

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016年12月8日 (08.12.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/192523 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/19 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/081956
- (22) 国际申请日: 2016年5月13日 (13.05.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510304401.0 2015年6月4日 (04.06.2015) CN
- (71) 申请人: 中国科学院上海生命科学研究院 (SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市岳阳路319号, Shanghai 200031 (CN)。
- (72) 发明人: 刘滢 (LIU, Yi); 中国上海市岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。 陈亚琼 (CHEN, Yaqiong); 中国上海市岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。 周瓚 (ZHOU, Zan); 中国上海市岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。 袁源 (YUAN, Yuan); 中国上海市岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。 孙秀杰 (SUN, Xiujie); 中国上海市岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。
- (74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE,

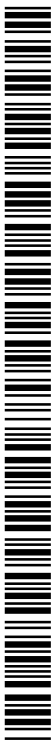
LLC); 中国上海市桂平路435号, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。



WO 2016/192523 A1

(54) Title: USE OF ARTEPILLIN C AND ANALOGS THEREOF IN PREPARATION OF DRUGS FOR PREVENTING AND TREATING METABOLIC DISEASES

(54) 发明名称: 阿特匹灵C及其类似物在制备防治代谢性疾病的药物中的应用

(57) Abstract: Disclosed is a use of artepillin C and analogs thereof in the preparation of a drug for preventing and treating metabolic diseases. The present invention is the first to disclose a significant effect of artepillin C or analogs thereof in preventing and treating metabolic diseases, thus providing a multifunctional drug focusing on the regulation of CREB/CRTC2 or SREBP.

(57) 摘要: 阿特匹灵C及其类似物在制备防治代谢性疾病的药物中的应用。首次揭示阿特匹灵C或其类似物对于代谢性疾病的防治具有极其显著的效果, 从而提供了以调节 CREB/CRTC2 或 SREBP 为靶点的多功能药物。

阿特匹灵 C 及其类似物在制备防治代谢性疾病的药物中的应用

技术领域

- 5 本发明属于生物医药领域，更具体地，本发明涉及阿特匹灵 C 及其类似物在制备防治代谢性疾病的药物中的应用。

背景技术

- 10 肝脏对血糖处理(包括吸收血糖、糖原转化和糖异生及输出)调控处于中枢地位。肝糖异生亢进是 2 型糖尿病肝糖输出升高的一个重要病理，纠正亢进的肝糖生成有利于控制糖尿病发病进程及续发性疾病。所以靶向肝糖产生的抑制剂研究对控制和治疗代谢综合症，包括高血糖、肥胖和 2 型糖尿病，有重要意义。

- 肝糖异生的效率在很大程度上依赖于对糖异生相关基因的转录调控。饥饿时血液中胰高血糖素升高，胰高血糖素受体(Glucagon receptor, GCGR)被激活，通过 $G\alpha_s$ 激活膜上的腺苷酸环化酶合成 3', 5'-环单磷酸腺苷(cAMP)，利用 cAMP - PKA 信号通路激活肝细胞中的 CREB (CRE response element-binding protein)转录活化因子直接上调肝糖异生途径关键酶：葡萄糖 -6- 磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6Pase)和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)的表达；CREB 还通过上调转录因子 PGC1 α (PPAR γ coactivator 1- α)和孤儿核受体 NR4A1 成员的转录，使它们持续而间接地上调糖异生必需基因的表达，满足长期饥饿时机体对血糖的需求。2003 年发现了一种新的转录辅助因子能够与 CREB 结合并极大地增强 CREB 转录活性，作为第一个被发现的 CREB 共激活因子，被命名为 TORC1 (Transducer of Regulated CREB)。因与哺乳动物雷帕霉素靶点 mTORC(mammalian target of rapamycin) 名称类似，NCBI 重新命名为 CRTC1。

- 25 从果蝇、秀丽线虫到人类都存在着高度同源的 CRTC s 蛋白：包括 3 个成员 CRTC1、CRTC2 和 CRTC3。它们具有相似的蛋白质分子结构(以 CRTC2 为例，图 11)，都包含 N 端 CREB 结合区(CBD, CREB binding domain)，中心调控区(REG, regulatory domain)，剪切区(SD, splicing domain)及 C 端转录活性区 TAD (transcription active domain)。N 端 CBD 形成螺旋-螺旋结构与 CREB 的 ZIP 区结合，是 CRTC s 家族的特征结构。入核信号区 NLS (nuclear leading signaling) 区、出核信号区 NES(nuclear export signal)位于中心调控区 REG，其中 171 位丝氨酸的

磷酸化状态调控 CRTC2 的核质穿梭过程。C 端 TAD(transcription active domain) 能与 TAF 结合具有转录活性。CRTC 的 3 种亚型具有特征性分布, CRTC1 主要在脑组织中表达, CRTC2 在肝脏组织中表达最高, CRTC3 的高丰度表达部位是淋巴细胞和肺, 在肌肉、肝、胰、肠等消化系统中表达量低。

5 胰岛素敏感性组织中, CREB/CRTCs 通路在激素和营养对能量代谢调控过程中承担了多种角色。最新研究证明 CRTC2 是肝糖异生途径中一个重要的转录调节共激活因子(图 12)。静息条件下, CRTC2 的 S171 被 SIK2 (Salk induced kinases 2) 持续磷酸化, 与胞质蛋白 14-3-3 结合而被滞留在胞浆中, 当 cAMP 升高时, 被 PKA 激活的 SIK2 磷酸化能力降低, 导致 CRTC2 磷酸化水平急剧下降并脱离 14-3-3 随
10 后进入细胞核与停留在 CRE 元件上的 CREB 结合, 同时 CRTC2 的 628 位赖氨酸被 CBP/P300 乙酰化, CRTC2 再招募来 TAF4, 此时以 CBP/P300-CREB/CRTC2-ATF4 为主要成分的蛋白复合体有力地上调 CRE 的靶基因转录, 快速上调肝糖异生相关基因的转录。饥饿或给予胰高血糖素时肝实质细胞内发生以上事件。进食后, 胰岛素通过 AKT 使 SIK2 去磷酸化, 激酶活性增强的 SIK2 使 CRTC2 重新磷酸化与 14-3-3 稳定结合而停留在核外; 另一方面核内的 CRTC2 被 SIRT1 去乙酰化后随即被 COP1 介导的泛素化所降解, 从而迅速抑制 CREB 下游基因的转录。因此, CRTC2 的磷酸化、乙酰化、泛素化等修饰水平在肝糖异生调控中发挥重要作用。活体内 CRTC2 的表达降低与肝产糖减少关系已经比较明确。多项独立的研究成果证实了 cAMP-PKA-CREB/CRTC2 在肝糖异生信
15 号转导中的核心地位, 是血糖控制的一个全新靶点。

肝脏 CRTC2 整合了激素、营养因子(cAMP 激动剂、胰高血糖素、胰岛素)以及多种调控性蛋白质(CRY1, AMPK, SIK, SMEK1/2)对肝糖异生进行转录调控。研究证实 CRTC2 还介导了抗糖尿病一线临床药物 metformin 和噻唑烷二酮类 (thiazolidinedione)的降糖作用, 这些药物通过调节 AMPK 的激酶活性间接增强
25 CRTC2 磷酸化、抑制 2 型糖尿病人亢进的肝糖生成最终改善高血糖。因此增强 CRTC2 磷酸化的化合物有可能成为新的肝糖异生抑制剂。

靶向肝糖生成的特异性抑制剂是降糖药物研发的一个重要方向。其中属于肝糖异生途径的靶点有胰高血糖素受体(Glucagon receptor, GCGR)、果糖 1,6-二磷酸酶 (fructose-1, 6-biphosphatase, FBPase) 和葡萄糖 -6- 磷酸酶 (glucose-6-phosphatase, G6Pase)。目前研究发现胰高血糖素受体小分子抑制剂(如 NNC92-1687, Bay-27-9955, 和三取代脲)以及胰高血糖素受体高效单抗有很好的
30

降糖应用前景。但这些抑制剂都是从抑制靶点的功能入手，还不能改善这类靶点表达量持续过高的病理。

5 肝脏同时又是脂类（脂肪酸、胆固醇和磷脂）代谢的重要器官。肝脏能分解甘油三酯成为脂肪酸并分泌到循环系统以供其它组织使用。同时肝脏还合成了大量的脂蛋白，以协助脂肪的分泌。当过量的碳水化合物及蛋白质出现时，肝脏能把过量的碳水化合物和蛋白质转化为脂肪酸和甘油三酯，以转入脂肪组织中储存。另一方面，胆固醇的合成、吸收及转化为胆酸的代谢过程也由肝脏执行。

10 因此，从表达源头上抑制过度活跃的肝糖异生及脂类合成是治疗代谢综合症的一个新思路，本领域有必要筛选调控 CREB/CRTC2 转录调控功能的小分子以期发展新型的、机制新颖的代谢调节药物。

发明内容

本发明的目的在于提供阿特匹灵 C 及其类似物在制备防治代谢性疾病的药物中的应用。

15 在本发明的第一方面，提供阿特匹灵 C 或其类似物或其药学上可接受的盐在制备预防、缓解或治疗代谢性疾病的药物中的用途。

在一个优选例中，所述的代谢性疾病包括：脂代谢疾病、糖代谢疾病或代谢综合症。

20 在另一优选例中，所述的脂代谢疾病包括(但不限于)：高血脂症，脂肪肝，肥胖症，动脉粥样硬化，冠心病、高血压，脑梗塞，中风，肾功能衰竭。

在另一优选例中，所述的糖代谢疾病包括(但不限于)：高血糖症，糖尿病，肥胖症，高胰岛素症，动脉粥样硬化，冠心病、高血压，甲状腺功能亢进、糖尿病眼病、糖尿病肾病。

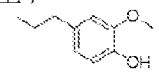
在另一优选例中，所述的阿特匹灵 C 或其类似物具有如下式(I)结构：

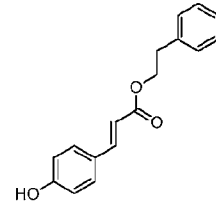


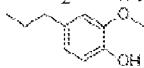
其中，R1 选自 H，异戊烯基(prenyl)；

R2 为 OH；

R3 选自 H，异戊烯基；

R4 选自 H，CH₂Ph， 或 CH₂CHPh。



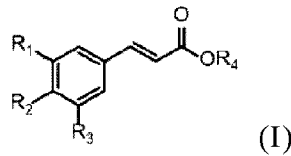
- 5 在另一优选例中，所属的化合物选自：阿特匹灵 C；
 R1 为 H、R2 为 OH、R3 为 H、R4 为 H 的化合物；
 R1 为 H、R2 为 OH、R3 为异戊烯基、R4 为 H 的化合物；
 R1 为 H、R2 为 OH、R3 为 H、R4 为 CH₂Ph 的化合物；或
 R1 为 H、R2 为 OH、R3 为 H、R4 为  的化合物。

- 在另一优选例中，所述的药物还用于：
 抑制肝糖异生；
 降低肝糖异生关键基因 *Pgc1a*, *Pck1*(编码 PEPCK), *G6pc* 的水平；
 10 降低肝脏葡萄糖输出量；
 提高葡萄糖耐受性；
 降低体内脂肪含量；
 降低血清甘油三酯含量；
 降低总胆固醇含量；
 15 降低低密度脂蛋白胆固醇含量；
 降低高密度脂蛋白胆固醇含量；
 降低肝脏血脂输出量；
 抑制肝脏脂肪酸合成；
 抑制胆固醇合成；
 20 抑制肝脏的血脂输出及吸收；
 降低 SREBP 及其下游靶基因的表达；和/或
 提高胰岛素敏感性。

25 在本发明的另一方面，提供一种制备药物的方法，所述的药物用于预防、缓解或治疗脂代谢疾病或糖代谢疾病的药物，所述方法包括：将有效量的阿特匹灵 C 或其类似物或其药学上可接受的盐与药学上可接受的载体混合。

在一个优选例中，所述的代谢性疾病包括：脂代谢疾病，糖代谢疾病或代谢综合症。

在另一优选例中，所述的阿特匹灵 C 或其类似物具有如下式(I)结构：



其中, R1 选自 H, 异戊烯基(prenyl);

R2 为 OH;

R3 选自 H, 异戊烯基;

5

R4 选自 H, CH₂Ph,  或 CH₂CHPh。

本发明的其它方面由于本文的公开内容, 对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

10

图 1、巴西绿蜂胶改善糖尿病小鼠的葡萄糖代谢平衡及胰岛素敏感性。

A、口服巴西绿蜂胶 1-2 天, *db/db* 小鼠的饥饿 16 小时血糖水平;

B、口服巴西绿蜂胶 2 周后, *db/db* 小鼠的葡萄糖耐受性(GTT)检测;

C、口服巴西绿蜂胶 2 周后, *db/db* 小鼠的胰岛素敏感性(ITT)检测;

D、口服巴西绿蜂胶 2 周后, DIO 小鼠的丙酮酸耐受性(PTT)检测;

15

E、DIO 小鼠服用巴西绿蜂胶 3 周后, QPCR 检测肝糖异生关键基因的 mRNA 转录水平。

F、DIO 小鼠活体内肝脏成像分析, DIO 小鼠 13 周后, 尾静脉注射腺病毒 Ad-*G6P-Luc*, 3 天后连续服用巴西绿蜂胶 3 天, 饥饿 16 小时后进行活体成像检测;

20

G、原代肝细胞中报告基因 *G6P-Luc* 转录活性分析, 肝原代细胞经蜂胶(0.2%)预处理 1 小时后胰高血糖素(100nM)刺激 6 小时;

H、原代肝细胞中报告基因 *CRE-Luc* 转录活性分析, 肝原代细胞经蜂胶(0-0.2%)预处理 1 小时后胰高血糖素(100nM)刺激 6 小时;

25

图 2、CREB/CRTC2 双杂交系统检测巴西绿蜂胶成分活性。

A、胰高血糖素信号转导通路;

B、原代肝细胞中 CREB 的磷酸化及 cAMP 水平检测, Artepillin C(10 μ M)预处理原代肝细胞 1 小时, 胰高血糖素(100nM)刺激 30 分钟, 细胞中 cAMP 含量以裂解液蛋白质含量校正;

C、CREB-CRTC2 哺乳动物双杂交系统的建立，表达质粒 AD-hCRTC2-Ser171Ala、BD-hCREB、Gal4-Luc 和 RSV-Renilla 共转入 HEK293T 瞬间表达；

