



(10) 授权公告号 CN 111801140 B

(45) 授权公告日 2025. 05. 16

(21) 申请号 201980008316.6

专利权人 乔斯林糖尿病中心公司

(22) 申请日 2019.01.17

(72) 发明人 麦克·A·莱内斯 曾玉华
马修·D·莱内斯

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111801140 A

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
专利代理师 刘潇

(43) 申请公布日 2020.10.20

(30) 优先权数据

62/618,332 2018.01.17 US

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 3/08 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.07.13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/013934 2019.01.17

(56) 对比文件

WO 2014172606 A1, 2014.10.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/143767 EN 2019.07.25

审查员 纪圆圆

(73) 专利权人 康涅狄格大学

地址 美国康涅狄格州

权利要求书1页 说明书14页

序列表7页 附图6页

(54) 发明名称

治疗糖尿病、肝炎和/或炎症性肝病的方法

(57) 摘要

本发明公开了细胞外人金属硫蛋白 (MT) 抑制剂用于治疗选自糖尿病、糖尿病前期、糖耐量受损、肝炎和/或炎症性肝病炎症性肝病的疾病的用途,以及含有细胞外人MT的组合物。

1. 细胞外人金属硫蛋白 (MT) 抑制剂在制备用于治疗或限制受试者的疾病发展的药物中的用途, 其中, 所述疾病选自2型糖尿病、和非酒精性脂肪性肝炎 (NASH), 所述细胞外人金属硫蛋白 (MT) 抑制剂包括特异性结合细胞外人MT的抗MT抗体或其抗原结合片段, 所述细胞外人金属硫蛋白 (MT) 抑制剂为UC1MT。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其中, 所述受试者为2型糖尿病患者或有发展为2型糖尿病风险的患者。

3. 根据权利要求2所述的用途, 其中, 所述受试者具有2型糖尿病的风险。

4. 根据权利要求3所述的用途, 其中, 所述受试者具有2型糖尿病的风险因素中的一个或多个, 所述风险因素选自肥胖、吸烟、久坐的生活方式、有2型糖尿病患者的父母或兄弟姐妹、糖尿病前期、有糖尿病前期患者的父母或兄弟姐妹、不良的饮食习惯、年龄50岁或以上、高血压、高胆固醇、睾酮缺乏、金属硫蛋白1A (MT1A) rs8052394位点的G改变单核苷酸多态性, 以及妊娠糖尿病史。

5. 根据权利要求2所述的用途, 其中, 所述受试者为2型糖尿病的患者。

6. 根据权利要求5所述的用途, 其中, 所述治疗包括限制2型糖尿病的一种或多种并发症并减少了需要胰岛素或其他治疗的频率, 所述并发症选自高血糖、低血糖、胰岛素抵抗、糖尿病肾病、糖尿病神经病变、糖尿病视网膜病变、蛋白尿、肾小球清除受损、糖尿病循环障碍、肾功能衰竭、心血管疾病、多尿、多饮、体重减轻、中风。

7. 根据权利要求1所述的用途, 其中, 所述疾病为非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)。

8. 根据权利要求7所述的用途, 其中, 所述治疗包括限制或减缓NASH的一种或多种并发症的进展, 所述并发症选自疲劳、不适、肝纤维化、肝癌和/或肝硬化。

9. 根据权利要求1所述的用途, 其中, 所述受试者为哺乳动物。

10. 根据权利要求9所述的用途, 其中, 所述受试者为人。

治疗糖尿病、肝炎和/或炎症性肝病的方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请享有于2018年1月17日提交的第62/618332号美国临时专利申请的优先权，并通过引用将其全部内容合并于此。

背景技术

[0003] 糖尿病通常用胰岛素替代治疗。已经进行了研究来替代在糖尿病中受损的胰岛，但是除非阻止破坏胰岛产生胰岛素的炎症过程，否则胰岛移植或胰腺中的胰岛干细胞的再生将是短期治疗。同样，目前用于治疗肝炎和/或炎症性肝病的方法是不足的。

发明内容

[0004] 一方面，本公开提供了用于治疗或限制疾病发展的方法，所述疾病选自糖尿病、糖尿病前期、糖耐量受损、肝炎和/或炎症性肝病，包括对患有所述疾病或具有患病风险的受试者给予有效治疗量的组合物，以治疗或限制所述疾病的发展，所述组合物包括细胞外人金属硫蛋白(MT)抑制剂。在一个实施方式中，所述受试者患有糖尿病或存在患糖尿病的风险，并且所述方法用于治疗或限制糖尿病的发展。在另一实施方式中，所述受试者有1型糖尿病的患病风险，并且所述方法用于限制所述受试者中1型糖尿病的发展。在一个这样的实施方式中，所述受试者可以具有1型糖尿病的一种或多种风险因素，包括但不限于有1型糖尿病的父母或同胞、胰腺肿瘤、胰腺炎、胰岛细胞自身抗体、胰岛素自身抗体、谷氨酸脱羧酶自身抗体(GADA)、胰岛素瘤相关的(IA-2)自身抗体、锌转运蛋白自身抗体(ZnT8)和IDDM1基因的变体，所述IDDM1基因的变体选自DRB1 0401, DRB1 0402, DRB1 0405, DQA 0301, DQB1 0302和DQB1 0201；多尿、多饮、口干、多食、疲劳或体重减轻。

[0005] 在其他实施方式中，所述受试者为1型糖尿病患者，所述方法用于治疗所述受试者的1型糖尿病。在一个这样的实施方式中，所述治疗包括以下的一种或多种：降低需要胰岛素注射的频率；减缓受试者的1型糖尿病并发症的发展或进展，包括但不限于胰腺β细胞的破坏、高血糖、低血糖、多尿、多食、多饮、体重减轻、视力模糊、疲劳、伤口愈合能力下降、尿路感染、性功能障碍、口干、糖尿病性酮症酸中毒、心血管疾病、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病、糖尿病性视网膜病、中风、肾衰竭和足溃疡；以及延迟了胰腺或胰岛细胞移植的需要。

[0006] 在其他实施方式中，所述受试者具有2型糖尿病的风险，所述方法用于限制所述受试者中的2型糖尿病的发展。在一个这样的实施方式中，所述受试者可具有2型糖尿病的一个或多个风险因素；所述风险因素包括但不限于肥胖、吸烟、久坐的生活方式、有2型糖尿病患者的父母或兄弟姐妹、糖尿病前期、有糖尿病前期患者的父母或兄弟姐妹、不良的饮食习惯(例如：脂肪过多、纤维不足、简单碳水化合物过多)、年龄50岁或以上、高血压、高胆固醇、睾酮缺乏、金属硫蛋白1A(MT1A) rs8052394位点(G改变)单核苷酸多态性，以及妊娠糖尿病史。

[0007] 在其他实施方式中，所述受试者为2型糖尿病的患者，所述方法用于治疗所述受试者的2型糖尿病。在一个这样的实施方式中，所述治疗可包括限制2型糖尿病的一种或多种

并发症并降低了对胰岛素或其他治疗的需要频率,所述并发症包括但不限于高血糖、低血糖、胰岛素抵抗、糖尿病肾病、糖尿病神经病变、糖尿病视网膜病变、蛋白尿、肾小球清除受损、糖尿病循环障碍、肾功能衰竭、心血管疾病、多尿、多饮、体重减轻、中风。

[0008] 在其他实施方式中,所述受试者为糖尿病前期患者,并且所述方法用于治疗所述受试者中的糖尿病前期。在一个这样的实施方式中,所述治疗可包括限制或减缓糖尿病前期的一种或多种并发症的进展,包括但不限于2型糖尿病、高血糖、胰岛素抵抗和/或心血管疾病。

[0009] 在一个实施方式中,所述受试者为葡萄糖耐量受损患者,所述方法用于治疗受试者的受损的葡萄糖耐量。在一个这样的实施方式中,所述治疗可包括限制或减缓糖耐量受损的一种多种并发症的进展,包括但不限于2型糖尿病、高血糖、胰岛素抵抗和/或心血管疾病。

[0010] 在进一步的实施方式中,所述受试者为肝炎患者,且所述方法用于治疗所述受试者的肝炎。在一个这样的实施方式中,所述治疗可包括限制或减缓肝炎的一种或多种并发症的进展,包括但不限于皮肤和/或眼睛白斑变黄、食欲差、呕吐、疲劳、腹痛、腹泻、急性肝衰竭、肝疤痕、肝衰竭和肝癌。

[0011] 在其他实施方式中,所述受试者为炎症性肝病,所述方法用于治疗所述受试者中的炎症性肝病。在一个这样的实施方式中,所述炎症性肝病包括非酒精性脂肪性肝炎(NASH)和/或非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)。在其他这样的实施方式中,所述治疗包括限制或减缓炎症性肝病的一种或多种并发症的进展;所述炎症性肝病并发症包括但不限于疲劳、不适、肝纤维化、肝癌和/或肝硬化。

[0012] 在一个实施方式中,所述细胞外人MT抑制剂可包括特异性结合到细胞外人MT的抗MT抗体或其抗原结合片段和/或适配子。在一个这样的实施方式中,所述细胞外人MT抑制剂包括抗MT抗体或其抗原结合片段。所述抗MT抗体或其抗原结合片段包括但不限于单克隆抗体或其抗原结合片段,人源化抗MT抗体或其抗原结合片段。

[0013] 在其他实施方式中,所述细胞外人MT抑制剂连接到胰腺或肝细胞靶向部分。在一个这样的实施方式中,胰腺细胞靶向部分可包括优先结合胰腺 β 细胞的一个或多个肽或其他部分,选自胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)、胰高血糖素样肽-2 (GLP-2)、肽YY (PYY)、神经肽Y (NPY)、胰肽 (PPY) 和exendin-4。在其他实施方式中,肝细胞靶向部分包括但不限于环子孢子蛋白 (CSP)、CSP区域I、CSP I plus、乳样化人血清白蛋白、糖基化脂蛋白和/或阿拉伯半乳聚糖。

[0014] 在一个实施方式中,所述受试者为哺乳动物包括但不限于人类受试者。

[0015] 在其他方面,本公开提供了一种组合物,包括:

[0016] (a) 细胞外人金属硫蛋白 (MT) 的抑制剂;

[0017] (b) 与细胞外人MT的抑制剂连接的胰腺或肝细胞靶向部分。

[0018] 在一个实施方式中,所述抑制剂包括特异性结合人金属硫蛋白 (MT) 的抗金属硫蛋白抗体或其片段,包括但不限于单克隆抗体和/或人源化抗体或其抗原结合片段。在其他实施方式中,所述细胞靶向部分为胰腺细胞靶向部分,所述胰腺细胞靶向部分例如选自胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)、胰高血糖素样肽-2 (GLP-2)、肽YY (PYY)、神经肽Y (NPY)、胰肽 (PPY) 和exendin-4。在其他实施方式中,所述细胞靶向部分是肝细胞靶向部分,可包括但不限于

