(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119343061 A
(43)申请公布日 2025.01.21

(21)申请号 202380049301.0
(22)申请日 2023.04.25
(30)优先权数据
22382390.7 2022.04.25 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.12.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/060827 2023.04.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/208944 EN 2023.11.02
(71)申请人 欧罗卡特基金会
地址 西班牙切达约拉德尔瓦莱斯
申请人 赫罗纳约瑟夫特鲁塔博士生物医学研究基金会
生物技术网络研究中心联合会
(72)发明人 约瑟夫·玛利亚·德拉斯普廖尔
泽维尔·埃斯科特米罗
塞尔吉奥·克萨达巴斯克斯
荷西·曼纽尔·费尔南德斯-雷尔莱莫斯
乔迪·马伊内里斯佩尔塞克斯
胡里奥·卡洛斯·包丁卢克
安东尼·卡伊马里帕洛
弗兰塞斯克·普伊格罗斯拉维尼斯
安娜·卡斯特利斯诺博
(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务所(普通合伙) 11413
专利代理师 尹浩明 回振海
(51)Int.Cl.
A23L 5/00(2006.01)
A61K 31/198(2006.01)
A61K 31/4172(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61P 3/04(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)

权利要求书4页 说明书38页
序列表（电子公布） 附图21页

(54)发明名称

含有氨基酸组合的药物组合物和保健食品组合物及其在以组织中脂质蓄积为特征的疾病中的用途

(57)摘要

本发明公开了药物组合物或膳食补充剂组合物,其包含包括组氨酸、丝氨酸、半胱氨酸和肌肽的化合物的特定组合。所述组合物被提出作为食品的成分,且其已被证明能够有效治疗以组织中脂肪蓄积为特征的疾病,如脂肪性肝病、肥胖和动脉粥样硬化。

CN 119343061 A

1.一种药物组合物或膳食补充剂组合物,其包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:

(i)治疗上或保健食品上有效量的半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和/或治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有半胱氨酸以及组氨酸、丝氨酸和肌肽中的至少两种的氨基酸序列;或者,可替代地,

(ii)治疗上或保健食品上有效量的N-乙酰半胱氨酸(NAC)或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和/或治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有NAC以及组氨酸、丝氨酸和肌肽中的至少两种的氨基酸序列。

2.根据权利要求1所述的组合物,其包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:

(i)治疗上或保健食品上有效量的半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物和治疗上或保健食品上有效量的肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和/或治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有半胱氨酸、组氨酸、丝氨酸和肌肽的氨基酸序列;或者,可替代地,

(ii)治疗上或保健食品上有效量的NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和治疗上或保健食品上有效量的肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和/或治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有NAC、组氨酸、丝氨酸和肌肽的氨基酸序列。

3.根据权利要求1所述的组合物,其包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:

(i)治疗上或保健食品上有效量的半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;或者,可替代地,

(ii)治疗上或保健食品上有效量的N-乙酰半胱氨酸(NAC)或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上

可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:

(i)治疗上或保健食品上有效量的半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和治疗上或保健食品上有效量的肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;或者,可替代地,

(ii)治疗上或保健食品上有效量的NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和治疗上或保健食品上有效量的肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

5.根据权利要求1或3中任一项所述的组合物,其包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:治疗上或保健食品上有效量的N-乙酰半胱氨酸(NAC)或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的组合物,其包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:治疗上或保健食品上有效量的NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和治疗上或保健食品上有效量的肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

7.根据权利要求1至4中任一项所述的组合物,其中半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象2mg至每Kg对象550mg的剂量;组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象7.5mg至每Kg对象250mg的剂量;丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象1.3mg至每Kg对象250mg的剂量;并且肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象4.5mg至每Kg对象200mg的剂量。

8.根据权利要求7所述的组合物,其中半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象30mg至每Kg对象550mg的剂量;组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象10mg至每Kg对象250mg的剂量;丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象10mg至每Kg对象250mg的剂量;并且肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象10mg至每Kg对象200mg的剂量。

9.根据权利要求1至6中任一项所述的组合物,其中NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象2mg至每Kg对象550mg的剂量;组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象7.5mg至每Kg对象250mg的剂量;丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象1.3mg至每Kg对象250mg的剂量;并且肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象4.5mg至每Kg对象200mg的剂量。

10.根据权利要求9所述的组合物,其中NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象30mg至每Kg对象550mg的剂量;组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象10mg至每Kg对象250mg的剂量;丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象10mg至每Kg对象250mg的剂量;并且肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象10mg至每Kg对象200mg的剂量。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的组合物,其中组氨酸的药物上或保健食品上可接受的盐是L-组氨酸的盐酸盐。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的组合物,其中组氨酸的药物上可接受的盐是L-组氨酸一盐酸化物一水合物。

13.根据权利要求1至4、7、8、11或12中任一项所述的组合物,其中半胱氨酸的药物上或保健食品上可接受的盐是L-半胱氨酸的盐酸盐。

14.根据权利要求1至6或9至12中任一项所述的组合物,其包含:

-治疗上或保健食品上有效量的L-组氨酸一盐酸化物一水合物;

-治疗上或保健食品上有效量的NAC;

-治疗上或保健食品上有效量的L-丝氨酸;和

-治疗上或保健食品上有效量的L-肌肽,

以及一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体。

15.根据权利要求1至4和7、8、11至13中任一项所述的组合物,其包含:

-治疗上或保健食品上有效量的L-组氨酸一盐酸化物一水合物;

-治疗上或保健食品上有效量的L-半胱氨酸盐酸化物;

-治疗上或保健食品上有效量的L-丝氨酸;和

-治疗上或保健食品上有效量的L-肌肽,

以及一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体。

16.一种固体形式或液体形式的食品,其包含根据权利要求1至15中任一项所限定的药物组合物或膳食补充剂组合物。

17.根据权利要求16所述的食品,其为饮料。

18.根据权利要求1至15中任一项所限定的药物组合物或膳食补充剂组合物,或根据权利要求16至17中任一项所限定的食品,其用于治疗。

19.根据权利要求18所述使用的药物组合物或膳食补充剂组合物或食品,其用于预防和/或治疗选自脂肪性肝病、肥胖、超重、动脉粥样硬化、生态失调及其组合的疾病。

20.根据权利要求18至19中任一项所述使用的药物组合物或膳食补充剂组合物或食品,其用于预防和/或治疗选自非酒精性脂肪性肝病和酒精性脂肪性肝病的脂肪性肝病。

21.根据权利要求20所述使用的药物组合物或膳食补充剂组合物或食品,其中非酒精性脂肪性肝病选自患有单纯性脂肪变性的非酒精性脂肪肝(NAFLD)和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

22.根据权利要求18所述使用的药物组合物或膳食补充剂组合物或食品,其用于预防和/或治疗雌性哺乳动物、特别是女性人类中的与绝经相关的症状。

23.根据权利要求22所述使用的药物组合物或膳食补充剂组合物或食品,其中雌性哺乳动物、特别是女性人类中的与绝经相关的症状是与绝经相关的代谢变化。

含有氨基酸组合的药物组合物和保健食品组合物及其在以组织中脂质蓄积为特征的疾病中的用途

[0001] 本申请要求于2022年4月25日提交的欧洲专利申请22382390.7的优先权。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于降低与脂肪组织沉积有关的风险或治疗与脂肪组织沉积有关的疾病的膳食补充剂领域和药物组合物领域。因此,本发明涉及营养领域和医学领域。

背景技术

[0003] 由于包括加工食品和富含脂肪的食品而被称为西式饮食的饮食消费的增长和世界范围内的扩大,与包括内脏、血管和皮下组织的几个身体部位内的脂肪组织沉积有关的疾病或病症成为趋势,其不仅涉及卫生系统的高成本,而且最重要的涉及对象体内健康问题。这些病症的实例为伴有相关的内脏脂肪蓄积的肥胖、动脉粥样硬化和脂肪性肝病。

[0004] 简而言之,肥胖是过量的身体脂肪蓄积到可能对健康产生负面影响的程度的病症。

[0005] 动脉粥样硬化是疾病动脉硬化的一种模式,其中动脉壁出现称为病变的异常。这些病变可能由于动脉粥样硬化斑块的积聚而导致动脉变窄。严重时,其能导致冠状动脉疾病、卒中、外周动脉疾病或肾脏问题,这取决于哪些动脉受到影响。

[0006] 脂肪性肝病(FLD),通常也称为肝脂肪变性(HS),是肝脏中过量脂肪积聚的病症。脂肪性肝病分为非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)和酒精性肝病。饮食和生活方式的西式化改变能导致一些关键危险因素的发展,例如肥胖、瘦素或胰岛素抵抗(IR)、血脂异常和代谢综合征,这些与NAFLD的发展相关。NAFLD是当今患病率较高的人类疾病之一,影响世界近三分之一的人口。这种疾病的特征是肝脏中脂肪过度蓄积和低度炎症。这种异常的脂质代谢可能影响脂质氧化,扰乱更晚期的氧化还原稳态。因此,活性氧(ROS)的蓄积以及由此导致的脂质过氧化的增加可能导致肝脏细胞损伤和纤维化。NAFLD根据严重程度和恢复其健康状态的能力分为不同的等级:患有单纯性脂肪变性的非酒精性脂肪肝(NAFL);患有晚期脂肪变性和炎症的非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。此外,NASH可能最后在晚期发展为纤维化,并最终发展至如肝硬化或肝癌的不可逆的阶段。NAFLD的治疗通常通过改变饮食和促进运动从而减轻体重来进行,除非发生严重的进展而必须进行肝脏移植。

[0007] 已在体内测试了作为饮食中的补充剂的某些化合物的混合物,以促进脂肪的氧化和谷胱甘肽(GSH)的合成。GSH是防止脂肪酸氧化的不完全产物的蓄积所需的。一个实例是Mardinoglu等人的文献,“Personal model-assisted identification of NAD+ and glutathione metabolism as intervention target in NAFLD”, Mol Syst Biol-2017, vol. no. 13:916。这些作者在用包含高水平的脂肪和蔗糖的西式饮食喂养的小鼠中测试了由丝氨酸、NAC(N-乙酰-L-半胱氨酸)和烟酰胺核苷(NR)组成的混合物。在混合物中包含丝氨酸是因为其能容易地转化为甘氨酸,而包含NAC是因为半胱氨酸可能是GSH合成中甘氨酸补充后的限制性代谢物。该试验的目的是提供基于促进GSH和NAD+合成的可能的治疗策

略的概念验证,并从通过对患有不同程度肝脂肪变性的人类队列进行的个性化基因组尺度代谢建模的分析中得出结果。其背后的原理是降低脂质代谢中的氧化应激。从人类队列的GEM分析中,作者还得出结论,血浆的丝氨酸和甘氨酸的水平与HS呈负相关,而HS与血浆的半胱氨酸和谷氨酰胺的水平之间不存在显著相关性。

[0008] 提出饮食补充以减轻高脂肪饮食诱导的肝脂肪变性的另一篇文献是Mong等人,"Histidine and carnosine alleviated hepatic steatosis in mice consumed high saturated fat diet", European Journal of Pharmacology 653 (2011) 82-88。作者在观察到用组氨酸和二肽肌肽的补充剂喂养的小鼠降低了其体重、附睾脂肪和肝脏的甘油三酯水平和胆固醇水平,同时观察到改善的胰岛素敏感性和减弱的高胰岛素血症之后,提出使用组氨酸和二肽肌肽来减轻肝脂肪变性。

[0009] 归因于组氨酸的一些作用是作为抗炎剂和抗氧化剂的作用等,从而作为肝脏的保护剂。首先,组氨酸补充的这种抗炎特性与调节NF-kB和PPARα-诱导的途径有关,其降低了血浆中TNFα、IL6和C-反应蛋白的浓度以及肝脏中的水平。此外,组氨酸具有与降低炎症小体激活相关的抗糖化作用。另一方面,组氨酸治疗的抗氧化特性是由于这种氨基酸是自由基清除剂,其具有结合二价金属离子的能力。

[0010] 基于这后一种作为自由基清除剂的能力,一些作者提出使用新合成的二聚组氨酸(H-bihistidine)来治疗非酒精性肝损伤(NLI)和其他自由基诱导的疾病(见Zhao, Z.; Fu, C.; Zhang, Y.; Fu, A. Dimeric Histidine as a Novel Free Radical Scavenger Alleviates Non-Alcoholic Liver Injury. Antioxidants 2021, 10, 1529. https://doi.org/10.3390/antiox10101529)。虽然这是一个很好的方法,但使用合成化合物的复杂性始终是一个缺点。

[0011] 因此,仍然需要替代方法来应对所有这些与组织中脂肪沉积相关的疾病或病症。

发明内容

[0012] 发明人出人意料地发现,组氨酸、半胱氨酸、丝氨酸和肌肽中的三种或多于三种的特定组合能够减轻NAFLD的肝损伤和肝脏特征,所述损伤在宏观上表现为肝脏重量、肝脏发白和脂肪肝;在生化水平上通过对丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平和天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平进行分析。这些化合物的组合还降低了肝脏脂质含量和肝脂肪变性。在饮食中补充所述化合物的组合降低了与NAFLD相关的肝脏炎症,增加了抗氧化防御和抗肿瘤活性,并减轻了胰岛素抵抗。简而言之,在患有所述疾病的动物模型中,这些化合物中的三种或多于三种的组合可以逆转NAFLD症状。

[0013] 此外,发明人还发现,所述化合物的组合还可以抵消切除卵巢(OVX)大鼠中的与绝经相关的脂体重积累,并降低OVX大鼠的瘦体重损失,有助于更健康的身体组成状况。在该动物模型中,这些化合物还能改善胰岛素抵抗。因此,作者发现,所述化合物的组合有助于逆转切除卵巢(OVX)大鼠中的与绝经相关的代谢变化。

[0014] 在不受任何理论约束的情况下,发明人提出,将这些化合物的组合作为保健食品组合物、食品补充剂中的成分或作为药物组合物中的活性成分,最终导致血浆组氨酸水平的增加,这最终并且由于各种因素的复杂性而可以降低脂肪蓄积。这假设了新的与先前公开的将组氨酸在涉及脂肪蓄积的疾病中用作自由基清除剂或用作抗炎剂有关的方法。该方

法是出人意料的,因为,此外,组氨酸仅被提出为对所有这些疾病具有适度的效果,同时现有技术中的治疗更多集中于促进脂肪的氧化和谷胱甘肽(GSH)的合成。此外,源于发明人真实观察的所提出的方法,允许安全地应对这些对象体内的与脂肪在几个身体组织中蓄积有关的疾病,在所述对象中脂肪氧化能力的控制没有受到损害,但由于最终降低了组氨酸循环水平的其他机制,这些对象也患有临床症状。

[0015] 该原理也可能是肥胖对象中的内脏脂肪减少和动脉粥样硬化模型中LDL-胆固醇减少的原因。

[0016] 因此,本发明的第一方面是药物组合物或膳食补充剂组合物,其包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少三种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和/或治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有组氨酸、半胱氨酸、丝氨酸和肌肽中至少三种的氨基酸序列,具体而言,药物组合物或膳食补充剂组合物包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:

[0017] (i)治疗上或保健食品上有效量的半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和/或治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有半胱氨酸以及组氨酸、丝氨酸和肌肽中的至少两种的氨基酸序列;或者,可替代地,

[0018] (ii)治疗上或保健食品上有效量的N-乙酰半胱氨酸(NAC)或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和/或治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有NAC以及组氨酸、丝氨酸和肌肽中的至少两种的氨基酸序列。

[0019] 药物组合物或膳食补充剂组合物可与常用食品的常见成分一起用作这类食品的成分,所述食品例如饮料(即苏打水)、乳制品(即酸奶)、烘焙食品等。因此,本发明的第二方面是固体形式或液体形式的食品,其包含第一方面中所限定的药物组合物或膳食补充剂组合物。

[0020] 如将在实施例中所说明的,并且如先前所指示的,包含所列化合物中的至少三种的组合物或食品在NAFLD动物模型和绝经动物模型中提供了多种有益效果。因此,本发明的另一方面是在第一方面中所限定的组合物或第二方面的食品在治疗中(即作为医药)的用途。

附图说明

[0021] 图1示出了治疗对(A)肝脏重量;(B) 肝脏的代表性宏观外观;和(C)血清ALT(丙氨

酸氨基转移酶);和(D)血清AST(天冬氨酸氨基转移酶)的影响。数据为平均值±SEM;n=16只动物/组。与对照小鼠相比,*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001、****p<0.0001;与HFHFr小鼠相比,#p<0.05、##p<0.01、###p<0.001。

[0022] 图2示出了治疗对(A)总肝脏脂质含量;(B)总肝脏甘油三酯(TG)含量;(C)总肝脏胆固醇含量的影响。数据为平均值±SEM;n=16只动物/组。与对照小鼠相比,**p<0.01、***p<0.001、****p<0.0001;与HFHFr小鼠相比,#p<0.05、####p<0.0001。

[0023] 图3示出了通过(A)H&E(苏木精-伊红染色)和所选区域的放大,在下面的面板中示出了放大的区域;(B)脂滴计数;(C)脂滴表面积视野;(D)NAFLD/NASH评分表测定的肝脏组织病理学分析和图像分析。st.,脂肪变性。线条(bar)=100μm。数据为平均值±SEM;n=6只动物/组。与对照小鼠(C)相比,**p<0.01、****p<0.0001;与HFHFr小鼠相比,###p<0.001、####p<0.0001。AA小鼠为治疗小鼠。

[0024] 图4示出了治疗对肝脏胰岛素抵抗的影响。(A)代表性的Akt激活(pAktS473)、总Akt蛋白质水平(T-Akt)、管家β-肌动蛋白水平和使用丽春红S膜染色的蛋白质上样量的蛋白质印迹分析;(B)磷酸化Akt和总Akt之比的密度测量分析。数据为平均值±SEM。n=5只至6只动物/组。与对照小鼠相比,*p<0.05。(C)四联治疗后脂肪酸β-氧化(肉碱棕榈酰基转移酶,Cpt1a)、炎症(趋化因子(C-C模体)配体2,CCL2)、脂肪分解(激素敏感性脂肪酶,HSL;和脂滴包被蛋白,Plin)和脂肪生成(脂肪酸合酶,FASN)的关键基因的肝脏表达的分析。数据表示为平均值±SEM;每种条件n=10至12。*p＜0.05。

[0025] 图5示出了治疗对循环胆固醇水平的影响。在(A)中描述了循环(HDL)水平,在(B)中描述了低密度脂蛋白(LDL)水平,在(C)中描述了LDL/HDL比。数据为平均值±SEM。n=16只动物/组。*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001、****p＜0.0001。

[0026] 图6示出了治疗对治疗后体重变化(A)和对治疗后主要内脏库的重量(B)的影响;附睾白色脂肪组织(EWAT);腹膜后白色脂肪组织(RWAT)和肠系膜白色脂肪组织(MWAT)。(C)生长曲线。圆形代表“瘦”,正方形代表“肥胖”,三角形代表“肥胖+4AA”。(D)通过H&E(苏木精-伊红染色)确定的内脏脂肪组织组织病理学分析和图像分析。(E)BAT重量。(F)BAT组织病理学分析及图像分析。(G)BAT中所指示的基因的基因表达分析。(H)BAT中所指示的蛋白的代表性蛋白质印迹分析和定量。(I)小鼠热成像分析和定量。在(D)至(I)中,左列代表“瘦”,中列代表“肥胖”,右列代表“肥胖+4AA”。数据为平均值±SEM。n=16只动物/组。*p＜0.05、**p＜0.01、****p＜0.0001。

[0027] 图7示出了以下列浓度单独或组合地使用所指示的氨基酸治疗24小时对人类肝脏细胞(HepG2)中Cpt1a mRNA、Ccl2 mRNA、Hsl mRNA、Plin mRNA和Fasn mRNA表达的影响:组氨酸10毫摩尔/升、肌肽5毫摩尔/升、半胱氨酸5毫摩尔/升和丝氨酸5毫摩尔/升。这些浓度在不同的组合中是恒定的。数据表示为平均值±SEM;每种条件n=3至4。与载剂相比,*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001。

[0028] 图8示出了切除卵巢、17β-E2注射和四联组氨酸+半胱氨酸+丝氨酸+肌肽(4AA)治疗在治疗57天后对假手术(SH)和切除卵巢(OVX)的雌性Sprague-Dawley大鼠的体重变化(A)、脂体重变化(B)和瘦体重变化(C)的影响。体重每7天记录一次,而脂体重和瘦体重每28天记录一次。以克计的体重增加(D)被计算为整个研究期间每周累积的最终体重的商。脂体重增加和瘦体重增加被计算为实验结束时的脂体重与基线点之间的百分比的差。数据以平

均值±SEM给出(n=10)。在每个面板中,不同的上标小写字母(a、b、c、d)指出了组间显著不同的平均值(单因素ANOVA和Duncan事后检验、Welch检验和Games-Howell事后检验或Kruskal-Wallis检验和Mann-Whitney U事后检验,$p<0.05$)。I:干预的影响,t:时间的影响,Ixt:干预类型与时间的交互作用(RM-ANOVA,$p<0.05$)。SH:假手术大鼠,OVX:切除卵巢大鼠,OVX-E2:17β-雌二醇治疗的OVX大鼠,OVX-4AA:补充四联组氨酸+半胱氨酸+丝氨酸+肌肽(4AA)的OVX大鼠。在(A)至(C)中,圆形代表"SH",三角形代表"OVX",菱形代表"OVX-E2",正方形代表"OVX-4AA"。

[0029] 图9示出了切除卵巢、17β-E2注射和四联组氨酸+半胱氨酸+丝氨酸+肌肽(4AA)治疗在干预57天后对假手术(SH)和切除卵巢(OVX)的大鼠的RWAT(A)库重量、MWAT(B)库重量、IWAT(C)库重量、肥胖指数(D)和循环瘦素水平(E)的影响。数据以平均值±SEM给出(n=9至10)。肥胖指数被计算为IWAT库重量、MWAT库重量和RWAT库重量的总和(以克计),并被表示为体重的百分比。在每个图中,不同的上标小写字母(a、b、c)指出了组间显著不同的平均值(单因素ANOVA和Duncan事后检验,$p<0.05$)。I:干预的影响。SH:假手术大鼠,OVX:切除卵巢大鼠,OVX-E2:17β-雌二醇治疗的OVX大鼠,OVX-4AA:补充四联组氨酸相关氨基酸(4AA)的OVX大鼠。MWAT:肠系膜白色脂肪组织;RWAT:腹膜后白色脂肪组织;IWAT:腹股沟白色脂肪组织。

[0030] 图10示出了干预57天后假手术(SH)和切除卵巢(OVX)的大鼠在研究结束时的血浆胰岛素水平(a)、血浆葡萄糖水平(b)和血浆HOMA-IR水平(c)。数据以平均值±SEM给出(n=9至10)。上标小写字母(a、b、c)指出了组间显著不同的平均值(单因素ANOVA和Duncan事后检验,$p<0.05$)。I:干预的影响。SH:假手术大鼠,OVX:切除卵巢大鼠,OVX-E2:17β-雌二醇治疗的OVX大鼠,OVX-4AA:补充四联组氨酸+半胱氨酸+丝氨酸+肌肽(4AA)的OVX大鼠。HOMA-IR:稳态模型评估估算的胰岛素抵抗。

[0031] 图11示出了血浆组氨酸和脂肪变性程度与人类肠道微生物群和Hut基因的关系。a)控制年龄、BMI、性别和国家,使用带偏差校正的微生物组分析(ANCOM-BC),鉴定发现队列(n=73)中与循环组氨酸水平相关的差异细菌科的火山图。b)控制年龄、BMI、性别和国家,使用带偏差校正的微生物组分析(ANCOM-BC),鉴定发现队列(n=73)中与肝脂肪变性程度(肝脏活体组织检查)相关的差异细菌科的火山图。绘制了每个分类单元的与血浆组氨酸水平单位变化相关的log2(倍数变化)和对多重检验进行调整的-log10(p值)。根据门的不同,对显著不同的分类单元进行着色。c)组氨酸利用途径。前三个途径似乎是普遍的。根据属的不同,亚胺代甲基谷氨酸有两种不同的降解途径:水解为甲酰胺和谷氨酸,或水解为甲酰基谷氨酸并随后水解为甲酸盐和谷氨酸。d)在脂肪变性程度低于33%或高于33%的对象中,中心对数比变换的涉及组氨酸利用的微生物基因的小提琴图,所述基因分别为hutH、hutU、hutI和hutG。e)涉及组氨酸利用的微生物基因(hutH和hutG)表达的qPCR。数据为平均值±SEM。相对于NAFLD小鼠,*$p<0.05$、**$p<0.01$、***$p<0.001$、****$p<0.0001$。

[0032] 本发明的详细描述

[0033] 除非另有说明,否则本申请中使用的所有术语应被理解为其在本领域已知的常规含义。本申请中使用的某些术语的其他更具体的定义如下所述,旨在一致地适用于整个说明书和权利要求书,除非另有清楚描述的定义提供更广泛的定义。

[0034] 如本文所用,单数指代"一个"和"一种"与"至少一个"或"一个或多于一个"同义。

除非另有说明,本文使用的特别指代,如“所述的”还包括名词的复数。

[0035] 为了本发明的目的,给出的任何范围包括该范围的下端点和上端点。

[0036] 如本文所用,术语“药物上可接受的盐”是指在合理的医学判断范围内,适合用于与人类和低等动物的组织接触而不具有不适当的毒性、刺激、过敏反应等,并且与合理的收益/风险比相称的盐。药物上可接受的盐在本领域中是众所周知的。药物上可接受的盐、无毒的酸加成盐的实例是与如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸的无机酸或与如乙酸、三氟乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸的有机酸形成的氨基盐,或通过使用在本领域中使用的其他方法如离子交换形成的氨基盐。其他药物上可接受的盐包括己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、十二烷酸盐、十二烷基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、帕莫酸盐(pamoate)、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。衍生自合适的碱的盐包括碱金属盐、碱土金属盐和铵盐。代表性的碱金属盐或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等的盐。在合适的情况下,其他药物上可接受的盐包括使用反离子形成的无毒的铵、季铵和胺基阳离子的盐,如卤化物、氢氧化物、羧酸盐、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐、低级烷基磺酸盐和芳基磺酸盐。

