



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109640993 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201780049430.4

(22)申请日 2017.08.14

(30)优先权数据

10-2016-0103174 2016.08.12 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.02.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2017/008852 2017.08.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/030879 KO 2018.02.15

(71)申请人 诺麦塔制药有限公司

地址 韩国首尔市江南区彦州路727,13层
(论岷洞,特里斯大厦)

申请人 浦项工科大学校产学协力团

(72)发明人 金景泰 郑会润 李憲鍾

(74)专利代理机构 上海元好知识产权代理有限公司 31323

代理人 刘琰 张静洁

(51)Int.Cl.

A61K 31/4706(2006.01)

A61K 31/155(2006.01)

A61K 31/427(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

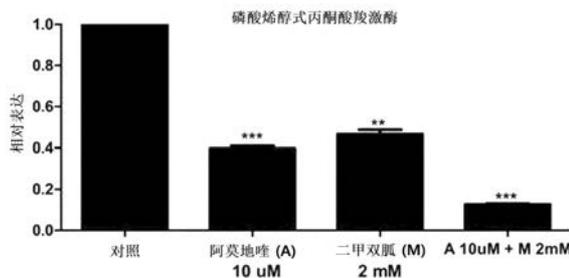
权利要求书2页 说明书25页 附图32页

(54)发明名称

包含阿莫地喹及抗糖尿病药物作为有效成分的用于预防或治疗糖尿病的药学组合物

(57)摘要

本发明涉及抑制由过氧化物酶体增殖物激活受体-γ (Peroxisome proliferator-activated receptor-γ, PPAR-γ)活化引起的副作用的同时用于预防或治疗糖尿病的药学组合物,上述药学组合物包含(a)阿莫地喹(amodiaquine)化合物或其药剂学上可接受的盐;以及(b)抗糖尿病药物作为有效成分,具体地,上述组合物用于同时预防或治疗选自对过氧化物酶体增殖物激活受体-γ活化产生反应的2型糖尿病以及对过氧化物酶体增殖物激活受体-α (Peroxisome proliferator-activated receptor-α, PPAR-α)活化反应的肥胖、血脂异常、心血管疾病及脂肪肝组成的组中的一种以上。



1. 一种抑制由过氧化物酶体增植物激活受体- γ 活化引起的副作用并用于预防或治疗糖尿病的药学组合物,其特征在於,包含:

(a) 由下述化学式1表示的阿莫地喹或其药剂学上可接受的盐;以及

(b) 选自由双胍药物、胰岛素增敏剂、二肽基肽酶4抑制剂、钠-葡萄糖共转运体2抑制剂、胰高血糖素样肽1激动剂、促胰岛素分泌剂、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、大麻素受体1拮抗剂及含有组氨酸-脯氨酸环二肽或锌盐和组氨酸-脯氨酸环二肽的组合物组成的组中的一个以上的抗糖尿病药物作为有效成分,

上述双胍药物选自由二甲双胍、丁双胍及苯乙双胍组成的组中,

上述胰岛素增敏剂选自由曲格列酮、环格列酮、罗格列酮、匹格列酮及恩格列酮组成的组中,

上述二肽基肽酶4抑制剂选自由西他列汀、利拉利汀、维格列汀、吉格列汀、沙格列汀、阿格列汀、特力利汀、安奈格列汀及依格列汀组成的组中,

上述钠-葡萄糖共转运体2抑制剂选自由达格列净、坎格列净、恩格列净、伊格列净、托格列净、鲁格列净、瑞格列净、依碳酸瑞格列净及埃格列净组成的组中,

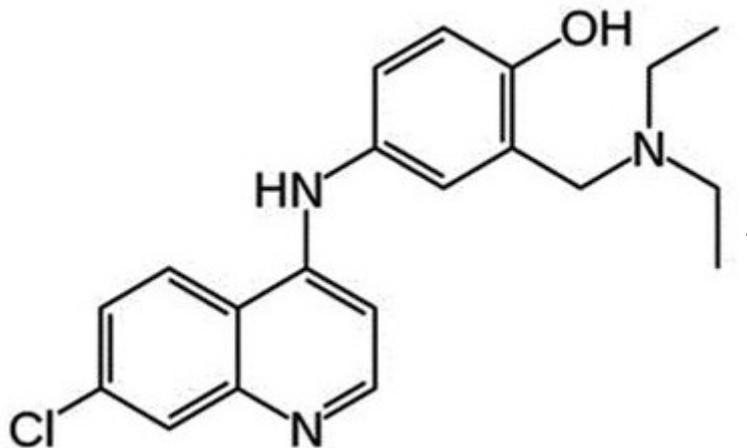
上述胰高血糖素样肽1激动剂选自由艾塞那肽、利西拉肽、利拉鲁肽、阿必鲁肽及杜拉鲁肽组成的组中,

上述促胰岛素分泌剂选自由格列本脲、格列甲脲、格列齐特、格列美脲、妥拉磺脲、甲苯磺丁脲、醋磺己脲、氢磺丁脲、氯磺丙脲、格列波脲、格列喹酮、格列生脲、格列索脲、格列派特、格列吡脲、格列环脲、格列太特、瑞格列奈及那格列奈组成的组中,

上述 α -葡萄糖苷酶抑制剂选自由阿卡波糖、伏格列波糖、乙格列酯及米格列醇组成的组中,

上述大麻素受体1拮抗剂选自由利莫那班、奥替那班、伊比那班及溴乙那班组成的组中:

化学式1:



2. 根据权利要求1所述的抑制由过氧化物酶体增植物激活受体- γ 活化引起的副作用并用于预防或治疗糖尿病的药学组合物,其特征在於,上述组合物为用于同时预防或治疗选自由对过氧化物酶体增植物激活受体- γ 活化产生反应的2型糖尿病以及对过氧化物酶体增植物激活受体- α 活化产生反应的肥胖、血脂异常、心血管疾病及脂肪肝组成的组中的一种以上。

3. 根据权利要求2所述的抑制由过氧化物酶体增植物激活受体- γ 活化引起的副作用

并用于预防或治疗糖尿病的药学组合物,其特征在于,上述血脂异常为选自由高脂血症、高甘油三酯血症及高胆固醇血症组成的组中的一种以上。

4.根据权利要求1所述的抑制由过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 活化引起的副作用并用于预防或治疗糖尿病的药学组合物,其特征在于,上述阿莫地喹及上述抗糖尿病药物的重量比为1:0.01至1:500。

5.根据权利要求1所述的抑制由过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 活化引起的副作用并用于预防或治疗糖尿病的药学组合物,其特征在于,上述组合物的每日给药量为8mg/kg至20mg/kg。

包含阿莫地喹及抗糖尿病药物作为有效成分的用于预防或治疗糖尿病的药学生物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含活化所有过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ) 及过氧化物酶体增殖物激活受体- α (PPAR- α) 的阿莫地喹及抗糖尿病药物作为有效成分的用于预防或治疗糖尿病的药学生物组合物。

背景技术

[0002] 糖尿病是指由于作为在胰脏的 β 细胞中分泌的糖(葡萄糖(glucose))调节激素的胰岛素无法在体内以所需的量来生成或胰岛素无法正常作用于细胞,血液中的葡萄糖不能被利用为能量,蓄积在血液中而引发高血糖,因而从尿中检测出糖的症状。通常,根据为了治疗糖尿病是否必须需要胰岛素,分为胰岛素依赖性糖尿病(1型糖尿)和胰岛素非依赖性糖尿病(2型糖尿病)。2型糖尿病为胰岛素非依赖性糖尿,因胰岛素抵抗性而胰岛素作用不充分或胰岛素相对不足,从而发病,但是所有糖尿病患者中的90%的患者属于2型糖尿,且主要在30多岁以后发病,固也称作成人型糖尿病。

[0003] 若糖尿长期持续下去,则无法正常进行体内葡萄糖的吸收而造成糖脂代谢及脂质代谢和蛋白质代谢的异常,从而引发多种糖尿病并发症,如高胰岛素血症、神经并发症、糖尿病性视网膜病变(非增殖性视网膜病变、增殖性视网膜病变、糖尿病性白内障)、肾功能衰竭、性功能障碍、皮肤疾病(过敏)、高血压、动脉硬化症、脑卒中(中风)、心脏病(心肌梗塞症、心绞痛症、心脏发作)、坏疽。因此,为了理解2型糖尿病的多种原因和病因并准备改善方案,在国内外正积极进行与葡萄糖的移送及代谢过程、胰岛素信号传递体系等有关的研究,但实际上没有开发可从根本上治疗糖尿病的药物。

[0004] 目前,已知的2型糖尿病治疗剂大致可分为诱导胰岛素的分泌的磺脲(sulfonylureas)类药物、具有向肌肉细胞移动糖并在肝抑制糖的合成的效果的双胍(biguanides)类、在小肠抑制生成葡萄糖的酶的 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)抑制剂、使与脂肪细胞分化有关的过氧化物酶体增殖物激活受体(Peroxisome proliferator-activated receptors,PPAR)- γ 活化的噻唑烷二酮(TZD,thiazolidinedione)类药物等4种。但是,这种口服降血糖药伴随诱发低血糖症(磺脲类药物)、肾毒性(双胍类药物)、乳酸酸中毒(双胍类药物)、腹泻和泻肚(α -葡萄糖苷酶抑制剂)等多种副作用。

[0005] 另一方面,过氧化物酶体(Peroxisome)作为成为这些对象功能异常的原因的细胞内小器官之一,在氧、葡萄糖、脂质及激素的代谢中起重要的作用,还影响细胞增殖及分化的调节、多种炎症媒介物的调节。并且,过氧化物酶体通过脂质代谢和葡萄糖代谢,不仅影响胰岛素敏感性,而且还影响细胞膜和肥大细胞的形成,并影响氧化应激,进而在老化及肿瘤的产生方面起重要的作用。过氧化物酶体增殖物激活受体(Peroxisome proliferator-activated receptors,PPAR)作为借助配体(Ligand)结合来调节基因表达的核受体之一,各种脂肪酸作为内源性配体来作用。目前发现的过氧化物酶体增殖物激活受体为过氧化物酶体增殖物激活受体 α 、过氧化物酶体增殖物激活受体 β/δ (PPAR- β/δ) 及过氧化物酶体增殖

物激活受体 γ 。

[0006] 在脂肪组织中发现最多过氧化物酶体增植物激活受体 γ ，此外，在血管内皮、巨噬细胞及胰脏的 β 细胞中被发现，调节直返细胞的分化并对全身脂质稳态起决定性作用。尤其，过氧化物酶体增植物激活受体 γ 的全部或部分活性化化合物对2型糖尿病的治疗有效。但是，当使过氧化物酶体增植物激活受体 γ 活性化时，存在因副作用而产生的肥胖、血脂异常、心血管疾病、脂肪肝等问题。

[0007] 主要在血管壁、肝、心脏、肌肉、肾脏及褐色脂肪组织等发现过氧化物酶体增植物激活受体 α ，与作为作用剂的贝特(fibrate)类一同预防动脉硬化症或延缓发病，并通过促进脂肪氧化起抗肥胖作用。

[0008] 因此，为了预防、改善或治疗借助过氧化物酶体增植物激活受体的作用所调节的各种疾病，提出开发可进一步有效调节过氧化物酶体增植物激活受体的活性的新的化合物的必要性。

[0009] 为此，本发明人在研究具有优秀的抗糖尿活性并可安全地适用的化合物的过程中，关注到阿莫地喹(amodiaquine)。

[0010] 阿莫地喹为抗疟疾性化合物，已报告多篇有关疟疾的治疗剂的研究。并且，与现有的阿莫地喹有关的专利授权中的技术来看，有口服给药用抗疟疾配合制剂及其制备方法(韩国授权专利第10-0623322号)、作为抗疟疾制剂有哌嗪衍生物(韩国授权专利第10-1423785号)等。

[0011] 但是，实际上完全没有对抑制作为通过过氧化物酶体增植物激活受体的作用来调节疾病，过氧化物酶体增植物激活受体- γ 活化时抑制作为副作用产生的肥胖、血脂异常、心血管疾病、脂肪肝等，同时用于预防或治疗糖尿病的阿莫地喹及抗糖尿病药物的复合制剂研究及技术。

发明内容

[0012] 技术问题

本发明的目的在于，提供包含(a)阿莫地喹化合物或其药剂学上可接受的盐；以及(b)抗糖尿病药物作为有效成分的组合物的新型用途，即，根据过氧化物酶体增植物激活受体- γ 活化的副作用，同时用于预防或治疗糖尿病的新型用途。

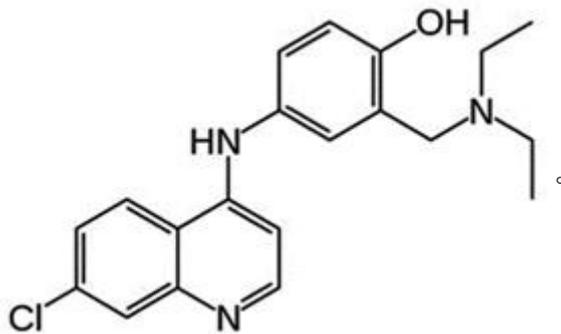
[0013] 但是，本发明所要解决的技术问题并不限于以上所提及问题，对本领域技术人员而言，可由以下的记载清楚地理解未提及的或其他问题。

[0014] 解决问题的方案

本发明提供一种抑制由过氧化物酶体增植物激活受体- γ 活化引起的副作用并用于预防或治疗糖尿病的药学组合物，包含：(a)由下述化学式1表示的阿莫地喹或其药剂学上可接受的盐；以及(b)选自由双胍药物(Biguanide)、胰岛素增敏剂(insulin sensitizer)、二肽基肽酶4抑制剂(Dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) inhibitor)、钠-葡萄糖共转运体2抑制剂(Sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitor)、胰高血糖素样肽1激动剂(Glucagon-like peptide 1 (GLP1) agonist)、促胰岛素分泌剂(insulin secretagogue)、 α -葡萄糖苷酶抑制剂(α -glucosidase inhibitor)、大麻素受体1拮抗剂(cannabinoid receptor 1 antagonist)及含有组氨酸-脯氨酸环二肽或锌盐和组氨酸-脯氨酸环二肽的

组合物组成的组中的一个以上的抗糖尿病药物作为有效成分,上述双胍药物(Biguanide)选自由二甲双胍(metformin)、丁双胍(buformin)及苯乙双胍(phenformin)组成的组中,上述胰岛素增敏剂(insulin sensitizer)选自由曲格列酮(troglitazone)、环格列酮(ciglitazone)、罗格列酮(rosiglitazone)、匹格列酮(pioglitazone)及恩格列酮(englitazone)组成的组中,上述二肽基肽酶4抑制剂(Dipeptidyl peptidase 4(DPP-4) inhibitor)选自由西他列汀(Sitagliptin)、利拉利汀(Linagliptin)、维格列汀(Vildagliptin)、吉格列汀(Gemigliptin)、沙格列汀(Saxagliptin)、阿格列汀(Alogliptin)、特力利汀(Teneligliptin)、安奈格列汀(Anagliptin)及依格列汀(Evogliptin)组成的组中,上述钠-葡萄糖共转运体2抑制剂(Sodium-glucose co-transporter 2(SGLT2) inhibitor)选自由达格列净(Dapagliflozin)、坎格列净(Canagliflozin)、恩格列净(Empagliflozin)、伊格列净(Ipragliflozin)、托格列净(Tofogliflozin)、鲁格列净(Luseogliflozin)、瑞格列净(Remogliflozin)、依碳酸瑞格列净(Remogliflozin etabonate)及埃格列净(Ertugliflozin)组成的组中,上述胰高血糖素样肽1激动剂(Glucagon-like peptide 1(GLP1) agonist)选自由艾塞那肽(Exenatide)、利西拉肽(Lixisenatide)、利拉鲁肽(Liraglutide)、阿必鲁肽(Albiglutide)及杜拉鲁肽(Dulaglutide)组成的组中,上述促胰岛素分泌剂(insulin secretagogue)选自由格列本脲(glybenclamide、glyburide)、格列甲嗪(glipizide)、格列齐特(gliclazide)、格列美脲(glimepiride)、妥拉磺脲(tolazamide)、甲苯磺丁脲(tolbutamide)、醋磺己脲(acetohexamide)、氨磺丁脲(carbutamide)、氯磺丙脲(chlorpropamide)、格列波脲(glibornuride)、格列喹酮(gliquidone)、格列生脲(glisentide)、格列索脲(glisolamide)、格列派特(glisoxepide)、格列吡脲(glycropyamide)、格列环脲(glycylamide)、格列太特(glipentide)、瑞格列奈(repaglinide)及那格列奈(nateglinide)组成的组中,上述 α -葡萄糖苷酶抑制剂(α -glucosidase inhibitor)选自由阿卡波糖(acarbose)、伏格列波糖(voglibose)、乙格列酯(emigliate)及米格列醇(miglitol)组成的组中,上述大麻素受体1拮抗剂(cannabinoid receptor 1 antagonist)选自由利莫那班(Rimonabant)、奥替那班(Otenabant)、伊比那班(Ibinabant)及溴乙那班(Surinabant)组成的组中:

化学式1:



[0015] 上述组合物可以为用于同时预防或治疗选自由对过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 活化产生反应的2型糖尿病以及对过氧化物酶体增殖物激活受体- α (Peroxisome proliferator-activated receptor- α)活化产生反应的肥胖、血脂异常、心血管疾病及脂肪肝组成的组中的一种以上。

[0016] 上述血脂异常可以为选自自由高脂血症 (hyperlipidemia)、高甘油三酯血症 (Hypertriglyceridemia) 及高胆固醇血症 (hypercholesterolemia) 组成的组中的一种以上。

[0017] 上述阿莫地喹及上述抗糖尿病药物的重量比可以为1:0.01至1:500。

[0018] 上述组合物的每日给药量可以为8mg/kg至20mg/kg。

[0019] 发明的效果

根据本发明的用于抑制由过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 活化引起的副作用并预防或治疗糖尿病的药学组合物包含 (a) 阿莫地喹化合物或其药剂学上可接受的盐; 以及 (b) 抗糖尿病药物作为有效成分, 阿莫地喹可促进过氧化物酶体增殖物激活受体- α 和过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 的活性。

[0020] 因此, 相对于单独制剂, 在向这种阿莫地喹或其药剂学上可接受的盐中混合二甲双胍等诸如双胍药物之类的抗糖尿病药物的复合制剂的情况下, 对抑制糖新生作用以及抑制脂质代谢相关中性脂肪和磷脂的生物合成等具有很大的协同效应, 因此期待本发明的组合物可有效地用于同时预防或治疗选自自由对过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 活化产生反应的2型糖尿病以及对过氧化物酶体增殖物激活受体- α 活化产生反应的肥胖、血脂异常、心血管疾病及脂肪肝组成的组中的一种以上。

附图说明

[0021] 图1a及图1b为测定阿莫地喹的过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 活化效果的曲线图, 图1c及图1d为测定过氧化物酶体增殖物激活受体- α 活化效果的曲线图。

[0022] 图2为在对作为大鼠来源肌肉细胞的C2C12肌管 (myotube) 细胞株处理阿莫地喹24小时的情况下, 测定葡萄糖类似物的吸收值的曲线图。

[0023] 图3a为确认阿莫地喹摄取对小鼠的空腹血糖浓度的影响的曲线图, 图3b为示出确认阿莫地喹摄取对向小鼠给药葡萄糖后血糖随着时间经过产生的变化的影响的腹腔内注射葡萄糖耐量试验 (IPGTT) 结果的曲线图。

[0024] 图4为确认阿莫地喹摄取对小鼠的糖化血红蛋白值的影响的曲线图。

[0025] 图5a为示出当以高脂饮食诱导肥胖小鼠 (High fat diet-induced obesity mice) 为对象摄取高脂的同时给药阿莫地喹时, 小鼠的肥胖抑制现象的曲线图, 图5b为示出小鼠的日平均饲料摄取量的曲线图。图5c为示出基于向高脂饮食长期 (20周) 诱导肥胖小鼠给药阿莫地喹的肥胖治疗现象的曲线图, 图5d为确认各小鼠的日平均饲料摄取量的曲线图。

[0026] 图6为示出当暴露于低温时, 高脂诱导肥胖小鼠通过摄取阿莫地喹产热的曲线图。

[0027] 图7a为示出以同时高脂饮食和阿莫地喹给药的小鼠为对象, 给药葡萄糖后, 确认对血糖随着时间经过而变化的影响的口服葡萄糖耐量试验 (OGTT) 结果的曲线图, 图7b为示出以同时进行高脂饮食和阿莫地喹给药的小鼠为对象, 注射胰岛素后, 确认对血糖浓度随着时间经过而变化的胰岛素耐量试验 (IPITT) 的曲线图, 图7c为示出以高脂饮食长期 (20周) 诱导肥胖小鼠为对象, 给药阿莫地喹后, 确认通过注射胰岛素来血糖浓度随者时间经过而变化的胰岛素耐量试验 (IPITT) 的曲线图。

[0028] 图8a为示出阿莫地喹对在利用高脂饮食饲养14周的实验动物中分别利用苏木精-

伊红 (Hematoxylin-Eosin) 染色肝来确认抑制脂肪引起的干细胞组织学变化的曲线图,图 8b 为示出阿莫地喹对在利用高脂饮食饲养 22 周的实验动物中分别利用苏木精-伊红 (Hematoxylin-Eosin) 染色肝来确认抑制脂肪引起的干细胞组织学变化的曲线图。

[0029] 图 9a 为示出在摄取阿莫地喹的高脂诱导肥胖小鼠的肝组织中测定与脂肪酸氧化有关的多个基因的表达的结果,图 9b 为示出在摄取阿莫地喹的高脂诱导肥胖小鼠的肌肉组织中测定与脂肪酸氧化有关的多个基因的表达的结果,图 9c 为示出在摄取阿莫地喹的高脂诱导肥胖小鼠的脂肪组织中测定与脂肪酸氧化有关的多个基因的表达的结果。

[0030] 图 10 为示出摄取阿莫地喹的高脂诱导肥胖小鼠的脂肪组织中测定与抗炎症有关的多个基因的表达的结果的曲线图。

[0031] 图 11 为示出将阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂对作为人源干细胞的 HepG2 细胞株处理 24 小时时,测定与糖新生有关的基因磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 的表达的结果的曲线图。

[0032] 图 12 为示出将阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂对作为人源干细胞的 HepG2 细胞株处理 24 小时时,测定与脂质代谢有关的中性脂肪和磷脂的生物合成相关的基因胆固醇调节元件结合蛋白 1 (SREBP-1) 的表达的结果的曲线图。

[0033] 图 13 为示出将用于诱导胰岛素抵抗性的棕榈酸与阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂一起对分化的作为鼠源肌肉细胞的 C2C12 细胞处理 16 小时时,测定与胰岛素反应性有关的基因葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) 的表达的结果的曲线图。

[0034] 图 14a 为示出以 1:50 的重量比给药阿莫地喹及二甲双胍的小鼠为对象,确认对给药葡萄糖后随着时间经过的血糖变化的影响的葡萄糖耐量试验影响的结果的曲线图,图 14b 为示出以 1:150 的重量比给药阿莫地喹及二甲双胍的小鼠为对象,确认对给药葡萄糖后随着时间经过的血糖变化的影响的葡萄糖耐量试验影响的结果的曲线图,图 14c 为示出以 1:300 的重量比给药阿莫地喹及二甲双胍的小鼠为对象,确认对给药葡萄糖后随着时间经过的血糖变化的影响的葡萄糖耐量试验影响的结果的曲线图,图 14d 为示出以 1:500 的重量比给药阿莫地喹及二甲双胍的小鼠为对象,确认对给药葡萄糖后随着时间经过的血糖变化的影响的葡萄糖耐量试验影响的结果的曲线图。

[0035] 图 15a 为示出以 1:1 的重量比给药阿莫地喹及西他列汀的小鼠为对象,确认对空腹血糖的变化的影响的结果的曲线图,图 15b 为示出以 1:2 的重量比给药阿莫地喹及西他列汀的小鼠为对象,确认对空腹血糖的变化的影响的结果的曲线图,图 15c 为示出以 1:10 的重量比给药阿莫地喹及西他列汀的小鼠为对象,确认对空腹血糖的变化的影响的结果的曲线图,图 15d 为示出以 1:20 的重量比给药阿莫地喹及西他列汀的小鼠为对象,确认对空腹血糖的变化的影响的结果的曲线图,图 15e 为示出以 1:1 的重量比给药阿莫地喹及西他列汀的小鼠为对象,确认对给药葡萄糖后随着时间经过的血糖变化的影响的葡萄糖耐量试验影响的结果的曲线图,图 15f 为示出以 1:2 的重量比给药阿莫地喹及西他列汀的小鼠为对象,确认对给药葡萄糖后随着时间经过的血糖变化的影响的葡萄糖耐量试验影响的结果的曲线图,图 15g 为示出以 1:10 的重量比给药阿莫地喹及西他列汀的小鼠为对象,确认对给药葡萄糖后随着时间经过的血糖变化的影响的葡萄糖耐量试验影响的结果的曲线图,图 15h 为示出以 1:20 的重量比给药阿莫地喹及西他列汀的小鼠为对象,确认对给药葡萄糖后随着时间经过的血糖变化的影响的葡萄糖耐量试验影响的结果的曲线图,图 15i 为示出以 1:1 的重量比

给药阿莫地喹及西他列汀的小鼠为对象确认对糖化血红蛋白值的影响的曲线图,图15j为示出以1:2的重量比给药阿莫地喹及西他列汀的小鼠为对象确认对糖化血红蛋白值的影响的曲线图,图15k为示出以1:10的重量比给药阿莫地喹及西他列汀的小鼠为对象确认对糖化血红蛋白值的影响的曲线图,图15l为示出以1:20的重量比给药阿莫地喹及西他列汀的小鼠为对象确认对糖化血红蛋白值的影响的曲线图,确认对糖化血红蛋白值的影响的曲线图。

[0036] 图16a为示出以1:0.02的重量比给药阿莫地喹及达格列净的小鼠为对象确认对空腹血糖变化的影响的结果的曲线图,图16b为示出以1:0.2的重量比给药阿莫地喹及达格列净的小鼠为对象确认对空腹血糖变化的影响的结果的曲线图,图16c示出以1:2的重量比给药阿莫地喹及达格列净的小鼠为对象确认对空腹血糖变化的影响的结果的曲线图,图16d为示出以1:0.02的重量比给药阿莫地喹及达格列净的小鼠为对象确认对给药葡萄糖后随着时间经过的血糖变化的影响的葡萄糖耐量试验影响的结果的曲线图,图16e为示出以1:0.2的重量比给阿莫地喹及达格列净的小鼠为对象确认对给药葡萄糖后随着时间经过的血糖变化的影响的葡萄糖耐量试验影响的结果的曲线图,图16f为示出以1:2的重量比给阿莫地喹及达格列净的小鼠为对象,确认对给药葡萄糖后随着时间经过的血糖变化的影响的葡萄糖耐量试验影响的结果的曲线图,图16g为示出以1:0.02的重量比给药阿莫地喹及达格列净的小鼠为对象确认对糖化血红蛋白值的影响的曲线图,图16h为示出以1:0.2的重量比给药阿莫地喹及达格列净的小鼠为对象确认对糖化血红蛋白值的影响的曲线图,图16i为示出以1:2的重量比给药阿莫地喹及达格列净的小鼠为对象确认对糖化血红蛋白值的影响的曲线图。

[0037] 图17a为示出以1:0.001的重量比给药阿莫地喹及艾塞那肽的小鼠为对象确认对给药葡萄糖后随着时间经过的血糖变化的影响的葡萄糖耐量试验影响的结果的曲线图,图17b以1:0.005的重量比给药阿莫地喹及艾塞那肽的小鼠为对象,确认对给药葡萄糖后随着时间经过的血糖变化的影响的葡萄糖耐量试验影响的结果的曲线图。

具体实施方式

[0038] 本发明人确认,相对于单独制剂,向均可以活化过氧化物酶体增殖物激活受体- α 和过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 的阿莫地喹或其药剂学上可接受的盐中混合抗糖尿病药物的复合制剂的情况下,对血糖调节以及抑制脂肪蓄积(尤其,抑制肝组织的中性脂肪蓄积)具有很大的协同效应,抑制根据过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 活化的副作用的同时,可预防或治疗糖尿病,从而完成了本发明。

