(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107847513 B
(45)授权公告日 2021.08.31

(21)申请号 201580081769.3
(22)申请日 2015.07.20
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107847513 A
(43)申请公布日 2018.03.27
(30)优先权数据
10-2015-0101710 2015.07.17 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.01.17
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2015/007491 2015.07.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/014331 KO 2017.01.26

(73)专利权人 蔚山大学校产学协力团
地址 韩国蔚山
(72)发明人 金旼宣
(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270
代理人 康艳青 姚开丽

(51)Int.Cl.
A61K 31/7084(2006.01)
A23L 33/10(2006.01)
A61K 9/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 100350968 C,2007.11.28
CN 101287478 A,2008.10.15

审查员 程婷

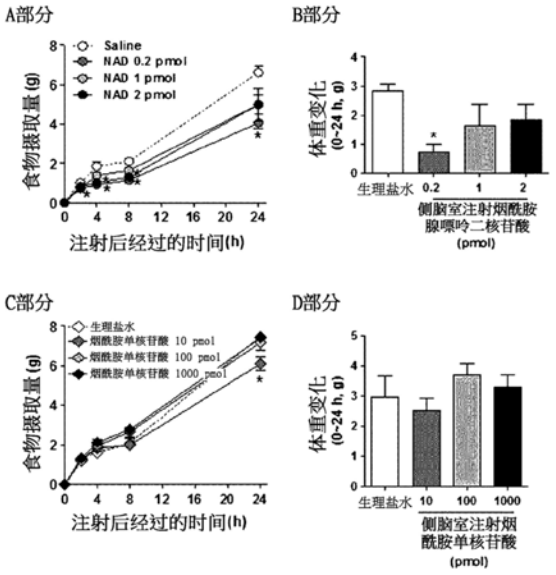
权利要求书1页 说明书13页 附图7页

(54)发明名称

包含烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的用于预防及治疗肥胖或糖耐量减低的组合物

(57)摘要

本发明涉及包含烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD,nicotinamide adenine dinucleotide)作为有效成分的用于预防及治疗肥胖或糖耐量减低的药学组合物、食品组合物及利用其的肥胖或糖耐量减低的预防及治疗方法。本发明的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸表现出如下的效果,即,改善由高脂肪饮食的摄取引起的肥胖动物模型的异常性食物摄取模式,使运动性增加,从而抑制因高热量摄取导致的体重增加,并且改善葡萄糖耐量(gluc ose tolerance)。并且,确认了即使利用比以往公知的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的前体更少的量,也可持续如上所述的效果。因此,本发明的包含烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的组合物可有效地用作可有效地预防及治疗肥胖或糖耐量减低的药学组合物或食品组合物。



CN 107847513 B

1.烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NAD在制备用于通过增加血浆或下丘脑中NAD^+的水平来减少食物摄取的药物中的应用。

2.根据权利要求1所述的应用,其特征在于,上述烟酰胺腺嘌呤二核苷酸通过调节包括肥胖患者的食物摄取期及食物摄取周期的食物摄取模式,来使食物摄取减少。

3.烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NAD在制备用于通过增加血浆中NAD^+的水平来减少食物摄取的食品组合物中的应用。

4.根据权利要求3所述的应用,其特征在于,上述烟酰胺腺嘌呤二核苷酸具有通过调节包括食物摄取期及食物摄取周期的食物摄取模式,来使食物摄取减少的功能。

5.烟酰胺腺嘌呤二核苷酸在制备用于通过增加血浆或下丘脑中NAD^+的水平来减少食物摄取的药物中的应用,包括以除了人类之外的哺乳动物作为对象给药烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的步骤。

6.根据权利要求5所述的应用,其特征在于,上述给药为腹腔内给药、血管内给药或口服给药。

7.根据权利要求6所述的应用,其特征在于,进行上述腹腔内给药时的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药剂量对应每kg为0.1mg至100mg,kg为对象个体的体重单位。

8.根据权利要求6所述的应用,其特征在于,进行上述血管内给药时的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药剂量对应每kg为0.1mg至100mg,kg为对象个体的体重单位。

9.根据权利要求6所述的应用,其特征在于,进行上述口服给药时的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药剂量对应每kg为0.1mg至1000mg,kg为对象个体的体重单位。

10.根据权利要求5所述的应用,其特征在于,上述给药进行每日1～3次。

包含烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的用于预防及治疗肥胖或糖耐量减低的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD,nicotinamide adenine dinucleotide)作为有效成分的用于预防及治疗肥胖或糖耐量减低的药学组合物、食品组合物及利用其的肥胖或糖耐量减低的预防及治疗方法。

背景技术

[0002] 在氧化或还原代谢反应中,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD+,nicotina mide adenine dinucleotide)起到介导氢转移的酶辅因子(enzyme cofactors)的作用(Berger,F.,et al.(2004)."The new life of a centenarian:signalling functions of NAD+(P)."Trends in biochemical sciences 29(3):111-118)。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD+)在甘油醛3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)催化的糖酵解反应(glycolytic reaction)及三羧酸(TCA,tricarboxylic acid)循环的四个步骤中转化为NAD+H((Lin,S.-J.and L.guarente(2003)."Nicotinamide adenine dinucleotide,a metabolic regulator of transcription,longevity and disease."Current opinion in cell biology 15(2):241-246)。并且,在线粒体中的脂肪酸和氨基酸的氧化过程中,NAD+也转化成NAD+H。为了保持适当的氧化还原状态,NAD+H被重新氧化,并在线粒体中的氧化磷酸化及腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)合成过程中起到电子供体的作用(Lin andguarente,2003)。

[0003] 进而,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸在由去乙酰化酶(sirtuins)及CD38胞外酶(ectoenzymes)催化的生化反应中起到重要的辅被用物(cosubstrate)的作用。去乙酰化酶(sirtuins)为III-NAD+-依赖性脱乙酰酶(class III-NA D+-dependent deacetylases),对如禁食、脱氧核糖核酸(DNA)损伤及氧化应激等的营养学性及环境压力的适应性反应中起到重要的作用。去乙酰化酶去除作为底物的蛋白赖氨酸(lysine)缺陷的乙酰基并将其传递至二磷酸腺苷(ADP)-核糖(ribose)。在由去乙酰化酶催化的脱乙酰化反应过程中,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸分解为烟酰胺(nicotinamide)。

[0004] 始于烟酸(nicotinic acid,NA)的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸合成的Preiss-Handler途径被广泛观察于单细胞生物体中,需要通过烟酰胺腺嘌呤二核苷酸合成酶的烟酸部分(moiety)的后续酰胺化反应(Preiss,J.and P.Handler(1958)."Biosynthesis of diphosphopyridine nucleotide."Journal of biological chemistry 233:493-500)。在哺乳动物中的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸生物合成通过四种不同途径发生:1)从色氨酸重新(de novo)合成,2)从烟酸或烟酰胺(nicotinamide)的转化,3)从烟酰胺核糖核苷(nicotinamide riboside,NR)转化,4)通过再利用(salvage)途径,从烟酰胺再利用合成。在哺乳类中,也从色氨酸(tryptophan)通过犬尿氨酸(kynurenine)途径来重新合成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,但不足以维持正常的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸水平。在人体中,大多数烟酰胺腺嘌呤二核苷酸由烟酰胺合成(Rongvaux,

[0005] A.,et al.(2003)."Reconstructing eukaryotic NAD+metabolism."Bioessays 25(7):683-690),烟酰胺在烟酰胺腺嘌呤二核苷酸-依赖性酶反应中释放。在营养学角度上推荐的烟酰胺的每日摄取量为大约15mg(Institute of Medicine Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes its Panel on Folate 1998),但烟酰胺腺嘌呤二核苷酸周转(turnover)在肝脏仅为数克的范围(～6.5-8.5g NAD+,这相当于约1.5g的烟酰胺的量)(Chiarugi,A.,et al.(2012)."The NAD+metabolome a key dete rminant of cancer cell biology."Nature Reviews Cancer 12(11):741-752)。因此,为了维持组织的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸水平,需要烟酰胺完全地被再利用,在这里需要称为烟酰胺磷酸核糖转移酶(nicotinamide phosphoribosyl transferase,Nampt)的酶。烟酰胺磷酸核糖转移酶为限速酶(rate-limiting enzyme),催化磷脂酰基的5-磷酸核糖-1-焦磷酸(PRPP)将磷酸核糖基转移成烟酰胺,作为酶促反应结果,生成烟酰胺单核苷酸(nicotinamide mononucleotide,NMN)和焦磷酸盐(pyrophosphate)(Revollo,J.R.,et al.(2007)."The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals."Current opinion ingastroenterology 23(2):164-170)。作为下一步骤,烟酰胺单核苷酸通过烟酰胺单核苷酸腺苷转移酶(nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase,Nmnat)转化为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。

