



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104093410 B

(45)授权公告日 2018.04.27

(21)申请号 201380008424.6

(22)申请日 2013.02.08

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104093410 A

(43)申请公布日 2014.10.08

(30)优先权数据

61/596,480 2012.02.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.08.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/025294 2013.02.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/119917 EN 2013.08.15

(73)专利权人 佛罗里达大学研究基金会有限公
司

地址 美国佛罗里达州

(72)发明人 萨达希瓦·维佳萨加尔

保罗·奥库尼夫 张鲁榕

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.

A61K 31/70(2006.01)

A61K 31/505(2006.01)

A61K 9/16(2006.01)

A61K 9/14(2006.01)

A61P 1/12(2006.01)

审查员 池雪琴

权利要求书1页 说明书19页 附图6页

(54)发明名称

用于治疗腹泻的物质和方法

(57)摘要

本发明提供了用于治疗胃肠疾病和病症(例如腹泻)、提供再水化、纠正电解质与流体失衡和/或改善小肠功能的治疗组合物和方法。在一个实施方案中,本发明提供了配制为用于经肠施用的组合物,其中所述组合物不包含葡萄糖。在一个优选实施方案中,将所述组合物配制成作为经口再水化饮品施用。

1. 治疗组合物在制备用于通过经肠施用治疗患有腹泻之对象的药物中的用途，
其中所述组合物包含一种或更多种选自以下的游离氨基酸：赖氨酸、苏氨酸、缬氨酸和丝氨酸；电解质；和水；
并且其中葡萄糖转运蛋白的任何底物以及可水解成葡萄糖转运蛋白之底物的任何化合物如果存在于所述组合物中的话，则其以低于0.6mM的浓度存在。
2. 根据权利要求1所述的用途，其中所述对象患有轮状病毒诱发的腹泻。
3. 根据权利要求1所述的用途，其中所述对象是人。
4. 根据权利要求3所述的用途，其中所述对象的年龄为五岁或更小。
5. 根据权利要求1所述的用途，其中经口施用所述组合物。
6. 根据权利要求1所述的用途，其中所述组合物不包含葡萄糖或葡萄糖类似物，所述葡萄糖类似物选自 α -甲基-D-吡喃葡萄糖苷、3-O-甲基葡萄糖、脱氧-D-葡萄糖、 α -甲基-D-葡萄糖和半乳糖。
7. 根据权利要求6所述的用途，其中所述组合物不包含 α -甲基-D-吡喃葡萄糖苷 (AMG)、3-O-甲基葡萄糖 (3-OMG)、脱氧-D-葡萄糖或 α -甲基-D-葡萄糖。
8. 根据权利要求1所述的用途，其中所述组合物不包含任何碳水化合物。
9. 根据权利要求1所述的用途，其中所述组合物还包含一种或更多种选自以下的游离氨基酸：色氨酸、甘氨酸、酪氨酸、天冬氨酸以及异亮氨酸。
10. 根据权利要求9所述的用途，其中所述组合物还包含一种或更多种选自以下的电解质： Na^+ 、 K^+ 、 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 和 Cl^- 。
11. 根据权利要求1所述的用途，其中所述组合物基本由以下组成：一种或更多种选自赖氨酸、苏氨酸、缬氨酸和丝氨酸的游离氨基酸，以及任选地，一种或更多种选自丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、色氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、精氨酸和酪氨酸的游离氨基酸；一种或更多种选自 Na^+ 、 K^+ 、 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 和 Cl^- 的电解质；水；以及任选地，一种或更多种载体、缓冲剂、防腐剂和/或矫味剂。
12. 根据权利要求1所述的用途，其中所述组合物基本由以下组成：一种或更多种选自赖氨酸、甘氨酸、苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、色氨酸和丝氨酸的游离氨基酸；一种或更多种选自 Na^+ 、 K^+ 、 HCO_3^- 、 Ca^{2+} 和 Cl^- 的电解质；水；以及任选地，一种或更多种载体、缓冲剂、防腐剂和/或矫味剂。
13. 根据权利要求1所述的用途，并且其中葡萄糖转运蛋白的任何底物以及可水解成葡萄糖转运蛋白之底物的任何化合物如果存在于所述组合物中的话，则其以低于0.05mM的浓度存在。
14. 根据权利要求1所述的用途，其中所述组合物还包含天冬氨酸、甘氨酸、异亮氨酸和酪氨酸。
15. 一种包装，其包含组合物，所述组合物如权利要求1中定义，或者所述包装包含当与特定量的水组合时形成组合物的粉末，所述组合物如权利要求1中定义。
16. 根据权利要求15所述的包装，其为粉末形式，当所述粉末形式与水组合时形成组合物，所述组合物如权利要求1中定义。
17. 根据权利要求15所述的包装，其还包含用于将所述组合物施用于患有腹泻之对象的说明书。

用于治疗腹泻的物质和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2012年2月8日提交的序列号为61/596,480的美国临时申请的权益,其通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 轮状病毒感染是全世界范围婴幼儿严重腹泻疾病和脱水的首要原因。轮状病毒感染的症状包括水样腹泻(watery diarrhea)、严重脱水、发热以及呕吐。轮状病毒感染还可导致空肠病变,在接种后第三天发生最大损伤,并且在一些情况下,导致绒毛表面积减小至正常水平的30%至50%(Rhoads等,(1996) J.Diarrhoeal Dis.Res.14(3):175-181)。

[0004] 轮状病毒诱发腹泻的病理生理学机制是通过肠毒素-非特异性蛋白-4(NSP4)对小肠上皮细胞的作用。NSP4动员小肠隐窝上皮细胞和大肠隐窝上皮细胞二者中的胞内 Ca^{2+} ,从而模拟胆碱能激动剂卡巴胆碱(CCh)在增强cAMP依赖性流体分泌中的分泌作用。

[0005] 已知胞内cAMP ($[\text{cAMP}]_i$) 和 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 的增加在与感染性病症及炎性病症相关的腹泻中介导 Cl^- 和/或 HCO_3^- 分泌(Zhang等,(2007) J Physiol 581(3):1221-1233)。由氯离子的分泌而产生的渗透梯度导致水被动运输至小肠腔内,从而导致水样便。在正常的消化和吸收期间,发生较少量的 Cl^- 分泌及水被动运输,这对于适当的混合、搅拌以及顺利推进通过肠腔是必要的。在正常的吸收性小肠中,在发生于绒毛细胞区中的吸收与从隐窝细胞分泌之间存在着微妙的平衡。由降低的吸收、升高的分泌或其组合效果而导致的失衡(imbalance)可引起腹泻。

[0006] 钙激活氯离子通道(calcium activated chloride channel,CaCC)参与重要的生理过程。用针对由IL-4调控的每种膜蛋白的特异性小干扰RNA转染上皮细胞揭示,未知功能的推定质膜蛋白家族成员TMEM16A与钙依赖性氯离子流有关(Caputo等,(2008) Science 322(5901):590-594)。TMEM16A在哺乳动物组织中广泛表达,所述组织包括气管、肠以及胃肠道中的腺上皮细胞、平滑肌细胞和卡哈尔(Caial)间质细胞(Namkung 等,J.Biol.Chem.286(3):2365-2374)。

[0007] 在小肠中肠细胞对腔葡萄糖的吸收遵循继发性主动运输(Hediger等,(1994) Physiol.Rev.74(4):993-1026;Wright等,(2004) Physiology (Bethesda) 19:370-376)。钠-葡萄糖转运蛋白(SGLT-1)的化学计量(stoichiometry)为2:1,因此,对于一个葡萄糖分子跨腔膜转运两个钠离子(Chen等,(1995) Biophys.J.69(6):2405-2414)。紧密偶联的钠葡萄糖转运由通过Na-K-ATP酶活性形成的 Na^+ 电化学梯度驱动。SGLT-1介导的产电 Na^+ 吸收导致溶剂牵引,从而导致水从腔中被动吸收。

[0008] 水化的维持在治疗包括轮状病毒诱发之腹泻在内的腹泻疾病中是关键要素。目前,用经口再水化饮品(oral rehydration drink,ORD)(包含钠和大量葡萄糖以及其他糖分子的盐溶液)来治疗分泌性腹泻。在肠内流体和胃肠外流体二者中,葡萄糖一直是用于纠正与疾病病症相关的电解质和营养物质吸收缺陷的主要依靠。ORD被设计成纠正在分泌性腹泻中流体和电解质的损失,其基于这样的理论,在小肠中主动、偶联地摄入钠和葡萄糖之

后,在吸收状态的运输后存在随后水的流入。

[0009] 虽然ORD在霍乱和其他腹泻病症的治疗中提供重大突破,但是其效力仍然需要改进。需要改进的制剂是因为现有ORD制剂提供差的再水化速率。腹泻患者的再水化速率跟不上电解质损失的速率。现有ORD制剂示出在治疗轮状病毒诱发的腹泻中无效,而导致该无效的确切原因仍然未知。因此,存在对用于治疗腹泻之改进ORD制剂的需要。

发明内容

[0010] 本发明提供了用于治疗胃肠疾病和病症(例如腹泻)、提供再水化、纠正电解质与流体失衡和/或改善小肠功能的治疗组合物和方法。

[0011] 在一个实施方案中,本发明提供了配制为用于经肠施用的组合物,其中所述组合物不包含葡萄糖。在一个优选实施方案中,所述组合物被配制为经口再水化饮品(ORD)。在另一个优选实施方案中,所述组合物为粉末形式,并且可在水中重构用作ORD。

[0012] 在一个实施方案中,本发明的组合物包含一种或更多种选自以下的成分:游离氨基酸;电解质;二肽和/或寡肽;维生素;以及任选地,水、可治疗用载体、赋形剂、缓冲剂、矫味剂、着色剂和/或防腐剂。在一个实施方案中,所述组合物的总渗量(total osmolality)为约100毫渗摩尔(mosm)至250毫渗摩尔。在一个实施方案中,所述组合物的pH为约2.9至7.3。

[0013] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种治疗,该治疗包括通过经肠途径将有效量的本发明组合物施用于有此治疗需要的对象。所述组合物可每天施用一次或多次。在一个优选实施方案中,经口施用所述组合物。

[0014] 在一个优选实施方案中,本发明提供了对由轮状病毒感染和/或NSP4诱发之腹泻的治疗方法。在另一个优选实施方案中,本发明导致降低的 Cl^- 和/或 HCO_3^- 分泌,和/或提高的流体吸收。

附图说明

[0015] 图1示出了 Na^+ 偶联的葡萄糖转运以及 Na^+ 偶联的3-O-甲基葡萄糖(3-OMG)转运的饱和和动力学。(A)腔葡萄糖浓度升高导致 I_{sc} 的浓度依赖性升高。用Michaelis-Menten模型对酶动力学的非线性曲线拟合示出 $V_{\text{max}}=3.3\pm0.19\mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$,并且 $K_{\text{m}}=0.24\pm0.06\text{mM}$ 。(B) 3-OMG腔浓度升高导致 I_{sc} 的浓度依赖性升高,并且 $V_{\text{max}}=1.9\pm0.13\mu\text{eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, $K_{\text{m}}=0.22\pm0.07\text{mM}$ 。当与未经H-89预处理的组织相比时,经H-89预处理的组织中3-OMG浓度的升高导致 I_{sc} 显著降低。(C) 在经根皮苷(phlorizin)预处理的组织中添加升高浓度的3-OMG示出对葡萄糖无应答。这些值从 $n=6$ 个组织中获得。

[0016] 图2示出 Na^+ (A)和 Cl^- (B)的单向通量和净通量。(A)用0mM、0.6mM或6mM浓度的葡萄糖孵育小肠组织未导致 $J_{\text{ms}}\text{Cl}^-$ 的显著差异。葡萄糖引起小肠中 $J_{\text{sm}}\text{Cl}^-$ 升高。具体地,当与0mM葡萄糖相比时,在存在0.6mM和6mM葡萄糖的情况下 $J_{\text{sm}}\text{Cl}^-$ 显著更高。在0mM葡萄糖下,观察到显著的 Cl^- 吸收(当与在0.6mM和6mM葡萄糖下的 Cl^- 吸收水平相比时),而在0.6mM和6mM葡萄糖下,观察到 Cl^- 的分泌。(B)在0mM葡萄糖下,在小肠组织中观察到 Na^+ 的净吸收。在0.6mM葡萄糖下观察到最小的 Na^+ 吸收,而在6mM葡萄糖下观察到显著的 Na^+ 吸收。在0mM、0.6mM或6mM葡萄糖下,单向通量(J_{ms} 和 J_{sm})未示出显著差异。这些值从 $n=8$ 个组织中获得。

