



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106456700 B

(45)授权公告日 2020.02.18

(21)申请号 201580006642.5

(22)申请日 2015.01.29

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106456700 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(30)优先权数据  
14153017.0 2014.01.29 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.07.29

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2015/051856 2015.01.29

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02015/114062 EN 2015.08.06

(73)专利权人 斯特拉斯堡大学  
地址 法国斯特拉斯堡  
专利权人 法国国家卫生及研究医学协会  
瓦克西尼私人有限公司

(72)发明人 文森特·马里昂  
尼古拉·彼得罗夫斯基

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限  
责任公司 11219

代理人 金海霞 杨青

(51)Int.Cl.  
A61K 38/03(2006.01)  
A61P 3/04(2006.01)  
A61P 3/08(2006.01)  
A61P 3/10(2006.01)

(56)对比文件  
US 2013336952 A1,2013.12.19,  
US 2013331374 A1,2013.12.12,  
US 2005250719 A1,2005.11.10,  
WO 2005079300 A9,2009.03.05,  
CN 101506175 A,2009.08.12,  
CN 1684694 A,2005.10.19,  
Collin GB等.Mutations in ALMS1 cause  
obesity, type 2 diabetes and neurosensory  
degeneration in Alström syndrome.《Nat  
Genet》.2002,第31卷(第1期),第74-78页.

审查员 朱兵

权利要求书1页 说明书24页  
序列表53页 附图13页

(54)发明名称

糖尿病治疗和预防的新靶标

(57)摘要

本发明涉及将ALMS1鉴定为参与调节胰岛素介导的通过GLUT4分选囊泡的葡萄糖摄取中遗漏的角色,并涉及ALMS1通过 $\alpha$  PKC的下调。因此,本发明涉及能够阻止 $\alpha$  PKC在ALMS1上的结合的分子,所述分子用于治疗或预防糖尿病,特别是2型糖尿病。另外,本发明涉及鉴定能够阻止 $\alpha$  PKC在ALMS1上的结合的分子的方法。

1. 阻止 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的分子在制备用于治疗或延迟选自以下的疾病的进展或发作的药物中的应用:糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症,其中所述分子是包含如SEQ ID No 4所示的 $\alpha$ PKC的片段的氨基酸序列的肽。

2. 权利要求1的应用,其中所述疾病是2型糖尿病。

3. 权利要求1或2的应用,其中所述分子不干扰TBC1D4与ALMS1的结合。

4. 权利要求1的应用,其中所述分子是小于50个氨基酸的肽。

5. 权利要求4的应用,其中所述分子是小于20个氨基酸的肽。

6. 权利要求1的应用,其中所述分子是具有5和50个之间的氨基酸的肽。

7. 权利要求1的应用,其中所述分子是具有5和20个之间的氨基酸的肽。

8. 权利要求1的应用,其中所述分子是包含如SEQ ID No 4所示的 $\alpha$ PKC的片段的氨基酸序列的肽,所述片段包括一个或若干个选自F114、D116、C118、L121、N138、Q142、I145、P148、G433、E545、S562、S566、F597、D601、W602、K604、E606、G620、T631、V664和I667的残基。

9. 权利要求1的应用,其中所述分子是如SEQ ID No 14所示的肽或其片段。

10. 鉴定适合用于治疗或延迟选自糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症的疾病的进展或发作的分子的体外或离体方法,其中检测所述分子阻止 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的能力并选择能够阻止这种结合分子。

11. 权利要求10的方法,其中所述方法还包含下述的步骤:其中测试所选择的分子干扰TBC1D4与ALMS1结合的能力并且其中选择不干扰的分子。

12. 权利要求10或11的方法,其中所述结合在对胰岛素有响应的细胞体系中测定。

13. 权利要求10或11的方法,其中所述结合在存在和/或不存在胰岛素下测定。

14. 一种药物组合物,其包括阻止 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的分子,其中所述分子是包含如SEQ ID No 4所示的 $\alpha$ PKC的片段的氨基酸序列的肽或所述肽的片段。

15. 权利要求14的药物组合物,其中所述肽包含如SEQ ID No 4所示的 $\alpha$ PKC的片段的氨基酸序列,所述 $\alpha$ PKC的片段包括一个或若干个选自F114、D116、C118、L121、N138、Q142、I145、P148、G433、E545、S562、S566、F597、D601、W602、K604、E606、G620、T631、V664和I667的残基。

16. 权利要求14的药物组合物,其中所述分子是小于50个氨基酸的肽。

17. 权利要求14的药物组合物,其中所述分子是小于20个氨基酸的肽。

18. 权利要求14的药物组合物,其中所述分子是具有5和50个之间的氨基酸的肽。

19. 权利要求14的药物组合物,其中所述分子是具有5和20个之间的氨基酸的肽。

20. 权利要求14的药物组合物,其中所述分子是如SEQ ID No 14所示的肽或其片段。

## 糖尿病治疗和预防的新靶标

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学领域。更具体地，它涉及糖尿病。

### 背景技术

[0002] 糖尿病是一类代谢疾病，其中人因为胰腺不产生足够的胰岛素或因为细胞对所产生的胰岛素没有响应而有高血糖。

[0003] 糖尿病有三种主要类型：

[0004] -1型由身体不能产生胰岛素引起，目前需要人注射胰岛素或佩戴胰岛素泵。

[0005] -2型由胰岛素抵抗引起，胰岛素抵抗是细胞不能正当利用胰岛素的病症。

[0006] -第三种被称作妊娠糖尿病并且在怀孕女性中发生。

[0007] 2型糖尿病的比率自1960年以来与肥胖症平行地明显增加：与1985年的3千万相比，到2010年为止，有大约2.85亿人患有所述疾病。高血糖的长期并发症可以包括心脏病、中风、糖尿病性视网膜病、可能需要透析的慢性肾衰竭、和导致截肢的肢体循环不良。可能发生非酮症高渗性昏迷。

[0008] 已经报道，高血糖症参与糖尿病发作和进行性损害，即葡萄糖毒性理论。换言之，慢性高血糖症导致胰岛素分泌减少并进一步导致胰岛素敏感性降低，并因此，血糖浓度增加，使得糖尿病是自我加重的。因此，通过治疗高血糖症，打断前述的自我加重循环，使得糖尿病的预防或治疗成为可能。

[0009] 令人遗憾的是，因为 $\beta$ 细胞功能随时间衰退，已有的治疗从长期看来在恢复正常血糖方面不成功。此外，目前没有单一的药物能够逆转所述疾病的所有方面。

[0010] 2型糖尿病的进行性性质意味着许多患者将最终需要口服降血糖药物、可能与胰岛素和/或艾塞那肽(exenatide)注射一起的组合。已经开发了抗糖尿病药剂来对抗参与2型糖尿病的主要机制：胰岛素抵抗(双胍类和噻唑烷二酮类)和胰岛素分泌(磺酰脲类，格列奈类，二肽基肽酶-4抑制剂，胰高血糖素样肽1受体激动剂)，延迟胃肠道对葡萄糖的吸收或促进体重减少的药剂，和促进肾排泄葡萄糖的新药剂。然而，这些药物中大多数已经显示出具有有害的副作用，例如体重增加、外周性水肿或充血性心力衰竭，并且这些药剂有随着长期应用而疗效丧失的重大问题。因此，尽管用于血糖控制的治疗选项数量越来越多，但仍需要治疗糖尿病和相关病症的替代和改良的药物。

### 发明内容

[0011] 本发明人鉴定了用于治疗糖尿病、特别是2型糖尿病的新靶标。他们有了新的发现，即ALMS1(Alstrom综合征蛋白1)通过它与参与葡萄糖调节的关键分子的结合相互作用来参与胰岛素对成熟脂肪细胞对葡萄糖的吸收的调节。简言之，当胰岛素结合它的受体时，他们证明了在Alms1周围形成蛋白质复合体(ALMSome)并且活化，导致H<sup>+</sup>泵活化、GLUT4受体易位和葡萄糖被脂肪细胞吸收。他们还证明了在没有Alms1并从而阻止ALMSome组装的情况下，由于GLUT4不能与细胞膜融合，所以葡萄糖不能被转运到所述细胞中。因此，他们证明了

调制ALMS1复合体形成可用于调节葡萄糖转运并可以由此用于避免胰岛素抵抗和治疗2型糖尿病。

[0012] 更具体地,本发明人鉴定了参与通过ALMS1进行的葡萄糖转运调节的两种蛋白质,即TBC1D4 (TBC1结构域家族成员4) 和 $\alpha$ PKC (PKC $\alpha$ 或 $\alpha$ 型蛋白激酶C)。更具体地,这两种葡萄糖调节蛋白质在ALMS1上的结合位点如此靠近,使得由于空间位阻而不可能同时结合这两种蛋白质。TBC1D4,通过它与蛋白质(即,Rab10、Rab14等)和ALMS1的相互作用,调节GLUT4受体易位到细胞膜。另一方面, $\alpha$ PKC,当结合于ALMS1时,阻断TBC1D4结合位点并从而下调GLUT4受体易位到细胞膜,减少细胞的葡萄糖吸收。他们还证明了靶向ALMS1和 $\alpha$ PKC的相互作用足以触发脂肪细胞中的葡萄糖吸收,不管INS存在与否。因此,在本发明中揭示的新的治疗策略是通过阻断 $\alpha$ PKC在ALMS1上的结合来提高细胞的葡萄糖吸收和减少高血糖症。最优选地,以不影响或甚至提高TBC1D4在ALMS1上的结合这样的方式来抑制 $\alpha$ PKC在ALMS1上的结合。

[0013] 因此,本发明涉及能够阻止 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的分子,其用于治疗或延迟糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症的进展或发作。它还涉及这种分子在制造治疗或延迟糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症的进展或发作的药物中的应用。它还涉及在有需要的对象中治疗或延迟糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症的进展或发作的方法,其中施用治疗有效量的能够阻止 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的分子,从而提高由胰岛素引起的葡萄糖吸收。在优选实施方式中,所述分子不干扰TBC1D4与ALMS1的结合。优选地,所述分子选自肽或多肽或肽模拟物、抗体、其片段或衍生物、适配体、镜像寡核苷酸 (Spiegelmers) 和化合物。更优选地,所述分子是小于50个氨基酸、优选小于20个氨基酸的肽。

[0014] 在第一种优选实施方式中,所述分子是包含ALMS1 (SEQ ID No 1) 的片段的氨基酸序列的肽。优选地,所述分子是包含ALMS1的片段的氨基酸序列的肽,所述片段包括一个或若干个据预测介导与 $\alpha$ PKC相互作用的残基,特别是一个或若干个选自E17、D58、S59、G62、H65、L66、Q736、T737、E738、D828、S829、T1088、D1089、A1169、Q1170、F2882、L2883和E2884的残基。在非常具体的实施方式中,所述分子是包含以下序列之一或由以下序列之一组成的肽:

[0015] -LSDSDSHYGPQHLESIDD (SEQ ID No 5);

[0016] -DSHQTEETL (SEQ ID No 6);

[0017] -QQTLPESHLP (SEQ ID No 7);

[0018] -QALLDSDLPE (SEQ ID No 8);

[0019] -PADQMTDTP (SEQ ID No 9);

[0020] -HIPEEAQKVSVA (SEQ ID No 10);

[0021] -SCIFLEQ (SEQ ID No 11), 和

[0022] -其包含6个连续氨基酸的片段。

[0023] 在第二种优选实施方式中,所述分子是包含 $\alpha$ PKC (SEQ ID No 4) 的片段的氨基酸序列的肽。优选地,所述分子是包含 $\alpha$ PKC的片段的氨基酸序列的肽,所述片段包括一个或若干个据预测介导与ALMS1相互作用的残基,特别是一个或若干个选自F114、D116、C118、

L121、N138、Q142、I145、P148、G433、E545、S562、S566、F597、D601、W602、K604、E606、G620、T631、V664和I667的残基。

[0024] 本发明还涉及鉴定适合用于治疗或延迟糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症的进展或发作的分子的方法，其中检测所述分子阻止 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的能力并选择能够阻止这种结合的分子。所述方法还可以包含下述的步骤，其中测试所选择的分子干扰TBC1D4与ALMS1结合的能力并且其中选择不干扰的分子。优选地，所述结合在对胰岛素有响应的细胞体系中测定。任选地，所述结合在存在和/或不存在胰岛素下测定。

[0025] 本发明中揭示的另一种治疗策略是通过提高TBC1D4与ALMS1的结合来提高细胞的葡萄糖吸收。本发明中揭示的另一种治疗策略是通过上调ALMS1的表达来提高细胞的葡萄糖吸收。

[0026] 因此，本发明还涉及能够提高TBC1D4在ALMS1上的结合或增加ALMS1表达的分子，其用于治疗或延迟糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症、特别是2型糖尿病的进展或发作。它还涉及这种分子在制造治疗或延迟糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症、特别是2型糖尿病的进展或发作的药物中的应用。它还涉及在有需要的对象中治疗或延迟糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症、特别是2型糖尿病的进展或发作的方法，其中施用治疗有效量的能够提高TBC1D4在ALMS1上的结合或增加ALMS1表达的分子，从而提高由胰岛素引起的葡萄糖吸收。在优选实施方式中，所述分子还抑制 $\alpha$ PKC在ALMS1上的结合。

[0027] 本发明还涉及鉴定适合用于治疗糖尿病的方法，其中检测所述分子增加ALMS1表达的能力并选择能够上调ALMS1的分子。它还涉及鉴定适合用于治疗糖尿病的方法，其中检测所述分子提高TBC1D4与ALMS1结合的能力并选择能够提高这种结合的分子。任选地，所述方法还包含测定所述分子阻止 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的能力并选择能够阻止这种结合的分子。

## 具体实施方式

[0028] 本发明人将ALMS1鉴定为参与调节胰岛素介导的通过GLUT4分选囊泡摄取葡萄糖到脂肪细胞中的遗漏的关键角色。

[0029] 现在已经认识到，即使脂肪组织负责约20%的葡萄糖吸收，但该组织的功能障碍仍可引起糖尿病发生。因此，能够调节胰岛素介导的葡萄糖摄取到脂肪细胞中的任何手段应能延迟、逆转或预防糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症的发生。

[0030] ALMS1活性通过结合 $\alpha$ PKC而被下调，然而它通过结合TBC1D4而被激活。还已经显示，这两种蛋白质在ALMS1上的结合位点是如此靠近，使得这两种蛋白质由于空间位阻而不允许同时结合。因此，这种调节机制是治疗或延迟糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症的进展或发作的新靶标，并且本发明人提议对这些治疗适应症使用能够阻止 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的

分子。

[0031] 定义

[0032] ALMS1,即Alstrom综合征蛋白1,是由ALMS1基因编码的蛋白质。已经发现在所述ALMS1基因中的突变引起**Alström**综合征。它被记载在几个数据库中,即UniProt ID No Q8TCU4;Gene ID No 7840,HGNG ID No 428。在Genbank中,在NM\_015120.4下公开了mRNA参比序列,在NP\_055935.4下公开了蛋白质参比序列。人类ALMS1的蛋白质序列被公开在SEQ ID No 1中。

[0033] TBC1D4 (TBC1结构域家族成员4),目前也称为As160,被认为起到RAB2A、RAB8A、RAB10和RAB14的GTP酶激活蛋白的作用。它被记载在几个数据库中,即UniProt ID No 060343,Gene ID No 9882,HGNG ID No 19165。在Genbank中,在NM\_014832.3下公开了mRNA参比序列,在NP\_055647.2下公开了蛋白质参比序列(对于同工型1而言,被选作规范序列)。同工型2因缺失第678-740位氨基酸而不同于同工型1并在UniProt中以No 060343-2提及,其促进胰岛素诱导的葡萄糖转运蛋白SLC2A4/GLUT易位在质膜处,从而增加葡萄糖摄取。人类TBC1D4(同工型1)的蛋白质序列被公开在SEQ ID No 2中。人类TBC1D4(同工型2)的蛋白质序列被公开在SEQ ID No 3中。

[0034]  $\alpha$ 型蛋白激酶C,也称为 $\alpha$ PKC、PKC-A或PKC- $\alpha$ ,属于能够被钙和第二信使二酰基甘油激活的丝氨酸-和苏氨酸-特异性蛋白激酶的家族。它被记载在几个数据库中,即UniProt ID No P17252,Gene ID No9393,HGNG ID No 5578。在Genbank中,在NM\_02737.2下公开了mRNA参比序列,在NP\_002728.1下公开了蛋白质参比序列。人类 $\alpha$ PKC的蛋白质序列被公开在SEQ ID No 4中。

[0035] 筛选方法

[0036] 本发明涉及鉴定、筛选或选择能够阻止 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的分子的体外或离体方法。所述方法包括测定分子对 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的效应,并选择减少或阻止 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的分子。优选地,所述方法还包括测定分子对TBC1D4与ALMS1结合的效应,并淘汰减少或阻止TBC1D4与ALMS1结合的分子。任选地,所述方法可以包括选择增加或提高TBC1D4与ALMS1结合的分子的步骤。

[0037] 本发明还涉及鉴定、筛选或选择能够提高或增加TBC1D4与ALMS1结合的分子的体外或离体方法。所述方法包括测定分子对TBC1D4与ALMS1结合的效应,并选择增加或提高TBC1D4与ALMS1结合的分子。任选地,所述方法还包括测定分子对 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的效应,并选择减少或阻止 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的分子。

[0038] 为了测定分子对 $\alpha$ PKC和/或TBC1D4与ALMS1结合的效应,可以进行本领域技术人员已知的任何技术,特别是适合于测定蛋白质相互作用的任何方法。例如,可以将重组或纯化的天然ALMS1或 $\alpha$ PKC结合于表面等离子共振芯片,并使另一种分子流过所述芯片以评价结合亲和性,例如在Biacore (General Electric,USA) 机器中。同样的方法可用于测量ALMS1与TBC1D4或ALMS1与 $\alpha$ PKC的结合亲和性。

[0039] 分子对 $\alpha$ PKC和/或TBC1D4与ALMS1结合的效应通过在被测分子不存在和存在下测量 $\alpha$ PKC和/或TBC1D4与ALMS1的结合并通过比较所述 $\alpha$ PKC和/或TBC1D4与ALMS1的结合来测定。

[0040] 另外,所述筛选方法可以包括选择能够与ALMS1结合的分子的预备步骤。事实上,

阻止ALMS1和 $\alpha$ PKC之间相互作用的分子直接作用于 $\alpha$ PKC的ALMS1结合位点可能是有利的。

[0041] 或者,所述筛选方法可以包括选择能够与 $\alpha$ PKC结合的分子的预备步骤。事实上,阻止ALMS1和 $\alpha$ PKC之间相互作用的分子直接作用于ALMS1的 $\alpha$ PKC结合位点可能也是有利的。

[0042] 另外,所述筛选方法可以包括选择能够与TBC1D4结合的分子的预备步骤。

[0043] 在鉴定、筛选或选择能够阻止 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的分子的优选实施方式中,本发明的筛选方法还包括测定所述分子、特别是所选择的分子对TBC1D4与ALMS1结合的效应,并选择所述TBC1D4与ALMS1的结合未被所述分子降低或阻止的分子。更有甚之,所述方法可以包括选择TBC1D4与ALMS1的结合被所述分子增加或提高的分子的步骤。

[0044] 在鉴定、筛选或选择能够提高TBC1D4与ALMS1结合的分子的优选实施方式中,本发明的筛选方法还包括测定所述分子、特别是所选择的分子对 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的效应,并选择所述 $\alpha$ PKC与ALMS1的结合被所述分子降低或阻止的分子。

[0045] 由于结合配偶体、特别是ALMS1和TBC1D4的大尺寸,本发明人更愿意在所述筛选方法中使用细胞体系。优选地,所述细胞体系是对胰岛素有响应的细胞体系。例如,所述细胞体系可以选自间充质细胞系、间充质干细胞、脂肪间充质干细胞、前脂肪细胞和脂肪细胞。优选地,所述细胞是人类细胞。

[0046] 然后,可以在不存在或存在胰岛素下,进行结合测定,优选在胰岛素存在下进行 $\alpha$ PKC与ALMS1的结合测定并在胰岛素存在下进行TBC1D4与ALMS1的结合测定。

[0047] 在第一个方面,可以进行利用ALMS1作为诱饵的免疫沉淀检测,具体如实验部分中所详述的。例如,所述检测可以用在不存在和/或存在胰岛素下、优选在不存在胰岛素下培养的细胞、特别是脂肪细胞进行。将待测分子添加到培养基中。然后,对 $\alpha$ PKC进行免疫检测。任选地,也可以对TBC1D4进行免疫检测。这种方法被详细地公开在实施例部分中。

[0048] 在优选实施方式中,测定与ALMS1结合的 $\alpha$ PKC的量并与被测分子不存在时、特别是不存在胰岛素时的所述量做比较。如果在被测分子存在下与ALMS1结合的 $\alpha$ PKC的量减少,则选择所述分子。

[0049] 测定与ALMS1结合的TBC1D4的量并与被测分子不存在时、特别是存在胰岛素时或者在存在和不存在胰岛素两种情况下的所述量做比较。如果在被测分子存在下与ALMS1结合的TBC1D4的量减少,则舍弃所述分子。如果在被测分子存在下与ALMS1结合的TBC1D4的量增加,则选择所述分子。

[0050] 在第二个方面,可以进行与质谱术偶联的亲纯化,特别是在化学交联后。例如,可以将细胞培养在没有甲硫氨酸和亮氨酸但包含可光活化的甲硫氨酸和亮氨酸的培养基中。然后,对细胞进行UV照射以便稳定蛋白质复合物,并通过质谱术分析蛋白质复合物。

[0051] 其他方法是本领域技术人员可利用的,例如双分子荧光互补、串联亲和纯化等。具体而言,WO 2012/117245公开了鉴定能够阻止两个蛋白质之间相互作用的分子的方法:WO 2012/117245(即,用于鉴定小分子)。WO12174489也公开了开发适合于阻止两个蛋白质之间相互作用的分子的方法。

[0052] 另外,合适的分子也可以通过分子建模来设计。例如在实施例部分中详述了这样的方法。

[0053] 在具体的方面,本发明涉及ALMS1的结构同源性模型,和它在鉴定能够抑制或刺激ALMSome功能、特别是抑制ALMS1和 $\alpha$ PKC之间相互作用和/或增加ALMS1和TBC1D4之间相互作用

用的分子的计算机模拟(in silico)方法中的应用。

[0054] 本发明还涉及TBC1D4的结构同源性模型,和它在鉴定能够抑制或刺激ALMS1功能、特别是增加ALMS1和TBC1D4之间相互作用的分子的计算机模拟方法中的应用。

[0055] 本发明还涉及鉴定、筛选或选择能够在基因和蛋白质水平上上调ALMS1的分子的方法。所述方法包括测定分子对ALMS1表达的效应,并选择增加ALMS1表达的分子。为了测定分子对与ALMS1表达的效应,可以进行本领域技术人员已知的任何技术。本领域已知的各种技术可以用于检测或定量ALMS1表达,包括测序、杂交、扩增和/或与特异性配体(例如抗体)结合。合适的方法包括Southern印迹(用于DNA)、Northern印迹(用于RNA)、荧光原位杂交(FISH)、凝胶迁移、ELISA、放射性免疫检测(RIA)和酶免检测(IEMA)。

[0056] “增加的”、“增加”或“提高”意在指当与被测分子不存在时在相同条件下测量的结合相比,结合增加了至少10、20、30、40、50、60、70、80或90%。“降低的”或“减少”意在指当与被测分子不存在时在相同条件下测量的结合相比,结合降低了至少10、20、30、40、50、60、70、80或90%。

[0057] 另外,本发明的筛选方法可以包括利用动物模型的检测。可以向所述动物模型施用待测分子,并可以评价所述分子对葡萄糖吸收或糖尿病的效应。例如,所述动物模型可以是患有胰岛素抵抗、糖尿病或高血糖症的小鼠或大鼠。所述分子的效应可以通过测量血糖水平来评价。

[0058] 分子

[0059] 所述能够阻止或阻断 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的分子可以是能够结合 $\alpha$ PKC或ALMS1并从而阻止或阻断 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的任何配体。

[0060] 在第一个方面,本发明涉及通过与一个或多个选自E17、D58、S59、G62、H65、L66、Q736、T737、E738、D828、S829、T1088、D1089、A1169、Q1170、F2882、L2883和E2884的ALMS1残基相互作用来阻止或阻断 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的分子。在另一个方面,本发明涉及通过与一个或多个选自F114、D116、C118、L121、N138、Q142、I145、P148、G433、E545、S562、S566、F597、D601、W602、K604、E606、G620、T631、V664和I667的 $\alpha$ PKC残基相互作用来阻止或阻断 $\alpha$ PKC与ALMS1结合的分子。

[0061] 所述能够提高或增加TBC1D4与ALMS1结合的分子可以是能够结合TBC1D4或ALMS1并从而提高或增加TBC1D4与ALMS1结合的任何配体。

[0062] 在第一个方面,本发明涉及通过与一个或多个选自H65、L66和S2879的ALMS1残基相互作用来提高或增加TBC1D4与ALMS1结合的分子。在另一个方面,本发明涉及通过与一个或多个选自G75、A76、P77、A78、R80、E81、V82和I83的TBC1D4残基相互作用来提高或增加TBC1D4与ALMS1结合的分子。

[0063] 本发明涉及这类分子、包含这类分子的药物组合物、和这类分子作为药物或在制造药物中的应用。

[0064] 所述分子可以是肽或多肽或肽模拟物、抗体、其片段或衍生物、适配体、镜像寡核苷酸、或化合物。所述分子可以通过本领域已知的或上文详细描述过的筛选方法来选择,并可以通过任何方便的计算机模拟建模方法进行设计。

[0065] 在优选实施方式中,所述分子是肽或多肽。优选地,所述肽可以具有5和50个之间的氨基酸。更优选地,它具有5和20个之间的氨基酸。更优选地,所述肽或多肽包含小于50个

氨基酸,更优选小于40、30、20、15或10个氨基酸。

[0066] 在第一个方面,所述分子是包含ALMS1 (SEQ ID No 1) 的片段的氨基酸序列的肽或多肽。在优选实施方式中,所述分子是包含ALMS1的片段的氨基酸序列的肽或多肽,所述片段包括一个或若干个据预测介导与 $\alpha$ PKC相互作用的残基。特别是,这些残基选自E17、D58、S59、G62、H65、L66、Q736、T737、E738、D828、S829、T1088、D1089、A1169、Q1170、F2882、L2883、和E2884。更优选地,这些残基选自D58、S59、G62、H65、L66、Q736、T737、E738、D828、S829、T1088、D1089、A1169、Q1170、F2882、L2883和E2884。D58、S59、G62、H65和L66限定第一相互作用区段。T737和E738限定第二相互作用区段。D828和S829限定第三相互作用区段。T1088和D1089限定第四相互作用区段。A1169和Q1170限定第五相互作用区段。F2882、L2883和E2884限定第六相互作用区段。