[0037] 术语“溶剂化物”是指包含感兴趣的化合物(即L-组氨酸、L-半胱氨酸、L-丝氨酸和L-肌肽或其药物上可接受的盐)和由非共价分子间力键合的化学计算量或非化学计算量的一种或多于一种溶剂分子(例如水)的分子络合物。当形成分子络合物的一部分的一种或多于一种溶剂分子为水时,溶剂化物为水合物。溶剂化的方法在本领域是普遍已知的。

[0038] 术语“药物”还包括“兽医用组合物”的概念。因此,其涉及当通过任何期望的或适用的途径施用于包括人类的任何动物时在治疗上有效的组合物。

[0039] 本文所用的表述“治疗上有效量”是指当施用时足以预防所处理的疾病的一种或多于一种症状的发展、或在某种程度上缓解所处理的疾病的一种或多于一种症状的化合物的量。根据本发明施用的化合物的具体剂量当然将由与该病例相关的具体情况来确定,所述情况包括施用的化合物、施用途径、正在治疗的具体病症以及类似的考虑因素。

[0040] 表述“药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体”是指药物上可接受的材料、组合物或载剂。每种组分必须是药物上可接受的,即与药物组合物的其他成分相容。其还必须适合用于与人类和动物的组织或器官接触而不具有过度的毒性、刺激、过敏反应、免疫原性或其他问题或其他并发症,并且与合理的收益/风险比相称。合适的可接受的赋形剂的实例为溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体载剂、分散助剂或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体黏结剂、润滑剂等。除非任何常规赋形介质与物质或其衍生物不相容,例如通过产生任何不期望的生物效应或以其他有害方式与药物组合物的任何其他一种或多于一种组分相互作用,否则其使用应被考虑到在本发明的范围内。

[0041] 本文所使用的表述“保健食品上有效量”是指当施用时足以在某些特定代谢方面为对象提供生理益处的化合物的量。根据本发明施用的化合物的具体剂量当然将由与该病

例相关的具体情况来确定,所述情况包括施用的化合物、施用途径、正在治疗的具体病症以及类似的考虑因素。

[0042] “膳食补充剂组合物”,在此也称为“保健食品组合物”或“食品补充剂”,其是在某些具体代谢方面向对象提供生理益处的组合物。虽然它们不能标上药物声明,但根据卫生管理机构的规定,它们可以带有健康声明和营养声明。在此类别下,包括几种组合物,其根据不同国家的规定而有所不同。通常,它是一种含有“膳食成分”的口服产品,旨在补充饮食。这些产品中的“膳食成分”可能包括:维生素、矿物质、草药或其他植物制剂、氨基酸,以及例如酶、器官组织、腺体和代谢物的物质。膳食补充剂也能够是提取物或浓缩物,其可以具有多种形式,如片剂、胶囊、软胶囊、明胶胶囊、液体或粉末。

[0043] “功能性食品”,在本说明书中也称为“食品”,其在加工过程中被提高了营养价值或被富集,然后以向消费者提供益处来进行推销。

[0044] 本文使用的术语“NAC”或“N-乙酰半胱氨酸”或“乙酰半胱氨酸”是指氨基酸L-半胱氨酸的乙酰化形式,且其具有(2R)-2-乙酰氨基-3-巯基丙酸的IUPAC名称。如技术人员所理解的,NAC是得到良好确认的半胱氨酸前体药物,因此半胱氨酸和NAC能够在本发明的组合物中互换使用。

[0045] 如前所指示的,本发明的第一方面是药物组合物或膳食补充剂组合物,其包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少三种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和/或治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有选自组氨酸、半胱氨酸、丝氨酸和肌肽中的至少三种化合物的氨基酸序列,具体而言,药物组合物或膳食补充剂组合物包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:

[0046] (i)治疗上或保健食品上有效量的半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和/或治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有半胱氨酸以及组氨酸、丝氨酸和肌肽中的至少两种的氨基酸序列;或者,可替代地,

[0047] (ii)治疗上或保健食品上有效量的N-乙酰半胱氨酸(NAC)或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和/或治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有NAC以及组氨酸、丝氨酸和肌肽中的至少两种的氨基酸序列。

[0048] 在特定实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少三种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;

半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

[0049] 在特定实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:

[0050] (i)治疗上或保健食品上有效量的半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和/或治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有半胱氨酸以及组氨酸、丝氨酸和肌肽中的至少两种的氨基酸序列;或者,可替代地,

[0051] (ii)治疗上或保健食品上有效量的N-乙酰半胱氨酸(NAC)或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和/或治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有NAC以及组氨酸、丝氨酸和肌肽中的至少两种的氨基酸序列。

[0052] 在另一个特定实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:

[0053] (i)治疗上或保健食品上有效量的半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;或者,可替代地,

[0054] (ii)治疗上或保健食品上有效量的N-乙酰半胱氨酸(NAC)或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

[0055] 在另一个特定实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:

[0056] (i)治疗上或保健食品上的半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物和治疗上或保健食品上有效量的肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和/或治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有半胱氨酸、组氨酸、丝氨酸和肌肽的氨基酸序列;或者,可替代地,

[0057] (ii)治疗上或保健食品上有效量的NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的组氨酸或其药物上或保健食品上可接

受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和治疗上或保健食品上有效量的肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和/或治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有NAC、组氨酸、丝氨酸和肌肽的氨基酸序列。

[0058] 在另一个特定实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:

[0059] (i)治疗上或保健食品上有效量的半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和治疗上或保健食品上有效量的肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;或者,可替代地,

[0060] (ii)治疗上或保健食品上有效量的NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和治疗上或保健食品上有效量的肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

[0061] 在更特别的实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:治疗上或保健食品上有效量的N-乙酰半胱氨酸(NAC)或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

[0062] 在更特别的实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和以下物质:治疗上或保健食品上有效量的NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和治疗上或保健食品上有效量的肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

[0063] 在特别实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物为其中,半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象2mg至每Kg对象550mg的剂量;组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象7.5mg至每Kg对象250mg的剂量;丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象1.3mg至每Kg对象250mg的剂量;并且肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象4.5mg至每Kg对象200mg的剂量。

[0064] 在特别实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物为其中,组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象10mg至每Kg对象250mg的剂量;半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或

两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象30mg至每Kg对象550mg的剂量;丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象10mg至每Kg对象250mg的剂量;并且肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象10mg至每Kg对象200mg的剂量。

[0065] 在另一个特别实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物为其中,NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象2mg至每Kg对象550mg的剂量;组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象7.5mg至每Kg对象250mg的剂量;丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象1.3mg至每Kg对象250mg的剂量;并且肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象4.5mg至每Kg对象200mg的剂量。

[0066] 在另一个特别实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物为,其中NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象30mg至每Kg对象550mg的剂量;组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象10mg至每Kg对象250mg的剂量;丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象10mg至每Kg对象250mg的剂量;并且肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象10mg至每Kg对象200mg的剂量。

[0067] 所指示的治疗上或保健品上有效量是指与动物体重有关的量,所述动物特别是哺乳动物,包括小鼠和人类。实际上,量和剂量通常由本领域的技术人员通过人体等效剂量(HED)计算来确定,技术人员可以找到用于人体的值(成年健康志愿者治疗药物初步临床试验中最大安全起始剂量的行业估算指南(Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers), 美国卫生与人类服务部(U.S. Department of Health and Human Services), 食品和药品管理局(Food and Drug Administration), 品评价和研究中心(Center for Drug Evaluation and Research (CDER)), July 2005 药理学与毒理学(Pharmacology and Toxicology))。

[0068] 例如,小鼠中组氨酸、丝氨酸和肌肽的剂量为210mg/Kg,推断HED为17.027mg/Kg(人类体重的中位数为70Kg)。同样,剂量为490mg/Kg,推断HED为39.730mg/Kg。在本发明的特别实施方案中,每Kg对象的量是用于计算每日剂量(即量)的量。人体中,组氨酸、丝氨酸和肌肽(或其任何盐或溶剂化物)的具体每日剂量为660mg/天至1500mg/天,半胱氨酸(或其任何盐或溶剂化物)的具体每日剂量为1700mg/天至3000mg/天。

[0069] 在特别实施方案中,组氨酸、丝氨酸和肌肽或其药物上可接受的盐或溶剂化物中任何一种的治疗上或保健食品上有效量为施与12mg/Kg至230mg/Kg、或甚至更特别为17mg/Kg至210mg/Kg的剂量。

[0070] 在特别实施方案中,人体中组氨酸、丝氨酸和肌肽或其药物上可接受的盐或溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与12mg/Kg至25mg/Kg的剂量,或选自0.5mg/Kg、

1mg/Kg、1.5mg/Kg、2mg/Kg、2.5mg/Kg、3mg/Kg、3.5mg/Kg、4mg/Kg、4.5mg/Kg、5mg/Kg、5.5mg/Kg、6mg/Kg、6.5mg/Kg、7mg/Kg、7.5mg/Kg、8mg/Kg、9mg/Kg、10mg/Kg、11mg/Kg、12mg/Kg、13mg/Kg、14mg/Kg、15mg/Kg、16mg/Kg、17mg/Kg、18mg/Kg、19mg/Kg、20mg/Kg、21mg/Kg、22mg/Kg、23mg/Kg、24mg/Kg和25mg/Kg的量。在小鼠中其为200mg/Kg至230mg/Kg,更特别为210mg/Kg。

[0071] 在特别实施方案中,人体中组氨酸、丝氨酸和肌肽或其药物上可接受的盐或溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量为施与0.5mg/Kg至25mg/Kg、1mg/Kg至25mg/Kg、1.3mg/Kg至25mg/Kg、1.5mg/Kg至25mg/Kg、2.5mg/Kg至25mg/Kg、4mg/Kg至25mg/Kg、5mg/Kg至25mg/Kg、6mg/Kg至25mg/Kg、7.5mg/Kg至25mg/Kg、8mg/Kg至25mg/Kg、9mg/Kg至25mg/Kg、10mg/Kg至25mg/Kg、12mg/Kg至25mg/Kg、15mg/Kg至25mg/Kg、17mg/Kg至25mg/Kg或20mg/Kg至25mg/Kg、特别为15mg/Kg至25mg/Kg的剂量。在另一个特别实施方案中,人体中组氨酸、丝氨酸和肌肽或其药物上可接受的盐或溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量为施与10mg/Kg至25mg/kg、12mg/Kg至22mg/kg、15mg/Kg至20mg/Kg或16mg/Kg至18mg/kg、特别为15mg/kg至20mg/kg的剂量。

[0072] 在另一个更特别的实施方案中,可选地结合任意上述或下述的实施方案,半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量为施与35mg/Kg至500mg/Kg的剂量。在另一个更特别的实施方案中,可选地结合任意上述或下述的实施方案,人体中半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量为施与35mg/Kg至50mg/Kg的剂量,或选自0.5mg/Kg、1mg/Kg、2mg/Kg、3mg/Kg、4mg/Kg、5mg/Kg、6mg/Kg、7mg/Kg、8mg/Kg、9mg/Kg、10mg/Kg、15mg/Kg、20mg/Kg、25mg/Kg、30mg/Kg、35mg/Kg、36mg/Kg、37mg/Kg、38mg/Kg、39mg/Kg、39.5mg/Kg、40mg/Kg、41mg/Kg、42mg/Kg、43mg/Kg、44mg/Kg、45mg/Kg、46mg/Kg、47mg/Kg、48mg/Kg、49mg/Kg和50mg/Kg的量。在小鼠中其为480mg/Kg至500mg/Kg,更特别为490mg/Kg。

[0073] 在另一个特别实施方案中,可选地结合任意上述或下述的实施方案,人体中半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量为施与1mg/Kg至10mg/Kg、1.5mg/Kg至7.5mg/Kg或2mg/Kg至5mg/Kg、特别为2mg/Kg至5mg/Kg的剂量。

[0074] 在另一个特别实施方案中,可选地结合任意上述或下述的实施方案,人体中半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量为施与20mg/Kg至55mg/Kg、25mg/Kg至50mg/Kg、30mg/Kg至45mg/Kg或35mg/Kg至40mg/Kg、特别为35mg/Kg至40mg/Kg的剂量。

[0075] 在另一个更特别实施方案中,可选地结合任意上述或下述的实施方案,NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量为施与35mg/Kg至500mg/Kg的剂量。在另一个更特别的实施方案中,可选地结合任意上述或下述的实施方案,人体中NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量为施与35mg/Kg至50mg/Kg的剂量,或选自0.5mg/Kg、1mg/Kg、2mg/Kg、3mg/Kg、4mg/Kg、5mg/Kg、6mg/Kg、7mg/Kg、8mg/Kg、9mg/Kg、10mg/Kg、15mg/Kg、20mg/Kg、25mg/Kg、30mg/Kg、35mg/Kg、36mg/Kg、37mg/Kg、38mg/Kg、39mg/Kg、39.5mg/Kg、40mg/Kg、41mg/Kg、42mg/Kg、43mg/Kg、44mg/Kg、45mg/Kg、46mg/Kg、47mg/Kg、48mg/Kg、49mg/Kg和50mg/Kg的量。在小鼠中其为

480mg/Kg至500mg/Kg,更特别为490mg/Kg。

[0076] 在另一个特别实施方案中,可选地结合任意上述或下述的实施方案,人体中NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量为施与1mg/Kg至10mg/Kg、1.5mg/Kg至7.5mg/Kg或2mg/Kg至5mg/Kg、特别为2mg/Kg至5mg/Kg的剂量。

[0077] 在另一个特别实施方案中,可选地结合任意上述或下述的实施方案,人体中半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量为施与20mg/Kg至55mg/Kg、25mg/Kg至50mg/Kg、30mg/Kg至45mg/Kg或35mg/Kg至40mg/Kg、特别为35mg/Kg至40mg/Kg的剂量。

[0078] 在更特别的实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物为其中,半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象1mg至每Kg对象7.5mg的剂量,其中所述对象优选为人类;组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象5mg至每Kg对象25mg的剂量,其中所述对象优选为人类;丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象1mg至每Kg对象5mg的剂量,其中所述对象优选为人类;并且肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象2mg至每Kg对象15mg的剂量,其中所述对象优选为人类。

[0079] 在甚至更特别的实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物为其中,半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象2mg至每Kg对象5mg的剂量,其中所述对象优选为人类;组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象7.5mg至每Kg对象20mg的剂量,其中所述对象优选为人类;丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象1.3mg至每Kg对象3.3mg的剂量,其中所述对象优选为人类;并且肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象4.5mg至每Kg对象10mg的剂量,其中所述对象优选为人类。

[0080] 在更特别的实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物为其中,NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象1mg至每Kg对象7.5mg的剂量,其中所述对象优选为人类;组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象5mg至每Kg对象25mg的剂量,其中所述对象优选为人类;丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象1mg至每Kg对象5mg的剂量,其中所述对象优选为人类;并且肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象2mg至每Kg对象15mg的剂量,其中所述对象优选为人类。

[0081] 在甚至更特别的实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物为其中,NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象2mg至每Kg对象5mg的剂量,其中所述对象优选为人类;组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象7.5mg至每Kg对象20mg的剂量,其中所述对象优选为人类;丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受

的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象1.3mg至每Kg对象3.3mg的剂量,其中所述对象优选为人类;并且肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象4.5mg至每Kg对象10mg的剂量,其中所述对象优选为人类。

[0082] 在更特别的实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物为其中,半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象35mg至每Kg对象40mg的剂量,其中所述对象优选为人类;组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象15mg至每Kg对象20mg的剂量,其中所述对象优选为人类;丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象15mg至每Kg对象20mg的剂量,其中所述对象优选为人类;并且肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象15mg至每Kg对象20mg的剂量,其中所述对象优选为人类。

[0083] 在更特别的实施方案中,药物组合物或膳食补充剂组合物为其中,NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象35mg至每Kg对象40mg的剂量,其中所述对象优选为人类;组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象15mg至每Kg对象20mg的剂量,其中所述对象优选为人类;丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象15mg至每Kg对象20mg的剂量,其中所述对象优选为人类;并且肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象15mg至每Kg对象20mg的剂量,其中所述对象优选为人类。

[0084] 在第一方面的另一个特别实施方案中,所述组合物包含治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少三种:L-组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、L-半胱氨酸组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、L-丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和L-肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

[0085] 实际上,所述组合物中的氨基酸可以是D型对映异构体或L型对映异构体中的任何一种,尽管它们在特别实施方案中是L-氨基酸。同样地,二肽肌肽可以以L-肌肽或D-肌肽的形式存在,尽管在特别实施方案中是L-肌肽。在一个实施方案中,本发明的组合物包含任何L-形式或D-形式的化合物的任何组合。在另一个实施方案中,本发明的组合物包含L-形式或D-形式的组氨酸、丝氨酸、肌肽和/或半胱氨酸中的任何氨基酸的任何组合。

[0086] 在第一方面的特别实施方案中,所述组合物包含:

[0087] (i)治疗上或保健食品上有效量的L-半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:L-组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、L-丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和L-肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;或者,可替代地,

[0088] (ii)治疗上或保健食品上有效量的N-乙酰半胱氨酸(NAC)或其药物上或保健食品

上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少两种:L-组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、L-丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和L-肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

[0089] 在第一方面的另一个特别实施方案中,所述组合物包含:

[0090] (i)治疗上或保健食品上有效量的L-半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的L-组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的L-丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物和治疗上或保健食品上有效量的L-肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;或者,可替代地,

[0091] (ii)治疗上或保健食品上有效量的NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的L-组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的L-丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和治疗上或保健食品上有效量的L-肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

[0092] 在根据第一方面的药物组合物的另一个特别实施方案中,组氨酸和半胱氨酸的药物上或保健食品上可接受的盐是盐酸盐,更特别为L-组氨酸和L-半胱氨酸的盐酸盐。甚至更特别地,L-组氨酸的药物上可接受的盐是L-组氨酸一盐酸化物一水合物,并且L-半胱氨酸的药物上可接受的盐是L-半胱氨酸盐酸化物。

[0093] 在根据第一方面的药物组合物的另一个特别实施方案中,组氨酸的药物上或保健食品上可接受的盐是盐酸盐,更特别为L-组氨酸的盐酸盐。甚至更特别地,L-组氨酸的药物上可接受的盐是L-组氨酸一盐酸化物一水合物。

[0094] 在根据第一方面的药物组合物的另一个特别实施方案中,半胱氨酸的药物上或保健食品上可接受的盐是盐酸盐,更特别为L-半胱氨酸的盐酸盐。甚至更特别地,L-半胱氨酸的药物上可接受的盐是L-半胱氨酸盐酸化物。

[0095] 在第一方面的药物组合物和膳食补充剂组合物的更特别的实施方案中,其包含所指示的成分中的至少三种,其中至少一种是组氨酸,更特别为L-组氨酸或盐或两者之任一的溶剂化物。实际上,正如将在下文的实施例中所描述的,包含组氨酸的三联组合在通过肉碱棕榈酰基转移酶I提高脂肪酸β-氧化速率方面提供了良好的效果。这些至少含有组氨酸的三联组合物实际上是化合物的混合物,其最终能够增加对象中的组氨酸血浆水平。丝氨酸和半胱氨酸通过多种途径代谢得到组氨酸,并且肌肽是组氨酸的来源,因为其是由氨基酸β-丙氨酸和组氨酸组成的二肽。NAC是L-半胱氨酸的前体,其在摄入后转化为L-半胱氨酸。

[0096] 在根据第一方面的药物组合物或膳食补充剂组合物的另一个特别实施方案中,其包含治疗上或保健食品上有效量的以下物质:

[0097] (a)组氨酸、更特别为L-组氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;半胱氨酸、更特别为L-半胱氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和丝氨酸、更特别为L-丝氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;或者可替代地,

[0098] (b)组氨酸、更特别为L-组氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;半胱氨酸、更特别为L-半胱氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和肌肽、更特别为L-肌肽、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;或者可替代地,

[0099] (c)半胱氨酸、更特别为L-半胱氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,丝氨酸、更特别为L-丝氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和肌肽、更特别为L-肌肽、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;或者可替代地,

[0100] (d)组氨酸、更特别为L-组氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,丝氨酸、更特别为L-丝氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和肌肽、更特别为L-肌肽、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

[0101] 在根据第一方面的药物组合物或膳食补充剂组合物的另一个特别实施方案中,所述组合物包含治疗上或保健食品上有效量的以下物质:

[0102] (a)半胱氨酸、更特别为L-半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;组氨酸、更特别为L-组氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和丝氨酸、更特别为L-丝氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;或者可替代地,

[0103] (b)半胱氨酸、更特别为L-半胱氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;组氨酸、更特别为L-组氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和肌肽、更特别为L-肌肽、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;或者可替代地,

[0104] (c)半胱氨酸、更特别为L-半胱氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,丝氨酸、更特别为L-丝氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和肌肽、更特别为L-肌肽、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

[0105] 在根据第一方面的药物组合物或膳食补充剂组合物的另一个特别实施方案中,所述组合物包含治疗上或保健食品上有效量的以下物质:

[0106] (a)NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;组氨酸、更特别为L-组氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和丝氨酸、更特别为L-丝氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;或者可替代地,

[0107] (b)NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;组氨酸、更特别为L-组氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和肌肽、更特别为L-肌肽、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;或者可替代地,

[0108] (c)NAC或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,丝氨酸、更特别为L-丝氨酸、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和肌肽、更特别为L-肌肽、或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

[0109] 在本发明的第一方面的更特别的实施方案中,所述组合物包含治疗上或保健食品上有效量的组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;治疗上或保健食品上有效量的半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和治疗上或保健食品上有效量的肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,以及一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体。

[0110] 更特别地,其包含治疗上或保健食品上有效量的L-组氨酸或其药物上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;治疗上或保健食品上有效量的L-半胱氨酸或其药物上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的L-丝氨酸或其药物上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和治疗上或保健食品上有效量的L-肌肽或其药物上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,以及一种或多于一种药物上可接受的赋形剂或载体。

[0111] 在另一个更特别的实施方案中,所述组合物包含治疗上或保健食品上有效量的L-组氨酸或其药物上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;治疗上或保健食品上有效量的NAC或其药物上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,治疗上或保健食品上有效量的L-丝氨酸或其药物上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,和治疗上或保健食品上有效量的L-肌肽或其药物上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,以及一种或多于一种药物上可接受的赋形剂或载体。

[0112] 在甚至更特别的实施方案中,所述组合物包含:

[0113] -治疗上或保健食品上有效量的L-组氨酸一盐酸化物一水合物;

[0114] -治疗上或保健食品上有效量的L-半胱氨酸盐酸化物;

[0115] -治疗上或保健食品上有效量的L-丝氨酸;和

[0116] -治疗上或保健食品上有效量的L-肌肽,

[0117] 以及一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体。

[0118] 在另一个甚至更特别的实施方案中,所述组合物包含:

[0119] -治疗上或保健食品上有效量的L-组氨酸一盐酸化物一水合物;

[0120] -治疗上或保健食品上有效量的NAC;

[0121] -治疗上或保健食品上有效量的L-丝氨酸;和

[0122] -治疗上或保健食品上有效量的L-肌肽,

[0123] 以及一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体。

[0124] 已在前面的段落中公开了具体的治疗或保健食品的量。

[0125] 在特别实施方案中,用于人类食用的组合物包含:

[0126] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的L-组氨酸一盐酸化物一水合物,其施与17mg/Kg的剂量;

[0127] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的L-半胱氨酸盐酸化物,其施与39.7mg/Kg的剂量;

[0128] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的L-丝氨酸,其施与17mg/Kg的剂量;和

[0129] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的L-肌肽,其施与17mg/Kg的剂量;

[0130] 以及一种或多于一种药物上可接受的赋形剂或载体。

[0131] 在另一个特别实施方案中,用于人类食用的组合物包含:

[0132] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的L-组氨酸一盐酸化物一水合物,其施与17mg/Kg的剂量;

[0133] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的NAC,其施与39.7mg/Kg的剂量;

[0134] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的L-丝氨酸,其施与17mg/Kg的剂量;和

[0135] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的L-肌肽,其施与17mg/Kg的剂量;

[0136] 以及一种或多于一种药物上可接受的赋形剂或载体。

[0137] 在另一个特别实施方案中,用于人类食用的组合物包含:

[0138] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的L-组氨酸一盐酸化物一水合物,其施与7.5mg/Kg至20mg/Kg的剂量;

[0139] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的L-半胱氨酸盐酸化物,其施与2mg/Kg至5mg/Kg的剂量;

[0140] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的L-丝氨酸,其施与1.3mg/Kg至3.3mg/Kg的剂量;和

[0141] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的L-肌肽,其施与4.5mg/Kg至10mg/Kg的剂量;

[0142] 以及一种或多于一种药物上可接受的赋形剂或载体。

[0143] 在另一个特别实施方案中,用于人类食用的组合物包含:

[0144] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的L-组氨酸一盐酸化物一水合物,其施与7.5mg/Kg至20mg/Kg的剂量;

[0145] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的NAC,其施与2mg/Kg至5mg/Kg的剂量;

[0146] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的L-丝氨酸,其施与1.3mg/Kg至3.3mg/Kg的剂量;和

[0147] -人体中的治疗上或保健食品上有效量的L-肌肽,其施与4.5mg/Kg至10mg/Kg的剂量;

[0148] 以及一种或多于一种药物上可接受的赋形剂或载体。

[0149] 在第一方面的另一个特别实施方案中,所述组合物包含治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有处于任何其L-构型或D-构型及其组合(即一种化合物为D-异构体形式,另一种为L-异构体形式)的组氨酸、半胱氨酸、丝氨酸和肌肽中的至少三种的氨基酸序列。

[0150] 在第一方面的另一个特别实施方案中,所述组合物包含治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有处于任何其L-构型或D-构型及其组合(即一种化合物为D-异构体形式,另一种为L-异构体形式)的半胱氨酸以及组氨酸、丝氨酸和肌肽中的至少两种的氨基酸序列。在第一方面的另一个特别实施方案中,所述组合物包含治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有处于任何其L-构型或D-构型及其组合(即一种化合物为D-异构体形式,另一种为L-异构体形式)的半胱氨酸、组氨酸、丝氨酸和肌肽的氨基酸序列。

[0151] 在第一方面的另一个特别实施方案中,所述组合物包含治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有NAC以及组氨酸、丝氨酸和肌肽中的至少两种的氨基酸序列,其中组氨酸、丝氨酸和/或肌肽中的至少两种处于任何其L-构型或D-构型及其组合(即一种化合

物为D-异构体形式,另一种为L-异构体形式)。在第一方面的另一个特别实施方案中,所述组合物包含治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有NAC、组氨酸、丝氨酸和肌肽的氨基酸序列,其中组氨酸、丝氨酸和肌肽处于任何其L-构型或D-构型及其组合(即一种化合物为D-异构体形式,另一种为L-异构体形式)。

