(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110049781 B
(45)授权公告日 2023.02.17

(21)申请号 201780075531.9
(22)申请日 2017.11.20
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110049781 A
(43)申请公布日 2019.07.23
(30)优先权数据
10-2016-0165901 2016.12.07 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.06.05
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2017/013154 2017.11.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/105921 KO 2018.06.14
(73)专利权人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔市城北区安岩路145(邮递区号:02841)
(72)发明人 高齐祥 姜玟铢
(74)专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205
专利代理师 马爽 臧建明
(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)
C12Q 1/6883(2018.01)
A61K 39/00(2006.01)
(56)对比文件
US 2016074471 A1,2016.03.17
WO 2012051301 A1,2012.04.19
Yuhui Wang 等,.Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis.《Nat Rev Mol Cell Biol 》.2015,第16卷(第11期),678-689.
Kang,H,等.ACN32251.1.《GenBank》.2016,1.
审查员 徐丹

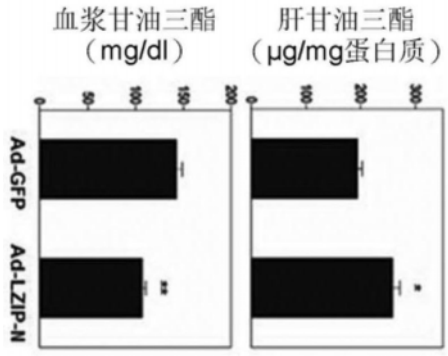
权利要求书1页 说明书12页
序列表6页 附图10页

(54)发明名称

脂肪肝预防或治疗用医药组成物与筛选法及诊断用组成物

(57)摘要

本发明提供一种用于预防或治疗脂肪肝的医药组成物及其药物筛选方法,以及用于诊断脂肪肝的组成物。本发明涉及一种白氨酸拉链蛋白质用于诊断或治疗脂肪肝的用途。根据本发明,能够确认的是白氨酸拉链蛋白质处存在的特定片段,尤其其N端区通过调节载脂蛋白A4的转录活性而在肝脏组织的脂质代谢中起重要作用,且因此,本发明的蛋白质或其片段可用做脂肪肝的诊断、预防或治疗的标靶。



CN 110049781 B

1.白氨酸拉链蛋白质N端片段的表达抑制剂在制备预防或治疗脂肪肝医药组成物活性成分中的用途，所述白氨酸拉链蛋白质N端片段由SEQ ID NO.1组成，所述表达抑制剂是SEQ ID No.1的编码基因的反义寡核苷酸、siRNA或shRNA。

2.白氨酸拉链蛋白质N端片段的活性抑制剂在制备预防或治疗脂肪肝医药组成物活性成分中的用途，所述白氨酸拉链蛋白质N端片段由SEQ ID NO.1组成，所述活性抑制剂选自特异性结合SEQ ID No.1所示氨基酸序列的抗体；以及SEQ ID No.1的编码基因的反义寡核苷酸、siRNA或shRNA。

3.根据权利要求1或2所述的用途，其中所述医药组成物抑制载脂蛋白A4的表达。

4.一种探针在制备用于诊断脂肪肝的组成物中的用途，所述探针包括用于测量SEQ ID No.1的编码基因的表达或SEQ ID No.1所示蛋白质的探针。

5.根据权利要求4所述的用途，其中所述探针是：特异性结合到SEQ ID No.1所示片段的抗体；或特异性结合到SEQ ID No.1的编码基因的核酸探针或引物。

6.一种筛选用于预防或治疗脂肪肝的药物的方法，所述方法包括：活体外培养含有表达SEQ ID No.1的编码基因和候选材料的细胞以及测量所述基因在细胞中的表达，

其中当所述候选材料下调所述基因的表达时，将所述候选材料确定为用于预防或治疗脂肪肝的药物。

7.一种筛选用于预防或治疗脂肪肝的药物的方法，所述方法包括：活体外培养表达SEQ ID NO.1的编码基因和候选材料的细胞以及测量所述基因的表达产物在所述细胞中的活性，

其中当所述候选材料下调SEQ ID No.1所示蛋白的活性时，将所述候选材料确定为用于预防或治疗脂肪肝的药物。

8.一种用于筛选用于预防或治疗脂肪肝的药物的方法，所述方法包括：活体外培养表达白氨酸拉链蛋白质和候选材料的细胞以及测量所述白氨酸拉链蛋白质在所述细胞中的活性的步骤，

其中当所述候选材料减少SEQ ID No.1所示片段与Akt之间的复合物的形成时，将所述候选材料确定为用于预防或治疗脂肪肝的药物。

脂肪肝预防或治疗用医药组成物与筛选法及诊断用组成物

[0001] 本专利申请主张2016年12月7日申请的韩国专利申请案第10-2016-0165901号的优先权和权益，所述申请案的公开内容以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种白氨酸拉链蛋白质用于诊断或治疗脂肪肝的用途。本发明根据项目第HI15C1906010015号在大韩民国未来创造科学部(Ministry of Science, ICT and Future Planning of the Republic of Korea)的支持下进行，且所述项目的特定研究管理机构是“韩国国家研究基金会(National Research Foundation of Korea)”，研究方案名称是“克服疾病的技术方案(Technology Program for Overcoming Disease)”，研究项目名称是“[1/3]通过多尿症和糖尿病血管疾病的相关机制的研究对代谢疾病调节材料的开发方案([1/3] A development program of metabolic disease regulation materials through studies on an associated mechanism for diabetes and diabetic vascular diseases)”，且研究时期是“从2015年11月12日到2016年10月31日”。

背景技术

[0003] 脂肪肝是脂肪在肝细胞中积聚的症状，且是脂肪在医学上超出总肝脏重量的5%或大于5%的病理症状。包含脂肪肝的肝脏疾病已据报导成为发达国家中导致40-50多岁的成人群体的死亡中次于癌症的最严重疾病。包含发达国家的主要国家的30%人口显示脂肪肝症状，20%的这些情况发展到肝硬化，且患有肝硬化的约一半患者在诊断后10年内死于肝脏疾病。

[0004] 脂肪肝可归因于肥胖症、糖尿病、高脂血症、药物以及类似因素而划分为酒精性脂肪肝病(alcoholic fatty liver disease)和非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)。

[0005] 非酒精性脂肪肝病是单纯脂肪肝，其对并未摄入过量酒精的患者并不伴随发炎性反应，且并不伴随从所述发炎性反应发展的各种疾病，包含肝细胞的发炎性反应、肝纤维化以及肝硬化。非酒精性脂肪肝病根据其原因而划分为原发性非酒精性脂肪肝病和继发性非酒精性脂肪肝病，且已知的是原发性非酒精性脂肪肝病归因于作为代谢综合症的特征的高脂血症、糖尿病、肥胖症或类似因素而发生，且继发性非酒精性脂肪肝病归因于营养原因(体重快速减轻、饥饿以及肠旁路术)、各种药物、毒性物质(有毒蘑菇和细菌毒素)、代谢原因以及其他因素而发生。已知的是非酒精性脂肪肝病与作为代谢综合症的重要特征的糖尿病和肥胖症相关联，其在约50%的患有糖尿病的患者、约76%的患有肥胖症的患者以及几乎所有的患有糖尿病伴随肥胖症的患者中是原发性因素。此外，对丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)的含量水平增大的患有糖尿病和肥胖症的患者进行活检的结果显示，脂肪性肝炎的发病率是18%到36%。

[0006] 同时，对脂肪肝施用几种糖尿病或肥胖症治疗药物的治疗作用是已知的，且据报告，在这些治疗药物当中，已用作经口肥胖症治疗剂的奥利司他(orlistat)改善患有脂肪

性肝炎的患者的肝脏组织的修复。另外，据报告，二甲双胍(metformin)减小血清肝脏酶含量水平且减轻并不伴随糖尿病的患有非酒精性脂肪肝的患者的肝脏的坏死性炎症和纤维化，且据报告，作为PPAR(过氧化体增殖物活化受体(peroxisome proliferator-activated receptor))的促效剂(agonist)的噻唑啶二酮(thiazolidinedione，TZD)类药物抑制肝脏和肌肉中的脂肪积累，且在非酒精性脂肪肝病的动物模型中呈现对肝脏的直接抗纤维化作用。然而，即使这些治疗药物的开发(韩国专利申请公开第10-2013-0103190号)，但可用于治疗脂肪肝的药物是不足够的且不存在用于脂肪肝的已确立治疗方法，且因此可做出的唯一建议是适当锻炼和饮食。

发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 本发明已致力于解决前述问题，且作为对推导引发肝脏中脂肪的合成的物质的深入研究的结果，本发明人确认白氨酸拉链蛋白质处存在的特定片段，尤其其N端区通过改善载脂蛋白A4(Apolipoprotein A4)的表达而有助于脂肪在肝脏组织中的累积，进而基于这一发现完成本发明。

[0009] 因此，本发明的一目的是提供一种白氨酸拉链蛋白质用于预防或治疗脂肪肝的用途。

[0010] 因此，本发明的一目的是提供一种白氨酸拉链蛋白质用于诊断脂肪肝的用途。

[0011] 本发明的一目的是提供一种白氨酸拉链蛋白质用于预防脂肪肝或开发治疗药物的用途。

[0012] 然而，通过本发明实现的技术问题不限于前述问题，且未提及的其它问题可由所属领域的技术人员根据以下描述清晰地理解。

[0013] 技术解决方案

[0014] 为了实现本发明的前述目的，本发明提供一种用于预防或治疗脂肪肝的医药组成物，包含作为活性成分的白氨酸拉链蛋白质的表达抑制剂或活性抑制剂。

[0015] 作为本发明的一实施例，白氨酸拉链蛋白质的表达抑制剂可以是编码白氨酸拉链蛋白质的基因的反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide)、siRNA或shRNA。

