



(10) 授权公告号 CN 110536692 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 14

(21) 申请号 201880026184.5
(22) 申请日 2018.03.13
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 110536692 A
(43) 申请公布日 2019.12.03
(30) 优先权数据
 10-2017-0033742 2017.03.17 KR
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2019.10.18
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/KR2018/002933 2018.03.13
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02018/169282 KO 2018.09.20
(73) 专利权人 美迪引擎
 地址 韩国首尔
(72) 发明人 金贤珠
(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
 专利代理师 陈桢

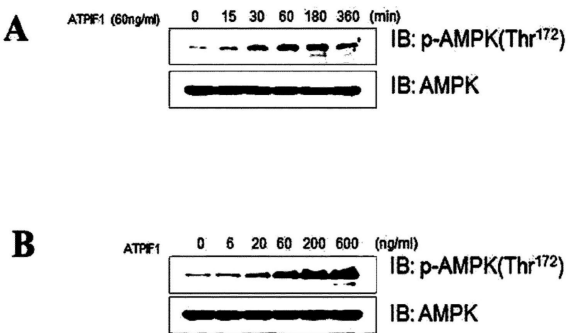
(51) Int.Cl.
 A61K 38/16 (2006.01)
 A61K 38/28 (2006.01)
(56) 对比文件
 US 2004/0072739 A1,2004.04.15
 US 2015065556 A1,2015.03.05
 Genoux,A.等.Mitochondrial Inhibitory
Factor 1 (IF1) Is Present in Human Serum
and Is Positively Correlated with HDL-
Cholesterol.《PLOS ONE》.2011,第e23949号文
章.
 NAKAMURA,J.等.IF1, a natural
inhibitor of mitochondrial ATP synthase,
is not essential for the normal growth
and breeding of mice.《Biosci. Rep.》.2013,
第e00067号文章.

审查员 李影

权利要求书1页 说明书14页
序列表2页 附图7页

(54) 发明名称
 用于治疗糖尿病的含有ATPIF1的药物组合物

(57) 摘要
 本发明涉及用于预防或治疗糖尿病或糖尿病并发症的含有ATP酶抑制剂因子1 (ATPIF1) 作为活性成分的药物组合物,并且涉及用于预防或治疗肥胖症的含有ATPIF1作为活性成分的药物组合物.根据本发明的含有ATPIF1的组合物通过促进肌肉细胞中的糖吸收和改善胰岛素敏感性而具有糖尿病治疗作用,并且通过阻抑脂肪细胞中的脂肪合成和促进脂肪细胞的褐变的作用而具有肥胖症预防或治疗作用。



1. ATP1F1 (ATP酶抑制剂因子1) 在制备用于预防或治疗糖尿病或糖尿病并发症的药物中的用途, 其中所述药物进一步包含胰岛素或胰岛素类似物。
2. 根据权利要求1的用途, 其中所述糖尿病是1型糖尿病或初发2型糖尿病。
3. 根据权利要求1的用途, 其中所述糖尿病并发症包括选自糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变、高脂血症和脂肪肝的至少一种。
4. 根据权利要求1的用途, 其中所述ATP1F1 (ATP酶抑制剂因子1) 促进胰岛素敏感性。
5. ATP1F1 (ATP酶抑制剂因子1) 在制备用于预防或治疗肥胖症的药物中的用途。

用于治疗糖尿病的含有ATPIF1的药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于预防或治疗糖尿病或糖尿病并发症的含有ATP酶抑制剂因子1 (ATPIF1) 作为活性成分的药物组合物, 和用于预防或治疗肥胖症的含有ATPIF1作为活性成分的药物组合物。

背景技术

[0002] 已知肌肉充当支撑人体结构的骨架并且并通过其收缩和放松而参与动作(运动), 但是最近已知其还起到内分泌器官的作用。在20世纪80年代中期, 发现脂肪组织是新的内分泌器官, 从脂肪组织分泌的物质被称为“脂肪因子”, 并且目前已知的脂肪因子包括瘦素、脂联素、抵抗素等。已经发现脂肪因子具有多种功能, 不仅包括与脂肪合成有关的功能, 而且还包括与免疫、代谢、神经和癌症有关的功能。最近, 发现当骨骼肌收缩时分泌某种物质, 并且这种物质被鉴定为肌肉因子(myokine), 其曾经被称为“运动因子”。许多类型的肌肉因子被认为是用于疾病研究的新的靶物质(Whitham M, 等人, Nat Rev Drug Discov. 15:719-29, 2016; Lightfoot AP, 等人, Curr. Opin. Rheumatol., 28:661, 2016)。

[0003] 同时, 世界卫生组织(WHO)已经观察到, 伴随多种疾病(如糖尿病、肥胖症、高血压、高脂血症和动脉粥样硬化)的代谢综合征是现代社会的死因。迄今为止, 尚未建立治疗和控制代谢综合征的方法, 并且最近的研究表明, 缺乏运动是糖尿病和肥胖症的最重要的病理生理原因。因此, 全面的治疗需要对参与运动的肌肉收缩和分泌的物质有基本的了解。因此, 预期对肌肉因子(肌肉分泌的物质)的研究不仅能够解决当前的医学问题, 而且还能够引起巨大的经济、工业和技术涟漪效应。

[0004] 根据美国药物开发协会(American Drug Development Association)2015年的报告, 正在开发针对多于200个靶标的与代谢综合征相关的新药物, 并且考虑到当前全球竞争性研究趋势, 肌肉因子是药物开发的潜在靶标。对肌肉因子的研究已知由Amrad、Genvec、Novartis和美国西北大学进行。

[0005] 与外国集中于基于作用机制开发靶标不同, 韩国缺乏基础研究结果, 并且医疗行业应用结果不足。近来, 在一些实验室中已经进行了关于肌肉因子的研究, 并且已经取得了一些研究成果, 但是没有研究来尝试开发新药物。

[0006] 因此, 本发明人付出巨大的努力来寻找具有控制脂肪细胞中葡萄糖摄取和脂肪代谢的功能的肌肉因子。作为结果, 本发明人已经发现, 是已知抑制肌肉细胞中线粒体ATP合成的蛋白质的ATP酶抑制剂因子(ATPIF1)能够控制肌肉细胞中的葡萄糖和脂肪细胞中的脂肪代谢。基于该发现, 完成本发明。

发明内容

[0007] 因此, 本发明的一个目的是提供用于预防或治疗糖尿病或糖尿病并发症的含有具有调节葡萄糖摄取的功能的肌肉因子的组合物。

[0008] 本发明的另一个目的是提供用于预防或治疗肥胖症的含有具有调节脂肪细胞中

脂肪代谢的功能的肌肉因子的组合物。

[0009] 根据本发明的一个方面,上述和其他目的可以通过提供用于预防或治疗糖尿病或糖尿病并发症的含有ATPIF1(ATP酶抑制剂因子1)作为活性成分的药物组合物来实现。

[0010] 根据本发明的另一个方面,提供了预防或治疗糖尿病或糖尿病并发症的方法,包括给予ATPIF1(ATP酶抑制剂因子1)。

[0011] 根据本发明的另一个方面,提供了ATPIF1(ATP酶抑制剂因子1)用于预防或治疗糖尿病或糖尿病并发症的用途。

[0012] 根据本发明的另一个方面,提供了ATPIF1(ATP酶抑制剂因子1)用于制备用于治疗或预防糖尿病或糖尿病并发症的药物的用途。

[0013] 根据本发明的另一个方面,提供了用于预防或治疗肥胖症的含有ATPIF1(ATP酶抑制剂因子1)作为活性成分的药物组合物。

[0014] 根据本发明的另一个方面,提供了用于预防或治疗肥胖症的方法,包括给予ATPIF1(ATP酶抑制剂因子1)。

[0015] 根据本发明的另一个方面,提供了ATPIF1(ATP酶抑制剂因子1)用于预防或治疗肥胖症的用途。

[0016] 根据本发明的另一个方面,提供了ATPIF1(ATP酶抑制剂因子1)用于制备用于治疗或预防肥胖症的药物的用途。

附图说明

[0017] 图1显示了蛋白质印迹结果,其显示了在C2C12骨骼肌细胞系中由ATPIF1引起的AMPK磷酸化的增加。

[0018] 图2显示了蛋白质印迹结果,其显示了在肌肉细胞系中由ATPIF1引起的Akt磷酸化的增加。

[0019] 图3显示了蛋白质印迹结果,其显示了在肌肉细胞系中由ATPIF1引起的Glut4蛋白表达的增加。

[0020] 图4显示了蛋白质印迹结果,其显示了在肌肉细胞系中由ATPIF1引起的Glut4mRNA表达的增加。

[0021] 图5显示了蛋白质印迹结果,其显示了在肌肉细胞系中由ATPIF1引起的葡萄糖摄取的增加。

[0022] 图6显示了蛋白质印迹结果,其显示了在肌肉细胞系中ATPIF1作为胰岛素增敏剂的功能。

[0023] 图7显示了蛋白质印迹结果,其显示了在脂肪细胞中ATPIF1的ACC磷酸化和UCP1激活。

[0024] 图8显示了如下结果,其显示了在小鼠运动过程中血液中ATPIF1浓度的变化。

[0025] 图9显示了在向2型糖尿病模型dbdb小鼠腹膜内给予重组ATPIF1蛋白一个月后进行的GTT(葡萄糖耐量测试)的结果。

具体实施方式

[0026] 除非另外定义,本文所用的全部技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人

员所理解的意义相同的意义。通常,本文所用的命名法在本领域中为公知的并且为通常使用的。

[0027] ATPIF1被认为在 α - β 界面与ATP酶结合以与ATP酶形成一对一的复合物,这阻止了ATP的释放,从而抑制ATP的合成(van Raaij MJ等人,Biochemistry.35:15618,1996)。ATPIF1具有两个低聚二聚体(活性状态)和四聚体,并通过在低pH下两个单体的C末端区域之间反向平行的卷曲螺旋相互作用形成二聚体。在高pH值下,抑制剂通过包括N末端和抑制区域在内的卷曲螺旋相互作用形成四聚体和更高阶低聚体,从而阻抑抑制活性(Cabazon E等人,J.Biol.Chem.277:41334,2002)。

