

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02817279.5

[51] Int. Cl.

A61K 38/26 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年6月6日

[11] 授权公告号 CN 1319594C

[22] 申请日 2002.9.9 [21] 申请号 02817279.5

[30] 优先权

[32] 2001.9.7 [33] GB [31] 0121709.0

[86] 国际申请 PCT/GB2002/004082 2002.9.9

[87] 国际公布 WO2003/022304 英 2003.3.20

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.4

[73] 专利权人 皇家创新有限公司

地址 英国伦敦

[72] 发明人 斯蒂芬·罗伯特·布鲁

穆罕默德·阿里·加特

卡罗琳·简·斯墨尔

凯瑟琳·路易丝·达金

[56] 参考文献

US585975 1999.1.12

US6191102B1 2001.2.20

审查员 吴希哲

[74] 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

代理人 傅强国 董红曼

权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 19 页

[54] 发明名称

用于预防或治疗体重过重的胃肠激素

[57] 摘要

本发明涉及防止和治疗哺乳动物体重过重的合成物和使用方法。该合成物含有显示出减少食物摄取的胃肠激素。

1. 胃肠激素在制造用于预防和治疗哺乳动物体重过重的药物中的用途。
2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述体重过重指肥胖症。
3. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述胃肠激素为人胃肠激素。
4. 如权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述胃肠激素为人胃肠激素。
5. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述哺乳动物为人。
6. 如权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述哺乳动物为人。
7. 如权利要求 3 所述的用途，其特征在于，所述哺乳动物为人。
8. 如权利要求 4 所述的用途，其特征在于，所述哺乳动物为人。
9. 如权利要求 1 至 8 中任何一项所述的用途，其特征在于，所述胃肠激素为其盐的形式，或与一个或多个基团共轭，或被烷化、二硫化成形、金属络合、酰化、酯化、酰胺化、硝化、酸处理、碱处理、氧化或还原，或在金属存在下被提供。
10. 如权利要求 1 至 8 中任何一项所述的用途，其特征在于，所述药物为与口服给药，非肠道给药，粘膜给药，直肠给药，皮下或透皮给药相适应的形式。
11. 如权利要求 10 所述的用途，其特征在于，所述药物为与吸入给药，口腔，舌下或鼻部给药相适应的形式。
12. 如权利要求 10 所述的用途，其特征在于，所述胃肠激素为其盐的形式，或与一个或多个基团共轭，或被烷化、二硫化成形、金属络合、酰化、酯化、酰胺化、硝化、酸处理、碱处理、氧化或还原，或在金属存在下被提供。

## 用于预防或治疗体重过重的胃肠激素

### 技术领域

本发明涉及减轻哺乳动物体重的合成物和使用方法。

### 背景技术

肥胖是发生率最高但缺乏有效治疗方法的疾病之一。它使人处于虚弱状态，降低了生活质量并显著增加了患其他疾病的风险。

在美国，目前有 25% 的成年人属于临床意义上的肥胖。据估计，肥胖直接导致美国的保健费用每年 450 亿美元，占总保健费用的 8%。在欧洲，肥胖人数也日益增加。由于缺少新的方法，预测到 2005 年，20% 的英国人将成为临床意义上的肥胖病人。医疗人员和健康权威正逐渐认识到肥胖是一种代谢疾病。但在长期的肥胖控制中，能与饮食控制和锻炼相结合应用的有效且安全的药物仍缺乏。

### 发明内容

本发明的目的是提供这类药物，并提供鉴定和进一步开发此类药物的方法。

前高血糖素原 (preproglucagon) 是一种 160 个氨基酸组成的多肽，它以组织特异性方式被激素原转换酶-1 和-2 切割而产生在中枢神经系统 (CNS) 和外周组织中具有不同功能的许多产物。在肠道和中枢神经系统中，前高血糖素原切割的主要转译后产物是胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)、胰高血糖素样肽-2 (GLP-2)，肠高血糖素和胃肠激素 (oxyntomodulin, OXM)，如图 A 所示。到目前为止，OXM 在中枢神经系统中的作用仍未被证明。

虽然 GLP-1 与 GLP-2 显示能抑制食物摄取，但未能证明不同的肽 OXM 有此作用。作为生物活性肽，OXM 的重要性也未能证明。

与预计相反，现已令人惊奇地发现 OXM 肽能抑制食物摄取，和降低体重。

因此本发明第一方面是提供含 OXM 的合成物，用于哺乳动物体重过重的预防与治疗。

在本文中，术语“胃肠激素”与“OXM”一样，指含以下 OXM 肽序列或其类似物的任意合成物：

OXM 序列为本领域所熟知并有文字记录。本发明涉及本文引用的所有序列，具体包括以下的人 OXM 序列（与老鼠、大鼠的 OXM 序列相同）：

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr  
Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln  
Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys  
Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala

鮫鱈鱼的 OXM 序列如下：

His Ser Glu Gly Thr Phe Ser Asn Asp Tyr  
Ser Lys Tyr Leu Glu Asp Arg Lys Ala Gln  
Glu Phe Val Arg Trp Leu Met Asn Asn Lys  
Arg Ser Gly Val Ala Glu

鳗鲡的 OXM 序列如下：

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Asn Asp Tyr  
Ser Lys Tyr Leu Glu Thr Arg Arg Ala Gln  
Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Ser Lys  
Arg Ser Gly Gly Pro Thr

本文中使用的术语 OXM 还涵盖任何含有以上 OXM 序列的类似物，其中 1 位上的组氨酸残基被保留，或者被携带阳电荷的芳香族部分或其衍生物所替代，其中，该部分优选为氨基酸，更优选组氨酸衍生物，以上 OXM 序列的 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 或 22 位的氨基酸可单独地被其他任何所选氨基酸单独替代，但 1 位组氨酸除外。

此序列中任何一个或多个（可至 22） $\alpha$ -氨基酸残基都可单独地被其他任何  $\alpha$ -氨基酸残基所替代。如本领域所熟知，除组氨酸外的任何氨基酸残基都可被一个保守替代物所代替，即用一个相似化学类型的氨基酸来替代，例如，用一个疏水氨基酸来代替另一个疏水氨基酸。

如上所述，1-22 位氨基酸均可被替代。除了以上替代选项外，也可用非必需或改造过的或者氨基酸的同分异构体来替代。例如，1-22 位的氨基酸可用同分异构体（例如 D-氨基酸），或者改性氨基酸，例如正氨基酸（如己氨酸或戊氨酸），或非必需氨基酸（例如牛磺酸）所替代。此外，1-22 位氨基酸也可用通过其侧链连接的相应的或者不同的氨

基酸（例如  $\gamma$  链谷氨酸）来替代。对于上述各种替代，1 位上的组氨酸残基是不能改变的或如上述限定。

另外，除 1 位的组氨酸外（或如上所限定），1、2、3、4 或 5 位氨基酸残基可从 OXM 序列中去除。被去除的残基可以是任意 2、3、4 或 5 位的相邻残基或者完全分离的残基。

OXM 序列的 C 末端可通过加入其它氨基酸残基或者其他部分来改性。可将上述 OXM 作为其相应的盐提供。药学上可接受的 OXM 盐及其类似物的例子包括衍生自有机酸，例如甲磺酸，苯磺酸和对-甲苯硫酸；衍生自无机酸，例如盐酸和硫酸等的盐；及甲基磺酸盐，苯磺酸盐，对-甲苯磺酸盐，盐酸和硫酸盐等；或衍生自碱，例如有机碱和无机碱的盐。适用于形成本发明合成物的盐的无机碱的例子包括氢氧化物，碳酸盐和氨、锂、钠、钙、钾、铝、铁、镁、锌等的重碳酸盐。这种盐也可用适当的有机碱形成。适合于形成具有本发明合成物的药学上可接受的碱加成盐的这种碱包括无毒性，并足以形成盐的有机碱。这样的有机碱为本领域所熟知，可包括氨基酸，如精氨酸和赖氨酸，单、双、或三羟基烷基胺，例如单-，双-和三乙胺，胆碱，单-，双-和三烷基胺，如甲胺，二甲胺，和三甲胺；胍；N-甲葡萄糖胺；N-甲基哌嗪；吗啉；乙(撑)二胺；N-苯甲基苯乙胺；tris(羟甲基)；氨基甲烷等。

此类盐可以本领域熟知方法按常规制备。所述碱性化合物的酸加成盐可通过将游离碱性化合物溶解在水中，或者水酒精溶液，或者其他含有所需酸的适当溶剂中而制备。当 OXM 含有酸性功能基因时，所述合成物的碱性盐可通过使所述合成物与适当的碱反应而制备。酸性或碱性盐可直接分离或者通过浓缩溶液，例如通过蒸发来获得。OXM 也可以溶于溶剂或者水合形式存在。

可将本发明的 OXM 共轭于一个或多个，例如脂类，糖，蛋白质或者多肽。OXM 可通过结合于一个组群连接（例如通过共价或离子键）而共轭，或者与其缔结。当 OXM 结合于该组群时，共轭键最好不要通过 C 或 N 末端的氨基酸。可将 OXM 共轭于一聚合物如聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮；聚乙烯醇聚；氧乙烯-聚氧丙烯共聚物；多糖如纤维素、纤维素衍生物、壳聚糖、阿拉伯胶、刺梧桐树胶、瓜耳树胶、黄原胶、黄芪胶、褐藻酸、角叉菜胶、琼脂糖和帚叉藻聚糖、右旋糖苷、淀粉、淀粉衍生物、聚酯、聚胺、聚酞和聚邻酞。

OXM 也能被化学改性。具体地，OXM 的氨基酸侧链、的 N 末端和/或 C 末端能被改性。例如，可使 OXM 进行一次或多次烷化，二硫化物形成，金属络合，酰化，酯化，酰胺化，硝化，酸处理，碱处理，氧化或还原。进行这些过程的方法是本领域熟知的。特别是 OXM 可作为低级烷化脂，低级的烷化酰胺，低级二烷基酰胺，酸加成盐，羧酸盐或其烷化加减

盐。具体说，OXM 的氨基或者羧基末端此衍生可以通过例如酯化，酰胺化，酰化，氧化或者还原而成。特别是 OXM 的羧基末端也可衍生形成一酰胺基团。

OXM 可用金属，特别是二价金属处理。锌、钙、镁、铜、锰、钴、钼或铁中的一种或几种金属都可用于处理 OXM。

OXM 也可与药学上可接受的这载体或稀释剂组合提供。本领域熟知的合适运载体和/或稀释剂包括药物级淀粉，甘露醇，乳糖，硬脂酸镁，糖精钠，滑石，纤维素，葡萄糖，蔗糖（或者其他糖类），碳酸镁，明胶，油，酒精，去污剂，乳化剂或水（无菌的最好）。该组合物可以是一种组合物的混合制剂，或可以是供同时、分开或者相继使用（包括给药）的组合制剂。OXM 可采用结晶固体，粉末，水溶液，悬浮液或者油剂提供。

前述所指的与本发明组合物可通过任何方便的方法来给药，例如口服（包括吸入），非肠道给药，粘膜（例如口腔，舌下，鼻部）给药，直肠给药，皮下或透皮给药，采取相应形式的该组合物。

对于口服给药，该组合物可配制成液体或固体，例如溶液，糖浆，悬浮液或乳液，片剂，胶囊以及药糖块。

液体制剂通常包括、该组合物的悬浮液或溶液或生理学上可接受盐的含适水溶液或非水液体载体，例如水，乙醇，甘油，聚乙二醇或油。这些制剂还可含有悬浮剂，防腐剂，调味剂或者着色剂。

片剂形式的组合物可用药学上常规用于制备固体制剂的适当运载体制备。这样的运载体包括硬脂酸镁，淀粉，乳糖，蔗糖和微晶纤维。

胶囊形式的组合物可用常规的胶囊包封程序来制备。例如，可采用标准运载体来制备含活性成分的粉末，颗粒或者小团，并将其填充入硬明胶胶囊中；或可采用适当的药学运载体，例如水树脂，纤维素，硅酸盐或者油来制备分散液或悬浮液，并将其填充入软明胶胶囊中。

可设计用于口服的合成物在其通过消化道时保护活性分子不受降解，例如有外裹层的片剂或者胶囊。

典型的非肠道吸收组合物包括此组合物或其生理学上可接受的盐的溶液或悬浮液以灭菌的水性碱、非水性运载体或非肠道可吸收的油，例如聚乙二醇，吡咯烷酮乙烯聚合物，卵磷脂，花生油或芝麻油配制。或者该溶液也可以冻干，给药前再用适当的溶剂重建。

鼻腔或口服给药的组合物可以方便地制成气雾剂，滴剂，凝胶和粉末形式。气雾剂通常含有用生理学可接受的水或非水溶剂配制的活性物质的溶液或 00 悬浮液，一剂或多剂以

灭菌形式装于密封容器中，如药筒或可重复使用的喷雾器装置。密封容器也可以是一次性分配装置，如单剂鼻腔吸入器或者装有一次性堆放容器内物质的计量阀的气雾分配器。若该药剂形成含气雾分配器，将加入药学上可接受的推进剂。此气雾剂形式可采取泵喷雾器形式。

适合口服或舌下给药的组合物包括片剂，药糖块和锭剂，其中活性成分与一种运载体，如糖和阿拉伯树胶，黄芪胶或明胶和甘油一起配制。

用于直肠或阴道给药的组合物可制成使用方便的栓剂形式（含有一中方便的栓剂基质，如可可，黄油），子宫托，阴道管，泡沫材质或灌肠剂。

适于透皮给药的组合物包括药膏，凝胶，贴片和粉末注射的注射剂。

该组合物以单位计量形式如药片，胶囊或安瓿使用方便。

OXM 可用作预防措施，来防止过度的体重增加，或可用于降低体重的治疗方法。

虽然没有证明患体重过重的哺乳动物为临床意义上的肥胖，但是体重过重通常就是肥胖。OXM 可以是液体，固体或者半固体形式。

在当今社会，预防或治疗哺乳动物体重过重确实需要。优选的哺乳动物是人，虽然也包括其他哺乳动物如马，犬科动物（特别是家庭饲养的犬科动物），猫科动物（特别是家庭饲养的猫科动物）以及那些生产肉类的哺乳动物如猪，牛和绵羊科动物。本发明可用于这类动物的体重过重，而使瘦肉的生产最大化。