[0006] 另一方面,有证据表明衰老对细胞及器官水平的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸生物合成具有显著影响,导致人及啮齿动物组织中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的量的减少。老年小鼠由于在胰腺、白色脂肪组织、肝及骨骼肌中,因多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)活性增加而伴随着烟酰胺腺嘌呤二核苷酸水平降低,这导致去乙酰化酶(SIRT1)的活性降低及线粒体功能降低。衰老的大鼠(rats)因心脏、肺,肝和肾中的脱氧核糖核酸损伤的增加而引起的多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶的活性的增加,而表现出细胞内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸水平的降低,由此表现出去乙酰化酶(SIRT1)的活性的降低及线粒体活性的降低。并且,因衰老的大鼠的脑中所增加的多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶活性,而导致烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的量的减少及乙酰化酶(SIRT1)的活性降低。(Braidy,Guillemin et al.2011)。类似于这种结果,Liu等人也报道了衰老动物的脑中烟酰胺磷酸核糖转移酶活性和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的量降低的情况(Liu,L.-Y.,et al.(2012)."Nicotinamide phospho ribosyltransferase may be involved in age-related brain diseases."PloS one 7(10):e44933)。

[0007] 因此,根据这些报道出的研究结果,适当的细胞烟酰胺腺嘌呤二核苷酸含量对正常的组织代谢功能来说非常重要,因此提出了用于增加细胞内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的量的各种治疗方案。第一,试图进行了通过补充作为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸前体的烟酰胺核糖核苷,来增加烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的量的方案,但在如肝和骨骼肌等的外周组织(peripheral tissues)中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸水平增加,而在脑中未增加(CantoHoutkooper et al.2012)。在其他的研究组中,使用了作为烟酰胺磷酸核糖转移酶反应的产物且为重要的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸前体的烟酰胺单核苷酸。对摄取了高脂饮食(HFD-fed)的糖尿病小鼠的腹膜内(IP)烟酰胺单核苷酸给药成功地在肝、脂肪组织及骨骼肌中增加了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的量(Yoshino,Mills et al.2011)。并且,在糖尿病小鼠中,烟酰胺单核苷酸给药使损伤的葡萄糖耐量(glucose tolerance)得到了恢复。这些结

果表明,由高脂肪饮食(HFD)引起的糖尿病中烟酰胺单核苷酸的给药改善了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的缺乏(Yoshino,Mills et al.2011)。然而,因烟酰胺单核苷酸的给药引起的下丘脑烟酰胺腺嘌呤二核苷酸增加效果有待进一步的研究,烟酰胺单核苷酸的向细胞内的运输机制也尚未阐明。

[0008] 第二,由于多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶-1是细胞中主要的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸消耗物,因此多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶的药理学抑制可使体外和体内的细胞的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸水平增加,并增强乙酰化酶(SIRT1)的活性。因此,多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶抑制剂的开发被认为是治疗代谢异常所伴随的疾病的一种治疗方法。

[0009] 第三,具有如下方法,即,由NAD(P)H:醌氧化还原酶1(NQO1,(NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1))介导的氧化还原反应将NAD(P)H转化为NAD(P)+,使得诱导NAD(P)+/NAD(P)H比率的增加。为了预防及治疗由如肥胖、糖尿病、代谢综合征及退化性疾病等的氧化还原途径的过量摄取能量或变化导致的、与NAD(P)+/NAD(P)H比率的减少相关的疾病,NAD(P)H:醌氧化还原酶1作为可通过增加这些疾病模型中的NAD(P)/NAD(P)H比率的方法来进行开发(Mazence,2007.8.21.,Method for controlling NAD(P)/NAD(P)H ratio by oxidoreducta se.,10-2007-0082557)。据报道,作为NAD(P)H:醌氧化还原酶1活性因子之一的吡喃并1,2-萘醌化合物(Pyrano-1,2-naphthoquinone)(βL)使烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、NAD+/NADH及NADP+/NADPH比率增加。使NAD(P)H:醌氧化还原酶1活性增加的这些化合物的代谢效果需要进行进一步研究。

[0010] 已知对通过体外(in vitro)实验进行培养的神经元细胞、星形胶质细胞和心肌细胞(cardiac myocytes)进行烟酰胺腺嘌呤二核苷酸处理,可使由氧化应激诱导的细胞凋亡减少,在利用啮齿类的体内(in vivo)实验中,当进行外源性(exogenous)烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药时,改善了缺血性脑损伤和心脏肥大(Pillai,V.B.,et al.(2010)."Exogenous NAD+blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway."Journal of Biological Chemistry 285(5):3133-3144;Zheng,C.,et al.(2012)."NAD+administration decreases ischemic brain damage partially by blocking autophagy in a mouse model of brain ischemia." Neuroscience letters 512(2):67-71)。但是,尚未报道有关在动物水平施用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸本身用于肥胖及2型糖尿病的治疗的研究结果。

[0011] 因此,本发明人通过证实烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的直接性全身给药有效地改善肥胖及葡萄糖耐量,从而完成了本发明。

发明内容

[0012] 技术问题

[0013] 本发明的目的在于提供利用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD,nicotinamide adenine dinucleotide)的用于预防及治疗肥胖或糖耐量减低的药学组合物。

[0014] 本发明的再一目的在于,提供利用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的用于预防及改善肥胖或糖耐量减低的食品组合物。

[0015] 本发明的另一目的在于,提供利用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的用于预防及治疗肥胖或糖耐量减低的方法。

[0016] 解决问题的手段

[0017] 为了实现上述目的，本发明提供包含烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD，nicotinamide adenine dinucleotide)或其药学上可接受的盐作为有效成分的用于预防及治疗肥胖或糖耐量减低的药学组合物。

[0018] 本发明一实施例中，上述烟酰胺腺嘌呤二核苷酸可通过调节包括肥胖患者的食物摄取期及食物摄取周期的食物摄取模式来使食物摄取减少。

[0019] 在本发明一实施例中，上述烟酰胺腺嘌呤二核苷酸可使肥胖患者的身体活动量增加。

[0020] 在本发明一实施例中，上述药学组合物能够以腹腔内给药、血管内给药或口服给药方式进行给药。

[0021] 在本发明一实施例中，上述药学组合物进行腹腔内给药时的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药剂量对应每kg可以为0.1mg至100mg，kg为对象个体的体重单位。

[0022] 在本发明一实施例中，进行上述药学组合物的血管内给药时的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药剂量对应每kg可以为0.1mg至100mg，kg为对象个体的体重单位。

[0023] 在本发明一实施例中，上述药学组合物的口服给药时的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药剂量可以为每日1mg至1000mg。

[0024] 并且，本发明提供用于预防及改善肥胖或糖耐量减低的包含烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD，nicotinamide adenine dinucleotide)或其食品学上可接受的盐的食品组合物。

[0025] 在本发明一实施例中，上述烟酰胺腺嘌呤二核苷酸可起到如下功能，即，通过调节包括食物摄取期及食物摄取周期的食物摄取模式来减少食物摄取。

[0026] 进而，本发明提供包括以除了人类之外的哺乳动物作为对象给药烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的步骤的肥胖或糖耐量减低的预防及治疗方法。

[0027] 在本发明一实施例中，上述给药可以为腹腔内给药、血管内给药或口服给药。

[0028] 在本发明一实施例中，上述腹腔内给药时的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药剂量对应每kg可以为以0.1mg至100mg，kg为对象个体的体重单位。

[0029] 在本发明一实施例中，上述血管内给药时的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药剂量对应每kg可以为0.1mg至100mg，kg为对象个体的体重单位。

[0030] 在本发明一实施例中，上述口服时的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药剂量对应每kg可以为0.1mg至1000mg，kg为对象个体的体重单位。

[0031] 在本发明一实施例中，上述给药能够以每日1～3次进行给药。

[0032] 发明的效果

[0033] 本发明的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药表现出了如下的效果，即，改善由高脂肪饮食的摄取引起的肥胖动物模型的异常性食物摄取模式，使运动性增加，从而抑制因高热量摄取导致的体重增加，并且改善葡萄糖耐量(glucose tolerance)。并且，确认了即使利用比以往公知的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的前体更少的量，也可持续如上所述的效果。因此，本发明的包含烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的组合物可有效地用作可有效地预防及治疗肥胖或糖耐量减低的药学组合物或食品组合物。

附图说明

[0034] 图1表示在摄取高脂肪饮食的小鼠中，血浆及下丘脑中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的量减少。为了测定烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的量，将饲喂高脂肪饮食(HFD)或普通饮食(ND)20周的C57BL/6小鼠禁食5小时之后处死，采集血浆及下丘脑，利用高效液相色谱(HPLC，high performance liquid chromatography)来测定了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的量。与饲喂普通饮食的小鼠相比，饲喂高脂肪饮食20周的小鼠在血浆及下丘脑均出现烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的显著减少($P<0.05$)。

[0035] 图2为显示烟酰胺腺嘌呤二核苷酸及烟酰胺单核苷酸的单次(single)血管内给药对食物摄取及体重所涉及的影响的实验结果。(a)向前夜禁食状态的C57BL/6小鼠的血管内单次给药0.2、1及2pmol的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸之后，自由摄取食物，并观察了24小时期间的食物摄取及体重变化。与接受了生理盐水给药的小鼠相比，在接受了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药的小鼠中食物摄取明显减少。食物摄取的减少效果在烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药后的2小时开始显著，在24小时之后也保持了显著水平。(b)为调查烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药后的24小时期间的体重变化的结果。与注射了生理盐水的小鼠相比，在注射0.2pmol的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的小鼠中，24小时期间体重增加显著被抑制。(c)为了与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸比较效果，在前夜禁食的状态下，向C57BL/6小鼠注射了10pmol、100pmol、1000pmol的烟酰胺单核苷酸一次至脑室内。与注射了生理盐水的小鼠相比，在注射了10pmol的烟酰胺单核苷酸的小鼠中食物摄取减少，但烟酰胺单核苷酸的食物摄取的抑制效果比烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(0.2pmol)微弱。(d)在注射后的24小时期间的体重变化中，对照组与烟酰胺单核苷酸-处理组之间未出现大的差异。以上的研究结果表明，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脑室内给药以相对于烟酰胺单核苷酸的1/20的少量也能够诱导更为有效及持续性的食物摄取减少及体重减少。