D、巴西绿蜂胶的成分的活性追踪，组分 Petr-ether, EtOAc, n-BuOH, H₂O；

5 E、巴西绿蜂胶的成分分离流程；

F、巴西绿蜂胶中 Artepillin C 的 HPLC-UV 色谱检测 (254nm)；

G、CREB-CRTC2 双杂交系统评价巴西绿蜂胶单体的生物活性，转染 4 小时加入受试化合物(25 μ M)处理 6 小时；

H、Artepillin C 的分子结构及相同来源的结构类似物。

10

图 3、Artepillin C 抑制 CREB 与 CRTC2 的蛋白质相互结合。

A、GST-pull down 分析 Artepillin C 抑制 GST-CREB 与 FLAG-mCRTC2 相互结合的作用，用 GST-CREB beads 免疫沉淀含过表达 FLAG-mCRTC2 的 HEK293T 细胞裂解液，Artepillin C(10 μ M)预处理细胞 1 小时并加入免疫沉淀体系共孵育过夜；

15

B、免疫共沉淀分析 Artepillin C 在肝原代细胞中抑制内源性 CREB 与 FLAG-mCRTC2 相互结合的活性，Artepillin C (10 μ M)预处理过表达 HA-CRTC2 的肝原代细胞 1 小时后，胰高血糖素刺激 30 分钟，以抗 CREB 为一抗的免疫共沉淀系统中包括 Artepillin C(10 μ M)共孵育过夜；

20

C、GST-pull down 检测 Artepillin C 对纯化蛋白质 GST-CREB 与 HIS-CRTC2-Ser171Ala 相互结合的抑制活性，GST-CREB beads 免疫沉淀纯化蛋白质 HIS-CRTC2-Ser171Ala，免疫共沉淀体系中包含 Artepillin C (0, 5, 10, 50 μ M)；

25

D、表面等离子共振(SPR)检测小分子 Artepillin C 与蛋白质 HIS-CREB 的直接结合，纯化蛋白质 HIS-hCREB 通过 HIS 标签被固定在 NTA 芯片上，不同浓度的 Artepillin C(0-100 μ M)通过流动相与固定的 HIS-CREB 相互接触，检测 300 秒内芯片上复合物分子量大小变化；

30

E、微量等温量热滴定(ITC)检测小分子 Artepillin C 与蛋白质 HIS-CREB 的结合放热，纯化的原核表达蛋白质 HIS-hCREB (100uM) 逐滴加入含 Artepillin C 的样品池中，测定每次滴加后体系的放热量；

F、GST-CREB 及 N'截断体的表达，包括 GST-CREB341 全长，GST-CREB

Δ Q1(102-341)、GST-CREB Δ Q1 Δ KID(160-341)、GST-CREB-bZIP(283-341),
GST 抗体检测;

G、GST-pull down 分析 CREB 与 Artepillin C 的结合区域, GST beads 固定含不同 N 端的 GST-CREB 截断体蛋白质, 分别 pull-down 纯化蛋白质
5 HIS-CRTC2-Ser171Ala, 免疫沉淀体系包括 Artepillin C(5 μ M), HIS 抗体检测 pull-down 洗脱物;

H、Artepillin C 抑制 CREB-CRTC2 相互结合的剂量曲线, 哺乳动物 CREB-CRTC2 双杂交系统检测 Artepillin C 的 IC50。

10 图 4、Artepillin C 抑制原代肝细胞中胰高血糖素诱导的肝糖异生。

A、CHIP-QPCR 检测 Artepillin C 对由胰高血糖素诱导的 CRTC2 及 CREB 与 CRE 元件结合的影响, 腺病毒 Ad-HA-CRTC2 感染后的原代肝细胞经 Artepillin C(10 μ M)预处理 1 小时, 胰高血糖素(100nM)刺激 30 分钟后进行 CHIP-QPCR 检测;

15 B、QPCR 检测肝糖异生关键基因(*G6P*, *Pck1*, *Pgc1 α*)的转录, 原代肝细胞与 Artepillin C(10 μ M)预培养 1 小时后, 胰高血糖素(100nM)刺激 4 小时;

C、原代肝细胞的葡萄糖输出检测, 原代肝细胞与 Artepillin C(10 μ M)预培养 1 小时后, 胰高血糖素(100nM)刺激 4 小时, 产糖反应 8 小时;

20 D、MTT 检测 Artepillin C 对原代肝细胞活力的影响, 原代肝细胞与不同浓度的 Artepillin C (0-100 μ M)共培养 24 小时后, MTT 检测原代细胞的活力;

E、cAMP 检测, 原代肝细胞与不同浓度的 Artepillin C (10 μ M)共培养(0, 0.5, 1, 2 小时)后, 胰高血糖素刺激 30 分钟后检测 cAMP 含量;

25 F、Western blot 分析 Artepillin C 对原代肝细胞中 CREB 磷酸化、CRTC2 去磷酸化的影响, Artepillin C(10 μ M)预培养 1 小时后, 胰高血糖素(100nM)刺激 0.5 小时;

G、CRTC2 缺失的原代肝细胞(CRTC2^{-/-})的葡萄糖糖输出检测, Artepillin C(10 μ M)预处理 CRTC2 缺失的原代肝细胞(CRTC2^{-/-})1 小时, 胰高血糖素(100nM)刺激 4 小时, 产糖反应 8 小时;

30 H、QPCR 检测缺失 CRTC2 的肝原代细胞(CRTC2^{-/-})中肝糖异生关键基因的转录, Artepillin C(10 μ M)预处理 CRTC2 缺失的原代肝细胞(CRTC2^{-/-})1 小时, 胰高血糖素(100nM)刺激 4 小时。

图 5、Artepillin C 改善高血脂症及脂肪肝。

DIO 小鼠(左, 0, 10, 20mg/kg) 及 *db/db* 模型小鼠(右, 20mg/kg)经腹腔注射 Artepillin C 5 周。

- 5 A、Artepillin C 抑制糖尿病模型小鼠(左, DIO, 右, *db/db*)的体重增加;
 B、Artepillin C 降低糖尿病模型小鼠(左, DIO, 右, *db/db*)的活体内脂肪含量;
 C、Artepillin C 降低糖尿病模型小鼠(左, DIO, 右, *db/db*)血清甘油三脂(TG)含量;
- 10 D、Artepillin C 降低糖尿病模型小鼠(左, DIO, 右, *db/db*)的血清胆固醇含量, 包括总胆固醇(TC)、低密度胆固醇(LDLC)及高密度胆固醇(HDLC);
 E、Artepillin C 降低糖尿病模型(DIO)小鼠肝脏的甘油三脂(TG)含量;
 F、DIO 小鼠肝脏、脂肪组织切片分析。

图 6、Artepillin C 通过抑制 SREBPs 的表达降低脂类合成。

DIO 小鼠腹腔注射 Artepillin C (0, 10, 20mg/kg) 5 周后, 自由取食的小鼠肝脏组织用于检测 *Srebps* 的表达;

- A、DIO 小鼠肝脏中 *Srebp-1a, 1c* 及 *2* 的 mRNA 水平检测
 B、DIO 小鼠肝脏中 SREBP1, 2 的蛋白质水平检测;
- 20 C、DIO 小鼠肝脏中 SREBPs 的靶基因及脂类代谢相关基因的 mRNA 水平检测;
- D、DIO 小鼠白色脂肪组织(WAT)中相关基因的 mRNA 水平检测;
 E、DIO 小鼠的肝脏组织的核受体相关基因转录水平检测;
 F、原代肝细胞中 LXR α 及 SREBP1 的表达水平, 原代肝细胞与 Artepillin
- 25 C(10 μ M)共培养 1 小时后胰岛素(100nM)刺激(0, 3, 18 小时)。

图 7、Artepillin C 改善糖尿病小鼠的葡萄糖代谢平衡及胰岛素敏感性。

- A、活体成像分析 DIO 小鼠中肝脏 *G6P-luc* 报告基因表达, DIO 小鼠经尾静脉注射感染腺病毒 Ad-*G6p-luc*, 3 天后连续 3 天腹腔注射 Artepillin
- 30 C(20mg/kg), 饥饿 16 小时后进行活体成像分析;

 B、DIO 小鼠腹腔注射 Artepillin C(20mg/kg)5 周后, QPCR 检测 DIO 小鼠

肝脏组织中肝糖异生关键基因的转录；

C、DIO 小鼠腹腔注射 Artepillin C(20mg/kg)5 周后，Western blot 分析 DIO 小鼠肝脏组织中糖异生关键蛋白质 PEPCK(图中示为 PCK1)及 PGC1 α 的蛋白质表达水平；

5 D、野生型正常小鼠血糖水平检测，野生型正常小鼠腹腔注射 Artepillin C (20mg/kg)3 天后，胰高血糖素(100 μ g/kg)诱导 4 小时后的血糖水平；

E、DIO 小鼠饥饿血糖监测，高脂诱导糖尿病鼠(DIO)腹腔注射 Artepillin C(20mg/kg)1 周后，16 小时饥饿血糖水平检测；

10 F、*db/db* 小鼠饥饿血糖监测，*db/db* 小鼠腹腔注射 Artepillin C(20mg/kg)1 周后，16 小时饥饿血糖水平检测；

G、*db/db* 小鼠腹腔注射 Artepillin C(20mg/kg)5 周后，血清胰岛素水平检测；

H、*db/db* 小鼠(5 周)及 DIO 小鼠(4 周)腹腔注射 Artepillin C(20mg/kg)后，血清中谷草转氨酶(Aspartate transaminase, AST)以及谷丙转氨酶(Alanine transaminase, ALT)水平检测。

15

图 8、Artepillin C 改善糖尿病小鼠的葡萄糖代谢平衡及胰岛素敏感性。

DIO 小鼠(左)及 *db/db* 小鼠(右)腹腔注射 Artepillin C(20mg/kg)1-5 周之内，葡萄糖耐受性(GTT, A)，丙酮酸耐受性(PTT, B)及胰岛素敏感性(ITT, C)检测。

20

图 9、Artepillin C 提高整体胰岛素敏感性的分子机制。

图 10、APC 类似物的抑制活性评价。

A、APC 类似物抑制 CREB/CRTC2 相互结合的活性评价；

25 B、APC 类似物 IC50 测试。

图 11、转录共激活因子 CRTC2 的蛋白质结构。

图 12、CREB/CRTC2 介导的肝糖异生分子机制。

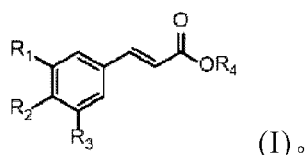
30

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，首次揭示阿特匹灵 C(Artepillin C, APC)或其类似物对于代谢性疾病的防治具有极其显著的效果。本发明提供了以调节 CREB/CRTC2 及 SREBP 为靶点的多功能药物。

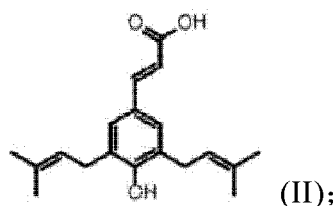
5 化合物

本发明提供了阿特匹灵 C(Artepillin C, APC)或其类似物，其具有如下式(I)的化学结构：



结构式(I)所示结构的化合物形成一种适合的化合物空间构型，具有该结构的化合物可以以 CREB/CRTC2 途径为靶点，通过与 CREB 的相关位点发生相互作用，从而调控下游的一系列作用机制。也即：所述的阿特匹灵 C 或其类似物是一种 CREB/CRTC2 途径的抑制剂。

最优选地，所述的化合物是阿特匹灵 C，其结构式如下：



本发明还包括上述化合物的药学上可接受的盐、水合物或前体，只要它们也具有预防、缓解或治疗代谢性疾病的作用。所述的“药学上可接受的盐”是指一类化合物与无机酸、有机酸、碱金属或碱土金属等反应生成的盐。这些盐包括（但不限于）：(1) 与如下无机酸形成的盐：如盐酸、硫酸、硝酸、磷酸；(2) 与如下有机酸形成的盐，如乙酸、草酸、丁二酸、酒石酸、甲磺酸、马来酸、或精氨酸。其它的盐包括与碱金属或碱土金属(如钠、钾、钙或镁)形成的盐，以酯、氨基甲酸酯，或其它常规的“前体药物”的形式。

所述的“化合物的前体”指当用适当的方法服用后，该化合物的前体在病人体内进行代谢或化学反应而转变成具有结构式(I)所示结构的一种化合物，或结构式(I)所示结构的一个化合物所组成的盐或溶液。

本发明还包括上述化合物的异构体、外消旋体，只要它们也具有防治代谢性疾病的作用。本文所用的术语“异构体”包括：几何异构体、对映异构体、非对

映异构体 (如顺反异构体, 构象异构体)。化合物具有一个或多个不对称中心。所以, 这些化合物可以作为外消旋的混合物、单独的对映异构体、单独的非对映异构体、非对映异构体混合物、顺式或反式异构体存在。

本领域人员应理解, 在得知了本发明化合物的结构以后, 可通过多种本领域
5 熟知的方法、利用公知的原料, 来获得本发明的化合物, 比如化学合成或从生物 (如动物或植物) 中提取的方法, 这些方法均包含在本发明中。

合成化学改造、保护官能团方法学(保护或去保护)对合成应用化合物是很有帮助的, 并且是现有技术中公知的技术, 如 R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T.W. Greene and P.G.M. Wuts, *Protective
10 Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., John Wiley and Sons (1999); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); 和 L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995)中都有公开。

一些具有式(I)所示结构的化合物也可自生物 (如动物或植物) 中提取、分离
15 和纯化。

用途

本发明人发现, 阿特匹灵 C 通过与 CREB 的 N 端直接结合, 抑制入核后的
20 CRTC2 与 CREB 的相互结合, 降低了由 CREB/CRTC2 驱动的下流基因的表达, 包括肝糖异生的主要成分 PGC1 α , 及重要的限速酶 G6PC 和 PEPCK(PCK1), 抑制肝糖异生及肝脏的葡萄糖输出, 降低饥饿血糖。另一方面, APC 通过抑制核受体 LXR α 的表达, 协同转录共激活因子 PGC1 α 被抑制的状态, 降低了由 LXRE 驱动的 SREBPs 的表达, 抑制 SREBPs 的下流靶基因, 降低由 SREBPs 调控的胆固醇及脂肪酸的合成、吸收, 最终降低血液中脂肪含量。

25 基于本发明人的新发现, 本发明提供了具有式 (I) 所示结构的化合物或其异构体、外消旋体、药学上可接受的盐、水合物或前体的用途, 用于制备防治代谢性疾病的药物(或组合物)。

作为本发明的优选方式, 所述的代谢性疾病包括: 脂代谢疾病或糖代谢疾病。所述的脂代谢疾病包括: 高血脂症, 脂肪肝, 肥胖症, 动脉粥样硬化, 冠心病、
30 高血压, 脑梗塞, 中风, 肾功能衰竭等。所述的糖代谢疾病包括: 高血糖症,