[0028] ATPIF1(ATP酶抑制剂因子1)是具有抑制线粒体ATP合成功能的蛋白质。本发明首先鉴定了ATPIF1具有控制肌肉细胞中的葡萄糖和脂肪细胞中的脂肪代谢的功能。在本发明中,通过实验比较AMPK(AMPK激活的蛋白质激酶)的磷酸化水平、Akt(其是胰岛素信号下游物质)的磷酸化、Glut4蛋白和mRNA的表达以及使用同位素的葡萄糖摄取,以证明在肌肉细胞系中ATPIF1的血糖控制机制。另外,对UCP1(解偶联蛋白1)(乙酰基-CoA羧化酶(ACC)的磷酸化和脂肪褐变的标记基因)进行实验,以研究在脂肪细胞系中ATPIF1与脂肪合成的关联。

[0029] 实验鉴定了ATPIF1通过增加肌肉细胞中AMPK和Akt的活性而表现出血糖控制作用,并且还具有作为如下药物(制剂)的适用性,所述药物能够通过表现出作为可以克服胰岛素耐受性的胰岛素增敏剂的功能而克服2型糖尿病。

[0030] 因此,在一个方面,本发明涉及用于预防或治疗糖尿病或糖尿病并发症的含有ATPIF1(ATP酶抑制剂因子1)作为活性成分的药物组合物。

[0031] 迄今为止,参与血糖控制的主要蛋白质包括Akt、AS(Akt底物)160、PKC ζ 等,并且已知主要作用于葡萄糖转运蛋白的转运。另外,与葡萄糖、尿等分子水平的发生机制相关的疾病被认为是由受体后过程的异常、特别是蛋白质之间通过磷酸肌醇-3激酶(PI-3激酶)的信号传导的异常引起,而不是由胰岛素受体的缺陷引起。因此,重要的是发现与血糖控制有关的新的靶蛋白并鉴定其分子机制,因为胰岛素对糖尿病的治疗作用是有限的。

[0032] 在本发明中,糖尿病可以是1型糖尿病或初发2型糖尿病,并且糖尿病并发症可以是糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变、高脂血症、脂肪肝等。

[0033] 在本发明中,ATPIF1(ATP酶抑制剂因子1,SEQ ID NO:1)可以促进胰岛素敏感性。因此,本发明可以进一步包括胰岛素或胰岛素类似物。

[0034] 在另一个方面,本发明涉及预防或治疗糖尿病或糖尿病并发症的方法,包括给予ATPIF1(ATP酶抑制剂因子1)。

[0035] 在另一个方面,本发明涉及ATPIF1(ATP酶抑制剂因子1)用于治疗或预防糖尿病或糖尿病并发症的用途。

[0036] 在另一个方面,本发明涉及ATPIF1(ATP酶抑制剂因子1)用于制备用于治疗或预防糖尿病或糖尿病并发症的药物的用途。

[0037] 如本文所用,术语“糖尿病”意指涉及胰岛素分泌不足、胰岛素功能障碍等的代谢疾病。通过向受试者共给予本发明的组合物,可以通过控制血糖来治疗糖尿病。

[0038] 如本文所用,术语“预防”是指通过共给予本发明的组合物预防或延迟糖尿病的任何动作,并且如本文所用,术语“治疗”是指通过共给予本发明的组合物改善或积极地改变糖尿病的症状的任何动作。糖尿病治疗适用于可能患有糖尿病的任何哺乳动物,包括但不

限于人和灵长类动物以及家畜(如牛、猪、绵羊、马、狗和猫),但优选人。

[0039] 如本文所用,术语“给予”是指通过任何适当的方法将根据本发明的药物组合物引入受试者中的动作,并且组合物的给予途径可以是任何一般途径,只要所述途径能够将组合物递送至靶组织。药物组合物可以腹膜内、静脉内、肌肉内、皮下、皮内、口服、局部、鼻内、肺内或直肠内给予,但不限于此。在口服给予时,肽被消化,因此口服组合物可以用活性药物包被或可以进行配制以保护所述口服组合物在胃中不降解。

[0040] 优选地,组合物可以以注射剂的形式给予。另外,可以通过能够将活性物质递送至靶细胞的任何装置来给予可持续制剂。

[0041] 另外,本发明的药物组合物是根据药物的类型、活性成分是什么以及各种相关因素(如待治疗的疾病,给予途径,患者的年龄、性别和体重,以及疾病的严重程度)来确定。

[0042] 在本发明中,胰岛素包括具有胰岛素受体刺激活性的任何肽和经修饰的肽,例如胰岛素类似物或其片段,其中天然胰岛素、速效胰岛素、基础胰岛素和天然胰岛素中的一些氨基酸通过取代、添加、缺失和修饰中的任何一种方法或其组合而改变。另外,在本发明中,胰岛素可以是应用了持续技术以克服其短半衰期的持续性胰岛素。优选地,胰岛素是可以每周给予一次的持续性胰岛素或持续性胰岛素类似物。根据本发明的胰岛素的一些特定例子包括在韩国专利号10-1058290和韩国专利申请号10-2014-0022909和10-2014-0006938中描述的胰岛素或胰岛素类似物及其持续形式,但是本发明的胰岛素的范围不限于此。

[0043] 如本文所用,术语“胰岛素类似物”意指在天然(完整)序列中具有一个或多个氨基酸的修饰的胰岛素。

[0044] 胰岛素类似物可以是具有胰岛素的B或A链的氨基酸的变异,与天然类型相比具有降低的胰岛素效价和/或降低的胰岛素受体结合能力的胰岛素类似物。

[0045] 本发明中使用的胰岛素是通过基因重组技术产生的胰岛素类似物,但是本发明不限于此,并且优选包括反转胰岛素、胰岛素变体、胰岛素片段等。产生方法可以通过遗传重组以及固相方法进行,但不限于此。

[0046] 胰岛素类似物是具有与胰岛素相同的体内血糖控制功能的肽,所述胰岛素类似物包括胰岛素激动剂、衍生物、片段和变体等。

[0047] 本发明的胰岛素激动剂是指与胰岛素的体内受体结合并显示出与胰岛素相同的生物活性的物质,而不管胰岛素的结构如何。

[0048] 本发明的胰岛素类似物可以与天然胰岛素的A链和B链以及各自的氨基酸序列同源,并且可以具有选自以下的变异:取代(例如 α -甲基化、 α -羟基化)、去除(例如脱氨基)、修饰(例如,N-甲基化)及其组合,并且可以意指具有控制体内血糖的功能的肽。

[0049] 在本发明中,胰岛素类似物可以意指即使氨基酸序列与天然胰岛素没有典型的同源性也能够与胰岛素受体结合并控制血糖的肽模拟物和低分子或高分子化合物。

[0050] 本发明的胰岛素片段是指在胰岛素中添加或缺失一个或多个氨基酸的胰岛素形式,并且所添加的氨基酸可以是不以天然状态存在的氨基酸(例如D型氨基酸),并且这种胰岛素片段可以具有血糖控制功能。

[0051] 本发明的胰岛素变体意指具有一个或多个与胰岛素不同的氨基酸序列并且在体内保持血糖控制功能的肽。

[0052] 各自用于本发明的胰岛素激动剂、衍生物、片段和变体中的制备方法可以单独使

用,也可以组合使用。例如,包括具有一个或多个不同的氨基酸序列、在氨基末端氨基酸残基中脱氨基,并且在体内具有血糖控制功能的肽。

[0053] 具体地,胰岛素类似物可以具有用其他氨基酸、优选用丙氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、异亮氨酸、缬氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、赖氨酸、组氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸或天冬氨酸取代选自链B的氨基酸1、2、3、5、8、10、12、16、23、24、25、26、27、28、29和30以及链A的氨基酸1、2、5、8、10、12、14、16、17、18、19和21的一个或多个氨基酸。另外,具有一个或多个氨基酸的缺失的胰岛素类似物也落入本发明的范围内,而任何胰岛素类似物可以不受限制地落入本发明的范围内。

[0054] 优选的胰岛素类似物是当与生物相容性材料或载体组合时与天然胰岛素相比具有增加的半衰期的胰岛素类似物,并且此类类似物可以是韩国专利申请号10-2014-0022909和10-2014-0006938中公开的胰岛素类似物,但不限于此。

[0055] 当将白蛋白用作本发明组合物中的载体时,本发明可以包括但不限于将白蛋白或白蛋白片段与胰岛素和/或ATPIF1直接共价键合以增加体内稳定性的技术,将白蛋白结合物质(例如白蛋白特异性结合抗体或抗体片段)与肽结合和将所述白蛋白结合物质与白蛋白结合而不是将白蛋白直接与所述肽结合的技术,以及将具有白蛋白结合能力的特异性肽/蛋白质与所述肽结合的技术(包括将具有白蛋白结合能力的脂肪酸与所述肽结合的技术),并且可以包括可使用白蛋白增加体内稳定性的任何技术、结合方法等。

[0056] 本发明还可以包括使用抗体或抗体片段作为增加体内半衰期的载体与所述肽结合的技术。这种抗体或抗体片段可以是具有FcRn结合位点的抗体或抗体片段,或者可以是不包含FcRn结合位点的任何抗体片段,例如Fab。其中可以包括CovX Co.,Ltd.的使用催化抗体的CovX-body技术,并且使用Fc片段增加体内半衰期的技术也落入本发明的范围内。当使用Fc片段时,用于与Fc片段和肽结合的接头及其结合方法可以分别是聚乙二醇和肽键,但不限于此,并且任何化学键合方法都是可能的。另外,本发明中的Fc片段与胰岛素的结合比可以为1:1或1:2,但不限于此。

[0057] 使用肽或蛋白质片段作为增加体内半衰期的载体与胰岛素类似物结合的技术也落入本发明的范围内。所使用的肽或蛋白质片段可以由特定氨基酸的组成的重复单元组成的弹性蛋白样多肽(ELP)。本发明包括Xten的技术,它是由Versartis Inc.生产的人工多肽PEG。本发明还包括使用由Zealand Co.,Ltd生产的多赖氨酸增加体内半衰期的结构诱导探针(SIP)技术,Prolor Corporation的CTP融合技术,以及已知在体内具有高稳定性的转铁蛋白、作为结缔组织的组分的纤连蛋白及其衍生物。

[0058] 与本发明的ATPIF1或胰岛素结合的肽或蛋白质不限于此,并且增加胰岛素的体内半衰期的任何肽或蛋白质都落入本发明的范围内。另外,本发明的ATPIF1或胰岛素与增加体内半衰期的肽或蛋白质的结合可以是共价键,并且接头的类型和结合方法可以分别是聚乙二醇和肽键,但不必限于此,并且任何化学键合形式都是可能的。