[0016] 作为本发明的另一实施例，白氨酸拉链蛋白质的表达抑制剂可以是：特异性结合到白氨酸拉链蛋白质的抗体；编码由SEQ ID No. 1组成的氨基酸序列的片段的基因的反义寡核苷酸、siRNA或shRNA；以及磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase)(PI3K)/Akt抑制剂。

[0017] 作为本发明的再一实施例，组成物可抑制载脂蛋白A4(Apolipoprotein A4)的表达。

[0018] 此外，本发明提供一种用于诊断脂肪肝的组成物，包含用于测量白氨酸拉链蛋白质的表达或活性的探针。

[0019] 作为本发明的一实施例，用于测量白氨酸拉链蛋白质的表达的探针可以是：特异性结合到白氨酸拉链蛋白质的抗体；或特异性结合到编码白氨酸拉链蛋白质的基因的核酸探针或引物。

[0020] 作为本发明的另一实施例，用于测量白氨酸拉链蛋白质的活性的探针可以是：特

异性结合到由SEQ ID No. 1的氨基酸序列组成的片段的抗体;或特异性结合到编码所述片段的基因的核酸探针或引物。

[0021] 另外,本发明提供一种用于筛选用于预防或治疗脂肪肝的药物的方法,所述方法包含:活体外(in vitro)培养表达白氨酸拉链蛋白质和候选材料的细胞以及测量所述细胞中的白氨酸拉链蛋白质的表达的步骤,其中当候选材料下调白氨酸拉链蛋白质的表达时,将候选材料确定为用于预防或治疗脂肪肝的药物。

[0022] 此外,本发明提供一种用于筛选用于预防或治疗脂肪肝的药物的方法,所述方法包含:活体外(in vitro)培养表达白氨酸拉链蛋白质和候选材料的细胞以及测量所述细胞中的白氨酸拉链蛋白质的活性的步骤,其中当候选材料下调由SEQ ID No. 1的氨基酸序列组成的片段的表达时,将候选材料确定为用于预防或治疗脂肪肝的药物。

[0023] 此外,本发明提供一种用于筛选用于预防或治疗脂肪肝的药物的方法,所述方法包含:活体外(in vitro)培养表达白氨酸拉链蛋白质和候选材料的细胞以及测量所述细胞中的白氨酸拉链蛋白质的活性的步骤,其中当候选材料减少由SEQ ID No. 1的氨基酸序列组成的片段与Akt之间的复合物的形成时,将候选材料确定为用于预防或治疗脂肪肝的药物。

[0024] 有利效果

[0025] 根据本发明,能够确认的是,白氨酸拉链蛋白质(Leucine-zipper protein)处存在的特定片段,尤其其N端区通过调节载脂蛋白A4(Apolipoprotein A4)的转录活性而在肝脏组织的脂质代谢中起重要作用,且因此,本发明的蛋白质或其片段可用作脂肪肝的诊断、预防或治疗的标靶。

附图说明

[0026] 图1是在用LZIP进行的治疗中根据浓度(0 μg、0.25 μg、0.5 μg以及1 μg(微克))测量的ApoA4启动子(promoter)活性的结果。

[0027] 图2A是根据具有Flag-LZIP的处理剂的浓度(0 μg、1 μg以及2 μg)确认的ApoA4 mRNA表达水平的变化的结果;且图2B是根据具有LZIP siRNA的处理剂的浓度(0 pmol/μl、5 pmol/μl以及10 pmol/μl(皮摩尔/微升))确认的ApoA4 mRNA表达水平的变化的结果。

[0028] 图3A是根据具有Ad-LZIP的处理剂的浓度(0 MOI、5 MOI、10 MOI以及20 MOI)确认的ApoA4蛋白质表达水平的变化的结果;且图3B是根据具有LZIP siRNA的处理剂的浓度(0 pmol/μl、5 pmol/μl、10 pmol/μl 以及20 pmol/μl)确认的ApoA4蛋白质表达水平的变化的结果。

[0029] 图4是根据具有布雷菲德菌素A(Brefeldin A;BFA)、衣霉素(Tunicamycin;TM)或毒胡萝卜素(Thasigargin;TG)的处理来确认ApoA4表达的变化的结果。

[0030] 图5A是根据具有BFA的处理剂的浓度(0 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、50 ng/ml以及100 ng/ml(纳克/毫升))测量的ApoA4启动子活性的结果;图5B是根据具有BFA的处理剂的浓度(0 ng/ml、1 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、50 ng/ml以及100 ng/ml)确认的ApoA4 mRNA表达水平的变化的结果;图5C是根据用BFA处理的时间(0小时、1小时、3小时、6小时、10小时以及14小时(h))确认的ApoA4 mRNA表达水平的变化的结果;且图5D是根据具有BFA的处理剂的浓度(0 ng/ml、1 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、50 ng/ml以及100 ng/ml)确认的ApoA4蛋

白质表达水平的表达的结果。

[0031] 图6是根据BFA和LZIP的组合施用来测量ApoA4启动子活性的结果。

[0032] 图7A是根据BFA和LZIP siRNA的组合施用来确认ApoA4 mRNA表达水平的变化的结果;且图7B是根据BFA和LZIP siRNA的组合施用来确认蛋白质ApoA4表达水平的变化的结果。

[0033] 图8A是根据具有BFA的处理的通过细胞核/细胞质分离方法来确认的LZIP蛋白质细胞内迁移(movement)方面的结果;且图8B是根据具有BFA的处理的通过荧光显微镜来观测的LZIP蛋白质细胞内迁移方面的结果。

[0034] 图9A是根据LZIP N端的处理剂的浓度(0μg、0.05μg、0.1μg以及5 μg)测量的ApoA4启动子活性的结果;图9B是根据Flag-LZIP N端的处理剂的浓度(0μg、0.25μg、0.5μg以及1μg)确认的ApoA4 mRNA表达水平的变化的结果;且图9C是根据Ad-LZIP N端的处理剂的浓度(0 MOI、5 MOI、10 MOI以及20 MOI)确认的蛋白质ApoA4表达水平的变化的结果。

[0035] 图10A是根据在具有BFA的处理剂的浓度(50 ng/ml、100 ng/ml、250 ng/ml以及500 ng/ml)确认的LZIP N端蛋白质分离/产生的结果;图10B是根据Ad-LZIP N端的处理剂的浓度(0 MOI、5 MOI以及10 MOI)确认的ApoA4 mRNA表达水平的变化的结果;且图10C是根据Ad-LZIP N端的处理剂的浓度(0 MOI、5 MOI以及10 MOI)确认的蛋白质ApoA4表达水平的变化的结果。

[0036] 图11A是通过活体外激酶分析(in vitro kinase assay)确认LZIP N端是否结合到Akt的结果;且图11B是通过GST下拉分析(GST-pull down assay)确认LZIP N端是否结合到Akt的结果。

[0037] 图12A是根据具有Akt抑制剂的处理来确认蛋白质ApoA4表达的变化的结果;图12B是根据具有Akt抑制剂的处理来确认LZIP N端分离的结果;且图12C是根据具有Akt抑制剂的处理来确认LZIP N端稳定性的变化的结果。

[0038] 图13A是通过在作为人肝脏细胞株的HepG2中组合施用油酸与LZIP N端来确认肝细胞中累积的脂肪量的结果;且图13B是通过在小鼠原发性肝细胞中组合施用油酸与LZIP N端来确认肝细胞中累积的脂肪量的结果。

[0039] 图14是使用小鼠动物模型的根据LZIP N端的处理来确认在肝脏组织中ApoA4表达水平的变化的结果。

[0040] 图15A是使用小鼠动物模型的根据LZIP N端的处理来确认在肝脏组织或血浆中甘油三酯量的变化的结果;且图15B是利用油红O(Oil Red O)染色的使用小鼠动物模型的根据LZIP N端的处理来确认肝脏组织中的三酸甘油酯的结果。

[0041] 图16是比较归因于肥胖症的脂肪肝组织中的LZIP或ApoA4的表达与正常肝脏组织中的所述表达的结果。

[0042] 图17是比较酒精性脂肪肝组织中的LZIP或ApoA4的表达与正常肝脏组织中的所述表达的结果。

[0043] 图18是比较非酒精性脂肪肝组织中的LZIP或ApoA4的表达与正常肝脏组织中的所述表达的结果。

具体实施方式

[0044] 在下文中,将对本发明进行详细描述。

[0045] 本发明提供一种白氨酸拉链蛋白质的用于诊断或治疗脂肪肝用途。

[0046] 更具体地,本发明提供:一种用于预防或治疗脂肪肝的医药组成物,包含作为活性成分的白氨酸拉链蛋白质的表达抑制剂或活性抑制剂;一种白氨酸拉链蛋白质的表达抑制剂或活性抑制剂用于预防或治疗所述疾病的用途;以及一种用于治疗所述疾病的方法,所述方法包含:将治疗有效量的白氨酸拉链蛋白质的表达抑制剂或活性抑制剂施用到个体的步骤。

[0047] 如本文中所使用,术语“预防”是指所有通过施用根据本发明的医药组成物来抑制脂肪肝或延迟脂肪肝发作的动作。

[0048] 如本文中所使用,术语“治疗”是指所有通过施用根据本发明的医药组成物来改善或有利地改变由脂肪肝引起的症状的动作。

[0049] “脂肪肝(fatty liver)”是待由本发明的组成物防止或治疗的疾病,是一种脂肪以大于正常肝脏中的脂肪比例(5%)的量累积的症状。脂肪肝可归因于肥胖症、糖尿病、高脂血症、药物以及类似因素而基本上划分为因酗酒所致的酒精性脂肪肝和非酒精性脂肪肝。酒精性脂肪肝是因为摄入大量酒精促使脂肪在肝脏中合成且正常能量代谢不进行而发生,且非酒精性脂肪肝是归因于除酒精以外的原因而发生,且已知的是非酒精性脂肪肝时常伴有成人疾病从而引起脂肪代谢异常。为了治疗具有上文所述的症状的脂肪肝,本发明具有一种技术特征,其中本发明靶向白氨酸拉链蛋白质或编码所述白氨酸拉链蛋白质的基因,更具体地,白氨酸拉链蛋白质中的特定片段或编码所述特定片段的基因。