本文中，术语“预防”指任何程度减轻过重体重的作用。本文中的术语“治疗”指任何程度改善过重体重。

第二方面，本发明提供了一种预防或者治疗哺乳动物体重过重的方法，该方法包括给予哺乳动物含 OXM 的合成物。哺乳动物很可能需要预防或治疗体重过重。体重减轻有美体作用。含 OXM 的合成物将以有效浓度给药。

本发明第一方面的所有优选特征也适用于第二方面。

本发明的第三方面提供一种美化性减轻哺乳动物体重的方法，该方法包括给予哺乳动物含 OXM 的合成物。在这样的情况下，体重减轻纯粹是出于美化外观的目的。

第一、第二方面的所有优选特征也适用于第三方面。

不受理论的束缚，可明白本发明是通过给予 OXM 作为进食抑制剂来预防或治疗哺乳动物体重过重。通过减少食物摄入结果是防止和治疗哺乳动物体重过重。本文中，术语“食物”包括被摄取并具有发热值的物质。

本发明第四方面提供 OXM 在制造用于防止或治疗体重过重药物中的用途。

第一和第三方面的优选特征都可应用于第四方面。

本发明的第一、二、四方面内容与药物有关，具体的剂量方案最终由主治医师决定，并且在在使用 OXM 时考虑到以下因素：动物的类型、年龄、体重、症状的严重程度和/或治疗力度，给药方法，副反应和/或相反的迹象。可由标准设计的临床试验和对病人的病情进展和康复的全面监控来确定具体的剂量范围。

这些试验可采用逐步增加剂量的方法，使用动物所能承受的最大剂量的低百分比值作为人使用的起始剂量。

本发明第五方面涉及与运用 OXM 来鉴定能抑制哺乳动物摄食的制剂。本发明这方面提供了一种鉴定和进一步开发防治体重过重的合适药物的方法。

OXM 的应用可包括此肽本身的使用或包括 OXM 的原理或模型特征的应用。所用的 OXM 功能或结构特性可以是肽本身的特性，或者可以是一种计算机构建的模型，一种物理的二维或三维模型或者一种电子构建的（例如计算机构建的）一级、二级或三级结构，以及药效基团（三维电子密度图谱）或其 X-射线晶体结构。

此结构特性可用于鉴定潜在的能与 OXM 相互作用从而影响其功能的，可通过计算机建立模型和/或合理的药物设计进行鉴定。

本发明的每一方面的优选特性都对其他各方面作了必要的修正。

### 附图说明

现在通过实施例方式说明本发明，并参见以下图表，其中：

图 A 是前高血糖素原及其组成成分图；

图 1 是 ICV 和 iPVN 两种方法注射高血糖素原衍生的相关产物对禁食老鼠食物摄入的影响的比较。图 1A 表明在给禁食动物 IVC 注射 GLP-1、OXM、胰高血糖素或肠高血糖素（均 3nmol）后 8 小时的累计摄食量（g）。\*, P<0.05（以生理盐水作为对照）。图 1B 表明在给禁食动物急剧 iPVN 注射 GLP-1, OXM（均为 1nmol），或激动素(exendin)-4（0.03nmol）后，24 小时食物的累计摄入量（g）。\*, 所有组在 1, 2, 4h 时 P<0.01（以生理盐水作为对照）。\*, 只用激动素-4 在 8h 时 P<0.05（以生理盐水作为对照）。

图 2 是两张 ICV 和 iPVN 给予 OXM 对禁食老鼠摄食影响的作用效果图。图 2A，在给禁食老鼠急剧 ICV 注射 OXM（0.3, 1, 3, 或 10nmol）后 8 小时食物的累计摄入量（g）。图 2B 给禁食老鼠即刻 iPVN 注射 OXM（0.3, 1, 3, 或 10nmol）后 8 小时食物的累计摄入量（g）。\*, P <0.05（以生理盐水作为对照）。



图 3 是两张在黑暗初期 ICV 注射 OXM 作用效果的柱形图。在黑暗初期饱食老鼠接受 OXM、GLP-1(3nmol)或盐水的 ICV 注射,测定注射后 1h 的食物摄入量(克;A)和行为(B)。\*, $P<0.05$ (以生理盐水作为对照)。

图 4 是 OXM 和 GLP-1 由激动素- (9-39) 所致食物摄入的抑制作用的两张柱形图。图 4A, 急剧 ICV 注射 GLP-1(3nmol)、GLP-1 加激动素- (9-39) (30nmol)、OXM (3nmol)、OXM 和激动素- (9-39) (30nmol), 或单用激动素- (9-39) (30nmol) 后 1h 的食物摄入量。图 4B, 给禁食老鼠急剧 iPVN 注射 GLP-1(1nmol)、GLP-1 和激动素- (9-39) (10nmol)、OXM (1nmol)、OXM 和激动素- (9-39) (10nmol), 或单用激动素- (9-39) (10nmol) 后 1h 的食物摄入量。\*\*, $P<0.005$ (以生理盐水作为对照)。

图 5 是 GLP-1 和 OXM 对老鼠下丘脑膜 $[^{125}\text{I}]$ GLP-1 的结合竞争。

图 6 表明两种作用效果: a) 在黑暗早期给禁食 24h 的老鼠 IP 注射 OXM (30, 100 和 300nmol/kg 溶于  $50\mu\text{l}$  生理盐水中) 或生理盐水后的累计食物摄入量(实心方块=生理盐水, 空环=OXM 30nmol/Kg, 空心三角=OXM 100 nmol/Kg, 空三角=OXM 300 nmol/Kg); b) 黑暗期开始前给非禁食的老鼠 IP 注射 OXM (30, 100 和 300nmol/kg 溶于  $50\mu\text{l}$  生理盐水中) 或生理盐水后的食物的累计摄入量(实心方块=生理盐水, 空环=OXM 30nmol/Kg, 实心三角=OXM 100 nmol/Kg)。\* $P<0.05$ (以生理盐水作为对照);

图 7 表明一周内每天两次 IP 注射 OXM (50nmol/Kg) 或生理盐水对 a) 食物累计摄入量(g); 和 b) 体重增加量(g) 的影响。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.005$ (以生理盐水作为对照);

图 8 表明 IP 注射 OXM (50nmol/Kg), 生理盐水或阳性对照(1 小时=GLP-1(50nmol/Kg); 2 小时=CCK (15nmol/Kg)), 对禁食 36 小时的老鼠胃排空的影响。胃内容物(干重)以喂食后三十分钟内摄食量的百分比表示。\*\* $P<0.01$ (以生理盐水作为对照);

图 9 显示增加注射入禁食 24 小时的老鼠弓形核内的 OXM 剂量(0.01-1.0nmol) 对注射后 1h 食物摄入量的影响。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.05$ (以生理盐水作为对照);

图 10 表明在 IP 注射 OXM (30nmol/Kg)、GLP-1 (30nmol/Kg) 或生理盐水之前 15 分钟 iARC 注射激动素 9-39 (5nmole) 对注射后 1 小时食物摄入的影响。(S=生理盐水, G=GLP-1 (30nmol/Kg), Ex=激动素 9-39(5nmoles));

图 11a 表明 IP 注射 A) 生理盐水和 B) 以 OXM(50nmol/Kg) 於下丘脑弓形核中显示的 fos-样免疫反应。\*\*\* $P<0.005$ (生理盐水作对照);

图 11b 表明 IP 注射 A) 生理盐水和 B) OXM(50nmol/Kg) 或 C) IP CCK (15nmol/Kg) 于脑中 NTS 和 AP 中显示的 fos-状免疫反应。

### 具体实施方式

A: 以 ICV 和 iPVN 注射 OXM 后引起禁食老鼠的摄食量显著减少。

#### 肽和化学试剂

GLP-1, 肠高血糖素, 胰高血糖素和 SP-1 购自半岛实验室 (Peninsula Laboratories, Inc.) (St. Helens, UK), OXM 购自 IAF BioChem Pharma (Laval, Canada)。激动素-4 和激动素-(9-39) 由英国伦敦 Hammersmith 医院临床科学中心止血单元药物研究委员会 (Medical Research Council, Hemostasis Unit, Clinical Sciences Center, Hammersmith Hospital, London, UK) 在 396 MPS 肽合成仪 (Advanced ChemTech, Inc.) 上用 F-moc 化学试剂合成并经反相 HPLC 在 C<sub>8</sub> 柱 (Phenomex, Macclesfield, UK) 上纯化。分子量通过质谱验证正确。所有的化学试剂都购自 Merck & Co., (Lutterworth, Leicester, UK), 另有说明的除外。

#### 动物

成年雄性 Wistar 老鼠 (ICSM, Hammersmith Hospital) 在控制温度 (21-23°C) 和光线 (光照 12 小时, 黑暗 12 小时) 的条件下单笼培养; 随时可获得食物 (RM1 diet, Special Diet Services UK Ltd., Witham, UK) 和自来水。日常对待手术后康复的老鼠直至研究完成。所有动物操作程序都得到英国内务部动物处 (British Home Office Animals) 的批准 (Scientific Procedures Act 1986 (Project License PIL 90/1077))。

#### 试验合成物的 ICV 和 iPVN 插管和灌注

动物置放永久性不锈钢导管 (Plastics One, Roanoke, VA), 主体定位注入 ICV 或 iPVN。所有的研究工作均在禁食 24h 后的早期光照阶段, 在 0900-1100 之间进行, 测定注射后 1, 2, 4, 8 和 24h 的食物摄入量。

#### 喂食实验方法

高血糖素原衍生物和相关肽对食物摄取的影响的比较

在 1a 实验中, 老鼠 ICV 注入  $10\mu\text{l}$  的生理盐水, GLP-1 (13nmol), OXM (3nmol), 胰高血糖素 (3nmol), 或肠高血糖素 (3nmol;  $n=8$ /每组)。

在所有的实验中, 采用具有以下序列的 OXM:

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr  
Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln  
Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys  
Arg Asn Lys Asn Asn Ile Ala

采用具有以下序列的人 GLP-1:

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val  
Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys  
Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

在 1b 实验中, 老鼠 iPVN 注入  $1\mu\text{l}$  生理盐水, GLP-1 (1.0nmol), OXM (1.0nmol), 肠高血糖素 (1.0nmol), 胰高血糖素 (1.0nmol) 或 SP-1 (3.0nmol;  $n=12-15$ /group)。当注射 ICV 时, 激动素-4 抑制食物摄入比 GLP-1 更强。因此, 激动素-4 注射剂量为 0.03nmol 的 iPVN。

#### OXM 剂量增加对食物摄入量的影响研究

在 2a 实验中, 给老鼠 ICV 注射生理盐水, GLP-1 (3nmol), 或 OXM (0.3, 1, 3 或 10nmol;  $n=8$ /group)。在 2b 试验中, 给老鼠 iPVN 注射生理盐水 GLP-1 (1.0nmol), 或 OXM (0.1, 0.3, 或 1.0nmol;  $n=12-15$ /group)。为了评估 OXM 是否通过 GLP-1 受体起作用, 用 GLP-1 受体的拮抗剂激动素-(9-39) 进行研究。

#### 夜间喂食与行为分析

实验 3: OXM 可能通过引起非特异性厌食而抑制食物的摄入, 这可能不是真正的过饱因素。因此, 在黑暗期将 GLP-1 (3nmol), OXM (3nmol) 或生理盐水 ( $n=6$ /group) 注入插入 ICV 导管的老鼠。注射后 1h 进行摄食量测定 (实验 3a) 和行为分析 (实验 3b)。注射后 1h 采用行为评分表来观察老鼠的行为。

在实验 4a 中, 老鼠分别用 ICV 注射盐水; GLP-1 (3nmol); GLP-1 (3nmol) 加激动素-(9-39) (30nmol), OXM (3nmol), OXM (3nmol) 加激动素-(9-39) (30nmol), 或激动素-(9-39) (30nmol) 单独注射。在 4b 试验中, 老鼠分别用 iPVN 注射盐水, GLP-1

(1nmol), GLP-1 (1nmol) 加激动素-(9-39) (10nmol), OXM (1nmol), OXM (1nmol) 加激动素-(9-39) (10nmol), 或激动素-(9-39) (10nmol, n=10-12/组) 单独注射。

### 实验 5 受体结合试验

受体结合试验在终体积 0.5ml 的溶液进行。溶液含老鼠丘脑下部的细胞膜 (含 200  $\mu$ g 蛋白质); 500Bq 的 [ $^{125}$ I]GLP-1 (100pM) 和未标记竞争肽 (GLP-1 和 OXM)。含膜溶液室温孵育 90 分钟。结合的和游离的放射性标记物通过离心分离 (2 分钟、4 $^{\circ}$ C)。沉淀的膜用试验缓冲液 (0.5ml、冰浴的) 洗涤, 洗涤后按上述方法离心。除去上清液, 沉淀的放射活性用  $\gamma$  计数器测量。特异性结合值 (饱和) 计算为在缺乏 (总结合) 和存在 1  $\mu$ m GLP-1 或 OXM (非饱和结合) 时 [ $^{125}$ I]GLP-1 结合量之间的差异。所有曲线是用一式三份测量值点构成。IC<sub>50</sub> 值用 Prism 3 程序 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) 计算得到。

### 统计

关于食物摄取分析, 数据以平均值 $\pm$ 标准误差 (SEM) 形式表示。实验各组间的统计学差异先进行方差分析 (ANOVA), 继而以多重方差 (*post-hoc*) 最小显著性差异检验 (Systat 8.0, Evanton, IL) 确定。关于行为分析, 数据显示为每种行为发生数的中值和范围。使用 Mann-Whitney U 检验 (Systat 8.0) 比较各组间的差异。所有检验中,  $P < 0.05$  认为具有统计学意义。