[0017] 图3示出葡萄糖和3-O-甲基-葡萄糖对回肠的绒毛、隐窝和全细胞级分中胞内cAMP水平的影响。(A) 毛喉素(forskolin)处理以相似的方式显著提高隐窝细胞和绒毛细胞的胞内cAMP水平。(B) 用8mM葡萄糖孵育细胞导致在绒毛细胞中胞内cAMP水平显著升高,但是在隐窝细胞中并非如此。(C) 分别用葡萄糖和3-O-甲基-葡萄糖孵育由绒毛和隐窝上皮细胞二者组成的黏膜碎屑导致胞内cAMP水平显著升高。用6mM的3-O-甲基-葡萄糖孵育细胞导致胞内cAMP水平较小但显著升高。用不同浓度的葡萄糖孵育细胞对胞内cAMP水平产生相似的影响。柱(column)表示平均值,并且短线(bar)表示S.E.M。这些值从n=4只不同小鼠中获得,重复三次。用各级分的蛋白质水平对cAMP水平进行标准化(standardize),并表示为 $\text{pmol}(\text{mg蛋白质})^{-1}$ 。与添加毛喉素或葡萄糖之后的组相比,* $P<0.001$;经盐水处理的绒毛细胞与经葡萄糖处理的绒毛细胞之间比较,# $P<0.01$ 。NS=无显著性(Bonferroni's多重比较)。

[0018] 图4示出葡萄糖和3-O-甲基-葡萄糖对Caco-2细胞中胞内 Ca^{2+} 水平的影响。(A) 当与对照相比时,用0.6mM葡萄糖孵育Caco-2细胞导致荧光升高。当与对照和0.6mM葡萄糖相比时,用6mM葡萄糖孵育导致荧光显著升高。在用1,2-双(邻氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA-AM)预孵育(45分钟的时间)的细胞中,葡萄糖未能刺激胞内 Ca^{2+} 水平的任何升高。与相似浓度的葡萄糖相比,用3-OMG孵育导致葡萄糖刺激的胞内 Ca^{2+} 水平的升高显著较低。(B) 示出由0.6mM和6mM浓度的葡萄糖刺激的胞内 Ca^{2+} 水平升高的代表性迹线。

[0019] 图5示出显示 Cl^- 依赖性 HCO_3^- 分泌和 Cl^- 非依赖性 HCO_3^- 分泌的pH稳态(pH stat)实验的结果。(A) 在不存在葡萄糖的情况下, Cl^- 非依赖性 HCO_3^- 分泌水平最低。在存在6mM葡萄糖的情况下,去除腔 Cl^- 不导致 HCO_3^- 分泌的显著降低。(B) 阴离子交换抑制剂和阴离子通道阻断剂对 HCO_3^- 分泌的影响。实验在存在腔 Cl^- 的情况下进行。在不存在葡萄糖的情况下,100 μM 4,4'-二异硫氰基-2,2'-二苯乙烯二磺酸(DIDS)的添加消除了 HCO_3^- 分泌,而10 μM 5-硝基-2-(3-苯基丙基氨基)-苯甲酸(NPPB)对 HCO_3^- 分泌没有任何抑制作用。在存在6mM葡萄糖的情况下,NPPB抑制 HCO_3^- 分泌,而DIDS并非如此。这些值从不同小鼠的n=6个组织中获得。 $P<0.001$ 。

具体实施方式

[0020] 本发明提供了用于治疗胃肠疾病和病症(例如腹泻)、提供再水化、纠正电解质与流体失衡和/或改善小肠功能的治疗组合物和方法。

[0021] 在一个实施方案中,本发明提供了配制为用于经肠施用的组合物,其中所述组合物不包含葡萄糖。在一个优选实施方案中,所述组合物被配制为经口再水化饮品(ORD)。在另一个优选实施方案中,所述组合物为粉末形式,并且可在水中重构用作ORD。

[0022] 在一个实施方案中,本发明的组合物包含一种或更多种选自以下的成分:游离氨基酸;电解质;二肽和/或寡肽;维生素;以及任选地,水、可治疗用载体、赋形剂、缓冲剂、矫味剂、着色剂和/或防腐剂。在一个实施方案中,所述组合物的总渗量为约100毫渗摩尔至250毫渗摩尔。在一个实施方案中,所述组合物的pH为约2.9至7.3。在一个实施方案中,本发明提供了一种治疗,该治疗包括通过经肠途径将有效量的本发明组合物施用于有此治疗需要的对象。所述组合物可每天施用一次或多次。在一个优选实施方案中,经口施用所述组合物。

[0023] 在一个优选实施方案中,本发明提供了对由轮状病毒感染和/或NSP4诱发的腹泻

的治疗。在另一个优选实施方案中,本发明导致降低的 Cl^- 和/或 HCO_3^- 分泌,和/或提高的流体吸收。

[0024] 葡萄糖对阴离子分泌的诱导

[0025] 根据本发明,发现腔葡萄糖在小肠中诱导净离子分泌。特别地,葡萄糖诱导由升高的胞内cAMP和 Ca^{2+} 水平介导的主动氯离子分泌。另外,在高葡萄糖浓度下,小肠中的净 Na^+ 转运是吸收性的。此外,葡萄糖导致小肠中碳酸氢根离子的分泌。

[0026] 本发明人已示出,胞内cAMP水平的升高介导 Cl^- 和/或 HCO_3^- 分泌。 Cl^- 和/或 HCO_3^- 的分泌主要由囊性纤维化跨膜传导调控子(CFTR)离子通道介导,该离子通道具有许多(约20个)潜在的丝氨酸和苏氨酸磷酸化位点。已知蛋白激酶A(PKA)和蛋白激酶C(PKC)活化CFTR阴离子通道。在膜片钳研究中,已示出除非由PKA持续地活化,否则CFTR通道迅速失活(“停止运转(run down)”),这显示出PKA在CFTR活化中的重要性。与该发现一致的是,用强效的PKA抑制剂H89预处理小肠细胞导致葡萄糖激发的 I_{sc} 净升高显著降低。

[0027] 已示出PKA拮抗剂抑制在暴露于葡萄糖后SGLT1蛋白质的表达(Dyer等,(2003) Eur. J. Biochem. 270 (16):3377-3388)。CFTR通道由cAMP依赖性蛋白激酶(PKA)活化,导致阴离子分泌。在小肠中葡萄糖刺激的 I_{sc} 升高部分地由CFTR介导的离子转运介导。

[0028] 葡萄糖以及PKA激动剂(例如,cAMP)已示出提高SGLT1向刷状缘膜的运输(Wright等,(1997) J. Exp. Biol. 200 (Pt2):287-293;Dyer等,(2003) Eur. J. Biochem. 270 (16):3377-3388)。 V_{max} 的降低表明离子流(current)的总体降低,这代表葡萄糖转运的降低。 V_{max} 的降低可由主要在绒毛上皮细胞发现的葡萄糖转运蛋白SGLT1总数的减少而导致。绒毛的损失导致可用于将葡萄糖摄入细胞的转运蛋白的显著损失。

[0029] 已发现,用葡萄糖孵育肠细胞使胞内cAMP水平升高。在绒毛细胞中观察到比在隐窝细胞中葡萄糖诱导的胞内cAMP水平的更大升高。用毛喉素孵育肠细胞使隐窝细胞和绒毛细胞二者中的胞内cAMP水平升高(图3A)。SGLT1介导的葡萄糖转运主要在绒毛细胞中而非在隐窝细胞中发生,因为在绒毛区中定位有比隐窝区更大数目的SGLT-1(Knickelbein等,(1988) J. Clin. Invest. 82 (6):2158-2163)。因此,升高隐窝细胞中的葡萄糖浓度不导致升高的cAMP应答(图3B)。

[0030] 即便在低浓度(例如,0.6mM葡萄糖,约为其 V_{max} 的一半)下,腔葡萄糖也诱导净阴离子分泌。在较高的葡萄糖浓度下,钠吸收占主导。升高的腔葡萄糖浓度使胞内cAMP水平和 Ca^{2+} 水平升高。此前的研究显示, Na^+ 偶联的葡萄糖转运的 K_m 为0.2mM至0.7mM(Lo&Silverman (1998) J. Biol. Chem. 273 (45):29341-29351)。

[0031] 在经H-89预处理的细胞中,剩余的葡萄糖介导 I_{sc} 升高的存在表明在葡萄糖诱导的阴离子分泌中存在PKA非依赖途径。跨越小肠产电的阴离子分泌由离子通道介导,基于其活化机制可分成例如通过cAMP、 Ca^{2+} 、细胞体积和膜电位活化。

[0032] 还发现,腔葡萄糖诱导胞内 Ca^{2+} 水平的升高。此外,葡萄糖诱导的 Cl^- 分泌由PKA依赖途径及PKA非依赖途径介导。这表明,除了CFTR之外,钙激活氯离子通道(CaCC)也在葡萄糖诱导的阴离子分泌中起作用。

[0033] 此外,葡萄糖刺激产电 HCO_3^- 分泌。用葡萄糖孵育的小肠细胞在含腔 Cl^- 的溶液中表现出比在不含腔 Cl^- 的溶液中更高的 HCO_3^- 分泌水平(图4A和4B)。这些结果表明,阴离子通道在葡萄糖的存在下介导 HCO_3^- 分泌。此外,当与未添加葡萄糖的细胞相比时,葡萄糖的添加导

致 Cl^- - HCO_3^- 交换的轻微降低。该降低程度可次于用葡萄糖使胞内cAMP水平升高的程度。这也表明,葡萄糖诱导阴离子通道介导的分泌并且抑制电中性的 Cl^- - HCO_3^- 交换。

[0034] 此外,分别用阴离子通道阻断剂(100mM NPPB)和阴离子交换抑制剂(100mM DIDS)孵育小肠细胞。NPPB(100mM)对葡萄糖诱导的、阴离子通道介导的 HCO_3^- 分泌存在显著的抑制($4.2 \pm 0.7 \text{mEq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 相对于 $7.6 \pm 1.5 \text{mEq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)。

[0035] 在阴离子通道抑制剂的存在下,仍然观察到残余的 HCO_3^- 分泌。这表明,在葡萄糖介导的分泌中存在 Cl^- - HCO_3^- 交换。这还表明,在正常消化功能期间,以及在某些疾病病症中,提高的胞内钙水平可抑制钠-氢交换蛋白3(NHE3)的活性。这还表明,SGLT1起双重作用,既调节钠离子吸收,并且有时又刺激分泌性缺陷和/或吸收性缺陷。

[0036] 对葡萄糖诱导的分泌机制的发现可用于治疗包括腹泻在内的胃肠疾病。患有急性腹泻疾病的患者常常在上胃肠道中发生受损的葡萄糖吸收。未被吸收的碳水化合物的存在可在肠中产生渗透性影响,从而导致腹泻。此外,葡萄糖使胞内 Ca^{2+} 和/或cAMP水平升高,并诱导阴离子分泌。葡萄糖的分泌性影响此前被并行发生的 Na^+ -葡萄糖吸收所替代或掩盖。此外,由于其分泌性影响,葡萄糖的施用特别加剧了伴有受损的 Na^+ -葡萄糖吸收的胃肠疾病,例如,克罗恩病以及辐射或化学治疗诱导的伴有绒毛缩短的肠炎,从而极度影响吸收。

[0037] 在轮状病毒感染期间,虽然经钠依赖的葡萄糖共转运蛋白(SGLT-1)(主要在绒毛细胞中表达)的葡萄糖偶联的 Na^+ 吸收占主导,但是在小肠中也存在显著的经钙激活氯离子通道(CaCC或TMEM-16a)的钙激活的 Cl^- 分泌。此外,胞内葡萄糖活化钙激活的氯离子和流体分泌。非结构蛋白(NSP4)是由轮状病毒产生的肠毒素。发现当葡萄糖和NSP4一起施用时导致细胞中持续的氯离子分泌。因此,包含大量葡萄糖的现有ORD制剂进一步使钙刺激的氯离子分泌升高,从而使轮状病毒诱发的腹泻恶化。