[0059] 另外,用于增加体内半衰期的载体可以是非肽物质,如多糖或脂肪酸。结合可以增加肽的体内半衰期的载体的接头可以包括肽、聚乙二醇、脂肪酸、糖、高分子量聚合物、低分子量化合物、核苷酸或其组合,并且任何化学键(如非共价化学键或共价化学键)都是可能的,并且对化学键的类型没有限制。

[0060] 能够增加生物利用度或不断持续的活性的制剂可以包括基于使用PLGA、透明质

酸、壳聚糖等的微粒、纳米粒子等的缓释制剂。

[0061] 另外,可以增加生物利用度或维持持续活性的制剂的其他方面可以是制剂,如植入剂、吸入剂、经鼻制剂和贴剂。

[0062] 在本发明中,可共给予的胰岛素的例子包括天然胰岛素、胰岛素类似物和长效胰岛素(例如,作为天然胰岛素的Humulin和Novolin,作为速效胰岛素的Novolog、Humalog和Apidra,以及作为长效胰岛素的Lantus、Levemir和Tresiba)。

[0063] 可用于本发明的载体物质可以选自抗体、免疫球蛋白Fc区、白蛋白、脂肪酸、碳水化合物、具有作为重复单元的肽的聚合物、转铁蛋白和PEG,优选为免疫球蛋白Fc区。在本发明的具体实施方案中,持续性胰岛素或持续性GLP-1/胰高血糖素双重激动剂经由作为接头的非肽基聚合物与载体连接。在更具体的实施方案中,与该非肽基聚合物接头连接的载体是免疫球蛋白Fc片段。免疫球蛋白Fc区与胰岛素或双重试剂的结合可以无需任何接头的框内融合,或者可以使用非肽基聚合物作为接头来实现。在本发明中,免疫球蛋白Fc可以与免疫球蛋白片段互换使用。

[0064] 如本文所用,术语“非肽基聚合物”意指具有结合在一起的两个或更多个重复单元的生物相容性聚合物,并且所述重复单元通过共价键而不是肽键彼此连接。在本发明中,非肽基聚合物可以与“非肽基接头”互换使用。

[0065] 可用于本发明的非肽基聚合物可以选自可生物降解的聚合物,如聚乙二醇、聚丙二醇、乙二胺和丙二胺的共聚物、聚氧乙烯化多元醇、聚乙烯醇、多糖、葡聚糖、聚乙基乙醚,PLA(聚乳酸)和PLGA(聚乳酸-乙醇酸)、脂质聚合物、甲壳质、透明质酸及其组合,优选为聚乙二醇。本领域已知的所述非肽基聚合物的衍生物和在本领域技术水平上可容易地制备的衍生物均落入本发明的范围内。

[0066] 用于通过常规的框内融合方法制备的融合蛋白的肽基接头的缺点在于,它在体内容易被蛋白酶裂解,因此无法如预期的那样获得通过载体延长活性药物半衰期的效果。

[0067] 然而,在本发明中,类似于所述载体,使用蛋白酶抗性聚合物可以维持肽在血液中的半衰期。因此,任何非肽基聚合物都可以用于本发明而不受限制,只要其是发挥上述作用的聚合物,也就是说在体内对蛋白酶具有抗性的聚合物。非肽基聚合物的分子量在1至100kDa的范围内,优选在1至20kDa的范围内。另外,与免疫球蛋白Fc区组合的本发明的非肽基聚合物不仅可以用作一种聚合物,还可以用作不同种类的聚合物的组合。

[0068] 用于本发明的非肽基聚合物可以具有可与免疫球蛋白Fc区和蛋白质药物组合的反应性基团。非肽基聚合物的两个末端反应性基团优选地选自反应性醛基团、丙醛基团、丁醛基团、马来酰亚胺基团和琥珀酰亚胺衍生物。这种琥珀酰亚胺衍生物可以是琥珀酰亚胺丙酸酯、羟基琥珀酰亚胺基、琥珀酰亚胺基羧甲基或琥珀酰亚胺碳酸酯。特别地,当非肽基聚合物的两端均具有醛反应性基团作为反应基团时,所述反应基团可有效地最大程度地减少非特异性反应,并且有效地在非肽基聚合物的两端分别与生物活性多肽和免疫球蛋白结合。通过醛键的还原烷基化所获得的最终产物比通过酰胺键连接的那些稳定得多。醛反应性基团在低pH下与N末端选择性地反应,并在高pH下(例如在pH 9.0下)可与赖氨酸残基形成共价键。作为非肽基聚合物的接头的两个末端反应性基团可以彼此相同或不同。例如,马来酰亚胺基团可存在于一端,而醛基团、丙醛基团或丁醛基团可存在于另一端。当两端具有羟基反应性基团的聚乙二醇用作非肽基聚合物时,羟基基团可以通过公知的化学反应激活

为各种反应性基团中的一种,或者本发明的长效胰岛素或胰岛素衍生缀合物和长效GLP-1/胰高血糖素缀合物可以使用可商购的具有反应性基团的经修饰的聚乙二醇来制备。

[0069] 另外,由于与完整免疫球蛋白分子相比,免疫球蛋白Fc区具有相对较低的分子量,其在缀合物的制备、纯化和产生方面是有利的,并且由于去除了因为抗体之间的氨基酸序列不同而显示高异质性的Fab部分,预期免疫球蛋白Fc区表现出极大地提高物质同质性和降低诱导血液中抗原性的可能性的作用。

[0070] 如本文所用,术语“免疫球蛋白Fc区”意指免疫球蛋白的重链恒定区2(CH2)和重链恒定区3(CH3),不包括重链和轻链可变区、重链恒定区1(CH1)和轻链恒定区(CL1),并且可以包括重链恒定区中的铰链结构域。另外,本发明的免疫球蛋白Fc区可以是延伸的Fc区,其包括免疫球蛋白的重链恒定区1(CH1)和/或轻链恒定区(CL1)的全部或部分,不包括重链可变区和轻链可变区,只要所述免疫球蛋白Fc区具有与天然类型基本相同的作用或比天然类型改善的作用即可。免疫球蛋白Fc区也可以是已从中去除一些对应于CH2和/或CH3的相当长的氨基酸序列的区域。也就是说,本发明的免疫球蛋白Fc区可以是1)CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域和CH4结构域,2)CH1结构域和CH2结构域,3)CH1结构域和CH3结构域,4)CH2结构域和CH3结构域,5)一个或两个或更多个结构域与免疫球蛋白铰链区(或铰链区的一部分)的组合,或6)重链恒定区和轻链恒定区的每个结构域的二聚体。

[0071] 另外,本发明的免疫球蛋白Fc区不仅包括天然氨基酸序列,还包括其序列衍生物(突变体)。氨基酸序列衍生物意指天然氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基由于缺失、插入、非保守或保守取代或其组合而具有不同的序列。例如,对于IgG Fc,已知对于结合而言重要的氨基酸残基214至238、297至299、318至322或327至331可以用作合适的修饰位点。

[0072] 另外,可以有各种衍生物,其中从天然Fc去除了能够形成二硫键的位点,去除了N末端的一些氨基酸,或将甲硫氨酸残基添加至天然Fc的N末端。另外,可以去除补体结合位点(例如C1q结合位点)或ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)位点,以消除效应子功能。在PCT国际WO 97/34631、WO 96/32478等中披露了产生此类免疫球蛋白Fc区的序列衍生物的技术。

[0073] 总体上不改变分子活性的蛋白质和肽中的氨基酸交换是本领域已知的(H.Neurode,R.L.Hill,The Proteins,Academic Press,纽约,1979)。最常发生的交换是氨基酸残基Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thy/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、Asp/Gly之间的交换。在一些情况下,可能进行如下修饰,如磷酸化、硫酸化、丙烯酸化、糖基化、甲基化、法呢基化、乙酰化和戊基化。

[0074] 上述Fc衍生物是表现出与本发明的Fc区相同的生物活性并且具有增强的Fc区对热、pH等的结构稳定性的衍生物。

[0075] 另外,该Fc区可以获得自从动物(如人、牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、大鼠或豚鼠)体内分离的天然类型,或者可以是获得自转化的动物细胞或微生物的重组类型或其衍生物。在本文中,从天然类型获得所述Fc区的方法可以是如下方法,其包括将整个免疫球蛋白从人或动物体分离,然后用蛋白酶对所述Fc区进行处理。当用木瓜蛋白酶处理时,免疫球蛋白被裂解为Fab和Fc,而当用胃蛋白酶处理时,免疫球蛋白被裂解为pF'c和F(ab)2。可以使用尺寸排阻色谱法分离Fc或pF'c。优选地,Fc区是重组免疫球蛋白Fc区,其中人来源的Fc区

是从微生物获得的。

[0076] 另外,免疫球蛋白Fc区可以采取天然糖链的形式,与天然形式相比增加(更长)的糖链,与天然形式相比减少(更短)的糖链,或其中从天然形式去除糖链的形式。糖链的增加或减少或去除可以通过本领域已知的常规方法,如化学方法、酶促方法和使用微生物的遗传工程方法进行。在本文中,从Fc去除糖链的免疫球蛋白Fc区具有显著降低的与补体(c1q)的结合强度,并且具有降低或消除的抗体依赖性细胞毒性或补体依赖性细胞毒性,因此在体内没有引起不需要的免疫反应。就这一点而言,可以将与作为药物的载体的原始功能进一步一致的形式视为去糖基化或非糖基化的免疫球蛋白Fc区。

[0077] 如本文所用,术语“去糖基化”是指通过酶从其中去除糖的Fc区,并且术语“非糖基化”是指原核动物、优选大肠杆菌(E.coli)中产生且未糖基化的Fc区。

[0078] 同时,免疫球蛋白Fc区可以源自人或动物(如牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、大鼠或豚鼠),优选为人。

[0079] 另外,免疫球蛋白Fc区可以是衍生自IgG、IgA、IgD、IgE、IgM或其组合或其杂种的Fc区。免疫球蛋白Fc区优选地衍生自在人血液中最丰富的IgG或IgM,并且最优选地衍生自已知增强配体结合蛋白的半衰期的IgG。

