



(43) 申请公布日 2016.01.06

序列表4页 附图17页

[illegible]

NET+碳链的 α -亚甲基羧化位, 3- γ -亚甲基羧化位

1. 一种治疗代谢紊乱的方法,其包括向有需要的患者施用治疗有效量的 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述代谢紊乱选自以下各项组成的组:非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、脂肪性肝炎、II 型糖尿病、高血糖症、高血脂症、血脂异常、肥胖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗、高胆固醇血症、非家族性高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症、杂合型家族性高胆固醇血症、纯合型家族性高胆固醇血症、混合型血脂异常、动脉粥样硬化、早发型冠心病、血脂异常、高甘油三酯血症、高脂肪酸血症和肝硬化。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述生物学活性片段包括 SEQ ID NO:1 的残基 5-46、5-55、5-62、1-46、1-55、1-52、1-53、4-52、4-53 或 1-62。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述 Nrg4 变体与 SEQ ID NO:1 至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 相同。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的方法,其中所述 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段由病毒载体编码。

6. 如权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法,其中所述 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段是经化学合成的或从重组来源中纯化得到的。

7. 一种治疗以神经调节蛋白 4 (Nrg4) 缺陷为特征的疾病或病状的方法,其包括向有需要的患者施用治疗有效量的 Nrg4 (SEQ ID NO:1)、Nrg4 变体或其生物学活性片段。

8. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述疾病或病状为与来自健康患者的脂肪组织中的 NRG4 的表达相比,脂肪组织中的 NRG4 的表达减少。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述脂肪组织为褐色脂肪组织或白色脂肪组织。

10. 如权利要求 7、8 或 9 所述的方法,其中所述疾病或病状为脂肪细胞和人体组织之间的异常交流。

11. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述疾病或病状为代谢紊乱。

12. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述代谢紊乱选自以下各项组成的组:非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、脂肪性肝炎、II 型糖尿病、高血糖症、高血脂症、血脂异常、肥胖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗、高胆固醇血症、非家族性高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症、杂合型家族性高胆固醇血症、纯合型家族性高胆固醇血症、混合型血脂异常、动脉粥样硬化、早发型冠心病、血脂异常、高甘油三酯血症、高脂肪酸血症和肝硬化。

13. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述生物学活性片段包括 SEQ ID NO:1 的残基 5-46、5-55、5-62、1-46、1-55、1-52、1-53、4-52、4-53 或 1-62。

14. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述 Nrg4 变体与 SEQ ID NO:1 至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 相同。

15. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段由病毒载体编码。

16. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段是经化学合成的或从重组来源中纯化得到的。

17. 一种减少肝脏中的脂肪积累的方法,其包括向有需要的患者施用治疗有效量的 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段与治疗

有效量的降脂剂共同施用。

19. 如权利要求 18 所述的方法, 其中所述降脂剂选自由以下各项组成的组: 阿托伐他汀、辛伐他汀、罗素伐他汀、氟伐他汀、依泽替米贝、烟酸、苯扎贝特、环丙贝特、安妥明、吉非罗齐和非诺贝特。

20. 一种降低血糖水平方法, 其包括向有需要的患者施用治疗有效量的 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段。

21. 如权利要求 20 所述的方法, 其中所述 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段与治疗有效量的胰岛素、GLP-1、二甲双胍或 DPP4 抑制剂共同施用。

22. 一种组合物, 其包含 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段以及药学上可接受的载体。

23. 如权利要求 22 所述的组合物, 其中所述生物学活性片段包括 SEQ ID NO:1 的残基 5-46、5-55、5-62、1-46、1-55、1-52、1-53、4-52、4-53 或 1-62。

24. 如权利要求 22 所述的组合物, 其中所述 Nrg4 变体与 SEQ ID NO:1 至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 相同。

25. 一种诊断测试个体中的代谢紊乱的方法, 其包括测定来自所述测试个体的样品中的 Nrg4 水平的步骤, 其中与正常个体中的 Nrg4 水平相比, 所述测试个体中降低的 Nrg4 水平是所述病状的提示, 并且其中已知所述正常个体没有罹患所述代谢紊乱。

26. 一种用于诊断个体中代谢紊乱的方法, 其包括检测来自所述个体的样品中的 Nrg4 水平的步骤, 其中与同一个体中之前的 Nrg4 水平相比, 降低的 Nrg4 水平是所述代谢紊乱的提示。

27. 一种用于测定测试个体中对代谢紊乱的易感性的方法, 其包括测定来自所述测试个体的样品中的 Nrg4 水平的步骤, 其中与来自正常个体的样品中的 Nrg4 水平相比, 所述测试个体中降低的 Nrg4 水平指示对所述病状的易感性, 并且其中已知所述正常个体没有罹患所述代谢紊乱。

28. 一种用于测定个体中对代谢紊乱的易感性的方法, 其包括检测来自所述个体的样品中的 Nrg4 水平的步骤, 其中与同一个体中之前的 Nrg4 水平相比, 所述个体中降低的 Nrg4 水平是对所述代谢紊乱的易感性的提示。

29. 一种用于测定个体中代谢紊乱的进展的方法, 其包括测定来自所述个体的样品中的随着时间的 Nrg4 水平的步骤, 其中 Nrg4 水平随着时间的减少是所述代谢紊乱的进展的提示。

30. 一种用于监测个体中代谢紊乱的治疗有效性的方法, 其包括测定来自所述个体的样品中的随着时间的 Nrg4 水平的步骤, 其中 Nrg4 水平随着时间的增加是有效治疗的提示。

31. 如权利要求 25-30 中任一项所述的方法, 其中所述代谢紊乱选自由以下各项组成的组: 非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、脂肪性肝炎、II 型糖尿病、高血糖症、高血脂症、血脂异常、肥胖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗、高胆固醇血症、非家族性高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症、杂合型家族性高胆固醇血症、纯合型家族性高胆固醇血症、混合型血脂异常、动脉粥样硬化、早发型冠心病、血脂异常、高甘油三酯血症、高脂肪酸血症和肝硬化。

32. 如权利要求 25-31 中任一项所述的方法, 其中 Nrg4 水平是 Nrg4 的血清蛋白浓度的量度。

33. 如权利要求 25-31 中任一项所述的方法,其中 Nrg4 水平是 NRG4 mRNA 水平的量度。
34. 如权利要求 25-31 中任一项所述的方法,其中 Nrg4 水平是 Nrg4 活性的量度。
35. 如权利要求 34 所述的方法,其中所述 Nrg4 活性是特异性结合活性。

治疗代谢紊乱的方法

[0001] 政府资助

[0002] 本发明是在由国立卫生研究院授予的批准号 HL097738 和 DK077086 下借助政府资助完成。政府对本发明具有一定的权利。

[0003] 以引用的方式并入电子提交材料

[0004] 本申请含有呈计算机可读形式的序列列表(文件名:46768S_SeqListing.txt;2014 年 3 月 18 日创建;3,026 字节-ASCII 文本文件),所述序列列表作为本公开内容的单独部分,以引用的方式整体并入。

发明领域

[0005] 本发明涉及治疗以神经调节蛋白 4(Nrg4) 缺陷为特征的病状(如代谢紊乱)的方法。

[0006] 背景

[0007] 代谢综合征已经成为全球流行病,其显著增加了患 2 型糖尿病、心血管疾病和非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 的风险。在胰岛素抵抗中,升高的肝葡萄糖产生和脂蛋白分泌促成高血糖症和高脂血症的发病机理。肥胖症也与过量脂肪在肝脏中的累积相关,过量脂肪在肝脏中的累积是影响成年人和孩子的 NAFLD 的最典型特征。虽然肝脂肪变性通常作为对肝功能没有明显的不良效应的良性病状出现,但是在 20%–30% 的患有非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的 NAFLD 患者中观察到进行性肝损伤、炎症和纤维化。NASH 正在成为终末期肝病的主要危险因素。控制肝葡萄糖和脂质代谢的调节网络已经成为过去二十年中的研究焦点。这些研究为促成葡萄糖和脂质稳态的分子和生理机制提供了关键性的认识。然而,介导不同组织间(尤其是在脂肪组织和肝脏之间)的串扰的激素线索仍然难以确定。

[0008] 神经调节蛋白 (NRG) 为含有保守的表皮生长因子 (EGF) 样结构域的生长因子的家族。至今,已经在哺乳动物中鉴定了 4 种神经调节蛋白基因 (Nrg1–4),所述基因通过广泛的选择性剪接产生一系列多样化的信号传导配体。NRG 通常被合成为经受蛋白水解裂解以释放含有 EGF 样结构域的细胞外片段的跨膜蛋白。基因和生物化学的研究证明了 NRG 通过酪氨酸激酶受体的 ErbB 家族发出信号并且以旁分泌、自分泌和内分泌的方式发挥它们的生物效应。在神经肌肉系统的发育中 Nrg1 已经被广泛地表征,尤其是在神经肌肉突触和外周神经中。此外,在维持心脏的稳态和中枢神经系统发育中 Nrg1 起着重要的作用。Nrg1 和 Nrg3 的遗传多态性已分别与精神分裂症和先天性巨结肠疾病 (Hirschsprung Disease) 的风险相关。NRG 令人惊奇地引发靶细胞中的特异性生物应答。Nrg4 基于它的序列与其它 NRG 成员具有同源性而被发现并且预测其编码 115 个氨基酸的前体蛋白。介导 Nrg4 对尤其是葡萄糖和脂质代谢和 NAFLD 的生物效应的相关细胞受体还未确定。

[0009] 前述观察结果提供了仍然需要在治疗疾病如 2 型糖尿病、心血管疾病和非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 中有用的组合物和制剂的证据。

[0010] 概述

[0011] Nrg4 被鉴定为靶向肝脏中的肝细胞的脂肪细胞源性因子。在肥胖症的小鼠模型

中, Nrg4 在脂肪组织中的表达明显减少。使用 Nrg4 敲除的小鼠, 确定了 Nrg4 缺陷使饮食诱导的高血糖症、高血脂症和肝脂肪变性加剧。相反, Nrg4 的脂肪 - 特异性转基因表达使在高脂食物喂养之后这些代谢参数显著提高。合起来, 这些研究鉴定 Nrg4 为用于生物治疗剂的开发的新型靶标, 从而用于治疗 2 型糖尿病、高血脂症和 NAFLD。

[0012] 在本公开的一个方面中, 提供了治疗代谢紊乱的方法, 所述方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段。

[0013] 在一些实施方案中, 代谢紊乱选自以下各项组成的组: 非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、脂肪性肝炎、II 型糖尿病、高血糖症、高血脂症、血脂异常、肥胖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗、高胆固醇血症、非家族性高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症、杂合型家族性高胆固醇血症、纯合型家族性高胆固醇血症、混合型血脂异常、动脉粥样硬化、早发型·冠心病、血脂异常、高甘油三酯血症、高脂肪酸血症和肝硬化。

[0014] 在一些实施方案中, 生物学活性片段包括 SEQ ID NO:1 的残基 5-46、5-55、5-62、1-46、1-55、1-52、1-53、4-52、4-53 或 1-62。

[0015] 在一些实施方案中, Nrg4 变体与 SEQ ID NO:1 至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 相同。

[0016] 在一些实施方案中, Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段由病毒载体编码。

[0017] 在一些实施方案中, Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段是经化学合成的或从重组来源中纯化得到的。

[0018] 在本公开的另一个方面中, 提供了治疗以神经调节蛋白 4 (Nrg4) 缺陷为特征的疾病或病状的方法, 该方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的 Nrg4 (SEQ ID NO:1)、Nrg4 变体或其生物学活性片段。

[0019] 在一些实施方案中, 所述疾病或病状为与来自健康患者的脂肪组织中的 NRG4 的表达相比, 脂肪组织中的 NRG4 的表达减少。在一些实施方案中, 脂肪组织为褐色脂肪组织或白色脂肪组织。

[0020] 在一些实施方案中, 所述疾病或病状为脂肪细胞和人体组织之间的异常交流。

[0021] 在一些实施方案中, 所述疾病或病状为代谢紊乱。在一些实施方案中, 代谢紊乱选自以下各项组成的组: 非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、脂肪性肝炎、II 型糖尿病、高血糖症、高血脂症、血脂异常、肥胖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗、高胆固醇血症、非家族性高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症、杂合型家族性高胆固醇血症、纯合型家族性高胆固醇血症、混合型血脂异常、动脉粥样硬化、早发型冠心病、血脂异常、高甘油三酯血症、高脂肪酸血症和肝硬化。

[0022] 在一些实施方案中, 生物学活性片段包括 SEQ ID NO:1 的残基 5-46、5-55、5-62、1-46、1-55、1-52、1-53、4-52、4-53 或 1-62。

[0023] 在一些实施方案中, Nrg4 变体与 SEQ ID NO:1 至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 相同。

[0024] 在一些或任何实施方案中, Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段由病毒载体编码。

[0025] 在一些实施方案中, Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段是经化学合成的或从重组来源中纯化得到的。

[0026] 在本公开的另一个方面中, 提供了治疗选自以下各项组成的组的病状的方法:

非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、脂肪性肝炎、II 型糖尿病、高血糖症、高血脂症、血脂异常、肥胖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗、高胆固醇血症、非家族性高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症、杂合型家族性高胆固醇血症、纯合型家族性高胆固醇血症、混合型血脂异常、动脉粥样硬化、早发型冠心病、血脂异常、高甘油三酯血症、高脂肪酸血症和肝硬化,该方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段。在一些实施方案中,生物学活性片段包括 SEQ ID NO:1 的残基 5-46、5-55、5-62、1-46、1-55、1-52、1-53、4-52、4-53 或 1-62。在一些实施方案中,Nrg4 变体与 SEQ ID NO:1 至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 相同。

[0027] 在本公开的又一个方面中,提供了减少肝脏中脂肪累积的方法,该方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段。在一些实施方案中,Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段与治疗有效量的降脂剂共同施用。在一些实施方案中,降脂剂选自以下各项组成的组:阿托伐他汀 (atorvastatin)、辛伐他汀 (simvastatin)、罗素伐他汀 (rosuvastatin)、氟伐他汀 (fluvastatin)、依泽替米贝 (ezetimibe)、苯扎贝特 (bezafibrate)、环丙贝特 (ciprofibrate)、安妥明 (clofibrate)、烟酸 (niacin)、吉非罗齐 (gemfibrozil) 和非诺贝特 (fenofibrate)。

[0028] 而在本公开的又一个方面中,提供了降低血糖水平的方法,该方法包括向有需要的患者施用治疗有效量的 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段。在一些实施方案中,Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段与治疗有效量的胰岛素、GLP-1、二甲双胍或 DPP4 抑制剂共同施用。

[0029] 而在本公开的又一个方面中,提供了药物组合物,该药物组合物包含 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段以及药学可接受的载体。在一些实施方案中,生物学活性片段包括 SEQ ID NO:1 的残基 5-46、5-55、5-62、1-46、1-55、1-52、1-53、4-52、4-53 或 1-62。在一些实施方案中,Nrg4 变体与 SEQ ID NO:1 至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 相同。

[0030] 而在另一个本公开的方面中,提供了诊断测试个体中的代谢紊乱的方法,该方法包括测定来自测试个体的样品中的 Nrg4 水平的步骤,其中与正常个体中的 Nrg4 水平相比,测试个体中降低的 Nrg4 水平是病状的提示,并且其中已知正常个体没有罹患代谢紊乱。

[0031] 在另一个本公开的方面中,提供了用于诊断个体中代谢紊乱的方法,该方法包括检测来自个体的样品中的 Nrg4 水平的步骤,其中与同一个体中之前的 Nrg4 水平相比,降低的 Nrg4 水平是代谢紊乱的提示。

[0032] 在另一个本公开的方面中,提供了用于测定测试个体中对代谢紊乱的易感性的方法,该方法包括测定来自测试个体的样品中的 Nrg4 水平的步骤,其中与来自正常个体的样品中的 Nrg4 水平相比,测试个体中降低的 Nrg4 水平指示对病状的易感性,并且其中已知正常个体没有罹患代谢紊乱。

[0033] 在另一个本公开的方面中,提供了用于测定个体中对代谢紊乱的易感性的方法,该方法包括检测来自个体的样品中的 Nrg4 水平的步骤,其中与同一个体中之前的 Nrg4 水平相比,个体中降低的 Nrg4 水平是对代谢紊乱的易感性的提示。

[0034] 在另一个本公开的方面中,提供了用于测定个体中代谢紊乱的进展的方法,该方法包括测定来自个体的样品中的随着时间的 Nrg4 水平的步骤,其中 Nrg4 水平随着时间的

减少是代谢紊乱的进展的提示。

[0035] 在另一个本公开的方面中,提供了用于监测个体中代谢紊乱的治疗有效性的方法,该方法包括测定来自个体的样品中的随着时间的Nrg4水平的步骤,其中Nrg4水平随着时间的增加是有效治疗的提示。

[0036] 在段落[0018]–[0023]的方法的一些实施方案中,代谢紊乱选自由以下各项组成的组:非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、脂肪性肝炎、II型糖尿病、高血糖症、高血脂症、血脂异常、肥胖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗、高胆固醇血症、非家族性高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症、杂合型家族性高胆固醇血症、纯合型家族性高胆固醇血症、混合型血脂异常、动脉粥样硬化、早发型冠心病、血脂异常、高甘油三酯血症、高脂肪酸血症和肝硬化。

[0037] 在以上方法的一些实施方案中,Nrg4水平是Nrg4的血清蛋白浓度的量度。

[0038] 在一些实施方案中,Nrg4水平是NRG4 mRNA水平的量度。

[0039] 在一些实施方案中,Nrg4水平是Nrg4活性的量度。

[0040] 在一些实施方案中,Nrg4活性是特异性结合活性。

[0041] 在另一个方面中,本公开包括使用Nrg4来制备药剂。在另一个方面中,本公开包括使用Nrg4和包含Nrg4的组合物来治疗NAFLD、脂肪性肝炎、II型糖尿病、高血糖症、高血脂症、血脂异常、肥胖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗、高胆固醇血症、非家族性高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症、杂合型家族性高胆固醇血症、纯合型家族性高胆固醇血症、混合型血脂异常、动脉粥样硬化、早发型冠心病、血脂异常、高甘油三酯血症、高脂肪酸血症和肝硬化。在本公开中还提供其它相关方面。

[0042] 从以下的详细描述中将会明了本公开的其它特点和优点。然而,应理解的是,虽然详细描述和具体实施例示出本公开的优选实施方案,但它们仅通过说明的方式给出,这是因为本领域技术人员从这一详细描述中将会明了在本公开的精神和范围内的各种变化和修改。

[0043] 附图简述

[0044] 图1:人和小鼠的Nrg4蛋白质序列的比对。EGF样结构域的特征为存在三个保守的二硫键(细线连接半胱氨酸残基)。推定的N-连接糖基化位点(N³⁹YT)、蛋白水解裂解位点(箭头)和预测的跨膜结构域(TM)被指出。应注意到人和小鼠的Nrg4的EGF样结构域(氨基酸1至大约氨基酸52)是高度保守的。

[0045] 图2:Nrg4在脂肪组织和培养的脂肪细胞中的表达。(A)在不同组织中的Nrg4 mRNA的Taqman定量PCR分析。Nrg4在褐色脂肪组织(BAT)和白色脂肪组织(WAT)中被大量地表达。分析来自三只C57BL/6J雄性小鼠的混合的RNA样本。(B)在褐色(顶部)和白色(3T3-L1,底部)脂肪细胞的分化过程中诱导Nrg4 mRNA表达。包括了作为分化标记的UCP1和PPAR γ 。示出了来自一个代表性研究的三个复孔的平均值 $\pm$ 标准差。

[0046] 图3:Nrg4缺陷的小鼠具有低温耐受性并且具有正常的低温诱导的生热作用。(A)野生型和Nrg4 KO小鼠在低温暴露之后的直肠温度。在自由获取食物和水的情况下将小鼠从环境温度转移至4°C持续共4小时。(B)肩胛间的褐色脂肪组织的组织学(H&E)(比例尺=100 μ m)。(C)对暴露在环境温度(室温,WT=5,KO=6)或低温温度(低温,WT=5,KO=7)的小鼠中的BAT基因表达的qPCR分析。(D)在低温暴露之后的WT和Nrg4 KO小鼠中的血浆甘油三酯(TG)、酮(β -羟基丁酸)和非酯化脂肪酸(NEFA)的浓度。

