物(或前体)，当将其给予至生物体系(例如，人体组织)时，作为例如自发化学反应、酶催化化学反应和/或代谢化学反应的结果生成所述化合物。前药通常具有X-药物的结构，其中，X是惰性载体部分，药物是活性化合物。通常，前药缺乏活性、或活性低于药物，并且在体内药物从载体中释放。前药通常是无活性的、或活性低于所得到的药物，并且可用于例如改善药物的物理化学性质、使药物靶向至特定的组织、改善药物的药代动力学和药效学性质和/或减少不期望的副作用。适合于前药设计的一些常见官能团包括但不限于：羧基、羟基、氨基、磷酸根/膦酸根和羰基。通常，通过这些基团的修饰而产生的前药包括但不限于：酯、碳酸盐/酯、氨基甲酸盐/酯、酰胺和磷酸盐/酯。用于选择合适的前药的具体技术指导是一般的公知常识[11-15]。此外，可通过本领域技术人员已知的常规方法进行前药的制备。可用于合成前药的方法在针对该主题的众多综述中进行了描述[12;16-21]。

[0107] 本文所用的术语药物的“代谢物”是指在给予至生物体后，通常通过专门的酶体系对所述药物进行(生物化学)修饰或处理而获得的分子，并且该分子显示出或保留了药物的生物活性。已经公开了代谢物对于大部分的母体药物的治疗作用负责。

[0108] 术语“盐”是指本发明化合物在药学上可接受的并且相对无毒的、无机或有机的酸加成盐或者碱加成盐。药学的盐形成物通常由成对的酸性、碱性或两性离子药物分子与抗衡离子组成，以生成药物的盐形式。在中和反应中可使用多种化学物质。尽管给定活性成分的大多数盐是生物等价的，但其中的一些可具有增加的溶解度或生物利用度特性。目前，如在H.Stahl和C.G Wermuth在他们的手册中所教导的，在药物开发过程中盐的选择是常见的标准操作[22]。

[0109] 在优选的实施方式中，化合物的标识意在指化合物本身以及该化合物的任意的药学上可接受的盐、水合物、异构体、外消旋体、酯或醚。

[0110] 在更优选的实施方式中，化合物的标识意在指具体指定的化合物本身以及其任意的药学上可接受的盐。

[0111] 在具体的实施方式中，使用化合物的缓释制剂。

[0112] 用于治疗糖尿病及相关紊乱的组合物和方法

[0113] 通过对涵盖细胞生物学研究、表达谱实验和遗传关联性研究的结果的实验数据进行综合整合，本发明人已经能够选择单独和/或组合使用均有效改变血糖控制的相关途径的少数药物，并且代表了用于治疗糖尿病及相关紊乱的新的治疗方式。这些药物或组合可通过作用于例如胰岛素释放、胰高血糖素释放、葡萄糖利用和/或葡萄糖生成，而用于使血糖水平正常化，并且提供了糖尿病及相关紊乱的新的有效的疗法。如在实施例中所公开的，

这些药物和组合对糖尿病的相关功能具有强的作用：它们参与了 β 细胞免于细胞凋亡的保护、肌肉组织和脂肪细胞中的葡萄糖摄取的增高、胰腺 β 细胞的胰岛素分泌的增高和/或肝组织中的葡萄糖生成的控制。

[0114] 因此，这些药物和组合代表了用于对有需要的哺乳动物中的血糖水平进行控制的新的治疗方式。它们还代表了用于对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗的新的治疗方式。

[0115] 在这方面，本发明的目的涉及用于对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗的组合物，所述组合物包含选自于由以下化合物所组成的组中的至少一种化合物：阿坎酸、氨来咕诺、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、非索非那定、艾芬地尔、美西律、尼麦角林、托哌酮、托拉塞米、氨苯蝶啶、托芬那酸、毗贝地尔、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌和利美尼定。

[0116] 本发明还涉及上文列出的至少一种化合物在制造用于对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗的药物中的用途。

[0117] 本发明还涉及用于对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗的方法，所述方法包括向所述哺乳动物给予至少一种上述列出的化合物。

[0118] 在下表1中提供所选择的各化合物的示意性CAS号：

[0119] 表1

药物名称	CAS 号
阿坎酸	77337-76-9; 77337-73-6
阿米三嗪	27469-53-0; 29608-49-9
氨来咕诺	68302-57-8;
氮卓斯汀	58581-89-8; 79307-93-0
巴氯芬	1134-47-0; 66514-99-6; 69308-37-8; 70206-22-3; 63701-56-4; 63701-55-3
喷托维林	77-23-6; 23142-01-0; 1045-21-2
西咪替丁	51481-61-9; 70059-30-2
西那卡塞	226256-56-0; 364782-34-3
右溴苯那敏	86-22-6; 980-71-2; 2391-03-9
乙胺嗪	90-89-1; 1642-54-2
二羟丙茶碱	479-18-5
D-甘露糖	10030-80-5; 3458-28-4
芬司匹利	5053-06-5; 5053-08-7
非索非那定	83799-24-0; 138452-21-8; 153439-40-8; 139965-10-9; 139965-11-0
艾地苯醌	58186-27-9
艾芬地尔	23210-56-2; 23210-58-4
左西孟旦	141505-33-1
美西律	5370-01-4; 31828-71-4
尼麦角林	27848-84-6
毗贝地尔	3605-01-4
利美尼定	54187-04-1; 85409-38-7
托芬那酸	13710-19-5
托哌酮	728-88-1; 3644-61-9
托拉塞米	56211-40-6; 72810-59-4
氨苯蝶啶	396-01-0

[0120]

[0121] 如在实施例中所提及的,当单独试验时,上述化合物对于通过改变葡萄糖稳态的独特的重要通路来改善葡萄糖水平而言是有效的。

[0122] 此外,本发明人出乎预料地发现,阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、艾芬地尔、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、托拉塞米和氨苯蝶啶在如下方面特别有效:保护β细胞免于细胞凋亡、改善肌肉组织的葡萄糖摄取和/或胰岛素释放。因此,此类化合物代表了用于本发明的最优秀的实施方式。

[0123] 因此,本发明的组合物可包含1种、2种、3种、4种或5种不同的上述药物,更优选2种、3种或4种不同的药物用于有需要的受试者中的糖尿病或相关紊乱的组合治疗。此外,上述药物组合物还可进一步与一种或多种另外的药物或治疗组合使用,所述另外的药物或治疗有益于患有糖尿病或相关紊乱的受试者。

[0124] 就这方面而言,本发明的具体目的涉及用于治疗糖尿病或相关紊乱的组合物,所述组合物包含选自如下的化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、艾芬地尔、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、托拉塞米或氨苯蝶啶。

[0125] 优选在组合疗法中使用上述分子以提供最有效的临床益处。药物组合特别有利,因为药物组合能够影响不同通路并因此更有效。此外,由于药物组合的疗效和作用方式,可在低剂量下使用药物组合,这是进一步非常重大的优势。因此,最优秀的药物组合物包含2种、3种、4种或5种不同的药物,甚至更优选2种、3种或4种不同的药物,以用于对有需要的受试者中的糖尿病或相关紊乱的组合治疗。在优选的实施方式中,为提供最有效的作用,本发明的药物以组合的方式使用以用于组合给予、分别给予或依次给予,以提供最有效的作用。

[0126] 就这方面而言,本发明的优选的目的涉及如下的组合物以及该组合物在对有需要的哺乳动物中的糖尿病/或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含选自于由如下化合物所组成的组中的至少两种化合物的组合:阿坎酸、阿米三嗪、氨来咕诺、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、非索非那定、艾芬地尔、美西律、尼麦角林、托哌酮、呋塞米、氨苯蝶啶、托芬那酸、毗贝地尔、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌和利美尼定。

[0127] 本发明更优选的目的涉及如下组合物以及此类组合物用于对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含选自于由如下化合物所组成的组中的至少两种化合物的组合:阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、艾芬地尔、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、托拉塞米和氨苯蝶啶。

[0128] 本发明的另一目的涉及如下组合物以及此类组合物在治疗糖尿病或相关紊乱中的用途,所述组合物包含:

[0129] -选自如下的至少一种化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、艾芬地尔、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、托拉塞米或氨苯蝶啶;以及

[0130] -选自如下的至少一种不同的化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氨来咕诺、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、非索非那定、艾芬地尔、美西律、尼麦角林、托哌酮、托拉塞米、氨苯蝶啶、托芬那酸、毗贝地尔、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌或利美尼定。

[0131] 本发明的另一目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含:(i)艾芬地尔;以及(ii)选自于由以下化合物所组成的组中的化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氨来咕诺、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、非索非那定、美西律、尼麦角林、托哌酮、托拉塞米、氨苯蝶啶、托芬那酸、吡贝地尔、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌或利美尼定。

[0132] 本发明的又一目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含:(i)阿坎酸;以及(ii)选自于由以下化合物所组成的组中的化合物:阿米三嗪、氨来咕诺、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、非索非那定、艾芬地尔、美西律、尼麦角林、托哌酮、托拉塞米、氨苯蝶啶、托芬那酸、吡贝地尔、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌或利美尼定。

[0133] 本发明的具体目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含:(i)氮卓斯汀;以及(ii)选自于由以下化合物所组成的组中的化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氨来咕诺、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、非索非那定、艾芬地尔、美西律、尼麦角林、托哌酮、托拉塞米、氨苯蝶啶、托芬那酸、吡贝地尔、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌或利美尼定。

[0134] 本发明的另一具体目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含:(i)托拉塞米;以及(ii)选自于由以下化合物所组成的组中的化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氨来咕诺、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、非索非那定、艾芬地尔、美西律、尼麦角林、托哌酮、托拉塞米、氨苯蝶啶、托芬那酸、吡贝地尔、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌或利美尼定。

[0135] 本发明的目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含:(i)芬司匹利;以及(ii)选自于由以下化合物所组成的组中的化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氨来咕诺、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、非索非那定、艾芬地尔、美西律、尼麦角林、托哌酮、托拉塞米、氨苯蝶啶、托芬那酸、吡贝地尔、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌或利美尼定。

[0136] 本发明的具体目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含:(i)托芬那酸;以及(ii)选自于由以下化合物所组成的组中的化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氨来咕诺、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、非索非那定、艾芬地尔、美西律、尼麦角林、托哌酮、托拉塞米、氨苯蝶啶、吡贝地尔、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌或利美尼定。

[0137] 本发明的具体目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含:(i)氨苯蝶啶;以及(ii)选自于由以下化合物所组成的组中的化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氨来咕诺、氮卓斯汀、巴氯芬、喷

托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、非索非那定、艾芬地尔、美西律、尼麦角林、托哌酮、托拉塞米、托芬那酸、毗贝地尔、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌或利美尼定。

[0138] 本发明的另一具体目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含:(i)毗贝地尔和(ii)选自于由以下化合物所组成的组中的化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氨来咕诺、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、非索非那定、艾芬地尔、美西律、尼麦角林、托哌酮、托拉塞米、氨苯蝶啶、托芬那酸、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌或利美尼定。

[0139] 在最优先的实施方式中,本发明的组合物包含至少一种下述药物组合,用于组合给予、分别给予或依次给予:

- [0140] -艾芬地尔和阿坎酸;
- [0141] -艾芬地尔和巴氯芬;
- [0142] -巴氯芬和阿坎酸;
- [0143] -美西律和西那卡塞;
- [0144] -美西律和托拉塞米;
- [0145] -磺胺异噁唑和托拉塞米;
- [0146] -氮卓斯汀和尼麦角林;
- [0147] -艾地苯醌和尼麦角林;
- [0148] -喷托维林与尼麦角林;
- [0149] -阿米三嗪和尼麦角林;
- [0150] -西咪替丁和尼麦角林;
- [0151] -乙胺嗪和尼麦角林;
- [0152] -艾芬地尔和尼麦角林;
- [0153] -氮卓斯汀和艾地苯醌;
- [0154] -阿坎酸和尼麦角林;
- [0155] -氮卓斯汀和喷托维林;
- [0156] -氮卓斯汀和阿米三嗪;
- [0157] -艾地苯醌和喷托维林;
- [0158] -艾地苯醌和阿米三嗪;
- [0159] -氨苯蝶啶和尼麦角林;
- [0160] -D-甘露糖和尼麦角林;
- [0161] -艾地苯醌和乙胺嗪;
- [0162] -艾芬地尔和芬司匹利;
- [0163] -艾芬地尔和托拉塞米;
- [0164] -艾芬地尔和氨苯蝶啶;
- [0165] -艾芬地尔和托芬那酸;
- [0166] -芬司匹利和托拉塞米;
- [0167] -芬司匹利和氨苯蝶啶;

[0168] -芬司匹利和托芬那酸；

[0169] -托拉塞米和氨苯蝶啶；

[0170] -托拉塞米和托芬那酸；

[0171] -氨苯蝶啶和托芬那酸；或

[0172] -D-甘露糖和巴氯芬。

[0173] 本发明的另一目的在于，如上所定义的组合物用于控制有需要的哺乳动物中的血液或血浆葡萄糖水平的用途。

[0174] 本发明的又一目的在于，如上所定义的组合物在用于制造控制有需要的哺乳动物中的血液或血浆葡萄糖水平的药物中的用途。

[0175] 本发明的又一目的在于，如上所定义的组合物在用于制造治疗糖尿病或相关紊乱的药物中的用途。

[0176] 如前面所指出的，在本发明的组合物或组合治疗中，化合物或药物可共同配制或分别配制，并可共同给予、分别给予或依次给予。

[0177] 本发明特别适合用于校正患有糖尿病、前驱糖尿病（也称为IGT或IFG）、代谢综合征、肥胖症或暗示糖尿病倾向的心血管疾病的人类患者中的葡萄糖水平失调。

[0178] 本发明的另一目的是治疗糖尿病或相关紊乱的方法，所述方法包括同时、分别或依次向有需要的受试者给予有效量的如上定义的药物或药物组合。

[0179] 在优选的实施方式中，本发明涉及对有需要的受试者中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的方法，所述方法包括同时、分别或依次向受试者给予有效量的至少一种下述药物组合：

[0180] -艾芬地尔和阿坎酸；

[0181] -艾芬地尔和巴氯芬；

[0182] -巴氯芬和阿坎酸；

[0183] -美西律和西那卡塞；

[0184] -美西律和托拉塞米；

[0185] -磺胺异噁唑和托拉塞米；

[0186] -氮卓斯汀和尼麦角林；

[0187] -艾地苯醌和尼麦角林；

[0188] -喷托维林与尼麦角林；

[0189] -阿米三嗪和尼麦角林；

[0190] -西咪替丁和尼麦角林；

[0191] -乙胺嗪和尼麦角林；

[0192] -艾芬地尔和尼麦角林；

[0193] -氮卓斯汀和艾地苯醌；

[0194] -阿坎酸和尼麦角林；

[0195] -氮卓斯汀和喷托维林；

[0196] -氮卓斯汀和阿米三嗪；

[0197] -艾地苯醌和喷托维林；

[0198] -艾地苯醌和阿米三嗪；

- [0199] -氨基苯蝶啶和尼麦角林；
[0200] -D-甘露糖和尼麦角林；
[0201] -艾地苯醌和乙胺嗪；
[0202] -艾芬地尔和芬司匹利；
[0203] -艾芬地尔和托拉塞米；
[0204] -艾芬地尔和氨基苯蝶啶；
[0205] -艾芬地尔和托芬那酸；
[0206] -芬司匹利和托拉塞米；
[0207] -芬司匹利和氨基苯蝶啶；
[0208] -芬司匹利和托芬那酸；
[0209] -托拉塞米和氨基苯蝶啶；
[0210] -托拉塞米和托芬那酸；
[0211] -氨基苯蝶啶和托芬那酸；或
[0212] -D-甘露糖和巴氯芬。
[0213] 在具体的实施方式中，治疗糖尿病或相关紊乱的方法进一步包括在给药前和/或给药后对来自哺乳动物受试者的血液样品中的血糖水平进行测量的步骤。
[0214] 就这方面而言，本发明的另一目的是控制血糖水平的方法，所述方法包括以下步骤：
[0215] 1) 测量来自哺乳动物受试者的血液样品中的血糖水平，
[0216] 2) 向所述受试者给予有效量的上述公开的组合物。
[0217] 在本发明的方法中，例如为了评估或监测治疗有效性和/或调整治疗方案，可在治疗过程中重复测量血糖水平。
[0218] 通常，本发明的组合物包含一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。此外，为在本发明中使用，通常将药物或化合物与药学上可接受的赋形剂或载体进行混合。
[0219] 就这方面而言，本发明的另一目的是制备药物组合物的方法，所述方法包括将上述化合物在适当的赋形剂或载体中混合。
[0220] 根据本发明优选的实施方式，如上文所指出的，将化合物以其本身使用，或者以其药学上可接受的盐、前药、代谢物或缓释制剂的形式使用。
[0221] 尽管上述方法、组合物或联合疗法在体外和体内均非常有效，但取决于受试者或特定条件，上述方法、组合物或组合疗法还可进一步与另外的药物或治疗方法结合使用、或联合使用、或组合使用。
[0222] 与本发明所述的药物或药物组合相结合使用的不同的另外的糖尿病疗法可包括：一种或多种调节血糖水平的药物；一种或多种用于治疗高脂血症或高胆固醇血症的药物；一种或多种可用于临床试验或目前在临床试验中进行评估的、用于治疗糖尿病或相关病症的药物。优选的是，所述一种或多种药物选自：阿卡波糖、醋磺己脲、阿格列汀、小檗碱、苯扎贝特、溴隐亭、丁双胍、氨磺丁脲、氯磺丙脲、吡啶甲酸铬、环丙贝特、氯贝丁酯、考来维仑、右芬氟拉明、度格列汀、艾塞那肽、非诺贝特、吉非罗齐、吉格列汀、格列本脲、格列波脲、格列他尼、格列齐特、格列美脲、格列吡嗪、格列喹酮、格列生脲、格列吡脲、咪达普利、胰岛素、菊粉、硫辛酸、利拉利汀、利拉鲁肽、甲钴胺、二甲双胍、米格列醇、米格列奈、那格列奈、奥利司。