糖尿病，肥胖症，高胰岛素症，动脉粥样硬化，冠心病、高血压，甲状腺功能亢进、糖尿病眼病等。

总之，本发明的化合物通过全新的机制调控脂质代谢和糖代谢，经过动物试验论证，对脂代谢疾病或糖代谢疾病有显著疗效。

5

组合物

如本文所用，术语“本发明的组合物”通常是药物组合物，其含有阿特匹灵 C 或其类似物或它们的异构体、外消旋体、药学上可接受的盐、水合物或前体作为防治代谢性疾病的活性成分；以及药学上可接受的载体或赋形剂。

10 本发明中，术语“含有”表示各种成分可一起应用于本发明的混合物或组合物中。因此，术语“主要由...组成”和“由...组成”包含在术语“含有”中。

本发明中，“药学上可接受的”成分是适用于人和/或动物而无过度不良反应(如毒性、刺激和变态反应)即有合理的效益/风险比的物质。

15 本发明中，“药学上可接受的载体”是用于将本发明的阿特匹灵 C 或其类似物或它们的异构体、外消旋体、药学上可接受的盐、水合物或前体传送给动物或人的药学上或食品上可接受的溶剂、悬浮剂或赋形剂。载体可以是液体或固体。适用于本发明的药学上可接受的载体包括(但不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。

20 本发明还提供了制备防治代谢性疾病的组合物的方法，包括使用可将有效量的阿特匹灵 C 或其类似物或它们的异构体、外消旋体、药学上可接受的盐、水合物或前体与药学上可接受的载体混合获得本发明的组合物，活性成分在组合物中的重量比例例如可以是 0.0001-50 wt %；较佳地可以是 0.001-20 wt %。

25 本发明所述的药物组合物的剂型可以是多种多样的，只要是能够使活性成分有效地到达哺乳动物患处的剂型都是可以的。从易于制备和给药的立场看，优选的药物组合物是一种口服或注射的制剂。比如可选自：颗粒剂、片剂、胶囊剂、溶液、或悬浮液、粉末剂。本发明的组合物中可以加入制备不同剂型时所需要的各种常规载体或辅料，如填充剂、矫味剂、抗氧化剂、香料、色素、润滑剂、助流剂、润湿剂、乳化剂、pH 缓冲物质等。这些添加剂都是本领域人员所熟知的。

30 本发明还提供了一种防治代谢性疾病的方法，包括步骤：给需要的对象施用有效量的阿特匹灵 C 或其类似物或它们的异构体、外消旋体、药学上可接受的盐、水合物或前体。活性成分的给药量是治疗有效量。当外用时，本发明所述的

化合物的安全有效量通常约 0.1ng-100mg/kg 体重；较佳的约 1ng-10mg/kg 体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、用药者健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围内的。

此外，本发明所述的化合物还可与其他活性成分或治疗剂（如其它降血脂药物、降胆固醇药物、糖尿病药物等）一起使用。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 J.萨姆布鲁克等编著，分子克隆实验指南，第三版，科学出版社，2002 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

I、材料和方法

1、巴西蜂胶化合物分离

将 500 mL 巴西绿蜂胶 60%乙醇初提取液减压浓缩得浸膏，加水混悬后，依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取 3 次，得到各个部位浸膏。乙酸乙酯层经 MCI 柱层析，依次用甲醇水不同梯度洗脱，得到 40%、60%、80%和 100%四个分段。乙酸乙酯-40%部位(3.2 g)通过正相柱层析和反相 ODS 柱分离；乙-60%(21.8 g)经过反复正相柱、ODS 柱(甲醇-水体系)、Sephadex LH-20 凝胶柱(甲醇-水体系洗脱)等分离手段分离；乙酸乙酯-80%部位(37.2 g)经过正相柱、重结晶、ODS 柱(甲醇-水体系)、Sephadex LH-20 凝胶柱(甲醇-水体系洗脱)等方法分离；乙酸乙酯-100%部位(29.6 g)通过正相柱层析和重结晶；水层通过 ODS 柱分离。获得巴西绿蜂胶的单体化合物。

2、哺乳动物双杂交筛选

构建 CREB-CRTC2 哺乳动物双杂交系统，包括人源 CREB 与 BD(Gal4-Binding domain)、人源 CRTC2 与 AD(Gal4-Active domain)的融合表达载体，结合诱导性 Gal4-Luciferase 以及组成性 RSV-Renilla 双报告基因表达载体，从而建立一个完整的 CREB/CRTC2 哺乳动物双杂交系统。

哺乳动物双杂交系统中融合蛋白质表达载体以质粒 804 和 811(获自同济大学)为骨架。克隆位点和引物如表 1。双杂交报告基因 GAL4-Luciferase 购自(Promega)，参照报告基因 RSV-Renilla 构建如表 1，即 RSV 启动子序列替换 CMV-Renilla

(NEB)的 CMV 启动子序列。

融合蛋白 HIS-CRTC2-S171A 表达载体骨架为 pET28C(购自 Addgene), 带 GST 标签的 CREB 全长及 N 端截短体融合蛋白质的原核表达载体以 pGEX5X-1(GE)为骨架, 具体克隆位点及 PCR 扩增引物见表 1。

5

表 1、表达载体的构建

表达融合蛋白	载体	克隆方式	目标基因扩增引物(正向)	目标基因扩增引物(反向)
hCRTC2-S171 A-AD	804	双酶切 (HindIII/XhoI)	Hind3-hCRTC2-F: CCCAAGCTTATGGCGACGTCG GGGG(SEQ ID NO: 1)	hCRTC2-XhoI-R(deleteTAG): CCGCTCGAGTTGGAGCCGGTCACTGC GGAATGACTCCTC(SEQ ID NO: 2)
BD-hCREB	811	双酶切 (EcoRI/HindIII)	EcoRI-hCREB-F: CCCGAATTCATGACCATGGAA TCTG(SEQ ID NO: 3)	hCREB-Hind3-R (keep TAA): GCCCAAGCTTTTAATCTGATTTGTGG CA(SEQ ID NO: 4)
RSV-Renilla	pGL3	双酶切 (XhoI/SalI)	XhoI-RSV-Rluc-F:CCGCTCG AGAAAGCGGGGCTTCGGTTG TACGCGG(SEQ ID NO: 5)	SalI-RSV-Rluc-R: CCGACGTCGACTGCATTGGTACCACA TTTGTAGAGG(SEQ ID NO: 6)
GST-hCREB	pGEX5X-1	双酶切 (EcoRI/NotI)	EcoRI-CREB-F: CGAATTCA TGACCATGGAATCTGGAGCCG AG(SEQ ID NO: 7)	NotI-hCREB-TGA-R1040:CGGCCGCCT AATCTGATTTGTGGCAGTAAAGGTCC TTAAGTG(SEQ ID NO: 8)
GST-hCREB- Δ Q1	pGEX5X-1	双酶切 (EcoRI/NotI)	EcoRI-hCREB-F304: CGGGAATTCATGATGATTTCA ACTATTGCAGAAAGTG(SEQ ID NO: 9)	NotI-hCREB-TGA-R1040: GCGGCCGCCTAATCTGATTTGTGGCA GTAAAGGTCCTAAGTG(SEQ ID NO: 10)
GST-hCREB- Δ KID	pGEX5X-1	双酶切 (EcoRI/NotI)	EcoRI-hCREB-F481: CGGGAATTCATGTCAGCACCT GCCATCAC(SEQ ID NO: 11)	NotI-hCREB-TGA-R1040: GCGGCC GCCTAATCTGATTTGTGGCAGTAAAG GTCCTTAAGTG(SEQ ID NO: 12)
GST-hCREB- Δ Q2	pGEX5X-1	双酶切 (EcoRI/NotI)	EcoRI-hCREB-F850:CGGGAATT CATGCGAAAGAGAGAGGTCC GTCTAATGA(SEQ ID NO: 13)	NotI-hCREB-TGA-R1040: GCGGCC GCCTAATCTGATTTGTGGCAGTAAAG GTCCTTAAGTG(SEQ ID NO: 14)
GST-hCREB-b ZIP	pGEX5X-1	双酶切 (EcoRI/ NotI)	EcoRI-hCREB-F850: CGGGAAT TCATGCGAAAGAGAGAGGTC CGTCTAATGA(SEQ ID NO: 15)	NotI-hCREB-TGA-R1040: GCGG CCGCCTAATCTGATTTGTGGCAGTAA AGGTCCTTAAGTG(SEQ ID NO: 16)

GST-hCREB-1 euZIP	pGEX5X-1	双酶切 (EcoRI/ NotI)	EcoRI-hCREB-F850: CGGGAAT TCATGCGAAAGAGAGAGGTC CGTCTAATGA(SEQ ID NO: 17)	NotI-hCREB-TGA-R996: TCTGCGGCCGAGTGCTTTTAGCTCC TCAATCAAT(SEQ ID NO: 18)
HIS-hCRTC2-S 171A	pET28C	双酶切 (EcoRI/HindIII)	EcoRI-CT2-F30: CGGGAATTC CTCTGGTGCCGCGCGGCAGC ATGGCGACGTCGGGGGCGAA CGGGC(SEQ ID NO: 19)	Hind3-CT2-R2050:CGGAA GCTTTCATTGGAGCCGGTCACTGCGG AATGACTCCTC(SEQ ID NO: 20)
HIS-CREB	pET28C	同源重组	PET28C-EcoRI-CREB-F: CAGCAAATGGGTGGATCCGA ATCACCATGGAATCTGGAGC CGAG(SEQ ID NO: 21)	PET28C-Hind3-CREB-taa-R: AGTG CGGCCCAAGCTTTTAATCTGATTTG TGGCAGTAAAGG(SEQ ID NO: 22)

HEK293T 细胞生长致对数生长期时接种到 24 孔培养板上培养过夜，脂质体(Lipo 2000, Invitrogen)介导哺乳动物双杂交质粒系统转染，6h 后加入待测化合物及溶剂对照(1%DMSO)，每个化合物设 3 个重复，培养 18 小时后检测报告基因表达量，评价校正后 Gal4-荧光素酶的表达水平，利用抑制筛选模型对受试化合物进行分析。

3、肝原代细胞双报告基因检测

通过高纯度腺病毒为转基因媒介向短期培养的原代肝细胞转入诱导性 Ad-CRE-Luciferase 和组成性表达的 Ad-RSV-Renilla 报告基因，构建双报告基因检测系统，以胰高血糖素为激动剂，以受试化合物为抑制剂，评价化合物对 CRE-荧光素酶报告基因活性的抑制活性。

表达诱导性 Ad-CRE-Luciferase 的重组腺病毒获自美国 Salk Institute 的 Dr. Marc R.Montminy。表达组成性表达的 Ad-RSV-Renilla 报告基因的重组腺病毒载体的构建方法：CMV-Renilla 表达载体的启动子 CMV 通过克隆被置换成启动子 RSV，通过亚克隆，使片段 RSV-Renilla 克隆到腺病毒穿梭载体 pshutter，阳性的 pshutter-RSV-Renilla 与质粒 Ad-easy 重组，获得 Ad-easy-RSV-Renilla 质粒。阳性重组质粒 Ad-easy-RSV-Renilla 经过内切酶 PacI 酶切成为线性化 Ad-easy-RSV-Renilla，随后转入腺病毒包装细胞系 MGH293(获自美国 Salk Institute 的 Dr. Marc R.Montminy)，7-14 天后出现噬菌斑表明腺病毒包装成功。

腺病毒经扩增和氯化铯纯化后用于小鼠体内及细胞实验。

4、小鼠肝原代细胞分离及培养

25g 左右野生型 C57 小鼠麻醉后固定，经门静脉-下腔静脉循环进行原位灌
5 流，HBSS 前灌流液清除肝脏中血液，胶原酶(Sigma)原位消化细胞外胶原蛋白
以分离细胞，100 目细胞筛过滤组织碎片后，用无血清 M199 培养基清洗肝原
代细胞 2 次，处理后的肝原代细胞培养于含血清的 M199 培养基中。实验前于
无血清 M199 培养基中饥饿 16 小时。

10 5、细胞活力检测 MTT

原代肝细胞接种于 96 孔细胞板(3000 个细胞/孔)，于无血清 M199 中饥饿
16 小时，加入不同浓度的受试化合物，培养 1-2 天，去培养基后，加入 20ul MTT
试剂 (5 μ g/ml, PH 7.4) 与细胞共培养 5 小时，加入 150 μ l DMSO 后充分溶解
MTT，检测 OD490 的吸光值，评价受试化合物对原代肝细胞活力的影响。

15

6、免疫印迹 Western Blot

处理后的细胞或冻存组织裂解于 RIPA 缓冲液 (25mM Tris-HCl, 150mM
NaCl, 1% NP-40, 1%脱氧胆酸钠(sodium deoxycholate), 0.1% SDS, pH 7.6),
充分裂解后离心后去取上清，适度稀释后用 BCA 方法测定样品总蛋白浓度，取
20 等量总蛋白的样品加入 5 \times SDS 后于 95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟，以一定浓度的 SDS-PAGE
胶分离不同的蛋白质，然后在电场中转到 PVDF 膜。利用抗体检测总蛋白质中
目标蛋白质的磷酸化或表达量的变化。

7、免疫共沉淀

25 处理后的细胞或冻存组织裂解于 IP 缓冲液，充分裂解后离心后去取上清，
适度稀释后用 BCA 方法测定样品总蛋白浓度，取 10%的裂解液为 Input 组。取
含 1 μ g 总蛋白质的裂解液，加入 Protein A/G beads(Millipore)以及识别目标蛋白
质的一抗后于 4 $^{\circ}$ C 下孵育。清洗沉淀后的 beads，加入 3 \times SDS 缓冲液于 95 $^{\circ}$ C 下
加热 6 分钟洗脱下与抗体免疫蛋白相互结合的蛋白质复合体。Western blot 分析
30 免疫沉淀样品中目标蛋白质的变化。FLAG-mCRTC2 质粒获自美国 Salk Institute
的 Dr. Marc R. Montminy。

8、免疫染色

肝原代细胞接种于 24 孔板中的无菌盖玻片上培养, 经相应的处理后, 用多聚甲醛固定, PBS 洗去多聚甲醛, 封闭并使细胞膜通透(PBS, 0.3% TritonX-100, 5% BSA)。孵育一抗(PBS, 0.3% TritonX-100, 5%BSA)后清洗, 孵育荧光二抗 Alex(Invitrogen)后清洗, DAPI 染核及清洗后封片。荧光显微镜下观察目标蛋白质的变化。