[0047] 图 4 :Nrg4 的 EGF 样结构域与肝细胞结合。(A) 分泌的碱性磷酸酶 (SEAP) 对照或 SEAP-Nrg4 融合蛋白 (氨基酸 1-62) 的示意图。(B) SEAP-Nrg4^{N62} 特异性地与肝细胞结合, 但并不与 BAT、心脏、肌肉和脾脏中的细胞结合。(C) 过量的 GST-Nrg4^{N62} 融合蛋白竞争存在肝细胞上的 Nrg4 结合位点。在 3.0g/mL GST 或 GST-Nrg4 重组蛋白存在下将 SEAP-Nrg4^{N62} 与肝切片一起孵育。

[0048] 图 5 :通过肥胖调节脂肪 Nrg4 表达。(A) 来自瘦的或饮食诱导的肥胖小鼠的 WAT 和 BAT 中的 Nrg4 mRNA 水平的 qPCR 分析。野生型 C57BL/6J 雄性小鼠保持进食标准食物 (n = 5) 或高脂食物 (n = 6) 3 个月。将总 RNA 从脂肪组织分离以用于 qPCR 分析。(B) 来自 WT (n = 5) 或瘦素受体缺陷 db/db (n = 6) 小鼠的脂肪组织中的 Nrg4 mRNA 水平的 qPCR 分析。A-B 中的数据为平均值 $\pm$ SEM。*p<0.05。(C) 来自被喂养标准食物 (n = 3) 或高脂食物 (n = 3) 的小鼠的附睾的 WAT 分离的基质血管成分 (SVF) 和脂肪细胞成分中的 Nrg4 mRNA 水平的 qPCR 分析。*p<0.01 标准食物对比 HFD。(D) 在用媒介物 (-) 或 TNF α (10ng/mL) 处理所指示的时间的成熟 3T3-L1 脂肪细胞中的 Nrg4 表达。示出了来自一个代表性研究的三个复孔的平均值 $\pm$ 标准差。*p<0.01 TNF α 对比媒介物。

[0049] 图 6 :Nrg4 表达水平和代谢参数之间的相关性。具有 54 只野生型 C57BL/6J 雄性小鼠的组被喂养高脂食物 2 个月。检测附睾的 WAT 中的相对 Nrg4 mRNA 表达和代谢参数。(A-B) Nrg4 mRNA 表达与体重负相关 (A) 并且与附睾的白色脂肪重量负相关 (B)。(C) 高 Nrg4 (下框) 和低 Nrg4 (上框) 表达水平分别与低血糖水平和高血糖水平相关。(D) 高 Nrg4 (下框) 和低 Nrg4 (上框) 表达水平分别与低肝脂肪含量和高肝脂肪含量相关。

[0050] 图 7 :Nrg4 缺陷使饮食诱导的胰岛素抵抗和高血脂症加剧。(A) 被喂养标准食物或高脂食物 (HFD) 的野生型 (填充的, n = 8) 和 Nrg4 KO (灰白的, n = 9) 小鼠的体重。在 HFD 喂养之后的 8 周检测血浆瘦素水平。(B) 在喂养和禁食条件下检测血浆葡萄糖和胰岛素水平。(C) 甘油三酯、总胆固醇和 β -羟基丁酸的血浆浓度。数据代表平均值 $\pm$ SEM。*p<0.05。

[0051] 图 8 :Nrg4 缺陷使饮食诱导的肝脂肪变性加剧。(A) 在被喂养 HFD 7 周的野生型 (填充的, n = 9) 和 Nrg4 KO (灰白的, n = 8) 小鼠中的肝甘油三酯含量。数据代表平均值 $\pm$ SEM。*p<0.05。(B) 来自 HFD 之后的 7 周的 WT 和 Nrg4 KO 小鼠的附睾的 WAT 和肝切片的 H&E 染色。比例尺 = 100 μ M。

[0052] 图 9 :脂肪组织中 Nrg4 的转基因表达使小鼠免受饮食诱导的代谢紊乱。(A) 脂肪特异性 Nrg4 转基因小鼠 (TG) 免受饮食诱导的肥胖症。(B) 在 8 周的高脂喂养之后的 WT (n = 10) 和 TG (n = 9) 小鼠中的血浆瘦素浓度。(C) 在 WT 和 TG 小鼠中的血浆葡萄糖 (喂养和禁食)、总胆固醇 (喂养) 和 β -羟基丁酸 (禁食) 的浓度。A-C 中的数据代表平均值 $\pm$ SEM。*p<0.05。

[0053] 图 10 :Nrg4 转基因小鼠具有更大的葡萄糖耐受性、胰岛素敏感性并且免受饮食诱导的脂肪肝。(A) 在 10 周的高脂喂养之后的 WT 和 TG 小鼠中的葡萄糖耐受性测试。(B) 在 12 周的高脂喂养之后的 WT 和 TG 小鼠中的胰岛素耐受性测试。A-B 中的数据代表平均值 $\pm$ SEM (n = 8-10)。*p<0.05。(C) 在被喂养 HFD 11 周的 WT (灰白的, n = 9) 和 TG (填充的, n = 9) 小鼠中的肝甘油三酯含量。数据代表平均值 $\pm$ SEM。*p<0.05。(D) 附睾的 WAT 和肝切片的 H&E 染色。

[0054] 图 11 :在 11 周的 HFD 喂养之后的 WT 和 TG 小鼠中的肝基因表达的 qPCR 分析。数

据代表平均值 $\pm$ SEM。* $p < 0.05$ 。

[0055] 图 12:重组 Nrg4 使饮食诱导的肥胖小鼠中的血糖降低。HFD 喂养的肥胖小鼠腹腔内注射 GST 或 GST-Nrg4^{N62}两次(每克体重 4 μ g),持续共 6 小时。应注意到 Nrg4 使血糖水平降低,而并非通过促进胰岛素分泌。

[0056] 图 13:对 Nrg4 作为用于治疗 2 型糖尿病和非酒精性脂肪肝病的潜在生物治疗剂的模型描绘。Nrg4 为脂肪细胞源性激素,该激素作用于肝脏以降低血糖和脂质,并且减少肝脂肪含量。

[0057] 图 14:对释放 Nrg4 的细胞外片段重要的氨基酸的绘制。SEAP-Nrg4 融合载体在 SEAP cDNA 和全长 Nrg4 即氨基酸 1-115 之间被构建并且瞬时被转染至 HEK293 细胞中。在免疫印迹上指出丙氨酸突变体的位置。收获条件培养基和总细胞裂解物并且用抗-SEAP 抗体通过免疫印迹法分析。应注意到氨基酸 53-54 或 53 的突变显著地减少了融合蛋白向培养基中的分泌。

[0058] 图 15:在肥胖症的小鼠模型中褐色和白色脂肪组织中的 Nrg4 的表达减少。(A) 来自瘦的(空白柱)或肥胖(黑柱)小鼠的附睾的白色脂肪(eWAT)和 BAT 中的 Nrg4 mRNA 表达的 qPCR 分析。对于 DIO,WT 雄性小鼠被喂养标准食物($n = 5$)或 HFD($n = 6$)3 个月。对于遗传型的肥胖症,分析一组中的 WT($n = 3$)和 ob/ob($n = 4$)小鼠和一个单独组中的 WT($n = 5$)和 db/db($n = 6$)小鼠。(B) 来自瘦的($n = 3$)或 DIO($n = 3$)小鼠的 eWAT 分离的基质血管成分(SVF)和脂肪细胞成分(Ad)中的 Nrg4 mRNA 表达的 qPCR 分析。a-b 中的数据代表平均值 $\pm$ s. e. m。* $p < 0.05$ 。(C) 在用媒介物(Veh)、TNF α (10ng/ml)或 IL1 β (40ng/ml)处理 6 小时之后的已分化的褐色或 3T3-L1 脂肪细胞中的 Nrg4 mRNA 表达的 qPCR 分析。数据代表来自一个进行三次重复的代表性研究的平均值 $\pm$ 标准差。* $p < 0.05$ 对比 Veh。

[0059] 图 16:Nrg4 缺陷使饮食诱导的肥胖症加剧并且升高血浆甘油三酯水平。(A) 被喂养标准食物或 HFD 的野生型(填充的, $n = 8$)和 Nrg4 KO(灰白的, $n = 9$)小鼠的体重、肥胖和瘦体重的百分比。(B) 在喂养和禁食条件下的 WT 和 Nrg4 KO 小鼠中的血浆 TAG 水平。(C) β -羟基丁酸的血浆浓度。数据代表平均值 $\pm$ SEM。* $p < 0.05$ 。

[0060] 图 17:Nrg4 缺陷使饮食诱导的肝脂肪变性加剧。(A) 在被喂养 HFD7 周的野生型(填充的, $n = 9$)和 Nrg4 KO(灰白的, $n = 8$)小鼠中的肝甘油三酯含量。数据代表平均值 $\pm$ SEM。* $p < 0.05$ 。(B) 来自 HFD 之后 7 周的 WT 和 Nrg4 KO 小鼠的 BAT、附睾的 WAT 和肝切片的 H&E 染色。比例尺 = 100 μ M。

[0061] 图 18:Nrg4 缺失小鼠患有更严重的高脂食物诱导的葡萄糖的不耐受性和胰岛素抵抗。(A) 在 HFD 喂养的 WT 和 KO 小鼠中的喂养和禁食的血糖以及禁食的血浆胰岛素水平。(B) 在喂养 HFD 13 周之后的 WT($n = 7$,填充的菱形,黑线)和 Nrg4 KO($n = 7$,空白方块,红线)小鼠中葡萄糖耐受性测试。(C) 在喂养 HFD 15 周之后的 WT($n = 7$)和 Nrg4 KO($n = 9$)小鼠中的胰岛素耐受性测试。数据代表平均值 $\pm$ s. e. m。* $p < 0.05$, KO 对比 WT。

[0062] 图 19:Nrg4 缺陷促进肝脂肪生成基因程序的异常激活。(A) 自由进食的 WT 和 Nrg4 KO 小鼠中的肝基因表达的 qPCR 分析。数据代表平均值 $\pm$ s. e. m。* $p < 0.05$, KO 对比 WT。(B) 将肝组织从 HFD 喂养的 WT 和 Nrg4 KO 小鼠切下并且被处理用于 qPCR 和免疫印迹法分析。使用所指出的抗体的总肝裂解物的免疫印迹(顶部);pSREBP1 表示前体蛋白。使用肝细胞核提取物的核 SREBP1(nSREBP1)的免疫印迹(底部)。核纤层蛋白 A/C 免疫印迹作为上样

对照被包括。

[0063] 图 20 :在原代肝细胞中, Nrg4 通过 LXR 激活来减弱对脂肪生成基因表达的诱导。在含有 SEAP 或 SEAP-Nrg4N62 的条件培养基存在下, 用媒介物或 T0901317 处理的原代肝细胞中的基因表达的 qPCR 分析。数据代表平均值 $\pm$ 标准差。* $p < 0.05$ 。

[0064] 图 21 :脂肪组织中 Nrg4 的转基因表达使小鼠免受饮食诱导的肥胖症。(A) 在 12 周的 HFD 喂养之前和之后的 WT (实心柱, $n = 10$) 和 aP2-Nrg4 转基因 (Tg, 空心柱, $n = 9$) 小鼠的生长曲线。(B) 身体组成。(C) 在 6 周的 HFD 喂养之后的 WT 和 aP2-Nrg4 Tg 小鼠中的食物摄取和 V02。V02 值被标准化为体重 (中间图) 和瘦体重 (右图)。

[0065] 图 22 :Nrg4 转基因小鼠免受 HFD 诱导的代谢紊乱。(A) 在 10 周的高脂喂养之后的 WT (空心柱, $n = 9$) 和 Tg (实心柱, $n = 8$) 小鼠中的血浆代谢物浓度。(B) 在 HFD 喂养的 WT (空心柱, $n = 9$) 和 Tg (实心柱, $n = 8$) 小鼠中的喂养的和禁食的血糖以及禁食的血浆胰岛素水平。数据代表平均值 $\pm$ s. e. m。* $p < 0.05$, WT 对比 Tg。

[0066] 图 23 :Nrg4 转基因小鼠免受 HFD 诱导的葡萄糖不耐受性和胰岛素抵抗。(A) HFD 喂养的 WT (空心, $n = 9$) 和 Tg (实心, $n = 8$) 小鼠中的葡萄糖耐受性测试。(B) HFD 喂养的 WT (空心, $n = 9$) 和 Tg (实心, $n = 8$) 小鼠中的胰岛素耐受性测试。数据代表平均值 $\pm$ s. e. m。* $p < 0.05$, WT 对比 Tg。

[0067] 图 24 :通过减弱肝脂肪生成使 Nrg4 转基因小鼠免受 HFD 诱导的脂肪肝。(A) HFD 喂养的小鼠中的脂肪组织和肝切片的 H&E 染色。比例尺 = $100 \mu\text{m}$ 。(B) 肝 TAG 含量。(C) 使用总肝裂解物 (顶部) 和肝细胞核提取物 (底部) 的免疫印迹。应注意到在来自 Tg 小鼠的肝脏中, 前体和核 SREBP1 的水平减少。(D) 自由进食的 WT (空心) 和 Tg (实心) 小鼠中的肝基因表达的 qPCR 分析。数据代表平均值 $\pm$ s. e. m。* $p < 0.05$, WT 对比 Tg。

[0068] 图 25 :重组 Nrg4 使饮食诱导的肥胖小鼠中的血糖和胰岛素降低。HFD 喂养的肥胖小鼠腹腔内注射 GST 或 GST-Nrg4^{N62} 每天两次 (每克体重 $4 \mu\text{g}$), 持续共 5 天。应注意到 Nrg4 使血糖水平降低, 而并非通过促进胰岛素分泌。

[0069] 详述

[0070] 定义

[0071] 如本文所使用, 术语“Nrg4” (SEQ ID NO:1) 是指由人 NRG4 基因编码的蛋白质。Nrg4 基于它的序列与其它 NRG 成员具有同源性而被发现并且被预测编码 115 个氨基酸的前体蛋白。Nrg4 在小鼠和人之间是高度保守的, 在 EGF 样结构域中具有超过 90% 的氨基酸序列同一性 (大约 AA 1-52, 图 1)。因此, 在一些实施方案中, 术语“Nrg4”是指 SEQ ID NO:2, 即由小鼠 NRG4 基因编码的蛋白质。

[0072] 如本文所使用, 术语“治疗的”或“治疗”是指如本文所描述的向有需要的患者施用治疗有效量的 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段以达到疾病或病状的改变或改善的目的。在某些方面的治疗需要以定期间隔施用单剂量或多剂量以改变病状的过程。

[0073] 如本文所使用, “施用”意指将药剂提供给动物 (包括人类患者), 并且包括但不限于通过医学专业人员施用或自我施用。

[0074] 如本文所使用, 术语“共同施用”是指两种或更多种药剂向动物 (包括人类患者) 的施用。在某些方面中, 药剂为单一药物组合物或分开的药物组合物。共同施用包括通过相同或不同施用路径施用每种药剂。共同施用还涵盖并行或依序施用。

[0075] 如本文所使用,术语“治疗有效量”是指向动物(包括人类患者)提供治疗益处的药剂的量。

[0076] 如文中所使用,“药学可接受载体”包括任何和所有的溶剂、分散介质、包衣剂、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如抗菌剂、抗真菌剂)、等渗剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料等、类似物质和其组合,如本领域的普通技术人员所知的(Remington's, 1990)。

[0077] 如本文所使用,术语“代谢紊乱”是指以代谢功能的改变或扰乱为特征的病状。“代谢的”和“代谢”是本领域中熟知的术语并且通常包括发生在活有机体内的整个范围的生物化学过程。

[0078] 本发明的 Nrg4 变体可包括天然氨基酸在特定的残基处的保守性替代。享有共同的侧链性质并且适合用于产生保守性替代的氨基酸残基被如下分组。

[0079] (1) 疏水性:正亮氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸;

[0080] (2) 中性亲水性:半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸;

[0081] (3) 酸性:天冬氨酸、谷氨酸;

[0082] (4) 碱性:天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸、精氨酸;

[0083] (5) 影响链定向的残基:甘氨酸、脯氨酸;以及

[0084] (6) 芳族:色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸。

[0085] Nrg4

[0086] 本文发现神经调节蛋白 4(Nrg4)(信号传导配体的神经调节蛋白家族的成员)为调节血浆葡萄糖和脂质水平以及 NAFLD 发展的新型脂肪源性激素。Nrg4 表达在脂肪组织中是高度富集的并且在褐色和白色脂肪细胞的分化过程中被诱导。使用结合测定,发现 Nrg4 通过推定的受体(或多个受体)以可饱和方式仅仅与肝细胞结合。在饮食诱导的和遗传的小鼠肥胖症模型中脂肪细胞中的 Nrg4 表达水平明显减少,表明了 Nrg4 不足可促成肥胖症相关联的代谢紊乱的发展。对这一点的支持,在高脂食物喂养之后 Nrg4 缺失小鼠患有更严重的高血糖症、高血脂症和肝脂肪变性。相反, Nrg4 的脂肪-特异性转基因表达使血糖和脂质降低,并且减少肝脂肪含量。本文所描述的研究将 Nrg4 确定为在维持代谢稳态中起有益作用的新型脂肪源性激素。因此, Nrg4 的治疗靶向为治疗例如 2 型糖尿病、高血脂症和 NAFLD 提供了新途径。

[0087] 本文所提供的方法包括那些其中待施用的 Nrg4 为 Nrg4 变体,该 Nrg4 变体与 SEQ ID NO:1 至少 45%相同、至少 50%相同、至少 55%相同、至少 60%相同、至少 65%相同、至少 70%相同、至少 75%相同、至少 80%相同、至少 85%相同、至少 90%相同、至少 95%相同、至少 96%相同、至少 97%相同、至少 98%相同、或至少 99%相同。

[0088] 本发明的 Nrg4 变体可包括天然氨基酸在特定的残基处的保守性替代。享有共同的侧链性质并且适合用于产生保守性替代的氨基酸残基被如下分组。

[0089] (1) 疏水性:正亮氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸;

[0090] (2) 中性亲水性:半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸;

[0091] (3) 酸性:天冬氨酸、谷氨酸;

[0092] (4) 碱性:天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸、精氨酸;

[0093] (5) 影响链定向的残基:甘氨酸、脯氨酸;以及

[0094] (6) 芳族:色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸。

[0095] 本公开也设想包括施用一种或多种 Nrg4 的生理活性片段以治疗以 Nrg4 的不足水平或活性为特征的病状的方法。Nrg4 片段包括但不限于缺乏 SEQ ID NO:1 的前 4 个残基的 Nrg4 片段、包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸残基 5 至 46、5 至 55、5 至 62、1 至 46、1 至 55、1 至 52、1 至 53、4 至 52、4 至 53 或 1 至 62 或者由其组成的片段。本领域中的技术人员可通过在相关的生物测定中针对活性进行筛选而容易地筛选活性片段。在各种实施方案中, Nrg4 片段包括 x 至 y 的氨基酸残基或由其组成, 其中 x 为 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、或 25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、或 55, 并且 y 为 26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、或 115。

[0096] 在所提供的方法中使用的 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段来源于本领域中所已知的任何方法。例如, 在一个方面中, Nrg4 来源于表达内源性的 Nrg4 的细胞。或者, Nrg4、其变体或生物学活性片段的来源来自于用编码 Nrg4 或其前体的核酸载体转化的细胞, 并且在各种方面中所述细胞为哺乳动物细胞、细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞、整个有机体或其它有用的重组蛋白来源的细胞。

[0097] Nrg4 的 N-端片段(Nrg4 的氨基酸 1 至大约氨基酸 52) 含有 EGF 样结构域并且能够与肝细胞上的它的受体结合。合成肽或从哺乳动物细胞(例如, 中国仓鼠卵巢 CHO) 产生和纯化的重组 Nrg4 可用于降低血糖水平。用 Nrg4 慢性治疗可降低肝脂肪含量, 类似于由转基因 Nrg4 表达引起的作用。合成的肽可用 N-端乙酰化、C-端酰胺化、酰化、糖基化和聚乙二醇化以及其它来修饰以进一步改善药代动力学特征。此外, 可使用保留 Nrg4 的生物活性的更小肽。

[0098] 对于 Nrg4 蛋白的重组产生, 提供了编码重组 Nrg4 蛋白和控制指导细菌、哺乳动物或昆虫细胞中的蛋白质表达的序列的分离的 DNA 和 / 或重组载体。在一些情况下, 希望重组 Nrg4 编码序列与可(但不限于)促进重组蛋白纯化的另外的氨基酸序列融合。例如, 在一个方面中, 所表达的 Nrg4 蛋白被表达为融合蛋白, 该融合蛋白包括一个或多个组氨酸标记、谷胱甘肽 S 转移酶(GST) 序列、麦芽糖结合蛋白(MBP) 序列、标志序列(Flag sequence) 和 / 或 myc 标记的 RGT 序列。这些帮助重组蛋白的纯化的另外的序列任选地通过蛋白酶裂解来移除。