他、苯乙双胍、毗格列酮、普兰林肽、瑞格列奈、罗格列酮、沙格列汀、西他列汀、妥拉磺脲、甲苯磺丁脲、维格列汀和伏格列波糖。

[0223] 在下表2中提供这些化合物各自的示意性CAS号(副作用主要来自Sweetman S (Ed), Martindale: The complete drug reference. London: Pharmaceutical Press. Electronic version, (2011年版) 和Nathan等(2009) [9]):

[0224] 表2

药物名	CAS 号	副作用
胰淀素类似物		
普兰林肽	196078-30-5	胃肠、体重减轻
胰高血糖素样肽-1 受体激动剂		
艾塞那肽	141758-74-9	胃肠、
利拉鲁肽	204656-20-2	体重减轻
α -葡萄糖苷酶抑制剂		
阿卡波糖	56180-94-0	胃肠
米格列醇	72432-03-2	
伏格列波糖	83480-29-9	

二肽基肽酶 4 抑制剂		
阿格列汀	850649-62-6	
小檗碱	2086-83-1 ; 633-65-8 ; 633-66-9	
度格列汀	852329-66-9	
吉格列汀	911637-19-9	上呼吸道感染
利拉利汀	668270-12-0	
沙格列汀	361442-04-8	
西他列汀	654671-78-0	
维格列汀	274901-16-5	
格列奈类		
米格列奈	145375-43-5	体重增加、
那格列奈	105816-04-4	心血管并发症、
瑞格列奈	135062-02-1	低血糖
磺酰脲类		
醋磺己脲	968-81-0	
氨磺丁脲	339-43-5	
氯磺丙脲	94-20-2	
格列本脲	10238-21-8	
格列波脲	26944-48-9	
格列吡嗪	29094-61-9	
格列美脲	93479-97-1	
格列齐特	21187-98-4	
格列喹酮	33342-05-1	
格列生脲	32797-92-5	
格列吡脲	631-27-6	
甲苯磺丁脲	64-77-7	
妥拉磺脲	1156-19-0	
贝特类		
苯扎贝特	41859-67-0	
环丙贝特	52214-84-3	
氯贝丁酯	637-07-0 ; 882-09-7 ; 39087-48-4; 14613-30-0	胃肠、
非诺贝特	49562-28-9 (非诺贝特) ; 42017-89-0 (非诺贝酸) ; 856676-23-8	肌病
吉非罗齐	25812-30-0	
噻唑烷二酮类		
罗格列酮	122320-73-4; 302543-62-0; 155141-29-0; 397263-60-4	外周水肿、 充血性心力衰竭

[0226]

毗格列酮	111025-46-8; 112529-15-4	
双胍类		
丁双胍	1190-53-0	
二甲双胍	657-24-9; 1115-70-4	胃肠、乳酸性酸中毒
苯乙双胍	834-28-6	
其它		
溴隐亭	22260-51-1	胃肠、低血压、心血管并发症
吡啶甲酸铬	14639-25-9	N/A
考来维仑	182815-44-7	胃肠、高氯酸性酸中毒、血浆甘油三酯浓度增高
右芬氟拉明	3239-44-9	心血管并发症
咪达普利	89396-94-1	低血压、心血管并发症、肾损害、上呼吸道症状、胰腺炎
菊粉	9005-80-5	N/A
硫辛酸	62-46-4	N/A
甲钴胺	13422-55-4	N/A
奥利司他	96829-58-2	胃肠、肝毒性风险
胰岛素		
胰岛素	9004-10-8 ; 11070-73-8 ; 12584-58-6 ; 11061-68-0 ; 8063-29-4 ; 9004-21-1 ; 68859-20-1 ; 8049-62-5 ; 53027-39-7 ; 9004-17-5 ; 116094-23-6 ; 9004-12-0 ; 51798-72-2 ; 11091-62-6 169148-63-4; 160337-95-1; 207748-29-6; 133107-64-9; 874442-57-6	低血糖、体重增加

[0227] [0228] 就这方面而言,本发明的目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物受试者中的糖尿病或相关紊乱水平进行治疗方面的用途,所述组合物包含:

[0229] -选自于由以下化合物所组成的组中的至少一种化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氨来咕诺、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、非索非那定、艾芬地尔、美西律、尼麦角林、托哌酮、托拉塞米、氨苯蝶啶、托芬那酸、毗贝地尔、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌和利美尼定;以及

[0230] -至少一种化合物,所述化合物选自于由以下化合物所组成的组:阿卡波糖、醋磺己脲、阿格列汀、小檗碱、苯扎贝特、溴隐亭、丁双胍、氨磺丁脲、氯磺丙脲、吡啶甲酸铬、环丙贝特、氯贝丁酯、考来维仑、右芬氟拉明、度格列汀、艾塞那肽、非诺贝特、吉非罗齐、吉格列汀、格列本脲、格列波脲、格列他尼、格列齐特、格列美脲、格列吡嗪、格列喹酮、格列生脲、格

列吡脲、咪达普利、胰岛素、菊粉、硫辛酸、利拉利汀、利拉鲁肽、甲钴胺、二甲双胍、米格列醇、米格列奈、那格列奈、奥利司他、苯乙双胍、吡格列酮、普兰林肽、瑞格列奈、罗格列酮、沙格列汀、西他列汀、妥拉磺脲、甲苯磺丁脲、维格列汀和伏格列波糖。

[0231] 本发明的另一优选的目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物受试者中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途，所述组合物包含：(i) 选自于由以下化合物所组成的组中的化合物：阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、艾芬地尔、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、氨苯蝶啶或托拉塞米；以及(ii) 与(i) 中的化合物相组合的选自于由以下化合物所组成的组中的化合物：阿卡波糖、醋磺己脲、阿格列汀、小檗碱、苯扎贝特、溴隐亭、丁双胍、氨磺丁脲、氯磺丙脲、吡啶甲酸铬、环丙贝特、氯贝丁酯、考来维仑、右芬氟拉明、度格列汀、艾塞那肽、非诺贝特、吉非罗齐、吉格列汀、格列本脲、格列波脲、格列他尼、格列齐特、格列美脲、格列吡嗪、格列喹酮、格列生脲、格列吡脲、咪达普利、胰岛素、菊粉、硫辛酸、利拉利汀、利拉鲁肽、甲钴胺、二甲双胍、米格列醇、米格列奈、那格列奈、奥利司他、苯乙双胍、吡格列酮、普兰林肽、瑞格列奈、罗格列酮、沙格列汀、西格列汀、妥拉磺脲、甲苯磺丁脲、维格列汀和伏格列波糖。

[0232] 本发明的甚至更优选的目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物受试者中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途，所述组合物包含：选自于由格列本脲、瑞格列奈、二甲双胍和吡格列酮所组成的组中的化合物；以及与上述化合物相组合的选自于由以下化合物所组成的组中的化合物：阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、艾芬地尔、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、托拉塞米或氨苯蝶啶。

[0233] 本发明的非常优选的目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物中的糖尿病或相关病症进行治疗方面的用途，所述组合物包含与二甲双胍相组合的选自于由以下化合物所组成的组中的化合物：阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、艾芬地尔、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、托拉塞米或氨苯蝶啶。

[0234] 本发明的更优选的目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物受试者中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途，所述组合物包含：(i) 选自于由以下化合物所组成的组中的至少两种化合物：阿坎酸、阿米三嗪、氨来咕诺、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、非索非那定、艾芬地尔、美西律、尼麦角林、托哌酮、托拉塞米、氨苯蝶啶、托芬那酸、吡贝地尔、左西孟旦、西咪替丁、二羟丙茶碱、艾地苯醌和利美尼定；以及选自于由以下化合物所组成的组中的化合物：阿卡波糖、醋磺己脲、阿格列汀、小檗碱、苯扎贝特、溴隐亭、丁双胍、氨磺丁脲、氯磺丙脲、吡啶甲酸铬、环丙贝特、氯贝丁酯、考来维仑、右芬氟拉明、度格列汀、艾塞那肽、非诺贝特、吉非罗齐、吉格列汀、格列本脲、格列波脲、格列他尼、格列齐特、格列美脲、格列吡嗪、格列喹酮、格列生脲、格列吡脲、咪达普利、胰岛素、菊粉、硫辛酸、利拉利汀、利拉鲁肽、甲钴胺、二甲双胍、米格列醇、米格列奈、那格列奈、奥利司他、苯乙双胍、吡格列酮、普兰林肽、瑞格列奈、罗格列酮、沙格列汀、西他列汀、妥拉磺脲、甲苯磺丁脲、维格列汀和伏格列波糖。

[0235] 本发明的更优选的目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物

受试者中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含:

[0236] -选自于由以下化合物所组成的组中的至少两种化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、艾芬地尔、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、托拉塞米或氨苯蝶啶;

[0237] -与上述化合物相组合的选自于由以下化合物所组成的组中的化合物:阿卡波糖、醋磺己脲、阿格列汀、小檗碱、苯扎贝特、溴隐亭、丁双胍、氨磺丁脲、氯磺丙脲、吡啶甲酸铬、环丙贝特、氯贝丁酯、考来维仑、右芬氟拉明、度格列汀、艾塞那肽、非诺贝特、吉非罗齐、吉格列汀、格列本脲、格列波脲、格列他尼、格列齐特、格列美脲、格列吡嗪、格列喹酮、格列生脲、格列吡脲、咪达普利、胰岛素、菊粉、硫辛酸、利拉利汀、利拉鲁肽、甲钴胺、二甲双胍、米格列醇、米格列奈、那格列奈、奥利司他、苯乙双胍、吡格列酮、普兰林肽、瑞格列奈、罗格列酮、沙格列汀、西他列汀、妥拉磺脲、甲苯磺丁脲、维格列汀和伏格列波糖。

[0238] 本发明的甚至更优选的目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物受试者中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含与选自于由格列本脲、瑞格列奈、二甲双胍和吡格列酮所组成的组中的一种化合物相组合的选自于由以下化合物所组成的组中的至少两种化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、艾芬地尔、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、托拉塞米或氨苯蝶啶。本发明的另一优选的目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物受试者中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含与选自于由苯扎贝特、环丙贝特、氯贝丁酯、吉非罗齐、非诺贝特、奥利司他所组成的组中的一种化合物相组合的选自于由以下化合物所组成的组中的至少两种化合物:阿坎酸、阿米三嗪、氮卓斯汀、巴氯芬、喷托维林、西那卡塞、右溴苯那敏、乙胺嗪、D-甘露糖、芬司匹利、艾芬地尔、左西孟旦、美西律、尼麦角林、托芬那酸、托哌酮、托拉塞米或氨苯蝶啶。

[0239] 本发明的另一优选的目的涉及如下组合物以及此类组合物在对有需要的哺乳动物受试者中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途,所述组合物包含与巴氯芬和阿坎酸相组合的选自于由吡格列酮、罗格列酮、苯扎贝特、环丙贝特、氯贝丁酯、非诺贝特、吉非罗齐、丁双胍、考来维仑、奥利司他所组成的组中的一种化合物。

[0240] 本发明更优选的目的涉及如下组合物,所述组合物包含与下列化合物组合中的至少一种相组合的二甲双胍:

[0241] -艾芬地尔和阿坎酸;

[0242] -艾芬地尔和巴氯芬;

[0243] -巴氯芬和阿坎酸;

[0244] -美西律和西那卡塞;

[0245] -美西律和托拉塞米;

[0246] -磺胺异噁唑和托拉塞米;

[0247] -氮卓斯汀和尼麦角林;

[0248] -艾地苯醌和尼麦角林;

[0249] -喷托维林与尼麦角林;

[0250] -阿米三嗪和尼麦角林;

- [0251] -西咪替丁和尼麦角林；
- [0252] -乙胺嗪和尼麦角林；
- [0253] -艾芬地尔和尼麦角林；
- [0254] -氮卓斯汀和艾地苯醌；
- [0255] -阿坎酸和尼麦角林；
- [0256] -氮卓斯汀和喷托维林；
- [0257] -氮卓斯汀和阿米三嗪；
- [0258] -艾地苯醌和喷托维林；
- [0259] -艾地苯醌和阿米三嗪；
- [0260] -氨苯蝶啶和尼麦角林；
- [0261] -D-甘露糖和尼麦角林；
- [0262] -艾地苯醌和乙胺嗪；
- [0263] -艾芬地尔和芬司匹利；
- [0264] -艾芬地尔和托拉塞米；
- [0265] -艾芬地尔和氨苯蝶啶；
- [0266] -艾芬地尔和托芬那酸；
- [0267] -芬司匹利和托拉塞米；
- [0268] -芬司匹利和氨苯蝶啶；
- [0269] -芬司匹利和托芬那酸；
- [0270] -托拉塞米和氨苯蝶啶；
- [0271] -托拉塞米和托芬那酸；
- [0272] -氨苯蝶啶和托芬那酸；或
- [0273] -D-甘露糖和巴氯芬。

[0274] 本发明的另一更优选的目的涉及此类组合物在对有需要的哺乳动物受试者中的糖尿病或相关紊乱进行治疗方面的用途。包含本发明的一种或多种药物、在表2中所列的已知药物、或它们的组合的上述组合物，使得降低了这些药物用于糖尿病治疗的剂量。这一降低使得能够避免或延缓这些药物的已知缺点的呈现(表2；例如，随时间而增高的对治疗的抗性、体重增加、外周水肿、由乳酸性酸中毒造成的肾毒性)。

[0275] 如前文所述，在上述的组合疗法中，根据各药物的特定药代动力学特征，药物可共同给予或分别给予、同时给予或依次给予，从而在生物体中产生组合效应或协同效应。

[0276] 还可将上述组合与调节血糖水平的任何另外的疗法结合使用；具体而言，此类疗法可为，众所周知的糖尿病特定饮食(高膳食纤维、低脂肪、低糖)；作为肉桂(*Cinnamomum cassia*)、辣木、人参、武靴叶、芦荟、核桃叶、月桂、大蒜、多叶奇果菌(*grifola frondosa*)、蕈、姬松茸(*Agaricus blazei*)、茶树菇(*Agrocybe cylindracea*)、冬虫夏草、仙鹤草、苜蓿、芫荽、桉树、杜松的部分或其提取物的天然补充剂；以及微量元素，如铬、钒、镁或锌。

[0277] 本发明所述的疗法可在家、医生办公室、诊所、医院门诊部或医院提供，以便人们可密切地观察所述疗法的效果，并随所测量的血糖水平的需要而作出任何调整。

[0278] 疗法的持续时间取决于所治疗疾病的阶段、患者的年龄和状况、以及患者对治疗的响应情况。可独立地对给药的剂量、频率和方式或本发明的药物组合的成分进行控制。例

如,组合的一种药物可口服给予,而第二种药物可经肌内给予,或者在一天内的不同时间给予。还可将药物配制在一起,从而使一次给予递送所有的药物。

[0279] 本发明的治疗可在一天中的特定时段内给予,例如,当葡萄糖浓度达到其在血浆中的峰值时、或刚好在此之前或之后。甚至通过患者自己使用不同的可商购的血糖仪也可容易地确定血糖。因此,可使治疗的时间和剂量适于所测定的血糖。如果是连续给予,则给予可取决于血糖浓度,例如,在葡萄糖峰值前给予第一种活性成分,而在葡萄糖峰值后给予另外的活性成分。通常,受试者血浆中的葡萄糖浓度在餐后达到峰值。

[0280] 可通过任何合适的方式使组合的各药物的给予与另外的成分组合,使得药物的浓度能够控制血糖水平。

[0281] 尽管药物或组合的药物可作为纯化学品给予,但优选以药物组合物的形式给予,在本文中还称作药物制剂。可能的组合物包括适于口服给予、直肠给予、局部给予(包括经皮给予、口腔给予和舌下给予)或肠胃外给予(包括皮下给予、肌内给予、静脉内给予和皮内给予)给予的组合物。

[0282] 更常见的是,将这些药物制剂以包含许多剂量单位或者用于给予计量单位剂量的另外的方式的“患者包(patient packs)”的形式向患者开药,从而以单一包装(通常为铝塑包装)在不同的治疗时期使用。与传统处方相比,患者包的优点在于,药剂师从批量的供应商中分选出患者的药物供给,以使患者总能够接触到包含在患者包中的药品说明书(这在传统处方中一般是缺失的)。已显示出包含药品说明书可改善患者对医师指示的依从性。因此,如本文之前所述,本发明进一步包括药物制剂以及适用于所述制剂的包装材料。在此类的患者包中,可通过说明书、辅助物(facilities)、规定、适应症和/或其它手段推断剂型用于组合治疗的预期用途,从而帮助使用最适合于治疗的制剂。此类措施使患者包特别适合于并且适用于用本发明的组合物进行的治疗。

[0283] 药物能够以任何适当的量包含在任何合适的载体物质中。药物能够以高达组合物总重量的99wt%的量存在。能够以适于口服、肠胃外(例如,静脉内、肌内)、直肠、表皮(cutaneous)、鼻、阴道、吸入、皮肤(贴片)或眼部给予途径的剂型提供组合物。因此,组合物可处于以下形式,例如片剂、胶囊剂、丸剂、散剂、颗粒剂、混悬剂、乳剂、溶液剂、含有水凝胶的凝胶剂、糊剂、软膏剂、霜剂、硬膏剂、顿服药、渗透递送装置、栓剂、灌肠剂、注射剂、植入物、喷雾剂或气雾剂。

[0284] 可按照常规的药物实践配制药物组合物(参见例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy(第20版),A.R.Gennaro,Lippincott Williams&Wilkins编著,2000和Encyclopedia of Pharmaceutical Technology,J.Swarbrick和J.C.Boylan编著,1988-1999,Marcel Dekker,New York)。