[0039] 在本发明的一实施例中,为了确认阿莫地喹是否作为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 和过氧化物酶体增殖物激活受体 α 的双配体来作用,通过使用载体来测定过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 和过氧化物酶体增殖物激活受体 α 的活性(参照实施例1),且为了确认是否因阿莫地喹的葡萄糖吸收能力增加而具有血糖降低效果,用小鼠的肌肉细胞株进行葡萄糖吸收能力评价实验(参照实施例2)。并且,对小鼠进行因阿莫地喹的血糖下降及血糖调节效果、糖化血红蛋白(HbA1C)减少效果、体重减少效果、产热效果及脂肪肝预防效果评估(参照实施例3至8)。并且,确认阿莫地喹给药可通过调节基于肝、肌肉、脂肪组织内过氧化物酶体增殖物激活受体 α 活性化的多个目标基因(酰基辅酶A氧化酶(ACOX)、肉毒碱棕榈酰

转移酶-1 (CPT-1) 及中链酰基辅酶A脱氢酶 (mCAD)) 的表达来促进脂肪酸分解(参照实施例9), 且确认阿莫地喹给药可抑制基于脂肪组织内抗炎症反应的多个目标基因(肿瘤坏死因子 α (TNF α)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 及诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)) 的表达(参照实施例10)。

[0040] 其结果, 处理阿莫地喹的过氧化物酶体增植物激活受体- γ 与过氧化物酶体增植物激活受体- α 活化和根据其的一系列反应对血糖调节以及抑制脂肪蓄积有效。

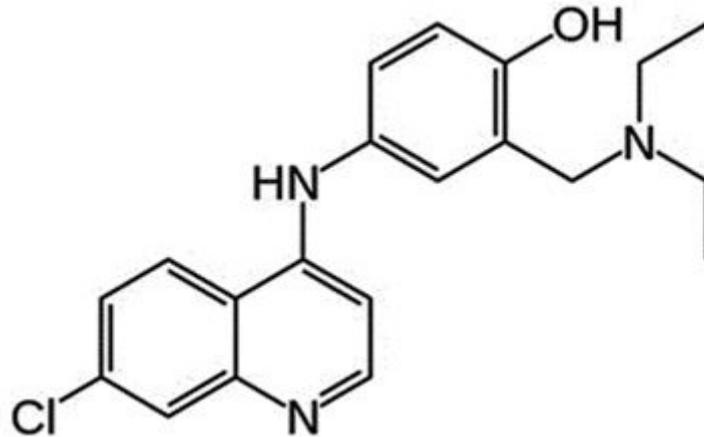
[0041] 另一方面, 在本发明的再一实施例中, 测定了对处理阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂的糖新生作用抑制的协同效应(参照实施例11), 测定了对于脂质代谢相关中性脂肪和磷脂的生物合成抑制的协同效应(参照实施例12), 在被棕榈酸诱导的胰岛素抵抗性状态中, 可增加肌肉细胞内葡萄糖转运蛋白4基因的表达(参照实施例13)。

[0042] 并且, 在本发明的还有一实施例中, 确认了对通过给药阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂的小鼠的血糖调节效果的影响(参照实施例14), 在本发明的另一实施例中, 确认了对通过给药阿莫地喹及西他列汀的复合制剂的小鼠的血糖下降、血糖调节效果及糖化血红蛋白含量的影响(实施例15), 在本发明的又一实施例中, 确认了对通过给药阿莫地喹及达格列净的复合制剂的小鼠的血糖下降、血糖调节效果及糖化血红蛋白含量的影响(实施例16), 在本发明的又一实施例中, 确认了对通过给药阿莫地喹及艾塞那肽的复合制剂的小鼠的血糖调节效果的影响(实施例17)。

[0043] 其结果, 相对于处理单独制剂, 在处理阿莫地喹及抗糖尿病药物的复合制剂的情况下, 对血糖调节及抑制脂肪蓄积(尤其, 抑制肝组织的中性脂肪蓄积) 具有很大的协同效应。

[0044] 因此, 提供一种抑制由过氧化物酶体增植物激活受体- γ 活化引起的副作用并用于预防或治疗糖尿病的药学组合物, 包含: (a) 由下述化学式1表示的阿莫地喹或其药剂学上可接受的盐; 以及 (b) 选自由双胍药物、胰岛素增敏剂、二肽基肽酶4抑制剂、钠-葡萄糖共转运体2抑制剂、胰高血糖素样肽1激动剂、促胰岛素分泌剂、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、大麻素受体1拮抗剂及含有组氨酸-脯氨酸环二肽或锌盐和组氨酸-脯氨酸环二肽的组合物组成的组中的一个以上的抗糖尿病药物作为有效成分, 上述双胍药物选自由二甲双胍、丁双胍及苯乙双胍组成的组中; 上述胰岛素增敏剂选自由曲格列酮、环格列酮、罗格列酮、匹格列酮及恩格列酮组成的组中; 上述二肽基肽酶4抑制剂选自由西他列汀、利拉利汀、维格列汀、吉格列汀、沙格列汀、阿格列汀、特力利汀、安奈格列汀及依格列汀组成的组中; 上述钠-葡萄糖共转运体2抑制剂选自由达格列净、坎格列净、恩格列净、伊格列净、托格列净、鲁格列净、瑞格列净、依碳酸瑞格列净及埃格列净组成的组中; 上述胰高血糖素样肽1激动剂选自由艾塞那肽、利西拉肽、利拉鲁肽、阿必鲁肽及杜拉鲁肽组成的组中; 上述促胰岛素分泌剂选自由格列本脲、格列甲脲、格列齐特、格列美脲、妥拉磺脲、甲苯磺丁脲、醋磺己脲、氨磺丁脲、氯磺丙脲、格列波脲、格列喹酮、格列生脲、格列索脲、格列派特、格列吡脲、格列环脲、格列太特、瑞格列奈及那格列奈组成的组中; 上述 α -葡萄糖苷酶抑制剂选自由阿卡波糖、伏格列波糖、乙格列酯及米格列醇组成的组中; 上述大麻素受体1拮抗剂选自由利莫那班、奥替那班、伊比那班及溴乙那班组成的组中。

[0045] 化学式1:



上述抗糖尿病药物为目前处于临床等开发中的或者被产品化的药物,具体地,可以为双胍药物、胰岛素增敏剂、二肽基肽酶4抑制剂、钠-葡萄糖共转运体2抑制剂、胰高血糖素样肽1激动剂、促胰岛素分泌剂、 α -葡萄糖苷酶抑制剂、大麻素受体1拮抗剂及组氨酸-脯氨酸环二肽或锌盐及含组氨酸-脯氨酸环二肽组合物,优选为双胍药物、二肽基肽酶4抑制剂、钠-葡萄糖共转运体2抑制剂及胰高血糖素样肽1激动剂,但并不限于此。

[0046] 更具体地,上述双胍药物可选自二甲双胍、丁双胍及苯乙双胍组成的组中;上述胰岛素增敏剂可选自曲格列酮、环格列酮、罗格列酮、匹格列酮及恩格列酮组成的组中;上述二肽基肽酶4抑制剂可选自西他列汀、利拉利汀、维格列汀、吉格列汀、沙格列汀、阿格列汀、特力利汀、安奈格列汀及依格列汀组成的组中;上述钠-葡萄糖共转运体2抑制剂可选自坎格列净、达格列净、恩格列净、伊格列净、托格列净、鲁格列净、瑞格列净、依碳酸瑞格列净及埃格列净组成的组中;上述胰高血糖素样肽1激动剂可选自艾塞那肽、利西拉肽、利拉鲁肽、阿必鲁肽及杜拉鲁肽;上述促胰岛素分泌剂可选自格列本脲、格列甲脲、格列齐特、格列美脲、妥拉磺脲、甲苯磺丁脲、醋磺己脲、氨磺丁脲、氯磺丙脲、格列波脲、格列喹酮、格列生脲、格列索脲、格列派特、格列吡脲、格列环脲、格列太特、瑞格列奈及那格列奈组成的组中;上述 α -葡萄糖苷酶抑制剂可选自阿卡波糖、伏格列波糖、乙格列酯及米格列醇组成的组中;上述大麻素受体1拮抗剂可选自利莫那班、奥替那班、伊比那班及溴乙那班组成的组中。

[0047] 另一方面,在含有组氨酸-脯氨酸环二肽(Cyclo-his-pro)或锌盐和组氨酸-脯氨酸环二肽的组合物中,组氨酸-脯氨酸环二肽可使用促进锌和锌代谢的酶的精制的组氨酸-脯氨酸环二肽,锌盐可包含锌阳离子及氯化物、硫酸盐等阴离子。这些组合物促进胰岛素降解酶(IDE)合成并可通过增加活性度来改善胰岛素抵抗性。

[0048] 即,在将阿莫地喹或或其药剂学上可接受的盐用作单独制剂,或者将二甲双胍等诸如双胍药物之类的抗糖尿病药物用作单独制剂的情况下,也具有一定的效果,如调节血糖且抑制脂肪蓄积等,但是其水平微不足道。但是,在对于这些的复合制剂的情况下,对血糖调节及抑制脂肪蓄积(尤其,抑制肝组织的中性脂肪蓄积)等可具有显著的协同效应。

[0049] 包含对于这些的复合制剂的组合物可以为用于同时预防或治疗选自对过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 活化产生反应的2型糖尿病以及对过氧化物酶体增殖物激活受体- α 活化产生反应的肥胖、血脂异常、心血管疾病及脂肪肝组成的一种以上。将选自上述肥胖、血脂异常、心血管疾病及脂肪肝组成的一种以上可视为根据过氧化物

酶体增植物激活受体- γ 活化的副作用。此时,上述血脂异常可以为选自高脂血症、高甘油三酯血症及高胆固醇血症组成的组中的一种以上。

[0050] 上述阿莫地喹及上述抗糖尿病药物的重量比可以为1:0.01至1:500。具体地,在上述抗糖尿病药物为双胍药物的情况下,优选地,上述阿莫地喹及上述抗糖尿病药物的重量比为1:50至1:500,更优选为1:300至1:500,但并不限于此。并且,在上述抗糖尿病药物为二肽基肽酶4抑制剂的情况下,优选地,上述阿莫地喹及上述抗糖尿病药物的重量比为1:1至1:20,更优选为1:10至1:20,但并不限于此。并且,在上述抗糖尿病药物为钠-葡萄糖共转运体2抑制剂的情况下,优选地,上述阿莫地喹及上述抗糖尿病药物的重量比为1:0.02至1:2,更优选为1:1至1:2,但并不限于此。并且,在上述抗糖尿病药物为胰高血糖素样肽1激动剂的情况下,优选地上述阿莫地喹及上述抗糖尿病药物的重量比为1:0.01至1:0.05,更优选为1:0.02至1:0.05,但并不限于此。

[0051] 此时,若阿莫地喹的重量比过多,则具有由细胞毒性引起的问题,若抗糖尿病药物的重量比过多,则相对阿莫地喹的重量比变少,因此具有不能充分活化过氧化物酶体增植物激活受体- γ 及过氧化物酶体增植物激活受体- α 的问题。

[0052] 在本发明中所使用的术语“治疗”指通过本发明的药学组合物的给药来使与代谢性疾病有关的病情有所好转或变好的所有行为。

[0053] 为此,还可包含为了制备药学组合物而通常使用的适当的载体、赋形剂及稀释剂。并且,可按照通常的方法以散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、悬浮液、乳胶、糖浆、气雾剂等的口服剂型、外用剂、栓剂及灭菌注射溶液的形态进行剂型化来使用。

[0054] 可包含在上述组合物的载体、赋形剂及稀释剂为乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、赤藓、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟苯甲酯、羟苯丙酯、滑石、硬脂酸镁及矿物油等。在对上述组合物进行制剂化的情况下,通过使用一般使用的填充剂、增量剂、结合剂、湿润剂、崩解剂、表面活性剂等稀释剂或赋形剂来制备。

[0055] 本发明的药学组合物以药学上有效的量进行给药。在本发明中,“药学上有效的量”指在医学治疗中,以可适用的合理的效益/风险比率充分治疗疾病的量,有效用量水平可根据包括患者的疾病的种类、严重程度、药物的活性、对药物的敏感度、给药时间、给药途径及排出比例、治疗时间、同时使用的药物的要素及其他医学领域中已知的要素来确定。

[0056] 本发明的药学组合物为了增进治疗效果,优选地,可与被联用的药物同时(simultaneous)、单独(separate)或依次(sequential)给药,且可给药一次或多次。考虑所有上述要素,在没有副作用的前提下,给药最小的量来可得到最大效果是最为重要的,这可由本领域技术人员容易地确定。具体地,本发明的药学组合物的有效量可根据患者的年龄、性别、状态、体重、体内活性成分吸收度、惰性及排泄速度、疾病种类、联用的药物而不同。

[0057] 可通过多种途径向个体给药本发明的药学组合物。可预期给药的所有方式,例如,可根据口服给药、鼻腔内给药、支气管给药、动脉注射、静脉注射、皮下注射、肌肉注射或腹腔内注射来进行给药。每日给药量为0.0001mg/kg至100mg/kg,优选为8mg/kg至20mg/kg,且优选地一天给药一次或分几次进行给药,但并不限于此。在保持上述药学组合物的日给药量为8mg/kg至20mg/kg的情况下,可具有均使过氧化物酶体增植物激活受体 γ 及过氧化物酶体增植物激活受体 α 活性化并可最小化因毒性引起的问题的优点。

[0058] 本发明的药学组合物根据所要治疗的疾病、给药途径、患者的年龄、性别、体重及疾病的严重程度等各种相关因子和作为活性成分的药物种类来确定。

[0059] 在本发明的另一实施方式中,本发明提供包括对个体给药上述药学组合物的步骤的用于抑制根据过氧化物酶体增植物激活受体- γ 活化的副作用的同时治疗糖尿病的方法。

[0060] 在本发明中,“个体”指需要治疗疾病的对象,更具体地,指人类或非人类的灵长类、小鼠(mouse)、大鼠(rat)、狗、猫、马及牛等哺乳类。

[0061] 进而,本发明提供用于抑制根据过氧化物酶体增植物激活受体- γ 活化的副作用且预防或治疗糖尿病的上述药学组合物的用途。

[0062] 以下,为了有助于理解本发明提供优选实施例。但是下述实施例仅用于进一步理解本发明而所提供的,而本发明的内容并不限定于下述实施例。

[0063] 准备例

在下述实施例中使用的阿莫地喹、二甲双胍购自西格玛奥德里奇(株),西他列汀购自开曼化学(Cayman Chemica),达格列净、艾塞那肽购自(株)SUNGWOO生物制药。

实施例

[0064] 实施例1.借助阿莫地喹的过氧化物酶体增植物激活受体- γ 或过氧化物酶体增植物激活受体- α 的活化测定

为了确认阿莫地喹是否作为过氧化物酶体增植物激活受体 γ 或过氧化物酶体增植物激活受体 α 的配体来作用,使用3种载体。通过使用在pZeo载体的SV40启动子,表达作为酵母的转录因子的GAL4-DNA结合结构域(DNA binding domain,DBD)和人过氧化物酶体增植物激活受体 γ -配体结合结构域(ligand binding domain,LBD)或过氧化物酶体增植物激活受体 α -配体结合结构域的载体、使重复8次可与GAL4基因相结合的碱基序列(5'-CTCGGAGGACAGTACTCCG-3')的基因结合在作为报告基因的荧光素酶(luciferase)的载体及作为转染对照组的表达 β 半乳糖苷酶(β -galactosidase)的载体,按照公开的方法(Cell, 68:879-887,1992)进行。

[0065] 利用GAL4-过氧化物酶体增植物激活受体 γ -配体结合结构域质粒或GAL4-过氧化物酶体增植物激活受体 α -配体结合结构域质粒和GAL4-荧光素酶载体、 β 牛乳糖(β -galactosidase)载体转化BE(2)C细胞6小时后,在5%的CO₂培养箱培养处理阿莫地喹20小时的细胞后,测定荧光素酶表达的活性化。此时,对同时按浓度(0.01~50 μ M)处理阿莫地喹的实验组、处理0.3%的二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide,DMSO)的对照组、同时按浓度(0.001~50 μ M)处理作为过氧化物酶体增植物激活受体 γ 配体的公知的化合物的罗西格列酮(美国西格玛)的阳性对照组、同时按浓度(0.01~50 μ M)处理作为过氧化物酶体增植物激活受体 α 配体的公知的化合物的WY-14,643(美国西格玛)的阳性对照组及同时按浓度(0.001~50 μ M)处理作为阿莫地喹的类似物的公知的化合物的氯喹(Chloroquine)(7-chloro-4-(4-diethylamino-1-methylbutylamino)quinoline)(美国西格玛)的阳性对照组进行比较。上述实验结果通过进行实验组和对照组的t检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异。

[0066] 其结果,如图1a及1b所示,可知与处理作为过氧化物酶体增植物激活受体 γ 配体

的公知的化合物的罗西格列酮的阳性对照组相比,处理阿莫地喹的组呈现浓度依赖性地更高的过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 活性,与此相反,在处理作为过氧化物酶体增殖物激活受体 α 配体的公知的化合物的WY-14、643的阳性对照组及处理作为阿莫地喹的类似物的公知的化合物的氯喹的阳性对照组中,未呈现过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 活性。并且,如图1c及1d所示,可知与处理作为过氧化物酶体增殖物激活受体 α 配体的公知的化合物的WY-14、643的阳性对照组类似地,处理阿莫地喹的组中,呈现浓度依赖性高的过氧化物酶体增殖物激活受体 α 活性,但是在处理作为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 配体的公知的化合物的罗西格列酮的阳性对照组及处理作为阿莫地喹的类似物的公知的化合物的氯喹的阳性对照组中,未呈现过氧化物酶体增殖物激活受体 α 活性。

[0067] 因此,确认阿莫地喹处理具有均促进过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 及过氧化物酶体增殖物激活受体- α 活性的功效,且可知可将上述阿莫地喹作为预防或治疗与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 相关的疾病的2型糖尿病等的用途来利用,并可作为预防或治疗由过氧化物酶体增殖物激活受体 α 信号所调节的与肥胖、血脂异常、心血管疾病、脂肪肝等的用途来利用。

[0068] 并且,由图1b及1d的结果可知,阿莫地喹由于具有被苯环和羟基所取代的结构特征,均促进过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 及过氧化物酶体增殖物激活受体 α 活性,即使是阿莫地喹的类似物,也不会促进相同的活性。

[0069] 实施例2.借助阿莫地喹的C2C12肌管细胞的去糖吸收值(uptake)效果测定

在肌肉、脂肪、干细胞等中,通过基于胰岛素的信号传递来产生胰岛素受体的磷酸化,由此,位于下位的各种蛋白质被磷酸化,从而增加葡萄糖吸收能,因而降低血糖。因此,为了确认阿莫地喹是否对糖尿病有效果,进行葡萄糖吸收能评价实验。在包含10%的牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)的达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)中培养作为肌肉细胞的C2C12成肌细胞(myoblast)。当细胞密度为约80~90%时,用包含2%的马血清(horse serum)的达尔伯克改良伊格尔培养基培养液进行置换,由肌管诱导细胞分化,使C2C12成肌细胞完全分化后进行实验。在完全分化的C2C12肌管细胞中,与包含0.5%的牛血清白蛋白的达尔伯克改良伊格尔培养基一同混合浓度分别为10 μ M及30 μ M的阿莫地喹、0.1%的二甲基亚砷及50 μ M的作为葡萄糖吸收能的阳性对照组的公知的化合物的罗西格列酮(美国西格玛)后,处理24小时。处理24小时后,去除培养基,在保持在37 $^{\circ}$ C的温度的板上,通过利用3ml的KRP(0.1%的牛血清白蛋白+5mM的葡萄糖)缓冲液清洗来去除残余试样。以20分钟为间隔反复3次清洗。然后,注入1ml的KRP缓冲液,在37 $^{\circ}$ C的温度下,加入在KRP缓冲液同时溶解未标记的2-DOG和 $[^3\text{H}]$ 2-DOG(Amersham Pharmacia)的溶液(0.2mM,0.2 μ Ci),就处理10分钟。通过利用3ml的冷磷酸缓冲食盐水清洗来终止葡萄糖吸收能反应,再用磷酸缓冲食盐水清洗2次后,通风干燥细胞1小时左右后,通过加入1ml的0.1%的SDS并用移液器进行推吸使其溶解,取300 μ l的溶解液并用液体闪烁计数器(scintillation counter)(美国珀金埃尔默)测定放射性。

[0070] 其结果,如图2所示,确认与阳性对照组的罗西格列酮处理组的葡萄糖吸收值相比,阿莫地喹处理组的葡萄糖的吸收值进一步增加。

[0071] 因此,由上述结果可知,具有如下的效果,即,阿莫地喹在细胞内通过增加作为糖尿病治疗剂的代表性目标蛋白质的过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 的活性来促进向肌肉

细胞内部吸收葡萄糖。

[0072] 实施例3.借助阿莫地喹的小鼠的血糖下降效果及血糖调节效果测定

3-1.阿莫地喹及阴性对照组给药

将购自(株)日本Clea的5周龄的KKAy预饲养1周后,以每组为5只分为两组。

[0073] 将第一组给药磷酸缓冲食盐水并设为阴性对照组,将第二组每日以18mg/kg的浓度给药6周。

[0074] 3-2.小鼠的空腹血糖下降效果及血糖调节效果测定

禁食12小时后在1周、2周、5周、6周时,从尾静脉取样全血测定6周的空腹血糖。血糖测定利用血糖条(韩国京畿道绿十字)。上述实验结果通过进行实验组和对照组的t检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异(* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$)。而且,为了确认血糖调节效果,禁食16小时后,在对照及实验进行组动物们的腹腔内注入2g/kg的葡萄糖,每隔30分钟测定血中葡萄糖量并测定2小时。血中葡萄糖量测定利用糖耐性检查腹腔内注射葡萄糖耐量试验(IPGTT, intraperitoneal glucose tolerance test)。上述试验结果通过对实验组和对照组各组进行t检验来检验其显著性,统计学上具有显著性差异(* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$)。

[0075] 其结果,如图3a所示,确认与对照组相比,在摄取阿莫地喹的小鼠中空腹血糖显著下降。而且,如图3b所示,与对照组相比,在阿莫地喹给药组中,确认给药葡萄糖2小时后血中葡萄糖迅速下降。具体地,对照组的空腹血糖为132.4mg/dl,但是阿莫地喹给药组的空腹血糖为100.2mg/dl,对照组的糖负荷2小时后血糖为293.2mg/dl,但是阿莫地喹的血糖为207mg/dl。

[0076] 因此,可知,由于阿莫地喹具有降低血中葡萄糖浓度的优秀的效果,进而包含阿莫地喹作为有效成分的药学组合物可有用地使用于糖尿病预防及治疗,且具有降低空腹血糖的作用,因此可有用地作为胰岛素抵抗性2型糖尿病预防剂及治疗剂来使用。

[0077] 实施例4.对借助阿莫地喹的糖化血红蛋白(HbA1C)含量的影响

分布于血液中的一部分葡萄糖与血红素相紧密结合,将其称为糖化血红蛋白。血糖调节中,不仅要调查血糖值,而且还必须要调查糖化血红蛋白值。因为其具有因糖尿而引起的合并症随着降低1%的糖化血红蛋白而降低20%的效果。在本实施例中,观察借助阿莫地喹摄取的小鼠的糖化血红蛋白含量。

[0078] 4-1.阿莫地喹及阴性对照组给药

为了测定借助阿莫地喹的小鼠的糖化血红蛋白,从(株)日本Clea购买的5周龄的KKAy初步饲养一周后,以每组5只的方式分为两组。与上述实施例3相同,向实验动物第一组给药磷酸缓冲食盐水并设为对照进行组,将第二组以18mg/kg的浓度每日通过1ml注射器口服给药6周。

[0079] 4-2.小鼠的糖化血红蛋白测定

为了测定阿莫地喹的糖化血红蛋白降低效果,从对照及实验进行组的动物们的尾静脉取样全血注入easy Alc cartridge后,利用easy Alc analyzer(韩国首尔asanpharm)进行测定。上述试验结果通过对实验组和对照组各组进行t检验来检验其显著性,统计学上具有显著性差异(** $p < 0.005$)。

[0080] 其结果,如图4所示,确认与对照组小鼠相比,在阿莫地喹的摄取小鼠中,糖化血红蛋白的生成被抑制至69%左右。

[0081] 因此,可知阿莫地喹具有降低糖化血红蛋白的效果。

[0082] 实施例5.测定借助阿莫地喹的体重下降

5-1.实验动物的设计及实验饮食的组成

为了测定借助阿莫地喹的小鼠的体重下降,购买7周龄的C57BL/6雄性小鼠(日本东京维通利华),在一定条件(温度:22±2℃,相对湿度:55±10%,日周期:12小时)下饲养。以7只小鼠为一组,在笼子中给7只小鼠自由提供水和食物,实验前经1周的驯化后使用于实验。

[0083] 适应期结束后,分为7组并进行饮食和阿莫地喹及阳性对照组(WY-14,643,罗西格列酮)给药如下述表1所示的期间。

[0084] 表1

组	饮食类型	阿莫地喹 (mg/kg)	WY-14, 643 (mg/kg)	环格列酮 (mg/kg)	期间
正常对照组	低脂饮食 (LFD)	-	-	-	给药物质 14周
高脂对照组	高脂饮食 (HFD)	-	-	-	
阳性对照组 (预防用)	高脂饮食	-	50	-	
阿莫地喹组	高脂饮食	20	-	-	
高脂对照组	高脂饮食	-	-	-	用高脂饮食诱导15 周后给药 物质7周
阳性对照组 (治疗用)	高脂饮食	-	-	50	
阿莫地喹组	高脂饮食	20	-	-	

低脂饮食(10% kcal as fat;D12450B,Research Diets Inc.)

高脂饮食(60% kcal as fat;D12492,Research Diets Inc.)