[0152] 在另一个特别实施方案中,具有含有至少三种所指示的化合物的序列的这些肽具有3个至50个氨基酸的长度,更特别地具有3个至10个氨基酸的长度,甚至更特别地具有选自3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个和10个氨基酸的长度。

[0153] 在更特别的实施方案中,所述肽选自三肽、四肽和五肽。

[0154] 在优选实施方案中,所述组合物中的肽是包含至少一个组氨酸残基的肽。在另一个优选实施方案中,所述组合物中的肽是包含至少一个半胱氨酸残基或NAC残基的肽。在另一个优选实施方案中,所述组合物中的肽是包含至少一个组氨酸残基和至少一个半胱氨酸残基、更优选为至少一个组氨酸残基和至少一个NAC残基的肽。

[0155] 在另一个特别实施方案中,四肽包含选自组氨酸、半胱氨酸、丝氨酸和肌肽中的至少三种的氨基酸,其他氨基酸为任何本领域技术人员已知的氨基酸,包括所有天然存在的氨基酸,特别是选自真核生物中发现的21种蛋白质原性α-氨基酸的任何氨基酸。

[0156] 在另一个特别实施方案中,四肽包含半胱氨酸和选自组氨酸、丝氨酸和肌肽中的至少两种的氨基酸,其他氨基酸为任何本领域技术人员已知的氨基酸,包括所有天然存在的氨基酸,特别是选自真核生物中发现的21种蛋白质原性α-氨基酸的任何氨基酸。在另一个特别实施方案中,四肽包含NAC和至少两种选自组氨酸、半丝氨酸和肌肽中的氨基酸,其他氨基酸为任何本领域技术人员已知的氨基酸,包括所有天然存在的氨基酸,特别是选自真核生物中发现的21种蛋白质原性α-氨基酸的任何氨基酸。

[0157] 本发明的意义上的氨基酸包括:丙氨酸(A)、精氨酸(R)、天冬酰胺(N)、天冬氨酸(天冬氨酸盐,D)、半胱氨酸(C)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、甘氨酸(G)、组氨酸(H)、异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、赖氨酸(K)、蛋氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、脯氨酸(P)、吡咯赖氨酸(O)、丝氨酸(S)、硒代半胱氨酸(U)、苏氨酸(T)、色氨酸(W)、酪氨酸(Y)和缬氨酸(V)。经修饰的氨基酸包括2-氨基己二酸(Aad)、3-氨基己二酸(bAad)、β-丙氨酸(bAla)、2-氨基丁酸(Abu)、6-氨基己酸(Acp)、2-氨基庚酸(Ahe)、2-氨基异丁酸(Aib)、2-氨基庚二酸(Apm)、2,4-二氨基丁酸(Dbu)、锁链素、2,2'-二氨基庚二酸(Dpm)、2,3-二氨基丙酸(Dpr)、N-乙基甘氨酸(EtGly)、N-乙基天冬酰胺(EtAsn)、羟赖氨酸(Hyl)、别-羟基赖氨酸(aHyl)、3-羟基脯氨酸(3Hyp)、4-羟基脯氨酸(4Hyp)、异锁链素(Ide)、别-异亮氨酸(alle)、N-甲基异亮氨酸(Melle)、6-N-甲基赖氨酸(MeLys)、N-甲基缬氨酸(Meval)、正缬氨酸(Nva)、正亮氨酸(Nle)和鸟氨酸(Orn)。在多个实施方案中,一种氨基酸可由另一种氨基酸取代,同时在每个选定位置保持疏水性、芳香性和碱度。

[0158] 在另一个特别实施方案中,所述肽包含组氨酸、半胱氨酸、丝氨酸和肌肽,且其至少为五肽,优选为五肽。在另一个特别实施方案中,所述肽包含组氨酸、NAC、丝氨酸和肌肽,且其至少为五肽,优选为五肽。

[0159] 在所述组合物的所有这些可能的肽中,氨基酸残基在从N端到C端阅读的序列中按任意顺序排列。

[0160] 一旦组合物被施用,其中包含的肽将通过常见的细胞过程和身体过程(即水解酶、

蛋白酶等)被自然水解,并且单独的部分将被递送。

[0161] 这些肽的剂量调整将会变化,但在特别实施方案中,其将被调整以施与如前面所公开的单独的化合物的上文所指示的剂量。

[0162] 所有这些肽的制备是根据本领域技术人员已知的常见做法。

[0163] 本发明的所有药物组合物或膳食补充剂组合物包含常见的赋形剂和/或载体。

[0164] 合适的药物上和保健食品上可接受的赋形剂的实例为溶剂、分散介质、稀释剂或其他液体载剂、分散助剂或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或乳化剂、防腐剂、固体黏结剂、润滑剂等。除非任何常规赋形介质与物质或其衍生物不相容,例如通过产生任何不期望的生物效应或以其他有害方式与药物组合物的任何其他一种或多于一种组分相互作用,否则其使用应被考虑到在本发明的范围内。

[0165] 本发明的药物组合物或保健食品组合物中的活性成分、药物上或保健食品上可接受的赋形剂、和/或任何其他成分的相对量将根据所治疗的对象的身份、大小和/或病症以及组合物的施用途径而变化。

[0166] 用于制造药物组合物的药物上或保健食品上可接受的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂、分散剂和/或造粒剂、表面活性剂和/或乳化剂、崩解剂、黏结剂、防腐剂、缓冲剂、润滑剂和/或油。根据制剂师的判断,可以在组合物中加入如着色剂、被膜剂、甜味剂和芳香剂的赋形剂。

[0167] 含有组氨酸、肌肽、丝氨酸和半胱氨酸中至少三种的组合的药物组合物或保健食品组合物例如为固体或液体,并且可以通过任何合适的途径施用,例如口服途径、肠外途径、直肠途径、局部途径、鼻内途径、眼内途径、腹腔途径或舌下途径,为此其将包含配制所期望剂型所需的药物上或保健食品上可接受的赋形剂。更特别地,本发明的第一方面的药物组合物或膳食补充剂组合物例如是固体或液体,并且可以通过任何合适的途径施用,例如口服途径、肠外途径、直肠途径、局部途径、鼻内途径、眼内途径、腹腔途径或舌下途径,为此其将包含配制所期望剂型所需的药物上或保健食品上可接受的赋形剂。

[0168] 示例性稀释剂包括但不限于碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸钙、磷酸氢钙、磷酸钠、乳糖、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、山梨醇、肌醇、氯化钠、干淀粉、玉米淀粉、糖粉及其组合。

[0169] 示例性造粒剂和/或分散剂包括但不限于马铃薯淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、乙醇酸淀粉钠、黏土、海藻酸、瓜尔胶、柑橘果肉、琼脂、膨润土、纤维素和木制品、天然海绵、阳离子交换树脂、碳酸钙、硅酸盐、碳酸钠、交联聚乙烯基吡咯烷酮(交联聚维酮)、羧甲基淀粉钠(乙醇酸淀粉钠)、羧甲基纤维素、交联羧甲基纤维素钠(交联羧甲基纤维素)、甲基纤维素、预糊化淀粉(淀粉1500)、微晶淀粉、非水溶性淀粉、羧甲基纤维素钙、硅酸镁铝(Veegum)、十二烷基硫酸钠、季铵化合物及其组合。

[0170] 示例性黏结剂包括但不限于淀粉(如玉米淀粉和淀粉糊);明胶;糖(如蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖蜜、乳糖、乳糖醇、甘露醇);天然树胶和合成树胶(如阿拉伯胶、海藻酸钠、爱尔兰苔藓提取物、决明子树胶(panwar gum)、茄替胶(ghatti gum)、车前子壳(isapol husks)的黏液、羧甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、乙酸纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮)、硅酸镁铝(Veegum)和落叶松阿拉伯半乳聚糖);海藻酸盐;聚乙烯氧化物;聚乙二醇;无机钙盐;硅酸;聚甲基丙烯酸

酯;蜡;水;醇;及其组合。

[0171] 示例性防腐剂可包括抗氧化剂、螯合剂、抗菌防腐剂、抗真菌防腐剂、醇防腐剂、酸性防腐剂和其他防腐剂。示例性抗氧化剂包括但不限于α-生育酚、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、抗坏血酸硬脂酸酯、抗坏血酸油酸酯、丁基羟基茴香醚、丁基羟基甲苯、一硫代甘油、焦亚硫酸钾、丙酸、没食子酸丙酯、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠和亚硫酸钠。示例性螯合剂包括乙二胺四乙酸(EDTA)、一水柠檬酸、乙二胺四乙酸二钠、乙二胺四乙酸二钾、乙二胺四乙酸、延胡索酸、苹果酸、磷酸、乙二胺四乙酸钠、酒石酸和乙二胺四乙酸三钠。

[0172] 示例性缓冲剂包括但不限于柠檬酸盐缓冲溶液、乙酸盐缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、氯化铵、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡乳醛酸钙、葡庚糖酸钙、葡萄糖酸钙、D-葡萄糖酸、甘油磷酸钙、乳酸钙、丙酸、乙酰丙酸钙、戊酸、磷酸氢二钙、磷酸、磷酸氢三钙、磷酸氢氧化钙、乙酸钾、氯化钾、葡萄糖酸钾、钾混合物、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸钾混合物、乙酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钠混合物、氨丁三醇、氢氧化镁、氢氧化铝、海藻酸、无热原水、等渗盐水、林格氏液、乙醇及其组合。

[0173] 示例性润滑剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、二氧化硅、滑石、麦芽、山嵛酸甘油酯、氢化植物油、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、亮氨酸、十二烷基硫酸镁、十二烷基硫酸钠及其组合。

[0174] 所有这些药物组合物或保健食品组合物的制备是根据本领域技术人员已知的常规做法。

[0175] 如前所指示的,本发明的另一方面是固体形式或液体形式的食品,其包含第一方面中所限定的药物组合物或膳食补充剂组合物。在更特别的实施方案中,所述食品是饮料。这些食品或膳食补充剂实际上是功能性食品或补充剂,其即使在不存在病理状况的情况下也提供健康益处。因此,它们被认为是可以预防或降低患上例如那些与组织中脂肪沉积有关的疾病的风险的组合物。

[0176] 当在第一方面或第二方面及其实施方案中公开的食品或组合物被施用于患有NAFLD的小鼠时,动物得到有效治疗,降低了肝脏中蓄积的脂肪。同样地,由于脂体重导致的体重也降低了。此外,在分析动脉粥样硬化风险的试验中,观察到当动物接受本发明的组合物时,所述风险降低了。此外,当将本发明的组合物施用于表现出与绝经相关的代谢变化的切除卵巢大鼠时,相应的代谢参数的值变得更接近对照大鼠的值。将本发明的组合物施用于诱导NAFLD的小鼠,降低了被发现在NAFLD患者中增加的细菌组氨酸利用基因的表达,从而抵消了微生物组失调或生态失调。因此,作为第三方面,提出该药物组合物或膳食补充剂组合物或食品用于治疗。

[0177] 在本发明第三方面的特别实施方案中,第一方面的组合物或第二方面的食品用于预防和/或治疗选自脂肪性肝病、肥胖、超重、动脉粥样硬化、生态失调及其组合的疾病。

[0178] 这也可以表述为本发明的组合物或食品在制备用于预防和/或治疗选自脂肪性肝病、肥胖、超重、动脉粥样硬化、生态失调及其组合的病症或疾病的药物中的用途。本发明还涉及用于预防和/或治疗选自脂肪性肝病、肥胖、超重、动脉粥样硬化、生态失调及其组合的病症或疾病的方法,其包括将治疗上或保健食品上有效量的组合物或食品,与药物上或保健食品上可接受的赋形剂和/或载体一起,施用于需要其的包括人的对象。

[0179] 本文使用的术语“肥胖”是指对象中对健康构成风险的异常或过度的脂肪蓄积,所

述对象特别是哺乳动物,更特别是人类。与人类、特别是成年人的肥胖相关的BMI为30或高于30。肥胖通常被细分为3类:

[0180] 1级肥胖:BMI为30至<35

[0181] 2级肥胖:BMI为35至<40

[0182] 3级肥胖:BMI为40或高于40。3级肥胖有时被归类为“重度”肥胖。

[0183] 儿童和青少年的BMI分类通常基于限于特定性别和限于特定年龄的BMI百分位数,而成年人的BMI分类仅基于BMI。儿童和青少年肥胖又细分为两类:

[0184] 2级肥胖:BMI为≥第95百分位数的120%至<第95百分位数的140%,或BMI为≥35kg/m2至<40kg/m2

[0185] 3级肥胖:BMI为≥第95百分位数的140%,或BMI为≥40kg/m2

[0186] 本文使用的术语“身体质量指数”或“BMI”是指对象以千克(或磅)记的体重除以以米(或英尺)记的身高的平方。

[0187] 在本发明第三方面的特别实施方案中,所述组合物或食品用于预防和/或治疗成年人的肥胖。在本发明第三个方面的另一个特别实施方案中,所述组合物或食品用于预防和/或治疗未成年人的肥胖。如本领域专家所熟知的,未成年人是小于18岁的人,成年人是18岁或大于18岁的人。

[0188] 在本发明第三方面的特别实施方案中,所述组合物或食品用于预防和/或治疗1级肥胖、2级肥胖和/或3级肥胖,特别是成年人的肥胖。在特别实施方案中,其用于预防和/或治疗1级肥胖,特别是成年人的1级肥胖。在另一个实施方案中,其用于预防和/或治疗2级肥胖,特别是成年人的2级肥胖。在另一个实施方案中,其用于预防和/或治疗3级肥胖,特别是成年人的3级肥胖。在另一个实施方案中,其用于预防和/或治疗1级肥胖或2级肥胖,特别是成年人的1级肥胖或2级肥胖。在另一个实施方案中,其用于预防和/或治疗2级肥胖或3级肥胖,特别是成年人的2级肥胖或3级肥胖。

[0189] 在本发明第三方面的特别实施方案中,所述组合物或食品用于预防和/或治疗2级肥胖和/或3级肥胖,特别是未成年人的肥胖。在特别实施方案中,其用于预防和/或治疗2级肥胖,特别是未成年人的2级肥胖。在另一个实施方案中,其用于预防和/或治疗3级肥胖,特别是未成年人的3级肥胖。在本发明第三方面的特别实施方案中,所述组合物或食品用于预防和/或治疗2级肥胖和3级肥胖,特别是未成年人的2级肥胖和3级肥胖。在本发明第三方面的特别实施方案中,所述组合物或食品用于预防和/或治疗2级肥胖或3级肥胖,特别是未成年人的2级肥胖或3级肥胖。

[0190] 本文使用的术语“超重”是指对象中对健康构成风险的异常或过度的脂肪蓄积,所述对象特别是哺乳动物,更特别是人类,其在人类、特别是成年人中与上文限定的25至30的BMI相关,而对于儿童和青少年,则与第85百分位数至小于第95百分位数的BMI相关。

[0191] 在本发明第三方面的特别实施方案中,所述组合物或食品用于预防和/或治疗超重,特别是成年人的超重。在本发明第三个方面的另一个特别实施方案中,所述组合物或食品用于预防和/或治疗未成年人的超重。

[0192] 术语“生态失调”是指其中体内微生物组、特别是肠道微生物组的正常多样性或正常功能被破坏的任何病症。

[0193] 在更特别的实施方案中,第一方面的组合物或第二方面的食品用于预防和/或治

疗选自非酒精性脂肪性肝病和酒精性脂肪性肝病的脂肪性肝病。

[0194] 在更特别的实施方案中,其用于预防和/或治疗选自患有单纯性脂肪变性的非酒精性脂肪肝(NAFL)和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的非酒精性脂肪性肝病。

[0195] 在本发明第三方面的另一个特别实施方案中,所述组合物或食品用于预防和/或治疗雌性哺乳动物、特别是女性人类的与绝经相关的症状,特别是与绝经相关的代谢变化。

[0196] 这也可以表述为本发明的组合物或食品在制备用于预防和/或治疗雌性哺乳动物、特别是女性人类的与绝经相关的症状、特别是与绝经相关的代谢变化的药物中的用途。本发明还涉及用于预防和/或治疗与绝经相关的症状、特别是与绝经相关的代谢变化的方法,其包括将治疗上或保健食品上有效量的组合物或食品,和药物上或保健食品上可接受的赋形剂和/或载体一起,施用于需要其的包括女性人类的雌性哺乳动物。

[0197] 在本发明第三方面的另一个特别实施方案中,所述组合物或食品用于在雌性哺乳动物、特别是女性人类中预防和/或治疗与绝经相关的症状、特别是与绝经相关的代谢变化,以及预防和/或治疗选自脂肪性肝病、肥胖、超重、动脉粥样硬化、生态失调及其组合的疾病。

[0198] 这也可以表述为本发明的组合物或食品在制备用于在雌性哺乳动物、特别是女性人类中预防和/或治疗与绝经相关的症状、特别是与绝经相关的代谢变化,以及预防和/或治疗选自脂肪性肝病、肥胖、超重、动脉粥样硬化、生态失调及其组合的疾病的药物中的用途。本发明还涉及用于预防和/或治疗与绝经相关的症状、特别是与更年期相关的代谢变化,以及预防和/或治疗选自脂肪性肝病、肥胖、超重、动脉粥样硬化、生态失调及其组合的疾病的方法,其包括将治疗上或保健食品上有效量的组合物或食品,与药物上或保健食品上可接受的赋形剂和/或载体一起,施用于需要其的包括女性人类的雌性哺乳动物。

[0199] 本文使用的术语“与绝经相关的症状”是指代谢变化、体重变化、心血管变化和肌肉骨骼变化、泌尿生殖系统萎缩和皮肤萎缩;性功能障碍和与中枢神经系统相关的病症,其通常作为绝经的后果而发生在雌性哺乳动物、特别是女性人类中。本文使用的术语“与绝经相关的代谢变化”是指作为绝经的后果而发生在雌性哺乳动物、特别是女性人类中的与代谢相关的参数变化。所述参数的非限制性实例包括体重、肥胖和胰岛素抵抗。更具体而言,所述参数包括体重、脂体重、瘦体重、脂肪蓄积、肥胖指数、胰岛素抵抗。

[0200] 在特别实施方案中,与绝经前、特别是开始绝经过渡期之前相比,在绝经过渡期、绝经期或绝经后期的雌性哺乳动物、特别是人类女性中,与绝经相关的代谢变化选自体重增加、脂肪增加、胰岛素抵抗增加。

[0201] 在另一个特别实施方案中,与绝经前、特别是开始绝经过渡期之前相比,在绝经过渡期、绝经期或绝经后期的雌性哺乳动物、特别是人类女性中,与绝经相关的代谢变化选自体重增加、脂体重增加、瘦体重降低、脂肪蓄积增加、肥胖指数增加、胰岛素抵抗增加。

[0202] 在特别实施方案中,“绝经前”是指开始绝经前的1年、2年、3年、4年,优选1年。在另一个特别实施方案中,“开始绝经过渡期之前”是指开始绝经过渡期之前的1年、2年、3年、4年,优选1年。

[0203] 本文使用的术语“绝经”是指雌性哺乳动物、优选女性人类的状态,其特征在于卵巢不再排卵或产生很少的性激素。在临床上,自然绝经被定义为无任何病理原因或生理原因的最终月经期(FMP)后的1年闭经期。

[0204] 术语“绝经过渡期”或“围绝经期”是指从发生不规律的月经周期开始直到最后一次月经期的一段被定义的时间,其特点是生殖激素的波动。

[0205] 本文所使用的术语“绝经后期”是指绝经发生后的时间段,即从最终月经期(FMP)后12个月开始的时间段。

[0206] 在另一个特别方面,本发明涉及用于降低超重对象体重的非治疗性方法,其包括将本发明第一方面的组合物或本发明第二方面的食品施用于所述对象,其中所述对象特别为哺乳动物,甚至更特别为人类。在特别实施方案中,施用剂量为如本发明第一方面所公开的本发明组合物的剂量。在另一个特别实施方案中,施用途径为如本发明第一方面所公开的本发明组合物的那些途径。在特别实施方案中,人类是成年人。在另一个特别实施方案中,人类是未成年人。

[0207] 在特别实施方案中,减轻超重对象的超重涉及将所述对象的BMI降低至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%,特别是至少5%。在另一个特别实施方案中,减轻超重对象的超重涉及将所述对象的BMI降低至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7,特别是至少1。

[0208] 如将在实施例中所说明的,富含脂肪和糖的饮食在补充组氨酸、丝氨酸、半胱氨酸和肌肽这四种的特定组合时,能够降低在肝脏和其他身体组织中蓄积的脂肪。

[0209] 因此,本文还首次公开了包含以下物质的组合:治疗上或保健食品上有效量的组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;治疗上或保健食品上有效量的半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、治疗上或保健食品上有效量的丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和治疗上或保健食品上有效量的肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,以及一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体。这种组合从未被公开过,现在提出将其作为具有患脂肪性肝病、肥胖和动脉粥样硬化中一种或多于一种的风险的对象的膳食补充剂。任何前述实施方案中所指示的与任何化合物的量(剂量)相关以及与化合物的异构体相关的第一方面和第二方面,也适用于所指示的四种成分的组合。

[0210] 任何前述实施方案中所指示的与任何化合物的量(剂量)相关以及与化合物的异构体相关的第一方面和第二方面,也适用于所指示的四种成分的组合,其中半胱氨酸由NAC取代。

[0211] 在整个说明书和权利要求书中,词语“包含”或“包括”及其变体不旨在排除其他技术特征、添加剂、组分或步骤。此外,词语“包含”涵盖了“由……组成”的情况。本发明的其他对象、优点和特征对于本领域技术人员在审查说明书后将变得明显,或者可以通过对本发明的实践来学习。下文的实施例是通过说明的方式提供的,其不旨在限制本发明。此外,本发明涵盖本文所述的特别实施方案和优选实施方案的所有可能的组合。

实施例

[0212] 1.-人类队列试验。

[0213] 1.1.-依赖于脂肪变性程度的不同队列中的循环组氨酸水平。

[0214] 为了获得NAFLD患者肝脂肪变性的详细信息,通过1H-NMR谱对尿液和血浆进行代

谢分析。全代谢组关联分析(MWAS)发现,尿液中124个代谢物信号和血浆中80个代谢物信号与肝脂肪变性及相关的临床特征相关。在一些与NAFLD等级强相关的肝脂肪变性的代谢物中,发现血浆中组氨酸和尿液中组氨酸的显著降低呈显著负相关。在发现研究中,102名患者和56名患者的血浆组氨酸与肝脂肪变性呈负相关,这也在两项313名患者和283名患者的验证队列研究中得到证实。这283名患者的队列研究还显示,与瘦的无脂肪变性患者相比,肥胖的无脂肪变性患者的组氨酸水平有所下降。当脂肪变性程度增加时,循环组氨酸水平降低,证实了组氨酸水平与肝脂肪变性呈负相关。

[0215] 实施例1.含有组氨酸、丝氨酸、半胱氨酸和肌肽的组合物作为补充剂用于改善肝脂肪变性的临床症状。

[0216] 材料和方法

[0217] 动物模型与饮食

[0218] 在实验开始时,使用48只6周龄的C57BL/6J雄性小鼠(Envigo,Sant Feliu de Codines,巴塞罗那,西班牙)。将动物在控制温度(22℃±2℃)和控制湿度(55%±10%)的条件下,在12小时的明暗周期下,分组饲养(每笼4只小鼠),并自由获取食物和水。让小鼠不受干扰地适应动物设施一周。在适应期结束后,将动物随机分为两个不同饮食的实验组。16只对照小鼠保持标准饮食(D12328,Research Diets,新布朗斯维克,NJ),32只动物(NAFLD组)用HFHFr饮食喂养(HFHC:D12331,Research Diets),并在饮用水中补充23.1g/L果糖和18.9g/L蔗糖。小鼠在自由条件下保持这些饮食20周。这些特定剂量是基于先前研究和从人类剂量到动物剂量的剂量转换计算确定的。所有实验方案由Eurecat的营养与健康的技术部门的动物伦理委员会(Animal Ethics Committee of the Technological Unit of Nutrition and Health of Eurecat)(雷乌斯,西班牙)批准,加泰罗尼亚自治政府批准了所有流程(10281)。实验方案遵循“实验动物护理原则(Principles of Laboratory Care)”指导,并按照欧洲共同体理事会指令(European Communities Council Directive)(86/609/EEC)进行。

[0219] 在实验的最后4周(第16周至第20周)里,将NAFLD小鼠随机分为两组:16只小鼠保持与前述相同的喂养条件(HFHFr组),16只小鼠被暴露于组氨酸相关的氨基酸治疗(AA组)。AA是以下化合物的混合物:210mg/kg的L-组氨酸一盐酸化物一水合物(Merck,德国GmbH)、490mg/kg的L-半胱氨酸盐酸化物(Merck,德国GmbH)、210mg/kg的L-丝氨酸(Merck,德国GmbH)和210mg/kg的L-肌肽98%(Acros Organics,赫尔(Geel),比利时)。将组氨酸、半胱氨酸、丝氨酸和肌肽用含有23.1g/L果糖和18.9g/L蔗糖的饮用水(载剂)稀释。新鲜溶液每周新鲜配制三次,用储存粉末配制,并且避光。在安乐死之前,每组随机选择10只动物进行胰岛素刺激。用1mU/g胰岛素(n=5/组)或生理盐水(n=5/组)对它们进行腹腔注射,15min后将它们处死。

[0220] 离心获得血清,在-80℃下保存以进行进一步分析。通过酶比色测定法(QCA,巴塞罗那,西班牙)定量血清的丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)。空腹的血胰岛素和血糖分别用小鼠胰岛素ELISA试剂盒(Mercodia,乌普萨拉,瑞典)和葡萄糖液体试剂盒(QCA,巴塞罗那,西班牙)检测。迅速收集肝脏,称重并分成两部分——在福尔马林中保存肝左内叶,剩余组织在液氮中冷冻并在-80℃下保存直到进一步分析。

[0221] 肝脏脂肪定量

[0222] 提取肝脏脂质并定量。简单地说,通过加入1mL己烷/异丙醇(3:2,体积/体积)并用氮气脱气,从80mg至100mg肝脏切片中提取总脂质。然后,将它们在室温下避光进行轨道振荡过夜。用0.3mL的Na_2SO_4(0.47M)萃取后,分离有机层,将其用氮气干燥。乳化前用重量分析定量总脂质。使用商品化酶试剂盒(QCA)检测甘油三酯和总胆固醇。