[0285] 可配制本发明所述的药物组合物,从而在给予后立即释放活性药物、或在给予后的任何预定时间或时间段释放活性药物。

[0286] 控释制剂包括:(i)在长的时间段内,使体内药物浓度基本上保持不变的制剂;(ii)在预定的滞后时间之后在长的时间段内,使体内药物浓度基本上保持不变的制剂;(iii)伴随着与活性药物物质的血浆水平的波动有关的不期望的副作用的最小化,通过在体内保持相对且恒定的有效药物水平,在预定的时间段内保持药物活性的制剂;(iv)通过例如将控释组合物空间定位至疾病组织或器官附近、或定位至疾病组织或器官中,使药物

在局部发挥活性的制剂；以及(v)通过使用载体或化学衍生物以将药物递送至特定的靶细胞类型，从而靶向药物活性的制剂。

[0287] 处于控释制剂形式的药物的给予特别优选在以下情况进行，其中，所述药物具有：(i)窄的治疗指数(即，导致有害副作用或毒性反应的血浆浓度与导致治疗效果的血浆浓度之间的差别小；一般来说，将治疗指数TI定义为中值致死剂量(LD₅₀)与中值有效剂量(ED₅₀)的比值)；(ii)窄的胃肠道中的吸收窗；或(iii)非常短的生物半衰期，从而使得需要在一天中频繁给药，以将血浆水平维持在治疗水平。

[0288] 为获得控释效果，可实施大量策略中的任何策略，其中，释放的速率比所讨论的药物的代谢速率更快。通过对多种配制参数和成分、包括例如多种类型的控释组合物和涂层进行适当选择，获得控释。因此，将药物与适当的赋形剂配制成药物组合物，在给药时以受控的方式释放药物(单一或多个单位的片剂或胶囊组合物、油溶液、混悬剂、乳剂、微胶囊、微球、纳米颗粒、贴剂和微脂粒)。

[0289] 口服使用的固体剂型

[0290] 口服使用的制剂包括片剂，所述片剂含有与无毒的药学上可接受的赋形剂混合的本发明的组合物。这些赋形剂可为，例如惰性稀释剂或填充剂(例如蔗糖、微晶纤维素、包括马铃薯淀粉在内的淀粉、碳酸钙、氯化钠、磷酸钙、硫酸钙或磷酸钠)；制粒剂和崩解剂(例如，包括微晶纤维素在内的纤维素衍生物、包括马铃薯淀粉在内的淀粉、交联羧甲基纤维素钠、藻酸盐/酯或藻酸)；粘合剂(例如，金合欢胶、藻酸、藻酸钠、明胶、淀粉、预胶化淀粉、微晶纤维素、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮或聚乙二醇)；以及润滑剂、助流剂和抗粘附剂(例如，硬脂酸、氧化硅或滑石)。另外的药学上可接受的赋形剂可为着色剂、矫味剂、增塑剂、保湿剂和缓冲剂等。

[0291] 片剂可为非包衣的，或者可通过已知技术任选地对片剂进行包衣，以延迟在胃肠道中的崩解和吸收，从而在较长的时间内提供持久的作用。包衣可适合于以预定的模式释放活性药物物质(例如，以实现控释制剂)，或者包衣可适合于不释放活性药物物质直至经过胃部之后(肠溶包衣)。包衣可为糖包衣、薄膜包衣(例如，基于羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、甲基羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、丙烯酸酯共聚物、聚乙二醇和/或聚乙烯吡咯烷酮的包衣)或肠溶包衣(例如，基于甲基丙烯酸共聚物、乙酸纤维素邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、乙酸羟丙基甲基纤维素琥珀酸酯、聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯、虫胶和/或乙基纤维素的包衣)。可采用时间延迟材料，例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0292] 固体片剂组合物可包含适合于防止组合物发生不希望的化学变化的包衣(例如，活性药物物质释放之前的化学降解)。所述包衣能够以类似于Encyclopedia of Pharmaceutical Technology中所述的方式施用至固体剂型上。

[0293] 在片剂中，药物可混合在一起、或者分隔开。例如，第一种药物包含在片剂内部，并且第二种药物在外部，从而使在释放第一种药物之前释放出大部分的第二种药物。

[0294] 口服使用的制剂还可作为咀嚼片剂或硬明胶胶囊存在(其中的活性成分与惰性固体稀释剂(例如，马铃薯淀粉、微晶纤维素、碳酸钙、磷酸钙或高岭土)混合)、或者作为软明胶胶囊存在(其中的活性成分与水或油介质(例如，液体石蜡或橄榄油)混合)。散剂和颗粒剂能够以常规的方式使用上述在片剂和胶囊剂时提到的成分来制备。

[0295] 可例如构建用于口服使用的控释组合物,从而通过控制活性药物物质的溶解和/或扩散来释放活性药物。

[0296] 可通过对药物的片剂、胶囊剂、丹剂或颗粒制剂进行合适的包衣,或者通过将药物掺入到适合的基质中,实现扩散或溶解控释。控释包衣可包括上文提及的一种或多种包衣物质,和/或包括例如虫胶、蜂蜡、糖蜡(glycowax)、蓖麻蜡、巴西棕榈蜡、硬脂醇、单硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、棕榈酸硬脂酸甘油酯、乙基纤维素、丙烯酸树脂、d1-聚乳酸、乙酸纤维素丁酸酯、聚氯乙烯、聚乙酸乙烯酯、乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯、聚甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、2-羟基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸酯水凝胶、1,3-丁二醇、乙二醇甲基丙烯酸酯、和/或聚乙二醇。在控释基质制剂中,基质材料还可包括例如水合甲基纤维素、巴西棕榈蜡和硬脂醇、聚羧乙烯934、硅酮、三硬脂酸甘油酯、丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸甲酯、聚氯乙烯、聚乙烯和/或卤代碳氟化合物。

[0297] 含有一种或多种所请求保护的组合的药物的控释组合物还可处于漂浮片剂(buoyant tablet)或胶囊剂的形式(即,在口服给予时,在一定的时间段内浮在胃的内容物顶部的片剂或胶囊剂)。药物的漂浮片剂制剂可通过将具有赋形剂的药物与20%-75%w/w水胶体的混合物制粒而制备,所述水胶体例如羟乙基纤维素、羟丙基纤维素或者羟丙基甲基纤维素。然后,可将所获得的颗粒压制片剂。在与胃液接触时,片剂在其表面周围形成基本上不透水的凝胶屏障。该凝胶屏障参与了维持密度小于1,从而允许片剂保持漂浮在胃液中。

[0298] 用于口服给予的液体

[0299] 适于通过加入水而制备水性混悬剂的散剂、可分散散剂或颗粒剂是用于口服给予的方便的剂型。作为混悬剂的制剂提供了与分散剂或润湿剂、混悬剂以及一种或多种防腐剂混合的活性成分。合适的悬浮剂为例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、藻酸钠等。

[0300] 肠胃外组合物

[0301] 药物组合物还能够以剂型、制剂的形式通过注射、输注或植入(静脉内、肌内、皮下等)经肠胃外给予,或者经由合适的递送装置或含有常规的且无毒的药学上可接受的载体和佐剂的植入物经肠胃外给予。此类组合物的制剂和制品为药物制剂领域中的技术人员所公知。

[0302] 肠胃外使用的组合物能够以单位剂型(例如,在单剂量安瓿瓶中)、或以含有多重剂量的小瓶提供,并且其中可加入合适的防腐剂(参见下文)。组合物可处于溶液剂、混悬剂、乳剂、输注装置或用于植入的递送装置的形式,或者组合物可作为干粉存在,以在使用前用水或另外的合适的溶媒复原。除活性药物外,组合物可包含合适的肠胃外可接受的载体和/或赋形剂。可将活性药物掺入用于控释的微球、微胶囊、纳米颗粒、微脂粒等中。组合物可包含混悬剂、增溶剂、稳定剂、pH调节剂和/或分散剂。

[0303] 本发明所述的药物组合物可处于适用于无菌注射的形式。为制备此类组合物,将合适的活性药物溶于或悬浮于肠胃外可接受的液体溶媒中。在可使用的可接受的溶媒和溶剂中,可使用水,通过加入适量的盐酸、氢氧化钠或合适的缓冲液、1,3-丁二醇、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液将水调节至合适的pH值。水性制剂还可包含一种或多种防腐剂(例如,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯)。在药物中的一种仅少量或微溶于水的情况下,可加入溶解增强剂或增溶剂,或者溶剂可包含10%-60%w/w的丙二醇等。

[0304] 控释的肠胃外组合物可处于水性混悬剂、微球、微胶囊、磁性微球、油溶液剂、油混悬剂或乳剂的形式。或者,可将活性药物掺入至生物相容的载体、微脂粒、纳米颗粒、植入物或输注装置中。在制备微球体和/或微胶囊中使用的材料为例如可生物降解/可生物蚀解的聚合物,例如聚乳酸羟基乙酸(polygalactin)、聚(异丁基氰基丙烯酸酯)、聚(2-羟乙基-L-谷氨酰胺)。当配制控释的肠胃外制剂时,可使用的生物相容载体为碳水化合物(例如葡聚糖)、蛋白质(例如白蛋白)、脂蛋白或抗体。植入物中使用的材料可为不可生物降解的(例如,聚二甲基硅氧烷)、或可生物降解的(例如,聚(己酸内酯)、聚(乙醇酸)或聚(原酸酯))。

[0305] 替代途径

[0306] 尽管不太优选并且不太方便,但可考虑另外的给予途径,以及由此可考虑另外的制剂。在这方面,为了直肠应用,组合物的合适剂型包括栓剂(乳剂或混悬剂类型)和直肠明胶胶囊(溶液剂或混悬剂)。在典型的栓剂制剂中,活性药物与适当的药学上可接受的栓剂基质(例如可可脂、酯化的脂肪酸、甘油化的明胶、以及诸如聚乙二醇的多种水溶性或可分散的基质)相结合。可掺入多种添加剂、增强剂或表面活性剂。

[0307] 药物组合物还能够以含有常规、无毒的药学上可接受的载体和赋形剂(包括微球和微脂粒)的剂型或制剂局部地施用于皮肤上,用于经皮吸收。制剂包括霜剂、软膏剂、洗剂、搽剂、凝胶剂、水凝胶、溶液剂、混悬剂、药棒(sticks)、喷雾剂、糊剂、硬膏剂和另外类型的经皮药物递送系统。药学上可接受的载体或赋形剂可包括乳化剂、抗氧化剂、缓冲剂、防腐剂、保湿剂、渗透增强剂、螯合剂、凝胶形成剂、软膏基质、香料和皮肤保护剂。

[0308] 防腐剂、保湿剂、渗透增强剂可为对羟基苯甲酸酯(例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯)、以及苯扎氯铵、甘油、丙二醇和尿素等。

[0309] 上述用于在皮肤上局部给予的药物组合物还可与在待治疗的机体的部分上的局部给予、或在待治疗的机体的部分附近的局部给予联合使用。组合物可适于直接施用、或者通过特定的药物递送装置施用,所述药物递送装置例如敷料、或者贴膏(plasters)、垫、海绵、条带或其它形式的合适的柔性材料。

[0310] 治疗的剂量和持续时间

[0311] 在一天的不同时间点,通过口服、或者经皮下注射、静脉内注射或肌内注射将本发明所述的组合物给予受试者,从而改变血糖水平。在进行这一方法中,当期望对哺乳动物的血糖水平进行改变、调节或正常化以治疗糖尿病或相关紊乱、或者同时治疗两者时,将本发明的组合物以足以改变、调节或使受试者血液中葡萄糖水平正常化的剂量给予。在一天的特定时间段内,例如当葡萄糖浓度刚好达到其在血浆中的峰值时、或者在刚好达到峰值之前或之后,可将本发明的组合物给予显示出异常血糖水平的哺乳动物、特别是人类。哺乳动物血液中的葡萄糖水平是时段相关的(time-of-day dependent),并且是周期性的。在一天的不同时间点,血液中的葡萄糖水平优先取决于进食时间以及身体活动/锻炼时间而上升和下降。通常,葡萄糖浓度在餐后达到其在受试者血浆中的峰值,因此,本发明的组合物可在例如优选餐前2小时至餐后2小时、更优选餐前1小时至餐后1小时、甚至更优选在进食期间给予,以达到最大的治疗作用。

[0312] 将能理解的是,组合的药物能够以相同或不同的药物制剂同时给予或依次给予。对本说明书所述的组合的最低要求是所述组合应该旨在与活性成分的组合的有效作用的益处组合而使用。组合的预期用途可通过工具(facilities)、规定、适应症和/或其它方式

进行推断,以帮助使用本发明所述的组合。

[0313] 在本发明的组合中的药物的治疗有效量包括例如有效用于控制血液或血浆葡萄糖水平的量。

[0314] 给予可每天一次至数次,持续数天至数年,甚至可能对患者终生给予。在大多数情况下,需要长久或至少周期性重复的长期给予。

[0315] 术语“单位剂量型”是指适合作为用于人类受试者的单一剂量的物理上离散的单位(例如胶囊剂、片剂或装药的注射针筒),各单位含有经计算产生期望治疗效果的预定量的活性物质或材料以及所需的药物载体。

[0316] 在优选的单位剂量组合物中的各药物的量取决于多种因素,所述因素包括:给予方法、患者的体重和年龄、疾病的阶段、考虑到待治疗的人的总体健康状况的潜在副作用的风险。此外,特定患者的药物基因组学信息(基因型对药物动力学、药效学或治疗有效性的影响)可能会影响所使用的剂量。

[0317] 除了当响应于特别受损的葡萄糖水平时可能需要更高的剂量之外,组合物中的各药物的优选剂量处于不高出通常用于长期维持性治疗或在3期临床研究中证明安全的剂量的范围内。

[0318] 本发明的一个显著优点是,在组合治疗中,各化合物能够以低剂量使用,同时对患者产生组合的实质性的临床收益。在化合物单独使用时具有低的效果或无效果时的剂量下,组合治疗能够在实际上有效。因此,本发明特别的优点在于,能够使用各化合物的亚最佳剂量,即,比起通常所规定的治疗剂量而言更低的剂量、优选治疗剂量的1/2,更优选治疗剂量的1/3、1/4、1/5,或甚至更优选治疗剂量的1/10。在具体实例中,使用治疗剂量的1/20、1/30、1/50、1/100、或甚至更低的剂量。

[0319] 在此类亚治疗剂量下,化合物将表现出没有副作用或较少的副作用,而本发明所述的组合在控制血液或血浆中的葡萄糖水平方面完全有效。

[0320] 优选的剂量相当于通常用于长期维持性治疗的规定剂量的1%至50%的量。

[0321] 最优选的剂量可相当于通常用于长期维持性治疗的规定剂量的1%至10%的量。

[0322] 下面提供了在本发明中使用的药物剂量的具体实例:

[0323] -阿坎酸,口服每天约9mg至200mg;

[0324] -阿米三嗪,口服每天约0.5mg至10mg;

[0325] -氨来咕诺,口服每天约0.75mg至15mg;

[0326] -氮卓斯汀,口服每天约0.04mg至0.4mg;

[0327] -巴氯芬,口服每天约0.15mg至50mg;

[0328] -喷托维林,口服每天约0.6mg至18mg;

[0329] -西咪替丁,口服每天约4mg至160mg;

[0330] -西那卡塞,口服每天约0.3mg至36mg;

[0331] -D-甘露糖,口服每天0.01g至1.6g;

[0332] -右溴苯那敏,口服每天约0.06mg至1.2mg,;

[0333] -乙胺嗪,口服每天约0.6mg至600mg;

[0334] -二羟丙茶碱,口服每天约9mg至320mg;

[0335] -芬司匹利,口服每天1.6mg至24mg;

- [0336] -非索非那定,口服每天1.2mg至18mg;
- [0337] -艾地苯醌,口服每天约4.5mg至225mg;
- [0338] -艾芬地尔,口服每天约0.4mg至6mg;
- [0339] -左西孟旦,口服每天约0.05mg至4mg;
- [0340] -二甲双胍,口服每天约1mg到2.5mg;
- [0341] -美西律,口服每天约6mg至120mg;
- [0342] -尼麦角林,口服每天约0.6mg至6mg;
- [0343] -毗贝地尔,口服每天约0.8mg至25mg;
- [0344] -利美尼定,口服每天约10 μ g至200 μ g;
- [0345] -托哌酮,口服每天约1.5mg至4.5mg;
- [0346] -托芬那酸,口服每天约3mg至60mg;
- [0347] -托拉塞米,口服每天约0.05mg至4mg;
- [0348] -氨基蝶啶,口服每天约1.5mg至25mg。

[0349] 在本发明的组合中,药物之间的摩尔比可从例如0.001变化至1000。此外,在本发明的组合物中,药物与赋形剂之间的比优选在0.001至1000之间变化。

[0350] 将能理解的是,实际给予的药物的量将由医生根据相关情况确定,所述相关情况包括:待治疗的一种或多种病症;待给予的确切的组合物;个体患者的年龄、体重和响应;患者症状的严重程度;以及所选择的给予途径。因此,上述剂量范围旨在提供一般性指导和对本文教导的支持,但并不旨在对本发明的范围进行限制。

[0351] 以下实施例仅用于说明目的,而并非进行限制。

[0352] 实施例

[0353] 糖尿病是极度影响能量稳态的代谢性疾病,并且在患者中观察到的葡萄糖的高血浆水平可具有多种诱因。1型糖尿病的特征在于胰岛的 β 细胞的破坏。2型糖尿病的特征部分上在于,通过胰腺 β 细胞产生的胰岛素减少、 β 细胞渐进性死亡、胰岛素抵抗(即,肌细胞和脂肪细胞对葡萄糖的较低的捕获)、或肝糖异生的异常升高。因此,基于数种的体外和体内研究进行候选化合物的疗效确定,以解决(address)表征该复杂的病理学的大多数的代谢和生理损伤。首先对药物进行单独测试,然后试验它们的组合作用。给予多种模型确定药物的活性,这表明了代表血糖水平异常的不同生理特征,例如糖尿病或相关紊乱中涉及的血糖水平。