9、GST-pull down

HIS 标签融合人源 CRTC2-Ser171Ala 重组蛋白质原核表达载体的构建(表 1): 人源 CRTC2-Ser171Ala 表达序列通过 EcoRI/HindIII 克隆原核表达载体 pET28C, 测序鉴定 CRTC2-Ser171Ala 与 HIS 融合并完整表达。GST 标签融合 CREB 的重组蛋白原核表达载体的构建如表 1。人源 CREB(hCREB)通过 EcoRI/NotI 克隆到原核表达载体 pGEX5X1, 测序鉴定与标签 GST 融合并完整表达。

原核表达载体转入 *E.coli* 中, 16℃下 IPTG 诱导表达过夜后, 收集菌体后裂解菌体、超声、离心后取上清, 以 GST beads 或 HIS beads 纯化标签蛋白质。

GST 融合 CREB 的重组蛋白的裂解液上清中加入 GST beads 室温孵育 30 分钟, 清洗去除 beads 上的非特异结合蛋白, 制备成 GST-CREB beads。

HIS 标签融合人源 CRTC2-Ser171Ala 重组蛋白质(HIS-CRTC2-Ser171Ala)在细菌中被诱导表达, 以 HIS beads 纯化 HIS-CRTC2-Ser171Ala 蛋白质后脱盐去除咪唑, 获得的纯化蛋白质 HIS-CRTC2-Ser171Ala 用于 pull down。

在 500μl 的 pull down 体系中包括 800ng 的 HIS-CRTC2-Ser171Ala 纯化蛋白质, 40μl GST-CREB beads 及受试化合物, 于 4℃孵育。清洗结合后的 beads, 去除非特异性结合蛋白, 加入 3XSDS buffer 95℃处理 6 分钟获得结合后的蛋白质样品。Western blot 分析洗脱样品中蛋白质的变化。

10、cAMP 检测

以短期培养的原代肝细胞为实验材料, 以受试化合物预处理 1 小时, 随后 100nM 胰高血糖素刺激 30 分钟后去掉上清, PBS 洗涤后裂解细胞, 按照用 cAMP ELISA(R& D)试剂盒说明操作, 评价受试化合物对胰高血糖素诱导的 cAMP 合

成的影响。

11、肝细胞葡萄糖输出

以 M199 为培养基，短期培养原代肝细胞饥饿过夜，加入受试化合物预培养 1 小时，100nM 胰高血糖素刺激 4 小时后，换无糖、无丙酮酸钠、无酚红培养基(Sigma)并加丙酮酸钠和乳酸钠孵育 8 小时，收集培养基并离心，上清按照试剂盒(GO kit, Sigma)测定培养基中的葡萄糖含量，评价受试化合物对原代肝细胞产糖能力的影响。

12、基因转录水平检测

培养后的细胞或冻存的组织裂解于 Trizol 中，异丙醇沉淀法抽提总 RNA，80%乙醇(DEPC)洗涤、干燥后溶解于 EDPC 水中。以 0.5-1 μ g 的总 RNA 为模版反转录合成 cDNA (TAKARA)。以 cDNA 为模版，利用 QPCR 方法扩增目标基因(IBA7900)，通过检测 Ct 值分析各目标基因 mRNA 拷贝数变化。

15

13、表面离子共振(SPR)

表面等离子共振(SPR, Surface plasmon resonance)生物传感分析技术检测小分子与蛋白质的相互结合。人源重组蛋白质 HIS-CREB 通过与 NTA 芯片捕获的 Ni 离子特异结合，从而被固定在 NTA 芯片上，不同浓度的小分子通过流动相以一定速度流过芯片表面的蛋白质，如流动相分子与固定蛋白质相互结合，芯片表面结合分子的分子量改变，造成芯片对入射光的折射率(RU)相应改变，仪器(Biacore 100, GE)实时检测不同条件下芯片的折射率(RU)的传感图。检测时设定捕获 Ni 但不结合蛋白质的通道为参照通道，相同条件下实验通道上的 RU 值扣减参照通道 RU 值后为原始数据。流动相分子浓度与其响应的 RU 值通过单一位点模式拟合结合曲线，以获得该对分子相互结合时的动力学参数。

HIS 标签融合人源 CREB 重组蛋白质的获得：人源 CREB 编码基因通过同源重组手段克隆到原核表达载体 pET28C，测序鉴定 CREB 与 HIS 融合并完整表达。HIS-CREB 转入大肠杆菌表达菌株 BL21 中，诱导表达后，收集菌体，超声，分离裂解液上清，以 HIS beads 亲和纯化 HIS-CREB，高盐洗脱下的 HIS-CREB 经透析去除咪唑，用于小分子与蛋白质的亲和实验。

30

14、等温滴定量热检测(ITC)

等温滴定量热技术(ITC, isothermal titration calorimetry, GE)通过监测成分间相互结合而产生的热量变化(放热或吸热),以测定小分子和蛋白质之间的直接结合。纯化的蛋白质 HIS-CREB 脱盐浓缩后溶解于 PBS (8.0, NaCL 500mM),
5 滴入待测小分子稀释液中,检测(Micro Cal iTC200, GE)每次滴定加入后体系的放热量,获得每次注射的热量变化,以热量变化峰积分面积与注入分子摩尔比作图。通过 ORIGIN7 软件以单一位点模式拟合结合等温线,获得结合常数、化学计量、熵及焓参数。

10 15、小鼠葡萄糖耐受性(GTT)、丙酮酸耐受性(PTT)及胰岛素敏感性(ITT)检测

实验小鼠经处理后, GTT 实验前饥饿过夜, 每只小鼠按照体重腹腔注射无菌葡萄糖(2g/kg), 分别在注射后 0, 15, 30, 60, 120 分钟时尾静脉取血, 用血糖仪(Roche)测试血糖浓度, 以时间为横轴, 血糖浓度为纵坐标, 做不同处理组
15 小鼠的血糖浓度变化曲线。PTT 实验注射物为丙酮酸钠(1.5g/kg)。ITT 实验前小鼠饥饿 3 小时, 注射物为胰岛素(1.5U/kg)。

16、小鼠体内报告基因活体成像

实验小鼠经过处理后, 尾静脉注射带有报告基因的腺病毒, 包括表达诱导性 Ad-G6P-Luciferase 报告基因和组成性 Ad-RSV- β -gal 的报告基因, 3 天后进行
20 活体成像实验, 实验前小鼠饥饿过夜, 异氟烷(Abbott)麻醉小鼠后皮下注射荧光素酶底物 Luciferin(Biosynth AG), 15 分钟后通过活性成像仪(IVIS lumina, Xenogen)采集小鼠肝脏荧光素酶生物发光的信号, 分析 β -gal 值校正后的荧光素酶信号, 评价受试化合物在活体内对饥饿胰高血糖素所诱导的 G6P-Luciferase
25 相对活性的影响。

17、腺病毒构建及纯化

腺病毒 Ad-HA-mCRTC2, Ad-G6p-luc, Ad-CRE-Luc. Ad- β -Gal; 均获自美国 Salk Institute 的 Dr. Marc R. Montminy.

30 表达组成性表达的 Ad-RSV-Renilla 报告基因的重组腺病毒载体的构建方法: CMV-Renilla 表达载体的启动子 CMV 通过克隆被置换成启动子 RSV, 通

过亚克隆，使片段 RSV-Renilla 克隆到腺病毒穿梭载体 pshutter，阳性的 pshutter-RSV-Renilla 与质粒 Ad-easy 重组，获得 Ad-easy-RSV-Renilla 质粒。阳性重组质粒 Ad-easy-RSV-Renilla 经过内切酶 PacI 酶切成为线性化 Ad-easy-RSV-Renilla，随后转入腺病毒包装细胞系 MGH293，7-14 天后出现噬菌斑表明腺病毒包装成功。腺病毒经扩增和氯化铯纯化后用于小鼠体内及细胞实验。

腺病毒扩增培养后，收集培养基，离心收集细胞并反复冻融 3 次，在饱和硫酸铵的条件下沉淀病毒颗粒，然后用 PBS 重悬病毒。在 CsCl 密度梯度中经两次纯化病毒，随后在 PBS-甘油(10%)缓冲液中透析过夜，清除病毒的无机盐，储存于 -80℃。

18. 组织切片

小鼠实验结束后取出组织固定，石蜡包埋后切片，HE 染色观察细胞形态。Olympus 相机拍照。

15

19、染色质免疫共沉淀(CHIP)

原代肝细胞经甲醛交联处理后在 PBS 中刮下细胞，于裂解 buffer 中收集细胞核，超声波 50%功率脉冲 1 秒，间隙 2 秒，剪切处理 3 分钟，获取上清用于后续实验。剪切后的染色体溶液分别与 IgG(Santa Cruz)、CREB(Cell Signal)抗体和 CRTC2(Calbiochem)抗体 4℃ 孵育 2 H，随后加入 Protein A beads (Millipore)于 4℃ 孵育过夜。免疫沉淀的染色质用 Chelex 100(Bioered)纯化回收，并用 QPCR (ABI7900)方法定量。抗体 CREB 和 CRTC2 免疫沉淀-QPCR 信号以相应的 IgG 信号为内标进行校正，所用 PCR 引物列于表 2。

20

表 2、CHIP-QPCR 分析用引物

<i>CRE-G6pc</i>	Fwd	ATCAGGCTGTTTTTGTGTG
	Rev	CATCATCAGTAGGTTGATGC
<i>CRE-Pgc-1α</i>	Fwd	GGGCTGCCTTGGAGTGACGTC
	Rev	AGTCCCCAGTCACATGACAAAG
<i>CRE-Pck1</i>	Fwd	TCTCCCTGGAGTTTATTGTG
	Rev	TACTATATAGAAGGGAGGACAGC

25

20、甘油三酯(TG)、胆固醇(Cholesterol)的检测

眼眶血经 EDTA 抗凝处理后离心(3000rpm, 15 分钟)后取得的上清用于检测血清总甘油三酯(TG, triglyceride)、总胆固醇(TC, total cholesterol)、低密度胆固醇(LDLC, LDL cholesterol)及高密度胆固醇(HDLC, HDL cholesterol)的含量, 按照试剂盒(北化康泰)说明书操作。肝脏组织中甘油三酯、胆固醇经提取后含量按照试剂盒(普利来)说明操作, 其组织样品中脂肪浓度用样品蛋白质浓度校正。

21、血清生化检测

小鼠血清中的胰岛素(Millipore)、丙氨酸转氨酶(ALT, 科华)、精氨酸转氨酶(AST, 科华)的含量测定按照试剂盒操作。

22、活体脂肪含量检测

在清醒、无侵入的条件下使用 NMR 仪器(The Minispec, Bruker)测定小鼠活体内脂肪含量, 肌肉与脂肪的比值(Lean/Fat)。

15

II、实验结果

实施例 1、巴西绿蜂胶抑制糖尿病小鼠肝糖异生

为了研究蜂胶的降血糖机制, 首先在 *db/db* 糖尿病小鼠中检测了巴西绿蜂胶的降血糖活性。结果表明 1-2 天的短期口服巴西绿蜂胶(250mg/kg)明显降低糖尿病小鼠的空腹血糖(图 1.A)。*db/db* 糖尿病小鼠服用巴西绿蜂胶 2 周后, *db/db* 糖尿病小鼠的糖耐受性(图 1.B)和胰岛素敏感性(图 1.C)得到显著性提高。

DIO(高脂诱导肥胖模型, diet induced obesity, DIO)小鼠服用巴西绿蜂胶 2 周后, 进行丙酮酸耐受性检测。结果表明, 巴西绿蜂胶明显抑制了高脂诱导糖尿病小鼠(DIO)的肝糖异生能力(图 1.D)。

DIO 小鼠服用巴西绿蜂胶 3 周后发现, 在转录水平上蜂胶显著抑制了 DIO 小鼠肝脏中肝糖异生限速酶 *G6pc* 和 *Pck1* 的转录水平(图 1.E)。

DIO 小鼠服用巴西绿蜂胶 3 天后, 小鼠活体内肝脏成像检测进一步表明, 口服巴西绿蜂胶显著降低饥饿诱导的肝脏 *G6p-LUC* 报告基因活性(图 1.F)。在原代肝细胞中再次检测到蜂胶抑制胰高血糖素诱导的 *G6p-LUC*(图 1.G)以及 *CRE-LUC* 报告基因转录的生物活性(图 1.H)。

以上结果说明, 巴西绿蜂胶能改善糖尿病小鼠整体葡萄糖代谢以及胰岛素

敏感性，这种活性与蜂胶抑制胰高血糖素诱导的肝糖异生的生物活性有密切联系。

实施例 2、CREB/CRTC2 双杂交系统检测巴西绿蜂胶成分活性

5 胰高血糖素诱导肝糖异生主要依赖于 GCGR-cAMP-PKA-CREB/CRTC2-CRE 信号通路(图 2.A)。

由于巴西绿蜂胶对胰高血糖素刺激产生的 cAMP 及 CREB 的磷酸化并无显著影响(图 2.B)，说明巴西绿蜂胶对肝糖异生的抑制作用靶点可能处于胰高血糖素信号通路的末端。CRTC2 被胰高血糖素激活去磷酸化后通过入核与 CREB 的相互结合，能有力地促进肝糖异生的相关基因的转录，基于这一原理构建了
10 CREB: CRTC2-Ser171Ala 哺乳动物双杂交系统(图 2.C)(本系统利用突变体 CRTC2-Ser171Ala 模拟被去磷酸化、激活的 CRTC2 状态)，利用这一系统检测蜂胶对 CREB-CRTC2 结合的影响。

双杂交报告基因检测显示，蜂胶(0.2%(V/V))非常显著地抑制了双杂交系统
15 报告基因的转录活性(图 2.C)。该结果表明，巴西蜂胶能通过抑制 CREB 与 CRTC2 的相互结合，进而在转录水平上抑制肝糖异生。为了从巴西绿蜂胶中发现有效的降血糖活性成分，发明人对蜂胶的分离成分进行了活性追踪。

首先，利用不同极性溶剂对蜂胶水混悬液进行液液萃取，得到石油醚(Petroleum ether)、乙酸乙酯(EtOAc)、正丁醇(n-BuOH)和水层(Water)四个部分，
20 并对各个部位抑制 *G6p-Luc* 报告基因的活性进行了评价。结果显示，乙酸乙酯层的活性最好(图 2.D)。由于乙酸乙酯层成分最丰富，本发明人通过 MCI 柱对乙酸乙酯层进行进一步的分段，梯度洗脱得到 4 个部位，其中 60%和 80%甲醇水的洗脱部位活性较好。着重对这两个部分进行细分，最终从 60%和 80%部位分离鉴定得到 18 个化合物。另外还从乙酸乙酯层 40%和 100%层分离得到 P1、
25 P9 和 P8(图 2.E)。所分离的 21 个化合物中有 8 个肉桂酸类、2 个咖啡酸类、1 个苯并呋喃类、6 个黄酮醇类、2 个二氢黄酮类和 2 个二氢黄酮醇类化合物(图 2.E)。其中苯丙烯酸类化合物 P3(阿特匹灵 C, Artepillin C)是巴西蜂胶中高含量成分之一。