环子孢子蛋白 (CSP)、CSP区域I、CSP I plus、乳糖样化人血清白蛋白、糖基化脂蛋白和/或阿拉伯半乳糖。

[0019] 在一个实施方式中,所述组合物包括重组多肽。在其他方面,本公开提供编码重组多肽的重组核酸,包含重组核酸的重组表达载体、包含重组表达载体的重组宿主细胞以及药物组合物,所述药物组合物包括 (a) 所述组合物、重组核酸和重组表达载体或本发明的重组宿主细胞;和 (b) 药学上可接受的载体。

[0020] 在其他实施方式中,本发明提供了组合物、重组核酸、包含重组表达载体的重组宿主细胞和所述药物组合物的用途,所述药物组合物包括本发明所述的组合物、重组核酸、重组表达载体、重组宿主细胞或药物,或者在此公开的任何实施方式或实施方式的组合中的用于治疗或限制疾病的发展的药物组合物,所述疾病选自糖尿病、糖尿病前期、糖耐量受损、肝炎和/或炎症性肝病。

[0021] 在其他实施方式中,细胞外人MT的抑制剂包括组合物、重组核酸、包含重组表达载体的重组宿主细胞和药物组合物,所述药物组合物是包括本公开所述组合物、重组核酸、重组表达载体、重组宿主的药物组合物,或者是在此公开的任何实施方式或实施方式组合的药物组合物。

附图说明

[0022] 图1示出了用MOPC21或UC1MT治疗过程结束时腹膜内注射葡萄糖的小鼠的葡萄糖耐量测试结果;

[0023] 图2示出了归一化到图1所示组中每只动物的初始测量值的葡萄糖耐量测试结果的变化;

[0024] 图3示出了通过qPCR研究显示MOPC21或UC1MT对附睾白色脂肪组织RNA表达水平的影响。UC1MT治疗对白色附睾脂肪组织的某些基因表达有影响(尤其是过氧化物酶体增殖物激活受体 γ -辅酶激活因子1- α (PGC-1 α),调节能量代谢的转录辅活化剂,以及过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR- α));

[0025] 图4示出了抗体治疗对脂肪组织重量的影响: (A) 组织重量占体重的百分比; (B) 组织重量(克)。注意附睾白色脂肪组织 (eWAT) 的变化。(BAT=棕色脂肪组织; sWAT=皮下白色脂肪组织);

[0026] 图5示出通过qPCR研究显示MOPC21或UC1MT对肝脏RNA表达水平的影响。与用MOPC21同种型匹配的对照抗体治疗的HFD小鼠相比,在高脂饮食治疗的小鼠中与UC1MT治疗相关的抗炎IL-10基因表达显著增加;

[0027] 图6示出用Thermo Fisher Triglycerides试剂盒(比色法)显示MOPC21或UC1MT对肝甘油三酸酯的影响。所示的是给予了10 UC1MT的饲喂16周的HFD的雄性小鼠的平均值和标准误差N=8 MOPC.*p=0.0453,采用双尾t检验;

[0028] 图7示出每日腹腔注射MOPC21或UC1MT(每只小鼠100u1,持续两周)对NOD小鼠30周后血糖水平的影响。UC1MT处理抑制NOD小鼠的T1D发展;

[0029] 图8示出小鼠腹腔注射UC1MT或MOPC21,100u1(每周两次)对小鼠第3周(A)和第6周(B)后血糖水平的影响。UC1MT处理可抑制NOD小鼠的T1D发展;

[0030] 图9示出MOPC21或UC1MT对炎症细胞向朗格汉斯胰岛浸润(胰岛素炎)的影响。

具体实施方式

[0031] 除非上下文另有明确说明,否则本文所使用的,单数形式的“一个”,“一种”和“该”包括复数指示物。除非另有明确说明,否则本文所用的“与”可与“或”互换使用。

[0032] 除非上下文另有明确说明,否则本公开的任何方面的所有实施方式都可以组合使用。

[0033] 除非上下文另有明确说明,否则在整个说明书和权利要求书中,“包括”,“包含”等词语应理解为包含性含义,而不是排他性或穷举性含义;也就是“包括但不限于”的意思。使用单数或复数的词也分别包括复数和单数。另外,当在本申请中使用,词语“在此”,“以上”和“以下”以及类似含义的词语应整体上指本发明,而不是本发明的任何特定部分。组合物及其使用方法可以“包括”,“基本上由……组成”或“由”说明书中公开的任何成分或步骤“组成”。

[0034] 本公开的実施方式的描述并非旨在穷举或将本公开限制为所公开的具体形式。尽管本文出于说明性目的描述了本公开的特定实施例和示例,但是如相关领域的技术人员将认识到的,在本公开的范围内可以进行各种等效修改。

[0035] 一方面,本发明提供了用于治疗或限制疾病发展的方法,所述疾病选自糖尿病、糖尿病前期、糖耐量受损、肝炎和/或炎症性肝病,所述方法包括对患有该疾病或有该疾病风险的个体施用有效治疗量的包含细胞外人金属硫蛋白(MT)抑制剂的组合物来治疗或限制疾病的发展。

[0036] 如以下实施例中公开的,细胞外人MT的抑制剂。其可用于治疗或限制糖尿病、糖尿病前期、葡萄糖耐量受损、肝炎和/或炎症性肝病的发展。

[0037] 如本发明所述的“有效治疗量”是指有效治疗和/或限制相关病症的组合物量。

[0038] 如本发明所述,人金属硫蛋白是指已在人中鉴定并归类为MT1至MT4的18种金属硫蛋白异构体及亚型异构体。在选择性表达MT3和MT4的地方,MT1和MT2在许多细胞类型中都是高诱导性的,可以从细胞中释放出来(Lynes等,2006,Laukens等,2009)。本公开的抑制剂具体靶向或结合释放的金属硫蛋白。示例性亚型包括但不限于;

[0039] Human MT1-A:

MDPNCSCATG GSCTCTGSCK CKECKCTSCK KSCCSCCPMS CAKCAQGCIC

[0040] **KGASEKCSCC A (SEQ ID NO:1)**

[0041] Human MT1-B

MDPNCSTTG GSCACAGSCK CKECKCTSCK KCCCSCCPVG CAKCAQGCVC

[0042] **KGSSEKCRCC A (SEQ ID NO:2)**

[0043] Human MT1-E

MDPNCSCATG GSCTCAGSCK CKECKCTSCK KSCCSCCPVG CAKCAQGCVC

[0044] **KGASEKCSCC A (SEQ ID NO:3)**

[0045] Human MT1_F

MDPNCSCAAG VSCTCAGSCK CKECKCTSCK KSCCSCCPVG CSKCAQGCVC

[0046] **KGASEKCSCC D (SEQ ID NO:4)**

[0047] Human MT1-G:

[0048] MDPNCSCAAA GVSCTCASSC KCKECKCTSC KKSCCSCCPV GCAKCAQGCI
CKGASEKCS CA (SEQ ID NO:5)

[0049] Human MT2:

[0050] MDPNCSCAAG DSCTCAGSCK CKECKCTSCK KSCCSCCPVG CAKCAQGCIC
KGASDKCSCC A (SEQ ID NO:6)

[0051] Human MT3:

[0052] MDPETPCPS GGSCTCADSC KCEGCKCTSC KKSCCSCCPA ECEKCAKDCV
CKGGEEAAEAE AEKCSCCQ (SEQ ID NO:7)

[0053] Human MT-4

[0054] MDPRECVCMS GGICMCGDNC KCTTCNCKTY WKSCCPCCPP GCAKCARGCI
CKGGSDKCS CP (SEQ ID NO:8)

[0055] 在一个实施方式中,本公开的抑制剂特异性地靶向或结合以释放MT1和/或MT2。

[0056] “特异性”或“选择性”结合金属硫蛋白是指一种结合反应,其决定了金属硫蛋白在蛋白质和其他生物制品的异质群体中的存在。因此,在指定的免疫测定或其他条件下,本发明的特定抗体或适配子与金属硫蛋白结合至少是本底的两倍,并且基本上不与样品中存在的金属硫蛋白以外的蛋白质大量结合。因此,在这种条件下与抗体或适配子的特异性结合可能涉及使用从抗体或适配子组成的组中选择的抑制剂,所述抗体或适配子因其对金属硫蛋白的特异性而被选择。

[0057] 在本文中,“抗体”包括与人MT发生免疫反应的免疫球蛋白分子(优选对人MT具有选择性,或对一种或多种人MT异构体具有选择性)或其片段,并包括单克隆抗体。存在多种抗体的同型,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4和其他Ig,例如IgM、IgA、IgE同种型。该术语还包括基因工程形式,例如嵌合抗体(例如,人源化的鼠抗体)和异源结合抗体(例如,双特异性抗体),完全人源化的抗体和人抗体。如在本申请通篇使用的,术语“抗体”包括具有抗原结合能力的片段(例如Fab', F(ab')₂, Fab, Fv和rIgG。另请参见《皮尔斯目录和手册》,1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)。另见,例如, Kuby, J., Immunology, 第三版, 弗里曼公司, 纽约(1998), 该术语还指重组单链Fv片段(scFv)。术语抗体还包括二价或双特异性分子、双抗体、三抗体和四抗体。二价和双特异性分子在例如Kostelny等人(1992)免疫学杂志148:1547, Pack和Pluckthun(1992)生物化学31:1579, Hollinger等, 1993, Gruber等, 同上(1994), 免疫学杂志:5368, Zhu等(1997), 蛋白质科学6:781, Hu等(1996), 癌症研究56:3055, Adams等(1993), 癌症研究.53:4026和McCartney等(1995)蛋白质工程.8:301中进行了描述。抗体可以包含异双功能抗体,例如,其抗MT的臂阻断MT功能,同时可以通过抗体的另一臂结合组织特异性决定簇而将MT稳定在特定位置。在一个实施方式中,抗体包括单克隆抗体。实施例通过使用示例性单克隆抗体UC1MT来展现本公开的方法,所述示例性单克隆抗体UC1MT描述于US 2003/0007973中并且可从马萨诸塞州剑桥市的Abcam Inc.商购。克隆UC1MT也已经由Lynes等人描述。(毒理学1993(85):161-177)。

[0058] 在一个实施方式中,本文所述方法中使用的抗体是人源化抗体。人源化抗体是指非人(例如鼠)抗体的形式,其是特异性的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其抗原结合片段,其包含衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。在大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中受体的互补决定区(CDR)的残基被非人物种(供体抗体)(例如小鼠,大