[0223] 组织学评估

[0224] 将固定在缓冲福尔马林(4%甲醛、4g/L的NaH_2PO_4、6.5g/L的Na_2HPO_4;pH为6.8)中的部分肝脏以3.5μm的厚度切割,并用苏木精-伊红染色(H&E)和三色染色进行染色。使用连接到数字瞄准照相机(DS-Ri1,Nikon)的显微镜(ECLIPSE Ti;Nikon,东京,日本)拍摄肝脏图像(放大40倍),并使用ImageJ NDPI软件(美国国立卫生研究院,贝塞斯达,MD,USA;https://imagej.nih.gov/ij,version 1.52a)进行分析。为了避免分析中的任何偏倚,该研究具有双盲设计,防止审查人员在组织病理学分析期间了解来自小鼠的任何数据。建立通用NAFLD评分系统诊断患NAFLD/NASH的小鼠。NAFLD和NASH的主要特征如下进行分类:脂肪变性的评估是通过分别分析大泡性脂肪变性(0至3)和小泡性脂肪变性(0至3),接着是肝细胞肥大(0至3),其评估细胞异常增大,最终给出总分9分的脂肪变性状态。通过计数细胞聚集(炎症病灶)对炎症进行评分。分数0至3取决于特征的等级。其分为0(<5%)、1(5%至33%)、2(34%至66%)和3(>66%),这个评分用于脂肪变性的每个特征,然后加到总的脂肪变性评分中[23]。评分系统中不包括气球样变,因为啮齿动物NAFLD评分只考虑定量指标。重要的是强调,肥大不是细胞损伤的标志,而是稍微指细胞的异常增大,而不分辨这种增大的原因。

[0225] RNA提取与定量聚合酶链反应

[0226] 根据制造商的说明,使用TriPure试剂(Roche Diagnostic,圣库加特-德尔巴列斯,巴塞罗那,西班牙)将每组8个肝脏的匀浆用于总RNA提取。使用纳米光度计(Implen GmbH,慕尼黑,德国)测量RNA浓度和纯度。使用高容量 RNA-to-cDNA 试剂盒(Applied Biosystems,威尔明顿,DE,USA)将RNA转为cDNA。在使用商品化的LightCycler 480 Sybr green I master在Lightcycler ® 480 II(Roche Diagnostics GmbH,曼海姆,德国)上孵育前,将cDNA以1:10稀释。表1示出了使用的引物列表,所述引物先前在其他研究中被描述过并且使用Primer-Blast软件(美国国家生物技术信息中心,贝塞斯达,MD,USA)进行了验证。如前所述,36b4被用作管家基因。

[0227] 表1.RT-PCR中使用的寡核苷酸的序列。

[0228]

引物	正向	反向
Ppara	5'-CCCTGTTTGTGGCTGCTATAATTT-3' (SEQ ID NO: 1)	5'-GGGAAGAGGAAGGTGTCATCTG-3 (SEQ ID NO: 2)'
Fasn	5'-GCTGCGGAAACTTCAGGAAAT-3' (SEQ ID NO: 3)	5'-AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT-3' (SEQ ID NO: 4)
Cd11c	5'-ACGTCAGTACAAGGAGATGTTGGA-3' (SEQ ID NO: 5)	5'-ATCCTATTGCAGAATGCTTCTTTACC-3' (SEQ ID NO: 6)
Tnfa	5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3' (SEQ ID NO: 7)	5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3' (SEQ ID NO: 8)
Il6	5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3' (SEQ ID NO: 9)	5'-TCCACGATTTCCCAGAGAAC-3' (SEQ ID NO: 10)
Il1a	5'-CCAGAAGAAAATGAGGTCGG-3' (SEQ ID NO: 11)	5'-AGCGCTCAAGGAGAAGACC-3' (SEQ ID NO: 12)
F4/80	5'-CATAAGCTGGGCAAGTGGTA-3' (SEQ ID NO: 13)	5'-GGATGTACAGATGGGGGATG-3' (SEQ ID NO: 14)
Scd1	5'-AGATCTCCAGTTCTTACACGACCAC-3' (SEQ ID NO: 15)	5'-GACGGATGTCTTCTTCCAGGTG-3' (SEQ ID NO: 16)
Acc1	5'-GATGAACCATCTCCGTTGGC-3' (SEQ ID NO: 17)	5'-CCCAATTATGAATCGGGAGTGC-3' (SEQ ID NO: 18)
Cd36	5'-GAACCACTGCTTTCAAAAACTGG-3' (SEQ ID NO: 19)	5'-TGCTGTTCTTTGCCACGTCA-3' (SEQ ID NO: 20)
Fabp4	5'-TGAAAGAAGTGGGAGTGGGC-3' (SEQ ID NO: 21)	5'-CGAATTCCACGCCCAGTTTG-3' (SEQ ID NO: 22)
Cpt1a	5'-CTCAGTGGGAGCGACTCTTCA-3' (SEQ ID NO: 23)	5'-GGCCTCTGTGGTACACGACAA-3' (SEQ ID NO: 24)
Cbs	5'-GCAGCGCTGTGTGGTCATC-3' (SEQ ID NO: 25)	5'-CATCCATTTGTCACTCAGGAACTT-3' (SEQ ID NO: 26)
Cth	5'-GGCTTCCTGCCTAGTTTCCA-3' (SEQ ID NO: 27)	5'- AGTCAAAGGCATCCACCAAAG -3' (SEQ ID NO: 28)
Acox	5'- CTATGGGATCAGCCAGAAAG -3' (SEQ ID NO: 29)	5'-ATGAGGTTGGCTTTCAGGAG-3' (SEQ ID NO: 30)
Irf4	5'-CCCCAAAGCCCTCAGTCGTTGT-3' (SEQ ID NO: 31)	5'-CAGCCACTCAGGCACCGCAC-3' (SEQ ID NO: 32)
Il-10	5'-AAGGCAGTGGAGCAGGTGAA-3' (SEQ ID NO: 33)	5'-CCAGCAGACTCAATACACAC-3' (SEQ ID NO: 34)
Atg5	5'-CGTGTATGAAAGAAGCTGATGC-3' (SEQ ID NO: 35)	5'- ACGAAATCCATTTTCTTCTGGA -3' (SEQ ID NO: 36)
Atg7	5'-ATGCCAGGACACCCTGTGAACTTC-3'	5'- ACATCATTGCAGAAGTAGCAGCCA-3'

	(SEQ ID NO: 37)	(SEQ ID NO: 38)
Mtus1	5'- ACAGAAGATGGATCGCGTTATG -3' (SEQ ID NO: 39)	5'- CCCCGTGACTCACTGAAGG -3' (SEQ ID NO: 40)
LepR	5'-TCCAGGAGAGATGCTCACACTTT-3' (SEQ ID NO: 41)	5'-TGCGTGGAACAGGTTTGAAA-3' (SEQ ID NO: 42)
Sec24b	5'-GACCCGAGAAGGCGCTTT-3' (SEQ ID NO: 43)	5'-TTTGCCAACCCAAATGTAGAAA-3' (SEQ ID NO: 44)
Cebpb	5'-ATCGACTTCAGCCCGTACCT-3' (SEQ ID NO: 45)	5'-CCGTAGTCGTCGGAGAAGAG-3' (SEQ ID NO: 46)
36bB4	5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3' (SEQ ID NO: 47)	5'-CGATCCGAGGGCCTCACTA-3' (SEQ ID NO: 48)

[0229] 蛋白质提取和蛋白质印迹分析

[0230] 使用Tyssuelyser LT(Qiagen,希尔登,德国)将约20mg肝脏在300μL裂解缓冲液(8毫摩尔/升NaH_2PO_4、42毫摩尔/升Na_2HPO_4、1% SDS、0.1摩尔/升NaCl、0.1% NP40、1毫摩尔/升NaF、10毫摩尔/升正钒酸盐、2毫摩尔/升PMSF和1%蛋白酶抑制剂的混合物(MMillipore Sigma,达姆施塔特,德国))中进行匀浆化50秒。蛋白质提取物通过标准化BCA法(Bio-Rad蛋白测定;BioRad,赫拉克勒斯,CA,USA)定量。蛋白质提取物(20μg至25μg)在10%的SDS-PAGE上电泳分离,并电转染至硝化纤维素膜(Li-cor biosciences,NE,USA)。通过丽春红S染色监测有效的蛋白质转移。接下来,在室温下封闭(5% BSA)膜,并在4℃下在1% BSA中用特异性一抗(以1:1000稀释)孵育探针过夜:总Akt(4685)(CST,丹弗斯,MA,USA)、磷酸化Akt(Ser473)(4060)(CST)和β-肌动蛋白(Santa Cruz Biotechnology,Inc;达拉斯,TX,USA)。此后,使用红外荧光二抗抗兔680、抗兔800和抗鼠680(LI-COR Biosciences,林肯,NE,USA;分别为926-32211、926-68071和926-68070)进行检测,并使用ImageJ定量。

[0231] 统计分析

[0232] 使用GraphPad Prism 9软件(Graph-Pad Soft-ware,拉荷亚,CA,USA)进行统计分析。数据表示为平均值±SEM。数据分布采用Shapiro-Wilk正态性检验进行分析。使用非配对t检验(双尾,95%置信区间)确定两组之间的差异。采用单因素方差分析(ANOVA)来检验三组之间的差异。认为低于0.05的p值具有统计学意义。使用GraphPad Prism 9软件(Graph-Pad Soft-ware,拉荷亚,CA,USA)进行统计分析。数据表示为平均值±SEM。数据分布采用Shapiro-Wilk正态性检验进行分析。使用非配对t检验(双尾,95%置信区间)确定两组之间的差异。采用单因素方差分析(ANOVA)来检验三组之间的差异。认为低于0.05的p值具有统计学意义。

[0233] 结果

[0234] 特定的氨基酸组合减轻了NAFLD的肝损伤和肝脏特征

[0235] 在由组氨酸、丝氨酸、半胱氨酸和肌肽组成的特定的氨基酸(AA)治疗4周后,处死动物,分析肝脏重量。与HFHFr动物相比,AA补充组的肝脏重量表现出降低的趋势,HFHFr动物与对照组相比肝脏重量显著增加(图1(A))。AA组和HFHFr组之间发现的肝脏重量的差异与固体或液体的摄取量的差异无关(数据未显示)。此外,进行了宏观观察,表明与对照组相比,HFHFr动物出现肝脏发白和脂肪肝,而与HFHFr组相比,AA治疗部分恢复了健康的肝脏外观(图1(B))。与HFHFr动物相比,AA组表现出显著降低的AST水平。然而,与HFHFr组的ALT相比,AA组的ALT没有表现出任何显著变化,而与对照组相比,HFHFr组的这两种氨基转移酶都

表现出显著的增加(图1(C)和图1(D))。

[0236] AA补充降低了肝脏脂质含量和肝脂肪变性

[0237] 本研究在对肝脏状态进行评估后,分析了肝脏脂质含量及肝脂肪变性的特征。与对照组相比,在HFHFr组中观察到肝脏的总脂质含量、总胆固醇和甘油三酯的水平显著增加。有趣的是,与HFHFr组相比,AA补充的动物表现出肝脏甘油三酯水平显著降低(图2(B)),但这种效果并未反映在肝脏总胆固醇水平上(图2(C))。然而,与HFHFr组相比,AA组的总肝脏脂质水平表现出轻微下降(图2(A))。

[0238] 与肝脏状态评估和生化分析相一致,肝脏组织学分析表明,HFHFr组出现明显的肝脂肪变性,表现为大泡性脂肪变性和小泡性脂肪变性的存在,并伴有肥大增加,其引发了核位移。值得注意的是,AA补充的治疗改善了肝脂肪变性,事实上,小泡性脂肪变性尤其降低,大泡性脂肪变性占据的表面积也减少,肥大减轻,减轻了核位移(图3(A))。因此,观察到脂滴量和脂质表面积显著降低(图3(B)和图3(C))。通过建立通用NAFLD评分系统对NAFLD/NASH小鼠进行诊断,该评分系统证实了与HFHFr组相比,在AA补充治疗的动物中分析的不同参数有显著的改善(图3(D))。

[0239] 为了评估这种特定的氨基酸的组合是否调节促炎症标志物的水平,分析了一些代表性炎症基因的表达水平。与本研究的前期结果相关,与HFHFr组相比,AA补充的动物中的巨噬细胞浸润标志物F4/80显著下调,而HFHFr组与对照组相比表现出该基因水平的显著上调。也对TNFα mRNA水平观察到了类似的结果,与对照组相比,TNFα mRNA水平在HFHFr动物中显著增加,尽管与其对应物相比,AA补充组的TNFα表达显著下调(数据未显示)。

[0240] AA补充的有益效果不涉及脂肪生成途径或脂质转运途径

[0241] 为了认识AA补充后哪些代谢途径可能参与NAFLD的改善,进行了对与脂质代谢相关的基因表达的分析,如肝脏脂肪生成、脂质转运等。HFHFr组表现出与脂质转运相关基因Cd36和Fabp4的显著增加。在AA组中,与脂质转运相关的这两个基因未见任何影响,与对照组相比,这些基因保持高表达水平。当与对照组和HFHFr组相比时,观察到与从头肝脏脂肪生成相关的基因Scd1的mRNA水平的显著变化。其他从头肝脏脂肪生成基因Acc1和Fasn在对照组和HFHFr组之间没有表现出显著差异。AA治疗后,与HFHFr组相比,从头肝脏脂肪生成基因水平没有差异,除了Acc1,其中AA组与HFHFr组相比表现出显著的增加。

[0242] AA补充减轻了与NAFLD相关的肝脏炎症

[0243] 为了评估AA补充是否调节促炎性标志物的水平,评估了一些代表性炎症基因的表达水平。正如预期的那样,与对照小鼠相比,HFHFr组中的巨噬细胞浸润标志物F4/80的mRNA水平显著上调。相反,AA治疗显著纠正了这种F4/80表达的上调。对Tnfα的表达观察到了类似的显著结果,其中在HFHFr组中增加的水平在AA组中得到纠正,并且发现了有趣的Il1a基因表达的统计学趋势,其与对照组相比,在HFHFr组中显著增加,但是AA没有显著地降低Il1a的水平。Il6水平和IL10水平上均未表现出显著性结果。然而,与对照组相比,HFHFr组和AA组中Cd11c的表达表现出显著增加,尽管HFHFr小鼠和AA小鼠之间没有差异。

[0244] AA补充促进了NAFLD的抗氧化防御和抗肿瘤活性

[0245] 对与自噬、免疫应答、抗氧化防御、抗肿瘤活性和囊泡运输相关的基因进行了分析。在自噬方面,对照小鼠、HFHFr小鼠和AA小鼠之间的这两个基因均未发现差异。然而,当谈到与抗氧化活性相关的基因,如CBS或CTH时,发现了显著性结果。在对照和HFHFr之间没

有发现差异,但在AA小鼠中,与HFHFr组相比,这两个基因的表达均显著增加。关于与抗肿瘤活性相关的基因,与HFHFr组相比,AA小鼠中Mtus1的表达表现出显著的增加。关于与免疫应答相关的基因,IRF4表达未见差异。然而,与HFHFr组相比,观察到了AA组中的Cebpb表达显著增加。最后,与HFHFr小鼠相比,AA小鼠中的与囊泡运输相关的基因Sec24b表现出显著的增加。

[0246] AA补充减轻了与NAFLD相关的肝脏胰岛素抵抗

[0247] 考虑到受损的肝脏胰岛素信号在NAFLD发展中起着重要作用,为了评估胰岛素抵抗,用腹腔胰岛素推注刺激动物,确定Akt激活(丝氨酸473的磷酸化),或用生理盐水。正如预期的那样,与注射胰岛素的小鼠相比,对照组表现出在胰岛素刺激的小鼠中的显著的Akt磷酸化(pAktS473)。在HFHFr组中没有观察到这一事实,表明这些动物中存在肝脏胰岛素抵抗。相反,与注射载剂的AA小鼠相比,AA补充组表现出在胰岛素刺激小鼠中的胰岛素信号的显著促进、Akt磷酸化显著增加。数据如图4所示,其中(A)示出了代表性的Akt激活(pAktS473)、总Akt蛋白质水平(T-Akt)、管家β-肌动蛋白水平和使用丽春红S膜染色的蛋白质上样量的蛋白质印迹分析。(B)示出了磷酸化Akt和总Akt之比的密度测量分析。

[0248] 此外,四联治疗后脂肪酸β-氧化(肉碱棕榈酰基转移酶,Cpt1a)、炎症(趋化因子(C-C模体)配体2,CCL2)、脂肪分解(激素敏感性脂肪酶,HSL;和脂滴包被蛋白,PLIN)和脂肪生成(脂肪酸合成酶,FASN)的关键基因的肝脏表达的分析,表现出Cpt1a增加的趋势、重要的肝脏炎症(Cc12)的减轻和脂肪分解的增加(更高的脂肪酶Hsl的表达和更低的周围脂滴蛋白Plin的水平)(图4(C))。相反,未观察到脂肪生成(Fasn)的任何变化。数据在图4中表示为平均值±SEM;每种条件n=10至12。*p<0.05。

[0249] AA补充提高了NAFLD的肝脏中的氨基酸水平

[0250] 为了分析基于氨基酸的治疗对肝脏的影响,对血清进行了LC/MS评估,目的是定量治疗中的参与者的氨基酸。在单独地组氨酸和丝氨酸的情况下,各组之间没有发现差异。当把氨基酸的水平合并到一起时,观察到这些氨基酸的浓度有增加的趋势,但并不显著。这可能是由于氨基酸的组织生物蓄积造成的。因此,通过LC/MS对不同组的肝脏匀浆进行了这些氨基酸的分析,以证明这一假设。所得结果表明,与对照组相比,HFHFr组中的组氨酸和丝氨酸水平显著降低。此外,与HFHFr组相比,在AA组中观察到组氨酸和丝氨酸水平有明显增加的趋势。丙氨酸是肌肽的一部分的氨基酸,并且可以通过肌肽合成酶产生,其与对照组相比,在HFHFr组中表现出显著的降低。此外,与HFHFr小鼠相比,在AA小鼠中显著增加。甘氨酸是与丝氨酸和GSH代谢相关的氨基酸,并且其水平的增加可能是由于丝氨酸的施用。与对照组相比,发现HFHFr组中的甘氨酸水平降低。此外,与HFHFr小鼠的甘氨酸水平相比,AA小鼠中的甘氨酸水平恢复了。

[0251] 实施例2.AA补充降低动脉粥样硬化的风险

[0252] 动脉粥样硬化是复杂的病症,其表现出慢性炎症过程的许多特征。动脉粥样硬化性心血管疾病仍然是世界范围内发病率和死亡率的主要原因,并且肥胖增加了动脉粥样硬化和死亡的风险。阐明患有动脉粥样硬化和不患有脉粥样硬化的肥胖个体之间差异背后的机制,可以揭示治疗肥胖的有害心血管后果的治疗靶点,将其作为减肥计划的替代手段或辅助手段,所述减肥计划的长期成功已知是有限的。我们这个时代最引人注目的临床挑战之一是肥胖的日益普遍及其对心血管系统的有害影响。肥胖影响炎症和参与动脉粥样硬化

性疾病发展的病理生理学过程。肥胖和超重伴随着不利的血脂曲线模式。血脂异常是冠状动脉疾病的主要风险因素。在肥胖患者中,高甘油三酯血症的估计患病率是非肥胖个体的两倍。此外,高甘油三酯血症和高LDL和低HDL的致动脉粥样硬化组合在肥胖患者和超重患者中更为普遍。

[0253] 血清分析和血液分析

[0254] 使用酶比色测定法分析血清空腹血糖、血清总胆固醇、血清甘油三酯(QCA,巴塞罗那,西班牙)。使用小鼠胰岛素ELISA试剂盒(Mercodia,乌普萨拉,瑞典)分析血清的空腹血胰岛素,使用EnzyChrom™ AF HDL和LDL/VLDL测定试剂盒(BioAssay System,海沃德,CA,USA)分析血清中的HDL水平和LDL水平。

[0255] 16只对照小鼠保持标准饮食(D12328,Research Diets,新布朗斯维克,NJ,USA),32只动物(致动脉粥样硬化组)用HFHFr饮食喂养(HFHC:D12331,Research Diets),并在饮用水中补充23.1g/L果糖和18.9g/L蔗糖。小鼠在自由条件下保持这些饮食20周。在实验的最后4周(第16周至第20周),将致动脉粥样硬化小鼠随机分为两组:16只小鼠保持与前述相同的喂养条件,其他16只小鼠使用上述实施例1中解释的组氨酸氨基酸组合进行治疗。

[0256] 在n=48只小鼠的试验中,还确定了高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)以及LDL/HDL比的循环水平。数据如图5所示,其中可以看到,与接受HFHFr饮食的小鼠相比,接受补充剂(组氨酸AA)组表现出更高的HDL水平(图5(A)),同时与用HFHFr饮食喂养的小鼠相比,其血清中的LDL显著降低(图5(B)),同时LDL/HDL比处于对照的平均值内(图5(C))。数据证实,该补充剂能够降低所谓的“坏胆固醇”(LDL)水平,增加所谓的“好胆固醇”(HDL),降低动脉粥样硬化的风险。

[0257] 实施例3.AA补充降低内脏脂肪和肥胖参数

[0258] 脂肪组织具有独特的异质性。皮下脂肪组织(scWAT)占全身脂肪储存的绝大部分,内脏脂肪组织(vWAT)占全身脂肪储存的较小部分,然而vWAT的过量比scWAT的过量具有更严重的风险,其中scWAT被报道发挥保护作用。在这方面,肥胖被定义为身体脂肪的过度蓄积或异常分布,其也可因相关疾病而复杂化,所述相关疾病如2型糖尿病、肝脂肪变性、心血管疾病、卒中、血脂异常、高血压以及某些类型的癌症等。尽管肥胖通常是由相对于能量消耗的过度能量供应引起的,但其病因是复杂的,包括遗传因素、生理因素、环境因素、社会因素、心理因素和经济因素,这些因素相互作用促进了肥胖的发展。这种过度的能量供应促进了脂肪组织库的扩张,这是由脂肪细胞大小的生长(肥大)和脂肪细胞数量的增加(增生)介导的。

[0259] 在与实施例1中小鼠数量相同的试验中,还确定了体重、体重增加以及其他参数,以阐明补充剂(AA)降低肥胖风险和内脏脂肪的能力。

[0260] 材料和方法

[0261] EWAT和BAT的组织学分析

[0262] 将EWAT部分和BAT部分固定在缓冲福尔马林(4%甲醛、4g/L的NaH_2PO_4、6.5g/L 的Na_2HPO_4;pH为6.8)中以5μm的厚度切割,并用苏木精-伊红(H&E)进行染色。使用连接到数字瞄准照相机(DS-Ri1,Nikon)的显微镜(ECLIPSE Ti;Nikon,东京,日本)拍摄BAT IWAT和EWAT图像的(放大4倍),并使用ImageJ NDPI软件进行分析(美国国立卫生研究院,贝塞斯达,MD,USA;https://imagej.nih.gov/ij,版本1.52a)。为了避免分析中的任何偏倚,该研

究具有双盲设计,防止审查人员在组织病理学分析期间了解来自小鼠的任何数据。通过Adiposoft插件分析脂肪细胞面积定量,以评估组间EWAT状态。通过Droplet Finder插件分析BAT中的脂滴定量。

[0263] RNA提取与定量聚合酶链反应

[0264] 根据制造商的说明,使用TriPure试剂(Roche Diagnostic,圣库加特-德尔巴列斯,巴塞罗那,西班牙)将来自EWAT、IWAT和BAT的匀浆用于总RNA提取。使用纳米光度计(Implen GmbH,慕尼黑,德国)测定RNA浓度和纯度。使用高容量RNA-to-cDNA 试剂盒(Applied Biosystems,威尔明顿,DE,USA)将RNA转化为cDNA。在使用商品化的LightCycler 480 Sybr green I master在Lightcycler® 480 II(Roche Diagnostics GmbH,曼海姆,德国)上孵育前,将cDNA以1:10稀释。表2示出了使用的引物列表,所述引物先前在其他研究中被描述过并且使用Primer-Blast软件(美国国家生物技术信息中心,贝塞斯达,MD,USA)进行了验证。36b4被用作管家基因。

[0265] BAT温度测量

[0266] 使用高分辨率红外相机(FLIR系统)可视化BAT周围的温度,并使用特定的软件包(FLIR-Tools-Software,FLIR;肯特,UK)进行分析,如前所述79。对于每张图像,划分BAT周围的区域,并将皮肤区域的平均温度计算为3张图片/只动物的平均值。

[0267] 表2.RT-PCR中使用的寡核苷酸的序列。

[0268]