[0038] 治疗组合物

[0039] 在一个方面,本发明提供了用于治疗胃肠疾病和病症(例如腹泻)、提供再水化、纠正电解质与流体失衡和/或改善小肠功能的治疗组合物。

[0040] 在一个实施方案中,所述组合物配制为用于经肠施用,并且不含葡萄糖。在一个优选实施方案中,将所述组合物配制成经口再水化饮品。在另一个优选实施方案中,所述组合物为粉末形式,并且可在水中重构用作经口再水化饮品。

[0041] 在另一个实施方案中,所述组合物不包含任何葡萄糖转运蛋白的底物。在另一个具体的实施方案中,所述组合物不包含钠依赖性葡萄糖共转运蛋白(SGLT-1)的激动剂,所述激动剂包括但不限于:葡萄糖类似物(例如,SGLT-1的不可代谢的葡萄糖激动剂)以及其他碳水化合物(例如糖)。

[0042] 在本领域中已知的SGLT-1的多种底物包括但不限于:不可代谢的葡萄糖类似物,例如, α -甲基-D-吡喃葡萄糖苷(AMG)、3-O-甲基葡萄糖(3-OMG)、脱氧-D-葡萄糖和 α -甲基-D-葡萄糖;以及半乳糖。可基于本领域已知的激动剂测定来选择葡萄糖转运蛋白(例如,SGLT-1)的底物。此外,可对葡萄糖和其他碳水化合物(例如糖)进行结构修饰以得到葡萄糖转运蛋白(例如,SGLT-1)的底物。

[0043] 在一个实施方案中,所述组合物不包含葡萄糖。在另一个实施方案中,所述组合物不包含碳水化合物(例如,二糖、寡糖或多糖)或者可水解成葡萄糖或葡萄糖转运蛋白(例如,SGLT-1)底物的其他化合物。

[0044] 在一个实施方案中,所述组合物包含选自以下的一种或更多种成分、基本由选自以下的一种或更多种成分组成或由选自以下的一种或更多种成分组成:游离氨基酸;电解质;二肽和/或寡肽;维生素;以及任选地,水、可治疗用载体、赋形剂、缓冲剂、矫味剂、着色剂和/或防腐剂。

[0045] 在另一个替代实施方案中,所述组合物包含选自以下的一种或更多种成分、基本由选自以下的一种或更多种成分组成或由选自以下的一种或更多种成分组成:游离氨基酸;电解质;二肽和/或寡肽;维生素;以及任选地,水、可治疗用载体、赋形剂、缓冲剂、矫味剂、着色剂和/或防腐剂;

[0046] 其中,葡萄糖转运蛋白(例如,SGLT-1)的底物(例如,葡萄糖、葡萄糖类似物)和/或可水解成葡萄糖转运蛋白(例如,SGLT-1)底物的化合物(例如碳水化合物)如果存在于所述组合物中的话,则其以低于0.05mM的总浓度或低于0.05mM的任何浓度存在,包括但不限于低于0.04mM、0.03mM、0.02mM、0.01mM、0.008mM、0.005mM、0.003mM、0.001mM、0.0005mM、0.0003mM、0.0001mM、 10^{-5} mM、 10^{-6} mM或 10^{-7} mM。在一个实施方案中,所述抗腹泻组合物不包含糖。在另一个实施方案中,所述抗腹泻组合物不包含葡萄糖转运蛋白(例如,SGLT-1)的底物(例如,葡萄糖、葡萄糖类似物)和/或可水解成葡萄糖转运蛋白(例如,SGLT-1)底物的化合物(例如,碳水化合物)。

[0047] 可用于本发明的抗腹泻组合物的氨基酸包括但不限于:丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、色氨酸和酪氨酸。

[0048] 在一个实施方案中,本发明提供了抗腹泻组合物,其中所述组合物包含以下成分、基本由以下成分组成或者由以下成分组成:游离氨基酸,赖氨酸、甘氨酸、苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、色氨酸和丝氨酸;以及任选地,由选自以下的一种或更多种游离氨基酸形成的二肽或寡肽:赖氨酸、甘氨酸、苏氨酸、缬氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、色氨酸和丝氨酸;可治疗用载体;电解质;缓冲剂;防腐剂;以及矫味剂。

[0049] 在一个实施方案中,所述抗腹泻组合物中所含的氨基酸为L形式。在一个实施方案中,所述治疗组合物中所含的游离氨基酸可以中性形式或盐形式存在。

[0050] 在一个实施方案中,所述治疗组合物还包含一种或更多种选自以下的电解质: Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 HCO_3^- 和 Cl^- 。在一个实施方案中,所述治疗组合物包含氯化钠、碳酸氢钠、氯化钙和/或氯化钾。

[0051] 在某些实施方案中,每种游离氨基酸可以以4mM至40mM的浓度、或其间的任何值存在,其中所述组合物的总渗量为约100毫渗摩尔至250毫渗摩尔。本文所用术语“基本由……组成”将成分和步骤的范围限制为指定的物质或步骤,以及不实质上影响本发明的基本特征和新特征的那些,例如,用于治疗胃肠疾病和病症(在某些实施方案中,其为治疗腹泻,例如轮状病毒诱发的腹泻)、提供再水化、纠正电解质与流体失衡和/或改善小肠功能的组合物和方法。例如,通过使用“基本由……组成”,所述治疗组合物不包含任何未指定的成分,包括但不限于:对治疗胃肠疾病和病症(在某些实施方案中,其为治疗腹泻,例如轮状病毒诱发的腹泻)、提供再水化、纠正电解质与流体失衡和/或改善小肠功能具有直接的有益治疗效果或不利治疗效果的未指定的游离氨基酸、二肽、寡肽或多肽或者蛋白质;单糖、二糖、寡糖或多糖;或者碳水化合物。

[0052] 此外,通过使用术语“基本由……组成”,所述组合物可包含对治疗胃肠疾病和病症(在某些实施方案中,其为治疗腹泻,例如轮状病毒诱发的腹泻)、提供再水化、纠正电解质与流体失衡和/或改善小肠功能不具有治疗效果的物质;这样的成分包括:对治疗胃肠疾病和病症(在一个实施方案中,其为治疗腹泻)、提供再水化、纠正电解质失衡和/或改善小肠功能无影响的载体、赋形剂、矫味剂、着色剂以及防腐剂等。

[0053] 本文所用术语“寡肽”是指由3至20个氨基酸组成的肽。

[0054] 本文所用术语“寡糖”是指由3至20个单糖组成的糖。本文所用术语“碳水化合物”是指具有通式 $C_n(H_2O)_n$ 的化合物,其中n为1以上的整数;并且包括单糖、二糖、寡糖和多糖。

[0055] 在一个实施方案中,所述组合物的总渗量为约100毫渗摩尔至250毫渗摩尔,或者其间的任何值,包括但不限于120毫渗摩尔至220毫渗摩尔、150毫渗摩尔至200毫渗摩尔,以及130毫渗摩尔至180毫渗摩尔。

[0056] 在另一个实施方案中,所述组合物的总渗量为约230毫渗摩尔至280毫渗摩尔,或者其间的任何值。优选地,总渗量为约250毫渗摩尔至260毫渗摩尔。在另一个实施方案中,所述组合物的总渗量为低于280毫渗摩尔的任何值。

[0057] 在某些实施方案中,所述组合物的pH为约2.9至7.3,或者其间的任何值,包括但不限于:pH为3.3至6.5、3.5至5.5以及4.0至5.0。

[0058] 在某些实施方案中,所述组合物的pH为约7.1至7.9,或者其间的任何值。优选地,所述组合物的pH为约7.3至7.5,更优选约7.2至7.4,或者更优选约7.2。

[0059] 在某些实施方案中,所述组合物不包含一种或更多种选自以下的成分:寡糖或多糖或碳水化合物;寡肽或多糖或蛋白质;脂质;短链脂肪酸、中链脂肪酸和/或长链脂肪酸;和/或含有一种或更多种上述营养物的食物。

[0060] 胃肠疾病和病症的治疗

[0061] 本发明的另一方面提供了用于治疗胃肠疾病和病症的方法。在某些实施方案中,本发明可用于治疗腹泻、提供再水化、纠正电解质与流体失衡和/或改善小肠功能。在一个优选实施方案中,本发明提供了对轮状病毒诱发的腹泻的治疗。在另一个优选实施方案中,本发明提供了对由NSP4诱发的腹泻的治疗。

[0062] 在一个实施方案中,所述方法包括通过经肠途径将有效量的本发明组合物施用于有此治疗需要的对象。所述组合物可每天施用一次或多次。在一个实施方案中,经口施用所述组合物。

[0063] 在一个优选实施方案中,本发明提供了降低的 Cl^- 和/或 HCO_3^- 分泌,和/或升高的流体吸收。

[0064] 本文所用术语“治疗”或其任何语法变化形式包括但不限于:缓解或减轻疾病或病症的症状;和/或减轻疾病或病症的严重程度。在某些实施方案中,治疗包括以下的一种或更多种:在患有腹泻的对象中缓解或减轻腹泻、减轻腹泻的严重程度、减少腹泻的持续时间、促进肠的治愈、提供再水化、纠正电解质失衡、促进小肠黏膜治愈,以及提高绒毛高度。

[0065] 本文所用术语“有效量”是指能够治疗或减轻疾病或病症,或能够以其他方式产生预期的治疗效果的量。

[0066] 本文所用术语“对象”或“患者”描述了可用根据本发明提供的组合物治疗的生物体,包括哺乳动物,例如灵长类。可从所公开的治疗方法受益的哺乳动物物种包括但不限

于：猿(ape)、黑猩猩(chimpanzee)、猩猩(orangutan)、人、猴；家养动物(domesticated animal)，例如，狗、猫；家畜(livestock)，例如，马、牛、猪、绵羊、山羊、鸡；以及其他动物，例如，小鼠、大鼠、豚鼠和仓鼠。

[0067] 在一个实施方案中，人对象是年龄小于一岁或者比一岁小的任何年龄的婴儿，例如，10个月大、6个月大以及4个月大。在另一个实施方案中，人对象是年龄小于五岁或比五岁小的任何年龄的幼儿，例如，四岁、三岁以及两岁。在一个实施方案中，需要本发明的治疗的对象遭受腹泻。

[0068] 在一个实施方案中，本发明可用于治疗腹泻。在某些实施方案中，本发明可用于治疗由病原体感染引起的腹泻，所述病原体感染包括但不限于由以下感染：病毒，包括但不限于轮状病毒、诺瓦克病毒、巨细胞病毒和肝炎病毒；细菌，包括但不限于弯曲杆菌(*campylobacter*)、沙门氏菌(*salmonella*)、志贺氏菌(*shigella*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)；寄生虫，包括但不限于兰伯氏贾第虫(*Giardia lamblia*)和隐孢子虫(*cryptosporidium*)。在一个优选实施方案中，本发明可用于治疗轮状病毒诱发的腹泻。

[0069] 在某些实施方案中，本发明可用于治疗由对小肠的损伤引起的腹泻，所述损伤由例如感染、毒素、化学物质、醇、炎症、自身免疫疾病、癌症、化学治疗、放射治疗、质子治疗以及胃肠外科手术引起。

[0070] 在某些实施方案中，本发明可用于治疗由包括但不限于以下的疾病引起的腹泻：包括克罗恩病和溃疡性结肠炎在内的炎性肠病(IBM)；肠易激综合征(IBM)；自身免疫性肠病；小肠结肠炎(enterocolitis)；以及乳糜泻(ceeliac disease)。

[0071] 在某些实施方案中，本发明可用于治疗由以下引起的腹泻：胃肠外科手术；胃肠切除；小肠移植；术后创伤；以及放射治疗、化学治疗和质子治疗诱发的肠炎。

[0072] 在另一个实施方案中，本发明可用于治疗醇相关的腹泻。在另一个实施方案中，本发明可用于治疗旅行者腹泻或由食物中毒引起的腹泻。

[0073] 在某些实施方案中，本发明可用于治疗由对小肠黏膜的损伤引起的腹泻，例如，在小肠中存在绒毛高度降低、黏膜表面积减小，以及绒毛萎缩(例如，绒毛区和刷状缘部分或完全萎缩)的腹泻病症。在某些实施方案中，本发明可用于治疗由对小肠黏膜上皮细胞的损伤引起的腹泻，所述小肠黏膜上皮细胞包括十二指肠、空肠和回肠的黏膜层。