[0067] 在非常具体的方面,所述肽或多肽包含以下序列之一或由以下序列之一组成:

[0068] -LSDSHYGPQHLESIDD (SEQ ID No 5), 靶向所述第一相互作用区段;

[0069] -DSHQTEETL (SEQ ID No 6), 靶向所述第二相互作用区段;

[0070] -QQTLPESHLP (SEQ ID No 7);

[0071] -QALLDSDLPE (SEQ ID No 8), 靶向所述第三相互作用区段;

[0072] -PADQMTDTP (SEQ ID No 9), 靶向所述第四相互作用区段;

[0073] -HIPEEAQKVSVA (SEQ ID No 10), 靶向所述第五相互作用区段;

[0074] -SCIFLEQ (SEQ ID No 11), 靶向所述第六相互作用区段, 和

[0075] -其包含6个连续氨基酸的片段。

[0076] 在第二个方面,所述分子是包含 $\alpha$ PKC (SEQ ID No 4) 的片段的氨基酸序列的肽或多肽。在优选实施方式中,所述分子是包含 $\alpha$ PKC的片段的氨基酸序列的肽或多肽,所述片段包括一个或若干个据预测介导与ALMS1相互作用的残基。特别是,这些残基选自F114、D116、C118、L121、N138、Q142、I145、P148、G433、E545、S562、S566、F597、D601、W602、K604、E606、G620、T631、V664和I667。F114、D116、C118和L121可以限定第一相互作用区段。N138、Q142、I145和P148可以限定第二相互作用区段。E545、S562和S566可以限定第三相互作用区段。F597、D601、W602、K604和E606限定第四相互作用区段。V664和I667可以限定第五相互作用区段。

[0077] 任选地,与参比序列(即,对来源于ALMS1的肽而言为SEQ ID No 1、对来源于 $\alpha$ PKC的肽而言为SEQ ID No 4,对来源于TBC1D4的肽而言为SEQ ID No 2或3)相比,所述肽或多肽可以包含一、二、三、四或五个氨基酸取代。

[0078] 所述肽或多肽还可以包含促进它的细胞摄取或进入的部分,特别是PTD(蛋白转导结构域)。PTD通常包含10至20个氨基酸的特定氨基酸序列(Matsushita和Matsui, (2005), J Mol Med 83,324-328; Vivès等, Biochimic et Biophysica Acta, 2008, 1786, 126-138)。PTD主要由碱性氨基酸例如精氨酸或赖氨酸构成,并且所述PTD的代表性实例包括富含精氨酸的肽例如聚R<sub>8</sub> (RRRRRRRR) 或 (RRPRRPRRPRRPRR)、触角足 (antennapedia) 或穿透蛋白 (penetratin) 肽例如 (RQIKIWFQNRRMKWKK) 或 HIV-Tat (YGRKKRRQRRR)。

[0079] 在具体的方面,所述分子是抗体、其片段或衍生物。

[0080] 所述肽或多肽可以由天然氨基酸和/或非天然氨基酸制成。“非天然氨基酸”是指天然氨基酸(即, Ala, Val, Gly, Leu, Ile, Lys, Arg, Glu, Gln, Asp, Asn, His, Tyr, Phe, Trp,

Ser,Pro,Thr,Cys,Met)的类似物或衍生物。它们存在修饰的侧链,例如更短、更长或具有不同的官能团。设想了异构体D和L,特别是因为异构体D对蛋白酶不敏感。另外,为了增加抗蛋白水解性,还设想了在一些或全部肽键中的修饰,特别是通过(-CO-NH-)、通过(-CH<sub>2</sub>-NH-)、(-NH-CO-)、(-CH<sub>2</sub>-O-)、(-CH<sub>2</sub>-S-)、(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)、(-CO-CH<sub>2</sub>-)、(-CHOH-CH<sub>2</sub>-)、(-N=N-)、和/或(-CH=CH-)进行修饰。所述肽可以存在羧酸C末端(-COO<sup>-</sup>)和酰胺末端(-CONH<sub>2</sub>)。所述肽也可以是如本文中公开的肽的D-反向-反转序列。所述N末端可以被修饰,尤其是被乙酰基修饰。任选地,为了增加稳定性,所述肽或多肽可以被聚乙二醇化。或者,可以修饰所述肽以成为钉合肽(stapled peptide)。术语“钉合肽”用在本文中时,是指人工修饰的肽,其中用连接所述肽中 $\alpha$ -螺旋的相邻转角的一个或多个人造分子桥(交联)稳定所述结构。制备钉合肽的方式已经被广泛综述,例如在Verdine和Hilinski(2012,Methods Enzymol,503,3-33)、W010033617和W010011313中,其公开内容通过引用结合到本文中)。

[0081] 本发明还涉及包含如上文定义的肽和可药用载体/赋形剂的药物组合物。它还涉及用作药物的如上文定义的肽或如上文定义的肽在制造药物中的应用。

[0082] 在另一种实施方式中,所述分子是抗体、其片段或其衍生物。用在本文中时,术语“抗体”和“免疫球蛋白”具有相同的含义并且在本发明中无差别地使用。术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有免疫特异性地结合抗原的抗原结合位点的分子。抗体包括任何种类的抗体,优选单克隆抗体。它们可以是例如IgG(免疫球蛋白G)或VHH(来自骆驼科哺乳动物的重链可变结构域抗体)。抗体片段或其衍生物包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、(scFv)<sub>2</sub>、dAb、互补决定区(CDR)片段、线性抗体、单链抗体分子、微抗体、双抗体、和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0083] 抗体、片段或衍生物可以阻断ALMS1和 $\alpha$ PKC之间的相互作用。优选地,它们对ALMS1和TBC1D4之间的相互作用没有影响或对所述相互作用具有增强效应。

[0084] 在第一种实施方式中,所述抗体是对ALMS1特异性的。特别是,所述抗体的表位包含一个或若干个参与与 $\alpha$ PKC相互作用的所述ALMS1残基,特别是一个或若干个选自E17、D58、S59、G62、H65、L66、Q736、T737、E738、D828、S829、T1088、D1089、A1169、Q1170、F2882、L2883和E2884的残基。

[0085] 或者,所述抗体是对 $\alpha$ PKC特异性的。特别是,所述抗体的表位包含一个或若干个参与与ALMS1相互作用的所述 $\alpha$ PKC残基,特别是一个或若干个选自F114、D116、C118、L121、N138、Q142、I145、P148、G433、E545、S562、S566、F597、D601、W602、K604、E606、G620、T631、V664和I667的残基。

[0086] 这样的抗体可以通过用包含一个或若干个经鉴定参与ALMS1和 $\alpha$ PKC之间相互作用的残基的免疫原性肽或蛋白质免疫非人类哺乳动物而产生。或者,可以提供并筛选抗体的文库。然后,对所产生的抗体、片段或衍生物结合所述相互作用配偶体之一的能力和/或它们阻止、抑制或阻断ALMS1和 $\alpha$ PKC之间相互作用的能力进行筛选。另外,如前面所指出的,可以进一步对抗体、片段或衍生物调制TBC1D4和ALMS1之间相互作用的能力进行筛选,并且如果它们增加或提高所述相互作用的话就入选。

[0087] 抗体、片段或衍生物可以提高ALMS1和TBC1D4之间的相互作用。优选地,它们对ALMS1和 $\alpha$ PKC之间的相互作用具有阻断效应。

[0088] 在第一种实施方式中,所述抗体是对ALMS1特异性的。特别是,所述抗体的表位包

含一个或若干个参与与TBC1D4相互作用的所述ALMS1残基,特别是一个或若干个选自H65、L66和S2879的残基。

[0089] 或者,所述抗体是对TBC1D4特异性的。特别是,所述抗体的表位包含一个或若干个参与与ALMS1相互作用的所述TBC1D4残基,特别是一个或若干个选自G75、A76、P77、A78、R80、E81、V82和I83的残基。

[0090] 这样的抗体可以通过用包含一个或若干个经鉴定参与ALMS1和TBC1D4之间相互作用的残基的免疫原性肽或蛋白质免疫非人类哺乳动物而产生。或者,可以提供并筛选抗体的文库。然后,对所产生的抗体、片段或衍生物结合所述相互作用配偶体之一的能力和/或它们提高或增加ALMS1和TBC1D4之间相互作用的能力进行筛选。另外,如前面所指出的,可以进一步对抗体、片段或衍生物调制 $\alpha$ PKC和ALMS1之间相互作用的能力进行筛选,并且如果它们降低或阻断所述相互作用的话就入选。

[0091] 单克隆或多克隆抗体的制备是本领域公知的,并且可以使用为数众多的可用技术中的任何一种(参见,例如,Kohler和Milstein,Nature 256:495-497(1975);Kozbor等,Immunology Today 4:72(1983);Cole等,《单克隆抗体和癌症治疗》(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)(1985),77-96页)。可以将用于产生单链抗体的技术(美国专利No.4,946,778)修改成用于产生针对目标多肽的抗体。还有,转基因小鼠或其他生物体例如其他哺乳动物可以用于表达人源化的、嵌合的、或类似修饰的抗体。或者,噬菌体展示技术可用于鉴定与所选择的抗原特异性结合的抗体和异聚Fab片段(参见,例如,McCafferty等,Nature 348:552-554(1990);Marks等,Biotechnology 10:779-783(1992))。

[0092] 对于适配体和镜像寡核苷酸,可以使用类似的方法以便选择适配体和镜像寡核苷酸。这些方法是本领域技术人员公知的。

[0093] 用于此处时,术语“适配体”是指能够结合ALMS1、 $\alpha$ PKC或TBC1D4的核酸分子或肽。它是指在分子识别方面代表抗体的替代品的一类分子。适配体是寡核苷酸或寡肽序列,其具有以高亲和性和特异性识别几乎任何类别的靶分子的能力。

[0094] 这样的配体可以通过如Tuerk C.和Gold L.,Science,1990,249(4968):505-10中所述的利用随机序列文库的指数富集进行的配体系统进化来分离。所述随机序列文库可通过DNA的组合化学合成来获得。在这个文库中,每个成员是单一序列的最终被化学修饰的线性低聚物。这类分子可能的修饰、用途和优点已经在Jayasena S.D.,Clin.Chem.,1999,45(9):1628-50中综述。肽适配体由平台蛋白质所展示的构象受限抗体可变区组成,所述平台蛋白质例如为通过两种杂交方法从组合文库中选择的大肠杆菌硫氧还蛋白A(Colas等,Nature,1996,380,548-50)。

[0095] 镜像寡核苷酸已经在例如W0 98/08856中公开。它们是与适配体相似的分子。然而,与适配体相反,镜像寡核苷酸完全或主要由L-核苷酸而不是D-核苷酸组成。另外,特别是关于镜像寡核苷酸可能的长度,在适配体方面所概括的同样适用于镜像寡核苷酸。

[0096] 化合物是指小于约1500道尔顿、1000道尔顿、800道尔顿、或甚至小于约500道尔顿的分子,特别是有机或无机化合物。在化学中的结构设计应该有助于发现这样的分子。所述分子可以通过本发明中公开的筛选方法来鉴定。

[0097] 合成的化合物文库可从许多公司商购,所述公司包括Maybridge Chemical Co.

(Trevillet, Cornwall, UK)、Comgenex (Princeton, N.J.)、Brandon Associates (Merrimack, N.H.)、和Microsource (New Milford, Conn.)。组合文库是可用的,或者可以根据已知的合成技术来制备。或者,采取细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物文库可得自例如Pan Laboratories (Bothell, Wash.)和MycoSearch (NC),或者可容易地通过本领域公知的方法产生。

[0098] 另外,天然的和合成产生的文库和化合物可以通过常规的化学和生化技术进一步修饰。

[0099] 所述分子可以共价或非共价地与靶向相关组织、优选脂肪的部分或与促进分子进入细胞中的部分连接。

[0100] 治疗适应症

[0101] 本发明人提议使用如本文中公开的分子增加葡萄糖摄取,特别是通过脂肪细胞的葡萄糖摄取,从而调节或控制血糖水平。那么,所述分子适合于治疗或延迟糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症的进展或发作。

[0102] 糖尿病以高血糖症为特征。更具体地,2型糖尿病以高血糖症和胰岛素抵抗为特征。在遗传上易患2型糖尿病的人中,肥胖症被认为是该疾病的主因。糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病是众所周知与糖尿病和胰岛素抵抗有关的疾病。

[0103] 于是,通过增加葡萄糖摄取来降低血糖,可以治疗或延迟这些疾病的进展或发作。

[0104] 本发明还涉及当用于治疗对象的糖尿病时用于减少胰岛素剂量或停止胰岛素治疗的本发明的分子,本发明的分子在制造当用于治疗对象的糖尿病时减少胰岛素剂量或停止胰岛素治疗的药物中的应用,或治疗对象的糖尿病的方法,其中向胰岛素剂量减少或没有胰岛素治疗的对象施用治疗有效量的本发明分子。更通常地,它可以用于降低抗糖尿病药的剂量。

[0105] “治疗”意指疾病被治愈、减轻或延迟。它包括预防性或治愈性治疗。术语治疗特别是指校正、延迟或减轻受损的葡萄糖体内稳态。术语“治疗”还指改善葡萄糖摄取(例如,脂肪细胞对葡萄糖的捕获)。在本发明的上下文中,术语“控制血糖水平”是指在具有异常水平(即,低于或超过具有正常的葡萄糖体内稳态的相应哺乳动物对象的已知参照值、中值或平均值的水平)的哺乳动物对象中血液或血浆葡萄糖水平的正常化或调节。

[0106] 本发明涉及所述分子的药学或兽医学应用。因此,所述对象可以是任何哺乳动物,优选人类对象,例如成人或儿童。在具体实施方式中,所述对象是患肥胖症的对象。任选地,所述对象没有可检测的抗胰岛抗体,并且超声检查没有发现胰腺异常。在兽医学应用的情况下,所述对象可以是动物,优选哺乳动物,特别是宠物动物例如狗、猫或马。

[0107] 本发明的分子可以与一种或多种其他活性药、优选抗糖尿病药联合使用,特别是用于治疗或延迟糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症的进展或发作。

[0108] 因此,本发明还涉及包含本发明的分子和一种或多种其他活性药、优选抗糖尿病药的药物组合物。

[0109] 它进一步涉及产品或试剂盒,其含有本发明分子和一种或多种其他活性药、优选抗糖尿病药,作为同时、分开或顺序应用的组合制品,或包含本发明分子和一种或多种其他

活性药、优选抗糖尿病药的组合制品,以供同时、分开或顺序应用,特别是用于治疗或延迟糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症的进展或发作。

[0110] 它涉及本发明的分子,其与一种或多种其他活性药、优选抗糖尿病药联合用于治疗或延迟糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症的进展或发作。

[0111] 它还涉及本发明的分子和一种或多种其他活性药、优选抗糖尿病药在制造药物,特别是治疗或延迟糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症的进展或发作的药物中的应用。

[0112] 最后,它涉及治疗或延迟糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症的进展或发作的方法,其中将治疗有效量的本发明分子与治疗或亚治疗有效量的一种或多种其他活性药、优选抗糖尿病药联合施用。“亚治疗”意指量可以是例如常规治疗剂量的90、80、70、60、50、40、30、20或10%(特别是对于相同的适应症和相同的给药途径来说)。

[0113] 特别是,所述其他活性药是用于治疗或延迟糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症的进展或发作的药物。例如,所述其他药可以是抗糖尿病药,例如降血糖剂或抗高血糖剂。它可以在非穷举名录中选择,所述名录包含胰岛素,二甲双胍,磺酰脲类例如甲苯磺丁脲、乙酰苯磺酰环己脲、妥拉磺脲、氯磺丙脲、优降糖(也称为格列本脲)、格列美脲、格列甲嗪、格列齐特、glycopyramide和格列喹酮, $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂例如阿卡波糖、米格列醇和伏格列波糖,噻唑烷二酮例如匹格列酮和罗格列酮,格列奈例如瑞格列奈和那格列奈,肠促胰岛素模拟物,胰高血糖素样肽类似物和激动剂例如exenotide、他司鲁泰和利拉鲁肽,二肽基肽酶-4抑制剂例如维格列汀、西他列汀、沙格列汀、利格列汀、alogliptin和septagliptin,淀粉不溶素类似物例如pamlintide, glycourics例如卡格列净和达帕格列净,或其任何组合。

[0114] 所述药物组合物的形式、给药途径、剂量和方案自然取决于待治疗的病症、疾病的严重程度、患者的年龄、重量和性别等等。

[0115] 本发明的药物组合物或治疗组合物可以被配制用于局部、口服、胃肠外、鼻内、静脉内、肌内、皮下或眼内给药等。

[0116] 用于本发明的药物组合物中的所述分子以治疗有效量存在。术语“治疗有效量”用于本申请中时,是指施用于患者的治疗剂的量足以建立如上文定义的糖尿病、胰岛素抵抗、糖尿病性视网膜病、糖尿病性神经病变、糖尿病性肾病、胰岛素抵抗、高血糖症、肥胖症和高胰岛素血症的治疗。

[0117] 包含所述分子的药物组合物根据本领域技术人员知道的标准制药实践(Lippincott Williams和Wilkins,2000和《制药技术大全》(Encyclopedia of Pharmaceutical Technology),J.Swarbrick和J.C.Boylan编著,1988-1999,Marcel Dekker,New York)来配制。

[0118] 对于口服给药来说,所述组合物可以被配制成为常规的口服剂型,例如片剂、胶囊、粉剂、颗粒剂和液体制剂例如糖浆、酏剂和浓缩滴剂。可以使用无毒的固体载体或稀释剂,

其包括例如医药级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、镁、碳酸盐等。对于压制片剂来说,作为向粉状材料赋予粘聚性质的试剂的粘结剂也是必需的。例如,淀粉、明胶、糖例如乳糖或右旋糖、和天然或合成胶可以用作粘结剂。崩解剂在片剂中也是必需的,以促进所述片剂的破碎。崩解剂包括淀粉、粘土、纤维素、藻胶、胶和交联聚合物。此外,所述片剂中还包括润滑剂和助流剂以防止在制造过程中片剂材料粘附于表面并改善粉末材料在制造期间的流动特性。胶体二氧化硅最常用足作助流剂,化合物例如滑石或硬脂酸最常用作润滑剂。

[0119] 对于经皮给药来说,所述组合物可以被配制成软膏、霜剂或凝胶形式,并且可以使用适当的渗透剂或清洁剂来促进渗透,例如二甲基亚砷、二甲基乙酰胺和二甲基甲酰胺。

[0120] 对于经粘膜给药来说,可以使用鼻喷雾剂、直肠或阴道栓剂。可以通过本领域已知的方法将所述活性化合物掺入到任何已知的栓剂基质中。这样的基质的实例包括可可脂、聚乙二醇(碳蜡)、聚乙烯单硬脂酸山梨糖醇酐酯、以及这些物质与其他相容材料的混合物以修改熔点或溶出率。

[0121] 本发明的药物组合物可以被配制成在给药后立即或在给药后任何预定的时间或时间段时基本释放所述活性药。

[0122] 本发明的药物组合物可以包含与可药用赋形剂和/或载体相结合的一种或多种本发明分子。这些赋形剂和/或载体根据如上所述的给药形式选择。

[0123] 在具体实施方式中,本发明的药物组合物包含0.001mg至10g本发明的分子。优选地,本发明的药物组合物包含0.01mg至1g本发明的分子。

## 附图说明

[0124] 图1.  $Alms^{foz/foz}$  小鼠的代谢表征

[0125] (A) WT和 $Alms^{foz/foz}$  雄性小鼠的平均体重 ( $n=6-8$  只小鼠/基因型)。(B) WT和 $Alms^{foz/foz}$  的内脏脂肪组织的照片。比例尺:25 $\mu$ M。(C) 在WT和 $Alms^{foz/foz}$  小鼠上进行的胰岛素耐受性试验(I.T.T.),并且相应的柱状图显示了各基因型 ( $n=6-8$  只小鼠/组) 的曲线下面积(A.U.C.)。( $p<0.001$ )。(D) WT和 $Alms^{foz/foz}$  雄性小鼠的平均体重 ( $n=6-8$  只小鼠/基因型)。(E) 来自相应的WT和 $Alms^{foz/foz}$  的内脏脂肪组织的照片。比例尺:25 $\mu$ M。(F) 在WT和 $Alms^{foz/foz}$  小鼠上进行的胰岛素耐受性试验,并且相应的柱状图显示了各基因型 ( $n=6-8$  只小鼠/组) 的A.U.C.。\*\*\*表示 $p$ -值 $<0.001$ 。(G) 在来自非肥胖的WT和 $Alms^{foz/foz}$  小鼠的胰岛素敏感组织中指定蛋白质的免疫印迹。(H) 向WT和 $Alms^{foz/foz}$  小鼠 ( $n=5$  只小鼠/基因型) 注射放射性脱氧葡萄糖后,在不同的靶组织中的放射性计数结果。\*表示 $p$ -值=0.05。

[0126] 图2. 人类成熟脂肪细胞中的ALMS1沉默效应

[0127] (A) 照片显示了在INS不存在时,在对照(shCTRL shRNA)或ALMS1-贫化的脂肪细胞(ALMS1shRNA)中,沉默的成熟脂肪细胞缺少2-NBDG的吸收(绿色)。(B) 照片描绘了与CTRLshRNA相比,在ALMS1shRNA中缺少2-NBDG的吸收。细胞核用DAPI、DIC复染:微分干涉对比图片。(C) 细胞内甘油三酯(TG)、质膜染成红色(PM)和细胞核染成蓝色(DAPI)的CTRLshRNA或ALMS1shRNA成熟脂肪细胞的3D图像。(D) 成熟脂肪细胞中与细胞内TG的量关联的荧光水平的测量 ( $n=16$  孔/测量条件) \* $p$ -值=0.05。(E-F) 在INS存在和不存在下,CTRLshRNA和ALMS1shRNA处理的成熟脂肪细胞中AKT和pS473-AKT的免疫检测。(G)

CTRLshRNA和ALMS1shRNA成熟脂肪细胞的3D图像显示在Ins不存在时胰岛素受体 (IR, 红色) 和GLUT4 (绿色) 的细胞定位。剖视图图像显示在Ins不存在时 (H), 30min INS刺激后 (I) 以及30min INS刺激、然后INS不存在2小时的情况下 (J) 在CTRLshRNA和ALMS1shRNA成熟脂肪细胞中GLUT4定位的动力学。比例尺: 在A、B、C中25 $\mu$ m, 在G-J中5 $\mu$ m。

[0128] 图3. ALMS1蛋白上预测的相互作用位点和它的配偶体TBC1D4的建模。(A) ALMS1蛋白的预测的3D结构, 带有螺旋和环。(B) ALMS1蛋白的预测的3D结构, 其中由红色圆点表示可能的相互作用位点。(C) TBC1D4蛋白的一级序列, 其中指出了结合位点或相互作用结构域的定位。(D) TBC1D4蛋白的预测的3D结构。

[0129] 图4. ALMS1是TBC1D4细胞运输需要的

[0130] (A) 计算机模拟预测的3D结构显示了ALMS1和TBC1D4之间的空间相互作用, 其中相互作用位点的放大视图突出了ALMS1蛋白的预测的相互作用氨基酸残基 (L66、Y61和S2879)。(B) 免疫染色的成熟脂肪细胞的3D图像描绘了TBC1D4 (绿色) 和ALMS1 (红色) 的共定位。细胞核用DAPI复染 (蓝色)。(C-D) 关于用或不用胰岛素处理的CTRLshRNA和ALMS1shRNA成熟脂肪细胞的细胞裂解物中指定蛋白质的免疫印迹 (每泳道加载50 $\mu$ g总蛋白)。对CTRLshRNA或ALMS1shRNA或者TBC1D4shRNA成熟脂肪细胞进行的免疫荧光试验的3D图像描绘了在胰岛素不存在 (-INS) 时 (E) 或在INS存在时 (F) 的GLUT4细胞定位。PM: 质膜和细胞核用DAPI复染。对CTRLshRNA或ALMS1shRNA脂肪细胞进行的免疫荧光试验的3D图像显示在INS不存在时 (G) 或当用INS处理30min时 (H) GLUT4 (绿色) 和TBC1D4的细胞定位。比例尺: 10 $\mu$ m。

[0131] 图5. TBC1D4不是ALMS1在脂肪细胞生物学中发挥作用的唯一相互作用配偶体

[0132] (A-C) 照片显示了Ins刺激30min后, 在CTRLshRNA或ALMS1shRNA或TBC1D4shRNA贫化的脂肪细胞中2-NBDG的吸收。(D-F) 利用非透化固定的成熟脂肪细胞获得的3D图像, 所述脂肪细胞用INS刺激然后免疫检测膜结合的GLUT4 (绿色)。质膜 (PM) 用Image-iT染色 (红色), 细胞核用DAPI复染。(G) 在利用ALMS1作为诱饵的IP试验 (图S4) 中由质谱术鉴定的2个质子泵亚基 (ATP6V0D1和ATP6V1A)、来自白色脂肪组织 (WAT) 和肾的细胞提取物中的 $\alpha$ PKC、GLUT4和 $\beta$ -微管蛋白的免疫印迹。每泳道加载50 $\mu$ g总蛋白。(H) 利用抗ALMS1和ATP6的抗体在脂肪细胞中检测到的Duolink阳性信号的照片。(I) 免疫荧光图片显示INS刺激后成熟脂肪细胞中ATP6V0D1和ALMS1的细胞定位以及合并的图片。(J) 计算机模拟预测的TBC1D4 (红色) 和PKC (黄色) 结合位点, 它们在ALMS1 3D结构中彼此只相距20埃。(K-L) 在INS不存在或存在下培养的脂肪细胞中, 利用ALMS1作为诱饵, 在免疫沉淀物中免疫检测 $\alpha$ PKC、TBC1D4和 $\alpha$ -辅肌动蛋白。