### 结果

高血糖素原衍生物和相关多肽对食物摄取的影响的比较。

#### ICV 给药

在实验 1a 中, OXM 和 GLP-1 显著减少了再进食。这种对食物摄取的抑制持续到注射后 4 个小时 (图 1A)。胰高血糖素和肠高血糖素 (3nmol) 在任何时间点对食物摄取都没有影响 (图 1A)。

#### iPVN 给药

在实验 1b 中, 当 iPVN 注射后, OXM, GLP-1 (3nmol) 和激动素-4 (0.03nmol) 也抑制了再进食。这种抑制持续到注射后 8 小时, 比 ICV 注射更久 (图 1B)。肠高血糖素, 胰高血糖素 (1nmol) 和 SP-1 (3nmol) 在 iPVN 注射后任何时间点对进食都没有影响。

## 增加 OXM 剂量对食物摄取的影响

### ICV 给药

在实验 2a 中, 当 ICV 注射后, OXM 以剂量依赖方式减少了再进食, 剂量 3 nmol 时, 注射后 1、2、和 4 小时达到最大抑制作用。

### IPVN 给药

在实验 2b 中, 当 iPVN 注射后, GLP-1 (1nmol) 和 OXM (1nmol) 显著减少食物摄取量, 持续到注射后 8 小时 (图 2B)。

## OXM 对在黑暗期开始时 ICV 插管饱食老鼠的影响

黑暗期是老鼠自然进食时间。因此, 评估此时假定的致饱因素对非禁食动物的影响更具有生理学意义。

## OXM 对食物摄取的影响

在实验 3a 中, 在黑暗早期注射时, 注射一小时后, 与注射盐水的相比, GLP-1 和 OXM 都显著降低了进食 (图 3A)。

## 观察 ICV 注射 OXM 后对行为的影响。

在黑暗早期, ICV 给予 OXM (3nmol) 导致显著降低进食行为的发生 (在实验 3a 中已经提到过), 并增加了饲养行为 (在实验 3b 中) (图 3B)。梳理毛发、静止、低头、挖洞或移动行为无变化。

为了评估 OXM 是否通过 GLP-1 受体发挥作用, 用 GLP-1 受体拮抗剂——激动素-(9-39) 作试验。

## ICV 给药 实验 4

GLP-1 受体拮抗剂——激动素-(9-39) 和 GLP-1 以 10: 1 比率 (拮抗剂/激动剂) 的 ICV 给药, 阻断了 GLP-1 的厌食作用 (图 4A)。此外, 激动素-(9-39) 和 OXM 的共同给药导致 OXM 的厌食作用减弱 (图 4A)。

### iPVN 给药

与上述相似，当 iPVN 注射后，GLP-1 和 OXM 的厌食作用都被同时注射的激动素-(9-39)所阻断（图 4B）。

### 受体结合实验 5

GLP-1 对老鼠下丘脑膜制备物中，GLP 受体的亲和力 ( $IC_{50}$ ) 是 0.16nM（图 5）。OXM 对同一制备物中，GLP-1 受体的亲和力是 8.2nM（图 5），大约比 GLP-1 弱两个数量级。

### 讨论

当注射 ICV 和 iPVN，OXM 对禁食所致的再进食有强抑制作用。此种作用对于 iPVN 可持续 8 小时，对于 ICV 持续 4 小时。在 ICV 和 iPVN 的摩尔给药量相同时，OXM 的作用的量级和时间过程与 GLP-1 大致相同。此外，OXM 能抑制黑暗期开始时非禁食老鼠摄取食物，此时老鼠没有厌食行为症状。

研究提示胃粘膜上有 OXM 特异性结合位点。然而，在 CNS 没有鉴定到这类结合位点。因此，推测 OXM 是通过下丘脑的 GLP-1 受体发挥作用，如同 OXM 和 GLP-1 在进食研究中有相类似作用。已显示 OXM 对 GLP-1 受体具有纳摩尔亲和力 ( $IC_{50}=8.2nm$ )，大约比 GLP-1 的 ( $IC_{50}=0.16nM$ ) 弱两个数量级。尽管对 GLP-1 的亲和力弱，但 OXM 降低食物摄取与 GLP-1 是同一个数量级。一种解释是 OXM 可能通过下丘脑的 GLP-1 受体和自己的受体起作用。因此尽管其对 GLP-1 受体亲和力低，OXM 诱导的反应比得上 GLP-1 的作用。

激动素-(9-39)是 GLP-1 受体拮抗剂激动素-4 的一层段，是 GLP-1 受体的选择性强拮抗剂。当 GLP-1 和激动素-(9-39)共同注射时，GLP-1 的厌食作用被阻断。当 OXM 和激动素-(9-39)共同注射时，OXM 的厌食作用也完全被阻断。这增强了 OXM 是通过 GLP-1 受体发挥作用的论点。

我们研究了在即刻 ICV 注射后，肠高血糖素和胰高血糖素对禁食老鼠的作用。给与这些多肽药物后，没发现对禁食所致食物摄取有影响。此外，当 iPVN 给药时，这些多肽也没有作用。当 iPVN 注射时，没有观察到 SP-1，假定的 OXM 的最小活性结构，对食物摄取有抑制作用。因此，观察到的 OXM 作用是特异性的。

B: 外周 OXM 给药也能导致食物摄取减少和体重减轻。

多肽和化学药品

OXM 购自 IAF BioChem Pharma(Laval, Canada)。GLP-1 购自半岛实验室 (Peninsula Laboratories Inc, St. Helens, UK)。激动素-(9-39)是在伦敦 Hammersmith 医院止血单元药物研究委员会 (Medical Research Council Hemostasis Unit Clinical Sciences Centre Hammersimth Hospital London UK) 中采用 F-moc 化学试剂在 396 MPS 多肽合成仪上合成, 用反相 HPLC C<sub>8</sub> 柱 (Phenomex Macclesfied, UK) 纯化, 以 0.1% 三氟乙酸配的乙晴梯度为洗脱。正确的分子量通过质谱证实。除非另有说明, 所有化学试剂都是从 Merck Eurolab Ltd (Lutterworth Leicestershire, UK) 购买。

## 动物

成年雄性 Wistar 老鼠 (180-200g) 在控制温度 (21-23°C) 和光照 (12 小时光照, 12 小时黑暗) 条件下, 单笼饲养。它们能够得到足量标准鼠食 (RM1 diet, Special Diet Services UK Ltd, Witham Essex, UK) 和水。所有操作过程的进行都得到英国内务部动物处 (British Home Office Animals) 的批准 (科学操作) Act 1986 (项目证号 PPL: 90/1077, 70/5281 和 70/5516)。

## 弓形核内套管插入术

立体定位给动物植入永久性留置的单侧不锈钢导入套管 (Plastics One, Ronoke, VA), 植入到下丘脑的弓形核中。套管植入位置是前囟后 3.3mm, 和外侧 0.3mm 及头骨外表面向下 9.0mm。

## 腹膜内注射

所有的腹膜内注射用 1 ml 注射器和 25 号针头。注射体积根据各动物体重调整, 最大注射量 500  $\mu$ l。所有肽溶于生理盐水中。

在这些研究中, 所用的人 OXM 和人 GLP-1 的序列在上述第 9 页提供。

## 体内方案

### 1. 研究外周给药 OXM 对禁食动物的食物摄取的剂量反应影响

在研究前, 动物被禁食 24 小时。在光照初期 (09.00-10.00 时), 老鼠分别腹膜内注射体积 500  $\mu$ l 的盐水; GLP-1 (30nmol/kg 体重, 作为阳性对照组) 和 OXM (10-

300nmol/kg 体重) (n=12/组)。注射后, 动物返回自己的笼子, 并提供已称重的鼠食。测定注射后 1, 2, 4, 8, 和 24 小时的摄食量。

## 2. 研究外周给药 OXM 对非禁食动物在黑暗期摄取食物的影响

黑暗期是老鼠“正常”的摄取食物时间。因此, 此时任何食物摄取的抑制可认为比禁食后再摄食的变化更符合生理情况。熄灯前 (18.00—19.00 时) 动物腹膜内注射盐水或 OXM (3—100nmol/kg 体重) (n=12/组)。测定关灯后 1, 2, 4, 8 和 12 小时的摄食量。

## 3. 反复腹膜内注射 OXM 的影响

45 只动物按体重随机分成 3 组 (每组 15 只): 1) 盐水处理组, 并随时获得充足食物, 2) OXM (每次注射 50nmol/kg 体重, 根据前面的剂量反应试验得出的剂量) 处理组, 并随时获得充足食物, 3) 盐水处理, 但白天食物受限制和 OXM 处理, 夜晚摄取食物。动物每天注射两次 (07.00 点和 18.00 时) 持续 7 天。每天测量食物摄取量 (g), 体重 (g) 和水摄取量 (ml)。第八天, 动物被断头处死。取出并称重附睾白色脂肪组织 (WAT) 和肩胛间棕色脂肪组织 (BAT) 作身体肥胖评估。

## 4. 研究外周给药 OXM 对胃排空的影响

动物禁食 36 小时, 以确保胃是空的。光照早期段 (09.00—10.00 时), 动物被允许接触足量的已称重的标准鼠食 30 分钟。此后, 取出食物并再称重。动物分别腹膜内注射盐水, OXM (50nmol/kg 体重) 和 CCK-8 (15nmol/kg 体重)。与前述食物摄取实验同样时间, 在取食 1, 2, 4 或 8 小时后, 每时间段每组杀死 12 只老鼠。CCK-8 组在这次实验中仅作为 2 小时点的阳性对照。动物用二氧化碳窒息处死。快速进行腹腔手术, 暴露胃。结扎幽门连接处 (2.0Mersilk Johnson& Johnson, Belgium), 然后结扎胃和食管连接处, 取出胃。然后取出胃内容物, 置于已称重的容器中, 空气干燥 48 个小时。一旦干燥, 称重内容物, 在半个小时再进食期间每只老鼠留存在胃内的鼠食百分率用下面的公式计算:

$$\% \text{胃内残余食物} = (\text{胃内容物干重}) / (\text{摄取食物总重}) \times 100$$

## 5. 研究增加 OXM 弓形核内用药剂量的影响

按体重将弓形核内 (Intra-ARC (iARC)) 植入套管的老鼠随机分成 6 组, 每组 12—15 只。在光照初期 (09.00—10.00 点), 禁食 24 小时的老鼠分别接受盐水 OXM (剂量为



0.01, 0.03, 0.1, 0.3 和 1.0nmol) iARC 注射。测定注射后 1, 2, 4, 8 和 24 小时的摄食量。

#### 6. 研究 OXM 的外周给药是否直接通过弓形核的 GLP-1 受体发挥作用

将弓形核内 (Intra-ARC (iARC)) 植入套管的老鼠随机分成 6 组 (n=10-12/组)。在光照初期 (09.00-10.00 时), 禁食 24 小时的老鼠接受盐水或激动素-(9-39) (5nmol) 弓形核内套管注射, 15 分钟后, 腹腔内分别注射盐水, OXM (剂量为 30nmol/kg 体重), 或 GLP-1 (剂量为 30nmol/kg 体重)。注射的细节在下表 1 中描述。

表 1

分组	ARC 内注射	腹腔内膜给药
1	盐水	盐水
2	盐水	OXM (30nmol/kg)
3	盐水	GLP-1 (30nmol/kg)
4	激动素-(9-39) (5nmol)	盐水
5	激动素-(9-39) (5nmol)	OXM (30nmol/kg)
6	激动素-(9-39) (5nmol)	GLP-1 (30nmol/kg)

#### 免疫组织化学

腹腔内分别注射 OXM (50nmol/kg), CCK (剂量为每公斤体重 15nmol/kg), 或盐水 90 分钟后, 最终被麻醉的老鼠先通过贲门灌注 0.1M 的磷酸缓冲盐水 (PBS), 然后灌注 4% 的甲醛磷酸缓冲液 (PBF)。取出脑子放在甲醛磷酸缓冲液固定过夜, 然后转移到蔗糖磷酸缓冲液 (20% w/v) 过夜。在冷冻超薄切片机中, 将脑和脑干切成 40  $\mu$ m 的冠状切片; 切片通过亲和素-生物素-过氧化物酶方法染色观察 fos-样免疫反应 (FLI)。然后, 将切片固定在聚-L-赖氨酸覆盖的载玻片上, 以递增浓度 (50-100%) 的乙醇脱水, 在二甲苯中脱脂, 用 DPX 仪盖上盖玻片。玻璃片用光学显微镜 (Nikon Eclipse E-800) 观察 FLI-阳性核, 用显微摄像机 (Xillix Micro Imager) 捕获影像。下丘脑和脑干的 FLI-阳性核的数目由不知道本实验的研究小组的独立成员计算。计算每张切片的 FLI-阳性核平均数目, 并以整数数值表示各动物的荧光阳性核数目。

## 下丘脑外植体静态培养

一种静态培养系统。雄性 Wistar 老鼠脱颈椎处死并立刻取出整个脑子。固定此脑子作成标本，腹侧面朝上，放置在振荡的显微镜切片机（Microfield Scientific Ltd., Dartmouth, UK）上。从下丘脑基部切取 1.7mm 的切片，侧面封闭于在 Willis 环（Circle of Willis）并在含有经 95%O<sub>2</sub> 和 5%CO<sub>2</sub> 平衡的 1ml 人造脑脊液的小室（chambers）中培养。该下丘脑切片含有中间前视觉区，PVN（下丘脑室旁核），背内侧核（dorsomedial nucleus），腹内侧核（ventromedial nucleus），下丘脑外侧核（lateral hypothalamic）和 ARC。将这些试管放在平台上，37℃ 恒温水浴中。经过最初 2 个小时平衡后，每个外植体用于测试期之前在 600 μl aCSF（人造脑脊液）中培养 45 分钟（基础期）。所用的 100nM OXM，是其 GLP-1 受体 IC<sub>50</sub> 的十倍剂量。最后接触含有 56mMKCl 的 aCSF45 分钟证实了该组织的活力。在每次实验期末取出 aCSF 并保存在 -20℃ 直到用放射免疫试验测定 α MSH-免疫反应的。