[0074] 在一个实施方案中，本发明可用于治疗分泌性腹泻。在某些实施方案中，本发明可用于治疗通过CFTR通道和/或CaCC通道(例如，TMEM-16a)介导的分泌性腹泻。在一个实施方案中，本发明可用于治疗急性和/或慢性腹泻。

[0075] 在一个实施方案中，本发明可用于治疗由营养物质吸收不良引起的腹泻。在一个实施方案中，本发明可用于治疗由葡萄糖转运蛋白(例如，SGLT-1)降低的功能活性水平引起的分泌性腹泻。

[0076] 本文所用术语“腹泻”是指在24小时内发生三次或更多次未成形的、松散的或水样的大便的病症。“急性腹泻”是指持续不超过四周的腹泻病症。“慢性腹泻”是指持续超过四周的腹泻病症。

[0077] 在一个实施方案中，本发明未涉及施用一种或更多种选自以下的成分：葡萄糖、葡萄糖类似物、葡萄糖转运蛋白(例如，SGLT-1)的底物、二糖、寡糖或多糖；碳水化合物；或者

可水解成葡萄糖或葡萄糖转运蛋白(例如,SGLT-1)底物的分子。

[0078] 在某些替代实施方案中,本发明包括施用一种或更多种选自以下的成分:葡萄糖、葡萄糖类似物、葡萄糖转运蛋白(例如,SGLT-1)的底物、二糖、寡糖或多糖;碳水化合物;或者可水解成葡萄糖或葡萄糖转运蛋白(例如,SGLT-1)底物的分子,其中这些成分的总浓度低于0.05mM或为低于0.05mM的任何浓度,包括但不限于,低于0.04mM、0.03mM、0.02mM、0.01mM、0.008mM、0.005mM、0.003mM、0.001mM、0.0005mM、0.0003mM、0.0001mM、 10^{-5} mM、 10^{-6} mM或 10^{-7} mM。

[0079] 制剂和施用

[0080] 本发明提供了包含治疗有效量的主题组合物并且任选地包含可药用载体的治疗组合物或药物组合物。这样的药物载体可为无菌液体,例如水。所述治疗组合物还可包含对治疗胃肠疾病和病症(其中,在一个实施方案中,为对腹泻的治疗)、提供再水化、纠正电解质与流体失衡和/或改善小肠功能无影响的赋形剂、矫味剂、着色剂和防腐剂等。

[0081] 在一个实施方案中,所述治疗组合物和其中包含的所有成分都是无菌的。在某些优选实施方案中,将所述组合物配制成饮品,或者所述组合物为粉末形式,并且可在水中重构用做饮品。

[0082] 术语“载体”是指与化合物一起施用的稀释剂、辅料、赋形剂或载剂。合适的药物载体的实例在由E.W.Martin所著的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中描述。这样的组合物包含治疗有效量的所述治疗组合物,以及合适量的载体以得到用于适当施用于患者的形式。所述制剂应当适合经肠施用模式。

[0083] 本发明还提供了药物包(pharmaceutical pack)或药盒(kit),其包含一个或更多个装有一种或更多种成分(例如,本发明的化合物、载体或药物组合物)的容器。所述组合物的成分可分开包装或者可混合到一起。所述药盒还可包含用于将所述组合物施用于患者的说明书。

[0084] 物质和方法

[0085] 动物准备

[0086] 通过CO₂吸入继之以颈脱位(cervical dislocation)来处死正常饲喂的8周龄雄性NIH Swiss小鼠。轻轻地移出小肠,在冰冷的林格液(Ringer's solution)中洗涤并冲洗该段。然后如此前所述通过穿过黏膜下层剥离将黏膜与浆膜和肌肉层分离(Zhang等,(2007) J Physiol 581 (3):1221-1233)。放血(exsanguination)后,从靠近盲肠的10cm节段获取回肠黏膜。全部实验都得到了佛罗里达大学实验动物管理和施用委员会(University of Florida Institutional Animal Care and Use Committee)的批准。

[0087] 生物电测量

[0088] 在回肠片上进行离子转运研究。然后将组织安放在暴露表面积为0.3cm²的尤斯(Ussing)型Lucite室(P2304,Physiologic Instruments,San Diego,CA,USA)的两半之间。将经95%O₂:5%CO₂鼓泡的常规林格液(115mM NaCl,25mM NaHCO₃,4.8mM K₂HPO₄,2.4mM KH₂PO₄,1.2mM MgCl₂和1.2mM CaCl₂)在两侧用作组织的溶液,并且将温度恒定地维持在37℃。平衡该室以消除渗透压力和静水压力。此外补偿因流体导致的阻力。使组织稳定。用计算机控制的电压/电流钳装置(VCC MC-8,Physiologic Instruments)记录基础(basal)短路电流(I_{sc})和相应的电导率(G)。

[0089] 通量研究

[0090] 使用钠的同位素 ^{22}Na 来研究在基础条件下的跨黏膜Na通量,然后添加葡萄糖。分配导电配对的组织,以研究表征分泌功能的浆膜至黏膜通量(J_{sm}),以及表征吸收功能的黏膜至浆膜通量(J_{ms})。将 ^{22}Na 添加至指定的组织侧,并且每15分钟从另一侧收集500 μl 样品。在独立的组织组中,将 ^{36}Cl 添加至浆膜侧或黏膜侧。将8mM浓度的葡萄糖添加于室中用于完全刺激,并记录相应的 I_{sc} 和电导率变化。基于欧姆定律记录电导率。

[0091] 在各条件下收集三次样品。用 γ 计数器对放射性进行计数。电导率的变化低于10%的组织是匹配的,并且计算平均 $J_{\text{net}} = J_{\text{ms}} - J_{\text{sm}}$ 。

[0092] 蛋白激酶A (PKA) 抑制剂研究

[0093] 用100 μM 不可逆蛋白激酶A (PKA) 抑制剂H-89 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) 处理具有相似电导率和电流的配对组织,或者不进行该处理。用H-89孵育组织30分钟。每五分钟添加升高浓度的葡萄糖(0.015mM至8mM),并记录峰值电流。用相应的 K_{m} 和 V_{max} 计算经处理组织和未经处理组织的饱和动力学常数。

[0094] Caco-2细胞培养

[0095] Caco-2细胞在汇合后分化成具有胚胎回肠上皮功能特征的细胞。Caco-2细胞产生微绒毛,并且具有包括SGLT1在内的小肠特异性转运蛋白的上调表达,因此其被广泛用作研究肠细胞功能的模式系统。

[0096] Caco-2细胞得自ATTC,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 和5% CO_2 下培养于补充有10%胎牛血清(FCS)和1%非必需氨基酸的杜氏改良伊格尔培养基(Dulbeco's modified Eagle's medium)中。将Caco-2细胞传代20至25次,然后接种于5cm培养皿上(2×10^5 个细胞/皿),并使其生长直至80%汇合,此时将FCS浓度改变为5%。使细胞再生长10天,然后将其用于功能研究。

[0097] 共聚焦 Ca^{2+} 荧光显微镜检查

[0098] 将在25mm圆盖玻片中生长的Caco2细胞安放在与20级串联适配器(series20stage adaptor)连接的浴室RC-21BR上(Warner Instruments, CT USA)。使用单通道台式加热控制器(single channel table top heater controller) (TC-324B, Warner Instruments, CT USA) 将细胞维持在37 $^{\circ}\text{C}$ 。在室温下用浓度为0.5 μM 的荧光钙指示剂Fluo-8AM染料(货号#0203, TEFLab, Inc., Austin, TX USA) 加载细胞,并孵育45分钟。使用Fluoview1000IX81倒置显微镜(Olympus, Tokyo, Japan) 和U Plan S-Apo的20 $\times$ 物镜进行激光共聚焦扫描显微检查。通过氩激光器在488nm处激发并在515nm处发射来记录荧光。用扫描共聚焦显微镜收集荧光图像。使用由VC-8阀控制器(Warner instruments, Hamden CT, USA) 控制的多阀灌注系统(VC-8, Warner instruments, Hamden CT, USA) 将林格液、含葡萄糖的林格液或含BAPTA-AM的葡萄糖-林格液添加至浴中。记录变化,并对多种细胞进行荧光测量。用林格液洗涤细胞,并使用3-O-甲基葡萄糖和卡巴胆碱(阳性对照) 重复该实验。

[0099] cAMP比色度测量

[0100] 在37 $^{\circ}\text{C}$ 下,于含有1.2mM Ca^{2+} 的林格液中洗涤新分离的回肠上皮细胞黏膜碎屑三次。然后将经洗涤的细胞分成两组,分别用生理盐水或6mM葡萄糖处理,并孵育45分钟。用0.1M HCl处理细胞以终止内源的磷酸二酯酶活性。然后使用cAMP直接免疫测定试剂盒(Calbiochem, USA) 将裂解物用于cAMP测定。

[0101] 使用在样品中以竞争方式与cAMP结合的cAMP多克隆抗体来进行cAMP的定量测定。

在室温下同时孵育后,洗去过量的试剂,并添加底物。在进行短时间孵育后,终止反应,并在405nm处读取所产生的黄颜色。颜色的强度与标准品和样品中的cAMP浓度成反比。用各级分的蛋白质水平对cAMP水平进行标准化,并表示为 $\text{pmol}(\text{mg蛋白质})^{-1}$ 。

[0102] 将经毛喉素处理的细胞用作阳性对照。将经葡萄糖和毛喉素处理的细胞孵育45分钟。所有这些测定一式三份进行,并且重复直至 $n=4$ 只不同小鼠。

[0103] 实施例

[0104] 以下是举例说明用于实施本发明之方法和实施方案的实施例。这些实施例不应当解释为限制。除非另有说明,否则所有百分比按重量计,并且所有溶剂混合物比例按体积计。

[0105] 实施例1-在回肠中葡萄糖刺激的 I_{sc} 升高

[0106] 本实施例示出,在小鼠回肠中葡萄糖刺激 I_{sc} 升高。具体地,将葡萄糖(8mM)添加至腔侧导致 I_{sc} 与其基础水平相比显著升高(3.4 ± 0.2 相对于 $1.1 \pm 0.1 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)。使用标准尤斯室研究得到的 I_{sc} 是跨上皮的净离子运输的总和($I_{sc} = J_{\text{netNa}^+} + J_{\text{netCl}^-} + J_{\text{netHCO}_3^-} - J_{\text{netK}^+}$)。

[0107] 在小肠中没有已知的 Na^+ 吸收(ENaC介导的)或 Na^+ 分泌机制。用 $10 \mu\text{M}$ 上皮钠通道抑制剂阿米洛利(amiloride)处理小肠黏膜侧未对 I_{sc} 产生影响。

[0108] 因此,基础 $I_{sc} 1.1 \pm 0.1 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 主要来自隐窝的囊性纤维化跨膜传导调控子(CFTR)活性和 K^+ 分泌流导致。

[0109] 为了确定 Na^+ 偶联的葡萄糖转运的饱和和动力学,在 140mM Na^+ 的存在下,将至高为8mM的浓度逐渐升高的葡萄糖添加至腔侧。浓度逐渐升高的葡萄糖导致增强而可饱和的 I_{sc} 速率(图1A),葡萄糖的 K_m 为 $0.24 \pm 0.03 \text{mM}$, V_{max} 为 $3.6 \pm 0.19 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。在葡萄糖浓度范围0.5mM至0.7mM内,葡萄糖饱和和动力学示出早期饱和和信号;然而,葡萄糖浓度的继续升高导致 I_{sc} 的继续升高,因而在葡萄糖浓度0.5mM至0.7mM处葡萄糖饱和曲线产生了坡折点(knick)。

[0110] 实施例2-3-O-甲基-葡萄糖刺激的 I_{sc} 升高

[0111] 本实施例研究在实施例1中观察到的葡萄糖饱和和动力学是否因为SGLT1介导的转运,而非因为上皮细胞中的葡萄糖代谢。具体地,将葡萄糖的代谢不良形式3-O-甲基-葡萄糖(3-OMG)添加至腔侧以研究 Na^+ 偶联的葡萄糖转运的饱和和动力学。

[0112] 图1B示出3-OMG的饱和和动力学, V_{max} 为 $2.3 \pm 0.13 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 并且 K_m 为 $0.22 \pm 0.07 \text{mM}$ 。当与葡萄糖相比时,3-OMG的添加导致在 Na^+ 偶联的葡萄糖转运中 V_{max} 的显著降低($2.3 \pm 0.13 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 相对于 $3.4 \pm 0.2 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$),但 K_m 没有变化。与葡萄糖相似,使用3-OMG在浓度0.5mM至0.7mM处观察到坡折点(图1B)。