鼠或兔子)的CDR残基取代,所述非人物种具有所需特异性、亲和力和能力。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv构架区(FR)残基被相应的非人残基替代。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或导入的CDR或框架序列中均未发现的残基,但把这些残基纳入从而进一步完善和优化抗体性能。通常,人源化抗体将包含至少一个可变域的基本上全部,并且通常是两个可变域,其中所有或基本上所有的CDR区域对应于非人免疫球蛋白的CDR区域,并且所有或基本上所有的FR区域是人免疫球蛋白共有序列的序列。所述人源化抗体最佳地还将包含免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区或结构域(Fc)。抗体可具有如WO 99/58572中所述修饰的Fc区。其他形式的人源化抗体具有相对于原始抗体有所改变的一个或多个CDR(一个,两个,三个,四个,五个,六个),也称为一个或多个“源自”来源于原始抗体的一个或多个CDR的CDR。人源化抗体也可能涉及亲和力成熟。

[0059] 如本文所用,“治疗”是指在患有的一种或多种所述疾病的个体中完成以下一项或多项:(a)降低疾病的严重性;(b)限制或预防所治疗疾病特征性症状的发展;(c)抑制所治疗疾病特征性症状的恶化;(d)限制或预防先前患有疾病的患者的疾病复发;和/或(e)限制或预防先前有症状的患者的症状复发。任何量的这种“治疗”对所述的疾病之一的受试者都是非常有益的。

[0060] 如本发明所用,“限制”或“限制其发展”是指在处于一种或多种所述病症风险中的个体中完成以下一项或多项:(a)减慢疾病进展和/或(b)限制或预防症状特征的演进发展为疾病。任何量的这种“限制性发展”对于处于所述疾病之一风险中的受试者都是非常有益的。

[0061] 这种治疗或限制其发展可能包括使用细胞外MT抑制剂作为单独的治疗方法,或者可能包括使用其来补充或增强其他治疗干预措施,这在主治医师看来是适当的。

[0062] 在一个实施方式中,所述受试者为处于患糖尿病的风险中或糖尿病患者,并且所述方法用于治疗或限制糖尿病的发展。

[0063] 在一个这样的实施方式中,所述受试者处于1型糖尿病的风险中,并且所述方法用于限制受试者中1型糖尿病的发展。如以下实施例所示,人MT1抑制剂防止NOD小鼠模型发展为1型糖尿病。因此,该实施方式的方法可用于限制有T1D风险的受试者中1型糖尿病(T1D)的发展。限制T1D的发展可能包括但不限于减缓向T1D的进展和/或减缓T1D的特征性症状的发展。在该实施方式中,具有T1D危险的受试者具有一个或多个T1D风险因素,主治医师人员从中认为该治疗是适当的。此类T1D风险因素包括但不限于:有患有1型糖尿病的父母或兄弟姐妹、胰腺肿瘤、胰腺炎、胰岛细胞自身抗体、胰岛素自身抗体、谷氨酸脱羧酶自身抗体(GADA)、胰岛素瘤相关性(IA-2)自身抗体、锌转运蛋白自身抗体(ZnT8)和/或IDDM1基因的变体,所述IDDM1基因的变体选自DRB1 0401、DRB1 0402、DRB1 0405、DQA 0301、DQB1 0302和DQB1 0201。可选地或者以组合的方式,受试者可能表现出一种或多种T1D症状(但尚未被诊断为T1D);此类症状可能包括但不限于多尿(排尿增加)、烦渴(口渴增加)、口干、多食(饥饿增加)、疲劳和体重减轻。如本领域技术人员将理解的,对T1D的发展或其症状的任何限制为处于危险中的受试者提供了极大的益处。

[0064] 胰岛素依赖性(I型)糖尿病1(IDDM1)基因位于6号染色体上的MHC II类区域。该基因的某些变体增加了1型糖尿病组织相容性特征降低的风险。此类变体包括DRB1 0401、DRB1 0402、DRB1 0405、DQA 0301、DQB1 0302和DQB10201。同理,糖尿病相关自身抗体的出

现,例如胰岛细胞自身抗体、胰岛素自身抗体、谷氨酸脱羧酶自身抗体(GADA)、胰岛素瘤相关的(IA-2)自身抗体、锌转运蛋白自身抗体(ZnT8)的出现通常早于1型糖尿病在出现任何高血糖之前。T1D的风险会随抗体类型的增加而增加,婴幼儿从自身抗体出现到临床可诊断的T1D的时间间隔可能是几个月,但在某些人可能需要数年时间。这种自身抗体可以通过例如免疫荧光或结合分析(binding assays)来检测。

[0065] 在另一个实施方式中,所述受试者患有1型糖尿病,并且所述方法用于治疗所述受试者的1型糖尿病。在该实施方式中,已经诊断出受试者患有T1D,并且该方法可以用于治疗T1D。T1D涉及胰腺中 β 细胞的自身免疫破坏,很少甚至没有胰岛素产生以及高血糖症。因此,治疗T1D涉及向受试者施用胰岛素。患有T1D的受试者可能会出现症状或并发症,包括但不限于低血糖、多尿、多食、多饮、体重减轻、视力模糊、疲劳、伤口愈合能力下降、尿路感染、性功能障碍、口干、糖尿病性酮症酸中毒、心血管疾病、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病、糖尿病性视网膜病、中风、肾功能衰竭和足溃疡。在一些情况下,患有T1D的受试者可能需要胰腺或胰岛移植。因此,在各种实施方式中,治疗可包括以下一项或多项:减少对胰岛素注射需要的频率;减缓受试者的1型糖尿病并发症的发展或进程,所述1型糖尿病并发症包括但不限于胰岛 β 细胞的破坏、高血糖、低血糖、多尿、多食、多饮、体重减轻、视力模糊、疲劳、伤口愈合能力下降、尿路感染、性功能障碍、口干、糖尿病性酮症酸中毒、心血管疾病、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病、糖尿病性视网膜病、中风、肾衰竭和足溃疡;以及延迟了胰腺或胰岛细胞移植的需要。在一个实施方式中,所述治疗可包括降低血糖水平(mg/dL)10%、15%、20%或更多,例如在给予抑制剂后20~120分钟之内。

[0066] 在另一个实施方式中,所述受试者处于2型糖尿病的危险中,并且所述方法用于限制所述受试者的2型糖尿病(T2D)的发展。T2D是一种以高血糖、胰岛素抵抗和胰岛素相对缺乏为特征的代谢性疾病。症状和/或并发症包括但不限于低血糖症、胰岛素抵抗、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病、糖尿病性视网膜病、蛋白尿、肾小球间隙受损、糖尿病循环系统疾病、肾衰竭、心血管疾病、多尿症、多饮、体重减轻和中风。在一个实施方式中,2型糖尿病的局限性发展可包括例如在施用抑制剂后20~120分钟之内,所述治疗包括降低血糖水平(mg/dL)降低10%、15%、20%或更多,例如在施用抑制剂后20~120分钟之内。

[0067] 罹患T2D的风险因素包括但不限于肥胖、吸烟、久坐的生活方式、有患有2型糖尿病的父母或兄弟姐妹、糖尿病前期、患有糖尿病前期的父母或兄弟姐妹、不良的饮食习惯(例如:过多脂肪、纤维不足、简单的碳水化合物过多等)、50岁或以上、高血压、高胆固醇、睾丸激素缺乏症、金属硫蛋白1A(MT1A) rs8052394基因座(G改变)单核苷酸多态性以及妊娠糖尿病。因此,在各种实施方式中,受试者具有这些风险因素中的一种或多种,并且该方法用于减缓向T2D的进展和/或(b)限制或防止T2D特征性症状的发展。

[0068] 如以下实施例中所公开的,这些方法显著改善T2D小鼠模型中葡萄糖耐量。因此,在另一实施方式中,受试者患有T2D,并且该方法用于治疗受试者中的T2D。在该实施方式中,治疗可以包括限制2型糖尿病的一种或多种并发症以及降低胰岛素或其他疗法的频率,所述2型糖尿病并发症包括但不限于高血糖症、低血糖症、胰岛素抵抗、糖尿病性肾病、糖尿病性神经病、糖尿病性视网膜病、蛋白尿、肾小球清除率受损、糖尿病性循环系统疾病、肾脏衰竭、心血管疾病、多尿、多饮、体重减轻、中风。这些症状/并发症的任何程度的限制对患有T2D的受试者都是非常有益的。在一个实施方式中,所述治疗包括降低血糖水平(mg/dL)

10%、15%、20%或更多,例如,在施用抑制剂后20~120分钟之内。

[0069] 在另一个实施方式中,所述受试者患有糖尿病前期,并且所述方法用于治疗所述糖尿病前期的受试者。在该实施方式中,所述受试者是患有糖尿病前期的患者。如本文所用,“糖尿病前期”是指满足部分但非全部满足糖尿病诊断标准的状态。因此,糖尿病前期受试者可能:(a)空腹葡萄糖耐量受损,即 β 细胞对口服葡萄糖激发(OGT)的反应不足的病状,或者(b)空腹血糖(IFG)可能持续升高,即空腹血糖升高至高于正常水平,但不足以被归类为糖尿病的疾病。糖尿病前状态可能与胰岛素抵抗和心血管病理风险增加有关。具有糖尿病前状态的个体患T2D的风险相对较高。本公开的方法可用于治疗糖尿病前期患者,例如,通过限制或减缓糖尿病前期的一种或多种并发症的进展,包括但不限于T2D、高血糖、胰岛素抵抗,和/或心血管疾病。在一个实施方式中,治疗可包括血糖水平(mg/dL)降低10%、15%、20%或更多,例如,在施用抑制剂后20~120分钟内。

[0070] 在另一个实施方式中,受试者葡萄糖耐量受损,并且该方法用于治疗受试者的葡萄糖耐量受损。如本文所用,葡萄糖耐量受损的定义为在75克口服葡萄糖耐量测试中,两小时的葡萄糖水平为140至199mg/dL(7.8至11.0mmol/L)。当患者在2小时后血糖水平出现中度升高,但低于符合2型糖尿病标准的水平时,称其处于IGT状态。空腹血糖可能正常或轻度升高。糖耐量受损是糖尿病前期的高血糖状态,与胰岛素抵抗和心血管疾病风险增加有关。IGT可先于2型糖尿病多年。在本实施例中,所述治疗包括限制或减缓葡萄糖耐量受损的一种或多种并发症的进展,所述并发症包括但不限于2型糖尿病、高血糖、胰岛素抵抗和/或心血管疾病。在一个实施例中,治疗可包括血糖水平(mg/dL)降低10%、15%、20%或更多,例如,在施用抑制剂后20~120分钟内。