## 放射免疫试验测定 α MSH-IR

α MSH 用一种室内放射性免疫试验（in-house radioimmunoassay）来测定，采用 Chemicon International Inc. 的抗体。

## 统计学分析

IP 和 iARC 摄食实验的数据用 ANOVA 和随后进行的 LSD（最小显著差异）检验作了分析。不同处理组的脂肪垫重量用非配对 t 检验分析。比较了下丘脑外植体培养实验各外植体与其自身基础期的数据，用配对 t 检验分析。在所有情况下，P<0.05 被认为有统计学显著性。

## 结果

### 1. 禁食动物 OXM 外周给药的影响

与盐水对照组相比，OXM 经腹膜内给药（100 和 300nmol/kg），导致禁食 24 小时动物注射后 1 小时再进食的明显抑制（1 小时：OXM 为 100nmol/kg，5.4±0.2g(P<0.05)，300nmol/kg，4.5±0.2g(P<0.05)；而盐水为 6.3±0.2g）。100nmol/kg OXM 所引起的摄食量减少持续到注射后 8 小时。然而，最高剂量 OXM（300nmol/kg）对进食的明显抑制作用持续到注射后 24 小时（24 小时：OXM 300nmol/kg，9.5±0.6g；而盐水 17.5±0.7g，

$P<0.05$ ) (图 6a)。在测定的任何时间点 30 nmol/kg 和 10 nmol/kg 的 OXM 不能改变摄食量。

## 2. 外周给药 OXM 对非禁食动物黑暗期摄食量的影响

在黑暗期前，立刻注射对通夜进食的老鼠，在实验的任何时间点，3 和 10 nmol/kg 的 OXM 对其摄食量均无影响。但是，30 nmol/kg 的 OXM 对摄食量有明显抑制作用持续至注射后 2 小时。(2 小时: OXM, 30 nmol/kg, 为  $4.5\pm 0.4\text{g}$  而盐水  $5.8\pm 0.4\text{g}$ ,  $P<0.05$ )。注射后 4 小时摄食量减少, 但不明显。在整个黑暗期, 100 nmol/kg 的 OXM 对摄食量有明显抑制 (8 小时: OXM 为 100nmol/kg,  $14.1\pm 0.8\text{g}$ ; 而盐水为  $16.9\pm 0.5\text{g}$ ,  $P<0.05$ ) (图 6b)。

## 3. OXM 反复腹腔注射 (IP) 给药的作用

每天两次 IP 注射 OXM (50 nmol/kg) 共七天与注射盐水的对照动物相比, 引起了积累性的日进食量明显减少 (第 7 天累积摄食: OXM 为 50 nmol/kg,  $168\pm 4.6\text{g}$ ; 而盐水为  $180\pm 4.3\text{g}$ ,  $P<0.05$ ) (图 7a)。此外, 注射 OXM 的动物比盐水相比, 体重增加明显减慢 (第 7 天累计增重: OXM 为 50 nmol/kg,  $21.0\pm 1.5\text{g}$ ; 而盐水为  $37.6\pm 1.9\text{g}$ ,  $P<0.005$ )。另外, 限制食物的“配对喂养”动物增重不如注射 OXM 动物那样慢, 尽管得到了同样的进食量。(第 7 天: 配对喂养为  $33.5\pm 2.0\text{g}$ ,  $P=\text{NS}$ ; 而盐水 (随意喂食) 为  $P<0.05$ ; 相比于 OXM) (图 7b)。此外, 持续的 OXM 引起了肥胖症的减少, 这在注射盐水的配对动物中没有观察到 (表 2)。OXM 处理动物在实验第一和第二天饮水明显减少 (第一天: OXM, 为  $24.1\pm 1.28\text{ ml}$ ; 而盐水对照为  $28.1\pm 1.33\text{ ml}$ ,  $P<0.05$ )。在随后的几天中, 与注射盐水动物相比, 日饮水量增加 (第 3-6 天)。然而, 第七天, 盐水和 OXM 处理组之间饮水量没有区别 (未显示)。

表 2:

组织/激素	盐水	OXM	配对喂养
WAT	$0.69\pm 0.02$	$0.51\pm 0.01^a$	$0.61\pm 0.02^b$
BAT	$0.16\pm 0.01$	$0.12\pm 0.01^a$	$0.15\pm 0.01^b$

每天两次腹腔注射 (IP) 盐水或 OXM (50 nmol/kg) 七天, 对限制食物和随意摄食老鼠附睾白色脂肪组织 (epididymal WAT) 和肩胛间棕色脂肪组织 (interscapular BAT) 增量的作用。

#### 4. 延迟胃排空对 OXM 厌食作用的影响

给禁食 36 小时老鼠食物一小时后, GLP-1 处理动物的胃内容物干重(作为 30 分钟喂食期食物消耗的百分比)明显高于盐水处理动物(1 小时: GLP-1 为  $50 \text{ nmol/kg}$ ,  $76.9 \pm 2.7\text{g}$ ; 而盐水对照组为  $65.8 \pm 1.6\text{g}$ ,  $P < 0.01$ ), 提示 GLP-1 引起了明显胃排空减少。OXM 处理动物胃内容物比盐水处理对照动物多, 尽管没有统计学显著性(1 小时: OXM,  $50 \text{ nmol/kg}$  为  $72.0$ ; 而盐水对照组为  $65.8 \pm 1.6\text{g}$ ,  $P < 0.07$ )。喂食后两小时, 与盐水处理动物相比 OXM 对胃内容物没有影响。但是, 在此刻, 注射阳性对照物 CCK( $15 \text{ nmol/kg}$ )的动物胃内容物明显高(2 个小时: CCK,  $15 \text{ nmol/kg}$  为  $64.7 \pm 6.4\text{g}$  而盐水对照组为  $38.5\text{g}$ ;  $P < 0.01$ ), 提示 CCK 引起了胃排空速率明显下降。与盐水对照动物相比, 喂食后 4 或 8 个小时, OXM 对胃内容物没有影响(图 8)。

#### 5. 弓状核内注射剂量增加的 OXM 作用的研究

24 小时禁食后再进食的第一个小时里, iARC 给药 OXM 的所有剂量(除了  $0.01 \text{ nmoles}$  外)都明显抑制了进食(1 小时: OXM  $0.03 \text{ nmoles}$ ,  $6.1 \pm 0.5\text{g}$  ( $P < 0.05$ );  $0.1 \text{ nmoles}$ ,  $5.6 \pm 0.4\text{g}$  ( $P < 0.05$ );  $0.3 \text{ nmoles}$ ,  $5.1 \pm 0.6\text{g}$  ( $P < 0.01$ );  $1.0 \text{ nmole}$ ,  $3.6 \pm 0.5\text{g}$  ( $P < 0.005$ ); 而盐水对照为  $7.7 \pm 0.2\text{g}$ ) (图 9)。OXM  $0.3$  和  $1.0 \text{ nmoles}$  对进食的显著抑制作用持续到注射后 8 小时。注射后二十四小时, OXM  $1.0 \text{ nmoles}$  对进食有抑制, 尽管不明显(24 小时: OXM  $1.0 \text{ nmole}$  为  $37.8 \pm 3.0\text{g}$ ; 而盐水对照对  $40.8 \pm 1.6\text{g}$ ,  $P = \text{NS}$ )。

#### 6. 对外周给药 OXM 是否通过弓状核 GLP-1 受体起作用的研究

腹腔内给药 GLP-1( $30 \text{ nmol/kg}$ )或 OXM ( $30 \text{ nmole/kg}$ ) 都能在进入黑暗期一小时后明显抑制进食(1 小时: GLP-1 为  $5.0 \pm 0.6\text{g}$ ; OXM 为  $5.1 \pm 0.4\text{g}$ ; 而盐水对照为  $9.2 \pm 0.3\text{g}$ )。然而, 预先给药 GLP-1 受体拮抗剂-激动素 9-39( $300 \text{ nmol/kg}$ ), 直接将其注射入 ARC, 阻断了 OXM 腹腔给药所致的厌食作用(表 3 和图 10)。腹腔内注射 GLP-1 抑制进食不受在先的激动素 9-39 的 iARC 给药的影响。

表 3

肽	进食	S.E.M.
盐水/盐水	9.2	0.3
盐水/GLP-1	5.0	0.6
激动素 9-39/*GLP-1	5.0	0.3
盐水/OXM	5.1	0.4
激动素 9-39/ OXM	9.4	0.4
激动素 9-39/盐水	9.0	0.3

在 OXM (30nmol/kg), GLP-1 (30nmol/kg) 或盐水的 IP 给药前, 激动素 9-39 (5nmole) iARC 给药或盐水注射 15 分钟对一小时摄食量 (g) 的影响。(S=盐水, G=GLP-1(30 nmol/kg), Ox= OXM(30 nmol/kg), Ex= 激动素 9-39(5 nmoles))。

#### 7. 绘制对 IP OXM 反应中下丘脑的 FLI 表达图

在 IP OXM(50 nmol/kg)给药后, 几乎只在下丘脑弓状核中发现致密的 FLI 着色(图 11a)。其他下丘脑核 (PVN (下丘脑室旁核), DMH (下丘脑背内侧核) VMH (下丘脑腹内侧核)) 中均未显示特异性的 c 状沟 (c-fos) 着色。

在脑中, IP CCK(15 nmol/kg)引起致密的 FLI 着色, 大部分见于 NTS (背侧孤束核 nucleus tractus solita) 和后区 (the area postrema) 中 (图 6b)。但是, 在同一脑干核研究中, 不论 IP 盐水或 IP OXM(50 nmol/kg)均未引起特异性 c-fos 表达增加 (图 11b)。

#### 8. 用 OXM 培育时下丘脑外植体释放 $\alpha$ -MSH 的变化

与基本释放 (basal release) 相比, 下丘脑外植体与 OXM 培育引起了  $\alpha$ -MSH 释放的明显增加 ( $\alpha$ -MSH: OXM, 100nM 为  $4.1 \pm 0.6$ fmol/每个外植体; 而基础释放为  $2.6 \pm 0.5$ fmol/每个外植体,  $P < 0.005$ )。外植体存活力通过在 56 mM KCl 中培育评估, 证实 80% 的外植体存活。将那些非存活(not viable)的外植体排除于此分析中。

#### 讨论

OXM 的外周给药引起老鼠进食减少。这可见于光照期禁食后和通过喂食期。厌食作用强并持续 24 小时。每天两次腹腔注射 OXM 七天, 与盐水处理动物相比, 日进食减少, 无

快速减敏现象。OXM 处理动物体重增加明显少于配对喂养的动物，尽管两组动物接收了相同的日摄取热量。腹膜内给药 OXM 确实可以短暂减少水的摄取，尽管这个现象没有持续；提示体重增加速率的降低并非由于脱水而致。

在总结长期研究时，取出附睾白色脂肪组织 (epididymal WAT) 和肩胛间棕色脂肪组织(interscapular BAT)并称重。发现，与配对应喂食的动物相比，尽管进食量相同，OXM 处理动物所有脂肪垫重量都有减少。因此看来外周 OXM 给药也影响了其他新陈代谢参数。

过饱的一个主要作用是通过迷走神经介导 (vagal mediated) 的可导致脑干活动的机制，过缓胃排空。GLP-1 和 OXM 都是啮齿动物和人胃排空的强抑制物，并且对 GLP-1 来说，认为是其促使过饱的主要机制。我们推测 OXM 以同样的方式起作用，并且它对胃排空的作用是引起持续厌食的原因。但是，尽管 OXM 外周给药导致再给食后最初一个小时中胃排空轻微延迟，但这不明显，而且作用是短暂的。这提示 OXM 确实能减缓胃排空，但它很可能不是造成强的持续进食抑制的原因。

这里我们报告了 OXM 外周给药几乎只增加了 ARC 中的 FLI。此外，我们发现用 OXM 培育下丘脑外植体引起了下丘脑外植体释放 POMC (阿片黑素皮素原 pro-opiomelanocortin) -衍生产物—— $\alpha$ -MSH 增加。腹腔注射 OXM 不影响 NTS 和 AP 中的 FLI 表达——这些区域被认为在整合迷走神经介导的信号 (vagal mediated information) 中起重要作用，进一步加强了关于 OXM 不是通过这些通路起作用的观点。

据认为脑干中的核是 GLP-1 作用的主要部位，随后信号被传递到下丘脑 PVN，在 PVN 介导了其厌食作用。OXM 直接注射入 ARC 中，即使是很低的剂量都能引起强烈持久的进食抑制作用，进一步支持了 ARC 是 OXM 作用部位的推测。在 ARC 中预先给予激动素 9-39 阻断了 OXM 外周给药所引起的厌食作用。然而令人感兴趣的是，GLP-1 外周给药无厌食作用。这些发现强有力表明 OXM 通过 ARC 中的 GLP-1 受体起作用。此外，还鉴定到介导 GLP-1 和 OXM 作用的不同通路。

综上所述，这些数据显示 OXM 在长期和短期调节进食和体重维持中有潜在的重要性。胜于“传统”的通过饱食通路来减少食欲，包括减缓胃排空和激活脑干核，循环性 OXM 通过直接与 ARC 相互作用——可能是激活此核中的 POMC 阿片里季皮质原神经元——而介导其厌食作用。因此，OXM 可用于治疗或预防哺乳动物肥胖等体重过重，并且为开发治疗哺乳动物肥胖等体重过重治疗药物提供了一个新的目标。

## 序列表

<110> 皇家学院创新有限公司

<120> 用于预防或治疗体重过重的胃肠激素

<130> PUKAI040198

<140> PCT/GB02/04082

<141> 2002-09-09

<150> GB 0121709.0

<151> 2001-09-07

<160> 5

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> 智人类(Homo sapiens)

<400> 1

His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ser
1				5					10					15	
Arg	Arg	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr	Lys	Arg	Asn
			20					25					30		
Arg	Asn	Asn	Ile	Ala											
			35												

<210> 2

<211> 36

<212> PRT

<213> 鮫鱈类(Lophius sp.)