[0113] 实施例3-在H-89的存在下葡萄糖刺激的 I_{sc}

[0114] 基于目前已知的转运机制,葡萄糖刺激的 I_{sc} 升高可能是由产电阴离子分泌或产电 Na^+ 吸收导致。

[0115] 在CFTR通道的活化中需要蛋白激酶A(PKA),其也称为cAMP依赖性蛋白激酶。为了研究PKA在葡萄糖诱导的 I_{sc} 升高中的作用,将组织安放在尤斯室中,并用PKA抑制剂H-89孵育45分钟。随后,将该组织用于研究葡萄糖饱和和动力学。

[0116] 在H-89的存在下,葡萄糖示出 V_{max} 为 $0.8 \pm 0.06 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$,并且 K_m 为 $0.58 \pm$

0.08mM。当用H-89预处理回肠细胞时,葡萄糖饱和曲线的坡折点(当用0.5mM至0.7mM浓度范围的葡萄糖孵育回肠组织时观察到的)完全消失了,饱和曲线向右迁移(图1C)。这些结果表明在低浓度的葡萄糖下对PKA依赖的转运过程的抑制。

[0117] 与葡萄糖饱和曲线相似,3-OMG也示出了对PKA敏感的电流。3-OMG饱和曲线(用H-89孵育)与在葡萄糖(用H-89孵育)的情况下观察到的没有显著不同(图1A和B)。

[0118] 表1在存在和不存在PKA抑制剂H-89的情况下葡萄糖饱和动力学和3-O-甲基-葡萄糖饱和动力学的变化

[0119]

	$V_{\max}$	K_m	$V_{\max}$	K_m
PKA抑制剂	—	—	H-89	H-89
葡萄糖	3.6 ± 0.2	0.2 ± 0.1	1.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
3-OMG	2.7 ± 0.1	0.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1

[0120] *部分葡萄糖和3-OMG刺激的电流在PKA的存在下消除。结果得自n=8个组织。

[0121] 这些结果表明,可被PKA抑制的电流(如表1所示)由 Na^+ 偶联的葡萄糖转运导致,而不是由其他与葡萄糖相关的胞内代谢导致(表1)。

[0122] PKA在cAMP介导的阴离子分泌和SGLT1介导的 Na^+ 和葡萄糖吸收中起重要作用。对H-89不敏感的电流的存在表明,葡萄糖刺激非PKA介导的阴离子分泌(例如胞内 Ca^{2+} 介导的分泌)。

[0123] 实施例4-在根皮苷的存在下葡萄糖刺激的 I_{sc} 升高的消除

[0124] 为了研究对葡萄糖转运的抑制是否消除对PKA敏感的电流,用SGLT1的可逆竞争性抑制剂根皮苷(Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA)来进行实验。具体地,将回肠组织安放于尤斯室中,用100 μM 根皮苷在腔侧进行处理,并进行葡萄糖饱和动力学研究。

[0125] 结果示出,在根皮苷的存在下,葡萄糖和/或3-OMG刺激的 I_{sc} 升高被完全消除(图1C)。这些结果表明,通过SGLT1的葡萄糖转运蛋白活性对于对PKA敏感的电流和对PKA不敏感的电流是必不可少的。

[0126] 实施例5-葡萄糖对钠的单向通量和净通量的影响。

[0127] 使用以稳态速率从黏膜向浆膜转移 J_{ms} 或从浆膜向黏膜转移 J_{sm} 的 ^{22}Na 进行 Na^+ 同位素通量测量。使用等式: $J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$ 来计算 Na^+ 的净通量。 $+J_{net}$ 表示净吸收;而 $-J_{net}$ 表示净分泌。

[0128] 在不存在葡萄糖(0mM)的情况下,小肠组织示出钠的净吸收($1.8 \pm 0.3 \text{mEq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)。在0.6mM葡萄糖的存在下, Na^+ 吸收被消除。然而,添加6mM葡萄糖导致 $J_{net} \text{Na}^+$ 显著升高($3.2 \pm 0.5 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$),表明钠的净吸收。在0mM、0.6mM和6mM葡萄糖下, Na^+ 的单向通量未示出显著差异(图2B)。

[0129] 实施例6-葡萄糖对氯离子的单向通量和净通量的影响

[0130] 在0.6mM葡萄糖下 I_{sc} 的变化计算为 $1.1 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($2.2 \pm 0.3 - 1.1 \pm 0.1 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$),并且在6mM葡萄糖下 I_{sc} 的变化计算为 $2.2 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($3.4 \pm 0.2 - 1.1 \pm 0.1 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)。 I_{sc} 随葡萄糖浓度升高而升高不能完全基于 $J_{net}\text{Na}^+$ 值(基于在0.6mM和6mM葡萄糖下的值)来解释。

[0131] 使用 ^{36}Cl 来进行 Cl^- 同位素通量测量,以确定 Cl^- 通量是否占据不能归因于 J_{netNa^+} 的 I_{sc} 的一部分。在不存在葡萄糖的情况下计算的 J_{netCl^-} 示出 Cl^- 的吸收($2 \pm 0.3 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)。在不存在葡萄糖的情况下,钠吸收水平($1.8 \pm 0.3 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)与氯吸收水平($2.0 \pm 0.3 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)相当,这表明 Na^+ 和 Cl^- 吸收是电中性的。

[0132] 将0.6mM或6mM葡萄糖添加至黏膜侧导致 Cl^- 的净分泌(图2A)。在0.6mM葡萄糖下的 J_{netCl^-} ($-3.6 \pm 0.8 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)与在6mM葡萄糖下的 J_{netCl^-} ($-4.0 \pm 1.4 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)没有显著差异。

[0133] 这些结果示出,当与不存在葡萄糖情况下的 J_{smCl^-} ($11.9 \pm 0.4 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)相比时,在存在葡萄糖的情况下(0.6mM和6mM葡萄糖), J_{smCl^-} 显著升高(J_{smCl^-} 分别为 $16.9 \pm 0.7 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ 和 $17 \pm 0.7 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) (图2A)。这些结果表明在葡萄糖浓度低至0.6mM时发生显著的 Cl^- 分泌。葡萄糖浓度的升高未导致 Cl^- 分泌的增加。

[0134] 实施例7-在不存在腔葡萄糖的情况下回肠中的 HCO_3^- 分泌

[0135] 跨上皮的电测量和通量研究示出,向回肠组织中添加葡萄糖诱导显著的 Cl^- 分泌。虽然在0.6mM和6mM葡萄糖的情况下, J_{netCl^-} 示出显著的阴离子分泌,但是这并不占据 I_{sc} 的所有变化,对于6mM葡萄糖与0.6mM葡萄糖的 I_{sc} 值之间的显著差异 $6 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ (7.5 ± 0.4 – $1.5 \pm 0.1 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) 尤其如此。

[0136] 进行pH稳态研究以确定 HCO_3^- 分泌是否对未被占据的 I_{sc} 部分有贡献。本发明人已鉴定了在小鼠小肠中的至少两种 HCO_3^- 分泌模式:1) Cl^- 依赖的、电中性的 Cl^- - HCO_3^- 交换,以及2) Cl^- 非依赖的、产电 HCO_3^- 分泌。

[0137] 这些结果示出,内源的 HCO_3^- 分泌对净 HCO_3^- 分泌没有贡献。具体地,将不含 HCO_3^- 的不良缓冲的溶液添加至安放在尤斯室的组织两侧,并在组织的两侧都用100% O_2 鼓泡。在这样的条件下记录最小 HCO_3^- 分泌($0.1 \pm 0.01 \text{mEq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, $n=12$)。随后将含有 HCO_3^- 的缓冲液添加至基底侧并用95% O_2 和5% CO_2 在该侧鼓泡导致显著的 HCO_3^- 分泌 $3.8 \pm 0.2 \text{mEq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($n=9$)。

[0138] 为了确定腔 Cl^- 非依赖的 HCO_3^- 分泌是否在 HCO_3^- 分泌中(在不存在腔葡萄糖的情况下)起作用,在不存在腔 Cl^- 的情况下进行pH稳态实验。在不存在腔 Cl^- 的情况下,记录最小 HCO_3^- 分泌($0.4 \pm 0.1 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) (图5A)。这些结果表明,在不存在腔葡萄糖的情况下,基础 HCO_3^- 分泌主要由 Cl^- 依赖的、电中性的 Cl^- - HCO_3^- 交换导致。

[0139] 实施例8-腔葡萄糖对回肠中 HCO_3^- 分泌的影响

[0140] 进行pH稳态实验以确定葡萄糖对腔 Cl^- 依赖的 HCO_3^- 分泌的影响。在存在腔 Cl^- 的情况下,将葡萄糖添加至腔侧导致显著的 HCO_3^- 分泌($7.6 \pm \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)。

[0141] 在存在葡萄糖的情况下, HCO_3^- 分泌可由腔 Cl^- 依赖的、电中性的 Cl^- - HCO_3^- 交换或腔 Cl^- 非依赖的、阴离子通道介导的 HCO_3^- 分泌导致。为了评估葡萄糖刺激的 HCO_3^- 分泌的机制,将葡萄糖添加至黏膜侧。在用6mM葡萄糖孵育的组织中,腔 Cl^- 的去除未消除 HCO_3^- 分泌($3.2 \pm 0.6 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) (图5A)。这些结果表明,在存在葡萄糖的情况下, HCO_3^- 分泌主要由腔 Cl^- 非依赖的分泌导致,并且是阴离子通道介导的。

[0142] 在另一个实验中,将100 μM 非特异性阴离子通道阻断剂5-硝基-2-(3-苯基丙基氨基)-苯甲酸(NPPB)添加至腔侧。在存在6mM葡萄糖的情况下,检测到NPPB抑制腔 Cl^- 非依赖的 HCO_3^- 分泌(图5B)。这些结果表明葡萄糖刺激的 HCO_3^- 分泌是通过阴离子通道介导的。

[0143] 为了研究葡萄糖诱导的 HCO_3^- 分泌是否通过CFTR通道发生,将100 μM 格列本脲(glibenclamide)添加至腔侧。格列本脲抑制由葡萄糖刺激的腔 Cl^- 非依赖的 HCO_3^- 分泌,这表明CFTR通道介导葡萄糖刺激的 HCO_3^- 分泌。

[0144] 实施例9-葡萄糖代谢对阴离子通道介导的 HCO_3^- 分泌的影响

[0145] 为了评估小肠组织中的葡萄糖代谢是否对葡萄糖刺激的 HCO_3^- 分泌有贡献,在不存在腔 HCO_3^- 和浴 HCO_3^- 的情况下用葡萄糖的代谢不良形式3-OMG孵育小肠组织。在存在3-OMG(6mM)并且不存在腔 HCO_3^- 和浴 HCO_3^- 的情况下,观察到了 HCO_3^- 分泌($0.1 \pm 0.03 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)。

[0146] 实施例10-葡萄糖对回肠中胞内cAMP水平的影响

[0147] 在不存在葡萄糖的情况下,当与隐窝细胞相比时,来自绒毛细胞的细胞裂解物示出更高的胞内cAMP水平。用毛喉素孵育导致绒毛细胞和隐窝细胞中 $[\text{cAMP}]_i$ 水平显著升高(图3A)。经毛喉素处理的细胞用作阳性对照。

[0148] 为了研究葡萄糖对胞内cAMP水平的影响,用6mM葡萄糖孵育绒毛细胞和隐窝细胞。当与隐窝细胞相比时,用葡萄糖孵育绒毛细胞裂解物导致胞内cAMP水平显著升高(图3B)。这些结果表明,葡萄糖介导的胞内cAMP水平的升高在介导葡萄糖刺激的阴离子分泌中起作用。在绒毛细胞中观察到升高的 $[\text{cAMP}]_i$,但在隐窝细胞并非如此;这表明,只有在完全成熟和分化的绒毛上皮细胞中才需要葡萄糖转运机制。