为了鉴定出具有抑制 CREB/CRTC2 介导的肝糖异生活性的蜂胶单体，通过
30 体外 CREB-CRTC2 哺乳动物双杂交系统对分离后的巴西绿蜂胶单体化合物进行了活性评价。初筛实验选择了 25 μ M 的单浓度。初筛结果显示，0.2%蜂胶浓

缩液能显著抑制 CRTC2:CREB 的结合；与溶剂对照组(1%DMSO)相比，8 个化合物(P1、P2、P3、P5、P6、P11、P16 和 P18)显示出较强的抑制活性；其中 P3 的活性最强，化合物 P1, P2, P5、P6、P11 和 P16 的活性相比相对弱些，而化合物 P4、P7、P10、P12、P14、P15、P17 和 P19 在 25 μ M 浓度下几乎没有抑制作用(图 2.G)。P1、P2、P3、P5 和 P6 具有类似的结构(图 2.H)，都是酚酸类衍生物。通过 CREB-CRTC2 双杂交系统对巴西绿蜂胶单体评价结果表明，蜂胶的活性单体主要集中在乙酸乙酯层的甲醇洗脱部位，P3 (Artepillin C)是具有抑制 CREB/CRTC2 相互结合的活性蜂胶单体化合物。

10 实施例 3、Artepillin C 抑制 CREB 与 CRTC2 的蛋白质相互作用

为了进一步研究 Artepillin C 抑制 CREB-CRTC2 相互结合的分子机制，本发明人利用免疫沉淀的方法检测 Artepillin C 的抑制活性。在过表达 FLAG-mCRTC2 的 HEK293T 细胞裂解液中，Artepillin C 明显地抑制了 GST-hCREB beads 与 FLAG-mCRTC2 的相互结合(图 3.A)。由于肝细胞能代谢外源性药物及代谢中间产物的功能，因此进一步验证 Artepillin C 是否能在肝细胞中保持抑制活性。以原代肝细胞为实验材料，免疫共沉淀检测 CREB 与 CRTC2 的相互结合，利用这一系统检测 Artepillin C 在肝细胞中的抑制活性。结果表明 Artepillin C(10 μ M) 显著抑制了 CREB 与 CRTC2 的结合，并且免疫沉淀时再次加入的 Artepillin C 具有更强的抑制活性(图 3.B)。这说明在肝细胞中 Artepillin C 也具有抑制 CREB-CRTC2 蛋白质相互结合的生物活性。

为了进一步研究 Artepillin C 的抑制活性是直接作用还是间接作用，利用纯化蛋白质进行体外免疫沉淀分析。首先在大肠杆菌中表达并纯化得到重组蛋白质 GST-hCREB 以及 HIS-hCRTC2-Ser171Ala。HIS-hCRTC2-Ser171Ala 携带的点突变 Ser171Ala 模拟 CRTC2 被胰高血糖素去磷酸化激活后进而被滞留在细胞核中的状态，因此与 CREB 的亲合性更高。利用这 2 种纯化蛋白质进行 GST-Pull down 分析，结果显示 Artepillin C 显著地抑制了 CREB(图中示为 GST-CREB) 与 HIS-hCRTC2-Ser171Ala 的相互结合并具有剂量效应(图 3.C)。这一结果表明 Artepillin C 能够直接地抑制 CREB 与 CRTC2 的相互结合，而不需要其他的辅助成分。

30 为了确定 Artepillin C 抑制活性的直接靶点，需要进一步检测 Artepillin C 与作用蛋白质 CREB、CRTC2 是否能直接结合。本发明人利用表面等离子共振

(SPR, Surface plasmon resonance)生物传感分析技术直接检测小分子 Artepillin C (APC)与蛋白质 CREB 的相互结合。纯化 HIS-CREB 蛋白质通过 N 端 HIS 标签被固定到 NTA 传感芯片(GE)上, 以流动相携带 Artepillin C 流过 HIS-CREB 蛋白质表面。SPR 分析(Biacore, GE)结果表明 Artepillin C 的流过时传感芯片表面的 RU 值(传感图响应值)增大, 并且传感图响应值(RU)与流动相 Artepillin C 的浓度呈正相关(图 3.D)。SPR 结果显示 Artepillin C 能够与 CREB 直接结合并具有剂量效应, 这种结合很可能是 Artepillin C 抑制活性的分子基础。

为了获得 Artepillin C 与 CREB 相互结合的动力学参数, 利用微量滴定量热技术(Isothermal titration calorimetry, ITC)进一步检测 Artepillin C 与 CREB 的结合后热量变化。ITC 结果表明当 HIS-CREB 滴入 Artepillin C 溶液时, 有大量结合热释放, 检测到的结合释放热量与滴定物摩尔浓度的相对关系按照单结合位点模式拟合成热力学曲线, 曲线回归提示 Artepillin C 与 CREB 结合的平衡解离常数 K_D 约为 2-5 μ M(图 3.E)。ITC 检测到 Artepillin C 与 CREB 的结合释放热进一步确定了小分子 APC 能直接与 CREB 结合, 并提示 CREB 是 Artepillin C 的蛋白质靶点。

为了确定 CREB 与 Artepillin C 的结合区域, 利用免疫沉淀手段进行缺失性分析, 本发明人分别检测 Artepillin C 对不同 CREB 截短体与全长 CRT2 蛋白质结合能力的影响。人源 CREB 全长(Genbank ID: M34356; Unigene ID: Hs.516646; Uniprot ID:P16220)及截短体包括: CREB Δ Q1(全长的第 102-341 位氨基酸); CREB Δ Q1 Δ KID(全长的第 160-341 位氨基酸); CREB-bZIP(全长的第 283-341 位氨基酸), 分别与 GST 标签融合表达(见图 3.F), 并以 GST beads 固定。

结果显示, 当 CREB 的 Q1 区域缺失后, Artepillin C 则不能抑制 CREB 与 CRT2 的相互结合(图 3.G)。CREB 功能缺失性试验结果表明 Artepillin C 可能通过与 CREB 的 Q1 区域结合, 从而抑制 CREB-CRT2 的相互作用。在哺乳动物双杂交系统中, Artepillin C 抑制 CREB-CRT2 相互结合半数抑制剂量(IC50)约为 2 μ M, 表明微摩尔水平的 Artepillin C 可在活细胞中发挥生物活性(图 3.H)。

综上所述, Artepillin C 通过与 CREB 的 Q1 区域结合, 抑制 CREB 与 CRT2 的相互结合, Artepillin C 的抑制活性具有剂量效应, 并能够在肝细胞中发挥抑制活性。

实施例 4、Artepillin C 抑制原代肝细胞中胰高血糖素诱导的肝糖异生

基于 Artepillin C 具有抑制 CREB-CRTC2 相互结合的生物活性，进一步检测了 Artepillin C 在肝原代细胞的作用。

采用 CHIP-QPCR 检测 Artepillin C 抑制 CRTC2 与 CRE 结合的活性。结果显示，在通过感染腺病毒 Ad-HA-CRTC2，过表达 HA-CRTC2 的肝原代细胞中，Artepillin C 抑制了胰高血糖素诱导的 CRTC2 向 CRE 元件募集，但是对 CREB 结合 CRE 的影响并不显著(图 4.A)。该结果表明，Artepillin C 能抑制 CRTC2 结合到 CRE 元件上，这一结果与 Artepillin C 能抑制 CREB 与 CRTC2 的免疫沉淀、以及 CREB/CRTC2 双杂交报告基因的作用是吻合的。

在转录水平上，Artepillin C 显著降低了胰高血糖素所诱导的肝糖异生关键基因 *G6pc*，*Pck1* 以及 *Pgc1a* 的 mRNA 水平(图 4.B)。

在细胞整体水平上，1-5 μ M 的 Artepillin C 处理显著抑制了胰高血糖素刺激的葡萄糖输出(图 4.C)，这表明 Artepillin C 能显著抑制肝原代细胞的葡萄糖输出。

通过 MTT 检测，高达 100 μ M 的 Artepillin C 对肝原代细胞的活力并无明显的毒性(图 4.D)，说明 Artepillin C 对肝原代细胞的损伤小，Artepillin C 抑制肝原代细胞葡萄糖输入并非 Artepillin C 降低细胞活力所导致。

进一步检测 Artepillin C 对胰高血糖素信号通路的影响，结果显示 Artepillin C 不影响肝原代细胞中胰高血糖素刺激产生的 cAMP 水平(图 4.E)，并且对 CREB 的磷酸化和 CRTC2 的去磷酸化作用也没有显著的影响(图 4.F)。说明 Artepillin C 对肝糖异生转录调控的信号通路上游没有显著影响。

在胰高血糖素信号通路的末端，CRTC2 作为转录共激活因子，能显著促进 CRE 靶基因的转录效率，因此本发明人利用缺失模型进一步检测 Artepillin C 抑制活性是否依赖于 CRTC2 的功能。结果表明在 *CRTC2*^{-/-}原代肝细胞中，Artepillin C 对肝葡萄糖输出的抑制活性消失(图 4.G)。此时，Artepillin C 也不能抑制胰高血糖素诱导的肝糖异生关键基因 *Pgc1a*，*Pck1* 的转录(图 4.H)。这说明 Artepillin C 对肝糖异生的抑制活性依赖于 CRTC2 的存在。

以上结果表明，Artepillin C 通过抑制胰高血糖素诱导由 CREB/CRTC2 介导的肝糖异生功能从而降低肝原代细胞的葡萄糖输出。

实施例 5、Artepillin C 改善高血脂症和脂肪肝

为了检测 Artepillin C 在活体内对代谢的作用, 本发明人以高脂肥胖小鼠(DIO)和 *db/db* 小鼠为实验对象, 经腹腔注射(DIO: 0, 10, 20mg/kg; *db/db*: 20mg/kg) 给药。

结果表明, Artepillin C 能显著抑制 DIO 和 *db/db* 模型小鼠的体重增长(图 5. A, 5 左 DIO, 右 *db/db*), 在 DIO 小鼠中 Artepillin C 减少 DIO 体重增长具有剂量效应(图 5. A)。同时 Artepillin C 也降低了小鼠体内的脂肪含量(图 5. B, 左 DIO, 右 *db/db*), 减轻了肥胖。与此相对应, Artepillin C 降低了两种模型小鼠血清中甘油三酯 (TG)(图 5.C, 左 DIO, 右 *db/db*)、降低了血清胆固醇(包括总胆固醇 TC, 低密度胆固醇 LDLC 和高密度 HDLC)的含量(图 5.D 左 DIO, 右 *db/db*), 同时也降低了 10 DIO 小鼠肝脏组织中甘油三酯(TG)的含量(图 5. E)。

组织切片结果显示 Artepillin C 使肝脏组织和脂肪组织的细胞变小, 细胞中脂滴缩小(图 5. F), 表明 Artepillin C 缓解了糖尿病小鼠的脂肪肝症状。

Artepillin C 既降低血脂含量又降低肝脏组织内脂肪含量, 这表明 Artepillin C 降低血脂水平的作用可能主要源于降低了肝脏血脂输出量, 因此提示 Artepillin C 15 对肝脏的血脂合成、输出及吸收有抑制作用。

实施例 6、Artepillin C 通过降低 SREBPs 的表达抑制脂类合成

鉴于 Artepillin C 能显著改善高血脂症和脂肪肝症状, 而转录因子 SREBPs 是脂类代谢重要的转录调控因子, 因此本发明人进一步检测了 Artepillin C 对 20 SREBP1, 2 表达的影响。本发明人以高脂肥胖小鼠(DIO)和 *db/db* 小鼠为实验对象, 经腹腔注射(DIO: 0, 10, 20mg/kg; *db/db*: 20mg/kg)给药干预。

结果表明, Artepillin C 显著降低了肝脏中 *Srebpl1a, 1c* 及 *Srebpl2* 的 mRNA 水平(图 6. A), 同时降低了肝脏 SREBP1, 2 的蛋白质含量(图 6. B)。QPCR 检测结果表明, Artepillin C 一方面抑制肝脏中 *Scap* 基因表达, 另一方面促进 *Insig1* 和 25 *Insig2b* 的转录(图 6. C), 该现象表明 Artepillin C 可能通过增加 INSIG 蛋白质的表达, 增强 INSIG-SREBPs 复合体的稳定性, 抑制 SREBPs 前体蛋白质从内质网迁移到高尔基体, 从而抑制 SREBPs 在高尔基体上进行的蛋白质酶切过程, 进而降低成熟 SREBPs 的蛋白质含量。同时 Artepillin C 通过降低胆固醇合成途径中的关键限速酶 *Hmgcl*, *Hmgcs* 表达量, 降低低密度蛋白质胆固醇受体(*Ldlr*)转录, 抑制 30 *Ldlr* 受体降解蛋白质 *Pcsk9* 的表达(图 6. C), 抑制肝脏胆固醇的合成和吸收, 降低肝脏中胆固醇的合成及含量; 在脂肪酸代谢方面, Artepillin C 通过抑制脂肪酸合

成关键酶 *Fasn*, *Acc* 的转录降低脂肪酸合成, 通过抑制 *ApoE* 的转录降低脂肪酸分泌, 通过抑制 *Acox1* 及 *Acs11* 表达抑制脂肪酸的过度氧化及长链脂肪酸的合成(图 6. C)。在白色脂肪组织中, *Artepillin C* 显著抑制了脂类调控转录因子 *Srebp1c* 和 *Srebp2* 的转录水平, 同时抑制了其靶基因, *Fans* 和 *Acc* 的转录, 降低肝脏组织
5 中脂肪酸的合成及甘油三酯的含量(图 6. D)。同时, *Artepillin C* 显著抑制了白色脂肪中 *LPL-1*, *SCD-1*, *ApoB*, *Res (Resistin)* 等多个脂肪代谢基因, 抑制了脂肪酸和脂肪因子的分泌,

由于 *Artepillin C* 能非常显著地抑制 SREBPs 及下游靶基因的转录, 而 PPAR γ , PPAR α 和 LXR α 是 SREBPs 的重要正调控转录因子, 因此本发明人进一步检测
10 这些核受体基因的表达。结果显示, *Artepillin C* 能显著抑制肝脏中核受体 *Lxra* 的转录, 但是对 PPAR γ , PPAR α 的转录没有显著影响(图 6. E)。 *Artepillin C* 同时也抑制白色脂肪组织中 *Lxra* 的转录(图 6. D)。