[0080] 同时,如本文所用,术语“组合”意指当形成二聚体或多聚体时,具有相同起源的编码单链免疫球蛋白Fc区的多肽与具有不同起源的单链多肽形成键。也就是说,可以从选自IgG Fc、IgA Fc、IgM Fc、IgD Fc和IgE Fc片段的两个或更多个片段制备二聚体或多聚体。

[0081] 如本文所用,术语“杂种”意指对应于免疫球蛋白Fc片段的一个或更多个不同来源的序列存在于一个单链免疫球蛋白Fc结构域中。在本发明中,各种杂种形式都是可能的。也就是说,包含选自IgG Fc、IgM Fc、IgA Fc、IgE Fc和IgD Fc的CH1、CH2、CH3和CH4的一至四个结构域的结构域杂种是可能的,并且可以包括铰链。

[0082] 同时,IgG也可分为IgG亚型,即IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,并且在本发明中,其组合或其杂种也是可能的。优选的是IgG2和IgG4亚类,并且最优选的是几乎没有效应子功能(如补体依赖性细胞毒性(CDC))的IgG4的Fc区。

[0083] 也就是说,本发明的药物载体的最优选的免疫球蛋白Fc区是源自人IgG4的非糖基化Fc区。人来源的Fc区比非人来源的Fc区更优选,所述非人来源的Fc区可能引起不期望的免疫反应,例如在人体内充当抗原以产生针对其的新的抗体。

[0084] 对产生本发明的持续性胰岛素缀合物的方法没有特别限制。关于详细的产生方法及其效果的例子的描述可以在例如韩国专利号10-1330868和10-1324828和10-1058290、韩国专利公开号10-2011-0111267和韩国专利申请号10-2014-0022909中找到。

[0085] 与单独给予ATPIF1或胰岛素时相比,当共给予本发明的ATPIF1和胰岛素时,ATPIF1和胰岛素同时起作用以降低血液中的葡萄糖浓度并显示出稳定的变化。另外,当以组合形式给予缀合物时,可以降低当单独给予胰岛素时可能发生的低血糖的风险,减轻体重并通过胰岛素分泌肽降低总胰岛素剂量。由于血液半衰期的显著增加和持续的体内效应,ATPIF1和胰岛素的组合的给予具有通过降低常规需要每日给予的慢性患者的给予频率来改善患者的生活质量的重大优点。另外,本发明的药物组合物具有优异的体内可持续性和效价,并且可以使用组合给予方法显著地降低剂量。

[0086] ATPIF1和胰岛素可以同时、顺序地或以相反顺序给予,并且可以以适当有效量的

组合形式同时给予。另外,优选地,ATPIF1和胰岛素可以在单独的容器中储存之后,同时、顺序地或以相反顺序共给予。

[0087] 另外,本发明的用于组合给予的组合物、持续性胰岛素缀合物和持续性GLP-1/胰高血糖素双重激动剂缀合物可以被包含在一个容器中作为用于治疗糖尿病的药剂盒提供,或各自储存在单独容器中作为用于治疗糖尿病的药剂盒提供。这种药剂盒可以包含药学上可接受的载体和所述药剂盒的使用说明书。

[0088] 另外,本发明鉴定了在抑制线粒体中ATP合成中发挥作用的蛋白质ATPIF1 (ATP酶抑制剂因子1) 具有控制肌肉细胞中葡萄糖和脂肪细胞中脂肪代谢的作用。

[0089] 肥胖症是由脂肪甘油三酸酯(TG)通过脂肪生成在脂肪细胞中积累引起的,并且控制这种脂肪生成是已知的肥胖症抑制的有效治疗(Chen,H.C.和Farese,R.V.Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.25,482-4865,2005;Cooke,D.和Bloom,S.,Nat.Rev.Drug Discov.5,919-1200,2006)。

[0090] 本发明鉴定了ATIF1控制参与脂肪细胞中脂肪合成的抑制的ACC活性,并且通过增加作为褐变标记物的UCP1的表达参与脂肪代谢的改善。进行动物实验以确定进行运动的动物中肌肉因子ATIF1的浓度是否高,并且结果表明运动组中ATIF1的浓度增加。

[0091] 在另一个方面,本发明涉及用于预防或治疗肥胖症的含有ATPIF1 (ATP酶抑制剂因子1) 作为活性成分的药物组合物。

[0092] 在另一个方面,本发明涉及使用ATPIF1 (ATP酶抑制剂因子1) 预防或治疗肥胖症的方法。

[0093] 在另一个方面,本发明涉及ATPIF1 (ATP酶抑制剂因子1) 用于预防或治疗肥胖症的用途。

[0094] 在另一个方面,本发明涉及ATPIF1 (ATP酶抑制剂因子1) 用于制备用于治疗或预防肥胖症的药物的用途。

[0095] 本发明的组合物可以与各种有效治疗此类疾病或问题的治疗剂组合使用。正如上文清楚地描述的那样,当前的糖尿病治疗包括饮食控制、运动、胰岛素、胰岛素促分泌剂、减少葡萄糖的激动剂、PPAR- γ 激动剂和 α -葡萄糖苷酶抑制剂。本发明的化合物可以与此类或其他医学治疗组合使用,以治疗和/或预防糖尿病和相关障碍,所述糖尿病和相关障碍包括但不限于其他症状,如I型糖尿病、II型糖尿病、肥胖症,葡萄糖耐受不良、胰岛素抗性、代谢综合征、高脂血症、高胆固醇血症、动脉粥样硬化、神经退行性疾病、炎症和中风。例如,当治疗II型糖尿病时,本发明的化合物可以与一种或多种药学上有效的药物组合使用,所述药学上有效的药物包括磺酰脲类(如二甲双胍、格列苯脲和格列吡嗪)、噻唑烷二酮类(如瑞格列奈、那格列奈、罗格列酮和吡格列酮)、阿卡波糖、米格列醇、艾塞那肽、普兰林肽和胰岛素。

[0096] 根据本发明的治疗性组合物可以进一步包含药学上可接受的载体,并且所述药学上可接受的载体包括载体、佐剂和媒介物,它们统称为“药学上可接受的载体”。可以用于本发明的药物组合物的药学上可接受的载体可以包括但不限于离子交换树脂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(例如人血清白蛋白)、缓冲物质(例如,几种磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾和饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物)、水、盐或电解质(例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、氯化钠和锌盐)、硅胶、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的基质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚芳酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯封闭聚合物、聚乙二

醇、羊毛等。

[0097] 根据本发明的药物组合物的给予途径包括但不限于口服、静脉内、肌肉内、动脉内、髓内、硬膜内、心脏内、透皮、皮下、腹膜内、鼻内、肠、局部、舌下或直肠给予。如本文所用，术语“肠胃外”包括皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、囊内、胸骨内、硬膜内、病灶内和颅内注射或输注技术。

[0098] 药物组合物可以是无菌可注射制剂的形式，作为无菌可注射水性或油性悬浮液。可以根据本领域已知的技术，使用合适的分散剂或润湿剂（例如吐温80）和悬浮剂来配制该悬浮液。无菌可注射制剂也可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液（例如在1,3-丁二醇中的溶液）。可用的可接受的媒介物和溶剂可以包括甘露醇、水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外，无菌非挥发性油通常用作溶剂或悬浮介质。为此，也可以使用任何刺激性较小的含有合成甘油单酯或甘油二酯的油。脂肪酸（如油酸）及其甘油酯衍生物可用于可注射制剂，例如药学上可接受的天然油（例如橄榄油或蓖麻油），特别是其聚氧乙基化形式。

[0099] 本发明的药物组合物可以以任何口服可接受的剂型口服给予，所述口服可接受的剂型包括但不限于胶囊、片剂和水性混悬液和溶液。对于口服片剂，常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常还添加润滑剂，如硬脂酸镁。用于以胶囊形式口服给予的有用稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当口服给予水性悬浮液时，将活性成分与乳化剂和悬浮剂组合。如果需要的话，可以添加甜味剂、调味剂和/或着色剂。

[0100] 本发明的药物组合物也可以用于直肠给予的栓剂形式给予。这些组合物可以通过将本发明的化合物与合适的无刺激性赋形剂混合来制备，所述赋形剂在室温下为固体，而在直肠温度下为液体。这些材料包括但不限于可可脂、蜂蜡和聚乙二醇。

[0101] 当所需的治疗涉及通过局部施用易于接近的部位或器官时，根据本发明的药物组合物的口服给予特别有用。当局部施用至皮肤时，应将药物组合物配制为含有悬浮或溶解在载体中的活性成分的合适的软膏形式。本发明的化合物的局部给予的载体包括但不限于矿物油、液体石蜡、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。可替代地，可以将药物组合物配制为含有悬浮或溶解在载体中的活性化合物的合适洗剂或乳霜形式。合适的载体包括但不限于矿物油、脱水山梨醇单硬脂酸酯、聚山梨醇酯60、鲸蜡基酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。本发明的药物组合物也可以以直肠栓剂或合适的灌肠剂的形式局部施用至下肠道。局部施用的透皮贴剂也落入本发明的范围内。

[0102] 本发明的药物组合物可以通过鼻气溶胶或吸入给予。这种组合物是根据药物领域公知的技术来制备的，并且使用苯甲醇或其他合适的防腐剂、增强生物利用度的吸收促进剂、碳氟化合物和/或本领域已知的其他增溶剂或分散剂制备成盐水溶液。

[0103] 本发明的组合物可以与常规的抗炎剂组合使用，或者与基质金属蛋白酶抑制剂、脂加氧酶抑制剂和IL-1 β 以外的细胞因子的抑制剂组合使用。本发明的组合物可以与免疫调节剂（例如溴匹立明、抗人 α 干扰素抗体、IL-2、GM-CSF、甲硫氨酸脑啡肽、干扰素 α 、二乙基二硫代氨基甲酸酯、肿瘤坏死因子、纳曲酮和rEPO）或前列腺素组合给予以预防或消除IL-1介导的疾病的症状，如炎症。当本发明的组合物与其他治疗剂组合给予时，本发明的组合物与其他治疗剂可以顺序地或同时向患者给予。可替代地，可以通过将ATPIF1与上述其他治疗剂或预防剂混合来制备根据本发明的药物组合物。

[0104] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指在治疗上述症状中使用的每天每kg体重约0.1mg至约100mg的剂量水平。