[0050] 在本发明中,白氨酸拉链蛋白质(leucine-zipper protein;LZIP)属于作为bZIP家族成员的CREB/ATF基因家族。白氨酸拉链蛋白质具有碱性DNA结合域(basic DNA-binding domain)和白氨酸拉链域,且结合到cAMP反应元件(cAMP-responsive element;CRE)和AP-1元件(AP-1 element)。另外,白氨酸拉链被揭露为促进细胞增殖和细胞转化的HCF-1结合蛋白质,且包含两种LxxLL转录辅助因子结合基元。此外,白氨酸拉链蛋白质由CREB3(LZIP,Luman)、CREB3L1(OASIS)、CREB3L2(BBF2H7)、CREB3L3(CREB-H)以及CREB3L4(AIbZIP)五个成员组成,且这些成员具有同源性(homology),但转录因子的相应功能是不同的。白氨酸拉链蛋白质的所报告功能的实例包含通过与CCR1结合来调节Lkn-1相依细胞迁移(cellular movement)、通过与CCR2启动子结合来调节CCR2的表达以及类似功能,但如本发明中所公开,载脂蛋白A4(Apolipoprotein A4)的表达和肝脏组织中的脂肪的调节还没有被报告。

[0051] 在本发明中,表达抑制剂可以是编码白氨酸拉链蛋白质的基因的反义寡核苷酸、siRNA、shRNA或miRNA或包含其的载体,且可优选地是由SEQ ID No. 5组成的siRNA,但只要抑制剂可呈现同等或类似的效果就不限于此。可使用本领域中公开已知的方法来构造所述反义寡核苷酸、siRNA、shRNA或miRNA或包含其的载体。如本文中所使用,“载体(vector)”是指包含插入到编码多肽的基因组中的外部DNA的基因构造体。与本发明相关的载体是其中将抑制所述基因的核酸序列插入到基因组中的载体,且载体的实例包含DNA载体、质体载体、粘质体载体、噬菌体载体、酵母载体或病毒载体。

[0052] 此外,如本文中所使用,活性抑制剂是指允许白氨酸拉链蛋白质以降低白氨酸拉

链蛋白质的功能的含量水平存在的物质，且优选地使得不可能感应所述蛋白质的功能或对所述蛋白质的功能的感应不显著。更具体地，活性抑制剂可以是：特异性结合到白氨酸拉链蛋白质的抗体；编码白氨酸拉链蛋白质中的特定片段的基因的反义寡核苷酸、siRNA、shRNA或miRNA，或包含其的载体；抑制白氨酸拉链蛋白质中的特定片段的活性且抑制因高尔基体应激(Golgi stress)所致的LZIP N端裂解的物质，包含AEBSF及类似物；或PI3K/Akt抑制剂，包含LY294002、Akt抑制剂IV(Akt inhibitor IV)以及类似物，但不限于此。

[0053] 白氨酸拉链蛋白质中的特定片段定位于白氨酸拉链蛋白质的N端处，可由由SEQ ID No. 1表示的氨基酸序列组成，且可包含具有70%或大于70%、优选地80%或大于80%、更优选地90%或大于90%且最优选地95%或大于95%的序列同源性的氨基酸序列，所述氨基酸序列具有由SEQ ID No. 1表示的氨基酸序列。

[0054] 另外，编码白氨酸拉链蛋白质中的特定片段的基因可优选地包含能够编码由SEQ ID No. 1表示的氨基酸的所有碱基序列(base sequence)类型，可最优选地由由SEQ ID No. 2表示的碱基序列组成，且可包含与由SEQ ID No. 2表示的碱基序列具有70%或大于70%、优选地80%或大于80%、更优选地90%或大于90%且最优选地95%或大于95%的序列同源性的碱基序列。另外，编码全长白氨酸拉链蛋白质的基因可优选地包含能够编码由SEQ ID No. 3表示的氨基酸的所有碱基序列(base sequence)类型，可最优选地由由SEQ ID No. 4表示的碱基序列组成。

[0055] 本发明的医药组成物可通过使用除了活性成分之外的医药学上适合且生理学上可接受的添加剂来制备，且增溶剂可用作所述添加剂，所述增溶剂如赋形剂、崩解剂、甜味剂、粘合剂、涂布剂、膨胀剂、润滑剂、助流剂或调味剂。

[0056] 本发明的医药组成物可通过额外包含除了用于施用的活性成分之外的一或多种药物学上可接受的载剂来调配。在调配为液体溶液的组成物中，医药学上可接受的载剂可适用于除菌和活体，有可能使用生理盐水溶液、除菌水、林格氏(Ringer's)溶液、缓冲生理盐水溶液、白蛋白注射溶液、右旋糖溶液、麦芽糊精溶液、甘油、乙醇以及其至少一个的混合物，且在必要时，可添加其它典型的添加剂，如抗氧化剂、缓冲溶液以及抑菌剂。此外，组成物可通过额外添加稀释剂、分散剂、表面活性剂、粘合剂以及润滑剂来调配成用于注射的剂型、丸剂、胶囊、粒剂或锭剂，如水溶液、悬浮液以及乳液。此外，可优选地根据具体疾病或根据成分通过将由宾夕法尼亚州伊斯顿(Easton, PA)的马克出版公司(Mack Publishing Company)出版的雷明顿氏医药科学(Remington's Pharmaceutical Science)中所公开的方法用作对应技术中的适当方法来调配所述组成物。

[0057] 本发明的医药组成物的医药制剂形式可以是粒剂、粉剂、包衣锭剂、锭剂、胶囊、栓剂、糖浆、果汁(juice)、悬浮液、乳液、滴剂、可注射溶液、活性化合物的缓释调配物或类似形式。

[0058] 本发明的医药组成物可经由静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、胸骨内、经皮、鼻内、吸入、局部、直肠、经口、眼内或皮内途径以典型的方法施用。

[0059] 本发明的医药组成物的有效量的活性成分是预防或治疗疾病或实现诱导骨生长的作用所需的量。因此，有效量的活性成分可根据如以下的各种因素来调整：疾病的类型和严重度；含于组成物中的活性成分和其它成分的类型和含量；剂型的类型；患者的年龄、体重、总体医学病况、性别和饮食；施用的持续时间和途径；组成物的释放速率；治疗持续时

间;以及同时使用的药物数目。虽然不限于此,但例如,在成人的情况下,在施用期间一天一次到数次,对于本发明的抑制剂,在施用期间一天一次到数次,施用可在以下剂量下进行:在化合物情况下的0.1ng/kg(纳克/千克)~10g/kg(克/千克);在多肽、蛋白质或抗体情况下的0.1ng/kg~10g/kg;以及在反义寡核苷酸、siRNA、shRNAi或miRNA情况下的0.01ng/kg~10g/kg。

[0060] 在本发明中,'个体'可以是人类、猩猩、黑猩猩、小鼠、大鼠、狗、牛、鸡、猪、山羊、绵羊以及类似物,但不限于这些实例。

[0061] 此外,本发明的另一方面提供一种白氨酸拉链蛋白质用于诊断脂肪肝的用途。

[0062] 更具体地,本发明提供:一种用于诊断脂肪肝的组成物,包含用于测量白氨酸拉链蛋白质的表达或活性的探针;一种探针测量用于诊断所述疾病的白氨酸拉链蛋白质的表达或活性的的用途;以及一种用于提供用于诊断所述疾病的信息的方法,所述方法包含将用于测量白氨酸拉链蛋白质的表达或活性的有效量的探针施用到个体的步骤。

[0063] 由于本发明的用于诊断的组成物以及类似物也使用上文所描述的白氨酸拉链蛋白质,因此将不包括两者之间相同的内容描述以避免本说明书过于冗长。

[0064] 如本文中所使用,术语"诊断"是指通过施用根据本发明的组成物来确认病理症状(即,脂肪肝的存在或特征)的动作。出于本发明的目的,在诊断中,将活组织中的白氨酸拉链蛋白质或白氨酸拉链蛋白质中的特定片段的表达或活性增强的案例确定为脂肪肝。

[0065] 在本发明中,用于测量白氨酸拉链蛋白质的表达的探针可以是:特异性结合到白氨酸拉链蛋白质的抗体;或特异性结合到编码所述蛋白质的基因的核酸探针或引物,用于测量白氨酸拉链蛋白质的活性的探针可以是:特异性结合到白氨酸拉链蛋白质中的特定片段的抗体;或特异性结合到编码所述片段的基因的核酸探针或引物,但只要物质可测量白氨酸拉链蛋白质的表达或活性,就可不受限制地包含所述物质。

[0066] 可将多株抗体、单株抗体、人类抗体以及人类化抗体或其片段用作抗体。此外,抗体片段可包含:Fab、Fab'、F(ab')2以及Fv片段;双功能抗体(diabody);线性抗体;单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体,以及类似物。