[0354] 1. 体外研究

[0355] 1.1 β 细胞凋亡的预防

[0356] 已对本发明的药物保护 β 细胞避免细胞凋亡的作用进行了试验。可考虑在1型糖尿病以及2型糖尿病中应用该活性。

[0357] 细胞培养和培养基

[0358] 选择 β 胰腺INS-1细胞用于该项研究。细胞在完全培养基中进行培养,所述完全培养基如由Asfari等(23)描述的补充有1mM丙酮酸钠、50 μ M 2-巯基乙醇、2mM谷氨酰胺、10mM HEPES、100IU/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素和10%热灭活的胎牛血清(FCS)的RPMI 1640 10mM葡萄糖。将INS-1细胞接种入聚鸟氨酸包被的96孔板中(4.5×10^4 细胞/孔),并在37°C下于95%空气/5%CO₂的潮湿气氛中培养。一天后,将细胞与测试分子预孵育1小时。然后,

在更换培养基后,将细胞在含有测试分子和葡萄糖30mM、肉豆蔻酸0.05mM、INF 25ng/mL、TNF 25ng/mL和IL 5ng/mL的培养基中培养24小时。

[0359] 细胞凋亡的定量

[0360] 随后,通过来自Chemicon的高度特异性凋亡检测试剂盒,对化合物预防细胞凋亡的效力进行评价(Ref. APT225)。该过程基于单链DNA(ssDNA)的测定,所述单链DNA为凋亡细胞的特异性标记物(24)。

[0361] 结果以光密度(OD)任意单位和由凋亡情况诱导的细胞凋亡减少的%表示。接着进行Dunnett t-检验,与凋亡对照条件相比,显示出凋亡细胞的%显著下降的所有化合物均被认为具有活性。

[0362] 结果

[0363] 结果示于图1和表3中,结果表明,当对本发明的药物单独进行测试时,诱导了针对 β 细胞凋亡的实质性的保护作用。在图1中,当与处于凋亡条件的未经处理的细胞相比时,D-甘露糖诱导了针对细胞凋亡的显著并且完整的 β 细胞的保护。D-甘露糖赋予了超过129%的避免细胞凋亡的保护。同样地,表3示出了由本发明的药物赋予的保护的百分比。

[0364] 表3

[0365]

药物	细胞凋亡降低的百分比
D-甘露糖	129%
美西律	74%
托哌酮	78%
巴氯芬	84%
西那卡塞	167%
右溴苯那敏	76%
乙胺嗪	44%
尼麦角林	112%
托拉塞米	67%
氨苯蝶啶	64%
阿米三嗪	103%
氮卓斯汀	81%
阿坎酸	49%
喷托维林	103%
艾芬地尔	54%
左西孟旦	118%

[0366] 1.2响应于葡萄糖刺激的胰岛素分泌

[0367] 细胞培养和培养基

[0368] 选择 β 胰腺INS-1细胞用于研究它们响应于如下物质的胰岛素分泌性质:葡萄糖和另外的生理学或药理学胰岛素促分泌素(如磺酰脲和GLP-1)。细胞在完全培养基中进行培养,所述完全培养基如由Asfari等(23)描述的补充有1mM丙酮酸钠、50 μ M 2-巯基乙醇、2mM谷氨酰胺、10mM HEPES、100IU/mL青霉素、100 μ g/ml链霉素和10%热灭活的胎牛血清(FCS)

的RPMI 1640 10mM葡萄糖。为进行胰岛素分泌试验,将INS-1细胞接种(4.5×10^4 细胞/孔)并培养于聚鸟氨酸包被的96孔板中。在37℃下于95%空气/5%CO₂的潮湿气氛中培养三天之后,移除培养基,并将细胞在含有5mM葡萄糖、1%FCS(以及用于长期评价的测试药物)的培养基中培养16h。

[0369] 在胰岛素分泌试验的当天,用Krebs-Ringer Bicarbonate HEPES缓冲液(KRBH;pH 7.4)0.1%的Bovin Serum Albumin(BSA)对细胞进行漂洗,并在含有2.8mM葡萄糖的KRBH 0.1%BSA中于37℃下预孵育30min。

[0370] 再次用KRBH漂洗细胞,并在含有3.5mM葡萄糖和测试分子的KRBH 0.1%BSA中孵育1小时。收集上清液用于胰岛素的确定和乳酸脱氢酶(LDH)活性的测量。

[0371] 胰岛素的定量

[0372] 根据制造商的建议,使用大鼠胰岛素抗体(胰岛素大鼠高范围ELISA Alpco Cat no 80-INSRTH-E10),通过ELISA试剂盒对在所收集的上清液中的胰岛素浓度进行测定。非常简要地说,将对胰岛素具有特异性的大鼠单克隆抗体固定至96孔板。向合适的孔中加入标准品、样品和对照品,所述孔具有辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体(缀合物)。在孵育后,对微孔板进行漂洗以移除未结合的缀合物,并加入TMB底物溶液与结合的缀合物进行反应。最后,在加入终止溶液后,使用620nm作为参考波长,在450nm下对光密度进行测量。黄色的强度与样品中的胰岛素的量直接成正比。

[0373] 通过对培养基中存在或不存在本发明的药物的情况下分泌的胰岛素的量(以pmol/L表示)进行评价,从而显示出药物的效力。

[0374] 结果

[0375] 本发明的药物诱导了响应于葡萄糖刺激的胰岛素分泌。例如,图2和图3显示出氨苯喋啶(10μM,+37%)和西那卡塞(1μM,+55%)分别能够显著提高响应于葡萄糖刺激的胰岛素分泌,随后分别进行短期或长期的孵育。

[0376] 1.3在肌肉或脂肪细胞中的葡萄糖摄取

[0377] 1.3.1在小鼠肌细胞中的葡萄糖摄取

[0378] 已在用于胰岛素抵抗的多种模型中对本发明的药物进行了测试。在处于正常或病理状况下的肌细胞和脂肪细胞中,对本发明组合物的葡萄糖摄取增强能力进行了测量。根据培养条件,肌细胞显示出连续的有丝分裂、或最终分化为肌管。

[0379] 细胞培养和培养基

[0380] 如此前由Fryer等所述的,在允许的条件下(33℃、在95%空气/10%CO₂的潮湿气氛下;补充有20%FCS、10%马血清、2%谷氨酰胺、0.5%鸡胚胎、20mU/mL小鼠INF γ、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素的DMEM 5.5mM D-葡萄糖),使小鼠肌细胞H-2Kb以 0.8×10^4 个细胞/孔的密度在包被有基质胶的24孔板上生长4天(25)。为了成肌细胞中的分化,将细胞转移至非允许的培养条件下(37℃、在95%空气/5%CO₂的潮湿气氛下;补充有2%FCS、10%马血清、2%谷氨酰胺、1%鸡胚胎、100U/mL青霉素和100μg/mL链霉素的DMEM 5.5mM D-葡萄糖)。

[0381] 葡萄糖的摄取

[0382] 对于长期效果的评价,在葡萄糖摄取试验的前一天,在测试分子存在的情况下,将细胞在补充有10%马血清、2%SVF、1%鸡胚胎、2%谷氨酰胺的DMEM 5.5mM D-葡萄糖中孵

育16小时。一天之后并在试验之前,对细胞进行漂洗,并在测试分子存在的情况下于含有5.5mM D-葡萄糖的无血清培养基(DMEM)中孵育4小时以上。

[0383] 对于短期效果的评价,在葡萄糖测试的4小时前,对细胞进行漂洗并在无血清培养基(DMEM)中孵育。然后,通过在Krebs-Ringer HEPES缓冲液(KRBH;pH 7.4)0.1% Bovine Serum Albumine(BSA) fraction V(Sigma_A-4503)中用放射性标记的2-脱氧-D-[1,2³H]葡萄糖孵育细胞5-10分钟,对葡萄糖的摄取进行测量。通过在冰冷的0.9%氯化钠中的两个漂洗步骤,抑制葡萄糖的摄取。然后,将细胞溶于0.1N NaOH中30分钟。然后,对细胞相关的放射性进行计数,并使用比色Lowry法确定蛋白定量。在加入600μL/孔的闪烁体(Optiphase SuperMix3)后,通过Microbeta计数器对掺入细胞中的放射性进行测量,从而估量葡萄糖摄取。

[0384] 通过衍生自Lowry法的比色试验进行蛋白质定量。

[0385] 结果以nmol的掺入葡萄糖/5mn/mg蛋白质和对照或基础状态(100%)的%表示。

[0386] 结果

[0387] 本发明的药物在单独测试时能够提高肌细胞中的葡萄糖摄取。例如,图4、图5和图6示出了相比于未经处理的肌细胞时,分别在用阿坎酸(0.1μM,+45%)和阿米三嗪(1μM,+80%)短期孵育后、或由尼麦角林(10μM,+28%)长期孵育后,由肌细胞H-2Kb摄取的葡萄糖显著提高。

[0388] 1.3.2人糖尿病肌管原代培养物中的葡萄糖摄取

[0389] 为建立最能反映糖尿病病理条件的模型,对药物增强糖尿病肌管中的葡萄糖摄取的效力进行了测试。事实上,已显示出从糖尿病受试者建立的肌管中的糖尿病表型得以保留。

[0390] 细胞培养和培养基

[0391] 使来自糖尿病患者的肌管在补充有15%胎牛血清、1mM谷氨酰胺的基于HAM's F10的培养基(Sigma,Ref.N6908)上生长。

[0392] 将成肌细胞以380 000细胞/孔的密度接种在12孔板中。在增殖2天后,将细胞置于降低的血清条件下(2%马血清)以诱导分化。在分化5天后使用肌管。

[0393] 将基于Dulbecco's改良的Eagle's培养基(DMEM)的培养基(Gibco,Ref.31053-028)补充2%热灭活的马血清、2%Glutamax(Gibco,35050),并漂洗用于葡萄糖摄取试验。将化合物溶于DMSO中,以在使用之前达到期望的最终浓度。

[0394] 在试验之前,用本发明的组合物对分化的肌管处理24小时。

[0395] 葡萄糖摄取试验

[0396] 在葡萄糖摄取开始前,对细胞剥夺血清和葡萄糖。首先在含有还原的葡萄糖(1g/L)并且无血清的DMEM培养基中进行剥夺。在以期望浓度加入化合物之后,将细胞在37℃下孵育2小时30分钟。用胰岛素的对照使得能够对通过胰岛素途径诱导的葡萄糖摄取进行测量。在37℃下于30分钟内进行胰岛素处理(100nM)。随后,在HBS缓冲液中于37℃下进行葡萄糖和血清的剥夺,持续2小时。用10μM的2-[³H]脱氧葡萄糖10Ci/mM+2-脱氧-D-葡萄糖的混合物对细胞处理30分钟。用1mL冷的PBS对细胞清洗(rinced)两次。在500μL 0.05N的NaOH中裂解20分钟。将细胞裂解物转移至闪烁瓶中,用于使用MicroBeta计数器进行放射性测量。

[0397] 结果

[0398] 本发明的组合物可提高人原代肌管中的葡萄糖摄取。例如,图13、图14、图15、图16和图17显示出在通过托拉塞米(在0.01 μ M和0.1 μ M下,分别为+24%和18%,P<0.01;在1 μ M下为+14%,p<0.05)、芬司匹利(在0.01 μ M和0.1 μ M下,分别为+34%和30%,P<0.01;在1 μ M下为+27%,p<0.05)、托芬那酸(在0.01 μ M、0.1 μ M和1 μ M下,分别为+13%、+13%和+12%,p<0.05)、艾芬地尔(在0.01 μ M下为+48%,p=0.07;并且在0.1 μ M和1 μ M下得以改进)和氨苯喋啶(在0.01 μ M下为+13%,p<0.05)预孵育之后,改善了糖尿病肌管中的葡萄糖摄取。

[0399] 1.3.3脂肪细胞3T3-L1中的葡萄糖摄取

[0400] 3T3-L1细胞是在适当条件下分化为脂肪细胞样细胞的成纤维细胞。使用这些细胞以显示出当与对照相比时,本发明的组合物增加了脂肪细胞中的葡萄糖摄取。

[0401] 细胞培养和分化

[0402] 在37°C下于5%CO₂气氛中,将3T3-L1前成脂肪细胞在含有1%青霉素-链霉素(PS)和10%牛血清的DMEM中培养。为诱导分化,将融合2天后的前成脂肪细胞在MDI分化培养基I(含有1%PS、10%FBS、0.5mM IBMX、1 μ M地塞米松、0.5 μ g/mL胰岛素的DMEM)中培养2天。通过脂肪形成标记物的表达和脂肪滴的外观对分化进行测量,所述分化通常在4天至8天之间完成。

[0403] 葡萄糖摄取活性试验

[0404] 通过测量放射性标记的葡萄糖的摄取对葡萄糖摄取活性进行分析。用无血清的DMEM对在12孔板中生长的分化的3T3-L1脂肪细胞漂洗两次,并在37°C下用含有0.1%BSA的1mL的DMEM孵育2小时。用Krebs-Ringer-HEPES(KRH)缓冲液(20mM HEPES,pH 7.4、136mM NaCl、4.7mM KCl、1.25mM MgSO₄、1.25mM CaCl₂、2mg/mL牛血清白蛋白)漂洗细胞三次,并在37°C下用0.9mL的KRH缓冲液孵育30分钟。

[0405] 接着,使用药物或不使用药物对细胞孵育不同的时间,以评价药物的短期作用和长期作用。

[0406] 为评价药物的短期作用,在37°C下用本发明的药物孵育细胞4小时。为评价本发明的药物的长期作用,在试验前一天,使用药物或不使用药物,将细胞预孵育16小时。一天之后并在试验之前,漂洗细胞,并在测试分子存在的情况下孵育细胞4小时以上。

[0407] 通过加入0.1mL含有2-脱氧-D-[³H]葡萄糖(37MBq/L)和葡萄糖(1mM)的KRH缓冲液起始葡萄糖的摄取。20分钟之后,通过用冷的PBS漂洗细胞三次,终止葡萄糖的摄取。通过在37°C下用0.7mL的Triton X-100孵育细胞20分钟,使细胞裂解。使用闪烁计数器确定细胞裂解物中的放射性水平。

[0408] 通过衍生自Lowry法的比色试验进行蛋白质定量。

[0409] 结果以nmol的掺入葡萄糖/5mn/mg蛋白质和对照或基础状态(100%)的%表示。

[0410] 结果

[0411] 本发明的药物能够提高脂肪细胞中的葡萄糖摄取。例如,图7、图12和图8中示出了在分别通过喷托维林(0.1 μ M,+58%)和毗贝地尔(10nM,+68%)进行短期孵育、或通过阿米三嗪(1 μ M,+69%)进行长期孵育后,提高了分化的3T3-L1脂肪细胞对葡萄糖的摄取。

[0412] 1.3.4在TNF α 诱导的胰岛素抵抗3T3-L1分化的脂肪细胞中的葡萄糖摄取

[0413] 为评价本发明的药物在胰岛素抵抗条件下改善脂肪细胞对葡萄糖的摄取能力,用TNF- α 对细胞进行预处理。一旦TNF- α 暴露,预期葡萄糖的摄取将响应于胰岛素而减少。相比

之下,在用TNF- α 和乙酰水杨酸处理3T3-L1细胞之后(阳性对照),预期到响应于胰岛素的葡萄糖摄取将增加。

[0414] 细胞培养和分化

[0415] 在37℃下于10%CO₂气氛中,将3T3L1成纤维细胞保持在补充有5%牛血清供体、5%新生牛血清、100U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM 4.5g/L葡萄糖中。使细胞在24孔板中以2560细胞/孔的密度于0.5mL生长培养基(补充有10%FCS、100U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素的DMEM 4.5g/L葡萄糖)中生长。在所述板中培养5天后(90%融合),在含有10%FBS、IBMX 100 μ M、地塞米松0.25 μ M和胰岛素170nM的DMEM 4.5g/L葡萄糖中进行脂肪细胞分化的诱导。两天后,移除诱导培养基,并用含有10%FBS和胰岛素170nM的DMEM 4.5g/L葡萄糖进行替换。两天后,替换为新鲜的培养基。三天后,将脂肪细胞在禁食培养基(含有0.2SVF、100U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素的DMEM 4.5g/L葡萄糖)中孵育过夜。然后,在含有10%FBS的DMEM 4.5g/L葡萄糖中,用H₂O或5ng/mL的大鼠TNF- α (Peprotech,400-14)对细胞处理48h。每天更新培养基。如下所述,在不同条件下对葡萄糖摄取进行试验:在胰岛素(100nM)存在或不存在的情况下,进一步用含有或不含有5ng/mL TNF- α 的0.1%DMSO、或含有5ng/mL TNF- α 和5mM乙酰水杨酸的0.1%DMSO、或含有5ng/mL TNF- α 和100nM胰岛素的0.1%DMSO、或含有5ng/mL TNF- α 的测试化合物对脂肪细胞处理24h。

[0416] 葡萄糖摄取活性试验

[0417] 在用2-脱氧-D-[1,2-³H]葡萄糖进行的孵育步骤5min之后,通过对掺入的放射性标记葡萄糖进行定量,对葡萄糖摄取进行测量。通过在冰冷的PBS1X中的两个漂洗步骤,抑制葡萄糖摄取。然后,在0.1N NaOH中溶解30分钟。然后,在加入600 μ L/孔的闪烁体(Optiphase SuperMix3)之后,通过使用MicroBeta计数器,对细胞相关的放射性进行计数。