[0105] 然而,应当理解,针对特定患者的特定有效量可以根据多种因素而变化,所述因素包括所使用的具体化合物的活性、年龄、体重、总体健康、性别、饮食、给予时间、给予途径、排出率、药物组合和待预防或治疗的某些疾病的严重程度。根据本发明的药物组合物可以配制成丸剂、糖衣丸、胶囊、溶液、凝胶、糖浆、浆液或悬浮液。

[0106] 在优选的实施方案中,用于口服给予的药物组合物可以通过将活性成分与固体赋形剂混合来制备,并且可以以颗粒的形式制备以获得片剂或糖衣丸制剂。合适的赋形剂包括糖形式(如乳糖、蔗糖、甘露醇和山梨糖醇)、来自玉米、面粉、大米、土豆或其他植物的淀粉或纤维素(如甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素钠)、碳水化合物(如树胶,包括阿拉伯胶和黄蓍胶)或蛋白质填充剂(如明胶和胶原蛋白)。如果需要的话,可以添加崩解剂或增溶剂,如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂和海藻酸或其盐形式(例如海藻酸钠)。

[0107] 在优选的实施方案中,对于肠胃外给予,可以在水溶液中制备本发明的药物组合物。优选地,可以使用物理上合适的缓冲液,如汉克斯氏溶液、林格氏溶液或物理缓冲盐水。可以向水性注射悬浮液中添加可以增加悬浮液粘度的基质,如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。另外,可以将活性成分的悬浮液制备为合适的油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪酸(如芝麻油)或合成脂肪酸酯(如油酸乙酯、甘油三酸酯或脂质体)。非脂质聚阳离子氨基聚合物也可以用作载体。任选地,悬浮液可以使用合适的稳定剂或试剂来增加化合物的溶解性和制备高浓度的溶液。

[0108] 实施例

[0109] 在下文中,将参考实施例更详细地说明本发明。然而,对于本领域技术人员将显而易见的是,这些实施例仅提出用于说明本发明,并且不应理解为限制本发明的范围。

[0110] 实施例1:鉴定通过ATPIF1增加肌肉细胞系中的AMPK磷酸化

[0111] 为了确定ATPIF1对肌肉细胞中AMPK (AMP激活的蛋白质激酶) 的磷酸化的影响,将肌肉细胞系(ATCC C2C12)在12孔板上含有5%FBS的DMEM (10%FBS) 培养基中培养24小时,随后用ATPIF1 (Phoenix Pharmaceuticals,伯林盖姆(Burlingame),加利福尼亚州,美国)在不同的时间以不同的浓度(0ng/ml、6ng/ml、20ng/ml、60ng/ml、200ng/ml和600ng/ml)处理。将30μg的细胞质蛋白在10%SDS-PAGE凝胶上进行电泳,然后使用AMPK (AMP激活的蛋白质激酶) 磷酸化抗体 (Millipore-Upstate,比勒利卡(Billerica),马萨诸塞州,美国)进行蛋白质印迹分析。

[0112] 结果显示,在用ATPIF1 (60ng/ml) 处理1至3小时的情况下,AMPK磷酸化最大化(图1A)。此外,在使用0ng/ml、6ng/ml、20ng/ml、60ng/ml、200ng/ml和600ng/ml的不同浓度的ATPIF1处理的情况下,AMPK磷酸化在20ng/ml的ATPIF1下开始增加,并且在60ng/ml的ATPIF1下获得最大的影响(图1B)。使用无活性的AMPK抗体 (Millipore-Upstate,比勒利卡,马萨诸塞州,美国)测定总AMPK蛋白水平。

[0113] 实施例2:鉴定通过ATPIF1增加肌肉细胞系中的Akt磷酸化

[0114] Akt是与AMPK一起参与血糖控制的主要蛋白质。为了测定ATPIF1对肌肉细胞中Akt的磷酸化的影响,将在与实施例1相同的条件下培养的肌肉细胞系(C2C12)在不同时间、不同浓度下用ATPIF1处理。然后,将30μg的细胞质蛋白在10%SDS-PAGE凝胶上进行电泳,然后

使用Akt磷酸化抗体 (Millipore-Upstate, 比勒利卡 (Billerica), 马萨诸塞州, 美国) 进行蛋白质印迹分析。

[0115] 结果显示, 在用ATPIF1 (60ng/ml) 处理后3小时, Akt磷酸化最大化 (图2A)。此外, 在使用0ng/ml、6ng/ml、20ng/ml、60ng/ml、200ng/ml和600ng/ml的不同浓度的ATPIF1处理的情况下, Akt磷酸化在20ng/ml下处理后开始增加, 并且在60ng/ml的ATPIF1下处理后获得最大的影响 (图2B)。

[0116] 此外, 结果显示, 用LY294002 (Calbiochem, 圣地亚哥, 加利福尼亚州, 美国) (它是Akt上游物质PI3K的抑制剂) 处理消除了通过ATPIF1引起的Akt磷酸化的增加, 这表明PI3K参与通过ATPIF1进行的Akt磷酸化 (图2C)。使用无活性的Akt抗体 (Millipore-Upstate, 比勒利卡, 马萨诸塞州, 美国) 测定总Akt蛋白水平。

[0117] 实施例3: 鉴定通过ATPIF1增加肌肉细胞系中的Glut4蛋白表达

[0118] 转运蛋白在将糖转运到细胞中发挥关键作用。在肌肉细胞中, Glut4作为转运蛋白发挥着关键作用。为了确定由ATPIF1引起的AMPK磷酸化和Akt磷酸化的增加是否确实改善了Glut4表达, 使用glut4抗体 (Millipore-Upstate, 比勒利卡, 马萨诸塞州, 美国) 通过蛋白质印迹分析了通过ATPIF1处理引起的肌肉细胞中Glut4表达的变化。

[0119] 作为结果, 如从图3A可以看出的那样, 通过用ATPIF1处理增加了肌肉细胞中Glut4表达。

[0120] 另外, 用PI3K的抑制剂LY294002 (Calbiochem, 圣地亚哥, 加利福尼亚州, 美国) 和AMPK的抑制剂化合物C (Calbiochem, 圣地亚哥, 加利福尼亚州, 美国) 处理消除了通过ATPIF1引起的GTP4表达的增加, 这表明PI3K和AMPK被发现参与Glut4蛋白表达 (图3B)。使用β-肌动蛋白抗体 (Millipore-Upstate, 比勒利卡, 马萨诸塞州, 美国) 以确定实验中所用的蛋白质的量的同一性。

[0121] 实施例4: 鉴定通过ATPIF1增加肌肉细胞系中的Glut4mRNA表达

[0122] 进行RT-PCR分析以确定在mRNA水平上是否也发生通过ATPIF1引起的glut4蛋白表达的变化。

[0123] 使用TRI试剂 (Life Technologies, 英国) 从肌肉细胞系 (C2C12) 分离总RNA。使用Thermoscript II一步式RT-PCR试剂盒 (Life Technologies, 英国) 从1μg分离的RNA合成cDNA。使用Gene Amp System 9700热循环仪 (Applied Biosystems, 英国) 扩增cDNA, 并且PCR反应进行34个循环 (94℃下持续30秒, 55℃下持续30秒, 72℃下持续60秒), 然后在72℃下延伸10分钟。

[0124] 以下引物对用作引物。

[0125] GLUT4-有义: 5'-TTG GAG AGA GAG CGT CCA AT-3' (SEQ ID NO:2)

[0126] GLUT4-反义: 5'-CTC AAA GAA GGC CAC AAA GC-3' (SEQ ID NO:3)

[0127] β-肌动蛋白-有义: 5'-CAG GAG GAG CAA TGA TCT TGA-3' (SEQ ID NO:4)

[0128] β-肌动蛋白-反义: 5'-ACT ACC TCA TGA AGA TCC TCA-3' (SEQ ID NO:5)

[0129] 通过在琼脂糖凝胶上进行电泳鉴定了10μL的上述获得的RT-PCR反应产物。

[0130] 作为结果, 如从图4A可以看出的那样, 通过用ATPIF1处理增加了肌肉细胞中Glut4mRNA表达。

[0131] 另外, 用PI3K的抑制剂LY294002 (Calbiochem, 圣地亚哥, 加利福尼亚州, 美国) 和

AMPK的抑制剂化合物C (Calbiochem, 圣地亚哥, 加利福尼亚州, 美国) 处理消除了通过ATPIF1引起的Glut4mRNA表达的增加, 这表明PI3K和AMPK被发现参与Glut4mRNA表达 (B)。鉴定了 β -肌动蛋白抗体以确定总mRNA的同源性。

[0132] 实施例5: 鉴定通过ATPIF1增加肌肉细胞系中的葡萄糖摄取

[0133] 血糖控制机制的主要特征是葡萄糖被摄取(摄入)至细胞中。

[0134] 为了鉴定由ATPIF1引起的AMPK活性的增加是否实际上导致了葡萄糖摄取的增加, 使用同位素标记的葡萄糖进行了实验, 以确定是否确实发生了葡萄糖摄取至肌肉细胞中。

[0135] 作为结果, 如从图5A可以看出的那样, ATPIF1增加了肌肉细胞的葡萄糖摄取。

[0136] 另外, 如从图5B可以看出的那样, 当使用PI3K的抑制剂LY294002和AMPK的抑制剂化合物C以及ATPIF1处理时, 消除了通过ATPIF1引起的葡萄糖摄取的增加, 这表明PI3K和AMPK参与葡萄糖摄取过程。胰岛素 (Sigma, 圣路易斯, 密苏里州, 美国) 用作阳性对照。

[0137] 实施例6: 鉴定ATPIF1在肌肉细胞系中的胰岛素增敏剂功能

[0138] 大多数患有2型糖尿病的人表现出胰岛素抗性, 这是治疗的最大障碍。为了克服这一问题, 有必要开发一种胰岛素增敏剂用于提供对胰岛素反应的敏感性。糖摄取实验显示, 增加AMPK和Akt活性的ATPIF1是否可以起到胰岛素增敏剂的作用。

[0139] 作为结果, 如从图6可以看出的那样, 与单独用胰岛素或ATPIF1处理时相比, 当用ATPIF1和胰岛素的组合处理时, 通过胰岛素引起的葡萄糖摄取进一步增加, 这表明ATPIF1起到胰岛素增敏剂作用。