[0036] 图3为显示烟酰胺腺嘌呤二核苷酸及烟酰胺单核苷酸的单次腹腔内(IP)注射对食物摄取所涉及的影响的实验结果(a)对前夜禁食状态的C57BL/6小鼠，将烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(给药剂量:0.3，1，及3mg/kg)单次腹腔给药之后，测定了24小时期间食物摄取及体重，在烟酰胺腺嘌呤二核苷酸腹腔给药之后4小时时，与注射了生理盐水的小鼠相比，食物摄取显著减少。(b)与注射了生理盐水的小鼠相比，注射了1mg/kg的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的小鼠在烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药后的24小时时，显示出显著减少的食物摄取。(c)向晚间禁食状态的C57BL/6小鼠以单次腹腔(IP)注射了30mg/k、100mg/k及300mg/kg的烟酰胺单核苷酸。与注射了生理盐水的对照组相比，注射了300mg/kg的烟酰胺单核苷酸的小鼠，在给药后4小时时，显示出了显著减少的食物摄取。(d)与对照组相比，烟酰胺单核苷酸-注射小鼠在给药后24小时期间为显示出食物摄取的减少。以上研究结果表明，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸腹腔注射以烟酰胺单核苷酸量的1/300左右的少的量，也能够诱导更为有效的食物摄取减少及体重减少。

[0037] 图4为显示长期的NAD+腹腔注射对体重的影响的实验结果。向以下四组的小鼠(即，腹腔注射了生理盐水的摄取普通饮食的小鼠、腹腔注射了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的摄取普通饮食的小鼠、腹腔注射了生理盐水的摄取高脂肪饮食的肥胖小鼠、腹腔注射了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的摄取高脂肪饮食的肥胖小鼠)每日一次关灯之前腹腔给药烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(0.3mg/kg/day)4周。在摄取普通饮食的正常小鼠中，与注射生理盐水的组相

比，注射烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的组中未观察到显著的体重差异，与之相反，摄取高脂肪饮食的肥胖小鼠与注射生理盐水的组相比，注射烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的组的体重显著减少。这些研究结果表明，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸治疗在正常体重的状态下不导致体重减少，仅仅在肥胖状态下导致体重减少。

[0038] 图5为显示烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的长期腹腔注射对食物摄取的白天周期节律的效果的实验结果。为此，将附图4的实验组中的三个实验组(即，腹腔注射了生理盐水的摄取普通饮食的小鼠、腹腔注射了生理盐水的摄取高脂肪饮食的肥胖小鼠、腹腔注射了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的摄取高脂肪饮食的肥胖小鼠)放在连续实验动物监测系统(CLAMS，continuous lab animal monitoring system，美国Oxymax公司)笼子中，分析了24小时期间的食物摄取模式。(a)注射生理盐水的摄取普通饮食的小鼠主要在晚间(相当于人的白天)摄取食物，在白天几乎不摄取的食物摄取的显著地白天周期节律。另一方面，摄取高脂肪饮食的肥胖小鼠中表现出在晚间食物摄取增加，但在白天食物摄取进一步增加，因而食物摄取模式的白天周期节律破坏。这些现象与从肥胖人群中所观察到的晚间食物摄取增加现象类似。对肥胖小鼠来说，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸注射未使晚间食物摄取显著减少，但使白天的食物摄取显著减少。这些研究结果表明，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸治疗可具有改善肥胖症中的食物摄取的白天周期障碍的效果。(b)当分析食物摄取频率时，与摄取普通饮食的正常小鼠相比，摄取高脂肪饮食的肥胖小鼠增加了食物摄取频率，尤其，白天的食物摄取频率显著增加了。并且，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸治疗将肥胖小鼠频繁的食物摄取抑制在正小鼠的水平。因此，证明了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸治疗具有减少肥胖症中所增加的食物摄取频率的效果。

[0039] 图6为显示烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(0.3mg/kg/日)的慢性腹腔注射对身体活动量的影响的实验结果。(a)将三组(即，摄取普通饮食的腹腔注射生理盐水组、摄取高脂肪饮食的腹腔注射生理盐水组及摄取高脂肪饮食的腹腔注射烟酰胺腺嘌呤二核苷酸组)放入连续实验动物监测系统的笼子中并测定了24小时身体活动量。注射了生理盐水的摄取普通饮食的正常对照组的身体活动量晚间(相当于人的白天)显著高于白天，因此可观察到身体活动量的显著地白天周期节律。反之，施用了生理盐水的摄取高脂肪饮食的肥胖组与对照组相比，夜间的身体活动量显著减少，显示出身体活动量的白天周期节律破坏。肥胖小鼠的4周期间的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的腹腔注射极大地恢复了夜间所降低的运动性。(b)将小鼠移动的身体活动量进行数据化来表示。这些研究结果表明，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药在肥胖症中有效地改善了身体活动量的白天周期障碍。

[0040] 图7为显示烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药对葡萄糖耐量的效果的实验结果。为此，在对正常C57BL/6小鼠进行彻夜禁食的状态下，从腹腔单次施用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg)，30分钟后，以口服的方式施用了葡萄糖(2g/kg)。在葡萄糖给药的前后，在15分钟、30分钟、60分钟及120分钟时在尾静脉采血，利用血糖仪测定了血糖。与注射了生理盐水的小鼠相比，注射了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的小鼠在施用葡萄糖之后，在15分钟及30分钟时血糖显著减少了。这些研究结果表明，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸腹腔给药可改善葡萄糖耐量。

[0041] 最佳实施方式

[0042] 肥胖与衰老及能量摄取的增加有关，而热量限制改善了多种生物体的健康与寿命

(Colman,R.J.,et al.(2009)."Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys."Science 325(5937):201-204)。近来,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸作为代谢、抗逆性及寿命的主要调节因子而备受瞩目。过度的能量摄取与衰老所伴随的下丘脑的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸减少有可能导致伴随于肥胖及衰老的代谢障碍的发生。但是,迄今尚未研究出对施用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸本身对食物摄取、体重及糖代谢的治疗效果,因此本发明人对直接施用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的效果进行了实验。

[0043] 首先,本发明人测定喂养了高脂肪饮食(HFD)的小鼠的血浆及下丘脑的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸水平,并与喂养了正常饮食(ND)的小鼠进行了比较。其结果,喂养了高脂饮食20周的肥胖小鼠与正常小鼠相比,作为血液与食欲以及体重调节中枢的脑的下丘脑观察到了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的量显著减少(图1)。因此,证明了摄取高脂饮食而导致的肥胖症中伴随烟酰胺腺嘌呤二核苷酸缺乏。

[0044] 本发明人调查了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的血管内或腹腔内单次给药对食物摄取及体重的影响效果。与注射生理盐水的情况相比,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的血管内注射在注射后24小时内大大降低了食物摄取及体重增加(图2)。因腹腔内注射的全身性烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药可有效减少与血管内注射差不多的食物摄取(图3)。有意思的是,很少的量(比作为前体的烟酰胺单核苷酸的有效给药剂量低至少100倍)的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸可显著抑制食物摄取和体重。并且,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的效果在腹腔注射之后保持了24小时,但烟酰胺单核苷酸的情况时并非如此。即,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的血管内给药(0.2pmol)在注射后24小时时使体重减少,反之侧脑室注射(ICV)烟酰胺单核苷酸的给药为使体重发生变化。尤其,在食欲抑制作用的方面,更低给药剂量的烟酰胺单核苷酸(10pmol)及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(0.2pmol)比更高给药剂量的烟酰胺单核苷酸(100pmol及1000pmol)及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(1及2pmol)更有效。大部分的毒性效果与给药剂量有关,因而如上所述的这些结果表明抑制由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸及烟酰胺单核苷酸诱导的食物摄取并非起因于非特异性毒性。因此,在治疗性目的方面上,确定烟酰胺腺嘌呤二核苷酸及烟酰胺单核苷酸的最为有效的给药剂量尤为重要。

[0045] 接着,本发明人以喂养了普通饮食(chow-diet)及高脂肪饮食(high fat diet)的小鼠为对象调查了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的长期(chronic)给药(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸0.3mg/kg,4周内1日1次腹腔注射)对体重的影响效果。其结果,在由高脂肪饮食诱导的肥胖小鼠中显著呈现了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的体重减少效果,但在正常喂养饮食的正常小鼠中未呈现出这种效果(图4)。这表明烟酰胺腺嘌呤二核苷酸摄取尤其可对肥胖对象诱导体重减少。