在原代肝细胞中, 本发明人发现, *Artepillin C* 显著降低核受体 LXR α 的蛋白质水平, 并且显著抑制了由胰岛素诱导的 SREBP1 的蛋白质水平(图 6. F), 该结果
15 与 QPCR 结果相吻合。

以上结果显示, *Artepillin C* 通过抑制核受体 LXR α 的转录, 从而抑制由 LXRE 元件驱动的 *Srebps* 基因转录, 进而降低了 SREBPs 及其下游多个的靶基因的表达, 抑制了 SREBPs 调控的胆固醇、脂肪酸合成及分泌。

20 实施例 7、*Artepillin C* 改善糖尿病模型鼠体内的葡萄糖代谢

基于 *Artepillin C* 抑制原代肝细胞肝糖异生的现象, 本发明人进一步在活体内检测 *Artepillin C* 的降血糖生物活性。

DIO 小鼠腹腔注射 *Artepillin C* (20mg/kg)3 天后, DIO 小鼠肝脏活体成像分析显示 *Artepillin C* 抑制了饥饿诱导的 *G6P-LUC* 报告基因转录活性(图 7.A)。同时
25 *Artepillin C* 显著降低了 DIO 肝脏组织中肝糖异生关键基因 *Pgc1 α* , *Pck1* 和 *G6pc* 的 mRNA 水平(图 7.B)。在 DIO 小鼠活体肝脏组织中, 肝糖异生限速酶 PEPCK 以及转录因子 PGC1 α 的蛋白质水平被 *Artepillin C* 显著抑制(图 7.C)。

发明人进一步检测 *Artepillin C* 对小鼠整体葡萄糖代谢的作用。首先以健康成年鼠为对象, 腹腔注射 *Artepillin C*(20mg/kg)3 次以后, 胰高血糖素刺激的血糖水平
30 升高被 *Artepillin C* 明显抑制(图 7.D)。因此进一步检测 *Artepillin C* 在胰岛素抵抗条件下对葡萄糖代谢的影响。结果显示, 给药一周的 *Artepillin C* 显著抑制了 DIO

小鼠(图 7.E)及 *db/db* 小鼠(图 7.F)的饥饿血糖水平。给药 5 周后, Artepillin C 对 *db/db* 小鼠的血清胰岛素水平没有显著影响(图 7.G)。由于 Artepillin C 没有影响 DIO 小鼠血清中谷草转氨酶(Aspartate transaminase, AST)以及谷丙转氨酶(Alanine transaminase, ALT)的水平(图 7.H), 说明 Artepillin C(20mg/kg)的剂量对肝脏无明显毒性, 同时也说明这一剂量的 Artepillin C 对肝糖异生的抑制活性并非来自肝脏损伤。

活体实验结果说明 Artepillin C 能显著改善糖尿病小鼠的高血糖症。

实施例 8、Artepillin C 改善糖尿病模型鼠的提高胰岛素敏感性

10 由于胰岛素抵抗不仅是 2 型糖尿病的发病机制和诊断依据, 也是多种代谢性疾病的主要共同纽带, 所以胰岛素抵抗是肥胖、高血糖症、高血脂症及代谢综合症的共同病理生理基础。鉴于 Artepillin C 对 DIO 及 *db/db* 糖尿病小鼠的体重、脂肪含量、高血脂症和高血糖症都有显著的改善作用, 发明人进一步检测 Artepillin 对糖尿病小鼠胰岛素敏感性的影响。以 DIO 小鼠和 *db/db* 小鼠为实验对象, 腹腔
15 注射(20mg/kg)给药 5 周以后进行耐受性试验。结果表明, Artepillin C 一方面明显提高糖尿病模型小鼠的葡萄糖耐受性(GTT)(图 8. A, 左, DIO; 右, *db/db*), 另一方面增强了丙酮酸耐受性、显著抑制糖尿病小鼠转化丙酮酸为葡萄糖的能力(PTT)(图 8.B, 左, DIO; 右, *db/db*)。在整体水平上, Artepillin C 显著增强了糖尿病小鼠的胰岛素敏感性(ITT)(图 8.C, 左, DIO; 右, *db/db*), 改善了糖尿病
20 小鼠对胰岛素的抵抗。

综上所述, Artepillin C 在整体水平上显著改善了糖尿病小鼠的糖脂代谢平衡, 显著提高了糖尿病小鼠的胰岛素敏感性。

实施例 9、Artepillin C 提高胰岛素敏感性的分子机制

25 本发明人的实验结果表明, 小分子化合物 Artepillin C(APC)通过与 CREB 的 N 端直接结合, 抑制入核后的 CRTC2 与 CREB 的相互结合, 降低了由 CREB/CRTC2 驱动的下流基因的表达, 包括肝糖异生的主要成分 PGC1 α , 及重要的肝糖异生限速酶 G6PC 和 PEPCK, 抑制肝糖异生及肝脏的葡萄糖输出, 降低饥饿血糖。另一方面, APC 通过抑制核受体 LXR α 的表达, 协同转录共激活因子 PGC1 α 被抑制的
30 状态, 最终降低了由 LXRE 驱动的 SREBPs 的表达, 抑制 SREBPs 的下游靶基因, 降低由 SREBPs 调控的胆固醇及脂肪酸的合成、吸收, 最终降低血液中脂肪含量(图

9)。

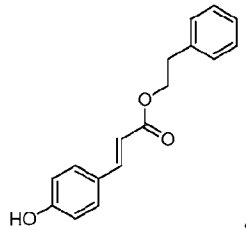
由于 APC 在活体中显著改善糖尿病小鼠的高血糖症及高血脂症，减少了脂肪，因此 APC 从整体上调节了糖脂代谢稳态，缓解了机体的胰岛素抵抗，增强了整体的胰岛素敏感性。

5

实施例 10、Artepillin C 的结构优化

为了进一步改造和优化小分子化合物 Artepillin C 对靶蛋白 CREB/CRTC2 的调控作用，本发明人对 Artepillin C 的多个结构类似物进行了测试和评价。

10 结果发现，化合物 63#，65#也具有抑制 CREB/CRTC2 相互结合的活性，如图 10。其中 65#抑制活性较强，通过双杂交测试，65#化合物的 IC₅₀ 约为 15.9 μ M。化合物 65#结构式如下：



15 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 阿特匹灵 C 或其类似物或其药学上可接受的盐在制备预防、缓解或治疗代谢性疾病的药物中的用途。

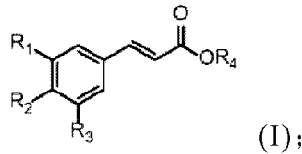
5

2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的代谢性疾病包括：脂代谢疾病、糖代谢疾病或代谢综合症。

3. 如权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述的脂代谢疾病包括：高血
10 脂症，脂肪肝，肥胖症，动脉粥样硬化，冠心病、高血压，脑梗塞，中风，肾功能衰竭。

4. 如权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述的糖代谢疾病包括：高血
15 糖症，糖尿病，肥胖症，高胰岛素症，动脉粥样硬化，冠心病、高血压，甲状腺功能亢进、糖尿病眼病、糖尿病肾病。

5. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的阿特匹灵 C 或其类似物具有如下式(I)结构：



20 其中，R1 选自 H，异戊烯基(prenyl)；

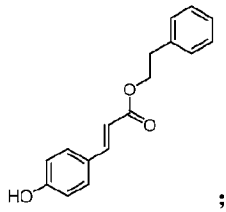
R2 为 OH；

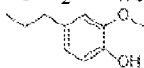
R3 选自 H，异戊烯基；

R4 选自 H，CH₂Ph， 或 CH₂CHPh。

25

6. 如权利要求 5 所述的用途，其特征在于，所述的化合物选自：
阿特匹灵 C；



- R1 为 H、R2 为 OH、R3 为 H、R4 为 H 的化合物；
- R1 为 H、R2 为 OH、R3 为异戊烯基、R4 为 H 的化合物；
- R1 为 H、R2 为 OH、R3 为 H、R4 为 CH₂Ph 的化合物；或
- 5 R1 为 H、R2 为 OH、R3 为 H、R4 为  的化合物。

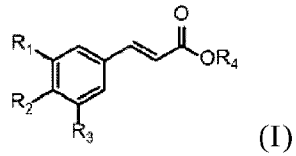
- 7. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述的药物还用于：
 - 抑制肝糖异生；
 - 降低肝糖异生关键基因 *Pgc1a*, *Pck1*, *G6pc* 的水平；
 - 10 降低肝脏葡萄糖输出量；
 - 提高葡萄糖耐受性；
 - 降低体内脂肪含量；
 - 降低血清甘油三酯含量；
 - 降低总胆固醇含量；
 - 15 降低低密度脂蛋白胆固醇含量；
 - 降低高密度脂蛋白胆固醇含量；
 - 降低肝脏血脂输出量；
 - 抑制肝脏脂肪酸合成；
 - 抑制胆固醇合成；
 - 20 抑制肝脏的血脂输出及吸收；
 - 降低 SREBP 及其下游靶基因的表达；和/或
 - 提高胰岛素敏感性。

- 8. 一种制备药物的方法，所述的药物用于预防、缓解或治疗脂代谢疾病或
 - 25 糖代谢疾病的药物，其特征在于，所述方法包括：将有效量的阿特匹灵 C 或其类似物或其药学上可接受的盐与药学上可接受的载体混合。

- 9. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述的代谢性疾病包括：脂代

谢疾病，糖代谢疾病或代谢综合症。

10. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述的阿特匹灵 C 或其类似物具有如下式(I)结构：