[0140] 实施例7: 确定通过ATPIF1在脂肪细胞中抑制脂肪合成和促进褐变

[0141] 为了确定ATPIF1是否能够控制肥胖症, 鉴定了ATPIF1是否调节脂肪生成控制蛋白ACC的磷酸化。

[0142] 使用ACC磷酸化抗体 (Millipore-Upstate, 比勒利卡, 马萨诸塞州, 美国) 在DMEM (10% FBS) 培养基中的脂肪细胞系 (3T3L1) (ATCC: 美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection)) 中进行蛋白质印迹实验。

[0143] 作为结果, 如从图7A可以看出的那样, 用ATPIF1处理后30分钟和1小时, ACC磷酸化最大化。如从图7B可以看出的那样, 在使用0ng/ml、6ng/ml、20ng/ml、60ng/ml、200ng/ml和600ng/ml的不同浓度的ATPIF1处理的情况下, ACC磷酸化在20ng/ml的浓度下开始增加, 并且在60ng/ml的浓度下获得最大的影响。

[0144] 使用TRI试剂 (Life Technologies, 英国) 从肌肉细胞系 (3T3L1) 分离总RNA。使用Thermoscript II一步式RT-PCR试剂盒 (Life Technologies, 英国) 从1 μ g分离的RNA合成cDNA。使用Gene Amp System 9700热循环仪 (Applied Biosystems, 英国) 扩增cDNA, 并且PCR反应进行34个循环 (94 $^{\circ}$ C下持续30秒, 55 $^{\circ}$ C下持续30秒, 72 $^{\circ}$ C下持续60秒), 然后在72 $^{\circ}$ C下延伸10分钟。

[0145] 以下引物对用作引物。

[0146] UCP1-有义: CTG CCT CTC TCG GAA ACA AG (SEQ ID NO:6)

[0147] UCP1-反义: GCC ACA AAC CCT TTG AAA AA (SEQ ID NO:7)

[0148] β -肌动蛋白-有义: 5'-CAG GAG GAG CAA TGA TCT TGA-3' (SEQ ID NO:4)

[0149] β -肌动蛋白-反义: 5'-ACT ACC TCA TGA AGA TCC TCA-3' (SEQ ID NO:5)

[0150] 通过在琼脂糖凝胶上进行电泳鉴定了10 μ L的上述获得的RT-PCR反应产物。

[0151] 作为结果,关于脂肪细胞中褐变标记基因UCP1的表达变化的RT-PCR实验结果显示,用ATPIF1处理导致mRNA表达增加(图7C),这表明ATPIF1具有抑制脂肪合成的功能以及促进脂肪褐变的功能。

[0152] 肥胖症是通过经由脂肪生成导致的脂肪细胞的细胞内甘油三酸酯(TG)积累引起的。控制这种脂肪生成被认为是抑制肥胖症的有效治疗(Chen,H.C.和Farese,R.V.Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.25,482-4865,2005;Cooke,D.和Bloom,S.,Nat.Rev.Drug.Discov.5,919-1200,2006),因为褐色脂肪细胞通过发热有效地治疗肥胖症和糖尿病(Aaron M Cyess和C Ronald Kanh,Curr.Opin.Endocrinol.Diabetes Obes.,17:143,2010)。结果表明ATPIF1对肥胖症具有治疗作用。

[0153] 实施例8:进行运动的小鼠的血液中ATPIF1的浓度分析

[0154] 为了确定ATPIF1的生理学意义,鉴定了进行运动的动物的血液中ATPIF1的浓度是否增加。

[0155] 每组准备10只小鼠(BALB/c,Central Lab Animal Inc.,CLA),并使用ELIZA试剂盒(Myobiosource,圣地亚哥,加利福尼亚,美国)测量进行短期运动(运动一小时后收集血液)和长期运动(每天运动一个小时,总共经历一个月,之后收集血液)的小鼠(A)血液中ATIF1的浓度。

[0156] 作为结果,如从图8可以看出的那样,与对照组相比,短期和长期运动组均表现出ATIF1浓度的增加。该结果表明,在运动过程中从肌肉组织分泌ATIF1,并且其以高水平存在于血液中,这意味着肌肉因子ATIF1在实际的体内条件下也可以发挥重要的生理作用,并且未来可以在临床中使用。

[0157] 实施例9:在动物实验中ATPIF1对改善葡萄糖耐量的作用

[0158] 对2型糖尿病模型dbdb小鼠(Central Lab Animal Inc.,CLA)进行GTT(葡萄糖耐量测试),以鉴定腹膜内给予5mg/kg浓度下的重组蛋白ATPIF1蛋白持续10周后胰岛素抗性是否得到改善。

[0159] 作为结果,如从图9可以看出的那样,与对照组或仅给予GST的小鼠相比,给予ATPIF1的小鼠表现出血糖水平的升高。该结果意味着ATPIF1可以通过改善胰岛素抗性来进行血糖控制。

[0160] 工业适用性

[0161] 根据本发明的含有ATPIF1的组合物通过促进肌肉细胞中葡萄糖的摄取和改善胰岛素敏感性而对糖尿病具有治疗作用,并且还具有抑制脂肪细胞中的脂肪合成和促进脂肪细胞褐变的作用,从而有效地预防或治疗肥胖症。

[0162] 尽管已经详细地描述了本发明的具体配置,但是本领域技术人员将理解,此详细描述是作为优选实施方案提供的,而不应当解释为限制本发明的范围。因此,本发明的实质范围由附属提交的权利要求及其等同物限定。

[0163] 序列列表自由文本

[0164] 附有电子文件。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 高丽大学校产学协力团
- [0003] <120> 用于治疗糖尿病的含有ATPIF1的药物组合物
- [0004] <130> PF-B2266
- [0005] <140> PCT/KR2018/002933
- [0006] <141> 2018-03-13
- [0007] <150> KR 10-2017-0033742
- [0008] <151> 2017-03-17
- [0009] <160> 7
- [0010] <170> PatentIn版本3.5
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 81
- [0013] <212> PRT
- [0014] <213> 人工序列
- [0015] <220>
- [0016] <223> ATPIF1 (AT酶抑制剂因子1)
- [0017] <400> 1
- [0018] Gly Ser Asp Gln Ser Glu Asn Val Asp Arg Gly Ala Gly Ser Ile Arg
- [0019] 1 5 10 15
- [0020] Glu Ala Gly Gly Ala Phe Gly Lys Arg Glu Gln Ala Glu Glu Glu Arg
- [0021] 20 25 30
- [0022] Tyr Phe Arg Ala Gln Ser Arg Glu Gln Leu Ala Ala Leu Lys Lys His
- [0023] 35 40 45
- [0024] His Glu Glu Glu Ile Val His His Lys Lys Glu Ile Glu Arg Leu Gln
- [0025] 50 55 60
- [0026] Lys Glu Ile Glu Arg His Lys Gln Lys Ile Lys Met Leu Lys His Asp
- [0027] 65 70 75 80
- [0028] Asp
- [0029] <210> 2
- [0030] <211> 20
- [0031] <212> DNA
- [0032] <213> 人工序列
- [0033] <220>
- [0034] <223> 引物
- [0035] <400> 2
- [0036] ttggagagag agcgtccaat 20
- [0037] <210> 3
- [0038] <211> 20

[0039] <212> DNA
[0040] <213> 人工序列
[0041] <220>
[0042] <223> 引物
[0043] <400> 3
[0044] ctcaaagaag gccacaaagc 20
[0045] <210> 4
[0046] <211> 21
[0047] <212> DNA
[0048] <213> 人工序列
[0049] <220>
[0050] <223> 引物
[0051] <400> 4
[0052] caggaggagc aatgatcttg a 21
[0053] <210> 5
[0054] <211> 21
[0055] <212> DNA
[0056] <213> 人工序列
[0057] <220>
[0058] <223> 引物
[0059] <400> 5
[0060] actacctcat gaagatcctc a 21
[0061] <210> 6
[0062] <211> 20
[0063] <212> DNA
[0064] <213> 人工序列
[0065] <220>
[0066] <223> 引物
[0067] <400> 6
[0068] ctgcctctct cggaacaag 20
[0069] <210> 7
[0070] <211> 20
[0071] <212> DNA
[0072] <213> 人工序列
[0073] <220>
[0074] <223> 引物
[0075] <400> 7
[0076] gccacaaacc ctttgaaaaa 20