[0099] 能够调节 Nrg4 活性或表达的化合物

[0100] 也设想调节 Nrg4 表达的化合物(即 Nrg4 调节剂)在本公开的范围。因为在肥胖症中 Nrg4 表达被严重抑制, 可能恢复脂肪细胞中的 Nrg4 表达的化合物或治疗可用于产生治疗益处。本文证明了 Nrg4 表达被炎症信号如 TNF α 抑制。因此, 恢复脂肪细胞中的 Nrg4 水平的抗炎化合物被认为在本公开的范围。

[0101] 也设想调节 Nrg4 脱落 / 激活的化合物(即 Nrg4 调节剂)在本公开的范围。Nrg4 被合成为前体跨膜蛋白, 该前体跨膜蛋白经受蛋白水解裂解和脱落或者 Nrg4 可溶的细胞外结构域从膜结合蛋白的释放。可溶的 Nrg4 释放到组织中并且循环对激活 Nrg4 是重要

的。裂解 Nrg4 的确切蛋白酶的身份仍未知。尽管这个不确定,但是为了并用于实现与施用的 Nrg4 具有类似的代谢益处可筛选出激活脱落事件并且增加活性 Nrg4 的释放的化合物。

[0102] 也设想调节 Nrg4 更新的化合物(即 Nrg4 调节剂)在本公开的范围。许多激素在循环中经受快速更新。阻止 Nrg4 的蛋白水解降解的化合物可增加 Nrg4 在血浆中的浓度,并且实现代谢益处。

[0103] 也设想调节 Nrg4 受体结合和信号传导的化合物(即 Nrg4 调节剂)在本公开的范围。改善 Nrg4 与其受体结合并且增加下游信号传导事件的另外的化合物可用于延长和/或增强靶细胞中的 Nrg4 作用。

[0104] 通过施用 Nrg4 而治疗的病状

[0105] 所提供方法被利用用于治疗可通过施用 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段而减轻的任何病状。在所提供方法的一些方面中,病状为代谢紊乱。示例性代谢紊乱包括但不限于 2 型糖尿病、高血糖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗和肥胖症。在其它方面中,病状为非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、脂肪性肝炎、高血脂症、血脂异常、高胆固醇血症、非家族性高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症、杂合型家族性高胆固醇血症、纯合型家族性高胆固醇血症、混合型血脂异常、动脉粥样硬化、早发型冠心病、血脂异常、高甘油三酯血症、高脂肪酸血症和肝硬化。方法还包括那些其中施用 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段来治疗以升高的脂质水平为特征的紊乱或病状的方法,此类脂质包括 LDL-C、ApoB、VLDL-C、IDL-C、非 HDL-C、Lp(a)、血清甘油三酯、肝甘油三酯、Ox-LDL-C、小 LDL 颗粒、小 VLDL、磷脂和氧化磷脂。

[0106] 在一些实施方案中,可通过施用 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段而减轻的病状特征为与来自健康患者的脂肪组织中的 NRG4 表达相比,脂肪组织中的 NRG4 表达减轻的病状为脂肪细胞和人体组织之间的异常交流。

[0107] 通过施用 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段而可治疗的病状的指示“NRG4 表达减少”可被定义为在来自已知具有病状的个体的样品中的 NRG4 表达相对于在来自已知没有病状的个体的样品中的 NRG4 表达的减少水平。在来自患有病状的个体的样品中, NRG4 表达的水平可降低例如至少 1.1 倍、1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍、1.5 倍、1.6 倍、1.7 倍、1.8 倍、1.9 倍、2.0 倍、2.1 倍、2.2 倍、2.3 倍、2.4 倍、2.5 倍、2.6 倍、2.7 倍、2.8 倍、2.9 倍、3.0 倍、3.1 倍、3.2 倍、3.3 倍、3.4 倍、3.5 倍、3.6 倍、3.7 倍、3.8 倍、3.9 倍、4.0 倍、4.1 倍、4.2 倍、4.3 倍、4.4 倍、4.5 倍、4.6 倍、4.7 倍、4.8 倍、4.9 倍、5.0 倍、5.1 倍、5.2 倍、5.3 倍、5.4 倍、5.5 倍、5.6 倍、5.7 倍、5.8 倍、5.9 倍、或 6.0 倍。

[0108] 在一些实施方案中,可通过施用 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段而减轻的病状为脂肪细胞和人体组织之间的异常交流。

[0109] 不希望受理论束缚,施用的 Nrg4、Nrg4 变体或其生物学活性片段负调节参与脂肪重新生成的基因的表达。这种肝脂肪生成的下调可能成为 Nrg4 的有益的代谢效果的基础。

[0110] 组合物和制剂

[0111] 最佳的 Nrg4 或 Nrg4 调节剂制剂将依据施用途和所需剂量由本领域的技术人员来确定。此类制剂可影响所施用药剂的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。

[0112] 除了本文所描述的那些代表性的 Nrg4 或 Nrg4 调节剂剂型之外,药学上可接受的赋形剂和载体通常是本领域的技术人员所已知的,并且因此包括在本发明中。此类赋形剂

和载体被描述在例如“Remingtons Pharmaceutical Sciences”Mack Pub. Co., New Jersey 中。

[0113] 使用一种或多种生理可接受的载体以常规方式来配制根据本发明使用的包含 Nrg4 或 Nrg4 调节剂的药物组合物,所述载体包括促进治疗组合物加工成可药理学上使用的制剂的赋形剂和辅助剂。可用本身已知的方式制造这些药物组合物,例如,通过常规混合、溶解、造粒、糖衣丸制备、研磨、乳化、包封、包埋或冻干方法。适合的制剂依赖于所选施用途径。

[0114] 当治疗有效量的 Nrg4 或 Nrg4 调节剂组合物通过例如皮内、皮肤或皮下注射来施用,组合物在一个方面中呈无热原的、胃肠外可接受的水性溶液的形式。制备此类胃肠外可接受的蛋白质或多核苷酸溶液,并适当考虑 pH、等渗性、稳定性等,在本领域的技术内。除了本发明的 Nrg4、Nrg4 调节剂或本发明的其它活性成分之外,组合物任选地包括等渗媒介物如氯化钠注射液、林格氏 (Ringer's) 注射液、葡萄糖注射液、葡萄糖和氯化钠注射液、乳酸林格氏注射液、或本领域内已知的其它媒介物。在另一个方面中,Nrg4 或 Nrg4 调节剂组合物还包括稳定剂、防腐剂、缓冲液、抗氧化剂或本领域中技术人员已知的其它添加剂。本发明的药剂被配制为水性溶液,优选地为生理相容的缓冲液如汉克斯溶液 (Hanks' s solution)、林格氏溶液或生理盐水缓冲液。对于经粘膜施用,适合于待渗透的屏障的渗透剂用于制剂中。此类渗透剂通常为本领域中已知的。

[0115] 在某些方面中,Nrg4 或 Nrg4 调节剂制剂被设计成如下文所描述的短效、快速释放、长效或持续释放的形式。因此,药物制剂的一种形式被配制用于控释或用于缓释。在其它方面中,本发明 Nrg4 或 Nrg4 调节剂组合物包括例如微胶粒或脂质体或一些其它包封形式,或者可以延迟释放的方式施用以提供持久储存和 / 或递送效果。因此,药物 Nrg4 或 Nrg4 调节剂制剂被任选地压制成小球或圆柱体并且作为储库注射液或作为植入物 (如支架) 被肌肉内或皮下植入。此类植入物可利用已知的惰性材料如聚硅酮和生物可降解聚合物。

[0116] 对于口服施用,可通过将活性化合物和本领域中熟知的药物可接受的载体结合来容易地配制组合物。此类载体能够使本发明的化合物被配制为片剂、丸剂、糖衣丸、粉末、胶囊、液体、溶液、凝胶、糖浆剂、药浆、混悬剂等,以用于待治疗患者的口服摄取。

[0117] 对于吸入施用,根据本发明使用的组合物使用适合的推进剂 (例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适合的气体) 从加压包装或喷雾器以气溶胶喷雾剂呈现形式方便地递送。

[0118] 用于胃肠外施用的包含 Nrg4 或 Nrg4 调节剂的组合物包括呈可溶于水的形式的组合物的水性溶液。任选地,混悬剂也可含有适合的稳定剂或增加组合物的溶解度以允许制备高浓度溶液的试剂。或者,活性成分可以呈粉末形式以在使用前用适合的媒介物 (例如,无菌无热原水) 复原。

[0119] 组合物还可以被配制为直肠组合物,如 (例如) 含有常规栓剂基质 (如可可脂或其它甘油酯) 的栓剂或保留灌肠剂。除前述制剂以外,化合物还可配制为储库制剂。此类长效制剂可通过植入 (例如皮下或肌肉内) 或通过肌肉内注射来施用。因此,例如,组合物可与适合的聚合材料或疏水性材料 (例如在可接受的油中的乳液) 或离子交换树脂一起配制,或配制为微溶的衍生物,例如,为微溶盐。

[0120] 组合物还可包括适合的固相或胶相载体或赋形剂。

[0121] 本发明的组合物可以呈本发明的蛋白质或其它活性成分连同蛋白或肽抗原的复合物的形式。

[0122] 组合物可包括能够将含有蛋白质或含有其它活性成分的组合物递送至组织损伤的位点的基质,该基质提供了用于形成骨骼和软骨的结构并且能够最佳地被再吸收到身体中。此类基质可由目前用于其它植入医疗应用的材料形成。基质材料的选择是基于生物相容性、生物可降解性、机械性能、装饰性外观和界面性能。

[0123] 组合物还可含有增强蛋白质或其它活性成分的活性,或者补充其治疗中的活性或用途的其它试剂。此类另外的因子和/或试剂可包括在药物组合物中以与本发明的蛋白质或其它活性成分产生协同效果,或者使副效应最小化。

[0124] 用于配制和施用本申请的治疗组合物的技术可见于最新版的“Remington's Pharmaceutical Sciences,”Mack 出版公司,Easton,PA 中。当应用于单独施用的单独活性成分时,治疗有效剂量是指该单独的成分。当应用于组合时,治疗有效剂量是指产生治疗效果的活性成分的组的量,无论是组合地、连续地或是同时施用。

[0125] 施用

[0126] 根据所提供的方法施用 Nrg4 或 Nrg4 调节剂将经由任何途径。涵盖施用的常规途径,例如胃肠外、皮下、静脉内、皮内、肌肉内、乳房内、腹膜内、鞘内、眼内、眼球后、肺内、气管内滴注、支气管内滴注、气雾剂、舌下、口、鼻、直肠、阴道或经皮递送,或通过在特定的位置手术植入。具体地涵盖包括静脉内施用的方法。

[0127] 在各种方面中,所提供的方法中的治疗包括单次剂量或一段时间内的多次剂量。Nrg4 或 Nrg4 调节剂的施用是全身性或局部的,并且可包括治疗有效量的 Nrg4 蛋白质组合物的单一位点的注射或输注。或者,涵盖治疗性的 Nrg4 或 Nrg4 调节剂组合物在多个位点处递送至患者。可同时给予多次施用,或者在一段时间内施用多次施用。还涵盖另外的疗法,其中 Nrg4 或 Nrg4 调节剂以周期(例如每天、每周或每月)为基础来施用。

[0128] 在某些实施方案中,治疗组合物的胃肠外施用通过起始大药丸进行,然后进行连续输注,以便维持药物产品的治疗循环水平。本领域一般技术人员将易于优化如根据良好的医学规范和个别患者的临床病状确定的有效剂量和施用方案。所提供的方法包括那些其中 Nrg4 经口和通过注射来施用的方法。在其中 Nrg4 或 Nrg4 调节剂被注射的方法中,注射为静脉内的或皮下的。在某些方面中,注射是用形成储库的组合物,并且在包括储库形成的实施方案中,形成储库的组合物通过将适合的递送装置植入患者中来施用。在一个方面中,递送装置被皮下植入,并且在某些方面中,递送装置为泵。

[0129] 给药频率将取决于 Nrg4 的药代动力学参数和施用途径。取决于施用途径,根据体重、体表面积或器官大小来计算适合的剂量。动物模型的有效性在促进对给定的治疗剂的适当剂量的决定中尤其有用。

[0130] 为确定适当的治疗剂量所必需的计算的进一步细化通过本领域中的普通技术人员来常规地进行,而无需过多的实验。最终的剂量方案将通过主治医师来确定,考虑到了改变 Nrg4 或 Nrg4 调节剂作用的因素,例如特异活性、患者响应性、患者的年龄、病状、体重、性别和饮食、任何病状的严重性、施用时间、同时治疗的种类(如果有的话)、治疗频率和期望效果的性质和其它临床因素。在进行研究时,将出现关于用于具体的疾病和病状的适当剂量水平和治疗持续时间的另外的信息。

[0131] 在一些实施方案中, Nrg4 或 Nrg4 调节剂单独来施用, 在其它实施方案中, Nrg4 或 Nrg4 调节剂结合针对目标病状或针对其其它症状的其它治疗剂来施用。剂量水平的数量级为每天每千克体重约 0.01mg 至 30mg, 例如约 0.1mg 至 10mg/kg。

[0132] 也提供了 Nrg4 或 Nrg4 调节剂的单位剂量。“单位剂量”被定义为分散在适合的载体中的治疗组合物的离散量。

[0133] 应理解所提供的 Nrg4 或 Nrg4 调节剂和治疗方法在人类医学和兽医医学中是有用的。因此, 待治疗的受试者为哺乳动物, 如人类或其它哺乳动物。出于兽医目的, 受试者包括例如农场动物(包括牛、绵羊、猪、马和山羊)、伴侣动物(如狗和猫)、异国动物和/或动物园动物、实验室动物(包括小鼠大鼠、兔子、豚鼠和仓鼠); 以及家禽如小鸡、火鸡、鸭和鹅。被治疗的患者具有任何年龄, 例如在 10 岁-50 岁之间、20 岁或更小、或 10 岁或更小。

[0134] 此外, 可以预期本发明的 Nrg4 或 Nrg4 调节剂与用于以下疾病的任何现有的治疗组合使用: 非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、脂肪性肝炎、II 型糖尿病、高血糖症、高血脂症、血脂异常、肥胖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗、高胆固醇血症、非家族性高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症、杂合型家族性高胆固醇血症、纯合型家族性高胆固醇血症、混合型血脂异常、动脉粥样硬化、早发型冠心病、血脂异常、高甘油三酯血症、高脂肪酸血症或肝硬化。例如, 在某些实施方案中, 可以预期本发明的方法与已知的代谢紊乱、心血管紊乱和/或升高的脂质紊乱的疗法组合使用。包括 Nrg4、变体或片段或 Nrg4 调节剂的组合物在此类疗法之前、之后或期间施用。

[0135] 组合疗法

[0136] 为了增加用所提供的 Nrg4 或 Nrg4 调节剂组合物治疗的有效性, 在某一方面中希望将这些组合物和在具体的疾病或病状的治疗中有效的其它疗法结合。

[0137] 在一些情况下, 本发明的组合物可在其它药剂治疗之前或之后间隔数分钟至数周施用。可以预期在相互约 12h-24h 内或在相互约 6h-12h 内施用两种形式。在一些情形下, 希望显著延长治疗时期, 其中各次施用之间经过数天 (2、3、4、5、6 或 7 天) 至数周 (1、2、3、4、5、6、7 或 8 周)。

[0138] 在某些具体的情况下, Nrg4 或 Nrg4 调节剂组合物与第二种药剂组合施用以预防或治疗代谢紊乱或者预防或治疗心血管疾病。例如, 与疗法组合使用的药剂包括但不限于降血糖剂 (即降低血糖的药剂) 或降脂剂 (即降低脂质水平的药剂)。

[0139] 降血糖剂

[0140] 当前, 存在用于治疗 2 型糖尿病的各种药物方法。它们经由不同的作用模式起作用: 1) 磺酰脲类 (例如, 格列美脲、格列生脲、磺酰脲、AY31637) 本质上刺激胰岛素分泌; 2) 双胍类 (例如, 二甲双胍) 通过促进葡萄糖利用、减少肝葡萄糖产生和减少肠葡萄糖输出来起作用; 3) α -葡萄糖苷酶抑制剂 (例如, 阿卡波糖、米格列醇) 减慢碳水化合物消化并且因此减慢从消化道的吸收并且减少餐后的高血糖症; 4) 噻唑烷二酮类 (例如, 曲格列酮、吡格列酮、罗格列酮、格列吡酮、巴格列酮、来格列酮、茛格列酮、曲格列酮、恩格列酮、AD 5075、T 174、YM 268、R 102380、NC 2100、NIP 223、NIP 221、MK 0767、环格列酮、艾格列酮 (adaglitazone)、CLX 0921、达格列酮、CP 92768、BM 152054) 增强胰岛素作用, 因此促进了外围组织中葡萄糖的利用; 5) 胰高血糖素样肽和激动剂 (例如, 艾塞那肽 (exendin)) 或其稳定剂 (例如, DPP4 抑制剂如西他列汀) 加强葡萄糖刺激的胰岛素分泌; 和 6) 胰岛素或其

类似物（例如LANTUS®）刺激组织葡萄糖利用并且抑制肝葡萄糖输出。以上提到的药物方法可被单独利用或以组合疗法利用。

[0141] 降脂剂

[0142] 术语“降脂剂”是指向个体提供以实现降低个体中的脂质的药剂。例如，在某些实施方案中，降脂剂被提供给个体以减少 LDL-C、ApoB、VLDL-C、IDL-C、非 HDL-C、Lp(a)、血清甘油三酯、肝甘油三酯、Ox-LDL-C、小 LDL 颗粒、小 VLDL、磷脂和氧化磷脂中的一个或多个。理想地，施用降脂剂导致个体中的一种或多种血清脂质随着时间的减少。

[0143] 在某些此类实施方案中，可与本发明的药物组合物共同施用的降脂药剂包括但不限于：阿托伐他汀、辛伐他汀、罗素伐他汀、普伐他汀（pravastatin）、氟伐他汀、依泽替米贝、苯扎贝特、环丙贝特、安妥明、吉非罗齐和非诺贝特。在某些此类实施方案中，降脂剂在施用本发明的药物组合物之前施用。在某些此类实施方案中，降脂剂在施用本发明的药物组合物之后施用。在某些此类实施方案中，降脂剂与本发明的药物组合物同时施用。在某些此类实施方案中，共同施用的降脂剂的剂量与如果降脂剂单独施用的情况下将要施用的剂量相同。在某些此类实施方案中，共同施用的降脂剂的剂量低于如果降脂剂单独施用的情况下将要施用的剂量。在某些此类实施方案中，共同施用的降脂剂的剂量高于如果降脂剂单独施用的情况下将要施用的剂量。

[0144] 试剂盒

[0145] 本发明也涵盖用于治疗本文所描述的紊乱的试剂盒。此类试剂盒包括至少第一无菌组合物，该无菌组合物包含在药学可接受的载体中以上描述的 Nrg4 (SEQ ID NO:1)、Nrg4 变体或其生物学活性片段。另一组分为任选地第二治疗剂，该治疗剂和用于施用治疗组合物的适合的容器和媒介物一起用于治疗紊乱。试剂盒任选地包括用于悬浮、稀释或达到递送第一组合物和第二组合物目的的溶液或缓冲剂。试剂盒任选地还包括用于递送使用在本发明的方法中的一种或多种组合物的导管、注射器或其它递送装置。在另一个方面中，试剂盒任选地还包括含有用于治疗方案的施用方法的说明书。

[0146] 诊断以 Nrg4 缺陷为特征的病状的方法

[0147] 本公开也涵盖诊断患者中的选自由以下各项组成的组的代谢紊乱的方法：非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、脂肪性肝炎、II 型糖尿病、高血糖症、高血脂症、血脂异常、肥胖症、高胰岛素血症、胰岛素抵抗、高胆固醇血症、非家族性高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症、杂合型家族性高胆固醇血症、纯合型家族性高胆固醇血症、混合型血脂异常、动脉粥样硬化、早发型冠心病、血脂异常、高甘油三酯血症、高脂肪酸血症和肝硬化，该方法包括测定来自疑似罹患该病状的患者样品中的 Nrg4 水平。