5-2.测定小鼠的体重变化

体重变化调查通过使用电子秤(Dragon 204/S,美国梅特勒-托利多)以1周1次上午10点为准测定供给正常饲料的小鼠、供给高脂的高脂诱导肥胖小鼠及高脂中给药阿莫地喹及阳性对照组(WY-14,643及罗西格列酮)的高脂诱导肥胖小鼠的体重21周。体重平均通过合计每组7只小鼠的体重后除于小鼠并用作各个平均体重。上述实验结果通过对高脂诱导肥胖对照组和阿莫地喹、阳性对照组(WY-14,643及罗西格列酮)之间的各组进行t检验来检验

其显著性,统计学上具有显著差异(* $P<0.05$,** $P<0.005$,*** $P<0.0005$)。

[0085] 实验结果,如图5a所示,可观察到,与高脂诱导肥胖小鼠的体重相比,阿莫地喹给药组高脂诱导肥胖小鼠的体重显著下降,且与阳性对照组(WY-14、643)类似。在用高脂诱导肥胖后给药阿莫地喹的图5c的情况下,也观察到,与高脂诱导肥胖小鼠的体重相比显著下降。与此相反,在作为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 的作用剂的阳性对照组(罗西格列酮)的情况下,可确认到与高脂诱导肥胖小鼠类似或更重。

[0086] 5-3.测定高脂诱导肥胖小鼠的食物摄取量

食物摄取量调查以每日上午11点为准对摄取正常饲料长大的小鼠、摄取高脂的高脂诱导肥胖小鼠及在高脂中给药阿莫地喹及阳性对照组(WY-14、643及罗西格列酮)的高脂诱导肥胖小鼠进行测定。对于食物摄取量平均,由于每组是7只,因此除以7只用作各个平均摄取量。每日摄取的摄取量换算为千卡(kcal)来表示。试验结果,如图5b及5d所示,可观察到给药阿莫地喹及阳性对照组(WY-14、643及罗西格列酮)的高脂诱导肥胖小鼠的食物摄取量与高脂诱导肥胖小鼠的食物摄取量之间无差异。

[0087] 上述结果显示阿莫地喹具有降低小鼠的体重的效果,其与食物摄取量无关,因此,表示上述阿莫地喹可作为抗肥胖医药品来利用。

[0088] 实施例6.测定借助阿莫地喹的产热效果

脂肪细胞分为作用于脂肪蓄积的白色脂肪细胞和虽然量少但作用于产热的褐色脂肪细胞。褐色脂肪细胞具有在饭后使身体变暖的饮食诱导性产热作用,若气温下降,则活动量增加并进行产热,从而具有维持体温的功能。由于作为肥胖的实验模型的遗传性肥胖动物的ob/ob小鼠的褐色脂肪细胞功能不理想,因此,若暴露在4℃的低温下,则体温会逐渐下降且4小时左右后死亡。若褐色脂肪细胞的功能不能正常进行,则在日常生活中,由于因热而损失的能量少,因而造成过多的能量蓄积导致发生肥胖的可能性高。因此,在本发明的实施例中,观察了借助给药阿莫地喹的高脂诱导肥胖小鼠的产热能力。

[0089] 6-1.测定高脂诱导肥胖小鼠的产热能力

在实施例5中设计的实验动物中,以进行14周的高脂饮食小鼠为对象进行4℃的低温试验(cold test),用于测定产热能力(Spiegelman B.M. et al., Cell 92:829-839,1998)。以下,对上述测定方法进行详细说明。在使高脂诱导肥胖小鼠组的多个小鼠暴露在4℃的温度之前,测定体温并记录为起始测定温度,在4℃的温度的房间暴露至6小时且每小时测定体温。体温利用小鼠用直肠温度计(testo 925,德国)进行测定。产热测定值表示每小时测定的温度。上述试验结果通过对实验组和对照组各组进行t检验来检验其显著性,统计学上具有显著性差异(* $p<0.05$,*** $p<0.0005$)。

[0090] 试验结果,如图6所示,确认与高脂肥胖诱导小鼠相比,阿莫地喹给药组高脂肥胖诱导小鼠的体温下降少,产热效果突出。

[0091] 因此,可从上述结果可知,由于本发明的阿莫地喹通过提高高脂诱导肥胖小鼠的产热活性使以热生成的能量多,因此具有降低肥胖的可能性的效果。

[0092] 实施例7.测定借助阿莫地喹的小鼠的血糖调节效果

在本实施例中,为了以在实施例5设计的实验动物为对象测定血糖调节效果,进行糖耐量试验和胰岛素耐量试验。

[0093] 7-1.测定小鼠的口服糖负荷检查

禁食16小时后,以对照及实验进行组为对象口服给药2g/kg的葡萄糖,每隔30分钟测定血中葡萄糖量并测定2小时。血中葡萄糖量测定利用口服葡萄糖耐量试验(OGTT, oral glucose tolerance test)。上述实验结果通过对高脂诱导肥胖小鼠对照组和阿莫地喹、阳性对照组(WY-14,643)及摄取正常饲料小鼠之间的各组进行t检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异(* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$)。

[0094] 其结果,如图7a所示,与高脂诱导肥胖小鼠对照组相比,在阿莫地喹给药组中,确认给药葡萄糖2小时后血中葡萄糖迅速下降。具体地,高脂诱导肥胖小鼠对照组的糖负荷2小时后血糖为180.5mg/dl,但是阿莫地喹的血糖为139.1mg/dl。

[0095] 因此,可知,由于阿莫地喹具有降低血中葡萄糖浓度的优秀的效果,因此包含阿莫地喹作为有效成分的药学组合物可有用地作为成胰岛素抵抗性2型糖尿病预防剂及治疗剂来使用。

[0096] 7-2. 测定小鼠的胰岛素耐量试验

禁食16小时后,以对照及实验进行组动物们为对象向腹腔给药0.5U/kg的胰岛素,每隔30分钟测定血中葡萄糖量并测定2小时。血中葡萄糖量测定利用胰岛素耐量试验(IPITT, intraperitoneal insulin tolerance test)。上述实验结果通过对高脂诱导肥胖小鼠对照组和阿莫地喹、阳性对照组(WY-14,643及罗西格列酮)及摄取正常饲料小鼠间的各组进行t检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异(* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$)。

[0097] 其结果,如图7b所示,在高脂诱导肥胖小鼠对照组及实验组中,通过给药胰岛素来测定胰岛素抵抗性的结果,显示在所有组中30分钟时的血糖为最低值,之后慢慢增加。高脂诱导肥胖小鼠对照组在120分钟时血糖上升至空腹血糖,在正常饲料摄取组、阳性对照组(WY-14,643)、阿莫地喹给药组中,2小时后血中葡萄糖以低于空腹血糖的水平维持。而且,在具有通过图7c的高脂诱导的胰岛素抵抗性的肥胖小鼠对照组和实验组中给药胰岛素来用早期血糖的百分比(%)进行表示。测定胰岛素抵抗性的结果显示,在高脂诱导肥胖小鼠和阿莫地喹给药组中,在30分钟时显示最低值,之后慢慢增加。在阳性对照组(罗西格列酮)及正常饲料摄取组中在60分钟时血糖具有最低值,之后慢慢增加。高脂诱导肥胖小鼠对照组在120分钟时血糖上升至初期血糖的70%左右,在正常饲料摄取组、阳性对照组(罗西格列酮)、阿莫地喹给药组中,2小时后血中葡萄糖维持在初期血糖的40~45%左右。

[0098] 因此,可知,阿莫地喹的摄取具有使胰岛素敏感性增加的作用,可有用的作为胰岛素抵抗性2型糖尿病预防剂或治疗剂来使用。

[0099] 实施例8. 测定借助阿莫地喹的脂肪肝预防效果

脂肪肝的原因在于,除了由于酒精的过多摄取而引起的酒精性脂肪肝之外,可列举高热量和高脂饮食、与单纯糖的摄取相关的营养失衡。尤其,高热量或高脂饮食的持续摄取造成肝中的脂肪合成和分解之间的脂质代谢障碍,从而诱发脂肪肝。

[0100] 为此,在本实施例中,为研究借助阿莫地喹的处理的对脂肪肝诱发的影响。

[0101] 8-1. 高脂诱导肥胖小鼠组的组织取样

在实施例5中设计的实验动物中,对于同时给予高脂与药物14周的高脂诱导肥胖小鼠组,以及利用高脂诱导15周后同时给予高脂和药物的高脂诱导肥胖小鼠,以脱臼法使其牺牲后,固定于解剖用固定架,利用手术用手术刀切开腹部取出肝。为了防止所取出的肝组织收缩变形,固定于10%的福尔马林溶液。24小时后,在流水下冲洗固定的组织后,通过使用

自动组织处理装置(6460B,日本樱花)处理一般组织的脱水、透明及渗透过程14小时,且石蜡块的制作和冷冻使用自动包埋装置(Tissue-TEX,日本)。通过使用旋转式微切片机以垂直方向以4~5 μ m的厚度切片所制作的石蜡块,来经浮游温水槽和新电过程附着于载玻片。

[0102] 8-2. 观察借助阿莫地喹的脂肪肝预防效果

用苏木精染色切开的组织片后,用自来水冲洗过染色的部分后,通过1%的HCL,70%的A/C溶液中浸渍3~5次来氰化核。之后冲洗是5~10分钟左右充分冲洗,并用细胞质进行对照染色,以使核呈清明的颜色后,用流水清洗过度的伊红溶液15秒并经脱水及透明过程。通过使用光学显微镜(BX50,日本奥林巴斯)观察各个肝组织,并用安装在显微镜的CCD相机(PM-C35DX,日本奥林巴斯)拍摄各组的组织。

[0103] 实验结果,如图8a和图8b所示,确认高脂诱导肥胖小鼠的肝都是脂肪,与此相反,在阿莫地喹给药组高脂诱导肥胖小鼠的肝的情况下,几乎与正常小鼠的肝相同的形状。

[0104] 因此,从上述结果可知,本发明的阿莫地喹的脂肪肝抑制效果突出。

[0105] 实施例9. 确认根据给药阿莫地喹的肝、肌肉、脂肪组织内过氧化物酶体增殖物激活受体 α 活性化的目标基因的表达

据悉,过氧化物酶体增殖物激活受体 α 通过诱导参与脂肪酸氧化代谢途径的酶的遗传因子的酰基辅酶A氧化酶(acyl-CoA oxidase)、肉毒碱棕榈酰转移酶-1(carnitine palmitoyl transferase-1)及中链酰基辅酶A脱氢酶(medium chain acyl-CoA dehydrogenase)的表达来降低脂肪酸(fatty acid)合成。因此,若测定上述酰基辅酶A氧化酶、肉毒碱棕榈酰转移酶-1及中链酰基辅酶A脱氢酶基因的表达量,则可了解脂肪酸氧化效能。为此,在本实施例中,要研究在肝、肌肉、脂肪组织中给药阿莫地喹对酰基辅酶A氧化酶、肉毒碱棕榈酰转移酶-1及中链酰基辅酶A脱氢酶基因的表达量的影响。

[0106] 在实施例5中设计的实验动物中,以脱臼法使供给高脂14周的高脂诱导肥胖小鼠组的小鼠牺牲后,固定于解剖用固定架,利用手术用手术刀进行切开取出肝、肌肉、脂肪组织使用各组织, β -肌动蛋白(β -actin)、酰基辅酶A氧化酶、肉毒碱棕榈酰转移酶-1及中链酰基辅酶A脱氢酶的引物序列如下。

[0107] β -actin forward:5'-GGG AAG GTG ACA GCA TTG-3'

reverse:5'-ATG AAG TAT TAA GGC GGA AGA TT-3'

ACOX forward:5'-ACA CTA ACA TAT CAA CAA GAG GAG-3'

reverse:5'-CAT TGC CAG GAA GAC CAG-3'

CPT-1 forward:5'-CCA CCT CTT CTG CCT CTA T-3'

reverse:5'-TTC TCA AAG TCA AAC AGT TCC A-3'

mCAD forward:5'-CCG AAG AGT TGG CGT ATG-3'

reverse:5'-AGC AAG AAT CAC AGG CAT T-3'

利用粉碎机粉碎各组织后,利用Trizol提取RNA,并利用逆转录聚合酶链反应(RT PCR, Reverse transcription polymerase chain reaction)合成互补脱氧核糖核酸(cDNA)。作为对照组使用 β -肌动蛋白,且为了了解参与根据过氧化物酶体增殖物激活受体 α 活性化的目标基因及脂肪酸分解的酰基辅酶A氧化酶、肉毒碱棕榈酰转移酶-1及中链酰基辅酶A脱氢酶基因表达量,通过利用各个引物进行实时聚合酶链反应(RT PCR, Real-time polymerase chain reaction)。(95 $^{\circ}$ C 3分钟、<95 $^{\circ}$ C 10秒钟、60 $^{\circ}$ C 10秒钟、72 $^{\circ}$ C 30秒钟> 39次、95 $^{\circ}$ C

10秒钟、65℃ 5秒钟)。利用β-肌动蛋白校正酰基辅酶A氧化酶、肉毒碱棕榈酰转移酶-1及中链酰基辅酶A脱氢酶并算出结果值。上述试验结果通过对高脂诱导肥胖小鼠对照组和阿莫地喹及阳性对照组(WY-14,643)小鼠之间的各组进行t检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异(*p<0.05,**p<0.005,***p<0.0005)。

[0108] 其结果,如图9a、9b、9c所示,与对照组相比,在给药阿莫地喹的实验组中,确认基因表达量增加大约215倍以上。

[0109] 因此,阿莫地喹的处理在各组织中,使根据过氧化物酶体增殖物激活受体α活化性的目标基因和参与脂肪酸分解的酰基辅酶A氧化酶、肉毒碱棕榈酰转移酶-1及中链酰基辅酶A脱氢酶基因的表达增加,由此看来,意味着阿莫地喹活化过氧化物酶体增殖物激活受体α来可调节过氧化物酶体增殖物激活受体α的目标基因,且认为可通过促进脂肪酸氧化来抑制脂肪蓄积。

[0110] 实施例10. 确认借助阿莫地喹给药的脂肪组织内抗炎症的目标基因的表达

脂肪细胞从间充质干细胞(mesenchymal stem cell)及前成脂肪细胞(preadipocyte)分化,对脂质代谢功能、糖代谢功能、进一步对脂肪细胞因子分泌带来变化。由肥胖患者中增加的肿瘤坏死因子α、单核细胞趋化蛋白-1及诱导型一氧化氮合酶等促进脂肪分化为脂肪细胞的炎症,且使其他成人病发病率增加。据悉,肿瘤坏死因子α为在炎症反应中起重要作用的细胞分泌物质,单核细胞趋化蛋白-1作为炎症性趋化因子,从脂肪细胞分泌,影响肥胖、胰岛素抵抗性、动脉硬化症。并且,据悉,诱导型一氧化氮合酶作为炎症性前成物质促进炎症反应。

[0111] 因此,若测定上述肿瘤坏死因子α、单核细胞趋化蛋白-1及诱导型一氧化氮合酶基因的表达量,则可掌握抗炎症效能。为此,在本实施例中,要研究阿莫地喹给药对肿瘤坏死因子α、单核细胞趋化蛋白-1及诱导型一氧化氮合酶基因的表达量的影响。

[0112] 在实施例5中设计的实验动物中,以脱臼法使供给高脂14周的高脂诱导肥胖小鼠组的小鼠牺牲后,固定于解剖用固定架,利用手术用手术刀进行切开取出脂肪组织使用,β-肌动蛋白、肿瘤坏死因子α、单核细胞趋化蛋白-1及诱导型一氧化氮合酶的引物序列如下。

[0113] β-actin forward:5'-GGG AAG GTG ACA GCA TTG-3'

reverse:5'-ATG AAG TAT TAA GGC GGA AGA TT-3'

TNFα forward:5'-ATG AGA AGT TCC CAA ATG GC-3'

reverse:5'-TTT GAG AAG ATG ATC TGA GTG TGA G-3'

MCP-1 forward:5'-AAT GAG TAG GCT GGA GAG-3'

reverse:5'-TCT CTT GAG CTT GGT GAC-3

iNOS forward:5'-GCT TCT GGC ACT GAG TAA-3'

reverse:5'-GGA GGA GAG GAG AGA GAT-3

利用粉碎机粉碎脂肪组织后,利用Trizol提取RNA,并利用逆转录聚合酶链反应合成互补脱氧核糖核酸。作为对照组使用β-肌动蛋白,且为了了解参与肿瘤坏死因子α、单核细胞趋化蛋白-1及诱导型一氧化氮合酶基因表达量,通过利用各个引物进行实时聚合酶链反应。(95℃ 3分钟、<95℃ 10秒钟、60℃ 10秒钟、72℃ 30秒钟> 39次、95℃ 10秒钟、65℃ 5秒钟)。利用β-肌动蛋白校正肿瘤坏死因子α、单核细胞趋化蛋白-1及诱导型一氧化氮合酶并算出结果值。上述试验结果通过对高脂诱导肥胖小鼠对照组和阿莫地喹及阳性对照组

(WY-14、643)小鼠之间的各组进行t检验来检验显著性,统计学上具有显著差异(* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$)。

[0114] 其结果,如图10所示,与对照组相比,在给药阿莫地喹的实验组中,确认基因表达量下降大约540%左右。

[0115] 因此,阿莫地喹的处理在各组织中抑制参与抗炎症反应的肿瘤坏死因子 α 、单核细胞趋化蛋白-1及诱导型一氧化氮合酶基因的表达,由此看来,阿莫地喹通过抑制对抗炎症反应起重要作用的多个因子来影响肥胖、胰岛素抵抗性、动脉硬化症。

[0116] 实施例11.测定给药阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂对抑制干细胞内糖新生作用的协同效应

据悉,作为血糖调节激素的胰岛素和胰高血糖素用于调节作为肝组织的糖代谢酶的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶活性度。胰岛素通过降低作为糖新生酶的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶活性度来抑制糖新生作用,从而缩短肝组织的糖生成过程。与此相反,胰高血糖素抑制葡萄糖激酶(glucokinase)的基因表达,并促进肝组织的G6Pase活性度及mRNA表达和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶转录过程,因此少量的胰高血糖素浓度增加,使糖新生作用增加。已知,磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶为糖新生过程的速率酶,对草酰乙酸盐(oxaloacetate)转化为磷酸烯醇丙酮酸盐(phosphoenolpyruvate)的反应起到催化作用。因此,若测定上述磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因的表达量,则可掌握糖新生作用。为此,在本实施例中,研究对干细胞处理阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂,对磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因的表达量的影响。

[0117] 细胞使用了购自韩国细胞株库的人干细胞, β -肌动蛋白及磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的引物碱基序列如下。

[0118] β -actin forward:5'-GGG AAG GTG ACA GCA TTG-3'

reverse:5'-ATG AAG TAT TAA GGC GGA AGA TT-3'

PEPCK forward:5'-CAG TTG AGT AGC ACA GAG AA-3'

reverse:5'-GAT TCC TGA GTG ACC TTG AA-3'

使用了如下的细胞,即,在5%的 CO_2 、37°C的温度的培养器中,将HepG2干细胞培养于达尔伯克改良伊格尔培养基(10%的胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素)后,同时对不含血清的达尔伯克改良伊格尔培养基处理阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂并培养24小时后,利用Trizol提取RNA,利用逆转录聚合酶链反应合成互补脱氧核糖核酸。作为对照组使用 β -肌动蛋白,为了了解磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因的表达量,利用引物进行实时聚合酶链反应(95°C 3分钟、<95°C 10秒钟、60°C 10秒钟、72°C 30秒钟> 39次、95°C 10秒钟、65°C 5秒钟)。利用 β -肌动蛋白校正磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶并算出结果值。利用上述实验结果通过利用实验组与对照组的t检验进行比较检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异(** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$)。

[0119] 其结果,如图11所示,相对于单独处理10 μ M的阿莫地喹或者单独处理2mM的二甲双胍,处理10 μ M的阿莫地喹及2mM的二甲双胍的复合制剂时具有很大的协同效应。因此,可知,由于认为10 μ M的阿莫地喹及2mM的二甲双胍的复合制剂的处理在肝中抑制作为糖新生过程的主要酶的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因表达,从而可降低空腹时血糖,因而可用于治疗作为相关疾病的糖尿病。

[0120] 实施例12.测定给药阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂对抑制干细胞内脂质代谢相

关于中性脂肪和磷脂的生物合成的协同效应

据悉,胆固醇调节元件结合蛋白1用于抑制参与与脂质代谢相关中性脂肪和磷脂的生物合成有关的基因的调节的脂肪生成和体脂蓄积,在一项研究报告中,在具有高度肥胖和胰岛素抵抗性的特征的ob/ob老鼠中发生的脂肪肝病,若灭活胆固醇调节元件结合蛋白1基因,则肝组织的中性脂肪蓄积减少。因此,若测定上述胆固醇调节元件结合蛋白1基因的表达量,则可掌握肝组织的中性脂肪蓄积减少功效。为此,在本实施例中研究,对干细胞处理阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂时,对胆固醇调节元件结合蛋白1基因的表达量的影响。

[0121] 细胞使用了购自韩国细胞株库的小鼠干细胞, β -肌动蛋白及胆固醇调节元件结合蛋白1的引物碱基序列分别如下。

[0122] β -actin forward:5'-GGG AAG GTG ACA GCA TTG-3'

reverse:5'-ATG AAG TAT TAA GGC GGA AGA TT-3'

SREBP-1 forward:5'-CGA CTA CAT CCG CTT CTT G-3'

reverse:5'-GGT CCT TCA GTG ATT TGC TT-3'

使用了如下的细胞,即,在5%的CO₂、37℃的温度的培养器中,将HepG2干细胞培养于达尔伯克改良伊格尔培养基(10%的胎牛血清(FBS)、1%的青霉素-链霉素)后,同时对不含血清的达尔伯克改良伊格尔培养基处理阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂并培养24小时后,利用凯杰RNA提取试剂盒(QIAGEN RNA extraction kit)(德国希尔登凯杰(QIAGEN))分离RNA后,利用逆转录聚合酶链反应合成cDNA。作为对照组使用 β -肌动蛋白,为了了解胆固醇调节元件结合蛋白1基因的表达量,利用引物进行实时聚合酶链反应(95℃ 3分钟、<95℃ 10秒钟、60℃ 10秒钟、72℃ 30秒钟> 39次、95℃ 10秒钟、65℃ 5秒钟)。利用 β -肌动蛋白校正胆固醇调节元件结合蛋白1并算出结果值。上述实验结果利用实验组与对照组的t检验来进行比较检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异(*p<0.05,**p<0.005)。

[0123] 其结果,如图12所示,相对于单独处理10 μ M的阿莫地喹或者单独处理2mM的二甲双胍,处理10 μ M的阿莫地喹及2mM的二甲双胍的复合制剂时具有很大的协同效应。因此,认为10 μ M的阿莫地喹及2mM的二甲双胍的复合制剂的处理,在肝中抑制作为参与脂肪酸和中性脂肪的合成的主要蛋白质的胆固醇调节元件结合蛋白1基因表达,在脂肪肝病中可减少肝组织的中性脂肪蓄积,可知可以用于治疗相关脂肪肝。

[0124] 实施例13.测定给药阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂对棕榈酸诱导的胰岛素抵抗性状态中肌肉细胞内葡萄糖转运蛋白4基因的表达

据悉,葡萄糖转运蛋白4的表达借助骨骼肌中多种转录因子来增加,随着葡萄糖转运蛋白4表达的量的增加,胰岛素反应性也增加(J M Ren *et al.*, J. Clin. Invest., 95:429-432, 1995)。因此,骨骼肌中葡萄糖转运蛋白4水平对我们身体的血糖调节非常重要,因而,若测定上述葡萄糖转运蛋白4基因的表达量,则可掌握胰岛素反应性。为此,在本实施例中,研究在棕榈酸诱导的胰岛素抵抗性状态下处理阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂对肌肉细胞的葡萄糖转运蛋白4基因的表达量的影响。

[0125] 细胞使用了购自韩国细胞株库的小鼠成肌细胞, β -肌动蛋白及葡萄糖转运蛋白4的引物碱基序列如下。

[0126] β -actin forward:5'-GGG AAG GTG ACA GCA TTG-3'

reverse:5'-ATG AAG TAT TAA GGC GGA AGA TT-3'

GLUT4 forward:5'-AAA TCT AGC CCT GCC TCC-3'

reverse:5'-GCT CTA ACC GTC CTT GCC-3'

利用2%的马血清分化 1×10^7 的C2C12(小鼠成肌细胞)来制成肌管细胞后,为了在胰岛素抵抗性条件下进行实验,处理400 μ M的棕榈酸和阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂16小时后,利用凯杰RNA提取迷你试剂盒(QIAGEN RNeasy Mini kit)(美国凯杰)提取RNA。分离的RNA利用生物分析仪(Bioanalyzer)2100(美国安捷伦(Agilent))确认完整性,利用逆转录酶聚合酶链反应合成cDNA。作为对照组使用 β -肌动蛋白,为了了解葡萄糖转运蛋白4基因的表达量,利用引物进行实时聚合酶链反应(RT PCR, Real-time polymerase chain reaction)(95 $^{\circ}$ C 3分钟、<95 $^{\circ}$ C 10秒钟、60 $^{\circ}$ C 10秒钟、72 $^{\circ}$ C 30秒钟> 39次、95 $^{\circ}$ C 10秒钟、65 $^{\circ}$ C 5秒钟)。利用 β -肌动蛋白校正葡萄糖转运蛋白4并算出结果值。上述实验结果通过利用实验组与对照组的t检验进行比较检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异(* $p < 0.05$, *** $p < 0.0005$)。

[0127] 其结果,如图13所示,对用于诱导胰岛素抵抗性而分化的C2C12骨骼肌细胞处理400 μ M的棕榈酸16小时时,葡萄糖转运蛋白4的表达不会因胰岛素而明显增加,与此相反,确认相对于单独处理10 μ M的阿莫地喹或者单独处理2mM的二甲双胍,处理10 μ M的阿莫地喹及2mM的二甲双胍的复合制剂时具有很大的协同效应。因此,可知,通过确认10 μ M的阿莫地喹及的二甲双胍的复合制剂的处理通过胰岛素抵抗性状态的肌肉细胞中葡萄糖转运蛋白4基因表达增加,来对血糖调节及糖代谢改善起到积极影响,从而可用于治疗作为相关疾病的糖尿病。

[0128] 实施例14.测定给药阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂对小鼠的血糖调节效果
14-1.阿莫地喹及二甲双胍的单独给药及给药复合制剂

为了测定借助阿莫地喹及二甲双胍的复合制剂的血糖调节效果,从(株)日本Clea购买6周龄的KKAy,并在恒定的条件下(温度:22 \pm 2 $^{\circ}$ C,相对湿度:55 \pm 10%,日周期:12小时)饲养。以7只为一组,自由供给水和饮食,实验前经1周的驯化后使用于实验。

[0129] 在适应期间结束后,分为10个组,以如下述表2所示的重量比每日单独给药阿莫地喹和二甲双胍且给药阿莫地喹和二甲双胍的复合制剂并口服给药6周。

[0130] 表2

组	阿莫地喹	二甲双胍
正常对照组	-	-
单独给药组	1	-
	-	50
	-	150
	-	300
	-	500
阿莫地喹：二甲双胍复合组合物给药组	1	50
	1	150
	1	300
	1	500

14-2. 测定小鼠的血糖调节效果

为了测定血糖调节效果,绝食16小时后,向对照组及实验组动物的腹腔注入2g/kg的葡萄糖,并以30分钟的间隔测定血中葡萄糖量,对于血中葡萄糖量测定进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT,oral glucose tolerance test)。上述实验结果通过进行实验组与对照组的按组的t检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异(* $p < 0.05$,** $p < 0.005$,*** $p < 0.0005$)。

[0131] 其结果,如图14a~d所示,确认相对于单独给药组,相对于阿莫地喹:二甲双胍的重量比为1:50及1:150的情况,以1:300及1:500的重量比给药阿莫地喹和二甲双胍的复合制剂给药组在给药葡萄糖2小时后血中葡萄糖迅速减少。

[0132] 因此,相对于单独给药阿莫地喹或者单独给药二甲双胍,在给药复合制剂给药组中确认具有减少血中葡萄糖浓度的优秀的协同作用,因此,可知,以1:300或1:500的重量比给药阿莫地喹和二甲双胍的复合制剂可用地用于预防或治疗糖尿病,并可用地作为成胰岛素抵抗性2型糖尿病预防剂或治疗剂来使用。

[0133] 实施例15. 给药阿莫地喹及西他列汀的复合制剂对小鼠的血糖下降、血糖调节效果及糖化血红蛋白含量的影响

15-1. 单独给药阿莫地喹和西他列汀及给药复合制剂

为了测定借助阿莫地喹及西他列汀的复合制剂的血糖调节的效果,从(株)日本Clea购买6周龄的KKAy,并在恒定的条件下(温度:22±2℃,相对湿度:55±10%,日周期:12小时)饲养。以7只为一组,在笼子中自由供给水和饮食,实验前经1周的驯化后使用于实验。

[0134] 在适应期间结束后,分为10个组,如下述表3所示的重量比每日单独给药阿莫地喹和西他列汀且给药阿莫地喹和西他列汀的复合制剂并口服给药8周。

[0135] 表3

组	阿莫地喹	西他列汀
正常对照组	-	-
单独给药组	1	-
	-	1
	-	2
	-	10
	-	20
阿莫地喹：西他列汀 复合组合物给药组	1	1
	1	2
	1	10
	1	20

15-2. 测定小鼠的空腹血糖下降效果

在绝食16小时后,在药物处理第8周从尾静脉采集全血来测定空腹血糖。对于血糖测定使用了血糖条(韩国京畿道绿十字)。上述实验结果通过进行实验组与对照组的t检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异(* $p < 0.05$)。其结果,如图15a~d所示,确认相对于单独给药组,相对于以1:1,以1:2、1:10及1:20的重量比给药阿莫地喹和西他列汀的复合制剂给药组中,空腹血糖显著减少的协同效应。

[0136] 15-3. 测定小鼠的血糖调节效果

为了确认血糖调节效果,绝食16小时后,向对照组及实验组动物的腹腔注入2g/kg的葡萄糖,并以30分钟的间隔测定血中葡萄糖量2小时。对于血中葡萄糖量测定进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT, oral glucose tolerance test)。上述实验结果通过进行实验组与对照组的按组的t检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异(* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$)。