[0046] 由饮食诱导的肥胖小鼠在食物摄取模式中,表现出了白天周期节律的消失,即(对应于人的夜间食物)白天食物摄取增加与白天食物摄取频率的增加。尤其,对肥胖小鼠的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸治疗显著减少白天的食物摄取量与频率(图5),这表现出了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸处理可调正肥胖人的损伤的食物摄取的白天周期节律。

[0047] 额外地,4周的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药还恢复了由饮食诱导的肥胖鼠的晚间所减少的身体活动量(图6)。因此,所增加的身体活动可成为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸摄取的抗-肥胖效果的另一机制。并且,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的长期注射不显现出特别副作用,这表示慢性全身性烟酰胺腺嘌呤二核苷酸处理是安全的。由这些结果可知,全身性烟酰胺

腺嘌呤二核苷酸给药可减少食物摄取，增加运动性，从而可预防因高热量的摄取引起的体重增加。

[0048] 并且，本发明人调查了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的单次给药葡萄糖负荷(glucose challenge)试验期间对血糖的影响效果。葡萄糖给药前向腹腔施用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药时，在葡萄糖给药后15分钟及30分钟时显著降低了血糖，这些研究结果启示着烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药可改善葡萄糖耐量(glucose tolerance)。

[0049] 因此，本发明可提供包含酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD，nicotinamide adenine dinucleotide)或其药学上可接受的盐作为有效成分的用于预防及治疗肥胖或糖耐量减低的药学组合物。本说明书中所使用的术语“预防”是指施用药物疗法(例如，预防剂或治疗剂)或药物疗法的组合物，来阻止在对象体中肥胖或糖耐量减低的症状的发作或复发或发展。在本说明书中所使用的术语“治疗”是指改善或调节肥胖或糖耐量减低患者的症状或至少一种身体参数，或延迟期发生或进展，并且不论患者是否意识到。本说明书中所使用的的术语“药学上可接受的”是指生理学上可接受，并向动物给药时，通常不引起如胃肠功能紊乱、头晕等的过敏反应或与此类似的反应的组合物。本发明的药学组合物可包含一种以上的药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。作为上述载体、赋形剂及稀释剂的例子，可举例为乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、金合欢橡胶、海藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、丙基羟基苯甲酸酯、滑石粉、硬脂酸镁及矿物油。并且，还可包括填料、抗凝剂、润滑剂、润湿剂、香料、乳化剂、防腐剂等。作为适用的载体可举例为包含生理盐水、磷酸盐缓冲盐水，最低基本培养基(MEM)或羟乙基呱嗪乙硫磺酸(HEPES)缓冲液的最低基本培养基的水性介质，但不限定于此。

[0050] 并且，为了能够提供向哺乳动物施用本发明的药学组合物之后，活性成分的快速、持续或延迟的释放，可利用本发明所属技术领域中公知的方法来进行剂型。剂型可以为粉剂、颗粒剂、片剂、乳剂、糖浆、气溶胶、软或硬明胶胶囊、无菌注射液、无菌粉末等的形态。本发明的药学组合物可通过肌肉、皮下、透皮、静脉内、鼻内、腹膜内或口服途径进行给药，优选地，可通过肌肉内或皮下途径进行给药。组合物的给药剂量可根据给药途径、动物的年龄、性别、体重及严重程度等各种因素来适当选择。

[0051] 本发明的药学组合物可剂型化为以下的多种口服或非口服给药形态，但不限定于此。首先，用于口服的固体制剂中包括片剂、药丸、散剂、颗粒剂、硬胶囊或软胶囊等，这种固体制剂可通过在本发明的有效成分中混合至少一种赋形剂来配制。并且单纯的赋形剂以外，还可利用如硬脂酸镁、滑石等的润滑剂。作为用于口服的液态制剂具有悬浮剂、内溶液剂、乳剂、糖浆等，经常使用的单纯稀释剂可包括水、液体石蜡之外的各种赋形剂。并且，本发明的药学组合物可以为非口服给药型，非口服给药型可根据注入皮下注射剂、静脉注射剂、肌肉内注射剂或胸部内注射剂的方法来进行。此时，为了制剂化为非口服给药用剂型，将本发明的有效成分与稳定剂或缓冲剂一同在水中混合，制备溶液或悬浮液，将其制备成安瓿或小瓶的单位给药剂量形式。用于非口服给药的制剂包括无菌水溶液、非水溶剂、悬浮剂、乳剂、冻干制剂、栓剂等。作为非水溶剂、悬浮剂，可使用丙二醇(propyleneglycol)、聚乙二醇、如橄榄油等的植物油或如油酸乙酯等的注射用酯等。

[0052] 并且，本发明的药学组合物可通过多种途径向小鼠、大鼠、家畜、人类等的哺乳动

物进行给药，作为其例子，具有口服、直肠、静脉内、肌肉、皮下、宫内硬膜、脑血管内注射等。本发明的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸可根据患者的年龄、性别、体重来选择适当方法进行给药。

[0053] 作为另一实施方式，本发明的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸可用作功能性食品组合物。本发明的食品组合物有望具有改善烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的抗肥胖或葡萄糖耐量的效果。为了使上述效果增倍，本发明的功能性食品组合物可通过额外地调配其他生理活性成分，即，经稳定性验证的天然抗氧化物质等来制备。本发明的食品组合物并非限定于此，但可制备成选自由例如，片剂、颗粒剂、粉剂、胶囊、液态溶液及丸组成的组中的一种剂型。本发明的食品组合物对其形态不做特别限定，例如，除了普通形态之外，可制备成流质食品、营养食品、保健食品、儿童食品等的形态。在连续摄取的方面，可制备成米饭或各种调味料、组合脂肪或人造黄油、起酥油、蛋黄酱、酱汁等的油脂加工品。并且，形态可利用固体形式、半固体形式、凝胶形式、液体形式、粉末形式等本发明所属技术领域中通常使用的任何形态。并且，本发明的食品组合物能够以糖果、加工食品、组合油脂、乳制品、饮料、维生素复合剂、健康功能性食品类等形态进行商品化。额外地，本发明的食品组合物除了本发明的糖蛋白之外，还可包含各种营养素、维生素、电解质、香料、着色剂及填充剂、果胶酸、海藻酸、有机酸、保护胶体增稠剂、pH调节剂、稳定剂、防腐剂、甘油、酒精、碳酸饮料中使用的碳酸化剂等，这些成分可单独地或组合使用。

[0054] 进而，本发明的特征在于，作为用于治疗肥胖或耐糖症的新型方法，直接施用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸本身，从而治疗效果更优异于现有方法，并根据烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药途径的最佳给药剂量来表征。

[0055] 如上所述，根据给药途径的最佳给药剂量可利用腹腔内给药、血管内给药或口服，优选地，腹腔内给药及血管内给药以对应每kg为0.1mg至100mg的量进行，kg为对象个体的体重单位，优选地，口服时的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药剂量对应每kg为0.1mg至1000mg，kg为对象个体的体重单位。

[0056] 尤其，根据本发明一实施例，证明了以小鼠为对象施用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸来解释了肥胖或耐糖症治疗效果，能够导出这种效果的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药剂量为0.03mg/kg至1000mg/kg，像这样通过动物实验来得到确认的药理上物质的处理浓度通过本发明所属技术领域中公知的以下公式来预算出可适用于人类的药理上物质的处理浓度。

[0057] 人类(Human)适用浓度(mg/kg)＝动物(animal)适用浓度(mg/kg)×动物适用Km指数

[0058] 在这里，Km指数为换算成对于个体的身体(body)的体表面积的所定值，被定为成人(human adult)为37，儿童(human child)为25，小鼠(mice)为3，大鼠(rat)为6。因此，通过这种公式计算，本发明中以小鼠为对象进行的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的处理浓度根据人类(成人)适用浓度来换算成适用浓度时，可处理为0.1mg/kg～3000mg/kg的量，适用于人类(成人)时，在腹腔或血管内给药的情况下，优选地，以0.1mg/kg～300mg/kg的量进行处理，在口服给药的情况下，优选地，以0.1mg/kg～3000mg/kg的量进行处理。更为优选地，适用于人类(成人)时，在腹腔或血管内给药的情况下，能够以0.1mg/kg～100mg/kg的量进行处理，在口服给药的情况下，能够以0.1mg/kg～1000mg/kg的量进行处理。

[0059] 如上所述，当根据各个给药途径的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药剂量超过如上所述的范围时，不仅治疗效果微乎其微，而且可导致体内其他副作用，因此最好在如上所述的

范围内进行给药。

[0060] 以下,根据实施例,进一步详细说明本发明。以下实施例仅用于更加具体地说明本发明,本发明的范围并不局限于这些实施例中,这对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说是显而易见的。

具体实施方式

[0061] 实施例1

[0062] 实验材料及方法

[0063] 1-1实验动物

[0064] 从Orientbio公司(韩国,京畿道)购入成熟的雄性C57BL/6小鼠。除非另有说明,使小鼠自由摄取标准饮食(农标普瑞纳,韩国,首尔)。为了制作饮食-诱导肥胖(diet-induced obesity,DIO)模型,给小鼠喂养高脂肪饮食(60%的脂肪,Research Diet Co.,New Brunswick,NJ)20周。在所调解的温度(22±1℃)及12小时明暗周期(从08:00a.m至8:00p.m为光亮条件)下进行了动物饲养。