[0148] 应理解测定患者样品中的 Nrg4 水平将会在确定如何处理患者中的病状中 useful。例如，因为 Nrg4 水平的减少与代谢紊乱和肝病相关，所以临床医生可使用关于 Nrg4 水平的信息以帮助做出关于患者的治疗的决定。因此，如果 Nrg4 水平指示处于以上提到的病状中之一的早期阶段，那么可以开具适当的治疗方案。

[0149] 为代谢紊乱的指示物的 Nrg4 水平可被定义为存在于来自已知具有紊乱的个体的样品中的 Nrg4 水平相比在来自已知没有紊乱的个体的样品中的 Nrg4 水平的减少水平。在来自具有紊乱的个体的样品中，Nrg4 水平可降低例如至少 1.1 倍、1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍、1.5 倍、1.6 倍、1.7 倍、1.8 倍、1.9 倍、2.0 倍、2.1 倍、2.2 倍、2.3 倍、2.4 倍、2.5 倍、2.6 倍、

2.7 倍、2.8 倍、2.9 倍、3.0 倍、3.1 倍、3.2 倍、3.3 倍、3.4 倍、3.5 倍、3.6 倍、3.7 倍、3.8 倍、3.9 倍、4.0 倍、4.1 倍、4.2 倍、4.3 倍、4.4 倍、4.5 倍、4.6 倍、4.7 倍、4.8 倍、4.9 倍、5.0 倍、5.1 倍、5.2 倍、5.3 倍、5.4 倍、5.5 倍、5.6 倍、5.7 倍、5.8 倍、5.9 倍、或 6.0 倍。

[0150] 应理解本发明的方法包括辅助诊断的方法和预后方法。也应理解本发明的方法有用于医师确定患者的处理或治疗的过程。

[0151] 在一个方面中,使用所提供的方法鉴别的 Nrg4 标记用于评估治疗功效(例如改善病理学的一种或多种症状)。在与 Nrg4 缺陷有关的病状的改善可能与 Nrg4 水平的增加有关的情况下,在治疗过程之前(作为背景)和期间或之后(例如,在指定时间,周期性地或随机地)检测从患者获取的样品中的 Nrg4 水平。因为 Nrg4 水平的增加可能是瞬间的,所以在在一个方面中,在在每次治疗之前和之后紧接着以定期间隔(例如,每 6 小时、每 12 小时、每 18 小时、每 24 小时、每 2 天、每 3 天、每 4 天、每 5 天、每 6 天、每 7 天、每 8 天、每 9 天、每 10 天、每 11 天、每 12 天、每 13 天、每 2 周、每 3 周、每 4 周、每 5 周、每 6 周、每 7 周、每 2 个月、每 3 个月、每 4 个月、每 5 个月、每 6 个月、每 7 个月、每 8 个月、每 9 个月、每 10 个月、每 11 个月、每年或更长)进行该方法。根据治疗过程和其它临床变量,出于诊断或疾病/治疗监测的目的,本领域的普通技术的临床医生将能够确定用于进行该测定的适当的计划表。

[0152] 在各种实施方案中,使用许多充分认识的免疫学结合测定中的任一种监测和/或量化样品中的 Nrg4 蛋白质(参见例如美国专利号 4,366,241;4,376,110;4,517,288 和 4,837,168)。对于一般的免疫测定的综述,也参见 Methods in Cell Biology 第 37 卷:Antibodies in Cell Biology,Asai 编,Academic Press,Inc.New York(1993);Basic and Clinical Immunology 第 7 版,Stites&Terr 编(1991)。

[0153] 在另一个实施方案中,免疫印迹(蛋白质印迹)分析被用于检测和量化 Nrg4 在样品中的存在。技术通常包括通过以分子量为基础的凝胶电泳分离样品蛋白质、将分离的蛋白质转移到适合的固体支撑物(如硝化纤维素过滤器、尼龙过滤器或衍生的尼龙过滤器)、和用特异性结合 Nrg4 的抗体孵育样品。抗-Nrg4 抗体与固体支撑物上的 Nrg4 特异性结合。这些抗体可直接被标记或替代地可随后使用特异性结合至抗-Nrg4 抗体的标记的抗体(例如,标记的绵羊抗小鼠抗体)来检测。

[0154] 在另一个实施方案中,当检测的 Nrg4 水平高于或低于对照样品的测量或已知水平(例如,对正常的健康个体的已知或测量水平或者对相同的个体在不同时间测定的“基线/参考”水平)时,Nrg4 的定量测定被认为显示阳性结果,例如,Nrg4 水平升高或降低。在特别优选的实施方案中,当样品和“对照”之间的差别为统计学上显著(例如,在 85%或更大,优选地在 90%或更大,更优选地在 95%或更大和最优选地在 98%或更大的置信水平)时,测定被认为显示阳性结果。

[0155] 在一个本公开的实施方案中,抗体使来自溶液的 Nrg4 蛋白质发生免疫沉淀又与在聚丙烯酰胺凝胶的蛋白质印迹或免疫印迹上的 Nrg4 蛋白质发生反应。在另一个实施方案中,抗体检测储存的血清样品中的 Nrg4 蛋白质。

实施例

[0156] 提供以下实施例以用于说明目的,而不以任何方式限制本发明的范围。

[0157] 实施例 1:Nrg4 为靶向肝细胞的脂肪细胞源性因子

[0158] 在这个实施例中,使用激素结合测定证明在 i. p. 注射之后,Nrg4 与肝细胞结合并且降低血糖浓度。在 Nrg4 缺失小鼠中的代谢研究还证明,在 HFD 喂养之后,Nrg4 缺陷使高血糖症和高血脂症的发展加剧。此外,缺乏 Nrg4 的小鼠患有更严重的脂肪肝。这些发现强调了 Nrg4 在调节整个体内葡萄糖和脂质代谢中的重要作用。

[0159] 材料和方法

[0160] Nrg4 转基因小鼠的产生

[0161] 将小鼠 Nrg4cDNA (包括 5' UTR 和部分的 3' UTR) TA- 克隆到 pCR2.1 TOPO 载体中。将 AP2 启动子插入在载体上的 HindIII 和 KpnI 之间,而将人类生长激素 polyA 插入在 EcoRV 和 XbaI 之间。通过用 HindIII 和 ApaI 双重消化使整个载体线性化,以释放转基因盒用于显微注射到 C57BL/6J 小鼠受精卵以产生 AP2-Nrg4 转基因幼崽。

[0162] Nrg4 敲除小鼠购自突变小鼠区域性资源中心 (Mutant Mice Regional Resource Center) (MMRRC)。

[0163] 脂肪细胞分化和处理

[0164] 将 SV40 大 T 抗原永生化的褐色脂肪前体细胞培养在具有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 中直到融合 (计为第 0 天) 后 2 天。通过将含有 0.5mM IBMX、125 μ M 吡啶美辛、1 μ M 地塞米松的混合物添加到含有 10% FBS、20nM 胰岛素和 1nM T3 的分化维持 DMEM 中来诱导分化。在诱导后的两至三天,将细胞单独培养在维持培养基中。在褐色脂肪细胞分化过程中在不同天数时将总 RNA 分离以用于基因表达分析。

[0165] 将 3T3-L1 脂肪前体细胞培养在具有 10% 促生长小牛血清 (BGS) 的 DMEM 中直到融合 (计为第 0 天) 后 2 天。通过将含有 0.5mM IBMX、1 μ M 地塞米松和 1 μ g/mL 胰岛素的混合物添加到补充有 10% FBS 的 DMEM 中来诱导分化。诱导后的三天,将细胞在含有 10% FBS 和 1 μ g/mL 胰岛素的 DMEM 中再培养两天,然后维持在补充有 10% FBS 的 DMEM 中。对于 TNF α 处理,在 RNA 分离之前,将 10ng/mL TNF α 添加到培养在 10% FBS DMEM 中的成熟的 (第 8 天) 3T3-L1 脂肪细胞中,分别持续 6 小时。对于 IL-1 β 处理,在 RNA 分离之前,将 40ng/mL IL-1 β 添加到培养在 10% FBS DMEM 中的成熟的 (第 8 天) 3T3-L1 脂肪细胞中,持续 6 小时。

[0166] Nrg4 结合测定

[0167] 用表达 SEAP 或 SEAP-Nrg4^{N62}的载体转染 293T 细胞。在转染后的 24 小时,将细胞转移到无血清的培养基并持续另外的 2 天,之后使用 Centricon 收集和浓缩培养基。简单地说,将冷冻的组织切片用 SEAP 或 SEAP-Nrg4^{N62}条件培养基在室温下孵育 45 分钟,之后将它们在含有 0.1% 吐温 -20 的 PBS 中洗涤 4 次,并且固定在含有 20mM HEPES (pH7.4)、60% 丙酮和 3% 甲醛的溶液中。使内源性碱性磷酸酶在 65°C 下失活 30 分钟之后,使用 NBT/BCIP 底物来检测源于融合蛋白的酶活性。对于竞争结合,将冷冻的组织切片用 4 μ g/ μ L GST 或 GST-Nrg4^{N62}预孵育 30 分钟,之后用 SEAP-Nrg4^{N62}条件培养基共同孵育另外 1 个小时。

[0168] 结果

[0169] Nrg4 是细胞外信号传导配体的神经调节蛋白家族的成员,神经调节蛋白家族还包括 Nrg1、Nrg2 和 Nrg3。Nrg4 的主要的编码同种型被预测编码 115 个氨基酸的蛋白质,该同种型含有于 Cys9-Cys23、Cys17-Cys34 和 Cys36-Cys45 之间具有三个特征二硫键的单个 EGF 样结构域、推定的 N- 连接的糖基化位点和跨膜结构域 (图 1)。像其它神经调节蛋白,

Nrg4 被合成为跨膜蛋白并且经受释放细胞外 EGF 样肽以用于受体结合和信号转导的蛋白水解裂解。负责 Nrg4 的脱落的蛋白酶的身份目前未知,但是可能为基质金属蛋白酶。Nrg4 在小鼠和人之间是高度保守的,在 EGF 样结构域 (Nrg4 的氨基酸 1 至大约氨基酸 52,图 1) 中具有超过 90%的氨基酸序列同一性。

[0170] Nrg4 表达已经报道在胰腺细胞、乳腺上皮细胞、前列腺癌细胞系和淋巴瘤细胞系中。然而,Nrg4 mRNA 前体转录物经受复杂的选择性剪接并且产生许多看起来缺乏蛋白质编码潜能的剪接同种型。此外,在之前的免疫组织化学研究中使用的 Nrg4 抗体的特异性仍不确定。因此,Nrg4 表达和其调节的准确特征还未最后确立。本文中开发了特异性检测 Nrg4 的编码同种型的 Taqman 定量 PCR(qPCR) 方法。发现 Nrg4mRNA 在褐色脂肪组织 (BAT) 和白色脂肪组织 (WAT) 中被大量地表达,但没有在其它组织中被检测到,其它组织包括肾脏、骨骼肌肉、脑、睾丸、小肠、肝脏、心脏、脾脏、肺和胰腺 (图 2A)。Nrg4 表达限制在脂肪组织说明,在正常生理条件下,Nrg4 可充当介导脂肪细胞和体内其它组织之间的交流的配体。在褐色和白色脂肪细胞分化过程中也检测 Nrg4 表达,以确定 Nrg4 表达是否被调节。与 UCP1 (一种用于褐色脂肪细胞的标记) 类似,在褐色脂肪细胞分化过程中,Nrg4 mRNA 表达被高度诱导 (图 2B)。在 3T3-L1 白色脂肪细胞的分化过程中,Nrg4 mRNA 水平也明显增加 (图 2B)。

[0171] 在啮齿动物中,褐色脂肪在响应于低温暴露的适应性生热作用中起着重要作用。因为 Nrg4 在褐色脂肪组织中高度表达,所以评价了它在低温诱导的生热作用中的潜在作用。将野生型和 Nrg4 缺陷的小鼠暴露至低温温度 (4℃) 并且检测不同时间点的直肠温度。在低温暴露过程中,在这两组小鼠中的核心体温是几乎不能区别的,表明了 Nrg4 不是抵御急性低温应激所需要的 (图 3A)。WT 和 KO 组之间的褐色脂肪的组织学表现是类似的 (图 3B)。褐色脂肪基因 (如 UCP1 和脱碘酶 2(DI02)) 的低温诱导的表达也是类似的 (图 3C)。有趣的是,在 Nrg4 缺陷的小鼠中血浆甘油三酯 (TG) 浓度较高,而血浆非酯化脂肪酸和酮 (β -羟基丁酸) 水平较低 (图 3D)。这些观察结果表明,尽管 Nrg4 具有脂肪特异性表达,但 Nrg4 可能靶向体内的其它细胞类型。

[0172] 为了鉴定用于 Nrg4 结合和作用的组织靶标,在分泌的碱性磷酸酶 (SEAP) 和 Nrg4 的 N-端 62 个氨基酸之间产生融合蛋白 (SEAP-Nrg4^{N62}),并且结合测定如之前所述进行。Nrg4 的这个片段含有 EGF 样结构域并且被预测能胜任起始信号转导。从用 SEAP 或 SEAP-Nrg4^{N62} 质粒瞬时转染的 HEK 293T 细胞收集条件培养基并且使用 Centricon 旋转柱对条件培养基进行浓缩。在组织切片上进行结合测定,然后充分洗涤、固定、加热失活并且用碱性磷酸酶底物 (BCIP/NBT) 孵育。对于 SEAP 和 SEAP-Nrg4^{N62},在褐色脂肪、心脏、骨骼肌肉和脾脏上仅仅背景信号被检测到 (图 4A)。相反,观察到 SEAP-Nrg4^{N62} 与肝细胞的强结合 (图 4B)。此外,过量 GST-Nrg4^{N62} 而不是 GST 的存在完全破坏了 SEAP-Nrg4^{N62} 与肝细胞的结合,表明了肝细胞上的推定的 Nrg4 结合位点是有限的并且可饱和的 (图 4C)。

[0173] 实施例 2 :在肥胖症中脂肪细胞 Nrg4 表达被下调

[0174] 在这个实施例中,使用高度灵敏和特异性的 Taqman 定量 PCR 测定,发现 Nrg4 在褐色和白色脂肪组织中被大量地表达。在其它组织中检测出非常少的 mRNA 表达。在脂肪细胞分化过程中,Nrg4 表达是高度可诱导的。这种表达特征表明 Nrg4 在介导脂肪组织和其它代谢组织之间的串扰中可起到未被认识到的作用。在来自饮食诱导的和遗传型的肥胖小鼠的脂肪组织中 Nrg4 mRNA 表达显著减少。因此,肥胖症与 Nrg4 表达和作用的潜在缺陷相

关。

[0175] 材料和方法

[0176] 代谢的检测方法

[0177] 使用商业测定试剂盒（分别使用Sigma、Stanbio Laboratory、Wako Diagnostics）检测血浆甘油 / 甘油三酯、酮 / 胆固醇和非酯化脂肪酸的浓度。

[0178] 基因表达分析

[0179] 来自白色脂肪组织的总 RNA 使用购自 Invitrogen 的商业试剂盒来提取。来自其它组织和培养细胞的 RNA 使用 TRIzol 方法来提取。对于定量实时 PCR (qPCR) 分析, 使用 MMLV-RT 对等量的 RNA 进行反转录, 然后使用 SYBR Green (Life Technologies) 进行定量 PCR 反应。mRNA 的相对丰度被标准化为核糖体蛋白 36B4。

[0180] 为了使用 Taqman PCR 检测 Nrg4 的编码同种型, 产生了包含外显子 3 和外显子 6 的接点的正义引物 (5' CCCAGCCCATTCTGTAGGTG 3' (SEQ ID NO:3))、外显子 6 中的反义引物 (5' ACCACGAAAGCTG-CCGACAG 3' (SEQ ID NO:4)) 以及在外显子 6 中但在正义引物和反义引物之间的 taqman 探针 (5' 6-FAM-CGGAGCACGCTGCGAAGAGGTT-BHQ 3' (SEQ ID NO:5))。使用来自 ABI 的 Taqman Universal PCR Master Mix 系统进行 Taqman PCR, Nrg4 编码同种型的相对丰度被标准化为核糖体蛋白 36B4。

[0181] 结果

[0182] 为了确定在肥胖症中 Nrg4 表达是否调节异常, 对来自被喂养标准食物 (瘦的) 或含有 60% 脂肪源性卡路里的 高脂食物 (HFD) (肥胖的) 的小鼠的脂肪组织分离的总 RNA 进行 qPCR 分析。如预期的, TNF α (炎症细胞因子) 的表达在来自 HFD 喂养的小鼠的附睾的白色脂肪中升高 (图 5A)。尽管在两组之间褐色脂肪中的 Nrg4 表达是相似的, 但是在饮食诱导的肥胖小鼠的附睾的白色脂肪中它的 mRNA 水平显著减少 (图 5A 和图 15A)。同样地, 在来自瘦素或瘦素受体缺陷 (ob/ob 或 db/db) 的小鼠的附睾的白色脂肪和褐色脂肪中 Nrg4 表达也显著减少 (图 5B 和图 15A)。Nrg4 表达的下调特定地发生在脂肪细胞中 (图 5C 和图 15B)。实际上, 在附睾的白色脂肪的基质血管成分中 Nrg4 mRNA 水平很低。相反, 成熟的脂肪细胞成分表达大量 Nrg4, 该表达在肥胖症中显著减少。因为促炎性细胞因子已与脂肪组织胰岛素抵抗和代谢调节异常相关, 所以进行实验以确定促炎性细胞因子信号传导是否调节培养的脂肪细胞中的 Nrg4 表达。在从所处理的细胞分离总 RNA 之前, 用媒介物 (PBS)、TNF α 或 IL-1 β 对完全分化的褐色和 3T3-L1 脂肪细胞处理不同的时间段, 以用于基因表达的分析。与媒介物相比, TNF α 和 IL-1 β 处理大幅度地降低褐色和白色脂肪细胞中的 Nrg4 mRNA 表达 (图 5D 和图 15C)。

[0183] 还研究了脂肪中的 Nrg4 表达和肥胖症的严重性之间的关系。用高脂食物喂养一组野生型 C57BL/6J 雄性小鼠大约 2 个月以诱导肥胖症。HFD 喂养的小鼠患有不同严重性的肥胖症, 并且体重范围为 30.7 克至 51.9 克。检测这些小鼠中的代谢参数并且研究代谢参数与内脏脂肪中的 Nrg4 表达的关联。Nrg4 mRNA 表达与体重负相关 ($R^2 = 0.632$) 并且与附睾的白色脂肪重量负相关 ($R^2 = 0.726$) (图 6A 和 6B)。此外, 具有低 Nrg4 表达的小鼠倾向于患有更严重的高血糖症并且在肝脏中具有更高的脂肪含量。相反, 在白色脂肪中的高的 Nrg4 表达与较低的血糖和肝脂肪累积相关 (图 6C 和 6D)。合起来, 这些研究证明在肥胖症中 Nrg4 表达严重减少并且有力地表明 Nrg4 表达不足可与肥胖症相关联的代谢紊乱 (如

高血糖症和脂肪肝)的发展联系起来。

[0184] 实施例 3 :Nrg4 的缺失使饮食诱导的胰岛素抵抗、肝脂肪变性和高甘油三酯血症加剧

[0185] 为了提供升高 Nrg4 水平可赋予代谢益处的概念验证证据,在这个实施例中使脂肪特异性 Nrg4 转基因小鼠产生以救助肥胖症中的 Nrg4 表达减少。与 Nrg4 缺陷明显相反, Nrg4 转基因小鼠明显降低血糖和脂质浓度,并且减少肝中的脂肪累积。因此, Nrg4 激素信号传导的增强被预测来改善与肥胖症相关的代谢紊乱的发展。

[0186] 为了确定 Nrg4 不足促成代谢紊乱的发病机理的程度,检测 HFD 喂养之后的野生型 (WT) 和 Nrg4 敲除 (KO) 小鼠中的代谢参数。当喂养标准食物时, Nrg4 KO 小鼠是有活力的、正常生长,并且与 WT 同窝出生仔畜没有区别。在 HFD 喂养之后, Nrg4 缺失小鼠比对照组获得稍微多的体重 (图 7A)。此外, Nrg4 缺失小鼠中的血糖水平更高 (图 7B)。在缺乏 Nrg4 的小鼠中,血浆胰岛素浓度也升高 (图 7B),表明了 Nrg4 在维持葡萄糖稳态中,尤其在代谢应激状态如肥胖症中起到保护作用。血浆甘油三酯水平在 Nrg4 缺失小鼠中较高,而 β -羟基丁酸 (酮体的主要成分) 的浓度在缺失组中较低 (图 7C)。因为酮体是肝脂肪酸 β -氧化的产物,所以这些结果与 Nrg4 结合至肝细胞和这个因素在调节肝脂质代谢中的潜在作用是一致的。为了进一步测试这个可能性,检测了肝脂肪含量。与对照相比,在 HFD 喂养之后 Nrg4 缺失小鼠在肝脏中甘油三酯的堆积升高 (图 8A)。组织学染色表明在 Nrg4 KO 肝细胞中脂质的累积显著增加。相反,两组之间的脂肪组织的组织学表现仍是类似的 (图 8B)。