[0067] 核酸探针是自然或修饰过的单体或键(linkages)的线性寡聚物,且是包含脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸的核酸探针,可与靶核苷酸序列特异性地杂交,且是自然地存在或人工合成的。根据本发明的探针可以是单链,优选地寡脱氧核糖核苷酸。本发明的探针可包含自然dNMP(即,dAMP、dGMP、dCMP以及dTMP)、核苷酸类似物或其衍生物。另外,本发明的探针还可包含核糖核苷酸。举例来说,本发明的探针可包含:主链修饰核苷酸,例如肽核酸(peptide nucleic acid;PNA)、硫代磷酸酯DNA、二硫代磷酸酯DNA、磷酰胺酸DNA、酰胺连接的DNA、MMI连接的DNA、2'-O-甲基RNA、α-DNA以及膦酸甲酯DNA;糖修饰的核苷酸,例如2'-O-甲基RNA、2'-氟RNA、2'-氨基RNA、2'-O-烷基DNA、2'-O-烯丙基DNA、2'-O-炔基DNA、己醣DNA、哌喃糖基RNA以及脱水己糖醇DNA;以及具有碱基修饰的核苷酸,例如C-5取代的嘧啶(取代基包含氟基-、溴基-、氯基-、碘基-、甲基-、乙基-、乙烯基-、甲酰基-、乙炔基-、丙炔基-、炔基-、噻唑基-、咪唑基-以及吡啶基-)、具有C-7取代基的7-去氮弗林蛋白酶(7-deazafurin)(取代基是氟基-、溴基-、氯基-、碘基-、甲基-、乙基-、乙烯基-、甲酰基-、炔基-、烯基-、噻唑基-、咪唑基-或吡啶基-)、肌苷以及二氨基嘌呤。

[0068] 引物可以是单链寡核苷酸,所述单链寡核苷酸可在适合温度下在适当的缓冲溶液

中充当合适的条件下的模版指导的DNA合成的起始点(即,四种类型的不同核苷三磷酸和聚合酶)。引物的适合长度可根据各种因素(例如温度和引物的使用)而变化。另外,引物的序列并不需要是完全与模版的部分序列互补的序列,且所述引物的序列足以具有在引物可与模版杂交以呈现引物的固有功能的范围内的充分互补性。因此,本发明中的引物并不需要完全与作为模版的基因的核苷酸序列互补的序列,且所述引物足以具有在引物可与基因序列杂交以充当引物的范围内的充分互补性。此外,根据本发明的引物可用于基因扩增反应。扩增反应是扩增核酸分子的反应,且基因的这些扩增反应在所属领域中是众所周知的,且可包含例如聚合酶链反应(polymerase chain reaction;PCR)、反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction;RT-PCR)、连接酶链式反应(ligase chain reaction;LCR)、转录介导扩增(transcription-mediated amplification;TMA)、基于核酸序列的扩增(nucleic acid sequence-based amplification;NASBA)以及类似扩增反应。

[0069] 本发明的用于诊断非酒精性脂肪肝的组成物可包含在试剂盒形式中。

[0070] 试剂盒可包含能够测量白氨酸拉链蛋白质或白氨酸拉链蛋白质中的特定片段的活性的抗体、探针、引物或类似物,且其定义可与以上描述的那些相同。

[0071] 当试剂盒应用于PCR扩增程序时,试剂盒可任选地包含从PCR扩增所需的试剂获得的热稳定性DNA聚合酶、DNA聚合酶辅因子以及dNTP,例如缓冲溶液和DNA聚合酶(例如,水生栖热菌(*Thermus aquaticus*;*Taq*)、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*;*Tth*)、丝状栖热菌(*Thermus filiformis*)、黄栖热菌(*Thermus flavus*)、海滨嗜热球菌(*Thermococcus literalis*)以及激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*;*Pfu*)),且当试剂盒应用于免疫分析时,本发明的试剂盒可任选地包含二次抗体和经过标记的底物。此外,可将根据本发明的试剂盒构造为包含前述试剂成分的多个分离封装或隔室。

[0072] 此外,本发明的用于诊断非酒精性脂肪肝的组成物可包含在微阵列形式中。

[0073] 在本发明的微阵列中,能够测量白氨酸拉链蛋白质或白氨酸拉链蛋白质中的特定片段的表达或活性的抗体、探针、引物或类似物用作可杂交阵列元件(hybridizable array element),且固定于底物(substrate)上。优选的底物是适合的硬质或半硬质支撑物,且其实例可包含膜片、滤膜、芯片、载玻片、晶片、纤维、磁性或非磁性珠粒、凝胶、导管、板片、聚合物、微颗粒以及毛细管。可杂交阵列元件布置和固定于底物上,且如上文所描述的固定可通过化学键结方法或共价键结方法(如UV)进行。举例来说,可杂交阵列元件可键结到经过修改以包含环氧化合物或醛基的玻璃表面,且进一步,可通过UV键结在聚赖氨酸涂布的表面上。另外,可杂交阵列元件可经由连接子(例如:乙二醇寡聚物和二胺)键结到底物。

[0074] 同时,当应用于本发明的微阵列的样品是核酸时,样品可经过标记且可与微阵列上的阵列元件杂交。杂化条件可不同,且杂交程度的检测和分析可取决于标记材料而不同地进行。

[0075] 作为本发明的另一方面,本发明提供一种白氨酸拉链蛋白质用于开发用于预防或治疗脂肪肝的药物的用途。

[0076] 由于本发明的筛选方法以及类似物也使用上文所描述的白氨酸拉链蛋白质,因此将不包括两者之间共同的内容描述以避免本说明书过于冗长。

[0077] 作为一实施例,本发明提供一种用于筛选用于预防或治疗脂肪肝的药物的方法,

所述方法包含:活体外(in vitro)培养表达白氨酸拉链蛋白质和候选材料的细胞以及测量所述细胞中的白氨酸拉链蛋白质的表达的步骤,其中当候选材料下调白氨酸拉链蛋白质的表达时,将候选材料确定为用于预防或治疗脂肪肝的药物。

[0078] 作为另一实施例,本发明提供一种用于筛选用于预防或治疗脂肪肝的药物的方法,所述方法包含:活体外(in vitro)培养表达白氨酸拉链蛋白质和候选材料的细胞以及测量所述细胞中的白氨酸拉链蛋白质的活性的步骤,其中当候选材料下调白氨酸拉链蛋白质的表达时,将候选材料确定为用于预防或治疗脂肪肝的药物。

[0079] 作为再一实施例,本发明提供一种用于筛选用于预防或治疗脂肪肝的药物的方法,所述方法包含:活体外(in vitro)培养表达白氨酸拉链蛋白质和候选材料的细胞以及测量所述细胞中的白氨酸拉链蛋白质的活性的步骤,其中当候选材料减少白氨酸拉链蛋白质的特定片段与Akt之间的复合物的形成时,将候选材料确定为用于预防或治疗脂肪肝的药物。

[0080] 候选材料可以是白氨酸拉链蛋白质或通过典型的选择方法抑制白氨酸拉链蛋白质转录和转译成特定片段的材料,或据推测有可能作为抑制白氨酸拉链蛋白质或其特定片段的功能或活性的药物的单独核酸、单独蛋白质、单独肽、另一提取物或自然产物、化合物以及类似物,或被随机选择。

[0081] 随后,可在用候选材料治疗的细胞中测量基因的表达水平、蛋白质的量或蛋白质的活性,且当作为测量结果,发现基因的表达水平、蛋白质的量或蛋白质的活性减小时,可将候选材料确定为能够预防或治疗脂肪肝的物质。

[0082] 用于测量基因的表达水平、蛋白质的量或蛋白质的活性的方法可通过本领域中公开已知的各种方法来进行,且可通过使用例如逆转录酶聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)、实时聚合酶链反应(real time-polymerase chain reaction)、蛋白质印迹(western blot)、RNA印迹(northern blot)、ELISA(酶联免疫吸附分析(enzyme linked immunosorbent assay))、放射免疫分析(RIA:radioimmunoassay)、放射免疫扩散法(radioimmunodiffusion)、免疫沉淀分析(immunoprecipitation assay)以及类似方法来进行,但不限于此。

[0083] 呈现抑制白氨酸拉链蛋白质或其特定片段的表达或抑制由本发明的筛选方法获得的蛋白质的功能的活性的候选材料可以是用于用以预防或治疗脂肪肝的药物的候选材料。

[0084] 如上文所描述的用于用以预防或治疗脂肪肝的药物的候选材料在开发用于脂肪肝的治疗剂的后续程序中充当前导化合物(leading compound),且用于脂肪肝的新治疗剂可通过对所述前导化合物的结构进行修饰和优化使得前导化合物可呈现抑制白氨酸拉链蛋白质或其特定片段的功能的作用来开发。

[0085] 下文中,将呈现用于提供对本发明的更清晰理解的优选实例。然而,以下实例仅提供为了使本发明可更易于理解,且本发明的内容不受以下实例限制。

[0086] 实例]

[0087] 实例1. 通过白氨酸拉链蛋白质(Leucine zipper protein)调节ApoA4的表达

[0088] 调节脂肪在肝脏细胞水平上的累积和释放对实际脂肪肝的形成是极重要的,且根据现有技术的报告,已知的是脂肪可不仅归因于高脂肪饮食且还归因于内质网应激

(endoplasmic reticulum stress)而在组织中累积。鉴于这些点,本发明人意欲确认白氨酸拉链蛋白质(Leucine zipper protein)(下文称为LZIP)与脂肪肝的发作之间的相关性,所述白氨酸拉链蛋白质是由内质网或高尔基体应激(ER/ Golgi stress)活化的转录因子中的一个。在此之前,在本实例中,根据具有LZIP的处理的脂蛋白(lipoprotein)表达的变化得到确认,且意欲推导出与此相关的活化LZIP的症状和具体活化位点。

[0089] 通过肝脏细胞株中的LZIP改变ApoA4的表达

[0090] 在肝脏细胞株HepG2中,测量由具有LZIP的处理剂的浓度引起的载脂蛋白A4(Apolipoprotein A4)(下文称为ApoA4)的启动子活性,且基于结果,意欲确认由具有用于作为肝脏细胞株的HepG2和Huh-7的LZIP的处理或所述LZIP的抑制引起的ApoA4 mRNA和蛋白质表达水平的变化。在以下实例中,对于具有LZIP的处理或LZIP的表达,使用Flag-LZIP(pCMV-3 Tag-1载体(vector),其中克隆LZIP序列,在所述LZIP序列中Flag表位(epitope)(DYKDDDDK)(SEQ ID No. 6)在N端处被标记(tagging))或Ad-LZIP(pShuttle-IRES-hrGFP-2载体(vector),其中克隆LZIP序列,在所述LZIP序列中HA表位(epitope)在C端处被标记(tagging)),且LZIP siRNA(SEQ ID No. 5)用于抑制LZIP。