[0065] 为了单次给药烟酰胺腺嘌呤二核苷酸及烟酰胺单核苷酸的实验,给8周龄的小鼠从腹腔将烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(从Sigma购入,0.3mg/kg、1mg/kg及3mg/kg)或烟酰胺单核苷酸(从Sigma购入,30mg/kg、100mg/kg及300mg/kg)在晚间禁食之后至早上9-10点时间进行给药。为了长期烟酰胺腺嘌呤二核苷酸治疗,4周内每日在关灯之前从腹腔内注射了一次烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(0.3mg/kg的体重/日(day)。

[0066] 1-2血管内套管插入式(cannulation)及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药

[0067] 通过手术将永久26度不锈钢套管(permanent 26-gauge stainless steel cannulae)插入小鼠的第三脑室(套管插入位置:从前囟(bregma)向后1.8mm,从矢状窦(sagittal sinus)向下5.0mm)。为了手术,将小鼠利用舒泰(Zoletil)及Rumpun混合物(2:1v/v,10μl/g的体重)进行了麻醉。套管的正确插管位置在施用血管紧张素(angiotensin)II(50ng)之后利用致渴反应(positive dipsogenic response)来确认。仅将套管位置准确的小鼠用于数据分析中。手术后经过7日的恢复期间之后,1周期间每日抚摸小鼠规定时间,以使对于实验的应激反应最小化。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸及烟酰胺单核苷酸在给药之前溶于0.9%的生理盐水而使用。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和烟酰胺单核苷酸溶于2μl的生理盐水中并向血管内施用。

[0068] 1-3摄食研究

[0069] 初始光明步骤(light phase)(09:00-11:00)中,以所指示的方法,给夜间禁食的C57BL/6小鼠给药规定给药剂量的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸或烟酰胺单核苷酸。对照组小鼠接受相同量的载体(vehicle,在这种情况下为生理盐水)。注射后的24小时内观察了食物摄取及体重。

[0070] 1-4食物摄取及身体活动量的白天周期模式评价

[0071] 利用连续实验室动物监测系统(CLAMS,Comprehensive Laboratory Animal Monitoring system,哥伦布仪器(Columbus Instruments)制造)来测定了食物摄取量及身体活动量(n=4～5)。光与食物条件保持与原来饲养状态(home cage)相同。在观察过程期间,可以随时喝水。

[0072] 1-5口服葡萄糖耐量试验(Oralglucose tolerance test)

[0073] 为了进行口服葡萄糖耐量试验,使小鼠彻夜禁食,口服给药(oralgavage)2g/kg(体重)的葡萄糖,在口服给药前(0分钟)及给药后15分钟、30分钟、60分钟及120分钟时测定了血糖。在葡萄糖给药30分钟前,从腹腔给药烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(0.3mg/kg、1mg/kg及3mg/kg)。

[0074] 1-6烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的测定

[0075] 利用100μl的1M的$HClO_4$,从血浆(plasma)100μl及下丘脑组织提取烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,添加66μl的3M的K_2CO_2来中性化。15分钟的离心分离(4℃,13000g)之后,将20ml的上清液负荷到高效液相色谱(HPLC)柱(AHima HPC 18AQ 5mM,15x 4.6cm)。

[0076] 高效液相色谱以1ml/min的速度工作,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸以10分钟时的尖的峰值来进行了提取。基于峰值面积,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的量与标准曲线相比进行定量化,利用组织的湿重量(wet weight)进行校正。这参照了Imai Shin的以往的论文中公开的方法(Ramsey,Mills et al.2008,Yoshino,Mills et al.2011)。

[0077] 1-7统计处理

[0078] 数据利用平均±SEM来表示。统计分析利用IBM SPSS(Chicago,Illinois)来进行。各组之间的统计显着性利用单向ANOVA(one-way analysis of variance)及LSD事后检验(post hoc LSD test)或未配对学生t-检验(unpaired Student's t-test)来进行检验。显著性定义为$P<0.05$。

[0079] 实施例2

[0080] 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药在肥胖动物模型中对食物摄取及体重的影响

[0081] 为了测定由饮食摄取诱导肥胖的动物的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的量,对被喂养高脂肪饮食(HFD)或普通饮食(ND)的C57BL/6小鼠,在喂养第20周时,采集血浆及下丘脑进行了用于测定烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的高效液相色谱法(HPLC,high performance liquid chromatography)(图1)。与喂养了普通饮食的小鼠相比,喂养了20周高脂肪饮食的小鼠在血浆及下丘脑均显现出烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的量的显著的减少($P<0.05$)。

[0082] 为了查看烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药对肥胖动物模型的食物摄取的影响,将烟酰胺腺嘌呤二核苷酸进行脑室内或腹腔内给药,并且将以往周知的作为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的前体的烟酰胺单核苷酸作为比较实验对象。首先,为了查看根据脑室内注射的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药对肥胖动物模型的食物摄取的影响,给夜间禁食装填的摄取普通饮食的C57BL/6小鼠向血管内单次给药0.2pmol、1pmol及2pmol的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。与作为对照组的注射了生理盐水的小鼠相比,注射了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸小鼠显现出减少的食物摄取(图2a),食物摄取的减少从烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药后的2小时开始保持了24小时。反之,给夜间禁食状态的摄取普通饮食的C57BL/6小鼠单次脑室内注射10pmol、100pmol及1000pmol的烟酰胺单核苷酸的结果,注射之后24小时时,与注射了生理盐水的小鼠相比,注射了10pmol的烟酰胺单核苷酸小鼠显现出更低的食物摄取(图2c)。

[0083] 并且,为了查看通过腹腔注射的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药对食物摄取的影响,给夜间禁食状态的摄取普通饮食的C57BL/6小鼠向腹腔内单次给药0.3mg/kg、1mg/kg及3mg/kg的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。其结果,注射了1mg/kg的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的小鼠在烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药后的4小时及24小时时均与注射了生理盐水的小鼠相比,食

物摄取显著减少(图3a,图3b)。反之,给夜间禁食状态的C57BL/6小鼠向腹腔内单次给药30mg/kg、100mg/kg及300mg/kg的烟酰胺单核苷酸,其结果,注射了300mg/kg的烟酰胺单核苷酸的小鼠与注射了生理盐水的对照组相比,给药后4小时时显现出显著减少的食物摄取,但在24小时之后,未显现出相比于对照组的食物摄取的减少(图3c,图3d)。

[0084] 并且,查看了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药对肥胖动物模型的体重变化的影响。与脑室内注射生理盐水的小鼠相比,注射了0.2pmol的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的小鼠在施用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸之后的24小时时,显现出显著减少的体重增加(图2b)。反之,对照组与烟酰胺单核苷酸-处理组之间未显现出注射之后24小时内的体重变化(图2d)。

[0085] 进而,确认了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的长期腹腔注射对体重的效果(图4)。将小鼠分为四组(腹腔注射了生理盐水的摄取普通饮食的小鼠、腹腔注射了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的摄取普通饮食的小鼠、腹腔注射了生理盐水的摄取高脂肪饮食的小鼠、腹腔注射了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的摄取高脂肪饮食的小鼠),对此,4周1次施用腹腔给药剂量(0.3mg/kg/日)的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。摄取普通饮食的非肥胖小鼠中,与生理盐水给药组相比,在烟酰胺腺嘌呤二核苷酸给药期间的体重未出现显著差异,但摄取高脂肪饮食的肥胖小鼠因烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药而诱导了显著的体重减少。

[0086] 并且,如下确认了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的长期腹腔注射对食物摄取的效果。为了调查烟酰胺腺嘌呤二核苷酸腹腔注射对食物摄取的慢性效果,对以下三组小鼠4周内每日一次施用了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(0.3mg/kg)或生理盐水:摄取普通饮食的腹腔内生理盐水注射组,摄取高脂肪饮食的腹腔内生理盐水注射组及摄取高脂肪饮食的腹腔内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸注射组。

[0087] 注射生理盐水的摄取普通饮食的小鼠主要在夜间(相当于人类的白天)摄取食物,白天几乎不摄取食物,由此显现出了食物摄取的显著地白天周期节律。另一方面,摄取高脂肪饮食的肥胖小鼠中夜间也增加食物摄取,但在白天进一步增加食物摄取,因而显现出食物摄取模式的白天周期节律破坏。对于肥胖小鼠烟酰胺腺嘌呤二核苷酸注射并未显著地减少夜间食物摄取,但使白天的食物摄取显著减少。这种研究结果表明,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸治疗在肥胖症中对食物摄取的白天周期障碍具有改善的效果(图5b)。

[0088] 实施例3

[0089] 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药对肥胖动物模型的身体活动性的影响

[0090] 为了实验烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(0.3mg/kg/日)的慢性腹腔注射对肥胖动物模型的运动性的影响,将这些小鼠分为摄取普通饮食的腹腔内注射生理盐水组、摄取高脂肪饮食的腹腔内注射生理盐水组及摄取高脂肪饮食的腹腔内注射烟酰胺腺嘌呤二核苷酸组的三组,并进行了运动性评价。注射生理盐水的摄取普通饮食的正常对照组的身体活动量在夜间(相当于人类的白天)比白天显著高,因此观察到身体活动量的显著白天周期节律。反之,施用生理盐水的摄取高脂肪饮食的肥胖组的夜间的身体活动量比对照组显著减少,因此显现出身体活动量的白天周期节律破坏。肥胖小鼠的4周期间的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的腹腔注射极大地恢复了夜间的减少的运动性(参照图6a及6b)。