[0149] 为了确定葡萄糖机制是否对胞内cAMP水平有影响,用3-OMG预孵育来自回肠的黏膜碎屑45分钟,然后将该细胞裂解物用于测量胞内cAMP水平。

[0150] 与葡萄糖相似,用0.6mM和6mM浓度的3-OMG孵育绒毛细胞导致胞内cAMP水平显著升高(图3C)。当与6mM葡萄糖相比时,用6mM的3-OMG孵育绒毛细胞导致显著更高的胞内cAMP水平($P < 0.01$) (图3C)。这些结果示出,所观察到的胞内cAMP水平升高不是由小肠组织中的葡萄糖代谢引起的。

[0151] 实施例11-葡萄糖对Caco2细胞系中胞内 Ca^{2+} 的影响

[0152] PKA抑制剂(H-89)抑制cAMP刺激的阴离子分泌和SGLT1介导的葡萄糖转运二者。对H-89不敏感的 I_{sc} 的存在(图1A和B)表明,PKA非依赖的机制也对葡萄糖诱导的分泌有贡献。如同cAMP,胞内 Ca^{2+} 也是一种重要的与阴离子分泌有关的胞内第二信使。

[0153] 为了确定胞内 Ca^{2+} 在葡萄糖刺激的 I_{sc} 升高中的作用,分别在存在不同浓度的葡萄糖和3-OMG的情况下以及存在胞内钙特异性整合剂BAPTA-AM(1,2-双(邻氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸)的情况下测量胞内 Ca^{2+} 水平。通过激光扫描共聚焦显微法监测加载有 Ca^{2+} 指示剂fluo8的Caco2培养细胞中 Ca^{2+} 对葡萄糖和3-OMG的应答。将0.6mM葡萄糖添加至浴介质中使胞内 Ca^{2+} 开始振荡(图4B)。振荡的振幅随着时间降低。用0.6mM葡萄糖诱导的钙荧光平均峰值振幅(F/F_0)计算为 1.32 ± 0.1 ($n=10$)。

[0154] 葡萄糖诱导的 Ca^{2+} 振荡与胞内葡萄糖代谢无关,因为0.6mM3-OMG诱导相似的 Ca^{2+} 振荡(1.2 ± 0.1) ($n=10$) (图4A)。通过用胞内 Ca^{2+} 整合剂BAPTA-AM预孵育细胞45分钟,葡萄糖刺激的 Ca^{2+} 振荡被消除(1.01 ± 0.1) ($n=10$) (图4A)。

[0155] 添加更高浓度(6mM)的葡萄糖以确定升高的葡萄糖浓度是否使 Ca^{2+} 振荡的振幅升高。当与0.6mM的葡萄糖或3-OMG相比时,将6mM葡萄糖(1.85 ± 0.2 相对于 1.32 ± 0.1)或3-OMG(1.5 ± 0.1 相对于 1.2 ± 0.2)添加至浴介质中, Ca^{2+} 振荡显著更高(图4A)。通过用BAPTA-

AM预孵育细胞,完全消除了葡萄糖刺激的 Ca^{2+} 振荡升高(图4A)。这表明,胞内 Ca^{2+} 与葡萄糖诱导的阴离子分泌有关。

[0156] 实施例12-用于治疗腹泻的治疗组合物

[0157] 在某些实施方案中,本实施例提供了用于治疗腹泻(例如轮状病毒诱发的腹泻)的制剂。在一个实施方案中,该制剂不包含葡萄糖、葡萄糖类似物、葡萄糖转运蛋白的底物或糖分子。

[0158]

制剂 1		
(份量 1 瓶 (237 ml))		
	每份的量	%每日值*
L-缬氨酸	276 mg *	
L-天冬氨酸	252 mg *	
L-丝氨酸	248 mg *	

[0159]

L-异亮氨酸	248 mg *
L-苏氨酸	225 mg *
L-赖氨酸 HCL	172 mg *
L-甘氨酸	141 mg *
L-酪氨酸	51 mg *
其他成分: 水、电解质	
制剂 2	
(份量 1 瓶 (237 ml))	
每份的量	
	%每日值*
总脂肪 0 g	0%
钠 440 mg	18%
总碳水化合物 0 g	0%
蛋白质 2 g	
成分: 水、氨基酸 (L-色氨酸、L-缬氨酸、L-天冬氨酸、L-丝氨酸、L-异亮氨酸、L-苏氨酸、L-赖氨酸盐酸盐、L-甘氨酸、L-酪氨酸)、电解质	
氨基酸	量 mg/1 瓶份量 (237 ml)
L-赖氨酸 HCl	175
L-天冬氨酸	255
L-甘氨酸	144
L-异亮氨酸	251
L-苏氨酸	228
L-酪氨酸	52
L-缬氨酸	281
L-色氨酸	392
L-丝氨酸	252

[0160] 本文引用的全部参考文献,包括出版物、专利申请和专利均通过引用并入,程度如同各参考文献单独地并且特别地示出通过引入并入并在文中以其整体给出。

[0161] 除非在本文中另有说明或者明确地与上下文相矛盾,否则在描述本发明的上下文中所使用的没有数量词修饰的名词表示一个/种或更多个/种。

[0162] 除非本文中另有说明,否则本文中值之范围的叙述仅旨在作为单独地指落在该范

围内的各单独的值的速记方法,各单独的值并入说明书中,如同其在本文中单独引用。除非另有说明,否则本文所提供的所有精确值都是相应近似值的代表(例如,关于特定要素或测量结果而提供的所有精确的示例性值可理解为还提供相应的近似测量结果,适当时由“约”修饰)。

[0163] 除非另有说明,否则本文提供的任何及全部实施例,或者示例性语言(例如,“例如”)的使用仅旨在更好地阐述本发明,而不构成对本发明范围的限制。除非明确陈述,否则在本说明书中任何语言都不应当解释为指定任何要素对于实施本发明必不可少。

[0164] 除非上下文中另有说明,或者明确地与上下文相矛盾,否则使用提及要素的术语例如“包含”“具有”“包括”或“含有”的本发明任何方面或实施方案的描述旨在为“由…组成”、“基本由…组成”或“基本包含”特定要素的本发明类似方面或实施方案提供支持,(例如,除非上下文中另有说明,或者明确地与上下文相矛盾,否则文中描述的包含特定要素的组合物应理解为还描述了由该要素组成的组合物)。

[0165] 应理解,本文所述的实施例和实施方案仅用于举例说明的目的,并且由此启发的多种修改或变化对本领域技术人员而言是明显的,并且将包含于本申请的精神和范围内。

[0166] 参考文献

[0167] Zhang H,Ameen N,Melvin JE,&Vidyasagar S(2007) Acute inflammation alters bicarbonate transport in mouse ileum.J Physiol581(3):1221-1233.

[0168] Hediger MA&Rhoads DB(1994)Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters.(Translated from eng)Physiol.Rev.74(4):993-1026(in eng).

[0169] Wright EM,Loo DD,Hirayama BA,&Turk E(2004)Surprising versatility of Na⁺-glucose cotransporters:SLC5.(Translated from eng)Physiology(Bethesda)19:370-376(in eng).

[0170] Chen XZ,Coady MJ,Jackson F,Berteloot A,&Lapointe JY(1995)Thermodynamic determination of the Na⁺:glucose coupling ratio for the human SGLT1 cotransporter.(Translated from eng)Biophys.J.69(6):2405-2414(in eng).

[0171] Torres-Pinedo R,Rivera CL,&Fernandez S(1966)Studies on infant diarrhea.II.Absorption of glucose and net fluxes of water and sodium chloride in a segment of the jejunum.(Translated from eng)J.Clin.Invest.45(12):1916-1922(in eng).

[0172] Davidson GP,Gall DG,Petric M,Butler DG,&Hamilton JR(1977)Human rotavirus enteritis induced in conventional piglets.Intestinal structure and transport.(Translated from eng)J.Clin.Invest.60(6):1402-1409(in eng).

[0173] Nalin DR,et al.(1979)Oral rehydration and maintenance of children with rotavirus and bacterial diarrhoeas.(Translated from eng)Bull.World Health Organ.57(3):453-459(in eng).

[0174] Lorrot M&Vasseur M(2007)How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea?(Translated from eng)Virol J4:31(in eng).

[0175] Chapman MJ,et al.(2009)Glucose absorption and gastric emptying in

critical illness. (Translated from eng) Crit Care 13(4):R140 (in eng).

[0176] Telch J, et al. (1981) Intestinal glucose transport in acute viral enteritis in piglets. (Translated from eng) Clin Sci (Lond) 61(1):29-34 (in eng).

[0177] Lo B & Silverman M (1998) Cysteine scanning mutagenesis of the segment between putative transmembrane helices IV and V of the high affinity Na⁺/Glucose cotransporter SGLT1. Evidence that this region participates in the Na⁺ and voltage dependence of the transporter. (Translated from eng) J. Biol. Chem. 273(45):29341-29351 (in eng).

[0178] Wright EM, Hirsch JR, Loo DD, & Zampighi GA (1997) Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. (Translated from eng) J. Exp. Biol. 200 (Pt2):287-293 (in eng).

[0179] Dyer J, Vayro S, King TP, & Shirazi-Beechey SP (2003) Glucose sensing in the intestinal epithelium. (Translated from eng) Eur. J. Biochem. 270(16):3377-3388 (in eng).

[0180] Gribble FM (2008) RD Lawrence Lecture 2008: Targeting GLP-1 release as a potential strategy for the therapy of Type 2 diabetes. (Translated from eng) Diabet. Med. 25(8):889-894 (in eng).

[0181] Gustavsson N, et al. (Synaptotagmin-7 as a positive regulator of glucose-induced glucagon-like peptide-1 secretion in mice. (Translated from eng) Diabetologia 54(7):1824-1830 (in eng).

[0182] Eissele R, et al. (1992) Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. (Translated from eng) Eur. J. Clin. Invest. 22(4):283-291 (in eng).

[0183] Elliott RM, et al. (1993) Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. (Translated from eng) J. Endocrinol. 138(1):159-166 (in eng).

[0184] Herrmann C, et al. (1995) Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. (Translated from eng) Digestion 56(2):117-126 (in eng).

[0185] Knickelbein RG, Aronson PS, & Dobbins JW (1988) Membrane distribution of sodium-hydrogen and chloride-bicarbonate exchangers in crypt and villus cell membranes from rabbit ileum. J. Clin. Invest. 82(6):2158-2163.

[0186] Vidyasagar S, Rajendran VM, & Binder HJ (2004) Three distinct mechanisms of HCO₃⁻ secretion in rat distal colon. Am J Physiol Cell Physiol 287(3):C612-621.

[0187] Coon S, Kekuda R, Saha P, & Sundaram U (Reciprocal regulation of the primary sodium absorptive pathways in rat intestinal epithelial cells. (Translated from eng) Am J Physiol Cell Physiol 300(3):C496-505 (in eng).

- [0188] Hu Z, et al (2006) MAPKAPK-2 is a critical signaling intermediate in NHE3 activation following Na⁺-glucose cotransport. (Translated from eng) J. Biol. Chem. 281 (34) : 24247-24253 (in eng) .
- [0189] Turner JR & Black ED (2001) NHE3-dependent cytoplasmic alkalization is triggered by Na⁽⁺⁾-glucose cotransport in intestinal epithelia. (Translated from eng) Am J Physiol Cell Physiol 281 (5) : C1533-1541 (in eng) .
- [0190] Donowitz M & Li X (2007) Regulatory binding partners and complexes of NHE3. (Translated from eng) Physiol. Rev. 87 (3) : 825-872 (in eng) .
- [0191] Zachos NC, Kovbasnjuk O, & Donowitz M (2009) Regulation of intestinal electroneutral sodium absorption and the brush border Na⁺/H⁺ exchanger by intracellular calcium. (Translated from eng) Ann. N. Y. Acad. Sci. 1165 : 240-248 (in eng) .
- [0192] Zachos NC, et al. (2009) NHERF3 (PDZK1) contributes to basal and calcium inhibition of NHE3 activity in Caco-2BBE cells. (Translated from eng) J. Biol. Chem. 284 (35) : 23708-23718 (in eng) .
- [0193] Donowitz M, et al. (2009) NHE3 regulatory complexes. (Translated from eng) J. Exp. Biol. 212 (Pt 11) : 1638-1646 (in eng) .
- [0194] Zhu X, et al. (Elevated Calcium Acutely Regulates Dynamic Interactions of NHERF2 and NHE3 Proteins in Opossum Kidney (OK) Cell Microvilli. (Translated from eng) J. Biol. Chem. 286 (40) : 34486-34496 (in eng) .
- [0195] Caputo A, et al. (2008) TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. (Translated from eng) Science 322 (5901) : 590-594 (in eng) .
- [0196] Namkung W, Phuan PW, & Verkman AS (TMEM16A inhibitors reveal TMEM16A as a minor component of calcium-activated chloride channel conductance in airway and intestinal epithelial cells. (Translated from eng) J. Biol. Chem. 286 (3) : 2365-2374 (in eng) .
- [0197] Engle MJ, Goetz GS, & Alpers DH (1998) Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. (Translated from eng) J. Cell. Physiol. 174 (3) : 362-369 (in eng) .
- [0198] Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, & Estes MK (1996) Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. (Translated from eng) Science 272 (5258) : 101-104 (in eng) .
- [0199] Rhoads JM, et al. (1996) Can a super oral rehydration solution stimulate intestinal repair in acute viral enteritis? (Translated from eng) J. Diarrhoeal Dis. Res. 14 (3) : 175-181 (in eng) .