[0133] 图6. 在ALMS1-贫化的脂肪细胞中恢复酸化使葡萄糖吸收复原

[0134] (A-B) 在用INS刺激的对照或ALMS1-贫化的吡啶橙染色的脂肪细胞上获取时间流逝照片。(C-D) 在用电中性的K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交换离子载体尼日利亚菌素 (Nigericin) (NIG) 刺激的对照或ALMS1-贫化的吡啶橙染色的脂肪细胞上获取时间流逝照片。(E) 上至下: 不用Ins或用INS或用NIG刺激的对照脂肪细胞的扫描电镜 (SEM) 图片。白色箭头显示膨胀的囊泡。(F) 在 (E) 中显示的对应的透射电镜 (TEM) 图片显示, 在INS和NIG存在下, 囊泡与质膜融合。(G) 上至下: 不用INS或用INS或用NIG刺激的ALMS1-贫化的脂肪细胞的SEM图片。(H) 在 (G) 中显示的对应的TEM图片显示只有在NIG存在下囊泡才与质膜融合。(I) 照片显示在不存在INS (上图) 或INS刺激30分钟后 (中图) 或NIG刺激30min后 (下图), 对照成熟脂肪细胞中2-NBDG的细

胞内含量(绿色)。(J)照片显示在不存在INS(上图)或INS刺激30分钟后(中图)或NIG刺激30min后(下图),ALMS1-贫化的成熟脂肪细胞中2-NBDG的细胞内含量(绿色)。比例尺:20 $\mu$ m,但F和H:500nm。

[0135] 图7. GLUT4运输需要ALMSome蛋白质复合体

[0136] (A)利用非透化固定的成熟脂肪细胞获得的3D图像,所述脂肪细胞用NIG刺激然后免疫检测膜结合的GLUT4(绿色)。质膜(PM)用Image-iT染色(红色),细胞核用DAPI复染。(B)照片显示NIG处理后24hr,细胞内TG含量。(C)不存在INS刺激时,成熟脂肪细胞中ALMS1细胞定位和蛋白配偶体的示意图。(D)INS刺激后,成熟脂肪细胞中ALMS1动力学和蛋白配偶体的示意图。

[0137] 图8. 在INS不存在时通过特异性干扰ALMSome中的 $\alpha$ PKC结合位点触发葡萄糖吸收

[0138] (A)照片显示了在INS存在或不存在时,在CTRL慢病毒粒子或携带 $\alpha$ PKC结构域的慢病毒粒子感染的脂肪细胞中2-NBDG的吸收。(B)在INS存在或不存在时,在CTRL慢病毒粒子或携带 $\alpha$ PKC结构域的慢病毒粒子感染的脂肪细胞中细胞内葡萄糖类似物2-NB的定量。(n=8/组)。

[0139] 图9. 脂肪细胞中min- $\alpha$ PKC-FLAG构建物表征

[0140] 上图:慢病毒感染后48小时,在成熟脂肪细胞中利用抗FLAG抗体免疫检测min- $\alpha$ PKC-FLAG。第二和第三张图:所述脂肪细胞的3D图像显示min- $\alpha$ PKC-FLAG的核周定位。最后的图:用于评价min- $\alpha$ PKC-FLAG对葡萄糖吸收的效应的试验方法的示意图。

[0141] 实施例

[0142] **Alström**综合征(ALMS)是一种罕见的常染色体隐性遗传病,以包括肥胖症和早期发作的糖尿病在内的几个临床特征为特征。它起源于编码460kDa蛋白质的ALMS1基因中的突变。

[0143] 迄今尚未知道ALMS1基因的功能和它如何引起**Alström**综合征表型,对其功能的研究受到所编码的蛋白质极大的尺寸及其低表达水平的阻碍。

[0144] **Alström**综合征(ALMS)是罕见的单基因儿童期肥胖综合征,迄今为止只鉴定到一个致病性突变基因,ALMS1基因。ALMS被归类为纤毛类(ciliopathy)疾病的成员,该类疾病包括Bardet Biedl综合征,这是起源于在主要纤毛功能中共同发挥关键作用的许多不同蛋白质的突变的一组综合病征。Alms1编码461kDa ALMS1蛋白质,所述蛋白质最初被描述为具有纯粹中心粒定位,但是最近的数据还提示ALMS1的胞质定位。

[0145] ALMS通过集体的多系统表型进行临床鉴定,所述表型被认为反映了ALMS1遍在的组织表达,密切模拟了BBS的许多表型特征。ALMS常见的临床特征包括视网膜变性、听力损失、儿童期肥胖、早期发作的2型糖尿病(T2DM)、扩张性心肌病、肝肾功能失常、甲状腺机能减退、身材矮小、高脂血症、和器官纤维变性。患有ALMS的儿童在儿童期的早期发生肥胖症,这与16岁年龄左右早期发作T2DM相关,在ALMS中早期发作T2DM的总体发病率比产生类似体重指数(BMI)的其他儿童期肥胖综合征(包括BBS)中所见到的高得多。T2DM在患有ALMS的儿童中的这种好发性与他们的肥胖程度不相称的原因仍然难以捉摸。

[0146] 本发明人研究了在成脂分化过程期间ALMS1蛋白的作用,发现ALMS1蛋白表达水平在脂肪生成期间增加。在成脂分化型间充质干细胞中,遏制ALMS1抑制了抗成脂级联,但意外的是不利于脂肪生成。

[0147] 另外,本发明人表明,ALMS1蛋白质复合体也是成熟脂肪细胞中GLUT4有效停留在它的胰岛素响应室中和它响应胰岛素刺激而与质膜融合的能力所需要的。ALMS1失活减少了在胰岛素刺激后能够被成熟脂肪细胞吸收的葡萄糖的量,因此促进了高血糖症和糖尿病发作。

[0148] 以前在自发突变体 $Alms1^{foz/foz}$ 和基因诱捕的 $Alms1$ 敲除鼠类ALMS模型中的研究证实,这些小鼠,与患病的人类儿童类似,由于食欲过盛在青春初期发生肥胖症,并且还表现出葡萄糖耐受性受损、高胰岛素血症和胰岛肥大,与严重的胰岛素抵抗相符,但是这种胰岛素抵抗的组织来源或机制以前尚未被鉴定。鼠类3T3-L1成纤维细胞系体外研究的以前发表的研究表明,抑制ALMS1基因表达导致轻度脂肪生成受损,但据报道,通过胰岛素介导的AKT磷酸化进行测量,在所产生的成熟脂肪细胞中对胰岛素信号转导途径没有影响。该数据直接偏离在此介绍的本发明,即 $Alms1$ 确实在胰岛素信号转导途径中和在GLUT4介导的葡萄糖转运中发挥着迄今未被认识的关键作用。

[0149] 实际上,尽管以前发表的相反的数据,但发明人当仔细研究肥胖澳洲鼠类ALMS模型( $Alms1^{foz/foz}$ )的表型时,鉴定到在这种模型中的胰岛素抵抗是在肥胖症发生之前而不是之后。他们进一步将所述脂肪组织鉴定为在ALMS中驱动胰岛素抵抗以及后续发生葡萄糖耐受不良和T2DM的特异性位点。他们证实了在 $Alms1^{foz/foz}$ 脂肪细胞中的胰岛素信号转导始终是完好的,直到所述胰岛素介导的葡萄糖摄取途径的最后一个已知成员——TBC1D4的磷酸化为止,不过通过随后的一系列研究,他们鉴定到了一种被他们称为Almsome的蛋白质复合体,其由几个关键蛋白质构成,所述关键蛋白质与ALMS1相关并且共同是GLUT4囊泡响应胰岛素信号转导而栓系和融合到脂肪细胞质膜(PM)上所需要的。因此,Almsome代表了胰岛素介导的葡萄糖摄取到脂肪细胞中的迄今未鉴定到的最终步骤,在ALMS中由于ALMSome功能破坏引起的胰岛素抵抗导致GLUT4膜融合故障并从而阻断了脂肪细胞葡萄糖转运。

[0150] 实施例1

[0151]  $Alms1^{foz/foz}$ 小鼠即使在没有肥胖症的情况下仍表现出严重的特异性脂肪组织胰岛素抵抗

[0152] 动物管理

[0153]  $Alms1^{foz/foz}$ 小鼠和 $Alms1^{+/+}$ (WT)同窝仔畜在动物设施中以每12小时明/暗周期维持在C57BL/6J背景上。小鼠随意地自由摄取水和含5.4%脂肪、能量含量12MJ/kg的正常饲料(Gordon的大鼠和小鼠饲养颗粒,Gordon的特殊原料,澳大利亚)或含23%脂肪、High Simple碳水化合物、0.19%胆固醇、能量含量20MJ/kg的高脂膳食(HFD)(SF03-020,特殊饲料,澳大利亚)。Foz突变侧翼的引物用于PCR基因分型:正向ACA ACT TTT CAT GGC TCC AGT (SEQ ID No 13);反向TTG GCT CAG AGA CAG TTG AAA (SEQ ID No 14)。

[0154] 六月龄肥胖的和年轻(<60日龄)非肥胖的 $Alms1^{foz/foz}$ 小鼠和野生型(WT)同窝仔畜用于研究哪种主要代谢损害导致 $Alms1^{foz/foz}$ 小鼠发生T2DM。与WT同窝仔畜的平均体重 $26.4g \pm 1.3g$ 相比,六月龄 $Alms1^{foz/foz}$ 小鼠是肥胖的,平均体重 $45.5g \pm 1.7g$ (图1A),并且如以前所显示具有空腹高血糖症和糖耐受性减低以及HOMA得分升高。胰岛素耐受性试验(ITT)显示,与WT(图1B)和杂合性同窝仔畜不同,肥胖 $Alms1^{foz/foz}$ 小鼠中的血糖对胰岛素给药没有响应(图1B),即使当施用高达20U/kg的胰岛素剂量时(图1C)。 $Alms1^{foz/foz}$ 小鼠的肥胖症是由于严重的脂肪细胞肥大(图1B)而不是更常见于肥胖BBS小鼠中的脂肪细胞增

生。为了确定哪种主要缺陷在Alms1<sup>foz/foz</sup>小鼠中引起葡萄糖耐受不良,研究年轻的瘦Alms1<sup>foz/foz</sup>小鼠以除去肥胖症对胰岛素响应性的混淆效应。在2月龄时,WT和Alms1<sup>foz/foz</sup>雄性小鼠具有~24g的相似平均体重(图1D)。然而,在这些小鼠中的ITT显示,年轻的非肥胖Alms1<sup>foz/foz</sup>雄性小鼠已经表现出明显降低的胰岛素响应性(图1E),与这个模型中肥胖症之前的胰岛素抵抗相符。对6月龄未禁食的Alms1<sup>foz/foz</sup>和WT的胰岛素敏感组织即心脏、肝脏、骨骼肌和白色脂肪组织(WAT)进行IRAP、Akt、p-AKT、GLUT4、C/EBP- $\alpha$ 和GAPDH的免疫检测显示,除了在WAT中p-AKT与总AKT的比率一致增加之外,蛋白质水平没有重大差异,与葡萄糖耐受不良Alms1<sup>foz/foz</sup>小鼠中胰岛素信号转导途径上游成员的激活反常地增加而不是降低相符(图1G)。为了鉴定哪些组织单独或共同可能是在Alms1<sup>foz/foz</sup>小鼠中观察到的胰岛素抵抗的主要来源,在WT和Alms1<sup>foz/foz</sup>小鼠中比较胰岛素介导的脱氧葡萄糖(DOG)摄取的组织分布。这证实了当与WT小鼠比较时,严重受损的DOG摄取限于Alms1<sup>foz/foz</sup>小鼠的WAT,而DOG摄取到胰岛素响应性腓肠肌和比目鱼肌中代偿性增加。

[0155] 这些研究证明,虽然Alms1<sup>foz/foz</sup>小鼠随着年龄变得肥胖并发展出进行性的T2DM,但造成胰岛素抵抗和高血糖症的主要初始缺陷是脂肪组织的功能性ALMS1响应胰岛素信号转导而摄取葡萄糖的情况缺失时的故障,这种缺陷提前了肥胖症的发展。

[0156] 实施例2

[0157] 人类脂肪细胞中Alms1的沉默通过损害GLUT4细胞分选而阻断葡萄糖摄取

[0158] 材料.来自Molecular Probes,Invitrogen:吖啶橙,Image-iT<sup>®</sup>LIVE质膜和细胞核染色标记试剂盒,2-NBDG(2-(N-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑-4-基)氨基)-2-脱氧葡萄糖),Hoechst 33258和Cell Light<sup>™</sup> Early Endosomes-RFP\*BacMam 2.0\*;目录号:A3568, I34406, N13195, H3569和C1058。来自Lonza:AdipoRed<sup>™</sup>检测试剂(目录号:PT-7009)。慢病毒粒子来自Santa Cruz Biotechnology, INC.:ALMS1shRNA(h)慢病毒粒子, TBC1D4shRNA(h)慢病毒粒子和对照shRNA慢病毒粒子-A;目录号:分别是sc-72345-V、sc-61654-V和sc-108080。来自Tocris Biosciences:尼日利亚菌素钠盐(目录号:4312)。

[0159] 生化试验.通过胰岛素耐受性试验(ITT)和腹膜内葡萄糖耐受性试验(IPGTT)测试小鼠的胰岛素抵抗。对于ITT,将小鼠禁食4小时,不能得食但能自由得水。将小鼠称重并以0.75U/kg体重在0.9%注射用生理盐水(Pfizer,美国)中ip注射胰岛素(Humulin R, Eli Lilly,美国)。获取尾血并利用血糖仪(Optium Xceed, Abbott,美国)和血糖试纸(Optium point of care, Abbott,美国)在胰岛素注射后0、15、30和60min测定每只小鼠的血浆葡萄糖。对于IPGTT,将小鼠禁食18小时并在0.9%注射用生理盐水中以2mg/g体重注射D-葡萄糖(Analar, VWR, USA)。在葡萄糖注射后0、15、30、60和120min通过尾静脉取样,利用血糖仪测定每只小鼠的血浆葡萄糖。在清醒的动物上通过颊放血收集血液用于血浆胰岛素测量。在收集后,将血样存放在冰上并在4℃以17000g旋转10min。利用商业的超敏小鼠胰岛素ELISA试剂盒(Crystal Chem Inc., USA)检测胰岛素水平。胰岛素抵抗(HOMA-IR)指标的体内稳态模型评价利用各个小鼠的空腹胰岛素和空腹葡萄糖水平来计算。利用下面的算式:HOMA-IR = [空腹葡萄糖(mg/dL) × 空腹胰岛素( $\mu$ U/mL)]/405。

[0160] 细胞培养.购买来源于健康骨髓的人类白色内脏前脂肪细胞(目录号:C-12732; PromoCell)和人类间充质干细胞(目录号:C-12974; PromoCell)。前脂肪细胞按照制造商的方案接种并培养在前脂肪细胞生长培养基(目录号:C-27410; PromoCell)中至汇合。在诱导

终末脂肪生成的前一天,所述细胞用购自Santa Cruz Biotechnology的由3种shRNA靶特异性构建物库组成的特异性慢病毒粒子感染,次日,通过将培养基变为前脂肪细胞分化培养基(目录号:C-27436;PromoCell),来诱导成脂分化2天。分化期之后,所述培养基最后变为脂肪细胞营养培养基(目录号:C-27438;PromoCell)。对于没有胰岛素的培养,将没有胰岛素的脂肪细胞基础培养基(目录号:C-2431;PromoCell)补充5g/L脱氧葡萄糖、8 $\mu$ g/mL d-生物素、400ng/ml地塞米松。至于hMSC,将它们在间充质干细胞生长培养基(目录号:C-28010;PromoCell)中培养至汇合。将HMSC用如上所述的特异性siRNA转染,并在次日通过将培养基变为MSC成脂分化培养基(目录号:C28011;Promocell)来诱导成脂分化。

[0161] RNA提取,cDNA合成,q-PCR和Taqman.利用RiboPure™试剂盒(目录号:AM1924;Ambion)从不同的组织和细胞制备总RNA,接着用TURBO DNA-free™(目录号:AM 1907;Ambion)进行DNase处理。RNA完整性通过凝胶电泳评价,RNA浓度通过带有Hellma®Tray Cell的Eppendorf Biophotometer Plus(目录号:105.810-uvs;Hellma)评价。利用BioRad iScript™ cDNA合成试剂盒(目录号:170-8891;BioRad)进行1 $\mu$ g总RNA向cDNA的反转录。在BioRad CFX96™实时系统中利用iQ™SYBR®Green Supermix(目录号:170-8886;BioRad)和针对基于SYBR Green的实时PCR进行实时PCR的待测靶标而优化的引物组,进行实时定量聚合酶链反应扩增。Taqman分析用Taqman®Fast Advanced Master Mix(目录号:4444557;Applied Biosystems)以特异性基因检测来进行。利用比较循环阈值(C<sub>t</sub>)法,通过利用1.5版CFX Manager软件将靶mRNA C<sub>t</sub>相对于对GAPDH的C<sub>t</sub>归一化来计算靶基因的归一化倍数表达,并利用Lin-Reg程序验证。

[0162] Western印迹和免疫荧光显微术.将雄性Alms1<sup>foz/foz</sup>和WT同窝仔畜麻醉。获取以下胰岛素敏感组织:肝脏、心脏、肌肉和脂肪组织,并直接放入补充了Complete mini蛋白酶抑制剂混合物和PhosSTOP磷酸酶抑制剂混合物(Roche,瑞士)的RIPA缓冲液(Tris 50mM,NaCl 150mM,0.1%SDS,1%Triton-X100)中。将样品进行超声处理并在4℃以17 000g离心30min。蛋白质浓度用BCA检测(Thermo Fisher Scientific,USA)进行检测。通过三氯乙酸沉淀从细胞获得细胞蛋白质,并利用30-50 $\mu$ g总蛋白进行免疫印迹分析。利用SuperSignal®West Femto最高灵敏度底物(目录号:Lf145954,Pierce)在BioRad Versadoc™成像系统或ImageQuant LAS4000成像仪(GE Healthcare,UK)上将特异性抗体结合可视化。用丽春红S染色的非特异性蛋白被用作加样对照,以将在利用Bio-Rad Quantity One程序特异性免疫检测目标蛋白质后获得的信号归一化。为了进行免疫荧光试验,将所述细胞接种在permanox 8-孔Lab-Tek II腔室载玻片(目录号:177445;NUNC)上。细胞按指示进行处理。然后将细胞和组织冷冻切片二者在甲醇固定和用0.1%Triton X-100透化后进行处理以供蛋白质检测。用Vectashield封固介质(目录号:H-1200;Vector Laboratories)安装所述显微镜载玻片以便检测。为了观察膜相关蛋白质,将细胞用福尔马林固定15min并直接封闭,接着免疫染色和利用直立式Zeiss AxioImager Z2显微镜显示。利用具有相应的3D和示踪Zeiss模块的Zeiss AxioVision程序或Zeiss Zen 2012成像平台进行图像分析、3D重建和时间流逝试验和内体示踪试验。

[0163] 荧光测量.将前脂肪细胞培养在96孔板中,并且12个孔感染ALMS1shRNA慢病毒粒子或CTRL shRNA慢病毒粒子并在次日分化成成熟脂肪细胞。3周以后,用AdipoRed染色遵照

制造商的程序对细胞内甘油三酯进行染色并在Tecan Infinite 200quad4单色仪(Tecan, 法国里昂)上以520nm的波长测量荧光。然后利用Tecan Magellan数据分析软件,像空白未染色脂肪细胞那样使用,分析生成的数据。

[0164] 共免疫沉淀试验.对于共免疫沉淀试验,我们使用Dynabeads®抗体偶联试剂盒(目录号:143.11D,Invitrogen)与Dynabeads®共免疫沉淀试剂盒(目录号:143.21D,Invitrogen)的组合。将HMSC培养至汇合并通过改变培养基触发成脂分化。通过改变培养基引发成脂分化后7天,将在裂解前24小时用或不用Ins培养的脂肪细胞在自然条件下裂解并按照所述试剂盒使用。在免疫沉淀和从珠子释放后,将样品加载在具有Hi Mark™预染色的HMW蛋白质标准品(目录号:LC5699,Invitrogen)的NuPage 3-8%TrisAcetate凝胶(目录号:EA0375BOX,Invitrogen)上。

[0165] 蛋白质制备和质谱鉴定.在凝胶消化中:凝胶消化程序如Rabilloud等(参考文献)所述进行。在胰蛋白酶消化之前制备凝胶块由液体处理机器人(liquid handler robot)(QuadZ215,Gilson International,法国)进行。简言之,将凝胶带用100μl的25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>、然后100μl的50%乙腈(ACN)交替洗涤(在振荡下洗涤3min,丢弃液体,然后添加下一溶剂)。将这种水化/脱水循环重复两次,将所述凝胶块干燥20min,然后还原(10mM DTT/25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>缓冲液在56°C 45min)和烷基化(25mM碘乙酰胺/25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>缓冲液45min,室温)。然后,将凝胶斑点交替用25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/ACN的3个循环再次洗涤。20min干燥步骤后,所述凝胶块被3体积的12.5ng/μl胰蛋白酶(Promega,V5111)/在25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>缓冲液中(新鲜稀释)再水化并在室温下温育过夜。通过在适宜体积的35%H<sub>2</sub>O/60%ACN/5%HCOOH中剧烈振荡30min和15min超声处理步骤,从凝胶提取胰蛋白酶肽。

[0166] MALDI-TOF(/TOF)质谱术和数据库检索.MALDI质量测量在以反射阳离子模式使用的Autoflex III Smartbeam(Bruker-Daltonik GmbH,Bremen,德国)基质辅助的激光解吸/电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF TOF)上进行。有HCCA基质的预先形成斑点的锚芯片靶(PAC系统,Bruker Daltonik,技术说明TN011)用于分析胰蛋白酶消化物。所产生的肽质量指纹谱数据(PMF)和肽片段指纹谱数据(PFF)由Biotools 3.2软件(Bruker Daltonik)合并并传送到检索引擎MASCOT的内联网版本(Matrix Science,英国伦敦)。将可变修饰(N-端蛋白质乙酰化,甲硫氨酸氧化和半胱氨酸脲甲基化)和一个胰蛋白酶遗漏的裂解纳入考虑并且将肽质量误差被限制在50ppm。蛋白质通过在NCBI非冗余蛋白质序列数据库中检索数据来鉴定,然后提交给人类限制性数据库。在全部结果中,概率得分大于被确定为具有p值0.05的显著性的分数。NanoLC-MSMS质谱术和数据库检索:对于nanoLC-MS/MS分析,肽在与LC自动进样器系统(nanoLC-U3000,Dionex,US)相容的玻璃插入物中运输。所述LC系统与ESI-Q-TOF质谱仪(MicroTOFQ-II,Bruker,德国)偶联。所述方法包括利用两种溶剂的梯度:A(99.9%水:0.1%甲酸)和B(99.92%乙腈:0.08%甲酸)以300nL/min的流速运行60min。所述系统包括:用于肽预浓缩的300μm X 5mm PepMap C18和用于肽洗脱的75μm X 150mm C18柱。每天对所述TOF分析仪进行校准:利用Hystar2.8和DataAnalysis 2.6软件自动获取和处理数据。利用Mascot2.2(MatrixScience,英国)和Proteinscape 2.0(Bruker,德国)的当地版本,首先在NCBI数据库中和然后在人类子数据库中对每个样品进行连续检索。利用反诱饵数据库评估蛋白质鉴定的假阳性率(FPR):利用FPR低于1%进行蛋白质确认。此外,只通过1个肽鉴定的蛋白质由人工检查;MS/MS谱根据常规片段化法则检查。

[0167] 原位邻位连接检测 (PLA) . 具有抗小鼠 PLUS 探针和抗兔 MINUS 探针 (目录号: 90701 和 90602; OLINK Bioscience) 的 Duolink 原位 PLA 试剂盒根据制造商的程序与适当的第一抗体相结合使用。将人类原代前脂肪细胞和成熟脂肪细胞在 8-孔 Lab-Tek II 腔室载玻片 (Nunc) 上培养, 并且在第一抗体温育步骤之前像用于免疫荧光显微术那样进行处理。洗涤后, 将细胞用 PLA PLUS 和 MINUS 探针 (1:20 稀释) 在 37°C 处理 2hr。探针的杂交和连接、扩增、和最后的 SSC 洗涤根据制造商的程序进行。基于蛋白质-蛋白质相互作用的荧光转移利用 Duolink 检测试剂盒 613 (OLINK Bioscience) 来可视化, 并获取图像。

[0168] 统计. 统计分析利用 GraphPad Prism 5 软件 (GraphPad Software, Inc., 美国) 进行。结果显示为平均值 ± 标准差。结果的显著性通过配对 t 检验确定或使用非参数 Mann-Whitney U 检验进行 BMI 和 AUC 数据的统计比较。P < 0.05 的值被认为表示统计学显著性并用星号标记。

[0169] 利用原代人类前脂肪细胞作为体外模型, 本发明人将 ALMS1 主要定位在胞浆池而不是以前报道的中心体池中。ALMS1 在脂肪生成期间沉默, 虽然观察到抗成脂因子 Pref-1 显著减少, 但在促成脂转录因子例如 cEBP 和 PPAR  $\gamma$  的表达水平上没有能检测出重大差异。

[0170] 在 2-周龄成熟脂肪细胞中 ALMS1 沉默之后, 利用标记的葡萄糖类似物 (2-NBDG) 评价葡萄糖吸收能力。在不存在胰岛素刺激下, 在 ALMS1-沉默的和对照的成熟脂肪细胞中未能检测出 2-NBDG 摄取 (图 2A)。另一方面, 胰岛素刺激导致在对照人类成熟脂肪细胞 (图 2B, 上图) 而不是 ALMS1-沉默细胞 (图 2B, 下图) 中 2-NBDG 摄取增加。在 ALMS1-沉默脂肪细胞中葡萄糖吸收降低之外, 本发明人还观察到一周以后在这些细胞中细胞内甘油三酯 (TG) 降低 (图 2C-D)。要注意, 在 ALMS1-缺乏的脂肪细胞中这种葡萄糖吸收降低与胰岛素的下游信号转导靶——AKT 的磷酸化减少不相关, 因为与胰岛素一起温育 30 分钟后, pS473-AKT 水平在对照和 ALMS1-沉默人类脂肪细胞二者中是相似的 (图 2E-F), 与以前在 *Alms1<sup>foz/foz</sup>* 鼠类脂肪细胞中观察到的 AKT 磷酸化水平在正常至增加的范围内相符 (图 1G)。