[0091] 因此,如图1中所说明,可确认的是ApoA4启动子的活性取决于具有LZIP的处理剂的浓度(0 μg、0.25 μg、0.5 μg以及1 μg)而增大,且如图2A至图2B和图3A至图3B中所说明,有可能在mRNA和蛋白质含量水平两者方面观测到由具有LZIP的处理引起的ApoA4表达的增强和由LZIP的抑制引起的ApoA4表达的减弱。同时,已知的是ApoA4与动脉硬化的缓解和脂肪的单纯转运相关联,但没有关于对肝脏组织的作用的报告。通过LZIP改变肝细胞中的ApoA4表达表明脂肪在肝脏组织中的累积的可能性和由此引起的脂肪肝的发作。

[0092] 根据高尔(Golgi)基体应激通过LZIP的活化改变ApoA4的表达

[0093] 如上文所描述,LZIP是通过内质网或高尔基体应激(ER/Golgi stress)活化的转录因子和附接到内质网表面的蛋白质中的一种。更具体地,本实例寻求通过利用作为拆解高尔基体的材料的布雷菲德菌素A(Brefeldin A;BFA)、抑制内质网中的糖化程序的衣霉素(Tunicamycin;TM)以及耗尽内质网中的钙的毒胡萝卜素(Thasigargin;TG)处理肝细胞来活化LZIP,且接着确认所引起的ApoA4表达的改变。同时,将用1μl(微升)100%甲醇处理的群组用作对照组(Con)。

[0094] 此外,当用BFA处理细胞从而在实验中呈现显著结果时,所述结果通过再次确认ApoA4启动子的活性、ApoA4 mRNA和蛋白质表达的改变以及类似因素来校验,且意欲通过利用细胞核/细胞质分离方法和荧光显微镜来观测LZIP蛋白质的结构性改变和细胞内迁移方面而发现通过LZIP调节ApoA4表达的核心机制。在荧光分析中,观测根据具有BFA的处理(BFA)的LZIP蛋白质的细胞内迁移方面,且意欲利用具有BFA的处理通过将利用具有BFA的处理的迁移方面与用LZIP N端(GFP标记(GFP tagging))(LZIP N1-220)处理细胞的案例进行比较来确认LZIP N端的分离(分解(degradation)),所述LZIP N端是LZIP的部分分离片段。同时,仅用LZIP处理的群组用作对照组(Con),在所述群组中GFP被标记(tagging)。

[0095] 因此,如图4中所说明,能够确认的是当用TM或TG处理细胞时,未显示与对照组的大的差异,而当通过BFA活化LZIP时,ApoA4的表达显著地增强。另外,如图5A至图5D中所说明,可见的是通过BFA活化LZIP取决于处理后的BFA的浓度(5 ng/ml、10 ng/ml、50 ng/ml以及100 ng/ml)或时间(1小时、3小时、6小时、10小时以及14小时(h))而增强ApoA4启动子的

活性以及ApoA4 mRNA和蛋白质的表达。

[0096] 确切地说，如图6和图7A至图7B中所说明，在与LZIP的组合处理期间，由具有BFA的处理引起的ApoA4表达的增强是显著的，而当抑制LZIP的表达时，ApoA4 mRNA和蛋白质的量在肝细胞HepG2和Huh-7两者中均减少，且LZIP的活化产物(即，LZIP N端)也减少，从而展示通过高尔基体应激的LZIP活化在ApoA4表达的调节中起极重要的作用。同时，作为通过BFA分析LZIP N端的迁移方面的结果，如图8A至图8B中所说明，可见的是LZIP N端通过BFA与LZIP分离且从细胞质迁移到细胞核(见图8A)，且即使在使用GFP的荧光显微镜分析中，当用BFA处理细胞时，LZIP在细胞核中比在细胞质中表达的量更大，且对于GFP-LZIP的N端，在细胞核中检测到LZIP N端的量比在细胞质中更大，如以上描述的案例(见图8B)。这些结果指示通过BFA的高尔基体应激使LZIP N端分离和活化，且活化的LZIP N端迁移到细胞核且结合到ApoA4启动子以调节其表达。

[0097] 通过LZIP N端改变ApoA4表达

[0098] 为了直接确认LZIP N端在ApoA4表达的调节上的作用，在LZIP N端在肝脏细胞株中进行复制和表达后，确认所引起的ApoA4的活性以及所引起的ApoA4 mRNA和蛋白质表达的改变。此外，通过使用小鼠的原发性肝细胞，再次校验通过具有BFA的处理的LZIP N端的分离和所引起的ApoA4 mRNA和蛋白质表达的改变。在以下实例中，对于具有LZIP N端的处理或所述LZIP N端的表达，使用Flag-LZIP-N(pCMV-3 Tag-1载体(vector)，其中克隆LZIP N端序列，在所述LZIP N端序列中Flag表位(epitope)(DYKDDDDK)(SEQ ID No. 6)在N端处被标记(tagging))或Ad-LZIP-N(pShuttle-IRES-hrGFP-2载体(vector)，其中克隆LZIP N端序列，在所述LZIP N端序列中HA表位(epitope)在C端处被标记(tagging))。

[0099] 因此，如图9A至图9C中所说明，当LZIP N端在肝脏细胞株中表达时，ApoA4启动子的活性以及ApoA4 mRNA和蛋白质的表达依赖于浓度而增强，且影响的结果是所述活性和表达比用全长LZIP处理的细胞的案例(参见实例1-1和图1和图2A至图2B)增强更多。另外，如图10A至图10C中所说明，确认的是即使在小鼠的原发性肝细胞中，由具有BFA的处理剂分离的LZIP N端增加，且ApoA4 mRNA和蛋白质的表达通过分离的LZIP N端的增加而增强，且再次确认的是ApoA4在肝细胞或组织中的表达通过LZIP的活化产物和所述活化产物当中的LZIP N端来调节。

[0100] 实例2. 通过Akt信号传导机制稳定LZIP N端

[0101] 已知的是PI3K/Akt信号传导系统和作为其抑制物质的PTEN信号传导系统在脂肪肝的形成中起极重要的作用。因此，在本实例中，经由活体外激酶分析(in vitro kinase assay)和GST下拉分析(GST-pull down assay)，确认本发明的LZIP N端是否结合至Akt。此外，基于结果，确认通过具有Akt抑制剂的处理的LZIP N端蛋白质的量和所引起的ApoA4蛋白质表达的改变。

[0102] 因此，如图11A和图11B中所说明，活化的Akt与LZIP N端之间的结合可在每一实验中观测到另外，如图12A至图12C中所说明，当用Akt抑制剂(Akt抑制剂IV(Akt Inhibitor IV))处理细胞时，不仅LZIP N端且ApoA4也显著地减少(图12A和图12B)。此外，作为确认具有Akt抑制剂的处理/不处理对LZIP-N的稳定性的影响的结果，在实验程序期间用环己酰亚胺(Cycloheximide)处理细胞以便抑制待合成的新蛋白质的表达时，确认的是当用Akt抑制剂处理细胞时，LZIP-N的稳定性在短时间段内降低(图12C)。因此，可见的是表达的改变通

过PI3K/Akt信号传导系统与分离的LZIP N端之间的相互作用来调节。

[0103] 实例3.LZIP N端与肝细胞或组织中的脂肪累积之间的相关性

[0104] 在本实例中，意欲基于实例1和实例2的结果来确认肝脏组织中的脂肪累积(即，脂肪肝的发作)与通过具有LZIP N端的处理的ApoA4表达的改变之间的相关性。具体地说，细胞用与油酸(oleic acid;OA)组合的LZIP N端处理使得作为人类肝脏细胞株或小鼠原发性肝细胞的HepG2中的脂肪累积，且接着将组合处理的肝细胞中累积的脂肪的量与用油酸单独处理的案例相比较。此外，在活体内(in vivo)确认小鼠动物模型的利用具有LZIP N端的处理的ApoA4表达水平和肝脏组织中累积的脂肪量的改变。具体地说，包含LZIP N端的病毒经由静脉内注射施用到小鼠，且三天后，通过从小鼠提取肝脏组织将ApoA4的表达水平、甘油三酯的比例以及类似因素与对照组(Ad-GFP)中的那些相比较和分析。

[0105] 因此，如图13A和图13B中所说明，可见的是当用与油酸组合的LZIP N端处理细胞时，肝脏组织中累积的脂肪的量与仅用油酸处理的群组相比较增大。这一倾向依赖于具有LZIP N端的处理剂的浓度，且可见的是确切地说当用20 MOI的LZIP N端处理小鼠原发性肝细胞时，累积的脂肪的量增大到与仅用油酸处理的群组相比的约2.5倍。此外，确认的是在施用LZIP N端的小鼠的肝脏组织中，如图14和图15A至图15B中所说明，ApoA4的表达水平与对照组相比显著地增强，且甘油三酯在肝脏组织中的比例增大，而甘油三酯在血浆中的比例减小，且可观测到脂肪在肝脏组织中的累积，其是经由油红O(Oil Red O)染色得到的组织病理学发现。从结果可见的是由LZIP N端引起的ApoA4在肝脏组织中的增加导致脂肪的累积，其是脂肪肝发作的主要机制。

[0106] 实例4. LZIP和ApoA4在各种人类脂肪肝组织中的表达

[0107] 在实例3中，确认脂肪在小鼠的肝细胞或小鼠的肝脏组织中的累积的影响，而本实例寻求确认以上描述的影响是否也可在人体内观测到。具体地说，将对归因于肥胖症的脂肪肝、酒精性脂肪肝或非酒精性脂肪肝组织来说的LZIP和ApoA4的表达水平与正常肝脏组织的所述表达水平相比较。