[0071] 在另一个实施方式中,所述受试者为肝炎患者,并且所述方法用于治疗所述受试者的肝炎。如以下实施例中所公开的,MT抑制剂可有效地限制组织炎症,并减少促炎细胞因子MCP-1和TNF- α ,同时增强肝脏组织中的抗炎IL-10信号。肝炎是肝脏组织的炎症。症状包括但不限于皮肤和眼睛白黄变色、食欲不振、呕吐、疲倦、腹痛、腹泻、急性肝功能衰竭、肝脏瘢痕形成、肝功能衰竭或肝癌。肝炎的最常见病因是病毒感染(A、B、C、D和E型)、大量饮酒、某些药物、毒素、其他感染、自身免疫性疾病和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。因此,在各种实施方式中,治疗可包括限制或减缓肝炎的一种或多种并发症的进展,包括但不限于皮肤和/或眼白黄变、食欲不振、呕吐、疲劳、腹痛、腹泻、急性肝衰竭、肝脏疤痕、肝衰竭和肝癌。

[0072] 在另一实施方式中,所述受试者为炎症性肝病患者,并且所述方法用于治疗所述受试者的炎症性肝病。如本文所用,“炎症性肝病”是一种由脂肪变性引起的肝细胞中甘油三酸酯脂肪胞浆内积累相关的病症(即,脂质在细胞内的异常滞留)。肝脏在全身代谢中起着重要作用,能量失衡尤其与肝脏脂质代谢的缺陷有关。具体而言,肥胖和胰岛素抵抗通常与非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)肝脏特征性脂质沉积增加有关。尽管脂质代谢是高度动态的,但慢性脂质超负荷会导致肝脏组织损伤,从而导致肝脏驻留和非驻留免疫细胞的募集,从而可能引起非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的纤维化。肝纤维化可导致肝硬化、癌症并显著增加罹患心血管疾病的风险。这增加了阻断免疫细胞向肝脏募集以降低非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)风险的潜力。如以下实施例所示,MT抑制剂治疗增加了附睾白色脂肪组织的湿组织重量,降低了总甘油三酯水平,还降低了促炎细胞因子MCP-1和TNF- α ,同时增强抗炎性IL-10信号。炎症性肝病可能是脂肪变性(非酒精性脂肪肝(NAFL))。在另一个实施方式中,

脂肪肝疾病可以是非酒精性脂肪肝疾病 (NAFLD), 包括但不限于非酒精性脂肪性肝炎 (NASH), 是NAFLD的最极端形式。NAFLD是一种炎症性肝病, 它是由于过量饮酒以外的原因导致脂肪沉积 (脂肪变性) 而发生的一种炎症性肝病。NASH和NAFLD的症状可能包括但不限于疲劳、全身乏力、右上腹部钝性不适、轻度黄疸和常规血液检查中肝功能检查异常; NASH和NAFLD的并发症可能包括但不限于肝纤维化, 肝癌和/或肝硬化。因此, 在一个实施方式中, 炎症性肝病包括非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 和/或非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD)。在另一个实施方式中, 所述治疗包括限制或减缓炎症性肝病的一种或多种并发症的进展, 所述炎症包括但不限于疲劳、不适、肝纤维化、肝癌和/或肝硬化。

[0073] 在一个实施方式中, MT抑制剂 (包括但不限于抗MT抗体) 可连接到胰腺细胞靶向部分, 以特异性靶向产生MT的胰腺细胞, 例如胰腺 β 细胞。本实施方式对于治疗或限制T1D、T2D、糖尿病前期和/或糖耐量受损的发展将是尤其有用的。在一个实施方式中, 胰腺细胞特异性靶向部分包含一个或多个优先结合胰腺 β 细胞的肽或其他部分, 包括但不限于胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)、胰高血糖素样肽-2 (GLP-2)、肽YY (PYY)、神经肽Y (NPY)、胰肽 (PPY) 和 exendin-4。

[0074] 胰高血糖素样肽1; (aa92-128)

[0075] **HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO:9)**

[0076] 胰高血糖素样肽2; GLP2 (aa146-178)

[0077] **HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD (SEQ ID NO:10)**

[0078] 胰肽 (PPY)

MAAARLCLSLLLLSTCVALLLQPLLGAQGAPLEPVYPGDNATPEQMAQY

[0079] **AADLRRYINMLTRPRYGKRHKEDTLAFSEWGSPHAAVPRELSPLDL (SEQ ID NO:11)**

[0080] 神经肽Y (NPY)

MLGNKRLGLSGLTLALSLLVCLGALAEAYPSKPDNPGEDAPAEDMARYY

[0081] **SALRHYINLITRQRYGKRSSPETLISDLLMRESTENVPRTRLEDPAW (SEQ ID NO:12)**

[0082] 肽YY (PYY)

MVFVRRPWPALTTVLLALLVCLGALVDAYPIKPEAPGEDASPEELNRYYA

[0083] **SLRHYLNLVTRQRYGKRDPDTLLSKTFFPDGEDRPVRSRSEGPDLW (SEQ ID NO:13)**

[0084] exendin-4

MKIILWLCVFGFLATLFPISWQMPVESGLSSEDSASSESFASKIKRHGEG

[0085] **TFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSG (SEQ ID NO:14)**

[0086] 胰腺细胞靶向部分与MT抑制剂 (包括但不限于MT抗体或其片段或适配子) 的连接可以通过任何能结合两个分子的化学反应来完成, 只要胰腺细胞靶向部分和MT抗体或其片段或适配子保留其各自的活性。在一个实施方式中, 其中所述胞外MT抑制剂包括抗体或其片段, 所述组合物包括重组融合蛋白。在其他实施方式中, 胰腺细胞靶向部分和MT抗体或其片段之间的连接可以包括许多化学机制, 例如共价结合、亲和力结合、嵌入、配位结合和络合。共价结合可以通过现有侧链的直接缩合或通过外部桥接分子的结合来实现。许多二价

或多价连接剂可用于将蛋白质分子(例如抗体)与其他分子偶联。例如,偶联剂的代表性的非限制性实例可以是有机化合物,例如硫酯、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、二异氰酸酯、戊二醛、重氮苯和六亚甲基二胺。

[0087] 在所有实施方式中,受试者可以是能从本公开提供的治疗方法中受益的任何受试者,包括哺乳动物、人、牛、狗、猫、马、鸡等。在一个实施方式中,受试者是人。

[0088] 通常将用于给药的组合物配制成包含药学上可接受的载体的药物组合物。能够形成药学上可接受的盐的合适的酸包括诸如盐酸、氢溴酸、高氯酸、硝酸、硫氰酸、硫酸和磷酸等的无机酸,以及诸如甲酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、邻氨基苯甲酸、肉桂酸、萘磺酸和磺胺酸等的有机酸。能够形成此类盐的合适碱包括诸如氢氧化钠、氢氧化铵和氢氧化钾等的无机碱,以及诸如单、二和三烷基胺和芳基胺(例如三乙胺、二异丙基胺、甲胺、二甲基胺等)和可选取代的乙醇胺(例如乙醇胺和二乙醇胺等)的有机碱。

[0089] 除组合物和载体外,药物组合物还可包括(a)冻干保护剂;(b)表面活性剂;(c)填充剂;(d)张力调节剂;(e)稳定剂;(f)防腐剂和/或(g)缓冲剂。在一些实施方式中,药物组合物中的缓冲剂为Tris缓冲剂、组氨酸缓冲剂、磷酸盐缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂或乙酸盐缓冲剂。所述药物组合物还可包括冻干保护剂,例如蔗糖、山梨糖醇或海藻糖。在某些实施方式中,药物组合物包含防腐剂,例如苯扎氯铵、苯乙酮、氯己定、苯酚、间甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯丁醇、邻甲酚、对甲酚、氯甲酚、硝酸苯汞、硫柳汞、苯甲酸及它们的各种混合物。在其他实施方式中,药物组合物包含填充剂,例如甘氨酸。在其他实施方式中,药物组合物包含表面活性剂,例如聚山梨酸酯-20、聚山梨酸酯-40、聚山梨酸酯-60、聚山梨酸酯-65、聚山梨酸酯-80、聚山梨酸酯-85、泊洛沙姆-188、脱水山梨醇单月桂酸酯、脱水山梨醇单棕榈酸酯、脱水山梨醇单硬脂酸酯、脱水山梨醇单油酸酯、脱水山梨糖醇三月桂酸酯、脱水山梨糖醇三硬脂酸酯、脱水山梨糖醇三油酸酯或它们的组合。药物组合物还包含张力调节剂,例如使制剂与人血基本等渗或等渗的化合物。示例性的张力调节剂包括蔗糖、山梨糖醇、甘氨酸、蛋氨酸、甘露糖醇、右旋糖、肌醇、氯化钠、精氨酸和精氨酸盐酸盐。在其他实施方式中,药物组合物还包含稳定剂,例如其是这样一种分子,当与基于蛋白质的组合物组合时该分子基本上防止或减少了冻干或液体形式的蛋白质的化学和/或物理不稳定性。示例性的稳定剂包括蔗糖、山梨糖醇、甘氨酸、肌醇、氯化钠、蛋氨酸、精氨酸和精氨酸盐酸盐。

[0090] 可以通过任何合适的途径给药,包括口服、胃肠外,通过吸入喷雾,直肠或局部,来施用剂量单位配方的组合物,所述剂量单位配方含有常规药学上可接受的载体、佐剂和赋形剂。本发明所用的术语肠胃外包括皮下、静脉内、动脉内、肌肉内、胸骨内、腱内、脊柱内、颅内、胸腔内、输注技术或腹膜内。可以调整剂量方案以提供最佳的期望反应(例如,治疗或预防反应)。合适的剂量范围可以是例如0.1 μ g/kg~100mg/kg体重;或者,可以为0.5 μ g/kg至50mg/kg;1 μ g/kg至25mg/kg体重,或5 μ g/kg至10mg/kg体重。所述组合物可以单次推注来递送,或者可以由主治医师人员确定来施用一次以上(例如2、3、4、5或更多次)。所述组合物可以是单独施用的治疗剂,或者可以与主治医师人员认为适当的一种或多种其他治疗剂(单独或组合)一起施用。在一个非限制性实施方式中,所述受试者患有T1D或处于T1D的风险中,并且所述抑制剂可以与胰岛素、二甲双胍或普兰林肽中的一种或多种一起使用。在另一