[0171] 本发明人接下来研究在 ALMS1 不存在下, 人类脂肪细胞中 GLUT4 的动力学。在 ALMS1 沉默之后, 胰岛素受体 (IR) 在质膜上的细胞定位没有受损, 在不存在胰岛素时在质膜 (PM) 附近检测到 (图 2G, 上图)。相反, 在不存在胰岛素时, 在 ALMS1-缺乏的脂肪细胞中 GLUT4 失去了它的核周定位并且在整个细胞质中分散地检测到, 而不是采取它通常的核周定位 (图 2G, 中图和下图和 2H)。在胰岛素刺激后, 观察到在对照和 ALMS1-沉默的脂肪细胞二者中, GLUT4 都移到肌动蛋白网内的 PM (图 2I)。在胰岛素不存在的情况下, 胰岛素刺激后两小时, 仍然在 ALMS1-沉默脂肪细胞的整个细胞质中分散检测到 GLUT4, 然而对照脂肪细胞使它们的 GLUT4 适当地再定位到核周区域 (图 2J)。因为在往返于 PM 的 GLUT4 囊泡的胞吐和胞吞之间存在平衡, 本发明人进行检查以排除在 *Alms1*-沉默脂肪细胞中挑选的受损 GLUT4 不是由于有缺陷的 GLUT4 胞吞所致。检查胞吞中的关键分子——动力素, 证明在脂肪细胞中 ALMS1 沉默之后蛋白质水平或细胞定位都没有差异。此外, 在 ALMS1-沉默的和对照的脂肪细胞之间, 标记的内体的平均速度相似, 这反对了胞吞中的缺陷是响应胰岛素信号转导在 PM 中存在 GLUT4 降低的原因。

[0172] 实施例 3

[0173] ALMS1 是 TBC1D4 响应胰岛素信号转导而靶向到 PM 上所需要的

[0174] 为了了解 ALMS1 失活对 GLUT4 定位的影响所潜在的分子机制, 本发明人鉴定了人类

脂肪细胞中ALMS1的相互作用配偶体。利用ALMS1作为诱饵的免疫沉淀(IP)利用年轻的成熟人类脂肪细胞(分化触发后4天)进行,接着通过质谱术鉴定ALMS1相互作用配偶体。在与ALMS1一起免疫沉淀的蛋白质之中,TBC1D4是已知的AKT底物GTP酶,它是GLUT4适当停留在GLUT4分选囊泡(GSV)中和GLUT4易位到细胞膜上进行细胞内葡萄糖摄取所需要的。

[0175] 实施例4

[0176] 开发ALMS1、TBC1D4和PKC的结构同源性模型。

[0177] 因为Alms1的晶体结构还没有解决,利用计算机模拟的结构同源性建模来预测Alms1的3D结构并鉴定可以结合潜在的相互作用配体的结构基序(图3A-C)。

[0178] ALMS1的结构模型。利用片段建模方法与同源性建模程序Modeller,构建ALMS1的模型。将ALMS1的每个外显子的氨基酸序列提交给在PISRED服务器上可用的基于概况(profile-based)的线程算法并鉴定合适的模板。然后将那些鉴定到的模板蛋白质与相应的外显子序列对齐,并且每个外显子单独利用Modeller来建模。基于离散的优化蛋白质能量分数进行模型的能量优化和选择。最后,组装模型以构建全长ALMS1的结构,并且利用分子动力学模拟程序NAMD进行所述全长蛋白质的松弛和最小化。

[0179] TBC1D4的PTP结合结构域的结构模型。TBC1D4的PTP结合结构域位于前160个残基内。没有鉴定到可靠的同源结构来对在PTP结合结构域和Rab结合结构域之间的结构建模。在Swiss模型上通过基于HMM的模板检索鉴定到的鼠类Disabled-1(Dab-1)的PTP结构域的晶体结构,1NU2(E-值=5.2e-17),被用作构建TBC1D4的PTP结合结构域的模板。

[0180] TBC1D4与ALMS-1相互作用的PTP结构域。利用ClusPro 2.0算法进行大分子对接。位于相互作用表面中有 $\geq 0.4$ 埃重叠的残基被认为是相互作用残基。Interproscan揭示ALMS-1在前3871个残基内包含WD40-样结构域。含WD40结构域的蛋白质是起到大分子相互作用的支架功能的蛋白质家族。

[0181] TBC1D4与ALMS-1相互作用的PTP结合结构域。起初,利用Cluspro 2服务器将TBC1D4的PTP结合结构域和RabGTP结合结构域与所述ALMS1模型对接以确定最可能的相互作用位点。然后,利用Autodock 4.2将这两个结构域与它们在ALMS1上各自的相互作用位点对接,并计算它们的结合亲和性。基于该亲和性,TBC1D4的PTP结合结构域以比RabGTP结合结构域高~100倍的亲和性结合ALMS1。因此,发明人预测所述PTP结合结构域与所述RabGTP结合结构域相比,可能具有更高的与ALMS1分子相互作用的概率。

[0182] TBC1D4的PTP结构域建模。在从Swiss模型模板鉴定算法鉴定到合适的模板后,对TBC1D4的磷酸酪氨酸结合结构域进行建模。

[0183] TBC1D4PTP结构域和RabGTP结合结构域与ALMS1对接。起初,利用Cluspro 2服务器将TBC1D4的PTP结合结构域和RabGTP结合结构域与所述ALMS1对接并鉴定相互作用位点。然后,利用Autodock 4.2将这两个结构域与它们各自的相互作用位点对接,并计算它们的结合亲和性。

[0184]	具有与另一个配体相互作用的可能性的预测的ALSM-1残基数量	65,66,69,72,73,74,75,76,77,78,80,87,2875,2876,2877,2878,2879,2880,2881,2882,2883,2884,2885,2887,2888,2889,2890,2892,2893,2894,2895,2897,2909,2910,2912,2929,2931,2932,2933,2934,2935,3557,3558,4131,144,145,146,147,148,149,150,151,193,194,195,198,199,200,201,205,208,211,214,226,227,229,233,234,235,236,239,242,243,246,248,249,250,251,252,314,319,321,986,1341,1344,2269,113,114,115,116,123,126,127,128,1340,1438,1439,1440,1441,1442,1443,1444,1446,1447,1448,1449,1450,1451,1452,1453,1454,1457,1458,1459,1478,1915,1918,1919,1920,1922,1923,1930,2041,2042,2043,2257,2267,2483,2484,3866,218,219,220,221,222,223,224,277,278,279,282,285,286,287,288,686,688,689,690,691,699,1856,1858,1859,1861,1862,1863,1864,1865,1866,1867,1868,1869,1870,1871,1872,1949,1968,1969,1971,1974,1979,1980,1981,1982,1983,1984,2104,2107,2111,2870,2872,2874,2915,3285,3286,3287,793,795,796,797,1285,1314,1408,1409,1422,1423,1425,1426,1427,1430,1431,1671,1672,1794,1797,2538,2539,2540,2555,2556,2557,2563,2564,2565,2567,2568,2588,2591,2599,2603,2699,2701,2702,3108
	介导与aPKC相互作用的预测的ALMS1残基	E17, D58, S59, G62, H65, L66, Q736, T737, E738, D828, S829, T1088, D1089, A1169, Q1170, F2882, L2883, E2884
	介导与ALMS1相互作用的预测的aPKC残基	F114, D116, C118, L121, N138, Q142, I145, P148, G433, E545, S562, S566, F597, D601, W602, K604, E606, G620, T631, V664, I667
	介导与ALMS1相互作用的预测的TBC1D4残基	G75, A76, P77, A78, R80, E81, V82, I83
	介导与TBC1D4相互作用的预测的ALMS1残基	H65, L66, S2879

[0185] 所述同源性模型揭示,Alms1采取苹果核型结构,潜在配体的大量结合位点集中在核周围。TBC1D4晶体结构同样没有解决,因此本发明人使用同源性建模方法来预测TBC1D4的PTP结合结构域的结构(图3C-D)。随后,进行计算机模拟对接研究,其预测通过TBC1D4残基G75、A76、P77、A78、R80、E81、V82、I83与Alms1上的相互作用残基H65、L66、S2879的氢键键合,TBC1D4与ALMS1以高亲和力结合(图4A)。然后通过免疫荧光研究证实了在人类脂肪细胞中ALMS1和TBC1D4的共定位(图4B)。接着在有或者没有胰岛素刺激下,在ALMS1-沉默脂肪细胞中测试GLUT4、TBC1D4和IRAP的表达水平,但没有发现显著差异(图4C)。在通过激活的AKT磷酸化后,脂肪细胞中的磷酸化TBC1D4(p-TBC1D4)靶向RAB蛋白质例如RAB14和RAB10,然后GSV被靶向到PM。然而,在胰岛素刺激Alms1-沉默的脂肪细胞后,在TBC1D4、p-TBC1D4、RAB14和RAB10的水平上未能检测出差异(图4D)。本发明人接下来致力于研究GLUT4细胞定位。在不存在胰岛素刺激下,TBC1D4沉默再现了在成熟脂肪细胞中看到的ALMS1沉默效应,即GLUT4在整个细胞质中错误定位(图4E)。对胰岛素刺激作出响应,GLUT4在对照脂肪细胞中从核周区域释放,分散在整个脂肪细胞细胞质中(图4F),从而再现了在胰岛素不存在(图4E)和存在(图4F)时在ALMS1和TBC1D4-沉默脂肪细胞中看到的GLUT4分布模式。本发明人随后研究了ALMS1沉默对TBC1D4响应胰岛素的细胞动力学的效应。在胰岛素不存在时,在对照和ALMS1-沉默的脂肪细胞两者中,TBC1D4定位到核周区域(图4G),但值得注意的是,对胰岛素作出响应,TBC1D4只在对照脂肪细胞中而不在ALMS1-沉默脂肪细胞中转运到PM(图4H)。

#### [0186] 实施例5

[0187] ALMS1形成在人类成熟脂肪细胞中胰岛素刺激的葡萄糖转运所需要的动态蛋白质复合体ALMSome

[0188] 虽然本发明人证明了ALMS1沉默阻止TBC1D4靶向到PM上,但这种损害本身是否能解释在ALMS1-缺乏的脂肪细胞中观察到的葡萄糖摄取严重降低,尚有待观察。本发明人因

此比较了在ALMS1或TBC1D4-沉默的或对照的脂肪细胞中在胰岛素刺激后2-NBDG的细胞摄取,发现与对照脂肪细胞相比,ALMS1-沉默脂肪细胞中几乎没有2-NBDG吸收(图5A-B),然而虽然与对照相比降低,但仍有可观量的2-NBDG被TBC1D4-沉默脂肪细胞所吸收(图5C)。随后对ALMS1或TBC1D4-沉默的或对照的脂肪细胞在30分钟胰岛素刺激之后进行GLUT4-抗体结合检测,显示在对照和TBC1D4-沉默脂肪细胞中而不是在ALMS1-沉默细胞中,GLUT4在PM中的比例高(图5D-F),表明在Alms1-沉默细胞中TBC1D4靶向到PM的次要缺陷本身不能解释在ALMS1-缺乏细胞中葡萄糖转运和GLUT4PM表达方面的非常严重的缺陷。Alms1IP数据的进一步检查揭示了V型ATP酶质子(H<sup>+</sup>)泵的几个亚基(A,B,D1和G2),本发明人然后证明它们在成熟脂肪细胞中与 $\alpha$ PKC一起表达(图5G), $\alpha$ PKC是所述H<sup>+</sup>泵在胰岛素控制下的激活激酶。通过原位PLA Duolink方法靶向ALMS1和质子泵亚基A1和D1(图5H)并且还通过共免疫染色ALMS1、VATP酶A1和D1、和 $\alpha$ PKC(图5H,I)这两种方法,本发明人证实,在胰岛素存在下,ALMS1在成熟脂肪细胞中紧邻V-ATP酶H<sup>+</sup>泵。ALMS1与整合在GSV膜中的质子泵亚基V0D1共定位(图5I),表明ALMS1与定位在GSV内的质子泵一起在所述脂肪细胞中转运。利用它们基于计算机模拟的ALMS1相互作用配偶体的结构模型,本发明人鉴定了PKC在Alms1上的结合基序。TBC1D4和 $\alpha$ PKC在Alms1上的结合位点如此紧密相邻,所以所述模型显示由于空间位阻,这两种蛋白质与Alms1同时对接是不可能的(图5J)。发明人如此假设。为了检验他们的假设,即 $\alpha$ PKC或者TBC1D4的ALMS1结合是在脂肪细胞中胰岛素信号转导的相互控制下,本发明人再次利用ALMS1作为诱饵进一步进行IP,但这次使用在胰岛素存在或不存在下培养的人类成熟脂肪细胞,并且利用IP对 $\alpha$ PKC和TBC1D4二者进行免疫印迹。结果揭示, $\alpha$ PKC只能在胰岛素不存在下温育的脂肪细胞的提取物中被Alms1拉下并通过免疫印迹检测到(图5K),而TBC1D4只在胰岛素存在下温育的脂肪细胞的提取物中被ALMS1拉下并检测到,与本发明人的互惠的胰岛素调节的Alms1结合模型相符(图5L)。

#### [0189] 实施例6

[0190] ALMSome是在GLUT4输送到质膜之前GSV酸化所需要的

[0191] 虽然TBC1D4的AKT磷酸化已知在某些方式下引起GLUT4运输,最终的GSV-PM融合步骤是胰岛素调节的非AKT依赖性事件,其需要GSV在vATP酶H<sup>+</sup>泵作用下的渗透膨胀。然而,对激活所述H<sup>+</sup>泵的实际信号和机制的认识尚缺失。利用亲酸性染料吖啶橙(其在将吖啶橙质子化并整合的溶酶体中在低浓度下发绿色荧光和在高浓度下发橙红色荧光),本发明人测试了ALMS1失活是否能够阻止GSV酸化并因此阻止GLUT4化学渗透介导地释放到PM。在不存在胰岛素时,在所述脂肪细胞中检测不到橙红色荧光。相反,在对照人类成熟脂肪细胞(图6A)而不是在ALMS1-沉默脂肪细胞(图6B)中胰岛素诱导的迅速出现的红颜色表明在ALMS1-沉默脂肪细胞中失去了溶酶体的胰岛素介导的酸化。

[0192] 本发明人接下来测试利用尼日利亚菌素(NIG)——一种已知引起GSV渗透膨胀的电中性K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交换离子载体——酸化ALMS1-沉默脂肪细胞,是否能规避在GLUT4融合和葡萄糖吸收中Alms1-相关的缺陷。NIG处理导致对照和ALMS1-沉默脂肪细胞二者迅速酸化(图6C-D),从而激活所述细胞内囊泡的膨胀和融合。平行的电子显微镜分析显示,位于挨着PM的囊泡在胰岛素不存在时在对照和ALMS1-沉默脂肪细胞二者中都没有融合(图6E-F,上图)。胰岛素处理只在对照脂肪细胞(图6E,中图)而不是在ALMS1-沉默脂肪细胞(图6F,中图)中引起囊泡的膨胀(图6E,中图),囊泡的膨胀是与囊泡同PM融合以供葡萄糖吸收相关

的。然而,在对照和ALMS1-沉默脂肪细胞二者中,NIG均诱导囊泡膨胀并与PM融合(图6E-F, 下图)。NIG处理在ALMS1-沉默脂肪细胞中恢复了葡萄糖吸收。虽然胰岛素在ALMS1-沉默脂肪细胞中诱导2-NBDG吸收的效应甚微(图6G-H, 上和中图),但NIG不仅恢复囊泡融合而且还可以显示出在ALMS1-沉默脂肪细胞中将2-NBDG吸收恢复到在对照细胞中看到的水平(图6G-H, 下图)。这在NIG-处理的ALMS1-沉默脂肪细胞中恢复了葡萄糖转运,这与恢复GLUT4与PM融合相关(图7A)而不是与TBC1D4靶向到PM上相关(图7B);并导致在NIG处理后24-小时ALMS1-沉默脂肪细胞的TG填充的恢复。

#### [0193] 实施例7

#### [0194] PKC与Alms1结合的肽抑制剂的鉴定

[0195] 一旦两种蛋白质之间结合相互作用的位点是已知的,则如本领域所知,有可能利用对参与介导所述相互作用的每种蛋白质的构象和氨基酸的认识,利用计算机模型来设计通过在所述相互作用位点区域中结合而能够在空间上或以其它方式阻碍所述结合相互作用的肽或小分子药。本发明人因此利用以前在实施例4中描述的ALMS1、TBC1D4和 $\alpha$ PKC结构模型,设法鉴定会抑制ALMS1与 $\alpha$ PKC或TBC1D4的相互作用的肽。利用这种方法预测的阻断 $\alpha$ PKC和ALMS1之间相互作用的肽包括序列LSDSHYGPQHLESIDD (SEQ ID No 5), DSHQTEETL (SEQ ID No 6), QQTLPESHLP (SEQ ID No 7), QALLDShLPE (SEQ ID No 8), PADQMTDTP (SEQ ID No 9), HIPEEAQKVS AV (SEQ ID No 10) 或 SCIFLEQ (SEQ ID No 11)。利用这种方法鉴定的阻断TBC1D4和ALMS1之间相互作用的肽是序列GCGAPAAREVILVL (SEQ ID No 12)。

#### [0196] 实施例8

[0197] 所述特异性ALMS1-相互作用型 $\alpha$ PKC相互作用结构域在成熟脂肪细胞中的表达在胰岛素不存在时触发葡萄糖吸收

[0198] 接下来,本发明人验证了胰岛素介导 $\alpha$ PKC从ALMSome复合体释放以诱导葡萄糖吸收的假设。为此,他们将 $\alpha$ PKC的相互作用结合域(SEQ ID No 14和15)与Flag-TAG一起克隆在慢病毒载体中。所选的序列是 $\alpha$ PKC的最小序列(min- $\alpha$ PKC-FLAG),以便防止与ALMS1上的TBC1D4相互作用位点的空间位阻。在脂肪细胞中表达的min- $\alpha$ PKC-FLAG与内源性 $\alpha$ PKC竞争,以防止它结合Almsome,并因此有利于胰岛素介导的TBC1D4与Almsome结合。然后用对照或min- $\alpha$ PKC慢病毒粒子感染成熟脂肪细胞以评价min- $\alpha$ PKC-FLAG对葡萄糖吸收的影响。感染后48小时,利用抗FLAG-Tag的抗体免疫检测min- $\alpha$ PKC-FLAG(图9)。为了所述概念的体外证明,我们按照描述处理成熟脂肪细胞(图9),然后与2-NBDG一起温育所述处理的成熟脂肪细胞以评价min- $\alpha$ PKC-FLAG对葡萄糖吸收的效应。有趣的是,2-NBDG在INS不存在时在min- $\alpha$ PKC-FLAG处理的脂肪细胞中被吸收(图8A,左列),其相当于与对照比较增加3.5倍(图8B)。另一方面,在INS存在下没有观察到显著差异(图8A右列和8B)。这些数据证明,靶向ALMS1和 $\alpha$ PKC的相互作用足以在所述脂肪细胞中触发葡萄糖吸收,不管INS存在与否。

#### [0199] 携带 $\alpha$ PKC结构域的慢病毒载体的制造

[0200] 从带有N-端FLAG标签的人类HEK293细胞cDNA,使用正向5'-gtacGAATTCGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGCTCACGGACTTCAATTTCTC-3' (SEQ ID No 16) 和反向5'-tagcGGATCCTCATACTGCACTCTGTAAGATGGG-3' (SEQ ID No 17) 引物扩增人类PKC $\alpha$ 的ALMS1-相互作用结构域,并将其克隆到慢病毒载体pCDH-EF1-MCS-IRES-puro (System Biosciences) 中。至于病毒制造,将PKC $\alpha$ 慢病毒载体与包装质粒pSPAX2和pMD2.G (Addgene) 一起分别以3:

2:1的重量比,利用Lipofectamine 2000 (Life Technologies) 转染到293TN细胞 (System Biosciences) 中。转染后四十八小时,通过以 $500 \times g$ 离心10min收获培养物上清液,接着通过带有PES膜的 $0.45 \mu m$ 针筒式滤器 (Sartorius) 过滤。然后通过添加1/2体积的冷的溶解在0.5M NaCl中的30% (重量/体积) PEG6000浓缩该病毒溶液,并将其在 $4^{\circ}C$ 伴随着不时的混合来温育过夜。然后将混合物在 $4^{\circ}C$ 以 $3000 \times g$ 离心15min。然后将含有慢病毒粒子的沉淀物重悬浮在1mL DMEM培养基中并储存在 $-80^{\circ}C$ 下直至感染靶细胞。

## 序列表

<110> 斯特拉斯堡大学等  
 <120> 糖尿病治疗 and 预防的新靶标  
 <130> SCT163922-90  
 <160> 21  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 4169  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens  
 <400> 1

Met Glu Pro Glu Asp Leu Pro Trp Pro Gly Glu Leu Glu Glu Glu Glu  
 1                    5                    10                    15

[0001]

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ala  
                   20                    25                    30

Ala Ala Ala Ala Asn Val Asp Asp Val Val Val Val Glu Glu Val Glu  
                   35                    40                    45

Glu Glu Ala Gly Arg Glu Leu Asp Ser Asp Ser His Tyr Gly Pro Gln  
                   50                    55                    60

His Leu Glu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Asp Glu Glu Ala Lys Ala Trp  
 65                    70                    75                    80

Leu Gln Ala His Pro Gly Arg Ile Leu Pro Pro Leu Ser Pro Pro Gln  
                   85                    90                    95

His Arg Tyr Ser Glu Gly Glu Arg Thr Ser Leu Glu Lys Ile Val Pro

	100		105		110
Leu Thr Cys His Val Trp Gln Gln Ile Val Tyr Gln Gly Asn Ser Arg					
	115		120		125
Thr Gln Ile Ser Asp Thr Asn Val Val Cys Leu Glu Thr Thr Ala Gln					
	130		135		140
Arg Gly Ser Gly Asp Asp Gln Lys Thr Glu Ser Trp His Cys Leu Pro					
	145		150		155
					160
Gln Glu Met Asp Ser Ser Gln Thr Leu Asp Thr Ser Gln Thr Arg Phe					
			165		170
					175
Asn Val Arg Thr Glu Asp Thr Glu Val Thr Asp Phe Pro Ser Leu Glu					
	180		185		190
[0002]					
Glu Gly Ile Leu Thr Gln Ser Glu Asn Gln Val Lys Glu Pro Asn Arg					
	195		200		205
Asp Leu Phe Cys Ser Pro Leu Leu Val Ile Gln Asp Ser Phe Ala Ser					
	210		215		220
Pro Asp Leu Pro Leu Leu Thr Cys Leu Thr Gln Asp Gln Glu Phe Ala					
	225		230		235
					240
Pro Asp Ser Leu Phe His Gln Ser Glu Leu Ser Phe Ala Pro Leu Arg					
	245		250		255
Gly Ile Pro Asp Lys Ser Glu Asp Thr Glu Trp Ser Ser Arg Pro Ser					
	260		265		270
Glu Val Ser Glu Ala Leu Phe Gln Ala Thr Ala Glu Val Ala Ser Asp					





625	630	635	640
Asn Leu Thr Glu	Glu Pro Leu Glu Val	Ser Ala Ala Pro Gly	Pro Val
	645	650	655
Glu Gln Lys Thr Gly	Ile Pro Thr Val	Ser Ser Thr Ser	His Ser His
	660	665	670
Val Glu Asp Leu Leu Phe Phe	Tyr Arg Gln Thr Leu Pro Asp Gly	His	
	675	680	685
Leu Thr Asp Gln Ala Leu Lys Val Ser Ala Val Ser Gly Pro Ala Asp			
690	695	700	
Gln Lys Thr Gly Thr Ala Thr Val Leu Ser Thr Pro His Ser His Arg			
705	710	715	720
[0005]			
Glu Lys Pro Gly Ile Phe Tyr Gln Gln Glu Phe Ala Asp Ser His Gln			
	725	730	735
Thr Glu Glu Thr Leu Thr Lys Val Ser Ala Thr Pro Gly Pro Ala Asp			
	740	745	750
Gln Lys Thr Glu Ile Pro Ala Val Gln Ser Ser Ser Tyr Ser Gln Arg			
	755	760	765
Glu Lys Pro Ser Ile Leu Tyr Pro Gln Asp Leu Ala Asp Ser His Leu			
	770	775	780
Pro Glu Glu Gly Leu Lys Val Ser Ala Val Ala Gly Pro Ala Asp Gln			
785	790	795	800
Lys Thr Gly Leu Pro Thr Val Pro Ser Ser Ala Tyr Ser His Arg Glu			

805

810

815

Lys Leu Leu Val Phe Tyr Gln Gln Ala Leu Leu Asp Ser His Leu Pro  
 820 825 830

Glu Glu Ala Leu Lys Val Ser Ala Val Ser Gly Pro Ala Asp Gly Lys  
 835 840 845

Thr Gly Thr Pro Ala Val Thr Ser Thr Ser Ser Ala Ser Ser Ser Leu  
 850 855 860

Gly Glu Lys Pro Ser Ala Phe Tyr Gln Gln Thr Leu Pro Asn Ser His  
 865 870 875 880

Leu Thr Glu Glu Ala Leu Lys Val Ser Ile Val Pro Gly Pro Gly Asp  
 885 890 895

[0006]

Gln Lys Thr Gly Ile Pro Ser Ala Pro Ser Ser Phe Tyr Ser His Arg  
 900 905 910

Glu Lys Pro Ile Ile Phe Ser Gln Gln Thr Leu Pro Asp Phe Leu Phe  
 915 920 925

Pro Glu Glu Ala Leu Lys Val Ser Ala Val Ser Val Leu Ala Ala Gln  
 930 935 940

Lys Thr Gly Thr Pro Thr Val Ser Ser Asn Ser His Ser His Ser Glu  
 945 950 955 960