<400> 2

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Ser	Asn	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Glu	Asp
1				5					10					15	
Arg	Lys	Ala	Gln	Glu	Phe	Val	Arg	Trp	Leu	Met	Asn	Asn	Lys	Arg	Ser
			20					25					30		
Gly	Val	Ala	Glu												
			35												

<210> 3  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> 鳗类(Anguilla sp.)

<400> 3

```

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Asn Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Thr
1           5           10           15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Ser Lys Arg Ser
           20           25           30
Gly Gly Pro Thr
           35
  
```

<210> 4  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> 智人类(Homo sapiens)

<400> 4

```

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1           5           10           15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
           20           25           30
Lys Asn Asn Ile Ala
           35
  
```

<210> 5  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 智人类(Homo sapiens)

<400> 5

```

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1           5           10           15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
           20           25           30
  
```



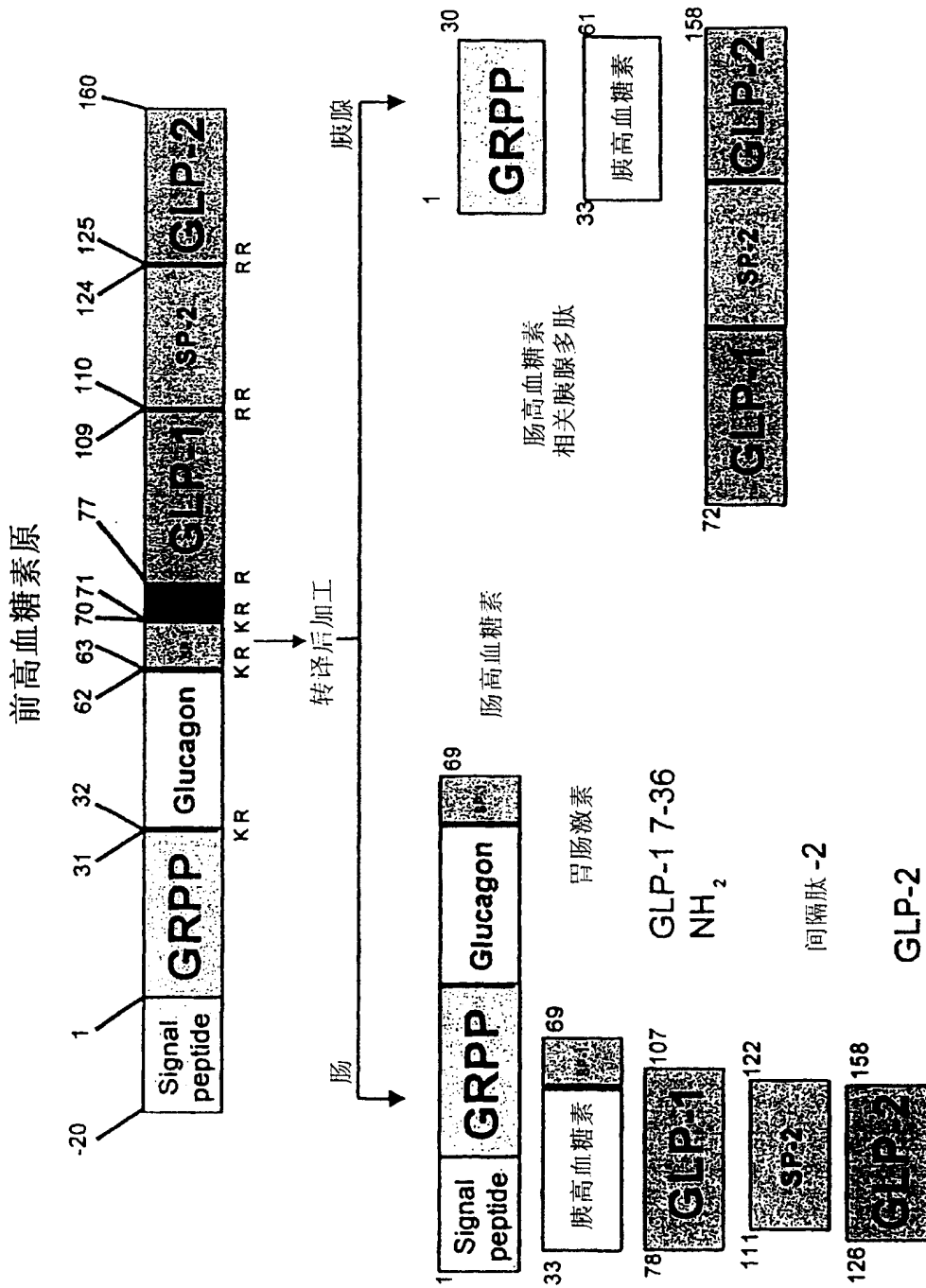


图 A

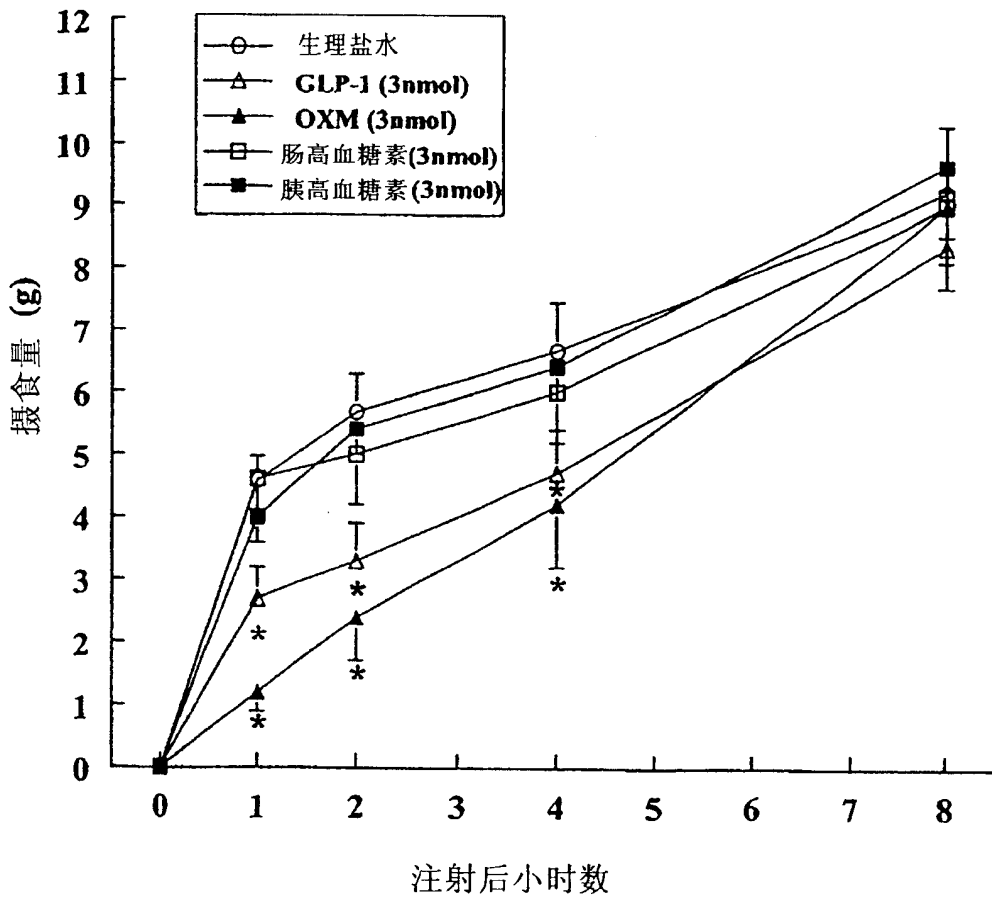


图 1 A

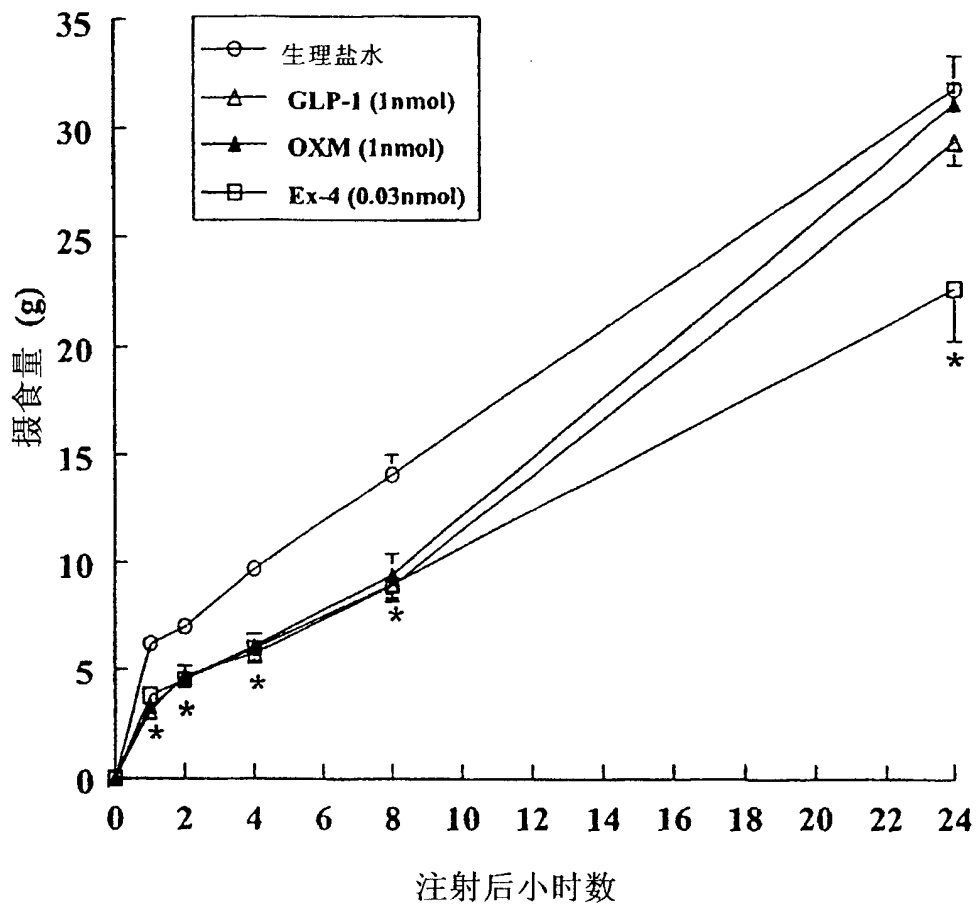


图 1 B

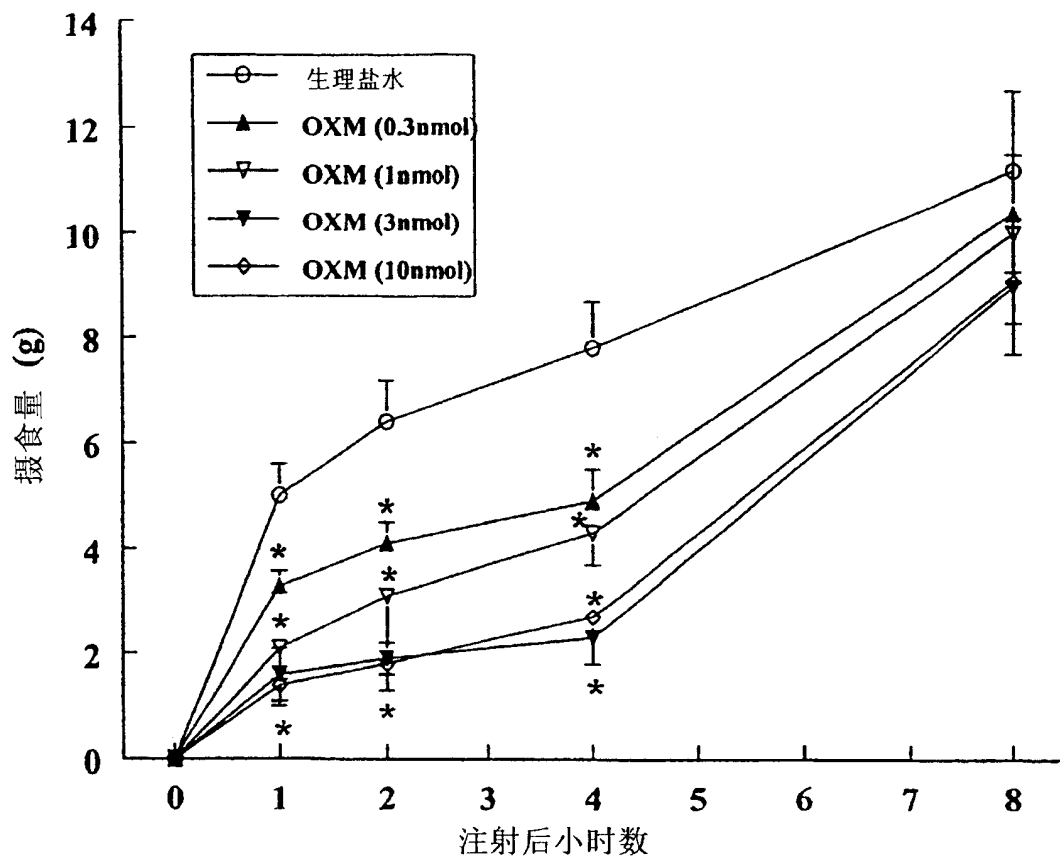


图 2 A

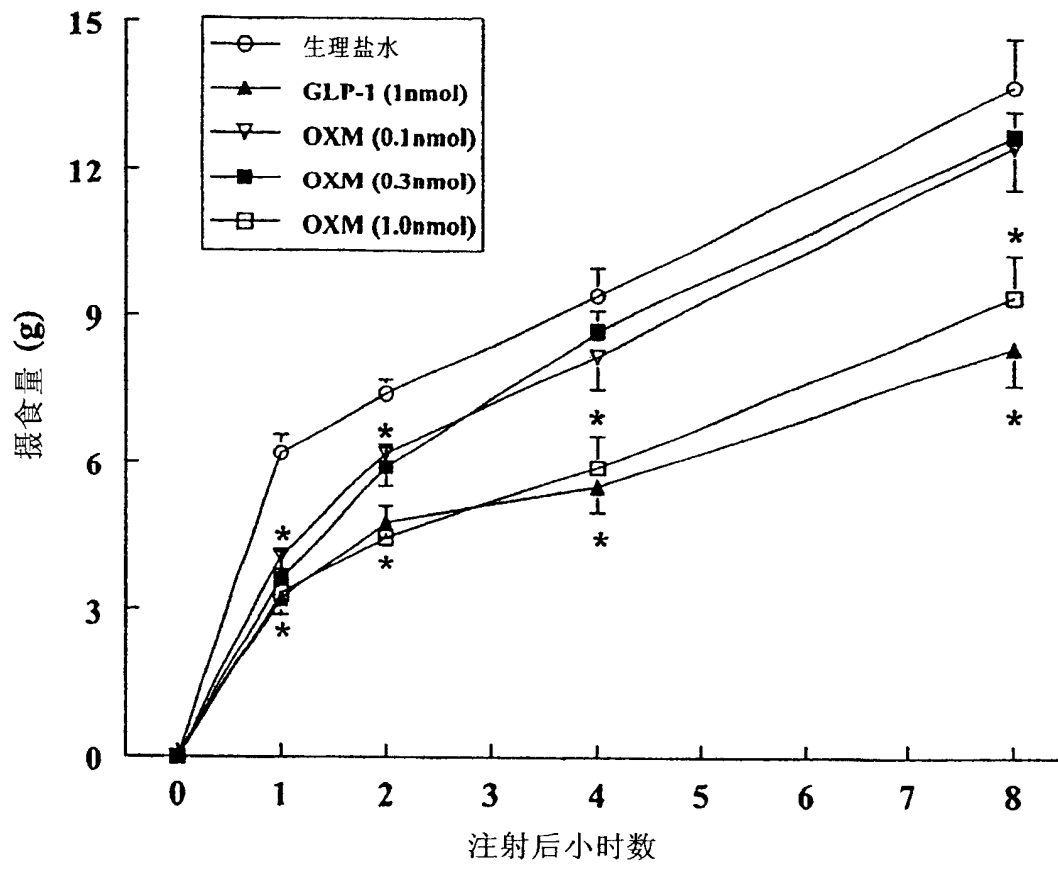


图 2 B

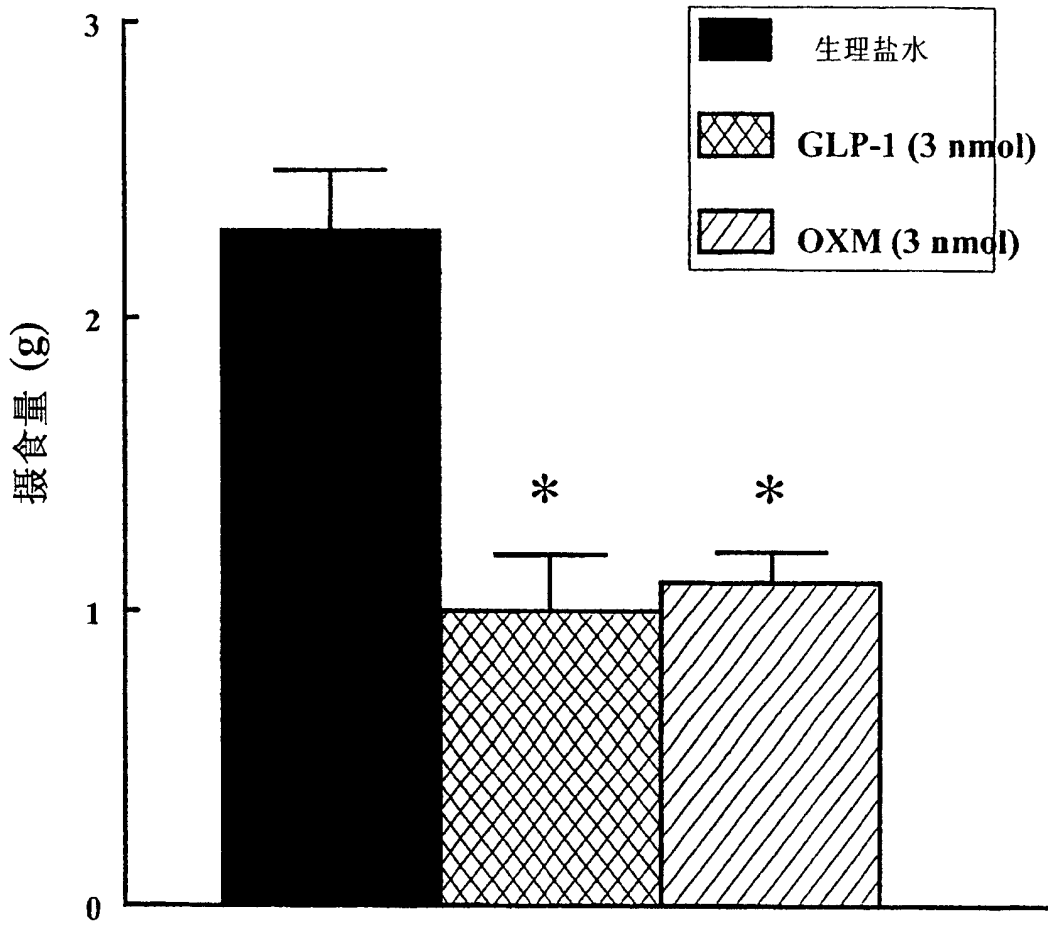


图 3 A

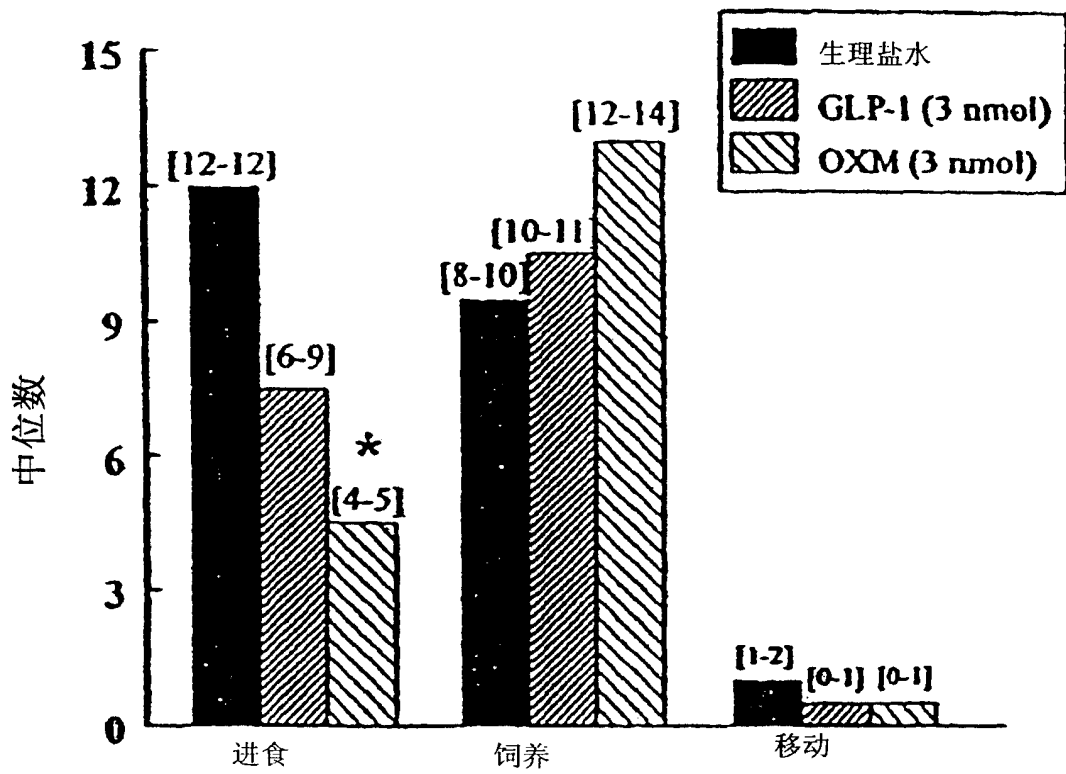


图 3 B

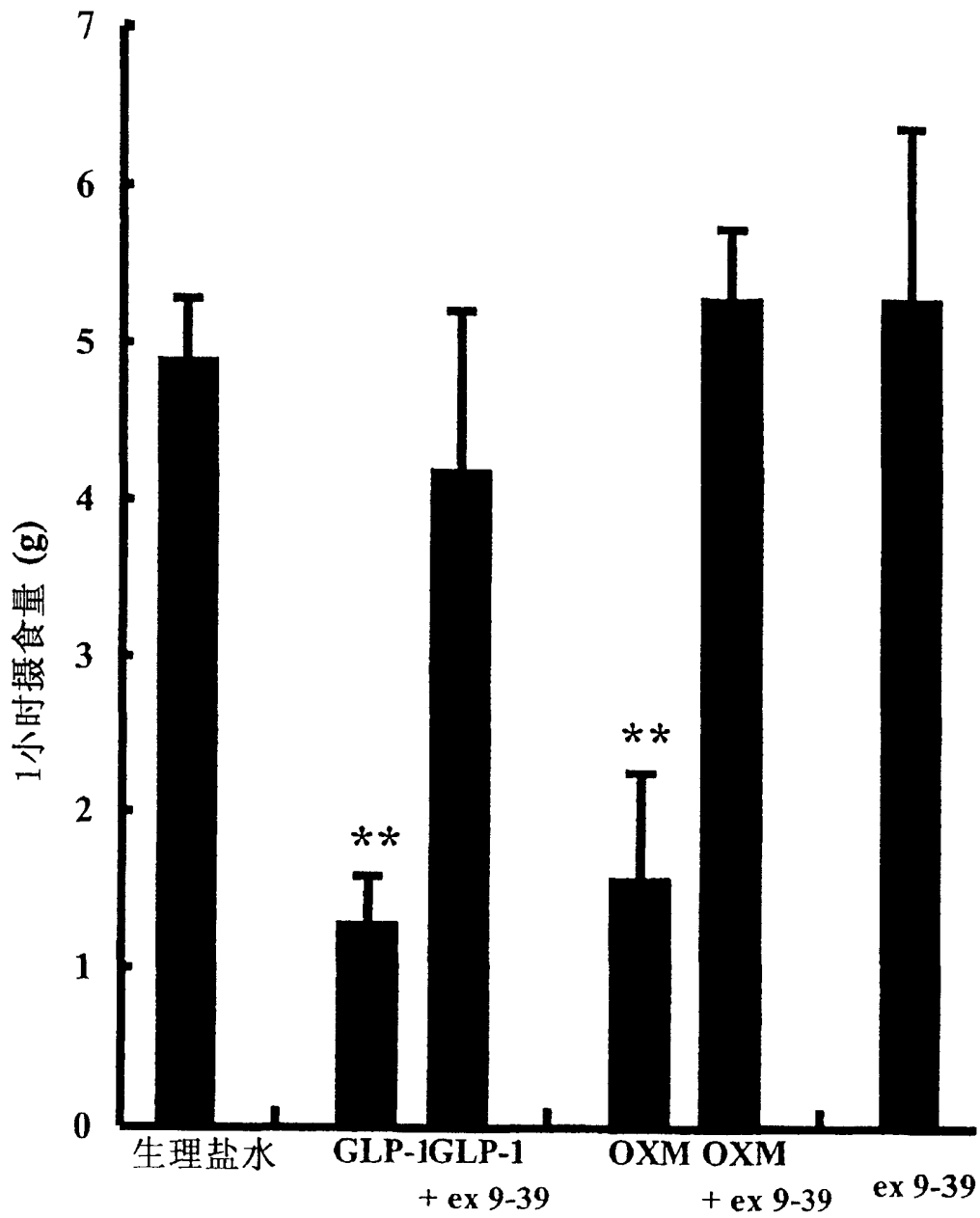


图 4 A



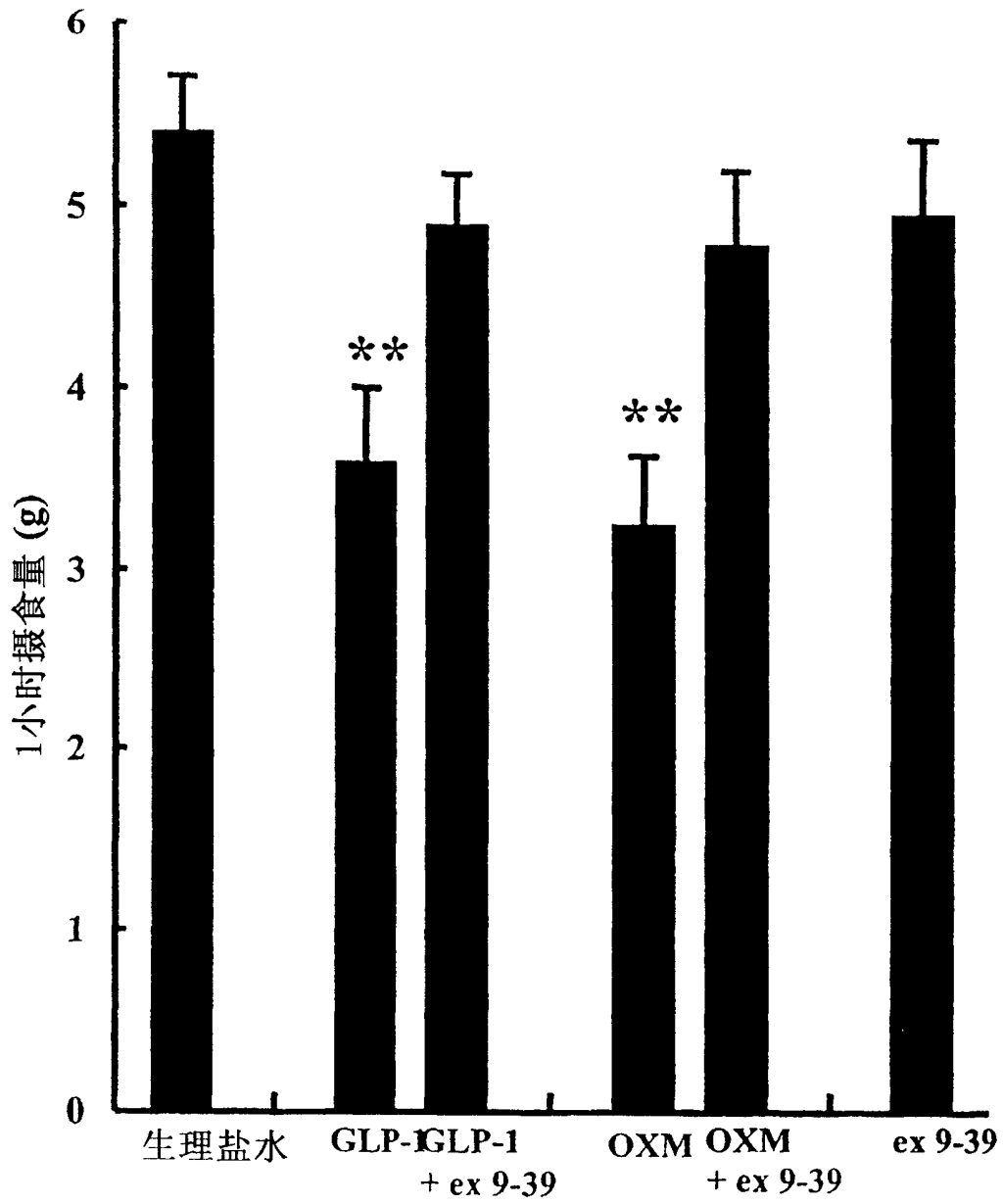


图 4 B