[0137] 其结果,如图15e~h所示,确认相对于单独给药组,相对于以1:1,以1:2、1:10及1:20的重量比给药阿莫地喹和西他列汀的复合制剂给药组,在给药葡萄糖2小时后,血中葡萄糖迅速减少。

[0138] 因此,相对于阿莫地喹单独给药组或者西他列汀单独给药组,在复合制剂给药组中确认具有减少血中葡萄糖浓度的优秀的协同作用,因此以1:10或1:20的重量比给药阿莫地喹和西他列汀的复合制剂可用地用于预防或治疗糖尿病,且可用地作为成胰岛素抵抗性2型糖尿病预防剂或治疗剂来使用。

[0139] 15-4. 测定小鼠的糖化血红蛋白

血糖调节不仅检测血糖值,还检测糖化血红蛋白数值。这是因为,糖化血红蛋白减少1%,由糖尿病引起的并发症减少20%以上。在本实施例中,观察通过摄取阿莫地喹及西他列汀的复合制剂的小鼠的糖化血红蛋白含量。为了测定阿莫地喹及西他列汀的复合制剂的糖化血红蛋白降低效果,从对照组及实验组动物中采集尾静脉全血并注入血红蛋白A1c试剂盒(Hemoglobin A1c reagent kit)后利用DCA优势分析仪(DCA vantage analyzer)(美

国纽约西门子)进行测定。上述实验结果通过进行实验组与对照组的按组t检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异(* $p < 0.05$)。

[0140] 其结果,如图15i~l所示,确认相对于单独给药组,相对于以1:1,以1:2、1:10及1:20的重量比给药阿莫地喹和西他列汀的复合制剂给药组中糖化血红蛋白生成抑制效果有所上升。

[0141] 因此,阿莫地喹及西他列汀的复合制剂具有减少糖化血红蛋白的效果,因此可有用地作为成胰岛素抵抗性2型糖尿病预防剂或治疗剂来使用。

[0142] 实施例16. 给药阿莫地喹及达格列净的复合制剂对小鼠的血糖下降、血糖调节效果及糖化血红蛋白含量的影响

16-1. 单独给药阿莫地喹和达格列净以及给药复合制剂

为了测定借助阿莫地喹及达格列净的复合制剂的血糖调节的效果,从(株)日本Clea购买6周龄的KKAy,并在恒定的条件下(温度:22±2℃,相对湿度:55±10%,日周期:12小时)饲养。以7只为一组,在笼子中自由供给水和饮食,实验前经4周的驯化后使用于实验。

[0143] 在适应期间结束后,分为8个组,如下述表4所示的重量比每日单独给药阿莫地喹和达格列净且给药阿莫地喹和达格列净的复合制剂并口服给药8周。

[0144] 表4

组	阿莫地喹	达格列净
正常对照组	-	-
单独给药组	1	-
	-	0.02
	-	0.2
	-	2
阿莫地喹: 达格列净复合 组合物给药组	1	0.02
	1	0.2
	1	2

16-2. 测定小鼠的空腹血糖下降效果

在绝食16小时后,在药物处理第8周从尾静脉采集全血来测定空腹血糖。对于血糖测定使用了血糖条(韩国京畿道绿十字)。上述实验结果通过进行实验组与对照组的t检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异(* $p < 0.05$,** $p < 0.005$)。其结果,如图16a~c所示,确认相对于单独给药组,相对于以1:0.02及1:0.2,以1:2的重量比给药阿莫地喹和达格列净的复合制剂给药组中具有空腹血糖显著减少的协同效应。

[0145] 16-3. 测定小鼠的血糖调节效果

为了确认血糖调节效果,绝食16小时后,向对照组及实验组动物的腹腔注入2g/kg的葡萄糖,并以30分钟的间隔测定血中葡萄糖量2小时。对于血中葡萄糖量测定进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT,oral glucose tolerance test)。上述实验结果通过进行实验组与对照组的按组的t检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异(* $p < 0.05$,** $p < 0.005$)。

[0146] 其结果,如图16d~f所示,确认相对于单独给药组,相对于以1:0.02及1:0.2,以1:

2的重量比给药阿莫地喹和达格列净的复合制剂给药组中,在给药葡萄糖2小时后,血中葡萄糖迅速减少。

[0147] 因此,相对于阿莫地单独给药组或达格列净单独给药组,在复合制剂给药组中确认具有减少血中葡萄糖浓度的优秀的协同作用,因此以1:2的重量比给药阿莫地喹和达格列净的复合制剂可有用地用于预防或治疗糖尿病,并可用地作为成胰岛素抵抗性2型糖尿病预防剂或治疗剂来使用。

[0148] 16-4.测定小鼠的糖化血红蛋白

有许多诊断糖尿病的方法,如测定血中葡萄糖,但是测定血中葡萄糖因饮食、运动等各种饮食的影响而不准确,因此为了管理并治疗糖尿病,测定血液中糖化血红蛋白为有效方法之一。1986年,为了管理所有形态的糖尿病,美国糖尿病协会通过提出每年进行2次糖化血红蛋白测定来开始使用相对稳定的指标的糖化血红蛋白的量作为糖尿病管理指标(韩国公开专利10-2009-0006999,公开日为2009年1月16日)。在本实施例中,观察借助摄取阿莫地喹及达格列净的复合制剂的小鼠的糖化血红蛋白含量。为了测定阿莫地喹及达格列净的复合制剂的糖化血红蛋白下降效果,从对照组及实验组动物中采集尾静脉全血并注入H血红蛋白A1c试剂盒后利用DCA优势分析仪(美国纽约西门子)进行测定。上述实验结果通过进行实验组与对照组的按组t检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异(* $p < 0.05$,** $p < 0.005$)。

[0149] 其结果,图16g~i所示,确认相对于单独给药组,相对于以1:0.02,以1:0.2或1:2的重量比给药阿莫地喹和达格列净的复合制剂给药组中糖化血红蛋白生成抑制效果有所上升。

[0150] 因此,阿莫地喹及达格列净复合制剂具有减少糖化血红蛋白的效果,因而可有用地作为成胰岛素抵抗性2型糖尿病预防剂或治疗剂来使用。

[0151] 实施例17.给哟啊阿莫地喹及艾塞那肽的复合制剂对小鼠的血糖调节效果的影响

17-1.单独给药阿莫地喹和艾塞那肽及给药复合制剂

为了测定借助阿莫地喹及艾塞那肽的复合制剂的血糖调节效果,从杰克逊实验室(Jackson laboratory)购买6周龄的ob/ob,并在恒定的条件下(温度:22±2℃,相对湿度:55±10%,日周期:12小时)饲养。以7只为一组,在笼子中自由供给水和饮食,实验前经1周的驯化后使用于实验。

[0152] 在适应期间结束后,分为6个组,如下述表5所示的重量比以隔日皮下注射的方式单独给药阿莫地喹和艾塞那肽且给药阿莫地喹和艾塞那肽的复合制剂。

[0153] 表5

组	阿莫地喹	艾塞那肽
正常对照组	-	-
单独给药组	1	-
	-	0.001
	-	0.005
阿莫地喹：艾塞那肽 复合组合物给药组	1	0.001
	1	0.005

17-2. 测定小鼠的血糖调节效果

为了确认血糖调节效果,在绝食16小时后,向对照组及实验组动物的腹腔注入2g/kg的葡萄糖,并以30分钟的间隔测定血中葡萄糖量2小时。对于血中葡萄糖量测定进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT, oral glucose tolerance test)。上述实验结果通过进行实验组与对照组的按组的t检验来检验其显著性,统计学上具有显著差异(* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$)。

[0154] 其结果,如图17a~b所示,确认相对于单独给药组,相对于以1:0.001,以1:0.005的重量比给药阿莫地喹和艾塞那肽的复合制剂给药组中,在给药葡萄糖2小时后,血中葡萄糖迅速减少。

[0155] 因此,相对于阿莫地喹单独给药组或者艾塞那肽单独给药组,复合制剂给药组中确认具有减少血中葡萄糖浓度的优秀的协同作用,因此以1:0.005的重量比给药阿莫地喹和艾塞那肽的复合制剂可有用地用于预防或治疗糖尿病,并可用地作为成胰岛素抵抗性2型糖尿病预防剂或治疗剂来使用。

[0156] 上述的本发明的说明仅用于例示,对本发明所属领域的普通技术人员而言,可理解在不变更本发明的技术思想或必须的特征下,可容易地转变为其他形态。因此,应理解的是,以上描述的实施例在所有方面都是例示性的,而并不是限制性的。