[0091] 实施例4

[0092] 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的给药对葡萄糖耐量的影响

[0093] 图7为示出烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的单次腹腔注射对葡萄糖耐量的效果的实验结

果。为了调查烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的单次腹腔注射对葡萄糖耐量的影响，对处于夜间禁食状态的摄取普通饮食的C57BL/6小鼠进行了口服葡萄糖耐量试验。单次施用腹腔内给药剂量的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(0.3mg/kg、1mg/kg及3mg/kg)，30分钟后口服葡萄糖(2g/kg)之后，在15分钟、30分钟、60分钟及120分钟测定了血糖。注射了烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的小鼠与注射了生理盐水的小鼠相比，在葡萄糖负荷后15分钟及30分钟显现出更低的血糖量。

[0094] 到目前为止，重点查看了本发明的多个优选实施例。本发明所属技术领域的普通技术人员应理解在不脱离本发明的本质特征的范围内以变形的形态来体现本发明。因此所公开的多个实施例应在说明性的观点来进行考虑而不是限定性的观点。本发明的范围出现在发明要求保护范围内，而不是前述的说明中，与其等同范围内的所有不同点应解释为包括在本发明中。

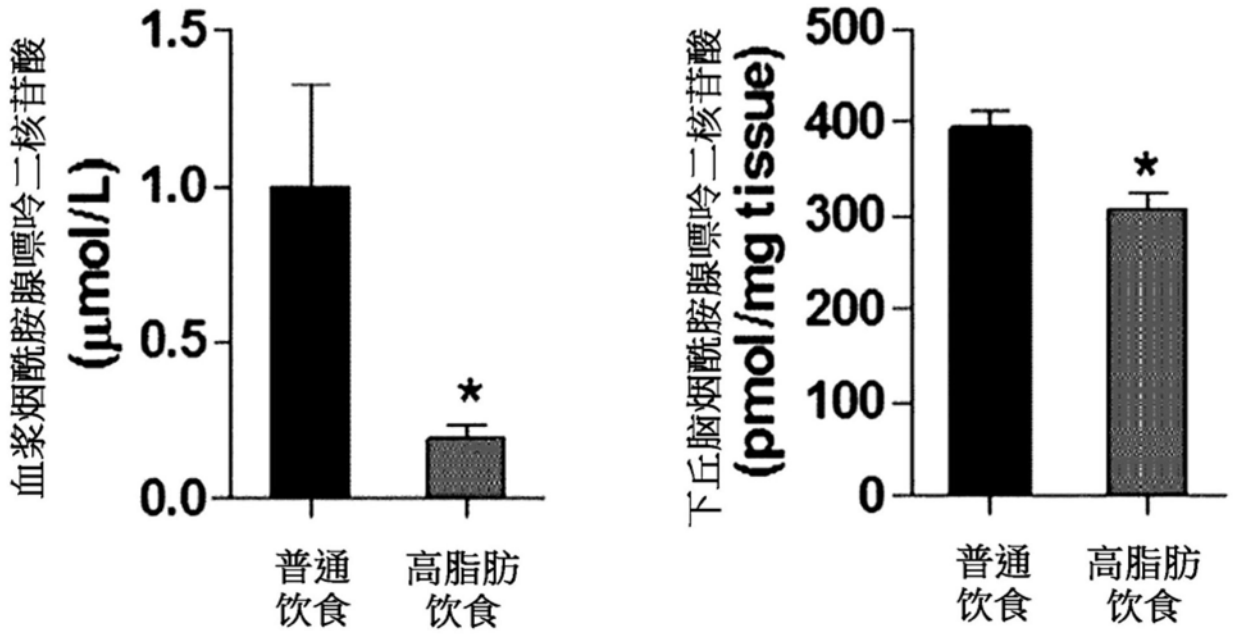
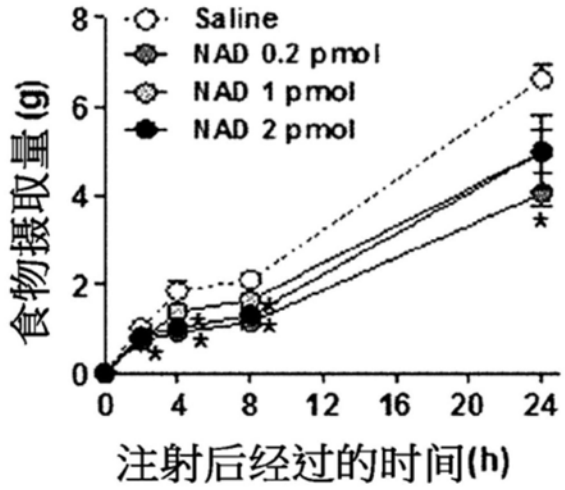
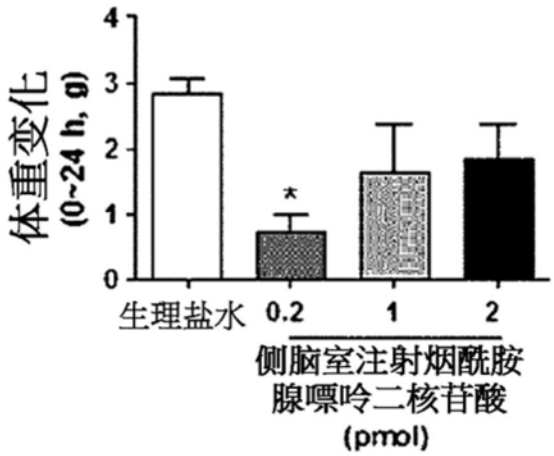

血浆烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
(μmol/L)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
普通饮食
高脂肪饮食
下丘脑烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
(pmol/mg tissue)
500
400
300
200
100
0
*
普通饮食
高脂肪饮食