[0108] 因此，如图16到图18中所说明，确认的是在所有归因于肥胖症的脂肪肝、酒精性脂肪肝以及非酒精性脂肪肝中的LZIP和ApoA4的表达水平比正常肝脏组织的所述表达水平更高。

[0109] 当前述结果放在一起时，可看出的是LZIP，确切地说LZIP N端调节与脂蛋白(lipoprotein)转运相关联的ApoA4蛋白质的表达，且因此，在脂肪在肝脏中的累积中起重要作用，且LZIP N端可用作用于诊断和治疗脂肪肝的核心标靶因子。

[0110] 本发明的以上描述出于说明性目的而提供，且本发明所属的领域的技术人员将理解可在不改变本发明的技术精神或必要特征的情况下易于将本发明修改为其它具体形式。因此，应理解，上文所描述的实施例在所有方面都是说明性的且不具有限制性。

<110> 高丽大学校产学协力团

<120> 脂肪肝预防或治疗用医药组成物与筛选法及诊断用组成物

<130> IP-2017-0196_X17U13C0189

<150> KR 10-2016-0165901
<151> 2016-12-07

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
<211> 219
<212> PRT
<213> LZIP N 端（LZIP N terminus）

<400> 1
Met Glu Leu Glu Leu Asp Ala Gly Asp Gln Asp Leu Leu Ala Phe Leu
1 5 10 15

[0001]

Leu Glu Glu Ser Gly Asp Leu Gly Thr Ala Pro Asp Glu Ala Val Arg
20 25 30

Ala Pro Leu Asp Trp Ala Leu Pro Leu Ser Glu Val Pro Ser Asp Trp
35 40 45

Glu Val Asp Asp Leu Leu Cys Ser Leu Leu Ser Pro Pro Ala Ser Leu
50 55 60

Asn Ile Leu Ser Ser Ser Asn Pro Cys Leu Val His His Asp His Thr
65 70 75 80

Tyr Ser Leu Pro Arg Glu Thr Val Ser Met Asp Leu Glu Ser Glu Ser
85 90 95

Cys Arg Lys Glu Gly Thr Gln Met Thr Pro Gln His Met Glu Glu Leu
100 105 110

Ala Glu Gln Glu Ile Ala Arg Leu Val Leu Thr Asp Glu Glu Lys Ser
115 120 125

Leu Leu Glu Lys Glu Gly Leu Ile Leu Pro Glu Thr Leu Pro Leu Thr

130 135 140

Lys Thr Glu Glu Gln Ile Leu Lys Arg Val Arg Arg Lys Ile Arg Asn
145 150 155 160

Lys Arg Ser Ala Gln Glu Ser Arg Arg Lys Lys Lys Val Tyr Val Gly
165 170 175

Gly Leu Glu Ser Arg Val Leu Lys Tyr Thr Ala Gln Asn Met Glu Leu
180 185 190

Gln Asn Lys Val Gln Leu Leu Glu Glu Gln Asn Leu Ser Leu Leu Asp
195 200 205

Gln Leu Arg Lys Leu Gln Ala Met Val Ile Glu
210 215

<210> 2
<211> 657
<212> DNA
[0002] <213> LZIP N 端(LZIP N terminus)

<400> 2
atggagctgg aattggatgc tggtgaccaa gacctgctgg ccttcctgct agaggaaagt 60

ggagatttgg ggacggcacc cgatgaggcc gtgagggccc cactggactg ggcgctgccg 120

ctttctgagg taccgagcga ctgggaagta gatgatttgc tgtgctccct gctgagtccc 180

ccagcgtcgt tgaacattct cagctcctcc aacccctgcc ttgtccacca tgaccacacc 240

tactccctcc cacgggaaac tgtctctatg gatctagaga gtgagagctg tagaaaagag 300

gggacccaga tgactccaca gcatatggag gagctggcag agcaggagat tgctaggcta 360

gtactgacag atgaggagaa gagtctattg gagaaggagg ggcttattct gcctgagaca 420

cttcctctca ctaagacaga ggaacaaatt ctgaaacgtg tgcggaggaa gattcgaaat 480

aaaagatctg ctcaagagag ccgcaggaaa aagaaggtgt atgttggggg tttagagagc 540

agggtcttga aatacacagc ccagaatatg gagcttcaga acaaagtaca gcttctggag 600

gaacagaatt tgtcccttct agatcaactg aggaaactcc aggccatggt gattgag 657

<210> 3
<211> 372
<212> PRT
<213> LZIP

<400> 3

Met Glu Leu Glu Leu Asp Ala Gly Asp Gln Asp Leu Leu Ala Phe Leu
1 5 10 15

Leu Glu Glu Ser Gly Asp Leu Gly Thr Ala Pro Asp Glu Ala Val Arg
20 25 30

Ala Pro Leu Asp Trp Ala Leu Pro Leu Ser Glu Val Pro Ser Asp Trp
35 40 45

Glu Val Asp Asp Leu Leu Cys Ser Leu Leu Ser Pro Pro Ala Ser Leu
50 55 60

[0003]

Asn Ile Leu Ser Ser Ser Asn Pro Cys Leu Val His His Asp His Thr
65 70 75 80

Tyr Ser Leu Pro Arg Glu Thr Val Ser Met Asp Leu Glu Ser Glu Ser
85 90 95

Cys Arg Lys Glu Gly Thr Gln Met Thr Pro Gln His Met Glu Glu Leu
100 105 110

Ala Glu Gln Glu Ile Ala Arg Leu Val Leu Thr Asp Glu Glu Lys Ser
115 120 125

Leu Leu Glu Lys Glu Gly Leu Ile Leu Pro Glu Thr Leu Pro Leu Thr
130 135 140

Lys Thr Glu Glu Gln Ile Leu Lys Arg Val Arg Arg Lys Ile Arg Asn
145 150 155 160

Lys Arg Ser Ala Gln Glu Ser Arg Arg Lys Lys Lys Val Tyr Val Gly
165 170 175

Gly Leu Glu Ser Arg Val Leu Lys Tyr Thr Ala Gln Asn Met Glu Leu
180 185 190

Gln Asn Lys Val Gln Leu Leu Glu Glu Gln Asn Leu Ser Leu Leu Asp
195 200 205

Gln Leu Arg Lys Leu Gln Ala Met Val Ile Glu Ile Ser Asn Lys Thr
210 215 220

Ser Ser Ser Ser Thr Cys Ile Leu Val Leu Leu Val Ser Phe Cys Leu
225 230 235 240

Leu Leu Val Pro Ala Met Tyr Ser Ser Asp Thr Arg Gly Ser Leu Pro
245 250 255

Ala Glu His Gly Val Leu Ser Arg Gln Leu Arg Ala Leu Pro Ser Glu
260 265 270

Asp Pro Tyr Gln Leu Glu Leu Pro Ala Leu Gln Ser Glu Val Pro Lys
275 280 285

Asp Ser Thr His Gln Trp Leu Asp Gly Ser Asp Cys Val Leu Gln Ala
290 295 300

[0004] Pro Gly Asn Thr Ser Cys Leu Leu His Tyr Met Pro Gln Ala Pro Ser
305 310 315 320

Ala Glu Pro Pro Leu Glu Trp Pro Phe Pro Asp Leu Phe Ser Glu Pro
325 330 335

Leu Cys Arg Gly Pro Ile Leu Pro Leu Gln Ala Asn Leu Thr Arg Lys
340 345 350

Gly Gly Trp Leu Pro Thr Gly Ser Pro Ser Val Ile Leu Gln Asp Arg
355 360 365

Tyr Ser Gly Leu
370

<210> 4
<211> 1116
<212> DNA
<213> LZIP

<400> 4

atggagctgg aattggatgc tggtgaccaa gacctgctgg ccttcctgct agaggaaagt 60

ggagatttgg ggacggcacc cgatgaggcc gtgagggccc cactggactg ggcgctgccg 120

ctttctgagg taccgagcga ctgggaagta gatgatttgc tgtgctccct gctgagtccc 180

ccagcgtcgt tgaacattct cagctcctcc aacccctgcc ttgtccacca tgaccacacc 240

tactccctcc cacgggaaac tgtctctatg gatctagaga gtgagagctg tagaaaagag 300

gggacccaga tgactccaca gcatatggag gagctggcag agcaggagat tgctaggcta 360

gtactgacag atgaggagaa gagtctattg gagaaggagg ggcttattct gcctgagaca 420

cttcctctca ctaagacaga ggaacaaatt ctgaaacgtg tgcggaggaa gattcgaaat 480

aaaagatctg ctcaagagag ccgcaggaaa aagaaggtgt atgttggggg tttagagagc 540

agggtcttga aatacacagc ccagaatatg gagcttcaga acaaagtaca gcttctggag 600

gaacagaatt tgtcccttct agatcaactg aggaaactcc aggccatggt gattgagata 660

[0005]

tcaaacaaaa ccagcagcag cagcacctgc atcttggtcc tactagtctc cttctgcctc 720

ctccttgtac ctgctatgta ctcctctgac acaaggggga gcctgccagc tgagcatgga 780

gtgttgtccc gccagcttcg tgccctcccc agtgaggacc cttaccagct ggagctgcct 840

gccctgcagt cagaagtgcc gaaagacagc acacaccagt ggttggacgg ctcagactgt 900

gtactccagg cccctggcaa cacttcctgc ctgctgcatt acatgcctca ggctcccagt 960

gcagagcctc ccctggagtg gccattccct gacctcttct cagagcctct ctgccgaggt 1020

cccatcctcc ccctgcaggc aaatctcaca aggaagggag gatggcttcc tactggtagc 1080

ccctctgtca ttttgcagga cagatactca ggctag 1116

<210> 5
<211> 40
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> LZIP siRNA

<400> 5
ccagaugacc acagcauuua ugcuguggag ucaucugguu 40

[0006]