引物	正向	反向
AdipoQ	AAGGGAGAGAAAGGAGATGC (SEQ ID NO: 49)	TACACATAAGCGGCTTCTCC (SEQ ID NO: 50)
Ccl2	ATTGGGATCATCTTGCTGGT (SEQ ID NO: 51)	CCTGCTGTTCACAGTTGCC (SEQ ID NO: 52)
Cpt1a	CTCAGTGGGAGCGACTCTTCA (SEQ ID NO: 23)	GGCCTCTGTGGTACACGACAA (SEQ ID NO: 24)
Cpt1b	CGAGGATTCTCTGGAACTGC (SEQ ID NO: 53)	GGCCTCTGTGGTACACGACAA (SEQ ID NO: 54)
Dio2	AGAGTGGAGGCGCATGCT (SEQ ID NO: 55)	GGCATCTAGGAGGAAGCTGTTC (SEQ ID NO: 56)
Dio3	CTACGTCATCCAGAGTGGCA (SEQ ID NO: 57)	CTGTTCATCATAGCGCTCCA (SEQ ID NO: 58)
Fasn	GCTGCGGAAACTTCAGGAAAT (SEQ ID NO: 3)	AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT (SEQ ID NO: 4)
Fgf21	CCTCTAGGTTTCTTTGCCAACAG (SEQ ID NO: 59)	AAGCTGCAGGCCTCAGGAT (SEQ ID NO: 60)
Glut4	AAAAGTGCCTGAAACCAGAG (SEQ ID NO: 61)	TCACCTCCTGCTCTAAAAGG (SEQ ID NO: 62)
Hsl	TCCTGGAACTAAGTGGACGCAAG (SEQ ID NO: 63)	CAGACACACTCCTGCGCATAGAC (SEQ ID NO: 64)
Lep	CTCCATCTGCTGGCCTTCTC (SEQ ID NO: 65)	CATCCAGGCTCTCTGGCTTCT (SEQ ID NO: 66)
LepR	TCCAGGAGAGATGCTCACACTTT (SEQ ID NO: 41)	TGCGTGGAACAGGTTTGAAA (SEQ ID NO: 42)
Pgc1a	AGCCGTGACCACTGACAACGAG (SEQ ID NO: 67)	GCTGCATGGTTCTGAGTGCTAAG (SEQ ID NO: 68)
Pparγ	CACAATGCCATCAGGTTTGG (SEQ ID NO: 69)	GCTGGTCGATATCACTGGAGATC (SEQ ID NO: 70)
Prdm16	CAGCACGGTGAAGCCATTC (SEQ ID NO: 71)	GCGTGCATCCGCTTGTG (SEQ ID NO: 72)
Tfam	CACCCAGATGCAAAACTTTCAG (SEQ ID NO: 73)	CTGCTCTTTATACTTGCTCACAG (SEQ ID NO: 74)
Tmem26	ACCCTGTCATCCCACAGAG (SEQ ID NO: 75)	TGTTTGGTGGAGTCCTAAGGTC (SEQ ID NO: 76)
Ucp1	ACTGCCACACCTCCAGTCATT (SEQ ID NO: 77)	CTTTGCCTCACTCAGGATTGG (SEQ ID NO: 78)
36b4	AGTCCCTGCCCTTTGTACACA (SEQ ID NO: 47)	CGATCCGAGGGCCTCACTA (SEQ ID NO: 48)

[0269] 结果

[0270] 从图6所示数据可以看出,喂养补充本发明的四联组合(组氨酸、半胱氨酸、丝氨酸和肌肽)的HFHFr饮食的小鼠在4周的治疗后没有改变其初始体重和最终体重,这与仅喂养HFHFr饮食的小鼠相反,其最终体重显著高于初始体重(图6(A))。此外,使用本发明的四联组合进行治疗的肥胖动物在治疗的第二周体重增加停止(图6(C))。此外,当确定附睾白色脂肪组织(EWAT)、腹膜后脂肪组织(RWAT)和脂肪组织平均重量时,与未补充的小鼠相比,补充四联组合的用HFHFr饮食喂养的那些小鼠脂肪量减少(图6(B))。在微观水平上通过脂肪细胞大小的减小、增加的较小脂肪细胞数量和降低的较大脂肪细胞数量,证实了通过四联组合治疗减少了肥大内脏脂肪组织(图6(D))。此外,四联组合治疗还调节了棕色脂肪组织

(BAT),降低该脂肪库中的肥大,以及减小棕色脂肪细胞的大小(图6(E))。对BAT的这些影响伴随着关键产热基因(Ucp1、Fgf21、Pgc1a、Prdm16、Dio2和Dio3)的mRNA表达的增加、胰岛素敏感性脂肪因子(Adipoq)以及其他与脂肪酸氧化相关的基因(Cpt1b)和葡萄糖摄取相关的基因(Glut1和Glut4)的增加(图6(G))。在蛋白质水平证实了四联组合治疗后增加的Ucp1的mRNA水平,表明了更高的燃烧脂肪酸的能力(图6(H))。实际上,这种能力是通过热成像术来评估的,其观察到了在四联组合治疗的动物的BAT区域的更高的温度(图6(I))

[0271] 实施例4.体外实验

[0272] 使用肝细胞细胞系(HepG2)进行体外实验,以测试不同的补充氨基酸组合对脂肪酸β-氧化(肉碱棕榈酰基转移酶,Cpt1a)、炎症(趋化因子(C-C模体)配体2,CCL2)、脂肪分解(激素敏感性脂肪酶,HSL;和脂滴包被蛋白,LPIN)和脂肪生成(脂肪酸合成酶,FASN)的关键基因的肝脏表达的影响。如前所指示的(见实施例1中的材料和方法),通过qPCR确定基因表达。表3示出了使用的引物列表。Cpt1a酶位于外膜,其是肉碱依赖性的跨线粒体内膜转运中的关键酶。其缺乏导致下降的脂肪酸β-氧化的速率。

[0273] 表3.RT-PCR中使用的寡核苷酸的序列。

[0274]

引物	正向	反向
CPT1a	GACGGCTATGGTGTGTCGTA (SEQ ID NO: 79)	TCCAGCCCAGCACATGAAC (SEQ ID NO: 80)
CCL2	AGCAGCAAGTGTCCCAAAGA (SEQ ID NO: 81)	GGTGGTCCATGGAATCCTGA (SEQ ID NO: 82)
HSL	CAAGTGTGTCAGCGCCTATGCT (SEQ ID NO: 83)	CAAGTGTGTCAGCGCCTATGCT (SEQ ID NO: 84)
PLIN	TGCCAGAAACAGCATCAG (SEQ ID NO: 85)	CAAATTCCGCAGTGTCTCT (SEQ ID NO: 86)
FASN	TGCGTGGCCTTTGAAATGTG (SEQ ID NO: 87)	CTCCATGTCCGTGAACTGCT (SEQ ID NO: 88)
RPLP0	ATGGCAGCATCTACAACCCT (SEQ ID NO: 89)	AGGACTCGTTTGTACCCGTT (SEQ ID NO: 90)

[0275] 数据如图7所示,其中指出了对于任意补充介质的表达水平(mRNA)。所测试的补充剂为组氨酸(His)、肌肽(Car)、半胱氨酸(Cys)、丝氨酸(Ser)、组氨酸+肌肽(His+Car)、组氨酸+丝氨酸(His+Ser)、组氨酸+半胱氨酸(His+Cys)、肌肽+半胱氨酸(Car+Cys)、丝氨酸+肌肽(Ser+Car)、丝氨酸+半胱氨酸(Ser+Cys)、组氨酸+肌肽+丝氨酸(His+Car+Ser)、组氨酸+半胱氨酸+丝氨酸(His+Cys+Ser)、组氨酸+肌肽+半胱氨酸(His+Car+Cys)、丝氨酸+肌肽+半胱氨酸(Ser+Car+Cys)、和四联组氨酸+半胱氨酸+丝氨酸+肌肽(4AA)。测试浓度如下:组氨酸10毫摩尔/升、肌肽5毫摩尔/升、半胱氨酸5毫摩尔/升和丝氨酸5毫摩尔/升。这些浓度在不同的组合中是恒定的。数据在图7中表示为平均值±SEM;每种条件n=3至4。

[0276] 如图7所示,表现最佳的是用4AA进行补充。与对照组相比,三联组合也是有效的(组合中都含有组氨酸),其与由单一氨基酸引起的所提及的酶的表达相比表现出效果的增加。同样值得注意的是,包含组氨酸、丝氨酸和半胱氨酸的三联组合也表现出明显的增加。总体来说,这些数据能够证实,组氨酸、半胱氨酸、丝氨酸、肌肽中的至少三种的组合,特别是包含组氨酸的三联组合和四联组合,出人意料地增加了所分析的酶的水平,这作为它们在那些涉及脂肪蓄积的疾病或病症中的积极作用的证据。同样值得注意的是,即使在肌肽

的存在下,四联组合也表现出更好的协同作用,而当肌肽与一些其他氨基酸一起添加时,该化合物表现出降低效果的趋势。

[0277] 实施例5:AA补充改善与绝经相关的代谢变化

[0278] 材料和方法

[0279] 按照Koebele, S. V.和Bimonte-Nelson, H. A,2016中描述的步骤,对40只24周龄大鼠进行卵巢切除。对另外10只同龄大鼠进行了假手术。手术后2周至3周,将大鼠随机分为4个实验组,进行为期8周的以下实验:

[0280] -SHAM,模拟手术

[0281] -OVX:每天接受安慰剂的OVX大鼠

[0282] -OVX-E2:每两周接受皮下注射雌激素(17β-雌二醇)治疗的OVX大鼠。OVX-E2大鼠每两周接受皮下注射以玉米油为载体溶液的25μg/kg体重的17β-雌二醇(Sigma-Aldrich,圣路易斯,MO)。

[0283] -OVX+4AA:每天补充4AA的OVX大鼠,其剂量为105mg/kg体重的组氨酸、肌肽、丝氨酸和245mg/kg体重的半胱氨酸。

[0284] 身体组成分析:在研究的开始和结束时,使用EchoMRI-700™设备(Echo Medical Systems,L.L.C.,休斯顿,USA)在没有麻醉的情况下进行瘦体重和脂体重的测量(以克计)。测量在自由条件下于上午8点进行三次重复,结果表示为体重的百分比。

[0285] 肥胖指数:肥胖指数计算为IWAT库重量、MWAT库重量和RWAT库重量的重量之和(以克计),并表示为体重的百分比。

[0286] 血清瘦素水平:使用大鼠ELISA试剂盒(EZRL-83K/Millipore,巴塞罗那,西班牙)测定血清瘦素水平。

[0287] 葡萄糖水平和胰岛素水平:使用葡萄糖酶比色法试剂盒(998282/QCA,巴塞罗那,西班牙)和大鼠胰岛素ELISA试剂盒(10-1250-01/Mercodia,乌普萨拉,瑞典)分析葡萄糖水平和胰岛素水平。

[0288] HOMA-IR分析:使用以下公式计算稳态模型评估估算的胰岛素抵抗(HOMA-IR):(葡萄糖_胰岛素)/22.5,如前所述(Matthews等人,1985)。

[0289] 结果

[0290] 先前使用切除卵巢(OVX)大鼠进行的研究表明,与假手术大鼠(对照)相比,这些动物表现出体重增加、肥胖和胰岛素抵抗障碍。

[0291] 本文公开的结果表明,用四联组氨酸+半胱氨酸+丝氨酸+肌肽(4AA)组合治疗可有效改善与绝经相关的代谢变化。

[0292] 实施例6.血浆组氨酸和脂肪变性程度与人类的肠道微生物群和Hut基因的关系

[0293] 材料和方法

[0294] 宏基因组分析

[0295] 对于宏基因组分析,排除了在10%的样本中计数少于10的那些微生物科、微生物属或微生物种。使用带偏差校正的微生物组分析(ANCOM-BC)方法,对与循环组氨酸水平、肝脂肪变性或HAA治疗相关的分类单元进行差异丰度分析。通过将根据观察到的数据估计的样本特定的偏移添加到线性回归模型中,该方法考虑了样本间不同采样分数造成的偏差。对数尺度的线性回归模型类似于对数比变换,以考虑宏基因组数据集的组成性质,而偏移项

起到偏差校正的作用。所有人类的模型都对年龄、性别、BMI和国家的进行了调整。使用“SGoF”R包中实现的顺序拟合优度对多重比较的P值进行了调整。与FDR方法不同,FDR方法分别随着hutG、hutH、hutI和hutU的数量,降低了其统计能力。

[0296] 粪便基因组DNA提取及全基因组鸟枪法测序(宏基因组)

[0297] 生成了发现队列中n=73名患者的粪便鸟枪法测序数据。简而言之,使用QIAamp DNA粪便迷你试剂盒(Qiagen)从冷冻的人类粪便中提取总DNA,并稍作修改,增加了珠磨步骤进行轻微修饰。使用Qubit 3.0荧光计(Thermo Fisher Scientific,USA)进行DNA定量,根据制造商的说明使用Bioscientific PCR free文库试剂盒对每个样品的3ng提取DNA进行制备,并在Hiseq 2500(Illumina)上使用2×150双端测序化学进行测序。使用prinseq-lite-0.20.4程序对获得的输入fastq文件进行解压、过滤和按质量修剪3’端,并使用FLASH-1.2.11连接重叠对。然后将fastq文件转换为fast文件,并通过使用Bowtie 2以端到端选项和非常敏感的选项,通过比对参考人类基因组(GRCh38.p11,Dec 2013)的测序片段(reads)来移除人类宿主测序片段。接着,通过MEGAHIT v1.1.2将非宿主测序片段组装成重叠群(contigs),并使用Bowtie 2将这些测序片段与重叠群进行比对,来进行功能分析。未组装的测序片段被附加到重叠群上。接着,使用Prodigal v2.6.342来预测编码区域。利用HMMER对照2016版的京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库进行功能注释,获得基因的功能子类别、路径和注释。使用R 3.1.0进行最佳注释的过滤和orf注释对每个测序片段的分配,并使用R 3.1.0对对齐的测序片段进行计数,并添加类别及其覆盖率,最后构建丰度矩阵。在Kaiju v1.6.2上使用贪婪模式对无人类测序片段进行分类单元注释。所有样本的谱系信息添加、分类单元计数和丰度矩阵生成均使用R包来进行。

[0298] 细菌基因组DNA分离、16S rRNA测序与分析(宏基因组)

[0299] 使用MBP DNA土壤提取试剂盒从小鼠粪便样品中分离细菌基因组DNA。基因组DNA用EB(10毫摩尔/升Tris-HCl)标准化至5ng/μL,并建立文库。简单而言,在第一次PCR和使用KAPA纯化磁珠(Roche目录号07983298001)进行清理之后,使用Nextera XT Index试剂盒v2的P7和P5的标签引物(Illumina目录号:FC-131-2001至FC-131-2004)组成第二次PCR主混合液。PCR反应后,使用Quant-iT dsDNA测定试剂盒,高灵敏度试剂盒(目录号10164582)对文库进行定量,并在FLUOstar Optima平板读取器上运行。合并文库,并使用Agilent Tapestation 4200在High Sensitivity D1000 ScreenTape(Agilent目录号5067-5579)上运行,以计算最终的文库池摩尔浓度。使用MiSeq® Reagent Kit v3(Illumina目录号FC-102-3003)在Illumina MiSeq仪器上运行该池(600个循环),遵循Illumina推荐的变性建议和上样建议,其中包括20%的PhiX加标对照(PhiX Control v3 Illumina目录号FC-110-3001)。使用MiSeq reporter在MiSeq上对原始数据进行本地分析。对于16S测序分析,LotuS 1.36使用短扩增子模式和默认质量过滤的分析流程(pipeline)。对原始16S rRNA基因测序片段进行质量过滤,以确保最小长度为170bp,不超过8个同核苷酸,没有模糊不清的碱基,平均质量>=27,累积误差低于0.5,去重过滤器设置为“6:1,3:2”。使用DADA2将清洗后的测序片段聚类为扩增子测序变体(ASV),使用DADA2从头嵌合体检查去除嵌合ASV。剩余的phiX测序片段通过将ASV与phiX参考基因组比对来进行过滤。使用LotuS2 LCA算法对照Silva 138.1参考数据库进行ASV分类。平均每个样本可分配5500±3108个蓝藻菌源的测序片段。进一步的数据分析使用R统计语言的3.00版本(The R Foundation,https://www.r-

project.org/),采用rtk软件对所有数据归一化处理。16S原始数据可以在https://1drv.ms/u/s!ApVezdktX3aIlZVJXYWok9s2qhgfvg?e=VDyr2c中找到。

[0300] 对于HutH和HutG微生物群功能的引物设计

[0301] 将原核生物物种的多个序列从数据库上传到ARDEP程序中,从而设计出能在HutH基因和HutG基因的保守区扩增的简并引物,并覆盖所有用于引物设计的物种。基于k-mer算法,将引物长度设置为k,并将所有序列划分为k-mer。分析平台允许使用位于“序列处理”部分的工具在序列数据库上执行序列长度统计、长度过滤和冗余去除。在执行序列数据库质量控制后,在“引物处理”部分运行用于引物设计的ARDEP,得到不同引物集的可能性列表。使用“Covered Taxonomy Calculator”选项对引物集覆盖的分类单元和功能群的序列数量进行计数。考虑引物的基本特性(Tm、GC%、引物长度),选择最佳方案。

[0302] 结果

[0303] 微生物与宿主间相互作用可能有助于代谢性疾病的发展,并且最近已经阐明了将肠道微生物组与肝脂肪变性联系起来的分子网络。

[0304] 肠道微生物组在非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)(图11b)和如肥胖、IBD、内脏脂肪组织和不健康的代谢曲线的其他疾病和病症的病理生理学中起关键作用。

[0305] 变形菌门(Proteobacteria)的科黄单胞菌科(Xanthomonadaceae)、立克次氏体科(Rickettsiaceae)和交替单胞菌科(Alteromonadales),在肝脂肪变性中增加。在属的水平上,嗜胆菌属(Bilophila)和弯曲杆菌属(Campylobacter)也被描述为在NAFLD中增加。

[0306] 组氨酸可以被许多细菌利用,是变形菌门重要的碳来源、氮来源和/或能量来源。组氨酸利用(Hut)途径涉及从组氨酸中消除氨以产生尿刊酸、丙酸咪唑酮和亚胺代甲基谷氨酸。(图11c)

[0307] 为了评估肠道微生物群在调节血浆组氨酸水平中的潜在作用,对来自发现队列的73例患者的粪便样本进行了鸟枪法宏基因组分析。控制年龄、BMI、性别和国家,使用带偏差校正的微生物组分析(ANCOM-BC)以考虑宏基因组数据集的组成性质,并鉴定与循环组氨酸水平相关的差异富集的分类单元。

[0308] 组氨酸水平与变形菌门成员之间存在强烈的负相关。变形菌门的科(图11a)也与肝脂肪变性程度密切相关。循环组氨酸水平也与蓝藻菌(Cyanobacteria)、棒状杆菌目(Corynebacteriale)(放线菌门(Actinobacteria))和Marinilabiliales(拟杆菌门(Bacteroidetes))呈强正相关(图11a)。

[0309] 循环组氨酸水平也与已知产生抗炎代谢物的健康肠道细菌指标呈正相关,所述细菌如粪杆菌属(Faecalibacteirum)、双歧杆菌属(Bifidobacterium)和气味杆菌属(Odoribacter)(图11a)。

[0310] 与这些结果一致,发现脂肪变性程度较高的患者的微生物Hut基因水平升高,而在HAA补充(这里所用的“HAA”,对应于前面实施例中使用的包含组氨酸、半胱氨酸、丝氨酸和肌肽的组合物)后,微生物Hut基因水平下降,表明了HAA施用对相关的生态失调的作用。

[0311] 脂肪变性程度<33%的患者和肝脂肪变性>33%的患者被发现具有较高丰度的参与前三个组氨酸降解步骤的微生物基因,这些步骤似乎是普遍的,包括组氨酸转化为尿刊酸、尿刊酸水化为丙酸咪唑和咪唑环裂解以获得亚胺代甲基谷氨酸(图11d)。

[0312] 上述结果表明,补充涉及组氨酸的氨基酸(HAA)在小鼠中改善了NAFLD并减轻肝脏

炎症。

[0313] 本文表明,在NAFLD诱导的小鼠中补充HAA降低了细菌组氨酸利用基因(hutH和hutG)的表达,而这两个基因的表达在NAFLD患者中增加(图11e)。

[0314] 总之,这些结果表明血浆组氨酸水平与NAFLD中失调的细菌科呈负相关。这种微生物组失调,被称为生态失调,可以被HAA施用所抵消。

[0315] 本发明的其他方面/实施方案可在以下条款中找到:

[0316] 1.一种药物组合物或膳食补充剂组合物,其包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少三种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;和/或治疗上或保健食品上有效量的肽,所述肽包含含有组氨酸、半胱氨酸、丝氨酸和肌肽中的至少三种的氨基酸序列。

[0317] 2.根据条款1所述的组合物,其包含一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体,和治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少三种:组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

[0318] 3.根据条款1至2中任一项所述的组合物,其中组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上或保健食品上有效量是施与每Kg对象10mg至每Kg对象250mg的剂量;半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象30mg至每Kg对象550mg的剂量;丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象10mg至每Kg对象250mg的剂量;并且肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物的治疗上有效量是施与每Kg对象10mg至每Kg对象200mg的剂量。

[0319] 4.根据条款1至3中任一项所述的组合物,其包含治疗上或保健食品上有效量的以下物质中的至少三种:L-组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;L-半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、L-丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物、和L-肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物。

[0320] 5.根据条款1至4中任一项所述的组合物,其中组氨酸和半胱氨酸的药物上或保健食品上可接受的盐是L-组氨酸的盐酸盐和L-半胱氨酸的盐酸盐。

[0321] 6.根据条款1至5中任一项所述的组合物,其中组氨酸的药物上可接受的盐是L-组氨酸一盐酸化物一水合物。

[0322] 7.根据条款1至6中任一项所述的组合物,其包含治疗上或保健食品上有效量的组氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;治疗上或保健食品上有效量的半胱氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物;治疗上或保健食品上有效量的丝氨酸或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶

剂化物;和治疗上或保健食品上有效量的肌肽或其药物上或保健食品上可接受的盐或两者之任一的溶剂化物,以及一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体。

[0323] 8. 根据条款7所述的组合物,其包含:

[0324] -治疗上或保健食品上有效量的L-组氨酸一盐酸化物一水合物;

[0325] -治疗上或保健食品上有效量的L-半胱氨酸盐酸化物;

[0326] -治疗上或保健食品上有效量的L-丝氨酸;和

[0327] -治疗上或保健食品上有效量的L-肌肽,

[0328] 以及一种或多于一种药物上或保健食品上可接受的赋形剂或载体。

[0329] 9. 一种固体形式或液体形式的食品,其包含根据条款1至8中任一项所限定的药物组合物或膳食补充剂组合物。

[0330] 10. 根据条款9所述的食品,其为饮料。

[0331] 11. 根据条款1至8中任一项所限定的药物组合物或膳食补充剂组合物,或根据条款9至10中任一项所限定的食品,其用于治疗。

[0332] 12. 根据条款11所述使用的药物组合物或膳食补充剂组合物或食品,其用于预防和/或治疗选自脂肪性肝病、肥胖、动脉粥样硬化及其组合的疾病。

[0333] 13. 根据条款11至12中任一项所述使用的药物组合物或膳食补充剂组合物或食品,其用于预防和/或治疗选自非酒精性脂肪性肝病和酒精性脂肪性肝病的脂肪性肝病。

[0334] 14. 根据条款13所述使用的药物组合物或膳食补充剂组合物或食品,其中非酒精性脂肪性肝病选自患有单纯性脂肪变性的非酒精性脂肪肝(NAFLD)和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。

[0335] 引用列表

[0336] -Koebele, S. V. & Bimonte-Nelson, H. A. “Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research”. Maturitas 2016, 87, 5-17.

[0337] -Mardinoglu等人,“Personal model-assisted identification of NAD+ and glutathione metabolism as intervention target in NAFLD”, Mol Syst Biol-2017, vol. no. 13:916

[0338] -Mong等人,“Histidine and carnosine alleviated hepatic steatosis in mice consumed high saturated fat diet”, European Journal of Pharmacology 653 (2011) 82-88

[0339] -Zhao, Z.; Fu, C.; Zhang, Y.; Fu, A. Dimeric Histidine as a Novel Free Radical Scavenger Alleviates Non-Alcoholic Liver Injury. Antioxidants 2021, 10, 1529.