[0187] 从这些研究中可推断出 Nrg4 信号传导的丢失使饮食诱导的代谢调节异常 (尤其是血糖控制)、脂肪肝的进展和血浆甘油三酯稳态加剧。

[0188] 实施例 4 :脂肪组织中 Nrg4 的转基因表达改善饮食诱导的代谢调节异常

[0189] 这个实施例证明在机理层面, Nrg4 通过调节代谢基因表达来发出信号。Nrg4 负调节参与脂肪重新生成的基因的表达。这种肝脂肪生成的下调可能成为 Nrg4 的有益的代谢效果的基础。

[0190] 结果

[0191] 如上所述,在饮食诱导的和遗传型的肥胖症小鼠中脂肪细胞的 Nrg4 表达显著减少 (图 5A 和 5B)。因此,脂肪组织中 Nrg4 的转基因过表达可使由肥胖症诱导的代谢稳态正常化或救助由肥胖症诱导的代谢稳态的恶化。此外,重组 Nrg4 蛋白的施用可提供在治疗高血糖症、非酒精性脂肪肝和高血脂症中的治疗益处。为了测试这些可能性,在 aP2 启动子 / 增强子的控制下产生脂肪特异性 Nrg4 转基因小鼠, aP2 启动子 / 增强子已被广泛用来指导脂肪细胞中的基因的转基因表达。在褐色和白色脂肪组织中,产生具有各种水平的 Nrg4 转基因表达的五个独立的转基因始创者。选择系 #111 用于进一步研究,因为脂肪组织中的 Nrg4 转基因被特异性表达至稍高于瘦的小鼠中的 Nrg4 转基因的表达水平。关于出生后生长、体态和一般的行为特征, AP2-Nrg4 转基因小鼠与非转基因同窝出生仔畜没有区别。

[0192] 为了确定 Nrg4 的转基因表达是否使小鼠免受饮食诱导的代谢紊乱,用高脂肪食物喂养对照小鼠和转基因小鼠。在 11 周的 HFD 喂养之后,转基因组比对照组获得稍微少的体重 (图 9A)。代谢检测表明在喂养和禁食条件下 AP2-Nrg4 转基因小鼠具有较低的血糖 (图 9C)。在整夜饥饿之后,与具有更低的血浆酮水平的 Nrg4 缺失小鼠对比,转基因小鼠具有升高的酮水平 (图 9C),表明了可通过 Nrg4 的转基因表达增强肝脂肪酸氧化和酮生成。

在转基因组中血浆甘油三酯浓度较低。葡萄糖耐受性和胰岛素耐受性测试表明 AP2-Nrg4 转基因小鼠具有更高的葡萄糖耐受性和胰岛素敏感性 (图 10A-10B)。除了提高的血浆代谢特征之外,转基因小鼠中的肝脂肪累积明显减少 (图 10C-10D)。一致地,基因表达分析表明来自转基因小鼠的肝脏具有较低的主要的脂肪生成基因的表达。在转基因肝脏中,脂滴相关基因如 FSP27 和 s3-12 的表达也明显降低 (图 11)。合起来,这些研究为升高 Nrg4 水平可对血糖的控制产生希望结果并且对脂肪肝病实现重要的保护提供了基因证据。

[0193] 进行原理验证研究以评估重组 Nrg4 蛋白的潜在治疗效果。GST 和 GST-Nrg4^{N62} 融合蛋白被表达并且从含有相关的表达载体的细菌纯化。每隔 3 小时给饮食诱导的肥胖小鼠腹腔内施用两剂量的 GST 或 GST-Nrg4^{N62}。在第二次剂量后的三小时收获血浆和组织样品以用于代谢物检测和基因表达分析。用 GST-Nrg4^{N62} 处理的小鼠中的血浆葡萄糖浓度比对照组明显更低。在 GST-Nrg4^{N62} 处理之后胰岛素水平也趋向降低 (图 12),表明了 GST-Nrg4^{N62} 降低血糖的能力是通过不同于作为胰岛素促分泌素的机制来介导的。在这个短期实验中,没有观察到 GST-Nrg4^{N62} 对血浆和肝脂质的明显作用。有趣的是,参与脂肪重新生成的关键酶 (包括 SREBP1c 和 SCD1) 的表达通过 GST-Nrg4^{N62} 明显减少。

[0194] 实施例 5 :合成 Nrg4 肽

[0195] 为了评估外源性施用的 Nrg4 在治疗 2 型糖尿病和非酒精性脂肪肝病中的治疗潜能,合成了对应于 Nrg4 的 EGF 样结构域 (氨基酸 1-52) 的 Nrg4 肽。引入 N- 端乙酰化和 C- 端酰胺化以改善循环中肽的稳定性。评估在培养的细胞中的这种肽的生物活性并且在急性治疗和慢性治疗条件下进行体内研究。对于急性实验,通过以不同剂量的 i. p. 注射来递送肽,并且在注射之后检测血浆和肝脏代谢物浓度。在饮食诱导的和遗传型的肥胖症小鼠模型中进行这些研究。分析肝基因表达以调查涉及的目标代谢通路。对于慢性治疗,通过 i. p. 注射或渗透泵系统来递送肽,以实现稳定和可控的递送。在治疗开始之后,在不同时间点进行代谢分析。改变药代动力学特征以克服快速清除和 / 或失活。为了这个目的,产生具有脂肪酰基的化学修饰 (例如,棕榈酰化) 的 Nrg4 肽。已经表明酰化的肽与血清白蛋白相关并且大大提高在循环和生物利用度中的半衰期。也产生了另外的化学修饰如聚乙二醇化和糖基化。

[0196] 实施例 6 :产生于哺乳动物细胞中的重组 Nrg4

[0197] 目前在临床使用中的许多生物治疗剂为从工程化的哺乳动物细胞系纯化的重组蛋白。构建产生 Nrg4 作为聚组氨酸标记的分泌蛋白 (His-Nrg4) 的质粒。产生稳定转染的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系,该细胞系分泌 His-Nrg4 并且使用亲和基质纯化重组 Nrg4。期望此重组蛋白含有适当的糖基化和二硫键并且具有与天然 Nrg4 类似的药代动力学特征。评估小鼠中的重组 Nrg4 的生物活性。此外,建立方案来从 CHO 细胞纯化非标记的 Nrg4 以用于体内评估其在降低血糖和治疗非酒精性脂肪肝病中的治疗效果。

[0198] 实施例 7 :对释放 Nrg4 的细胞外片段重要的氨基酸的绘制

[0199] 为了绘制 Nrg4 的细胞外裂解位点,一组丙氨酸突变体产生在位于 EGF 样结构域和跨膜结构域之间的氨基酸 51-61 上。为了便于检测,将全长野生型和突变型 Nrg4 蛋白融合至分泌的碱性磷酸酶 (SEAP) 的 C- 端。通过 SEAP-Nrg4 融合蛋白在来自瞬时转染的 HEK293 细胞的条件培养基 (CM) 中的存在来检测成熟的 Nrg4 的裂解和分泌。免疫印迹分析表明 SEAP-Nrg4 蛋白从转染的细胞产生、释放并且在 CM 中是容易检测的 (图 14),指示了 Nrg4

细胞外结构域的脱落。尽管前体蛋白在总细胞裂解物中具有相似的表达,但是由丙氨酸替代氨基酸 53-54 (53-2A) 或氨基酸 53 (53-A) 的突变体使在 CM 中可检测的 SEAP-Nrg4 融合蛋白的水平显著降低。相反,在氨基酸 51-52、54、55-57、55-58、58-59 或 60-61 处的丙氨酸突变体对 SEAP-Nrg4 向培养基中的释放具有适度的影响。这些结果说明氨基酸 53 对于通过蛋白酶裂解 Nrg4 并将其释放到细胞外空间中是至关重要的。

[0200] 实施例 8:在进食高脂食物之后, Nrg4 缺陷导致严重的肥胖症、胰岛素抵抗、肝脂肪累积和高血脂症

[0201] 进行另外的研究以确定高脂食物对具有 Nrg4 缺陷的受试者的影响。

[0202] 材料和方法

[0203] 身体组成和代谢笼研究

[0204] 向野生型和 Nrg4 KO 小鼠喂养标准食物或高脂食物。使用 NMR 分析仪 (Minispec LF90II, Bruker Optics) 检测脂肪体重和瘦体重。使用综合实验室监测系统 (Comprehensive Laboratory Monitoring System) (CLAMS, Columbus Instruments) 检测氧消耗 (VO₂)、自发活动量和食物摄取量,该综合实验室检测系统为配备有光束活动监测装置的集成开路热量计。小鼠被单独地放置在密封室 (7.9"x 4"x 5") 中,并且小鼠自由获取食物和水。在设置为 20°C -23°C 并具有 12-12 小时 (6:00PM ~ 6:00AM) 暗-光循环的实验房间中进行研究。连续 72 小时进行检测。在这个时间期间,通过配备的位于室里面的喂养和饮水装置向动物提供食物和水。通过附设在室下面的精密天平监测每只动物的食物量。以 10 分钟的间隔依序对每个室的 VO₂ 采样 5 秒并且在 X 和 Z 维度上每秒记录活动量。

[0205] 代谢的检测方法

[0206] 使用商业测定试剂盒检测甘油三酯 (Sigma) 和非酯化脂肪酸 (Wako Diagnostics) 的血浆浓度。提取肝甘油三酯并且如之前所述检测。使用 ELISA 测定试剂盒 (CrystalChem) 检测血浆胰岛素。进行葡萄糖和胰岛素耐受性测试。

[0207] 为了确定 Nrg4 不足促成代谢紊乱的发病机理的程度,检测 HFD 喂养 (Research Diets, D12492) 之后的野生型 (WT) 和 Nrg4 缺失小鼠中的代谢参数。Nrg4 KO 小鼠以预期的孟德尔比率 (Mendelian ratio) 出生。当喂养标准食物时, Nrg2KO 小鼠显示与对照组类似的食物摄入量、身体活动量和氧消耗速率并且获得与对照组类似的体重 (图 16A)。在 HFD 喂养之后, Nrg4 缺失小鼠获得稍微多的体重,并伴随有明显的肥胖的增加和瘦体重百分比的减少。血浆甘油三酯 (TAG) 水平在 Nrg4 缺失小鼠中较高 (图 16B), 而 β -羟基丁酸 (酮体的主要成分) 的浓度在缺失组中较低 (图 16C)。因为酮体是肝脂肪酸 β -氧化的产物, 所以这些结果与 Nrg4 结合至肝细胞是一致的。这些结果也证明 Nrg4 在调节肝脂质代谢中的作用。

[0208] 接着检测 Nrg4 KN 和 WT 小鼠中的肝脂肪含量。在 HFD 喂养之后发现 Nrg4 缺失小鼠在肝脏中甘油三酯的堆积升高 (图 17A)。在 Nrg4 缺失小鼠的肝脏中脂肪含量增加了大约 60%。组织学评估 (H&E 染色) 显示在 HFD 喂养之后, Nrg4 缺失小鼠比对照组患有更严重的肝脂肪变性, 而褐色和白色脂肪组织的组织学看起来类似 (图 17B)。

[0209] 与对照组相比, 在 KO 组中禁食的血糖和喂养的血浆胰岛素水平升高 (图 18A)。此外, 葡萄糖耐受性测试 (GTT) 和胰岛素耐受性测试 (ITT) 显示 Nrg4 缺失小鼠比对照组小鼠患有更严重的葡萄糖耐受性和胰岛素抵抗 (图 18B 和 18C)。合起来, 这些结果证明 Nrg4 在

维持葡萄糖稳态中,尤其在代谢应激状态如高脂诱导的肥胖症中起到保护作用。

[0210] 这些研究证明 Nrg4 信号传导的丢失使饮食诱导的代谢调节异常(尤其是血糖控制)、脂肪肝的发展和血浆甘油三酯稳态加剧。

[0211] 实施例 9 :Nrg4 抑制肝脏中的脂肪生成基因程序的诱导

[0212] 这个实施例证明 Nrg4 通过减弱肝脏中的脂肪生成基因表达来发出信号。不希望受理论的束缚,认为这种肝脂肪生成的下调可能成为 Nrg4 的有益的代谢效果的基础。

[0213] 材料和方法

[0214] 免疫印迹分析

[0215] 通过将肝脏在裂解缓冲液中均化来制备总肝脏裂解物,裂解缓冲液含有 50mM Tris(pH 7.5)、150mM NaCl、5mM NaF、25mM β -磷酸甘油、1mM 原钒酸钠、10%甘油、1%曲通 X(tritonX)-100、1mM 二硫苏糖醇(DTT)和新添加的蛋白酶抑制剂。也制备了肝细胞核提取物。简单来说,使用杜恩斯(Dounce)均化器将冷冻的肝脏在冰冷的均化缓冲液中均化,均化缓冲液含有 0.6% NP40、150mM NaCl、10mM HEPES(pH = 7.9)、1mM EDTA 和蛋白酶抑制剂混合物。在 4°C 下以 450rpm 短暂地离心均浆以移除组织碎片。将悬浮液转移至新的管中,并且在 4°C 下以 3000rpm 离心 5 分钟。用均化缓冲液洗涤核沉淀物并且重新悬浮于低盐的缓冲液中,该缓冲液含有 20mM Tris(pH = 7.5)、25%甘油、1.5mM MgCl₂、200 μ M EDTA、20mM KCl 和蛋白酶抑制剂。在 4°C 下添加高盐缓冲液(1/2 体积)2 小时之后将细胞核蛋白质提取,高盐缓冲液含有 20mM Tris(pH = 7.5)、1.5mM MgCl₂、200 μ M EDTA、1.2M KCl 和蛋白酶抑制剂。使用抵抗 SREBP1 和 ChREBP(Santa Cruz Biotechnology)、微管蛋白(Sigma)和核纤层蛋白 A/C、磷酸-ErbB4 和总 ErbB4、磷酸-AKT(S473)和总 AKT、磷酸-AMPK(Thr172)和总 AMPK(Cell Signaling)的特异性抗体进行免疫印迹实验。

[0216] 肝细胞分离和处理

[0217] 如通过使用 II 型胶原酶(Invitrogen, Carlsbad, CA)将原代肝细胞从 C57BL/6J 小鼠分离。在 37°C 和 5% CO₂ 下将肝细胞维持在含有 10% BGS 的 DMEM 培养基中。在分离的同一天,进行腺病毒感染。24 小时后,用具有媒介物(DMSO)或 T0901317(5 μ mol/L)的 GST 和 GST-Nrg4Ex(10 μ g/mL)处理细胞 24 小时。为了发出信号,在 GST 和 GST-Nrg4Ex 处理之前将细胞转移到补充有 0.1% BSA 的 DMEM,持续 12 小时。如之前所述,使用 AdEasy 腺病毒载体(Stratagene, Santa Clara, CA)产生重组腺病毒(Li 等, Cell Metabolism 8:105-117, 2008)。

[0218] 结果

[0219] 建立了肝脏是 Nrg4 靶向的主要的代谢组织,进行实验以确定 Nrg4 通过其来调节肝代谢的机制。基因表达分析表明在对照组的肝脏和 KO 的肝脏之间,肝代谢的数种转录的调节子(包括 PGC-1、PGC-1、ChREBP 和 SREBP2)的 mRNA 水平是相似的(图 19A)。相反,在 Nrg4 KO 小鼠的肝脏中, SREBP1c(即脂肪重新生成和甘油三酯合成的关键调节子)的 mRNA 表达被明显诱导。重要的是,在细胞核(nSREBP1)中前体 SREBP1(pSREBP1)和 SREBP1 的裂解的和转录的活性同种型的蛋白质水平也升高(图 19B)。在 WT 和 KO 的肝脏之间,磷酸-AMPK 和磷酸-AKT(S473)(即 mTOR 复合物 2 的底物)的水平是相似的。

[0220] 定量 PCR 分析表明数种已知的参与脂肪生成的 SREBP1 靶标基因的 mRNA 表达(包括葡萄糖激酶(Gck)、酰基-辅酶 A 羧化酶 1(Acc1)、胞质苹果酸酶(Me1)、脂肪酸合酶

(Fasn)、硬脂酰-辅酶 A 去饱和酶 1 (Scd1) 和甘油激酶 (Gyk)) 在 Nrg4 缺失小鼠的肝脏中比在对照组小鼠的肝脏中明显更高 (图 19A)。Fsp27 即与肝脂肪变性相关的脂滴蛋白的表达也提高了。相反,在两组之间参与脂肪酸 β 氧化、糖异生和线粒体氧化代谢的基因的表达是可比较的。

[0221] 不希望受理论的束缚,在 Nrg4 缺失小鼠的肝脏中的脂肪生成的异常激活可能起因于 Nrg4 信号传导对脂肪生成的基因程序的直接影响。或者,可能肥胖增加,即使适度的,可促成 Nrg4 缺失小鼠中的肝脂质代谢的破坏。为了区别这两种可能,研究了在原代肝细胞中 Nrg4 对脂肪生成的基因表达的影响。在含有 SEAP 或 SEAP-Nrg4N62 的 CM 存在下,用媒介物 (DMSO) 或 T0901317 (一种用于肝 X 受体的有效刺激 Srebp1c 和脂肪生成的基因表达的激动剂) 处理培养的肝细胞。虽然 Srebp1c、Fasn 和 Scd1 的基础表达是可比较的,但响应于 LXR 激活的它们的诱导通过 SEAP-Nrg4N62 明显减弱 (图 20)。

[0222] 实施例 10:脂肪组织中 Nrg4 的转基因表达改善饮食诱导的代谢调节异常

[0223] 这个实施例证明升高 Nrg4 水平为血糖调节提供了有益的效果,并减小脂肪肝病的严重性。

[0224] 如上所述,在饮食诱导的和遗传型的肥胖症小鼠中脂肪细胞的 Nrg4 表达显著减少。因此,脂肪组织中 Nrg4 的转基因过表达可使由肥胖症诱导的代谢稳态正常化或救助由肥胖症诱导的代谢稳态的恶化。此外,重组 Nrg4 蛋白的施用可提供在治疗高血糖症、非酒精性脂肪肝病和高血脂症中的治疗益处。为了测试这些可能性,在 aP2 启动子 / 增强子的控制下产生具有脂肪特异性 Nrg4 的转基因小鼠,aP2 启动子 / 增强子已被广泛用来指导脂肪细胞中的基因的转基因表达。在褐色和白色脂肪组织中,产生具有各种水平的 Nrg4 转基因表达的五个独立的转基因始创者。选择一种特定的系 (内部指定为 #111) 用于进一步研究,因为脂肪组织中的 Nrg4 转基因以稍高于瘦的小鼠中的 Nrg4 表达的水平被特异性表达。关于出生后生长、体态和一般的行为特征,AP2-Nrg4 转基因小鼠与非转基因同窝出生仔畜没有区别。

[0225] 为了确定 Nrg4 的转基因表达是否使小鼠免受饮食诱导的代谢紊乱,用 HFD 喂养对照小鼠和转基因小鼠。在 11 周的 HFD 喂养之后,转基因组获得比对照组稍微轻的体重 (图 21A)。体重组成分分析显示脂肪质量百分比在转基因组中降低,而瘦肉质量百分比仍基本上相似 (图 21B)。接着使用综合实验室动物监测系统 (CLAMS) 检测整个身体能量代谢。虽然对照组和转基因小鼠具有类似的食物摄入量,但转基因小鼠显示出明显升高的被标准化为体重或瘦体重的氧气消耗速率 (V_{O2}) (图 21C)。转基因小鼠也看起来增加了运动活动量,该运动活动量通过红外珠破坏 (infrared bead-breaking) 装置监测。在整夜饥饿之后,转基因小鼠具有较低的血浆 TAG 浓度和较高的酮水平 (图 22A),表明了可通过 Nrg4 的转基因表达增强肝脂肪酸氧化和酮生成。在转基因组中总胆固醇水平也降低。

[0226] 与 Nrg4 缺陷相比,在喂养和禁食条件下 Nrg4 转基因小鼠比对照组具有更低的血糖水平 (图 22B)。在转基因组中禁食的血浆胰岛素水平也降低。在腹膜内激发葡萄糖 (2mg/kg) 之后,葡萄糖耐受性测试表明 Nrg4 转基因小鼠提高了葡萄糖耐受性 (图 23A)。与提高的葡萄糖代谢一致,在胰岛素耐受性测试中,转基因小鼠对胰岛素更具有响应性 (图 23B)。组织学分析表明转基因小鼠患有较不严重的肝脂肪变性 (图 24A),而在两组中脂肪组织的组织学是相似的。一致地,在转基因组中肝甘油三酯含量降低 (图 24B)。

[0227] 接着进行基因表达研究以调查对 Nrg4 的转基因升高做出响应的下游的代谢途径。在转基因小鼠的肝脏中, SREBP1c mRNA 和蛋白质的水平明显降低(图 24C 和 24D)。肝脂肪生成基因(包括 Gck、Ac1、Acc1、Me1、Fasn 和 Scd1)的表达水平相应地被减弱以响应于 Nrg4 在脂肪组织中的转基因表达。Fsp27mRNA 表达也显著减少。合起来, 这些研究为升高 Nrg4 水平对血糖和脂质水平产生希望结果提供了基因证据并且为 Nrg4 过表达可有益于非酒精性脂肪肝病的治疗提供了证据。

[0228] 实施例 11: 重组 Nrg4 片段

[0229] 为了评估外源性施用的 Nrg4 对治疗 2 型糖尿病和非酒精性脂肪肝病的治疗潜能, 使用细菌宿主产生表达重组 Nrg4 蛋白(GST-Nrg4)的载体。进行原理验证研究以评估重组 Nrg4 蛋白的潜在治疗效果。GST-Nrg4 融合蛋白和 GST 被表达并且从含有相关的表达载体的细菌纯化。连续 5 天每天给饮食诱导的肥胖小鼠腹腔内施用两剂量的 GST 或 GST-Nrg4。在最后注射之后的两小时收获血浆和组织样品以用于代谢检测和基因表达分析。用 GST-Nrg4 处理的小鼠中的血浆葡萄糖和胰岛素浓度比对照组中的更低(图 25)。不希望受理论束缚, 这些结果表明 GST-Nrg4 降低血糖的能力是通过不同于作为胰岛素促分泌素的机制来介导的。参与脂肪重新生成的酶(包括苹果酸酶 1(ME1) 和硬脂酰-辅酶 A 去饱和酶 1(SCD1))的表达通过 GST-Nrg4 明显减少。

[0230] 根据发现或提出的具体的实施方案对本公开进行了描述, 以包括用于文中所描述的本发明的方法和组合物的实践的具体模式。在不背离本发明的范围和精神下, 所描述的发明的各种修改和变化对于本领域技术人员来说是显而易见的。虽然本公开提供具体的实施方案, 但应理解所要求保护的本发明不应过分地限制于此类具体的实施方案。事实上, 对于相关领域技术人员来说显而易见的用于进行本发明的所描述模式的各种修改意图在以下权利要求的范围内。

[0231] 参考文献:

[0232] Cohen, J. C., Horton, J. D. & Hobbs, H. H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 332, 1519-1523 (2011).