Lys Ser Ser Val Phe Tyr Gln Gln Glu Leu Pro Asp Ser Asp Leu Pro  
 965 970 975

Arg Glu Ser Leu Lys Met Ser Ala Ile Pro Gly Leu Thr Asp Gln Lys

980					985					990					
Thr	Val	Pro	Thr	Pro	Thr	Val	Pro	Ser	Gly	Ser	Phe	Ser	His	Arg	Glu
		995					1000					1005			
Lys	Pro	Ser	Ile	Phe	Tyr	Gln	Gln	Glu	Trp	Pro	Asp	Ser	Tyr	Ala	
	1010					1015						1020			
Thr	Glu	Lys	Ala	Leu	Lys	Val	Ser	Thr	Gly	Pro	Gly	Pro	Ala	Asp	
	1025					1030						1035			
Gln	Lys	Thr	Glu	Ile	Pro	Ala	Val	Gln	Ser	Ser	Ser	Tyr	Pro	Gln	
	1040					1045						1050			
Arg	Glu	Lys	Pro	Ser	Val	Leu	Tyr	Pro	Gln	Val	Leu	Ser	Asp	Ser	
	1055					1060						1065			
[0007]															
His	Leu	Pro	Glu	Glu	Ser	Leu	Lys	Val	Ser	Ala	Phe	Pro	Gly	Pro	
	1070					1075						1080			
Ala	Asp	Gln	Met	Thr	Asp	Thr	Pro	Ala	Val	Pro	Ser	Thr	Phe	Tyr	
	1085					1090						1095			
Ser	Gln	Arg	Glu	Lys	Pro	Gly	Ile	Phe	Tyr	Gln	Gln	Thr	Leu	Pro	
	1100					1105						1110			
Glu	Ser	His	Leu	Pro	Lys	Glu	Ala	Leu	Lys	Ile	Ser	Val	Ala	Pro	
	1115					1120						1125			
Gly	Leu	Ala	Asp	Gln	Lys	Thr	Gly	Thr	Pro	Thr	Val	Thr	Ser	Thr	
	1130					1135						1140			
Ser	Tyr	Ser	Gln	His	Arg	Glu	Lys	Pro	Ser	Ile	Phe	His	Gln	Gln	

1145		1150		1155
Ala Leu Pro Gly Thr His Ile	Pro Glu Glu Ala Gln	Lys Val Ser		
1160		1165		1170
Ala Val Thr Gly Pro Gly Asn	Gln Lys Thr Trp Ile	Pro Arg Val		
1175		1180		1185
Leu Ser Thr Phe Tyr Ser Gln	Arg Glu Lys Pro Gly	Ile Phe Tyr		
1190		1195		1200
Gln Gln Thr Leu Pro Gly Ser	His Ile Pro Glu Glu	Ala Gln Lys		
1205		1210		1215
Val Ser Pro Val Leu Gly Pro	Ala Asp Gln Lys Thr	Gly Thr Pro		
1220		1225		1230
[0008]				
Thr Pro Thr Ser Ala Ser Tyr	Ser His Thr Glu Lys	Pro Gly Ile		
1235		1240		1245
Phe Tyr Gln Gln Val Leu Pro	Asp Asn His Pro Thr	Glu Glu Ala		
1250		1255		1260
Leu Lys Ile Ser Val Ala Ser	Glu Pro Val Asp Gln	Thr Thr Gly		
1265		1270		1275
Thr Pro Ala Val Thr Ser Thr	Ser Tyr Ser Gln Tyr	Arg Glu Lys		
1280		1285		1290
Pro Ser Ile Phe Tyr Gln Gln	Ser Leu Pro Ser Ser	His Leu Thr		
1295		1300		1305
Glu Glu Ala Lys Asn Val Ser	Ala Val Pro Gly Pro	Ala Asp Gln		

1310	1315	1320
Lys Thr Val Ile Pro Ile Leu	Pro Ser Thr Phe Tyr	Ser His Thr
1325	1330	1335
Glu Lys Pro Gly Val Phe Tyr	Gln Gln Val Leu Pro	His Ser His
1340	1345	1350
Pro Thr Glu Glu Ala Leu Lys	Ile Ser Val Ala Ser	Glu Pro Val
1355	1360	1365
Asp Gln Thr Thr Gly Thr Pro	Thr Val Thr Ser Thr	Ser Tyr Ser
1370	1375	1380
Gln His Thr Glu Lys Pro Ser	Ile Phe Tyr Gln Gln	Ser Leu Pro
1385	1390	1395
[0009]		
Gly Ser His Leu Thr Glu Glu	Ala Lys Asn Val Ser	Ala Val Pro
1400	1405	1410
Gly Pro Gly Asp Arg Lys Thr	Gly Ile Pro Thr Leu	Pro Ser Thr
1415	1420	1425
Phe Tyr Ser His Thr Glu Lys	Pro Gly Ser Phe Tyr	Gln Gln Val
1430	1435	1440
Leu Pro His Ser His Leu Pro	Glu Glu Ala Leu Glu	Val Ser Val
1445	1450	1455
Ala Pro Gly Pro Val Asp Gln	Thr Ile Gly Thr Pro	Thr Val Thr
1460	1465	1470
Ser Pro Ser Ser Ser Phe Gly	Glu Lys Pro Ile Val	Ile Tyr Lys

1475	1480	1485
Gln Ala Phe Pro Glu Gly His	Leu Pro Glu Glu Ser	Leu Lys Val
1490	1495	1500
Ser Val Ala Pro Gly Pro Val	Gly Gln Thr Thr Gly	Ala Pro Thr
1505	1510	1515
Ile Thr Ser Pro Ser Tyr Ser	Gln His Arg Ala Lys	Ser Gly Ser
1520	1525	1530
Phe Tyr Gln Leu Ala Leu Leu	Gly Ser Gln Ile Pro	Glu Glu Ala
1535	1540	1545
Leu Arg Val Ser Ser Ala Pro	Gly Pro Ala Asp Gln	Thr Thr Gly
1550	1555	1560
[0010]		
Ile Pro Thr Ile Thr Ser Thr	Ser Tyr Ser Phe Gly	Glu Lys Pro
1565	1570	1575
Ile Val Asn Tyr Lys Gln Ala	Phe Pro Asp Gly His	Leu Pro Glu
1580	1585	1590
Glu Ala Leu Lys Val Ser Ile	Val Ser Gly Pro Thr	Glu Lys Lys
1595	1600	1605
Thr Asp Ile Pro Ala Gly Pro	Leu Gly Ser Ser Ala	Leu Gly Glu
1610	1615	1620
Lys Pro Ile Thr Phe Tyr Arg	Gln Ala Leu Leu Asp	Ser Pro Leu
1625	1630	1635
Asn Lys Glu Val Val Lys Val	Ser Ala Ala Pro Gly	Pro Ala Asp



1805		1810		1815
Arg Glu	Leu Pro His Phe Thr	Glu Ala Gly Leu Lys	Ile Leu Arg	
1820		1825		1830
Val Pro	Gly Pro Ala Asp Gln	Lys Thr Gly Ile Asn	Ile Leu Pro	
1835		1840		1845
Ser Asn	Ser Tyr Pro Gln Arg	Glu His Ser Val Ile	Ser Tyr Glu	
1850		1855		1860
Gln Glu	Leu Pro Asp Leu Thr	Glu Val Thr Leu Lys	Ala Ile Gly	
1865		1870		1875
Val Pro	Gly Pro Ala Asp Gln	Lys Thr Gly Ile Gln	Ile Ala Ser	
1880		1885		1890
[0012]				
Ser Ser	Ser Tyr Ser Asn Arg	Glu Lys Ala Ser Ile	Phe His Gln	
1895		1900		1905
Gln Glu	Leu Pro Asp Val Thr	Glu Glu Ala Leu Asn	Val Phe Val	
1910		1915		1920
Val Pro	Gly Gln Gly Asp Arg	Lys Thr Glu Ile Pro	Thr Val Pro	
1925		1930		1935
Leu Ser	Tyr Tyr Ser Arg Arg	Glu Lys Pro Ser Val	Ile Ser Gln	
1940		1945		1950
Gln Glu	Leu Pro Asp Ser His	Leu Thr Glu Glu Ala	Leu Lys Val	
1955		1960		1965
Ser Pro	Val Ser Ile Pro Ala	Glu Gln Lys Thr Gly	Ile Pro Ile	

1970	1975	1980
Gly Leu Ser Ser Ser Tyr Ser His Ser His Lys Glu Lys Leu Lys		
1985	1990	1995
Ile Ser Thr Val His Ile Pro Asp Asp Gln Lys Thr Glu Phe Pro		
2000	2005	2010
Ala Ala Thr Leu Ser Ser Tyr Ser Gln Ile Glu Lys Pro Lys Ile		
2015	2020	2025
Ser Thr Val Ile Gly Pro Asn Asp Gln Lys Thr Pro Ser Gln Thr		
2030	2035	2040
Ala Phe His Ser Ser Tyr Ser Gln Thr Val Lys Pro Asn Ile Leu		
2045	2050	2055
[0013]		
Phe Gln Gln Gln Leu Pro Asp Arg Asp Gln Ser Lys Gly Ile Leu		
2060	2065	2070
Lys Ile Ser Ala Val Pro Glu Leu Thr Asp Val Asn Thr Gly Lys		
2075	2080	2085
Pro Val Ser Leu Ser Ser Ser Tyr Phe His Arg Glu Lys Ser Asn		
2090	2095	2100
Ile Phe Ser Pro Gln Glu Leu Pro Gly Ser His Val Thr Glu Asp		
2105	2110	2115
Val Leu Lys Val Ser Thr Ile Pro Gly Pro Ala Gly Gln Lys Thr		
2120	2125	2130
Val Leu Pro Thr Ala Leu Pro Ser Ser Phe Ser His Arg Glu Lys		

2135	2140	2145
Pro Asp Ile Phe Tyr Gln Lys Asp Leu Pro Asp Arg His Leu Thr		
2150	2155	2160
Glu Asp Ala Leu Lys Ile Ser Ser Ala Leu Gly Gln Ala Asp Gln		
2165	2170	2175
Ile Thr Gly Leu Gln Thr Val Pro Ser Gly Thr Tyr Ser His Gly		
2180	2185	2190
Glu Asn His Lys Leu Val Ser Glu His Val Gln Arg Leu Ile Asp		
2195	2200	2205
Asn Leu Asn Ser Ser Asp Ser Ser Val Ser Ser Asn Asn Val Leu		
2210	2215	2220
[0014]		
Leu Asn Ser Gln Ala Asp Asp Arg Val Val Ile Asn Lys Pro Glu		
2225	2230	2235
Ser Ala Gly Phe Arg Asp Val Gly Ser Glu Glu Ile Gln Asp Ala		
2240	2245	2250
Glu Asn Ser Ala Lys Thr Leu Lys Glu Ile Arg Thr Leu Leu Met		
2255	2260	2265
Glu Ala Glu Asn Met Ala Leu Lys Arg Cys Asn Phe Pro Ala Pro		
2270	2275	2280
Leu Ala Arg Phe Arg Asp Ile Ser Asp Ile Ser Phe Ile Gln Ser		
2285	2290	2295
Lys Lys Val Val Cys Phe Lys Glu Pro Ser Ser Thr Gly Val Ser		

2300	2305	2310
Asn Gly Asp Leu Leu His Arg Gln Pro Phe Thr Glu Glu Ser Pro		
2315	2320	2325
Ser Ser Arg Cys Ile Gln Lys Asp Ile Gly Thr Gln Thr Asn Leu		
2330	2335	2340
Lys Cys Arg Arg Gly Ile Glu Asn Trp Glu Phe Ile Ser Ser Thr		
2345	2350	2355
Thr Val Arg Ser Pro Leu Gln Glu Ala Glu Ser Lys Val Ser Met		
2360	2365	2370
Ala Leu Glu Glu Thr Leu Arg Gln Tyr Gln Ala Ala Lys Ser Val		
2375	2380	2385
[0015]		
Met Arg Ser Glu Pro Glu Gly Cys Ser Gly Thr Ile Gly Asn Lys		
2390	2395	2400
Ile Ile Ile Pro Met Met Thr Val Ile Lys Ser Asp Ser Ser Ser		
2405	2410	2415
Asp Ala Ser Asp Gly Asn Gly Ser Cys Ser Trp Asp Ser Asn Leu		
2420	2425	2430
Pro Glu Ser Leu Glu Ser Val Ser Asp Val Leu Leu Asn Phe Phe		
2435	2440	2445
Pro Tyr Val Ser Pro Lys Thr Ser Ile Thr Asp Ser Arg Glu Glu		
2450	2455	2460
Glu Gly Val Ser Glu Ser Glu Asp Gly Gly Gly Ser Ser Val Asp		

2465	2470	2475
Ser Leu Ala Ala His Val Lys Asn Leu Leu Gln Cys Glu Ser Ser		
2480	2485	2490
Leu Asn His Ala Lys Glu Ile Leu Arg Asn Ala Glu Glu Glu Glu		
2495	2500	2505
Ser Arg Val Arg Ala His Ala Trp Asn Met Lys Phe Asn Leu Ala		
2510	2515	2520
His Asp Cys Gly Tyr Ser Ile Ser Glu Leu Asn Glu Asp Asp Arg		
2525	2530	2535
Arg Lys Val Glu Glu Ile Lys Ala Glu Leu Phe Gly His Gly Arg		
2540	2545	2550
[0016]		
Thr Thr Asp Leu Ser Lys Gly Leu Gln Ser Pro Arg Gly Met Gly		
2555	2560	2565
Cys Lys Pro Glu Ala Val Cys Ser His Ile Ile Ile Glu Ser His		
2570	2575	2580
Glu Lys Gly Cys Phe Arg Thr Leu Thr Ser Glu His Pro Gln Leu		
2585	2590	2595
Asp Arg His Pro Cys Ala Phe Arg Ser Ala Gly Pro Ser Glu Met		
2600	2605	2610
Thr Arg Gly Arg Gln Asn Pro Ser Ser Cys Arg Ala Lys His Val		
2615	2620	2625
Asn Leu Ser Ala Ser Leu Asp Gln Asn Asn Ser His Phe Lys Val		

2630		2635		2640
Trp Asn Ser Leu Gln Leu Lys Ser His Ser Pro Phe Gln Asn Phe				
2645		2650		2655
Ile Pro Asp Glu Phe Lys Ile Ser Lys Gly Leu Arg Met Pro Phe				
2660		2665		2670
Asp Glu Lys Met Asp Pro Trp Leu Ser Glu Leu Val Glu Pro Ala				
2675		2680		2685
Phe Val Pro Pro Lys Glu Val Asp Phe His Ser Ser Ser Gln Met				
2690		2695		2700
Pro Ser Pro Glu Pro Met Lys Lys Phe Thr Thr Ser Ile Thr Phe				
2705		2710		2715
[0017]				
Ser Ser His Arg His Ser Lys Cys Ile Ser Asn Ser Ser Val Val				
2720		2725		2730
Lys Val Gly Val Thr Glu Gly Ser Gln Cys Thr Gly Ala Ser Val				
2735		2740		2745
Gly Val Phe Asn Ser His Phe Thr Glu Glu Gln Asn Pro Pro Arg				
2750		2755		2760
Asp Leu Lys Gln Lys Thr Ser Ser Pro Ser Ser Phe Lys Met His				
2765		2770		2775
Ser Asn Ser Gln Asp Lys Glu Val Thr Ile Leu Ala Glu Gly Arg				
2780		2785		2790
Arg Gln Ser Gln Lys Leu Pro Val Asp Phe Glu Arg Ser Phe Gln				

2795		2800		2805
Glu Glu Lys Pro Leu Glu Arg Ser Asp Phe Thr Gly Ser His Ser				
2810		2815		2820
Glu Pro Ser Thr Arg Ala Asn Cys Ser Asn Phe Lys Glu Ile Gln				
2825		2830		2835
Ile Ser Asp Asn His Thr Leu Ile Ser Met Gly Arg Pro Ser Ser				
2840		2845		2850
Thr Leu Gly Val Asn Arg Ser Ser Ser Arg Leu Gly Val Lys Glu				
2855		2860		2865
Lys Asn Val Thr Ile Thr Pro Asp Leu Pro Ser Cys Ile Phe Leu				
2870		2875		2880
[0018]				
Glu Gln Arg Glu Leu Phe Glu Gln Ser Lys Ala Pro Arg Ala Asp				
2885		2890		2895
Asp His Val Arg Lys His His Ser Pro Ser Pro Gln His Gln Asp				
2900		2905		2910
Tyr Val Ala Pro Asp Leu Pro Ser Cys Ile Phe Leu Glu Gln Arg				
2915		2920		2925
Glu Leu Phe Glu Gln Cys Lys Ala Pro Tyr Val Asp His Gln Met				
2930		2935		2940
Arg Glu Asn His Ser Pro Leu Pro Gln Gly Gln Asp Ser Ile Ala				
2945		2950		2955
Ser Asp Leu Pro Ser Pro Ile Ser Leu Glu Gln Cys Gln Ser Lys				

2960	2965	2970
Ala Pro Gly Val Asp Asp Gln Met Asn Lys His His Phe Pro Leu		
2975	2980	2985
Pro Gln Gly Gln Asp Cys Val Val Glu Lys Asn Asn Gln His Lys		
2990	2995	3000
Pro Lys Ser His Ile Ser Asn Ile Asn Val Glu Ala Lys Phe Asn		
3005	3010	3015
Thr Val Val Ser Gln Ser Ala Pro Asn His Cys Thr Leu Ala Ala		
3020	3025	3030
Ser Ala Ser Thr Pro Pro Ser Asn Arg Lys Ala Leu Ser Cys Val		
3035	3040	3045
[0019]		
His Ile Thr Leu Cys Pro Lys Thr Ser Ser Lys Leu Asp Ser Gly		
3050	3055	3060
Thr Leu Asp Glu Arg Phe His Ser Leu Asp Ala Ala Ser Lys Ala		
3065	3070	3075
Arg Met Asn Ser Glu Phe Asn Phe Asp Leu His Thr Val Ser Ser		
3080	3085	3090
Arg Ser Leu Glu Pro Thr Ser Lys Leu Leu Thr Ser Lys Pro Val		
3095	3100	3105
Ala Gln Asp Gln Glu Ser Leu Gly Phe Leu Gly Pro Lys Ser Ser		
3110	3115	3120
Leu Asp Phe Gln Val Val Gln Pro Ser Leu Pro Asp Ser Asn Thr		

3125		3130		3135
Ile Thr Gln Asp Leu Lys Thr	Ile Pro Ser Gln Asn Ser Gln Ile			
3140		3145		3150
Val Thr Ser Arg Gln Ile Gln	Val Asn Ile Ser Asp Phe Glu Gly			
3155		3160		3165
His Ser Asn Pro Glu Gly Thr	Pro Val Phe Ala Asp Arg Leu Pro			
3170		3175		3180
Glu Lys Met Lys Thr Pro Leu	Ser Ala Phe Ser Glu Lys Leu Ser			
3185		3190		3195
Ser Asp Ala Val Thr Gln Ile	Thr Thr Glu Ser Pro Glu Lys Thr			
3200		3205		3210
[0020]				
Leu Phe Ser Ser Glu Ile Phe	Ile Asn Ala Glu Asp Arg Gly His			
3215		3220		3225
Glu Ile Ile Glu Pro Gly Asn	Gln Lys Leu Arg Lys Ala Pro Val			
3230		3235		3240
Lys Phe Ala Ser Ser Ser Ser	Val Gln Gln Val Thr Phe Ser Arg			
3245		3250		3255
Gly Thr Asp Gly Gln Pro Leu	Leu Leu Pro Tyr Lys Pro Ser Gly			
3260		3265		3270
Ser Thr Lys Met Tyr Tyr Val	Pro Gln Leu Arg Gln Ile Pro Pro			
3275		3280		3285
Ser Pro Asp Ser Lys Ser Asp	Thr Thr Val Glu Ser Ser His Ser			

3290	3295	3300
Gly Ser Asn Asp Ala Ile Ala Pro Asp Phe Pro Ala Gln Val Leu		
3305	3310	3315
Gly Thr Arg Asp Asp Asp Leu Ser Ala Thr Val Asn Ile Lys His		
3320	3325	3330
Lys Glu Gly Ile Tyr Ser Lys Arg Val Val Thr Lys Ala Ser Leu		
3335	3340	3345
Pro Val Gly Glu Lys Pro Leu Gln Asn Glu Asn Ala Asp Ala Ser		
3350	3355	3360
Val Gln Val Leu Ile Thr Gly Asp Glu Asn Leu Ser Asp Lys Lys		
3365	3370	3375
[0021]		
Gln Gln Glu Ile His Ser Thr Arg Ala Val Thr Glu Ala Ala Gln		
3380	3385	3390
Ala Lys Glu Lys Glu Ser Leu Gln Lys Asp Thr Ala Asp Ser Ser		
3395	3400	3405
Ala Ala Ala Ala Ala Glu His Ser Ala Gln Val Gly Asp Pro Glu		
3410	3415	3420
Met Lys Asn Leu Pro Asp Thr Lys Ala Ile Thr Gln Lys Glu Glu		
3425	3430	3435
Ile His Arg Lys Lys Thr Val Pro Glu Glu Ala Trp Pro Asn Asn		
3440	3445	3450
Lys Glu Ser Leu Gln Ile Asn Ile Glu Glu Ser Glu Cys His Ser		

3455		3460		3465
Glu Phe	Glu Asn Thr Thr	Arg Ser Val Phe Arg Ser	Ala Lys Phe	
3470		3475		3480
Tyr Ile	His His Pro Val His	Leu Pro Ser Asp Gln	Asp Ile Cys	
3485		3490		3495
His Glu	Ser Leu Gly Lys Ser	Val Phe Met Arg His	Ser Trp Lys	
3500		3505		3510
Asp Phe	Phe Gln His His Pro	Asp Lys His Arg Glu	His Met Cys	
3515		3520		3525
Leu Pro	Leu Pro Tyr Gln Asn	Met Asp Lys Thr Lys	Thr Asp Tyr	
3530		3535		3540
[0022]				
Thr Arg	Ile Lys Ser Leu Ser	Ile Asn Val Asn Leu	Gly Asn Lys	
3545		3550		3555
Glu Val	Met Asp Thr Thr Lys	Ser Gln Val Arg Asp	Tyr Pro Lys	
3560		3565		3570
His Asn	Gly Gln Ile Ser Asp	Pro Gln Arg Asp Gln	Lys Val Thr	
3575		3580		3585
Pro Glu	Gln Thr Thr Gln His	Thr Val Ser Leu Asn	Glu Leu Trp	
3590		3595		3600
Asn Lys	Tyr Arg Glu Arg Gln	Arg Gln Gln Arg Gln	Pro Glu Leu	
3605		3610		3615
Gly Asp	Arg Lys Glu Leu Ser	Leu Val Asp Arg Leu	Asp Arg Leu	

3620	3625	3630
Ala Lys Ile Leu Gln Asn Pro Ile Thr His Ser Leu Gln Val Ser		
3635	3640	3645
Glu Ser Thr His Asp Asp Ser Arg Gly Glu Arg Ser Val Lys Glu		
3650	3655	3660
Trp Ser Gly Arg Gln Gln Gln Arg Asn Lys Leu Gln Lys Lys Lys		
3665	3670	3675
Arg Phe Lys Ser Leu Glu Lys Ser His Lys Asn Thr Gly Glu Leu		
3680	3685	3690
Lys Lys Ser Lys Val Leu Ser His His Arg Ala Gly Arg Ser Asn		
3695	3700	3705
[0023]		
Gln Ile Lys Ile Glu Gln Ile Lys Phe Asp Lys Tyr Ile Leu Ser		
3710	3715	3720
Lys Gln Pro Gly Phe Asn Tyr Ile Ser Asn Thr Ser Ser Asp Cys		
3725	3730	3735
Arg Pro Ser Glu Glu Ser Glu Leu Leu Thr Asp Thr Thr Thr Asn		
3740	3745	3750
Ile Leu Ser Gly Thr Thr Ser Thr Val Glu Ser Asp Ile Leu Thr		
3755	3760	3765
Gln Thr Asp Arg Glu Val Ala Leu His Glu Arg Ser Ser Ser Val		
3770	3775	3780
Ser Thr Ile Asp Thr Ala Arg Leu Ile Gln Ala Phe Gly His Glu		

3785		3790		3795
Arg Val Cys Leu Ser Pro Arg Arg Ile Lys Leu Tyr Ser Ser Ile				
3800		3805		3810
Thr Asn Gln Gln Arg Arg Tyr Leu Glu Lys Arg Ser Lys His Ser				
3815		3820		3825
Lys Lys Val Leu Asn Thr Gly His Pro Leu Val Thr Ser Glu His				
3830		3835		3840
Thr Arg Arg Arg His Ile Gln Val Ala Asn His Val Ile Ser Ser				
3845		3850		3855
Asp Ser Ile Ser Ser Ser Ala Ser Ser Phe Leu Ser Ser Asn Ser				
3860		3865		3870
[0024]				
Thr Phe Cys Asn Lys Gln Asn Val His Met Leu Asn Lys Gly Ile				
3875		3880		3885
Gln Ala Gly Asn Leu Glu Ile Val Asn Gly Ala Lys Lys His Thr				
3890		3895		3900
Arg Asp Val Gly Ile Thr Phe Pro Thr Pro Ser Ser Ser Glu Ala				
3905		3910		3915
Lys Leu Glu Glu Asn Ser Asp Val Thr Ser Trp Ser Glu Glu Lys				
3920		3925		3930
Arg Glu Glu Lys Met Leu Phe Thr Gly Tyr Pro Glu Asp Arg Lys				
3935		3940		3945
Leu Lys Lys Asn Lys Lys Asn Ser His Glu Gly Val Ser Trp Phe				

3950		3955		3960
Val Pro	Val Glu Asn	Val Glu Ser Arg	Ser Lys Lys	Glu Asn Val
3965		3970		3975
Pro Asn	Thr Cys Gly	Pro Gly Ile Ser	Trp Phe Glu	Pro Ile Thr
3980		3985		3990
Lys Thr	Arg Pro Trp	Arg Glu Pro Leu	Arg Glu Gln	Asn Cys Gln
3995		4000		4005
Gly Gln	His Leu Asp	Gly Arg Gly Tyr	Leu Ala Gly	Pro Gly Arg
4010		4015		4020
Glu Ala	Gly Arg Asp	Leu Leu Arg Pro	Phe Val Arg	Ala Thr Leu
4025		4030		4035
[0025]				
Gln Glu	Ser Leu Gln	Phe His Arg Pro	Asp Phe Ile	Ser Arg Ser
4040		4045		4050
Gly Glu	Arg Ile Lys	Arg Leu Lys Leu	Ile Val Gln	Glu Arg Lys
4055		4060		4065
Leu Gln	Ser Met Leu	Gln Thr Glu Arg	Asp Ala Leu	Phe Asn Ile
4070		4075		4080
Asp Arg	Glu Arg Gln	Gly His Gln Asn	Arg Met Cys	Pro Leu Pro
4085		4090		4095
Lys Arg	Val Phe Leu	Ala Ile Gln Lys	Asn Lys Pro	Ile Ser Lys
4100		4105		4110
Lys Glu	Met Ile Gln	Arg Ser Lys Arg	Ile Tyr Glu	Gln Leu Pro