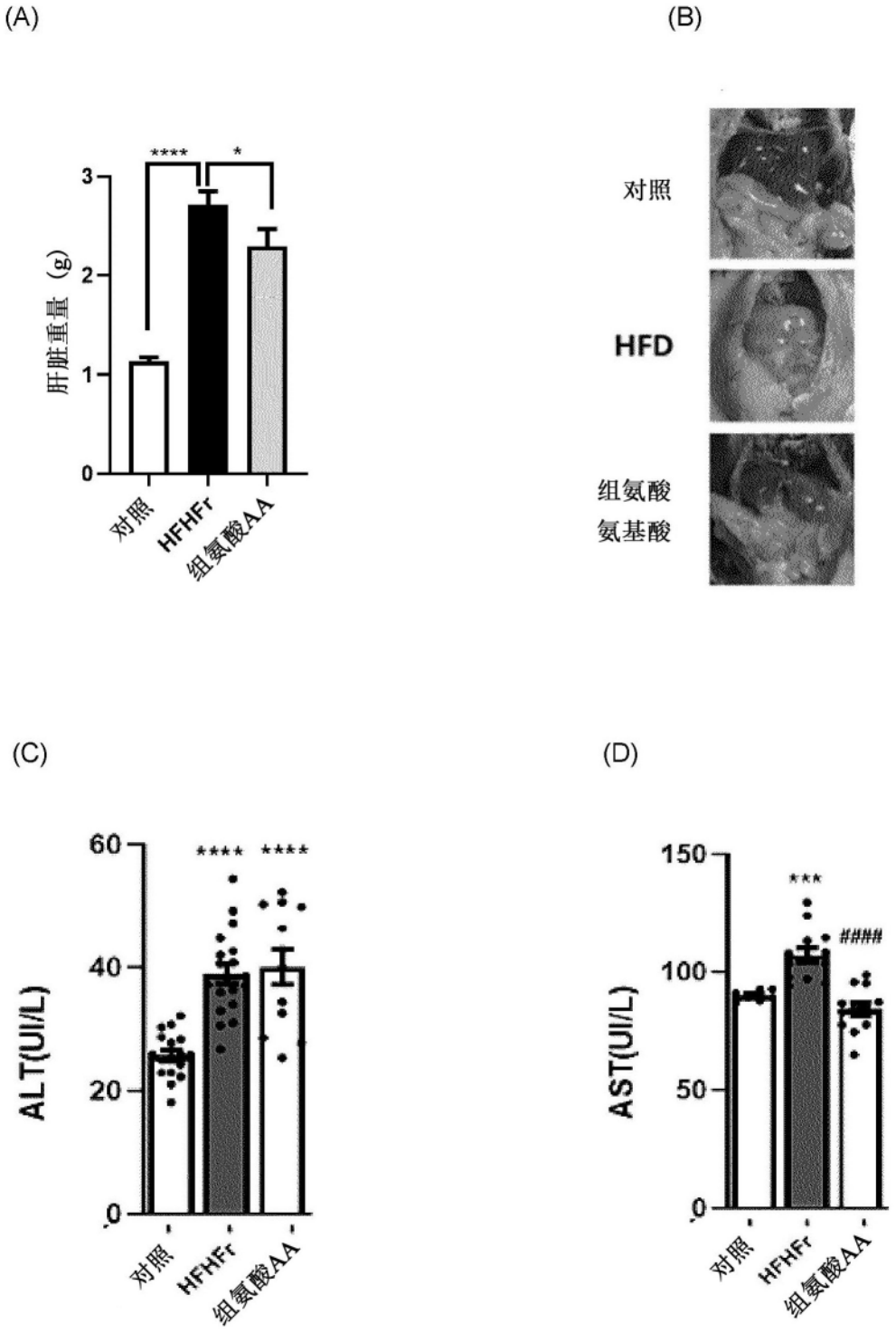

(A)
肝脏重量（g）
****
*
对照
HFHFr
组氨酸AA
(B)
对照
HFD
组氨酸
氨基酸
(C)
ALT(UI/L)
****
****
对照
HFHFr
组氨酸AA
(D)
AST(UI/L)
***
####
对照
HFHFr
组氨酸AA

图1

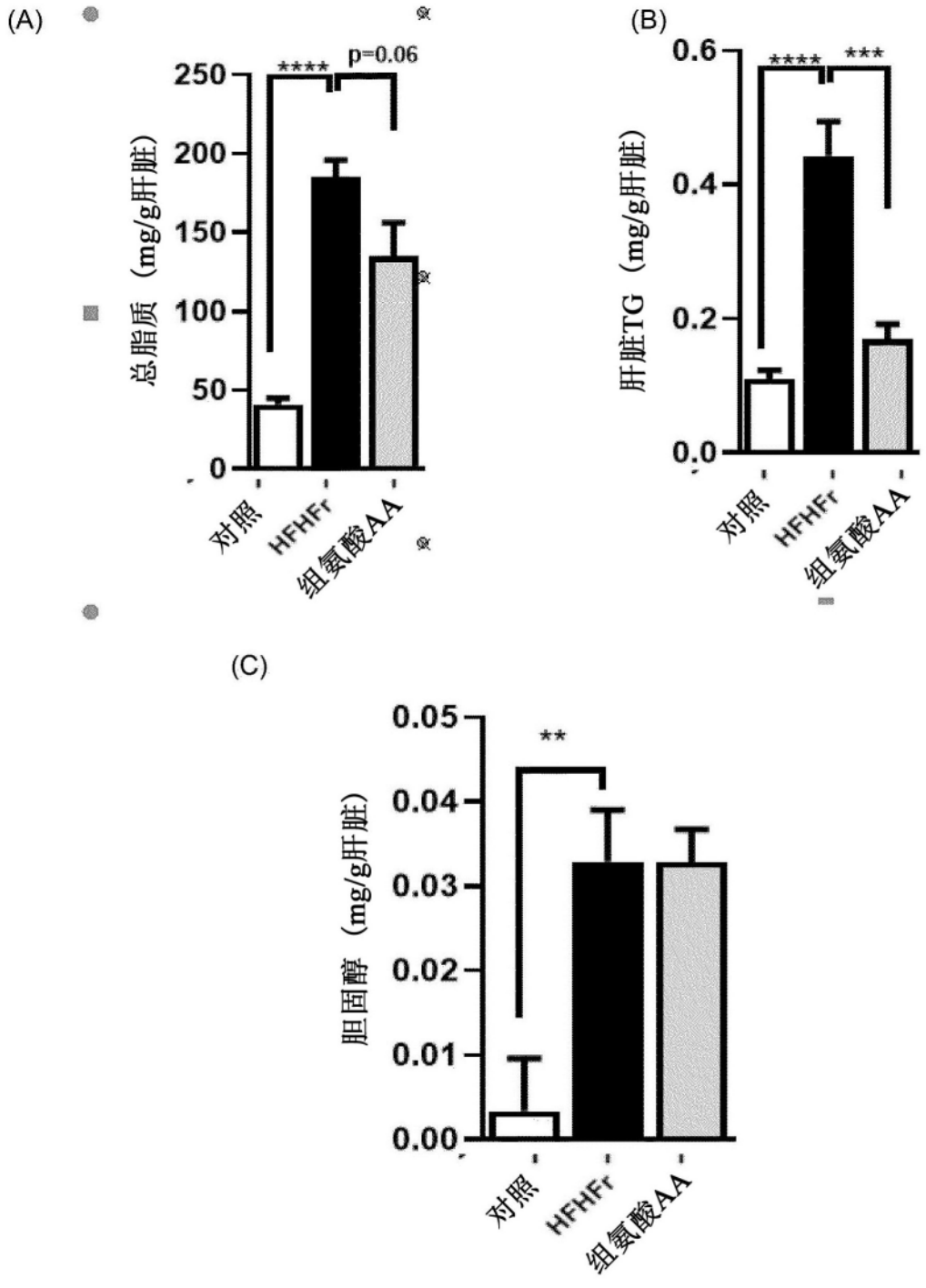
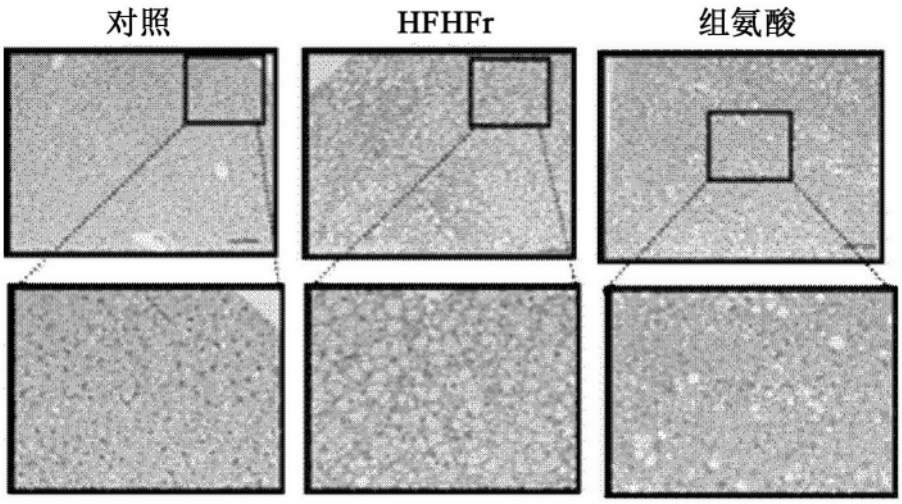
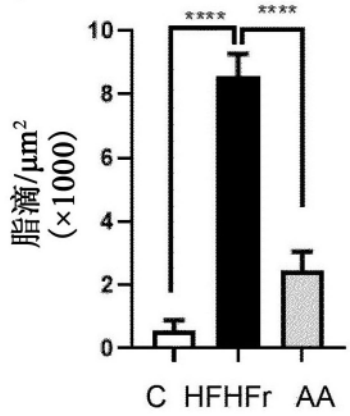

(A)
总脂质（mg/g肝脏）
250
200
150
100
50
0
****
p=0.06
对照
HFHFr
组氨酸AA
(B)
肝脏TG（mg/g肝脏）
0.6
0.4
0.2
0.0
****
***
对照
HFHFr
组氨酸AA
(C)
胆固醇（mg/g肝脏）
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
**
对照
HFHFr
组氨酸AA

图2

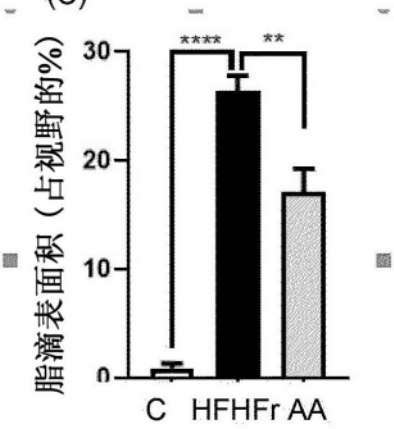
(A)



(B)



(C)



(D)

	大泡性st.（0至3）	小泡性st.（0至3）	肥大（0至3）	脂肪变性（0至9）	炎症	
对照	0	0	0	0	0	无NAFLD
HFHFr	2	3	2	7	1	NASH
AA	1	1	0	2	0	NAFLD

图3

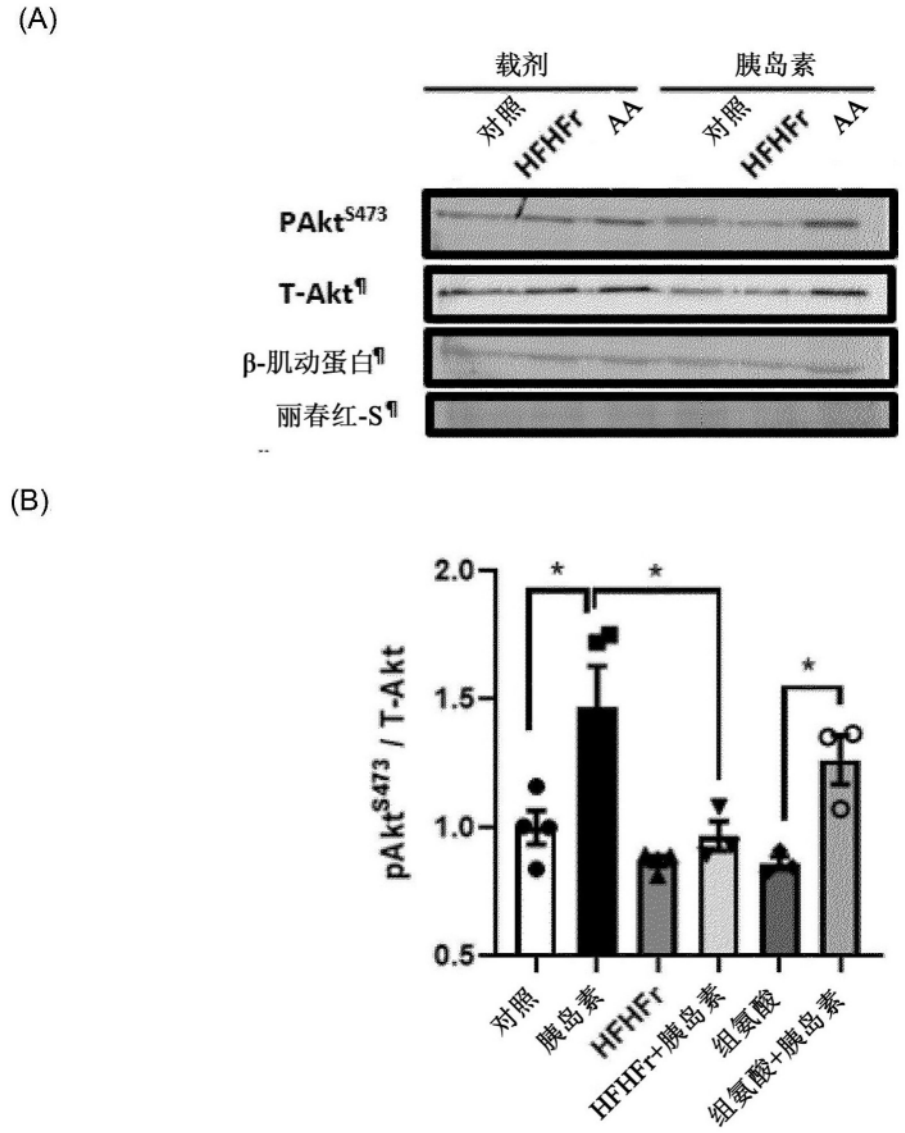

(A)
载剂
胰岛素
对照
HFHFr
AA
对照
HFHFr
AA
PAkt^S473
T-Akt¶
β-肌动蛋白¶
丽春红-S¶
(B)
pAkt^S473 / T-Akt
2.0
1.5
1.0
0.5
*
*
*
对照
胰岛素
HFHFr
HFHFr+胰岛素
组氨酸
组氨酸+胰岛素

图4(续)

C

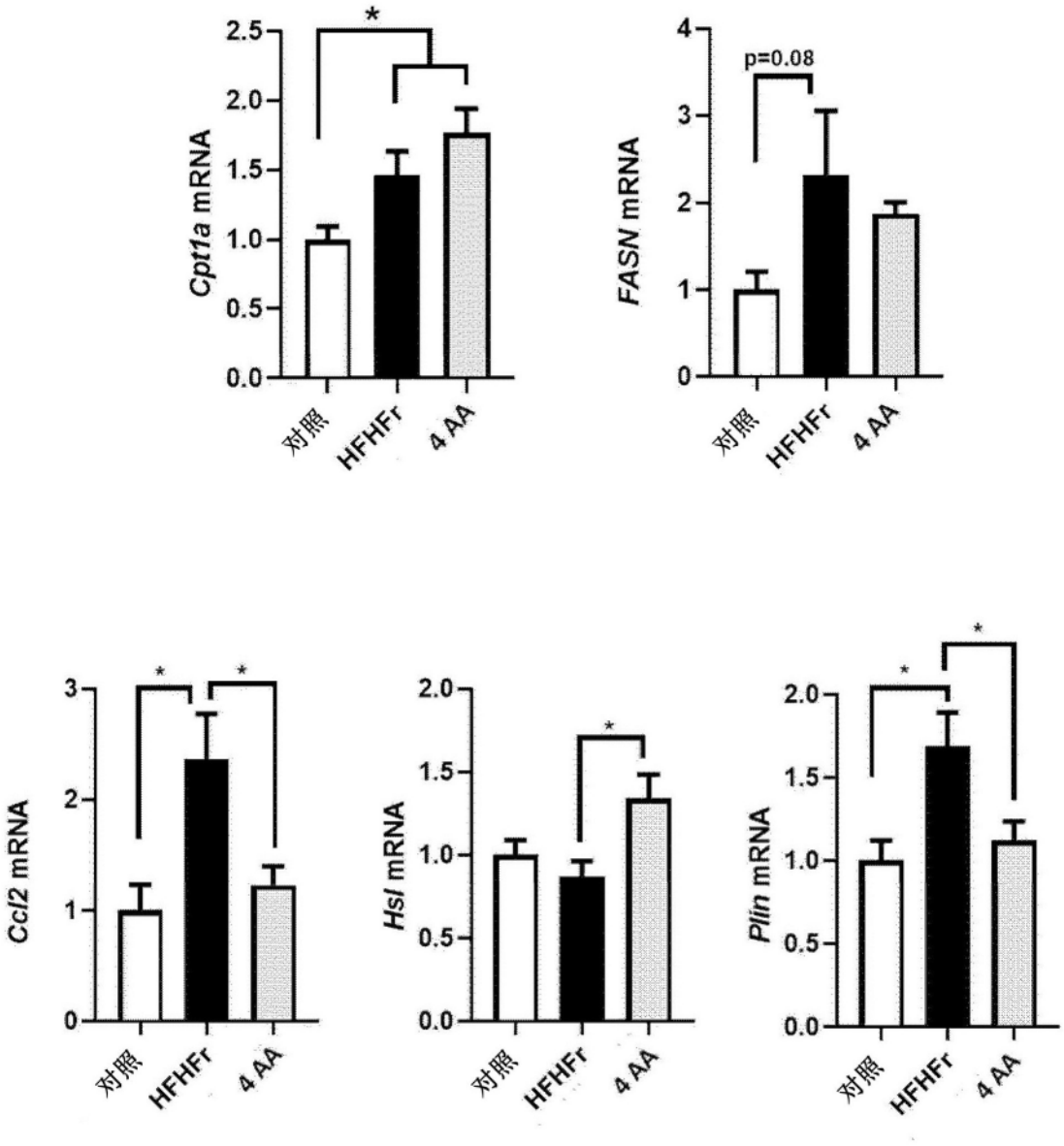

Cpt1a mRNA
FASN mRNA
p=0.08
Ccl2 mRNA
Hsl mRNA
Plin mRNA
对照
HFHFr
4 AA

图4

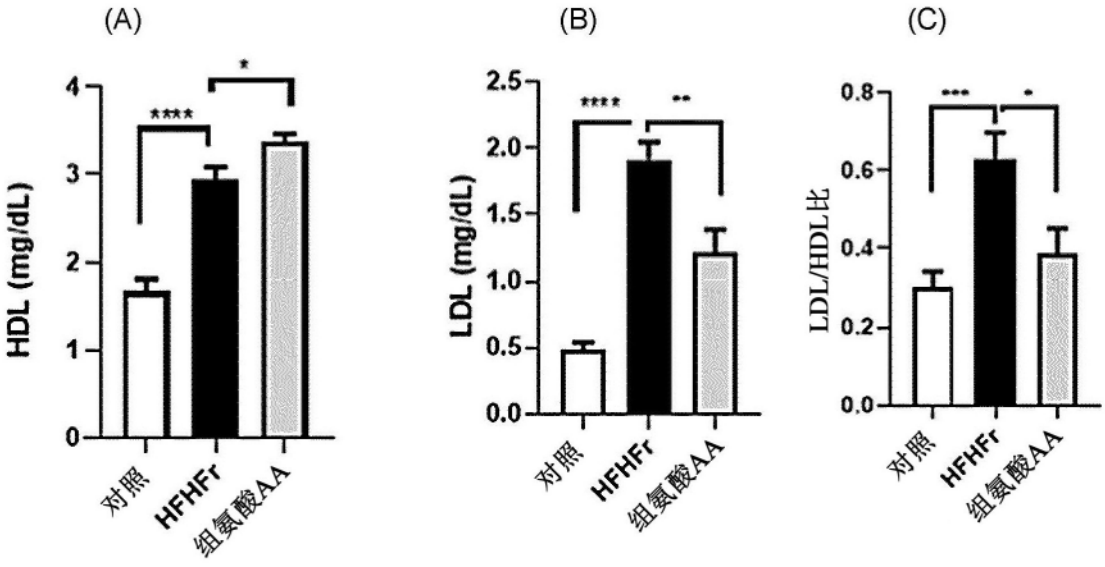

(A)
HDL (mg/dL)
4
3
2
1
0
****
*
对照
HFHFr
组氨酸AA
(B)
LDL (mg/dL)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
****
**
对照
HFHFr
组氨酸AA
(C)
LDL/HDL比
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
*
对照
HFHFr
组氨酸AA

图5

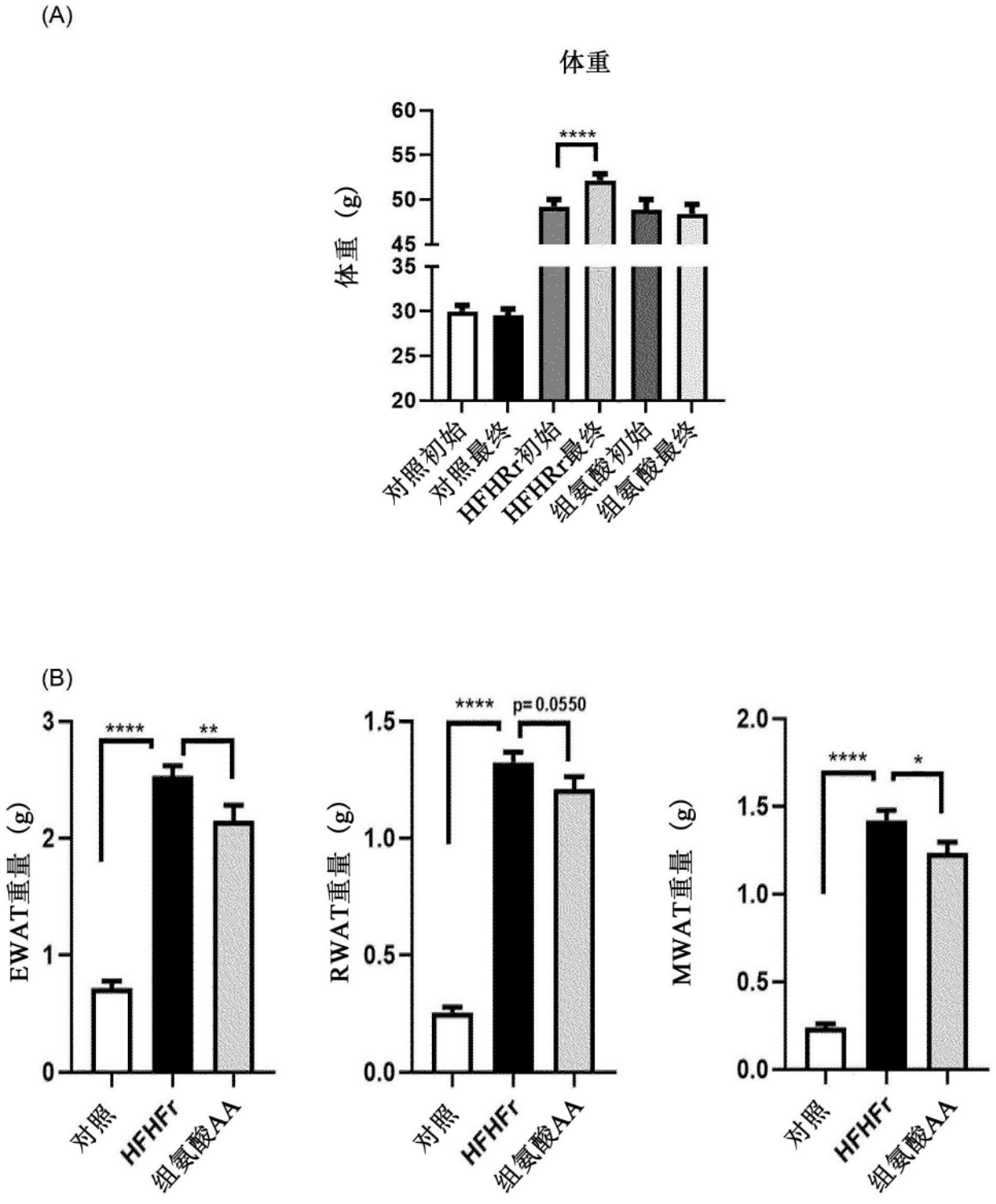
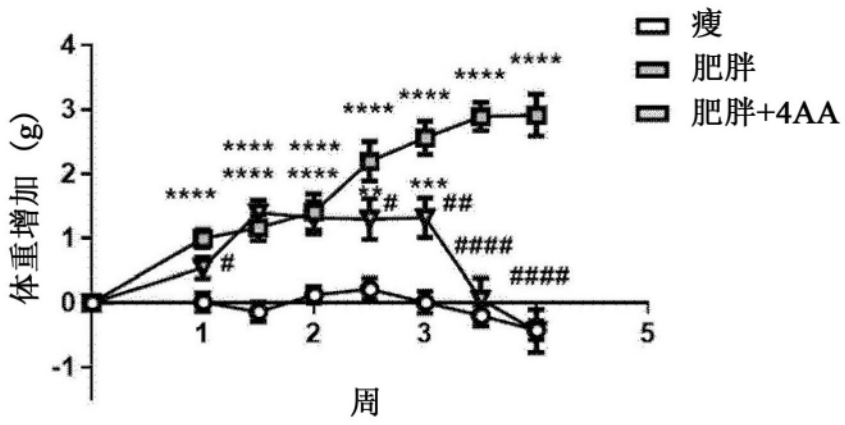

(A)
体重
体重（g）
60
55
50
45
35
30
25
20
****
对照初始
对照最终
HFHRr初始
HFHRr最终
组氨酸初始
组氨酸最终
(B)
EWAT重量（g）
3
2
1
0
****
**
对照
HFHFr
组氨酸AA
RWAT重量（g）
1.5
1.0
0.5
0.0
****
p=0.0550
对照
HFHFr
组氨酸AA
MWAT重量（g）
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
****
*
对照
HFHFr
组氨酸AA

图6(续)

(C)


瘦
肥胖
肥胖+4AA
体重增加（g）
周

(D)

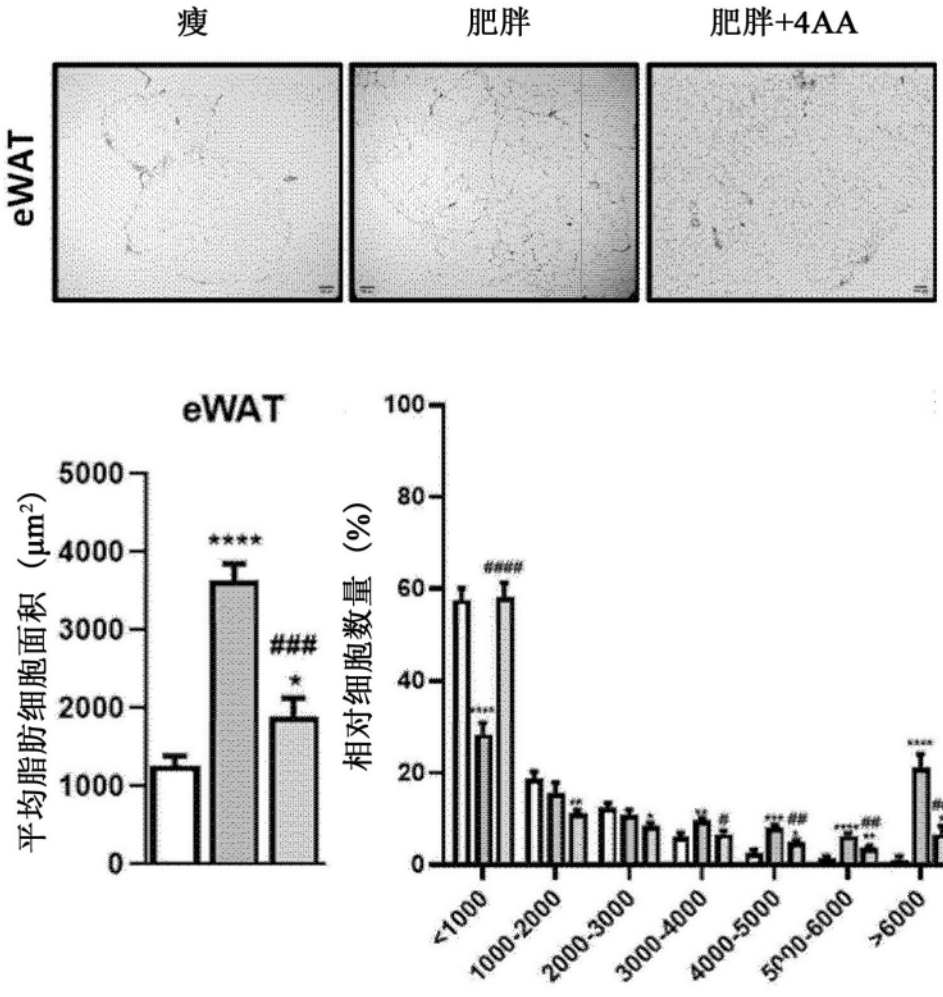
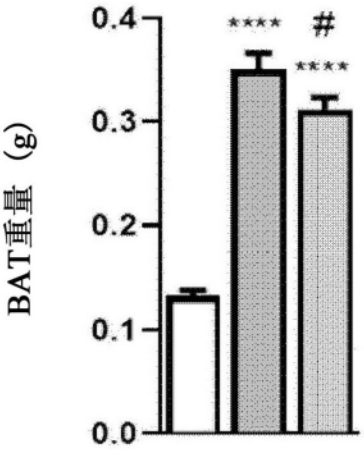
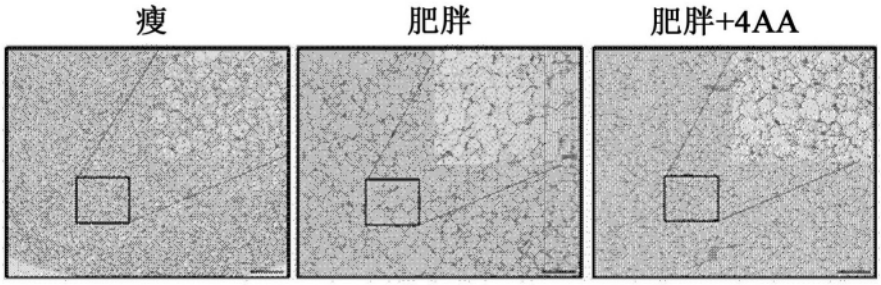