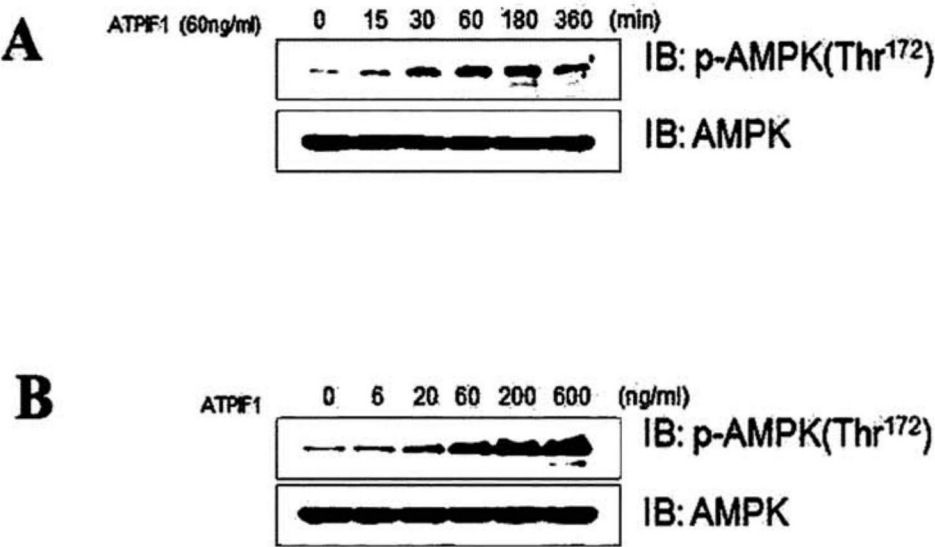


图1

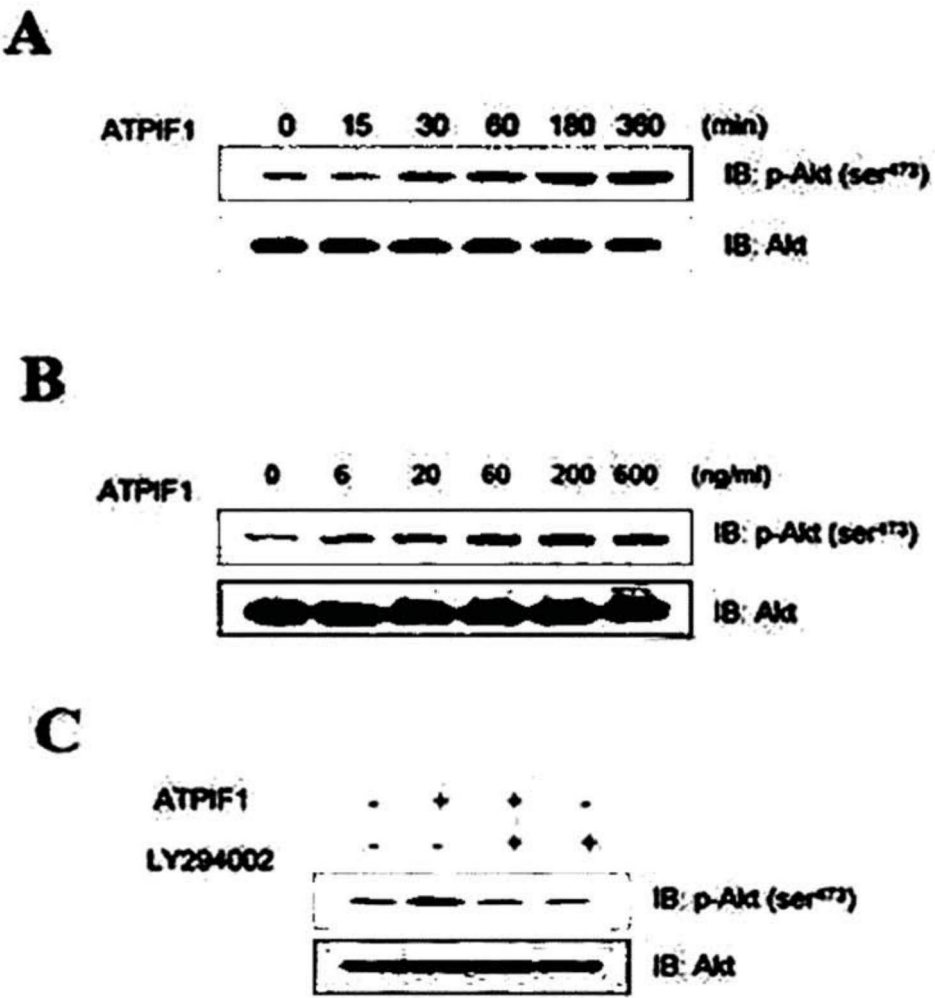


图2

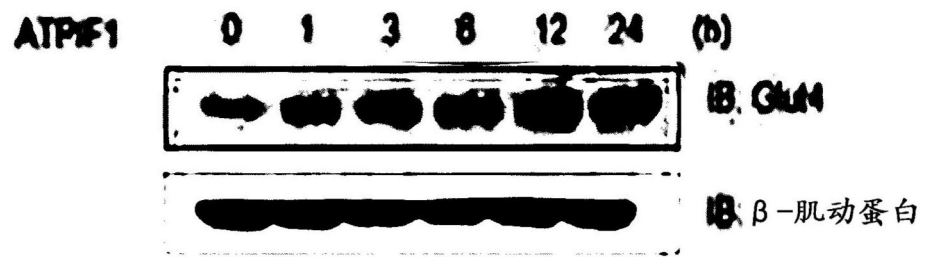
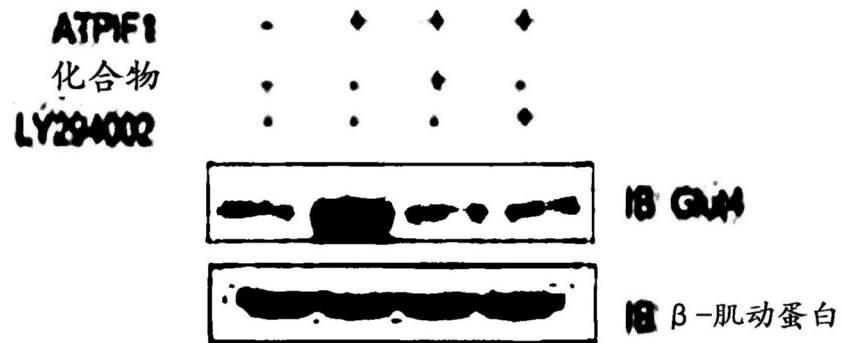
A**B**