其中，R1 选自 H，异戊烯基(prenyl)；

R2 为 OH；

R3 选自 H，异戊烯基；

R4 选自 H，CH₂Ph， 或 CH₂CHPh。

10

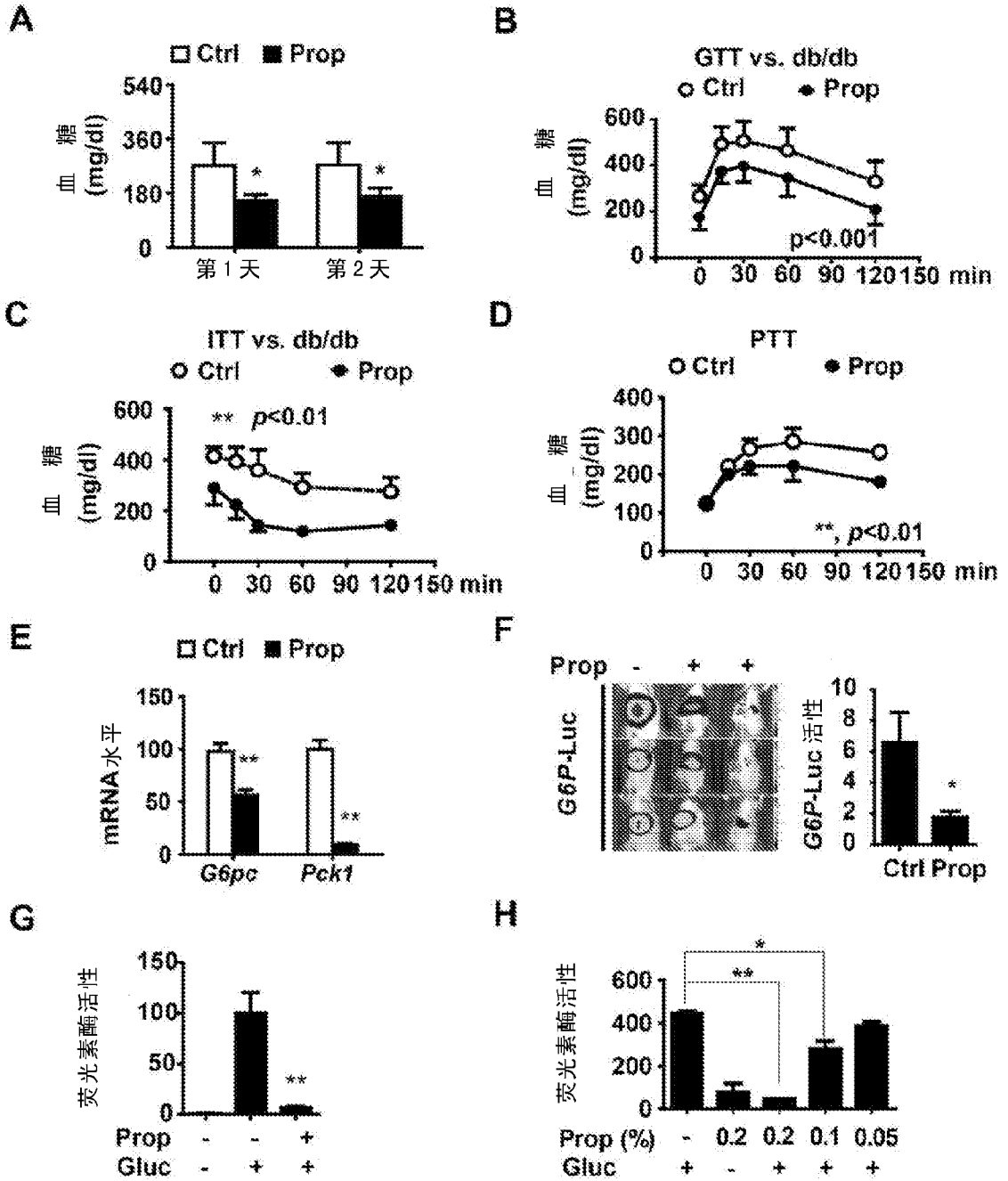


图 1

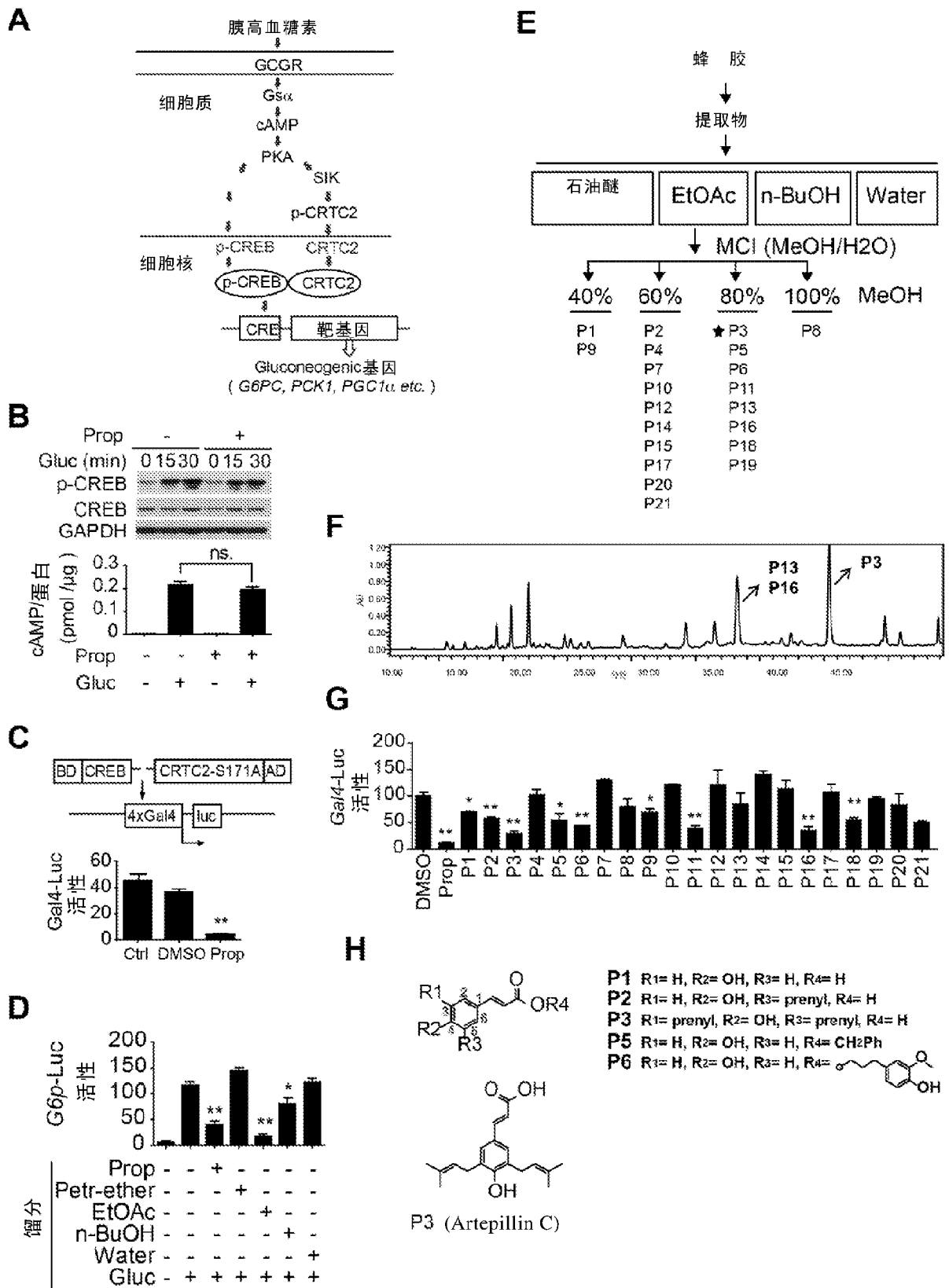


图 2

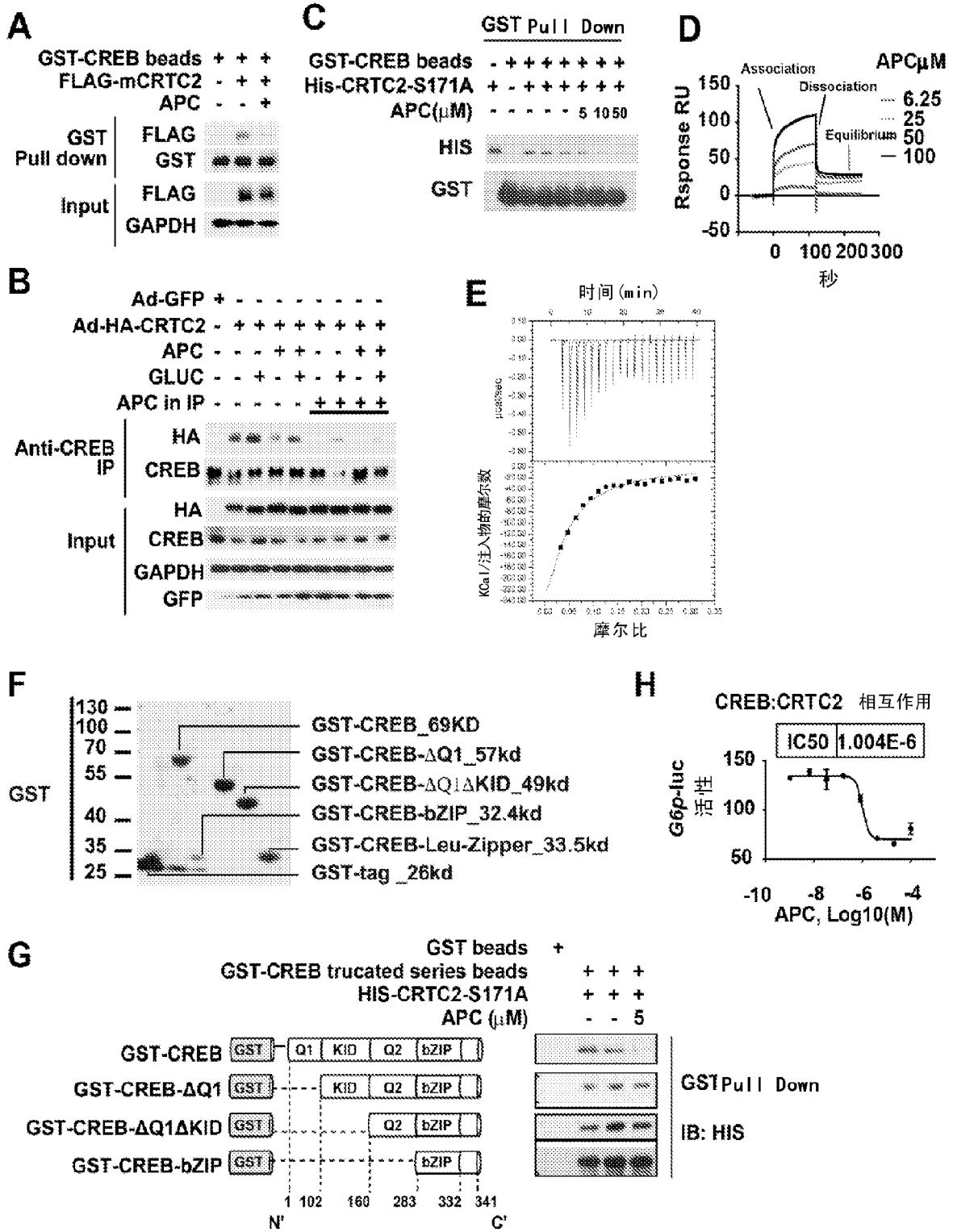


图 3

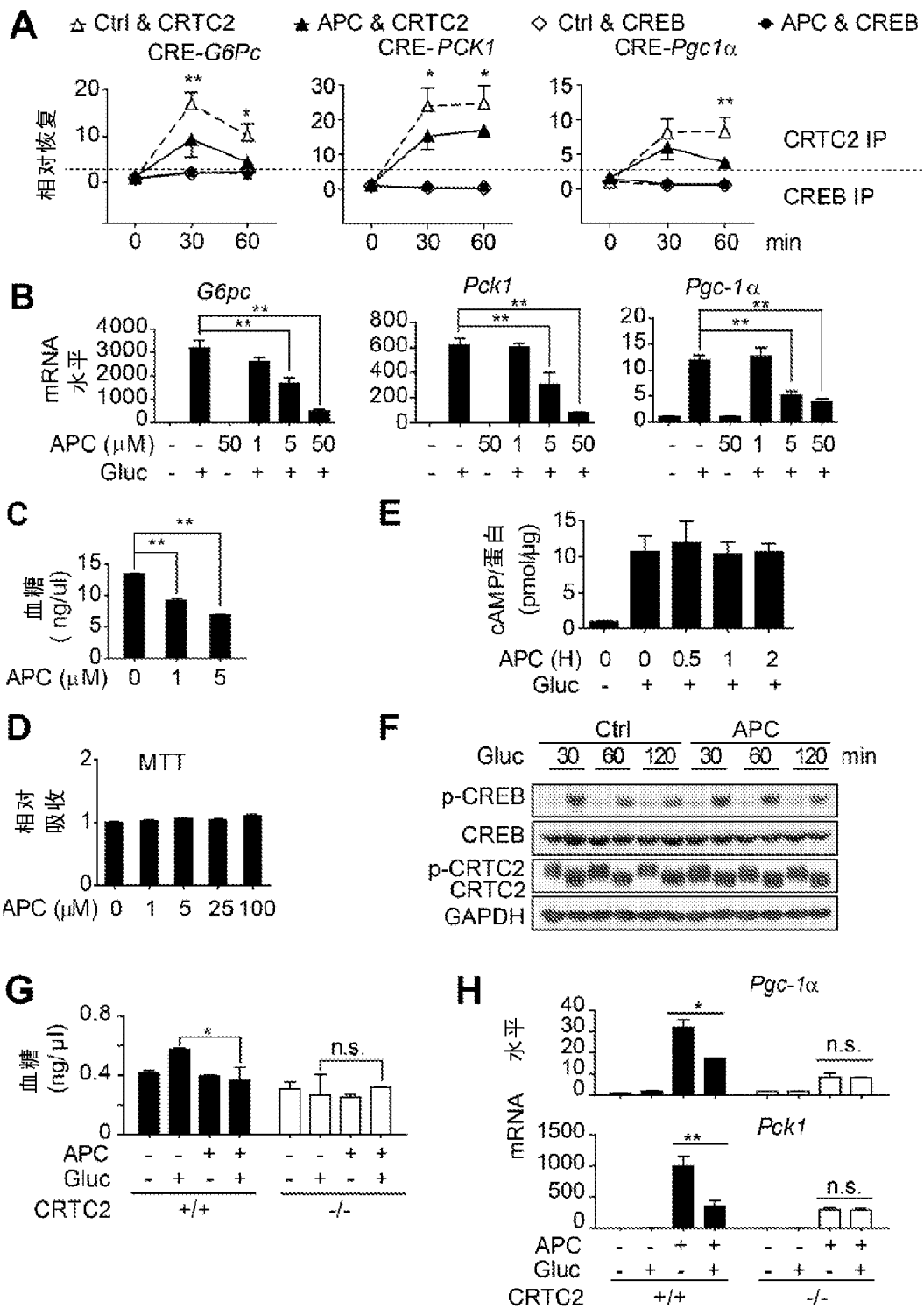


图 4

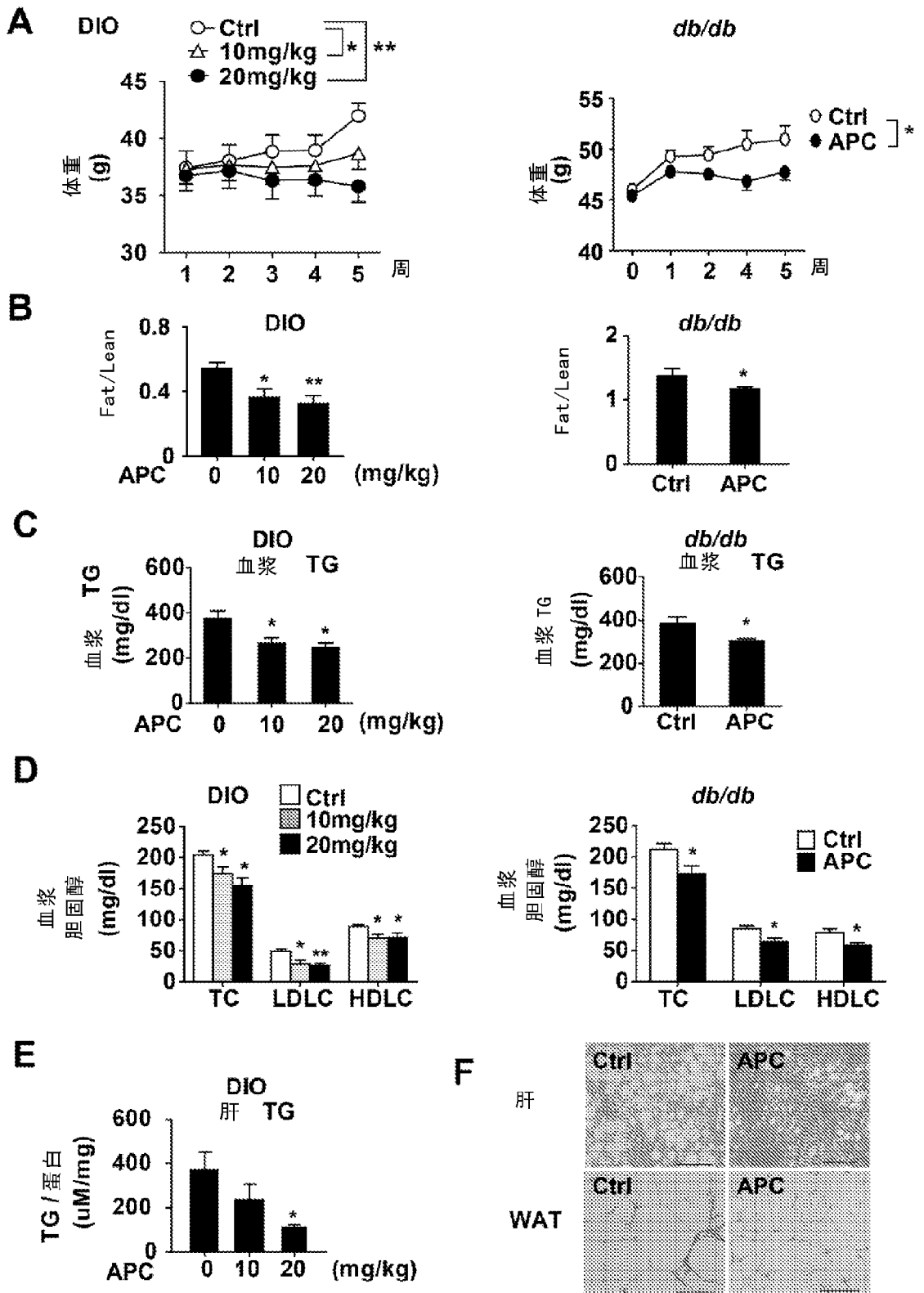


图 5

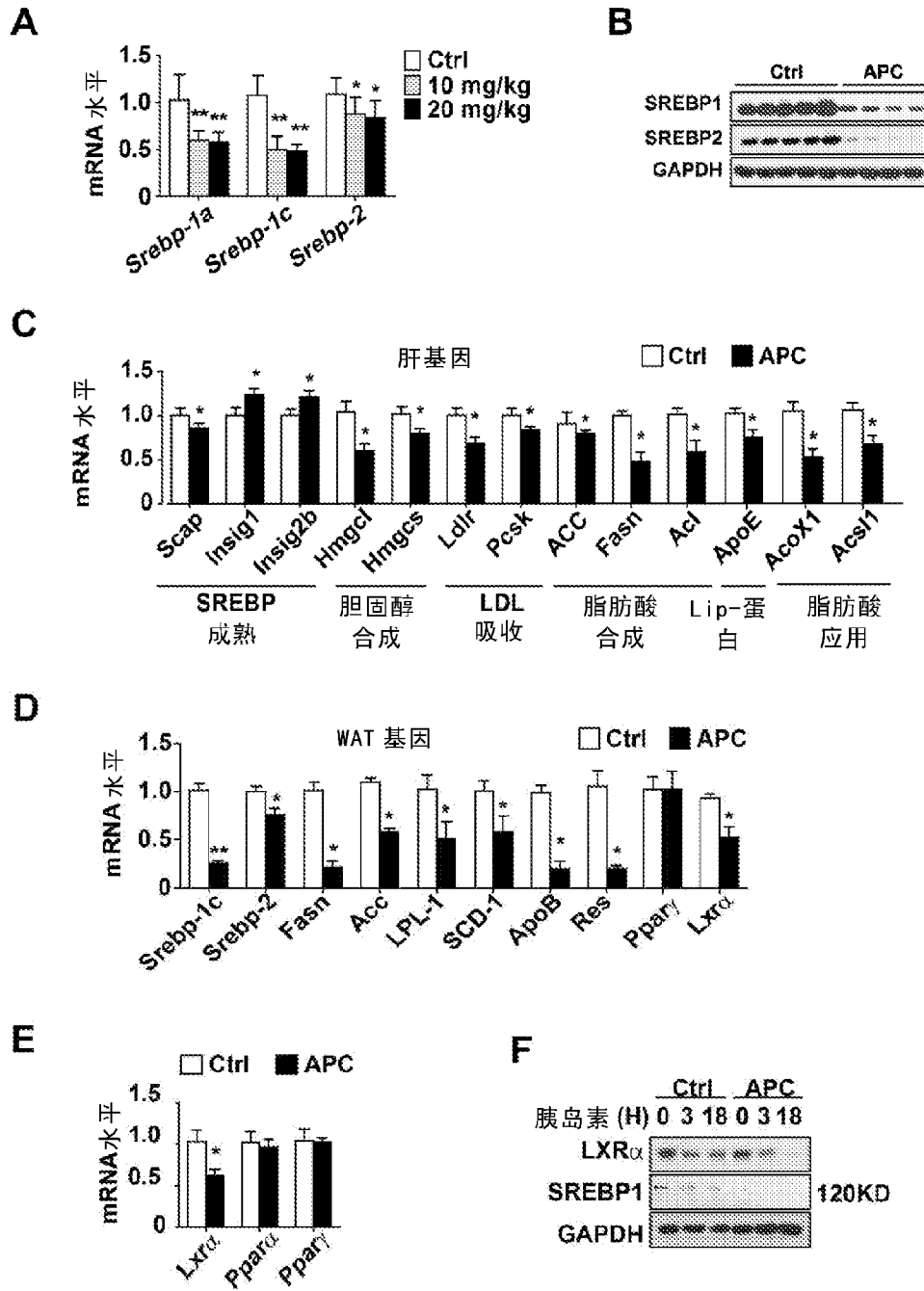


图 6

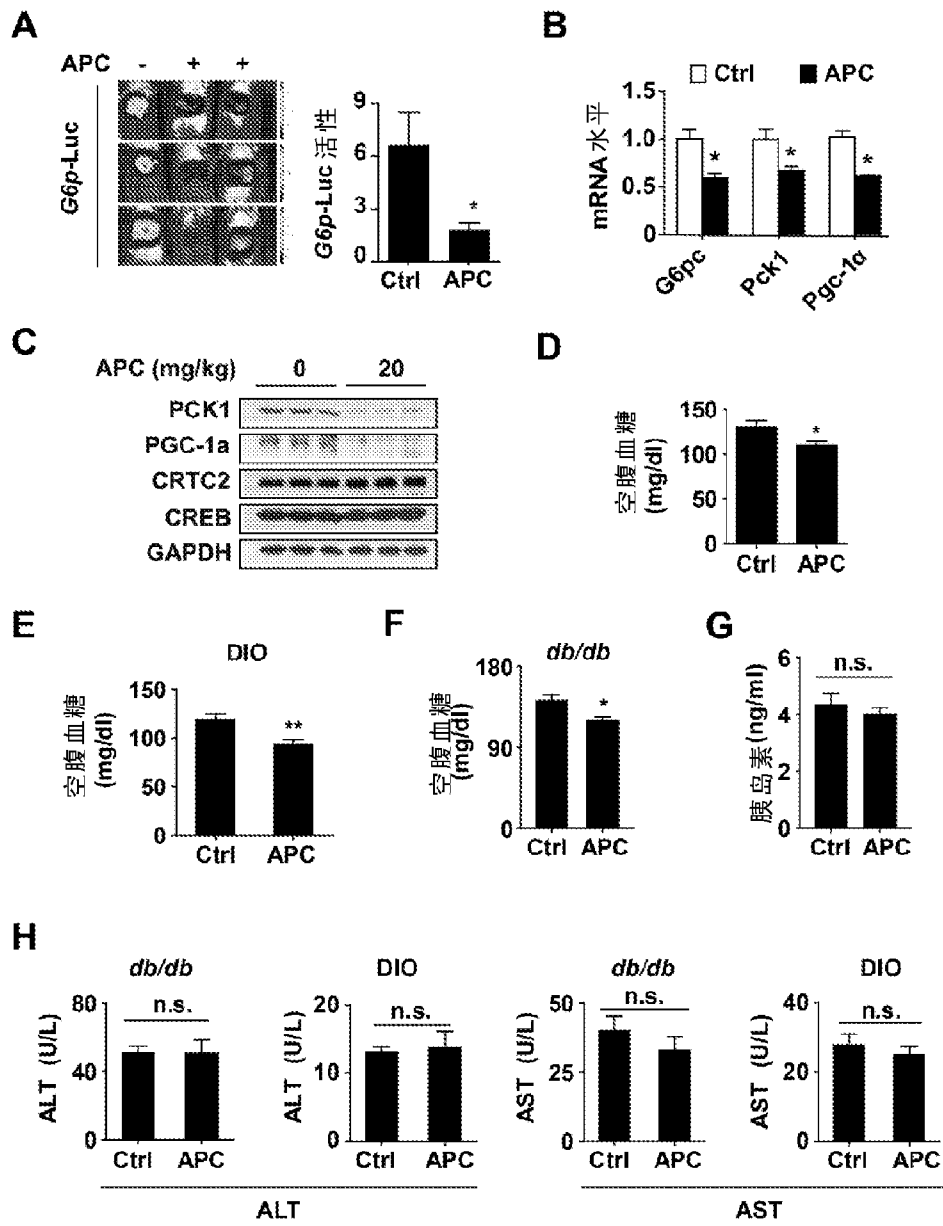


图 7

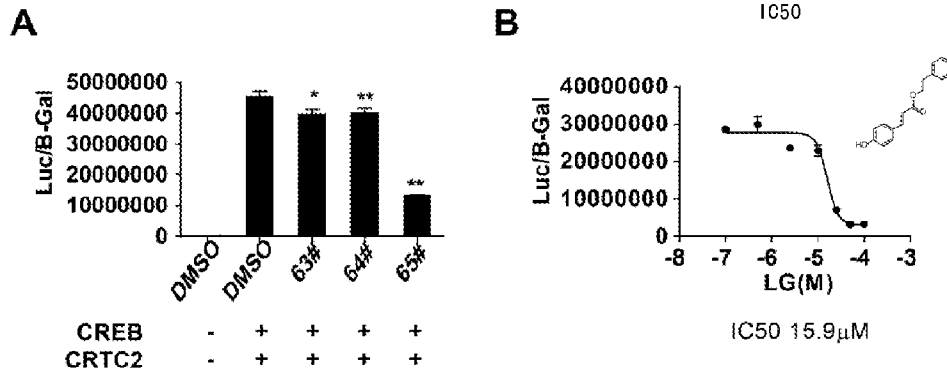


图 10

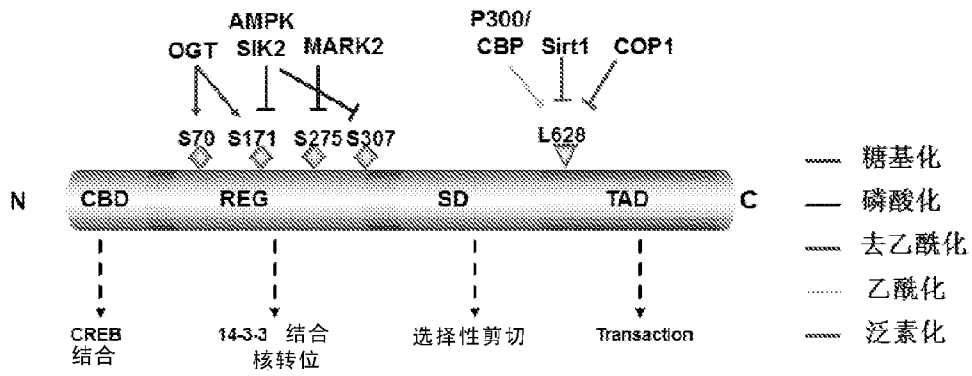


图 11

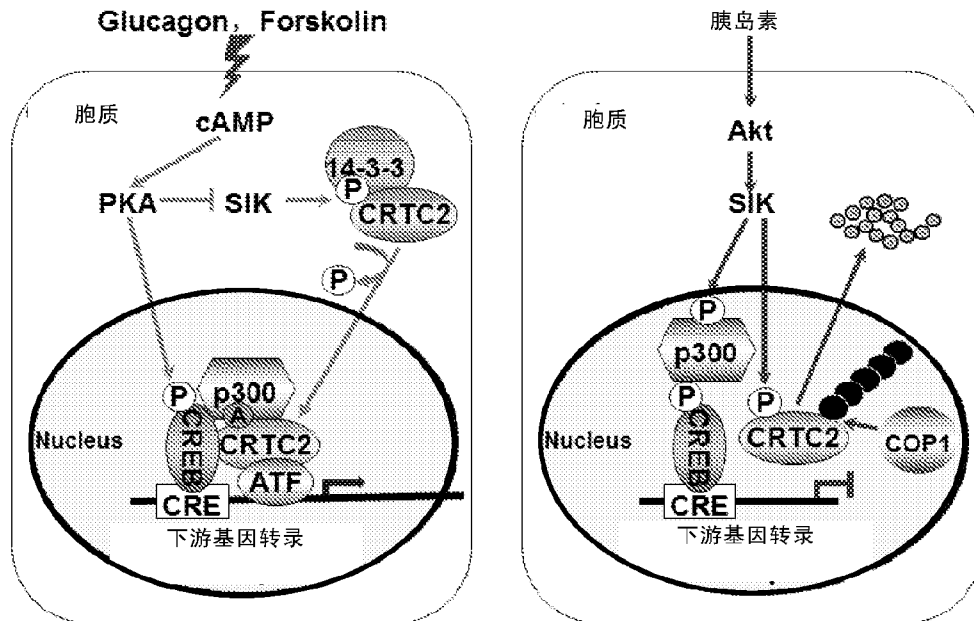


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/081956

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 31/19 (2006.01) i; A61P 3/10 (2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61K 31/-; A61P 3/-		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNPAT; CNKI; WPI; EPODOC; CNABS; VEN: Artepillin C, metabolism, lipid metabolism, glycometabolism, metabolic syndrome, Artepillin, supersession, atherosclerosis, cerebral infarction, diabetes		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP08268885 A (OYO, S.K.), 15 October 1996 (15.10.1996), abstract, and claim 1	1-10
X	JP 4847696 B2 (AKIZAWA, T.; MORIKAWA KENKODO KK; YAHARA, M.), 28 December 2011 (28.12.2011), abstract, and description, paragraphs [0029]-[0030]	1-2, 4-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family	
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
13 June 2016 (13.06.2016)	29 June 2016 (29.06.2016)	
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer CHEN, Weixing Telephone No.: (86-10) 62413788	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/081956

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 08268885 A	15 October 1996	JP H08268885 A	15 October 1996
JP 4847696 B2	28 December 2011	JP 2006143685 A	08 June 2006

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/081956