瘦
肥胖
肥胖+4AA
eWAT
eWAT
平均脂肪细胞面积（μm²）
相对细胞数量（%）
<1000
1000-2000
2000-3000
3000-4000
4000-5000
5000-6000
>6000

图6(续)

(E)



(F)



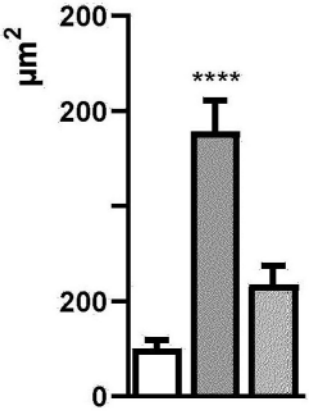
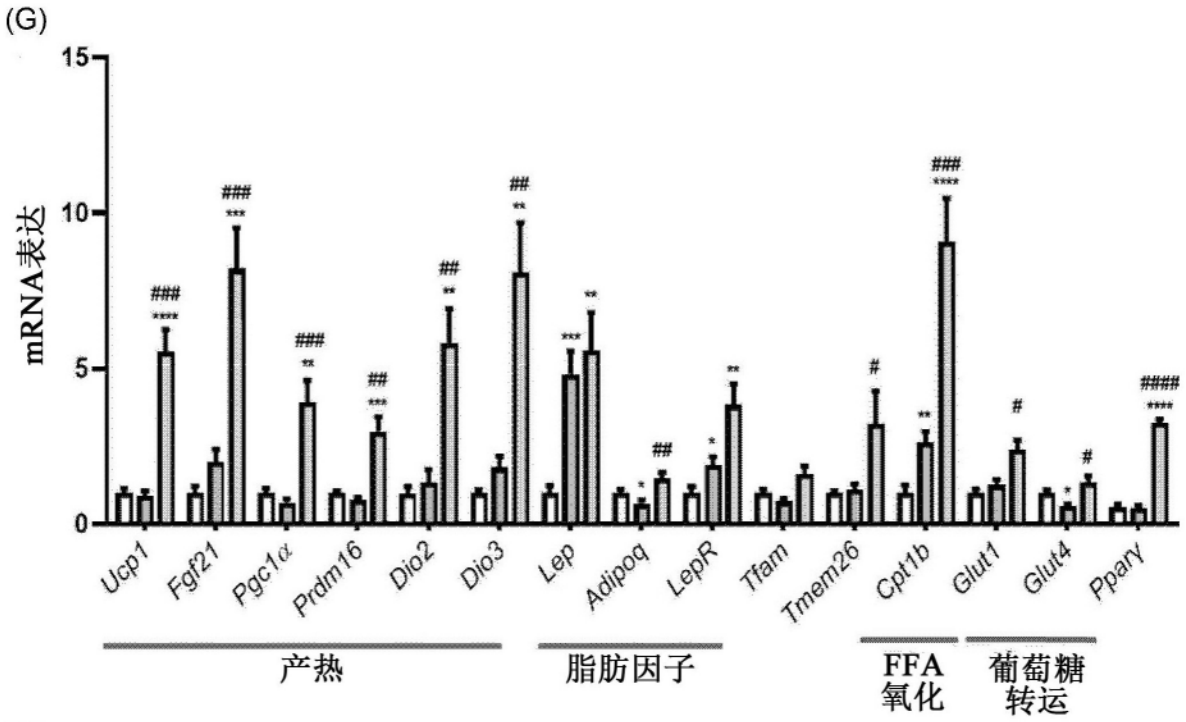
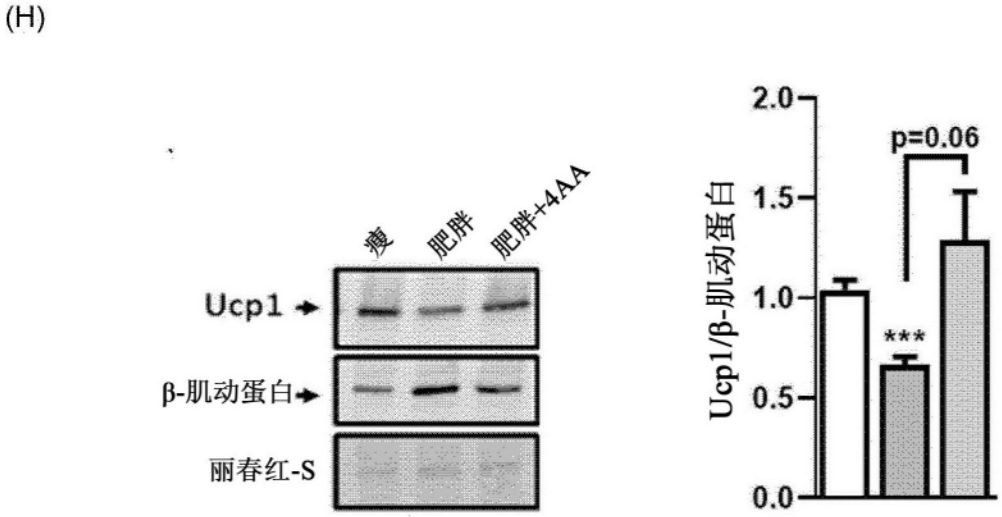


图6（续）


(G)
mRNA表达
Ucp1
Fgf21
Pgc1α
Prdm16
Dio2
Dio3
Lep
Adipoq
LepR
Tfam
Tmem26
Cpt1b
Glut1
Glut4
Pparγ
产热
脂肪因子
FFA 氧化
葡萄糖 转运


(H)
瘦
肥胖
肥胖+4AA
Ucp1
β-肌动蛋白
丽春红-S
Ucp1/β-肌动蛋白
p=0.06

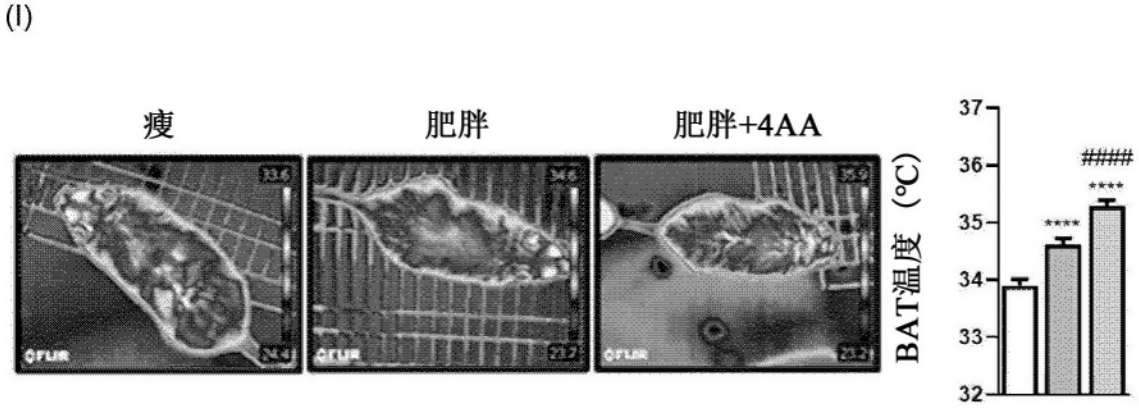

(I)
瘦
肥胖
肥胖+4AA
BAT温度（℃）

图6

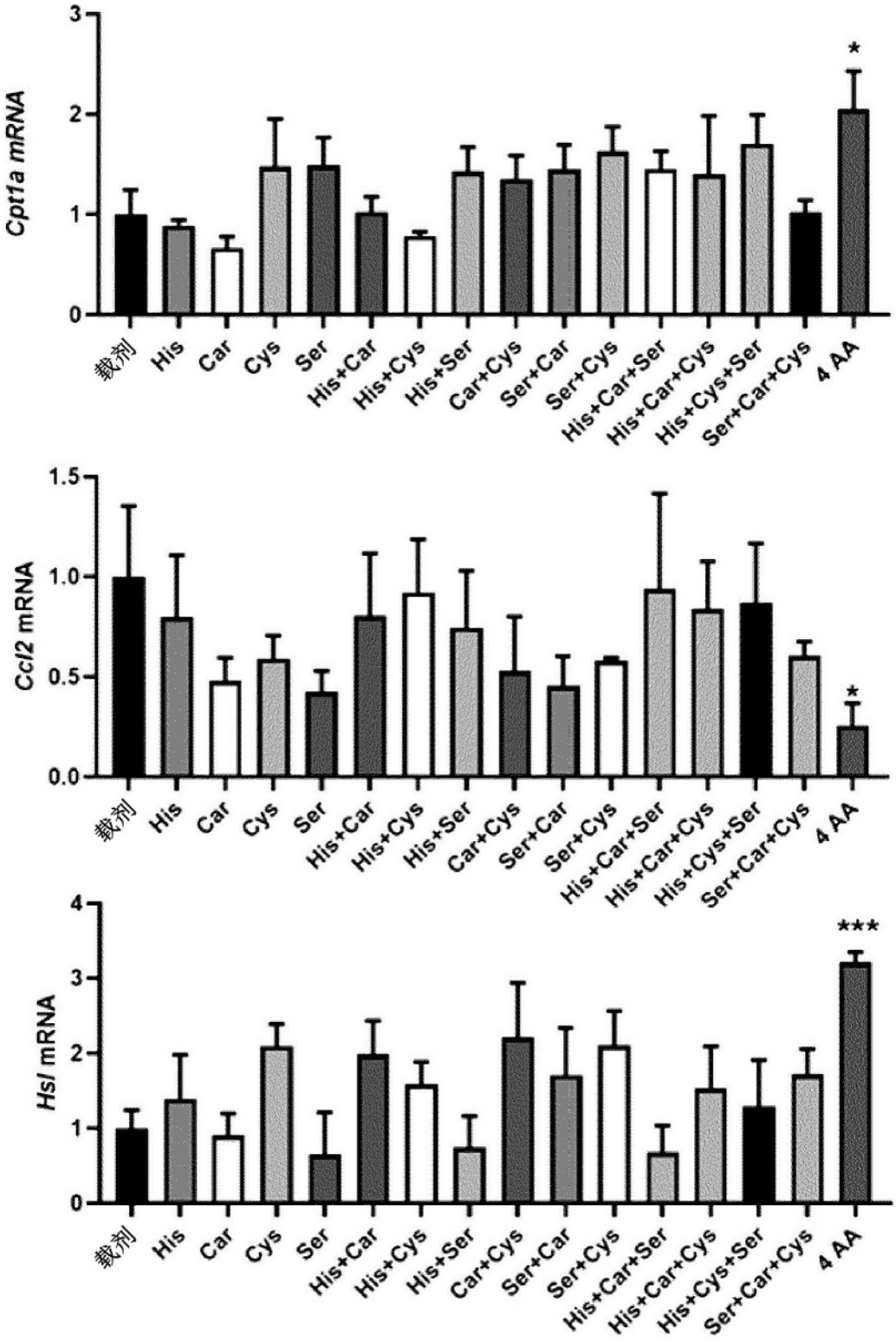

Cpt1a mRNA
3
2
1
0
*
载剂
His
Car
Cys
Ser
His+Car
His+Cys
His+Ser
Car+Cys
Ser+Car
Ser+Cys
His+Car+Ser
His+Car+Cys
His+Cys+Ser
Ser+Car+Cys
4 AA
Ccl2 mRNA
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Hsl mRNA
4
3
2
1
0
***

图7(续)

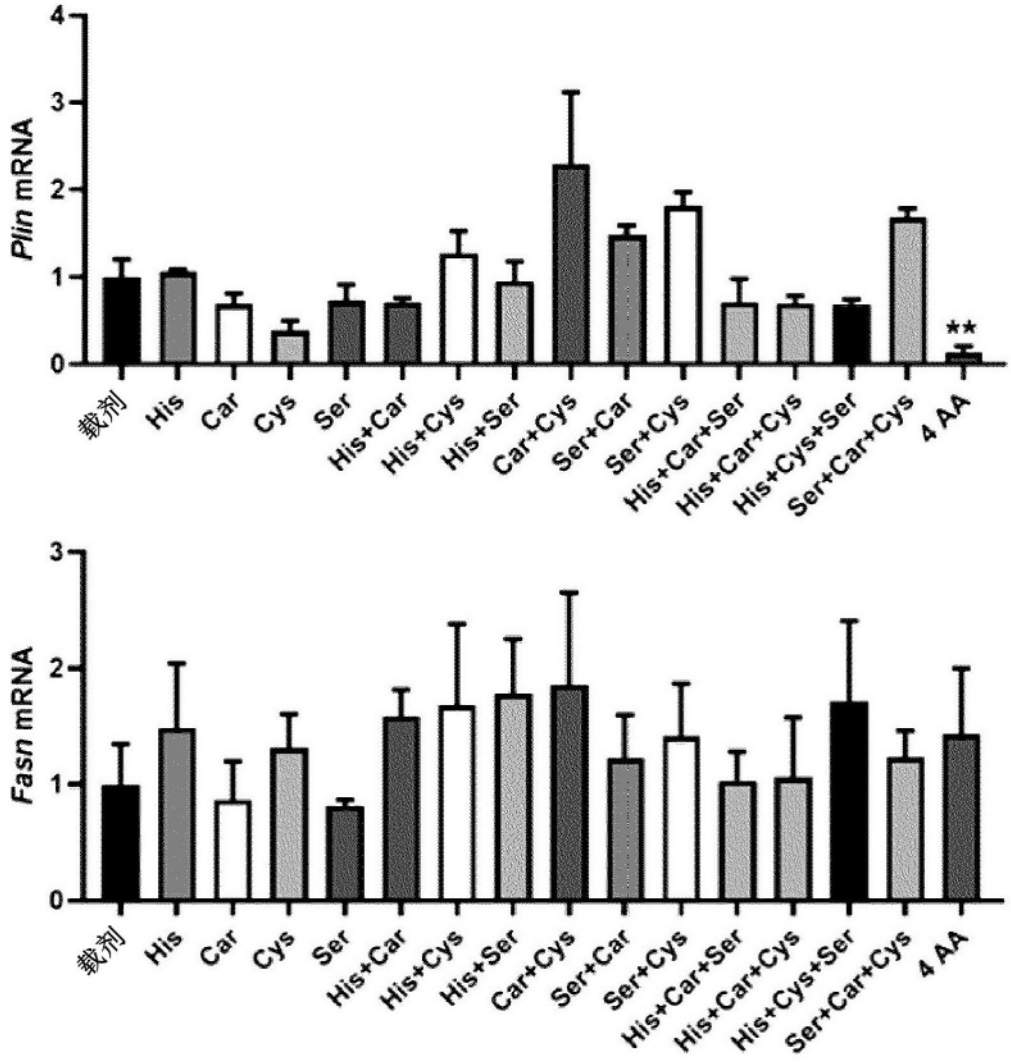

Plin mRNA
4
3
2
1
0
**
载剂
His
Car
Cys
Ser
His+Car
His+Cys
His+Ser
Car+Cys
Ser+Car
Ser+Cys
His+Car+Ser
His+Car+Cys
His+Cys+Ser
Ser+Car+Cys
4 AA
Fasn mRNA
3
2
1
0
载剂
His
Car
Cys
Ser
His+Car
His+Cys
His+Ser
Car+Cys
Ser+Car
Ser+Cys
His+Car+Ser
His+Car+Cys
His+Cys+Ser
Ser+Car+Cys
4 AA

图7

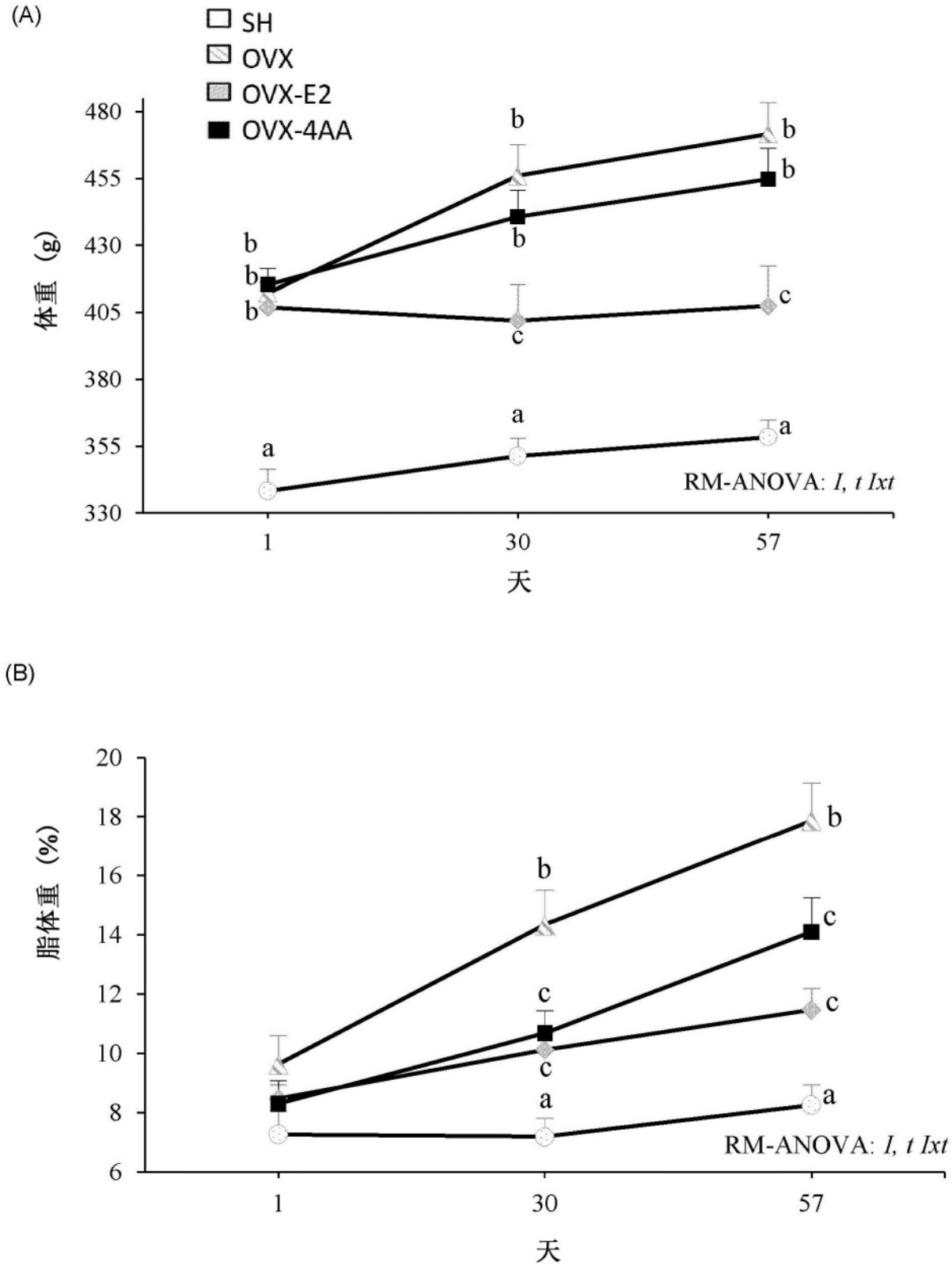
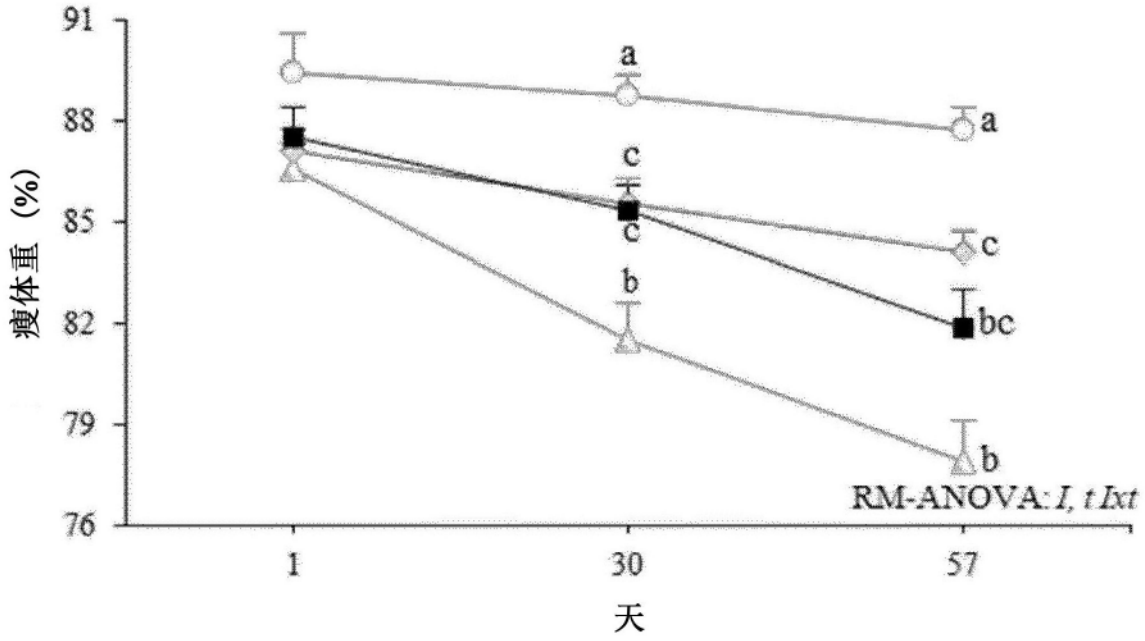

(A)
SH
OVX
OVX-E2
OVX-4AA
体重（g）
480
455
430
405
380
355
330
1
30
57
天
RM-ANOVA: I, t Ixt
(B)
脂体重（%）
20
18
16
14
12
10
8
6
1
30
57
天
RM-ANOVA: I, t Ixt

图8(续)

(C)


91
88
85
82
79
76
瘦体重（%）
a
a
c
c
c
bc
b
b
RM-ANOVA: I, t Ixt
1
30
57
天

(D)

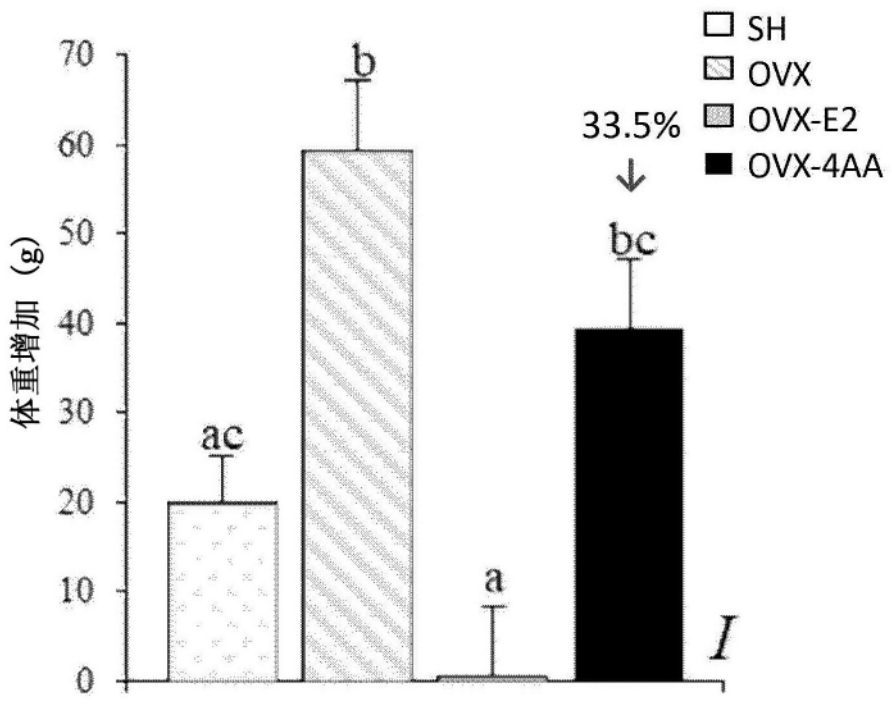
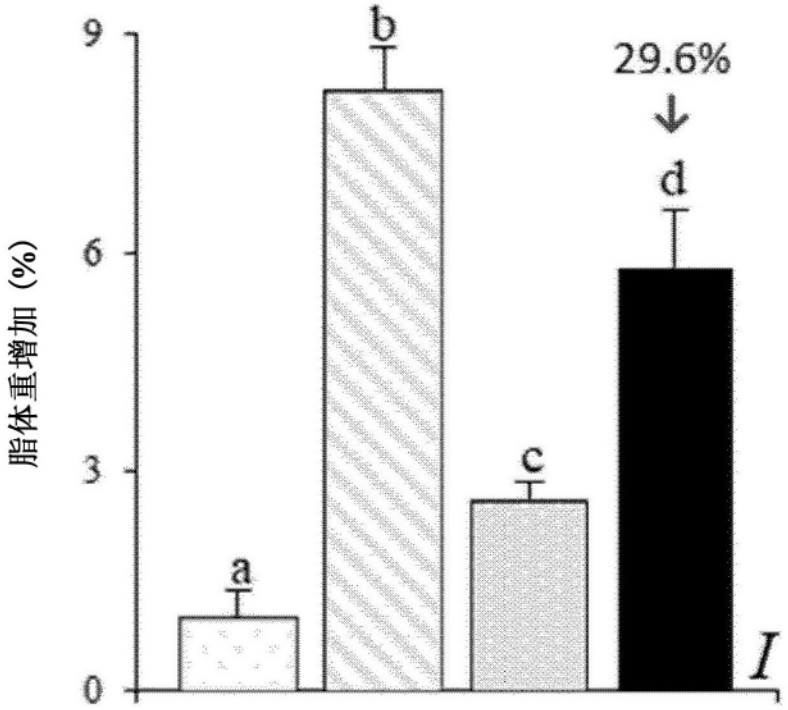