[0418] 同时,通过衍生自Lowry法的比色试验确定蛋白质定量。结果以nmol的掺入葡萄糖/5mn/mg蛋白质和对照或基础状态(100%)的%表示。

[0419] 为评估细胞存活力,通过使用商业化的试剂盒(ABS pentra LDH IFCC CP, Ref.A11A01871)的UV方法,在上清液上进行LDH活性测量。非常简要地说,LDH通过将乳酸氧化为丙酮酸而将NAD⁺还原为NADH。通过对340nm处的吸收进行测量,对所产生的NADH进行评价。作为细胞毒性的结果,所产生的NADH的量与释放在培养基中的LDH的量成正比。细胞存活力的结果以对照或基础状态(100%)的%表示。

[0420] 结果

[0421] 在胰岛素抵抗的模拟条件下,本发明的药物在单独测试时提高了脂肪细胞中的葡萄糖摄取。例如,图18、图19、图20和图21显示出在通过托拉塞米(在0.37nM下为+121%,p<0.05;在1nM和3.3nM下分别为+123%和+129%,p<0.01)、艾芬地尔(在1 μ M为+140%,p<0.01;在10nM和100nM下有改善,未示出)、芬司匹利(在1nM下为+130%,p<0.01;在0.37nM和3.3nM下有改善,未示出)和托芬那酸(在10nM下为+127%,p<0.01;在100nM和1 μ M下所改善,未示出)的长期温孵育之后,通过TNF- α 诱导的胰岛素抵抗3T3-L1脂肪细胞进行的葡萄糖摄取显著提高。

[0422] 第1.3节的结果表明,本发明的药物在改善正常肌细胞和脂肪细胞中的葡萄糖摄取、以及在胰岛素抵抗模拟条件下的葡萄糖摄取中有效。

[0423] 1.4通过肝细胞进行的葡萄糖生产

[0424] 细胞培养和分化

[0425] 在胶原酶存在的情况下,通过非原位肝灌注,将肝细胞从禁食24小时的雄性Wistar大鼠(200g-250g体重)中分离。通过台盼蓝拒染试验对细胞的存活力进行验证。然后,将细胞悬浮在补充有胰岛素的William's培养基中,接种至6孔板(8×10^5 细胞/孔)上,并在37°C下于95%空气/5%CO₂的潮湿气氛中孵育。在所述板培养后,移除培养基,并将细胞在无葡萄糖的RPMI培养基(补充有用于长期评价的测试药物)中培养16小时。第二天,在糖新生(neoglucogenic)底物(10mM乳酸和1mM丙酮酸)和测试分子存在的情况下,在Krebs-Ringer Bicarbonate HEPES缓冲液(KRBH;pH 7.4)中对肝葡萄糖产生测试进行评估,持续4小时(短期)。

[0426] 葡萄糖的定量

[0427] 收集上清液,并使用葡萄糖氧化酶试剂盒(仪器实验室0018250840),确定葡萄糖浓度。同时,使用比色Lowry法进行蛋白质的定量。

[0428] 结果以nmol的葡萄糖/mg蛋白质和对照状态(KLP:含有乳酸和丙酮酸的KRBH)的%表示。

[0429] 结果

[0430] 本发明的药物在单独测试时可减少通过肝细胞产生的葡萄糖。例如,图9、图10和图11显示出在通过D-甘露糖(10μM,-22%)短期处理后、或者通过艾芬地尔(0.01μM,-22%)或氮卓斯汀(10μM,-36%)长期处理后,由肝细胞产生的葡萄糖显著减少。

[0431] 1.5分离的器官

[0432] 1.5.1分离的胰岛中的胰岛素和胰高血糖素的分泌

[0433] 用一系列浓度的葡萄糖孵育的分离的胰岛显示出胰岛素释放的剂量依赖模式。因此,分离的胰岛的使用是考察候选化合物作为引发剂和胰岛素分泌增强剂的作用的生理途径。

[0434] 组织的制备

[0435] 通过腹膜内(ip)注射氯胺酮/xylasine对大鼠进行麻醉。暴露腹膜腔,并在胰主管至肠之间夹住。然后,经由总胆管对胰腺进行插管,用胶原酶进行膨胀并移除。对胰岛进行摘取、洗涤,并在离心之前经过无菌不锈钢筛。然后,对胰岛进行清洗,并置于含有2mM谷氨酰胺、10%胎牛血清和1%抗生素/抗真菌溶液的CMRL培养基中,放置在含有5%CO₂的37°C的培养室中。

[0436] 胰岛的灌注

[0437] 在37°C下用5%CO₂将胰岛在含有10%FBS和3mM葡萄糖的RPMI1640培养基中预孵育90分钟。然后,在37°C下,使对照组和治疗组的胰岛在具有恒定流速(500μL/min)的葡萄糖灌注系统中孵育90分钟。将胰岛在基础条件下(3mM葡萄糖)放置30min,在高葡萄糖浓度(20mM)培养基中放置30min,最后再在基础条件下(3mM葡萄糖)放置30min。在整个灌注过程中,从输出部分处收集培养基的样品,并在-80°C下冷冻。在灌注结束时,收获胰岛并冷冻在-80°C下。使用酸乙醇(处于95%乙醇中的0.18M HC1)对胰岛中的总蛋白质进行提取。通过ELISA,实现对所收集的输出部分中的胞内胰岛素和胰高血糖素、或释放的胰岛素和胰高血糖素的定量。

[0438] 1.5.2分离的肌肉中的葡萄糖摄取

[0439] 肌肉的孵育程序

[0440] 在29°C下,将切出的滑车(epitrochlearis)在3mL连续充气(95%O₂、5%CO₂)的预孵育培养基中孵育50分钟,所述预孵育培养基由Krebs-Henseleit碳酸氢盐缓冲液(KHB)、8mM葡萄糖、32mM甘露醇和0.1%的牛血清白蛋白(BSA)组成。在预孵育之后,将肌肉转移至另外的小瓶中,并在29°C下,在3mL连续充气的洗出培养基中孵育10分钟,所述洗出培养基由KHB、2mM丙酮酸、38mM甘露醇和0.1%BSA组成。

[0441] 最后,在29°C下,将肌肉在3mL摄取培养基中孵育20分钟,所述摄取培养基由KHB、2mM丙酮酸、6mM葡萄糖和32mM甘露醇、0.1%BSA组成,所述摄取培养基具有或不具有280μCi/mmol[³H]2-脱氧葡萄糖(2-DG)和10μCi/mmol[¹⁴C]-甘露醇以及指定的处理。

[0442] 在孵育之后,立即将肌肉短暂地在用0.9%盐水溶液浸湿的纱布上吸取,并在液氮中冷冻夹紧。

[0443] 肌肉葡萄糖摄取的测量

[0444] 在摄取培养基中,在孵育的20分钟内,由2-DG进入肌肉纤维中的掺入速率对葡萄糖的摄取进行计算。在60°C下,使冷冻的肌肉样品在1mL的1M KOH中消化20分钟。用1mL的1M HCl将肌肉匀浆中和,并将300μL加入闪烁混合物中。在LS-6000液体闪烁分光光度计中,对二重复的样品的³H和¹⁴C进行计数。

[0445] 作为总肌肉2-DG和胞外空间2-DG之间的差,对肌肉2-DG的摄取进行计算。通过组织中的[¹⁴C]-甘露醇的量确定胞外空间的2-DG浓度。

[0446] 1.5.3由分离的肝脏产生的葡萄糖

[0447] 离体灌注大鼠模型的模型使得能够对完整器官的直接作用进行研究,而不受肝外激素和其它代谢流的系统性改变的影响。

[0448] 组织的制备

[0449] 通过ip注射硫喷妥(50mg/kg)对大鼠进行麻醉。实施无血红蛋白的非循环灌注。在门静脉和腔静脉插管之后,将肝脏放置于有机玻璃室中。灌注流体为在37°C下通过带有同步温度调节的膜氧合器用氧气和二氧化碳(95:5)的混合物饱和的Krebs/Henseleit-碳酸氢盐缓冲液(pH 7.4)。由蠕动泵提供的流量为30mL/min-33mL/min。在用无脂肪酸的牛血清白蛋白补充Krebs/Henseleit-碳酸氢盐缓冲液之后,将候选化合物或溶媒加入至灌注液以确保药物的充分溶解。对于药物的所有浓度,摩尔白蛋白/药物的比例等于2.4。

[0450] 从氧气摄取速率和灌注流体从其表面的泄漏这两方面对经灌注肝脏的细胞存活力进行判定。当氧气摄取下降至0.7μmol min⁻¹g⁻¹、或者当表面流体泄漏超过门脉血流的2.5%时,丢弃肝脏。收集流出的灌注液体样品,并对所述样品的代谢物含量进行分析。通过标准酶法程序对下列化合物进行分析:葡萄糖、乳酸和丙酮酸。采用特氟隆屏蔽的铂电极,连续地对流出的灌注液中的氧气浓度进行监测,所述铂电极恰好位于灌注液出口处的有机玻璃室中。由输入-输出差和总流速计算代谢率,并称为肝脏的湿重。

[0451] 1.6结果的综合

[0452] 表4汇集了在所有先前描述的模型中获得的结果(参见上述1.1至1.5的点)。值归因于各候选化合物,所述候选化合物取决于它们在不同的体外模型中相比于溶媒而言的作用。将结果进行归一化和权衡,以产生各候选化合物的相对性能值。高的值反映了化合物使葡萄糖水平正常化的高潜力,并因此反映了控制葡萄糖水平和/或治疗糖尿病或相关紊乱

的显著效力。

[0453] 表4

[0454]

药物名称	相对性能值
阿坎酸	15
阿米三嗪	38
氮卓斯汀	30
巴氯芬	16
喷托维林	33
西咪替丁	31
西那卡塞	32
右旋溴苯那敏	21
乙胺嗪	32
二氢丙茶碱	11
D-甘露糖	18
艾地苯醌	53
艾芬地尔	28
左西孟旦	20
美西律	10
尼麦角林	40
呲贝地尔	24
托芬那酸	9
托哌酮	19
托拉塞米	16
氨苯蝶啶	18
利美尼定	16

[0455] 还在上述体外模型中对本发明的药物组合的效力进行了评估。在这些试验中所使用的方案与上述第1部分相同。在下表5中列出的药物组合显示出特别高的相对性能值(如上述所确定)。

[0456] 结果:

[0457] 将所有的药物组合详述于表5中,使得对血糖水平的正常化具有全球性的积极作用,并因此认为是有效的糖尿病疗法。

[0458] 表5

具有高的相对值的药物组合	在糖尿病中的效力
艾芬地尔和阿坎酸	+
艾芬地尔和巴氯芬	+
巴氯芬和阿坎酸	+

美西律和西那卡塞	+
美西律和托拉塞米	+
磺胺异噁唑和托拉塞米	+
氮卓斯汀和尼麦角林	+
艾地苯醌和尼麦角林	+
喷托维林与尼麦角林	+
阿米三嗪和尼麦角林	+
西咪替丁和尼麦角林	+
乙胺嗪和尼麦角林	+
艾芬地尔和尼麦角林	+
氮卓斯汀和艾地苯醌	+
阿坎酸和尼麦角林	+
氮卓斯汀和喷托维林	+
氮卓斯汀和阿米三嗪	+
艾地苯醌和喷托维林	+
艾地苯醌和阿米三嗪	+
氨苯蝶啶和尼麦角林	+
D-甘露糖和尼麦角林	+
艾地苯醌和乙胺嗪	+
巴氯芬和 D-甘露糖	+
巴氯芬和二甲双胍	+
D-甘露糖和二甲双胍	+
巴氯芬和 D-甘露糖和二甲双胍	+
艾芬地尔和芬司匹利	+
艾芬地尔和托拉塞米	+
艾芬地尔和氨苯蝶啶	+
艾芬地尔和托芬那酸	+
芬司匹利和托拉塞米	+
芬司匹利和氨苯蝶啶	+
芬司匹利和托芬那酸	+
托拉塞米和氨苯蝶啶	+
托拉塞米和托芬那酸	+
氨苯蝶啶和托芬那酸	+
二甲双胍和艾芬地尔和芬司匹利	+
二甲双胍和艾芬地尔和托拉塞米	+
二甲双胍和艾芬地尔和氨苯蝶啶	+
二甲双胍和艾芬地尔和托芬那酸	+
二甲双胍和芬司匹利和托拉塞米	+
二甲双胍和芬司匹利和氨苯蝶啶	+
二甲双胍和芬司匹利和托芬那酸	+

[0460]

	二甲双胍和托拉塞米和氨苯蝶啶	+
[0461]	二甲双胍和托拉塞米和托芬那酸	+
	二甲双胍和氨苯蝶啶和托芬那酸	+

[0462] 2. 体内研究

[0463] 2.1 组合在Zucker糖尿病肥胖 (ZDF) 大鼠模型中的抗炎作用

[0464] 在Zucker糖尿病肥胖 (ZDF) 大鼠模型中, 对本发明的包含表4和表5的化合物的药物组合物的效力进行确认。Zucker糖尿病肥胖 (ZDF) 大鼠是基于通过引起胰岛素抵抗的遗传的肥胖基因突变造成的葡萄糖耐量受损的2型糖尿病的精确模型。发生在ZDF大鼠中的fa突变产生了缩短了瘦素受体蛋白, 所述瘦素受体蛋白不能有效地与瘦素相互作用。该突变在表型上表现为肥胖, 同时血液中具有高水平的正常瘦素。

[0465] 已知的是, 炎症在2型糖尿病和代谢综合征的病因中发挥作用。C反应蛋白 (CRP) 的异常的高血浆水平与糖尿病和代谢综合征有关。已将ZDF大鼠用于对本发明的组合物针对2型糖尿病的炎性成分的作用进行研究。ZDF大鼠显示出增加的血浆CRP水平。

[0466] 饲养和长久治疗

[0467] 将大鼠单独饲养, 并保持在22±2°C下的12小时亮/暗的循环下。动物随意获取食物 (Purina 5008) 和水。一组接受溶媒, 而其它各组分别用表5和表6中列出的候选化合物处理4周。通过口服途径以一天两次进行给予。

[0468] 血液样品

[0469] 从所有组中的过夜禁食的大鼠的局部麻醉的尾部获取血液样品。

[0470] 血浆CRP水平的测量

[0471] 根据制造商的建议 (来自Millipore的ref CYT294), 通过ELISA试剂盒, 对所有大鼠 (瘦大鼠 (Lean rats)、经溶媒处理过的ZDF大鼠以及经巴氯芬-阿坎酸处理过的ZDF大鼠) 血浆中的CRP浓度进行测量。大鼠C反应蛋白 (CRP) 试剂盒是测量大鼠CRP的双多克隆抗体夹心酶联免疫法 (EIA)。将血浆的标准品、质量对照品和样品在包被有多克隆抗大鼠CRP抗体的微量滴定孔中孵育30分钟。在彻底漂洗后, 将标记有辣根过氧化物酶 (HRP) 的多克隆抗大鼠CRP抗体加入至孔, 并与固定化的抗体-CRP络合物孵育30分钟。接着, 进行另一洗涤步骤, 使得剩余的HRP偶联抗体能够与底物和四甲基联苯胺 (TMB) 反应。通过加入酸性溶液终止反应 (5-10分钟), 并在450nm处用分光光度计对得到的黄色产物的吸光度进行测定。吸光度与CRP浓度成正比。通过绘制相对于标准品的CRP浓度的吸光度值构建标准曲线, 并使用该标准曲线确定未知样品的浓度。

[0472] 结果

[0473] 本发明的组合物有效地降低了ZDF大鼠血浆中的CRP浓度。例如, 图22示出了当与经溶媒处理的ZDF大鼠相比时, 通过阿坎酸和巴氯芬处理 (分别为7.5mg/kg和0.5mg/kg) 的CRP浓度显著降低, 并达到瘦大鼠的CRP水平。这些结果表明, 本发明的组合具有全身性抗炎作用。

[0474] 2.2db/db小鼠模型中的葡萄糖稳态控制

[0475] 缺乏瘦素受体的db/db小鼠品系是用于评价靶向于糖尿病的化合物的众所周知且特征性的小鼠模型。使用db/+杂合 (heterozygous) 小鼠作为对照。

[0476] 适应期和预研究期

[0477] 从Janvier(法国)购入85只小鼠(8周龄,75只db/db和10只db/+)。在整个实验期间,将动物饲养在28个通风的笼($530\text{cm}^2 \times 20\text{cm}$)中。动物的衬垫每周更新两次。将小的设备放置在笼子中以改进环境(小鼠住宿处和纤维素附加物(cellulose plugs))。在正常的12小时光照循环(在下午7点灭灯)、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $55 \pm 10\%$ 的相对湿度下,将小鼠安置为两组。小鼠具有至少14天的适应期,在此期间,用标准食物R04饮食(SAFE-Augy法国)饲喂小鼠,并且小鼠自由获取水。

[0478] 在适应12天后并在开始处理前2天(D0),对所有小鼠进行称重,并从上午08:00至下午02:00禁食6小时。随后,随着研究的进行每天测量体重。

[0479] 在异氟烷麻醉下,从球后窦收集血液($200\mu\text{L}/\text{EDTA}$)。使用酶法和免疫-酶法分别对血浆葡萄糖和血浆胰岛素进行定量,从而使动物在同质组中随机化。

[0480] 在第0天,就在管饲法前,从尾静脉采集一滴血,以使用血糖仪(SmartCheck[®])测量未经禁食的血糖。

[0481] 测试组

[0482] 根据小鼠的体重和空腹血糖将小鼠分组(N=8只小鼠/组):

[0483] -用溶媒处理的瘦的对照(db/+小鼠)(经口服,每日两次)。

[0484] -用溶媒处理的肥胖阴性对照(db/db小鼠)(经口服,每日两次)。

[0485] -用二甲双胍以 $300\text{mg}/\text{kg}$ 处理的肥胖阳性对照(db/db小鼠)(经口服,每日一次)。

[0486] -用本发明的化合物或组合物处理的肥胖动物(db/db小鼠)。

[0487] 处理

[0488] 处理研究持续6周。通过管饲法每天用溶媒、参照化合物或PXT化合物以 $10\text{mL}/\text{kg}$ 的剂量(最大上至 $20\text{mL}/\text{kg}$ /天)在上午08:00和下午04:00对小鼠处理两次。