个实施方式中,所述受试者为T2D患者或者具有糖尿病前期和/或糖耐量异常的风险,并且所述抑制剂可以与二甲双胍、磺酰脲类(包括但不限于格列本脲,格列吡嗪,和格列美脲)、美格替尼(包括但不限于瑞格列奈和那格列奈)、噻唑烷二酮(包括但不限于罗格列酮和吡格列酮)、DPP-4抑制剂(包括但不限于西他列汀、沙格列汀和利那列汀)、GLP-1受体激动剂(包括但不限于艾塞那肽、利拉鲁肽和司马鲁肽)、SGLT2抑制剂(包括但不限于卡格列净、达帕格列净和恩帕格列净)或胰岛素中的一种或多种一起使用。在一个非限制性实施方式中,所述受试者患有肝炎或处于肝炎的风险,并且所述抑制剂可以与恩替卡韦、替诺福韦、拉米夫定、阿德福韦、替比夫定、西美普韦、索非布韦、干扰素或利巴韦林中的一种或多种联合使用。

[0091] 在另一个实施方式中,所提供的组合物包括:

[0092] (a) 细胞外人金属硫蛋白(MT)的抑制剂;

[0093] (b) 胰岛素、二甲双胍、普兰林肽、磺脲类药物(包括但不限于格列本脲,格列吡嗪和格列美脲)、美格替尼(包括但不限于瑞格列奈和那格列奈)和噻唑烷二酮(包括但不限于罗格列酮和吡格列酮)、DPP-4抑制剂(包括但不限于西他列汀、沙格列汀和利那列汀)、GLP-1受体激动剂(包括但不限于艾塞那肽、利拉鲁肽和司马鲁肽)、SGLT2抑制剂(包括但不限于卡格列净、达帕格列净和恩帕格列净)、恩替卡韦、替诺福韦、拉米夫定、阿德福韦、替比夫定、西美普韦、索非布韦、干扰素或利巴韦林中的一个或多个。例如,可以将组合物用于本公开的方法中。在一个实施方式中,所述抑制剂包括特异性结合人金属硫蛋白(MT)的抗金属硫蛋白抗体或其片段。以上公开的抗体的所有实施方式和实施方式的组合都适合包含在该方面的组合物中。在一个实施方式中,抗MT抗体或其抗原结合片段包括单克隆抗体或其抗原结合片段。在另一个实施方式中,抗MT抗体包括人源化抗MT抗体或其抗原结合片段。

[0094] 在另一方面,本发明提供了组合物,其包含:

[0095] (a) 细胞外人金属硫蛋白(MT)的抑制剂;

[0096] (b) 与细胞外人MT的抑制剂连接的胰腺或肝细胞靶向部分。

[0097] 例如,可以在本公开的方法中使用这些组合物。在一个实施方式中,抑制剂包括特异性结合人金属硫蛋白(MT)的抗金属硫蛋白抗体或其片段。以上所公开抗体的所有实施方式及实施方式的组合适合于包括在该方面的组合物中。在一个实施方式中,抗MT抗体或其抗原结合片段包括单克隆抗体或其抗原结合片段。在另一实施方式中,抗MT抗体包括人源化抗MT抗体或其抗原结合片段。

[0098] 在一个实施方式中,细胞靶向部分是肝细胞靶向部分。在示例性的此类实施方案中,其中肝细胞靶向部分包括但不限于环孢子蛋白(CSP)、CSP区域I、CSP区域I-plus、乳白的人血清白蛋白、糖基化脂蛋白和/或阿拉伯半乳糖。在一个实施方式中,肝细胞结合部分是肽或其肝细胞结合片段,所述肽选自CSP、CSP区域I、CSP区域I plus。CSP靶向到肝脏的疟原虫孢子,这是由于环孢子蛋白(CSP)存在于疟原虫孢子表面(Rathore D, et al. 生物化学杂志, 2005年; 280(21): 20524-20529)。CSP大约有400个氨基酸长,被组织成三个结构域: 包括一个名为“区域I”的保守KLKQP基序的N端结构域,一个高度重复的中心结构域,以及一个包含另一个名为“区域II”的保守序列的C端结构域(Singh等人, 细胞2007年; 131(3): 492-504)。除了保守区域I-KLKQP序列外, N-末端区域还包含区域I上游的两个共有硫酸肝素结合序列。包含保守区域I氨基酸和两个来自区域I上游的共有肝素结合序列的肽被

命名为“区域I-加区”(Prudêncio等人,自然评论微生物学,2006;4(11):849-856)。

[0099] 在另一个实施方式中,细胞靶向部分是胰腺细胞靶向部分,包括但不限于胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、胰高血糖素样肽-2(GLP-2)、肽YY(PYY)、神经肽Y(NPY)、胰肽(PPY)和exendin-4;此类肽的示例性氨基酸序列如上所述。

[0100] 可以使用任何将两个分子结合的化学反应来完成将细胞靶向部分与MT抑制剂(包括但不限于MT抗体或其片段或适配体)结合,只要细胞靶向部分和MT抗体或其片段或适配体保持它们各自的活性。在细胞外MT抑制剂包括抗体或其片段并且细胞靶向部分是肽的一个实施方式中,该组合物包括重组融合蛋白。在其他实施方式中,细胞靶向部分与MT抗体或其片段之间的连接可以包括许多化学机制,例如共价结合、亲和力结合、插层、配位结合和复合。共价结合可以通过现有侧链的直接缩合或通过外部桥接分子的结合来实现。许多二价或多价连接剂可用于将蛋白质分子(例如抗体)与其他分子偶联。例如,偶联剂的代表性的非限制性实例可以是有机化合物,例如硫酯、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、二异氰酸酯、戊二醛、重氮苯和六亚甲基二胺。

[0101] 在另一方面,本公开提供了编码与肽靶向部分融合的抗MT抗体或其片段的重组融合多肽的重组核酸,包括本文具体公开的那些。重组核酸序列可以包括单链或双链RNA或DNA及其衍生物。此类重组核酸序列可包括用于促进编码的蛋白的表达和/或纯化的附加序列,包括但不限于polyA序列、修饰的Kozak序列以及编码表位标签、输出信号和分泌信号、核定位信号的序列和质膜定位信号。

[0102] 在另一方面,公开了重组表达载体,其包括本发明的任何实施方式或实施方式的组合的重组核酸,操作性地连接到合适的控制序列。”重组表达载体”包括将核酸编码区或基因操作性地连接到能够影响基因产物表达的任何控制序列的载体。可操作地连接到本发明的核酸序列的“控制序列”是能够影响核酸分子表达的核酸序列。控制序列不必与核酸序列相邻,只要它们具有指导其表达的功能即可。因此,例如,在启动子序列和核酸序列之间可以存在插入的转录但未翻译的序列,并且启动子序列仍然可以被认为与编码序列“操作性地连接”。其他此类控制序列包括但不限于聚腺苷酸化信号、终止信号和核糖体结合位点。这种表达载体可以是任何类型,包括但不限于质粒和基于病毒的表达载体。表达载体可以作为附加体或整合到宿主染色体DNA中,在宿主生物体内可复制。在非限制性实施方式中,表达载体可包括质粒或病毒载体。

[0103] 在另一方面,本发明提供了包含所述的重组表达载体的重组宿主细胞,所述宿主细胞可以是原核或真核的,例如哺乳动物细胞。细胞可以被瞬时或稳定地转染。

[0104] 在另一实施方式中,公开了本发明所公开的任何实施方式或实施方式组合的组合物、重组核酸、重组表达载体、重组宿主细胞或药物组合物的用途,以治疗或限制疾病的发展,所述疾病包括糖尿病、糖尿病前期、糖耐量受损、肝炎和/或炎症性肝病。这些用途如上所述。

[0105] 在另一个实施方式中,本发明提供了通过向受试者施用有效量来治疗或限制疾病的发展的方法、在此公开的任何实施方式或事实方式的组合的重组核酸、重组表达载体、重组宿主细胞或药物组合物,所述疾病包括糖尿病、糖尿病前期、糖耐量受损、肝炎和/或炎症性肝病。

[0106] 实施例

[0107] UC1MT治疗2型糖尿病

[0108] 为了模拟II型糖尿病的胰岛素抵抗特征,我们给小鼠喂了高脂饮食(HFD)。在开始治疗之前,给5周龄的C57BL/6J小鼠喂食标准的60%高脂饮食14周。每周给小鼠IP注射两次100 μ L 1mg/mL的抗MT抗体(UC1MT;购自马萨诸塞州剑桥市的Abcam公司),历时8周,然后将小鼠在27周龄处死(总计22周HFD)。两个治疗组之间的体重或食物摄入量均无差异。图1示出了在用IgG1同种型对照(MOPC21)或UC1MT治疗的过程结束时腹膜内注射葡萄糖的小鼠的葡萄糖耐量测试的结果。图2示出了该组中每只动物的葡萄糖耐量试验结果的标准化变化。对照动物出现脂肪肝和葡萄糖不耐症,但是与对照相比,用UC1MT治疗的小鼠表现出更好的葡萄糖耐量。这些数据证明抗MT抗体可以用于治疗受损的葡萄糖耐量。由于葡萄糖耐量可以调节炎症状态,因此这些结果也表明UC1MT可以改善小鼠的炎症状况,从而提高HFD喂养的小鼠处理大量葡萄糖挑战的能力。

[0109] UC1MT或MOPC21处理的HFD喂养小鼠对NASH(非酒精性脂肪性肝炎)肝脏炎症的影响

[0110] 肝脏在全身代谢中起着重要作用,能量失衡尤其与肝脏脂质代谢的缺陷有关。具体而言,肥胖和胰岛素抵抗通常与非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的肝脏中脂质沉积增加有关(Katsiki N等,代谢,2016 PMID:27237577)。尽管脂质代谢是高度动态的(Sakaguchi M等人,细胞代谢,2017 PMID:28065828),但慢性脂质超负荷会导致肝脏组织损伤,从而导致肝脏驻留和非驻留免疫细胞的募集,从而可能引起非酒精性脂肪性肝炎的纤维化(NASH)(Narayanan S等人,免疫网络,2016 PMID:27340383)。肝纤维化可导致肝硬化、癌症,并显著增加罹患心血管疾病的风险。这增加了阻断免疫细胞向肝脏募集以降低非酒精性脂肪性肝(NAFLD)风险的潜力。

[0111] 通过qPCR研究评估mRNA表达,检查了上述2型糖尿病研究中相同的动物的肝表型。UC1MT治疗对白色附睾脂肪组织的某些基因表达有影响(特别是过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活物1- α (PGC-1 α),调节能量代谢的转录辅激活物以及过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR γ))(图3)。