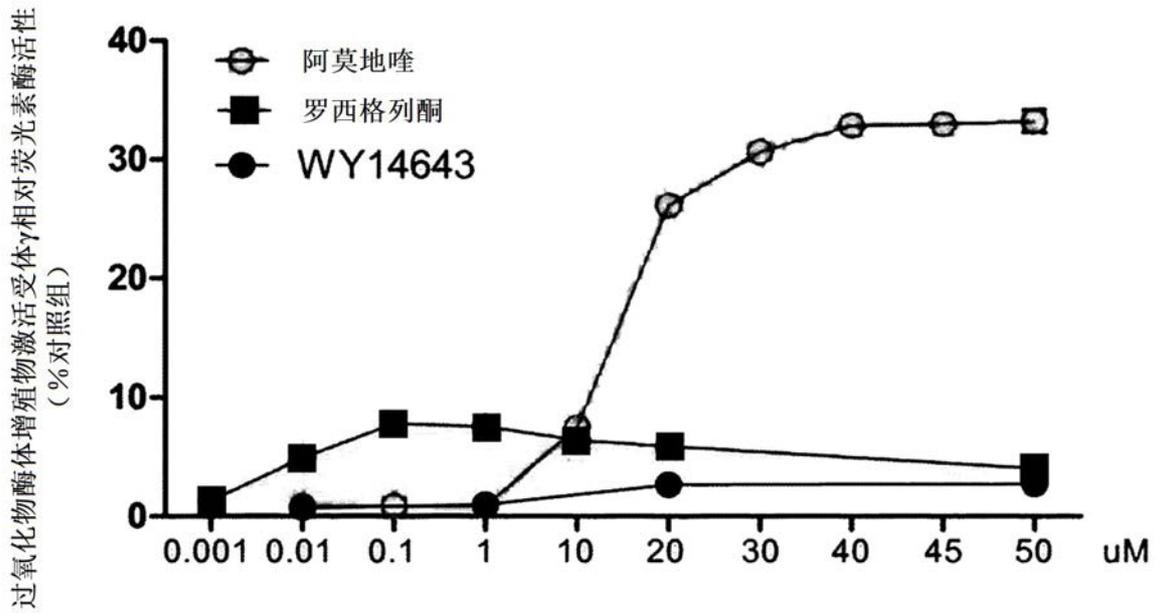


图1a

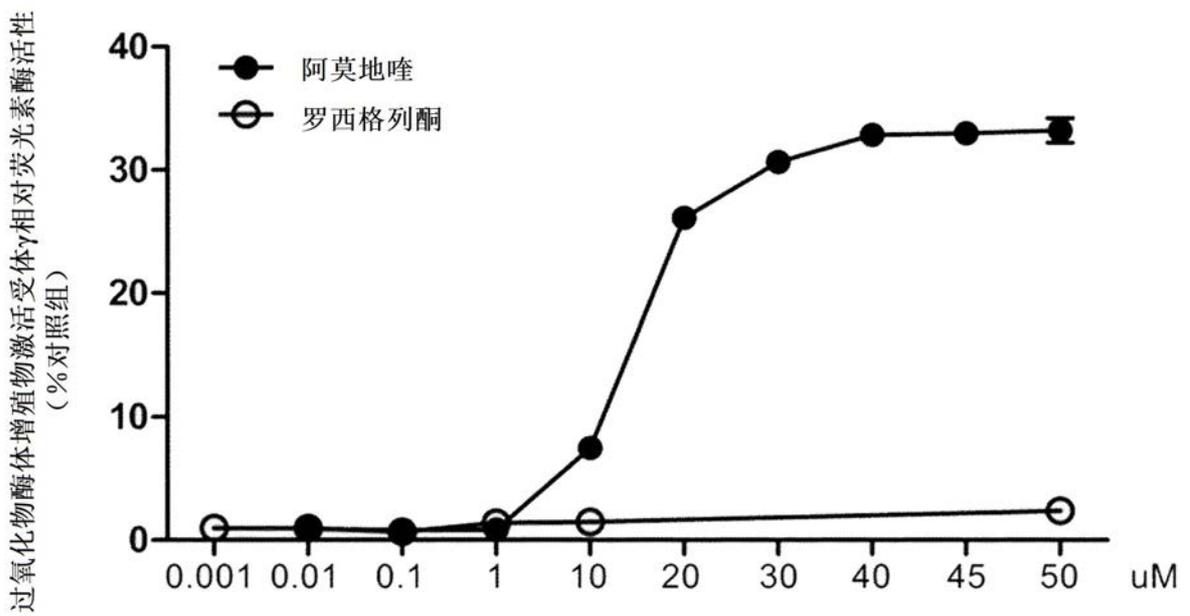


图1b

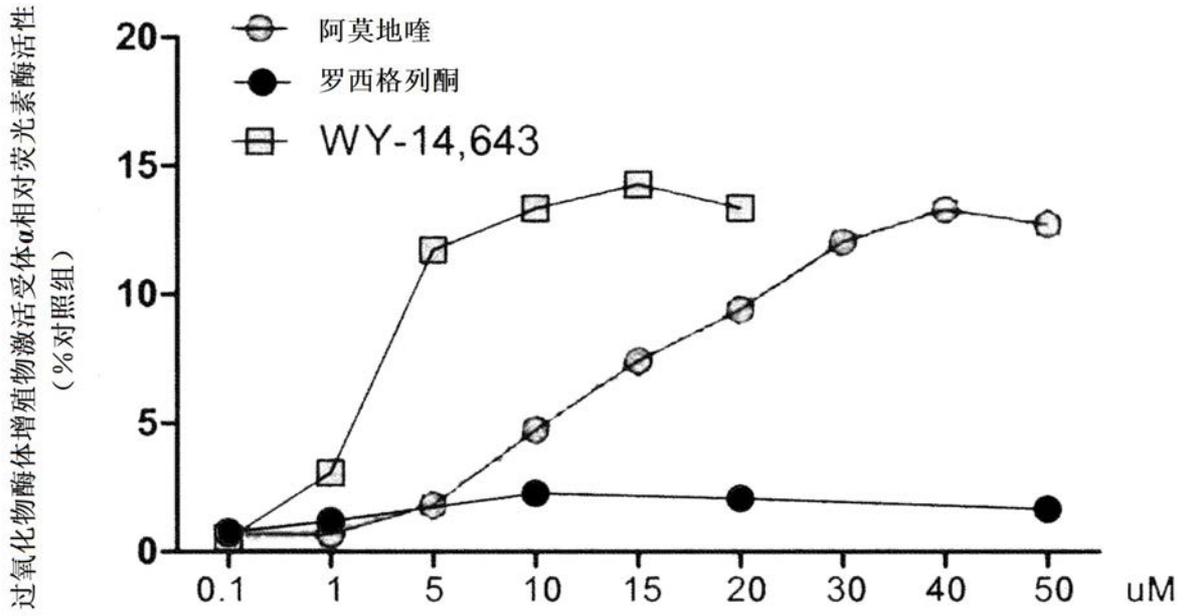


图1c

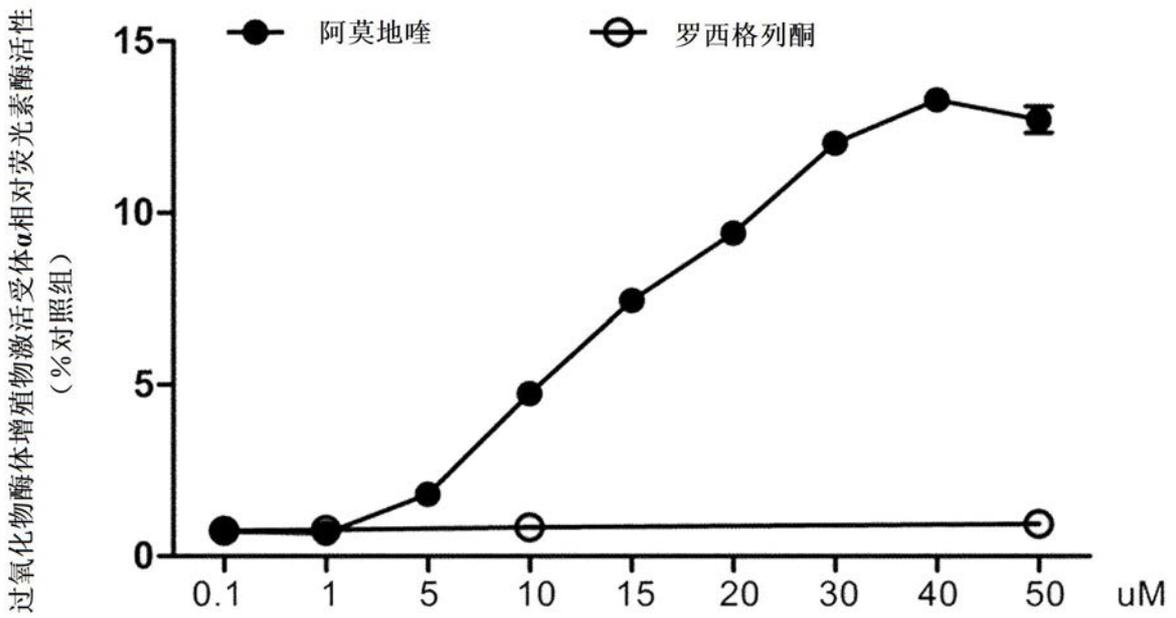


图1d

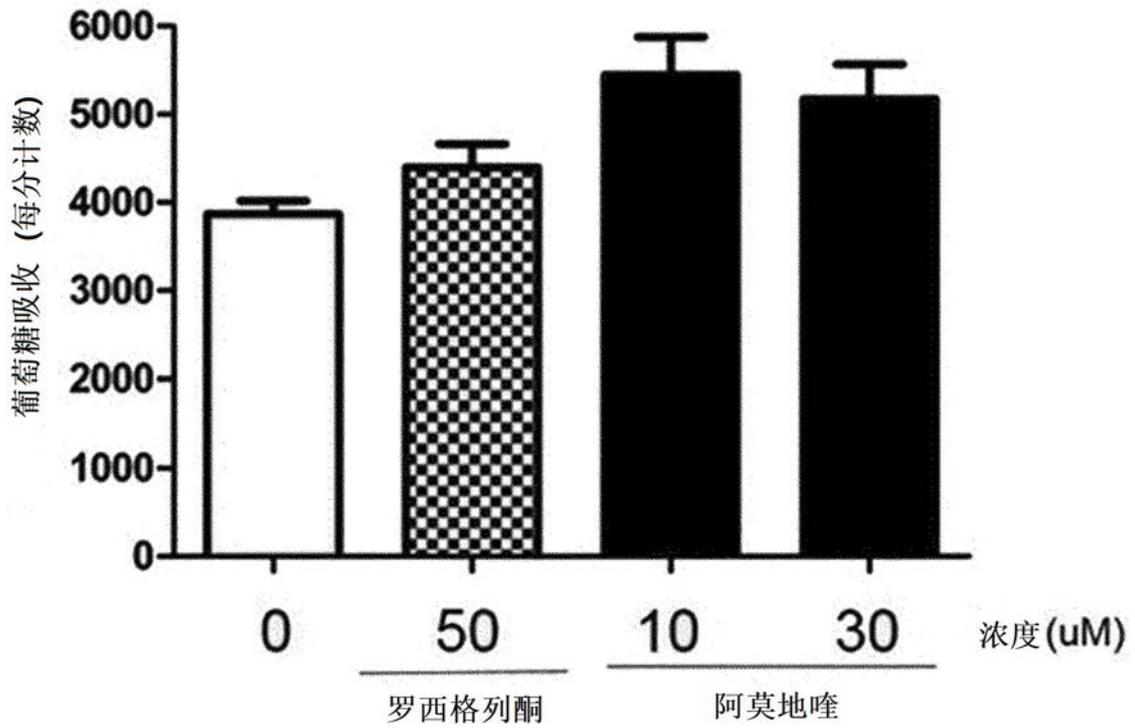


图2

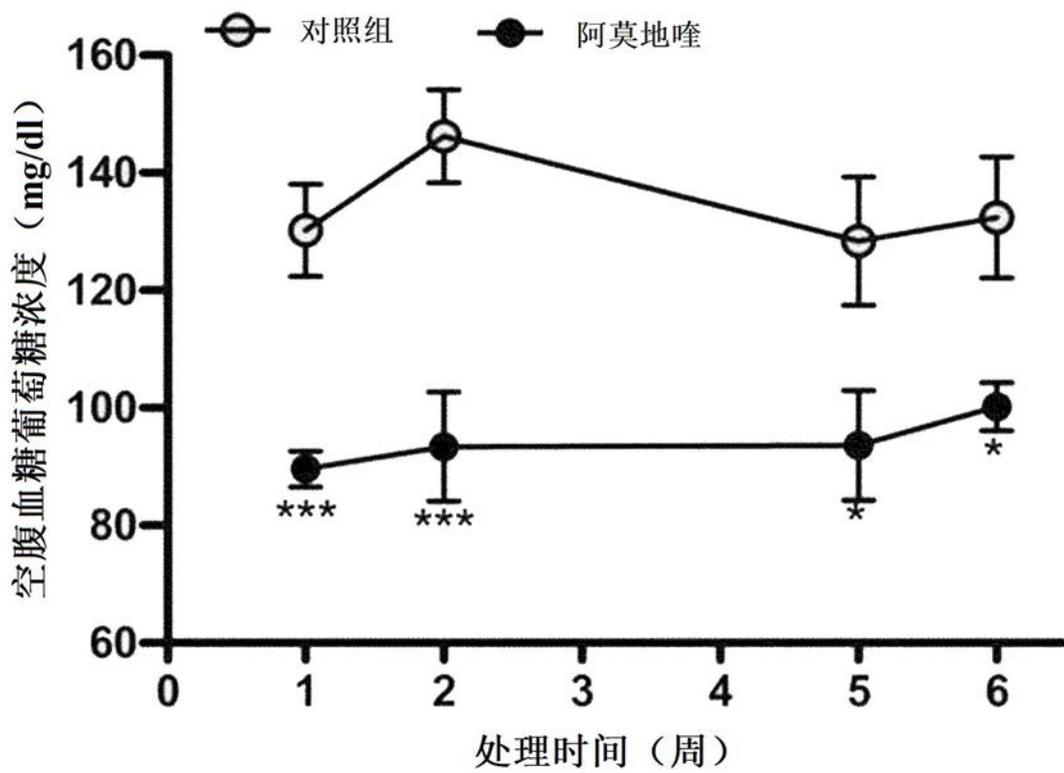


图3a

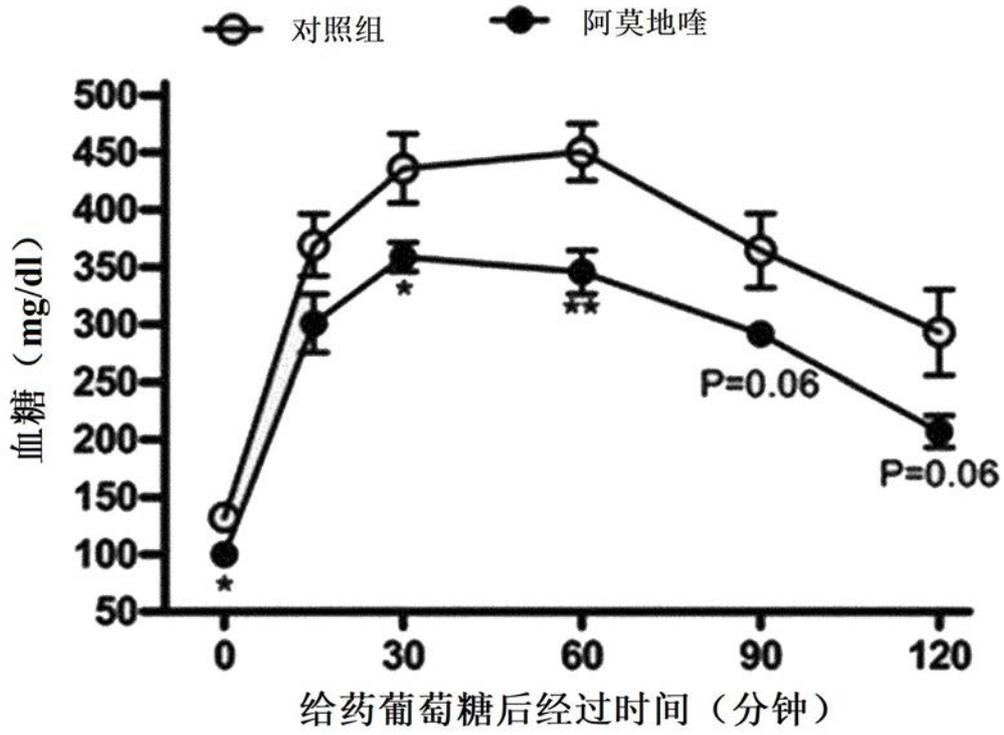


图3b

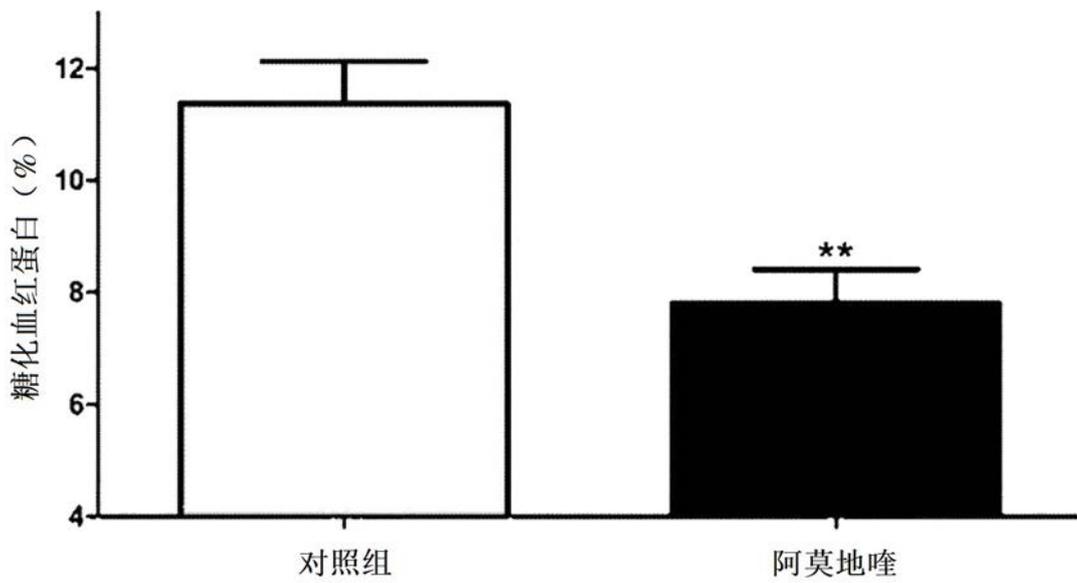


图4

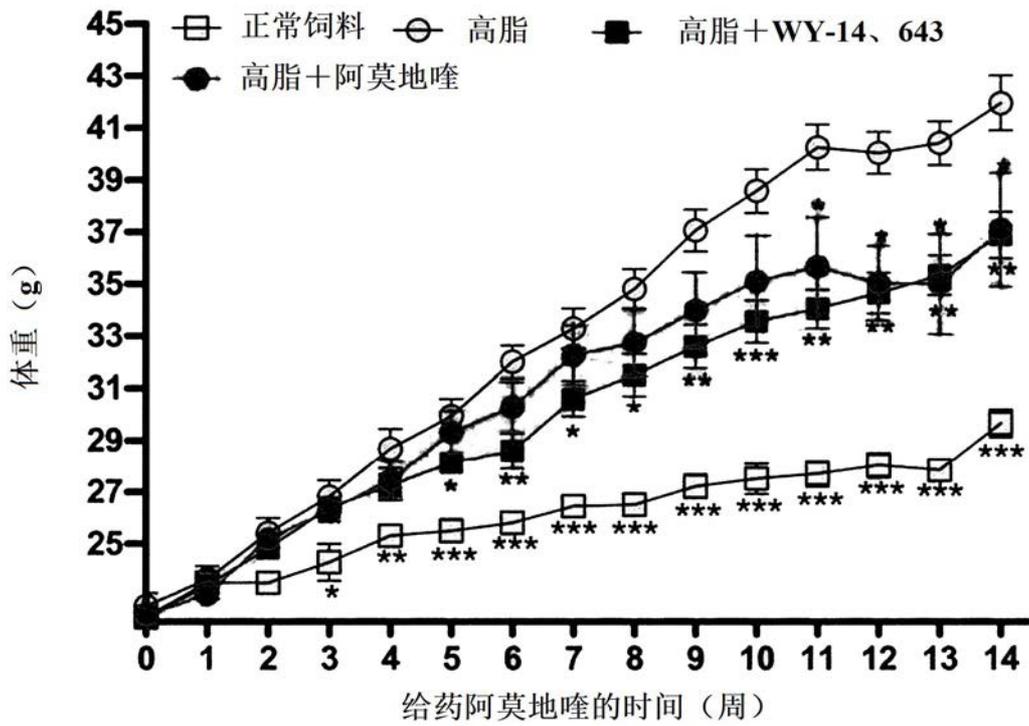


图5a

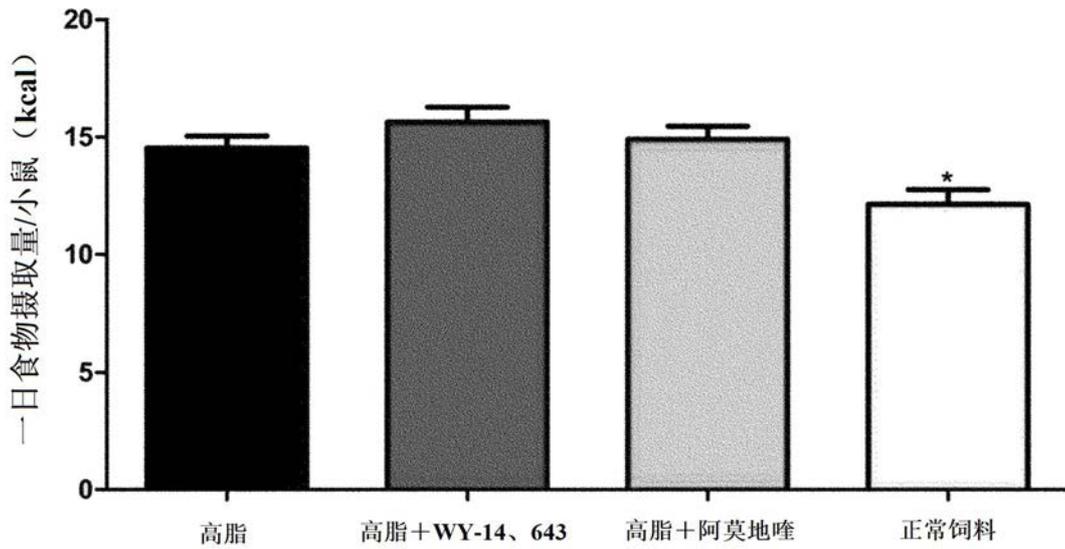


图5b

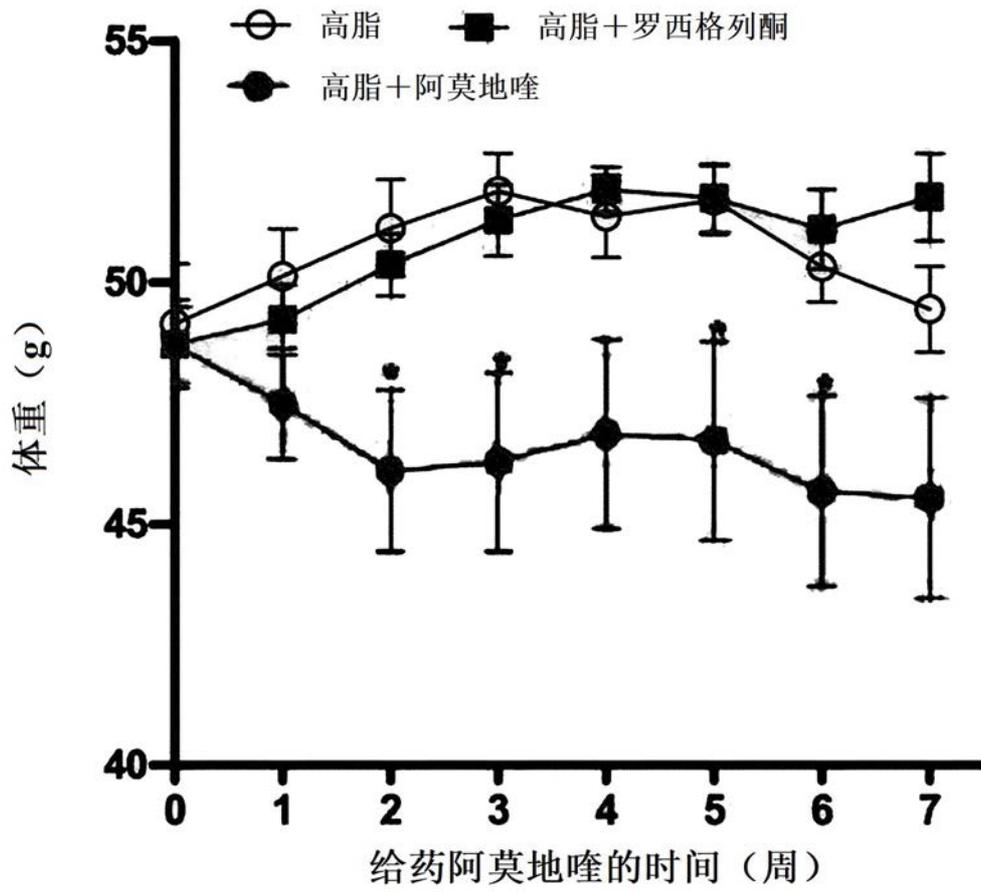


图5c

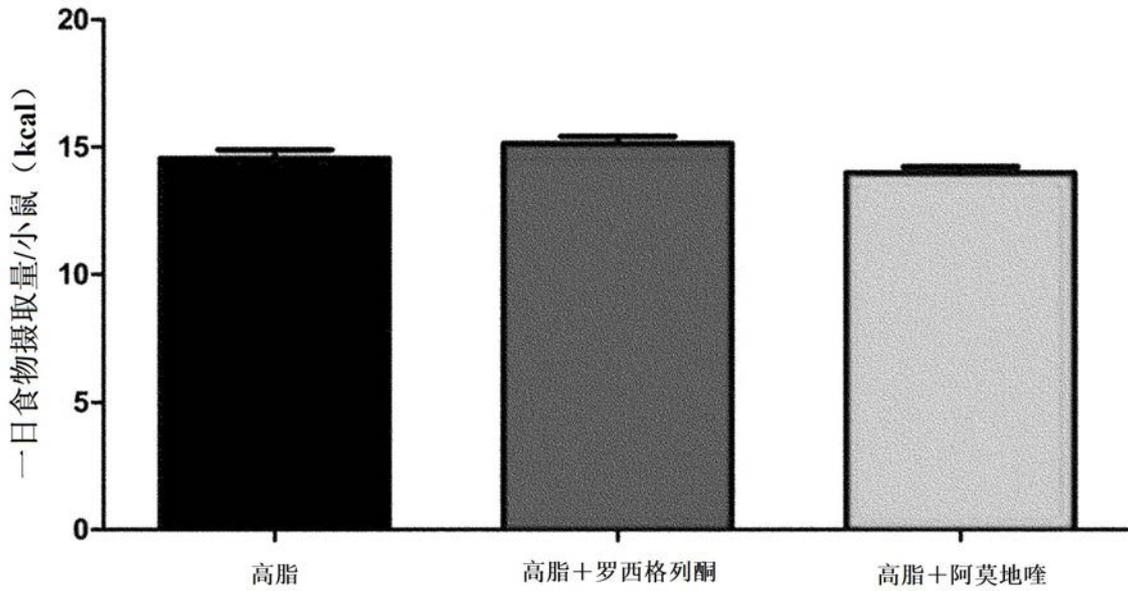


图5d

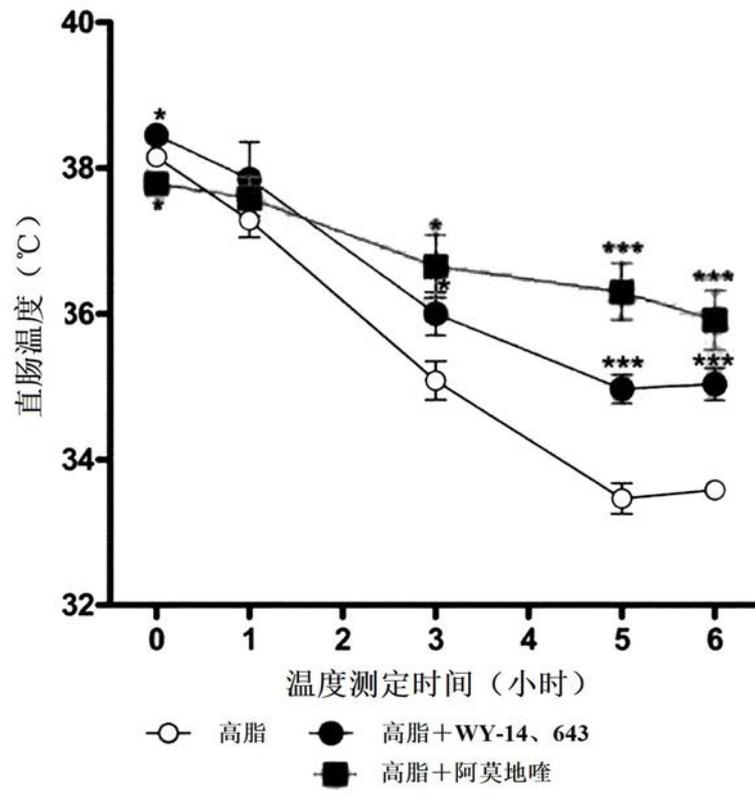


图6