[0489] 将灌胃体积依早晨记录的体重个性化地调整。

[0490] 在处理期间,对食物和水的消耗进行监测和记录。每日对食物摄入进行测量和记录(连续两天之间的差)。平均食物摄入以各动物每天消耗的食物的克数表示,将平均食物摄入分配至所考虑的笼中的所有小鼠。每周两次使用相同的方法对水的摄取进行评价。

[0491] 每周一次,正好在管饲法之前的第7天、第13天、第21天、第27天、第35天和第41天,从尾静脉采集一滴血,以使用血糖仪(SmartCheck[®])测量未经禁食的血糖。

[0492] 在第14天、第28天和第42天,在上午08:00移除食物。在下午02:00,在麻醉状态下从球后窦收集血液($200\mu\text{L}/\text{EDTA}$),以测量空腹血糖。

[0493] 葡萄糖的定量

[0494] 在葡萄糖氧化酶存在的情况下,基于葡萄糖的酶促氧化,通过比色法确定血浆葡萄糖浓度。在通过过氧化物酶催化的反应中,所生成的过氧化氢与苯酚和4-氨基非那宗反应,从而形成红-紫色醌亚胺染料作为指示剂。最终颜色的强度与葡萄糖浓度直接成正比,并在 505nm 处对最终颜色的强度进行测量。

[0495] 结果

[0496] 本发明的组合物在处理的第28天时即已降低了db/db小鼠血浆中的血糖(未示出)。图23显示出在第42天,当与用溶媒给予的动物相比时,用D-甘露糖($5\text{mg}/\text{kg}$)、(RS)-巴氯芬($6\text{mg}/\text{kg}$)和二甲双胍($150\text{mg}/\text{kg}$)的组合进行给予使葡萄糖浓度显著降低($P<0.001$)。

[0497] 值得注意的是,当药物单独使用时不会诱导任何显著的血糖降低。更显著的是,可

将本发明的化合物视为是目前已知的用于治疗糖尿病的有效增强剂,由此允许减少剂量,并因此预期降低的副作用。

[0498] 参考文献:

- [0499] 1. van Belle,T.L.,K.T.Coppieters和M.G.von Herrath,Type 1 diabetes: etiology,immunology, and therapeutic strategies.Physiol Rev,2011,91(1) :79–118.
- [0500] 2. Maggio,C.A. 和F.X.Pi-Sunyer,The prevention and treatment of obesity.Application to type 2 diabetes.Diabetes Care,1997,20(11) :1744–66.
- [0501] 3.Stumvoll,M.,B.J.Goldstein和T.W.van Haeften,Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy.Lancet,2005,365 (9467) :1333–46.
- [0502] 4.Boden,G.,Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM.Diabetes,1997,46 (1) :3–10.
- [0503] 5.Goldstein,B.J.,Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus.Am J Cardiol,2002,90 (5A) :3G–10G.
- [0504] 6.Bessac,L.,Unmet medical needs and therapeutic goals in the treatment of type 2 diabetes.Curr Opin Investig Drugs,2003,4 (10) :1173–8.
- [0505] 7.Rolla,A.R.,Starting insulin strategies for patients with an inadequate response to oral therapy.Diabetes Obes Metab,2009,11 (Suppl 5) :6–9.
- [0506] 8.Yang,Y.X.,S.Hennessy和J.D.Lewis,Insulin therapy and colorectal cancer risk among type 2 diabetes mellitus patients.Gastroenterology,2004,127 (4) :1044–50.
- [0507] 9.Nathan,D.M.等,Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes:a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy:a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes.Diabetes Care,2009,32 (1) :193–203.
- [0508] 10.Ettmayer,P.,Amidon,G.L.,Clement,B.和Testa,B,Lessons learned from marketed and investigational prodrugs.J.Med.Chem,47:2393–2404 (2004) 。
- [0509] 11.Beaumont,K.,Webster,R.,Gardner,I.和Dack,K,Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds:challenges to the discovery scientist.Curr.Drug Metab,4:461–485 (2003) 。
- [0510] 12.Heimbach,T.等,Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs.Int.J.Pharm,261:81–92 (2003) 。
- [0511] 13.Yang,C.Y.,Dantzig,A.H.和Pidgeon,C.,Intestinal peptide transport systems and oral drug availability.Pharm.Res,16:1331–1343 (1999) 。
- [0512] 14.Steffansen,B.等,Intestinal solute carriers:an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption.Eur.J.Pharm.Sci,21:3–16 (2004) 。
- [0513] 15.Stella,V.等,Prodrugs:Challenges and Rewards (AAPS,New York,2007) 。
- [0514] 16.Wermuth,CG,The Practice of Medicinal Chemistry (Hardbound,2003) ,第VI部分第33章:Designing prodrugs and bioprecursors。

- [0515] 17.Pezron,I.等,Prodrug strategies in nasal drug delivery.Expert Opin.Ther.Pat.,12(3):331-340(2002)。
- [0516] 18.Stella,V.J.,Prodrugs as therapeutics.Expert Opin.Ther.Pat.14:277-280(2004)。
- [0517] 19.Stella,V.J.和Nti-Addae,K.W.,Prodrug strategies to overcome poor water solubility.Adv.Drug Deliv.Rev.,59:677-694(2007)。
- [0518] 20.Higuchi,T.,Stella,V.eds.,Prodrugs As Novel Drug Delivery Systems.ACS Symposium Series.American Chemical Society:Washington,DC(1975):31。
- [0519] 21.Roche,E.B.,Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs.American Pharmaceutical Association:Washington,DC(1977)。
- [0520] 22.Stahl H.,Wermuth C.G. (Eds.) ,Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties,Selection, and Use.Wiley-VCH,第二版(2011年3月29日)。
- [0521] 23.Asfari M.,Janjic D.,Meda P.,Li G.,Halban P.A.和Wollheim C.B.,Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines.Endocrinology,130:167-78(1992)。
- [0522] 24.Frankfurt O.S.和Krishan A.,Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the specific detection of apoptotic cells and its application to rapid drug screening.J Immunol Methods,253:133-144(2001)。
- [0523] 25.Fryer L.G.,Hajduch E.,Rencurel F.,Salt I.P.,Hundal H.S.,Hardie D.G.,Carling D,Activation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via stimulation of nitric oxide synthase.Diabetes.Dec,49(12):1978-85(2000)。