[0233] James, O. & Day, C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 353, 1634-1636 (1999).

[0234] Jornayvaz, F. R., Samuel, V. T. & Shulman, G. I. The role of muscle insulin resistance in the pathogenesis of atherogenic dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease associated with the metabolic syndrome. *Annu Rev Nutr* 30, 273-290 (2010).

[0235] Szczepaniak, L. S., et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E462-468 (2005).

[0236] Browning, J. D., et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 40, 1387-1395 (2004).

[0237] Loomba, R., Sirlin, C. B., Schwimmer, J. B. & Lavine, J. E. Advances in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 50, 1282-1293 (2009).

- [0238] Chitturi, S., et al. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 35, 373–379 (2002).
- [0239] Schneider, M. R. & Wolf, E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *Journal of cellular physiology* 218, 460–466 (2009).
- [0240] Burgess, A. W. EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets. *Growth factors* 26, 263–274 (2008).
- [0241] Falls, D. L. Neuregulins and the neuromuscular system: 10 years of answers and questions. *Journal of neurocytology* 32, 619–647 (2003).
- [0242] Reiss, K. & Saftig, P. The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Seminars in cell & developmental biology* 20, 126–137 (2009).
- [0243] Blobel, C. P., Carpenter, G. & Freeman, M. The role of protease activity in ErbB biology. *Experimental cell research* 315, 671–682 (2009).
- [0244] Tang, C. S., et al. Genome-wide copy number analysis uncovers a new HSCR gene: NRG3. *PLoS genetics* 8, e1002687 (2012).
- [0245] Stefansson, H., et al. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *American journal of human genetics* 71, 877–892 (2002).
- [0246] Hayes, N. V., Newsam, R. J., Baines, A. J. & Gullick, W. J. Characterization of the cell membrane-associated products of the Neuregulin 4 gene. *Oncogene* 27, 715–720 (2008).
- [0247] Harari, D., et al. Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 18, 2681–2689 (1999).
- [0248] Falls, D. L. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Experimental cell research* 284, 14–30 (2003).
- [0249] Dunn, M., et al. Co-expression of neuregulins 1, 2, 3 and 4 in human breast cancer. *The Journal of pathology* 203, 672–680 (2004).
- [0250] Hayes, N. V., et al. Identification and characterization of novel spliced variants of neuregulin 4 in prostate cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 3147–3155 (2007).
- [0251] Ebi, M., et al. The role of neuregulin4 and HER4 in gastrointestinal malignant lymphoma. *Molecular medicine reports* 4, 1151–1155 (2011).
- [0252] Muller, H., Dai, G. & Soares, M. J. Placental lactogen-I (PL-1) target tissues identified with an alkaline phosphatase-PL-I fusion protein. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 46, 737–743 (1998).
- [0253] Lin, J. & Linzer, D. I. Induction of megakaryocyte differentiation by a novel pregnancy-specific hormone. *The Journal of biological chemistry*

ry274, 21485-21489 (1999).

[0001]

序列表

<110> 密歇根大学董事会

<120> 治疗代谢紊乱的方法

<130> SCT155497-30

<140> 61/804,046

<141> 2013-03-21

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Pro	Thr	Asp	His	Glu	Glu	Pro	Cys	Gly	Pro	Ser	His	Lys	Ser	Phe
1				5					10					15	

Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Leu	Cys	Tyr	Val	Ile	Pro	Thr	Ile	Pro	Ser	Pro
			20					25						30	

Phe	Cys	Arg	Cys	Val	Glu	Asn	Tyr	Thr	Gly	Ala	Arg	Cys	Glu	Glu	Val
		35					40					45			

Phe	Leu	Pro	Gly	Ser	Ser	Ile	Gln	Thr	Lys	Ser	Asn	Leu	Phe	Glu	Ala
		50					55					60			

Phe	Val	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Val	Thr	Leu	Ile	Ile	Gly	Ala	Phe	Tyr
65					70					75				80	

Phe	Leu	Cys	Arg	Lys	Gly	His	Phe	Gln	Arg	Ala	Ser	Ser	Val	Gln	Tyr
				85					90					95	

[0002]

Asp Ile Asn Leu Val Glu Thr Ser Ser Thr Ser Ala His His Ser His
100 105 110

Glu Gln His
115

<210> 2
<211> 115
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2

Met Pro Thr Asp His Glu Gln Pro Cys Gly Pro Arg His Arg Ser Phe
1 5 10 15

Cys Leu Asn Gly Gly Ile Cys Tyr Val Ile Pro Thr Ile Pro Ser Pro
20 25 30

Phe Cys Arg Cys Ile Glu Asn Tyr Thr Gly Ala Arg Cys Glu Glu Val
35 40 45

Phe Leu Pro Ser Ser Ser Ile Pro Ser Glu Ser Asn Leu Ser Ala Ala
50 55 60

Phe Val Val Leu Ala Val Leu Leu Thr Leu Thr Ile Ala Ala Leu Cys
65 70 75 80

Phe Leu Cys Arg Lys Gly His Leu Gln Arg Ala Ser Ser Val Gln Cys
85 90 95

Glu Ile Ser Leu Val Glu Thr Asn Asn Thr Arg Thr Arg His Ser His
100 105 110

[0003]

Arg Glu His

115

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer

<400> 3

cccagcccac tctgtaggtg

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer

<400> 4

accacgaaag ctgccgacag

20

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5' 6-FAM

<220>

[0004]

<221> misc_feature

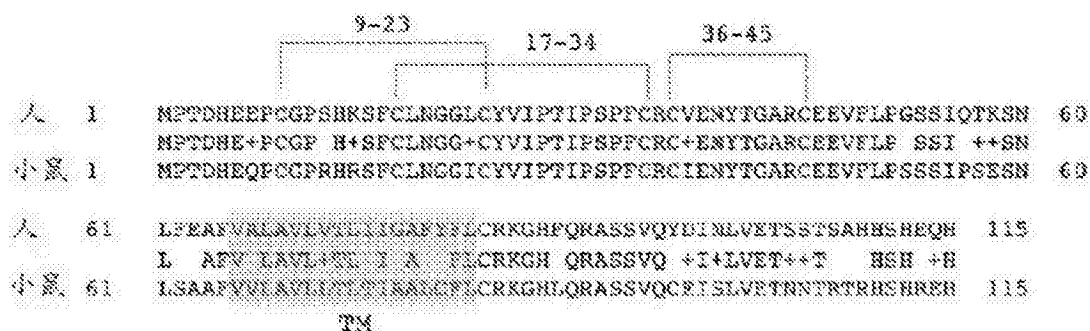
<222> (22)..(22)