图1

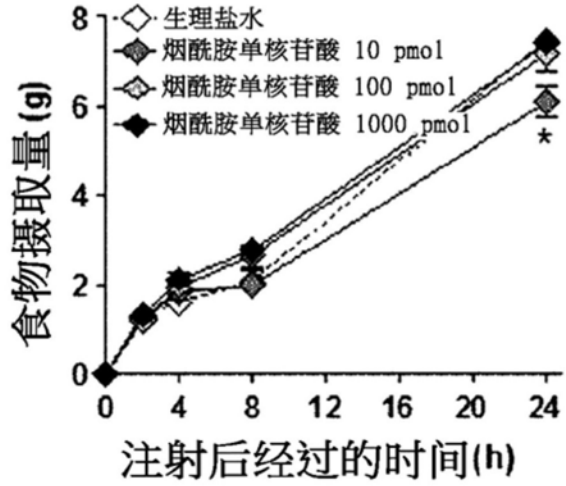
A部分



B部分



C部分



D部分

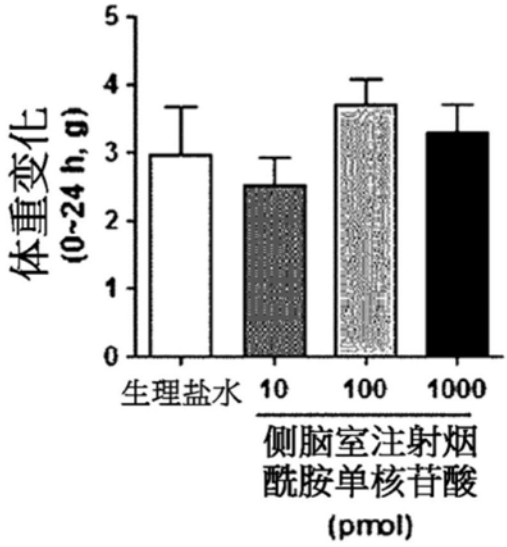


图2

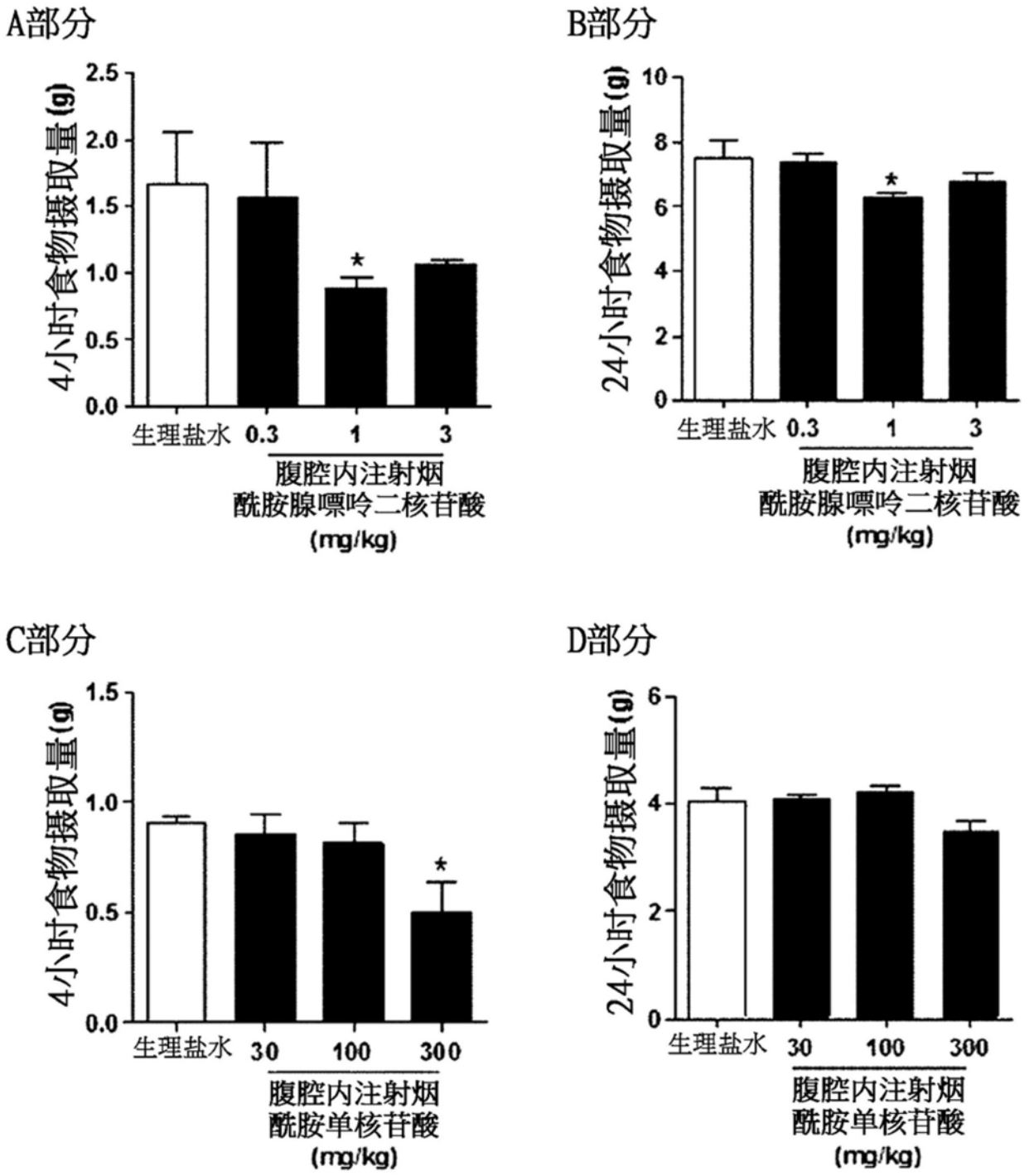

A部分
4小时食物摄取量(g)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
生理盐水
0.3
1
3
*
腹腔内注射烟
酰胺腺嘌呤二核苷酸
(mg/kg)
B部分
24小时食物摄取量(g)
10
8
6
4
2
0
生理盐水
0.3
1
3
*
腹腔内注射烟
酰胺腺嘌呤二核苷酸
(mg/kg)
C部分
4小时食物摄取量(g)
1.5
1.0
0.5
0.0
生理盐水
30
100
300
*
腹腔内注射烟
酰胺单核苷酸
(mg/kg)
D部分
24小时食物摄取量(g)
6
4
2
0
生理盐水
30
100
300
腹腔内注射烟
酰胺单核苷酸
(mg/kg)

图3

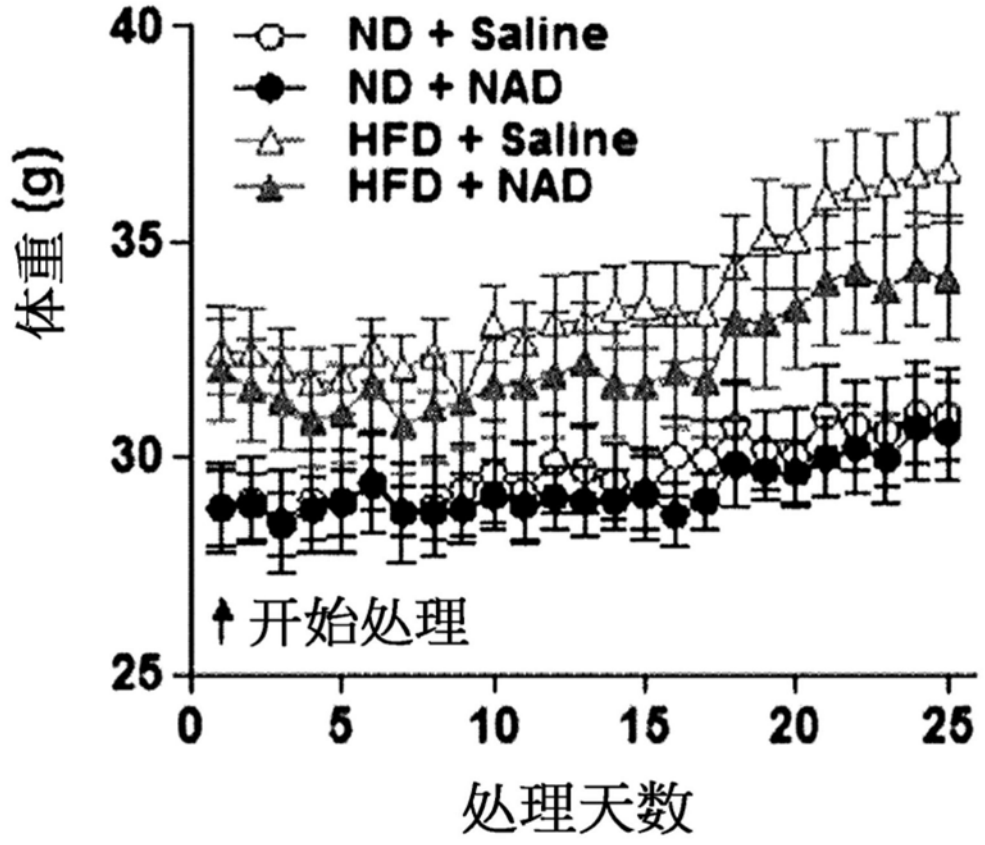

ND + Saline
ND + NAD
HFD + Saline
HFD + NAD
体重(g)
40
35
30
25
开始处理
0
5
10
15
20
25
处理天数

图4

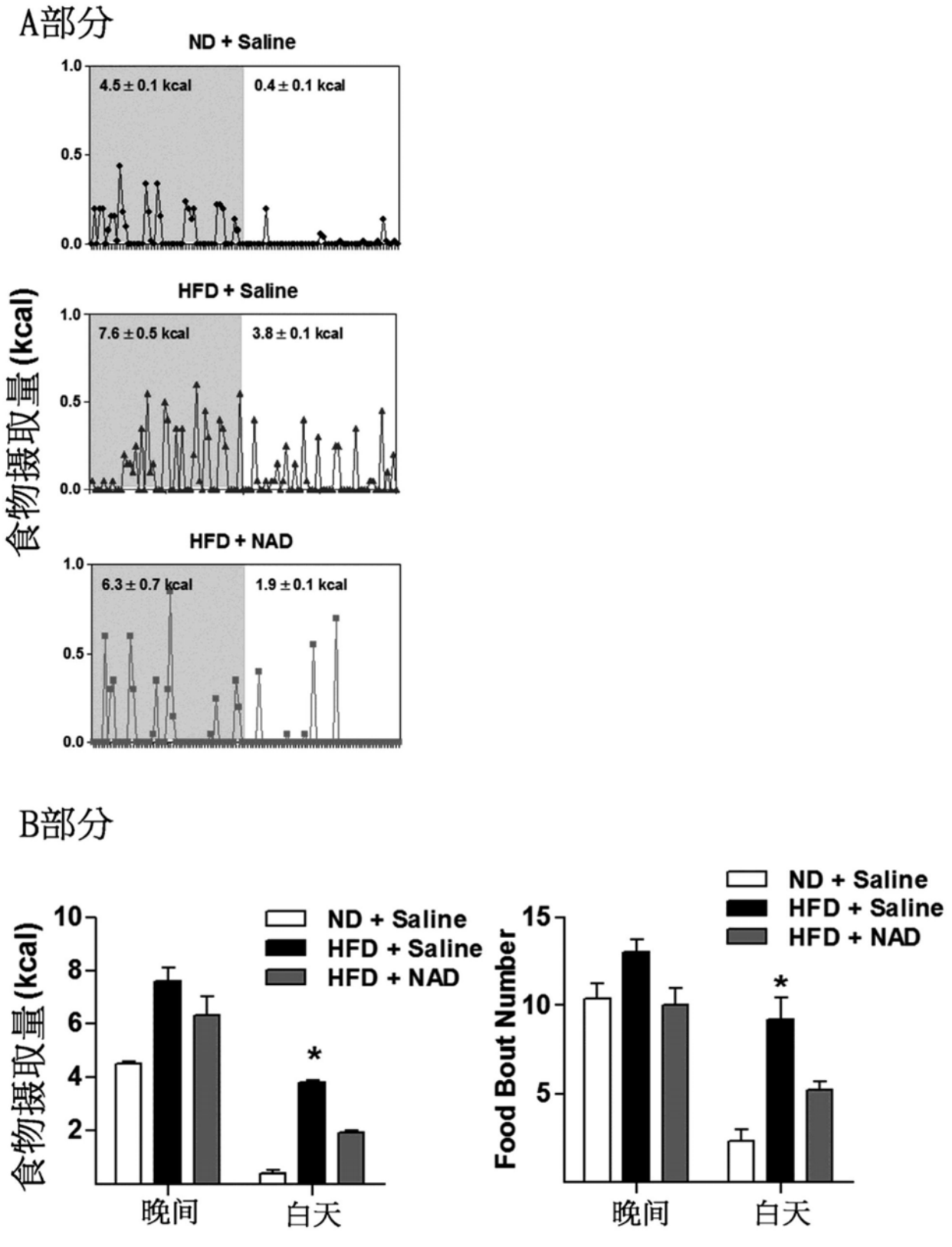

A部分
ND + Saline
4.5 ± 0.1 kcal
0.4 ± 0.1 kcal
HFD + Saline
7.6 ± 0.5 kcal
3.8 ± 0.1 kcal
HFD + NAD
6.3 ± 0.7 kcal
1.9 ± 0.1 kcal
食物摄取量 (kcal)
1.0
0.5
0.0
B部分
食物摄取量 (kcal)
Food Bout Number
ND + Saline
HFD + Saline
HFD + NAD
晚间
白天
*