[0112] 在处死动物时,收集肝脏、胰腺、鳞状白色脂肪组织、eWAT、肩胛内棕色脂肪组织和血清。每个样品的一半用于RNA,一半用于组织学(所有组织都固定在福尔马林中,胰腺用Z-FIXTM(Fisher Scientific)固定。数据表明,抗MT抗体的作用是:

- [0113] • 附睾白色脂肪组织的湿组织重量增加(图4A-B);
- [0114] • 肝脏中总甘油三酯水平降低(图6);
- [0115] • 某些促炎细胞因子(MCP-1和TNF- α)的表达降低(图5);
- [0116] • 抗炎性IL-10信号的表达增强(图5)。

[0117] 抗金属硫蛋白抗体不会改变高脂饮食治疗小鼠的体重或体重增加,也不会显著改变肝脏组织学。

[0118] 与上述改善的葡萄糖耐量一致,用抗MT抗体治疗的小鼠的肝甘油三酯水平降低。这些数据表明,MT抑制剂可以改善全身性葡萄糖代谢,从而可以减轻肝脏营养过剩的负担,并限制肝脂肪变性的发展。

[0119] 1型糖尿病研究

[0120] NOD/ShiLtJ小鼠品系(通常称为NOD)是自身免疫性1型糖尿病的多基因模型。NOD

小鼠的糖尿病的特征是高血糖和胰岛炎,即胰岛的白细胞浸润。大约12周龄的雌性大鼠胰腺胰岛素含量显著下降,而雄性大鼠则在数周后出现明显下降。0%的雌性和45%的雄性在30周后患糖尿病;雌性发病率中位数为17周。NOD背景中的免疫表型包括抗原呈递、T淋巴细胞库、NK细胞功能、巨噬细胞细胞因子产生、伤口愈合和C5补体缺陷。这些缺陷使NOD背景成为免疫缺陷小鼠品系的常见选择。

[0121] 我们将雌性NOD (非肥胖型糖尿病) 小鼠用于我们的1型DM预防研究,因为NOD小鼠自1980年被描述以来已经被发现自发发展为1型糖尿病。其致病性事件至少在出生后3周开始,在胰腺淋巴结中出现胰岛抗原。胰岛炎先是APC,然后是淋巴细胞,大约在4~6周龄开始,在接下来的15周内逐渐发展。BS>250mg/dL的弗兰克糖尿病在18至20周内开始。此外,NOD小鼠中自发性糖尿病的发病率在雌性中为60~80%,在雄性中为20~30%。因此,我们决定将NOD小鼠分为3组(每个治疗组10只):(1)用PBS进行阴性对照治疗;(2)用0.1mg/mL的非特异性IgG治疗;以MOPC作为同型对照;(3)每只小鼠每天腹膜内注射0.1mg/ml UC1MT,以研究抗MT单克隆抗体在T1型糖尿病中的潜在作用。每组从5周龄开始接受指定的治疗。总疗程为2周。每周检查一次血糖水平,处死连续2周血糖大于250mg/dL的小鼠。其余无糖尿病的NOD小鼠在30周龄时被处死。如图7和图8所示,与同型对照MOPC21或PBS载体对照组相比,抗MT抗体治疗显著减轻了用高脂饮食治疗的小鼠的葡萄糖耐受不良。UC1MT还导致胰岛素样炎症的明显减少(即:炎症细胞浸润胰岛)(图9)。

- <110> 康涅狄格大学
 麦克·A·莱内斯
 曾玉华
 马修·D·莱内斯
- <120> 治疗糖尿病、肝炎和/或炎症性肝病的方法
- <130> 17-1682-PCT
- <150> 62/618332
 <151> 2018-01-17
- <160> 14
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> 人
- <400> 1

[0001]

Met	Asp	Pro	Asn	Cys	Ser	Cys	Ala	Thr	Gly	Gly	Ser	Cys	Thr	Cys	Thr
1				5					10					15	
Gly	Ser	Cys	Lys	Cys	Lys	Glu	Cys	Lys	Cys	Thr	Ser	Cys	Lys	Lys	Ser
			20					25					30		
Cys	Cys	Ser	Cys	Cys	Pro	Met	Ser	Cys	Ala	Lys	Cys	Ala	Gln	Gly	Cys
			35				40					45			
Ile	Cys	Lys	Gly	Ala	Ser	Glu	Lys	Cys	Ser	Cys	Cys	Ala			
	50					55					60				

- <210> 2
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

Met	Asp	Pro	Asn	Cys	Ser	Cys	Thr	Thr	Gly	Gly	Ser	Cys	Ala	Cys	Ala
1				5					10					15	
Gly	Ser	Cys	Lys	Cys	Lys	Glu	Cys	Lys	Cys	Thr	Ser	Cys	Lys	Lys	Cys
			20					25					30		

Cys Cys Ser Cys Cys Pro Val Gly Cys Ala Lys Cys Ala Gln Gly Cys
35 40 45

Val Cys Lys Gly Ser Ser Glu Lys Cys Arg Cys Cys Ala
50 55 60

<210> 3
<211> 61
<212> PRT
<213> 人

<400> 3

Met Asp Pro Asn Cys Ser Cys Ala Thr Gly Gly Ser Cys Thr Cys Ala
1 5 10 15

Gly Ser Cys Lys Cys Lys Glu Cys Lys Cys Thr Ser Cys Lys Lys Ser
20 25 30

Cys Cys Ser Cys Cys Pro Val Gly Cys Ala Lys Cys Ala Gln Gly Cys
35 40 45

[0002] Val Cys Lys Gly Ala Ser Glu Lys Cys Ser Cys Cys Ala
50 55 60

<210> 4
<211> 61
<212> PRT
<213> 人

<400> 4

Met Asp Pro Asn Cys Ser Cys Ala Ala Gly Val Ser Cys Thr Cys Ala
1 5 10 15

Gly Ser Cys Lys Cys Lys Glu Cys Lys Cys Thr Ser Cys Lys Lys Ser
20 25 30

Cys Cys Ser Cys Cys Pro Val Gly Cys Ser Lys Cys Ala Gln Gly Cys
35 40 45

Val Cys Lys Gly Ala Ser Glu Lys Cys Ser Cys Cys Asp
50 55 60

<210> 5
<211> 62

<212> PRT

<213> 人

<400> 5

Met Asp Pro Asn Cys Ser Cys Ala Ala Ala Gly Val Ser Cys Thr Cys
 1 5 10 15

Ala Ser Ser Cys Lys Cys Lys Glu Cys Lys Cys Thr Ser Cys Lys Lys
 20 25 30

Ser Cys Cys Ser Cys Cys Pro Val Gly Cys Ala Lys Cys Ala Gln Gly
 35 40 45

Cys Ile Cys Lys Gly Ala Ser Glu Lys Cys Ser Cys Cys Ala
 50 55 60

<210> 6

<211> 61

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

[0003]

Met Asp Pro Asn Cys Ser Cys Ala Ala Gly Asp Ser Cys Thr Cys Ala
 1 5 10 15

Gly Ser Cys Lys Cys Lys Glu Cys Lys Cys Thr Ser Cys Lys Lys Ser
 20 25 30

Cys Cys Ser Cys Cys Pro Val Gly Cys Ala Lys Cys Ala Gln Gly Cys
 35 40 45

Ile Cys Lys Gly Ala Ser Asp Lys Cys Ser Cys Cys Ala
 50 55 60

<210> 7

<211> 68

<212> PRT

<213> 人

<400> 7

Met Asp Pro Glu Thr Cys Pro Cys Pro Ser Gly Gly Ser Cys Thr Cys
 1 5 10 15

Ala Asp Ser Cys Lys Cys Glu Gly Cys Lys Cys Thr Ser Cys Lys Lys

	20	25	30
	Ser Cys Cys Ser Cys Cys Pro Ala Glu Cys Glu Lys Cys Ala Lys Asp 35 40 45		
	Cys Val Cys Lys Gly Gly Glu Ala Ala Glu Ala Glu Ala Glu Lys Cys 50 55 60		
	Ser Cys Cys Gln 65		
	<210> 8 <211> 62 <212> PRT <213> 人		
	<400> 8		
	Met Asp Pro Arg Glu Cys Val Cys Met Ser Gly Gly Ile Cys Met Cys 1 5 10 15		
[0004]	Gly Asp Asn Cys Lys Cys Thr Thr Cys Asn Cys Lys Thr Tyr Trp Lys 20 25 30		
	Ser Cys Cys Pro Cys Cys Pro Pro Gly Cys Ala Lys Cys Ala Arg Gly 35 40 45		
	Cys Ile Cys Lys Gly Gly Ser Asp Lys Cys Ser Cys Cys Pro 50 55 60		
	<210> 9 <211> 37 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 人工合成		
	<400> 9		
	His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val 1 5 10 15		
	Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu 20 25 30		

Val Lys Gly Arg Gly
35

<210> 10
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成

<400> 10

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp

[0005] <210> 11
<211> 95
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成

<400> 11

Met Ala Ala Ala Arg Leu Cys Leu Ser Leu Leu Leu Leu Ser Thr Cys
1 5 10 15

Val Ala Leu Leu Leu Gln Pro Leu Leu Gly Ala Gln Gly Ala Pro Leu
20 25 30

Glu Pro Val Tyr Pro Gly Asp Asn Ala Thr Pro Glu Gln Met Ala Gln
35 40 45

Tyr Ala Ala Asp Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg
50 55 60

Tyr Gly Lys Arg His Lys Glu Asp Thr Leu Ala Phe Ser Glu Trp Gly
65 70 75 80

Ser Pro His Ala Ala Val Pro Arg Glu Leu Ser Pro Leu Asp Leu
85 90 95

<210> 12
<211> 97
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成

<400> 12

Met Leu Gly Asn Lys Arg Leu Gly Leu Ser Gly Leu Thr Leu Ala Leu
1 5 10 15

Ser Leu Leu Val Cys Leu Gly Ala Leu Ala Glu Ala Tyr Pro Ser Lys
20 25 30

Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp Met Ala Arg Tyr
35 40 45

[0006] Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
50 55 60

Gly Lys Arg Ser Ser Pro Glu Thr Leu Ile Ser Asp Leu Leu Met Arg
65 70 75 80

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

Trp

<210> 13
<211> 97
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工合成

<400> 13

Met Val Phe Val Arg Arg Pro Trp Pro Ala Leu Thr Thr Val Leu Leu
1 5 10 15

Ala Leu Leu Val Cys Leu Gly Ala Leu Val Asp Ala Tyr Pro Ile Lys
20 25 30

Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr
35 40 45

Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
50 55 60

Gly Lys Arg Asp Gly Pro Asp Thr Leu Leu Ser Lys Thr Phe Phe Pro
65 70 75 80

Asp Gly Glu Asp Arg Pro Val Arg Ser Arg Ser Glu Gly Pro Asp Leu
85 90 95

Trp

<210> 14
<211> 87
<212> PRT
<213> 人工序列

[0007]