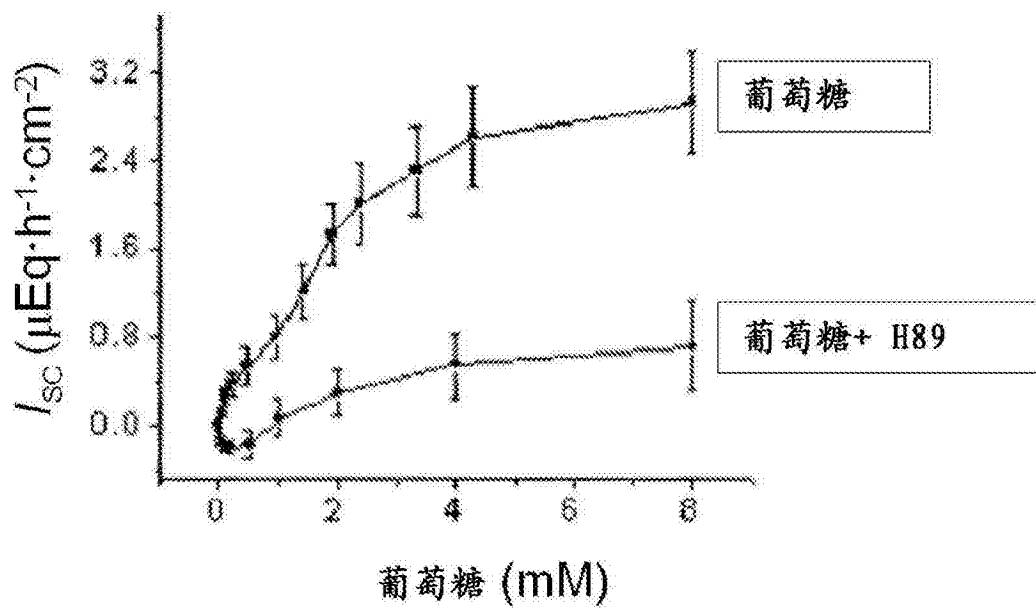


图1A

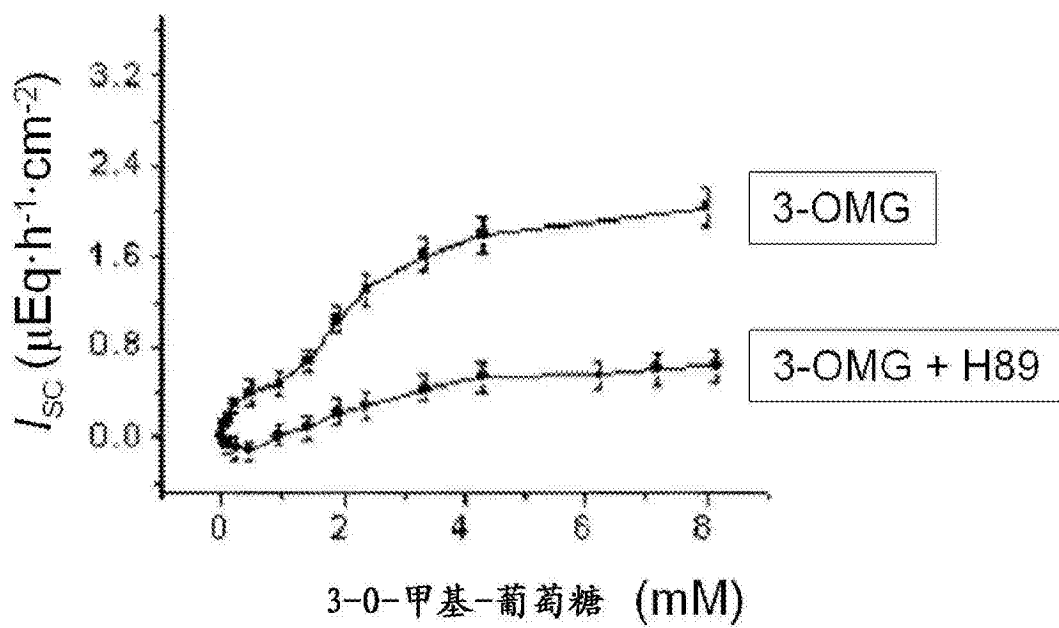


图1B

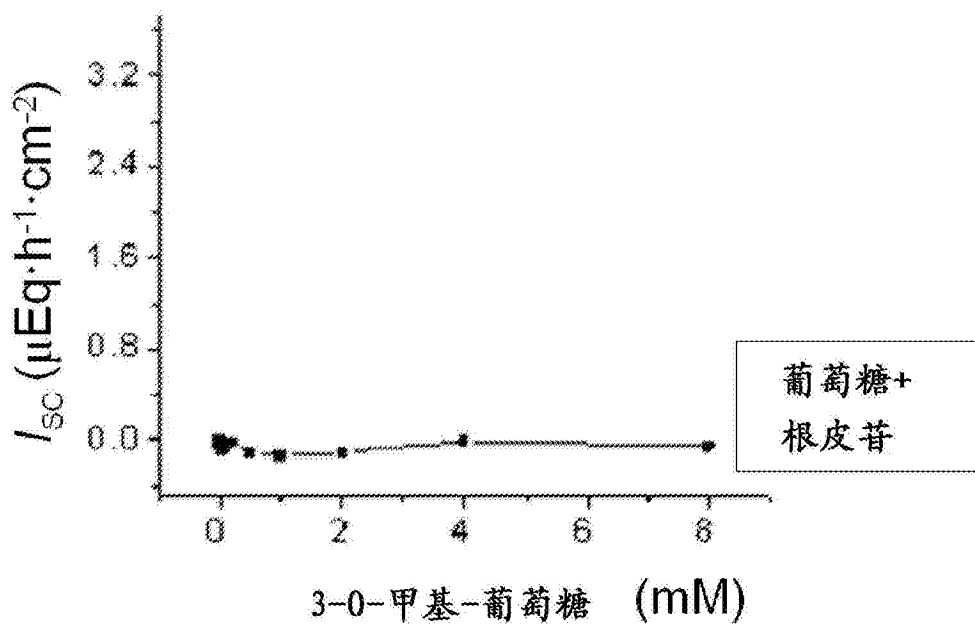


图1C

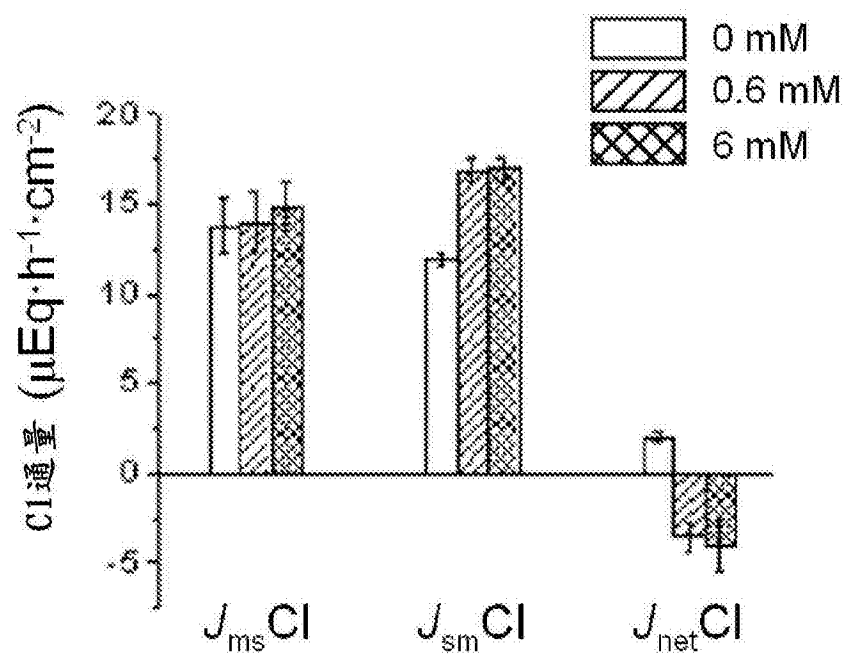


图2A

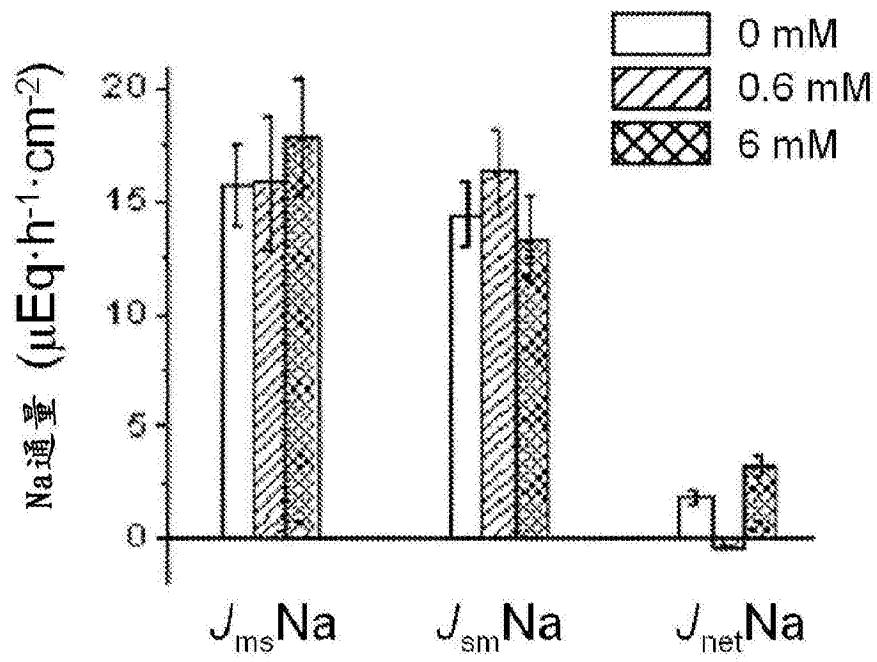


图2B

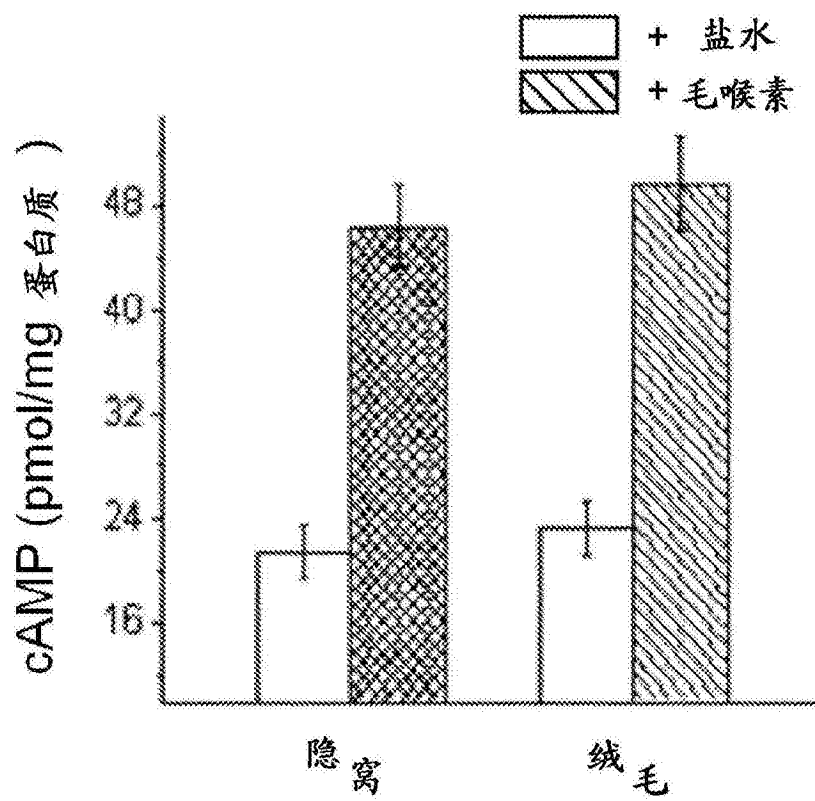


图3A