Pro Gly Ala Gly Ala Ser Gly Gly Thr Ser Pro Ser Ala Thr Gln Pro  
 100 105 110

Asn Pro Ala Val Phe Ile Phe Glu His Lys Ala Gln His Ile Ser Arg  
 115 120 125

Phe Ile His Asn Ser His Asp Leu Thr Tyr Phe Ala Tyr Leu Ile Lys  
 130 135 140

Ala Gln Pro Asp Asp Pro Glu Ser Gln Met Ala Cys His Val Phe Arg  
 145 150 155 160

Ala Thr Asp Pro Ser Gln Val Pro Asp Val Ile Ser Ser Ile Arg Gln  
 165 170 175

[0027] Leu Ser Lys Ala Ala Met Lys Glu Asp Ala Lys Pro Ser Lys Asp Asn  
 180 185 190

Glu Asp Ala Phe Tyr Asn Ser Gln Lys Phe Glu Val Leu Tyr Cys Gly  
 195 200 205

Lys Val Thr Val Thr His Lys Lys Ala Pro Ser Ser Leu Ile Asp Asp  
 210 215 220

Cys Met Glu Lys Phe Ser Leu His Glu Gln Gln Arg Leu Lys Ile Gln  
 225 230 235 240

Gly Glu Gln Arg Gly Pro Asp Pro Gly Glu Asp Leu Ala Asp Leu Glu  
 245 250 255

Val Val Val Pro Gly Ser Pro Gly Asp Cys Leu Pro Glu Glu Ala Asp  
 260 265 270

Gly Thr Asp Thr His Leu Gly Leu Pro Ala Gly Ala Ser Gln Pro Ala  
 275 280 285

Leu Thr Ser Ser Arg Val Cys Phe Pro Glu Arg Ile Leu Glu Asp Ser  
 290 295 300

Gly Phe Asp Glu Gln Gln Glu Phe Arg Ser Arg Cys Ser Ser Val Thr  
 305 310 315 320

Gly Val Gln Arg Arg Val His Glu Gly Ser Gln Lys Ser Gln Pro Arg  
 325 330 335

Arg Arg His Ala Ser Ala Pro Ser His Val Gln Pro Ser Asp Ser Glu  
 340 345 350

[0028] Lys Asn Arg Thr Met Leu Phe Gln Val Gly Arg Phe Glu Ile Asn Leu  
 355 360 365

Ile Ser Pro Asp Thr Lys Ser Val Val Leu Glu Lys Asn Phe Lys Asp  
 370 375 380

Ile Ser Ser Cys Ser Gln Gly Ile Lys His Val Asp His Phe Gly Phe  
 385 390 395 400

Ile Cys Arg Glu Ser Pro Glu Pro Gly Leu Ser Gln Tyr Ile Cys Tyr  
 405 410 415

Val Phe Gln Cys Ala Ser Glu Ser Leu Val Asp Glu Val Met Leu Thr  
 420 425 430

Leu Lys Gln Ala Phe Ser Thr Ala Ala Ala Leu Gln Ser Ala Lys Thr  
 435 440 445

Gln Ile Lys Leu Cys Glu Ala Cys Pro Met His Ser Leu His Lys Leu  
 450 455 460

Cys Glu Arg Ile Glu Gly Leu Tyr Pro Pro Arg Ala Lys Leu Val Ile  
 465 470 475 480

Gln Arg His Leu Ser Ser Leu Thr Asp Asn Glu Gln Ala Asp Ile Phe  
 485 490 495

Glu Arg Val Gln Lys Met Lys Pro Val Ser Asp Gln Glu Glu Asn Glu  
 500 505 510

Leu Val Ile Leu His Leu Arg Gln Leu Cys Glu Ala Lys Gln Lys Thr  
 515 520 525

[0029]

His Val His Ile Gly Glu Gly Pro Ser Thr Ile Ser Asn Ser Thr Ile  
 530 535 540

Pro Glu Asn Ala Thr Ser Ser Gly Arg Phe Lys Leu Asp Ile Leu Lys  
 545 550 555 560

Asn Lys Ala Lys Arg Ser Leu Thr Ser Ser Leu Glu Asn Ile Phe Ser  
 565 570 575

Arg Gly Ala Asn Arg Met Arg Gly Arg Leu Gly Ser Val Asp Ser Phe  
 580 585 590

Glu Arg Ser Asn Ser Leu Ala Ser Glu Lys Asp Tyr Ser Pro Gly Asp  
 595 600 605

Ser Pro Pro Gly Thr Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ser Ser Ala Trp Gln  
 610 615 620



Glu Leu Leu Pro Leu Ser Pro Leu Ser Pro Thr Met Glu Glu Glu Pro  
 805 810 815

Leu Val Val Phe Leu Ser Gly Glu Asp Asp Pro Glu Lys Ile Glu Glu  
 820 825 830

Arg Lys Lys Ser Lys Glu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Lys Ala Ile His  
 835 840 845

Gln Gln Ile Leu Leu Leu Arg Met Glu Lys Glu Asn Gln Lys Leu Glu  
 850 855 860

Ala Ser Arg Asp Glu Leu Gln Ser Arg Lys Val Lys Leu Asp Tyr Glu  
 865 870 875 880

[0031]

Glu Val Gly Ala Cys Gln Lys Glu Val Leu Ile Thr Trp Asp Lys Lys  
 885 890 895

Leu Leu Asn Cys Arg Ala Lys Ile Arg Cys Asp Met Glu Asp Ile His  
 900 905 910

Thr Leu Leu Lys Glu Gly Val Pro Lys Ser Arg Arg Gly Glu Ile Trp  
 915 920 925

Gln Phe Leu Ala Leu Gln Tyr Arg Leu Arg His Arg Leu Pro Asn Lys  
 930 935 940

Gln Gln Pro Pro Asp Ile Ser Tyr Lys Glu Leu Leu Lys Gln Leu Thr  
 945 950 955 960

Ala Gln Gln His Ala Ile Leu Val Asp Leu Gly Arg Thr Phe Pro Thr  
 965 970 975

His Pro Tyr Phe Ser Val Gln Leu Gly Pro Gly Gln Leu Ser Leu Phe  
 980 985 990

Asn Leu Leu Lys Ala Tyr Ser Leu Leu Asp Lys Glu Val Gly Tyr Cys  
 995 1000 1005

Gln Gly Ile Ser Phe Val Ala Gly Val Leu Leu Leu His Met Ser  
 1010 1015 1020

Glu Glu Gln Ala Phe Glu Met Leu Lys Phe Leu Met Tyr Asp Leu  
 1025 1030 1035

Gly Phe Arg Lys Gln Tyr Arg Pro Asp Met Met Ser Leu Gln Ile  
 1040 1045 1050

[0032] Gln Met Tyr Gln Leu Ser Arg Leu Leu His Asp Tyr His Arg Asp  
 1055 1060 1065

Leu Tyr Asn His Leu Glu Glu Asn Glu Ile Ser Pro Ser Leu Tyr  
 1070 1075 1080

Ala Ala Pro Trp Phe Leu Thr Leu Phe Ala Ser Gln Phe Ser Leu  
 1085 1090 1095

Gly Phe Val Ala Arg Val Phe Asp Ile Ile Phe Leu Gln Gly Thr  
 1100 1105 1110

Glu Val Ile Phe Lys Val Ala Leu Ser Leu Leu Ser Ser Gln Glu  
 1115 1120 1125

Thr Leu Ile Met Glu Cys Glu Ser Phe Glu Asn Ile Val Glu Phe  
 1130 1135 1140

	Leu Lys	Asn Thr	Leu Pro	Asp	Met Asn	Thr Ser	Glu	Met Glu	Lys					
	1145			1150			1155							
	Ile Ile	Thr Gln	Val Phe	Glu	Met Asp	Ile Ser	Lys	Gln Leu	His					
	1160			1165			1170							
	Ala Tyr	Glu Val	Glu Tyr	His	Val Leu	Gln Asp	Glu	Leu Gln	Glu					
	1175			1180			1185							
	Ser Ser	Tyr Ser	Cys Glu	Asp	Ser Glu	Thr Leu	Glu	Lys Leu	Glu					
	1190			1195			1200							
	Arg Ala	Asn Ser	Gln Leu	Lys	Arg Gln	Asn Met	Asp	Leu Leu	Glu					
	1205			1210			1215							
[0033]	Lys Leu	Gln Val	Ala His	Thr	Lys Ile	Gln Ala	Leu	Glu Ser	Asn					
	1220			1225			1230							
	Leu Glu	Asn Leu	Leu Thr	Arg	Glu Thr	Lys Met	Lys	Ser Leu	Ile					
	1235			1240			1245							
	Arg Thr	Leu Glu	Gln Glu	Lys	Met Ala	Tyr Gln	Lys	Thr Val	Glu					
	1250			1255			1260							
	Gln Leu	Arg Lys	Leu Leu	Pro	Ala Asp	Ala Leu	Val	Asn Cys	Asp					
	1265			1270			1275							
	Leu Leu	Leu Arg	Asp Leu	Asn	Cys Asn	Pro Asn	Asn	Lys Ala	Lys					
	1280			1285			1290							
	Ile Gly	Asn Lys	Pro											
	1295													

<210> 3  
 <211> 1235  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

<400> 3

Met Glu Pro Pro Ser Cys Ile Gln Asp Glu Pro Phe Pro His Pro Leu  
 1                    5                    10                    15

Glu Pro Glu Pro Gly Val Ser Ala Gln Pro Gly Pro Gly Lys Pro Ser  
                   20                    25                    30

Asp Lys Arg Phe Arg Leu Trp Tyr Val Gly Gly Ser Cys Leu Asp His  
                   35                    40                    45

[0034] Arg Thr Thr Leu Pro Met Leu Pro Trp Leu Met Ala Glu Ile Arg Arg  
                   50                    55                    60

Arg Ser Gln Lys Pro Glu Ala Gly Gly Cys Gly Ala Pro Ala Ala Arg  
 65                    70                    75                    80

Glu Val Ile Leu Val Leu Ser Ala Pro Phe Leu Arg Cys Val Pro Ala  
                   85                    90                    95

Pro Gly Ala Gly Ala Ser Gly Gly Thr Ser Pro Ser Ala Thr Gln Pro  
                   100                    105                    110

Asn Pro Ala Val Phe Ile Phe Glu His Lys Ala Gln His Ile Ser Arg  
                   115                    120                    125

Phe Ile His Asn Ser His Asp Leu Thr Tyr Phe Ala Tyr Leu Ile Lys  
                   130                    135                    140

Ala Gln Pro Asp Asp Pro Glu Ser Gln Met Ala Cys His Val Phe Arg  
145 150 155 160

Ala Thr Asp Pro Ser Gln Val Pro Asp Val Ile Ser Ser Ile Arg Gln  
165 170 175

Leu Ser Lys Ala Ala Met Lys Glu Asp Ala Lys Pro Ser Lys Asp Asn  
180 185 190

Glu Asp Ala Phe Tyr Asn Ser Gln Lys Phe Glu Val Leu Tyr Cys Gly  
195 200 205

Lys Val Thr Val Thr His Lys Lys Ala Pro Ser Ser Leu Ile Asp Asp  
210 215 220

[0035]

Cys Met Glu Lys Phe Ser Leu His Glu Gln Gln Arg Leu Lys Ile Gln  
225 230 235 240

Gly Glu Gln Arg Gly Pro Asp Pro Gly Glu Asp Leu Ala Asp Leu Glu  
245 250 255

Val Val Val Pro Gly Ser Pro Gly Asp Cys Leu Pro Glu Glu Ala Asp  
260 265 270

Gly Thr Asp Thr His Leu Gly Leu Pro Ala Gly Ala Ser Gln Pro Ala  
275 280 285

Leu Thr Ser Ser Arg Val Cys Phe Pro Glu Arg Ile Leu Glu Asp Ser  
290 295 300

Gly Phe Asp Glu Gln Gln Glu Phe Arg Ser Arg Cys Ser Ser Val Thr  
305 310 315 320

Gly Val Gln Arg Arg Val His Glu Gly Ser Gln Lys Ser Gln Pro Arg  
 325 330 335

Arg Arg His Ala Ser Ala Pro Ser His Val Gln Pro Ser Asp Ser Glu  
 340 345 350

Lys Asn Arg Thr Met Leu Phe Gln Val Gly Arg Phe Glu Ile Asn Leu  
 355 360 365

Ile Ser Pro Asp Thr Lys Ser Val Val Leu Glu Lys Asn Phe Lys Asp  
 370 375 380

Ile Ser Ser Cys Ser Gln Gly Ile Lys His Val Asp His Phe Gly Phe  
 385 390 395 400

[0036]

Ile Cys Arg Glu Ser Pro Glu Pro Gly Leu Ser Gln Tyr Ile Cys Tyr  
 405 410 415

Val Phe Gln Cys Ala Ser Glu Ser Leu Val Asp Glu Val Met Leu Thr  
 420 425 430

Leu Lys Gln Ala Phe Ser Thr Ala Ala Ala Leu Gln Ser Ala Lys Thr  
 435 440 445

Gln Ile Lys Leu Cys Glu Ala Cys Pro Met His Ser Leu His Lys Leu  
 450 455 460

Cys Glu Arg Ile Glu Gly Leu Tyr Pro Pro Arg Ala Lys Leu Val Ile  
 465 470 475 480

Gln Arg His Leu Ser Ser Leu Thr Asp Asn Glu Gln Ala Asp Ile Phe  
 485 490 495

Glu Arg Val Gln Lys Met Lys Pro Val Ser Asp Gln Glu Glu Asn Glu  
 500 505 510

Leu Val Ile Leu His Leu Arg Gln Leu Cys Glu Ala Lys Gln Lys Thr  
 515 520 525

His Val His Ile Gly Glu Gly Pro Ser Thr Ile Ser Asn Ser Thr Ile  
 530 535 540

Pro Glu Asn Ala Thr Ser Ser Gly Arg Phe Lys Leu Asp Ile Leu Lys  
 545 550 555 560

Asn Lys Ala Lys Arg Ser Leu Thr Ser Ser Leu Glu Asn Ile Phe Ser  
 565 570 575

[0037]

Arg Gly Ala Asn Arg Met Arg Gly Arg Leu Gly Ser Val Asp Ser Phe  
 580 585 590

Glu Arg Ser Asn Ser Leu Ala Ser Glu Lys Asp Tyr Ser Pro Gly Asp  
 595 600 605

Ser Pro Pro Gly Thr Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ser Ser Ala Trp Gln  
 610 615 620

Thr Phe Pro Glu Glu Asp Ser Asp Ser Pro Gln Phe Arg Arg Arg Ala  
 625 630 635 640

His Thr Phe Ser His Pro Pro Ser Ser Thr Lys Arg Lys Leu Asn Leu  
 645 650 655

Gln Asp Gly Arg Ala Gln Gly Val Arg Ser Pro Leu Leu Arg Gln Ser  
 660 665 670

Ser Ser Glu Gln Cys Ser Asp Gly Glu Gly Arg Lys Arg Thr Ser Ser  
 675 680 685

Thr Cys Ser Asn Glu Ser Leu Ser Val Gly Gly Thr Ser Val Thr Pro  
 690 695 700

Arg Arg Ile Ser Trp Arg Gln Arg Ile Phe Leu Arg Val Ala Ser Pro  
 705 710 715 720

Met Asn Lys Ser Pro Ser Ala Met Gln Gln Gln Asp Gly Leu Asp Arg  
 725 730 735

Asn Glu Leu Leu Pro Leu Ser Pro Leu Ser Pro Thr Met Glu Glu Glu  
 740 745 750

[0038] Pro Leu Val Val Phe Leu Ser Gly Glu Asp Asp Pro Glu Lys Ile Glu  
 755 760 765

Glu Arg Lys Lys Ser Lys Glu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Lys Ala Ile  
 770 775 780

His Gln Gln Ile Leu Leu Leu Arg Met Glu Lys Glu Asn Gln Lys Leu  
 785 790 795 800

Glu Ala Ser Arg Asp Glu Leu Gln Ser Arg Lys Val Lys Leu Asp Tyr  
 805 810 815

Glu Glu Val Gly Ala Cys Gln Lys Glu Val Leu Ile Thr Trp Asp Lys  
 820 825 830

Lys Leu Leu Asn Cys Arg Ala Lys Ile Arg Cys Asp Met Glu Asp Ile  
 835 840 845

	His Thr Leu Leu Lys Glu Gly Val Pro Lys Ser Arg Arg Gly Glu Ile	
	850	855 860
	Trp Gln Phe Leu Ala Leu Gln Tyr Arg Leu Arg His Arg Leu Pro Asn	
	865	870 875 880
	Lys Gln Gln Pro Pro Asp Ile Ser Tyr Lys Glu Leu Leu Lys Gln Leu	
		885 890 895
	Thr Ala Gln Gln His Ala Ile Leu Val Asp Leu Gly Arg Thr Phe Pro	
		900 905 910
	Thr His Pro Tyr Phe Ser Val Gln Leu Gly Pro Gly Gln Leu Ser Leu	
		915 920 925
[0039]	Phe Asn Leu Leu Lys Ala Tyr Ser Leu Leu Asp Lys Glu Val Gly Tyr	
	930	935 940
	Cys Gln Gly Ile Ser Phe Val Ala Gly Val Leu Leu Leu His Met Ser	
	945	950 955 960
	Glu Glu Gln Ala Phe Glu Met Leu Lys Phe Leu Met Tyr Asp Leu Gly	
		965 970 975
	Phe Arg Lys Gln Tyr Arg Pro Asp Met Met Ser Leu Gln Ile Gln Met	
		980 985 990
	Tyr Gln Leu Ser Arg Leu Leu His Asp Tyr His Arg Asp Leu Tyr Asn	
		995 1000 1005
	His Leu Glu Glu Asn Glu Ile Ser Pro Ser Leu Tyr Ala Ala Pro	
	1010	1015 1020

	Trp	Phe	Leu	Thr	Leu	Phe	Ala	Ser	Gln	Phe	Ser	Leu	Gly	Phe	Val
	1025						1030					1035			
	Ala	Arg	Val	Phe	Asp	Ile	Ile	Phe	Leu	Gln	Gly	Thr	Glu	Val	Ile
	1040						1045					1050			
	Phe	Lys	Val	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Ser	Ser	Gln	Glu	Thr	Leu	Ile
	1055						1060					1065			
	Met	Glu	Cys	Glu	Ser	Phe	Glu	Asn	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Lys	Asn
	1070						1075					1080			
	Thr	Leu	Pro	Asp	Met	Asn	Thr	Ser	Glu	Met	Glu	Lys	Ile	Ile	Thr
	1085						1090					1095			
[0040]	Gln	Val	Phe	Glu	Met	Asp	Ile	Ser	Lys	Gln	Leu	His	Ala	Tyr	Glu
	1100						1105					1110			
	Val	Glu	Tyr	His	Val	Leu	Gln	Asp	Glu	Leu	Gln	Glu	Ser	Ser	Tyr
	1115						1120					1125			
	Ser	Cys	Glu	Asp	Ser	Glu	Thr	Leu	Glu	Lys	Leu	Glu	Arg	Ala	Asn
	1130						1135					1140			
	Ser	Gln	Leu	Lys	Arg	Gln	Asn	Met	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Gln
	1145						1150					1155			
	Val	Ala	His	Thr	Lys	Ile	Gln	Ala	Leu	Glu	Ser	Asn	Leu	Glu	Asn
	1160						1165					1170			
	Leu	Leu	Thr	Arg	Glu	Thr	Lys	Met	Lys	Ser	Leu	Ile	Arg	Thr	Leu
	1175						1180					1185			

Glu Gln Glu Lys Met Ala Tyr Gln Lys Thr Val Glu Gln Leu Arg  
 1190 1195 1200

Lys Leu Leu Pro Ala Asp Ala Leu Val Asn Cys Asp Leu Leu Leu  
 1205 1210 1215

Arg Asp Leu Asn Cys Asn Pro Asn Asn Lys Ala Lys Ile Gly Asn  
 1220 1225 1230

Lys Pro  
 1235

<210> 4

<211> 672

<212> PRT

<213> homo sapiens

[0041]

<400> 4

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

Ala Asn Arg Phe Ala Arg Lys Gly Ala Leu Arg Gln Lys Asn Val His  
 20 25 30

Glu Val Lys Asp His Lys Phe Ile Ala Arg Phe Phe Lys Gln Pro Thr  
 35 40 45

Phe Cys Ser His Cys Thr Asp Phe Ile Trp Gly Phe Gly Lys Gln Gly  
 50 55 60

Phe Gln Cys Gln Val Cys Cys Phe Val Val His Lys Arg Cys His Glu  
 65 70 75 80



Gly Ser Leu Ser Phe Gly Val Ser Glu Leu Met Lys Met Pro Ala Ser  
 260 265 270

Gly Trp Tyr Lys Leu Leu Asn Gln Glu Glu Gly Glu Tyr Tyr Asn Val  
 275 280 285

Pro Ile Pro Glu Gly Asp Glu Glu Gly Asn Met Glu Leu Arg Gln Lys  
 290 295 300

Phe Glu Lys Ala Lys Leu Gly Pro Ala Gly Asn Lys Val Ile Ser Pro  
 305 310 315 320

Ser Glu Asp Arg Lys Gln Pro Ser Asn Asn Leu Asp Arg Val Lys Leu  
 325 330 335

[0043] Thr Asp Phe Asn Phe Leu Met Val Leu Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys  
 340 345 350

Val Met Leu Ala Asp Arg Lys Gly Thr Glu Glu Leu Tyr Ala Ile Lys  
 355 360 365

Ile Leu Lys Lys Asp Val Val Ile Gln Asp Asp Asp Val Glu Cys Thr  
 370 375 380

Met Val Glu Lys Arg Val Leu Ala Leu Leu Asp Lys Pro Pro Phe Leu  
 385 390 395 400

Thr Gln Leu His Ser Cys Phe Gln Thr Val Asp Arg Leu Tyr Phe Val  
 405 410 415

Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Asp Leu Met Tyr His Ile Gln Gln Val  
 420 425 430

Gly Lys Phe Lys Glu Pro Gln Ala Val Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ser  
 435 440 445

Ile Gly Leu Phe Phe Leu His Lys Arg Gly Ile Ile Tyr Arg Asp Leu  
 450 455 460

Lys Leu Asp Asn Val Met Leu Asp Ser Glu Gly His Ile Lys Ile Ala  
 465 470 475 480

Asp Phe Gly Met Cys Lys Glu His Met Met Asp Gly Val Thr Thr Arg  
 485 490 495

Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp Tyr Ile Ala Pro Glu Ile Ile Ala Tyr  
 500 505 510

[0044]

Gln Pro Tyr Gly Lys Ser Val Asp Trp Trp Ala Tyr Gly Val Leu Leu  
 515 520 525

Tyr Glu Met Leu Ala Gly Gln Pro Pro Phe Asp Gly Glu Asp Glu Asp  
 530 535 540

Glu Leu Phe Gln Ser Ile Met Glu His Asn Val Ser Tyr Pro Lys Ser  
 545 550 555 560

Leu Ser Lys Glu Ala Val Ser Ile Cys Lys Gly Leu Met Thr Lys His  
 565 570 575

Pro Ala Lys Arg Leu Gly Cys Gly Pro Glu Gly Glu Arg Asp Val Arg  
 580 585 590

Glu His Ala Phe Phe Arg Arg Ile Asp Trp Glu Lys Leu Glu Asn Arg  
 595 600 605



Asp Ser His Gln Thr Glu Glu Thr Leu  
1 5

<210> 7  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> peptide 3

<400> 7

Gln Gln Thr Leu Pro Glu Ser His Leu Pro  
1 5 10

<210> 8  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> artificial sequence

[0046]

<220>  
<223> peptide 4

<400> 8

Gln Ala Leu Leu Asp Ser His Leu Pro Glu  
1 5 10

<210> 9  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> peptide 5

<400> 9

Pro Ala Asp Gln Met Thr Asp Thr Pro  
1 5



<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> primer

<400> 13  
ttggctcaga gacagttgaa a

21

<210> 14  
<211> 337  
<212> PRT  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> PKCalpha domain

<400> 14

[0048]

Leu Thr Asp Phe Asn Phe Leu Met Val Leu Gly Lys Gly Ser Phe Gly  
1                    5                    10                    15

Lys Val Met Leu Ala Asp Arg Lys Gly Thr Glu Glu Leu Tyr Ala Ile  
                  20                    25                    30

Lys Ile Leu Lys Lys Asp Val Val Ile Gln Asp Asp Asp Val Glu Cys  
                  35                    40                    45

Thr Met Val Glu Lys Arg Val Leu Ala Leu Leu Asp Lys Pro Pro Phe  
                  50                    55                    60

Leu Thr Gln Leu His Ser Cys Phe Gln Thr Val Asp Arg Leu Tyr Phe  
65                    70                    75                    80

Val Met Glu Tyr Val Asn Gly Gly Asp Leu Met Tyr His Ile Gln Gln  
                  85                    90                    95

Val Gly Lys Phe Lys Glu Pro Gln Ala Val Phe Tyr Ala Ala Glu Ile  
 100 105 110

Ser Ile Gly Leu Phe Phe Leu His Lys Arg Gly Ile Ile Tyr Arg Asp  
 115 120 125

Leu Lys Leu Asp Asn Val Met Leu Asp Ser Glu Gly His Ile Lys Ile  
 130 135 140

Ala Asp Phe Gly Met Cys Lys Glu His Met Met Asp Gly Val Thr Thr  
 145 150 155 160

Arg Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp Tyr Ile Ala Pro Glu Ile Ile Ala  
 165 170 175

[0049] Tyr Gln Pro Tyr Gly Lys Ser Val Asp Trp Trp Ala Tyr Gly Val Leu  
 180 185 190

Leu Tyr Glu Met Leu Ala Gly Gln Pro Pro Phe Asp Gly Glu Asp Glu  
 195 200 205

Asp Glu Leu Phe Gln Ser Ile Met Glu His Asn Val Ser Tyr Pro Lys  
 210 215 220

Ser Leu Ser Lys Glu Ala Val Ser Ile Cys Lys Gly Leu Met Thr Lys  
 225 230 235 240