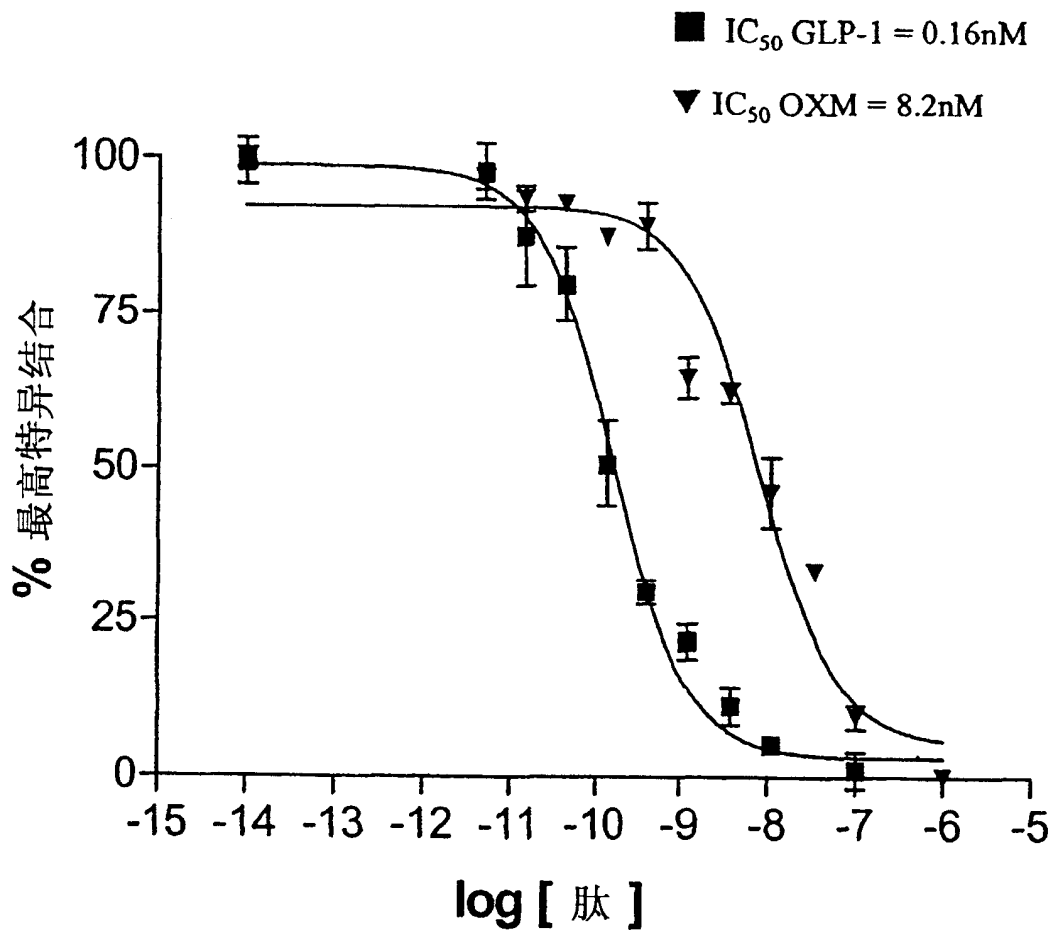


图 5

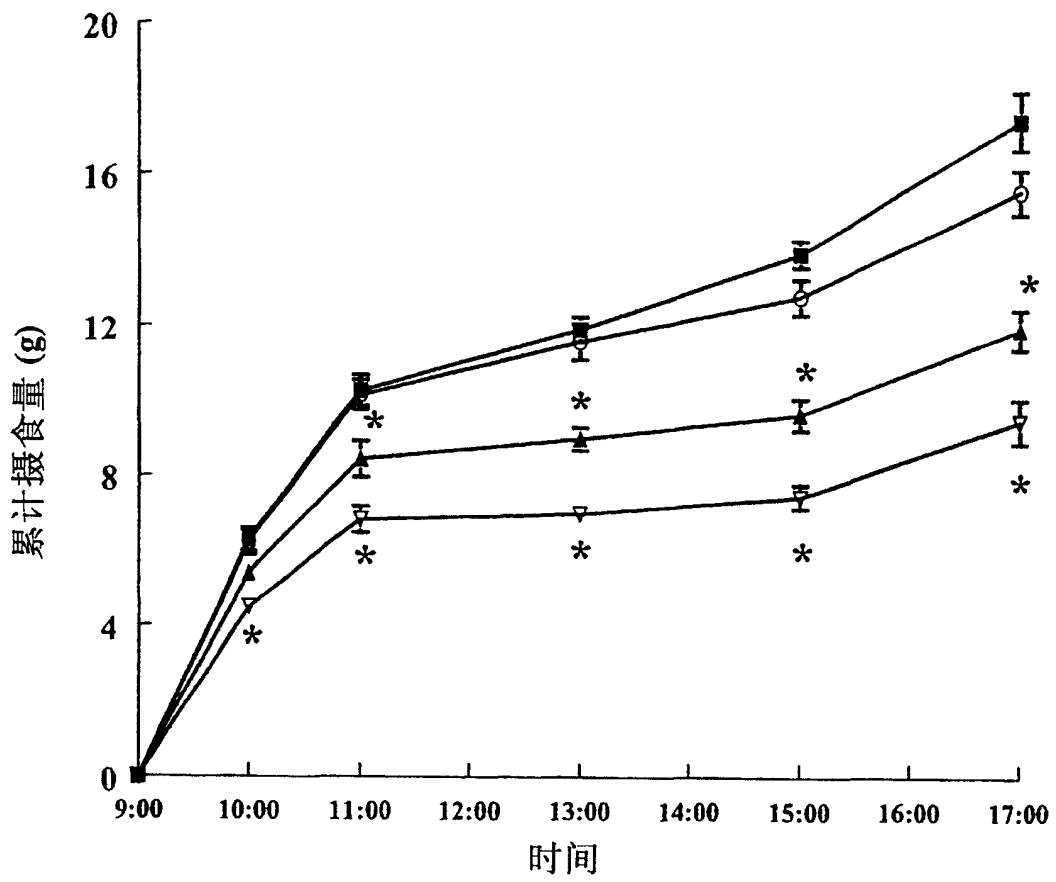


图 6 A

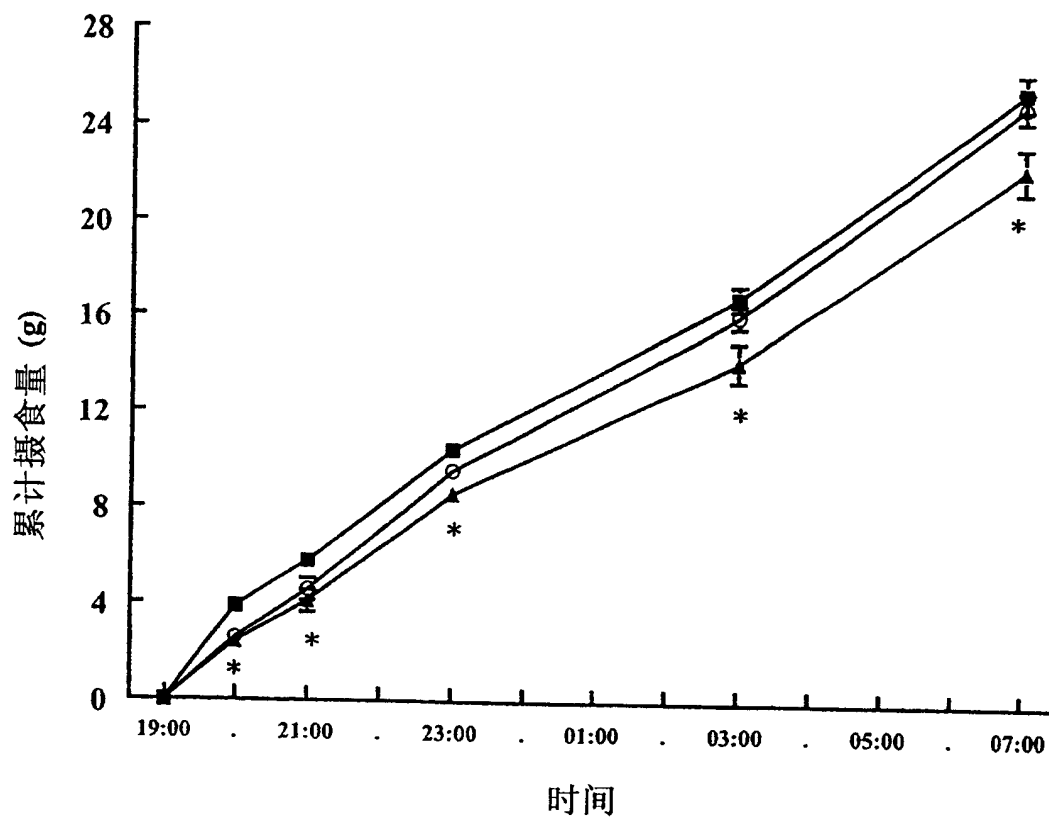


图 6 B

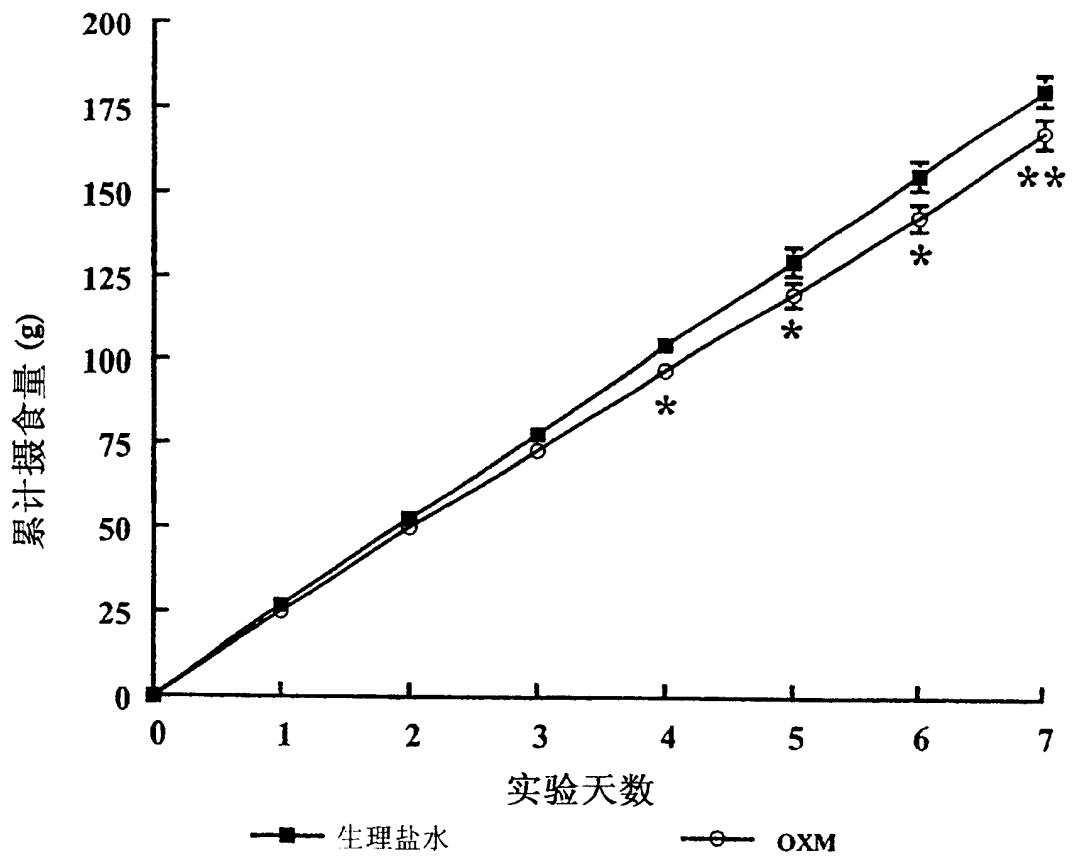


图 7 A

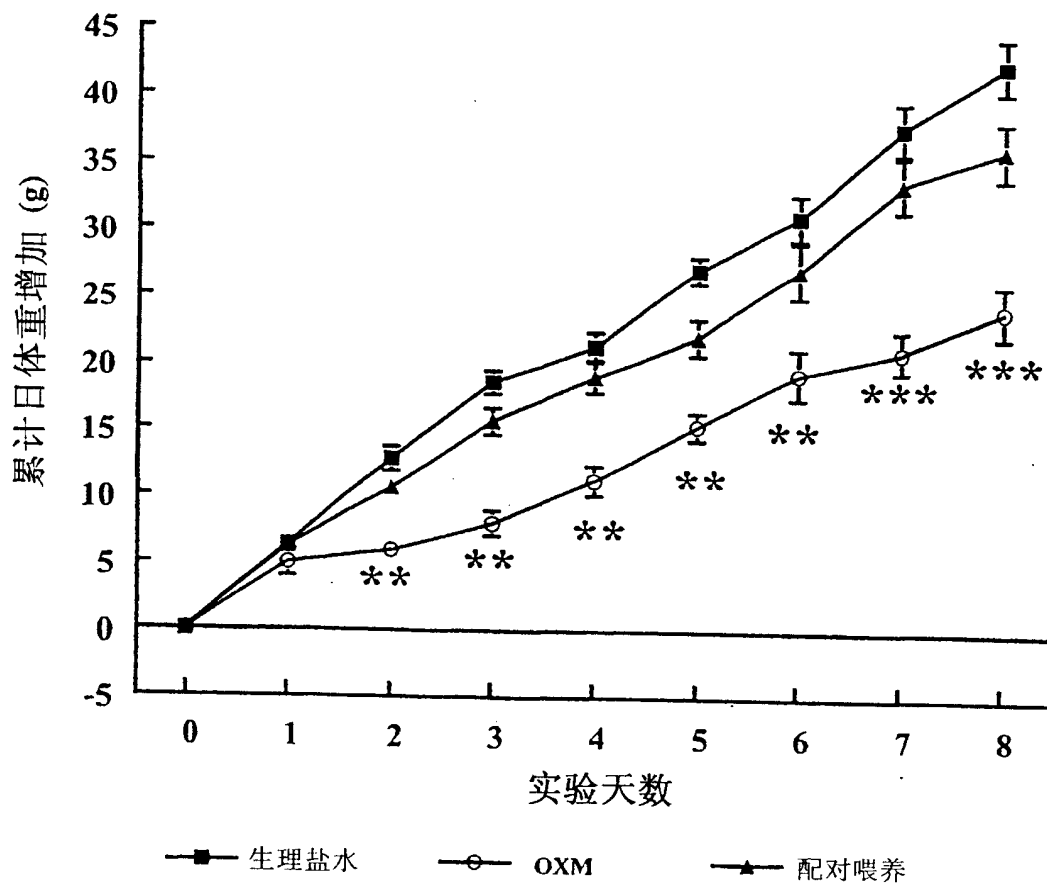


图 7B

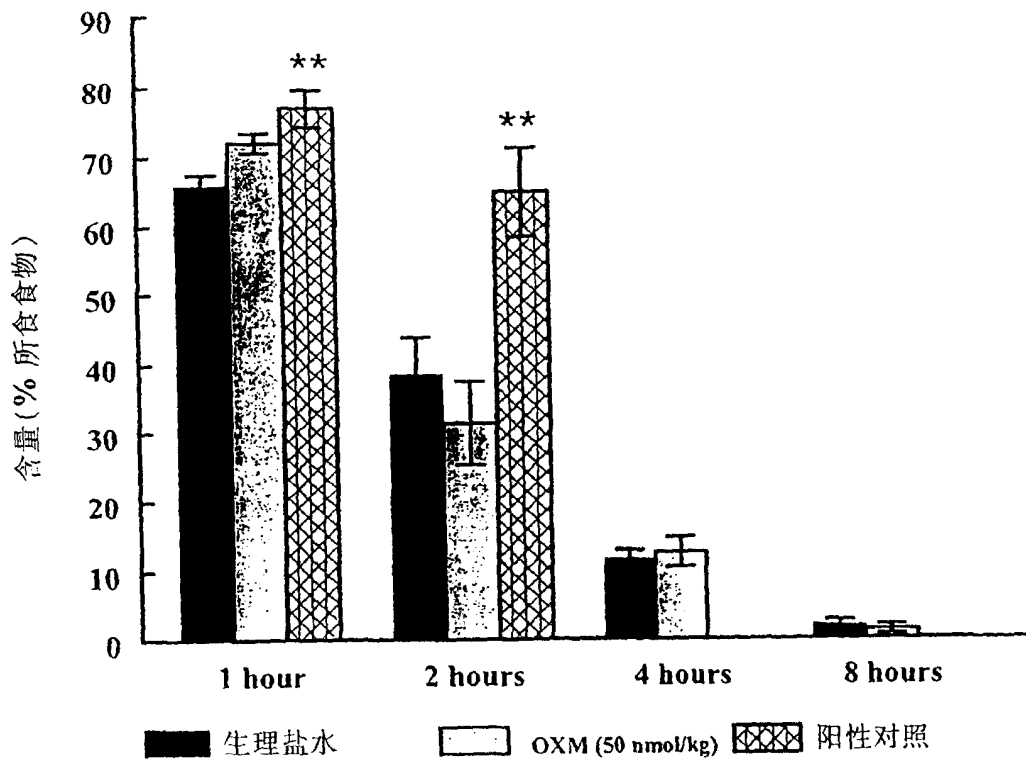


图 8

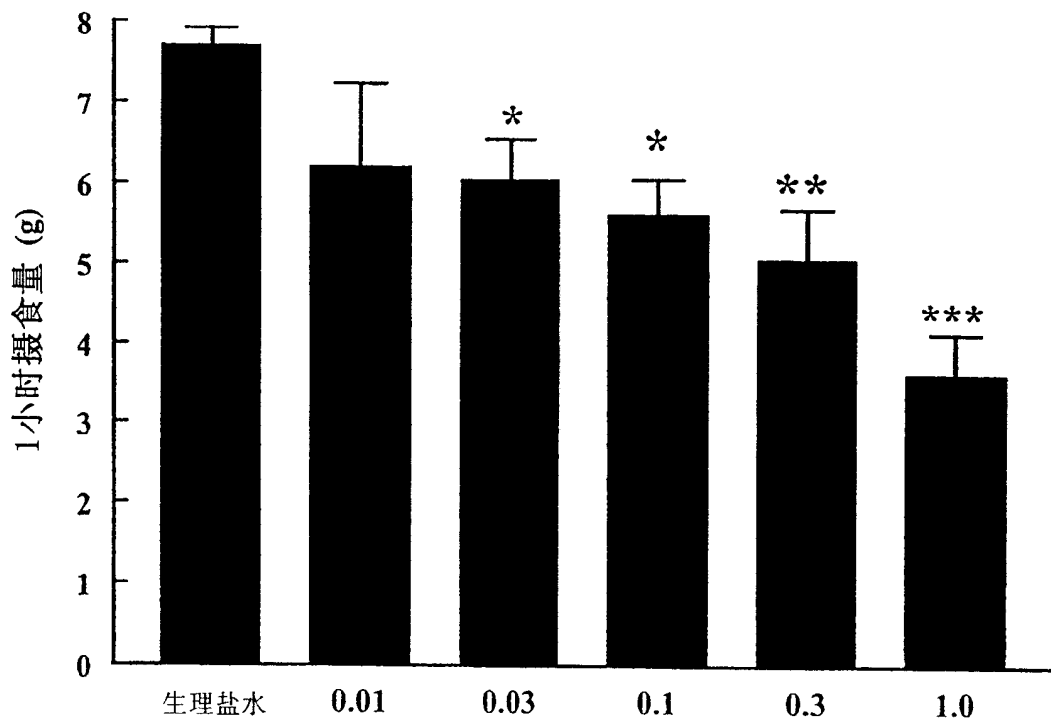


图9



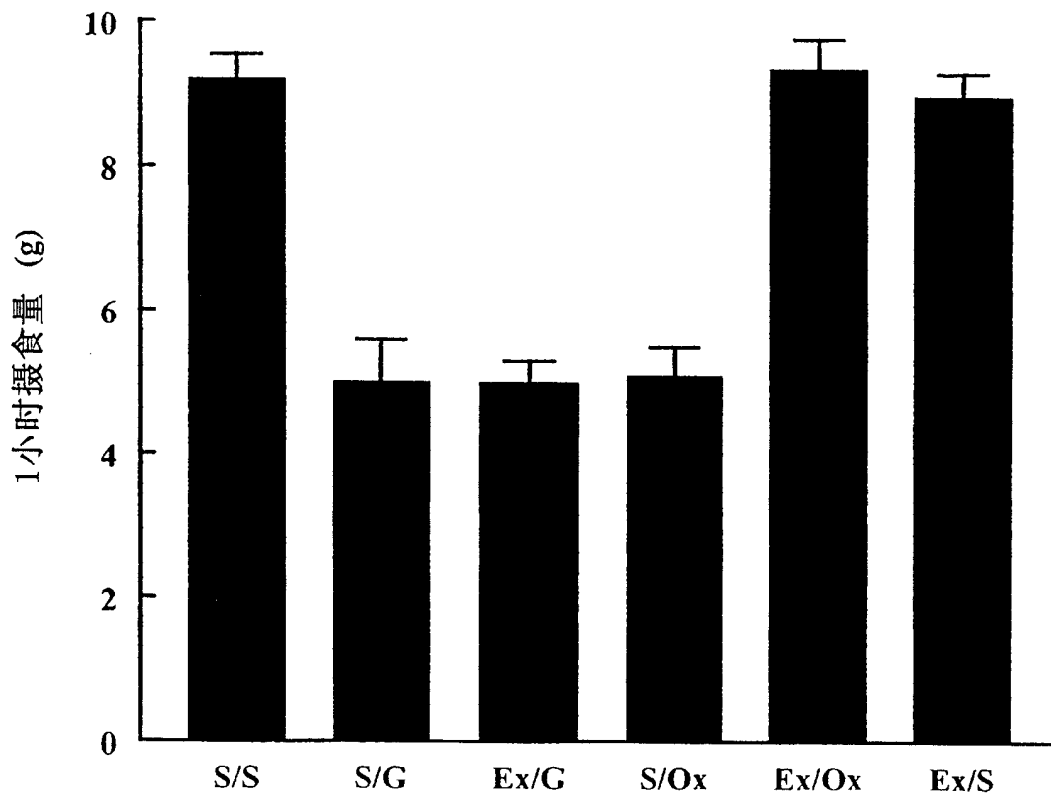
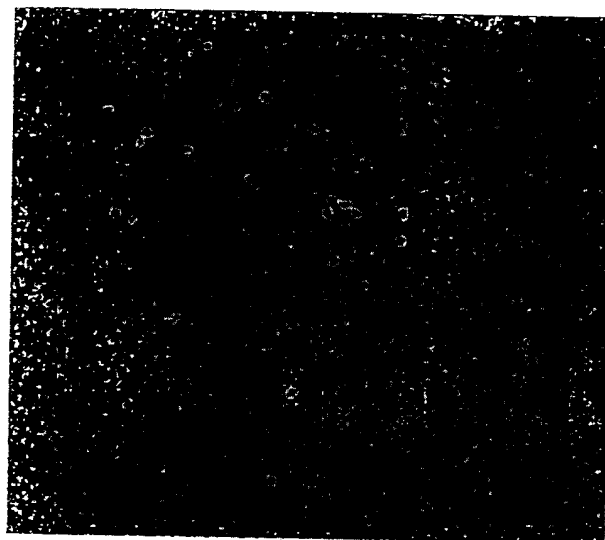
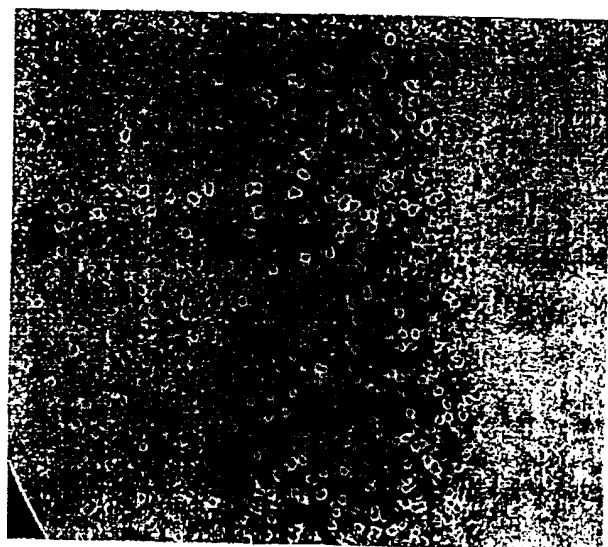


图 10



**A**

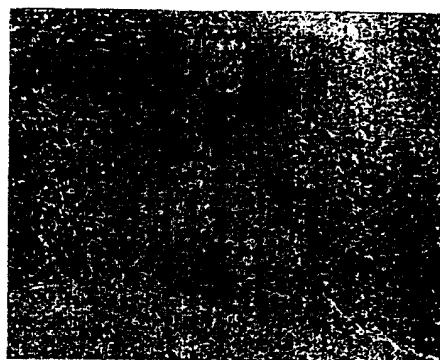


**B**

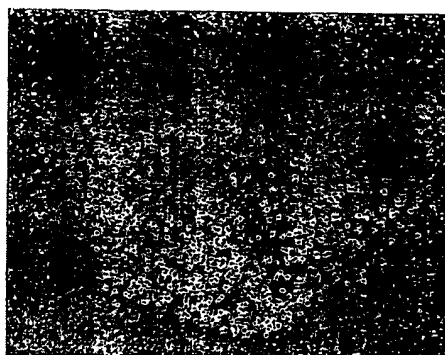
图 11 a



A)



B)



C)

图 11b