图3

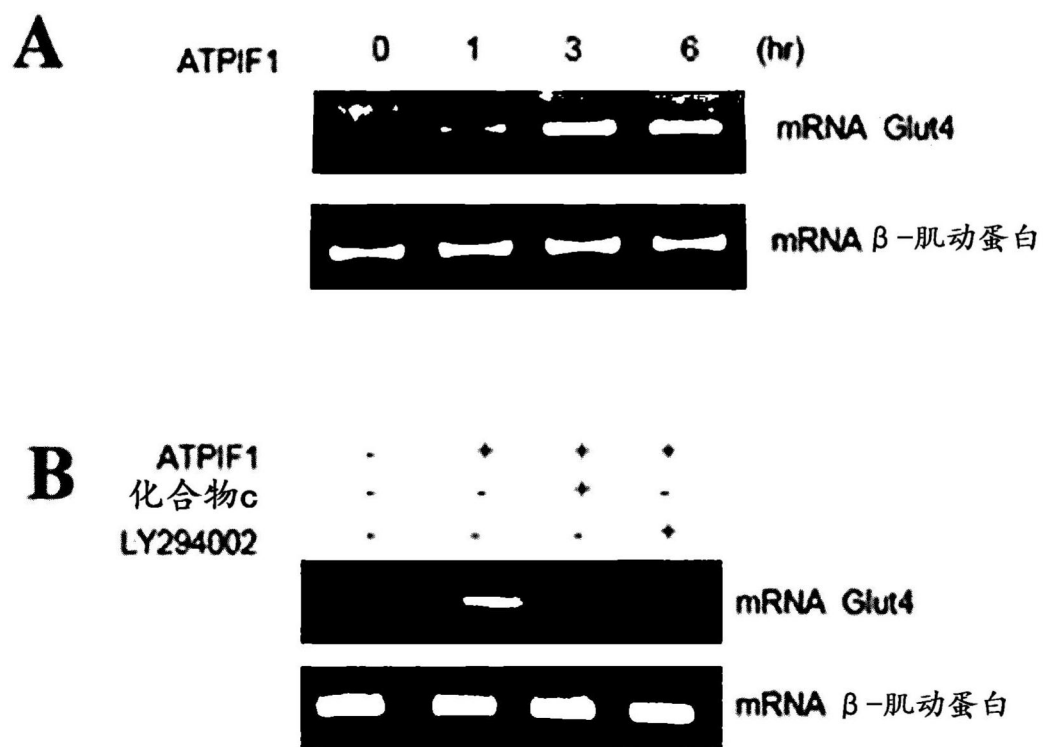


图4

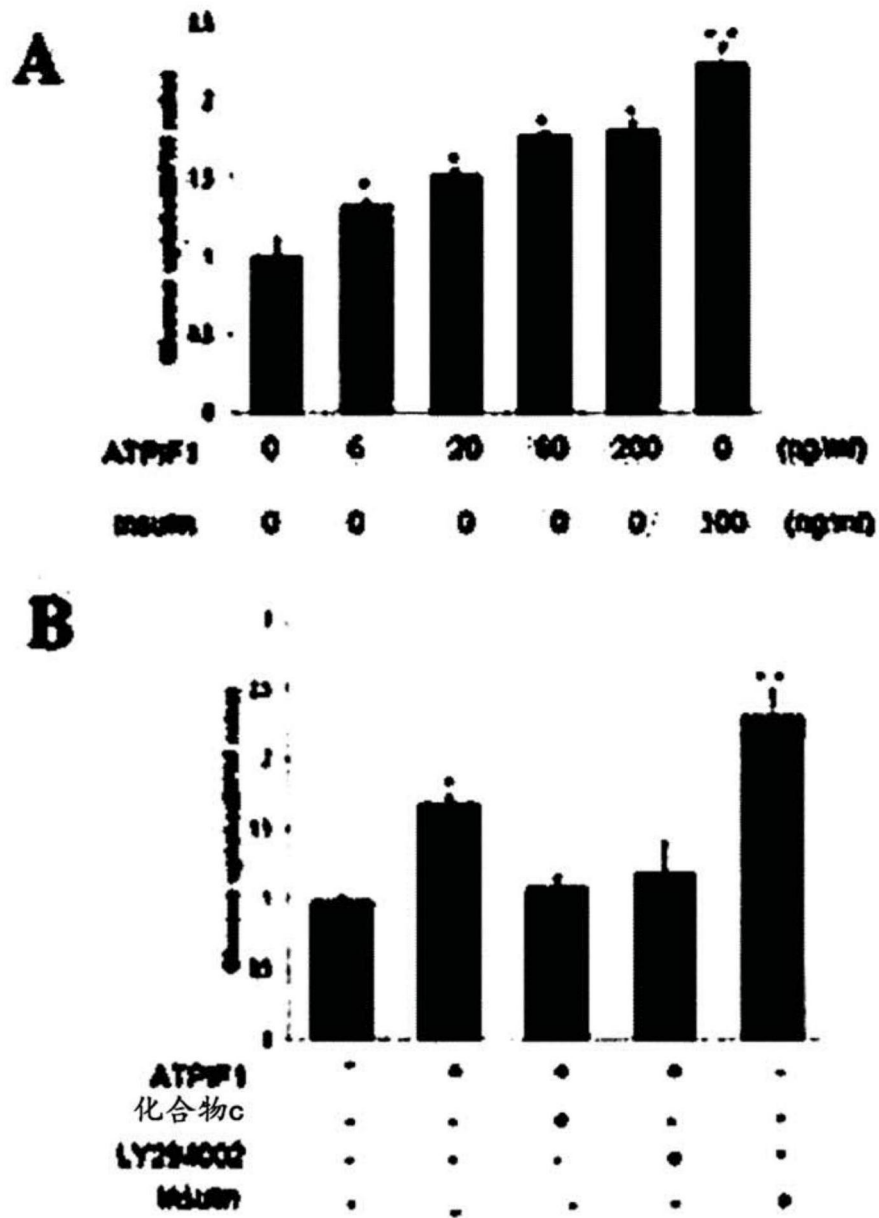


图5

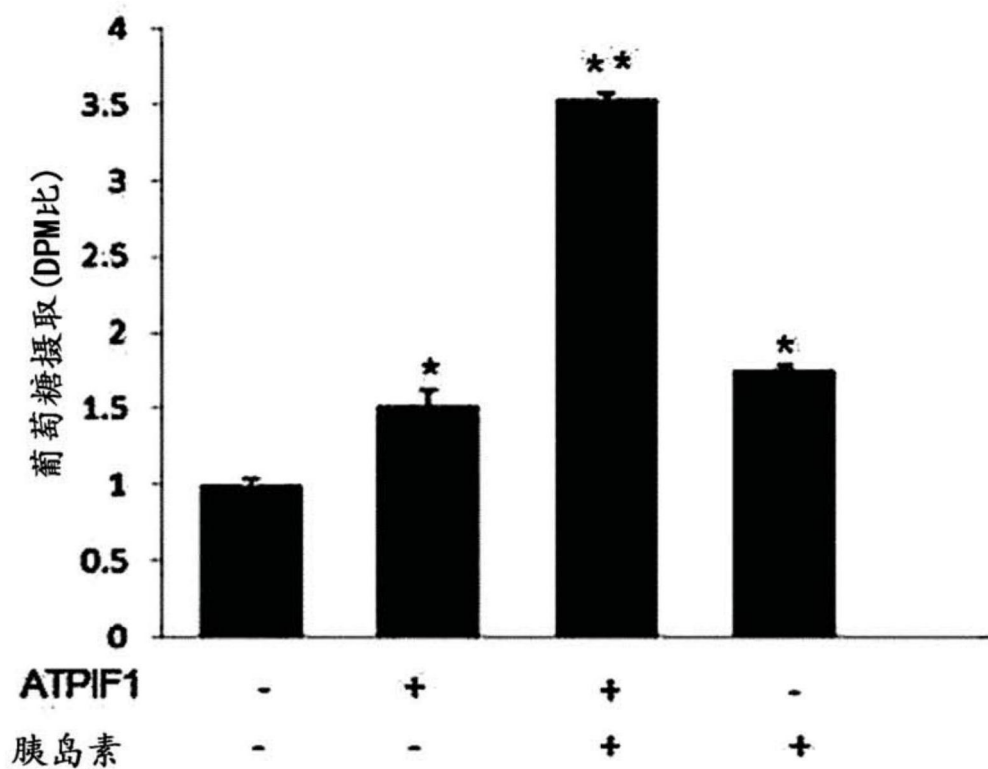


图6

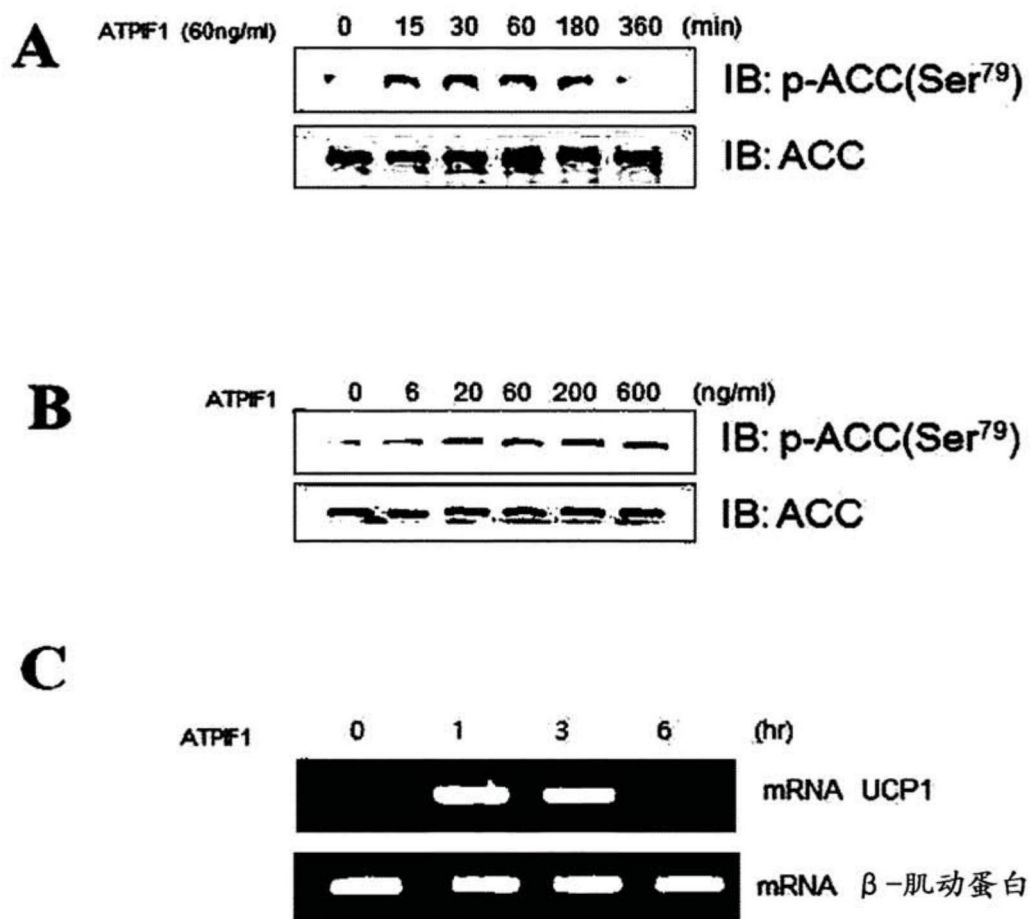


图7

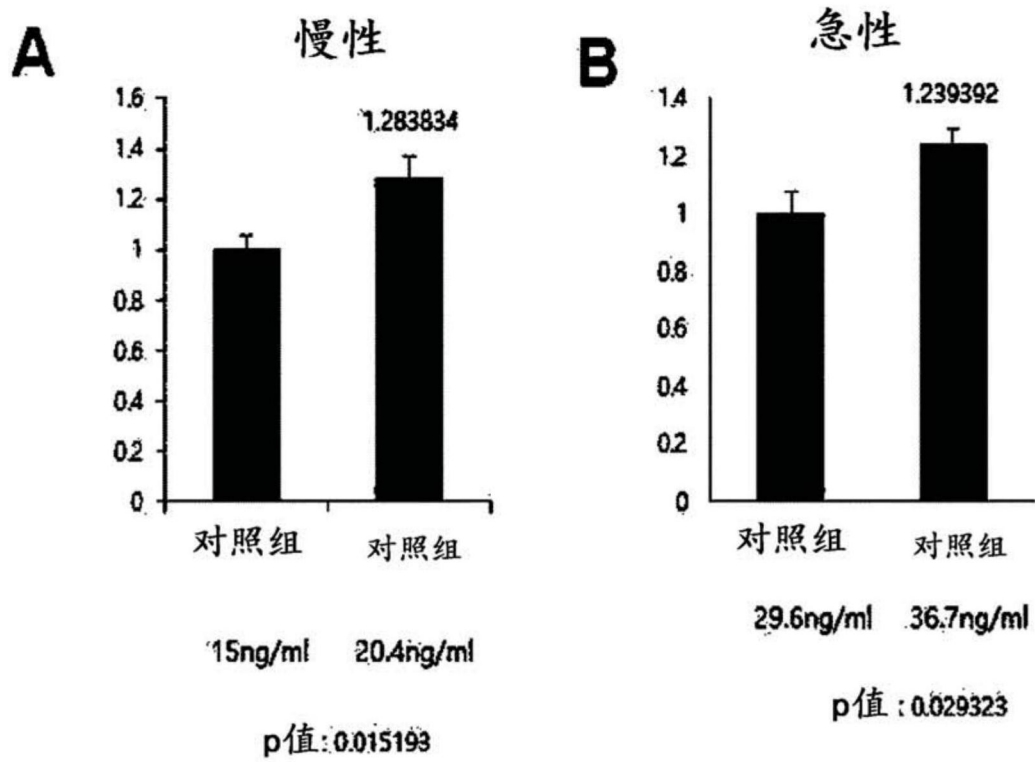


图8

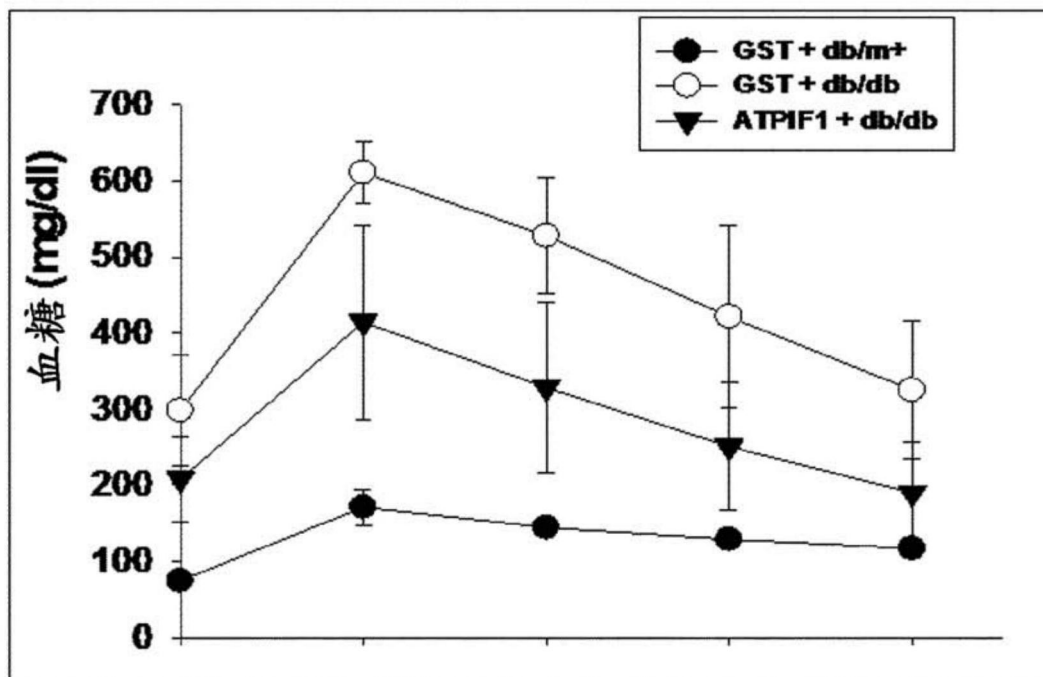


图9