<220>
<223> 人工合成

<400> 14

Met Lys Ile Ile Leu Trp Leu Cys Val Phe Gly Leu Phe Leu Ala Thr
1 5 10 15

Leu Phe Pro Ile Ser Trp Gln Met Pro Val Glu Ser Gly Leu Ser Ser
20 25 30

Glu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Ser Phe Ala Ser Lys Ile Lys Arg His
35 40 45

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu
50 55 60

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser
65 70 75 80

Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly
85

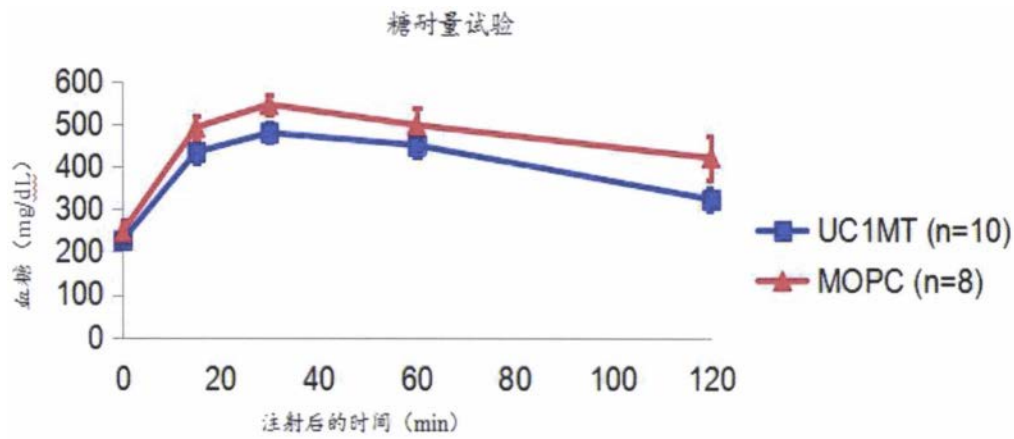