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61K 31/19(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>											
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61K 31/-; A61P 3/-</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNPAT;CNKI;WPI;EPODOC;CNABS;VEN; 阿特匹灵C, 代谢, 脂代谢, 糖代谢, 代谢综合症, 动脉粥样硬化, 脑梗塞, 糖尿病, Artepillin, supersession, atherosclerosis, cerebral infarction, diabetes</p>											
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 08268885 A (OYO SEIKAGAKU KENKYUSHO) 1996年 10月 15日 (1996 - 10 - 15) 说明书摘要, 权利要求1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 4847696 B2 (AKIZAWA T, MORIKAWA KENKODO KK, YAHARA M) 2011年 12月 28日 (2011 - 12 - 28) 说明书摘要, 说明书第[0029]-[0030]段</td> <td>1-2, 4-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	JP 08268885 A (OYO SEIKAGAKU KENKYUSHO) 1996年 10月 15日 (1996 - 10 - 15) 说明书摘要, 权利要求1	1-10	X	JP 4847696 B2 (AKIZAWA T, MORIKAWA KENKODO KK, YAHARA M) 2011年 12月 28日 (2011 - 12 - 28) 说明书摘要, 说明书第[0029]-[0030]段	1-2, 4-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求									
X	JP 08268885 A (OYO SEIKAGAKU KENKYUSHO) 1996年 10月 15日 (1996 - 10 - 15) 说明书摘要, 权利要求1	1-10									
X	JP 4847696 B2 (AKIZAWA T, MORIKAWA KENKODO KK, YAHARA M) 2011年 12月 28日 (2011 - 12 - 28) 说明书摘要, 说明书第[0029]-[0030]段	1-2, 4-10									
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>											
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2016年 6月 13日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2016年 6月 29日</p>									
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>陈卫星</p> <p>电话号码 (86-10)62413788</p>									

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/081956

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
JP	08268885	A	1996年 10月 15日	JP	H08268885	A	1996年 10月 15日
JP	4847696	B2	2011年 12月 28日	JP	2006143685	A	2006年 6月 8日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)