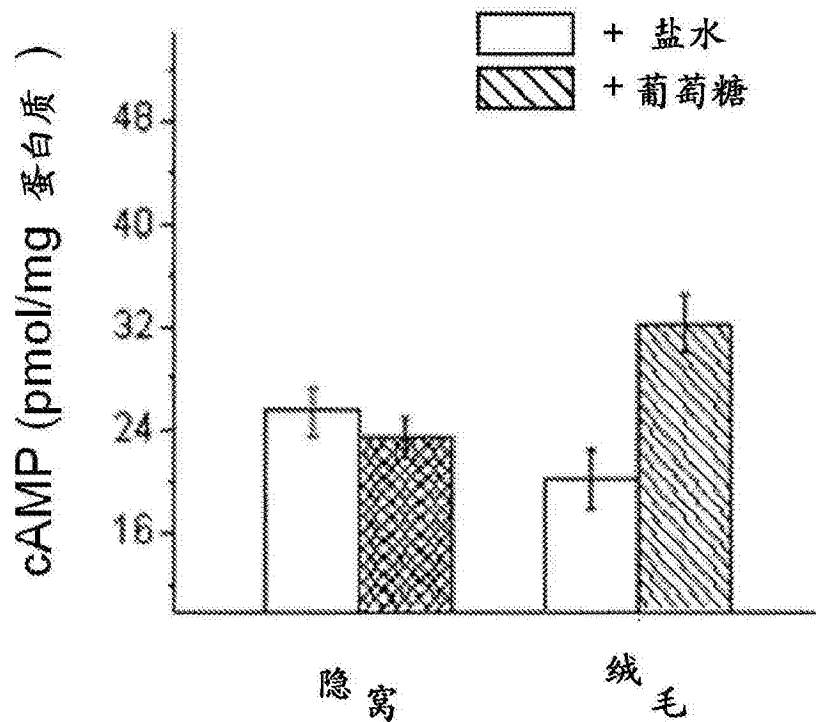


图3B

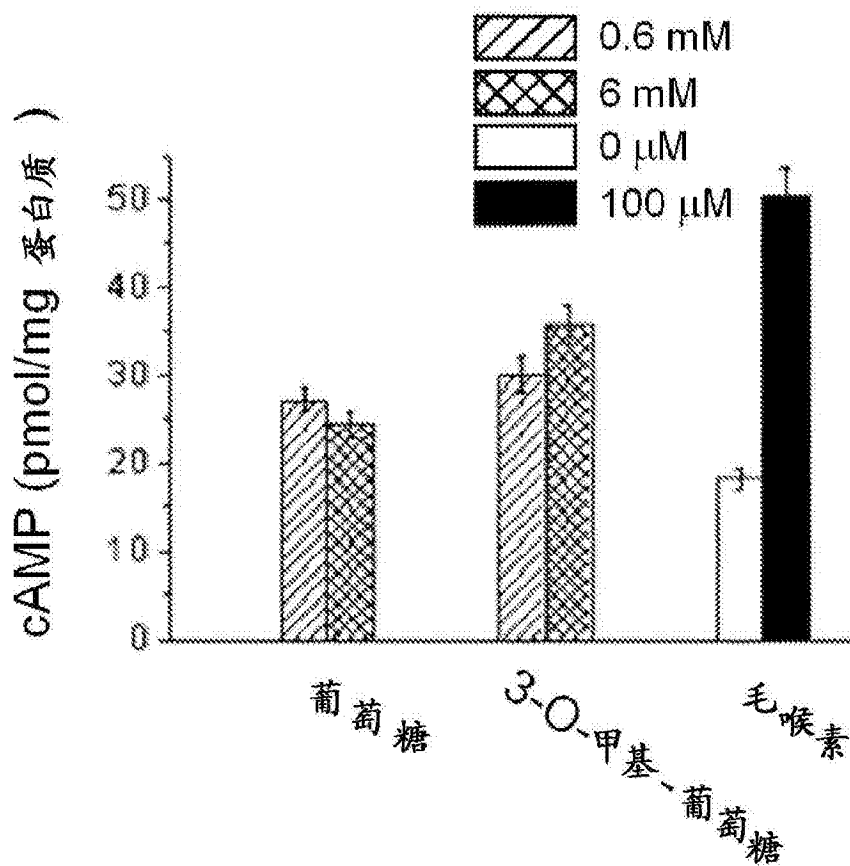


图3C

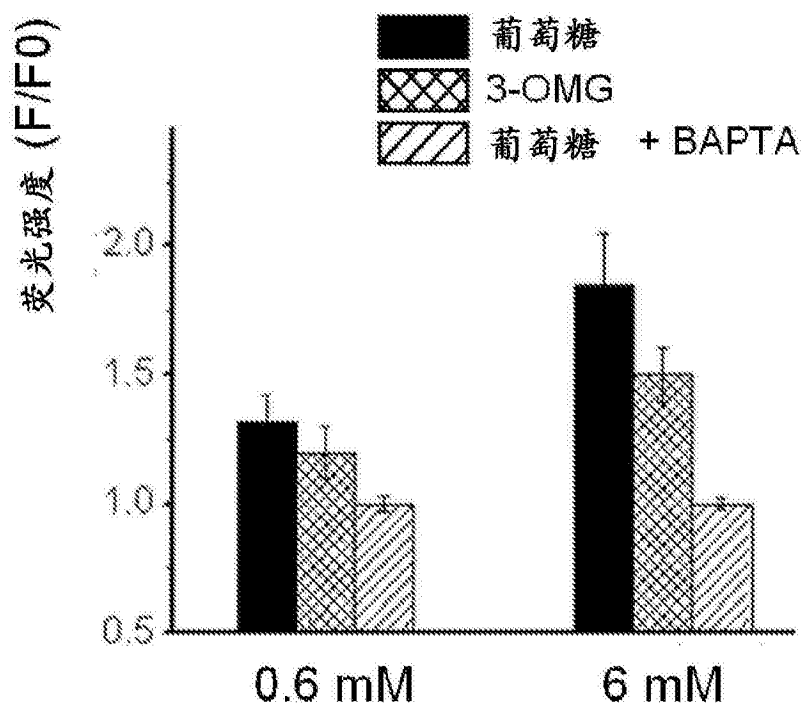


图4A

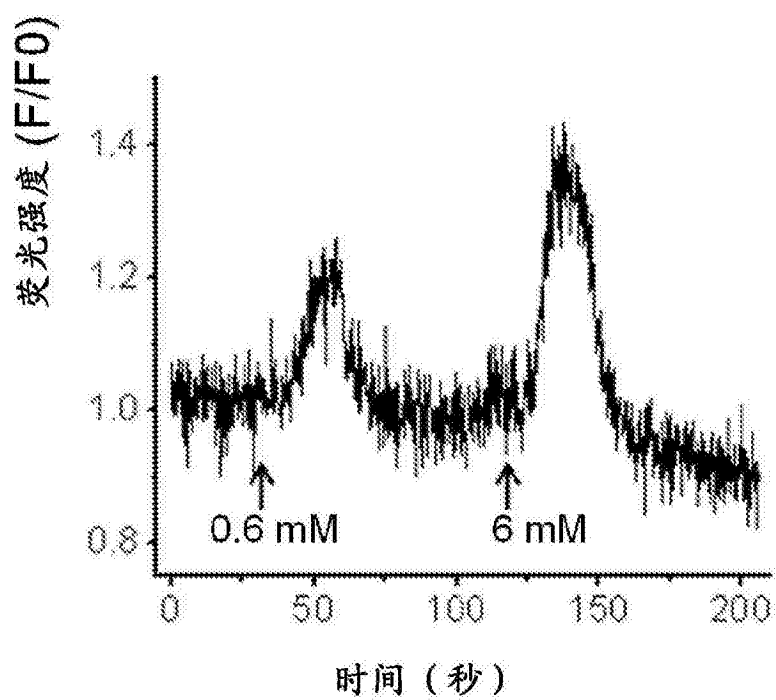


图4B

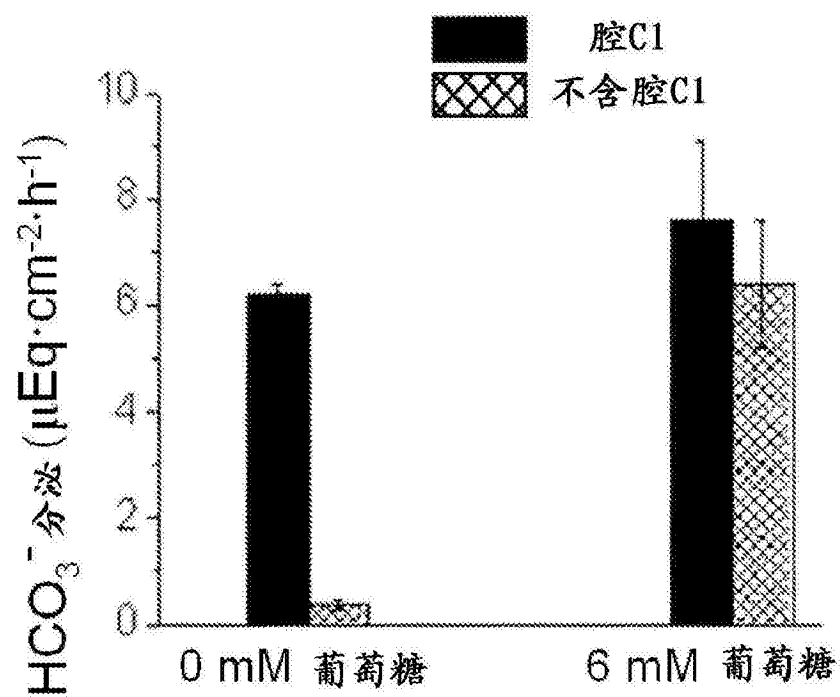


图5A

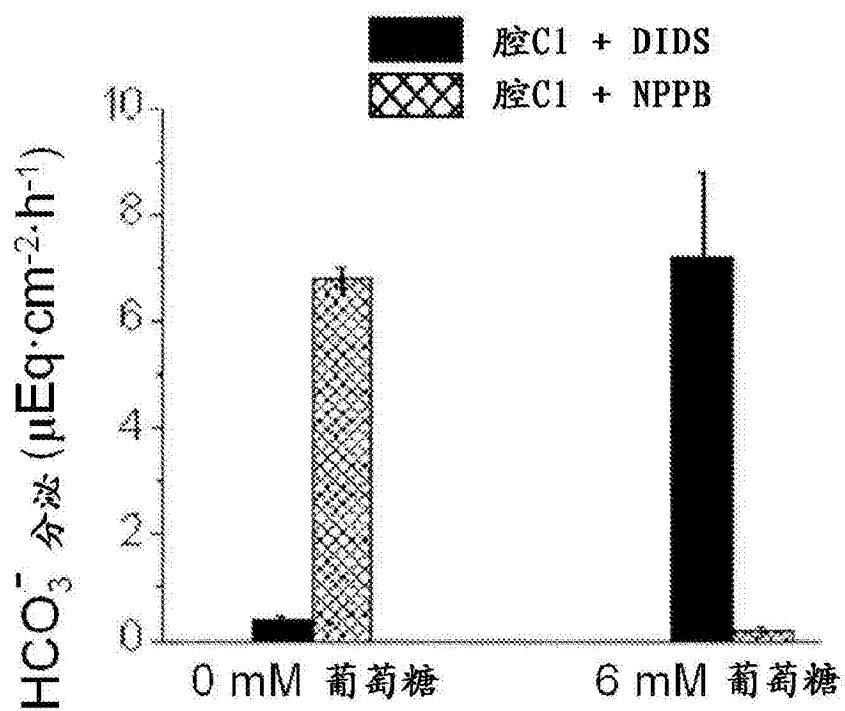


图5B