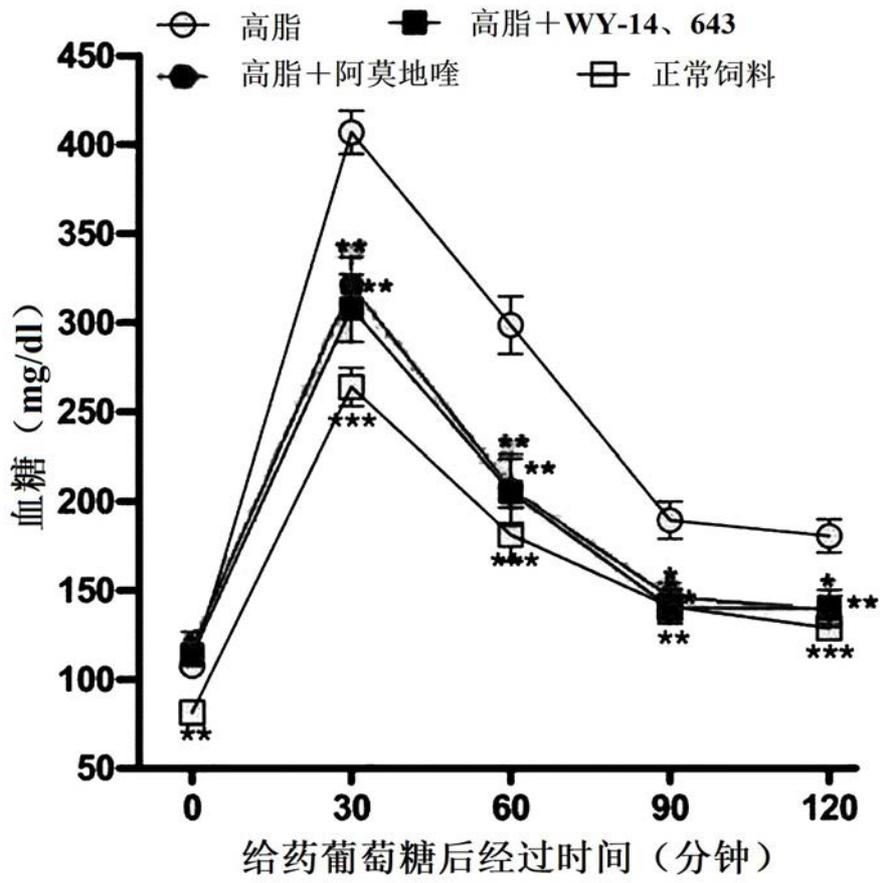


图7a

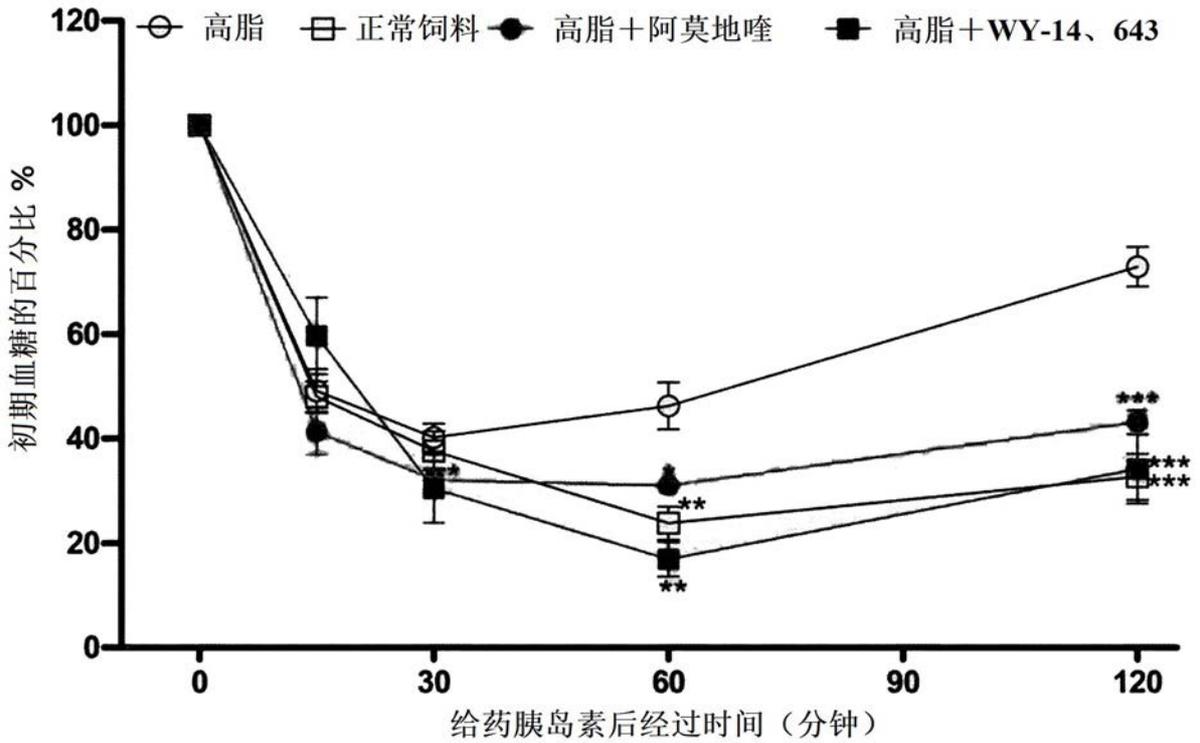


图7b

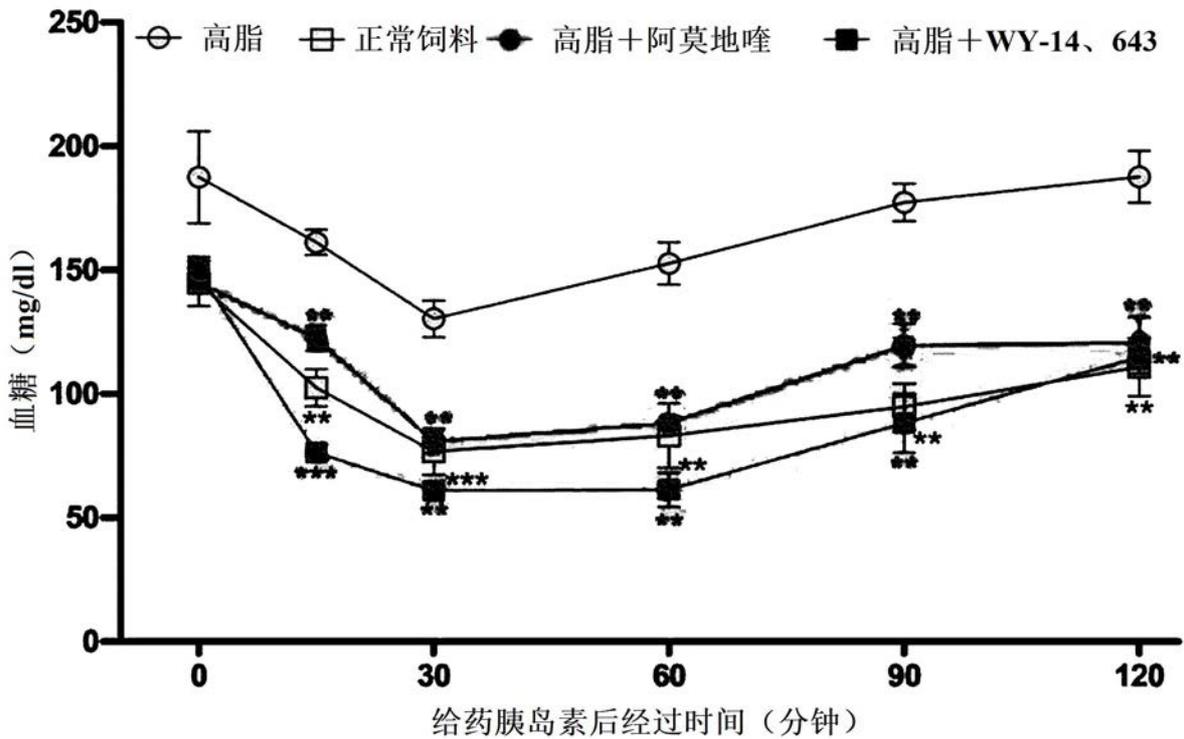


图7c

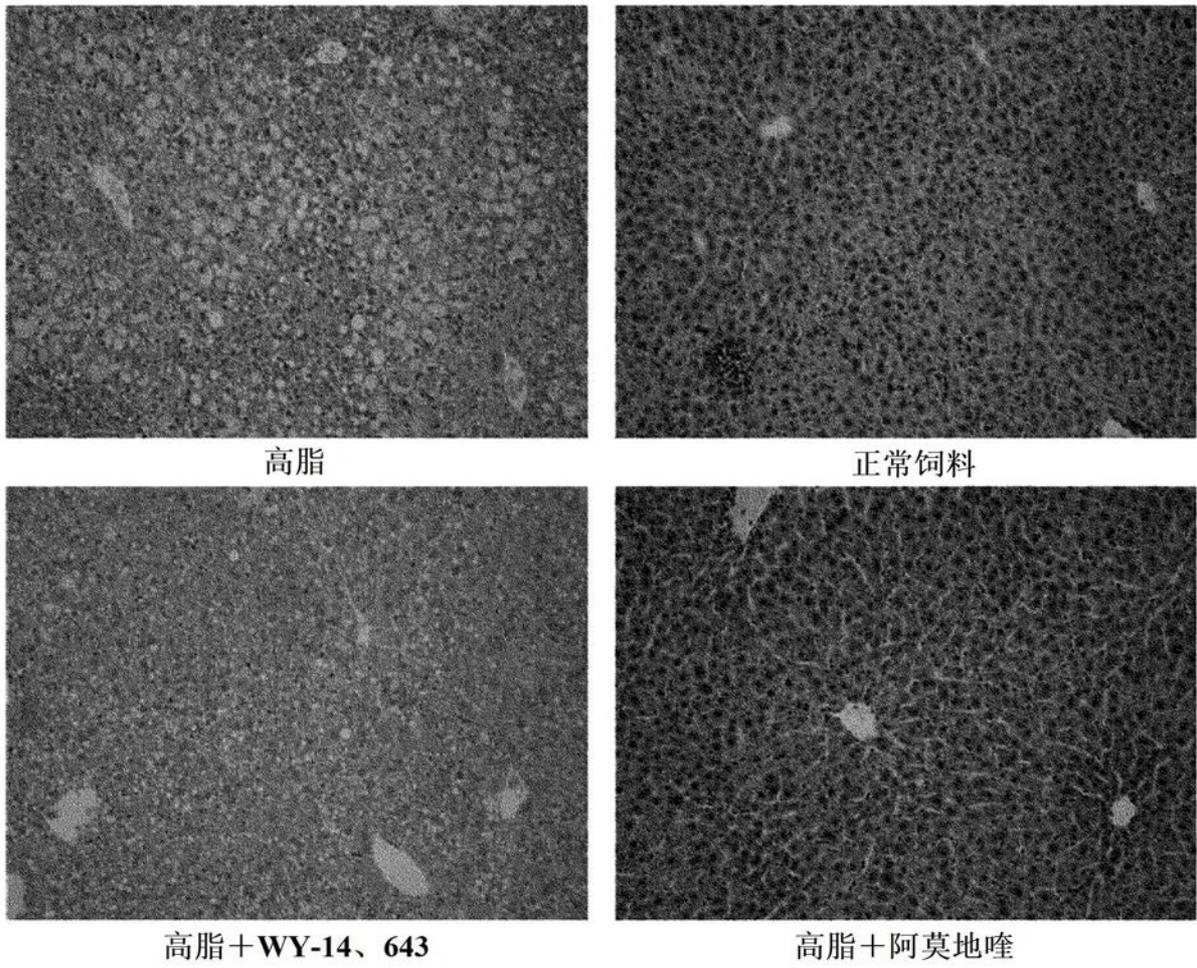


图8a

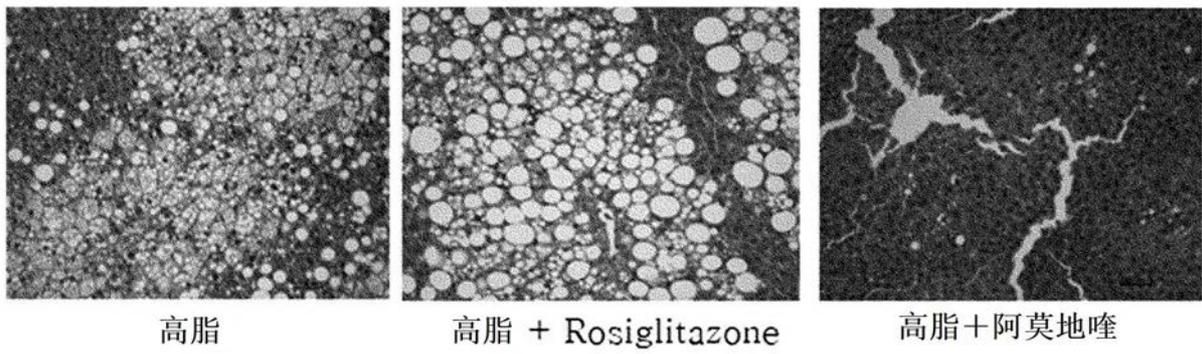


图8b

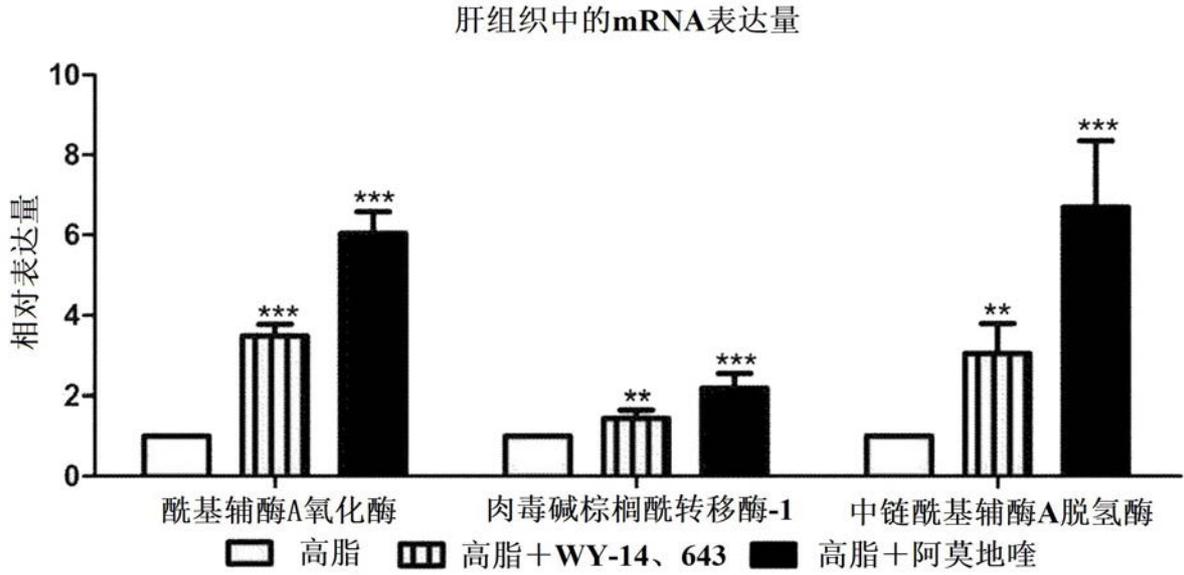


图9a

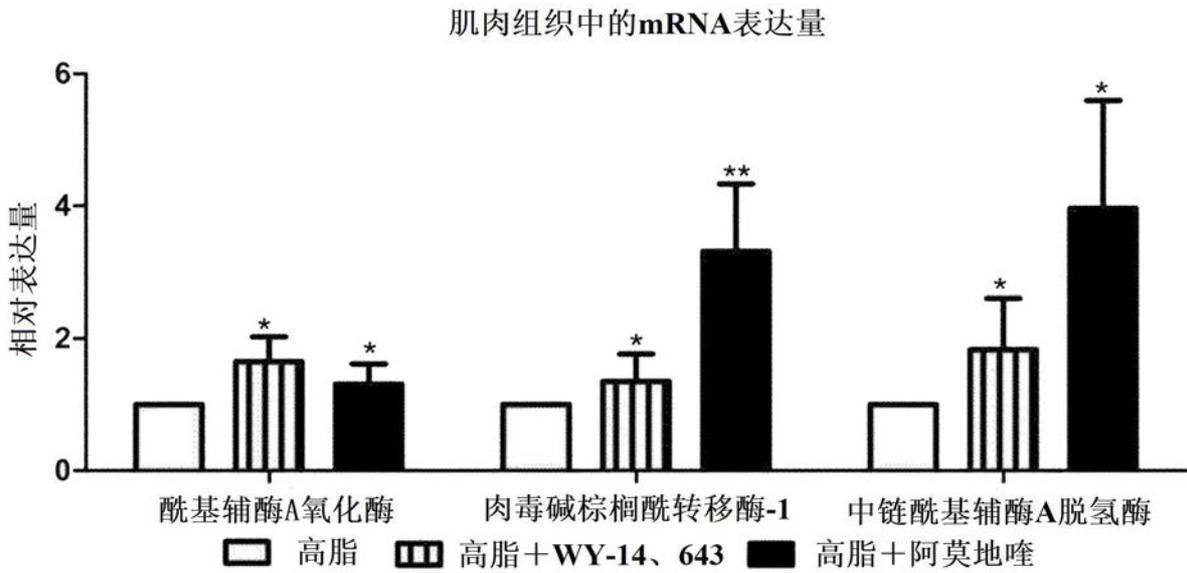


图9b

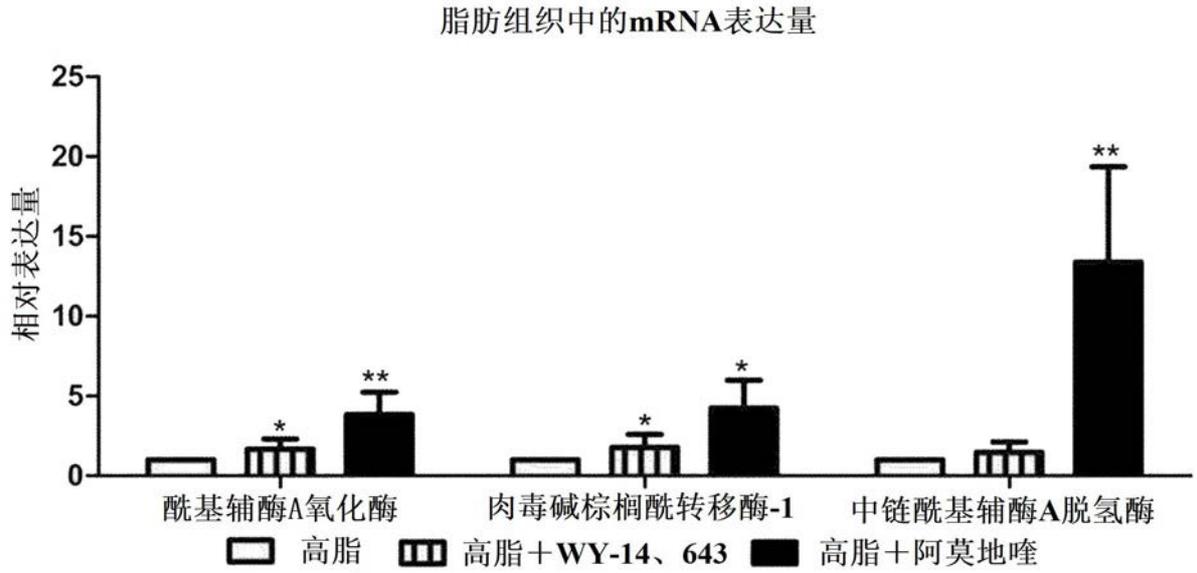


图9c

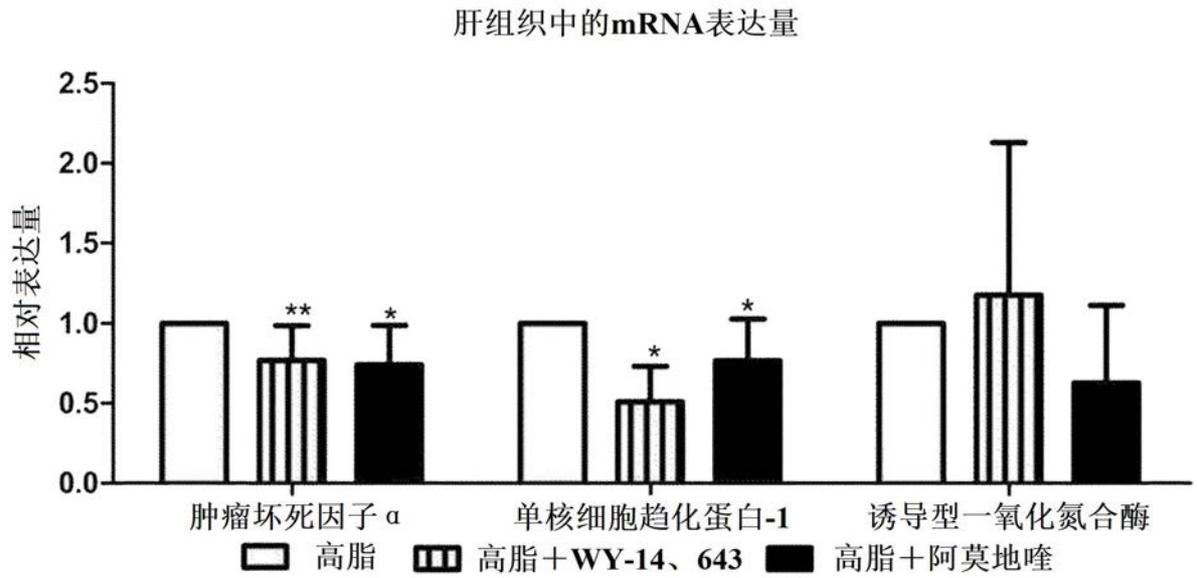


图10

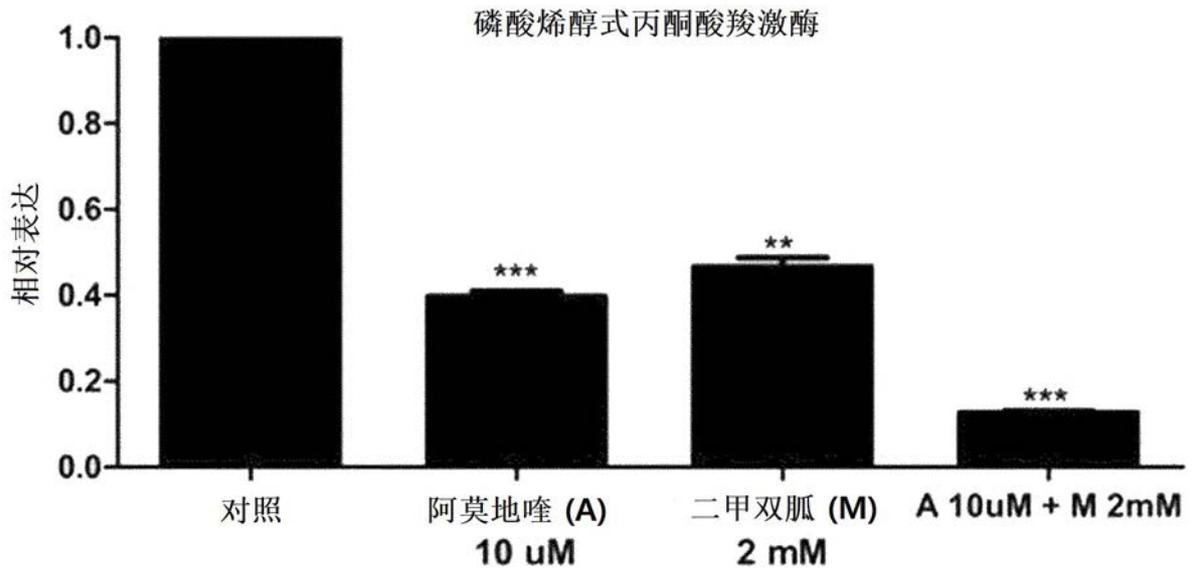


图11

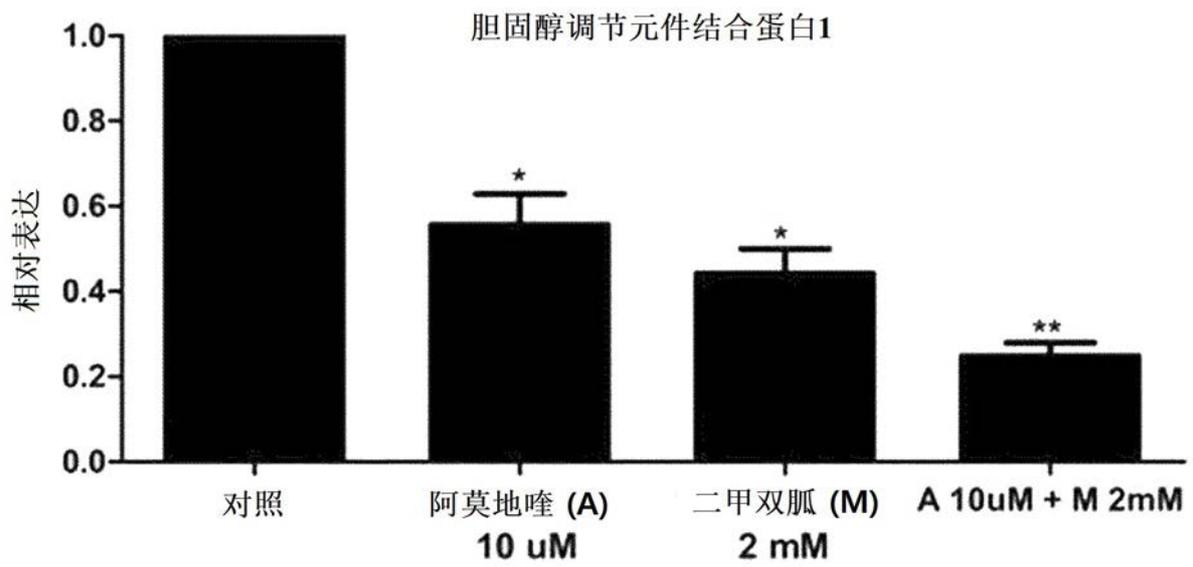


图12

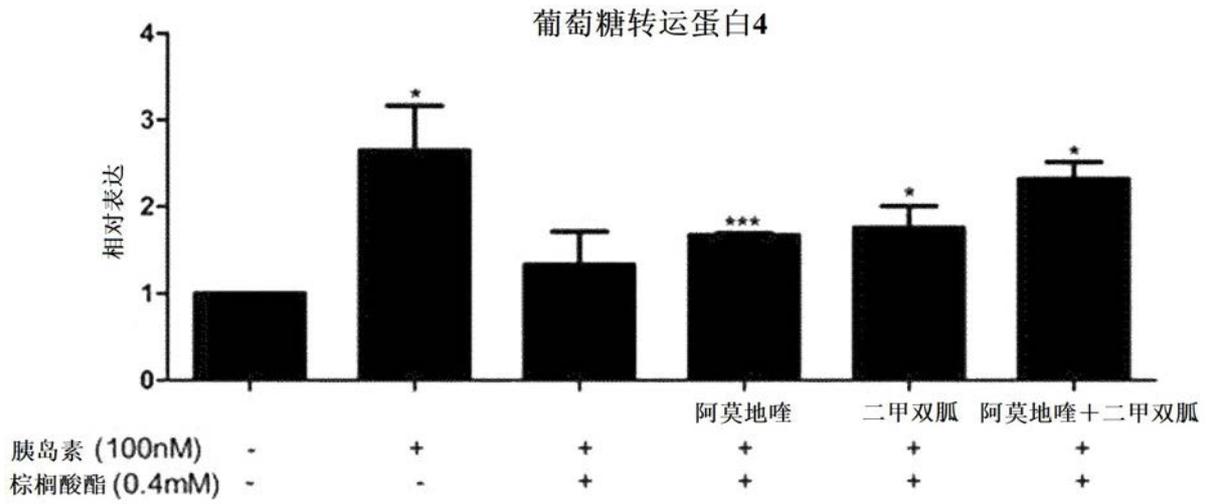


图13

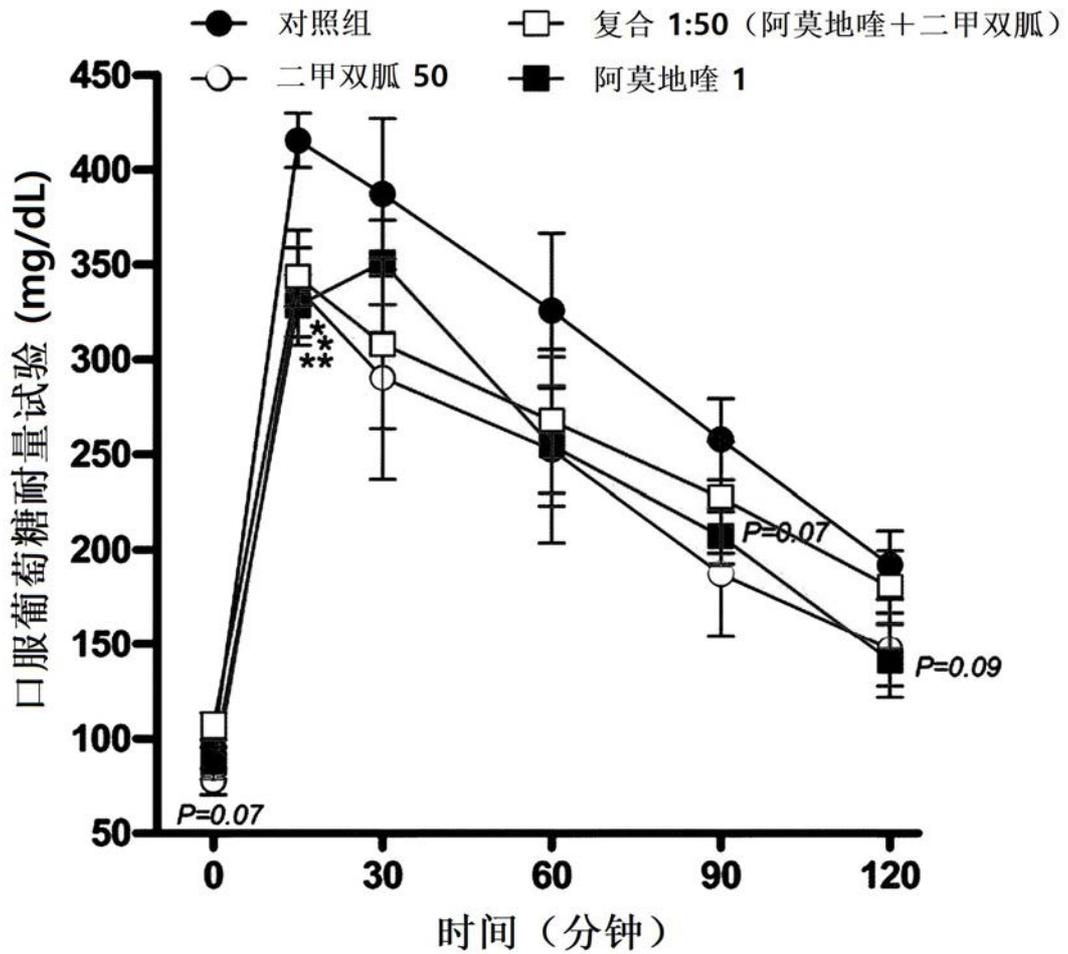


图14a