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Flag-LZIP

<400> 6
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

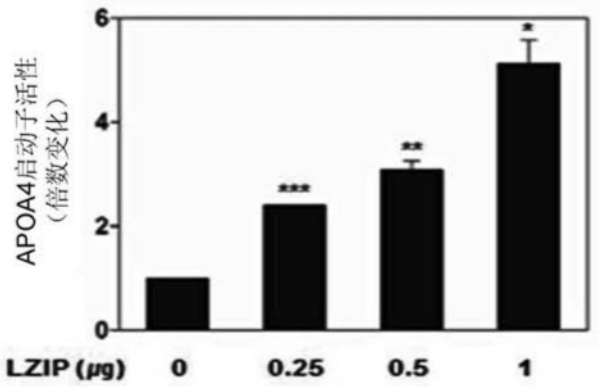


图1

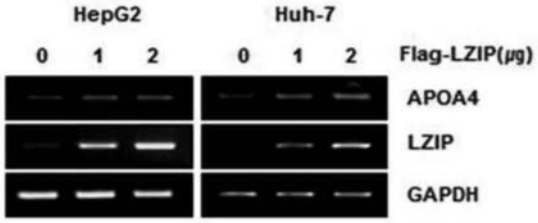


图2A

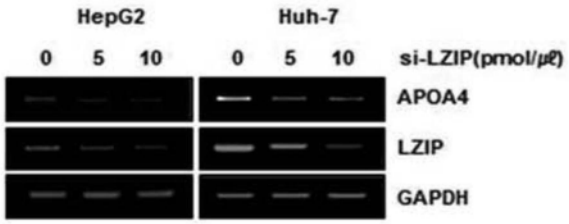


图2B

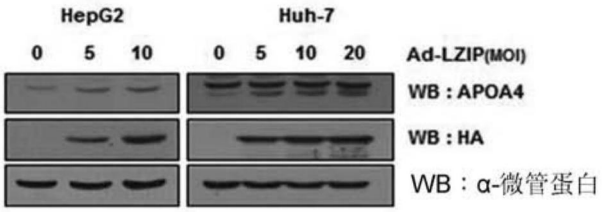


图3A

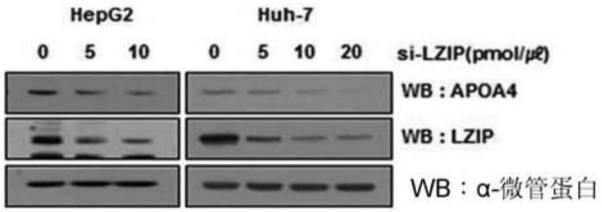


图3B

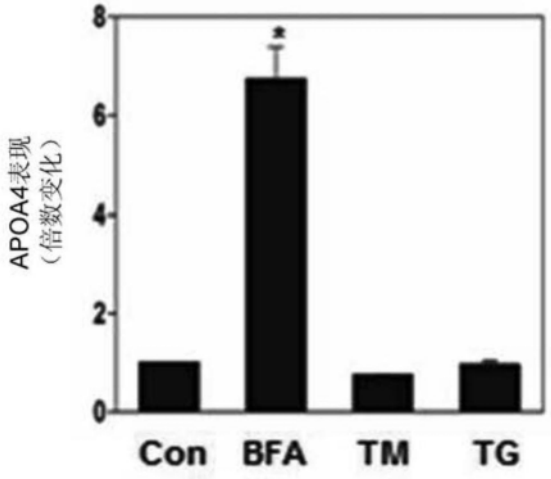


图4

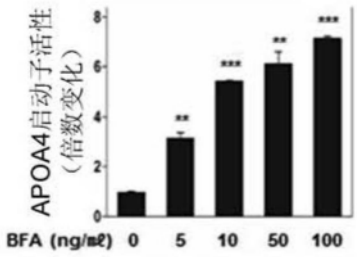


图5A

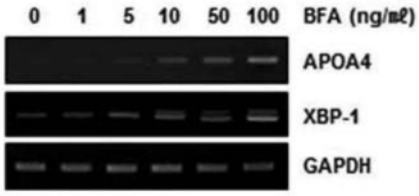


图5B

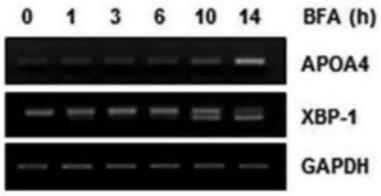


图5C

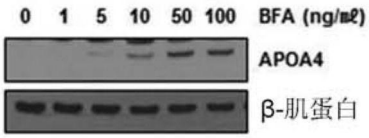


图5D

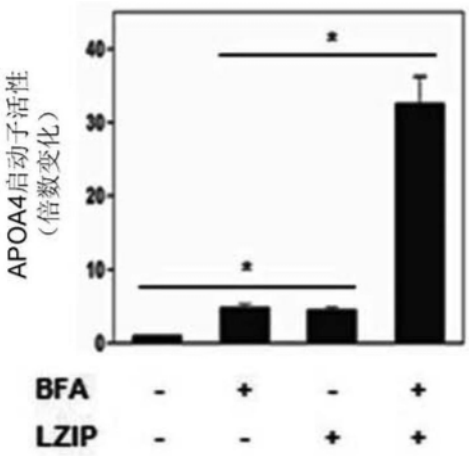


图6

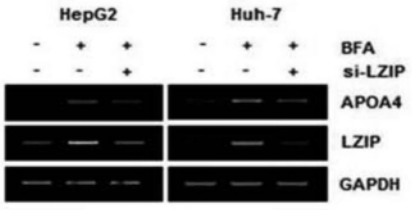


图7A

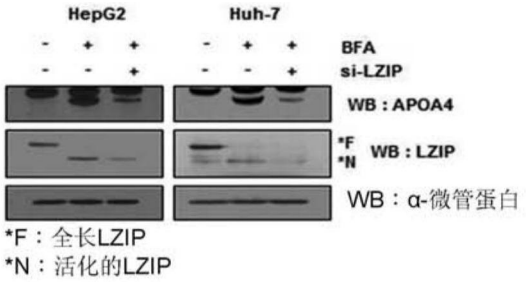


图7B

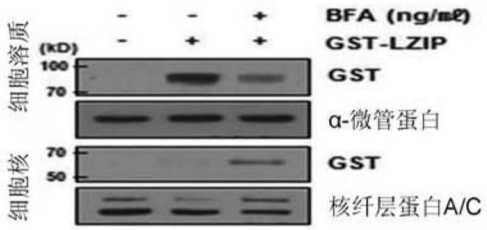


图8A

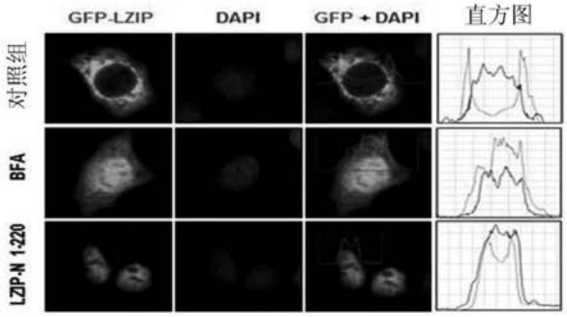


图8B

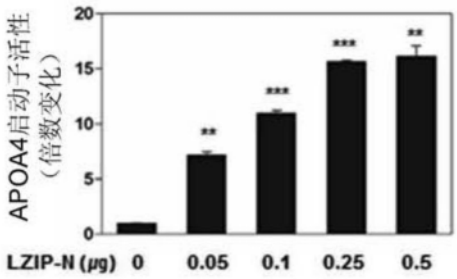


图9A

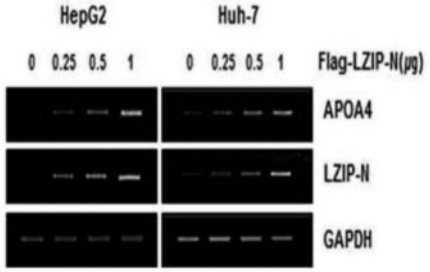


图9B

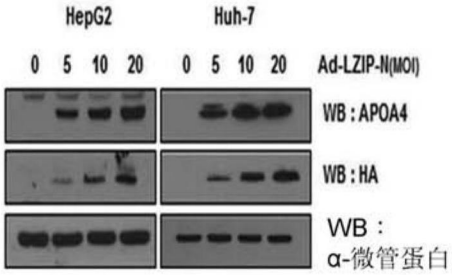


图9C