图5

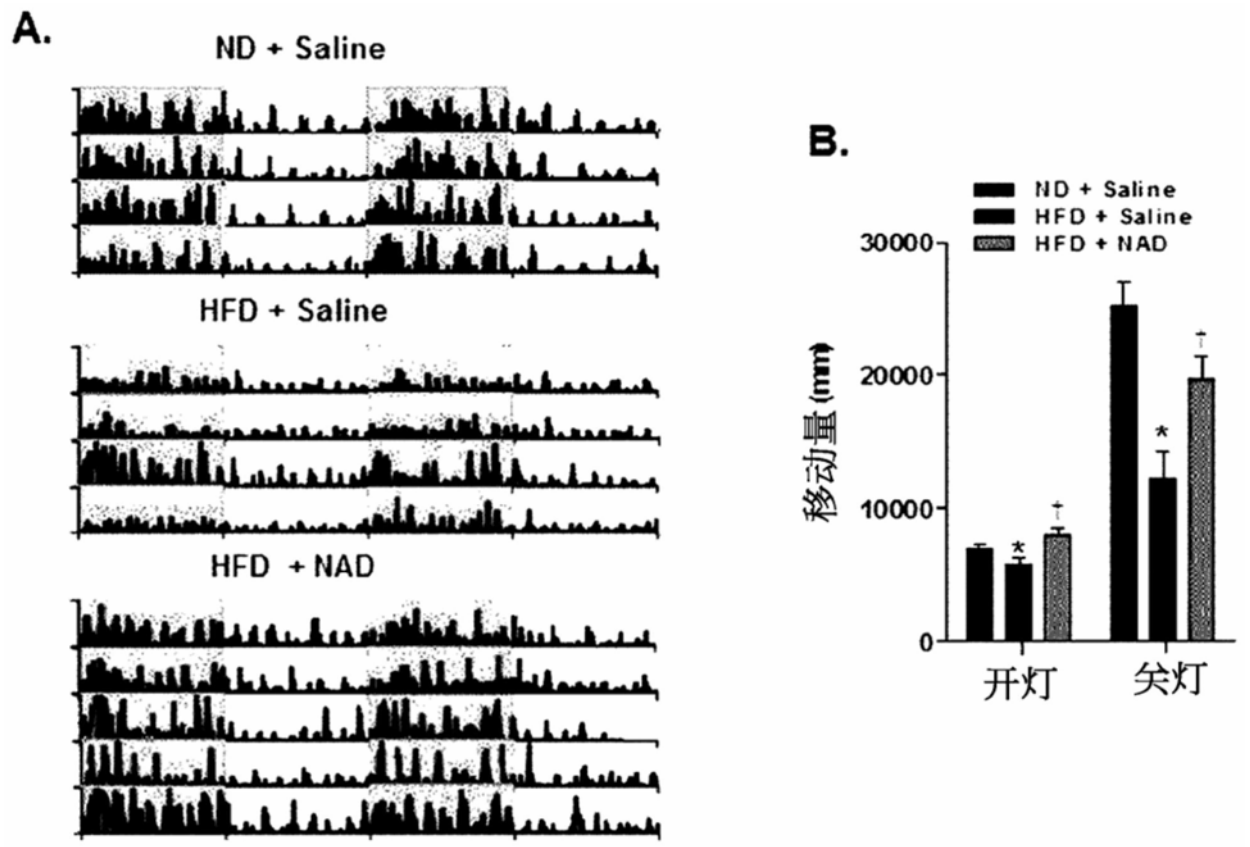

A.
ND + Saline
HFD + Saline
HFD + NAD
B.
ND + Saline
HFD + Saline
HFD + NAD
移动量 (mm)
30000
20000
10000
0
开灯
关灯

图6

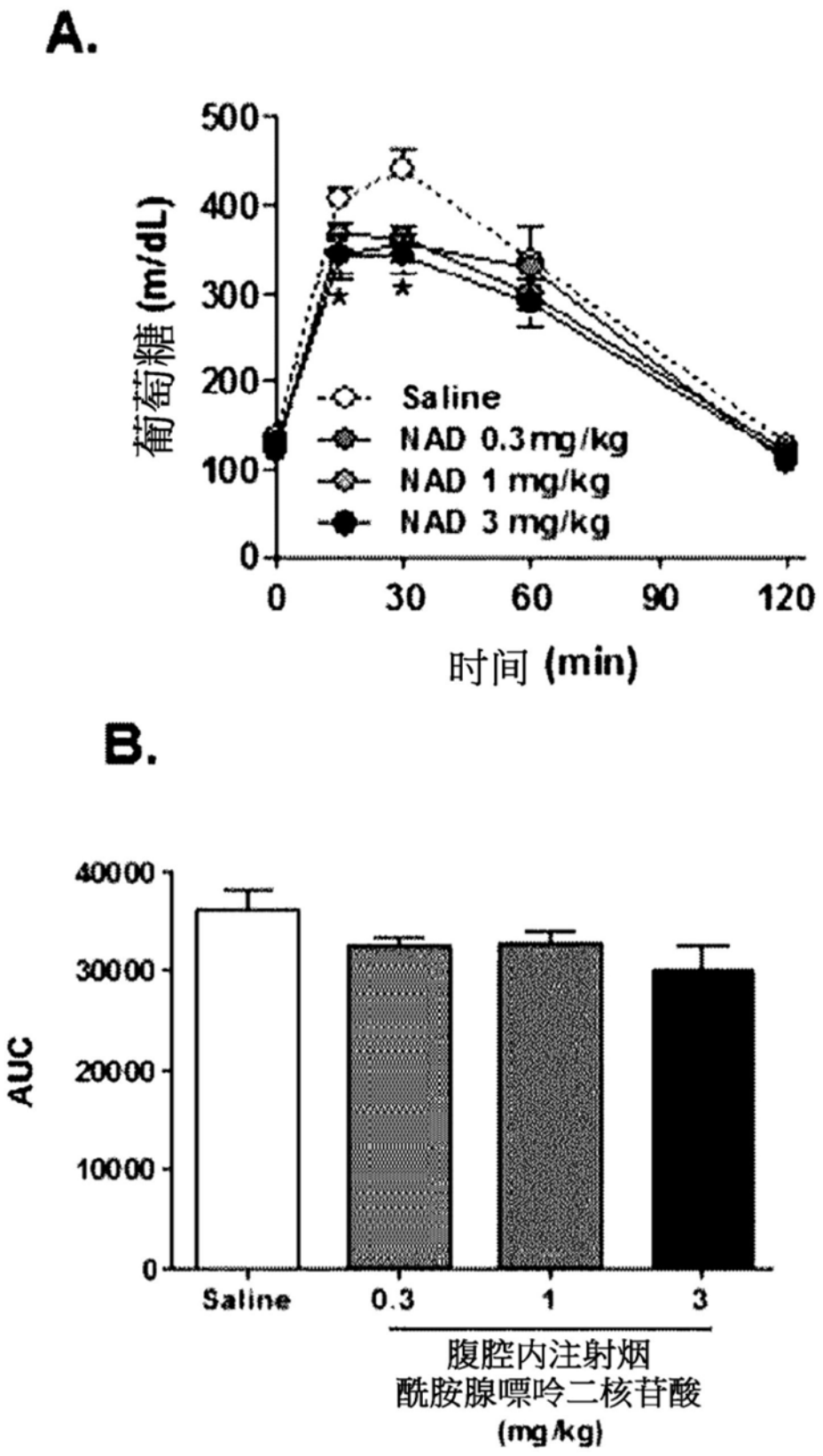

A.
葡萄糖 (m/dL)
500
400
300
200
100
0
Saline
NAD 0.3mg/kg
NAD 1 mg/kg
NAD 3 mg/kg
0
30
60
90
120
时间 (min)
B.
AUC
40000
30000
20000
10000
0
Saline
0.3
1
3
腹腔内注射烟
酰胺腺嘌呤二核苷酸
(mg/kg)

图7