图1

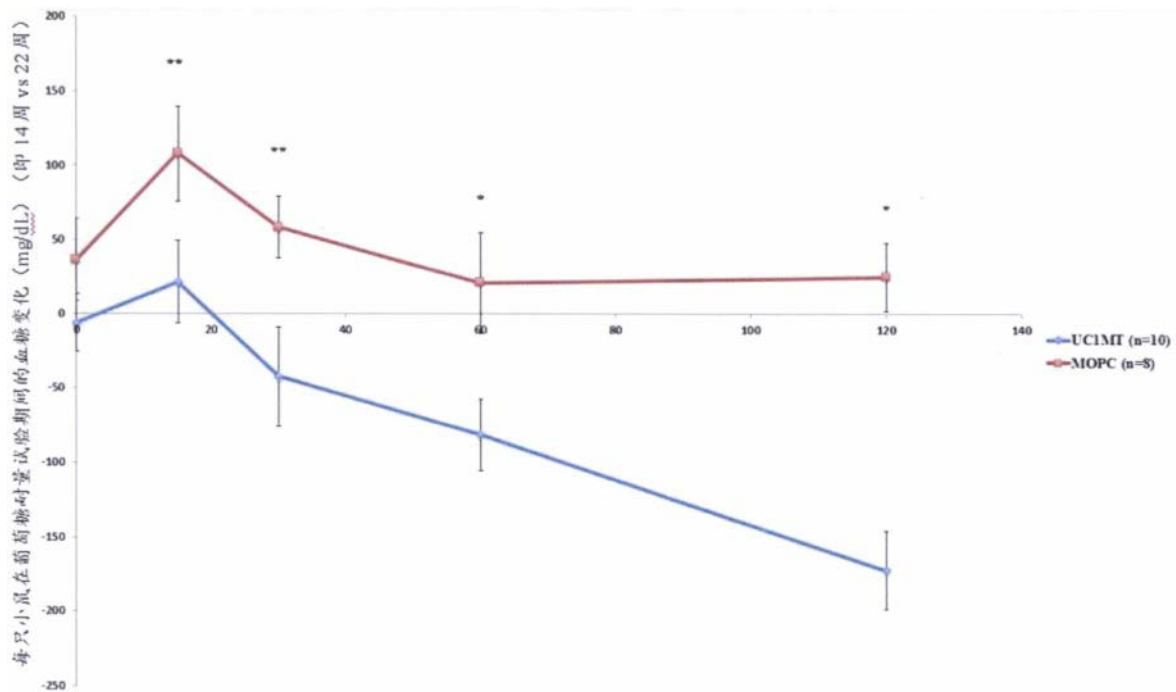


图2

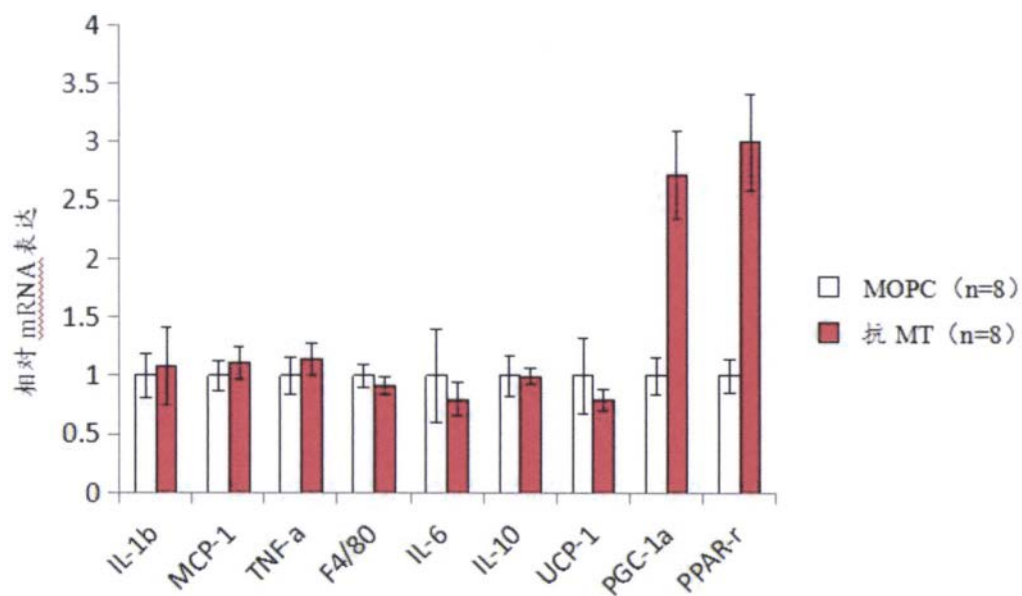


图3

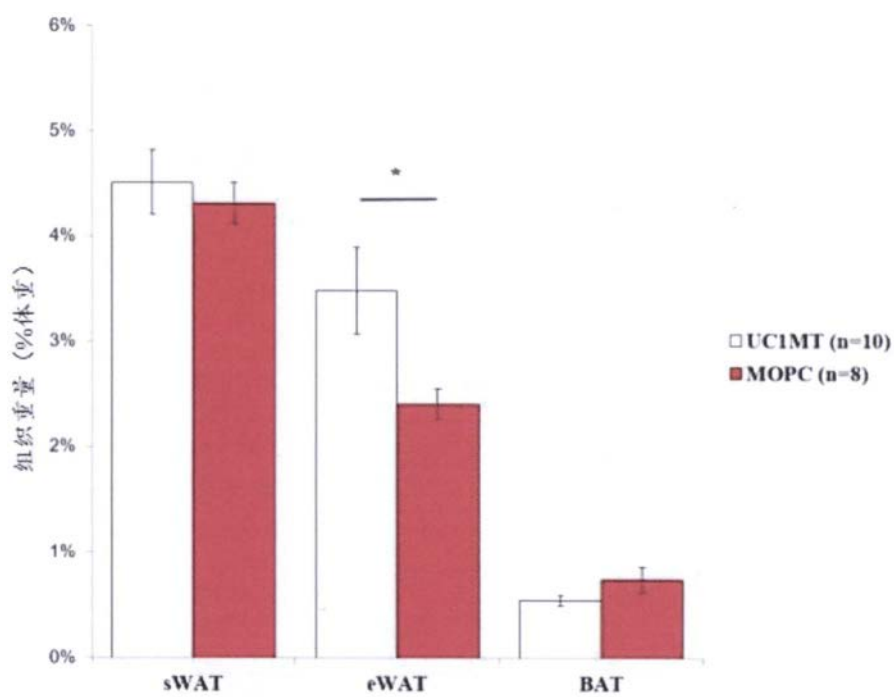


图4A

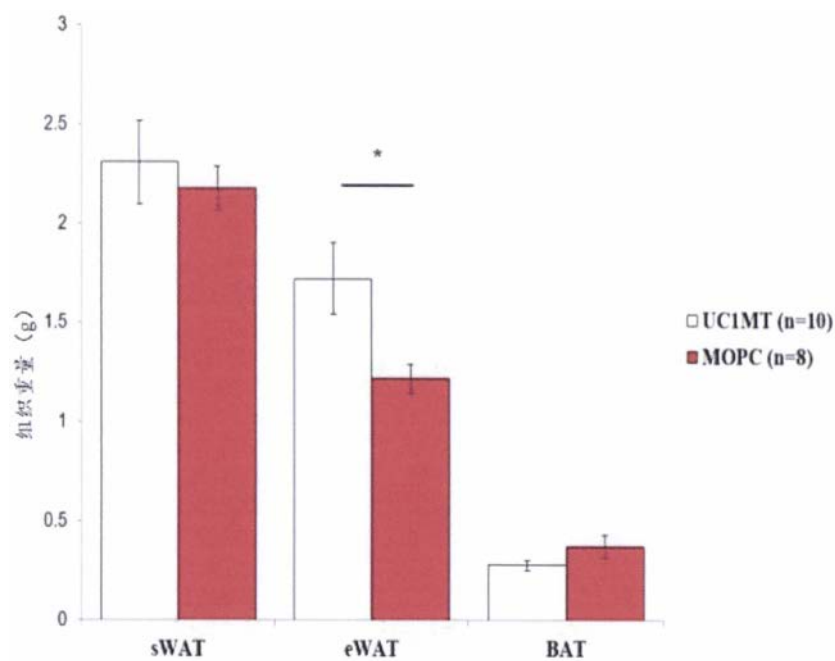


图4B

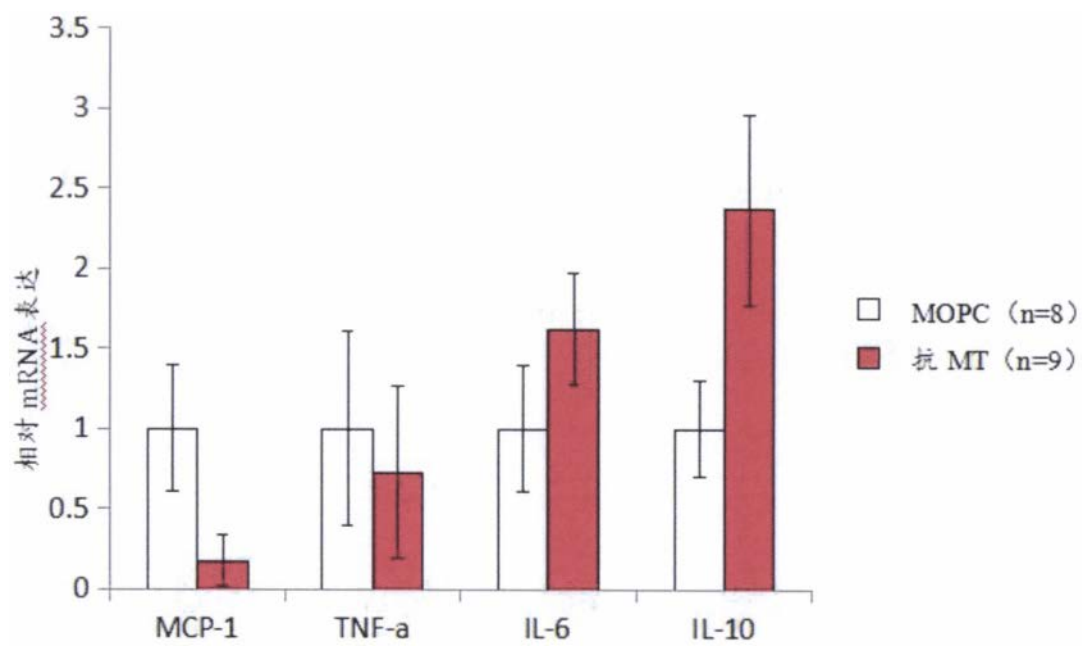


图5

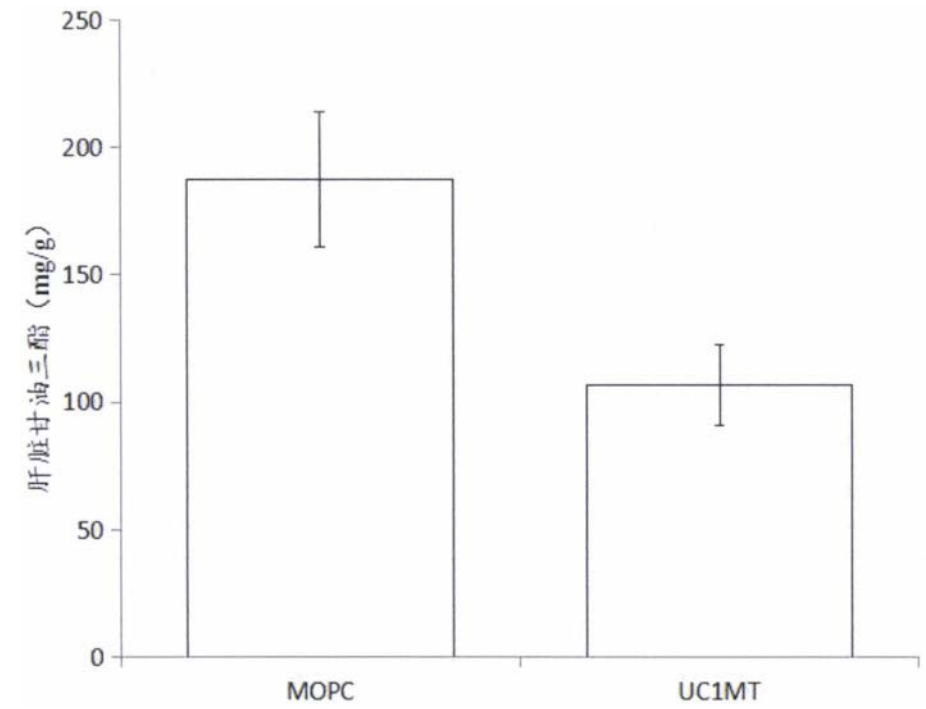


图6

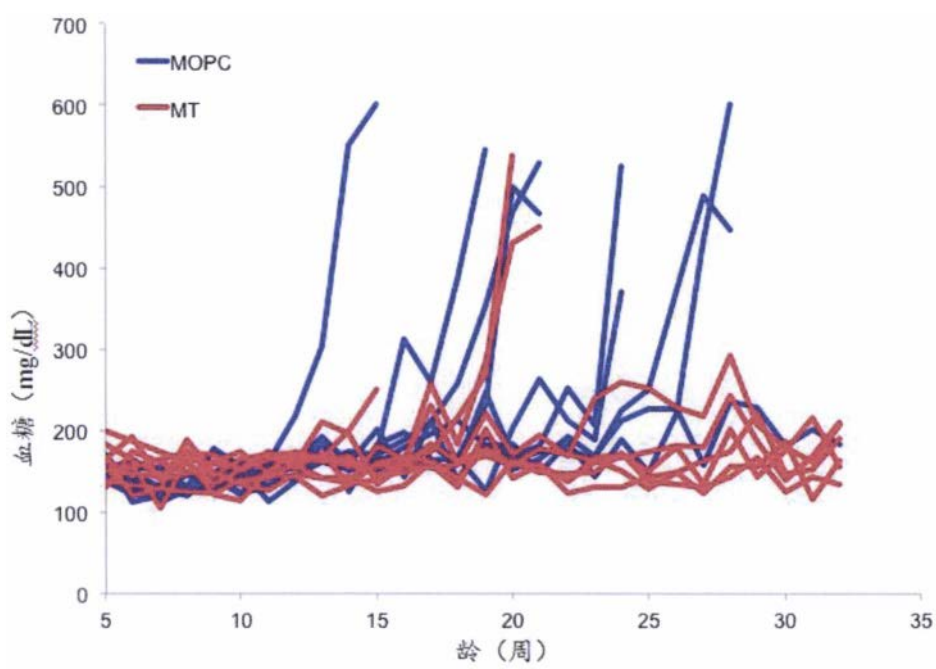


图7

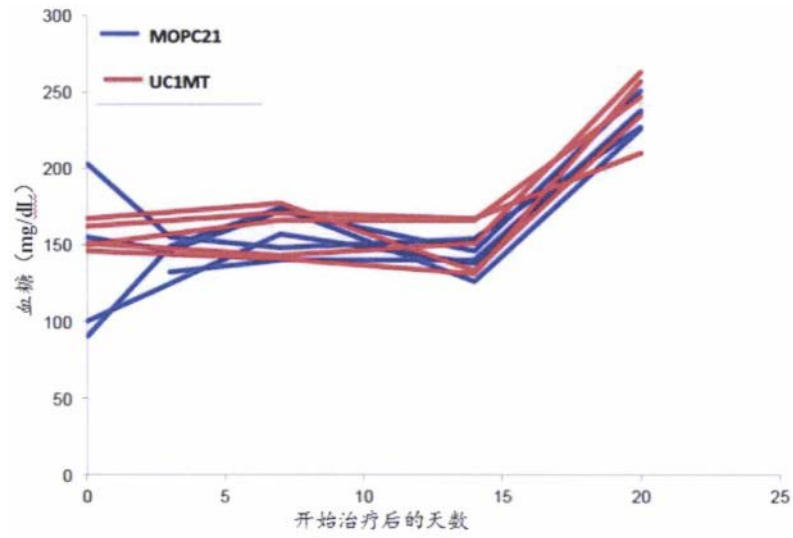


图8A

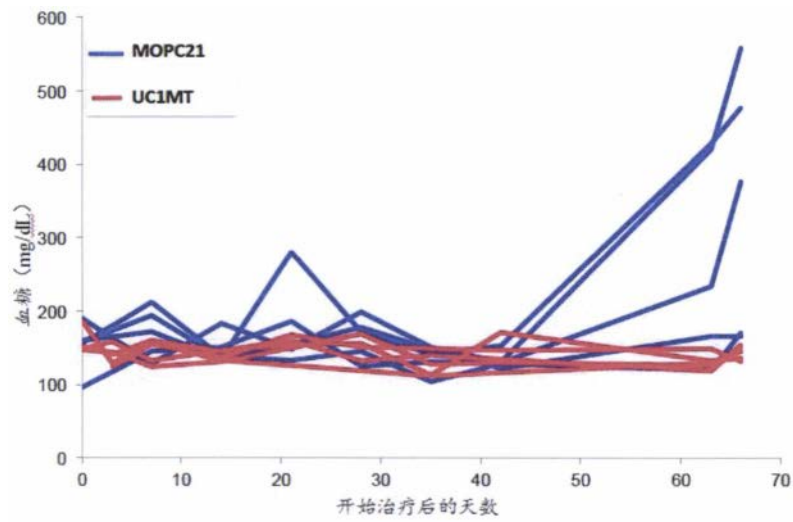


图8B

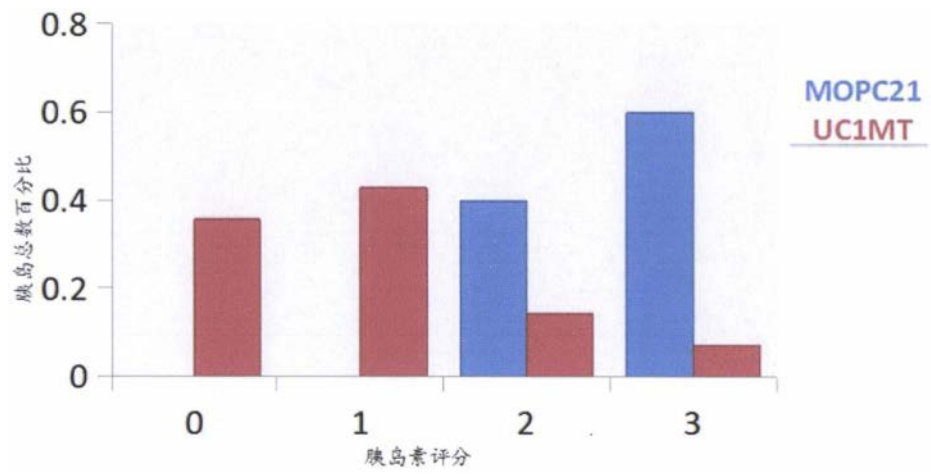


图9