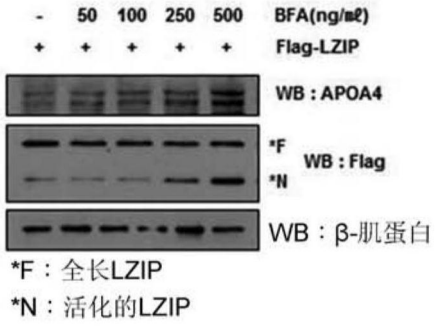


图10A

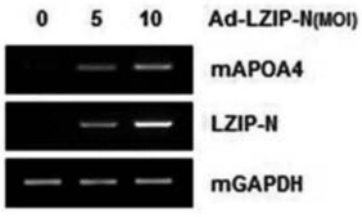


图10B

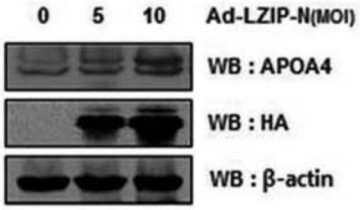


图10C

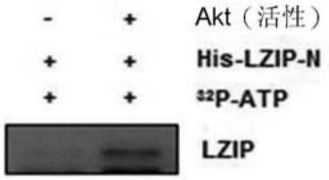


图11A

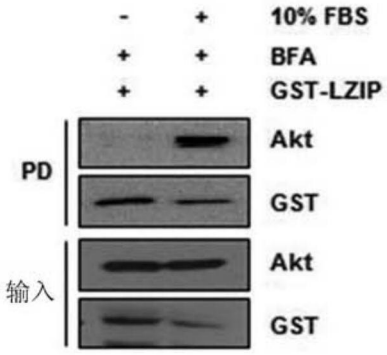


图11B

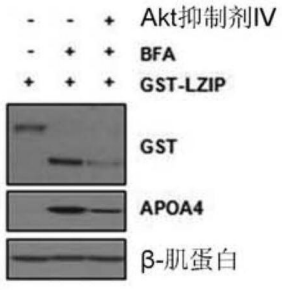


图12A

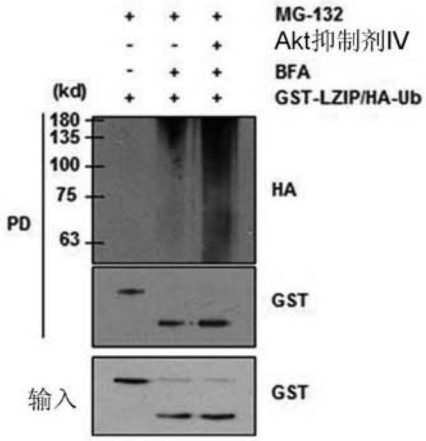


图12B

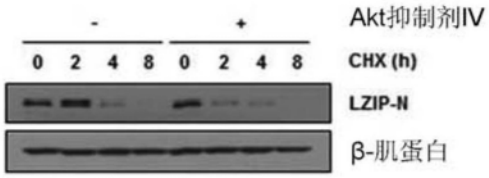


图12C

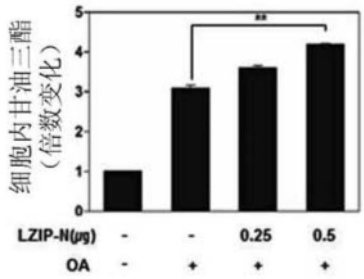


图13A

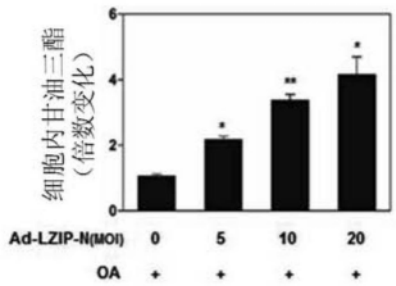


图13B

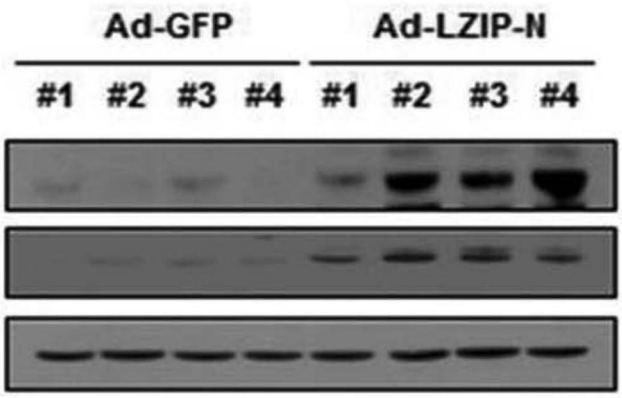


图14

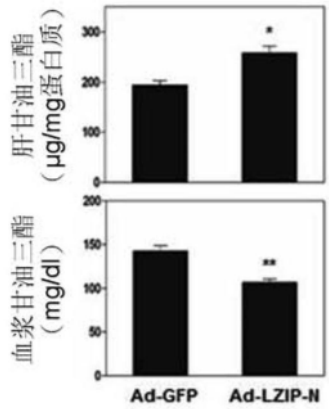


图15A

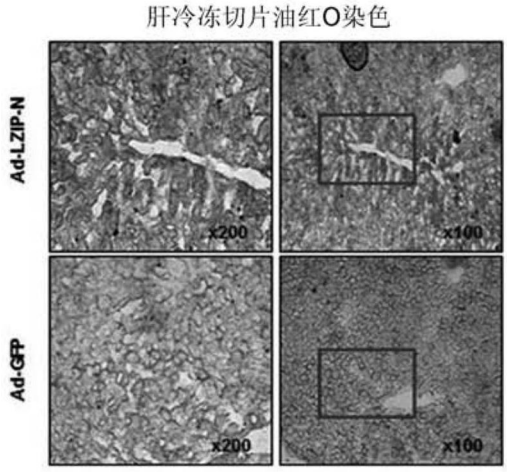


图15B

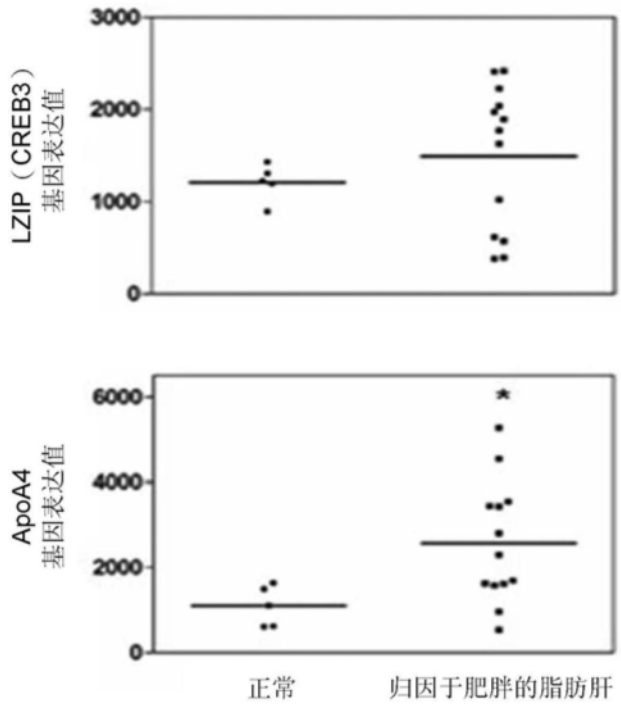

LZIP（CREB3）
基因表达值
3000
2000
1000
0
ApoA4
基因表达值
6000
4000
2000
0
正常
归因于肥胖的脂肪肝

图16

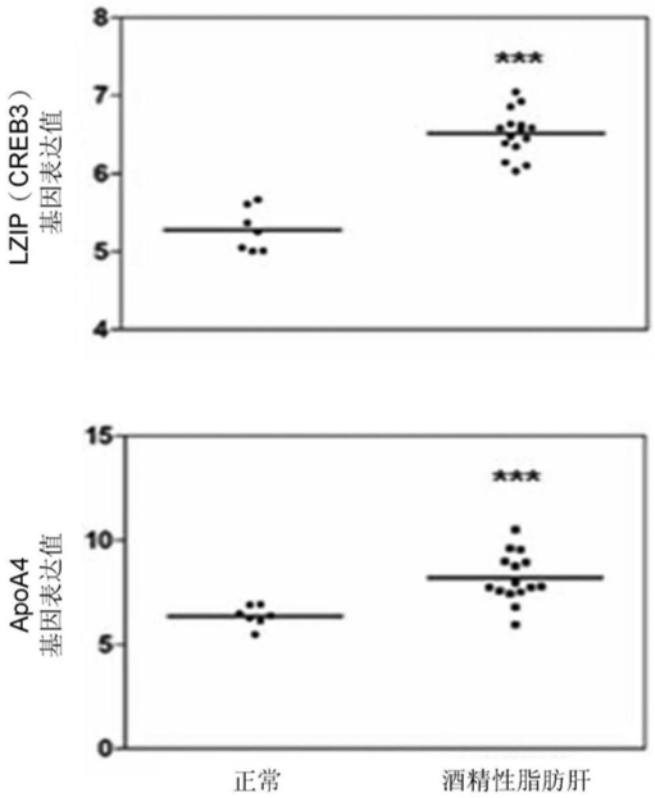

LZIP（CREB3）
基因表达值
8
7
6
5
4
ApoA4
基因表达值
15
10
5
0
正常
酒精性脂肪肝

图17

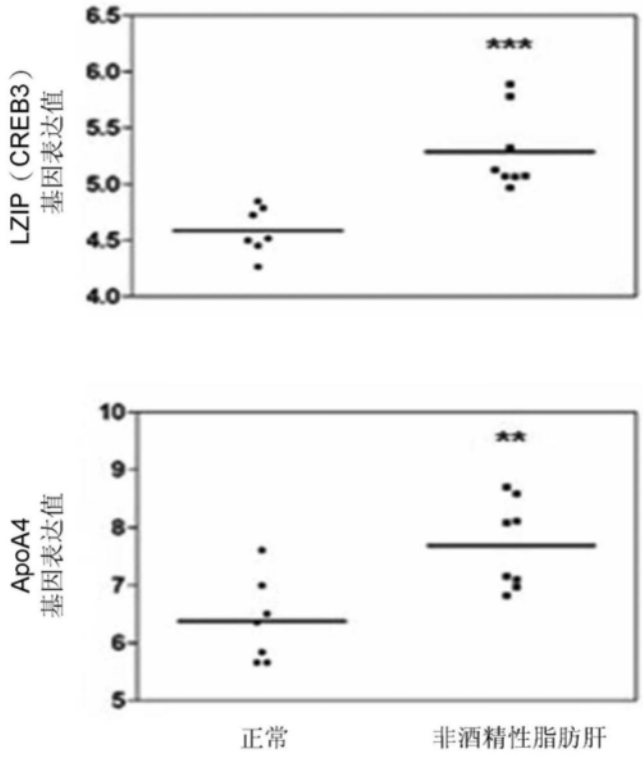

LZIP（CREB3）
基因表达值
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
***
ApoA4
基因表达值
10
9
8
7
6
5
**
正常
非酒精性脂肪肝

图18