<223> 3' BHQ

<400> 5

eggagcacgc tgcgaagagg tt

22



NYT:预测的N-连接糖基化位点

C-C:预测的二硫键

图 1

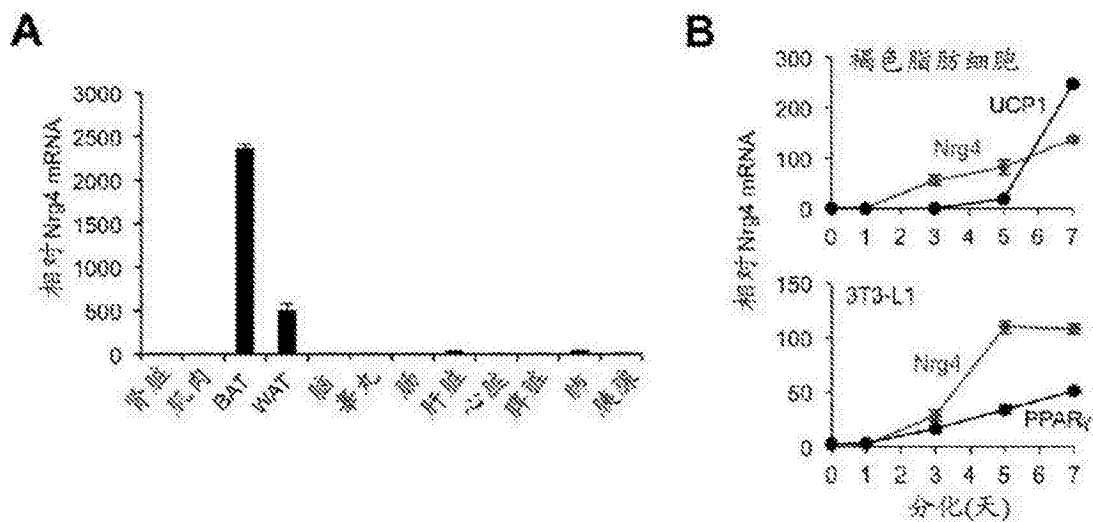


图 2

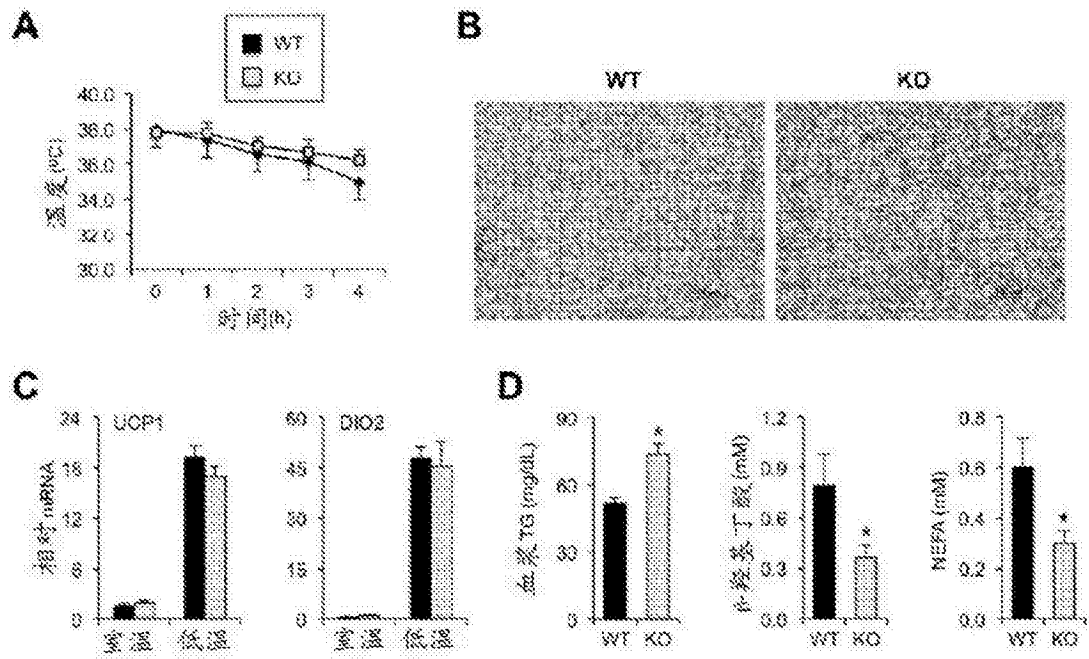


图 3

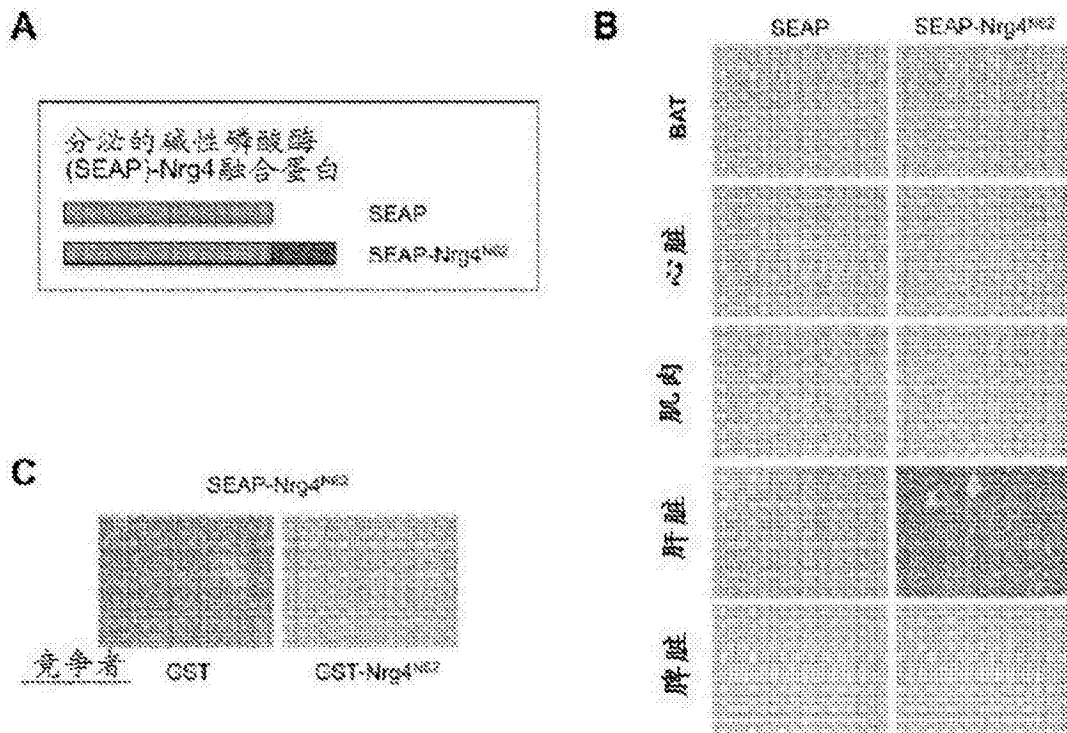


图 4

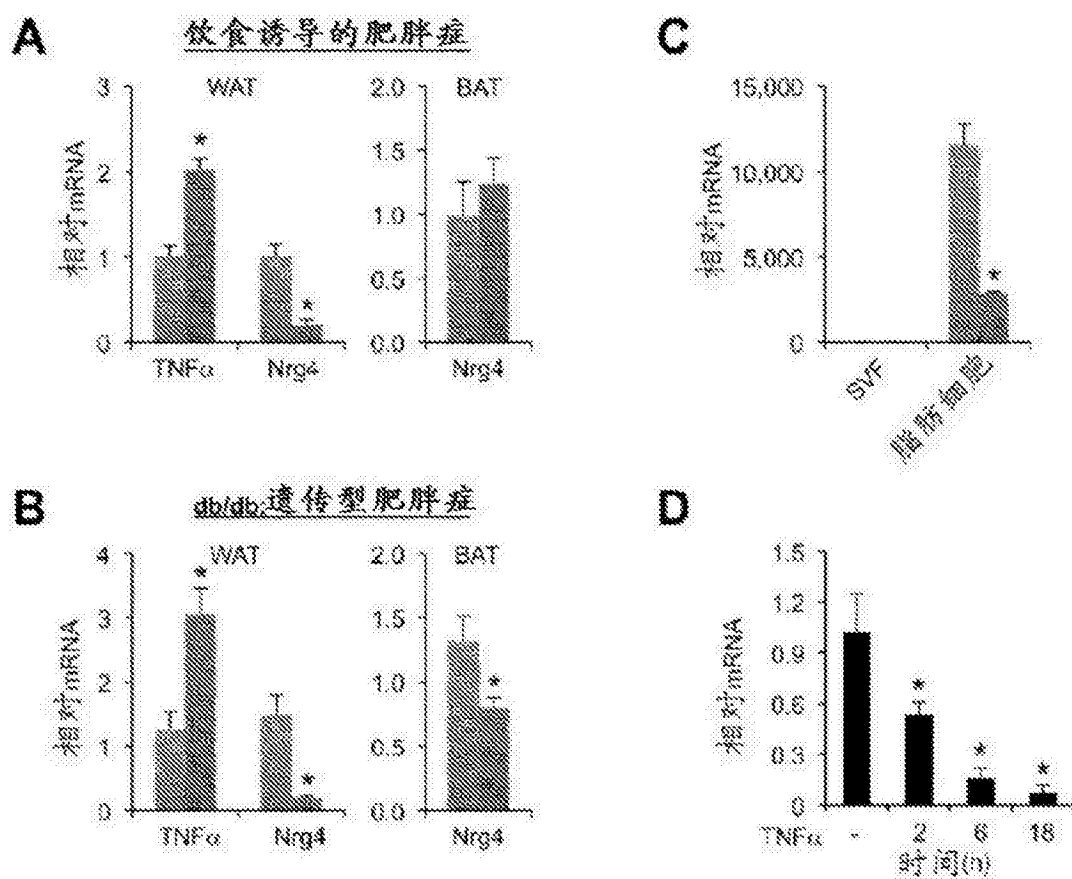


图 5

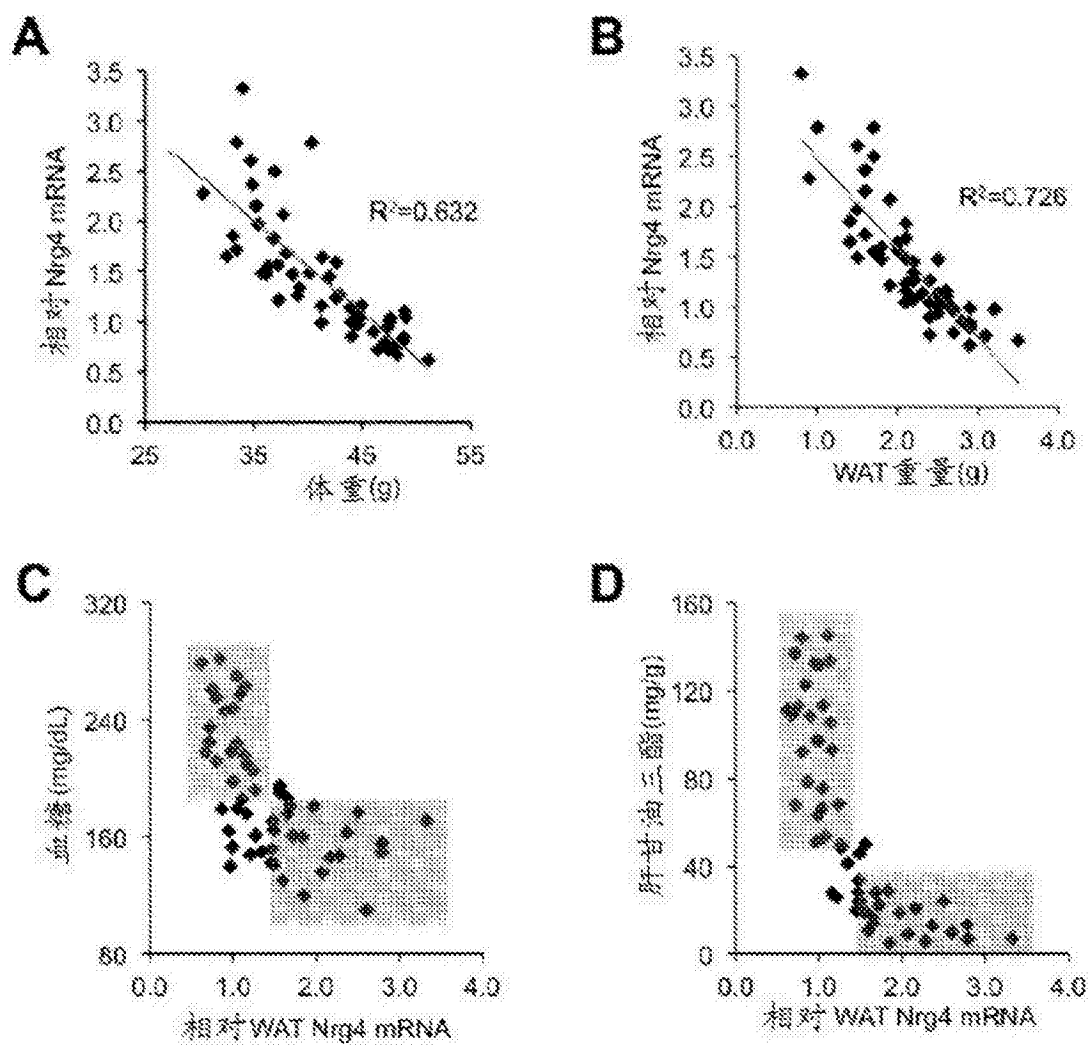


图 6

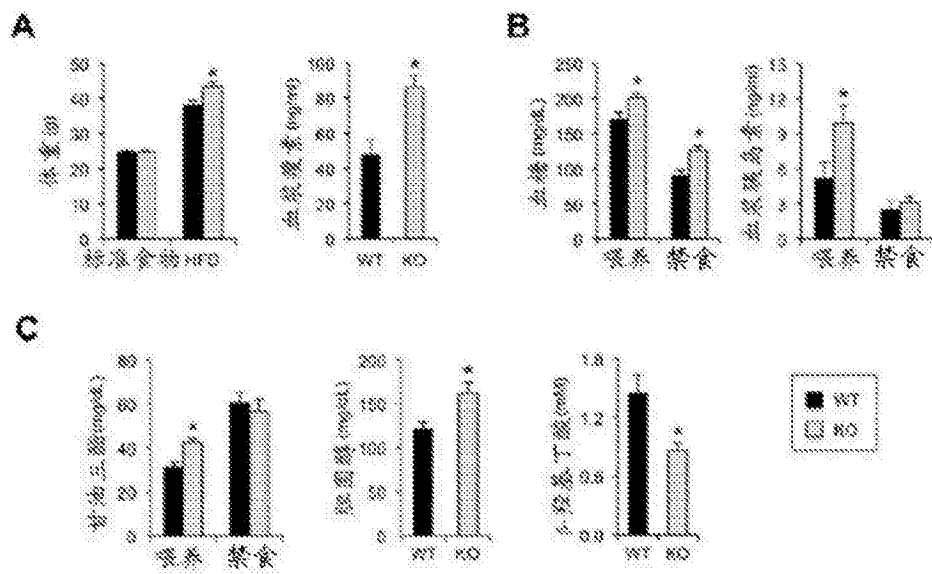


图 7

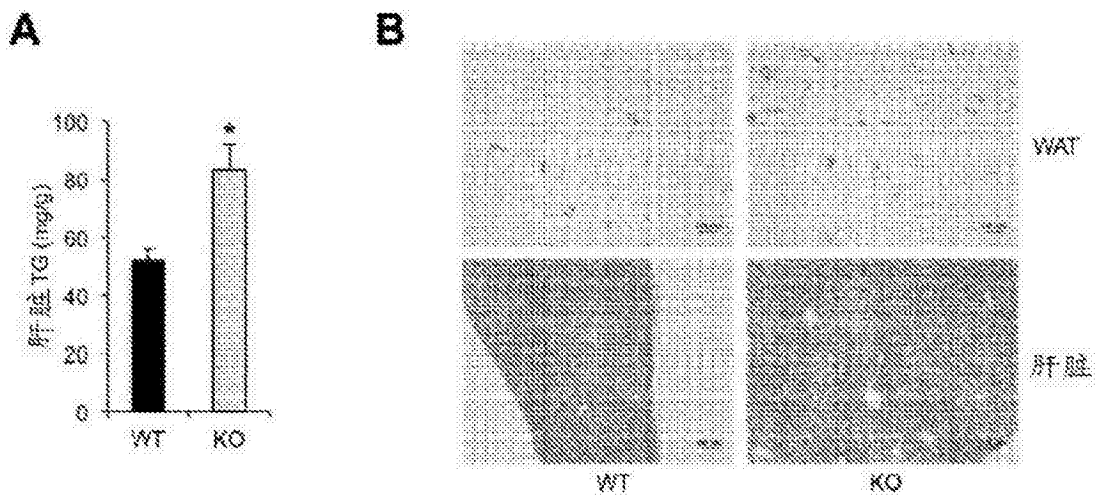


图 8

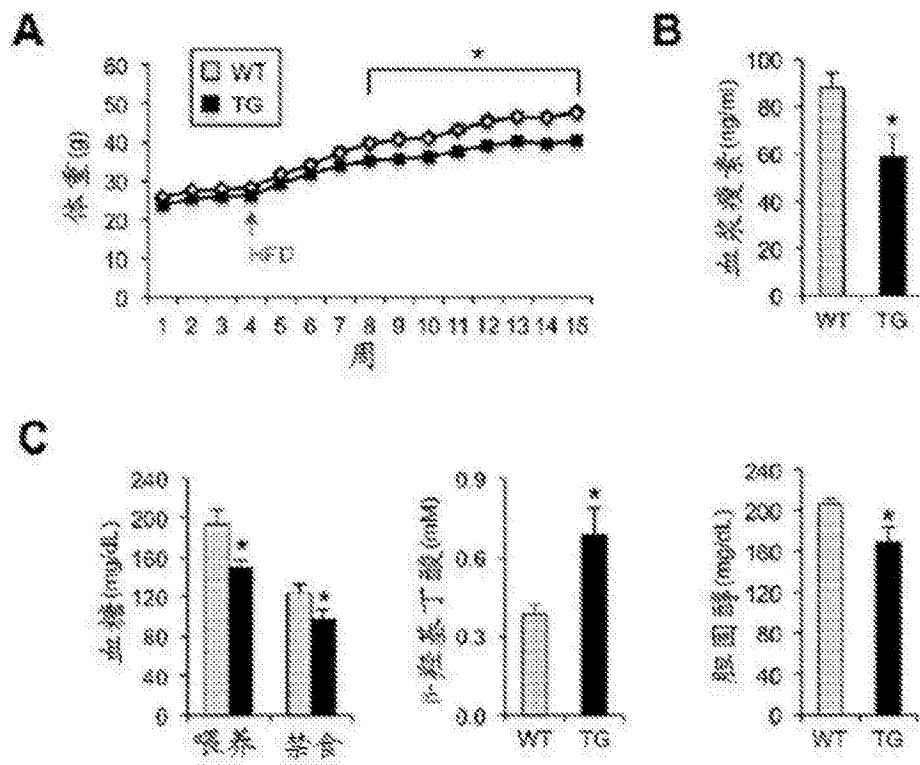


图 9

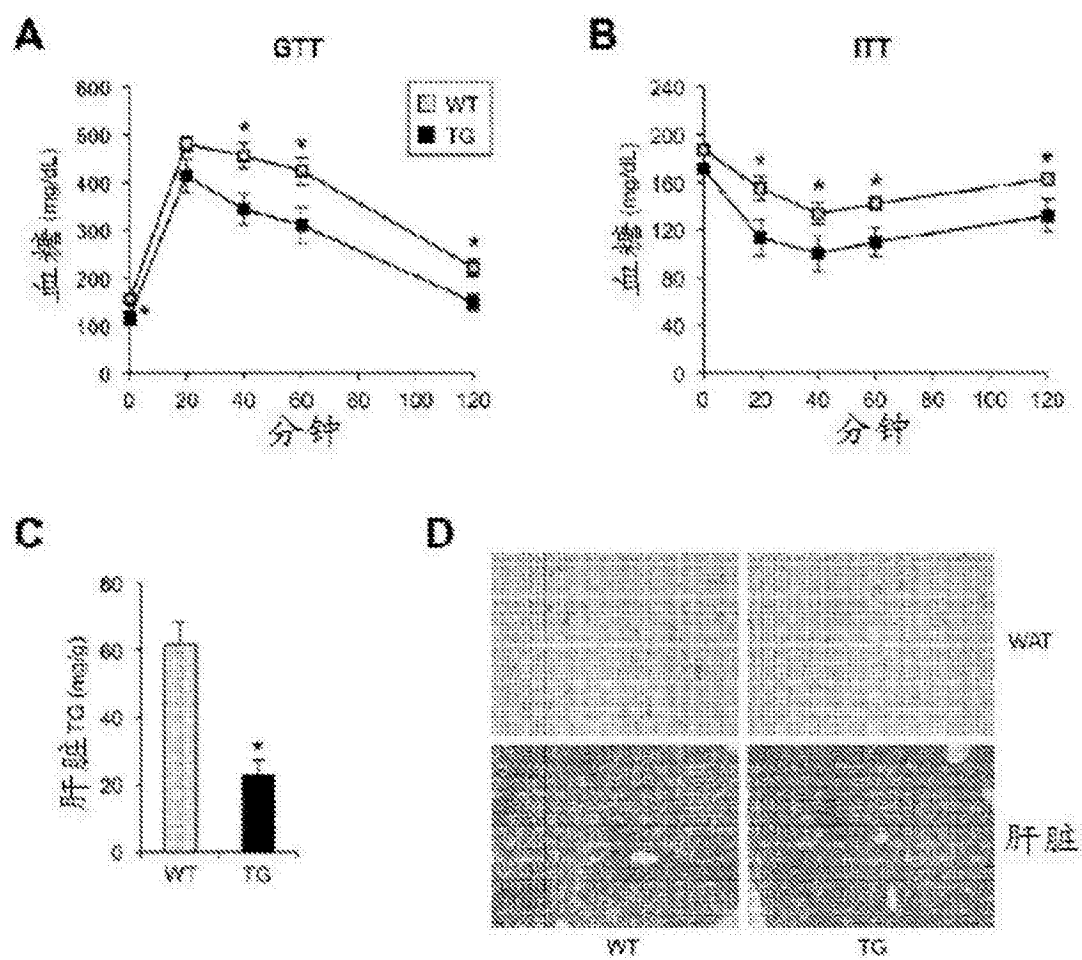


图 10

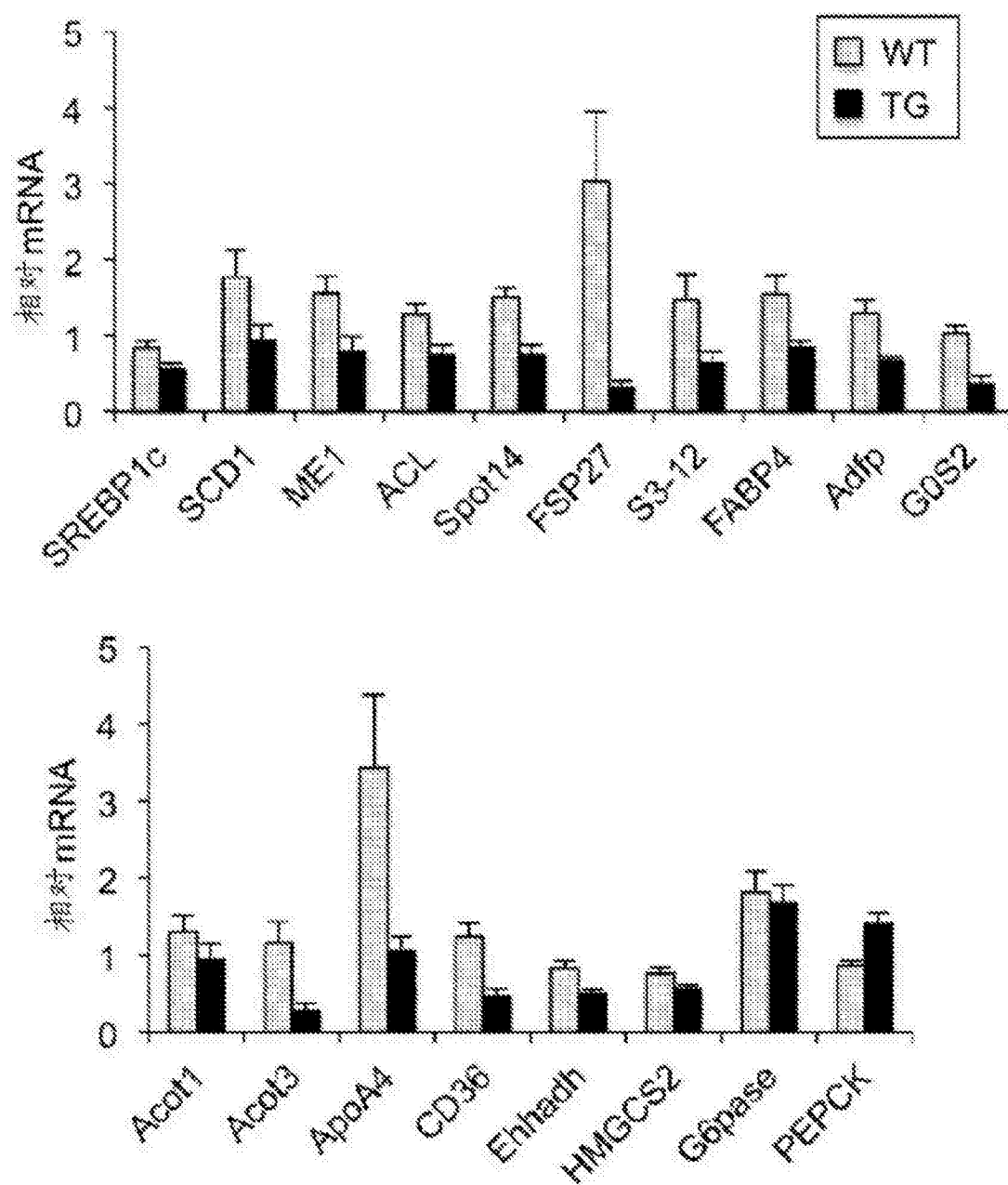


图 11

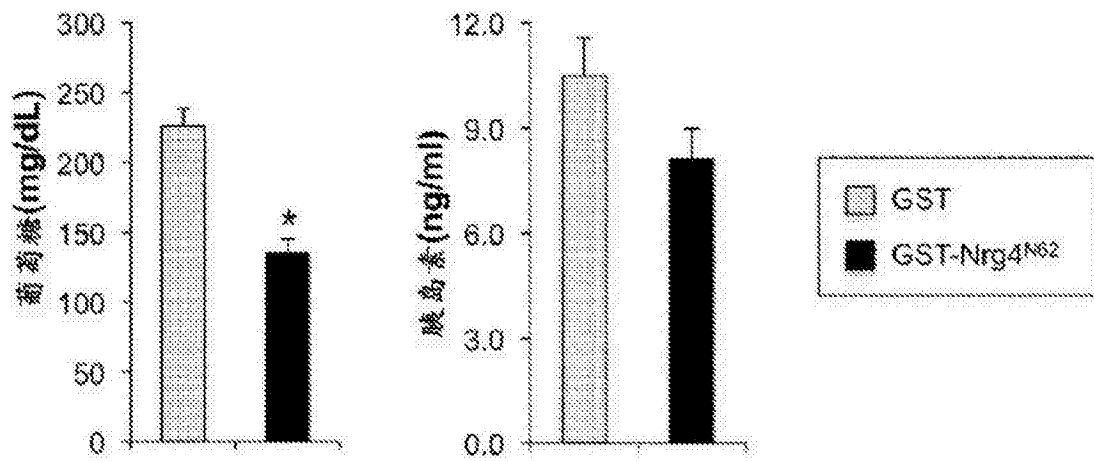