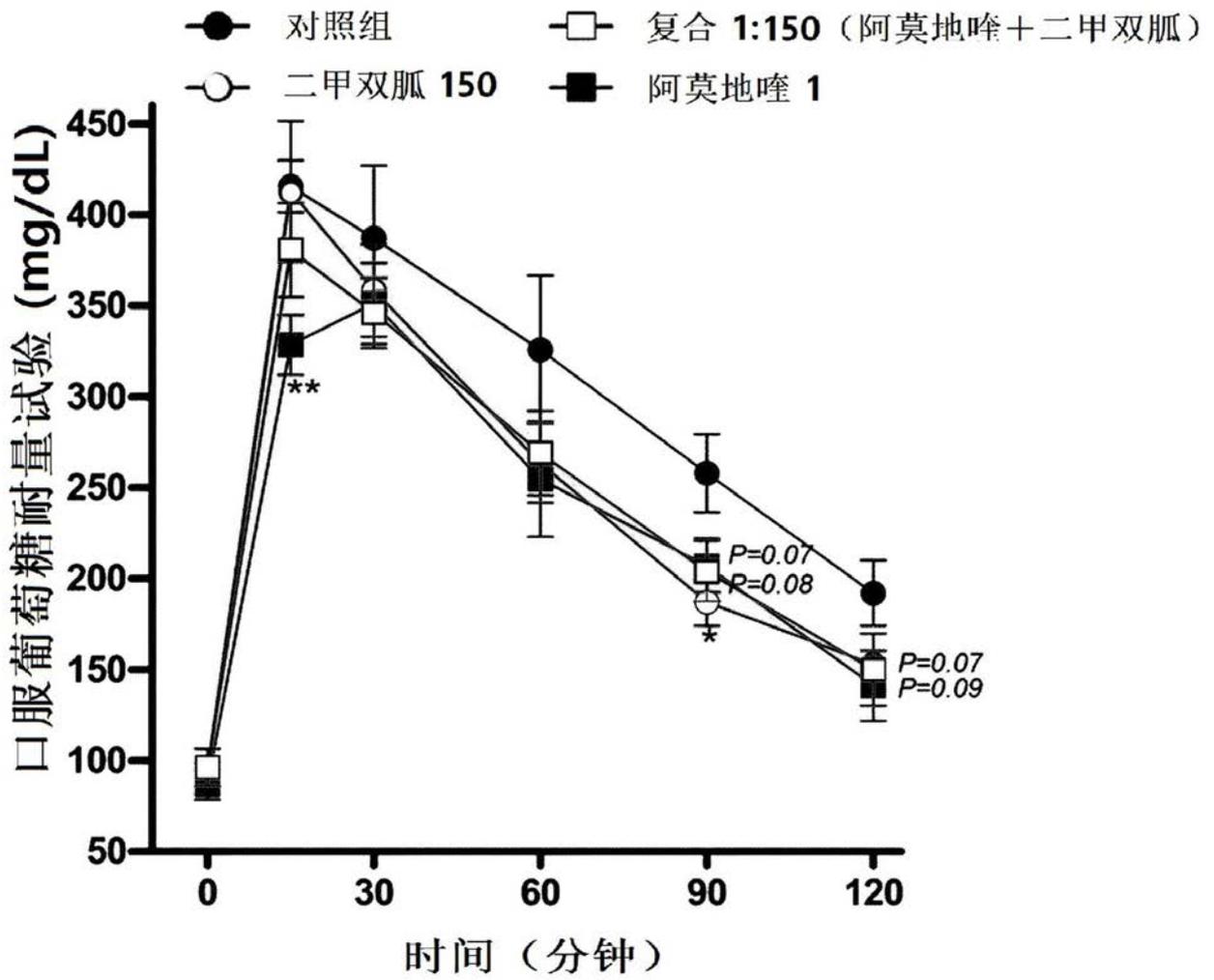


图14b

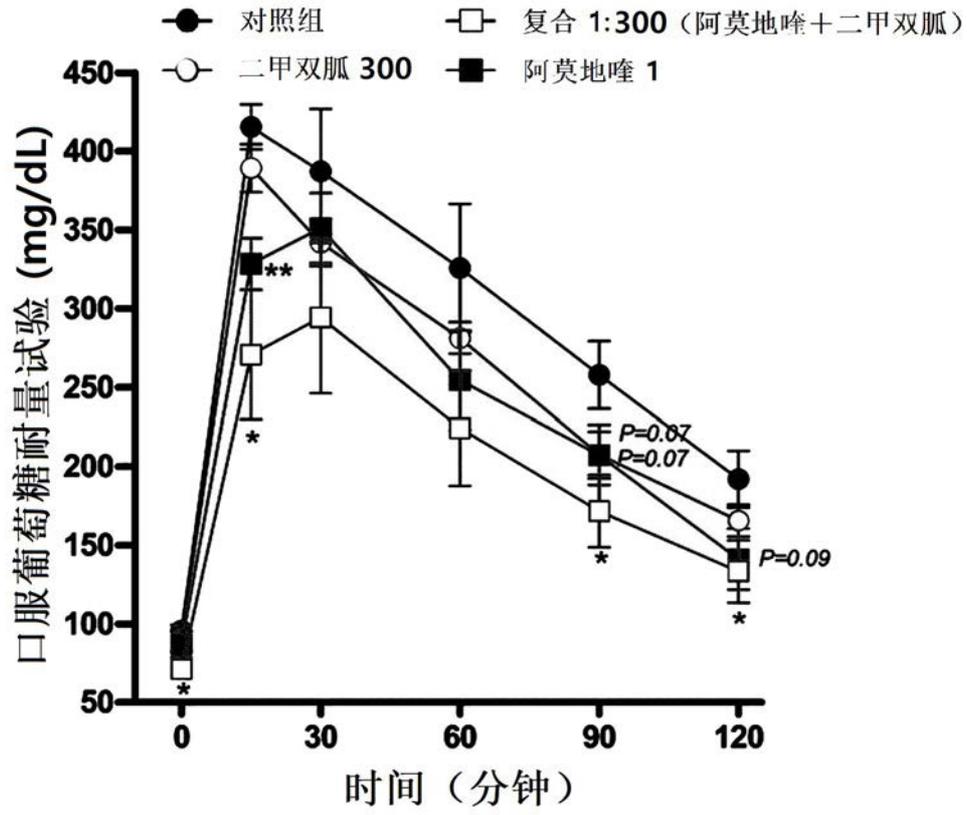


图14c

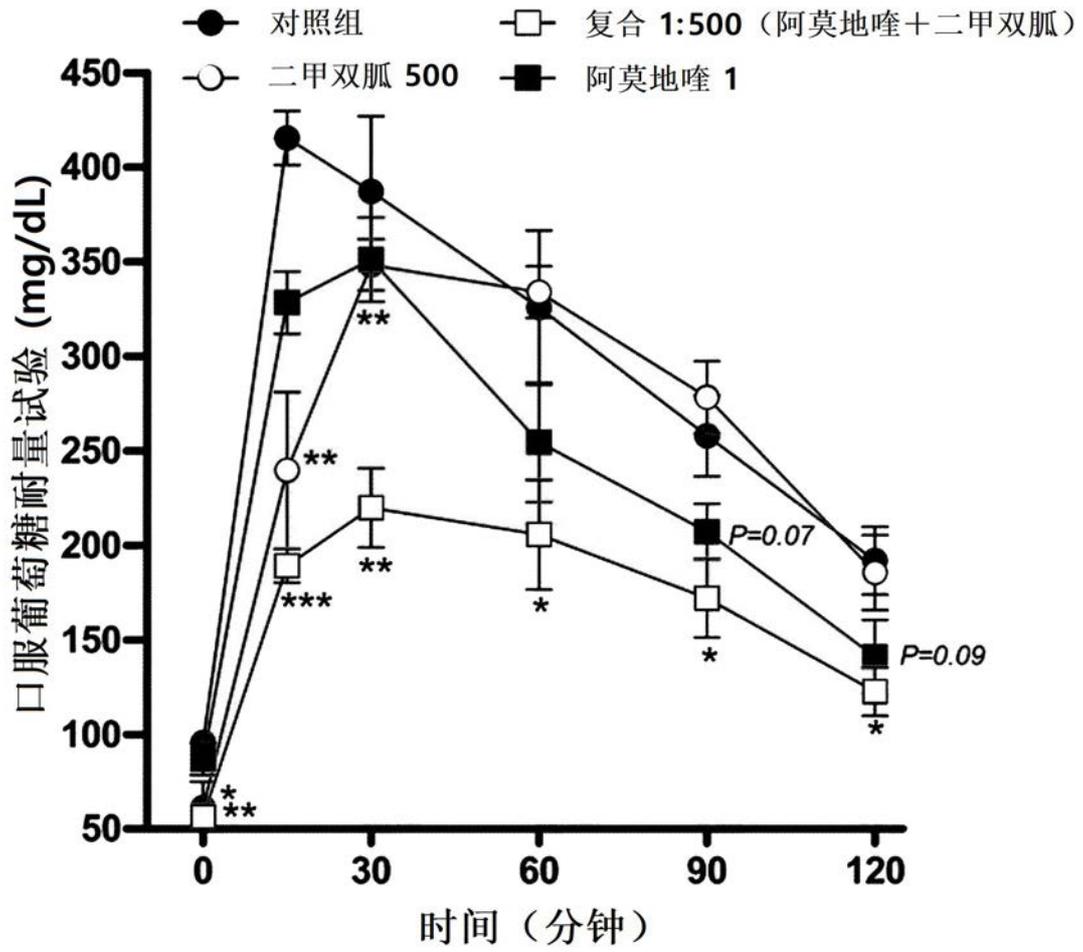


图14d

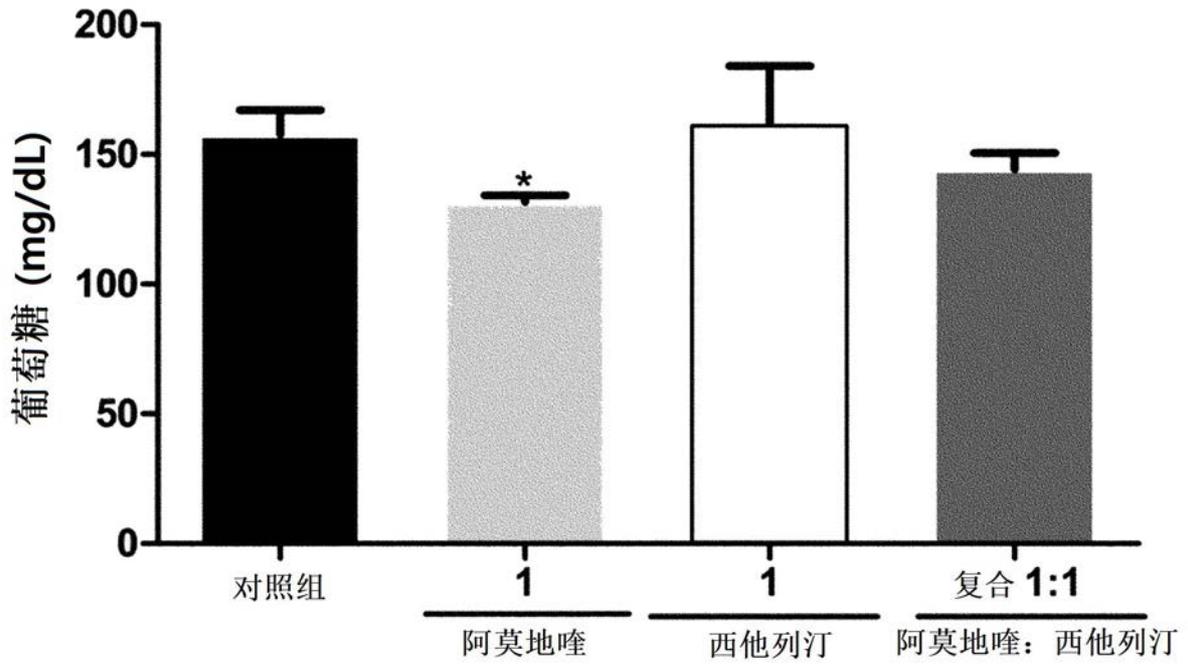


图15a

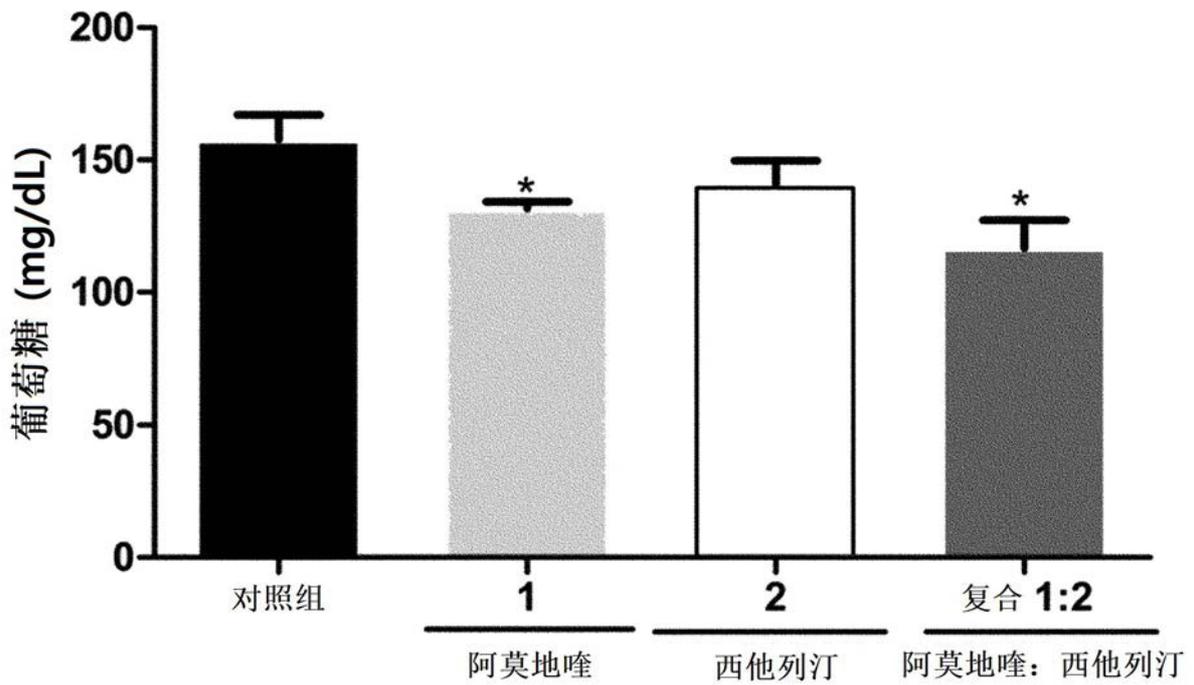


图15b

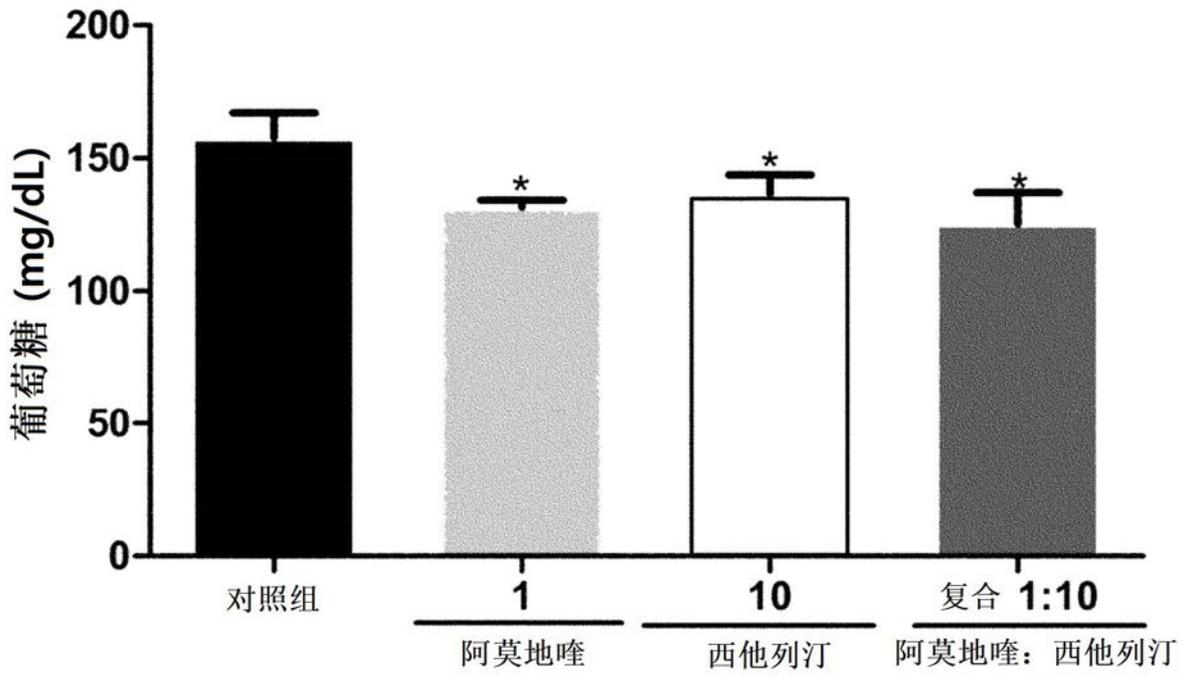


图15c

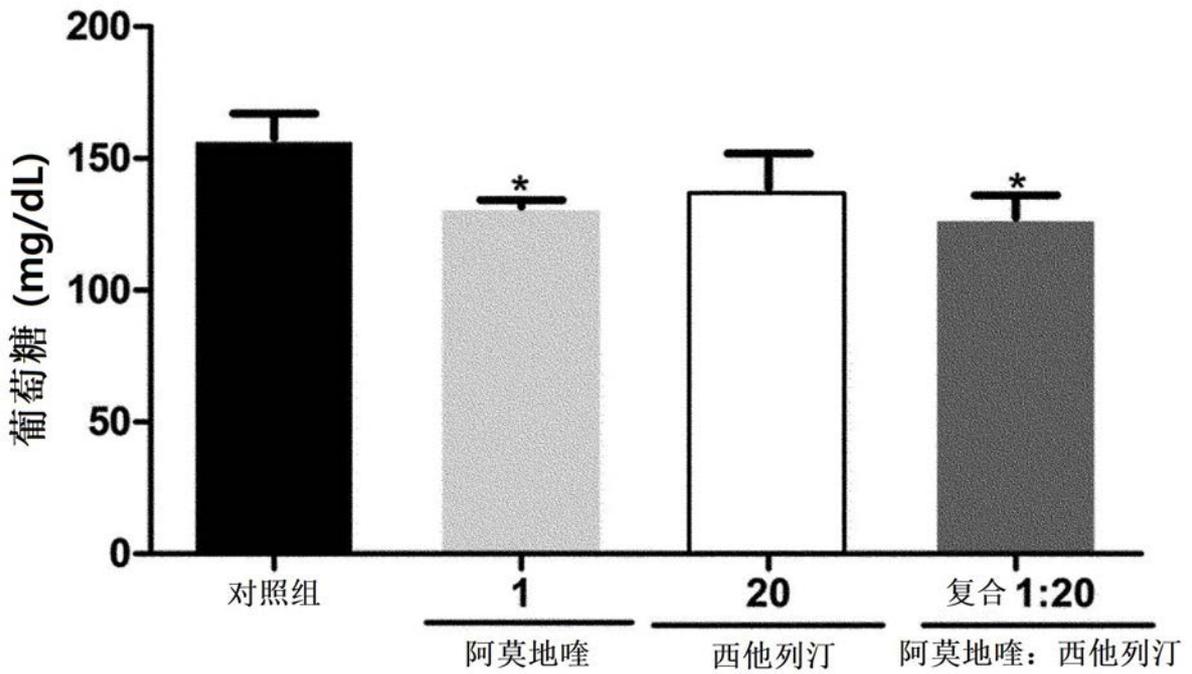


图15d

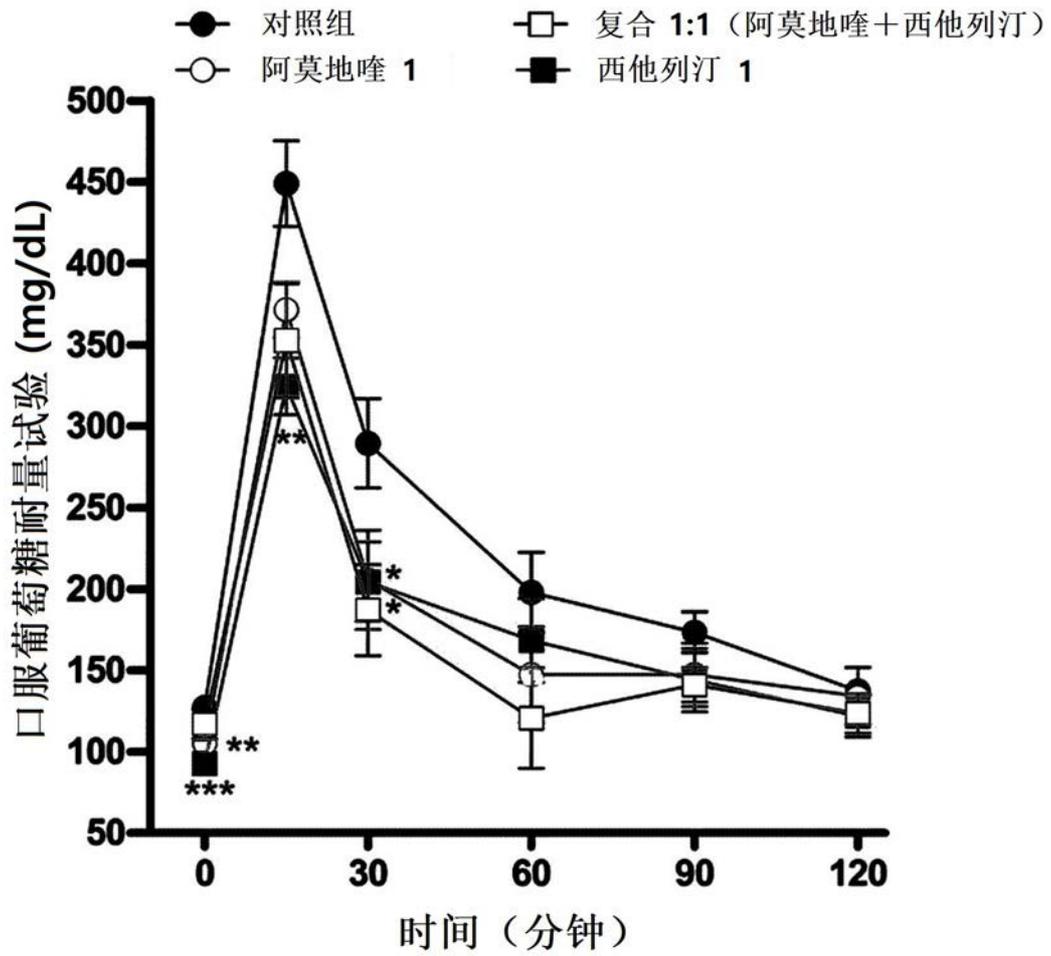


图15e

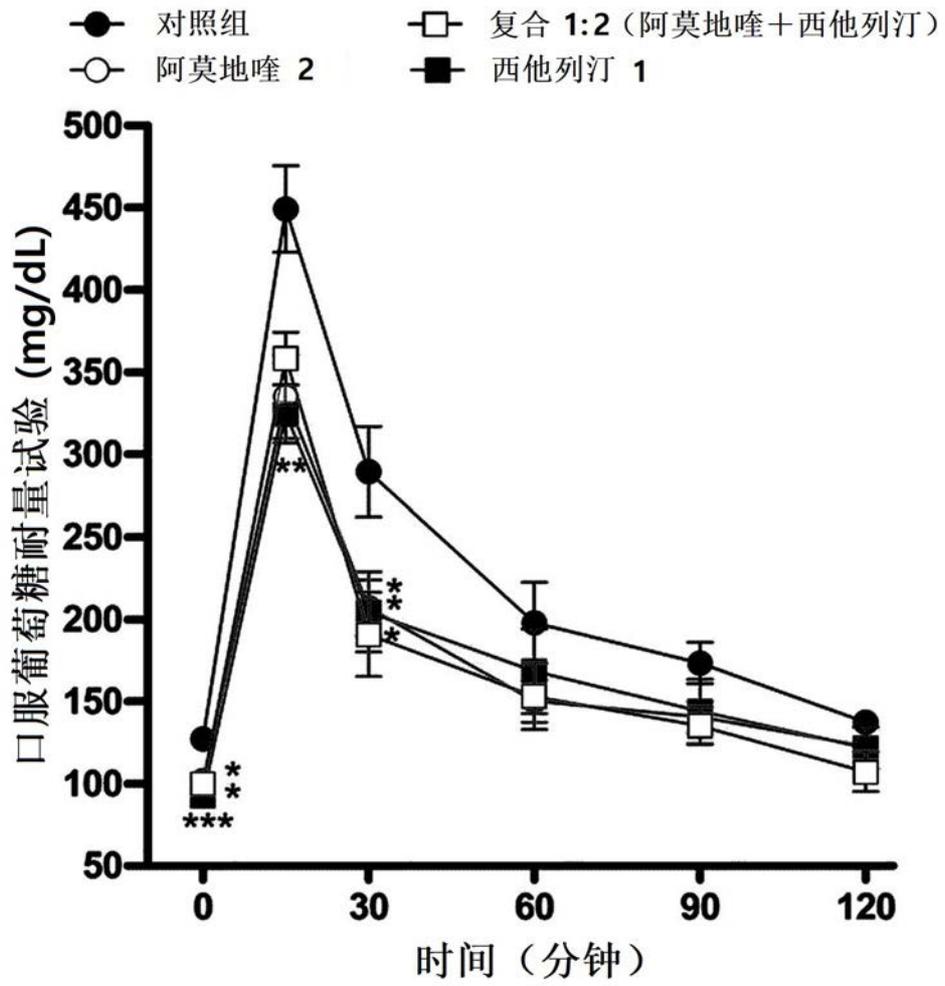


图15f

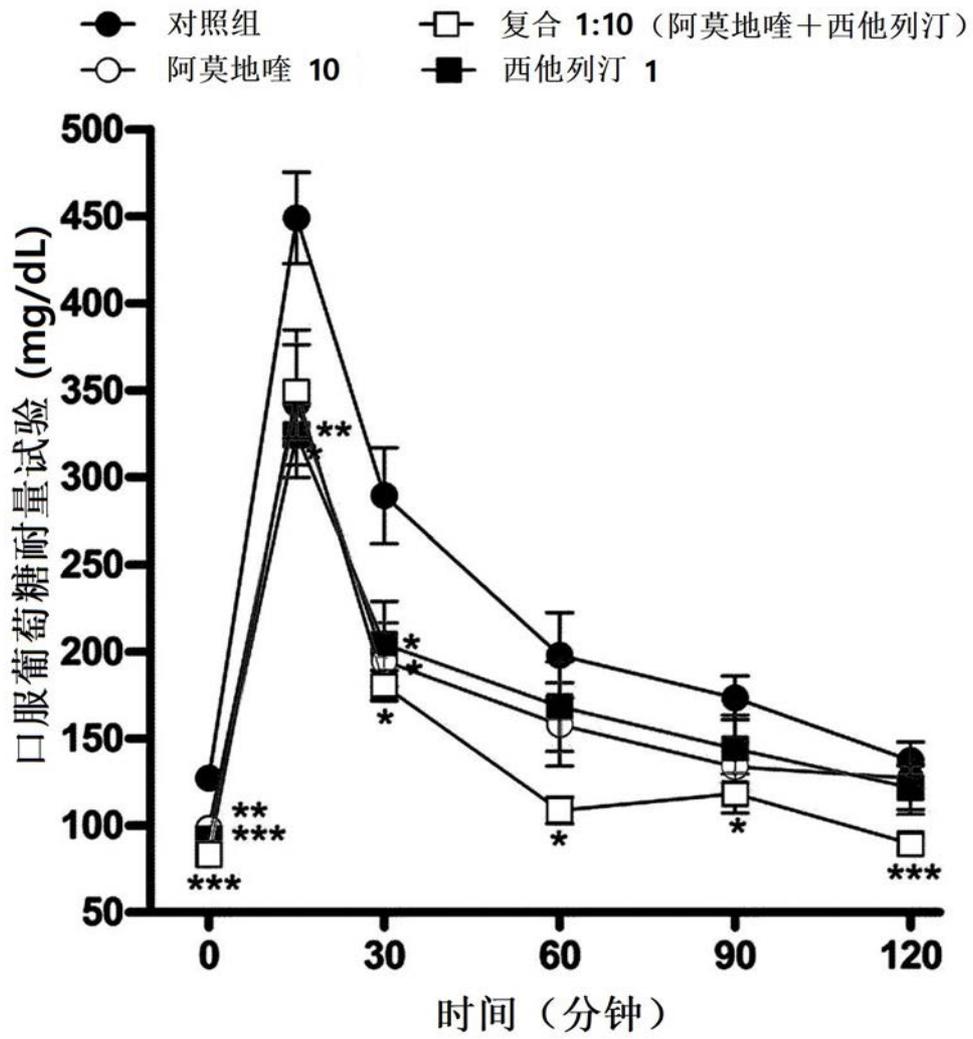


图15g

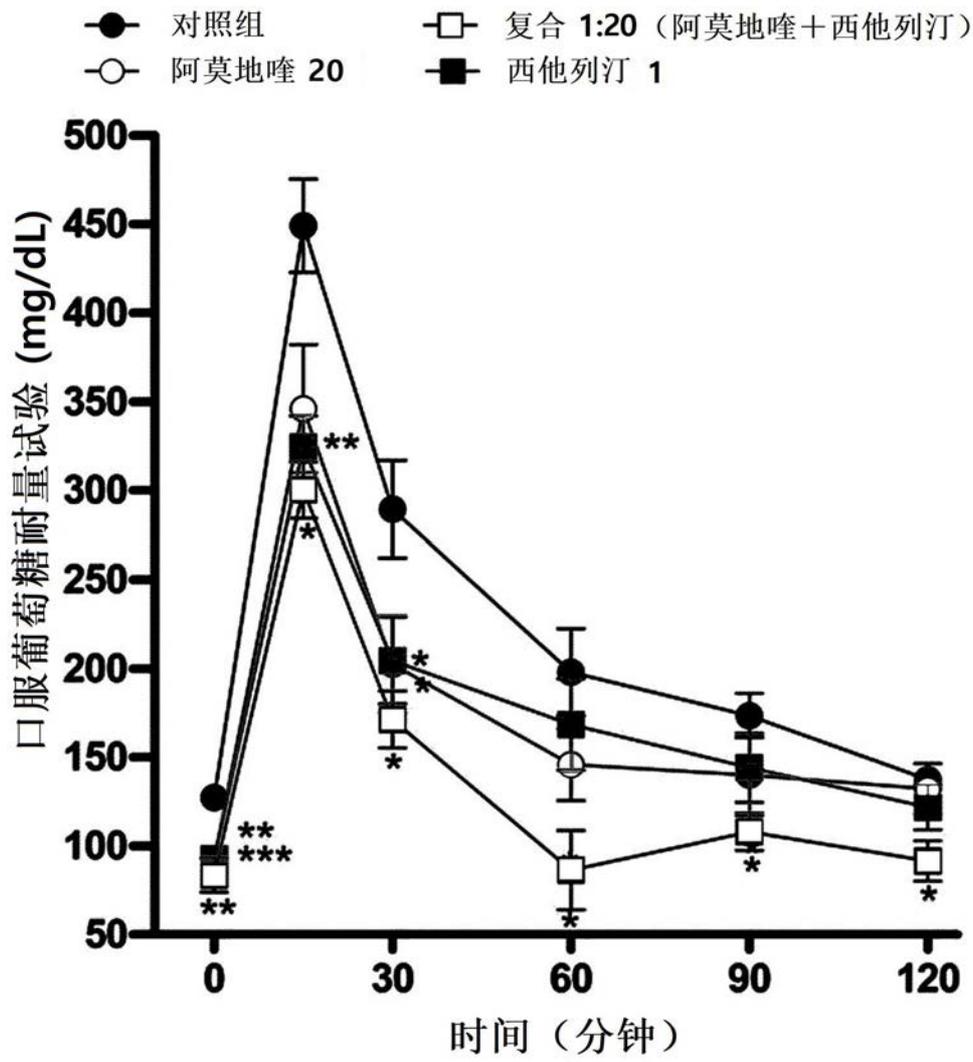


图15h

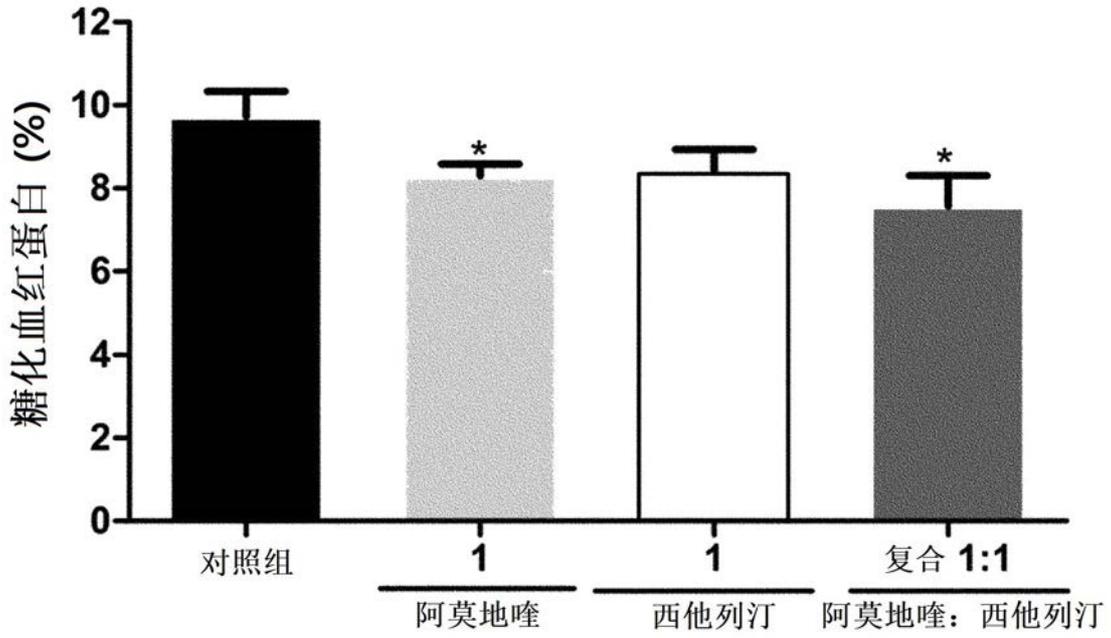


图15i

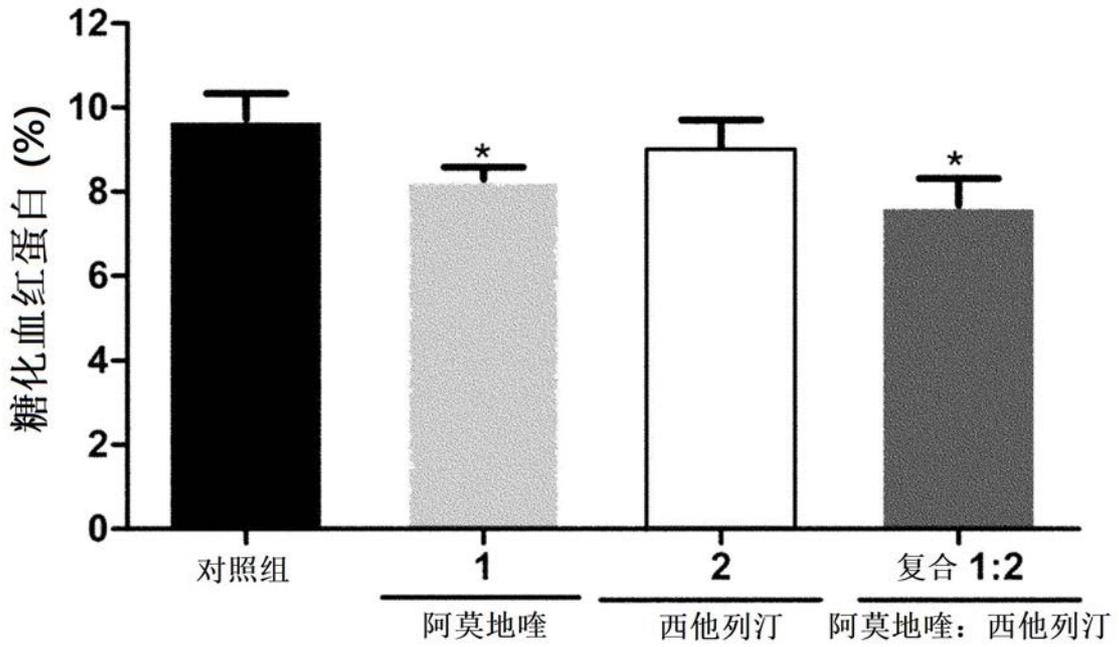


图15j