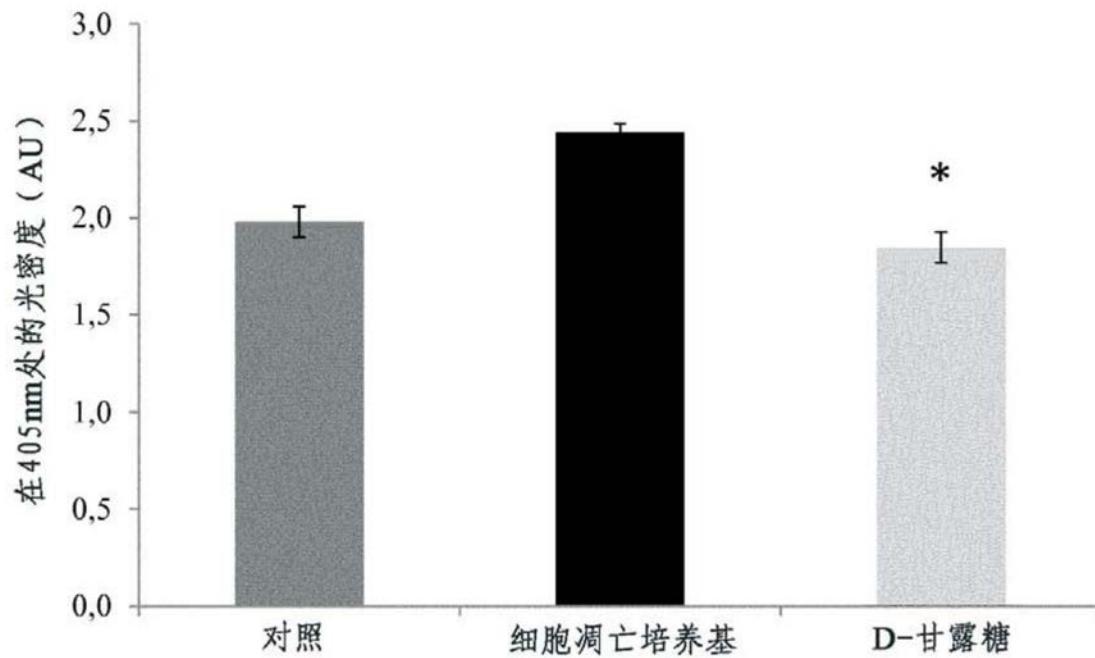


图1

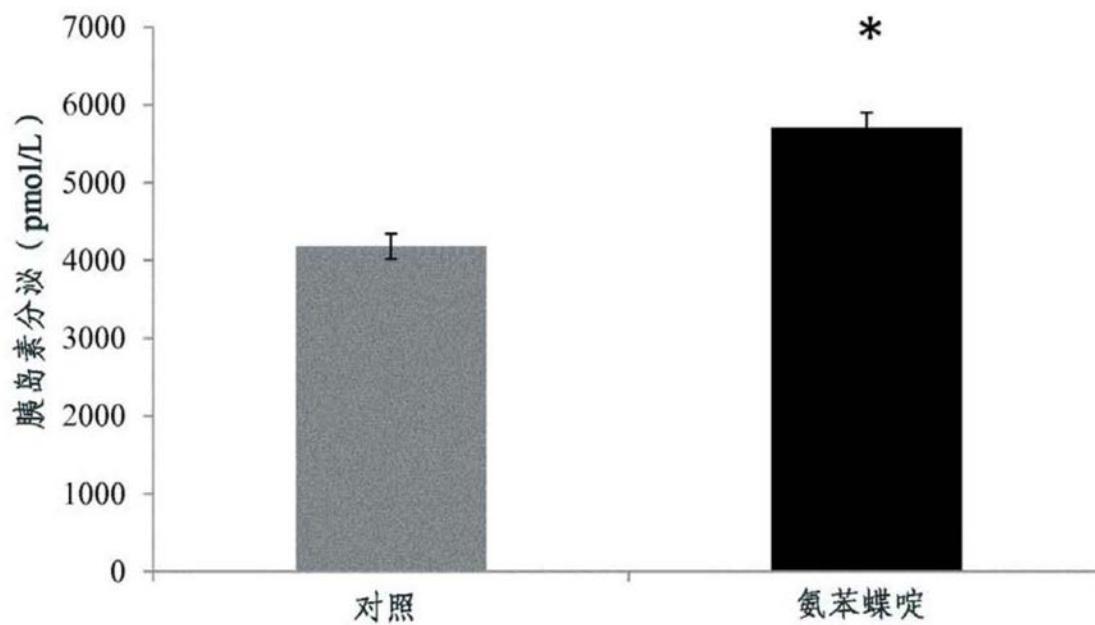


图2

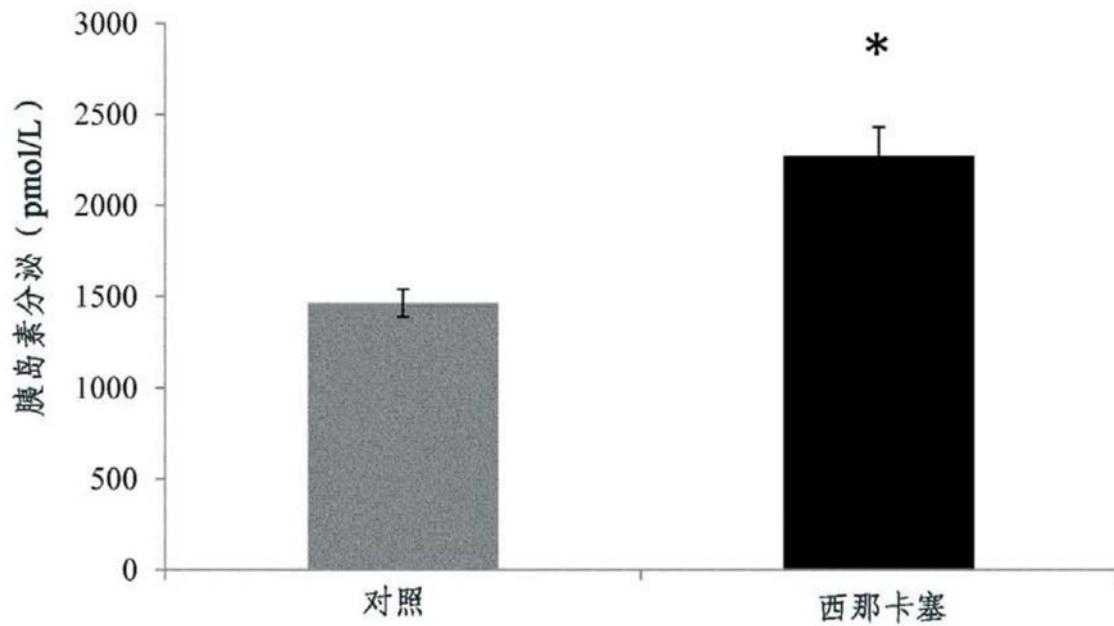


图3

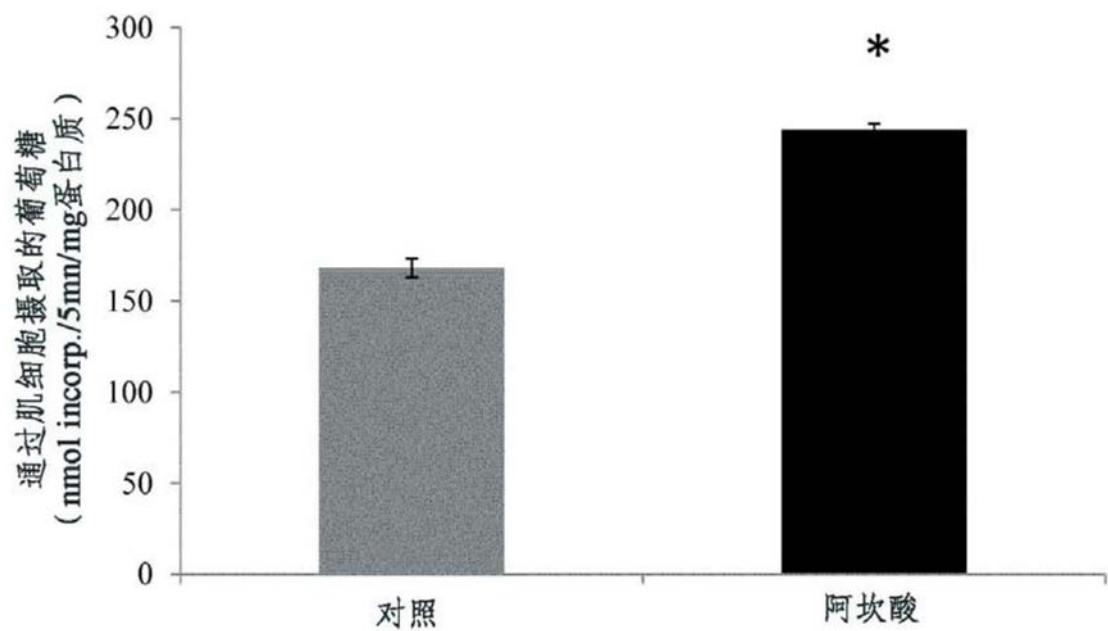


图4

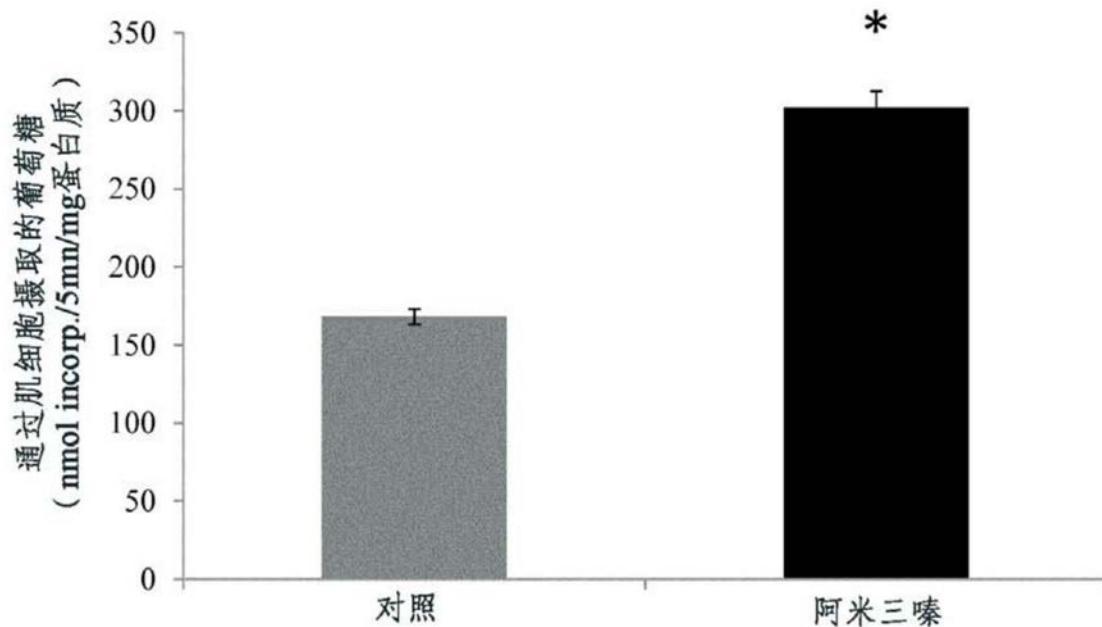


图5

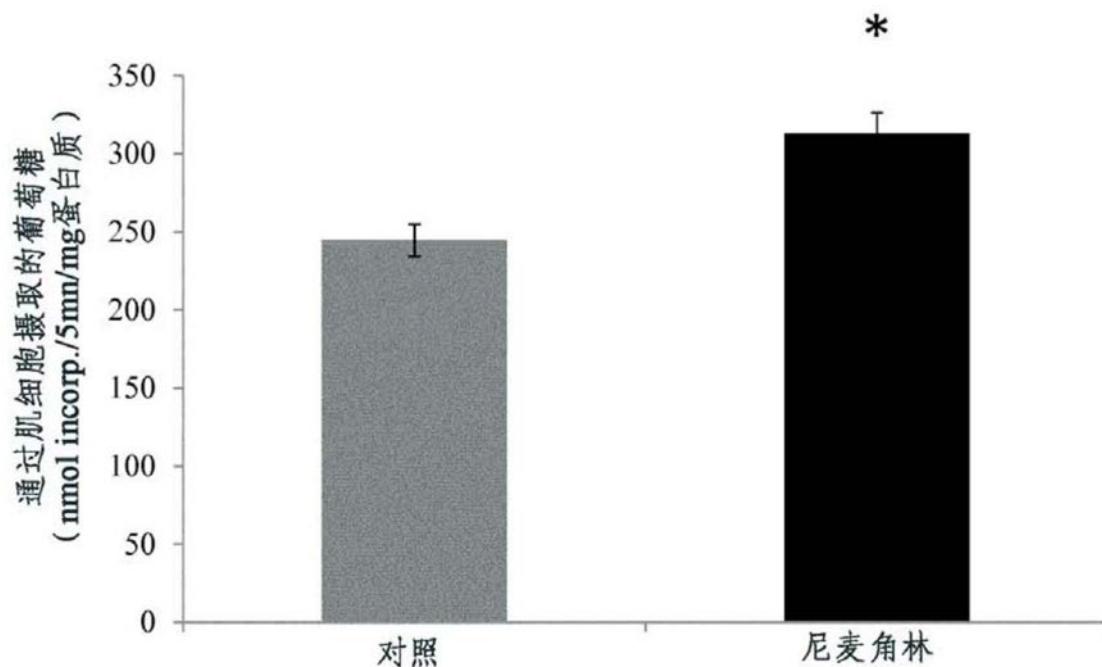


图6

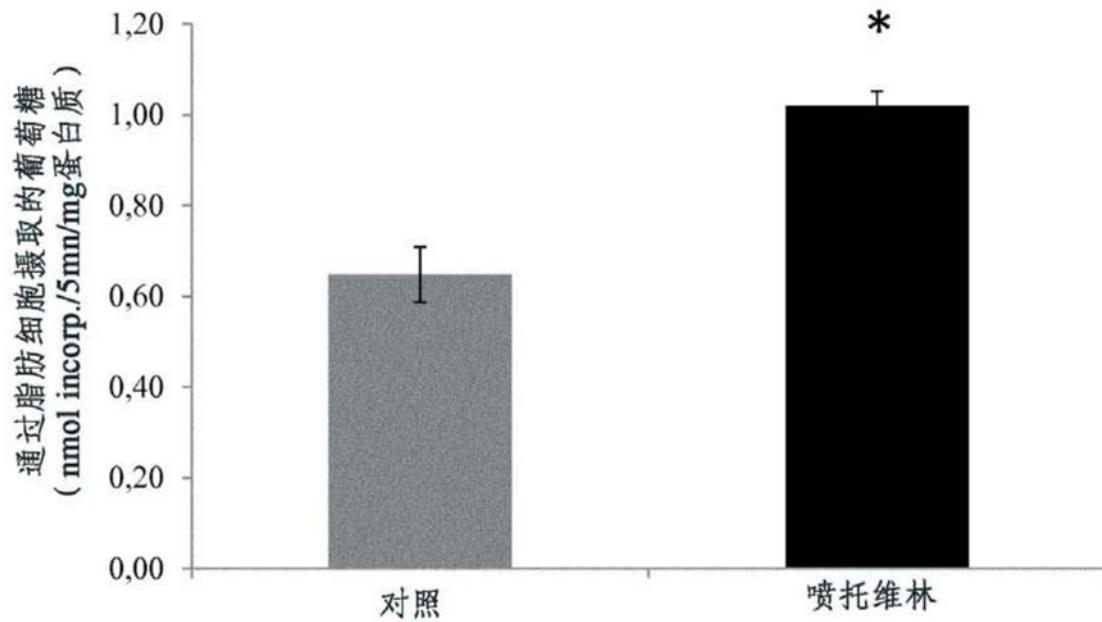


图7

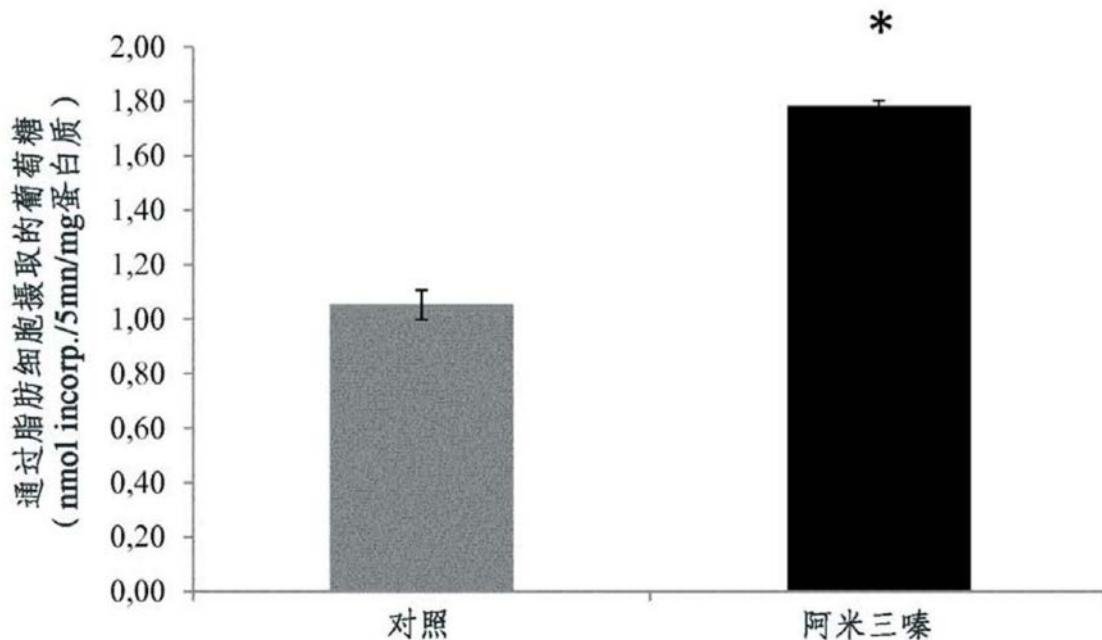


图8

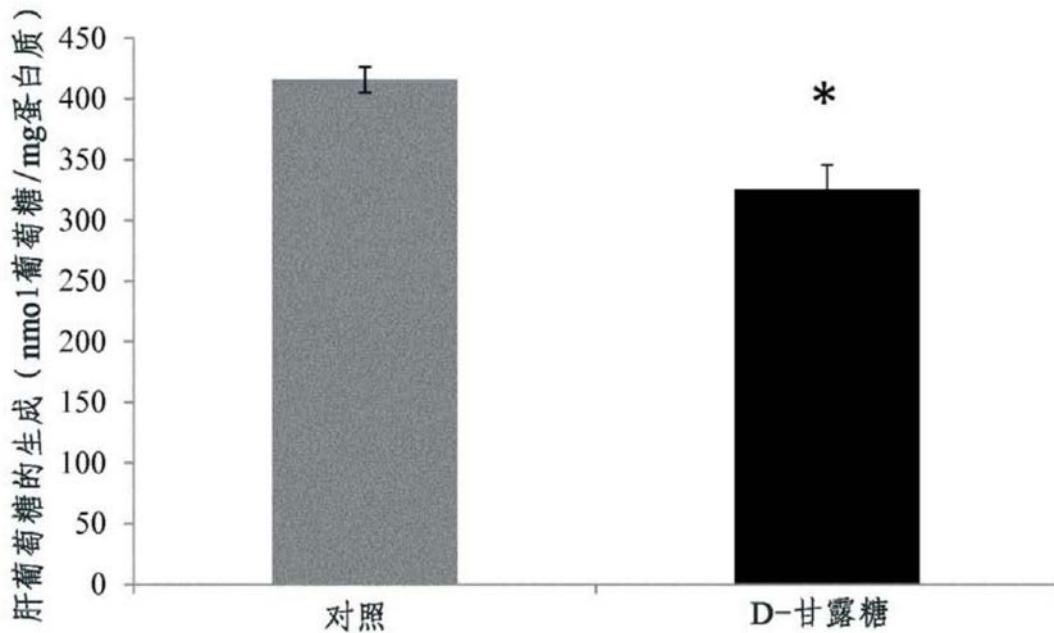


图9

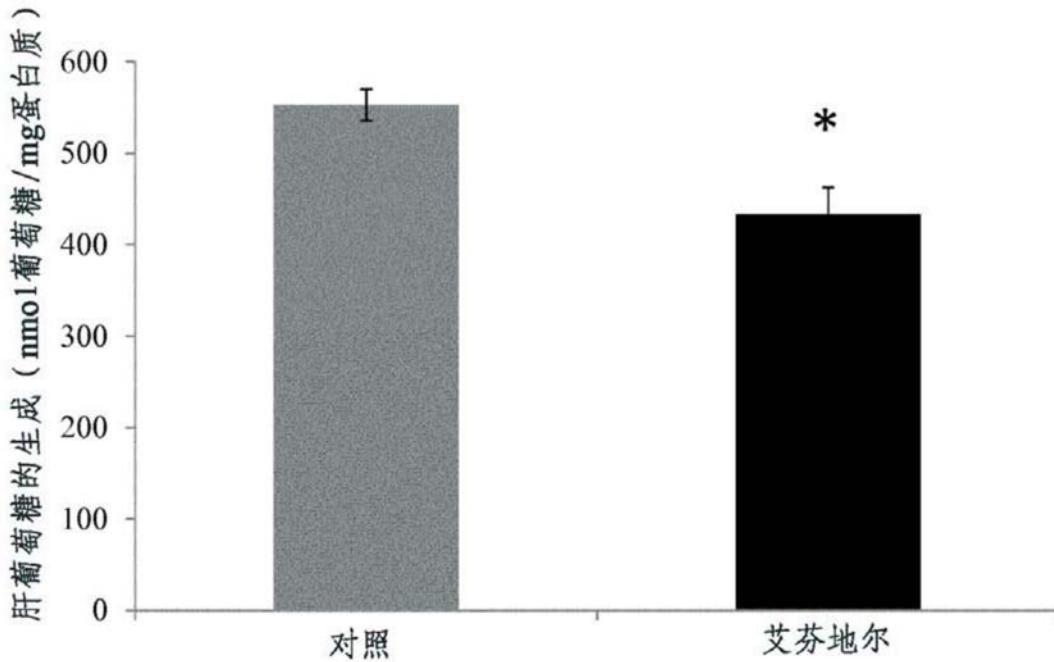


图10

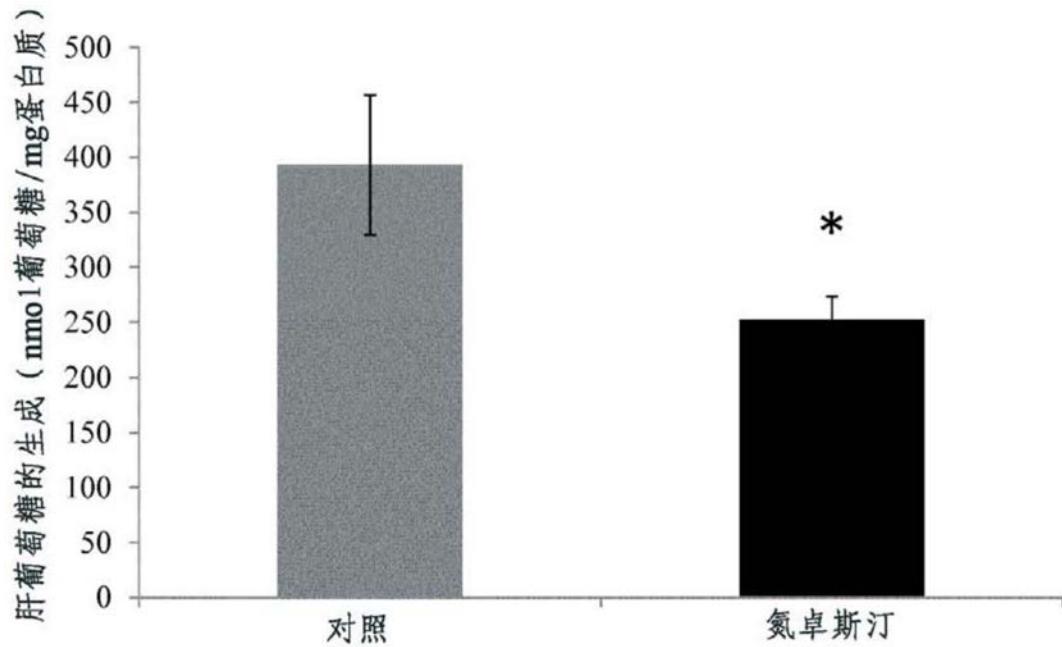


图11

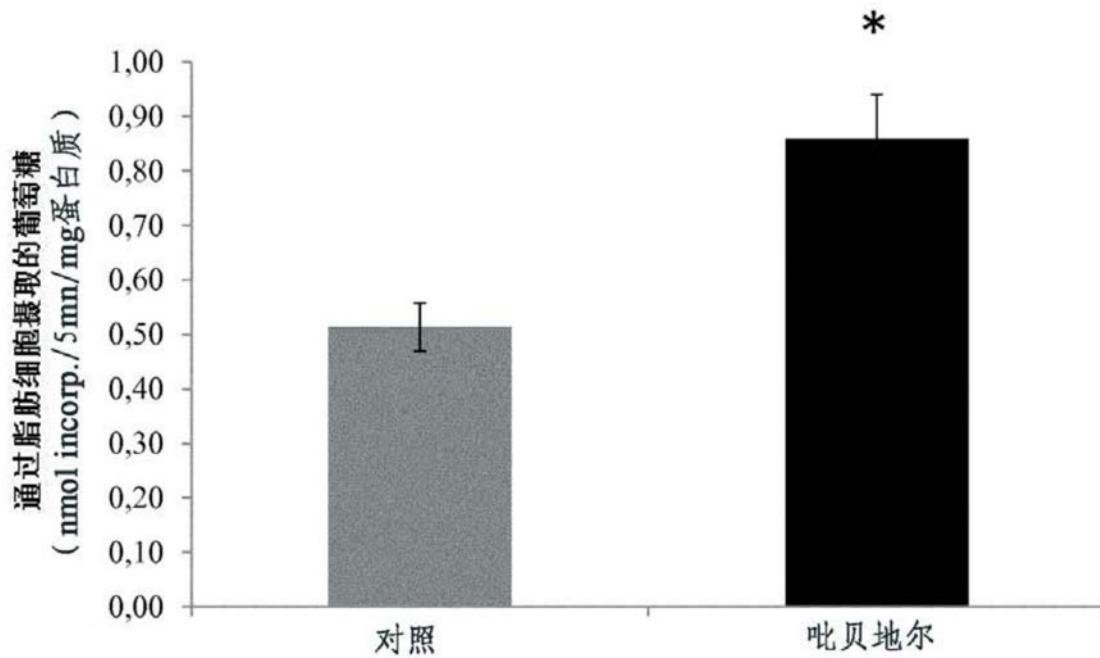