图 12

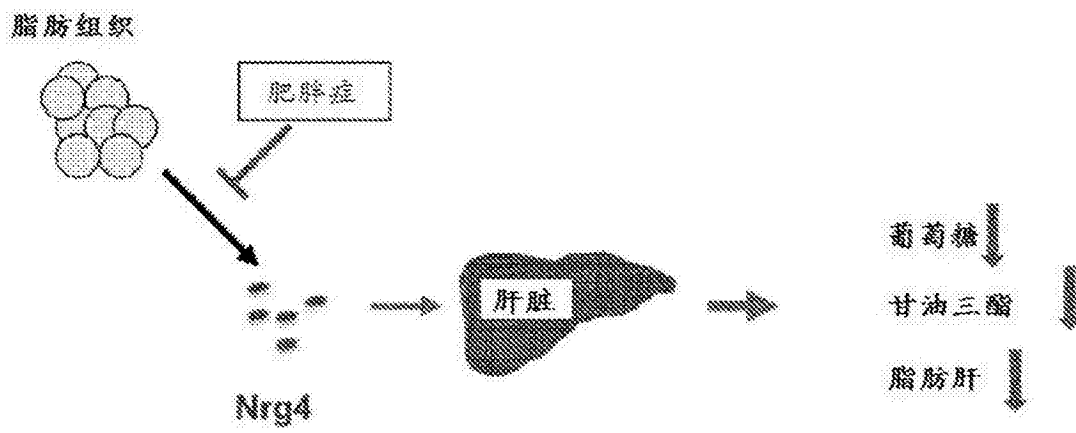


图 13

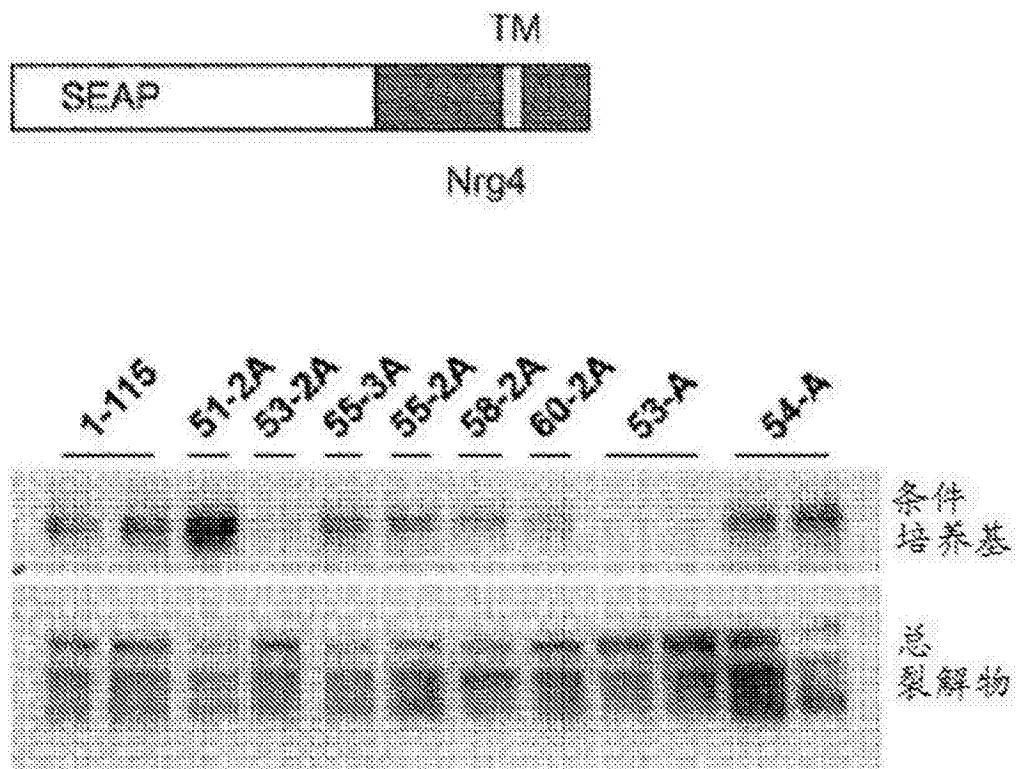


图 14

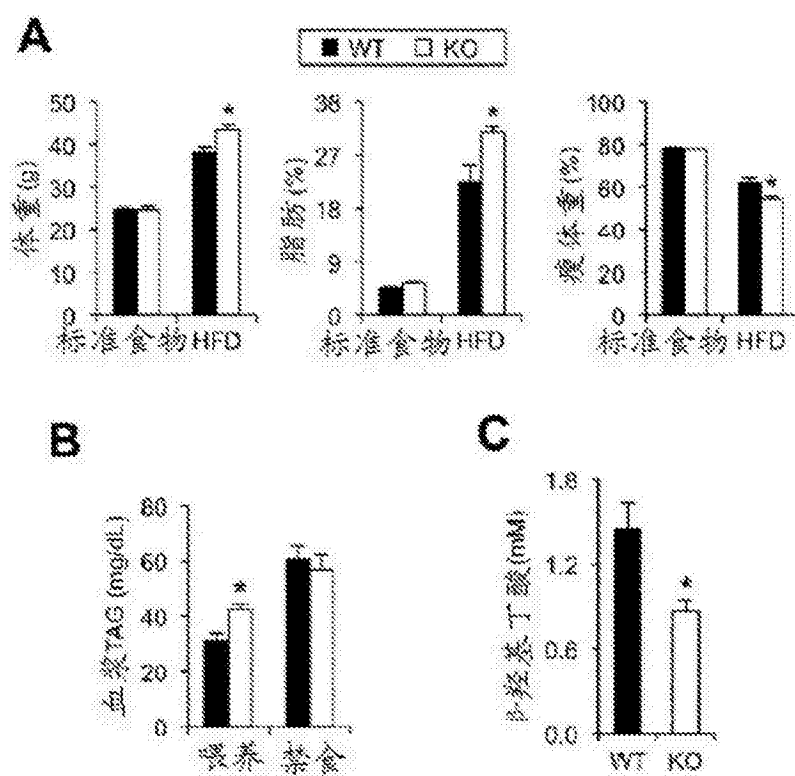


图 16

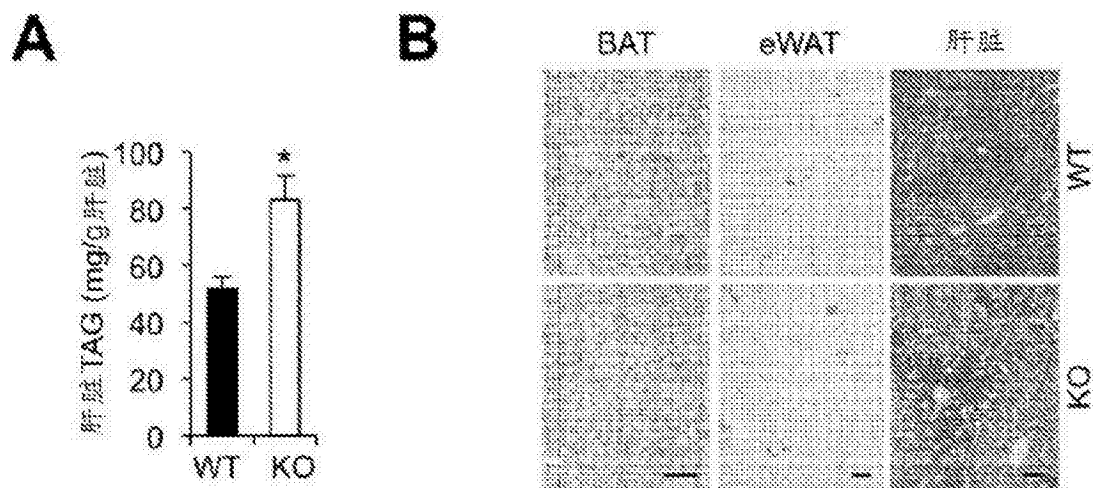


图 17

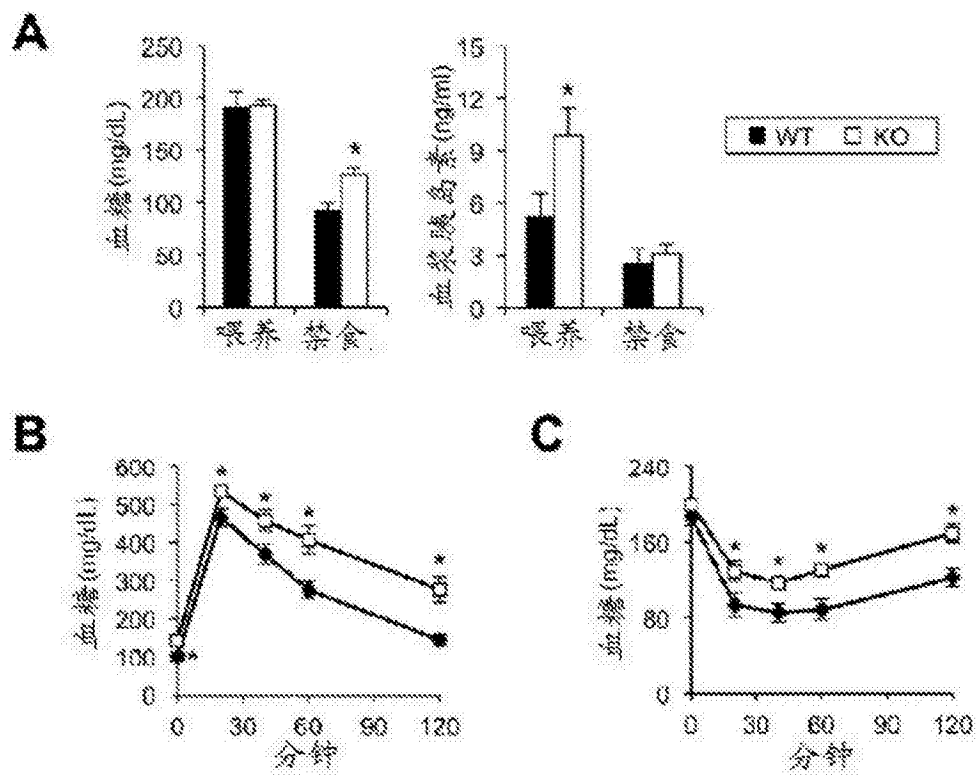


图 18

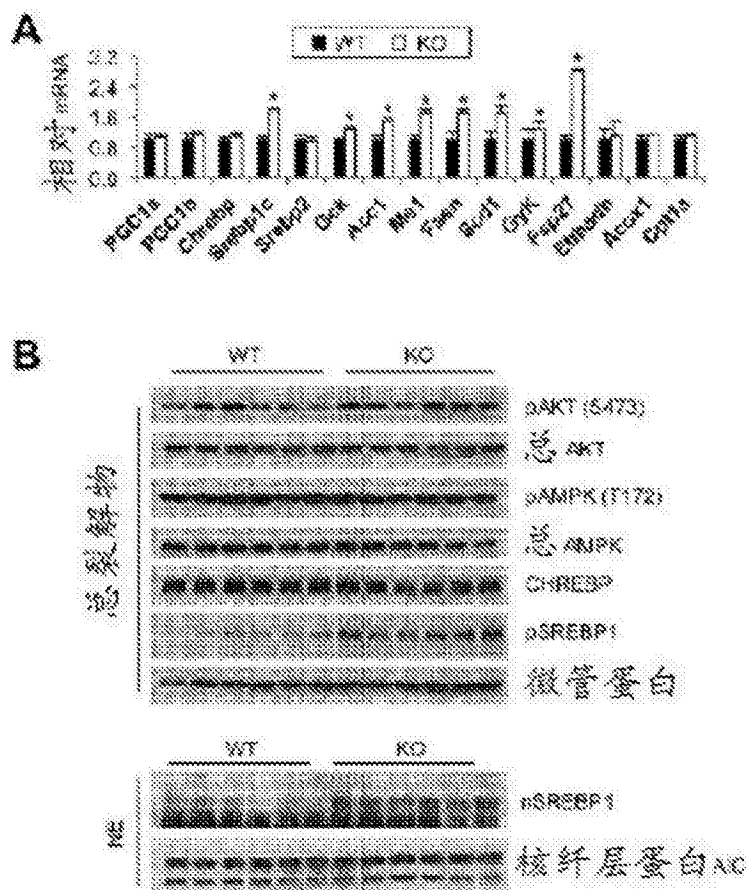


图 19

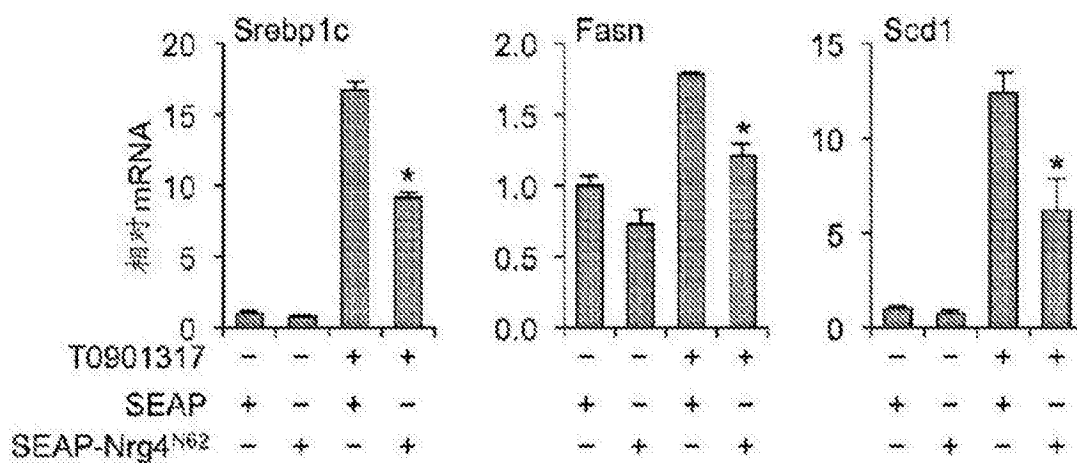


图 20

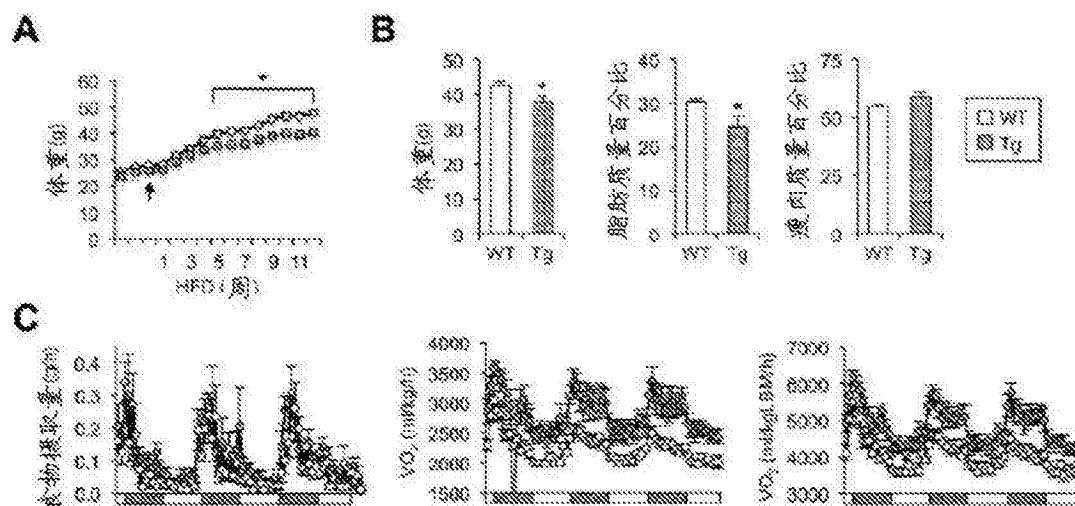


图 21

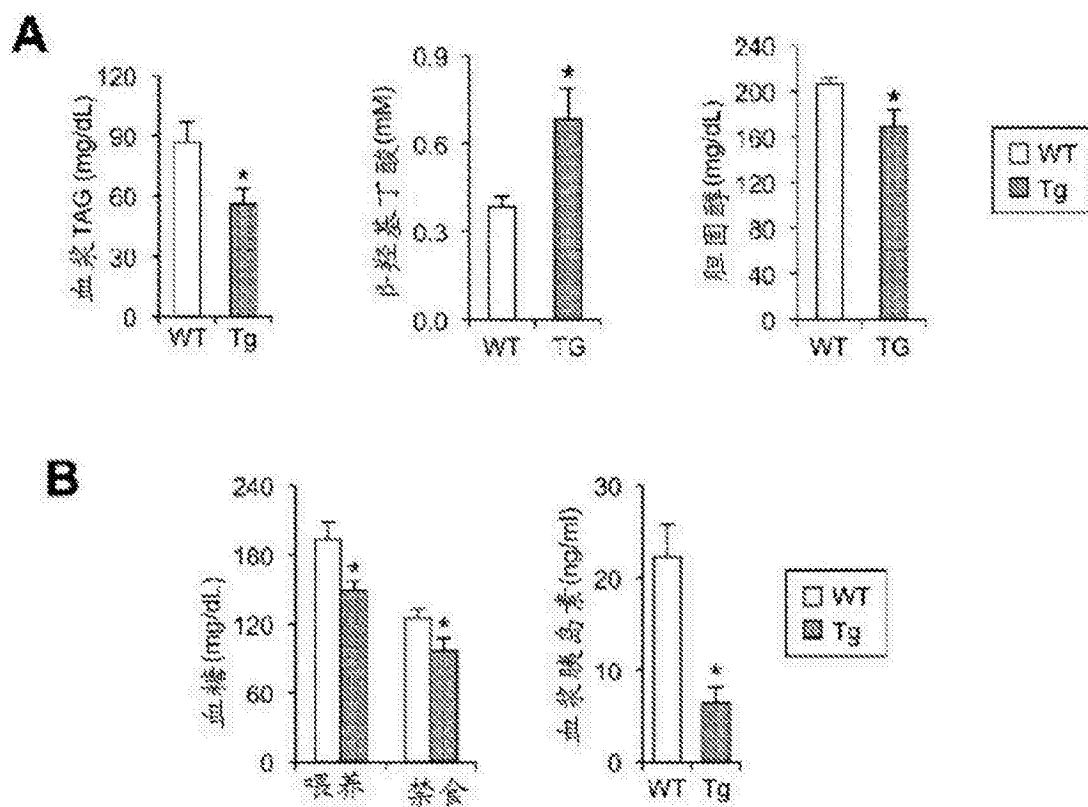


图 22

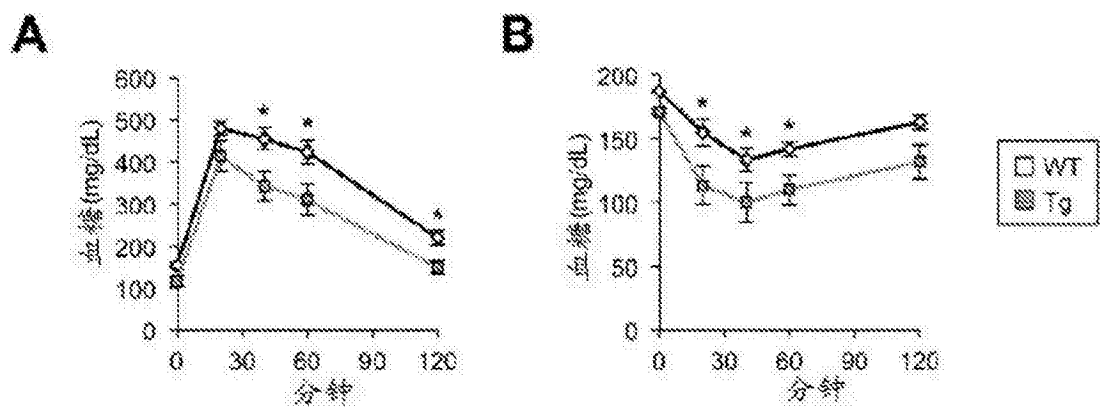


图 23

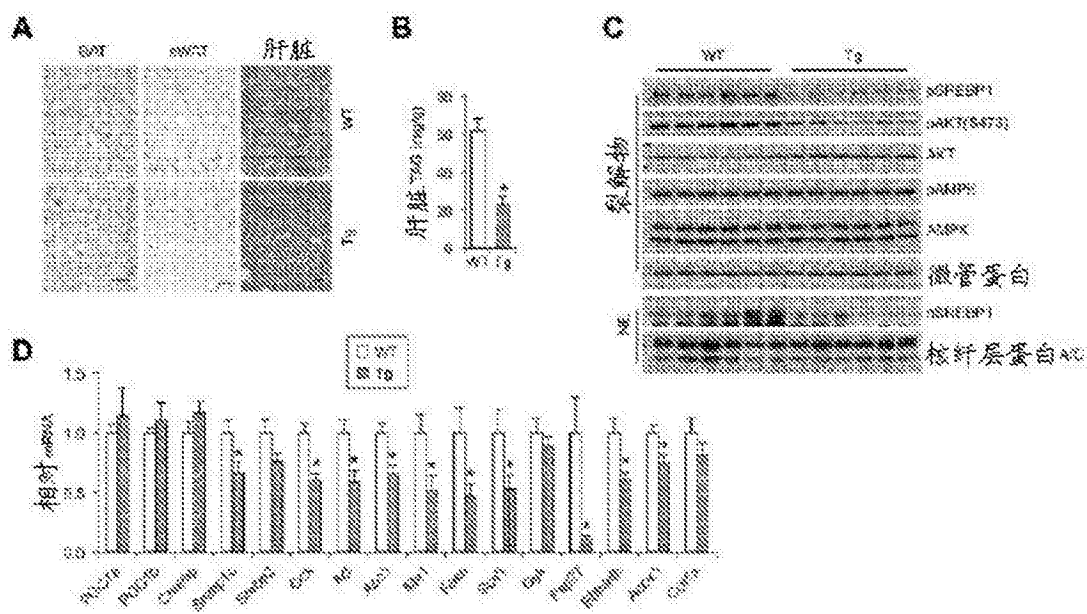


图 24

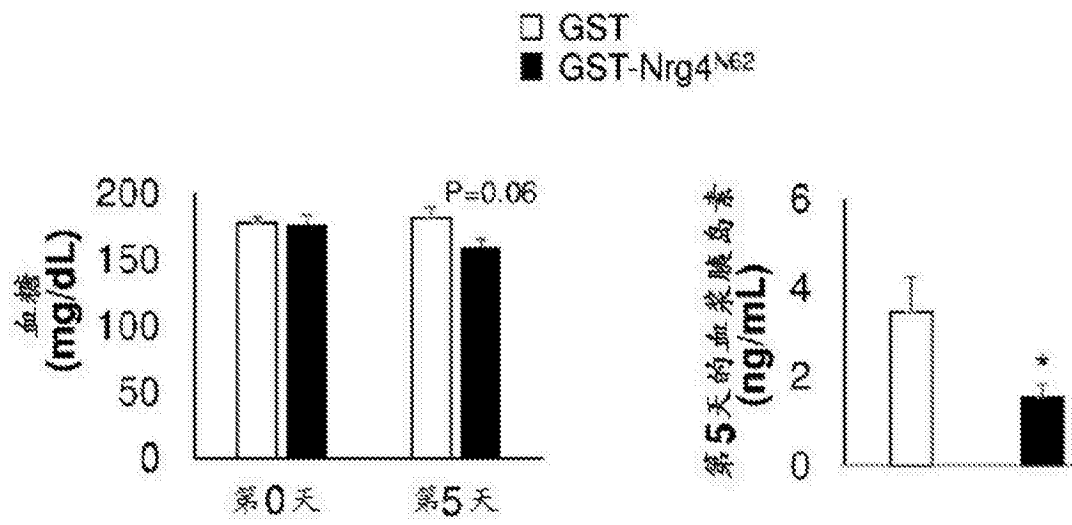


图 25