His Pro Ala Lys Arg Leu Gly Cys Gly Pro Glu Gly Glu Arg Asp Val  
 245 250 255

Arg Glu His Ala Phe Phe Arg Arg Ile Asp Trp Glu Lys Leu Glu Asn  
 260 265 270

Arg Glu Ile Gln Pro Pro Phe Lys Pro Lys Val Cys Gly Lys Gly Ala  
 275 280 285

Glu Asn Phe Asp Lys Phe Phe Thr Arg Gly Gln Pro Val Leu Thr Pro  
 290 295 300

Pro Asp Gln Leu Val Ile Ala Asn Ile Asp Gln Ser Asp Phe Glu Gly  
 305 310 315 320

Phe Ser Tyr Val Asn Pro Gln Phe Val His Pro Ile Leu Gln Ser Ala  
 325 330 335

Val

[0050]

<210> 15  
 <211> 1014  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> PCKalpha domain

<400> 15  
 ctcacggact tcaatttcct catggtgttg ggaaagggga gttttggaaa ggtgatgctt 60  
 gccgacagga agggcacaga agaactgtat gcaatcaaaa tcctgaagaa ggatgtggtg 120  
 attcaggatg atgacgtgga gtgcacatg gtagaaaagc gagtcttggc cctgcttgac 180  
 aaacccccgt tcttgacgca gctgcactcc tgcttcaga cagtggatcg gctgtacttc 240  
 gtcatggaat atgtcaacgg tggggacctc atgtaccaca ttcagcaagt aggaaaattt 300  
 aaggaaccac aagcagtatt ctatgcggca gagatttcca tcggattgtt ctttcttcat 360  
 aaaagaggaa tcatttatag ggatctgaag ttagataacg tcatgttga ttcagaagga 420  
 catatcaaaa ttgctgactt tgggatgtgc aaggaacaca tgatggatgg agtcacgacc 480

	aggaccttct gtgggactcc agattatata gccccagaga taatcgctta tcagccgtat	540
	ggaaaatctg tggactggtg ggcctatggc gtcctgttgt atgaaatgct tgccgggcag	600
	cctccatttg atggtgaaga tgaagacgag ctatttcagt ctatcatgga gcacaacgtt	660
	tcctatccaa aatccttgtc caaggaggct gtttctatct gcaaaggact gatgaccaa	720
	caccagcca agcggctggg ctgtgggcct gagggggaga gggacgtgag agagcatgcc	780
	ttcttccgga ggatcgactg ggaaaaactg gagaacaggg agatccagcc accattcaag	840
	cccaaagtgt gtggcaaagg agcagagaac ttgacaagt tcttcacacg aggacagccc	900
	gtcttaacac cacctgatca gctggttatt gctaacatag accagtctga ttttgaaggg	960
	ttctcgtatg tcaacccccca gtttgtgcac cccatcttac agagtgcagt atga	1014
	<210> 16	
	<211> 64	
[0051]	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> Primer	
	<400> 16	
	gtacgaattc gccacatgg attacaagga tgacgacgat aagctcacgg acttcaattt	60
	cctc	64
	<210> 17	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> artificial sequence	
	<220>	
	<223> primer	
	<400> 17	
	tagcggatcc tcatactgca ctctgtaaga tggg	34



<210> 21  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> artificial sequence

[0053] <220>  
<223> HIV-Tat

<400> 21

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1                    5                    10

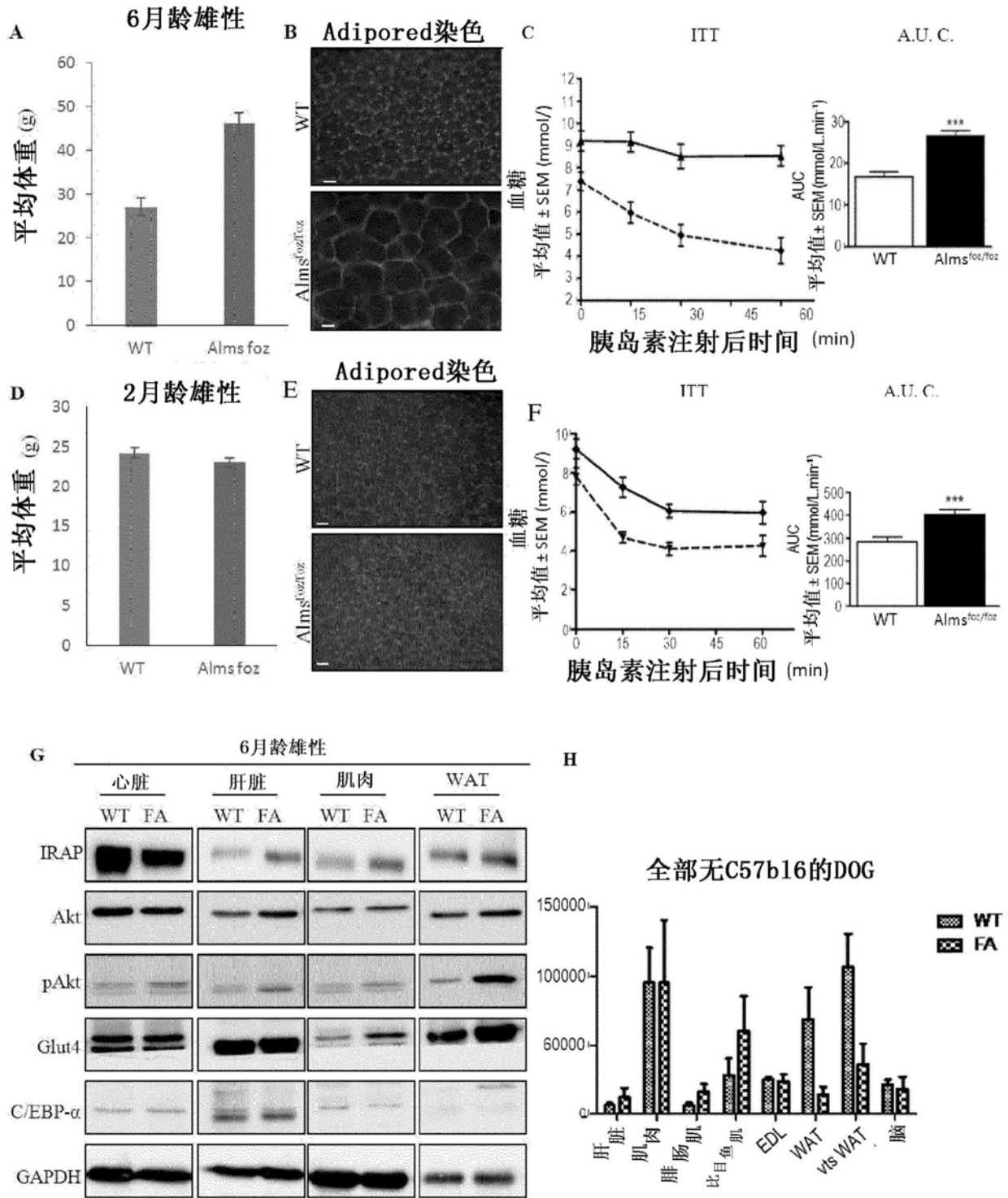


图1

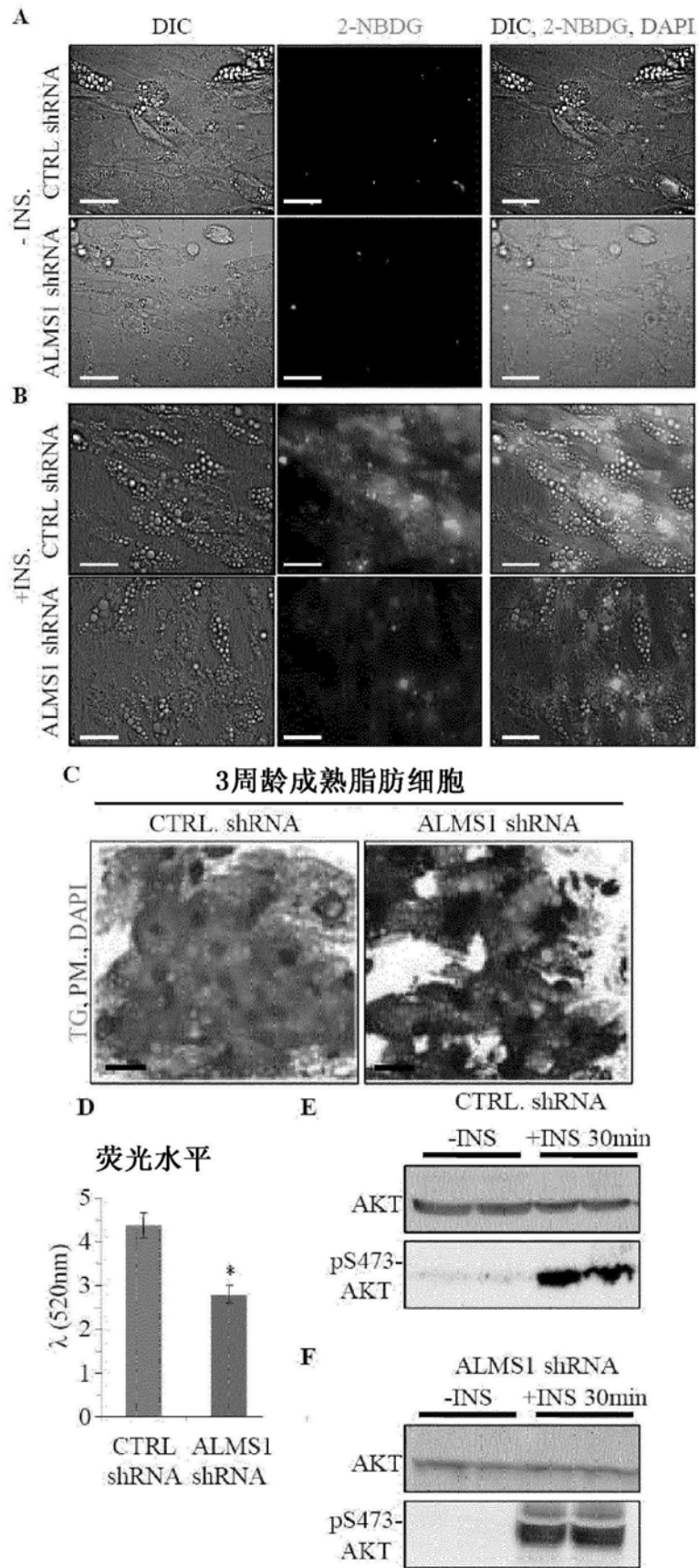


图2

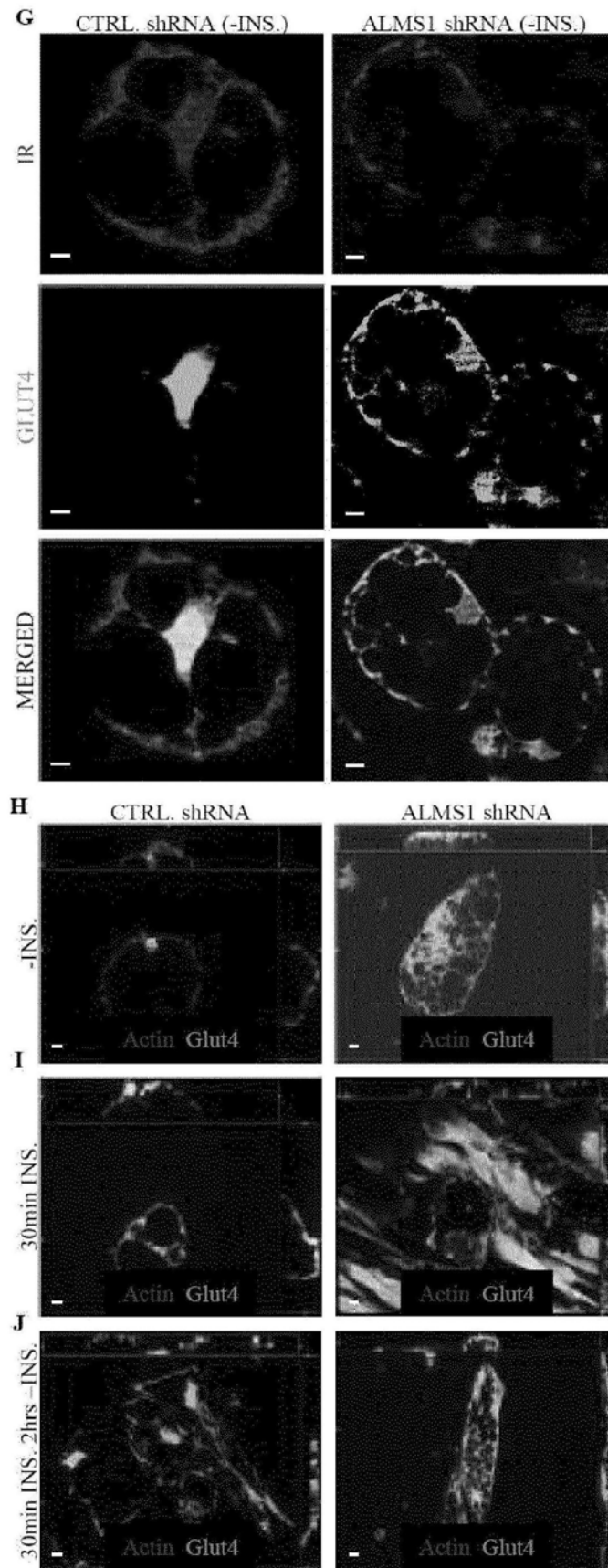


图2(续)

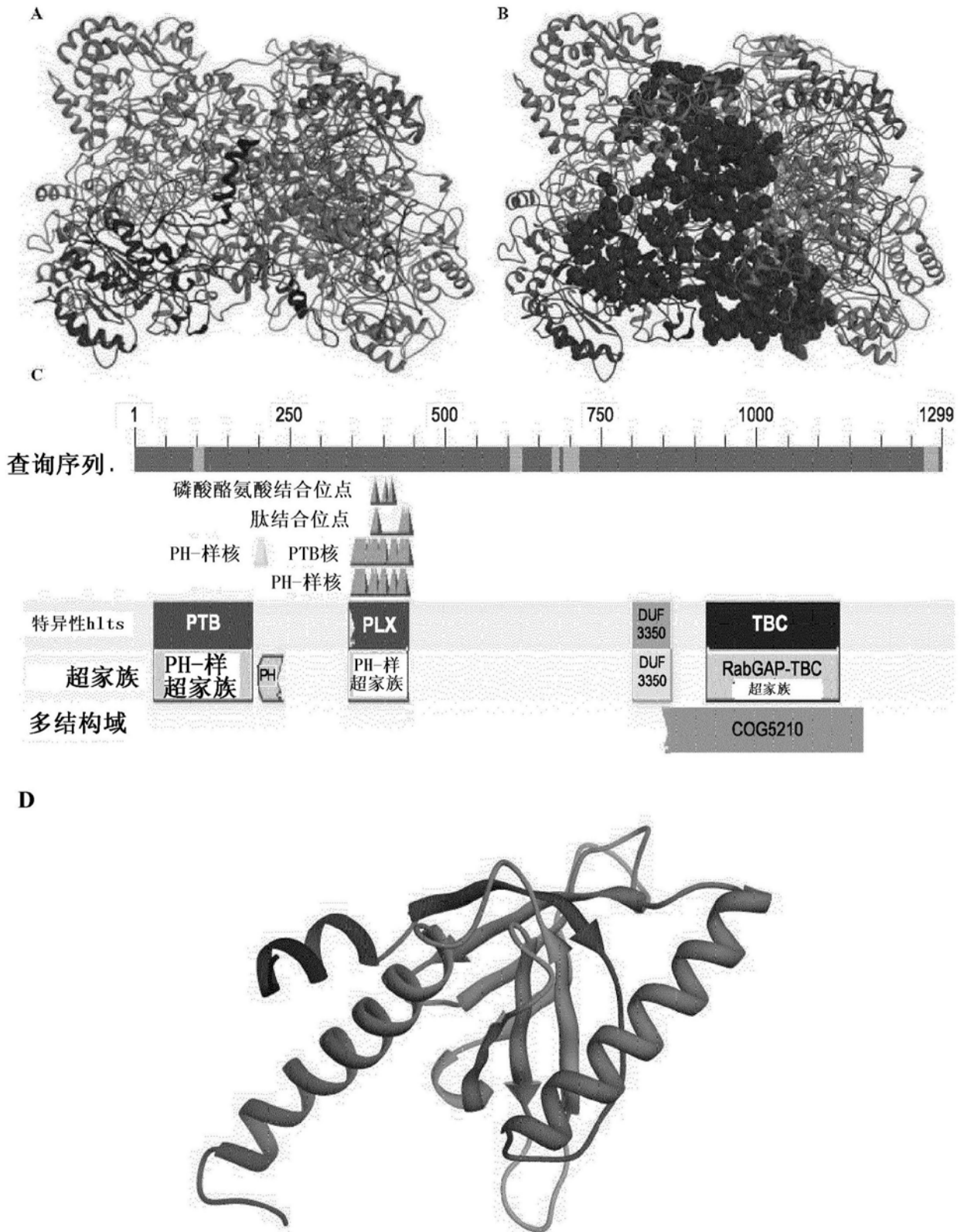
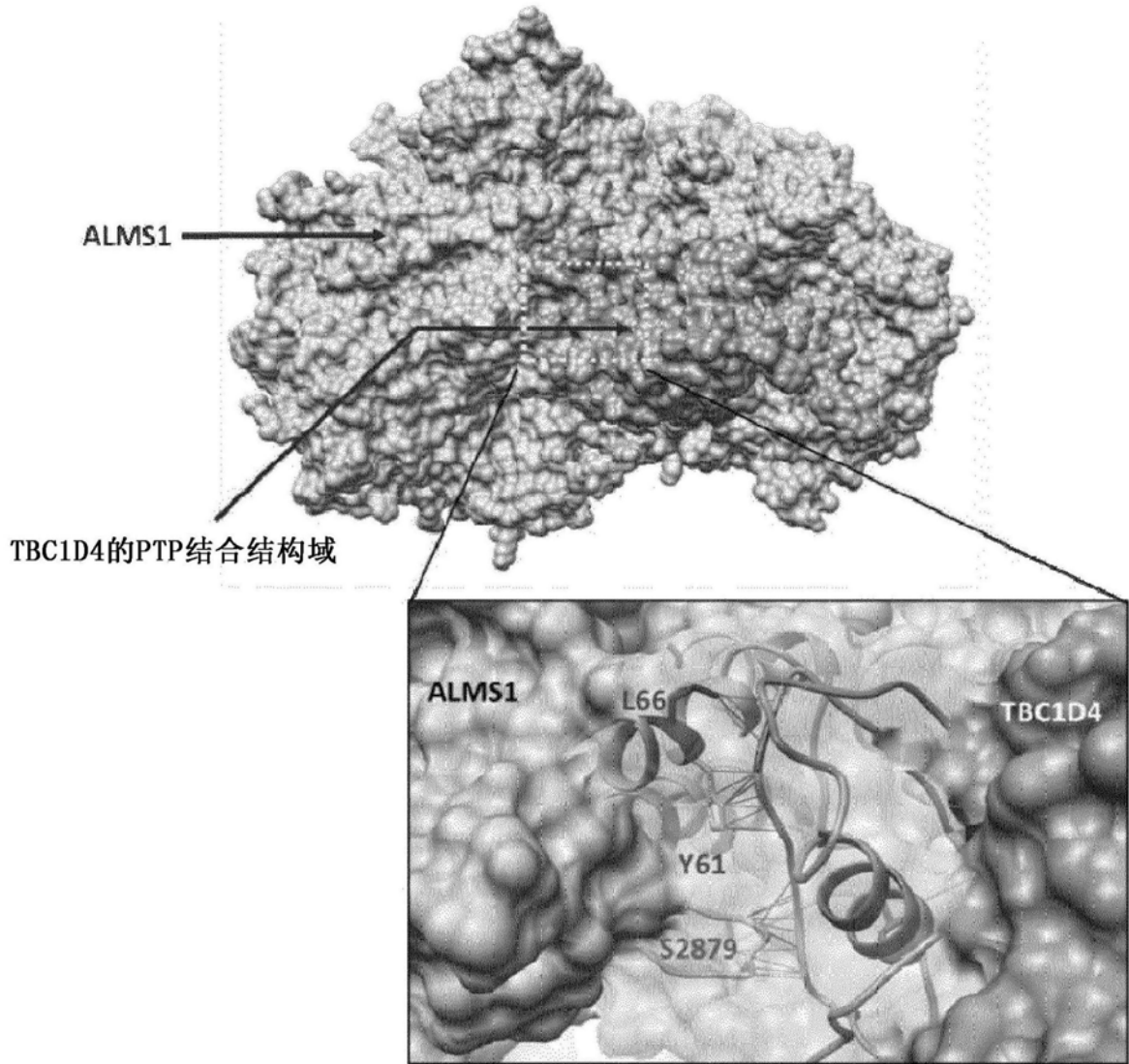


图3

A



B 成熟脂肪细胞 (3D图像)

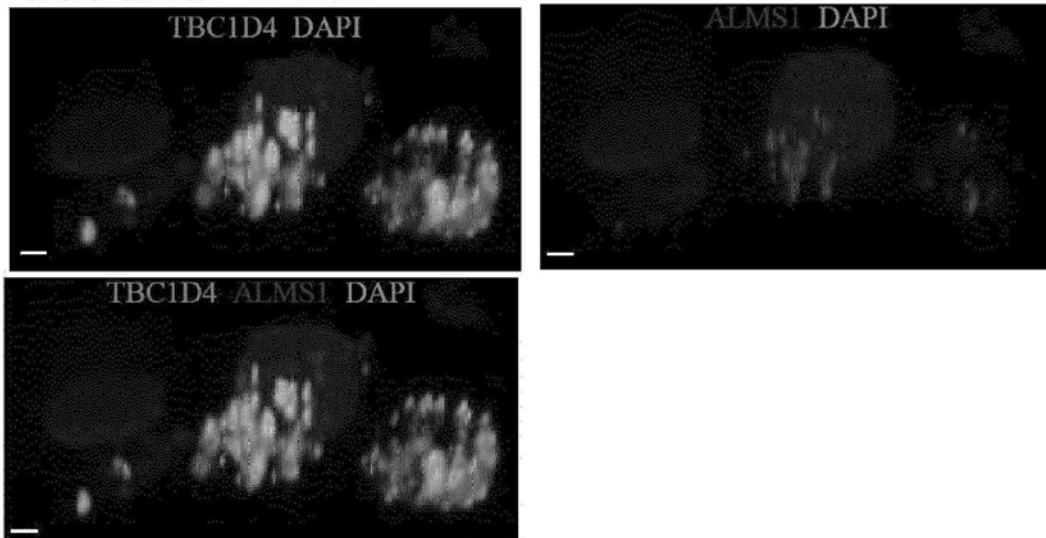


图4

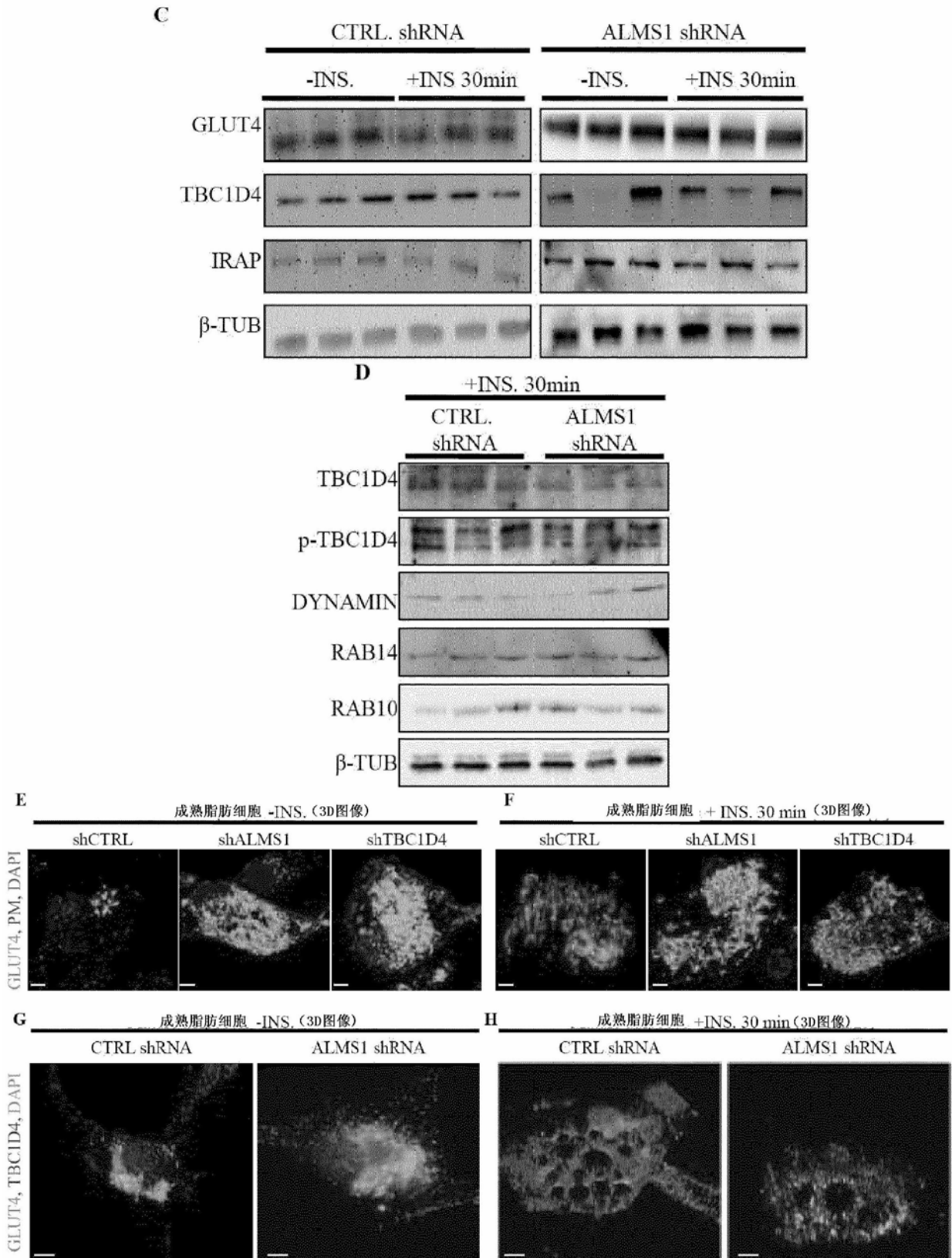


图4 (续)