图12

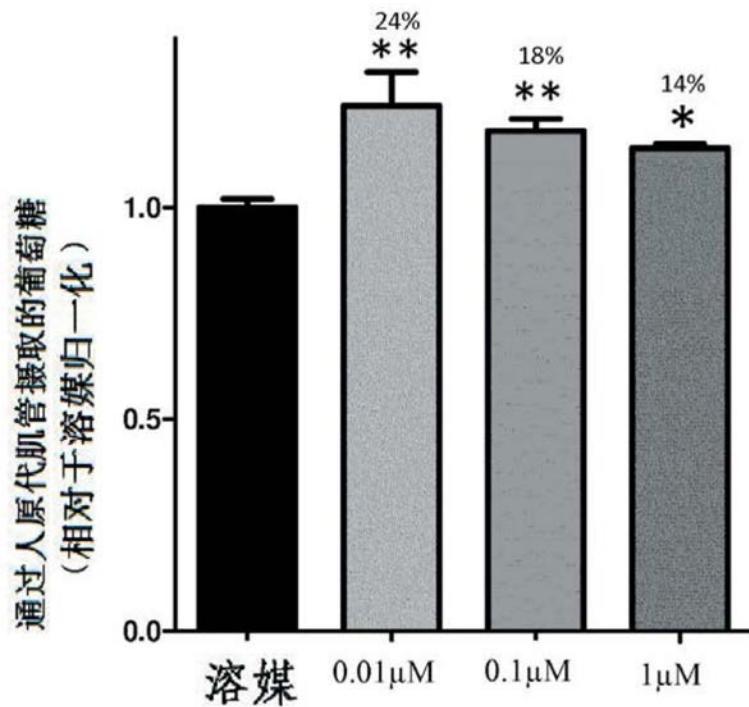


图13

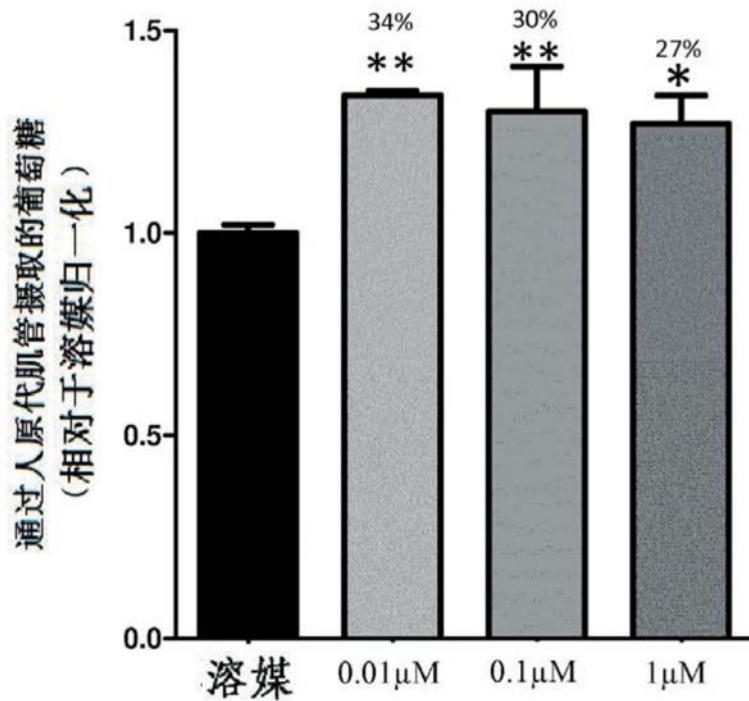


图14

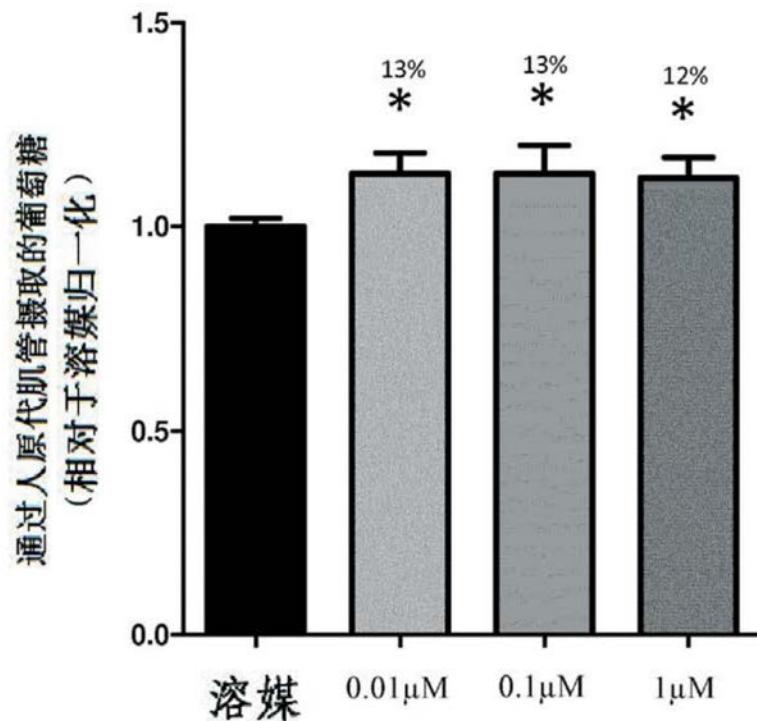


图15

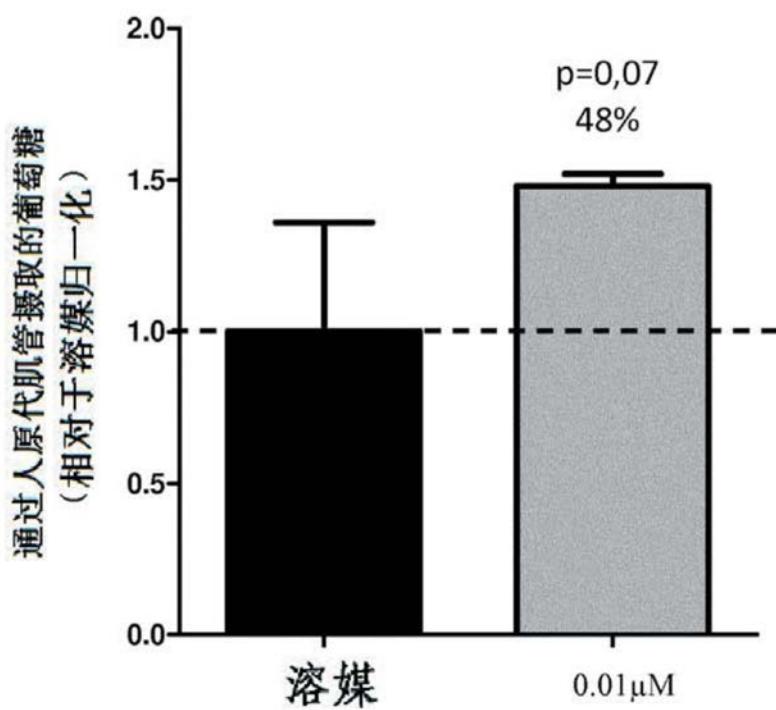


图16

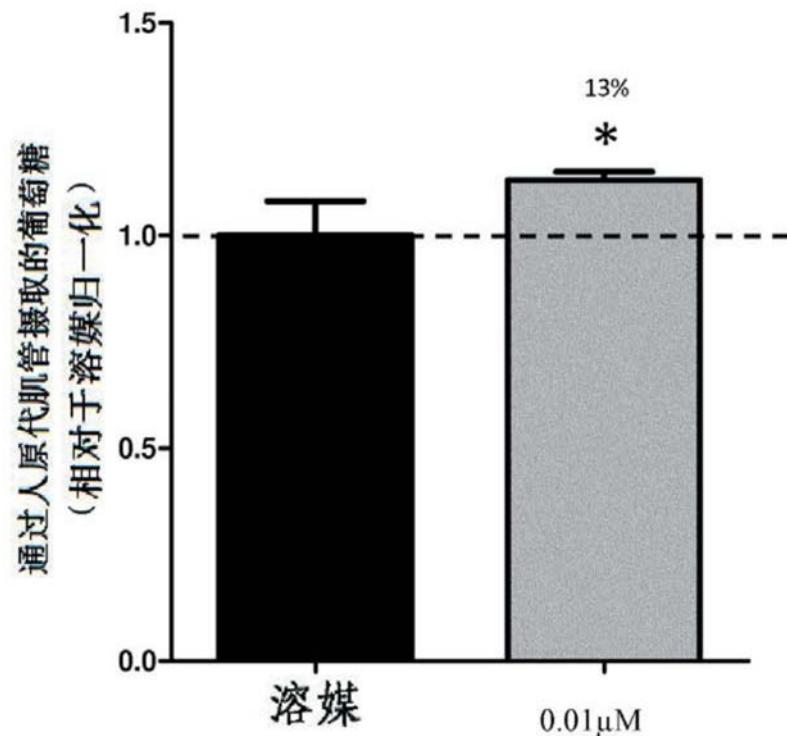


图17

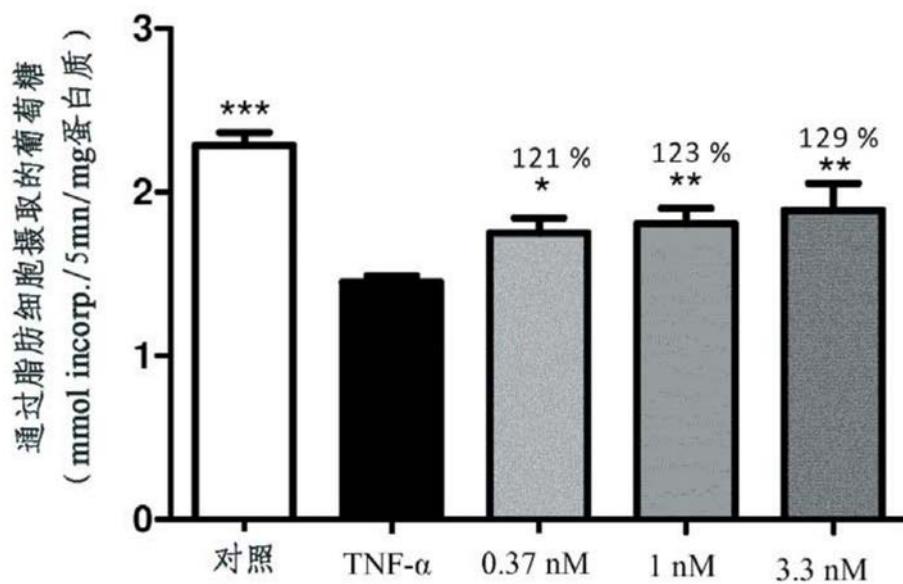


图18

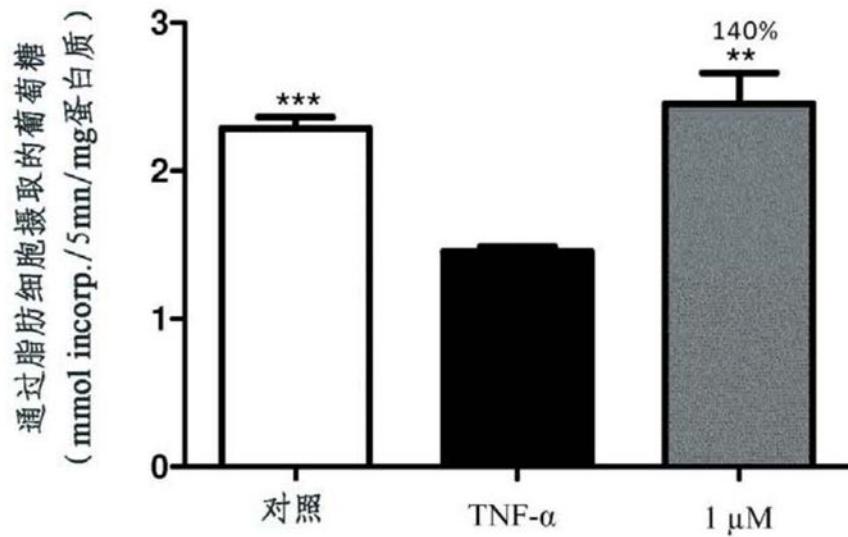


图19

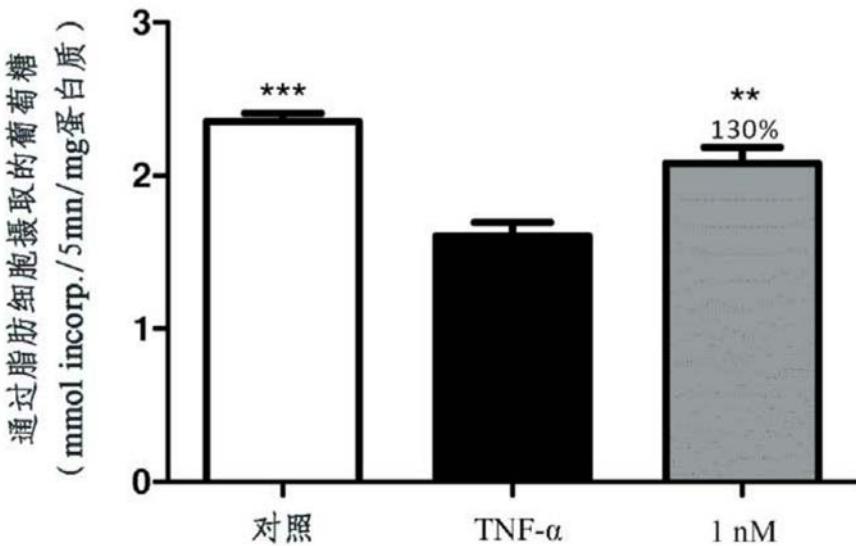


图20

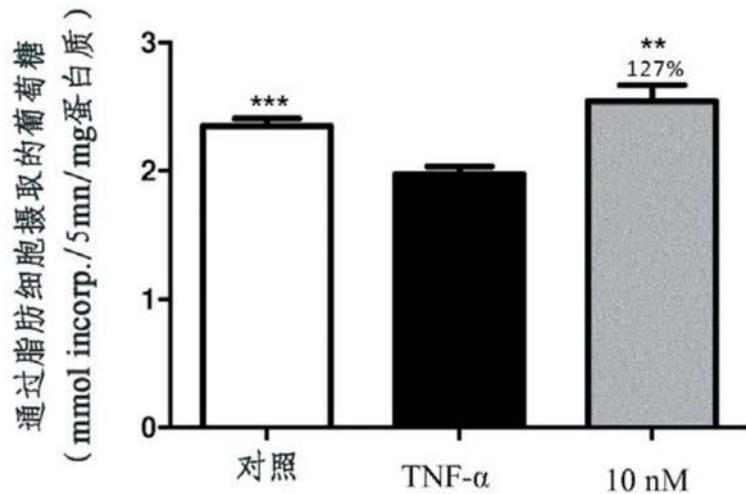


图21

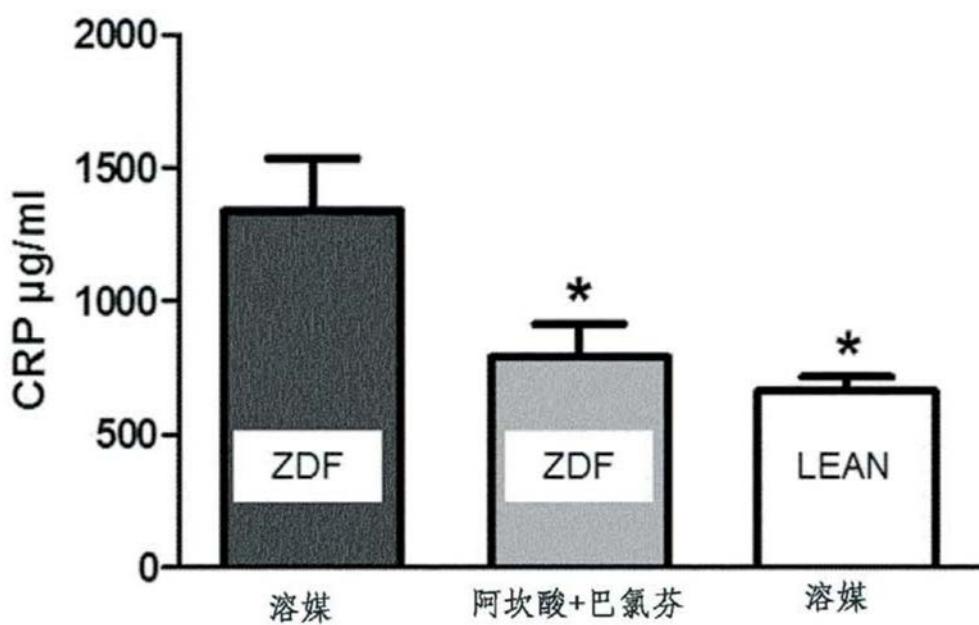


图22

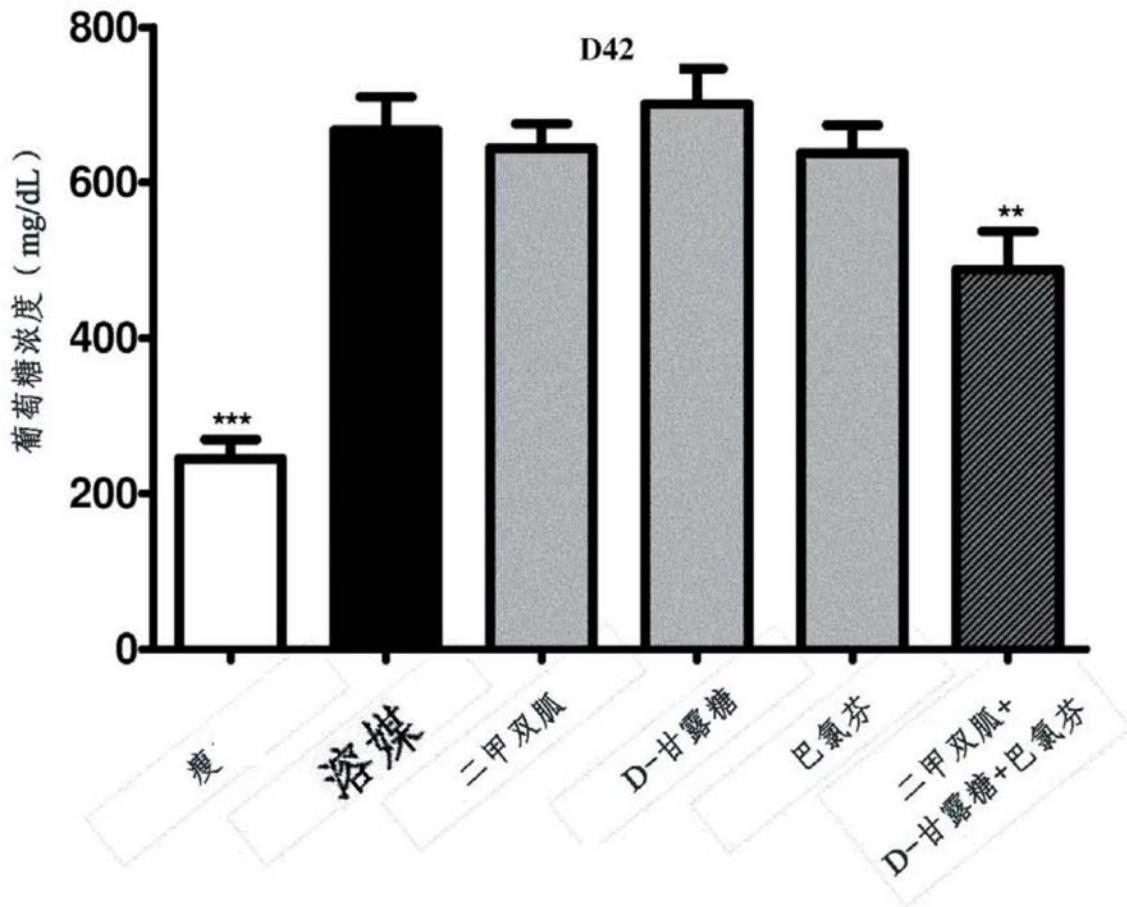


图23