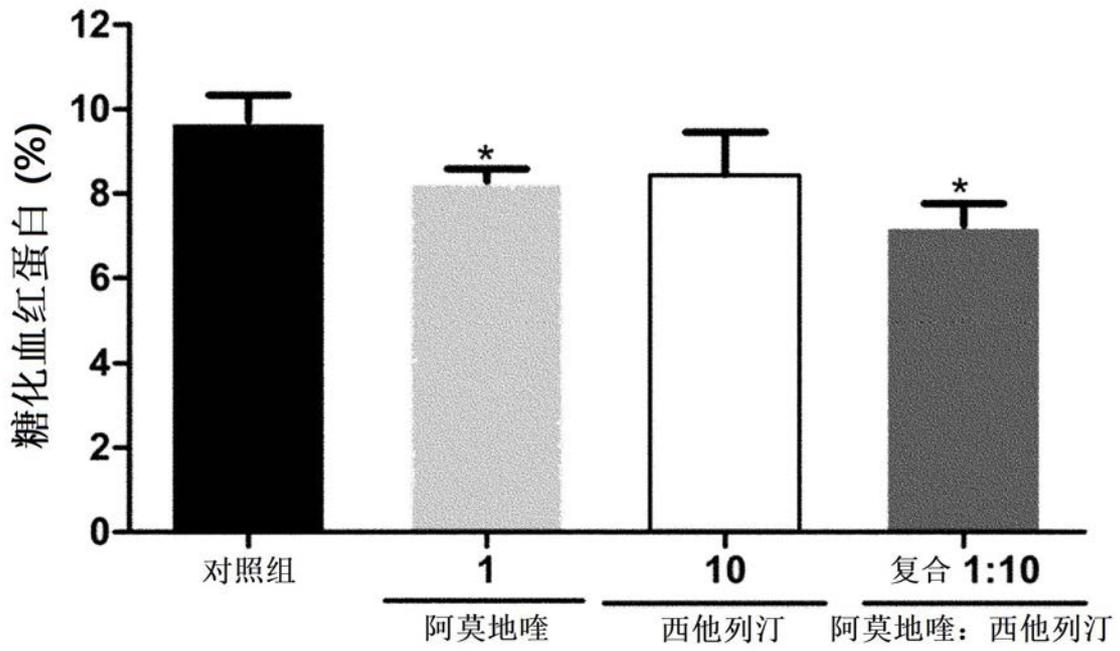


图15k

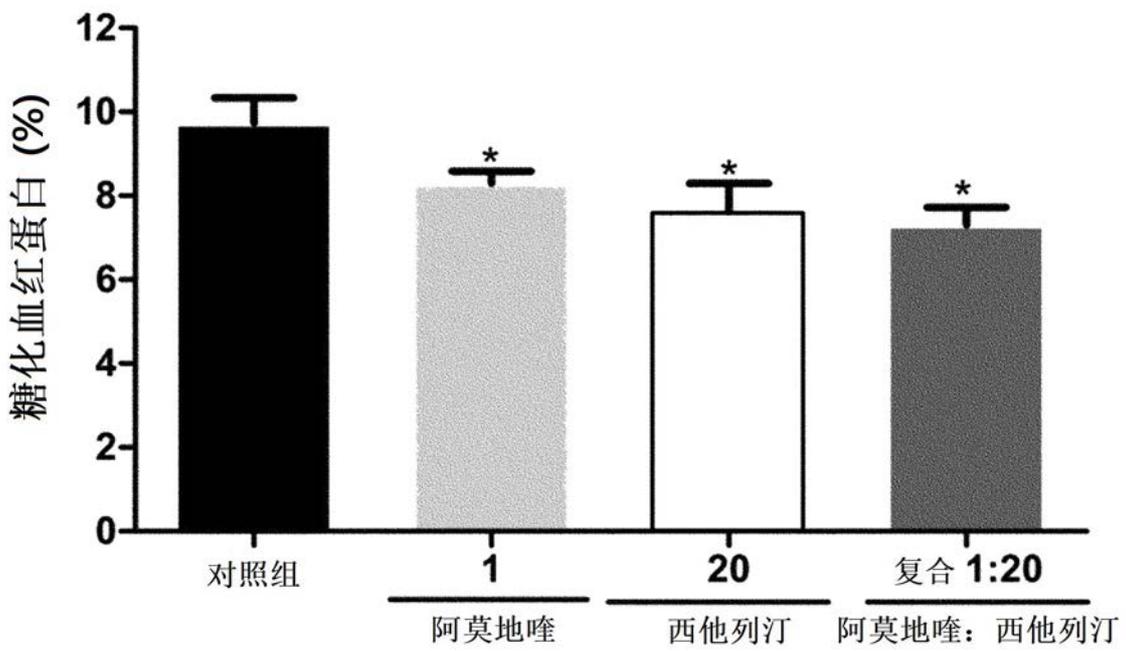


图15l

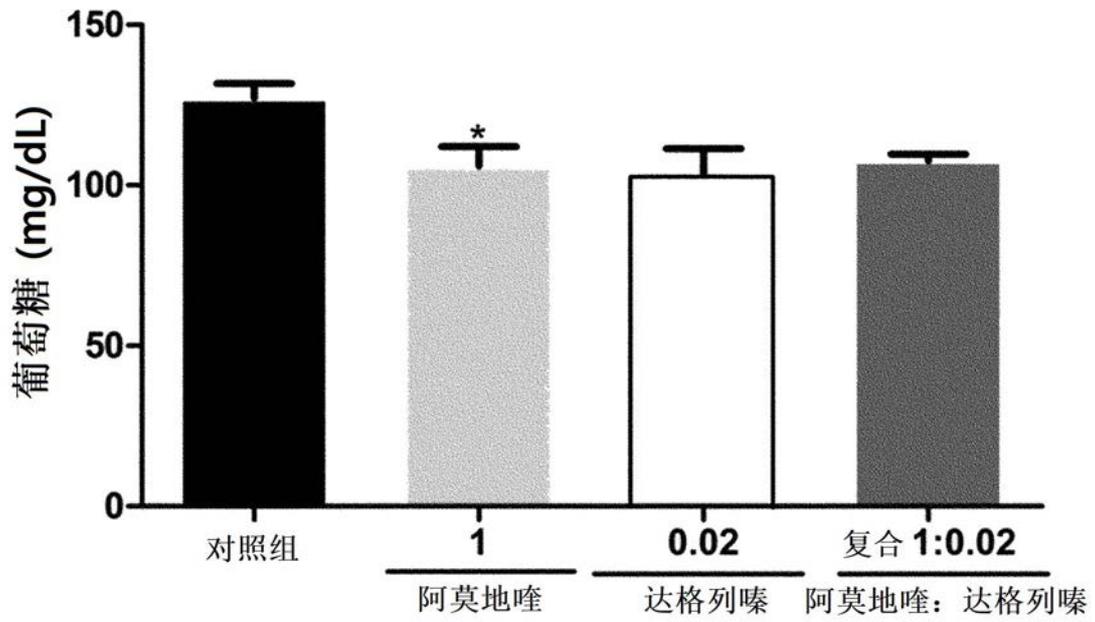


图16a

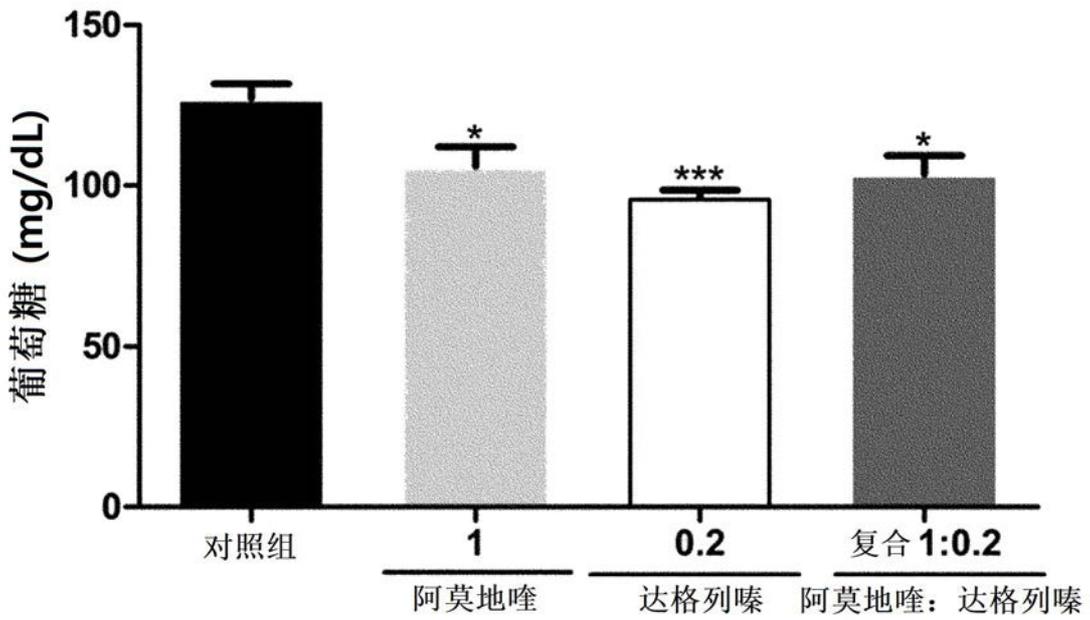


图16b

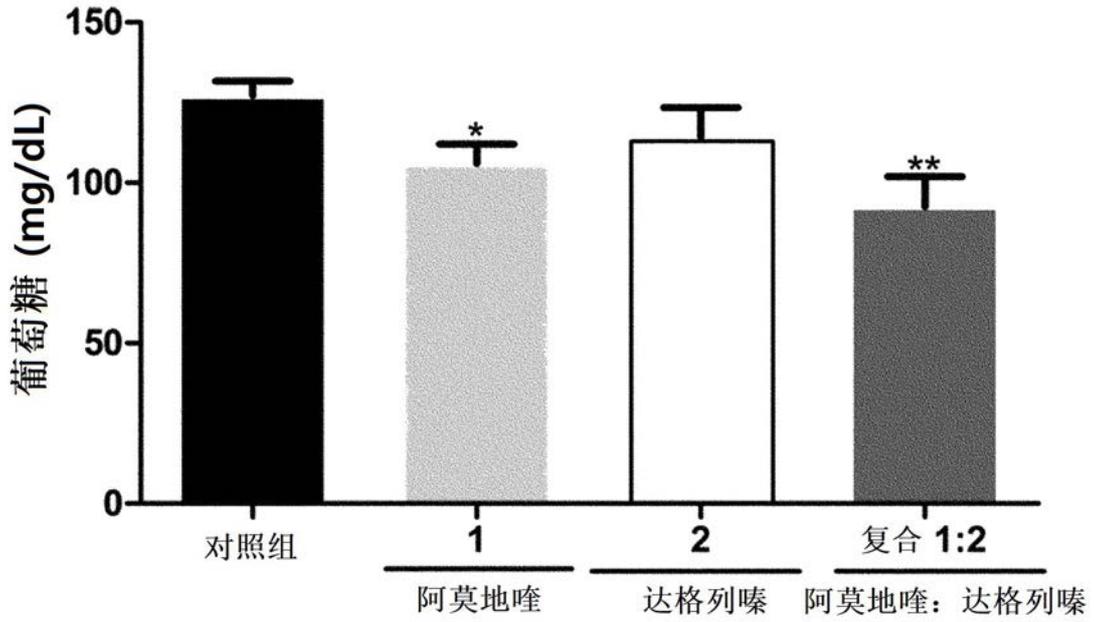


图16c

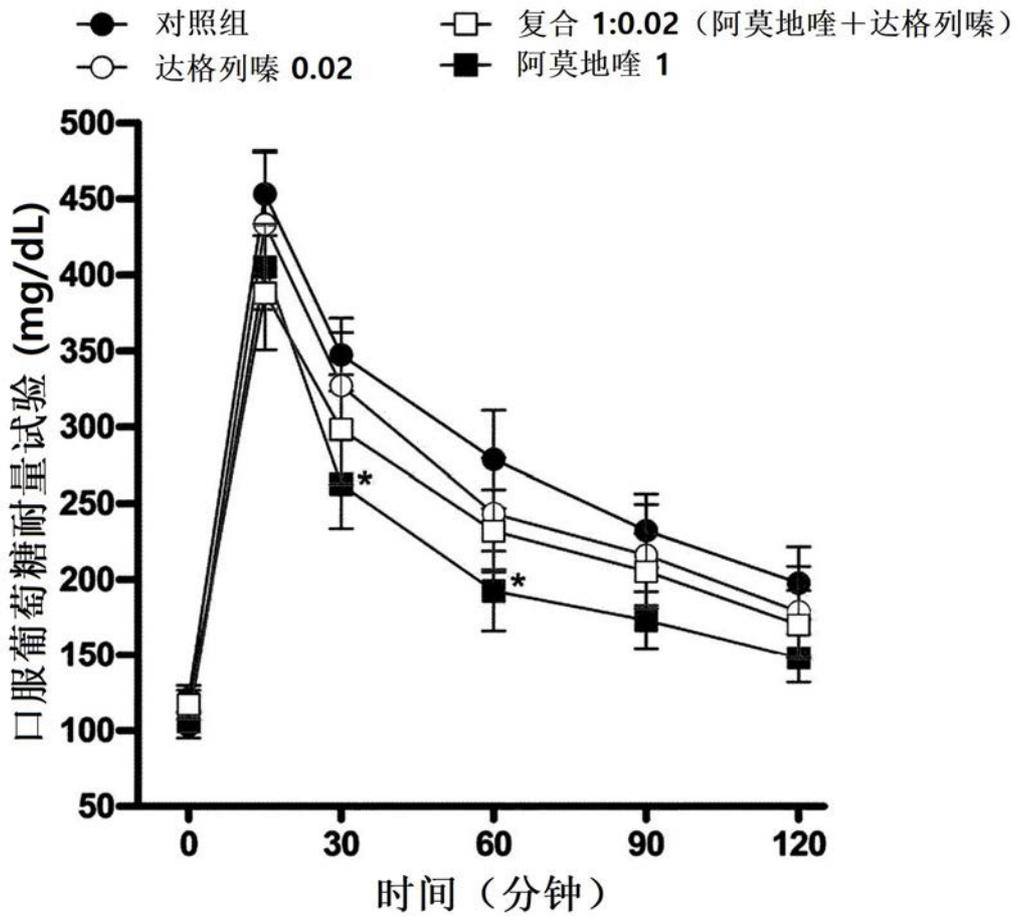


图16d

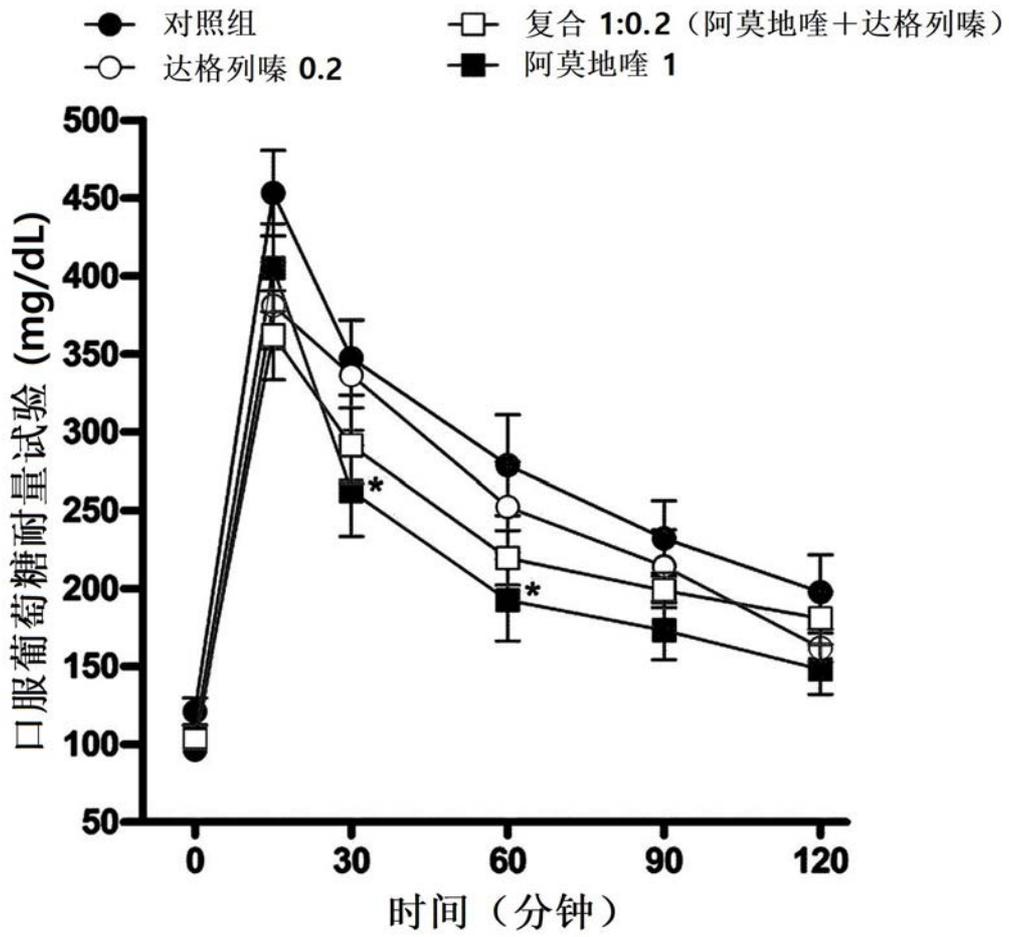


图16e

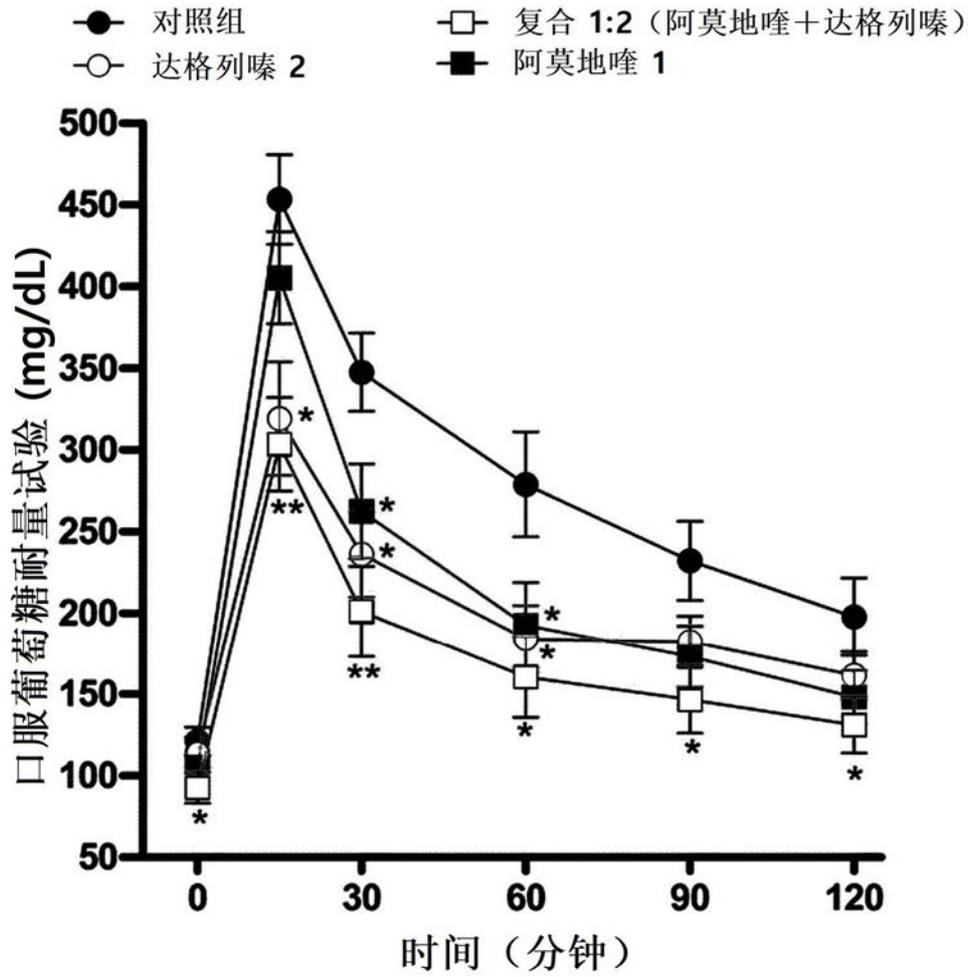


图16f

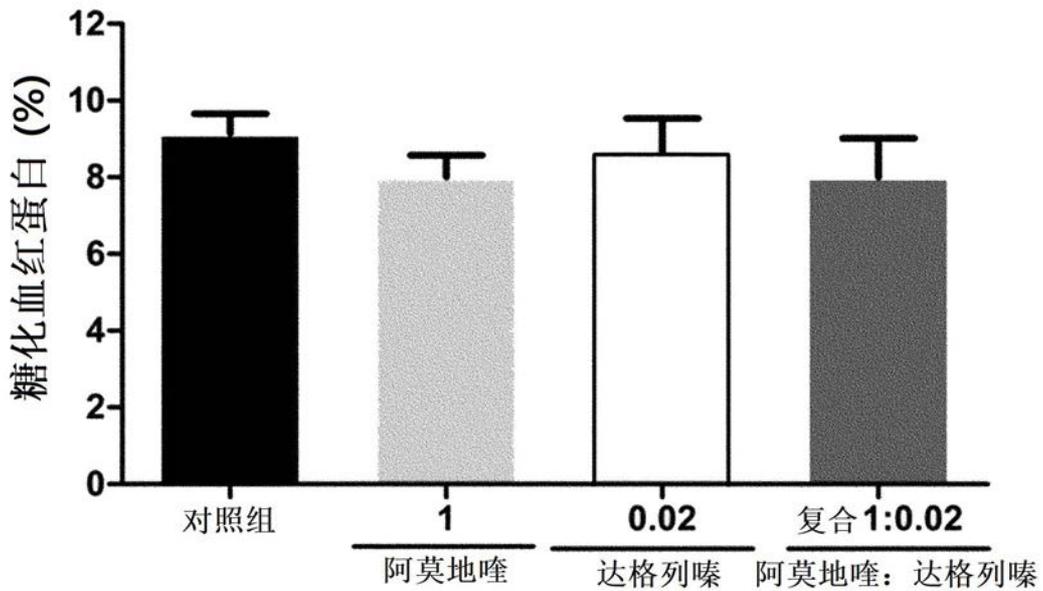


图16g

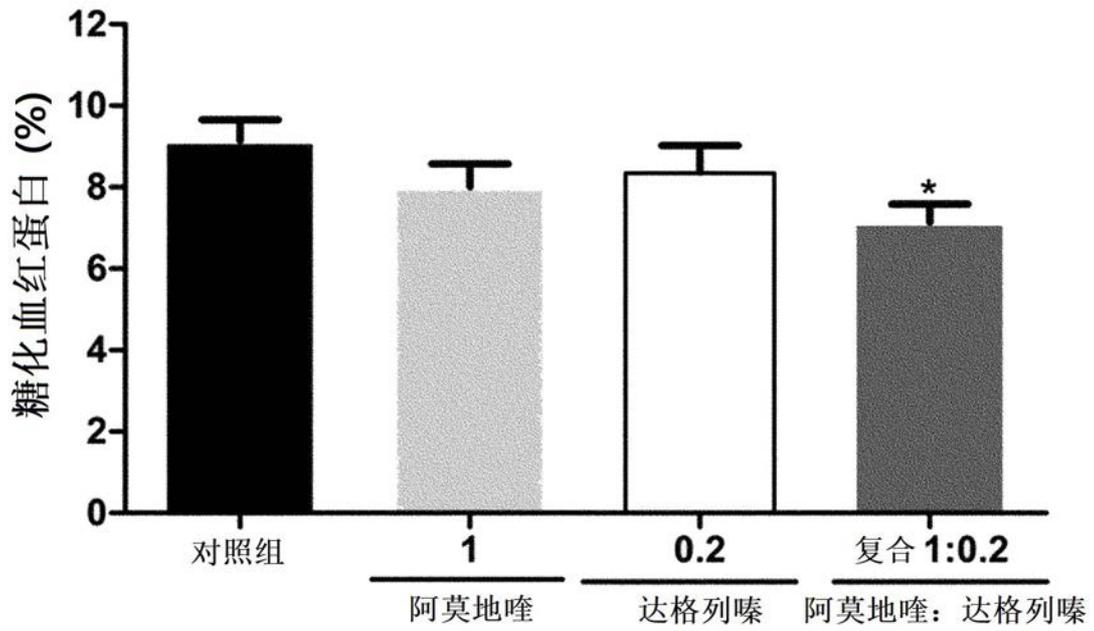


图16h

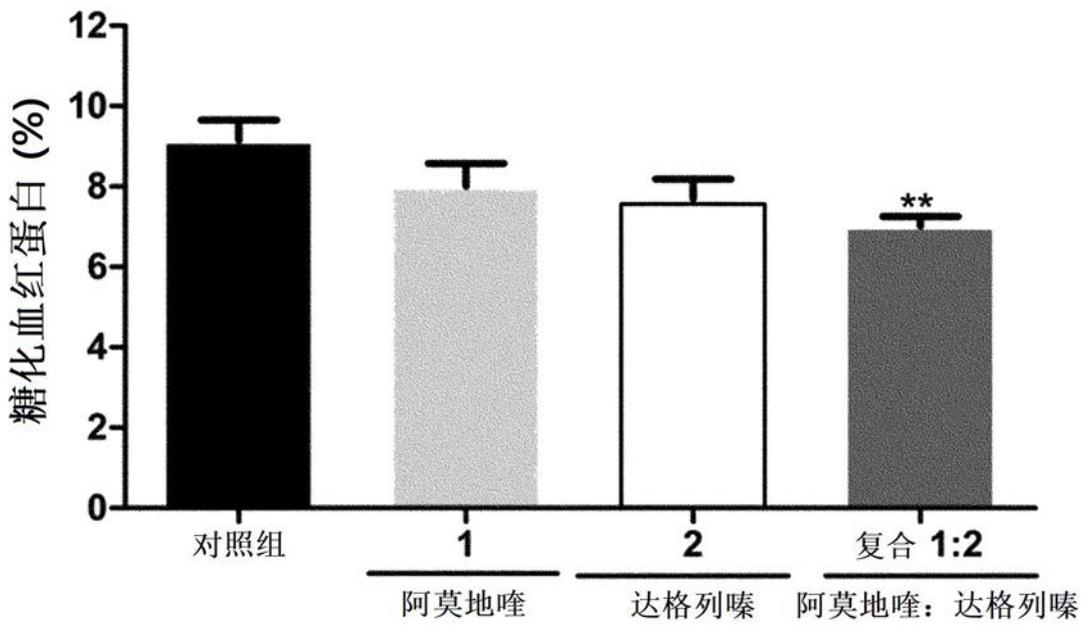


图16i

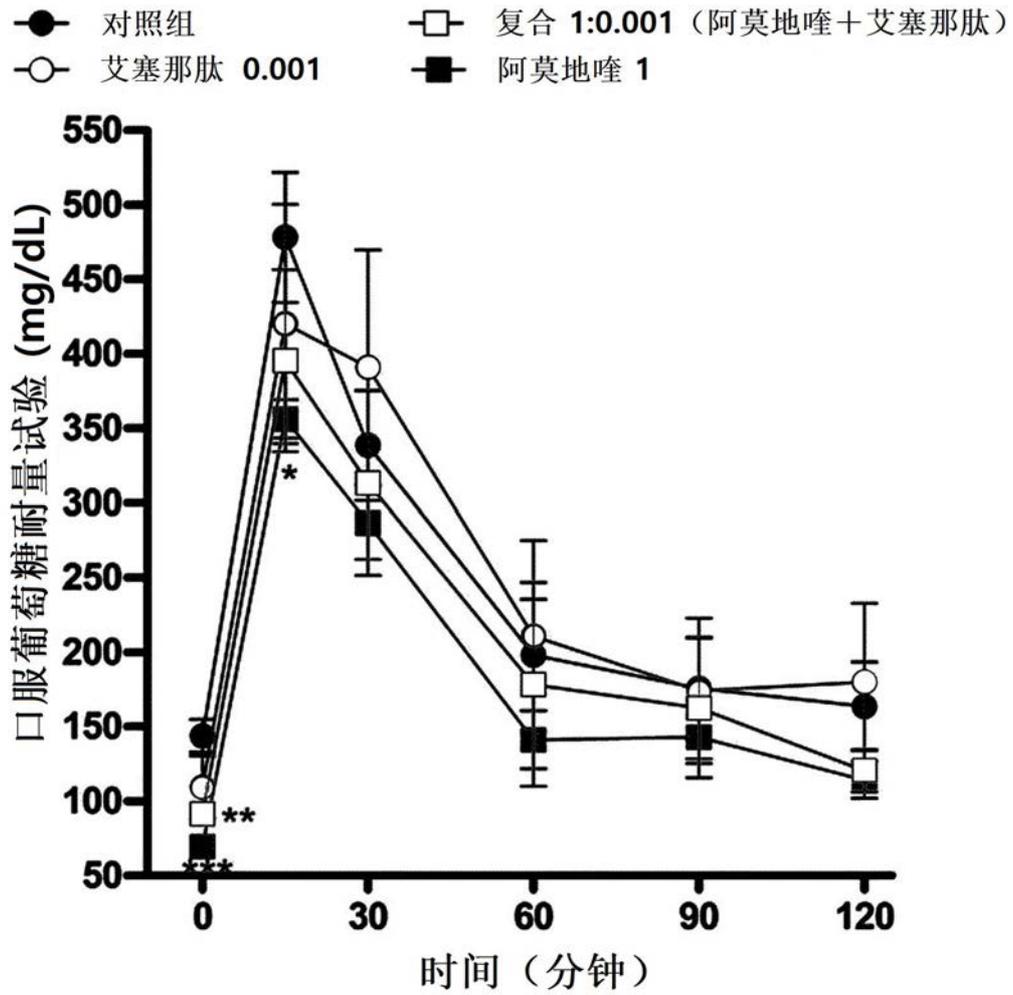


图17a

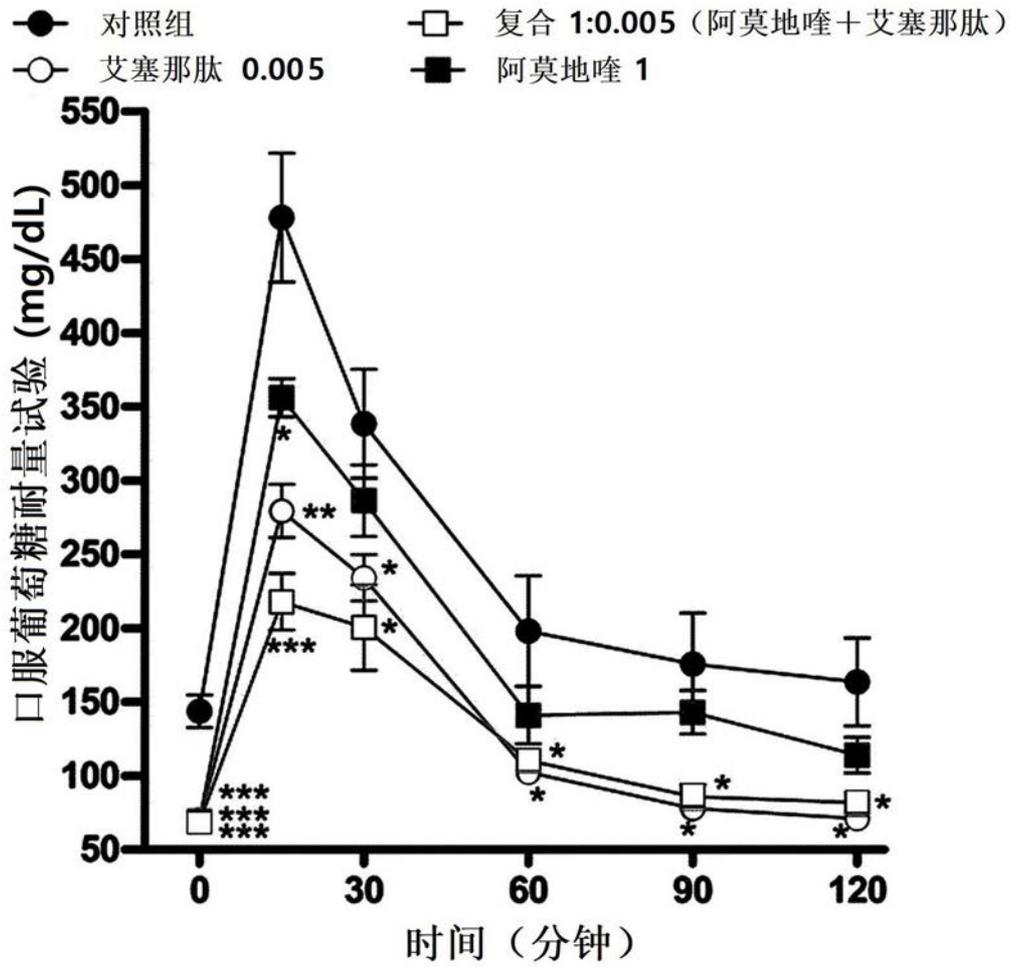


图17b