70
60
50
40
30
20
10
0
体重增加（g）
b
ac
a
bc
33.5%
I
SH
OVX
OVX-E2
OVX-4AA

图8(续)

(E)



(F)

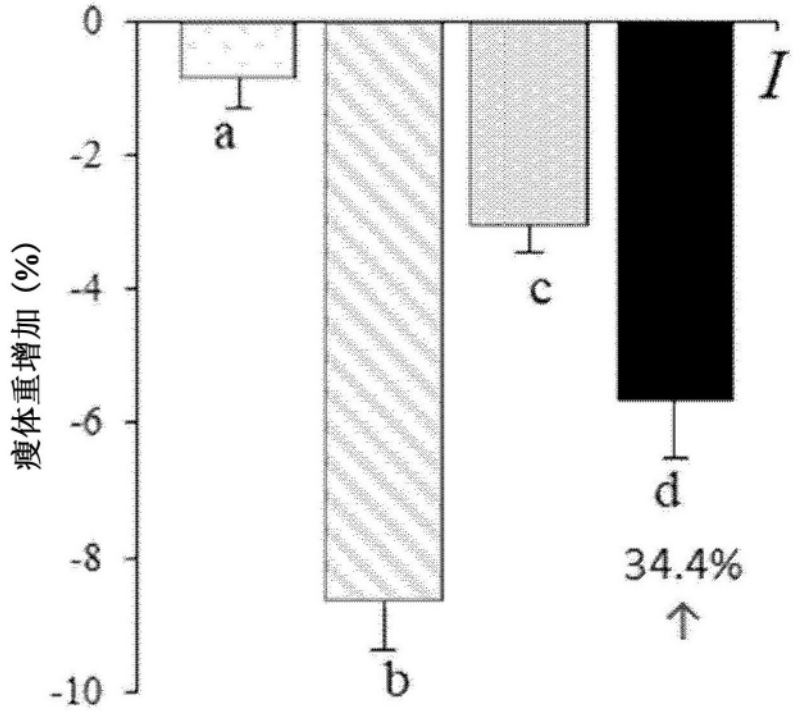


图8

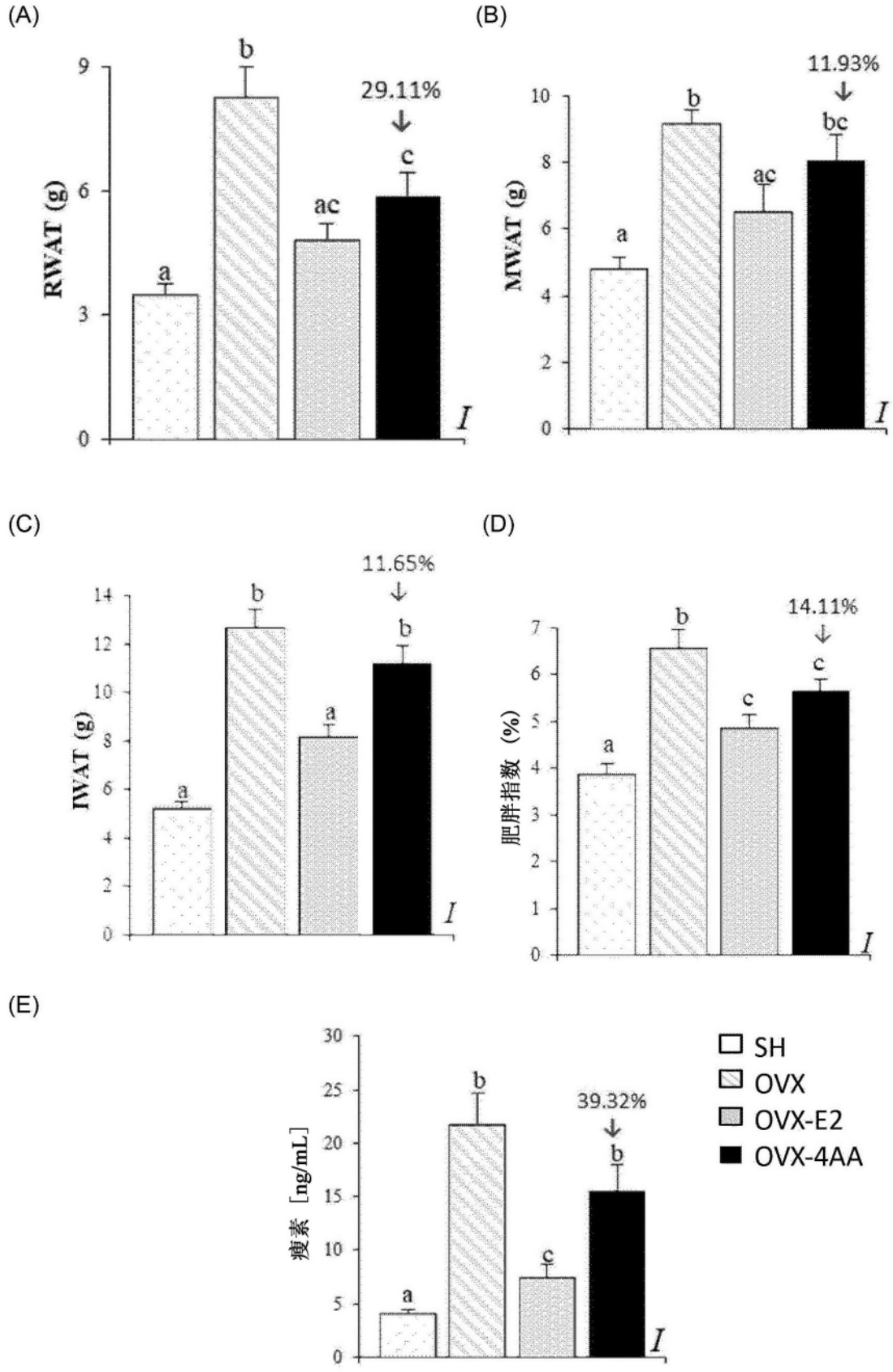

(A)
RWAT (g)
29.11%
(B)
MWAT (g)
11.93%
(C)
IWAT (g)
11.65%
(D)
肥胖指数 (%)
14.11%
(E)
瘦素 [ng/mL]
39.32%
SH
OVX
OVX-E2
OVX-4AA

图9

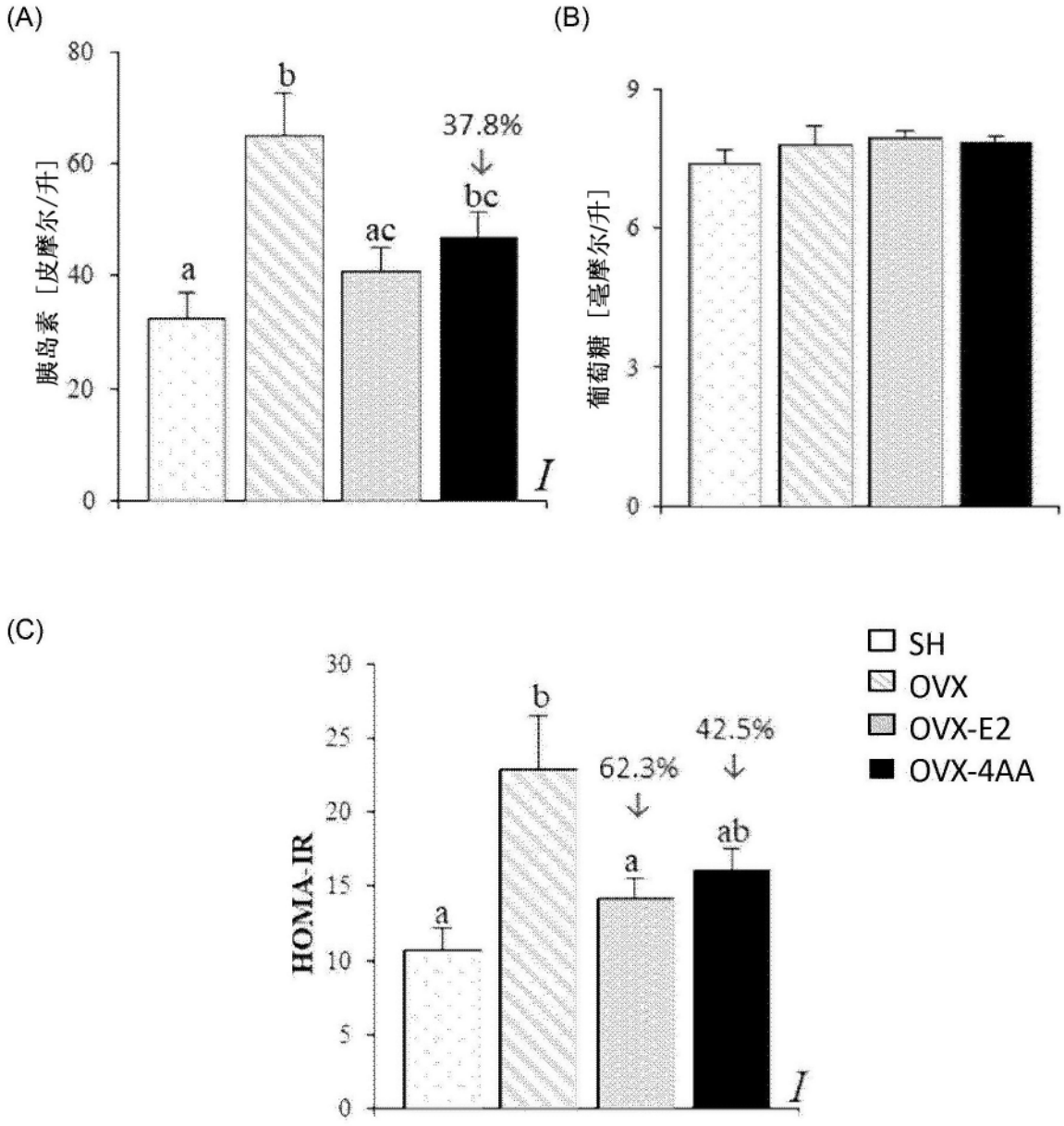

(A)
胰岛素 [皮摩尔/升]
80
60
40
20
0
a
b
ac
bc
37.8%
I
(B)
葡萄糖 [毫摩尔/升]
9
6
3
0
(C)
HOMA-IR
30
25
20
15
10
5
0
a
b
a
ab
62.3%
42.5%
I
SH
OVX
OVX-E2
OVX-4AA

图10

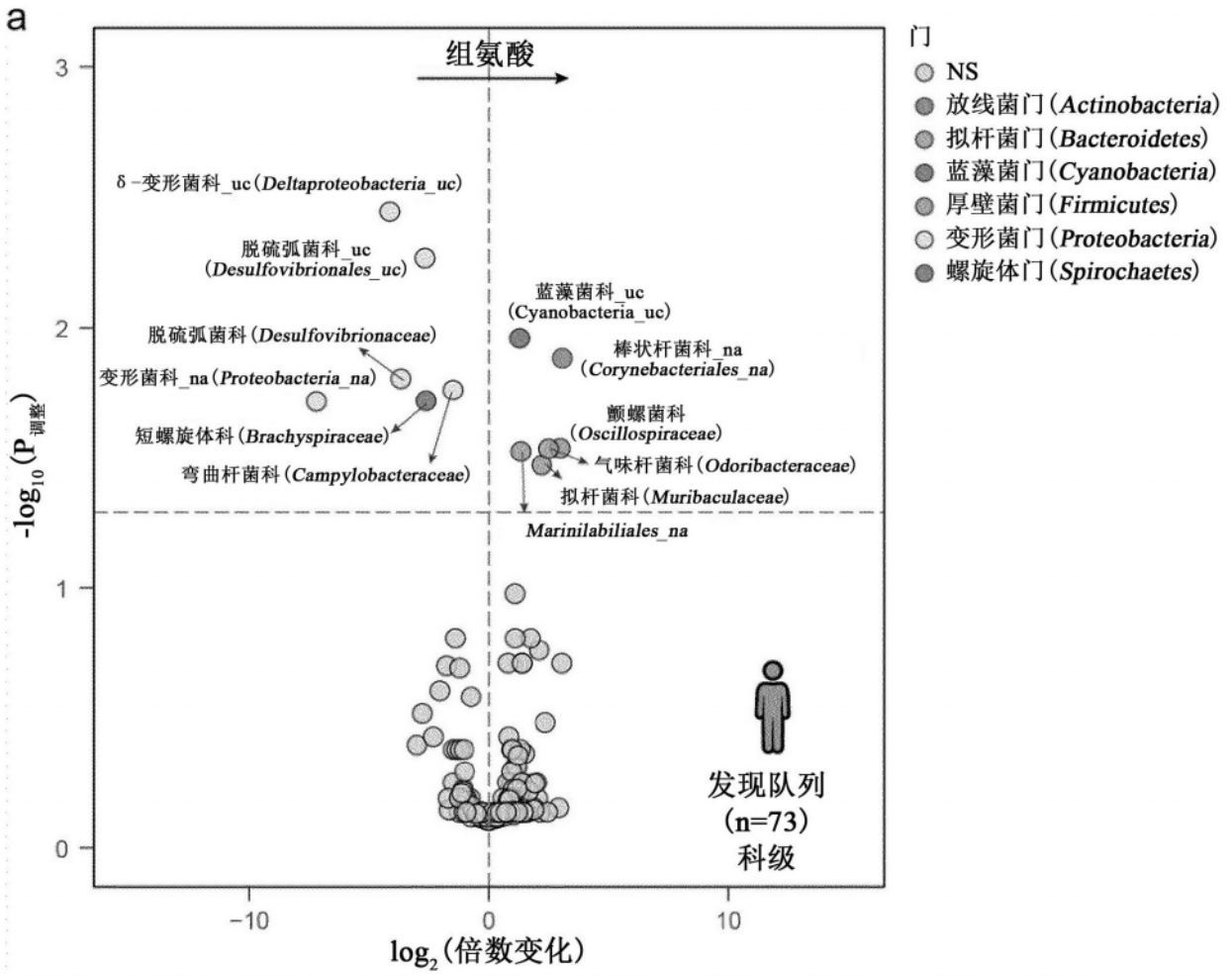

a
组氨酸
δ-变形菌科_uc(Deltaproteobacteria_uc)
脱硫弧菌科_uc
(Desulfovibrionales_uc)
脱硫弧菌科(Desulfovibrionaceae)
变形菌科_na(Proteobacteria_na)
短螺旋体科(Brachyspiraceae)
弯曲杆菌科(Campylobacteraceae)
蓝藻菌科_uc
(Cyanobacteria_uc)
棒状杆菌科_na
(Corynebacteriales_na)
颤螺菌科
(Oscillospiraceae)
气味杆菌科(Odoribacteraceae)
拟杆菌科(Muribaculaceae)
Marinilabiliales_na
发现队列
(n=73)
科级
门
NS
放线菌门(Actinobacteria)
拟杆菌门(Bacteroidetes)
蓝藻菌门(Cyanobacteria)
厚壁菌门(Firmicutes)
变形菌门(Proteobacteria)
螺旋体门(Spirochaetes)
-log10(P调整)
log2(倍数变化)
3
2
1
0
-10
0
10

图11(续)

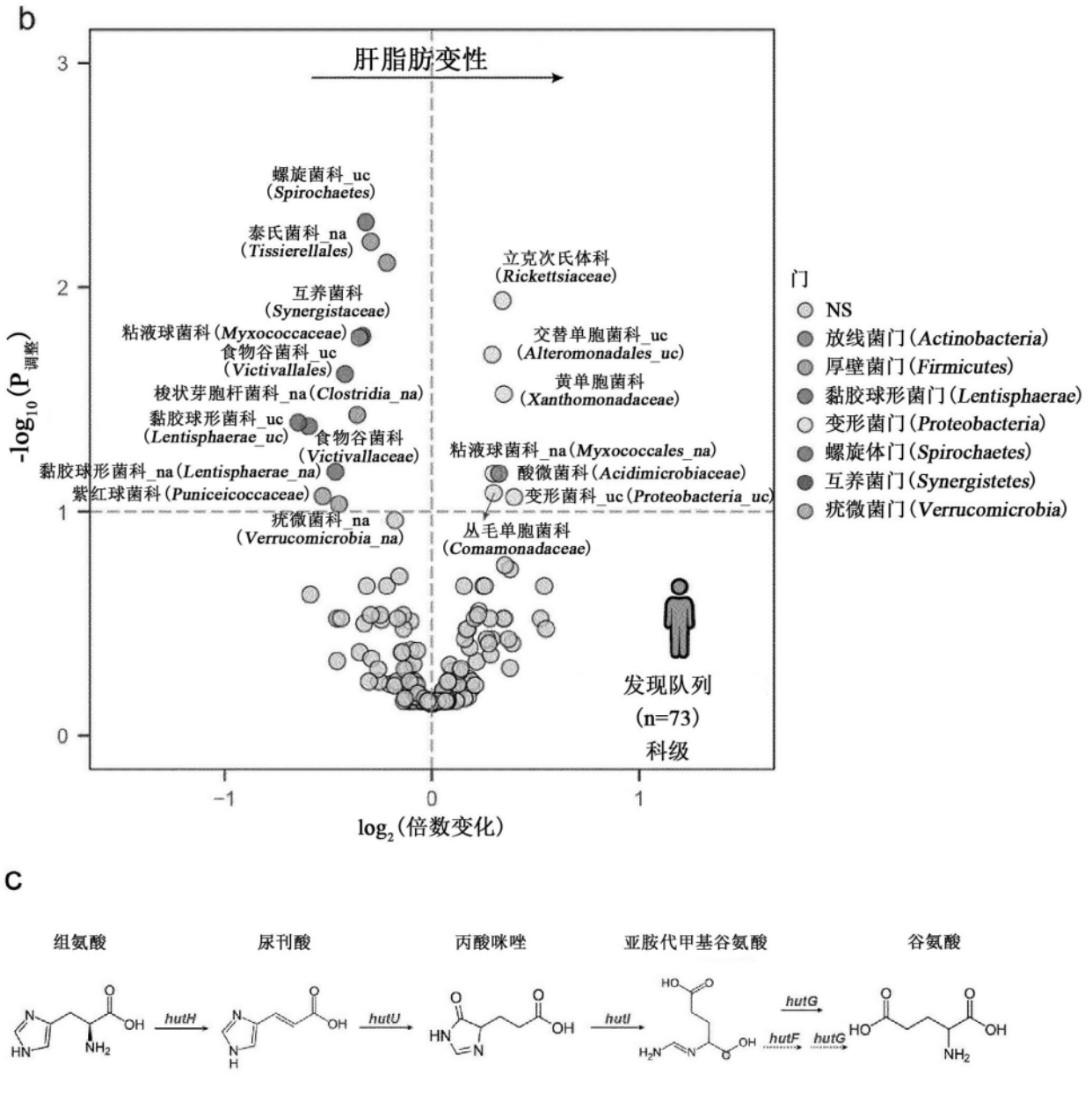

b
肝脂肪变性
螺旋菌科_uc
(Spirochaetes)
泰氏菌科_na
(Tissierellales)
互养菌科
(Synergistaceae)
粘液球菌科(Myxococcaceae)
食物谷菌科_uc
(Victivallales)
梭状芽胞杆菌科_na(Clostridia_na)
黏胶球形菌科_uc
(Lentisphaerae_uc)
食物谷菌科
(Victivallaceae)
黏胶球形菌科_na(Lentisphaerae_na)
紫红球菌科(Puniceicoccaceae)
疣微菌科_na
(Verrucomicrobia_na)
立克次氏体科
(Rickettsiaceae)
交替单胞菌科_uc
(Alteromonadales_uc)
黄单胞菌科
(Xanthomonadaceae)
粘液球菌科_na(Myxococcales_na)
酸微菌科(Acidimicrobiaceae)
变形菌科_uc(Proteobacteria_uc)
从毛单胞菌科
(Comamonadaceae)
发现队列
(n=73)
科级
-log10(P调整)
log2(倍数变化)
门
NS
放线菌门(Actinobacteria)
厚壁菌门(Firmicutes)
黏胶球形菌门(Lentisphaerae)
变形菌门(Proteobacteria)
螺旋体门(Spirochaetes)
互养菌门(Synergistetes)
疣微菌门(Verrucomicrobia)
c
组氨酸
尿刊酸
丙酸咪唑
亚胺代甲基谷氨酸
谷氨酸
hutH
hutU
hutI
hutG
hutF
hutG

图11(续)

d

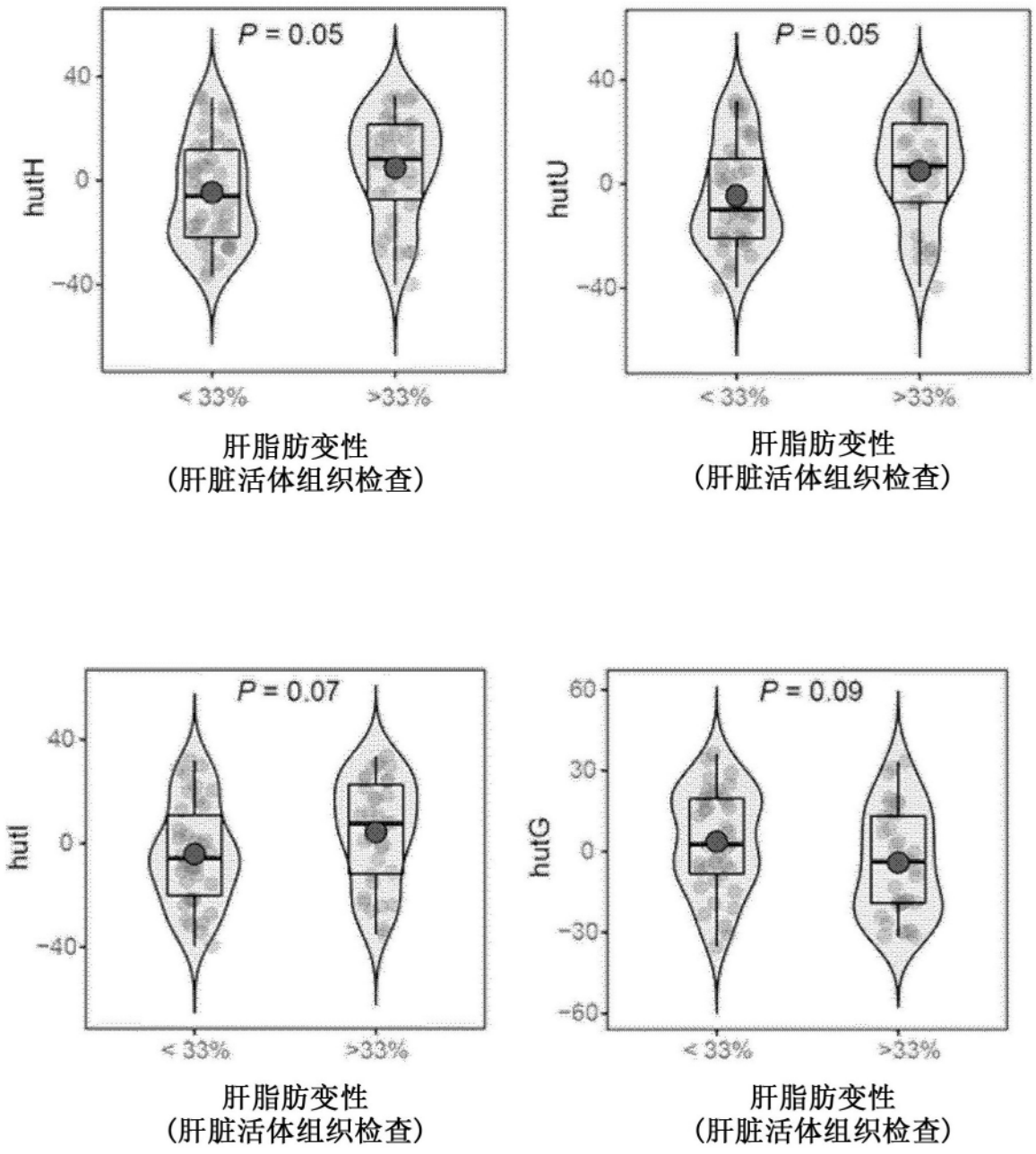

P = 0.05
hutH
40
0
-40
< 33%
>33%
肝脂肪变性
(肝脏活体组织检查)
P = 0.05
hutU
40
0
-40
< 33%
>33%
肝脂肪变性
(肝脏活体组织检查)
P = 0.07
hutI
40
0
-40
< 33%
>33%
肝脂肪变性
(肝脏活体组织检查)
P = 0.09
hutG
60
30
0
-30
-60
< 33%
>33%
肝脂肪变性
(肝脏活体组织检查)

图11(续)

e

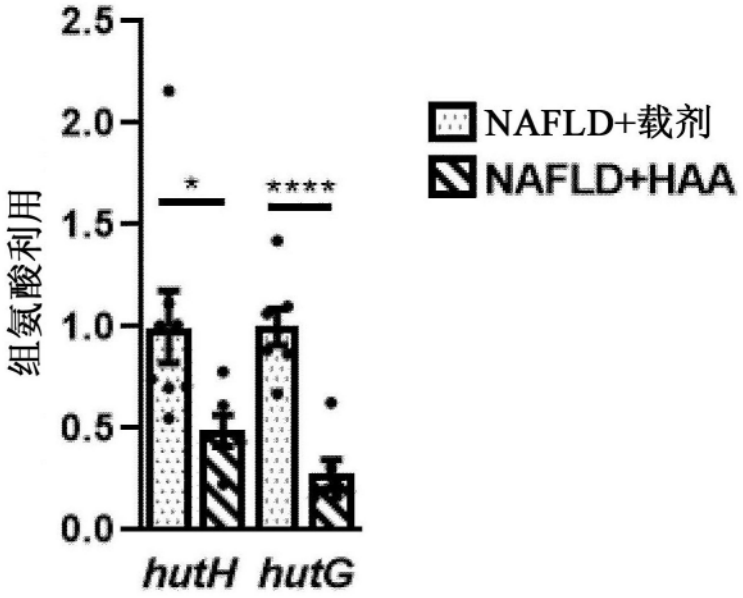


图11