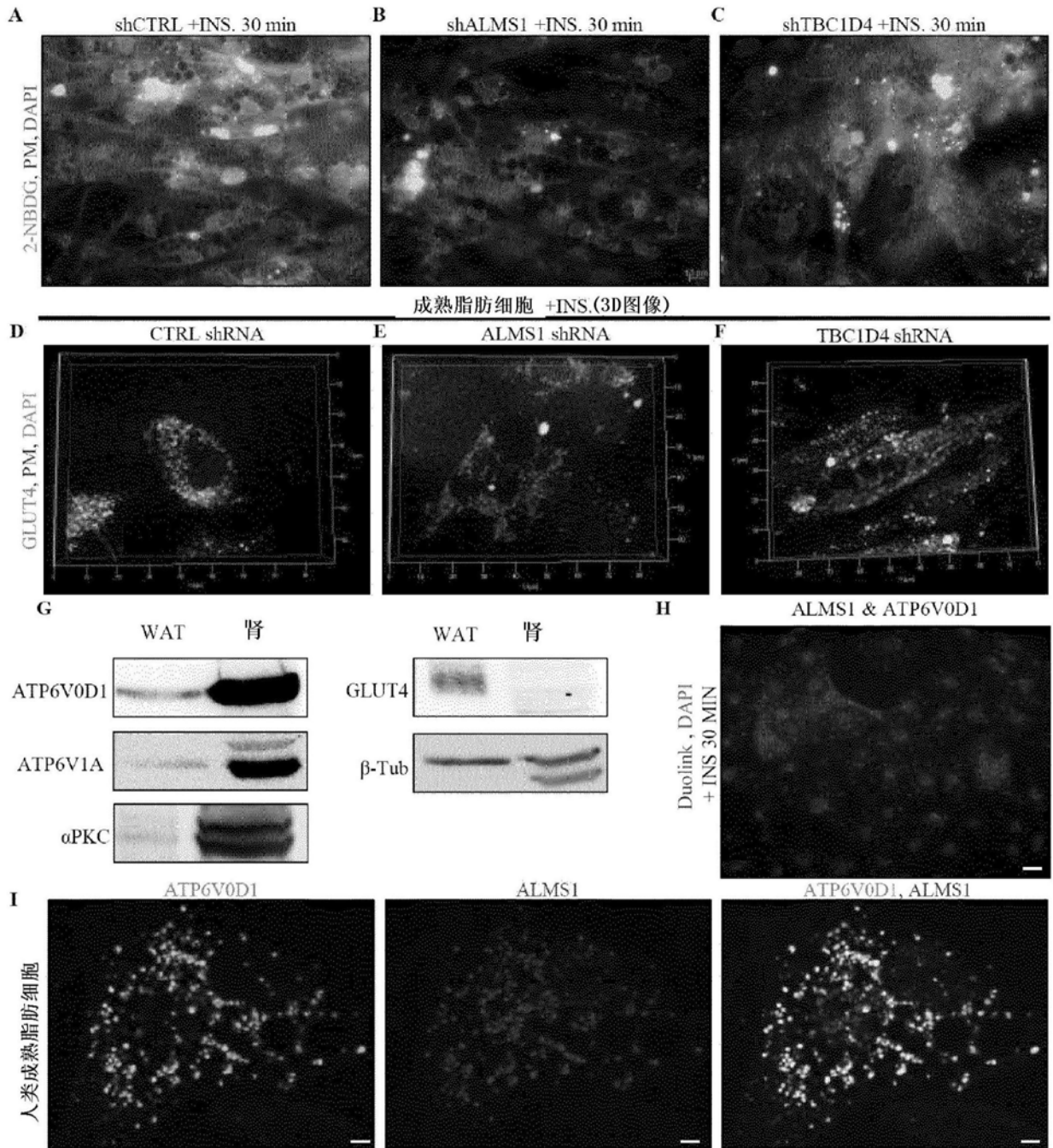


图5

**J**

PKC结合基序  
(距TBC1D4位点~20Å)

预测的TBC1D4结合位点

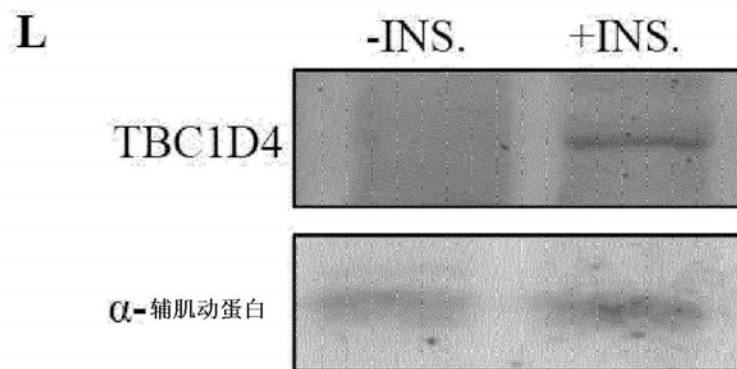
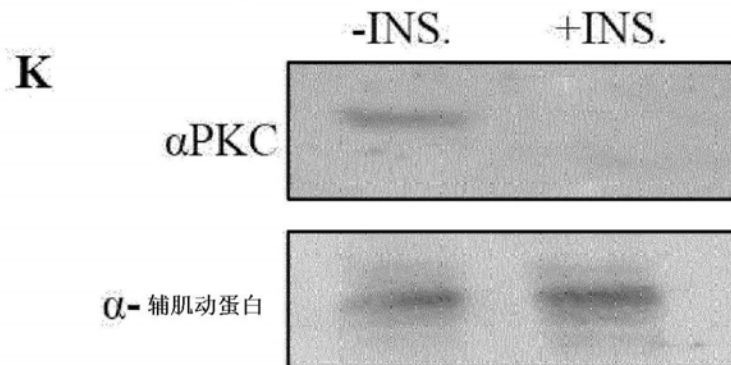


图5 (续)

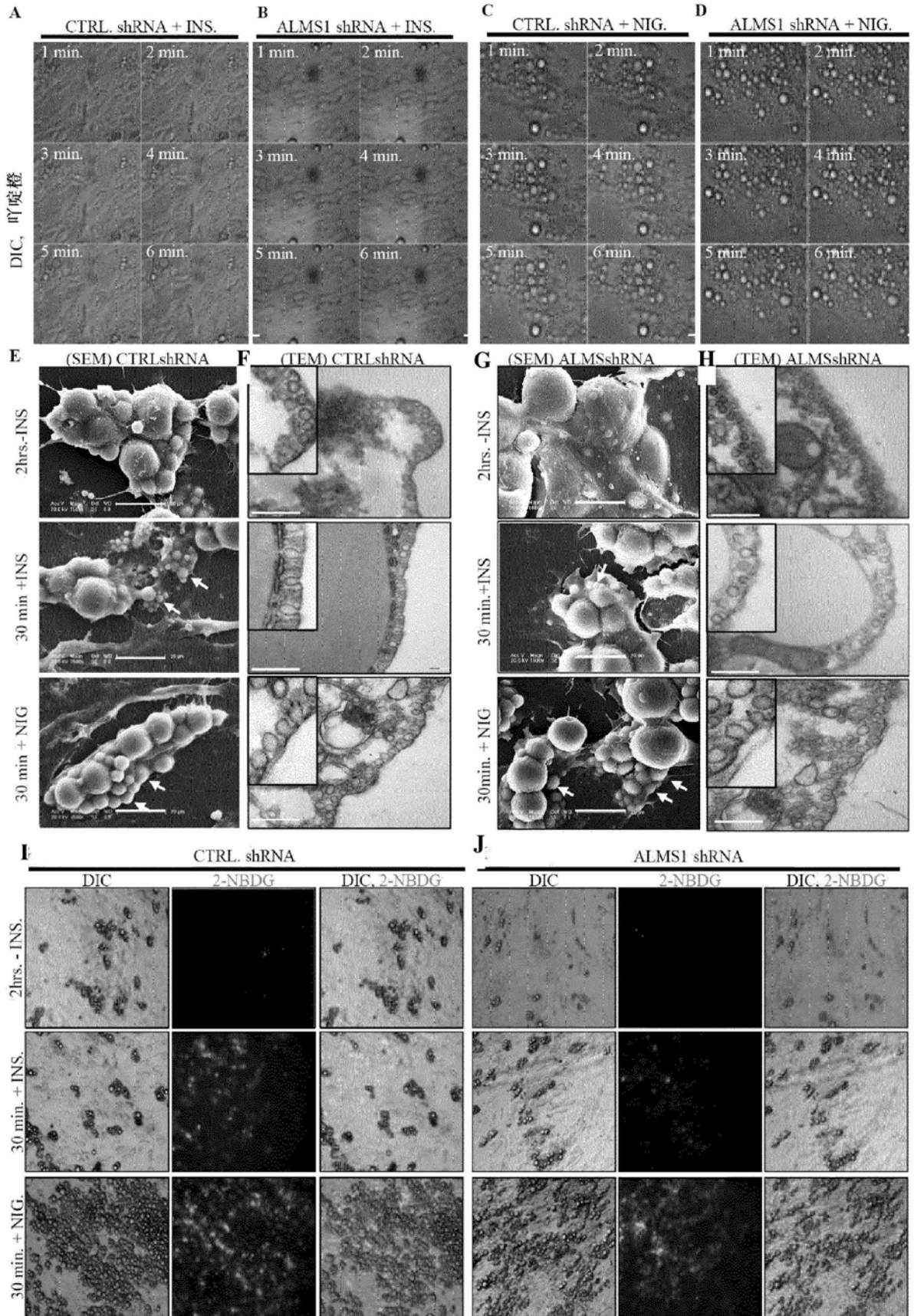


图6

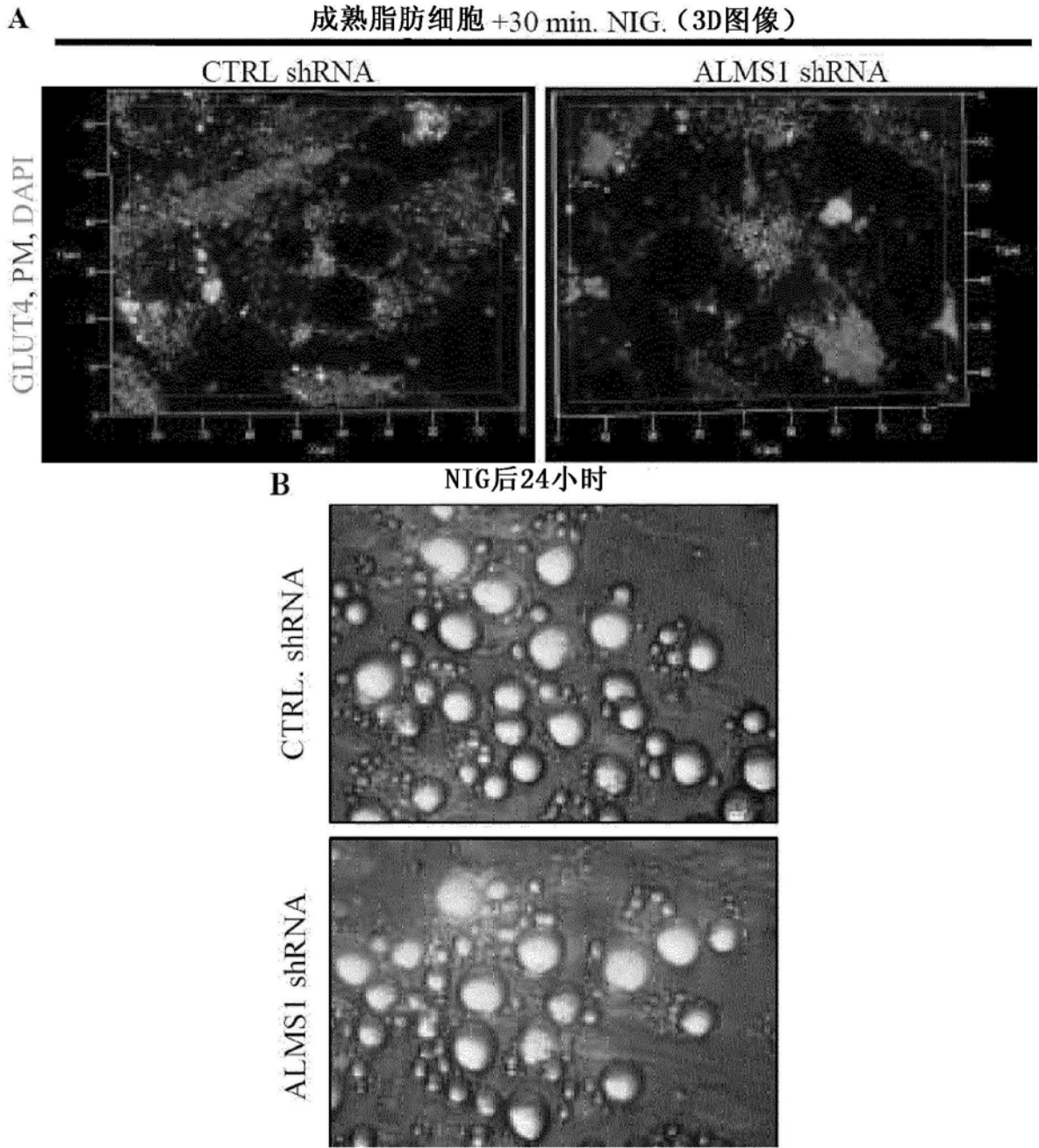
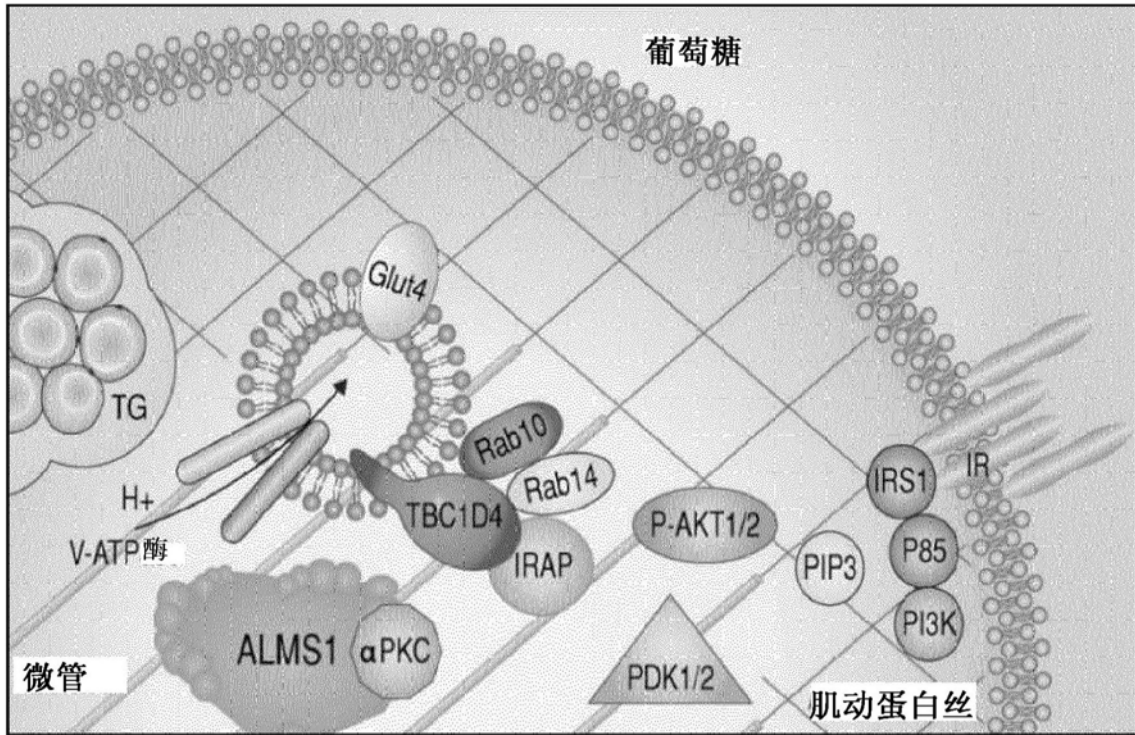


图7

C

胰岛素不存在时



D

胰岛素存在时

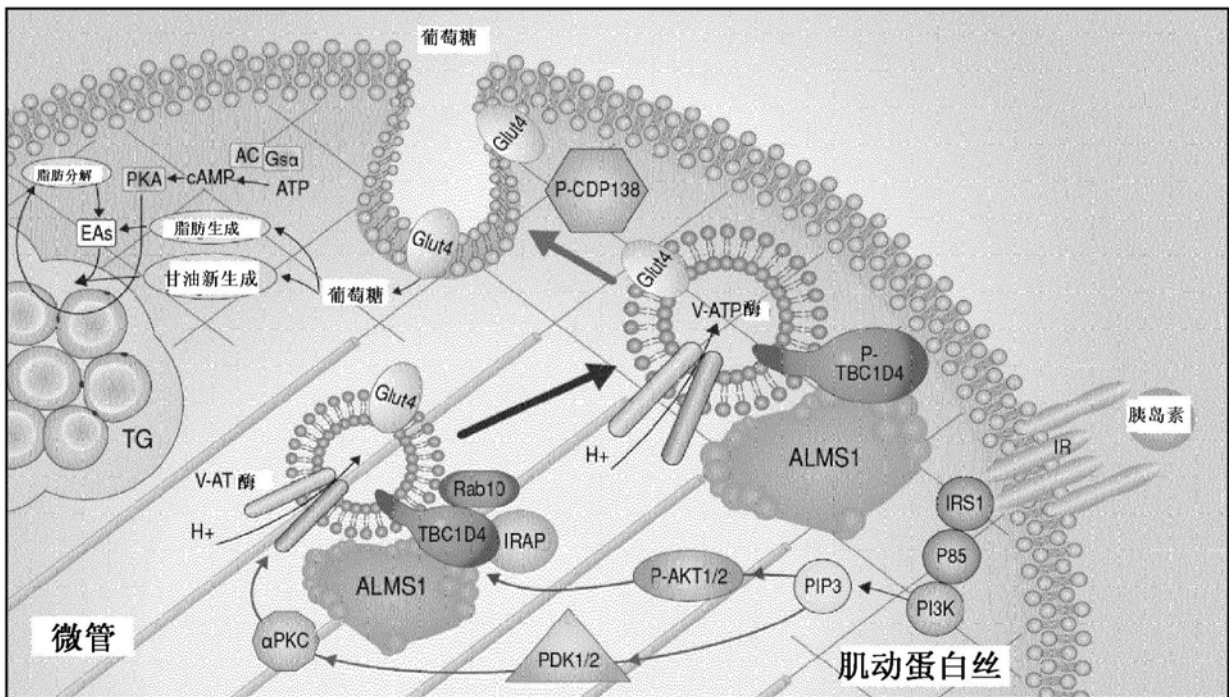


图7 (续)

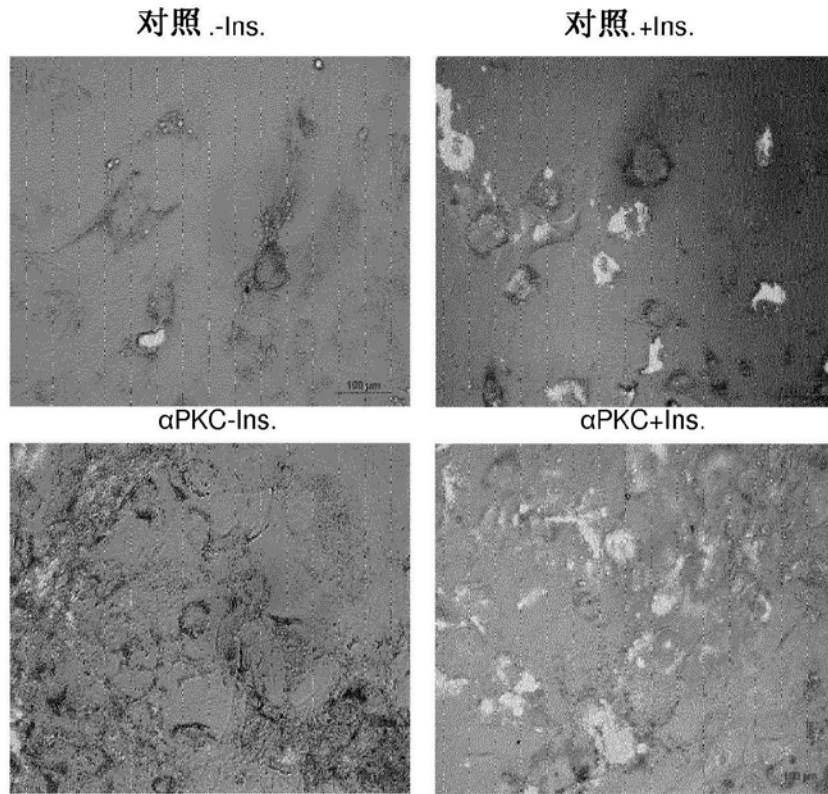


图8A

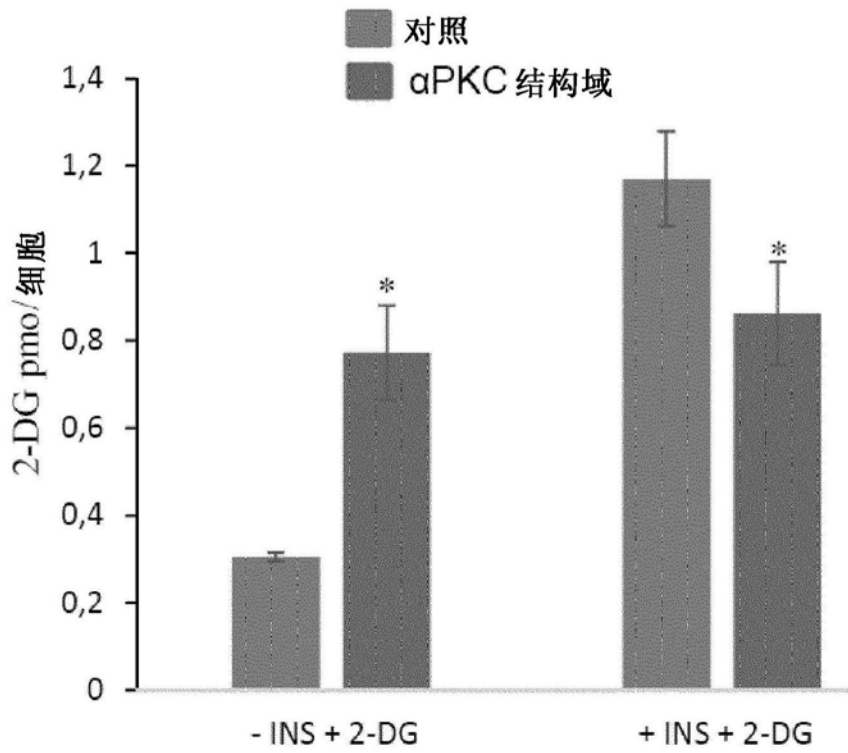


图8B

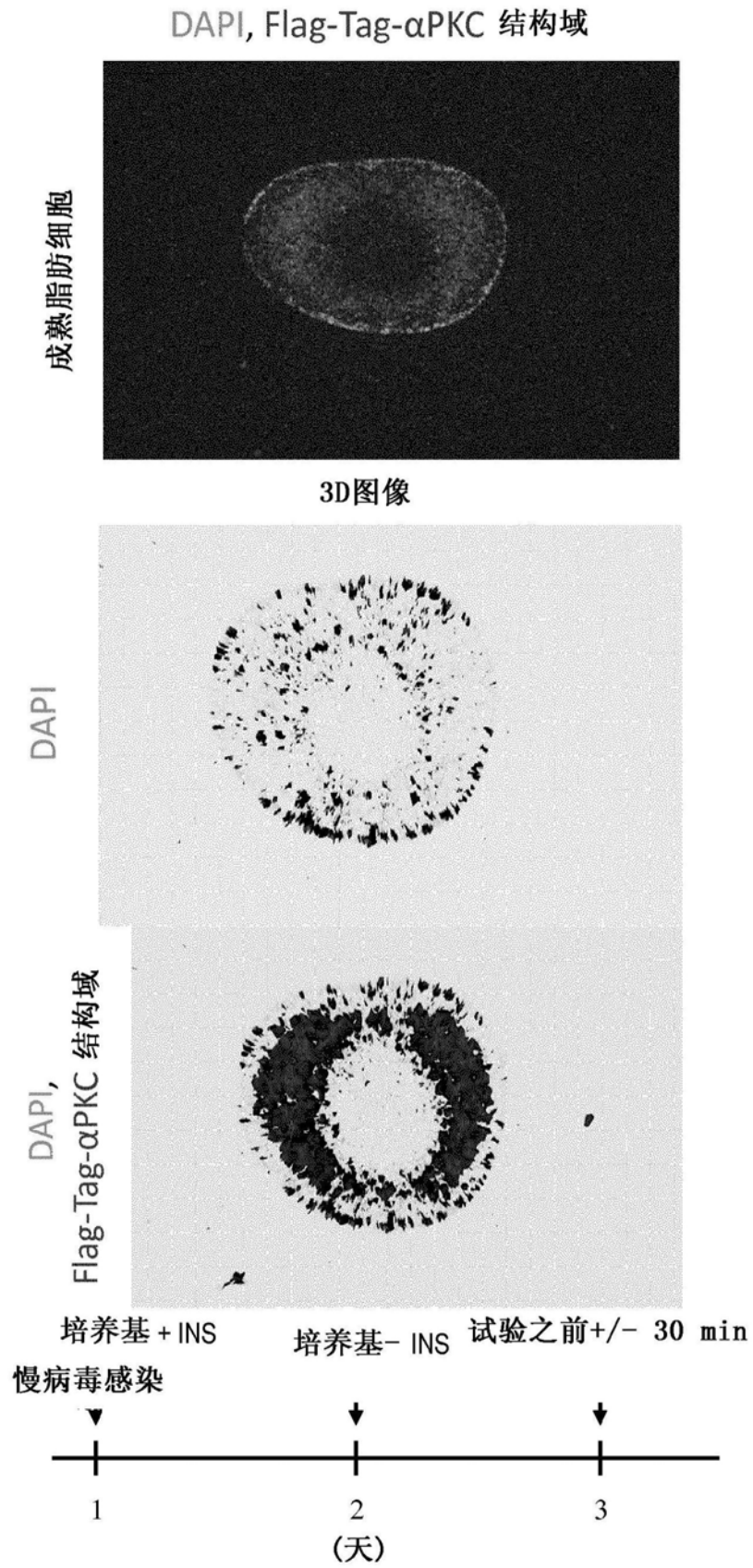


图9